

# 사람의 타액선에서 proline-rich protein의 발현양상과 기능적 단백질 구조에 대한 분자생물학적 연구

주재용 · 이석근\* · 박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강병리학교실\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:31-41)

## A MOLECULAR BIOLOGICAL STUDY ON THE EXPRESSION PATTERN AND FUNCTIONAL PROTEIN STRUCTURES OF PROLINE-RICH PROTEINS IN HUMAN SALIVARY GLANDS

Jae-Yong Joo, Suk-Keun Lee\*, Young-Wook Park

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Department of Oral Pathology\*,  
College of Dentistry, Kangnung National University

Proline-rich proteins (PRPs) are major components of human saliva. In order to know the biological roles of PRPs, we explored the expression pattern and functional protein structures of PRPs by the immunohistochemical and various molecular biological methods. Polyclonal antibody against human gPRP was generated from rabbit by the injection of oral exfoliated cells specially treated by urea and SDS buffer.

The PRPs began to be expressed both in the acinar cells and ductal cells from the EIDS (Early Intermediate Developmental Stage) of fetal salivary glands and became intense in the salivary epithelium in the LDS (Late Developmental Stage) and adult salivary glands. The polyclonal antibody against the gPRP showed the cross-reactivity with aPRP and bPRP, these results were relevant to the high homology among subtypes of PRP. However, the simulated protein structures of PRPs showed the characteristic repetitive whorling domains except the N-terminal signal peptide. The whorling domains were also contained the multiple amino acids of glutamine and glycine, which may provide the receptor binding or cross-linking sites of PRPs.

**Key words** : Proline-rich protein (PRP), Salivary gland, Subtracted cDNA library

### I. 서 론

Proline-rich protein (이하 PRP)은 사람의 타액선에서 분비되는 단백질의 주된 구성성분으로서 사람의 이하선 타액에서 분비되는 단백질의 약 70%를 차지하고 있다<sup>1,2)</sup>. 1965년에 사람의 타액에서 처음으로 PRP를 관찰하였고<sup>3)</sup>, 1971년에 사람의 타액에서 PRP를 순수분리한 후 그 특성과 기능에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다<sup>4)</sup>. PRP는 아미노산 조성이 매우 특징적인데, proline(25~42%), glycine(16~22%), glutamic acid/glutamine(15~28%)이 풍부하게 존재하는 반면, 방향족이나 sulfur기를 함유하는 아미노산은 매우 드물다<sup>4)</sup>. 현재까지 20종 이상의 PRP가 사람의 타액에서 분리되었고<sup>5,6)</sup>, 전기영동적 및 화학적 특성에 따라 acidic PRP와

basic PRP로 분류되며, 이들이 당화 (glycosylation)된 glycosylated PRP가 있다 (이하 aPRP, bPRP, gPRP)<sup>7)</sup>. aPRP는 분자량이 16kDa 내외이며, bPRP는 20kDa 내외, gPRP는 40kDa 내외인 것으로 알려져 있으며<sup>8)</sup>, 이하선 타액에서 분비되는 단백질에서 aPRP가 약 30%, bPRP가 약 23%, gPRP가 약 17%를 차지한다고 보고되어 있다<sup>1)</sup>. 초기의 여러 선학들에 의한 연구에서 aPRP를 암호화하는 유전자좌 (gene loci)가 17개, bPRP와 gPRP를 암호화하는 유전자좌가 12개나 될 정도로 PRP가 매우 복잡하고 다양한 유전적 발현 및 진화 양상을 보이는 것으로 보고가 되었으나<sup>9)</sup>, 최근에는 DNA를 이용한 연구로부터 PRP를 암호화하는 유전자좌가 6개만이 존재한다는 주장이 인정되고 있다<sup>10,11)</sup>. 염색체 12p13.2에 존재하는 PRP 유전자는 제한효소의 종류에 따라 크게 Hae III형 (PRH)과 Bst N1형 (PRB)으로 나눌 수 있는데, 이들은 다시 PRH1과 PRH2, PRB1과 PRB2, PRB3, PRB4로 나누어진다<sup>12,13)</sup>. aPRP는 타액내의 칼슘이온, 수산화인회석과 결합하여 타액의 농도를 일정하게 유지하는 역할을 하며, bPRP는 음식물에 존재하는 tannin 성분과 결합하여 tannin의 유해 효과를 방지하는 것으로 알려져 있으며, gPRP는 주로 타액의 윤활 작용에 관여하는 것으로 보고되고 있다<sup>14)</sup>. 한편, PRP는 치아표면이나 구강내의 상피세포에 강하게 결

#### 박영욱

210-702 강원도 강릉시 지변동 123

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook, Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National Univ.

123, Chibyun-dong, Kangnung, Kangwon-do, 210-702, Korea

Tel : 82-33-640-3183 Fax : 82-33-640-3103

E-mail : ywpark@kangnung.ac.kr

합한 후 다양한 종류의 세균에 대한 부착을 매개하는 것으로 밝혀지고 있는데, 구강내의 감염성 질환에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추측되며<sup>15)</sup>, 이에 대한 연구는 구강점막의 감염성 질환을 통제하는 새로운 방법을 제시해 줄 것으로 기대된다<sup>16-18)</sup>.

본 연구에서는 PRP를 연구하는데 있어서 필수적인 PRP 항체를 분자생물학적 방법으로 제작하였고, 사람 태생기 및 성인의 타액선 조직에서의 PRP의 발현양상을 관찰하였으며, 기능적 단백질 구조와 각 아형별 차이점과 유사성 등을 일련의 분자생물학적인 방법으로 분석하여 타액내의 PRP의 특이한 기능을 연구하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 사람의 악하선 조직에서 subtracted cDNA library 제작

혀 기저부의 편평상피세포암으로 진단된 환자에서 경부 광경 수술시 함께 적출된 악하선 조직 약 1g을 통법에 따라서 GTC (4.0 M Guanidinium Thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) 용액에 넣고 균질화시킨 후 Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 방법으로 RNA를 일차적으로 분리하였다. 그리고 Cecium chloride-EDTA 용액 (96.0g CeCl<sub>2</sub> in 100ml DEPC water, 0.01 M EDTA (pH 7.5))을 이용한 초원심분리 방법으로 2차적으로 순수한 RNA를 얻었다. 이렇게 얻은 total RNA에서 Oligotex (Qiagen, CA, USA)를 이용해서 mRNA를 검출하였다. 순수 분리된 mRNA 5 $\mu$ g을 이용하여, MMLV reverse transcriptase (Stratagene, CA, USA)로 외가닥 (single strand) cDNA를 만들었으며 곧이어 RNase H (1.5U/ $\mu$ l)와 DNA polymerase 1 (9.0U/ $\mu$ l)을 이용해서 이중가닥 (second strand) cDNA를 제작하였다. 한편 악하선에서 얻은 cDNA를 subtraction하기 위해 사람의 정상적인 상피세포를 불멸화 (immortalized)시킨 RHEK 세포주를 충분히 배양해서 같은 방법으로 mRNA를 추출하고 이중가닥 cDNA를 제작하였다. RHEK 세포주의 cDNA에 Klenow (NewEngland Biolabs, 212L, Hertfordshire, UK) 효소를 이용해서 dUTP-digoxigenin을 부착시킨 DNA probe를 제작한 후 사람의 악하선에서 얻은 cDNA와 반응시켜서 보합결합 (hybridization)시켰다. 그리고 biotin이 붙어 있는 anti-digoxigenin 항체 (Roche Molecular Biochemical, Germany)로 반응시킨 후에 자분 (magnetic particle)이 붙어 있는 streptoavidin (Roche Molecular Biochemical, Germany)으로 복합체를 형성시킨 후에 magnetic chamber 내에서 RHEK 세포의 DNA probe에 보합결합된 cDNA를 제거하였다. 이렇게 얻은 이중가닥 cDNA의 양 끝을 *pfu* DNA polymerase (2.5U/ $\mu$ l)를 이용해 blunting시켰으며 *EcoRI* adaptor를 붙인 후 *EcoRI* adaptor 부위는 T4 polynucleotide kinase로 인산화 시키고, 다시 cDNA를 *XhoI*로 digest시켰다 (Stratagene, CA, USA). 이 cDNA는 T4 DNA ligase (4U/ $\mu$ l)를 이용해서 Uni-ZAP XR vector에 ligation시켜서 집어넣었으며 vector는 packaging extract (Stratagen, CA, USA)에 packaging시켜서 Lambda phage의 증식을 XL1-Blue MRF<sup>+</sup> 세포에 감염시켜서 한천 평판 (agar plate)에서 plaque의 발현을 확인하였다.

### 2. 클로닝 (cloning) 및 염기서열분석 (sequencing)

위의 방법으로 사람의 악하선에서부터 얻어진 subtracted cDNA library에서 클론을 얻기 위하여, SOLR strain의 세포와 Exassist helper phage의 도움으로 *in vivo* mass excision을 수행하였다. 이때 X-Gal (Sigma, SL, USA) 반응에 의해서 파란색 발색반응을 보이는 콜로니는 버리고, 발색반응이 없는 백색 콜로니를 취해서 ampicillin-LB broth (10g tryptone, 5g yeast extract, 5g NaCl, 1ml 1N NaOH, in 1 l H<sub>2</sub>O, 100 $\mu$ g/ml ampicillin)에 배양하였다. 충분히 배양된 세균을 resin bead (Promega, WI, USA)를 이용해서 cDNA를 포함하는 플라스미드로 분리하였고, 각각에 대한 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 시행하였다. PCR 반응물 2 $\mu$ l를 1% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 ALF-express (Pharmacia Biotech, CA, USA)의 자동 염기서열 분석기를 사용해서 부분적 염기서열 분석을 시행하였는데 여기서 얻은 결과는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색 프로그램을 통하여 유사성 검색을 하였으며, 유사성 검색에서 PRP의 유전인자로 확인된 클론은 RNA *in situ* hybridization을 시행하기 위하여 보관하였다.

### 3. RNA *in situ* hybridization

사람 태생기 타액선 조직에 대한 *in situ* hybridization을 위하여 사산된 태아의 타액선 조직을 4% 중성 paraformaldehyde에 고정시킨 후 RNase protection된 방법으로 파라핀 블럭을 제작하였으며, 4 $\mu$ m 두께의 현미경 절편을 실란 (silane; Muto-glass, Japan)으로 처리된 유리 슬라이드에 부착하여 보관하였다. RNA *in situ* hybridization에 사용되는 RNA probe를 제작하기 위하여, *in vitro* transcription 반응을 시켰는데, 각각의 클론들에 대하여 13 $\mu$ l의 DNA template, 2 $\mu$ l의 10 $\times$  transcription buffer, 1 $\mu$ l의 RNase inhibitor (Fermentas, MD, USA), 2 $\mu$ l의 DIG RNA labeling mixture (Roche Molecular Biochemical, Germany), 2 $\mu$ l의 T3 또는 T7 RNA polymerase (Fermentas, MD, USA)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 후 formamide 용액 20 $\mu$ l를 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. RNA probe의 생산을 확인하기 위하여 보관된 반응물 중에서 2 $\mu$ l를 1% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 조사한 후 다음과 같은 방법으로 RNA *in situ* hybridization을 시행하였다<sup>19)</sup>.

- 1) 파라핀 절편 슬라이드를 xylene에서 15분씩 2회 넣어 파라핀을 제거한다.
- 2) 100% ethanol에서부터 90, 80, 70% ethanol까지 5분씩 수화시킨 후 DEPC (diethylpyrocarbonate; Sigma, SL, USA)로 처리한 PBS (phosphate buffered saline)용액에 5분간 넣는다.
- 3) 4% paraformaldehyde 용액으로 상온에서 10분간 재고정을 시킨다.
- 4) Proteinase K 용액 (0.01 $\mu$ g/ $\mu$ l)으로 상온에서 20분간 반응시킨다.
- 5) 0.2N HCl 용액으로 상온에서 10분간 반응시켜 내재성 alka-

- line phosphatase를 불활성화시킨다.
- 6) DEPC로 처리한 PBS 용액으로 5분씩 2회 중화한다.
  - 7) 0.1M TEA (triethanolamine; Sigma, SL, USA) 용액에서 10분간 적정화한다.
  - 8) 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 상온에서 10분간 반응시킨다.
  - 9) DEPC 처리된 PBS로 5분씩 2회 중화한다.
  - 10) 50°C로 예열된 100  $\mu$ l의 hybridization 용액에 4  $\mu$ l의 DIG labeled RNA probe를 첨가한 후 절편위에 기포가 생기지 않도록 떨어뜨린 후 Hybrislip®(PGC, MD, USA) 으로 덮고 55°C 배양기에서 14-16시간 동안 배양한다.
  - 11) 배양기에서 꺼낸 후에 2X SSC (0.3M sodium chloride, 0.03M sodium citrate)-50% formamide 용액을 사용하여 50°C 수조에서 10분간 반응시킨 후 Hybrislip®을 제거하고 다시 2X SSC-50% formamide 용액으로 50°C 수조에서 20분간 반응시킨다.
  - 12) DIG 1 (0.1M Tris, 0.15M NaCl)용액에 넣은 후 37°C 수조에서 10분간 반응시킨다.
  - 13) DIG 2 (0.1M Tris, 0.15M NaCl, 2% blocking)용액에 넣은 후 실온에서 1-2시간 동안 반응시킨다.
  - 14) anti-DIG antibody (1 : 1,000 dilution in DIG 1 solution; Roche Molecular Biochemical, Germany)로 상온에서 2시간 반응시킨다.
  - 15) DIG 1 용액으로 1시간씩 4회 세척한다.
  - 16) DIG 3 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl)용액에 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; Roche Molecular Biochemical, Germany)와 NBT (nitroblue tetrazolium salt; Kirkegaard & Perry Lab, SF17, MA, USA), 2M MgCl<sub>2</sub>를 섞어 상온에서 20분 이상 발색한다.
  - 17) 발색이 충분하기를 현미경으로 직접 관찰하고 DIG 4 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)용액으로 10분간 세척한다.
  - 18) Glycerol gel (DAKO, 106-1, CA, USA)로 봉입한다.

*In situ* hybridization에서 발현된 양성반응의 결과는 Image Pro-4.0 (Media Cybernetics, MA, USA)의 Image analyzer 영상처리를 통하여 양성 반응의 정도를 분석하였고, 사람 태생기 타액선 조직 절편을 태령에 따라 EIDS (early intermediate developmental stage; 임신 18-24주), LIDS (late intermediate developmental stage; 임신 25-32주), LDS (late developmental stage; 임신 33-40주)의 세 군으로 분류하여 발현 양상을 살펴보았다<sup>20</sup>. 또한 성인으로부터 제작된 타액선 조직 절편에서도 동일한 실험을 시행하여 태생기 타액선 조직과 비교 분석하였다.

#### 4. PRP에 대한 항체의 제작과 특이성 (specificity) 검증

사람의 이하선 타액 30mL을 튜브에 모은 후 4°C, ×1,000 RPM에서 10분 동안 원심분리하고 상청액을 조심스럽게 제거하였다. 10% buffered formaline 5mL을 넣고 30분 동안 고정한 후, 같은 조건에서 다시 원심분리하여 상청액을 제거함으로써 구강내의 탈

락 상피세포 성분을 일차적으로 분리하였다. 여기에 PBS 10mL을 첨가하고 초음파 세포파쇄기인 Vibracell®(Sonics & Materials Inc. CT, USA)에서 10분 정도 처리하여 세포막을 파괴한 후 같은 조건에서 원심분리하여 PBS를 제거하였다. SDS (sodium dodecyl sulfate) lysis buffer 10mL과 8M urea (pH 8.0) 10mL을 넣고 중탕하여 1주일 동안 가열하였는데, 매일 같은 조건에서 원심분리하고 상청액을 제거한 후 용액을 교환해 주었다. 최종적으로 남은 용액에서 3mL을 취하여 Freund's incomplete adjuvant (Life technologies inc, NY, USA) 3mL과 혼합하여 체중 약 3kg의 건강한 가토에 1.5mL씩 나누어 1-2주 간격으로 4회에 걸쳐 주사하고 ketamine chloride (Keiran®, 한국유나이트제약)를 70mg/kg로 근육 주사한 후 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 4°C, 15,000 RPM에서 5분간 원심분리하여 혈청 성분을 분리해낸 후 0.02% sodium azide를 첨가하여 다클론 (polyclonal) 항체를 제작하였다. 이렇게 제작된 항체를 이용하여 PRP에 대한 특이성을 확인하기 위해 다양한 실험을 수행하였는데, 우선 중탕 처리한 후 항체 제작에 이용하고 남은 용액에 PAS 염색과 제작된 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 또한 건강한 성인의 탈락 상피세포로부터 세포 표본 (cell block)을 만들어 통상적인 H&E 염색을 하였다. 그리고 건강한 성인에서 변형된 Lashley 컵을 이용하여 순수하게 모은 이하선 타액을 동결건조 처리하여 단백질 성분을 분리한 후, 이것을 이용하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하고 Coomassie blue 염색과 제작된 항체를 이용한 Western blotting을 하였다. 또한, 이하선 타액과 제작된 항체를 이용하여 Protein A-sepharose column (ImmunoPure® ; Pierce, IN, USA)에서 immunoprecipitation을 시행하여 항체와 결합한 단백질과 결합하지 않은 단백질로 분리해낸 후, 이들에 대해서도 동일한 실험을 시행하였으며, 이 항체를 이용하여 이하선에서 제작한 클론에 대한 screening을 하여 항체와 결합한 클론만을 선택한 후 위와 동일한 방법으로 cloning과 sequencing을 시행하였다. 그리고, aPRP의 아미노산 160개와 bPRP의 아미노산 180개 정도를 암호화하는 염기 서열을 각각 pET vector (Novagen, WI, USA)에 삽입하고 *E. coli*에 감염시켜 재조합 단백질 (recombinant protein)을 발현시키도록 한 후, 이것을 이용하여 SDS-PAGE와 Western blotting을 시행하였으며, pET vector로 감염시키지 않은 *E. coli*의 단백질 성분을 추출하여 음성 대조군으로 사용해서 PRP 항체에 대한 특이성을 관찰하였다. 한편, 동결건조 처리한 이하선 타액 단백질을 이용하여 proteomics를 시행하였는데, 11cm의 immobilized pH gradient strip (ReadyStrip® ; Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 일차원적인 isoelectric focusing (IEF)을 PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, CA, USA) 기기에서 시행한 후, 이차원적으로 PROTEAN® II Xi Cell (Bio-Rad, CA, USA)에서 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 젤은 transfer membrae (Immobilon-P® ; Millipore, MA, USA)에 옮긴 후 제작된 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다.

**Table 1.** Immunohistochemical staining

Deparaffinization	Xylene 10min (×4), 99%, 90%, 70% ethanol
Blocking	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5min, PBS 30 min
Primary antibody	4°C Overnight
Secondary antibody	30min, room temperature
Streptoavidin	30min, room temperature
DAB (diaminobenzidine)	3-5min
Counter staining (option)	Harris hematoxylin

5. 면역조직화학 염색

사람 태생기 타액선 조직에 가토에서 제작된 항체와 DAKO LSAB<sup>®</sup> kit (DAKO, Denmark)를 이용하여 streptoavidin-peroxidase 방법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다(Table 1). 면역조직화학 염색에서 발현된 양성반응의 결과는 Image Pro-4.0의 Image analyzer 영상처리를 통하여 양성 반응의 정도를 분석하였고, 사람 태생기 타액선 조직 절편을 태령에 따라 EIDS, LIDS, LDS의 세 군으로 분류하여 발현 양상을 살펴보았다. 또한 성인으로부터 제작된 타액선 조직 절편에서도 동일한 실험을 시행하여 태생기 타액선 조직에서와 비교 분석하였다.

6. PRP의 특성 검색 및 가상 단백질 구조

aPRP, bPRP, gPRP 사이의 아미노산 배열에 있어서의 유사성을 살펴보기 위하여 Genedoc<sup>®</sup> 프로그램을 이용하였고, 각각의 아미노산 서열을 분석하여 반복되는 부분이 존재하는지를 살펴보았다. 또한 PRP의 3차원적 구조를 살펴보기 위하여 aPRP, bPRP, gPRP의 전구 단백질 (precursor protein) 6종에 대한 아미노산 서열을 이용하였는데, 현재까지 알려진 단백질 구조와의 유사성을 검색하기 위하여 PDB (protein data bank) site (www.rcsb.org/pdb)에 있는 단백질 구조를 이용하였고 Unix 컴퓨터 시스템의 Sybyl 6.6<sup>®</sup> (Tripos, MO, USA) 프로그램으로 단백질 구조를 관찰하였다. 이때 결합에너지를 최소화하기 위한 컴퓨터 환경설정은 Powel method, 0.05 kcal/(mol×A) termination gradient, 1,000,000 max iteration, Kollman united force energy field에서 charges는 Kollman type으로 해서 가상의 단백질 구조를 3차원적으로 영상 처리하여 관찰하였다.

III. 연구결과

1. 클로닝 (cloning) 및 염기서열분석 (sequencing)

사람의 악하선 조직에서 제작한 subtracted cDNA library에서 모두 163개의 클론을 얻었는데, 이들의 부분 염기서열 (5' end 약 500~1,000bp)을 얻은 후 NCBI의 BLAST 검색 프로그램을 통하여 검색한 결과 PRP의 유전인자 7개 (aPRP : 2종 6레, bPRP : 1종 1레)를 확인하였다.

**Table 2.** Expressions of PRP mRNA by *in situ* hybridization

	Acinus	Intercalated Ducts	Striated Ducts	
			Luminal	Basal
EIDS	-	-	±	-
LIDS	+	+	++	+
LDS	++	++	++	+
Adult	+++	++	++	+

- : negative ± : rare +: slight ++: moderate +++: strong

2. RNA *in situ* hybridization에 의한 PRP mRNA의 발현

PRP의 유전인자로 확인된 클론을 선택하여 사람 태생기 타액선 조직과 성인 타액선 조직에 RNA *in situ* hybridization을 시행한 결과 특징적인 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 1).

타액선의 도관 세포 (ductal cell)와 선포 세포 (acinar cell)에서 전반적으로 강한 양성반응이 나타났으며, 장액성 선포 세포 (serous acinar cell)가 점액성 선포 세포 (mucous acinar cell)보다는 강한 양성반응이 관찰되었으며, 고배율 소견에서 세포질에 강한 양성반응이 나타나는 것을 확인하였다. 도관세포에서는 개재관 (intercalated duct), 선조관 (striated duct), 분비관 (secretory duct) 모두에서 양성반응이 관찰되었으며 기저 세포 (basal cell)보다는 관강 세포 (luminal cell)에서 좀 더 강한 양성반응이 관찰되었다. 이러한 양성반응의 정도는 태령이 증가할수록, 즉, 타액선의 발생이 진행될수록 증가하였으며 성인의 타액선에서는 아주 강한 양성반응이 관찰되었다(Table 2).

3. PRP에 대한 항체의 제작과 특이성 검증

정상적인 형태를 갖고 있는 구강내 탈락 상피세포 (Fig. 2a)가 SDS-urea buffer에서 중탕하여 가열한 후에는 세포가 완전히 파괴되고 용해되어 소량의 고형성분만이 잔존함을 확인하였으며 (Fig. 2b), 이 잔존물을 이용해서 가토에서 생산된 항체로 원래의 항원물질에 면역조직화학 염색 (Fig. 2c)을 시행한 결과 강한 양성반응이 보였고, 이하선 타액을 이용하여 Western blot과 immunoprecipitation을 시행한 결과, 50kDa 정도의 단일 밴드가 관찰되었다 (Fig. 3). 그러므로 제작된 항체가 약 50kDa의 gPRP에 특이하게 반응하는 항체임을 짐작할 수 있었는데, 역으로 이를 검증하기 위해 제작된 항체를 이용하여 악하선에서 제작한 cDNA library에 대한 screening을 시행하였는데 8개의 클론 중에서 2개가 PRP인 것으로 확인이 되었다. 가토에서 생산된 PRP 다클론 항체를 *E. coli*에서 발현시킨 aPRP와 bPRP의 재조합 단백질을 이용하여 Western blot한 결과 각기 약 20kDa의 단일 밴드가 확인이 되어서 본 연구를 통하여 가토에서 생산된 PRP 항체가 사람의 PRP에 특이한 양성반응을 나타냄을 확인하였다(Fig. 4). 그리고 이하선 타액 단백질을 이용하여 proteomics를 시행한 후 Western blot한 결과 넓은 범위에 걸쳐 양성반응을 보였다. 이로

**Table 3.** Immunohistochemical staining with gPRP antibody

	Acinus	Intercalated Ducts	Striated Ducts	
			Luminal	Basal
EIDS	-	±	±	-
LIDS	+	++	++	+
LDS	+++	++	+++	++
Adult	+++	+++	+++	++

- : negative ± : rare + : slight ++ : moderate +++ : strong

써 PRP의 아형 사이에 특이한 면역학적 교차 반응이 있음을 알 수 있었다.

#### 4. 사람의 태아 및 성인의 타액선에서 면역조직화학 염색

태생기 타액선의 도관 세포와 선포 세포 모두에서 강한 양성반응이 나타났으나, 전반적으로 도관 세포에서 양성반응의 정도가 더 강하였고, 기저 세포보다는 관강 세포에서 좀 더 강한 양성반응이 관찰되었으며, 분비관에서의 양성반응이 개재관, 선조관에서의 양성반응보다 강하게 나타났다. 또한, 장액성 선포 세포에서 점액성 선포세포보다는 양성반응의 정도가 증가하였으며, 탈락되어가는 상피 세포에서도 강한 양성반응이 관찰되었다. 이러한 양성반응의 정도는 *in situ* hybridization의 결과와 유사하게 태령이 증가할수록 양성반응의 정도가 증가하였고, 성인의 타액선에서도 강한 양성반응이 관찰되었다 (Table 3, Fig. 5).

#### 5. PRP의 특성 검색 및 가상 단백질 구조

Genedoc® 프로그램을 이용하여 aPRP와 bPRP, gPRP 사이의 유사성을 검색한 결과, aPRP는 gPRP와 약 52%, bPRP는 gPRP와 약 71%의 유사성을 보였다. 각각의 아미노산 서열 내에 반복되는 부분을 조사한 결과 aPRP에서는 PQ-GPP-QQGG가 6회, PPPQGGK가 4회 반복되었고, bPRP에서는 PPGKPPQGG-GNKPQGGPPPP가 11회 반복되었으며, gPRP에서는 GKPEGP-PPQGGNQSQGGPPPRP가 10회 반복되었다. PRP의 전구 단백질 6종의 아미노산 서열을 이용하여 PDB site에서 현재까지 알려진 단백질 구조와의 유사성을 검색한 결과, PRH2와 PRB1, PRB4에서는 이전의 알려진 단백질 구조와 유사성이 없었다. 나머지 3종에 대한 가상 단백질 구조와 특성을 살펴본 결과, 대략의 단백질 구조를 simulation할 수 있었는데, 3종 모두에서 급격히 꺾여져서 회전되는 부위와 중요한 motif domain으로 작용하리라 예측되는 부위에서는 proline과 glutamine, lysine이 풍부하게 존재하였다.

##### 1) aPRP (PRH1)의 전구 단백질

가상 단백질 구조에서 N-말단 쪽에서는 커다란 원형의 구조를 보인 반면, C-말단 쪽에서는 5회 회전하는 전형적인 나선 (helix) 구조가 관찰되었으며, 51번과 54번 아미노산 사이에서도 나선 구조가 관찰되었다 (Fig. 6a).

##### 2) bPRP (PRB2)의 전구 단백질

가상 단백질 구조에서 다수의 회전성 가닥 (whorling strands)이 존재하였고, N-말단 쪽에서는 편평하게 펼쳐진 판상의 구조를 보인 반면, C-말단 쪽에서는 나선형으로 회전하며 구형으로 뭉쳐진 구조가 관찰되었다 (Fig. 6b).

##### 3) gPRP (PRB3)의 전구 단백질

가상 단백질 구조에서 전반적으로 나선형의 구형으로 뭉쳐진 구조를 보였으며, N-말단과 C-말단이 특징적으로 매우 가깝게 밀집해 있었다 (Fig. 6c).

### IV. 총괄 및 고찰

PRP는 사람의 타액선에서 분비되는 타액 단백질의 주된 구성 성분으로서 타액의 기능에 큰 영향을 미치므로, 이들에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다<sup>1)</sup>. 단백질을 이용한 초기의 연구에서 PRP를 암호화하는 매우 복잡하고 다양한 유전자좌가 보고되었으나<sup>9)</sup>, 이후의 DNA를 이용한 연구에서부터 PRP를 암호화하는 유전자좌는 염색체 12p13.2에 존재하는 6종으로 밝혀져 있는데, 이렇게 적은 수의 유전자좌로부터 20종 이상이나 되는 많은 종류의 PRP가 발현되는 것은 단백질 해독 (translation) 과정에서의 differential RNA splicing과 단백질 절단, 인산화, 당화 (glycosylation) 등의 단백질 생산 후의 변형 (posttranslational modification)에 의한 것으로 추정된다<sup>21)</sup>. PRP의 기능에 관해서 현재까지도 집중적인 연구가 행해지고 있는데, 특히 주목할 부분은 PRP가 치아표면의 수산화인회석이나 구강점막 상피에 부착한 후, 세균의 fimbriae와 같은 adhesin과 직접적인 단백질-단백질 상호작용에 의해 구강내 여러 세균들의 부착을 매개한다는 것이다<sup>22-24)</sup>. 또한 타액의 중요한 기능중의 하나인 윤활 작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 그러나, PRP가 호흡기 및 체장에서도 소량이 발견되는데 이것은 이들의 기능이 구강내에서만 한정된 것이 아닌 일반적인 기능을 가지고 있음을 시사해 준다<sup>24,26)</sup>.

본 연구에서는 사람의 타액선에서 제작된 cDNA library에서 PRP의 유전인자를 찾고자 상피세포로부터 만들어진 세포주인 RHEK cell line의 cDNA를 사용해서 subtracted cDNA library를 제작한 후 클로닝을 실시하여 타액선에 특징적으로 발현되는 유전인자를 효과적으로 찾을 수 있었다. 결과적으로 163개의 클론 중에서 114개의 비반복성 유전인자 (nonredundant gene)를 얻었는데, 이는 타액선에서 밝혀지지 않은 특징적인 새로운 유전자가 아직도 많이 있음을 의미한다. cDNA library 클로닝에서 얻어진 클론에는 aPRP가 6레, bPRP가 1레 포함 되어 있는데, gPRP는 얻어지지 않았다. 이는 사용한 타액선 조직에서의 PRP의 발현 양상에 의한 것으로 타액선의 경우는 이하선보다 PRP의 발현이 상대적으로 적고, gPRP의 비율도 상대적으로 매우 낮기 때문으로 추측된다<sup>27)</sup>.

타액선에서 PRP mRNA의 발현을 관찰하기 위하여 RNA *in situ* hybridization을 사람의 태생기 타액선 조직과 성인 타액선 조직에서 시행하였는데, 본 연구에서 시행한 방법은 방사선 동위원

소를 사용한 것에 비하여 비록 발색정도가 강하지는 못해도 조직의 보존성이 좋아서 고배율의 현미경 관찰과 동일한 조건에서 실험이 이루어졌으므로 발현 강도에 대한 비교 연구가 가능하였다. 특징적으로 장액성 선포 세포에서 매우 강한 양성 반응이 나타났는데, 이는 이전의 다른 연구 결과와도 일치하고 있다<sup>27)</sup>. 본 연구에서는 사람 태생기의 타액선에서 조직의 발생이 진행될수록 PRP의 발현도 증가하는 것을 *in situ* hybridization을 통하여 관찰하였는데, 이는 gPRP에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색에서도 확인이 되었다.

현재까지 PRP의 단백질 발현 양상과 기능을 연구하는데 있어서 필수적인 PRP 항체 제작이 쉽지 않아서 어려움이 많다. 통상적으로 PRP 항체를 제작하기 위해서는 타액에서 PRP를 순수 분리하거나, *E. coli*를 이용해서 재조합 PRP 단백질을 만들어서 주로 가도를 이용한 항체 제조법을 사용하는데, PRP에 특이한 반응을 보이는 항체를 만들기가 어렵다. 그 이유는 PRP가 구강내로 분비되는 즉시 타액내에 포함되어 있는 여러 종류의 단백질분해 효소 (protease)에 의해 신속하게 분해되거나, 다른 단백질과 강하게 결합하는 등의 단백질 변형이 일어나기 때문에 항원성의 유지가 어려우며, PRP가 대부분 소수성이고 항원성 부위가 PRP 단백질 구조에서 cryptic하기 때문인 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 본 연구에서는 탈락상피를 사용하여 PRP 항체를 제작하였는데, PRP 중에서 aPRP와 bPRP는 타액선에서 분비된 후 바로 각각 음식물이나 타액내의 알칼리성 또는 산성 물질과 반응하여 위장관으로 이동하게 되지만 gPRP는 주로 점막상피세포에 교차결합 (cross-link)되어서 비교적 장기간 구강점막에 남아 있게 된다. 이런 경우 PRP 단백질은 각화 상피나 다른 부착 물질에 달라붙은 상태에서 비활성화 상태로 되므로 PRP 특유의 epitope이 쉽게 노출되어진다. 따라서 이렇게 노출된 PRP epitope에 대하여 항체를 제작하기는 비교적 쉽다. 구강점막 상피에는 다량의 gPRP가 존재하게 되는데 이 gPRP는 transglutaminase에 의하여 점막각화상피 세포막에 강하게 교차결합되어 있으므로 urea나 SDS와 같은 denaturing 용액 내에서 끓여도 떨어지지 않게 된다. 즉, 각화상피내의 다른 가용성 단백질 (soluble protein)들이나 물에 비교적 쉽게 변성되는 각질 (keratin) 등은 urea와 SDS 용액 내에서 끓이면 거의 용해되지만 gPRP는 마지막까지 각화상피의 세포막에 잔존되어질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 gPRP의 특성을 이용해서 항체를 제작하였는데, 이 항체는 약 50kDa의 gPRP에 특이성을 보였고, 다양한 종류의 SDS-PAGE와 항체를 이용한 cDNA library에 대한 screening을 시행하여 이 항체의 특이성을 검증하였다. 제작된 gPRP에 대한 항체는 *E. coli*를 이용하여 제작한 aPRP와 bPRP의 재조합 단백질과도 면역학적 교차 반응을 보였는데, 이는 이전의 다른 연구에서도 확인이 된 바 있다. 이는 이들 사이의 아미노산 서열에 있어서의 매우 높은 유사성 때문인 것으로 사료되는데, 실제로 Genedoc<sup>®</sup> 프로그램을 이용한 유사성 검색에서 세 아형 간의 높은 유사성을 확인하였으며, aPRP는 gPRP와 약 52%, bPRP는 gPRP와 약 71%의 유사성을 보였다.

PRP 항체를 이용한 면역조직화학 연구는 매우 드물다<sup>26,28)</sup>. 본 연구에서는 사람 태생기 타액선 조직과 성인 타액선 조직에

gPRP 항체를 이용하여 면역조직 화학 염색을 시행하였는데, 전반적으로 도관세포와 선포 세포 모두에서 강한 양성반응이 나타났으며, 태령이 증가할수록 양성반응의 정도가 증가하였다. 한편, 탈락되어가고 있는 상피 세포에서도 양성 반응이 나타났는데, 이는 항체 제작과정에서 이용된 SDS-urea buffer에서 중탕 처리한 후 잔존하는 상피 세포 성분에 의한 것으로 사료된다. 결과적으로 사람 태생기 타액선에서 비교적 초기인 20주 경부터 PRP의 생산이 관찰되었는데, 타액선의 선포 세포와 도관 세포에서 모두 양성반응을 보였다. 특히, 점액성의 선포 세포보다는 장액성의 선포 세포에서 더 활발한 양성반응이 관찰되었고 도관에서는 관강 세포에서 증가된 양성반응을 보였다. 태령이 증가할수록 PRP 양성반응이 증가되었는데, 생후 성인의 타액선에서도 매우 강한 양성반응이 관찰되었다. 이는 타액의 분비가 증가될수록 PRP의 생산도 증가되며 타액내 필수적인 구성 단백질로서 구강내에서 중요한 역할을 하는 단백질을 암시한다.

단백질의 3차원적 구조를 밝혀내기는 매우 어려워 현재까지도 PRP의 3차원적인 구조에 관해서는 거의 알려진 바가 없다. 컴퓨터 프로그램을 통한 단백질의 가상 구조는 단백질의 기능과 연관된 매우 유용한 정보를 제공해주며, 타액 내의 또 다른 구성 단백질인 statherin에 대한 가상 단백질 구조는 제시된 바 있다<sup>29)</sup>. PRP의 전구 단백질에 대한 가상 단백질 구조에서는 각 아형 별로 각기 독특한 형태를 지니고 있음이 확인되었는데, 공통적으로 급격히 꺾여지는 부위와 중요한 domain으로 작용하리라 예측되는 부위에서는 proline과 glutamine, lysine이 풍부하게 존재하여 이들 아미노산이 PRP의 기능에 있어서 매우 중요한 역할을 수행하리라 추측할 수 있다. 그러나 PRH2와 PRB1, PRB4에서는 현재까지 알려진 단백질 구조와의 유사성을 찾을 수가 없었는데, 이는 이들이 지금까지 알려진 것과는 다른 매우 독특한 단백질 구조를 가질 수 있음을 시사한다. PRP의 단백질 구조에는 proline (P)과 glycine (G)이 반복적으로 배열하면서 독특한 회전성 (whorling) 구조를 이루며, 이들 proline과 glycine의 반복 구조와 더불어 glutamine (Q)이 규칙적으로 섞여 있는 구조를 보인다. 특히 이러한 glutamine의 반복적인 배열은 transglutaminase의 기질 (substrate)의 구조적 특징과 일치한다. 따라서 이러한 PRP의 반복되는 회전성의 덩어리 구조가 타액내에 존재하는 secretory transglutaminase에 의하여 구강내 다른 점막 세포막이나 치아 표면, 또는 세균막에 교차결합하는데 관여할 것으로 추측된다. 그러나, 기능적 단백구조를 알아내기 위한 가상단백질 구조가 실제의 단백질 구조와 비교적 유사하다고는 하나, 어느 정도의 오차는 있을 수 있으므로, 앞으로 X-ray crystallography, mass spectrometry, circular dichroism, NMR 등의 실험적 방법을 이용한 단백질 구조에 관련된 연구가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 타액 내에 PRP가 매우 풍부하고 산성, 중성 및 알칼리성의 광범위한 형태로 존재하는 것을 확인하였으며, 이 중에서 aPRP와 bPRP는 각기 특수한 중화 및 용해 반응에 사용되고, gPRP는 구강 점막 등에 부착하는데 주로 사용되고 있으며, gPRP의 항원성이 매우 독특해서 다른 aPRP와 bPRP의 항원성과 쉽게 교차 반응하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서

구강 점막의 탈락 상피에 cross-link되어 있는 PRP를 이용해서 제작한 PRP 항체를 사용하여 타액선 내에 PRP의 발현 양상을 관찰하였는데, 태생 초기부터 PRP의 발현이 나타나서 태생 말기와 생후에는 매우 풍부한 PRP의 발현이 나타나는 것을 확인하였다. 그리고 컴퓨터를 이용한 PRP의 단백질 구조를 관찰하여 PRP의 기능성 구조를 검색하였는데, proline, glycine 및 glutamine의 아미노산 배열이 특징적인 회전성 구조를 이루었다. 이로써 타액내 PRP가 타액의 주요 기능인 중화, 항세균, 점막 보호 및 운할 작용의 기전을 이해하는데 중요한 정보를 얻을 수 있었다.

## V. 결 론

사람의 타액선에서 PRP의 발현양상과 기능적 단백질 구조에 대해 알아보기 위하여 일련의 분자생물학적 연구를 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람의 악하선 조직에서 얻은 subtracted cDNA library에서 molecular cloning과 sequencing을 시행하여 얻은 163개의 타액선 유전인자 중에서 aPRP와 bPRP의 유전인자로 확인된 7개의 클론을 얻었다.
2. PRP 클론들을 이용하여 RNA probe를 제작한 후, 사람 태생기 타액선 조직에 RNA *in situ* hybridization을 시행하여 선포 세포와 도관 세포에서 강한 양성반응이 나타나는 것을 확인하였고, 타액선의 발생이 진행될수록 선포 세포와 도관 세포에서 PRP mRNA의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.
3. 가도를 이용하여 gPRP에 대한 다클론 항체를 제작하였고, 이 항체가 제조된 aPRP와 bPRP에 매우 높은 특이성을 가지며, 타액내의 aPRP, bPRP와도 면역학적 교차 반응을 보이는 것을 관찰하였다.
4. 제작된 항체를 이용하여 사람 태생기 타액선 조직에 면역조직화학 염색을 시행하여 도관 세포와 선포 세포에 강한 양성반응이 나타나는 것을 확인하였고, 태생기 타액선에서 태령이 증가할수록 PRP의 발현이 증가하며 성인의 타액선에서도 매우 풍부한 PRP의 발현을 관찰하였다.
5. PRP의 기능적 단백질 구조에 대해 연구한 결과, 각 아형 사이에 아미노산 서열에 있어서의 높은 유사성이 있음을 확인하였다. 한편, 3차원적인 가상 단백질 구조에 있어서 proline, glycine 및 glutamine 등이 반복되며 회전성의 단백질 구조를 갖고 있음을 관찰하였다.

## 참고문헌

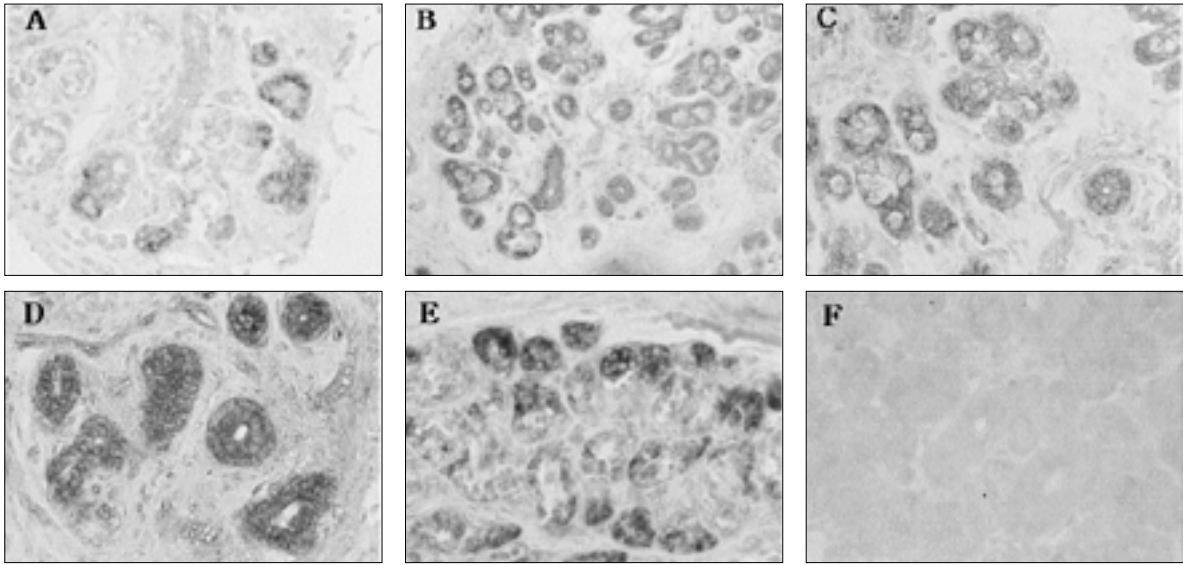
1. Bennick A: Salivary proline-rich proteins. Mol Cell Biochem 45(2): 83-99, 1982.
2. Dowd FJ: Saliva and dental caries. Dent Clin North Am 43(4): 579-97, 1999.
3. Carlson DM, Zhou J, Wright PS: Molecular structure and transcriptional regulation of the salivary gland proline-rich protein multigene families. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 41: 1-22, 1991.
4. Carlson DM: Proline-rich proteins and glycoproteins: expression of salivary gland multigene families. Biochimie 70(11): 1689-95, 1988.
5. Ramasubbu N, Reddy MS, Bergey EJ, Haraszthy GG, Soni SD,

- Levine MJ: Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. Biochem J 280: 341-52, 1991.
6. Schlesinger DH, Hay DI, Schluckebier SK, Ahern JM: Primary structure of a novel human salivary acidic proline-rich protein. Pept Res 7(5): 242-7, 1994.
7. Bennick A: Structural and genetic aspects of proline-rich proteins. J Dent Res 66(2): 457-61, 1987.
8. de Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P: Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. Infect Immun 68(6): 3172-9, 2000.
9. Ann DK, Lin HH: Transcriptional regulation of salivary proline-rich protein gene expression. Ann N Y Acad Sci 842: 108-14, 1998.
10. Hay DI, Bennick A, Schlesinger DH, Minaguchi K, Madapallimattam G, Schluckebier SK: The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f). Biochem J 255(1): 15-21, 1988.
11. Kim HS, Maeda N: Structures of two Hae III-type genes in the human salivary proline-rich protein multigene family. J Biol Chem 261(15): 6712-8, 1986.
12. Kauffman DL, Bennick A, Blum M, Keller PJ: Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: relationships of the covalent structures of ten proteins from a single individual. Biochemistry 30(14): 3351-6, 1991.
13. Stubbs M, Chan J, Kwan A, So J, Barchynsky U, Rassouli-Rahsti M, Robinson R, Bennick A: Encoding of human basic and glycosylated proline-rich proteins by the PRB gene complex and proteolytic processing of their precursor proteins. Arch Oral Biol 43(10): 753-70, 1998.
14. Charlton AJ, Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, McDonald CJ, Williamson MP: Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. FEBS Lett 382(3): 289-92, 1996.
15. Amano A, Nakamura T, Kimura S, Morisaki I, Nakagawa I, Kawabata S, Hamada S: Molecular interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with host proteins: kinetic analyses based on surface plasmon resonance. Infect Immun 67(5): 2399-405, 1999.
16. Gibbons RJ: Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res 68(5): 750-60, 1989.
17. Kataoka K, Amano A, Kawabata S, Nagata H, Hamada S, Shizukuishi S: Secretion of functional salivary peptide by *Streptococcus gordonii* which inhibits fimbria-mediated adhesion of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 67(8): 3780-5, 1999.
18. Tandler B: Salivary gland changes in disease. J Dent Res 1987; 66(2): 398-406.
19. Lee SK, Kim YS, Song IS, Lee SS, Lee YJ, Kim WH, Chi JG: Improved technique of digoxigenin labeled RNA in situ hybridization. Korean J Path 35: 89-1, 2001.
20. Lee SK, Lim CY, Chi JG, Yamada K, Hashimura K, Kunikata M, Mori M: Prenatal development of human major salivary glands and immunohistochemical detection of keratins using monoclonal antibodies. Acta Histochem 89(2): 213-35, 1990.
21. Drzymala L, Castle A, Cheung JC, Bennick A: Cellular phosphorylation of an acidic proline-rich protein, PRP1, a secreted salivary phosphoprotein. Biochemistry 39(8): 2023-31, 2000.
22. Gibbons RJ, Hay DI: Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. Infect Immun 56(2): 439-45, 1988.
23. Hallberg K, Hammarstrom KJ, Falsen E, Dahlen G, Gibbons RJ, Hay DI, Stromberg N: *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 express different binding specificities to N-acetyl-beta-D-galactosamine, whereas *Actinomyces odontolyticus* expresses a different binding specificity in colonizing the human mouth. Oral Microbiol Immunol 13(6): 327-36, 1998.
24. Li T, Bratt P, Jonsson AP, Ryberg M, Johansson I, Griffiths WJ, Bergman T, Stromberg N: Possible release of an ArgGlyArgProGln pentapeptide with innate immunity properties from acidic proline-

- rich proteins by proteolytic activity in commensal streptococcus and actinomyces species. *Infect Immun* 68(9): 5425-9, 2000.
25. Castle AM, Castle JD: Enhanced glycosylation and sulfation of secretory proteoglycans is coupled to the expression of a basic secretory protein. *Mol Biol Cell* 9(3): 575-83, 1998.
  26. Ito S, Isemura S, Saitoh E, Sanada K, Suzuki T, Shibata A: Immunohistochemical demonstration of salivary proline rich peptide P-C like immunoreactivity in human pancreatic B-cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 103(4): 544-51, 1983.
  27. Sabatini LM, Warner TF, Saitoh E, Azen EA: Tissue distribution of RNAs for cystatins, histatins, statherin, and proline-rich salivary proteins in humans and macaques. *J Dent Res* 68(7): 1138-45, 1989.
  28. Warner TF, Seo IS, Azen EA, Hafez GR, Zarling TA: Immunocytochemistry of acinic cell carcinomas and mixed tumors of salivary glands. *Cancer* 56(9): 2221-7, 1985.
  29. Gururaja TL, Levine MJ: Solid-phase synthesis and characterization of human salivary statherin: a tyrosine-rich phosphoprotein inhibitor of calcium phosphate precipitation. *Pept Res* 9(6): 283-9, 1996.

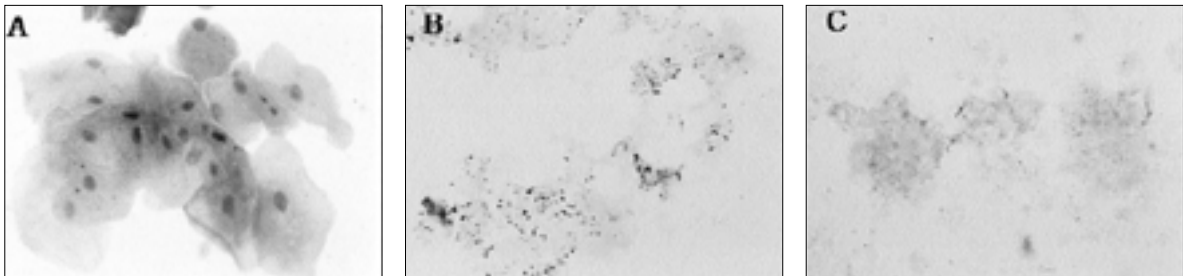


사진부도 설명 ①



**Fig. 1.** RNA *in situ* hybridization of PRP clones in human salivary gland

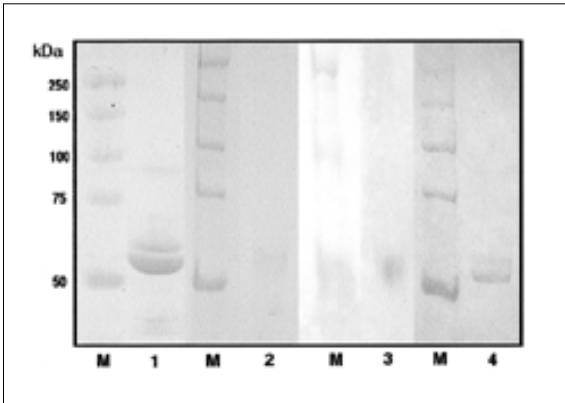
- A. fetal salivary gland, early intermediate developmental stage (X200)
- B. fetal salivary gland, late intermediate developmental stage (X200)
- C. fetal salivary gland, late developmental stage (X400)
- D. fetal salivary gland, late developmental stage (X400)
- E. adult salivary gland (X400)
- F. sense (X400)



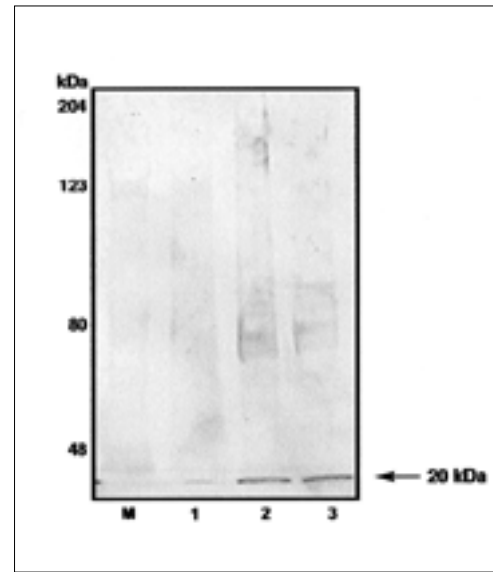
**Fig. 2.** A. H&E staining at exfoliated oral mucosa squamous cells

- B. PAS staining at exfoliated oral mucosa squamous cells after treatment with SDS-urea buffer
- C. immunohistochemical staining using gPRP antibody at exfoliated oral mucosa squamous cells after treatment with SDS-urea buffer

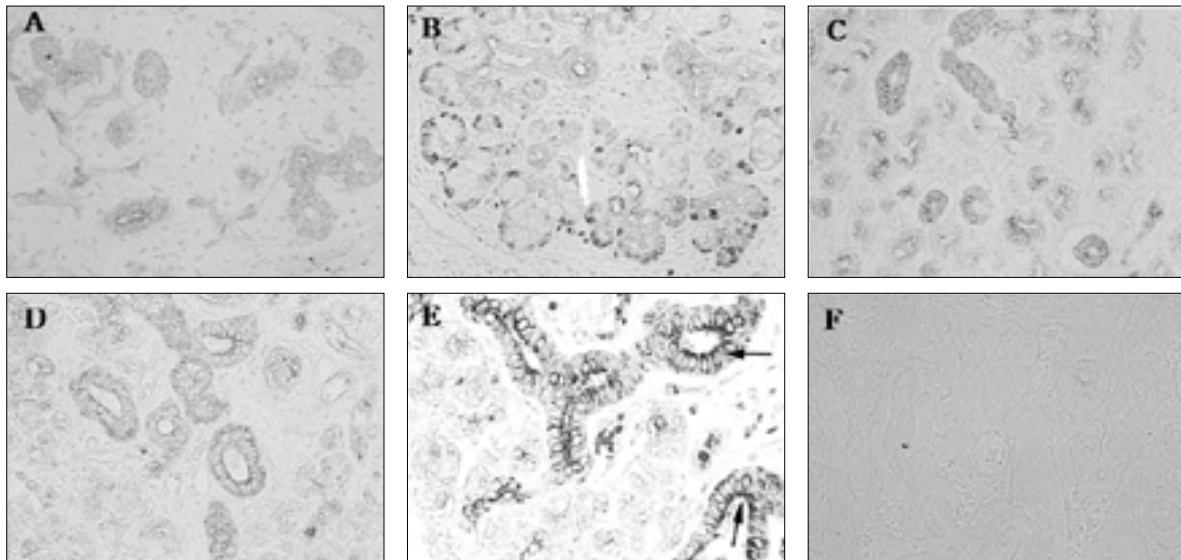
사진부도 설명 ②



**Fig. 3.** SDS-PAGE at different protein from human adult parotid saliva  
 M : BIO-RAD prestained SDS-PAGE standards  
 1 : adult human parotid saliva(Coomassie blue staining)  
 2 : immunoprecipitation of adult human parotid saliva with gPRP anti-body(Coomassie blue staining)  
 3 : immunoprecipitation of adult human parotid saliva with gPRP anti-body(Western blot)  
 4 : adult human parotid saliva (Western blot)

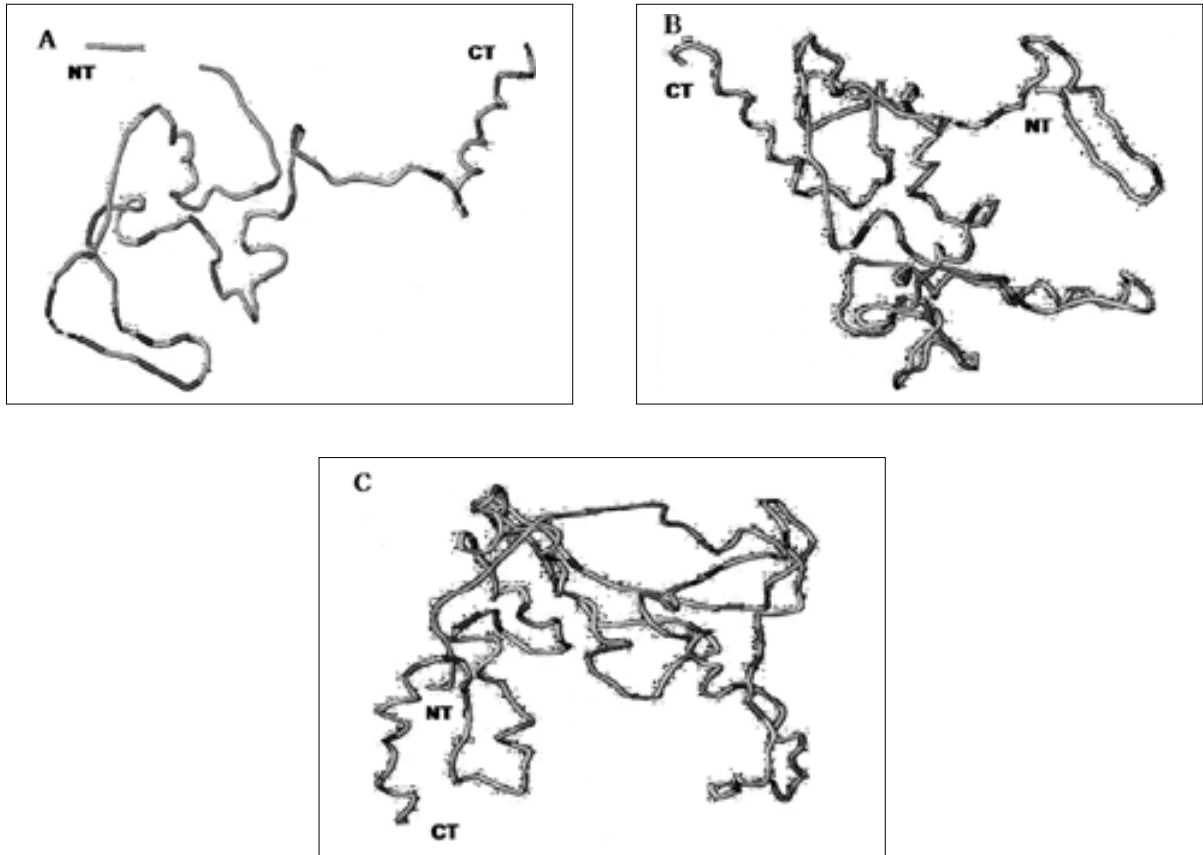


**Fig. 4.** Western blot using recombinant proteins of PRP  
 M : BIO-RAD high range prestained SDS-PAGE standards  
 1 : control  
 2 : basic PRP  
 3 : acidic PRP



**Fig. 5.** Immunohistochemical staining using gPRP antibody  
 A. fetal salivary gland, early intermediate developmental stage (X200)  
 B. fetal salivary gland, late intermediate developmental stage (X200)  
 C. fetal salivary gland, late developmental stage (X200)  
 D. fetal salivary gland, late developmental stage (X200)  
 E. adult salivary gland (X400)  
 F. negative control (X200)

사진부도 설명 ③



**Fig. 6.** Simulated protein structures of PRP (yellow : proline, red : glutamine, purple : lysine)  
A. PRH1 (aPRP); N-terminal (NT) forms large globular structure, while C-terminal (CT) shows a typical helical domain  
B. PRB2 (bPRP); multiple whorling strands, N-terminal (NT) forms plate shape, while C-terminal (CT) shows whorling and globular structure  
C. PRB3 (gPRP); whorling and globular structure, N-terminal (NT) and C-terminal (CT) are approximated