

2006년 8월  
박사학위논문

치주인대섬유모세포의 분화와 성숙  
과정에서 아미노산 수송계  $L$ 의  
발현 및 역할

조선대학교 대학원

치의학과

황 규 영

치주인대섬유모세포의 분화와 성숙  
과정에서 아미노산 수송계 L의  
발현 및 역할

*Role and expression of amino acid transport system L  
in the differentiation and maturation of  
periodontal ligament fibroblasts*

2006년 8월 일

조선대학교 대학원

치의학과

황 규 영

치주인대섬유모세포의 분화와 성숙  
과정에서 아미노산 수송계  $L$ 의  
발현 및 역할

지도교수 김 병 옥

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

황 규 영

# 황규영의 박사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교    수    김    생    곤    인

위    원    전남대학교    교    수    김    영    준    인

위    원    조선대학교    교    수    김    도    경    인

위    원    조선대학교    교    수    장    현    선    인

위    원    조선대학교    교    수    김    병    옥    인

2006년 6월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차 .....	iii
도목차 .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>I. 서론</b> .....	1
<b>II. 실험재료 및 방법</b> .....	3
1. 실험재료 및 실험동물 .....	3
2. 치주인대섬유모세포의 배양과 분화 .....	3
3. 역전사 중합효소연쇄반응 분석 .....	3
4. Alizaline red 염색 .....	4
5. Uptake 실험 .....	4
6. 통계학적 검정 .....	6
<b>III. 실험결과</b> .....	7
1. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 발현 .....	7
2. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 분화 특이유전자의 발현 .....	7
3. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 세포형태의 변화 .....	8
4. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 석회화 결절의 형성 .....	8

5. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 [ <sup>14</sup> C]L-Leucine의 수송특성 .....	9
IV. 총괄 및 고안 .....	10
V. 결론 .....	13
VI. 참고문헌 .....	14
VII. 사진 부도 설명 .....	17
VIII. 사진부도 .....	20

## 표 목 차

Table 1. Primer sequences for PCR .....	5
---	---

## 도 목 차

Fig. 1. Detection of LAT1 mRNA by RT-PCR .....	20
Fig. 2. Detection of LAT2 mRNA by RT-PCR .....	21
Fig. 3. Detection of 4F2hc mRNA by RT-PCR .....	22
Fig. 4. Detection of alkaline phosphatase (ALP) mRNA by RT-PCR .....	23
Fig. 5. Detection of type I collagen (Col I) mRNA by RT-PCR .....	24
Fig. 6. Change of cell morphology in PDL fibroblast cells .....	25
Fig. 7. Mineralized nodule formation in PDL fibroblast cells .....	26
Fig. 8. [ <sup>14</sup> C]L-Leucine uptake by PDL fibroblast cells .....	27



# *ABSTRACT*

## *Role and expression of amino acid transport system L in the differentiation and maturation of periodontal ligament fibroblasts*

*Hwang, Kyu-Young*

*Advisor: Prof. Kim, Byung-Ock, D.D.S., M.S.D., Ph.D.*

*Department of Dentistry,*

*Graduate School of Chosun University*

The periodontium is a topographically complex organ consisting of epithelial tissue, soft and mineralized connective tissues. Structures comprising the periodontium include the gingiva, periodontal ligament (PDL), cementum and the alveolar bone. The molecular mechanism of differentiation in PDL fibroblast cells remain unclear. Amino acid transporters play an important role in supplying nutrition to normal and cancer cells and for cell proliferation. Amino acid transport system L is a major nutrient transport system responsible for the Na<sup>+</sup>-independent transport of neutral amino acids including several essential amino acids. The system L is divided into two major subgroups, the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and the L-type amino acid transporter 2 (LAT2). In this study, the role and expression pattern of amino acid transport system L were, therefore, investigated in the differentiation and maturation of PDL fibroblast cells.

To determine the expression level and its role of amino acid transport system L participating in intracellular transport of amino acids in the differentiation and maturation of PDL fibroblast cells, it was examined RT-PCR, observation of cell

morphology, Alizalin-red S staining and uptake analysis after inducing experimental differentiation in PDL fibroblast cells isolated from mouse molar teeth. The results are following.

1. The LAT1 was expressed in the early stage of PDL fibroblast cell differentiation. This expression was gradually reduced by differentiation-inducing time and it was not observed after the late stage.
2. The expression of LAT2 was increased in time-dependent manner during differentiation induction of PDL fibroblast cells.
3. There was no changes in the expression level of 4F2hc, the cofactor of LAT1 and LAT2, during differentiation of PDL fibroblast cells.
4. The expression of ALP was gradually increased and the expression of Col I was decreased during differentiation of PDL fibroblast cells.
5. The L-leucine transport was reduced by time from the early stage to the late stage in PDL fibroblast cell differentiation.

As the results, it is considered that among neutral amino acid transport system L in differentiation of PDL fibroblast cells, the LAT1 has a key role in cell proliferation in the early stage of cell differentiation and the LAT2 has an important role in the late stage of cell differentiation for providing cells with neutral amino acids including several essential amino acids. Besides, it suggests new direction for alveolar bone regeneration in the treatment of periodontal disease.

# I. 서 론

치주조직(periodontium)은 치아를 지지하고 감싸는 조직으로 시멘트질(cementum), 치주인대(periodontal ligament), 치조(alveolus)의 안쪽을 둘러싸는 뼈 및 잇몸(gingiva)으로 구성된다. 이 중 치주인대는 치주인대섬유모세포(periodontal ligament fibroblast), 상피세포(epithelial cell), 미분화 간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell), 대식세포(macrophage) 및 시멘트질모세포(cementoblast) 등 다양한 세포들로 구성되어 있으며, 정상적인 자극에 의해 치조골과 시멘트질을 생성할 수 있기 때문에 치주조직의 치유에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>1)</sup>. 또한 치주인대섬유모세포는 치주치료 시 치주인대 유지, 치료 및 재생과정에서 골모세포(osteoblast)와 시멘트질모세포로 분화와 증식이 가능하기 때문에 치주조직의 재생에 중심적인 역할을 한다고 볼 수 있다<sup>1)</sup>.

치주인대섬유모세포의 분화와 증식을 위해서, 분화를 위한 세포내 화학적·물리적 신호 및 증식을 위한 단백질 합성에 필수적인 아미노산들의 세포 내 유입이 증가하여야 할 것이다. 세포 내로 아미노산 수송의 증가는 아미노산을 수송할 수 있는 아미노산 수송체의 과발현에 의해 유도될 것으로 생각되나 이와 같은 실험적 자료는 거의 없다.

아미노산은 단백 합성의 기질이 되는 기능 이외에도, 포도당, 퓨린, 피리미딘 등 많은 생체분자들의 합성을 위한 전구물질이 되므로 생체 내 필수 영양물질 중의 하나이다<sup>2)</sup>. 생체분자의 생합성 반응은 주로 세포 내에서 이루어지고 아미노산은 세포막을 통과하기 어려운 친수성 물질이므로, 세포는 아미노산을 세포의 밖에서 세포의 안으로 수송하기 위한 수송 단백질(아미노산 수송체)을 세포막에 필수적으로 보유해야 한다<sup>2)</sup>.

세포 내 대사가 특이적으로 향진되거나 지속적인 증식과 성장이 필수적인 세포들에게는 아미노산 수송체의 기능이 상승되어 단백 합성을 위한 아미노산의 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현(overexpression) 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다<sup>2,3)</sup>.

아미노산 수송계 L은  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 중성 아미노산을 주로 수송하는 세포막 단백질로서 중앙 세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성 아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송체로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. Kanai 등(1998)<sup>3)</sup>에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번

제 아형인 아미노산 수송체 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 rat glioma cell에서 동정되었다. LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, methionine과 histidine같은 구조가 큰 중성 아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다<sup>3-5</sup>. LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide 결합을 가진 heterodimer형 막 단백질이며, LAT1이 기능을 나타내기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이다<sup>3-6</sup>. 중성 아미노산 수송체 LAT1은 종양세포와 같이 세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 계속적인 증식과 성장이 필수적인 세포에서 과발현되어 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>3,4,7,8</sup>. 한편, LAT1의 분자적 동정 후에 아미노산 수송체 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정 되었다<sup>9-12</sup>. LAT2는 구조적으로 LAT1과 매우 유사하며,  $\text{Na}^+$ -비의존적으로 다수의 필수아미노산을 포함하는 중성 아미노산을 수송한다<sup>9-12</sup>. LAT1이 구조가 큰 중성 아미노산 만을 수송하는 특징을 보이는 반면, LAT2는 구조에 관계없이 중성아미노산을 모두 수송하는 넓은 기질특이성을 지니고 있다<sup>3-5,9-12</sup>.

아미노산 중 필수아미노산은 세포 자신이 합성하지 못하므로 세포 외로부터 세포 내로 수송되어야 한다<sup>2</sup>. 생체 내 아미노산 수송체들의 역할은 모두 중요하지만, 그 중에서 특히 아미노산 수송체 L은 그 수송기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성 아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다<sup>3,4,7,8</sup>. 치주인대섬유모세포의 분화와 증식 과정에서도 아미노산 수송체 L을 포함한 아미노산 수송체들의 과발현 현상이 나타나리라 사료되지만 이와 같은 아미노산 수송체들의 발현에 관한 실험적 증거 및 분자적인 기전을 밝히는 연구는 거의 없었다.

따라서 본 연구에서는 치주조직의 재생에 중요한 역할을 하는 치주인대섬유모세포의 분화와 증식과정에서 아미노산 수송체 L의 발현을 관찰하여 치주인대섬유모세포의 분화·성숙과정에서 아미노산 수송체 L의 역할을 밝히고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 실험동물

[<sup>14</sup>C]L-leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. 실험동물로는 동일조건 하에서 일정기간 사육한 체중 50 gm 내외의 실험용 생쥐(ICR mouse)를 암수 구별없이 사용하였으며, 먹이와 물은 제한하지 않았다.

### 2. 치주인대섬유모세포의 배양과 분화

본 실험에서 사용한 치주인대섬유모세포는 실험용 생쥐의 대구치에서 분리하여 사용하였다. 발치한 치아의 치근 중간 1/3에서 절제한 치주인대조직을 40% FBS(fetal bovine serum)와 20% 항생제를 가한  $\alpha$ -MEM으로 3회 세척한 후, 60mm 배양접시로 옮겨 약 1mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 조직을 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 20분간 배양시킨 후, 각 배양접시 당 2ml의 10% FBS와 1% 항생제를 포함한  $\alpha$ -MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 세포 분화와 석회화 유도를 위하여, 배양된 치주인대섬유모세포에 10% FBS와 항생제(penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 mg/ml)가 함유된 DMEM에 ascorbic acid(50 $\mu$ l/ml)와  $\beta$ -glycerophosphate(10mM)를 첨가하여 배양하면서 실험에 이용하였다<sup>13)</sup>.

### 3. 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석

분화가 진행되는 각각의 치주인대섬유모세포를 TRI REAGENT kit(Molecular

Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. cDNA를 합성하기 위하여 5 $\mu$ g의 total RNA를 reverse-transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 LAT1, LAT2, 4F2hc, alkaline phosphatase(ALP) 및 type I collagen(Col I) 등의 primer(Table 1)을 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR) 시행하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 12분, 변성(denaturation)반응을 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 결합(annealing)반응을 50~55 $^{\circ}$ C에서 1분, 중합(extension)반응을 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 40주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의 T<sub>m</sub> 값을 고려하여 LAT1과 4F2hc의 결합반응 온도는 54 $^{\circ}$ C, LAT2의 결합반응 온도는 50 $^{\circ}$ C, ALP와 Col I의 결합반응 온도는 55 $^{\circ}$ C로 시행하였다. RT-PCR 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

#### 4. Alizaline red 염색

치주인대섬유모세포의 석회화 정도를 확인하기 위하여 Alizaline red 염색을 시행하였다. 분화를 유도한 치주인대섬유모세포를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethanole로 20분 동안 고정된 다음 0.1% NH<sub>4</sub>OH가 함유된 1% Alizalin red-S(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 5분간 염색하여 관찰하였다.

#### 5. Uptake 실험

분화를 유도한 치주인대섬유모세포들에서 아미노산 수송체 L의 특성을 조사하기 위하여 Kim 등(2002)<sup>14)</sup>의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다.

37 $^{\circ}$ C의 성장배지가 함유된 6 well plate에서 배양된 각 분화시기별 치주인대섬유모세포를 uptake 실험에 이용하였다. 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤 세포를

*Table 1. Primer sequences for PCR*

<i>Primer Name</i>	<i>Sequence (5'→3')</i>	<i>PCR Product (bp)</i>
LAT1 (sense)	CAGCTCCCTGAGTATGAAAG	499
LAT1 (antisense)	ATCCTCAGGACATCACAAAC	
LAT2 (sense)	TCAGCTGGAGAGACTCAGAT	500
LAT2 (antisense)	ATCCTTCATACCTGGTCCTT	
4F2hc (sense)	AAGGAGGAGCTACTGAAGGT	497
4F2hc (antisense)	ATTTTGGTGGCTACAATGTG	
ALP (sense)	TGGCCAAGAAGACAGTAAGT	321
ALP (antisense)	GCCTTATTTTCATTTTCGATG	
Col I (sense)	CTCCATGGTAGATTACGCTC	422
Col I (antisense)	GATACAGGCAAGGCAGATAG	
GAPDH (sense)	TGCATCCTGCACCACCAACT	349
GAPDH (antisense)	CGCCTGCTTCACCACCTTC	

ALP: alkaline phosphatase

Col I : type I collagen

Na<sup>+</sup>-free uptake 용액(125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.4)을 사용하여 3회 세척한 후 10분간 전배양 하였다. 그 후, [<sup>14</sup>C]L-leucine 30μM이 존재하는 동일 uptake 용액으로 교체하여 2분 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4℃의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 세포를 0.1 N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 본 논문의 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 군은 4개의 well을 이용하였으며, 각각의 결과를 mean ± SEM으로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 3회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다. 본 논문의 실험대상이 되는 아미노산 수송계 L에 의한 중성 아미노산들의 수송은 Na<sup>+</sup>-비의존적으로 이루어짐으로, 본 논문의 모든 uptake 실험은 Na<sup>+</sup>-free uptake 용액에서 시행하여 비교하였다<sup>3-5,9-12)</sup>.

## 6. 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



### III. 실험 결과

#### 1. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 발현

치주인대섬유모세포의 증식과 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 아형인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc mRNA의 발현을 확인하기 위해, 각각의 primer(Table 1)을 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 치주인대섬유모세포에서 아미노산 수송체 LAT1의 발현을 분화시간별로 관찰하면, 분화유도 0일째인 대조군의 세포들에서 LAT1의 발현이 관찰되었고, 분화유도 2일째에서는 분화 0일째의 발현양인 GAPDH 대비 47%에서 LAT1의 발현이 30%로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 분화유도 4일째에서도 LAT1의 발현양이 감소하여 GAPDH 대비 12%까지 감소하였으며, 분화유도 7일째부터는 LAT1의 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 아미노산 수송체 LAT2의 발현은 분화유도 0일째인 대조군에서는 관찰되지 않았으나, 분화유도 2일째부터 관찰되었다(Fig. 2). 분화유도 2일째에는 GAPDH 대비 12%의 발현을 관찰할 수 있었고 4일째에는 20%까지 발현이 증가하였으며 분화유도 7일째에는 GAPDH 대비 58%로 최대의 발현을 보였다(Fig. 2). LAT2의 발현은 분화유도 14일째와 21일째로 진행하면서 점차 감소하였다(Fig. 2). LAT1과 LAT2의 기능에 필수적 보조인자인 4F2hc의 발현은 분화유도 0일부터 21일째까지 비슷한 경향을 보였다(Fig. 3).

#### 2. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 분화 특이유전자의 발현

치주인대섬유모세포에서 분화를 유도한 후, 실험적으로 분화가 유도되는지 확인하기 위해, 치주인대섬유모세포의 분화에 의해 특이적으로 발현이 증가 및 감소되는 유전자인 ALP 및 Col I의 primer(Table 1)을 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 본 연구에서 치주인대섬유모세포에서 분화를 유도한 후 시간이 경과함에 따라 ALP의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 분화유도 0일, 2일 및 4일째까지는 ALP의

발현을 관찰할 수 없었으나, 7일째부터 GAPDH 대비 82%의 발현을 보이기 시작하여 14일째에서는 190%, 21일째에서는 213%의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). Col I의 발현은 치주인대섬유모세포의 분화유도과정에서 감소하였다(Fig. 5). Col I은 분화유도 0일째인 대조군에서 GAPDH 대비 123%의 발현을 보였으며, 분화유도 2일째에서 130%, 4일째에서는 127%, 7일째에서는 113%, 14일째에서는 97%, 21일째에서는 56%로 발현이 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5). 이 실험의 결과로 본 실험에서 분화유도 배지에 의한 치주인대섬유모세포의 분화를 확인할 수 있었다.

### 3. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 세포형태의 변화

치주인대섬유모세포의 분화과정에서 세포형태의 변화를 관찰하였다. 분화유도 4일째부터 세포의 증식과 팽창이 관찰되었으며 세포형태의 변화가 관찰되었다(Fig. 6B, Fig. 6C). 분화유도 7일째에는 여러 층의 결절과 세포가 관찰되었으며, 특히 분화유도 4일과 7일 사이에 세포의 증식이 급격히 증가하여 여러 층의 세포와 흰 결절들이 관찰되기 시작하였다(Fig. 6C, Fig. 6D). 분화유도 7일에서 14일까지의 기간에서 흰 결절들이 육안으로도 확인되었으며, 이 시기의 세포형태는 분화유도 초기의 세포형태와 많은 차이가 있었다(Fig. 6D, Fig. 6E). 분화유도 14일과 21일에서 흰 결절들이 더욱 결집하여 크기의 증가를 보였다(Fig. 6E, Fig. 6F).

### 4. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 석회화 결절의 형성

치주인대섬유모세포 분화과정에서 석회화 결절을 확인하기 위하여 분화유도 후, Alizalin-red S 염색을 시행하였다. 분화유도 후 7일째부터 세포증식이 관찰되었으며, 분화유도 14일째부터는 여러 층의 결절을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A). 분화유도 21일째에는 더 많은 층의 결절이 관찰되었으며, 이 결절들을 Alizalin-red S 염색을 통하여 확인한 결과 석회화 결절이 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 7B).

## 5. 치주인대섬유모세포 분화과정에서 [ $^{14}C$ ]L-Leucine의 수송특성

치주인대섬유모세포 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성아미노산 중 실험적으로 가장 많이 이용되는 [ $^{14}C$ ]가 표지된 L-leucine을 이용하여 uptake 실험을 시행하였다. 분화유도 0일째인 대조군에서 L-leucine의 uptake 양은  $1875 \pm 175$  pmol/mg protein/min이었고, 분화유도 2일째에서는  $1768 \pm 165$  pmol/mg protein/min이었으며, 분화유도 4, 7, 14 및 21일째에는  $1524 \pm 107$ ,  $984 \pm 106$ ,  $935 \pm 127$  및  $896 \pm 84$  pmol/mg protein/min로 L-leucine의 uptake 양이 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 8).

## IV. 총괄 및 고안

본 연구에서는 치주인대섬유모세포의 분화와 성숙과정 시 필수적인 생체 영양물질인 아미노산들의 세포 내 수송에 관여하는 아미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 밝히기 위해, 실험용 생쥐의 대구치에서 분리한 치주인대섬유모세포에서 실험적 분화를 유도한 후, 아미노산 수송계 L의 발현을 관찰하고 아미노산 수송분석을 시행하였다.

아미노산 수송체들의 발현을 조사하는 RT-PCR 기법을 통해, LAT1 mRNA 발현은 분화유도 2일째에 대조군에 비해 감소하는 것을 볼 수 있었고, 분화유도 7일째부터는 그 발현을 관찰 할 수 없었다(Fig. 1). LAT2 mRNA 발현은 분화유도 2일 및 4일째부터 대조군에 비해 증가하였으며, 분화유도 7일째에 가장 많은 증가를 보이고 14일째부터 점점 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 LAT1은 정상 조직에서는 뇌, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 매우 제한되어 있다<sup>3,4)</sup>. 또 LAT1은 종양세포에서 과발현되며, 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>3,4,7,8)</sup>. 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 LAT2는 대부분의 사람 장기에서 발현하고 있으며, 특히 심장, 뇌, 태반, 신장, 비장, 전립선, 정소, 난소, 림프절 및 태아의 간 등에서 많은 발현을 하고 있다<sup>9-12)</sup>. 사람의 신장암 세포인 T24 세포<sup>14)</sup>와 사람의 구강편평세포암종 KB 세포<sup>15)</sup>에서도 LAT1의 발현을 확인할 수 있었으나 LAT2의 발현은 관찰할 수 없었다. 본 연구에서도 치주인대섬유모세포의 분화과정 중 아미노산 수송계 L의 두아형인 LAT1과 LAT2는 그 발현시기 및 발현양이 많은 차이가 있었다. Shibuya 등(2005)<sup>13)</sup>과 Foster 등(2006)<sup>16)</sup>은 치주인대섬유모세포에서 실험적인 분화를 유도하여 석회화 결절을 형성시킨 실험에서 분화과정 중 ALP, bone sialoprotein(Bsp), Col I, dentin matrix protein-1(Dmp-1), osteocalcin(Ocn) 및 osteropontin(Opn) 등의 유전자들이 발현을 증가 또는 감소하게 되어 석회화 결절의 형성에 기여한다고 보고하였다. 이 같은 선행연구자들의 보고들<sup>13,16)</sup>은 분화시기별로 중요한 역할을 하는 유전자와 단백질들이 서로 다르다는 것을 시사한다. 따라서 LAT1과 LAT2가 치주인대섬유모세포의 분화과정 중 시기별로 발현양상과 발현양이 서로 다르

다는 것을 확인한 본 연구결과와 분화시기별로 중요한 역할을 하는 유전자와 단백질들이 서로 다르다는 것을 시사한 선행연구자들의 보고<sup>13,16)</sup>를 같이 고찰하여 볼 때, 치주인대섬유모세포의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 중성아미노산 수송체 LAT1은 분화유도 초기에서 세포의 증식을 조절하며, 중성아미노산 수송체 LAT2는 분화기간 동안 석회화 결절 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2의 기능을 위한 필수적인 보조인자인 4F2hc 발현은 치주인대섬유모세포의 분화와 성숙과정 동안 발현의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 이는 LAT1과 LAT2는 분화과정 동안 그 발현양이 조절되지만, 4F2hc는 그들의 보조인자로 필수적이기 때문에 발현양의 변화가 관찰되지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서 ALP mRNA의 발현은 분화유도 초기에서는 그 발현을 관찰할 수 없었으나, 분화유도 7일째부터 발현되어 분화유도 14일과 21일에 발현이 최대로 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 4). Col I mRNA의 발현은 분화가 진행함에 따라 점점 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이 결과는 Foster 등(2006)<sup>16)</sup>의 연구결과와 유사한 것으로서, 본 연구에서 치주인대섬유모세포의 실험적인 분화가 정상적으로 이루어졌음을 의미한다. 또한 분화 중인 치주인대섬유모세포의 형태학적인 관찰(Fig. 6)과 석회화 결절 형성을 확인하기 위한 Alizalin red-S 염색(Fig. 7)을 통해서도 석회화 결절 및 분화 중인 세포와 기질들을 관찰할 수 있었다.

치주인대섬유모세포 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성아미노산 L-leucine을 이용하여 uptake실험을 시행한 결과, 분화유도 후 4일까지 완만한 감소를 보였으며, 분화유도 7일 이후에 급격한 감소를 보였다(Fig. 8). Yoon 등(2005)<sup>17)</sup>은 사람의 정상 구강편평상피세포와 사람의 구강편평세포암종에서 아미노산 수송체 L의 발현 및 역할을 밝힌 연구에서, 정상세포주인 구강편평상피세포에서는 LAT2만 발현하고 암세포주인 구강편평세포암종에서는 LAT1만 발현하여 각각의 세포에서 중성아미노산의 세포 내 유입역할을 담당한다고 보고하였으며, 구강편평상피세포에서 LAT1에 의해 유도되는 L-leucine uptake 양이 구강편평세포암종에서 LAT2에 의해 유도되는 L-leucine uptake 양보다 동일한 조건에서 많다는 것을 보고하였다. 본 연구

의 치주인대섬유모세포 분화과정에서는 시기에 따라 발현하는 아미노산 수송체 L의 아형이 서로 달랐으며, LAT1이 발현하는 분화유도 초기에는 L-leucine uptake 양이 상대적으로 높았으나 LAT2가 발현하는 분화유도 중기이후에는 L-leucine uptake 양이 점차 감소함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서의 L-leucine uptake 결과와 Yoon 등 (2005)<sup>17)</sup>의 연구결과를 같이 고찰하여 볼 때, 본 연구에서 치주인대섬유모세포의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 중성아미노산 수송체 LAT1은 분화유도 초기의 세포증식에 요구되는 중성아미노산을 세포 내로 유입시키는 역할을 하며, 아미노산 수송체 LAT2는 분화기간 동안 분화 및 석회화 결절형성에 요구되는 중성아미노산을 세포 내로 유입시키는 역할을 한다고 사료된다.

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 성장, 증식 및 분화가 일어나는 세포들에서는 아미노산 수송체들의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다<sup>3,4,7,8)</sup>. 아미노산 수송체 중 아미노산 수송체 L은 그 수송 기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다<sup>2,3)</sup>. 본 연구에서 LAT1은 분화유도 초기에 발현이 나타나 분화가 진행됨에 따라 그 발현이 감소하였고, LAT2는 분화유도 중기에서부터 발현이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 치주인대섬유모세포의 분화과정에서 아미노산 수송체 LAT1은 분화유도 초기의 세포의 증식에 중요한 역할을 하며, 아미노산 수송체 LAT2는 세포증식 이후의 세포분화 및 석회화 결절형성에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

결론적으로, 본 연구의 결과로 치주인대섬유모세포의 분화과정에서 중성아미노산 수송체 L 중, 환경의 변화에 따라 발현 변화가 민감한 LAT1은 분화유도 초기의 세포 증식에서, LAT2는 분화유도 중기이후의 세포분화에서 단백질 생합성을 위한 중성아미노산의 수송에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되며, 이들 아미노산 수송체 이론을 응용한 유전자, 단백질 및 약물을 이용하여 치조골 재생에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

치주인대섬유모세포의 분화와 성숙과정 시 필수적인 생체 영양물질인 아미노산들의 세포 내 수송에 관여하는 아미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 밝히기 위해, 실험용 생쥐의 대구치에서 분리한 치주인대섬유모세포에서 실험적 분화를 유도한 후, RT-PCR 분석, 세포 형태 관찰, Alizalin-red S 염색 및 uptake 분석실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대섬유모세포의 분화과정 초기에 LAT1은 발현하였고, 그 발현은 분화유도 시간이 경과하면서 점차 감소하였으며 분화유도 중반기 이후에서는 LAT1의 발현을 관찰할 수 없었다.
2. 치주인대섬유모세포의 분화과정 초기에서 분화유도 중반기로 시간이 경과함에 의해 LAT2의 발현은 증가하였다.
3. 치주인대섬유모세포의 분화과정 동안 LAT1과 LAT2의 보조인자인 4F2hc 발현은 변화가 없었다.
4. 치주인대섬유모세포의 분화과정에서 ALP의 발현은 점차 증가하였으며, Col I의 발현은 감소하였다.
5. 치주인대섬유모세포의 분화과정에서 분화유도 초기에서 분화유도 중반기로 시간이 경과함에 의해 L-leucine의 수송은 감소하였다.

본 연구의 결과로 치주인대섬유모세포의 분화과정에서 중성아미노산 수송계 L 중, LAT1은 분화유도 초기의 세포증식에서, LAT2는 분화유도 중기 이후의 세포분화에서 단백질 생합성을 위한 중성아미노산의 수송에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 또한 본 실험의 결과로 치주질환 치료 시 치조골 재생에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것이라 사료된다.

## VI. 참고 문헌

1. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol* 2000;24:56-72.
2. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990;70:43-77.
3. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, et. al. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Bio Chem* 1998;273:23629-23632.
4. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, et. al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:291-302.
5. Uchino H, Kanai Y, Kim DK, et. al. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 2002;61:729-737.
6. Nakamura E, Sato M, Yang H, et. al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274:3009-3016.
7. Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 1995;55:1152-1159.



8. Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 1996;56:5012–5022.
9. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, et. al. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 1999;274:19745–19751.
10. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000;440:503–512.
11. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, et. al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738–19744.
12. Rossier G, Meier C, Bauch C, et. al. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999;274:34948–34954.
13. Shibuya N, Nemoto E, Kanaya S, Kunii R, Shimauchi H. Retinoic acid is a potential negative regulator for differentiation of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2005;40:432–440.
14. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, et. al. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565:112–121.

15. Yoon JH, Kim YB, Kim MS, et. al. Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;205:215-226.
16. Foster BL, Nociti FH Jr, Swanson EC, et. al. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 2006;78:103-112.
17. Yoon JH, Kim IJ, Kim H, et. al. Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett* 2005;222:237-245.

## VII. 사진부도 설명

Fig. 1. Detection of LAT1 mRNA by RT-PCR. The first stand cDNAs prepared from the periodontal ligament (PDL) fibroblast cell total RNAs were used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresis on a 1.5 % agarose gel and visulaized with ethidium bromide. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from PDL fibroblast cells (LAT1; 499 bp, GAPDH; 349 bp) (0; 0 day after treatment with differentiation media, 2; 2 days after treatment with differentiation media, 4; 4 days after treatment with differentiation media, 7; 7 days after treatment with differentiation media, 14; 14 days after treatment with differentiation media, 21; 21 days after treatment with differentiation media) *B.* The percentage of LAT1 mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 2. Detection of LAT2 mRNA by RT-PCR. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from PDL fibroblast cells (LAT2; 500 bp, GAPDH; 349 bp) *B.* The percentage of LAT2 mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 3. Detection of 4F2hc mRNA by RT-PCR. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from PDL fibroblast cells (4F2hc; 497 bp, GAPDH; 349 bp) *B.* The percentage of 4F2hc mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 4. Detection of alkaline phosphatase (ALP) mRNA by RT-PCR. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from PDL

fibroblast cells (ALP; 321 bp, GAPDH; 349 bp) *B*. The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 5. Detection of type I collagen (Col I) mRNA by RT-PCR. *A*. Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from PDL fibroblast cells (Col I; 422 bp, GAPDH; 349 bp) *B*. The percentage of Col I mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

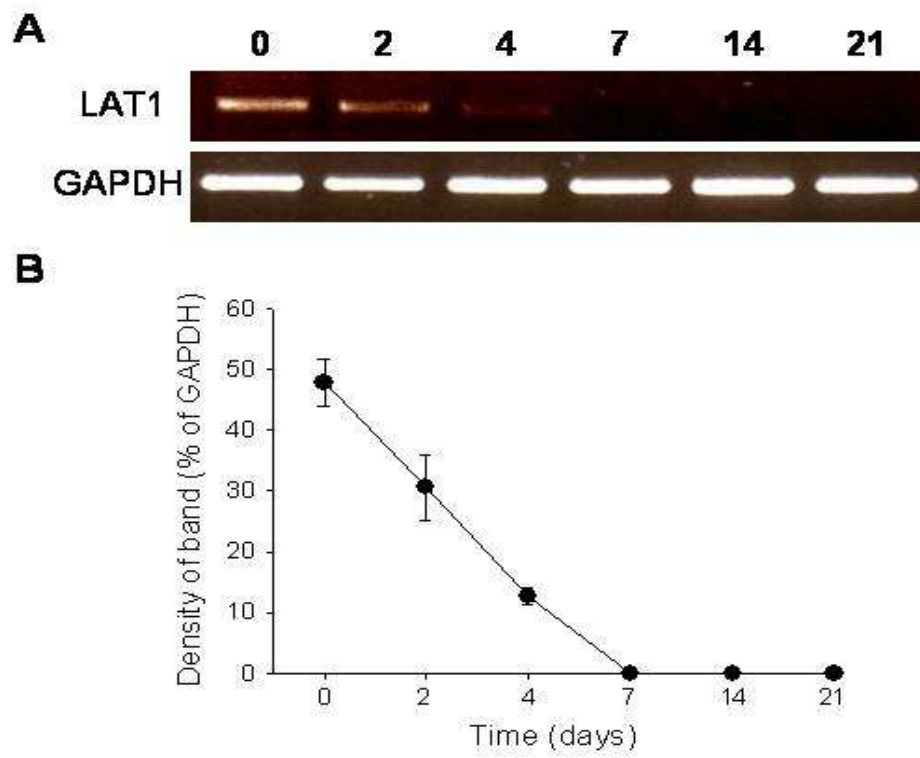
Fig. 6. Change of cell morphology in PDL fibroblast cells. The cell morphology in the differentiation media was examined after 2, 4, 7, 14 and 21 days of culture. The change of cell morphology during differentiation of PDL fibroblast cells was investigated to inverted microscope 100 X. *A*. The differentiating PDL fibroblast cells on 6 cm cell culture dish. It took the photograph from the square zone. *B*. Differentiation pattern of PDL fibroblast cells at 2 days after treatment with differentiation media. *C*. Differentiation pattern of PDL fibroblast cells at 4 days after treatment with differentiation media. *D*. Differentiation pattern of PDL fibroblast cells at 7 days after treatment with differentiation media. *E*. Differentiation pattern of PDL fibroblast cells at 14 days after treatment with differentiation media. *F*. Differentiation pattern of PDL fibroblast cells at 21 days after treatment with differentiation media. All scale bars indicated 20  $\mu\text{m}$ .

Fig. 7. Mineralized nodule formation in PDL fibroblast cells. The mineralized nodule formation induced by the differentiation media was examined after 7 and 14 days of culture. The cells were grown in the presence of ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate for inducing the mineralization. The nodules were

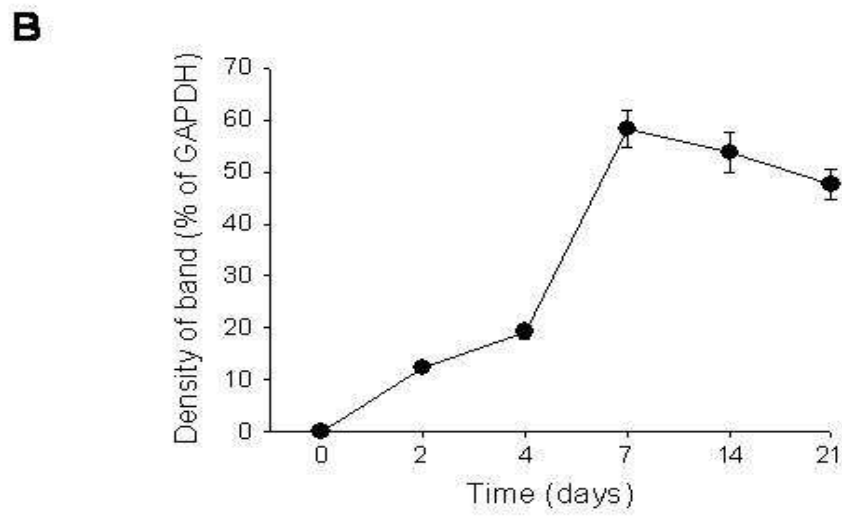
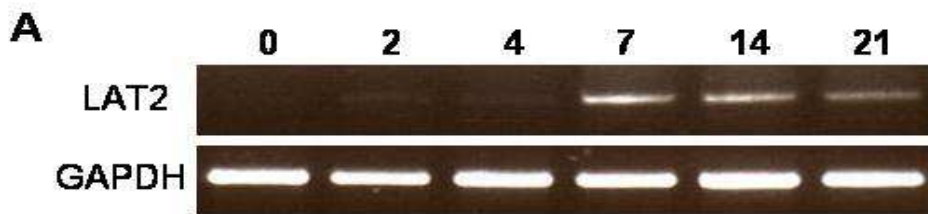
detected by Alizalin red-S staining. *A.* Mineralized nodule formation pattern of PDL fibroblast cells at 7 days after treatment with differentiation media. *B.* Mineralized nodule formation pattern of PDL fibroblast cells at 14 days after treatment with differentiation media. All scale bars indicated 10  $\mu\text{m}$ .

Fig. 8. [ $^{14}\text{C}$ ]L-Leucine uptake by PDL fibroblast cells. The [ $^{14}\text{C}$ ]L-Leucine (30  $\mu\text{M}$ ) uptake measured at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min in the  $\text{Na}^+$ -free uptake solution. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of three experiments. \*\* $P < 0.01$  vs. 0 day (the PDL fibroblast cells at 0 day after treatment with differentiation media).

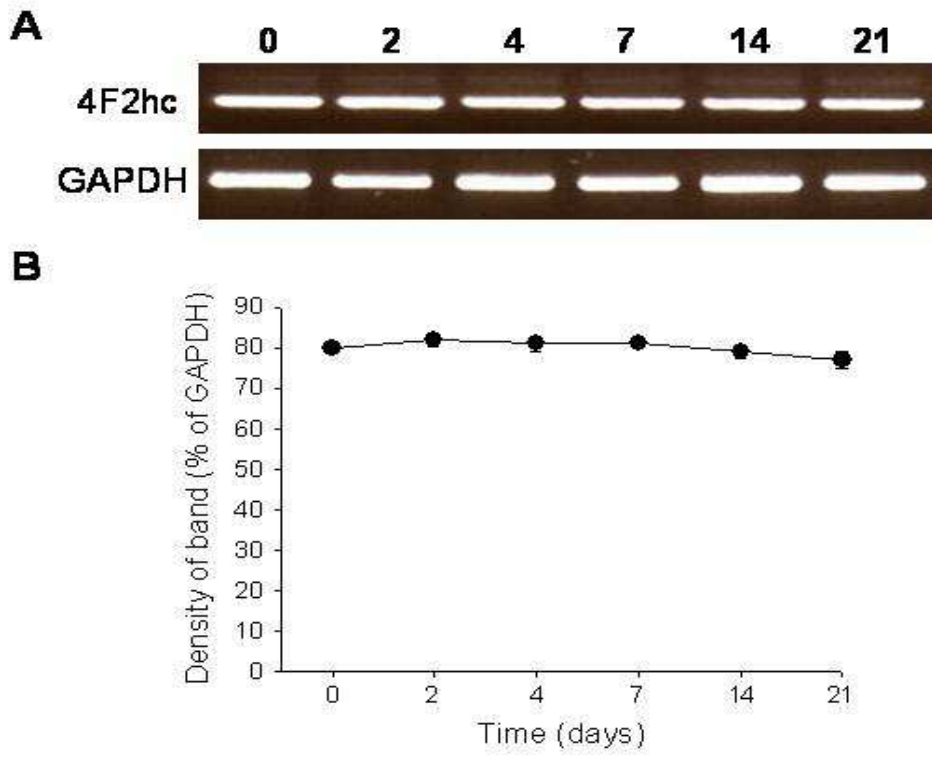
### VIII. 황규영 사진부도(Fig. 1)



VIII. 황규영 사진부도(*Fig. 2*)

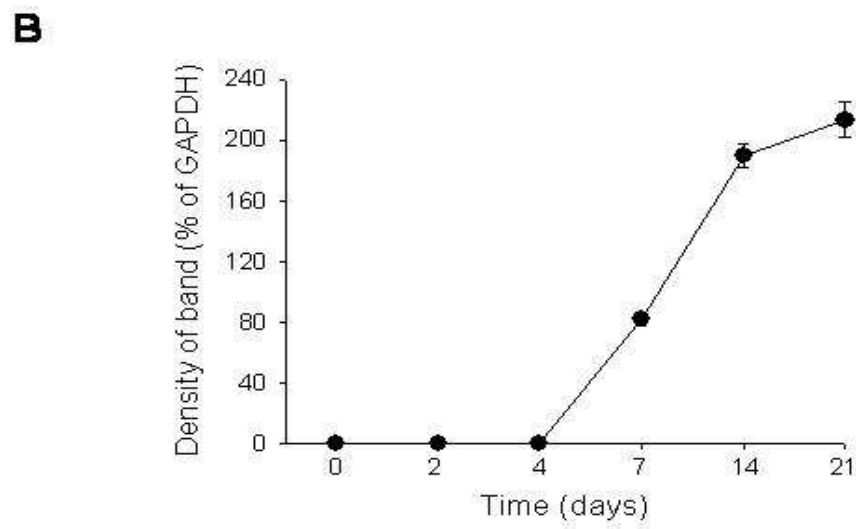
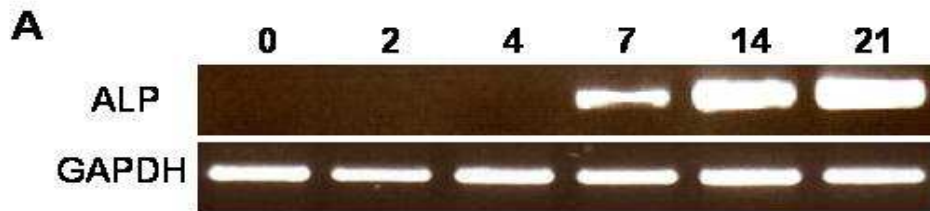


VIII. 황규영 사진부도(*Fig. 3*)

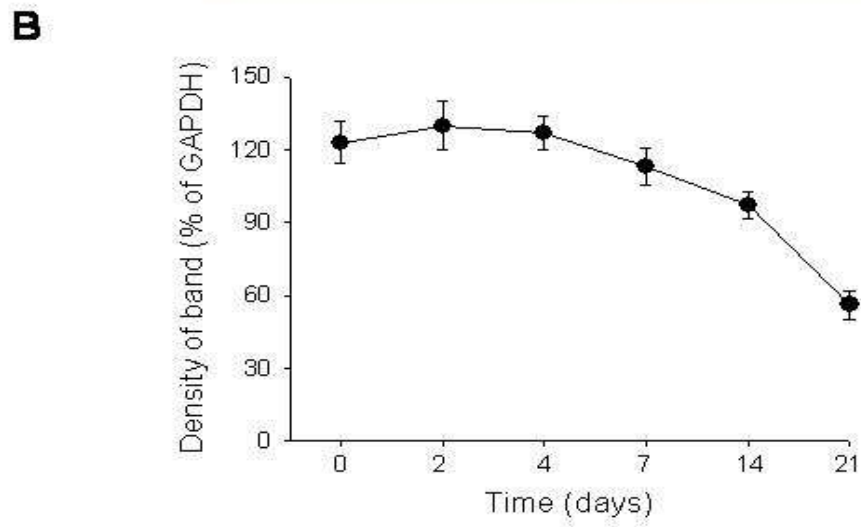
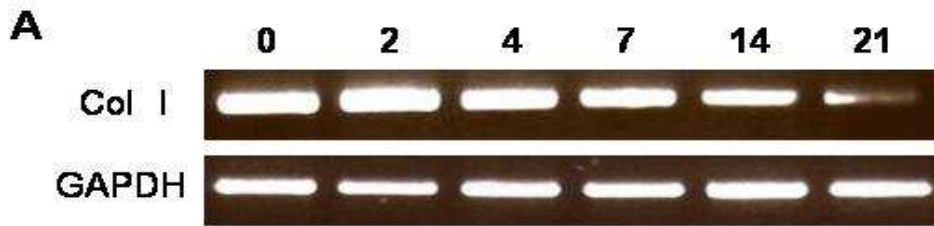




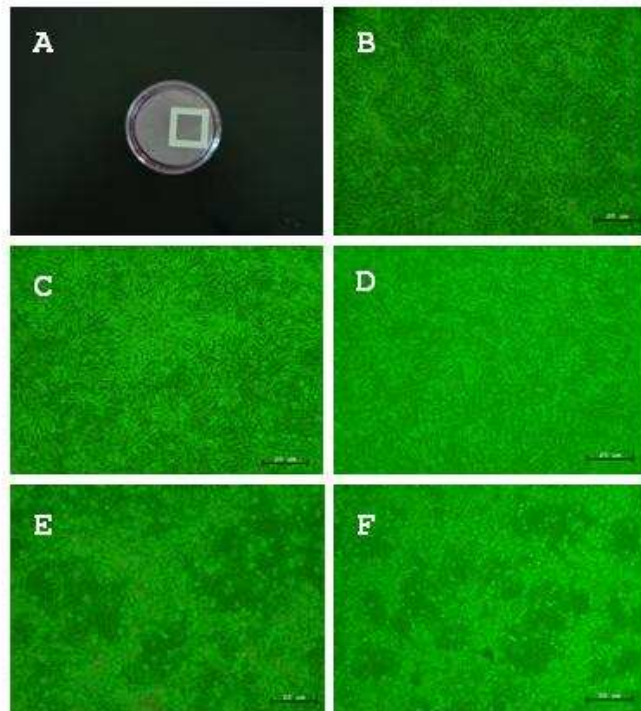
## VIII. 황규영 사진부도(Fig. 4)



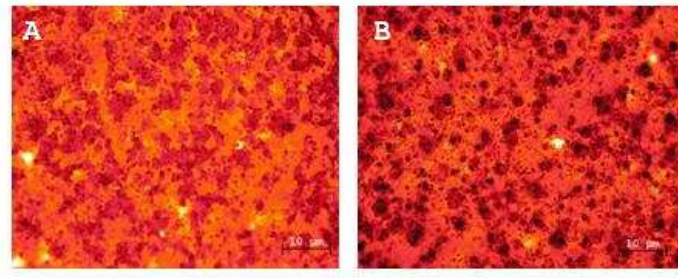
### VIII. 황규영 사진부도(Fig. 5)



VIII. 황규영 사진부도(*Fig. 6*)



## VIII. 황규영 사진부도(*Fig. 7*)



### VIII. 황규영 사진부도(Fig. 8)

