

*Porphyromonas gingivalis*와 *Tannerella forsythia*의 응집반응

엄홍식¹, 이석우², 박재웅³, R.K. Nauman^{4*}

¹강릉대학교 치과대학 치주과학교실, ²Division of Periodontics, School of Dental and Oral Surgery, Columbia University, U.S.A., ³경희대학교 치과대학 소아치과학교실, ⁴Department of Microbiology, Baltimore College of Dental Surgery, University of Maryland, U.S.A.

I. 서론

다양한 종류의 세균으로 구성되는 biofilm인 치면세균막이 치주질환의 일차적인 원인요소라는 것은 잘 알려진 사실이다. 거의 모든 구강내 세균은 다른 세균과 응집(coaggregation)할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 다른 종류의 세균이 서로 특이적으로 부착할 수 있다. 여러 종류의 세균이 치면세균막을 형성하는 과정에서 응집반응이 필수적인 역할을 한다는 것은 명확한 사실이다. 세균 간의 응집은 치면세균막 형성의 초기에 집락화하는 세균들 사이에 (예를 들어, *Streptococcus sanguis*와 *Actinomyces viscosus*), 초기에 집락화하는 세균과 후기에 집락화하는 세균들 사이에 (예를 들어, *Streptococcus gordonii*와 *Fusobacterium nucleatum*), 그리고 후기에 집락화하는 세균들 사이에 (예를 들어, *Treponema denticola*와 *P. gingivalis*) 일어날 수 있는 것으로 보고되고 있다.^{1,2} 응집반응을 통하여 치면세균막의 형성이 촉진될 뿐 아니라, 서로 다른 세균이 인접하게 위치함으로써 생리적 및 대사

의 상호작용이 촉진될 수 있을 것이다.

*Porphyromonas gingivalis*와 *Tannerella forsythia*는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등과 더불어 중요한 치주질환 원인균으로 지목되어 왔다. 몇몇 임상연구와 실험적 연구를 통하여 *T. forsythia*와 *P. gingivalis*가 치주질환의 진행에서 상승효과(synergy)를 보이는 것으로 보고되어왔다.^{3,4} 다른 치주질환 원인균과는 달리 모든 *T. forsythia* 균주가 치주질환 환자에서 강한 면역반응을 일으키지는 않는다. *T. forsythia*는 단독으로는 질환을 일으키지 못하나, *P. gingivalis* 등의 다른 세균과 함께 동시감염을 일으키면 상승효과를 통하여 치주질환 진행에 기여할 지도 모른다. 이러한 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 상승효과에도 불구하고, 이 세균들의 상호작용의 기구는 아직 제대로 밝혀져 있지 않다.

이 연구의 목적은 *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 사이의 응집반응과 이에 연관된 기구를 확인하는데 있었다.

* 이 연구는 강릉대학교치과병원의 지원으로 이루어졌음.

* 교신저자 : 엄홍식, 강원도 강릉시 지변동 123 강릉대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 210-702

II. 연구재료 및 방법

1. 균주

이 연구에 사용된 균주는 *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Porphyromonas gingivalis* 381, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25843, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, 그리고 *Treponema denticola* ATCC 33520이었다. 모든 세균은 각각의 선택배지에서 37°C의 혐기성 조건(10% H₂, 5% CO₂, and 85% N₂)에서 배양하였다.

2. 응집반응의 분석

세균들의 응집활성을 분석하기 위해서 Kolenbrander¹가 제안한 육안분석법을 이용하였다. 응집반응을 관찰하고자 하는 두 세균을 culture plate에서 채취하여 PBS로 3회 세척한 후, 응집 완충액(coaggregation buffer) (1 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃)에 재부유하였다. 각각 0.5 ml의 세균 부유액(약 10⁹개 세균)을 10 x 75 mm 크기의 바닥이 둥근 유리 시험관에 넣고 vortex로 10초간 혼합하였다. 세균부유액을 혼합한 후 응집반응을 실온에서 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90분에 각각 관찰하였다. 응집반응의 정도를 0에서 4까지의 점수로 기록하였는데, 부유액을 역광조명 하에서 확대경으로 관찰하여 혼탁하게 보이면 0, 역광조명 하에서 확대경으로 관찰하여 응집체가 보이면 1, 확대경을 사용하지 않고도 응집체가 관찰되면 2, 응집체가 커지고 부유액이 맑게 보이면 3, 응집체가 완전히 가라앉으면 4로 기록하였다. 한 종류의 세균 부유액 1 ml를 넣은 시험관을 대조표본으로 하였다.

3. 전자현미경 및 Epifluorescence 현미경 관찰

현미경 검사를 위하여 각각 약 10⁹ 개 세포가 들어있는 *T. forsythia*와 *P. gingivalis*의 세균 부유액을 혼합하여 세균응집체가 형성되게 하였다. 세균응집체의 부유액을 copper formvar coated grid에 놓고 pH 6.8의 1% sodium phosphotungstate로 negative staining하였다. Specimen grid는 JEOL JEM-1200 EXII transmission electron microscope로 80kV에서 관찰하였다. Epifluorescence microscopic examination을 위해서는 세균응집체를 제조사의 지시에 따라 LIVE/DEAD BacklightTM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)로 염색하고 Nikon Eclipse E 800으로 관찰하였다.

4. 응집에 영향을 주는 요소

온도가 세균 응집 반응에 미치는 영향을 관찰하기 위해 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 부유액을 서로 혼합하기 전에 37°C, 55°C, 80°C, 혹은 100°C에서 20분간 처리하였다.

수종의 당류와 단백분해효소(protease)를 이용하여 이들이 응집반응을 억제하는지 관찰하였다. 당류의 억제효과를 관찰하기 위해서 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 부유액을 혼합하기 전에 0.1 M lactose, galactose, glucose, mannose, fucose, 혹은 N-acetylglucosamine으로 37°C에서 30분간 처리하였다. 단백분해효소 처리효과를 관찰하기 위해서는 각 세균을 최종농도 4.8 mD/ml, 48 mD/ml, 480 mD/ml, 및 4.8 D/ml의 단백분해효소로 37°C에서 30분간 처리한 후 응집반응을 관찰하였다. EDTA의 효과를 관찰하기 위해서 최종농도 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM의 EDTA를 세균 부유액에 첨가하고 30분간 방치한 후 응집반응을 관찰하였다.

응집 완충액의 pH를 4, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 및

10으로 조정하여 응집반응이 가장 활발하게 일어나는 pH를 관찰하였다.

III. 연구결과

1. 세균 간의 응집반응

*P. gingivalis*는 *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. viscosus*, 및 *S. sanguis*와 강한 응집반응을 보였다. 그러나, *T. forsythia*는 *P. gingivalis*와 응집반응을 보였을 뿐이며, 이 실험에 사용된 다른 세균과는 응집반응을 보이지 않았다. *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 응집반응에서 혼합 후 5-10분에 응집체가 나타나기 시작하여 1시간 이내에 응집체가 완전히 가라앉는 것을 볼 수 있었다.

2. 전자현미경 및 Epifluorescence 현미경 관찰



Figure 1. Negative staining electron microscopy showing interbacterial binding between *P. gingivalis*(round-shaped) and *T. forsythia* (rod-shaped).

세균 응집체의 전자현미경 관찰과 epifluorescence 현미경 관찰에서 *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 세포가 직접 결합하는 것이 관찰되었다(Figure 1 and 2).

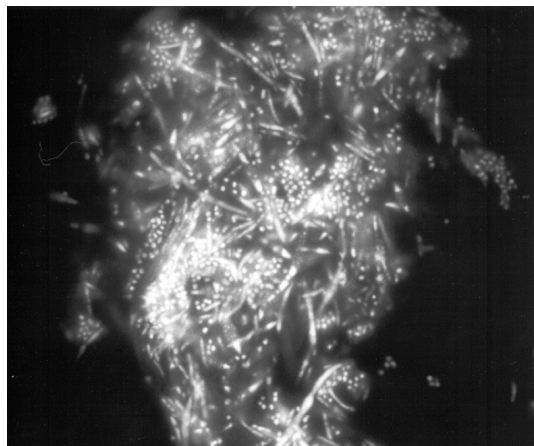


Figure 2. Epifluorescence microscopy of the *P. gingivalis* - *T. forsythia* coaggregates. The bacterial cells were stained with LIVE/DEAD Backlight™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). *P. gingivalis* cells (small round) were stained more intensely than *T. forsythia* cells (rod shaped).

3. 온도, 당류, 단백분해효소, EDTA, 및 pH의 효과

P. gingivalis 부유액을 80°C 및 100°C에서 20분간 처리한 결과, *T. forsythia*와의 응집반응이 완전히 억제되었다. 반면, *T. forsythia*를 80°C 및 100°C에서 20분간 처리하여 세균 응집반응을 관찰한 결과, *P. gingivalis*와의 응집반응이 극적으로 증진되었다(Table 1). 이 경우, vortex로 혼합한 직후부터 세균 응집체가 형성되는 것이 육안으로 관찰되었다. 열처리하지 않은 경우에 이 정도의 반응은 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*를 혼합한 후 10분 정도가 경과되어야 관찰되었다. SDS-PAGE 분석에서 *T. forsythia*를 80°C 및 100°C에서 열처리하면 210-kDa 단백질이 사라지는 것이 관찰되었다

Table 1. Effect of heat-treatment of *T. forsythia* on coaggregation activity (coaggregation score)

Time (min.)	Temperature (°C)				
	Room Temp.	37	55	80	100
0	1	1	1	2	2
5	1	1	1	3	3
10	1	1	2	3	3
15	1	1	2	3	3
20	2	2	2	4	4
30	3	3	3	4	4
60	4	4	4	4	4

1: aggregates are visible under the magnifier

2: aggregates are visible with naked eyes

3: part of or whole suspension become clear with large aggregates

4: aggregates completely settled

(Fig 3).

이 실험에서 사용된 당류 중 어느 것도 *T. forsythia*와 *P. gingivalis*의 응집반응을 억제하지 못하였다.

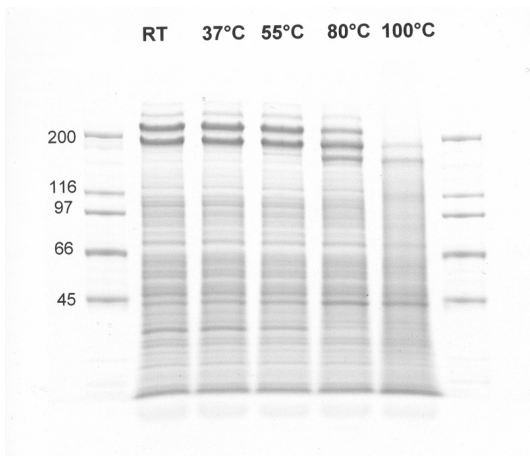


Figure 3. SDS-PAGE of the total cellular lysates of *T. forsythia* 43037, showing effect of temperature. The 210-kDa protein was disintegrated when *T. forsythia* samples were heat treated (>55°C).

*T. forsythia*나 *P. gingivalis* 중 하나를 단백질 분해효소로 처리하면 세균 응집 반응이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

세균 부유액에 EDTA를 첨가하면 *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 사이의 응집반응이 감소하였다. *T. forsythia*와 *P. gingivalis*의 응집반응은 pH 7.5의 응집 완충액을 사용할 때 가장 활발하였다.

4. 열처리한 *T. forsythia*의 응집반응

*T. forsythia*를 열처리하면 *P. gingivalis*와의 응집 활성이 증가하는 현상을 조사하기 위해서, *T. forsythia* 부유액을 80°C에서 20분간 열처리한 후에, 당류, 단백질분해효소, 혹은 EDTA로 처리하고 *P. gingivalis* 부유액과 혼합하였다. 그 결과, 이 실험에 사용된 당류는 어느 것도 *P. gingivalis*와 열처리한 *T. forsythia* 사이의 응집반응을 억제하지 못하였다. 반면, 단백질분해효소로 처리하거나 EDTA로 처리한 경우는 *P. gingivalis*와 열처리한 *T. forsythia* 사이의 응집반응이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

IV. 고안

치주질환의 진행에 있어서 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*가 상승효과를 보인다는 것이 여러 연구를 통해 제안되었다. Gmür 등⁵은 *P. gingivais*와 *T. forsythia*가 치은연하에서 함께 검출되는 경우가 많다고 하였고, Socransky 등⁶은 치은연하의 세균 중 *P. gingivalis*, *T. forsythia*, 그리고 *T. denticola*가 하나의 complex에 속하며, 이 complex는 치주낭 깊이와 탐침 시 출혈과 같은 치주질환 지표와 강한 상관관계를 가진다고 보고하였다. Fujiise 등⁷은 만성치주염 환자의 병소와 건강부위에서 세균들이 어떤 조합으로 나타나는지 검사하였다. 그 결과, *P. gingivalis*와 *T. forsythia*가 함께 나타나는 빈도가 건강한 부위에 비해 병소에서 높았으며, *T. forsythia*는 나타나고 *P. gingivalis*는 없는 경우의 빈도가 건강한 부위에서 높게 나타났다. 더구나 그들은 치료 전에 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*가 함께 존재하는 부위에서는 치료 후 탐침깊이의 감소가 적고, 탐침시 출혈과 배농의 감소 또한 미약하였다고 보고하였다. Takemoto 등⁸은 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 동시감염의 효과를 실험하였는데, 이 두 세균 중 하나로 토끼를 단독 감염시키면 병소가 생기지 않는 반면, 두 세균으로 동시감염시키면 모든 토끼에서 농양이 발생하였으며, 6마리 중 4마리가 패혈증으로 희생되었다고 보고하였다.

Yoneda 등⁴은 쥐에서 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 혼합 감염이 농양의 형성에 상승효과를 보인다고 보고하였으며, *P. gingivalis*가 생산하는 cysteine proteinase인 *gingipain*이 이 상승효과에 관여할 것이라고 하였다. Kamaguchi 등⁹은 *gingipain* 내의 adhesion domain이 *P. gingivalis*와 *Prevotella intermedia*의 응집반응에서 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 따라서 *P. gingivalis*의 *gingipain* 분자가 *P. gingivalis*와 *T.*

*forisythia*와의 응집에도 관여할 수도 있을 것이다.¹⁰ Sabet 등¹¹은 *T. forsythia*의 surface (S-) layer가 혈구응집소임을 보고하였다. 혈구응집소는 여러 속의 세균에서 adhesin으로 작용하므로, *T. forsythia*의 S-layer가 *P. gingivalis*와의 응집반응에 관여할 가능성도 있다.

*P. ginivalis*를 열처리하면 응집반응이 억제되는 것으로 보아, 응집반응에 관여하는 *P. gingivalis*의 성분은 열에 약한 성질을 가지는 것으로 보인다. 반면, *T. forsythia*를 80°C 혹은 100°C로 열처리하면 응집 활성이 극적으로 증진되었다. 이 경우, vortex로 혼합한 직후부터 세균 응집체가 육안으로 관찰되었다. 열처리하지 않은 경우에 이 정도의 반응은 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*를 혼합한 후 10분 정도가 경과되어야 관찰된다. SDS-PAGE 분석에서 *T. forsythia*를 55°C 이상에서 열처리하면 S-layer의 중요한 성분 중의 하나인 210-kDa 단백질이 사라지기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. 비활성 상태로 있던 *T. forsythia*의 어떤 응집 인자가 열처리로 인하여 활성화 되는 것으로 추측할 수 있겠다.

*P. gingivalis*나 *T. forsythia* 중 하나를 단백분해 효소로 처리하면 응집 활성이 상당히 감소하였는데, 이를 보아 이 두 세균 사이의 응집 반응은 단백질과 단백질 사이의 상호작용에 의한 것일 수 있다. 이 실험에서 사용된 당류 중 어떤 것도 응집 반응을 억제하지 못하였다. 따라서 이 반응은 탄수화물 성분에 의해 중개되는 것으로 보이지는 않는다.

이 연구의 결과는 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 응집반응이 단백질-단백질 상호작용에 의한 것임을 시사한다. 또한, *T. forsythia*의 어떤 성분이 열처리에 의해 활성화되어 *P. gingivalis*와의 응집반응이 증진될 수 있다는 점도 시사한다. *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 사이의 응집반응의 기구를 구명하고, 또한 이 반응이 치주질환의 진행에 어떤 역할을 하는지를 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

*P. gingivalis*와 *T. forsythia*는 혼합감염 시에 상승효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 이 두 세균의 상호작용을 구명하기 위한 일환으로 이들 세균의 응집반응에 대해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. gingivalis*는 *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. viscosus*, 및 *S. sanguis*와 강한 응집반응을 보였다. 그러나, *T. forsythia*는 *P. gingivalis*와 응집반응을 보였으며, 이 실험에 사용된 다른 세균과는 응집반응을 보이지 않았다.
2. *P. gingivalis*를 열처리하면 응집 반응이 억제되었다. 반면, *T. forsythia*를 80°C 및 100°C에서 열처리하면 응집반응이 극적으로 증진되었다.
3. *P. gingivalis*나 *T. forsythia* 중 하나를 단백질 분해효소로 처리하면 응집 활성이 감소하였다. 이 실험에서 사용된 당류 중 어떤 것도 응집반응을 억제하지 못하였다.

이 연구의 결과는 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*의 응집반응이 단백질-단백질 상호작용에 의한 것임을 시사한다. 또한, *T. forsythia*의 어떤 성분이 열처리에 의해 활성화 되어 *P. gingivalis*와의 응집 반응이 증진될 수 있다는 점도 시사한다.

VI. 참고문헌

1. Kolenbrander PE. Coaggregation among oral bacteria. *Methods Enzymol* 1995; 253: 385-397.
2. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, and Palmer Jr. RJ. Communication among oral bacteria *Microbiol Mol Rev* 2002; 66: 486-505.
3. Kamma JJ, Nakou M, and Manti FA. Periodontal microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res* 1995; 30: 66-72.
4. Yoneda M, Hirofujii T, Anan H, Matsumoto A, Hamachi T, Nakayama K, and Maeda K. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: Involvement of gingipains in a synergistic effect. *J Periodontal Res* 2001; 36: 237-243.
5. Gmür R, Strub JR, and Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* 1989; 24: 113-120.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, and Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
7. Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, and Maeda K. Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 1253-1259.
8. Takemoto T, Kurihara H, Dahlen G. Characterization of *Bacteroides forsythus* isolates. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1378-1381.
9. Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Bara H, and Nakayama K. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology* 2003; 149: 1257-1264.
10. Fujise O, Miura M, Hamachi T, and Maeda K. Involvement of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotype in treatment outcome following

- non-surgical periodontal therapy. J Periodontol 2005; 76: 1661-1666.
11. Sabet M, Lee S-W, Nauman RK, Sims T, and Um H-S. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. Microbiol 2003; 149: 3617-3627.

Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*

Heung-Sik Um¹, Seok-Woo Lee², Jae-Hong Park³, R.K. Nauman⁴

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Kangnung National University

²Division of Periodontics, School of Dental & Oral Surgery, Columbia University, USA

³Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyung-Hee University

⁴Department of Microbiology, Baltimore College of Dental Surgery, University of Maryland, USA

Dental plaque, a biofilm consisting of more than 500 different bacterial species, is an etiological agent of human periodontal disease. It is therefore important to characterize interactions among periodontopathic microorganisms in order to understand the microbial pathogenesis of periodontal disease. Previous data have suggested a synergistic effect of two major periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in the periodontal lesion. In the present study, to better understand interaction between *P. gingivalis* and *T. forsythia*, the coaggregation activity between these bacteria was characterized. The coaggregation activity was observed by a direct visual assay by mixing equal amount (1×10^9) of *T. forsythia* and *P. gingivalis* cells. It was found that the first aggregates began to appear after 5–10 min, and that the large aggregates completely settled within 1 h. Electron and epifluorescence microscopic studies confirmed cell-cell contact between two bacteria. The heat treatment of *P. gingivalis* completely blocked the activity, suggesting an involvement of a heat-labile component of *P. gingivalis* in the interaction. On the other hand, heat treatment of *T. forsythia* significantly increased the coaggregation activity; the aggregates began to appear immediately. The coaggregation activity was inhibited by addition of protease, however carbohydrates did not inhibit the activity, suggesting that coaggregation is a protein-protein interaction. The results of this study suggest that coaggregation between *P. gingivalis* and *T. forsythia* is a result of cell-cell physical contact, and that coaggregation is mediated by a heat-labile component of *P. gingivalis* and *T. forsythia* component that can be activated on heat treatment.