Agouti Gene의 Human Homologue의 Molecular Structure와 Chromosomal Mapping

Heajoon Y. Kwon*, Scott J. Bultman*†, Christiane Löffler‡, Wen-Ji Chen§, Paul J. Furdon§, John G. Powell¶, Anton-Lewis Usala¶, William Wilkison§, Ingo Hansman‡, and Richard P. Woychik*

*Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, P.O. Box 2009, Oak Ridge, TN 37831-8077; †The University of Tennessee-Oak Ridge Graduate School of Biomedical Sciences, P.O. Box 2009, Oak Ridge, TN 37831-8077; ‡Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, Göttingen, Germany; § Biochemistry Department, Glaxo Inc. Research Institute, Research Triangle Park, NC 27709; ¶Department of Pediatric Endocrinology, Eastern Carolina University, Greenville, NC

Abstract- mouse chromosome2에 있는 agouti locus는 정상적으로는 털색깔을 조절하는 gene이다. mouse agouti gene은 최근에 cloning 되었고 131 amino acid peptide와 consensus signal peptide를 encode한다고 보고되었다. 이 논문에서 interspecies-DNA hybridization approach를 이용하여 mouse agouti gene의 human homologue를 cloning 하였다. Sequence analysis 결과, 이는 mouse gene에 85% 유사하였고 consensus signal peptide sequence 를 포함하는 132 amino acid를 coding하였다. somatic-cell hybrid mapping pannel과 Fluoresence-*in-situ* hybridization에 의한 chromosomal mapping을 한 결과, agouti gene은 MODY (*m*aturity *o*nset *d*abetes of the *y*oung), myeloid leukemia locus 등이 위치한 human chromosome 20q11.2에 mapping 되었다. 성인 tissue로부터 추출한 RNA를 이용한 발현연구에 의하면 human agouti gene은 adipose tissue와 testis에 발현되었다.

서 론

mouse chromosome 2 에 위치한 agouti locus는 정상적으로는 hair follicle안에 있는 melanocyte에의한 eumelanine과 pheomelanine의 선별적 생성을 조절하는 역할을 한다. agouti pigmentation은 각 머리털에 흑갈색 바탕에 노란 띠가 있음으로서 만들어지는 것이다 (1, 2). 우리는 최근에 agouti gene을 cloning하였고 일반적으로 neonatal skin에 발현되는 것을 확인하였다 (3, 4). agouti gene은 consensus signal peptide를 포함하는 작은 protein을 coding하는데 이는 agouti protein이 secrete될 가능성을 시사하고있다. 여러 dominant agouti allele들은(A^{y} A^{iy} A^{sy} A^{dy}) 노란 털 색깔외에도 (1) non-insulin-dependent diabetes 같은 증상과 현저한 비만, tumor 발생증가등을 나타낸다 (1,8-11). 이 mutant들의 증상은 사람의 non-insulin-dependent diabetes와 매우 유사하다 (11, 12). 우리는 이러한 mutant allele들이 non-coding부분의 구조변화에 의한 agouti gene의 무통제 발현을 일으킨다는 것을 보인 바있다 (3, 13). 이러한 발견에 근거하여 우리는 특정한 tissue에서의 agouti protein의 과다발현이 이러한 mutant의 dominant pleiotropic effect를 일으킨다는 가설을 세웠다.

agouti 털색깔은 많은 포유동물류중에 보존되고 있지만 (2) 사람에게서 agouti 머리털색깔이 발견되었다는 보고는 없었다. 따라서 사람도 agouti gene을 가졌는가는 확실치 않았다. 한편으로는 dominant agouti mutant의 phenotype과 사람의 non-insulin-dependent diabetes의 유사함은 사람의 agouti gene이 어떤 종류의 당뇨병이나 비만과 관련이 있지않나하는 의문을 제기한다. 또한 생쥐에서의 agouti 유전자의 ectopic expression과 tumor 발생증가의 관련성은 사람의 tumor 발생도 사람 agouti 유전자의 부통제 발현에 의한 것일 가능성을 시사하고 있다. 이러한 이유에서 본 논문에서는 사람도 agouti 유전자를 가졌나를 밝히고 만일 존재한다면 이를 cloning하여 그 분자구조를 규명하고자 한다.

이 연구에서, human genome에도 agouti 유전자가 존재하며 이는 생쥐의 agouti 유전자와 매우 유사하고, 생쥐 chromosome 2의 agouti 유전자가 존재하는 부분과 (14,15) synteny conservation을 보이는 chromosome 20의 한 부분에 mapping 되었음을 보고한다. human chromosome 20의 이 부분은 myeloid leukemia 를 일으키는 deletion complex (16) 와 non-insulin-dependent diabetes mellitus 발생에 연관된 MODY locus(17) 와 연관되어있다.

실험재료 및 방법

Southern Blotting. southern blotting은 standard procedure에따라 수행되었다 (18,19, 20) .

Human Genomic Clone의 추출. *Sau*BA 에의해 부분적으로 digeste된 human genomic lambda library (Stratagene) 를 human sheared genomic DNA로 reassociate된 mouse agouti full-length cDNA probe로 screening 하였다. 하나의 positive clone이 검출되었고, sequencing하기 위하여 여러 restriction fragments로 나뉘어 pGEM4 vector (Promega)로 subclone 되었다. total mouse DNA에는 hybridize하지않고 mouse cDNA probe에만 hybridize한 a 1.2-kilobase (kb) *Psd* fragment는 first coding exon과 유사한 sequence로 예상되어 subclone되었다. 생쥐 exon III의 5′ or 3′ 끝부분에 complemenary 하는 두개의 겹치는 42 base oligonucleotides(5′-CACTGAACAAGAAATCCAAG AAGATCAGCAGAAAAGAAGCCG-3′) (5′-TTGGAAGACCTCTTCCGCTTCTCGGCTTCTTTTCTGCTGATC-3′) 에 hybridize 하는 4.5-kb *Eco*RI fragment에서는 두번째 coding exon 과 유사한 sequence가 발견되었다. 생쥐 6.2-kb *Eco*RI fragment는 생쥐 exon IV를 함유하는 probe XBR 1.2 에 hybridize 하였고 마지막 agouti exon과 유사한 sequence가 발견되었다.

DNA Sequencing. Genomic subclone들은 the T7 DNA polymerase(U. S. Biochemical)를 이용하는 Sanger dideoxynucleotide method (21, 22)에따라 sequencing 하였다. DNA sequence는 University of Wisconsin Genetics Computing Group sequence analysis programs에 의하여 분석되었다 (23).

Chromosomal Assignment. human agouti gene의 chromosomal assignment를 위하여는 NIGMS human rodent somatic cell hybrid mapping panel 2 (24)의 24 DNA sample과 human (NAIMR91), mouse (NA05862), chinese hamster (NA106588) parental cell line의 3 sample의 polymerase chain reactions (PCR) 이 수행되었다. exon II의 35 bp upstream에 위치한 intron sequence에 따른 oligonucleotide (5′-CCTCTTACCATTACCCCTGA-3′), exon II의 3′ splice junction sequence에 따른 oligonucleotide (5′-

CTAGGTGACTTACCCACAAT-3′)가 primer A와 B로서 사용되었다. PCR은 100 ng template DNA, 15 pM primer A와 B, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 15 mM $MgCl_2$, 0.01% (w/v) gelatin, 250 mM dNTP and 1.4 U Taq polymerase를 함유하는 50ml volume에서 수행되었다. 처음 denaturation은 95°C 4분간 수행하였고, 그 다음에는 94°C 1분간 , 55°C 1분간 , 72°C 2분간의 32 cycle을 수행하였다. Ethidium bromide stain된 PCR fragment는 nondenaturing polyacrylamide gel에서 분리한후 시각화되었다. .

Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) 에의한 Mapping . FISH analysis를 위한 Prometaphase chromosome은 배양된 human lymphocytes에서 얻어 Rybak *et al.* 에 수록된 (25) 방법에따라 준비하였다. human agouti gene의 regional mapping을 위하여 17-kb genomic probe h20B1을 nick translation에의해 biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim)으로 label 하였다. Labeling, hybridization 과 signal detection은 수록된바 대로 수행하였다 (26, 27). signal은 biotinylated goat-anti-avidin immunoglobulin (Vector)을 이용하여 2배 증대되었다. Slide는 band 감식을 위하여 ethidium bromide 또는 4, 6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI)로 counterstain되어 90% glycerol, 10% PBS와 1 mg/ml phenylene diamine을 함유하는 anti-fade solution으로 mount되었다. A Zeiss axiophot fluorescence microscope (63X, filter LP420 and LP520)가 analysis에 이용되었고 대표적인 metaphase를 Scotch T640 film으로 photograph 하였다. agouti locus의 map position은 G-band상에서의 FISH signal의 위치에 따라 규명되었고, 또한 length measurement를 Lichter *et al* (28)에따른 fractional length from pter values (FL-pter)로 나타내었다 .

RNA Isolation 과 RT-PCR. human adipose tissue의 Poly(A)$^+$ RNA는 guanidinium-based lysis buffer (Invitrogen)를 이용하는 FastTrack mRNA isolation kit를 사용하여 추출하였다. 다른 tissue의 Poly(A)$^+$ RNA는 Clonetech으로부터 구입하였다. 200 ng poly(A)$^+$ RNA 는 random-hexamer primer와 avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 first strand c-DNA로 reverse transcribe 되었다. 이 reaction mixture의 1/20 vol으로 specific PCR amplification이 수행되었다. PCR은 in 20% glycerol with Taq I polymerase and the h20B1의 open reading frame (ORF)의 5′ 또는 3′ 끝부분의 sequence에따른 20 pM 5′ primer (5′-ATGGATGTCACCCGCTTACTCCTGGCC-3′)와 3′ primer (5′-GCGCTCAGCAGTTGAGGCTGAGCACGC-3′)를 사용하여 35 cycle(95°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min) 수행되었다. GPDH primer (Clontech)는 같은 reverse transcriptase product의 control로서 별도의 PCR reaction에 가하였다. Amplified PCR product는 1% agarose gel에서 electrophoresis 되었다.

실험 결과

human clone의 isolation. agouti gene이 사람에도 존재하는가 확인하기 위하여 생쥐 cDNA clone이 human genomic DNA를 함유하는 Southern blot에 hybridize 되었다. cross-hybridizing DNA fragment를 선별하기 위하여 여러 종류의 restriction enzyme과 약한 강도의 hybridization condition이 채택되었다. 이 결과에따라 같은 mouse agouti cDNA probe가 human genomic library를 검색하기 위하여

사용되었다. 그 결과로 h20B1라고 명명된 human genomic lambda clone을 얻었다. 이 clone은 restriction mapping에 따르면 약 17 kb의 insert 를 포함하는 것으로 알려졌다 .

또한 h20B1은 각각 생쥐 agouti gene의 세 coding exon에 cross-hybridize하는 세개의 구별되는 segment를 포함하였다 (Fig. 1). 이 cross-hybridizing하는 부분을 subclone하여 각 생쥐 exon의 sequence에따른 primer로 sequencing 하였다. 이 sequence analysis에 의하면 h20B1의 각 cross-hybridizing하는 부분의 sequence는 생쥐 agouti gene의 세 coding exon중의 하나와 유사하였다. 또한, 5′ 끝만 splice acceptor site로 시작되는 마지막 부분을 제외하고는, 각 보존된 부분은 consensus splice donor 와 acceptor로 쌓여 있었다. 한개의 polypyrimidine tract 와 각 보존된 3′ splice acceptor site 의 10-50 bp upstream에 위치한 branch point signal로 추정되는 부분도 발견되었다.

놀랍게도 h20B1의 각 보존된 sequence 부분안에서 생쥐 agouti gene에의해 추정되는 ORF도 보존되어 있었다(Fig. 1). 이 보존된 sequence 부분을 putative splice donor와 acceptor sequence에서 서로 붙이면 396 bp의 ORF이 만들어진다. 이 ORF은 생쥐의 131 amino acid protein와 매우 유사한 132 amino acids의 protein 을 encode할 것으로 추정된다. 이 ORF은 *translation initiation codon* (ATG)로 시작되어, 생쥐와 거의 같은 부분에서 stop codon (UGA)으로 끝난다 (Fig.1)생쥐의 exon IV에 해당하는 부분에는 생쥐의 AATAAT 와 비슷한 위치에서 한개의 polyadenylation signal (AATATA)이 발견되었다. 생쥐 와 사람의 nucleotide sequence를 비교하면 ORF sequence는 85% 일치한다 (Fig. 1). 대조적으로, 생쥐 mRNA의 5′과 3′의 untranslate 된 부분에 해당하는 부분은 현저하게 상이하였다 (Fig. 1). human sequence는 exon III에 해당하는 부분에서 3 bp deletion과 exon IV의 coding region에 해당하는 부분에서 6 bp insertion이 각각 발견되었다. 두개의 sequence 변화 모두가 3 bp의 배수로 일어나, ORF을 보존하고 있었다. 종합적으로, 추정된 amino acid sequence의 비교에의하면 human protein은 생쥐에비해 80% 일치하였다 (Fig. 2). 생쥐 protein과 같이, human protein의 amino terminus는 consensus cleavage site를 포함하여 signal peptide의 모든 특성을 함유하고 있었다. carboxy-terminus근처의 highly basic domain과 cysteine-rich domain도 예측된 mouse와 human protein간에 보존되었다 (3).

Chromosomal Mapping. agouti에 link되어있는 mouse chromosome 2의 여러 gene들은 human chromosome 20의 long arm에 mapping 되어진다 (14, 15). h20B1도 역시 human chromosome 20로 mapping 될 것인가를 확인하기 위하여, NIGMS human-rodent somatic cell hybrid panel 2 의 24 DNA samples을 사용하여 PCR을 수행하였다 (24). putative exon II sequence에 따른 primer와 parental human cell line NAIMR91의 human genomic DNA를 사용하여 PCR한 결과 예상한대로 238-bp amplified fragment를 얻었다. somatic cell hybrid panel 2의 분석에 의하면, agouti-specific 238-bp fragment는 이 cell의 84%는 human chromosome 20, 8%는 chromosome 4로 이루어진 cell line NA10478에서만 detect된다고 알려졌다 (24). 어떤 specific product도 parental mouse line (NA05862), chinese hamster cell line (NA10658), 혹은 어떤 다른 cell hybrids, 특히 human chromosome 4만을 함유하는 hybrid NA 10115로부터 amplify되지 않았다. 이 모든 결과에 따라 h20B1은 human chromosome 20로 mapping 되었다.

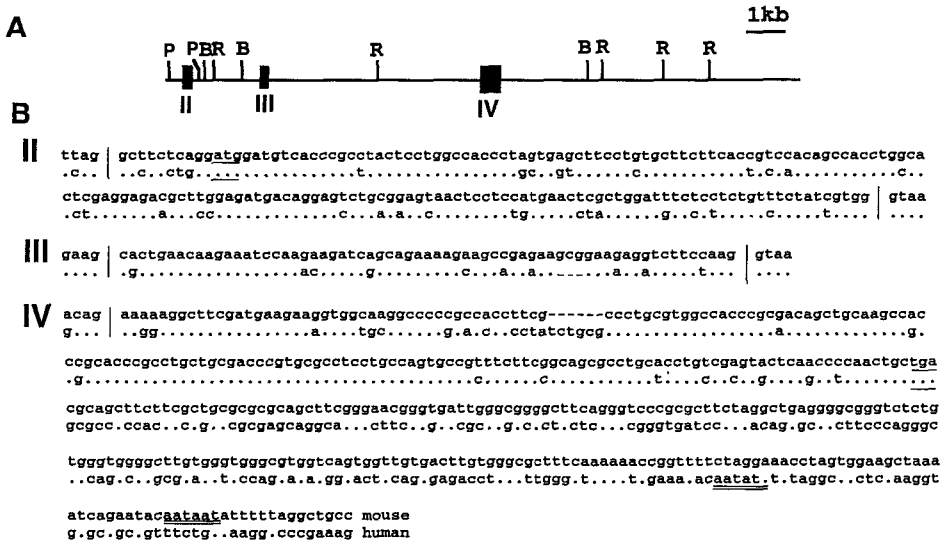

FIG. 1. (*A*) Genomic structure of human clone h20B1. Regions homologous to the three coding exons of the mouse gene are represented by black boxes and Roman numerals. P, *Pst* I; R, *Eco*RI; B, *Bam*HI. (*B*) Nucleotide sequence comparison of mouse and human exons of the agouti gene; the mouse sequence is shown above, and the human sequence is shown below. Identical nucleotides are represented as dots, different nucleotides are indicated, and an absence of nucleotides is noted as a dash. Actual exon sequences and the sequences of the 5′ splice donors and 3′ splice acceptors are separated by a space and vertical lines. The proposed translational initiation codons and stop codons are underscored by single lines, and the potential polyadenylylation signals are underscored by double lines.

```
Met Asp Val Thr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Leu Val
 .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   Leu

Ser Phe Leu Cys Phe Phe Thr Val His Ser His Leu
Val  .   .   .   .   .   .  Ala Asn  .   .   .

Ala Leu Glu Glu Thr Leu Gly Asp Asp Arg Ser Leu
Pro Pro  .   .  Lys  .  Arg  .   .   .   .   .

Arg Ser Asn Ser Ser Met Asn Ser Leu Asp Phe Ser
 .   .   .   .   .  Val  .  Leu  .   .  Val Pro

Ser Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Lys Lys Ser Lys
 .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .

Lys Ile Ser Arg Lys Glu Ala Glu Lys Arg Lys Arg
Gln  .  Gly  .   .  Ala  .   .   .   .   .   .

Ser Ser Lys Lys Lys Ala Ser Met Lys Lys Val Ala
 .   .   .   .  Glu  .   .   .   .   .   .  Val

Arg Pro Pro Pro Pro Ser  -   - Pro Cys Val Ala
 .   .  Arg Thr  .  Leu Ser Ala  .   .   .   .

Thr Arg Asp Ser Cys Lys Pro Pro Ala Pro Ala Cys
 .   .  Asn  .   .   .   .   .   .   .   .   .

Cys Asp Pro Cys Ala Ser Cys Gln Cys Arg Phe Phe
 .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .

Gly Ser Ala Cys Thr Cys Arg Val Leu Asn Pro Asn
Arg  .   .   .  Ser  .   .   .   .  Ser Leu  .

Cys  mouse
 .   human
```

FIG. 2. Comparison of the amino acid sequence of the mouse agouti gene with that deduced from the homologous regions of human clone h20B1. Shown above is the reported mouse sequence (3); shown below is the human sequence as predicted from the ORF created by the juxtaposition of the regions from Fig. 1 that are homologous to the individual agouti exons. Identities are represented by dots, and differences are indicated; absences of amino acids are noted as dashes.

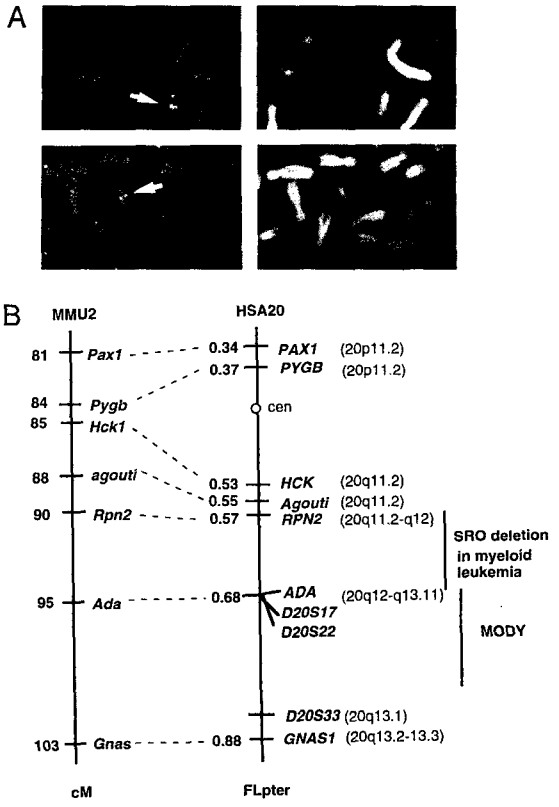

FIG. 3. (*A*) Assignment of clone h20B1 to human chromosome 20q11.2. Two partial metaphases (*Upper, Lower*) showing specific

double signals by FISH at 20q11.2 (arrows) after hybridization with h20B1 DNA (*Left*) and the corresponding DAPI-fluorescence pattern of the same metaphases (*Right*). (*B*) Localization of the agouti gene within the physical FISH map of human chromosome 20 (HSA20) based on mean FL-pter values (15) demonstrating conservation of synteny within the respective segment on the composite linkage map of mouse chromosome 2 (MMU2) (14). Numbers to the left of MMU2 indicate genetic distances in centimorgans (cM) of the loci from the centromere. Numbers to the left of HSA20 indicate physical map positions of the loci as measured by FISH and expressed as FL-pter. The cytogenetic bands in which the human loci are located are indicated in parentheses at right of the chromosome. To the far right are indicated the locations on the cytogenetic map within which the *MODY* locus may lie based on genetic linkage data (17) and the regions of the chromosome commonly deleted in patients with myeloid leukemia (16).

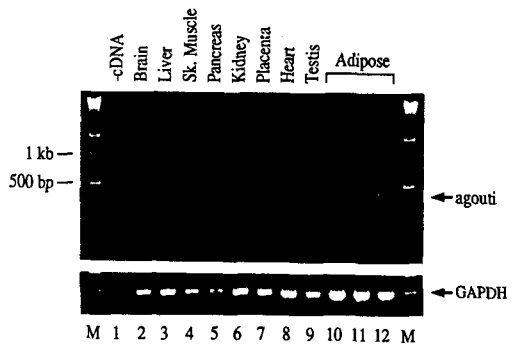

FIG. 4. Tissue distribution of human transcripts. (*Upper*) Amplified PCR products using agouti-specific primers and cDNA template reverse-transcribed from poly(A)$^+$ RNA of various tissues. Lanes: 1, no cDNA template in PCR reaction; 2–9, RNA from brain, liver, skeletal muscle, pancreas, kidney, placenta, heart, and testis, respectively; 10–12, RNA from adipose tissue of three different normal individuals. (*Lower*) Amplified PCR products using human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-specific primers as a control.

human agouti의 regional localization을 위하여, h20B1을 probe로 사용하여 FISH를 수행하였다. Hybridization signal은 대부분 의 metaphases의 chromosome 20의 proximal long arm에서 볼 수 있었다(Fig. 3). Specific한 FISH signal들은 어느 다른 chromosome에서도 발견되지 않았다. DAPI-stained metaphase chromosomes의 banding pattern에 의하면, agouti gene의 FISH signal은 band 20q11.2에 위치한다. 몇개의 하나짜리 signal들은 어떤 metaphase의 다른 chromosomal site의 chromatids상에서 발견되지만, 그 pattern이 일정하지 않으므로 unspecific background hybridization으로 사료된다.

chromosome 20의 physical FISH map(Fig. 3)에서의 h20B1의 위치는 13개의 chromosome 20로부터의 length measurement에 의하여 측정되었으며, 그 결과는 fractional-length-pter (FLpter)로 표시되었다 (28). mean FLpter-value는 0.55±0.05였고, 이 결과는 band 20q11.2로의 localization과 일치하였다 (Fig. 3*A*). 이 결과는 h20B1에 hybridize하는 sequence를 함유하는 450-kb YAC를 사용한 FISH mapping에의해 다시 한번 확인된바 있다. 이 YAC와 hybridize하는 11개의 chromosome 20의 length measurement를 한 결과, FLpter-value는, h20B1 clone에의한 결과와 거의 일치하여, 0.55 ±0.04로 밝혀졌다.

Expression in Human Tissues. h20B1의 homologous sequence가 발현되는가 확인하기위한 시도로서, non-insulin- dependent diabetes mellitus에 연관된 3개의 tissue (muscle, liver와 fat) 를 포함하여, 다양한 adult human tissues에서 agouti transcipt의 존재 유무를 평가하기 위하여 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) procedure를 사용하였다. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 예상된 403-bp agouti-specific fragment는 adipose tissue와 testis에서만 볼 수 있었다. 이 403-bp fragment가 실제적으로 해당하는 human mRNA에서 만들어졌는 가를 확인하기 위하여, PCR fragment를 nucleotide sequence analysis한 결과 h20B1 clone의 mouse-human homologous region에 있는 sequence를 함유하고 있는 것이 발견되었다. 더 나아가서, 403-bp fragment의 sequence analysis에 따르면 3개의 homologous region들이, Fig. 1에서 볼 수 있는 바대로 putative splice site들에따라 splicing되어 연결되어있는 것과 같이, 서로 맞물어 있는

것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 h20B1에 있는 homologous sequence들은 실제적으로 선별된 human tissue에서 발현되는 functional gene의 exon에 해당함을 밝혀 주었다.

고찰

cross-species hybridization approach를 이용하여, 본 연구팀은 mouse agouti gene의 전체 coding region을 구성하는 3개의 exon에 해당하는 증간보존 되어진 3개의 sequence 멍어리들을 내포하는 human genomic clone을 얻었다. human clone의 conserved ORF이 RNA transcript로 발현되어, mouse gene의 product와 매우 유사하고, 크기도 거의같은 protein을 coding한다는 사실은 h20B1의 conserved sequence는 실제적으로 functional gene의 coding exon임을 시사하고 있다. 이러한 결과와 mapping data에 따라 본 연구팀은 h20B1의 sequence는 agouti gene의 human homolog의 coding exon들임을 제의한다.

이 논문에 기술된 FISH mapping 실험은 human agouti가 MODY1 locus와 근접해 있음을 시사하고 있다 (Fig. 3). MODY1은 젊은 나이에 발병하며 autosomal dominant mode로 유전되는 non-insulin-dependent diabetes mellitus의 한 종류이다 (29). 생쥐의 dominant yellow agouti mutation들은 MODY patient에서 볼 수 있는 non-insulin-dependent diabetes mellitus와 유사한 증상을 보인다는 사실에 근거하여, 본 연구 팀은 agouti가 MODY의 candidate gene인가의 여부를 이 둘 사이의 linkage에따라 평가하였다. 이 연구의 종합적인 FISH 결과에 따르면 agouti는 loci HCK와 RPN2가 mapping된 바있는 band 20q11.2로 mapping되었다 (Fig. 3). 3개의 loci (HCK-agouti-RPN2)는 ADA, D20S17, PPGB, D20S16와 D20S75를 포함하는13 cM sex-averaged interval의 약간 더 proximal쪽에 위치한다 (17). 따라서, MODY1의 genetic linkage data와 이 연구에서 보고된대로 agouti가 약간 더 proximal 20q segment로 physical assignmant된다는 사실에만 의거다면 (Fig. 3*B*, agouti는 MODY1과 관련이 없다고 결론지어진다. 그러나 MODY1 locus는 RW라 불리는 한 가족의 자료만을 이용하여 mapping되었기 때문에(17), 이 가족에서 inversion과 같은 특이한 chromosomal structural alteration이 일어났을 수도 있고, 이 mutation의 특성 자체가 genetic recombination에 영향을 미쳐 이 부분에서의 agouti의 정확한 배치에 착오를 일으켰을 가능성도 있다. 이러한 경우라 human agouti gene의 human tumor 발생에의 관련여부의 측면에서는, 최근에 Roulston et al. (16)은 human chromosome 20q의 region은 myeloid leukemia 환자에게서 빈번하게 delete 되어있음을 보고하였다. FISH와 cytogenetic analysis에 의하면, 20q11.2-q12로 mapping되는 commonly deleted interstitial segment (SRO)가 발견되었으며 이는 ADA와 SRC loci를 포함하고 있었고 proximal쪽으로는 ribophorin 2 gene locus (RPN2)와 distal쪽으로는 D20S17 (16)사이에 위치하였다. 이 연구에 발표된 FISH 결과에 의하여 agouti gene은 이 commonly deleted segment 의 proximal boundary에 가까움이 밝혀졌다 (16). agouti가 deleted region안쪽에 mapping되는지는 확실하지 않지만, 만일 agouti가 deleted region에 근접한다해도 dominant mouse mutation인 lethal yellow에서와 같은 경우일수도 있다 (3, 13). Lethal yellow 생쥐들은 증가된 spontaneous와 induced tumor 발병률을 보인다. 본 연구팀은 최근에 agouti coding exon의 upstream 부분에서 발견된 170-kb deletion이 agouti의 발현을 촉진하여 pleiotropic effects을 일으킨다고 보고한 바있다 (13, 30). 따라서, 사람의 경우에도,

human agouti gene이 근접하는 sequence의 deletion에 의하여 발현 촉진되어 human myeloid leukemia의 발생을 일으킬 가능성을 배제할 수 없다.

agouti pigmentation pattern은 많은 포유류 중간에서 진화중 보존되었지만 사람의 머리털에서 agouti와 같이 띠가있는 pigmentation pattern이 보고된 경우는 없었다. 따라서 human agouti gene이 pigmentation을 위하여 하는 역할은 무엇인가하는 의문이 제기된다. coding exon의 sequence가 잘 보존되어 있는 것으로 미루어 agouti gene은 사람의 경우에도 실제적인 역할을 함에는 틀림없다. 첫째로, agouti가, melanocyte가 phaeomelanosomes을 생산하도록 신호를 보내는 것을 포함하여, 사람이나 생쥐에서 똑같은 역할을 수행할 가능성도 있다. 이러한 경우에는, 사람에게서 띠가 있는 agouti pigmentation이 발견되지 않는 이유는 agouti pigmentation을 가진 여러 포유동물중들이 단기간동안의 털갈이를 하는데 비하여, 사람의 머리털은 계속적으로 자라기 때문이라고 설명할수도 있다. 둘째로는, 사람과 생쥐의 agouti gene은 각각 다른 발현 조절 기전을 가지도록 진화되었을수도 있다. 본 연구 팀에서는 이 문제를 밝히기 위하여 human agouti gene의 promoter 와 untranslated region에 관한 실험이 진행되고 있다.

마지막으로, 우리의 human agouti gene의 발현 연구에 의하면 건강인의 adipose tissue에서의 agouti transcripts 생성은 흥미롭다. 생쥐의 경우, agouti 와 다른 pigmentation gene들은 melanocyte안에서 cAMP 농도를 조절함으로써 그 역할을 수행한다 (31). 만일 agouti가 adipocyte에서도 비슷한 기전으로 cAMP level을 조절한다면, agouti의 adipose-specific 발현은 adipocyte에서의 cAMP 농도를 낮출 것이다. 이 cAMP 농도 저하는 hormone sensitive lipase의 비활성화를 초래하여 lipolysis의 감소를 일으킬 것이며, 이는 adipocyte hypertrophy와 비만 으로 발전될 수 있다 (32). 이 비만은 insulin resistance (33) 혹은 non-insulin dependent diabetes(34)를 초래하게 될 것은 명백하다. 따라서 사람의 경우, agouti는 adipocyte에서 지방대사를 조절하는 역할을 수행할 것으로 사료된다. 또한 agouti gene의 adipose tissue에서의 발현에 대한 연구와 그 obesity 와 non-insulin-dependent diabetes로 발전되는데 하는 역할을 정의하기 위한 연구가 진행중에있다.

감사의 말씀

이 논문을 위하여 조언을 하여준 M. L. Mucenski, W. Pories 와 R. Mural에게 감사하며, human genomic lambda library를 제공하여준 J. J. Schrick에게 감사한다. 이 연구는 the office of Health and Environmental Research, Department of Energy와 the office of Health and Environmental Research와, the National Institute of Environmental Health Sciences로부터 지급받은 연구비로 수행되었다 또한 일부는 the Deutsche Forschungsgemeinschaft (I. H.)의 연구비로 충당되었다.

참고 문헌

1. Silvers, W. K. (1979) *The Coat Colors of Mice* (Springer, New York), pp. 6-44.

2. Searle, A. G. (1968) *Comparative Genetics of Coat Color in Mammals.* Academic Press, New York.

3. Bultman, S. J., Michaud, E. J. & Woychik, R. P. (1992) *Cell* **71**, 1195-1204.

4. Miller, M. W., Duhl, D. M. J., Vrieling, H., Cordes, S. P., Ollmann, M. M., Winkes, B. M. & Barsh, G. S. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 454-467.

5. Silvers, W. K. & Russell, E. S. (1955) *J. Exp. Zool.* **130**, 199-220.

6. Silvers, W. K. (1958) *J. Exp. Zool.* **137**, 181-188.

7. Silvers, W. K. (1958) *J. Exp. Zool.* **137**, 189-196.

8. Wolff, G. L., Roberts, D. W. & Galbraith, D. B. (1986) *J. Hered.* **77**, 151-158.

9. Heston, W. E. & Vlahakis, G. (1961) *J. Natl. Cancer Inst.* **26**, 969-983.

10. Dickerson, G. E. & Gowen, J. W. (1947) *Science* **105**, 496-498.

11. Coleman, D. L. (1982) in *The Mouse in Biomedical Research* eds. Foster, H. L., Small, J. D. & Fox, J. G. (Academic, New York), Vol. 4, pp. 125-132.

12. Hellerström, C. & Hellman, B. (1963) *Metabolism* **12**, 527-536.

13. Michaud, E. J., Bultman, S. J., Stubbs, L. J. & Woychik, R. P. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 1203-1213.

14. Siracusa, L. D. & Abbott, C. M. (1993) *Mammalian Genome* **4**, S31-S46.

15. Löffler, C., Rao, V. V. N. G., Schnittger, S., Pastuszak, D., Schubert, S., Hansmann, I. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **53S**, 1324.

16. Roulston, D., Espinosa III, R., Stoffel, M., & Le Beau, M. M. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **53S**, 352

17. Rothschild, C. B., Akots, G., Hayworth, R., Pettenati, M. J., Nagesh Rao, P., Wood, P., Stolz, F-M., Hansmann, I., Serino, K., Keith, T. P., Fajans, S. S. & Bowden, D. W. (1993) *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 110-123

18. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York).

19. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Plainview, NY), 2nd Ed.

20. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984) *Anal. Biochem.* **137**, 266.

21. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

22. Tabor, S. & Richardson, C. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4767-4771.

23. Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.

24. Drwinga, H. L., Toji, L. M., Kim, C. H., Greene, A. E. & Mulivor, R. A. (1993) *Genomics* **16**, 311-314.

25. Rybak, J, Tharapel, A., Robinett, S., Garcia, M., Maniken, C. & Freeman, M. (1982) *Hum. Genet.* **60**, 328-333

26. Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D. C. (1988) *Hum. Genet.* **80**,224-234.

27. Rao, V. V. N. G., Löffler, C., Wozney, J. M. & Hansmann, I. (1992) *Hum. Genet.* **90**, 299-302.

28. Lichter, P., Tang, C. C., Call, K., Hermanson, G., Evans, A., Housman, D & Ward, D. C. (1990) *Science* **247**,64-69.

29. Fajans, S. S., Bell, G. I. & Bowden, D. W. (1992) *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 206-210

30. Michaud, E. J., Bultman, S. J., Klebig, M. L., van Vugt, M. J., Stubbs, L. J. & Woychik, R. P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

31. Takeuchi, T., Kobunai, T. & Yamamoto, H. (1989) *J. Invest. Dermatol.* **92**, 239S-242S

32. Strålfors, P., Björgell & Belfrage, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3317-3321

33. Bonadonna, R. C. & Defronzo, R. A. (1992) in *Obesity* Björntorp, P. & Brodoff, B. N., eds (Philadelphia, J. B. Lippincott)

34. Reaven, G. M. (1988) *Diabetes* **37**, 1595-1607