

한국인 우식아동으로부터 분리한 *Streptococcus mutans*의 내산성 단백질의 발현

강경희*

Acid Stress-Induced Proteins of the *Streptococcus mutans* Isolated from Korean Children with Caries

Kyung-hee Kang*

요 약

한국인 아동의 우식치아로부터 *S. mutans*를 분리하고, acid stress하에서 분리한 *S. mutans*의 내산성 능력과 관련된 단백질을 규명하고자 하였다. *S. mutans*의 16S rDNA 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하고 16S rDNA sequencing을 실시한 결과, 한국인 아동으로부터 분리된 *S. mutans* K7은 기존에 보고된 표준균주와 99.9% 일치하는 결과를 나타내 *S. mutans*로 판명되었다. 또한 2D gel electrophoresis 를 수행한 결과, acid stress에 관여하는 것으로 추정되는 단백질들을 확인 할 수 있었다.

1. 서론

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, *S. mutans*의 이러한 능력은 다른 구강 내 세균과 구분되는 특성으로서 충치의 진행에 있어서 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 내산성 세균의 산저항기작에 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.

지금까지 치아우식에 관여하는 *S. mutans*의 내산성과 관련된 생리적, 기능적 및 유전적 특성에 관한 연구는 대부분 백인을 대상으로 해서 보고되어졌다. 국내에서도 *S. mutans*에 대한 항균 및 유기산 억제 효과를 지니는 천연물질의 탐색에 관한 연구는 활발히 이루어지고 있으나 치아우식의 발생과 관계있는 단백질 및 이와 관련된 유전자에 관하여는 glucosyltransferase와 fructosyltransferase를 coding 하는 glucosyltransferase gene(gtf)와 fructosyltransferase gene(fft)외에는 거의 보고된 바

가 없다. 따라서, 본 연구에서는 한국인 12세 미만 아동의 우식치아를 대상으로 세균을 채취하여 *S. mutans*를 분리하고, acid stress하에서 분리한 *S. mutans*의 내산성 능력과 관련된 단백질을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

1. 사용균주

우식이 진행되고 있는 12세 미만 아동의 치아우식부위로부터 가압멸균된 면봉을 이용하여 치면세균막을 채취하여 다음의 실험에 사용하였으며 대조균주는 한국유전자은행(KCTC, Daejeon, Korea)으로부터 분양받은 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였다.

2. 균주분리

*S. mutans*의 선택배양을 위해서 MS(Mitis salivarius) agar에 0.2 unit/ml의 bacitracin을 첨가한 mitis salivarius bacitracin(MSB) 배지를 이용하였다. 피검자로부터 가압멸균된 면봉을 이용하여 채취한 치면세균막을 평판배지상에 균일하게 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 1종류의 대표적인 colony를 채취하여 Brain Heart Infusion(BHI) agar plate에 도말한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하고 이를 다시 BHI 액체배지에 배양하여 균주동정

에 이용하였다.

3. DNA의 추출 및 정제

Chromosomal DNA의 분리를 위하여 분리된 균주들을 BHI 액체배지를 이용하여 37°C에서 48시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 얻었다. Genomic DNA의 분리는 genomic DNA isolation kit(Nucleogen, Korea)를 이용하였다.

4. 단백질 추출

균체를 세척한 후 10배 부피의 7 M urea, 2 M Thiourea, 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT), 2%(v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer(PowerGen125, Fisher Scientific, USA)에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 하였으며, 15°C에서 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

3. 결 과

1. 16S rDNA의 염기서열분석

분리된 11개 균주와 표준균주의 sequence를 비교 분석결과, 표준균주인 *S. mutans* KCTC 3065의 16S rDNA와 분리된 4개 균주는 100% 일치하는 identity를 나타내었으며, 7개 균주는 1개의 sequence 차이만 나타내었다.

샘플링한 11명의 아동들에서 치아우식부위로부터 채취한 11개 균주들은 16S rDNA sequencing을 통하여 *S. mutans*로 판명되었으며, 기존에 보고된 표준균주와 99.9% - 100% 일치하였다.

2. gtfB primer analysis

S. mutans UA159의 Glucoxyltransferase B(gtfB)와 Glucoxyltransferase I(gtfI)의 gene sequence를 기초로 설계한 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 분리된 11개 균주 모두 469bp에서 PCR product를 확인할 수 있었으며 664bp에서는 PCR product가 확인되지 않았다. 이 결과로 11개의 분리된 균주는 *S. mutans*임을 확인할 수 있었다.

3. 2D gel electrophoresis에 의한 단백질 발현 분석

분리된 균주들의 산에 대한 내성정도를 알아보고자 40-50% 정도 성장이 저해되는 20 mM의 lactic acid를 대수증식기에 배지에 첨가하였다. 성장패턴을 조사한 후, 생육이 가장 활발한 균주인 K-7을 산에 대한 내성이 가장 뛰어난 균주로 판단하고 표준균주를 대조균주로 하여 비교하였다.

대수증식기에 20 mM의 lactic acid를 1시간동안 처리한 cell과 처리하지 않은 cell을 가지고 2D gel electrophoresis를 수행한 결과, elongation factor Ts, hypothetical protein, putative amino acid ABC, adenylate kinase, fructokinase, Putative 40K cell wall protein precursor, peptide deformylase, shikimate/quininate 5-dehydrogenase, mannose-6-phosphate isomerase, threonine synthase의 발현량이 뚜렷이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 이들 단백질은 acid stress에 관여하는 단백질들로 추정된다.

참고문헌

- [1] Beighton D, Russell RR, Whiley RA. A simple biochemical for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991;25(3):174-178.
- [2] Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. *J Microbiol Methods* 2001.;46(2):99-105.
- [3] Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J Med Microbiol* 2000;49(12):1069-1074.
- [4] Svensater G, Welin J, Wilkins JC Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol lett* 2001;205(1):139-146.
- [5] Lemos JA, Luzardo Y, Burne RA. Physiologic effects of forced down-regulation of dnaK and groEL expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2007;189(5):1582-1588.
- [6] Svensater G, Sjogreen B, Hamilton I. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* 2000;146(1):107-117.