

*P. gingivalis*에 특이적으로 작용하는 앵타머에 관한 연구

A study on the Aptamer Specific Detection on *P. gingivalis*

신애리

광주보건대학교 치위생과

Ae-Ri Shin(shinar77@naver.com)

요약

본 연구는 치주질환의 주 원인균인 *P. gingivalis*에 선택적으로 작용하는 특이적 앵타머를 선별하고 선별된 앵타머와 결합하는 단백질 분자를 정제 및 동정함으로써 *P. gingivalis*에 관한 작용기전을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 39개의 random sequence를 갖는 DNA library를 제조하여 SELEX 방법을 이용하여 *P. gingivalis*에 특이성을 가진 앵타머를 선별하였으며 PCR2.1 cloning vector를 활용한 cloning을 시행하여 염기서열을 분석했다. 8종의 각기 다른 염기서열을 가진 앵타머를 선별하였고 직접적으로 작용하는 단백질을 밝혀내고자 선별된 앵타머 중 APG-3를 이용하여 modified weston blot을 시행하고 단백질을 분석한 결과 *P. gingivalis*에 선택적으로 결합하는 11종의 단백질을 분리, 동정하였다. 이와 같은 결과로 앵타머가 치주질환의 원인균인 *P. gingivalis*의 당 대사 및 세포활성억제와 관련된 단백질에 선택적으로 결합하여 부착함으로써 치주질환의 진단을 위한 센서로 가능성을 제시했다.

■ 중심어 : | *P. gingivalis* | 앵타머 | SELEX |

Abstract

In this study, by selecting specific aptamers that selectively detection on *P. gingivalis*, the main cause of periodontal disease, and purifying and identifying protein molecules that bind to the selected aptamers, the mechanism of action of *P. gingivalis* was investigated. A DNA library having 39 random sequences was prepared, and aptamers with specificity for *P. gingivalis* were selected using the SELEX method, and the nucleotide sequence was analyzed by cloning using PCR2.1 cloning vector. 8 of aptamers with different nucleotide sequences were selected, and modified weston blot was performed using APG-3 among the selected aptamers to identify 11 proteins that act directly, and proteins were analyzed. As a result, a protein that selectively binds to *P. gingivalis* was isolated and identified. Therefore, aptamer selectively binds and attaches to proteins related to inhibition of sugar metabolism and cell activity of *P. gingivalis*, suggesting the possibility of a sensor for diagnosis of periodontal disease.

■ keyword : | *P. gingivalis* | Aptamer | SELEX |

I. 서론

삶의 질이 향상되고 건강한 삶을 유지하려는 노력이 계속되는 가운데 구강건강관리에 대한 중요성이 주목 받고 있다. 치주질환은 전 세계 인구의 90%가 발병된 경험이 있을 정도로 보편적인 질환으로 치아를 지지하는 주위조직에 발생하는 만성 감염성 구강질환이며 성인의 약 15%는 심한 치주질환에 까지 이환된 경험이 있다[1].

감염성 치주질환은 특정 미생물에 의하여 발생하고 치아주위조직에 응집체를 형성하여 염증을 일으키고 염증성 병변인 치주낭을 형성하는데 초기에는 자각증상이 거의 없어 치조골의 파괴까지 진행되어 결국 치아 상실의 주된 원인이 된다[2][3].

치면세균막은 건강한 상태에서 그람양성의 호기성 세균이 주를 이루고 치주질환이 진행됨에 따라 그람음성의 혐기성 세균이 증가하며 병원성이 높은 세균의 복합체로 전환하면서 독소와 대사산물이 방출되어 치주조직이 파괴되고 면역체계에 영향을 주어 치주질환이 발생한다[4][5].

치주질환 원인군 중 가장 독성이 강한 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)는 *Bacteroides gingivalis*로도 불리는 세균으로 건강한 치주조직이나 초기 치은염의 상태에서는 거의 나타나지 않고 대부분 치주질환이 진행된 상태에서 발견된다. 정상세균총의 미생물에 불균형을 유발하여 질환의 상태로 진행하게 하는 주된 역할을 하는 세균으로 치주조직의 파괴를 위하여 피막, 섬모, 점소 등으로 구강 내에서 세균의 집락이 잘 형성될 수 있게 작용하고 골 흡수를 유도하는 등 독성인자로 작용한다[6-8].

또한 gingipain이라 불리는 단백질분해효소는 *P. gingivalis*의 성장을 위한 단백질 분해에 작용하여 숙주조직에 침입한 후 치주조직을 파괴하고 면역체계에 영향을 주기도 한다[9].

또한 *P. gingivalis*는 구강 내에서만 제한적으로 작용하는 세균이 아니고 혈관 내 염증반응을 일으키는 biofilm에서 다수가 발견되어 혈관을 막는 역할을 하는 주요 세균으로 지목되었을 뿐만 아니라 류마티스 질환 등 전신질환에도 영향을 준다고 보고되었다

[10][11].

치주질환을 예방하는데 방법은 치면세균막을 제거하는 기계적인 방법과 항균제 및 항생제를 이용해 세균의 수를 줄이는 화학적인 방법이 있다. 이상적인 기계적 제거에도 불구하고 전반적으로 치주질환이 개선되지 않는 경우 항생제를 적용하여 치주치료의 효과를 높였으나, 항생제 내성균주가 생성되고 비특이적 작용에 의해 정상세균총에 까지 불균형을 초래하는 등의 부작용을 일으키게 된다[12]. 클로르헥시딘 양치용액은 구강 내 세균의 수를 효과적으로 감소시키는 효과가 검증된 반면 장기간 사용했을 때 치아와 연조직의 착색 등 부작용이 나타난다[13][14]. 따라서 치주질환의 원인군에 특이성이 강하여 그 세균에만 선택적으로 작용하고 내성과 부작용 없는 새로운 물질에 대한 연구가 필요하다. 앵타머는 DNA 또는 RNA 조각의 핵산중합체로 1970년대까지는 단순히 유전정보를 전달하는 기능을 한다고 알려졌지만 1980년대 Colorado 대학의 연구팀들은 앵타머가 특정 단백질 또는 생물분자 등의 다양한 표적물질에 강한 결합을 하는 효소임을 밝혀냈고 단백질처럼 안정화된 3차원적인 구조를 형성하며 복잡한 작용한다고 보고했다[15].

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)는 1990년 Colorado 대학에서 개발된 연구방법으로 표적물질에 대한 앵타머를 선별하는 과정이다. random nucleotide sequence RNA 분자들의 라이브러리로 부터 표적물질에 친화력이 높고 특이적으로 결합하는 염기서열을 찾아 앵타머를 선별하였고 이를 통해 선별된 앵타머는 표적분자에 nM ~ pM 수준의 높은 친화력과 특이성을 가진다. SELEX로 앵타머 선별 시 어떠한 제한 없이 다양한 표적물질을 대상으로 할 수 있고 화학적인 합성이 가능하며 고가의 장비가 별도로 필요하지 않아 저비용으로 빠른 시간 내에 선별이 가능하고 동일한 과정을 반복하여 선별 시 선별된 각 앵타머는 차이가 없이 동일하다. 항체와 매우 유사할 것이라 여겨졌던 앵타머는 관리가 어려운 항체와 다르게 실온에서 보관이나 운반이 가능할 뿐 아니라 멸균 후에도 기능이 유지되고 변성이 되더라도 빠른 시간 안에 재생이 가능할 정도로 매우 안정적이며 생체 내에서 면역거부반응이 거의 없

어 치료제로서의 가능성이 제시된다[16-18]. 또한 최근에는 앵타머를 이용한 코로나-19 진단키트 등을 개발하는 연구가 진행되고 있다[19]. 이와 같이 다양한 질환의 진단 및 치료를 위해 사용되는 앵타머를 보편적인 구강질환인 치주질환에 적용하여 보다 쉽게 치주질환을 예측할 수 있도록 앵타머에 대한 연구가 필요할 것이다. 따라서 본 연구는 치주질환의 주된 원인균으로 작용하는 *P. gingivalis*에 특이적인 앵타머를 SELEX 방법을 이용하여 선별하고, 그와 결합하는 단백질 분자를 정제 및 동정함으로써 *P. gingivalis*의 작용기전을 규명하여 치주질환 진단을 위한 센서로의 가능성을 확인하고자 한다.

II. 연구방법 및 연구도구

1. 실험균주 및 세포

치주질환의 원인이 되는 대표 균주로 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277를 사용하였고, 앵타머의 특이성에 대한 교차검증을 시행하기 위하여 구강질환을 일으키는 대표적인 세균인 *Streptococcus mutans* ATCC 31989, *Treponema denticola* ATCC 33521을 사용하였다. 앵타머 cloning을 위하여 pCR2.1-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, USA)와 *E. coli* TOP10을 사용하였다.

2. 앵타머의 선별

*P. gingivalis*에 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하기 위해 중합효소연쇄반응(polymerase Chain Reaction, PCR) 기반의 SELEX (Systemic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법을 수정해 사용하였다[16]. DNA library는 39개 random sequence를 갖는 뉴클레오티드의 5'와 3'의 위치에 각 44개, 38개의 primer sequence가 결합된 oligomer를 고안하여 사용하였고, PCR을 통해 선별된 앵타머를 증폭시키기 위하여 사용된 primer는 BamHI sequence만을 포함한 reverse primer와 T7 promoter sequence와 BamHI sequence가 포함된

forward primer를 제조하여 사용했다[Table 1]. 제조된 primer의 상등액을 제거하고 selection buffer를 50 μ l 넣은 뒤 13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5분동안 원심분리를 시행하였고 200 μ l의 PBS로 세척 후 10 μ l의 PCR product를 100 $^{\circ}$ C에 5분동안 가열하고 즉시 얼음으로 열을 식히고 10 μ l의 세균 현탁액과 혼합하였다. Rocking shaker로 4 $^{\circ}$ C로 1시간 동안 보관 한 후, 13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리를 시행하였고 PBS 50 μ l를 넣은 뒤 현탁시키고 다시 500 mM의 NaCl 200 μ l를 넣은 뒤 현탁하고 13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C로 10분 동안 원심분리를 시행하여 상등액을 모아서 20 $^{\circ}$ C로 보관하였다. 제조된 상등액을 nucleic acid library pool에 혼합하여 nucleotide 단편들이 대상 DNA에 부착될 수 있도록 일정 시간이 지난 후에 결합하지 않은 핵산들을 제거 하였고, 다른 한 편으로는 단백질에 결합된 핵산을 분리하였다. 분리된 핵산 단편들은 다시 PCR 과정을 통하여 증폭시킨 후에 1차 앵타머 library로 사용하였고 선별된 앵타머 library는 다시 target 분자와 혼합하고 대상 DNA에 대한 선택성을 높이기 위하여 수차례 위의 과정을 반복하였다. 선별된 앵타머에 대한 염기서열 분석은 Bioneer Co. Ltd. (South Korea, Daejeon)에 의뢰했다.

Table 1. Random DNA library and primers used for SELEX

Primers	Sequences
A P T - N 4 0 (86mer)	5'-CGGATCCATGGGCACTATTTATATCAA -N40-AATGTCGTTGGTGGCCC-3'
APT-F (44mer)	5'-CGCGGATCCTAATACGACTACTATAGGGGCACCAACGACATT-3'
A P T - R (38mer)	5'CCCGACACCCGCGGATCCATGGGCACTATTTATATCAA-3'

3. Modified-western blot analysis

선별된 앵타머의 결합성을 분석하기 위하여 배양된 균주에 lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) 5 ml를 첨가하여 초음파 파쇄기(Vibra cell VCX-600, Sonics and Materials Inc., USA)에 균체를 파쇄한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 시행하여 상등액을 분리 하였다. Nitrocellulose membrane은 5 cm \times 1 cm 크기로 잘라 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM

Glycine, 20% (v/v) methanol)에 20분 동안 담가놓고, membrane에 20 ng/ml의 균주를 분주했다. 해당 membrane은 TTBS buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.6, 1.37 M NaCl, 0.1% Tween 20)에 20분 동안 blocking하고 nitrocellulose membrane을 0.1% Tween 20이 함유된 TBS buffer 50ml에 15분씩 3회 세척하고 TTBS에 primary antibody를 1 : 500의 농도로 희석하여 첨가한 후 24시간 동안 반응시켰다.

반응시간 종료 후 nitrocellulose membrane을 TBS buffer 50ml에 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고 Alkaline phosphatase-conjugated anti DIG를 blocking buffer에 1 : 2000의 농도로 희석한 secondary antibody 용액에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS buffer에 동일하게 세척하고, NBT/BCIP stock solution 200 μ l이 첨가된 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 5 ml에 발색했다. negative control로 E. coli TOP10을 1번에 *S. mutans*를 2번에 *P. gingivalis*를 3번에, *T. denticola*를 4번에 loading하였다. 이를 filter paper에 옮기고, 선택된 앵타머를 primary antibody로 사용해서 modified-Western blot을 수행했다.

4. 앵타머 결합 단백질의 분석

앵타머의 부착에 직접적으로 관여하는 *P. gingivalis* 유래물질을 분석하기 위하여 초음파 파쇄기를 이용하여 배양된 균체를 파쇄한 뒤 원심분리를 통하여 균체의 세포벽과 세포질을 분리하여 분획하였고, 각각에 대하여 modified-Westernblot analysis를 시행하였다. 또 한편으로는 앵타머를 nitrocellulose membrane에 고정화한 후 분획된 세포벽 용액을 첨가하여 부착되도록 한 후에 단백질을 분석하였다.

III. 연구결과

1. 선별된 앵타머의 염기서열

*P. gingivalis*의 DNA에 부착된 앵타머를 분리시킨 후 PCR을 통해 증폭하고, 전기영동을 통하여 분석하였

는데 동일하게 약 100 base pair 정도의 위치에서 분리된 앵타머를 확인할 수 있었다. 선택된 앵타머를 pCR2.1-TOPO cloning vector로 cloning하고 E. coli TOP10에 형질전환 시킨 후, 형질전환 된 positive colony들을 배양하였고, 이로부터 plasmid vector를 분리하고 확인한 결과, 앵타머 단편들이 cloning된 것을 확인했다. lane M에는 100 base pair DNA ladder를 lane 1,3은 온전한 plasmid vector, lane 2,4는 분리한 plasmid vector를 확인한 결과이다[Figure 1].

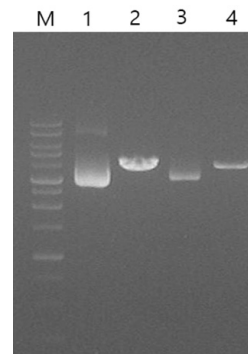


Fig. 1. Cloning of aptamers with of pCR2.1-TOPO

선택된 앵타머를 염기서열 분석하였고 그 중 SELEX를 위해 사용된 DNA library로부터 유래한 것을 확인하기 위해 BamHI와 T7 promoter sequence를 기준으로 이들 염기서열이 포함된 앵타머만 선택한 결과 8개 앵타머가 확인되었다. 각 앵타머를 APG-1, APG-2, APG-3, APG-4, APG-5, APG-6, APG-7, APG-8이라고 명명하였고 그 염기서열은 다음과 같다[Table 2].

Table 2. Nucleotide sequences of aptamers specific to *P. gingivalis*

Name	Sequences
APG-1	5'-TGCTACAGCATTCAACGTCGCGTGGTACAGCATTGTGA A-3'
APG-2	5'-GGGTATCCCTTCGGACGTTTCATACCTGGCTGGTTGCA A-3'
APG-3	5'-AGCGCGTGGACACTATGCGCTAGCTCAATTTGAGCTA A-3'

APG-4	5'-GCCAACTGGTTATCCCTGTGTCTAAACATCCCGGAA A-3'
APG-5	5'-CGTTTGGGGTGCACTTGCAAGACCGTACGTTGCCCC AA-3'
APG-6	5'-TGCAACCGTTCGTGTGAGGAGGTTGACGCAATGCGT AA-3'
APG-7	5'-TGGTACGGAGCGTGGAGTCGTGGGAGGCGCAATGCGT AA-3'
APG-8	5'-TTACGTCAGTCTCCACGTTGATCGTTTACGGAA A-3'

2. 앵타머의 선택적 결합

선택된 앵타머의 결합성은 *E. coli* TOP10(lane 1) 을 negative control로 하고 *S. mutans*(lane 2), *P. gingivalis*(lane 3), *T. denticola*(lane 4)을 사용하여 modified-Western blot을 시행하였다. 그 결과 APG-1과 APG-4를 제외한 다른 앵타머들은 *S. mutans*(lane 2)와도 미약하게 교차결합의 가능성을 보였으며 그 중 APG-7과 APG-8은 *S. mutans*와 *P. gingivalis*(lane 3)에 비교적 강한 교차결합 특성을 나타내었다. APG-1과 APG-4는 *P. gingivalis*에 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다[Figure 2].

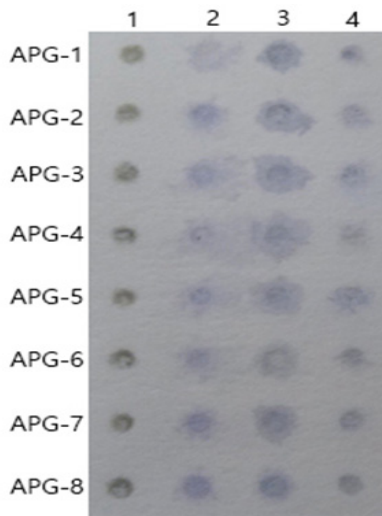


Fig. 2. Modified-Western blot of APG

3. 앵타머 결합 단백질

앵타머의 부착에 직접적으로 관여하는 *P. gingivalis* 유래의 물질을 분석하기 위하여 APG3의 단백질을 분석한 결과 분자량이 유사한 11종의 단백질이 동정되었다[Table 3].

Table 3. Putative list of proteins from *Porphyromonas gingivalis* which bind to APG3

Accession	Sequence coverage	Sequence count	Description
A0A1W7R076	68.3	52	Cell division protein
A0A1W9FL68	63	31	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
A0A1W9FPS5	60	45	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))
A0A1W9FM53	51.8	29	Aminotransferase
A0A1W9FLP0	58.3	22	Catabolite control protein A
A0A1W9FM22	47.8	22	dTDP -glucose 4,6-dehydratase
A5HKP2	45.2	15	Elongation factor Tu
A0A1W7QZN8	39.1	25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
A0A1W9FLY7	33.7	15	Ribonuclease Z
A0A1W7R3I3	32.5	15	Methionine import ATP-binding protein
A0A1W7R028	31.3	16	Cysteine synthase

IV. 고찰

앵타머는 질환의 원인이 되는 표적분자에 대한 선별과 그 질환의 치료제로서의 가능성을 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 현재까지 가장 각광받고 있는 표적 지향적 치료제인 항체보다 앵타머는 표적분자에 친화력이 뛰어나 세포와 같은 시료도 확인이 가능하고 생체에 특정조직에서 발현되는 분자들이나 질환에 특

이적으로 발현하는 단백질을 인지하여 인식매체로 활용 가능한 바이오센서로 적용하는 등의 다양한 시도가 이루어지고 있다[20][21]. 이러한 질환의 예측가능성을 바탕으로 2006년 제노프라사에서는 앵타머칩을 개발하여 심혈관환자의 질병진행 단계를 예측하는 실험을 통해 77~100% 구분하는 효과가 입증되었다[22].

항체와 비교적 유사한 특성의 앵타머는 표적분자에 작용하지만 단백질인 항체와는 다르게 핵산성분이므로 면역반응을 유도하지 않고 그 크기가 매우 작아 항체가 접근하기 어려운 부분과도 선택적으로 상호작용을 할 수 있어 질환의 치료제로 활용가능성이 매우 크다. 1970년대 초 folkman은 질환의 치료를 위한 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 억제에 대한 연구를 시작하였고 망막의 손상을 주는 신생혈관의 성장을 억제하는 물질을 탐색하는 연구를 하여 VEGF165 단백질에 특이적으로 작용하는 앵타머를 선별하였다. 이를 2004년에 미국식약처(food and drug administration, FDA)에 승인을 받았고 그로써 사용이 허가된 앵타머 기반의 최초 노화성 황반변성(age-related macular degeneration, AMD)의 치료제인 Pegaptanib (Macugen®)가 개발되어 시판되었다. 이와 같이 다양한 표적분자에 결합력이 우수하고 특이성이 뛰어난 앵타머를 이용하여 효소반응을 억제하는 화합물을 선별이 가능하기 때문에 그를 위한 연구는 활발히 진행 중 이다[23][24].

대상균주는 치주질환의 주 원인균인 *p. gingivalis*로 DNA분석을 통하여 치아우식증의 대표적인 원인균인 streptococcus mutans (*S. mutans*)의 GTPase인 SGP에 대한 아미노산 염기서열과 비슷한 특성을 가진 PGP (*P. gingivalis* GTP-binding protein)가 존재한다[25]. 그렇기 때문에 PGP 유전자를 가진 *E. coli*를 배양하였고 재조합 PGP 단백질(recombinant PGP, rPGP)을 생산하고 정제하여 특이적 결합을 하는 앵타머를 선별는데 이 때 SELEX 방법을 바탕으로 NI-NTA 아가로스 레진에 고정시킨 rPGP를 적용하였고 선택적으로 결합하는 8개의 앵타머를 선별하였다. 선별된 앵타머의 특이적 특성과 작용기전의 분석을 위해 앵타머가 직접적으로 작용하는 단백질을 밝혀내고자 *P. gingivalis*의 세포벽과 세포질을 분획하여 modified

weston blot을 시행한 결과 APG-3 앵타머에서 *P. gingivalis*에 선택적으로 결합하는 8개의 단백질 분획을 분리, 동정하였다. 구강세균인 *S. mutans*에 대한 연구[26]에서는 앵타머와 결합하는 6개의 단백질 분획을 밝혀내어 비슷한 수준이다. 또한 *S. mutans*는 분획들 중 약 36 kDa의 분획을 분석하여 비슷한 분자량의 단백질이 동정되었는데 *P. gingivalis*는 분획들 중 약 25 kDa의 분획을 획득하였고 그를 분석한 결과, 유사한 분자량의 단백질 11종이 동정되었으며 Aminotransferase, Catabolite control protein A, Cell division protein, Cysteine synthase, dTDP-glucose 4,6-dehydratase, Elongation factor Tu, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)), Methionine import ATP-binding protein, Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Ribonuclease Z로 모두 세포질 내 존재하는 단백질이다. 단백질은 치주질환의 주된 국소적인 원인으로 작용하는 치면세균막을 형성하는데 작용하기도 하는데 치면세균막을 형성하는데 필수 세균인 streptococcal pathogenesis를 대상으로 한 연구에서 Kietzman[27]은 Catabolite control protein A (Ccp A)이 결핍되었을 때 세균의 성장이 억제됨을 확인하였고 Tang 등[28]은 *Streptococcus suis*의 Ccp A가 탄소의 분해를 억제하고 독성에 작용함이 밝혀져 Ccp A가 세균에 의한 국소적인 감염에 작용할 뿐 아니라 치면세균막을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. Cell division protein은 세포표면에 존재하는 단백질로 당성분과 결합할 수 있는 수용체 부위를 가진 단백질인 렉틴과 유사한 활성을 보여 당단백질이 탄수화물에 결합할 수 있게 도움을 주고 이러한 분자는 획득피막의 생성을 촉진하고 균체의 연결을 도와 초기의 치면세균막을 형성하게 한다.

본 연구는 다음의 결과를 바탕으로 DNA 앵타머가 치주질환의 원인균인 *P. gingivalis*의 대사작용 조절 및 세포활성억제에 관여하는 단백질에 선택적으로 부착함으로써 치주질환의 진단을 위한 센서로의 사용 가능성을 제시했다. 또한 *P. gingivalis*가 치주질환 뿐만 아니라 다양한 질환에 영향을 주기 때문에 그에 따른

전신질환의 진단 및 예방, 치료에도 활용될 수 있을 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 치주질환의 주 원인균인 *P. gingivalis*에 선택적으로 결합하는 앵타머를 탐색하고 선별하고자 하였다.

1. *P. gingivalis*를 대상물질로 선별한 앵타머를 SELEX 방법을 통해 pCR2.1 cloning vector에 cloning하고, 그 염기서열을 분석하였다.
2. 그 결과 각기 다른 8종의 염기서열을 가진 앵타머를 선별하였다.
3. 선별된 앵타머 중 APG-3를 이용하여 앵타머와 직접 결합하는 단백질 11종을 분리, 동정하였다.

위의 결과로 선별된 앵타머들은 *P. gingivalis*에 선택적으로 결합함을 확인하였고, 이 앵타머가 당 대사 및 세포활성억제와 관련된 단백질에 결합함으로써 치주질환의 진단에 앵타머를 활용한 새로운 진단도구로의 가능성을 확인했다.

참 고 문 헌

[1] P. E. Petersen and H. Ogawa, "Strengthening the prevention of periodontal disease : The WHO approach," J Periodontal, Vol.76, No.12, pp.2187-2193, 2005.

[2] M. Taba, J. J. Kinney, A. S. Kim, and W. V. Giannobile, "Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases," Dent Clin North Am, Vol.49, No.3, pp.551-571, 2005.

[3] R. L. Mandell, J. L. Ebersole, and S. S. Socransky, "Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis," J Clin Periodontol, Vol.14, No.9, pp.534-540, 1987.

[4] S. Clais, G. Boulet, M. Kerstens, T. Horemans, W. Teughels, M. Quirynen, E. Lanckacker, ID. Meester, A. M. Lambeir, P. Delputte, L. Maes, and P. Cos, "Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical Porphyromonas gingivalis isolates," Pathogens and Disease, Vol.70, No.3, pp408-413, 2014.

[5] B. E. Siegrist, F. A. Gusberti, M. C. Sreex, H. P. Weber, and N. P. Long, "Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds," J Periodontal Res, Vol.21, No.16, pp.60-73, 1986.

[6] R. P. Darveau, A. Tanner, and R. C. Page, "The microbial challenge in periodontitis," Periodontol 2000, Vol.14, No.1, pp.12-32, 1997.

[7] C. Cugini, V. Klepac-Ceraj, E. Rackatyte, J. E. Riggs, and M. E. Darvey, "Porphyromonas gingivalis : keeping the pathos out of the biont," J oral Microbiol, Vol.5, pp.1-10, 2013. DOI: 10.3402/jom.v5i0.19804

[8] N.J. Lopez, "Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in progressing adult periodontitis," J Periodontal, Vol.71, No.6, pp948-952, 2000.

[9] J. Aduse-Opoku, J. M. Slaney, A. Hashim, A. Gallagher, R. P. Gallagher, M. Rangarajan, K. Boutaga, M. L. Laine, A. J. V. Winkelhoff, and M. A. Curtis, "Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of Porphyromonas gingivalis," Infect Immun, Vol.74, No.1, pp.449-460, 2006.

[10] C. Slocum, C. Kramer, and C. A. Genco, "Immune dysregulation mediated by the oral microbiome: potential link to chronic inflammation and atherosclerosis," J intern med, Vol.280, No.1, pp.114-128, 2016.

[11] T. R. Mikuls, J. B. Payne, F. Yu, G. M. Thiele, R. J. Reynolds, G. W. Cannon, J. Markt, D. McGowan, G. S. Kerr, R. S. Redman, A.

- Reimold, G. Griffiths, M. Beatty, S. M. Gonzalez, D. A. Bergman, B. C. Hamilton, A. R. Erickson, J. Sokolove, W. H. Robinson, C. Walker, F. Chandad, and J. R. O'Dell, "Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum*, Vol.66, No.5, pp.1090-1100, 2014.
- [12] 나용철, 김강주, 유형근, 신형식, "성인형 치주염 환자에서 분리한 Actinobacillus actinomycetemcomitans의 항생제 내성에 관한 연구," *圓光齒醫學*, 제6권, 제1호, pp.23-40, 1996.
- [13] H. Löe, CR. Schiött, G. Karring, and T. Karring, "Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects," *J Periodontal Res*, Vol.11, No.3, pp.135-144, 1976.
- [14] D. Adams and M. Addy, "Mouthrinses," *Adv Dent Res*, Vol.8, No.2, pp.291-301, 1994.
- [15] S. Shin, IH. Kim, W. Kang, J. K. Yang, and S. S. Hah, "An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer functionalized quantum dot,s," *Bioorg Med Chem Lett*, Vol.20, No.11, pp.3322-3325, 2010.
- [16] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science*, Vol.249, No.4968, pp.505-510, 1990.
- [17] A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington, "Aptamers as therapeutics," *Nat Rev Drug Discov*, Vol.9, No.7, pp.537-550, 2010.
- [18] K. Germer, M. Leonard, and X. Zhang, "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications," *Int J Biochem Mol Biol*, Vol.4, No.1, pp.27-40, 2013.
- [19] <http://dongascience.donga.com/news/view/43897>
- [20] H. H. Jo and CI. Ban, "Aptamer-nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools," *Exp Mol Med*, Vol.48, No.5, pp.1-9, 2016.
- [21] J. P. Park, H. J. Shin, S. G. Park, H. K. Oh, C. H. Choi, H. J. Park, M. S. Kook, and S. H. Ohk, "Screening and development of DNA aptamers specific to several oral pathogens," *J Microbiol Biotechnol*, Vol.25, No.3, pp.393-398, 2015.
- [22] 김병희, 김성천, 장병탁, "기계학습에 의한 암타머칩 데이터 기반 심혈관 질환 단계의 예측," *한국정보과학회 한국컴퓨터종합학술대회 논문집*, 제33권, 제1호, pp.85-87, 2006.
- [23] R. Stanislas and P. Jean, "VEGF as a target," *Targeted Oncology*, Vol.1, No.4, pp.239-240, 2006.
- [24] J. Folkman, "Angiogenesis," *Annu Rev Med*, Vol.57, pp.1-18, 2006.
- [25] M. J. Chun, K. J. Park, and S. H. Ohk, "Putative Down-stream Signaling Molecule of GTPase in Porphyromonas gingivalis," *Prikl Biokhim Mikrobiol*, Vol.48, No.4, pp.389-393, 2012.
- [26] 박병주, 옥승호, "DNA aptamers를 이용한 Streptococcus mutans의 부착억제," *한국산학기술학회논문지*, 제19권, 제3호, pp.382-388, 2018.
- [27] C. C. Kietzman and M. G. Caparon, "Distinct time-resolved roles for two catabolite-sensing pathways during Streptococcus pyogenes infection," *Infect Immun*, Vol.79, No.2, pp.812-821, 2011.
- [28] Y. Tang, W. Wu, X. Zhang, Z. Lu, J. Chen, and W. Fang, "Catabolite control protein A of Streptococcus suis type 2 contributes to sugar metabolism and virulence," *J Microbiol*, Vol.50, No.6, pp.994-1002, 2012.

저 자 소 개

신 애 리(Ae-Ri Shin)

정회원



- 2013년 2월 : 전남대학교 치의학과 (치의학석사)
- 2019년 2월 : 전남대학교 치의학과 (치의학박사)
- 2019년 3월 ~ 현재 : 광주보건대학교 치위생과 겸임교수

〈관심분야〉 : 치위생학, 구강보건학