

연골분화과정에서 닭 유래 연골기질 단백질 (CCMP 10)의 발현연구

오경애, 김흥중¹, 김성미, 박주철

조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ¹조선대학교 치과대학 구강해부학교실

간추림 : 본 연구는 닭 배아의 연골성 중간엽세포에는 존재하지 않으나 전연골 미분화 중간엽세포에서 특이하게 발현되는 것으로 알려진 유전자 CCMP 10을 이용하여, 전연골성 미분화 중간엽세포-특히 유전자 CCMP 10에 의한 단백질 합성 여부와 합성단백질의 세포와 조직 분포 그리고 배양 연골세포의 분화과정에서 CCMP 10의 발현 양상을 알아보기 위하여 GFP vector를 이용한 CCMP 10의 세포내 transfection과 CCMP 10 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 그리고 닭 배아의 미분화 중간엽세포의 micromass culture를 통하여 연골분화 과정에서 CCMP 10의 기능을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Transfection 실험에서 CCMP 10은 단백질을 합성하였으며 그 단백질들은 세포의 핵과 세포질에서 발현되었으나 그 발현 강도는 핵에서 더욱 현저하게 나타났다.
 2. 면역조직화학적 염색에서 CCMP 10 단백질은 연골 형성을 위한 전연골성 중간엽세포, 연골막, 긴뼈의 성장판의 정지층과 증식층에서 발현되었으나 하부 성숙 연골층과 비대 연골세포층에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다.
 3. CCMP 10 단백질은 배양 초기에서부터 발현되었으나 배양 3일에는 발현이 다소 감소하고 배양 5일째에는 급격하게 단백질 양이 감소하는 경향을 보였다. 제II형 교원질은 전연골 중간엽세포 단계에서는 전혀 발현되지 않았으나, 배양 1일 후부터 발현되어 배양 5일까지 시간이 지날수록 발현이 증가하는 양상을 보였다.
- 이상의 실험 결과를 요약하면 CCMP 10 단백질은 세포질 보다는 핵에서 현저하게 발현되며, 새로운 단백질로 연골분화의 초기에 관여하는 것으로 관찰할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 연골분화, 연골기질 단백질, 닭 배아

서 론

연골은 뼈가 생겨나기 전의 태생기에 일차 뼈대를 형성하여 신체 각 부위를 보호하는 역할을 한다. 태생기 이후에는 관절의 원반이나 또는 압력이 많이 가해지는 부위에 위치하여 외부의 힘에 저항하는 것과 같은 중요한 역할을 하는 조직이다. 연골 조직의 기질은 주로 제II형 교원질, 제IX형 교원질, 제XI형 교원질과 아그리칸 (aggrecan) 그리고 프로테오글리칸 (proteoglycan) 등의 풍부한 세포외기

질로 구성되어 있지만 혈관은 존재하지 않는 특성을 갖고 있다 (Chen 등 1993, Rombrug 등 2000, Farjanel 등 2001). 연골세포는 근육세포, 지방세포, 섬유모세포 및 골모세포 등과 마찬가지로 미분화 중간엽세포 (undifferentiated mesenchymal cell)가 모양이 변하고 빠르게 증식한 후 중간엽세포의 응축 (mesenchymal condensation)을 형성하는 과정을 통하여 분화하는데 최근에는 관절염과 같은 연골 질환의 증가추세와 더불어 연골분화 과정에 관여하는 유전자나 단백질들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Michael과 Gordon 1989, Cacedda 등 1995, Chris 등 1999).

교신저자 : 박주철 (조선대학교 치과대학 구강조직학교실)

현재까지 알려진 연골분화에 관여하는 인자들에 관한 연구는 주로 미분화 중간엽세포에는 존재하지 않으나 특이하게 발현하는 인자들과 연골 기질의 주성분인 제II형 교원질의 발현을 조절하는 전사인자에 집중되고 있다(Cheah 등 1991). 현재까지 알려진 연골분화 유도인자들로는 HLH (helical loop helix), CTGF (connective tissue growth factor), Sox9, Cbfa1 등이 있다 (Crombrugge 등 2000, Minina 등 2001, Yang과 Karsenty 2002). 특히 Sox9은 L-Sox5와 Sox6과 함께 중간엽세포의 응축과 초기 연골세포 분화시기에 제II형 교원질의 발현 그리고 연골모세포가 비대화 연골세포로 변해 가는 과정에 관여하는 인자로 알려져 있다. 또 다른 Sox9계 유전자인 L-Sox5와 Sox6 등이 있는데 이 유전자들은 Sox9과 같이 작용하여 연골분화를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lefebvre와 Crombrugge 1998, Crombrugge 등 2000, Kolettas 등 2001, Smits 등 2001, Yang과 Karsenty 2002, Szele 등 2002).

위와 같이 연골분화 과정에서 세포의 영향인자 및 세포내 조절인자 등에 관한 많은 연구에도 불구하고, 연골모세포의 분화를 직접 제어하는 분자생물학적 기전에 관하여는 명확히 규명되어 있지 않아서 기존의 인자들의 연골분화에서의 역할을 재조명하고 이와 연관된 다른 새로운 인자를 탐색하는 연구의 필요성이 대두되고 있다.

최근에 Park과 Ninomiya (2000, 2002)는 연골의 분화과정을 유도하는 인자가 연골 발생전 전연골성 미분화 중간엽세포 (prechondrogenic mesenchyme)에서

발현되어 연골 분화과정을 조절하고 연골이 분화한 후에는 그 발현이 감소할 것이라는 논리를 바탕으로 닭 배아에서 연골성 중간엽세포에는 존재하지 않으나 전연골 미분화 중간엽세포에서 특이하게 발현되는 유전자 Chicken Cartilage Matrix Protein 10 (CCMP 10)을 동정하여 그 유전자 서열을 확인하고 Northern 분석과 mRNA 인사이투 (in-situ hybridization) 연구를 통하여 CCMP 10이 전연골세포와 뇌조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 전연골성 미분화 중간엽세포-특이 유전자 CCMP 10의 추정 ORF (open reading frame)가 어떤 단백질을 합성하며 그 단백질이 세포와 조직에 어떻게 분포하고 배양 연골세포의 분화과정에서 어떤 발현 양상을 나타내는지 알아보기 위하여 GFP (green fluorescent-labelled protein) vector를 이용한 CCMP 10의 세포내 주입과 항 CCMP 10 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 그리고 닭 배아의 미분화 중간엽세포의 micromass culture를 통하여 연골분화 과정에서 CCMP 10의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. CCMP 10 ORF 플라스미드의 제작

Park과 Ninomiya의 105D3 cDNA (Fig. 1)를 주형으로 CCMP 10 ORF를 EcoR I site를 포함한 forward primer 5'-CGGAATTCATGGTTCAAATGGC-

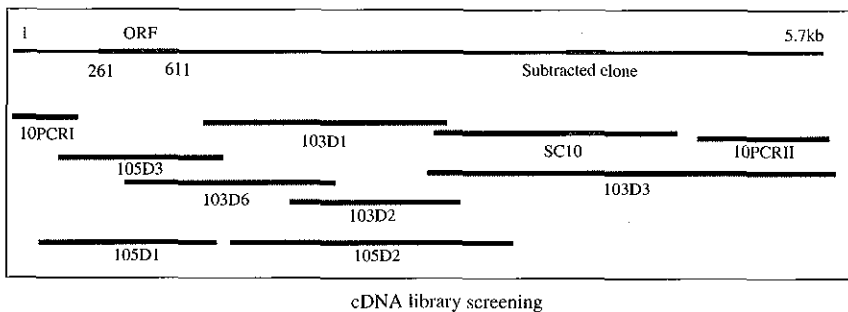


Fig. 1. Schematic representation of cDNA library screening of the chicken cDNA, CCMP 10.

ACACAA-3와 Sal I site를 포함한 reverse primer 5'-ACGCGTCGACAGGTACGTGGTGAC-TGC-TG-3'를 이용하여 PCR 증폭한 후 산물을 GFP expression vector (pEGFP-C2, #:U57606)에 subcloning하였다. Subcloning된 유전자 단편을 sequencing하여 염기서열을 재확인한 후 transfection 실험에 이용하였다.

2. Cell transfection

HEK 293T cell을 6.5×10^5 개씩 chambered coverglass (Nunc)에 넣고 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, USA)이 포함된 D-MEM 배양액 (Gibco BRL, USA)으로 하룻밤 동안 배양시켰다. 이튿날 배양액을 제거하고 OPTI-MEM (Gibco BRL, USA)을 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에 배양시켰다. E-tube에 Plus Reagent (Gibco BRL, USA) 10 µl와 pEGFP-CCMP 10 플라스미드를 2 µg씩 분주한 후 OPTI-MEM을 넣어 최종량이 100 µl로 맞춘 후 실온에서 15분간 방치시켰다. 새로운 E-tube를 준비하고 Lipofectamin (Gibco BRL, USA) 8 µl와 OPTI-MEM 92 µl를 넣은 후 pipetting하여 잘 섞은 후 첫 번째 E-tube에 들어있는 내용물을 옮겼다. 가볍게 vortexing하여 실온에 15분 정도 방치한 후 세포가 배양된 chambered coverglass를 꺼내어 OPTI-MEM 배양액을 제거하고 미리 준비해둔 Lipofec-

tamine reagent와 plus reagent에 pEGFP-CCMP 10 plasmid가 혼합된 내용물을 0.4 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 3시간 배양하였다. 3시간 후 10% Fetal Bovine Serum이 포함된 D-MEM 배양액을 0.4 ml 첨가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에 24시간 더 배양하여 단백질의 발현을 형광현미경 (BX50F-3, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

3. CCMP 10 단백질에 대한 항체의 제작 및 면역조직화학적 염색

1) 항체의 제작

CCMP 10 단백질의 폴리펩타이드 영역에서 펩타이드 ISNKYLBKRQSRD를 선택, 주문 합성하였다 (Fig. 2). 펩타이드들은 자동 펩타이드 합성기 (모델 430; Applied Biosystems, USA)의 보조하에 고상 질체를 사용하여 화학적으로 합성하였다. 합성 펩타이드를 MBS 커플링 방법에 의해 설프히드릴기를 통해 담체 폴리펩타이드인 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)에 접합시켰다. 1 ml의 완전 프로인트 보조제 (complete Freund's adjuvant)를 이용하여 KLH에 접합시킨 합성 펩타이드 항원용액 (100 µg/ml)을 안정하게 부유화 시킨 후 토끼 림프 결절에 주입하여 1차 면역시켰다. 3주 후 100 µg/ml의 항원으로 2차 면역 후, 다시 10일 후 50 µg/ml 항원 용액으로 3차 면역시켰다. 20일 후 귀의 이면 중추

261	ATGGTTCAAATGGCACACACAATAAAATGTTACCGGCAGCACACAGCTCCCCAAATCTT	320
	M V Q M A H T I K C Y R Q H T A P Q N I	
321	GCAGGCTCAATCATTTACAGTGGGCTCTGCACTCCTCCACTGCATCAGCAGCGCCAAAAT	380
	A G S I I Y S G L C T P F L H Q Q R Q N	
381	CAAAAAGCGCAGTGCCTTCCCTTCTGACCGCAACCCGAATGTGTGTGGGGGGTTCTGCTT	440
	<u>Q K A Q C F P S D R N P N V C G G V L I</u>	
441	TCAAAAAAGTACATGGACAAAAATCCAATGTTAGACACTAACATTTCCAGAGAATTCATA	500
	S K K V H G Q K S M L D T N I S R E F I	
551	GAAACTACTTGTCCATGCAAGTTGCAAAAGACACTTTTTCAAATGTGAAAAGAAGCACTT	611
	E T T C P C K L Q K T L F Q M *	

Fig. 2. Deduced amino acid sequences of cDNAs coding for a novel CCMP 10. The peptide which used for the antibody production are underlined.

동맥에서 채혈하여 얻은 다클론 항혈청은 CNBr-sepharose 4B (Amersham pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 친화성 정제 (Pepton, Korea)하였다.

2) 조직표본의 제작

닭의 유정란을 구입하여 100% 습도, $38 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 조건에서 배양기에 배양시켜 가면서 현미경으로 배아의 발생 단계를 결정하여 Hamburger-Hamilton stage 23, 27, 28과 발생 15일 닭 배아의 긴뼈(fetal long bone)를 4% paraformaldehyde 용액에 4°C 에서 12시간 동안 고정한 후, Phosphate Buffered Salin (PBS)로 2시간 세척하고 10% Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) 용액에 4°C 에서 2~4주간 탈회하였다. 탈회를 확인한 다음 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 알콜로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chlorform용액에서 2시간씩 4회 처리한 후 paraffin에 포매하였다. $6 \mu\text{m}$ 두께로 박절한 후, ethoxysilan-coated 슬라이드에 올려면역조직화학적 염색 때까지 4°C 에 보관하였다.

3) 면역조직화학적 염색

절편을 xylene으로 탈파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서로 함수 후, 0.1 M PBS로 두 차례 세척하고, 0.3% 과산화수소가 포함된 완충액 (Methanol 40 ml + 30% H_2O_2 0.4 ml)에서 20~30분 동안 endogenous peroxidase block 처리한 후 다시 PBS로 세 차례 세척하였다. 이 절편을 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin)가 함유된 PBS 용액을 사용하여 희석된 normal serum으로 20분 동안 예비 항은 처리한 뒤, PBS로 세척하였다. 단편을 1차 항체로서 normal serum을 사용하여 1:10의 비율로 희석한 항 CCMP 10 항혈청과 4°C 에서 하룻밤 동안 항은 처리하였다. PBS로 40분 동안 세척한 후, 단편을 2차 항체로서 0.5% BSA를 희석 (1drop/0.5% BSA sol 10 ml)한 염소 항토끼 IgG 항체 (Vector Lab, USA)와 실온에서 1시간 동안 항은 처리하였다. PBS로 20분 동안 세척한 후, 단편을 사용하기 30분전에 PBS로 희석한 ABC 시약 (Vector Lab, USA)과 45분 동안 반응시켰다. PBS로 20분 동안 세척한 후 0.05% DAB (Deaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색반응으로 발

색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 닭 배아 팔다리뼈의 미분화 중간엽세포의 micromass culture 및 Western 분석

현미경으로 배아의 발생 단계를 결정하여 Hamburger-Hamilton stage 23~24에 달하면 clean bench에서 종란의 배아를 꺼낼 부위를 알코올로 소독한 후 소독된 핀셋을 가지고 조심스럽게 꺼냈다. 미리 준비된 Tyrode 용액에 배아를 꺼내어 일정량에 이르도록 모았다. 머리와 다리 부위의 뼈를 절제하면서 새로운 Tyrode 용액으로 이동시킨 후 면도날(도루코) 두 개를 서로 겹치게 하는 작용으로 팔다리 뼈를 자른 후 0.5% trypsin tyrode 용액으로 읊긴 후 얼음 위에서 30~40분 방치해 두었다. 그리고 파스테르 피펫 (pasteur pipette)을 사용하여 상피를 제거하였다. 5 ml CMF tyrode용액 (Tyrode에서 CaCl_2 와 MgCl_2 를 제외)이 들어있는 15 ml centrifuge tube (Corning, USA)에 팔다리뼈를 읊긴 후 미리 준비된 37°C 수조에 40분간 방치하였다. 상청액을 제거한 후 1~2 ml의 2% Fetal bovine serum이 포함된 Ham's F-12 배양액 (Gibco BRL, USA)을 넣고 30회 정도 pipetting하면서 닭 배아의 중간엽세포를 분리하였다. 분리된 mesencymal cell의 수를 세어 2×10^7 Cell/ml를 35 mm cell culture plate (Nunc, Denmark)에 분주하여 37°C , 5% CO_2 incubator에 3시간 배양한 후 Ham's F-12 배양액 2 ml을 첨가하여 다시 배양하였다.

중간엽세포를 micromass culture법으로 1일, 2일, 3일, 5일 동안 배양한 후 배양 세포를 PBS로 3회 수세한 뒤 RIPA buffer (0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 2% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 4°C 에서 20분 동안 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (14% gel)를 시행하고 PVDF membrane (Pall corporation, USA)에 10V의 전압으로 40분 동안 transfer 하였다. Transfer된 PVDF membrane을 4°C 에서 16시간 동안 5% non-fat dry

milk/PBS-Tween 20으로 blocking한 뒤 PBS-Tween 20용액으로 5분간 수세하고 CCMP 10과 col2a1에 대한 1차 항체로 1시간 30분 반응시킨 다음 PBS-Tween 20용액으로 5분간 3회 수세하였다. Goat anti-rabbit IgG (Santa cruz Biotechnology, USA, 1 : 20,000)으로 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween 20용액으로 15분간 3회 수세하였다. Supersignal west Femto Maximum sensitivity substrate (Pierce, USA)로 2분간 반응시킨 후 암실에서 X-ray film (Fuji, Japan)으로 현상한 후 NIH program을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. CCMP 10 ORF의 단백질 합성 및 세포내 분포

CCMP 10 ORF의 transfection 실험에서 CCMP 10 ORF에 의하여 합성된 단백질들이 293T cell의 핵과 세포질에서 발현되었으나 그 발현 강도는 핵에서 더욱 현저하였다 (Fig. 3).

2. CCMP 10 단백질의 조직내 발현: 면역조직학적 염색

발생 3일의 stage 23 닭 배아의 팔다리씩 cross

section에서 CCMP 10 단백질은 연골 형성을 위한 전연골성 중간엽세포에서 강한 발현을 보였다 (Fig. 4). 또한, 발생 5~7일의 stage 27, 28의 prevertebrate에서 CCMP 10 단백질은 연골형성이 시작되는 전연골성 중간엽과 연골의 연골막에서 발현이 관찰되었으며 발생 15일의 긴뼈 연골에서 CCMP 10은 정지층과 증식층에서 발현되었으나 증식층 하부의 연골층과 비대 연골세포층에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다 (Figs. 5, 6, 7).

3. 연골세포 분화 과정에 따른 CCMP 10 단백질의 발현: Western 분석

CCMP 10 단백질은 배양 초기에서부터 발현되어 배양 기간동안 그 발현이 유지되었으나 배양 3일에는 발현이 다소 감소하고 배양 5일째에는 급격하게 단백질 양이 감소하는 경향을 보였다. 연골세포 분화의 표지자가 될 수 있는 col2a1은 전연골 중간엽세포 단계에서는 전혀 발현되지 않았으나, 배양 1일 후부터 단백질이 소량으로 검출되었으며 배양 2일 후부터는 col2a1의 발현 양이 증가하기 시작하여 배양 5일까지 시간이 지날수록 점점 증가하는 소견을 보였다 (Fig. 8).

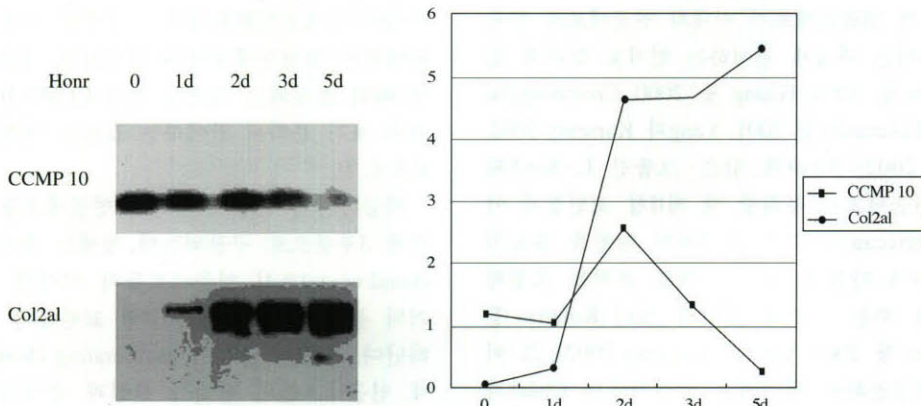


Fig. 8. Temporal changes in the translational activity of CCMP 10 and col2a1 in micromass culture of chicken limb bud mesenchymal cells. Proteins were analyzed by immunoblotting with anti-CCMP 10 and anti-col2a1. CCMP 10 was expressed as 11 kDa protein cultured cells.

고 찰

미분화 중간엽세포에 근육세포의 myoD와 myogenin 그리고 Myf5, 지방세포의 PPAR γ 2, 골모세포의 Cbfa1과 같은 분화 유도인자(master 유전자)가 작용하여 다른 전사인자나 표현형-특이 유전자들의 발현을 개시하고 조절함으로써 미분화 중간엽세포로부터 다양한 세포로 분화가 이루어진다. 연골 분화 즉 중간엽세포가 연골모세포로 분화하는 과정에서도 특정한 유전인자의 존재를 충분히 가정할 수 있다. 특정 분화유도인자의 작용에 의하여 연골모세포가 분화한다면, 그 분화 유도인자는 연골-특이 유전자 가운데 가장 빠른 시기에 출현하며 연골모세포에서 특징적으로 발현되는 제II형 교원질 유전자 보다 앞서서 발현되어 연골 분화를 개시하고 다양한 전사인자와 유전자들의 발현을 순차적으로 조절한다고 생각 할 수 있다 (Hiraki 등 1991, Cacedda 등 1995, Farjanel 등 2001). 현재까지 알려진 연골분화 유도인자들로는 HLH (helical loop helix), CTGF (connective tissue growth factor), Sox9, Cbfa1 등이 있다 (Crombrugge 등 2000, Minina 등 2001, Yang과 Karsenty 2002, Gerstenfeld 등 2002). 특히 Sox9은 중간엽세포의 응축과 전비후 연골세포 (prehypertrophic chondrocytes)에서 강한 발현이 나타나는데, 연골세포 분화 초기에 제II형 교원질 발현과 함께 연골모세포가 비대화 연골세포로 변화되고 유지되는 과정에 관여하는 인자로 알려져 있다 (Lefebvre 등 1998, Huang 등 2000, Crombrugge 등 2000, Takahashi 등 2001, Yang과 Karsenty 2002, Szele 등 2002). Sox9과 같은 그룹인 L-Sox5와 Sox6는 연골세포가 분화할 때 제II형 교원질과 아그리칸 (aggrecan)과 같은 유전자의 발현을 유도시키며, Sox9과 마찬가지로 연골세포 분화를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Kolettas 등 2001, Smits 등 2001, Yang과 Karsenty 2002). 그 이외에도 연골분화에 관여하는 유전자에는 Cbfa1과 Runx2 등이 있는데, 연골에서 Cbfa1의 발현은 전비후 중간엽세포에 제한되어 있으며 연골세포의 비대화에 꼭 필요한 유전자로 알려져 있다 (Nicolle 등

2001, Nakashima 등 2002, Stricker 등 2002). 위와 같이 연골 분화과정에서 세포의 영향 인자 및 세포내 조절인자 등에 관한 많은 연구에도 불구하고, 연골모세포 분화를 직접 제어하는 분자생물학적 기전에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

최근에 Park과 Ninomiya (2000, 2002)가 특이하게 발현되는 유전자 CCMP 10을 동정하고 Northern 분석과 in-situ hybridization 연구를 통하여 CCMP 10이 전연골세포와 뇌조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 보고한 논문을 바탕으로 본 연구에서는 CCMP 10 유전자가 단백질 합성하는지 알아보기 위하여 세포에 transfection을 하였는데 핵과 세포질에서 발현되는 것으로 확인되었으며, 그 발현 정도가 세포질보다 핵에서 강하게 발현되는 것으로 보아 CCMP 10은 핵단백질로 추정되었다 (Fig. 3).

연골세포는 발생과정에서 중간엽세포로부터 분화하여 연골조직을 형성한다. 다른 유형의 조직과는 달리 연골조직은 연골세포 한 종류만으로 구성되어 있으며, 관절연골과 같이 영구적인 연골조직으로 남아있거나 발생과정에서 뼈 형성을 위한 주형으로 작용한다. 즉 연골내골화 (endochondral bone formation) 과정에서 분화된 연골세포는 비대 연골세포로 성숙되고 이어 세포사멸에 의해 빈 공간을 남기게 되면 이 공간을 따라 혈관이 형성되어 조골세포가 유입됨으로서 뼈를 형성하게 된다.

본 연구에서 CCMP 10 단백질에 대한 항체를 제작하여 면역조직화학적으로 염색한 결과 CCMP 10 단백질은 전연골세포에서 발현되고, 연골이 분화함에 따라 소실되는 것으로 보아 CCMP 10 단백질은 연골 초기 분화에 관여하는 것으로 생각된다 (Figs. 4, 5, 6, 7).

지금까지의 연구에 의하면 연골세포들의 집단은 크게 3부분으로 구분되는데, 첫째는 휴지기 (resting chondrocyte)로서 연골세포들의 크기가 매우 작고 거의 분화하지 않으며 제II형 교원질의 발현이 나타난다. 둘째는 증식기 (proliferating chondrocyte)인데, 연골세포들의 활발한 분열과 증식이 나타나고 제II형 교원질, 아그리칸 그리고 CMP 유전자의 발현이 나타나며 제II형 교원질의 발현이 점점 감소하는 경향을 보인다. 마지막으로 비후기 (hyper-

trophic chondrocyte)로서 연골세포가 비대해지고 성숙해지며 제IX형 교원질의 발현이 나타난다(Crombrugge 등 2000, Carlberg 등 2001, Yang과 Karsenty 2002). 본 연구에서는 발생단계의 판정이 용이한 닭 배아를 이용하여, Hamburger-Hamilton stage 23-24에 달한 중간엽세포를 micromass culture법을 통하여 배양된 세포에서 추출한 단백질을 western 분석한 결과 CCMP 10의 단백질이 col2a1 단백질에 비하여 초기에 나타나는 것으로 보아 CCMP 10이 연골분화 초기에 중요한 역할을 하는 인자임을 재증명하였다.

본 연구는 닭 배아에서 연골성 중간엽세포에는 존재하지 않으나 전연골 미분화 중간엽세포에서 특이하게 발현되는 것으로 알려진 유전자 CCMP 10을 이용하여, 전연골성 미분화 중간엽세포-특이 유전자 CCMP 10에 의한 단백질 합성 여부와 합성 단백질의 세포와 조직 분포 그리고 배양 연골세포의 분화과정에서 CCMP 10의 발현 양상을 알아보기 위하여 GFP vector를 이용한 CCMP 10의 세포 내 transfection과 CCMP 10 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 그리고 닭 배아의 미분화 중간엽세포의 micromass culture를 통하여 연골분화 과정에서 CCMP 10의 기능을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Transfection 실험에서 CCMP 10은 단백질을 합성하였으며 그 단백질들은 세포의 핵과 세포질에서 발현되었으나 그 발현 강도는 핵에서 더욱 현저하게 나타났다.

2. 면역조직화학적 염색에서 CCMP 10 단백질은 연골 형성을 위한 전연골성 중간엽세포, 연골막, 긴 뼈의 성장판의 정지층과 증식층에서 발현되었으나 하부 성숙 연골층과 비대 연골세포층에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다.

3. CCMP 10 단백질은 배양 초기에서부터 발현되었으나 배양 3일에는 발현이 다소 감소하고 배양 5일째에는 급격하게 단백질 양이 감소하는 경향을 보였다. 제II형 교원질은 전연골 중간엽세포 단계에서는 전혀 발현되지 않았으나, 배양 1일 후부터 발현되어 배양 5일까지 시간이 지날수록 발현이 증가하는 양상을 보였다.

본 연구를 통해 CCMP 10은 새로운 단백질로 연골 분화의 초기에 관여함을 밝혔다. 그러나 앞으로 CCMP 10 유전자의 연골분화 과정에서 기능을 분자생물학적으로 명확히 이해하기 위해서는 CCMP 10 mRNA를 제거하여 연골분화 과정의 변화를 알아보는 RNAI 처리와 CCMP 10 유전자를 과량 발현(over expression)하여 중간엽세포에서 연골세포의 분화가 유도되는지를 확인하는 등의 보완 실험이 필요할 것으로 사료된다.

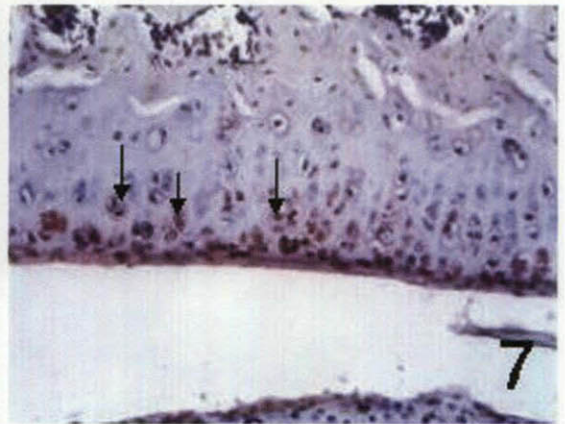
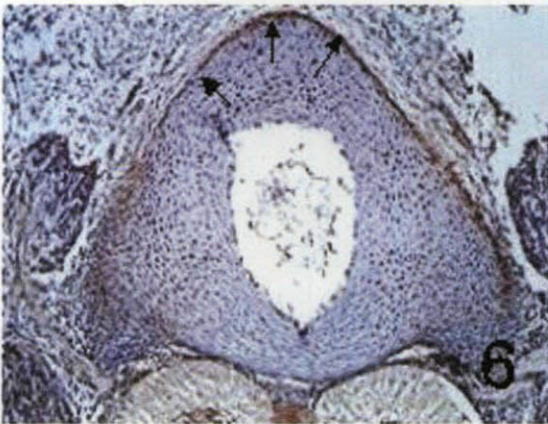
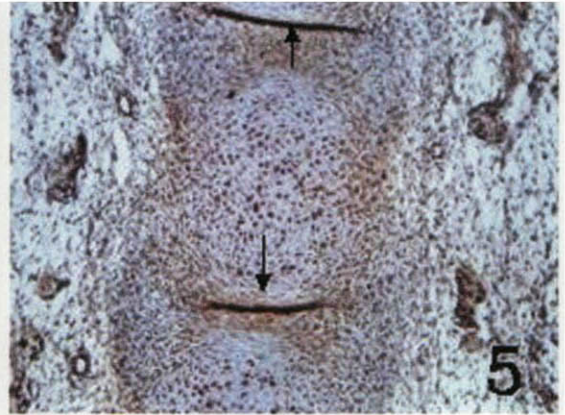
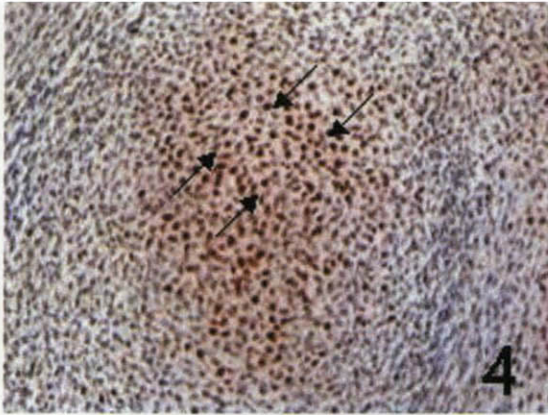
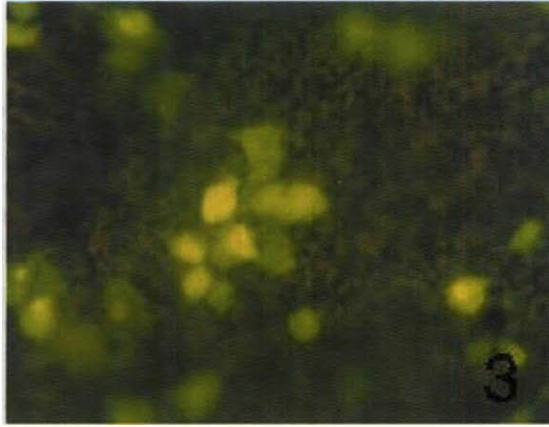
참고문헌

- Cacedda R, Camcedda FD, Castagnola P : Chondrocyte Differentiation. *Int Review Cytol* 159 : 265-359, 1995.
- Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ : Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 67(4-5) : 128-138, 2001.
- Cheah KSE, Lau ET, Au PKC, Tam PPL : Expression of the mouse 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development* 111 : 945-953, 1991.
- Chen P, Yu YM, Reddi AH : Chondrogenesis in chick limb bud mesodermal cells: Reciprocal modulation by activin and inhibin. *Experimental Cell Research* 206(1) : 119-127, 1993.
- Chris H, Dafe U, Paul TS : Regulation and Role of Sox 9 in Cartilage Formation. *Develop Dynamics* 215 : 69-78, 1999.
- De Crombrugge B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W : Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology (Mini review)* 19(5) : 389-394, 2000.
- Farjanel J, Schurmann G, Brucker P : Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 9(a) : S55-S63, 2001.
- Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Eintorn TA : Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone and Mineral Res* 17(2) : 221-229, 2002.
- Hiraki Y, Tanaka H, Kondo J, Kamizono A, Suzuki F : Mole-

- cular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 971-977, 1991.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, De Crombrughe B : Phosphorylation of Sox9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances Sox9's ability of transactivate Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 20 : 4149-4158, 2000.
- Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, Hardingham TE : Chondrocyte phenotype and survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor. *Rheumatology (Oxford)* 40(10) : 1146-1156, 2001.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B : A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17 : 5718-5733, 1998.
- Michael JS, Gordon LEK : Multiple zone in the sequence of calretium (CRP55, Calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 8 : 3581-3586, 1989.
- Minina EM, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A : BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128 : 4523-4534, 2001.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Deng JM, Beringer RR, De Crombrughe B : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108 : 17-29, 2002.
- Nicoll SB, Wedrychowska A, Smith NR, Bhatnagar RS : Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect Tissue Res* 42(1) : 59-69, 2001.
- Park JC, Ninomiya Y : Cloning of a novel chicken cDNA expressed in prechondrogenic mesenchyme. *J. Dental Res (Abst)* 79 : 301, 2000.
- Park JC, Ninomiya Y : Cloning of the chondrogenic factors. *Tokyo Biochem Res Foundation (Abst)* : 1-14, 2000.
- Park JC, Ninomiya Y : Isolation and expression of novel chicken cDNAs from prechondrogenic mesenchyme. *J Dental Res (Abs)* 81 : 105, 2002.
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, De Crombrughe B, Lefebvre V : The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1 : 277-290, 2001.
- Striker S, Fundele R, Vortemp A, Mundlos S : Role of Runx Gene in chondrocyte differentiation. *Develop Biol* 245(1): 95-108, 2002.
- Szele FG, Chin HK, Rowson MA, Cepko CL : Sox-9 and cDachsund-2 expression in the developing chick telencephalon. *Mech Dev* 112(1-2) : 179-182, 2002.
- Takahashi K, Nuckolls GH, Takahashi I, Nonaka K, Nagata M, Ikura T, Slavkin HC, Shum L. : Msx2 is a repressor of chondrogenesis of cranial neural crest cells. *Dev Dyn* 222 : 252-262, 2001.
- Yang X, Karsenty G : Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends in molecular Medicine* 8(7) : 340-345, 2002.

Legends for Figures

- Fig. 3.** CCMP 10 protein expression in transfected HEK 293T cells : I ($\times 400$). CCMP 10 protein was expressed in the nucleus and cytoplasm of the HEK 293T cell. HEK 293T cells were cotransfected with pEGFP-CCMP 10 plasmid.
- Fig. 4.** Immunohistochemical localization of CCMP 10 protein in developing chicken embryo of H-H stage 23 ($\times 200$). CCMP 10 protein was observed in the mesenchymal cell condensation (arrows). Section was counterstained with hematoxylin.
- Fig. 5.** Immunohistochemical localization of CCMP 10 protein in developing chicken embryo of H-H stage 27 ($\times 100$). CCMP 10 was expressed in the prechondrogenic mesenchyme and developing chondroblasts of developing chicken vertebrate(arrows). Section was counterstained with hematoxylin.
- Fig. 6.** Immunohistochemical localization of CCMP 10 protein in developing chicken embryo of H-H stage 28 ($\times 100$). CCMP 10 was expressed in the perichondrium and developing chondroblasts of developing chicken vertebrate(arrows). Section was counterstained with hematoxylin.
- Fig. 7.** Immunohistochemical localization of CCMP 10 protein in developing chicken embryo of 15 days ($\times 100$). CCMP 10 immunoreactivity was observed in the resting and proliferative zone of the developing chicken epiphyseal growth plate(arrows). Section was counterstained with hematoxylin.



Korean J Phys Anthrop
16(1): 15 ~ 25, 2003

Abstract

Expression of Chicken Cartilage Derived Matrix Protein 10 (CCMP 10) in Chondrogenesis

Kyoung Yai Oh, Heung Joong Kim¹, Sung Mi Kim, Joo Cheol Park

*Department of Oral Histology, ¹Department of Oral Anatomy, College of Dentistry,
Chosun University, Kwangju, Korea*

Over the past few years, considerable progress has been achieved about the extracellular elements and intracellular regulatory molecules that are involved in the regulation of chondrogenesis. However, little is known about the molecular mechanism of how these molecules influence the gene activities during cartilage differentiation. Recently we isolated a Chicken Cartilage derived Matrix Protein (CCMP 10), a novel protein, from chicken prechondrogenic mesenchyme. To further understand the function of CCMP-10 in cartilage development, we investigated the expression of CCMP-10 during the prechondrocyte differentiation in chick embryos and micromass cultured prechondrogenic cells, using a variety of methods such as transient transfection of CCMP 10, immunohistochemical localization, northern analysis, and western analysis. When transiently transfected, CCMP 10 was expressed in both nucleus and cytoplasm, with stronger intensity in the nucleus. In an immunohistochemical study, CCMP 10 was expressed in prechondrogenic mesenchymal cell, perichondrium, and resting and proliferative zone of the growth plate of long bone, while no expression of CCMP 10 was observed in upper mature chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Northern analysis of micromass cultured prechondrogenic cells showed the expression of CCMP-10 mRNA for first 2 days, while Col 2a1, aggrecan, and CMP mRNAs, known genes to express in mature chondrocyte, initiated the expression at day 2 and continued to express by day 5. In western analysis, CCMP-10 was detected at initial stage and continued to express by day 3, while Col 2a1 protein began to express only one day after, and continued to express. Taken together, our data suggest that CCMP-10 may play a significant role in the early cartilage development.

Key words : Cartilage differentiation, Chicken Cartilage derived Matrix Protein (CCMP 10), Chick embryo