

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella intermedia*, 그리고 *Prevotella nigrescens*에서의 hemin 결합 단백질에 대한 연구

김성조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

1. 서론

생명체에 있어 필수 영양소로서 중요한 역할을 하는 철분 (iron)은 세균의 성장 및 대사에도 영향을 미쳐 감염성 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 요소로 작용한다¹⁻³⁾. 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 있다¹⁻³⁾. 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)은 각각 숙주의 haptoglobin과 hemopexin 및 albumin에 단단히 결합하여 그들의 제거

와 숙주에 의한 재활용에 기여하게 된다⁴⁻⁹⁾.

한편, 세포 외부에 존재하는 소량의 철분도 transferrin과 lactoferrin에 결합되어 균주에 의한 활용이 제한된다¹⁻³⁾. Transferrin과 lactoferrin은 혈액 및 세포 간질과 외분비물에 각각 존재하는 당단백질로 철분의 킬레이션과 이동 및 교환에 관여한다. 이로 인해 숙주 내에서 실제 활용 가능한 유리 철분 또는 hemin의 농도는 매우 낮아, 유리 철분의 경우 그 농도는 단지 10^{-18} M 정도로¹⁾, 이는 대부분의 세균에 있어 성장에 필요한 수준인 10^{-6} M에 크게 미달하여 세균의 성장을 뒷받침하는데 있어 일반적으로 불충분하다.

병원성 세균들은 이러한 숙주 내 환경에서 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 pro-

* 이 논문은 2002년도 부산대학교병원 의학연구소 연구비 (2002-13)에 의하여 연구되었음.

* 교신저자 : 김성조, 부산광역시 서구 아미동 1-10 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 602-739

teins)이 중요한 역할을 한다¹⁰⁻¹⁵⁾.

In vitro에서의 세균 성장 과정에서 철분이 억제 되는 경우 새로운 세포막단백질이 발현됨이 몇몇 균주에서 보고된 바 있는데, 이러한 철분에 의해 조절 되는 세포막 단백질들은 siderophore를 위한 iron transport system으로 작용하거나, transferrin과 lactoferrin을 결합하는 수용체로 작용할 수도 있고, hemin이나 porphyrin analog를 결합하는 수용체로 작용할 수 있다¹⁶⁻²¹⁾. 실제로 몇몇 다른 균주들에서의 연구 보고에 의하면 hemin에 의해 조절 되는 세포막 단백질 (hemin-regulated membrane proteins)의 일부가 hemin 획득에 있어 중요한 역할을 한다^{20,22-38)}.

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

*P. gingivalis*와 *P. intermedia*는 치주질환 주요 병원균 중의 하나로 성인성 치주염 환자의 치주낭 내에서 우세하게 존재한다³⁹⁻⁴¹⁾. *P. intermedia*는 또한 급성괴사성 궤양성 치은염과 임신성 치은염과도 연관이 있다^{42,43)}. *P. nigrescens*는 *P. intermedia*와 밀접한 연관을 가지고있으며, Shah와 Gharbia⁴⁴⁾에 의해 과거 *P. intermedia*로 분류되었던 strain들 중에서, 생화학적 특성 등에 의거하여, *Prevotella genus* 내의 별도의 새로운 종 (species)으로 분류된 바 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 용혈 및 혈구응집 활성⁴⁵⁾ 그리고

beta-lactamase 생성 및 항균제에 대한 감수성 등^{46,47)}에 있어 상이함이 보고된 바 있고, 이 두가지 균종은 SDS-PAGE와 PCR등의 방법에 의해 구분될 수 있다⁴⁸⁻⁵¹⁾.

본 연구는 hemin 의존성을 갖는치주질환 주요 병원균인 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, 그리고 *P. nigrescens*의 hemin 결합 세포막 단백질의 특성을 비교 분석하기 위해 수행되었다. 본 연구는 이들 균주에서의 porphyrin 생리 및 hemin 획득 기전을 밝히는데 있어중요한 의의가 있으리라 사료된다.

II. 연구재료 및 방법

1. 균주 및 배양 조건

사용된 균주는 *P. gingivalis* 381, *P. intermedia* ATCC 25611, 그리고 *P. nigrescens* ATCC 33563이었으며, 이들 균주를 enriched Trypticase soy agar, 또는 2.1% (W/V) Mycoplasma broth base (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD)에서, 1 µg/ml의 menadione과 5 µg/ml의 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 이중 배양 후 660 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 균주 배양의 오염 여부는 Gram 염색 후 검정하여 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, 냉각

된 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 파쇄하고, 저속 (10,000 x g, 30 min) 및 고속 (200,000 x g, 2 hr) 원심 분리를 시행하여 세포막을 분리하였다. 분리된 세포막은 PBS에 녹여 -20°C에 보관하였다.

3. 단백질 정량

Kennel과 Holt⁵²⁾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 μ l의 시료를 microtiter well에 넣고 증류수로 2배 연속 희석한 후, 200 μ l의 protein assay reagent를 각 well에 가하여 30분간 실온에 위치시키고, plate reader (570 nm)로 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin이 사용되었다.

4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis

단백질 분포의 평가를 위해서는 Laemmli⁵³⁾의 discontinuous sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였고, 세포막 단백질 중에서 heme-associated peroxidase activity를 갖는 밴드를 확인하기 위해서는 lithium dodecyl sulfate (LDS) PAGE를 시행하였다. 12% acrylamide separating gel과 4%의 acrylamide stacking gel을 이용하였으며, vertical slab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, CA)와 minigel apparatus (Mini PROTEANR II Dual Slab Cell, Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용하여 30 mA에서 전기영동 하였다. 각 lane에는 통상 20 μ g 및

60 μ 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 단백질밴드의 분자량 계산은 linear regression analysis에 의거하였다. 세포막 단백질의 hemin-associated peroxidase activity를 결정하기 위해 LDS-PAGE gel을 tetramethylbenzidine (TMBZ, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 염색하였다. TMBZ 염색은 Stugard³¹⁾의 방법에 의거하여 수행하였다. Reducing agent인 2'-mercaptoethanol의 존재가 전기영동에 미치는 영향도 분석하였다.

5. Hemin 결합 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 결합 단백질 밴드 (결과 참조)를 절제한 후, Hager와 Burgess의 방법⁵⁵⁾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

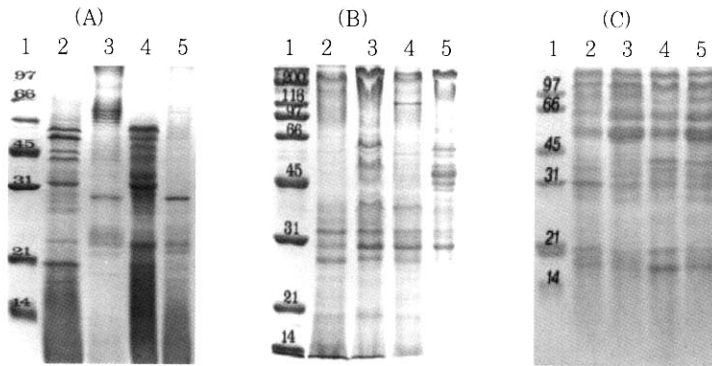


Figure 1. SDS-PAGE of cell envelopes from *P. gingivalis* (A), *P. intermedia* (B), and *P. nigrescens* (C). Lane 1, M.W. standards; Lane 2 and 3, unheated samples; Lane 4 and 5, samples heated at 100°C for 5 min; Lane 2 and 4, cells grown in 7.7 μM hemin; Lanes 3 and 5, cells grown without hemin (passage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

55), Amido black으로 염색한 후 해당 밴드를 잘라 내었으며, 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. Cyanogen bromide digestion

*P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합 단백질 (결과 참조)은 N-terminus가 봉쇄되어 cyanogen bromide (CNBr)로 절단한 후 아미노산 서열을 결정하였다. 간략히 소개하면, acetone으로 침전시킨 24 kDa 단백질에 70% formic acid에 녹인 CNBr을 가하여 실온에서 16시간 방치한 후, N₂와 SpeedVac SC 100 (Savant)을 이용하여 건조하였다.

III. 결 과

각 전기영동 조건에서 정상적으로 7.7 μM의 hemin을 공급하여 배양한 경우와 hemin을 고갈시킨 경우 (passage 5)에서의 단백질 밴드의 분포와 수는 매우 유사하였다 (Figure 1). 그러나, passage 5의 *P. gingivalis*에서 약 24 kDa (unheated

30 kDa), 그리고 passage 5의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서는 약 50 kDa의 단백질 밴드가 현저히 강화되어 발현되었다 (Figure 1). LDS-PAGE gel을 TMBZ로 염색한 결과, passage 5의

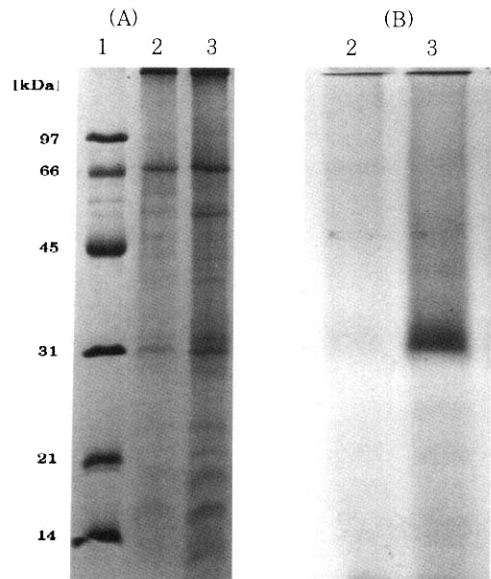


Figure 2. Coomassie Brilliant blue stained (A) and tetramethylbenzidine (TMBZ) stained (B) LDS-PAGE of cell envelopes from *P. gingivalis*. Protein (70 μg) was applied to each lane following incubation with hemin. Lane 1, low M.W. standards; Lane 2, cells grown in 7.7 μM hemin; Lane 3, passage 5.

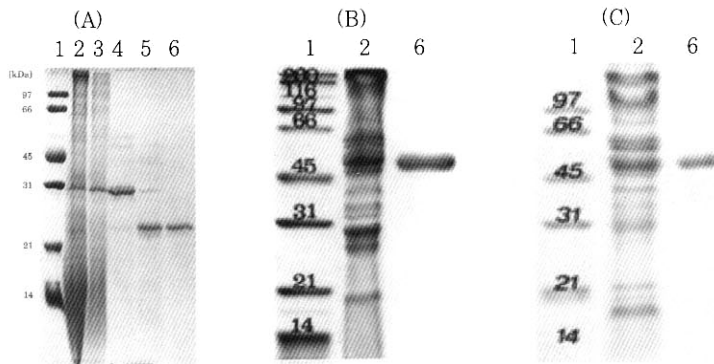


Figure 3. SDS-PAGE analysis of the purification of putative hemin-binding proteins from *P. gingivalis* (A), *P. intermedia* (B), and *P. nigrescens* (C). Lane 1, M.W. standards; Lane 2, cell envelope fraction; Lane 3, 1% CHAPS-soluble fraction of *P. gingivalis*; Lane 4, isolation of 30 kDa protein of *P. gingivalis*; Lane 5, 100°C heated isolation 30 kDa protein of *P. gingivalis*; Lane 6, purified putative hemin-binding protein proteins.

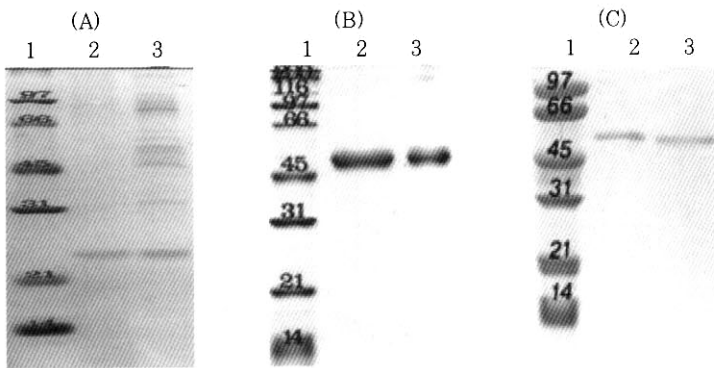


Figure 4. Electrophoretic mobility of putative hemin-binding proteins from *P. gingivalis* (A), *P. intermedia* (B), and *P. nigrescens* (C) in the presence and absence of reducing agent, 2-mercaptoethanol. Lane 1, M.W. standards; Lane 2, sample with treatment buffer containing 2-mercaptoethanol; Lane 3, sample without 2-mercaptoethanol.

P. gingivalis 세포막단백질은 30 kD에서 hemin-associated peroxidase activity를 보였다 (Figure 2).

Passage 5의 *P. gingivalis*에서 약 24 kDa (unheated 30 kDa) hemin 결합 단백질, 그리고 passage 5의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서는 약 50 kDa의 hemin 결합 추정 단백질을 각각 분리하였다. 분리된 단백질은 여타의 단백질에 오염되지 않고 1개의 밴드로 구성되어 있었다 (Figure 3). 분리된 각각의 단백질은 환원제인

2'-mercaptoethanol의 존재 유무와 상관없이 동일한 전기영동 양상을 보였다 (Figure 4).

*P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합 단백질을 CNBr로 처리한 결과 최소 3개의 단백질 밴드 (12 kDa, 17 kDa, 그리고 20 kDa)가 확인 되었으며, 이들 밴드의 내부 아미노산 서열이 표 1 (A)에 제시되어 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서의 약 50 kDa hemin 결합 추정 단백질의 N-terminal 아미노산 서열은 표 1 (B)와 (C)에 제시되어 있다.

Table 1. N-terminal amino acid sequence analysis of putative hemin-binding proteins from *P. gingivalis* (A), *P. intermedia* (B), and *P. nigrescens* (C)

(A)	
Fragments	Amino acid sequence
20 kDa	DQATSVPTDG(X)Y(X)TVD(X)KLGRI TVK
17 kDa	GPDG(H)ZMEYEE
12 kDa	EYEEQGFSEVITGKKNAAQGF(AA(X)G(X)LEF(S)

* (X), unknown; (), assume to be correct amino acid.

(B)	
Fragment	Amino acid sequence
50 kDa	SIITDVYAREVLDSRG

(C)	
Fragment	Amino acid sequence
50 kDa	MEVLKIMESLEQKHP

IV. 총괄 및 고찰

병원성 세균들은 숙주 내 환경에서 서식하고 병원성을 발휘하기 위해, 필수 영양소인 철분을 숙주로 부터 획득하기 위한 고도의 친화력을 갖는 철분 획득 기전들을 소유하고 있다. 본 연구는 hemin 의존성을 갖는 치주질환 주요병원균주인 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, 그리고 *P. nigrescens*의 hemin 결합 세포막 단백질의 특성을 비교 분석하기 위해 수행되었다.

본 연구에서는 hemin이 고갈된 상태인 passage 5의 *P. gingivalis*에서 약 24 kDa (unheated 30 kDa), 그리고 passage 5의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서는 약 50 kDa의 단백질 밴드가 현저히 강화되어 발현되었다. Smalley 등³⁰⁾과 Bramanti와 Holt³⁸⁾는 몇몇 치주질환 병원 균주에서의 hemin 조절 세포막 단백질이 hemin 결합 단백질로서의 역할을 수행할 수 있음을 보고한 바 있다. 이에 *P. gingivalis*에서 24 kDa (unheated 30 kDa) hemin 조절 단백질, 그리고 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서의 50 kDa hemin 조절 단백질은 이들 균주에서의 hemin 결합에 관여하

는 단백질로 추정할 수 있다. 또한, 본 연구에서는 passage 5의 *P. gingivalis*의 30 kD 세포막 단백질에서 hemin-associated peroxidase activity를 확인하였다. 이는 *P. gingivalis*의 경우 30 kD 세포막 단백질이 hemin 결합에 실질적으로 간여함을 의미한다.

본 연구에서 분리된 *P. gingivalis*의 24 kDa (unheated 30 kDa) hemin 결합 단백질, 그리고 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 50 kDa hemin 결합 추정 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, *P. intermedia*의 50 kDa hemin 결합 추정 단백질은 *Streptococcus intermedius*의 Enolase와 아미노산 서열이 일치하였으며, *P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합 단백질과 *P. nigrescens*의 50 kDa hemin 결합 추정 단백질은 기존의 보고된 단백질과 상동성을 갖지 않는 새로운 단백질로 추정된다.

본 연구는, hemin 의존성을 갖는 치주질환 주요

병원균주인 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, 그리고 *P. nigrescens*에서의 hemin 조절 세포막 단백질로, hemin 결합에 관여하여 이들 균주에서의 hemin 획득에 중요한 역할을하는 것으로 추정되는 단백질을 확인하여 순수분리하고 몇몇 특성을 비교 분석한 최초의 보고로 사료된다. 향후, 이 단백질에 대한 보다 심도있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

V. 결론

본 연구는 hemin 의존성을 갖는 치주질환 주요 병원균주인 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, 그리고 *P. nigrescens*의 hemin 결합 세포막 단백질의 특성을 비교 분석하기 위해 수행되었다. 본 연구에서는 hemin이 고갈된 상태인 passage 5의 *P. gingivalis*에서 약 24 kDa (unheated 30 kDa), 그리고 passage 5의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*에서는 약 50 kDa의 hemin 조절 세포막 단백질이 확인되었으며, 이들은 hemin 결합에 관여하는 것으로 추정된다. *P. gingivalis*의 30 kD 세포막 단백질에서는 hemin-associated peroxidase activity가 확인되었다. N-terminal 아미노산 서열을 분석한 결과에 의하면, *P. intermedia*의 50 kDa hemin 결합 추정 단백질은 *Streptococcus intermedius*의 Enolase와 아미노산 서열이 일치하였으며, *P. gingivalis*의 24 kDa hemin 결합 단백질과 *P. nigrescens*의 50 kDa hemin 결합 추정 단백질은 기존의 보고된 단백질과 상동성을 갖지 않는 새로운 단백질로 추정된다.

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 Wiley & 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 *Hemophilus 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 *Haemophilus 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 *Haemophilus 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 *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166:1146-1154.
39. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979;6:278-307.
40. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986;13:570-577.
41. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
42. Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, Genco RJ. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1983;54:557-562.
43. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodont Res* 1980;15: 111-122.
44. 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.
45. 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.
46. 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 se-

- lected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2383-2388.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-685.
54. 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.
55. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.

Isolation and Partial Characterization of Hemin-binding Cell Envelope Proteins from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*

Sung-Jo Kim

Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

The results of this study confirm that the availability of hemin influences the expression of selected membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*. A 30 kDa (heated 24 kDa) hemin-binding protein whose expression is hemin regulated was identified and purified in *P. gingivalis*. A strong hemin-binding function was found by LDS-PAGE and TMBZ staining when *P. gingivalis* cells were grown under hemin-limited conditions. A 50 kDa cell envelope associated protein, whose expression is hemin regulated, is considered to be a putative hemin binding protein from *P. intermedia* and *P. nigrescens*, respectively. N-terminal amino acid sequence analysis of CNBr-digested 24 kDa hemin binding protein from *P. gingivalis* revealed that this protein belongs to a new, so far undescribed hemin-binding class of proteins. N-terminal amino acid sequence of a 50 kDa putative hemin binding protein from *P. intermedia* was identical with Enolase from *Streptococcus intermedia*. Work is in progress to further characterize the molecular structure of these proteins.

Key words : Hemin, Cell envelope proteins, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*