

*Porphyromonas gingivalis*의 열충격단백 발현조절 환경인자에 관한 연구

최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

열충격단백 (heat shock protein: hsp)이 치주질환의 원인인자로, 동맥경화증 및 rheumatic arthritis 등을 포함한 자가면역질환 (autoimmune disease)의 원인인자로 대두되고 있는 것이 최근 전세계적인 추세다¹⁾. 이로서 치주질환을 유발시키는 세균생태계를 구성하는 환경요소 중에서 hsp의 발현을 조절하는 요소들이 있을 수 있고¹⁾, 이를 규명하는 것은 치주질환의 병인에 관여하는 세균항원요소의 발현기작을 규명하는 의미가 있으며^{2,3)}, 이는 치주질환-동맥경화의 상호연관가설을 입증할 수 있는 공통유발인자를 규명할 수 있는 기초적인 작업으로서의 의의가 있다. 동시에 자가면역질환으로서의 치주질환과 동맥경화증의 성격을 심도있게 접근해 볼 수 있는 기초작업적인 연구로서 의미를 부여할 수 있다.

최근에 수종의 치주질환 병원균의 열충격단백 DNA 염기서열이 규명되었다^{4,8)}. 열충격단백이 helper나 suppressor T cell 반응에 의한 질환을 일으키는 과정에 능동적으로 관여할 수도 있다. 또한 열충격단백이 세균종이나 mammalian cell중에 상당한 sequence homology를 보인다는 것이 발표되었다¹⁾. 이러한 개

념은 gingival 결합 조직에 있는 mammalian cell의 열충격단백을 겨냥하는 자가 면역이 치주질환 병인화에 관여하는 기작을 파괴시킨다는 개념을 낳았다^{2,3)}.

추정되는 치주질환 병원균들의 열충격단백 유전자의 발현을 조절하는 다양한 환경인자들을 규명하는 것이 중요하다. 최근까지 열충격단백은 다른 다양한 인자들도 관여할 수도 있겠지만 오로지 열에 의해서만 유도된다고 알려져 왔다. 치은염증은 활성기에서 더 높은 온도를 나타내는 치은열구내 환경에서 잘 일어날 수 있다. 이것은 열충격단백의 발현을 몇 배로 증가하도록 자극하는 최적의 조건을 제공한다. 그러나 온도증가는 이미 확립된 깊은 pocket이 있는 곳에서의 열충격단백 발현에 필요한 단독의 필요조건이 아니라 정지단계의 질환진행과정의 필요조건이다. 치주질환 치주낭에서 열충격단백 발현을 조절하는데 있어 온도조건 이외의 몇 가지 다른 요소를 규명하는 것도 흥미있는 일이다. 세균성 biofilm을 형성하는 다른 종간의 bacterial 상호작용은 stress 상태를 불러일으킬 수 있다¹⁾. 이것은 미생물이 유일한 생태학적 적소에서 종간의 신호를 교환하는 큰 생태계 환경으로의 치주낭에 특히 중요하다. 본 연구의 목적은 가장 중요한 치주질환 병원균

*본 연구는 2001년도 부산대학교 의학연구소 연구비 (MRI 2001-01-32)의 지원에 의해 시행되었음
교신 저자: 최점일, 부산광역시 서구 아미 1가 10 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 602-739

인 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)의 열충격단백 유전자 발현을 조절하는 몇 가지 환경요소를 규명함에 있다.

II. 연구재료 및 방법

1. *P. gingivalis*의 다양한 배양

*P. gingivalis*는 hemin 5 micrograms/ml와 menadione 0.5 micrograms/ml이 첨가된 tryptic soy broth(TSB)에서 다음과 같은 5가지 다른 방법으로 배양시킨다.

- 1) 37 °C에서 배양한 다음 44 °C에서 한시간 배양한 양성대조군 (*Pg*-TSB-44)
- 2) 37 °C에서 배양한 음성대조군 (*Pg*-TSB-37)
- 3) *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)과 37 °C에서 같이 배양한 군 (*Pg/Fn*-TSB-37)
- 4) culture plate를 이용하여 37 °C에서 biofilm 상태로 배양한 군C (*Pg*-biofilm-37)
- 5) culture plate를 이용하여 37 °C에서 *F. nucleatum*과 함께 혼합 biofilm으로 배양한 군 (*Pg/Fn*-biofilm-37)

2. *P. gingivalis*의 total RNA 분리

배양한 세균액 0.5ml로부터 Purescript RNA Isolation Kit (Gentra)를 이용하여 RNA를 다음과 같이 분리하였다. 먼저 배양한 세균세포를 pellet화 하여 cell lysis solution을 300 μ l 첨가하여 pipet으로 조심스럽게 섞어준 다음 65°C에서 5분간 반응시켜 cell을 완전히 lysis시켰다. 이어서 protein-DNA precipitation solution 100 μ l 첨가하여 얼음에서 5분간 반응시킨 후 13,000-16,000 \times g에서 3분간 원심분리 하였다. RNA이 포함되어 있는 상등액을 100% isopropanol 300 μ l에 첨가하고 섞어준 다음 13,000-16,000 \times g에서 3분간 원심분리하여 상등액을 버리고 70% ethanol로 세척한 다음 공기 중에서 말렸다. 이 후에 RNA hydration solution을 첨가하여 얼음에서 30분간 반응시키고 RNA 농도는 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

3. *P. gingivalis* cDNA 합성

Total RNA 1 μ g을 사용하여 cDNA를 다음과 같이 합성하였다. 먼저 RNA에 reverse primer (5'-TTGTCAGCGATAACGCACTC-3')를 첨가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에서 10분간 방치하였다. M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂가 포함된 reaction buffer를 RNA에 첨가하고 여기에 dNTP, RNase inhibitor를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응 시켰다. 95°C에서 5분간 처리하여 반응을 정지시키고 얼음에 식혔다.

P. gingivalis 열충격단백 유전자 sequence로부터의 primer 용 nucleotide 제작

Oligonucleotide primer는 *Porphyromonas gingivalis*의 열충격단백 유전자인 PgGroEL sequence에 기초하여 사용하였다.

PgGroEL 5'primer (20mer)

5'-GCGGTTATCAGCGAAGAGAC-3'

PgGroEL 3'primer (20mer)

5'-TTGTCAGCGATAACGCACTC-3'

4. PCR amplification

PCR은 0.1 ml total volume으로 DNA thermal cycler(Perkin Elmer)사용하여 수행하였다. Reaction mixture는 10 \times PCR buffer (Promega), 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primer, cDNA와 2.5units Taq DNA polymerase (Promega)로 ice에서 제조하였다.

Amplification profile은 다음과 같았다.

denaturation : 94°C, 1분

annealing : 55°C, 1분 30초

extension : 72°C, 1분 30초

30cycle amplification 후에 PCR product 10 μ l를 1% agarose gel에서 electrophoresis하여 ethidium bromide staining으로 확인하였다.

III. 연구결과

아래와 같은 5가지의 상이한 조건 중에서 섭씨 37도에서 biofilm으로 배양한 경우, 섭씨 37도에서 *Fusobacterium nucleatum*과 용액으로 혼합배양한 경우, 섭씨 37도에서 *Fusobacterium nucleatum*과 biofilm 상태로 혼합배양한 경우 *Porphyromonas gingivalis*의 GroEL 유전자의 발현강도는 섭씨 44도에서 배양한 양성대조군과 유사하였다 (Figure 1).

1. 37 °C에서 배양한 다음 44 °C에서 한시간 배양한 양성대조군 (Pg-TSB-44)
2. 37 °C에서 배양한 음성대조군 (Pg-TSB-37)
3. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)과 37 °C에서 같이 배양한 군 (Pg/Fn-TSB-37)
4. culture plate를 이용하여 37 °C에서 biofilm 상태로 배양한 군C (Pg-biofilm-37)
5. culture plate를 이용하여 37 °C에서 *F. nucleatum*과 함께 혼합 biofilm으로 배양한 군 (Pg/Fn-biofilm-37)

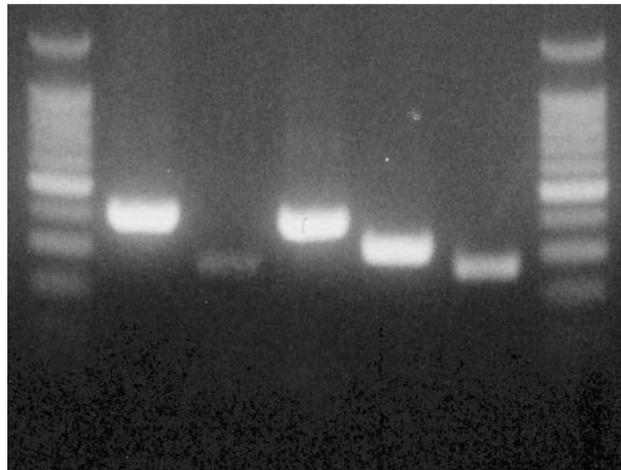


Figure 1. *P. gingivalis* GroEL gene의 발현강도를 보여주는 PCR 산물의 전기영동사진.

- Lane 1: 분자량 marker
Lane 2: 37 °C에서 배양한 다음 44 °C에서 한시간 배양한 양성대조군
Lane 3: 37 °C에서 배양한 음성대조군
Lane 4: *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)과 37 °C에서 같이 배양한 군
Lane 5: culture plate를 이용하여 37 °C에서 biofilm 상태로 배양한 군
Lane 6: culture plate를 이용하여 37 °C에서 *F. nucleatum*과 함께 혼합 biofilm으로 배양한 군

IV. 총괄 및 고안

치주질환 병원균의 세균총을 구성하는 치주낭의 세균 생태계에는 단독 및 혼합 세균의 biofilm이 상호 영양공급과 antagonism 및 synergism 등의 균형 속에 생물학적 활성을 유지하고 있다. 치주낭내로 감염되는 세균에 의해 기존 세균의 열충격단백의 발현이 증가되고¹⁾, 치주낭 상피내로 침투하는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 열충격단백의 발현도 증가하는 것이 보고되었다⁹⁾. *P. gingivalis*의 열충격단백 발현 역시 증가하는 것이 보고되었다¹⁰⁾. 이로서 열충격단백은 치주질환의 병인에 강력한 요인으로 시사되고 있고 최 등도 최근 치주질환자에서의 *P. gingivalis* 열충격단백에 대한 항체상승과 T-cell 면역반응 및 열충격단백 면역우세항원의 mapping 결과도 보고한 바 있다¹¹⁻¹³⁾. 치주질환의 가장 주요 병원균인 *P. gingivalis*의 열충격단백은 치주질환의 유발과 진행과정에서 중요한 의미를 시사하고 있고 이는 자가면역질환으로서의 치주질환 성격을 규명하는 데 매우 큰 의미를 지니고 있다. 따라

서 *P. gingivalis*의 열충격단백의 발현에 영향을 주는 환경인자에 대한 이해는 치주질환의 진행과 예방의 측면에 필수적인 것이라 할 수 있다. 본 연구의 결과로 미루어 볼 때, *P. gingivalis*의 열충격단백의 발현을 향상시키는 환경인자로서 가장 중요한 두 가지 요인이 밝혀졌는 바 그 하나는 다른 세균과의 혼합 배양조건이며 다른 하나는 biofilm 상태의 배양이었다. 이러한 현상은 실제로 치주낭이라고 하는 세균 생태계에서 매일 관찰할 수 있는 상황이며 이것이 치주낭에 군집하는 복합세균의 치주질환의 병인에 관여하는 기전의 하나라고 추정할 수 있다.

V. 참고문헌

1. Kaufmann SHE, Schoel A, Wand-Wurtenberger A, Steinhoff U, Munk ME, Koga T. T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;155:125-141.
2. Ueki K, Tabeta K, Yoshie H, Yamazaki K. Self-heat shock protein 60 induces tumor necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:72-77.
3. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, Yoshie H, Seymour GJ. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun*. 2002;70:2492-2501.
4. Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H, Nagai A, Kurihara H, Murayama Y. Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: Molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;119:129-136.
5. Minami J, Matsumoto S, Yamada T. Putative heat shock protein 70 gene from *Actinobacillus actinomycescomitans*: molecular cloning and sequence analysis of its gene. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:113-119.
6. Tsai JP, Shi W. Analysis of gene expression in *Treponema denticola* with different display polynucleotide chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:305-308.
7. Reid Hi, Riggio MP. Identification and nucleotide sequence of the heat shock protein 60 (GroEL) gene of *Bacteroides forsythus*. *DNA Seq* 1998;9:359-364.
8. Kadri R, Devine D, Ashraf W. Purification and functional analysis of the DnaK homologue from *Prevotella intermedia* 326. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:63-68.
9. Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D, Uitto V. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycescomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;182:231-5.
10. Vayssier C, Mayrand D, Grenier D. Detection of stress proteins in *Porphyromonas gingivalis* and other oral bacteria by Western immunoblotting analysis. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:303-308.
11. Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Yoshie H, Hara K. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol*. 2000;120:285-93.
12. Maeda H, Miyamoto M, Koikeguchi S, Kono T, Nishimura F, Takashiba S, Murayama Y. Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;28:219-224.
13. Choi JI, Kang HS, Park YM, Kim SJ, Kim US. Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock-protein 60 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2004;18 (in press).

Environmental factors regulating the expression of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein

JEOM-IL CHOI

Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

The present study was done to evaluate the environmental factors responsible for the expression of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein. The intensity of the heat shock protein gene expression was comparable to those seen by the heat shock pretreatment of the bacteria (44 °C) when the bacteria was grown as a mixed culture or biofilm state at 37 °C.

Key words : heat shock protein, porphyromonas gingivalis, environmental factors(열충격단백, porphyromonas gingivalis, 환경인자)