

Expression of p58 in Fetal Thymocytes and Fetal Liver Lymphocytes

Dae-Ho Kwon¹, Hyung-Woo Park², Jeon-Soo Shin^{1,3}, Eui-Cheol Shin¹, Se-Jong Kim^{1,3}, Joo-Deuk Kim^{1,3} and In-Hong Choi^{1,3}

Department of Microbiology¹, Anatomy² and Institute for Immunology and Immunological Diseases³, Yonsei University College of Medicine, Shinchon-dong 134, Seodaemoon-ku, Seoul 120-752, Korea

Bipotent progenitors for T and natural killer (NK) lymphocytes are thought to exist among early precursor thymocytes or liver lymphocytes. The identification of such a progenitor population or mature NK cells in such organs remains undefined. Here we report the identification of a novel receptor of NK cells, p58 (HLA class I-specific inhibitory receptors), in fetal thymocytes and fetal liver lymphocytes. Our finding suggests the NK cells mature in the developmental stage during fetal ontogeny. Flow cytometric analysis revealed p58 positive cells in thymocytes or in fetal liver lymphocytes and reverse transcription PCR also showed amplification of p58 RNA. The result of single stranded conformational polymorphism (SSCP) showed it discriminates one or two base pair differences of the p58 gene. Although the question still remains as to whether the expression of p58 is due to the NK cells or natural T cells, it is clear the p58 is expressed in fetal thymocytes or liver lymphocytes. And SSCP analysis using appropriate sets of primers used in this study, is helpful to study the diversity of p58.

Korean J. Immunol. 20, 1: 17~23, 1998

Key Words: Fetal thymocytes, Fetal liver lymphocytes, NK cell receptor, p58

서 론

NK 세포는 여러 종류의 종양세포를 포함하여 세균 또는 바이러스에 감염된 표적세포를 죽이며 B 및 T 림프구와는 달리 비교적 항원 특이성이 적고 표적세포의 범위가 넓다. B 림프구의 항원 수용체는 면역글로불린인데 특이 항원과 직접 결합하며 T 림프구의 항원 수용체는 T 세포 수용체로서 MHC 분자와 결합한 특이 항원 펩타이드를 인지한다. 이에 비하여 NK 세포에서 항원을 인지하는 분자와 항원을 인지하는 과정에 대해서는 많은 부분이 아직 밝혀지지 않았으며 NK 세포에서는 면역글로불린이나 T 세포 항원 수용체의 유전자 재배열이 일어나지 않기 때문에 특이 항원 수용체는 없지만 'self'와 'non-self'를 구별한다고 알려져 있다. NK 세포에서 이 기능을 수행하는 분자는 NK cell receptor로서 NK cell receptor는 MHC class I 분자를 인지한다. B 림프구나 T 림프구의 항원 수용체는 특이 항원과 반응하여 세포내로 신호를 전달하여 그 세포가 증식하고 세포가 활성화되도록 유도한다. 이에 반하여 NK cell receptor는 특이 항원과 결합하여 NK 세포를 활성화시키는 것이 아니라 표적세포의 MHC class I 분자를 인지하여 NK 세포내로 inhibitory signal을 보낸다. 즉 NK 세

포가 적절한 MHC class I 분자를 인지하면 NK 세포에 inhibitory signal이 전해져 반응한 표적세포를 죽이지 않게 된다^{1~4}). 이를 통하여 NK 세포가 정상적으로 표현되는 자신의 MHC class I 분자를 인지하게 되면 해당 표적세포를 죽이지 않고, MHC 분자가 다른 allogeneic cell이나 종양세포와 바이러스에 감염된 세포들처럼 MHC 분자 표현에 이상이 있는 표적세포를 감별하여 죽이는 것으로 추정된다.

흉선은 T 림프구가 성숙하는 장기로서 80% 이상의 세포가 발달 도중의 미성숙 T 림프구이며 나머지 5~10%가 말초로 나오기 직전의 성숙한 T 림프구로 구성되어 있다. 이러한 흉선세포에 IL-2를 첨가하여 배양하면 CD56과 CD16를 표현하는 NK 세포가 생성되며 CD3⁻CD4⁻CD8⁻ 흉선세포에서 NK 세포가 만들어지는 것이 보고되었으나⁵) 아직도 논란이 많다. 흉선 림프계 계열 세포 중에서 CD34는 많이 표현하고 CD1, 3, 4, 8, 56은 표현하지 않는 세포가 stem cell factor, IL-2 및 IL-7을 첨가하여 배양하면 NK 세포로 성숙한다는 보고^{6,7})도 있는데 이때 stromal feeder layer, 즉 thymic environment가 필요하다고 한다. 이와 같이 흉선에서 T 림프구와 NK 세포로 성숙할 수 있는 bi-potential progenitor⁸)가 존재한다고 주장하는 보고가 있지만 다른 연구자들에 의하여 확인되지 않은 상태이다. 흉선

이 NK 세포가 성숙하는 장기라고 추정되지만 흉선이 없는 마우스에서도 NK 세포의 수와 기능이 정상인 것으로 미루어 흉선 이외 다른 기관에서도 성숙하는 것으로 생각되고 흉선 외 NK 세포가 성숙하리라고 알려진 장기는 간단히 충분한 보고가 없다.

본 연구에서는 NK 세포의 발생과정을 NK cell receptor와 연관지어 관찰하고자 하였다. NK 세포의 면역반응에 중요한 역할을 하는 NK cell receptor는 MHC class I allele와 isotype을 인지하므로 몹시 다양하다. 사람에서 HLA-C 분자를 인지하는 NK cell receptor는 p58이다. p58 분자 역시 다양하여 MHC 분자의 allotype에 따라 서로 다른 p58 분자와 반응하는 것으로 추정된다. 한 종류의 p58 분자에 대한 단클론 항체인 GL183 항체는 HLA-Cw3 표적세포와의 반응을 억제하고, EB6 단클론 항체는 HLA-Cw4 표적세포와의 반응을 억제한다. 이러한 실험 결과로 두 단클론항체는 p58 분자에서 다른 epitope을 인지하고 이 epitope에 따라 각기 다른 HLA-C 분자와 반응한다. 그리하여 본 연구에서는 NK 세포의 발달과 NK cell receptor의 표현과의 관계를 규명하기 위하여 NK cell receptor인 p58이 흉선 및 간 림프구에서 표현되는지 관찰하고 그 다양성을 측정하는 방법으로 SSCP를 이용한 분석법을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

총립프구 분리: 태아 조직은 의사와 보호자의 허락 아래 실시한 수술에서 얻었다. 태아 흉선과 간에서 림프구는 조직을 잘게 부순 후 Ficoll-hypaque (Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norway) density gradient법으로 분리하였다. 총 예 수는 13예로 모두 발생 중기 (16~25주)에 해당하였다. 13예를 대상으로 표면표식자를 측정하였으며 p58 RNA를 측정하기 위한 RT-PCR을 실시하였고 3예를 대상으로 유전자 클로닝을 실시하였다.

총 RNA분리 및 first strand cDNA 생성: 총 RNA는 RNeasy kit (Qiagen, Santa Claris, CA)을 이용하여 분리하였다. First strand cDNA는 random primer (pd(N)₆, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)를 이용하여 생성하였다. 총 RNA 5~10 µg에 random primer 0.1U, dNTP 200 mM, 반응완충액 및 DTT 800 mM와 reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 400 units를 혼합한 후 42°C에서 60분간 반응시켰다.

p58 유전자의 PCR: 5' primer sequence는 p58-3 (5'-gTC ATC CTg CAA TgT Tgg TCA gAT-3')이며 3' primer sequence는 p58-4 (5'-gAA AgA gCC gAA gCA TCT gTA ggT-3')이다. 각 primer 20 pM, dNTP 200 mM, MgCl₂ 2 mM, 50 mM KCl 및 0.001% gelatin이 포함된 10 mM Tris-HCl (pH=8.3) 반응완충액과 Ampli Taq polymerase (한국생공, 대전, 한국) 2.5 unit를 첨가하여 실시하였다. PCR 조건은 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분간씩 35회이다. 35회 반응 후 72°C에서 10분간 elongation시켰다. PCR 후 1.5% agarose gel에 PCR 산물 10 µl를 전기영동하였다. PCR 후 기대하는 DNA 산물의 크기는 약 500 bp이다.

유전자 클로닝: 유전자 클로닝하기 위해서는 50 ng pT7-Blue T-vector (Novagen, Madison, WI)에 PCR 산물 0.2 pM을 혼합하여 DNA ligase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 2U를 첨가하여 16°C에서 2시간 반응하여 ligation시켰다. Competent cell (genotype: endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac [F', proAB, lacQZDM15, Tn10 (tet) recA]을 transformation시켜 50 µg/ml ampicillin과 15 mg/ml tetracycline이 첨가된 agar plate에서 insert가 들어 있는 white colony를 형성하는 박테리아 클론을 선택하여 증식시킨 후 EcoRI 및 HindIII로 잘라서 500 bp의 insert가 있는 클론을 골라 배양하고 plasmid를 얻어 sequencing하였다. Sequencing은 automatic sequencer를 이용하였다.

SSCP (single stranded conformational polymorphism): Gel은 hydrolink MDE concentrate 8.0 ml, glycerol ACS 3.2 ml, 10x TBE 1.92 ml, 증류수 18.7 ml에 10% ammonium persulfate 0.2 ml 및 TEMED 20 µl를 첨가하여 20 cm x 49 cm gel을 만들었다. PCR 산물 2 µl를 loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.02% dye)와 동량 섞은 후 95°C에서 2~3분간 열처리한 후 loading하고 전기영동이 끝난 gel plate는 건조시킨 후 autoradiography 하였다. SSCP를 하기 위하여 실시한 PCR primer는 p58-5 (5'-CCT gCA Atg TTg gTC-Agt-3'), p58-6 (5'-gCT ggg CTg AgA gAg gAA-3') 및 p58-7 (5'-gTA CCA TCT ATC CAg ggA-3')과 p58-4 (5'-gAA AgA gCC gAA gCA TCT gTA ggT-3')였다. 각 primer의 부위는 Fig. 1과 같다. PCR 조건은 p58-3과 p58-4로 PCR을 실시할 때와 동일하였다. PCR은 ³²P-dCTP (NEN, Boston, MA)를 첨가하여 hot PCR을 실시하였다.

표면 표식자 측정: 단클론항체 (Becton Dickson, San Jose, CA)를 이용하여 CD16 및 CD56 표현을 측정하였다.

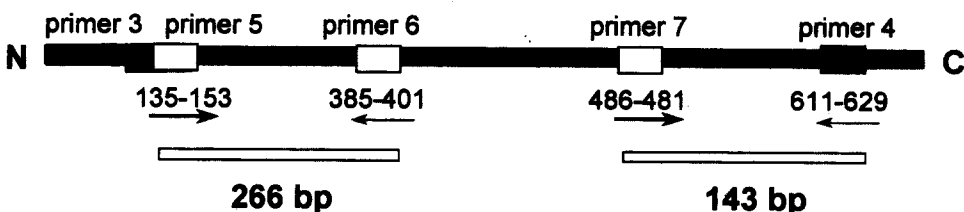


Fig. 1. Primer site.

Table 1. Surface markers of fetal thymocytes and fetal liver lymphocytes

Group*	CD16 ⁺ or CD56 ⁺	CD16 single	CD56 single	A210
Fetal thymus	0.6±0.8%	1.4±1.5%	0.2±0.2%	0.2±0.2%
Fetal liver	2.7±2.7%	2.4±1.7%	2.9±2.8%	0.6±0.4%

*N=13

Cells were stained with monoclonal antibodies and a total of 5,000 to 20,000 cells were analyzed. A210 is the anti-p58 monoclonal antibody

Table 2. Result of homology search of gene clones compared to GenBank data

Clones	Homology in GenBank data
thymus	
FT32-1	U24078
FT32-2	X94609
FT32-9	L76663
FT32-5	L76663
FT60-2	X94609
FT60-11	X94609
FT62-7	X94609
liver	
FL32-3	L76663
FL32-6	U24078
FL60-17	L76663
FL60-19	X89892
FL62-3	X94609
FL62-4	X89893
FL62-6	X98858

세포 1x10⁶에 각 단클론항체 5 µl 또는 10 µl를 첨가하고 30분간 4℃에서 반응시킨 후 0.1% bovine serum albumin 이 포함된 phosphate buffered saline으로 2회 세척한 다음 0.5% paraformaldehyde로 고정하였다. 죽은 세포는 propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO)로 염색하여 배제하고 FACstar Plus (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였다. A210은 본 교실에서 p58 분자에 대하여 생성한 단클론항체로서 검체당 20 µl를 사용하였다.

결 과

CD16/CD56 분자 양성율

13예의 태아 흉선세포에서 CD16/CD56 분자 양성율은 0.6±0.8%이었고, 태아 간 림프구에서 CD16/CD56 분자 양성율은 2.7±2.7%로 흉선세포에서 CD16/CD56 분자의 발현이 낮았다. CD16만으로 염색되는 세포는 흉선세포에서는 1.4±1.5%, 간 림프구에서는 2.4±1.7%로 관찰되었고 CD56만으로 염색되는 세포는 흉선세포에서는 0.2±0.2%, 간 림프구에서는 2.9±2.8%로 관찰되어 흉선세포에서 CD16 양성 세포의 비율과 CD56 양성 세포의 비율이 간 림프구에 비하여 낮았다 (Table 1). p58 분자에 특이적인 단클론항체인 A210으로 염색되는 비율은 태아 흉선세포 및 간 림프구에서 각각 0.2±0.2% 및 0.6±0.4%로 간

Fig. 2. RT-PCR of p58 gene in fetal thymocytes and fetal liver lymphocytes. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized with random hexamer. RT-PCR was done using p58 specific primers, 3 & 4. The first lane shows the size marker.

림프구군에서 약간 높았으나 두 군 모두에서 검출 비율이 낮았기 때문에 두 군간 차이가 명확하지 않았다 (Table 1).

태아 흉선세포와 간조직 림프구의 p58 발현

태아 흉선세포와 간조직 림프구의 RNA를 대상으로 RT-PCR을 실시한 결과 p58 RNA의 PCR 산물이 측정되었다 (Fig. 2). FT70, FL70 및 FT73, FT73은 모두 태생 23~25주에 해당하는 태아에서 얻은 조직인데 p58 RNA를 생성함을 알 수 있었다. 총 13예의 태아 흉선 및 간 조직에서 p58 RNA를 RT PCR로 측정된 결과 모두 검출되었는데 본 결과에서는 대표적인 결과만 보여주고 있다. 총 13예는 태령 16주~25주 사이였는데 개체의 태령에 따른 차이를 관찰할 수는 없었다.

태아 흉선세포와 간 림프구에서 분리한 p58 cDNA sequence

태아 흉선세포에서 분리한 p58 cDNA의 7 클론 (FT32-1, -2, -5, -9; FT60-2, -11; FT62-7)와 간 림프구에서 분리한 7 클론 (FL32-3, -6; FL60-17, -19; FL62-3, -4, -6)을 분리하여 염기서열을 파악한 후 GenBank에 보고된 클론과 비교하여 가장 유사한 염기서열을 가진 클론들의 이름과 연관 지었다. 그 결과 흉선세포에서 유래된 7 클론은 U24078, X94609, L76663, L76663, X94609, X94609 및 X94609이고 간 조직에서 유래된 클론은 L76663, U24079, L76663, X89892, X94609, X89893, X98858이었다 (Table 2). 분석한 클론의 수가 적어서 조직간 또는 개체간의 차이를 분명하게 비교할 수는 없었으나 X94609의 염기서열과 homology가 높은 클론이 분석한 총 14 클론 중 5 클론으로 가장 많았으며 L76663과 homology가 높은 클론이 4 클론이었다.

Fig. 3. SSCP pattern with primer 5 & 6 (N terminal) of p58 cDNA clones. p58 cDNA clones were obtained from RT-PCR products of lymphocytes from fetal thymus or fetal liver using primer 3 & 4. SSCP was done by the hot PCR and by the electrophoresis on MDE gel.

Fig. 4. SSCP pattern with primer 4 & 7 (C terminal) among p58 cDNA clones of lymphocytes from fetal thymus or fetal liver. p58 cDNA clones were obtained from RT-PCR products of lymphocytes from fetal thymus or fetal liver using primer 3 & 4. SSCP was done by the hot PCR and by the electrophoresis on MDE gel.

p58 cDNA 클론의 SSCP 결과

p58 유전자의 다양성을 screening하는 방법으로 SSCP을 이용하고자 하여 염기서열을 알고 있는 유전자 클론을 대상으로 SSCP를 실시한 결과 상이한 염기서열을 가지는 유전자 클론은 SSCP 양상도 완전히 다르다는 것을 확인하였다 (Fig. 3 및 Fig. 4).

N terminal에 가까운 쪽의 primer를 사용하여 SSCP 분석을 실시한 경우 (Fig. 3)에는 #32에서 얻은 흉선 조직 4 클론과 간 조직 2 클론을 SSCP 양상으로 분석하였을 때 동일한 양상을 보인 FT32-1과 FL32-6은 염기서열도 U24078과 homology가 가장 많았으며 동일한 SSCP 양상을 나타낸 FT32-9와 FL32-3도 염기서열이 L76663과 homology가 높았다. 단지 염기서열의 분석에서 L76663으로 여겨지는 FT32-5는 FT32-9나 FL32-3와 SSCP 양상이 다소 달랐다. #60에서 얻은 흉선 조직 2 클론과 간조직 2 클론을 SSCP 양상으로 분석하였을 때 SSCP 양상은 모두 달랐다. 염기서열의 분석에서 X94609으로 여겨지는 FT60-2와 FT60-11은 SSCP 양상이 달랐다. #62에서 얻은 흉선 조직 1 클

론과 간조직 3 클론을 동일한 SSCP 양상을 보인 FT62-7과 FL62-3은 염기서열도 X94609와 homology가 가장 많았다. 개체는 달랐지만 동일한 양상을 보인 FL60-19와 FL62-6은 염기서열도 X98858과 동일하게 homology가 높았다.

C terminal에 가까운 쪽의 primer를 사용하여 SSCP 분석을 실시한 경우 (Fig. 4)에는 #32에서 얻은 흉선 조직 4 클론과 간 조직 2 클론을 SSCP 양상으로 분석하였을 때 동일한 양상을 보인 FT32-9, FL32-3 및 FL32-5은 염기서열도 모두 L76663과 homology가 가장 많았다. #60에서 얻은 흉선 조직 2 클론과 간조직 2 클론을 분석한 결과 동일한 SSCP 양상을 보인 FT60-2와 FL60-11은 염기서열도 모두 X94609와 homology가 가장 많았다. #62에서 얻은 흉선 조직 1 클론과 간조직 3 클론을 동일한 SSCP 양상을 보인 FT62-7과 FL62-3은 염기서열도 X94609와 homology가 가장 많았다. N terminal의 primer를 이용하여 분석한 결과와 동일하게 개체는 달랐지만 동일한 SSCP 양상을 보인 FT60-2, FT60-11, FT62-7 및 FL62-3은 염기서열도 X94609과 모두 homology가 높았다.

Fig. 5. Discrimination of one or two base pair difference by SSCP in clones homologous to X94609.

Fig. 6. SSCP patterns of cDNA. cDNA was synthesized by random hexamer from total RNA. cDNA was amplified by primer sets, 4 & 7 or 5 & 6, respectively. SSCP was done by the hot PCR and by the electrophoresis on MDE gel.

특히 FT60-2, FT60-11, FT62-7 및 FL62-3 클론을 대상으로 C terminal과 N terminal의 primer를 사용하여 SSCP를 한 결과 C terminal의 SSCP는 모두 3 band로 동일한 위치에서 관찰되었다. 그러나 N terminal을 RT-PCR로 분석한 결과 FT62-7과 FL62-3은 SSCP 양상이 동일하게 관찰되었으나 FT60-2, FT60-11 및 FT62-7은 서로 다른 양상을 보였다. 이들 3 클론에서 2 band의 위 쪽 band는 동일한 부위에서 관찰되었지만 아래 쪽의 band는 이동 거리가 각각 달랐다. 이들 4 클론의 염기서열을 비교한 결과 FT62-7과 FL62-3의 염기서열은 완전히 일치하였으나, FT60-11과 FL62-3은 N terminal 쪽에서 1 base pair가 일치하지 않았고, FT60-2와 FT60-11 역시 N terminal 쪽에서 2 base pair가 일치하지 않았다 (Fig. 5).

p58 cDNA의 SSCP 결과

개체에 따른 p58 유전자의 다양성을 관찰하기 위하여 cDNA에서 직접 SSCP를 이용할 가능성을 측정하고자 FT32, FL32, FT60, FL60 및 FT62, FL60 cDNA를 대상으

로 C terminal과 N terminal의 SSCP를 실시한 결과 개체별 또는 장기별로 SSCP 상에서는 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 6). 단지 N terminal에 가까운 쪽의 primer를 사용하여 SSCP를 실시한 결과에서 FT60과 FL60에서 FT32, FL32, FT62, FL62와는 달리 가장 멀리 이동하는 band가 관찰되지 않았다.

고 찰

NK 세포의 발달 과정에 관해서는 분명하게 밝혀진 바가 없다. 일부 scid 환자에서 B 림프구와 myeloid cell은 정상인 반면 T 림프구와 NK 세포가 결핍되어 있기 때문에 NK 세포가 T 림프구와 연관되어 발달된다고 추측하고 있다^{9,10}. NK 세포와 T 림프구는 두 세포간의 표면표식자를 비교할 때 공통 항원이 많은데 대표적인 항원은 CD3로서 T 림프구 뿐 아니라 태아 NK 세포도 CD3 γ , δ , ϵ 및 ζ 를 표현한다¹¹. 완전히 성숙한 NK 세포에서는 CD3 분자들이

표현되지 않지만 특히 CD3e는 IL-2로 NK 세포를 자극하면 upregulation되어 표현될 뿐 아니라 CD3e 유전자 장애가 있는 마우스에서는 T 림프구와 NK 세포가 전혀 발달하지 않기 때문에 CD3e 분자가 이들 세포의 발달과 밀접한 관련이 있을 것으로 추측된다¹²⁾. T 림프구 성숙 장기인 흉선에서는 triple negative (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) 일부 세포가 NK 세포로 발달하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. CD3⁻CD4⁻CD8⁻ 세포에 IL-2를 첨가하여 배양하면 NK 세포의 표식자인 CD56과 CD16을 표현하며 NK 세포의 표적세포를 죽이는 기능이 있는 전형적인 NK 세포로 분화하였으며⁶⁾ 태아 간 (liver)에서도 유사한 세포군이 발견되었다⁷⁾. 최근 흉선에 존재하는 CD34⁺, CD1⁻, 3⁻, 4⁻, 8⁻, 56⁻인 세포군이 stem cell factor, IL-7 및 IL-2를 첨가하여 배양하면 NK 세포로 발생한다고 보고되었다^{8,13)}. 그리고 발생 과정에 radioresistant한 흉선 조직이 필요하다고 알려져 있다¹⁴⁾. 그러나 흉선이 없는 마우스에서도 NK 세포가 정상적으로 생성되고¹⁵⁾, 흉선이 생성되기 전의 발생시기에도 NK 세포가 발견되므로⁵⁾ 흉선만이 NK 세포 발생의 주된 장기라고 추정되지는 않지만 NK 세포와 T 림프구간에 유사성이 많기 때문에 흉선에서 NK 세포의 발생과 NK cell receptor의 형성 과정을 관찰하는 것도 필요할 것이다.

본 연구에서는 태아 흉선세포와 간 림프구에서 p58 유전자 표현이 관찰하여 태아 흉선세포와 간 림프구에서 NK 세포군의 존재를 시사하는 결과를 얻었다. 이는 태아 흉선세포와 간 림프구의 아군을 나누지 않고 모든 세포의 RNA를 대상으로 하여 RT-PCR로 측정된 결과이다. 최근 NK 세포 외에 CD4⁻CD8⁻ 흉선세포에서 $\alpha\beta$ TCR을 표현하면서 동시에 NK cell receptor를 표현하는 natural T cell이 보고되었다¹⁶⁾, 흉선세포의 약 0.5%, 간조직 림프구의 50%가 natural T cell에 해당한다고 하는데^{17,18)} 본 실험에서 표현된 p58 유전자가 NK 세포에 의한 것인지 또는 natural T cell 군에 의한 것인지는 명확하지는 않다. 이는 흉선세포와 간 림프구를 표면표식자에 따른 아군으로 나누어 p58 표현을 관찰하여야 확인될 것으로 생각된다. 그러나 본 연구결과에서 성숙한 NK 세포에서 표현되는 표식자인 CD16 및 CD56이 일부의 소수 흉선세포와 간 림프구에서도 관찰되고 아울러 동시에 p58이 표현되는 것을 통하여 태아 흉선과 간에 성숙한 NK 세포 또는 NK 세포의 전구세포가 존재할 가능성을 제시하고 있다. 특히 흉선세포의 경우는 CD16 또는 CD56 양성 세포의 비율이 적으나 p58을 표현하는 세포가 발견되므로 흉선에서는 NK 세포보다는 natural T cell의 존재를 더 시사하지만 간 림프구에서는 CD16과 CD56 비율이 다소 높은 것으로 미루어 NK 세포 계열의 세포로 인하여 p58이 표현되는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 p58의 다양성을 측정하기 위한 방법으로 SSCP를 실시하였다. 7 클론을 대상으로 염기서열을 파악하고 N terminal과 C terminal 부위로 나누어 SSCP를 실시한 결과 염기서열이 동일한 클론에서는 동일한 SSCP 양상이 관찰되었다. 4 종류의 클론 (FT60-2, FT60-11, FT62-7, FL62-3)은 homology search에서 X94609와 유사성이

많았으나 N terminal의 SSCP에서 상이한 band를 보였다. 이들 클론의 염기 서열을 분석한 결과 C terminal은 일치하지만 N terminal 부위에 1 base pair 또는 2 base pair가 다른 것을 확인하였다. 이와 같이 1 base pair 또는 2 base pair가 다른 경우에는 SSCP 분석을 통하여 감별할 수 있음을 알 수 있었으며 이를 통하여 본 연구자들이 사용한 primer들과 SSCP 법으로 p58 유전자의 다양성을 측정할 수 있음을 제시하였다. 본 연구자들이 사용한 primer들은 p58 유전자의 다양성이 집중되어 있는 2 부위를 중심으로 만들어졌는데 알려진 것보다 훨씬 다양한 p58 유전자 서열이 관찰되기 때문에 p58의 다양성을 관찰하기에 적합하다고 생각된다. 즉 GenBank에 보고된 유전자 클론의 염기서열과 일치하는 클론도 있었지만, 염기서열의 유사성은 많으나 다른 클론도 발견되었다. 본 결과의 FT62-7과 FL62-3 클론은 동일한 개체에서 유래된 클론으로 완전히 같은 염기서열을 나타내었다. 이에 반하여 FT60-2와 FT60-11은 동일 개체의 동일 장기에서 유래된 클론인데 다른 염기서열 (2 base pair 차이)을 나타내었다. 성인 말초혈액 림프구를 대상으로 실시한 본 연구자들의 SSCP 및 염기서열 분석한 결과에서도 유사한 현상이 관찰되었다 (data not shown). 물론 본 연구에서는 PCR을 통하여 cDNA를 클로닝하였으므로 1-2 base pair의 차이는 PCR에 의한 오류일 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

본 연구결과를 종합하면 태아 흉선세포와 간 림프구에서 p58 RNA가 생성되며 세포표면 단백질로도 표현됨을 관찰하였다. p58이 표현되는 세포가 NK 세포인지 또는 natural T cell인지는 본 연구결과로는 구별할 수는 없으나 발생과정의 흉선세포와 간 림프구가 p58 분자를 표현한다는 것을 RT-PCR을 통하여 제시하였으며 또한 p58 RNA의 다양성을 파악하는데 SSCP 법을 이용할 수 있음을 제시하였다.

참 고 문 헌

- 1) Yokoyama WM, Kehn PJ, Cohem DI, Shevacj EM: Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK1.1 antigen. *J Immunol* 145: 2353-2358, 1990.
- 2) Karlhofer FM, Ribuado RK, Yokohama WM: MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2 activated natural killer cells. *Nature* 358: 66-70, 1992.
- 3) Daniels B, Karlhofer FM, Seaman WE, Yokohama WM: A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 180: 687-92, 1994.
- 4) Smith HRC, Karlhofer FM, Yokohama WM: Ly-49 multigene family expressed by IL-2 activated NK cells. *J Immunol* 153: 1068-79, 1994.
- 5) Hori T, Spits H: Clonal analysis of human CD4⁻CD8⁻

- CD3⁻ thymocytes purified from postnatal thymus. *J Immunol* 146: 2116, 1991.
- 6) Sanchez MJ, Spits H, Lanier LL, Phillips JH: Human natural killer cell committed thymocytes and their relation to the T cell lineage. *J Exp Med* 178: 1857-66, 1993.
 - 7) Hori T, Phillips JH, Duncan B, Lanier L, Spits H: Human fetal liver-derived clones that express CD3 gamma, delta, and epsilon and proliferate in response to IL-2, IL-3, IL-4 or IL-7: Implications for the relationship between T and NK cells. *Blood* 80: 1270-8, 1992.
 - 8) Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH: Identification of a common/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 180: 569-76, 1994.
 - 9) Sanchez MJ, Gutierrez-Ramos JC, Fernandez E, Leonardo E, Lozano J, Matinez C, Toribio ML: Putative prethymic T cell precursors within the early human embryonic liver: A molecular and functional analysis. *J Exp Med* 177: 19, 1993.
 - 10) Bacchetta R, Vanderkerckhove BAE, Touraine JL, Bigler M, Martino S, Gebuhrer L, de Vries JE, Spits H, Roncarolo MG: Chimerism and tolerance to host and donor in severe combined immunodeficiencies transplanted with fetal liver stem cells. *J Clin Invest* 91: 1067, 1993.
 - 11) Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL: Ontogeny of human natural killer cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 ϵ , δ proteins. *J Exp Med* 175: 1055-66, 1992.
 - 12) Lanier LL, Chang C, Spits H, Phillips JH: Expression of cytoplasmic CD3 ϵ proteins in activated human adult NK cells and CD3 γ , δ , ϵ complexes in fetal NK cells: Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 149: 1876-80, 1992.
 - 13) Res P, Martinez-Caceres E, Cristina JA, Atsml F, Nöteboom E, Weijer K, Spits H: CD34+CD38⁻ cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87: 5196-206, 1996.
 - 14) Sykes M, Harty MW, Karhofer FM, Pearson DA, Szot G, Yokoyama W: Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J Exp Med* 178: 223-9, 1993.
 - 15) Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Levin D: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16: 230, 1975.
 - 16) Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR: Developmentally regulated expression of T cell receptor β chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med* 166: 577-582, 1987.
 - 17) Arase H, Arase N, Ogasawara K, Good A, Onoe K: An NK1.1⁺ CD4⁺8⁻ single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family. *PNAS* 89: 6506-10, 1992.
 - 18) Ohteki T, MacDonald HR: Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4⁺8⁻ and CD4⁻8⁻ subset of natural killer 1.1⁺ T cell receptor-alpha/beta⁺ in the liver of mice. *J Exp Med* 180: 699-704, 1994.
-