Subtraction 기법을 이용한 한우 성장 단계 특이 발현 유전자 탐색

장요순* · 김태헌* · 윤두학* · 박응우* · 정일정* · 조진기**
농촌진흥청 축산기술연구소*, 경북대학교 동물공학과**

Identification of the Differentially Expressed Genes of Hanwoo During the Growth Stage by Subtractive cDNA Hybridization

Y. S. Jang*, T. H. Kim*, D. H. Yoon*, E. W. Park*, I. C. Cheong* and J. K. Jo**
National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea*,
Department of animal science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea**

ABSTRACT

To identify the differentially expressed genes at growth stage of Hanwoo, we constructed the subtractive cDNA library from loin mRNA of 12- and 24-month old Hanwoo by PCR-based subtraction. The fourteen genes were confirmed by sequencing and reverse northern blot analysis, and they were selected as candidate of putative genes differentially expressed at the growth stage of Hanwoo. Three subtracted cDNA fragments that expressed specific signal to cDNA probe for 6-month-old loin of Hanwoo were highly homologous to those of the genes encoding EPV 20, Ca^{2+} ATPase, and TCTP, respectively. The nine cDNA clones showed intense signal to cDNA probe from 12-month-old loin of Hanwoo, and highly homologus to those of genes encoding VCP, HSP 70, aldolase A, MSSK1, GM-2 activator protein, ryanodine receptor, acidic ribosomal phosphoprotein p1, ADP/ATP translocase, and UCP 2, respectively. Two subtracted cDNA clones that expressed specific signal to cDNA probes for 12- and 24-month-old loin of Hanwoo were detected. One of them was highly homologus to the gene encoding ferrochelatase and the other was highly homologus to the gene encoding ADRP.
(**Key words** : Hanwoo, Growth stage, Differentially expressed gene, Subtraction)

Ⅰ. 서 론

동물의 성장, 육질, 유 생산, 번식, 질병 저항성 등과 같은 경제형질에 대한 유전능력 향상에 있어, 유전정보탐색 기술의 이용은 우량품종 선발 및 개량을 위한 중요한 수단으로 인식되고 있다. 가축에 있어 성장은 생산성과 직접적으로 관련되어 있고, 성장호르몬의 변화 등을 포함한 여러 요인이 관여하며, 유전자 수준 즉 성장단계에 따른 발현 유전자의 종류 및 발현양상에 있어 차이를 나타낼 것이다. 가축의 성장단계에 따른 발현 유전자에 관한 연구는 국내외적으로 극히 부족하며, 더구나 한우에 있어서는 발육 또는 육질의 유전적 특성에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔지만, 명확한 발육 및 육질특성을 구명하지 못한 실정이다. 그

Corresponding author : T. H. Kim, National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea Tel: 031-290-1591 E-mail : kth6160@rda.go.kr

리고 우리 나라 고유 품종인 한우의 유용 유전자를 확보하고 보존하며, 기능을 밝히고자 하는 연구 또한 부족하다.

고등생물에서 세포의 성장이나 기관형성과 같은 생물학적인 과정들은 differential gene expression program에 의해 이루어진다. 이들 과정의 조절작용을 이해하기 위해서는 발현양상이 다른 유전자의 특성 규명 및 cloning이 필요하고, differential screening 기술과 같은 실험적인 기법을 이용하면 가능하다.

Subtractive cDNA hybridization은 발현유무 및 발현양에 차이를 나타내는 유전자의 cDNA를 분리하는데 있어 강력한 접근방법으로 알려져 있다 (Duguin 및 Dinauer, 1990; Hara 등, 1991; Hendrick 등, 1984). 대부분의 cDNA subtraction 방법들은 대체로 하나의 집단 (tester)에서 유래된 cDNA를 다른 집단 (driver)에서 유래한 cDNA와 hybridization 반응을 실시하여 제거하고, hybridization된 공통서열로 hybridization 되지 않은 fraction (target)을 분리해내는 과정이 포함되어 있다. Hybridization 되지 않은 fraction 분리는 보통 hydroxylapatite chromatography (Hendrick 등, 1984), avidin-biotin binding 또는 oligo(dT)$_{30}$-latex beads (Hara 등, 1991)을 이용한다. Subtraction 기법을 실시하기 위해서는 20μg 이상의 poly(A)$^+$ RNA가 필요하고, 여러 단계를 거치며 일부는 반복 수행하는 과정을 거친다. 여러 가지의 subtraction 기법들을 살펴보면, representational difference 분석이라는 최근의 PCR-based 기술은 ss cDNA와 ds cDNA의 물리적인 분리 과정이 생략된 방법으로, 크기나 representation에 있어 차이가 있는 genomic DNA 단편들을 많도록 해주고 (Lisitsyn 및 Wigler, 1993), 발현양상의 차이를 나타내는 cDNA를 cloning할 수 있지만 (Hubank 및 Schatz, 1994), 여러 번의 subtraction을 실시해야 하는 단점이 있다. mRNA differential display (Liang 등, 1992)와 arbitrary primed PCR에 의한 RNA fingerprinting (Welsh 등, 1992)은 발현양상이 다른 유전자를 찾아내는 빠른 방법들로서, false positive가 많은 단점이 있지만 (Bauer 등, 1994), 발현량이 많은 유전자에 해당하는 mRNA 선발시 효과적인 방법이다 (Bertioli 등, 1995).

본 연구에서는 한우의 국제 경쟁력 향상을 위해, 유용 유전자를 확보하고 보존하며, 성장단계에 따른 특이 발현 유전자 탐색으로 한우의 발육 및 육질특성 연구를 위한 기초자료를 제공하는데 목표를 두었으며, 한우 등심조직을 이용하여 성장단계 특이적인 cDNA library를 구축함으로써 성장단계에 따라 다르게 발현되는 유전자들을 탐색하였다. 연구방법으로는 발현양상의 차이를 나타내는 target cDNA 단편을 선택적으로 증폭함과 동시에, 발현양 차이가 없는 nontarget cDNA 증폭은 억제하는 suppression subtractive hybridization (SSH) 방법을 이용하였다. 본 연구는 한우의 성장단계 특이발현 유전자를 분리하고, 조절영역 및 구조를 분석하고 특성을 해명하기 위한 1차적인 연구이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시재료

공시재료는 농촌진흥청 축산기술연구소에서 자유급식 형태로 사료를 공급하여 사육한 거세된 한우 수소를 사용하였으며, 6, 12, 및 24개월령의 등심조직을 이용하였다. 개체간의 변이를 평준화하기 위하여, 각 월령별 시료는 동일한 월령의 한우 5두로부터 등심조직을 취하였다.

2. Total RNA 및 mRNA 분리 · 정제

Total RNA는 Chirgwin 등 (1979)의 방법으로, 한우 등심조직 1g에 denaturing solution [26mM sodium citrate (pH 4.0), 0.5% N-lauroyl sarcosine, 0.125M β-mercaptoethanol, 4M guanidine thiocyanate] 12㎖을 첨가하여 조직을 파쇄한 후, phenol/chloloform/isoamylalcohol (125:24:1) 동량으로 추출하였다. mRNA는 total RNA 1.0mg을 PolyAtract System (Promega Co, USA) Kit을 사용하여 분리 · 정제한 후, RNase-free

water에 녹여 -70℃에 보관하였다.

3. Subtractive cDNA library 제작

12개월령 및 24개월령 한우의 등심조직 특이적인 cDNA library는 PCR-Selected Subtraction Kit (Clontech, USA)을 사용하여 Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 기법 (Fig. 1) (Diatchenko 등, 1996)으로 제작하였다. 분리 정제된 mRNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성하였고, 제한효소 *Rsa* I 을 이용하여 cDNA 말단을 blunt로 만들고 adaptor를 부착시켰다. 두 번의 hybridization 반응으로 subtraction을 실시하였다. Subtraction은 12개월령 (tester) - 24개월령 (driver) 및 24개월령 (tester) - 12개월령 (driver) 그룹으로 나누어 실시하였으며, subtraction 반응이 끝난 PCR 산물은 pCR2.1 vector (Invitrogen, USA)에 삽입하였고, *E. coli* TOP10을 숙주균으로 사용하여 subtracted cDNA library를 구축하였다.

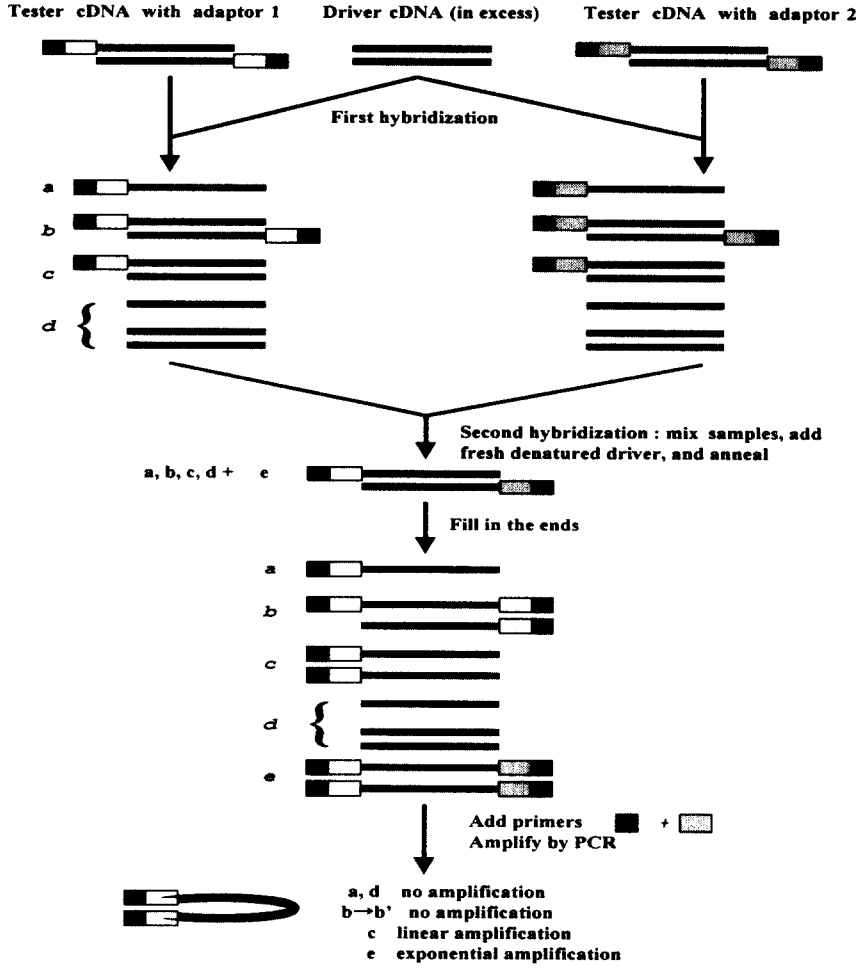

Fig. 1. Schematic diagram of PCR-selected cDNA subtraction. Solid lines represent the *Rsa* I digested tester or driver cDNA. Solid boxes represent the outer part of the adaptor 1 longer strand and corresponding PCR primer 1 sequence. Clear boxes represent the outer part of the Adaptor 1 and 2 longer strands and corresponding Nested PCR primer 1 sequence. Shade boxes represent the inner part of Adaptor 2 and the corresponding Nested PCR primer 2 sequence.

4. Subtractive cDNA library의 분석

구축된 subtractive cDNA library의 분석은 reverse northern blot 분석법 (von Stein 등, 1997)으로 실시하였다. 구축된 library로부터 선택한 cDNA 클론으로부터 추출한 plasmid DNA는 제한효소 *EcoR* I 으로 절단한 후, 전기영동하여 nylon membrane으로 옮겼다. Reverse northern blot 분석시 probe는 6, 12 및 24개월령 한우 등심조직으로부터 추출한 total RNA를 두 가닥의 cDNA로 전환한 후, DIG-high prime [random hexamers, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP, 0.35mM alkali-label-digoxigenin-11-dUTP, 1U/$\mu\ell$ labeling grade Klenow enzyme, 5x reaction buffer in 50%(v/v) glycerol] (Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 합성하였다.

5. 염기서열 결정 및 상동성 검색

DNA의 염기서열을 결정을 위해 Bigdye terminator (PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 cycle sequencing 반응을 실시하였다. cDNA 클론으로부터 분리한 plasmid DNA 200ng을 T7 및 Sp6 primer 1.6 pmole과 Bigdye terminator 2$\mu\ell$를 첨가하여, 96℃에서 10초, 50℃에서 5초, 60℃에서 4분간 25회 반응시켰다 (PE 9600, PE Applied Biosystems, USA). PCR 산물은 ethanol로 정제한 후, ABI 377 자동염기서열 분석장치 (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 전기영동하였고, 염기서열을 결정하였으며, BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 한우 성장단계 특이적인 subtractive cDNA library 구축

한우의 성장단계별 특이발현 유전자를 탐색하기 위하여, 한우의 등심조직으로부터 성장단계 특이적인 cDNA library를 구축하였다. Supression PCR의 효과에서 착안된 기술로 single strand cDNA와 double strand cDNA의 물리적인 분리를 위한 중간과정 필요 없이, 단 한 번의 subtractive hybridization으로 발현양상의 차이를 나타내는 cDNA 단편을 1,000배 이상 얻을 수 있는 장점을 가진 SSH 방법으로 12개월령 및 24개월령 등심조직 cDNA 사이의 subtraction (12개월령-24개월령, 24개월령-12개월령)을 실시하였다 (Fig. 2). Subtraction 실시 후, 증폭된 cDNA (subtracted cDNA)는 전기영동을 실시하여 PCR-Selected Subtraction Kit 내의 subtracted control과 12개월령 및 24개월령 등심조직 각각의 unsubtracted cDNA를 이용하여 비교함으로써, subtraction이 정상적으로 이루어진 것을 확인하였다 (Fig. 2의 lane 4 및 6). Subtraction 산물을 pCR2.1 vector에 삽입하여 12개월령 및 24개월령 특이적인 subtracted cDNA library를 구축하였다.

한우의 성장에 있어 생후 8~10개월령부터 근육 내 지방이 축적되기 시작하며, 12개월령 정도가 되면 육안으로도 근육 내 지방 증가를 관찰할 수 있고, 24~25개월령까지 계속적으로 지방축적이 진행된다는 연구결과 (축산기술연구소, 1997)를 근거로 12개월령 및 24개월령의 한우 등심조직을 공시재료로 이용하였다. 12개월령 및 24개월령 한우 등심조직에서 발현양상에 차이를 나타내는 유전자 탐색을 통하여, 한우에 있어 각 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 유전자들을 밝히고, 또한 근육 내 지방축적에 관여하는 유전자 및 유전자의 발현양상을 조사할 수 있다. 본 연구에서 구축한 한우 성장단계 특이적인 subtractive cDNA library는 한우에 있어 많은 유용 유전자를 확보할 수 있고, 또한 특이적 발현양상을 나타내는 유전자 분리 및 특성을 해명하기 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다.

2. Subtractive cDNA library 분석 및 염기서열 분석

한우의 12개월령 및 24개월령 등심조직 subtractive cDNA library를 reverse northern blot

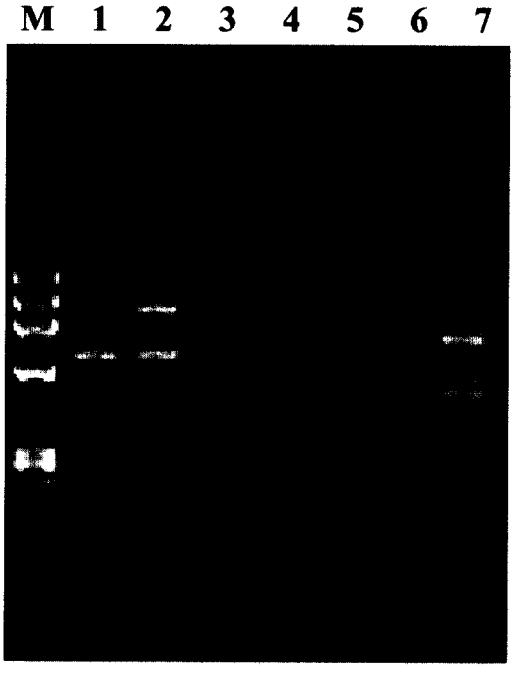

Fig. 2. Results of the Hanwoo loin cDNA subtraction according to the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) protocol described. Electrophoretic pattern after subtracted with 12-month-old and 24-month-old Hanwoo loin cDNA each other. M, ϕX174 DNA/*Hae*III digested size standard marker; Lane 1, Subtracted control cDNA in kit; Lane 2, Subtracted human skeletal cDNA; Lane 3, Unsubtracted human skeletal cDNA; Lane 4, 24-month-old Hanwoo loin cDNA subtracted with 12-month-old Hanwoo loin cDNA; Lane 5, Unsubtracted 12-month-old Hanwoo loin cDNA; Lane 6, 12-month-old Hanwoo loin cDNA subtracted with 24-month-old Hanwoo loin cDNA; Lane 7, Unsubtracted 24-month-old Hanwoo loin cDNA.

으로 분석하였다 (Fig. 3). 성장단계 특이적으로 발현될 것으로 추정되는 14개의 cDNA 클론을 선발하였으며, 염기서열을 결정하였고, 상동성을 분석하였다 (Table 1). Hybridization 조건을 일정하게 하기 위하여, 각 개월령 cDNA probe의 양 및 cDNA 클론의 양을 동일하게 사용하였다. Fig. 3의 B, C, D blot 분석결과, signal이 나타나지 않은 클론은 본 연구에서 확인한 성장단계 (6, 12, 24개월령) 이외의 단계에서 특이적인 발현양상을 나타낼 것으로 추정된다.

6개월령 특이적인 signal을 나타낸 3개의 cDNA (A12-66, A12-70 및 FC4-34)는 각각 EPV20, TCTP (translationally controlled tumor protein) 및 Ca^{2+}ATPase 유전자에 해당하였다. 이들 유전자 중 EPV20 protein은 크기가 20-kDa인 glycoprotein으로 우유의 skim milk fraction에서 처음 분리 동정 (Larsen 등, 1997) 되었으며, 정확한 기능은 밝혀지지 않았다. EPV 20 유전자는 사람의 epididymis HE1 cDNA 및 아미노산 수준에서 79%의 similarity가 있으며, 소의 신장, 비장, 간 및 유선조직에서 발현되고 사람의 epididymis에서의 특이적인 발현양상과는 달리, 소의 testis에서는 발현되지 않는 것으로 알려져 있다 (Kirchhoff 등, 1990). TCTP는 translation level에서 조절되는 성장관련 단백질로 histamin releasing factor (HRF) p23으로 알려져 있으며 (Thiele 등, 1998), 유전자의 전체 크기는 3819 bp로 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있다. 포유동물, 고등식물 및 *Saccharomyces cerevisiae*에 있고 (Thiele 등, 1998), Pb, Zn, Cd, 및 다른 오염된 광물질에 의해 TCTP 발현이 up-regulation 되는 것으로 보고되었다 (Sturzenbaum 등, 1998).

12개월령 cDNA probe에 대해서는 9개의 클론 (A24-5, A24-18, A24-23, A12-24, A12-57, A12-42, A12-43, A12-73 및 A12-92)이 6개월령 cDNA를 probe로 사용했을 때 보다 signal이 더 강해지는 것을 확인하였는데, 이 클론들은 각각 valosin-containing protein (VCP), aldolase A, muscle-specific serine kinase 1 (MSSK1), HSP 70, GM2-activator protein, ryanodine receptor, uncoupling protein 2, ADP/ATP translocase T1, acidic ribosomal phosphoprotein p1 유전자에 해당하였다. 1개의 cDNA 클론 (A24-4)이 12개월령 특이적인 signal을 나타내었으며, 이 클론은 6개월령 및 24개월령 cDNA probe를 사용했을 때는 signal이 검출되지 않았고, ferrochelatase 유전자에 해당하였다. 이 중 Aldolase는 3개의 isozyme을 가진 glycolytic enzyme으로 조직특

Table 1. List of candidated genes from subtracted cDNA library

Matching gene	Homology (%)	Name of subclone	Specificity of growth stage (month)	Characteristic
Ca^{2+} ATPase	91	FC4-34	6	Membrane ion transport proteins of the P-type ATPase family
Translationally controlledtumor protein (TCTP)	93	A12-70	6	-
B.taurus clone TUS4	99	A12-66	6	EPV20, Unknown function
Valosin-containing protein (VCP)	94	A24-5	12	The porcine gut protein
Aldolase A	90	A24-18	12	It has actin-binding activity of unknown function
Muscle-specific serine kinase 1 (MSSK1)	88	A24-23	12	-
Bovine 70kDa HSP	99	A12-24	12	Glucose regulated protein grp 70
G(M2)-activator protein	81	A12-57	12	-
Ryanodine receptor	94	A12-42	12	-
ADP/ATP translocase T1	97	A12-73	12	-
Acidic ribosomal phosphoprotein p1	90	A12-92	12	-
UCP 2 (Uncoupling protein 2)	99	A12-43	12	Regulator of lipids as fuel substrate
Ferrochleatase	99	A24-4	12	-
Adipose differentiation related protein (ADRP)	99	A12-62	24	Lipid storage droplets in animal cells

이성을 나타내는 aldolase A (muscle type), aldolase B (liver type) 및 aldolase C (brain type)가 알려져 있고 발달단계에 따라 조절되는 것으로 보고되었다 (Horecker 등, 1972). Minoro 등은 (1985) aldolase A mRNA를 사람의 간 조직으로부터 분리·동정하였고 동물의 거의 모든 조직에서 발현되어지지만 근육 특이적인 promoter를 가짐에 따라 근육에서 발현량이 많은 것으로 보고하였다.

UCP (uncoupling protein)는 열을 생산하고 신체의 전체 에너지 소비와 관련있는 specific site인 brown adipose tissue (BAT) 특이 단백질로서 brown adipocyte의 molecular maker로 이용되어지는 mitochondrial protein 이다. UCP는 3개의 isoform (UCP 1, UCP 2, UCP 3)이 밝혀져 있고, UCP 1은 BAT-specific isoform, UCP 2는 white adipose tissue type이고 UCP 3는 muscle type으로 알려져 있다 (Fleury 등, 1997; Boss 등, 1997; Gimeno 등, 1997). UCP 2와 UCP 3는 UCP 1과 유사하며, 사람의 경우 obesity, resting energy expenditure 및 hyperinsulinemia와 관련 있는 것으로 알려져 있는 (Bouchard 등, 1997) chromosome 11q13에 위치하고 있다 (Fleury 등, 1997; Gong 등, 1997; Enerback 등, 1997). Gong 및 Reitman (1999)은 UCP 3와 UCP 2는 obesity와 diabetes에 대하여 민감한 정도를 나타낼 수 있는 후보 유전자라고 발표하였다. Millet 등 (1997)은 결식 (fasting) 과정을 거친 개체 중 야윈 (lean) 개체와 비만한 개체의 골격근과 지방조직에서 UCP 2와 UCP 3

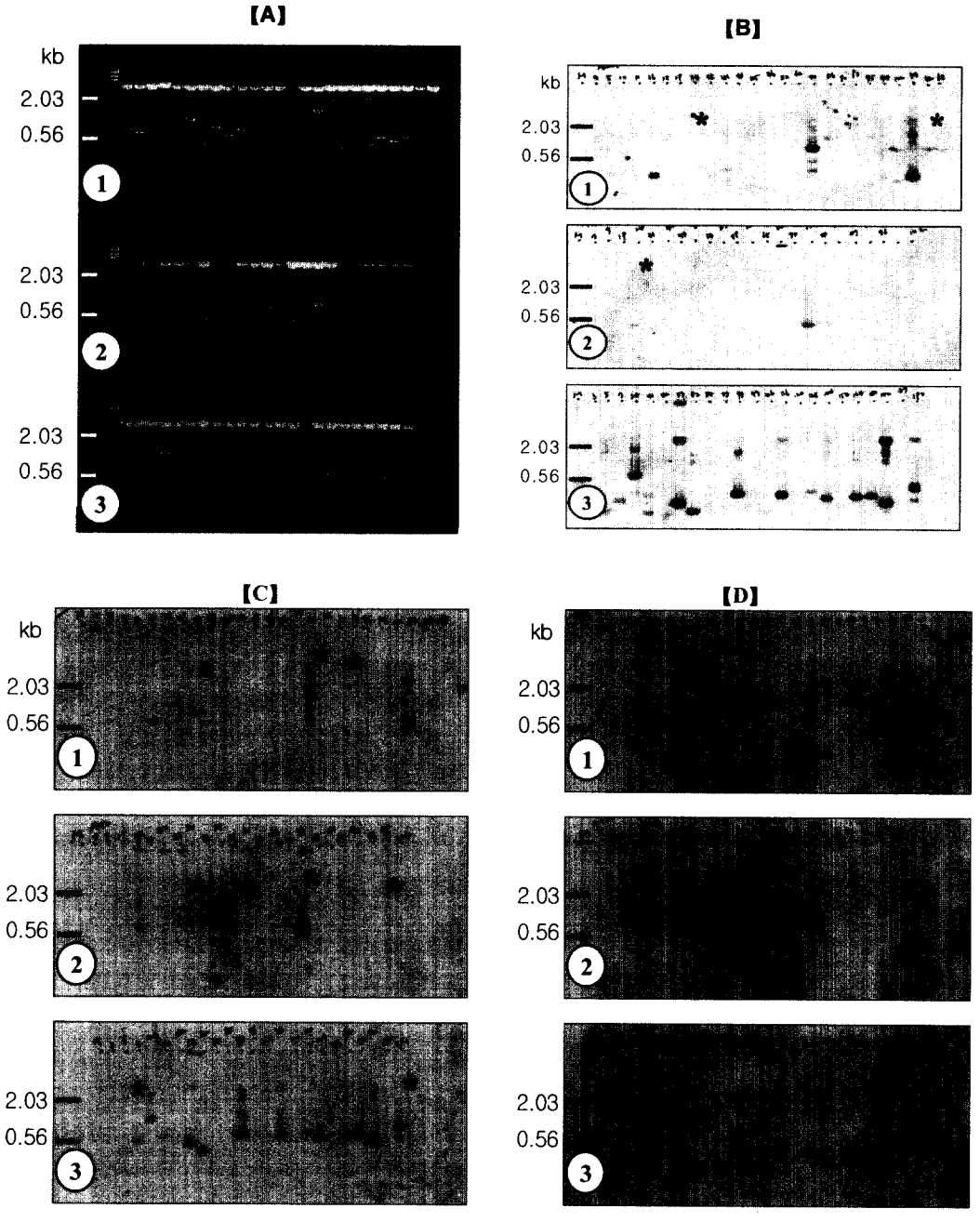

Fig. 3. Analysis of subtracted cDNA clones. A, Electrophoresis of selected cDNA clones from subtracted cDNA libraries. cDNA clones were digested with *EcoR* I and the fragments resolved on 1% agarose gel. B, C, & D, Results of reverse northern blot analysis, blots were hybridized with DIG-labeled growth stage specific double-stranded cDNA probes for Hanwoo loin of 6- (B), 12- (C), and 24- (D) month-old, respectively. Asterisks (*) represent selected cDNA clones in this study.

mRNA level이 증가되는 것을 확인하였고, 이런 연구결과로부터 UCP 2와 UCP 3 단백질이 fasting에 있어 대사적 적응 (metabolic adaptation)에 관여하는 것으로 가정하였다.

A12-62 cDNA 클론은 24개월령 특이발현 유전자로 추정되며, ADRP (adipocyte differentiation related protein) 유전자와 유사하였다. ADRP는 Jiang 및 Serrero (1992)에 의해서 처음 밝혀진 크기가 50 kDa인 membrane-associated protein으로서 지방조직에서 가장 강력하게 발현되며, 지방세포 분화의 초기 단계에서 발현이 유도된다고 알려져 있고, ADRP의 human orthrolog는 adipophilin으로 명명되어졌다. ADRP는 지방세포에서 lipid droplet을 coating하는 phophoprotein으로 알려진 perilipin (Egan 등, 1990)과 아미노산 수준에서 비교했을 때 65% (106aa)의 homology를 가지고 있다 (Jiang 등, 1992).

이상에서와 같은 14종의 한우 성장단계 특이발현 후보 유전자 이외에도, 62개의 cDNA 클론이 한우 성장단계에 따라 다른 발현양상을 나타내었으며, 이들 클론의 염기서열도 분석하였다.

본 연구에서 선정한 후보 유전자들에 관한 이후의 연구에서는 성장단계에 따른 발현양상 분석이 우선적으로 수행되어야 하며, 특이발현 유전자를 분리하고 특성 해명이 이루어져야 할 것으로 본다. 또한 후보 유전자로 선정되지는 않았지만, 특정 개월령 cDNA probe에 대해 다른 양상을 나타낸 많은 cDNA 클론에 관한 연구 또한 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Ⅳ. 요 약

한우의 성장단계 특이발현 유전자를 탐색하기 위하여, 본 연구에서는 유전자의 발현 유무 및 발현정도의 차이를 나타내는 유전자를 분리하는데 있어 가장 강력한 수단으로 알려진 subtractive cDNA hybridization 기법을 이용하여 한우 등심조직으로부터 12개월령 및 24개월령 특이적인 subtractive cDNA library를 제작하였다. 성장단계 특이적인 유전자를 탐색하기 위하여, 6, 12 및 24개월령 cDNA를 사용하여 reverse northern blot 분석을 실시하였으며, 6개월령 cDNA probe에 대하여 특이적인 signal을 나타낸 3개의 clone은 EPV 20, Ca^{2+} ATPase, 및 TCTP 유전자와 유사성을 나타내었다. 12개월령 cDNA probe에 대하여 특이적인 signal을 나타낸 9개의 cDNA clone은 각각 VCP, HSP 70, aldolase A, MSSK1, GM-2 activator protein, ryanodine receptor, acidic ribosomal phosphoprotein p1, ADP/ATP translocase T1 및 UCP 2 유전자와 높은 homology를 가지고 있었다. 또한 2개의 clone이 각각 12개월령 및 24개월령 cDNA probe에 대하여 특이적인 signal을 나타내었는데, 12개월령 cDNA probe에 대해서만 signal을 나타낸 clone은 ferrochelatase 유전자와 유사하였으며, 24개월령 probe에 대해서만 signal을 나타낸 clone은 ADRP 유전자와 유사하였다. 이상에서와 같이, 본 연구에서 제작한 성장단계 특이적인 subtractive cDNA library를 분석하여 14종의 유전자를 한우 성장단계 특이 발현 후보 유전자로 선정하여 염기서열을 분석하였으며, 이외에도 성장단계에 있어 특이적으로 발현될 것으로 추정되는 cDNA 클론의 염기서열을 분석하였다.

사 사

본 연구는 1998년 과학기술부의 특정연구개발사업 연구로 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

Ⅴ. 인 용 문 헌

1. Bauer, D., Warthoe, P., Rohde, L. and Struss, M. 1994. PCR methods and Applications(Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), Supplememt, pp. S97-S108.
2. Bertioli, D. J., Schichter, U. H. A., Adams, M. J., Burrows, P. R., Steinbiss, H. H. and Antoniw, J. F. 1995. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. Nucleic Acids Res. 23:4520-4523.
3. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A.,

Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J. P. 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett. 408(1): 39-42.

4. Bouchard, C., Perusse, L., Chagnon, Y. C., Warden, C. and Ricquier, D. 1997. Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. Hum. Mol. Genet. 6(11):1887-1889.
5. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18:5294-5299.
6. Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. 93(12):6025-6030.
7. Duguin, J. L. and Dinauer M. C. 1990. Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res. 18:2789-2792.
8. Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E. and Kozak, L. P. 1997. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. Nature 387(6628):90-94.
9. Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K. and Londos, C. 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. J. Biol. Chem. 265: 18769-18775.
10. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyruels, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Suirwit, R. S., Ricquier, D. and Warden, C. H. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nature Genetics 15:269-272.
11. Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Woolf, E. A. and Tartaglia, L. A. 1997. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. Diabetes 46(5):900-906.
12. Gong, D. W., He, Y. and Reitman, M. L. 1999. Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256(1):27-32.
13. Gong D. W., He Y., Karas M. and Reitman M. 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. J. Biol. Chem. 272(39):24129-24132.
14. Hara, E., Kato, T., Nakada, S., Sekiya, L. and Oda, K. 1991. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR; isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Res. 19: 7097-7104.
15. Hendrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. L. and Davis, M. M. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 308:149-153.
16. Horecker, B. L., Tsolas, O. and Lai, C. Y. 1972. In The Enzymes, Boyer, P. D. Ed., Academiv Press, New York. Vol. 7, pp. 213-258. in Minoru S., Tsunehiro, M. and Katsuji, H. (ed.) Biochem. Biophy. Res. Comm (BBRC) (1985) Nucleotide sequence of a cDNA clone for human aldolase : A messagenger RNA in the liver. 131(1):413-420.
17. Hubank, M. and Schatz, D. G. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res. 22:5640-5648.
18. Jiang H. P. and Serrero G. 1992. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 89(17):7856-7860.
19. Kirchhoff, C., Osterhoff, I., Habben, I. and Ivell, R. 1990. Cloning and analysis of mRNA expressed specifically in the human epididymis. Int. I. Androl. 13:155-167, in Larsen L. B., Raven P., Boisen A., Berglund L. and Petersen T. E. (ed.) Eur. J. Biochem. (1997) 243(1-2): 437-441. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharaterized type of domain.

20. Larsen, L. B., Raven, P., Boisen, A., Berglund, L. and Petersen T. E. 1997. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharaterized type of domain. Eur. J. Biochem. 243(1-2):437-441.
21. Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A. B. 1992. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res 52(24):6966-8.
22. Lisitsyn, N., Lisitsyn, L. and Wigler, M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. Science 259:946-951.
23. Minoru, S., Tsunehiro, M. and Katsuji, H. 1985. Nucleotide sequence of a cDNA clone for human aldolase : A messagenger RNA in the liver. Biochem. Biophy. Res. Comm (BBRC) (1985) 131(1):413-420.
24. Millet, L., Vidal, H., Andreelli, F., Larrouy, D., Riou, J. P., Ricquier, D., Laville, M. and Langin, D. 1997. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. J. Clin. Invest. 100(11):2665-2670.
25. Sturzenbaum, S. R., Kille, P. and Morgan, A. J. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm Lumbricus rubellus 1. Biochim. Biophys. Acta. 1398(3):294-304.
26. Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H. and Thiele, B. J. 1998. Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. Eur. J. Biochem. 257(1):62-68.
27. von Stein, O. D., Thies, W. G. and Hofmann, M. 1997. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. Nucleic Acids Res. 25(13):2598-2602.
28. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Ralph, D., Cheng, L. and McClelland, M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res. 20:4965-4970.
29. 축산기술연구소. 1997. 1997년 축산시험연구보고서. p160-165.

(접수일자 : 2001. 9. 18 / 채택일자 : 2001. 12. 7)