

토마토 뿌리조직 H⁺-ATPase 활성에 미치는 Thapsigargin의 저해효과

조광현 · 김영기*

충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

Inhibitory Effect of Thapsigargin on the Activities of H⁺-ATPases in Tomato Roots

Kwang-Hyun Cho and Young-Kee Kim*

Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Received August 2, 2005; Accepted August 24, 2005

Thapsigargin is a specific antagonist of SR/ER-type Ca²⁺-ATPase in animal tissue, and it was used to characterize the microsomal ATPases prepared from the roots of tomato. When 10 μM thapsigargin was added, it inhibited the microsomal ATPase activity by 30%. The thapsigargin-induced inhibition was dose-dependent. Since the activity of Ca²⁺-ATPase is very low in the roots of tomato tissue, it is possible that thapsigargin inhibits the activities of major H⁺-ATPases located in plasma and vacuolar membranes. The inhibitory effect of thapsigargin was reduced when the vacuolar H⁺-ATPase activity was inhibited by NO₃⁻. However, the effect of thapsigargin was not observed on the H⁺-ATPase activity located in the plasma membrane. These results suggest that thapsigargin inhibits the vacuolar H⁺-ATPase activity in the roots of tomato.

Key words: H⁺-ATPase, Nitrate, Thapsigargin, Tomato roots, Vanadate.

서 론

식물체에서 H⁺-ATPase 또는 proton 펌프는 세포의 분화, 양분의 흡수 및 저장, 팽압의 조절, 세포내 pH 조절, 기공의 개폐 등 다양한 생리현상에 주된 역할을 수행함으로써 식물의 생육 조절에 중심적 역할을 한다.¹⁻³⁾ 식물세포에는 원형질막 뿐만 아니라 액포막을 포함한 세포내 소기관 막에 여러 종류의 H⁺-ATPase가 존재하며, 이들중 원형질막 및 액포막의 H⁺-ATPase가 주된 효소이다. 원형질막의 H⁺-ATPase는 E₁E₂ 모델을 따르는 P-형 ATPase로서, 효소반응 단계에 따라 인산화 또는 탈인산화 과정을 거치는 효소이다. 원형질막 H⁺-ATPase의 활성은 vanadate에 의해 선택적으로 저해되나, NO₃⁻ 및 oligomycin, azide, molybdate 등에 의하여 저해되지 않는 특성이 보고되었다.¹⁾ 액포막의 H⁺-ATPase는 V-형 ATPase로서 vanadate에 의하여 저해되지 않고, NO₃⁻에 의하여 선택적으로 저해됨이 알려졌다.²⁾

식물의 생리활성 변화를 이해하기 위하여 저해제를 이용한 H⁺-ATPase의 활성연구가 광범위하게 이루어져 왔다. Thapsigargin은 미나리과 식물인 *Thapsia garganica*로부터 추출된 sesquiterpene

lactone 계통의 화합물로 동물조직의 SERCA(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase family)를 선택적으로 저해하는 특이성이 높은 약물이다.⁴⁾ 식물조직에서는 thapsigargin의 작용기작이 자세히 밝혀지지 않았으나, Ca²⁺ 뿐만 아니라 수소이온의 수송에 영향을 미침이 보고되었다.⁵⁾ 최근 골지체에서 thapsigargin에 의해 저해되는 Ca²⁺-ATPase가 처음 발견되어 특성이 알려졌으며, 완두에서 확인된 Ca²⁺-ATPase는 동물조직에서와 마찬가지로 thapsigargin은 물론 vanadate와 cyclopiazonic acid에 의해서도 저해됨이 확인되었다.⁶⁾

식물세포에서 현재까지 알려진 thapsigargin 효과는, Ca²⁺-ATPase 활성을 선택적으로 저해하지 않으나,⁷⁾ 고농도의 thapsigargin 첨가는 ATPase의 활성을 비선택적으로 저해함이 보고되었다.⁹⁾ 본 연구에서는 이온펌프 효소들의 특성구명을 위하여 막수송 효소에 대한 여러 가지 저해제들의 효과를 검증하던 중, thapsigargin에 의한 ATPase의 저해효과를 관측하였고, 그 저해 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

재료. 토마토의 종자는 홍농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer)를 사용하였다. 종자의 발아와 재배, 양액의 제조는 Cho 등⁸⁾의 방법을 따랐다. 본 연구에 사용한 토

*Corresponding author

Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

마토 뿌리조직은 생장조절기 내부의 온도를 28-32°C로 유지하며 약 4주간 재배하여 취하였다.

양액의 제조에는 모두 1급 이상의 시약을 사용하였고, 완충액용 sucrose는 Fluka Biochemical사(Switzerland)의 제품을 사용하였으며, 모든 시약과 효소들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

마이크로솜의 분리. 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜 분리는 Cho 등⁸⁾의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 이루어졌다. 분리한 마이크로솜은 액체질소로 순간냉동시켜 초저온냉동고에서 -70°C로 사용 시까지 보관하였으며, 3개월 이내에 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질 농도는 Lowry방법⁹⁾으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase 활성측정. 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 활성은 Niggli 등¹⁰⁾의 enzyme-coupled assay를 변형한 Cho 등⁸⁾의 방법으로 측정하였다. ATPase 활성 측정시에 오염된 미토콘드리아의 ATPase 활성은 거의 관측되지 않았으나, 필요시 10 mM KCN을 사용하여 저해하였다.

Ca²⁺ 농도별 용액의 제조. Ca²⁺ 농도 의존성 ATPase의 활성은 반응완충액에서의 유리상태 Ca²⁺ 농도를 조절한 후 측정하였다. 반응완충액의 Ca²⁺ 농도조절에 필요한 EGTA의 농도는 Fabiato의 stability constant¹¹⁾들을 이용한 컴퓨터 프로그램으로 계산하였고, 해당 량의 EGTA를 첨가하여 반응 완충액의 Ca²⁺ 농도를 조절하였다.

결 과

Thapsigargin에 의한 ATPase 활성 저해. 토마토의 뿌리조직을 균질하여 초고속원심분리 방법으로 얻은 마이크로솜 ATPase의 총활성은 $1,112 \pm 26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었다. 총활성은 원형질막에 위치하는 H⁺-ATPase의 선택적 저해제인 vanadate와 액포막 H⁺-ATPase의 선택적 저해제인 NO₃⁻에 의하여 각각 26, 36% 저해되었으며,^{12,13)} 이들 두 가지 저해제들을 동시에 사용하였을 때, 효과는 누적되는 것으로 관측되었다.⁸⁾ 총활성은 두 가지 저해제들을 처리한 후에도 약 30%가 잔류하였으며, 잔류활성의 특성은 밝혀지지 않았다. 마이크로솜 ATPase의 총활성은 분리한 마이크로솜의 상태에 따라 약간의 변화를 보였으나, 대조실험의 총활성에 대한 저해제의 저해효과는 비교적 일정한 비율로 얻어졌다. 그러므로, 본 연구에서는 대조실험에 대한 각 저해제의 효과를 평가함으로써 시료에 따른 차이를 최소화하였다.

세포의 생리활성은 Ca²⁺의 농도변화와 밀접한 것이 알려져 있으며,¹⁴⁾ 식물체에서 세포질내 Ca²⁺의 농도를 좌우하는 Ca²⁺-ATPase는 원형질막, 액포막, 골지체, 소포체 등에서 발견되었다.¹⁵⁾ 토마토의 뿌리조직에서 Ca²⁺ 이동을 유발하는 Ca²⁺-ATPase의 특성을 조사하기 위하여, thapsigargin을 기준에 알려진 저해농도인 100 nM로 처리하였으나 저해효과는 관측할 수 없었다(Fig. 1). 그러나, 이보다 높은 농도에서 thapsigargin의 저해효과는 농도의존적으로 나타났다. Thapsigargin은 100 μM 이상의 농도에서 총활성을 최대 50%까지 저해하였다(Fig. 1, Inset).

NO₃⁻·민감성 H⁺-ATPase 활성저해. Thapsigargin에 의한 마이

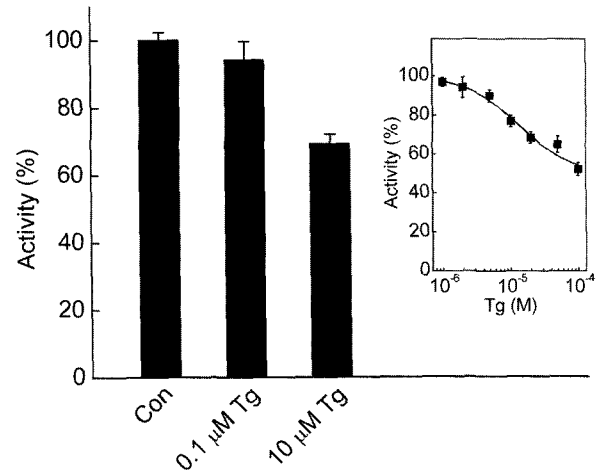


Fig. 1. Effect of thapsigargin on the microsomal ATPase activity. The activity of microsomal ATPase was measured by an enzyme-coupled method in the absence (Con) or in the presence (Tg) of 0.1 and 10 μM thapsigargin. Values are means \pm SD (n=5). Inset: Dose response of thapsigargin effect on the microsomal ATPase activity.

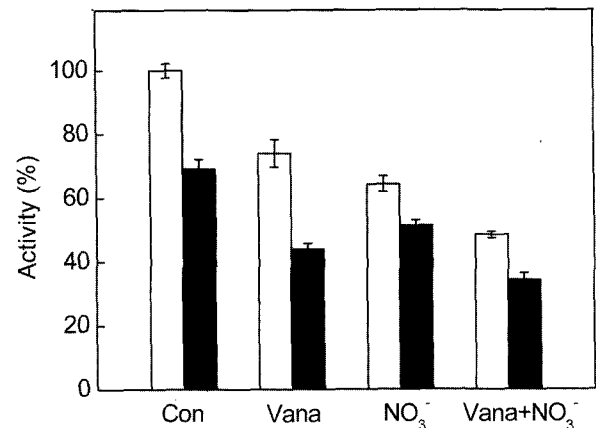


Fig. 2. Effects of thapsigargin on the microsomal ATPase activity in the presence of various inhibitors. The activities were measured in the absence (□) or in the presence (■) of 10 μM thapsigargin under the indicated conditions, the presence of vanadate (Vana), nitrate (NO₃⁻), and both (Vana+NO₃⁻). The concentrations of vanadate and nitrate were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means \pm SD (n=5-7).

크로솜 ATPase 활성의 저해 여부는 선택적 저해제인 vanadate와 NO₃⁻를 이용하여 확인하였다. 대조실험에서 10 μM thapsigargin은 ATPase 활성의 31%를 저해하였다(Fig. 2, Con). Vanadate와 NO₃⁻를 각각 처리한 후, thapsigargin에 의한 추가적인 저해효과는 각각 30%와 13%로 나타났다. Vanadate 처리 후에는 thapsigargin에 의한 추가 저해효과가 대조실험과 같은 비율로 나타났으나, NO₃⁻ 처리 후에는 thapsigargin의 추가 저해효과가 상당 비율 감소하였다(Fig. 2, NO₃⁻). 이것은 thapsigargin에 의한 활성저해가 vanadate의 그것과 무관하나, NO₃⁻에 의한 저해효과와는 서로 연관성이 있음을 보여준다.

Thapsigargin과 NO₃⁻의 저해효과 사이에 관련성을 확인하기 위하여 NO₃⁻의 농도를 조절하면서 thapsigargin의 효과를 관측하였다. 먼저, NO₃⁻의 농도를 100 μM에서 100 mM까지 단계적으로 증가시키기에 따라 ATPase 활성은 농도의존적으로 점차 감

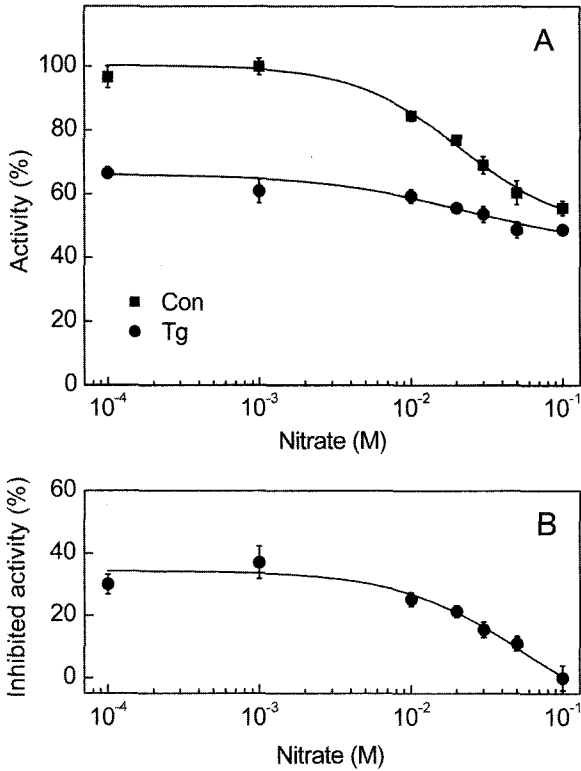


Fig. 3. Thapsigargin-induced inhibition of nitrate-sensitive H⁺-ATPase activity. (A) The activity of microsomal ATPase was decreased by increasing the concentration of nitrate (■). Thapsigargin-induced decrease in the activity is shown (●). (B) The inhibited activity by 10 μM thapsigargin in the presence of various concentrations of nitrate calculated by subtracting the activity obtained in the presence of thapsigargin from the corresponding control activity.

소하였으며, 10 mM 이상의 NO₃⁻ 농도에서는 급격히 저해되었다(Fig. 3A, Con). NO₃⁻를 처리한 각 농도에서 10 μM thapsigargin을 첨가하면 thapsigargin에 의한 추가저해는 20 mM 이하의 NO₃⁻에서 약 30%로 나타나지만, 30 mM 이상에서 점차 증가하였다(Fig. 3A, Tg). 위의 결과로부터 thapsigargin에 의하여 저해되는 ATPase 활성의 비율은 NO₃⁻ 농도가 증가할수록 점차 감소함을 확인하였다(Fig. 3B). 이것은 thapsigargin이 NO₃⁻에 의하여 선택적으로 저해되는 액포막 H⁺-ATPase 활성을 저해하는 것을 의미한다.

Vanadate-민감성 H⁺-ATPase 활성저해. Thapsigargin의 효과는 원형질막의 H⁺-ATPase 활성과는 무관하였다. Vanadate의 농도를 10 nM에서 2 mM까지 증가시켰을 때, 500 μM 이상의 농도에서 ATPase의 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 4, Con). 여기에 thapsigargin을 첨가하면, thapsigargin에 의한 추가저해효과는 vanadate의 전 농도구간에서 나타났다(Fig. 4, Tg). 각각의 vanadate 농도에서 thapsigargin의 저해효과는 vanadate의 농도와 관계없이 대략 27-35%로 나타났다. 이것은 vanadate에 의하여 저해되는 원형질막의 H⁺-ATPase 활성이 thapsigargin의 효과와는 무관함을 보여준다.

Ca²⁺ 농도에 따른 thapsigargin의 저해효과. 저자들은 사전연구를 통하여 100 μM 이상의 Ca²⁺이 토마토 뿌리조직에서 얻은 액포막 H⁺-ATPase 활성을 저해하며, 원형질막 H⁺-ATPase 활성

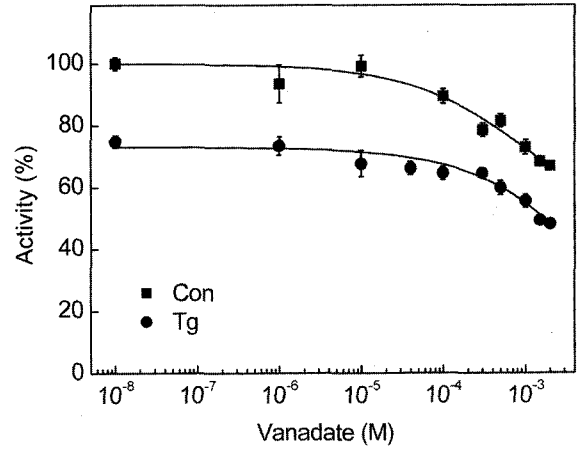


Fig. 4. Effect of thapsigargin on the vanadate-sensitive H⁺-ATPase activity. Microsomal ATPase activity was measured at various concentrations of vanadate (■). Thapsigargin (10 μM) was added in each concentration of vanadate (●).

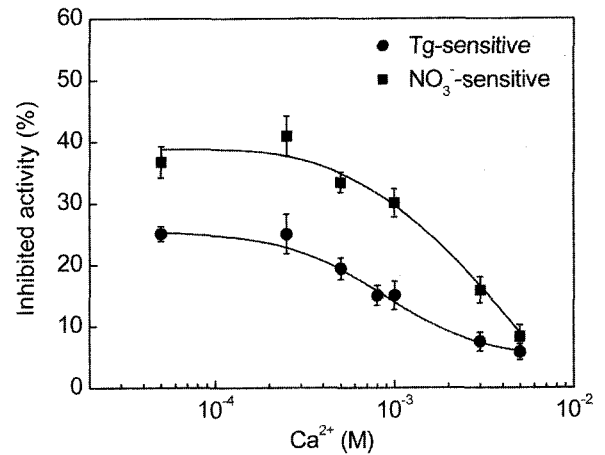


Fig. 5. Inhibitions of vacuolar H⁺-ATPase activity by thapsigargin and Ca²⁺. The effects of thapsigargin and nitrate on the activity of microsomal ATPase were measured at the various concentrations of Ca²⁺. The concentrations of thapsigargin and nitrate were 10 μM and 50 mM, respectively. The inhibited activities by thapsigargin (●) and nitrate (■) at the various concentrations of Ca²⁺ were calculated by subtracting the activity obtained in the presence of the inhibitor from the corresponding control activity.

에는 영향이 없음을 보고하였다.⁸⁾ 이러한 사실을 근거로 thapsigargin에 의한 액포막 H⁺-ATPase 활성저해 효과와 이에 대한 Ca²⁺ 농도의 영향을 관측하기 위하여 thapsigargin과 NO₃⁻의 활성저해 효과를 측정하였다(Fig. 5). NO₃⁻에 의해 저해되는 액포막의 H⁺-ATPase 활성은 Ca²⁺ 농도 증가에 따라 500 μM 이상에서 급격히 감소하였다. 동일한 Ca²⁺ 농도범위에서 thapsigargin의 저해효과는 Ca²⁺ 농도 250 μM 이상에서 점차 감소하여 3 mM Ca²⁺에서는 완전히 사라졌다. Thapsigargin의 ATPase 활성저해효과를 50%를 억제하는 Ca²⁺ 농도는 700 μM이었다. 이상의 결과는 Ca²⁺ 농도 증가에 따라 thapsigargin에 의한 H⁺-ATPase 활성의 저해효과가 감소하며, 이것은 thapsigargin과 NO₃⁻, Ca²⁺의 저해효과들이 서로 밀접한 관련이 있음을 보여준다. 한편, vanadate에 의하여 저해되는 원형질막 H⁺-ATPase의 활성은 반응용액의 Ca²⁺ 농도증가와 무관하였다(자료미제시).¹⁴⁾

고 찰

Thapsigargin은 동물조직에서 SR/ER-type Ca²⁺-ATPase를 특이적으로 저해하는 것이 밝혀졌으나, 원형질막의 Ca²⁺-ATPase와 Na⁺,K⁺-ATPase에는 영향을 주지 않는 것으로 알려졌다.⁴⁾ Thapsigargin은 SERCA의 작용기작인 E₁E₂ 모델에서 E₂ 상태의 효소에 결합하여 ATPase의 활성을 저해하며, 저해효과는 여러 가지 SERCA 저해제들 가운데 가장 우수함이 알려져 있다.^{16,17)}

미크로솜 ATPase의 활성저해 효과는 thapsigargin의 농도가 증가함에 따라 커지며, 10 μM thapsigargin에 의하여 총활성의 30%가 저해되었다. 이러한 큰 저해효과는 식물체에서 Ca²⁺-ATPase의 활성이 H⁺-ATPase의 활성에 비하여 매우 작다는 보고¹⁸⁾를 고려할 때, thapsigargin이 주된 ATPase인 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase들을 저해할 가능성을 보인다. 따라서 각각의 선택적 저해제를 이용하여 thapsigargin의 추가 저해여부를 확인하였다. NO₃⁻에 의해 액포막 H⁺-ATPase 활성을 저제한 후, thapsigargin에 의한 저해효과가 현저히 감소하는 것은 thapsigargin이 액포막에 위치한 H⁺-ATPase를 저해함을 보여준다(Fig. 2 & 3). Thapsigargin의 저해효과는 vanadate에 의하여 저해되는 원형질막 H⁺-ATPase의 활성과는 무관한 것으로 확인되었다(Fig. 4).

Vanadate는 P-형 ATPase의 저해제로서 원형질막을 포함하여 액포막, 소포체막 등에 위치한 Ca²⁺-ATPase들을 저해함이 알려져 있으며, 이들 각각의 50% 활성을 저해하는 vanadate 농도는 40 μM,¹⁹⁾ 43 μM,²⁰⁾ 38 μM²¹⁾로 보고되었다. 따라서 본 연구에서 사용한 1 mM vanadate의 처리는 원형질막 H⁺-ATPase와, 비록 적은 양이지만 존재할 가능성 있는 Ca²⁺-ATPase의 활성을 모두 저해할 것이다. Vanadate에 의한 ATPase의 활성저해 후에도 thapsigargin 첨가에 의한 추가저해가 크게 나타난 것은 thapsigargin이 미량의 Ca²⁺-ATPase 활성을 저해하는 것보다는 thapsigargin과 vanadate가 서로 다른 효소를 저해함을 나타낸다. 이것은 red beet에서 thapsigargin이 주로 Ca²⁺-ATPase를 저해한다는 보고⁵⁾와는 다르게 토마토 뿌리조직의 미크로솜에는 thapsigargin에 의한 액포막 H⁺-ATPase의 선택적 저해가 존재함을 보여준다. 물론, 토마토의 뿌리조직에서는 H⁺-ATPase의 활성에 비하여 상대적으로 활성이 매우 작은 Ca²⁺-ATPase가 존재할 것이 확실하지만, 본 연구에서는 토마토 미크로솜에서 Ca²⁺-ATPase의 양과 존재여부는 확인하기 어려웠다.

토마토의 미크로솜 H⁺-ATPase 활성은 100 μM 이상의 Ca²⁺ 농도에 의해 저해되었으며, 이러한 Ca²⁺의 효과는 액포막 H⁺-ATPase의 활성저해에 기인함을 제안하였다.⁸⁾ 본 연구에서 thapsigargin이 액포막 H⁺-ATPase를 저해한다는 사실은 Ca²⁺ 농도 증가에 따라 thapsigargin의 활성저해 효과가 현저히 감소하는 것으로도 확인하였다(Fig. 5). Thapsigargin에 민감한 ATPase 활성은 NO₃⁻에 민감한 활성보다는 작았으나 유사한 Ca²⁺ 의존성을 보였다. 이러한 결과는 각각의 자세한 작용기작은 밝혀지지 않았지만, thapsigargin과 Ca²⁺이 모두 액포막의 H⁺-ATPase 활성에 선택적으로 영향을 미침을 시사한다.

본 연구에서는 액포막 H⁺-ATPase 활성이 동물조직의 ER-type Ca²⁺-ATPase의 특이적 저해제인 thapsigargin에 의해 저해됨을

보였다. 식물세포의 액포막 H⁺-ATPase와 동물조직의 ER-type Ca²⁺-ATPase가 모두 thapsigargin에 의해서 저해된다는 것은 이들 사이에 최소한 thapsigargin의 결합부위가 공통적으로 존재한다는 것을 의미하며, 이것은 두 효소간에 구조적 연관성이 있을 가능성을 시사한다. 만약, 이러한 가능성이 구체적으로 확인된다면, 액포막에서 H⁺-ATPase의 생리학적, 생화학적 역할구명에 동물조직 ER-type Ca²⁺-ATPase에 관한 그간에 밝혀진 많은 특성들이 응용될 수 있어, 뿌리조직의 생리활성 연구에 크게 기여할 것이다.

초 록

Thapsigargin은 동물조직에서 ER/SR-type Ca²⁺-ATPase의 선택적 저해제로서, 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 미크로솜에서 ATPase의 특성을 조사하기 위하여 사용되었다. Thapsigargin은 미크로솜 ATPase 활성을 농도의존적으로 저해하였으며, 10 μM 농도에서 총활성의 약 30%를 저해하였다. 이것은 뿌리조직에서 Ca²⁺-ATPase의 활성이 매우 낮다는 것을 고려할 때, thapsigargin이 뿌리조직의 주된 ATPase 활성인 원형질막 및 액포막의 H⁺-ATPase 활성을 저해할 가능성을 보인다. Thapsigargin의 효과는 NO₃⁻를 사용하여 액포막 H⁺-ATPase 활성을 저해하였을 때 현저하게 감소하였다. 그러나, thapsigargin의 효과는 원형질막의 H⁺-ATPase 활성에는 영향을 미치지 않아, thapsigargin이 토마토 뿌리조직에서 액포막 H⁺-ATPase를 선택적으로 저해함을 보여준다.

Key words: 질산, H⁺ 펌프, 토마토 뿌리조직, Thapsigargin, Vanadate.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- Michelet, B. and Boutry, M. (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* **108**, 1-6.
- Ward, J. M. and Sze, H. (1992) Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺-ATPase from oats. *Plant Physiol.* **99**, 925-931.
- Palmgren, M. G. (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **52**, 817-845.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M. R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **266**, 17067-17071.
- Thomson, L. J., Hall, J. L. and Williams, L. E. (1994) A study of the effect of inhibitors of the animal sarcoplasmic/endoplasmic reticulum-type calcium pumps on the primary Ca²⁺-ATPases of red beet. *Plant Physiol.* **104**, 1295-1300.

6. Ordenes, V. R., Reyes, F. C., Wolff, D. and Orellana, A. (2002) A thapsigargin-sensitive Ca^{2+} pump is present in the pea Golgi apparatus membrane. *Plant Physiol.* **129**, 1820-1828.
7. Liang, F., Cunningham, K. W., Harper, J. F. and Sze, H. (1997) ECA1 complements yeast mutants defective in Ca^{2+} pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8579-8584.
8. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
10. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
11. Fabiato, A. (1988) Computer programs for calculating total free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* **157**, 378-417.
12. Palmgren, M. G., Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. and Larsson, C. (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **92**, 871-880.
13. Bennett, A. B., O'Neill, S. D. and Spanswick, R. M. (1984) H^{+} -ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **74**, 538-544.
14. Bush, D. S. (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122.
15. Sze, H., Liang, F., Whang, I., Curran, A. C. and Harper, J. F. (2000) Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 433-462.
16. Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S. and Casteels, R. (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 1410-1416.
17. Caspersen, C. and Treiman, M. (1995) Thapsigargin discriminates strongly between Ca^{2+} -ATPase phosphorylated intermediates with different subcellular distributions in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* **377**, 31-36.
18. Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M. C., Olivari, C. and Michelis, M. I. D. (1989) Identification and characterization of the Ca^{2+} -ATPase which drives active transport of Ca^{2+} at the plasma membrane of radish seedlings. *Plant Physiol.* **90**, 1429-1434.
19. Giannini, J. L., Ruiz-Cristin, J. R. and Briskin, D. P. (1987) Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue; II. characterization of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake into plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **85**, 1137-1142.
20. Pfeiffer, A. and Hager, A. (1993) A Ca^{2+} -ATPase and a $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. *Planta* **191**, 377-385.
21. Giannini, J. L., Gildensoph, L. H., Reynold-Niesman, I. and Briskin, D. P. (1987) Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue; I. characterization of Ca^{2+} -pumping ATPase associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **85**, 1129-1136.