급속진행성치주염 환자로부터 배양분리한 *Porphyromonas gingivalis* 균주의 ribotyping

김진홍[1] · 최봉규[2] · 최성호[1] · 조규성[1] · 채중규[1] · 김종관[1]

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소[1]
연세대학교 치과대학 구강생물학교실[2]

I. 서론

치주질환은 치태내 세균이 중요 원인인자로 작용해 치아주위조직의 염증과 파괴를 유발하여 결국 치아를 상실하게 하는 감염성 질환이다. 구강내에는 약 500여종의 세균종이 존재하며 이중 15~20여종의 세균종이 다양한 형태의 치주질환에 특이하게 관여한다고 알려졌다[1]. 특히 조기이환치주염의 한 범주인 급속진행성치주염은 주요 원인균이 *Porphyromonas gingivalis*로서 어떤 일정한 파괴양상 없이 전반적으로 대부분의 치아에서 발현되며 이전에 유년성 치주염을 앓았거나 정상인 상태에서 진행되기도 하는데 보통 사춘기에서 30세 전후에 호발하는 치주질환이다.

*P. gingivalis*는 그람 음성이고 혐기성이며 구형이나 짧은 막대모양의 비운동성 세균으로서 치은연하부에 집락을 형성한다. 병인론과 독성 인자[2,3], 숙주방어 등과 관련된 여러 연구를 통해 이 *P. gingivalis*는 치주질환의 원인에 중요한 역할을 담당한다는 것이 확인되었다[4-9]. *P. gingivalis*의 독성인자는 매우 다양한데[10-12] 특히 이 세균이 만들어내는 단백분해효소는 치주조직 파괴와 깊은 관련이 있다[13,14]. 구강내에서 세균집락을 형성하는 초기에 치아와 구강상피 표면에 세균이 부착할 때 관여하는 부착인자는 *P. gingivalis*의 병원성을 증가시키는 역할을 하고[15-20] 거의 fimbriae라는 구조에 존재한다. Fimbriae는 숙주내에서 강한 항원성을 지닌다는 보고가 있고[21,22] 이것을 구성하고 있는 단백질인 fimbrillin은 크기, 아미노산의 배열 및 항원적 다양성의 차이에 따라 fimbriae기능과 면역활성도가 달라져 병원성에 영향을 미치게 된다고 하였다[23].

한편 인종, 문화적, 경제적 배경이 다르고 지리적 위치가 다른 인구집단에서 치주질환 환자로부터 검출된 *P. gingivalis*는 각 인구집단에서 비슷한 분포를 보였다[24-29]. 그러나 이 세균은 각 균주마다 매우 다양한 병원성을 가지고 있으므로 지리적으로 다른 지역의 치주질환 환자로부터 검출된 *P. gingivalis* 균주를 특징화시킨다면 치주질환의 발생에 있어 이 세균이 어떤 역할을 하는지 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 이러한 특징화는 각 균주들을 명확히 구분해 낼 수 있는 기술이 필요한데 *P. gingivalis* 균주를 세부적으로 구분하는 방법으로서 표현형 구분법(phenotypic method)과 유전형 구분법(genotypic method)이 있다. Biotyping[30], serotyping[31], antibiotyping[32]과 SDS-PAGE protein profile[33,34]등이 표현형 구분법에 속한다. 표현형적 성질은 그 자체가 한 유전자의 발현에 전적으로 의지하므로 덜 정확하다고 할 수있다. 따라서 이방법으로는 유사한 각 *P. gingivalis* 균주들을 명확히 구분하는데 불충분하다. 최근에는 분자생물학의 발달로 다양한 세균들을 특

징화시킬 수 있는 제한효소분석법, multilocus enzyme electrophoresis 및 ribotyping과 같은 방법들이 개발되었다. 이 기술들은 세균의 유전적 특성에 근거한 것이므로 *P. gingivalis* 균주들을 구분하는데 좀더 정확한 방법이라 할 수 있다[35-37]. 이러한 방법으로 많은 연구가 이루어졌는데 계통분류학적 측면에서 수립된 *P. gingivalis*의 동일성에도 불구하고 *P. gingivalis*의 균주들간에는 매우 다양한 유전적 이질성이 나타남이 보고되고 있다[38-41]. Loos 등은 제한효소를 이용한 총 게놈DNA의 제한효소 절편길이다형화(restriction fragment length polymorphism: RFLP) 분석을 이용하여 치주염이나 근관감염이 있는 환자의 임상시료에서 분리한 33균주의 *P. gingivalis*에서 29가지의 상이한 DNA RFLP 지문을 관찰할 수 있었다[40]. 또 Van Steenbergen 등은 배우자간에 *P. gingivalis*가 전이될 수 있는가를 규명하는 연구에서, 배우자사이가 아닌 대상에 있어서는 *P. gingivalis* 균주의 DNA형태가 상이했지만 배우자간에는 DNA형태에 있어서 차이를 보이지 않는다고 보고하였다[41]. Loos와 Dyer가 수행한 *P. gingivalis* 100균주를 대상으로 한 multilocus enzyme electrophoresis에 의한 분석에서도 78가지의 서로 다른 그룹이 존재함을 보고하였다[39].

*P. gingivalis*의 제한효소분석법은 많은 수의 band를 만들어내므로 많은 균주를 시각적으로 비교분석하기는 매우 어렵다. Ribotyping방법은 사용된 제한효소마다 전형적인 소수의 band만을 형성하므로 이러한 문제들을 극복할 수 있다. 각 세균의 균주들을 ribotyping할 때 이용되는 소식자로서 16S ribosomal RNA(16S rRNA)특이소식자가 많이 이용되는데 그 이유는 16S rRNA유전자는 모든 세균에 존재하며, 모든 세균에서 같은 염기서열을 나타내는 보존부위와 종마다 특이한 염기서열을 보이는 특이부위로 구성되어있어 세균의 동정에 유용하게 사용될 수 있기 때문이다. 이러한 ribotyping 방법을 이용하여 다양한 유전적 이질성을 보이는 *P. gingivalis*를 지역,인종,문화 및 경제적인 배경에 따라 연구 분석을 한다면 *P. gingivalis*의 역학적 연구에 크게 기여할 것이다. 뿐만 아니라 *P. gingivalis*는 치주염의 vaccine으로 사용될 수 있는 세균 중 가장 유력한 균종이므로[42] 다양한 유전적 및 형질적 이질성을 가진 *P. gingivalis* 균주중 가장 많이 분포하는 균주를 찾아내는 것이 중요하다.

이에 본 연구에서는 한국인의 급속 진행성 치주염 환자로부터 분리한 *P. gingivalis*를 한국인에게서 어떤 ribotype이 가장 많이 존재하는지 또한 각 환자의 *P. gingivalis 균주*사이에 유전적 이질성이 존재하는지를 알아보기위하여 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 이용하여 ribotyping방법을 통해 규명하고 각 ribotype에 따라 fimbrillin에 대한 항원적 이질성과 단백분해활성도를 분석하였다.

II. 연구대상 및 연구방법

1 .연구대상

Y대학교 치과대학 부속병원 치주과에 내원한 급속 진행성 치주염 환자 10명을 선정하였다. 남녀 각각 5명씩이었으며 연령분포는 22세부터 36세까지였다. 급속 진행성 치주염 환자의 진단은 환자의 치과병력과 임상적, 방사선 사진상의 양상 및 환자의 연령을 고려하여 임상적으로 내려졌다.

2. 연구방법

(1) 치은연하치태 채취

치주낭의 깊이가 6mm 이상되는 부위에 3개의 paper point를 10초 동안 삽입한 후 제거하여 1㎖의 reduced transport medium[43] 이 들어있는 vial에 즉시 넣었다.

(2) 배양분리

치은연하치태를 인산완충용액으로 10배 단계희석한 후 5% 양혈액, hemin(10㎍/㎖), vitamin K_3(5㎍/㎖))이 함유된 혈액 BHI(Brain heart infusion, Difco. Detroit, MI.,USA) 한천배지에 접종하였다. 혐기성 환경(5% CO_2, 10% H_2, 85% N_2)에서 10일 이상 배양한 뒤 *P. gingivalis*의 형태로 추정되는 흑색집락을 다

시 혈액 BHI 한천배지에 접종하였다. 단일집락이 형성되면 500㎕의 BHI 액체배지에 접종한 후 2-3일간 방치하여 자란 세균을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 형태학적으로 짧은 막대모양이며 순수성을 확인한 후 5㎖ BHI 액체배지에 넣어 배양한 뒤, 일부(2㎖)는 glycerol(최종농도 15%)을 첨가한 후 -70℃에 냉동보관하고, 일부(500㎕)는 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide 전기영동에, 나머지 2.5 ㎖는 DNA 추출에 사용하였다.

⑶ DNA 추출

P. gingivalis 균주배양액(2.5㎖)을 5,000g에서 10분간 원침시켜 얻은 균침전물을 인산완충액으로 2회 세척하고 용해완충용액(500mM Tris-HCl, pH 9.0, 20mM EDTA, 10mM NaCl, 1% sodium dodesyl sulfate)으로 세균을 용해시킨 후 proteinase K(200㎍/㎖)를 첨가해 1시간동안 37℃에 방치했다. DNA를 동량의 phenol, phenol/chloroform(1:1), chloroform 순으로 추출한 후 ethanol로 침전시켰다. DNA를 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 뒤 200㎖의 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 용해하였다. RNA를 제거하기위해 RNase(50㎍/㎖)를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 얻은 DNA를 260 nm에서 흡광도를 재어 농도를 측정하였다.

⑷ 점상블롯 보합결합(Dot-blot hybridization)[44]

분리된 균주가 *P. gingivalis*인지 판별하기 위하여 균주로부터 DNA를 추출하여 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드소식자를 사용한 보합결합을 수행하였다. 치주염 환자로부터 배양분리한 *P. gingivalis* 균주의 DNA를 95℃에서 10분간 변성시킨 후 나일론막에 2㎕씩 점상블롯하였다. 나일론막에 자외선을(254nm, 3분) 조사하여 DNA를 막에 고정시킨 후 digoxigenin으로 표지된 *P. gingivalis*의 16S rRNA 특이 올리고뉴클레오타이드 소식자(5′ TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC 3′)를 이용하여 점상블롯 보합결합을 수행하였다.

올리고뉴클레오타이드 소식자는 Digoxigenin (DIG) oligonucleotide 3'-end labeling kit™ (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 DIG-ddUTP로 표지하였다. 즉 20㎕의 반응용액(X㎕ 100 pmol oligonucleotide, 4㎕ $CoCl_2$, 1㎕ DIG-ddUTP, 1㎕ terminal transferase)을 37℃에서 15분간 방치한 후 얼음에 놓고 2㎕의 stock solution(1㎕ glycogen과 200㎕ 0.2 mM EDTA의 혼합액)을 첨가하였다. 올리고뉴클레오타이드를 2.5㎕ 4 M LiCl와 75㎕ ethanol로 침전시키기 위해 잘 섞은 후 -20℃에서 하루동안 방치하였다. 올리고뉴클레오타이드를 4℃에서 12,000g로 원심분리하여 알콜을 제거한 후 침전물을 500㎕의 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 다음 올리고뉴클레오타이드를 20㎕ dH_2O에 녹였다. 나일론막을 보합결합용액(5 x SSC, 1% 우혈청 알부민, 0.1% N- lauroylsarkosine, 0.02% SDS)에 넣어 30분 동안 56℃에서 prehybridization시켰다. 여기에 digoxigenin으로 표지된 올리고뉴클레오타이드 소식자(50 pmol, 10㎕)를 넣어 1시간동안 보합결합시키고 세척완충용액 I(5 x SSC, 0.01% SDS)으로 15분간 같은 온도에서 두 번 세척하였다. 보합결합된 소식자는 DIG-luminescent detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 alkaline phosphatase(AP)가 결합된 anti-digoxigenin과 기질로서 chemiluminescence를 사용해 탐지해냈다. 즉 막을 AP가 결합된 anti-digoxigenin과 결합시킨 후 세척완충용액 II(0.1% maleic acid, 0.15M NaCl, 0.3% Tween 20, pH 7.5) 로 씻어 주었다. 그후 막을 1-2㎖ CSPD용액*(Boehringer Mannheim, Germany)에서 5분간 방치하였다. 여분의 액을 떨구고 막을 Whatman 3MM paper상에서 물기를 제거하되 완전 건조상태가 되지 않도록 하였다. membrane을 37℃에서 5-15분간 방치한 후 실온에서 막을 X-ray에 노

* CSPD 용액
(Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate, Boehringer Mannheim,Germany)을 탐지용액에서 1:100으로 희석한 것

출시켰다.

(5) 제한효소에 의한 DNA의 절단 및 Southern blot분석

P. gingivalis 균주의 ribotype을 결정하기위하여 DNA를 제한효소로 절단한 후 agarose 전기영동과 southern-blot을 거쳐 이 균주의 16S rRNA 특이소식자로 보합결합을 하였다.

DNA를 제한효소 *Kpn*I(MBI Fermentas St.Leon-Rot, Germany) 또는 *Pst*I(MBI Fermentas St.Leon-Rot, Germany) 1㎕와 10 x buffer 1㎕, 5~8㎕ DNA를 혼합하여 총량이 10㎕가 되도록 dH_2O로 양을 조절하였다. 이것을 37℃에서 1시간 이상 방치하였다. 절단한 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Agarose gel을 0.25 N HCl용액에 20분간 방치한 후, DNA를 변성시키기위해 agarose gel을 DNA변성용액(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 넣어 30분간 방치하였다. Agarose의 DNA를 20 x SSC(3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH 7.0)를 사용하여 나일론막에 이동시킨 후 나일론막을 gel로부터 분리하여 2 x SSC에서 15분간을 세척한 후 자외선(254 nm, 3분)을 조사하여 DNA를 나일론막에 부동화시켰다. 이 막을 보합결합용액(5 x SSC, 1% 우혈청 알부민, 0.1% N-lauroylsarkosine, 0.02% SDS)이 들어있는 용기에 넣어 56℃에서 30분간 반응시킨 후 digoxigenin으로 표지한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 첨가하여 56℃에서 1시간동안 보합결합시킨 후 세척완충용액 I로 56℃에서 15분간 2회 세척하였다. 그 후 막을 1%의 우혈청알부민으로 차단한 후 AP-conjugated anti-digoxigenin으로 실온에서 1 시간동안 반응시키고 AP에 대한 기질로 화학발광물질인 CSPD용액(Boehringer Mannheim, Germany)을 첨가한 후 X-ray film에 노출시켜 감광된 밴드를 확인하였다.

(6) SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)[34]

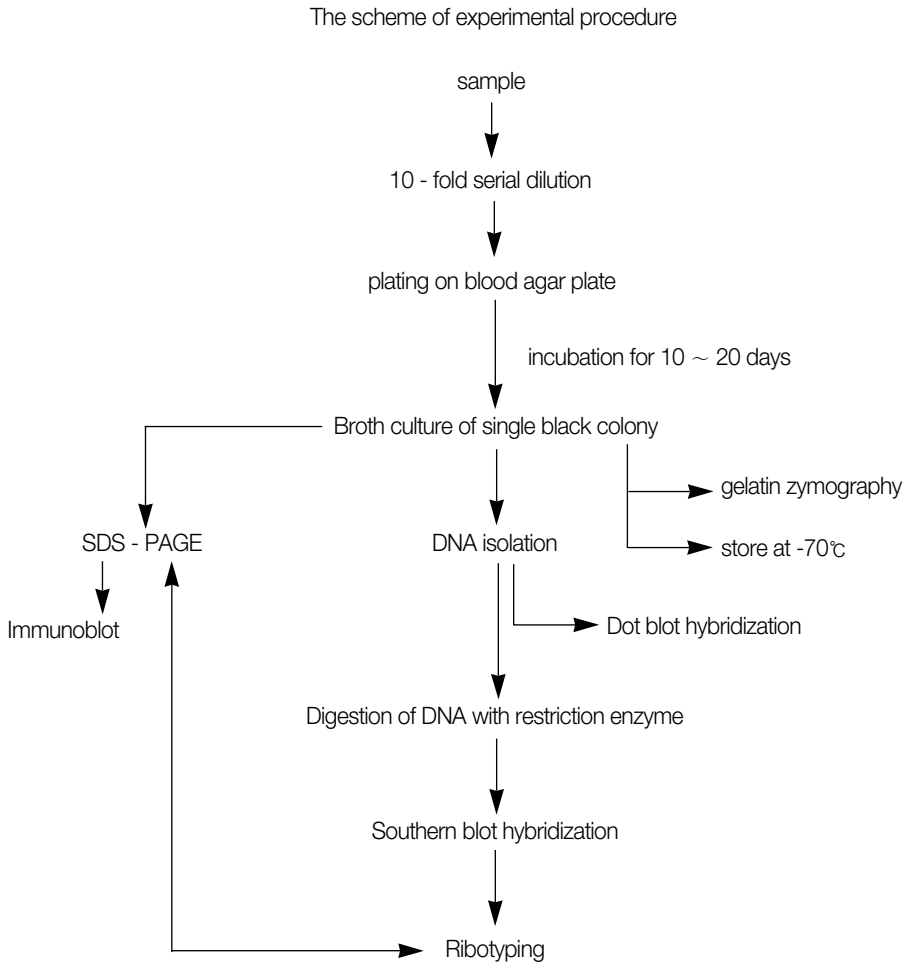
각 ribotype에 속하는 대표균주의 단백질 성상을 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 먼저 세균배양액을 원침(13,000g, 10분)시킨 후 균침전물에 시료완충용액(50mM Tris-HCl, pH 6.8, 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)을 섞어 95℃에서 5분간 가열한 뒤 10%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Gel을 0.25% Coomassie brilliant blue R250으로 염색하고 탈염색액(isopropyl alcohol/ glacial acetic acid)으로 탈색하여 단백질 성상을 관찰하였다.

(7) Immunoblot

각 ribotype에 속하는 대표균주의 fimbriae 표현형을 보기위해 fimbrillin에 대한 다클론항체를 사용하여 immunoblot을 수행하였다. 위에서와 같이 SDS-PAGE를 수행한 후 semidryer blotter를 사용하여 단백질을 니트로셀루로즈막에 이동시켰다. 이 막을 10% skim milk가 함유된 인산완충용액과 0.1% Tween 20의 혼합액으로으로 차단한 후 실험실 균주인 *P. gingivalis* strain 2561 anti-fimbrillin antibody (Ab)로 결합시켰다. 2차항체로 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 goat anti-rabbit IgG를 사용하였으며 ECL western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA)로 탐지했다.

(8) Gelatin zymography

*P. gingivalis*의 단백분해효소능을 확인하기 위해 gelatin을 기질로 사용한 zymography를 수행하였다. 균침전물을 용해완충용액으로 용해시킨 후 15㎕를 4㎕의 시료완충액(2.5% SDS, 3% sucrose, 0.005% bromophenol blue)과 섞은 뒤 0.2% gelatin을 함유한 SDS-polyacrylamide gel(8%)에서 전기영동하였다. Gel을 탈변성용액(2.5% Triton X-100과 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 30분간 2회 세척하여 SDS를 제거하였다. Gel을 37℃에서 효소반응용액(0.15 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)과 18시간 반응시킨 후 염색액 Coomassie Blue R-250(0.05%, isoprophyl alcohol: glacial acetic acid: dH_20 =1:1:8)으로 염색하고 isoprophyl alcohol: glacial acetic acid: dH_20(1:1:8)로 탈색하여 투명밴드로 나타나는 부분을 보았다.



III. 연구결과

1. P. gingivalis 균주의 동정 및 ribotype

급속 진행성 치주염 환자 10명으로 부터 총 36균주의 *P. gingivalis*를 배양분리하였다. *P. gingivalis* 균주는 혈액한천배지에서의 집락모양, 위상차 현미경상에서의 형태 및 16S rRNA를 탐지하는 특이 oligonucleotide 소식자를 사용한 보합결합을 통하여 동정하였다.

제한효소 *Kpn*I 및 *Pst*I으로 균주의 DNA를 절단한 후 균주의 동정에 사용했던 것과 같은 소식자로 보합결합하여 ribotype을 결정하였다. 두 제한효소를 사용하였을 때 *Kpn*I의 경우 6형이, *Pst*I의 경우는 7형이 확인되었으며(Figure 1), 배양분리균주의 ribotype은 참고균주로 사용한 ATCC 균주와는 다른 형을 나타내었다. *Kpn*I으로 절단했을 때 환자 10명중 5명이 I형을 나타났으며 2명이 II형, 그리고 나머지 환자는 각각 다른 형을 나타내었다. *Kpn*I을 사용했을 때 I형을 나타낸 균주는 *Pst*I을 사용했을 경우 3가지 형(e, f 및 g)을 나타내어 subgroup까지 총 8가지의 ribotype이 확인되었다. Ribotype I/e가 가장 많이 확인되었다.

같은 환자에서 분리한 균주는 두 환자를 제외하고는 모두 같은 형을 나타내었으며 두 환자(no 5, no7)에서 분리한 균주는 각각 2가지 형의 ribotype을 나

Table 1. *Porphyromonas gingivalis* isolates from rapidly progressive periodontitis patients and ribotypes

Patient no.(ID)	Sex & Age	No. of isolates (Designation of isolates)	Ribotype	
			*Kpn*I	*Pst*I
1(2-46)	female 28	1(A1)	III	c
2(10-36)	male 36	8(B1-8)	I	e
3(14-16)	female 29	2(C1-2)	IV	c
4(15-21)	male 25	2(D1-2)	V	d
5(17-26)	male 26	1(E1)	I	f
		1(E2)	I	g
6(19-11)	female 22	4(F1-4)	I	e
7(21-11)	male 30	3(G1-3)	VI	a
		2(H1-2)	II	b
8(26-11)	male 30	8(I1-8)	II	b
9(4-43)	female 32	1(J1)	I	e
10(27-16)	female 31	3(K1-3)	I	e

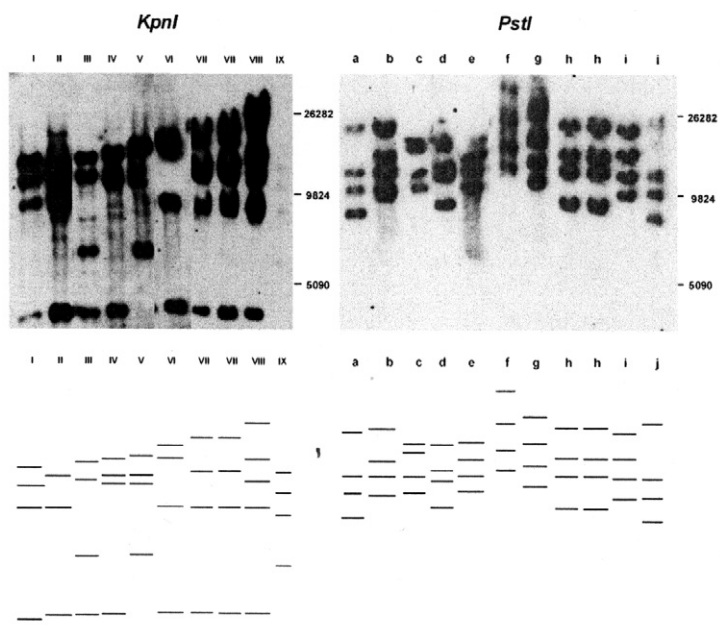


Figure 1. Ribotype patterns of representative *P. gingivalis* strains isolated from RPP patients and 4 reference strains. DNA of the isolates was digested with restriction enzymes *Kpn* I and *Pst* I, respectively and probed with a 16S rRNA-specific oligonucleotide probe for *P. gingivalis*. Reference strains of P. gingivalis were included: ATCC 33277(ribotype VII/h); strain 2561(ATCC 33277, ribotype VII/h); strain A7A1-28(ribotype VIII/i), strain W50(ATCC 53978, ribotype IX/j); MW: molecular weight standard(bp), *Mlu* I digest of lambda DNA

타내었다.

2. 단백질성상 비교

서로 다른 ribotype에 속하는 균주의 단백질성상을 SDS-PAGE로 비교하였다. 그림 2에서와 같이 40 kDa과 60 kDa 사이의 크기를 가진 단백질이 강하게 표현된 것을 볼 수 있으며 각각 다른 ribotype을 가진 균주의 단백질 성상에도 차이가 있음을 확인하였다. 또한 같은 ribotype에 속한 균주 G2와 B2도 서로 다

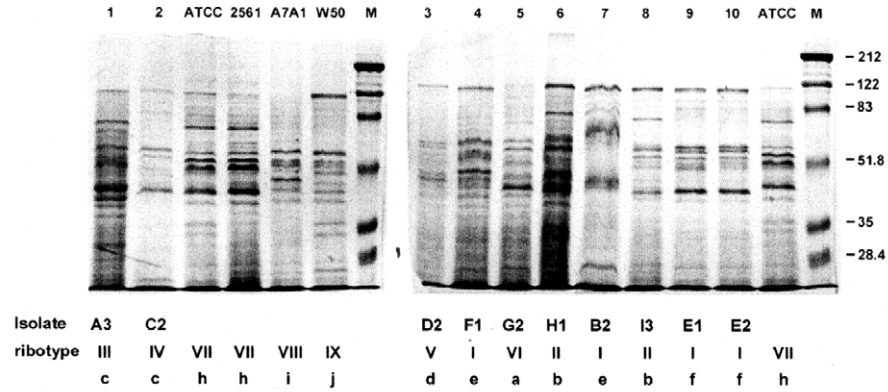


Figure 2. Coomassie blue-stained SDS-PAGE separation patterns of whole cell sonicates(10-20㎍) of representative *P. gingivalis isolates* using 10% polycarylamide gel. Reference strains of *P. gingivalis* were included: ATCC(ATCC 33277), 2561(ATCC 33277), A7A1-28, W50(ATCC 53978) M: molecular standard marker(kDa).

른 단백질성상을 나타내었다.

3. Fimbrillin의 이질성 분석

P. gingivalis 균주의 ribotype에 따른 fimbrillin형을 보기위해 대조균주로 선택한 균주중 *P. gingivalis* 2561의 fimbrillin(anti 2561 fimbrillin Ab)에 대한 다클론항체로 immunoblot을 시행하였다. 참고균주 ATCC 33277은 균주 2561과 같이 43 kDa의 fimbrillin 표현형을 나타내었으며, 균주 A7A1의 fimbrillin은 49 kDa이었고 균주 W50은 anti 2561 fimbrillin Ab와반응을 하지 않았으며 이는 다른 연구보고와 일치하였다. 급속 진행성 치주염 환자에서 배양분리된 균주의 fimbrillin 표현형은 41 kDa(lane 5, 6, 8, 9, 10), 43 kDa(lane 2, 7) 및 49 kD(lane 1, 3, 4)이었다. 같은 ribotype(ribotype I/e)을 가진 두 균주 F1과 B2의 fimbrillin은 각각 49 kDa과 43 kDa으로 fimbrillin 크기가 달랐다.

4. 단백분해효소능

Gelatin을 기질로 한 zymography에서 *P. gingivalis*

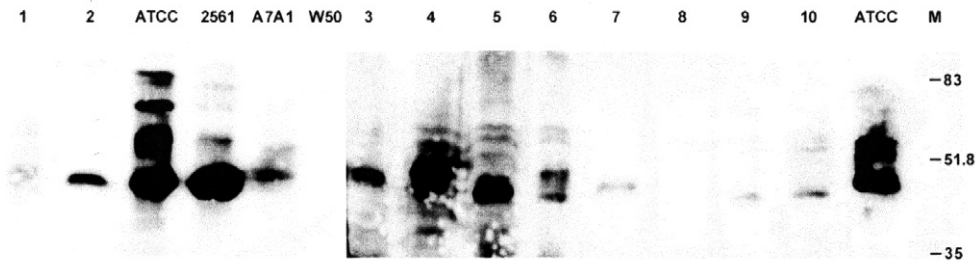


Figure 3. Immunoblot of whole cell sonicates of *P. gingivalis* isolates with polyclonal antibodies directed against fimbrillin of *P. gingivalis* 2561. After whole cell extracts(10-20㎍) of *P. gingivalis* isolates was separated on 10% SDS-PAGE, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti-fimbrillin polyclonal antibodies directed against P. gingivalis 2561. Goat anti-rabbit IgG labelled horseradish peroxidase(HRP) was used as the second antibody. Detection was performed using ECL immunodetection procedure. The same isolates were included as in Fig. 2. Reference strains of *P. gingivalis* were included: ATCC(ATCC 33277), 2561(ATCC 33277), A7A1-28, W50(ATCC 53978) M: molecular standard marker(kDa).

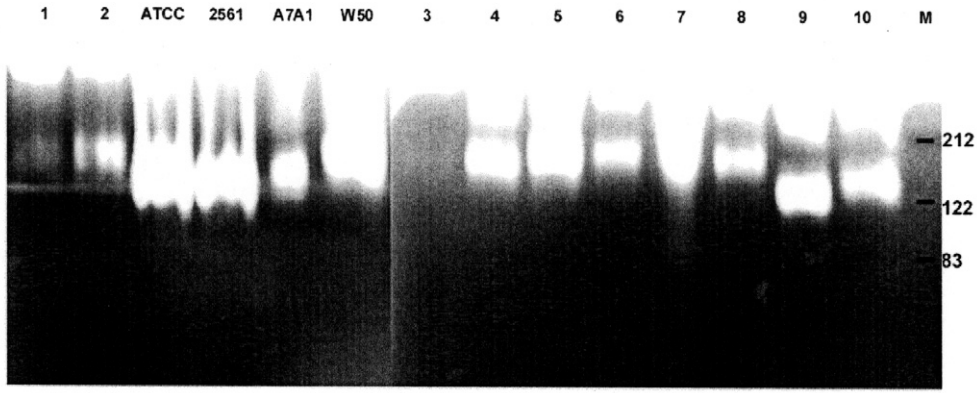


Figure 4. Zymograms of whole cell sonicates of *P. gingivalis* isolates. After whole cell extracts(10-20㎍) of *P. gingivalis* isolates was separated on 8% SDS-PAGE, the gels were washed and incubated in enzyme reaction buffer for 18 h at 37℃ and stained with Coomassie blue and destained. Reference strains of *P. gingivalis* were included: ATCC(ATCC 33277), 2561(ATCC 33277), A7A1-28, W50(ATCC 53978). M: molecular standard marker(kDa).

균주는 모두 강한 단백분해효소능을 나타내었으며 120 kDa과 200 kDa 사이의 크기를 가진 단백분해효소와 200 kDa 이상의 크기를 가진 단백분해효소를 관찰할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

치주질환의 원인균 중 *P. gingivalis*는 매우 다양한 독성인자를 보유하고 있으며 이로 인해 *P. gingivalis*가 많이 분포하는 부위에서는 치조골의 심한 파괴를 보이는 매우 진행된 치주염 양상을 보이고 있다[9,45-47]. 따라서 이 균의 감염을 억제하거나 적절한 술식을 통해 균 수를 감소시키면 치주질환의 예방과 치료에 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

치주질환의 주원인균인 *P. gingivalis*에 대한 역학적 연구가 인종, 문화적, 경제적인 차이가 있고 지리적 위치가 다른 인구집단에서 많이 이루어졌는데 각 인구집단의 치주질환 환자로부터 검출된 *P. gingivalis*는 모두 유사한 분포도를 보였다. Ali 등은 노르웨이와 수단의 성인 성치주염 환자에게서 추출한 *P. gingivalis, Prevotella intermedia, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum* 및 *Capnocytophaga* 등 세균을 배양하고, DNA탐침자로 분석한 결과 두 인구집단에 있어 서구의 성인 치주염 환자에게서 보이는 수치와 유사한 분포도를 보였다[24]. 또한 루마니아인 성인 치주염 환자의 *P. gingivalis*를 비롯한 6종의 병원성 세균을 기존의 배양방법을 통해 분포도를 조사한 결과 노르웨이 등 서구 치주염 환자에게서 보이는 것과 유사한 분포도를 보였다[25].

그러나 *P. gingivalis*는 형질적 및 유전적으로 매우 다양하며, *P. gingivalis* 각 균주마다 병원성에도 차이가 있다고 보고되었다. 많은 연구를 통해 동일한 *P. gingivalis* 균종이라 할 지라도 각 균주들 사이에는 매우 다양한 병원성을 보이고 있고 병원성이 없는 *P. gingivalis* 균주도 존재한다고 보고되었다[26,48-52].

균주의 동정은 전통적인 효소반응이나 당분해 능력을 분석하여 이루어지나 최근에는 유전자 소식자로 정확한 동정이 가능하게 되었다. *P. gingivalis*와 같이 형질적으로 다양한 균주에서는 정확한 동정이 매우 중요하다. 본 연구에서는 한국인의 급속 진행성 치주염 환자로부터 배양, 분리된 *P. gingivalis* 균주를 최종적으로 성인성 치주염 환자로부터 병원성 세균의 분포도에 대한 분자적 역학조사에서 사용된 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드소식자를 사용하여 동정하였다.

P. gingivalis 균주의 유전형을 구분할 수 있는 제한효소분석법, multilocus enzyme electrophoresis,

ribotyping 같은 기술이 개발되어 지리적으로 다른 위치의 치주염 환자로부터 채취한 *P. gingivalis* 균주들의 동정 및 구분과 *P. gingivalis*의 역학적 연구에 크게 기여하게 되었다.

1997년 Ali 등은 미국, 아프리카, 유럽의 치주염 환자로부터 *P. gingivalis 198균주*를 배양분리, ribotyping 하여 총 32종류의 ribotype을 발견하였다[53]. 1993년 Loos 등이 11개국에 분포한 치주염,치근단감염 등의 질환자로부터 검출한 *P. gingivalis* 88균주를 multilocus electrophoresis방법을 통해 68개의 유전형을 발견한 연구와 비교하면 유전적 이질성이 비교적 작다고 볼 수 있다[39].

본 연구에서는 10명의 급속 진행성 치주염 환자에게서 36균주를 검출하여 8가지의 ribotype을 발견하였는데 같은 환자에게서 분리한 균주는 두 환자를 제외하고는 모두 같은 형을 나타내었고 두 환자는 두가지형의 ribotype을 나타내었다. 반면 1992년 Socransky 등의 연구에 의하면 6명의 환자에게서 *P. gingivalis* 25균주를 채취하여 ribotyping한 결과 개인마다 ribotype은 모두 달랐고 같은 환자에서 채취한 균주들의 ribotype은 동일하여 한 개인이 두 가지의 ribotype을 보유한 경우는 없었다고 보고하였다[54]. Ali 등의 연구에서는 52명 중 3명이 2개의 ribotype을 나타내었고[53] 1993년 Van Steenbergen 등의 연구에서는 배우자 8쌍 중 1 쌍이[41], 1993년 Saarela 등의 연구에서는 9명 중 1명이 개인당 2개의 유전형을 가졌다고 보고하였다[55]. 이것은 소수의 치주염 환자에게서는 개인당 한 개이상의 ribotype을 가질 수 있다는 가능성을 시사한다. 이 결과를 근거로 1개 이상의 유전형이 Clonal turnover가 발생하기전 우세한 Clone이 다른 Clone으로 대체되는 이행기에 한 개인에게서 공존할 수 있음을 추측할 수 있다.

본 연구에서 *Kpn*I을 사용했을 때 I형을 나타낸 균주는 *Pst*I을 사용했을 경우 3가지 형(e , f 및 g)을 나타내었는데 이는 한 가지 제한효소를 사용하였을 때 한 가지의 ribotype을 보이는 균주들이 다른 효소 사용시에는 몇가지의 subgroup을 보인 Ali 등의 결과와 유사하다.

본 연구에서 10명중 4명이 동일한 ribotype I /e형을 보여 40%가 같은 형의 ribotype을 보유하고 있음이 나타났다. 이것은 Ali 등[53]의 연구에서 52명 중 11.5%가 동일한 ribotype을 가졌다는 결과와 차이를 보인다. 이 연구에서 11.5%를 보인 ribotype 7/a가 본 연구에서 가장 많은 빈도수를 차지한 ribotype I/e 형과 동일한 형태인지는 확인되지 않았다. 그러나 Ali 등의 연구에서 나타난 32형의 ribotype과 본 연구의 8형의 ribotype은 전혀 다른 형태가 아님을 발견할 수 있었다. 두 연구에서 동일하게 사용한 참고균주 ATCC33277과 W50의 ribotype band모양과 위치 관계를 고려했을 때, 제한효소 *Kpn*I 사용시 본 연구의 ribotype중 반 수 이상이 Ali 등의 32형의 ribotype과 유사했다.

본 연구에서는 *또한 P. gingivalis* 균주의 ribotype에 따른 fimbrillin형을 보기위하여 대조균주로 선택한 균주중 *P. gingivalis* 2561의 fimbrillin에 대한 다클론항체로 immunoblot을 수행하였다. *P. gingivalis*가 집락을 형성하는 초기에 치아나 구강상피 표면에 부착하는데 관여하는[56-58] fimbriae는 다양한 균주의 *P. gingivalis*에 대한 미세구조연구로 실제로 그와 같은 구조가 존재함이 밝혀졌다[59-62]. 이 fimbriae는 매우 여러 가지 생물학적 기능을 갖고있는데 항원성을 보유하고, 다양한 숙주단백질에 결합하며 cytokine형성을 유발하고 골흡수를 촉진시키는 역할을 한다. 최근에 *P. gingivalis* 381로부터 fimbriae가 순수분리되었는데 이 균주의 fimbriae는 fimbrillin 단량체가 반복적으로 배열된 중합체라는 것을 발견하였고 이것의 분자질량은 43 kDa이 된다고 밝혀졌다. 1991년 이 등은 여러 *P. gingivalis* 균주로부터 fimbrillin의 크기와 아미노산배열 및 항원적 다양성에 따라 다양한 fimbrillin을 비교하였는데, 분자질량은 40.5에서 49 kDa의 분포를 이루었고 아미노산의 배열에 따라 4가지 type으로 분류되었다[23]. 본 연구에서는 41 kDa, 43 kDa, 및 49 kDa크기의 fimbrillin을 확인하여 이 등이 관찰한 fimbrillin의 크기 범주에 속하였음을 확인하였다. 그러나 ribotype과 관련된 fimbrillin크기의 연관성은 발견되지 않았다.

Gelatin을 기질로 사용한 zymography를 이용하여 *P. gingivalis*의 단백분해효소능을 알아보았다. *P.*

*gingivalis*의 단백분해효소인 protease의 활성도와 치주조직파괴는 밀접한 관련이 있다고 보고되었는데[13,63] 이 protease는 숙주내에서 혈관침투, 혈액응고, 혈소판 응집, cytokine 조절, 항체변성 및 matrix metalloproteinase의 활성화 등에 관여하며 *P. gingivalis* 균주 특유의 단백분해성을 나타내주는 효소로 인식되었다[64]. 본 실험 결과 *P. gingivalis* 균주는 모두 강한 단백분해효소능을 나타내었고 다양한 크기의 단백분해효소를 관찰할 수 있었지만 ribotype간의 차이와 어떤 특이한 관계는 발견할 수 없었다.

이번 실험에서 10명의 급속 진행성 치주염 환자로부터 배양분리한 *P. gingivalis*균주를 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자로 ribotyping한 결과 가장 많이 보유한 ribotype은 I/e형으로서 환자의 40%를 차지하였고 또한 한 개인이 2개의 ribotype을 보유할 수 있음을 확인할 수 있었다. 앞으로 성인성 치주염에서의 *P. gingivalis* ribotyping에 대한 연구도 필요하다고 생각되는데 급속 진행성 치주염에서의 ribotype과 차이를 발견한다면 이 ribotyping이란 방법이 치주염의 또 하나의 정확한 진단도구로 사용될 수 있으리라 사료된다.

V. 결론

한국인의 급속 진행성 치주염 환자에게 존재하는 *P. gingivalis*의 ribotype을 알아보기위하여 환자로부터 *P. gingivalis*를 배양, 분리하여 ribotype을 결정하고 fimbrillin 발현 및 단백분해 활성도를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제한효소 *Kpn* I 및 *Pst* I을 사용하여 *P. gingivalis*를 ribotyping 한 결과 각각 6형과 7형의 다른 ribotype이 확인되었다. *Kpn* I 사용시 나타난 ribotype을 기준형으로 정하고 *Pst* I 사용시 세분된 형을 합하여 총 8형의 ribotype을 관찰할 수 있었다.
2. Ribotype I/e형이 가장 빈도수가 높았다.
3. 단백질 성상과 ribotype의 연관성은 발견되지 않았다.
4. 배양분리된 *P. gingivalis* 균주에서 발현된 fimbrillin은 41KDa, 43KDa, 49KDa의 크기를 보였다.
5. *P. gingivalis* 균주는 모두 강한 단백분해 효소능을 나타내었으며 고분자로서 120KDa이상의 크기였다.

이상의 결론에서 10명의 급속 진행성 치주염 환자로 부터 배양분리한 *P. gingivalis*균주를 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자로 ribotyping한 결과 가장 많이 보유한 ribotype은 I/e형으로서 환자의 40%를 차지하였고 또한 한 개인이 2개의 ribotype을 보유할 수있음을 확인할 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Moore W.E.C. and Moore L.V.H. : The bacteria of periodontal diseases, Periodontol. 2000, 5: 66-77, 1994.
2. Holt S.C. and Bramanti T. : Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis, Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2: 77-81, 1991.
3. Slots J. and Genco R.J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and Actinobacillus *actinomycetemcomitans* in human periodontal disease virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction, J. Dent. Res., 63:412-421, 1984.
4. Dahlén G. : Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6:181-192, 1993.
5. Haffajee A.D. and Socransky S.S. : Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases, In: Socransky S.S. and Haffajee A.D. ed. Microbiology and immunology of periodontal disease. Periodontol. 2000., 5:74-111, 1994.
6. Loesche W.J., Syed S.A., Schmidt E. and Morrison E.C. : Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis, J. periodontol., 56: 447-

56, 1985.

7. Slots J. : Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work, J. Clin. Periodontol., 13:570-7, 1986.
8. Sundqvist G. : Pathology and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6:125-138, 1993.
9. Tanner A.C.R., Socransky S.S. and Goodson J.M. : Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone, J. Periodont. Res., 19:279-291, 1984.
10. Holt S.C., Kesavalu L. walker S. and Genco C.A.: Virulence factors of *porphyromonas gingivalis,* Periodontol.2000, 20:168-238, 1999.
11. Mayrand D. and Holt S.C. : Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteriodes* species, Microbiol. Rev., 52: 134-152, 1988.
12. Shah H.N. : Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. Ann Arbor. MI: CRC Press., 1993.
13. Kuramitsu H. K. : Protease of *Porphyromonas gingivalis* : what don't they do?, Oral Microbiol. Immunol.. : 13: 263-270, 1998.
14. Lewis J.p. and Macrina F.L. : IS/95, an insertion sequence-like element associated with protease genes in *Porphyromonas gingivalis*, Infect. Immun., 3035-3042, 1998.
15. Beachey, E. H. : Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces, J. Infect. Dis. 143:325-345, 1981.
16. Gibbons R. J. : Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J. Dent. Res., 63:378-385, 1984.
17. Gibbons, R. J., and van Houte : Bacterial adherence and the formation of dental plaques, P. 61-104. *In* E. H. Beachey(ed.), Bacterial adherence: receptors and recognition, series B, vol. 6. Chapman & Hall, London, 1980.
18. Hamada S., Fujiwara T., Morishima S., et al. : Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *porphyromonas gingivalis,* Microbiol. Immunol., 38:921-930, 1994.
19. Jones G. W. : The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells, P. 139-176. In J. L. Ressig.(ed.), Microbial interactions: receptors and recognition, series B, vol. 3. Chapman & Hall, Ltd., London, 1977.
20. Ofek I. and Beachey E. H. : General concepts and principles of bacterial adherence in animal and man, P. 1-29. *In* E. H. Beachey(ed.), Bacterial adherence: receptors and recognition, series B, vol. 6. Chapman & Hall, Ltd., London, 1980.
21. Gaastra W., and de Graaf. F. K. : Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46:129-161. 1982.
22. Germanier R. :(ed.) Bacterial vaccines. Academic Press Inc., New York, 1984.
23. Lee J. Y., Sojar H. T., Bedi G. S. and Genco R. J : *Porphyromonas*(*Bacteroides) gingivalis* Fimbrillin : size, amino terminal sequence, and antigenic Heterogeneity, Infect. Immun. Jan : 383-389, 1991.
24. Ali R.W., Bakken V., Nilsen R. and Skaug N. : Comparative detection freqency of six putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients, J. Periodontol., 65:1046-1052, 1994.
25. Ali R.W., Velcescu C., Jivanescu M., Lofthus B. and Skaung N. : Prevalence of six putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples in Romanian adult periodontitis patients, J. Clin. Periodontol., 23:133-139, 1996.
26. Dahlén G., Manji F., Baelum V. and Fejerskov O. : Black-pigmented *Bacteroides* species and

Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival plaque of adult Kenyans, J. Clin. Periodontol., 26:305-310, 1989.

27. Moore W.E.C., Holdeman L.V., Cato E.P., Smibert R.M., Burmeister J.A. and Ranney R.R. : Bacteriology of moderate(chronic) periodontitis in mature adult humans, Infect. Immun., 42: 510-515. 1983.
28. Slots J., Rams T.E., Feik D., Taveras H.D. and Gillespie M. : Subgingival microflora of advanced periodontits in the Dominican Republic, J. Periodontol., 62:543-547, 1991.
29. Tanner A.C.R., Haffer C., Bratthall G.T., Visconti R.A. and Socransky S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man, J. Clin. Periodontol., 6:278-307, 1979.
30. Laliberté M. and Mayrand D. : Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals, J. Appl. Microbiol., 55:247-252, 1983.
31. Nagata A., Man-yoshi T., Sato M. and Nakamura R. : Serological of *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* and correlation with enzyme activity, J. Periodont. Res., 26: 184-190, 1991.
32. Notten F.J.W., Nieman F.H.M. and Mikx F.H.M. : Antibiotypes of *Bacteroides gingivalis* assessed by antimicrobial disks and multivariate analysis, J. Clin. Microbiol., 22: 1020-1024, 1985.
33. Kinder S. A., Korman K.S. and Holt S.C. : Characterization of serected gram-negative oral microorganisms by SDS-PAGE, Oral. Microbiol. Immunol., 4:52-57, 1989.
34. Laemmli U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227:680-685. 1970 .
35. Madianos P.N., Papapunou P.N., Socransky S.S., Dahlén G. and Sandros J. : Host -related genotypic heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the beagle dog, Oral Microbiol. Immunol., 9: 241-247, 1994.
36. Teanpaisan R., Douglas C.W.I., Eley A.R. and Walsh T.F. : Clonality of *Pophyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites, J. Periodont. Res., 31:423-432, 1996.
37. Zhang Y.J., Yasui S., Yoshimura F. and Ishikawa I. : Multiple restriction fragment length polymorphism genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in single periodontal pocks, Oral Microbiol. Immunol., 10:12-128, 1995.
38. Loos B. G. and Dyer D. W. : Restriction fragment length polymorphism analysis of the fimbrillin locus, *fimA*, of *Porphyromonas gingivalis,* J. Dent. Res., 71: 1173-1181, 1992.
39. Loos B. G., Dyer D. W., Whittam T. S. and Selander R. K. : Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections, Infect. Immun., 61: 204-212, 1993.
40. Loos B. G., Mayrand D., Genco R. J. and Dickinson D. P. : Genetic heterogeneity of *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* by genomic DNA fingerprinting [published erratum appears in J Dent Res 1990 Sep : 69(9) : following 1323]. J. Dent. Res., 69: 1488-1493, 1990.
41. Van Steenbergen T.J.M., Petit M.D.A., Scholte L.H.M., van der Velden U. and de Graaff J. : Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses, J. Clin. Periodontol., 20:340-345, 1993.
42. Sims T.J., Ali R.W., Brockman E.S., Skaug N. and Page R.C. : Antigenic variation in *Porphyromanas gingivalis* ribotypes recognized by serum immunoglobulin G of adult periodontitis patients, Oral Microbiol. Immunol., 14:73-85, 1999.
43. Syed S.A. and Loesche W.J. : Survival of human

dental plaque flora in various transport media, Appl.Microbiol., 24:638-644, 1972.

44. 박성희, 김소영, 최성호, 채중규, 김종관, 조규성 : 한구인 성인성 치주염 환자에서 16S rRNA 분석을 이용한 치은연하치태 세균 분포도 조사, 대한치주과학회지, 28: 691-701,1998.

45. Rodenburg J.P., van Winkelhoff A.J., Winkel E.G., Goene R.J., Abbas F. and Graaff J. : Occurrence of *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius,* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history, J. Clin Periodontol., 17:392-399, 1990.

46. Van Steenbergen T.J.M., van Winkelhoff A.J. and de Graff J.: Black-pigmented oral anaerobic rods: classification and role in periodontal disease, In Hamada S, Holt S.R.(ed), Periodontal diseases: pathogens and host immune responses, Quintessence Publishing Company,Ltd., Tokyo, p41-52, 1991.

47. Van Winkelhoff A.J., Van der Velden U., Clement M. and de Graaff J.: Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides* species in periodontal patients, Oral Microbiol. Immunol., 3:83-85, 1988.

48. Grenier D. and Mayrand D. : Selected characteristics of pathogenic and non-pathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*, J. Clin. Microbiol., 25:738-740, 1987.

49. Mckee A.S., Mcdermid A.S., Wait R., Baskerville A. and Marsh P.D.: Isolation of colonial variance of *Bacteroides gingivalis* W50 with a reduced virulence, J. Med. Microbiol., 27: 59-64, 1989.

50. Neiders M.E., Chen P.B., Suido H. Reynolos H.S. and Zambon J.J. : Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*, J. Periodont. Res., 24: 192-198, 1989.

51. Sundqvist G., Figdor D., Hanstrom L., Sorlin S. and Sandstrom G. : Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingvivalis,* Scand. J. Dent. Res., 99:117-129, 1991.

52. Van Steenbergen T.J.M., Delemarre F. G. A., Namavar F. and de Graaff J. : Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. Antonie Van Leeuwenhoek, 53:233-244, 1987.

53. Ali R.W., Martin L., Haffajee A.D. and Socransky S. S. : Detection of identical ribotypes of *porphyromonas gingivalis* in patients residing in the United States, Sudan, Romania and Norway, Oral Microbiol. Immunol., 12:106-111, 1997.

54. Socransky S. S. and Martin L. : Ribotyping of *Porphyromonas Gingivalis* and *Campylobactor rectus*. J. Dent. Res., 71:246, 1127, 1992.

55. Saarela M., Von Troil- Linden B., Torkko H. et al. : Transmission of oral bacterial species between spouses, Oral. Microbiol. Immunol., 8:349-354, 1993.

56. Hamada S. Amano A., Kimura S., Nakagawa I. Kawabata S. and Morisaki I. : The importance of fimbriae in the virulence and etilogy of some oral bacteria, Oral Microbiol. Immunol., 13:129-138, 1998.

57. Malek R., Fisher J.G., Caleca A., Stinson M., Vanos C.J. Lee J.Y., Cho M. I., Genco R.J., Evans R.T. and Dyer D.W.: Inactivation of the *porphyromonas gingivalis* fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. J. Bacteriol., 176: 1052-1059, 1994.

58. Okuda K. : Attachment mechanisms and colonization, IN shah H.N. Mayrand D. and Genco R.J.(ed), Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. C.R.C. Press, Inc., Boca Ration, Fla., P. 139-158, 1993.

59. Okuda K. and Takazoe I. : Haemagglutinating activity of *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol., 19: 415-416, 1974.

60. Okuda K., Slots J. and Genco R. J. : Bacteroides gingivalis, Bacteroides *asaccharolyticus*, and

Bacteroides melaninogenicus subspecies: cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells, Curr. Microbiol., 6: 7-12, 1981.

61. Slots J., and Gibbons R.J. : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus subsp. asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and periodontal pockets. Infect. Immun., 19;254-264, 1978.
62. Woo, D. D. L., Holt S. C. and Leadbetter E. R. : Ultrasturcture of *Bacteroides* species: *Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus subspecies intermedius*. J. Ingect. Dis., 139:534-546, 1979.
63. Potempa J., Pike R. and Travis J. : Host and *Porphyromonas gingivalis* proteinases in periodontitis : a biochemical model of infection and tissue destruction, Perspect Drug. Discovery Design, 2:445-458, 1995.
64. Slots J. : Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the A.P.I. Z.Y.M. system, J. Clin Microgiol. 14: 288-294, 1981.

-Abstract-

Ribotyping of *Porphyromonas Gingivalis* Isolated from Rapidly Progressive Periodontitis Patients

Jin-Hong Kim[1], Bong-Kyu Choi[2], Seong-Ho Choi[1], Kyoo-Sung Cho[1], Jung-Kiu Chai[1], Chong-Kwan Kim[1]
Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration[1] and Oral Biology[2],
College of Dentistry, Yonsei University

This study examined ribotypes of 36 *P. gingivalis* strains isolated from 10 rapidly progressive periodontitis patients in Korean and revealed the presence of genetic heterogeneity among the patients. Ribotyping was performed by using a oligonucleotide probes based on 16S rRNA after whole genomic DNA had been digested with the restriction endonuclease enzyme *Kpn* I and *Pst* I. In addition, the antigenic heterogeneity of fimbrillin and protease activity was analysed to observe the virulency of *P. gingivalis*. The results were as follows.

1. Using *Kpn*I, 6 ribotypes were detected, whereas 7 ribotypes were identified by using *Pst*I. When combined two enzymes, a total of 8 ribotypes was subgrouped.
2. Ribotype I /e was the most common and detected in 4 among 10 patients.
3. The fimbrillin expressed from *P. gingivalis* isolates had the molecular size of 41kDa, 43kDa, 49kDa. It was observed that the size of fimbrillin with the same ribotypes could be identical.
4. All the P. gingivalis strains showed strong proteolytic activity and had the molecular size more than 120kDa.

In summary, total 8 ribotypes were observed for isolates from rapidly progressive periodontitis patients. Forty percent of the patients harbored isolates exhibiting the same ribotype I /e, and it was observed that more than one ribotype can coexist in an individual patient.