

## 대두 유식물에서 Protein Kinase C의 부분 정제

崔允僖·李俊承  
(梨花女子大學校 生物科學科)

### Partial Purification of Protein Kinase C in *Glycine max*

Choy, Yoon Hi and June Seung Lee

(Department of Biology, Ewha womans University, Seoul)

#### ABSTRACT

Protein kinase C, a protein related in PI cascade, was partially purified from the cytosol protein of etiolated plant of *Glycine max* by DEAE-52 cellulose chromatography and phenylsepharose chromatography. When the DEAE column was eluted with 0-0.8 M linear gradient KCl, two fractions were found that increased the phosphorylation of histon H1 about five and nine-fold in the presence of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phosphatidylserine and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diolein, respectively. These fractions were used as DEAE pool. The fraction eluted with relatively high concentration of KCl was loaded on phenylsepharose column with 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and eluted with 1 mM EGTA. A fraction contained the protein kinase C, which increased the phosphorylation of the histon H1 was fractionated. To determine the molecular weight of PKC, the fraction eluted from phenylsepharose column was analyzed by 5~15% polyacrylamide gel electrophoresis after concentrated with the Amicon membrane (YM10). That revealed two bands corresponding to 60 and 65 kD by silver staining of the gel, respectively.

#### 서론

동물세포의 경우 phosphoinositide(PI) cascade에 의한 신호전달체계는 1980년대 초에 이미 많이 밝혀졌으며 식물세포도 생장과정에서 빛, 중력, 호르몬과 같은 신호는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도에 영향을 주며 결국 이러한  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도변화가 여러가지 생리적 현상을 조절하게 된다는 것은 오래전부터 알려져왔다(Helper and Wayne, 1985). 최근에 PI의 가수분해와 관련이 있는 G protein의 존재가 밝혀졌고(Blum *et al.*, 1988) 또한 식물세포의 신장을 촉진하는 농도의 auxin이 phosphatidylinositol turnover에 관여하고(Ettliger, 1988) *Samanea saman*의 엽침에서는 빛에 의해 inositol-1,4,5-trisphosphate( $\text{IP}_3$ )와 diacylglycerol(DAG)의 농도가 일시적으로 증가하며(Morse *et al.*, 1987, 1989) 액포와 소포체와 같은 세포내의  $\text{Ca}^{2+}$  저장기관에서  $\text{IP}_3$ 에 의해서  $\text{Ca}^{2+}$ 이 방출됨이 보고되었다(Drøbak *et al.*, 1985;

Ranjeva *et al.*, 1988). 이는 식물에서도 동물에서와 같이 PI cascade가 존재함을 의미한다.

PI cascade에서  $\text{IP}_3$ 에 의한 세포질 내의  $\text{Ca}^{2+}$  농도변화로 활성화되는 단백질로  $\text{Ca}^{2+}$  dependent protein kinase(CDPK)나  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin dependent protein kinase가 있으며 DAG에 의해서 활성화되는 것으로  $\text{Ca}^{2+}$  dependent, phospholipid dependent protein kinase(PKC)가 있다. 이중 대두 배양세포에서 52와 55 kD의 분자량을 가지는 CDPK가 분리되었고(Putnam-Evans *et al.*, 1990) 특히 대두식물의 질소고정을 하는 뿌리의 nodule에서는 막 단백질인 nodulin-26, 세포막의 H<sup>+</sup>-ATPase 등이 CDPK의 기질이라고 보고되었다(Robert and Harmon, 1992). 그러나 PKC에 대해서는 호박의 하배축, 밀의 배, 비름, 비트의 잎 등에 존재한다는 보고가 있었으나(Schäfer *et al.*, 1985; Elliott and Kokke 1987; Klucis and Polya, 1987) 아직 PKC의 정제가 이루어지지 않았을 뿐만아니라 효소의 성질에 대한 규명이 이루어지지 않고 있다. 그러나 동물에서는 쥐의 뇌, 돼지의 지라와 소의 심장 등에서 PKC가 정제되어 그 성질에 관하여 비교적 연구가 상세히 이루어

이 연구는 교육부(BSRI-92-422) 기초과학 육성 연구비 지원에 의해서 수행된 것임.

졌다. 분자량은 68.5~113.6 kD으로 나타났고 등전점은 5.2~5.8이며 최적 pH로 6.5~8.0을 가진다. PKC의 활성 물질로는  $Ca^{2+}$  외에 DAG와 phosphatidylserine이 가장 효과적이라고 알려졌다. DAG는  $Ca^{2+}$ 에 대한 PKC의 친화력을 증가시켜  $Ca^{2+}$ 과 함께 PKC를 활성화시키고 여러가지 인지질 중에서는 phosphatidylserine이 가장 효과적으로  $Ca^{2+}$ 과 함께 PKC를 활성화시킨다. Histon, protamine, myelin basic protein과 microtubule-associated protein 등이 PKC에 의해서 인산화가 되는데 이 중에서 histon과 myelin basic protein에 대한 특이성이 가장 높게 나타난다. 또한 PKC는 autophosphorylation되며 *in vitro*에서는 DAG와 구조가 유사한 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)와 같은 phorbol ester가 PKC의 활성물질로 알려져 있으며 chlorpromazine, verapamil과 tetracaine 등의 물질이 저해제로 알려져 있다(Kuo, 1985).

본 실험실에서는 PKC의 활성물질인 DAG가 옥수수 자연초 조직 세포의 길이 성장을 증가시키며 또한 IAA에 의한 길이성장도 촉진한다는 연구결과를 보고한 바가 있다(Chung and June, 1991). 동물에서 DAG와 같은 기능을 한다고 알려진 TPA를 옥수수 자연초 절편에 처리하여도 길이의 생장이 촉진되며 이 때 세포내 단백질의 인산화가 TPA, IAA, IAA + TPA의 순서로 증가함을 알았다. 이러한 결과는 식물세포의 길이생장에 PKC가 관여하고 있다는 가능성을 의미하므로 식물의 길이생장에 관여하는 단백질 중 어떠한 단백질이 PKC에 의하여 인산화되는 지를 알아보기 위하여 우선 PKC를 분리정제할 목적으로 본 실험을 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 대두(*Glycine max* L.) 유식물은 100 mm 정도가 되는 것으로 사용하였다. Histon H1, L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serine, diolein, ATP, EDTA, EGTA, PMSF는 Sigma에서 구입하였으며 [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP는 Dupont에서, phenylsepharose CL-4B는 Pharmacia에서 DEAE-52 cellulose와 3MM 여과지는 Whatman에서 구입하였다.

**PKC 부분정제.** Tsutomu와 Charles(1984)와 Putnam-Evans 등(1990)의 방법을 변형하여 실험하였으며 모든 실험 과정은 0~4°C에서 수행하였다. 떡잎부분만을 제거한 대두 유식물 2 kg(FW)을 이들 부피의 1배 정도되는 homogenization buffer(0.25 M sucrose, 50 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5)에 넣어 분쇄한 후 8점의 거어지로 걸러냈다. 걸러진 용액은 11,000 g에서 원심분리하여 상정액을 세포질 분획으로 사용하였다. DEAE-52 cellulose column (2.7×44, 2.4×46 cm)에 sucrose를 제외한 homogenization

buffer로 미리 평형시킨 후 위의 방법으로 얻은 세포질 분획을 column에 직접 loading하고 0~0.8 M linear gradient KCl 1500 mL를 1 mL/min의 속도로 용출시켜 10 mL씩 받았다. 이 분획들을 protein kinase assay하여 phosphatidylserine과 diolein에 의하여 histon H1의 인산화가 증가되는 분획에 0.1 M  $CaCl_2$ 를 넣어  $CaCl_2$ 의 최종농도를 5 mM로 맞추었다. Phenylsepharose column(1×5 cm)를 buffer A(50 mM Tris-Cl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 0.1 mM PMSF, pH 7.5)로 미리 평형을 시키고  $CaCl_2$ 의 농도를 5 mM로 맞춘 DEAE pool을 loading하였다. Column 부피의 10배되는 양의 buffer A와 buffer B(50 mM Tris-Cl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 M NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 7.5)로 column을 씻어낸 후 elution buffer(50 mM Tris, pH 7.5, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF)로 1 mL/min의 속도로 용출시켜 3 mL씩 받았다. 용출된 분획 중에서 phosphatidylserine과 diolein에 의해서 histon H1의 인산화가 증가되는 분획을 찾아 Amicon membrane(YM 10)으로 농축하고 5~15% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하여 silver staining하였다.

**Protein Kinase Assay.** Tsutomu와 Charles(1984)의 방법을 변형하여 실험하였다. 25 mM Tris(pH 7.5), 200  $\mu$ g/mL histon H1, 10 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M ATP, [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP 0.3  $\mu$ Ci/fraction, 400  $\mu$ M EDTA, 0.5 mM  $CaCl_2$ ,  $\pm$  50  $\mu$ g/mL phosphatidylserine,  $\pm$  0.5  $\mu$ g/mL diolein이 포함된 반응액 70  $\mu$ L에 각 column에서 용출된 분획들의 30  $\mu$ L씩을 넣어 30°C에서 10분간 반응시켰다. 0.63% BSA(4°C)를 100  $\mu$ L를 넣어주고 20% trichloroacetic acid(TCA), 0.2%  $NaH_2PO_4$ (4°C) 1 mL를 넣어 반응을 중지시켰다. 3MM 여과지로 여과하여 20% TCA, 0.2%  $NaH_2PO_4$ (4°C) 10 mL로 여과지를 씻어내고 scintillation cocktail 5 mL를 넣어서 Liquid Scintillation Counter로 방사능을 측정하였다.

## 결 과

대두 유식물에서 PKC를 분리하기 위하여 DEAE-52 cellulose chromatography와 phenylsepharose chromatography를 수행하였다. 떡잎을 제거한 대두 유식물은 homogenization buffer에 넣어 분쇄하고 원심분리하여 상정액만을 모았다. 이것을 sucrose를 뺀 homogenization buffer로 미리 평형시킨 DEAE-52 cellulose column에 loading하여 0~0.8 M KCl로 용출하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 1). KCl의 농도가 증가함에 따라 나타난 3가지 단백질 profile 중에서 51번 분획과 87번 분획의 protein kinase activity를 측정하였을 때 EDTA를 넣어준 대조구에 비해 50  $\mu$ g/mL phosphatidylserine과 0.5  $\mu$ g/mL diolein을 넣은

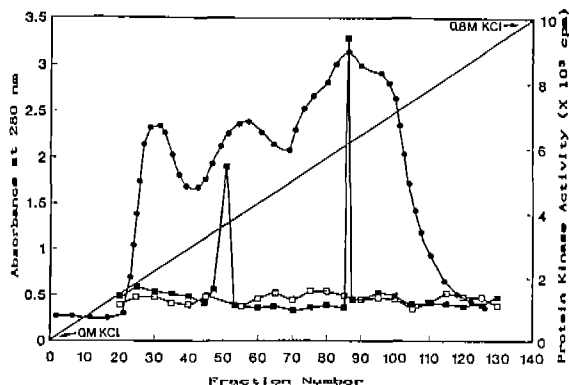


Fig. 1. DEAE-52 cellulose chromatography of protein kinase C. A 30  $\mu$ L aliquot of each fraction was assayed for PKC. The closed circles denote the absorbance at 280 nm and the straight line KCl gradient (0-0.8 M). The open squares denote protein kinase activity in the presence of EDTA and closed squares in the presence of phosphatidylserine and diolein.

비교구에서 5.4배와 9.2배의 histon H1 인산화가 증가되었다. 따라서 51번과 87번 분획을 phenylsepharose chromatography할 때의 DEAE pool로 사용하였다. 이 DEAE pool 각각에 100 mM  $CaCl_2$ 를 넣어  $CaCl_2$ 의 최종농도를 5 mM로 맞추고 0.1 mM  $CaCl_2$ 이 있는 buffer A로 미리 평형시킨 phenylsepharose column에 loading하였다. 이 column을 buffer A로 씻은 다음 0.5 M NaCl을 넣은 buffer B로 씻어내고 1 mM EGTA로 용출한 후에 280 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 2). 이 때 용출되는 단백질의 profile은 아주 낮게 나타났다. Protein kinase activity는 DEAE column의 51번 분획을 phenylsepharose column에 loading한 후 용출된 7번째 분획에서 phosphatidylserine과 diolein에 의해 증가되었다. 그러나 이외에도 3번 분획과 9번 분획의 phosphatidylserine과 diolein을 넣어주지 않은 대조구에서 histon의 인산화가 증가하였다. 이는 PKC가 분리되어질 때 CDPK가 같이 분리되어져 나온 결과라 여겨진다. DEAE column의 87번 분획의 경우는 phenylsepharose column에서 용출된 3번 분획에서 DEAE column에서 나타난 정도의 PKC activity가 나타났으나 CDPK의 activity는 나타나지 않았다. 이렇게 한 PKC의 정제 결과는 Table 1에 요약하였다. 상징액의 비활성도는  $0.009 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 였으나 DEAE-52의 51번과 87번 분획은 각각 phenylsepharose chromatography를 한 후 303.333과 221.751 pmol/min/mg으로 나타났으며 894배와 1596배 정제되었다.

PKC의 분자량을 확인하기위하여 DEAE와 phenylsepharose pool를 5~15% polyacrylamide gel에서 전기영동

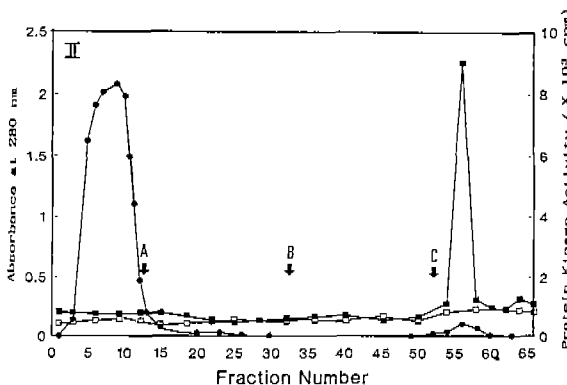
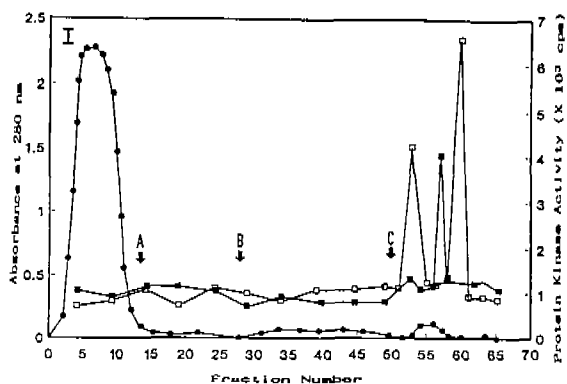


Fig. 2. Phenylsepharose chromatography of DEAE pool. Panel I show the results of 51 fraction of DEAE column and II displayed the results of 87 fraction of DEAE column. A 30  $\mu$ L aliquot of each fraction was assayed for PKC. The closed circles denote the absorbance at 280 nm. The open squares denote protein kinase activity in the presence of EDTA and closed squares in the presence of phosphatidylserine and diolein. The column was washed with buffer A containing 0.1 mM  $CaCl_2$  at A, followed by buffer B containing 0.5 M NaCl at B. The kinase eluted with elution buffer containing 1 mM EGTA at C.

하고 silver staining으로 band를 확인하였다(Fig. 3). DEAE column의 51번 분획은 phenylsepharose column 후에 전기영동상에서 4 band로 나타났으나 87번 분획은 2 band로 나타났다. 이 2 band의 이동거리를 표준 단백질과 이동거리를 비교하여 분자량을 확인한 결과 60과 65 kD임을 알 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

현재 식물에서 protein kinase C(PKC)는 호박의 하배축, 비류, 대두 유식물의 자엽에서 유도한 칼루스, T37로 형

Table 1. Summary of partial purification of Ca<sup>2+</sup> dependent, phospholipid dependent protein kinase (PKC) from *Glycine max*

Fraction	Volume mL	Protein mg	Total activity pmol P/min	Ca <sup>2+</sup> stimulation -fold	Specific activity pmol P/min	Recovery %	purification -fold
Supernatant	3,790	28,538.7	268.7	1.01	0.009	100	1
DEAE-cellulose							
II <sup>c</sup>	83	222.44	75.45	4.35	0.339	28.08	37.67
III <sup>b</sup>	19.5	85.25	11.82	6.75	0.139	4.40	15.44
Phenylsepharose							
II <sup>c</sup>	3	0.009	2.73	4.00	303.333	3.62	894.78
III <sup>d</sup>	3	0.0082	1.82	6.33	221.951	15.40	1596.77

<sup>a</sup>DEAE-cellulose II contained the fractions of 46-54. <sup>b</sup>DEAE-cellulose III had the fraction of 87. <sup>c</sup>Phenylsepharose II and <sup>d</sup>Phenylsepharose III meant the elutes of 1 mM EGTA from phenylsepharose column after loading with the DEAE-cellulose II and the DEAE-cellulose III respectively. One unit of PKC is defined as that amount of enzyme which incorporates 1 μmol of phosphate from ATP into histon H1 per minute at 30°C. Specific activity is expressed as units per milligram of protein. Protein is determined by the method of Bradford with bovine serum albumin as a standard.

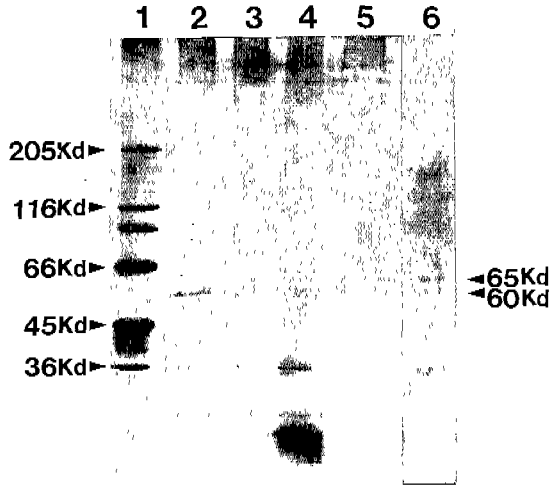


Fig. 3. Analysis of purification pool by 5~15 polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins from 2 stages of purification were resolved by 5~15 gradient gel in the presence of SDS and stained with silver. Lane 1 contained the following molecular mass markers; Myosin, 205 kD; β-galactosidase, 116 kD; bovine albumin, 66 kD; ovalbumin, 45 kD; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 36 kD. Other lanes shows the following fractions(1 μg) from each step of the purification procedure; lane 2, crude homogenate; lane 3, crude supernatant; lane 4, DEAE pool; lane 5, phenylsepharose pool of 87 fraction of DEAE column; lane 6, phenylsepharose pool of 51 fraction of DEAE column.

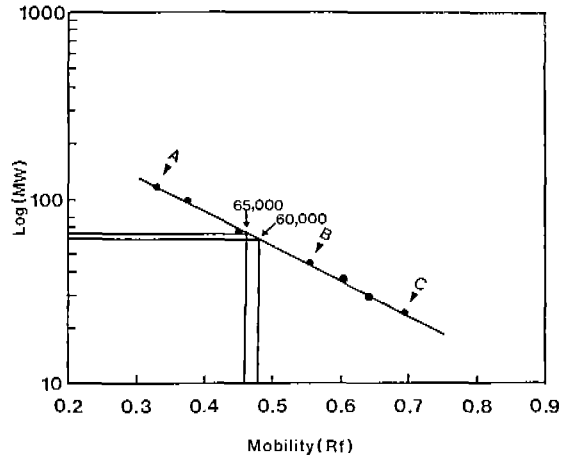


Fig. 4. Determination of molecular weight of partial purified PKC. Molecular size standards had the following molecular mass weights; A. β-galactosidase, 66 kD; B. ovalbumin, 45 kD; C. Trypsinogen, 24 kD.

질전환시킨 담배의 crown gall 조직과 비트의 잎 등에서 존재하고 있다고 보고되었으나 비름에서만 부분 분리가 되었을 뿐 완전한 정제가 이루어지지 않았다(Schäfer *et al.*, 1985; Elliott and Kokke, 1987; Klucis and Polya, 1987). 식물에서 PKC를 분리하고자 할 때는 동물에서 사용되어진 방법을 응용하여 적용하는데, PKC도 다른 효소처럼 단백질 분해 효소에 의해서 쉽게 가수분해가 되므로 비교적 고농

도의 단백질 분해효소의 저해제를 처리하고 분리하는 모든 실험 단계를 4°C에서 3일 안에 종료하여야 된다. 또 PKC가 분리되어진 후에도 불안정하여 효소활성을 일주일 이상 유지하기가 어렵고 냉동보관 후에는 효소활성이 상실되는 문제점을 안고 있기 때문에 분리에 어려움이 있다.

본 실험실에서는 PKC를 분리하기 위해서 대두 유식물을 DEAE-cellulose chromatography와 phenylsepharose chromatography를 수행하였다. PKC는 DEAE-cellulose를 사용하였을 때 KCl의 농도 증가에 따라 나타나는 단백질의 profile 중 2번째와 3번째에서 phosphatidylserine과 dioleoin에 의해 5.4배와 9.2배의 histon 인산화가 증가하는 분획을 찾아 각각 phenylsepharose chromatography를 하였다(Fig. 1). 이 때 PKC는  $Ca^{2+}$  dependent하게 활성화되는 단백질이므로 calmodulin을 분리할 때 사용하는 조건을 변형하여 적용하였다. 우선 고농도의  $Ca^{2+}$ 으로 처리하여 phenylsepharose에 붙인 후 저농도의  $Ca^{2+}$ 으로 column을 씻어낸 다음 고농도의 NaCl로 씻어내고 EGTA로 용출하였다. 그러나 이러한 조건은  $Ca^{2+}$ 에 대한 의존성을 나타내는 다른 protein kinase인 CDPK를 분리할 때 사용되어지는 조건이므로 PKC와 함께 분리되어질 수 있다는 문제점이 있다.

실제로 DEAE column에서 PKC 활성을 보인 51번 분획을 phenylsepharose column chromatography한 결과 PKC 활성과 CDPK 활성이 같이 나타났었다(Fig. 2A). 그러나 비교적 고농도의 KCl에서 용출된 87번 분획에서는 phenylsepharose column 후 PKC 활성만 나타났었다(Fig. 2B). 이 phenylsepharose column의 pool을 Amicon membrane(YM 10)으로 농축하고 DEAE pool과 함께 5~15% gel electrophoresis를 행하여 silver staining을 한 결과 DEAE의 51번 분획은 phenylsepharose chromatography를 한 후 60과 65 kD외에 36 kD 부근의 2 band가 나타났으나 DEAE 87번 분획은 60과 65 kD의 분자량을 가지는 2 band로 나타났었다(Fig. 3). 이 결과는 소의 뇌에서 분리한 PKC의 조절 영역에 대한 anti-serum을 비름에서 DEAE-sephacel column으로 부분분리한 PKC에 결합시켰을 때 84.5, 65, 40 kD의 세 종류의 단백질과 결합한다는 결과와 일치한다(Eillot *et al.*, 1987). DEAE의 51번 분획은 phenylsepharose chromatography를 한 후 나타난 4 band 중에서 60과 65 kD의 band가 DEAE 87번 분획을 phenylsepharose chromatography를 한 후 나타난 2 band와 일치하고 있는데 이는 DEAE 51번 분획을 phenylsepharose column 후 affinity column을 행하여 60과 65 kD의 2 band가 나타나는 지를 확인하여야 된다고 생각된다.

또한 DEAE 87분획을 phenylsepharose column을 한 후 나타난 2 band 중 어느 band가 PKC의 활성을 가지는 지를 알아보기 위하여 동물에서 분리된 PKC가 autophosphory-

lation 된다는 사실을 적용하여 autophosphorylation을 실행하고자 하였으나 추출된 PKC의 양이 너무 적어서 아직까지 성공하지 못하고 있다. 실제로 식물에서 보고된 PKC 뿐만 아니라 다른 protein kinase도 보고된 경우의 1/3 정도만 autophosphorylation된다고 보고되어 있다. 더욱이 식물에서 보고된 PKC들은 동물에서 DAG와 같은 기능을 한다고 알려진 phorbol ester에 대한 특이적 결합이 아직까지 증명되지 않았다. 또한, 비름과 같은 식물에서는 동물의 경우처럼 PKC의 phosphatidylserine과 DAG 의존성이 나타나는 반면에  $Ca^{2+}$ 에 의해서만 완전히 활성화되어 phosphatidylserine과 dioleoin를 비롯한 다른 인지질의 영향을 받지 않는 경우도 있음이 보고되었다(Schäfer *et al.*, 1985; Muto *et al.*, 1985; Olah *et al.*, 1986; Harmon *et al.*, 1987). 그러므로 PKC의 activation curve가  $Ca^{2+}$ 만 처리하였을 때보다 여러 가지 PKC 활성물질들을 같이 처리하였을 때 낮은 농도의  $Ca^{2+}$ 에서 나타나는 것을 확인해야 한다는 필요성이 제기되었다. 현재 본 실험실에서는 CDPK와 함께 분리된 PKC는 분리되어져 나온 단백질의 양이 아주 적으므로 affinity column으로 CDPK와 PKC를 분리하고자 하는 시도를 하고 있으며 DEAE column에서 고농도의 KCl에 의해 용출되었던 87번 분획의 phenylsepharose column결과 나타난 2 band는 어떠한 것이 PKC의 활성을 보이는 지 알아보기 위하여 동물에서 분리된 PKC에 대한 항체를 결합시켜 확인하고 좀 더 많은 양을 얻어 autophosphorylation을 실행해야 된다고 생각한다.

## 적 요

대두(*Glycine max* L.) 유식물에서 PKC를 분리하고자 세포질 단백질을 모아 DEAE-52 cellulose chromatography와 phenylsepharose chromatography를 수행하였다. DEAE-52 cellulose column에서 0~0.8 M KCl linear gradient로 용출시켜 5  $\mu$ g/mL phosphatidylserine과 0.5  $\mu$ g/mL dioleoin의 존재하에서 histon H1의 인산화가 각각 5.4배와 9.2배가 증가하였던 분획들을 DEAE pool로 사용하였다. 비교적 고농도의 KCl에 의해 용출되었던 DEAE pool를 5 mM  $Ca^{2+}$ 의 존재하에서 phenylsepharose에 loading하고 1 mM EGTA로 용출하였다. 이 phenylsepharose column의 분획들 중에서 protein kinase assay를 행하여 phosphatidylserine과 dioleoin이 있을 때 DEAE에서와 비슷한 정도의 histon H1 인산화의 증가를 보이는 분획을 찾을 수 있었다. 이 phenylsepharose pool을 Amicon membrane(YM10)으로 농축하여 5~15% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 silver staining하였다. 이 때 나타난 2 band의 분자량은 각각 60과 65 kD으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Blum, W., K-D. Hinsch, G. Schults and E.W. Weiler. 1988. Identification of GTP-binding proteins in the plasma membrane of higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **156**: 954-959.
- Chung, E.J. and J.S. Lee. 1991. Effect of TPA and IAA on corn coleoptile elongation. *Korean J. Bot.* **35**: 77-84.
- Drøbak, B.K. and I.B. Ferguson. 1985. Release of  $Ca^{2+}$  from vacuolar membrane vesicle of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**: 3944-3949.
- Elliott, D.C. and T.S. Kokke. 1987. Partial purification and properties of a protein kinase C type enzyme from plants. *Phytochemistry* **26**: 2929-2935.
- Elliott, D.C. and Y.S. Kokke. 1987. Cross-reaction a plant protein kinase with antiserum raised a sequence from bovine brain protein kinase C regulatory sub-unit. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **145**: 1043-1047.
- Ettlinger, C. and L. Lehle. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* **339**: 176-178.
- Harmon, A.C., M. Fechheimer, C., Putnam-Evans and M.J. Cormier. 1989. A calcium dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* **83**: 830-837.
- Hepler, P.K. and R.O. Wayne. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397-439.
- Klucis, E. and G.M. Polya. 1987. Calcium-independent activation of two plant leaf calcium regulated protein kinases by unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **174**: 1041-1047.
- Morse, M.J., R.C. Crain and R.L. Satter. 1987. Phosphatidylinositol cycle metabolite in *Samanea saman*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7075-7078.
- Morse, M.J., G.G. Coté and R.L. Satter. 1989. Light-stimulated inositol phospholipid turnover in *Samanea saman* pulvini. Increased levels of diacylglycerol. *Plant Physiol.* **89**: 724-727.
- Muto, S. and K. Shimogawara. 1985. Calcium- and phospholipid-dependent phosphorylation of rubulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by a chloroplast envelope-bound protein kinase *in situ*. *FEBS Lett.* **193**: 88-92.
- Olah, Z. and Z. Kiss. 1986. Occurrence of lipid and phorbol ester activated protein kinase in wheat cells. *FEBS Lett.* **195**: 33-36.
- Putnam-Evans, C.L., A.C. Harmon and M.H. Cormier. 1990. Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean. *Biochemistry* **29**: 2488-2495.
- Ranjeva, R., A. Carrasco and A.M. Boudet. 1988. Inositol trisphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from *Acer* cell. *FEBS Lett.* **230**: 137-141.
- Roberts, D.M. and A.C. Harmon. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 375-414.
- Schäfer, A., F. Bygrave, S. Matzenauer and D. Marmé. 1985. Identification of a calcium- and phospholipid-dependent protein kinase in plant tissue. *FEBS Lett.* **187**: 25-28.
- Tsutomu, U. and R.F. Charles. 1984. Affinity chromatography of protein kinase C-phorbol ester receptor on polyacrylamide-immobilized phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* **259**: 12311-12314.
- Turner, R.S. and J.F. Kuo. 1985. Phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase (protein kinase C): The enzyme, substrate, and regulation. In, Phospholipids and cellular regulation, C.D. Kuo (ed.). Vol. 2, CRC press. FL. pp. 75-110.

(1993. 4. 28 接受)