

담배 배양 세포의 성장과정 중 칼슘/칼모듈린-결합단백질 및 glutamate decarboxylase의 생성변화

오석흥* · 한광수¹

우석대학교 이공대학 생물공학과, ¹생명자원학과

초 록 : 담배 배양 세포의 성장과정 중의 칼모듈린 농도변화 및 칼모듈린 결합 단백질의 종류에 대하여 조사하고 이들 단백질들 중 글루탐산 탈탄산효소를 immunodetection과 활성측정으로 확인하였다. 담배세포는 유도기(초기 1~2일간), 대수증식기(3~5일), 정지기 등의 전형적인 성장 패턴을 보였다. 칼모듈린의 농도는 비록 대수증식기에 약간 감소하는 경향을 보이다 정지기에 이르면서 유도기의 수준을 회복하는 것으로 나타났지만 전체적으로는 성장단계에 관계없이 유사한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 주요 칼슘-의존형 칼모듈린 결합단백질은 56, 46, 36, 32-kDa의 4종류인 것으로 조사되었고, 모노클로날 항체를 이용하여 immunodetection을 실시해 본 결과 56-kDa 단백질이 담배 글루탐산 탈탄산효소로 확인되었다. 56-kDa의 글루탐산 탈탄산효소는 대수증식기에 수확한 세포에서 가장 많이 검출되었고, 이와같은 패턴은 효소활성 측정에서도 확인되었다. 이러한 결과들은 담배세포의 성장과정 중에 칼슘/칼모듈린-의존형 글루탐산 탈탄산효소 농도가 조절되고 있음을 제안해 주는 것이다. (2000년 9월 18일 접수, 2000년 10월 25일 수리)

서 론

고등 생물의 성장 및 발달과 관련된 수 많은 세포내 반응들의 조절에 칼슘신호가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이와 같은 칼슘의 역할은 칼슘-조절 단백질들로 알려진 세포내의 칼슘-결합단백질들과 칼슘이 결합함으로써 증대되어진다.^{3,5)} 칼모듈린(calmodulin)은 아마도 가장 잘 연구된 칼슘-조절 단백질일 것이다.^{4,5)} 칼모듈린은 조사된 모든 진핵조직에서 발견되었고, 그리고 세포의 성장과 생존을 위해 필수적인 단백질이다. 비록 칼모듈린의 칼슘-비의존성 활성들의 가능성이 제기되기도 했지만,⁶⁾ 고등 진핵생물에서 발견된 수 많은 칼모듈린의 활성이 칼슘을 필요로 하고, 대부분의 칼모듈린 기능들이 칼슘에 의해 조절되어진다.^{3,5,7,9)}

칼모듈린은 그 자체로서는 아무런 효소적 활성을 갖지 못하며 칼슘과 결합한 후 많은 효소들이나 혹은 단백질들과 결합하여 그들의 활성을 조절함으로써 그 역할을 하는 단백질이다.^{3,5)} 그러므로 칼모듈린에 의해 활성화되는 효소와 칼모듈린과 결합할 수 있는 단백질들을 찾아내는 것은 어떤 특정 세포에서 칼모듈린의 기능을 알아내는데 필수적인 것이다. 동물조직들로부터는 적어도 25종류 이상의 칼모듈린-조절 단백질들이 확인된 바 있으며, 이들 중에는 수 종류의 단백질 인산화 효소, 단백질 탈인산화 효소, cyclic nucleotide 대사에 관련된 효소들, Ca²⁺-ATPases 그리고 NAD 인산화 효소 등이 포함되어 있다.⁵⁾

비록 식물 칼모듈린의 구조가 밝혀졌고, 식물체내 몇몇 칼모듈린-의존형 효소와 칼모듈린-결합 단백질들이 확인되긴 했지만 아직 그 알려진 정도가 매우 미흡하다.⁵⁾ 동물세포에서 25종

류 이상의 칼모듈린-의존형 단백질들이 발견된 사실로 미루어 볼 때, 식물로부터도 앞으로 새로운 칼모듈린 타겟 단백질들이 발견될 것으로 기대된다. 본 연구자는 ¹²⁵Iodine이 라벨링된 칼모듈린의 overlay법¹⁰⁾을 새로이 응용하여 당근세포의 분화과정 중의 칼모듈린 결합단백질의 변화되는 패턴을 관찰할 수 있었다.¹¹⁾

이와 같이 동물과 식물의 성장과 발육에 있어 칼모듈린의 가능한 역할을 제시하기 위해서는 이들 생물의 성장과 칼모듈린 농도변화와의 관계를 밝혀내고, 칼모듈린 의존형 효소들 그리고 다른 칼모듈린 타겟 단백질의 확인 및 분석이 필수적이라 할 수 있다. 또한 세포내 협력적인 반응을 위해서는 다른 조절 체계가 있을 수 있으므로 칼모듈린 활성을 조절 할 수 있는 인자에 대해서도 조사해 보는 것이 필요하다. 지금까지 식물로부터 얻어진 칼슘-의존형 칼모듈린-결합 단백질의 예를 들면 glutamate decarboxylase(GAD), NAD kinase, nucleoside triphosphatase 등이 있다.⁹⁾ GAD의 경우 담배식물체내 유전자의 발현을 통해 식물의 성장과 발달과도 밀접한 관련이 있음이 확인된 바 있다.⁵⁾ 그러나 아직 식물세포 성장과정 중의 GAD 효소의 농도변화 및 활성변화 패턴 등에 관한 연구는 없다. 본 연구에서는 담배 배양 세포의 성장과정 중의 칼모듈린 농도변화 및 칼모듈린 타겟 단백질의 종류에 대하여 조사하고 이들 단백질 중에 GAD의 존재와 효소의 생성변화를 활성 측정과 Western-blot으로 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양

담배 현탁 세포배양액을 얻기 위해 Smith의 방법¹²⁾에 따라 담배 유식물체의 줄기를 이용하였다. 유식물체는 비타민이 함유되어 있는 MS 기본 배지(Sigma, USA) 1 리터당 1 mg의

찾는말 : 칼모듈린, 글루탐산 탈탄산효소, 담배 세포배양
*연락처 : Tel : 82-63-290-1433; Fax : 82-63-291-9312
E-mail : shoh@core.woosuk.ac.kr

NAA(naphthalene acetic acid)와 50 µg의 BAP(benzylamino-purine)를 가하여 조제한 배지에서 자라게 하였고, 유식물체의 줄기는 BAP가 빠진 상기의 배지에 옮겨 약 5주 동안 자라게 하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 리터당 2 mg의 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 1 mg의 NAA 및 비타민이 함유되어 있는 MS 기본배지에서 배양을 시작하여 세포를 증식시켰고, 증식된 세포는 새로운 배지에 약 1:5의 비율로 희석하여 배양하면서 유지시켰다.

세포성장곡선

세포의 증식정도를 측정하기 위해서는 희석하여 배양을 시작한 다음 7일에 걸쳐 세포의 건중량과 총 단백질 함량의 변화를 조사하였다.¹³⁾ 건중량은 배양액 5 ml를 흡입여과한 후 공기 중에서 12시간 건조한 후 세포무게를 측정하여 정하였다. 총 단백질 함량을 측정하기 위해 먼저 세포 배양액 100 µl에 400 µl의 acetone을 가한 후 10분간 microcentrifuge(Vision, Korea)로 최대속도에서 원심분리 하여 침전물을 얻었다. 이어 100 µl의 0.1 N NaOH를 침전물에 가하여 용해 한 후 10분간 실온에 방치한 후 약간 vortex하고 5분간 microcentrifuge로 원심분리 한 후 상등액을 얻었다. 이 상등액 중의 단백질 함량은 BCA(bicinchoninic acid) 단백질 정량 kit(Sigma, USA)와 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 사용하여 측정하였다.

칼모듈린 분석

담배세포 중의 칼모듈린 함량 측정은 Oh 등에 의한 칼모듈린 추출방법¹¹⁾과, Oh와 Roberts에 의한 경쟁적 RIA(radio-immunoassay)¹⁴⁾ 방법으로 실시하였다. 단백질시료를 얻기 위해 먼저 약 1.0 g의 세포 시료에 액체질소를 가하고 유발로 마쇄한 후 3.0 ml의 추출 완충액[100 mM potassium phosphate, pH 7.4, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 20 mM β-mercaptoethanol(BME), 1 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), 10 mM sodium isoascorbate, 10%(w/v) polyvinylpyrrolidone(PVPP)]을 넣고 단백질을 추출하였다. 이어 30,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 침전물에 다시 3.0 ml의 완충액을 가하여 재추출을 실시하여 동일한 조건에서 원심분리하여 상등액을 취하여 첫 번째의 상등액과 합하였다. 시료중의 칼모듈린 함량은 폴리크로날 칼모듈린 항체와 ¹²⁵I가 labeling된 칼모듈린을 사용하는 경쟁적 RIA¹⁴⁾로 의해 측정하였다.

칼모듈린 결합단백질 분석

세포 추출액 중의 칼모듈린-결합 단백질은 SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리한 후 ¹²⁵I-calmodulin overlay 방법¹⁰⁾으로 분석하였다. SDS-PAGE 후 gel을 isopropanol/acetic acid 용액(25% isopropanol, 10% acetic acid)과 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 7.6 완충액으로 번갈아 씻어 준 후 약 2~4시간 동안 blocking 용액(50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7.6)으로 씻어 주었다. 이어 ¹²⁵I-calmodulin(10⁷ cpm/gel)과 1 mM CaCl₂ 혹은 대조구로서 ¹²⁵I-calmodulin과 5 mM

EDTA가 들어 있는 blocking 용액을 조제하여 약 12시간 동안 실온에서 반응시킴으로써 칼슘-의존형 칼모듈린 결합단백질의 존재를 확인하고자 하였다. 반응이 끝난 후 gel을 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 7.6 완충액에 1 mM CaCl₂ 혹은 5 mM EDTA를 가한 용액으로 철저히 씻어 준 후 Coomassie 염색하였고, 건조 한 후 X-ray film에 노출시켰다.

글루탐산 탈탄산효소 (glutamate decarboxylase, GAD) 활성 측정

GAD assay를 위해 먼저 약 1.0 g의 세포 시료에 액체질소를 가하고 유발로 마쇄한 후 3.0 ml의 추출 완충액[50 mM bis-Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM PMSF, 0.1 mM pyridoxal 5'-phosphate(PLP), 10%(w/v) PVPP, 10%(v/v) glycerol]을 넣고 단백질을 추출하였다.¹⁵⁾ 이어 23,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, GAD assay는 Snedden 등에 의해 확립된 L-[¹⁴C]Glu-dependent ¹⁴CO₂ 생성 방법¹⁶⁾으로 실시하였다. 칼슘/칼모듈린-의존형 여부를 확인하기 위해 assay 완충액(100 mM bis-Tris, 1 mM DTT, 0.5 mM PLP, 10 % glycerol, pH 7.0)에 100 nM 칼모듈린과 2.5 mM CaCl₂ 혹은 2.5 mM ethyleneglycol-bis-β-aminoethyl ether, N, N, N', N'-tetraacetic acid(EGTA)를 가하여 효소 활성을 측정 비교하였다.

Western-blot of GAD

담배세포 추출액 중의 GAD를 검출하기 위하여 단백질은 10 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PLP, 1 mM PMSF, 10%(w/v) PVPP, 10%(v/v) glycerol, pH 7.4 완충액으로 추출하고 Bradford의 법¹⁷⁾에 의하여 정량하였다. 총 단백질 함량으로 16.7 µg의 단백질을 12.5% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose 막에 전기적으로 옮겼다. GAD의 확인을 위해 anti-petunia GAD 모노클로날 항체¹⁸⁾와 ECL chemiluminescence kit(Amersham, UK)를 사용하였다.¹⁵⁾

결과 및 고찰

세포성장곡선

본 실험에 사용한 담배 세포 배양액의 성장곡선의 모양은 Fig. 1과 같다. 7일 동안의 성장기간을 분석해 보면 유도기(초기 1~2일간), 대수증식기(3~5일), 정지기 등의 전형적인 성장 패턴을 보였으며, 이와같은 성장 패턴은 새로운 배지에 1:5의 비율로 희석하여 배양을 다시 시작하여도 그대로 유지되었다. 이는 다른 식물세포 배양곡선^{11,13)}에서 나타난 것과 같은 전형적인 식물세포 성장곡선 패턴이다.

칼모듈린 분석

세포배양 곡선의 여러 단계에서 담배세포를 수확한 후 단백질을 추출하고 총 단백질 중의 칼모듈린 함량을 RIA를 통해 조사해 본 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 총 단백질 mg당 칼모듈린의 농도는 대수증식기에 약간 감소하는 경향을 보이다 정지기에 이르면서 유도기의 수준을 회복하

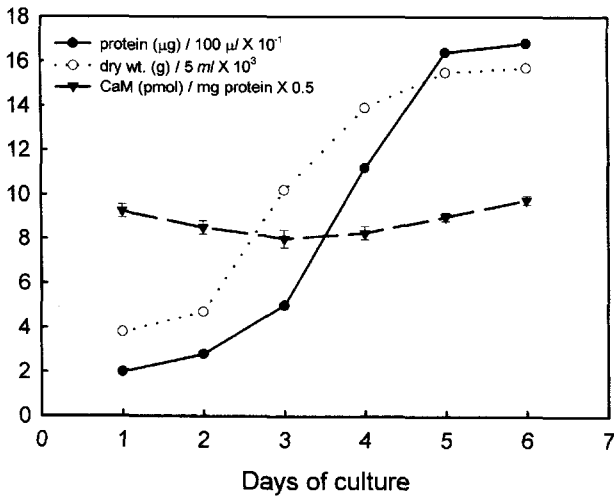


Fig. 1. Growth characteristics and calmodulin protein levels of tobacco cell suspension cultures. Total protein was estimated with BCA in 100 μ l of cell suspension cultures. Dry weight was measured using five-milliliter aliquots of cell suspension cultures. Calmodulin protein levels in soluble protein extracts were measured by RIA as described in Materials and Methods. Error bars show the standard errors. CaM, calmodulin.

는 것으로 나타났다. 당근세포의 경우에도 정지기에 이르러 칼모듈린의 양이 약간 증가한 것으로 조사된 바 있어¹³⁾ 본 결과와 유사한 패턴으로 여겨지지만 두 경우 모두 성장단계별 칼모듈린 농도변화에 있어서의 유의성은 없는 것으로 조사되었다. 일반적으로 식물의 경우 칼모듈린의 증가는 일시적으로 나타나며,^{13,19)} 세포성장 중의 칼모듈린 변화는 거의 없는 것으로 나타났다.^{11,13)} 그러나 본 실험에 사용한 담배 배양 세포는 synchronized된 세포들이 아니기 때문에 cell cycle 단계 특이적 칼모듈린 단백질 변화에 대해서는 앞으로 연구가 더 진행되어야 할 것으로 여겨진다. 예를들면 동물세포의 경우 cell cycle의 G1/S 경계에서 칼모듈린의 순간적인 증가가 관찰된 바 있다.⁸⁾

칼모듈린-결합 단백질 분석 및 GAD 확인

칼모듈린의 담배세포내 목표 단백질을 확인하기 위하여 ¹²⁵I-calmodulin overlay 분석을 실시하였다. 세포성장의 각 단계별로 얻은 시료 중의 칼모듈린-결합 단백질의 패턴은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 주요 칼모듈린-결합 단백질은 56, 46, 36, 32-kDa의 4종류인 것을 알 수 있었고 그 외에도 수 종류가 더 있는 것으로 추정되나 밴드의 진하기가, 매우 약한 것으로 미루어 그 양은 적은 것으로 판단된다. Fig. 2에 나타난 밴드는 모두 1 mM CaCl₂의 존재하에서만 나타났으며 칼슘대신 EDTA 혹은 EGTA를 넣어주면 overlay 상에 아무 밴드도 나타나지 않아(자료 미제시) ¹²⁵I-calmodulin이 이들 단백질들과 반응을 하기 위해서는 철저하게 칼슘을 필요로 하는 것을 알 수 있었다. 이들 단백질들 중 GAD 단백질을 확인하기 위해 anti-petuniaGAD 모노클로날 항체를 이용하여 Western-blot 분석을 실시해 본 결과 Fig. 3에서와 같이 56-kDa 단백질이 담배 GAD로 확인되었다. 또한 56-kDa의 GAD 단백질은 대수증식기에 수확한 세포에 가장 많은 것으로 미루어 보아 이 단백

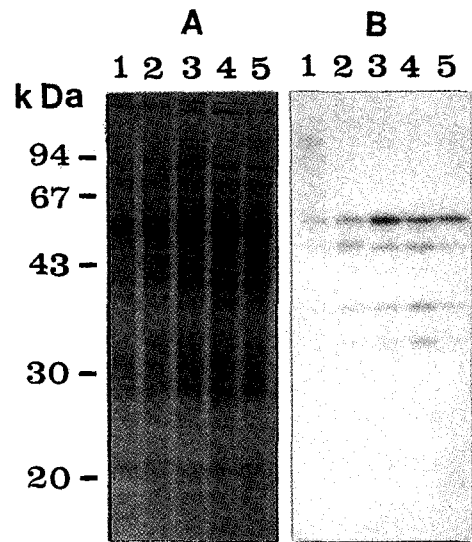


Fig. 2. Analysis of calmodulin-binding proteins in tobacco cell suspension cultures. Samples representing 2-day(lane 1), 3-day(lane 2), 4-day(lane 3), 5-day(lane 4), and 6-day(lane 5) tobacco samples (16.7 μ g of protein in each lane) were subjected to SDS-polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis. (A) Coomassie blue-stained gel. (B) Autoradiogram of the gel exposed to ¹²⁵I-calmodulin in the presence of 1 mM CaCl₂.

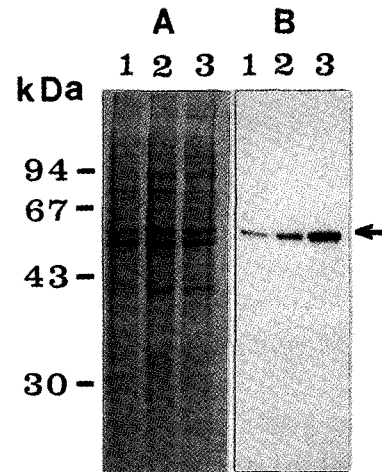


Fig. 3. Western-blot analysis of GAD levels in tobacco cell suspension cultures. Proteins from 2-day(lane 1), 3-day(lane 2), and 4-day(lane 3) tobacco samples (16.7 μ g of protein in each lane) were subjected to SDS-polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis. (A) Coomassie blue-stained gel. (B) Western-blot showing the presence of 56-kDa GAD, detected with an anti-GAD monoclonal antibody with a chemiluminescence protocol using an ECL kit (Amersham). The arrow indicates the position of the tobacco GAD.

질의 발현이 담배 세포의 성장과정 중에 조절되고 있음을 알 수 있다. 따라서 이 시기에 담배 세포내 GABA의 생성요구가 많을 것으로 추정되며, *Astragalus mongholicus* 세포배양의 경우 대수증식기에 세포내 GABA의 함량이 가장 높은 것으로 조사된 바 있다.²⁰⁾

담배 GAD의 효소활성

담배세포 GAD의 칼슘/칼모듈린 의존도를 알아보기 위하여

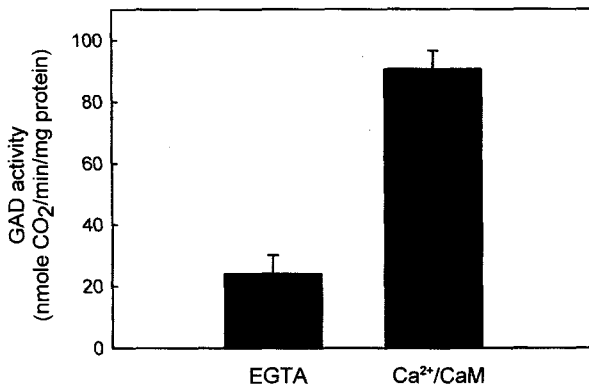


Fig. 4. Activation of tobacco GAD by Ca²⁺/calmodulin. Extracts of 4-day-old cultured tobacco suspension cells were prepared and GAD activity was measured in the presence of 2.5 mM EGTA or 2.5 mM CaCl₂ and 100 nM calmodulin. The GAD activities were standardized to total soluble proteins in the extracts. CaM, calmodulin.

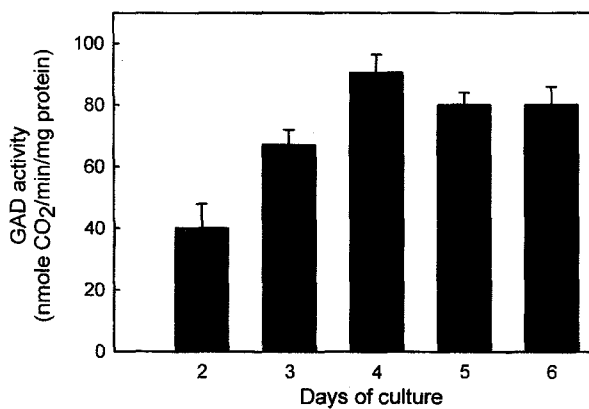


Fig. 5. Analysis of the GAD activities during tobacco cell growth. Extracts from 2-day, 3-day, 4-day, 5-day, and 6-day cultured tobacco suspension cells were prepared and GAD activity was measured in the presence of 2.5 mM CaCl₂ and 100 nM calmodulin. The GAD activities were standardized to total soluble proteins in the extracts.

실험구에는 칼슘과 칼모듈린을 대조구에는 EGTA를 사용하여 효소활성을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 담배세포로부터 얻은 GAD는 칼슘/칼모듈린-의존형을 알 수 있었고 EGTA의 존재하에서도 약간의 활성이 있는 것으로 조사되었다. 이는 아마도 EGTA에 의한 칼슘제거에 의해서도 칼모듈린이 그 결합 단백질인 GAD와 잘 분리되지 않을 만큼 강력한 결합을 유지하고 있기 때문인 것으로 생각된다. 다른 칼모듈린 의존형 효소의 경우도 이와같은 강력한 상호작용을 보이고 있는 것으로 조사된 바 있다.^{21,22} 한편 담배 cDNA library로부터 클로닝하여 대장균 발현을 통해 얻은 담배 GAD는 상기와 같은 background 활성없이 가해진 칼슘과 칼모듈린에 의해서만 활성을 보이는 것으로 조사된 바 있다.²³ 또한 담배세포의 성장에 따른 GAD의 활성을 조사해 본 결과 대수증식기에 효소 활성이 가장 높았으며 정지기에도 비슷한 경향을 유지하였다 (Fig. 5). 이는 immunodetection 결과와 유사한 패턴을 보여주는 것으로서 GABA의 생성이 대수증식기부터 많아질 것으로 판단된다. 한편, *Astragalus mongholicus* 세포배양의 경우 대수증식기에 세포내 GABA의 함량이 가장 높은 것으로 조사된 바 있

고, 생성된 GABA는 정지기에 이룰수록 세포외로 상당부분 분비되어 배지에서 검출되는 GABA의 함량이 더 많은 것으로 조사된 바 있다.²⁰ Baum 등의 보고²⁴에 의하면 칼모듈린 결합 부위가 제거된 폐튜니아 GAD 돌연변이 유전자의 담배 세포내 발현은 담배식물체의 성장과 발달에 있어 형태적 이상을 가져온 반면, 정상 유전자의 발현은 GABA 함량 증진과 더불어 아무런 형태적 이상이 관찰되지 않았다. 이는 칼모듈린-결합 식물 GAD가 식물의 정상적인 성장과 발달조절에 관여함을 보여주는 하나의 좋은 예이다. 앞으로 정상 담배세포 및 GAD 고발현 담배세포의 성장과정 중의 GAD 및 GABA 함량변화에 대하여 조사가 이루어지면 식물세포의 성장조절에 있어서의 GAD 및 GABA의 역할에 대한 심도있는 해석이 내려질 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 우석대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 본 연구를 수행하는데 필요한 radioactive materials의 사용에 도움을 준 전북대학교 의과대학에 감사 드립니다.

참고문헌

- Hepler, P. K. and Wayne, R. O. (1985) Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
- Berridge, M. J. (1990) Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* **265**, 9583-9586.
- Roberts, D. M., Lukas, T. J. and Watterson, D. M. (1986) Structure, function, and mechanism of action of calmodulin. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **4**, 311-339.
- Roberts, D. M. and Harmon, A. C. (1992) Calcium-modulated calmodulin: targets of intracellular signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- Snedden, W. A. and Fromm, H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Sci.* **3**, 299-304.
- Geiser, J. R., Van Tuinen, D., Brockerhoff, S. E., Neff, M. M. and Davis, T. N. (1991) Can calmodulin function without binding calcium? *Cell* **65**, 945-959.
- Rasmussen, C. D. and Means, A. R. (1987) Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. *EMBO J.* **6**, 3961-3968.
- Rasmussen, C. D. and Means, A. R. (1989) Calmodulin is required for cell-cycle progression during G₁ and mitosis. *EMBO J.* **8**, 73-82.
- Rasmussen, C. D., Means, R. L., Lu, K. P., May, G. S. and Means, A. R. (1990) Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **265**, 13767-13775.
- Burgess, W. H., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J. (1984) Identification of calmodulin-binding proteins in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **99**, 550-557.
- Oh, S. H., Steiner, H. Y., Dougall, D. K. and Roberts, D. M. (1992) Modulation of calmodulin levels, calmodulin

- methylation, and calmodulin-binding proteins during carrot cell growth and embryogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 28-34.
12. Smith, R. H. (1986) Establishment of calli and suspension cultures. *Methods Enzymol.* **118**, 539-549.
 13. Perera, I. Y. and Zielinski, R. E. (1992) Synthesis and accumulation of calmodulin in suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* **100**, 812-819.
 14. Oh, S. H. and Roberts, D. M. (1990) Analysis of the state of posttranslational calmodulin methylation in developing pea plants. *Plant Physiol.* **93**, 880-887.
 15. Oh, S. H. and Cha, Y. S. (2000) Regulation of γ -aminobutyric acid production in tobacco plants by expressing a mutant calmodulin gene. *Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 69-73.
 16. Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H. and Shelp, B. J. (1995) Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.* **108**, 543-549.
 17. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
 18. Snedden, W. A., Koutsia, N., Baum, G. and Fromm, H. (1996) Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 4148-4153.
 19. Wick, S. M., Muto, S. and Duniec, J. (1985) Double immunofluorescence labeling of calmodulin and tubulin in cultured cells. *Protoplasma* **126**, 703-709.
 20. Kajimura, K., Iwamoto, Y., Yoshida, S., Yamasaki, K., Tanaka, R., Suzuki, S., Nakazawa, H. and Yoneda, K. (1991) Studies on cultures of *Astragalus mongholicus* (I): Amino acids composition in seeds, young plantlets and cell cultures. *Shoyakugaku Zasshi* **45**, 293-298.
 21. Collinge, M. and Trewavas, A. J. (1989) The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **262**, 8865-8872.
 22. Rasi-Caldogno, F., Carnelli, A. and De Michelis, M. I. (1993) Controlled proteolysis activates the plasma membrane Ca^{2+} pump of higher plants. *Plant Physiol.* **103**, 385-390.
 23. Yun, S. J. and Oh, S. H. (1998) Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/calmodulin-dependent glutamate decarboxylase. *Mol. Cells* **8**, 125-129.
 24. Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., and Fromm, H. (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* **15**, 2988-2996.

Changes in the levels of Ca^{2+} /calmodulin-binding proteins and glutamate decarboxylase during the growth of tobacco suspension cells

Suk-Heung Oh* and Kwang-Soo Han¹(Department of Biotechnology and ¹Life Resource Sciences, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea)

Abstract : The changes of calmodulin levels, calmodulin-binding proteins, and Ca^{2+} /calmodulin-dependent glutamate decarboxylase during the growth of tobacco suspension cells were investigated. Tobacco cells exhibited a typical growth curve, including an exponential growth phase between 3 and 5 days after inoculation, and an apparent stationary phase occurring after 5 day. Although slight changes were observed from sample to sample, calmodulin protein levels remained similar during the phases of culture growth. Several Ca^{2+} -dependent calmodulin-binding proteins including 56, 46, 36, and 32-kDa proteins were detected in tobacco cell extracts. The 56-kDa protein was identified as glutamate decarboxylase by Western-blot analysis using an anti-GAD monoclonal antibody. The levels of GAD protein and the specific activity of GAD enzyme were highest during the middle exponential phase of the culture growth cycle. These data suggest that Ca^{2+} /calmodulin-dependent glutamate decarboxylase is modulated during the growth of tobacco suspension cells.

Key words : calmodulin, glutamate decarboxylase, tobacco cell culture

*Corresponding author