

DNA 앵타머를 이용한 *Streptococcus mutans*의 부착 억제

박병주¹, 옥승호^{2*}

¹전남대학교 치의학전문대학원 구강생화학교실

²전남대학교 치의학전문대학원 구강미생물학교실

A novel anti-adhesion agent using DNA aptamers for *Streptococcus mutans*

Byung-Ju Park¹, Seung-Ho Ohk^{2*}

¹Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chonnam National University

²Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Chonnam National University

요약 본 연구는 치아우식증의 주 원인균으로 작용하는 *S. mutans*에 특이적인 앵타머 및 그 작용 기전에 관한 것으로 더욱 상세하게는 SELEX방법을 이용하여 *S. mutans*에 특이적인 앵타머를 선별하고, 앵타머와 결합하는 단백질 분자를 정제 및 동정함으로써 *S. mutans*의 부착에 관련된 기전을 보다 더 명확하게 규명하고자 하였다. 표적분자에 높은 친화도와 선택성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 앵타머는 3차원적인 특이적 구조에 의해 표적물질에 대해 수 nM ~ 수 pM 수준의 높은 결합력과 선택성을 지니고 있으며, 항체와 유사한 특성을 가지는 핵산으로 여겨지고 있다. 또한, 항체에 비해 안정성이 매우 높아 실온 보관이나 운반이 가능하고, 장시간이나 반복사용이 요구되는 진단용으로의 응용이 매우 용이하다. 또한 생체 내 면역거부반응이 거의 일어나지 않는 점 등을 바탕으로 보다 저렴한 앵타머로 대체하려는 시도가 이루어지고 있으며, 이는 치료용으로의 개발연구에 매우 중요한 장점이 될 수 있다. 이를 위하여 39개의 random sequence를 갖는 DNA library를 제조하고, *S. mutans*를 앵타머 선별의 대상물질로 하여, SELEX 방법을 통하여 선별하고 pCR2.1 cloning vector에 cloning하고, 그 염기서열을 분석하였다. 그 결과 6종의 서로 다른 염기서열을 갖는 앵타머를 선별하였으며, 선별된 앵타머 중 SM-2를 이용하여 앵타머와 직접 결합하는 단백질을 분리, 동정하였다. 위의 결과로부터 선별된 앵타머들은 *S. mutans*에 선택적으로 결합함을 확인하였고, 이 앵타머는 세균의 당 대사 및 단백질 합성 관련 단백질에 결합함으로써 세균의 부착을 억제 할 수 있음을 확인하였다.

Abstract In this study, the SELEX method was used to screen for and select aptamers with high selectivity and affinity for *Streptococcus mutans*, which is the causative agent of dental caries. Aptamers are single stranded oligonucleotides of DNA or RNA with high selectivity and affinity for target molecules because of their specific three-dimensional structures that are used to collect biometric information. When compared to antibodies in vitro, aptamers are more advantageous because of their ease of use in the screening process, low cost, chemical stability, and lack of restrictions on the target molecules. We sorted DNA aptamers, which contain 44 bp or 38 bp primer sequences in 5' and 3', 39 bp random sequences in the middle. We then analyzed the character and affinity to *S. mutans*. Aptamers of specific oligonucleotides that combine with *S. mutans* were selected and these results are selectively fused to *S. mutans*. The results confirmed that DNA aptamers can be used for rapid diagnosis and treatment of dental caries caused by bacteria of the oral cavity, namely *S. mutans*.

Keywords : anti-adhesion, aptamer, SELEX, *Streptococcus, mutans*

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. NRF-2015R1D1A1A01057503).

*Corresponding Author : Seung-Ho Ohk(Chonnam National Univ.)

Tel: +82-62-530-4852 email: shohk@chonnam.ac.kr

Received January 19, 2018

Revised February 14, 2018

Accepted March 9, 2018

Published March 31, 2018

1. 서론

구강 감염성 질환 중 치아우식증은 아직도 이환율이 높은 질병으로 인식되고 있다. 이러한 치아우식증을 예방하기 위하여 여러 가지 형태의 예방법 및 치료 방법이 개발되어 왔으며[1-4], 이로 인하여 미국이나 서구 유럽의 경우 이의 발병율이 다소 감소하였다고는 하지만, 우리나라의 경우는 아직도 어린이를 비롯한 성인의 치과질환의 대다수를 차지하고 있다. 더욱이 치아우식증의 발생은 사람에 따라 서로 다르게 나타나기 때문에 치과영역에서 이 질환은 해결되어야 할 중요한 부분으로 간주되고 있다.

경조직의 우식을 수반하게 되는 치아우식증은 치아의 파괴를 동반한 감염성 질환 (progressively infectious disease)으로, 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환이다. 이와 관련된 미생물로는 치태내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다. 즉, *S. mutans*는 치면의 획득 피막에 부착한 후 glucosyltransferase에 의하여 자당 (sucrose)으로부터 포도당 중합체 (glucose polymer)인 비수용성 mutan을 합성한다[5,6]. *S. mutans*에 의하여 합성된 mutan은 치면에서 증식하는 세균들 간의 결합을 증가시킬 뿐만 아니라, 치면에 부착한 *S. mutans*는 치면에 국소적으로 자리 잡아 접착성 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로써 치아우식증과 더불어 다양한 치주질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. 이런 치아우식 유발성 물질인 plaque에는 대부분 2×10^8 이상의 많은 수의 세균이 포함되어 있으며, 이들 세균에 의하여 자당이 포도당과 과당으로 분해되고 pH 5.5 이하의 약산성 조건을 형성하게 되어 경조직인 치아의 탈회를 야기할 수 있는 조건이 만들어진다. 이와 같이, pH 감소에 의한 산 생성 과정이 반복되면 법랑질의 탈회가 일어나 치아우식 병소가 발생된다[7-13].

이러한 치아우식증은 *S. mutans*에 의한 감염성 질환이며, 여기에 섭취한 음식물의 종류, 그리고 시간, 치아 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력 등에 의한 변수가 가세되어 이 질환의 진행 정도가 결정된다. 이처럼 치아우식은 원천적으로 치아자체의 탈회에 대한 저항력이나 타액의 세정작용으로 발생 초기에 억제될 것으로 생각되나, 그럼에도 불구하고 치아우식증은 계속 증가추세

에 있기 때문에 여러 가지 다른 요인들이 복합적으로 작용하는 다인자성 질환으로 생각되고 있다. 따라서 최근에는 천연물 유래의 새로운 물질을 이용하여 다양한 감염성 질환의 치료 및 예방에 대한 연구가 진행되고 있기도 하다[14-16].

한편, 다양한 종류의 표적분자에 높은 친화도와 선택성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 앵타머는 안정된 삼차구조의 작은 핵산조각으로서, “꼭 맞다”의 의미를 가지는 ‘aptus’라는 라틴어에서 그 어원이 유래되었다[17]. 앵타머를 선별하는 방법으로는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 방법을 통해서 이루어진다. 이는 1990년에 Colorado 대학의 Larry Gold 연구팀에 의해 처음으로 개발되었는데[18], 양 끝에 특정 sequence를 갖는 40mer 이상의 random nucleotide sequence RNA 분자들의 라이브러리를 사용하여 bacteriophage T4 DNA polymerase에 결합하는 RNA분자를 발견하고, 이 방법을 SELEX라고 명명하였다. 이 SELEX방법을 이용하여 RNA 또는 DNA 분자가 저분자 화합물로부터 고분자 단백질에 이르기까지 여러 종류의 표적분자에도 결합할 수 있음이 보고되었다.

일반적으로 앵타머는 3차원적인 특이적 구조에 의해 표적물질에 대해 nM ~ pM 수준의 높은 결합력과 선택성을 지니고 있으며, 항체와 유사한 특성을 가지는 핵산으로 여겨지고 있다[19]. 또한, 항체에 비해 안정성이 매우 높아 실온 보관이나 운반이 가능하고, 심지어 멸균 후에도 기능을 유지할 수 있으며, 변성이 되더라도 다시 짧은 시간에 재생이 가능하기 때문에 특히 장시간이나 반복사용이 요구되는 진단용으로서의 응용이 매우 용이하다. 또한 생체 내 면역거부반응이 거의 일어나지 않는 점 등을 바탕으로 보다 저렴한 앵타머로 대체하려는 시도가 이루어지고 있으며, 이는 치료용으로서의 개발연구에 매우 중요한 장점이 될 수 있다.

앵타머 선별 방법은 고가의 부가 장비를 필요로 하지 않을뿐더러, 짧은 시간 내에 앵타머를 선별할 수 있기 때문에 의료진단 시스템으로 활용도를 높여 구강 내 존재하는 미생물에 대한 감염 여부와 균종을 확인하고 환자로 부터 구강 내 잔류하는 치주질환 균의 임상적 진단 및 검출을 빠른 시간 내 효과적으로 할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 치아우식증의 주 원인균으로 작용하는 *S. mutans*에 특이적인 앵타머 및 그 작용 기전에 관한 것으로 더욱 상세하게는 SELEX방법을 이용하여

*S. mutans*에 특이적인 앵타머를 선별하고, 앵타머와 결합하는 단백질 분자를 정제 및 동정함으로써 *S. mutans*의 부착에 관련된 기전을 보다 더 명확하게 규명 할 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주 및 plasmid

이 연구에 사용된 균주는 다음과 같다. 먼저 부착능 검증을 위한 균주로는 *Streptococcus mutans* ATCC 31989를 사용하였으며, 앵타머 선택성의 교차검증을 위하여 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Treponema denticola* ATCC 33521을 사용하였다. 앵타머의 cloning을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* TOP10과 pCR2.1-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, USA)를 사용하였다.

2.2 SELEX

*S. mutans*에 결합하는 앵타머를 선별하기 위하여 Tuerk 등[18]의 SELEX (Systemic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법을 변형하여 사용하였다. 앵타머 선별을 위한 DNA library는 39개의 random sequence를 갖는 nucleotide의 5'과 3'의 위치에 각각 44 또는 38개의 primer sequence가 결합된 올리고머를 고안하여 사용하였고, PCR을 통하여 선별된 앵타머를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 각각 *Bam*HI과 T7 promoter sequence를 갖는 forward primer와 *Bam*HI sequence만 포함된 reverse primer를 제조하여 사용하였다 (Table 1). 상등액을 버린 후, selection buffer (50 mM Tris.HCl pH 7.4, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1% NaN₃)[20]50 µl를 넣은 뒤 13,000×g, 4°C에서 5분간 원심분리 하고 PBS 200 µl로 2회 세척하였다. 10 µl PCR product를 100°C에서 5분 끓이고 즉시 아이스에 식히고 10 µl 세균 현탁액과 혼합하였다. Rocking shaker 4°C에서 1시간 보관한 뒤, 13,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리 후 PBS 50 µl를 넣은 후 현탁시키고, 500 mM NaCl 200 µl를 넣고 현탁시키고 13,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하고 상등액을 모아 20°C에 보관하였다. Nucleic acid library pool에 상등액을 혼합하여 nucleotide 단편들이 대상 DNA에 부착할 수 있도록 하고, 일정 시간이 경과 된 후에 결합되

지 않은 핵산들을 제거 한 후, 한 편으로는 단백질에 부착된 핵산을 분리하였다. 분리된 핵산 단편들은 다시 PCR을 통하여 증폭시킨 후 1차 앵타머 library로 사용하였다. 1차선별을 거친 이들 1차 앵타머 library는 다시 target 분자와 혼합하여 위의 과정을 수차례 반복하여, 대상 DNA에 대한 선택성을 높이고자 하였다 (Fig. 1).

Table 1. Random DNA library and primers used for SELEX

Primers	Sequences
APT-N40 (86 mer)	5'-CGGATCCATGGGCACTATTTATATCAA -N40-AATGTCGTTGGTGGCCC -3'
APT-F (44 mer)	5'-CGCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGCC ACCAACGACATT-3'
APT-R (38 mer)	5'CCCGACACCCGCGGATCCATGGGCACTATTTAT ATCAA-3'

2.3 *S. mutans*의 부착능 분석

*S. mutans*의 부착능 분석을 분석하기 위하여 BHI 액체배지에 10%의 농도가 되도록 자당을 혼합한 뒤 각 앵타머를 1 pM이 되도록 첨가하고, *S. mutans*를 접종하였다. 또한 멸균된 glass beads의 무게를 측정 한 후 6 well plate에 넣고 시료와 균을 혼합한 배지를 각 well 당 5 ml씩 분주 하여 37°C 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양 후 각 시료배양액들은 제거하고, 75% ethyl alcohol을 넣어 균체가 부착된 glass beads를 고정 한 후 건조시켜 beads의 무게 측정하여 비교하였다. 모든 실험은 3회 반복 시행하였다.

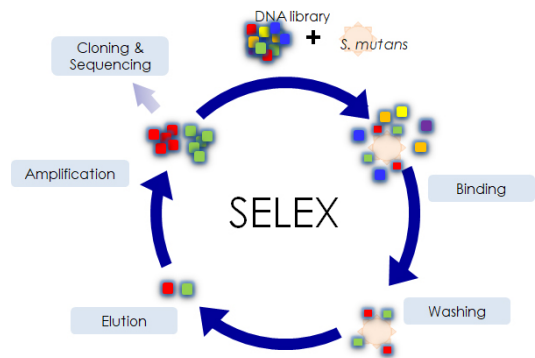


Fig. 1. Schematic diagram of SELEX process. SELEX is a multi-step process in which strongly binding ligands are preferably selected by rounds of affinity assays and PCR amplification.

2.4 Western blot analysis

균주를 배양하고 배양 된 균체에 5 ml의 lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 첨가한 후 초음파 파쇄기 (Vibra cell VCX-600, Sonics and Materials Inc., USA)로 균체를 파쇄하고, 13,000 rpm, 10분간 원심분리하고 상등액만 분리하였다. 약 가로 5 cm, 세로 1 cm의 크기로 자른 nitrocellulose membrane을 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% (v/v) methanol)에서 20분간 침지시키고, membrane에 균주를 20 ng/ml로 정량하여 분주하였다. 이 membrane을 3% non-fat dry milk (Seoul milk Co., Korea)가 함유된 TTBS buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.6, 1.37 M NaCl, 0.1% Tween 20)에서 20분간 blocking하고 nitrocellulose membrane을 0.1% Tween 20이 포함된 50 ml의 TBS buffer에 3회에 걸쳐 매회 15분간 세척하고 TTBS로 primary antibody를 1 : 500으로 희석하여 첨가한 후 하루 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 nitrocellulose membrane을 0.1% Tween 20이 포함된 50 ml의 TBS buffer에 3회에 걸쳐 매회 15분간 세척하고 Alkaline phosphatase-conjugated anti DIG를 blocking buffer에 1 : 2000로 희석한 secondary antibody 용액에서 1시간 반응시켰다. 이후 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer에 3회에 걸쳐 15분간 세척하고, 200 μ l의 NBT/BCIP stock solution을 첨가된 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 5 ml에 발색 반응시켰다.

2.5 통계분석

S. mutans 부착능에 대한 통계학적 자료분석은 측정된 무게 값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 이 중 앵타머의 종류에 따른 *S. mutans*의 부착능은 one way ANOVA를 통하여 분석하였고, 두 군간 비교는 Tukey's test를 시행하였다. 통계분석은 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences 18.0. SPSS Inc. USA) 통계프로그램을 이용하여 수행하였다.

3. 결과

3.1 SELEX를 통한 앵타머의 선별

S. mutans 균체는, 6% formaldehyde를 사용하여 균체를 고정화 하고 SELEX를 수행하였다. 250 mM NaCl

이 함유된 소량의 PBS를 첨가하여 DNA에 부착된 앵타머를 분리한 후 PCR을 통해 증폭하고, agarose gel 전기영동을 통하여 분석한 결과 100 base pair 정도의 위치에서 분리된 앵타머를 확인할 수 있었다. 선별된 앵타머는 그의 염기서열 분석을 위하여 pCR2.1-TOPO cloning vector에 cloning하고 *E. coli* TOP10에 형질전환 하였다. 각각 형질전환 된 positive colony들을 배양하고, 이 들로부터 plasmid vector를 분리하여 제한효소로 절단하여 확인한 결과, 앵타머 단편이 cloning된 것을 확인할 수 있었다.

선별된 앵타머의 염기서열 분석은 Bioneer Co. Ltd. (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 분석된 염기서열 중 이들이 SELEX를 위하여 사용된 DNA library로부터 유래한 것임을 확인하기 위하여 *Bam*HI과 T7 promoter sequence를 기준으로 하여 이들의 염기서열이 포함된 앵타머만을 선택하였다. 그 결과 6개 앵타머의 염기 서열을 확인하고 각각 SM-1, SM-2, SM-3, SM-4, SM-5, SM-6이라 명명하였다. 그 염기서열은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Nucleotide sequences of aptamers specific to *Streptococcus mutans*

Name	Sequences
SM-1	5'-GCATCGAATTCGAAGTTGCTCTAGTGCCCGTGTGCTCAA-3'
SM-2	5'-GGGCTAGGTAACCGTACCACCTTCCCTGCTTGA TGCAA-3'
SM-3	5'-TGTAACGGTGGAAAGGATCTGAGGAGGCGCAAT GCGTAA-3'
SM-4	5'-TGGCACCATTAACCCGTGTTGAGGAGGCGCAATG CGTAA-3'
SM-5	5'-CCTAACGTTGTAACCGCGCTCCTCAAGGAGCCAC GCTAA-3'
SM-6	5'-GTGTTTCGCGCTATTTCCGTACAACCGGAATACG CCTAA-3'

3.2 앵타머에 의한 *S. mutans*의 부착 억제

선별된 앵타머가 *S. mutans*의 부착능에 미치는 영향을 분석하였다. *S. mutans*는 10% 자당이 함유된 BHI 배지에서 glass bead에 효과적으로 부착 할 수 있음을 관찰할 수 있었으며, 24시간 배양 후 glass bead의 질량은 7.2 \pm 0.7 mg 증가하는 것으로 관찰되었다. 각각의 앵타머가 1 pM의 농도로 첨가되었을 때 bead의 질량의 변화를 측정할 결과 모든 군에 있어서 대조군과 큰 차이를 나타내었으며, SM-2와 SM-3의 경우 질량의 변화가

2.1±0.5 mg, 1.9±0.1 mg로서 가장 낮게 나타났다 (Table 3).

Table 3. Effect of aptamers on the adhesion of *Streptococcus mutans*

Name	Before [†]		After [‡]		Difference [*]		unit : g
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Control	1.5850 ± 0.0333	1.5923 ± 0.0332	0.0072 ± 0.0007 ^a				
SM-1	1.5652 ± 0.1115	1.5698 ± 0.1129	0.0045 ± 0.0016 ^{ab}				
SM-2	1.5992 ± 0.0827	1.6013 ± 0.0830	0.0021 ± 0.0005 ^b				
SM-3	1.5243 ± 0.1376	1.5262 ± 0.1375	0.0019 ± 0.0001 ^b				
SM-4	1.5305 ± 0.1378	1.5332 ± 0.1376	0.0027 ± 0.0001 ^b				
SM-5	1.4759 ± 0.0516	1.4794 ± 0.0518	0.0034 ± 0.0002 ^b				
SM-6	1.5521 ± 0.0913	1.5558 ± 0.0887	0.0036 ± 0.0029 ^{ab}				

[†]: Before the adhesion of bacterial cells

[‡]: After the adhesion of bacterial cells

^{*}: p<0.05, by one way ANOVA

a,b: The same letter indicates no significant difference by Tukey's test at $\alpha=0.05$

3.3 앵타머의 결합 선택성

선별된 앵타머의 결합특성을 분석하기 위하여 DIG-labelled 앵타머를 제조하고, 이를 primary antibody 로 사용하여 modified-Western blot을 시행하였다. 먼저 negative control로서 *E. coli* TOP10을 lane 1에 loading 하고 *S. mutans*를 lane 2에 loading하고 *P. gingivalis*를 lane 3에, *T. denticola*를 lane 4에 loading하였다. 이를 filter paper에 transfer하고, DIG-labelled 앵타머를 primary antibody로 사용하여 Western blot을 수행한 결과 *S. mutans*에만 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

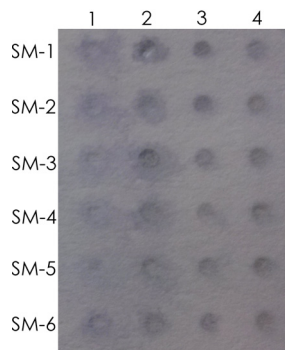


Fig. 2. Modified-Western blot of SM. DIG-labelled aptamers were used as primary antibodies and anti-digoxigenin-AP conjugate was used as a secondary antibody. Color development reaction was done in a solution containing NBT/BCIP. Lanes 1, *E. coli* TOP10; 2, *S. mutans*; 3, *P. gingivalis*; 4, *T. denticola*.

4. 고찰

2004년 말 Pfizer에서 노화와 연관된 황반 변성 (age-related macular degeneration, AMD)을 유발하는 VEGF165 단백질에 결합하는 앵타머를 선별하여 개발한 앵타머 치료제인 Macugen을 FDA로부터 신약 승인을 받아 AMD의 치료제로서 시판됨으로 앵타머의 실용성이 입증되었다. 앵타머는 표적분자에 대한 결합력이 좋고 특이성이 뛰어나기 때문에 이를 활용하여 새로운 화합물 신약을 screening 할 수 있는 것으로 각광을 받고 있다. 실제로 많은 앵타머들이 신약 표적단백질에 대하여 선별되었으며, 이들을 competitive inhibition할 수 있는 화합물을 chemical library 중에서 screening 하고자 하는 연구와, 앵타머를 PCR과 같은 유전자 증폭 (sequence amplification)등에 응용하여 DNA detection 등이 가능하고 표적인자에 대해 항체보다 더 높은 친화력과 특이성을 가지고 결합할 수 있는 특징을 가진 이들 앵타머는 세포와 같은 복합시료도 인지할 수 있어, 특히 생체 특정 조직에서 발견되는 분자들이나, 질환 특이적으로 발현하는 단백질들을 특이적으로 인지하는 앵타머 분자를 인식소자로 활용하여 chip이나 sensor용으로 적용하고자 하는 시도가 진행 중이다[21,22].

본 연구에서는 *S. mutans*에 선택적으로 결합하는 앵타머를 선별하기 위하여 39개의 random sequence를 갖는 nucleotide의 5'과 3'의 위치에 각각 44 또는 38개의 primer sequence가 결합된 올리고머를 고안하여 사용하였고, PCR을 통하여 선별된 앵타머를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 각각 *Bam*HI과 T7 promoter sequence를 갖는 forward primer와 *Bam*HI sequence만 포함된 reverse primer를 제조하여 사용하였다.

일명 cell SELEX라고도 일컫는 균체를 이용한 SELEX방법은 세균에 선택적으로 작용하는 앵타머의 선별에 유용한 방법이다. 원심분리를 통하여 *S. mutans* 균체를 모은 후, 고정화 시킨 균과 DNA library를 혼합하여 앵타머를 선별하였다. 선별된 앵타머는 cloning을 통하여 염기서열을 분석을 하였다.

한편, 선별된 앵타머는 glass bead를 사용한 부착능 분석법을 통하여 효과적으로 *S. mutans*의 부착을 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과 선별된 모든 앵타머가 대조군에 비하여 현저한 부착 억제능을 나타냈으며 그 중 SM-2와 SN-3이 가장 큰 억제능을 나타내었다.

이와 같은 결과를 바탕으로, 본 연구에서의 DNA 앵타머는 치아우식증의 주요 원인균인 *S. mutans*에 특이적으로 결합하기 때문에 구강 내에서 *S. mutans*의 부착 및 생육을 효과적으로 억제할 수 있고, 환자가 치아우식증에 이환되었는지를 확인하는 센서로 기능을 연구하는 차별화된 대안으로 활용 될 수 있을 것이다. 또한, 본 연구에서의 DNA 앵타머를 치과에서의 진단 기구에 묻혀 시료를 채취하여 사용하면 대상균주를 신속하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 검출 및 치료에 효과적일 수 있으며, 세포의 다양한 물질들을 대상으로 한 특이적인 앵타머를 선별하고, 이들에 대한 충분한 library를 확보할 수 있다면, 세균 세포뿐만 아니라 대부분의 모든 세포의 생육과 대사를 조절하는 새로운 소재를 제공할 수 있고, 세포의 생리적 기능을 연구하는 획기적인 대안이 될 수 있을 것이다.

5. 결론 및 요약

이 연구에서는 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*에 선택적으로 결합하는 앵타머를 탐색, 선별하고자 하였다. 이를 위하여

- 1) 39개의 random sequence를 갖는 DNA library를 제조하고, *S. mutans*를 앵타머 선별의 대상물질로 하여, SELEX 방법을 통하여 선별하였다.
- 2) 선별된 앵타머를 pCR2.1 cloning vector에 cloning 하고, 그 염기서열을 분석하였다.
- 3) 그 결과 6종의 서로 다른 염기서열을 갖는 앵타머를 선별하였다.

위의 결과로부터 선별된 앵타머들은 *S. mutans*에 선택적으로 결합함을 확인하였고, 이 앵타머는 세균의 당 대사 및 단백질 합성 관련 단백질에 결합함으로써 세균의 부착을 억제 할 수 있음을 확인하였다.

References

- [1] H. S. Yoon, "Dental Fear Level according to Oral Symptom Awareness in College Students, *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 17(12), pp. 198-204, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2016.17.12.198>
- [2] J. M. Tanzer, M. L. Freedman, R. J. Fitzgerald, and R. H. Larson, "Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*", *Infect. Immun.*, vol. 10, pp. 197-203, 1974.
- [3] S. Hamada, T. Ooshima, N. Masuda, J. Mizuno, and S. Sobue, "Inhibition of rat dental caries by dextranase from a strain of *Spicaria violacea*", *Japan. J. Microbiol.*, vol. 20, pp. 321-330, 1976.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1976.tb00994.x>
- [4] K. Nakahara, S. Kawabata, H. Ono, K. Ogura, T. Tanaka, T. Ooshima, and S. Hamada, "Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans Streptococci", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, pp. 968-973, 1993.
- [5] S. Hamada, and H.D. Slade, "Biology, Immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*", *Microbiol. Rev.*, vol. 44, pp. 331-384, 1980.
- [6] T. J. Montville, C. L. Cooney, and A.J. Sinskey, "*Streptococcus mutans* dextranase", *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 24, pp. 55-84, 1978.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70636-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70636-1)
- [7] S. Hamada, and M. Torii, "Interaction of glycosyltransferase from *Streptococcus mutans* with various glucans", *J. Gen. Microbiol.*, vol. 116, pp. 51-59, 1980.
- [8] T. Koga, S. Sato, T. Yakushiji, and M. Inoue, "Separation of insoluble and soluble glucan-synthesizing glycosyltransferases of *Streptococcus mutans* OMZ176 (serotype d)", *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 16, pp. 127-130, 1983.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00272.x>
- [9] S. Hamada, and H. D. Slade, "Chemical and immunological characterization of Type e polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*", *Infect. Immun.*, vol. 14, pp. 68-76, 1976.
- [10] S. Hamada, K. Gill, and H.D. Slade, "Chemical and immunological properties of the Type f polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*", *Infect. Immun.*, vol. 14, pp. 203-211, 1976.
- [11] D. M. Spinell, and R. J. Gibbons, "Influence of culture medium on the glycosyltransferase and dextran-binding capacity of *Streptococcus mutans* 6715 cells", *Infect. Immun.*, vol. 10, pp. 1148-1151, 1974.
- [12] K. Fukui, T. Moriyama, Y. Miyake, K. Mizutani, and O. Tanaka, "Purification and properties of glycosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*", *Infect. Immun.*, vol. 37, pp. 1-9, 1982.
- [13] K. Fukushima, R. Motoda, and T. Ikeda, "Resolution of *Streptococcus mutans* glycosyltransferases into two components essential to water-insoluble glucan synthesis", *FEBS Letters*, vol. 128, pp. 213-216, 1981.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80083-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80083-X)
- [14] J. H. Choi, and S. H. Ohk, "Antibacterial Activity of Fraviola extract to inhibit the *Staphylococcus epidermidis*", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 18(5), pp. 667-673, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.5.667>
- [15] J. H. Choi, and S. H. Ohk, "Evaluations on Antioxidant Effect of Water Extract from Graviola Leaves", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*,

vol. 18(6), pp. 129-135, 2017.

DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.6.129>

- [16] S. H. Lee, M. S. Lee, "The Study of Physiological and Antimicrobial Activities on the *Citrus Junos* Extracts with its Textures and Skin, *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 18(4), pp. 67-74, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.4.67>
- [17] A. D. Ellington, and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", *Nature*, vol. 346, pp. 818-822, 1990.
DOI: <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- [18] C. Tuerk, and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: R ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", *Science*, vol. 249, pp. 505-510, 1990.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- [19] N. S. Que-Gewirth, and B. A. Sullenger, "Gene therapy progress and prospects: RnA aptamers", *Gene Ther.*, vol. 14, pp. 283-91, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302900>
- [20] B. J. Paster, S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst, "Bacterial diversity in human subgingival plaque", *J. Bacteriol.*, vol. 183, pp. 3770-3783, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001>
- [21] B. K. Kim, and B. G. Park, "Study on Optical Characteristics of 8-Hydroxyquinoline Synthesized Derivative as Sensing Material of the Fiber-Optic Copper Ion Sensor in Aqueous Environment" *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 18(12), pp. 100-105, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.12.100>
- [22] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX -A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands", *Biomolecular Engineering*, vol. 24(4), pp. 381-403, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>

박 병 주(Byung-Ju Park)

[정회원]



- 1982년 2월 : 전남대학교 의과대학 의학과 (의학사)
- 1991년 2월 : 전남대학교 대학원 의학과 (의학박사)
- 1986년 4월 ~ 현재 : 전남대학교 치의학전문대학원 교수

<관심분야>

의생명과학, 생화학

옥 승 호(Seung-Ho Ohk)

[정회원]



- 1993년 2월 : 연세대학교 대학원 생명공학과 (공학석사)
- 1997년 2월 : 연세대학교 대학원 생명공학과 (공학박사)
- 2003년 2월 ~ 현재 : 전남대학교 치의학전문대학원 교수

<관심분야>

의생명과학, 미생물