대한치과보존학회지 : Vol. 22, No. 1, 1997

*Porphyromonas endodontalis*와 *Porphyromonas gingivalis*의 단백질분해능력에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보존학교실

하주희 · 최호영

Abstract

COMPARISON OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* AND *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

Joo-Hee Ha, D.M.D., M.S.D., Ho-Young Choi, D.D.S., Ph.D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University

Porphyromonas endodontalis is specifically involved in endodontic infections. The bacterium can be isolated almost exclusively only from infected root canals. *P. gingivalis* also has been implicated in endodontic infection. Pathogenicity of *P. gingivalis* is attributed to a variety of virulence factors, especially proteases, produced by the bacterium. Importance of *P. endodontalis* in endodontic infection has been revealed. However, the pathogenic property of *P. endodontalis* has not been extensively studied. The present study was undertaken to characterize the proteolytic activity of *P. endodontalis* and compare the activity with that of *P. gingivalis* which has the most potent and diverse proteases among oral bacteria. For this purpose, culture supernatants(SUP) and cell extracts(CE) were obtained from these two bacteria and were subjected to zymography using 15% polyacrylamide gel copolymerized with gelatin, type I, IV collagens or albumin. Hydrolysis of the collagens was further investigated by the cleavage assay using native type I and IV collagens in solution-phase. The results were as follows:

1. *P. endodontalis* apparently has a proteolytic activity that is comparable with that of *P. gingivalis*.
2. SUP and CE obtained from *P. endodontalis* and *P. gingivalis* showed the strongest activity for gelatin, followed by type I and IV collagens, and albumin.
3. In the zymography, no noticeable difference in proteolytic activity for gelatin and albumin between the SUP and CE was observed, but in the cleavage assay using native collagens, the SUP showed a stronger collagenolytic activity than the CE.
4. The gelatinolytic activity of both the SUP and CE from these two bacteria was diminished in the presence of $CaCl_2$ or reducing agents such as β-mercaptoethanol and dithiothreitol(DTT).

5. Type I(calf skin and human placenta) collagenolytic activity of *P. endodontalis* and *P. gingivalis* was reduced by DTT but not affected by $CaCl_2$. The inhibitory effect of DTT, however, was reduced to some extent by $CaCl_2$.
6. Type IV collagenolytic activity of these two bacteria was not affected by $CaCl_2$ but increased to some extent in association with the reducing agents.
7. Hydrolysis of albumin by *P. endodontalis* and *P. gingivalis* was demonstrated only in the presence of the reducing agents.

The overall results indicate that with respect to proteolytic activity, *P. endodontalis* appears to be as potent as *P. gingivalis*, or maybe more, and its proteolytic characteristic is similar to that of *P. gingivalis*. This suggests that *P. endodontalis* has so potent proteolytic activity that can participate by itself in endodontic infections and apical periodontitis, causing tissue destruction.

I. 서 론

Miller[1]가 괴사된 치수조직내에 세균이 존재한다고 발표한 이래, 치수질환에서 세균의 중요성이 인식되기 시작하였다. Henrici와 Hartzell[2]은 정상 치수인 경우 무균상태이며, 근관치료는 조직의 감염을 미리 예방하고 이미 존재하는 감염을 제거하는 것이라고 발표하여 세균의 중요성을 강조하였을 뿐만 아니라 이미 현대적 개념의 근관치료의 궁극적인 목적을 제시하였다. 이후 행해진 연구들에서도 치수 및 치근단 주위질환의 대부분이 세균의 감염, 그리고 감염에 따른 세균의 직접적인 조직파괴 또는 세균에 대한 조직의 반응에서 오는 이차적인 결과에 의한 것임을 밝혀냈다[3,4]. 그러나 근관의 감염은 감염시간 또는 감염진행 경과에 따라 세균의 분포가 다르게 나타나는 동적인 상태이지만 그 세균분포의 변화는 일정한 양상을 보인다고 밝혀진 것은 최근의 일이다. 즉 초기감염시에는 통성(facultative) 세균인 streptococci나 enterococci 등이 주로 나타나며, 치수괴사가 유발되면서 근관이 보다 혐기적 상태로 변해갈 때 특히 치근단 부위에서는 혐기성 세균이 크게 증가한다[5,6]. 1970년대 초반까지만 해도 초기감염세균들만이 주로 배양이 가능하여 이들 세균이 근관감염시 나타나는 중요한 세균으로 인식되었으나, 세균배양법이 크게 발전되면서 1976년, Sundqvist[7]는 근관감염시 혐기성 세균이 많이 나타나는 것을 발견하였고 이들 혐기성 세균이 근관감염시에 중요한 역할을 한다고 시사하였다.

괴사치수조직내에는 혐기성 세균이 전체 배양분리균 중 70~95%를 차지하고 있다[8,9]. 진행된 감염근관에서 발견되는 세균의 종류는 극히 제한되어 있으며 이들 혐기성 세균의 대부분은 흑색의 집락을 형성하는 소위 "black-pigmented anaerobic rods"이다. 이 중에서도 *Porphyromonas*와 *Prevotella*속(genus)에 속하는 세균이 대종을 이루고 있으며[10,11], 최근의 연구에서 특히 *Porphyromonas*(과거 *Bacteroides*) *gingivalis*(이하 *P. gingivalis*로 표기)와 *Porphyromonas endodontalis*(이하 *P. endodontalis*로 표기)가 근관감염과 치근단병소와 관련하여 나타나는 주요 세균종이라고 제시하고 있다[10,12,13]. 근관감염의 결과로 유발된 농양에서도 이 두 세균이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다[9,11,13,14]. *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 근관내 출현은 임상적 증상과 관련해서도 중요한 의미를 갖는데, Sundqvist[7]는 흑색집락형성 혐기균은 동통을 동반하는 근관감염과 관련성이 있다고 최초로 보고하였다. 이후 많은 연구들이 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*는 근관감염과 치근단 치주염의 동통과 깊은 연관성이 있음을 입증하였고[15-17], 또한 이 두 세균은 급성감염과도 관련해서 나타나는 것으로 알려지고 있다[14]. *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*가 어떻게 급성, 동통성 근관 및 치근단 감염과 관련해서 나타나는지에 대한 학설은 정립되어 있지 않으나 Hahn 등[18]과 Hashioka 등[19]은 동통성 근관감염의 확산은 이들 세균이 생산하는 분해효소와 관련이 있을 것이라고 보고하였다.

*P. gingivalis*는 근관감염 이외에도 골파괴를 동반하는 진행성 치주질환, 특히 성인형 치주염에서 중요한 역할을 하는 반면[13,20-24], *P. endodontalis*는 거의 근관과 관련된 감염시에만 나타나는 세균으로 보고된 바 있다[21,22,24]. *P. endodontalis*의 이 독특한 출현양상은 근관이 형태적으로 특별한 구조를 갖고 있어 *P. endodontalis*와 같이 조직에 대한 부착능력이 없는 세균도 집락화할 수 있기 때문이고[25], *P. endodontalis* 자신은 단백질분해효소, 내독소(lipopolysaccharide; LPS), 외독소 등 많은 독성인자(virulence factors)를 생산하여 조직파괴와 더불어 증식이 가능하기[3,4,24] 때문인 것으로 보인다.

*P. gingivalis*는 다른 어떤 구강세균보다도 많은 종류의 독성인자들을 갖고 있으나[26] 그 중에서도 효소의 광범위한 분해능력은 이 세균의 강력한 병원성을 반영하고 있다[27]. *P. gingivalis*는 일반 구강세균에서 나타나지 않는 다양한 분해능력의 trypsin-like 단백질분해효소[28-36]를 비롯하여 collagenase[28,30-42], 그 외에 여러 thiol(cysteine) proteases[30,43-46], aminopeptidases [32,34,47] 등의 단백질분해효소, neuraminidase[26,30]와 β-N-acetylhexosaminidase[48] 같은 exoglycosidases, 그리고 lipases[30], phospholipases[31], aminoglycanases[30], phosphatases[49] 등의 가수분해효소를 생산한다. 이들 분해효소의 단독 또는 복합작용으로 *P. gingivalis*는 알려진 모든 세포간질단백질, 조직내 기질(matrix)단백질 및 혈장단백질[34,44,50] 그리고 인체의 방어기전 단백질인 immunoglobulins와 보체[34,46,51,52,53], 탐식세포의 이들 방어기전 단백질을 위한 수용기[54,55] 등을 모두 분해시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 보고된 바 있다[26].

*P. endodontalis*는 근관감염에서의 중요한 원인균임에도 불구하고 *P. gingivalis*에 비해 연구가 활발히 이루어지고 있지 않았으며, 일부 연구에서 *P. endodontalis*의 병원성, 독성인자들에 대한 극히 제한적인 정보를 제공한다. 예를 들어, *P. endodontalis*의 LPS는 보체활성화를 유도할 수 있고[56] 치주인대세포들을 자극하여 interleukin-6을 생산함으로써[57] 염증을 악화시키고 치근단병소를 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있고, 또한 *P. endodontalis*는 치은섬유모세포로 하여금 plasminogen activator의 생산을 증가시켜, 결과적으로 조직내 plasmin의 활성을 높임으로써[58] 조직파괴에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 그러나 *P. endodontalis*가 근관감염에서 주요세균으로서 역할을 하고 있다는 사실을 입증하기 위해서는 보다 다각적인 연구가 이루어져야 한다.

Van Winkelhoff 등[24]은 *P. gingivalis*는 구강세균중 가장 강력하고 다양한 단백질분해효소를 소유하고 있고, *P. endodontalis*는 그 다음으로 강한 단백질분해능력이 있으며, 단백질분해능력은 이들 세균의 병원성과 깊은 관련이 있을 것이라고 시사하였다. 그럼에도 불구하고 *P. endodontalis*의 단백질분해효소에 대한 연구는 극히 미미한 실정이다. 본 연구에서는 *P. endodontalis*의 단백질분해능력을 구명하기 위하여 이미 알고있는 *P. gingivalis*의 단백질분해능력과 비교하여, 이들 단백질분해효소의 성상을 관찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험균주 및 배양

실험균주로 *P. gingivalis* 세균종의 대표균주인 2561(ATCC 33277)과 *P. endodontalis*의 대표균주인 ATCC 35406을 사용하였다. 두 세균은 yeast extract(5 mg/ml), hemin(5 μg/ml), vitamin K(0.2 μg/ml)가 포함된 1.5-l half-strength (18.5 mg/ml) brain heart infusion(BHI ; Difco) broth배지를 사용하여 37℃에서 혐기적(85% N_2, 10% H_2, 5% CO_2)으로 2일간 배양하였다[59].

2. Crude enzyme의 준비

균이 증식배양된 BHI broth를 12,000 x *g*로 4℃에서 40분간 원침하여 배양상청액과 균 pellet로 분리하였고, 배양상청액은 후에 crude enzyme을 분리하기 위해 사용 전까지 4℃에 보관하였다.

침전된 균 pellet는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 4℃에서 40분간 12,000 x *g*로 1회 세

정한 다음 1% Triton X-100(Sigma)이 포함된 50 mM Tris-HCl buffer(30 ml)에 부유시켰으며, 균부유액은 magnetic stirrer를 사용하여 4℃에서 30분간 교반하여 표면단백질을 추출하였다. 교반 후 12,000 x *g*로 4℃에서 1시간동안 원침하여 균표면단백질이 포함된 상청액을 수집하였다.

수집된 두 세균의 배양상청액과 균추출물 상청액에 각각 ammonium sulfate를 첨가하여 80% 포화용액을 만든 다음 4℃에서 16~18시간 동안 교반한 후 4℃에서 12,000 x *g*로 40분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 침전단백질은 소량(3~5 ml)의 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 용해시킨 다음 같은 buffer로 4℃에서 2일간 투석한 후 용해되지 않은 침전물은 4℃에서 12,000 x *g*로 30분간 원침하여 제거시키고 상청액만을 crude enzyme으로 사용하였다[35]. Crude enzyme의 단백질 농도는 Lowry방법[60]으로 측정하였다.

3. Zymography

두 세균으로부터 준비한 crude enzyme의 단백질분해능력을 비교 관찰하기 위해 zymography[61]를 시행하였다.

분해효소를 위한 기질(substrate)단백질로 gelatin(bovine skin ; Sigma G 6650), type I collagen(acid-soluble, calf skin ; Sigma C 3511), type Ⅳ collagen(acid-soluble, human placenta ; Sigma C 7521), 그리고 albumin(bovine serum ; Sigma A 7030) 등 4가지를 사용하였으며, 각각의 기질(200 μg/ml)을 acrylamide 용액과 함께 혼합하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-15% polyacrylamide gel(1.5-mm 두께)로 중합시켰다. 준비된 crude enzyme(10 μg) 각각을 β-mercaptoethanol이 포함된 것과 포함되지 않은 전기영동용 2X sample buffer와 혼합한 후 열처리하지 않은 채로 gel 상에서 Laemmli방법[62]으로 전기영동하였다.

전기영동 후 2% Triton X-100이 포함된 5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 gel을 22℃에서 30분간 rocker 상에서 수세하여 gel내 SDS를 제거한 다음, 같은 buffer로 2회 더 수세하였고, 수세된 gel은 10 mM $CaCl_2$, 5 mM dithiothreitol (DTT; Sigma)을 각각 첨가했거나 첨가하지 않은 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 37℃에서 16~18시간 배양하여 단백질분해효소를 활성화시켰다. 배양 후 gel은 고정용액(50% methanol, 12% acetic acid)으로 22℃에서 1시간동안 고정시키고 나서 0.1% Coomassie blue로 30분간 염색하였으며, 염색된 gel은 탈색용액(5% methanol, 7% acetic acid)으로 탈색시킨 다음 gel에 나타난 투명대를 단백질분해상태로 간주하여 각 crude enzyme의 단백질분해능력을 비교 관찰하였다[35].

4. Native collagen분해실험

Crude enzyme에 의한 native collagen의 분해양상을 보다 면밀히 관찰하기 위해[35] 앞서 기술한 type I collagen(calf skin)과 type Ⅳ collagen 이외에 human placenta type I collagen (acid-soluble ; Sigma C 7774)을 추가로 사용하여, 이들 collagen을 증류수(HPLC grade; Merck) 또는 10 mM HCl에 용해시킨 다음 Tris-HCl buffer(pH 7.5)와 혼합시켜 최종적으로 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)의 0.9% NaCl-collagen용액(1 mg/ml)이 되도록 조절하였다.

Collagen용액 25 μl(25 μg)를 2~3 μl(5 μg)의 crude enzyme과 혼합한 후 10 mM $CaCl_2$와 5 mM DTT를 각각 첨가, 또는 첨가없이 22℃와 37℃에서 24시간동안 배양하였다. 배양혼합액은 β-mercaptoethanol이 포함된 4X sample buffer(15 μl)와 함께 100℃에서 10분간 열처리하여 혼합액내 효소의 단백질분해활성을 정지시킨 다음 혼합액 20 μl를 SDS-10% polyacrylamide gel(1.0-mm 두께) 상에서 전기영동 후 gel은 위에 기술한 바와 같이 0.1% Coomassie blue로 염색하고 탈색한 다음 관찰하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. Zymography

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 crude enzyme으로 사용된 균추출물 상청액(cell extract; 이하 CE)과 배양상청액(culture supernatant; 이하 SUP)의 기질단백질에 대한 분해능력을 zymography로 시행하여 관찰하였다.

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 gelatin (bovine skin)분해효소들은 분자량의 크기가 36 kDa 이상인 것으로 나타났다. 두 세균의 전체적인 gelatin분해능력에는 차이가 없었고 CE와 SUP간에도 큰 차이는 발견되지 않았으나 SUP이 CE보다는 분자량이 큰 gelatin분해효소를 갖고 있는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 두 세균의 CE와 SUP의 전체적인 gelatin분해능력은 $CaCl_2$에 의해 감소하였으며(Fig. 1B), 환원제인 β-mercaptoethanol 또는 DTT가 함께 존재할 때는 분해능력이 더욱 감소하였다(Fig 1A, C). 환원제에 의한 영향은 *P. gingivalis*가 *P. endodontalis*보다 크게 받았고, 특히 SUP이 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

Type I collagen(calf skin)에 대한 두 세균의 분해능력은 gelatin분해능력에 비해 약하였고, collagen분해효소의 분자량 크기는 두 세균 모두 45 kDa 이상으로 나타났다. *P. endodontalis*가 *P. gingivalis*보다 전체적으로 collagen분해능력이 약간 큰 것으로 나타났고, SUP이 CE보다 큰 분자량의 collagen분해효소를 갖고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 두 세균 모두 $CaCl_2$의 영향을 크게 받지 않았으나 일부 고분자량의 효소들과 45 kDa 크기의 효소가 $CaCl_2$에 의해 분해능력이 감소되었다(Fig. 2B). CE와 SUP을 β-mercaptoethanol로 처리한 상태에서는 collagen분해효소들이 영향을 받지 않았으나(Fig. 2A), 전기영동 후 gel을 DTT와 함께 배양하면 일부 고분자량의 효소와 45 kDa 효소의 collagen분해능력이 약간 감소하였다. 반면 95 kDa과 55 kDa 사이의 일부 효소들의 활성은 증가하였다(Fig. 2C).

Type Ⅳ collagen(human placenta)에 대한 분해능력은 약하게나마 약 40 kDa부터 관찰되었으며, 두 세균의 type Ⅳ collagen분해능력은 gelatin과 type I collagen에 대한 것보다 약하게 나타났다. *P. gingivalis*의 CE는 95 kDa과 55 kDa 사이, SUP은 55 kDa과 43 kDa 사이에서 분해능력을 보인 반면, *P. endodontalis*의 CE와 SUP은 보다 큰 분자량에서 type Ⅳ collagen분해효소의 활성이 주로 관찰되었다(Fig. 3A). 두 세균 모두 $CaCl_2$의 영향을 받지 않았으며(Fig. 3B), 두 세균의 CE와 SUP 모두 β-mercaptoethanol, 또는 DTT에 의해 type Ⅳ collagen분해활성이 증가하였다(Fig. 3A, C). 특히 *P. endodontalis*의 SUP은 β-mercaptoethanol로 처리했을 때 고분자량의 분해효소들과 45 kDa 분해효소의 활성이 증가하였다(Fig. 3A, C).

사용된 기질단백질 중 albumin(bovine serum)에 대한 분해능력이 가장 낮게 나타났는데 환원제로 처리하지 않는 한 두 세균 모두 분해능력이 나타나지 않았다. 다만 *P. endodontalis*의 SUP은 환원제가 없어도 극히 미약하나마 활성을 보였다. 그러나 CE와 SUP을 β-mercaptoethanol로 처리했을 경우, 두 세균 모두 CE와 SUP내 고분자량의 효소들이 albumin분해활성을 보였다(Fig. 4A). 이 효소들의 albumin분해활성은 $CaCl_2$의 영향을 받지 않았으며(Fig. 4B), 전기영동 후 gel을 DTT와 함께 배양했을 때 두 세균 모두 CE와 SUP내 95 kDa과 55 kDa 사이의 효소들이 추가적으로 albumin분해능력을 보였다(Fig. 4C).

2. Native collagen분해능력

Zymography를 시행할 때 전기영동 준비과정이나 전기영동시에 발생할 수 있는 CE와 SUP내 단백질분해효소와 collagen의 변성을 배제하고 collagen의 분해양상을 관찰하기 위해 collagen의 자연상태를 유지한 용액상태에서 CE와 SUP의 collagen분해실험을 시행하였다.

*P. gingivalis*는 22℃에서 type I collagen (calf skin)과 함께 배양했을 때 type I collagen에 대해 강한 분해능력을 보였다. Type I collagen은 CE에 의해 거의 완전히 분해되어 일

부만이 60 kDa과 44 kDa의 절편으로 존재하였으나 *P. gingivalis* CE의 활성은 DTT에 의해 약간 억제되는 것으로 나타났다. SUP도 DTT에 의해 collagen분해능력이 억제되었으나 그 영향은 극히 적은 것으로 관찰되었으며, DTT에 의한 억제는 $CaCl_2$가 첨가되었을 때 감소되었다(Fig. 5A). *P. endodontalis*도 *P. gingivalis*와 유사한 양상을 보여 22℃에서 CE는 type I collagen을 거의 분해시키고 collagen의 일부만을 44 kDa 절편으로 남겼으며, *P. endodontalis*의 CE는 DTT에 의해 아주 약하게 type I collagen분해능력이 억제된 반면 SUP은 DTT의 영향을 받지 않았고 44 kDa 절편대신 소량의 67 kDa 절편을 남겼다(Fig. 5B).

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 type I collagen(calf skin)에 대한 분해능력은 37℃에서 배양했을 때 더 크게 나타났으나, *P. gingivalis* CE 만이 DTT에 의해 극히 약하게 억제되었고, 두 세균 모두 CE에 의해서는 일부 collagen이 44 kDa의 절편으로 남은 반면, SUP에 의해서는 완전 분해되었다(Fig. 6A, B).

P. gingivalis CE의 type I collagen(human placenta)분해능력은 22℃에서 배양했을 때 DTT에 의해 완전히 억제되었으나, DDT의 분해억제효과는 $CaCl_2$에 의해 감소되지 않았다. *P. gingivalis*의 SUP도 DTT에 의해 크게 억제되었으나 $CaCl_2$에 의해 collagen분해능력이 많이 회복되었다(Fig. 7A). *P. endodontalis*도 22℃에서는 DTT에 의해 collagen분해능력이, 특히 SUP의 분해능력이 크게 억제되었다(Fig. 7B).

37℃에서 배양했을 때 *P. gingivalis* CE와 SUP의 type I collagen(human placenta)분해능력은 DTT에 의해 크게 억제되었는데, 22℃ 배양시와는 반대로 DTT억제효과는 CE의 경우 $CaCl_2$에 의해 크게 감소되었으나 SUP의 경우는 DTT억제효과가 $CaCl_2$에 의해 큰 영향을 받지 않았다(Fig. 8A). *P. endodontalis*는 37℃에서 배양했을 때 어떤 조건에서도 CE, SUP 모두 type I collagen(human placenta)을 완전 분해하였다(Fig. 8B).

Type IV collagen(human placenta)은 type I collagen에 비해 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*에 의한 분해정도가 낮게 나타났다. Type IV collagen과 *P. gingivalis* CE를 22℃에서 배양했을 때 collagen 일부가 145, 135, 120, 90, 70, 60, 44 kDa의 절편으로 분해되었으며, 이 CE의 분해능력은 $CaCl_2$에 의해 크게 억제된 반면 SUP은 $CaCl_2$에 의해 크게 항진되었다. CE와 SUP 모두 DTT에 의해 분해능력이 일부 억제되었다. SUP은 CE에 비해 type IV collagen분해능력이 컸으며, 135, 90, 70, 60 kDa의 절편을 형성하였다(Fig. 9A). *P. endodontalis*의 경우, 22℃에서 SUP이 CE보다 강한 type IV collagen분해능력을 보였으며, *P. endodontalis*의 CE는 $CaCl_2$에 의해 분해능력이 증가하였고, CE와 SUP 모두 DTT에 의해 억제되었으나, $CaCl_2$와 함께 배양했을 때는 DTT에 의한 억제가 감소되었다(Fig. 9B).

Type IV collagen(human placenta)은 37℃에서 배양했을 때 분해효소가 없어도 자체 분해현상을 보였으며, 효소에 의한 분해정도도 22℃ 배양시보다 크게 증가하였다. *P. gingivalis*의 CE와 SUP 모두 $CaCl_2$나 DTT에 의해 분해능력이 증가하였으며, CE는 분해산물로 44 kDa 절편을 남긴 반면, SUP은 소량의 90 kDa 절편을 분해산물로 남겼다(Fig. 10A). *P. endodontalis*는 37℃에서 CE가 type IV collagen의 극히 일부를 분해시키지 못한 반면 SUP은 type IV collagen을 완전 분해시켰다(Fig. 10B).

IV. 총괄 및 고안

특정 세균의 병원성은 그 세균이 갖는 독성에 의해 결정되며[23], 그 독성을 결정하는 인자들(virulence factors)은 감염과정인 특정부위로의 부착, 숙주방어기전으로부터의 도피 또는 보호, 부착한 부위에서의 증식, 감염, 그리고 감염에 따른 질병유발에 중요하게 관여하는 세균의 구성물질 또는 분비물질이다[63]. 단백질분해효소는 이 감염과정 중 각각의 단계에서 중요한 역할을 할 수 있는데 예를 들어, 단백질분해를 통해 숙주세포나 조직 상에 숨겨져 있는 수용기를 노출시켜 세균의 부착과정을 도울 수도 있고, 거대분자물질(macromolecules)을 분해하여 성장과 증식을

위한 영양분으로 취하거나 숙주의 방어기전에 관여하는 물질들을 분해하여 집락과정을 도울 수가 있으며, 직접적으로 조직을 파괴하거나 조직침투에 관여함으로써 감염과 질병을 유도하는 등 세균의 병원성에 중요한 역할을 한다[26,32,34,43,51].

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*는 동통을 수반하는 급성감염, 농양성 근관감염 및 치근단병소에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있으며[9,10,11,13-15,17], 독성인자 중 특히 단백질분해효소들이 이들 세균의 병원성과 깊은 관련이 있다고 제시되었다[18,19,41]. 단백질분해효소는 최근 *P. gingivalis* 연구에서 큰 관심의 대상이 되면서 많은 단백질분해효소들이 순수정제되고[28,35,39,44,46] cloning되었고[38,43,45,50], 그 결과 *P. gingivalis* 단백질분해효소들의 성상이 자세히 보고된 바 있으나, *P. endodontalis*의 단백질분해효소에 관한 연구는 소수에 불과하다[31,33,40,52]. *P. endodontalis*는 부착능력이 없기[22,25] 때문에 집락시 부착이 요구되지 않는 근관에 보다 쉽게 감염하는 것으로 추측되고 있으며, 따라서 *P. endodontalis*의 병원성은 제한된 공간인 근관내에서 발휘되는 단백질분해능력과 깊은 관계가 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서 *P. endodontalis*의 숙주단백질에 대한 분해능력을 관찰한 결과 *P. gingivalis*와 비슷하거나 오히려 높게 나타났으며 이러한 사실은 *P. endodontalis*가 단독으로 조직파괴에 관여하여 근관감염을 유발 또는 악화시키고, 결과적으로 치근단병소를 유도할 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 일반적으로 *P. gingivalis*는 *P. endodontalis*보다 단백질분해능력이 큰 것으로 보고되고 있다[22,24,26]. 본 연구에서는 CE와 SUP 내에 존재하고 있는 기질단백질에 대한 각각의 특이적 분해효소와 비특이적 분해효소가 모두 작용할 수 있도록 허용하여 각 기질단백질에 대한 CE나 SUP의 총체적인 분해능력을 관찰한 반면, 다른 연구에서는 각 기질단백질에 대한 특이적 분해효소의 작용을 주로 관찰하였기 때문에 나타난 차이라고 사료된다.

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 CE와 SUP 모두 본 실험에 사용된 기질단백질 중 gelatin에 대해 가장 큰 활성을 보였으나 두 세균간의 gelatin분해능력에는 차이가 없었다(Fig. 1). Gelatin은 collagen을 열처리했을 때 collagen이 변성되면서 형성되는 것으로[64] 치밀한 구조의 collagen에 비해 단백질분해효소에 쉽게 노출되기 때문에 효소들의 일반적인 분해능력을 측정하는 기질단백질로서 많이 이용된다. 따라서 본 실험의 결과는 *P. endodontalis*가 *P. gingivalis*와 유사한 단백질분해능력이 있음을 시사하고 있다. 이 gelatin분해효소들은 대체적으로 $CaCl_2$와 환원제에 의해 활성이 감소되었는데, 이 사실은 gelatin분해효소들이 metalloproteinase가 아니며[65] 효소내 thiol group이 중요한 역할을 하고 있음[37]을 알 수 있다. Zymogram 상에서 gelatin 분해효소는 분자량이 36 kDa 이상의 크기로 나타나고 있으나, 본 실험에서는 효소의 활성을 유지시키기 위해 CE나 SUP를 열처리하지 않았기 때문에 분해효소들이 실제 분자량을 반영하는 monomer의 형태로 나타나지 않고 자연상태처럼 polymer의 형태로, 또는 다른 단백질과 결합되어 zymogram 상에서 고분자량의 단백질로 나타났을 가능성이 있으며, 따라서 zymogram 상에서 측정된 분해효소들의 분자량은 실제의 분자량이 아닐 수도 있다.

두 세균의 단백질분해능력은 collagen을 사용하여 보다 면밀하게 관찰하였는데, zymography에서 *P. endodontalis*는 type I과 type IV collagen에 대해 *P. gingivalis*와 유사한 분해능력을 보였다(Fig. 2, 3). 구강세균의 type I collagen분해능력에 대해서는 많은 논란이 있어 왔는데, Type I collagen의 분해는 collagen추출방법, 실험 중 collagen처리방법, 세균단백질분해효소의 분리방법, 세균추출물내 비특이 효소의 오염유무, pH와 온도 같은 실험조건, 특히 배양시간에 따라 크게 달라진다[31,40,42]. 실험조건을 극히 제한한 경우, 즉 효소와 collagen의 혼합 및 배양시간을 2시간 이내로 제한하고 collagen을 변성시키지 않은 상태에서는 구강세균 중 *P. gingivalis*만이 유일하게 collagen을 분해할 수 있는 것으로 보고되고 있다[31,33,40,42]. 본 연구에서는 두 세균이 특이적 collagen분해효소를 갖고 있는 가에 초점을 맞춘 것이 아니라, 총체적인

효소의 작용이 collagen을 분해할 수 있는 가에 관심을 갖고 실험을 진행하였다. 배양시간을 20시간으로 증가시켰을 경우 Mayrand와 Grenier[40], Robertson 등[41]은 *P. endodontalis*를 포함한 다른 구강세균도 type I collagen을 분해시킬 수 있다고 보고하였다. 이 type I collagen 분해현상은 *P. gingivalis*의 경우는 특이적 collagenase와 비특이적 단백질분해효소에 의해, 그리고 *P. endodontalis*의 경우는 비특이적 단백질분해효소에 의해 이루어졌을 것으로 예상하였으나, 비특이적 단백질분해효소가 작용할 수 있는 조건이 주어지더라도 모든 구강세균이 collagen을 분해하는 것은 아니기 때문에[41] 본 실험에서 관찰된 *P. endodontalis*의 이 collagen 분해능력은 *P. endodontalis*의 병원성과 관련하여 중요한 의미를 갖는 것으로 생각된다.

Zymography를 시행할 때에는 세균효소와 기질단백질이 SDS에 노출되어 변성될 수 있고 전기영동 중에 발생되는 열로 인해 더욱 변성될 수 있다는 사실 때문에 세균효소와 collagen이 변성되지 않는 조건, 즉 용액상태, 그리고 22℃에서 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 collagen분해능력을 관찰하였다(Fig. 5, 7, 9). 이 실험에서도 *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*와 비슷하거나 보다 강한 type I, type IV collagen분해능력을 나타내었고 또한 37℃에서 배양했을 때에는 collagen의 분해가 증가되었으며(Fig. 6, 8, 10), 특히 type IV collagen은 37℃에서 세균의 단백질분해효소 없이도 스스로 일부가 분해되는 현상을 보였기 때문에(Fig. 10), 실온 이상의 온도에서 분해능력을 관찰하는 것은 바람직하지 않은 것으로 생각된다. 실제 collagen은 33℃ 이상에서는 변성되어 random coil 절편으로 바뀌게 되어[66] native collagen보다는 쉽게 효소에 의해 분해될 수 있다.

본 실험에서 이 두 세균에 의해 type I collagen의 일부는 작은 절편으로 분해되고 나머지는 완전 분해되어 polyacrylamide gel 상에 나타나지 않았다. Type I collagen의 한 곳만을 절단하여 polyacrylamide 상에서 특징적인 두 개의 절편, 즉 3/4과 1/4 크기의 절편을 형성하는 포유동물의 collagenase[67]와는 달리 세균의 collagen분해효소들은 본 실험의 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*에서 관찰한 것과 같이 일반적으로 비전형적인 collagen분해양상을 보인다. 그 외에도 이들 세균의 collagenase는 Eriochrome black T[68]나 사람의 metalloproteinase inhibitor[69]에 의해 억제되지 않는 대신, aminophenylmercuric acetate에 의해 활성이 억제되는 점[37]이 포유동물의 collagenase와 다르다.

*P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 type I collagen분해능력은 DTT에 의해 약간 억제됨으로써(Fig. 7, 9), 일부 효소에서 thiol group이 중요함을 알 수 있으며, DTT의 억제효과는 $CaCl_2$에 의해 많이 감소되었는데 이는 일부 collagen분해효소의 활성이 $CaCl_2$에 의해 항진되면서 DTT에 의해 억제된 일부 효소의 역할을 대신 보충해 주기 때문으로 보인다. 현재까지 보고된 *P. gingivalis*의 type I collagen분해효소는 매우 다양한 성상을 보이고 있는데[28,35-39,42], 순수정제된 대부분의 collagen분해효소는 β-mercaptoethanol이나 DTT, cysteine 등에 의해 활성이 증가되는 thiol proteinase로 보고되었다[28,35,39]. 한편 이들 효소 중에는 $CaCl_2$에 의해 영향을 받지 않는 것이 있는 반면[28,35], $CaCl_2$에 의해 활성이 증가하는 것[38]도 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 실험에 나타난 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*의 type I collagen분해능력은 위와 같은 여러 종류의 collagen분해효소들이 총체적으로 작용했거나, 또는 비특이적 단백질분해효소들과 함께 작용하여 나타난 복합적인 결과라고 생각된다.

Type IV collagen에 대한 이 두 세균의 분해능력은 type I collagen에 대한 분해능력에 비해 훨씬 낮게 나타났는데(Fig. 9), 이는 type IV collagen이 보다 치밀하고 단단한 망사같은 구조를 형성하고 있기[70] 때문인 것으로 사료된다. 불완전 분해로 인해 형성된 type IV collagen의 분해절편들을 관찰할 수 있었으며, 이 절편들의 크기는 145, 135, 120, 90, 70, 60, 44 kDa 등 다양하게 나타났다. 단백질분해효소가 없어도 나타난 약 100 kDa의 type IV collagen절편은(Fig. 9) 제조회사의 collagen정제과정 중에 이미 생성된 것

으로 보인다[70].

Type I collagen은 결합조직과 골을 구성하는 주 기질단백질이고 type Ⅳ collagen은 상피의 기저막을 구성하는 주 단백질[66,70]이기 때문에 이들 collagen의 분해는 치주조직이나 치수조직 파괴의 직접적인 원인이 될 수 있어 구강세균의 collagen분해능력은 중요한 독성인자로서 주목을 받아왔다. 그러나 실제 조직파괴에 관여하는 것은 세균의 collagen분해효소보다는 숙주의 collagenase인 것으로 최근 밝혀지고 있다[68,71]. 그럼에도 불구하고 세균의 collagen분해효소는 조직내로 침투하고 치밀한 조직내에서 세균이 확산하는데 도움을 줌으로써 세균의 병원성에 기여할 것으로 생각되며[37] 한편, 이들 세균의 일부 단백질분해효소는 새로이 생성된 비활성의 숙주 collagenase를 활성화시킴으로[72] 간접적으로 collagen분해에 관여하기도 한다.

Albumin은 혈액의 colloid삼투압에 기여하는 주 인자이고, 여러 조직에 아미노산을 제공하는 주 공급원으로[73], 조직내에 침투한 세균에 의해 분해되어 영양분으로 사용될 수도 있다. Zymography의 결과, *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*에는 비교적 소수의 효소들이 albumin을 분해시킬 수 있는 것으로 나타났으며(Fig. 4), 흥미롭게도 이들 albumin분해효소는 환원제가 존재해야 활성을 나타냈다. Sundqvist 등[42]도 *P. gingivalis*의 albumin분해효소들이 활성을 갖기 위해서는 금속이온과 환원제가 필요하다고 보고하였고, 따라서 이 두 세균의 albumin분해효소들은 thiol protease[29]로 사료된다.

본 실험의 결과에서 나타난 것과 같이 *P. endodontalis*의 단백질분해능력은 전체적으로 *P. gingivalis*와 비슷한 것으로 나타났으며, 또한 분해양상도 *P. gingivalis*와 유사하게 나타난 것으로 미루어 보아 인체내에서 *P. gingivalis*와 유사한 조직파괴능력을 가질 것으로 예상된다. *P. endodontalis*는 본 실험에서 관찰한 것처럼 조직의 기질단백질 또는 혈장단백질을 분해시킬 능력이 있을 뿐만 아니라 immunoglobulins[52,53]와 같이 인체의 방어기전에 중요한 단백질도 분해할 수 있기 때문에 구강조직에서 질병을 유발 또는 악화시키는 중요한 병원성 세균인 것으로 판단된다.

V. 결 론

근관감염과 치근단병소의 유발 및 진행과 관련된 세균인 *P.(Porphyromonas) endodontalis*는 감염근관과 치근단병소에서 발견되는 특이성 세균이며, *P.(Porphyromonas) gingivalis* 또한 이들 부위의 감염시 발견되는 중요한 세균이다. *P. gingivalis*의 병원성은 *P. gingivalis*가 생산하는 다양한 독성인자, 특히 단백질분해효소와 깊은 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 *P. endodontalis*는 근관감염에서의 중요성에도 불구하고 그 병원성에 대한 연구가 없었다. 본 연구의 목적은 *P. endodontalis*의 독성인자 중 단백질분해효소의 분해능력과 성상을 관찰하는 것이다. 본 연구를 위해 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*로부터 배양 및 균추출물 상청액을 채취한 후, gelatin, collagen, albumin을 기질로 하는 zymography와 native collagen분해실험을 실시하여 *P. endodontalis*의 단백질분해능력을 구강세균중 가장 강력한 병원성을 갖는 *P. gingivalis*의 단백질분해능력과 비교하였고, 그 단백질분해효소들의 성상을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *P. endodontalis*의 총체적인 단백질분해능력은 *P. gingivalis*와 유사하였다.
2. *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*의 배양 및 균추출물 상청액 모두 gelatin, type I, type Ⅳ collagen, albumin의 순으로 이들 기질단백질에 대해 강한 분해능력을 보였다.
3. Zymography에서 배양상청액과 균추출물 상청액간의 gelatin과 albumin분해능력에는 큰 차이가 발견되지 않았으나, native collagen을 이용한 단백질분해실험에서는 배양상청액이 균추출물 상청액보다 collagen분해능력이 높게 나타났다.
4. 두 세균의 배양 및 균추출물 상청액 모두 gelatin분해능력은 $CaCl_2$와 환원제인 β-mercaptoethanol 또는 dithiothreitol(DTT)에 의해 감소되었다.

5. 두 세균의 type I collagen(calf skin과 human placenta)분해효소는 DTT에 의해 활성이 감소되었으나 $CaCl_2$의 영향은 받지 않았다. 그러나 DTT의 억제효과는 $CaCl_2$에 의해 약간 감소되었다.
6. 두 세균의 type Ⅳ collagen에 대한 분해능력은 $CaCl_2$의 영향을 받지 않았으나 환원제에 의해 약간 증가하였다.
7. 두 세균의 albumin분해효소의 활성은 환원제와 같이 존재할 때에만 나타났다.

이상의 결과로 *P. endodontalis*의 단백질분해능력은 *P. gingivalis*와 유사하고 이들 단백질분해효소들의 성상도 비슷하다는 것을 알 수 있었으며 따라서 *P. endodontalis*는 근관이나 치근단 등 특정의 부위에서 단독으로도 조직파괴에 관여할 수 있고, 그럼으로써 감염을 유발 또는 악화시킬 수 있는 능력이 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Miller, W.D. : Microorganisms of the human mouth. S.S. White Dental Co., Philadelphia, 1890 (cited from the reference No. 3).
2. Henrici, A.T., and Hartzell, T.B. : The bacteriology of vital pulp. Res. J., 1 : 419-422, 1919 (cited from the reference No. 5).
3. Kettering, J.D., and Torabinejad, M. : Microbiology and immunology. p.363-376. In S. Cohen and R.C. Burns (ed.), Pathways of the pulp, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1994.
4. Pisano, J.V., and Weine, F.S. : Microbiolgy of endodontics. p.693-712. In F.S. Weine (ed.), Endodontic therapy, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1996.
5. Dahlén, G., and Möller, A.J.R. : Microbiology of endodontic infections. p.444-475. In J. Slots and M.A. Taubman (ed.), Contemporary oral microbiology and immunology, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1992.
6. Haapasalo, M. : Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6 : 213-218, 1993.
7. Sundqvist, G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Thesis. Umeâ University, Odontology, Dissertation No. 7, 1976 (cited from the reference No. 4).
8. Kobayashi, T., Hayashi, A., Yoshikawa, R., Okuda, K., and Hara, K. : The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int. Endod. J., 23 : 100-106, 1990.
9. Van Winkelhoff, A.J., Carlee, A.W., and de Graaff, J. : Bacteroides endodontalis and other black-pigmented Bacteroides species in odontogenic abscesses. Infect. Immun., 49 : 494-497, 1985.
10. Haapasalo, M. : Bacteroides spp. in dental root canal infections. Endod. Dent. Traumatol., 5 : 1-10, 1989.
11. Sundqvist, G., Johansson, E., and Sjögren, U. : Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. J. Endod., 15 : 13-19, 1989.
12. Baumgarten, J.C., and Falkler, W.A. Jr. : Reactivity of IgG from explant cultures of periapical lesions with implicated microorganisms. J. Endod., 17 : 207-212, 1991.
13. Tanner, A., and Stillman, N. : Oral and dental infections with anaerobic bacteria : clinical features, predominant pathogens, and treatment. Clin. Infect. Dis., 16(Suppl.) : S304-S309, 1993.
14. Haapasalo, M., Ranta, H., Ranta, K., and Shah, H. : Black-pigmented Bacteroides spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun., 53 : 149-153, 1986.
15. Chen, H. : The correlation of black-pigmented Bacteroides spp. to symptoms associated with apical periodontitis. Chung-Hua Kou Chiang i Hsueh Chinese J. Stomatol., 20 : 70-72, 1991.
16. Griffee, M.B., Patterson, S.S., Miller, C.H., Kafrawy, A.H., and Newton, C.W. : The relationship of Bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 50 : 457-461, 1980.
17. Yoshida, M., Fukushima, H., Yamamoto, K., Ogawa, K., Toda, T., and Sagawa, H. : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals with periapical lesions. J. Endod., 13 : 24-28, 1987.
18. Hahn, C.-L., Falkler, W.A. Jr., and Minah, G.E. : Correlation between thermal sensitivity and microorganisms isolated from deep carious dentin. J. Endod., 19 : 26-30, 1993.

19. Hashioka, K., Suzuki, K., Yoshida, T., Nakane, A., Horiba, N., and Nakamura, H. : Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. J. Endod., 20 : 75-77, 1994.
20. Dahlén, G.G. : Black-pigmented Gram-negative anaerobes in periodontitis. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6 : 181-192, 1993.
21. Jousimies-Somer, H.R. : Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic Gram-negative rods. Clin. Infect. Dis., 20(Suppl.) : S187-S191, 1995.
22. Mayrand, D., and Holt, S.C. : Biology of asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species. Microbiol. Rev., 52 : 134-152, 1988.
23. Sundqvist, G. : Pathogenicity and virulence of black-pigmented Gram-negative anaerobes. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6 : 125-138, 1993.
24. Van Winkelhoff, A.J., van Steenbergen, T.J.M., and de Graaff, J. : The role of black-pigemented Bacteroides in human oral infectons. J. Clin. Periodontol., 15 : 145-155, 1988,
25. 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 of periodontal pockets. Infect. Immun., 19 : 254-264, 1978.
26. Socransky, S.S., and Haffajee, A.D. : Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases : a critical assessment. J. Periodont. Res., 26 : 195-212, 1991.
27. Van Winkelhoff, A.J., van Steenbergen, T.J.M., Kippuw, N., and de Graaff, J. : Enzymatic characterization of oral and nonoral black-pigmented Bacteroides species. Anton. Van Leeuwenh., 52 : 163-171, 1986.
28. Bedi, G.S., and Williams, T. : Purification and characterization of a collagen-degrading protease from Porphyromonas gingivalis. J. Biol. Chem., 269 : 599-606, 1994.
29. Durmaz,B., Jousimies-Somer, H.R., and Finegold, S.M. : Enzymatic profiles of Prevotella, Porphyromonas, and Bacteroides species obtained with the API ZYM System and Roso Diagnostic Tablets. Clin. Infect. Dis., 20(Suppl.) : S192-S194, 1995.
30. Gharbia, S.E., and Shah, H.N. : Hydrolytic enzymes liberated by black-pigmented Gram-negative anaerobes. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6 : 139-146, 1993.
31. Grenier, D., Labbé, S., Mouton, C., and Mayrand, D. : Hydrolytic enzymes and lectin-binding activity of black-pigmented anaerobic rods. Microbiology, 140 : 873-878, 1994.
32. Grenier, D., and Mayrand, D. : Proteinases. p.227-243, In H.N. Shah, D. Mayrand, and R.J. Genco (ed.), Biology of the species Porphyromonas gingivalis, CRC Press, Boca Raton, 1993.
33. Jin, K.-C., Barua, P.K., Zambon, J.J., and Neiders, M.E. : Proteolytic activity in black-pigmented bacteroides species. J. Endod., 15 : 463-467, 1989.
34. Nakamura, R., Hinode, D., Terai, H., and Morioka, M. : Extracellualr enzymes of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis in relation to periodontal destruction. P.129-141. In S. Hamada, S.C. Holt, and J.R. McGhee (ed.), Periodontal diseases : pathogens and host immune responses, Quintessence Publishing Co., Ltd., Tokyo, 1991.
35. Sojar, H.T., Lee, J.-Y., Bedi, G.S., and Genco, R.J. : Purification and characterization of a protease from Porphyromonas gingivalis capable of degrading salt-solubilized collagen. Infect. Immun., 61 : 2369-2376, 1993.
36. Sorsa, T., Uitto, V.-J., Suomalainen, K., Turto, H., and Lindy, S. : A trypsin-like protease from Bacteroides gingivalis : partial purification and characterization. J. Periodont. Res., 22 : 375-380, 1987.
37. Birkedal-Hansen, H., Taylor, R.E., Zambon, J.J., Barua, P.K., and Neiders, M.E. : Characterization of collagenolytic activity from strains of Bacteroides gingivalis. J. Periodont. Res., 23 : 258-264, 1988.
38. Kato, T., Takahashi, N., and Kuramitsu, H.K. : Sequence analysis and characterization of the Porphyromonas gingivalis prtC gene, which expresses a novel collagenase activity. J. Bacteriol., 174 : 3889-3895, 1992.
39. Lawson, D.A., and Meyer, T.F. : Biochemical characterization of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis collagenase. Infect. Immun., 60 : 1524-1529, 1992.
40. Mayrand, D., and Grenier, D. : Detection of collagenase activity in oral bacteria. Can. J. Microbiol., 31 : 134-138, 1985.
41. Robertson, P.B., Lantz, M., Marucha, P.T., Korn-

man, K.S., Trummel, C.L., and Holt, S.C. : Collagenolytic activity associated with Bacteroides species and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J. Periodont. Res., 17 : 275-283, 1982.
42. Sundqvist, G., Carlsson, J., and Hänström, L. : Collagenolytic activity of black-pigmented Bacteroides species. J. Periodont. Res., 22 : 300-306, 1987.
43. Bourgeau, G., Lapointe, H., Péloquin, P., and Mayrand, D. : Cloning, expression, and sequencing of a protease gene (tpr) from Porphyromonas gingivalis W83 in Escherichia coli. Infect. Immun., 60 : 3186-3192, 1992.
44. Ciborowski, P., Nishikata, M., Allen, R.D., and Lantz, M.S. : Purification and characterization of two forms of a high-molecular-weight cysteine proteinase (Porphypain) from Porphyromonas gingivalis. J. Bacteriol., 175 : 4549-4557, 1994.
45. Otogoto, J.-I., and Kuramitsu, H.K. : Isolation and characterization of the Porphyromonas gingivalis prtT gene, coding for protease activity. Infect. Immun., 61 : 117-123, 1993.
46. Wingrove, J.A., DiScipio, R.G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J., and Hugli, T.E. : Activation of complements C3 and C5 by a cysteine proteinase (Gingipain-1) from Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis. J. Biol. Chem., 267 : 18902-18907, 1992.
47. Suido, H., Eguchi, T., Tanaka, T., and Nakamura, M. : Identification of periodontopathic bacteria based upon their peptidase activities. Adv. Dent. Res., 2 : 304-309, 1988.
48. Lovatt, A., and Roberts, I.S. : Cloning and expression in Escherichia coli of the nahA gene from Porphyromonas gingivalis indicates that β -N-acetylhexosaminidase is an outer-membrane-associated lipoprotein. Microbiology, 140 : 3399-3406, 1994.
49. Yamashita, Y., Toyoshima, K., Yamazaki, M., Hanada, N., and Takehara, T. : Purification and characterization of alkaline phosphatases of Bacteroides gingivalis 381. Infect. Immun., 58 : 2882-2887, 1990.
50. Fletcher, H.M., Schenkein, H.A., and Macrina, F.L. : Cloning and characterization of a new protease gene (prtH) from Porphyromonas gingivalis. Infect. Immun., 62 : 4279-4286, 1994.
51. Frandsen, E.V.G. : Hydrolysis of immunoglobulins. p.219-226. In H.N. Shah, D. Mayrand, and R.J. Genco (ed.), Biology of the species Porphyromonas gingivalis, CRC Press, Boca Raton, 1993.
52. Jansen, H.-J., van der Hoeven, J.S., van den Kieboom, C.W.A., Göertz, J.H.C., Camp, P.J.M., and Bakkeren, J.A.J.M. : Degradation of immunoglobulin G by periodontal bacteria. Oral Microbiol. Immunol., 9 : 345-351, 1994.
53. Kilian, M. : Degradation of immunoglobulin A1, A2 and G by suspected principal periodontal pathogens. Infect. Immun., 34 : 757-765, 1981.
54. Jagels, M.A., Travis, J., Potempa, J., Pike, R., and Hugli, T.E. : Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from Porphyromonas gingivalis. Infect. Immun., 64 : 1984-1991, 1996.
55. Tai, H., Kobayashi, T., and Hara, K.: Changes in complement and immunoglobulin G receptor expression on neutrophils associated with Porphyromonas gingivalis-induced inhibition of phagocytosis. Infect. Immun., 61 : 3533-3535, 1993.
56. Horiba, N., Maekawa, Y., Yamauchi, Y., Ito, M., Matsumoto, T., and Nakamura, H. : Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 74 : 648-651, 1992.
57. Ogura, N., Shibata, Y., Kamino, Y., Matsuda, U., Hayakawa, M., Oikawa, T., Takiguchi, H., Izumi, H., and Abiko, Y. : Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. Biochem. Med. Metab. Biol., 53 : 130-136, 1994.
58. Oikawa, T., Ogura, N., Akiba, M., Abiko, Y., Takiguchi, H., and Izumi, H. : Stimulation of plasmin activity in cultured human fibroblast cells by Porphyromonas endodontalis. Int. J. Biochem., 25 : 1227-1231, 1993.
59. 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., 59 : 383-389, 1991.
60. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.
61. Heussen, C., and Bowdle, E.B. : Electrophoretic analysis of plasminogen activators in poly-

acrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. Anal. Biochem., 102 : 196-202, 1980.

62. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 256 : 495-497, 1970.
63. Finlay, B.B., and Falkow, S. : Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev., 53 : 210-230, 1989.
64. Harkness, R.D., Marko, A.M., Muir, H.M., and Neuberger, A. : The metabolism of collagen and other proteins of the skin of rabbits. Biochem. J., 56 : 558-569, 1954.
65. Priest, F.G. : Extracellular enzymes. Aspect of Microbiology 9. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1984.
66. Piez, K.A., and Reddi, A.H. : Extracellular matrix biochemistry. Elsivier, New York, 1984.
67. Fields, G.B. : A model for interstitial collagen metabolism by mammalian collagenases. J. Theor. Biol., 153 : 585-602, 1991.
68. Klausen, B., Evans, R.T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Sfintescu, C., Lee, J.-Y., Bedi, G., Zambon, J.J., and Genco, R.J.Periodontal bone level and gingival proteinase activity in gnotobiotic rats immunized with Bacteroides gingivalis. Oral Microbiol. Immunol., 6 : 193-201, 1991.
69. Murphy, G., Cawston, T.E., and Reynolds, J.J. : An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. Biochem. J., 195 : 167-170, 1981.
70. Miller, E.J., and Gay, S. : The collagens : an overview and update. p.3-41. In Methods in enzymology, Vol. 144, Academic Press, Inc., Orlando, 1987.
71. Sorsa, T., Suomalainen, K., and Uitto, V.-J. : The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. Arch. Oral Biol., 35(Suppl.) : 193S-196S, 1990.
72. Uitto, V.-J., Larjava, H., Heino, J., and Sorsa, T. : A protease of Bacteroides gingivalis degrades the surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. Infect. Immun., 57 : 213-218, 1989.
73. Peters, T. Jr. : Serum albumin. p.133-181. In F.W. Putnam (ed.), The plasma proteins, Vol. 1, Academic Press, New York, 1975.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Gelatin-zymogram of cell extract(CE) and culture supernatant(SUP) from *P. gingivalis* and *P. endodontalis*. The CE and SUP were treated with 2X sample buffer without heating under nonreducing and reducing conditions. An SDS-15% polyacrylamide gel(1.5-mm thick) was copolymerized with 200 μg of gelatin(bovine skin) per ml. After electrophoresis, enzymes in the gel were activated for 16~18 h at 37℃ by development buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5(A), or Tris-HCl with 10 mM $CaCl_2$(B), or with 5 mM dithiothreitol(DTT)(C). The lytic bands were visualized by staining with 0.1% Coomassie blue, followed by destaining with 5% methanol and 7% acetic acid. Lanes 1 to 4, the CE and SUP were treated under nonreducing conditions, lanes 5 to 8, the CE and SUP were treated under reducing conditions. Lanes: 1 and 5, *P gingivalis* CE; 2 and 6, *P. gingivalis* SUP; 3 and 7, *P. endodontalis* CE; 4 and 8, *P. endodontalis* SUP.

Fig. 2. Type I collagen-zymogram of CE and SUP from *P gingivalis* and *P. endodontalis*. The experimental procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 1 except that the polyacrylamide gel was copolymerized with acid-soluble type I collagen(calf skin).

Fig. 3. Type IV collagen-zymogram of CE and SUP from *P. gingivalis* and *P. endodontalis*. The experimental procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 1 except that the polyacrylamide gel was copolymerized with acid-soluble type IV collagen(human placenta).

Fig. 4. Albumin-zymogram of CE and SUP from *P gingivalis* and *P. endodontalis*. The experimental procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 1 except that the polyacrylamide gel was copolymerized with bovine serum albumin.

Fig. 5. Cleavage of type I collagen(calf skin) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis* (B) at 22℃. The CE or SUP(5 μg) of the bacteria were incubated with 25 μl of the collagen (1 mg/ml) at 22℃ for 24 h in the absence and presence of 10 mM $CaCl_2$ or 5 mM DTT After the incubation, the reaction of the mixture was stopped by the addition of 15 μl of 4X sample buffer and by heating at 100℃ for 10 min. After heating, 20 μl of the reaction mixture was loaded onto an SDS-10% polyacrylamide gel(1.0-mm thick) and electrophoresed. The gel was stained with 0.1% Coomassie blue. Lanes: 1, type I collagen only; 2, collagen with CE; 3, collagen with CE and 10 mM $CaCl_2$; 4, collagen with CE and 5 mM DTT; 5, collagen with CE, 10 mM $CaCl_2$, and 5 mM DTT; 6, collagen with SUP; 7, collagen with SUP and 10 mM $CaCl_2$; 8, collagen with SUP and 5 mM DTT; 9, collagen with SUP, 10 mM $CaCl_2$, and 5 mM DTT.

Fig. 6. Cleavage of type I collagen(calf skin) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis* (B) at 37℃. The procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig 5 except that the reaction mixture was incubated at 37℃.

Fig. 7. Cleavage of type I collagen(human placenta) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis* (B) at 22℃. The procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 5 except that the calf skin type I collagen was replaced by human placenta type I collagen

Fig. 8. Cleavage of type I collagen(human placenta) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis*(B) at 37℃. The procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 7 except that the reaction mixture was incubated at 37℃.

Fig. 9. Cleavage of type IV collagen(human placenta) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis*(B) at 22℃. The procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 5 except that the calf skin type I collagen was replaced by human placenta type IV collagen.

Fig. 10. Cleavage of type I collagen(human placenta) by the CE and SUP of *P. gingivalis*(A) and *P. endodontalis*(B) at 37℃. The procedure, samples, and lanes were the same as those presented in Fig. 9 except that the reaction mixture was incubated at 37℃.

논문사진부도①

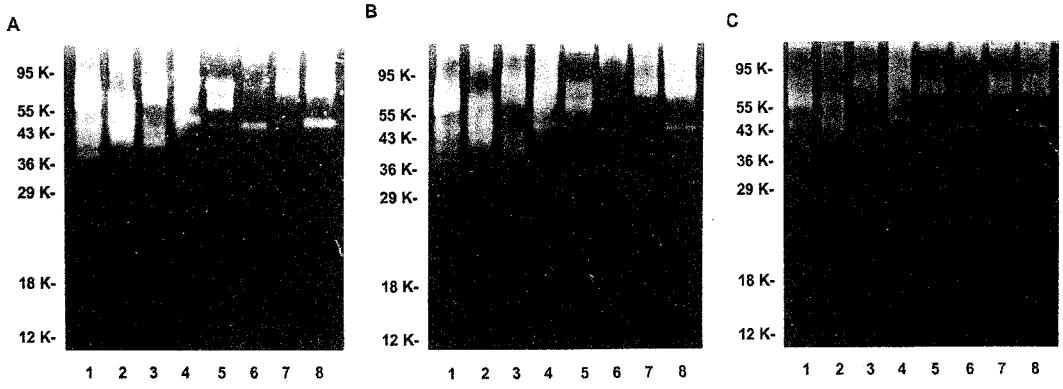


Fig. 1

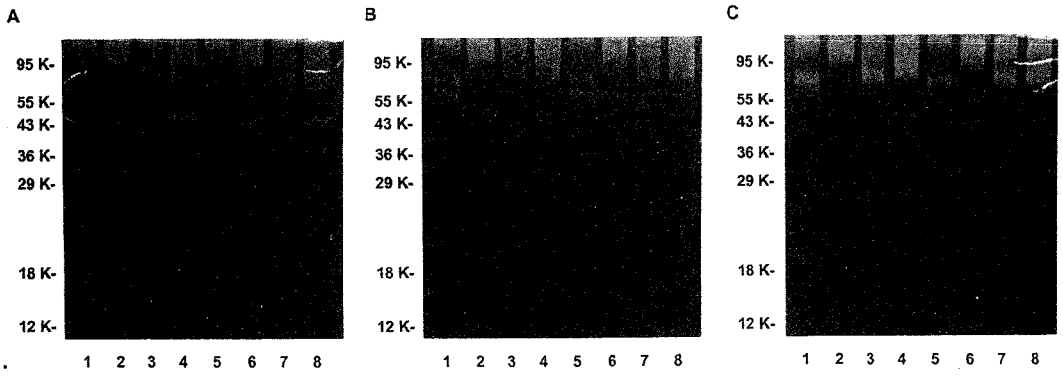


Fig. 2.

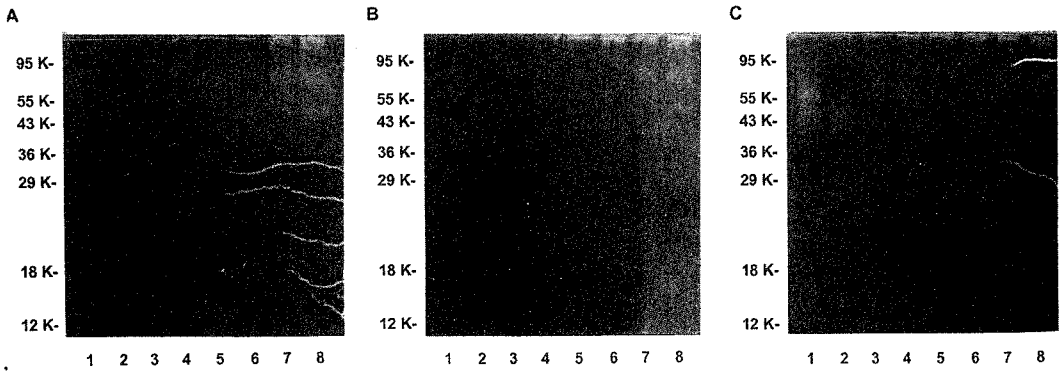


Fig. 3.

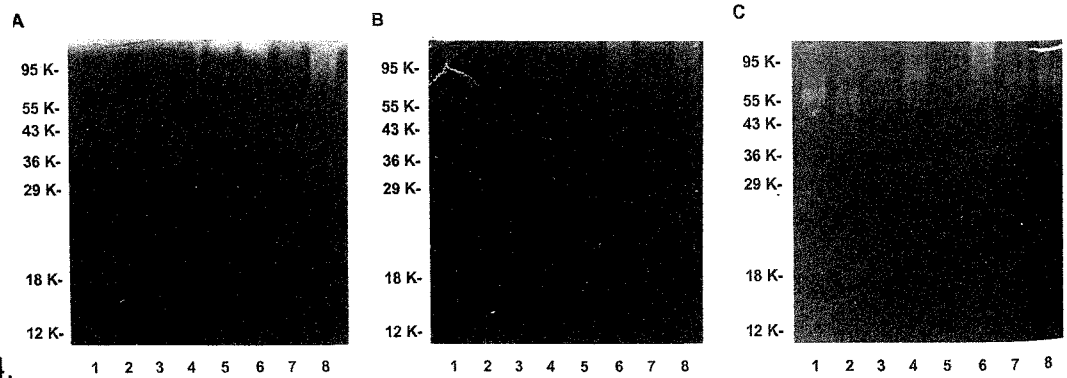
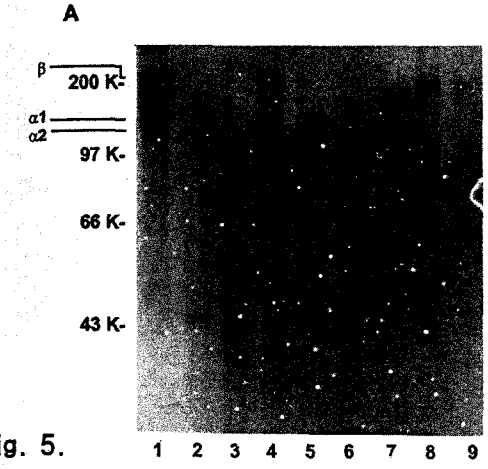


Fig. 4.

논문사진부도②



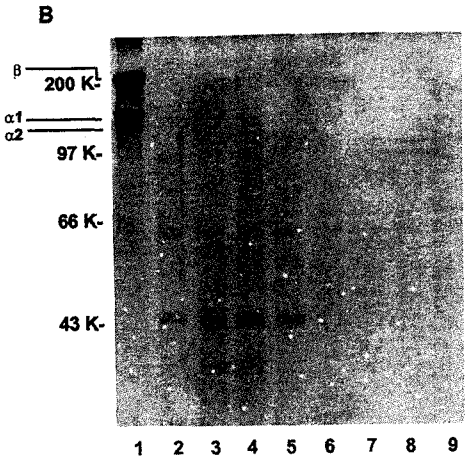
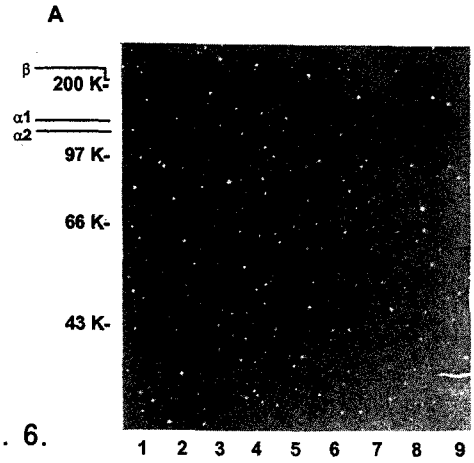


Fig. 5.



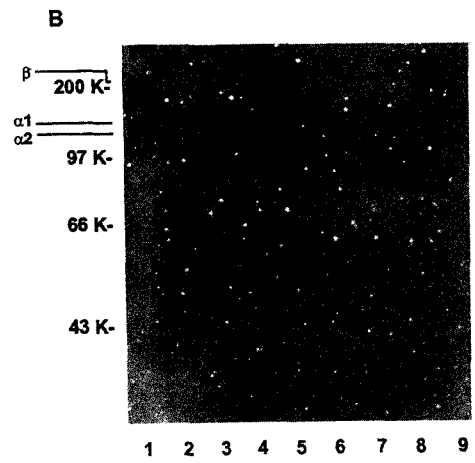
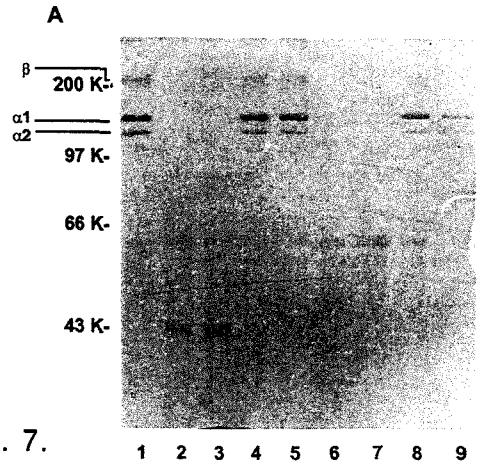


Fig. 6.



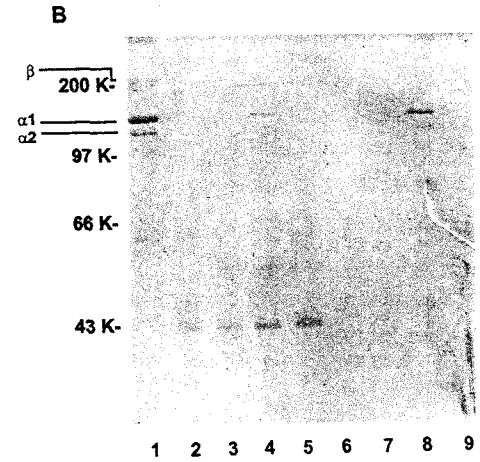


Fig. 7.

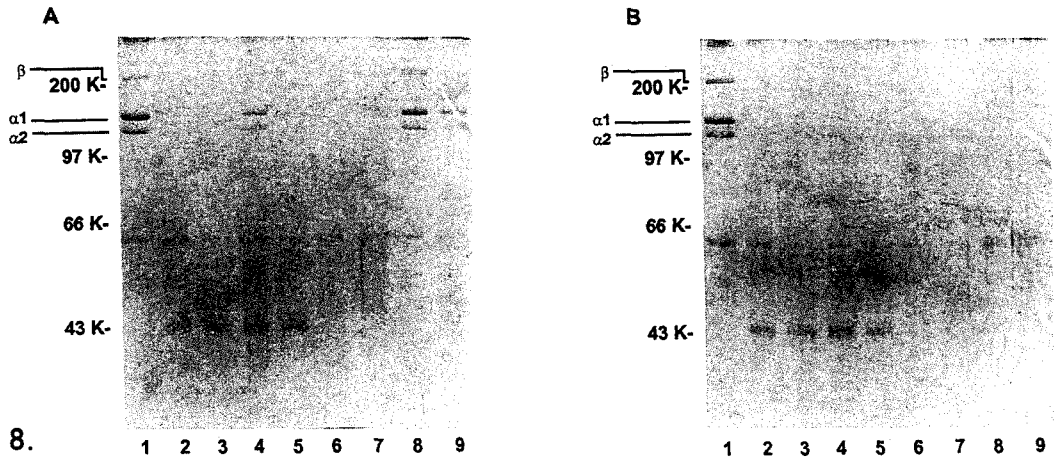


Fig. 8.

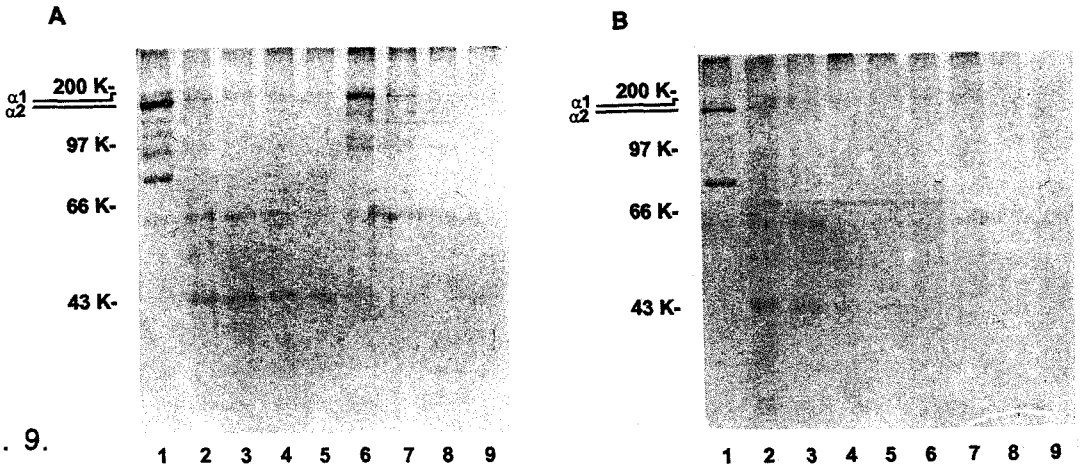


Fig. 9.

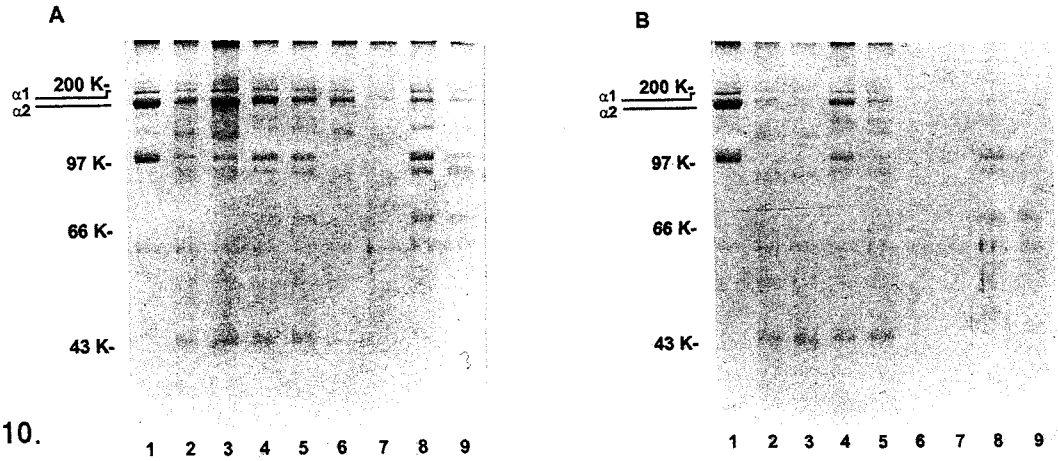


Fig. 10.