

## 두툽상어 연골 조직에서 생리 활성 유전자들의 cDNA 클로닝

김지태 · 김명순 · 장은령 · 김영진 · 김규원<sup>1\*</sup>

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

<sup>1</sup>서울대학교 약학대학 약학과

### Cloning of various bioreactive genes from cartilage tissues of *Scyliorhinus torazame*

Ji Tae Kim, Myung-Soon Kim, Eun-Ryoung Jang, Yung-Jin Kim and Kyu-Won Kim<sup>1\*</sup>

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### Abstract

Compared to mammal including human, many bioreactive genes that regulate various biological events has not been cloned and characterized yet in fishes, especially shark, *Scyliorhinus torazame*.

In order to isolate genes that regulate physiological processes in cartilaginous fishes, we performed reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the RNA of cartilage tissues of *Scyliorhinus torazame*.

The cloned partial genes were 86%, 80%, 73%, 84%, 75%, 79% identical to  $\alpha$ -actin, 90-kDa heat-shock protein, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase, ubiquitin, glutamine synthetase and connective tissue growth factor genes of human, respectively. They also have similar nucleotide sequence homologues with those of another species.

These partial bioreactive genes elucidated in this study may support to studies of phylogenetic analysis based on evolutionary relationships between shark and other species.

**Key Words** — cloning, shark, actin, 90-kDa heat-shock protein, tetrahydrofolate synthetase, ubiquitin, glutamine synthetase, connective tissue growth factor

#### 서 론

생명체에 있어 매우 많은 생리 활성 유전자들이 존재하여 그 기능을 수행함으로써 인해 다양한 생명활동을 지속하게 한다. 이러한 생리 활성 유전자들의 동정과 기능에 대한 연구는 다양한 종, 특히 인간과 쥐를 비롯한 포유류에

서 주로 행해지고 있는 반면 상어를 포함한 어류에서의 연구는 미약한 상태이다.

특히 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*)는 우리나라 연근해에 주로 서식하는 연골어류이나, 그에 대한 유전자 보고는 본 연구팀에서 밝혀낸 metalloproteinase inhibitor 3 precursor (TIMP-3, accession number, AF110767)[8]와 membrane type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP, accession number, AF244994)[9]를 비롯한 몇 가지 생리 활성 유전자만 밝혀져 있을 뿐 매우 미비하다. 이에 본 실험에서는 두

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel. 02-880-6988, Fax : 02-872-1795  
E-mail : qwonkim@plaza.snu.ac.kr

툽상어 연골 조직에서 분리한 RNA를 주형으로, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 기법을 사용하여 여러 가지 두툽상어의 생리활성 유전자의 일부 염기서열을 동정하였다.

구체적으로 본 연구에서는 심장근에서 근수축에 매우 중요한 기능을 수행하는 한 인자[15]로서, 심장 마비[17] 및 가족 특이적 비후성 심근장애[13]등의 질병과 밀접한 관련이 있는 cardiac muscle alpha-actin, 세포내에 편재하는 molecular chaperone으로 신호전달, cell cycle, 조절 및 전사 조절에 필요한 단백질에 필수적인 기능을 하는 90-kDa heat-shock protein[3,18], 단백질의 sorting 및 분해, DNA repair, 세포분열과 autophagy, apoptosis 등의 중요한 세포 작용에 관련한 ubiquitin[5,6], 및 tetrahydrofolate 유도체의 interconversion 과정에서 세가지 연속적인 반응을 촉진하는 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase[19], glutamate와  $\text{NH}_4^+$  및 ATP등을 이용하여 glutamine을 합성하는 역할을 하는 glutamine synthetase[4]와 간엽세포에 의한 증식과 collagen합성, chemotaxis 등을 촉진할[1] 뿐만 아니라 혈관내피세포의 이동이나 증식에 관여하는[20] connective tissue growth factor 등의 유전자의 일부를 클로닝하여 그 염기서열을 밝혀내었다. 이러한 두툽상어 유래의 유전자들은 이미 다른 종에서 밝혀진 해당유전자들과의 분자생물학적 비교연구에 의한, 진화 과정에 따른 다른 종과의 계통도 확립 및 comparative genomics 연구에 유용한 지표로 사용될 것이라 판단되며, 이들 유전자들 중 발생단계 및 계배에서 혈관신생(angiogenesis)을 촉진한다고 보고된 바 있는 connective tissue growth factor의 경우[14], 이전에 본 연구팀에서 밝힌[9] MT3-MMP와 더불어 상어 유래의 허혈성 질환의 치료제로 사용가능 하리라 사료된다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에서 사용한 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*)는 부산 자갈치에서 구입하였다. 구입한 상어를 가급적 빨리 필요한 조직별로 절단한 다음, 액체 질소로 동결시켜서 사용할 때까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

### 두툽상어 연골조직으로부터 total RNA분리

두툽상어 연골조직으로부터 total RNA를 분리하기 위하여 TRIZOL reagent (GIBCO BRL)를 사용하였다. 두툽상어로부터 연골조직을 적출한 후, 유발에 액체질소를 첨가하고, 유봉을 사용하여 homogenization을 실시한다. 연골 조직 1 g당 10 ml의 TRIZOL reagent를 첨가하며, 이 후 상온에서 5분간 방치한다. 그 다음 2 ml의 chloroform을 첨가하고 15초간 강하게 흔들어 준 후 상온에서 2-3분 방치한다.  $4^\circ\text{C}$ , 12,000 g에서 15분간 원심분리한 후 상층을 새 tube에 옮기고 여기에 0.25 ml isopropyl alcohol과 0.25 ml high salt precipitation solution (0.8 M sodium acetate & 1.2 M sodium chloride)을 첨가한다. 그런 후, 10분간 상온에서 방치하고  $4^\circ\text{C}$ , 12,000 g에서 원심분리하면 tube 바닥에 흰색의 침전물이 생기는데 이 침전물이 total RNA이다. Total RNA 침전물을 75% ethanol로 간단하게 씻어주고 상온에서 5-10분간 말려준 후 적정량의 DEPC-D.W로 total RNA를 녹인다. 그리고, 2.5 M LiCl를 넣은 후,  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간동안 침전시킨다[2]. 그 후, RNA를 다시 70% ethanol로 2번 정도 씻어주고, 상온에서 말린 다음 적정량의 DEPC-D.W에 녹인다.

### RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

두툽상어의 생리 활성 유전자들을 클로닝하기 위하여 RT-PCR 기법을 사용하였다. 먼저, 5  $\mu\text{g}$ 의 두툽상어 연골 및 뇌, 근육, 간 조직의 total RNA와 Superscript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase, 500 ng oligo (dT)<sub>12-18</sub>를 사용하여 역전사 반응을 실시한 결과(GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), cDNA를 획득하였다. 획득한 두툽상어 연골조직 cDNA 1  $\mu\text{g}$ 과 10X PCR 완충용액, 200  $\mu\text{M}$  각각의 dNTP, 2.5 units Taq DNA polymerase 및 sense와 antisense primer를 사용하여 반응을 수행하였다. 각각의 유전자의 클로닝에 사용된 primer들의 sequence는 Table 1에 나타내었으며, 각 유전자에 대한 PCR 증폭 cycle 및 PCR 반응조건은 다음과 같다.

Actin의 경우, DNA가닥 분리를 위해  $94^\circ\text{C}$ 에서 30초, primer와 주형 cDNA의 결합을 위해  $55^\circ\text{C}$ 에서 30초, DNA 복제를 위해  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분의 순서로 40 cycle 반복하여 반응을 수행하였으며, 90-kDa heat-shock protein의 경우,  $95^\circ\text{C}$ 에서 30초,  $55^\circ\text{C}$ 에서 1분,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분의 순서로 40

Table. 1. Used primer sequences for RT-PCR and homologues of PCR products

Primers	Sequences	Homologues of PCR products
Actin sense	5'-GACTACCTCATGAAGATC-3'	Actin
Actin antisense	5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3'	
S 1	5'-CA(C/T)CC(A/G/C)CA(G/A)(A/G/C)(C/A)N GC(G/C)TT(C/T)TGC-3'	90-kDa heat-shock protein gene, Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase -methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase -formyltetrahydrofolatesynthetase gene
As 1	5'-(A/G)TC(T/G/C)(G/A)TCCA(G/C/A)A(G/A /T)(G/A)CA(G/C/A)T(G/C)(G/A)(G/T)(T/C)-3'	
S 2	5'-ATGGCCCCCTTTGCACCC-3'	Ubiquitin gene, Glutamine synthetase gene
As 2	5'-ATCTGGGACCGCAGGGAC-3'	
S 3	5'-GTCATCAGGGCCAAGTTC-3'	Connective tissue growth factor gene
As 3	5'-GTCCGTCCACAAGCAATG-3'	

cycle, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase의 경우, 10% (v/v) DMSO를 첨가하여 95℃에서 30초, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분의 순서로 40 cycle, ubiquitin의 경우에는 94℃에서 30초, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분의 순서로 40 cycle, glutamine synthetase의 경우 94℃에서 30초, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분의 순서로 40 cycle, connective tissue growth factor의 경우, 94℃에서 30초, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분의 순서로 40 cycle 반복하여 증폭을 실시하였다. 증폭산물은 1.8% agarose gel에서 전계시켜 EtBr 염색 후, band를 분리하였다.

cDNA 클로닝 및 유전자의 염기서열 분석

Agarose gel에서 분리한 PCR 증폭산물인 DNA 단편들은 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI)을 이용하여, pGEM-T easy vector에 클로닝 하였다. 그리고, *EcoR* I 제한효소를 이용하여 그 결합여부를 조사한 후, 확인된 재조합 plasmid를 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit (ABI)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination method로 automatic DNA sequencing을 수행하였다. DNA 서열 분석은 BLAST database program (NCBI, EMBL)과 DNASIS program (Hitachi)을 이용하였다.

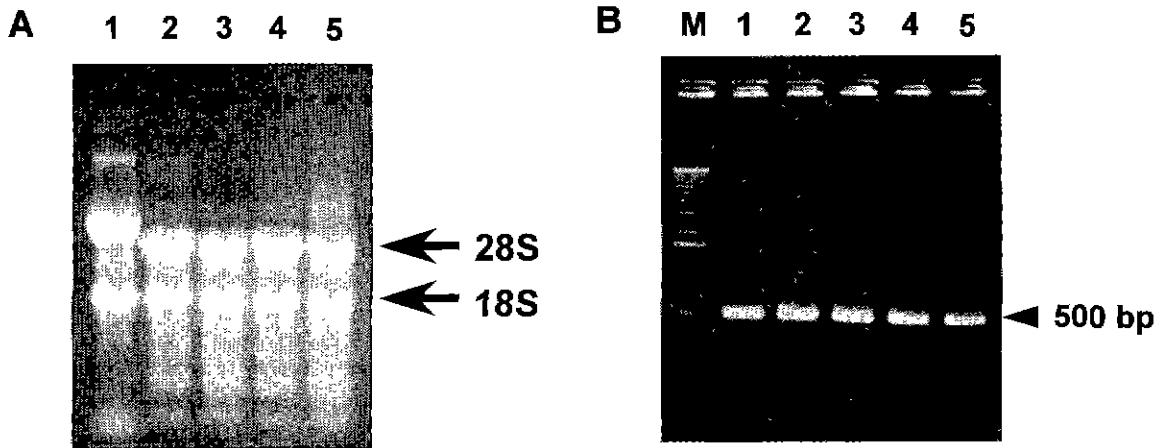
결과 및 고찰

먼저 두릅상어의 다양한 생리 활성 유전자들의 동정을

위해, 뇌 조직 및 연골, 간, 근육 조직의 total RNA를 분리하였다. 대조군으로서 인간 섬유육종암 세포인 HT1080의 RNA를 분리하여 그 양상을 확인 한 결과, Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 추출한 두릅상어 조직 RNA의 안정성이 정상적임을 확인하였다. 이들 RNA로부터 각 조직의 cDNA를 합성하고, 먼저 일반적인 housekeeping 유전자로서 정량적인 RNA 분석 실험에 널리 사용되며[22], 세포의 선도 발달에 비례적으로 분포하여 극성에 의한 세포이동에 중요한 기능을 수행하고 있다고 알려진[11]  $\beta$ -actin primer [21]를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 대조군인 HT-1080 세포 및 두릅상어의 모든 조직에서 약 500 bp 크기의 PCR 단편을 얻었고, 이들 중 연골조직 cDNA를 사용한 PCR 단편을 gel로부터 분리한 후, actin sense primer를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 그 결과 인간의 cardiac muscle alpha-actin과 86%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1C).

앞서 언급한 방법으로 제작된 두릅상어 연골 cDNA와 S 1, As 1 primer를 사용하여 서로 다른 온도 주기와 반응 조건으로 PCR을 수행하여 442 bp transcript (Fig. 2A) 및 656 bp transcript (Fig. 3A)를 동정하였다. 이들을 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과, 인간의 90-kDa heat-shock protein 유전자 및 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase 유전자와 각기 80% (Fig. 2B), 73% (Fig. 3B) 상동성이 있음을 확인하였다.

또한, 두릅상어 연골 cDNA 및 S 2, As 2 primer를 사용하여 앞서 언급한 두 유전자의 경우에서와 마찬가지로 각



**C Homo sapiens actin, alpha, cardiac muscle (ACTC) mRNA**  
**Length = 1134**

**Identities = 393/455 (86%), Strand = Plus / Plus**

```

Shark: 31  ACTGCTGAACGTGAGATTGCCCGTGATAAAGGAGAAGCTGTGTTATGTCGCCCTGGA 90
Human: 613 ACTGCTGAACGTGAAAATTGCC-GTGACATTAAGGAGAAGCTGTGCTATGTCGCCCTGGA 671
Shark: 91  CTTTGAGAATGAAATGGCTACTGCAGCCTCTTCATNGNNTCTGGAAAAGAGCTATGAAT 150
Human: 672  TTTTGAGAATGAGATGGCCACAGCTGCCTCTTCCTCCTCCT-TGGAGAAGAGCTATGAAC 730
Shark: 151  TGCCTGATGGTCAGGTCATCACCATTGGTAATGAGCGTTCCGTTGTCCTGAGACCCCT 210
Human: 731  TGCCTGATGGCCAAGTCATCACTATCGGCAATGAGCGCTCCGCTGTCCTGAGACACTCT 790
Shark: 211  TCCAGCCATCTTCAATGGCATGGAGTCGCTGGTATTCATGAACTACATAACAGCA 270
Human: 791  TCCAGCCCTCCTTCATTTGGTATGGAATCTGCTGGCATCCATGAAACAACCTACAATAGCA 850
Shark: 271  TCATGAAGTGCGATAATGACATCCGTAAGGATCTGTATGCCAACAATGTCTGTCTGGTG 330
Human: 851  TCATGAAGTGACATTCATATCCGCAAGGACCTGTATGCCAACAATGTCTTATCTGGAG 910
Shark: 331  GCACCACCATGTACCCTGGTATTGCTGACCCTATGCAAAAAGAAATCACAGCCCTGGCTC 390
Human: 911  GCACCACCATGTACCCTGGTATTGCTGATCGTATGCAGAAGGAAATCACTGCTCTGGCTC 970
Shark: 391  CCAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCTCCACCTGAGCGTAAATATCCNNTTGGGATT 450
Human: 971  CTAGCACCATGAAGATTAAGATTAATGCTCCCCCTGAGCGTAAATACTCTGTCT-GGATT 1029
Shark: 451  GGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTATCCACCTCCA 485
Human: 1030 GGGGGCTCCATCTTGGCCTCTCTGTCCACCTCCA 1064
    
```

Fig. 1. Total RNA and RT-PCR products from various tissues of *Scyliorhinus torazame*. Comparison of cloned fragments with human actin, alpha, cardiac muscle.

A. Total RNA isolated HT1080, human fibrosarcoma cells (lane 1), brain tissues (lane 2), cartilage tissues (lane 3), liver tissues (lane 4), muscle tissues (lane 5) of *Scyliorhinus torazame*, B, Lane M, 1 kb size marker; Lane 1, amplified PCR product of about 500 bp encoding predicted shark actin, alpha, cardiac muscle. C, Comparison of nucleotide sequences of amplified transcript with human actin, alpha, cardiac muscle gene.

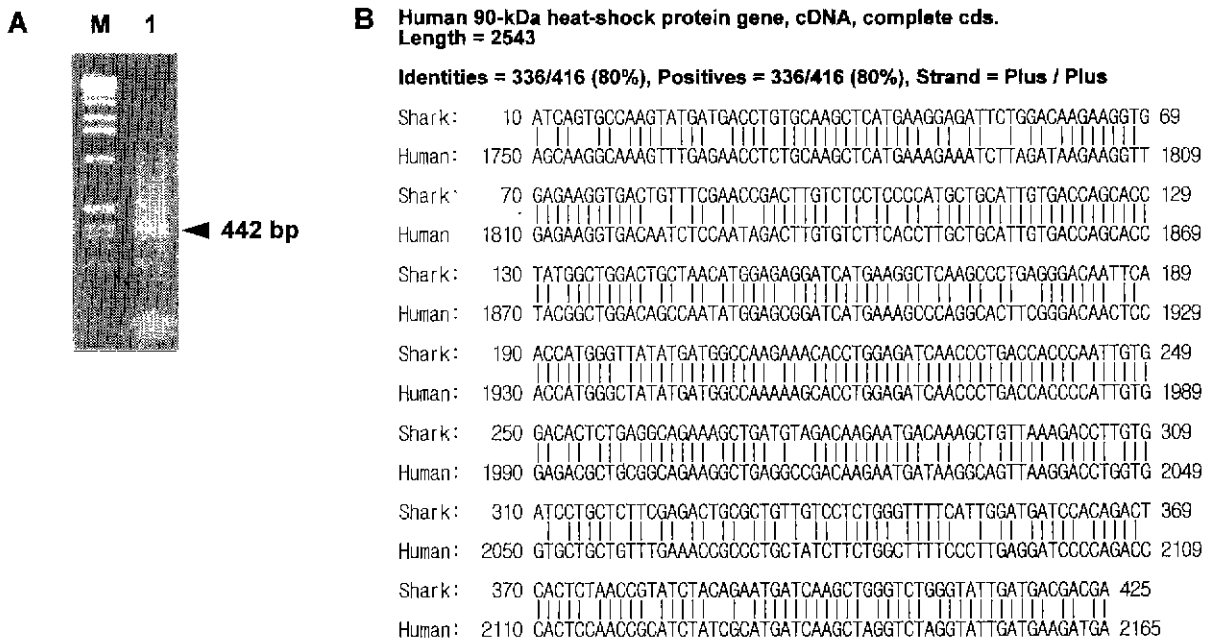


Fig. 2. Comparison of cloned fragments with human 90-kDa heat-shock protein gene.

A, Lane M, 1 kb size marker, Lane 1, amplified PCR product of 442 bp encoding predicted shark 90-kDa heat-shock protein.  
B, Comparison of nucleotide sequences of amplified transcript with human 90-kDa heat-shock protein gene.

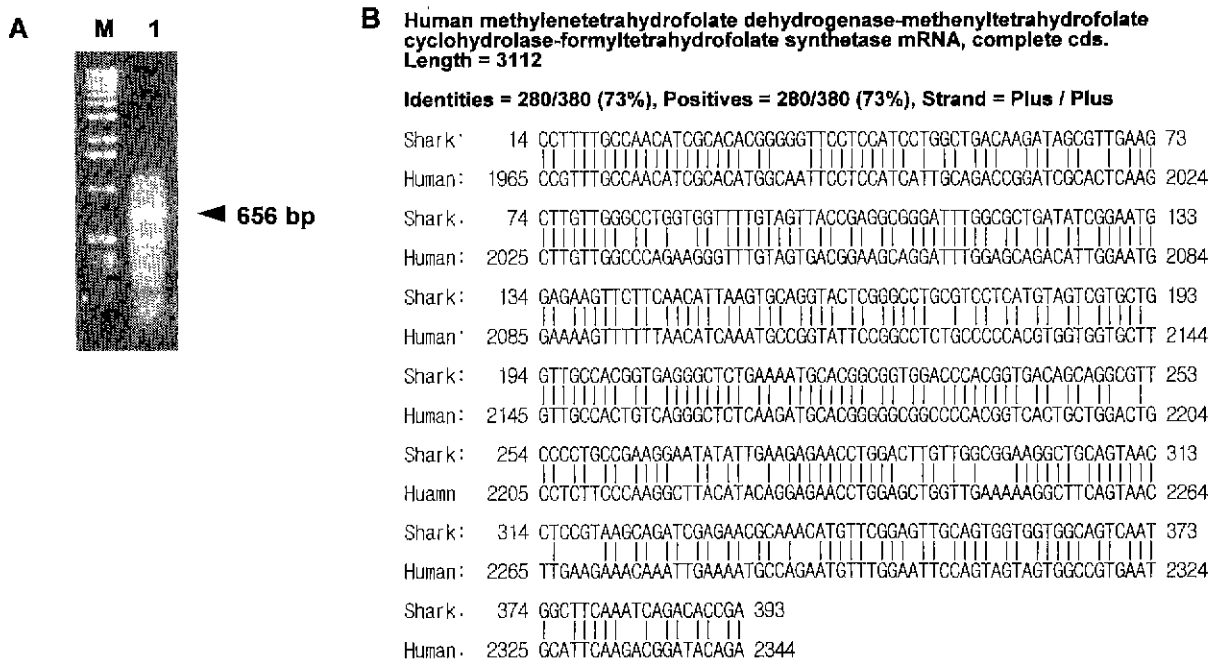


Fig. 3. Comparison of cloned fragments with human methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase.

A, Lane M, 1 kb size marker; Lane 1, amplified PCR product of 656 bp encoding predicted shark methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase B, Comparison of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase nucleotide sequences of amplified transcript with human tetrahydrofolate synthetase gene.

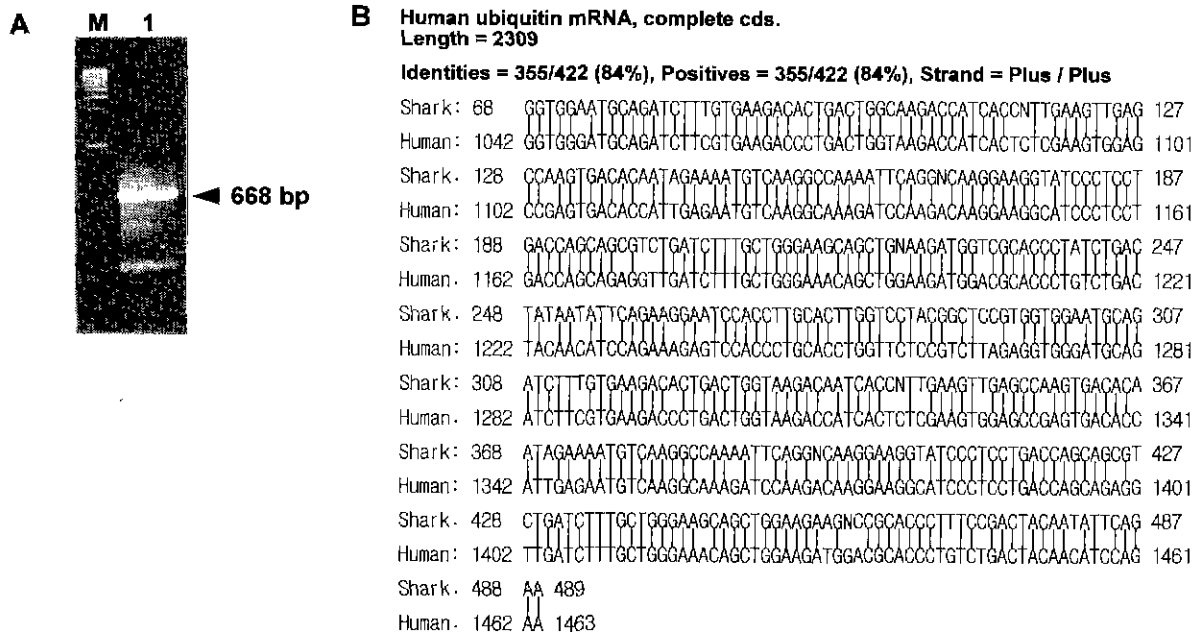


Fig. 4. Comparison of cloned fragments with human ubiquitin mRNA.  
 A, Lane M, 1 kb size marker; Lane 1, indicates the amplified PCR product of 668 bp encoding predicted shark ubiquitin. B, Comparison of nucleotide sequences of amplified transcript with human ubiquitin gene.

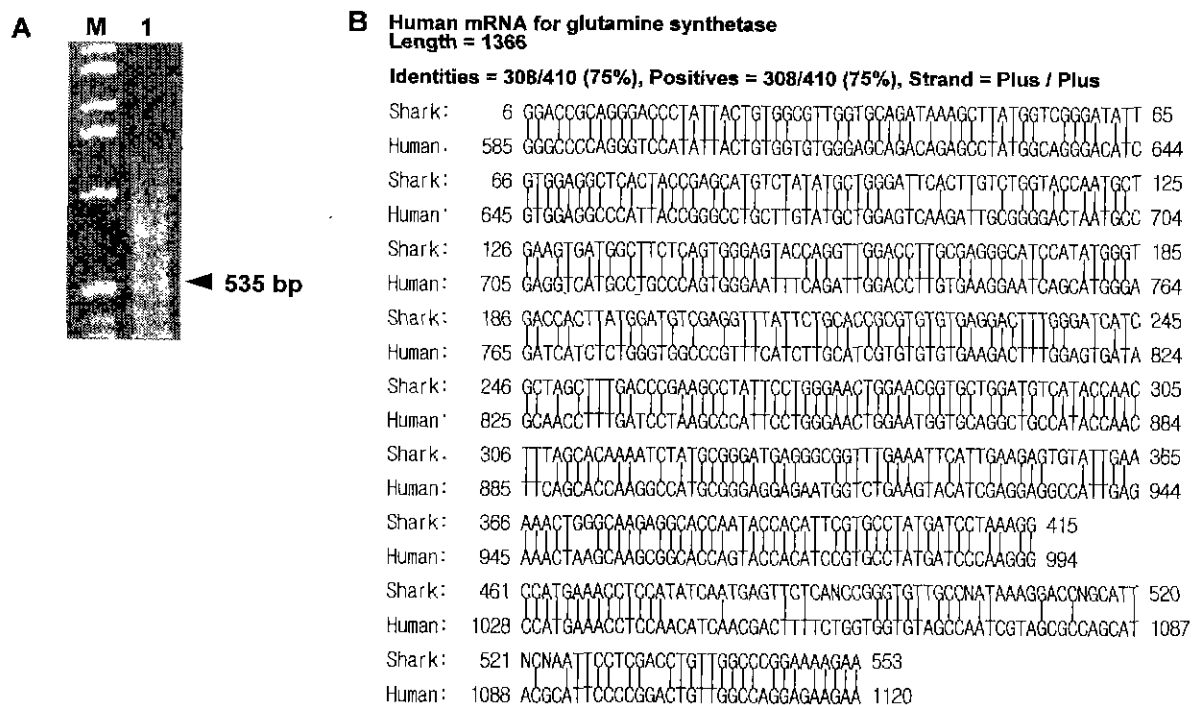


Fig. 5. Comparison of cloned fragments with human glutamine synthetase.  
 A, Lane M, 1 kb size marker; Lane 1, amplified PCR product of 535 bp encoding predicted shark glutamine synthetase. B, Comparison of nucleotide sequences of amplified transcript with human glutamine synthetase gene.

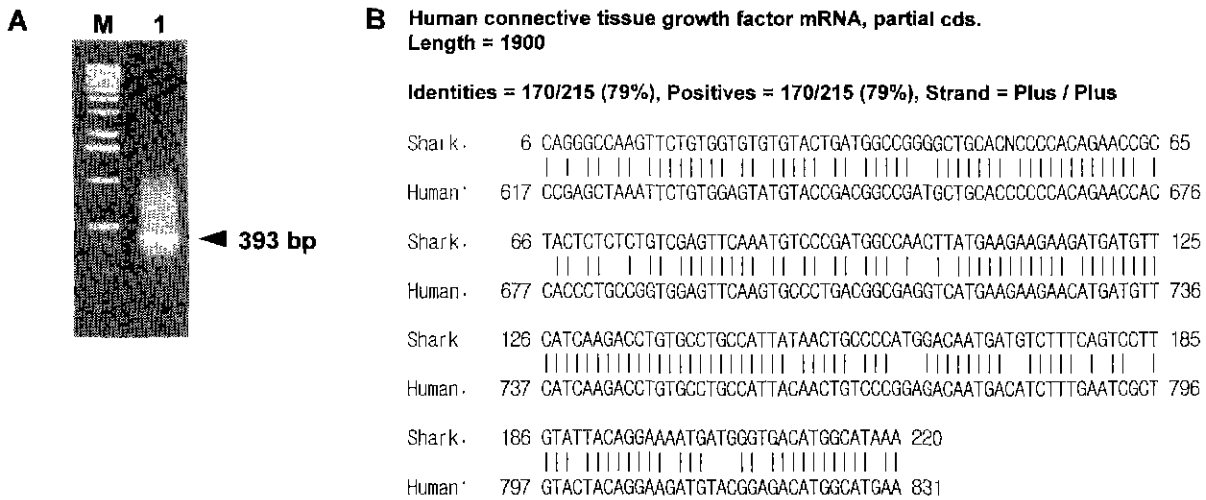


Fig. 6. Comparison of cloned fragments with human connective tissue growth factor. A, Lane M, 1 kb size marker; Lane 1, amplified PCR product of 393 bp encoding predicted shark connective tissue growth factor. B, Comparison of nucleotide sequences of amplified transcript with human connective tissue growth factor gene.

기 상이한 온도 주기와 반응 조건으로 PCR을 수행하여 668 bp (Fig. 4A) 및 535 bp (Fig. 5A) transcript를 증폭하였다. 이들 역시 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과 인간의 ubiquitin 유전자 및 glutamine synthetase 유전자와 각기 84% (Fig. 4B) 및 75% (Fig. 5B) 상동성을 나타내었다.

마지막으로 S 3 및 As 3 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 393 bp transcript (Fig. 6A)를 동정하였다. 이 cDNA 또한 클로닝한 후 염기서열을 결정하여 인간의 connective tissue growth factor mRNA와 79% 상동성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 6B).

본 논문에서 밝힌 두툽상어의 생리 활성 유전자들의 염기서열은 위에서 나타낸 인간뿐만 아니라 쥐, 생쥐, 소를 비롯한 포유류와 닭, 개구리 및 다른 어류 등, 다른 종에서의 해당 유전자들과도 인간의 염기서열과 유사한 상동성을 지니고 있음을 검증하였다(data not shown). 더불어 이들 유전자의 염기서열을 GenBank nucleotide sequence database에 각기, Scyliorhinus torazame actin mRNA (AF305690), connective tissue growth factor mRNA (AF305691), glutamine synthetase mRNA (AF306642), 90 kDa heat-shock protein mRNA (AF306643), tetrahydrofolate synthase mRNA (AF306644) 및 ubiquitin mRNA (AF306645) 등으로 accession numbers를 등록하였다.

결론적으로, 이들 유전자 단편의 염기서열은 다른 종의

해당유전자들과 비교, 분석하여 진화과정에 의한 다른 종과의 계통도 확립 및 comparative genomics 연구에 유용한 지표로 사용될 것이라 판단되며, 이들 유전자들 중 특히 다른 종에서 이미 혈관신생 촉진능력이 있는 것으로 알려진 바 있는[14] connective tissue growth factor의 경우, 본 연구팀이 이전에 밝힌 두툽상어의 연골 및 뇌조직으로부터 동정한 혈관신생 억제활성을 지닌 TIMP-3[7,8], 촉진능력을 가진 MT3-MMP[10]와 더불어 연골 추출물에 의한 혈관신생 억제 활성이 매우 높은 것으로 알려진[12,16] 상어 유래의 혈관신생 조절 의약품으로 사용되어질 수 있리라 추측된다.

**요 약**

지금까지 인간을 비롯한 여러 종에서 다양한 생리 활성 유전자가 동정되어 그 연구가 수행되어지고 있으나, 상어를 비롯한 어류에서의 유전자 동정은 미비한 상태이다.

본 연구에서는 한국의 연근해에 주로 서식하는 연골 어류인 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*)의 연골 조직으로부터 RNA를 분리한 후, RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 기법을 수행하여 다양한 생리 활성 인자들의 cDNA 단편을 클로닝하였다. 구체적으로 본 연구에서 동정된 생리 활성 유전자의 단편들은 염기서열수준

에서 인간의 alpha cardiac muscle actin, 90-kDa heat-shock protein, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase, ubiquitin, glutamine synthetase 및 connective tissue growth factor 유전자들과 각각 86%, 80%, 73%, 84%, 75%, 79%의 상동성을 나타내었다. 또한 인간 이외의 다른 종에서의 각 유전자들과도 이와 유사한 상동성을 지니고 있었다. 결론적으로, 이들 동정된 유전자 단편들은 두 톱상어의 해당 유전자 혹은 이와 유사한 기능을 수행하는 유전자들의 일부 cDNA라 추측되며, 다른 종과의 진화 계통도 확립 및 comparative genomics 연구에 유용한 자료로 사용되리라 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업과 과학기술부의 국가지정연구실사업(2000-N-NL-01-C-015)에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Abraham, D. J., Shiwen, X., Black, C. M., Sa, S., Xu, Y. and Leask, A. 2000. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 15220-15225.
2. Barlow, J. J., Mathias, A. P., Williamson, R. and Gammack, D. B. 1963. A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 61-66.
3. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. and Lindquist, S. 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3919-3930.
4. Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. and Rotstein, S. H. 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 122-145.
5. Finley, D. and Chau, V. 1991. Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 25-69.
6. Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. 2000. Ubiquitin and its kin : how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* **10**, 335-342.
7. Kim, J. T., Jeong, J. -W., Sohn, T. -K. and Kim, K. -W. 2000. Anti-angiogenic Effect of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) from Shark, *Scyliorhinus torazame*. *Korean Association of Cancer Prevention*, **5**, 71-80.
8. Kim, J. T., Kim, M. -S., Bae, M. -K., Song, H. S., Ahn, M. -Y., Kim, Y. -J., Lee, S. -J. and Kim, K. -W. Cloning and characterization of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) from shark, *Scyliorhinus torazame*. *Biochim. Biophys. Acta.*, in press.
9. Kim, M. -S., Bae, M. -K., Kim, J. T., Song, H. S., Ahn, M. -Y., Kim, J. W., Lim, W. K., Kim, K. -W. and Kim, Y. -J. 1999. Cloning of membrane type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) gene from *Scyliorhinus torazame*. *Korean Association of Cancer Prevention*, **4**, 17-24.
10. Kim, M. -S., Bae, M. -K., Kim, J. T., Jeong, J. -W., Song, H. S., Ahn, M. -Y., Kim, J. W., Lim, W. K., Kim, K. -W. and Kim, Y. -J. Cloning and Characterization of membrane type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) from *Scyliorhinus torazame*. Manuscript prepared.
11. Lawrence, J. B. and R. H. Singer. 1986. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* **45**, 407-415.
12. Lee, A. and Langer R. 1983. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* **221**, 1185-1187.
13. Mogensen, J., Klausen, I. C., Pedersen, A. K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T. A., Gregersen, N., Hansen, P. S., Baandrup, U. and Borglum, A. D. 1999. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **103**, R39-43.
14. Moussad, E. E and Brigstock D. R. 2000. Connective Tissue Growth Factor: What's in a Name? *Mol. Genet. Metab.* **71**, 276-292.
15. Nowak, K. J., Wattanasirichaigoon, D., Goebel, H. H., Wilce, M., Pelin, K., Donner, K., Jacob, R. L., Hubner, C., Oexle, K., Anderson, J. R., Verity, C. M., North, K. N., Iannaccone, S. T., Muller, C. R., Nurnberg, P., Muntoni, F., Sewry, C., Hughes, I., Sutphen, R., Lacson, A. G., Swoboda, K. J., Vigneron, J., Wallgren-Pettersson, C., Beggs, A. H. and Laing, N. G. 1999. Mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy. *Nat. Genet.* **23**, 208-212.
16. Oikawa, T., Ashino-Fuse, H., Shimamura, M., Koide, U. and Iwaguchi, T. 1990 A novel angiogenic inhibitor



- derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. *Cancer Lett.* **51**, 181-186.
17. Olson, T. M., Michels, V. V., Thibodeau, S. N., Tai, Y. S. and Keating, M. T. 1998. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* **280**, 750-752.
18. Pearl, L. H. and Prodromou, C. 2000. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 46-51.
19. Rozen, R., Barton, D., Du, J., Hum, D. W., MacKenzie, R. E. and Francke, U. 1989. Chromosomal localization of the gene for the human trifunctional enzyme, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 781-786.
20. Shumo, T., Nakanishi, T., Kimura, Y., Nishida, T., Ishizeki, K., Matsumura, T. and Takigawa, M. 1998. Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J. Biochem.* **124**, 130-140.
21. Yanagisawa, K., Kondo, M., Osada, H., Uchida, K., Takagi, K., Masuda, A., Takahashi, T. and Takahashi, T. 1996. Molecular analysis of the FHIT gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **56**, 5579-5582.
22. Zhong, H. and Simons J. W. 1999. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 523-526.