

Structural Organization of Calmodulin Gene and Expression in Transgenic plants

최 영 주

부산여자대학교 식품영양학과

1. 서 론

생물이 외부의 자극(신호)을 받아 세포내에서 최종 반응이 일어나기 까지의 과정을 신호전달(signal transduction)이라고 한다. 세포가 이러한 신호들을 어떻게 인지하고 세포내의 반응(response)으로 어떻게 전환하는가 하는 문제는 최근 가장 흥미 있는 연구분야 중의 하나이다.

신호전달과정의 연구는 calcium이 messenger로서 작용한다고 밝혀진 후로¹⁻⁴⁾ 식물에서 Ca^{++} -messenger system에 대한 생화학적 및 분자생물학적 분야에서의 연구는 급속하게 발전하게 되었다. 식물 세포에서 calcium 이온들의 많은 작용은 EF hand family로서 알려진 calcium binding protein (calmodulin)에 의해서 조절된다⁵⁾.

Calmodulin (CaM)은 highly conserve 되어 있으며, 4

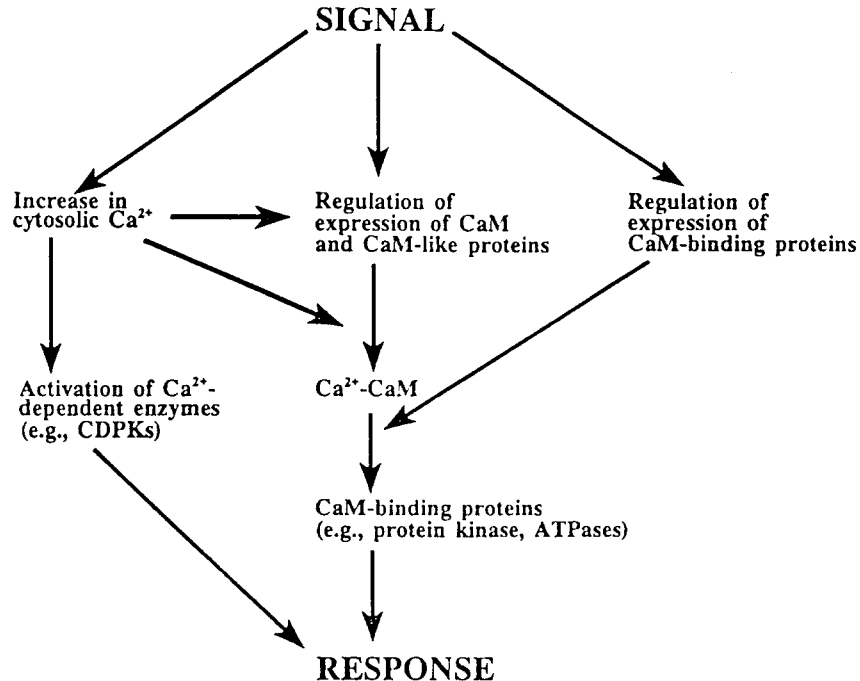


Fig. 1. Schematic illustration of the proposed events involving Ca^{2+} , CaM, and CBP in signal transduction. Signals induce changes in cytosolic Ca^{2+} and these changes in cytosolic Ca^{2+} are transmitted to the metabolic machinery through CBP.

개의 calcium binding domain^{2,51}을 가진 ubiquitous한 단백질이다. Calmodulin이 calcium과 결합하면 구조적인 변화가 일어나서 효소와 상호 작용하는 것으로 밝혀져 있다. Ca⁺⁺-CaM 복합체는 protein kinase에 의해서 단백질의 인산화 및 탈인산화를 통하여 직접 또는 간접적으로 효소의 활성을 조절할 수 있다^{2,5-7}). CaM은 많은 생리적인 과정을 조절하는 것으로 밝혀져 있으며⁵), 식물에서 최근 CaM 또는 CaM related 단백질이 여러가지 물리 화학적인 신호에 대응해서 반응하는 것으로 알려져 있다. 이러한 CaM 유전자의 발현에 대한 auxin 및 빛과 같은 신호의 영향에 관해서 딸기나 옥수수 뿌리에서 연구되었다⁹). 사과나무에서는 CaM의 발현이 wounding에 의해서 현저히 유도되며⁹), *Arabidopsis*에서 CaM 또는 CaM related 유전자의 발현이 환경적인 자극(touch, wind, rain, wounding)에 의해서 급속히 증가된다¹⁰). 대부분 CaM 유전자에 대한 이러한 연구들은 transcription 수준에서 연구되고 있으며, 또한 CaM 유전자를 methylation 등에 의하여 변형시킨 후 calcium과의 친화력에 관해서 주로 연구하였으며, 이에 비해 calmodulin 유전자의 발현을 조절하는 promoter에 관한 연구는 거의 없다.

본 연구는 calmodulin 유전자의 발현에 미치는 calcium, EGTA, calcium ionophore 및 calmodulin antagonist의 영향과 또한 외부신호(light, wounding), chemical (salicylic acid, ethylene, sucrose) 및 auxin 등의 영향을 reporter (CAT, GUS)와 유전자의 분석에 의해서 CaM 유전자의 발현기작을 규명하고자 하였으며, 또한 calmodulin 유전자의 organ-specific 발현 및 calmodulin의 새로운 생리적인 기능도 연구하고자 하였다.

2. Calmodulin 유전자의 구조 및 발현

1) CaM 유전자의 아미노산 sequence

시금치와 밀의 CaM 아미노산 순서가 단백질의 sequencing에 의해서 처음 보고 되었다^{11,12}). Calmodulin을 code 하는 cDNA 및 genomic clone이 *Chlamydomonas*¹³), 감자⁸), 보리^{14,15}), *Arabidopsis*^{10,16,17}), petunia¹⁸), alfalfa¹⁹), 토마토²⁰), 수도²¹) 및 사과나무⁹)에서 분리되었다. 동물의 CaM 아미노산 순서와 여러식물의 CaM 및 CaM-related 단백질의 아미노산 sequence에 대한 비교는 Fig.2에 나타

나왔다.

여러 식물로 부터 분리된 CaM은 아미노산 순서에서 92% 이상의 homology를 가지고 있으며 비록 식물의 CaM이 몇가지 독특한 성질을 가지고 있지만 동물의 CaM과 거의 동일한 기능을 가지고 있다. 효모의 CaM 유전자의 아미노산 순서는 다른 척추동물의 CaM과 60%의 동일성을 나타내었다²²). 그런데 CaM 유전자가 결핍된 효모세포에서는 정상적인 증식을 할 수 없으며 이러한 CaM이 결핍된 세포에 척추동물의 CaM 유전자의 대량생산은 효모의 증식을 정상적으로 회복시켰다²³). 이러한 결과는 CaM 유전자의 상당한 구조적인 차이에도 불구하고 기능적으로는 매우 유사하다는 것을 의미한다. cDNA 및 genomic clone의 이러한 연구는 CaM 유전자의 발현을 분석하는데 많은 도움을 줄 수 있다.

2) Transcription 수준에서의 CaM 유전자 발현

최근 연구에서 CaM 또는 CaM-related 유전자들이 외부 신호에 대응해서 반응하는 것으로 알려져 있다. 여러가지 물리적 및 화학적인 신호는 CaM과 CaM 관련 유전자들의 mRNA를 유도하는 것으로 보고되었다. Jena 등⁸)은 감자의 CaM cDNA probe를 사용하여 딸기에 auxin-response 및 Merit corn 뿌리에서 light-response의 효과를 연구하였다. CaM message의 높은 수준은 auxin이 처리된 딸기에서 발견되었으며 빛으로 처리된 Merit corn 뿌리는 암상태보다 CaM mRNA 수준이 유도되었다. *Arabidopsis*에서 Braam과 Davis¹⁰)는 touch, wind, rain 및 wounding 같은 다양한 자극에 대응해서 4개의 cDNA(TCH1, TCH2, TCH3, TCH4)에 대한 mRNA의 응답은 빠른 유도를 (10~30min) 나타내는 것으로 보고하였다. 4개의 유전자 중에서 TCH1은 CaM으로 확인되었고 TCH2와 3은 CaM 관련 유전자로 확인되었다. 사과에서 CaM의 발현은 wounding에 의해서 현저히 유도되었다⁹). 이러한 결과는 물리적 또는 화학적 신호가 CaM 유전자의 발현을 유도하는 것을 의미하며, 또한 cytosolic calcium에 의해서도 어떤 touch 유전자가 조절되는 것으로 알려져 있다²⁴).

최근 *Arabidopsis*와 수도의 연구에서 CaM 유전자가 multiple 유전자에 code 되어있는 것으로 밝혀졌다^{16,17,21}). *Arabidopsis* (6CaM 유전자)와 수도(2CaM 유전자)에서 이러한 유전자들의 발현은 differentially 조절되는 것으로

Ca⁺⁺ BINDING DOMAIN

	* * * * *	
ADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSL		Rice (CaM-1)
-----S-----		Rice (CaM-2)
-----E--S-----		Arabidopsis (ACaM-2)
-----E-----		Alfalfa
-----E-----		Barley (BCaM-3)
-E--EE-----		Wheat
-----EE-----T-----		Potato (pPCM-1)
-ER-SEE-----R-----M-----		Chick (CM-1)
		Rat testis (CaM)
	* * * * *	
GQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARK		Rice (CaM-1)
-----S-A-Q-----		Rice (CaM-2)
-----VG-----S-----S-----		Arabidopsis (ACaM-2)
		Alfalfa
		Barley (BCaM-3)
		Wheat
		Potato (pPCM-1)
		Chick (CM-1)
		Rat testis (CaM)
	* * * * *	
MKDTDSEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNL		Rice (CaM-1)
-----K-----		Rice (CaM-2)
-----IR-----G-Y-----		Arabidopsis (ACaM-2)
-R-S-----IR-----G-Y-----		Alfalfa
		Barley (BCaM-3)
		Wheat
		Potato (pPCM-1)
		Chick (CM-1)
		Rat testis (CaM)
	* * * * *	
GEKLTDEEVDEMIREADVDGDGQINYEEFVKVMAK		Rice (CaM-1)
-----K-----		Rice (CaM-2)
-----I-----V-----RM-L-----		Arabidopsis (ACaM-2)
-----I-----V-----QM-T-----		Alfalfa
-----K--CNN--V-----RM-TQ-----		Barley (BCaM-3)
		Wheat
		Potato (PCM-1)
		Chick (CM-1)
		Rat testis (CaM)

Fig. 2. Amino acid sequence comparison of CaM from plants and animals. Amino acids that are believed to be involved in Ca-binding are denoted by asterisks. Hyphens indicate the identities in amino acid.

밝혀졌다. 예를들면, ACaM1은 뿌리에서 발현되는데 비해 ACaM2 와 3은 발현되지 않았다. 이러한 결과는 여러 CaM 유전자가 다른 조절인자를 가지고 있는 것으로 추정된다. 사람에게는 동일한 단백질을 code하는 3개의 CaM 유전자가 밝혀져 있다²⁵⁾.

TCH1의 아미노산 순서는 ACaM2 및 3과 동일하였다. *Arabidopsis*의 CaM 유전자들은 touch에 의해서 유도되었지만 kinetic은 유전자에 따라 차이가 있는 것으로 보고되었다¹⁰⁾.

3) Interving sequencing

ACaM3 유전자는 coding region이 하나의 intron(491 bp)에 의해서 25번째 아미노산 부터 interrupted 되어있으며, 수도에서는 Southern blot에 의해서 적어도 4개의 CaM 및 CaM-related 유전자가 존재하는 것을 확인되었으며²¹⁾ 그 중 2개의 CaM 유전자를 분리하고 sequencing 하였다. RCaM1과 2의 아미노산 순서는 139번째 아미노산을 제외하고는 동일하였으며, 두개의 RCaM 유전자는 각각 하나의 intron(1600bp, 780bp)을 함유하고 있으며 25번째 아미노산에서 interrupted 되어있었다. 사과에서 CaM-coding sequence는 25번째 아미노산에서 하나의 in-

tron(860bp)에 의해서 interrupted 되어있다. 이와 같이 고등식물에서는 intron의 수와 위치는 conserve 되어있다. *Chlamydomonas*의 CaM 유전자는 5개의 intron을 가진 단일 유전자에 의해서 coding 되어 있으며 첫번째 intron의 위치는 *Arabidopsis*, 수도 및 사과나무에서 동일하였다. 포유동물의 CaM 유전자에는 여러개의 intron이 존재하며 intron의 크기도 상당히 conserve 되어있지만 25번째에서 부터 하나의 intron을 가진것은 발견되지 않았다.

4) CaM-related 단백질

CaM외에 CaM related 유전자가 식물에서 발견되었다. *Arabidopsis*에서 고등식물과 65%의 아미노산 유사성을 가지는 CaM-like 단백질에 대한 cDNA가 분리되었다. Braam과 Davis¹⁰⁾는 CaM-related 단백질을 coding 하는 2개의 partial cDNA (TCH2,TCH3)를 분리하였으며 CaM과 40% 및 70%의 아미노산 유사성을 각각 나타내었다. 또한 CaM-related cDNA가 *petunia*에서도 분리되었으며 그것은 C-말단에서 35개의 아미노산이 extra 영역에 포함되어 있었다¹⁸⁾. *Petunia*의 CaM-like단백질의 extra domain에서는 아미노산 잔기의 40%가 positively charged 되어있다. 이러한 CaM-like protein의 중요성 및 역할

Table 1. Comparison of putative promoter sequences of rice CaM genes(RCaM-1 and RCaM-2) with other CaM promoter sequences.

*Indicates a non-consensus TATA box sequence.

Gene	TATA box	CAAT box	Repeats/palindromes	Conserved GC rich region ^a	CREB/AP-2 ^b	HSE ^c	AGGA ^d
Rice							
RCaM-1	+	-	+/+	+	-	-	+
RCaM-2	-	-117	+/+	+	+/+	-	+
Human							
Cam III	-	-174	+/-	+	-	-	+
Rat							
Cam I	-	-	-	+	-	-	+
Cam II	*	-	+/+	+	+/+	-	+
Cam III	-	-	+/+	+	-	-	+
Chicken							
Cam III	*	-	-	+	+/-	-	+
<i>Drosophila</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>Chlamydomonas</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>Arabidopsis</i>	+	-130	+/+	-	+/+	+	-

^aRegions containing >60% G+C; ^bcyclic AMP regulatory element binding site; ^cheat shock promoter sequence elements; ^didentified in CaM gene promoters.

은 현재까지 밝혀지지 않았다.

5) Putative CaM promoter sequence

RCaM-1과 RCaM-2 promoter 영역의 1Kb정도의 염기 순서가 결정되었으며²¹⁾ putative *cis*-activating 조절인자에 대해서 연구되었다(Table 1). RCaM 유전자의 promoter 영역은 몇몇 동물에서 보고되었지만 식물에서는 *Arabidopsis* ACaM-3 promoter가 연구되었다. ACaM3 promoter는 동물 CaM 유전자 promoter에서 발견되는 몇개의 conserve된 형태가 결핍되어 있었다.

RCaM promoter의 전체적인 형태는 *Arabidopsis* promoter보다는 동물의 promoter와 유사하였다. *Arabidopsis* CaM-3 유전자의 5'-flanking의 염기순서는 AT rich (70% A+T)였으며 동물 CaM 유전자에서 발견되는 GC repeat가 결핍되어 있었다.

*Arabidopsis*의 ACaM-3 유전자와는 대조적으로 수도의 CaM promoter는 GC repeat영역이 존재하였다²¹⁾. RCaM-1의 putative promoter 영역에는 TATA box를 함유하지만 RCaM-2 promoter의 5'-flanking 영역에는 CAAT box와 cyclic AMP조절인자의 binding site가 존재하였다. 이러한 결과는 RCaM 유전자가 척추동물에서 보고된 것

처럼 CaM 유전자 발현은 RCaM의 두 isoform 사이에 차이가 있음을 시사하고 있다.

3. Transgenic plant에서 CaM promoter의 발현

1) Transgenic 식물의 여러조직에서 수도의 CaM promoter의 발현

Chimeric RCaM promoter-CAT 유전자를 함유한 transgenic 담배에서 CAT 활성이 여러 vegetative 및 reproductive 기관에서 측정되었다. Fig. 3A에 나타난 바와같이 RCaM-1 promoter의 활성은 다른 기관에 비해 꽃이나 어린 seed에서 높게 나타났으며 RCaM-2 promoter의 활성은 stem, petiole, flower 등 reproductive 기관을함유한 어린 기관에서 높게 나타났다. 또한 어린 잎의 경우 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 어린 잎의 petiole이나 vein에서 높게 나타났으며 잎 blade에서 낮게 나타났다. 성숙한 담배 잎에서는 어느 조직에서도 발현되지 않았다. 이러한 결과는 CaM-promoter가 vegetative 및 reproductive 기관을 함유한 어린 조직에서만 발현되며 또한 RCaM promoter-1,2의 활성이 서로 다르게 발현 됨을 나타내고 있다.

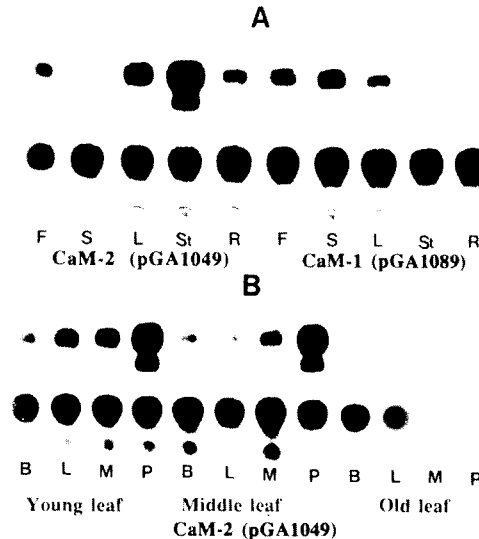


Fig. 3. Expression of CAT reporter gene by the RCaM promoters in transgenic tobacco plants.

(A) Expression in vegetative and reproductive organs. F, flower ; S, seed ; L, Young leaf ; St, stem ; R, roots.

(B) Expression in young, middle and old leaf. P, petiole ; M, main vein ; L, lateral vein ; B, leaf blade.

2) RCaM promoter의 발현에 대한 여러가지 chemical의 효과

T-DNA 유전자는 식물호르몬 즉 auxin이나 cytokinin이 풍부한 tumor조직에서 강하게 전사된다. 본 연구는 RCaM promoter에 대한 식물호르몬의 효과를 조사하였다. 여러 가지 연구된 식물호르몬 중에서 2,4-D가 RCaM-2 promoter 활성화에 가장 효과가 있었으며(Fig. 4D), RCaM-1 promoter는 앞에서는 거의 발현되지 않았으며(not shown data), 또한 호르몬에 의해서도 RCaM-2 promoter와 달리 거의 유도되지 않았다. auxin의 효과는 auxin이 여러 활성기관에서 promoter활성을 증가시키기 때문에 거의 모든 식물에 일반화 되어 있다. CaMV 35S promoter의 활성화

어떤 성장 호르몬에 의해서 증가되지 않는 반면 NOS-promoter의 경우는 호르몬에 의해서 현저히 증가 되는 것으로 알려져 있다. RCaM-2 promoter의 발현에 대한 sucrose, ethephon 및 salicylic acid의 효과도 어린잎에서 연구되었다(Fig. 4A, B, C.). RCaM-2 promoter의 활성화는 sucrose 및 salicylic acid에 의해서는 현저히 증가되었지만 식물의 노후화에 관련된 ethephon의 처리에 의해서 현저히 RCaM-2 promoter의 활성이 저해되었다. 이러한 결과는 RCaM-2 promoter가 developmental stage나 signal에 의해서 조절되며 초기 세포의 생육과도 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다.

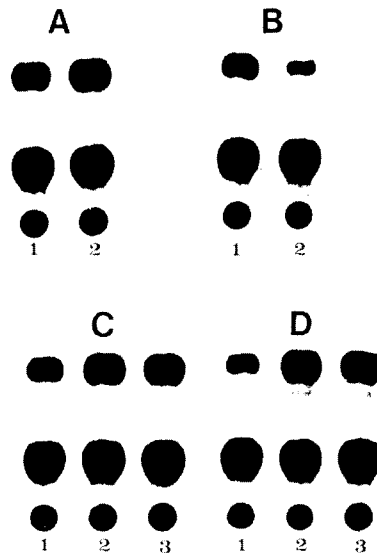


Fig. 4. Induction of CaM promoter by various chemical treatment in transgenic leaf sections.

(A) Salicylic acid, (B) Ethephon, (C) Sucrose, (D) 2,4-D. 1, Control ; 2, 24 hrs treatment (ethephon 30min) ; 3, 48 hrs treatment.(leaf sections were floated on the solution containing chemicals).

3) CaM promoter의 발현에 대한 light 및 dark의 영향

RCaM promoter의 활성화에 대한 light의 효과를 연구하기 위해서 transgenic 담배의 어린잎이 dark 및 light로 처리되었다(not shown data). RCaM-2 promoter의 활성화는 dark상태에서 light 상태에 비해 약간 높게 나타났다.

CaM발현이 어떤 step에서 영향을 받는지는 모르지만 CaM promoter활성에 있어서의 증가는 dark상태의 어린잎에서 CaM mRNA의 높은 수준에 기인 하는 것으로 생각된다. 그런데 Jena등⁸⁾은 Merit corn root tip으로 행한 실험에서는 오히려 light로 처리된 root tip에서 높게 나타났다. Zielinski²⁶⁾는 보리 잎에서 dark상태에서 CaM mRNA가 증가함을 보고 하였다. 이러한 차이는 실험재료

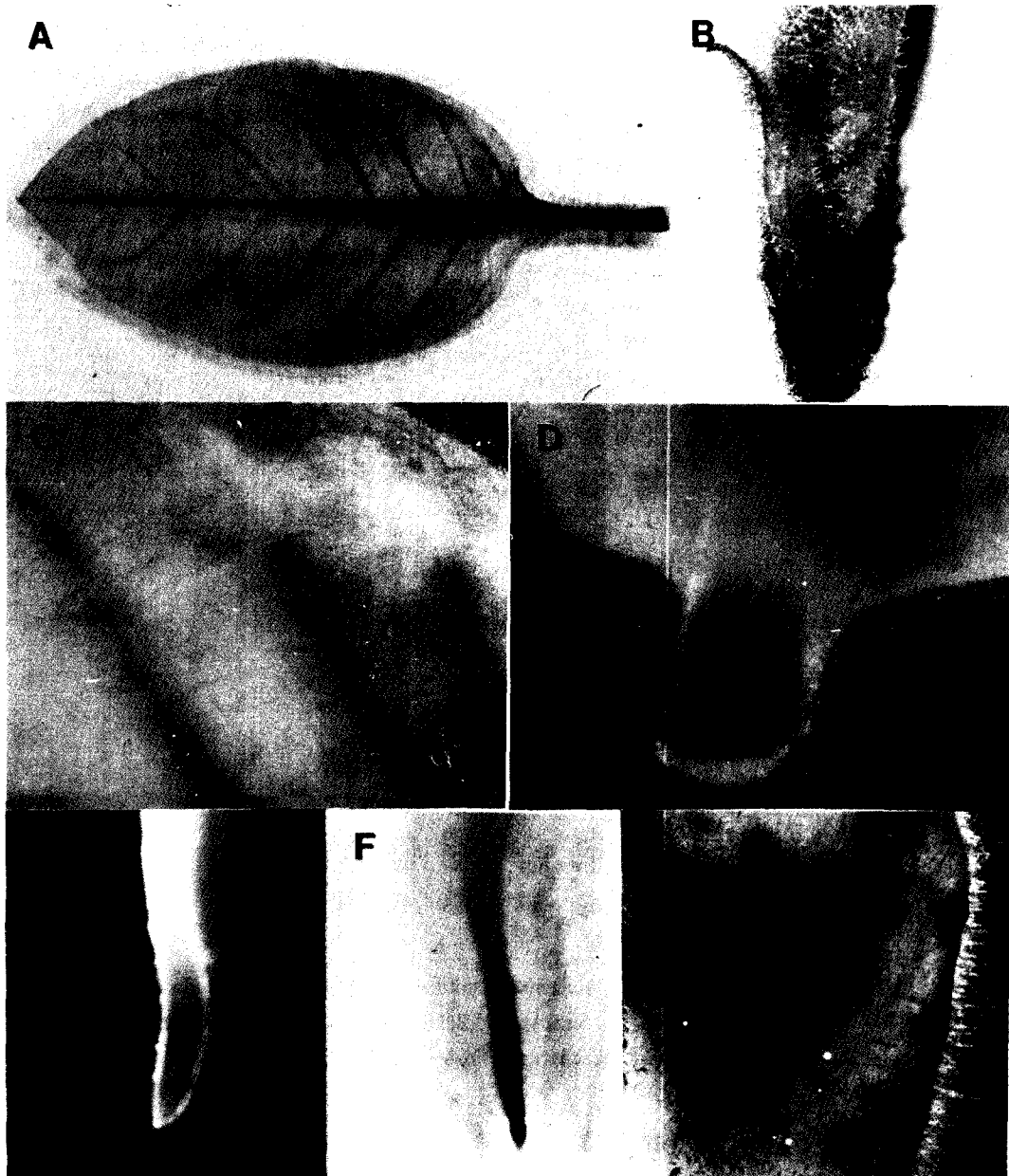


Fig. 5. GUS expression in transgenic tobacco plants transformed with the RCaM-2 promoter-GUS fusion gene. A, young leaf ; B, Stem ; C, lateral vein; D, petiole ; E, root ; F, root tip ; G, wounding(10min).

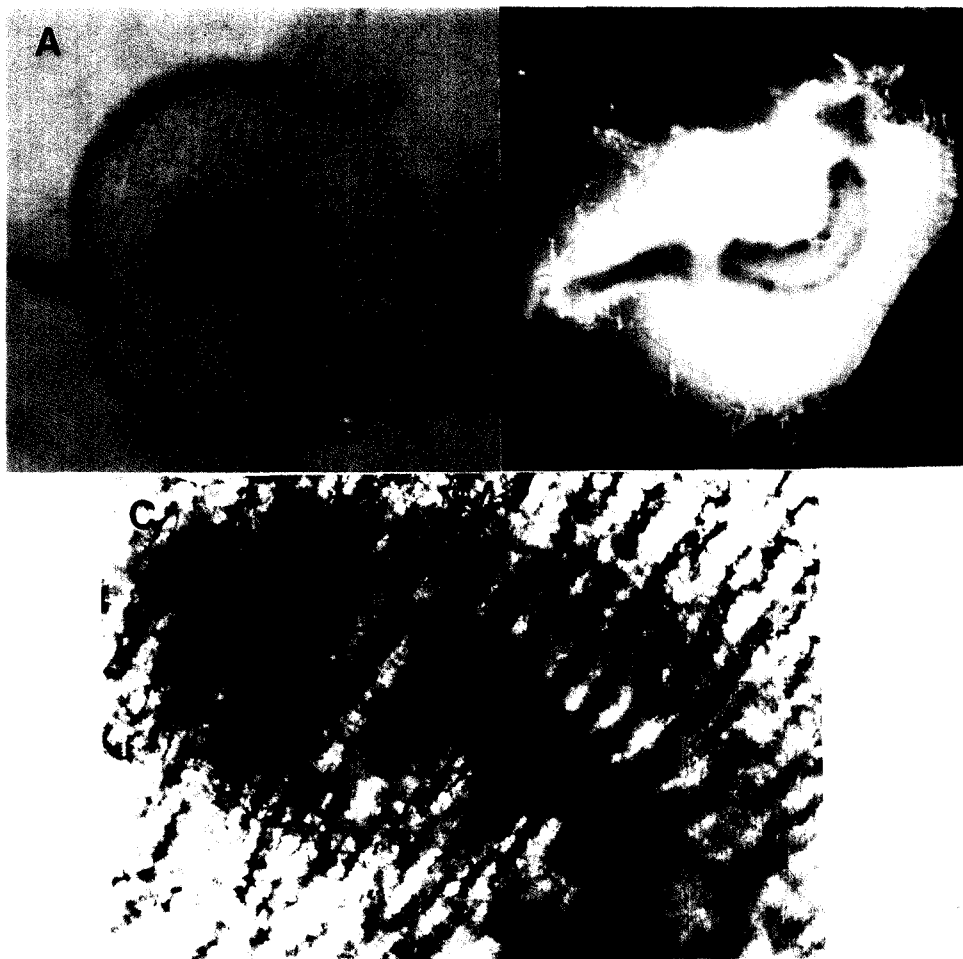


Fig. 6. Histochemical localization of GUS expression in transformed plant tissues. A, transverse section of petiole ; B, transverse section of main vein ; C, expanded picture of the section A.

로 사용한 시료의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

4) RCaM-promoter의 발현에 대한 calcium depletion, Calcium channel blocker, calmodulin antagonists의 효과

CaM 유전자의 발현조절에 대한 calcium의 역할을 연구하기 위해 calcium 수준을 조절하기 위해 동물 및 식물에서 널리 사용되고 있는 ionophore 및 calcium channel blocker를 사용하였다^{2,27~30}. EGTA 및 ionomycin에 의한 calcium의 고갈은 CAT활성을 결과적으로 감소시켰다. 그런데 CaMV 35S의 경우는 calcium 고갈에 의해서 영향을 받지 않았다. 게다가 calcium channel blocker인 verapamil은 reporter 유전자의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 calmodulin 유전자 발현에 calcium이 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있다.

5) Transgenic 담배에서 RCaM promoter-GUS fusion 유전자의 발현

식물에서 RCaM의 발현조절기작을 연구하기 위해 RCaM-2 promoter와 GUS reporter 유전자로 이루어진 fusion 유전자는 구축하였다. 왜냐하면 CAT reporter 유전자보다는 GUS 활성의 발현은 histochemically 쉽게 발견할 수 있기 때문이다³¹. 수도 CaM-2 유전자의 1,2Kb 5'upstream region이 GUS coding 염기 순서에 fuse되었다. 이 fusion 유전자는 *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformatin에 의해서 담배에 도입되었다.

Kanamycin(10 μ g/ml) 저항성에 의해서 선발된 transgenic 식물은 3% sucrose를 함유한 MS배지에서 성장되고 RCaM promoter-GUS 유전자 발현 형태를 연구하기 위해서 X-glu(5-bromo-4-chloro-3-indolyglucuronide)로 염색되었다. Fig. 5에 나타는 바와 같이 어린 잎의 stem, petiole, root tip, vein과 같은 기관에서 선택적으로 많이 발현되었다. 특히 RCaM-2 promoter의 활성은 wounding(10min)에 의해서 현저히 유도 되었다. 이러한 결과는 세포분열이 왕성하게 일어나는 성장점에서 CaM이 많이 발현되는 것으로 보아 CaM유전자의 발현은 cell 성장과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다. 그런데 RCaM-1 promoter의 발현은 CAT분석에 의해서 나타난 바와 같이 flower를 제외한 다른 기관에서는 거의 발현되지 않았다. 이러한 결과는 두개의 RCaM promoter의 조절기작이 서로

다르며 식물에서 multiple CaM isoform 사이의 기능적인 차이가 있음을 시사하고 있다. Poovaiah와 Raddy^{2,32} 및 Robert 등⁵은 calmodulin이 식물의 모든 부분에서 발견된다고 하였지만 calmodulin의 수준은 식물의 여러 조직에서 차이가 있었다. Reporter 유전자를 사용한 transgenic 담배에서 얻은 우리의 실험결과는 수도의 CaM 유전자가 서로 다르게 조절됨을 나타내었다.

6) GUS 발현에 대한 Histochemical 분석

RCaM promoter-GUS fusion 유전자로 형질전환된 transgenic 담배의 petiole에서 GUS 활성에 대한 histochemical 분석은 chromogenic 기질로서 X-glu로 수행되었다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 petiole의 transverse section에서의 GUS staining은 vascular system의 내부에만 제한되었으며 vascular system의 외부에 위치한 cortex 및 epidermis에서는 강하게 발현된 식물에서도 GUS 염색은 전혀 나타나지 않았다. 이러한 transverse section은 petiole의 적당한 위치에서 조제 될 때 대부분 어린 잎의 petiole에서 axillary bud 근처에서 강하게 발현되었다. 담배는 내부 및 외부 phloem과 bicollateral vascular system 을 가지고 있다. 강한 GUS 염색은 petiole의 transverse section의 외부의 phloem에서 관찰되었다.

인 용 문 헌

1. Hepler, P. F. and Wayne, R. O. *Annu. Rev. Plant physiol.* 36, 397~439(1987).
2. Poovaiah, B. W. and Reddy, A. S. N. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6, 47~103(1987).
3. Poovaiah, B. W., Reddy, A. S. N. and McFadden, J. *J. Physiol. Plant*, 569~573(1987).
4. Roux, S. J. and Serlin, B. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 5, 205~236(1987).
5. Roberts, D. M., Lukas, T. J., and Watterson, D. M. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 311~339(1986).
6. Veluthambi, K. and Poovaiah, B. W. *Science* 223, 167~169(1984).
7. Ranjeva, R. and Boudet, A. M. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 73~93(1987).

8. Jena, P. K., Reddy, A. S. N., and Poovaiah, B. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3644~3648(1989).
9. Watillon, B., Kettmann, R., Boxus, P. H., and Burny, A. *Plant Sci.* 82, 202~206(1992).
10. Braam, J. and Davis, R. W. *Cell* 60, 357~364(1990).
11. Lukas, T. J., Iverson, D. B., Schleicher, M., and Watterson, D. M. *Plant Physiol.* 75, 788(1984).
12. Toda, H., Yazawa, M., Sakiyama, F., and Yagi, K. *J. Biochem.* 98, 833(1985).
13. Zimmer, W. E., Schloss, J. A., Silflow, C. D., Youngblom, J., and Watterson, D.M. *J. Biol. Chem.* 263, 19370(1987).
14. Ling, V. and Zielinski, R. E. *Plant Physiol.* 90, 714 (1989).
15. Ling, V., Perera, I., and Zielinski, R. E. *Plant Physiol.* 96, 1196(1991).
16. Perera, I. Y. and Zielinski, R. E. *Plant Mol. Biol.* 19, 649(1992).
17. Gawienowski, M. C., Szymanski, Perera, I. Y., and Zielinski, R. E. *Plant Mol. Biol.* 22, 215~225(1993).
18. Chua, N. H., Carlenor, E., and Fromm, H. Unpublished results from Genbank.
19. Barnett, M. J. and Long, S. R. *Nucleic Acids Res.* 18, 3395(1990).
20. Clowell, G., Paul, E. M., Thomas, S. R., and Erion, J. L. Unpublished results from Genbank.
21. Choi, Y. J., Lim, C. O., Shin, P. G., Gal, S. W., Bahk, J. D., An, G., and Cho, M. J. *Mol. Cells* 3, 255~261 (1993).
22. Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiartsz, F. R., and Thorner, J. *Cell* 47, 423~431(1986).
23. Davis, T. N. and Thorner, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86,7909~7912(1989).
24. Knight, M. R., Smith, S. M., and Trewavas, A. J. *Proc. Natl. Sci. USA* 89, 4967(1992).
24. Jefferson, R. A., kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. *EMBO J.* 6, 3901~3907(1987).
25. Fischer, R., Koller, M., Flura, M., Mathews, S., Strehler-Page, M.A., Krebs, J., Penniston, J. T., CarAfoli, E., and Strehler, E. E. *J. Biol. Chem.* 263, 17055 (1988).
26. Zielinski, R. E., *Plant Physiol.* 84, 937~943(1987).
27. Wu, F. S., Park, Y. C., Roufa, D., and Martonosi, A. *J. Biol. Chem.* 256, 5309~5314(1981).
28. Resendez, E. Jr., Atenello, J. W., Graftsky, A., Chang, C. S., and Lee, A.S. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1212~1219 (1985).
29. Stratowa, C. and Rutter, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4292~4296(1986).
30. Lam, E., Bedyk, M. and Chua, N. H. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4819~4823(1989).
31. Jefferson, R. A., kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. *EMBO J.* 6, 3901~3907(1987).
32. Poovaiah, B. W. and Redd, A. S. N. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 12,185~211(1993).