

# 애기장대에서 액포막 존재 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase11 (ACA11) 형질전환체의 세포사멸 표현형 분석

이상민<sup>1,2</sup> · 호앙 티 마이 한<sup>1</sup> · 김경은<sup>1</sup> · 정우식<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 대학원 응용생명과학부, <sup>2</sup>경상대학교 환경생명과학국가핵심연구소

## Cell death phenotype of vacuole $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase11 (ACA11) transgenic plant in *Arabidopsis*

Sang Min Lee<sup>1,2</sup> · My Hanh Thi Hoang<sup>1</sup> · Kyung Eun Kim<sup>1</sup> · Woo Sik Chung<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science (BK21 program), Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center

<sup>2</sup>Environmental Biotechnology National Core Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**ABSTRACT** Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is thought to play the important role as a second messenger for signal transduction that results in various physiological responses to cope with developmental programs and environmental changes in plant. In plant cells, the central vacuole functions as a major calcium store, which is important for both signal transduction and preventing cytotoxicity. Although there is evidence for the biochemical characterizations of a calmodulin-regulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA11) localized to vacuole membrane, the biological function to ACA11 in plant has not been verified. In this study, we show that the cell death as the hypersensitive response (HR) in mature leaves is induced in transgenic plant of a vacuole ACA-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ACA11. Evidence that cell death phenotype is the result of ACA11 gene silencing is provided by Western blot assay using membrane fraction proteins extracted from transgenic plant. The 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) staining study provides that the cell death is caused by the increase of reactive oxygen species (ROS) in mature leaves of transgenic plants.

**Key words:**  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, vacuole, hypersensitive response, *Arabidopsis*

### 서 론

칼슘은 세포 내 신호전달 과정에서 이차매개체로서 식물 외부의 발달신호나 환경변화에 반응하여 다양한 생리학적 반응을 유발하는 중요한 기능을 수행한다. 세포질의 칼슘 농도의 변화는 많은 외부의 자극들에 의해서 유발되며, 식물의 다양한 생리학적 반응은 이러한 칼슘의 변화와 관련된다 (Bush 1995; Sanders et al. 1999; Berridge et al. 2000). 식물에서 액포는 세포 내 칼슘을 포함하는 이온들의 주요 저장소로서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 액포는 1 mM 이상의 높은 농도의 칼슘을 포함하고 있으며, 반면에 세포질은 100-200 nM 이하의 낮은 농도의 칼슘을 유지하고 있다. 액포로부터 세포질로의 칼슘의 유입은 여러 칼슘 채널

널들에 의해서 매개되며, 신호전달 후 세포질 내 낮은 농도의 칼슘을 유지하기 위해서 세포질로부터 외부 혹은 특정부위로 칼슘의 방출이 일어나야 하는데 이는 high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase와 low-affinity  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter에 의해서 이루어진다 (Muir and Sanders 1997; Marty 1999; Sze et al. 2000; Hetherington and Brownlee 2004).

애기장대에는 14개의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase들이 존재하며 이들은 단백질의 구조와 효소조절 메커니즘에 기초해서 크게 autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (ACAs)와 ER-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (ECAs)로 나뉘어진다. 애기장대의 ACA-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase들은 10개가 존재하며, 이들은 세포 내 위치에 따라 크게 4개의 하위그룹으로 나뉘어진다. 원형질막에 ACA8, ACA9, ACA10의 3개의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase들이 있으며, 소포체 막에는 ACA1, ACA2, ACA7의 3개의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase들이 위치하고 있다 (Hong et al. 1999; Bonza et al. 2000; Baxter et al. 2003; Schiott et al. 2004; George et al. 2008). 또한 액포막에는 ACA4, ACA11의 2개의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase들이 존재하며 (Geisler et al. 2000b;

\*Corresponding author Tel 055-751-6254 Fax 055-759-9363

E-mail: chungws@gnu.ac.kr

Lee et al. 2007), 아직 세포 내 존재위치가 알려져 있지 않은 ACA12, ACA13의 2개의  $Ca^{2+}$ -ATPase들이 존재한다. 식물의 ACA-type  $Ca^{2+}$ -ATPase는 동물의 CaM-stimulated plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPases (PMCA)와 유사한 특징을 보이지만, 동물의  $Ca^{2+}$ -ATPase가 원형질막에 독점적으로 분포하는데 비해 식물에서는 원형질막뿐만 아니라 다양한 세포 내 소기관에 존재하는 것으로 알려져 왔다. 또한 식물의 ACA-type  $Ca^{2+}$ -ATPase는 N-terminus에 calmodulin의 결합에 의해서 조절되는 부분이 있는데 반해 동물의  $Ca^{2+}$ -ATPase는 C-terminus에 calmodulin의 결합에 의해서 조절되는 부분이 존재한다 (Evans and Williams 1998; Geisler et al. 2000a). 현재까지 식물에서  $Ca^{2+}$ -ATPase들의 분자생물학적인 특징들은 보고되었지만, 그들의 생물학적 기능들은 상세히 밝혀져 있지 않다.

동물과 달리 식물의 ACA-type  $Ca^{2+}$ -ATPase들은 원형질막뿐만 아니라 다양한 세포 내 소기관들에 위치하고 있기 때문에 이러한 세포 내 소기관에서 특이적인 신호전달에 관여할 것으로 예상할 수 있다. 원형질막에 존재하는 것으로 밝혀진 ACA9 단백질은 주로 화분에서 발현되며, ACA9 유전자에 T-DNA 삽입 돌연변이 식물체는 성장이 줄어들며, 씨앗의 생성이 상당히 감소하는 것으로 보고되었다 (Schlott et al. 2004). 이러한 원인은 ACA9의 유전자가 파괴되었을 때 부분적인 융성불임을 유발함으로써 수정이 제대로 이루어지지 못해 발생되었다. 또한 원형질막에 위치할 것으로 예상되는 ACA10 유전자에 T-DNA 삽입 돌연변이 식물체는 잎의 발달이 저해되며 화서 마디가 제대로 성장되지 않아 꽃이 다발을 이루는 표현형이 보고 되었다 (George et al. 2008). 이제까지 밝혀진  $Ca^{2+}$ -ATPase들의 생물학적인 기능은 식물에서 신호전달에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있지만 아직까지 그들의 생물학적인 기능은 많이 보고되어져 있지 않다. 특히 세포 내 80% 이상의 공간을 차지하며, 칼슘의 주요 저장기관인 액포의  $Ca^{2+}$ -ATPase는 특히 세포 내 신호전달에서 중심적인 역할을 할 것으로 예상할 수 있다.

본 연구에서는 애기장대의 액포막에 존재하는  $Ca^{2+}$ -ATPase를 암호화하는 유전자에 대한 연구를 수행하였다. 애기장대의  $Ca^{2+}$ -ATPase인 ACA11을 암호화하는 유전자를 식물에 도입하여 형질전환된 식물의 표현형을 조사해본 결과 식물체의 잎에서 세포사멸을 관찰할 수 있었다. 이러한 세포사멸 표현형이 ACA11 유전자의 gene silencing에 의해서 발생한다는 것을 형질전환된 식물에서 막 단백질을 분리하여 Western blot 분석을 통해서 밝혔다. 또한 이러한 세포사멸의 원인이 형질전환된 식물의 잎에서 과도하게 축적되는 활성산소종 (ROS)에 의한 것임을 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 염색을 통해서 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 형질전환에 사용한 운반체

식물 형질전환용 vector를 제작하기 위하여 먼저 ACA11 cDNA

를 *Xho* I과 *Spe* I의 제한효소로 절단시켰다. 운반체는 선발 마커로 kanamycin 저항성 유전자를 가진 35S-GFP 운반체를 이용하였다. 35S-GFP 운반체는 pRT 운반체에 CaMV-35S promoter가 도입된 pBIN19 운반체로부터 유래되었다 (Hong et al. 1999). 35S-GFP 운반체를 *Xho*I과 *Spe*I의 제한 효소로 절단한 후 이미 절단되어진 ACA11 유전자를 그 사이에 연결하였다. 35S-ACA11-GFP를 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)에 형질전환 시킨 후, 형질전환된 *A. tumefaciens*를 애기장대의 형질전환용으로 사용하였다. 형질전환된 애기장대의  $T_0$  씨앗을 50 mg/mL의 kanamycin과 3% sucrose가 함유된 MS배지에 뿌려 3주 후 kanamycin에 저항성을 가져 살아나오는 식물을 흙으로 옮겨 심었다 (Clough and Bent 1998). 실험에 사용되어진 ACA11-GFP가 형질전환된 식물은 모두  $T_2$  세대의 식물을 사용하였다.

### 막 단백질의 분리

막 단백질의 모든 분리과정은 냉각된 용액을 이용하여 4°C가 유지되는 저온실에서 수행하였다. 식물의 막 단백질을 분리하기 위해서 흙에서 4주 동안 자란 애기장대의 잎을 액체 질소로 냉각된 막자 사발에 넣고 동결상태로 완전하게 분말이 되도록 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 290 mM sucrose, 2 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2 mM PMSF, 76 mM  $\beta$ -mercaptoethanol로 구성된 용액에 넣고 4°C에서 10분 동안 교반하였다 (Hong et al. 1999). 교반된 시료들을 촘촘한 천을 이용해서 찌꺼기를 제거하고 원심 분리를 이용하여 5000 xg에서 원심분리하여 세포벽과 나머지 찌꺼기를 제거하였다. 원심분리된 상층액을 이용하여 100,000 xg에서 1시간 동안 다시 원심분리하였다. 침전된 막 단백질들은 앞서 사용한 용액을 넣고 유리 동질화기구 (homogenizer)를 사용하여 다시 녹여내었다. 다시 녹여낸 막 단백질을 Western blot 분석을 위해 사용하였다.

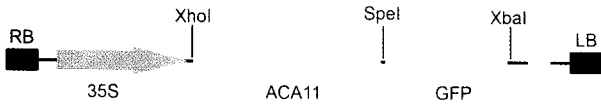
### 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 염색

식물의 잎에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 발생하는지 조사하기 위해서 3, 3'-diaminobenzidine 시약을 이용하여 식물의 잎을 염색하였다. DAB 용액은 DAB 1 mg당 멸균된 물 (pH 3.8) 1 mL에 완전히 녹여 만든다. 애기장대의 잎을 Silwet (0.05%) 이 첨가된 멸균수 (pH 3.8)에 담그고 5분 동안 vacuum infiltration을 수행한다. 다음으로 멸균수를 제거한 후 DAB 염색용액을 넣고 4-12시간 염색한다. 염색이 끝나면 Lacto-phenol 용액으로 염색을 제거한 후 현미경으로 관찰한다.

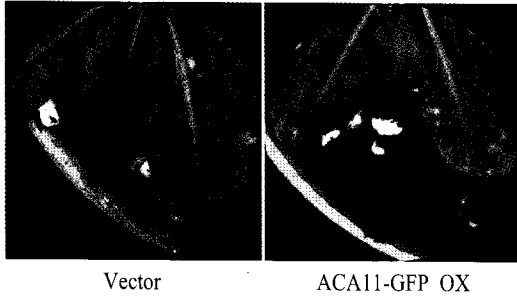
## 결과 및 고찰

### 애기장대에서 ACA11의 형질전환체 선발

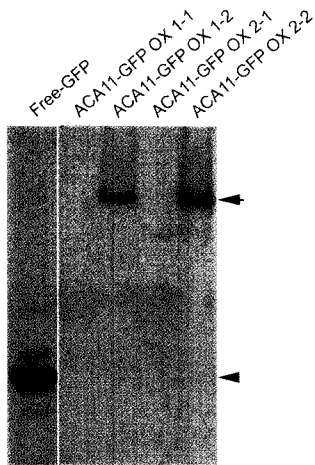
칼슘은 신호전달 과정에 있어서 중요한 이차 매개체로서의 역



**Figure 1.** Schematic map of binary vector for an ACA11-GFP transgenic plant. LB, left T-DNA border sequence; RB, right border sequence; 35S, CaMV 35S promoter



**Figure 2.** Cell death phenotype in leaves of the ACA11 transgenic plant. Under normal condition, the vector and ACA11-GFP transgenic plant were grown for 4 weeks on the soil



**Figure 3.** Western blot analysis of free-GFP and ACA11-GFP expressed in transgenic plants with anti-GFP antibody. Membrane fraction proteins of the transgenic plants were separated on 8% SDS-PAGE on and transferred to immobilon-P membranes. Immunoblotting was done using anti-GFP (anti-GFP Ab) antibody. Immunoreactive bands were detected by ECL as manufacture's manual (GE healthcare). Arrow and arrowhead indicate to 26 kDa GFP and 137 kDa ACA11-GFP fusion protein, respectively

할을 한다고 잘 알려져 있다(Berridge et al. 2000; Sanders et al. 1999). 식물은 동물과 달리 칼슘을 조절하는 단백질들이 세포 내 다양한 소기관에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Sanders et al 1999). 이러한 칼슘을 조절하는 단백질 중 특히 칼슘의 주요 저장소인 액포막 (vacuole membrane)에 존재하는  $Ca^{2+}$ -ATPase를 암호화하는 ACA11 유전자의 생물학적인 기능을 알아보고자 애기장대에 ACA11 단백질을 과발현하기 위해서 다음과 같이 애기장대에 형질 전환시켰다. 애기장대에서 ACA11 유전자를 분리하여 식물의

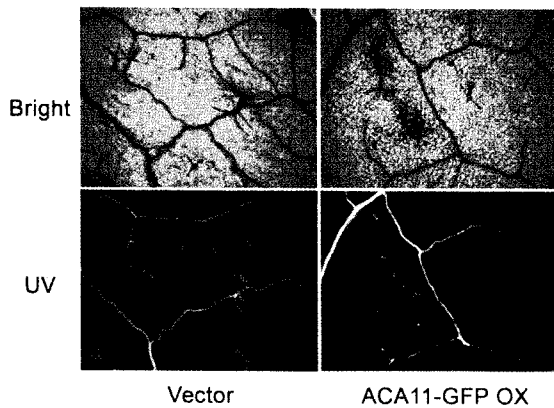
binary vector인 35S-GFP vector에 *Xho I/Spe I*의 제한 효소를 이용하여 재조합하였다. 이렇게 재조합한 35S-ACA11-GFP와 35S-GFP vector를 각각 애기장대에 형질전환하였다 (Figure 1). 이렇게 형질 전환된 식물을 선별하기 위해서  $T_0$  씨앗을 kanamycin과 3% sucrose가 함유된 MS배지에 뿌려 저항성을 가지는 식물을 형질전환 식물로 선별하고 실험을 수행하였다.

### ACA11이 형질전환된 애기장대의 표현형

앞서 만들어진 ACA11-GFP 유전자가 형질전환된 식물의  $T_2$  세대를 이용하여 그 표현형을 관찰하였다. 35S-ACA11-GFP 유전자와 35S-GFP가 형질전환된 애기장대를 흙에 심어 식물이 씨앗을 맺을 때까지 그들의 표현형을 관찰하였다. 이러한 ACA11-GFP 유전자가 형질전환된 식물은 꽃이 피기 전 발달단계까지는 표현형을 관찰 할 수 없었다. 흥미롭게도, 형질전환된 식물들 중 일부에서 꽃이 피기 시작하면서 성숙된 잎들에서 pathogen을 처리한 후 나타나는 것과 유사한 hypersensitive response (HR)와 같은 표현형을 보였다 (Figure 2). 이러한 표현형은 같은 형질전환 식물에서 받은 씨앗에서 자란 식물들 중에서도 잎에서 HR을 보이는 식물이 있는 반면 야생형과 같은 표현형을 유지하는 식물들로 나뉘어져 나타났다. 또한 표현형을 보이는 식물과 보이지 않는 식물에서 씨앗을 받아 다음 세대에서 표현형을 관찰해 보았을 때도 두 종류의 식물에서도 동일하게 HR을 보이는 식물과 보이지 않는 식물로 나뉘어 졌다. 이러한 표현형은 형질전환된 식물의 잎이 성숙하면서 조금씩 나타나기 시작하였고 잎 이외에서는 세포사멸 외의 다른 특별한 표현형을 관찰할 수 없었다.

### 형질전환된 식물의 ACA11 단백질 발현 분석

ACA11-GFP 유전자가 형질전환된 식물 잎에서 보여지는 HR의 표현형이 ACA11-GFP 단백질의 과발현에 의한 것인지 확인하기 위해서 형질전환된 식물에서 막 단백질을 분리하여 Western blot 분석을 수행하였다. ACA11-GFP가 형질전환된 식물을 흙에서 4주간 키운 후 HR이 발생하는 식물과 발생하지 않는 식물을 각각 구분하여, 식물 전체로부터 막 단백질을 분리하여 실험을 수행하였다. Western blot을 수행한 결과 표현형이 발생하지 않는 ACA11-GFP OX 1-2과 2-2 식물체에서는 약 130 kDa에서 ACA11-GFP의 단백질 발현을 확인 할 수 있었고, HR이 일어나는 형질전환체인 ACA11-GFP OX 1-1과 2-1 식물체에서는 ACA11-GFP의 발현을 관찰할 수 없었다 (Figure 3). 이러한 결과는 실제로 ACA11-GFP 유전자가 형질전환된 식물의 HR 표현형의 원인이 ACA11 유전자의 과발현 때문이 아니라 오히려 형질전환된 식물에서 ACA11 유전자의 유전자 침묵 (gene silencing)을 발생하여 표현형을 유발할 가능성을 시사하였다. 세포사멸 표현형을 보이는 형질전환체와 표현형을 보이지 않는 형질전환체를 이용하여 수 차례의 단백질 발현여부에 대한 반복실험 결과 ACA11-GFP 유전자가 발현이 되지 않는 형질



**Figure 4.** 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) staining for detection of reactive oxygen species (ROS). Plants were grown under long day condition for 4 week on soil. The images were monitored with an Olympus AX-70 fluorescence microscope and were captured with a cooled CCD camera (Olympus DP-70)

전환체가 표현형이 나타남을 확인함으로써 *ACA11* 유전자의 유전자 침묵에 의하여 세포사멸이 유발됨을 추정할 수 있었다. 하지만 앞으로 *ACA11-GFP* 유전자가 형질전환된 식물에서 본래 식물체가 발현하고 있던 *ACA11* 유전자의 RNA 발현이 이루어지지 않음을 확인을 해야 할 것이며 돌연변이를 이용하여 본 가설을 증명해야 할 것으로 판단된다.

#### 형질전환된 식물 잎의 DAB 염색 분석

지금까지 보고된 바에 따르면 식물에 병원균이 침입하게 되면 가장 먼저 세포 내 칼슘의 농도가 변화되고 다음으로 활성산소가 증가하게 된다. 이러한 신호전달 과정을 거쳐 식물은 방어 메커니즘이 작동하게 되고 병원균으로부터 식물을 보호하기 위해서 잎에 침입한 병원균을 격리하기 위해서 국부적으로 HR과 같은 세포사멸을 발생시키게 된다. 이러한 세포사멸 현상은 식물자체에서 병원균에 감염된 부분을 격리함으로써 더 이상의 감염을 피하기 위한 하나의 전략이다 (Nürnberg and Scheel 2001). 이러한 보고들을 근거로 *ACA11-GFP* 유전자가 형질전환되어 HR을 보이는 식물은 *ACA11* 유전자가 파괴됨으로써 세포질의 칼슘을 액포 내로 격리하지 못해 세포질에 칼슘농도가 증가되게 되고 증가된 칼슘을 신호로 세포 내 활성산소 (ROS)가 과다 축적되어 잎에서 HR인 세포사멸을 유발할 것으로 예상하고 실험을 진행하였다. 실제로 *ACA11* 유전자가 형질전환되어 HR을 보이는 식물의 잎을 이용하여 활성산소가 과도하게 축적되는지 활성산소를 염색하는 DAB 염색 시약을 이용하여 실험을 수행하였다. 그림에서 보는 바와 같이 free GFP vector가 형질전환된 잎에서는 활성산소가 관찰되지 않는데 반해 *ACA11-GFP* 유전자가 형질전환된 식물의 잎에서는 갈색의 염색 부분을 확인함으로써 활성산소가 상당한 양으로 축적되는 것을 확인할 수 있다 (Figure 4). 이러한 결과는 *ACA11-GFP* 유전자가 형질전환된 식물에서 보여지는 HR인 세포사멸은 액포막 존재 칼

슘 펌프의 유전자 침묵에 의하여 액포에서 유래한 칼슘이 액포로 다시 수송하지 못하고 세포질에 머물게 됨으로써 세포질에 고농도로 칼슘 증가되고 이는 세포질 등에서 활성산소가 축적되게 유도함으로 발생된다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 적 요

작물 스트레스 내성 연구의 궁극적인 과제는 가진 형질을 극대화하여 생산량을 증대하고 외부의 환경적인 요소로부터 피해를 최소화하는 것이다. 따라서 작물의 다양한 외부 환경적 스트레스에 대응하기 위한 연구들이 진행되고 있다. 특히 세포 내 신호전달 과정의 이차매개체인 칼슘에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있지만 아직까지 많은 부분이 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 모델식물인 애기장대를 이용하여 세포 내 칼슘의 주요 저장소인 액포로 칼슘을 수송하는 역할을 수행하는  $Ca^{2+}$ -ATPase의 형질전환 식물을 이용하여 세포 내 칼슘의 신호전달과 식물 생물학적 기능을 알아보았다. *ACA11-GFP* 유전자가 형질전환된 식물에서 흥미롭게도 *ACA11* 유전자가 발현 침묵됨으로써 세포 내 칼슘농도 항상성 조절과 신호전달 과정에 문제가 발생하고 세포질 내 활성산소가 증가되어 결국 형질전환체의 잎에서 HR과 같은 세포사멸을 유발한다는 것을 제시하였다.

#### 사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 지원한 환경생명과학 국가핵심 연구센터 (EB-NCRC) 연구비 (#R15-2003-012-02003-0)와 World Class University 연구비 (R32-10148), 그리고 농촌진흥청에서 지원한 바이오그린21 사업 연구비 (#20080401034023)로 수행되었음.

호양 마이 환과 김경은은 교육과학기술부에서 지원한 BK21 프로그램의 장학금을 수혜하였음.

#### 인용문헌

- Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF and Axelsen K B (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 132:618-628
- Bush DS (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:95-122
- Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21
- Bonza MC, Morandini P, Luoni L, Geisler M, Palmgren MG and De Michelis MI (2000) At-ACA8 encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus. *Plant Physiol* 123:1495-1506
- Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743

- Evans DE and Williams LE (1998) P-type calcium ATPases in higher plants: biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 9:1-25
- Geisler M, Axelsen KB, Harper JF and Palmgren MG (2000a) Molecular aspects of higher plant P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1465:52-78
- Geisler M, Frangne N, Gomes E, Martinoia E and Palmgren MG (2000b) The ACA4 gene of Arabidopsis encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol* 124:1814-1827
- George L, Romanowsky SM, Harper JF and Sharrock RA (2008) The ACA10  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase regulates adult vegetative development and fluorescence architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:716-728
- Hetherington AM and Brownlee C (2004) The Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55:401-427
- Hong B, Ichida A, Wang Y, Gens JS, Pickard BG and Harper JF (1999) Identification of a calmodulin-regulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 119:1165-1175
- Lee SM, Kim HS, Han HJ, Moon BC, Kim CY, Harper JF and Chung WS (2007) Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis. *FEBS Lett* 581:3943-3949
- Marty F (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11:587-599
- Muir SR and Sanders D (1997) Inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* 114:1511-1521
- Nürnberg T and Scheel D (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 6:372-379
- Sanders D, Brownlee C and Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11:691-706
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG and Harper JF (2004) A plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9502-9507
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC and Harper JF (2000) Diversity and regulation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:433-462

(접수일자 2009년 3월 12일, 수리일자 2009년 3월 18일)