*2006*년 *2*월 박사학위논문

> 한국인의 정상 치주조직 및 치주질환 병소의 치면세균막에서 Fusobacterium nucleatum의 발현빈도 비교

> > 조선대학교대학원

치의학과

김 화 숙

한국인의 정상 치주조직 및 치주질환 병소의 치면세균막에서 Fusobacterium nucleatum의 발현빈도 비교

Comparison of the frequency of Fusobacterium nucleatum in dental plaque between healthy region and periodontitis lesion

2006년 2월 24일

조선대학교대학원

치의학과

김 화 숙

한국인의 정상 치주조직 및 치주질환 병소의 치면세균막에서 Fusobacterium nucleatum의 발현빈도 비교

지도교수 국 중 기

이 논문을 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조선대학교대학원

치의학과

김 화 숙

김화숙의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 <u>박 주 철 (인)</u> 위원 조선대학교 교수 <u>김 동 기 (인)</u> 위원 전남대학교 교수 <u>강 인 철 (인)</u>

위원 조선대학교 교수 <u>김 홍 중 (인)</u>

위원 조선대학교 교수 국 중 기 (인)

*2005*년 *12*월 일

조선대학교대학원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
영문초록 (ABSTRACT)	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 연구대상	4
2. 치면세균막 채취 및 <i>F. nucleatum</i> 의 배양	4
3. <i>F. nucleatum</i> 의 유전체 DNA 추출 및 핵산염기서열 결정	5
4. 생화학 검사	8
5. <i>F. nucleatum</i> 종-특이 PCR 프라이머의 특이도 평가	8
Ⅲ. 연구결과	10
IV. 총괄 및 고안	31
V. 결론	36
참고문헌	38

표 목 차

Table 1.	The primers used for the 16S rDNA sequencing	1
Table 2.	Isolation and identification of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. periodonticum</i> based on 16S rDNA sequences from dental plaques	11
Table 3.	Identification of <i>F. nucleatum</i> based on the nucleotide sequence of Fu4 DNA probe-like sequence at the subspecies level	24
Table 4.	Detection frequency of <i>F. nucleatum</i> isolated from subgingival plaques according to the degree of diseases of periodontal tissue	27

도 목 차

Fig. 1.	Phylogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequences of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. periodonticum</i> strains isolated	
	from subgingival plaque of Koreans	14
Fig. 2.	Nucleotide sequence of Fu4 DNA probe, derived from the <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 ^T , is composed of partial 5'dUTPase and zinc protease genes.	16
Fig. 3.	Phylogram derived from homology analysis from the Fu4 DNA probe-like sequences of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. periodonticum</i> strains isolated from subgingival plaque of Koreans	17
Fig. 4.	Phylogram derived from homology analysis from the partial sequences of 5'dUTPase gene of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. periodo-nticum</i> strains isolated from subgingival plaque of Koreans	19
Fig. 5.	Phylogram derived from homology analysis from the partial sequences of zinc protease gene of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. perio-donticum</i> strains isolated from subgingival plaque of Koreans	21
Fig. 6.	Detection frequency of <i>F. nucleatum</i> and <i>F. periodonticum</i> isolated from subgingival plaques according to the degree of disease of periodontal tissue	28
Fig. 7.	Specificity test of Fu4-F38 and Fu4-R1189 primers. Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates	30

ABSTRACT

Comparison of the frequency of Fusobacterium nucleatum in dental plaque between healthy region and periodontitis lesion

Kim, Hwa-Sook, B.Sc., M.S.D.

Advisor: Prof. Kook, Joong-Ki, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Fusobacterium nucleatum is a gram-negative anaerobic rod implicated in the pathogenesis of periodontal diseases. F. nucleatum has five subspecies and the genetic- and phenotypic-characteristics are variable among the subspecies. These observations suggest that the detection frequency of subspecies of F. nucleatum might be different according to the degree of periodontal diseases. The purpose of this study was to investigate the distribution of subspecies of F. nucleatum in the subgingival plaques from the periodontal healthy region and periodontitis (gingivitis, periodontitis, and periimplantitis) lesion. In addition, we evaluate the specificity of Fu4-F38 and Fu4-R1189 primers, introduced in Shin (PhD paper in Graduate School of Chosun University, 2005), whether they can be useful in the detection and identification of F. nucleatum. The subgingival plaques from total 346 tooth sites (113 persons) were collected; 88 tooth sites (44 persons) of healthy region, 193 sites (36 persons) of gingivitis lesion, 45 sites (22 persons) of periodontitis lesion, and 22 sites (11 persons) of periimplantitis subjects. The identification of the isolates, growing on the F. nucleatum-selective media, at the species level by 16S rDNA sequencing comparison method. For the identification of the F. nucleatum at

the subspecies level, Fu4 DNA probe-like region were amplified from the genomic DNAs of clinical isolated from the subgnigival plaques and sequences of them. The species-specificity of the Fu4-F38 and Fu4-R1189 primers to the F. nucleatum were evaluated by PCR with the genomic DNAs from 7 other Fusobacterium species. The 56 strains of F. nucleatum and 7 strains of F. periodonticum were isolated from the subgingival plaques. The five subspecies of F. nucleatum exhibited relatively high levels of sequence similarity(the hemology range is 97.8 to 99.7%) by 16S rDNA sequences. On the other hand, the Fu4 DNA probe-like sequences were significantly different among the subspecies of F. nucleatum (the hemology range is 89.7 to 99.0%). F. nucleatum subsp. vincentii/fusiforme was associated with healthy region and both F. nucleatum subsp. nucleatum and F. nucleatum subsp. animalis were associated with periodontitis lesion. The PCR data showed that Fu4-F38 and Fu4-R1189 primers were specific to the F. nucleatum. These results suggest that distribution of 5 subspecies of F. nucleatum were different in the according to the degree of periodontal diseases. In the further, study, new methodology must be developed to the detection of F. nucleatum at the subspecies level and try to reinvestigate the detection frequency of subspecies of F. *nucleatum* with the more samples.

I. 서론

치주질환은 치석과 치면세균막 내 치주병인균에 의한 만성 세균 감염성 질환이다. 그리고 치주질환은 성인에 있어서 연령이 증가함에 따라 일반적으로 증가하는 경향을 보이며 치아상실의 주원인으로서 치은염증과 치아주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성이 특징적으로 나타난다⁶⁾. 구강 내에는 약 700여종 이상의 세균 종이 존재하고 있고, 이들의 절반 이상이 현재 분리 배양되지 않은 상태이다²³⁾. 특히 구강 내 치면세균막에 존재하는 여러 세균들 중에서 Fusobacterium nucleatum, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia(Bacteroides forsythus), Prevotella intermedia, Eubacterium nodatum, Treponema spp., Streptococcus intermedius, Peptostreptococcus micros, Eikenella corrodens 및 Eubacterium spp. 등은 치주질환과 높은 상관관계를 갖는 것으로 보고 되었다¹⁸⁾.

이 중 *F. nucleatum*은 그람음성의 비아포형성 및 비운동성을 지닌 편성 혐기성 간 균^{37,38)}으로 구강 내 치면세균막에 존재하는 *F. periodonticum*과 유사한 표현형을 가지 며^{4,49)}, 치은염과 치주염 병소부위 뿐만아니라 건강한 치은열구나 성공적으로 치료된 비활성부위의 치은열구에서도 검출 빈도가 높고^{10,18)} 많은 세균수가 존재하며, 치주질환의 발생 및 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{8,11,12,36,40,43,44,50,52)}. 또한이 세균 종은 구강 내 대부분의 세균과 응집할 수 있어서 치면세균막의 초기 및 후기집락화하는 세균 종들을 연결시켜 주는 연결고리 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 그리고 *Fusobacterium*는 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *A. actinomycetemcomitans* 및 *Treponema* spp.^{19,28)} 등을 포함한 다양한 그람음성 세균종과 서로 응집하여 존재하는 것으로 보고되었다²⁵⁻²⁷⁾.

Dzink 등⁹⁾은 DNA homology법과 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)법을 이용하여 *F. nucleatum* 종 내에서 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* 및 *F. nucleatum* supsp. *vincentii*라고 명명한 세 가지 그룹을 분류하였다. Gharbia와 Shah¹³⁻¹⁶⁾는 세포 또는 군락 모양 그리

고 2-oxoglutarate reductase(OGR)와 glutamate dehydrogenase(GDH) 효소들의 전기 영동패턴을 사용하여 *F. nucleatum*을 4가지 아종 *nucleatum, polymorphum, fusiforme* 및 *animalis*로 분류하였다. 그리고 Lawson 등^{32,33)}은 리보솜 RNA 유전자 restriction pattern을 이용하여 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum, F. nucleatum* subsp. *nucleatum, F. nucleatum* subsp. *fusiforme* 및 *F. nucleatum* supsp. *animalis*을 동정하고, 4가지 아종에 대한 표준균주를 구별하였다.

F. nucleatum 중 내에는 nucleatum, polymorphum, vincentii, fusiforme 및 animalis 등 다양한 아종이 존재하기 때문에 이들 중 어떤 아종이 치주질환의 발병 및 진행에 좀 더 연관성이 있는 지에 대한 연구 결과가 보고되었다 16,17 . Gharbia 등 16,17 은 사람의 치주 상태에 따른 F. nucleatum 아종의 분리 빈도 연구에서 치주질환 부위는 F. nucleatum subsp. nucleatum의 빈도가 높게 나타났고, 건강한 치은 부위에서는 F. nucleatum subsp. polymorphum이 높게 나타났다고 보고하였다. 하지만 이들의 연구는 단지 F. nucleatum 3가지 아종에 대해서만 발현 빈도를 보았고, 샘플수도 적었기 때문에 치주질환의 발병 및 진행정도에 따른 F. nucleatum 아종간의 상관관계를 결정하기에는 무리가 있는 것으로 보았다 46 .

치주질환과 관련이 깊은 세균 종을 동정하기 위한 방법으로 21 alloenzyme법과 immunoenzymatic assay, 단백질 전기영동법 및 DNA-DNA hybridization법들이 이용되었지만, 이러한 방법들을 이용할 경우 교차반응과 위양성(false-positive) 결과가 나타났다^{2,7)}. 현재 계통분류학적 측면에서 세균을 종 수준으로 분류하는 데 있어 기준이되는 방법은 16S rRNA 유전자(rDNA) 염기서열비교법이다^{1,22,34,41,51)}. 그리고 치은연하치면세균막에서 치주질환 원인균을 검출하기 위한 가장 효과적인 방법이 세균의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 설계된 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응 (PCR; polymerase chain reaction)법이라고 보고되었다⁴⁸⁾.

최근 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*을 검출 및 동정할 수 있는 DNA 프로브(Fu4; *F. nucleatum* ATCC 25586^T로부터 클로닝됨)가 개발되어 소개되었다²⁹⁾. Fu4 DNA 프로브 염기서열 내에는 5'dUTPase 유전자의 5'-말단부와 아연 단백가수분해 효소(zinc protease) 유전자의 3'-말단부 일부가 존재하였다. 신⁵³⁾은 Fu4 DNA 프로브 염기서열

을 바탕으로 Fu4-F38과 Fu4-R1189라고 명명된 PCR 프라이머 쌍을 이용하여 *F. nucleatum* 5 가지 아종의 유전체 DNA로부터 PCR 증폭물을 얻고, 이들의 핵산염기서열을 결정하여 *F. nucleatum*을 아종-수준으로 동정하려는 시도를 하였다. 신⁵³⁾은 그의연구에서 Fu4-F38과 Fu4-R1189 프라이머를 이용하여 *F. nucleatum* ATCC 25586^T이외의 균주 유전체 DNA로부터 클로닝된 PCR 증폭산물을 'Fu4 DNA 프로브 유사 부위'('Fu4 DNA probe-like region')라고 소개하였다. 신⁵³⁾은 *F. nucleatum* 아종에 대한표준균주들의 유전체 DNA만을 이용하여 Fu4-F38과 Fu4-R1189 PCR 프라이머 쌍이 *F. nucleatum*에 대한 종-특이성이 있다고 소개하였지만, 본 연구자의 예비 실험 결과신⁵³⁾이 제시한 PCR 조건에서는 *F. periodonticum* 유전체 DNA도 증폭됨을 알게 되었다. 따라서 Fu4-F38과 Fu4-R1189 PCR 프라이머 쌍의 *F. nucleatum*에 대한 종-특이성을 갖는 PCR 조건을 찾을 필요성이 있었다.

그러므로 본 연구는 한국인의 건강한 치주조직과 치주질환 병소의 치은연하 치면세 균막에 존재하는 *F. nucleatum*을 아종 수준으로 동정하여 치주질환 진행에 있어서 가장 밀접한 연관성이 있는 아종을 밝히고자 시행되었다. 또한 Fu4-F38과 Fu4-R1189 PCR 프라이머 쌍의 *F. nucleatum*에 대한 종-특이성을 *F. nucleatum*과 유전학적으로 가까운 세균 종의 유전체 DNA를 이용하여 평가하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구대상

조선대학교 치과대학 재학생 및 치과대학에 근무하는 연구원 중 치주조직이 건강한 사람 44명과 조선대학교 치과병원 예방치과 및 치주과에 치은염, 치주염, 또는 매식치아주위염(periimplantitis)의 치료를 받기 위해 내원한 환자 각각 36, 22, 11명씩을 대상(상·하악 전치부 및 구치부를 선별)으로 하였다. Gingival index(GI; 치은지수), pocket depth(PD; 치주낭 깊이), bleeding on probing(BOP; 탐침시 자발 출혈), attachment loss(AL; 부착소실), 방사선 사진에서의 치조골 파괴 존재 유무 등의 임상적 검사를 실시하여 Jin 등²¹⁾의 판정 기준을 바탕으로 건강한 치주조직을 가지고 있는 부위, 치은염 부위, 치주염 부위로 나누었다.

- 1. 건강한 부위: GI≤1 mm, PD≤3 mm, BOP(-), AL≤1.0 mm, bone loss(-)
- 2. 치은염 부위: GI≥2 mm, PD≤4 mm, BOP(+), AL≤1.0 mm, bone loss(-)
- 3. 치주염 부위: PD≥5 mm, BOP(+), AL≥3.0 mm, bone loss(+) 판정이 명확하지 않을 경우에는 본 실험에서 제외하였다.

2. 치면세균막 채취 및 F. nucleatum의 배양

작각의 병소부위에서 치면세균막을 멸균된 paper point를 이용하여 채취한 뒤 reduced transfer fluid 1 째에 담고, 이를 즉시 실험실로 옮겨 혐기성 세균 배양기 안에서 1×PBS로 10,000배 희석한 다음 멸균된 면봉을 이용하여 *F. nucleatum*에 대한 고형 선택배지(1% trytic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 1.5% Bacto agar, 5% defibrinized sheep blood, 4 μg/ml erythromycin, 5 μg/ml crystal violet)에 도말하였다. 37℃ 혐기성배양기(85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂, Model Bactron I, Cornelius, OR, USA)에서 2~3일 동안 배양하여 crystal violet에 의해 보라색을 띄는 군락을 선택하여 erythromycin이 함유된 schaedler 배지에 접종하여 37℃ 혐기성 세균배양기에서 2~3일 동안 배양하여 다음의 실험에 사용하였다.

3. F. nucleatum의 유전체 DNA 추출 및 핵산염기서열 결정

3-1. F. nucleatum의 유전체 DNA 추출

Genomic DNA는 Lippke 등³⁵⁾의 방법에 따라 추출하였다. 이를 간략히 설명하면 다음과 같다. 각각의 세균은 35 配의 액체배지에서 배양하였고, 10분간 원심분리(7,000 × g)하여 세균의 펠릿을 얻었다. 펠릿에 lysis buffer[5 M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 2% S-lauryl sarcosinate, 140 mM 2-mercapto ethanol]를 넣고 잘 현탁한 후에 통법의 phenol/chloroform 추출법과 에탄올 침전법을 이용하여 유전체 DNA를 얻었다. DNA 농도는 UV spectrophotometry(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)로 260 nm에서 정량하였다.

3-2. PCR을 이용한 16S rDNA 및 Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 증폭

Fusobacterium 종을 16S rDNA 종-특이 PCR 프라이머²⁴⁾(All-F6; 5'-CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT-3', Fn-R6; 5'-TTG CTT GGG CGC TGA GGT TC-3')를 이용하여 선택배지에 자라난 균주가 *F. nucleatum*인지를 동정하였다. *AccuPower*® Premix[5 nmole deoxynucleoside triphosphate, 0.8 umole KCl, 0.2 umole Tris-HCl(pH 9.0), 0.03 umole MgCl₂, 1 unit *Taq* DNA polymerase](Bioneer Co., Seoul, Korea)에 20 雌의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 씩의 All-F6 및 Fn-R6 프라이머와 100 pg의 세균 유전체 DNA를 넣고, PTC-200 PCR machine(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR의 조건은 94℃에서 2분간 predenaturation 실시한 후, 94℃에서 1분간 denaturation, 65℃에서 30 초간 annealing, 72℃에서 45초간 extension 단계를 30회 반복한 후, final extension을 위해 72℃에서 10분간 시행하였다. 배양한 세균이 *F. nucleatum*이 맞는지를 2 雌씩 1.5% 아가로스 젤에 로딩하여 100 V에서 15분간 전기영동하여 그 증폭산물를 확인하였다.

16S rDNA 종-특이 PCR 결과 *F. nucleatum*으로 확인된 세균는 16S rDNA를 증폭할 수 있는 universal PCR 프라이머(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC

AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR의 조건은 94℃에서 2분간 predenaturation을 실시한 다음 9 4℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 과정을 30회 반복하여 시행하고, 마지막 extension을 72℃에서 10분간 시행하여 16S rDNA를 증폭하였다.

모든 *F. nucleatum*으로부터 Fu4 DNA 프로브 유사부위를 증폭할 수 있도록 Fu4 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 PCR 프라이머 ⁵³⁾(Fu4-F38; 5'-TTC TCC TCT ATA ATC ACT GTC AAC-3', Fu4-R1189; 5'-GTA TAG AAA AAG AAA GAA ATG TGA-3')를 이용하여 *AccuPower®* Premix(Bioneer Co., Seoul, Korea)에 20 雌의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 씩의 Fu4-F38 및 Fu4-R1189 프라이머와 100 pg의 세균 유전체 DNA를 넣고, PTC-200 PCR machine(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR의 조건은 95℃에서 2분간 predenaturation 실시한 후, 95℃에서 1분간 denaturation, 50℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 단계를 30회 반복하여 증폭한 다음 final extension을 72℃에서 10분간 실시하였다. 최종 반응물 중 2 μ씩 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하여 그 증폭산물을 확인하여 결정하였다.

3-3. 증폭된 16S rDNA 및 Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 클로닝 및 플라스미드 추출

앞에서 증폭한 16S rDNA와 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자의 일부를 포함하고 있는 Fu4 DNA 프로브 유사부위를 pGEM-T easy vector(Promega Corp., Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, $E.\ coli$ DH5a에 형질전환하였다. 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법 47 으로 $AccuPrep^{TM}$ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 즉, 세균배양액 1 때를 30초간 원심분리($12,000 \times g$)하고, 얻어진 세균 덩어리에 $250\ \mu$ 의 resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, $250\ \mu$ l lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, $350\ \mu$ l의 neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 10분간 원심분리($12,000 \times g$)하였다. 여과액은 버리고,

binding column tube에 80% 에탄올 700 μ l를 넣은 후 1분간 원심분리(12,000 × g)하였다. binding column tube에 남아 있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 3분간 원심분리(12,000 × g)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μ l의 elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 1분간 원심분리(12,000 × g)하여 여과액을 -20 $^{\circ}$ 에서 보관하여 핵산염기서열 결정(Bioneer Co., Seoul, Korea)에 사용하였다.

3-4. 증폭된 16S rDNA 및 Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 핵산염기서열 결정

16S rDNA 핵산염기서열 결정을 위해서 5 가지의 시퀀싱 프라이머를 이용하였다 (Table 1). 또한 Fu4 DNA 프로브 유사부위의 핵산염기서열은 ChDC-GEM-F(5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAAAA-3'), ChDC-GEM-R(5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3') 및 All-Fu4-Seq1(5'-TAT CTC CTA CTA TTG TTT GTG A-3') 프라이머를 이용하 여 결정하였다. 결정된 핵산염기서열을 하나의 contig로 assemble하기 위해 SeqMan 프로그램(Version 5.0; DNASTAR, Inc., Maidison, WI, USA)을 이용하여 분석하였고, 16S rDNA 핵산염기서열은 GenBank의 데이터 베이스를 통하여 상동성 검색을 하여 기존에 알려진 F. nucleatum의 16S rDNA의 염기서열과 98%이상 상동성을 보이는 것 만 사용하였다.

Table 1. The primers used for the 16S rDNA sequencing

Name of Primers	Oligonucleotide sequences (5'→3')
ChDC-GEM-F	TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA
Seq-F1	CCT ACG GGA GGC AGC AG
Seq-R2	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC
Seq-F16	TAG ATA CCC YGG TAG TCC
ChDC-GEM-R	GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC

4. 생화학 검사

선택배지에서 배양된 세균의 색깔과 모양을 관찰하여 F. nucleatum이라 생각되는 군락을 선택하여 indole test와 catalase test 및 esculin test를 시행하였다.

4-1. Indole test

F. nucleatum에 대한 선택배지(0.05% L-tryptophan이 함유됨)에서 자란 보라색의 원형 세균 군락을 멸균된 이쑤시개로 따서 100 μℓ의 Kovács 제재를 떨어 트린 Whatman No. 2 paper에 문지른 다음 2분 내에 파란색 또는 녹색 색깔을 나타낼 때 양성(+)으로, 아무런 색깔 변화가 없으면 음성(-)으로 판정하였다.

4-2. Catalase test

선택배지에서 72시간 배양한 F. nucleatum 세균 군락을 조심히 멸균된 백금이로 떼어낸 다음, 이를 3% 과산화수소 (H_2O_2) 에 넣어 산소가 발생할 경우 양성(+), 아무런 변화가 없는 경우 음성(-)으로 판정하였다.

4-3. Esculin test

이 실험은 esculin을 가수분해 할 수 있는 세균의 능력을 알아보기 위한 실험으로, 먼저 schadler broth에서 24시간 *F. nucleatum* 균주들을 배양하고, 이들 세균배양액 20 μ 를 0.05% ferric citrate, 0.5% sodium chloride 및 0.1% esculin이 혼합된 schadler broth 200 μ 에 접종하여 48시간 동안 37℃ 혐기성 세균배양기에서 배양하여 색깔의 변화를 관찰하였다. 이때 검정색에 가까운 짙은 갈색을 띄면 양성(+)으로 판정 하였다.

5. F. nucleatum 종-특이 PCR 프라이머의 특이도 평가

Fu4 DNA 프로브 유사부위를 증폭할 수 있도록 Fu4 DNA 프로브의 핵산염 기서열을 바탕으로 설계된 *F. nucleatum* 종-특이 PCR 프라이머⁵³⁾(Fu4-F38; 5'-TTC TCC TCT ATA ATC ACT GTC AAC-3', Fu4-R1189; 5'-GTA TAG AAA AAG AAA GAA ATG TGA-3')를 이용하여 *F. nucleatum* 검출 및 동정을 위한 프라이머의 중-특이성을 알아보기 위하여 *F. nucleatum* 5가지 아종과 *F. canifelinum, F. periodonticum, F. necrophorum, F. naviforme, F. simiae 및 Leptotrichia buccalis* 표준균주 혹은 참고균주의 유전체 DNA를 주형으로 하여 PCR를 시행하였다. 그리고 Kim 등²⁴⁾이 개발한 *F. nucleatum*의 16S rDNA 종-특이 PCR 프라이머(All-F6; 5'-CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT-3', Fn-R6; 5'-TTG CTT GGG CGC TGA GGT TC-3')와 Avila-Campos 등³⁾이 개발한 *F. nucleatum* 종-특이 프라이머 FN5047(5'-CAA ATG CTT GTG TCA ATA ATA CT-3', 5'-TTT AGA AGA AAT GGT AGA ATA ATA ATA CT-3', 5'-ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G-3') 및 Külekçi 등³¹⁾이 개발한 프라이머(FnF; 5'-CTA AAT ACG TGC CAG CAG CC-3', FnR; 5'-CGA CCC CCA ACA CCT AGT AA-3')와 *F. nucleatum* 종-특이성을 비교하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 16S rDNA 염기서열비교법을 통한 F. nucleatum의 동정

총 113명의 346개 치아를 대상으로 하여 얻은 치은연하 치면세균막을 *F. nucleatum* 선택배지에서 배양하여 39명으로부터 *F. nucleatum*이라고 여겨지는 보라색을 띄는 세균 군락 334 균주를 얻었다. 이 334 균주는 *Fusobacterium* 종-특이 프라이머를 이용하여 PCR를 시행하였다. PCR 결과 양성반응을 보인 108 균주는 16S rDNA를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 다음 GenBank의 데이터 베이스를 이용하여 상동성 검사를 한 결과, 98% 이상의 상동성을 갖는 56 균주의 *F. nucleatum*과 7 균주의 *F. periodonticum*을 얻을 수 있었다(Table 2와 Fig. 1).

Fusobacterium의 표준균주와 임상에서 분리 동정한 균주를 16S rDNA 핵산염기서 열을 이용하여 phylogram을 실시하여 세균 종을 그룹화한 결과 한국인에서 분리한 일부의 F. nucleatum 균주들에서 F. nucleatum 5 가지 아종 그룹과 F. periodonticum 그룹 이외에 여러개의 새로운 그룹이 형성되었다(Fig. 1).

Table 2. Isolation and identification of *F. nucleatum* and *F. periodonticum* based on 16S rDNA sequences from dental plaques

	Patient No.	Tooth site (#)	Strains	Species
Normal	예방 4	44	ChDC* F47 ¹⁾	F. nucleatum
	예방 5	35	ChDC F8 ¹⁾	F. nucleatum
	Seong 3	36	ChDC F119 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 25	36	$ChDC\ F288^{3)}$	F. nucleatum
		44	$ChDC\ F289^{2)}$	F. nucleatum
			ChDC F290 ²⁾	F. nucleatum
	학생 20	16	ChDC F300 ³⁾	F. nucleatum
	학생 21	16	ChDC F302 ³⁾	F. nucleatum
		36	ChDC F309 ³⁾	F. nucleatum
	학생 24	16	ChDC F304 ³⁾	F. nucleatum
		24	ChDC F305 ²⁾	F. nucleatum
	학생 26	16	ChDC F306 ³⁾	F. nucleatum
	학생 35	46	ChDC F324 ³⁾	F. nucleatum
	학생 36	36	ChDC F326 ³⁾	F. nucleatum
	학생 40	46	ChDC F330 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F331 ³⁾	F. nucleatum
	학생 44	35	ChDC F334 ³⁾	F. periodonticum

^{*}ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University $^{1)}$, Jang *et al.*, $2003^{20)}$; $^{2)}$, 신, $2005^{53)}$; $^{3)}$, In this study,

Table 2. (Continued in previous page)

	Patient No.	Tooth site (#)	Strains	Species
Gingivitis	예방 4	35	ChDC* F37 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC F38 ¹⁾	F. nucleatum
	예방 20	34	ChDC PV-F37 ¹⁾	F. nucleatum
	예방 21	15	$ChDC\ PV\text{-}F42^{1)}$	F. nucleatum
			ChDC PV-F45 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F46 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F55 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F58 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F61 ¹⁾	F. nucleatum
	Seong 1	44	ChDC F113 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 5	41	ChDC F145 ³⁾	F. nucleatum
	Seong 6	44	ChDC F165 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 8	16	ChDC F171 ³⁾	F. periodonticum
	Seong 9	41	ChDC F174 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F175 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 10	36	ChDC F186 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 13	44	ChDC F206 ³⁾	F. nucleatum
	Seong 16	41	ChDC F218 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F219 ²⁾	F. nucleatum
	Seong 22	36	ChDC F267 ³⁾	F. periodonticum
	Seong 25	21	ChDC F286 ³⁾	F. nucleatum
	예방 P2	14	ChDC F310 ³⁾	F. nucleatum
		36	ChDC F311 ³⁾	F. nucleatum
		37	ChDC F312 ³⁾	F. periodonticum

*ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University $^{1)}$, Jang *et al.*, $2003^{20)}$; $^{2)}$, $\[\]$, $2005^{53)}$; $^{3)}$, In this study,

Table 2. (Continued in previous page)

	Patient No.	Tooth site (#)	Strains	Species
Periodontitis	예방 21	26	ChDC* PV-F48 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F49 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F53 ¹⁾	F. nucleatum
		43	ChDC PV-F63 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F65 ¹⁾	F. nucleatum
			ChDC PV-F67 ¹⁾	F. nucleatum
	Seong 4	16	ChDC F128 ³⁾	F. nucleatum
		21	ChDC F130 ²⁾	F. nucleatum
		44	ChDC F134 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F136 ³⁾	F. nucleatum
	치주 P8	26	ChDC F317 ³⁾	F. nucleatum
	치주 P11	23	ChDC F318 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F319 ³⁾	F. nucleatum
	치주 P12	36	ChDC F320 ³⁾	F. periodonticum
	치주 P13	47	ChDC F321 ³⁾	F. periodonticum
	서정 1		ChDC F332 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F333 ³⁾	F. nucleatum
Perimplantitis	치주 PI9	46	ChDC F313 ³⁾	F. nucleatum
			ChDC F314 ³⁾	F. periodonticum
	치주 PI10		ChDC F315 ³⁾	F. nucleatum
	치주 PI11	38	ChDC F316 ³⁾	F. nucleatum
	치주 PI22	46	ChDC F335 ³⁾	F. nucleatum

^{*}ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

1), Jang *et al.*, 2003²⁰⁾; ²⁾, 신, 2005⁵³⁾; ³⁾, In this study,

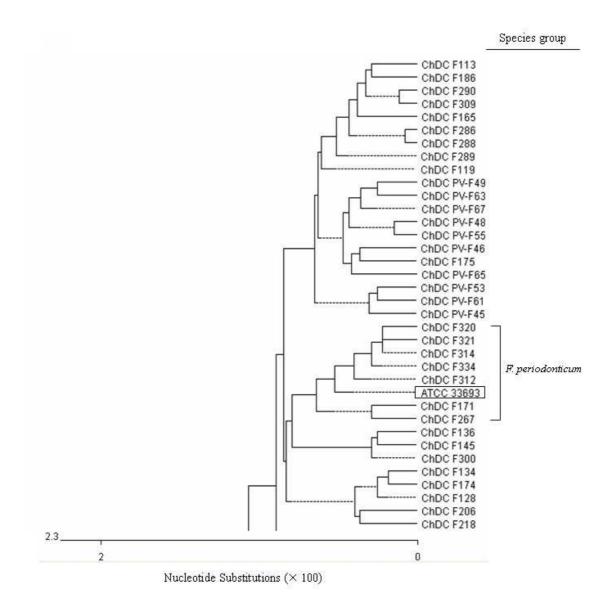


Fig. 1. Phylogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequences of *F. nucleatum* and *F. periodonticum* strains isolated from subgingival plaque of Koreans.

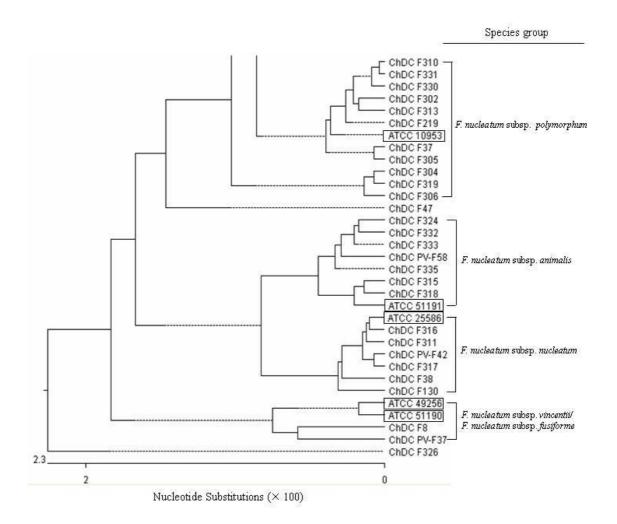
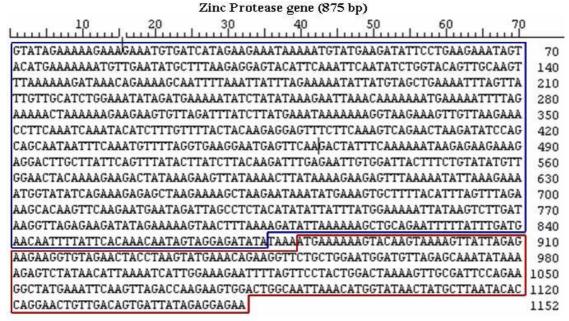


Fig. 1. (Continued in previous page)

2. Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 핵산염기서열 분석

Fu4 DNA 프로브 유사 부위는 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자의 일부분으로 구성되어있다. Fu4 DNA 프로브의 핵산염기서열을 바탕으로 그 위치를 보면 Fig. 2와 같다.

Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 핵산염기서열(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자)을 바탕으로한 phylogram 결과는 97% 이상의 상동성을 기준으로 하여 *F. nucleatum* 아종간의 그룹화를 하였다. 이 때 Fu4 DNA 프로브 유사 부위의 핵산염기서열은 16S rDNA 핵산염기서열(Fig. 1) 결과에 비해 *F. nucleatum* 5 가지 아종간의 상이성이 더 컸다. 특히 5'dUTPase 유전자 핵산염기서열 분석 결과는 아종간의 상이 가장 컸다(Fig. 3-5).



5'dUTPase gene (273 bp)

Fig. 2. Nucleotide sequence of Fu4 DNA probe, derived from the *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T, is composed of partial 5'dUTPase and zinc protease genes. The upper and lower boxes are the open reading frames of 5'dUTPase and zinc protease genes, respectively.

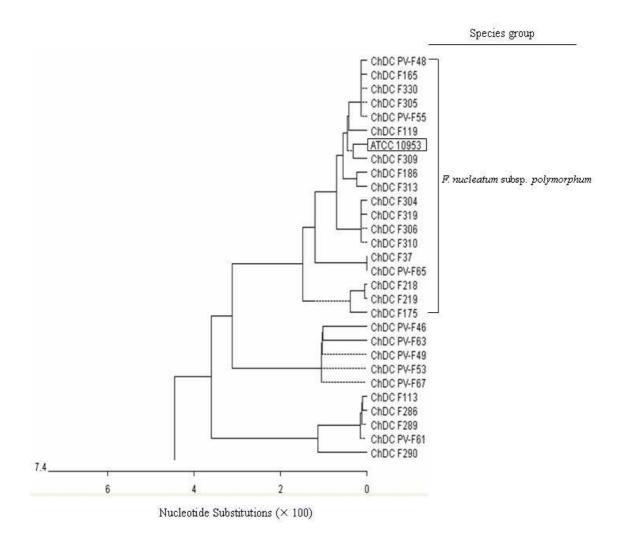


Fig. 3. Phylogram derived from homology analysis from the Fu4 DNA probe-like sequences of F. nucleatum and F. periodonticum strains isolated from subgingival plaque of Koreans.

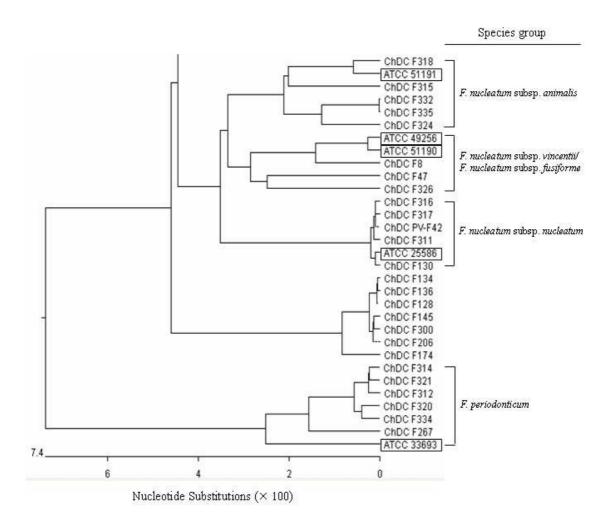


Fig. 3. (Continued in previous page)

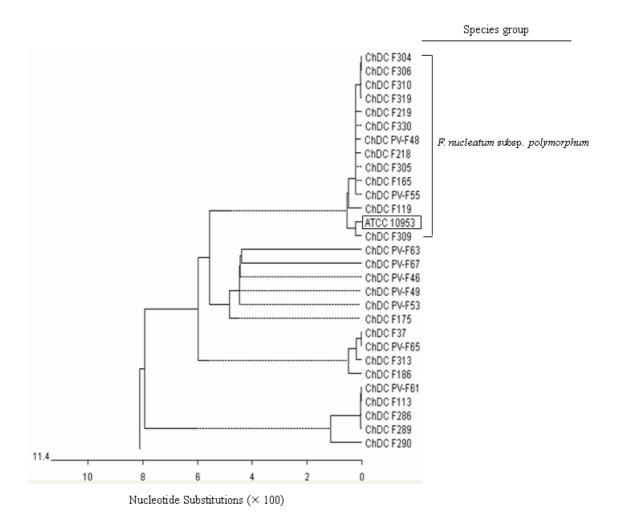


Fig. 4. Phylogram derived from homology analysis from the partial sequences of 5'dUTPase gene of F. nucleatum and F. periodonticum strains isolated from subgingival plaque of Koreans.

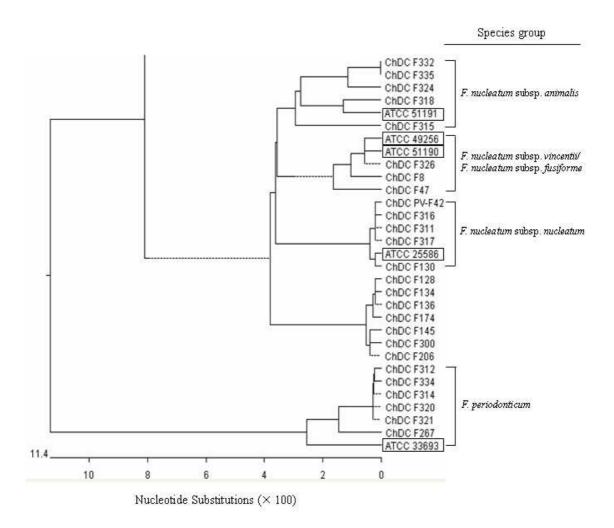


Fig. 4. (Continued in previous page)

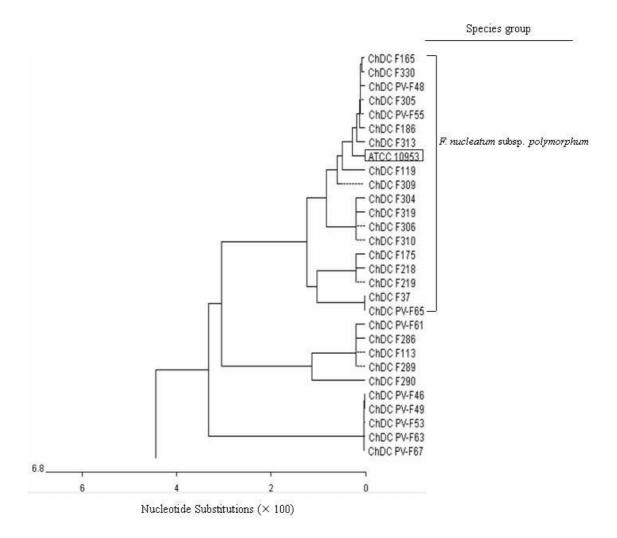


Fig. 5. Phylogram derived from homology analysis from the partial sequences of zinc protease gene of *F. nucleatum* and *F. periodonticum* strains isolated from subgingival plaque of Koreans.

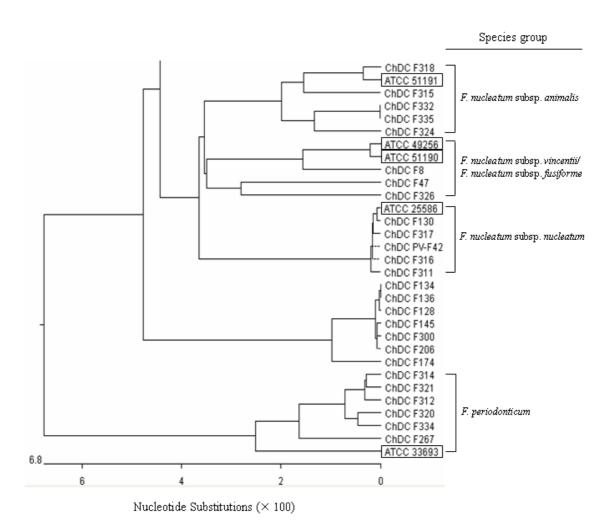


Fig. 5. (Continued in previous page)

3. 치주상태에 따른 F. nucleatum 아종의 발현 빈도

Fu4 DNA probe 유사 부위 핵산염기서열을 바탕으로 각각의 치주조직의 건강상태에 따른 *F. nucleatum* 5가지 아종의 발현 빈도를 보면, *F. nucleatum* subsp. nucleatum 및 *F. nucleatum* subsp. animalis 균주의 경우 치주염과 매식치아주위염 부위에서, *F. nucleatum* subsp. vincentii/fusiforme은 건강한 치주조직에서 좀더 높은 검출 빈도를 보였다. 그러나 *F. nucleatum* subsp. polymorphum은 건강한 치주조직 뿐만아니라 치은염, 치주염 및 매식치아주위염 부위에서도 높은 검출 빈도를 보였다(Table 3과 Table 4, Fig. 6).

Table 3. Identification of F. nucleatum based on the nucleotide sequence of Fu4 DNA probe-like sequences at the subspecies level

	Patient No.	Tooth site (#)	Species or subspecies
Normal	예방 4	44	F. nucleatum subsp. vincentii/fusiforme ChDC* F47 ¹⁾
	예방 5	35	F. nucleatum subsp. vincentii/fusiforme ChDC F8 ¹⁾
	Seong 3	36	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F119 ²⁾
	Seong 25	36	ND** ChDC F288 ³⁾
		44	F. nucleatum(NI***) ChDC F289 ²⁾
			F. nucleatum(NI***) ChDC F290 ²⁾
	학생 20	16	F. nucleatum(NI***) ChDC F300 ³⁾
	학생 21	16	ND** ChDC F302 ³⁾
		36	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F309 ³⁾
	학생 24	16	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F304 ³⁾
		24	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F305 ²⁾
	학생 26	16	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F306 ³⁾
	학생 35	46	F. nucleatum subsp. animalis ChDC F324 ³⁾
	학생 36	36	F. nucleatum subsp. vincentii/fusiforme ChDC F326 ³⁾
	학생 40	46	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F330 ³⁾
			ND** ChDC F331 ³⁾

^{*}ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

^{**}ND, not determined

^{***}NI, did not identified at the subspecies level because the homology of the Fu4 DNA probe-like sequences was beyond the rage of 97%. $^{1)},$ Jang $\it et~al.,~2003^{20)};~^{2)},$ 신, $2005^{53)};~^{3)},$ In this study,

Table 3. (Continued in previous page)

	Patient No.	Tooth site (#)	Species or subspecies
Gingivitis	예방 4	35	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC* F37 ¹⁾
			ND** ChDC F38 ¹⁾
	예방 20	34	ND** ChDC PV-F37 ¹⁾
	예방 21	15	F. nucleatum subsp. nucleatum ChDC PV-F421)
			ND** ChDC PV-F45 ¹⁾
			F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F46 ¹⁾
			F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC PV-F55 ¹⁾
			ND** ChDC PV-F58 ¹⁾
			F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F61 ¹⁾
	Seong 1	44	F. nucleatum(NI***) ChDC F113 ²⁾
	Seong 5	41	F. nucleatum(NI***) ChDC F145 ³⁾
	Seong 6	44	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F165 ²⁾
	Seong 8	16	ND** ChDC F171 ³⁾
	Seong 9	41	F. nucleatum(NI***) ChDC F174 ³⁾
			F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F175 ²⁾
	Seong 10	36	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F186 ²⁾
	Seong 13	44	F. nucleatum(NI***) ChDC F206 ³⁾
	Seong 16	41	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F218 ³⁾
			F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F219 ²⁾
	Seong 25	21	F. nucleatum(NI***) ChDC F286 ³⁾
	예방 P2	14	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F310 ³⁾
		36	F. nucleatum subsp. nucleatum ChDC F3113)

^{**}ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

^{**}ND, not determined

^{***}NI, did not identified at the subspecies level because the homology of the Fu4 DNA probe-like

Table 3. (Continued in previous page)

	Patient No.	Tooth site (#)	Species or subspecies		
Periodontitis	예방 21	26	$\it F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC* PV-F48^{1)}$		
			F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F49 ¹⁾		
			F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F53 ¹⁾		
		43	F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F63 ¹⁾		
			F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC PV-F65 ¹⁾		
			F. nucleatum(NI***) ChDC PV-F67 ¹⁾		
	Seong 4	16	F. nucleatum(NI***) ChDC F128 ³⁾		
		21	F. nucleatum subsp. nucleatum ChDC F130 ²⁾		
		44	F. nucleatum(NI***) ChDC F134 ³⁾		
			F. nucleatum(NI***) ChDC F136 ³⁾		
	치주 P8	26	F. nucleatum subsp. nucleatum ChDC F317 ³⁾		
	치주 P11	23	F. nucleatum subsp. animalis ChDC F318 ³⁾		
			F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F3193)		
	서정 1		F. nucleatum subsp. animalis ChDC F332 ³⁾		
			ND** ChDC F333 ³⁾		
Perimplantitis	치주 PI9	46	F. nucleatum subsp. polymorphum ChDC F313 ³⁾		
	치주 PI10		F. nucleatum subsp. animalis ChDC F315 ³⁾		
	치주 PI11	38	F. nucleatum subsp. nucleatum ChDC F316 ³⁾		
	치주 PI22	46	F. nucleatum subsp. animalis ChDC F335 ³⁾		

^{**}ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

^{**}ND, not determined

^{***}NI, did not identified at the subspecies level because the homology of the Fu4 DNA probe-like sequences was beyond the rage of 97%. 1), Jang *et al.*, 2003^{20} ; 2 , 4, 2005^{53} ; 3 , In this study,

Table 4. Detection frequency of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaques according to the degree of diseases of periodontal tissue (based on Fu4 DNA probe-like sequences)

Diagnosis (No. of total	Detection frequency No. of tooth site (No. of person)					
tooth site/ No. of total person)	Fnn	Fnp	Fnv/Fnf	Fna	NI*	Total
Normal (88/44)	0(0)	6(5)	3(3)	1(1)	2(2)	14(11)
Gingivitis (193/36)	2(2)	7(7)	0(0)	0(0)	6(6)	14(13)
Periodontitis (45/22)	2(2)	3(3)	0(0)	2(2)	4(2)	7(5)
Periimplantitis (22/11)	1(1)	1(1)	0(0)	2(2)	0(0)	4(4)

^{*}NI, did not identified at the subspecies level because the homology of the Fu4 DNA probe-like sequences was beyond the rage of 97%.

Fnn, F. nucleatum subsp. nucleatum; Fnp, F. nucleatum subsp. polymorphum; Fnv/Fnf, F. nucleatum subsp. vincentii/fusiform; Fna, F. nucleatum subsp. animalis

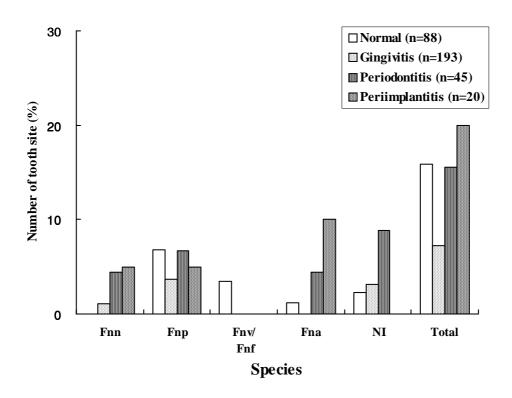


Fig. 6. Detection frequency of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaques according to the degree of diseases of periodontal tissue (based on Fu4 DNA probe-like sequences).

4. F. nucleatum의 생화학 검사

F. nucleatum 5가지 아종과 F. periodonticum에 대한 표준균주 및 한국인에서 분리한 임상균주들의 esculin 가수분해능 결과 모두 음성으로 나왔다. 그리고 catalase test에서는 ChDC F171을 제외한 모든 균주에서 음성반응, indole test 결과는 ChDC F38과ChDC F171 균주를 제외하고는 모두 양성 반응을 보였다.

5. F. nucleatum에 대한 종-특이 PCR 프라이머

다섯 종류의 *F. nucleatum* 종-특이 PCR 프라이머를 이용하여 *F. nucleatum* 표준균 주 및 *F. nucleatum*과 유전학적으로 가장 가까운 다른 *Fusobacterium* 종들의 표준균 주를 대상으로 특이성을 평가한 결과 Fu4-F38과 Fu4-R1189 프라이머(Annealing 온도: 53℃)만이 *F. nucleatum* 종-특이성을 보였다. 그러나 Avila-Campos 등³⁾이 설계한 FN5047 프라이머 쌍은 증폭크기인 0.5 Kbp 이외에서도 반응을 보였고, 1 Kbp의 5059S 프라이머 쌍은 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* 균주에서 반응을 보이지 않았다 (Fig. 7).

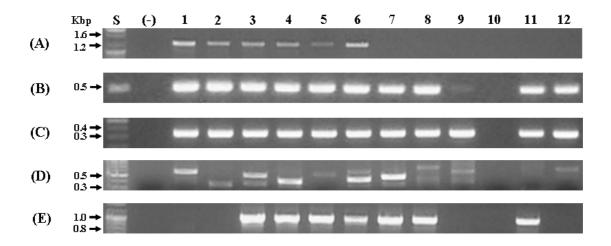


Fig. 7. Specificity test of (A) Fu4-F38 and Fu4-R1189 primers. Four ng of each bacterial genomic DNA were used as PCR templates. The PCR reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. (B) All-F6 and Fn-R6 primers²⁴⁾, (C) FnF and FnR primers³¹⁾, (D) FN5047-F and FN5047-R primers³⁾, (E) 5059S-F and 5059S-R primers³⁾. Lanes: S, size marker; (-), negative control; 1, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T; 2, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726; 3. *F. nucleatum* subsp. *polyphum* ATCC 10953^T; 4. *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T; 5. *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T; 6. *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191^T; 7. *F. canifelinum* CCUG 49733^T; 8. *F. periodonticum* ATCC 33693^T; 9. *F. necrophorum* ATCC 25286^T; 10. *F. naviforme* CCUG 50052^T; 11. *F. simiae* CCUG 16798^T; 12. *Leptotrichia, buccalis* CCUG 34316^T.

Ⅳ. 총괄 및 고안

본 연구는 한국인의 건강한 치주조직과 치은염, 치주염 및 매식치아주위염이 있는 병소부위의 치은연하 치면세균막에 존재하는 *F. nucleatum*을 아종 수준으로 동정하기 위하여 16S rDNA와 Fu4 DNA 프로브 유사 부위(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자)의 핵산염기서열비교법을 이용하여 한국인의 치주질환 진행에 있어서 가장 밀접한 연관성이 있는 아종을 밝히고자 시행되었다.

한국인에서 분리한 임상균주의 16S rDNA 핵산염기서열을 GenBank에서 BLASTn 검색하여 상동성 검사를 실시한 결과 F. nucleatum과 98% 이상의 상동성을 갖는 56 균주의 F. nucleatum과 7 균주의 F. periodonticum을 얻을 수 있었다(Table 2와 Fig. 1). 그러나 F. nucleatum 임상균주의 경우 98% 이상의 높은 상동성을 보였지만, phylogram 결과에서는 서로 차이를 갖는 그룹들이 존재하였다. 그리하여 GenBank에 서 제공하는 F. nucleatum 아종 및 F. periodonticum 표준균주들에 대한 16S rDNA 핵산염기서열을 다운 받아 분석해 보았다. 그 결과 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, F. nucleatum subsp. animalis ATCC 51191^T 및 F. periodonticum ATCC 33693^T 균주의 염기서열에서 제대로 읽혀 지지 않은 nucleotide가 각각 12개, 15개 및 20개씩 존재하였다. 그래서 *F. nucleatum* 5 가지 아종의 표준균주와 1 균주의 F. periodonticum 표준균주를 새롭게 16S rDNA를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 후 GenBank에서 BLASTn 검색을 실시한 결과 F. nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586^T 및 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T 균주들은 전체 유전체 DNA 염기서열이 밝혀져 있어서 같은 아종들과 99% 이상의 상동성을 보였다. 그러나 F. nucleatum subsp. fusiforme ATCC 51190^T 균주는 F. nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256^T[FNU6964]와 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T균주는 F. canifelinum strain RMA 1036^T[AY162221] 균주와 99%의 높은 상동성을 보였고, F. nucleatum subsp. animalis ATCC 51191^T 균주는 F. nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586^T[AE009951]과 F. periodonticum ATCC 33693^T 균주는 F. nucleatum subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T[AE010643]과 더 높은 상동성을 보였다. 이를 바탕으

로 GenBank에 등록된 Fusobacterium spp.의 16S rDNA 데이터 베이스가 확실하게 갖추어 지지 않았다고 생각해 볼 수 있게 되었다. 그러므로 본 연구에서 새롭게 분석한 F. nucleatum 5 가지 아종 및 F. periodonticum 표준균주들에 대한 16S rDNA 핵산염기서열 데이터를 GenBank에 등록하게 된다면 Fusobacterium spp.을 동정하고 분류하는데 있어 발생되는 오류를 최소화 할 수 있을 것으로 생각된다.

F. nucleatum 표준균주간의 16S rDNA 염기서열의 상동성을 비교해 보면, F. nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256^T과 F. nucleatum subsp. fusiforme ATCC 51190^T 사이의 상동성이 99.7%로 가장 높았고, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T과 *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191^T 간의 상동성은 97.8%로 가장 낮았다. 그리고 *F. periodonticum* ATCC 33693^T은 *F. nucleatum* subsp. polymorphum ATCC 10953^T과 98.8%의 상동성을 보였다. 이는 Bolstad 등⁵⁾이 리보솜 RNA 유전자 염기서열(약 1.3 Kbp)를 이용하여 F. nucleatum 4 가지 아종(nucleatum, polymorphum, fusiforme 및 animalis)간의 상동성을 비교한 결과(97.3~98.4%) 보다 더 높은 상동성이 있음을 보여 주고 있다. 그리고 Bolstad 등 $^{5)}$ 이 F. periodonticum과 F.nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586^T 사이에 99.5%(16S rDNA 염기서열을 기 준으로 한 본 실험 결과에서는 98.0%)의 매우 높은 상동성을 갖는다는 보고와도 차이 가 있었다. 그러나 Fu4 DNA 프로브 유사 부위(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자)의 핵산염기서열을 바탕으로 한 F. nucleatum 아종 수준에서의 동정 결과는 16S rDNA 핵산염기서열에 의한 결과보다 아종간의 상이성이 더 큰 것으로 분석되었 다. 특히 5'dUTPase 유전자 핵산염기서열은 아종간의 상이성이 가장 컸다(Fig. 3-5). 따라서 기존의 방법들로 F. nucleatum 5 가지 아종을 분류하기 위해서는 기술적으로 복잡하고, 많은 비용과 노동력을 필요로 하는 세균배양법이나 DNA-DNA hybridization법, 세균 종을 분류하고 동정하기는 간단하나 표현형(phenotype)을 구별하 기가 어려운 16S rDNA 염기서열법 보다는 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자의 핵 산염기서열 비교법등을 이용하는 것이 좀 더 신속하고, 정확하게 세균 종을 동정할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T과 *F. nucleatum* subsp.

fusiforme ATCC 51190^T 사이의 상동성은 16S rDNA(99.7%) 뿐만아니라 Fu4 DNA 프로브 유사부위(99.0%), 일부의 5'dUTPase(98.9%) 및 zinc protease 유전자(99.1%)에서도 서로 높은 상동성을 보여 두 아종을 구별할 수가 없었다. Gharbia와 Shah는 16) 그들이 명명한 F. nucleatum subsp. fusiforme은 Dzink 등9이 명명한 F. nucleatum subsp. vincentii와 같은 아종일 것이라고 제안하였다. 따라서 아종 vincentii와 fusiforme의 유전형 및 표현형에 대한 연구를 진행하여 이들이 같은 아종에 속하는 지에 대한 연구가진행되어야 할 것으로 생각된다.

치주조직의 건강상태에 따른 F. nucleatum 아종의 발현 빈도에 있어서 건강한 치주 조직에서는 F. nucleatum subsp. vincentii/fusiforme이 높은 검출 빈도를 보였다. 그리 고 치주염과 매식치아주위염 병소에서는 아종 nucleatum과 animalis 균주가 높은 양상 으로 나타났다. 그러나 아종 polymorphum은 건강한 치주조직 뿐만아니라 치은염, 치 주염 및 매식치아주위염 병소에서도 높은 검출 빈도를 보였다. 그리고 F. nucleatum 아종 수준과 3% 이내의 차이를 갖는 새로운 그룹의 경우 치주염에서 많이 검출되었다 (Table 3과 Table 4, Fig. 6). Gharbia와 Shah는 13-16) F. nucleatum 3 가지 아종 중에 서 아종 nucleatum은 치주질환과 관련이 있고, 아종 polymorphum과 fusiforme은 건강 한 치은연하 부위와 관련이 있는 것으로 보고하였고, Paster 등⁴²⁾은 아종 *animalis*가 건강한 치주조직에서는 검출되지 않고, 치주질환 부위에서만 유일하게 검출되었다고 보고하였다. 그리고 Roques 등⁴⁶⁾도 치주염 환자로부터 *nucleatum* 34.7%와 *vincentii* 26.5%를 분리할 수 있었다고 보고하였다. 이는 본 연구 결과와도 일치하였다. 따라서 사람의 구강에서 분리된 아종 nucleatum과 동물에서 분리된 아종 animalis는 치주질환 과 높은 상관성이 있고, 건강한 치주조직에서는 아종 vincentii/fusiforme이 관계하고 있는 것으로 생각된다. 그러나 Moore와 Moore³⁹⁾가 치은열구 내에는 아종 *vincentii*, nucleatum 및 polymorphum이 7:3:2의 비율로 존재한다는 보고는 전반적으로 아종 polymorphum의 빈도가 다른 아종들에 비해 높게 나타났던 본 연구와 차이가 있었다. 이와 같이 Moore와 Moore³⁹⁾의 결과와 차이를 보이는 이유는 그들의 연구가 단지 3가 지 아종에 대해서만 발현 빈도를 보았고, 샘플수도 적었다는 문제점 때문으로 생각된 다. 본 연구에서도 치주염과 매식치아주위염의 경우 연구 샘플 개수가 많지 않았다. 그

리고 각각의 치주상태에 따라 분리 동정한 *F. nucleatum* 균주의 수가 너무 적었다. 따라서 치주상태 및 진행정도에 따른 아종 사이의 상관관계를 분류하기에는 어려움이 있는 것 같고, 좀 더 세균 종의 분리 동정이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

F. nucleatum 좋은 일반적으로 indole 합성능이 있고, catalase 활성과 esculin 가수 분해능은 없는 것으로 보고되었다^{30,45)}. 본 연구의 결과 F. nucleatum 5 가지 아종과 F. periodonticum에 대한 표준균주 및 한국인에서 분리한 임상균주들의 esculin 가수분해능 결과 모두 음성으로 나와 여러 보고들과 같은 결과를 보여 주었다. 그러나 catalase test와 indole test 결과에 있어서는 몇몇 균주에서 차이가 있었다. 특히, F. nucleatum은 indole 합성능이 있는 것으로 보고 되었지만, ChDC F38과 ChDC F171 균주에서는 음성 반응을 보였다. 다른 연구 결과들과 차이를 보이는 본 연구 결과의 원인을 현재로써는 알 수 없다. 하지만 이 두 균주의 경우 indole 합성 능력과 관련이 있는 부위의 변이에 의한 것으로 고려해 볼 수 있다. 그러므로 한국인에서 분리 동정된 F. nucleatum 균주에 대한 전반적인 특성의 확립과 그에 따른 검증 실험이 이루어져야할 것으로 생각된다.

최근 신⁵³⁾은 Fu4 DNA 프로브 유사 부위(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전 자)의 핵산염기서열을 결정하여 분석한 결과 *F. nucleatum* 아종간의 상이성이 크게 나타났다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 Fu4 DNA 프로브 유사 부위를 증폭하기위해 신⁵³⁾과 동일한 조건(Annealing 온도 : 50℃)으로 PCR을 시행하여 *F. nucleatum* 5 가지 아종과 *F. periodonticum*에 대한 표준균주 및 한국인에서 분리한 임상균주들을 증폭하여 핵산염기서열을 분석할 수 있었다. 그러나 *F. nucleatum*에 대한 종-특이 PCR 프라이머로써의 특성을 고려한다면 *F. nucleatum* 이외에 *F. periodonticum* 균주까지 검출되었기 때문에 종-특이성이 떨어진다고 생각할 수 있었다. 그래서 PCR의 Annealing 온도를 53℃로 증가시키고, *F. nucleatum*과 유전학적으로 가장 가까운 다른 *Fusobacterium* 종들의 표준균주를 대상으로 하여 실험한 결과 *F. nucleatum*에서만 종-특이적으로 반응을 보였고, 나머지 종에서는 아무런 반응을 보이지 않았다. 그리고 Avila-Campos 등³⁾이 개발한 *F. nucleatum* 종-특이 프라이머(FN5047와 5059S) 및 Külekci 등³¹⁾이 개발한 프라이머(FnF, FnR)는 *F. nucleatum* 균주에 대해 보고된 바와

달리 종-특이성을 보이지 않았다.(Fig. 7). Kim 등²⁴⁾이 개발한 *Fusobacterium* 16S rDNA 종-특이 PCR 프라이머(All-F6, Fn-R6)는 F. necrophorum ATCC 25286^T, F. naviforme CCUG 50052^{T} 및 F. simiae CCUG 16798^{T} 균주들을 제외한 나머지 모든 균주에서 반응을 보여 일부 Fusobacterium 종에 대한 특이성이 있다고 볼 수 있었다. 본 연구를 위해 구입한 F. naviforme CCUG 50052^{T} 균주의 경우 16S rDNA 핵산염기서열분석 결과 F. naviforme이 아닌 다른 균주로 나타났다. 따라서 Fu4-F38과 Fu4-R1189와 같은 종-특이 PCR 프라이머를 이용한 방법은 다른 방법들에 비해 F. nucleatum을 정확하게 동정할 수 있다는 장점이 있기 때문에 치주상태 및 진행정도에 따른 F. nucleatum 종의 발현 빈도도 신속하고, 쉽게 구할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합할 때, 치주조직의 건강상태에 따라 치면세균막에 존재하는 F. nucleatum 아종에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 추후 연구에서 F. nucleatum을 세균배양법보다 신속하고 정확하게 동정할 수 있는 방법을 개발하여 좀 더 많은 샘플을 대상으로 검증하여야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 Fu4-F38과 Fu4-R1189 프라이머 쌍이 F. nucleatum을 종 수준에서 특이성 있게 검출 및 동정할 수 있는 최초의 것임을 검증할 수 있었다.

V. 결론

본 연구는 한국인의 건강한 치주조직과 치주질환 병소의 치은연하 치면세균막에 존재하는 *F. nucleatum*을 아종 수준으로 동정하여 치주질환 진행에 있어서 가장 밀접한 연관성이 있는 아종을 알아보기 위해 시행하였다. *F. nucleatum* 균주들은 16S rDNA와 Fu4 DNA 프로브 유사 부위(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자) 염기서열 결정비교법을 이용하여 종 또는 아종 수준으로 동정하였다. 또한 *F. nucleatum*에 대한 종-특이 PCR 프라이머라 제안되었던 Fu4-F38과 Fu4-R1189 PCR 프라이머 쌍의 *F. nucleatum*에 대한 종-특이성을 *F. nucleatum*이외의 *Fusobacterium* 종들의 표준균주 유전체 DNA를 이용하여 평가하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1. 총 113명의 346개 치아를 대상으로 하여 얻은 치은연하 치면세균막을 *F. nucleatum* 선택배지에서 배양하여 39명으로부터 *F. nucleatum*이라고 여겨지는 보라색을 띄는 세균 군락 334 균주를 얻었다. 이 334 균주는 All-F6와 Fn-R6 프라이머(*Fusobacterium* 종-특이 프라이머라 소개됨)를 이용하여 PCR를 시행하였다. PCR 결과 양성반응을 보인 108 균주들의 16S rDNA를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 다음 GenBank의 데이타 베이스를 이용하여 상동성 검사를 한 결과, 56 균주의 *F. nucleatum*과 7 균주의 *F. periodonticum*을 얻을 수 있었다.
- 2. 5가지 F. nucleatum 아종에 대한 표준균주들만의 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성은 97.8~99.7%로 매우 높은 반면, Fu4 DNA 프로브 유사 부위(일부의 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자)의 핵산염기서열은 89.7~99.0%로 아종간의 상이성이 컸다.
- 3. 치주조직의 건강상태에 따른 치은연하치면세균막 내의 *F. nucleatum* 아종 검출 빈도를 조사한 결과, 건강한 치주조직에서는 *F. nucleatum* subsp. vincentii/fusiforme이, 치주염과 매식치아주위염 병소에서는 *F. nucleatum* subsp. nucleatum과 *F. nucleatum* subsp. animalis가 상대적으로 높은 검출 빈도를 보이 는 경향이 나타났다.

4. Fu4-F38과 Fu4-R1189 프라이머는 PCR 조건 중 결합온도를 53℃로 할 경우 *F. nucleatum*에 대한 종-특이성을 가졌다.

이상의 결과를 종합할 때, 치주조직의 건강상태에 따라 치면세균막에 존재하는 F. nucleatum 아종에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 추후 연구에서 F. nucleatum을 세균배양법보다 신속하고 정확하게 동정할 수 있는 방법을 개발하여 좀 더 많은 샘플을 대상으로 검증하여야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 Fu4-F38과 Fu4-R1189 프라이머 쌍이 F. nucleatum을 종 수준에서 특이성 있게 검출 및 동정할 수 있는 최초의 것임을 검증할 수 있었다.

참고문헌

- 1. Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H.: Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News.* **60**:360–365, 1994.
- 2. Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I. and Slots, J.: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11:266–273, 1996.
- 3. Avila-Campos, M.J., Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Steigerwalt, A.G. and Mayer, L.W.: Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol.* **70**:1202-1208, 1999.
- 4. Bartold, P.M., Gully, N.J., Zilm, P.S. and Rogers, A.H.: Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *J. Periodontal Res.* 26:314-322, 1991.
- 5. Bolstad, A.I., Jensen, H.B. and Bakken, V.: Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum. Clin. Microbiol. Rev.* **9**:55-71, 1996.
- 6. Caton, J.G., Quinones, C.R.: Etiology of periodontal diseases. *Curr. Opin. Dent.* 1:17-28, 1991.
- 7. Chen, C. and Slots, J.: Microbiological tests for *Actinobacillus* actinomycetemcomitans and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol*. 2000. 20:53-64, 1999.
- 8. Claesson, R., Edlund, M.B., Persson, S. and Carlsson, J.: Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 5:137–142, 1990.
- 9. Dzink, J.L., Sheenan, M.T. and Socransky, S.S.: Proposal of three subspecies of Fusobacterium nucleatum Knorr 1922: Fusobacterium nucleatum subsp.

- nucleatum subsp. nov., comb. nov.; Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum subsp. nov., nom. nev., comb. nov.; and Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii subsp. nov., nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 74–78, 1990.
- 10. Dzink, J.L., Socransky, S.S and Haffajee, A.D.: The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **15**:316–323, 1988.
- 11. Falkler, W.A., Jr. and Hawley, C.E.: Hemagglutinating activity of *Fusobacterium nucleatum*. *Infect. Immun.* **15**:230–238, 1977.
- 12. Falkler, W.A., Jr., Lai, R., Vincent, J.W., Dober, L., Spiegel, C. and Hayduk, S.: The ELISA system for measuring antibody reactive to *Fusobacterium nucleatum* in the sera of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 53:762-766, 1982.
- 13. Gharbia, S.E. and Shah, H.N.: Characteristics of glutamate dehydrogenase, a new diagnostic marker for the genus *Fusobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 134(Pt 2): 327–332, 1988.
- 14. Gharbia, S.E. and Shah, H.N.: Glutamate dehydrogenase and 2-oxoglutarate reductase electrophoretic patterns and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization among human oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:467-470., 1989.
- 15. Gharbia, S.E. Shah, H.N.: Fusobacterium nucleatum subsp. fusiforme subsp. nov. and Fusobacterium nucleatum subsp. animalis subsp. nov. as additional subspecies within Fusobacterium nucleatum. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:296–298, 1992.
- Gharbia, S.E. Shah, H.N.: Heterogeneity within Fusobacterium nucleatum, proposal of four subspecies. Lett. Appl. Microbiol. 10:105–108, 1990.
- 17. Gharbia, S.E., Shah, H.N., Lawson, P.A. and Haapasalo, M.: Distribution and

- frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. *Oral Microbiol. Immunol.* 5: 324-327, 1990.
- 18. Haffajee, A.D. and Socransky, S.S.: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol. 2000. 5*:78–111, 1994.
- 19. Ishihara, K., Kuramitsu, H.K., Miura, T. and Okuda, K.: Dentilisin activity affects the organization of the outer sheath of *Treponema denticola*. *J. Bacteriol.* 180:3837–3844, 1998.
- Jang, H.S., Kim, S.-H., Kim, H.-S., Kook, J.-K., Kim, M.-K., Yoo, S.Y. and Kim, B.-O.: Isolation of *Fusobacterium nucleatum* from subgingival plaque in Korean. *J. Korea Academy. Periodontol.* 33:149-158, 2003.
- 21. Jin, L., Wong, K.Y., Leung, W.K. and Corbet, E.F.: Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *J. Clin. Dent.* 11:35-41, 2000.
- 22. Jousunues-Sinerm, H.R., Summanen, P.H. and Finegold, S.M.: *Bacteroides*, *Pophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods and cocci,. In: Murray, F.C. and Yolken, R.H.(Eds.), Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 7th ed. ASM press Washington, 690-711, 1999.
- 23. Kazor, C.E., Mitchell, P.M., Lee, A.M., Stokes, L.N., Loesche, W.J., Dewhirst, F.E. and Paster, B.J.: Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients with Halitosis and Healthy Patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:558–563, 2003.
- 24. Kim, M.-K., Kim, H.-S., Kim, B.-O., Yoo, S.Y., Seong, J.-H., Kim, D.-K., Lee, S.E., Choe, S.-J., Park, J.-C., Min, B.-M., Jeong, M.-J., Kim, D.K., Shin, Y.-K. and Kook, J.-K.: Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rDNA primers for simultaneous detection of *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:110-115, 2004.

- 25. Kolenbrander, P.E. and Andersen, R.N.: Inhibition of coaggregation between Fusobacterium nucleatum and Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis by lactose and related sugars. Infect. Immun. 57:3204–3209, 1989.
- 26. Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N. and Moore, L.V.: Coaggregation of Fusobacterium nucleatum, Selenomonas flueggei, Selenomonas infelix, Selenomonas noxia, and Selenomonas sputigena with strains from 11 genera of oral bacteria. Infect. Immun. 57:3194–3203, 1989.
- 27. Kolenbrander, P.E., Ganeshkumar, N., Cassels, F.J. and Hughes, C.V.: Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* 7:406-413, 1993.
- 28. Kolenbrander, P.E., Parrish, K.D., Andersen, R.N. and Greenberg, E.P.: Intergeneric coaggregation of oral Treponema spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect. Immun.* 63:4584-4588, 1995.
- 29. Kook, J.-K., Kim, M.-K., Seong, J.-H., Kim, D.-K., Kim, B.-O., Park, J.-C., Kim, K.-K., Choe, S.-J. and Min, B.-M.: A new method for rapid screening of bacterial species— or subspecies—specific DNA probes. *FEMS Microbiol. Lett. 219*:121–127, 2003.
- 30. Krieg, N.R.: Identification of Procaryotes. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Garrity, G., Ed.), Vol. 1, second ed., pp.33-38. *Springer Verlag*, New York, 2001.
- 31. Külekçi, G., Çiftçi, S., Keskin, F.A., Kiliç, O., Türkollu, S., Badur, S., Develiollu, Ö.N., Leblebiciollu, B. and Külekçi, M.: PCR analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum* in middle ear effusion. *Anaerobe*. 7:241-246, 2001.
- 32. Lawson, P.A., Gharbia, S.E., Shah, H.N. and Clark, D.R.: Recognition of

- Fusobacterium nucleatum subgroups Fn-1, Fn-2 and Fn-3 by ribosomal RNA gene restriction patterns. FEMS Microbiol. Lett. 53:41-45, 1989.
- 33. Lawson, P.A., Gharbia, S.E., Shah, H.N., Clark, D.R. and Collins, M.D.: Intrageneric relationships of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:347-354, 1991.
- 34. Liesack, W. and Stackebrandt, E.: Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174:5072-5078, 1992.
- 35. Lippke, J.A., Peros, W.J., Savitt, E.D. and French, C.K.: Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2588-2589, 1987.
- 36. Moore, W.E., Holdeman, L.Y., Cato, E.P., Smibert, R.M., Burmeister, J.A., Palcanis, K.G. and Ranney, R.R.: Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 48:507–519,1985.
- 37. Moore, W.E., Holdeman, L.Y., Smibert, R.M., Hash, D.E., Burmeister, J.A. and Ranney, R.R.: Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect. Immun.* 38:1137–1148, 1982.
- 38. Moore, W.E.: Microbiology of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 22:335-341, 1987.
- 39. Moore, W.E.C. and Moore, L.V.H.: The bacteria of periodontal diseases. Periodontol. 2000. *5*:66–77, 1994.
- 40. Ozaki, M., Miyake, Y., Shirakawa, M., Takemoto, T., Okamoto, H. and Suginaka, H.: Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. *J. Periodontal Res.* 25:129-134, 1990.
- 41. Pace, N.R.: A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science.

- **276**:734-740 1997.
- 42. Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. and Dewhirst, F.E.: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183:3770–3783, 2001.
- 43. Persson, S., Edlund, M.B., Claesson, R. and Carlsson, J.: The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 5:195–201, 1990.
- 44. Pianotti, R., Lachette, S. and Dills, S.: Desulfuration of cysteine and methionine by *Fusobacterium nucleatum*. *J. Dent. Res.* **65**:913-917, 1986.
- 45. Roberts, G.L.: Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br. J. Biomed.* 57:156–162, 2000.
- 46. Roques, C.G., EI Kaddouri, S., Barthet, P., Duffort, J.F. and Arellano, M.: *Fusobacterium nucleatum* involvement in adult periodontitis and possible modification of strain classification. *J. Periodontol.* 71:1144–1150, 2000.
- 47. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual. Ed, 2nd. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 1988.
- 48. Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M.J., Li, G. and Chen, C.: Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* 20:S304-S307, 1995.
- 49. Slots, J., Potts, T.V. and Mashimo, P.A.: *Fusobacterium periodonticum*, a new species from the human oral cavity. *J. Dent. Res.* **62**:960–963, 1983.
- 50. Van Palenstein Heldeman, W.H. and Winkler, K.C.: Elective medium for the direct count of *vibrio* (*campylobacter*), *fusobacteria*, *bacteroides*, *selenomonas* and *veillonella* in the gingival crevice flora. *J. Periodontal Res.* 10:230-241, 1975.
- 51. Woese, C.R.: Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271, 1987.

- 52. Xie, H., Gibbons, R.J. and Hay, D.I.: Adhesive properties of strains of Fusobacterium nucleatum of the subspecies nucleatum, vincentii and polymorphum. Oral Microbiol. Immunol. 6:257-263, 1991.
- ③ 신환선: 5'dUTPase 및 zinc protease 유전자 핵산염기서열을 이용한 Fusobacterium nucleatum의 동정. 석사학위논문. 조대치대. 2005.