

악하선-설하선 혼합타액내 주요 단백질에 대한 구강내 주요 균주의 부착

서울대학교 치과대학 구강내과 · 진단학 교실

이승우 · 정성창 · 김영구 · 고흥섭

목 차

- I. 서 론
- II. 연구내용 및 방법
- III. 결 과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

타액은 구강 환경에서 가장 중요한 역할을 하는 물질로서 그 기능은 운할작용, 완충작용, 항균작용, 보호작용, 광화작용, 소화작용 등으로 나누어 볼 수 있으며, 구강내에서 그 역할이나 중요성은 이미 잘 알려져 있다¹⁾. 그 중에서도 미생물의 집락을 조절(modulation of microbial colonization) 하는 기능은 타액내에 있는 개개 단백질 및 당단백질의 치아 표면이나 구강점막 표면에 대한 친화성(affinity)과 그 정도, 개개 타액 단백질과 다양한 미생물과의 친화성과 그 정도, 다양한 미생물사이의 aggregation 가능성 및 그 정도 뿐만 아니라, 구강내 세균이나 백혈구에서 유래된 효소에 의한 타액내 단백질의 분해

(degradation), 타액내 단백질들 혹은 분해산물 사이의 복합체(complex) 형성, 타액에 의해 매개되어 지는 agglutination을 저해하는 요인, 타액내에 있을 때에 비해 치아나 점막 표면에 있을 때 변화될 수 있는 단백질이나 당단백질의 삼차원적 구조(conformation)와 이에 의한 cryptitope의 가능성 등 수 많은 변수 인자의 영향을 받을 수 있다^{2,3)}.

타액내 단백질과 구강내 세균과의 상호작용을 이해하기 위해서는 특정 단백질과 특정 세균과의 부착(adhesion) 과정의 이해가 중요하며, 이러한 부착과정은 치아우식증 및 치주염 뿐만 아니라 여러 감염성 질환 발생의 첫 번째 단계이다. 그러므로 구강내에서 세균의 부착에 대한 지식은 구강 감염증 뿐만 아니라 심각한 전신 감염증을 예방하는 방법을 연구하는데 매우 중요하다⁴⁾. 이러한 부착 과정은 타액 단백질이 용액내에 존재하는 경우와 특정 표면에 존재하는 경우에 따라 다르게 나타나는 경우가 있으며⁵⁾, 그에 따라 특정 단백질의 구강내에서의 역할도 달라질 수 있다⁶⁾. 이러한 위치 변화에 따른 기능의 차이는 *in vitro*에서의 연구시 고체면에서의 연구(solid-phase assay) 결과와 용액 상태에서의 연구(solution-phase assay) 결과를 비교 분석해 보아야 하는 중요한 이유가 된다.

* 이 논문은 서울대학교병원 일반연구비(04-1998-052-0) 지원에 의해 이루어진 것임.

이와 같이 타액내의 단백질과 구강세균과의 상호 작용에 관한 연구는 중요한 의미를 가지고 있지만, 전타액(혼합 타액: whole saliva)은 이하선, 악하선, 설하선 등과 같은 대타액선과 구강내 여러 소타액선의 타액 뿐만 아니라 구강내 상피세포, 백혈구 등도 포함하고 있어, 각 단백질의 기능을 이해하기 위한 연구에 전타액의 사용은 장애가 된다. 그러므로 이러한 어려움을 극복하기 위해서는 개별 타액선 타액(glandular saliva)이나 순수 분리 정제된 특정 타액 단백질 혹은 당 단백질을 시료로 활용하여야 한다⁷⁾. 하지만 순수 분리 정제시의 기술상의 난점이나 비용 및 시간 등도 어려움이 되지만, 역으로 순수한 개개 단백질을 분리 정제하기 위한 여러 단계의 실험과정과 이에 의한 단백질의 구조적 변화 가능성도 실험 결과를 해석하는데 중요한 하나의 변수 요인이 될 수 있다.

본 연구는 미생물 조절에 중요한 역할을 하고 있는 인체 악하선-설하선 혼합 타액(human submandibular-sublingual saliva: HSMSL)을 분리 채취하고, 이를 부분 정제한 mucin- 및 amylase-enriched fraction과 acidic PRPs (proline-rich proteins)-enriched fraction을 얻은 다음, 구강내 주요 미생물 중의 하나인 *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus aureus*와의 부착 친화도를 solid-phase assay를 사용하여 조사하는데 있다. 이를 통하여 치아면 혹은 구강점막면에서 타액 내 low-molecular-weight mucin(MG2), α -amylase, acidic PRPs와 *S. gordonii*, *A. viscosus*, *S. aureus* 사이의 부착 친화도에 관한 정보를 제공하여 줄 수 있을 것이다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 악하선-설하선 혼합 타액(HSMSL)의 채취

연구대상은 중증의 전신질환 병력이 없고 구강위생 상태가 양호한 34세의 남자를 대상으로 하였다. 타액 채취는 오전 9:00 - 11:00에 시행하였으며, 타액채취 최소 2시간 전부터 물을 제외

한 음식물 섭취, 양치질을 삼가하게 하였다. 연구대상의 악하선 개구부위에 silicone rubber 인상재를 이용하여 custom-made collector를 만든 다음 타액을 채취하였다. 이때 타액은 2% Na₂-EDTA, 5mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)를 함유하고 있는 2.5ml 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 포함하고 있는 ice-cold tube에 채취하였다. 2% citric acid를 혀에 30초 간격으로 면봉을 사용하여 도포함으로써 미각적 자극을 유도하였으며, 한번에 약 50ml를 채취하였다. 채취된 타액은 점도를 줄이기 위하여 같은 양의 냉각된 0.154M NaCl를 사용하여 희석하고, 4°C에서 30분간 혼합하였으며, 희석된 타액을 4°C에서 12,000 xg로 30분동안 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, SpectraPor 3 dialysis membrane(molecular weight cutoff 3.5 kDa, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA)을 이용하여 0.2% Na₂EDTA 상에서 5일동안 dialysis를 수행하고 이를 freeze-dry하였다⁸⁾.

2. 악하선-설하선 혼합 타액(HSMSL)의 부분 정제

본 실험에 사용된 mucin- 및 amylase-enriched fraction과 acidic PRPs-enriched fraction을 만들기 위해 freeze-dry된 HSMSL을 guanidine hydrochloride를 함유하고 있는 Tris buffer에 녹인 다음 Sephadex G-200 gel filtration column(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA)을 통과시켰다. 이 경우 크게 4개의 Pool(A,B,C,D)로 나누어 지는데, Pool A가 mucin- 및 amylase-enriched fraction이며 Pool C가 acidic PRPs-enriched fraction에 해당된다⁹⁾.

3. 전기영동 및 Western transfer

전기영동은 일반적으로 널리 시행되는 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)¹⁰⁾를 Hoefer SE 280 Tall Mighty Small Electrophoresis unit(Hoefer

Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 본 실험에서의 이용되는 타액내 단백질의 분자량을 고려하여 7.5-10% gel이 사용되었으며, molecular weight marker로 low-molecular-weight protein standard(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하였다. 전기영동후 gel을 2시간동안 0.25% Coomassie brilliant blue 용액(methanol/acetic acid/water : 4/1/5, v/v/v)에 염색시킨후 탈색시켰다(methanol/acetic acid/water : 1/1/8, v/v/v).

Western transfer는 Semi-Dry Blotting unit (Fisher Biotech SDB 2020, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA)와 Tris-glycine buffer를 이용한^{11,12)} 일반적인 Semi-dry blot법이 이용되었으며, membrane으로는 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane인 Immobilon-P(Millipore Corp., Bedford, MA, USA)와 nitrocellulose membrane인 Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)을 이용하였다. 이때 300-400mA로 45-60분간 transfer한 다음, 타액 단백질이 transfer된 membrane을 3% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 Tris-buffered saline(TBS)으로 1시간이상 blocking 하였다. MG2, acidic PRPs, amylase의 확인을 위하여 rabbit anti-human MG2 polyclonal antibody, rabbit anti-human amylase polyclonal antibody, rabbit anti-human PRPs polyclonal antibody를 primary antibody로 이용하고, alkaline phosphatase-conjugated goat-anti rabbit IgG(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 secondary antibody로 이용한 다음 NBT/BCIP(nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 이용하여 발색 반응시켰다. 각 단계 사이에 0.1% BSA 함유 TBS로 5분간 3번씩 wash를 시행하였다. 본 연구에 사용된 rabbit anti-human MG2 polyclonal antibody와 rabbit anti-human PRPs polyclonal antibody는 Buffalo 뉴욕주립대학 구강생물학과의 Dr. Michael J. Levine이 제공해 주었으며, rabbit anti-human

amylase polyclonal antibody는 구입하였다 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

4. 세균 배양

본 연구에서는 *Streptococcus gordonii* strain G9B, *Actinomyces viscosus* strain T14V, *Staphylococcus aureus* ATCC strain 31153 균주를 사용하였다. 모든 균주는 blood agar plate와 0.5-1% yeast extract를 함유하고 있는 trypticase soy broth를 이용하여 37°C에서 배양하였으며, *S. gordonii*와 *A. viscosus*는 candle jar를 이용하여 limited oxygen-tension 하에서, *S. aureus*는 aerobic 상태에서 static incubation 하였다. Bacterial overlay assay를 위하여 모든 bacteria를 10-15% glycerol 하에서 multiple stock을 만들고 일정 간격으로 plating하여 항상 신선한 균주를 이용하였다

5. Solid-phase bacterial overlay assay

타액 단백질이 transfer된 membrane을 3% BSA를 함유한 TBS로 1시간이상 blocking하고, 1.0×10^9 정도의 세균을 blocking buffer에 suspension한 다음 overlay하여 overnight 하였다. 다음 primary antibody로는 rabbit anti-*S. gordonii* strain G9B polyclonal antibody, rabbit anti-*A. viscosus* strain T14V polyclonal antibody, rabbit anti-*S. aureus* strain 31153 polyclonal antibody가 이용되었으며. 이후는 Western blot transfer(연구방법 항목 3) 항목에 기술한 바와 같은 방법으로 발색반응 시켰다.

III. 결 과

1. 악하선-설하선 혼합 타액의 채취 및 부분 정제

악하선-설하선 혼합 타액을 연구 내용 및 방법에서 언급한 바와 같이 gel filtration column을 통과시켰을 때 크게 4개의 pool을 얻을 수 있었다. HSMSL과 HSMSL Pool A, B, C, D를 전기

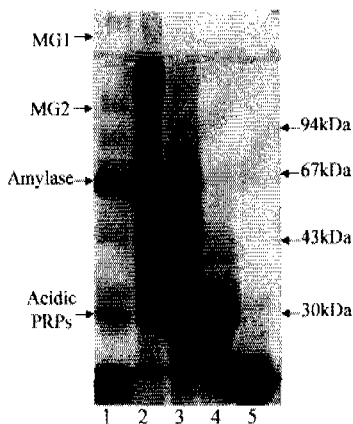


Fig. 1. SDS-10%PAGE of resulting pools from gel filtration of freeze-dried HSMSL saliva(Lane 1) on a column of Sephadex G-200. Pool A contained high- and low- molecular weight salivary mucins and amylase(Lane 2). Pool C contained predominantly acidic PRPs (Lane 4).

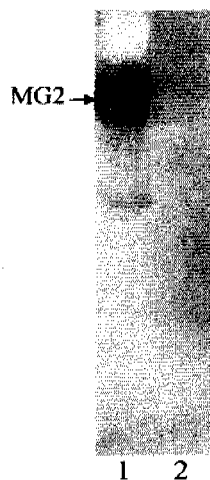


Fig. 2. SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-MG2 sera (a 1:2,000 dilution). Lane 1, Pool A(mucin- and amylase-enriched fraction); Lane 2, Pool C(PRPs-enriched fraction).

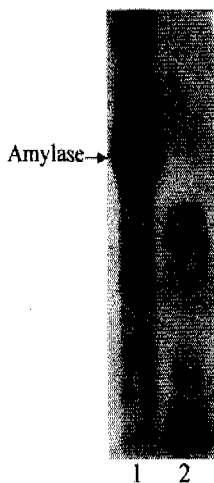


Fig. 3. SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-amylase sera (a 1:2,000 dilution). Lane 1, Pool A(mucin- and amylase-enriched fraction); Lane 2, Pool C(PRPs-enriched fraction).

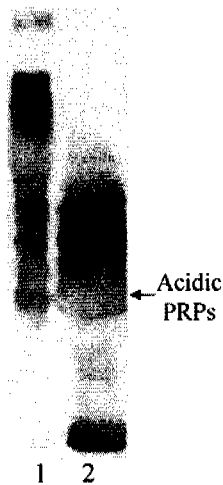


Fig. 4. SDS-10%PAGE/Western transfer probed with rabbit anti-PRPs sera (a 1:2,000 dilution). Lane 1, Pool A(mucin- and amylase-enriched fraction); Lane 2, Pool C(PRPs-enriched fraction).

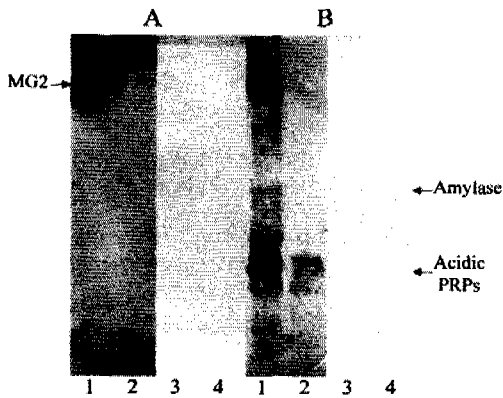


Fig. 5. SDS-7.5%PAGE/Western transfer overlaid with *S. gordonii* strain G9B and probed with rabbit anti-strain G9B sera (a 1:2,000 dilution). Panel A) Immobilon-P membrane. Panel B) nitrocellulose membrane. In all panels: Lane 1, Pool A (mucin- and amylase-enriched fraction); Lane 2, Pool C (PRPs-enriched fraction); Lane 3, Pool A without bacterial overlay; Lane 4, Pool C without bacterial overlay.

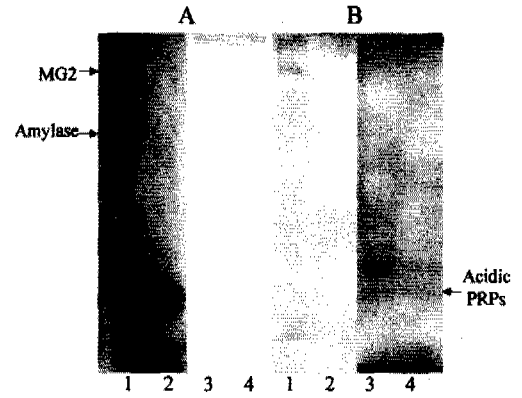


Fig. 6. SDS-10%PAGE/Western transfer overlaid with *A. viscosus* strain T14V and probed with rabbit anti-strain T14V sera (a 1:2,000 dilution). Panel A) Immobilon-P membrane. Panel B) nitrocellulose membrane. In all panels: Lane 1, Pool A (mucin- and amylase-enriched fraction); Lane 2, Pool C (PRPs-enriched fraction); Lane 3, Pool A without bacterial overlay; Lane 4, Pool C without bacterial overlay.

Table 1. Summary of bacterial binding to salivary proteins adsorbed to Immobilon-P

	<i>S. gordonii</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>S. aureus</i>
MG2	+(-)	+(-)	+(-)
Amylases	(-)	+(-)	()
PRPs	-(-)	+(-)	-(-)

* Data in parenthesis are results from the experiments without bacterial overlay(negative controls).

Table 2. Summary of bacterial binding to salivary proteins adsorbed to nitrocellulose membrane

	<i>S. gordonii</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>S. aureus</i>
MG2	+(-)	+(-)	+(-)
Amylases	+(-)	+(-)	-(-)
PRPs	+(-)	+(+)	+(+)

* Data in parenthesis are results from the experiments without bacterial overlay(negative controls).

영동한 결과가 Fig. 1이다. Ramasubbu 등⁹⁾이 언급한 바와 같이 Pool A가 mucin과 amylase-enriched fraction이며, Pool C가 acidic PRPs와 cystatins-enriched fraction이다. Fig. 2,3,4는 Pool A와 C를 각각 anti-MG2 antibody, anti-amylase antibody, anti-PRPs antibody로

immunoblotting한 결과이다.

2. Solid-phase bacterial overlay assay

구강내 주요 세균에 대한 타액 단백질의 부착 실험 결과는 사용한 solid-phase가 Immobilon-P

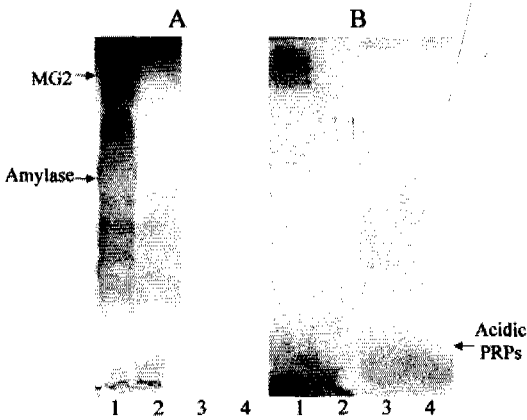


Fig. 7. SDS-10%PAGE/Western transfer overlaid with *S. aureus* strain 31153 and probed with rabbit anti-strain 31153 sera (a 1:2,000 dilution). Panel A) Immobilon-P membrane. Panel B) nitrocellulose membrane. In all panels: Lane 1. Pool A (mucin- and amylase-enriched fraction): Lane 2. Pool C (PRPs-enriched fraction): Lane 3. Pool A without bacterial overlay: Lane 4. Pool C without bacterial overlay.

인가 혹은 nitrocellulose membrane 인가에 따라 다르게 나타났으며, 이는 부착 실험이 assay-sensitive 하다는 것을 반영해 주는 것이라 할 수 있다. 우선 Immobilon-P에서의 결과를 보면, *S. gordonii*는 MG2에만 부착하였고, *A. viscosus*는 MG2, amylase, PRPs 모두에 부착하였으며, *S. aureus*는 MG2와 amylase에 부착하였다. 해당 균주를 overlay하지 않고 같은 실험을 반복하였을 때(negative control), 모든 경우에 있어 양성 반응이 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 5,6,7).

Nitrocellulose membrane에서의 결과는 다른 양상을 나타내었다. *S. gordonii*와 *A. viscosus*는 MG2, amylase, PRPs 모두에 부착하였으며, *S. aureus*는 MG2, PRPs에 부착하였다. 하지만 해당 균주를 overlay하지 않고 실험한 negative control 결과를 보면 rabbit anti-*A. viscosus* antisera와 rabbit anti-*S. aureus* antisera 모두 PRPs와 교차 양성 반응을 나타내었다(Table 2,

Fig. 5,6,7).

IV. 총괄 및 고찰

타액내 MG2(human salivary low-molecular-weight mucin: MUC7)와 구강내 주요 균주와의 부착에 관한 연구 보고로는 MG2의 주요 acidic trisaccharide인 SA α 2,3Gal β 1,3GalNAc이 *viridans Streptococci*의 부착에 중요한 역할을 한다는 보고¹³⁾ 이외에는 결론에 이를 만한 정보가 아직 축적되지 못하였다. 본 연구에서도 유사한 결과를 얻었는데, *S. gordonii*가 Immobilon-P나 nitrocellulose membrane에 부착된 MG2에 모두 부착하였다. *A. viscosus*도 MG2에 잘 부착하는 소견을 보였는데, 이는 lactose-sensitive lectin activity를 가진 type 2 fimbriae와 MG2의 carbohydrate side chain의 상호작용에 의한 것으로 여겨진다. Type 2 fimbriae의 이러한 lectin activity는 actinomyces와 streptococci의 coaggregation 혹은 neuraminidase-treated erythrocytes의 hemagglutination에 의해 확인된 바 있다^{14,15)}. *S. aureus*도 membrane에 부착된 MG2에 부착하였다. Biesbrock 등¹⁶⁾은 solution-phase에서 *S. aureus*와 MG2의 부착에 관해 연구 보고하였는데, MG2가 sIgA와 complex를 이루었을 때만 부착정도가 뚜렷이 증가된다고 하였으나, 본 연구 결과를 보면 solid-phase에서 *S. aureus*가 MG2에 부착함을 알 수 있다.

타액내 amylase는 전통적인 작용이라 할 수 있는 starch의 분해 작용 이외에도 다양한 종류의 *Streptococci*와 solution 상태에서 binding 한다는 보고가 있다^{17,18)}. 특히 amylase가 범람질 pellicle에서 발견된다는 사실¹⁹⁾은 amylase의 구강내 작용은 소화작용보다는 미생물의 modulation에 더 중요성이 있음을 제시하는 것이다. 예를 들면, amylase가 타액내에 존재하는 경우에는 여러 종류의 병원성 균주와 결합하여, 이들 균주를 구강내로부터 씻어내는 작용을 하는 반면²⁰⁾, amylase가 치아면에 부착하면, 프로그 유발 균주의 부착을 촉진하고 starch를 maltose로 분해한다. 이는 치아우식증 유발 균주

에 의해 이용되어 산을 형성하고 치면의 탈석회화를 일어나게 할 수 있다¹⁹⁾. 본 연구에 의하면 *S. gordonii*는 Immobilon-P에 부착된 amylase에는 부착되지 않았으며, nitrocellulose membrane에 부착된 amylase에는 부착되었다. 이는 각각의 membrane이 다른 물리적, 화학적 성질을 가진 다른 종류의 solid-phase임을 암시하여 주는 것이다. 이러한 membrane에 따른 상이한 결과는 *S. aureus*에서도 관찰되었는데, *S. aureus*는 Immobilon-P에 부착된 amylase에만 부착하였다. *A. viscosus*는 양쪽 membrane에 있는 amylase에 모두 부착하였다. 하지만 이들 균주와 amylase와의 부착에 대해서는 부착 활성영역 및 구조에 관한 추가적인 연구와 정보가 필요하다.

타액내 단백질과 구강 세균과의 부착정도에 관한 연구보고 중 대다수는 acidic PRPs에 관한 보고이다. 치아 법랑질 pellicle의 *in vitro* 실험 모델이라고 할 수 있는 hydroxyapatite particle을 이용한 실험 보고에서 Gibbons와 Hay²¹⁾는 *A. viscosus* strain T14V가 type 1 fimbriae를 통하여 치아면 pellicle에 존재하는 salivary PRP-1과 statherin에 부착한다고 제안하였으며, solution-phase와 solid-phase에서의 binding과 binding inhibition 실험결과를 비교하여 cryptitope의 가능성을 제시한 바 있다²²⁾. 그 후 acidic PRPs의 C-terminal 부분의 sequence에 해당하는 synthetic peptide fragment를 이용한 실험모델에서 C-terminal 149-150 부위에 위치하는 Gln-Pro이 *S. gordonii* binding에 가장 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였고, 이 부분이 hidden receptor가 될 수 있는 가능성을 보고한 바 있다²³⁾. 본 연구의 결과를 보면, *S. gordonii*와 *S. aureus*는 nitrocellulose membrane에 부착된 PRPs에만 부착하였으며, *A. viscosus*는 양쪽 membrane에 다 부착하였다. 하지만 nitrocellulose membrane의 경우 rabbit anti-strain T14V sera와 rabbit anti-strain 31153 sera가 PRPs와 cross reactivity를 보여 정확한 해석을 어렵게 하였다. 하지만, 본 실험과 같이 membrane을 이용한 solid-phase assay에서도

다른 연구 결과와 유사하게 *S. gordonii*와 *A. viscosus*가 PRPs에 부착하는 소견을 보였다는 점이 흥미롭다.

본 연구는 타액내 주요 단백질이라 할 수 있는 PRPs, amylase와 highly glycosylated protein인 MG2가 solid-phase 상태에서 구강내 주요 bacteria과 어떠한 친화도를 보이는가에 대한 정보를 얻기 위한 것이다. 특히 화학적으로 다른 solid membrane을 이용함으로써 포괄적인 결과를 얻고자 하였다. 본 실험 결과에서 나타난 바와 같이 다른 종류의 membrane에서는 다른 결과가 나타나는 경우가 있었다. 이는 *in vitro*에서의 결과를 *in vivo*에서 적용할 때 가장 큰 장애가 되는 요인으로 적절한 *in vivo* 실험 모형의 개발이 필요하다고 할 수 있다. 특히 PRPs와 amylase는 치아 법랑질 pellicle의 구성성분이고¹⁹⁾, PRPs와 MG2가 이미 oral mucosal pellicle의 구성 성분으로서 구강점막과 공유결합한다는 실험적 증거가 있다는 것^{24,25)}을 고려해 볼 때, 이와 같은 실험 결과는 치아뿐만 아니라 구강점막에서의 타액 단백질과 구강 세균과의 상호 작용을 알아 볼 수 있는 자료로 활용될 수 있을 것이다.

구강내 타액 단백질과 당단백질은 구강내에서 외부 환경과 구강조직 사이에서 외부 자극에 대항할 수 있는 permeability barrier로서의 역할과 치아와 구강점막 혹은 치아와 치아사이의 윤활제로서의 역할 뿐만 아니라, 구강내 균주의 조절을 담당하는 중요한 역할을 하고 있다. 그러므로 타액내 주요 단백질과 주요 균주사이의 부착 친화도에 대한 연구는 구강내 치아우식증과 치주 질환과 같은 주요 감염성 질환에 대한 이해를 돕는다. 또한, 약물에 의한 면역억제 상태나 방사선 치료 혹은 화학 요법후 나타날 수 있는 타액량 감소 및 이에 의한 타액내 주요 단백질 성분의 변화나 감소, 구강내 미생물 균주 생태의 변화에 의해 빈번하게 나타날 수 있는 구강내 이차 감염이나 궤양성 질환에서, 타액내 단백질의 역할 및 타액 단백질과 구강내 미생물과의 관련성을 밝히고, 이러한 질환을 치료하는데 도움이 될 수 있는 물질의 개발에 관한 연구에 기초가 되는 정보를 제공하여 줄 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 인체 악하선-설하선 혼합 타액을 채취하고 이를 부분 정제한 mucin- 및 amylase-enriched fraction과 acidic PRPs-enriched fraction을 얻은 다음, 구강내 주요 미생물 중 하나인 *S. gordonii*, *A. viscosus*, *S. aureus*와의 부착 친화도를 solid-phase assay를 사용하여 조사하였다.

Immobilon-P에서의 결과를 보면, *S. gordonii*는 MG2에, *A. viscosus*는 MG2, amylase, PRPs 모두에, *S. aureus*는 MG2와 amylase에 부착하였다. Nitrocellulose membrane에서는 *S. gordonii*와 *A. viscosus*는 MG2, amylase, PRPs 모두에 부착하였으며, *S. aureus*는 MG2와 PRPs에 부착하였다. 하지만 해당 균주를 overlay하지 않고 실험한 negative control 결과를 보면 rabbit anti-*A. viscosus* antisera와 rabbit anti-*S. aureus* antisera 모두 nitrocellulose membrane에서 PRPs와 교차 양성 반응을 나타내었다. 이와 같이 구강내 주요 세균에 대한 타액 단백질의 부착 실험 결과는 사용한 solid-phase에 따라 다르게 나타났으며, 이는 부착 실험이 assay-sensitive 하다는 것을 반영해주는 것이라 할 수 있다.

특히 PRPs와 amylase는 치아 법랑질 pellicle의 구성성분이고, PRPs와 MG2가 이미 oral mucosal pellicle의 구성 성분으로서 구강점막과 공유결합한다는 실험적 증거가 있다는 것을 고려해 볼 때, 이와 같은 연구 결과는 치아뿐만 아니라 구강점막에서의 타액 단백질과 구강 세균과의 상호 작용을 알아 볼 수 있는 자료로 활용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Mandel, I.D. : The functions of saliva. *J. Dent. Res.*, 66:623-627, 1987.
- Levine, M.J. : Development of artificial salivas. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 4:279-286, 1993.
- Scannapieco, F.A. : Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 5:203-248, 1994.
- Gibbons, R.J. : Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. *J. Dent. Res.*, 68:750-760, 1989.
- Gibbons, R.J. and Hay, D.I. : Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, 56:439-445, 1988.
- Scannapieco, F.A., Bhandary, K., Ramasubbu, N., and Levine, M.J. : Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human salivary α -amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173:1109-1115, 1990.
- Levine, M.J. : Salivary macromolecules : A structure/function synopsis. In Malamud, D. and Tabak, L. eds. *Saliva as a diagnostic fluid*. *Annals New York Academy of Sciences*, 694:11-16, 1993.
- Shomers, J.P., Tabak, L.A., Levine, M.J., Mandel, I.D., and Ellison, S.A. : The isolation of a family of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.*, 61:973-977, 1982.
- Ramasubbu, N., Reddy, M.S., Bergery, E.J., Haraszthy, G.G., Soni, S.D., and Levine, M.J. : Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem. J.*, 280:341-352, 1991.
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354, 1979.
- Burnett, W.N. : "Western blotting." Electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112:195-203, 1981.
- Murray, P.A., Levine, M.J., Tabak, L.A., and Reddy, M.S. : Specificity of salivary-bacterial

-
- interactions: II. Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a NeuAca_{2,3}Galβ_{1,3}GalNAc sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106:390-396, 1982.
14. Revis, G.J., Vatter, A.E., Crowle, A.J., and Cisar, J.O. : Antibodies against the Ag2 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V inhibit lactose-sensitive bacterial adherence. *Infect. Immun.*, 36:1217-1222, 1982.
 15. Cisar, J.O., David, V.A., Curl, S.H., and Vatter, A.E. : Exclusive presence of lactose-sensitive fimbriae on a typical strain (WVU45) of *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.*, 46:453-458, 1984.
 16. Biesbrock, A.R., Reddy, M.S., and Levine, M.J. : Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect. Immun.*, 59:3492-3497, 1991.
 17. Scannapieco, F.A., Bhandary, K., Ramasubbu, N., and Levine, M.J. : Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of h-human salivary α-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173:1109-1115, 1990.
 18. Scannapieco, F.A., Torres, G., and Levine, M.J. : Salivary amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 4:301-307, 1993.
 19. Al-Hashimi, I. and Levine, M.J. : Characterization of *in vitro* salivary-derived enamel pellicle. *Arch. Oral Biol.*, 34:289-295, 1989.
 20. Scannapieco, F.A., Bergey, E.J., Reddy, M.S., and Levine, M.J. : Characterization of the salivary α-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, 57:2853-2863, 1989.
 21. Gibbons, R.J. and Hay, D.I. : Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, 56:439-445, 1988.
 22. Gibbons, R.J., Hay, D.I., Cisar, J.O., and Clark, W.B. : Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, 56:2990-2993, 1988.
 23. Gibbons, R.J., Hay, D.I., and Schlesinger, D.H. : Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, 59:2948-2954, 1991.
 24. Bradway, S.D., Bergey, E.J., Jones, P.C., and Levine, M.J. : Oral mucosal pellicle: Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem. J.*, 261:887-896, 1989.
 25. Bradway, S.D., Bergey, E.J., Scannapieco, F.A., Ramasubbu, N., Zawacki, S., and Levine, M.J. : Formation of salivary-mucosal pellicle: role of transglutaminase. *Biochem. J.*, 284:557-564, 1992.

- ABSTRACT -

Adhesion of Oral Pathogens to Human Submandibular-Sublingual Salivary Proteins

Sung-Woo Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Sung-Chang Chung, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Young-Ku Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Hong-Seop Kho, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Dept. of Oral Medicine & Oral Diagnosis, College of Dentistry, Seoul National University

The present study was performed to investigate the binding between salivary proteins (low-molecular-weight mucin:MG2, amylase, proline-rich proteins:PRPs) and oral pathogens (*Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus aureus*) by using solid-phase assay.

In the case of transferring proteins to Immobilon-P, *S. gordonii* binds to MG2. *A. viscosus* binds to MG2, amylase, and PRPs, and *S. aureus* binds to MG2 and amylase. On nitrocellulose membrane, *S. gordonii* and *A. viscosus* bind to MG2, amylase, and PRPs. *S. aureus* binds to MG2 and PRPs. However, rabbit anti-*A. viscosus* antisera and rabbit anti-*S. aureus* antisera showed cross reactivity to PRPs adsorbed to only nitrocellulose membrane in negative control experiments, which were done without bacterial overlay. The results were different according to the membrane used as solid-phase, which reflected the assay-sensitive nature of binding experiment.

PRPs and amylase are known to be components of tooth enamel pellicle. In addition, there was experimental evidence that PRPs and MG2 may covalently bind to oral mucosal epithelium. Considering above facts, the results of the present study can provide information on the interactions between salivary proteins and oral bacteria on tooth and oral mucosal surfaces.

Key words : saliva, mucin, amylase, proline-rich proteins, adhesion, binding assay