Korean J. Zool. 37:240-248, 1994

근세포 분화에 관한 연구: 차별 혼성화 스크리닝법에 의한 근원세포 분화 관련 유전자의 클로닝

강봉석 · 장세헌* · 유병제 · 양재섭*

대구대학교 자연과학대학 생물학과, *분자생물학과

골격근 세포는 미분화 단핵 근원세포로부터 신장과 융합을 거쳐 다핵 횡문근섬유로 분화되어 가며 동시에 근특이 유전자의 발현이 선택적으로 일어난다.

본 연구에서는 계배 배양 근원세포의 분화동안 유전자 발현 조절 양상에 대한 연구를 위해, 계배 근원세포를 72시간 배양한 근섬유로부터 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 이 cDNA 라이브러리를 미분화 단핵 근원세포(배양 36시간)와 분화된 다핵 근섬유(배양 72시간)의 poly(A)$^+$ RNA 주형에서 합성된 [^{32}P]cDNA를 probe로 사용한 differential plaque hybridization 방법으로 스크리닝하였다. 분화된 다핵 근섬유 cDNA probe에 강하게 혼성화되는 cDNA clone을 선별하여 클로닝하였다. 선별한 cDNA clone 들 중 하나는 약 1.3 Kb 크기의 삽입절편을 갖고 있는 것으로 나타났고, 이 cDNA를 probe로 사용하여 northern blotting 한 결과, 이 cDNA에 대한 유전자는 미분화 단핵 근원세포에서 분화된 다핵 근섬유로 분화가 진행됨에 따라 유전자 산물인 RNA 양이 증가되는 것으로 나타났다. 또한 이 1.3 Kb cDNA에 대한 RNA의 크기는 약 2.7 Kb로 확인되었다.

KEY WORDS: muscle cell differentiation, differential screening, cDNA cloning

세포분화는 특수화된 세포의 기능에 필요한 유전자 산물의 유도 및 미분화 상태의 세포와 관련된 유전자의 조절을 포함하는 유전자 발현의 복잡한 변화를 의미한다. 배아 발생과정동안 일군의 특정세포들이 분화된 조직으로 전환되는 중에 특정 유전자의 차별적 발현(differential expression)이 일어나며, 이는 분화된 조직에 있어 기능적 전환을 의미한다.

골격근 세포는 형태적으로는 미분화 단핵 근원세포로 부터 신장과 융합을 거쳐 다핵 횡문근 섬유로 분화되어 가며, 동시에 기능적으로는 근특이 단백질의 선택적 합성과 축적이 일어난다(Devlin and Emerson, 1979; Garfinkel *et al.*, 1982; Hastings and Emerson, 1982). 대부분의 근특이 유전자들의 발현은 선택적으로 일어나며, 근특이 단백질 특히 수축성 단백질은 다유전자 가족(multigene family)으로 존재하기 때문에 이들 유전자의 발현은 조직이나, 분화 단계에 따라 상이한 양상으로 나타나는 것으로 보고되고 있다(Whalen *et al.*, 1981; Billeter *et al.*, 1982; Bronson and Schabat, 1982; Bucher *et al.*, 1988).

수축성 단백질을 암호화하는 전사물에 대한 연구결과, 대부분의 수축성 단백질의 mRNA는 근원세포 분화동안 20-30배 이상으로 그양이 증가하는 것으로 보고되었으며(Paterson and Bishop, 1977; Hastings and Emerson, 1982), 근세포 분화는 근특이 단백질과 대사효소 유전자의 전사단계에서의 활성화와 이들 mRNA의 축적이 동시에 연관되어 있다고 보고되었다(Buonanno and Merlie, 1986; Bucher *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1987; Sternberg *et al.*, 1988; Buskin and Hauschka, 1989). 이러한 결과는 근원세포

*이 연구는 1990년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-'90-419)의 지원에 의한 것임.

발생에서 수축성 단백질의 선택적 합성은 번역단계(translational level)에서의 조절보다는 전사단계(transcriptional level)에서의 mRNA 축적에 연유한 조절의 결과로 생각된다.

이러한 점으로 볼때 골격근세포는 형태적, 생화학적 수준에서의 일련의 특징들이 초기 배양세포에서 충실히 재현될 수 있기 때문에, 근세포 분화과정에서 일어나는 유전자 조절같은 분자적 수준에서의 기구 연구에 흥미있는 model system으로 제공되어 질 수 있다.

근세포 분화과정 중 가장 특징적인 점은 미분화 단핵 근원세포에서 다핵 근관으로 세포융합이 일어나는 점이다. 이러한 세포 융합은 일련의 조직 특이 유전자 산물의 합성 및 축적과 연유되어 있으며(Paterson and Stroham, 1972; Emerson and Bechner, 1975; Devlin and Emerson, 1978; Benoff and Nadal-Ginard, 1980; Schwartz and Rothblum, 1981; Ha *et al.*, 1981, 1983; Emerson *et al.*, 1986), 세포 분화동안 이들 조직 특이단백질의 유도에는 유전자의 전사단계와 번역단계에서의 정확한 조절 기구가 있다는 것을 암시한다.

최근에 근원세포의 분화에 관계되는 조절단백질인 MyoD1, myogenin, myf5, 그리고 MRF4 등이 확인되었으며(Braun *et al.*, 1989; Rodes and Konieczny, 1989; Wright *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990; Buonanno *et al.*, 1992; Saitoh *et al.*, 1993), 이 조절단백질들의 기능은 비근육세포를 근세포로 유도할 수 있는 핵단백질로(Davis *et al.*, 1987; Emerson, 1990), 근특이 단백질 유전자의 조절부위에 결합하여 이들의 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Lassar *et al.*, 1989; Piette *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991; Wentworth *et al.*, 1991; Mitsui *et al.*, 1993). 그러나 근발생과정에서 이들의 정확한 역할은 아직 충분히 알려져 있지 않다.

본 논문에서는 배양 계배 근원세포의 분화단계에 따라 유전자 발현의 차이를 나타내는 근세포 분화 관련 유전자를 찾고자 계배 근원세포를 72시간 배양한 분화된 다핵 근섬유에서 cDNA 라이브러리를 제작하여 근원세포의 분화과정동안 유전자 발현의 차이를 나타내는 근세포 분화 관련 유전자인 약 1.3 Kb의 cDNA clone을 differential hybridization screening 방법에 의해 클로닝하였다. 이 1.3 Kb의 cDNA를 probe로 하여 northern blotting 한 결과 이 유전자는 미분화 단핵 배양 근원세포에서 보다 분화된 다핵 배양 근섬유에서 높은 수준으로 발현되는 유전자임을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 근세포 배양

근세포 배양은 부란 12일된 계배 가슴근육을 재료로 하여 O'Neill과 Stockdale(1972)의 방법에 따라 행하였다. 근세포 현탁액을 10% 말혈청, 10% 계배추출물과 1% 항생제 용액을 함유한 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)으로 조성된 811 배양액으로 5×10^5 cells/ml 되게 희석하여, 근세포를 collagen이 발라진 배양기에 심은 후 24시간 배양하였다. 배양24시간에 배양액을 10% 말혈청, 2% 계배추출물과 1% 항생제 용액을 함유한 MEM으로 조성된 8102 배양액으로 갈아준 후 72-96시간까지 배양하였다.

2. RNA 분리

배양 근세포로부터 Chirgwin 등(1974)의 방법으로 총 RNA를 분리하였다. 미분화 단핵 근원세포의 총 RNA는 배양 24-36시간된 배양세포로부터 추출하였고, 분화된 다핵 근섬유의 총 RNA는 배양 72-96시간된 세포로 부터 분리하였다. 이와같이 각각의 단계에서 얻어진 총 RNA는 Aviv 등(1972)의 방법에 따라 oligo (dT)-cellulose column을 이용하여 poly(A)$^+$ mRNA를 얻었다.

3. 배양 계배 근섬유의 cDNA 합성 및 라이브러리 제작

이중가닥 cDNA 합성은 배양 72시간대의 분

화된 다핵 근섬유에서 추출한 poly(A)$^+$ mRNA로부터 cDNA synthesis kit(Pharmacia)를 사용하여 Pharmacia에서 제시한 방법으로 합성하였다. 합성된 cDNA는 Sephacryl S-300 spun column(Pharmacia)으로 크기 분획화(size fractionation)한 후, cDNA 말단부위에 EcoR I adaptor를 붙였다. 이 cDNA를 T_4 polynucleotide kinase로 인산화 시킨 후 미리 EcoR I 제한효소와 Bacterial Alkaline Phosphatase(BAP)로 5′-말단이 탈 인산화된 λgt10 vector(Stratagene)에 클로닝시켰다. 이와같이 얻어진 재조합 λgt10 DNA를 packaging extract kit(Stratagene)을 이용하여 packaging 한 후 *E. coli* C600과 C600 hfl-을 숙주세포로 LB plate에 도말하여 확인 하였다.

4. Differential screening

제작된 배양 계배 근세포(배양 72시간) λgt10 cDNA 라이브러리를 *E. coli* C600hfl- 세포에 감염시켜 약 1.2×10^5 phages를 배양하여 미분화 단핵 근원세포(배양 36시간)와 분화된 다핵 근섬유(배양 72시간)의 poly(A)$^+$ RNA 주형에서 합성된 [^{32}P]cDNA를 사용하여 스크리닝하였다(Benton and Davis, 1977; Sambrook *et al.*, 1989).

[^{32}P]cDNA 표식자(probe)들은 Sambrook 등(1989)이 제시한 방법에 의하여 합성하였다. 1 μg의 미분화 단핵 근원세포와 분화된 다핵 근섬유에서 추출한 poly(A)$^+$ RNA 주형에 25 unit의 RNase inhibitor, 12.5 μg의 random primer(Pharmacia), 1× reverse transcription(RT) buffer(50mM Tris. HCl, pH7.6, 10mM DTT, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$), 0.8mM의 dNTP(dATP, dGTP, dTTP, Pharmacia) 용액, 4.8 μM의 dCTP, 100 μCi의 dCTP(~3,000 Ci/mmole, Amersham), 그리고 M-MLV reverse transcriptase(BRL) 200 unit를 혼합하여 37°C에서 60분간 반응시켜 방사성 동위원소로 표식된 첫번째 가닥 cDNA probe를 각각 얻었다.

분화된 다핵 근섬유 cDNA가 클로닝된 phage DNA를 각각 2장의 nylon membrane에 흡착시킨 후, 미분화 단핵 근원세포와 분화된 다핵 근섬유에서 합성된 probe cDNA와 6x SSC, 5× Denhardt's, 100 μg/ml Salmon sperm DNA 그리고 0.5% SDS로 조성된 반응용액과 68°C에서 16-24시간 동안 혼성화시켰다. 각각의 membrane을 2× SSC/0.1% SDS로 상온에서 5분간 5번 각각 세척하였고, 1× SSC/0.1% SDS로 68°C에서 30분간 세척한 후, −70°C에서 intensifying screen을 사용해 X-ray film에 감광시켰다.

미분화 단핵 근원세포에서 합성된 표식자 cDNA보다는 분화된 다핵 근섬유에서 합성된 표식자 cDNA와 강하게 혼성화되는 positive clone들을 선별 분리하였다.

3번의 순차적인 스크리닝에서 분화된 다핵 근섬유의 라이브러리에 특이적인 cDNA clone을 분리 하였다. 선별된 positive plaque에서 재조합 λgt10 DNA를 Sambrook 등(1989)이 제시한 plate lysate 방법을 이용하여 파아지 DNA를 추출한 후 EcoR I 제한효소를 처리하여 약 1.3 Kb의 삽입절편 cDNA를 확인 분리하였다. 분리된 cDNA를 연구를 더 진행하기 위하여 pBluescript SK+(Stratagene)에 subcloning하여 *E. coli* strain NM522에 형질전환시켜 보관하였다. 위에서 분리된 cDNA 삽입절편을 포함하는 재조합 plasmid인 pBluescript SK+ DNA는 CsCl/EtBr 농도구배법에 따라 분리하였고(Sambrook *et al.*, 1989), 분리된 재조합 pBluescript SK+ DNA를 재차 EcoR I 효소로 처리한 후 1.3 Kb의 삽입절편 cDNA를 electroelution으로 정제 분리하였다.

5. Northern blots

미분화 단핵 근원세포(배양 24시간)와 분화된 다핵 근섬유(배양 72시간)에서 추출한 RNA를 2.2M의 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 positive charged Nylon membrane(Boehringer Mannheim)에 20× SSC의 흡착 용액으로 4시

간 동안 진공 흡착(TransVac TE80, Hoefer) 하였다(Kroczek and Siebert, 1990).

각각의 RNA가 흡착된 membrane을 differential screening에서 선별되어 pBluescript SK+ DNA에 subcloning된 DNA를 위와 같이 분리 정제한 후, 1.3 Kb의 삽입절편 cDNA를 Random Primed labelling kit(BM)을 이용해 방사성 동위원소(α-^{32}P-dCTP, ~3,000 Ci/mmole, Amersham)로 표식시켜 반응용액(50% formamide, 5× SSPE, pH7.4, 5× Denhardt's, 0.1% SDS, 100 μg/ml Salmon sperm DNA)에 첨가(5 × 10^6 CPM/ml)하여 42℃에서 20-24시간 혼성화시켰다. 혼성화된 membrane을 2× SSC/0.1% SDS로 상온에서 15분간 3번, 0.2× SSC/0.1% SDS에서 2번 세척하여 −70°C에서 intensifying screen을 사용해 X-ray film에 감광시켰다.

결과 및 고찰

근세포 분화는 유전자 발현의 조절결과로 볼 수 있는 데 이러한 근세포 분화기작에 대한 연구를 위해서는 근세포 분화동안 일어나는 근특이 단백질의 합성과 이들 유전자 조절의 단계를 이해하는 것이 필수적이다. 계배 골격근 세포는 초기배양이 손쉽게 이루어지고 있으며 생체에서의 분화과정을 *in vitro* 에서도 비교적 충실히 재현되어질수 있다(Bischoff and Holtzer, 1969; O'Neill and Stockdale, 1972; Buckingham, 1977; Ha *et al.*, 1979). 골격근 세포 분화과정은 세포학적 및 생화학적 수준에서의 많은 연구가 행해져 왔으며, 특히 생화학적 수준에서의 연구는 근특이 유전자 발현 기구에 주로 집중되어 연구되어지고 있다. 본 연구에서는 계배 배양 골격근 세포분화 단계에 따라 특이하게 발현되는, 근세포 분화와 밀접히 연관된 유전자를 찾는 데 그 목적이 있다.

배양 계배 근세포 분화에는 배양액에 첨가되는 계배 추출물이 필수적인 것으로 알려져 있으며, 그 필수성은 계배 추출물에 들어있는 trasferrin (TF)에 기인하는 것으로 알려져 있다(Slater, 1976; Yoo *et al.*, 1988). 또한, TF는 세포 안에 철을 공급하는 단백질로 수용체와 결합하여 endocytosis되어 lysosome과 결합한 후 주위의 pH가 낮아짐에 따라 철을 해리하고 exocytosis에 의해 세포 밖으로 방출되었다가 재차 사용되는 것으로 알려져있다(Renswoude *et al.*, 1982; Schnider *et al.*, 1982; Snider *et al.*, 1985).

본 연구에서는 계배 근세포 분화를 유도하기 위해 계배 추출물의 농도가 2% 들어 있는 8102 배양액을 사용하여 계배 근원세포를 배양하였다. 8102 배양액을 사용하여 배양한 근세포의 형태를 그림 1에 나타내었다.

그림에서 보듯이 분화가 진행됨에 따라 분화의 형태적인 특징인 세포 융합이 일어나는 것을 알

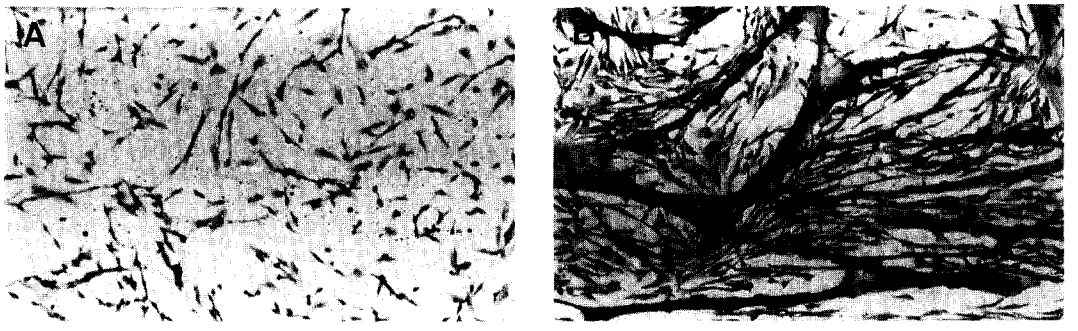

Fig. 1. Microphotographs of chick embryonic myoblasts cultured in the normal medium (8102 medium; 10% Horse serum, 2% embryo extract, 1% antibiotic solution, 87% MEM) for 36 hours (A) and 72 hours (B).

수 있다. 근원세포의 분화 과정은 이러한 형태적 변화와 더불어 근특이 단백질의 선택적 합성 및 축적, 유전자 발현 조절같은 생리적 변화를 동시에 겪게 되는 과정이다(Buckingham, 1977; Devlin and Emerson, 1978; Ha *et al.*, 1981, 1983). 이러한 분화의 각 단계, 즉 미분화 단핵 근원세포(배양 24-36시간)에서와 분화된 다핵 근섬유(배양 72시간)에서 유전자 발현의 차이를 나타내는 분화 관련 유전자를 찾기위해 differential plaque hybridization screening 방법을 통해 분화된 다핵 근섬유에서 높은 수준으로 발현되는 유전자를 확인하였다.

분화된 다핵 근섬유(배양 72시간)에서 발현되는 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 λgt10 vector에 클로닝하여 분화된 다핵 근섬유 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 본 연구에서 제작된 분화된 다핵 근섬유 cDNA 라이브러리는 차제에 근세포분화에 대한 연구에 많은 응용성을 제공해 줄 것으로 생각된다. 제작된 cDNA 라이브러리를 약 1.2×10^5 재조합 phages를 배양하여 미분화된 단핵 근원세포와 분화된 다핵 근섬유의 mRNA에서 제작된 표식자 cDNA로 differential screening 하여 미분화 단핵 근원세포 cDNA probe에서 보다 분화된 다핵 근섬유의 cDNA probe와 강하게 혼성화되는 cDNA clone을 3번의 순차적인 스크리닝을 통해 분리하였다(Fig. 2).

분리된 cDNA clone은 northern 분석을 위해 pBluescript SK+ vector(Stratagene)에 subcloning하였다. 확인된 cDNA의 크기는 약 1.3 Kb였다(Fig. 3).

위와같이 분리된 계배 배양 근섬유에 특이적인 cDNA 를 표식자로 하여 미분화 단핵 근원세포의 RNA및 분화된 다핵 근섬유의 RNA에 northern분석을 행하였다. 그 결과 1.3 Kb cDNA에 대한 RNA의 크기는 약 2.7 Kb로 확인되었다(Fig. 4). 2.7 Kb의 RNA는 위에서 분리된 1.3 Kb cDNA에 대한 mRNA로 생각되며, 분화의 단계에 따라 약 6-7배의 RNA 합성 양의 차이(data not shown)를 가지는 것으로 보아 이 1.3 Kb cDNA의 유전자 발현은 일차적으로 전사단계에서의 조절에 기인하는 것으로 사료된다.

분화 단계에 따라 유전자 발현 양상이 서로 차이를 가진다는 것은 세포분화 동안에 유전자 발현의 시간적, 공간적 조절기구와 연유되어 근원세포의 분화와 밀접한 관련이 있고, 또한 분화가 진행됨에 따라 분화에 필수적인 산물에 대한 유전자 발현이 필요하다(Parterson and Bishop, 1977; Devlin and Emerson, 1978; Buckingham and Minty, 1983). 그러므로 근원세포 분화 단계에 따라 유전자 발현양상의 차이를 가지는 유전자를 분석하는 것은 세포분화 기작에 대한 이해에 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 생각된다.

근원세포 분화가 진행됨에 따라 근특이 유전자의 mRNA축적과 근특이 단백질의 합성이 선택적으로 일어난다(Devlin and Emerson, 1979; Garfinkel *et al.*, 1982; Hastings and Emerson, 1982). 골격근 특이 유전자의 전사 단계에서의 활성화에 관계하는 조절인자의 유전자군들이 다수의 생물 종에서 확인되어져 있으며, 이들은 'MyoD family'-MyoD1, myogenin, myf5, 및 MRF4로 알려져 있다(Emerson, 1990; Weintraub *et al.*, 1991). 이들 조절인자의 특성이 몇몇 근특이 유전자 발현에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되고 있다. 즉, 근특이 단백질 중 creatin kinase, myosin light chain, troponin I, 그리고 nicotinic acetylcholine receptor(nAChR) 유전자들의 조절인자에 이들 근세포분화에 관계되는 조절단백질인 MyoD family가 결합되어 이들의 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Lassar *et al.*, 1989; Piette *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991; Wentworth *et al.*, 1991; Mitsui *et al.*, 1993).

본 연구에서 확인된 1.3 Kb의 cDNA는 미분화 단핵 근원세포에서 분화된 다핵근섬유로 분화가 진행됨에 따라 유전자 산물인 RNA의 양이 증가됨을 알 수 있다. 따라서 1.3 Kb cDNA에 해당하는 유전자는 계배 골격근 세포분화에 매우

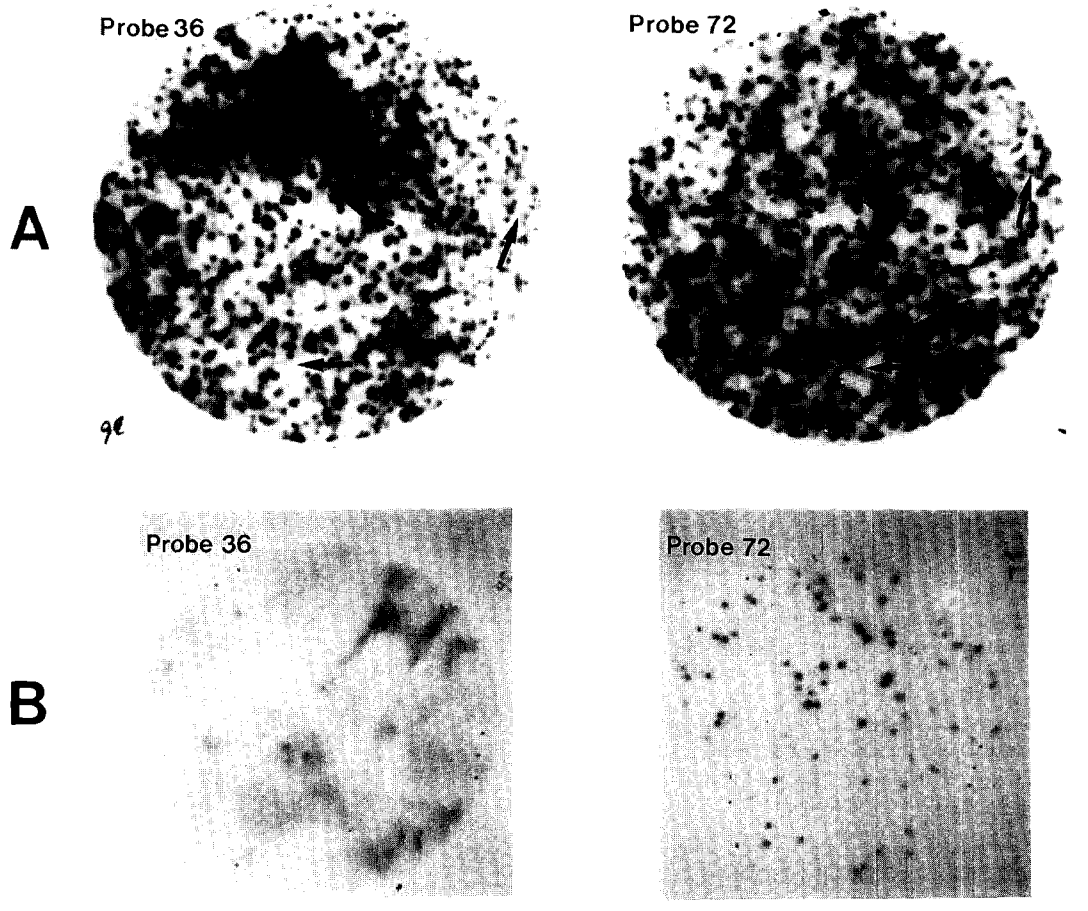

Fig. 2. Differential screenings of chick embryonic myofiber cDNA library. The ^{32}P-cDNA probes were synthesized from undifferentiated myoblasts (Probe-36) and differentiated myofiber (Probe-72) poly (A)$^+$ RNA templates, and then hybridized to the myofiber cDNA library, respectively. A: Example of first screening of chick embryonic myofiber cDNA library. B: Example of final screening of chick embryonic myofiber cDNA library. Arrows indicate differentially hybridizing clones after first screening.

밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.

앞으로 이 1.3 Kb cDNA에 대한 full length cDNA를 합성하여, 이들에 대한 구조 및 특성에 대한 연구를 더욱 더 진행할 예정이다. 또한 이전 연구에서 계배 배양 근원세포의 분화 및 증식에 철과 계배추출물에 포함된 Tf가 필수적인 것으로 나타났는데(Yoo *et al.*, 1991), 이 결과를 근거로 해서 근원세포 분화의 초기조절단계인 세포증식과 세포분열의 중지에 필요한 철의 공급 여부에 따른 1.3 Kb cDNA의 유전자 발현 양상에 대해서도 연구할 예정이다.

인용문헌

Affara, N.A., P. Daubas, A. Weydert, and F. Gros, 1980. Changes in gene expression during myogenic differentiation II. Identification of the proteins encoded by myotube-specific complementary DNA sequences. *J. Mol. Biol.* **140:** 459-470.

Aviv, H. and P. Leder, 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69:** 1408-1412.

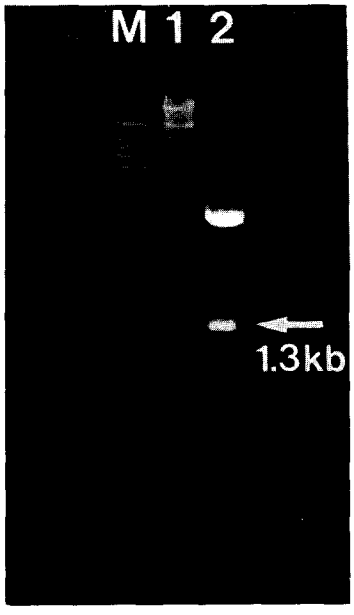

Fig. 3. Size analysis of insert cDNA in a recombinant λgt10 phage and pBluescript SK+ plasmid. The DNAs were restricted with EcoRI enzyme and then electrophoresed onto a 0.8% agarose gel. Lane 1: Insert cDNA cloned in recombinant λgt10 phage picked after final screenings. Lane 2: Insert cDNA subcloned in pBluescript SK+ plasmid. Lane M represents the size marker DNA(1Kb DNA ladder, BRL)

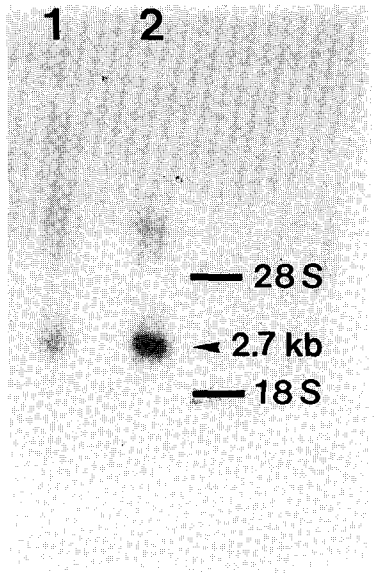

Fig. 4. Northern blot anaysis of total RNA from myoblasts and myofiber cells. Total RNA was separated on 1.2% agarose gels containing 2.2M formaldehyde, and then the gels were blotted onto positive charged Nylon membrane (BM). The blot was hybridized with ^{32}P-labelled 1.3Kb cDNA probe synthesized as described in Materials and Methods. Lane 1: 30 μg of total RNA was isolated from 24 hour of cultured myoblasts. Lane 2: 30 μg total RNA was isolated from 72 hour of cultured myoblasts. Dash marks to right indicate the location of 28S and 18S ribosomal RNAs.

Benoff, S. and B. Nadal-Ginard, 1980. Transient induction of poly-A short myosin heavy chain mRNA during terminal differentiation of L_6E_9 myoblasts. *J. of Molecular Biology.* **140:** 283-298.

Benton, W.D., and R.W. Davis, 1977. Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ. Science.* **196:** 180-182.

Billeter, R., C.W. Heizmann, U. Reist, H. Howald and E. Jenny. 1982. Two dimensional peptide analysis of myosin heavy chains and actin from single-typed human skeletal muscle fibres. *FEBS Letters,* **139:** 45-48.

Bischoff, B., and H. Holtzer, 1969. Mitosis and the process of differentiation of myogenic cells *In vitro. J. Cell. Biol.* **41:** 188-200.

Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H.H. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8:** 701-709.

Bronson, D.D. and F.H.Schachat. 1982. Heterogeneity of contractile proteins. Differences in trophomyosin in fast, mixed and slow skeletal muscles of the rabbit. *J. Biol. Chem.* **257:** 3937-3944.

Bucher, E.A., P.C. Maisonpierre, S.F. Konieczny, and C. P. Emerson. Jr., 1988. Expression of the troponin complex genes: Transcriptional coactivation during myoblast differentiation and independent control in heart and skeletal muscles. *Mol. Cell. Biol.* **8:** 4134-4142.

Buckingham, M.E., 1977. Muscle protein synthesis and its control during the differentiation of skeletal muscle cells *In vitro.* In: Biochemistry of cell differentiation II (J. Paul ed.), *University Park Press.* **15:** 269-332.

Buckingham, M.E. and A.J. Minty. 1983. Contractile protein genes. Eukaryotic genes (Maclean, N. and S.P. Gregory and R.A. Flavell. Eds) pp.365-395.

Buonanno, A., and J.P. Merlie, 1986. Transcriptional regulation of nicotinic acetylcholine receptor genes during muscle development. *J. Biol. Chem.* **261:** 11452-11455.

Buonanno, A., L. Apone, M.I. Morasso, R. Beers, H.

Brenner, and R. Eftimie, 1992. The myoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse myf-5 cDNA. *Nucleic Acid Research.* **20:** 539-544.

Buskin, J.N. and S.D. Hauschka, 1989. Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **9:** 2627-2640.

Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. Macdonald, and W.J. Rutter, 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemystry.* **18:** 5294-5299.

Davis, R.L., Cheng, P-F., Lassar, A.B. and Weintraub, H. 1990. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell.* **60:** 737-746.

Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* **51:** 987-1000.

Devlin, R.B., and C.P. Emerson, Jr., 1978. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. *Cell.* **13:** 599-611.

Devlin, R.B., and C.P. Emerson, Jr., 1979. Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation. *Dev. Biol.* **69:** 202-216.

Emerson, C.P. and S.K. Beckner. 1975. Activation of myosin synthesis in fusing and mononucleated myoblasts. *J. Mol. Biol.* **2:** 674-684.

Emerson, C., D. Fischman, B. Nadal-Ginard, and M.A. Q. Siddiqui, 1986. Molecular biology of muscle developoment. *Alan R. Liss, Inc.*, New York.

Emerson, C.P. Jr., 1990. Myogenesis and developmental control genes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2:** 1065-1075.

Evans, S., D. Goldman, S. Henemann, and J. Patrick, 1987. Muscle acetylcholine receptor biosynthesis: Regulation by transcript availability. *J. Biol. Chem.* **262:** 4911-4916.

Garfinkel, L.I., M. Periasamy, and B. Nadal-Ginard, 1982. Cloning and characterization of cDNA sequences corresponding to γ-tropomyosin and α-actin. *J. Biol. Chem.* **257:** 1078-1086.

Ha, D.B., R. Boland, and A. Martonosi, 1979. Synthesis of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other muscle specific proteins during development of muscle cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta,* **585:** 165-187.

Ha, D.B., W.B. Im and B.J. Yoo, 1981. Synthesis of muscle proteins during the differentiation of cultured chicken pectoralis muscle cells. *Korean J. Zool.* **24:** 173-188.

Ha, D.B., B.J. Yoo, J.K. Sonn, H.S. Kang and Y.S. Lee, 1983. Synsthesis of muscle-specific proteins during the differemtiation of chick embryonic muscle cells in culture. *Korean J. Zool.* **26:** 1-17.

Hastings, K.E., and C.P. Emerson, Jr., 1982. cDNA clone analysis of six co-regulated mRNAs encoding skeletal muscle contractile proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79:** 1553-1557.

Kroczek, R.A., and E. Siebert, 1990. Optimization of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal. Biochem.* **184:** 90-95.

Lassar, A.B., J.N. Buskin, D. Lockshon, R.L. Davis, S. Apone, S.D. Hauschka, and H. Weintraub, 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinast enhancer. *Cell.* **58:** 823-831.

Lin, H., K.E. Yutzey, and S.F. Konieczny, 1991. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **11:** 267-280.

Mitsui, K., M. Shirakta, and B.M. Paterson, 1993. Phosphorylation inhibits the DNA-binding activity of MyoD homodimers but not myoD-E12 heterodimers. *J. Biol. Chem.* **268:** 24415-24420.

O'Neill, B.B., and S.D. Stockdale, 1972 A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* **52:** 52-65.

Paterson, B. and R.C. Stroham. 1972. Myosin synthesis in cultures of differentiating chicken embryo skeletal muscle. *Developmental Biology.* **29:** 113-138.

Paterson, B.M., and J. O. Bishop, 1977. Changes in the mRNA population of chick myoblasts during myogenesis *In vitro*. *Cell.* **12:** 751-765.

Piette, J., J.L. Besserean, M. Huchet, and J.P. Changeux, 1990. Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor δ-subunit gene. *Nature.* **345:** 353-355.

Renswoude, J.V., K.R. Bridges, J.B. Harford and R.D. Klausner, 1982. Receptor- mediated endocytosis of transferrin and the uptake Fe in K562 cells: Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79:** 6186-6190.

Rhodes, S.J. and Konieczny, S.F. 1989. Identification of MRF 4; a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3:** 2050-2061.

Saitoh, O., A.F. Sehara, Y.I. Nabeshima, and M. Periasamy, 1993. Expression of myogenic factors in denervated chicken breast muscle: isolation of the chicken myf-5 gene. *Nucleic Acid Research.* **21:** 2503-2509.

Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring

Harbor Laboratory.

Schneider, C., R. Sutherland, R. Newman, and M. Greaves, 1982. Structural features of the cell surface receptors for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J. Biol. Chem.* **257:** 8516-8522.

Schwartz, R.J. and K.N. Rothblum. 1981. Gene switching in myogenesis: differential expression of the chicken actin multigene family. *Biochemistry.* **20:** 4122-4129.

Slater, C.R., 1976. Control of myogenesis *in vitro* by chick embryo extract. *Devel. Biol.* **50:** 264-284.

Snider, M.D. O.C. Rogers, 1985. Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: Resialyation of asialo-transferrin receptors in human erythroleukemia cells. *J. Cell Biol.* **100:** 826-834.

Sternberg, E.A., G. Spizz, W.M. Perry, D. Vizard, T. Weil, and E.N. Olson, 1988. Identification of upstream and intragenic regulatory elements that confer cell-type-restricted and differentiation-specific expression on the muscle creatine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **8:** 2896-2909.

Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Krause, R. Benezra, T.K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, S. Hollenberg, Y. Zhuang, and A. Lassar, 1991. The myoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* **251:** 761-766.

Wentworth, B.M., M. Donoghue, J.C. Engert, E.B. Berglund, and N. Rosenthal, 1991. Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88:** 1242-1246.

Whalen, R.G., S.M. Sell, G.S. Butler-Browne, K. Schwartz, P. Bouveret and I. Pinset. 1981. Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in developing rat muscle. *Nature,* London. **292:** 805-809.

Wright, W.E., Sassoon, D.A. and Lin, V.K. 1989. Myogenin a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell.* **56:** 607-617.

Yoo, B.J., C.H. Lee, K.B. Kwak, C.H. Chung, and D.B. Ha, 1988. The presence in embryo extract and fusion of chick embryonic myoblasts in culture. *Korean J. Zool.* **31:** 207-217.

Yoo, B.J., S.W. Jee, S.H. Kim, J.K. Sonn, B.H. MIn, and J.S. Yang, 1991. Effect of Fe^{3+} on differentiation fo chick embryonic myoblasts cultured *in vitro*. *Korean J. Zool.* **34:** 610-617.

(Accepted February 26, 1994)

Studies on the Differentiation of Myoblasts: Molecular Cloning of Differentiation-related Genes in the Chick Embryonic Myoblasts by Differential Hybridizaion.

Bong Seok Kang, Sei Heon Jang*, Byoung Je Yoo, and Jae Sub Yang* (Department of Biology and *Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Taegu University, Kyungpook 713-714, Korea)

To study the muscle gene regulation during differentiation of cultured chick embryonic myoblasts, we have constructed a cDNA library of the chick embryonic myofiber obtained from 72 hour culture of embryonic myoblasts. This cDNA library was screened by differential plaque hybridization using [^{32}P]cDNA probes synthesized from undifferentiated myoblast (36 hour of culture) and differentiated myofiber (72 hour of culture) poly(A)$^+$ RNA templates. The cDNA clones which preferentially hybridized to the differentiated myofiber [^{32}P]cDNA probe were selected. One of the selected cDNA clones was resulted in size of about 1.3 Kb insert. Northern blot analysis of mRNA from myoblast and myofiber revealed the cDNA clone of a 2.7 Kb transcript. The amount of a 2.7 Kb transcript was incresed about 7-folds during the muscle cell differentiation.