



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사 학위논문

만성 치주염 환자에서 분리한
*Porphyromonas gingivalis*의
gingipain의 유전자적 변이에 관한
연구

2014 년 2 월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

강 철 근

만성 치주염 환자에서 분리한
*Porphyromonas gingivalis*의
gingipain의 유전자적 변이에 관한
연구

지도교수 최 영 님

이 논문을 치의학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 1 월

서울대학교 치의학대학원
치 의 학 과
강 철 근

강철근의 석사 학위논문을 인준함
2014 년 2 월

위 원 장 최 봉 규 (인)

부위원장 최 영 님 (인)

위 원 김 각 균 (인)

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 저작물을 제공 하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

①본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제 할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.

②본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제·배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

①서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.

②서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문제목 : 만성 치주염 환자에서 분리한 *Porphyromonas gingivalis*의 gingipain의 유전자적 변이에 관한 연구

학위구분 : 석사 · 박사

학 과 : 치의학대학원 치의학과

학 번 : 2010-22428

연 락 처 : 010-3033-5876

저 작 자 : 강철근 (인)

제 출 일 : 2014년 1 월 29 일

서울대학교총장 귀하

국문초록

*Porphyromonas gingivalis*는 그람음성 혐기성 세균으로 치주질환의 가장 중요한 원인균 중 하나이다. *P. gingivalis*의 단백질 분해효소인 arginine-과 lysine-specific cysteine proteinases (gingipains)는 치주병을 일으키는 주요 병독성 인자이다. 이후 각각을 RgpA, B 그리고 Kgp로 명명한다. 본 연구의 목적은 RgpA, B 그리고 Kgp의 단백질 서열 변이와 만성 치주염 환자의 증상 차이의 연관성을 분석하는 것이다. 치주염을 가진 10명의 환자 (P1-P10)의 치태로부터 *P. gingivalis*를 분리하였다. 각각의 임상균주의 단백질 분해 활성을 비교 분석한 결과로부터 활성에 차이를 보이는 4개의 균주 P1, P4, P8, P10을 선별하였다. P1과 P8은 단백질 분해 활성이 표준균주인 *P. gingivalis* ATCC33277에 비해 낮는데 반해, P4와 P10은 높은 활성을 보이는 균주이다. Genomic DNA를 분리 후, RgpA, RgpB와 Kgp에 대한 PCR을 시행하고 단백질 서열 분석을 하였다. 그 결과 여러 자리에서 변이가 존재함을 확인하였다. RgpA의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 각 균주 마다 5부위에 있었고, P1과 P8의 경우는 Asn-Pro반복서열이 첨가되었음을 확인했다. RgpB의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 P1은 11부위, P4는 7부위, P8은 2부위, P10은 한 부위에서 발견하였다. Kgp의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 총 14개 있었다. 주목할만한 점은 P1과 P8의 경우 변이된 부분이 한 곳을 제외하고 모두 일치하였다.

결과적으로 임상균주간의 변이를 확인할 수 있었지만, 활성부위에서의 변이는 관찰되지 않았다. 그리고 단백질 분해 활성의 차이를 설명할만한 유의미한 연관성은 찾지 못했다. 추가적인 단백질의 삼차원적인 구조 분석이 요구된다.

주요어 : Porphyromonas gingivalis; Rgp; Kgp; variation;
gingipain; periodontal disease

학 번 : 2010 - 22428

목 차

제 1 장	1
제 2 장	4
제 1 절	4
제 2 절	6
제 3 장 고찰	9
참고문헌	11
Abstract	20

표 목 차

[Table 1]	12
[Table 2]	13
[Table 3]	14
[Table 4]	15
[Table 5]	16
[Table 6]	17
[Table 7]	18

제 1 장 서 론

치주질환은 치은의 염증, 치조골을 포함하는 치아주위 조직을 파괴시킴으로써 성인에서 치아상실을 초래하는 가장 대표적인 질병이다. 65세 성인인구의 90% 이상이 치주질환을 경험하고 있거나 경험한 것으로 나타날 정도로 빈발하는 질환이다.¹⁾

치주질환의 주요한 원인은 특정 병원균의 치주조직 감염을 통한 치주조직의 직접적인 파괴와 이들 세균에 대한 숙주의 방어기전의 결과에 의해 좌우된다.²⁾ 세균이 치주조직을 자극해 각종 cytokine, chemokine 등의 분비를 유도하고 이로 인해 염증이 유발되어 결과적으로 치주조직의 파괴가 일어난다.³⁾

*Porphyromonas gingivalis*는 흑색집락형성 그람음성 혐기성 세균으로 치주질환의 가장 중요한 원인균 중 하나이다. 치주질환이 진행될수록 *P. gingivalis* 이환율과 치은연하치태 세균 중 점유율이 유의하게 증가하기 때문에 치주질환과 가장 연관성이 높은 세균으로 알려져 있다.⁴⁾

*P. gingivalis*의 병독성 인자로는 lipopolysaccharides⁵⁾, 숙주 면역 체계를 파괴 및 침투에 관여하는 arginine-과 lysine- specific cysteine proteinases(gingipains)⁶⁾, 그리고 타액 단백질이 흡착된 구강조직, 세포 외 기질성분(extracellular matrix components) 및 치은섬유 모세포(gingival fibroblast)와 상피세포의 집락화를 매개하는 부착물질인 fimbriae⁷⁾, hemagglutinin, hemolysin 등이 알려져 있다.⁸⁾

*P. gingivalis*에 의한 치주염의 발병과정은 숙주의 치은열구내 상피세포에 부착하는 것을 시작으로, 부착한 세균들 중 일부는 조직내로 침투하여 숙주의 방어기전을 파괴함으로써 미생물의 증식이 가능해 지면서 발병하게 된다.⁹⁾ 첫 번째 단계인 세균이 치주낭(periodontal pocket)에 부착 단계에서 세포의 표면에 있는 fimbriae, hemagglutinin, LPS 등이 주요 구조물로 여겨지며, 특히 fimbriae는 세균과 숙주세포간의 초기 상

호작용에 중요한 인자로 알려져 있다.¹⁰⁾ 그리고 숙주내 조직 침투와 방어기전을 파괴하는데 Arg-과 Lys-specific gingipain 이 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이 단백질 분해효소들은 숙주 단백질 분해효소 억제제, immunoglobulin, iron transporting/sequestering proteins, extracellular matrix proteins 등 다양한 숙주내 단백질을 분해하는 능력을 가지고 있다.

Arg-specific gingipain은 rgpA, rgpB라는 두 개의 연관된 유전자에 의해 암호화되어 있는 반면 Lys-specific gingipain은 kgp라는 오직 하나의 유전자 좌위(locus)에 암호화되어 있다. 앞으로 본 논문에서는 arg-과 lys-specific gingipain을 각각 RgpA, RgpB 그리고 Kgp라고 표기할 것이다.

Rgp는 Rgp null mutant를 이용한 in vivo model에서 병독성(virulence)이 크게 감소하는 것을 관찰 하였다.¹²⁾ 또 다른 Rgp-null mutant 실험¹⁰⁾에서는 fimbriae 주요 성분이 fimbrilin의 전구체 형태가 그대로 남겨져 있는 것을 볼 때 75-kDa cell surface protein인 fimbrilin 전구체의 성숙 및 전위에 관여하는 주요 processing enzyme으로 생각하고 있다. Koji nakayama, 연구에 따르면, suicide plasmid system을 이용한 rgpA과 rgpB double mutant 실험에서는 호중구의 기능 파괴가 이루어지지 않았고, P. gingivalis의 hemagglutination의 뚜렷한 감소를 보이는 것을 봤을 때 hemagglutinin activity에도 관여하는 것으로 생각된다.¹¹⁾

RgpA는 4가지 영역(domain)으로 이루어져 있다: signal sequence, amino terminal propeptide, catalytic proteinase, carboxy-terminal adhesin domain. RgpA와 대조적으로 Rgp B는 adhesin domain이 없고 대부분이 soluble한 형태의 단백질로 구성된다. RgpB의 촉매 부위가 RgpA의 촉매 부위와 서열이 거의 일치함에도 불구하고¹³⁾, 기질의 다른 부분을 절단하는 것을 볼 때 RgpA 유전자 산물과 RgpB의 유전자 산물의 4개의 아미노산 서열 차이가 활성 차이를 가져다주는 것으로 증명되었다.

Kgp도 RgpA와 유사한 구조로 이루어져 있다. 이 효소는 fibrinogen의 응고를 방해함으로써 출혈을 일으키는데 기여하며 leukocyte C5a 수용체를 분해함으로써 C5a에 의한 leukocyte로부터 세균이 포식되는 것을 막는데 기여한다.¹⁴⁾

세균은 같은 종이라도 균주에 따라 변이성이 보이게 되는데 이 변이성은 세균의 발병기전에도 영향을 미치며, *P. gingivalis* 균주들 사이에서도 Rgp와 Kgp의 변이성이 관찰된다. 본 연구실에서는 10명의 치주질환환자(P1-P10)로부터 *P. gingivalis*를 채취하였고, 이중 4개의 임상균주 P1, P4, P8, P10에서 세균의 침투 능력 및 단백질 분해 활성에 현저한 차이가 있음을 관찰하였다. 본 연구의 목적은 이러한 차이가 RgpA, B 그리고 Kgp의 변이성에서 비롯된다는 가설아래, DNA 및 단백질 서열을 비교연구해 보고 치주질환의 심각성과의 연관성을 알아보기 위함이다.

제 2 장 본 론

제 1 절 연구의 방법

가. *P. gingivalis* 임상균주 선택

본 연구실에서는 치주질환을 가지고 있는 10명의 환자들(P1-P10)로부터 채취한 *P. gingivalis*의 싸이토카인 분해 실험을 통해, 통계적으로 유의미한 차이를 보이는 4개의 임상균주 P1, P4, P8, P10을 확인하였다.

나. 균주 배양

*P. gingivalis*를 5ug/ml의 hemin과 5 ug/ml menadione이 첨가된 BHI(Brain Heart Infusion)에 접종하고, 37°C의 혐기성 조건하에서 2-5 일 동안 배양하였다. 배양액을 16,000Xg, 4°C에서 15분간 원심분리 (J2-21M/E, Beckman Co., CA, U.S.A)하여 균체를 모은 후, 0.9% (w/v) NaCl 용액으로 3회 세척하여 사용 시까지 -20°C에 보관하였다.

다. *P. gingivalis*의 genomic DNA 추출 및 PCR 산물로부터 Rgp, Kgp 유전자 동정

RgpA, B 그리고 Kgp 유전자의 서열변이를 동정하기 위해서 4 개의 임상균주 P1, P4, P8, P10로부터 세균 DNA를 G-Spin Genomic DNA Extraction Kit (Intronbio, 한국)를 이용해 분리했다. 분리한 genomic DNA로부터 Rgp와 Kgp에 대한 PCR 산물을 얻기위해 각 유전자의 특이적인 프라이머를 제조하여 사용하였다(Table1). Primer 디자인시 사용

한 template 서열은 다음과 같다.: RgpA (5114 bp, accession number: U15282), RgpB(2210bp, accession number: U85038), Kgp (5171bp, accession number: U54691). PCR은 94도씨에서 5분간 template를 변성 시킨후 94도씨에서 30초, 55도씨 에서 annealing 30초, 72도씨에서 primer extension 30초간의 PCR cycle을 35회 시행한 다음 72도씨에서 5분간 그리고 4도씨에서 PCR을 마무리하였다. PCR 산물은 MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit(Intronbio, korea)로 정제한 후 마크로젠(서울, 한국) 회사에 보내 염기서열을 결정 하였다.

제 2 절 서열 분석 결과

가. RgpA 단백질 서열 분석

Template 서열로 사용한 arginine-specific cysteine proteinase RgpA (Strain: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, 1703아미노산, accession number: YP_001930085)의 아미노산 서열과 4개의 임상균주 P1, P4, P8, P10의 RgpA아미노산 서열을 비교하였다. P1의 경우 마지막 염기서열 1623bp는 PCR 서열 분석시 알 수 없는 이유로 Mixed signal 이 나타나서 분석하지 못하였다. PCR 서열 분석이 완료된 부분들만 가지고 아미노산 서열을 비교한 결과는 아래와 같다(Table2와 Table3).

P1(1163아미노산) 서열은 1156/1163 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 5곳이 있었다. 특이한 점은 951번째 위치에 NP(Asn-Pro) 반복서열이 template에서는 5개 인데 반해 P1에서는 6개가 존재하였다.

P4 (1704아미노산)는 1690/1704 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 5부위가 있었다.

P8(1706아미노산)은 1693/1706 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 5부위가 있었고, P1처럼 951번째 위치에 NP(Asn-Pro)반복서열이 template와 달리 하나가 첨가되었다.

P10(1704아미노산)는 1695/1704 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 5부위가 관찰되었다.

4개의 임상균주의 아미노산 변이가 생긴 부분 중 활성부위 (433..436,466,468,512)에서의 변이는 관찰 되지 않았다.

나. RgpB 단백질 서열 분석

Template 서열로 사용한 arginine-specific cysteine proteinase

RgpB (Strain: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, 736아미노산, accession number: YP_001929582.1)의 아미노산 서열과 4개의 Clinical strain(P1,P4,P8,P10)의 아미노산 서열을 비교하였다(Table4 와 Table5).

P1은 719/736 (97%)의 유사도를 보였고, 기능적으로 다른 아미노산 변화가 11부위가 있었다.

P4은 720/736 (97%) 의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 7부위가 있었다.

P8은 728/736 (98%) 의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 2부위가 있었다.

P10은 719/736(97%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 1부위가 있었다.

4개의 임상균주의 아미노산 변이가 생긴 부분 중 활성부위 (438..441,471,473,517)에서의 변이는 관찰되지 않았다. 그리고 P1와 P10의 경우 아미노산 변이된 곳이 대부분 일치하였다. P4와 P8의 경우는 변이된 곳이 모두 달랐다.

다. Kgp 단백질 서열 분석

Template 서열로 사용한 lysine-specific cysteine proteinase Kgp (Strain: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, 1723aa, accession number: YP_001929844)의 아미노산 서열과 4개의 임상균주 P1, P4, P8, P10의 아미노산 서열을 비교하였다(Table6과 Table7).

P1의 경우 마지막 염기서열 3406bp가 PCR이 되지 않았고 나머지 P4,P8,P10의 경우도 마지막 염기서열 1671bp 부분이 알 수 없는 이유로 PCR이 되지 않아 분석하지 못하였다. PCR 서열 분석이 완료된 부분들만 가지고 아미노사 서열을 비교한 결과는 아래와 같다.

P1 (587아미노산)은 559/587 (95%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 14부위가 있었다.

P4 (1186아미노산)는 1174/1184 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 3부위가 있었다.

P8 (1186아미노산)는 1156/1184 (94%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 14부위가 있었다.

P10 (1186아미노산)는 1177/1184 (99%)의 유사도를 보였고 기능적으로 다른 아미노산 변화는 3부위가 있었다.

4개의 임상균주의 아미노산 변이가 생긴 부분 중 활성부위 (442..445,475,477,553)에서의 변이는 관찰되지 않았다. 특이한 점은 균주 간 변이성이 Peptidase C25(235-679)부분에서 많이 관찰되었는데, P1과 P8의 경우 변이된 부분이 대부분 일치하였다. 그리고 P4와 P10의 아미노산 서열을 서로 비교하였을 때 기능적으로 다른 아미노산 변화가 관찰되지 않았다.

제 3 장 고 찰

본 연구실에서는 치주질환을 가지고 있는 10명의 환자들(P1-P10)로부터 채취한 *P. gingivalis*의 싸이토카인 분해 실험을 통해, 통계적으로 유의미한 차이를 보이는 4개의 임상균주 P1, P4, P8, P10를 확인하였다. P1과 P8은 단백질 분해 활성이 표준균주인 *P. gingivalis* ATCC33277에 비해 낮은데 반해, P4와 P10은 높은 단백질 분해 활성을 보였다.

*P. gingivalis*의 단백질 분해 활성 차이가 단백질 분해효소인 RgpA, RgpB, Kgp의 단백질 서열변이로 인한 기능차이에서 비롯되었다는 가정하에 PCR을 통한 서열분석을 통해 변이여부를 확인하였다. Template 서열로 *P. gingivalis* ATCC 33277의 gingipain 서열을 사용했고 비교 결과 RgpA, RgpB, Kgp의 단백질 분해 활성을 가진 영역(proteolytic domain)에서 변이가 있음을 확인하였다. RgpA의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 각 균주 마다 5곳이 있었고, P1과 P8의 경우는 Asn-Pro반복서열이 첨가되었음을 확인했다. 그리고 P1의 경우, 마지막 1623bp 서열이 PCR이 안된 것을 볼 때, 여러 가지 이유가 있겠지만 다른 균주와 다른 서열 변이가 있는 것으로 생각된다. RgpB의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 P1은 11곳, P4는 7곳, P8은 2곳, P10은 한 곳에서 발견하였다. 특이한 점은 P1과 P10의 경우 변이가 생긴 총 9곳중 6곳이 같은 자리였고, 기능적으로 다른 변이는 오직 한 곳만 존재했다. Kgp의 경우 기능적으로 다른 아미노산 변화가 총 14곳이 있었다. 주목할만한 점은 P1과 P8의 경우 변이된 부분이 한곳을 제외하고 모두 일치하였다.

실험결과, 각 균주의 gingipain의 여러 자리에서 서열변이가 존재함에도 불구하고, 활성부위(active site)로 알려진 부분에서의 서열 변이는 관찰되지 않았다. 그리고 RgpA과 Kgp의 경우 P1과 P8에서 서열변이의 유사성을 발견할 수 있었고, RgpB의 경우 P1과 P10간의 서열변이의 유사성을 관찰할수 있었지만 이러한 사실만 가지고 임상 균주간 단백질 분해

활성 차이를 설명해 주긴 힘들다.

본 연구를 통해서 Clinical strain간의 변이성을 확인할 수 있었지만, 치주질환의 증상의 정도를 설명할만한 유의미한 연관성은 찾지 못했다. 본 연구가 의미있는 연구가 되기 위해서는 우선, 서열분석을 완료하지 못한 부분을 완성시켜야한다. 그리고 이를 바탕으로 단백질의 삼차원적인 구조 분석이 요구된다. 이차원적인 단백질 서열만 가지고 변이된 아미노산 각각이 단백질 분해효소의 활성화에 어떻게 영향을 미칠지 모두 알기는 어렵고 단백질의 기능 및 특이성, 병의 진행 정도와의 관계를 설명하기에는 부족하다. 이러한 것들이 완료된다면 치주질환의 병인기전에서 *P. gingivalis*의 gingipain의 역할을 이해하고, 나아가 심한 치주질환을 일으키는 특이적 서열의 발견을 통해 치주질환 진단도구나 백신개발에도 도움이 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Loe H, epidemiology of periodontal disease. In Genco RJ, Goldman HM and Cohen DW , 『Contemporary periodontics』 , (st.louis : C.V. Mosby company, 1990): 106-116.
- 2) Genco, Caroline Attardo, et al. "Role of gingipains R in the pathogenesis of Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease." Clinical infectious diseases 28.3 (1999): 456-465.
- 3) 이민기, "Porphyromonas gingivalis에 감염된 치주인대 섬유모세포의 유전자 발현", 경희대학교 대학원 박사논문,(2009)
- 4) Nonnenmacher, Claudia, et al. "Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients." Journal of periodontology 76.9 (2005): 1542-1549.
- 5) Wang, P-L., and K. Ohura. "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts - CD14 and Toll-like receptors." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 13.2 (2002): 132-142.
- 6) Curtis, M. A., J. Aduse-Opoku, and M. Rangarajan. "Cysteine proteases of Porphyromonas gingivalis." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 12.3 (2001): 192-216.
- 7) Lamont, Richard J., and Howard F. Jenkinson. "Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis." Microbiology and Molecular Biology Reviews 62.4 (1998): 1244-1263.
- 8) Beikler, T., et al. "Sequence analysis of kgp in Porphyromonas gingivalis isolates from periodontitis patients." Oral microbiology and immunology 18.6 (2003): 393-397.
- 9) 김태진, "Porphyromonas gingivalis fimbriase 재조합 단백질의 발현과 면역에 관한 연구", 경희대학교 대학원 박사논문,(2004,2)

- 10) Kadowaki, Tomoko, et al. "Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*." *Journal of Biological Chemistry* 273.44 (1998): 29072-29076.
- 11) Forng, R Y., et al. "Oral Microbiology: Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *Oral diseases* 6.6 (2000): 351-365.
- 12) O'Brien-Simpson, Neil M., et al. "Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model." *Infection and immunity* 69.12 (2001): 7527-7534.
- 13) Ally, Nafisa, et al. "Characterization of the specificity of arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes." *Biochemistry* 42.40 (2003): 11693-11700.
- 14) Jagels, Mark A., et al. "Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*." *Infection and immunity* 64.6 (1996): 1984-1991

[Table 1] Sequences of the nested primers used for sequence analysis

Primer		Sequence(5' - 3')
RgpA	RgpA-(1)-F	ATGAAAACTTGAACAAGTTTGTT
	RgpA-(1)-R	TGGTCGGGACAAGTGTACG
	RgpA-(2)-F	CGACACATGGACTGTTTTTCG
	RgpA-(2)-R	TCCGGAAGACAGACAGAGC
	RgpA-(3)-F	CTTCCCGCAGGTACGAAATA
	RgpA-(3)-R	TTACTTTACAGCGAGTTTCTCT
RgpB	RgpB-(1)-F	ATGAAAAAGAATTTTAGCAGGATC
	RgpB-(1)-R	GAGTGGTGCCGAAGTGAG
	RgpB-(2)-F	CAACGGAGGAATCTCGTTG
	RgpB-(2)-R	TTACTTCACTATAACCTTTTCTGT
Kgp	Kgp-(1)-F	ATGAGGAAATTATTATTGCTGAT
	Kgp-(1)-R	GATATTTTCGGCATGAGTAGCA
	Kgp-(2)-F	TGCTGCTACTCATGCCGAAA
	Kgp-(2)-R	GAGCTGTCAGCCAGTCCAAT
	Kgp-(3)-F	TACTATCGATGCCGATGGCG
	Kgp-(3)-R	AGTAGCCTGCAATTTGACCCA

[Table 2] Comparison of RgpA amino acid sequence identified in P1,P4,P8 and P10

RgpA		Template	P1	P4	P8	P10
Template (1704aa)	identities		99%	99%	99%	99%
	positives		99%	99%	99%	99%
	Gap		0	0	0	0
P1(1163aa)		1156		99%	99%	99%
		1158		99%	99%	99%
		2		0	0	
P4(1704aa)		1690	1156		99%	99%
		1699	1158		99%	99%
		0	2		0	0
P8(1706aa)		1693	1160	1692		99%
		1699	1161	1699		99%
		2	0	2		0
P10(1704aa)		1695	1158	1692	1701	
		1699	1159	1699	1703	
		0	2	0	2	

[Table 3] Amino acid variation sites of RgpA in P1,P4,P8 and P10

RgpA(aa) Strain	295	303	433	662	709	826	878	940	950-960	1086	1262	1375	1378
Template	G	V	V	N	L	G	K	T	5NP	E	G	P	F
P1	C	V	V	N	L	G	Q	T	6NP	E	-	-	-
P4	G	I	A	S	F	G	Q	T	5NP	E	G	P	L
P8	G	V	V	N	L	R	Q	T	6NP	K	D	S	F
P10	G	V	V	N	L	G	K	M	5NP	E	D	S	F
	-	+*	-	+	-	-	+	-		+	-	-	-
Domain region of RgpA	Peptidase(228-719)					-			Cleaved adhesion(965-1310)			unknown	

*indicates functionally different amino acid change

[Table 4] Comparison of RgpB amino acid sequence identified in P1,P4,P8 and P10

RgpB		Template	P1	P4	P8	P10
Template (736aa)	identities		97%	97%	98%	97%
	positives		98%	99%	98%	98%
	Gap		0%	0%	0%	0%
P1(736aa)		719		98	98%	99%
		727		98	98%	99%
		0		0	0%	0%
P4(736aa)		720	723		98%	98%
		729	728		99%	98%
		0	0		0%	0%
P8(736aa)		728	727	728		98%
		734	729	731		98%
		0	0	0		0%
P10(736aa)		719	732	723	725	
		725	734	728	727	
		0	0	0	0	

[Table 5] Amino acid variation sites of RgpB in P1,P4,P8 and P10

RgpB(aa)	57	305	394	419	421	423	435	447	512	515	560	596	706	725
Strain														
Template(736aa)	D	V	Q	V	P	N	V	G	Y	P	N	Q	R	E
P1	D	I	E	A	A	K	A	V	S	S	N	Q	R	E
P4	G	I	Q	V	P	N	V	G	S	S	K	Q	H	K
P8	D	I	Q	V	P	N	V	G	Y	P	N	Q	R	E
P10	G	V	E	A	A	K	A	V	S	S	N	L	R	E
	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Domain region of RgpB		Peptidase(231- 660)										Por_sere_tail^a(682-738)		

* indicates functionally different amino acid change

^aPor secretion system C-terminal sorting domain

[Table 6] Comparison of Kgp amino acid sequence identified in P1,P4,P8 and P10

Kgp		Template	P1	P4	P8	P10
template (1723aa)	identities		95%	99%	94%	99%
	positives		97%	99%	98%	99%
	Gap		0	0	0	0
P1(587aa)		559		96%	99%	97%
		573		97%	99%	97%
		0		0	0	0
P4(1186aa)		1174	563		98%	99%
		1181	575		98%	100%
		2	0		0	0
P8(1186aa)		1156	584	1158		98%
		1170	586	1173		98%
		2	0	0		0
P10(1186aa)		1177	563	1183	1161	
		1181	575	1186	1173	
		2	0	0	0	

[Table 7] Amino acid variation sites of Kgp in P1,P4,P8 and P10

Kgp(aa) Strain	21	232	254	381	389	390	393	394	395	398	403	404	411	418	421	437	449	454	457	457	460	478	493	495	568	899
Template	N	T	E	A	S	Y	P	K	I	Q	A	V	D	S	P	G	S	S	A	T	V	V	M	P	E	K
P1	N	I	D	V	Y	S	S	Q	V	P	G	M	E	N	L	S	A	L	T	S	L	I	I	V	G	-
P4	S	I	D	A	S	Y	P	K	I	Q	A	V	D	S	P	G	S	S	A	T	V	V	M	P	E	Q
P8	S	T	E	V	Y	S	S	Q	V	P	G	M	E	N	L	S	A	L	T	S	L	I	I	V	G	K
P10	S	I	D	A	S	Y	P	K	I	Q	A	V	D	S	P	G	S	S	A	T	V	V	M	P	E	K
	+*	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Domain region of RgpB	Peptidase(235 - 679)																									

* indicates functionally different amino acid change

Abstract

Investigation of genomic variation of *Porphyromonas* *gingivalis* gingipain isolated from chronic periodontitis

Cheol-Keun Kang

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Porphyromonas gingivalis, a gram-negative anaerobic bacterium, is one of the major causative organisms of periodontal diseases. This bacterium is known to produce a large amount of arginine-specific protease and lysine-specific protease, which are referred to as RgpA, RgpB and Kgp, respectively in this article. The aim of this study was to examine amino acids variations of RgpA,B and Kgp in clinical isolates of *P. gingivalis* as well as to assess the association of

severity of patients with periodontitis. To obtain the clinical isolates of *P. gingivalis*, bacterial samples were generated from ten periodontitis patients (P1-P10). We have found distinct differences in the proteolytic activity of four clinical strains(P1,P4,P8,P10) of ten *P. gingivalis* isolates. Proteolytic activity seen in the cases of P1 and P8 was lower than that of *P. gingivalis* ATCC33277; however, the activity observed in P4 and P10 was found to be higher. To identify amino acid sequence variations within RgpA,B and Kgp, bacterial genomic DNA was isolated to perform a PCR process. Protein sequence analysis of RgpA, B and Kgp in P1,P4,P8,P10 revealed several amino acid variations.

It was found that, in the case of RgpA, each strain had five variation sites presenting functionally different amino acids, and that P1 and P8 had repeating sequences of Asn-Pro added. For RgpB, there have been many alteration sites of functionally different amino acid; eleven in P1, seven in P4, 2 in P8 and one in P10. For Kgp, a total number of fourteen amino acid alterations, was found. Here, what we should be paying attention to is that in cases of P1 and P8, locations of variations were all identical except for one.

Despite the sequence variations described above, any changes in active sites could not be observed. It was also not sufficient to demonstrate any significant association between the sequence variation and the differences of proteolytic activity. Further studies are needed to explore 3D structures of proteins and their possible functional change.

keywords : Porphyromonas gingivalis; Rgp; Kgp; variation; gingipain; periodontal disease
Student Number : 2010-22428