

Control of Trophoblast Gene Expression and Cell Differentiation

이화여대 생물학과

천 종 윤

I. 요약

태반 영양배엽 (trophoblast)은 포유동물의 발생과정 중 가장 먼저 분화되는 세포로서, 자궁환경 내에서 배아가 착상, 발생, 및 분화하기 위해서 반드시 필요한 태반을 형성하는 핵심적인 세포이다. 영양배엽 세포의 분화과정중의 결합은 배아의 사산이나 임신질환 등의 치명적 결과를 초래한다. 하지만, 영양배엽 세포의 분화를 조절하는 분자생물학적인 메카니즘은 아직 규명되지 않고 있다. 영양배엽 세포의 분화를 조절하는 경로를 규명하기 위한 선결과제는 분화된 영양배엽 세포에서만 발현하는 많은 유전자들이 밝혀져야만 한다. 본 연구팀은 최근에 분화된 영양배엽 세포에서만 발현하는 두 종류의 새로운 유전자들을 찾았다. 한 종류는 homeobox를 보유하고 있는 조절 유전자 *Psx*이고, 다른 한 종류는 임신호르몬인 태반 프로락틴 라이크 단백질 유전자 PLP-C β 이다. 본 연구과제의 목표는 이들 유전자의 기능과 조절 메카니즘을 규명함으로써, 영양배엽 세포의 분화를 조절하는 조절경로를 밝히는 것이다. 이를 위하여 다음과 같은 일련의 연구를 수행할 것이다. 1) *Psx* 유전자가 분화된 영양배엽 세포에서만 발현케 하는 조절 메카니즘을 규명하기 위해 functional assays, *in vitro* footprinting, gel mobility shift assays, 생쥐형질전환, UV crosslinking, Southwestern blot 등의 방법을 통해 *Psx* 유전자의 *cis*-acting 요인과 *trans*-acting factor를 밝혀 분석한다. 2) 영양배엽 세포의 분화조절 경로를 규명하기 위해 random oligonucleotide library screening, DD-PCR, subtractive screening 등의 방법을 이용하여 *Psx* 유전자에 의해 조절되는 하부유전자를 밝힌다. 3) *Psx* 유전자를 knock-out시켜 영양배엽 세포가 발달 및 분화하는데 미치는 역할을 밝힌다. 4) Yeast two-hybrid screening 방법을 이용하여 태반 프로락틴 유전자의 수용체를 찾아 이들의 신호 전달 기전을 밝힌다.

제 1차년 연구결과로서, mouse와 rat으로부터 각각 *Psx* 유전자의 genomic DNA를 클로닝하여, 유전자 구조를 비교한 결과, mouse *Psx* (m*Psx*2)는 4개의 exons으로 이루어져 있는 반면에, rat *Psx* (r*Psx*3)는 3개의 exons으로 구성되어 있었다. 즉, r*Psx*3는 m*Psx*2의 exon1이 없었다. Northern blot과 *in situ* hybridization 분석에 의해 mouse와 rat에서 *Psx* 유전자가 다르게 발현 조절되는 현상을 밝혔다. 실제로 m*Psx*2와 r*Psx*3의 5'-flanking지역을 클로닝하여 염기서열 분석 결과 전혀 homology를 찾을 수 없었다. 또한, 이들 각각 promoter의 activity를 luciferase reporter를 이용하여 조사한 결과 Rcho-1 trophoblast cells에서 각기 다른 activity를 보여 주는 것을 발견하였다. *Psx* 유전자의 transcription start sites는 Primer extension에 의해 밝혔다. 또한 *Psx*2 유전자를 knock-out 시키기 위해 targeting vector를 *Osdupde1*에 제작하였다.

본 과제를 시작할 때 새로운 프로락틴 유전자 하나를 클로닝하여 이 유전자를 PLP-I라고 이름

을 붙였다. 이 후 이 유전자 (PLP-I)는 PLP-C β 라고 이름을 붙이게 되었다. Mouse PLP-C β 유전자의 counterpart를 rat에서 찾아 염기서열을 비교한 결과 mouse와 rat에서 PLP-C β 유전자의 homology는 약 79% (amino acid level)였다. 본 연구과정을 통해 또 하나의 새로운 PLP-C subfamily member를 mouse로부터 클로닝 하였고, 이 유전자를 PLP-C γ 라 하였다. PLP-C β 와 PLP-C γ 의 발현 유형은 Northern blot과 *in situ* hybridization 분석에 의해 태반의 제한된 spongiotrophoblast와 trophoblast giant cells에서만 발현하는 것을 밝혔다. 놀랍게도 이들 두 새로운 유전자는 alternative splicing에 의해 두 종류의 isoform이 있음을 밝혔다. PLP family member 유전자로서 splicing에 의한 isoforms을 보여 주는 유전자로는 PLP-C β 와 PLP-C γ 가 최초이다. 이들 isoform mRNAs의 발현 유형은 RT-PCR 방법을 이용하여 규명하였다. 또 하나의 새로운 발견은 PLP-C β 와 PLP-C γ 가 독특한 유전자 구조를 갖고 있었다. 즉, PLP-C β 는 exon3의 alternative splicing에 의해 5개 혹은 6개의 exons을 갖는 two isoforms이 생긴다. 반면에 PLP-C γ 는 exon2가 alternative splicing이 되면서 7개의 exons을 갖거나 6개의 exons을 갖는 isoforms을 만든다. 그리고, PLP-C γ 의 promoter activity를 trophoblast Rcho-1 γ 세포주를 이용하여 PLP-C γ 의 1.5 kb 5'-flanking 지역이 trophoblast-specific promoter activity를 갖고 있음을 밝혔다. PLP-C γ 유전자의 transcription start site는 Primer extension에 의해 밝혔다.

제 1차 년도의 연구결과를 토대로, 2차년에서는 다음단계의 연구를 수행하고자 한다. 즉, 1) mPsx2와 rPsx3의 promoter를 비교분석 함으로서 mouse와 rat에서 Psx 유전자가 다르게 조절되는 메카니즘 규명, 2) Psx와 PLP-C 유전자의 promoter에 있는 cis-acting elements 탐색, 3) Psx2와 Psx3의 단백질질을 이용하여 이들이 binding하는 target sequence 규명, 4) 제작한 Psx2 targeting vector를 이용하여 ES cells에서 Psx2 유전자 knock-out, 5) Psx 유전자를 과발현시키는 세포주를 만들고 Psx에 의해 조절되는 유전자 탐색, 6) 새로 밝힌 PLP-C members 유전자들의 조절기전을 Rcho-1 세포주를 이용하여 여러 가지 성장인자와 다른 호르몬에 대한 반응을 탐색, 7) Psx와 PLP-C γ 유전자의 chromosomal mapping 등을 밝힐 것이다.

II. 연구배경

수정이 일어난 후 embryo가 자궁에 착상하여 분화를 이루는 과정은 생명의 근본을 이루는 중요한 생물학적 현상이다. 하지만 이 과정에 관한 정확한 조절기전 및 메카니즘에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다. 이 과정에서 관여하는 중요한 세포로서 후에 태반 (placenta)으로 분화되는 영양배엽 (trophoblast) 세포와 embryo로 분화되는 inner cell mass (ICM), derivative of ICM 등이 존재한다.¹ 이중 영양배엽은 embryo와 uterus를 물리적으로 연결하는 역할을 하며, 또한 임신 중에 필요한 자궁의 변화에 필수적인 maternal hormonal change를 조절하는데 결정적인 역할을 한다.²

1. 영양배엽의 발달과 분화 (development and differentiation of trophoblast)

영양배엽 세포는 다양한 분화 경로를 거치게 된다.³ 따라서 영양배엽 세포는 형태적으로 구분이 되는 여러 층을 구성한다. 포유동물들 간에는 다르게 구성되어 있다. 실험용 생쥐의 경우는 세층의 영양배엽 세포인, trophoblast giant cells, labyrinthine trophoblast, spongiotrophoblast로 구성되어 있다.³ 이중 giant cell은 비록 형태적으로 차이는 있지만 spongiotrophoblast와 함께 내분비 활성 (endocrine activities), 즉 임신관련 호르몬을 생산하고 invasion 성질을 갖고 있다.^{4,5} Labyrinthine

trophoblast는 태아에 가장 가까이 위치한 태반 형성 세포 층으로서 모체로부터 혈액을 통한 영양분 공급과 태아의 노폐물 분비를 담당하고 있다.⁶ 반면에 사람의 경우는 cytotrophoblast와 syncytiotrophoblast로 구성되어 있다.⁷ 임신 기간동안, cytotrophoblast는 계속해서 분화되어 완전히 분화가 된 syncytiotrophoblast로 바뀌게 된다.^{8,9} Cytotrophoblast가 syncytiotrophoblast로 전환하는 데는 여러 중간 단계의 분화과정을 거치게 된다.^{9,10} 여러 종류의 임신 영양배엽세포 결합이 이와 같은 분화의 여러 단계에서 발견되고 있다.¹¹⁻¹⁵

2. 영양배엽 특이 유전자 발현 및 조절 (expression and regulation of trophoblast-specific gene)

영양배엽에 발현하는 조절유전자들로는, *Mash-2*, *Hxt*, *I-mfa*, *GATA-2*, *GATA-3*, *mSna*, *ERR-β*, *Ets2*, *AP-2γ* 등이 보고되었다.^{2,6-21} *Mash-2*의 경우, 영양배엽 증식을 유지하는데 필수적이지만 분화된 giant cell의 형성을 억제한다.¹⁷ 반면에 *Hxt* 조절유전자는 세포의 증식을 억제하고 세포의 분화를 유도하여 분화된 giant cell 형성을 촉진한다.² 이들 유전자가 knock-out되었을 때 영양배엽의 발달 및 분화의 이상에 따라 태반 형성에 이상이 초래되었고, 따라서 임신중 생쥐가 사산이 되었다.^{17,22} bHLH subfamily의 하나인 *I-mfa*는 *Hxt*와 함께 영양배엽 세포의 분화를 촉진하지만 *Mash2* 유전자의 발현을 억제하였다.¹⁶ *GATA-2*와 *GATA-3* 유전자들이 knock-out 되었을 때 영양배엽-특이 유전자, 즉 placental lactogen I과 proliferin의 발현 (mRNA)이 크게 줄어들었다.²³ 이 밖에도 *ERR-β*와 *RxRa* 유전자에 mutation은 각각 giant cell과 labyrinthine trophoblast에 이상을 초래하여 embryonic death를 가져왔다.^{18,24}

3. 영양배엽과 homeobox 유전자 (trophoblast and homeobox gene)

Homeobox 유전자는 tissues, organs, region, positions의 identity를 정하도록 세포의 운명을 결정하는데 관여하는 transcription factor (조절유전자)로 널리 알려져 있다.²⁵ 지금까지 수많은 homeobox 유전자들이 클로닝되고 연구되었지만 이들은 대부분 태아 발달에 관여하였다. 하지만, homeobox 유전자로서 영양배엽 세포 발달 및 분화에 관여하는 유전자는 극히 일부이다. 영양배엽 세포에 발현하는 homeobox 유전자로는 지금까지 3종류 (*Pem*, *Esx1*, *Psx*)가 생쥐로부터 클로닝되었다.²⁶⁻²⁸ *Pem*과 *Esx1* 유전자는 영양배엽 세포 외에도 고환 (testis)에서도 발현이 되었다. 하지만 *Psx* (Placenta-specific homeobox) 유전자는 영양배엽에서만 발현하는 homeobox 유전자로서, 본 연구팀에 의해 클로닝이 되었다.²⁸ 영양배엽에서만 발현하는 조절유전자로나 homeobox 유전자로는 *Psx*가 처음이다.

4. 영양배엽과 태반 프로락틴 유전자 패밀리 (trophoblast and placental prolactin gene family)

영양배엽 세포중 giant cells과 spongiotrophoblast cells은 임신 호르몬인 태반 프로락틴 (PRL) 페밀리를 생산한다.²⁹ PRL은 임신 환경 및 임신 유지를 조절하는 다양한 기능을 한다고 알려져 있다.³⁰ 이들은 태반 뿐 만 아니라 뇌하수체 및 자궁에서 생산되지만 target tissues는 PRL 종류에 따라 다르다.²⁹ PRL은 PRL receptor에 binding하여 PRL receptor signaling pathway를 거치는 유무에 따라 classical 멤버와 nonclassical 멤버로 구분 짓는다.³⁰ PRL receptor에 binding하는 멤버는 classical members로, prolactin, PL-I, PL-IV, PL-II가 있고, PRL receptor에 binding하지 않는 멤버는 nonclassical members로 prolactin-like protein (PLP)-A, PLP-B, prolactin-like protein-C subfamily (PLP-C, PLP-Cv, PLP-D, PLP-E, d/tPLP), proliferin (PLF), proliferin-related protein (PLF-RP), PLP-F, PLP-G 등이다. 이들

sport protein 혹은 binding protein과 같이 다른 메커니즘을 갖고 있는지를 밝히는 연구가 앞으로 예상된다.

지금까지 15종류의 PRL family 유전자가 클로닝되었다.³⁰ 이중 PRL-like protein-C (PLP-C) subfamily의 경우 rat에서는 5종류 (PLP-C, PLP-Cv, PLP-D, PLP-H, d/PRP)가 밝혀졌지만 mouse에서는 최근에 PLP-C α 만이 보고되었다.³¹ 이 보고에 의하면 mouse에서는 PLP-C α 의 다른 PLP-C subfamily 유전자를 찾을 수 없었기 때문에 PLP-C α 한 유전자가 5종류의 rat PLP-C subfamily 유전자들의 기능을 대체할 것으로 추정하였다.³¹ 하지만, 최근에

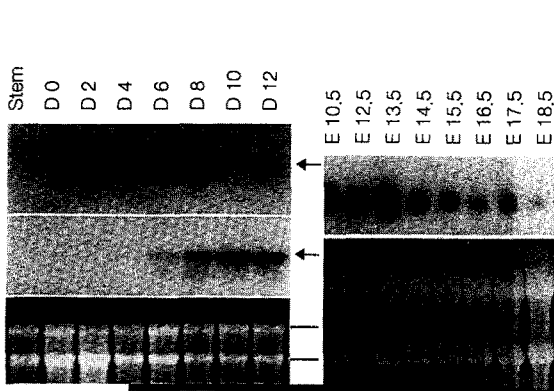


Figure 3A. Mouse Psx mRNA expression patterns during embryo development. Total RNA was prepared from mouse conceptuses including embryos and extra-embryonic tissues at the times of gestation indicated.

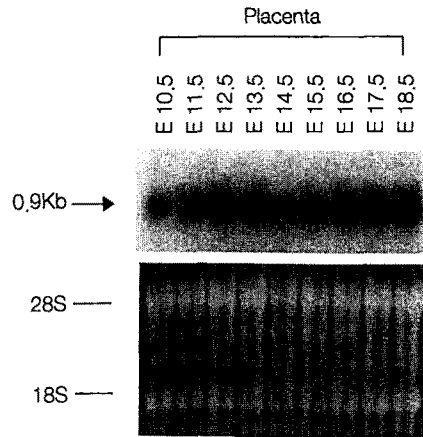


Figure 3B. Mouse Psx mRNA expression in placenta at various stages of development.

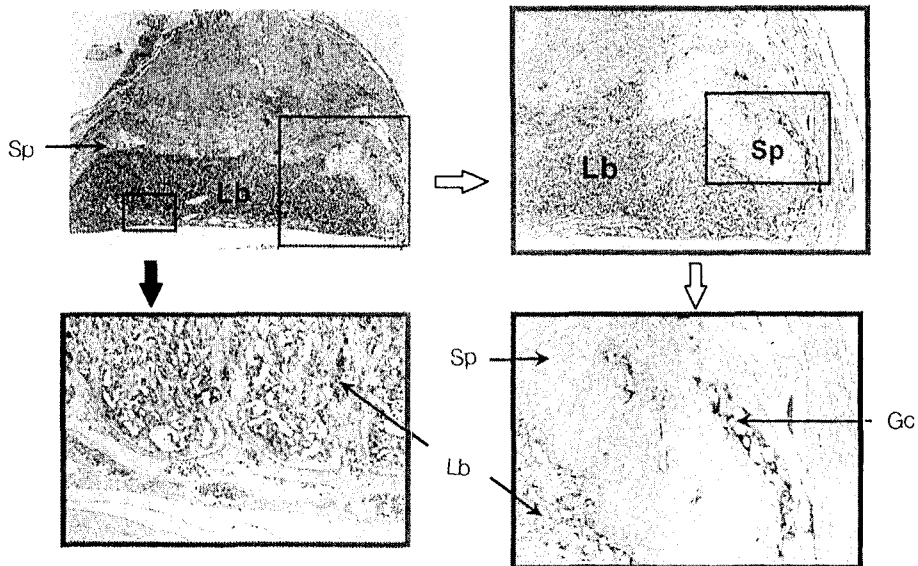


Figure 4. Cellular distribution of mouse Psx mRNA. Placenta at stage 13.5 days are analysed by In situ hybridization using Psx antisense riboprobe. Psx mRNA is detected only in labyrinthine trophoblast layer and trophoblast gint cells.

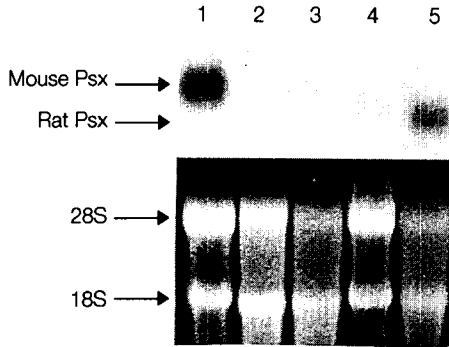


Figure 5A. Pso mRNA expression at various trophoblast cell lines. (1) RNA from mouse placenta at E13.5 as a positive control. (2) RNA from human placenta choriocarcinoma JAR cells. (3) RNA from rat normal placenta HRP-1 cells. (4) RNA from rat choriocarcinoma Rcho-1 cells. (5) RNA from differentiated Rcho-1 cells.

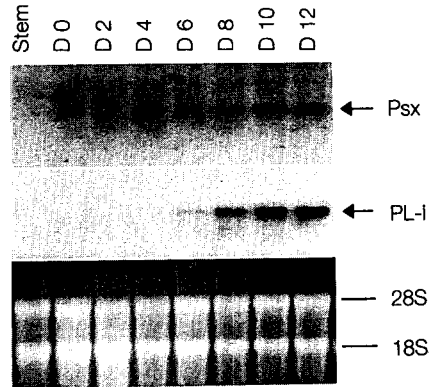


Figure 5B. Pso mRNA expression during trophoblast cell differentiation. RNA from rat Rcho-1 at the time of differentiation indicated.

PLP-C β 가 mouse와 rat에서 클로닝됨으로서 위의 주장과는 달리 여러 종류의 PLP-C subfamily가 mouse에도 존재한다는 것을 보여주고 있다. 뿐만 아니라, PLP-C subfamily의 경우 target tissues가 아직 전혀 밝혀진게 없으므로, 앞으로 이들의 target tissues가 무엇인지 밝혀져야 할 것이다. 특히 여러 종류의 PLP family가 mouse와 rat에서 클로닝 되었기 때문에 mouse의 모델 시스템과 knock-out방법을 이용하여 이들 유전자의 기능을 밝히기가 유리하다.

III. 연구목적

태반 영양배엽 세포의 정상적인 분화를 조절하는 조절경로를 밝히고, 또한 조절경로의 장애로 발생하는 임신질환을 초래케 하는 결정적인 요인을 규명하여 임신질환을 예방 및 치료할 수 있는 기초자료를 제공하는 것이 본 연구의 목표이다. 이를 위해 mouse와 rat에서 영양배엽 세포 특이 유전자를 찾아, 이들 유전자의 조절기작과 역할을 밝힘으로서 영양배엽 세포 분화조절 경로를 규명하고자 한다.

IV. 연구결과

1. 영양배엽 특이 homeobox 유전자 Pso 클로닝 및 염기서열 분석

Mouse에서 homeobox를 갖고 있는 두 종류의 Pso 유전자 (Pso-1과 Pso-2)가 클로닝되었다. 이들

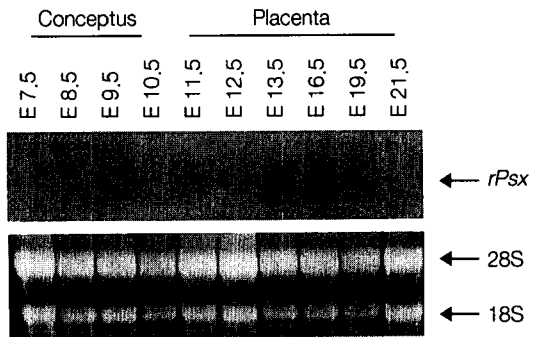


Figure 6. Rat Pso expression patterns during embryo development. Total RNA was prepared from mouse conceptuses and placenta at the times of gestation indicated.

간 염기서열의 유사성 (91%)은 높지만, 전반적으로 여러 곳의 염기서열에서 차이를 보여주고 있다 (Figure 1). *Psx-2* 유전자는 4개의 exons과 3개의 introns으로 약 2.6 kb genomic DNA로 구성되어 있다. 하지만 *Psx-1* 유전자의 구조는 아직 밝혀지지 않았다. Rat에서도 두 종류의 *Psx* homologues를 클로닝 하였지만, 이들의 염기서열은 mouse *Psx*와 다소 다르다. 따라서 이들을 *Psx-3*과 *Psx-4*로 하였다 (Figure 1). Rat *Psx* homologues의 mRNA 크기는 mouse *Psx* mRNA 보다 약 250 bp 정도 작았다 (Figure 1). 일반적으로 homeobox 유전자는 가까운 종 간에 아주 높은 염기서열 보존을 보여주는 것이 특징이다. 하지만 *Psx* homeobox 유전자의 경우 기존 homeobox 유전자의 일반 특징과 전혀 다른 양상을 보여 주고 있어서, 유전자 진화 연구에 좋은 모델이 된다.

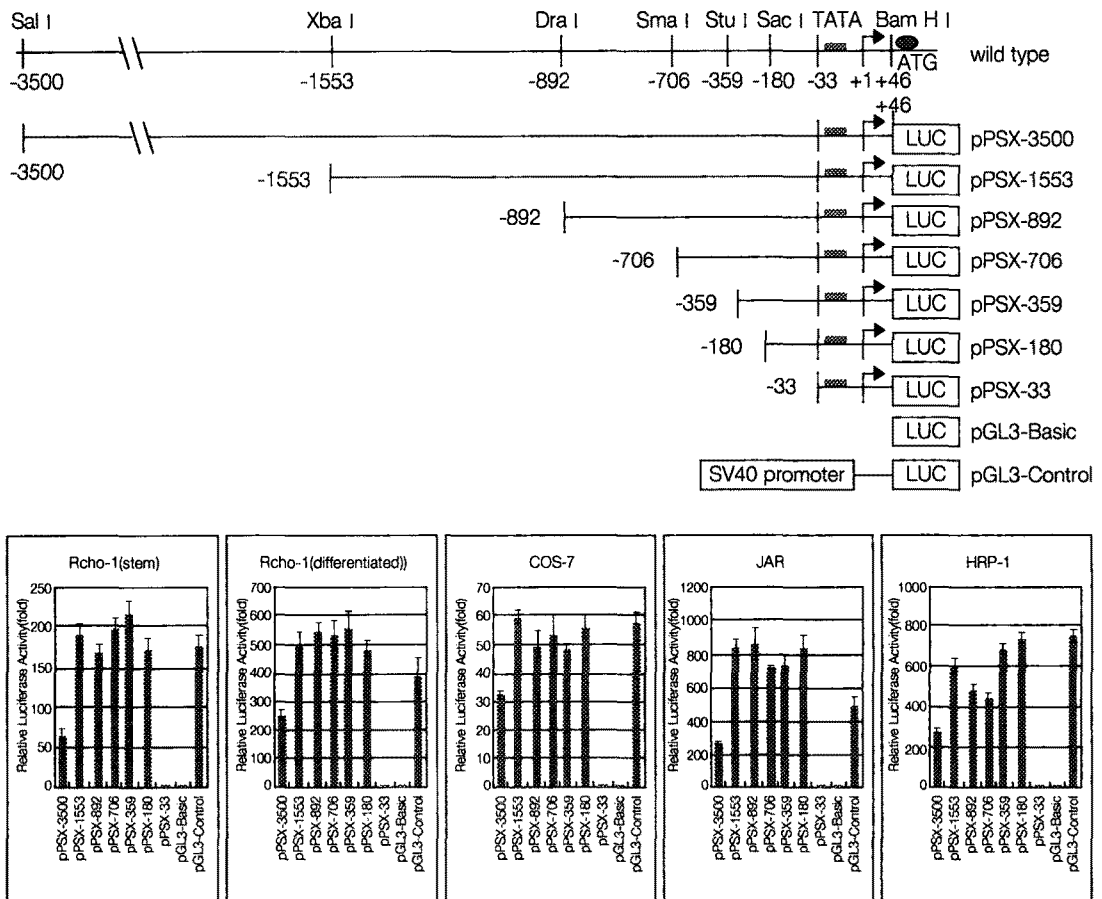


Figure 7. Transient transfection analysis of the mouse *Psx-2* promoter. Upper panel; *Psx-2* promoter constructs in pGL3-Basic vector used for transient transfection. The TATA box, transcription start site (+1), and putative translation initiation site (ATG) are indicated. Numbers on the left of each construct represents the 5' end of the promoter fragment relative the transcription start site. Lower panel; Transient transfection of cells with *Psx-2* promoter constructs. Stem and differentiated Rcho-1 cell, COS-7, JAR and HRP-1 cells were transfected with each of the constructs shown in upper panel.

```

PLP-I 1  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD 54
rPLP-H  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD
mPLP-Ca  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD
rPLP-D  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD
rPLP-Cv  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD
rPLP-C  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD
rdPRP  MVLPLSQHFSGALLLVVSNLLLWEKASRFRACNAQKVRCHNPLVETVQCHAD

PLP-I 55  SWLRLADNL-CRAVHNOFSSGQILFNNSLIRRETVRAGTYCHSTLSNE 106
rPLP-H  RAEFLNADQIVYVYVNOFSSRQCADLNSKLRKRETVLKGTYCHSTLAKR
mPLP-Ca  KAEFLNADQIVYVYVNOFSSGQWDFSSQIIRQKGVVYRAGTYCHSTLAKR
rPLP-D  KAEFLNADQIVYVYVNOFSSGQWDFSSQIIRQKGVVYRAGTYCHSTLAKR
rPLP-Cv  KAEFLNADQIVYVYVNOFSSGQWDFSSQIIRQKGVVYRAGTYCHSTLAKR
rPLP-C  RAEFLNADQIVYVYVNOFSSRQCADLNSKLRKRETVLKGTYCHSTLAKR
rdPRP  RAEFLNADQIVYVYVNOFSSGQWDFSSQIIRQKGVVYRAGTYCHSTLAKR

PLP-I 107  DRGRCHADADPEKYLKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL 160
rPLP-H  QTRG--GNFELBEHKLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL
mPLP-Ca  NTEV-HINIEIASYKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL
rPLP-D  ENKEVHINIEIKENYKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL
rPLP-Cv  QNKCI--NIDIEVILKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL
rPLP-C  KSRGV--NIDIEVILKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL
rdPRP  BLRGEENIKTKKYLKTLINVCANTPLHWVLEIANQDVPETILSKAKDL

PLP-I 161  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN 214
rPLP-H  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN
mPLP-Ca  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN
rPLP-D  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN
rPLP-Cv  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN
rPLP-C  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN
rdPRP  EENRQLDLRWILTKVPTAEKKEEPPWEHLSPLKSSGKHVYKLANFNLSN

PLP-I 215  EENRQYHHDFYLRKKEQITGCGC 239
rPLP-H  ELNDKXFRHHLRLLKGLITGCGC
mPLP-Ca  IDHDSKYILQLRLLKGLITGCGC
rPLP-D  LGYDAKYTLNDRHLLKGLITGCGC
rPLP-Cv  LEDDKXFRYHLRLLKGLITGCGC
rPLP-C  LDYDQVHYTLSQLNGLITGCGC
rdPRP  SLRVDIFYTKFLRLALGLITGCGC
    
```

Figure 8. Comparison of amino acid sequences of PLP-I with other homologous PLP proteins. Conserved amino acids are indicated shadowed box and absent amino acids are indicated by dash.

2. *Psx* 유전자의 염색체상 위치

Psx 유전자는 mouse X chromosome에 A2-A4 사이에 위치하고 있다 (Figure 2). 따라서 두 종류의 *Psx* 유전자는 mouse genomic상 가까운 곳에 위치하여 있을 것으로 추정된다. 이들 유전자의 정확한 mapping은 duplication된 유전자의 진화상 연구에 큰 도움이 된다. 이들 유전자가 mouse genome상 서로 다른 곳에 있다는 것은 genomic Southern blot분석에 의해 증명되었다. Homeobox 유전자인 *Pem*과 *Esx1* 또한 X chromosome에 위치하고 있다.^{26,27}

3. *Psx* 유전자의 발현유형

*Psx*는 생쥐 임신 8.5일경에 발현이 시작되어 분만할 때까지 꾸준히 강하게 발현이 된다 (Figure 3). 이는 *Psx* 유전자가 임신기간 동안 중요함을 나타낸다. *Psx*는 태반에서만 발현이 되고, 태반 영양 배엽중 trophoblast giant cells과 labyrinthine trophoblast cells에서만 발현이 제한되었다 (Figure 4). 특히 재미있는 발견은 *Psx* 유전자가 rat trophoblast cell line인 Rcho-1이 분화 (differentiation)되었을 때만 발현이 되고, 이들 세포가 증식 (proliferation)하는 stem 상태에서는 전혀 발현이 되지 않았다 (Figure 5). 분화된 Rcho-1 세포주에서만 발현하는 transcription factor로서는 *Psx*가 첫 번째 경우이다. 따라서 *Psx* 유전자는 분화된 영양배엽 세포가 어떻게 조절되는지 연구하는데 아주 좋은

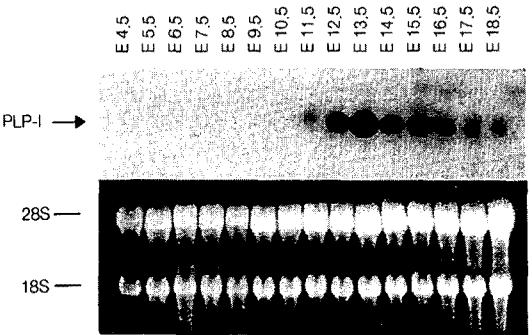


Figure 9A. PLP mRNA expression patterns during embryo development. Total RNA was prepared from mouse conceptuses including embryos and extraembryonic tissues at the times of gestation indicated.

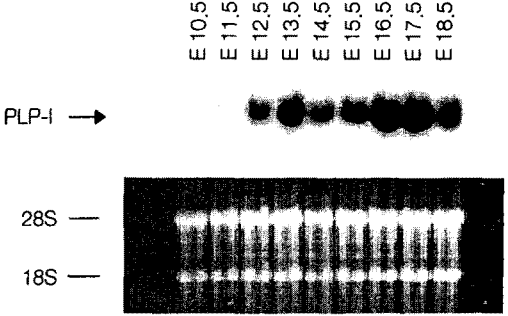


Figure 9B. PLP mRNA expression in placenta during embryo development. Total RNA was prepared from placenta at the times of gestation indicated. various stages of development.



Figure 10. Cellular distribution of PLP mRNA. Placenta at stage 13.5 days are analysed by In situ hybridization using PLP antisense riboprobe. *Psx* mRNA is detected only in spongiotrophoblast layer and trophoblast giant cells.

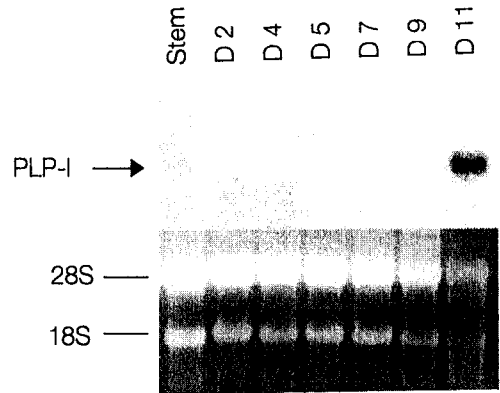


Figure 11. PLP mRNA expression during trophoblast cell differentiation. RNA from rat Rcho-1 at the time of differentiation indicated.

모델이 된다. Rat *Psx* homologues의 발현기작은 mouse *Psx*와 다르다. Mouse *Psx*의 경우 임신 8.5일부터 발현되기 시작하여 태어날 때까지 강하게 태반의 제한된 영양배엽 세포층에서만 발현이 된다. 반면에 rat *Psx*는 임신 11.5일에 발현이 약하게 되기 시작하여 임신 13.5일과 16.5일 사이 강하게 발현되고, 이후 태어날 때까지 약하게 발현이 된다 (Figure 6). 발현부위는 mouse와 달리 태반 영양배엽의 모든 층에서 발현이 되었다. 같은 유전자가 mouse와 rat에서 다르게 조절되는 경우는 별로 알려진 바가 없다.

4. *Psx* promoter의 기능분석

Psx 유전자가 영양배엽 세포에서만 발현한다는 것은 이를 조절하는 영양배엽 특이 promoter를 갖고 있다는 것을 말한다. 따라서 *Psx* 유전자를 이용하여 영양배엽 특이 promoter를 밝히는 일은 앞으로 태반연구에 있어서 아주 중요한 연구 시스템을 제공할 것이다. *Psx*-2 5'-flanking 지역의 promoter 기능을 3.5 kb까지 분석하였다. 하지만 영양배엽 특이성을 보여 주지 않았다. 그러나 한 가지 발견은 최소 -180 bp의 *Psx* promoter만으로도 mammalian strong promoter SV-40와 같은 여러 종류의 세포주에서 활성을 보여 주었다 (Figure 7). 세포주에 상관없이 세포특이 promoter가 활성을 보여 주는 예는 알려진 바가 있다. 이들 경우 간혹 methylation에 의해 조절되는 경우가 있다. 하지만 *Psx*의 경우 methylation에 의해 조절되는 경우가 아님을 확인하였다.

5. 태반 프로락틴-라이크 단백질 유전자 PLP-C β 의 클로닝 및 염기서열 분석

PLP-C subfamily의 새로운 멤버 cDNA를 mouse로부터 클로닝하였다.³² 이 유전자는 PLP-C subfamily와 같이 signal sequence와 2곳의 putative N-linked glycosylation sites를 갖고 있고, 기존에 알려진 PLP-C α , PLP-D, PLP-H, PLP-C ν , PLP-C와 55~66% 염기서열의 유사성을 보여주고 있다 (Figure 8).

6. PLP-C β 유전자의 발현유형

PLP-C β 의 발현 유형은 기존의 PLP계열 유전자와 전혀 다르다. 임신 11.5일에 발현이 시작되고, 12.5일에 발현이 크게 증가되어 태어날 때까지 강하게 발현한다 (Figure 9). 발현부위로는 영양배엽 세포중 trophoblast giant cells과 spongiotrophoblast에서만 발현이 된다 (Figure 10). Rcho-1 세포주의 경우 분화되었을 때 만 발현이 되었다 (Figure 11). 따라서 영양배엽 세포가 분화하는 동안 새로운 PLP 유전자가 어떻게 조절되고 있는지 밝히는 일은 세포 분화 조절기작 연구에 필요하다.

참 고 문 헌

1. Muntener M, Hsu YC. Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Acta Anat* 1977; 98: 241-52.
2. Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Werb Z. Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates development of placenta trophoblast cells. *Development* 1995; 121: 2513-23.
3. Rossant J. Development of the extraembryonic lineages. *Semin Dev* 1995; 6: 237-47.
4. Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Kamei DT, Orwig KE. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta* 1996; 17: 277-89.
5. Orwig KE, Wolfe MW, Cohick CB, Dai G, Peters TJ, Soares MJ. Trophoblast-specific regulation of endocrine-related genes. *Trophoblast Res* 1998; 11: 65-85.
6. Takata K, Fujikura K, Shin B-C. Ultrastructure of the rodent placenta labyrinth: a site of barrier and transport. *J Reprod Dev* 1997; 43: 13-24.
7. Morriss, Jr. FH, Boyd RDH. Placenta Transport. In: E. Knobil and J. Neil et al., ed. *The Physiology of Reproduction*. Raven press, Ltd., New York. 1988. pp 2043-83.
8. Kurman RJ, Main CS, Chen MC. A distinctive form of trophoblast with specific morphological, biological and functional features. *Placenta* 1984; 5: 349-55.
9. Merz WE. The Primate placenta and human chorionic gonadotropin. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 222-34.
10. Wynn RM. Cytotrophoblastic specification: an ultrastructural study of the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114: 339-55.
11. Danihel L, Porubsky J, Vojtassak J, Breitenecker G. Mola hydatidosa: Immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 675.
12. Horn LC, Bilek K. Histologic classification and staging gestational trophoblastic disease. *Gen Diagn Pathol* 1997; 143: 87-101.
13. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation. invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 151; 1809-18.
14. Losch A, Kainz C. Immunohistochemistry in the diagnosis of the gestational trophoblastic disease. *Acta. Obstet Gynecol Scand* 1996; 75: 753-6.
15. Mazur MT, Murman RJ. Gestational trophoblastic disease and related lesions. In: Kurman RJ, ed.

- Blaustein's pathology of the female genital tract. New York: Springer, 1994; pp 1049-93.
16. Kraut N, Snider L, Chen CMA, Tapscott SJ, Groudine M. Requirement of the mouse *I-mfa* gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO J* 1998; 17: 6276-88.
 17. Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL. Essential role of *Mash-2* in extraembryonic development. *Nature* 1994; 371: 333-6.
 18. Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguère V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor *ERR-1*. *Nature* 1997; 388: 778-82.
 19. Nakayama H, Scott IC, Cross JC. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the *mSNA* zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 1998; 199: 150-63.
 20. Ng Y.-K, George KM, Engel JD, Linzer DIH. GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development* 1994; 120: 3257-66.
 21. Shi D, Kellems RE. Transcription factor AP-2 regulates murine adenosine deaminase gene expression during placenta development. *J Biol Chem* 1998; 273: 27331-8.
 22. Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The *Hand1* bHLH transcription factor is essential for placental and cardiac morphogenesis. *Nature Gen* 1998; 18: 271-5.
 23. Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD, Linzer DIH. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* 1997; 124: 907-14.
 24. Sapin V, Dolle P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P. Defects of the chorioallantoic placenta in mouse *RXR α* null fetuses. *Devel Biol* 1997; 191: 29-41.
 25. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 8: 283-302.
 26. Li Y, Lemaire P, Behringer RR. *Esx1*, a novel chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev Biol* 1997; 188: 85-95.
 27. Lin TP, Labosky PA, Grabel LB, Kozak CA, Pitman JL, Kleeman J, MacLeod CL. The *Pem* homeobox gene is X-linked and exclusively expressed in extraembryonic tissues during early murine development. *Dev Biol* 1994; 166: 170-9.
 28. Han YJ, Park AR, Sung DY, Chun JY. *Psx*, a novel murine homeobox gene expressed in placenta. *Gene* 1998; 207: 159-66.
 29. Soares MJ, Faria TN, Roby KF, Deb S. Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placenta expression. *Endocrine Reviews* 1991; 12: 402-23.
 30. Soares MJ, Muller H, Orwig KE, Peters TJ, Dai G. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol Reprod* 1998; 58: 273-84.
 31. Dai G, Chapman BM, Liu B, Orwig KE, Wang D, White RA, Preuett B, Soares MJ. A new member of the mouse prolactin (PRL)-like protein-C subfamily, PRL-like protein-C α : structure and expression. *Endocrinology* 1998; 139: 5157-63.
 32. Hwang IT, Lee YH, Moon BC, Ahn KY, Lee SW, Chun JY. Identification and characterization of a new member of the placental prolactin-like protein-C (PLP-C) subfamily, PLP-C β . *Endocrinology* 2000; 141: 3343-52.