

APin 재조합 단백질의 합성과 적용

¹조선대학교 구강생물학 연구소 및 2단계 BK21, ²남서울대학교 치위생학과

김지웅¹ · 박종태¹ · 이유진¹ · 배현숙² · 김홍중¹ · 이경연¹ · 윤성호¹ · 박주철^{1*}

I. 서 론

치성상피는 치아기(dental 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 형성한다¹⁾.

Dey 등²⁾은 상아모세포의 분화와 상아질 형성 과정에 관여하는 새로운 인자를 탐색할 목적으로 두개골의 골모세포(calvarial osteoblast)와 치유두 세포(dental papilla cell)에서는 발견되지 않고 상아모세포/치수세포(odontoblast/pulpal cell)에서 특이하게 발견되는 유전자로 OD314를 보고하였다. Northern 분석에서 APin mRNA는 뼈, 뇌, 심장, 간, 폐, 골격근에서는 발견되지 않으며 상아모세포에서 선택적으로 발견된다고 하였으며, 김 등³⁾과 김 등⁴⁾은 OD314가 154아미노산을 합성하는 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자로 사람 치수세포의 분화과정에서 OD314는 치수세포가 상아모세포로 분화하는 초기 과정에 발견되어 그 발현이 유지되다가 석회화과정에서 더욱 증가한다고 보고하였다. 그러나 최근에 박 등⁵⁾은 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발견된다고 하여 OD314의 법랑모세포에

서의 역할을 시사하였다.

최근에 Solomon 등⁶⁾은 일명 Pindborg tumor라고 일컬어지는 상피성 치성 종양 유래의 세포들이 만들어내는 Apin 단백질을 보고하였는데, APin의 유전자 서열은 OD314와 동일하였다. 또한, Aung 등⁷⁾은 위암 특이유전자를 검색하여 APin이 위암 세포에서 강하게 발현된다고 보고하였고, 흥미롭게도 Moffatt 등⁸⁾은 박 등⁵⁾의 결과와 유사하게 APin이 성숙기 법랑모세포에서 뿐 아니라 치아기에서도 발현된다고 하였다. 그러나 APin 단백질의 법랑질과 상아질의 형성 과정에서의 그 중요성에도 불구하고 단백질 차원의 APin의 명확한 역할에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

이 연구는 다양한 연구를 통하여 법랑모세포의 분화와 법랑질의 성숙과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있는 APin 단백질의 기능을 명확히 하기 위하여, APin 유전자를 이용하여 분자생물학적인 방법으로 다량의 재조합 APin 단백질을 합성하고 이를 생체 적용 등의 다양한 분야에 응용하는 데 이용하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. OD314 유전자의 특성 분석

김 등⁴⁾의 OD314 염기서열을 Blast search (NCBI)와 단백질 분석 프로그램 (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/waveTM>)을 이용하여 coding region 과 아미노산의 구성 그리고 TM (transmembrane) domain 등을 확인하였다.

* 교신저자.

** 본 논문은 2005년도 조선대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

2. APin (OD314) expression construct의 제작과 대장균내 발현

1) APin expression construct의 제작

전장의 OD314 cDNA를 template로 NheI insertion primer (5'-caggct gctagcatgtctatg-tggtcc-3')와 PstI insertion primer(5'-gtaaa-ctgcagcttatggttctct taggctatc-3')를 이용하여 95℃에서 1분, 60℃에서 45초, 72℃에서 1분간의 사이클을 30회 실시하는 PCR 조건으로 OD314의 481 bp의 APin coding region의 유전자 단편을 얻었다. pRSET-A vector를 template로 pRSET-NheI insertion primer (5'-gatccggctgcagacaaa-gcccgaag-3')와 PRSET-PstI insertion primer (5'-ccaccagtcatgctagccataaccatg-3')를 이용하여 동일한 조건으로 PCR을 시행하여 2747 bp의 pRSET-vector 단편을 얻었다. 481 bp의 APin 단백질의 coding region 유전자 단편과 2747 bp의 pRSET-vector 단편을 DNA ligase (Invitrogen)를 이용하여 ligation하여 6XHis-tag이 들어 있는 pRSET-OD314 construct를 만들고, 이를 다시 NdeI과 PstI 제한 효소로 절단 후 pHCEIIBNd-vector에 subcloning하여 pHCEIIBNd-OD314 construct를 완성하였다 (Fig. 1).

2) APin (OD314) recombinant protein의 대장균내 발현

pRSET-OD314 construct와 pHCEIIBNd-OD314 construct를 대장균에 transformation 하여 고체 배지에서 얻은 single colony를 대량의 액체배지로 접종하여 고발현 하였다. 단백질의 발현 정도는 Western blotting을 이용하여 검토 하였다.

APin의 발현에는 *E. coli* JM109 strain, XL1-blue strain, Codon plus strain 및 BL21 (DE3) pLysS strain 등의 다양한 대장균 호스트가 이용되었다.

3. APin 재조합 단백질의 평가-Western blotting

pRSET-OD314 construct와 pHCEIIBNd-

OD314 construct가 transformation된 대장균을 접종한 LB 배양액을 3, 20, 24시간 배양 후 4℃, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 상청액을 10% trichloroacetic acid로 4℃에서 1시간동안 침전시켜 침전물을 얻고 이를 high salt lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 420mM NaCl, 25% Glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT)를 첨가하고 잘 부유시켜 얼음위에서 20분간 반응한 후, strage buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100mM NaCl, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF)를 첨가 후, 14000 RPM에서 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. transfer된 membrane을 5% skim milk로 실온에서 1시간동안 blocking 한 후, 1:1000의 비율로 polyclonal 1차 항체(His-tag)를 4℃, overnight처리하고, 2차 항체로서는 goat-anti rabbit IgG (Santa Cruz Biotech, USA)를 사용하여 실온에서 1시간동안 처리 후, ECL detection Kit (Amersham Biosciences, UK)을 사용하여 ECL hyper film (Amersham Biosciences, UK)을 통해 발현을 확인하였다.

III. 실험결과

1. OD314 유전자의 특성 분석

상동성 검색 결과 OD314 유전자는 18.7 kDa 의 159 amino acid로 구성된 APin 단백질을 coding하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 2). APin 단백질에는 중간에 glutamine이 풍부한 지역으로 구성되어 있었으며, 친수성 영역으로 구성된 transmembrane domain은 존재하지 않았다.

2. 구축된 발현 구조물을 이용한 대장균 호스트에서의 APin 발현 확인

pRSET-OD314 construct를 이용한 APin 단백

질의 발현은 3시간 배양 후의 BL21 호스트를 이용한 실험에서 22 kDa의 분자량으로 강하게 발현되었고 (Fig. 3A) soluble한 형태로 확인되었다 (Fig. 3B). PHCEIBNd-OD314 construct를 APin 단백질의 발현은 JM109 호스트를 이용한 실험에서 22 kDa의 분자량으로 강하게 발현되었다 (Fig. 4). 50 mM NaH₂PO₄ (pH8.0) buffer를 이용하여 24시간 4°C에서 dialysis된 정제 단백질을 수거하였다. 최종적으로 단백질을 정제 및 Dialysis 완료 후 확인 결과 2.6 mg/ml의 농도로 총량 80 mg을 얻었다. Fig. 5 (C)의 #2~6 lane에서 보이는 약 60 kDa의 band와 아래쪽의 band는 실제 정제 후, 3~5 % 미만의 비율을 차지하게 되며, 보다 많은 양을 차지하는 작은 size의 band는 size cut-off filtration을 통해 추가 제거가 이루어졌다. 확보된 단백질은 약 1 mg/ml의 농도로 얻어졌다. 정제된 단백질의 SDS-PAGE analysis와 6X-His tag antibody를 사용하여 western를 한 결과 동일하게 APin 단백질은 22KDa에서 확인되었다(Fig. 5A, 5B). APin 단백질을 JM109 균주 안에서 transformation 시킨 후 5 ml LB에 single colony를 접종하여 배양하였다. 1 mM IPTG에서 특정 단백질을 만들기 위해 induction 하였다. Washing buffer와 elution buffer를 gradient를 주어 imidazole 농도를 서서히 증가시키면서 His-Tag 단백질을 분리해내었다. Imidazole 농도에 따른 변화에서 3 lane에서 OD 값이 급격히 증가되었다. 일차로 각각 정제된 APin 단백질의 SDS-PAGE의 결과이다(Fig. 5C).

IV. 총괄 및 고안

현재까지 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 수준까지 많이 진행되어 왔다. 초기의 치아발생에는 BMP, FGF, MSX1, PAX9 및 CBFA1 등의 여러 유전자들이 관여하는 것으로 알려졌으며 그들의 신호 전달 경로들에 관한 연구들도 활발히 진행되고 있다⁹⁾. 그러나 치아의 초기 발생과는 대조적으로 상아모세포와 법랑모세포 그리고 백악모세포의 분화를 조절하는 인자에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

상피기원인 법랑모세포는 법랑질형성 각 시기

의 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 구별 된다¹⁰⁾. 분비전기에는 내치아상피가 법랑모세포로 분화하여 단백질 합성 기구를 발달시켜 유기바탕질 분비를 준비한다. 분비기 법랑모세포는 Tomes돌기를 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 운반 한다¹¹⁻¹⁵⁾.

법랑모세포는 법랑질을 형성할 때 유기기질과 무기질을 동시에 분비하여 부분 광화된 상태로 존재하다가 성숙해감에 따라 높은 함량의 유기기질을 제거하고 석회화 기질 성분을 높여가는 형태로 법랑질을 석회화시키기 때문에, 유기기질이 먼저 분비되고 나중에 석회화가 진행되는 뼈, 상아질 그리고 백악질의 석회화 과정과는 다르다¹⁶⁾. 또한 법랑모세포는 법랑질 형성 후에 치은의 접합상피(junctional epithelium)로 잔존하는 극히 일부를 제외하고는 치아에 존재하지 않기 때문에 골모세포, 상아모세포 그리고 백악모세포가 치아에 존재해서 경우에 따라 골, 상아질, 백악질의 유지와 치유 및 재생에 관여하는 양상과도 다르다. 최근에 활발한 분자생물학적 연구를 포함하여 법랑모세포에 관한 많은 연구에도 불구하고¹⁷⁻²⁰⁾, 법랑모세포가 법랑질 완성 후에 존재하지 않는 세포 접근의 한계와 법랑모세포가 갖는 세포의 단계에 따른 다양한 변화와 석회화의 독특한 특성으로 인하여, 현재까지 법랑모세포의 분화와 성숙 그리고 법랑질의 석회화에 관련된 인자와 기전에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

박 등²¹⁾은 APin mRNA는 법랑모세포의 분비기에서 부터 발현되기 시작하여 법랑모세포가 성숙해갈 수록 그 발현이 증가하며, APin 단백질은 분비전단계의 법랑모세포에서는 발현되지 않고 분비기의 법랑모세포에서는 세포질에 약한 발현을 보이다가 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포에서는 강하게 발현된다고 하

었다. 이 결과는 APin이 법랑모세포의 성숙과정 즉 유기기질을 제거하고 석회화를 증진하는 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포의 기능과 깊은 관련이 있음을 시사한다.

또한, 박 등²²⁾은 법랑모세포 세포주를 배양하여 석회화 결절의 형성을 유도한 후 APin, amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblastin, MMP-20, kallikrein-4 (KLK4) mRNA의 발현을 분석한 RT-PCR 분석에서 APin mRNA가 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 21일까지 그 발현이 증가하였고, 배양 28일에도 강한 발현이 유지된다고 하였다. 이는 APin이 법랑모세포의 분화과정과 법랑질의 석회화 과정에 연관된다는 것을 암시하는 결과로 볼 수 있다. 김 등⁴⁾은 사람 치수세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 28일의 배양 과정에서 APin 단백질은 22 kDa의 크기로 배양 시작부터 치수 세포에서 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일, 14일 까지 유지되며, 석회화 결절이 형성되는 21일과 28일에는 발현이 더욱 증대된다고 하였다. 또한, amelogenin mRNA는 배양 시작 후 7일까지 발현이 유지되다가 점차 그 발현이 현저히 감소하였는데, 이는 amelogenin이 법랑모세포의 초기 분화과정이나 법랑질이 석회화되기 전 단계에서 다양한 분해효소에 의해서 길거나 짧게 잘려 저분자 조각이 되기 때문이라고 하였다. 법랑질 단백질중 석회화가 관련이 있는 tuftelin과 ameloblastin은 28일 배양 과정에서 석회화 결절이 형성되는 14일에는 발현이 더욱 증대된다고 하였다. 이 결과는 APin 단백질이 법랑모세포의 석회화 과정에 깊은 관련성을 가지고 있는 단백질이라는 것을 유추할 수 있다. 두개의 MMP-20와 KLK4 proteinase 중 MMP-20 mRNA는 치아기의 상아모세포와 법랑모세포에서 검출되고^{23, 24)}, KLK4는 초기 성숙기 동안의 법랑모세포에서 검출되었다고 보고되어 있다²⁵⁾.

Bartelett 등²⁶⁾과 Fukae 등²⁷⁾은 MMP20이 법랑질 분해효소로서 관여한다고 하였으며, 성숙기 동안 MMP-20 null mouse에서 석회화 물질이 현저히 감소한다고 하였다. 그리고 tuftelin은 처음에는 세포신호 전달에 관여하고, 나중에는 무기질 침착에 관여하며 tuftelin을 overexpre-

ssion을 시켰을 때 enamel crystallite에 강한 영향을 준다는 Wen Luo 등²⁸⁾의 보고 등을 추론하여 종합하여보면 tuftelin과 MMP-20은 석회화와 유기기질 제거를 하는데 중요한 역할을 하고 있다고 볼 수 있다. 그러나 앞으로 법랑질의 성숙과 석회화와 관련한 이 효소들의 역할과 더불어 APin의 기능을 해석하기 위해서는 다량의 APin 재조합 단백질의 합성이 요구된다고 할 수 있다.

이 실험에서는 다양한 연구 결과를 통하여 상아질의 형성뿐만 아니라 법랑모세포의 분화와 법랑질의 성숙 및 석회화 과정에 중요한 기능을 할 것으로 보고되고 있는 APin 유전자의 기능을 보다 명확히 규명하고 더 나아가 이 유전자나 단백질을 치주치료 등에 응용할 목적으로 재조합 APin 단백질을 합성하고자 하였다. 실험 결과 pRSET-OD314 construct를 이용한 induction system은 고발현이 확인되었으며, pHCEIIBNd-OD314construct에 JM109 strain을 발현 호스트로 사용하였을 때에도 고발현이 이루어지는 형질전환체가 확보되었다. 또한 발현단백질이 대부분 soluble 상태로 발현되어, 이 재조합 단백질들을 세포나 생체 적용 등에 용이하게 사용될 수 있음을 보여 주었다.

결론적으로 이 실험에서 재조합 APin 단백질을 다양한 실험에 적용할 정도의 대량생산을 이루었다. 따라서 앞으로 이를 이용한 법랑질의 형성과 관련한 추가 연구는 법랑질의 형성 과정을 이해하고 더 나아가 법랑질의 재생을 이루어낼 수 있는 토대를 마련할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

APin 단백질은 일명 Pindborg tumor라고 일컬어지는 상피성 치성 종양에서 분비되는 아미로이드로 처음 보고되었으며 이 유전자 서열은 OD314와 유사하였다. APin은 또한 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 APin의 법랑모세포의 분화와 법랑질 형성과정에서의 역할을 시사하였다. 그러나 APin 재조합 단백질의 합성이나 단백질 차원의 기능에 대한 연구는 잘

알려져 있지 않다.

이 연구에서는 APin 재조합 단백질을 합성하기 위하여 pRSET-OD314 construct와 pHCEIIBNd-OD314 construct를 제작하고 이를 다양한 발현 호스트와 조건을 적용하여 다량의 단백질을 정제하고자 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pRSET-Od314 construct를 이용한 induction system에서 APin의 고발현이 확인되었다.
2. pHCEIIBNd-Od314 construct에 JM109 strain을 발현 호스트로 사용하였을 때 고발현이 이루어지는 형질전환체를 확보하였다.
3. 발현된 APin 재조합 단백질은 22 kDa의 분자량을 나타냈다.
4. 발현단백질은 대부분 soluble 상태로 발현되었다.

이 실험에서 APin 재조합 단백질을 다량으로 합성하였다. 따라서 앞으로 이를 이용하여 법랑모세포의 분화와 법랑질 형성과정과 관련한 APin 단백질 차원의 다양한 실험이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, Macdougall M : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1(Dmp1) and dentin sialophosphoprotein(DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner R* 12(12): 2040-2049, 1997.
2. Dey R, Son HH, Cho MI : Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Archiv Oral Biol* 46: 249-260, 2001.
3. 김두현, 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철 : 상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능연구. *대한치과보존학회지* 29(4): 399-408, 2004.
4. 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철 : RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현억제가 상아모세포 전구세포에 미치는 영향. *대한재질인류학회지* 17(2): 121-129, 2004.
5. 박주철, 김익환, 김홍중, 정문진, 오현주, 정제오, 손호현 : 흰쥐 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 역할. *대한재질인류학회지* 18(3): 187-196, 2005.
6. Alan Solomon, Charles L. Murphy, Kristal Weaver, Deborah T. Weiss, Rudi Hrucic, Manfred Eulitz, Robert L. Donnell, Knut Sletten, Gunilla Westermarck, Per Westermarck : Calcifying epithelial odontogenesis(Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 142(5): 348-355, 2003.
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. Nancy A : Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., Mosby, Inc., St. Louis, MI, p192-239, 2003.
10. Garant PR : Oral cells and tissues. Quintessence publishing Co., Inc., Chicago, IL, p25-52, 2003.
11. 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(1): 37-46, 2006.
12. 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.
13. 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.
14. Smith CE : Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 128-161, 1998.
15. 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.
16. Calvi LM, Shin HI, Knight MC, Weber JM, Young MF, Giovannetti A, Schipani E : "Constitutively active PTH/PTHrP receptor in odontoblasts alters odontoblast and ameloblast function and maturation." *Mech Dev* 121: 397-408, 2004.
17. Bei M, Stowell S, Maas R : "Msx2 controls ameloblast terminal differentiation." *Dev Dyn* 231: 758-765, 2004.
18. 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 post-natal mouse incisor teeth." *Connective Tissue Res* 44: 124-129, 2003.
19. Smith CE : "Cellular and chemical events during enamel formation." *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 128-161, 1998.
20. 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.
21. 박주철, 안성민, 김홍중, 정문진, 박민주, 신인철, 손호현 : "법랑모세포 분화와 성숙과정에서 OD314 발현." *대한치과 보존학회지* 30(5): 423-430, 2005.
 22. 박종태, 최용석, 김홍중, 정문진, 오현주, 신인철, 박주철, 손호현 : "법랑모세포 분화와 법랑질 형성과정에서 OD314, Apin protein의 발현 및 기능." *대한치과 보존학회지* 31(6): 437-444, 2006.
 23. Begue-Kim C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT : Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* 106: 963-970, 1998.
 24. Fukae M, Tanabe T : Degradation of enamel matrix proteins in porcine secretory enamel. *Connect Tissue Res* 39: 123-129, 1998.
 25. Hu JC, Ryu OH, Chen JJ, Uchida T, Wakida K, Murakami C : Localization of EMSP 1 expression during tooth formation and cloning of mouse cDNA. *J Dent Res* 79: 70-76, 2000.
 26. Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC : Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 183: 123-128, 1996.
 27. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Simith CE : Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 83(12): 909-913, 2004.
 28. Wen Luo, Xin Wen, Hong-jun Wang, Mary MacDougall, Malcolm L.Snead, Michael L.Paine : In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs* 177: 212-220, 2004.

Explanation of Figures

- Fig. 1. Cloning strategy of APin gene into expression vectors. (A) Showing the APin (OD314) ORF and restriction map. (B) Showing pRSET-A vector. (C) Showing pRSET-OD314 construct. (D) Showing PHCEIIBNd-OD314 construct
- Fig. 2. Deduced amino acid sequence of APin protein in OD314 cDNA.
- Fig. 3. Expression of APin recombinant protein using pRSET-OD314 (A) and its soluble form (B).
- Fig. 4. Expression of APin recombinant protein using PHCEIIBNd-OD314 construct.
- Fig. 5. Expression of APin recombinant protein. (A) Purification of the APin protein. SDS-PAGE analysis : lane 1 : LMW marker, lane 2 : 1 μ g loading, lane 3 : marker, lane 4 : 3 μ g loading. APin was expressed as 22 kDa in purified protein. (B) Western blotting of the APin protein with 6X-His tag antibody. (C) Elution of the APin protein using FPLC. SDS-PAGE analysis: lane 1 : LMW marker, lane 2 : soluble fraction of cell lysate, lane 3 : wash-out fraction.

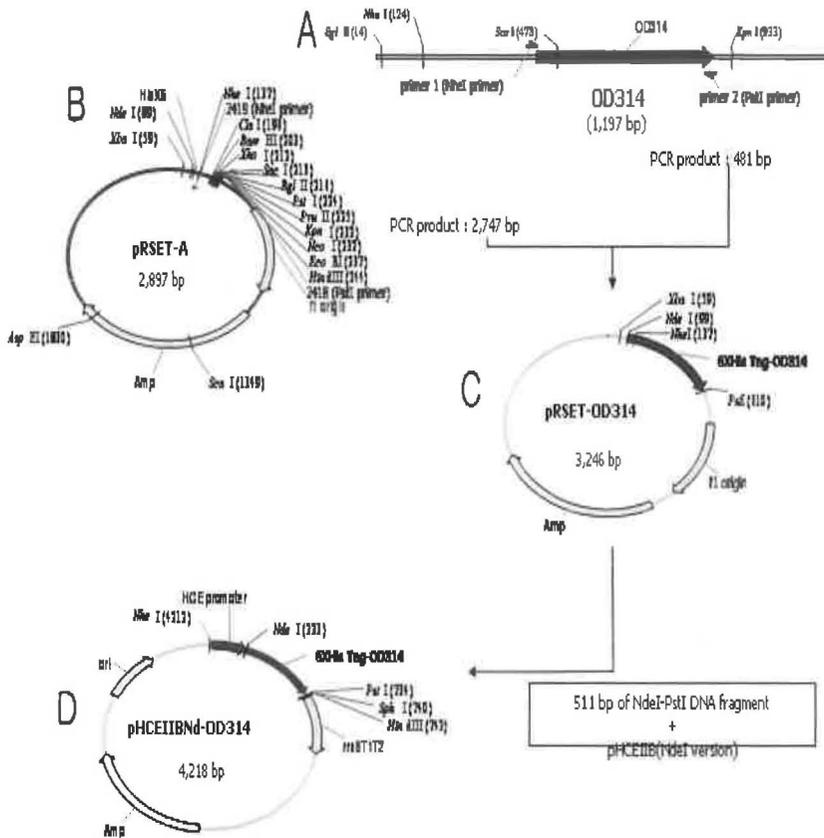


Fig. 1.

Glutamine-rich region

MSYWPVKVP QDQTQMFQYYPVYMLLPWEQPPQQTVTSSPQQTGQQLYEEQIPFYNQGFVPPQQAEPGVPGGQQHL
 VLDSFVGTAPETPGMPAVEGPLYPQKEPIGFKQDNVGVSTPSTSPKPDGTGNFFTSEINPTIALLLPEQKVNADSLREP*

Fig. 2.

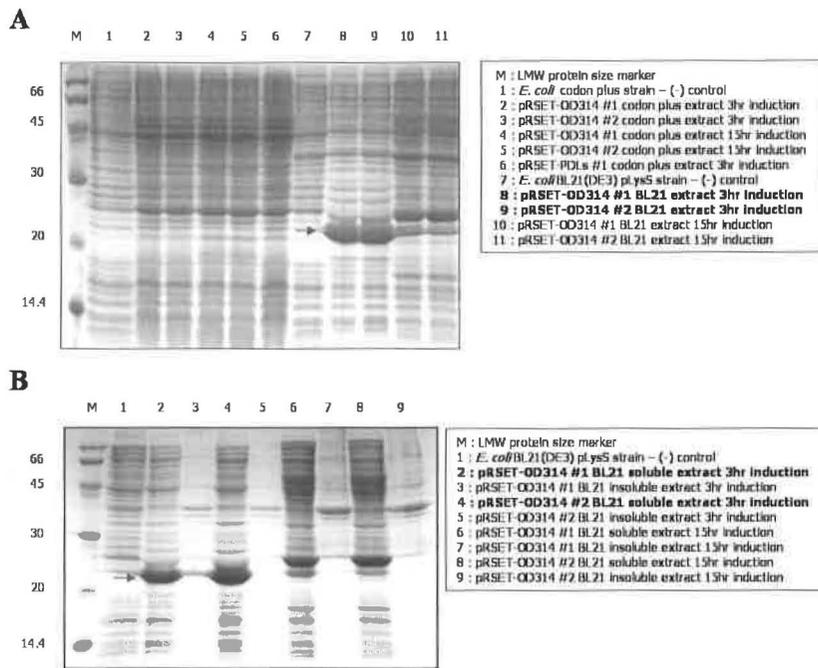


Fig. 3.

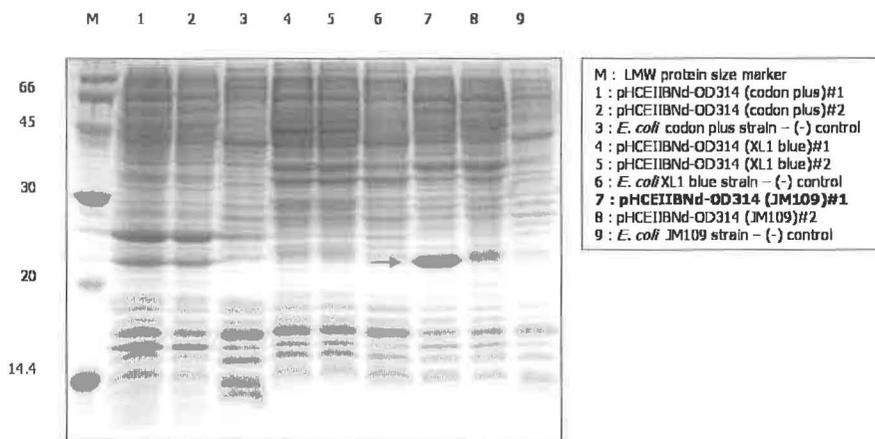


Fig. 4.

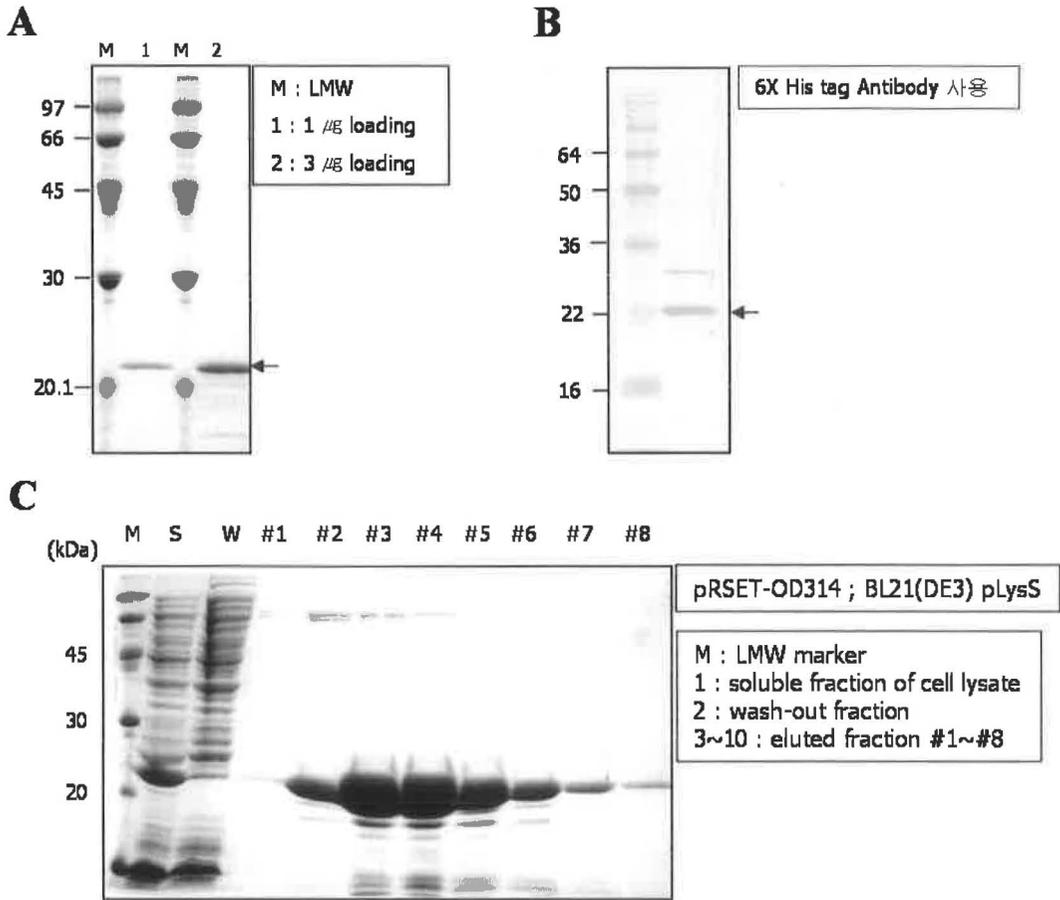


Fig. 5.

- ABSTRACT -

Production of APin recombinant protein and its application

Ji-Woong Kim¹, Jong-Tae Park¹, You-Jin Lee¹, Hyun-Sook Bae², Heung-Joong Kim¹,
Kyoung-Yeon Lee¹, Seong-Ho Yun¹, Joo-Cheol Park^{1*}

¹Oral Biology Research Institute, Chosun University and The second stage of BK21

²Dept. of Dental Hygiene, Namseoul University

Apin protein, calcifying epithelial odontogenic (pindborg) tumors (CEOTs)-associated amyloid, were isolated from CEOTs, and has similar nucleotide sequences to OD314. It was reported that APin was highly expressed during ameloblast maturation and mineralization. APin protein was also efficiently secreted from cultured ameloblasts. However, little is known about the functional study of APin using recombinant protein during amelogenesis.

In this study, in order to produce the APin recombinant protein, the APin-expression construct were made and expressed its protein in various host cell and temperature conditions for the utilization of further enamel functional studies.

The results were as follows:

1. APin protein was strongly expressed in the induction system using pRSET-OD314 construct.
2. When the JM109 was used as a expression host, APin protein was strongly expressed in the induction system using pHCEIIBNd-OD314 construct.
3. The APin protein was recognized at a molecular weight of 22 kDa in Western blots.
4. Almost of the expressed APin protein was soluble.

These results suggest that considerable amount of APin recombinant protein was produced and it could be used for further amelogenesis research effectively.

Key Words: APin, recombinant protein, Solubility, Expression, OD314