

Protein microarray를 이용한 APin-단백질의 상호작용에 관한 연구

박주철¹ · 박선화¹ · 김흥중¹ · 박종태¹ · 윤성호¹ · 김지웅¹ · 이태연² · 손호현^{2*}
¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ²서울대학교 치의학대학원 치과보존학교실

ABSTRACT

A STUDY OF APIN-PROTEIN INTERACTIONS USING PROTEIN MICROARRAY

Joo-Cheol Park¹, Sun-Hwa Park¹, Heung-Joong Kim¹, Jong-Tae Park¹,
Seong-Ho Youn¹, Ji-Woong Kim¹, Tae-Yeon Lee², Ho-Hyun Son^{2*}

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

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

Protein microarray or protein chips is potentially powerful tools for analysis of protein-protein interactions. APin cDNA was previously identified and cloned from a rat odontoblast cDNA library. The purpose of this study was to investigate the APin-protein interactions during ameloblast differentiation. Protein microarray was carried with recombinant APin protein and MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein were selected among 74 interacting proteins. Immortalized ameloblast cells (ALCs) were transfected with pCMV-APin construct and U6-APin siRNA construct. After transfection, the expression of the mRNAs for four proteins selected by protein microarrays were assessed by RT-PCR.

The results were as follows:

1. APin expression was increased and decreased markedly after its over-expression and inactivation, respectively.
2. Over-expression of the APin in the ALCs markedly down-regulated the expression of MEF2 and Aurora kinase A, whereas their expression remained unchanged by its inactivation.
3. Expression of BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein were markedly increased by the over-expression of the APin in the ALCs, whereas expression of BMPR-IB remained unchanged and expression of EF-hand calcium binding protein was markedly decreased by its inactivation.

These results suggest that APin plays an important role in ameloblast differentiation and mineralization by regulating the expression of MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein. (J Kor Acad Cons Dent 32(5):459-468, 2007)

Key words: APin, Ameloblast, Protein microarray, Mineralization, Interaction, Differentiation.

- Received 2007.7.11., revised 2007.8.11., accepted 2007.8.16.-

* Corresponding Author: Ho-Hyun Son

Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Seoul National University
22 Yeongun-dong, Chongro-gu, Seoul, 110-749, Korea
Tel: 82-2-2072-2652 Fax: 82-2-2072-3859
E-mail: hhson@snu.ac.kr

I. 서 론

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다¹⁾. 치성상피는 치아기 (dental

※ 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(RO1-2006-000-10581-0)지원으로 수행되었음.

organ)를 형성하여 법랑모세포 (ameloblast)로 분화하여 법랑질을 형성하고, 외배엽성 간엽세포는 치유두 (dental papilla)를 형성하여 상아모세포 (odontoblast)와 치수세포 (pulp cell)로 분화하여 상아질과 치수를 형성한다²⁾.

Dey 등³⁾은 흰쥐 두개골의 골모세포 (calvarial osteoblast)와 치유두 세포 (dental papilla cell)에서는 발현되지 않으나 상아모세포에서 특이하게 발현되는 OD314 유전자를 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관여하는 인자로 보고하였다. 이 유전자는 Solomon 등⁴⁾에 의해 상괴성치성종양 (calcifying epithelial odontogenic tumor)에서 amyloid 침전물의 분비성분에서 분리된 APin 유전자와 동일한 것으로 밝혀졌다. 김 등⁵⁾은 OD314 (APin)가 154아미노산을 합성하는 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자로 주로 세포질에 존재하며, mRNA와 그 합성 단백질이 상아모세포에서 선택적으로 발현된다고 하였다. 또 사람 치수세포의 분화과정에서 OD314 (APin)는 치수세포가 상아모세포로 분화하는 초기 과정에 발현되어 그 발현이 유지되다가 석회화과정에서 더욱 증가한다고 보고하였는데, 이러한 사실은 OD314 (APin)가 상아질의 석회화과정에 관여함을 나타낸다.

최근에 박 등⁶⁾은 상아모세포 분화과정에서 OD314 (APin)의 역할에 대한 연구 과정에서 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314 (APin)가 치아 발생과정에서 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314 (APin)의 법랑질 형성에서의 역할을 시사하였다. 최근에 Aung 등⁷⁾은 위암 특이유전자를 검색하여 APin이 위암세포에서 강하게 발현된다고 보고하였고, 흥미롭게도 Moffatt 등⁸⁾은 APin이 법랑모세포의 분비 단백질의 일종으로 치아기 뿐 아니라 성숙기 법랑모세포에서 더욱 강하게 발현된다고 하였다.

단백질은 그 특성상 또 다른 단백질과 상호작용을 통해 그 기능을 수행한다. 단백질칩 (protein chip)을 이용한 protein microarray는 단백질의 연구에 중요하게 사용되는 핵심기술로 질병의 진단 및 biomarker 발굴, 단백질의 발현 및 기능연구, 단백질의 상호작용연구, 신약개발 등 다양한 응용분야를 가지고 있어 의학, 약학, 생명과학 분야에서 광범위하게 이용되고 있다^{9,10)}. 따라서 단백질칩을 이용한 APin의 protein microarray는 APin과 상호작용하는 단백질들을 분석하는 적절한 방법으로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 protein microarray를 이용하여 APin 단백질과 높은 친화성을 나타낸 74개의 단백질 중에서 치아 발생이나 석회화 연관되는 전사인자나 분화 유도인자들을 선택하였다. MADS box transcription enhancer factor 2 (MEF2)^{11,12)}와 Aurora kinase A¹³⁻¹⁵⁾는 종양의 생성

(tumorigenesis)과 증식 (tumor proliferation)에 관계가 있는 전사인자이고, bone morphogenetic protein receptor IB (BMP-IB)^{16,17)}는 다양한 기관의 발생과정에 관여하고, EF-hand calcium binding protein^{18,19)}는 다양한 세포들의 석회화(mineralization) 과정에 연관된 것으로 알려져 있다.

RNAi (RNA interference)는 특정 유전자의 발현을 억제 (inactivation)함으로써 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 기법이다²⁰⁾. 본 실험에서는 김 등²¹⁾의 방법에 의하여 APin 유전자의 발현을 억제할 수 있는 U6-APin siRNA construct와 APin 유전자를 과발현 (over-expression)시킬 수 있는 CMV-APin construct를 제작 후 법랑모세포주에 transfection하였다.

본 연구는 protein microarray를 통하여 APin 단백질과 상호작용하는 단백질들을 검출한 후 치아발생과정과의 관련성을 중심으로 선별한 MEF2, Aurora kinase A, BMP-IB 및 E-F hand calcium binding protein 등의 APin-단백질 상호작용을 법랑모세포주²²⁾이용한 유전자 발현 조절을 통하여 관찰하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. APin 재조합 단백질 (recombinant protein)의 합성

APin 재조합 단백질의 합성은 김²³⁾이 시행한 과정과 동일한 방법으로 합성하였다. 과정을 요약하면 다음과 같다.

사용된 균주 및 배양은 E. coli BL21 (DE3)와 pLysS (pRSET-APin)을 사용하여, 주배양은 1 L LB 배지에 100 ml 배양액을 접종하여 OD 600이 0.4 - 0.6 사이 도달 시 최종농도가 1 mM이 되도록 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 3 - 6시간 배양하였다. Cell lysate 준비는 발현이 유도된 균체를 원심분리한 후, lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)의 초기 배양액 부피 대비 25 - 50배로 농축, 현탁 후, 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 lysozyme을 처리한 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

Fast protein liquid chromatography (FPLC)를 이용한 정제과정은 Ni-NTA column에 10 ml의 샘플을 주입하고, binding buffer로 0.5 ml/min, 3 CV동안 His-Tag 단백질을 resin에 결합시켰다. Washing buffer로 0.5 ml

/min, 3 CV동안 흘려 non-specific binding protein을 씻어냈다. Washing buffer와 elution buffer로 gradient를 주어 imidazole 농도를 서서히 증가시키면서 His-Tag 단백질을 분리해내었다. 회수된 정제 단백질의 분리는 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0) buffer를 이용하여 4°C에서 24시간 dialysis 하였다. Dialysis 후, 정제 단백질 확인하여 많은 양을 차지하는 작은 size의 band는 size cut-off filtration을 통해 추가로 제거를 하였다.

2. Protein Microarray

ProtoArray™ (Invitrogen Life technologies, California, USA) kit를 사용하여 protein microarray를 시행하였다.

1) Blocking

정제된 단백질 (50 µg/ml) 120 µl를 vortexing 없이 잘 섞어준 후 protein microarray 포함한 mailer를 4°C에 15분간 유지하였다. Chamber 안에 microarray를 위로 향하게 장착 후 25 ml blocking buffer를 벽면을 따라 넣어 cold room에서 1시간 배양하였다. Mailer 제거 후 wipe 위에서 array의 끝을 서서히 쳐서 완충액만 건조하였다.

2) Probing과 washing

Protein (50 µg/ml) 120 µl를 array membrane에 전체적으로 골고루 뿌린 후 hybrislip cover slip을 array membrane area에 덮었다. 50 ml 튜브에 array가 위를 향하도록 하고 넣어 뚜껑을 닫고 tapping 한 후 어떠한 충격 없이 4°C에 1시간 30분간 두었다. 50 ml 튜브에서 array를 꺼내 얼음위에서 배양된 chamber안에 사선방향으로 넣은 후 25 ml probing buffer를 넣어 array를 서서히 흔들어 hybrislip을 제거한 후 chamber rail에 array를 장착하였다. 25 ml probing buffer를 chamber 벽면에 넣어 얼음위에서 1분간 배양한 후 천천히 3회 따라내기를 하였다.

3) Antibody 처리

Probing buffer와 Anti-His-Alexa Fluor 647 Antibody를 0.3 µg 농도로 25 ml를 chamber 벽면을 따라 넣어 암실 얼음 위에서 30분간 배양하였다.

4) Washing과 drying

25 ml probing buffer를 chamber 벽면에 넣어 얼음 위에서 1분간 배양한 후 천천히 3회 따라내기를 하였다. 멸균된 50 ml 튜브에 array를 두고 800 × g로 원심분리시킨 다음 암실에서 1시간 동안 배양한 후 scan을 하였다.

3. APin의 과발현과 발현억제 construct의 제작 및 transfection

1) Construct 제작

APin 과발현 construct의 제작은 APin의 open reading frame (ORF)을 포함하는 cDNA를 진핵 세포 발현 vector인 pcDNA3의 EcoRI 절단 부위에 정상 단백질 합성 방향으로 위치시킨 후 potent cytomegalovirus promoter (pCMV)를 부착시켜 construct를 제작하였다.

APin 발현억제 construct의 제작은 김 등²³⁾의 방법으로 제작한 APin siRNA construct를 제작하여 실험에 이용하였다.

2) 법랑모세포주 배양 및 transfection

Dr. Sugiyama로부터 받은 법랑모세포주²²⁾를 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 항생제 (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml 및 fungizone 2.5 µg/ml)가 함유된 Modified Eagles Medium (MEM, Gibco BRL)에 epidermal growth factor (EGF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 type I collagen이 처리된 배양접시에서 하루 동안 배양하였다.

다음날 세포가 배양접시의 70 - 80%의 면적까지 증식한 것을 확인한 후 Lipofectamine reagent (Gibco BRL)와 plus reagent에 각각 CMV-APin 플라스미드와 U6-APin siRNA 플라스미드를 혼합한 다음 OPTI-MEM (Gibco BRL)을 넣고 배양기에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 5 - 7시간 배양하였다. 그 후 5% FBS와 ascorbic acid 그리고 β-glycerophosphate가 포함된 MEM 배양액을 첨가 한 다음 배양기에서 하루 더 배양한 다음 Trizol (Invitrogen) 용액을 이용하여 각각의 세포에서 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 양을 spectrophotometer를 이용하여 정량한 다음 20µg 씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

4. RT-PCR

RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 APin, MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 비교로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 특이적 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다 (Table 1). PCR은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 33사이클을 시행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다. GAPDH는 PCR 증폭시 posi-

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

| Proteins | | Primer sequence (5' - 3') | size (bp) |
|---------------------------------|----|-------------------------------|-----------|
| APin | S | ccagcaggctagtcctatgtcctatgtgg | 608 |
| | AS | cgcgctcgacatgagatcagtg | |
| MEF2 | S | aatgtcactgcctggcaaca | 378 |
| | AS | tcatcccggctctcccgtctcata | |
| Aurora kinase A | S | gttgaagattgcagacttcgggtg | 427 |
| | AS | ccgtggttcaggattccctaagat | |
| BMPR-IB | S | gggttggtgtcactggtaggatta | 476 |
| | AS | acctgacagatcagatgcttcctc | |
| EF-hand calcium binding protein | S | gaaggagacagccaatcagatcca | 499 |
| | AS | cgtagatgacgaaggttaggcat | |
| GAPDH | S | accacagtccatgccatcac | 452 |
| | AS | tccaccacctggtgtgt | |

tive control 로서 사용하였다. Fold induction 값은 densitometer 로 측정 한 후 GAPDH 값과 비교하여 그 상대적 수치를 나타내었다.

III. 결 과

1. APin 재조합 단백질의 합성

정제된 APin 단백질은 약 1 mg/ml의 농도로 얻어졌고, SDS-PAGE 분석과 6X-His tag antibody를 사용하여 western을 시행하여 확인되었다.

2. Protein Microarray

본 연구에서는 글라스 위에 nitrocellulose가 coating되어 있는 NC slide칩을 사용하였다. 칩상의 모든 단백질은 gateway system으로 full length clone을 만들고 insect cell을 이용하여 발현시켰다. 생산되는 모든 단백질은 glutathione s-transferase (GST) tag을 가지고 있기 때문에 GST column을 이용하여 분리하여 pin spot 방식으로 spotting하였다.

Figure 1은 APin 단백질을 probe로 이용한 protoarray 실험 결과를 나타낸 것이다. APin과 결합하는 단백질 중에서 Z-score (Z ratios and Z test statistics) 값이 3 이상이 되는 74개의 단백질을 친화성이 강한 순서로 나열하였다 (Figure 2). 그 중에서 APin의 기능과 관련이 있을 것으로 생각되는 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-

hand calcium binding protein을 분석하였다 (Table 2).

3. APin의 과발현과 발현억제

pCMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin 발현을 억제시킨 경우에는 APin은 관찰되지 않았다 (Figure 3).

4. APin의 과발현과 발현억제에 따른 상호작용하는 유전자의 변화

상호작용하는 단백질 중에서 종양생성과 증식에 관계가 있는 MEF2와 Aurora kinase A는 CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 MEF2와 Aurora kinase A 둘 모두에서 발현이 현저히 감소하였다. U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다.

여러 기관의 발생과 관련이 있는 BMPR-IB와 석회화 과정에 연관된 EF-hand calcium binding protein은 APin의 과발현을 유도한 경우에는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein 모두에서 발현이 많이 증가되었으나, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하여 관찰이 어려웠다 (Figure 4, 5).

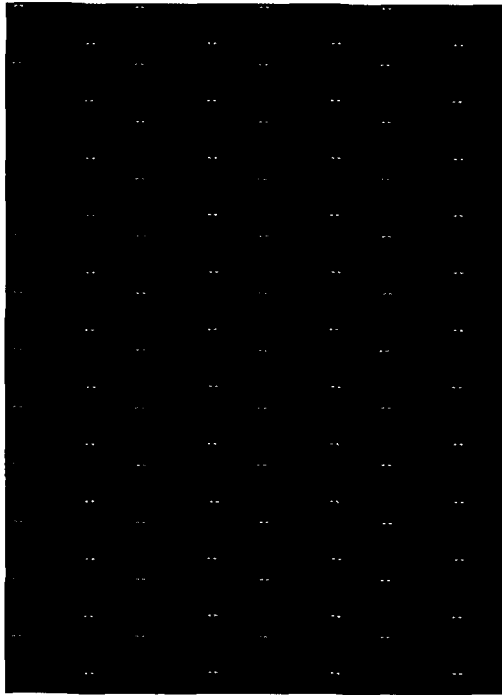


Figure 1. Detection of the APin protein using protein microarray.

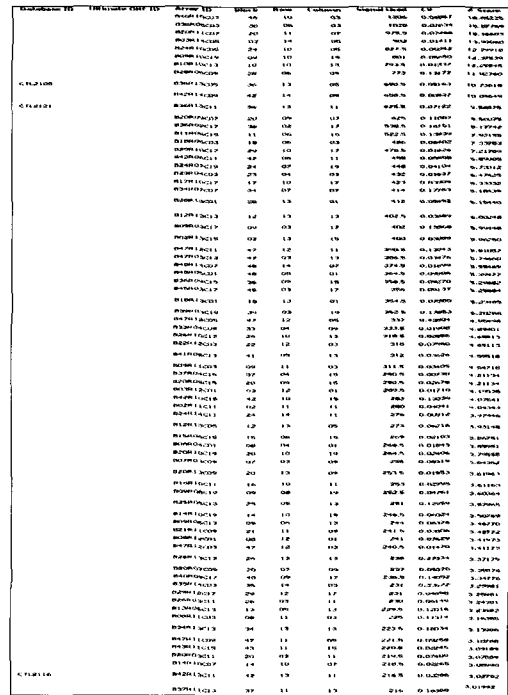


Figure 2. Relative affinity ranking with the APin protein.

Table 2. Four high expression proteins are related to the functional characteristics, such as tumorigenesis, organ development and mineralization

| Order | Z-Score | Proteins | Function |
|-------|---------|---------------------------------|---|
| 14 | 7.92155 | MEF2 | - coregulator for myogenic cell proliferation - tumor proliferation and tumorigenesis. |
| 29 | 5.39477 | Aurora kinase A | - overexpression and amplification of human tumor |
| 51 | 3.57965 | BMPR-IB | - organ development |
| 13 | 8.17742 | EF-hand calcium binding protein | - regulate cellular activity and mineralization |

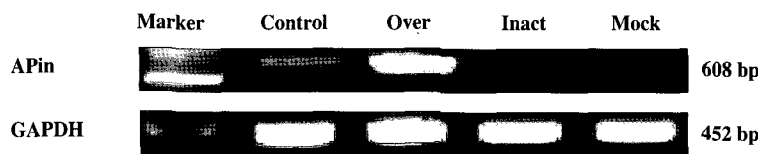


Figure 3. RT-PCR amplification of the APin in ameloblast cell line after over-expression with CMV-APin plasmid and inactivation with U6-APin siRNA.

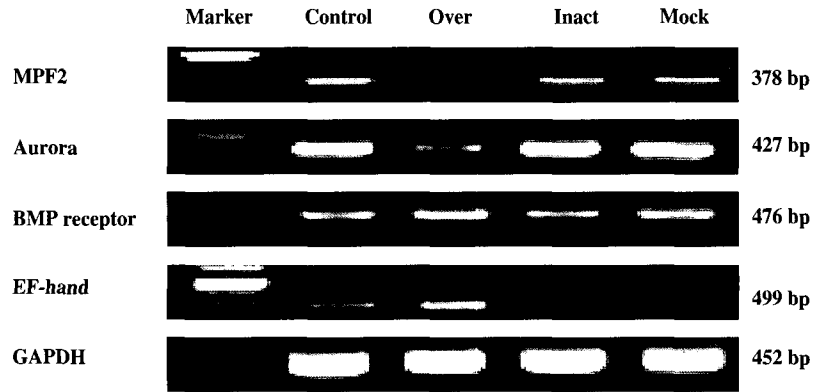


Figure 4. RT-PCR amplification of MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein ameloblast cell line after over-expression with CMV-*Apin* protein plasmid and inactivation with U6-*Apin* protein siRNA.

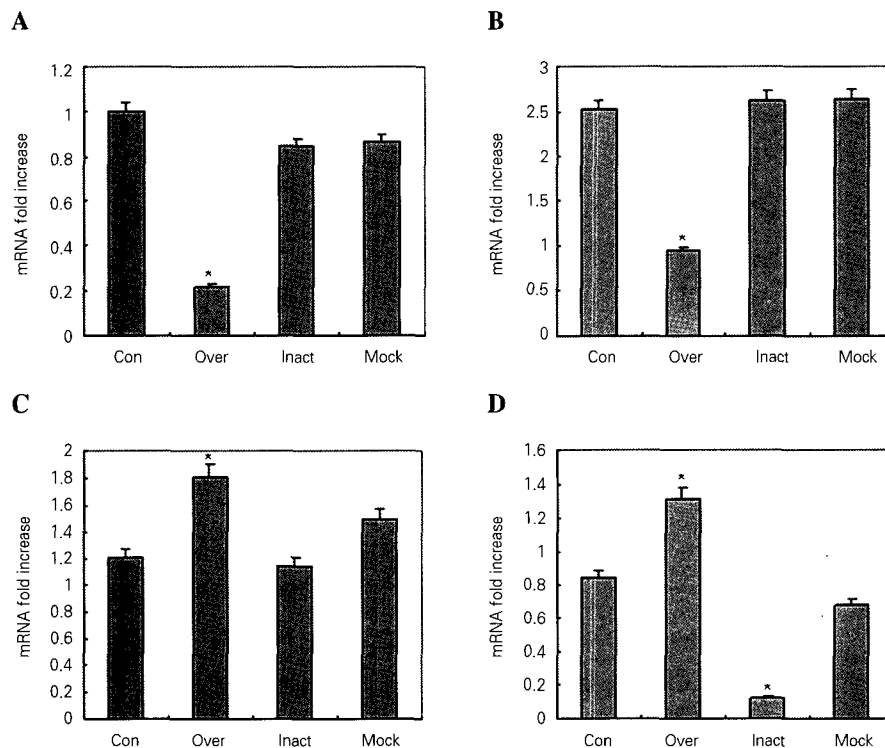


Figure 5. The amplification for the *Apin* reactions in control, over-expression, inactivation and mock groups. The relative amounts of MEF2 (A), Aurora kinase A (B), BMPR-IB (C) and EF-hand calcium binding (D) mRNA after normalization with the amounts of the GAPDH mRNA. The results were represented as means \pm SD of three independent transfections. Con, normal ALC; Over, *Apin* over-expression; Inact, *Apin* inactivation; Mock, ALC expressing empty vector.

IV. 고 찰

치아의 발생은 상피기원의 법랑모세포와 중간엽기원의 상아모세포에 의해서 상호 조절된다¹⁾. 최근 들어 치아형성에 관여하는 이들 세포들의 분화유도인자와 독특한 세포-특이적 유전자들에 대한 관심이 높아지고 있으나, 법랑모세포의 분화과정이나 법랑질의 형성과정의 분자생물학적 기전에 대하여 명확히 밝혀져 있지 않다²⁴⁻²⁶⁾.

상피기원인 법랑모세포는 법랑질 형성 각 시기의 주요활성이 반영된 표현형의 변화를 점진적으로 보이는 독특한 생활주기를 갖는다. 법랑질 형성은 기능적으로 분비전기 (presecretory stage), 분비기 (secretory stage), 성숙기 (maturation stage)의 세 시기로 일반적으로 구별된다^{27,28)}. 분비전기에는 내치아상피 (inner dental epithelium)가 법랑모세포로 분화하여 단백질 합성기구를 발달시켜 유기바탕질 (organic matrix) 분비를 준비한다. 분비기 법랑모세포는 Tome's 돌기를 특징으로 하며 왕성한 합성 및 분비활동을 반영한다. 성숙기의 법랑모세포에는 주름세포끝 (ruffle ended)과 평탄세포끝 (smooth ended)이 주기적으로 교대로 나타나면서 무기질 침착에 필요한 이온을 조성하고 운반한다²⁹⁻³³⁾.

최근에 박 등⁵⁾은 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314의 법랑질 형성에서의 역할을 시사하였다. Solomon 등⁴⁾에 의해 OD314가 APin 단백질의 염기서열과 거의 유사함이 밝혀졌으며, Moffatt 등⁸⁾은 APin이 성숙기 법랑모세포에서 뿐 아니라 치아기에서도 발현된다고 하였다.

본 연구에 사용한 법랑모세포 세포주는 Nakata 등²²⁾이 C57BL/6J mouse의 하악 대구치에서 얻은 세포주로, 분화 유도를 위한 일정한 조건에서 이 세포를 배양하면 세포들이 법랑모세포의 특성을 보이는 것을 RT-PCR 분석을 통하여 확인한 세포주이다. 본 실험에서 법랑모세포 세포주에 U6-APin siRNA construct와 CMV-APin construct를 이용하여 APin의 과발현과 발현억제를 유도하였다. APin의 과발현을 유도하였을 때 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, APin의 발현을 억제 시킨 경우에는 APin mRNA의 발현이 관찰되지 않았다. 이는 법랑모세포 세포주에 대하여 APin의 과발현과 발현 억제가 정상적으로 이루어졌음을 나타낸다.

이 실험에서는 지금까지 보고된 APin 단백질⁴⁻⁷⁾의 상호작용을 연구하고자 protein microarray를 시행하였다. 단백질은 그 특성상 또 다른 단백질과 상호작용을 통해 그 기능을 수행하는데 단백질칩은 단백질 상호작용을 분석하는데 가장 적합한 방법 중의 하나이다. 단백질칩은 수천 개의 단백질을 작은 칩상에 고정해 동시다발적으로 단백질의 결합

을 분석하는 자동화 기기시스템으로 센서칩과 단백질결합 분석장치로 구성되어 있다. 센서칩은 수백개의 단백질이 작은 표면에 일정한 배열로 결합된 것으로 대부분 슬라이드글라스 크기의 유리나 플라스틱이 이용된다. 본 연구에서는 글라스위에 nitrocellulose가 coating되어있는 NC slide칩을 사용하였다. 칩상의 모든 단백질은 gateway system으로 full length clone을 만들고 insect cell을 이용하여 발현시켰다. 생산되는 모든 단백질은 GST tag를 가지고 있기 때문에 GST column을 이용하여 분리하여 pin spot 방식으로 spotting하였다.

본 실험에서 APin 단백질을 probe로 이용하여 protoarray 실험을 한 결과, APin과 결합하는 단백질 중에서 Z-score 값이 3 이상이 되는 74개의 단백질 중, 친화성이 강하면서 그들의 역할에 관심이 있는 4개의 단백질들(MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein)을 분석하였다.

MEF2는 근육-특이 유전자(muscle-specific genes)의 발현을 조절하는 MADS-box transcription factor를 포함한다¹¹⁾. MEF2는 생쥐 배아의 carcinoma P19 세포의 분화 과정 중에 발현이 증가¹¹⁾되고, 발육중인 근육세포에서도 그 발현이 증가¹²⁾하기 때문에 근육세포의 증식과 증양의 증식 조절자로 작용하는 것으로 여겨진다.

Aurora kinase는 세포분열의 핵심조절인자로 확인된 serine/threonine kinase을 나타내며 Aurora-A, Aurora-B와 Aurora-C kinase의 3종류로 분류된다¹⁵⁾. 인간의 다양한 암세포에서 그 발현이 증가되어 암세포와 관련된 많은 세포의 표현형에 관여한다¹⁵⁾. Brown 등¹³⁾과 Carvajal 등¹⁴⁾은 transfection 실험에서 Aurora kinase의 과발현이 악성(malignancy)과 관련이 있기 때문에 이들 kinase의 억제를 통한 암치료에 적용을 암시하였다.

본 실험에서는 종양세포의 증식과 관련이 있는 MEF2와 Aurora kinase A는 CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 둘 모두에서 발현이 현저히 감소하였다. U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다. APin 과발현이 MEF2와 Aurora kinase A의 발현을 억제하는 것으로 보아 APin은 법랑모세포의 증식과정에서 MEF2와 Aurora kinase A의 역할을 대신하는 것으로 생각된다.

BMP는 치아발생이나 모낭(hair follicle)의 발생과 같은 상피-간엽상호작용에 의한 발생과정에서 세포의 분화와 증식을 조절한다⁶⁾. 발생동안에 BMP들은 세포사멸, 증식과 분화를 유도하는데 이들의 각각 다른 효과는 두 종류의 BMP receptors에 의해 조절된다. BMPR-IB와 -II는 상아모세포에서 확인이 됨에 반하여 BMPR-IA와 -II는 법랑모세포에서 확인되었다¹⁷⁾.

EF-hand calcium binding protein parvalbumin은 지금까지 근육과 신경세포에서 광범위하게 연구되어 왔으나 최근에 immunogold cytochemistry법에 의해 세포내 발현을 확인함으로써 치아발생 과정동안의 석회화 (mineralization)에 그의 역할이 제기되었다¹⁸⁾. 분화중인 법랑모세포에서 parvalbumin은 Tomé's 돌기의 형성 초기에는 세포의 근위부에 발현되다가 돌기 형성이 완료되면 세포 전체에 고루 퍼진다¹⁸⁾. 주름끝과 평탄끝 법랑모세포에서 parvalbumin의 발현은 다양하게 나타나며, 분화중인 상아모세포에는 법랑모세포에서보다 더 약하게 발현된다. 또한 법랑질의 광화에 있어 중요한 역할을 하는 tuftelin은 EF-hand calcium-binding domain을 갖는다¹⁹⁾.

치아발생과 같은 기관의 발생과 석회화와 관련이 있는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein은 APin의 과발현을 유도한 경우에는 모두에서 발현이 많이 증가되었으나, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하였다. 본 연구에서 APin 과발현시 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein의 발현이 많이 증가한다는 것은 APin은 BMPR-IB와 EF-hand calcium-binding protein의 역할을 촉진시켜 치아형성 말기에 법랑질과 상아질의 석회화에 관여한다는 것을 암시한다.

본 연구 결과로 보아 APin 단백질은 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 상호작용하여 법랑모세포의 분화와 석회화 과정 중에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 그들 상호간의 신호전달 경로 등에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

단백질칩을 이용한 protein microarray는 단백질의 상호작용 연구에 중요하게 사용되는 핵심기술이다. 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 최근에 APin 단백질의 염기서열과 거의 유사함이 밝혀졌으며, 법랑모세포에도 발현되어 APin의 법랑질 형성에서의 역할을 시사하였다. 이 연구에서는 protein microarray를 이용하여 법랑모세포 분화과정 중에 APin의 역할을 탐색하고자 하였다.

APin protein microarray를 시행하여 APin 단백질과 높은 친화성을 보이며, 치아 발생과 관련이 있는 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein을 분석하였다. 법랑모세포주에 APin 과발현과 발현억제를 유도하기 위해서 U6-APin siRNA construct와 CMV-APin construct로 transfection하였다. Transfection 후에 protein microarray에 의해서 선택된 4개의 유전자 발현을 RT-PCR로 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin 발현을 억제시킨 경우에는 APin은 관찰되지 않았다.
2. APin의 과발현을 유도한 경우에는 MEF2와 Aurora kinase A 둘 모두에서 발현이 현저히 감소한 반면에, APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다.
3. APin의 과발현을 유도한 경우에는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein 모두에서 발현이 크게 증가한 반면, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하였다.

위의 결과들로 보아 APin 단백질은 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 상호작용하여 법랑모세포의 분화와 석회화 과정 중에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

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 (Dmpl) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*. *J Bone Miner R* 12:2040-2049, 1997.
3. Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Arch Oral Biol* 46:249-260, 2001.
4. Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Sletten K, Westermarck G, Westermarck P. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 142:348-355, 2003.
5. 김두현, 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. 상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능 연구. *대한치과보존학회지* 29:399-408, 2004.
6. 박주철, 김익환, 김홍중, 정문진, 오현주, 정재오, 손호현. 흰쥐 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 역할. *대한체질인류학회지* 18:187-196, 2005.
7. Aung PP, Oue N, Mitani Y, Bosserhoff AK, Yasui W. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene* 25: 2546-2557, 2006.
8. Moffatt P, Smith CE, Sooknunan R, St-Arnaud R, Nanci A. Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach. *Eur J Oral Sci* 114(Suppl):

- 139-146, 2006.
9. Kawahashi Y, Doi N, Takashima H, Tsuda C, Oishi Y, Oyama R, Yonezawa M, Miyamoto-Sato E, Yanagawa H. *In vitro* protein microarrays for detecting protein-protein interactions: application of a new method for fluorescence labeling of proteins. *Proteomics* 3:1236-1243, 2003.
 10. Letarte M, Voulgaraki D, Hatherley D, Foster-Cuevas M, Saunders NJ, Barclay AN. Analysis of leukocyte membrane protein interactions using protein microarrays. *BMC Biochem.* 6:1-12, 2005.
 11. Hidaka K, Morisaki T, Byun SH, Hashido K, Toyama K, Mukai T. The MEF2B homologue differentially expressed in mouse embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213:555-560, 1995.
 12. Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 6:1783-1798, 1992.
 13. Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol* 4:39-45, 2004.
 14. Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK. Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 12:6869-6875, 2006.
 15. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 22:451-464, 2003.
 16. Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB 3rd, Millar SE. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* 131:2257-2268, 2004.
 17. Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. Expression patterns of BMPs in the developing mouse molar. *Cell Tissue Res* 324:33-40, 2006.
 18. Davideau JL, Celio MR, Hotton D, Berdal A. Developmental pattern and subcellular localization of parvalbumin in the rat tooth germ. *Arch Oral Biol* 38:707-715, 1993.
 19. Deutsch D, Dafni L, Palmon A, Hekmati M, Young MF, Fisher LW. Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. *Ciba Found Symp* 205:135-147, 1997.
 20. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-5520, 2002.
 21. 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현억제가 상아모세포 전구세포에 미치는 영향. *대한체질인류학회지* 17:121-129, 2004.
 22. 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 Commun* 308:834-839, 2003.
 23. 김지웅. APin 재조합단백질의 합성과 적용. 조선대학교 대학원 석사학위논문, 2006.
 24. Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 231:758-765, 2004.
 25. 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. *Connect Tissue Res* 44:124-129, 2003.
 26. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 7:719-730, 2004.
 27. Garant PR. Oral cells and tissues. 2nd ed., Quintessence publishing Co., Inc., Chicago, IL, p25-52, 2003.
 28. Nancy A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., Mosby, Inc., St. Louis, MI, p192-239, 2003.
 29. Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, St-Arnaud R, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J* 399:37-46, 2006.
 30. Reith EJ, Boyde A. Autoradiographic evidence of cyclical entry of calcium into maturing enamel of the rat incisor tooth. *Arch Oral Biol.* 26:983-987, 1981.
 31. Salama AH, Zaki AE, Eisenmann DR. Cytochemical localization of Ca²⁺-Mg²⁺ adenosine triphosphatase in rat incisor ameloblasts during enamel secretion and maturation. *J Histochem Cytochem* 35:471-482, 1987.
 32. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:128-161, 1998.
 33. Takano Y, Crenshaw MA, Reith EJ. Correlation of ⁴⁵Ca incorporation with maturation ameloblast morphology in the rat incisor. *Calcif Tissue Int* 34:211-213, 1982.

국문초록

Protein microarray를 이용한 APin-단백질의 상호작용에 관한 연구

박주철¹ · 박선화¹ · 김홍중¹ · 박종태¹ · 윤성호¹ · 김지웅¹ · 이태연² · 손호현^{2*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실, ²서울대학교 치의학대학원 치과보존학교실

이 연구에서는 법랑모세포 분화과정에서 APin의 기능을 알아보하고자 APin-protein microarray를 시행한 후 치아발생과 관련이 있는 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 MEF2와 Aurora kinase A 둘 모두에서 발현이 현저히 감소한 반면에, APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다.
2. APin의 과발현을 유도한 경우에는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein 모두에서 발현이 크게 증가한 반면, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하였다.

위의 결과들로 보아 APin 단백질은 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 상호작용하여 법랑모세포의 분화와 석회화 과정 중에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

주요어: APin, 법랑모세포, Protein microarray, 석회화, 상호작용, 분화