Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 21, No. 5 pp. 216-222, 2020

https://doi.org/10.5762/KAIS.2020.21.5.216
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

돼지에서 TRAF4 유전자 특성 및 Tight junction 관련 기능 분석

윤정희[1,2], 황인설[1], 황성수[3], 박미령[1*]
[1]농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, [2]축산물이용과, [3]농촌진흥청 국외기술농업과

Characterization of TRAF4 mRNA and Functions related to tight junction in pig

Jeong-hee Yun[1,2], In-Sul Hwang[1], Seongsoo Hwang[3], Mi-Ryung Park[1*]
[1]Animal Biotechnolgy Division, [2]Animal Products Utilization Division, National Institute of Animal Science,
[3]Division for KOPIA, Rural Development Administration

요 약 Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4)는 사람의 유방암에서 과발현 되며, 암세포 전이, ROS 및 세포 극성 형성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 돼지에서는 아직까지 그 기능과 특성에 대한 연구가 보고 된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 돼지 TRAF4의 mRNA 전장서열을 분석하고, 그 기능과 특성을 알아보고자 수행되었다. TRAF4의 전장서열을 밝히기 위해 돼지 신장유래세포(pK15)에서 total RNA 추출하여 RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) PCR을 수행하였다. 2,030 염기쌍의 mRNA 전장서열을 분석하였고, 470개의 아미노산으로 구성 되어 있는 것을 확인하였다. 사람과 쥐의 Homology를 분석한 결과 각각 93 % 그리고 90 %의 유사도를 가지며, 사람과는 8개, 쥐와는 12개의 아미노산 차이가 있음을 확인하였다. qPCR을 통하여 TRAF4, CLDN4, OCLN 그리고 TJP1의 발현을 분석한 결과 세포의 confluency 정도에 따라 발현이 다르게 나타남을 확인하였고, 세포가 40 % 증식한 그룹 보다 60 %와 80 % 이상 증식 한 그룹에서 유의적으로 높게 나타났다. 또한 TRAF4의 기능을 확인하기 위하여 TRAF4 siRNA 처리 한 결과 TRAF4와 tight junction 관련 유전자가 낮게 발현됨을 관찰하였다. 따라서 사람과 마우스와 같이 돼지에서도 TRAF4가 발현되며, 세포-세포 간 중요한 역할을 하는 tight junction에 관여하는 것으로 사료된다.

Abstract Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) is found to be overexpressed in human breast cancer. It plays a role in cancer metastasis, production of reactive oxygen species, and cell polarity at membranes. The characteristics and functions of TRAF4 in pigs have not yet been identified. As the first step of research, the mRNA sequence of TRAF4 in porcine cells has been determined. To obtain the full-length sequence, rapid amplification of cDNA ends (RACE) has been carried out. Upon cloning, 2,030 bp of nucleotides were found to encode 470 amino acids, and 8 and 12 amino acids were different from those of the human and mouse TRAF4, respectively. The coding region of porcine TRAF4 was shown to be 93% and 90% homologous to human and mouse TRAF4, respectively. qPCR was conducted to determine the relative expression level of TRAF4. TRAF4 expression in pK15 was enhanced by cell-cell contacts. The mRNA levels of CLDN4, OCLN, and TJP1 at 60% and 80% confluency were significantly higher than at 40% confluency. Further, TRAF4 and tight junction-related genes were down-regulated upon treatment with TRAF4 siRNA. Thus, TRAF4 may affect the function of tight junctions in pig.

Keywords : Pig, TRAF4, Tight junction, PK15, Sequence

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01319003)의 지원에 의해 이루어진 것임
*Corresponding Authors : Mi-Ryung Park(National Institute of Animal Science)
email: mrpark45@korea.kr
Received March 13, 2020 Revised May 6, 2020
Accepted May 8, 2020 Published May 31, 2020

1. 서론

TRAF4는 tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors (TRAFs) family에 속하며, 세포신호전달 단백질로써 배발생, 암세포 형성, 그리고 혈소판 응집 등에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다[1-3]. 주로 세포질과 세포막에서 관찰되며 폐암이나 유방암 세포에서 과발현 되는 것으로 알려져 있다[1,4-5]. TRAF4 넉아웃 마우스의 경우 배아 신체기관, 신경관 및 골격계 형성 등에 영향이 있다고 보고되었다[2]. 또한, EGFR의 Juxtamembrane 부위에 TRAF 도메인이 결합하면서 세포증식과 신호전달에도 중요한 역할을 한다[6]. TRAF4는 RING 도메인과 7개의 zinc finger, 그리고 TRAF 도메인으로 구성되어 있으며, 2개의 NLS 서열을 가지고 있는 것이 특징이다[7].

TRAF 도메인은 C-말단 upstream에 반응기를, downstream에 작용기를 가진다. TRAFs의 반응기에는 극성과 비극성 부위를 가지는 것으로 보고되고 있다. 특히, 극성 부위로는 β 3 와 β 3, β 4의 연결 고리 부분이며, 친수성으로는 β 6와 β 6, β 7를 연결하는 부분으로 알려져 있다. 그리고 소수성 부분으로는 β 4, β 5, β 6 그리고 β 7으로 알려져 있으며, 여기에는 다양한 분자들이 결합하는 것으로 밝혀져 있다[8]. 그러나, TRAF4는 표면에 음의 극성을 띄는 수용체 결합부위를 가지는 것으로 알려져 있다[9].

사람 TRAF4의 경우 NOD2(Nucleotide binding oligomerization domain containing 2), GPVI, 그리고 GPIbβ와 결합하여 작용한다[10-13]. TRAF4와 p47phox는 혈소판 당단백 수용체인 GPIb-IX-V 복합체, 그리고 GPVI와 결합한다. GPIb-IX-V 복합체는 Von Willebrand Factor(VWF)와 GPVI는 콜라겐과 결합하여 혈액응고반응을 유도한다[3]. 혈액이 응고될 때 혈소판 수용체인 GPIb-IX-V 복합체와 GPVI는 TRAF4와 반응하여 ROS를 생성 할 뿐만 아니라, 면역 항상성 유지 기능을 지닌 NOD2 반응의 억제 조절 인자로 보고되고 있다[3,11]. 또한, TRAF4는 Epithelial cells에서 주로 발현되며 세포-세포간 tight junction을 통하여 세포 생존과 밀접한 관련성이 있는 것으로 보고되고 있다[14]. 이와 같이 TRAF4는 다양한 생리적 반응과 관련하여 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 세포성 기능에 대해서는 아직까지 명확하게 규명되어 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 돼지 TRAF4 유전자의 서열을 분석하고 돼지 신장 유래 세포의 confluency 에 따른 TRAF4 유전자의 발현과 tight junction과의 상관관계를 분석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 클로닝 및 RACE (Rapid Amplified cDNA ends) PCR

본 실험에 공시된 세포는 돼지 신장 유래 세포인 PK15를 이용하였다. Total RNA를 분리하기 위하여 세포 배양시기에 따라 샘플을 회수한 후 trizol (Invitrogen)를 처리하였다. cDNA의 합성은 LA Taq HS (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. cDNA단편은 TRAF4 특이적 프라이머(5`-ATG CCC GGC TTC GAC TAC AAG TTT CT-3`, 5` -TCA GCT GAG GAT CTT TCG GGG CAA T -3`)를 이용하여 실시하였고, 이후 pSTBlue-1 벡터에 재조합하여 클로닝하였다.

TRAF4의 전장서열을 확인하기 위해서 GeneRacer core kit(Invitrogen)를 사용하여 RACE PCR이 수행되었다.

2.2 아미노산 정렬

사람, 돼지 그리고 쥐의 TRAF4 아미노산 서열을 비교분석하기 위하여 Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/ msa/clustalO/)로 분석을 실시하였다.

2.3 pK15에서 TRAF4와 Tight junction 관련 유전자 발현 분석

pK15 세포를 6 well dish에 계대 배양 한 후 각각의

Table 1. The primer sequence for real-time RT-PCR

Genes		Sequence
TRAF4	F	TGCCAAGATCTACCCATACC
	R	AGGGAACCACATTGAAGCTG
CLDN4	F	AGTGCAAGGTGTACGACTCGCT
	R	GCTCTCATCATCCACGCAGTTGGTG
OCLN	F	ACGGGAAAGTGAACGAGAAGC
	R	GCTGCCTGAGGTCCTCCAC
TJP1	F	GTCCAGAATCTCGGAAAAGTGCC
	R	GCTTCTTTCAATGCTCCATACCAACC
TRAF4 siRNA	F	CCUCUGGACUAUGCCAAGATT
	R	UCUUGGCAUAGUCCAGAGGAA
ACTB	F	CATCACCATCGGCAACGAGC
	R	TAGAGGTCCTTGCGGATGTC

세포가 40 %, 60 %, 그리고 80 % 증식 하였을 때 세포를 회수하여 total RNA를 분리하였다. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit(Roche)를 이용하여 cDNA를 합성 한 후 real-time RT-PCR을 수행하였으며, 사용한 프라이머는 Table 1과 같다.

2.4 pK15에 TRAF4 siRNA 농도별 처리

pK15 세포를 35Ø dish에 배양하여 증식 밀도가 70 % 이상 도달하였을 때, Lipofectamin LTX & plus reagent(Invitrogen)를 사용하여 5 pM, 10 pM 그리고 25 pM의 siRNA를 처리하였다. 24시간 후 6 well dish에 계대 배양하여 40 %, 60 %, 그리고 80 % 의 증식 밀도에 도달하였을 때 세포를 회수하였다. 이후 total RNA를 추출하여 real-time RT-PCR을 실시하였으며, TRAF4, CLDN4, OCLN, 그리고 TJP1의 발현을 상대정량하였다.

2.9 통계처리

통계처리는 SAS Enterprise Guide 7.1 프로그램의 Tukey`s studentized range test(HSD)를 이용하여 처리구간 유의성 분석을 실시하였다(P<0.05, Mean±SE).

3. 결과 및 고찰

3.1 돼지에서 TRAF4 mRNA sequence 및 유전적 유사성 분석

클로닝을 통해서 얻은 TRAF4의 암호영역을 NCBI에 등록되어 있는 XM_021067485.1과 비교하였다. 그 결과, 뉴클레오티드 티민이 아데닌으로 변한 차이가 있었으나 번역되는 아미노산은 프롤린으로 동일하게 나타났다(Figure 1. A.). 또한 5`UTR과 3`UTR을 바탕으로 RACE PCR을 실시한 후 클로닝을 수행하였다. 그 결과 돼지 TRAF4는 ATG를 개시코돈으로 3` 말단의 poly A 상류의 AATAAA 서열을 토대로 2,030개의 염기쌍으로 이루어져 있으며, 470개 아미노산으로 구성되어 있다는 것을 확인하였다(Figure 1B). 따라서, 전장서열을 분석함으로써 돼지에서도 TRAF4 유전자 부위가 있음을 확인할 수 있었다.

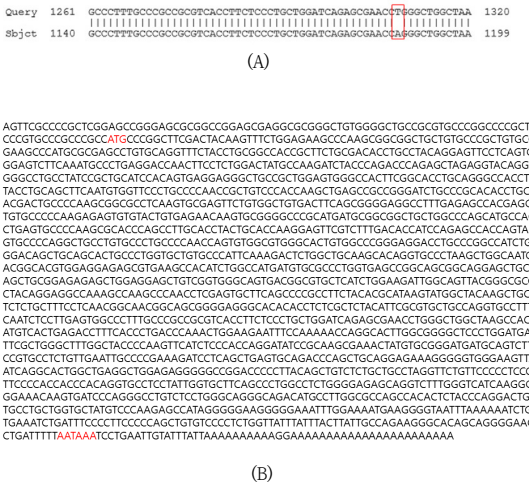

Fig. 1. Identification of porcine TRAF4 mRNA sequence. (A) CCT to CCA in comparison with XM_021067485.1 (B) 2,030 base pairs of porcine *TRAF4*

사람, 마우스, 그리고 돼지의 유전적 거리지수를 측정하기 위하여 TRAF4 유전자의 염기서열을 토대로 neighbor-joining method(Clustal Omega)를 활용하였다. 분석한 결과, 돼지와 사람이 0.03432, 그리고 0.03999의 수치가 확인되었으며, 이것은 0.06334로 나타난 마우스보다 두 종의 유연관계가 유전적으로 보다 더 가깝게 있다는 것을 보여 주는 결과이다(Figure 2.).

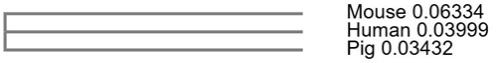

Fig. 2. Phylogenetic relationship of TRAF4 with representative species using neighbor-joining method.

또한, TRAF4의 종간 상동성을 분석 한 결과 돼지의 경우 사람과는 8개, 쥐와는 12개가 다르다는 것을 확인하였다. 돼지 TRAF4 암호부위의 서열을 비교했을 경우 사람과는 93 %, 쥐와는 90 %로 상동성이 높게 나타남을 확인하였다(Table 2.).

Table 2. Nonhomologic amino acid lists of residue

amino acid residue number	Mouse	Pig	Human
80	Ala	Pro	Pro
111	Val	Val	Ile
119	Ala	Thr	Met
153	Tyr	Phe	Tyr
159	Val	Val	Met
196	Ala	Thr	Thr
204	Tyr	Phe	Phe
220	Pro	Pro	Ala
237	Thr	Gly	Gly
244	Ser	Ser	Asn
247	Phe	Leu	Leu
254	Glu	Asp	Asp
267	Gly	Ala	Ala
304	Ile	Val	Val
365	Ile	Leu	Leu
395	Asp	Glu	Asp
461	Ser	Ser	Ala

사람에서는 TRAF4가 NOD2, PIP3, 그리고 GPIbβ 등과 결합하는 것으로 알려져 있다. TRAF 도메인은 PIP3와 결합하는 R297, K313, 그리고 K345 부분으로 밝혀져 있으며, GPIbβ와는 N355, S357, Y366, F434, 그리고 Y436 부분이 결합하는 것으로 보고되었다[15]. 따라서, 본 실험에서도 사람에서 나타난 결과와 같은 binding site가 있는지 확인하기 위하여 아미노산 서열을 분석한 결과, Figure 3에서 나타난 바와 같이 돼지 TRAF4의 TRAF 도메인에 PIP3, NOD2 그리고 GPIbβ binging sites가 있는 것을 확인할 수 있었다.

또한 TRAF4는 TRAF2, 3, 그리고 5와는 다르게 아미노산 421부터 426까지 고리를 가지고 있는데 이 또한 돼지 TRAF4의 TRAF 도메인에서도 확인되었다. 특히, 세린426은 IKKα에 의해 인산화 되어 NOD2와 결합하는데 이는 NOD2에 의한 신호전달을 억제하는 것으로 알려져 있다[11,15]. PIP3는 TRAF4의 TRAF 도메인에 결합하게 되면 TRAF4가 세포막부위에 위치하는 것을 매개하게 하는 역할을 한다[12-13].

Fig. 3. Reserved binding sites of PIP3, NOD2 and GPIb β on the TRAF4. Yellow : PIP3, Blue : NOD2, Red : GPIbβ.

3.2 pk15 세포에서 TRAF4와 Tight junction 관련 유전자 발현 분석

Rousseau 등은(2011) 사람 유선 조직에서 TRAF4를 형광염색 하였을 때 TJP1이 위치하는 부분에서 co-localization 되는 것을 보고하였다[16]. 쥐에서는 배발달 단계 중 8.5에서 13.5 dpc(days post coitum)에서 특히 높은 발현을 보인다고 알려져 있다[17]. 따라서, 본 연구에서는 pk15 세포를 이용하여 TRAF4 유전자가 tight junction 과 상관관계가 있는지 그 여부를 확인하기 위하여 세포 증식 정도에 따른 유전자 발현 분석을 실시하였다. 세포 증식이 40 %에서 80 %로 증가할 때 tight junction과 관련된 CLDN4, OCLN, 그리고 TJP1의 발현과 동시에 TRAF4의 발현도 유의적으로 높게 나타남을 확인하였다(Figure 4). Epithelial 및 mCCDc11 세포에서 세포 밀도가 증가할 때 세포 핵 내 TJP1 발현이 증가하고 OCLN 발현 역시 증가 하는 보고[18-19]와는 유사한 결과라고 사료된다.

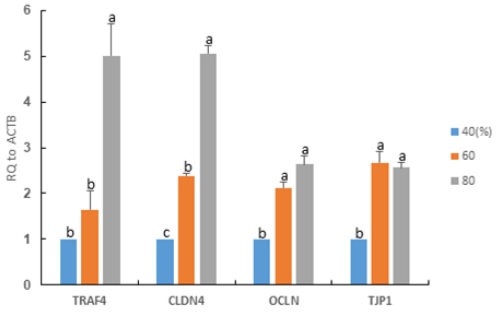

Fig. 4. Relative expression level of TRAF4 and tight junction related genes in pk15 cell. β - actin used as reference gene ($^{a,b,c}P < 0.05$. Data are means ± SE).

또한, TRAF4와 tight junction과의 상관성 여부를 검증하기 위하여 TRAF4 siRNA를 처리하였다. TRAF4 siRNA 3종류와 각 농도별 5 pM, 10 pM, 그리고 25 pM 처리 후 24시간 동안 배양한 후 TRAF4의 발현을 비교분석하였다. 그 결과 siRNA 2, 25 pM 농도로 처리하였을 때 TRAF4의 저해 효과를 확인할 수 있었으며 (Figure 5), 이후 실험들은 이 조건을 바탕으로 수행하였다.

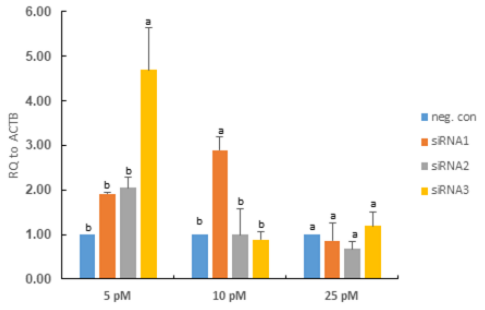

Fig. 5. TRAF4 expression in siRNAs treated pk15 cells ($^{a,b}P < 0.05$. Data are means ± SE).

세포 배양 confluency별 분석한 결과 세포의 connection이 다소 적은 40 % 세포군에서는 TRAF4에 대한 siRNA 처리 효과가 나타나지 않았다. 그러나 60 % 과 80 % 세포의 connection이 있는 그룹의 경우 TRAF4의 발현이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 TRAF4의 발현 변화와 함께 tight junction 관련 유전자의 발현을 확인한 결과 CLDN4, OCLN 그리고 TJP1도 유의적으로 낮게 나타났다(Figure 6). 사람 근위세뇨관 유래 세포(HK-2)에서 OCLN과 TJP1의 발현이 siRNA를 처리하였을 때 감소하였으며, 장점막투과저항성(Transepithelial electrical resistance, TER)이 낮아지고, 덱스트란 투과율이 높아졌다는 보고가 있다[19]. 돼지 신장유래세포 LLC-PK1을 이용한 실험에서 TJP1에 대한 siRNA 처리시 CLDN2 단백질 분해가 촉진되고, 프로모터 활성이 높아졌다는 결과가 보고된 바 있다[18]. 이러한 결과를 바탕으로 하였을 때, 돼지 TRAF4도 사람에서 보고된 것과 같이 tight junction과 관련 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

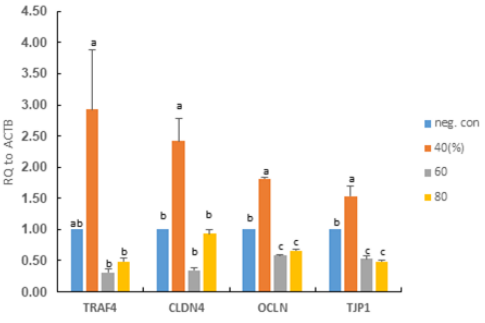

Fig. 6. Relative expression patterns of TRAF4 and tight junction associated genes after siRNA(#2) treatment ($^{a,b,c}P < 0.05$. Data are means ± SE).

4. 결론

본 연구 결과를 바탕으로 돼지 TRAF4 발현 및 세포-세포 간 tight junction 관련 유전자를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 돼지 TRAF4 mRNA 서열은 2,030 bp 로 470 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 마우스와 사람과도 유사성이 높은 것으로 나타났다.

(2) 사람에서 나타나는 것과 같이 돼지에서도 PIP3, NOD2, 그리고 GPIbβ 와의 결합 위치가 있는 것을 확인하였다.

(3) 세포 증식이 증가함에 따라 TRAF4의 발현 뿐만 아니라, CLDN4, OCLN, 그리고 TJP1 발현이 유의적으로 높아졌으며, TRAF4 siRNA 처리군에서는 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다.

본 연구에서 TRAF4 서열을 확인함으로써 돼지에서 유전자가 발현됨을 확인할 수 있었고, 사람과 쥐와 비교하였을 경우 유사성이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 PIP3, NOD2, 그리고 GPIbβ 결합자리가 사람과 같이 유지되어 있을 뿐만 아니라, 세포-세포 간 tight junction에서도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 결과를 바탕으로 TRAF4 유전자가 체세포 수준에서 뿐만 아니라 생식세포인 돼지 배 발달 단계에서는 어떻게 작용하는지 그 기능을 조사하여 기전을 규명하고자 한다.

References

[1] Régnier, Catherine H., Régis Masson, Valérie Kedinger, Julien Textoris, Isabelle Stoll, Marie-Pierre Chenard, Andrée Dierich, Catherine Tomasetto, and Marie-Christine Rio. "Impaired Neural Tube Closure, Axial Skeleton Malformations, and Tracheal Ring Disruption in Traf4-Deficient Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences,* Vol. 99, No. 8, pp. 5585, 2002. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.052124799

[2] Tomasetto, C., C. Regnier, C. Moog-Lutz, M. G. Mattei, M. P. Chenard, R. Lidereau, P. Basset, and M. C. Rio. "Identification of Four Novel Human Genes Amplified and Overexpressed in Breast Carcinoma and Localized to the Q11-Q21.3 Region of Chromosome 17." *Genomics,* Vol. 28, No. 3, pp. 367-76, Aug. 1995. DOI: https://doi.org/10.1006/geno.1995.1163

[3] Arthur, J. F., Y. Shen, E. E. Gardiner, L. Coleman, D. Murphy, D. Kenny, R. K. Andrews, and M. C. Berndt. "Tnf Receptor-Associated Factor 4 (Traf4) Is a Novel

Binding Partner of Glycoprotein Ib and Glycoprotein Vi in Human Platelets." *J Thromb Haemost*, Vol. 9, No. 1, pp. 163-72, Jan. 2011.
DOI: https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04091

[4] Kim, EunGi, Wanyeon Kim, Sungmin Lee, Jahyun Chun, JiHoon Kang, Gaeul Park, IkJoon Han, et al. "Traf4 Promotes Lung Cancer Aggressiveness by Modulating Tumor Microenvironment in Normal Fibroblasts." *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 1, pp. 8923, Aug. 2017.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-09447-z

[5] Li, Wei, Cong Peng, Mee-Hyun Lee, DoYoung Lim, Feng Zhu, Yang Fu, Ge Yang, et al. "Traf4 Is a Critical Molecule for Akt Activation in Lung Cancer." [In eng]. *Cancer research*, Vol. 73, No. 23, pp.6938-50, 2013.
DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0913

[6] Jura, N., N. F. Endres, K. Engel, S. Deindl, R. Das, M. H. Lamers, D. E. Wemmer, X. Zhang, and J. Kuriyan. "Mechanism for Activation of the Egf Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment." *Cell*, Vol. 137, No. 7, pp. 1293-307, Jun. 2009.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.025

[7] Régnier C. H, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard M-P, Wendling C, Basset P, Rio M-C., "Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma", *The journal of biological chemistry*, Vol. 270, No. 43, 1995.
DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25715

[8] Kim, C. M., J. Y. Choi, E. A. Bhat, J. H. Jeong, Y. J. Son, S. Kim, and H. H. Park. "Crystal Structure of Traf1 Traf Domain and Its Implications in the Traf1-Mediated Intracellular Signaling Pathway." *Sci Rep*, 6, pp. 25526, May. 2016.
DOI: https://doi.org/10.1038/srep25526

[9] Park, H. H. "Structure of Traf Family: Current Understanding of Receptor Recognition." *Front Immunol*, 9, pp. 1999, 2018.
DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01999

[10] Kim, C. M., Y. J. Son, S. Kim, S. Y. Kim, and H. H. Park. "Molecular Basis for Unique Specificity of Human Traf4 for Platelets Gpibbeta and Gpvi." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 114, No. 43, pp. 11422-27, Oct. 2017.
DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1708688114

[11] Marinis, J. M., J. E. Hutti, C. R. Homer, B. A. Cobb, L. C. Cantley, C. McDonald, and D. W. Abbott. "Ikappab Kinase Alpha Phosphorylation of Traf4 Downregulates Innate Immune Signaling." *Mol Cell Biol*, Vol. 32, No. 13, pp. 2479-89, Jul. 2012.
DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.00106-12

[12] Rousseau, A., A. G. McEwen, P. Poussin-Courmontagne, D. Rognan, Y. Nomine, M. C. Rio, C. Tomasetto, and F. Alpy. "Traf4 Is a Novel Phosphoinositide-Binding Protein Modulating Tight Junctions and Favoring Cell Migration." *PLoS Biol*, Vol. 11, No. 12 e1001726, Dec. 2013.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001726

[13] Rousseau, A., L. P. Wilhelm, C. Tomasetto, and F. Alpy. "The Phosphoinositide-Binding Protein Traf4 Modulates Tight Junction Stability and Migration of Cancer Cells." *Tissue Barriers*, Vol. 2, No. 4, e975597, 2014.
DOI: https://doi.org/10.4161/21688370.2014.975597

[14] Kedinger, V., F. Alpy, A. Baguet, M. Polette, I. Stoll, M. P. Chenard, C. Tomasetto, and M. C. Rio. "Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 4 Is a Dynamic Tight Junction-Related Shuttle Protein Involved in Epithelium Homeostasis." *PLoS One*, Vol. 3, No. 10, e3518, 2008.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003518

[15] Niu, Fengfeng, Heng Ru, Wei Ding, Songying Ouyang, and Zhi-Jie Liu. "Structural Biology Study of Human Tnf Receptor Associated Factor 4 Traf Domain." *Protein & Cell*, Vol. 4, No. 9, pp. 687-94, Sep. 2013.
DOI: https://doi.org/10.1007/s13238-013-3068-z

[16] Rousseau, A., M. C. Rio, and F. Alpy. "Traf4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer." *Cancers* (Basel), Vol. 3, No. 2, pp. 2734-49, Jun. 2011.
DOI: https://doi.org/10.3390/cancers3022734

[17] Masson, R., C. H. Regnier, M. P. Chenard, C. Wendling, M. G. Mattei, C. Tomasetto, and M. C. Rio. "Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 4 (Traf4) Expression Pattern During Mouse Development." *Mech Dev*, Vol. 71, No. 1-2, pp. 187-91, Feb. 1998.
DOI: https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00192-5

[18] Qiao, X., I. Roth, E. Feraille, and U. Hasler. "Different Effects of Zo-1, Zo-2 and Zo-3 Silencing on Kidney Collecting Duct Principal Cell Proliferation and Adhesion." *Cell Cycle* Vol. 13, No. 19, pp. 3059-75, 2014.
DOI: https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949091

[19] Amoozadeh, Y., S. Anwer, Q. Dan, S. Venugopal, Y. Shi, E. Branchard, E. Liedtke, et al. "Cell Confluence Regulates Claudin-2 Expression: Possible Role for Zo-1 and Rac." *Am J Physiol Cell Physiol* , Vol. 314, No. 3, C366-C78, Mar. 2018.
DOI: https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2017

윤 정 희(Jeong-hee Yun) [정회원]

- 2017년 3월 ~ 2019년 8월 : 충남대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2016년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
낙농식품, 생명과학

황 인 설(In-Sul Hwang) [정회원]

- 2006년 8월 : 경상대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2009년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2013년 9월 : 신슈대학교 종합공학계연구과 (농학박사)
- 2017년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

〈관심분야〉
바이오이종장기, 복제, 저온생물학

황 성 수(Seongsoo Hwang) [정회원]

- 1996년 2월 : 중앙대학교 축산학과 농학석사)
- 2002년 2월 : 중앙대학교 일반대학원 축산학과 농학박사)
- 2006년 8월 ~ 2019년 12월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구관
- 2020년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 기술협력국 국외기술농업과

〈관심분야〉
가축번식, 생명공학

박 미 령(Mi-Ryung Park) [정회원]

- 2000년 2월 : 경상대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 1월 ~ 2012년 12월 : 건국대 동물자원 전임연구원
- 2013년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
동물발생, 생명공학