

# Fam83h 발현 억제에 의한 조법랑세포 Amelogenin 발현 변화

이숙경 · 이경은 · 김정욱

서울대학교 치과대학 소아치과학교실

## 국문초록

치과유전질환의 하나인 법랑질 형성부전증은 유전적인 원인이 복잡할 뿐만 아니라 임상적인 양상 또한 다양하다. 법랑질 형성부전증은 임상적 양상에 따라서 크게 저형성형, 저성숙형, 저석회화형의 3 종류로 분류된다. 최근 상염색체 우성 저석회화 법랑질 형성부전증의 원인 유전자로 밝혀진 *Fam83h*의 기능에 관하여 알려진 바가 없어, *Fam83h*의 발현억제가 조법랑세포의 아멜로제닌 발현에 미치는 영향을 불멸화된 조법랑세포주를 이용하여 분석한 결과, *Fam83h*의 발현이 억제되더라도 아멜로제닌 발현에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으며, 향후 추가적인 연구를 통한 전체 유전자의 발현양상 변화 등을 통한 유전자 기능의 연구가 필요하리라 생각된다.

**주요어:** 법랑질, 법랑질 형성부전증, *Fam83h*, 발현 억제, 조법랑세포

## I. 서론

법랑질 형성부전증은 다른 구강외의 증상을 나타내지 않고 치아 법랑질에만 나타나는 유전질환의 통칭으로서, 임상적인 특징에 따라서 크게 3종류로 분류된다. 저형성증은 법랑질 기질의 양적감소로 인하여 나타나지만 강도는 정상이며, 저성숙형은 법랑질의 두께는 정상이나 성숙과정에 결함이 발생하여 법랑질의 강도가 약화된 상태이다. 저석회화형은 법랑질의 두께는 정상이나 석회화의 결함으로 법랑질의 강도가 매우 약해서 구강내로 맹출함에 따라 법랑질이 소실된다<sup>1)</sup>.

대부분의 법랑질 형성부전증 환자의 경우 법랑질이 얇거나 파절 혹은 소실되어 치아의 외관이 비심미적이고 심리적으로 위축되는 경우가 많고, 온도자극에 민감하게 반응하게 된다<sup>2)</sup>. 50% 정도의 환자가 개교합을 나타낸다고 보고되고 있으나, 이러한 양상이 특정유전자의 변이와 연관된 것인지, 아니면 냉온 자극이나 저작압에 민감하게 반응하게 된 결과인지는 아직 분명하지 않다<sup>3)</sup>.

현재 법랑질 형성부전증을 야기하는 것으로 확인된 유전자는 아멜로제닌 (*AMELX*)<sup>4,5)</sup>, 에나멜린 (*ENAM*)<sup>6,7)</sup>, matrix metalloproteinase 20 (*MMP20*)<sup>8,9)</sup>, Kallikrein 4 (*KLK4*)<sup>10)</sup> 등이 있으며, 최근에 기존의 후보유전자 검색기법이 아닌 염색

체 연관성 검사를 통하여 상염색체 우성 저석회화형 법랑질 형성부전증을 유발하는 원인유전자로 *Fam83h*가 발견되었고<sup>11,12)</sup>, 상염색체 열성 저성숙형 법랑질 형성부전증을 유발하는 원인 유전자로 *WDR72*가 발견되었다<sup>13)</sup>.

아직 *Fam83h*가 법랑질 형성에 있어서 어떠한 기능을 수행하며 어떤 기전을 통해서 법랑질의 저석회화를 야기하는 지는 알려지지 않고 있다. 이에 본 연구는 조법랑세포에서 이 유전자의 발현을 억제하였을 때 법랑질 기질에 가장 많은 단백질인 아멜로제닌 유전자의 발현에 변화양상이 있는지 확인해보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포주

본 연구에 사용된 불멸화된 법랑질모세포주는 2003년 Nakata 등에 의해서 수립·보고되었는데<sup>14)</sup>, C57BL/6J 생쥐에서 출산직후 하악구치 치배의 기관배양을 통하여 수립된 것으로서, 증식배지 (10% FBS, L-glutamine, 10ng/ml rhEGF를 함유한 SMEM)에서 배양되는 동안에는 분화가 이루어지지 않지만, 분화배지 (10% FBS, 10ng/ml rhEGF를

교신저자 : 김정욱

서울시 종로구 연건동 28 / 서울대학교 치과대학 소아치과학교실 / 02-2072-2639 / pedoman@snu.ac.kr

원고접수일: 2010년 09월 05일 / 원고최종수정일: 2010년 11월 03일 / 원고채택일: 2010년 11월 04일

\*이 논문은 2007년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-313-2007-2-E00511).

함유한 DMEM)로 배양하면서 분화를 유도하면 생체내에서와 유사하게 분화하는 것으로 알려져 있다.

## 2. shRNA plasmid 도입

본 연구에 사용된 shRNA plasmid는 Origene (Rockville, MD, USA)사의 shRNA plasmid를 사용하였다. Puromycin에 저항성을 가진 유전자단편을 함유하고 있어, 이를 이용하여 stable cell line을 선택적으로 배양할 수 있다. 선택을 위해서 먼저 세포주의 해당 항생제에 대한 감수성을 파악하여 유효 항생제 농도를 선정하고, 이를 transfection된 세포주의 배양에 사용한다.

## 3. Stable cell line 확보

0.6ug/ml농도의 puromycin을 포함하는 배지로 선택된 세포를 배양하고, 통법에 따라 RNA를 분리하였다.

## 4. RT-PCR을 이용한 발현억제 확인

분리된 total RNA 4ug을 이용하여 cDNA를 합성하고 (One-step 5x RT-PCR premix, ElpisBio, Daejeon, Korea) RT-PCR을 수행하여 해당 유전자의 발현 억제를 확인하고, 그 정도를 비교하였다. 본 실험에 사용된 프라이머는 다음과 같다. *Amelx*: forward primer: ACCCCTTTGAAGTG-GTACCAG, reverse primer: TGTTGGGTTGGAGT-CATGGAG, *Fam83h*: forward primer: GGGTACCTGC-CACCTCACTA, reverse primer: ACTTGTCGGC-CATGTCTAGG, *Gapdh*: forward primer: CCAAG-GTCATCCATGACAAC, reverse primer: GCTTCAC-CACCTTCTTGATG.

## Ⅲ. 연구 결과

*Fam83h*의 발현이 억제된 경우와 그렇지 않은 경우를 비교한 결과 *Amelx*의 mRNA 발현양에는 차이가 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). Housekeeping 유전자인 *Gapdh*로 각각에 사용된 RNA양이 동일함을 확인하였다.

## Ⅳ. 총괄 및 고찰

법랑질은 인체내에서 가장 단단한 조직으로서 분비, 석회화, 성숙 등의 단계별 과정을 거침으로써 저작압에 견딜 수 있는 특이한 구조를 가진 구조와 물성을 가진다. 이러한 법랑질의 석회화과정은 다른 광화조직과 유사성과 차이점을 가지는데 이러한 기전을 규명하는 것은 질환의 치료가능성을 제시하는데 필수적이며, 작용기전의 파악에는 유전자의 기능 및 상호작용의 이해가 필수적이다.

Fam83h

Gapdh

Amelx

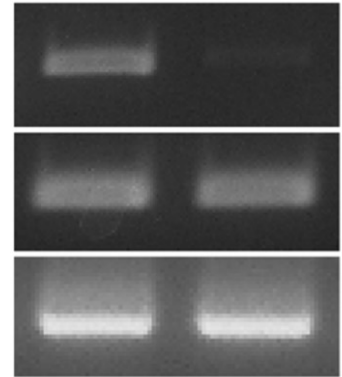


Fig. 1. RT-PCR result of ameloblastic cell line transfected with empty vector (left) and shRNA (right).

법랑기질단백질로는 성염색체에 존재하는 아멜로제닌 (Amelogenin X, Xp22.31-p22.1, Amelogenin Y, Yp11.2)과 4번 염색체에 위치하고 있는 에나멜린 (Enamelin, 4q21)과 아멜로블라스틴 (Ameloblastin, 4q21), 11번 염색체에 위치하고 있는 matrix metalloproteinase 20 (*MMP20*, 11q22.3), 19번 염색체에 위치하고 있는 serin proteinase의 일종인 Kallikrein 4 (*KLK4*, 19q13.41), 그리고 1번 염색체에 위치하고 있는 터프텔린 1 (*Tuftelin 1*, 1q21) 등이 있다<sup>1)</sup>.

1979년 돼지 아멜로제닌의 부분 단백질 서열이 보고된 이후<sup>15)</sup>, 소와 사람에서의 보고가 잇따랐다<sup>16,17)</sup>. 부분 단백질 서열에 이어 1983년 생쥐의 아멜로제닌 유전자가 처음 클로닝되었다<sup>18)</sup>. 1989년 아멜로제닌이 성염색체에 위치한다는 것이 보고되었으며<sup>19)</sup>, 결국 이런 연구 성과들을 토대로 1991년 반성유전되는 법랑질 형성부전증이 X 염색체 상에 존재하는 아멜로제닌 유전자의 변이에 의해 발생됨이 규명되었다<sup>20)</sup>. 성숙법랑질은 단백질 함량이 불과 2.5%이하인데, 아멜로제닌이 법랑기질내의 단백질 함량의 90% 정도를 차지하고, 나머지 10%에서 가장 많은 단백질이 에나멜린이며, 이의 발견은 아멜로제닌에 관한 연구에 비해 약 10-15년 정도 뒤졌다. 이처럼 법랑기질내에 발현하는 단백질의 규명과정은 현재까지 단백질의 직접 분리 및 부분 단백질 서열의 확인, 그리고 이를 통한 단백질 발현 유전자의 클로닝의 과정을 거쳐서 이루어졌다<sup>21)</sup>.

본 연구에서 조법랑세포주에서 *Fam83h* 유전자의 발현을 억제하더라도, 법랑기질내에 가장 많이 존재하는 아멜로제닌의 발현에는 아무런 영향을 미치는 않는 것이 확인되었다. 추가적인 연구를 통하여 전체적인 유전자 발현 양상을 분석하면, 이 유전자의 발현억제에 의한 영향을 보다 자세히 파악할 수 있을 것으로 사료된다.

성염색체 우성 법랑질 형성부전증의 경우 1994년 유전적 연관관사를 통하여 4번 염색체상에 연관부위가 존재함이 보고되

었고 (AIH2, 4q)<sup>22)</sup>, 1996년에 다른 환자군에서는 이 부분이 연관되어 있지 않다는 것이 증명되어 법랑질 형성부전증의 유전적 원인이 다양함이 규명되었다<sup>23)</sup>. 2001년 처음으로 에나멜린 유전자의 결함이 상염색체 우성 법랑질 형성부전증에서 보고되었고<sup>6)</sup>, 2003년에는 상염색체 열성 유전양상을 보이는 법랑질 형성부전증의 원인 유전자로도 에나멜린이 관여하는 것이 보고된 바 있다<sup>3)</sup>. 이는 동일한 유전자가 상염색체 우성과 열성 유전 질환에 모두 관여한다는 것이다. 또한 2004년에는 상염색체 열성유전양상의 저성숙형의 법랑질 형성부전증의 원인으로 Kallikrein 4의 돌연변이가 보고되었으며<sup>10)</sup>, 2005년에는 유사한 양상을 보이는 경우에서 또 다른 법랑기질내의 단백질 분해 효소인 MMP20에서의 돌연변이가 보고되었다<sup>8)</sup>.

저석회화형 법랑질 형성부전증의 경우 연관검사조차 보고되지 못하였으나, 2007년 인간염색체 8q24.3부위에 연관되어 있음이 최초로 보고되었고<sup>24)</sup>, 이후 *Fam83h*라는 신규유전자의 변이가 저석회화형 법랑질 형성부전증을 야기하는 것이 보고되었다<sup>11)</sup>. 최근에는 상염색체 열성의 저성숙형 법랑질 형성부전증의 원인유전자가 SNP chip을 이용한 microarray 기법으로 *WDR72*라는 것이 밝혀진 바 있다<sup>13)</sup>. 이 두 유전자는 법랑질 기질에 존재하는 것이 아니라 세포내에서 법랑질 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>.

치아 법랑질의 석회화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 *Fam83h* 유전자의 기능에 관한 연구는 아직까지 미지의 세계로 남아있던 광화의 기전에 대한 이해와 이를 이용한 생체내 석회화기전의 조절에 필수적인 자료를 마련할 수 있을 것으로 사료된다. 해당 유전자의 기능파악에 있어서 발현억제를 통한 발현유전자의 변화양상의 해석은 해당 유전자의 다른 유전자와의 상호작용을 연구하는 중요한 수단으로서, 향후 추가적인 연구를 통해서 전체적인 세포수준에서의 역할을 파악할 수 있을 것으로 여겨진다.

## V. 결 론

상염색체 우성 저석회화 법랑질 형성부전증의 원인 유전자로 최근 밝혀진 *Fam83h*의 발현억제가 조법랑세포의 아멜로제닌 발현에 미치는 영향을 불멸화된 조법랑세포주를 이용하여 분석한 결과, *Fam83h*의 발현이 억제되더라도 아멜로제닌의 발현에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으며, 향후 추가적인 연구를 통한 전체 유전자의 발현양상 변화 등을 통한 유전자 기능의 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. 김정옥: 법랑질 형성부전증의 분자유전학적 고찰. 대한소아치과학회지, 35:179-183, 2008.
2. 백병주, 김상훈, 이승익 등: 법랑질형성부전증에 대한 증례 보고. 대한소아치과학회지, 27:499-504, 2000.
3. Hart TC, Hart PS, Gorry MC, et al.: Novel ENAM

- mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects. J Med Genet, 40:900-906, 2003.
4. Aldred MJ, Crawford PJ, Roberts E, et al.: Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). Hum Genet, 90:413-416, 1992.
5. Kim JW, Simmer JP, Hu YY, et al.: Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. J Dent Res, 83:378-383, 2004.
6. Rajpar MH, Harley K, Laing C, et al.: Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. Hum Mol Genet, 10:1673-1677, 2001.
7. Kim JW, Seymen F, Lin BP, et al.: ENAM mutations in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. J Dent Res, 84:278-282, 2005.
8. Kim JW, Simmer JP, Hart TC, et al.: MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturational amelogenesis imperfecta. J Med Genet, 42:271-275, 2005.
9. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, et al.: MMP20 active-site mutation in hypomaturational amelogenesis imperfecta. J Dent Res, 84:1031-1035, 2005.
10. Hart PS, Hart TC, Michalec MD, et al.: Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturational amelogenesis imperfecta. J Med Genet, 41:545-549, 2004.
11. Kim JW, Lee SK, Lee ZH, et al.: FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. Am J Hum Genet, 82:489-494, 2008.
12. Lee SK, Hu JC, Bartlett JD, et al.: Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. Hum Mutat, 29:E95-E99, 2008.
13. El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, et al.: Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturational amelogenesis imperfecta. Am J Hum Genet, 85:699-705, 2009.
14. Nakata A, Kameda T, Nagai H, et al.: Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. Biochem Biophys Res Commun, 308:834-839, 2003.
15. Fukae M, Ijiri H, Tanabe T, et al.: Partial amino acid sequences of two proteins in developing porcine

- enamel. *J Dent Res*, 58:1000-1001, 1979.
16. Fincham AG, Belcourt AB, Termine JD, et al.: Dental enamel matrix: sequences of two amelogenin polypeptides. *Biosci Rep*, 1:771-778, 1981.
  17. Fincham AG, Belcourt AB, Termine JD, et al.: Amelogenins: Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem J*, 211:149-154, 1983.
  18. Snead ML, Zeichner-David M, Chandra T, et al.: Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:7254-7258, 1983.
  19. Lau EC, Mohandas T, Shapiro LJ, et al.: Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics*, 4:162-168, 1989.
  20. Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, et al.: A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*, 10:971-975, 1991.
  21. Hu JC, Yamakoshi Y: Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14:387-398, 2003.
  22. Forsman K, Lind L, Backman B, et al.: Localization of a gene for autosomal dominant amelogenesis imperfecta (ADAI) to chromosome 4q. *Hum Mol Genet*, 3:1621-1625, 1994.
  23. Karrman C, Backman B, Holmgren G, et al.: Genetic heterogeneity of autosomal dominant amelogenesis imperfecta demonstrated by its exclusion from the AIH2 region on human chromosome 4Q. *Arch Oral Biol*, 41:893-900, 1996.
  24. Mendoza G, Pemberton TJ, Lee K, et al.: A new locus for autosomal dominant amelogenesis imperfecta on chromosome 8q24.3. *Hum Genet*, 120:653-662, 2007.
  25. Ding Y, Estrella MR, Hu YY, et al.: Fam83h is associated with intracellular vesicles and ADHCAI. *J Dent Res*, 88:991-996, 2009.

## Abstract

THE EFFECT OF *Fam83h* KNOCKDOWN ON THE AMELOGENIN GENE EXPRESSION  
IN THE AMELOBLAST CELL LINE

Sook-Kyung Lee, Kyung-Eun Lee, Jung-Wook Kim

*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University*

Amelogenesis imperfecta, one of the dental genetic disease, is clinically and genetically complex disease. Amelogenesis imperfecta can be classified into three major categories according to clinical phenotype: hypoplastic, hypomaturational, and hypocalcification. Recently a novel gene, *Fam83h*, was identified to cause autosomal dominant hypocalcification amelogenesis imperfecta, however its functional role in the pathogenesis of enamel defect is not known yet. So this study was aimed to identify the knockdown effect of *Fam83h* gene on the amelogenin mRNA expression via shRNA transfection into immortalized ameloblast cell line. The result showed that the knockdown of *Fam83h* did not influence the amelogenin expression. Further study of the functional role of *Fam83h* gene should be performed to understand the complex nature of amelogenesis as well as molecular pathogenesis of amelogenesis imperfecta.

**Key words :** Enamel, Amelogenesis imperfecta, *Fam83h*, Knockdown, Ameloblast