

人間 唾液內 抗 磷酸칼슘 沈澱 蛋白質

강릉대학교 치과대학 구강생화학 교실

한 송

目 次

I. 序 論

II. 本 論

A. 人體 唾液 Statherin (Human Salivary Statherin)

1. 分離와 精製 및 構造

2. 生物學的 機能

B. Proline-Rich Protein

1. 分離와 精製 및 構造

2. PRP의 二次的 沈澱 沮害 기전

3. 生物學的 側面

C. 唾液 Histidine-Rich Protein.

1. 分離와 精製 및 構造

2. 生物學的 機能

參考文獻

英文草綠

I. 序 論

이 논문의 목적은 calcium phosphate의 자발적 침전 및 이차적 침전을 저해하는 특이한 성질을 가지고 있는, 타액내 수종의 단백질의 생화학적 및 생물학적 기능을 서술하는데 있다. 이러한 기능은 인간의 타액이 calcium phosphate에 대해 과포화 되어 있다는 것을 고려해 볼 때 매우 중요하다. Statherin, proline rich protein (PRP) 및 histidine rich protein (HRP)의 생물학적 기능은 타액선과 구강 분비액 및 치아면에서

calcium phosphate의 침전을 방해하는데 있다. 이러한 단백질에 의해 유지되는 타액내 과포화 상태는 치아에 대한 보호 작용과 회복 작용을 가능하게 하여 치아의 완전성 유지에 관계한다. Calcium phosphate에 대한 타액의 과포화 상태로 인해서 유래 되는 법랑질에 대한 보호 작용과 같은 장점은 구강내에서 선택적으로 나타나는 반면 타액선과 치아면에 calcium phosphate의 침전과 같은 바람직하지 못한 결과는 일어나지 않는다. 이러한 단백질의 정제 및 구조적 특성과 함께 기능의 임상적 중요성을 각각 논의 하고자 한다.

II. 本 論

A. 人體 唾液 Statherin (Human Salivary Statherin)

1. 分離와 精製 및 構造

耳下腺 唾液과 顎下腺 唾液에서 모두 관찰되는 statherin은 ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography 및 preparative electrophoresis을 사용하여 이하선 타액에서 분리되었으며¹⁾, 후에 anion exchange chromatography를 이용한 좀 더 단순화된 방법²⁾이 소개되었다. 순수 정제된 물질을 분석해보면 표 1과 같이 산성 amino acids, tyrosine, proline을 많이 포함하고 있고 등전점(isoelectric point)은 4.2이며, 한 분자당 2개의 phosphate 를 가지고 있고

Table 1
 AMINO ACID COMPOSITION OF HUMAN
 SALIVARY STATHERIN(Residues/minimum mol wt)

Arg	3
Asp	1
Glu	10
Gly	4
Ile	1
Leu	2
Lys	1
Phe	3
Pro	7
Ser	2
Thr	1
Tyr	7
Val	1
Phosphate	2

*Adapted from "Statherin and the Acidic Proline-Rich Proteins" by Donald I. Hay and Edgard C. Moreno in "Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology Vol I" edited by Jorma O. Tenovuo, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. 1989 and Hay, D. I. Arch. Oral Biol., 18 : 1531, 1973.

amino acid 서열에 근거하여 계산한 최소 분자량은 5380이다.

Statherin의 amino acid 서열²⁾에서 알 수 있는 바와 같이, statherin은 많은 전하를 띄고 있으며 구조적으로 비대칭적인 형태를 취하고 있다. 12개의 전하를 띤 amino acids 중 10개가 amino-terminus로부터 13번째 내에 위치하고 있으며, 특히하게도 음전하를 띄고 있는 5개의 amino acid가 amino-terminus에 모여 있다. 모든 tyrosine, proline, glutamine은 carboxy-terminal 2/3

내에 있으며 이 부분의 약 75%를 구성하고 있다 (그림 1).

2. 生物學的 機能

Statherin이 calcium phosphate 염의 沈澱(precipitation)을 방해하는 강력한 저해 작용을 가지고 있지만, 타액내에서의 역할을 제대로 이해하기 위해서는 1: 정상적인 타액내 인산칼슘(calcium phosphate)의 포화(saturation) 상태, 2: statherin의 특정 저해 작용, 3: 타액내 정상 농도^{3,4)} 등에 관한 정보가 필요하다. 타액과 같은 과포화(supersaturation)된 물질에서 calcium phosphate의 침전을 방해할 정도로 statherin이 높은 활성을 지니고, 고농도로 존재하기 위해서는 위의 세 요소 사이의 관계가 매우 중요하다.

Statherin은 唾液內의 정상적인 농도 정도에서, 타액과 유사하게 과포화 상태로 만든 *in vitro* 상태의 용액 내의 calcium phosphate 염의 침전을 저해하는 독특한 기능을 가지고 있다. 이러한 소견은 침전 저해 작용이 statherin의 실제 생화학적 기능임을 암시해 주며 statherin이 없을 경우 타액선내에서 calcium phosphate 염의 침전이 일어날 가능성을 나타내 준다.

몇 연구 결과로부터 인간의 타액이 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)에 관해 과포화되어 있을 수 있다는 것을 알 수 있으며 이로 인해 자발적인 침전이 선포액(acinar fluid) 내에서도 자극 상태에서 분비되는 타액 내에서 항상 일어날 수 있음을 알 수 있다. 만약 침전이 일어나면 타액선 선포와 도관에 유해 작용이 일어날 수 있으며, 타액이 과포화 상태를 상실함으로 인해 치

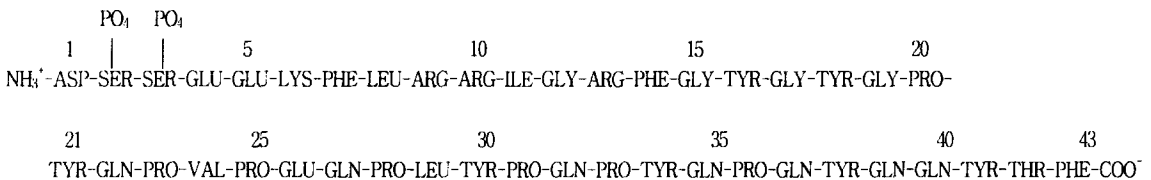


FIGURE 1. Covalent structure of statherin.

Adapted from J. Dent. Res., 62, 242, Abstr. 659, 1983

아에 대한 보호 작용을 할 수 없게 된다. 하지만 타액은 calcium phosphate 결정의 성장을 저해하는 물질을 가지고 있어 침전된 물질의 크기가 크게 되지는 못한다. 결과적으로 statherin이 없을 경우 미세 결정 침전물을 형성하게 되며, 고밀도의 침전물이나 타석과 같은 큰 침전물을 형성할 가능성은 적다. 오히려 치아에 대한 보호 작용 상실이 더 중요한 문제이며 이의 확인을 위해서는 statherin이 부족한 사람을 대상으로 한 연구가 필요하다.

Statherin의 唾液腺 內에서의 필요성은 명백해 보이지만 그 필요성이 어느 정도인지에 대해서는 명백하지 않다. 쉰 唾液(whole saliva) 내에서의 과포화 정도를 고려해 볼 때 구강 內에서의 statherin의 저해 작용은 바람직해 보인다. 하지만 전 타액 내에서 statherin은 구강 內 미생물의 단백 분해 효소에 의해 분해될 가능성이 있다. 하지만 그 분해물이나 분해가 일어나는데 필요한 타액의 잔류 시간에 대한 정보는 부족하다^{5,6)}. Statherin의 구강 內 작용을 이해하기 위해서는 위의 정보가 필수적이지만, statherin이 쉰 唾液 內에서 hydroxyapatite (HA)에 흡착(adsorption)된다는 사실을 간과할 수는 없다⁷⁾. 그러므로 statherin의 HA와 법랑질에 대한 선택적 흡착⁸⁾과 이로 인한 calcium phosphate 결정 성장 저해 효과를 무시할 수 없다. 즉, statherin은 자발적인 침전의 저해 작용제로서의 역할, 치아면에서 결정 성장 저해제로의 역할, enamel pellicle 형성시의 역할 모두에 관계된다.

B. Proline-Rich Protein(PRP)

Statherin의 calcium phosphate의 침전 저해 작용을 연구하는 과정⁹⁾에서 또 다른 물질이 관계 됨을 알게 되었다. PRP를 포함하고 있는 타액 분액(salivary fraction)이 이러한 효과를 나타내었는데, 침전 저해 효과는 관찰되지 않았지만 침전된 calcium phosphate의 양상이 다르며 침전이 대조군과 같은 정도로 진행되지 않았다. 일련의 실험¹⁰⁾을 거쳐 PRP가 calcium phosphate 결정 성장을 강력하게 저해하는 능력이

있다는 것을 알게 되었으나 4가지 주요 PRP의 활성에는 상당한 차이가 있음을 알게 되었다.

1. 分離와 精製 및 構造

Oppenheim¹¹⁾은 1971년 이하선 타액으로부터 PRP를 분리하여 그 특성을 보고 하였는데 PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4의 4가지 주요 단백질에 대해 기술하였으며 Bennick과 Connell¹²⁾은 Protein C (PRP-1)와 Protein A (PRP-3)에 대해 서술하였다. 그 후 8 개의 추가적인 PRP의 존재가 보고되었으며¹³⁾, PRP의 calcium 결합에 관한 연구 결과도 보고 되었다¹⁴⁻¹⁷⁾.

Schlesinger 등¹⁸⁾은 4개의 주요 PRP의 amino-terminus 부분의 서열을 보고하였고, Bennick 등은 PRP-3의 서열을 보고하였으며^{19,20)} 그 후 PRP-4²¹⁾, PRP-1²²⁾, PRP-2²³⁾의 구조가 보고되었다. 주요 PRP의 일반적 서열은 그림 2와 같다. 1984년 까지의 연구 결과에 따르면 4개의 단백질은 amino acid 서열 4번을 제외한 1부터 106까지 같은 서열을 하고 있다. PRP-1과 PRP-3의 경우 4번이 Asn이며 PRP-2와 PRP-4의 경우 Asp이다. PRP-1과 PRP-2는 좀 큰 단백질이며 107부터 150까지 같은 서열을 하고 있다.

PRP와 밀접하게 관련성이 있는 PIF(parotid isoelectric focusing variant)를 제외한 모든 PRP의 구조는 Maeda 등²⁴⁾에 의해 최근 확립되었다. Maeda 등은 PRP-1과 PRP-3에서 동형 접합성(homozygous)을 띤 사람을 대상으로 cDNA를 분리하여 염기 서열을 연구하였다. 연구결과에 따르면 PRP-1과 PRP-3는 같은 유전자에 의해 생성되며 PRP-3는 PRP-1의 Arg₁₀₆ - Gly₁₀₇ 부위의 번역 후 분리(posttranslational cleavage)에 의해 형성된다고 한다. 이는 인간의 이하선 타액 내에 107부터 150사이에서 유래된 부분이 존재한다는 사실²⁵⁾과 타액 kallikrein에 의해 Arg₁₀₆ - Gly₁₀₇ 에서 분리가 일어난다는 사실²⁶⁾에 의해 더욱 가능성이 인정 받고 있다. 이러한 가능성을 고려해 볼 때 PRP-2와 PRP-4의 구조적 관련성도 유사하리라 생각된다. PIF는 PRP-1의 4 번째와 50 번째 amino acid 배열이 뒤바뀐 구조를 하고

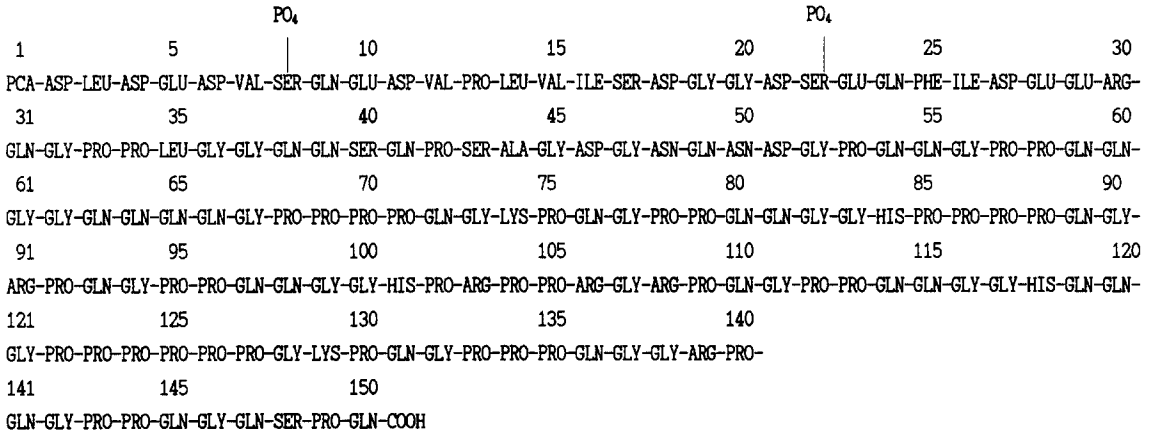


Figure 2. Covalent structure of a human proline-rich protein.
 Adapted from "Statherin and the Acidic Proline-Rich Proteins" by Donald I. Hay and Edgard C. Moreno in "Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology Vol 1" Edited by Jorma O. Tenovou, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. 1989 and references cited there.

있으며²⁴⁾ isoelectric focusing에 의해 구분이 가능하다²⁷⁾.

Statherin과 유사하게 PRP의 일차 구조는 비대칭적인 구조를 하고 있다. Amino-terminus로부터 50 번째 내에 대부분의 음 전하를 띤 구조가 있으며 나머지 부분은 중성 및 소수성 amino acid로 형성되어 있다. 이러한 구조적 특성은 PRP의 생물학적 기능을 이해하는데 매우 중요하다. PRP의 주요 생물학적 기능으로는 (1) hydroxyapatite 표면이나 범랑질 같은 calcium phosphate 표면에 대한 강력한 반응성, (2) calcium phosphate의 결정 성장을 저해하는 능력, (3) calcium 이온과 결합하는 능력을 들 수 있다. 그 외에 *in vitro*에서 세균을 hydroxyapatite 표면에 부착하도록 도와주는 능력이 있는데 만약 이러한 성질이 *in vivo*에서 입증된다면 치면상에 세균의 집락 형성을 이해하는데 도움이 될 것이다.

2. PRP의 二次的 沈澱 阻害 기전

이차적 침전(secondary precipitation)이라 불리는 결정 성장은 일차적 침전보다는 그 형성

과정이 잘 알려져 있다. 이차적 침전은 결정 표면에 이온이 일정하고 균등히 침착되는 것 보다는 틈새와 같은 특정 부분(specific growth site)에서 일어나는 것으로, 이와 같이 성장을 일으키는 특정 부분에 이물질(foreign compound)의 흡착이 일어나면 결정 성장이 일어나지 않는다²⁸⁾.

동일 타액 검체에 hydroxyapatite 양을 증가시킨 실험에서 가장 큰 선택적 흡착기능을 보인 단백질은 statherin이었으며⁸⁾ 다음으로는 histidine-rich acidic peptide²⁹⁾, PRP, 작은 염기성 단백질(small basic protein), 염기성 이하선 당단백질(basic parotid glycoprotein)^{30,31)} 순이었다³²⁾. 인체 타액에서 40 여종 이상의 단백질이 확인되었다는 것을 고려해 볼 때^{33,34)} 이러한 5 종류 단백질의 흡착 능력은 이 단백질이 hydroxyapatite와 반응하는 독특한 성질을 가지고 있다는 것을 의미한다. 이러한 단백질 중 statherin, PRP와 악하선 타액의 cysteine-rich protein³⁵⁾이 calcium phosphate의 침전 저해제로서 역할을 하는 것으로 확인되었다.

PRP의 calcium phosphate 결정 성장 저해 효과는 PRP의 hydroxyapatite에의 흡착과 밀접한 관련성이 있고³⁶⁻³⁸⁾ 정상 타액내의 PRP의 농도

는 결정 성장 저해에 필요한 양보다 훨씬 높으며, PRP의 한 부분(segment)이 이러한 저해 작용과 관련성이 있는 것으로 밝혀졌다³⁸⁾. 즉, 4가지 PRP를 tryptic digestion시킨 다음 anion exchange chromatography로 분리하면, 하나의 peak가 결정 성장 저해 작용과 관련성이 있다. 이 물질을 분리해 보면 phosphoserine을 함유한 amino-terminal tryptic peptide 임을 알 수 있다^{10,39)}. 이 부분으로부터 두 개의 phosphate group을 제거하면 저해 작용의 감소가 크게 일어나는 것으로 볼 때^{3,40)} phosphate group의 중요성을 알 수 있다. 또, 흡착시 분자의 입체 구조(configuration)에 변화가 일어나는데 이러한 변화는 이 물질의 여러 다른 생물학적 기능에 매우 중요한 역할을 한다^{41,42)}.

3. 生物學的 側面

PRP의 농도는 전신 건강 상태⁴³⁾나 연령⁴⁴⁾에 따른 큰 차이가 없으며 치태의 침착이나 치은 지수(gingival index)와 逆 相 關 關係를 보인다⁴⁵⁾. 이는 아마 구강 미생물에 의한 단백질의 파괴와 관련성이 있는 것 같다.

PRP가 구강 환경에 노출된 치아 표면에서 면역학적 방법을 사용하여 발견된다는 사실^{45,46)}은 치아 표면이 PRP의 작용 장소임을 암시해 준다. 어떤 연구에서는 발견된 치아 표면의 pellicle에서 PRP가 발견되었다는 보고⁴⁵⁾도 있으나 상반된 결과⁴⁶⁾도 보고되었다. 또, PRP의 amino-terminus로 부터 형성된 단분자층(monomolecular layer)으로도 calcium phosphate의 이차적 침전을 방해할 수 있으나 구강내에서 일정 시간이 지난 pellicle에서는 분해되어 검출되지 않을 수 있다⁴⁶⁾.

최근 PRP가 calcite의 침전을 저해하는 것으로 보고되었다⁴⁷⁾. 인간의 타액내의 calcite는 과포화 상태인 것으로 보고되었으므로⁴⁸⁾, calcite 침전의 저해가 인체 타액내에서 꼭 필요한 기능일 수 있다. 하지만 인체 타액내에서 존재하는 양보다 적은 농도의 무기 인산이 calcite의 침전을 방해하는 것으로 보아^{49,50)}, PRP와 statherin도 calcite

침전을 방해하는 요소이지만^{47,48)} phosphate에 비해 그 정도는 그리 크지 않은 것 같다.

PRP의 주요 기능이 치아 표면에 calcium phosphate 결정 성장 저해제로서의 역할이지만 PRP-1과 PRP-2의 4/5와 PRP-3과 PRP-4의 2/3 부분은 어떤 기능을 하는 지 명확하지 않다. 또, statherin과는 다르게 여러 유전적 다형질(genetic polymorphism)의 존재도 설명되지 않고 있다. 하지만 PRP가 초기 pellicle의 주요 구성 성분이므로^{45,46)} PRP중 proline, glycine, glutamine이 풍부한 carboxy-terminus 부분이 pellicle의 성숙에 어떤 역할을 할 것으로 추측해 볼 수 있다.

PRP를 포함한 타액 단백질이 *in vitro*상에서 hydroxyapatite 面上的의 세균의 집락 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며 *in vivo* 상에서 치아면에도 유사한 역할을 할 것으로 생각되어 진다. 최근 hydroxyapatite에 흡착된 PRP가 *Actinomyces viscosus*의 어떤 strain의 부착을 촉진하는 것으로 보고 되었으며, 이 균주가 용액내의 PRP와는 반응하지 않는 것으로 보아 hydroxyapatite면에 PRP가 흡착할 때 형태 변화(conformational change)가 일어나⁴²⁾ 내부에 숨겨져 있던 수용기가 외부로 드러나 세균 부착에 관계하는 것으로 생각된다⁵²⁾.

C. 唾 液 Histidine-Rich Protein(HRP)

1. 分 離 及 精 製 及 構 造

인체 타액내 histidine-rich proteins(HRPs)은 여러 연구자들에 의해 발견되어 각각 다른 명칭으로 불리어졌으며 HRPs를 분리하기 위해서도 여러가지 다른 방법들이 사용됨으로 인해 그 혼란성을 가중시켰다. 이러한 유사한 물질의 관련성이나 실체를 확립하는데는 어려움이 있으나 현재 HRPs에 대한 여러 의문점이 해결되고 있다.

인간의 이하선 타액은 밀도가 높은 support medium상에서 산성 상태 하에서 전기 영동했을 때 분자량이 적은 몇몇 요소가 염기성 단백질인

lysozyme보다 음극 쪽으로 더 빨리 움직이는 것을 볼 수 있다^{53,54}). 또, 이 단백질은 histone같은 arginine이 풍부한 단백질을 염색하는 물질에 친화성이 높고⁵⁵, chromatography를 이용하여 분리했을 때 lysozyme보다 cation exchanger에 친화성이 높았으며 histidine, arginine, lysine이 풍부하였다⁵⁶). 이러한 면을 고려해 볼 때 이 단백질은 인체 이하선 타액내에서 가장 염기성인 단백질이며 histone 단백질의 한 부류에 포함된다.

Azen⁵⁴)과 Baum 등⁵⁷)은 HRP들을 분리하는데 적합한 cationic electrophoresis system을 개발하여 인간의 이하선 타액에서 histidine이 풍부한 최소한 7가지의 요소를 분리하였다⁵⁸⁻⁶⁰). Cationic mobility 순서에 따라 Baum⁵⁷)은 7가지의 HRP들을 HRP-1부터 HRP-7까지 명명하였으며 Azen^{58,59,61})은 PPb(HRP-1, HRP-2), Pbe(HRP-3), Pbd(HRP-4), Pbb(HRP-5), Pba(HRP-6), PI(HRP-7)이란 용어를 사용하였다.

Hay²³)는 Component II라 명명한 타액내 histidine-rich protein을 처음으로 분리하여 특성을 규명하였다. 이 물질도 anionic proline-rich protein과 statherin처럼 hydroxyapatite 표면에 친화력을 가지고 있었다⁸). Component II는 acidic protein 또는 peptide와 같은 성질을 보여주었으나 anionic peptide는 아니었으며 pI는 7.04였다²⁰). 또 염기성 amino acid (histidine 19%, arginine 11%, lysine 8%)와 dicarboxylic acid (aspartic acid 14%, glutamic acid 9%)의 비율이 높았으며 상당량의 aromatic amino acid (tyrosine 9%, phenylalanine 8%)를 가지고 있었다. Component II는 hydroxyapatite에 대한 친화력, 전기 영동 분석 결과, 크로마토그래피 분석 결과, 중성에 가까운 pI 등을 고려해 볼 때 Azen과 Baum이 기술한 염기성 HRP들과는 다른 것으로 생각되었다. 그러나 gel filtration chromatography와 cationic exchanger에 의해 정제된 HRP의 amino acid 분석 결과⁵⁸⁻⁶⁰)는 Component II와 매우 유사하였으며, Component II, HRP-1, PPb는 같은 histidine-rich protein을 구성하는 것으로 확인되었다.

최근 Oppenheim 등^{62,63})은 neutral histidine-

rich polypeptide를 순수 분리하여 특성을 규명하였다. HRP-2의 조성은 HRP-1과 거의 동일하였으⁶⁰), 두번째 쌍(HRP-3/HRP-4), 세번째 쌍(HRP-5/HRP-6), 및 HRP-7은 순수 분리되지 못하였다. HRP-3와 HRP-4의 혼합물의 조성은 HRP-1나 HRP-2와 비슷하나 alanine이 존재하며, 염기성 물질이 많고 glutamic acid와 phenylalanine의 농도가 낮으며 proline이 없다. HRP-5/HRP-6의 경우처럼 빨리 이동하는 물질의 조성은 HRP-1과 유사하나 aspartic acid와 방향족 물질의 성분은 적은 반면 염기성 물질의 양은 증가되어 있는 양상을 보인다. HRP-7의 조성은 아직 알려지지 않았다. 7가지 모든 HRP들은 탄수화물을 거의 가지고 있지 않고 인간의 이하선 타액 및 악하선 타액에서 모두 발견되며 인체의 다른 체액에서는 발견되지 않았다⁶¹). 7가지 물질의 조성의 유사성과 면역학적 교차반응성(cross-reactivity)를 볼 때^{59,64}) 이 물질은 서로 밀접하게 관련이 있는 것 같다.

Neutral histidine-rich polypeptide(HRP-1)는 38개의 amino acid를 가지고 있으며 일차 구조가 밝혀진 첫번째 HRP이다⁶³) (그림 3). HRP-1의 분자량은 4929이며 많은 극성을 띠고 있는 side chain을 가지고 있고 7개의 histidine, 4개의 arginine, 3개의 lysine, 3개의 aspartic acid, 3개의 glutamic acid, 1개의 phosphoserine을 보유하고 있으며, 방향족(5개의 tyrosine, 3개의 phenylalanine)의 성분은 21%이고 threonine, alanine, valine, isoleucine, cysteine, methionine은 적다. Anionic proline-rich protein이나 statherin에서는 음전하를 띤 부분이 amino-terminus 부분에 위치해 있고, proline, glycine, glutamine 같은 amino acid는 carboxy-terminus 부분에 위치하고 있는 데 반해, HRP-1은 구조적 극성을 나타내지 않으며 친수성 구조물과 소수성 구조물이 균등하게 분포하고 있는 구조를 하고 있다. HRP-1의 이차적 구조는 밝혀지지 않았지만 알려진 일차적 구조를 토대로 추정해 볼 때^{65,66}) 2 곳의 α -helix(amino acid 서열 2-7과 12-19 부분), 2 곳의 β -pleated sheet(amino acid 서열 26-29와 35-38 부분), 3 곳의 reverse turn

액에서 유래되지는 않았지만, 유사한 항균 효과를 나타내는 단백질에 관심을 가지게 되었다. 대식 세포와 호중구 백혈구는 항균 작용을 나타내는 cationic protein이나 peptide를 보유하고 있으며^{72, 78)}, 토끼 폐의 대식 세포에 존재하는 cationic peptide인 MCP-1, MCP-2와 토끼 복막의 호중구 백혈구에 존재하는 cationic peptide인 NP-1, NP-2, NP-3a, NP-3b, NP-4, NP-5의 일차 구조가 결정되었다^{79, 80)}. 이러한 peptide는 arginine과 cysteine이 풍부하고 서로 구조적으로 밀접한 관련성을 가지고 있으며 32-34개의 amino acid로 구성되어 있다. MCP-1와 MCP-2의 amino acid 서열은 각각 NP-1 및 NP-2의 서열과 동일하다. HRP-1과 탐식세포에서 유래한 peptide 사이에는 조성과 구조면에서 유사성이 없으나, 둘다 짧은 polypeptide chain을 가지고 있으며 *Candida*에 대한 항균 활성을 가지고 있다.

參 考 文 獻

- Hay, D. I. : The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acid peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. Arch. Oral Biol., 18 : 1531, 1973.
- Schlesinger, D. H. and Hay, D. I. : Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. J. Biol. Chem., 252 : 1689, 1977.
- Carlson, E. R. and Hay, D. I. : Structure-activity studies of the acidic proline-rich proteins. J. Dent. Res., 62 : 242, Abstr. 659, 1983.
- Hay, D. I., Smith, D. J., Schluckebier, S. K., and Moreno, E. C. : Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. J. Dent. Res., 63 : 857, 1984.
- Hay, D. I. : Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. J. Dent. Res., 48 : 806, 1969.
- Oppenheim, F. G. : Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. Helv. Odontol. Acta, 14 : 10, 1970.
- Hay, D. I. : The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch. Oral Biol., 12 : 937, 1967.
- Hay, D. I. : The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch. Oral Biol., 20 : 1517, 1973.
- Hay, D. I., Schlesinger, D. H. : Human salivary statherin; a peptide inhibitor of calcium phosphate precipitation, in *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function*, Proc. Int. Symp. on Calcium-binding proteins and calcium functions. Wasserman et al., Eds., North-Holland, New York, 1978, 401.
- Hay, D. I., Moreno, E. C., and Schlesinger, D. H. : Phosphoprotein-inhibitors of calcium phosphate precipitation from salivary secretions. Inorg. Perspect. Biol. Med., 2 : 271, 1979.
- Oppenheim, F. G., Hay, D. I., and Franzblau, C. : Proline-rich proteins from human parotid saliva. Isolation and partial characterization. Biochemistry, 10 : 4233, 1971.
- Bennick, A. and Connell, G. E. : Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. Biochem. J., 123 : 455, 1971.
- Hay, D. I., and Oppenheim, F. G. : The isolation from human parotid saliva of a further group of proline-rich proteins. Arch. Oral Biol., 19 : 627, 1974.
- Bennick, A. : Chemical and physical characteristics of a phosphoprotein from human parotid saliva. Biochem. J., 145 : 557, 1975.
- Bennick, A. : The binding of calcium to a phosphoprotein, protein A, common to human parotid and submandibular secretions. Biochem. J., 155 : 163, 1976.
- Bennick, A. : The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. Biochem. J., 163 : 241, 1977.
- Bennick, A. : Chemical and physical characterization of a phosphoprotein, protein C, from human saliva and comparison with a related protein A. Biochem., 163 : 229, 1977.
- Schlesinger, D. H., Jacobs, R., and Hay, D. I. : Primary structure of protein inhibitor of calcium phosphate precipitation from human salivary

- secretions, in *Peptides*, Proc. 5th Am. Peptide Symposium, Goodman and Meienhofer, Eds., Halsted Press, John Wiley & Sons, New York, 1977, 56.
19. Bennick, A., Wong, R., and Cannon, M. : Structure and biological activities of salivary acidic proline-rich proteins, in *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function*, Proc. Int. Symp. on Calcium-Binding Proteins and Calcium Function, Wasserman et al., eds., North-Holland, New York, 1977, 391.
 20. Wong, R. S., Hofmann, T., and Bennick, A., The complete primary structure of a proline-rich phosphoprotein from human saliva. *J. Biol. Chem.*, 254 : 4800, 1979.
 21. Schlesinger, D. H., and Hay, D. I. : Complete primary structure of a proline-rich phosphoprotein (PRP-4), a potent inhibitor of calcium phosphate precipitation in human parotid saliva, in *Peptides, Structure and Biological Function*, Proc. 6th Am. Peptide Symp., Gross, G. and Meienhofer, J., Eds., Pierce Chemical, Rockford, IL, 1979, 133.
 22. Wong, R. S., and Bennick, A. : The primary structure of a salivary calcium-binding proline-rich phosphoprotein (protein C), a possible precursor of related salivary protein A. *J. Biol. Chem.*, 255 : 5943, 1980.
 23. Schlesinger, D. H., and Hay, D. I. : Complete covalent structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 27 : 373, 1986.
 24. Maeda, N., Kim, H. S., Azen, E. A., and Smithies, O., Differential RNA splicing and post-translational cleavages in the human salivary proline-rich protein gene system. *J. Biol. Chem.*, 260, 1123, 1985.
 25. Isemura, S., Saitoh, E., and Sanada, K. : The amino-acid sequence of a salivary proline-rich peptide, P-C, and its relation to a salivary proline-rich phosphoprotein, protein C. *J. Biochem. (Tokyo)*, 87 : 1071, 1980.
 26. Wong, R. S. C., Madapallimattam, G., and Bennick, A. : The role of glandular kallikrein in the formation of a salivary proline-rich protein A by cleavage of a single bond in salivary protein C. *Biochem. J.*, 211 : 35, 1983.
 27. Azen, E. A. and Denniston, C. : Genetic polymorphism of PIF (parotid isoelectric focusing variant) proteins with linkage to the PPP (parotid proline-rich protein) gene complex. *Biochem. Genet.*, 19, 475, 1981.
 28. Meyer, J. L., and Nancollas, G. H. : The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Res.*, 13 : 295, 1973.
 29. Hay, D. I. : Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Arch. Oral Biol.*, 20 : 553, 1975.
 30. Levine, M. J., Weill, J. C., and Ellison, S. A. : The isolation and analysis of a glycoprotein from parotid saliva. *Biochem. Biophys. Acta*, 188 : 165, 1969.
 31. Levine, M. J., Ellison, S. A., and Bahl, O. P. : The isolation from human parotid saliva and partial characterization of the protein core of a major parotid glycoprotein. *Arch. Oral Biol.*, 18 : 827, 1973.
 32. Hay, D. I., Schluckebier, S. K., and Moreno, E. C. : Adsorption of proteins by hydroxyapatite from human parotid, submandibular and whole salivas. *J. Dent. Res.*, 64 : 379, Abstr. 1838, 1985.
 33. Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. : The use of wool fast blue BL for the electrophoresis of human parotid salivary proteins in acrylamide gel. *Arch. Oral Biol.*, 13 : 839, 1968.
 34. Steiner, J. C. and Keller, P. J. : An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Arch. Oral Biol.*, 13 : 1213, 1968.
 35. Shomers, J. P., Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D., and Hay, D. I. : Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva, *J. Dent. Res.*, 61 : 397, 1982.
 36. Moreno, E. C., Kresak, M., and Hay, D. I. : Adsorption of human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy-, and fluorapatites. *Arch. Oral Biol.*, 23 : 525, 1978.
 37. Hay, D. I., and Moreno, E. C. : Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatite surface. *J. Dent. Res.*, 58(B) : 930, 1979.
 38. Moreno, E. C., Varughese, K., and Hay, D. I. :

- Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif. Tissue Int.*, 28 : 7, 1979.
39. Schlesinger, D. H., and Hay, D. I. : Primary structure of the active tryptic fragments of human and monkey salivary anionic proline-rich proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 17 : 34, 1981.
 40. Aoba, T., Moreno, E. C., and Hay, D. I. : Inhibition of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. *Calcif. Tissue Int.*, 36 : 651, 1984.
 41. Moreno, E. C., Kresak, M., and Hay, D. I. : Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium phosphates. *J. Biol. Chem.*, 257 : 2981, 1982.
 42. Moreno, E. C., Kresak, M., and Hay, D. I. : Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.*, 36 : 48, 1984.
 43. Mandel, I. D. and Bennick, A. : Quantitation of human salivary acidic proline-rich proteins in oral diseases. *J. Dent. Res.*, 62 : 943, 1983.
 44. Baum, B. J., Kousvelari, E. E., and Oppenheim, F. G. : Exocrine protein secretion from human parotid glands during aging: stable release of the acidic proline-rich proteins. *J. Gerontol.*, 17 : 392, 1982.
 45. Kousvelari, E. E., Baratz, R. S., Burke, B., and Oppenheim, F. G. : Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle and glandular tissue specimens. *J. Dent. Res.*, 59 : 1430, 1980.
 46. Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D., and Madapallimattam, G. : The role of human salivary acidic proline rich proteins in the formation of acquired dental pellicle *in vivo* and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch. Oral Biol.*, 28 : 19, 1983.
 47. Saitoh, E., Isemura, S., and Sanada, K. : Inhibition of calcium carbonate precipitation by human salivary proline-rich phosphoproteins. *Arch. Oral Biol.*, 30 : 641, 1985.
 48. Schluckebier, S. K., Hay, D. I., and Moreno, E. C. : Supersaturation of human saliva with respect to calcite, and inhibition of its precipitation by salivary constituents. *J. Dent. Res.*, 65 : 808, Abstr. 741, 1986.
 49. Reddy, M. M. : Crystallization of calcium carbonate in the presence of trace amounts of phosphorus -contain anions. *J. Cryst. Growth*, 41 : 287, 1977.
 50. Reitemeier, R. F., and Buehrer, T. F. : The inhibiting action of minute amounts of sodium hexameta-phosphate on the precipitation of calcium carbonate from ammoniacal solutions. I. Quantitative studies of the inhibition process. *J. Phys. Chem.*, 44 : 535, 1940.
 51. Gibbons, R. J., Hay, D. I., and Schluckebier, S. K. : Proline-rich proteins are pellicle receptor for type 1 fimbriae of *A. viscosus*. *J. Dent. Res.*, 65 : 179, Abstr. 84, 1986.
 52. Hay, D. I., Gibbons, R. J., and Schluckebier, S. K. : Evidence that type 1 fimbriae of *A. viscosus* bind to determinants exposed due to a conformational change in adsorbed proline-rich proteins. *J. Dent. Res.*, 65 : 179, Abstr. 85, 1986.
 53. Bonilla, C. A. and Stringham, R. M. : Electrophoresis of human salivary secretions at acid pH. *J. Chromatog.*, 50 : 345, 1970.
 54. Azen, E. A. : Genetic polymorphism of basic proteins from parotid saliva. *Science*, 176 : 673, 1972.
 55. Sung, M. and Smithies, O. : Differential elution of histones from gel trapped nuclei. *Biopolymer*, 7 : 39, 1969.
 56. Balekjian, A. Y. and Longton, R. W. : Histones isolated from human parotid fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50 : 676, 1973.
 57. Baum, B. J., Bird, J. L., and Longton, R. W. : Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich polypeptide. *J. Dent. Res.*, 56 : 1115, 1977.
 58. Peters, E. H. and Azen, E. A. : Isolation and partial characterization of human parotid basic proteins. *Biochem. Genet.*, 15 : 925, 1977.
 59. Peters, E. H., Goodfriend, T., and Azen, E. A. : Human Pb, human post-Pb, and nonhuman primate Pb proteins: immunological and biochemical relationships. *Biochem. Genet.*, 15 : 947, 1977.
 60. Baum, B. J., Bird, J. L., Millar, D. B., and Longton, R. W. : Studies on histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Arch. Biochem. Biophys.*, 177 : 427, 1976.
 61. Azen, E. A. : Properties of salivary basic proteins showing polymorphism. *Biochem. Genet.*, 9 : 69,

- 1973.
62. Oppenheim, F. G., and Yang, Y. C., and Troxler, R. F. : Structural and functional characterization of human parotid histidine-rich protein. *J. Dent. Res.*, 64 : 239(Sp. issue), Abstr. 571, 1985.
 63. Oppenheim, F. G., and Yang, Y. C., Diamond, R. D., Hyslop, D., Offner, G. D., and Troxler, R. F. : The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J. Biol. Chem.*, 262 : 1177, 1986.
 64. Baum, B. J., Ellison, S. A., and Levine, M. J. : Different antigenicity of human salivary histidine-rich polypeptides in goats and rabbits. *Arch. Oral Biol.*, 22 : 457, 1977.
 65. Chou, P. Y., and Fasman, G. E. : Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47 : 45, 1978.
 66. Chou, P. Y., and Fasman, G. E. : Prediction of α -turns. *Biophys. J.*, 26 : 367, 1979.
 67. Mackay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V. J., Krost, S. B., and Pollock, J. J. : Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine rich polypeptides on *Sterptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 44 : 695, 1984.
 68. Pollock, J. J., Denepitiya, L., Mackay, B. J., and Iacono, V. J. : Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 44 : 702, 1984.
 69. Holbrook, I. B., and Molan, P. C. : The identification of a peptide in human parotid saliva particularly active in enhancing the glycolytic activity of the salivary microorganisms. *Biochem. J.*, 149 : 489, 1975.
 70. Iwata, K., Yamaguchi, H., and Hiratani, T. : Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia*, 11 : 158, 1973.
 71. Sud, I. J., and Feingold, D. S. : Action of antifungal imidazoles on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22 : 470, 1982.
 72. Hocking, W. G. and Golde, D. W. : The pulmonary-alveolar macrophage. *N. Engl. J. Med.*, 301 : 580, 1979.
 73. Carrol, S. F., and Martinez, R. J. : Purification and properties of rabbits alveolar macrophage lysozyme. *Infect. Immun.*, 24 : 460, 1979.
 74. Weiss, J., Elabach, P., Olsson, I., and Odeberg, H. : Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane-active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 253 : 2664, 1978.
 75. Drazin, R. E., and Lehrer, R. I. : Fungicidal properties of a chymotrypsin-like cationic protein from human neutrophils: adsorption to *Candida parapsilosis*. *Infect. Immun.*, 17 : 382, 1977.
 76. Odeberg, H., and Olsson, I. : Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J. Clin. Invest.*, 56 : 1118, 1975.
 77. Patterson-Delafield, J., Sklarek, D., Martinez, R. J., and Lehrer, R. I. : Microbicidal cationic proteins of rabbits alveolar macrophages : amino acid composition and functional attributes. *Infect. Immun.*, 31 : 723, 1981.
 78. Selsted, M. E., Sklarek, D., and Lehrer, R. I. : Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.*, 45 : 150, 1984.
 79. Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., and Lehrer, R. I. : Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Biol. Chem.*, 258 : 14485, 1983.
 80. Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Hartwig, S. S. L., and Lehrer, R. I. : Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 260 : 4579, 1985.

ABSTRACT

Proteins Inhibiting Precipitation of Calcium Phosphate in Human Saliva

Song Han, D.D.S., Ph.D.

Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Kangnung National University

The purpose of this article is to describe the biochemical properties and biological functions of several salivary proteins that possess the unusual properties of inhibiting spontaneous and secondary precipitation of calcium phosphate. This function is very important since human salivary secretion is supersaturated with respect to calcium phosphate. Biological function of statherin, proline rich protein (PRP) and histidine rich protein (HRP) is to inhibit precipitation of calcium phosphate in salivary glands, in the oral fluids, and onto tooth surfaces. The resulting supersaturated state of the salivary secretions contributes a protective and reparative environment which is important for the integrity of the tooth. Beneficial consequences of salivary supersaturation with respect to calcium phosphate are selectively expressed in the oral cavity- that is, protection is provided for the dental enamel -- while undesirable consequences, for example, precipitation of calcium phosphates in the salivary glands and onto the teeth do not occur. Purification and structural characteristics of these proteins as well as clinical significance of functions of each protein will be discussed.