

한국인 아동으로부터 분리한 *Streptococcus mutans*의 산 스트레스에 따른 유전자 발현변화 분석

강경희^{1,4}, 김영권², 이형숙³, 진익렬^{4*}
¹건양대학교 치위생학과, ²건양대학교 임상병리학과,
³대구보건대학 치위생과, ⁴경북대학교 대학원 미생물학과

Analysis of Gene Expression in response to acid stress of *Streptococcus mutans* Isolated from a Korean Child

Kyung-hee Kang^{1,4}, Young-Kwon Kim², Hyung-Suk Lee³ and Ingyol Jin^{4*}

¹Department of Dental Hygiene, Konyang University

²Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University

³Department of Dental Hygiene, Daegu Health College

⁴Department of Microbiology, Graduate School, Kyungpook National University

요약 본 연구에서는 한국인 아동의 우식치아로부터 *S. mutans*를 분리하고, acid stress하에서 분리한 *S. mutans*의 유전자의 발현의 변화를 분석하고자 하였다. 치아우식증의 주요한 요소로 작용하는 치태형성에 기여하는 glucan 및 fructan 합성에 관여하는 세포내 효소인 glucosyltransferase B (*gtf B*), glucosyltransferase C (*gtf C*), glucosyltransferase D (*gtf D*) 및 fructosyltransferase (*ftf*)의 발현량의 변화를 확인한 결과, lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 16배에서 3배까지 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 산 스트레스하에서 균주의 성장속도 및 대사능력이 감소한 결과에 기인한 것으로 생각되어진다. *S. mutans*가 다른 구강내 미생물들과는 달리 내산성 가질 수 있는 요인으로 스트레스단백질의 발현은 매우 중요하며 따라서 앞으로의 연구에서는 스트레스 단백질을 동정하고 유전자 발현형태 및 관련대사를 밝혀내는 연구가 계속적으로 행해져야 할 것이다.

Abstract *S. mutans*, one of a major causal agents of dental caries, is component of the dental plaque and produces various organic acids such as lactic acid as the end-product of glycolysis. In this study, we are interested in comparing the gene expression of acid-shocked and control cells of *S. mutans* isolated from Korean with caries. Expression levels of *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* and *ftf* were analyzed by Real-time PCR, when the cells were grown under 20 mM lactic acid stress in the exponential phase. The data showed reduced expression of these genes. *S. mutans* is known to have developed a variety of mechanisms to tolerate acid stress. A more detailed analysis of the functions and interactions of acid stress proteins connecting the growth, stress tolerance, biofilm formation is under way.

Key Words : Acid, Gene, Korean, Stress, *Streptococcus mutans*

1. 서론

구강영역의 치주질환(periodontal disease)과 치아우식증(dental caries)은 미생물 감염에 의해 발생하는 대표적인 질환이다. 이 중, 치아우식증은 구강내 세균의 탄수화물 대사 결과에 의해 생성되는 산에 치아의 무기질과 유기

질을 붕괴되어 나타나는 질환이다.

현재 치아우식증의 유발에 관여한다고 알려진 *mutans streptococci*(뮤탄스 연쇄상구균, 이하 MS)는 과거 *Streptococcus mutans*로 불리던 생리·생화학적 성상이 서로 다른 이중성 세균군으로 현재는 생화학적, 혈청학적, 유전적 차이에 따라 *Streptococcus cricetus*(*criceti*), *S.*

*교신저자 : 진익렬(jimin@knu.ac.kr)

접수일 09년 09월 16일

수정일 09년 09월 28일

게재확정일 09년 10월 14일

rattus(ratti), *S. ferus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. macacae*, *S. downei* 등 7개의 종으로 분류된다[1].

MS 중에서 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*는 사람에게서 주로 분리되는 종으로, 이 두 종은 사람의 치아우식증과 가장 깊은 관련성을 갖고 우식부위의 치태 내에 나타나는 것으로 보고되고 있다.

특히 *S. mutans*는 치아우식증의 주요 원인균으로써 밝혀진 이래로 관련된 많은 연구가 진행되어 왔다[2,3]. *S. mutans*는 구강 내에 상재하는 통성 혐기성 균으로 치면의 피막에 부착 후 sucrose를 기질로 하여 glycolysis의 end-product로서 lactic acid를 생산하며, glucosyl transferase를 분비하여 glucose 중합체인 불용성 glucan을 형성한다. 이러한 glucan은 불용성의 점액성물질로서 치아 표면에 부착하여 치면에 세균부착을 도우며 생성된 유기산을 국소적으로 체류시킴으로 치질의 탈회를 가속화 시키는 역할을 한다. 결과적으로 *S. mutans*는 치면에 부착하여 당질 대사를 통하여 고농도의 산을 생산하고 법랑질을 탈회시킴으로써 치아우식증을 유발시킨다[4].

많은 연구들은 *S. mutans*가 탄수화물 분해에 의해서 생성되는 산에 의해 형성되는 낮은 pH에서도 당질 대사를 수행하며 생존할 수 있는 산에 대하여 가장 잘 견디는 균주로 보고해 왔으며[5,6], *S. mutans*의 이러한 능력은 다른 구강 내 세균과 구분되는 특성으로서 충치의 진행에 있어서 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[7]. 내산성 세균의 산저항기작에 대한 많은 연구들을 통하여 산에 대한 적응 및 방어기작은 병원성을 나타내는 데 중요한 요소로 작용한다는 결과가 보고되고 있으며[8], *S. mutans*의 경우도 특유의 acid stress와 관련된 기작들이 치아우식증 유발에 주요한 병독성으로 작용하는 것으로 생각된다.

지금까지 치아우식에 관여하는 *S. mutans*의 내산성과 관련된 생리적, 기능적 및 유전적 특성에 관한 연구는 대부분 백인을 대상으로 해서 보고되어 졌으며[9], 현재 국내에서 진행되는 *S. mutans* 관련 연구는 항균 및 유기산 억제효과를 지니는 천연물질의 탐색에 관한 것이 대부분이다[10]. 국내에서도 한국인의 치면으로부터 *S. mutans*의 분리에 관한 연구는 이루어지고 있으나[11], 치아우식의 발생과 관계있는 단백질 및 이와 관련된 유전자에 관하여는 거의 보고된 바가 없다[12].

치아우식증에 대한 근본적인 원인해결을 위해서는 *S. mutans*에 의한 치아우식증 발병과정의 분자생물학적 기작과 *S. mutans*가 구강내부 환경에 노출시 겪는 다양한 stress에 저항하는 능력 등을 분석하는 연구가 필요하며, 특히 *S. mutans*의 산에 대한 stress에 저항하는 방어기작에 관한 연구는 치아우식증에 대한 주요한 해결책을 제

시할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서, 본 연구에서는 한국인 12세 미만 아동의 우식 치아로부터 분리된 *S. mutans* K7[13]에서 acid stress동안 유전자 발현의 변화를 분석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용균주

우식이 진행되고 있는 12세 미만 아동의 치아우식부위로부터 분리한 *S. mutans* K7을 다음의 실험에 사용하였으며 대조균주는 미국 유전자은행(ATCC, USA)으로부터 분양받은 *S. mutans* UA159를 사용하였다.

2.2 균주배양 및 산 스트레스 처리

순수 배양된 각각의 균주를 BHI 액체배지에 one loop 접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 전 배양한 균주로 사용하였다. 고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 배양하면서 실험에 이용하였다. 산 스트레스로는 흡광도(600 nm)를 측정하여 흡광도가 약 0.5가 될 때 lactic acid 25 mM을 처리하였으며, lactic acid를 처리하지 않은 균주를 대조균으로 하였다.

2.3 흡광도 측정

순수 배양된 각각의 균주를 BHI 액체배지에 one loop 접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 전 배양한 균주로 사용하였다. 고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 대수증식기까지 배양한 후, 20 mM의 lactic acid를 첨가하여 배양하면서 spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다.

2.4 RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA는 TRIreagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 제조사의 지시를 따라 추출하였다. RNA 순도와 농도는 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. Prime script cDNA Synthesis (Takara Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japan)을 이용하여 Total RNA의 1 μ g을 cDNA를 합성하기 위한 역전사반응에 사용하였으며 실험방법은 제조사의 지시를 따랐다.

[표 1] Real-time PCR primer 염기서열

ORF ^a	Target gene	Direction ^b	Nucleotide sequences(5'→3')
16S rRNA	Normalizing internal standard	Fw	CCT ACG GGA GGC AGC AGT AG
		Rev	CAA CAG AGC TTT ACG ATC CGA AA
SMU.329	Hypothetical protein	Fw	GGT TCA GGA CTT GGC AAG
		Rev	AAG CAA TAA CTT GGC CCG
SMU.568	Putative amino acid ABC transporter	Fw	ACA GCA ACA GCG GAT CGC
		Rev	TCG CCG ACC ATT TCT GGA
SMU.2005	Adenylate kinase	Fw	TGG CTA TCC ACG TAC CAT
		Rev	CAC TCA AAC GCT CCA CCA
SMU.1840	Fructokinase	Fw	CGG AAAG CTG GAC ACG TTT
		Rev	ACC CGC TGC AAG TCC TTC
SMU.609	Putative 40K cell wall protein precursor	Fw	TAA AAT CCT CAC CTC GGC
		Rev	GCT ATG GAA TTG AGA CAG
SMU.1004	Glucosyltransferase B	Fw	AGC AAT GCA GCC AAT CTA CAA AT
		Rev	ACG AAC TTT GCC GTT ATT GTC A
SMU.1005	Glucosyltransferase C	Fw	GGT TTA ACG TCA AAA TTA GCT GTA TTA GC
		Rev	CTC AAC CAA CCG CCA CTG TT
SMU.910	Glucosyltransferase D	Fw	ACA GCA GAC AGC AGC CAA GA
		Rev	ACT GGG TTT GCT GCG TTT G
SMU.2028c	Fructoxyltransferase	Fw	AAA TAT GAA GGC GGC TAC AAC G
		Rev	CTT CAC CAG TCT TAG CAT CCT GAA

^aOpen reading frame, Based on the genome annotation of *S. mutans* provided by TIGR(The institute for Genomic Research, MD, USA)

^bFw, forward; Rev, reverse

2.5 Real-time PCR

Real-time PCR에 사용 된 모든 primer는 Primer Express V1.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 표 1에서 같이 제작되었다. Real-time PCR은 SYBR Green PCR master mix (QIAGEN, Gmbh, Hilden, Germany)를 사용하여 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응은 pre-denaturation을 50 °C에서 2분간 수행한 후, 95 °C에서 10분간 해리, 95 °C에서 15초간, 60 °C에서 1분간 중합과정을 40 cycle 수행하였다. PCR 반응 종결 후 melting curve 작성을 수행하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인 하였다. 유전자 발현량의 내부 보정을 위하여 16S rRNA를 이용하였고, 상대적 유전자 발현량은 $\Delta\Delta Ct$ 방법을 통하여 분석하였다(14).

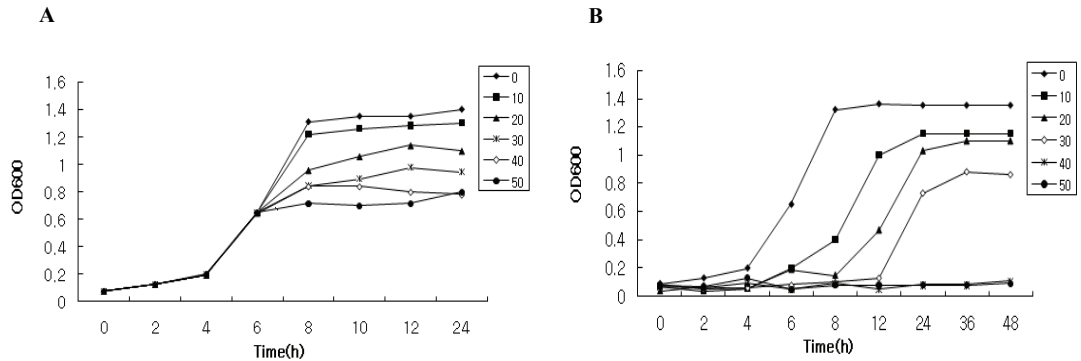
3. 결과 및 고찰

3.1 산 스트레스에 따른 균주의 성장곡선

Lactic acid를 배지에 농도별로 첨가하여 농도에 따른 *S. mutans* K7의 성장패턴을 조사하였다. 그림 1에서 보듯이 배지에 lactic acid의 함량을 증가시킬수록 균주의 생

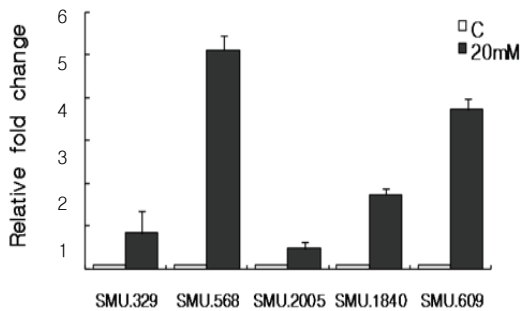
육이 저해되는 것을 알 수 있으며 40 mM 이상의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 흡광도의 증가가 거의 없었다. Lactic acid를 첨가하지 않았을 때의 최대 흡광도는 1.35 였고, 10 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 1.15로 정상 조건에 비해 생육이 감소하였다. 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 최대흡광도가 0.86으로 정상조건에 비해 생육이 현저하게 감소하였으며, 40 mM에서는 최대흡광도가 0.11로 시간의 경과에 따른 흡광도의 증가가 거의 없었다. 또한 lactic acid를 첨가하지 않은 정상배지에서는 약 8시간이 경과하여 정지기에 도달하는 반면, lactic acid의 농도가 증가되는 배지일수록 정지기에 도달하는 데 시간이 오래 소요되어, 10 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 12시간 후에 정지기에 도달하였으며, 20 mM과 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 24시간 후에 정지기에 도달하여 정상조건에 비해 정지기에 도달하는 데 3배의 시간이 소요되었다.

균의 성장이 가장 활발한 지수증식기 일 때 lactic acid를 첨가한 결과, 그림 2에서 보듯이 10 mM의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 최대흡광도가 1.30으로 30 mM의 lactic acid를 첨가한 배지에서는 0.95로 나타났으며 40 mM에서는 최대흡광도가 0.84로 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화가 거의 없었다. 또한 10mM의 lactic acid를



[그림 1] *S. mutans* K7 성장곡선. A) 유도기에 농도별 Lactic acid 첨가에 따른 *S. mutans* K7 성장곡선. B) 지수증식기에 농도별 Lactic acid 첨가에 따른 *S. mutans* K7 성장곡선. 0; 0 mM, 10; 10 mM, 20; 20 mM, 30; 30 mM, 40; 40 mM, 50; 50 mM lactic acid를 처리.

첨가한 배지에서는 약 8시간이 경과하여 정지기 상태로 접어들었으며, 20 mM과 30 mM의 lactic acid 첨가배지에서는 약 10시간 후에 정지기에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다.



[그림 2] 지수증식기에 20 mM의 Lactic acid 첨가에 따른 *S. mutans* K7의 유전자 발현변화. SMU.329; hypothetical protein, SMU.568; putative amino acid ABC transporter, SMU.2005; adenylate kinase, SMU.1840; fructokinase, SMU.609; putative 40k cell wall protein precursor. C; control, 20 mM; 20 mM lactic acid를 처리.

3.2 산 스트레스에 따른 유전자 발현양상

한국인 아동의 치아우식부위로부터 분리한 균주인 *S. mutans* K7을 지수증식기까지 배양시켜 40-50% 정도 성장이 저해되는 20 mM의 lactic acid를 본 실험의 mild-shock으로 결정하고 1시간동안 처리한 후, 2D gel electrophoresis를 수행하여 분석한 결과 acid stress동안 *S. mutans* K7에서 elongation factor Ts, hypothetical protein,

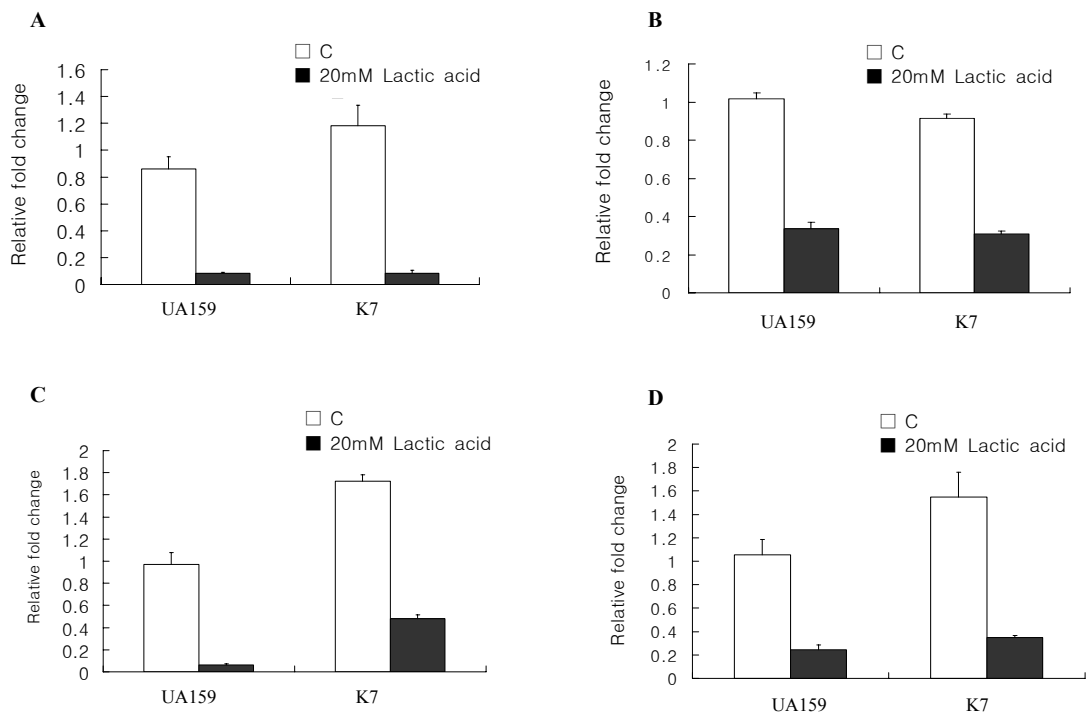
putative amino acid ABC transporter, adenylate kinase, fructokinase, Putative 40K cell wall protein precursor, peptide deformylase, shikimate 5-dehydrogenase, mannose-6-phosphate isomerase, threonine synthase, putative dTDP-glucose-4,6-dehydratase의 단백질이 발현량이 현저히 증가한 것을 보고 하였다[15].

이러한 결과를 바탕으로 이전 실험과 동일한 조건으로 *S. mutans* K7을 지수증식기까지 배양시켜 20 mM의 lactic acid를 1시간동안 처리한 후 RNA를 추출하였으며 대조군으로는 *S. mutans* UA159를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다.

그림 2에서 볼 수 있듯이 real-time PCR결과, 2D gel electrophoresis와 동일하게 hypothetical protein (SMU.329), putative amino acid ABC transporter (SMU.568), adenylate kinase(SMU. 2005), fructokinase(SMU.1840), putative 40k cell wall protein precursor(SMU.609)에서 모두 유전자의 발현량이 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다.

또한 치태의 기본골격역할을 하여 치질의 탈회를 가속화 시키는 역할을 하는 glucan과 fructan 합성에 관여하는 glucosyltransferase B (*gtfB*), glucosyltransferase C (*gtfC*), glucosyltransferase D (*gtfD*) 및 fructosyltransferase (*fft*)의 발현량의 변화를 확인한 결과 그림 3에서와 같이 나타났다.

지수증식기에 20 mM의 lactic acid의 산 스트레스하에서 *S. mutans* K7의 경우 *gtfB*는 발현량이 lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 14 배 감소하였으며, *gtfC*는 3 배, *gtfD*는 16 배, *fft*는 8배 감소하였다. *S. mutans* UA159에 있어서도 lactic acid를 처리하지 않은



[그림 3] 지수증식기에 20 mM의 Lactic acid 첨가에 따른 유전자의 발현량의 변화. A) *GtfB*의 발현량의 변화, B) *GtfC*의 발현량의 변화, C) *GtfD*의 발현량의 변화, D) *Ftf*의 발현량의 변화. UA159; *S. mutans* UA159, K7; *S. mutans* K7, C; control, 20 mM; 20 mM lactic acid를 처리.

control의 경우보다 *gtfB*는 10배, *gtfC*는 3 배, *gtfD*는 3.5 배, *ftf*는 5배 감소하는 결과를 나타내었다.

4. 결론

Lactic acid를 배지에 농도별로 첨가하여 산 스트레스 하에서 *S. mutans* K7의 성장패턴을 조사하였다. 배지에 첨가 된 lactic acid의 함량에 비례하여 *S. mutans*의 성장이 완만해 지는 것을 알 수 있었으며 유도기일 때 lactic acid를 첨가한 경우와 지수증식기일 때 lactic acid를 첨가한 경우의 OD값을 비교해 보면 지수증식기에 lactic acid를 첨가한 경우가 유도기에 비해 균의 성장이 더 활발한 것을 관찰 할 수 있었는데, 이는 지수증식기까지 성장하는 동안 대사과정을 통하여 생성되어지는 산에 대하여 *S. mutans*가 특유의 산 적응 기작에 의하여 적응한 결과로 생각되어진다.

S. mutans K7에서 현저하게 발현량이 증가된 결과를 보인 12개의 단백질은 K7에서 acid stress에 관여하는 특이적 단백질로 추정되며, 산 스트레스하에서 이들 단백질의 유전자 발현을 분석한 결과 lactic acid를 처리하지않

은 control에 비하여 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

또한 치아우식증의 주요한 요소로 작용하는 치태형성에 기여하는 glucan 및 fructan 합성에관여하는 세포내 효소인 *gtf B*, *gtf C*, *gtf D* 및 *ftf*의 발현량의 변화를 확인한 결과, lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 16 배에서 3배까지 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 산 스트레스하에서 균주의 성장속도 및 대사능력이 감소한 결과에 기인한 것으로 생각되어진다.

*S. mutans*가 다른 구강내 미생물들과는 달리 내산성 가질 수 있는 요인으로 스트레스단백질의 발현은 매우 중요하며 따라서 앞으로의 연구에서는 스트레스 단백질을 동정하고 유전자 발현형태 및 관련대사를 밝혀내는 연구가 계속적으로 행해져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

[1] Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods Oral Microbiol immol.

- 1986;1(1):65-72.
- [2] Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1992;71(7):1431-1438.
- [3] Li YH, Lau PCY, Tang N, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitc DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2002;184(22):6333-6342.
- [4] Trahan L. Xylital : a review of its action on Mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J* 1995;45(1):77-92.
- [5] Belli WA, Marquis RE. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1991;57(4):1134-1138.
- [6] Mcneill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol lett* 2003;221(1):25-30
- [7] Inoue M, Koga T. Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1979;25(3):922-931.
- [8] Lee IS, Slonczwski JL, Foster JW. A low-pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994;176(5):1422-1426.
- [9] Zhu I, Kreth J, Cross SE, Gimzewski JK, Shi W, Oi F. Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. *Micobiology* 2006;152(Pt 8):2395-2404.
- [10] 박윤미, 김신재, 조광호, 양은정, 정순택. 생약재의 향충치 및 항산화효과 탐색. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006;35(3):284-293.
- [11] 국중기, 박종휘, 유소영, 김화숙 이난영. 소아의 치면세균막에 존재하는 Mutans Streptoocci의 분포. *대한소아치과학회지* 2004;31(3):439-447.
- [12] 송요한, 김동섭, 정승룡, 서경석, 장기완. *Streptococcus mutans* 균주들의 성장과 glucosyltransferase 활성에 미치는 caffeic acid phenethyl ester의 억제효과. *대한구강 보건학회지* 2001;25(3):299-306.
- [13] 강경희, 남진식, 진익렬. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* from Korean children with caries. *대한의생명과학회지* 2007;13(4):341-347.
- [14] KJ Livak, TD Schmitteng. Analysis of relative gene expression data using real time quantitive PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ method. *Methods* 2001;25:402-408
- [15] 강경희, 남진식, 진익렬. 한국인 우식아동으로부터 분리한 *Streptococcus mutans*의 내산성 단백질의 발현

2009;10(7):1766-1772.

강 경 희(Kyung-hee Kang)

[정회원]



- 2001년 8월 : 경북대학교 미생물학과(박사수료)
- 2008년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 치위생학과 전임강사

<관심분야>
미생물학

김 영 권(Young-Kwon Kim)

[정회원]



- 1991년 2월 : 한남대학교 생물학과(박사)
- 2005년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 임상병리학과 교수

<관심분야>
미생물학

이 형 숙(Hyung-Suk Lee)

[정회원]



- 2000년 2월 : 경남대학교 교육학과(박사)
- 1980년 3월 ~ 현재 : 대구보건대학 치위생과 교수

<관심분야>
미생물학

진 익 렬(Ingyol Jin)

[정회원]



- 1986년 3월 : University of Tokyo(농학박사)
- 1986년 4월 ~ 현재 : 경북대학교 생명공학부 교수

<관심분야>
미생물학