

한국인 이하선 타액 내 Proline-rich Protein의

다형현상에 대한 연구

연세대학교 치과대학 구강진단·구강내과학교실

구윤성·김종열

- 목 차 -

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 연구방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론

I. 서 론

Mendel 및 Morgan의 연구에 의하여 유전자에 의한 유전 법칙이 발견된 이래, 유전 법칙을 따르는 유전자의 다형현상에 관한 연구는 법의학상 개인식별, 친자감정 및 집단 간의 유전학적 근연성 조사에 응용되어 왔다.

1901년 Landsteiner에 의해 혈액 내 유전적 다형물질인 ABO식 혈액 형질이 발견된 이후, 혈액을 이용한 혈액 내 다형현상에 관한 연구가 유전적 다형현상 연구의 주종을 이루어 왔다.

1953년 Curby에 의해 Double chamber cup이 고안된 이후, 이하선타액을 이용한 타액 내 단백질 다형현상에 관한 연구가 시작되어, Ward등²⁷⁾은 acidurea starch gel electrophoresis를 통하여 타액 내 Amylase의 유전적 변이형을 발견하였고, Azen¹⁾은 이하선 타액을 Ward등과 동일한 방법으로 전기영동하여 다형현상을 보이는 Parotid basic protein(Pb)을 발견하였으며, 이 다형현상의 유전자빈도가 인종에 따라 차이가 있음을 보고하였다. 1972년 Friedman등²⁸⁾은 Azen의 방법대로 전기영동하여 terminal anodal band를 발견하고 이를 acidic salivary protein(pa)이라 명하고, 이의 다형현상을 보고하였다. 1973년 Azen과 Oppenheim⁴⁾은 이

이하선 타액을 Alkaline slab polyacrylamide gel electrophoresis하여 세가지 표현형이 있음을 발견하고, 다형현상을 보이는 이 단백질이 이미 알려진 바 있는 proline-rich protein(pr)과 동일한 단백질을 밝혔다.²⁰⁾

그후, Azen과 Denniston³⁾은 proline-rich protein에 대한 추사에서 또 다른 단백질이 다형현상을 보임을 알게 되었고, 이것이 쌍대(Double-band)를 가지므로 Double-band protein(Ds)이라 명명하였다. Ikemoto등¹²⁾¹⁷⁾은 일본인 195명의 이하선 타액을 Azen의 방법대로 Acid urea starch gel electrophoresis하여 기존의 pa 단백질과 Pb단백질 사이에 다형현상을 보이는 또 다른 단백질이 존재함을 발견하고 이를 salivary parotid middle band protein(pm)이라 명명하였다. 또한 Ikemoto등¹³⁾은 이하선 타액을 SDS polyacrylamide gel electrophoresis하여 고분자량을 갖는 또 다른 다형물질을 발견하고 이를 parotid heavy protein(ph)이라 명명하였다.

이외에도 타액 효소 중 다형현상을 보이는 효소로서 Salivary peroxidase(SAPX), Salivary acid phosphatase(sap), Glucose-6-phosphate dehydrogenase(sgd), salivary esterase(set) 등의 다형현상이 보고된 바 있다.²⁾¹⁴⁾²²⁾²³⁾²⁵⁾²⁶⁾

한편, 위의 연구들을 토대로 일본인 집단을 대상으로 한 타액 단백질의 다형현상에 관한 연구가 Ikemoto등,¹⁶⁾¹⁵⁾ Minaguchi¹⁸⁾¹⁹⁾ Takaesu²⁴⁾ 등에 의하여 체계적으로 시행된 바 있으며, 한국인을 대상으로한 타액 단백질의 다형현상에 관한 연구로는 최근에 Lee²⁰⁾²⁹⁾에 의하여 시행된 온양 집단의 타액 내 Double-band protein의 다형현상에 대한 연구와 동일 집단의 타액 내 proline-rich protein의 다형현상에 대한 연

구가 보고된 바 있다.

이와같이 그동안 타액 단백질의 다형현상에 관한 많은 연구가 있었으나, 혈청 단백질의 다형현상 연구에 비하면 그 연구가 극히 미미하다 하겠으며, 특히 한국인을 대상으로한 타액 단백질 다형현상에 관한 연구는 지극히 초보적인 단계에 머물러 있다 하겠다. 따라서 저자는 향후 한국인에 대한 타액 단백질의 다형현상에 대한 체계적인 연구가 절실히 요청된다고 생각하며, 그 연구의 일환으로 proline-rich protein 및 그와 동시에 관찰되는 Double-band protein의 다형현상에 관한 연구를 시도하고 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 연구방법

20세에서 29세까지의 건강한 한국인 남녀 100 명으로부터 Curby의 Double chamber cup을 사용, 이하선 타액을 10cc 채취하여 1500r. p.m에서 20분간 원심분리한 후 상청액을 취하여 7일간 냉동건조시킨 후 -20°C 에 보관하였다. 보관된 시료를 처음 채취한 타액량의 1/5부피의 완충 용액(0.088M Tris-borate buffer, pH 8.9)으로 용해시켜 5배 농축시킨 다음, Azen과 Oppenheim의 방법대로 Alkaline slab polyacrylamide gel (5.5% gelling agent, 0.088M Trisborate buffer pH 8.9)을 사용하여 200V에서 6시간 동안 수직으로 전기영동하였다. 전기영동 후 겔을 증류수로 수세한 후 0.02M Sodium acetate 용액에 3,3-Dimethoxybenzidine (DMB)을 첨가하고, 초산으로 pH를 3.3으로 맞추는 다음 30% 과산화수소를 첨가하여 상온에서 30분간 염색하였다. 염색된 겔을 증류수로 수세하고 음지에서 건조시킨 후, 겔 표면에 나타나는 band 양상을 관찰하였다.

(table 1)

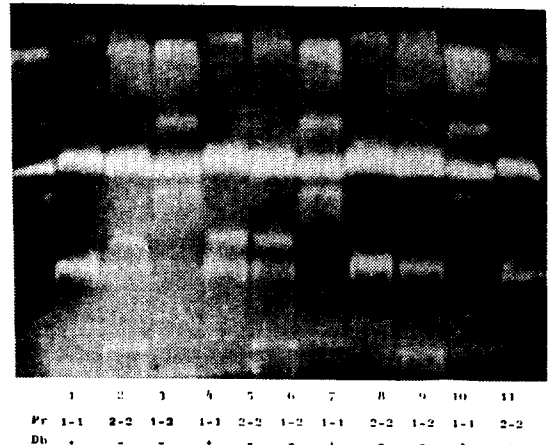
Distribution of phenotypes and gene frequencies (Pr)

Pr phenotypes	Number observed	Number expected	Gene frequencies
Pr 1-1	65	62.4	$\text{Pr}^1 = 0.790$
Pr 1-2	28	33.2	$\text{Pr}^2 = 0.210$
Pr 2-2	7	4.4	
	100	100	

III. 연구성적

이하선 타액을 상기의 방법대로 Alkaline slab polyacrylamide gel electrophoresis한 후 3-3' DMB 염색한 결과 갈색 바탕에 백색으로 음각된 band들이 나타나는데, 이 중 proline-rich protein은 느리게 진행되는 I, II band와 빠르게 진행되는 III, IV band 등 4개의 band로 나타나며, I band와 III band, II band와 IV band는 동시에 나타났다. proline-rich protein의 표현형은 I, III band만 나타나는 Pr 1-1형, II, IV band만 나타나는 pr 2-2형, I, II, III, IV band가 모두 나타나는 pr 1-2형 등 3가지 형태로 나타났다. (사진 1). 또한 I, II band 전방과 I, II band와 III, IV band 사이 두 곳에 동시에 음각 band가 나타나는 경우가 있는데, 이는 Double-band protein (Db)이며, 이 단백질의 표현형은 Db band가 존재하는 경우 (Db+형)와 Db band가 존재하지 않는 경우 (Db-형) 등 2가지로 나타났다.

Fig. 1. Phenotypes of Pronine-rich and double-band Protein



(table 2)

Distribution of phenotypes and gene frequencies (Db)

Db phenotypes	Number observed	Number expected	Gene frequencies
Db(+)	13	13.5	Db ⁺ =0.067
Db(-)	87	86.5	Db ⁻ =0.933
	100	100	

100명의 이하선 타액 중 proline-rich protein의 표현형은 pr 1-1형이 65명, pr 1-2형이 28명, pr 2-2형이 7명으로 나타났으며, 이를 Hardy-weinberg rule에 따라 유전자빈도를 조사한 결과, Pr¹은 0.790, Pr²는 0.210으로 나타났다. (table 1). Double-band protein의 표현형은 Db+형 13명, Db-형 87명으로 나타났고, 이 단백질의 유전자빈도는 Db⁺는 0.067, Db⁻는 0.933으로 나타났다. (table 2)

IV. 총괄 및 고찰

Proline-rich protein은 이하선 타액 단백질

의 약 4%를 차지하며, Alkaline slab polyacrylamide gel로 전기영동할 경우, 진행 속도가 서로 다른 4개의 단백질로 분리되어 나타나며, 이 단백질들의 아미노산 조성은 단백질에 따라 약간 다르게 나타나나, 모두 Proline, Glycine이 많이 포함되어 있는 반면, Cysteine, Cystine, Tyrosine은 전혀 포함되어 있지 않은 공통점을 가지고 있고, Glutamic acid, Aspartic acid 등 산성 아미노산이 비교적 많이 검출되는데, 이 아미노산들은 단백질에 포함되어 있을 때에는 Amide 형태인 Glutamine, Asparagine으로 존재하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ (table 3)

(table 3)

Aminoacid Composition of four proline-rich proteins from human parotid saliva

Residue	Residues/1000 ^a			
	Protein I	Protein II	Protein III	Protein IV
Asp	76	77	107	103
Thr	12	3	5	12
Ser	43	39	49	59
Glu	194	255	256	195
Pro	271	261	212	220
Gly	220	213	197	211
Ala	10	8	12	11
Val	28	21	29	35
Cys	0	0	0	0
Met	0	0	0	0
Ile	21	13	18	23
Leu	27	22	34	38
Tyr	0	0	0	0
Phe	9	8	10	12
Lys	17	16	11	12
His	25	22	21	24
Arg	47	42	39	45

○Not corrected for losses.

Proline-rich protein의 다형현상에 관한 연구는 1971년 Azen과 Oppenheim⁴에 의하여 처음 시작되었는데, 그들은 120명의 백인, 79명의 흑인, 40명의 중국인을 대상으로 이하선 타액을 채취하여 Alkaline slab polyacrylamide gel electrophoresis하여 Oppenheim등²⁰에 의해서 이미 밝혀진 4개의 protein이 I, III protein만 나타나는 Pr 1-1형, III, IV protein만 나타나는 pr 2-2형, I, II, III, VI protein이 모두 나타나는 Pr 1-2형 등 3가지 형태의 표현형으로 다형현상을 보임을 발견하고, 이 단백질의 유전자빈도가 백인 Pr¹=0.73, Pr²=0.27, 흑인 Pr¹=0.80, Pr²=0.20, 중국인 Pr¹=0.84, Pr²=0.16등으로 인종에 따라 차이를 보임을 보고하였다.

일본의 Ikemoto등¹⁶은 일본인 102명의 이하선 타액을 채취하여 proline-rich protein의 유전자빈도를 조사한 결과, Pr¹=0.745, Pr²=0.255로 나타남을 보고했고, Takaesu²⁴는 일본의 남서 제도 주민의 proline-rich protein의 유전자빈도를 조사하여 Amami의 유전자 빈도는 Pr¹=0.771, Pr²=0.229, Okinawa의 유전자빈도는 Pr¹=0.656, Pr²=0.344, Miyako의 유전자빈도는 Pr¹=0.758, Pr²=0.242, Yaeyama의 유전자빈도는 Pr¹=0.746, Pr²=0.254등으로 나타났으며, 일본 내에서도 지역에 따라 유전자빈도가 다르게 나타남을 보고 하였다.

한국인에 있어서 proline-rich protein의 다형현상에 관한 연구는 Lee²⁹의 연구가 보고된 바 있으며, 그는 온양 집단에서의 Proline-rich protein의 유전자빈도가 Pr¹=0.814, Pr²=0.186으로 나타나며, 이는 일본인 집단과 중국인 집단의 중간 정도임을 보고하였다.

본 연구에서 나타난 한국인의 proline-rich protein의 유전자빈도는 Pr¹=0.790, Pr²=0.210으로서, Pr¹=0.790은 일본 내 어떠한 지역의 유전자 빈도보다도 높게 나타났으나, 중국인에 비해서는 낮게 나타났으며, 이것은 Lee의 연구결과와 일치된 결과이다.

Double-band protein은 1974년 Azen과 Deniston³이 proline-rich protein의 다형현상에 관한 추사에서 이미 알려진 바 있는 I, II, III, IV band 외에 다형현상을 보이는 또 다른 한 쌍의 band가 있음을 발견하고, 이 단백질이 Pro-

line-rich protein과 무관한 새로운 단백질이며 이 단백질 다형현상의 표현형은 쌍대가 존재하는 Db⁺형과 쌍대가 존재하지 않는 Db⁻형 등 2가지로 나타나며, 이 표현형은 Db⁺인자형에 의하여 좌우됨을 밝히고, 그 유전자빈도가 백인 Db⁺=0.12, Db⁻=0.88, 흑인 Db⁺=0.56, Db⁻=0.44, 중국인 Db⁺=0.07, Db⁻=0.93으로 나타남을 보고하였다.

Ikemoto등¹⁶은 일본인 집단의 Double-band protein의 유전자빈도를 조사하여 일본인 집단의 유전자빈도는 Db⁺=0.05, Db⁻=0.95임을 밝혔고, 한국인의 Double-band protein의 유전자빈도는 온양 집단을 대상으로 한 Lee²⁹의 연구결과에 의하면 Db⁺=0.06, Db⁻=0.94로 보고되었는데, 본 연구에서 나타난 유전자빈도 Db⁺=0.067, Db⁻=0.933은 proline-rich protein과 마찬가지로 일본인 집단과 중국인 집단의 중간 정도를 나타남으로서 Lee의 결과와 일치되는 결과를 보였다.

이미 보고된 바 있는 proline-rich protein 및 Double-band protein의 유전자빈도와 본 연구결과 나타난 한국인의 유전자빈도를 비교하면 다음과 같다. (table 4)

한편, Ikemoto등¹⁵은 이하선 타액의 다형현상에 관한 연구가 인류 유전학적 근연성 조사에서 뿐만아니라 범의학상 개인식별 및 친자감정에 응용될 수 있음을 보고하였다. 일본인에 있어서 기존의 혈장 단백질 및 적혈구 효소의 다형현상만을 이용하여 친자감정할 경우, 잘못 짚지워진 친자를 91.9%까지 제외시킬 수 있는데 비해, 이하선 타액 단백질의 다형현상을 추가로 이용할 경우, 잘못 짚지워진 친자를 94.4%까지 제외시킬 수 있으며, 특히 proline-rich protein의 다형현상만으로도 잘못 짚지워진 친자의 14.8%를 제외시킬 수 있음을 보고하였다.

또한, proline-rich protein의 구강 내 기능 및 구강 질환과의 상관 관계는 명확히 밝혀진 바 없으나, proline-rich protein은 법랑질을 구성하는 단백질과 매우 유사한 구조를 가지며, hydroxyapatite와 친화성이 매우 크며, enamel pellicle의 형성에 관여하는 것으로 추정되고 있다.^{20,10,11}

따라서, 앞으로 한국인에 있어서 이하선 타액 내 단백질의 다형현상에 관한 체계적인 역학 조사가 요구된다 하겠고, 아울러 각 타액 단

〈table 4〉

Comparison of gene frequencies (Pr, Db)

race	Pr ¹	Pr ²	Db ⁺	Db ⁻	reference
Caucasian	0.73	0.27	0.12	0.88	4
Black	0.80	0.20	0.56	0.44	4
Chinese	0.84	0.16	0.07	0.93	4
Japanese	0.745	0.255	0.05	0.95	16
Japanese (Amami)	0.771	0.229	0.066	0.934	22
Japanese (Okinawa)	0.656	0.344	0.038	0.962	22
Japanese (Miyako)	0.758	0.242	0.052	0.948	22
Japanese (Yaeyama)	0.746	0.254	0.041	0.959	22
Korean (Onyang)	0.814	0.186	0.06	0.94	28, 29
Korean	0.79	0.21	0.067	0.933	present study

백질의 구강 내 역할 및 구강 질환과의 상관관계를 밝히는 연구 또한 절실히 요구된다 하겠다.

V. 결 론

저자는 한국인 100명의 이하선 타액을 Alkaline slab Polyacrylamide gel electrophoresis 후 3.3' DMB 염색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한국인 이하선 타액 내 proline-rich protein의 유전자빈도는 $Pr^1=0.790$, $Pr^2=0.210$ 으로 나타났다.
2. 한국인 이하선 타액 내 Double-band protein의 유전자빈도는 $Db^+=0.067$, $Db^-=0.933$ 으로 나타났다.
3. 한국인 이하선 타액 내 proline-rich protein 및 Double-band protein의 유전자 빈도는 일본인과 중국인의 유전자 빈도의 중간 정도임이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Azen, E.A.: Genetic polymorphism of basic proteins from parotid saliva, *Science*, 176:673-674, 1971.
2. _____: Salivary peroxidase (SAPX). Genetic modification and relationship to the proline-rich (Pr) and acidic (Pa) proteins, *Biochem. Genet.*, 15:9-28, 1977.
3. Azen, E.A., Deniston, C.L.: Genetic

polymorphism of human salivary proline-rich proteins: Further genetic analysis, *Biochemical Genetics*, 12:109-120, 1974.

4. Azen, E.A., Oppenheim, F.G.: Genetic polymorphism of proline-rich human salivary proteins, *Science*, 180:1067-1069, 1973.
5. Bear, P.N. et al.: Studies on periodontal disease in the mouse, *J. Dental Research*, 40:23-33, 1961.
6. Chung, C.S. et al.: Genetic and epidemiologic studies of oral characteristics in Hawaii's school children. I. Caries and periodontal disease, *J. Dental Research*, 49:1374-1385, 1970.
7. Friedman, R.D., Merrit, A.D.: Characterization of variant proteins in human parotid saliva (abst.), *Am. J. Hum. Genet.*, 25:28a, 1973.
8. Friedman, R.D., Merrit, A.D., Rivas, M.L.: Genetic studies of human acidic salivary protein (Pa), *Am. J. Hum. Genet.*, 27:292-303, 1975.
9. Gorlin, R.J., Stallard, R.E., Shapiro, B.L.: Genetics and periodontal disease, *J. periodontol.*, 38:5-10, 1967.
10. Hay, D.I.: The Absorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel, *Arch. Oral Biol.*, 12:937-946, 1967.
11. _____: Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle, *J. Dental Research*, 48:806-810, 1969.

12. Ikemoto, S. et al.: New genetic marker in human parotid saliva (Pm), *Science*, 197:378-379, 1977.
13. Ikemoto, S. et al.: Variant protein in human parotid saliva detected by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and its inheritance, *Ann. Hum. Genet. Lon.*, 43: 11-14, 1979.
14. Ikemoto, S. et al.: Phenotype and gene frequencies of acid phosphatase (s-AcP) in the human parotid saliva, *Hum. Genet.*, 71:30-32, 1985.
15. Ikemoto, S. et al.: Frequencies of salivary genetic marker systems in the Japanese population and their application to forensic medicine, *Forensic Science International*, 14:41-47, 1979.
16. Ikenoto, S., Minaguchi, K., Hinohora, H.: Genetic polymorphisms of human parotid salivary proteins (Pa, Pb, Pr, Db and Pm) and salivary amylase enzyme in Japanese population, *Hum. Hered.*, 27:328-331, 1971.
17. Minaguchi, K., Ikemoto, S., Suzuki, K.: Isolation and partial characterization of a polymorphic protein (Pm) in human parotid saliva, *Biochemical Genetics*, 19: 617-621, 1981.
18. Minaguchi, K., Suzuki, K.: Frequencies of salivary genetic marker systems in Caucasians with an emphasis on Pm and Ph systems, *Forensic Science International*, 17:5-7, 1981.
19. Minaguchi, K. et al.: Studies of genetic markers in human saliva. Analysis on electrophoresis of parotid saliva by Sal phenotyping system, *Bull. Tokyo Dental College* 20:25-30, 1979.
20. Oppenheim, F.G., Hay, D.I., Franzblau, C.: Proline-rich proteins from human parotid saliva, *Biochemistry*, 10:4233-4238, 1971.
21. Fruitt, K.M. et al.: The interaction of salivary proteins with tooth surface, *J. Dental Research*, 48:818-823, 1969.
22. Takaesu, Y.: Studies of salivary genetic marker systems in south western islands of Japan, The 212th Tokyo Dental College Congress, 1982.
23. Tan, S.G.: Human saliva esterase: Genetic studies, *Hum. Hered.*, 26:207-216, 1976.
24. Tan, S.G., Ashton, G.C.: Salivary acid phosphatases: Genetic Studies, *Hum. Hered.*, 26:81-89, 1976.
25. _____: An autosomal glucose-6-phosphate dehydrogenase (Hexose-6-phosphate dehydrogenase) polymorphism in human saliva, *Hum. Hered.*, 26:113-123, 1976.
26. Tenovueo, J., Fruitt, K.M., Relationship or the human salivary peroxidase system to oral health, *J. of oral pathology* 13:573-584, 1984.
27. Ward, J.C., Merrit, A.O., Bixter, O.: Human salivary amylase: Genetics of electrophoretic variants, *Am. J. Hum. Genet.*, 22:403-409, 1971.
28. 이하규 : 온양집단의 타액내 Double-band protein(Db) 다형현상에 대한 연구, 성심여자대학 자연과학연구소 연보 제8호 19-24, 1986.
29. 이하규 : 온양 집단의 타액 내 Proline-rich Protein(Pr) 다형현상에 대한 연구, 성심여자대학 자연과학연구소 연보, 제9호 21-27, 1987.

A Study of Polymorphisms of Proline-Rich Protein in the Korean Population

Y.S.Koo, D.B.S., C.Y.Kim, D. D. S.

*Dept. of Oral Diagnosis & Oral Medicine,
School of Dentistry, Yonsei University*

Abstract

After Alkaline slab polyacrylamide gel electrophoresis and 3-3' DMB staining of parotid saliva from 100 Korean population, Author have got following conclusions.

1. The gene frequencies of proline-rich protein in the Korean population were $Pr^1 = 0.79$, $Pr^2 = 0.21$.
2. The gene frequencies of Double-band protein in the Korean population were $Db^+ = 0.007$, $Db^- = 0.933$.
3. The gene frequencies of proline-rich protein and Double-band protein of the Korean population were between those of the Chinese and Japanese population.