

## 단백체를 이용한 애기장대 Cytokinin 유도 단백질의 분석

양영실<sup>1,2</sup>, 차준영<sup>1,2,3</sup>, 네티 엘마와티<sup>1,2</sup>, 정민희<sup>1,2</sup>, 배동원<sup>4</sup>, 이창원<sup>5</sup>, 손대영<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 대학원 응용생명과학부, <sup>2</sup>식물분자생물학 및 유전자조작연구소, <sup>3</sup>환경생명과학 국가핵심 연구센터, <sup>4</sup>공동실험실습관, <sup>5</sup>미생물학과

## Proteomic Analysis of Cytokinin Induced Proteins in *Arabidopsis*

Ying Shi Liang<sup>1,2</sup>, Joon-Yung Cha<sup>1,2,3</sup>, Netty Ermawati<sup>1,2</sup>, Min Hee Jung<sup>1,2</sup>, Dong-Won Bae<sup>4</sup>, Chang-Won Lee<sup>5</sup>, Daeyoung Son<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>3</sup>EBNCRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>4</sup>Central Laboratory, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**ABSTRACT** Cytokinins are essential plant hormones that play crucial roles in various aspects of plant growth and development. To better understand the molecular mechanisms of cytokinin action, we identified cytokinin related proteins by a proteomic approach. Proteins extracted from control and *trans*-zeatin treated *Arabidopsis* seedlings were separated and analyzed by two dimensional gel analysis. Differentially expressed protein spots were identified with peptide mass fingerprinting based on matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and database searching. We obtained ten up-regulated and one down-regulated proteins upon *t*-zeatin treatment. The expression of the following proteins was induced; pollen allergen like protein, L-ascorbate peroxidase, tetrapyrrole methylase family protein, SGT1 protein homolog, disease resistance related protein, maternal embryogenesis control protein, paxneb related protein, glutathione S-transferase and IAA amino acid hydrolase homolog.

**Key words:** MALDI-TOF mass spectrometry, *trans*-zeatin, two-dimensional gel electrophoresis

### 서 론

세포분열은 세포의 생명에 필수적인 과정으로 세포의 증식과 기관의 분화를 조절하여 정확한 형태형성이 일어나게 한다. 식물발달의 전 과정을 통하여 가장 중요한 역할을 하는 세포분열은 빛과 온도와 같은 외부적인 자극과 호르몬과 같은 내부적인 요인에 의하여 조절된다. 식물호르몬 중에서도 cytokinin은 1950년대 세포분열과 기관분화를 촉진하는 것으로 처음 발견된 이래 많은 보고들을 통하여 종자의 발아에서부터 잎의 노화에 이르는 동안 식

물의 전반적인 발달과정동안 매우 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Howell et al. 2003). Cytokinin은 세포의 분열과 엽록체의 발달을 촉진하고 노화를 지연시키며 식물 조직의 분화와 형태를 조절하는 등 식물의 성장과 발달에 매우 중요한 역할을 하는 호르몬임에도 불구하고, 그 작용기작에 관해서는 산발적인 결과만이 보고되고 있다 (Mok and Mok 2001). 작용 기작의 연구에 있어서 가장 큰 문제점은 cytokinin의 작용이 매우 빠르고 특별한 반응이 거의 나타나지 않는다는 것이다. 더욱이 auxin, ethylene, abscisic acid와 같은 식물 호르몬이나, 빛 그리고 온도와 같은 환경적인 자극이 cytokinin 작용을 상승 혹은 억제할 수 있기 때문이다 (Binns 1994). Cytokinin에 대한 분자생

\*Corresponding author Tel 055-751-6028 Fax 055-759-9363

E-mail: dyson@gsnu.ac.kr

물학적 측면에서의 연구는 1980년도 후반에 이르러 시작되었으며, 그 결과 cytokinin이 여러 가지 유전자의 발현을 조절한다는 것이 밝혀졌으며, 수 많은 cytokinin 관련 유전자들이 보고되었다. Cytokinin에 의하여 조절되는 유전자들은 광합성 기능의 효율화에 중요한 역할을 하고 있는 light-harvesting chlorophyll proteins (LHCPs; Longo et al. 1990; Flores and Tobin 1989), RubisCO small subunit (Lebs et al. 1984), nitrate reductase (Lu et al. 1990), 그리고 C<sub>4</sub> 광합성의 탄산농축경로에 관여하는 효소들의 유전자들로 cytokinin이 이들 유전자의 전사량과 mRNA의 안정성을 조절하는 것으로 밝혀졌다 (Suzuki et al. 1994). 세포주기 관련 유전자들인 *cdc2*와 *CycD3* (Menges et al. 2002), 그리고 분열조직의 발달에 관여하는 *STM*과 *KNAT1* 역시 cytokinin 처리에 의하여 발현량이 증가한다고 보고되었다 (Rupp et al. 1999). 또한 Rashotte 등 (2003)의 microarray 실험 결과에 의하면 type A Arabidopsis response regulator (ARR)들과 cytokinin을 분해하는 효소인 cytokinin oxidase를 포함한 최소한 30개의 유전자의 발현이 증가하였으며 peroxidase, kinase 그리고 E3 ubiquitin ligase 등을 포함한 최소한 40개의 유전자의 발현이 감소되는 것으로 밝혀졌다.

Cytokinin의 합성계와 수용체에 관한 정보는 전혀 없었는데, 일본의 Kakimoto (1996)가 T-DNA activation tagging 방법으로 cytokinin-independent mutant를 얻어 이 mutant로부터 cytokinin의 신호 전달계에서 cytokinin receptor로 작용할 것으로 여겨지는 유전자를 분리하였다. 그가 분리한 *CKII* 유전자는 histidine kinase와 homology가 높았으며, 이로써 cytokinin도 에틸렌과 옥신 같이 two component system을 통하여 신호가 전달됨을 시사하였다. 또한, 그는 *CKII* 유전자를 항상 발현시키게 되면 애기장대의 캘러스가 cytokinin이 없이도 성장하는 것으로 보아 *CKII*가 cytokinin 신호전달에 관여한다고 보고하였다 (Kakimoto 1996).

이러한 활발한 연구에도 불구하고 아직까지 이 단순한 분자인 cytokinin이 어떻게 식물의 발달에 관여하는지 그리고, cytokinin의 합성과 수송은 어떻게 해서 이루어지는지 하는 문제들은 여전히 풀리지 않는 숙제로 남아있다. 그러나, 최근 cytokinin의 정보전달계에 관한 해명의 실마리가 보이고 있어, 수년 안에 cytokinin 연구에 큰 진전이 있을 것으로 생각한다.

프로티오믹스는 어떤 현상에 관여하는 단백질을 동정하고 특징을 분석하는데 탁월한 기능을 하는 연구분야로, 최근 유전자 기능 분석의 기술로 가장 주목을 받는 분석 방법이다. 본 연구에서는 프로티오믹스 방법으로 cytokinin 처리에 의하여 발현량에 차이를 보이는 단백질을 동정하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

애기장대 종자를 100% 에탄올로 1분, 4% sodium hypochlorite 용액으로 5분간 살균한 다음 멸균수로 4-5회 충분히 세정한 후 4°C에서 2일간 저온처리하여 *trans*-zeatin (*t*-zeatin)을 각각 0, 0.01, 0.1 그리고 1  $\mu$ M 첨가한 MS 기본 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종하였다. 식물환경 조절실에서 8일간 생육시킨 식물체를 수확하여 액체질소로 냉동시킨 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 생장 조절실 내의 환경조건은 16/8시간 명기/암기 주기로 조절된 광주기 하에서 온도는 25°C, 습도는 70%로 유지되도록 조절하였다.

### 단백질 추출

Cytokinin을 농도별로 처리한 식물체 2 g 씩을 액체질소가 담긴 막자사발에서 완전히 파쇄한 다음, 20 mL의 단백질 추출용액 (0.5 M Tris-HCl pH 8.3, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% NP-40, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM PMSF)을 넣고, 식물체와 용액이 잘 섞이게 하였다. 이 혼합액을 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 100% acetone을 최종농도가 80%되게 첨가하여 -20°C에 30분간 두었다가 3,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 완전히 제거한 다음 80% cold acetone을 첨가하여 유리병으로 마쇄한 후 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 단백질 침전물을 lysis buffer (9.5 M urea, 2% NP-40, 2.8% pharmalyte pH 3~10, 100 mM DTT)에 녹인 후 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 Bradford 방법 (Bradford 1976)으로 단백질을 정량하여 일차원 전기영동의 시료로 사용하였다 (Kim et al. 2001).

### 이차원 전기영동

이차원 전기영동은 O'Farrell (1975)의 방법을 수정하여 실시하였다. 내경 1.8 mm 유리관에 isoelectric focusing (IEF) 겔 용액 (4% acrylamide/bis, 9.5 M urea, 2% NP-40, 2.8% ampholyte; pH 3~10, pH 5~8, pH 4~6)을 15.2 cm 길이가 되게 채운 후, 6시간 중합시켰다. 유리관을 전기영동조에 장착한 후 200  $\mu$ g의 단백질 시료를 loading한 다음 sample overlay solution (8.7 M urea, 2.7% carrier ampholyte, 2% NP-40)으로 중층하였다. 음극 완충액으로는 20 mM NaOH를 그리고 양극 완충액으로는 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 채우고, 250 V, 300 V, 400 V에서 각각 30분, 600 V에서 12시간, 800 V에서 6시간, 그리고 1000 V에서 3시간 일차원 전기

영동을 실시하였다. IEF 전기영동이 끝난 후, 겔을 유리판으로부터 빼내어 equilibration buffer (10% glycerol, 2.5% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml bromophenol blue)로 40분간 평형시킨 후, 12.5% SDS 겔 위에 수평이 되게 얹고, 0.8% low melting agarose 로 고정시켰다. 이차원 전기영동은 25 mM Tris, 195 mM glycine, 0.1% SDS의 running buffer를 사용하여 60 V로 수행하였다.

### Silver 염색

Silver 염색은 Blum 등 (1987)의 방법을 수정하여 실시하였다. SDS 전기영동이 끝난 겔을 즉시 고정액 (50% methanol, 10% acetic acid)에 담구어 3일간 고정시킨 후, sensitivity-enhancing solution (0.02% sodium thiosulfate), silver 염색 용액 (0.2% silver nitrate, 0.027% formaldehyde), developing solution (6% sodium carbonate, 0.0004% thiosulfate, 0.019% formaldehyde)을 단계적으로 처리하여 발색시킨 후 고정액으로 발색을 정지시켰다.

### 단백질 동정

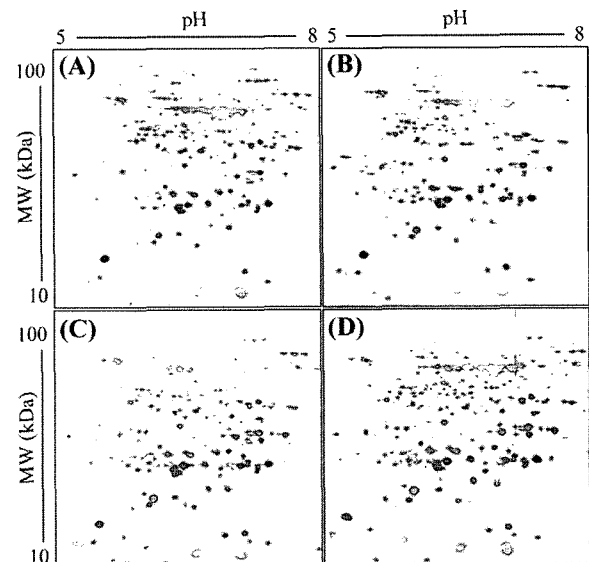
단백질 동정은 MALDI-TOF MS 방식인 Voyager<sup>TM</sup>-DE STR Biospectrometry Workstation을 사용하여 분석하였으며, Jensen 등 (1999)의 방법으로 시료를 처리하였다. 분석하고자 하는 시료를 겔로부터 잘라낸 후, 초순수와 acetonitrile을 1 : 1 비율로 섞은 용액으로 15분간 2회 세정한 후 acetonitrile과  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 에서 각각 5분씩 그리고 acetonitrile과 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 을 1 : 1로 섞은 용액에서 15분간 반응시킨 후 진공건조하였다. 건조시킨 겔 조각을 10 mM DTT/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 로 45분간 56°C에서 환원시키고, 55 mM iodoacetamide/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 에서 30분간 alkylation시킨 다음 진공건조하였다. 건조시킨 겔 조각에 12.5 ng/ $\mu\text{l}$ 의 trypsin을 처리하여 37°C에서 16시간 가수분해시켰다. 펩티드 추출은 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 와 acetonitrile로 1회, 5% formic acid와 acetonitrile로 2회 실시하였다. 추출한 펩티드 용액을 진공건조시킨 후 초순수 : acetonitrile : trifluoroacetic acid를 93 : 5 : 2로 혼합한 용액으로 다시 녹인 다음 solution phase nitrocellulose 방법으로 질량값을 측정하였다 (Landry et al. 2000). 시료 : standard solution : matrix solution을 2 : 1 : 2로 섞은 후 sample loading plate에 loading하였는데, standard solution (bradykinin과 nerrotensin)은 inter calibration을 위하여 사용하였다. Matrix solution은  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (40 mg/ml in acetone), nitrocellulose solution (20 mg/ml nitrocellulose in acetone), 그리고 2-propanol을 2 : 1 : 1로 혼합한 것이다. Loading한 시료 혼합액을 건조시킨 후 5% formic acid로 10초간 그리

고 초순수로 10초간 표면을 세정한 다음 다시 건조시켜 MALDI-TOP MS로 분석하였다. 최소 질량 값은 500 m/z로 하였으며, 질량 값 측정 후 inter calibration시킨 다음 MS-Fit를 이용하여 단백질을 동정하였다.

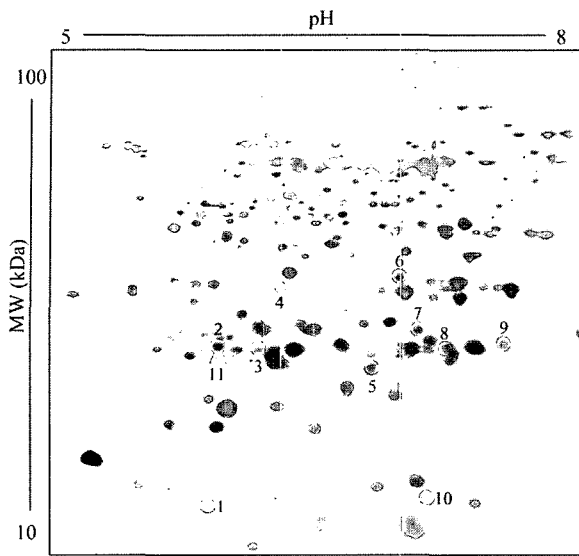
### 결과 및 고찰

Cytokinin은 식물의 성장과 발달을 조절하는 중요한 호르몬이다. 그러므로 cytokinin에 의해 발현이 유도되는 유전자와 단백질의 기능분석은 cytokinin의 작용기작을 이해하는데 매우 중요하다. 본 연구에서는 cytokinin에 의하여 발현이 조절되는 단백질을 분리하기 위하여 0, 0.01, 0.1, 그리고 1  $\mu\text{M}$ 의 *t*-zeatin을 각각 첨가한 배지에서 8일간 생육시킨 애기장대로부터 단백질을 추출하여 프로티움 분석을 하였다. 일차원 전기영동은 pH 3~10, 4~7, 5~8의 세 범위로 나누어 실시하였는데 이 중 단백질이 가장 잘 펠터진 pH 5~8의 겔에 식물체로부터 추출한 200  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 loading하여 일차원 전기영동 한 후, 12.5% SDS 겔에서 이차원 전기영동한 다음 silver 염색을 하였다 (Figure 1).

세 번 이상 반복실험 후 2-D 양상을 분석한 결과, 각 처리구의 전반적인 단백질 발현양상은 같았으나 cytokinin 처리에 의하여 발현량이 증가하는 10개의 단백질 spot들과 발현 양이 감소하는 1개의 단백질 spot을 관찰할 수 있었다

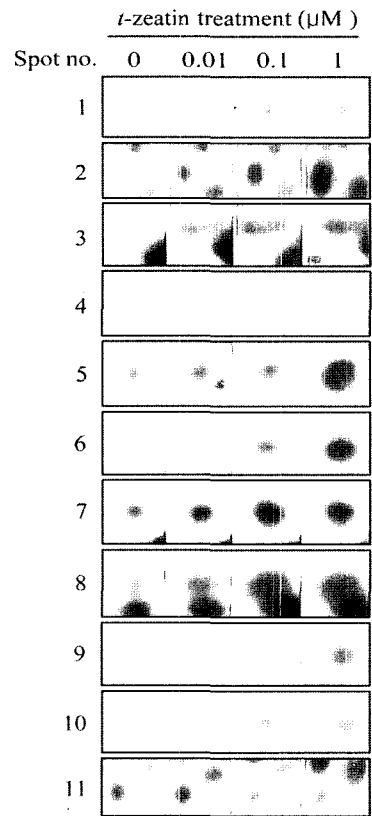


**Figure 1.** Detection of cytokinin regulated proteins by 2-D PAGE. Proteins were extracted from *Arabidopsis* seedlings grown in MS media without *t*-zeatin (A) or with 0.01  $\mu\text{M}$  (B), 0.1  $\mu\text{M}$  (C), and 1  $\mu\text{M}$  *t*-zeatin (D), respectively. In the first dimension (IEF), 200  $\mu\text{g}$  of protein was loaded on a 16 cm IPG strip with a linear gradient of pH 5-8. In the second dimension, 12.5% SDS PAGE gels were used, with a well for Mr standards. Proteins were visualized by silver staining.



**Figure 2.** Silver stained 2-DE gel of proteins extracted from 1  $\mu$ M *t*-zeatin treated *Arabidopsis* seedlings. Numbered spots are differentially expressed proteins. Protein spots indicated were excised, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF MS. Circles represent up-regulated proteins, and triangle represents down regulation.

(Figure 2). Figure 3은 각각의 단백질 spot을 확대한 것으로 cytokinin을 처리하지 않았을 때는 거의 발견되지 않다가 cytokinin 처리 후 농도가 높아질수록 급격하게 발현이 증가하는 단백질 (Spot nos. 3, 6, 10), cytokinin에 관계없이 어느 정도 식물체내에서 발견되고 있다가 cytokinin에 의하여 발현이 급증하는 단백질 (Spot nos. 2, 5, 7, 8, 9), cytokinin의 농도 증가에도 불구하고 발현이 약하게 증가하는 단백질 (Spot nos. 1, 4), 그리고 cytokinin 처리에 의하여 발현량이 감소하는 단백질 (Spot no. 11)로 분류되었다. 이들 단백질을 동정하기 위하여 이차원 전기영동을 한 겔을 silver 염색한 후 단백질 spot을 잘라내어 trypsin을



**Figure 3.** Close-up of the region of the gels showing differential expression of proteins upon different concentration of *t*-zeatin. The names of the proteins differentially expressed are shown in Table 1.

처리한 다음 추출한 펩타이드를 MALDI-TOF MS로 분석하여 얻은 peptide peak 값을 Ms-Fit에서 검색한 결과 Table 1 같은 단백질들이 동정되었다. Spot no. 1은 cytokinin의 농도가 증가함에 따라 발현양이 증가하는 단백질로 pollen allergen like protein으로 동정되었다. Crowell (1994)은 대두의 현탁배양세포에 cytokinin을 처리하여 증

**Table 1.** Proteins identified by MALDI-TOF MS analysis

Spot	Arabidopsis protein name	Accession number	Sequence coverage (%)	pI	MW (kDa)
1	Pollen allergen-like protein	gi 21593946	37	5.2	17.05
2	L-ascorbate peroxidase	gi 21554322	37	5.7	27.56
3	Tetrapyrrole methylase family protein	gi 7767663	14	5.6	40.67
4	SGT1 protein homolog	gi 17369179	8	4.8	73.16
5	Disease resistance related protein	gi 42568208	12	5.1	43.46
6	Maternal embryogenesis control protein	gi 30913012	12	5.3	79.31
7	Paxneb related-protein	gi 12321866	11	8.1	38.73
8	Glutathione S-transferase	gi 6056409	19	5.8	23.49
9	Glutathione S-transferase	gi 2266412	22	6.3	23.55
10	IAA-amino acid hydrolase homolog 2 precursor	gi 21264464	10	6.4	47.86
11	Unknown protein	gi 23297278	25	5.0	25.62

가하는 유전자들을 분리하였는데, 그 중 BA 처리에 의하여 4시간 내에 약 20배 이상 증가한 *cim 1* 유전자가 페레니얼 라이그라스 (*Lolium perenne* L.)의 pollen allergen cDNA 와 40% 유사한 것으로 나타났다. Cytokinin과 꽃가루 알레르겐의 직접적인 연관성에 대하여 아직까지는 밝혀져 있지 않으나 본 연구 결과 애기장대의 꽃가루 알레르겐도 cytokinin에 의하여 발현이 증가함을 알 수 있었다. Spot no. 2 는 항산화효소 중의 하나인 L-ascorbate peroxidase로 밝혀졌는데 cytokinin 처리를 하지 않았을 때는 거의 발현되지 않다가 0.01  $\mu$ M의 *t*-zeatin처리부터 발현양이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 엽록체의 생합성에 관여하는 tetrapyrrole methylase family protein (Spot no. 3), disease resistance related protein (Spot no. 5), maternal embryogenesis control protein (Spot no. 6), paxneb related protein (Spot no. 7), 그리고 IAA hydrolase homolog (Spot no. 10) 역시 처리한 cytokinin의 농도가 높아질수록 발현양이 증가하였다. Spot no. 4는 ubiquitin ligase 결합 단백질인 SGT1과 유사성이 높은 것으로 나타났는데 이 단백질은 식물이 NBS-LRR (nucleotide-binding site/leucine-rich repeat) 계통의 R단백질에 의해 매개되는 병 저항성을 갖는데 꼭 필요한 성분이다 (Muskett and Parker 2003). GST는 여러 가지 기능을 하는 큰 단백질 family로 광범위한 생물적, 비생물적 스트레스들이 식물의 GST 발현을 유도하는 것으로 밝혀져 있으며 특히 식물 세포를 oxidative damage로부터 보호하는 중요한 역할을 한다 (Kilili et al. 2004). Bianchi 등 (2002)의 연구결과에 의하면 가뭄에 의하여 발현이 유도되는 GST8은 oxidative stress와 auxin 및 cytokinin 처리에 의하여 발현이 증가한다고 하였다.

Cytokinin은 지금까지 주로 식물의 발달과 성장에 관여하는 호르몬으로 알려져 있으며 oxidative stress에 관한 연구 결과는 많지 않다. 최근 Dulmus와 Kadioglu (2005)는 BA를 전 처리한 옥수수 잎에 paraquat을 처리하면 이 제초제에 의한 chlorophyll과 carotenoid의 감소가 지연된다는 결과와 함께 식물체에 cytokinin을 처리하면 superoxide dismutase와 peroxidase의 활성이 높아져서 oxidative stress에 대한 내성을 갖게 된다고 발표하였다. 본 연구 결과 얻어진 L-ascorbate peroxidase와 GST들은 cytokinin의 oxidative stress에서의 역할을 구명할 수 있는 좋은 재료가 되리라 생각된다.

## 적 요

Cytokinin은 식물의 성장과 발달에 중요한 역할을 하는 필수 호르몬이다. Cytokinin의 작용 기작을 이해하기 위하여 단백체를 이용하여 cytokinin 관련 단백질들을 동정하였다. 대조구와 *t*-zeatin을 처리한 애기장대로부터 추출한 단

백질을 이차원 전기영동하여 분석하였다. 발현양에 차이가 있는 단백질 spot들을 MALDI-TOF 단백질 질량분석기와 database 검색을 통하여 동정하였다. 그 결과 *t*-zeatin 처리에 의하여 발현이 증가하는 10개의 단백질과 감소하는 10개의 단백질을 분리할 수 있었다. Cytokinin에 의하여 발현이 증가하는 단백질은 pollen allergen like protein, L-ascorbate peroxidase, tetrapyrrole methylase family protein, SGT1 protein homolog, disease resistance related protein, maternal embryogenesis control protein, paxneb related protein, glutathione S-transferase, 그리고 IAA amino acid hydrolase homolog들로 밝혀졌다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R04-2000-000-00024-0)와 환경생명과학 국가핵심 연구센터 (R15-2003-012-01001-0) 지원으로 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Bianchi MW, Roux C, Vartanian N (2002) Drought regulation of GST8, encoding the Arabidopsis homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. *Physiol Plant* 116: 96-105
- Binns AN (1994) Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 197-209
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Crowell DN (1994) Cytokinin regulation of a soybean pollen allergen gene. *Plant Mol Biol* 25: 829-835
- Durmus N, Kadioglu A (2005) Reduction of paraquat toxicity in maize leaves by benzyladenine. *Acta Biol Hung* 56: 97-107
- Flores S, Tobin EM (1989) Cytokinin modulation of LHCP mRNA levels: the involvement of post-transcriptional regulation. *Plant Mol Biol* 11: 409-415
- Howell SH, Lall S, Che P (2003) Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci* 8: 453-459
- Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, Mann M. (1999) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol Biol* 112: 513-530
- Kakimoto T (1996) CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985

- Kilili KG, Atanassova N, Vardanyan A, Clatot N, Al-Sabarna K, Kanellopoulos PN, Makris AM, Kampranis SC (2004) Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J Biol Chem* 279: 24540-24551
- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY (2001) Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22: 2103-2109
- Landry F, Lombardo CR, Smith JW (2000) A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection. *Anal Biochem* 279: 1-8
- Lebs S, Lebs W, Klyachko NL, Romanko EG, Kulaeva ON, Wollgiehn R, Parthier B (1984) Gene expression in cytokinin- and light-mediated plastogenesis of cucurbita cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 162: 289-298
- Longo GP, Bracale M, Rossi G, Longo CP (1990) Benzyladenine induces the appearance of LHCP-mRNA and of the relevant protein in dark-grown excised watermelon cotyledons. *Plant Mol Biol* 14: 569-573
- Lu JL, Ertl JR, Chen CM (1990) Cytokinin enhancement of the light incubation of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Mol Biol* 14: 585-594
- Menges M, Hennig L, Gruißsem W, Murray JA (2002) Cell cycle regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 41987-42002
- Mok DW, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Muskett P, Parker J (2003) Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signalling. *Microbes Infect* 5: 969-976
- O'Farrell, PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem* 250: 4007-4021
- Rashotte AM, Carson SD, To JP, Kieber JJ (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1998-2011
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schrüßling T (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNATI homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* 18: 557-563
- Suzuki I, Crétin C, Omata T, Sugiyama T (1994) Transcriptional and posttranscriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenol-pyruvate carboxylase gene in maize. *Plant Physiol* 105: 1223-1229

(접수일자 2005년 9월 14일, 수리일자 2005년 11월 7일)