

# Streptococcus mutans의 acid stress에 따른 유전자 발현변화 분석

강경희\*

\*건양대학교 의과대학 치위생학과

e-mail : dhkhkang@konyang.ac.kr

## Analysis of Gene Expression in response to acid stress of *Streptococcus mutans*

Kyung-hee Kang\*

\*Dept of Dental Hygiene, Konyang University

### 요 약

본 논문에서는 한국인 아동의 우식치아로부터 *S. mutans*를 분리하고, acid stress하에서 분리한 *S. mutans*의 유전자의 발현의 변화를 분석하고자 하였다. 치아우식증의 주요한 요소로 작용하는 치태 형성에 기여하는 glucan 및 fructan 합성에 관여하는 세포내 효소인 glucosyltransferase, glucosyltransferase, glucosyltransferase 및 fructosyltransferase의 발현량의 변화를 확인한 결과, lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 16배에서 3배까지 감소한 것을 확인할 수 있었다. Amino acid ABC transporter, adenylate kinase, fructokinase, 40k cell wall protein precursor에서는 모두 유전자의 발현량이 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다. 이들 유전자는 acid stress에 관여하는 특이적 유전자로 추정된다,

### 1. 서론

많은 연구들은 *S. mutans*가 탄수화물 분해에 의해 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 산저항 기작에 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 보고되어 왔으며, 현재 국내에서 진행되는 *S. mutans* 관련 연구는 항균 및 유기산 억제효과를 지니는 천연물질의 탐색에 관한 것이 대부분이다. 국내에서도 한국인의 치면으로부터 *S. mutans*의 분리에 관한 연구는 이루

어지고 있으나, 치아우식의 발생과 관계있는 단백질 및 이와 관련된 유전자에 관하여는 거의 보고된 바가 없다.

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 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서, 본 연구에서는 한국인 12세 미만 아동의 우식치아로부터 분리된 *S. mutans* K7에서 acid stress동안 유전자 발현의 변화를 분석하고자 하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2.1 사용균주

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

## 2.2 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 µg을 cDNA를 합성하기 위한 역전사반응에 사용하였으며 실험방법은 제조사의 지시를 따랐다.

## 2.3 Real-time PCR

Real-time PCR에 사용된 모든 primer는 Primer Express V1.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 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.

## 3. 결과 및 고찰

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.

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.

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 (*gtB*), glucosyltransferase C (*gtC*), glucosyltransferase D (*gtD*) 및 fructosyltransferase (*ftf*)의 발현량의 변화를 확인한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

지수증식기에 20 mM의 lactic acid의 산 스트레스하에서 *S. mutans* K7의 경우 *gtB*는 발현량이 lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 14배 감소하였으며, *gtC*는 3배, *gtD*는 16배, *ftf*는 8배 감소하였다. *S. mutans* UA159에 있어서도 lactic acid를 처리하지 않은 control의 경우보다 *gtB*는 10배, *gtC*는 3배, *gtD*는 3.5배, *ftf*는 5배 감소하는 결과를 나타내었다.

## 4. 결론

*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 처리하지 않은 control에 비하여 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

또한 치아우식증의 주요한 요소로 작용하는 치태형성에 기여하는 glucan 및 fructan 합성에 관여하는 세포내 효소인 *gtB*, *gtC*, *gtD* 및 *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 스트레프스 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, Cvitkovite 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