

2007년 2월  
석사학위논문

2007년 2월

석사학위논문

P D L S 2 2

재조합

단백질의

합성

및

평가

# PDLs22 재조합 단백질의 합성과 평가

조선대학교 대학원

치의학과

이 경 연

이

경

연

# PDLs22 재조합 단백질의 합성과 평가

Synthesis and evaluation of PDLs22  
recombinant protein

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

이 경 연

# PDLs22 재조합 단백질의 합성 및 평가

지도교수 박 주 철

이 논문을 치의학 석사학위 신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 경 연

# 이경연의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교 수    김    흥    종    인

위원        조선대학교    교 수    김    도    경    인

위원        조선대학교    교 수    박    주    철    인

2006년 11월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT .....	iii
I. 서 론 .....	1
II. 실험재료 및 방법 .....	3
1. PDLs22 유전자의 특성 분석 .....	
2. PDLs22 expression construct의 제작과 대장균내 발현	
1) PDLs22 expression constuct의 제작	
2) PDLs22 recombinant protein의 대장균내 발현	
3. PDLs22 재조합 단백질의 평가-Western blotting	
III. 실험결과 .....	7
1. PDLs22 유전자의 특성 분석	
2. 구축된 발현 구조물을 이용한 대장균에서의 over-expression 확인	
IV. 총괄 및 고안 .....	10
V. 결 론 .....	14
참고문헌 .....	15

# 도 목 차

Fig. 1. Cloning strategy of PDLs22 gene into expression vectors.	25
Fig. 2. Incubation procedure for the large scale preparation.	26
Fig. 3. Expression of PDLs22 recombinant protein using pRSET-PDLs22 (A) and PHCEIIBNd-PDLs22 (B)	26
Fig. 4. Expression of PDLs22 recombinant protein using <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS strain	26
Fig. 5. Expression of PDLs22 recombinant protein according to the various incubation conditions.	27
Fig. 6. Solubility of PDLs22 recombinant protein.	27

# *ABSTRACT*

## **Synthesis and evaluation of PDLs22 recombinant protein**

Lee, Kyoung Yeon

Advisor : Prof. Park, Joo-Cheol, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Periodontal ligament (PDL) is the connective tissue located between the tooth root and alveolar bone. In a previous study, *PDLs22* was isolated as a PDL-specific gene by using subtractive hybridization between cultured PDL fibroblasts and gingival fibroblasts. It was also suggested that PDLs22 plays important roles in the development, differentiation and maintenance of periodontal tissues. However, little is known about functional study of PDLs22 using recombinant protein in PDL fibroblast differentiation and periodontium formation.

In this study, in order to produce the PDLs22 recombinant protein, PDLs22-expression vector were constructed and expressed its protein in various host cell and temperature conditions.

The results were as follows:

1. PDLs22 protein was not strongly expressed in the induction system

using pRSET-PDLs22 construct.

2. When the BL21(DE3) pLysS was used as a expression host, PDLs22 protein was strongly expressed in the induction system using pHCEIIBNd-PDLs22 construct.
3. The PDLs22 protein was recognized at a molecular weight of 28 kDa in Western blots.
4. Almost of the expressed PDLs22 protein was not soluble and observed like as inclusion body.
5. The protein solubility was not improved after modification of induction time and temperature during PDLs22 protein production.

In this study, the system for the PDLs22 protein production was constructed. However, the results suggest that further studies will be needed to produce the considerable amount of PDLs22 recombinant protein, which can use for the periodontal regeneration.

Key words: PDLs22, recombinant protein, solubility, expression, UNCL



# I. 서 론

치주인대(periodontal ligament, PDL)는 치조골(alveolar bone)과 백악질(cementum) 사이에 위치하는 치밀결합조직으로 치아를 안정하게 유지시켜주고 생체 내에서 치주인대의 치유와 재생뿐만 아니라 인접 치조골과 백악질의 수복과 재생에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>.

치주조직에는 두 종류의 섬유모세포 즉 치주인대에 치주인대 섬유모세포(PDL fibroblast), 치은에 치은 섬유모세포(gingival fibroblast)가 존재한다. 이들 두 종류의 섬유모세포는 서로 근접해 있고 동일한 섬유모세포 집단을 이루지만 발생학적 기원과 그 특성이 매우 다른 것으로 알려져 있다. 치은 섬유모세포는 간엽조직(mesenchymal tissue)에서 기원한 반면, 치주인대 섬유모세포는 외배엽성 간엽조직(ectomesenchymal tissue)에서 기원한다<sup>3)</sup>. 치은 섬유모세포는 순수한 결합조직세포의 특성을 나타내는 반면에, 치주인대 섬유모세포는 높은 알칼리성 인산분해 효소 활성, 부갑상선 호르몬에 대한 반응, 골 유사 기질의 폴리펩타이드의 생산 및 석회화 결절 형성과 같은 골과 백악질을 형성하는 세포의 전구세포의 특징을 나타낸다<sup>4,5)</sup>. 이는 치주인대 섬유모세포가 치은 섬유모세포와 달리 치주조직의 재형성시 골모세포나 백악모세포로 분화가 가능하다는 것을 의미한다<sup>6,7)</sup>. 이와 같이 치주인대 섬유모세포는 치주조직의 항상성 유지에 있어 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8-10)</sup>. 그러나 아직까지 치주인대 섬유모세포의 분화과정과 치주조직의 재형성에 관여하는 인자나 물질에 관한 연구는 미비한 실정이다.

Park 등<sup>11)</sup>은 치주조직의 재형성을 유도할 수 있는 분화유도인자에 관한 연구에서 일반 결합조직의 섬유모세포인 치은 섬유모세포에 비하여 치주인대 섬유모세포에서 선택적으로 발현되는 유전자가 치주인대의 발생과 분화에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 추정하여, 배양 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포 사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 비교하여 치주인대 섬유모세포-특이 유전

자들을 검출하였다. 지 등<sup>12)</sup> 과 김 등<sup>13)</sup>은 치주인대에서 선택적으로 발현되는 유전자들 중에서 *PDLs22*가 치주인대세포의 분화와 재생 과정에 관여할 것이라고 하였으며, 최근에 Kim 등<sup>14)</sup>은 *PDLs22 (UNCL)*가 치주조직의 발생과 치주인대에 기계적 응력 적용시 중요한 역할을 한다고 하였다.

치주인대에서 선택적으로 발현되는 *PDLs22* 유전자는 종에 따라서 *UNC-50*, *UNC*, *UNCL* 등의 다양한 이름으로 불리어 지고 있다<sup>15)</sup>. *PDLs22 (UNCL)*는 치주조직 이외의 조직에서는 신경계 니코틴성 아세틸콜린 수용기 핵내막에 있는 RNA-binding protein으로 처음 보고되었다<sup>16)</sup>. 그러나 아직까지 *PDLs22*의 신체의 다른 조직이나 치주조직에서의 역할의 중요성에도 불구하고 생체에 *PDLs22 (UNCL)* 단백질을 적용하거나 이를 응용한 연구는 이루어 지지 않고 있다.

이 연구는 치주인대세포에서 발현되는 유전자 *PDLs22*를 치주조직의 재생과정에 적용하기 위한 일환으로 *PDLs22* 유전자를 이용하여 분자생물학적인 방법으로 제조한 *PDLs22* 단백질을 합성하여 그 기능을 연구하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. PDLs22 유전자의 특성 분석

김 등<sup>13)</sup>의 *PDLs22* 유전자 염기서열을 *Blast search*(NCBI)와 단백질 분석 프로그램 (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/waveTM>)을 이용하여 coding region, 아미노산의 구성 및 transmembrane domain 등을 확인하였다.

### 2. PDLs22 expression construct의 제작과 대장균내 발현

#### 1) PDLs22 expression construct의 제작

전장의 PDLs22 cDNA를 template로 제한효소 NheI 인식 염기서열이 삽입된 primer(5'-ccatctgctagcatgttaccgagtaacttc-3')와 한효소 PstI 인식 염기서열이 삽입된 primer(5'-cttctctgcagttatttcactctgtacttatag-3')를 이용하여 95°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분 간의 사이클을 30회 실시하는 PCR 조건으로 803bp의 PDLs22 coding region 유전자 단편을 얻었다(Fig. 1A). pRSET-A vector를 template로 pRSET-PstI insertion primer(5'-gatccggctgcagacaaagcccgaaag-3')와 pRSET-NheI insertion primer (5'-ccaccagtcatgctagccataccatg-3')를 이용하여 동일한 조건으로 PCR을 시행하여 2747bp의 pRSET-vector 단편을 얻었다(Fig. 1B). 803bp의 coding region 유전자 단편과 2747bp의 pRSET-vector 단편을 DNA ligase(Invitrogen)를 이용하여 ligation하여 6X His-tag이 들어 있는 pRSET-PDLs22 construct를 만들고(Fig. 1C), 이를 다시 NdeI과 PstI 제한 효소로 절단한 후 pHCEIIBNd-vector에 subcloning하여 pHCEIIBNd-PDLs22 construct를 완성하였다(Fig. 1D).

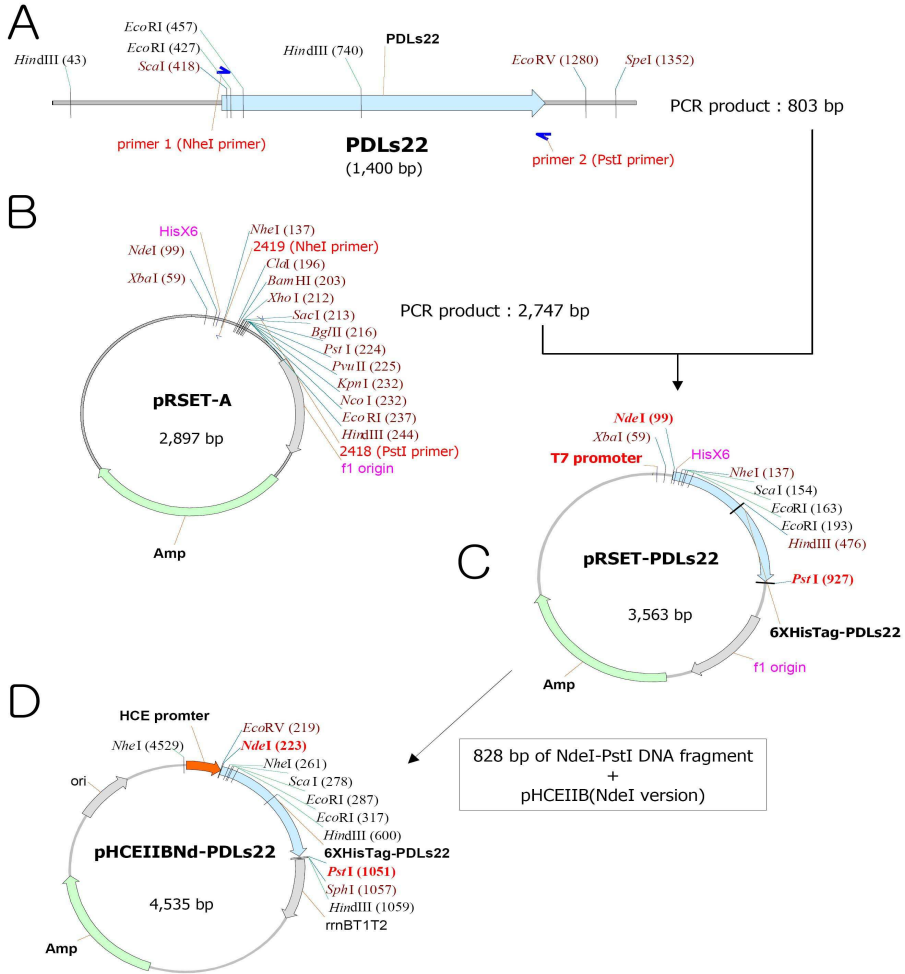


Fig. 1. Cloning strategy of PDLs22 gene into expression vectors. (A) The PDLs22 Open Reading Frame and restriction map. (B) pRSET-A vector. (C) pRSET-PDLs22 construct. (D) pHCEIIBNd-PDLs22 construct

## 2) PDLs22 recombinant protein의 대장균내 발현

pRSET-PDLs22 construct와 pHCEIIBNd-PDLs22 construct를 대장균에 형질전환하여 고체배지에서 얻은 single colony를 다음과 같은 순서로 액체배지로

접종하였다(Fig. 2). 단백질의 발현정도는 Western blotting을 이용하여 검토하였다.

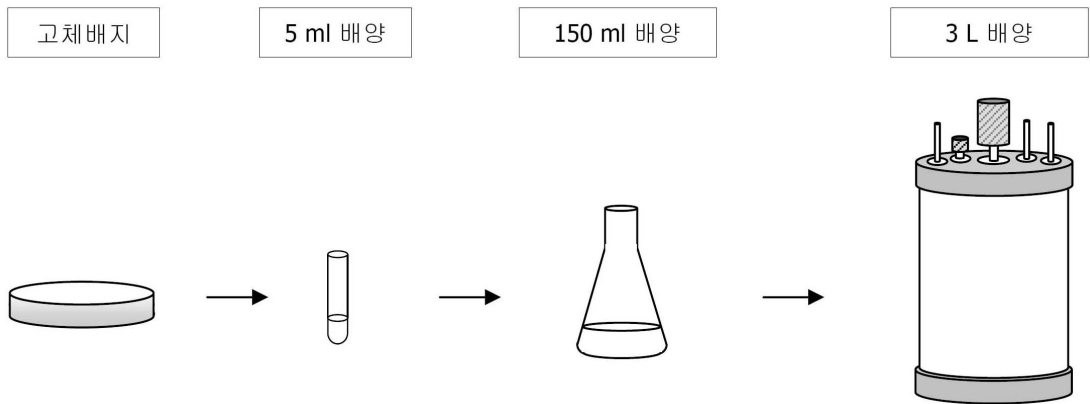


Fig. 2. Incubation procedure for the large scale preparation

PDLs22의 발현에는 *E. coli* JM83 strain, JM109 strain, XL1-blue strain, Codon plus strain 및 BL21(DE3) pLysS strain 등의 다양한 대장균 호스트가 이용되었다. 또한 최적의 배양조건을 결정하기 위하여 동일한 실험을 16, 23, 30 및 37°C에서 각각 반복 시행하였다.

### 3. PDLs22 재조합 단백질의 평가: Western blotting

pRSET-PDLs22 construct와 pHCEIIBNd-PDLs22 construct가 형질전환된 대장균을 접종한 LB 배양액을 3, 20, 24시간 배양 후 4°C, 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 얻었다. 상청액을 4°C의 10% trichloroacetic acid로 1시간 동안 침전시켜 침전물을 얻고, 침전물에 high salt lysis buffer(20mM HEPES, pH 7.9, 420mM NaCl, 25% Glycerol, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5 mM DTT)를 첨가하고 잘 부유시켜 얼음 위에서 20분간 반응시킨 후, storage buffer (20mM HEPES, pH 7.9, 100mM NaCl, 20% Glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF)를 첨가하여 14000rpm에서 20분간 원심분리 하였다.

추출된 단백질은 10-20% polyacrylamide gel을 사용하여 SDS PAGE를 수행한 후, 이를 다시 nitrocellulose membrane(Amersham Biosciences, UK)으로 100v 1시간에 걸쳐 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 처리한 후, polyclonal 1차항체(His-tag)를 1:1000의 비율로 4℃에서 하룻밤 처리하였다. 2차항체로 goat-anti rabbit IgG(Santa Cruz Biotech, USA)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 처리한 후, ECL detection Kit(Amersham Biosciences, UK)를 사용하여 His-Tag 단백질의 발현을 확인하였다.

### Ⅲ. 실험결과

#### 1. PDLs22 유전자의 특성 분석

PDLs 22 유전자는 259 아미노산으로 구성되었고 분자량 28 kDa으로 추정되었으며, 상동성 검색 결과 UNCL (uncoordinated-like)과 동일하였다. .

PDLs22 단백질에는 5개의 transmembrane domain(amino acid residue 82-111, 113-136, 159-187, 189-211, 213-246)이 존재하였다.

#### 2. 구축된 발현 구조물을 이용한 대장균에서의 over-expression 확인

pRSET-PDLs22 construct를 이용한 PDLs22 단백질의 발현은 3시간 배양 후의 extract와 soluble extract에서 모두 30kDa 하방에서 관찰되었다(Fig. 3A). pHCEIIBNd-PDLs22 construct를 이용한 PDLs22 단백질의 발현은 *E. coli* JM83 strain, JM109 strain, XL1-blue strain, Codon plus strain 및 BL21 (DE3) pLysS strain 등의 다양한 대장균 호스트를 이용한 실험에서 Codon plus strain(Fig. 3B)과 BL21 (DE3) pLysS strain(Fig. 4)을 이용하여 발현한 실험에서 확인되었다.

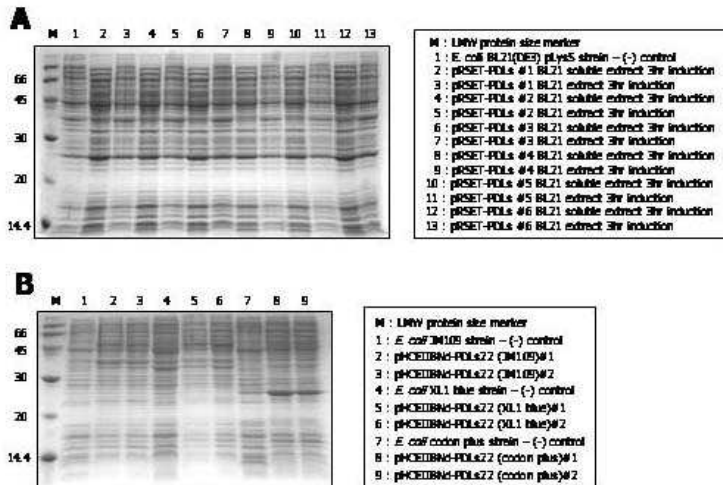


Fig. 3 Expression of PDLs22 recombinant protein using pRSET-PDLs22 (A) and pHCEIIBNd-PDLs22 (B).

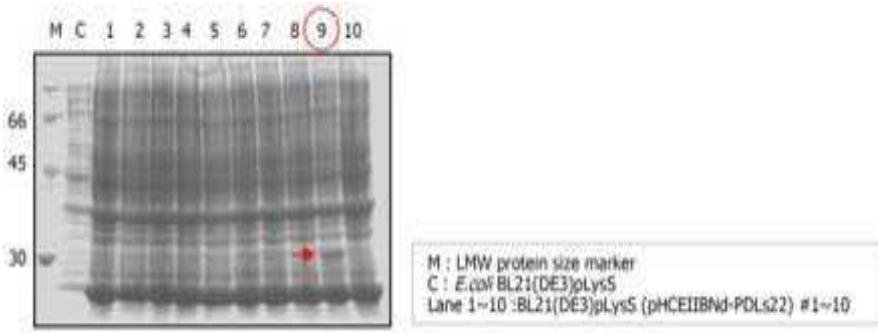


Fig. 4 Expression of PDLs22 recombinant protein using *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain.

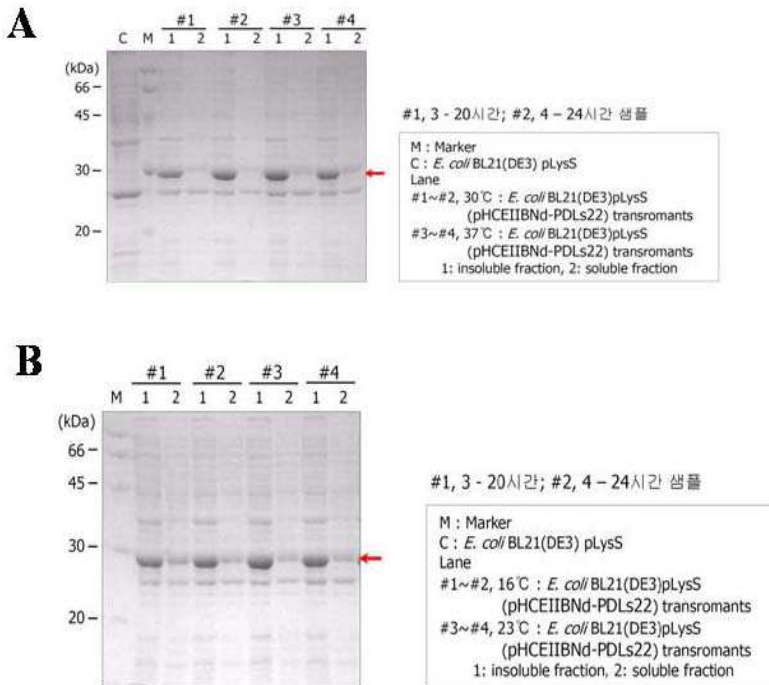


Fig. 5. Expression of PDLs22 recombinant protein according to the various incubation conditions. (A) Incubation at 30°C and 37°C. (B) Incubation at 16°C and 23°C.



고체배지에서 얻은 single colony를 5ml 액체배지에 접종하여 조건별로 테스트를 수행한 결과, 온도별(16, 23, 30, 37°C) 가용성 발현정도 검토에서 온도조건에 의하여 가용성의 발현이 개선되는 현상을 확인하지 못하였다(Fig. 5).

pRSET vector를 이용한 induction system에서는 PDLs22 단백질의 고발현이 확인되지 않았으며, pHCE vector를 이용한 실험에서 *E. coli* BL21(DE3)pLysS를 발현호스트로 사용하였을 때 PDLs22 단백질의 고발현이 이루어지는 형질전환체 1개를 확보하였으나, 발현단백질의 대부분은 insoluble 상태(inclusion body)로 발현 되었다(Fig. 6).

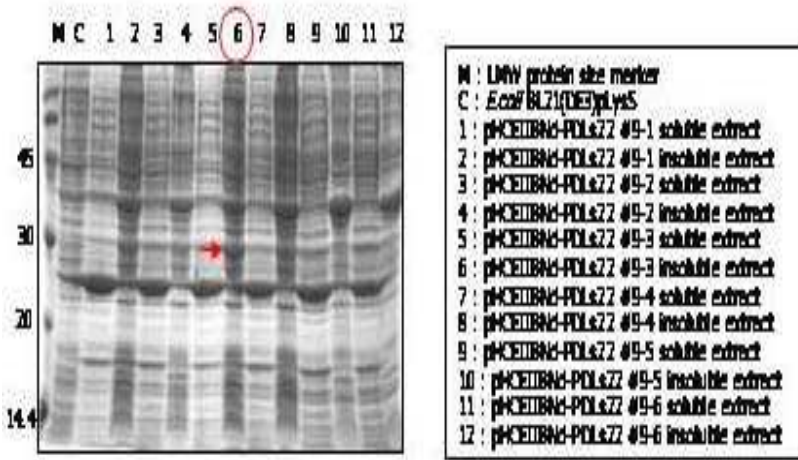


Fig. 6 Solubility of PDLs22 recombinant protein.

## IV. 총괄 및 고안

치조골과 백악질의 형성에 있어 치주인대 세포의 분화와 관련된 인자들로 BMP(bone morphogenetic proteins)<sup>17)</sup>, PDGF(platelet-derived growth factor)<sup>18)</sup>, TGF- $\beta$ 1(transforming growth factor)<sup>19)</sup>, FGF (fibroblast growth factor)<sup>20)</sup>, EGF(epidermal growth factor)<sup>21)</sup> 및 PTH-RP(parathyroid hormone-related protein)<sup>22)</sup>들에 관한 연구들이 이루어져 왔다. 그러나 이들 인자들은 경조직의 형성에 전반적으로 관여하는 인자들로 알려져 있으며 치주인대 섬유모세포의 분화와 치주조직 재생에 선택적으로 관여한다고는 볼 수 없다.

치주인대에서 선택적으로 발현되는 유전자를 동정하여 이를 치주조직의 재생과정에 응용할 목적으로 최근에 Park 등<sup>11)</sup>은 사람 치주인대 섬유모세포에서 특이하게 발현되는 유전자를 치은 섬유모세포와 치주인대 섬유모세포 사이의 유전자들을 subtraction 방법으로 동정하여 PDLs22 등을 얻었다. PDLs22의 기능에 관하여 지 등<sup>12)</sup>은 2주 동안 치주인대 섬유모세포를 배양하였을 때 치주인대 섬유모세포는 증식, 분화하여 석회화 결절을 형성한다고 하였으며, 이때 PDLs22의 발현은 치주인대 섬유모세포의 분화와 더불어 증가하여 배양 후 7일까지는 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되는 2주째에 약간 감소하는 양상을 보인다고 하였다. 따라서 PDLs22가 치주인대 섬유모세포의 증식과 분화, 치조골과 백악질의 초기 분화나 석회화 전단계에서 어떤 역할을 하는 것으로 추정하였다. 또한 김 등<sup>13)</sup>은 흰쥐의 치주조직 발생과정에서 PDLs22의 발현에 대해 보고한 바 있는데, 치근이 형성되기 시작하는 시기인 생후 14일에 PDLs22는 바깥치아상피와 하방의 별그물에서 약하게 발현되었고 이러한 발현은 발생중인 치근 상아질에 인접한 Hertwig's 상피근초의 바깥치아 상피층까지 이어진다고 하였다. Hertwig's 상피근초는 내, 바깥치아상피에서 유래된 두 층으로 구성되고 내치아상피는 치근의 상아질을 형성하도록 유도한다<sup>23)</sup>. 또한, Hertwig's 상피근초 세포는 치근발생 동안

에 백악모세포의 분화에 작용하여 결과적으로 무세포성 시멘트질(acellular cementum)의 형성에 관여한다<sup>24,25</sup>. 치아형성이 완료된 후에도 치주인대 섬유모세포는 골모세포와 백악모세포로 분화가 가능하여 치주조직에서 골과 시멘트질 형성에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있으며, 성장과 분화 인자들이 치주조직 재생 동안에 이들 세포들의 기능을 조절한다고 알려져 있다<sup>26,27</sup>. 백악질의 형성에 관여하는 인자에 관한 연구는 미비한데 이 연구결과로 미루어 볼 때 Hertwig's 상피근초의 바깥치아상피가 백악질의 형성에 관여할 것으로 추정되며 이런 과정에서 PDLs22는 바깥치아상피와 치아주머니의 세포간의 관계에서 중요한 매개체 역할을 할 것이라고 예상하였다. Hertwig's 상피근초는 치아 형성 기간 동안 백악질을 형성하고 최종적으로 Malassez 상피잔사로 치주인대 내에 존재한다. 또한 PDLs22는 발육중인 치아의 치조골과 치근면을 따라서 백악모세포 전구세포, 치주인대 섬유모세포와 골모세포 전구세포에서 강한 발현을 보인다고 하였다<sup>14</sup>. 이는 PDLs22가 치주인대의 항상성 유지와 재생과정에서 치조골 또는 백악질의 형성을 촉진하는 기능과 관련 있다는 것을 암시하는 것이다.

최근에 박 등<sup>28</sup>은 치아 교정력 적용 후 PDLs22의 발현을 관찰한 연구에서 PDLs22는 인장측의 백악모세포와 인접한 치주인대세포에 강한 발현을 보임으로서 PDLs22가 치주인대 섬유모세포로부터 백악모세포로 분화할 때 기능을 한다고 하였다. PDLs22의 발현 양상은 1일째부터 발현되어 3일째에 가장 강한 발현을 보이다가 5일째에 이르러 감소하는 양상을 보이고 있어 백악질의 초기분화에 관여한다고 하였으며 백악모세포의 분화가 특별히 없는 압박측에서는 발현이 미약한 것으로 미루어 안정된 상태의 치주조직에서는 PDLs22의 미약함을 시사하였다.

PDLs22와 상동성을 갖는 UNCL 유전자는 *C. elegans*에서 처음으로 발견되었으며 초파리의 X-염색체에 위치해있다<sup>29,30</sup>. 이 유전자에 돌연변이가 일어나면 기계적인 응력의 전달에 있어서 이상이 발생하여 운동기능 장애와 반응력의 저하를

가져온다. 그래서 초과리의 유충은 촉각에 무반응을 보이고, 성충은 행동장애가 일어나 소파 반사 유도를 이끌어내는 데 실패한다<sup>15)</sup>. 만약 동족과의 경쟁적인 환경이 아니면 반접합 UNC와 UNCL 유전자를 가진 초과리는 유충과 번데기 시기에는 대부분 살 수 있지만, 우화의 과정을 거친 다음은 일어날 수 없거나 걸을 수 없어서 죽게 된다. 이 연구로 미루어 인간에서의 UNC-50도 기계적인 응력과 관련 있음을 짐작케 한다. 최근에 Kim 등<sup>14)</sup>의 연구에 의하면 PDLs22는 치주조직의 발생, 분화 및 유지에 주요한 역할을 할 뿐만 아니라 저작기능 때와 같이 기능이 가해질 때 치주인대 섬유모세포의 mechanotransduction에 관여한다고 하였다.

Fitzgerald 등<sup>16)</sup>은 hydrophobicity plot 분석을 통하여 UNC-50은 여러 개의 막투과 영역을 가질 것으로 예상하였으며, 이 연구에서 SOSUI WWW Server(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>)로부터 분석한 자료에 의하면 PDLs22는 5개의 막투과 영역을 가질 것으로 예상되었다. 따라서 PDLs22가 막투과 단백질로서 세포의 다양한 신호전달체계에 관여할 것으로 추측된다. 최근에 Chantalat 등<sup>31)</sup>은 PDLs22를 GMH(membrane-associated high-copy suppressor) family로 분류하였으며, 효모에서는 이 유전자가 membrane trafficking에 관여한다고 하였으나 사람에게서는 다양한 조직에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되나 그 정확한 기전에 관하여는 다양한 연구가 필요하다고 하였다.

이 연구에서는 다양한 연구결과를 통하여 치주조직 뿐만아니라 신체의 다양한 조직에서 현재까지는 잘 알려져 있지 않으나 중요한 기능을 할 것으로 추정되는 PDLs22 유전자의 기능을 보다 명확히 규명하고, 더 나아가 이 유전자나 단백질을 치주치료 등에 응용할 목적으로 재조합 PDLs22 단백질을 합성하고자 하였다. 실험결과 pRSET-PDLs22 construct를 이용한 induction system에서는 PDLs22 단백질의 고발현이 확인되지 않았으나, pHCEIIBNd-PDLs22 construct에 BL21 (DE3)pLysS strain을 발현호스트로 사용하였을 때는 PDLs22 단백질의 고발현이 이루어지는 형질전환체를 확보하였다. 그러나 발현단백질의 대부분이 insoluble 상

태(inclusion body)로 발현되었다. 이는 잘 알려진 대로 PDLs22가 막투과영역을 다수 보유한 막단백질의 특성을 가지기 때문에 가용성 발현율이 매우 낮은 것으로 추정 할 수 있다.

결론적으로, 이 실험에서 재조합 PDLs22 단백질을 합성하였으나 발현율의 한계로 인하여 이를 다양한 실험에 적용할 정도의 대량생산을 하지 못하였다. 따라서 앞으로 이를 보완 할 수 있는 재조합 PDLs22 단백질 합성에 관한 추가 연구와 더불어 PDLs22의 기능을 이해하기 위한 RNA interference와 overexpression 및 knock/out 생쥐의 제작과 같은 연구 등이 수행되어야 할 것 이다.

## V. 결 론

PDLs22는 치주조직에서 치은 섬유모세포와 비교하여 치주인대 섬유모세포에 선택적으로 발현되는 유전자로 치주인대세포의 분화와 저작과 같은 기능력의 적용 시에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이 유전자에 대한 재조합 단백질의 합성이나 단백질 차원의 기능에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다.

이 연구에서는 PDLs22 재조합 단백질을 합성하기 위하여 pRSET-PDLs22 construct와 pHCEIIBNd-PDLs22 construct를 제작하고, 이를 다양한 발현호스트와 조건을 적용하여 다량의 단백질을 정제하고자 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pRSET-PDLs22 construct를 이용한 induction system에서 PDLs22 단백질의 고발현이 확인되지 않았다.
2. pHCEIIBNd-PDLs22 construct에 BL21(DE3)pLysS strain을 발현호스트로 사용하였을 때 PDLs22 단백질의 고발현이 이루어지는 형질전환체를 확보할 수 있었다.
3. 발현된 PDLs22 재조합 단백질은 소수성 아미노산이 전체의 47.5%를 차지하는 28 kDa의 분자량을 나타냈다.
4. 발현단백질의 대부분은 insoluble 상태(inclusion body)로 발현되었다.
5. 온도조건 및 발현시간의 변화에 의하여 가용성의 발현이 개선되지 않았다.

이 실험을 통해 다양한 실험에 적용할 수 있는 많은 양의 재조합 PDLs22 단백질 생산을 하지 못하였다. 추후 이를 보완 할 수 있는 추가 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic movement. Am J Orthod 1960;46:881-900
2. Mancini S, Romanelli R, Laschinger CA, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Assessment of a novel screening test for neutrophil collagenase activity in the diagnosis of periodontal diseases. J Periodontol. 1999 ;70:1292-302.
3. Nancy A. Ten Cate's Oral Histology: Development, structure, and function. sixth ed. Mosby, Missouri, 2003
4. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament : a unique, multifunctional connective tissue. Periodontology 1997;13:20-40
5. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Expression of TGF-beta isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells *in vitro*. J Periodontal Res 1999;34:301-309
6. Schroeder HE. The periodontium, Springer-Verlag. Berlin, 1986
7. Cho MI, Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptor during differentiation of cementoblasts, osteoblast, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. Anat Rec 1996;245:342-360
8. Cochram DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. Periodontology 2000;19:40-58
9. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech 2003;60:491-502
10. Hammarström L, Heiji L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal



dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. J. Clin. Periodontol 1997;24:669-77

11. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO, Han KY. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. Biochemical and Biophys Res Communi 2001;282:1145-1153
12. 지숙, 김병옥, 김홍중, 김성미, 박주철. 치주인대, 이틀뼈 및 시멘트질의 발생과정에서 치주인대-특이 유전자 PDLs22의 발현. 대한해부학회지 2003;36:123-132
13. 김홍중, 정문진, 김병옥, 국중기, 김종관, 박주철. 치주조직의 발생과 분화과정에서 치주인대-특이 유전자 PDLs22의 발현. 대한구강악안면병리학회지 2005;29:17-23
14. Kim HJ, Choi YS, Jeong MJ, Kim BO, Lim SH, Kim DK, Kim CK, Park JC. expression of UNCL during development of periodontal tissue and response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stress *in vivo* and *in vitro*. Cell Tissue Res 2007 327:25-31.
15. Perrimon N, Engstrom L, Maojwald AP. Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. Genetics 1989;121:333-352
16. Fitzgerald J, Kennedy D, Viseshakul N, Cohen BN, Mattick J, Bateman JF, Forsayeth JR. UNCL, the mammalian homologue of UNC-50, is an inner nuclear membrane RNA-binding protein. Brain Res 2000;877:100-123
17. Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. J Bone Miner Res 1993;8supple2:S499-502
18. Howes R, Bowness JM, Grotendorst GM, Marting GR, Reddi AH. Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation. Calcif Tissue Int 1998;42:34-38
19. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF- $\beta$ 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. J Periodontol 1994;65:641-48

20. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. J Clin Invest 1988;1:1572-1577
21. Cho MI, Lin WL, Garant PR. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: A light and electron microscopic radiographic study. Anat Rec 1991;231:14-24
22. Nohutch RM, Somerman MJ, McCauley LK. Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone(PTH) on human periodontal ligament cells *in vitro*. Calcif Tissue Int 1995;56:571-77
23. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. Biochem Cell Biol 1998;76:923-938
24. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech 2003; 60:491-502.
25. Slavkin HC, Bringas P, Besssem C, Santos V, Nakamura M, Hsu MY, Snead ML, Zichner-David M, Fincham AG. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. J Periodontal Res 1989;24:28-40.
26. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. J Periodontol 2000;19:40-58.
27. Howard PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. J Periodont Res 1998;33:500-508.
28. 박미경, 박주철, 임성훈, 김광원. 간헐적 교정력 적용 후 백서 치주인대에서 UNC-50 유전자의 발현. 대한치과교정학회지 2006;36(4):242-250.

29. Perrimon N, Smouse D, Miklos GL. Developmental genetics of loci at the base of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1989;121:313-331
30. Kernan M, Cowan D, Zuker C. Genetic dissection of mechanosensory transduction : mechanoreception-defective mutation of *Drosophila*. *Neuron* 1999;12:1195-1206
31. Chantalat S, Couebeyrette R, Senic-Matuglia F, Jackson CL, Goud B, Peyroche A. A novel golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Mol Bio Cell* 2003;14:2357-2371.

## 저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057237	과 정	석사
성 명	한글:이 경 연    한문 : 李京淵                      영문 : Lee Kyoung Yeon				
주 소	서울시 양천구 목동 912번지 15/1 목동 5단지 아파트 515-505				
연락처	011=9911-2328    E-MAIL : freedent@naver.com				
논문제목	한글 : PDLs22 재조합 단백질의 합성 및 평가				
	영문 : Synthesis and evaluation of PDLs22 recombinant protein				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다                      음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

**동의여부 : 동의( V )    반대(    )**

2007년    2월    일  
 저작자: 이 경 연                      (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**

