*Porphyromonas gingivalis*에서의 Hemin 결합 단백질 유전자의 특성 연구

김성조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

생명체에 있어 필수 영양소로서 중요한 역할을 하는 철분은 세균에 있어서도 성장 및 대사에 영향을 미쳐 감염성질환의 발병과 진행에 있어 중요한 요소로 작용한다[1,2]. 일반적으로 숙주 내에는 세포내부 및 외부에 철분이 풍부하게 존재하지만, 항균기전의 일환으로 세균에 대해서는 이에 대한 접근이 매우 제한되어, 숙주 내에서 실제 활용 가능한 유리 hemin 및 철분의 농도는 매우 낮은데, 유리철분의 경우 단지 10^{-18}M 정도로[2], 이는 대부분의 세균에 있어 성장에 필요한 수준인 10^{-6}M (0.2 - 4 μM)에 크게 미달하여, 세균의 성장을 뒷받침하는데 있어 일반적으로 불충분하다. 따라서, 세균 특히 병원성세균들은 이러한 철분이 제한된 숙주 내 환경 하에서 서식하고 병원성을 발휘하기 위해, 필수영양소인 철분을 숙주로 부터 획득하기 위한 고도의 친화력을 갖는 철분 획득기전들을 소유하고 있다.

인간에서의 치주질환은 복합적인 세균총과 관련이 있고 실제 치주병소에서는 다양한 균주들이 발견되지만, 몇몇 연구보고에 의하면 특정 세균들의 존재와 질환간에 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 특히, black - pigmented *Bacteroides* 균주들이 강력히 제시되어 왔으며, 그들 중에서도 특히 *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)*는 그람음성, 편성혐기성, 비자당분해성 간균으로, 진행된 치주염을 갖는 성인환자의 치주병소 (치주낭) 내에서 높은 빈도로 다수 존재하며, 반면 건강한 부위에서는 거의 존재하지 않거나 소수로 존재한다[3]. 더구나 *P. gingivalis*는 실험동물에 있어 기타의 다른 치주질환 병원성균주들에 비해 가장 독성이 큰것으로 알려져 있는데, 이는 고도의 단백질 및 교원질 분해능력이 있고, 설치류에 단일균감염 시켰을때 black - pigmented *Bacteroides* 균주 중 유일하게 확산성의 염증을 반복적으로 유발시키기 때문이다[4].

*P. gingivalis*를 포함한 black - pigmented *Bacteroides*는 유리철분을 활용하지는 못하고, siderophore를 생성하지 않으며, hemin 의존성으로 철분 공급원으로서 hemin이 필수적인데, 이는 hemin과 protoheme의 구성요소인 porphyrin ring을 생성하는 능력이 이 균주에 있어 결여되어 있는 것에 기인하는 것으로 여

본연구는 1997년도교육부학술연구조성비(유전공학GE 97 - 58)에의하여연구되었음

겨지며, 이 균주는 hemin으로 부터 electron transport system에 있어 주요한 구성요소 중의 하나인 cytochrome을 형성할 수 있다. Hemin은 *P. gingivalis*에 있어서의 철분 요구의 전부를 충족할 수 있는 것으로 알려져 있다.

실제 치주병소 부위에는 만성염증의 결과로 국소출혈이 일어나고, 적혈구가 용해되어 hemin이 유리되며, 유리된 heme이 균주를 위한 철분 공급원으로 활용될 수 있다. Carlsson 등[5]에 의해 보고된 바와 같이 *P. gingivalis*의 단백분해효소에 의한 hemopexin, albumin, 그리고 haptoglobin 같은 혈장단백질의 분해는 다른 black-pigmented *Bacteroides*에 비해 매우 효율이 높아, 치은열구액내에 존재하는 hemin에 대한 이들 단백질과의 경쟁에 있어 유리하게 작용할 수 있다.

Hemin 획득과정에 있어서의 최초의 단계는 세포표면에 hemin이 결합되는 것일 것이다. 이 과정에서 hemin 고갈 상태에서 증가되어 발현되는 세포막단백질이 hemin의 결합 및 이동에 관여할 수 있다. *P. gingivalis*가 heme 의존성으로 *in vitro*에서 성장을 위한 유일한 철분 공급원으로 hemin을 활용함이 이미 오래전 부터 알려져 왔음에도 불구하고, 이 균주에 있어서의 hemin 획득기전에 관하여는 최근까지 별로 알려진 바가 없었다. *P. gingivalis*는 siderophore를 생성하지 않으므로, 세포표면 상에 hemin 결합을 위한 기전이 존재하여, 세포막과 관련된 hemin 결합단백질에 의해 hemin의 결합과 획득이 일어날 수 있다.

*P. gingivalis*에서의 hemin 결합 단백질의 순수분리 및 특성분석은 김 등[6]에 의해 수행된 바 있다. 본 연구의 목적은 *P. gingivalis*에서의 hemin 결합단백질의 여타 특성 및 관련 유전자의 특성을 분석하는데 있다. Hemin 획득 과정에 있어 최초의 단계에 관여하는 hemin 결합단백질을 분자생물학적으로 연구하여 보는 것은 이 균주에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 규명하는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

II. 연구대상 및 방법

1. 균주 및 배양조건

사용된 *P. gingivalis* 균주는 381, W50, A7A1-28, 그리고 W50/BE1 이었으며, 이들 균주를 hemin (5 μg/ml)과 menadione (1 μg/ml)이 포함된 enriched trypticase soy agar 또는 2.1% (w/v) *Mycoplasma* broth base (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD)를 이용하여, 37℃의 혐기성 glove box (10% H_2/10% CO_2/80% N_2)내에서 배양하였다. 철분 제한(iron limitation)의 배양 조건을 위해서는 iron chelating compound인 2,2'-bipyridyl (BPD, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)을 통상의 용액 배지에 100-400 μM 농도로 첨가하였으며, hemin 제한(hemin restriction) 조건 즉 균주 세포 내부에 저장되어 있는 hemin을 고갈시키기 위해서는, hemin을 포함하지 않은 통상의 액체 배지에서 최소 5 passage를 배양시켰다. 세균의 성장은 660 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 오염되어 있는 철분과 hemin을 제거하기 위해 모든 유리 기구들은 chromic acid와 deionized water로 세척한 후 사용하였다. pUC18 plasmid와 expression vector를 위한 host strain으로는 *Escherichia coli* DH5α [*supE44 Δ lacU169*(*Ø80lacZΔM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]를 활용하였다.

2. Cell envelope의 분리

early stationary phase의 균주를 원심 분리하여 회수하여, phosphate-buffered saline(PBS, pH7.2)로 3회 세척한 후 각각 2 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF;

Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), Na - P - tosyl - L - lysine chloromethyl ketone(TLCK; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), 그리고 benzamidine(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo)의 protease inhibitor cocktail을 포함하고 있는 PBS에 분산시켰다. 그 후 sonicator로 세포를 파괴하고, low - speed (10,000 X g, 30 min)와 high speed (200,000 X g, 2h) centrifugation을 시행하여, cell envelope을 분리하였다.

3. Polyacrylamide gel electrophoresis

단백질 분포의 평가를 위해 Laemmli[7]의 discontinuous sodium dodecyl sulfate poly - acrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE)를 실시하였다. 12% acrylamide sep - arating gel과 4% acrylamide stacking gel을 제조하여, vertical slab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, CA)를 이용하여 30 mA에서 전기영동을 시행하였다. 각 lane에는 70μg의 단백질을 loading하였으며, 각 gel에는 분자량 측정을 위해 low molecular weight standards (Bio - Rad, Richmond, CA)도 함께 전기영동 하였다. Coomassie brilliant Blue - R - 250으로 gel을 염색하였고, 분자량의 계산은 linear regression analysis에 의하였다. Reducing agent인 2 - mercaptoethanol이 electrohoretic mobility에 미치는 영향도 관찰하였다.

4. Heat modifiability 관찰

Zwitterionic detergent인 3 - [(3 - chlo - ramidopropyl) - dimethy - ammonio] - 1 - propanesulfonate (CHAPS; Pierce, Rockfore, Ill)를 분리한 *P. gingivalis*의 cell envelope (passage 5)에 1% (wt/vol) 농도로 가하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 그 후 100,000 X g에서 1시간 utracentrifugation하여 CHAPS - soluble fraction을 분리하였다. 온도가 단백질에 미치는 영향을 관찰하기 위해, treatment buffer에 용해한 15μg의 1% CHAPS - soluble fraction에 5분간 25℃ (실온)에서 100°C에 이르는 열처리를 하여, SDS - PAGE를 시행하였다.

5. *P. gingivalis* 381의 hemin 결합 단백질에 대한 polyclonal antibody의 조제

이전의 연구 (김 등[6] 1996)에서 *P. gingi - valis* 381의 세포막 단백질에서 순수분리한 hemin 결합 단백질을 12%의 gel에서 SDS - PAGE하여, Coomassie brilliant Blue - R - 250으로 염색한 후, band를 절제하였다. 절제한 band를 PBS 용액내에서 파쇄한 후 incom - plete Freund's adjuvant와 혼합하였다. New Zealand White Rabbit (female, 3 to 4 kg)의 8부위에 피하로 2 ml의 protein - incomplete Freuned's adjuvant complex를 각각 주사하였다. 1차 immunization 시에는 약 400 μg의 단백질을 주입하였으며, 그 후 3차 (10일, 30일, 그리고 40일)에 걸쳐 약 100 μg의 단백질이 각각 주입되었다. 최종 주입 1주일 후에 enzyme - linked immunosorbent assay를 하여 항체역가를 결정하였으며, cardiac punc - ture하여 채혈하고 혈장을 분리하였다. Preimmune serum과 immune serum으로 immunoblotting하여 hemin 결합 단백질에 대한 반응을 측정하였다.

6. Antigenic reactivity of *P. gingivalis* strains

381, W50, A7A1 - 28, 그리고 W50/BE1 등 4종의 *P. gingivalis* strain에서의 hemin 결합 단백질의 공유 여부를 조사하였다. 각 strain을 hemin 고갈상태 (passage 5)로 배양한 후,

cell envelope을 분리하여 SDS - PAGE를 시행하고, Towbin 등[8]의 방법에 의거하여 25 mM Tris - HCl, 192 mM glycine, 그리고 20% methanol을 포함하고 있는 buffer (pH 8.3) 내에서, SDS - PAGE gel로부터 Immobilon P (Millipore Co., Bedford, MA)에 100 mA에서 4시간 electroblotting하였다. 그 후, 통법에 따라 적절히 희석한 *P. gingivalis* 381의 24 kDa hemin 결합 단백질에 대한 rabbit polyclonal antiserum과 goat anti - rabbit IgG (coupled to alkaline phosphatase) (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo)로 incubation한 후, BCIP/NBT (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo)로 developing 하였다.

7. DNA 분리

변형된 Marmur[9]의 방법을 이용하여 *P. gingivalis* 381로부터 chromosomal DNA를 분리하였다. Plasmid DNA의 추출에 있어서는 Maniatis 등[10]의 방법을 이용하였다.

8. *P. gingivalis*의 genomic library의 제조

P. gingivalis 381로부터 chromosomal DNA를 분리하여 *Hind* III로 부분절제한 후 3 - 10kb 크기의 DNA를 electroelution하였고, 이를 역시 *Hind* III으로 절단된 pUC18 vector의 DNA 조각과 16℃에서 overnight ligation한 다음, 반응 혼합물을 DH5α 세포에 형질전환하였다.

형질전환은 Maniatis 등[10]의 방법을 사용하였다. 대장균 세포를 log phase까지 성장시킨 후, 원심분리하여 세포를 회수하여, 이를 calcium chloride buffer (pH 7.5)에 ml 당 5 - 7x10^{8}의 밀도로 분산시켜 얼음 속에서 60분간 처리하고 나서, DNA를 넣고 역시 얼음속에서 30분간 위치시켰다. 그 후 42℃에서 2분간 열처리하고, LB media를 첨가하여 37℃에서 1시간 배양한 다음, ampicillin을 포함한 LB plate에 plating하여 37℃에서 overnight 배양하였다. 이 LB plate에는 5 - Bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - B - D - galactopyranoside (X - gal)와 isopropyl beta - D - thiogalactoside (IPTG)도 포함되어있었으며, 배양종료후 white colony만 선택하여 모았다.

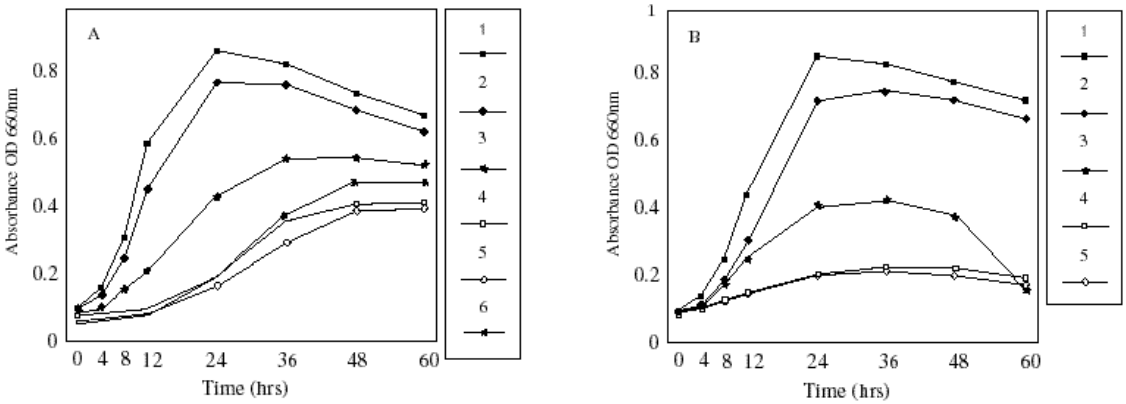

Figure 1. Effect of hemin restriction on the growth of *P. gingivalis* 381. (A) Cells were progressively passaged from hemin - excess culture to hemin - free medium for 5 passages; 1, hemin - excess (7.7 μM); 2, passage 1; 3, passage 2; 4, passage 3; 5, passage 4; 6, passage 5. B) Cells grown with BPD; 1, hemin - excess(7.7 μM); 2, 100 μM BPD; 3, 200 μM BPD; 4, 300 μM BPD; 5, 400 μM BPD.

9. Hemin 결합 clone의 확인

White colony들을 hemin (5 μg/ml)과 ampicillin (50 μg/ml)을 포함하고 있는 LB plate에 replica plating하여 37℃의 배양기 내에서 7일 간 배양한 후, 착색을 보이는 colony를 선택하였다.

10. Restriction endonuclease analysis와 Southern hybridization

Maniatis 등[10]의 방법에 따라, DNA를 여러 제한효소로 반응시킨 후 전기영동하고, denaturation한 다음 중화하여 nitrocellulose filter에 transfer 시켰다. 그 뒤 random primer로 labeling된 DNA probe와 hybridization시킨 뒤 X-ray film에 노출시켰다.

11. Gene product의 확인

Cloning한 DNA의 gene product를 확인하기 위해, pHM254 (결과 참조)의 insert DNA를 분리하여, expression vector인 pET11 vector에 recloning하였다. 이때 분리한 insert DNA를 T4 DNA polymerase로 처리한 후, 마찬가지로 T4 DNA polymerase로 처리한 pET11 vector와 ligation을 하였다. Ligation 후에 DH5α 세포에 형질전환하여, 형성된 transformants 중 일부를 0.5 mM IPTG로 induction하여 배양한 후 세포를 모아, whole cell lysate로 SDS-PAGE를 하였다. 이 중 약 21 kDa (결과 참조)의 진한 band를 보이는 colony를 선택하여 SDS-PAGE와 immunblotting analysis를 시행하였다.

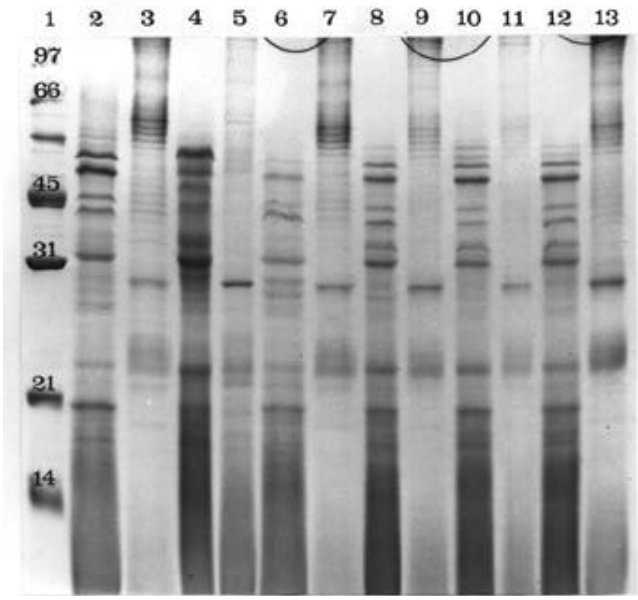

Figure 2. SDS-PAGE of cell envelopes from *P. gingivalis* 381. Each lane contains 70 μg of protein. Lane 1, low M. W. standards; Lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12, samples heated at 100oC for 5 min; Lanes 3, 5, 7, 9, 11, and 13, unheated samples; Lanes 2 and 3, cells grown in 7.7 μM hemin; Lanes 4 and 5, cells grown without hemin (passage 5); Lanes 6-13, cells grown in 7.7 μM hemin with BPD; Lanes 6 and 7, 100 μM BPD; Lanes 8 and 9, 200 μM BPD; Lanes 10 and 11, 300 μM BPD; Lanes 12 and 13,

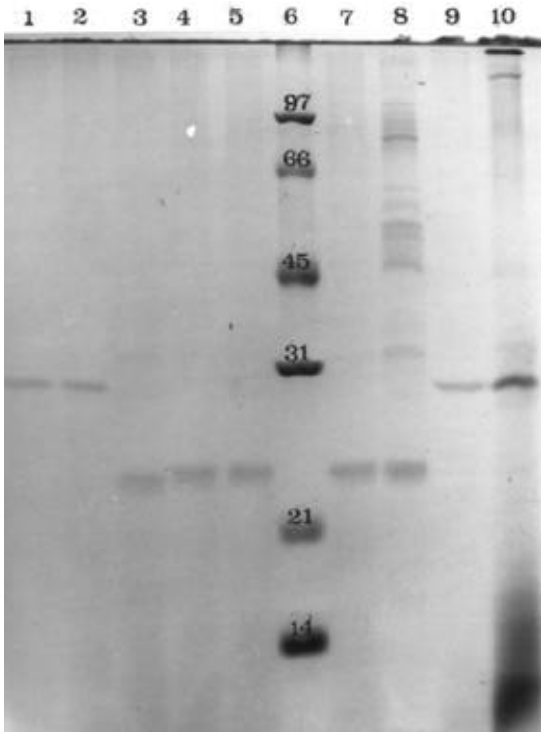

Figure 3. SDS - PAGE of cell envelope fraction from passage 5 *P. gingivalis* 381 solubilized with 1% CHAPS. 15 μg of protein was applied in each well. Lanes 1 - 5, samples treated with treatment buffer containing 2 - ME; Lane 1, unheated sample; Lane 2, heated at 55 ℃ for 5 min; Lane 3, heated at 70 ℃ for 5 min; Lane 4, heated at 90 ℃ for 5 min; Lane 5, heated at 100 ℃ for 5 min; Lane 6, low M. W. standards; Lane 7, heated at 100 ℃ with treatment buffer containing 2 - ME; Lane 8, heated at 100 ℃ without 2 - ME; Lane 9, unheated sample with treatment buffer containing 2 - ME; Lane 10,

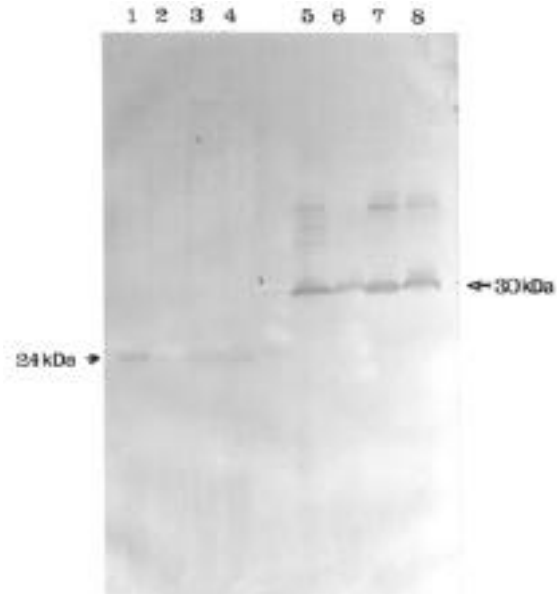

Figure 4. Immunoblotting analysis of passage 5 cell envelopes from four *P. gingivalis* strains. Lanes 1 - 4, heated at 100 °C; Lanes 5 - 8, unheated samples; Lanes 1 and 5, W50/BE; Lanes 2 and 6, A7A1 - 28; Lanes 3 and 7, W50; Lanes 4 and 8, 381.

III. 결과

1. Hemin (iron) 제한이 *P. gingivalis* 381의 성장에 미치는 영향

Hemin이 포함되어 있지 않은 배지에 연속적으로 균주를 계대배양한 결과 평균 generation time의 현저한 증가가 관찰되었다. 정상적으로 hemin (7.7 μM)이 공급된 상태에서는 평균 generation time이 7.2h^{-1} 이었다. Passage 1에서의 generation time도 이와 유사하였는데, 이는 세포 내부에 저장되어 있는 hemin을 균주가 활용하고 있음을 의미한다. 그러나, passage 2에서 passage 5로 갈수록 균주의 성장이 둔화되어 평균 generation time이 현저하게 증가되었으며, passage 5에서는 12.0h^{-1}에 이르렀다 (Figure 1A).

Iron chelating agent인 2,2 - bipyridyl(BPD)도 *P. gingivalis*의 성장에 현저한 영향을 미쳤다. 100 μM의 BPD 농도는 균주의 성장에 거의 영향을 미치지 않았다. 그러나, 200 μM 이상의 농도에서는 성장이 현저히 억제되어, 200 μM에서의 generation time은 11.3h^{-1}이었고, 300 및 400 μM에서는 성장이 거의 일어나지 않았다 (Figure 1B).

2. Hemin (iron)이 *P. gingivalis* 381의 세

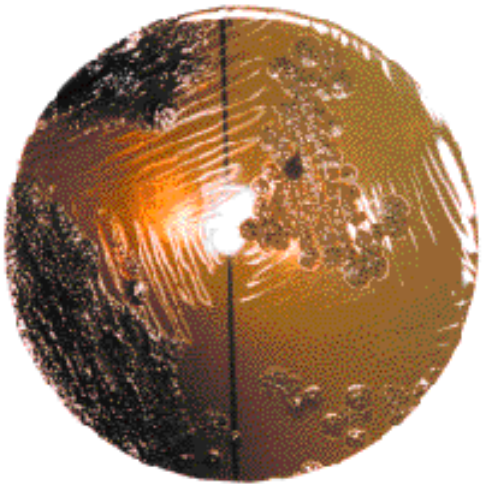

Figure 5. Pigmentation of *E. coli* on hemin - agar. Single colonies of *E. coli* DH5α containing pHM254 (left side) or pUC18 (right side) were streaked on LB - amp - hemin. The colony phenotypes are shown after 1w of growth at 37 ℃.

포막 단백질 발현에 미치는 영향

정상적으로 hemin (7.7 μM)이 공급된 상태에서 *P. gingivalis* 381은 다수의 단백질 밴드를 형성하였으며, 단백질 밴드의 수와 분포는 각 처치군에서 매우 유사하였다. 그러나, hemin을 억제하거나 BPD를 가하였을 때 최소 2개의 hemin (iron) - regulated band가 발현되었다. 약 30 kDa (unheated)과 24 kDa (heated)의 세포막 단백질이 hemin (iron) 제한 상태에서 증가되어 발현되었다 (Figure 2).

3. *P. gingivalis* 381의 세포막 단백질의 heat modifiability

CHAPS - soluble fraction을 55℃에서 100 ° C까지 가열하였을 때, 70℃에서 30 kDa 단백질이 24 kDa으로 전환되었다. 2 - mercap - toethanol(ME)은 이러한 것에 영향을 미치지 못하였는데, 이는 이들 단백질에 disulfide bond가 존재하지 않음을 제시하여 주고 있다 (Figure 3).

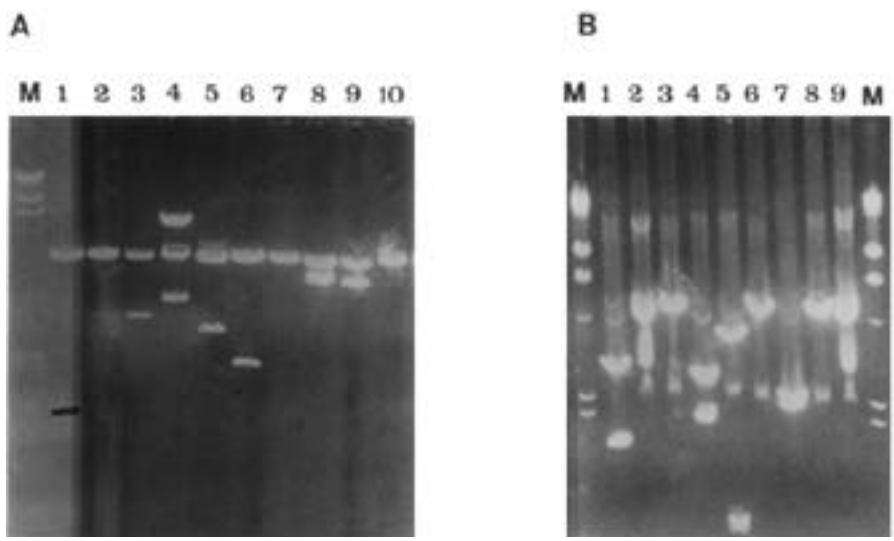

Figure 6. Detemination of insert DNA for various positive clones (A) and restriction enzyme pattern of a positive clone (pHM254) (B). (A), DNA digested with *Hind* III. M, λ - DNA/*Hind* III standard marker; 1, pHM182; 2, pHM251; 3, pHM252; 4, pHM254; 5, pHM272; 6, pHM281; 7, pHM282; 8, pHM283; 9, pHM284; 10, pHM285. (B), M, λ - DNA/*Hind* III standard marker; 1, digested with *BamH* I; 2, digested with *Bgl* II; 3, digested with EcoRI; 4, digested with *Hind* III; 5, digested with *Kpn* I; 6, digested with *Pst*

4. Antigenic reactivity of *P. gingivalis* strains

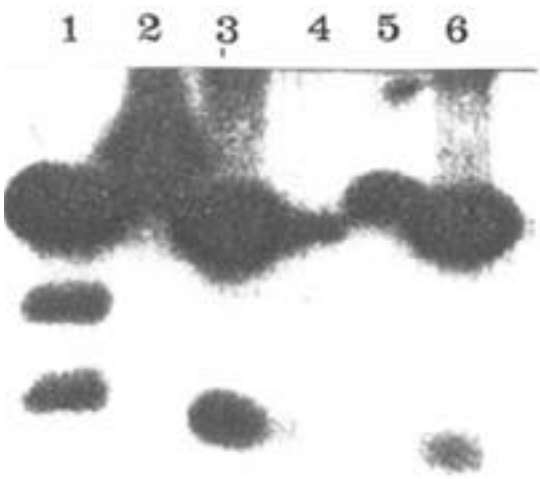

Figure 7. Southern hybridization of *P. gingivalis* chromosomal DNA for cloned DNA. The total chromosomal DNAs were digested with various restriction enzymes, electrophoresed on a 1.0% agarose gel, transferred to nitrocellulose filter, and then hybridized with a labelled cloned DNA. 1, size marker; 2, *BamH* I; 3, *Bgl* II;

W50, A7A1 - 28, 그리고 trypsin이 결여되어 있는 BE1 mutant 모두 *P. gingivalis* 381의 24 kDa hemin 결합 단백질에 대한 antiserum과 반응하였다. 100°C에서 가열 처리한 경우에 있어, 모든 strain에서 24 kDa 단백질이 반응하였으며, 열처리 하지 않은 경우에도 모든 strain에 있어 30 kDa 단백질이 매우 강력하게 반응하였으나, 기타 고분자량의 비슷한 epitope를 갖는 몇몇 단백질 들도 반응하였다 (Figure 4).

5. Hemin 결합 단백질 관련 유전자의 분리

Hemin 결합 단백질의 유전자를 분리하기 위하여 *P. gingivalis*의 chromosomal DNA를 분리하여 *Hind* III를 처리한 후 pUC18 vector의 *Hind* III site에 cloning하여 약 10,000개의 recombinant colonies를 얻었다. 각각의 colony를 LB - amp - hemin agar plate에 replica plating을 하여 검은 갈색으로 착색되는 10개의 colony를 screening하였다. 이 colony 들은 hemin 결합단백질을 포함하고 있는 putative clone으로 여겨지며, 이 각각의 clone의 특성을 규명하였다. 이 중에 약 5.5kb의

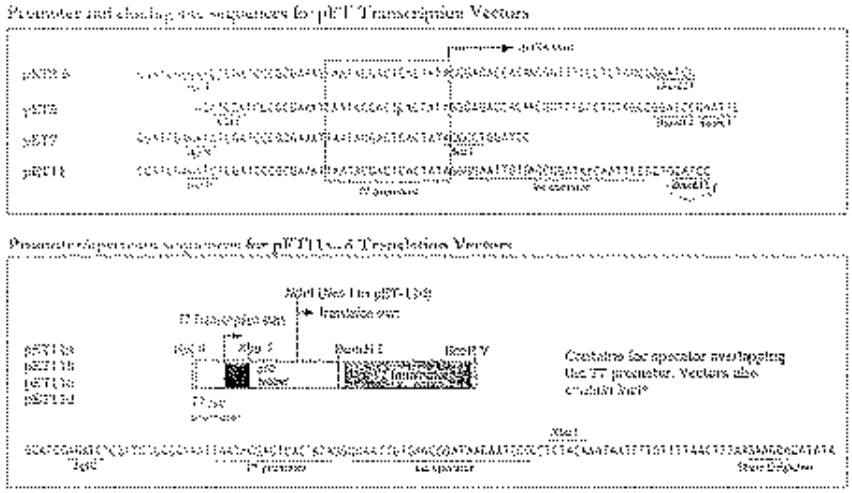

Figure 8. Cloning strategy for expression vector

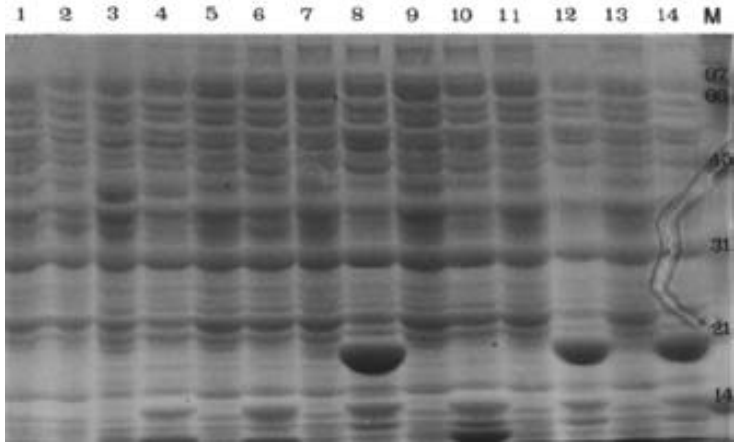

Figure 9. SDS - PAGE patterns of whole cell lysates from various induced clones. Host cells trans - formed with constructed DNA were grown to a mid - log phase in the presence of IPTG. Lanes 8, 12, and 14 showed a new band and its size was estimated about 21 kDa.

insert DNA 를 포함하고 있는 clone을 pHM254라 명명하였다. Figure 5는 분리한 pHM254 clone의 착색양상을 나타내는데, control pUC18 vector에 비하여 아주 검은 갈색을 나타내는것을 볼 수 있다.

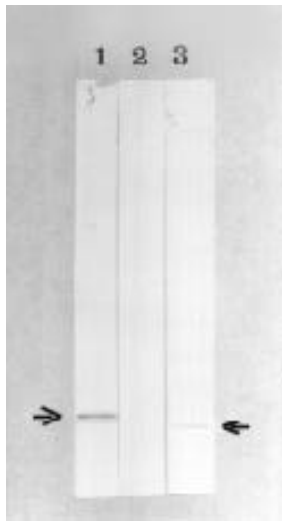

Figure 10. Immunoblot analysis of whole cell lysates using anti - 24 kDa hemin - binding protein antibody. *E. coli* cells were transformed with pET11 and grown to a mid - log phase in the presence of IPTG. Whole cell lysates were prepared and subjected to SDS - PAGE and electroblotting onto Immobilon P. 1, *P. gingi - valis* 381; 2, pET11 vector; 3, constructed DNA.

6. Insert DNA의 결정 및 restriction enzyme pattern

그림 6A는 pHM254 및 분리한 다른 putative clone의 insert DNA 크기를 확인하기 위하여 *Hind* III로 처리한 후 전기영동한 결과를 나타낸 것이다. Insert DNA의 크기는 0.5에서 5.5kb까지 다양하였다. 분리한 pHM254 DNA의 insert DNA 크기는 5.5kb였다. 분리한 clone의 DNA를 분리하여 *BamH* I, *Bgl* II, *EcoR* I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sal* I, 그리고 *Sma* I 등의 여러 제한효소로 처리하여 restriction enzyme mapping을 실시하였다 (Figure 6B). Nucleotide sequencing을 하기 위하여 pHM254를 exonucleaseIII로 serial deletion하여 pUC18 vector에 cloning하였고, 현재 sequencing을 진행 중이다.

7. Southern hybridization

Cloning한 pHM254의 염색체 내 위치를 확인하기 위하여 Southern blotting을 하였다. *P. gingivalis*의 chromosomal DNA를 여러 제한효소로 반응하여 전기영동을 한 후, pHM254의 insert DNA를 probe로 하여 hybridization하였다. *BamH* I, *EcoR* I, *Hind* III 등을 처리하였을 때 한개의 band를 나타내는 것으로 보아 분리한 pHM254 clone은 염색체 내에 single copy로 존재함을 보여 주고 있다 (Figure 7).

8. Gene product의 발현

*P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합단백질에 대한 항체가 pHM254를 갖고 있는 *E. coli* DH5α의 whole cell lysate에서의 비슷한 크기의 단백질과 반응하는지를 보기 위해 immunoblotting analysis를 수행하였다. 그러나, immunoreactive band가 발견되지 않았다.

따라서, 분리한 pHM254 DNA의 단백질 특성을 규명하기 위하여, pHM254의 insert DNA를 분리하여 expression vector인 pET11 vector에 cloning하였다. Cloning시에 reading frame을 맞추기 위하여 pET11vector의 a, b, c를 모두 사용하였다 (Figure 8). Insert DNA와 pET11 vector를 T4 DNA polymerase로 반응시킨 후 ligation하였다. 여러개의 transformant를 얻어 각각 배양하여 0.5mM IPTG로 처리하였을 때, 새로운 단백질의 발현을 보이는 3개의 clone을 확인할 수 있었다. 이들 3개의 clone은 IPTG induction 시에 T7 *lac* promoter가 제대로 발현되어, *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질 (24 kDa)보다는 약간 작은 약 21 kDa 크기의 단백질을 형성하였다(Figure 9).

Overexpression시킨 clone으로 부터 whole cell lysate를 얻어, *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질(24 kDa)에 대한 rabbit antibody를 이용하여 immunoblotting을 하였다. Figure 10은 immunoblotting의 결과로, *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질 (24 kDa)보다는 약간 작은 약 21 kDa 크기의 immunoreactive band를 보여주고 있다. 분리한 pHM254 clone은 hemin 결합 단백질을 포함하고 있는 것으로 생각된다.

IV. 총괄 및 고안

치주질환 병인 균주 중의 하나인 *P. gingivalis*는 heme 의존성으로 *in vitro*에서 성장을 위해서는 철분공급원으로 hemin을 필요로 한다. 본 연구자는 이전의 연구에서 *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질을 확인하여 순수분리하고 특성을 분석한 바 있다[6]. 본 연구는 hemin 결합단백질의 분자생물학적 연구를 통하여 *P. gingivalis*에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득기전을 규명하고자 시행되었다.

Iron (hemin)이 세균의 성장과 세포막 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있고, 이들 발현된 단백질이 iron (hemin)의 획득에 있어 역할을 할 수 있음이 몇몇 균주에서 보고된 바 있다. *P. gingivalis* 381을 연구대상으로 한 본 연구에서도 hemin이 균주의 성장 뿐 만 아니라, 세포막 단백질의 발현에 영향을 미쳐 hemin의 고갈에 의해 30kDa (unheated) 및 24 kDa (heated)의 단백질이 증가되어 발현되었다. 이들 세포막 단백질은 본인 등의 이전 연구에서 hemin 결합 단백질임이 확인된 바도 있다. Heat modifiability 실험 및 immunoblotting 결과에 의하면, 이들 두 단백질은 동일한 것으로 여겨진다. Reducing agent인 2-mercaptoethanol이 이들 단백질에 영향을 미치지 못하였는데, 이는 이들 단백질에 disulfide bond가 존재하지 않음을 제시하여 주고 있다. 한편, 3종의 다른 *P. gingivalis* strain을 대상으로 한 immunoblotting analysis의 결과는 24 kDa (unheted 30 kDa)의 hemin 결합 단백질을 *P. gingivalis* 각 strain이 공유하고 있음을 보여주는 것으로, 이는 이 hemin 결합 단백질이 치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. gingivalis*에 있어 주요

항원 물질일 수 있음을 제시해 주고 있다.

아울러, 본 연구에서는 *P. gingivalis* 381의 24 kDa hemin 결합 단백질 유전자의 클로닝 및 특성분석이 수행되었다. 최초에는 이 hemin 결합단백질의 N'-terminal amino acid sequence에 근거하여 조제한 oligonucleotide probe를 이용하여 유전자 클로닝을 시도하였다. 그러나, 이러한 시도는 성공적이지 못하였는데, 이는 이 방법에 의해 분리된 클론들 모두에서, hemin이 포함되어 있는 LB agar plate 상에서 성장시켰을 때, hemin 결합과 관련되어 특징적으로 나타나는 착색현상을 보이지 않았기 때문이다.

이에, oligonucleotide probe를 이용하는 방법 대신에, Hanson과 Hansen[11]이 *Hemophilus influenza*에서의 hemin 결합단백질 유전자의 클로닝 시 활용한 방법을 이용하여 연구를 진행하였다. 이들은 hemin 결합을 보이는 clone을 screening하기 위해, recombinant colony들을 hemin이 함유되어 있는 LB-amp agar plate에 replica plating하여 수일 간 배양한 후, 검은 갈색으로 착색을 보이는 colony를 putative clone으로 선택하였다. 본 연구에서도 이러한 방법에 의해 약 10,00개의 recombinant colony들을 screening하여, hemin 결합단백질을 포함하고 있는 putative clone으로 여겨지는 10개의 colony를 확인하여 특성을 규명하였다.

이들 clone의 insert DNA의 크기는 0.5에서 5.5kb까지 다양하였으며, 5.5kb로 크기가 가장 큰 clone (pHM254)을 대상으로 하여 특성분석을 수행하였다. 이 clone의 restriction enzyme pattern은 *BamH*I, *Bgl*II, *EcoR*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Xho*I, 그리고 *Sma*I 등의 여러 제한효소 부위가 존재함을 보여주고 있으며, pHM254 clone이 염색체 내에 single copy로 존재함을 Southern hybridization은 보여주고 있다.

*P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합단백질에 대한 항체가 pHM254를 갖고 있는 *E. coli* DH5α의 whole cell lysate에서의 비슷한 크기의 단백질과 반응하는지를 보기 위해 immunoblotting analysis를 수행하였으나, immunoreactive band가 발견되지 않았다. Gene product가 확인이 되지 않은 것은, *lac* promoter에서 부터 *E. coli* RNA polymerase에 의해 시작된 transcription이 이 유전자 이전의 부위에서 종결되어, polymerase가 *P. gingivalis* DNA로부터 RNA를 생성하는데 있어 효율적이지 못하기 때문인 것으로 여겨진다. 24 kDa 유전자로 부터의 아마도 강력한 *P. gingivalis* promoter의 upstream이 *E. coli* RNA polymerase에 의해 인지되지 못하였을 수 있다. *P. gingivalis*의 RNA polymerase는 *E. coli*의 RNA polymerase와 관련성이 없고, 서로 incompatible한 것으로 여겨진다는 보고가 이를 뒷받침 해주고 있다[12].

이러한 문제는 강력한 expression vector system에 fragment를 recloning함으로써 극복될 수 있다. Phage T7 RNA polymerase는 여타의 RNA polymerase에 비해 가장 강력한데, 이는 이 효소에 의한 모든 transcription이 독특한 T7 promoter에서 부터 시작되며, plasmid 상에서의 이 효소에 의한 T7 promoter로 부터의 transcription에 의해 plasmid 길이의 수배에 달하는 transcript를 형성하게 된다. 이에 본 연구에서는 pET11 vector system을 활용하였으며, 이 vector system에서는 21 kDa의 precursor protein으로 발현되었다. 분리한 pHM254 clone은 *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질을 포함하고 있는 것으로 생각된다. Nucleotide sequencing을 하기 위하여, exonucleaseIII로 serial deletion하여 pUC18 vector에 cloning하였고, 현재 sequencing을 진행 중 이다.

V. 결론

본 연구는 *P. gingivalis* 381에서의 hemin 결합 단백질과 관련 유전자의 특성을 분석하고자 수행되었다. Iron (hemin)은 이 균주의 성장 뿐만 아니라 세포막 단백질의 발현에 영향을 미치어, hemin의 고갈에 의해 30 kDa (unheated) 및 24 kDa (heated)의 단백질이 증가되어 발현되었다. 이들 세포막 단백질은 본인 등의 이전 연구에서 hemin 결합 단백질임이 확인된 바도 있다. Heat modifiability 실험 및 immunoblotting 결과에 의하면, 이들 두 단백질은 동일한 것으로 여겨진다. Reducing agent인 2-mercaptoethanol이 이들 단백질에 영향을 미치지 못하였는데, 이는 이들 단백질에 disulfide bond가 존재하지 않음을 제시하여 주고 있다. 한편, immunoblotting analysis의 결과는 24 kDa (unheted 30 kDa)의 hemin 결합 단백질을 *P. gingivalis* 각 strain이 공유하고 있음을 보여주고 있다. 본 연구에서는 *Escherichia coli*에서 *P. gingivalis*의 genomic library를 제조하여, hemin 결합 단백질을 포함하고 있는 putative clone으로 여겨지는 10개의 colony를 얻었으며, 이들 중 약 5.5kb의 가장 큰 insert DNA를 포함하고 있는 clone (pHM254)을 대상으로 하여 restriction enzyme pattern을 결정하였고, Southern hybridization 결과는 이 clone이 염색체 내에 single copy로 존재함을 보여 주

고 있다. 분리한 pHM254 DNA의 단백질 특성을 규명하기 위하여, expression vector인 pET11 vector에 cloning하여 새로운 단백질이 발현된 3개의 clone을 분리하였다. 3개의 clone은 IPTG induction 시에 T7 *lac* promoter가 제대로 발현되어, *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질 (24 kDa) 보다는 약간 작은 약 21 kDa 크기의 단백질을 형성하였으며, *P. gingivalis*의 hemin 결합단백질 (24 kDa)에 대한 rabbit antibody를 이용하여 immunoblotting을 한 결과, 이 21 kDa 크기의 pre - cursor protein band가 반응하였다. 분리한 pHM254 clone은 hemin 결합단백질을 포함하고 있는 것으로 생각된다. 현재 24 kDa hemin 결합 단백질 유전자의 DNA sequencing을 진행하고 있는 중이다.

VI. 참고문헌

1. Bullen, J.J.**:"** The significance of iron in infection ", Rev. Infect. Dis., 3: 1127 - 1138, 1981.
2. Weinberg, E.D.**:"** Iron and infection ", Microbiol. Rev., 42: 45 - 66, 1978.
3. Slots, J., Bragd, L., Wikstrom, M., and Dahlen, G.**:"** The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemconitans, Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults ", J. Clin. Periodont., 13: 570 - 577, 1986.
4. Mayrand, D., and Holt, S.C.**:"** Biology of asaccharolytic black - pigmented *Bacteroides* species ", Microbiol. Rev., 52: 134 - 152, 1988.
5. Carlsson, J., Hoefling, J.F., and Sundqvist, G.K.**:"** Degradation of albumin, haemopex - in, haptoglobin and transferrin, by black - pigmented *Bacteroides* species ", J. Med. Microbiol., 18: 39 - 46, 1984.
6. Kim, S.J., Chu, L., and Holt, S.C.**:"** Isolation and characterization of a hemin - binding cell envelope protein from *Porphyromonas gingivalis ,"* Microb. Pathog., 21: 65 - 70, 1996.
7. Laemmli, U.K.**:"** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ", Nature(London), 227: 680 - 685, 1970.
8. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.**:"** Electrophorectic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellular sheets: procedure and some applications ", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350 - 4354, 1984.
9. Marmur, J.**:"** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microor - ganism ", J. Mol. Biol., 3: 208 - 218, 1961.
10. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.**:"** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor ", CHS, NY, 1982.
11. Hanson, M.S, and Hansen, E.J.**:"** Molecular cloning, partial purification, and charac - terization of a hemin - binding lipoprotein from *Haemophilus influenza* type b ", Mol. Microbiol., 5(2): 267 - 278, 1991.
12. Klimpel, K.W., and Clark, V.L.**:"** The RNA polymerase of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* are unrelated to the RNA polymerase of *Escherichia coli ,"* J. Dent. Res., 69: 1567 - 1572, 1990.

- Abstract -

Characterization of the Gene for the Hemin - Binding Protein from *Porphyromonas Gingivalis*

Sung - Jo Kim
Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Porphyromonas gingivalis, a Gram negative, anaerobic, asaccharolytic rod, is one of the most frequently implicated pathogens in human periodontal disease and has a requirement for hemin for growth. A 30 kDa (heated 24 kDa) hemin - binding protein whose expression is both hemin and iron regulated has recently been purified and characterized in this oral pathogen. This study has identified a hemin - binding *P. gingivalis* protein by expression of a *P. gingivalis* genomic library in *Escherichia coli*, a bacterium which does not require or transport exogenous hemin. A library of genomic DNA fragments from *P. gingivalis* was constructed in plasmid pUC18, transformed into *Escherichia coli* strain DH5α, and screened for recombinant clones with hemin - binding activity by plating onto hemin - containing agar. Of approximately 10,000 recombinant *E. coli* colonies screened on LB - amp - hemin agar, 10 exhibited a clearly pigmented phenotype. Each clone contained various insert DNA. The *Hind* III fragment transferred to the T7 RNA polymerase/promoter expression vector system produced a sligltly smaller (21 kDa) protein, a precursor form, immunoreactive to the antibody against the 24 kDa protein, suggesting that the cloned DNA fragment probably carried an entire gene for the 24 kDa hemin - binding protein.

Key words: hemin, hemin - binding protein, *Porphyromonas gingivalis*, gene cloning

[This study is supported by the academic research fund of Ministry of Education, Republic of Korea]