

법랑모세포 분화와 법랑질 형성과정에서 OD314, Apin protein의 발현 및 기능

박종태¹ · 최용석¹ · 김흥중¹ · 정문진¹ · 오현주¹ · 신인철¹ · 박주철¹ · 손호현^{2*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ²서울대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

EXPRESSION AND FUNCTION OF OD314, APIN PROTEIN, DURING AMELOBLAST DIFFERENTIATION AND AMELOGENESIS

Jong-Tae Park¹, Yong-Seok Choi¹, Heung-Joong Kim¹, Moon-Jin Jeong¹, Hyun-Ju Oh¹,
In-Cheol Shin¹, Joo-Cheol Park¹, Ho-Hyun Son^{2*}

¹Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

²Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University

This study was aimed to elucidate the biological function of OD314 (Apin protein), which is related to ameloblast differentiation and amelogenesis. Apin protein, calcifying epithelial odontogenic (pindborg) tumors (CEOTs)-associated amyloid, were isolated from CEOTs, and has similar nucleotide sequences to OD314. We examined expression of the OD314 mRNA using in-situ hybridization during tooth development in mice. Expression of OD314 and several enamel matrix proteins were examined in the cultured ameloblast cell line up to 28 days by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification. After inactivation and over-expression of the OD314 gene in ameloblast cell lines using U6 vector-driven RNA interference and CMV-OD314 construct, RT-PCR were performed to evaluate the effect of the OD314 during amelogenesis.

The results were as follows:

1. In in-situ hybridization, OD314 mRNAs were more strongly expressed in ameloblast than odontoblast.
2. When ameloblast cells were cultured in the differentiation and mineralization medium for 28 days, the tuftelin mRNA expression was maintained from the beginning to day 14, and then gradually decreased to day 28. The expressions of amelogenin and enamelin were gradually decreased according to the ameloblast differentiation.
3. Inactivation of OD314 by U6-OD314 siRNA construct down-regulated the expression of OD314, MMP-20, and tuftelin, whereas over-expression of OD314 by CMV-OD314 construct up-regulated the expression of OD314 and MMP-20 without change in tuftelin.

These results suggest that OD314 is considered as an ameloblast-enriched gene and may play the important roles in ameloblast differentiation and mineralization. (J Kor Acad Cons Dent 31(6):437-444, 2006)

Key words: Apin protein, OD314, Mineralization, Ameloblast differentiation, Amelogenesis

* Corresponding author: Ho-Hyun Son

- Received 2006.8.24., revised 2006.9.19., accepted 2006.9.20. -

Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Seoul National University,
22 Yeongun-dong, Chongro-gu, Seoul, Korea
Tel : 82-2-2072-2652 Fax : 82-2-2072-3859
E-mail : hhson@snu.ac.kr

※ 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(RO1-2003-000-10141-0)지원으로 수행되었음.

I. 서 론

치아의 형성은 치성상피 (dental epithelium)와 외배엽 성 간엽세포 (ectomesenchymal cell) 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다¹⁾. 치성상피는 치아기 (dental organ)를 형성하여 법랑모세포 (ameloblast)를 분화시키는 반면에, 외배엽 성 간엽세포는 치유두 (dental papilla)를 형성하여 상아모세포와 치수세포가 분화하고 이들이 치관 상아질과 치수를 형성한다²⁾. 최근 들어 다양한 세포들의 분화유도인자를 동정할 목적으로 각각의 분화된 세포들이 갖는 독특한 세포-특이적 유전자들에 대한 관심이 높아지고 있으나³⁻⁶⁾, 아직까지 법랑모세포의 분화과정이나 법랑질의 형성과정과 관련한 분자생물학적 기전에 대하여 명확히 밝혀져 있지 않다.

Dey 등⁷⁾이 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관여하는 기전을 밝힐 목적으로 두개골의 골모세포 (calvarial osteoblast)와 치유두세포 (dental papilla cell)에서는 발현되지 않고 상아모세포/치수세포 (odontoblast/pulpal cell)에서 특이하게 발현되는 유전자로 OD314를 보고하였다. 또한 northern 분석에서 OD314 mRNA가 뼈, 뇌, 심장, 간, 폐, 골격근에서는 발현되지 않으며 상아모세포에서 선택적으로 발현된다고 하여, OD314의 상아모세포 분화과정과 상아질 형성과정에서의 역할을 암시하였다. 김 등⁸⁾과 김 등⁹⁾은 OD314가 154 아미노산을 합성하는 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자로 주로 세포질에 존재하며, mRNA와 그 합성 단백질이 상아모세포에서 선택적으로 발현되며, 사람 치수세포의 분화과정에서 OD314는 치수세포가 상아모세포로 분화하는 초기 과정에 발현되어 그 발현이 유지되다가 석회화과정에서 더욱 증가한다고 보고하여 OD314가 상아질의 석회화과정에 관여함을 시사하였다. 그러나 최근에 박 등¹⁰⁾은 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314의 법랑모세포에서의 역할을 시사하였다. 또한 흥미롭게도 Solomon 등¹¹⁾은 일명 Pindborg tumor라고 일컬어지는 상피성 치성 종양에서 치아를 형성할 수 있는 세포에서 OD314와 염기서열이 거의 유사한 Apin protein을 보고하였다.

법랑질형성 (amelogenesis)은 두 단계로 일어난다. 첫 단계에서는 전체 성분 중 30% 정도의 무기질 이 침착된 법랑질이 형성된 후 다음 단계가 진행되는데, 두번째 단계에서 유기바탕질과 물이 제거되면서 무기질의 추가 유입이 일어나 법랑질은 96% 이상의 무기질을 갖게 된다. 법랑모세포는 바탕질단백질을 분비하여 세포외바탕질 환경을 조성하고 유지함으로써 무기질 침착이 일어날 수 있도록 한다. 법랑모세포는 독특한 생활주기를 가지는데, 기능적으로 분비전기 (presecretory stage), 분비기 (secretory stage), 성

숙기 (maturation stage)의 세 시기로 구별하는 것이 일반적인 주기 분류 방식이다¹²⁾.

본 연구에서는 최근에 새롭게 알려진 OD314 즉 Apin protein 유전자의 조직과 세포내 발현을 확인하고, 법랑모세포 전구세포주의 분화과정에서 OD314와 amelogenin 등의 유전자 발현을 분석하여 OD314의 역할을 이해하고자 하였다. 또한, OD314 유전자를 과발현 (over-expression)시킬 수 있는 CMV-OD314 construct와 OD314 유전자의 발현을 억제 (inactivation)할 수 있는 U6-OD314 siRNA construct를 제작하고 이를 법랑모세포 세포주에 적용하여 법랑모세포 분화과정에서 OD314 유전자의 기능을 연구하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포 배양

법랑모세포 세포주를 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제 (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Gentamycin 50 μ g/ml 및 Fungizone 2.5 μ g/ml)가 함유된 Modified Eagles Medium (MEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에 ascorbic acid (50 μ g/ml), β -glycerophosphate (10mM), EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 type 1 collagen 처리된 배양접시에서 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 28일 후 Trizol 용액 (Gibco BRL, Rockville, USA)을 이용하여 각각의 세포에서 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 양은 spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)로 계산한 다음 20 μ g 씩 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2. 실험동물 처리 및 조직표본제작

생후 7일, 21일, 40일의 생쥐를 각각 5마리씩 4% paraformaldehyde (PFA) 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후, 상악 구치를 포함한 상악골을 적출한 다음 4 $^{\circ}$ C, 4% PFA 용액에서 16시간 후고정하였다. 고정 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액으로 2시간 세척한 후, 10% EDTA (pH 7.4) 용액에서 2주에서 4주간 탈회하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV ethanol로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chloroform 용액에서 4회 2시간씩 처리한 후, 통법에 따라 paraffin 포매하고 5 μ m 두께로 전치부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 직각되게 박절한 후, 4 $^{\circ}$ C 상태에서 보관하여 mRNA in-situ hybridization에 이용하였다.

3. In-situ hybridization

1197bp의 OD314 cDNA를 제한효소로 절단한 후 pBluescript-SK (+) vector (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA)에 subcloning한 다음, sequencing하여 cDNA의 삽입방향을 확인하였다. DNA를 선형화하고 proteinase K를 처리한 후, DIG RNA labelling kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)와 T3 및 T7 RNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 sense와 antisense cRNA probe를 합성하였다.

절편들을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 수화한 후, 4% PFA에 10분간 고정하였다. PBS로 두 차례 세척하고 acetylation 용액 (0.25% acetic anhydrate in 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에서 10분간 처리한 후, 2 × SCC (0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate)로 두 차례 세척한 다음 탈수 및 탈지 (70% ethanol 1분; 80% ethanol 1분; 95% ethanol 2분; 100% ethanol 1분; 100% ethanol 5분; 95% ethanol 1분) 과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 50% formamide, 10mM Tris-HCl, 200µg/ml tRNA, 600mM NaCl, 0.25% SDS, 1mM EDTA, 1x Denhardt's solution, 10% Dextran sulfate가 함유

된 용액내에서 OD314 cRNA 프로브를 50℃에서 16시간 hybridization 하였다. Hybridization 후 2 × SSC, 0.2 × SSC I, 0.2 × SSC II로 세척한 다음, 1.5% Blocking Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)로 다시 세척하고 anti-Dig antibody를 1:88로 Dig buffer I에 희석하여, 4℃에서 30분간 처리하였다. 다시 Dig buffer II (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 500mM MgCl₂)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt와 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIT)로 발색한 후, Dig buffer IV (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)에서 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. RT-PCR

-70℃에 보관 중인 총 RNA에서 RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 OD314, amelogenin, ameloblastin, enamelin, tuftelin, MMP20, KLK4 및 control인 GAPDH의 특이적 primer (Table 1)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR은 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초의 조건으로 33사이클을 시행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

Enamel Matrix Protein		Primer sequence(5'-3')	size(bp)
OD314	S	ccagcaggctagtcctatgtcctatgtgg	608
	AS	cgctcgacatgagatcagtg	
Amelogenin	S	ccagagcatgataaggcagc	457
	AS	gaactggcatcattgggtgc	
Ameloblastin	S	aaaaggagaaggtccagaag	473
	AS	tgcggaaggatagtaagtgt	
Enamelin	S	acaaaccctttataggagcc	465
	AS	aattaaatttgggcctacc	
Tuftelin	S	gacctatgcatgatgcctg	471
	AS	cgctgataacggctgagtgt	
MMP20	S	agctgtgagcaactgatgactgg	458
	AS	acagctagagccaagaacacacc	
KLK4	S	aggagatgaggcagggaag	426
	AS	gttccctgctctggctta	
GAPDH	S	accacagtccatgccatcac	452
	AS	tccaccacctgttctgtg	

5. OD314의 과발현과 발현 억제가 법랑모세포 분화과정에 미치는 영향

1) OD314 과발현 construct의 제작

OD314의 ORF를 포함하는 cDNA를 진핵 세포 발현 vector인 pcDNA3의 EcoRI 절단 부위에 정상 단백 합성 방향으로 위치시킨 후 potent cytomegalovirus promoter (pCMV)를 부착시켜 construct를 제작하였다.

2) OD314 발현 억제 construct의 제작

김 등의 방법으로 제작한 OD314 siRNA construct를 본 실험에 이용하였다.

3) 법랑모세포 배양 및 transfection

법랑모세포 세포주를 5% FBS와 항생제가 함유된 MEM에 ascorbic acid와 EGF를 첨가하여 하루 동안 배양시켰다. 다음날 세포가 배양접시의 70-80%의 면적까지 증식한 것을 확인한 후 Lipofectamine reagent (Gibco BRL, Rockville, USA)와 plus reagent에 각각 U6-OD314 siRNA 플라스미드와 CMV-OD314 플라스미드를 혼합한 다음 OPTI-MEM (Gibco BRL, Rockville, USA)을 넣고 배양기에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 5-7시간 배양시켰다. 배양 후 5% FBS와 ascorbic acid 그리고 β-glycerophosphate가 포함된 MEM 배양액을 첨가 한 다음 배양기에서 하루 더 배양한 후 RNA를 추출하였다.

III. 실험결과

1. mRNA in-situ hybridization 소견

상악 제 1대구치의 치관이 형성되는 생후 7일의 발육중인 치아에서 OD314 mRNA는 상아모세포에서 발현되었으며, 법랑모세포에서는 더욱 강한 발현이 관찰되었다 (Figure 1).

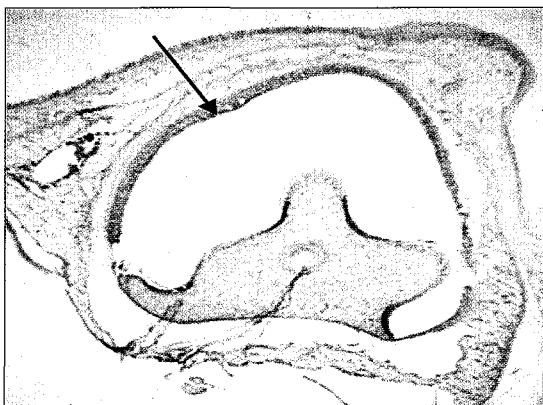


Figure 1. Maxillary molar of 1-week-old mouse hybridized with antisense cRNA probes of OD314. Intense signal for OD314 mRNA is detected in ameloblast (arrow).

2. 배양 법랑모세포 분화과정에서 OD314와 enamel matrix protein mRNA의 발현

법랑모세포 세포주에 ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 첨가한 후 28일의 배양과정에서 OD314 mRNA는 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 28일에도 강한 발현이 유지되었다 (Figure 2).

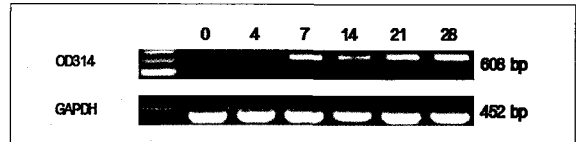


Figure 2. RT-PCR amplification of OD314 in the cultured ameloblast cell line up to 28 days.

Amelogenin과 enamelin은 7일부터 mRNA의 발현이 점차 감소하였고, tuftelin은 14일까지 발현이 지속되고, 그 이후부터 점차 감소하였다. ameloblastin은 28일까지 강한 발현이 지속되었다 (Figure 3).

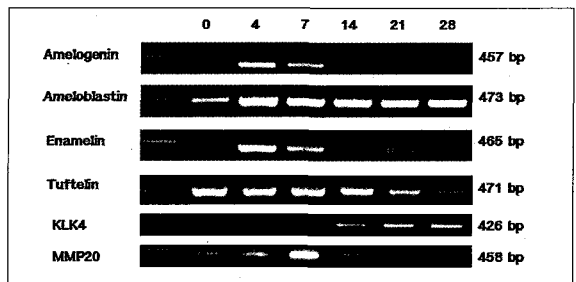


Figure 3. RT-PCR amplification of enamel matrix proteins in the cultured ameloblast cell line up to 28 days.

3. OD314의 과발현과 발현 억제가 법랑모세포 분화과정에 미치는 영향

CMV-OD314 construct를 transfection하여 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 OD314의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-OD314 siRNA construct를 transfection하여 OD314를 발현 억제시킨 경우에는 OD314는 관찰되지 않았다 (Figure 4).

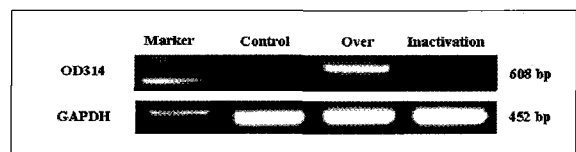


Figure 4. RT-PCR amplification of OD314 in ameloblast cell line after over-expression with CMV-OD314 plasmid and inactivation with U6-OD314 siRNA

법랑질의 matrix protein 중에 tuftelin은 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 tuftelin의 발현이 비슷하였으나, U6-314 siRNA를 transfection하여 OD314를 발현 억제시킨 경우에는 tuftelin은 관찰되지 않았다. 분해효소군 중 하나인 enamelysin (MMP-20)은 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 MMP-20의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-314 siRNA를 transfection하여 OD314의 발현을 억제시킨 경우에는 MMP-20는 관찰되지 않았다. 나머지 matrix protein은 control과 동일한 양상으로 발현되었다 (Figure 5).

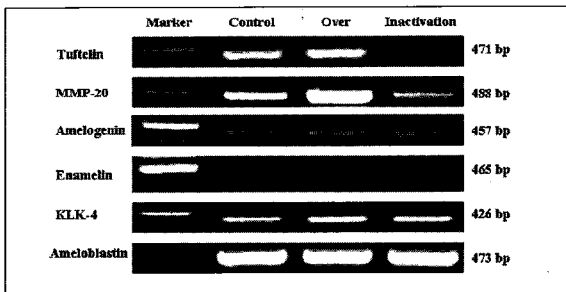


Figure 5. RT-PCR amplification of matrix protein in ameloblast cell line after over-expression with CMV-OD314 plasmid and inactivation with U6-OD314 siRNA.

IV. 총괄 및 고안

현재까지 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 수준까지 많이 진행되어 왔다. 치아발생의 초기에는 BMP, FGF, MSX1, PAX9 및 CBFA1 등의 여러 유전자들이 관여하는 것으로 알려졌으며 그들의 신호전달경로들에 관한 연구들도 활발히 진행되고 있다¹³⁾. 그러나 치아의 초기 발생과는 대조적으로 상아모세포와 법랑모세포 그리고 백악모세포의 분화를 조절하는 인자에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

본 논문에서 발생중인 생쥐 제1대구치 주변 조직 내에 OD314 mRNA의 분포를 확인하기 위하여 in-situ hybridization을 시행한 결과, OD314 mRNA는 상아모세포에서도 발현되었으나, 법랑모세포에서는 더욱 강한 발현이 관찰되었다. 이 결과는 박 등¹⁰⁾이 보고한 OD314는 상아모세포 뿐만 아니라 법랑모세포에서도 역할을 한다는 연구 결과와도 일치한다. 그리고 OD314가 법랑모세포에 더 강한 발현을 하는 것으로 보아 상아모세포 보다는 법랑모세포의 분화과정에 관여하는 인자로 볼 수 있다.

본 실험에서 사용한 법랑모세포 세포주는 Nakata 등¹⁴⁾이 C57BL/6J mouse의 하악대구치에서 얻은 세포주로, 일정한 조건에서 이 세포를 배양하면 세포들이 법랑모세포의 특

성을 나타낸다는 것을 RT-PCR 분석을 통하여 확인한 세포주이다. 또한, 본 실험에서 법랑모세포 세포주의 배양 과정도 Nakata 등¹⁴⁾의 석회화 결절 형성을 유도하는 실험 방법에 따라 이루어졌다.

법랑질의 유기바탕질은 비아교질 단백질로서 몇 종류의 법랑질 단백질과 효소로 구성된다. 법랑질 단백질 중에서 90%는 amelogenin인데 분자량이 작은 단백질 집단이다. 나머지 10%는 enamelin과 ameloblastin 같은 nonamelogenin 단백질이다¹³⁾. Nonamelogenin 단백질들은 결정 형성을 촉진하고 인도하는 반면, amelogenin은 결정의 두께와 폭 성장을 억제하는 것으로 여겨진다.

본 실험에서 법랑모세포 세포주를 배양하여 석회화 결절의 형성을 유도한 후 OD314, amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblastin, MMP-20, kallikrein-4 (KLK4) mRNA의 발현을 분석한 RT-PCR 분석에서 OD314 mRNA가 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지된 것은 OD314는 법랑모세포의 분화과정과 법랑질의 석회화 과정에 연관된다는 것을 암시하는 결과이다. 이 결과는 김 등⁸⁾이 사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양과정에서 OD314 단백질은 17KDa의 크기로 배양 시작부터 치수 세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일까지 유지되며, 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 더욱 증대되었다는 연구 결과와도 일치한다. 또한, amelogenin mRNA는 배양 시작 후 7일까지 발현이 유지되다가 점차 그 발현이 현저히 감소하였는데, 이는 amelogenin이 법랑모세포의 초기 분화과정이나 법랑질이 석회화되기 전 단계에서 분해효소에 의해서 길거나 짧게 잘려 저분자 조각이 된다는 보고¹³⁾와 부합한다. 또한 법랑질 단백질 중 tuftelin과 ameloblastin이 석회화와 관련이 있는 것으로 보고가 되고 있는데 본 연구에서 28일 배양과정에서 tuftelin과 ameloblastin은 석회화 결절이 형성되는 14일에는 발현이 더욱 증대되었다. 이 결과에서 OD314 단백질이 법랑모세포의 석회화과정에 깊은 관련성을 가지고 있는 단백질이라는 것을 유추할 수 있다. 그리고, MMP-20와 KLK4 proteinase 중 MMP-20 mRNA는 enamel organ의 상아모세포와 법랑모세포에서 검출되고¹⁵⁻¹⁶⁾, KLK4는 초기 maturation stage 동안의 법랑모세포에서 검출되었다고 보고¹⁷⁾되었는데 이는 본 실험 결과와 유사하였다.

RNAi (RNA interference)는 특정 유전자의 발현을 억제함으로써 나타나는 효과를 분석하여 역으로 그 기능을 추정하는 연구 방법으로, siRNA (small interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적으로 mRNA의 분해를 유도함으로써 단백질 합성을 차단하고 그 결과 유전자의 발현을 간접

작용하는 최신 기법이다¹⁸⁾. CMV promoter는 특정 유전자를 과발현 시키는데 널리 이용되고 있는 체계이다. 본 실험에서 OD314의 법랑모세포 분화과정에서의 역할을 규명하기 위하여 법랑모세포 세포주에 CMV-OD314 construct와 U6-OD314 siRNA construct를 이용하여 OD314의 과발현과 발현 억제를 유도하였다. OD314의 과발현을 유도하였을 때 OD314의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, OD314를 발현 억제 시킨 경우에는 OD314 mRNA의 발현이 관찰되지 않았다. 이는 법랑모세포 세포주에 대하여 OD314의 과발현과 발현 억제가 정상적으로 이루어지고 있음을 나타낸다. 그리고, U6-OD314 siRNA construct를 이용하여 transfection한 법랑모세포 세포주는 transfection하지 않은 법랑모세포 세포주보다 tuftelin과 MMP20 mRNA의 발현이 감소하였으며, CMV-OD314를 transfection하여 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 MMP20 mRNA의 발현이 뚜렷이 증대되었다.

Bartelett 등¹⁹⁾과 Fukae 등¹⁶⁾은 MMP20이 법랑질 분해 효소로서 관여한다고 하였으며, maturation stage 동안 MMP-20 null mouse에서 무기질이 현저히 감소한다는 Bartlett 등²⁰⁾의 보고가 있었다. 그리고 tuftelin은 처음에는 세포신호전달에 관여하고, 나중에는 무기질 침착에 관여한다는 보고와, tuftelin을 과발현 시켰을 때 enamel crystallite에 강한 영향을 준다는 Luo 등²¹⁾의 보고 등을 추론하여 종합하면 tuftelin과 MMP-20은 석회화와 유기기질 제거를 하는데 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. OD314 단백질이 CEOT의 Amyloid에서 발견된 것¹¹⁾은 OD314가 치아형성 즉 법랑질 형성과정과 깊은 관련이 있음을 의미하는 연구결과이며 이를 명확히 하기 위해서는 CEOT 표본을 이용한 체계적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 최근에 새롭게 알려진 OD314 즉 Apin protein 유전자의 발현을 분석하고, OD314 유전자의 과발현과 발현 억제가 법랑모세포의 분화에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. In-situ hybridization에서 OD314 mRNA는 발생중인 법랑모세포에서 강하게 발현되었다.
2. 법랑모세포 세포주의 분화과정에서 OD314 mRNA는 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지되었다.
3. 법랑모세포의 석회화 관련 유전자인 tuftelin은 석회화 결정이 형성되는 14일까지 발현이 지속되고, 그 이후부터 점차 감소하였다. 그리고 amelogenin, enamelin은

7일부터 그 발현이 점점 감소하였고, ameloblastin은 28일까지 강한 발현이 지속되었다.

4. U6-OD314 siRNA construct를 이용하여 transfection한 법랑모세포 세포주는 transfection 하지 않은 법랑모세포 세포주보다 OD314 mRNA를 비롯하여 tuftelin과 MMP20 mRNA의 발현이 감소하였으며, CMV-OD314를 transfection하여 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 OD314와 MMP20 mRNA의 발현이 뚜렷이 증대되었다.

본 연구 결과는 OD314가 법랑모세포의 분화와 법랑질의 형성 그리고 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 새로운 인자임을 시사한다. 그러나, 이를 보다 명확히 하기 위해서는 OD314에 대한 기능과 법랑모세포 관련인자들과의 상호연관성에 대한 향후 보완 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

1. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch oral Biol* 32:123-127, 1987.
2. D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, Macdougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1(Dmp1) and dentin sialophosphoprotein(DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 2040-2049, 1997.
3. Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 231:758-765, 2004.
4. Millar SE, Koyama E, Reddy ST, Andl T, Gaddapara T, Piddington R, Gibson CW. Over- and ectopic expression of Wnt3 causes progressive loss of ameloblasts in postnatal mouse incisor teeth. *Connective Tissue Res* 44:124-129, 2003.
5. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:128-161, 1998.
6. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signalling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 7:719-730, 2004.
7. Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Archiv Oral Biol* 46:249-260, 2001.
8. 김두현, 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. 상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능 연구. *대한치과보존학회지* 29(4):399-408, 2004.
9. 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현억제가 상아모세포 전구세포에 미치는 영향. *대한체질인류학회지* 17(2):121-129, 2004.
10. 박주철, 김익환, 김홍중, 정문진, 오현주, 정제호, 손호현, 원주상아모세포 분화과정에서 OD314의 역할. *대한체질인류학회지* 18(3):187-196, 2005.
11. Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Weiss DT, Hrucic R, Eulitz M, Donnell RL, Sletten K, Westermarck G, Westermarck P. Calcifying epithelial odontogenesis

- (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 142(5):348-355, 2003.
12. Garant PR. Oral cells and tissues. Quintessence publishing Co., Inc., Chicago, IL, p25-52, 2003.
 13. Nancy A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., Mosby, Inc., St. Louis, MI, p192-239, 2003.
 14. Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 308:834-839, 2003.
 15. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* 106:963-970, 1998.
 16. Fukae M, Tanabe T. Degradation of enamel matrix proteins in porcine secretory enamel. *Connect Tissue Res* 39:123-129, 1998.
 17. Hu JC, Ryu OH, Chen JJ, Uchida T, Wakida K, Murakami C. Localization of EMSP 1 expression during tooth formation and cloning of mouse cDNA. *J Dent Res* 79:70-76, 2000.
 18. Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNA: technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 99:5515-5520, 2002.
 19. Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 183:123-128, 1996.
 20. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Simith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 83(12):909-913, 2004.
 21. Luo W, Wen X, Wang H, MacDougall M, Snead ML, Paine ML. *In vivo* overexpression of Tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs* 177:212-220, 2004.

국문초록

법랑모세포 분화와 법랑질 형성과정에서 OD314, Apin protein의 발현 및 기능

박종태¹ · 최용석¹ · 김홍중¹ · 정문진¹ · 오현주¹ · 신인철¹ · 박주철¹ · 손호현^{2*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ²서울대학교 치과대학 치과보존학교실

본 연구에서는 법랑모세포 분화와 법랑질 형성에 연관이 있는 OD314 일명 Apin protein의 기능을 밝힐 목적으로, in-situ hybridization에 의한 OD314 mRNA 발현과 법랑모세포 세포주에서 OD314와 enamel matrix protein의 발현, 그리고 OD314 유전자를 과발현/억제시킬 수 있는 construct를 제작한 후 법랑질 형성 중에 OD314의 기능을 알아보기 위하여 RT-PCR를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. OD314 mRNA는 발생중인 상아모세포보다 법랑모세포에서 강하게 발현되었다.
2. Tuftelin은 석회화 결정이 형성되는 14일까지 발현이 지속되고, 그 이후부터 점차 감소하였다. Amelogenin과 enamelin은 7일부터 그 발현이 점점 감소하였다.
3. U6-OD314 siRNA construct를 이용하여 transfection한 법랑모세포 세포주는 OD314와 tuftelin, MMP20 mRNA 발현이 감소하였으며, CMV-OD314를 transfection하여 OD314의 과발현을 유도한 경우에는 OD314와 MMP20 mRNA의 발현이 뚜렷이 증대되었다.

이 결과는 OD314가 법랑모세포의 분화와 법랑질의 형성 그리고 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 새로운 인자임을 시사한다.

주요어: Apin protein, OD314, 석회화, 법랑모세포 분화, 법랑질 형성