

## 근세포 분화 조절에 관련된 특이 유전자에 관한 연구

강성구 · 김상해 · 이채관 · 박수정 · 김정락

인제대학교 자연과학대학 생물학과

배양 중의 골격근 세포는 증식을 거쳐 세포융합을 통해 다핵세포로 분화되므로 세포분화의 연구에 좋은 모델로서 이용되고 있다. 이전 실험에서 근원세포 융합을 억제하는 단일클론항체 (MII-3J31)가 제작되었으며(Kim *et al.*, 1992)이 항체에 대한 항원은 분자량이 약 38 kDa인 세포막 단백질로 추정되었다.

본 실험에서는 13일 계배와 성체의 근섬유 mRNA에서 cDNA 라이브러리를 제작하여 근원세포 분화에 특이적으로 나타나는 유전자를 추적하였다. 근원세포 융합에 관여하는 단백질에 대한 cDNA는 계배 13일 째의 근원세포 cDNA 라이브러리에서 단일클론항체를 사용한 immunoscreening 방법을 이용하여 확인하였다. 이 cDNA의 크기는 약 1.5 kb였다. 한편 13일 계배와 성체 근섬유 cDNA 라이브러리를 이용하여 13일 계배에만 특이하게 유전자 발현이 일어나고 성체에서는 나타나지 않는 약 0.8 kb의 cDNA를 찾았다.

**KEY WORDS:** Muscle gene, Monoclonal antibody, cDNA library, DNA subtraction

근원세포는 분리와 배양이 용이할 뿐 아니라 혈청이 결핍된 배양조건에서 쉽게 분화를 유도할 수 있고, 분화에 따른 형태적, 생화학적 변화가 뚜렷하여 분화과정에 따른 실험적 분석이 간편하고 또한 배양 세포는 생체의 분화과정을 비교적 충실하게 재현하므로 세포분화 기작을 밝히기 위한 연구 재료로서 많이 이용되고 있다(Bischoff and Holtzer, 1969; Ha *et al.*, 1979). 즉, 근원세포는 단핵의 근원세포가 증식하는 분열기를 지나 이들 근원세포의 신장과정을 거쳐 세포막이 서로 융합하여 다핵성 근관을 형성하게 되는 형태적 분화(Knudsen, 1985)와 동시에 근 특이 단백질의 선택적 합성과 그의 축적에 의한 수축과 이완의 기능을 갖춘 근세포로의 생화학적 분화가 일어난다(Ha *et al.*, 1979, 1981, 1983).

근원세포 분화의 직접적인 요인은 세포 자신이 분비한 분화촉진물질의 촉진작용과 배양액 내에 존재하는 성장인자, mitogen과 같은 분화억제물질의 저하의 결과라고 추론하고 있다(Yoo *et al.*,

1988). 이들 배양액 내의 분화촉진물질이나 분화억제물질들은 세포막을 통하여 세포 내로 전달될 것이므로 세포 표면단백질의 역할과 이 물질들의 수용체의 존재를 밝히는 것은 세포분화의 연구에 대단히 큰 중요성을 가지고 있다. 또한 근원세포가 물리적 융합을 하는 데에도 표면단백질이 중요한 역할을 할 것으로 추정된다(White and Blobel, 1989). 순수 정제되지 않은 표면단백질이나 특성이 규명되지 않은 표면단백질의 항원(Ag)에 대해서도 그 특이적 항체를 얻을 수 있으므로 면역학적 실험 기술이 향상되어 왔다. 복합적인 항원에 의해 특정한 항체를 얻는 방법은 개별적 항체를 선별할 수 있는 monoclonal antibody (MAb) 기법의 개발로 가능해지게 되었다(Köhler and Milstein, 1975).

본 연구는 하이브리도마 방법에 의해 추적한(Kim *et al.*, 1992) 근원세포의 융합과 직접적으로 연관이 있는 표면 단백질에 대한 유전자를 계배의 근원세포에 대한 cDNA 라이브러리를 제작하여 immunoscreening을 통하여 찾는 데 있다. 또한 근원세포의 분화 단계에 따라 특이하게 발현되는 유전자를 찾기위해 분화 전, 후의 mRNA를 분리

본 연구는 1989년 교육부 학술진흥재단 연구비의 지원에 의해 수행된 연구의 일부임.

하여 각각 cDNA 라이브러리를 제작하여 공통적으로 발현되는 유전자를 상쇄시켜 특이 유전자를 선별하여 클로닝하였다. 이러한 유전자는 근세포 분화단계와 근원세포의 융합에 직접적으로 관여하는 것으로 추정되기 때문에 세포분화기작의 분자생물학적 이해에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 근세포 배양

세포의 배양은 12일 된 계배의 가슴근육에서 근원세포를 적출하여 최초 24시간은 Eagle's minimum essential medium(MEM, 80%)과 말 혈청(10%), 계배 추출액(10%) 그리고 항생제 용액(1%)으로 이루어진 811 배양액을 사용하였고, 이후 48시간은 계배 추출액을 2%로 낮춘 8102 배양액을 사용했다.

### RNA 분리

근조직 또는 배양 세포로부터 전체 RNA를 분리하기 위하여 세포를 일정 시간에 회수하여 액체 질소를 부어 분쇄하여 가루로 만든 후, 8 M guanidium chloride와 5 mM sodium citrate(pH 7.0), 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% sarkosyl의 혼합용액으로 층을 만들고 그 위에 세포 마쇄물을 얹어 20°C에서 27,000 rpm으로 16시간 원심분리한다(Glishin *et al.*, 1973). 침전물을 8 ml의 7 M guanidine-HCl과 1 mM DTT, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5의 혼합용액으로 녹인 후 chloroform-isoamylalcohol(24:1)로 추출한다. 2.5 vol.의 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 방치한 후 원심분리하여 RNA를 얻는다.

Poly(A)<sup>+</sup> mRNA는 전체 RNA를 oligo(dT)-cellulose column을 이용하여 분리하였다(Aviv *et al.*, 1972).

### 계배 근세포의 라이브러리 제작

부화 13일 짜의 계배가슴근육으로부터 추출한 mRNA(20  $\mu$ g)에 primer(0.5  $\mu$ g primer/ $\mu$ g mRNA)를 넣고 1st strand 합성용액(50 mM

Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM spermidine, 10 mM DTT, 4 mM Na-pyrophosphate, 1 mM dNTP, 1 unit RNasin, 15 unit AMV reverse transcriptase/ $\mu$ g mRNA)에 녹인 후 24°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다음에 2nd strand 합성용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g/ml BSA, 5 mM DTT, 8 U/ml RNase H, 230 U/ml *E. coli* DNA pol I, 2 U *E. coli* ligase)를 넣은 후 14°C에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 T4 DNA Pol.(2 U/ $\mu$ g mRNA)와 10분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 분리하였다. 합성된 cDNA 용액에서 Sephacryl S-400을 이용하여 200 bp 이하의 DNA는 제외시킨 후 Eco RI adaptor를 붙였다. T4 polynucleotide kinase를 이용하여 인산화 시킨 후  $\lambda$ gt11 vector에 클로닝 시켰다(Gubler and Hoffman, 1983). 클로닝된 cDNA를 Packagene(Promega Co.)을 이용하여 packing 한 후 LB plate에서 확인하였다. 평균  $5 \times 10^5$  plaque/ml을 얻었다. 성체 근세포의 cDNA 라이브러리는 서울대 분자생물학과에서 제공받았다.

### Immunoscreening

만들어진 계배 근세포 cDNA 라이브러리를 *E. coli* Y1090에 감염시켜 plate를 배양하였다. 한개의 LB plate 당 약  $10^4$  plaque를 배양하여 immunoscreening하였으며 약  $5 \times 10^5$  phage를 스크린하였다(Benton and Davis, 1977; Huynh *et al.*, 1984). 10 mM IPTG로 적신후 건조시킨 nitrocellulose filter를 plate에 덮어서 약 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 반응용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 적신후 계배 세포융합을 억제시키는 항체(MII-3J31)와 anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate를 반응시켰다. 여기에 BCIP와 NBT를 이용하여 반응색이 나오는 plaque를 골라서 cDNA를 추출한 후 pGEM-3Z에 클로닝하였다.

### cDNA subtraction

계배 13일째 근 세포의 Eco RI-end cDNA(100

ng)와 성체 근육조직에서의 무딘 끝(blunt-end)을 갖는 cDNA(50  $\mu$ g)을 변형시킨 후 반응용액(50% formamide,  $5 \times$  SSC, 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , pH 7.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% SDS, 0.2 mg/ml yeast tRNA)에 첨가하여 37°C에서 18시간 서로 융합반응 시켰다. 반응후 phenol, chloroform, isoamyl alcohol로 처리하고 알코올로 침전시켜 DNA를 추출한 후 EcoRI-end의 pGEM-3Z에 클로닝시켰다. 이것을 XLI-blue 세포에 형질전환시켜 보관하였다(Sambrook *et al.*, 1990).

#### RNA blotting

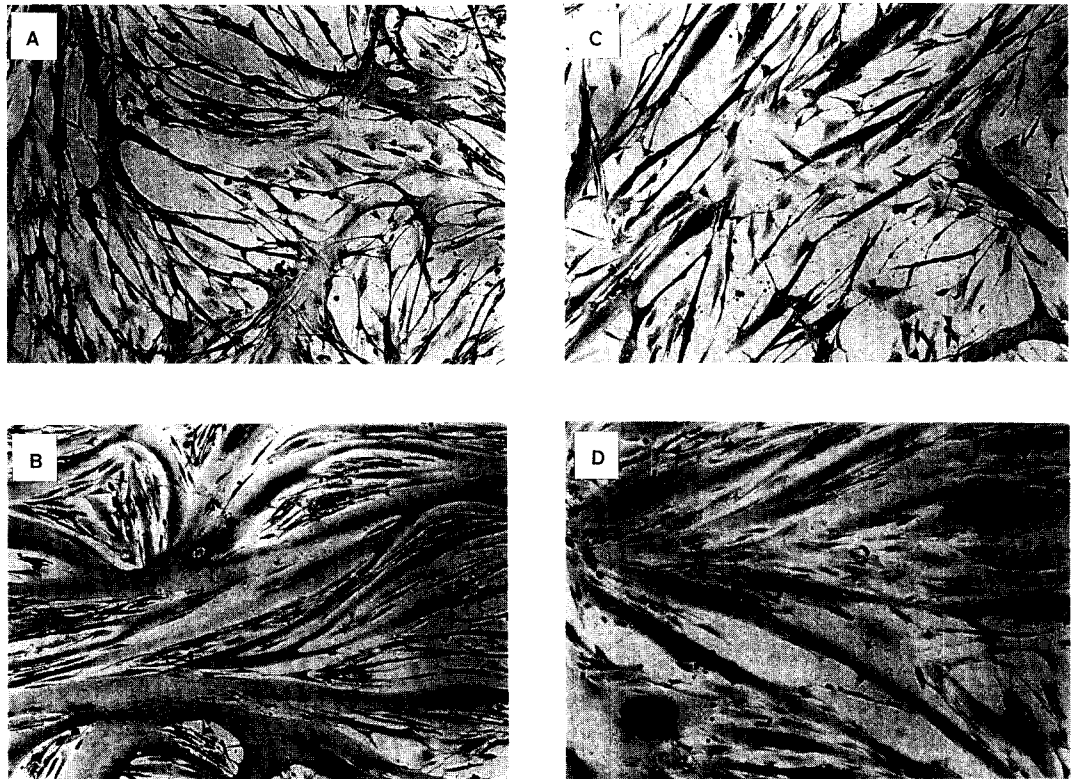
RNA의 dot blotting은 RNA를 formaldehyde로 변형시킨 뒤 65°C에서 15분간 처리하여 Hoeffers의 dot blot kit에서 수행하였다. 약한 진공을 통하여 RNA를 nitrocellulose 종이에 흡착시킨

후 [ $\alpha$ -32P]dCTP로 표지된 probe와 hybridize시켰다. Northern blotting은 Sambrook 등(1990)의 방법을 인용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 단일항체(MII-3J31)가 근원세포에 미치는 영향

MAb MII-3J31을(2  $\mu$ g/ml) 근원세포 배양 중 배양액에 첨가하였을때 근원세포의 융합이 현저히 억제되었다(Fig. 1). 또한 그 효과는 적어도 48시간 지속되었다. 이로 미루어 MAb MII-3J31이 인식하는 표면단백질은 근원세포의 융합에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 추정된다. 이러한 효과는 cell recognition이나 communication에 관계된 세포의 표면단백질에 항체가 결합함으로써 그 기능을 방해하는 것으로 추정된다.



**Fig. 1.** Effect of monoclonal antibody (MII-3J31) against myoblast on myogenesis in culture. Cells in normal medium for 72 hrs (A) and 96 hrs (B); cells in medium with MII-3J31 antibody (2  $\mu$ g/ml) for 72 hrs (C) and 96 hrs (D).

Immunoblotting과 immunoprecipitation으로 근원세포의 항원을 추적한 바 38 kDa의 단백질을 인지하였다(Park *et al.*, 1991). Wakshull 등은(1983) 근섬유의 세포막 단백질의 marker를 찾기 위해 단일항체를 생산하여 근원세포와 satellite cell에 특이하며 근섬유 형성시 사라지는 38 kDa의 단백질을 인지하는 MAb C3/1을 생산하였다. MAb C3/1을 근원세포 배양 중에 첨가하였을 때 분화에 아무런 영향을 주지 않는다는 사실에서 MAb C3/1이 인지하는 38 kDa의 단백질과 MAb-3J31이 인지하는 38 kDa의 단백질은 다르거나 같은 항원을 인지하는 항체인데 서로 다른 epitope을 인지하여 MAb의 결합이 기능에 미치는 영향의 차이에 기인한다고 볼 수 있다.

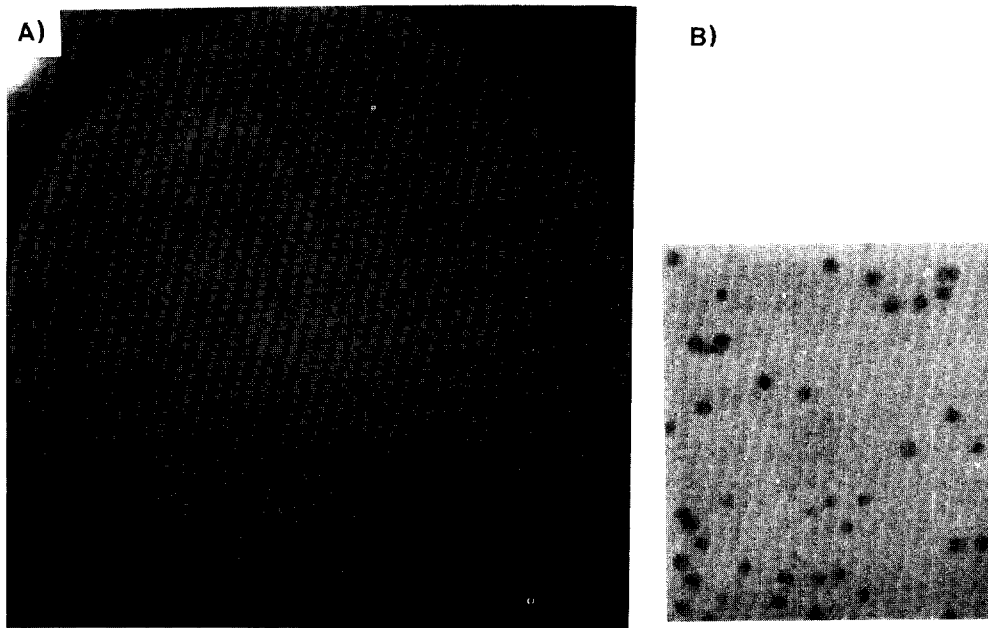
세포융합에 수반되는 근원세포 표면단백질의 변화와 그 기능적 역할에 대한 연구가 대단히 많이 이루어지고 있다(Knudsen, 1985; Spearman *et al.*, 1987). 일반적으로 세포 간의 인식에 관여되는 것으로 알려진 당단백질이 근원세포의 연접에 관여하며(Walsh and Philips, 1981; Herman and Fernandez, 1982; Knudsen, 1985; Spearman *et al.*, 1987), 특히 46 kDa의 당단백질이 결합된 배양 근원세포의 변이종의 하나인 L6 mutant는 분화가 일어나지 못함이 알려져 있고(Cates *et al.*, 1984), Rosenberg 등은(1985) 근세포의 분화 경과에 따라 105 kDa의 당단백질이 감소와 함께 90 kDa의 당단백질이 증가되는데 이러한 변화는 인위적으로 분화를 억제할 경우 나타나지 않는다고 보고하고 있다. 본 연구에서 추적중인 38 kDa의 단백질은 기존에 보고된 단백질과는 다른 것으로 추정하고 있다.

#### Immunoscreening을 이용한 항원 cDNA 확인

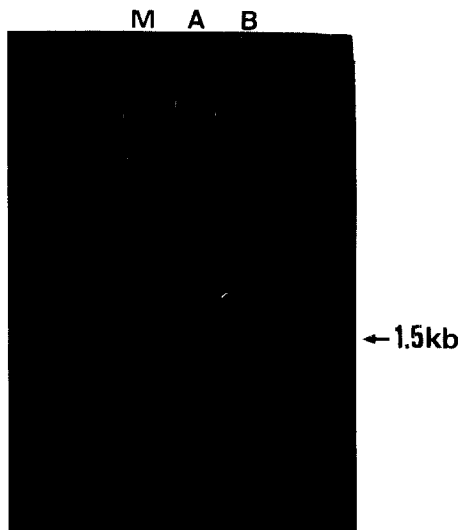
계배 근원세포의 분화에 관련한 특이적인 유전자를 찾기 위하여 13일된 계배 근원세포에서 발현된 mRNA를 추출하였고, 이들 mRNA로부터 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 13일 계배의 cDNA는 합성한 후 양 끝에 Eco RI adaptor를 붙인 후 일부는  $\lambda$ gt11에 클로닝하고 나머지는 성체 근섬유의 cDNA와의 subtraction에 사용하였다. 제작된 cDNA 라이브러리들은 *in vitro* packaging을 통하여 *E. coli* Y1090에 감염하여 증폭시켜 보

관하였다. 만들어진 phage 농도는 평균  $5 \times 10^5$  PFU/ml이었으며 cDNA의 크기는 0.8 kb-6 kb였다. cDNA의 평균 크기는 약 1.7 kb였다. 계배 13일째의 근원세포 cDNA 라이브러리는 계배 발생 중의 특정단계의 것을 만들었기 때문에 앞으로 계배 근세포 분화연구에 많이 이용될 것으로 생각된다.

13일 계배의 cDNA 라이브러리에 클로닝된 cDNA는 lacZ 단백질과 융합하여 발현된다. 따라서 이미 제작된 단일클론항체(MII-3J31)를 이용하여 생성된 항원을 Immunoscreening Kit (Promega Co.)를 이용하여 확인하였다(Fig. 2, A and B). 확인된 cDNA의 크기는 약 1.5 kb였다(Fig. 3). 1.5 kb cDNA는 연구를 더 진행시키기 위하여 pGEM-3Z 벡터에 subcloning하였다. 1.5 kb cDNA에서 만들어진 단백질은 근원세포 융합에 특이적으로 작용하는 것으로 추정된다. 근원세포의 분화에 직접적으로 관련된 유전자는 Myo D가 알려져 있다(Rupp and Weintraub, 1991). Myo D 유전자의 산물은 세포의 핵질에 존재하는 것으로 DNA의 특정부위와 결합하여 미분화 근세포가 분화되도록 유도하는 것으로 알려져 있다(Lin *et al.*, 1989). Myo D와 유사한 기능을 하는 유전자들로는 myogenin(Wright *et al.*, 1989), Myf-5(Braun *et al.*, 1989)와 Myf-6(Rhodes and Konieczny, 1989; Miner and Wold, 1990) 등이 있다. 이러한 여러가지 유전자들의 산물은 배아의 근세포 분화에 직, 간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으나(Davis *et al.*, 1987) 아직 근세포의 운명을 결정하는 기작에 대해서는 부족한 것이 사실이다. 일반적으로 세포의 분화에는 핵질속에서의 유전자 발현과 발현된 단백질이 세포질에서의 생물학적 기능으로 나눌 수 있다. Myo D 유전자들은 주로 핵질에서 DNA와 결합하여 유전자 발현에 관여하는 것으로 알려져 있지만 이번 실험에서 발견된 1.5 kb DNA의 산물인 세포융합과 관련된 단백질은 세포막에 존재하는 것으로 추정된다. 따라서 1.5 kb 유전자는 세포분화에 중요한 역할을 할 것으로 추정되며 앞으로 이 유전자의 제한효소 위치, 염기배열, 구조 및 기능에 대하여 더 한층 연구가 필요하다.



**Fig. 2.** Immunoscreening of chick embryonic muscle cDNA library. A) Identification of stained single plaque. Dark stained plaques are positive ones. B) Subculture of positive plaques for isolation of single phage plaque.



**Fig. 3.** Size determination of insert cDNA cloned in  $\lambda$ gt11 phage (A) and pGEM-3Z plasmid (B). Lane M represents the size marker DNA.

**분화 단계의 특이적인 cDNA의 분석**

계배 근원세포 분화단계에서 특이적으로 발현되는 유전자를 얻기 위하여 13일 계배와 성체 근

섬유의 cDNA들을 서로 상쇄시켜 분화가 시작될 때 발현되는 cDNA를 분리하였다. 13일 계배의 cDNA 라이브러리에만 특이적인 한 종의 cDNA를 분리하였는데 크기는 약 0.8 kb였고 부분적인 제한효소 지도 작성의 결과 Hind III 자리는 1개가 포함되어 있으며 Eco RI, Bam HI, Kpn I, Pst I, Xba I, Sma I 등의 자리는 없는 것으로 나타났다(Fig. 4). 분리한 13일 짜에 특이적인 cDNA를 probe로 하여 분화의 단계별로 생성되는 RNA와 hybridize시켜 보았다. 우선 부란 13일의 RNA와 분화가 완전히 일어난 성체의 근육으로부터 각각 RNA를 추출하여 같은 양으로 dot blot하고 위의 probe와 hybridize시켰다. Subtraction 결과 얻은 13일 계배에 특이적인 cDNA는 성체 닭의 RNA에서는 나타나지 않았으며 분화 전 단계인 13일의 RNA에서는 나타남을 알 수 있었다(Fig. 5, A and B). 계배 13일의 Poly(A<sup>+</sup>) RNA를 northern blot 분석을 하였을 때, 0.8 kb 크기의 주 RNA와 소량의 1.2 kb-RNA, 두 종류의 RNA가 확인되었다. 0.8 kb의 RNA는 probe로 사용한 cDNA에 대한 mRNA로 추정된다. 1.2 kb RNA의 존재는 앞으로 추가 실험을 통하여 자세히 밝힐 예정이

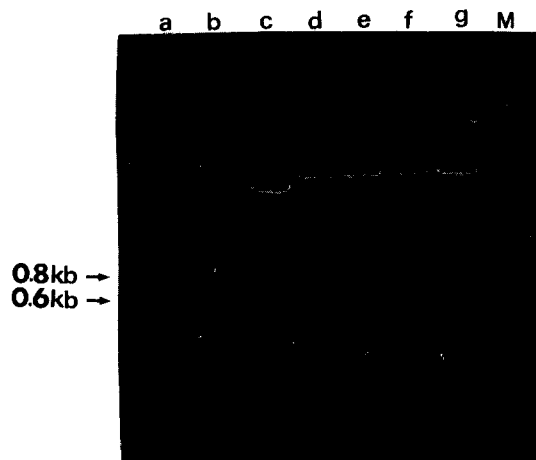


Fig. 4. Restriction analysis of cDNA specific for day 13th chick embryonic myoblast. The cDNA was digested with Bam HI (a), Eco IR (b), Hind III (c), Kpn I (d), Pst I (e), Sma I (f), Xba I (g), and M represents the size marker.

다. 발생단계를 거치는 세포는 stem cell에서 시간적, 공간적인 분화를 거쳐서 각 조직을 형성한다(Melton, 1991). 이러한 경우에 분화에 필요한 산물에 대한 유전자가 발현될 것이다. 분화 전의 세포와 분화 후의 세포에서 유전자 발현의 중간산물인 mRNA를 이용하여 cDNA를 만든 후 DNA를

분석하면 분화기작에 대한 이해를 돕게 될 것이다. 이러한 특이 유전자는 분화와 밀접한 관계가 있기 때문에 대단히 중요하다. 이번 실험에서 발견된 0.8 kb cDNA는 성체에서는 발현되지 않고 근세포 융합이 일어나는 근세포 분화 중간단계에서만 발현되는 것이 확인되었다. 이 유전자는 근세포 분화 조절기작을 설명하는데 중요한 단서를 제공할 것으로 사료되며 앞으로 0.8 kb cDNA의 구조와 기능 그리고 분화와 관련된 특성 등에 관한 연구를 계속 진행할 예정이다.

### 인용문헌

- Aviv, H. and P. Leder, 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *J. Mol. Biol.* **134**: 743.
- Benton, W.D. and R.W. Davis, 1977. Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180.
- 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. Tannch and H. H. Arnord, 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from Myo D1 induces myogenic conversion in IOT1/2 fibroblasts. The

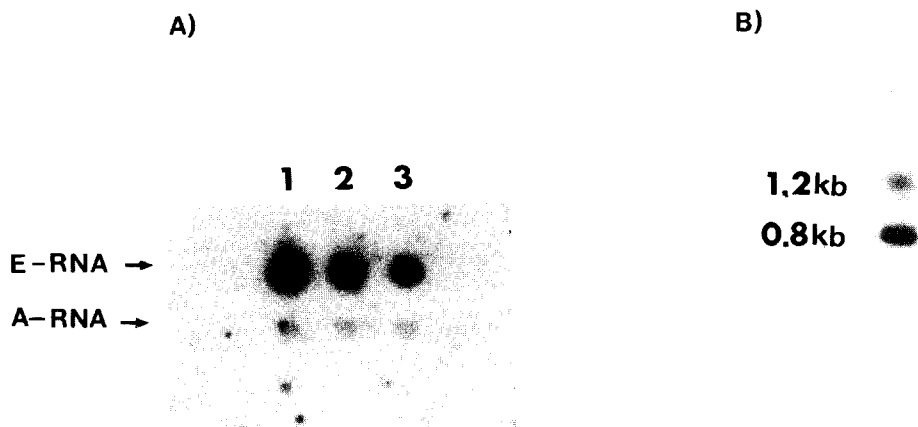


Fig. 5. Northern blotting of embryonic and adult chick myoblast RNAs. A) RNAs were blotted at a concentration of 40  $\mu$ g (lane 1), 20  $\mu$ g (lane 2) and 10  $\mu$ g (lane 3). E-RNA and A-RNA represent RNAs of chick embryonic and adult muscles, respectively. B) 13 day old chick embryonic mRNA was separated and then hybridized with  $^{32}$ P-labelled 0.8 kb DNA probe.

- EMBO. J.* **8**: 701-709.
- Cates, G. A., A. M. Brickenden and B. D. Sanwal, 1984. Possible involvement of a cell surface glycoprotein in the differentiation of skeletal myoblasts. *J. Biol. Chem.* **259**: 2646-2650.
- Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar, 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblast to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000.
- Glisin, V., R. Crkvenjakov and C. Byus, 1973. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13**: 2633.
- Gubler, V. and B. J. Hoffman, 1983. A simple and very effective method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**: 263.
- Ha, D. B., R. Boland and A. Matonsi, 1979. Synthesis of the calcium transport ATPase of sarcoplasmic reticulum and other muscle protein *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta* **585**: 165-187.
- 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., 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.
- Herman, B. A. and S. M. Fernandez, 1982. Dynamics and topographical distribution of surface glycoproteins during myoblast fusion: a resonance energy transfer study. *Biochemistry* **21**: 3275-3283.
- Huynh, T., R. Young and R. Davis, 1984. Construction and screening cDNA libraries in  $\lambda$ gt11. In *DNA cloning*, Vol. 1: A practical approach pp. 49. IRL press, Oxford.
- Kim, C. R., W. C. Choi and H. D. Kim, 1992. Identification of a fusion-associated protein in the selectal myoblast using monoclonal antibody. *Korean J. Zool.* **35**: 29-36.
- Kundsen, K. A., 1985. The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins. *J. Cell Biol.* **101**: 891-897.
- Kohler, G. and C. Milstein, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Lin, Z. Y., C. A. Dechesne, J. eldridge and B. M. Paterson, 1989. An avian muscle factor related to Myo D1 activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different genes. *Development* **3**: 986-996.
- Melton, D. A., 1991. Pattern formation during animal development. *Science* **252**: 234-241.
- Miner, J. H. and B. Wold, 1990. Herculin, a fourth member of the myo D family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1089-1093.
- Park, S. J., Y. M. Joo and C. R. Kim, 1991. Identification of a 38 KDa, plasma membrane protein related to myoblast fusion in culture. *Inje J.* **6**: 615-627.
- Rhodes, S. J. and S. F. Konieczny, 1989. Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3**: 2050-2061.
- Rosenberg, J., A. Szabo, D. Rheuark and C. Kayalar, 1985. Correlation between fusion and the developmental regulation of membrane glycoproteins in L6 myoblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8409-8413.
- Rupp, R. A. and H. Weintraub, 1991. Ubiquitous Myo D transcription at the midblastula transition precedes induction dependent Myo D expression in presumptive mesoderm of *Xenopus Laevis*. *Cell* **65**: 927-937.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1990. Molecular cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Spearman, M. A., J. C. Jamieson and J. A. Wright, 1987. Studies on the effect of glycoprotein processing inhibitors on fusion of L6 myoblast cell lines. *Exp. Cell Res.* **168**: 116-126.
- Walsh, F. S. and E. Philips, 1981. Specific changes in cellular glycoproteins and surface proteins during myogenesis in clonal muscle cells. *Develop. Biol.* **81**: 229-237.
- 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**: 467-477.
- White, J. M. and C. P. Blobel, 1989. Cell-to-cell fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 934-939.
- Wright, W. E., D. A. Sasson and V. K. Lin, 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to Myo D. *Cell* **6**: 607-617.
- Yoo, B. G., C. H. Le, 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 April 30, 1992)

---

**Studies on Specific Genes Related to the Regulation of Muscle Cell Differentiation**

Sung Goo Kang, Sang Hae Kim, Chae Gwan Lee, Soo Jung Park, and Chong-Rak Kim (Department of Biology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

Monoclonal antibody MII-3J31 reacts specifically with an epitope expressed on the cell surface of myoblast in primary cultures of chicken skeletal muscle cell. A polypeptide of 38 kDa was identified by immunoblotting with the antibody. Among the 13-day old chicken embryo muscle cDNAs cloned in  $\lambda$ gt11, a species of 1.5 kb-cDNA was identified as DNA encoding the MII-3J31 epitope. Another myoblast-specific cDNA of 0.8 kb was selected by subtraction of chicken adult muscle cDNAs (7 weeks) from chicken embryo muscle cDNA (13 days).