

Expression of Amino Acid Transporter LAT1 During Ameloblast Differentiation

Sang-Bong Kim, Do-Kyung Kim, Chun-Sung Kim, Joong-Ki Kook, Joo-Cheol Park¹, and Heung-Joong Kim*

Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea,

¹Department of Oral Histology & Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

(received August 26, 2009 ; revised September 3, 2009 ; accepted September 11, 2009)

Amino acid transporters play important roles in supplying nutrients to cells. In our current study, we investigated the expression of LAT1 and measured the amino acid uptake in ameloblast cultures to further elucidate the roles of this transporter during the differentiation of these cells. RT-PCR, observations of cell morphology, Alizaline red-S staining, and uptake analyses were performed following the experimental induction of differentiation in the cultures. LAT1 mRNA was detectable and found to gradually increase over time whereas LAT2 mRNA was not evident in the ameloblast cultures. Transcripts of 4F2hc, a cofactor of LAT1 and LAT2, were also found to be expressed in ameloblast cultures and increase with time. Amelogenin mRNA was expressed in the early stage ameloblast cultures. L-leucine uptake was observed to increase over 14 days of growth in culture. Our data suggest that LAT1 has a key role in the differentiation of ameloblasts and in providing these cells with neutral amino acids, including several essential amino acids.

Key words: amino acid transporter, LAT1, ameloblast, differentiation

서론

치아는 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽 상호작용을 통해 조절되고 형성된다(Mina and Kollar,

1987). 치성상피는 치아기를 형성하여 법랑질모세포를 분화시키는 반면에, 외배엽성 간엽세포는 치유두를 형성하여 상아질모세포와 치수세포가 분화하고 이들이 치관 상아질과 치수를 형성한다. 또한 외배엽성 간엽세포는 치낭을 형성하며 이 세포들이 백악질, 치주인대 및 치조골을 형성한다(D'Souza *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 1999). 치관이 완성된 후에 내치상피와 외치상피가 치관 아래쪽으로 증식하여 Hertwig 상피 근초를 형성하며, Hertwig 상피 근초가 치근의 형태를 결정하고 치근 상아질을 형성하는 상아질모세포의 분화를 유도한다(Bosshardt and Nanci, 2004).

법랑질 형성은 두 단계에 걸쳐 일어나며, 그 첫 번째 단계에서 전체 성분 중 30% 정도의 무기바탕질이 침착된 법랑질이 형성된다. 두 번째 단계에서 유기바탕질과 물이 제거되고 무기바탕질의 추가 유입이 일어나서, 법랑질은 96% 이상의 무기바탕질을 갖게 된다. 법랑질모세포는 바탕질 단백질을 분비하여 세포의 바탕질 환경을 조성하고 유지하여 무기바탕질 침착이 일어날 수 있게 한다. 최근 들어 다양한 세포들의 분화유도 인자에 대한 연구들이 진행되고 있으나(Smith, 1998; Millar *et al.*, 2003; Bei *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), 법랑질모세포의 분화과정이나 법랑질 형성과정에 관한 분자생물학적 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

법랑질모세포는 치아 이외의 일반적인 세포들(상피세포, 결합세포 등)과는 달리 많은 유기바탕질 및 무기바탕질을 생성하고 분비하여야 한다. 따라서 이를 위한 다양한 영양물질들을 세포 내로 이동시킬 수 있는 영양물질 수송체의 발현이 매우 중요하다고 사료되지만 이에 관한 연구는 없었다. 또한 법랑질모세포에서는 분화를 위한 세포 내 화학적·물리적 신호와 세포의 증식을 위한 단백질 합성에 필수적인 아미노산들의 세포 내 유입이 증가하여야 할 것이다. 세포 내로의 아미노산 수송 증가는 아미노산을 수

*Corresponding author: Heung-Joong Kim, Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel.: +82-62-230-6875; Fax.: +82-62-224-3706;
E-mail: hbjkim@chosun.ac.kr

송할 수 있는 아미노산 수송체의 과발현(overexpression)에 의해 유도될 것으로 생각되나 이와 관련된 보고 또한 없었다.

아미노산은 단백질 합성의 바탕질이 되는 기능 이외에도 포도당, 퓨린, 피리미딘 등 많은 생체분자들의 합성을 위한 전구물질이므로 생체 내 필수 영양물질 중의 하나이다(Christensen, 1990). 생체분자의 생합성 반응은 주로 세포 내에서 이루어지고 아미노산은 세포막을 통과하기 어려운 친수성 물질이므로, 세포는 아미노산을 세포 밖에서 세포 안으로 수송하기 위한 수송 단백질인 아미노산 수송체를 세포막에 보유해야 한다(Christensen, 1990). 세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 증식과 성장이 필수적인 세포들에는 아미노산 수송체의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산의 공급이 활발하고, 이는 이들 세포 내 아미노산 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다(Christensen, 1990; Kanai *et al.*, 1998).

아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산 종류가 다르며, 그 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성 아미노산 수송체로 분류된다(Christensen, 1990). 또 아미노산 수송체는 그들이 바탕질을 수송할 때의 Na^+ 의존적 유무에 따라, Na^+ 의존적과 Na^+ 비의존적 아미노산 수송체로 분류하기도 한다(Christensen, 1990; Kanai *et al.*, 1998).

아미노산 수송계 L은 Na^+ 비의존적으로 중성 아미노산을 주로 수송하는 세포막 단백질로 중앙세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성 아미노산의 주경로가 되는 아미노산 수송체로 알려져 있다(Christensen, 1990; Kanai *et al.*, 1998). Kanai 등(1998)에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 아미노산 수송체 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 glioma cell에서 동정되었다. LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, methionine과 histidine같은 구조가 큰 중성 아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2002). LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide 결합을 하는 heterodimer형 막 단백질이며, LAT1이 기능을 나타내기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이다(Kanai *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999; Yanagida *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2002). 중성 아미노산 수송체 LAT1은 중앙세포와 같이 세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 증식과 성장이 필수적인 세포에서 과발현되어 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Sang *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001). 한편, LAT1의 분자적 동정 후에 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다(Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Segawa *et al.*, 1999; Verrey *et al.*, 2000). LAT2는 구조적으로 LAT1과 매우 유사하며,

다수의 필수 아미노산을 포함하는 중성 아미노산을 수송한다(Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Segawa *et al.*, 1999; Verrey *et al.*, 2000). LAT1이 구조가 큰 중성 아미노산만을 수송하는 특징을 보이는 반면, LAT2는 구조에 관계없이 중성 아미노산을 모두 수송하는 넓은 바탕질특이성을 지니고 있다(Kanai *et al.*, 1998; Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Segawa *et al.*, 1999; Verrey *et al.*, 2000; Yanagida *et al.*, 2001; Uchino *et al.*, 2002).

아미노산 중 필수 아미노산은 세포 내에서 합성되지 않으므로 세포 외로부터 수송되어야 한다(Christensen, 1990). 생체 내 아미노산 수송체들의 역할은 모두 중요하지만, 그 중에서 특히 아미노산 수송계 L은 그 수송바탕질이 필수 아미노산을 포함한 대부분의 중성 아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다(Sang *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001). 범람질모세포의 증식과 분화과정에서도 아미노산 수송계 L을 포함한 아미노산 수송체들의 과발현 현상이 나타나리라 사료되지만 이와 같은 아미노산 수송체들의 발현에 관한 실험적 증거 및 분자생물학적인 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 배양 범람질모세포 세포주의 분화과정에서 아미노산 수송계 L의 발현양상을 분석하여 범람질모세포의 분화과정에서 아미노산 수송계 L의 역할을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

[^{14}C]L-leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc. (Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

범람질모세포의 배양과 분화

본 연구에서 이용한 범람질모세포 세포주는 Nakata 등이 C57BL/6J 생쥐의 하악대구치에서 얻은 세포주로서, 일정 조건에서 배양하면 범람질모세포의 특성을 나타낸다는 것을 확인한 세포주이다(Nakata *et al.*, 2003). 범람질모세포 세포주를 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제(penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, gentamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fungizone 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 함유된 Modified Eagles Medium (MEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에 배양하였으며, 세포분화와 석회화 유도를 위하여 동일배지에 ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 β -glycerophosphate (10 mM) 및 EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 type I collagen이 처리된 배양접시에서 배양하면서 실험에 이용하였다.

역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각각의 법랑질모세포 세포주에서 TRI REAGENT kit (Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. cDNA를 합성하기 위하여 5 µg의 total RNA를 reverse-transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 LAT1, LAT2, 4F2hc, amelogenin 및 GAPDH 등의 primer (Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 12분, 변성(denaturation)반응을 94°C에서 1분, 결합(annealing)반응을 50~55°C에서 30초, 중합(extension) 반응을 72°C에서 1분간 30주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의 T_m 값을 고려하여 LAT1, 4F2hc 및 GAPDH의 결합반응 온도는 54°C, LAT2의 결합반응 온도는 52°C, amelogenin의 결합반응 온도는 55°C로 시행하였다. RT-PCR 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

Alizaline red-S 염색

법랑질모세포 세포주의 석회화 결절을 확인하기 위하여 Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 분화를 유도한 법랑질모세포 세포주를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethyl alcohol로 20분 동안 고정한 다음 0.1% NH_4OH 가 함유된 1% Alizaline red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 5분간 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

Uptake 실험

분화를 유도한 법랑질모세포 세포주들에서 아미노산 수송체 L의 특성을 조사하기 위하여 Kim 등(2002)의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다.

37°C의 성장배지가 함유된 6 well plate에서 배양된 각

분화시기별 법랑질모세포 세포주를 uptake 실험에 이용하였다. 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤 세포를 Na^+ -free uptake 용액(125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, pH 7.4)을 사용하여 3회 세척한 후 10분간 전배양하였다. 그 후, [^{14}C]L-leucine 30 µM이 존재하는 동일 uptake 용액으로 교체하여 2분 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 세포를 0.1N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 본 논문의 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 군은 4개의 well을 이용하였으며, 각각의 결과를 mean \pm SEM으로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 4회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다. 본 논문의 실험대상이 되는 아미노산 수송체 L에 의한 중성 아미노산들의 수송은 Na^+ -비의존적으로 이루어짐으로, 본 논문의 모든 uptake 실험은 Na^+ -free uptake 용액에서 시행하여 비교하였다(Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001).

통계학적 검정

모든 실험성적은 mean \pm SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만($p < 0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

배양 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 아미노산 수송체 L의 발현

생쥐 하악대구치 유래의 법랑질모세포 세포주에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한 14일간의 배양과정에서 아미노산 수송체 L의 아형인 LAT1과 LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc mRNA

Table 1. Primer sequences for PCR

Primer Names	Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)
LAT1 (sense)	CAGCTCCCTGAGTATGAAAG	499
LAT1 (antisense)	ATCCTCAGGACATCACAAAC	
LAT2 (sense)	TCAGCTGGAGAGACTCAGAT	500
LAT2 (antisense)	ATCCTTCATACCTGGTCCTT	
4F2hc (sense)	AAGGAGGAGCTACTGAAGGT	497
4F2hc (antisense)	ATTTTGGTGGCTACAATGTG	
Amelogenin (sense)	CCAGAGCATGATAAGGCAGC	457
Amelogenin (antisense)	GAAGTGGCATCATTGGTTGC	
GAPDH (sense)	TGCATCCTGCACCACCAACT	349
GAPDH (antisense)	CGCCTGCTTCACCACCTTC	

LAT1: L-type amino acid transporter 1, LAT2: L-type amino acid transporter 2, 4F2hc: 4F2 heavy chain

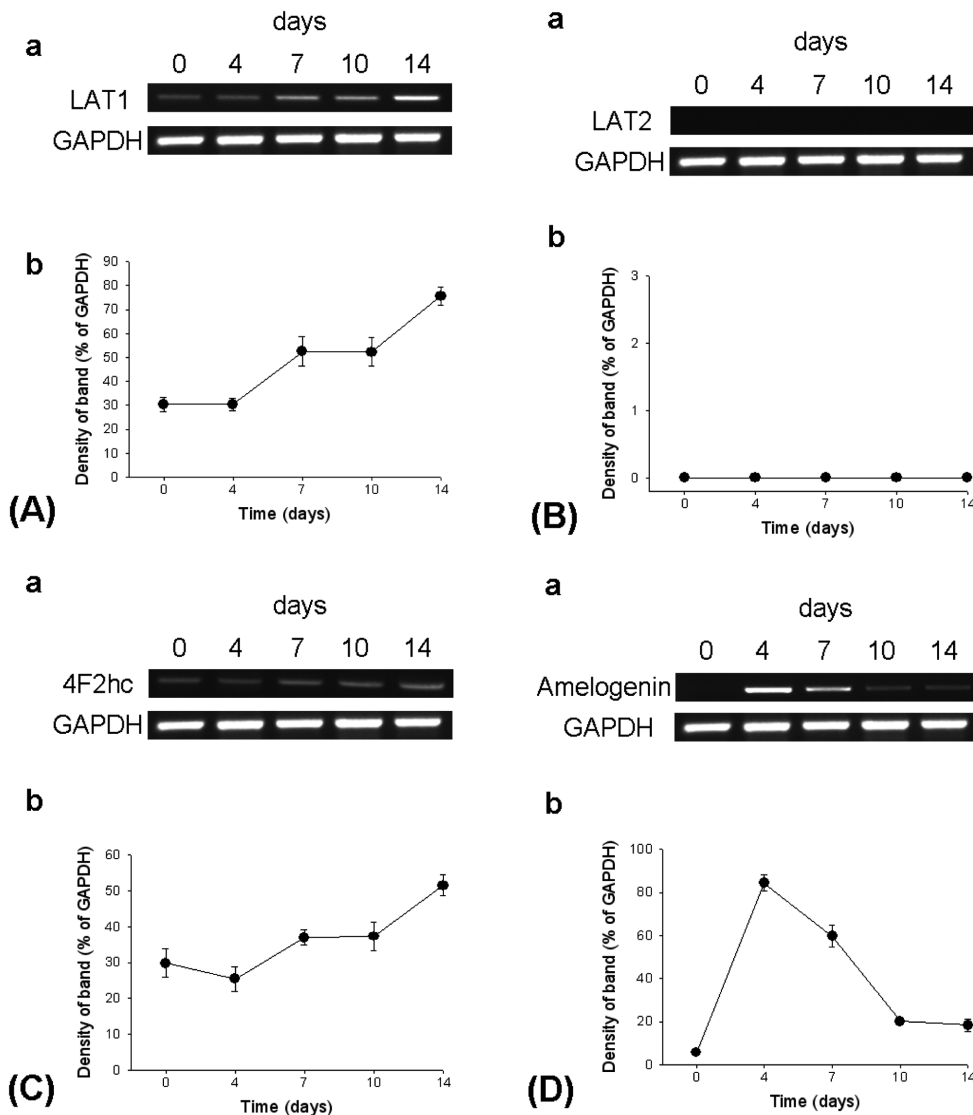


Fig. 1. Detection of LAT1 (A), LAT2 (B), 4F2hc (C), and amelogenin (D) mRNA by RT-PCR. a; Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from ameloblast cell line. b; The percentage of LAT1, LAT2, 4F2hc, and amelogenin mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

의 발현을 확인하기 위해, 각각의 primer (Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 법랑질모세포 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1의 발현을 배양시간별로 관찰하면, 배양 0일째부터 세포들에서 LAT1의 발현이 관찰되었고, 배양 4일째에는 0일째의 발현양인 GAPDH 대비 30%와 LAT1의 발현이 거의 유사하였다. 배양 7일째에서는 LAT1의 발현양이 증가하여 GAPDH 대비 53%까지 증가하였으며, 배양 10일째에는 배양 7일째와 LAT1의 발현이 유사하였다. 배양 14일째에는 LAT1의 발현양이 GAPDH 대비 76%까지 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 아미노산 수송체 LAT2는 법랑질모세포 세포주 배양 0일째의 대조군, 4일, 7일, 10일 및 14일째까지 관찰되지 않았다(Fig. 1B). LAT1과 LAT2의 기능에 필수적 보조인자인 4F2hc는 법랑질모세포 세포주 배양 0일째부터 발현이

관찰되었고, 배양 4일째에는 0일째의 발현양인 GAPDH 대비 29%와 4F2hc의 발현이 거의 유사하였다. 배양 7일째에서는 4F2hc의 발현양이 증가하여 GAPDH 대비 37%까지 증가하였으며, 배양 10일째에는 배양 7일째와 4F2hc의 발현이 유사하였다. 배양 14일째에는 4F2hc의 발현양이 GAPDH 대비 52%까지 증가함을 관찰하였다(Fig. 1C). 이 실험의 결과로 LAT1과 4F2hc의 발현양상이 유사함을 확인하였다.

배양 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 분화 특이 유전자 amelogenin의 발현

법랑질모세포 세포주를 분화유도 후, 실험적으로 분화가 유도되었는지 확인하기 위해, 법랑질모세포 세포주의 분화에 의해 특이적으로 발현이 감소되는 유전자 amelogenin

의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 본 연구의 법랑질모세포 세포주에서 배양 0일째의 대조군에서는 amelogenin의 발현이 매우 미약하였다. 그러나 법랑질모세포 세포주의 분화를 유도한 후 4일째에서 GAPDH 대비 84%로 amelogenin의 발현이 크게 증가하였으며, 그 발현이 7일째에서는 60%, 10일째에서는 20%, 14일째에서는 18%로 발현이 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1D). 이 실험의 결과로, 본 실험에서 분화유도 시킨 법랑질모세포 세포주는 분화배지에 의해 정상적인 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

배양 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 세포형태의 변화와 석회화 결절의 형성

법랑질모세포 세포주의 분화과정에서 세포형태의 변화를 관찰하였다. 배양 4일째에 세포가 증식하여 세포밀도의 증가와 함께 세포형태의 변화가 관찰되었고(Fig. 2B), 배양 7일째에는 여러 층의 세포와 결절들이 관찰되었으며(Fig. 2C), 특히 배양 4일과 7일 사이에 세포의 증식이 급격히 증가하여 고밀도의 세포와 결절들이 관찰되기 시작하였다. 배양 10일째에는 배양 7일째부터 관찰되던 결절들의 크기가 증가하는 것이 보였으며(Fig. 2D), 배양 14일째에는 결절들의 밀도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었

다(Fig. 2E). 배양 7일에서 14일까지의 기간에서 결절들이 육안으로 확인되었으며, 이 시기의 세포형태는 배양 초기의 세포형태와 많은 차이가 있었다.

법랑질모세포 세포주 분화과정에서 석회화 결절의 형성을 확인하기 위하여 Alizaline red-S 염색을 시행하였다. 배양 7일째부터 결절들이 육안으로 관찰되었으며(Fig. 2C), 배양 14일째는 크기가 증가하고 결집된 여러 층의 결절을 관찰할 수 있었다(Fig. 2E). 흰색의 결절들을 Alizaline red-S 염색을 통하여 확인한 결과, 석회화 결절임을 확인할 수 있었다.

배양 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 [¹⁴C]L-leucine의 수송특성

법랑질모세포 세포주 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성 아미노산 중 실험적으로 가장 많이 이용되는 [¹⁴C]가 표지된 L-leucine을 이용하여 uptake 실험을 시행하였다. 배양 0일째인 대조군에서 L-leucine uptake 양은 1720 ± 127 pmol/mg protein/min이었으며, 배양 4일째와 7일째에서는 각각 1675 ± 49 pmol/mg protein/min과 1662 ± 35 pmol/mg protein/min으로 별다른 변화를 보이지 않았다(Fig. 3). 그러나 배양 10일째에서 1780 ± 108 pmol/mg protein/min으로 L-leucine uptake 양이 증가하기 시작하여, 배양 14일째에서는 L-leucine uptake 양이 2259 ± 69 pmol/mg protein/min으로 급격한 증가를 보였다(Fig. 3).

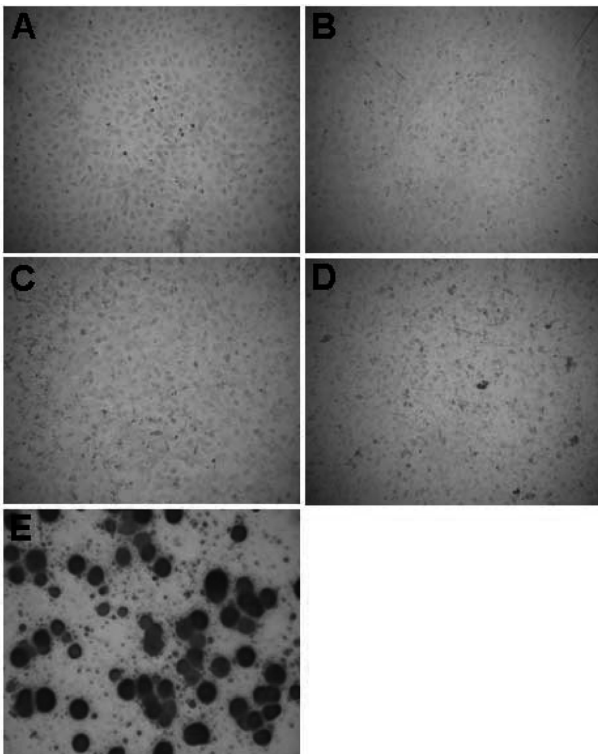


Fig. 2. Mineralized nodule formation in ameloblast cell line. The mineralized nodule formation of ameloblast cell line induced by the differentiation media was examined after 0 (A), 4 (B), 7 (C), 10 (D) and 14 (E) days of culture. The nodules were detected by Alizaline red-S staining.

고찰

최근 들어 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 수준까지 많이 진행되고 있다. 초기 치아발생에는 BMP, FGF,

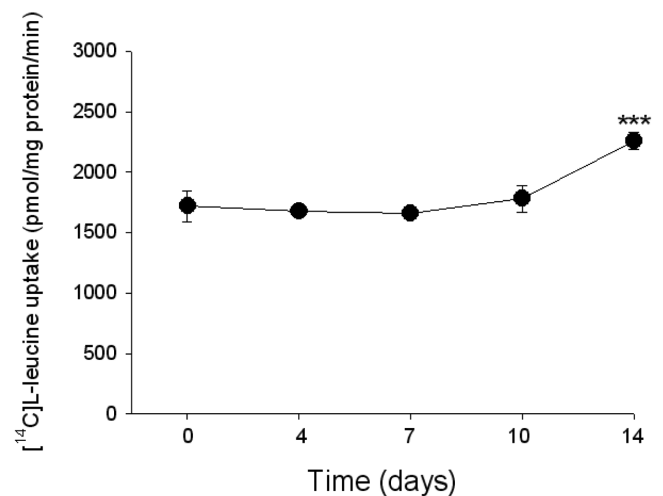


Fig. 3. [¹⁴C]L-Leucine uptake by ameloblast cell line. The [¹⁴C]L-leucine (30 μ M) uptake measured at 37°C for 2 min in the Na⁺-free uptake solution. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. ***P < 0.001 vs. 0 day.

MSX1, PAX9 및 CBFA1 등의 유전자들이 관여한다고 보고되고 있으며, 그들의 신호전달경로에 관한 연구들도 활발히 진행되고 있다(Nanci, 2003; Ko and Grzesik, 2005; Chung *et al.*, 2009). 그러나 치아 초기발생과는 달리 상아질모세포와 법랑질모세포 및 백악질모세포의 분화를 조절하는 인자에 관해서는 잘 알려져 있지 않다.

법랑질의 유기바탕질은 비아교질 단백질로서 몇 종류의 법랑질 단백질과 효소로 구성된다. 법랑질 단백질 중에서 90%는 amelogenin이며, 나머지 10%는 enamelin과 ameloblastin 같은 nonamelogenin 단백질이다(Nanci, 2003). Nonamelogenin 단백질 등은 결정 형성을 촉진하고 인도하며, amelogenin은 결정의 두께와 폭 성장을 억제하는 것으로 여겨진다. 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고 법랑질모세포의 분화과정이나 법랑질 형성과정과 관련된 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 법랑질모세포의 분화과정 시 필수적인 생체 영양물질인 아미노산들의 세포 내 수송에 관여하는 아미노산 수송체 L의 발현양상 및 역할을 밝히기 위해, 생쥐 하악대구치 유래의 법랑질모세포 세포주를 실험적으로 분화유도 후, 아미노산 수송체 L의 발현을 관찰하고 아미노산 수송분석을 시행하였다.

아미노산 수송체들의 발현을 조사하는 RT-PCR 분석을 통해, 법랑질모세포 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1 mRNA 발현은 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였으며, 배양 14일째 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 1A). 아미노산 수송체 LAT2의 발현은 배양 0일째의 대조군, 4일, 7일, 10일 및 14일째까지 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 아미노산 수송체 L의 첫 번째 아형인 LAT1은 정상 조직에서는 뇌, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 매우 제한되어 있다(Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001). 또한 LAT1은 종양세포에서 과발현되며, 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Sang *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*). 아미노산 수송체 L의 두 번째 아형인 LAT2는 대부분의 사람 장기에서 발현하고 있으며, 특히 심장, 뇌, 태반, 신장, 비장, 전립선, 정소, 난소, 림프절 및 태아의 간 등에서 많은 발현을 하고 있다(Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Segawa *et al.*, 1999; Verrey *et al.*, 2000). 사람의 신장암 세포인 T24 세포(Kim *et al.*, 2002)와 사람의 구강편평세포암종 KB 세포(Yoon *et al.*, 2004)에서도 LAT1의 발현을 확인할 수 있었으나 LAT2의 발현은 관찰할 수 없었다. 본 연구에서도 법랑질모세포 세포주의 분화과정 중에서 아미노산 수송체 L의 두 아형 중 LAT1의 발현은 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였으나, LAT2는 발현하지 않았다. 따라서 본 연구결과와 LAT1이 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한 선행연구자들의 보고(Sang *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001)를 같이 고찰하여 볼 때, 세포의

계속되는 성장에 중요한 역할을 수행하는 중성 아미노산 수송체 LAT1은 법랑질모세포의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 발현이 증가하여 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

아미노산 수송체 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2의 기능을 위한 필수적인 보조인자인 4F2hc mRNA 발현은 법랑질모세포 세포주 배양시간이 경과하면서 점차 증가하였으며, 배양 14일째 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 1C). 이 결과는 LAT1의 발현이 법랑질모세포 세포주의 분화과정 중에서 배양시간이 경과하면서 점차 증가한다는 결과와 매우 유사하였다. 본 연구의 결과는 법랑질모세포 석회화 결절과정에서 LAT1의 보조인자인 4F2hc의 발현증가가 수송체 본체인 LAT1의 발현증가와 기능의 증가를 위해 필수적인 과정임을 시사하고 있다.

본 연구에서 법랑질모세포 세포주의 분화를 유도한 후 amelogenin mRNA의 발현은 배양 시작 후 7일까지 발현이 유지되다 그 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 1D). 이 결과는 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 amelogenin mRNA 발현이 배양초기에 증가를 보이다 점차 감소한다고 한 보고(Park *et al.*, 2007)와 amelogenin이 법랑질모세포의 초기 분화과정이나 법랑질이 석회화되기 전 단계에서 분해효소에 의해서 잘려 저분자 조각이 된다고 한 보고(Nanci, 2003)와 부합한다. 따라서 본 연구의 법랑질모세포 세포주에서 amelogenin mRNA 발현 실험결과는 법랑질모세포 세포주의 실험적인 분화가 정상적으로 이루어졌음을 뒷받침하고 있다. 또한 분화 중인 법랑질모세포 세포주의 형태학적인 관찰과 석회화 결절 형성을 확인하기 위한 Alizaline red-S 염색을 통해서도 석회화 결절 및 분화중인 세포와 기질들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

법랑질모세포 세포주의 분화과정에서 아미노산 수송특성을 조사하기 위하여, 중성 아미노산 L-leucine을 이용하여 uptake 실험을 시행한 결과, 배양 10일째부터 L-leucine uptake가 증가하기 시작하여 배양 14일째에 최대를 보였다(Fig. 3). Yoon 등(2005)은 사람의 정상 구강편평상피 세포와 사람의 구강편평세포암종에서 아미노산 수송체 L의 발현 및 역할을 밝힌 연구에서, 정상세포주인 구강편평상피세포에서는 LAT2만 발현하고 암세포주인 구강편평세포암종에서는 LAT1만 발현하여 각각의 세포에서 중성 아미노산의 세포 내 유입역할을 담당한다고 보고하였다. 본 연구의 법랑질모세포 세포주 분화과정에서는 LAT2는 발현하지 않고 LAT1의 발현이 점차 증가하였다. 이러한 결과는 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 LAT1과 4F2hc의 발현이 배양시간이 경과하면서 점차 증가함에 의해 L-leucine uptake 양이 증가하는 것을 의미한다. 본 연구에서의 L-leucine uptake 결과와 Yoon 등(2005)의 연구결과로 볼 때, 이 연구에서 법랑질모세포의 분화유도 후 석회화 결절을 형성하는 과정에서 중성 아미노산 수송체 L 중 LAT1이 중성 아미노산을 세포 내로 유입시키는 중요한

역할을 한다고 사료된다.

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 지속적인 성장, 증식 및 분화가 일어나는 세포들에서는 아미노산 수송체들의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다(Sang *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2001). 아미노산 수송체 L은 그 수송 기질이 필수 아미노산을 포함한 대부분의 중성 아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다(Christensen, 1990; Kanai *et al.*, 1998). 본 연구에서 LAT1은 법랑질모세포 세포주의 배양 초기에 발현이 나타나 분화가 진행됨에 따라 점차 발현이 증가하였으며, LAT2는 법랑질모세포 세포주 분화과정에서 발현하지 않았다. 결론적으로, 본 연구의 결과로 법랑질모세포 분화 과정에서 아미노산 수송체 L 중, LAT1이 법랑질모세포의 석회화 결정형성 과정에서 중요한 역할을 한다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2008년도 조선대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn*. 2004;231:758-765.
- Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*. 2004;31:184-192.
- 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 Periodontol Res*. 1999;34:301-309.
- Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 1990;70:43-77.
- Chung KC, Kim TH, Yang YM, Baek JA, Ko SO, Cho ES. Transactivators for the odontoblast-specific gene targeting. *Int J Oral Biol*. 2009;34:105-113.
- 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 Res*. 1997;12:2040-2049.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Bio Chem*. 1998;273:23629-23632.
- Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1565:112-121.
- Ko HJ, Grzesik WJ. BMP Expression by Human Cementum-Derived Cells *in vitro*. *Int J Oral Biol*. 2005;30:99-103.
- 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 postnatal mouse incisor teeth. *Connective Tissue Res*. 2003;44:124-129.
- Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*. 1987;32:123-127.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N. 4F2(CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem*. 1999;274:3009-3016.
- Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Comm*. 2003;308:834-839.
- Nanci A. Ten Cate's oral histology: development, structure and function. 6th ed., St. Louis, Mosby, 2003, pp 192-239.
- Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, Dey R, Cho MI. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci*. 2007;115:153-160.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem*. 1999;274:19738-19744.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kühn LC. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem*. 1999;274:34948-34954.
- Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res*. 1995;55:1152-1159.
- Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem*. 1999;274:19745-19751.
- Smith CE. Cellular and chemical events during enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9:128-161.
- Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. *Mol Pharmacol*. 2002;61:729-737.
- Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch*. 2000;440:503-512.
- Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S,

- Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signalling and ameloblast differentiation. *Dev Cell*. 2004;7:719-730.
- Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res*. 1996;56:5012-5022.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1514:291-302.
- Yoon JH, Kim YB, Kim MS, Park JC, Kook JK, Jung HM, Kim SG, Yoo H, Ko YM, Lee SH, Kim BY, Chun HS, Kanai Y, Endou H, Kim DK. Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2004;205:215-226.
- Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, Kim SA, Lee CH, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Lee S, Kanai Y, Endou H, Kim DK. Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett*. 2005;222:237-245.