

근원세포 융합과 관련된 새로운 유전자의 확인

박수정 · 이영주 · 박혜경 · 김한도* · 강호성* · 임운기* · 김병기** · 김정락

인제대학교 자연과학대학 생물학과, 부산대학교 자연과학대학 분자생물학과*, 생물학과**

본 연구자들은 근원세포를 면역시켜 얻은 hybridoma들을 검색하여, 계배 근원세포의 분화와 관련된 단백질을 인지하여 분화를 억제하는 효과가 있는 monoclonal antibody 3H35를 선별하여 그 항원을 확인한 바 있다(Kim *et al.*, (1992), Korean J. Zool., 35: 29-36). 본 연구에서는 λ ZAP에 cloning된 chicken muscle cDNA library들을 *lacZ* fusion protein으로 발현시켜 항체 3H35로 검색하여 그 유전자를 찾아내었다. 선별한 cDNA clone 중 C59의 삽입 절편은 1.6 kb이었고, 발현시킨 *lacZ* fusion protein은 60 kDa로, β -galactosidase에 대한 항체에 반응하며 3H35와도 반응함을 immunoaffinity adsorbant와 immunoblot으로 확인하였다. Clone C59의 삽입 절편의 염기서열을 분석한 결과, 실제 유전자는 1.6 kb 이상이며, 알려진 어느 다른 유전자와도 관련이 없는 새로운 근원이 유전자로 판단되었다. 아미노산으로 전환시켰을 때 31개의 특이한 서열이 7차례 반복된 부분이 나타났으며 이 서열의 23개가 일정하게 보존되어있고 나머지 서열의 아미노산의 polarity도 매우 유사하게 보존되어있다. 이들의 보존성이 극히 높은 것으로 보아 독특한 기능을 수행하는 domain으로 추정된다.

KEY WORDS: Cell Differentiation, Monoclonal Antibody, Muscle Specific Gene

개체발생은 매우 정교한 조절기작에 의해 이루어진다. 수정란에서 각 조직에 따라 특수한 세포로 전환되는 세포분화는 수정란에 불연속적으로 산재된 물질과 발생 중인 배아 세포 간의 상호작용에 의해 결정된다. 근원세포는 분리와 배양이 용이할 뿐 아니라 혈청이 결핍된 배양조건에서 쉽게 분화를 유도할 수 있고, 분화에 따른 형태적, 생화학적 변화가 뚜렷하여 분화과정에 대한 실험적 분석이 간편하고, 배양 세포는 생체의 분화과정을 비교적 충실하게 재현하므로 세포분화 기작의 해명을 위한 연구재료로써 많이 이용되고 있다(Bischoff and Holtzer, 1969; Ha *et al.*, 1979). 근원세포의 분화는 단핵의 근원세포가 신장 융합하여 다핵성 근관을 형성하게 되는 형태적 분화와 함께 수축 이완의 기능을 갖추기 위한 근특이 단백질의 선택적 합성과 축적으로 생화학적 분화가 일어난다(Ha *et al.*, 1979; 1981; 1983; Endo and Nadal-Ginard, 1987).

근원세포 분화의 촉발요인으로는 근원세포의 배양 시 일정 밀도 이상의 세포를 접종해야 한다든지, 배양액에 embryo extract나 horse serum 등이 첨가되어야 하는 등, 환경적인 요인이 근세포의 분화를 일으키는데 필수적인 것으로 알려지고 있다(Konigsberg, 1971; Yeoh and Holtzer, 1977; Ha *et al.*, 1983, 1985; Yoo *et al.*, 1988). 또한 세포분화와 세포분열 간의 길항적 관계로 미루어 볼 때 세포분화의 직접적인 요인은 분화촉진물질의 분비와 (Doering and Fishman, 1977; Delain *et al.*, 1981; Ha *et al.*, 1984; Park *et al.*, 1986) 배양액 내에 존재하는 생장인자, mitogen과 같은 분화억제물질의 고갈에 있다는 것을(Spizz *et al.*, 1987; Wice *et al.*, 1987; Kelvin *et al.*, 1989) 추론하고 있다.

이들 배양액 내의 분화촉진물질이나 분화억제물질은 세포막을 통하여 세포 내로 전달될 것이므로 세포막 단백질의 역할에 관심이 모아지고

있다. 한편으로, 세포와 세포가 2 nm 이내로 접근함을 막는 큰 에너지 장애때문에, influenza virus의 hemagglutinin, Sendai virus의 hemagglutinin/neuraminidase와 fusion protein의 경우와 같이, enveloped virus가 숙주세포와 융합하는 데는 binding과 fusion의 기능을 갖는 단백질이 필요하다는 사실에 비추어, 근원세포가 물리적 융합을 하는 데에도 비슷한 기능의 막단백질이 관여할 것으로 추정된다(White and Blobel, 1989). 실제로 세포융합에 수반되는 근원세포 표면단백질의 변화와 그 기능적 역할에 대한 연구가 대단히 많이 이루어지고 있다(Engel and White, 1990; Knudsen, 1990). Integrin(Menko and Boettiger, 1987)과 NCAM(Dickson *et al.*, 1990), fibronectin과 그 수용체(Chung and Kang, 1990), rat myoblast high affinity hexose transport system(Kudo and Lo, 1990), cadherin(Donalies *et al.*, 1991), ecto-protein kinase와 112 kDa의 단백질(Chen and Lo, 1991) 등이 근세포 분화와 밀접하게 관련된 것으로 알려졌다.

본 연구자 등은 이전의 실험에서 계배 근원세포의 분화에 영향을 주는 단백질과 유전자에 대하여 관심을 갖고(Kim *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1992) 근원세포의 융합에 관여하는 세포 표면단백질에 대한 단일클론항체를 선별, 그 항원을 분리한 바 있다(Kim *et al.*, 1992a, b). 분리된 항체를 분화가 진행 중인 근원세포의 배양액에 첨가한 결과 세포의 분화와 융합이 억제되는 결과를 얻음으로서 이 항체에 대응한 항원 단백질이 근원세포의 분화에 관여한다는 것을 추정할 수 있었다. 이 단백질의 발현 조절을 연구하기 위하여 분리된 항체를 이용한 immunoscreening으로 chick muscle의 cDNA library로부터 근원세포 융합에 관여하는 표면단백질의 유전자를 찾아내었다.

재료 및 방법

Immunoscreening

계배 골격근 표면단백질에 대한 단일클론항체, 3H35를(Kim *et al.*, 1992b) 탐침으로하여 λ ZAP에 cloning된 chicken muscle cDNA library를(Stratagene, 935404) 조사하였다. *E. coli* BB4 strain에 λ ZAP library를 섞어 20 분간 상온에서 감염시켰다. LB plate에 soft agar를 이용하여 42°C에서 4시간 배양한 후, 10 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside를 (IPTG) 처리한 nitrocellulose (NC) paper를 LB plate에 덮어 다시 37°C에서 4시간 이상 배양하여 *lacZ* fusion protein을 발현시켰다. Plate에 NC paper 위치를 표시한 후 떼어내어 150 mM NaCl/0.05% Tween 20/10 mM Tris-HCl, pH 8.0 용액으로(TBST) 10분간 3번 세척한 후, 비특이적 결합을 막기 위해 차단용액에(1% BSA/0.05% sodium azide) 넣어 밤새 보관하였다. TBST로 세척하여 근원세포에 대한 일차 항체 3H35를 2시간 처리한 후, 다시 TBST로 세척하여 alkaline phosphatase가 결합된 이차항체 anti-mouse IgG를 2시간 처리하였다. TBST로 세척한 후 기질인 nitro blue tetrazolium와 (NBT) bromochloroindolyl phosphate를 (BCIP) 첨가하여 발색시켰다. NC paper에 발색된 부분의 plaque를 LB plate에서 찾아, 2-3방울의 chloroform을 떨어 뜨린 SM buffer에 넣어 상온에서 2시간 정도 방치한 후 4°C에서 보관하였다. 적당한 phage 농도를 결정한 후 nonspecific single plaque를 control로 하여 immunoscreening으로 재 확인하였다.

Immunoblot

E. coli BB4에 λ ZAP phage를 감염시켜 *lacZ* fusion protein을 발현시킨 배양액을 10% TCA 용액으로 농축한 후, bovine

serum albumin을(BSA, fraction V) 표준 단백질로 사용하여 단백질 정량하여(Lowry *et al.*, 1951) Laemmli의 방법에(1970) 따라 10% acrylamide gel에 전개하였다. 전기영동 시행 후의 gel을 증류수로 세척하고 transfer buffer에(192 mM glycine/1.3 mM SDS/20 % metanol/25 mM Tris, pH 8.3) 포화된 NC paper와 여과지에 포개어 0.8 mA/cm²의 전류로 1시간 transfer kit를 이용하여 전개하였다(Kyhse-Andersen, 1984). 분자량 추정을 위한 표준단백질은 india ink로(Hancock and Tsang, 1983) 염색하였다. 항원의 검색은 근원 세포에 대한 일차항체 3H35와 alkaline phosphatase가 결합된 이차항체를 결합시키고 기질인 BCIP와 NBT로 발색시켰다.

Immunoaffinity를 이용한 *lacZ* Fusion Protein의 분리

항체와 반응하는 단백질이 발현되는 plaque의 phage를 *E. coli* BB4에 감염시킨 후 LB broth에 10 mM IPTG를 첨가하여 *lacZ* fusion protein을 발현시켰다. 두 시간 27,000 rpm으로 cell lysate의 배양액을 원심분리하여 ProtoSorb *lacZ* Adsorbant(Promega) affinity column에 충전하여 3 M urea/0.1 M citrate, pH 2.9로 용출하였다.

DNA Sequencing

Lambda ZAP으로부터 helper phage를(Stratagene, ExAssist/SOLR system) 이용하여 pBluescript를 절제하였다. pBluescript에 cloning한 DNA를 *Hind* III와 *Kpn* I으로 3' overhang과 5' overhang을 각각 만든 후, *Exo* III를 이용하여 unidirectional deletion으로 subcloning하였다(Henikoff, 1984).

DNA 염기 서열의 결정은 Sequenase version 2.0을(USB) 이용하여 chain termination method를(Sanger *et al.*, 1977) 시행하였다. Subcloning한 pBluescript를 0.2 N NaOH/0.2 mM EDTA로 denature시킨 DNA를 template로 사용하였

다. 반응시킨 DNA를 8 M urea와 함께 6% acrylamide gel에서 50 W로 전기영동한 다음 autoradiograph를 하였다.

결과 및 고찰

다세포 생물의 세포 간의 인식과 신호 전달의 측면에서 분화 연구의 중요 문제는 세포막의 표면 단백질의 기능에 대한 것이다. 세포막을 이루고 있는 표면단백질은 수용액에 녹지 않으며 인지질과 결합되어 있어 여러가지 detergent로 지질을 제거할 경우 자연 상태의 구조가 변형되어 기능을 잃거나 다른 소수성 단백질들과 aggregation이 일어나기 쉬우므로 순수 분리에 많은 난점이 따른다. 근원세포 분화의 기작을 연구하는 데에도 표면단백질들의 중요성이 인식되고 있지만 개별적 분리 방법이 정립되어 있지 않으므로 가장 큰 장애가 되고 있다. 이러한 난점의 타개책의 하나로 막의 구조와 기능을 연구하는데 monoclonal antibody를 이용하고 있다. 세포막의 항원이 순수 분리되지 않았을 때나 그 특성이 충분히 알려져 있지 않을 때에도 그 미지의 물질에 대한 항체를 얻을 수 있으므로 오히려 면역학적 방법의 장점이 크게 드러난다. Monoclonal antibody를 이용한 근원세포의 표면단백질 연구로 CSAT와(Neff *et al.*, 1982) Thy-1(William and Gagnon, 1982), C3-1(Wakshull *et al.*, 1983), N-CAM(Couvault *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1987), 24.1D5(Gower *et al.*, 1989), integrin α 7(Song *et al.*, 1992) 등 항원을 찾아내었다.

이전의 연구에서 본 연구자들은 근원세포를 면역시켜 얻은 hybridoma들을 검색하여, 계배 근원세포의 분화와 관련된 단백질을 인지하여 분화를 억제하는 효과가 있는 monoclonal antibody 3H35를 선별하여 그 항원을 확인한 바 있다(Kim *et al.*, 1992b). 본 연구에서는 λ ZAP에 cloning된 chicken muscle cDNA library들을(Stratagene, 935404) *lacZ*

fusion protein으로 발현시켜 항체 3H35로 검색하였다(Fig. 1).

검색한 λ ZAP phage clone C59를 *E. coli* BB4에 감염시킨 후 *lacZ*(β -galactosidase) fusion protein을 발현시켜 cell lysate를 애초에 library 검색에 사용했던 항체 3H35로

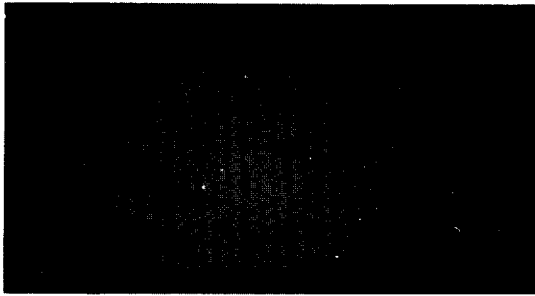


Fig. 1. Immunoscreening of chicken muscle cDNA library. Plaques were lift from a chicken muscle cDNA library in lambda ZAP and were probed with monoclonal antibody 3H35. Dark stained plaques are positive ones.

immunoblot으로 분석한 결과, 60 kDa의 단백질을 인지하였다(Fig. 2). 다시 *E. coli* BB4에 clone C59를 발현시켜 ProtoSorb *lacZ* Adsorbant(Promega) affinity column으로 동일한 60 kDa의 단백질을 분리할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 clone C59가 발현하는 fusion protein은 anti- β -galactosidase antibody에 반응하며 3H35 antibody에도 반응하는 60 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 clone C59의 cDNA의 크기는 1.6 kb였다(Fig. 4).

Clone C59의 cDNA의 염기서열을 분석한 결과, 실제 이 유전자의 크기는 1.6 kb 이상이며 지금까지 알려진 어느 다른 gene family와도 연관이 없는 새로운 근특이 유전자로 판단되었다. 아미노산으로 전환하였을때 특이한 31개의 아미노산 서열이 7차례 반복된 부분을 발견하였다(Fig. 5). 이들 아미노산 중 23개가 일정하게 보존되어 있었고, 9번째는 valine 또는 isoleucine, leucine, 12번째는 valine 또는 alanine, 17번째는 isoleucine 또는 valine,

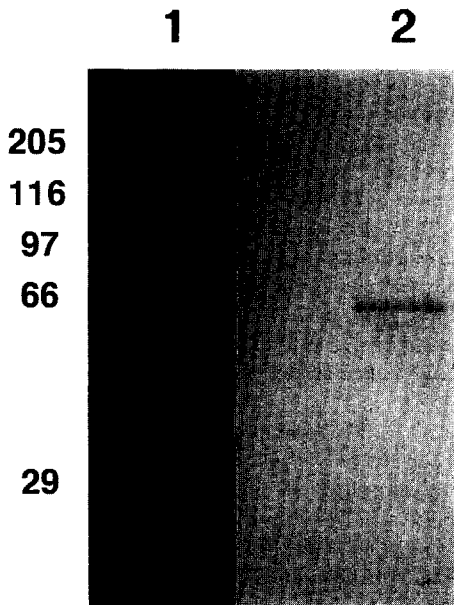


Fig. 2. Immunoblot analysis of *lacZ* fusion protein with monoclonal antibody 3H35. Infected bacterial lysates with 3H35 positive lambda clone C59 were fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose and probed with 3H35 monoclonal antibody (lane 2). Size standards were stained with India ink (lane 1).

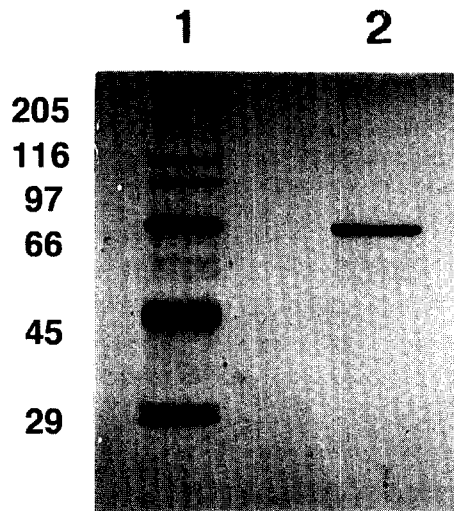


Fig. 3. Purification of *lacZ* fusion protein by immunoaffinity chromatography. *LacZ* fusion protein was purified from infected bacterial lysates with 3H35 positive lambda clone C59 by ProtoSorb *lacZ* immunoaffinity adsorbent (Promega) and resolved on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and silver-stained (lane 2). Size standards are indicated on the left (lane 1).

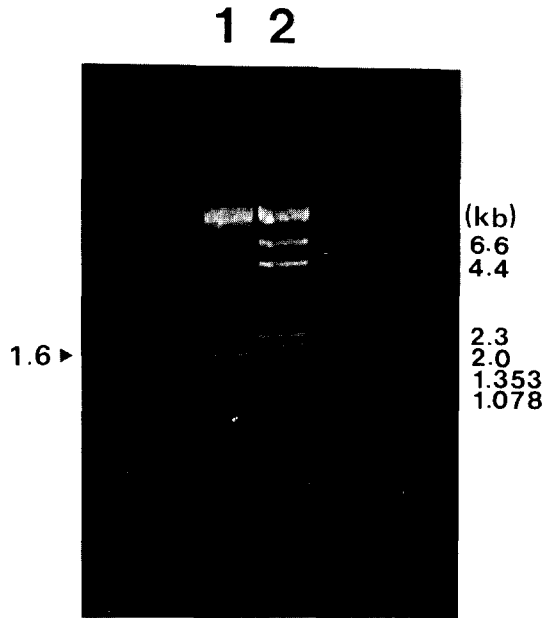


Fig. 4. Size determination of insert cDNA cloned in lambda ZAP. *Eco* RI restricted fragment was displayed (lane 1). Size markers indicated in kb were from *Hind* III digests of λ phage (lane 2).

10 20 30
SSVLYKENVGVKVTPTPTPEMERVKRNQEI

Fig. 5. Deduced amino acid sequence of insert cDNA from chicken muscle cDNA library. Insert cDNA of 3H35 positive lambda clone C59 had unique 31 amino acids' domain repeated seven times. Common residues are shaded.

25번째는 lysine 또는 arginine 등으로, 나머지 부분의 polarity도 매우 유사하게 보존되어 있었으며, TPTP서열이나 KRNQ서열에서 β -turn구조를 갖는 것으로 추정된다. 이들 부분이 기존에 알려진 세포막에 연관된 helix 구조와는 전혀 다르지만 또 다른 형태의 transmembrane 일 가능성도 배제할 수 없다. 이들의 보존성이 극히 높은 것으로 보아 독특한 기능을 수행하는 것으로 판단된다.

유전자 발현의 측면에서 고등생물의 발생과 분화를 연구하는데 transcription factor의 기능 연구는 또다른 중요한 문제이다. 현재 근원세포에서 *MyoD1*(Davis *et al.*, 1987)과 *myd*

(Pinney *et al.*, 1988), myogenin(Wright *et al.*, 1989), *Myf-5*(Braun *et al.*, 1989), *Myf-6*(Rhodes and Konieczny, 1989), CMD1(Lin *et al.*, 1989) 등 여러가지 transcription factor들이 알려져 있다. 본 연구에서 알려진 유전자의 발현 조절과 그들과의 상호관계는 앞으로 해결하여야 할 과제이다.

감사

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구조성비와 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-93-405)의 지원에 의해 수행된 연구임.

인용문헌

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

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

Chen, S.R. and T.C.Y. Lo, 1991. Involvement of cell surface protein and an ecto-protein kinase in rat L6 myoblasts. *Biochem. J.* **279**: 475-482.

Chung, C.Y. and M.S. Kang, 1990. Correlation between fibronectin and its receptors in chick myoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.* **142**: 392-400.

Couvalt, J., J.P. Merlie, C. Goridis and J.R. Sanes, 1986. Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **102**: 731-739.

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

Delain, D., J.P. Wahrman and F. Gros, 1981. Influence of external diffusible factors on myogenesis of the cells of the line L6. *Exp. Cell Res.* **131**: 217-224.

Dickson, G., D. Peck, S.E. Moore, C.H. Barton and F.S. Walsh, 1990. Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* **344**: 348-351.

Doering, J.L. and D.A. Fishman, 1977. A fusion-promoting macromolecular factor in muscle conditioned medium. *Exp. Cell Res.* **105**: 437-443.

Donalies, M., M. Cramer, M. Ringwald and A. Starzinski-

- Powitz, 1991. Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 8024-8028.
- Endo, T. and B. Nadal-Ginard, 1987. Three types of muscle-specific gene expression in fusion-blocked rat skeletal muscle cell; Translational control in EGTA-treated cells. *Cell* **49**: 515-526.
- Engel, L. and J.M. White, 1990. Antibodies to 100- and 60-kDa surface proteins inhibit substratum attachment and differentiation of rodent skeletal myoblasts. *Dev. Biol.* **140**: 196-208.
- Gower, H.J., S.E. Moore, G. Dickson, V.L. Elsom, R. Nayak and F.S. Walsh, 1989. Cloning and characterization of a myoblast cell surface antigen defined by 24.1D5 monoclonal antibody. *Development* **105**: 723-731.
- Ha, D.B., B.J. Yoo, J.K. Sonn, H.S. Kang, and Y.S. Lee, 1983. Synthesis of muscle-specific proteins during the differentiation of chick embryonic muscle cell in culture. *Korean J. Zool.* **26**: 1-17.
- Ha, D.B., C.C. Lee, Y.C. Park, W.K. Lim and B.G. Yoo, 1985. The effects of fractions chick embryo extract on the fusion of cultured chick embryonic myoblasts. *Korean J. Zool.* **28**: 179-193.
- Ha, D.B., R. Boland and A. Martonosi, 1979. Synthesis of the calcium transport ATPase of sarcoplasmic reticulum and other muscle proteins *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. and Y.J. Yoo, 1984. The effect of muscle-conditioned medium on the fusion of chick embryo myoblast cells in culture. *Korean J. Zool.* **27**: 151-164.
- Hancock, K. and V.C.W. Tsang, 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**: 157-162.
- Henikoff, S., 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Kang, S.G., S.H. Kim, C.G. Lee, S.J. Park and C.-R. Kim, 1992. Studies on specific genes related to the regulation of muscle cell differentiation. *Korean J. Zool.* **35**: 287-294.
- Kelvin, D.J., G. Simard, A. Sue-A-Quan and J.A. Connolly, 1989. Growth factors, signalling pathways, and the regulation of proliferation and differentiation in BC3H1 muscle cells. II. Two signalling pathways distinguished by pertussis toxin and potential role for the ras oncogene. *J. Cell Biol.* **108**: 169-176.
- Kim, C.-R., S.J. Park, J.C. Hah, H.S. Kang, W.K. Lim, H. D. Kim and D.B. Ha, 1992a. Characterization of plasma membrane protein related to myogenesis defined by a monoclonal antibody. *Mol. Cells* **2**: 273-279.
- Kim, C.-R., W.C. Choi and H.D. Kim, 1992b. Identification of a fusion-associated protein in the skeletal myoblast using monoclonal antibody. *Korean J. Zool.* **35**: 29-36.
- Kim, S.H., C.G. Lee, S.J. Park, S.M. Jung, C.-R. Kim and S.G. Kang, 1991. Construction and characterization of cDNA libraries related to differentiation stages of chick embryonic muscle cells. *Inje J.* **7**: 661-665.
- Knudsen, K.A., 1990. Cell adhesion molecules in myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 902-906.
- Konigsberg, I.R., 1971. Diffusion-mediated control of myoblast fusion. *Develop. Biol.* **26**: 133-152.
- Kudo, P.A. and T.C.Y. Lo, 1990. Involvement of hexose transport in myogenic differentiation. *J. Cell Physiol.* **145**: 347-355.
- Kyhse-Anderson, J., 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid trans of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lin, Z.Y., A. Dechesne, J. Eldridge and B.M. Paterson, 1989. An avian muscle factor related to MyoD1 activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different germ-layer origin and in BrdU-treated myoblasts. *Genes & Dev.* **3**: 986-996.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.R. Farr and H.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Menko, A.S. and D. Boettiger, 1987. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell* **51**: 51-57.
- Moore, S.E., J. Thompson, V. Kirkness, J.G. Dickson and F. S. Walsh, 1987. Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines. *J. Cell Biol.* **105**: 1377-1386.
- Neff, N.T., C. Lowry, C. Decker, A. Tovar, C. Damsky, C. Buck and A.F. Horwitz, 1982. A monoclonal antibody detaches embryonic skeletal muscle from extracellular matrices. *J. Cell Biol.* **95**: 654-666.
- Park, H.G., Y.C. Park, C.C. Lee and D.B. Ha, 1986. On the possible fusion-promoting factor secreted from cultured myoblast. *Korean J. Zool.* **29**: 294-306.
- Pinney, D.F., S.M. Pearson-White, S.F. Konieczny, K.E. Latham and C.P. Emerson, 1988. Myogenic lineage determination and differentiation: Evidence for a regulatory gene pathway. *Cell* **53**: 781-793.
- Rhodes, S.J. and S.F. Konieczny, 1989. Identification of MRF4; a new member of muscle regulatory factor gene

- family. *Genes & Dev.* **3**: 2050-2061.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Song, W.K., W. Wang, R.F. Foster, D.A. Bielser and S.F. Kaufman, 1992. H36- α 7 is a novel integrin alpha chain that is developmentally regulated during skeletal myogenesis. *J. Cell Biol.* **117**: 643-657.
- Spizz, G., S.J. Hu and E.N. Olson, 1987. Inhibit of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor does not require persistent c-myc expression. *Dev. Biol.* **123**: 500-507.
- Wakshull, E., E.K. Bayne, M. Chiquet and D.M. Fambrough, 1983. Characterization of a plasma membrane glycoprotein common to myoblasts, skeletal muscle satellite cells, and glia. *Dev. Biol.* **100**: 464-477.
- White, J.M. and C.P. Blobel, 1989. Cell-to-cell fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 934-939.
- Wice, B., J. Milbrandt and L. Glaser, 1987. Control of muscle differentiation in BC3H1 cells by fibroblast growth factor and vanadate. *J. Biol. Chem.* **262**: 1810-1817.
- Williams, A.F. and J. Gagnon, 1982. Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: Homology with immunoglobulin. *Science* **216**: 696-703.
- Wright, W.E., D.A. Sassoon and V.K. Lin, 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**: 607-617.
- Yeoh, G.C.T. and H. Holtzer, 1977. The effects of cell density, conditioned medium and cytosine arabinoside on myogenesis in primary and secondary cultures. *Exp. Cell Res.* **104**: 63-78.
- Yoo, B.G., C.H. Lee, K.B. Kwak, C.H. Chung and D.B. Ha, 1988. The present in embryo extract of a myotrophic protein that affects proliferation and fusion of chick embryonic myoblasts. *Korean J. Zool.* **31**: 207-217.

(Accepted December 15, 1994)

A New Gene of Protein Related to Myoblast Fusion Detected by Monoclonal Antibody

Su Jung Park, Young Ju Lee, Hye Gyeong Park, Han Do Kim*, Ho Sung Kang*, Woon Ki Lim*, Byeong Gee Kim**, and Chong-Rak Kim (Department of Biology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae 621-749, Korea; Department of Molecular Biology* and Department of Biology**, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

We have previously demonstrated the production of a panel of monoclonal antibodies against 48 h-cultured chick myoblasts [Kim *et al.* (1992), *Korean J. Zool.*, 35: 29-36]. Among a panel of monoclonal antibodies, 3H35 was inhibited myoblast fusion. In this study, we have isolated the cDNA encoding a novel protein of chicken myoblast by the monoclonal antibody 3H35. One of the selected cDNA clones, C59 was resulted in size of 1.6 kb insert. Nucleotide sequence analysis indicated that the gene is a new gene unrelated to any other gene family known. In estimated amino acid sequence it has a unique structural feature: 31 amino acids' domain repeated seven times and 23 amino acids of their sequences are invariant.