

## 인간염색체 12q13에 내재한 마우스 Gamm1의 인간유전자 homolog, MYG1의 클로닝과 발현

<sup>1</sup>양금진 · <sup>1</sup>이형남 · <sup>1</sup>배윤정 · <sup>1</sup>신동직 · <sup>1</sup>김은민 · <sup>2</sup>윤종복 · <sup>2</sup>박영일 · <sup>3</sup>김준 · <sup>4</sup>유지창 †, <sup>1</sup>김성주  
<sup>1</sup>가톨릭의과학연구원, <sup>2</sup>연세대학교 생화학과 PNR, <sup>3</sup>고려대학교 생명공학원, <sup>4</sup>가톨릭대학교 의과대학 병리학교실  
(접수 : 2002. 5. 28., 게재승인 : 2002. 7. 16.)

## Cloning and Expression of a Human Homolog of Mouse Gamm1, MYG1, Localized in 12q13

Keumjin Yang<sup>1</sup>, Hyoungham Lee<sup>1</sup>, Younjung Bae<sup>1</sup>, Dongjik Shin<sup>1</sup>, Eunmin Kim<sup>1</sup>, Jong-Bok Yoon<sup>2</sup>, Youngil Park<sup>2</sup>,  
Jun Kim<sup>3</sup>, Jichang Yu<sup>4</sup>, and Sungjoo Kim<sup>1</sup>†  
Research Institute of Molecular Genetics, Catholic Research Institutes of Medical Sciences Seoul 137-040, Korea  
Department of Biochemistry, PNR, Yonsei University Seoul 120-749, Korea  
Life Technology Institute, Korea University Seoul 136-701, Korea  
Department of Pathology, The Catholic University of Korea Seoul 137-701, Korea  
(Received : 2002. 5. 28., Accepted : 2002. 7. 16.)

Isolation of a gene and determination of its expression pattern are essential in understanding its function. Among the genes localized in 12q13, stSG3435 EST was chosen to study its expression pattern. The full-length cDNA was cloned by screening of human brain cDNA library and its sequence was determined by serial deletion followed by automated sequencing of the clones with overlapping fragments. The sequence analysis revealed that stSG 3435 cDNA displayed 100% identity to human MYG1 and 86% identity to mouse melanocyte proliferation gene-1 (Gamm 1) originally identified from melanocyte, suggesting that MYG1 determined by Northern blot analysis revealed the strongest expression in testes with ubiquitous expression in all the tissues tested. In order to investigate the cellular localization of its protein product, the green fluorescence protein gene was fused into the full-length coding sequence of MYG1. Transfection of the fusion construct followed by confocal microscopy resulted in the green fluorescence signal as a punctate state in cytoplasm indication that MYG1 was localized in one of the cellular organelles.

**Key Words** : Cloning, expression, mouse Gamm1, MYG1, 12q13

### 서론

인간 게놈의 총 유전자 수에 대한 많은 추측들이 있었으나 human genome project (HGP)의 염기서열 결정을 통하여 인간 게놈의 유전자는 기대보다 훨씬 적은 약 30,000~40,000여 개 정도로 발표되었다(1,2). 이 중에서 지금까지 모든 종에서 클로닝되어 그 기능이 연구되었거나 그 기능과 염기서열을 바탕으로 유추가 가능한 모든 정보를 기초로 하여 그 기능을 알 수 있는 유전자는 만 개 미만으로 아직도 그 기능

을 예측조차 못하는 수가 대다수이다. 따라서 post genome 시대의 가장 큰 연구 방향의 하나는 HGP에서 발견된 수많은 유전자의 기능을 규명하는 일로써 microarray를 이용한 발현양상 연구(3,4), comparative genomics를 이용한 비교연구, ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis를 이용한 phenotype variants 연구(5,6), gene-gene interaction을 통한 기능연구 등이 high throughput 개념을 바탕으로 이루어지고 있다. 전체 게놈의 염기서열이 발표된 *C. elegans*(7)에서는 발표된 전 유전자를 발현 vector에 클로닝하여 그 발현 위치를 결정하는 연구가 진행 중인가 하면 *Drosophila* 같은 개체에서는 각 유전자의 항체를 제작하여 항원의 세포내 혹은 조직 특이 발현을 분석하고 각 유전자와 *LacZ*의 fusion gene을 이용하여 조직 발현을 조사하기도 한다(8). 이들 종과는 달리 인간 유전자의 경우, 개체에서 직접 *in vivo*로 발현을 연구하기는 용이하지 않으며 주로 정상세포와 이상세포간의 발현 양상을 대

† Corresponding Author : Research Institute of Molecular Genetics, The Catholic Research Institutes of Medical Sciences 505 Banpo-dong, Seocho-ku, Seoul 137-040 Korea  
Tel : +82-2-590-2603, Fax : +82-2-532-0575  
E-mail : sjkyoon@catholic.ac.kr

량 비교 분석하는 연구로 microarray 방법이나 proteomics 방법을 이용하고 있다.

한편, 그 기능을 전혀 알지 못하는 유전자의 기능을 이해하기 위해서는 유전자의 full-length cDNA(최소한 start codon 부터 stop codon까지)를 클로닝하여 염기서열과 아미노산 서열을 이용한 domain search를 하는 것이 첫째 단계로 기능적인 domain은 그 단백질의 기능을 유추할 수 있는 중요한 정보를 제공하기 때문이다. 또한 full-length cDNA clone은 이를 이용하여 또 다른 정보를 유추할 수 있도록 요구에 따라 유전자 조작을 가능하게 한다. 둘째로 유전자의 조직 특이 발현 양상을 동정하여 유전자 산물의 활동 조직을 탐색하고 세포내 발현 위치를 조사하여 활동 위치에 따라 기능 유추가 가능해 진다. 따라서 본 연구에서는 인간유전자 12q13 부위의 고해상도도를 작성하는 과정에서 이 지역에 존재하는 유전자로 밝혀진 stSG 3435라는 EST에 해당하는 유전자를 클로닝하여 그 발현 양상을 분석하고자 하였다.

### 실험재료 및 실험방법

#### 실험재료

인간의 조직별 mRNA 발현을 확인하기 위하여 Human Multiple Tissue Northern(MTN<sup>TM</sup>) Blot과 Human MTN<sup>TM</sup> Blot II(CLONTECH Lab., USA)을 사용하였다. 또한 anti-His 항체는 Santa Cruz Biotechnology사의 제품을 이용하였으며, anti-MYG1은 부분 항체를 제작하여 고마 바이오텍사에 의뢰 제작하여 사용하였다. 한편 클로닝에 사용한 vector들로는 pBluescript II KS(+)(Stratagene, USA), pET28b(Invitrogen, USA), pEGFP-N2(CLONTECH Lab., USA) 등이 있으며 transfection 수행 시에는 lipofectamine<sup>TM</sup> reagent(Life technologies<sup>TM</sup>, USA)를 사용하였다.

#### 세포배양

HeLa 세포와 293 세포는 DMEM(Life technologies, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin-G와 100 U/mL streptomycin의 항생제를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 습식 배양기에서 배양하였다.

#### pBS-325E4 클로닝과 염기서열 결정

stSG 3435 EST를 포함하는 클론 NIB1 library를 검색하여 찾은 다음, 325E4 클론을 추출하였다. NIB1 library가 HindIII와 NotI으로 클로닝되어 있는 것을 이용하여 pBluescript II KS(+)의 상응하는 부위에 클로닝하여 pBS-325E4를 제작하였다. 순차적 결실 클론을 제작하기 위하여 HindIII와 KpnI으로 절단하고 exonucleaseIII를 이용하여 시간별로 절단한 후 Mung Bean nuclease 반응을 거쳐 클로닝하였다. 이들 클론들의 plasmid DNA를 주형으로 사용하여 M13 Forward (-20) primer로 Big Dye terminator cycle sequencing kit(Perkin- elmer, USA)을 이용하여 공급자의 지시에 따라 ABI3100 Prism 자동염기서열분석기(Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 결정하였다.

#### Northern blot analysis

pBS-325E4 plasmid DNA를 HindIII와 NotI으로 절단한 후,

전기영동을 수행하여 약 1.4 kb 길이의 절편을 분리하고 이를 정제하였다. 정제된 DNA를 주형으로 Random primed labeling kit(Roche, M. B. Germany)을 이용한 방법으로 방사성 동위원소 <sup>32</sup>P α-dCTP로 표지한 탐침으로 Northern blot analysis를 수행하였다. 이 때 blot은 Human MTN<sup>TM</sup> Blot과 Human MTN<sup>TM</sup> Blot II를 이용하였으며 prehybridization, hybridization은 Church-Gilbert buffer(50 mM NaPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5), 7% SDS, 1% BSA)를 이용하여 앞서 보고된 방법(9)을 사용하였다. MTN blot에는 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 골격근육, 신장, 췌장의, MTN blot II에는 비장, 흉선, 전립선, 정소, 난소, 소장, 말초혈액 백혈구 조직 각각의 poly A<sup>+</sup> RNA가 2 µg씩 포함되어 있다.

#### 대장균에서의 단백질 발현 확인

항원제작을 위하여 pBS-325E4로부터 stSG3435 full-length cDNA를 포함하고 있는 1.4 kb HindIII/NotI 절편을 분리하여 pET28b 벡터의 상응하는 클로닝 부위에 접합하여 pET-MYG1을 제작하였다. 클로닝된 유전자가 대장균에서 발현되지 않았으므로 MYG1의 coding 부위 729 bp에 위치한 PstI과 IroI로부터 3' 위치에 있는 벡터 부위를 XhoI으로 절단하였다. 이후 반응액을 Klenow 효소 반응을 시킨 다음, 재접합 반응을 하여 항원 construct plasmid를 제작하였다(Figure 3A). 이러한 일련의 과정을 통하여 MYG1의 C-terminus 133 개의 아미노산이 결손되어 있는 32 kd의 단백질을 생성하게 되었다. 이 항원 단백질의 과발현을 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG)로 대장균에서 유도한 후, Ni<sup>+</sup> column을 이용하여 affinity chromatography 방법(Invitrogen, USA)으로 제작자의 지시대로 정제하였으며 이와 같이 정제된 단백질을 항체제작에 사용하였다. 한편, 단백질은 Bradford 방법으로 정량하였고 SDS-PAGE와 Western blot analysis는 기본적으로 사용하는 방법(10)을 이용하였으며, 발광물질은 Western blotting luminol reagent(Nalge Nunc, Int. New York)를 사용하여 X-ray 필름으로 감광하였다.

#### pEGFP-MYG1 클로닝 및 Confocal 현미경을 통한 동물 세포에서의 유전자 발현 확인

MYG1 full-length cDNA를 포함하는 1.3 kb BamHI/HindIII 절편을 정제하여 pEGFP-N2의 상응하는 부위에 클로닝하였다(pEGFP-MYG1, Figure 4A). 이 construct는 MYG1의 coding 염기서열이 GFP 염기서열의 N 말단에 접합된 단백질을 생성할 수 있는 클론이다. 이 pEGFP-MYG1 DNA를 정제하여 HeLa 세포에 혹은 293 세포에 lipofectamine을 이용한 방법(Life Technologies, USA)으로 transfection하였다. 가열 멸균된 커버슬립이 들어있는 6-well plate에 well당 1.5×10<sup>5</sup> 세포를 도말하였으며 약 18시간 후, 세포가 약 70-80% 정도로 배양하였을 때 transfection 실험에 사용하였다. 100 µL FBS-free 배지에 0.5 µg의 DNA와 lipofectamine<sup>TM</sup> reagent 5 µL를 각각 희석한 후, 혼합하여 45분 동안 반응시켰다. 이후 준비한 세포를 FBS-free 배지로 수세하고 준비한 혼합액을 주입한 후 6시간 동안 배양하고 다음으로 serum을 최종농도가 10% 되도록 첨가한 후 배양하였다. 유전자 주입 후 최종 24 시간이 되었을 때 PBS로 2번 수세하고 3.7% formaldehyde/

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Hum : 1   | MGHRFLRGGLLTLPPPLYTRHRMLGPESVPPPKRSRSLMAPPRIPTHNGTFHCDEAL      | 60  |
|           | MG RFLRG L L +HRMLG E PP KR R+ LMAPPRIGTHNGTFHCDEAL            |     |
| Mou : 1   | MGRRFLRGILTLPLRSVLQ-AQHRMLGSEQDPPAKRPRNLMAPPRIPTHNGTFHCDEAL    | 59  |
| Hum : 61  | ACALLRLLPEYRDAEIVRTRDPEKLASCDIVVDVGGEYDPRRHRVDHHRQSFTETMSSLS   | 120 |
|           | ACALLRLLPEY +AEIVRTRDPEKLASCDIVVDVGGEY+P+ HRYDHHQR+FTETMSSL    |     |
| Mou : 60  | ACALLRLLPEYANAIEVTRTRDPEKLASCDIVVDVGGEYNPQSHRYDHHQRFTETMSSLC   | 119 |
| Hum : 121 | PGKFPWQTKLSSAGLIYLFHFGKLLAQLLGTSEEDSMVGTLYDKMYENFVEEVDVAVDNGIS | 180 |
|           | PGKFPWQTKLSSAGL-YLHFG KLLAQLLGTSEEDS+V T+YDKMYENFVEEVDVAVDNGIS |     |
| Mou : 120 | PGKFPWQTKLSSAGLVYLFHFGKLLAQLLGTSEEDSVVDTIYDKMYENFVEEVDVAVDNGIS | 179 |
| Hum : 181 | QWAEAGEPRYALT'TTLSARVARLNPTWNHPDQDTEAGFKRAMDLVQEEFLQRLDFYQHSWL | 240 |
|           | QWAEAGEPRYA+TTTLSARVARLNPTWN P+QDTEAGF+RAMDLVQEEFLQRL+FYQHSWL  |     |
| Mou : 180 | QWAEAGEPRYAMTTTLSARVARLNPTWNQPNQDTEAGFRRAMDLVQEEFLQRLNFYQHSWL  | 239 |
| Hum : 241 | PARALVEEALAQRQVDPVSGEIVELAKGACPWKEHLYHLESGLSPVAIFFVIYTDQAGQ    | 300 |
|           | PARALVEEALAQRQ+VD SGEIVELAKG CPWKEHLYHLES LSP VAI FVIYTDQAGQ   |     |
| Mou : 240 | PARALVEEALAQRQKVDSSGEIVELAKGGCPWKEHLYHLESELSPKVAITFVIYTDQAGQ   | 299 |
| Hum : 301 | WRIVQVCPKEPHSFQSRLPLPEPWRGLRDEALDQVSGIPGCIFVHASGFIGGHRTREGALS  | 360 |
|           | WR+QVCPKEPHSFQSRLPLPEPWRGLRD+ALDQVSGIPGCIFVHASGFIGGH TREGAL+   |     |
| Mou : 300 | WRVQVCPKEPHSFQSRLPLPEPWRGLRDKALDQVSGIPGCIFVHASGFIGGHHTREGALN   | 359 |
| Hum : 361 | MARATLAQRSYLPQIS   | 376 |
|           | MARATLAQR  |     |
| Mou : 360 | MARATLAQR  | 368 |

Figure 1. Sequence comparison of human MYG1 and mouse Gamm1. Identical amino acids between 2 sequences were noted in the middle.

PBS(pH 7.4)로 상온에서 15분 동안 고정하였다. 충분한 증류수로 수세한 후 Universal mounting 용액(Research Genetics, USA)으로 슬라이드 글라스에 접착하고 confocal 현미경으로 488 nm의 파장에서 집합된 단백질의 발현을 관측하였다. 핵은 고정 후에 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4'-6-Diamidino-2-phenylindole-2HCl (DAPI, Molecular Probes, Inc. OR, USA)로 1분간 발색하여서 365 nm 파장에서 관찰하였으며, 리소솜은 50 nM LysoTracker (Molecular Probes, Inc. OR, USA)로 30분간 발색한 후 고정하여서 580 nm 파장에서 관찰하였다.

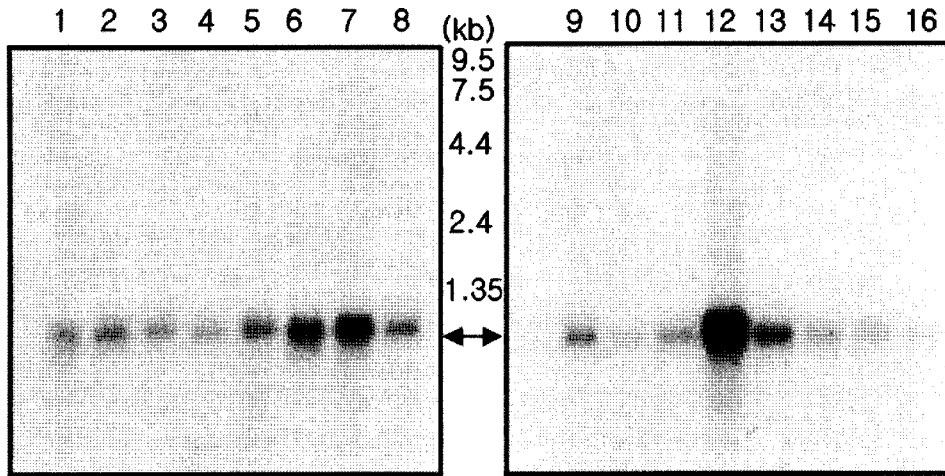
## 실험결과 및 고찰

### MYG1의 클로닝 및 염기서열 분석

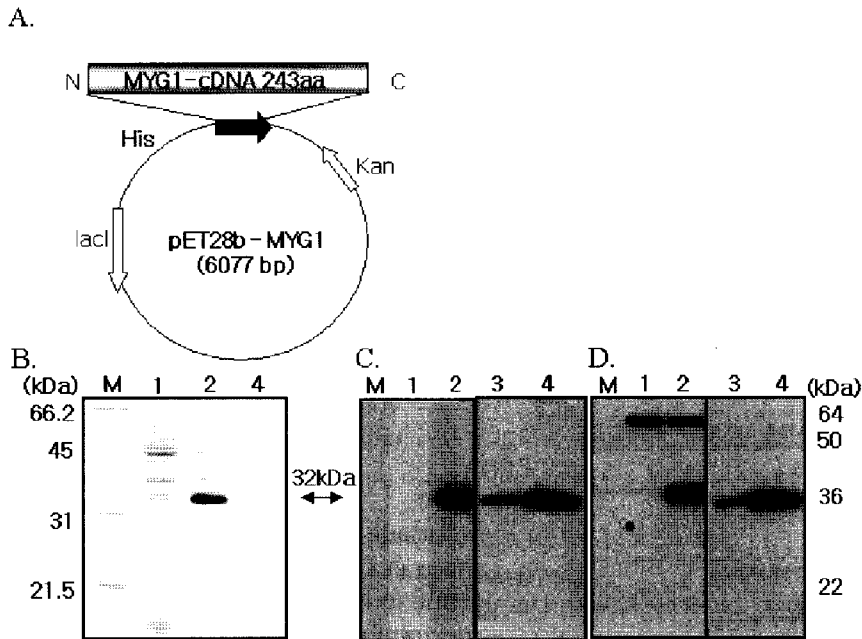
HGP의 일환으로 12q13 부위의 고휘상 물리지도가 작성되었으며 이 부위의 새로운 유전자들이 탐색되어 그 위치가 고휘상지도에서 결정되었다(10). stSG 3435는 D12S359와 D12S1618 사이에 위치한 EST(expressed sequence tag)로서 약 300 bp의 염기서열만이 보고되어 있어 새로운 유전자 발굴의 대상이 되었다. 더욱이 삽입서열이 긴 stSG 3435의 클론을 확보하기 위하여 이 표식자를 포함하는 염기서열을 TIGR human gene index database와 NCBI blast database(12)를 탐색하여 NIB1 library를 Soreas에 의해 제작된 human infant brain cDNA library로서 1 회의 normalization을 거쳐 약 40,000 여 개의 클론들이 96 well format으로 배열되어 있는 library이다(13).

또한 325E4 클론의 plasmid로부터 *Hind*III와 *Not*I 제한효소로 삽입서열을 절단하고 전기영동을 통하여 그 길이가 1,331 bp임을 결정하였다. 전체 염기서열을 결정하기 위하여 순차적 결실 클론들을 제작하여 결실된 길이를 전기영동으로 결정하여 약 300-400 bp 정도씩 차이가 있는 클론을 5개를 선별하였다. 이러한 클론들은 모두 한 방향의 말단 (3' 방향; pBS-325E4의 *Kpn*I 방향)염기서열은 동일한 반면, 그 반대 방향 (5' 방향; pBS-325E4의 *Hind*III 방향) 염기서열은 *Hind*III 부위에서부터 300-400 bp 정도씩 3' 방향으로 결실된 것들로 M13 Forward primer를 이용하여 염기서열을 분석할 수 있었다.

한편, 325E4 클론의 총 삽입서열은 1,131 bp로서 NCBI의 ORFinder에 의하면 이러한 클론은 start codon으로부터 stop codon을 포함하여 총 376 개의 아미노산으로 이루어져있어 약 40 kDa의 단백질을 암호화하는 것으로 유추되었다 (Figure 1) Blast를 통한 검색 결과 최근 database에만 발표된 human clone MYG1, MST024 clone의 염기서열과 100% 동일한 것으로 결정되었다. 또한 yeast hypothetical protein YEY6과 47% 동질성, 마우스의 melanocyte proliferating gene 1 또는 Gamm1, 또 다른 이름, MYG1과는 86%의 동질성을 보였다(14-16). 마우스의 Gamm1은 인간 염색체 12q13 부위와 syntenic 관계에 있는 마우스 15 번 염색체 위치에 내재하고 있으며 또한 86%라는 높은 동질성을 감안할 때, stSG 3435 EST클론은 마우스의 human homolog임을 강력히 시사하고 있다. 또한 아미노산 서열 분석 결과, 이 유전자의 생성



**Figure 2.** Expression of MYG1 in various human tissues by Northern blot analysis. To determine the tissue distribution of human MYG1 mRNA, multiple tissue expression array blot were probed with 1.3 kb cDNA fragment. 1 : heart; 2 : whole brain; 3 : placenta; 4 : lung; 5 : liver; 6 : skeletal muscle; 7 : kidney; 8 : pancreas; 9 : spleen; 10 : thymus; 11 : prostate; 12 : testis; 13 : ovary; 14 : small intestine; 15 : colon (no mucosa); 16 : peripheral blood leukocyte.



**Figure 3.** Expression of partial MYG1 in *E. coli*. A. map of expression construct. T7 promoter controlled the expression of N-terminus 243 A.A. of MYG1 antigen. B. Proteins from bacterial lysates stained with coomassie brilliant blue. C. Western blot analysis anti-His antibody. D. Western blot analysis against anti-MYG1 antibody. Lanes indicate as follows, M : Marker; 1 : lysates before IPTG induction; 2 : after IPTG induction; 3, 4 : eluates.

물은 인지할 만한 domain을 가지고 있지 않았으므로 이 유전자의 기능을 탐색하기 위하여 조직특이 발현 양상을 동정하고 세포내 발현 위치를 조사하였다.

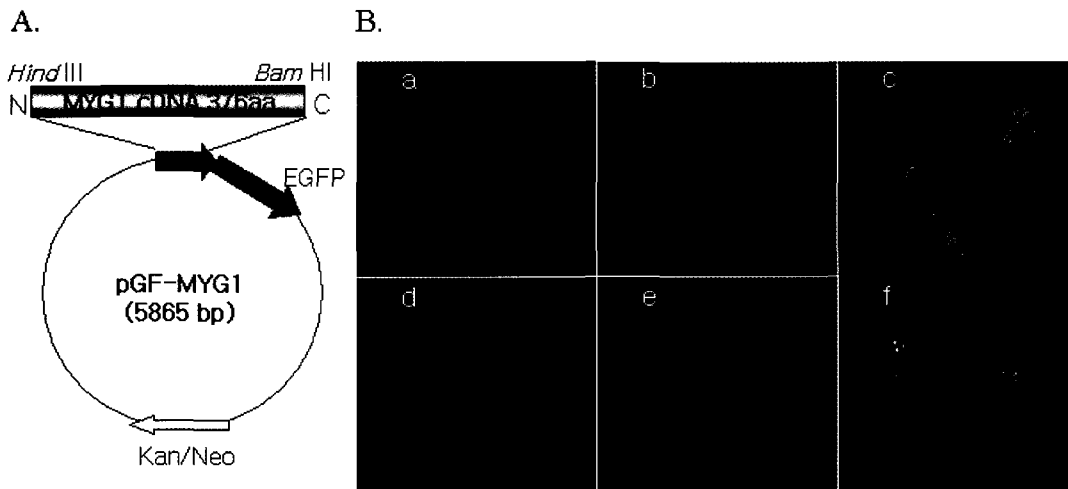
**MYG1 유전자의 조직 특이 발현**

MYG1의 조직특이 발현은 MTN blot을 이용하여 Northern blot analysis로 조사하였다. Full-length cDNA 1.4 kb 절편을 방사성 동위원소 <sup>32</sup>P로 표지하여 hybridization을 수행한 결과, 발현양상을 조사한 모든 조직에서 1.3 kb의 mRNA 전사체로 발현되는 것이 밝혀졌다. 발현양의 차이는 다른 조직보다 적어도 10배 이상 발현하고 있는 정소를 제외하고는 거의 모든 조직에서 일정하게 발현하고 있고 골격근육과 신장에서 소량

이지만 발현량이 더 많은 것으로 조사되었다(Figure 2). MYG1이 정소에서 다량 발현되는 이유는 정확히 알 수 없으나 정소 특유에 요구되는 기능에 사용될 것으로 추정된다.

**대장균에서 MYG1 부분 발현**

단백질의 생체 내 발현 조사를 위하여 항체는 필수적으로 요구되는 인자이다. MYG1에 대한 항체를 제작하기 위하여 대장균에서 MYG1 단백질을 과발현을 유도하였다. MYG1 단백질 376개의 아미노산 중 N 말단의 1-286 아미노산만을 His-tagging이 되도록 pET28b에 클로닝하여 발현을 유도하였으며 32 kd 단백질이 특이적으로 발현하는 것으로 확인되었다. (Figure 3 A and B). 이 항원은 affinity chromatography로 정



**Figure 4.** Cellular localization of MYG1 protein. A. map of pGF-MYG1. MYG1 full-length cDNA was fused with N-terminus of GFP gene. B. The fusion gene expressed after transfection in 293 cell line and LeHa cell line. The fluorescence was observed by confocal microscope. The symbols indicates as follows. a : DAPI in 293 cell; b : pGF-MYG1 in 293 cell; c : overlay of a and b; d : 50 nM LysoTracker in HeLa cell; e : pGF-MYG1 in HeLa cell; f : overlay of d and e.

제한 후 토끼 주사하여 항체를 제작하였으며 이 항체가 대장균에서 발현하는 항원 32 kd를 인지하는 것을 Western blot analysis로 확인할 수 있었다 (Figure 3C). 항원의 IPTG에 의한 유도 발현 전과 후, 동시에 인지하는 상위 단백질은 항원에 대장균의 오염에 따른 불특정 산물인 것으로 추정된다.

#### 세포내 발현위치 동정

MYG1 단백질의 정확한 세포내 활동 위치를 동정하기 위하여 MYG1 full-length cDNA를 형광 단백질인 GFP와 접합하였다 (Figure 4A). CMV promoter에 의해 MYG1 단백질의 HeLa 세포나 293 세포에서 정상적으로 발현한다는 것을 확인하였으며 이들 세포에서 녹색형광이 반점화 (punctate) 현상으로 발현되는 것을 관찰하였으며 (Figure 4B) 이는 MYG1 단백질이 세포내 소기관에 귀착한다는 것을 지적하고 있다. 세포내 소기관으로는 핵, 미토콘드리아, 골지체, 소포체, 리보솜, 리소솜, 페록시솜 등이 존재하므로 이들을 구별하기 위하여 소기관 특이 표식자와 co-localization 방법을 활용하였다. 녹색형광의 수와 DAPI 염색으로 핵은 MYG1 단백질의 귀착지가 아닌 것으로 결정하였으며 또한 LysoTracker와의 co-localization 조사 결과, 리소솜 또한 귀착지가 아닌 것으로 나타났다. 따라서 남은 소기관 중 녹색형광의 크기와 수로 미루어 미토콘드리아, 리보솜, 리소솜, 페록시솜 중의 하나로 MYG1이 귀착될 것으로 예측되며 장차 이들 소기관을 인지할 수 있는 표식자와의 co-localization 연구로 MYG1의 정확한 위치를 결정할 수 있을 것이다.

한편, 새로이 클로닝된 유전자의 기능을 이해하기 위한 접근 방법은 주로 기존에 기능이 알려져 있는 유전자의 염기서열과의 유사성을 기초로 하여 혹은 아미노산이 보유하고 있는 기능적인 domain을 기초로 하고 있다. HGP의 결과 이런 접근 방법으로 유전자의 기능을 유추할 수 있는 유전자는 1/3 정도 밖에 되지 않는다는 것이 이미 알려졌다. 따라서 본 연구의 접근 방법으로써 정확한 기능의 이해는 어려우나 유전자의 기능을 큰 카테고리로 묶는 역할을 할 것으로

사료된다.

#### 요 약

새로운 유전자를 클로닝하고 그 발현양상을 결정하는 것은 유전자의 기능을 이해하는데 필수적이다. 인간유전자 12q13의 고해상 물리지도를 작성하면서 이 지역의 D12S359와 D12S1618 사이에 내재하는 것으로 mapping된 stSG 3435 EST의 유전자를 클로닝하고 그 발현양상을 조사하였다. NIBI library를 조사하여 stSG 3435를 포함하는 클론 325E4를 분리하여 순차적 결실 방법으로 클로닝하여 자동염기서열 분석으로 염기서열을 결정하였다. 1,331 bp의 염기서열을 가진 이 유전자는 Blast search에 의하면 376 개의 아미노산으로 이루어진 단백질로써 인간의 MYG1과 동일하며 마우스의 Gamm1, melanocyte proliferation gene 1과 86%의 동질성을 보였다. MYG1은 인간염색체의 12에 내재하며 마우스의 Gamm1은 syntenic 부위인 마우스 염색체 15에 내재하므로 마우스의 Gamm1의 homolog으로 간주된다. Northern blot analysis 결과 MYG1은 인간의 모든 조직에서 발현되며 정소에서 가장 강한 발현을 보였다. 이 유전자의 세포내 발현을 green fluorescence protein과 융합시켜 발현 귀착지를 confocal 현미경으로 동정한 결과 MYG1 단백질은 핵과 리소솜을 제외한 소기관에서 발현되는 것을 관찰하였다.

#### 감 사

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비 (1998-010-158)에 의하여 지원되었음.

#### 사용기호

bp : base pair  
SDS : sodium dodecyl sulfate

NCBI : National Center for Biotechnology Information  
 EST : expressed sequence tag

## REFERENCES

- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, and W. FitzHugh et al. (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* **409**, 860-921.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, and R. A. Holt et al. (2001), The sequence of the human genome, *Science* **291**, 1304-1351.
- Denton M. D., T. Yoshida, L. L. Hsiao, R. V. Jenson, and S. R. Gullans (2002), DNA microarrays: applicability to renal physiology and disease, *J. Nephrol.* **5**, 184-191.
- Gershon, D. (2002), Microarray technology: an array of opportunities, *Nature* **416**, 885-891.
- Baird, P. N., R. H. Guymmer, D. Chiu, A. L. Vincent, W. S. Alexander, S. J. Foote, and D. J. Hilton (2002), Generating mouse models of retinal disease using ENU mutagenesis, *Vision Res.* **42**, 479-485.
- Herron B. J., W. Lu, C. Rao, S. Liu, H. Peters, R. T. Bronson, M. J. Justice, J. D. McDonald, and D. R. Beier (2002), Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis, *Nat. Genet.* **30**, 185-189.
- Reboul J., P. Vaglio, N. Tzellas, N. Thierry-Mieg, T. Moore, C. Jackson, T. Shin-i, Y. Kohara, D. Thierry-Mieg, and J. Thierry-Mieg et al. (2001), Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*, *Nat. Genet.* **27**, 332-336.
- Butler, D. (1999), Venter's *Drosophila* 'success' set to boost human genome efforts, *Nature* **401**, 729-730.
- Sambrook and Russell (2001), *Molecular cloning*, 3rd ed., p7.42-7.45, 9.4-9.11, CSHL Press, New York.
- Ed Harlow and David Lane (1999), *Using Antibodies*, p267-309, CSHL Press, New York.
- Lee H., E. Choi, Y. Seomun, K. Montgomery, A. Huebner, E. Lee, S. Lau, C. K. Joo, R. Kucherlapati, and S. J. Yoon (2000), High-resolution transcript map of the region spanning D12S1629 and D12S312 at chromosome 12q13: triple A syndrome-linked region, *Genome Res.* **10**, 1561-1567.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Bonaldo, M. F., G. Lennon, and M. B. Soares (1996), Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery, *Genome Res.* **6**, 791-806.
- Shibata, K., M. Itoh, K. Aizawa, S. Nagaoka, N. Sasaki, P. Carninci, H. Konno, J. Akiyama, K. Nishi, and T. Kitsunai (2000), RIKEN integrated sequence analysis (RISA) system-384-format sequencing pipeline with 384 multicapillary sequencer, *Genome Res.* **11**, 1757-1771.
- Carninci, P., Y. Shibata, N. Hayatsu, Y. Sugahara, K. Shibata, M. Itoh, H. Konno, Y. Okazaki, M. Muramatsu, and Y. Hayashizaki (2000), Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes, *Genome Res.* **11**, 1617-1630.
- Kawai, J. A., Shinagawa, K. Shibata, M. Yoshino, M. Itoh, Y. Ishii, T. Arakawa, A. Hara, Y. Fukunishi, and H. Konno, (2001), Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, *Nature* **409**, 685-690.