

산성환경에서 *S. mutans*의 생육에 미치는 *HtrA* gene의 영향

강경희*

*건양대학교 치위생학과

e-mail:dhkhkang@konyang.ac.kr

Role of *HtrA* in growth of *Streptococcus mutans* under acidic environment

Kyung-hee Kang*

*Dept of Dental Hygiene, Konyang University

요 약

본 연구에서는 한국인 아동의 우식치아로부터 분리한 *S. mutans* K7으로부터 *HtrA* gene을 동정하고 *HtrA* expression이 산성환경하에서 *S. mutans*의 생육에 미치는 영향을 알아보았다. *S. mutans* K7의 *HtrA* mutant strain은 산성환경에서 parental strain과 비교하였을 때, 생육에 있어서 상당한 차이를 나타내었다. 또한 Biofilm formation에 관여하는 *GtB*, 와 *GtC*의 발현량도 현저히 줄어들었다. 그리고 *HtrA* mutant strain에 *HtrA* gene을 삽입하여 *HtrA*의 발현량을 회복하였을 경우에는 acid stress하에서 control과 같은 normal growth phenotype을 회복하였다. 이러한 결과들은 *S. mutans* K7에서 *HtrA*가 acid stress동안에 중요한 역할을 담당함을 제시하고 있다.

1. 서론

많은 연구들은 *S. mutans*가탄수화물분해에 의해서 생성되는산에의해형성되는낮은 pH에서도 당질 대사를 수행하며 생존할 수 있는 산에 대하여 가장 잘 견디는 균주로 보고해 왔으며, *S.mutans*의 이러한 능력은 다른 구강 내 세균과 구분되는 특성으로서 충치의 진행에 있어서 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 내산성(acid tolerance)을 가지는 세균의 산 저항기작에 대한 많은 연구들을 통하여 산에 대한 적응 및 방어기작은 병원성을 나타내는데 중요한 요소로 작용한다는 결과가 보고되고 있으며, *S.mutans*의 경우도 특유의 acid stress와 관련된 기작들이 치아우식증 유발에 주요한 병독성으로 작용하는 것으로 생각된다.

스트레스와 관련하여 gram-negative 와 gram-positive bacteria는 다양한 환경적 조건에서 생존할 수 있는 control system을 소유하고 있다. HtrA (high-temperature requirement A)는 단백질 분해효소(protease)와 샤페론(chaperone)의 기능을 수행하며 환경스트레스(environmental stresses)에 대한 유기체의 생리적 항상성유지에 중요한 역할 담

당하는 것이 보고되고 있어 최근 들어 주목을 받고 있다.

스트레스에 노출은 transcription과 translation의 오류에 기인한 비정상적인 단백질의 축적을 유발한다. 이와 관련하여 분자샤페론과 protease는 단백질의 안정성을 조절하고 misfolded protein의 축적을 방지함으로써 생리적항상성 유지에 기여한다. acid stress 동안 몇몇의 분자샤페론과 protease 및 DNA repair enzyme의 발현이 증가됨이 보고되고 있으며 *HtrA*은 *S. mutans*의 heat shock stress, oxidative stress 등과 같은 다양한 stress와 biofilm형성에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 한국인 아동의 치아우식부위로부터 분리한 *S. mutans*의 acid stress하에서 *HtrA* 유전자의 발현변화를 분석하고, *HtrA* mutant strain을 제작하여 유전자 발현 변화에 따른 균주의 성장곡선을 분석하여 *HtrA* 유전자의 acid stress에 관여 여부를 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용균주

우식이 진행되고 있는 한국인 아동의 치아우식부위로부터 분리된 *S. mutans* K7 (KCTC 13616)[13]을 다음의 실험에 사용하였으며 대조균주는

American Type Culture Collection으로부터 분양받은 *S. mutans*

2.2. 성장조건

S. mutans 를 BHI broth에 접종하고 37°C에서 12시간 배양한 후, 배양한 *S. mutans* 를 신선한BHI broth 에 1% 접종하여 37°C에서 배양하면서 실험에 이용하였다. 산 스트레스 처리는 농도별로 lactic acid를 BHI broth 에 첨가하여 배양하면서 spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다.

2.3. Real-time PCR

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 µg을 cDNA를 합성하기 위한 역전사반응에 사용하였으며 실험방법은 제조사의 지시를 따랐다.

Real-time PCR에 사용된 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 rRNA을 이용하였고, 상대적 유전자 발현량은 $\Delta\Delta C_t$ 방법을 통하여 분석하였다

2.4. Mutant strain 제작

HtrA gene은 PCR ligation mutagenesis approach 방법에 의하여 kanamycin cassette로 대체되었다.

3. 결 과

3.1. 산성환경에서 HtrA expression 분석

S. mutans K7에 있어서 acid stress에 대한 HtrA gene의 관여여부를 알아보하고자 20 mM의 lactic acid를 OD₆₀₀이 0.5 일때 배지에 첨가하였다. lactic acid를 첨가한 후 1시간 동안 37°C에서 배양한 후 RNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하였다.

Control은 lactic acid를 첨가하지 않은 배지에서 성장한 *S. mutans* K7과 UA159를 사용하였다.

Real-time PCR을 이용하여htrA mRNA의 발현양을 비교한 결과, lactic acid를 처리한 군에서 control보다 htrA의 발현이 현저하게 증가하였다. Lactic acid를 첨가하였을 때 K7은 control보다 htrA의 발현양이 10.7 배 증가하였다. UA159의 경우도 control보다 htrA의 발현양이 6배 증가하였다. 그리고 acid tolerance를 더 강하게 나타냈던K7에서 UA159보다 HtrA mRNA의 발현량이 더 많이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

3.2. HtrA mutant strain의 growth 분석

산성환경에서 mutant strain과 parental strain은 growth에 유의한 차이를 나타내었다. 10 mM과 15 mM acid을 첨가한 경우에 *S. mutant* K7과 UA159의 mutant strain인 SKHM and SAB2-13은 parental strain에 비하여 성장이 현저히 저해되었다. SKHM의 final OD₆₀₀이 control에 비하여 10-15 %감소하였으며 SAB2-13에서도 control에 비하여 final OD₆₀₀이 16-18 %감소하였다.

또한, SKHM and SAB2-13의 산에 대한 민감성을 측정한 결과 SKHM과 parental strain은 survival이 현저한 차이를 나타내었으며. SAB2-13와 parental strain도 survival이 현저한 차이를 나타내었다.

3.3. Gtfs의 발현분석

HtrA deficiency가 gtfs의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR을 이용하여 HtrA mutant strains에서 gtfB mRNA와 gtfC mRNA 발현양을 control과 비교하였다. SKHM에서 gtfB는 control보다 발현양이 14배 감소하였으며, gtfCcontrol보다 3배 감소하였다. SAB2-13에서도 SKHM에서와 유사하게 gtfB와 gtfC의 발현량이 감소하는 결과를 볼 수 있었다.

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.