

더덕의 주근에서 유래한 Cyclophilin 1 (*CiCyP1*) 유전자의 분리 및 분석

이강, 인준교, 이범수, 김종학, 양덕춘^{1)*}
(주)바이오피아, ¹⁾경희대학교 한방재료가공센터

Isolation and Characterization of Cyclophilin 1 (*CiCyP1*) Gene from *Codonopsis lanceolata*

Kang Lee, Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, Jong-Hak Kim, Deok-Chun Yang^{1)*}
Biopia Co., Ltd, Yongin 449-701, Korea
¹⁾College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processing,
Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

A cyclophilin 1 cDNA clone(GenBank accession no.CF924191) was isolated from the taproot of *C. lanceolata* and designed as *CiCyP1*. Determination of the nucleotide sequence of *CiCyP1* identified an open reading frame of 525 bp, which shared high homologies with cyclophilins that were previously reported in other organisms. The *CiCyP1* amino acid sequence possesses 7 amino acid residue stretch(KSGKPLH) that is characteristic of plant cytosolic dehydrins. Currently available amino acid residues of plant cyclophilins were compared to examine their phylogenetic relationship to *CiCyP1*. In the phylogenetic analysis, based on the aligned sequences, *CiCyP1* showed high homology with arabidopsis ROC2 and rice CyP1. The transcript that corresponded to *CiCyP1* was abundant in callus, but only basal level of transcript was detected in stem, leaf and root. For the study in the defense mechanism against various stresses, we report expression patterns of this gene by quantitative RT-PCR.

Key words : abiotic stress, *Codonopsis lanceolata*, cyclophilin, RT-PCR.

서 언

Cyclophilin(CyP)은 면역 억제제인 cyclosporin A에 대해 높은 친화력을 가진 단백질로 인간에게서 처음 알려진 다기능 단백질 family이다

(Handschmacher *et al.*, 1984). 그것은 후에 CsA에 의해 활성이 저해될 수 있는 peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase(EC 5.2.1.8; PPIase; rotamase)으로 밝혀졌다 (Takahashi *et al.*, 1989). 하나의 immunophilin으로서 CyP는 CsA와 결합한다. 그리고 CyP-CsA 결합체는

* 교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

calcineurin과의 결합을 통해서 면역 반응을 억제한다. CyP-CsA 결합체는 T세포 면역 반응 초기에 calcineurin 유전자의 전사단계를 방해함으로써 Ca^{2+} 의존적인 T-cell의 활성화 경로를 방해하는 calcineurin의 phosphatase 활성을 저해한다(Walsh *et al.*, 1992). 콩과 식물인 *Vicia faba*에서는 CyP-CsA 결합체가 단백질의 인산가수분해효소(calcineurin)를 저해시키는 역할을 하며, Ca^{2+} 에 의해 유도되는 공변세포의 K^+ 채널의 불활성화를 방지한다(Luan *et al.*, 1993). CyPs는 사람을 포함하여 많은 생물에서 그 존재가 밝혀져 왔으며, 지금까지 연구된 대부분의 생물에서 특이적으로 보존되어 있다고 알려져 있다.

식물은 저온이나 ABA, drought, wounding 등의 다양한 스트레스에 노출되었을 때, cyclophilin mRNA의 발현량이 확실히 증가하였다. 이는 cyclophilin이 식물에서 외부 자극에 대한 반응에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다(Leonardo *et al.*, 1998). 그 외에 발생 단계에서의 조절과 단백질 변형과 같은 다양한 역할이 식물의 cyclophilins에서 제시되어 왔다(Luan *et al.*, 1994; Marivet *et al.*, 1994; Kern *et al.*, 1995). 이러한 결과들은 cyclophilin 단백질이 다양한 신호 전달 체계에 포함되어 있다거나 또는 스트레스 조건 하에서 단백질을 변형시키거나 집합시키는데 관여한다는 것을 나타낸다.

본 연구에서는 염기 서열 분석과 RT-PCR을 통해 더덕의 cDNA로부터 분리한 cyclophilin1 유전자(CICyP1)를 동정하고, 동시에 환경 스트레스에 대한 반응을 확인하였다. 비교적 단기간의 짧은 작물화 역사를 지닌 약용 작물의 대표식물로서 식품과 약재로 이용되는 더덕의 뿌리에서 cyclophilin에 대한 분자생물학적 연구는 환경 스트레스와 관련하여 점차 확산되는 더덕의 분자유종을 통한 환경 내성 증진에 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 충남농업기술원에서 재배된 4년

생 더덕(*Codonopsis lanceolata*)의 주근을 사용하였다.

RNA 추출과 cDNA library의 제작

Aqueous phenol extraction을 사용하여 더덕(*C. lanceolata*)의 주근으로부터 total RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하는 과정은 공급자 매뉴얼에 따라 cDNA synthesis kit(Clontech, SMART cDNA library construction kit, USA)를 이용하여 수행하였다.

DNA 및 단백질 서열 분석

pTriplEx2 에서 pTriplEx phagemid들을 분리하여 염기 서열 분석을 위한 template로 사용하였다. 무작위적으로 선별된 cDNA inserts의 5' 영역을 벡터 특이적인 시퀀싱 프라이머를 이용하여 automatic DNA sequencer (ABI prism 3700)로 sequencing 하였다. 분석된 EST clone들의 기능 동정은 NCBI의 blastx 프로그램을 사용하여 GeneBank의 non-redundant protein database와의 비교를 통해 이루어졌다. 뉴클레오타이드와 아미노산의 서열 분석 및 비교는 DNASISMAX(Hitachi) 프로그램을 사용하였으며, 분석된 염기 서열의 비교는 NCBI의 DNA와 아미노산 database를 바탕으로 blast 연산을 통해 수행한 후, ClustalW(Thompson, 1994)와 GeneDoc(Nicholas and Nicholas, 1997) 프로그램에 의해 디스플레이 되었다. 아미노산 서열 분석에는 단백질의 등전점(pI), 분자량, signal peptide 등의 조사를 위해, ExPasy(<http://www.expasy.org/tools/>)와 PSORT(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)를 사용하였다.

더덕 주근의 Stress 처리

환경 stress(저온, 고온, 염)에 따른 더덕 유전자의 발현 패턴을 조사하기 위하여 더덕 주근을 수직으로 얇게 잘라 슬라이스를 만들었다. 각각의 처리 조건에 따라 MS 액체 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 띄운 채로 22℃(wounding), 37℃(고온), 4℃(저온)에서 시간별(1h, 4h, 24h)로 암배양하였다. 염 스트레스 처리를 위해서는 340 mM NaCl을 첨가한 MS 액체 배지에 위와 동일한 방법으로 더덕 주근 슬라이스를

```

1  GGCCTTACGG TCCGGGGATT TGAACCTTGA AGAAAATCCC CAATTGCAGA CTCGCCTAAA GTTTCAGAT

71  CACTAGAAAA TTATGTCGAA CCCCAAAGTT TTCTTTGACA TAGTGATTGG AAAGATGAAA GCTGGCCGTA
      M S N P K V F F D I V I G K M K A G R I 1
141 TGTTCATGGA ACTATTTGCA GATTCTACCC CAAAACTGC TGAAAACTTC CGTGCCCTCT GCACAGGGGA
      V M E L F A D S T P K T A E N F R A L C T G E 21
211 GAAGGGGATT GGATTATCCG GGAAGCCCTT ACATTACAAG GGCTCTATTT TCCACCGCAT TATCCCAAAC
      K G I G L S G K P L H Y K G S I F H R I I P N 44
281 TTCATGTGTC AAGTGAGAGA TTCACTAGG TTTAATGGGA CAGGAGGTGA ATCCATCTAT GGAGCGAAGT
      F M C Q G G D F T R F N G T G G E S I Y G A K F 67
351 TTGCGGATGA GAACTTCAAG AACAAACATA CAGGACCAGG TATTCTATCT ATGGCTAATT CTGGACCAAA
      A D E N F K N K H T G P G I L S M A N S G P N 91
421 TACTAATGGG TCTCAGTTCT TCATATGTAC TGAGAAGACA TCGTGGCTCG ATGGAAAGCA TGTTGTCTTT
      T N G S Q F F I C T E K T S W L D G K H V V F 114
491 GGAAAGGTTG TTGATGGCTA TAGCGTTGTC AAAGAGATGG AGAAAGTTGG GTCAGATGGT GGAATTTCTA
      G K V V D G Y S V V K E M E K V G S D G G N S K 137
561 AATCGACAGT TGAGATTGAA GAATGTGGCC AGATTCAAGA GAATTAGCTG ACAATGGGAG ATAAATAAGG
      S T V E I E E C G Q I Q E N * 161
631 GAGAAGTAAG TGTTTTGGTT GATATATTTA ATCCTGCCAT GTGAACATTG GAGGTTGCTC TTAICTGAGA
701 GTATAAGCTC AGTAATTTGA ACCGAGTNAAG AGTTTCCTTT AT
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *CiCyP1* from *Codonopsis lanceolata*. The positions of nucleotides are shown on the left and the positions of amino acids on the right. Asterisk shows the termination codon. Underline indicates PCR primer.

만들어 처리한 후 22℃에서 암배양하였다. 매 시간 때마다 시료를 채취하여 액체 질소에 얼린 후, -80℃에 저장하여 실험에 사용하였다.

RT-PCR 분석

더덕(*C. lanceolata*)의 callus, 줄기, 잎, 주근으로부터 total RNA를 추출한 후(easy BLUE™ RNA Extraction Kit, iNtRON), *CiCyP1* 유전의 발현 분석을 위하여 RT-PCR 분석을 실시하였다. Oligo(dT) (18mer)를 프라이머로 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성(Promega)한 후, *CiCyP1*에 특이적인 primer를 이용하여 유전자의 ORF 부분을 증폭하였다 (TopTaq™). PCR 증폭은 94℃, 5분을 개시로 94℃ 40초, 54℃/58℃ 40초, 72℃ 1분 30초의 30 cycles /33 cycles 조건으로 하였다. PCR을 위한 *CiCyP1* 유전자의 특이적인 primer는 ORF 내에서 디자인 하였고, 5' -TCC ATG GTA TGT CGA ACC CCA AAG TTT

TC-3' (*CiCyP1*-forward)와 5' -AGG ATC CAT TGT CAG CTA ATT CTC TTG AAT C-3' (*CiCyP1*-reverse)를 이용한 PCR에서 ORF와 동일한 480 nucleotides 길이의 산물을 생산하였다. 정량 비교를 위한 보정 실험군은 actin primer를 사용하였으며, 프라이머는 5' -CGT GAT CTT ACA GAT AGC TTG ATG A-3' (forward)와 5' -AGA GAA GCT AAG ATT GAT CCT CC-3' (reverse)를 사용하였다.

결과 및 고찰

더덕 4년생 주근으로 제작된 cDNA library로부터 1000개의 clone을 확보하였다. 각 positive clone들에 대한 염기 서열에 대한 blastx 검색 결과, 그 중에서 4개의 clone들이 기존의 cyclophilin 유전자와 상동성을 나타내었다. 이 중 full length clone(GenBank

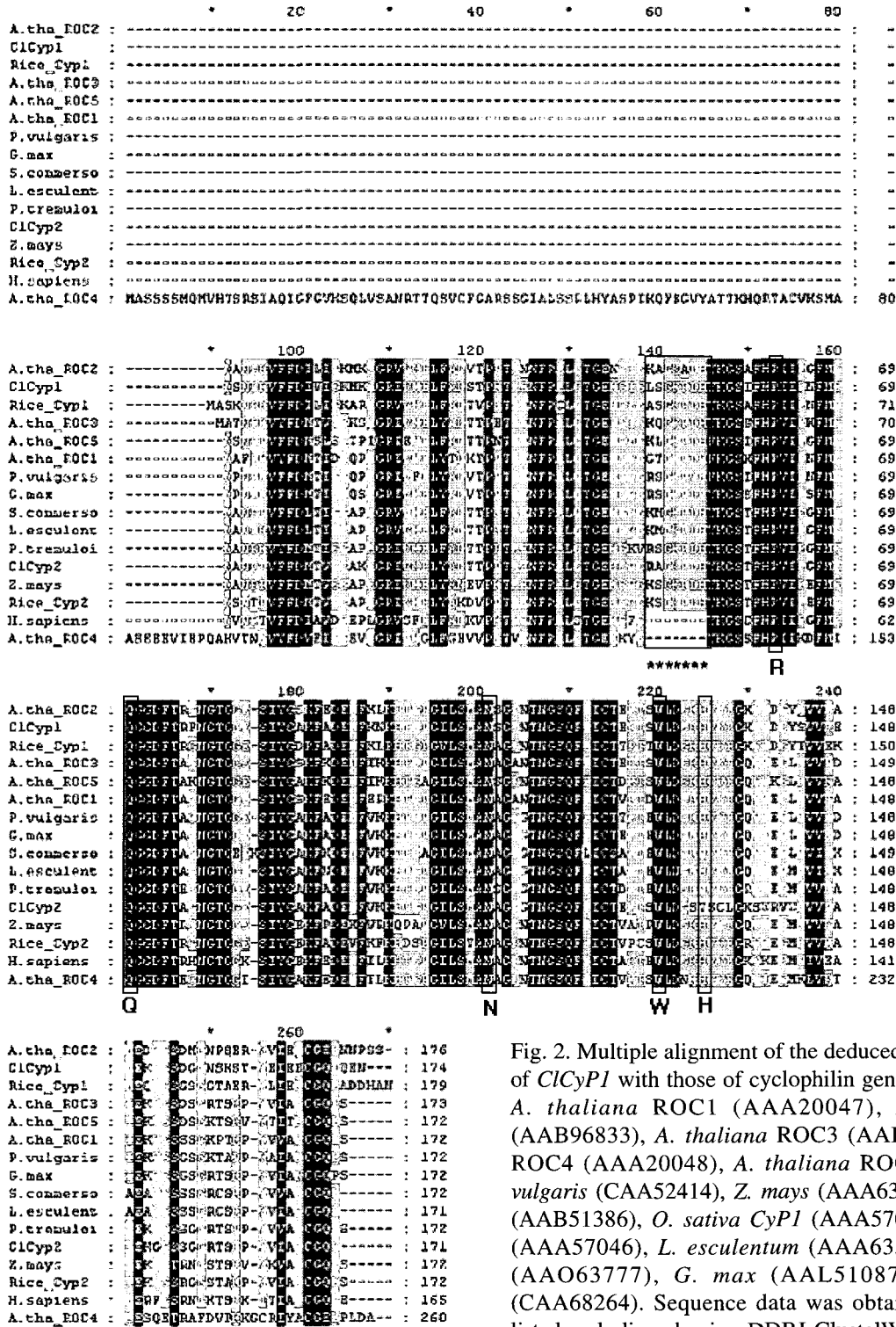


Fig. 2. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of C1Cyp1 with those of cyclophilin genes from other species; *A. thaliana* ROC1 (AAA20047), *A. thaliana* ROC2 (AAB96833), *A. thaliana* ROC3 (AAB96832), *A. thaliana* ROC4 (AAA20048), *A. thaliana* ROC5 (AAA66197), *P. vulgaris* (CAA52414), *Z. mays* (AAA63403), *S. commersonii* (AAB51386), *O. sativa* CyP1 (AAA57044), *O. sativa* CyP2 (AAA57046), *L. esculentum* (AAA63543), *P. tremuloides* (AAO63777), *G. max* (AAL51087), and *H. sapiens* (CAA68264). Sequence data was obtained from GeneBank listed and aligned using DDBJ ClustalW and GeneDoc. Gaps are marked with dashes. White letters in a black box indicate 16 out of 16 matches, white letters in gray box indicate 13 out of 16 matches.

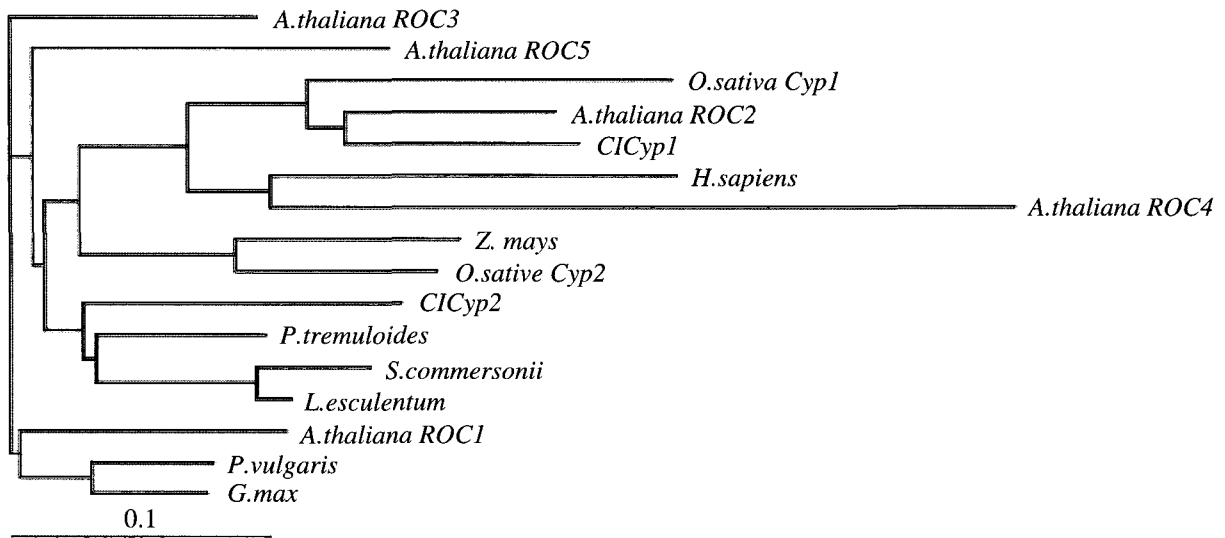


Fig. 3. phylogenetic relationship of *CICyP1* to other cyclophilins. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of cyclophilins from various plant species and human mentioned in Fig. 2 and including *ClcyP2* (*C.lanceolata* cyclophilin2). The tree was generated by TreeView Ver.1.6.1 (Hitachi software). The scale on the bottom shows similarity between two clusters and 0.1 means 0.1 nucleotide substitutions per site.

accession no. CF924191)을 대상으로 분리된 cyclophilin cDNA 는 *CICyP1* 으로 명명하였다.

*CICyP1*의 cDNA는 747 bp 길이로, 174 개 아미노산으로 번역되는 525 bp 의 ORF를 가지고 있으며 (Fig. 1), 분자량은 약 18.87 kDa, pI 값은 7.67 로 추정되었다. *CICyP1*의 아미노산 서열의 상동성 분석 결과(Fig. 2), *CICyP1* 은 여러 종의 식물들에서 발견되는 cyclophilin 유전자와 전형적인 특징 몇 가지를 공유하고 있다. Fig. 2의 별표 표시된 아미노산 서열에서 볼 수 있듯이, *CICyP1* 역시 대부분 식물의 cytosolic cyclophilin들과 같은 7개의 아미노산 (XSGKPLH)의 삽입 지역을 가지고 있다. 식물로부터 분리된 많은 CyP들이 양전하를 띠는 7개의 아미노산 잔기 삽입 구간을 지니고 있다. Kallen et al.(1991)이 보고한 인간의 cytosolic CyP의 3차원 구조를 보면 이 양전하를 띠는 아미노산 잔기는 2번째 β -turn과 3번째 β -strand 사이에 위치하며 인접한 ATP/GTP 결합 모티프(P-loop)를 노출시키고 있는 것을 알 수 있다. 이처럼 인간과 식물의 chloroplast 내에 존재하는 cyclophilin의 아미노산(Fig. 2)에서는

볼 수 없는 7개 아미노산 잔기의 보존을 통해서 식물의 cytosolic cyclophilin에서만 독특한 기능을 수행하도록 하게끔 하는 영역을 형성한다는 가설을 제안할 수 있다. 또한 박스로 표시된 4지역은 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 활성화에 관여하는(Zydowsky et al., 1992)것으로 보여지며, 그 중 W residue는 인간의 CyP에 존재하는 Trp-121 (Bossard et al., 1991; Buchholz et al., 1994)과 일치한다. Mutagenesis 연구에 의하면 Trp-121(Trp-128; Fig.2)는 PPIase 효소 활성화에 관여하지 않는 CsA 결합에 필요한 residue 로 밝혀졌다(Liu et al., 1991; Zydowsky et al., 1992; Patrick et al., 2004).

Phylogenetic tree 상에서 CyPs는 크게 콩과 식물, 목본을 비롯해 *CICyP2*를 포함한 쌍자엽, 그리고 단자엽 식물끼리 계통 분기를 이루고 있다. 그러나, *CICyP1*의 경우, *A. thaliana*의 ROC2와 가장 높은 수준의 상동성(82%)을 나타내는 동시에, 쌍자엽/단자엽의 구별없이 phylogenetic tree 내에서 *A. thaliana* ROC2, *O. sativa* CyP1와 하나의 계통 분기를 이루고 있다(Fig. 3). 이는 *CICyP1*이 cytosolic cyclophilin 내

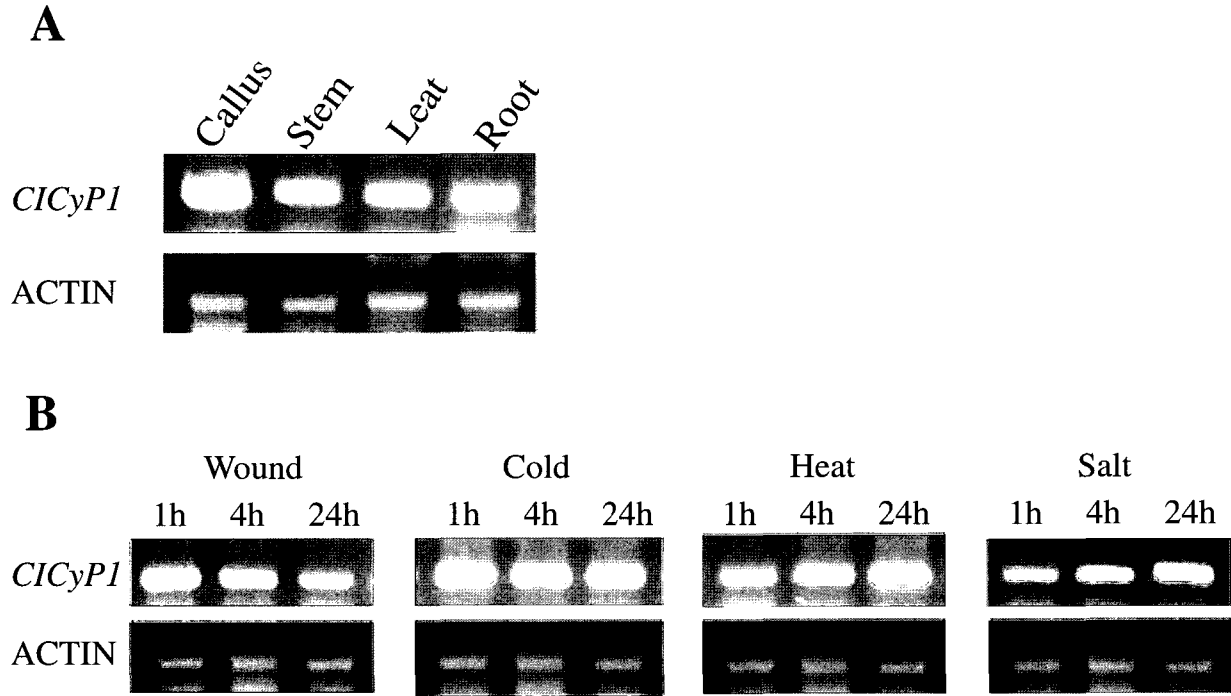


Fig. 4. Transcriptional expression of *CICYPI* in *C. lanceolata*. Tissue-specific expression (A) and stress-responsive expression in root (B).

에서도 특징적인 기능을 가지고 있음을 예측하게 해 준다.

환경 스트레스에 대한 CyP-mRNA의 발현 증가는 콩(Marivet *et al.*, 1992; Luan *et al.*, 1994 a,b), 옥수수(Marivet *et al.*, 1992, 1995; Luan *et al.*, 1994 a), periwinkle 세포 suspensions(Droual *et al.*, 1997) 그리고, 효모(Sykes *et al.*, 1993)에서 확인되어 왔다. 약용 식물인 더덕에서의 스트레스에 따른 cyclophilin 유전자의 발현 유형을 조사하고자 한다. RT-PCR을 이용하여 전사 단계에서의 더덕 조직(callus, 줄기, 잎, 주근)별 *CICYPI*의 발현 차이를 확인한 결과(Figure 4-A), 탈분화 조직인 callus에서는 다른 분화조직에 비해 높은 발현 양상을 보인 반면에, 줄기, 잎, 뿌리의 모든 분화 조직에서는 *CICYPI*이 일정한 양으로 발현하였다. 이는 *CICYPI*이 다른 cyclophilin 유전자와 마찬가지로 식물체 내 조직 전체에 넓게 분포하는 유전자라는 것을 증명하며(Chou and Gasser,

1997; Jackson and Soll, 1999), 나아가 아미노산 서열의 상동성 비교 데이터와 더불어 생물체 전반에 걸쳐 특이적으로 보존된 단백질이라는 사실을 뒷받침한다.

더덕 뿌리를 스트레스 처리시 슬라이스하였으므로 모든 스트레스에 대한 대조구로서 wound 처리 결과를 시간별로 제시하였다. 더덕 뿌리의 *CICYPI* 유전자의 전사량이 wound 스트레스 하에서는 초기에 과량으로 증가하였다가 시간이 흐를수록 점차 감소하였다. 그리고, 고온과 염 스트레스에서 *CICYPI*의 발현양은 시간이 지날수록 증가하였다(Kullertz *et al.*, 1999). 저온 스트레스에서 *CICYPI*의 RT-PCR 밴드는 시간에 관계없이 일정한 양으로 축적되었다. 그러나, wound 스트레스가 병행되었다는 점을 감안할 때, 실제적으로 저온 스트레스에 대한 *CICYPI*의 발현량은 시간에 따라 증가했다고 할 수 있겠다. 이처럼 고등 식물에서 CyPs는 발생단계에서 반응한다

고 알려져 왔으며(Marivet *et al.*, 1994), 빛이나 온도 변화(Luan *et al.*, 1994)에 대한 반응에도 연관된 것으로 보고되어 왔다. 이와 관련해 CyPs의 몇 가지 역할들이 제안되고 있는 가운데, 궁극적으로 단백질 변형시 chaperon 과 같은 역할을 하고 있다고 제시되고 있다. 그 증거로는 *E. coli*의 외막에서 folding (Dartigalongue and Raina, 1998); *drosophila*의 로돕신 동질 이성체의 변형(Stamnes *et al.*, 1991), 사람의 간종양 세포에서의 transferrin 변형(Lodish and Kong, 1990)등이 보고되어 있다.

앞으로 *CiCyPI*와 환경 스트레스 사이의 생리적 관계를 연구하기 위해서는 *CiCyPI* 유전자를 더덕에 도입하여 식물체 전체를 스트레스 처리함으로써 그에 따른 유전자의 발현 패턴과 내성 여부를 확인해야 할 것이다.

적요

더덕 뿌리에서 유래한 EST cDNA library로부터 cyclophilin 유전자와 높은 상동성을 나타내는 full clone cDNA를 얻었다. 더덕의 cyclophilin, *CiCyPI*은 747 bp의 cDNA로 174개의 아미노산을 코딩하는 525 bp의 ORF를 가지고 있다. *CiCyPI*의 아미노산 서열을 분석한 결과, 기존에 보고된 식물들의 cytosolic cyclophilin들과 높은 상동성을 나타내었으며, 여러 식물의 cytosolic CyP의 공통적인 특징인 7개의 아미노산 잔기(KSGKPLH)를 가지고 있었다. RT-PCR 분석 결과, 더덕의 *CiCyPI*은 식물의 조직 전체에서 발현되며, 저온, 고온, 그리고 염 스트레스에 대해 그 발현량이 증가하였다.

사사

본 연구는 농진청 Biogreen 21 사업의 특용작물사업단의 연구지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

- Bossard, M.J., P.L. Koser, M. Brandt, D.J. Bergsma, and M.A. Levy. 1991. A single Trp-121 to Ala-121 mutation in human cyclophilin alters cyclosporin A affinity and peptidyl-prolyl isomerase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1142-1148.
- Buchholz, G., L. Harris-Haller, R.T. DeRose, and T.C. Hall. 1994. Cyclophilins are encoded by small gene family in rice. *Plant Mol. Biol.* 25:837-843.
- Chou, I.T. and C.S. Gasser. 1997. Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol Biol.* 35:873-892.
- Dartigalongue, C., and S. Raina. 1998. A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:3968-3980.
- Droual, A.M., H. Maaroufi, J. Creche, J.C. Chenieux, M. Rideau, and S. Hamdi. 1997. Changes in the accumulation of cytosolic cyclophilin transcripts in cultured periwinkle cells following hormonal and stress treatment. *J. Plant Physiol.* 151:142-150.
- Handschumacher, R.E., M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, and D.W. Speicher. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226:544-547.
- Jackson K. and D. Soll. 1999. Mutations in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol. Gen. Genet.* 262 :830-838.
- Kallen, J., C. Spitzfaden, M.G.M. Zurini, G. Wider, H. Widmer, K. Wuthrich, and M.D. Walkishaw. 1991. Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporine-A determined by X-ray crystallography and NMR-spectroscopy. *Nature* 353:276-279.
- Kern, G., D. Kern, F.X. Schmid, and G. Fischer. 1995. A kinetic analysis of the folding of human carbonic

- anhydrase II and its catalysis by cyclophilin. J. Biol. Chem. 270:740-745.
- Kullertz, G., L. Andreas, R. Peter, S. Angelika, and D. Beate. 1999. Stress-induced expression of cyclophilins in proembryogenic masses of *Digitalis lannata* does not protect against freezing/thawing stress. *Planta* 208:599-605.
- Leonardo, A.M.Z., M.M. Baudo, E.T. Palava, and P. Heino. 1998. Isolation and characterization of a cDNA corresponding to a stress-activated cyclophilin gene in *Solanum commersonii*. J. Exp. Bot. 49:1451-1452.
- Liu, J., C.M. Chen, and C.T. Walsh. 1991. Human and *Escherichia coli* cyclophilins: Sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochem.* 30:2306-2310.
- Lodish, H., and N. Kong. 1990. Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 266:14835-14838.
- Luan, S., M.W. Albers, and S.L. Schreiber. 1994 a. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher-plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:984-988.
- Luan, S., W.S. Lane, and S.L. Schreiber. 1994b. *pCypB*: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* 6:885-892.
- Luan, S., W. Li, F. Rusnak, S.M. Assmann, and S.L. Schreiber. 1993. Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2202-2206.
- Marivet, J., P. Frendo, and G. Burkard. 1992. Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene-expression in maize and bean and sequence analysis of cyclophilin cDNA. *Plant Sci.* 84:171-178.
- Marivet, J., P. Frendo, and G. Burkard. 1995. DNA sequence analysis of a cyclophilin gene from maize: developmental expression and regulation by salicylic acid. *Mol. Gen. Genet.* 247:222-228.
- Marivet, J., M. Margis-Pinheiro, P. Frendo, and G. Burkard. 1994. Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol. Biol.* 26:1181-1189.
- Murashige, I. and V. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nicholas, K.B. and H.B. Nicholas. 1997. GeneDoc : analysis and visualization of genetic variation. <http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.html>
- Patrick, G.N.R., Peter, H., and Julie, E.G. 2004. The arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* 134:1-15.
- Stamnes, M.A., B.H. Shieh, L. Chuman, G.L. Harris, and C.S. Zuker. 1991. The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila rodopsins*. *Cell* 65:219-227.
- Sykes, K., M.J. Gething, and J. Sambrook. 1993. Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5853-5857.
- Takahashi, N., T. Hayano, and M. Suzuki. 1989. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337:473-475.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Walsh, C.T., L.D. Zydowsky, and F.D. McKeon. 1992. Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerase, and blockade of T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267:13115-13118.
- Zydowsky L.D., F.A. Etzkorn, H.Y. Chang, S.B. Ferguson, L.A. Stolz, S.I. Ho and C.T. Walsh. 1992. Active site mutants of human cyclophilin-A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin-

더덕의 Cyclophilin 1 유전자의 분리 및 분석

A binding and calcineurin inhibition. Protein Sci.
1:1092-1099.

(접수일 2004. 2. 28)

(수락일 2004. 8. 13)