

아프리카산 발톱개구리의 치아 발생과정에서 *Bmp4*의 발현

홍지수, 고병석, 정아위, 유양, 박병건, 이영훈[†]

전북대학교 치과대학 구강해부학교실, 구강생체과학연구소

접수: 2019년 11월 10일/ 수정접수: 2019년 11월 16일/ 게재 승인: 2019년 11월 18일/ 출간: 2019년 12월 31일

*Bmp4*는 치아발생 과정에서 발현을 나타내고 치아형성 위치, 치아발생개시, 치아형태의 조절, 치아모양의 결정에 관여한다. 그러나 아프리카산 발톱개구리의 치아발생과정에서는 잘 알려져 있지 않다. 아프리카산 발톱개구리의 알을 수정하여 사육하여 26일째(stage 54)의 올챙이부터 변태 직후 어린 개구리의 위턱을 in situ hybridization 방법으로 실험하였다. *Bmp4*는 stage 54의 치배에서는 발현되지 않았고, stage 56부터 stage 62까지 중간엽과 치아유두, 바깥치아상피에서 발현되었다. 변태 직후 어린 개구리에 해당하는 stage 66에서, *Bmp4*는 위턱뼈에 유착된 치아에서 발현되지 않았고, 계승치아의 중간엽과 바깥치아상피에서 발현되었다. 그러므로 *Bmp4*는 아프리카산 발톱개구리의 치아발생 과정에서 상아질 형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

주제어: 아프리카산 발톱개구리, 치아발생, *Bmp4* 발현

[†] 교신저자: 이영훈

전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, 전북대학교 치과대학 구강해부학교실

Tel: 82-63-270-4048, Fax: 82-63-270-4004, E-mail: yhlee@jbnu.ac.kr

서론

치아발생은 치아상피(dental epithelium)와 치아중간엽(dental mesenchyme)의 상호작용에 의해서 이루어지고, 많은 분자물질(molecules)과 성장인자(growth factors)가 이에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이러한 상피-중간엽 상호작용(epithelial-mesenchymal interaction)은 초기치아형태발생(early tooth morphogenesis)에서 *Bmp4*의 발현에 의해서 조절된다²⁻⁴⁾.

*Bmp4*는 TGF- β family에 포함되어 있고, 치아유도능(tooth inductive potential)을 치아상피(dental epithelium)에서 치아중간엽(dental mesenchyme)으로 전달하는 성장인자(growth factor)이다²⁾. *Bmp4*는 생쥐에서 발생 11.5일에 치아판상피(dental lamina epithelium)에서 발현되기 시작하여 발생 12.5일에 치아중간엽으로 그 발현이 이동하여 치아중간엽의 형태학적 변화를 유도한다^{2,5)}.

*Bmp4*는 상피-중간엽 상호작용에서 의해서 치아중간엽에서 *Msx1*과 *Msx2*, *Pitx1*, *Pax9*, *Barx1*의 발현과 법랑질결절(enamel knot)의 형성을, 상피조직에서는 *Pitx2*와 *Dlx2*의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다⁶⁻¹¹⁾. 또한, 닭(chick)에서는 *Bmp4*가 치아판(dental lamina)에서 발현되지 않아 치아가 형성되지 않는다고 보고되었고¹²⁾, 최근에는 키클리드과(cichlidae)와 경골어류(teleost)에서도 *Bmp4*의 소실이 치아결손과 관련이 있다고 추측하였고^{13,14)}, 다형성치(polyphyodonty) 어류인 무지개송어(rainbow trout)의 치아유두(dental papilla)에서 *Bmp4*의 발현이 보고되었다¹⁵⁾.

그러나 다형성치 동물인 아프리카산 발톱개구리에서 *Bmp4*에 관한 연구는 초기발생과정에서 다양하게 보고되어 있으나 치아형태발생에서 *Bmp4*의 연구보고는 찾아볼 수 없다. 그러므로 본 저자는 치아의 형성과 흡수, 재형성 과정을 반복하는 다형성

치 동물인 아프리카산발톱개구리를 대상으로 치아형성과정에서 *Bmp4*의 발현양상을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

아프리카산 발톱개구리 알을 실험실에서 수정시켜 normal amphibian medium (NAM)에서 배양하였다. 실험재료는 배양한 올챙이를 Nieuwkoop과 Faber¹⁶⁾의 분류에 따라 치배(tooth germ)가 형성되는 시기인 stage 55부터 56, 57, 59, 62, 66, 어린 개구리(수정 후 68일)의 표본에서 위턱 부위를 선택하였다.

Total RNA 추출

Stage 35/36의 아프리카산 발톱개구리 알을 채취하여 total RNA를 추출하였다. RNA를 정제하기 위해 아프리카산 발톱개구리 알을 Trizol (Invitrogen, USA) 용액에서 분쇄하여 균질액을 만든 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 chloroform을 첨가하여 혼합한 후 다시 실온에서 3분간 반응시키고 원심분리하였다. 원심분리한 상층액에 isopropyl alcohol를 첨가하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 원심분리하여 total RNA를 침전시킨다. 침전된 total RNA에 70% alcohol를 첨가하여 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 RNA는 260nm에서 spectrophotometer로 정량하였다.

cDNA 합성

Total RNA 3 μ g에 Random Primer (0.25 μ g), 10mM dNTP를 넣고 65°C에서 15분 반응시킨 후 얼음에서 5분간 둔다. 여기에 5x First-Strand buffer, 0.1M DTT, RNaseOUTTM Recombinant

Ribonuclease Inhibitor를 넣고 42°C에서 2분 반응시킨 후 SuperScript™ II를 넣고 다시 42°C에서 50분 반응시키고 70°C에서 15분간 가열하여 반응을 종결시켜 cDNA를 얻었다.

PCR를 이용한 *Bmp4* 증폭

cDNA 1 μ g에 10pM *Bmp4* primer (Forward: ATC GAT GCC ACC ATG ATT CCT GGT AAC CGA AT, Reverse : CTC GAG ACG GCA CCC ACA CCC TTC CA)와 10x PCR buffer, 25mM MgCl₂, 2.5mM dNTP, 2.5U Taq polymerase를 넣고 PCR하였다. PCR 반응은 95°C에서 10분간 처리하고, 95°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 34회를 주기로 처리한 다음 72°C에서 10분 동안 유지시키고 15°C로 종결시켰다.

cRNA probe 합성

얻어진 PCR 부산물은 pBS II vector에 삽입한 다음 sequencing을 확인하였다. 얻어진 pBS II-*Bmp4* plasmid를 ClaI로 자른 다음 T3 polymerase로 *Bmp4* antisense riboprobe를 합성하였다¹⁷⁾.

조직처리과정

치배가 형성되는 올챙이의 위턱부위를 MEMFA (10% formalin, 2 mM EGTA, 0.1 M MOPS, 1 mM magnesium sulfate)에 1시간 동안 실온에서 고정한 다음 70%, 95%, 100% 메탄올에 탈수한 후 -20°C 냉동고에 보관하였다. 다음날 xylene으로 투명한 다음 파라핀을 침투시켜 파라핀에 포매하여 시상단면의 절편(12 μ m 두께)을 제작한 후 37°C 슬라이드 건조기에서 3일 동안 건조시켰다.

In Situ Hybridization

제작한 조직절편을 Lemaire와 Gurdon¹⁸⁾의 방법을 통하여 *Bmp4*의 발현을 관찰하기 위하여 in

situ hybridization을 실시하였다. 절편은 함수과정(hydration)을 거친 후 4% 파라포름알데하이드에 재고정하였고, 인산완충액으로 세척 후 3 μ g/ml proteinase K를 37°C에서 10분 동안 처리하였다. Digoxigenin으로 표지된 *Bmp4* cRNA probe를 hybridization 용액으로 3 μ g/ml의 농도로 희석하여 절편에 도포한 후 60°C에서 16시간 동안 hybridization을 시행하였다. Hybridization이 끝난 후 hybridization 용액으로 10분간 60°C에서, 50% formamide과 0.3% CHAPS를 포함한 1X SSPE 용액에 60°C에서 10분간 2회, 25% formamide과 0.3% CHAPS를 포함한 1X SSPE 용액에 37°C에서 10분간 2회, 0.3% CHAPS를 포함한 1X SSPE 용액에 실온에서 1시간동안 세척하였다. 이어서 alkaline phosphate-conjugated anti-digoxigenin antibody (Roche; 1:2,000)를 이용하여 4°C에서 16시간 동안 면역반응을 실시하였다. 면역반응을 중단한 후에 세척하고 BM purple-alkaline phosphatase substrate (Roche)를 이용하여 빛을 차단한 다음 실온에서 16시간 동안 발색하였다. 발색과정을 마친 후 eosin으로 15분 동안 대조염색을 시행하였고 Axiophot 광학현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰한 다음, color view II 디지털카메라(Soft-Imaging System GmbH, Germany)로 사진촬영하였다.

결과

수정 후 26일째 되는 stage 54에서 아직 치배는 형성되지 않았고 *Bmp4*의 발현은 특정부위 즉, 치배가 형성될 구강상피 부위에서 관찰되지 않았다 (Fig. 1A, B).

수정 후 38일째 되는 stage 56에서 치아상피는 성장하여 중간엽쪽으로 융기되어 있고 치배는 안쪽치아상피(inner dental epithelium)와 바깥치아

상피(outer enamel epithelium), 치아유두(dental papilla)의 구조로 이루어져 있었다. 이 시기에 *Bmp4*는 치아유두에서 가장 강하게 발현되었고 바깥치아상피에서 미약하게 관찰되었다(Fig. 1C, D).

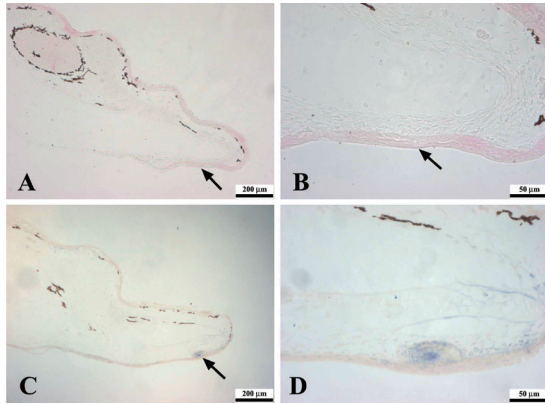


Fig. 1. *Bmp4* expression at stage 54 (PF 26 days; A, B) and stage 56 (PF 38 days; C, D). *Bmp4* is not detected in the presumptive dental epithelium at stage 54 but *Bmp4* expression is shown in the dental epithelium and mesenchyme at stage 56.

수정 후 41일째 되는 stage 57에서는 치아기질(dentin matrix)이 형성되는 시기이다. 이 시기에서도 *Bmp4*의 발현은 구강상피와 치아유두에서 관찰되었고 발현양상은 치아유두에서 강하게 나타났고 치아상피에서 미약하게 관찰되는 양상으로 stage 56과 유사하였다(Fig. 2A, B). 수정 후 45일째 되는 stage 59에서는 첫 번째 치아열의 뒤쪽에서 두 번째 치아열의 치배가 형성되는 시기이고 첫 번째 치아열의 치아에서 *Bmp4*는 이전 stage와 비슷한 결과로써 치아유두에서 강하게 발현되었고 바깥치아상피에서 미약하게 발현되었다(Fig. 2C, D).

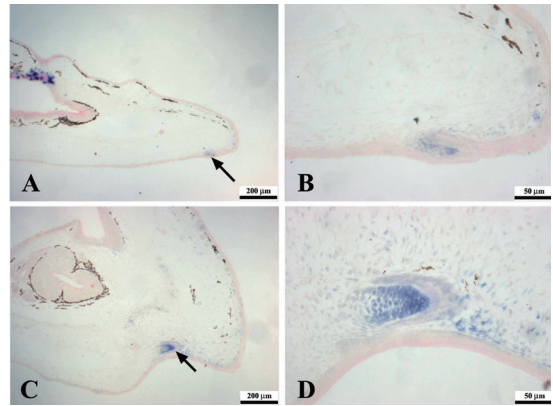


Fig. 2. *Bmp4* expression at stage 57 (PF 41 days; A, B) and stage 59 (PF 45 days; C, D). *Bmp4* is expressed in dental epithelium and mesenchyme at stage 57. In the dental epithelium, *Bmp4* expression is only observed at the tip of the bell. *Bmp4* is strongly expressed in the odontoblasts but weakly in the dental epithelium at stage 59.

수정 후 49일째 되는 stage 62의 첫 번째 치아열의 치아에서 *Bmp4*의 발현은 치아유두에서 강하게 관찰되었고 치아상피에서는 그 발현이 소실되는 양상으로 이전의 stage와 유사하게 관찰되었다(Fig. 3A, B).

수정 후 58일째 되는 stage 66에서 첫 번째 치아열의 치아는 상악골에 유착되어 있고 맹출되는 시기이다. 첫째 열의 치아에서 *Bmp4*의 발현은 전반적으로 나타나지 않고 있으나 일부 치수 내 치아와 맞닿는 부위에서 그 발현이 미약하게 관찰되었다. 둘째 열의 치아에서 *Bmp4*는 치아유두에서 강하게 발현되었고, 치아상피에서는 바깥치아상피에서 그 발현이 관찰되었다(Fig. 3C-F).

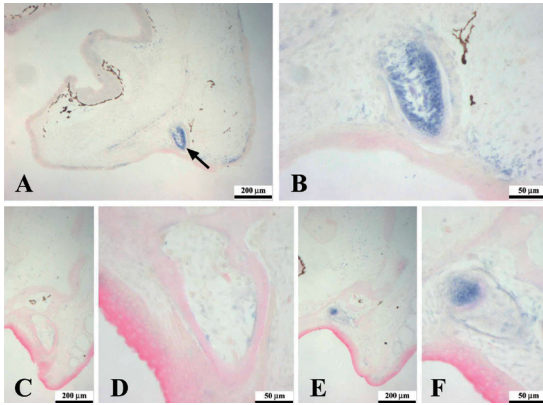


Fig. 3. *Bmp4* expression at stage 62 (PF 49 days; A, B) and stage 66 (PF 58 days; C-F). At stage 62, *Bmp4* expression is similar to previous stage (stage 59) in the tooth. At stage 66, *Bmp4* expression is reduced in the first row of the tooth, and *Bmp4* expression is observed in the dental epithelium and mesenchyme.

고찰

양서류인 아프리카산 발톱개구리는 일생동안 주기적인 이갈이(tooth replacement)를 하는 다형성치의 특징을 가진 실험동물로서, 성장과정에서 치아의 형성과 맹출, 탈락과정이 서로 다른 치아에서 동시에 나타난다. 아프리카산 발톱개구리 치아는 첫째 열의 치아의 뒤쪽에서 계승치아에 해당하는 둘째 열의 치아가 형성된다¹⁹. 아프리카산 발톱개구리의 치아에서 *Bmp4*는 판시기(lamina stage, stage 54)에서는 발현되지 않았으나, 모자시기(cap stage, stage 56) 이후에는 *Bmp4*가 발현되기 시작하였다. 첫째 열의 치아에서 *Bmp4*는 치아중간엽에서 강하게 발현되었으나, 치아상피에서는 미약하게 발현되는 양상을 나타내었고 탈락시기에는 그 발현이 소실되었다. 둘째 열의 치아의 치아중간엽에서 *Bmp4*의 발현은 첫째 열의 치아와 같은 발현 양상을 나타내었으나 치아상피에서는 첫째 열의 치아와 다르게 그 발현이 소실되었다.

생쥐의 치아발생과정에서 *Bmp4*는 치아상피에

서 발현이 시작되어 치아중간엽으로 이동하여 상피-중간엽 상호작용에 의해서 치아형성에 관여하는 많은 유전물질의 발현을 조절하는데, *Bmp4*는 치배가 형성되기 시작할 때에 치아중간엽에서 *Msx1*과 *Msx2*의 발현을 유도하고, 싹시기(bud stage)에서 모자시기(cap stage)로 이행할 때에 범랑질결절(enamel knot)의 형성과 *Msx2*의 발현을 유도하는 것으로 보고되었다⁶. 조직재조합실험(tissue recombinant experiment)과 *Bmp4*-soaked beads를 이용한 실험에서 *Bmp4*는 중간엽조직에서 *Pitx1*을, 상피조직에서 *Pitx2*를 억제하였다⁹. 첫 번째 아가미활(first branchial arch)에서 *Bmp4*를 억제하였을 때 상피조직에서 *Dlx2*는 감소하였으나 중간엽조직에서는 아무런 변화가 나타나지 않았다¹⁰. *Pax9* 유전자 제거된 생쥐의 중간엽조직에서 발생 13.5일에 치아중간엽에서 *Bmp4*의 발현이 소실되어 *Pax9*이 *Bmp4*의 발현을 유지시키는 역할을 한다고 보고하였다^{7,11}. 하악의 앞니(incisor)가 형성될 위치에서 *Bmp4* 억제인자로 알려진 *noggin*을 처리하면 *Barx1*이 중간엽에서 발현되고 앞니는 어금니(molar)로 변형된다고 보고하였다⁸.

닭(chick)의 치배에서는 판시기(lamina stage)에 형태학적으로 포유동물의 치배와 유사한 구조를 나타내었으나 닭 치배의 발생초기에 치아판(dental lamina)에서 *Fgf8*과 *Pitx2*가 발현되었고 치아유두부위에서 *Msx1*과 *Msx2*를 제외한 *Barx1*과 *Pax9*만이 발현되었다. 치아 형성에 관여하는 *Msx1*과 *Msx2*의 발현을 확인하기 위하여 *Bmp4* bead를 침지시켜 확인한 결과 *Msx1*과 *Msx2*의 발현은 *Bmp4*에 의해서 유도되었고 *Pax9*의 발현은 *Bmp4*에 의해서 억제되었다. 또한 닭의 치배는 싹시기에 정지되었으나 *Bmp4*와 *Fgf4*의 처리에 의해서 치아상피의 치아중간엽으로 함입(invagination)이 되는 것을 확인하였다¹². 키크리과(cichlid)의 치아는 동형치아(homodonty)이고 다형성치아(polyphyodonty)를

이루고 있는 것이 보고되었다²⁰). 키크리과 치배에서 *Bmp4*의 발현이 관찰되었고 *Bmp4*가 치아의 위치를 표시한다고 보고되었다¹³). 경골어류(teleost)에서 *Bmp4*는 치배발생이전(preinitiation)에는 발현되지 않았고, 발생초기(initiation)에는 치아상피에서 발현되기 시작하여 형태발생기(morphogenesis)에는 치아상피와 중간엽에서 동시에 발현되었다¹⁴). 다형성치 어류인 무지개송어(rainbow trout)에서 *Bmp4*는 치아상피에서는 발현되지 않았고, 치배형성이전시기와 치아형성기에 치아유두 부위에서 *Bmp4*가 발현된다고 보고되었다¹⁵). 이와 같이 *Bmp4*는 다양한 척추동물의 치아발생과정에서 *Bmp4*의 발현은 치배형성이전에 이루어지고 *Bmp4*의 소실로 인하여 치아형성이 정지하는 것으로 알려져 있으나 아프리카산 발톱개구리의 발생하는 치아에서 *Bmp4*는 중간엽과 치아유두에서 강하게 발현됨으로 상아질 형성에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Thesleff I, Mikkola M : The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 217: 93-135, 2002. DOI: 10.1016/s0074-7696(02)17013-6.
2. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I : Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45-58, 1993.
3. Åberg T, Wozney J, Thesleff I : Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 210: 383-396, 1997.
4. Thesleff I, Åberg T : Molecular regulation of tooth development. *Bone* 25: 123-125, 1999.
5. Turecková J, Sahlberg C, Åberg T, Ruch JV, Thesleff I, Peterkova R : Comparison of expression of the *Msx1*, *Msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar primordia. *Int J Dev Biol* 39: 459-468, 1995.
6. Jernvall J, Åberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I : The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125: 161-169, 1998.
7. Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R : Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12: 2735-2747, 1998.
8. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT : Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282: 1136-1138, 1998.
9. St. Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y : Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of *Pitx1* and *Pitx2* in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol* 217: 323-332, 2000. DOI: 10.1006/dbio.1999.9547.
10. Thomas BL, Liu JK, Rubenstein JL, Sharpe PT : Independent regulation of *Dlx2* expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. *Development* 127: 217-224, 2000.
11. Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghov R, Peters H, D'Souza RN : Functional consequences of interactions between *Pax9* and *Msx1* genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem* 281: 18363-18369, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M601543200.
12. Chen Y, Zhang Y, Jiang TX, Barlow AJ, St Amand TR, Hu Y, Heaney S, Francis-West P, Chuong CM, Maas R : Conservation of early odontogenic signaling pathways in Aves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10044-10049, 2000. DOI: 10.1073/pnas.160245097.
13. Streefman JT, Albertson RC : Evolution of novelty in the cichlid dentition. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306: 216-226, 2006. DOI: 10.1002/jez.b.21101.
14. Wise SB, Stock DW : Conservation and divergence of *Bmp2a*, *Bmp2b*, and *Bmp4* expression patterns within and between dentitions of teleost fishes. *Evol Dev* 8: 511-523, 2006. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2006.00124.x.
15. Fraser GJ, Graham A, Smith MM : Developmental and evolutionary origins of the vertebrate dentition:

- molecular controls for spatio-temporal organisation of tooth sites in osteichthyans. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306: 183-203, 2006. DOI: 10.1002/jez.b.21097.
16. Nieuwkoop PD, and Faber J : Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1967.
 17. Harland, R. M : In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Meth Cell Biol* 36: 685-695, 1991.
 18. Lemaire P, Gurdon JB : A role for cytoplasmic determinants in mesoderm patterning: cell-autonomous activation of the goosecoid and *Xwnt-8* genes along the dorsoventral axis of early *Xenopus* embryos. *Development* 120: 1191-1199, 1994.
 19. Shaw JP : The time scale of tooth development and replacement in *Xenopus laevis* (Daudin) *J Anat* 129: 323-342, 1979.
 20. Huysseune A, Thesleff I : Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. *Bioessays* 26: 665-671, 2004. DOI: 10.1002/bies.20039.

ABSTRACT

Bmp4* expression during tooth development of *Xenopus laevis

Ji Soo Hong, Byung Seok Ko, Yawei Cheng, Yang Liu, Byung Keon Park, Young-Hoon Lee

*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, and Institute of Oral Biosciences,
Jeonbuk National University*

Bmp4 exhibits expression patterns throughout tooth morphogenesis and is involved in positioning the sites of tooth formation, initiating tooth development, regulating tooth morphogenesis, determining tooth shape, and promoting the differentiation of tooth-specific cell types. However, little is known about *bmp4* expression during tooth development in *Xenopus*. *Bmp4* expression was examined by in situ hybridization during *Xenopus* tooth development from 26 days post-fertilization (PF, stage 54) to 58 days PF (stage 66). *Bmp4* was not shown to be expressed at stage 54 before tooth germ formation. From stage 56 to 62, *bmp4* expression was observed in the dental mesenchyme, dental papilla, and outer enamel epithelium. *Bmp4* was expressed strongly in the dental mesenchyme and weakly in the outer enamel epithelium. At stage 66 (58 days PF), *bmp4* expression was not detected in the tooth ankylosed to the maxillary bone; however, the transcripts showed an expression pattern similar to the previous stage in the successive tooth germ. These results suggest that *bmp4* may play a critical role in dentin formation during tooth development of *Xenopus laevis*.

Keywords: *Xenopus laevis*, tooth development, *Bmp4* expression