

2009년 2월
박사학위 논문

생쥐의 상아모세포 분화과정에서
*Thymosin β 4*의 발현

조선대학교 대학원

치의학과

윤 성 호

생쥐의 상아모세포 분화과정에서
*Thymosin β 4*의 발현

*Expression of Thymosin β 4 in odontoblast
differentiation of the mouse*

2009년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

윤 성 호

생쥐의 상아모세포 분화과정에서
*Thymosin β 4*의 발현

지도교수 김 홍 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2008년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

윤 성 호

윤성호의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 고 영 무 인
위 원 조선대학교 교수 정 윤 영 인
위 원 조선대학교 교수 국 중 기 인
위 원 조선대학교 교수 정 문 진 인
위 원 조선대학교 교수 김 흥 중 인

2008년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

도목차	ii
ABSTRACT	iii
I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	3
1. MDPC-23 세포의 배양 및 유도	3
2. 역전사증합효소반응(RT-PCR)	3
3. 면역화학적 단백질 검출법(Western blotting)	4
4. 조직표본 제작	5
5. 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)	6
6. 통계분석	7
III. 실험결과	8
1. MDPC-23 세포 분화 과정에서 Thymosin β 4 유전자 및 단백질 발현	8
2. 생쥐의 치아 발생 과정 중 Thymosin β 4 단백질의 발현양상	8
IV. 총괄 및 고안	11
V. 결 론	15
참고문헌	16
사진부도설명	24
사진부도	26

도 목 차

Figure 1. mRNA expression of Thymosin β 4 in differentiated MDPC-23 cells.....	26
Figure 2. Western blot of Thymosin β 4, after induction of differentiation in MDPC-23 cells.....	27
Figure 3. Immunostaining of Thymosin β 4 at bud, cap, early bell and advanced bell stage.....	28
Figure 4. Immunostaining of Thymosin β 4 at crown and functional stage.....	29
Figure 5. Possible role of Thymosin β 4 in odontoblast for dentinogenesis.....	30

ABSTRACT

Expression of Thymosin β 4 in odontoblast differentiation of the mouse

Yoon, Seong-Ho

Advisor : Prof. Kim, Heung-Joong, D.D.S. Ph.D

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

Thymosin β 4 has been known concerning to poly- and depolymerization of actin which is discovered not only in developing tooth but also in several tissues and has the function about alteration of cytoskeleton for cell differentiation and migration. However, the expression and function of Thymosin β 4 in odontoblast during mammalian tooth development have not yet been reported. Therefore, we investigated the expression of Thymosin β 4 in odontoblast differentiation during tooth development.

From RT-PCR and Western blotting, it showed that the expression level of Thymosin β 4 gene and protein in differentiated MDPC-23 is the highest at day 7 and decreased at day 28 likely in normal cells. The immunohistochemistry was performed to investigate the expression sites and levels of Thymosin β 4 at the stage of tooth development respectively. As a result, Thymosin β 4 expressed

strongly in mesenchymal cells around tooth bud, dental lamina and oral mucosa but presented weakly in oral epithelium, tooth bud, inner enamel epithelium and outer enamel epithelium at the embryonic day 15 and 17. Thymosin β 4 expressed intensely in entire cytoplasm of odontoblast in the postnatal day 1 (P1) and expressed intensively in apical area of cytoplasm at P4. At the P7 and P10, the expression of Thymosin β 4 increased in odontoblast layer than that of P4. Thymosin β 4 observed similarly in cytoplasm of odontoblast by the P14 and P21 but decreased in odontoblastic process at P21 compared with P14. Therefore, these results suggest that Thymosin β 4 may be related with the cell proliferation of tooth germ and enamel organ and participate in the polarization and exocytosis by cytoskeleton remodeling during the differentiation of odontoblast.

Key Words: Thymosin β 4, Tooth development, Odontoblast differentiation, MDPC-23

I. 서 론

상아모세포는 신경능선이 기원인 세포로서 치수의 바깥쪽 표면에 위치하고 법랑질 아래 쪽에 1차 상아질을 축적하는데(Lesot, 2000) 이것은 섬유교원질성 기질 및 몇 가지 세포외기질 단백질들의 발현과 상호작용에 의해 형성된다. 상아모세포는 사람의 경우 배아기 17-18주 정도에 처음 나타나고 미생물감염, 화학물질 침투 또는 치수괴사에 의해 손상되기 전까지는 계속해서 유지된다(Linde & Goldberg, 1993). 상아질 기질 분비를 시작하는 상아모세포는 극성을 띠면서 길이가 길어지고 세포내에 많은 수의 과립형질내세망이 발달하게 된다. 골지더미의 표면에 있는 골지주머니에서 떨어져 나온 분비소포는 상아질세관쪽으로 뻗어있는 세포질 끝으로 운반되어 분비된다(Sasaki & Garant, 1996). 분화된 상아모세포 세포질에는 수 많은 미세소관들과 세포질 세사들이 서로 얽혀 망을 이루는데 이러한 구조는 상아모세포 돌기의 끝을 향해 뻗어있다(Garant, 1972).

Thymosin β 4는 43개의 아미노산으로 구성되어 있고 4.9 kDa의 크기를 가지며 포유류에서 발견되는 Thymosin 종류 중 가장 많이 존재한다. Thymosin β 4는 세포 내 G-액틴의 분리과정(sequestering)에 관여하고(Safer 등, 1997), 세포의 증식, 분화 그리고 운동성을 조절하는 기능을 한다(Goldstein 등, 2005). Thymosin β 4는 1:1비율로 ATP-G-액틴과 결합 함으로서 액틴의 중합반응(polymerization)을 방해한다(Safer 등, 1991). 그리고 Thymosin β 4는 액틴의 급속한 중합/해중합반응에 관여함으로써 세포 운동성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Pantaloni & Carlier, 1993; Kang 등, 1999). 또 다른 연구는 Thymosin β 4가 혈관형성과정(Grant 등, 1995; Grant 등, 1999)에 기능적으로 관여하고, 생쥐의 배아신경계 발달, 배아세포가 심장세포로 분화하는 과정, 그리고 흰쥐의 발달중인 뇌에서도 발현된다고 보고 하였다(Gómez-Márquez 등,

1993; Gómez-Márquez 등, 1996; Anado'n 등, 2001). 더불어 Thymosin β 4는 모낭이 만들어지는 과정에서 줄기세포 이동에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(Philp 등, 2004). 또한 생쥐의 하악 발달과정에서 Thymosin β 4가 발현한다는 연구결과도 보고 되었다(Yamaza 등, 2001).

따라서 본 연구에서는 앞선 연구들을 바탕으로 Thymosin β 4가 치아의 발생과정 중 상아질 형성에 관여하는 상아모세포에서도 특정 기능을 할 것으로 생각되어 이의 발현양상 및 기능을 알아 보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. MDPC-23 세포의 배양 및 분화유도

배아가 18~19일에 이른 생쥐 치유두세포(dental papilla cell) 유래의 MDPC-23 세포(Hanks 등, 1998b)를 2×10^5 수로 60 mm 배양 접시에 접종하고 5 % CO₂농도와 37 °C 온도를 유지하는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovin serum(FBS; Gibco BRL, USA)과 항생제 (100-units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, 이상 Gibco), 1X non-essential amino acid solution(Gibco BRL, USA)을 첨가하여 사용하였다. 세포가 90 %정도 배양 접시를 차지했을 때 분화 유도를 위해서 FBS 농도를 5%로 줄이고 β-glycerol phosphate(SIGMA, USA) 10 mM과 ascorbic acid(SIGMA, USA) 50 µg/ml을 추가로 첨가하여 분화배양액으로 사용하였다. 분화 유도 후 4일, 7일, 14일, 21일 28일에 각각 총 RNA와 세포질 단백질을 분리하였다.

2. 역전사중합효소반응(RT-PCR)

분화를 유도한 MDPC-23 세포에 Tri reagent(MRC Inc, USA)를 처리하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 추출 방법은 Tri reagent 제조 회사의 설명서를 참고하였다. cDNA 합성을 위해서 mRNA에 특이적으로 결합하는 Oligo d(T)(Invitrogen, USA) 0.1 µg과 총 RNA 1 µg을 사용하였고 AccuPower RT Premix(Bioneer, KOR)와 혼합 후 RT(reverse-transcription, 42°C 1시간→ 95°C 5분)반응을 하였으며, *Er*

Taq polymerase(TaKaRa Bio Inc, JPN)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 생쥐 Thymosin β 4 유전자 특이적 프라이머인 forward: 5'-GTCAGTAAGCTTCTCCTTCCAGCAACCATGTC-3' 과 reverse: 5'-GTCAGTCTCGAGAATGTACAGTGCATATTGGC-3' 그리고 대조 발현군으로서 생쥐 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자 특이적인 forward: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3' 과 reverse: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' 프라이머를 각각 제작(Bioneer, KOR)하여 PCR을 수행하였으며, 반응조건은 Thymosin β 4 가 27 cycles, 94°C 5분, 94°C 40초, 54°C 30초, 72°C 30초, 72°C 5분이고, GAPDH는 30 cycles, 94°C 5분, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초, 72°C 5분으로 설정하였다. PCR 반응 후 생산물은 1.5% 농도의 agarose(Cambrex, USA)에 ethidium bromide(EtBr) 0.2 μ g/ml을 첨가한 겔을 사용하여 전기영동 후 UV를 조사하여 확인하였다. PCR 반응 후 나타난 Thymosin β 4 밴드의 크기는 184 bp이고 GAPDH는 199 bp로 확인됐다. 각각의 DNA 밴드 정량에는 Science lab Image Gauge(FUJI FILM, JPN) 프로그램을 사용하였다.

3. 면역화학적 단백질 검출법(Western blotting)

먼저 분화를 유도한 MDPC-23 세포를 4°C, 1X Phosphate buffered saline(PBS, pH7.4)로 세 번 세척한 후 NP-40 lysis buffer(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-HCl[pH 7.4], 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF ,2 mM EDTA [pH7.4], protease inhibitor: leupeptin and aprotinin)를 처리하여 세포를 용해시켰다. 이 세포 용해액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮기고 1분-2분간 강하게 vortexing했으며 30분 동안 얼음 속에 보관 후 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 세포질 단백질이 포함된 상층액을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겼다. 추출한 세포질 단백질은 DC Protein assay reagent A, B, 그리고 S(Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량 후 40 μ g씩 15%-SDS

polyacrylamide 겔에 전기영동 하였다. 겔 상에서 분리된 단백질은 Transfer buffer(25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 20 % methanol)에 110 V로 4°C에서 2시간 동안 Nitrocellulose 막으로 이동 시킨 후, blocking용액(5 % skim milk 0.15 % Tween 20 [Bio-Rad, CA] in 1X PBS)을 이용하여 실온에서 1시간 20분 동안 blocking 시켰다. 다음으로 세척액(0.15 % Tween 20 in 1X PBS)으로 10분간 세 번 세척하고 1차 항체인 anti-rabbit Thymosin β 4(Immunodiagnostik, GER)는 1:6,000 비율로, anti-mouse- β -actin(SIGMA, USA)은 1:2,500 비율로 blocking용액에 희석한 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다음날 세척액으로 15분간 세 번 세척 후 HRP(horseradish-peroxidase)가 연결된 2차 항체인 Goat-anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)와 Goat-anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:10,000 비율로 blocking용액에 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 다음으로 세척액을 이용하여 15분간 세 번 세척 하고 ECL(Amershamphamacia, UK)용액을 이용하여 3분 동안 발색 시켰으며 Chemiluminescence film(Amershamphamacia, UK)을 이용하여 암실에서 현상하였다. 현상 후 나타난 단백질밴드는 Science lab Image Gauge 프로그램으로 각 밴드의 밀도를 측정하여 정량 하였다. 필름에 나타난 Thymosin β 4 밴드의 크기는 5 kDa이고 β -actin 단백질의 크기는 42 kDa으로 확인됐다.

4. 조직표본 제작

생쥐 치아 발생 조직 표본은 암컷 ICR 생쥐(Damool Science, KOR)으로 부터 발생 15일, 17일째인 생쥐 태아와 생후 1일, 4일, 10일, 15일 그리고 20일째 생쥐를 이용하여 제작하였다. 먼저 발생 15일, 17일째 생쥐 태아를 적출하기 위해 임신한 암컷 생쥐에 염산케타민(Ketamin 0.2ml/100g, Yuhan, KOR)과 럼푼(Rompun 0.08ml/100g, Bayerkorea, KOR)을 근육 주사하여 마취시켰다. 적출한 발생 15일, 17일 생쥐태아와

생후 1일, 4일째인 생쥐는 약골을 절단한 후 즉시 고정액(4 % paraformaldehyde, 1 ml/L DEPC in 1X PBS, pH 7.4)에 옮겼다. 생후 10일, 15일 그리고 20일된 생쥐는 마취 후 개복하고 우심방으로 들어오는 대정맥을 절단한 후 좌심실에 DEPC-PBS(1 ml/L DEPC in 1X PBS, pH 7.4)를 천천히 주입하여 순환시켰다. DEPC-PBS를 혈액이 완전히 제거 될 때까지 순환시킨 후 고정액을 주입하는 관류 고정을 실시하였다. 고정액을 완전히 순환시킨 후 하악과두를 포함한 약골을 적출하여 다시 새로운 고정액 속에 4℃, 16시간 동안 고정하였다. 다음날 1X PBS용액으로 2시간 세척하고, 탈회액(10 % EDTA, 1 % paraformaldehyde in 1X PBS, pH 7.4)에서 4주간 탈회 하였다. 탈회 후 70 %, 80 %, 90 %, 100 % I, 100 % II, 100 % III, 100% IV 에탄올 처리를 하여 탈수하였고, 자일렌으로 투명화 과정을 거쳤으며, 파라핀을 침투시켜 포매 하였다. 파라핀 포매된 조직을 Motorized Rotary Microtome MT990(RMC products, USA)을 이용하여 5 µm두께의 절편으로 만든 후 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate(SIGMA, USA)로 코팅된 유리 슬라이드에 올리고 37℃ 신전기 위에서 하루 동안 건조 하였다.

5. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

준비된 조직 표본을 Xylene I, Xylene II, Xylene III에 순서대로 5분씩 처리하여 탈 파라핀을 하고 100 %, 90 %, 80 %, 70 % 에탄올에 각각 5분씩 처리하여 조직에 함수를 시켰다. PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척 후 100배 희석한 Tris-HCl(pH 7.5)용액에 1:1000의 비율로 Proteinase K(Invitrogen, USA)를 첨가한 다음 37 °C에서 20분간 조직 표본 위에 처리 하였다. 그 후 PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척한 후 내인성 과산화효소의 활성억제를 위하여 과산화수소수가 포함된 완충액(0.6% H₂O₂ in Methanol)을 20분간 상온에서 조직 표본 위에 처리 하였다. 다시 PBS로 조직 표본을 5분씩 세 번 세척 하고 비특이적반응을 줄이기 위하여 염소혈청(normal goat serum, Vector Lab, USA) 15 ml

를 PBS 1 ml에 희석한 용액을 20분간 상온에서 처리하는 2차 blocking 을 수행 하였다. 염소혈청 희석액을 간단히 제거하고 새로운 염소혈청 희석 용액에 Thymosin β 4 항체를 1:300의 비율로 희석하여 4°C에서 16 시간 동안 처리 하였다. 다음 날, PBS로 10분간 두 번 세척 후 2차 항체 인 Goat-anti-rabbit IgG(Vector Lab, USA)를 1:200 비율로 PBS에 희석 하여 상온에서 조직 표본 위에 20분간 처리하였다. 다음으로 PBS로 10 분간 2회 세척 후 사용하기 30분전 PBS 용액에 희석한 ABC 시약 (Vector Lab, USA)을 조직 표본 위에 20분간 반응시켰다. 다시 PBS로 10분간 2회 세척 과정을 거치고 0.05% DAB(Deaminobenzidine Tetrahydrochloride; Vector Lab, USA)를 이용하여 1분 40초 동안 발색 시켰다. 발색시킨 조직 표본을 이차증류수에 10분간 1번 세척 후 Hematoxylin(Samchun Chemical, KOR)으로 15초간 대조염색 하였고 다시 ddH₂O에 세척한 후 조직 표면에 탈수, 투명 및 봉입 과정을 수행 하였다. 염색된 조직 표본은 광학현미경(Carl Zeiss, GER)을 통해 관찰 하였고, Axiovision LE release 4.6(Carl Zeiss, GER) 프로그램을 이용하여 디지털 이미지화 하였다.

6. 통계분석

통계적 차이를 확인하기 위해 Excel 2007 프로그램(Microsoft, USA)을 이용하여 Student *t*-test분석을 수행 하였다. $P < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적 차이가 있음을 의미한다.

III. 실험 결과

1. MDPC-23 세포 분화 과정에서 *Thymosin β4* 유전자 및 단백질 발현

RT-PCR 결과 *Thymosin β4* 유전자의 발현은 분화를 유도하지 않은 군에서도 강하게 나타났고 분화 7일째까지 조금씩 증가하는 발현 양상을 유지하다가 14일째부터 감소하는 경향을 나타냈으며 28일째에 가장 낮게 발현되었다(Fig. 1). 분화 유도과정 중 *Thymosin β4* 단백질의 발현 양상은 RT-PCR 결과와 마찬가지로 분화 7일째에 가장 높았고, 14일째부터 감소하면서 28일째에 가장 낮게 발현 하였다(Fig. 2).

2. 생쥐의 치아 발생 과정 중 *Thymosin β4* 단백질의 발현양상

1) 싹시기(Bud Stage)

배아기 15일째(E15), 신경능선에서 기원한 간엽세포들에 의해 둘러싸인 상피세포들의 성장이 집중되어 형성된 치아 싹이 관찰 되었다(Fig. 3a). *Thymosin β4*의 발현은 구강상피 및 치아싹 내부의 세포들에서 약하게 발현 되었으며 치아싹 주변의 치유두 에서는 발현되지 않았지만 그 주변의 간엽세포에서 강하게 발현하였다(Fig. 3a).

2) 모자시기(Cap stage)

배아기 17일째(E17)에는 외배엽성간엽세포들이 뭉쳐 치유두를 형성하였고 치아싹의 크기가 커지면서 점막하조직 쪽으로 함입되어 형성된 법랑

기관이 관찰되었다(Fig. 3b). 이 시기에 Thymosin β 4는 치관과 구강점막층 및 치유두 바깥쪽 간엽세포에서 강하게 발현하였고 외법랑상피와 내법랑상피에서는 일부 세포에서 발현되었다(Fig. 3b).

3) 종시기 초기(Early bell stage)

출생 1일째(P1)에는 법랑기관과 치유두가 더 커지면서 조직분화와 형태분화 단계인 종시기가 관찰되었다(Fig. 3c). 치수와 가까운 곳에 위치한 상아모세포를 확인할 수 있었고, 상아모세포 층에서 Thymosin β 4가 발현하였으며 세포질 전체에 걸쳐 강하게 발현하는 것을 관찰하였다(Fig. 3c).

4) 종시기 후기(Advanced bell stage)

종시기 후기인 출생 후 4일째(P4) 치아 발생조직에서 상아질과 법랑질이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 치관부치수의 상아모세포 길이는 출생 후 1일째 보다 더 신장되었다(Fig. 3d). 상아모세포에서 Thymosin β 4의 발현양은 출생 후 1일째와 차이가 없었지만 발현부위가 세포질 첨단에 집중되어 관찰되었다. 또한 이 시기에서 수행한 음성 대조군 염색에서는 Thymosin β 4의 발현이 확인되지 않았다(inset of figure 3d).

5) 치관기(Crown stage) 및 기능시기(Functional stage)

출생 후 7일(P7)과 10일째(P10) 상아질의 두께는 출생 후 4일째 보다 더욱 두꺼워 졌고, 상아모세포 돌기가 관찰 되었으며, 치관부치수 부위에 위치한 상아모세포의 길이가 출생 후 4일째 보다 더욱 길게 신장되었다. 상아모세포에서 Thymosin β 4는 출생 후 4일째보다 더 증가하였고, 상아모세포 돌기에서도 발현되었다(Fig. 4a and b). 또한 출생 후 14일째

(P14) 조직에서 상아질이 많이 합성 된 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4c). 상아모세포의 길이는 치관기와 별 차이가 없었고 이 시기에 세포질 및 상아세관내의 세포질들기에서의 Thymosin β 4 발현도 유사하게 관찰 되었다. 세포질내 발현양상은 출생 후 21일째(P21)까지 유사하였으나 돌기내의 발현은 14일째 보다 약하게 관찰되었다(Fig. 4d).

IV. 총괄 및 고안

치아 발생과정 중 상아모세포는 외배엽성 간엽조직 세포가 모여 생성된 치유두 세포가 분화하여 형성된다(Maas & Bei, 1997; Theslef & Sharpe, 1997). 또한 발생 초기에 치관에 있는 상피 세포들은 증식을 거듭하여 치아싹을 형성하게 되고 법랑기관을 형성하게 된다. 치유두 세포는 상아모세포전구세포로 분화하는데 이것은 모자시기에 나타나며 법랑기관의 내법랑상피 부근에 모이게 된다(Ruch, 1984; Ruch, 1985). 이렇게 모인 상아모세포전구세포들은 이동끝(leading-edge) 세포질돌기를 이용해 내법랑상피 기저막 아래쪽 세사에 결합하고 성숙한 상아모세포로 분화하게 된다(Osman & Ruch, 1981). 초기 종시기에는 상아모세포의 분화가 가장 활발히 일어나고 후기 종시기에 이르면 상아모세포는 상아기질을 만들어 내기 시작하는데 이러한 과정을 상아질형성과정이라 부른다(Butler, 1995).

치수세포를 상아모세포전구세포로 분화를 유도한 결과, 기질형성이 증가되는 14일째부터 TGF- β 1 mRNA가 발현되어 21일째에 가장 많이 발현하였으며 28일째에 감소하기 시작했다고 보고 하였다(Toyono 등, 1997). 앞선 연구에서는 치유두 세포에 TGF- β 1을 FGF1과 함께 처리하고 전자 현미경으로 관찰 결과 처리 후 6일째에 상아모세포로의 분화와 기질합성을 유도한다고 보고하였다(Unda 등, 2000). 또한 최근 연구에서 TGF- β 1으로 자극한 상아모세포주인 MDPC-23 세포는 SMAD 단백질을 통해 dentin sialophosphoprotein(DSPP) 발현을 조절하여 분화를 조절한다는 결과가 보고 되었다(He 등, 2004). 그리고 MDPC-23 세포와 다른 상아모세포주인 MO6-G3에서 dentin phosphophoryn(DPP), dentin sialoprotein(DSP) 그리고 dentin matrix protein1(DMP-1)이 발현되고 분화를 자극하는 것으로 알려졌다(Hanks 등, 1998a). 이중 DSPP의 또

다른 보고에서는 *In-situ* hybridization 을 이용하여 DSPP mRNA의 발현을 관찰한 결과 생쥐 배아기 16일째의 상아모세포에서 강하였으며 이것은 전사인자인 *Runx2*의 조절을 받는다고 하였다(Chen 등, 2005). 그리고 BMP-2(bone morphogenic protein-2), BMP-4, BMP-7 그리고 TGF- β 1이 상아모세포의 형태적 변화와 치수세포의 분화를 자극한다는 것이 알려졌다(Bègue-Kirn 등, 1992; Nakashima 등, 1994; Nakashima, 1994). 그리고 다른 상아모세포주인 M2H4에 분화를 20일 동안 유도한 후 분화 및 광화와 관련된 인자들인, I형 교원질, DSPP, alkaline phosphatase(ALP) 그리고 DMP-1 유전자들의 발현을 알아본 실험에서 I형 교원질과 ALP 유전자는 분화유도 기간 동안 일정한 발현 양상을 보여준 반면 DMP-1 유전자는 분화 11일째에 증가한 후 20일째까지 비슷한 수준을 유지하였으며 DSPP는 분화 16일째에 증가하는 양상을 나타냈다(Magne 등, 2004).

최근에 *In-situ* hybridization 방법을 이용하여 생쥐의 대구치 발생 과정 중 치배의 형성 개시와 성장 그리고 분화에 Thymosin β 4가 관여할 것이라는 연구 (Akhter 등, 2005)가 있었으나 그러한 과정 중 상아모세포에서의 발현 양상 및 기능에 대한 연구는 아직까지 이루어진 것이 없었다. 따라서 본 연구에서는 상아모세포의 분화과정 중 Thymosin β 4 유전자 및 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 상아모세포주인 MDPC-23에 분화를 유도 하였다. RT-PCR 및 Western blotting결과 Thymosin β 4 유전자는 분화기간 동안 전체적으로 강한 발현 양상을 나타냈으며 분화 유도 후 7일에 가장 강하게 발현 하였고 14일부터 조금 감소하였으며 28일에는 분화를 유도하지 않은 수준으로 감소하는 경향을 나타냈다. Thymosin β 4의 발현은 위에서 언급된 상아모세포의 분화 및 광화에 관련된 유전자의 발현과 유사한 양상으로 나타난 것을 미루어 Thymosin β 4 또한 상아모세포 분화 또는 광화과정에 관여하는 인자일 것으로 생각되지만 이에 대한 구체적인 연구가 추후에 필요할 것으로 생각된다.

앞선 다른 연구에서 치아 발생의 초기 치배의 상피 조직내의 세포에서 발현하는 Thymosin β 4 mRNA의 발현 양상과 세포 증식의 지표 실험인 BrdU-양성세포의 위치가 아주 비슷하다는 것을 밝혀냈다(Shigemura 등, 1999; Shigemura 등, 2001). 따라서 Thymosin β 4는 치아발생 초기에 치배 상피세포의 증식 및 그에 따른 법랑기관내의 세포증식에 관여한다는 것을 알 수 있다(Akhter 등, 2005). 본 연구에서도 생쥐의 치아발생 초기인 배아기 15일째에서 Thymosin β 4 단백질이 구강상피 및 치아쪽 그리고 치낭 부위의 세포에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 모자시기가 관찰된 배아기 17일째에는 치판과 구강점막세포 및 치유두 바깥쪽 간엽세포에서 강하게 발현하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 이전 연구와 본 연구결과를 종합하면 치아발생 초기에 Thymosin β 4는 세포의 증식에 관여하는 것으로 생각된다.

완전히 분화된 상아모세포는 고도로 극성화되면서 핵은 세포 기저부에 위치하게 되고 그에 따라 몸체는 상아질 경계면으로부터 치수 쪽으로 후퇴하게 된다. 이러한 상아모세포의 극성화는 세포가 신장되는 동안 일어나고 세포소기관의 분포변화, 세포 침단부에서 세포내 단백질체사 출현 그리고 세포돌기의 형성으로 특징 지을 수 있다(Takuma & Nagai, 1971; Garant & Cho, 1985). 또한 세포극성화는 미세소관, 중간체사(intermediate filaments) 그리고 미세사와 같은 세포내 골격의 재구성이 필요하다(Lesot 등, 1982; Nishikawa & Kitamura, 1986; 1987; Ruch 등, 1987; Fausser 등, 1990).

최근의 다른 연구들을 통해 Thymosin β 4의 액틴 결합능력은 손상된 조직의 회복을 촉진하고 혈관 내피세포의 분화에도 관여하는 것으로 알려졌다(Grant 등, 1999; Philp 등, 2003). 또한 Thymosin β 4는 미세사 내의 액틴 연결을 느슨하게 하는데 이것은 미세사의 구조적 변형을 가져온다(Carlier 등, 1996; Ballweber 등, 2002). 따라서 Thymosin β 4의 이러한 작용에 의해 세포골격의 변화가 유도된다고 생각할 수 있다.

본 연구의 실험 결과 출생 후 1일과 4일인 증시기 초기와 후기에 Thymosin β 4 단백질이 상아모세포 층에서 발현하는 것을 볼 수 있었다.

또한 약간의 범랑질과 상아질이 형성된 것을 볼 수 있었고 상아모세포는 길이가 매우 신장되어 있었다. 이것은 분화된 상아모세포가 극성을 가지는 세포로 변화했다는 것을 의미하고 이에 따라 세포 골격 및 소기관의 분포가 변화했다는 것을 나타내며, 각각의 세포가 기질을 합성하고 있음을 나타낸다(Garant & Cho, 1985; Mesgouez 등, 2006). 또한 치관기인 출생 후 7일과 10일에는 완전히 극성화된 상아모세포에서 Thymosin β 4 단백질 발현이 증가하였고 더불어 상아모세포 돌기에서도 발현하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 출생 후 14일과 20일째 조직 표본에서는 상아질이 더욱 많이 합성되어 있는 것을 관찰할 수 있었고 상아모세포의 길이는 가장 길었고 Thymosin β 4 단백질 발현이 아주 강하게 나타났다. 최근 한 연구는 비만세포에서 Thymosin β 4가 세포외유출과정 중 액틴과 결합함으로써 β -Hex, 히스타민 그리고 비만세포 트립타제 등의 물질을 분비하는 과정에 관여한다고 보고 하였다(Wyczółkowska 등, 2007). 상아모세포는 상아질 합성에 필요한 단백질들을 분비하기 위해 골지복합체로부터 분비과립을 만들어내는데 이러한 과립들은 키네신(kinesin)과 같은 운동단백질 및 ATP를 에너지원으로 사용하여 상아모세포 돌기로 이동한 후 밖으로 분비된다(Garant, 1972). 따라서 상아모세포 및 상아모세포 돌기에서의 Thymosin β 4 단백질의 발현은 세포 극성화뿐만 아니라 상아질 합성을 위한 분비세포의 운반에 필요한 세포골격의 재구성과의 관계가 있을 것으로 추측된다(Fig. 5). 종합해보면 Thymosin β 4는 치아 발생 초기인 싹시기와 모자시기에는 치배 상피 세포의 증식 및 범랑기관 내의 세포 증식에 관여하고 종상기부터 치아의 맹출기까지는 상아모세포의 극성화 및 분비과립을 세포 밖으로 이동시키기 위한 세포골격 변화에 관계가 있을 것으로 생각된다. 하지만 이번 연구결과 만으로는 Thymosin β 4의 특징적인 기능에 관하여 증명하기 어려웠다. 따라서 분화과정에 있는 상아모세포에서 Thymosin β 4와 분화 및 광화 그리고 세포골격 형성 및 변화에 관여하는 다른 유전자들과의 발현 관계를 알아보고 발생과정에 있는 상아모세포내의 세포골격상에 Thymosin β 4가 위치 하는지에 관하여 실험이 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Thymosin β 4는 발생 중인 조직에서만 아니라 여러 조직에서 발현되며 세포 분화나 이동에 필요한 세포골격 변화에 관련이 있는 것으로 알려졌다. 하지만 발생 과정에 있는 치아의 상아모세포에서 Thymosin β 4의 발현 여부 및 기능에 관한 연구는 지금까지 이루어 지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 분화를 유도한 상아모세포와 발생중인 치아에서 Thymosin β 4 유전자 및 단백질의 발현을 확인하고 그 기능에 대해서 알아보고자 하였다.

MDPC-23 세포에서 Thymosin β 4 유전자 및 단백질의 발현 양상을 알아본 결과 분화 유도 후 7일째에 가장 강하게 발현 하였고 28일째에는 분화를 유도하지 않은 수준으로 감소하는 경향을 나타냈다. 다음으로 생쥐의 치아발생의 특정 시기에서 Thymosin β 4 단백질 발현부위 변화와 양상을 알아보기 위해 면역조직화학법을 수행 하였다.

실험결과 배아기 15일부터 Thymosin β 4는 구강상피, 치아삭 내부 세포들에서는 약하게 그리고 치아삭 주변 간엽세포 및 치판과 구강점막층에서 강하게 발현하였으나 외법랑상피와 내법랑상피에서는 일부 세포에서만 발현되었다. 출생 후 1일째에 Thymosin β 4는 상아모세포 층에서 세포질 전체에 걸쳐 강하게 발현하였고 출생 후 4일째에는 세포질 침단에 집중되어 관찰되었다. 출생 후 7일과 10일째에 Thymosin β 4는 상아모세포에서 출생 후 4일째보다 발현이 증가하였고 상아모세포 돌기에서도 발현되었다. 출생 후 14일과 21일에 상아모세포 세포질내 Thymosin β 4 발현양상은 출생 후 21일째까지 서로 유사하였으나 상아질 돌기내의 발현은 21일째에서 더 약하게 관찰되었다.

따라서 본 실험 결과들을 종합해 볼 때, Thymosin β 4는 치아발생 초기인 싹시기와 모자시기에는 치배 상피세포의 증식 및 법랑기관 내의 세포 증식에 관여하고 종상기부터 맹출기까지는 상아모세포의 분화에 따른 극성화와 분비과립을 세포 밖으로 이동시키기 위한 세포골격 변화에 관여할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Akhter M, Kobayashi I, Kiyoshima T, Matsuo K, Yamaza H, Wada H, Honda JY, Ming X and Sakai H (2005) Possible functional involvement of thymosin beta 4 in developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem Cell Biol* 124(3-4):207-213.
- Anado'n R, Moldes IR, Carpintero P, Evangelatos G, Livianou E, Leondiadis L, Quintela I, Cervino MC and Go'mez-Ma'rquez J (2001) Differential expression of thymosins b4 and b10 during rat cerebellum postnatal development. *Brain Res* 894:255 - 265.
- Ballweber E, Hannappel E, Huff T, Stephan H, Haener M, Taschner N, Stoffler D, Aebi U and Mannherz HG (2002) Polymerisation of chemically cross-linked actin:thymosin beta(4) complex to filamentous actin: alteration in helical parameters and visualisation of thymosin beta(4) binding on F-actin. *J Mol Biol* 315:613 - 625.
- Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D and Lesot H (1992) Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36(4):491-503.
- Butler WT (1995) Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 33:56-65.
- Carrier MF, Didry D, Erk I, Lepault J, Van Troys ML, Vandekerckhove J, Perelroizen I, Yin H, Doi Y and Pantaloni D

(1996) Tbeta 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration. J Biol Chem 271: 9231 - 9239.

Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluhak-Heinrich J, Chuang HH and Macdougall M (2005) Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by *Runx2* during odontoblast cytodifferentiation. J Biol Chem 280(33):29717-29727.

Fausser JL, Lesot H, Zidan G and Ruch JV (1990) Characterization of a mouse monoclonal antibody to vimentin by indirect immunofluorescence microscopy and immunoblotting. Biol Buccale 18:29-33.

Goldstein AL, Hannappel E and Kleinman HK (2005) Thymosin beta (4): actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. Trends Mol Med 11:421 - 429.

Garant PA and Cho MI (1985) Ultrastructure of the odontoblast. In: The chemistry and biology of mineralized tissues. Butler WT, editor. Birmingham, AL:Ebsco Media, Inc., pp.22-32.

Garant PR (1972) The organization of microtubules within rat odontoblastic processes revealed by perfusion fixation with glutaraldehyde. Arch Oral Biol 17:1047-1058.

Garant PR (2003) Oral cells and tissues. Quintessence Publishing group 4 pp.

Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL and Kleinman HK (1995) Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci* 108:3685 - 3694.

Grant DS, Rose W, Yaen C, Goldstein A, Martinez J and Kleinman H (1999) Thymosin β 4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3:125 - 135.

Go'mez-Ma'rquez J, Pedrares JI, Otero A and Anado'n R (1993) Prominent expression of the actin-sequestering peptide Fx gene in the hippocampal region of rat brain. *Neurosci Lett* 152:41 - 44.

Go'mez-Ma'rquez J, del Amo FF, Carpintero P, and Anado'n R (1996) High levels of mouse thymosin b4 mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues. *Biochim Biophys Acta* 1306:187 - 193.

Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA and Butler WT (1998a) Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:260-6.

Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH and Butler WT (1998b) Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 37(3-4):233-249.

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J and Smith AJ (2004) TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral*

Biol 49(11):911-918.

Kang F, Purich DL and Southwick FS (1999) Profilin promotes barbed- end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J Biol Chem* 274:36963 - 36972.

Lesot H, Meyer JM, Ruch JV, Weber K and Osborn M (1982) Immunofluorescent localization of vimentin, prekeratin and actin during odontoblast differentiation. *Differentiation* 21:133-137.

Lesot H (2000) Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *J Dent Res* 79(9):1640-1644.

Linde A and Goldberg M (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:679-728.

Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, Weiss P, Pilet P, Ritchie HH, Daculsi G and Guicheux J (2004) Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *Connect Tissue Res* 45(2):101-108.

Mass R and Bei M (1997) The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:4-39.

Mesgouez C, Oboeuf M, Mauro N, Colon P, MacDougall M, Machtou P, Sautier JM and Berdal A (2006) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of immortalized odontoblast MO6-G3. *Int Endod J* 39(6):453-463.

- Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y and Reddi AH (1994) Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 162(1):18-28.
- Nakashima M (1994) Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 73(9):1515-1522.
- Nishikawa S and Kitamura H (1986) Localization of actin during differentiation of the ameloblast, its related epithelial cells and odontoblasts in the rat incisor using NBD-phalloidin. *Differentiation* 30:237-243.
- Nishikawa S and Kitamura H (1987) Microtubules, intermediate filaments, and actin filaments in the odontoblast of rat incisor. *Anat Rec* 219:144-151.
- Osman M and Ruch JV (1981) Behavior of odontoblasts and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short-term culture. *J Dent Res* 60:1015-1027.
- Pantaloni D and Carlier MF (1993) How profiling promotes actin filament assembly in the presence of thymosin b4. *Cell* 75:1007 - 1014.
- Philp D, Badamchian M, Scheremeta B, Nguyen M, Goldstein AL and Kleinman HK (2003) Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair

in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen* 11:19-24.

Philp D, Goldstein AL and Kleinman HK (2004) Thymosin β 4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *Mech Ageing Dev* 125(2):113 - 115.

Ruch JV (1984) Tooth morphogenesis and differentiation. In: Linde A (ed). *Dentin and dentinogenesis*. Boca Raton, FL: CRC Press 47-49.

Ruch JV (1985) Odontoblast differentiation and formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 64S:489-498.

Ruch JV, Lesot H and Kubler MD (1987) Matrix-cytoskeleton interactions during odontoblast and ameloblast differentiation. In: *The cytoskeleton in cell differentiation and development*. Maccioni RB, Arechaga J, editors. Washington, DC: ICSU Press, pp.293-303.

Safer D, Elzinga M and Nachmias VT (1991) Thymosin β 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem* 266:4029 - 4032.

Safer D, Sosnick TR and Elzinga M (1997) Thymosin β 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends. *Biochemistry* 36:5806 - 5816.

Sasaki T and Garant PR (1996) Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec* 245(2):235-249.

- Shigemura N, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Yamaza H, Akamine A and Sakai H (1999) The distribution of BrdU- and TUNEL-positive cells during odontogenesis in mouse lower first molars. *Histochem J* 31:367 - 377.
- Shigemura N, Kiyoshima T, Sakai T, Matsuo K, Momoi T, Yamaza H, Kobayashi I, Wada H, Akamine A and Sakai H (2001) Localization of activated caspase-3 positive and apoptotic cells in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *Histochem J* 33:253 - 258.
- Takuma S and Nagai N (1971) Ultrastructure of rat odontoblast in various stages of their development and maturation. *Arch Oral Biol* 16:993-1011.
- Theslef I and Sharpe P (1997) Signaling networks regulating dental development. *Mech Dev* 67:111-123.
- Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A (1997) Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 76(9):1555-1560.
- Unda FJ, Martin A, Hilario E, Begue-Kirn C, Ruch JV, Arechaga J (2000) Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGF beta1. *Dev Dyn* 218:480-489.
- Wyczółkowska J, Walczak-Drzewiecka A, Wagner W and Dastyk J (2007) Thymosin beta4 and thymosin beta4-derived peptides induce

mast cell exocytosis. *Peptides* 28(4):752-759.

Yamaza H, Matsuo K, Kiyoshima T, Shigemura N, Kobayashi I, Wada H, Akamine A and Sakai H (2001) Detection of differentially expressed genes in the early developmental stages of the mouse mandible. *Int J Dev Biol* 45:675 - 680.

사진부도 설명

Figure 1. (a) Thymosin β 4 gene expression in MDPC-23 cells incubation with differentiation medium. (b) Thymosin β 4 mRNA normalized to the corresponding GAPDH (Sample/GAPDH). The * represents statistically significant differences (n=3, p<0.05). Each experiment was repeated three times (M, DNA size marker).

Figure 2. (a) Western blotting results of Thymosin β 4 protein in MDPC-23 cell lysates incubation with differentiation medium. β -actin was used as internal control for the western blotting. Each experiment was repeated three times. (b) Analysis of Thymosin β 4 protein expression in lysates of MDPC-23 cells during differentiation. The * represents statistically significant differences (n=3, p<0.05). Each experiment was repeated three times.

Figure 3. (a) At embryonic day 15 (E15), Thymosin β 4 protein was expressed slightly on oral epithelium layer and inside of tooth bud but strongly expressed in mesenchymal cells (*arrows*). (b) At E17, the Thymosin β 4 protein expressed intensely in the dental lamina, oral mucosa and mesenchymal cells (*arrows*). Meanwhile, Thymosin β 4 protein expressed weakly in inner and outer epithelium of enamel organ. (c) At postnatal day 1 (P1), Thymosin β 4 proteins were expressed in the cytoplasm of odontoblast (*arrow*). (d) At P4, Thymosin β 4 proteins were expressed intensively in apical area of cytoplasm (*arrow*). Negative control not presented the immunohistochemical signals (inset of figure d). (oe, oralepithelium; tb, tooth bud; dp, dental papilla; mc, mesenchymal cell; dl, dental

lamina; eo, enamel organ; oee, outer enamel epithelium; iee, inner enamel epithelium; om, oral mucosa; d, dentin; p, pulp)

Figure 4. The expression of Thymosin β 4 increased at postnatal day 7 (P7) more than P4 in odontoblast layers (*arrow* in figure **a**). Also, Thymosin β 4 protein was expressed in odontoblastic process and observed clearly at P7 and P10 (*arrow* in figure **a** and **b**). Thymosin β 4 observed similarly in cytoplasm of odontoblast by the P14 and P21 but decreased in odontoblastic process at P21 compared with P14 (*arrow* in figure c and d). (op, odontoblastic process)

Figure 5. Thymosin β 4 may be participate in the polarization and exocytosis by cytoskeleton remodeling during differentiation of odontoblast.

사 진 부 도

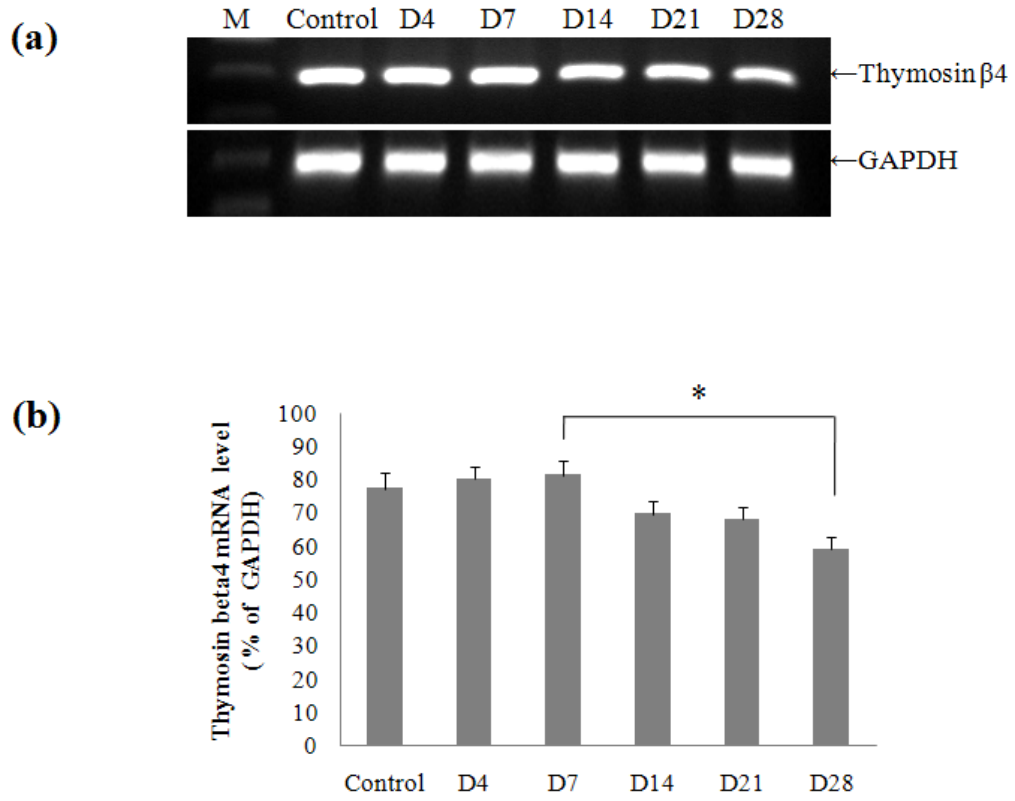


Figure 1. mRNA expression of Thymosin β 4 in differentiated MDPC-23 cells.

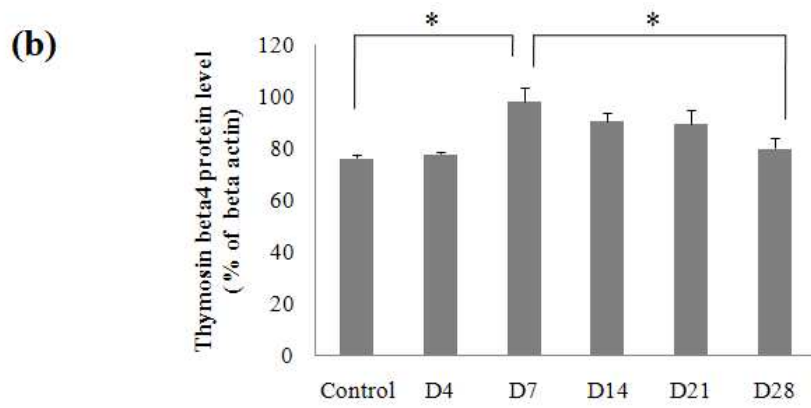
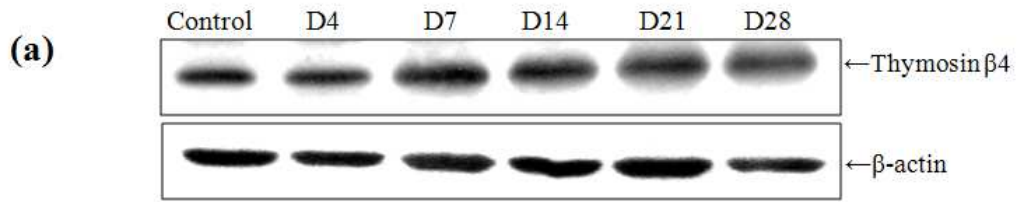


Figure 2. Western blot of Thymosin β 4, after induction of differentiation in MDPC-23 cells.

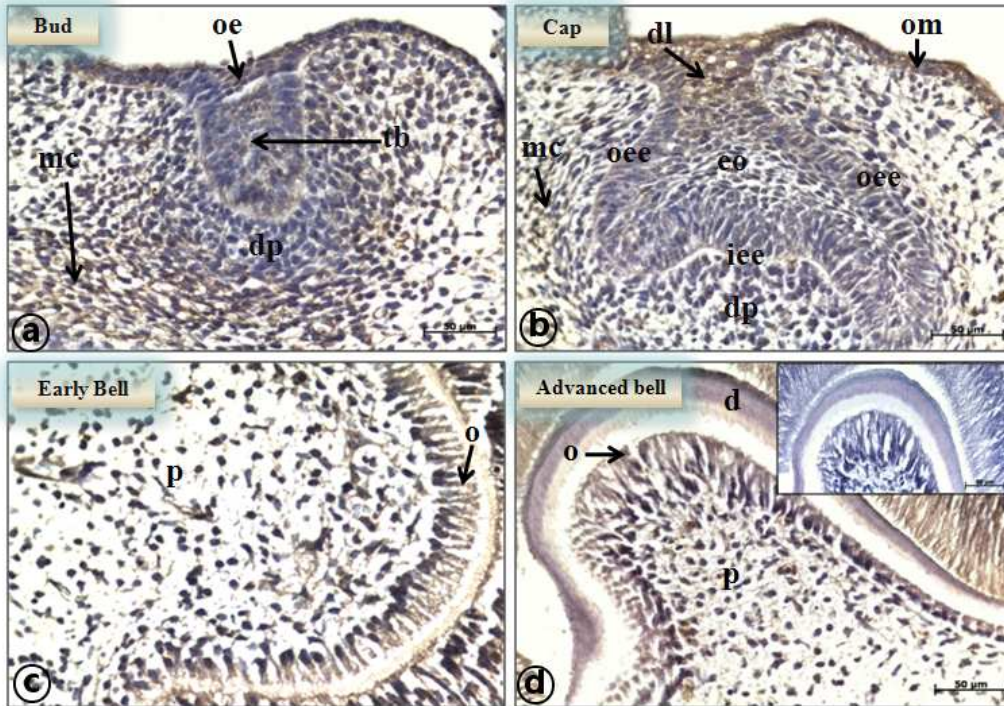


Figure 3. Immunostaining of Thymosin $\beta 4$ at bud, cap, early bell and advanced bell stage.

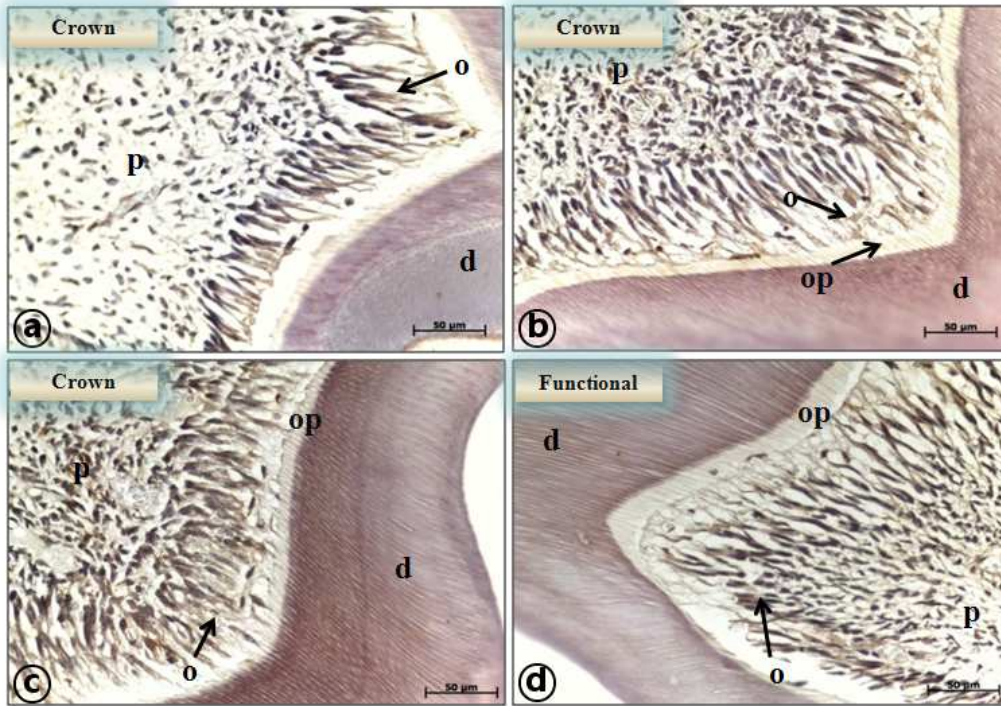


Figure 4. Immunostaining of Thymosin β 4 at crown and functional stage.

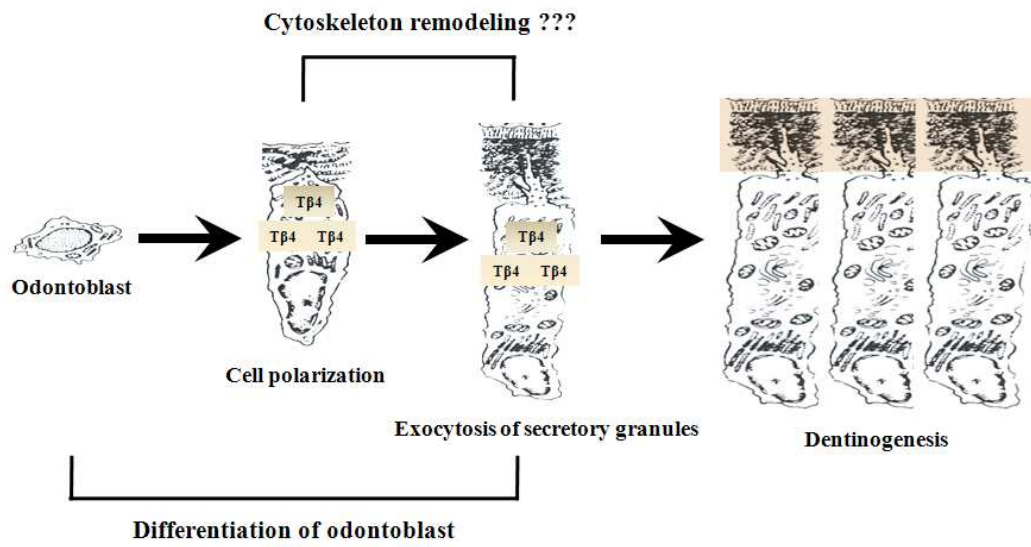


Figure 5. Possible role of Thymosin $\beta 4$ in odontoblast for dentinogenesis.

저작물 이용 허락서

학과	치의학과	학 번	20077383	과정	박사
성명	한글: 윤 성 호 한문		영문: Yoon, Seong-Ho		
주소	139-798 서울 논원구 중계본동 364 신안동진아파트 102-305				
연락처	E-mail :				
논문제목	한글: 생쥐의 상아모세포 분화과정에서 Thymosin β 4의 발현				
	영문: Expression of the Thymosin β 4 in odontoblast differentiation of the mouse				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 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 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2009년 월

저작자: 윤 성 호 (인)

조선대학교 총장 귀하