

상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능 연구

김두현¹ · 김흥중¹ · 정문진¹ · 손호현³ · 박주철^{1,2*}

조선대학교 치과대학 구강조직학교실¹ 및 BK21², 서울대학교 치과대학 치과보존학교실³

ABSTRACT

EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ODONTOBLAST-DERIVED GENE: OD314

Doo-Hyun Kim¹, Heung-Joong Kim¹, Moon-Jin Jeong¹, Ho-Hyun Son³, Joo-Cheol Park^{1,2*}

¹Department of Oral Histology and ²BK21, School of Dentistry, Chosun University,

³Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

Odontoblasts are responsible for the formation and maintenance of dentin. They are known to synthesize unique gene products including dentin sialophosphoprotein (DSPP). Another unique genes of the cells remain unclear.

OD314 was isolated from the odontoblasts/pulp cells of rats and partially characterized as an odontoblast-enriched gene (Dey *et al.*, 2001). This study aimed to elucidate the biological function of OD314, relating to odontoblast differentiation and dentinogenesis. After determining the open reading frame (ORF) of OD314 by transient transfection analysis using green fluorescent protein (GFP) expression vector, mRNA *in-situ* hybridization, immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western analysis were performed.

The results were as follows:

1. In *in-situ* hybridization, OD314 mRNAs were expressed in odontoblasts of developing coronal and root pulp.
2. OD314 was a novel protein encoding 154 amino acids, and the protein was mainly expressed in cytoplasm by transient transfection analysis.
3. Mineralized nodules were associated with multilayer cell nodules in the culture of human dental pulp cells and first detected from day 21 using alizarin-red S staining.
4. In RT-PCR analysis, OD314, osteocalcin (OC) and DSPP strongly expressed throughout 28 days of culture. Whereas, osteonectin (ON) mRNA expression stayed low up to day 14, and then gradually decreased from day 21.
5. Western blots showed an approximately 17 kDa band. OD314 protein was expressed from the start of culture and then increased greatly from day 21.

In conclusion, OD314 is considered as an odontoblast-enriched gene and may play important roles in odontoblast differentiation and dentin mineralization. [J Kor Acad Cons Dent 29(4): 399-408, 2004]

Key words : Odontoblast, OD314, Dentin, Differentiation, Mineralization

* Corresponding author: Joo-Cheol Park

Department of Oral Histology,
School of Dentistry, Chosun University
375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, Korea, 501-759
Tel : 82-62-230-6874 Fax : 82-62-224-3706
E-mail : jcapark@chosun.ac.kr

I. 서 론

상아모세포는 상아질을 형성하고 유지하는 세포이다¹⁾. 상아모세포는 정상적인 치아 발생과정에서는 상피-간엽의 상호 유도 작용에 의하여 치유두의 외배엽성 간엽세포에서 유래한다. 또한, 치아 우식증과 같은 병리적인 상황에서는 치

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10141-0)지원으로 수행되었음.

수의 세포가 상아모세포양 세포로 분화하여 수복 상아질을 형성한다²⁾. 그러나 상아모세포의 분화과정이나 상아질의 형성 과정을 조절하는 인자나 관련 분자 생물학적 기전에 관하여는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다. 상아모세포의 분화와 관련한 인자들로는 transforming growth factor- β (TGF- β)³⁻⁵⁾, dentin matrix protein 1 (DMP1)^{6,7)}, growth and differentiation factor 11 (Gdf11)⁸⁾, connective tissue growth factor (CTGF)⁹⁾ 그리고 그 외 몇몇 관련 인자¹⁰⁻¹²⁾가 있으나, 이 인자들은 골모세포를 포함한 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로 생각할 수 있으며 상아모세포의 분화에 선택적으로 관여한다고 볼 수 없다.

최근에 골모세포-특이 단백질인 Osterix (Osx)가 골모세포의 분화와 골 형성을 조절하는 인자라는 연구 결과에서도 알 수 있듯이¹³⁾, 각 각의 세포의 분화를 조절하는 인자는 세포-특이 유전자와 깊은 관련을 갖는 경우가 대부분이다. 상아모세포의 특이 인자로는 dentin sialophosphoprotein (DSPP)이 잘 알려져 있으나 이 인자가 상아모세포의 분화나 상아질 형성과정에서 핵심적인 역할을 하는 근거는 아직 보고 되지 않고 있다¹⁴⁻¹⁹⁾. 따라서 상아모세포에는 상아모세포의 분화를 조절하는 현재까지 알려져 있지 않은 또 다른 인자가 존재한다고 생각할 수 있다. 최근에 Dey 등²⁰⁾이 두 개골의 골모세포와 치유두 세포에서는 발현되지 않고 상아모세포/치수세포에서 주로 발현되는 상아모세포-유래 유전자 OD314 cDNA를 suppression subtractive hybridization 방법으로 동정하였다. Northern 분석을 통하여 OD314가 골 조직을 포함한 신체의 다른 조직에는 존재하지 않고 상아모세포에 독특하게 발현된다고 보고하였으나 상아모세포에서 OD314의 기능에 관하여는 아직까지 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

본 연구의 일차적인 목표는 상아모세포의 분화와 상아질의 형성 과정에서 OD314의 역할을 밝혀냄으로서 궁극적으로 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정을 조절하는 분화 유도 인자 탐색에 그 결과를 응용 하고자 하는 것이다. 새로운 상아모세포 특이 유전자인 OD314의 단백질 합성 여부, 조직내에서 mRNA와 단백질의 발현 분포 그리고 치수세포의 상아모세포 분화과정에서 OD314의 발현 변화를 cell transfection, mRNA *in-situ* hybridization, 면역조직화학, RT-PCR 및 western 분석 방법으로 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. mRNA *in-situ* hybridization

1) 조직 표본제작

생후 7일, 21일, 40일의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 각

각 5마리씩 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정 시킨 후 하악과두를 포함한 하악골을 적출하여 4℃, 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 재 고정하였다. 10% EDTA (pH 7.4) 용액에서 2주에서 4주간 탈회하고 통법에 따라 파라핀 포매 하고 5 μ m 두께로 전치부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 직각되게 박절한 후 mRNA *in-situ* hybridization과 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

2) *In-situ* hybridization

1197 bp의 OD314 cDNA를 선형화하고 Proteinase K 처리 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 작성하였다.

다양한 발생 시기의 절편들을 이용하여 OD314 유전자의 cRNA 탐침자를 50℃에서 16시간 hybridization 하였다. Hybridization 후 절편을 세척하고 anti-Dig antibody를 1:88으로 Dig buffer I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)에 희석하여 4℃에서 30분간 처리하였다. Dig buffer II (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM MgCl₂)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/ BCIP)로 발색하고 Dig buffer IV (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)로 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2. OD314 ORF의 transient transfection

1) OD314 추정 ORF의 플라스미드의 제작

Dey 등²⁰⁾의 OD314 cDNA (Figure 2)를 template로 long open reading frame (ORF) construct는 EcoR I site를 포함한 forward primer 5'-CGGAATTCATGAAAATTATAATTCTT-3'와 Sal I site를 포함한 reverse primer 5'-ACGCGTTCGACATCAGTGAAGAGGCTTTA-3' 그리고 short ORF construct는 EcoR I site를 포함한 forward primer 5'-CGGAATTCATGTCCTATGTGGTTCCTGTAAAA-3'와 Sal I site를 포함한 reverse primer 5'-ACGCGTTCGACATCAGTGAAGAGGCTTTA-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 6.5×10^6 개씩 chambered cover-glass (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)에 넣고 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)이 포함된 DMEM 배양액 (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)으로 하루밤 배양시켰다. 이튿날 OPTI-MEM (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 배양액으로 교체한 후 Lipofectamine Plus Reagent (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 pEGFP-OD314 long ORF construct plasmid와 pEGFP-OD314 short ORF construct plasmid를 HEK 293T 세포에 transfection 하였다. 5시간 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액 (Gibco BRL, Rockville, USA)을 0.4ml 첨가 한 후 37℃, 5% CO₂의 조건에서 24시간 더 배양 한 후 형광현미경 (IMT2-21, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

3. 항체의 제작 및 면역조직화학적염색

1) 항체의 제작

OD314 단백질의 폴리펩타이드 영역에서 펩타이드 STP-STSPKPDGTGNF와 PEQKVNADSLREP를 선택 주문 합성하였다 (Figure 2). 1 ml의 완전 프로인트 보조제 (complete Freund's adjuvant)를 이용하여 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)에 접합시킨 합성 펩타이드 항원용액(100 µg/ml)을 안정하게 부유화시킨 후 토끼 림프 결절에 주입하여 1차 면역 시켰다. 3주 후 100 µg/ml의 항원으로 2차 면역 후, 다시 10일 후 50 µg/ml 항원 용액으로 3차 면역 시켰다. 20일 후 귀의 이면 중추 동맥에서 채혈하여 얻은 다클론 항혈청은 CNBr-sepharose 4B (Amersham pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 친화성 정제 (Peptron, Daejeon, Korea)하였다.

2) 면역조직화학적 염색

In-situ hybridization때 사용된 것과 동일한 절편을 normal serum을 사용하여 1:100의 비율로 희석한 OD314 항혈청 (1차 항체)으로 4℃에서 하루밤 동안 항온 처리하고 PBS로 40분 동안 세척한 후 2차 항체로서 0.5% BSA로 희석 (1drop/0.5% BSA sol 10 ml)한 염소 항토끼 IgG항체 (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)와 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. ABC 시약 (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)과 45분 동안 반응시킨 후 0.05% DAB (Deaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색반응으로 발색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 배양 치수세포의 OD314 발현 분석

교정 치료를 목적으로 발치된 20대 환자의 상악 소구치의 치수 조직을 무균상태에서 항생제가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 용액으로 수회 세척한 후 해부현미경하에서 1-2 mm³ 정도의 크기로 자른 다음, 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, NY, USA)을 이용하여 5% CO₂, 37℃, 100% 습도 상태의 세포배양기에서 일차 배양하였다. 일차 배양된 세포들을 계대 배양하여 2계대의 세포를 실험에 이용하였다.

1) 석회화 결절의 형성 확인

세포들을 ascorbic acid (50 µg/ml)와 β-glycerophosphate (10 mM)를 함유한 DMEM 배양액을 이용하여 28일간 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 21일 그리고 28일 후 3 × PBS로 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizalin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액으로 5분간 염색하였다.

2) RT-PCR 분석

세포들을 ascorbic acid (50 µg/ml), β-glycerophosphate (10 mM)와 dexametasone (5 µM)을 투여하면서 28일간 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일, 14일, 21일 그리고 28일 후 Trizol reagents (Gibco BRL, Rockville, USA)를 이용하여 각 각의 세포에서 total RNA를 추출하였다. 각 각의 RNA들을 역전사효소 (Reverse Transcriptase of Avian Myeloblastosis Virus, Life Sciences, USA) 15U를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였다. First strand cDNA와 OD314, DSPP, osteocalcin (OC), osteonectin (ON), GAPDH 특이적 프라이머 (Table 1)를 이용하여 PCR (Polymerase chain reaction) 증폭을 시행하였다.

PCR 조건은 95℃에서 1분, 60℃에서 45초, 72℃에서 1분간의 사이클을 30회 실시하였다. PCR 생성물을 2.0% 아가로스겔에서 전기영동하여 유전자들의 발현을 확인하였다.

3) Western 분석

사람 치수세포를 각 각 1일, 4일, 7일, 14일, 21일, 28일 동안 배양한 후 배양 세포에서 단백질을 추출하였다. 단백질 정량 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (14% gel)를 시행한 후 PVDF mem-

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primer sets

	Protein	Primer sequence (5'-3')	size (bp)	Tm (°C)
OD314	S422-446	ATGTCCTATGTGGTTCCTGTAAAA	593	55
	AS1015-986	ATGAGATCAGTGAAGAGGCTTTATATACTT		
GAPDH	S386-402	CCATGGAGAAGGCTGGG	195	55
	AS580-561	CAAAGTTGTCATGGATGACC		
OC	S19-39	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	303	66
	AS321-301	CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG		
ON	S1240-1255	ACATGGGTGGACACGG	405	52
	AS1644-1627	CCAACAGCCTAATGTGAA		
DSPP	S784-802	AATGGGACTAAGGAAGCTG	814	54
	AS1597-1580	AAGAAGCATCTCCTCGGC'		

DSPP, dentin sialophosphoprotein; OC, osteocalcin; ON, osteonectin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

brane에 10V의 전압으로 40분 동안 transfer 하였다. transfer된 PVDF membrane을 4℃에서 16시간 동안 5% non-fat dry milk/PBS-Tween20으로 blocking한 뒤 PBS-Tween20용액으로 5분간 수세한 후 OD314에 대한 1차 항체로 1시간 30분 반응시킨 다음 PBS-Tween20용액으로 5분간 3회 수세하였다. Goat anti-rabbit IgG (Santa cruz Biotechnology, USA)를 1 : 20,000의 배율로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween20용액으로 15분간 3회 수세하였다. Supersignal west femto maximum sensitivity substrate (Pierce, USA)로 2분간 반응시킨 후 암실에서 X-ray film (Fuji, Minamoto, Tokyo, Japan)으로 현상하여 관찰하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. OD314 ORF의 구조 및 세포내 단백질 발현 양상

OD314의 추정 long ORF construct (836bp: nucleotides 48-884)와 short ORF construct (462bp: nucleotides 423-884)의 transfection 실험에서, 단백질의 합성 발현은 short ORF construct를 transfection한 세포의 세포질에서 관찰되었다 (Figure 1).

1197 bp의 OD314 염기 서열과 transfection 실험 결과로 short ORF 영역의 아미노산 서열을 추론한 결과 OD314는 nucleotide 423에서 884까지 154 아미노산을 합성하는 새로운 유전자로 확인되었다 (Figure 2).

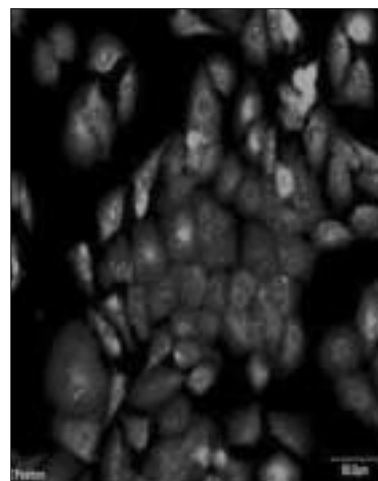


Figure 1. OD314 protein expression in short-ORF transfected HEK 293T cells (× 400). OD314 protein are expressed in the cytoplasm of the HEK 293T cell.

2. mRNA *in-situ* hybridization 소견

흰쥐 하악 제1대구치의 치근 형성 시기인 생후 7일의 조직표본에서 OD314 mRNA는 발생중인 치관부와 치근부의 상아모세포에서 특이적으로 강하게 발현되었다 (Figures 3, 4). 그러나 hybridization 과정에서 OD314 cRNA와 Digoxigenin 이차 항체를 사용하지 않은 음성 대조군에서는 OD314 mRNA의 발현을 관찰할 수 없었다 (Figure 5).

```

1  CCGGCAAGGT CACAGATCTTACAAAGAAATAAGGTATATCATCTGAAATGAAATTATAATTCTTCTTGAGACTCATCGAGCTACATCCT
91  CAGGCCCCGCTTATAACACAGGCTCTATTTCTGTAGCAACAGCCATGAGTTACTCTGAAATCTTAATTAATGCTCAACTTTTGGCACTGC
181  AATTTTCAGAGGGGCTTCAACTCTCTGATTCCTCCCTTCCCTGGGCTTCTACAGCAGCAACAGCAGCAGGCTCAGTCTCAGGACACCCAC
271  AGTTTCTCTCTCTCAACACTAGAGAGCTTTGCTGGCTTATTCGCAAAATCAGATACCTTCTCAGAGCAGGTTGCTTTGCCCAAGGAGGTC
361  AGGCTGGCCAGCAGACTTCTCAGAGCAGCAGACCATCTCAGACCCAGCAGGCTAGTCTCTATGTTCTGTTTAAAGTGC
                                     M E V V V P V K V P
451  CTCAGATCAAAACACAGATTTTCACTACTACCCATTTACATGCTTCTGCGCTGGGAGCAACCAAGCAGACAGTGCATCTCTCCGC
       Q D Q T Q M F Q V V P V V M L L P H E R P Q Q T V T E S P R
541  AGCAGACAGGGCAGCAGCTATACGAGGACAGATACCATCTCTATAATCAATTTGGATTTGTACCAACAAACAGAAAGCTGCTAGCCAG
       Q T G Q Q L V E E Q I P F V N Q F G F V P Q Q A E P G V P G
631  GAGGACAGCAGCACTTATTTCTGACAGCTTTGTAGGCAAGCTCCAGAACTCTGGAATGCAGCAGTASAGGCGCGCTGTATCCAC
       G Q Q H L V L D E F V G T A P E T P G M P A V E G P L V P R
721  AAAAAAGAACCAATCGGCTTAAAGCAAGATATGTAGGGTTTCCAGCGCTCAACTTCACCAAAAGCCAGACAGGCAATTTTTCAGTT
       K E P I G F E Q D N V G V E T P E T S P E P D T G N F P T E
811  CTGAAATAAAGCCAGATTTGCTCTACTGCTTCAGAACAGAGGTCAGTGTGATAGCTAAGGAAAGCAATAGACTTTGTTACATCA
       E I N P T I A L L L P E Q K V N A D S L R S P *
901  CTCAGAGT TTTGCAAGAGATGAGATGATGCTTGGCTCTTTTAAAGATTATTTCTCTCTATATGCTAATGAGTTTCTTAAATGA
991  TATTAAGGCTCTTCACTGATCTCATTTTCTTTACTTAAAGAGATGACTATTGATGTCAGAAAAATTAATGTATCATGGAAGAAATCCT
1081  ATCTTTATAATGTTCTTTTCCCAAGATTATGCTTATATATCTGGAATGACAGCACTAAGAGTAAAGCATATTTAAGCAAA
1171  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figure 2. The nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of OD314. Contains 1197 nucleotides in all. The poly a tail is preceded by the poly a (A^+) signal AATAAA (italics). The start codon ATG is in bold type and begins from nucleotide 423. The stop codon at nucleotide 884 is also in bold denoting the end of the open reading frame (ORF).

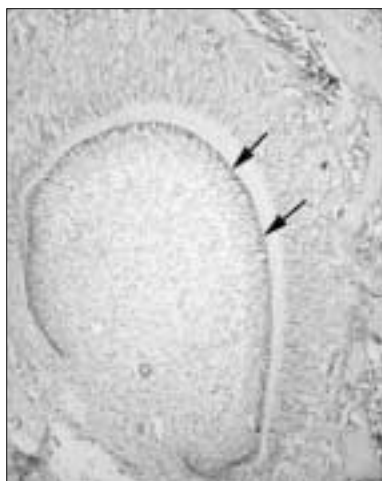


Figure 3. *In-situ* hybridization for OD314 in rat mandibular first molar at postnatal day 7. Arrows indicate the OD314 mRNA in the developing odontoblasts. $\times 100$.

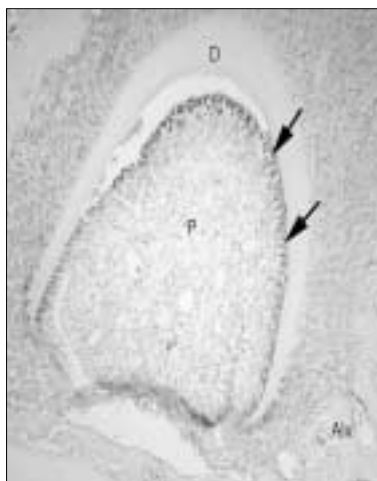


Figure 4. Expression of mRNA for OD314 in rat mandibular first molar at postnatal day 7. OD314 transcripts are strongly expressed in the developing odontoblasts (arrows). D; dentin, P; pulp, Alv, alveolar bone. $\times 100$.

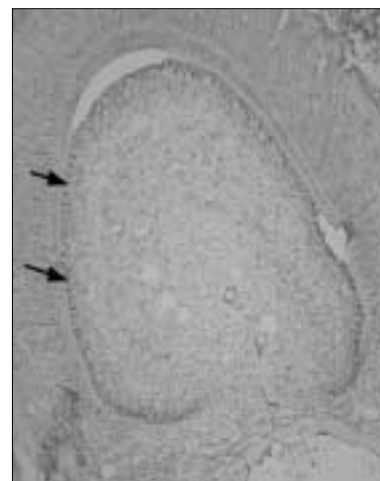


Figure 5. Negative control of *in-situ* hybridization. No positive signals were found in this section. $\times 100$.

3. 면역조직학적 염색 소견

원취 하악 제1대구치의 치근 형성 시기인 생후 7일의 조직표본에서 OD314 단백질은 발생중인 치관부와 치근부의 상아모세포에서 강하게 발현되었으며, 치조골의 일부 골모세포와 치주인대 형성 부위의 치낭의 세포에서는 미약한 발현을 나타냈다 (Figure 6). 치아가 맹출하여 기능적인 위치에 도달한 시기인 생후 40일의 조직 표본에서 OD314 단백질은 상아모세포의 성숙과 상아질 형성이 진행됨에 따라 상아모세포와 상아모세포 전구세포에서 강하게 발현되었다 (Figure 7).

4. 사람 치수세포 배양에서 OD314의 발현 분석

1) 세포배양 및 석회화 결절의 형성

배양 치수 세포들은 ascorbic acid와 β -glycerophosphate 첨가 후 배양 4일에는 방추형으로 섬유모세포와 유사한 형태를 나타냈으나 (Figure 8), 배양 14일 경부터 세포들이 풍부하고 긴 세포질을 가진 방추형의 형태를 띄면서 국소적으로 특정부위에 모여들어 배양 21일이 되면 여러 층으로 된 세포 집합체를 형성하였고 이러한 양상은 배양

28일까지 유지되었다 (Figure 9). 배양 21일에 세포를 Alizarin-red S로 염색한 결과 대부분의 세포 집합체들은 석회화 결절을 포함하였다 (Figure 10).

2) RT-PCR 분석

사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 OD314와 DSPP 그리고 OC mRNA는 배양 시작부터 치수세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일과 석회화 결절이 형성된 21일, 28일에도 동일한 발현 양상이 유지되었다. 그러나 ON mRNA는 배양 시작 후 4일, 7일, 14일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 다소 감소하는 소견을 보였다 (Figure 11).

3) Western 분석

사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 OD314 단백질은 17kDa의 크기로 배양 시작부터 치수세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일까지 유지되었으며 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 더욱 증대된 소견을 보였다 (Figure 12).

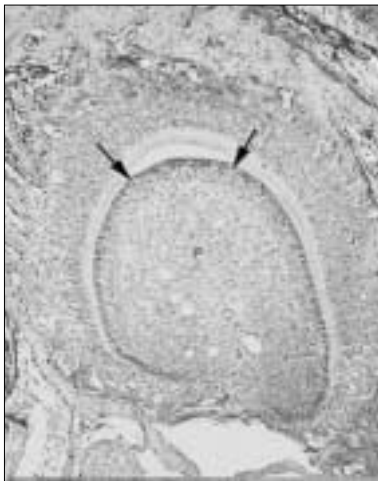


Figure 6. Immunohistochemical localization of OD314 protein in rat mandibular first molar at postnatal day 7. Arrows indicate the OD314 protein in the developing odontoblasts. P, pulp; Alv, alveolar bone. $\times 100$.



Figure 7. Immunohistochemical localization of OD314 protein in rat mandibular first molar at postnatal day 40. OD314 proteins are strongly expressed in subodontoblasts (arrows). D, dentin; P, pulp; PDL, periodontal ligament; Alv, alveolar bone. $\times 100$.



Figure 8. Human dental pulp cells after 4 days of culture. $\times 100$.

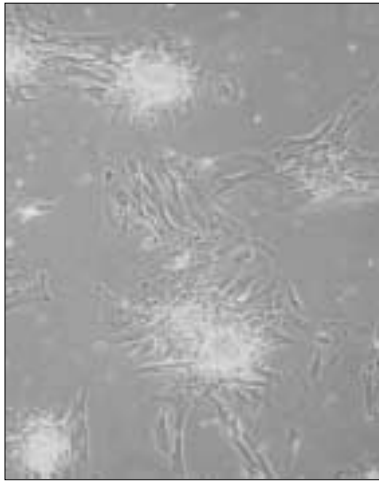


Figure 9. Human dental pulp cells after 21 days of culture. Formation of mineralization nodules in human dental pulp cells *in vitro* after β -glycerophosphate treatment. $\times 200$.

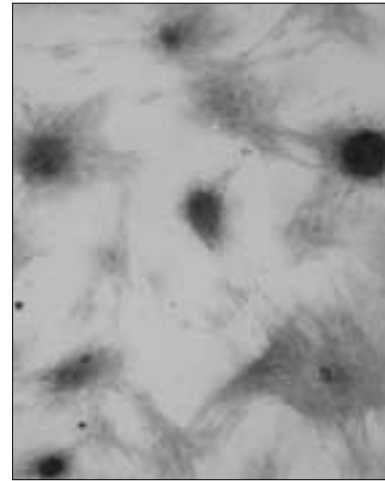


Figure 10. Visualization of mineralization nodules by Alizarin-red S stain after 21 days of culture. $\times 200$.

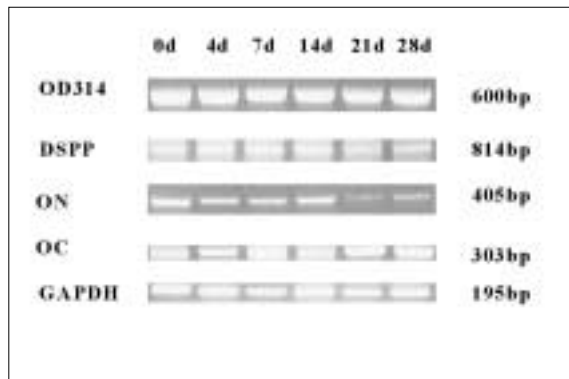


Figure 11. RT-PCR amplification of OD314, DSPP, ON, and OC transcripts in the culture of human dental pulp cells. Total RNAs were extracted from cultured cells after 0, 4, 7, 14, 21, and 28 days of culture. GAPDH used as a control. Sizes are indicated at right. DSPP, dentin sialophosphoprotein; ON, osteonectin; OC, osteocalcin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

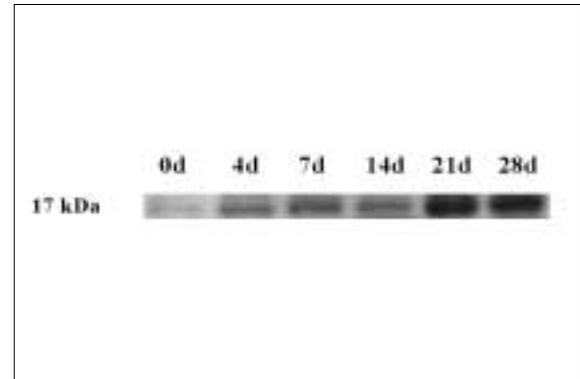


Figure 12. Temporal changes in the translational activity of OD314 in the culture of human dental pulp cells. Proteins were extracted from cultured cells after 0, 4, 7, 14, 21, and 28 days and analyzed by immunoblotting with anti-OD314. OD314 was expressed as 17 kDa protein in cultured cells.

IV. 총괄 및 고안

상아모세포는 신경능세포 기원의 외배엽성 간엽세포에서 기원하여 무기기질과 다양한 유기기질을 합성 분비한다. 무기기질은 주로 제I형 교원질과 비교원성 단백질로 구성되어 있는데, 비교원성 단백질에는 decorin, biglycan, osteonectin, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein,

DMP1, DMP2 그리고 DSPP 등이 있다^{21,22)}. DSPP는 다른 조직과 비교하여 상아질에서만 특이하게 발현되는 유전자로 알려져 있는데 독특하게도 하나의 유전자에서 dentin phosphoprotein (DPP)과 dentin sialoprotein (DSP) 단백산물이 합성되어 따로 따로 분비된다²³⁻²⁵⁾. 본 연구의 *in-situ* hybridization 실험에서 OD314 mRNA는 발생중인 치관부와 치근부의 상아모세포에서 특이적으로 강하게 발

현되었는데 (Figures 3, 4), 이는 Dey 등²⁰⁾의 northern 분석 결과와 일치하며 OD314가 DSPP 이외의 상아모세포내 특이 인자가 될 수 있음을 시사하는 결과이다.

OD314는 최근에 특정 세포에서 특이적으로 발현되는 유전자를 탐색하는데 널리 이용되고 있는 subtraction 방법^{11,26)}을 이용하여 상아모세포에서 동정되었는데 그 cDNA는 poly (A⁺) tail을 포함하는 1197 bp의 염기로서 구성되어 있었다. 최근에 발견되는 새로운 cDNA들의 경우는 단백질을 합성하지 않고 mRNA로서 기능을 하는 보조 인자들도 보고가 되고 있기 때문에²⁷⁾, 본 연구에서는 먼저 OD314 cDNA의 단백질 합성여부와 그 단백질의 세포내 존재 부위를 알아보고자 GFP expression vector를 이용한 cell transfection 실험을 시행하였다. 실험결과 OD314의 단백질의 합성 발현은 short ORF construct (462bp: nucleotides 423-884)를 transfection한 세포에서 관찰되었으며, 합성단백질들은 HEK 293T cell의 세포질에서 발현되었다 (Figure 1). 이 결과로 1197 bp의 OD314는 154 아미노산으로 구성된 새로운 상아모세포 관련 단백질을 합성하는 유전자임을 알 수 있었다.

면역조직학적 염색 조건에서 흰쥐 하악 제1대구치의 치근 형성 시기인 생후 7일의 조직표본에서는 OD314 단백질이 발생중인 치관부와 치근부의 상아모세포에서 강하게 발현되었으며, 치조골과 골막의 일부 세포 그리고 치주인대 형성 부위의 치낭의 세포에서는 미약한 발현을 나타냈고 (Figure 6), 치아가 맹출하여 기능적인 위치에 도달한 시기인 생후 40일의 조직 표본에서는 OD314 단백질이 상아모세포의 하부 상아모세포 아래세포에서 강하게 발현되었다 (Figure 7). 이 결과는 OD314 단백질이 상아모세포의 성숙과 상아질 석회화 과정이 진행됨에 따라 기존의 상아모세포와 상아모세포 전구세포의 분화와 성숙에도 관여하는 것으로 해석할 수 있다. OD314가 골이나 다른 조직에서는 발현되지 않고 상아모세포에서만 독특하게 발현되는 Northern과 *in-situ* hybridization 결과와는 달리 OD314 단백질이 상아모세포 이외에 일부의 골모세포와 치주인대 세포에서 발현된 면역 염색 결과는 주목할 만 하다. 이 결과와 관련하여 면역조직화학적 염색 과정의 비 특이적 산물로 인하여 OD314 단백질이 상아모세포 이외의 조직이나 세포에 발현 될 수 있다는 점과 OD314가 상아모세포-특이 인자라기보다는 치주인대 세포나 골모세포에 비하여 상아모세포에서 더욱 강하게 발현되는 인자로서 기능할 가능성을 시사한다는 점이 고려되어야 한다. 상아질의 특이 유전자와 관련하여 Qin 등²⁸⁾은 과거에서부터 최근까지 상아모세포-특이 인자로 간주되어 상아모세포를 구별하는 데에도 널리 이용되고 있는 DSPP가 상아모세포-특이 단백질이 아니며 골에서도 존재하나 상아모세포에서 더욱 광범위하게 존재하는 물질이라고 보고한 바 있다.

상아모세포의 특성을 연구하기 위해서는 상아모세포를 실험관에서 배양하는 방법이 필수적인데, 현재까지 알려진 방법으로는 주로 흰쥐의 치유두 세포와 흰쥐와 사람의 치수세포 그리고 세포주를 이용하는 방법들이 알려져 있다²⁹⁻³⁶⁾. 본 실험에서는 OD314가 흰쥐에서 동정된 cDNA임에도 불구하고 사람의 치수 세포를 배양하여 실험에 이용하였는데, 이는 대체로 흰쥐와 사람의 유전자들이 높은 homology를 나타낸다는 점과 흰쥐의 치유두 세포, 치수 세포, 세포주 등을 이용한 연구 결과에서는 배양 세포의 특성이 연구자들에 따라 균일한 결과를 나타내지 못하였으나 사람의 치수 세포를 이용한 경우에는 일차 배양에서부터 석회화 결절의 형성까지 거의 동일한 연구 결과를 보고한 점에 착안하였다³⁷⁻⁴⁰⁾. 또한, 배양 과정에서 ascorbic acid와 β -glycerophosphate의 첨가는 사람 치수세포 배양 후 3주에 석회화 결절의 형성을 유도한 About 등²¹⁾의 실험 방법을 참고하였는데 본 연구에서도 배양 21일부터 28일에 이르기까지 세포 집합체에 석회화 결절 형성이 Alizarin-red S 염색으로 확인되었다 (Figures 9, 10).

사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 후 OD314, DSPP, OC, ON mRNA의 발현을 분석한 RT-PCR 분석에서 OD314와 DSPP 그리고 OC mRNA는 배양 시작부터 치수세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일과 석회화 결절이 형성된 21일, 28일에도 동일한 발현 양상이 유지되었으나, ON mRNA는 배양 시작 후 4일, 7일, 14일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 다소 감소하는 소견을 보였다 (Figure 11). 이 결과는 ON은 상아모세포의 초기 분화 과정이나 상아질이 석회화되기 전 단계인 전상아질에서 발현되는 반면에 OC은 석회화 후의 상아질에서 주로 발현된다는 Papagerakis 등⁴¹⁾의 연구 결과와 일치한다. 또한, DSPP가 배양 전과정에서 발현된 것은 배양 치수 세포가 상아모세포의 특성을 나타내고 있음을 의미하며, OD314는 상아모세포의 존재와 더불어 발현된 결과로 생각된다. Western 분석에서 사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 OD314 단백질은 17 kDa의 크기로 배양 시작부터 치수세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일까지 유지되었으며 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 더욱 증대된 소견을 보였다 (Figure 12). 이는 OD314 ORF로부터 추정된 154 아미노산 합성과 OD314 단백질의 양이 일치함을 나타내며 OD314 단백질이 상아모세포의 석회화 과정에 깊은 관련을 갖는 새로운 단백질을 의미하는 결과로 해석할 수 있다. 그러나 OD314 단백질의 발현 양상이 RT-PCR 분석에 의한 mRNA의 발현양상과 다소 다른 양상을 나타내었는데 이는 RT-PCR 분석과 단백질 분석의 sensitivity 차이에 의한 결과로 해석할 수도 있으나 이를 보다 명확히 하기 위

해서는 향후 보완 연구도 필요할 것이다.

요약하면, OD314는 상아모세포-유래 유전자로 상아모세포의 분화 특히 상아질 형성의 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되나 상아모세포의 분화와 상아질 형성 과정에서 OD314의 정확한 기능을 이해하기 위해서는 OD314의 RNA interference와 overexpression 그리고 knock/out 생쥐의 제작과 같은 기능 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

상아모세포는 치수-상아질 복합체에서 치수조직의 최외층에 배열하고 세포돌기를 상아세관 내로 연장하여 상아질을 형성하고 유지하는 세포이다. 상아모세포는 DSPP와 같은 상아모세포-특이 유전자를 합성 분비한다. 그러나 아직까지 DSPP 이외의 상아모세포-특이 인자를 동정하고 상아모세포의 분화와 상아질 석회화 과정에서 이 인자들의 기능을 규명하는 연구 결과들은 거의 알려져 있지 않다.

본 연구는 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관련된 인자를 탐색하고 그 기능을 분석할 목적으로 새로운 상아모세포-유래 유전자로 알려진 OD314유전자의 기능을 mRNA *in situ* hybridization, cell transfection 분석, 항체 제작 및 면역조직화학적 염색, 치수세포 배양에 의한 석회화 과정에서 RT-PCR과 western 분석 등으로 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *In-situ* hybridization에서 OD314 mRNA는 발생중인 치관부와 치근부의 상아모세포에서 강하게 발현되었다.
2. OD314는 154 아미노산으로 구성된 단백질을 합성하는 새로운 유전자로 합성 단백질은 주로 세포의 세포질에서 발현되었다.
3. 면역조직화학적 염색에서 OD314 단백질은 상아모세포에서 강하게 발현되었으며 치아주위의 일부 골모세포와 치주인대 세포에서도 미약한 발현이 관찰되었다.
4. 치수세포는 배양 후 21일부터 석회화 결절을 형성하기 시작하여 배양 28일까지 석회화 결절이 유지되었다.
5. 치수세포의 배양과정에서 ON은 배양 초기부터 발현되었으나 석회화 결절이 형성되면서 발현이 감소한 반면에 OD314, OC, DSPP는 배양 전 과정에서 강하게 발현되었다.
6. 치수세포의 배양과정에서 OD314 단백질은 17 kDa의 크기로 초기 배양단계에서부터 발현되어 석회화 결절이 형성되는 시기까지 그 발현이 유지되었으나 그 발현 정도는 석회화 결절 형성 단계에서 더욱 강하게 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 OD314는 상아모세포-유래 유전자로 상아모세포의 분화 특히 상아질 형성의 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 새로운 유전자로 생각되며 앞으로 이에

대한 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다

참고문헌

1. Lesot H. Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *J Dent Res* 79(9):1640-1644, 2000.
2. Fitzgerald M, Chiego DJ, Jr, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 35:707-715, 1990.
3. Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, Takemoto T, Kato Y, Kurihara H. Transforming growth factor- β 1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* 80(7):1653-1659, 2001.
4. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* 69(1):75-81, 1990.
5. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF- β in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 106(1):192-196, 1998.
6. Hirst KL, Simmons D, Feng J, Aplin H, Dixon MJ, MacDougall M. Elucidation of sequence and the genomic organization of the human dentin acidic phosphoprotein1(DMP1) gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics* 42:38-45, 1997.
7. Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Cell Biol* 98(8):4516-4521, 2001.
8. Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11(Gdf11). *Gene Therapy* 9912:814-818, 2002.
9. Shimo T, Wu C, Billings PC, Piddington R, Rosenbloom J, Pacifici M, Koyama E. Expression, gene regulation, and roles of Fisp 12/CTGF in developing tooth germs. *Dev Dyn* 224(3):267-278, 2002.
10. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquair JC. Influence of resinous monomers on the differentiation *in vitro* of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res* 63(4):418-423, 2002.
11. Murakami S, Muramatsu T, Shimono M. Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat Embryol* 203:367-374, 2001.
12. Schmitt R, Ruch JV. *In vitro* synchronization of embryonic mouse incisor preodontoblast and preameloblast: repercussions on terminal differentiation. *Eur J Oral Sci* 108:311-319, 2000.
13. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(17-29):17-29, 2002.
14. Butler WT. Dentin-specific protein. *Methods in Enzymology* 145:290-303, 1987.
15. Butler WT. Dentin matrix protein. *Eur J Oral Sci*

- 106(91):204-210, 1998.
16. George A, Sabsay B, Simonian PAL, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *J Biol Chem* 268(17):12624-12630, 1993.
17. Ritchie HH, Hou H, Veis A, Butler WT. Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. *J Biol Chem* 269(5):3698-3702, 1994.
18. Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research: Historical and prospective views on phosphoporyn and dentin sialiprotein. *Eur J Oral Sci* 106(1):211-220, 1998.
19. Veis A, Perry A. The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry* 6(8):2409-2416, 1967.
20. Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontolast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Archives Oral Biol* 46:249-260, 2001.
21. About I, Bottero MJ, Denato PD, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production *in vitro*. *Experimental Cell Res* 258:33-41, 2000.
22. Butler W T, Bhowm M, Brunn JC, D' souza RN, Farach-carson MC, Hartha RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Somerman MJ, Foster RA, Tomana M, Djik SV. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-KDal dentin sialoprotein(DSP). *Matrix* 12:343-351, 1992.
23. 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 sialiphosphoprotein(DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*. *J Bone Miner Res* 12:2040-2049, 1997.
24. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 272(2):835-842, 1997.
25. Qin C, Cook RG, Orkiszewski RS, Butler WT. Identification and characterization of the carboxyl-terminal region of rat dentin sialoprotein. *J Biol Chem* 276(2):904-909, 2001.
26. Buchaills R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel gene expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 19:421-430, 2000.
27. Takeda K, Ichijo H, Fujii M, Mochida Y, Saitoh M, Nishitoh H, Sampath TK, Miyazono K. Identification of a novel bone morphogenetic protein-responsive gene that may function as a noncoding RNA. *J Biol Chem* 273(27):17079-17085, 1998.
28. Qin C, Brunn JC, Cadenna E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT. The Expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81(6):392-394, 2002.
29. Gronthos S, Brahimi JL, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cell. *J Dent Res* 81(8):531-535, 2002.
30. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Res* 37(3-4):233-249, 1998.
31. Hao J, Narayanan K, Ramachandran A, He G, Almushayt A, Evans C, George A. Odontoblast cells immortalized by telomerase produce mineralized dentin-like tissue both *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 277(22):19976-19981, 2002.
32. Lundquist P, Ritchie HH, Moore K, Lundgren T, Linde A. Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cell concomitant with mineralization. *J Bone Miner Res* 17(10):1801-1813, 2002.
33. Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT. Expression of dentin sialoprotein(DSP) and other molecular determinants by new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connective Tissue Res* 37(3-4):251-261, 1998.
34. Thonemann B, Schmalz G. Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. *Eur J Oral Sci* 108:432-441, 2000.
35. Thonemann B, Schmalz G. Immortalization of bovine dental papilla cells with simian virus 40 large t antigen. *Arch Oral Biol* 45:857-869, 2000.
36. Ueno A, Kitase Y, Moriyama K, Inoue H. MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol* 20:347-355, 2001.
37. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrt-Mabillon B, Boudeulle M, Maloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cell in explant culture. *Calcif Tissue Int* 66:129-138, 2000.
38. Gronthos S, Mankani M, Brahimi P, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cell(DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Cell Biol* 97(25):13625-13630, 2000.
39. Guo L, Berry JE, Somerman MJ, Davidson RM. A novel method to odontoblast from rat incisor. *Calcif Tissue Int* 66:212-216, 2000.
40. Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* 66:139-144, 2000.
41. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30(2):377-385, 2002.