

Prevotella nigrescens에서의 Hemin조절 세포막  
단백질의 순수분리 및 특성분석

김경미 · 최점일 · 김성조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

교신 저자: 김성조, 부산시 서구 아미동 1-10 부산대학교 치과대학 치주과  
학교실, 우편번호 :602-739

# I. 서 론

생명체에 있어 필수 영양소로서 중요한 역할을 하는 철분 (iron)은 세균에 있어서도 그 성장 및 대사에 영향을 미쳐 감염성 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 요소로 작용한다<sup>1-3)</sup>. 일반적으로 숙주 내에는 세포 내부 및 외부에 철분이 풍부하게 존재하지만 항균기전의 일환으로 세균에 대해서는 이에 대한 접근이 매우 제한되어 있다. 예를 들어, 숙주 내에 존재하는 대부분의 철분은 cytochrome, hemoglobin, myoglobin, 그리고 hemopexin 같은 heme 함유 단백질의 형태로 또는 ferritin과 hemosiderin으로 숙주 세포 내에 은폐되어 위치하고 있다<sup>1-3)</sup>. 세포 용해의 결과 이들이 유리되어 외부로 방출될 수 있으나, 혈장 내에 존재하는 단백질에 의해 신속히 결합되어 균주가 이를 용이하게 활용하지는 못하는데, 예를 들어 적혈구의 용해 과정에서 유리되는 hemoglobin과 그것의 분해 과정에서 유리되는 heme (hemin)의 경우 각각 숙주의 haptoglobin과 hemopexin 및 albumin에 단단히 결합하여 그들의 제거와 숙주에 의한 재활용에 기여하게 된다<sup>4-9)</sup>.

한편, 세포 외부에 존재하는 소량의 철분도 혈액 내 및 세포 간질과 외분비물에 각각 존재하는 당단백질로 철분의 킬레이션과 이동 및 교환에 관여하는 transferrin과 lactoferrin에 결합되어 균주에 의한 활용이 제한된다<sup>1-3)</sup>. 이로 인해 숙주 내에서 실제 활용 가능한 유리 철분 또는 hemin의 농도는 매우 낮아, 유리 철분의 경우 그 농도는 단지  $10^{-18}$  M 정도로<sup>1)</sup>, 이는 대부분의 세균에 있어 성장에 필요한 수준인  $10^{-6}$  M ( $0.2-4 \mu\text{M}$ )에 크게 미달하여 세균의 성장을 뒷받침하는데 있어 일반적으로 불충분하다.

세균 특히 병원성 세균들은 이러한 숙주 내 환경 하에서 서식하고 병원성을 발휘하기 위해, 필수 영양소인 철분을 숙주로부터 획득하기 위한 고도의 친화력을 갖는 철분 획득 기전들을 소유하고 있다. 철분 획득을 위한 세균의 기전들로는 siderophore, transferrin 및 lactoferrin 결합 단백질, 그리고 hemin 결합 단백질 등이 있으며, 이 과정에서 철분에 의해 조절되는 세포막 단백질 (iron-regulated membrane protein)이 중요한 역할을 한다<sup>10-15)</sup>.

In vitro에서의 세균 성장 과정에 있어 철분이 억제되는 경우 새로운 세포막 단백질이 발현됨을 몇몇 균주에서 보고된 바 있는데, 이러한 철에 의해 억제되는 세포막 단백질들은 siderophore를 위한 iron transport system으로 작용하거나, transferrin과 lactoferrin

을 결합하는 수용체로 작용할 수도 있고, hemin이나 porphyrin analog를 결합하는 수용체로 작용할 수 있다<sup>16-21</sup>). 실제로 몇몇 다른 균주들에서의 연구 보고에 의하면 hemin에 의해 조절되는 세포막 단백질 (hemin-regulated membrane protein)의 일부가 hemin 획득에 있어 중요한 역할을 한다<sup>20,22-38</sup>).

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)와 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)를 포함한 black-pigmented *Bacteroides*는 유리 철분을 활용하지는 못하고, siderophore를 생성하지 않으며, hemin 의존성으로 철분 공급원으로써 hemin이 필수적인데, 이는 hemin과 protoheme의 구성 요소인 porphyrin ring을 생성하는 능력이 이 균주에 있어 결여되어 있는 것에 기인하는 것으로 여겨지며, 이들 균주는 hemin으로부터 electron transport system에 있어 주요한 구성 요소 중의 하나인 cytochrome을 형성할 수 있다. Hemin은 *P. gingivalis*를 포함한 black-pigmented *Bacteroides*에 있어서의 철분 요구의 전부를 충족할 수 있는 것으로 알려져 있다.

치주질환 병인 균주에서의 hemin 결합 단백질의 순수분리 및 특성분석은 매우 제한적으로 이루어졌다. Hemin 의존성을 갖는 치주질환 병인균주인 *P. gingivalis*에서의 hemin 획득 기전에 관하여는 몇몇 연구가 진행되었으나<sup>20,29,30</sup>), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*)에 있어서의 hemin 획득 기전에 관하여는 최근까지 알려진 바가 없다.

*P. nigrescens*는 그람음성 간균으로 착색을 형성하는 혐기성 세균이다. *P. nigrescens*는 *P. intermedia*와 밀접한 연관을 가지고 있으며, Shah와 Gharbia<sup>39</sup>)에 의해 과거 *P. intermedia*로 분류되었던 strain들 중에서, 생화학적 특성 등에 의거하여, *Prevotella* genus 내의 별도의 새로운 종(species)으로 분류된 바 있고, type strain은 ATCC 33563이다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 hemolytic and hemagglutinating activity<sup>40</sup>), 효소활성 그리고 beta-lactamase 생성 및 항균제에 대한 감수성 등<sup>41,42</sup>)에 있어 *P. intermedia*와 상이함이 보고된 바 있고, 이 두가지 균종은 SDS-PAGE와 PCR등의 방법에 의해 구분될 수 있다<sup>43-46</sup>).

치주질환의 병인론에 있어 *P. nigrescens*의 역할에 관하여는 불분명한 점이 많다. *P. nigrescens*는 건강한 치주조직에서도 우세하게 분리되며, Baumgartner 등<sup>43</sup>)에 의하면 근관감염에 있어 *P. intermedia*에 비해 더 빈번히 검출되는 것으로 알려져 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 site specificity 뿐 만 아니라, 세포막 단백질과 fimbria 같

은 표면구조의 측면에 있어서도 상이할 수 있음이 제시된 바 있다<sup>47,48)</sup>.

*P. nigrescens*는 *P. gingivalis* 등의 다른 hemin 의존성 균주들에서와 마찬가지로 세포 표면상에 hemin 결합을 위한 기전이 존재하며, hemin 고갈 상태에서 증가되어 발현되는 세포막 단백질의 일부가 hemin 결합 단백질로 hemin 획득 과정에 관여할 수 있다. 본 연구는 hemin이 *P. nigrescens*의 성장 및 세포막 단백질의 발현에 미치는 영향을 규명하고, hemin 결합에 관여하는 것으로 추정되는 hemin 조절 단백질의 순수분리 및 특성분석을 위해 수행되었다. 이는 이 균주에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득 기전을 밝히는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 균주 및 배양 조건

사용된 *P. nigrescens* strain은 ATCC 33563이었으며, 이 균주를 enriched Trypticase soy agar, 또는 2.1% (W/V) Mycoplasma broth base (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD)에서, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 menadione과 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 hemin을 첨가하여, 37°C의 혐기성 조건 하에서 배양하였다. hemin 제한 조건에서의 배양을 위해서는, hemin을 포함하지 않은 액체 배지에서 최소 5회 계대 배양하여, 균주 세포 내부에 저장되어 있는 hemin을 고갈시켰다. 세균의 성장은 이중배양 후 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 균주 배양의 오염 여부는 Gram 염색 후 검경하여 판단하였다. 오염되어 있는 철분과 hemin을 제거하기 위해 모든 유리 기구들은 chromic acid와 deionized water로 세척한 후 사용하였다.

### 2. 세포막의 분리

Early stationary phase의 균주를 원심 분리 (12,000 X g, 20 min at 4°C)하여 회수하여, 냉각된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 세척한 후 각각 2 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Na-P-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 그리고 benzamidine을 포함하고 있는 PBS에 분산시켰다. 그 후 sonicator로 세포를 파괴하고, 저속 (10,000 X g, 30 min) 및 고속 (200,000 X g, 2 hr) 원심분리를 시행하여, 세포막을 분리하였다. 분리된 세포막은 PBS에 녹여 -20°C에 보관하였다.

### 3. 단백질 정량

Kennel과 Holt<sup>49)</sup>에 의해 변형된 bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce, Rockford, IL)법에 의거하여 단백질 농도를 결정하였다. 이는 microtiter plate (flat-bottomed)에서의 단백질 정량을 위해 변형된 방법으로, 이를 간략히 소개하면, 20  $\mu\text{l}$ 의 시료를 microtiter well에 넣고 증류수로 2배 연속 희석한 후, 200  $\mu\text{l}$ 의 protein assay reagent를 각 well에 가하고 30분간 실온에 위치시키고, plate reader (570 nm)로 측정하였다. 표준 단백질로 bovine serum albumin이 사용되었다.

#### 4. Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Electrophoresis

단백질 분포의 평가를 위해 Laemmli<sup>50)</sup>의 the discontinuous Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 12% acrylamide separating gel과 4%의 acrylamide stacking gel을 이용하였으며 vertical slab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, CA)와 minigel apparatus (Mini PROTEAN<sup>®</sup> II Dual Slab Cell, Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용하여, 30 mA에서 전기영동 하였다. 각 lane에는 통상 20  $\mu$ g 및 60  $\mu$ g의 단백질을 각각 적용하였으며, low molecular weight standards (Bio-Rad, Richmond, CA)를 활용하였다. 전기영동 후 Coomassie brilliant Blue-R-250 (CBB)으로 염색하고, 각 세포막 단백질 밴드의 분자량 계산은 linear regression analysis에 의거하였다. reducing agent인 2'-mercaptoethanol의 존재가 전기영동에 미치는 영향도 분석하였다.

#### 5. Hemin 조절 단백질의 순수분리

Reference well을 갖는 preparative comb과 12% separating gel을 이용하여, 세포막 단백질 (passage 5)을 전기영동 한 후, gel의 양단을 잘라내어 CBB로 염색하였다. 이 염색된 gel을 template로 활용하여, 분리하고자 하는 hemin 조절 단백질 밴드 (결과 참조)를 절제한 후, Hager와 Burgess의 방법<sup>51)</sup>에 의거하여 단백질을 용출하였는 바 그 방법은 다음과 같다. 잘라낸 gel 밴드를 잘게 부순 후, 0.1% SDS, 0.05 M Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 그리고 0.2 M NaCl을 포함하고 있는 elution buffer를 가하여, 실온에서 1시간 씩 2차에 걸쳐 단백질을 용출하였다. 그 후 Centricon-10 microconcentrator (10,000 molecular weight cutoff; Amicon Div., Beverly, MA)로 용출액을 농축하였다. 분리된 단백질의 순도는 SDS-PAGE로 확인하였다.

#### 6. N'-terminal 아미노산 서열의 결정

순수분리된 단백질을 SDS-PAGE 후 Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (ProBlot, Applied Biosystems, Foster City, CA)에 transfer하고<sup>52)</sup>, Amido black으로 염색한 후 해당 band를 잘라내었으며, Applied Biosystems Model 177A gas-liquid phase sequanator (coupled to an on-line HPLC model 120A analyzer)를 이용하여

N'-terminal 아미노산 서열을 결정하였다.

## 7. 아미노산 분석

순수분리된 단백질을 HCl로 hydrolysis 시킨 후 Amino Acid Analyzer를 이용하여 조성을 분석하였다.

### Ⅲ. 결 과

*P. nigrescens*를 hemin을 포함하지 않는 배지에 연속적으로 계대 배양한 결과 평균 generation time이 크게 증가되었다. 정상적으로 7.7  $\mu\text{M}$ 의 hemin을 공급한 상태에서의 평균 generation time은 4.1  $\text{h}^{-1}$ 이었으며, passage 1에서의 generation time은 이와 유사하였다. 그러나 passage 2에서 6로 진행됨에 따라 균주의 성장은 억제되었으며 passage 6의 경우 균주의 성장이 현저히 억제되어 평균 generation time은 11.5  $\text{h}^{-1}$ 에 달하였다 (그림 1). Passage가 증가함에 따라 원심분리 후의 균주의 착색은 현저히 감소되어, passage 6의 경우 착색이 전혀 존재하지 않았다.

각 전기영동 조건에서 정상적으로 7.7  $\mu\text{M}$ 의 hemin을 공급하여 배양한 경우와 hemin을 고갈시킨 경우 (passage 5)에서의 단백질 밴드의 분포와 수는 매우 유사하였다 (그림 2). 그러나, passage 5의 경우 약 50 kDa의 단백질 밴드가 현저히 강화되어 발현되었다 (그림 2, lane 5).

이 50 kDa의 단백질 밴드를 passage 5의 세포막 단백질에서 분리하였다. 분리된 단백질은 여타의 단백질에 오염되지 않고 50 kDa 1개의 밴드로 구성되어 있었다 (그림 3). 분리된 단백질은 환원제인 2'-mercaptoethanol의 존재 유무와 상관없이 동일한 전기영동 양상을 보였다 (그림 4). 한편, hemin에 의해 조절되는 약 50 kDa 단백질의 N'-terminal 아미노산 서열은 MEVLKIMESLEQKHP 이었다 (표 1). 아미노산 분석 결정에서 친수성 아미노산이 풍부하게 존재하였으며, 그중 glycine이 전체 아미노산의 약 60%를 차지하였다 (표 2).



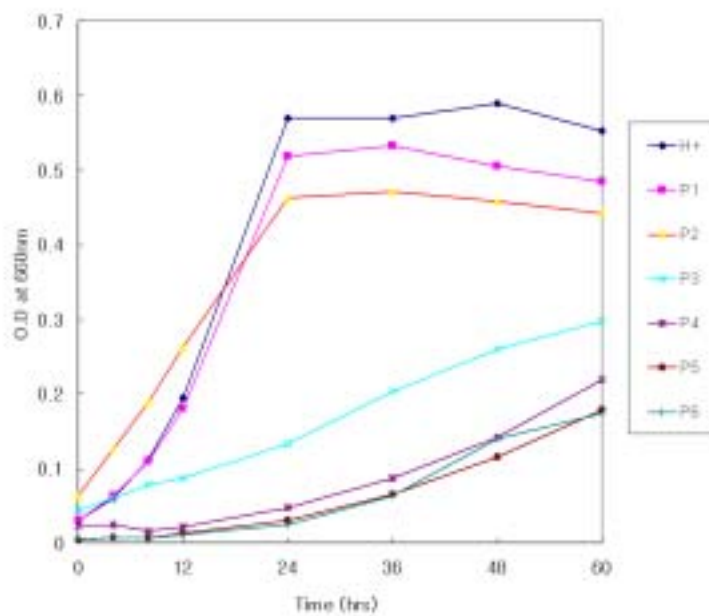


Figure 1. Effect of hemin restriction on the growth of *P. nigrescens*. Cells were progressively passaged from hemin excess culture to hemin-free medium for 6 passages; **H+**, hemin-excess ( $7.7 \mu\text{M}$ ); **P1**, passage 1; **P2**, passage 2; **P3**, passage 3; **P4**, passage 4; **P5**, passage 5; **P6**, passage 6.

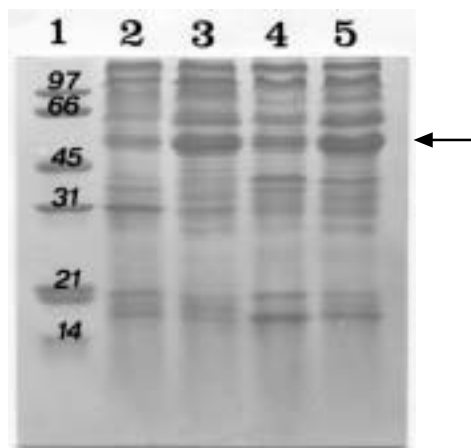


Figure 2. SDS-PAGE of cell envelopes from *P. nigrescens*. **Lane 1**, low M.W. standards; **Lane 2 and 3**, unheated samples; **Lane 4 and 5**, samples heated at 100°C for 5 min; **Lane 2 and 4**, cells grown in 7.7 μM hemin; **Lanes 3 and 5**, cells grown without hemin (passage 5).

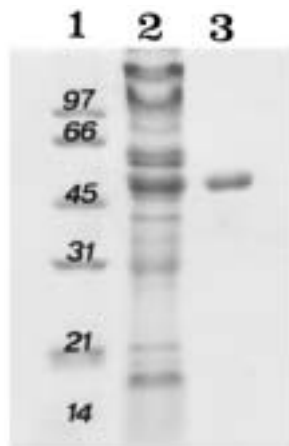


Figure 3. Purification of a hemin-regulated protein. **Lane 1**, low M.W. standards; **Lane 2**, cell envelope fraction (passage 5); **Lane 3**, isolation of 50 kDa protein.

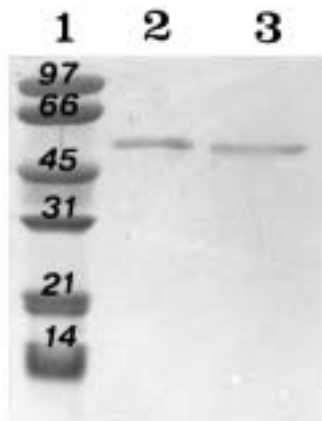


Figure 4. Electrophoretic mobility of 50 kDa protein in the presence and absence of reducing agent, 2'-mercaptoethanol. **Lane 1**, low M.W. standards; **Lane 2**, sample with treatment buffer containing 2'-mercaptoethanol; **Lane 3**, sample without 2'-mercaptoethanol.

Table 1. N'-terminal amino acid sequence of 50 kDa protein

<b>1</b>	<b>5</b>
N' - Met - Glu - Val - Leu - Lys - Ile - Met - Glu -	
<b>10</b>	<b>15</b>
Ser - Leu - Glu - Gln - Lys - His - Pro -	

Table 2. Amino acid analysis of 50 kDa protein

Amino acid	Mole%
Aspartic acid	4.4
Threonine	1.9
Serine	4.4
Glutamic acid	3.3
Proline	ND*
Glycine	59.8
Alanine	2.2
Cystine	6.5
Valine	8.7
Methionine	4.4
Isoleucine	ND
Leucine	3.3
Tyrosine	ND
Phenylalanine	ND
Histidine	ND
Lysine	2.2
Arginine	ND

\* ND, not determined

## IV. 총괄 및 고안

본 연구는 hemin이 *P. nigrescens*의 성장 및 세포막 단백질의 발현에 미치는 영향을 규명하고, hemin 조절 단백질의 순수분리 및 특성분석을 위해 수행되었다. 본 연구에서 hemin의 고갈을 위해 *P. nigrescens*를 hemin을 포함하지 않는 배지에 연속적으로 계대 배양 한 결과 균주의 성장이 현저히 억제되었다. 이는 hemin이, 다른 black-pigmented *Bacteroides*에서와 마찬가지로, 이 균주의 성장에 있어 필수적임을 제시하고 있다. 한편, passage 1에서의 *P. nigrescens*의 성장은 정상적으로 7.7  $\mu$ M의 hemin을 공급한 상태에서와 유사하였는데, 이는 균주세포 내에 저장되어 있는 hemin이 성장에 있어 활용되었음을 의미한다.

본 연구에서는 hemin이 고갈된 상태인 passage 5에서 약 50 kDa의 단백질 밴드가 현저히 강화되어 발현되었다. 몇몇 치주질환 병인 균주에서의 hemin 조절 세포막 단백질의 발현 그리고 이들 세포막 단백질이 hemin 결합 단백질의 역할을 함이 Smalley 등<sup>30)</sup>, 그리고 Bramanti와 Holt 등<sup>38)</sup>에 의해 보고된 바 있다. 이에 *P. nigrescens*의 세포막에서 발현된 50 kDa의 hemin 조절 단백질은 이 균주에서의 hemin 결합에 관여하는 단백질로 추정할 수 있다.

본 연구에서는 hemin 결합 단백질로 추정되는 50 kDa의 세포막 단백질을 순수분리 하였다. 이 50 kDa 단백질의 electrophoretic mobility는 환원제인 2'-mercaptoethanol의 존재 유무에 영향을 받지 않았는 바, 이는 이 단백질에 disulfide bond가 존재하지 않음을 보여준다. N'-terminal 아미노산 서열을 GenBank 자료에서 분석한 결과에 의하면, 이 50 kDa 단백질은 기존의 보고된 단백질과 상동성을 갖지 않는 새로운 단백질로 추정된다. 아미노산 조성 분석에 의하면 친수성 아미노산이 풍부하게 존재하였으며 그중 glycine이 60%로 가장 많이 차지하였다.

본 연구는 hemin 조절 단백질로 hemin 결합에 관여하여, *P. nigrescens*에서의 hemin 획득에 관련이 있는 것으로 추정되는 약 50 kDa의 세포막 단백질을 확인하고, 순수분리 및 몇몇 특성분석을 시도한 최초의 보고로 사료된다. 향후, 이 단백질에 대한 분자생물학적 연구 등 보다 심도있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

## V. 결 론

본 연구는 hemin이 *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*)의 성장 및 세포막 단백질의 발현에 미치는 영향을 규명하고, hemin 결합에 관여하는 것으로 추정되는 단백질의 순수분리 및 특성 분석을 위해 수행되었다. 본 연구의 결과에 의하면, hemin은 *P. nigrescens*의 성장 및 세포막 단백질의 발현에 영향을 미쳐, hemin이 고갈된 조건에서 균주의 성장이 현저히 억제되었으며, 약 50 kDa의 새로운 세포막 단백질이 발현되었다.

본 연구에서는 hemin 결합에 관여하는 것으로 추정되는 이 50 kDa의 세포막 단백질을 순수분리하였으며, 이 단백질에는 disulfide bond가 존재하지 않았다. N'-terminal 아미노산 서열은 MEVLKIMESLEQKHP이었고, GenBank 자료에서 분석한 결과에 의하면, 이 50 kDa 단백질은 기존의 보고된 단백질과 상동성을 갖지 않는 새로운 단백질로 추정된다. 아미노산 조성 분석에 의하면 친수성 아미노산이 풍부하게 존재하였으며 그중 glycine이 60%로 가장 많이 차지하였다. 본 연구는 *P. nigrescens*에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득 기전을 밝히는데 있어 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Bullen JJ. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis*, 1981;3:1127-1138.
2. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev*, 1984;64:65-102.
3. Finkelstein RA, Sciortino CV, McIntosh MA. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev Infect Dis*, 1983;5:s759-s777.
4. Koskelo P, Muller Eberhard U. Interaction of porphyrins with proteins. *Semin Hematol*, 1977;14:221-226.
5. Laurell CB, Gronvall C. Haptoglobins. *Adv Clin Chem*, 1962;5:135-172.
6. Martinez JL, Delgado Iribarren A, Baquero F. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 1990;75:45-56.
7. Muller Eberhard U, Morgan WT. Porphyrin-binding protein in serum. *Ann NY Acad Sci*, 1975;244:624-649.
8. Seery VL, Muller Eberhard U. Binding of porphyrins to rabbit hemopexin and albumin. *J Biol Chem*, 1973;248:3796-3800.
9. Eaton JW, Brandt, JR Mahoney. Haptoglobin: A natural bacteriostat. *Science*, 1982;215:691-693.
10. Crosa JH. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Lett*, 1989;53:517-530.
11. Schryvers AB, BC Lee. Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*. *Can J Microbiol* 1989;35:409-415.
12. Gonzalez GC, DI Caamano, AB Schryvers. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Microbiol*, 1990;4:1173-1179.
13. Yu R-H, SD Gray-Owen, J Ogunnariwo, AB Schryvers. Interaction of ruminant transferrin receptors in bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Infect Immun*, 1992;60:2992-2994.

14. Schryvers AB, S Gray-Owen. Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*; receptors for human transferrin. *J Infect Dis*, 1992;165:s103-s104.
15. Ogunnariwo JA, AB Schryvers. Correlation between the ability of *Haemophilus paragallinarum* to acquire ovotransferrin-bound iron and the expression of ovotransferrin-specific receptors. *Avian Dis*, 1992;36:655-663.
16. Griffith E. The iron uptake systems of pathogenic bacteria. In: Bullen J. J. and Griffiths, E. eds. *Iron and infection*. New York: John Willey & Sons, 1987;69-137.
17. Neilands JB. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann Rev Microbiol*, 1982;36:285-309.
18. Schryvers AB. Identification of the transferrin and lactoferrin binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*, 1989;29:121-130.
19. Tsai J, DW Dyer, PF Sparling. Loss of transferrin receptor activity in *Neisseria meningitidis* correlates with inability to use transferrin as an iron source. *Infect Immun*, 1988;56:3132-3138.
20. Bramanti TE, Holt SC. Hemin uptake in *Porphyromonas gingivalis*: Omp26 is a hemin-binding surface protein. *J Bacteriol*, 1993;175:7413-7420.
21. Coulton JW, Pang JCS. Transport of hemin by *Hemophilus influenzae* type b. *Curr Microbiol*, 1983;9:93-98.
22. Chu L, Song M, Holt SC. Effect of iron regulation on expression and hemin-binding function of outer-sheath proteins from *Treponema denticola*. *Microb Pathog*, 1994;16:321-335.
23. Fujimura S, Shibata Y, Hirai K, Nakamura T. Some binding properties of the envelope of *Porphyromonas gingivalis* to hemoglobin. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995;10:109-114.
24. Hanson MS, Hansen EJ. Molecular cloning, partial purification, and characterization of a hemin-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol*, 1991;5:267-278.



25. Lee BC. Isolation of heamin-binding proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. J Med Microbiol, 1992;36:121-127.
26. Lee BC. Isolation of an outer membrane hemin-binding protein of *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun, 1992;60:810-816.
27. Morse SA, Chen C-Y, LeFaopu A, Mietzner TA. A potential role for the major iron-regulated protein expressed by pathogenic *Neisseria* spp. Rev Inf Dis, 1988;10:s306-s310.
28. Otto BR, Sparrius M, Verweij-van Vught AMJJ, MacLaren DM. Iron-regulated outer membrane protein of *Bacteroides fragilis* involved in heme uptake. Infect Immun, 1990;58:3954-3958.
29. Grenier D. Hemin-binding property of *Porphyromonas gingivalis* outer membranes. FEMS Microbiol Lett, 1991;77:45-50.
30. Smalley JW, Birss AJ, McKee AS, Marsh PD. Hemin-binding proteins of *Porphyromonas gingivalis* W50 grown in a chemostat under haemin-limitation. J Gen Microbiol, 1993;139:2145-2150.
31. Stugard CE, Daskaleros PA, Payne SM. A 101-kilodalton heme-binding protein associated with Congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. Infect Immun, 1989;57:3534-3539.
32. Hanson MS, Slaughter C, Hansen E. The hbpA gene of *Haemophilus influenzae* type b encodes a heme-binding lipoprotein conserved among heme-dependent *Haemophilus* species. Infect Immun, 1992;60:2257-2266.
33. Scott D, Siboo IR, Chan ECS, Klitorinos A, Siboo R. Binding of hemin and congo red by oral hemolytic spirochetes. Oral Microbiol Immunol, 1993;8:245-250.
34. Pendrak ML, RD Perry. Characterization of a haemin-storage reservoirs of hemin and inorganic iron in *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1991;61:32-39.
35. Perry RD, TS Lucier, DJ Sikkema, RR Brubaker. Storage reservoirs of hemin and inorganic iron in *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1993;61:32-39.

36. Maciver I, O'Reilly T, Brown MRW. Porphyrin ring source can alter the outer membrane protein profile of non-typeable *Hemophilus influenzae*. J Med Microbiol, 1990;31:163-168.
37. Williams P, Brown MRW. Influence of iron restriction on growth and the expression of outer membrane proteins in *Hemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. FEMS Microbiol Lett, 1985;33:153-157.
38. Bramanti TE, Holt SC. Iron-regulated outer membrane proteins in the periodontopathic bacterium *Bacteroids gingivalis*. Biochem Biophys Res Commun, 1990;166:1146-1154.
39. Shah HN, Gharbia SE. Proposal of a new species *Prevotella nigrescens* sp. nov. among strains previously classified as *P. intermedia*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1993;6:97.
40. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. FEMS Microbiol Lett, 1999;178:299-304.
41. Matto J, Asikainen S, Vaisanen ML, Von Troil Linden B, Kononen E, Saarela M, Salminen K, Finegold SM, Jousimies Somer H. Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, 1999;43:2383-2388.
42. Andres MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. Antimicrob Agents Chemother, 1998;42:3022-3023.
43. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *nigrescens*. J Endod, 1999;25:324-328.
44. Conrads G, Pelz K, Hughes B, Seyfarth I, Devine DA. Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol Immunol, 1997;12:117-120.

45. Premaraj T, Kato N, Fukui K, Kato H, Watanabe K. Use of PCR and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis techniques for differentiation of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol, 1999;37:1057-1061.
46. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol, 1997;35:1876-1882.
47. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Electrophoresis of whole-cell soluble proteins of microorganisms isolated from bacteremias in endodontic therapy. Eur J Oral Sci, 1996;104:540-546.
48. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A. Characterization of *Prevotella intermedia* and *nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. J Periodontol, 1994;65:56-61.
49. Kennel W, Holt SC. Comparative studies of the outer membranes of *Bacteroides gingivalis* strains ATCC 33277, W50, W83, 381. Oral Microbiol Immunol, 1990;5:121-130.
50. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 1970;227:680-685.
51. Hager DA, Burgess RR. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with Sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. Anal Biochem, 1980;109:76-86.
52. Towbin H, Staehelin, TandGordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1984;76:4350-4354.

-Abstract-

## Isolation and Partial Characterization of a 50 kDa Hemin-regulated Cell Envelope Protein from *Prevotella nigrescens*

Kyung-Mi Kim, Jeom-IL Choi, Sung-Jo Kim

Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

In the study presented here, identification, purification, and partial characterization of a hemin-regulated protein in *Prevotella nigrescens* were carried out. The results of this study confirm that the availability of hemin influences the expression of a selected membrane protein as well as the growth rate of *P. nigrescens* ATCC 33563. The 50 kDa cell envelope associated protein, whose expression is hemin regulated, is considered to be a putative hemin-binding protein from *P. nigrescens*. Disulfide bonds were not present in this protein, and N'-terminal amino acid sequence analysis revealed that this protein belongs to a new, so far undescribed protein. The 50 kDa protein was found to be rich in hydrophilic amino acids, with glycine comprising approximately 60% of the total amino acids. The study described here is the first to identify, purify, and biochemically characterize a putative hemin-binding protein from *P. nigrescens*. Work is in progress to further characterize the molecular structure of this protein.

key words : Hemin, Cell envelope protein, *Prevotella nigrescens*