

*Streptococcus salivarius*의 요소분해효소 유전자 변이에 관한 연구

최혜진 · 이진용 · 최호영

경희대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

VARIATION OF UREASE GENES(*ureC*) FROM *Streptococcus salivarius*

Hye-Jin Choi, Jin-Yong Lee, Ho-Young Choi

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University

Urease of *Streptococcus salivarius* is believed to play a critical role in bacterial ecology and pH homeostasis in the mouth, and consequently affect the pathogenesis of dental caries and periodontal diseases. Expression of the urease gene is greatly enhanced by low p.H, excess of carbohydrate, and faster growth. It was observed that urease activity of the strains of *S. salivarius* that exhibited no or low urease activity was not increased even in low pH conditions. In this study, it was hypothesized that the urease gene of the strains is absent, defected, or greatly changed by genetic recombination. In order to prove this hypothesis, chromosomes were obtained from 28 *S. salivarius* strains which had been isolated from normal teeth and carious lesions, subjected to polymerase chain reaction(PCR) using primers encoding highly conserved sequence from *ureC*, and then the obtained PCR products were compared.

The results were as follows:

1. After PCR, the strains generated either one of 0.54- and 1.3-kbp PCR products, or none.
2. All 16 strains having a higher urease activity(>50 μ mol/min/mg) produced 0.54-kbp PCR products.
3. Twelve strains without urease activity and with a lower urease activity(<50 μ mol/min/mg) yield either one of 0.54 and 1.3-kbp PCR products, or none.
4. The DNA sequence of the 0.54-kbp PCR product(pCAP-0.54) exhibited 95% identity to the *ureC* of *S. salivarius* 57.1; 30bp were found to be different, which led to difference of only 2 amino acids in the sequence.
5. The DNA sequence of the 1.3-kbp PCR product(pCAP-1.3) was found to be highly homologous to the aminopeptidase C gene of *Streptococcus thermophilus*.

Overall results indicate that there are considerable variations of the urease genes from *S. salivarius* strains and the variations may affect the ureolytic activity of the bacteria directly or indirectly.

1. 서 론

자연계에서는 수많은 생물학적 과정에 의해 요소(urea)가 생성된다. 포유류의 경우, 단백질, 아미노산 대사과정으로 형성되는 독성의 암모니아가 비독성 물질인 요소로 전환되어 배출되며, 조류, 파충류 그리고 곤충의 경우는 uric acid로 배출되었다가 자연환경속에서 요소로 전환된다. 요소분해효소(urease, urea amidohydrolase(EC 3.5.1.5))는 인체를 비롯한 자연계에서 생성된 요소를 분해한다. 요소분

해효소의 작용으로 최종적으로 생성된 ammonium carbonate는 이후 자연 가수분해 과정을 거쳐 중탄산염(bicarbonate)과 암모니아 이온(NH₄⁺)으로 분해되며, 특히 암모니아 이온은 pH를 상승시켜 자연계의 pH 항상성이나 생태계에 중요한 영향을 미친다.

많은 세균들의 생존이나 병원성 발현에는 요소분해효소가 관련되어 있다. 예를 들어, *Proteus mirabilis*와 *Providencia stuartii* 등은 강한 요소분해능력이 있고 이로 인해 요도관과 신장의 pH를 상승시켜 요석과 신석을 형성하는 중요한

원인균으로 알려져 있으며, 같은 이유로 이들 세균은 요도 관 catheter의 폐쇄를 야기시키는 원인균이다⁵⁾. 또한 요소 분해효소가 직접적으로 신장조직을 파괴하여 신우신염을 유발할 수도 있다⁶⁾. 위암과의 관련성이 시사되고 있는 *Helicobacter pylori*⁷⁾는 위의 산성환경속에서 요소분해효소를 분비하여 암모니아 이온을 생성함으로써 위산을 중화시키는 생존기전으로써 사용할 뿐만 아니라⁵⁾ 위점막의 pH를 상승시켜 위산의 역류현상을 유도하여 위점막 손상을 초래하고^{9,10)} 위산을 과잉분비시키거나¹¹⁾ 요소분해효소의 활성에 의해 생성된 암모니아가 직접 위점막 손상을 초래하여¹²⁾ 위염과 위궤양을 유발시킨다.

정상인의 타액과 치은열구액에는 3~10mM 정도의 요소가 포함되어 있다^{13,14)}. 구강내 요소는 미생물에 의한 ornithine cycle에 의해 대사되기도 하지만¹⁵⁾ 대부분은 타액이나 치태내 세균의 요소분해효소에 의해 분해되어 암모니아가 생성되고 이에 따라 구강내 pH가 상승한다¹⁶⁾. 그 결과 산성이었던 구강내 환경이 중화될 수도 있고, 더욱 pH가 상승하여 알칼리 상태로 변하게 되면 산성환경에서 우세하게 나타나던 내산성, 우식원성 세균인 mutans streptococci나 유산균^{17,18)}은 오히려 출현이 감소될 수 있는 등, 세균 생태계에 변화를 초래할 수 있다. 임상적으로는 충치의 유발이나 진행이 억제될 수 있는 반면^{19,20)} 치석의 형성이 유도되는 등²¹⁾ 요소분해효소는 구강질환의 조절인자로서 중요한 역할을 담당하고 있다.

Streptococcus salivarius(*S. salivarius*)는 구강내에서 발견되는 구강세균 중 가장 강한 요소분해능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있다²²⁾. *S. salivarius*의 요소분해효소는 항상 생산되고 있지만 다른 세균의 요소분해효소와 마찬가지로 낮은 pH에서 활성이 증가하며^{23,25)}, 활성의 증가는 성장이 빠르게 진행되는 시기와 당이 충분할 경우 더욱 뚜렷하게 나타난다²⁴⁾. *S. salivarius*는 가장 초기에 구강내에 출현하고 설배를 비롯한 구강연조직과 타액내에 가장 많이 나타나는 세균종이기 때문에^{26,27)}, 구강의 세균 생태계와 pH 항상성에 깊이 관여할 것으로 생각되고 있다²⁸⁾.

세균에서 발견되는 대부분의 요소분해효소는 7개의 subunit 단백질로 이루어져 있다. 이 중 실제 활성에 관여하는 subunit(structural subunits)는 α , β , γ 이며 나머지 4개의 subunit는 활성을 위한 보조역할(accessory subunit)을 담당하고 있다. 이들의 유전자는 대개의 경우 chromosome상에 cluster로 존재하고 있으며^{29,30)}, 세균간의 유전자 염기서열도 매우 유사한 것으로 보고되고 있다^{30,32)}. 한편 이들 subunit 단백질을 조절하는 유전자가 일부 세균에서 밝혀지고 있다³³⁾. 최근에 *S. salivarius*의 요소분해효소 유전자 cluster에 대한 cloning과 염기서열 연구가 이루어졌는데 다른 세균의 요소분해효소와 비교했을 때 cluster 구조와 유전자의 염기서열이 매우 유사한 것으로 분석되고 있

다³⁴⁾. 대부분의 다른 세균에서 처럼 *S. salivarius*의 경우도 α subunit는 *ureC*, β 는 *ureB*, γ 는 *ureA* 유전자가 관여하고 있으며, 가장 큰 subunit는 α 로 약 62 kDa로 알려져 있다³⁴⁾.

요소분해효소활성을 갖는 세균은 200종 이상이 되지만 같은 세균종에서 모든 균주가 요소분해활성을 갖지는 않는다^{3,4,35)}. 요소분해효소활성 음성인 균주들이 어떠한 이유로 활성을 나타내지 못하는지는 확실치 않으나 유전자의 결여, 유전자의 변이, 또는 유전자 조절기전의 이상등을 예상할 수 있다. 그러나 요소분해효소활성 음성균주에 대한 구체적인 유전자 분석이 이루어진 보고는 아직 없다.

정등³⁶⁾은 충치부위와 정상부위의 치아에서 *S. salivarius*를 분리하여 요소분해효소활성을 측정 한 결과, 정상부위에서 분리한 균주 중 57%가 활성을 전혀 보이지 않거나 거의 없는 것($<5\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)으로 나타났고, 이들 균주는 산성 pH에서도 활성에 변화가 나타나지 않았다. 이 사실은 활성이 없는 균주들은 정상적인 요소분해효소 유전자와는 아주 다른 유전자 염기서열을 가졌거나 유전자가 결여되었기 때문이라는 추측이 가능하다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위해 본 연구에서는 *S. salivarius* 균주들로부터 chromosome을 분리하여 polymerase chain reaction(PCR) 및 DNA 염기서열분석(sequencing)을 실시함으로써 균주들의 요소분해효소 유전자를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험균주 및 배양

본 실험에서는 정등³⁶⁾이 분리·보고한 *S. salivarius* 균주 일부와 추가로 경희대학교 치과대학생 중 치아우식증이 없는 학생의 치태와 설태로부터 *S. salivarius* 균주를 분리하였다. 추가분리를 위해 채취한 치태나 설태는 brain heart infusion(BHI; Difco)액체배지로 수송하여 vortex mixer로 진탕한 후 $10^7 \sim 10^8$ 까지 단계희석 한 다음 Mitis-Salivarius(MS; Difco) 한천배지에 도말하여 37°C 혐기성 배양기(10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂)에서 1일간 혐기적으로 배양하였다. 배양된 균집락들 중에서 *S. salivarius*라고 예상되는 크고, 점액성이 있고 약간 투명한 청색의 집락³⁷⁾을 선택하였다.

2) *S. salivarius*의 동정

선택된 집락들의 동정을 위해 우선 집락을 다시 MS 한천배지에 희석도말법을 이용하여 혐기성 배양기에서 1일간 배양한 후 독립집락임을 확인하였다. 확인된 독립집락을

BHI 액체배지에 혐기적으로 배양한 후 배양된 균을 흡광도계(Ultrospec 2000; Pharmacia Biotech., U.S.A)로 측정하여 540nm에서 흡광도 1.2로 조정하였다. 조정된 균액은 API 20 Strep kit(BioMérieux, France)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 동정하였다. 즉, 배양된 균액을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 수집한 후 resuspension medium으로 재부유하여 그 중 500 μ l를 GP medium에 첨가하고 나머지 균액은 identification strip 중 VP에서 ADH 부분에 150 μ l씩 분주하였고, GP medium에 혼합된 균액은 RIB에서 GLYG 부분까지 250 μ l씩 분주하여 4시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 배양된 strip을 꺼낸 뒤 identification strip 중 VP 부분에는 VP1과 VP2 시약을 한방울씩 첨가하였으며, HIP 부분에는 MIN 시약을 두방울, PYRA에서 ADH까지는 ZYM A와 ZYM B를 각각 1방울씩 첨가하여 10분간 상온에서 배양 후 kit manual에 나와있는 판독표와 비교하여 양성, 음성 반응을 판정하였다. GP medium에 균액을 혼합한 부분은 18시간 동안 혐기적으로 더 배양한 후 비교하였다.

2. 실험방법

1) 요소분해효소 활성검사

*S. salivarius*로 동정·확인된 후 균주들의 요소분해효소 활성도를 검사하였다. 요소분해효소 활성검사는 Chen¹⁴⁾과 Collins와 Falkow³⁸⁾이 사용한 방법을 혼합, 변형하여 사용하였다. *S. salivarius*로 확인된 집락은 BHI 액체배지에서 1일간 혐기적으로 배양하여 증식된 균체를 2% 요소가 첨가된 새로운 BHI 액체배지에 1 : 20의 비율이 되도록 옮겨 성장 대수기(540nm에서 흡광도 1.0)까지 혐기적으로 배양하였다. 배양된 균액을 5,000rpm에서 원심분리하여 균체를 수집한 후 멸균증류수로 3회 세척한 후 200 μ l를 첨가하여 재부유하였다. 재부유된 균액 중 12 μ l를 사용 직전에 준비된 15 μ l의 40% 요소, 173 μ l의 요소분해효소 완충용액(20mM phosphate buffer in 0.6% NaCl, pH 7.0)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 여기에 500 μ l의 지시약인 phenol-nitroprusside와 500 μ l의 alkaline hypochlorite를 첨가한 후 vortex mixer로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 흡광도계를 이용하여 635nm에서 비색농도를 측정하였다. 대조 비색농도곡선은 NH₄Cl을 이용하여 결정하였으며, 시료의 측정치를 이 곡선에 대입하여 생성된 암모니아의 농도를 측정하였다. 실험에 사용된 균액의 농도를 맞추기 위한 단백질 농도의 결정은 Lowry 방법³⁹⁾을 이용하여 측정하였다. 요소분해효소 활성도는 세균(단백질) 1mg당 첨가된 요소로부터 1분 동안 생성할 수 있는 암모니아의 양(μ mol/min/mg)으로 나타내었다.

추가로 분리된 *S. salivarius* 균주 중 다양한 요소분해 활성도를 대표하는 균주를 본 실험군주에 포함시켰다(Table 1).

2) Polymerase chain reaction(PCR) 산물

(1) Chromosome의 분리

요소분해효소 유전자의 확인에 사용될 chromosome을 분리하기 위하여 Ausubel⁴⁰⁾이 사용한 방법을 이용하였다. *S. salivarius* 균주를 10ml의 BHI 액체배지에 하루동안 배양한 다음 증식된 균주를 50ml 원심분리용 튜브에 옮긴 다음 7,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 수집하였다. 수집된 균체에 4.4ml의 TE 완충용액(1mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA)를 첨가하여 재부유시킨 다음 480 μ l의 10% SDS와 48 μ l의 proteinase K(20mg/ml)를 첨가, 혼합한

Table 1. Ureolytic activity of *S. salivarius* strains used in the present study

Subjects(No.)	Ureolytic activity(μ mol/min/mg) of subjects'	
Non carious lesion		
N1		ND
N2		ND
N3		0.08
N4		0.08
N5		0.36
N6		2.53
N7		29.79
N8		37.90
N9		70.05
N10		93.26
N11		100.52
N12		105.73
N13		123.83
N14		135.50
N15		141.02
N16		198.58
N17		245.25
N18		261.99
N19		303.56
Carious lesion		
C1		ND
C2		0.08
C3		1.56
C4		42.09
C5		83.72
C6		83.74
C7		157.10
C8		177.65
C9		381.64

ND not detected

후 37°C에서 1시간 동안 정치하였다. 4ml의 5M NaCl을 첨가하여 섞어준 다음 3.2ml의 CTAB 용액(10% CTAB, 0.7M NaCl)을 첨가하여 완전히 혼합한 후 65°C에서 10분간 배양하였다. 배양된 튜브는 상온에서 5분간 식힌 후 8ml의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하고 완전히 섞이도록 잘 혼합한 다음 12,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리로 분리된 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 12ml의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -70°C에서 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 12,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% ethanol로 1회 세척한 후 상온에서 건조하였다. 건조된 DNA에 200μl의 증류수를 첨가하여 재부유한 후 -20°C에 사용하기 전까지 보관하였다.

(2) PCR

분리된 *S. salivarius* 균주에서 요소분해효소 유전자의 존재 유무를 확인하기 위하여 PCR 실험을 수행하였다. 사용된 primer는 Chen과 Burne²⁴⁾가 사용한 *S. salivarius* 57.1의 *ureC* 유전자에 근거하여 제조하였으며, 염기서열은 forward primer로 5'-AAAATACACgAggACTggggT-3'를, reverse primer로는 5'-TgCggggTTAA TggTgTATTT-3'를 사용하였다. *S. salivarius*에서 추출한 chromosome을 주형으로 한 PCR 반응을 위해 위에서 언급한 두 종류의 primer를 각각 0.8pmol 씩, 200μM dNTP, 0.75U Taq polymerase, PCR 완충용액(10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 15mM MgCl₂)을 첨가하여 혼합용액 총량이 30μl가 되도록 혼합하여 사용하였다. 혼합용액은 92°C에서 1분간 가열한 후 94°C에서 30초, 42°C 30초, 72°C에서 1분 30초간 모두 30cycle을 수행하여 DNA를 증폭하였고, 72°C에서 5분간 반응하여 증폭반응이 완전히 끝나도록 하였다.

(3) Agarose gel 전기영동

PCR을 통해 얻어진 산물을 확인하기 위하여 30ml의 TAE 완충용액(40mM Tris-acetate(pH 8.0), 2mM EDTA)에 0.3g의 agarose를 첨가하여 1% gel을 만든 다음 TAE 완충용액이 들어 있는 gel 탱크에 넣고 DNA 시료와 10×loading buffer(40% sucrose, 0.3% bromophenol blue)를 4 : 1의 비율로 섞어 well에 적하한 후 10V/cm로 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 ethidium bromide(2μg/ml) 용액에서 5분간 염색하여 UV transilluminator 상에서 결과를 관찰하였다.

3) 염기서열의 확인 및 비교

(1) DNA의 회수

전기영동을 통해 확인된 DNA band는 Gene clean kit II(Bio101 Inc., U.S.A)를 이용하여 수획하였다. 즉, UV transilluminator 상에서 확인된 DNA band 부위를 잘라내어 1.5ml 원심분리용 튜브에 넣고 3×volume의 sodium iodine을 첨가한 다음 55°C에서 10분간 액화하였다. 액화된 용액에 10μl의 glass milk를 넣고 섞은 후 얼음에서 10분간 반응시켜 DNA를 흡착시켰다. 7,000×g에서 5초간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 kit에서 제공된 세척액 900μl를 넣고 DNA-glass milk pellet을 재부유시켜 세척한 후 7,000×g에서 5초간 원심분리하였으며 2회 반복하여 세척하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 상온에서 건조시킨 다음 20μl의 증류수를 첨가하여 DNA를 용해하였다.

(2) PCR 산물의 cloning 및 형질전환

PCR을 통하여 획득된 산물의 염기서열을 분석하기 위하여 plasmid pCAP⁺ vector를 사용하였다. 우선 cloning에 사용할 vector DNA를 단일나선화 하였다. 10ng의 pCAP⁺ vector, 1unit MluN1, MluN1 buffer(20mM Tris-HCl(pH 8.5), 10mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol)를 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 회수된 PCR 산물과 단일나선화된 pCAP⁺ vector를 접합하기 위하여 1ng의 단일나선화된 pCAP⁺ vector, 1unit T4 ligase, 10ng PCR 산물, T4 ligase 완충용액(50mM Tris-HCl(pH 7.5), 10mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 60μg/ml BSA)를 혼합한 후 16°C에서 4시간 동안 반응시켰다.

Cloning된 산물의 보존등을 위해 일반적으로 많이 사용되는 *E. coli* HB101을 적격세포로 준비한 후 형질전환하였다. 적격세포의 준비를 위해 *E. coli* HB101을 37°C에서 5ml LB 액체배지에 전배양한 후 새로운 20ml의 LB 액체배지에 1:50의 비율이 되도록 첨가하여 37°C에서 흡광도를 540nm에서 0.4가 될 때까지 배양한 다음 5,000×g에서 원심분리하여 수획한 후 상층액을 제거하고 10ml의 100mM CaCl₂를 첨가하여 재부유시켰다. 얼음에서 10분간 정치한 다음 5,000×g에서 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 1ml의 100mM CaCl₂, 15% glycerol을 첨가하여 침전물을 재부유시키고 1.5ml 원심분리용 튜브에 200μl씩 분주하여 사용하였다. 적격세포로 준비된 200μl의 *E. coli* HB101에 2μl의 재접합된 DNA 용액을 첨가한 후 얼음에서 20분간 정치시키고 42°C에서 90초간 열처리 한 다음 얼음에서 10분간 냉각하였다. 여기에 200μl의 LB 액체배지를 첨가하여 섞어준 후 37°C에서 45분간 배양하고 50μg/ml의 ampicillin이 첨가된 LB 한천배지에 균액 100μl를

도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 형질전환체의 형성을 관찰하였다.

(3) Plasmid DNA의 분리

Cloning된 plasmid DNA를 분리하여 사용하기 위하여 Birnboim과 Doly¹¹⁾의 방법과 Ish-Horowitz와 Burke¹²⁾가 사용한 방법을 병용하여 사용하였다. 50µg/ml의 ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에 형질전환체를 하루동안 배양한 다음 7,000×g에서 5분간 원심분리하여 균체를 수확하였다. 수확된 균체에 4ml의 solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM EDTA)를 첨가하여 재부유시킨 다음 4ml의 solution II (0.2% NaOH, 1% SDS)를 넣고 혼합하여 균체를 용해시켰다. 여기에 4ml의 solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 23.5ml 증류수)를 첨가한 후 혼합하여 얼음에서 10분간 정치시킨 다음 12,000×g에서 15분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 상층액 총량의 0.7배 분량만큼 (0.7×volume)의 isopropanol을 첨가, 혼합하여 상온에서 30분간 DNA를 침전시켰다. 다음 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 1회 세척하여 상온에서 건조하였다. 여기에 200µl의 증류수를 첨가하여 DNA를 용해하여 사용하였다.

(4) DNA 염기서열분석 및 전기영동

분리된 cloned DNA의 염기서열을 분석하기 위해 Sanger¹³⁾이 개발한 dideoxy chain termination 방법을 사용하였다. 먼저 annealing반응을 시키기 위하여 1~2µg의 DNA를 20µl의 0.2M NaOH, 0.2mM EDTA에 녹인 후 상온에서 5분간 변성시킨 다음 2µl의 2M ammonium acetate-acetic acid(pH 4.5)로 중화시키고 2×volume의 ethanol을 넣어 DNA를 침전시킨 다음 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전시키고 70% ethanol로 세척하였다. 상온에서 건조한 다음 2pmol의 primer가 들어있는 8.5µl 증류수와 1.5µl 10×Klenow reaction 완충용액에 녹인 후 37°C에서 15분간 annealing 반응을 수행하였다. Annealing된 반응액에 1µl (α -³²P)dATP, 1µl Klenow 효소를 첨가하여 섞은 다음 각각 ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP가 2µl씩 첨가된 4개의 튜브에 annealing 반응 혼합액을 2.8µl씩 분주하고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 2µl의 Chase 용액을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시키고 4µl의 formamide dye mix를 첨가하여 95°C에서 3분간 가열한 후 얼음에서 냉각하여 반응을 정지시켰다.

반응된 시료를 확인하기 위하여 전기영동을 수행하였다. Gel판 중 짧은 것을 5% dimethyldichlorosilane(chloroform 수용액)으로 siliconizing한 다음 두 gel판의 3면에

spacer를 끼우고 클립으로 고정하였다. 여기에 42g urea, 15ml 40% acrylamide 용액, 10ml 10×TBE 완충용액 (0.89M Tris-borate(pH 8.0), 2mM EDTA)이 첨가된 100ml 용액을 37°C에서 녹인 후 0.6ml 10% ammonium acetate, 100µl TEMED를 넣고 혼합한 용액을 첨가한 다음 상온에서 응고시켰다. 준비된 gel판을 1×TBE 완충용액으로 채운 gel탱크에 장착하고 45V/cm로 1시간 동안 pre-running시킨 다음 준비된 시료들을 각 well에 적당하여 동일한 전압으로 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 분리하여 gel크기의 여과지위에 놓고 30분간 80°C에서 건조기에서 건조한 후 암실에서 Kodak XAR-5 필름을 건조된 gel위에 놓고 autoradiography용 cassette에 넣어 상온에서 16 ~ 18시간 동안 노출시켰다. 노출된 필름을 현상하여 light box상에서 아래쪽부터 염기서열을 기록, 확인하였다.

III. 실험성적

1. *S. salivarius* 균주의 요소분해활성

정등¹⁴⁾이 사용했던 균주들 중 일부와 보다 다양한 *ureC* 유전자 염기서열의 변이를 관찰하기 위해 정상치아 부위의 치대와 설태로부터 추가로 균주를 분리하였고 이중 다양한 요소분해활성도를 보이는 대표적인 균주들을 선택하여 본 실험에 사용하였다. 즉, 충치이환부위 분리균주로 선택한 9균주 중에는 요소분해활성이 전혀 없는 1개 균주, 미약한 요소분해활성(<50µmol/min/mg)을 보이는 3개 균주, 높은 활성(>50µmol/min/mg)을 보이는 5개 균주가 포함되었다. 반면 정상치아 분리균주 19개 중에는 요소분해활성이 측정되지 않은 2개 균주, 미약한 요소분해활성을 보인 6개 균주, 높은 활성을 보인 11개 균주가 포함되었다 (Table 1).

2. PCR 산물

Chen과 Burne¹⁵⁾는 *S. salivarius* 57.I의 *ureC* 유전자를 증폭하여 0.54kbp의 산물을 획득하였으며 이 산물의 염기서열을 확인하였다. 이들이 사용했던 동일한 primer를 사용하여 본 실험 *S. salivarius* 균주들의 *ureC* 유전자를 PCR로 증폭시킨 결과 *S. salivarius* 57 I에서 얻었던 산물과 동일한 크기인 0.54kbp 산물과 이와는 다른 크기인 1.3kbp의 산물이 확인되었다(Fig. 1)

요소분해효소 활성도에 따른 PCR 산물의 크기를 보면 각 균주의 PCR 산물은 다음 3가지 유형중 한가지를 보였다. 즉 예상되는 크기였던, 0.54kbp와 예상치 않았던 1.3kbp 크기의 PCR 산물을 생성하거나 아니면 전혀 PCR 산물을

생성하지 않았다(Table 2). 요소분해활성을 보이지 않았던 3개 균주를 제외하고 나머지 미약한 활성을 보이는 균주들 ($< 50 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)은 분리장소의 층차이환여부와 관계 없이 PCR에서 산물을 보이지 않거나 0.54나 1.3kbp 크기의 산물 중 하나를 생성하였다. 반면 활성도가 높은 균주들 ($> 50 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)은 PCR에서 모두 0.54kbp의 산물을 생성하였다.

3. 염기서열의 확인 및 비교

PCR로 생성된 0.54kbp와 1.3kbp PCR 산물 중 각각 하나씩(N11, C2) 선택하여 pCAP[®] vector에 cloning 하였으며, cloning이 정확히 수행되었는지를 확인하기 위하여 cloned DNA를 주형으로 하여 pCAP[®] vector의 multicloning 부위 양쪽 끝에 위치한 염기서열을 primer로 이용

Table 2. Variations in the size of the PCR products from chromosomes of *S. salivarius* strains

Strains	Urease activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	PCR product	
		0.54kbp	1.3kbp
Non-carious lesion			
N1	ND	-	-
N2	ND	-	-
N3	0.08	-	+
N4	0.08	-	+
N5	0.36	-	+
N6	2.53	-	+
N7	29.79	-	-
N8	37.90	+	-
N9	70.05	+	-
N10	93.26	+	-
N11	100.52	+	-
N12	105.73	+	-
N13	123.83	+	-
N14	135.50	+	-
N15	141.02	+	-
N16	198.58	+	-
N17	245.25	+	-
N18	261.99	+	-
N19	303.56	+	-
Carious lesion			
C1	ND	-	-
C2	0.08	-	+
C3	1.56	-	+
C4	42.09	-	+
C5	83.72	+	-
C6	83.74	+	-
C7	157.10	+	-
C8	177.65	+	-
C9	381.64	+	-

ND not detected

하여 동일한 조건에서 PCR 실험을 수행한 결과 기존에 확인되었던 크기에 약 300bp 정도의 multicloning 부위가 포함된 산물들이 각각 확인되었다. 또한 각각의 산물들을 multicloning 부위에 절단부위가 존재하는 *EcoR* I 과 *BamH* I 로 처리한 결과 multicloning 부위 일부가 포함된 산물들이 확인되었다(Fig. 2). 0.54kbp와 1.3kbp를 pCAP[®] vector에 삽입한 각각의 cloned DNA(각각

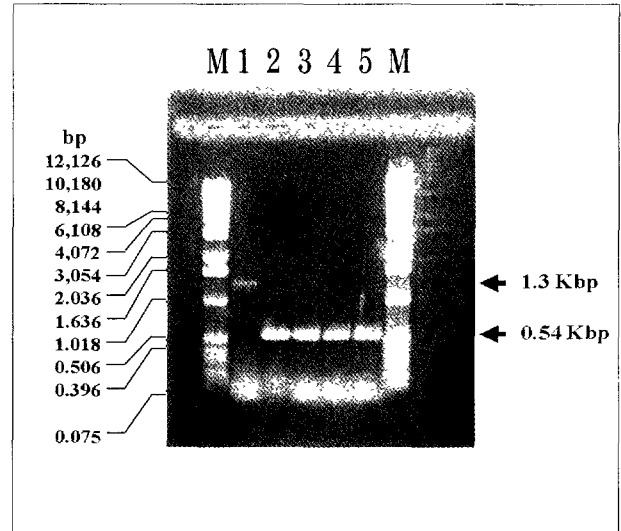


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR-amplified *ureC* genes from the representative strains of *S. salivarius*. M, DNA molecular marker. lanes: 1, N3; 2, N11; 3, N19; 4, C8; 5, C9.

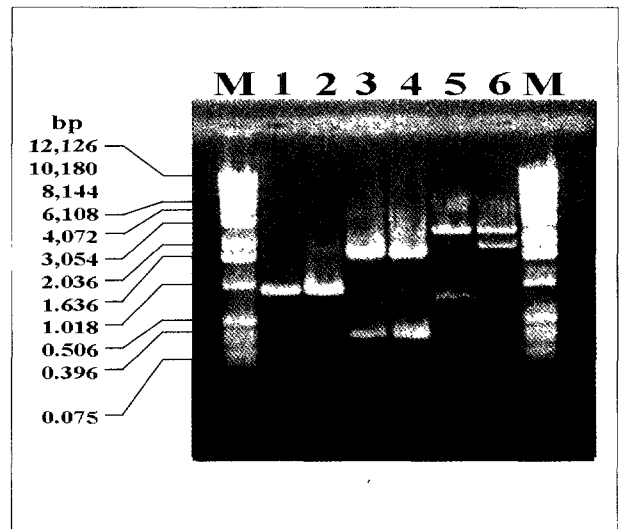


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR-amplified cloned DNA. M, DNA molecular marker. lanes: 1 and 2, pCAP-0.54; 3 and 4, pCAP-1.3; 5, *EcoR* I-*Hind* III digested pCAP-0.54; 6, *EcoR* I-*BamH* I digested pCAP-1.3.

1 GCAACTTACG CAGGAAATGA TAATTCCTTT AAAGTTCGG
 41 ATAAATATGA TGTTCCCTTT GCGGTTACACA CTGACTCATT
 81 GAATGAAGGT GGATTCATGG AAAACACTCT TGAGTCTTC
 121 CAAGGTGGTA CCGTTCACAC CTCCACACC GAAAGTTCAG
 161 GTGGTGGACA CGCTCCAGAT ATATATGGTCT TTGCTGGTAA
 201 GGAAAATATT TTGCCATCAT CAACTAACCC AACTA ACCCA
 241 TACACTACAA ATGCTATTGG TGAGTTGTTA GATATGCTTA
 281 TGGTTTGTCA CCACCTGGAT CCAAAAATCC CAGAAGACGT
 321 CTCTTTTGTCT GAATCACGTG TAGCTAAACA AACTGTGGCT
 361 GCAGAAGACG TTCTTCACGA TAGGGTGGCC CTTAGTATCA
 401 TGACTTCAGA TGCCATGGCA ATGGGCAGTG TCGCTGAAAT
 441 AGCCATGGCT TGTGGCAAC TAGCTGATAA GATGAAAGCT
 481 CAGCGTGGTC CACTTGAAGG GGATTCAGAA TTAAATGATA
 521 ATAATCGTAT CAAACGTTAC GTCGCT 546

Fig. 3. Complete DNA sequence of the pCAP-0.54

1 CTTCACATG AAATGTTTAC ACAGGATCAC TTGGACATC
 41 TAGCTCATCA TCAAGTTTAG ACTCAAGCCA AAGCACTGAC
 81 TCATCAAGTT CACAAGATAG TCAACAGTAC CGCCCTGATG
 121 CTTCACAAA TCCATCGACA TCGGCCCTCA ACGGTTCTGA
 161 ACATTCAAA TCAAACGCTC CTACAGCAGA AGAA¹AAGAA
 201 ATAAAGGGT TATCCGAATG GATAACTCTT TTTTACCGA
 241 TAAATTTAA AGAAGCTATA TAAAACCACT AGCATCATT
 281 CCACTGGCTT TATATATCTG CTATTTTGA AGCAAGGGCT
 321 CCAATGGGT CCCAAGGAGC AAGTACTCTC CGCTCTGCTT
 361 CATAGGCTGC TAATCTTCA GCCTAAGGA AGTCTTGGC
 401 CACAACGAT TGATAAGTGT ATTCATCCAT CCAGGCATCG
 441 CAAAGCACA AGTAACCTTT TTGCTCGACC TGTCTGCC
 481 TAGATTTTC AACCTCCAT TTAATAGGTT TACCAACAGC
 521 TCCAAATCA ACCCCAGT 538

Fig. 4. DNA sequence of pCAP-1.3 3'-half of the gene has been sequenced.

pCAP-0.54	1	GCAACTTACGCAGGAAATGATAA ¹ TCTCTTAAAGTTCGGATAAAATATGATGTTTCCTTTGCG	63
57.1	1	GCGACTTACGCAGGATTTGATAA ¹ TCCCTTAAAGTTCGGATAAAATACGATGTTTCCTTTGCG	63
pCAP-0.54	64	GTTACACTGACTCAT ¹ GAAATGAAGGTGGCTTCATGGAAAACACTCTTGAGTCTTTCCAA	123
57.1	64	GTTACACTGACTCT ¹ TGAAATGAGGGTGGCTTTATGGAAAATACTTTGGAATCCTTCCAA	123
pCAP-0.54	124	GGTCGTACCGTTACACCTTCCACACCGAAGCTTCAGCTGGTGGACACGGCTCCAGATATT	183
57.1	124	GCTCGTACTGTTCAATAC ¹ TCCACACCGAAGGTTCCAGCTGGTGGACATGCTCCAGATATC	183
pCAP-0.54	184	ATGGTCTTTGCTGGTAAGGAAAATATTTTGGCTATCAACTAACCCAACTAACCCATAC	243
57.1	184	ATGGTTTTGCTGGTAAGGAAAATATTTTCCTCTATCAACTAACCCAACTAACCCATAC	243
pCAP-0.54	224	ACTACAAATGCTAT ¹ GGTGGAGTTGTAGATATGGTTATGGTTTGTCCACACTTGGATCCA	303
57.1	224	ACCACAAATGCTAT ¹ TGGTGGAGTTGTAGATATGGTTATGGTTTGCACCACTTGGATCCA	303
pCAP-0.54	304	AAAATCCAGAAAGACGCTCTTTTGGCTGAATCACCTGTACGTAACAACAACTGTGGCTGCA	363
57.1	304	AAAATCCAGAAAGAC ¹ CTCTTTTGGCTGAATCACCTGTACCTAACAACTGTAGCTGCA	363
pCAP-0.54	364	GAAGACCTTCTTACGATATGGGGTGCCTTAGTATCATGACTTCAGATGCCATGGCAATG	423
57.1	364	GAAGACCTTCTTACGATATGGGGTGCCTTAGTATCATGACTTCAGATGCCATGGCAATG	423
pCAP-0.54	424	GCCAGTCTCGGTGAAGTAGCCATGCGTTGTTGGCAACTAGCTGATAAGATGAAAGCTCAG	483
57.1	424	GCACGTCCTCGGTGAAGTAGCCATGCGTTGTTGGCAACTAGCTGATAAGATGAAAGCTCAG	483
pCAP-0.54	484	CGTGGTCCACTTGAAGGGGATTCAGAAATTAATGATAATAATCGTATCAAACGTTACGTGGCT	546
57.1	484	CGTGGTCCACTTGAAGGGGATTCAGAAATTAATGATAATAATCGTATCAAACGTTACGTGGCT	546

Fig. 5. Comparison of the DNA sequence of the pCAP-0.54 and *ureC* gene of *S. salivarius* 57.1.

pCAP-0.54kbp, pCAP-1.3kbp로 명명)에 대한 염기서열을 확인하였다(Fig. 3, 4). 확인된 DNA 염기서열을 Gene Bank 통해 분석한 결과 pCAP-0.54의 경우, *S. salivarius* 57.1의 *ureC* 유전자와 30개의 bp에서 차이를 보

여 95%의 유사성을 나타내었고(Fig. 5), 아미노산 서열의 비교에서는 2개의 아미노산에서 차이를 나타내었다(Fig. 6) 반면 pCAP-1.3의 경우에는 염기서열이 확인된 538bp의 *Streptococcus thermophilus*의 aminopeptidase

pCAP⁻-0 54 ATYAGIDNSLKVADKYDVSFAVHTDSLNEGGMFMENT
 57 I ATYAGIDNSLKVADKYDVSFAVHTDSLNEGGMFMENT
 pCAP⁻-0 54 LESFQGRITVHTFHTEGSGGGHAPDIMVFAGKENILP
 57 I LESFQGRITVHTFHTEGSGGGHAPDIMVFAGKENILP
 pCAP⁻-0 54 SSTNPTNPYTTNAIGELLDMMVMVCHHLDPKIPEDVS
 57 I SSTNPINPYTTNAIGELLDMMVMVCHHLDPKIPEDVS
 pCAP⁻-0 54 FAESRVRKQTVAAEDVLHDMGALSIMTSDAMAMGS
 57 I FAESRVRKQTVAAEDVLHDMGALSIMTSDAMAMGR
 pCAP⁻-0 54 VGEVAMRCWQLADKMKAKRGPLEGDSEFNDKNRIK
 57 I VGEVAMRCWQLADKMKAKRGPLEGDSEFNDKNRIK
 pCAP⁻-0 54 RYVA
 57 I RYVA

Fig. 6. Deduced amino acid sequence of the pCAP⁻-0.54 aligned with the corresponding predicted sequence from *S. salivarius* 57 I

C와 높은 유사성을 나타내었다.

IV. 총괄 및 고안

*S. salivarius*의 요소분해효소는 구강환경속에서 세균 생태계와 pH 항상성의 변화에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. 환경의 산도가 낮을 때 요소분해효소의 활성이 증가하기 때문에²³⁻²⁵ 충치부위에서 *S. salivarius*의 존재는 충치진행 억제인자로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 정등³⁶은 정상부위보다는 충치이환부위에서 분리한 *S. salivarius* 균주들의 요소분해활성이 높다고 보고하였다. 정상부위에서 분리된 많은 균주들은 요소분해활성이 미약한 것으로 나타났는데, 산성환경 속에서 요소분해 활성을 측정했을 때도 이들 균주의 활성은 증가하지 않았다. 따라서 이 같이 요소분해활성이 미약한 것은 충치이환부위와 같은 산성 환경이 형성되지 않았기 때문에 기인한 것이라기 보다는 유전자 자체의 이상 또는 변이나 요소분해효소 발현 기전이 다르기 때문이라고 추정된다. 본 연구에서는 이같은 추정의 가능성을 확인하기 위해 우선 *S. salivarius*의 *ureC* 유전자의 변이에 관한 조사를 시행하였다. 만약 변이가 있다면 충치이환부위에서 분리되는 균주에서, 그리고 낮은 요소분해 활성을 보이는 균주에서 변이가 보다 다양하게 나타날 것이라는 예상하에서 정등³⁶이 정상부위에서 분리한 균주중 활성이 약한 균주와 충치부위에서 분리한 다양한 활성도를 보이는 일부 균주를 본 연구에 포함시켰고, 추가로 본 연구를 위해 정상부위에서 다양한 요소분해활성을 보이는 *S. salivarius* 균주를 분리하여 사용하였다.

기질(substrate)과 니켈의 부착을 위한 부위를 비롯하여 촉매부위들이 포함된 *ureC*의 가장 중요한 부위이며 세균간 염기서열 유사성이 높은 부위를 포함하는 primer를²⁴ 사용

하여 분리균주 chromosome에 대해 PCR을 시행한 결과, 각 균주의 PCR 산물은 다음 3가지 유형중 한가지를 보였다. 즉 예상되는 크기였던 0.54kbp나 예상치 않았던 1.3 kbp 크기의 PCR 산물을 생성하거나 아니면 전혀 PCR 산물을 생성하지 않았다. 요소분해효소활성을 보이지 않았던 3개 균주를 제외하고 나머지 미약한 활성을 보이는 균주들 (<50 μ mol/min/mg)은 충치여부와 관계없이 PCR에서 산물을 생성하지 않거나 1.3kbp 크기의 산물을 생성하였다. 반면 상대적으로 활성도가 높은 균주들 (>50 μ mol/min/mg)은 PCR에서 모두 0.54kbp의 산물을 생성하였다.

1.3kbp PCR 산물 중 1개를 선택하여 cloning과 염기서열 결정을 시행하였다. 이 1.3kbp 산물(pCAP⁻-1.3)의 염기서열을 Gene bank에서 확인한 결과 *Streptococcus thermophilus*의 aminopeptidase C와 높은 유사성을 보였다. *S. salivarius*와 *S. thermophilus*는 매우 유사한 유전적, 생화학적 성상을 가지고 있으나 *S. thermophilus*는 요소분해효소가 없는 것으로 알려져 있다⁴⁹. 따라서 *ureC*의 primer를 사용하였으나 aminopeptidase C의 염기서열이 PCR에 의해 증폭되었다는 사실은 1.3kbp 산물을 보이는 균주에는 요소분해효소 유전자가 없거나 매우 다른 염기서열을 갖기 때문에 실제 요소분해효소 유전자는 증폭되지 않았고 primer 염기서열과 유사한 염기서열을 포함한 aminopeptidase C가 증폭된 것임을 시사하는 것이다. 일부 세균종에서는 plasmid에 요소분해효소 유전자를 갖는 경우는 있지만⁴⁵⁻⁴⁸ 1.3kbp 산물을 보인 *S. salivarius* 균주가 이들 세균종 처럼 plasmid에 유전자를 갖고 있었기 때문에 chromosome에 대한 PCR에서 발견되지 않았다고는 생각되지 않는다. 만약 plasmid에 요소분해효소를 갖고 있었다면 요소분해능력시험에서 활성을 보였을 것이기 때문이다.

세균의 요소분해효소는 모두 같은 유전자에서부터 시작되었을 것으로 추측되고 있는데, 따라서 염기서열도 매우 유사하다⁵⁰. 그러나 같은 세균종, 그리고 같은 요소분해활성 양성 균주간에도 요소분해효소 유전자의 염기서열 변이는 발견되고 있다. Senior등⁴⁷은 요소분해효소의 isoenzyme(subunit)들의 전기영동 관찰에서 *Morganella morganii*와 *Proteus mirabilis*의 경우 균주들간의 크기에 커다란 차이를 발견하지 못했으나 *Providencia rettgeri*와 *Proteus vulgaris* 균주들간에는 isoenzyme 크기에 큰 차이가 발견되었다. Jones와 Mobley⁵¹도 *Proteaceae*에 속하는 요소분해효소활성 양성인 세균들 중에 요소분해효소 유전자를 이용한 DNA hybridization에 반응하지 않는 균주도 있음을 보고하였다. 이같은 결과는 균주간 유전자 사이에 커다란 차이가 있음을 시사하는 것이다. *Helicobacter pylori*의 경우도 요소분해효소 *ureA-ureB* 유전자의 PCR 후 PCR 산물의 restriction fragment length polymerase (PCR-RFLP)에서 대부분의 균주가 각기 다른 양상을 나

타입으로서 균주간 유전자 염기서열의 다양한 변이성을 시사하고 있다¹⁶⁾. Desai¹⁷⁾은 *ureC-ureD*를 분석한 결과 *ureA-ureB*보다 더 변이성이 크다고 보고하였다.

Sissons¹⁸⁾은 *S. salivarius* 요소분해효소 isoenzyme들의 전기영동관찰에서 균주간에 크기가 거의 동일하게 나타나는 것을 발견하였다. 그러나 이같은 특정 생화학적 동질성이 반드시 유전적 동질성을 시사하는 것은 아니다. 본 연구에서 나타난 0.54kbp 크기의 PCR 산물은 이전의 보고에 따라 예상했던 것과 정확히 같은 크기였다¹⁹⁾. 그러나 pCAP-0.54의 염기서열을 *S. salivarius* 57.1¹⁾와 비교한 결과 30곳에서 DNA 염기에 차이가 있었고, 실제 단백질 수준에서는 2개의 아미노산의 차이가 발견되었다. 즉, *S. salivarius* 57.1의 Ile-305가 pCAP-0.54에서는 Thr으로, Arg-371이 Ser으로 바뀌어 나타났다. 본 연구에서 얻어진 PCR산물에는 *ureC* 중 가장 중요한 역할을 하는 기질 부착부위인 His-224, 3개의 니켈부착 부위 중 하나인 His-251, 촉매부위인 His-325를 포함하고 있다. 그러나 이들 His 부위에 변이가 없었기 때문에 *S. salivarius* 57.1의 *ureC*와 같이 정상적인 기능을 발휘했을 것으로 추정된다. *Klebsiella aerogenes*의 *ureC* 유전자에서 Cys-319가 요소분해효소의 촉매과정에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데⁵⁾, *Klebsiella*와 *S. salivarius*의 *ureC*가 매우 유사한 것으로 미루어¹⁾ *S. salivarius*에서도 Cys(Cys-324)이 중요한 것으로 생각된다. pCAP-0.54는 Cys-324가 염기서열에 wobbling이 있으나 단백질 수준에서는 변화없이 Cys로 보존되어 있다.

본 연구에서 요소분해 활성이 높게 나타나는 균주 (>50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)들은 예외없이 0.54 kbp-PCR 산물을 생성하였다. 이들 균주들은 *S. salivarius*와 pCAP-0.54의 염기서열 비교에서 나타난 것처럼 상호간에 약간의 염기서열 변이는 나타날 수 있으나 근본적인, 즉 단백질 수준에서는 커다란 변화가 없을 것으로 예상된다. Desai¹⁷⁾은 위-십이지장질환을 유발하는 *Helicobacter pylori* 균주는 특정의 염기서열을 갖는 동질성의 유전적 특성균인 것을 발견하였는데, *S. salivarius*의 경우도 이들 0.54kbp-PCR 산물 생성 균주들은 서로 비슷한 성상을 갖는 집단일 것으로 추측된다.

요소분해활성 음성인 *Providencia stuartii* 균주들은 유전자 염기배열 양상이 양성인 균주들 보다 다양하게 나타나고 있고¹⁵⁾ *Helicobacter pylori*의 경우도 위-십이지장 질환을 유발하는 균주들 보다는 증상이 없는 사람들에서 분리한 균주들이 유전자 염기배열 양상이 더 다양하게 나타나는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 낮은 요소분해활성을 갖는 *S. salivarius* 균주들 (<50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)은 PCR에서 0.54나 1.3kbp 산물, 또는 산물을 생성하지 않는 것으로 미루어 이들도 다양한 유전적 양상을 보일 것으로 예상된다.

Riufu²⁰⁾은 *Ureaplasma urealyticum*의 요소분해효소를 PCR로 증폭시켜 전기영동으로 PCR산물을 비교한 결과, 숫자나 크기의 차이는 *Ureaplasma urealyticum* 균주간 생물학적 특성의 차이를 반영하고 있음을 발견하였다. 이 사실은 *S. salivarius ureC* PCR 산물의 차이가 구강내에서 요소분해활성의 차이를 반영할 것이라는 가능성을 시사해주고 있다. 그러나 *S. salivarius*에서 염기서열과 생물학적 특성의 차이간의 상관관계를 입증하기 위해선 보다 폭넓은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

*S. salivarius*의 요소분해효소는 구강내 pH 항상성과 세균생태계의 유지 및 변화에 중요하며 결과적으로 구강질환의 억제나 진행에도 커다란 영향을 미친다. 이 효소는 낮은 pH 탕의 유입, 빠른 성장시기에 발현이 증가한다. 이전 연구에서 분리된 *S. salivarius* 균주 중 요소분해활성이 낮은 균주는 낮은 pH에서도 활성이 증가하지 않음이 관찰되었다. 본 연구는 요소분해활성이 없거나 낮은 균주의 요소분해 효소는 높은 활성의 균주와 아주 다른 유전자 염기서열을 갖거나 없을 것이라는 가정하에서 중치이환부위와 상방부위에서 분리한 28개 *S. salivarius* 균주로부터 chromosome을 추출하여 *ureC* 유전자를 PCR로 증폭하여 PCR 산물을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PCR결과 *S. salivarius* 균주는 0.54와 1.3kbp 크기의 PCR 산물 중 하나를 생성하였고 일부 균주에서는 PCR 산물이 생성되지 않았다.
2. 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이상의 요소분해활성을 보인 16개 균주 모두 0.54kbp 크기의 PCR 산물을 생성하였다.
3. 요소분해활성이 없거나 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이하의 요소분해활성을 보인 12개 균주는 0.54나 1.3kbp 크기의 PCR 산물 중 하나를 생성하거나 전혀 생성하지 않았다.
4. *S. salivarius* 57.1의 *ureC*의 염기서열과 비교한 결과 0.54kbp-PCR 산물(pCAP-0.54)은 95%의 유사성을 보였으며(546bp 중 30개 bp가 다름), 실제 아미노산의 차이는 2개로 나타났다.
5. 1.3kbp-PCR 산물(pCAP-1.3)의 염기서열은 *S. salivarius ureC*와 다르게 나타났고 오히려 *Streptococcus thermophilus*의 aminopeptidase C 유전자와 유사한 것으로 나타났다.

본 연구결과 *S. salivarius* 균주간에는 *ureC* 유전자 염기서열에 유의한 변이가 있으며 이 변이는 *S. salivarius*의 요소분해활성에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 것으로 추정된다.

참고 문헌

- Mobley, H.L.T., and Hausinger, R.P. : Microbial ureases : significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.*, 53:85~108, 1989
- Qin, Y., and Cabral, J.M.S. Kinetic studies of the urease-catalyzed hydrolysis of urea in a buffer-free system. *Appl. Biochem Biotechnol.*, 49:217~240, 1994.
- Jones, B.D., and Mobley, H.L.T. : Genetic and biochemical diversity of urease of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect Immun.*, 55:2198~2203, 1987.
- Mobley, H.L.T., Jones, B.D., and Jerse, A.E. : Cloning of urease gene sequences from *Providencia stuarti*. *Infect Immun.*, 54:161~169, 1986.
- Mobley, H.L.T., and Warren, J.W. : Urease-positive bacteria and obturation of long-term urinary catheters. *J. Clin. Microbiol.*, 25:2216~2217, 1987.
- Braude, A.I., and Simiensi, J. : Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. *J. Bacteriol.*, 80:171~179, 1960.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sibley, R.K. : *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 325:1127~1131, 1991.
- Brady, C.E., Hadfield, T.L., Hyatt, J.R., and Utts, S.J. : *Campylobacter pyloridis*-survival in a hostile environment. *Am. J. Gastroenterol.*, 81:855, 1986.
- Miederer, S.E., and Grabel, P. : Profound increase of *Helicobacter pylori* urease activity in gastric antral mucosa at low pH. *Dig. Dis. Sci.*, 41:944~949, 1996.
- Hazell, S.L., and Lee, A. : *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back-diffusion and gastric ulcers. *Lancet*, ii:15~17, 1986.
- Levi, S., Bearshall, K., Haddad, G., Flayford, R., Ghosh, P., and Calam, J. : *Campylobacter pyloridis* and duodenal ulcers : the gastrin link. *Lancet*, i:1167~1168, 1989.
- Smoot, D.T., Mobley, H.L.T., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., and Resau, J.H. : *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun.*, 58:1992~1994, 1990.
- Golub, L.M., Borden, S.M., and Kleinberg, I. : Urea content of gingival crevicular fluid and its relationship to periodontal disease in humans. *J. Periodont. Res.*, 6:243~251, 1971.
- Kopstein, J., and Wrong, D.M. : The origin and fate of salivary urea and ammonia in man. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 52:9~17, 1977.
- Biswas, S.D., and Kleinberg, I. : Effect of urea concentration on its utilization, on the pH and the formation of ammonia and carbon dioxide in a human salivary sediment system. *Archs Oral Biol.*, 16:759~780, 1971.
- Sissons, C.H., Cutress, T.W., and Pearce, E.I.F. : Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaque. *Archs. Oral Biol.*, 12:781~790, 1985.
- Bradshaw, D.J., and McKee, A.S., and Marsh, P.D. : Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities *in vitro*. *J. Dent Res.*, 73:672~681, 1994.
- Van Houte, J. : Role of microorganisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, 73:672~681, 1994.
- Hamada, S., and Slade, H.D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 44:331~384, 1980.
- Loesche, W.J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, 50:353~380, 1986.
- Mandel, I.D., and Thompson, R.H. : The chemistry of parotid and submaxillary saliva in heavy calculus formers and non-formers. *J. Periodontol.*, 38:310~315, 1967.
- Sissons, C.H., Hancock, E.M., Perinpanayagam, H.E.R., and Cutress, T.W. : The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. *Archs. Oral Biol.*, 33:727~733, 1988.
- Sissons, C.H., Perinpanayagam, H.E.R., Hancock, E.M., and Cutress, T.W. : pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J. Dent Res.*, 69:1131~1137, 1990.
- Chen, Y.-Y.M., and Burne, R.A. : Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 135:223~229, 1996.
- Sissons, C.H., Perinpanayagam, H.E.R., and Hancock, E.M. : Processes involved in the regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius* by pH. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7:159~164, 1992.
- Liljemark, W.F., and Bloomquist, C. : Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 7:180~198, 1996.
- Scheie, A.A. : Mechanisms of dental plaque formation. *Adv. Dent. Res.*, 8:246~253, 1994.
- Clancy, A., and Burne, R.A. : Construction and characterization of a recombinant ureolytic *Streptococcus mutans* and its use to demonstrate the relationship of urease activity to pH modulating capacity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 151:205~211, 1977.
- Hausinger, R.P. : Nickel utilization by microorganisms. *Microbiol. Rev.*, 51:22~42, 1987.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., and Hausinger, R.P. : Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, 59:451~480, 1995.
- Collins, C.M., and Dorazio, S.E.F. : Bacterial ureases-structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 9:907~913, 1993.
- De Koning-Ward, T.F., Ward, A.C., Robins-Browne, R.M. : Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 145:25~32, 1994.
- Nicholson, E.B., Concaugh, E.A., Foxall, P.A., Island, M.D., and Mobley, H.L.T. : *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by *ureR*. *J. Bacteriol.*, 17:465~473, 1993.
- Chen, Y.-Y.M., Clancy, K.A., and Burne, R.A. : *Streptococcus salivarius* urease genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect Immun.*, 64:585~592, 1996.
- Owen, B.J., Beck, A., Dayal, P.A., and Dawson, C. : Detection of genomic variation in *Providencia stuarti* clinical isolates by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms containing rRNA cistrons. *J. Clin. Microbiol.*, 26:2161~2166, 1988.
- 정상백, 민병순, 최호영, 박상진, 이진용, 최기운 : *Streptococcus salivarius*의 요소분해효소 활성에 관한 연구. *경희치대논문집*, 19:535~545, 1997.
- 浜田 幸, 増田典男, 鳥居光男, 蝕原性 シソサ球菌の 分離 同定法. *日本歯醫評論*, 415:125~131, 1977.
- Collins, C.M., and Falkow, S. : Genetic analysis of *Escherichia coli* urease gene evidence for two distinct loci. *J. Bacteriol.*, 172:7138~7144, 1990.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265~275, 1951.

- 40 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, Brooklyn, NY.
- 41 Birnboim, H.C., and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res.*, 7: 1513-1513, 1979.
- 42 Ish-Horowitz, D., and Burke, J.F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nuc Acids Res.*, 9: 2989-2991, 1981.
- 43 Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467, 1977.
- 44 Farrow, J.A.E., and Collins, M.D. DNA base compositions, DNA-DNA homology, and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol.*, 130: 357-362, 1984.
- 45 Grant, R.B., Penner, J.L., Hennessy, J.N., and Jackowski, B.J. Transferable urease activity in *Providencia stuartii*. *J Clin Microbiol.*, 13: 561-565, 1987.
- 46 D'Orazio, S.E.F., and Collins, C.M. Characterization of a plasmid-encoded urease gene cluster found in members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol.*, 175: 1860-1864, 1993.
- 47 Senior, B.W., Bradford, N.C., and Simpson, D.S. The ureases of *Proteus* strains in relation to virulence for the urinary tract. *J Med Microbiol.*, 13: 507-512, 1980.
- 48 Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., and Berg, D.E. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nuc Acids Res.*, 20: 6221-6225, 1992.
- 49 Lopez, C.R., Owen, R.J., and Desai, M. Differentiation between isolates of *Helicobacter pylori* by PCR-RFLP analysis of urease A and B genes and comparison with ribosomal RNA gene patterns. *FEMS Microbiol Lett.*, 110: 37-44, 1993.
- 50 Owen, R.J., Bickley, J., Huitado, A., Frasier, A., and Pounder, R.E. Comparison of PCR-based restriction length polymorphism analysis of urease genes with rRNA gene profiling for monitoring *Helicobacter pylori* infections in patients on triple therapy. *J Clin Microbiol.*, 32: 1203-1210, 1994.
- 51 Desai, M., Linton, D., Owen, R.J., and Stanley, J. Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. *Epidemiol Infect.*, 112: 151-160, 1994.
- 52 Sissons, C.H., Loong, P.C., Hancock, E.M., and Cutress, T.W. Electrophoretic analysis of ureases in *Streptococcus salivarius* and in saliva. *Oral Microbiol Immunol.*, 4: 211-218, 1989.
- 53 Todd, M.J., and Hausinger, R.P. Identification of the essential cysteine residue in *Klebsiella aerogenes* urease. *J Biol Chem.*, 266: 24327-24331, 1991.
- 54 Martin, P.R., and Hausinger, R.P. Site-directed mutagenesis of the active site cysteine in *Klebsiella aerogenes* urease. *J Biol Chem.*, 267: 20024-20027, 1992.
- 55 Ruffu, Y., Manli, Z., Zhaobiano, G., and Maohu, W. Bacterial diversity is reflected by variations of genes encoding urease of *Ureaplasma urealyticum*. *Microbiol Immunol.*, 11: 625-637, 1997.