

구강환경에 따른 *Streptococcus salivarius*의 요소분해활성의 변화

목지은 · 박상진 · 최기운 · 최호영

경희대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

A CHANGE IN UREASE ACTIVITY OF *Streptococcus salivarius*
CAUSED BY DIFFERENT ORAL ENVIRONMENT

Ji-Eun Mok, Sang-Jin Park, Gi-Woon Choi, Ho-Young Choi

Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate School, Kyung Hee University

Urea in the oral cavity is hydrolyzed mainly by bacterial ureases to ammonia, which in turn, raises pH of the oral environment, maintaining oral pH homeostasis, thereby inhibiting dental caries. *Streptococcus salivarius* has been shown to be a major contribution to oral ureolysis. Synthesis of urease by *S. salivarius* appears to be constitutive, but can be greatly enhanced in the acidic environment. It has been presumed that ureolytic activity of *S. salivarius* strains isolated from caries-active site is greater than that of strains from caries-free site. However, no *in vivo* study has supported the presumption. The present study was performed to observe the ureolytic activity of *S. salivarius* strains isolated from different environments in the same individual, finding out whether the ureolytic activity is related to dental caries. For the purpose, *S. salivarius* strains were isolated from caries-active site (>C2), a caries-free site of the tooth, and the dorsum of the tongue of each of 50 patients having decayed teeth. The strains isolated from the patients who harbored *S. salivarius* in more than two sites were selected and then their ureolytic activities were measured. In order to examine clonal diversity of the strains, their *ureC* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then restricted with *EcoRV*, and the protein profiles of the strains were compared by SDS-PAGE. The results were as follows:

1. Of 50 patients, 13 patients harbored *S. salivarius* in more than two sites; a total of 61 *S. salivarius* strain were isolated from the patients and selected for the study.
2. Of 17 isolates from the caries-active site of 9 patients harboring *S. salivarius* in more than two sites including carious lesion, 10 (58.8%) showed a high ureolytic activity (> 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). While, 19 out of 44 isolates (43.2%) from the caries-free site of the teeth and the dorsum of the tongues of 13 patients were the strains with a high ureolytic activity.
3. Of 9 patients harboring *S. salivarius* in more than two sites including caries-active site, 6 patients were found to have the strains in the caries-active site showing a lower ureolytic activity than the strains in the other sites.
4. Of 34 isolates with ureolytic activity higher than 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 32 isolates produced 0.54-Kbp PCR products regardless of the sites of bacterial collection. In contrast, of 27 isolates with ureolytic activity lower than 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 26 isolates yielded 1.3-Kbp PCR products or none regardless of the sites.
5. Different clonal types of *S. salivarius* with relatively higher and lower ureolytic activities were found in the same individuals and even in the same sites.
6. None of strains showing different ureolytic activity appeared to be the same clonal type.

The overall results suggest that ureolytic activity of the isolates does not appear to be related to differences of the environments but related to their own genetic traits.

I. 서 론

치태와 타액의 pH 변화는 구강환경과 건강에 중요한 역할을 하고 있다^{1,2)}. 즉, 치태 미생물이 당을 분해하여 산을 생성할 경우, 치태의 산도가 증가하여 결과적으로 치아우식증이 유발된다. 그러나 구강의 생태계는 pH 감소에 대비하여 구강의 pH 항상성을 유지하려는 기전을 갖고 있는데, 그 기전 중 하나가 요소이다³⁻⁵⁾.

요소는 인체의 단백질 대사과정에서 생성되는 최종 질소 산물로써 타액⁶⁾이나 특히 치은열구액⁷⁾에 높은 농도로 존재한다. 구강내에서 요소는 분해되어 탄산가스와 암모니아를 생성하여, 암모니아는 결과적으로 타액이나 치태의 pH를 급속히 상승시킬 뿐만 아니라⁸⁾ 포도당이나 자당과 같은 당류보다 더 빠르게 대사되기 때문에⁹⁾ 치아우식증을 억제하는 가장 중요한 자연저항물질로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 요소 용액으로 양치할 경우, 구강내 pH를 중성상태로 유지시킬 수 있고¹⁰⁾ 신장질환자의 경우는 일반적으로 타액내 요소 농도가 높으며¹¹⁾ 치아우식 발생 빈도가 낮은 것으로 보고되고 있다¹²⁾.

구강내에서 요소는 부분적으로 역 ornithine cycle에 의해 이용되지만³⁾ 대부분은 타액 및 치태의 세균에 의해 분해되며¹³⁾, 특히 streptococci 및 *Actinomyces* 등¹⁴⁻¹⁶⁾이 구강내 중요한 세균으로 보고되고 있는데 이 중에서도 *Streptococcus salivarius*(*S. salivarius*)가 가장 강력한 요소분해능력을 갖는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 일부 병원성 세균의 요소분해 능력은 요소분해효소(urease)에 의하여 생기며, 이 효소는 그 세균의 독성인자(virulence factor)로서 병원성과 직접적인 관련성이 있는 것으로 보고되었다¹⁸⁾. 대장균과 함께 중요한 신우신염의 원인균인 *Proteus mirabilis*(*P. mirabilis*)는 요소분해효소를 분비하여 직접 신장조직을 파괴하는 것으로 알려지고 있다¹⁸⁾. 또한 *P. mirabilis*는 요소를 분해하여 주변환경을 알칼리 상태로 변화시켜 정상 pH에서 수용성이던 다가의 이온들을 파괴화 상태로 만들어 침전시키므로써 요석을 유도하는 주요 원인균이다¹⁹⁾. *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)는 강산성 환경인 위에서 요소분해 효소를 이용하여 암모니아를 생성하므로써 위의 pH를 높임과 동시에²⁰⁾ 직접 위점막을 자극하여²¹⁾ 위궤양 및 위암의 원인균으로 작용한다. 구강에서는 요소분해효소가 있어 산성 pH의 환경에서도 요소를 분해하여 pH를 높이는 능력이 있는 *S. salivarius*²²⁾나 *A. naeslundii*¹⁶⁾등이 요소를 분해하는 능력이 없는 구강세균에 비해 치태내에서 생존을 위해 유리하다.

세균의 요소분해효소는 주변환경과 관계없이 계속해서 일정량을 생산하지만^{23,24)}, 환경내 질소공급이 부족할 경우²⁵⁾, 성장정도나 세균 세포의 분화정도에 따라²⁶⁾, 환경내 요소의 유입량이 많아질 때²⁷⁾, 또는 특별히 pH가 낮아질 때 요소분해효소의 활성이 크게 증가할 수 있는 것으로 보고된 바있다²⁸⁾. Sisson 등²⁹⁾은 *S. salivarius*도 요소분해 효소를 일정량 생산하지만 환경의 변화, 특히 pH가 낮아질 때 요소

분해효소의 활성이 크게 증가한다고 보고하였으며 *S. salivarius*의 요소분해효소 활성은 성장 중에 산소와 cysteine에 의해 감소될 수 있음을 보고한 바있다³⁰⁾. Chen과 Burne³¹⁾도 pH가 낮을 때나 포도당이 많을 때 *S. salivarius*의 요소분해효소의 발현과 활성도가 높아지는 것을 관찰하였다.

한편 *S. salivarius*의 요소분해효소가 구강의 pH에 큰 영향을 미칠 수 있어 치아우식증과 관련성이 있을 것^{17,29,31)}이라고 제시한 바있지만 실제 인체에서 *S. salivarius*의 요소분해 활성도와 치아우식증의 관련성에 대해서 정 등³²⁾은 우식부위와 정상치아부위에서 분리한 *S. salivarius* 균주들의 요소분해 활성을 조사한 결과, 활성도가 다양하게 나타났으나 우식부위의 균주들이 정상부위 균주보다 활성도가 높은 경우가 많은 것으로 나타났다. 또한 요소분해효소의 활성은 일반적으로 중성 pH에서 활성도가 높은 균주들이 낮은 pH에서 활성도가 증가한 반면 활성도가 없거나 낮은 균주는 pH가 감소하여도 요소분해 활성도에 별 다른 변화를 보이지 않는 것으로 관찰되었다고 보고하였다. 최³³⁾는 *Streptococcus salivarius*의 *ureC* 유전자가 요소분해효소의 활성도에 따라 차이가 있음을 발견하였으나 정상치아부위에서 발견되는 *S. salivarius* 균주인 경우도 요소분해효소 활성도가 없는 것에서부터 높은 것까지 다양하게 나타나고 있음을 보고한 바있다.

이상의 연구 결과만으로 *S. salivarius*의 요소분해 활성도가 구강의 환경 특히 치아우식증과 관련성이 있는지를 단정하기는 어려운 것으로 판단되어 본 연구는 우식부위에서 분리한 *S. salivarius* 균주와 같은 개인의 정상치아 부위나 설배에서 분리한 균주의 요소분해 활성도를 비교, 관찰하여 *S. salivarius*의 요소분해 활성도와 치아우식증과의 관계를 밝히고자 실시하였으며, 또한 분리한 *S. salivarius* 균주의 요소분해효소 유전자의 변이성을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험균주 및 배양

실험에 사용할 *S. salivarius* 균주를 수집하기 위해 경희대학교 치과병원 보존과에 내원한 50명의 치아우식증 환자에서 C2이상의 우식와동의 표면에서 치태를 채취하여 실험균으로 하였고, 동시에 같은 환자에서 정상치아부위의 치태와 설태를 채취하여 대조균으로 하였다. 채취한 실험균과 대조균의 치태나 설태는 brain heart infusion(BHI; Difco) 액체배지로 수송하여 vortex mixer로 진탕한 후 $10^1 \sim 10^3$ 까지 단계희석한 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*의 특징적인 크고, 점액성이 있고 약간 투명한 청색의 집락³⁴⁾ 한 부위당 2개씩 선택하여 본 실험에 사용하였다.

2. *S. salivarius*의 동정

선택된 집락들을 다시 MS 한천배지에 희석도말법을 이용하여 혐기성 배양기에서 1일간 배양한 후 독립집락임을 확인하였다. 확인된 독립집락을 BHI 액체배지에 혐기적으로 배양한 후 배양된 균을 흡광광도계(Ultrospec 2000: Pharmacia Biotech., U.S.A)로 측정하여 540nm에서 흡광도 1.2로 조정하였다. 조정된 균액은 API 20 Strep kit(BioM rieux, France)를 이용하여 생산자가 권한 방법에 따라 동정하였다. 즉, 배양된 균액을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 수집한 후 resuspension medium으로 재부유하여 그 중 500 μ 를 GP medium에 첨가하고 나머지 균액은 identification strip 중 VP에서 ADH 부분에 150 μ 씩 분주하였고, GP medium에 혼합된 균액은 RIB에서 GLYG 부분까지 250 μ 씩 분주하여 4시간동안 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 추가 배양후 비교하였다³²⁾.

3. 요소분해 활성검사

우식부위, 정상치아부위 및 설배 중 두 부위 이상에서 *S. salivarius* 균주가 동정된 경우 이 균주들만 이후 실험에 사용하였다. 요소분해 활성검사는 Collins와 Falkow²⁴⁾ 및 Chen 등³⁵⁾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 를 첨가하여 재부유하였다. 재부유된 균액 중 12 μ 를 사용 직전에 준비된 15 μ 의 40% 요소, 173 μ 의 urease 완충용액(20mM phosphate buffer in 0.6% NaCl, pH 7.0)과 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 여기에 500 μ 의 지시약인 phenol-nitroprusside와 500 μ 의 alkaline hypochlorite를 첨가하여 vortex mixer로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, 흡광광도계를 이용하여 635nm에서 비색농도를 측정하

였다. 대조 비색농도곡선은 NH₄Cl을 이용하여 결정하였으며, 시료의 측정치를 이 곡선에 대입하여 생성된 암모니아의 농도를 측정하였다. 실험에 사용된 균액의 농도를 맞추기 위한 단백질 농도의 결정은 Lowry 방법³⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 요소분해 활성도는 세균(단백질) 1mg이 첨가된 요소로부터 1분간 생성할 수 있는 암모니아의 양(μ mol/min/mg)으로 나타내었다.

4. Chromosome의 분리

요소분해효소 유전자의 확인에 사용될 chromosome을 분리하기 위하여 Ausubel 등³⁷⁾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 수확하였다. 수확된 균체에 4.4ml의 TE 완충용액(10mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA)를 첨가하여 재부유시킨 다음 480 μ 의 10% SDS와 48 μ 의 proteinase K(20mg/ml)를 첨가, 혼합한 후 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 \times g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리로 분리된 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 12ml의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 12,000 \times g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% ethanol로 1회 세척한 후 상온에서 건조하였다. 건조된 DNA에 200 μ 의 증류수를 첨가하여 재부유한 후 -20 $^{\circ}$ C에 사용하기 전까지 보관하였다.

5. Polymerase chain reaction

분리된 *S. salivarius* 균주에서 요소분해효소 유전자의 존재 유무와 유전자 차이를 확인하기 위하여 polymerase chain reaction(PCR) 실험을 수행하였다. 사용된 primer는 Chen과 Burne³¹⁾이 사용한 *S. salivarius* 57.I의 *ureC* 유전자에 근거하여 제조하였으며, 염기서열은 forward primer로 5'-AAAATACACgAggACTggggT-3'를, reverse primer로는 5'-TgCggggTTAATgTgT ATTT-3'를 사용하였다. *S. salivarius*에서 추출한 chromosome을 주형으로 한 PCR 반응을 위해 위에서 언급한 두 종류의 primer를 각각 0.8 μ mol 씩, 200 μ M dNTP, 0.75U Taq polymerase, PCR 완충용액[10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 15mM MgCl₂]을 첨가하여 혼합용액 총량이 30 μ 가 되도록 혼합하여 사용하였다. 혼합용액은 92 $^{\circ}$ C에서

1분간 가열한 후 94℃에서 30초, 42℃ 30초, 72℃에서 1분 30초간 모두 30 cycle을 수행하여 DNA를 증폭하였고, 72℃에서 5분간 반응하여 증폭반응이 완전히 끝나도록 하였다.

6. Agarose gel 전기영동 및 DNA의 회수

PCR을 통해 얻어진 산물을 확인하기 위하여 1% agarose gel(0.3g agarose, 30ml TAE 완충용액(40mM Tris-acetate(pH 8.0), 2mM EDTA))을 사용하였다. Gel을 TAE 완충용액이 들어 있는 gel 탱크에 넣은 후 DNA 시료를 10×loading buffer(40% sucrose, 0.3% bromophenol blue)와 4 : 1의 비율로 섞어 gel의 각 well에 적하한 후 10V/cm로 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 ethidium bromide (2μg/ml) 용액에서 5분간 염색하여 UV transilluminator 상에서 결과를 관찰하였다.

전기영동을 통해 확인된 DNA band는 Gene clean kit II(Bio101 Inc., USA)를 이용하여 수획하였다. 즉, UV transilluminator 상에서 확인된 DNA band 부위를 잘라내어 1.5ml 원심분리용 튜브에 넣고 3×volume의 sodium iodine을 첨가한 다음 55℃에서 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.

7. 제한효소절단

회수한 PCR 산물 DNA 20μl 중 8μl를 제한효소(restriction enzyme)인 *EcoRV*(20units/μl) 1μl, buffer 1μl와 함께 37℃에서 2시간 배양하여 PCR 산물을 절단하였다. 절단 후 10×loading buffer 3μl와 혼합한 후 gel의 각 well에 적하하였다. 80V로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 10분간 염색하여 UV transilluminator 상에서 PCR product의 절단상태를 관찰하였다.

8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

S. salivarius 균주를 2일간 배양한 후, Tris 완충용액(5 mM, pH 8.0)으로 2회 세정하여 540nm에서 세균액을 흡광도 1.5로 조정하였다. 세균액 100μl를 원침한 후, 균 pel-

let을 초음파세척기에서 5분간 처리하고 β-mercaptoethanol이 첨가된 2×sample buffer로 10분간 100℃로 가열하였다. 가열 후 원침하여 상층액을 10% polyacrylamide gel에서 Laemmli 방법⁴³⁾으로 전기영동하였고, 영동된 gel은 0.1% Coomassie blue로 30분간 염색하고 탈색용액(5% methanol, 7% acetic acid)으로 탈색한 후 세균 단백질 profile을 관찰하였다.

III. 실험성적

1. *S. salivarius*의 분리·동정

치아우식증 환자 50명에서 실험군으로 우식부위 표면으로부터 채취한 치태 그리고 대조군으로 같은 환자에서 채취한 정상치아부위의 치태와 설태를 MS 한천배지에 각각 배양하여 얻은 *S. salivarius*의 특징적 집락을 2개씩 선택하여 API 20 Strep kit로 동정한 결과 두 부위 이상에서 *S. salivarius*의 존재가 확인된 환자는 13명이었다. 이들 13명의 환자로부터 우식부위에서 17균주, 정상치아부위에서 20균주, 설배에서 24균주 등 총 61개 균주가 분리되었다(Table 1).

2. *S. salivarius*의 요소분해 활성

실험군인 우식부위와 대조군인 정상치아부위와 설배에서 분리한 총 61개 균주의 요소분해 활성도를 측정된 결과 부위별로 봤을 때 3개 부위 모두 다양한 활성도를 보였다. 우식부위의 균주들은 최저 7.3μmol/min/mg에서 최고 1262 μmol/min/mg으로 약 170배, 정상치아부위의 균주들은 최저 5.3μmol/min/mg에서 1165.6μmol/min/mg으로 약 220배, 설배의 균주들은 최저 7.1μmol/min/mg에서 1340.3μmol/min/mg으로 약 190배 정도로 커다란 요소분해 활성도의 차이를 나타냈다(Table 2).

요소분해 활성도의 정도에 따라 비교했을 때, 17개의 실험군 균주 중 40μmol/min/mg 이하의 아주 낮은 활성도를 보인 균주가 6균주, 100~200μmol/min/mg의 비교적 낮은 활성도를 보인 균주는 1균주로 합해서 41.2%이었고, 200μmol/min/mg 이상의 활성도를 보인 균주는 모두 10균주로 58.5%로 나타났다. 반면 대조군인 정상치아부위와 설배부위의 균주들은 40μmol/min/mg 이하가 21균주, 40~100μmol/min/mg가 1균주, 100~200μmol/min/mg가 3균주로 모두 합해 56.8%, 200μmol/min/mg 이상인 경우는 19균주로 43.2%를 차지하여 실험군이 대조군보다 요소분해 활성도가 높은 균주가 다소 많은 것으로 나타났다(Table 3).

개인별로 각 분리균주들의 요소분해 활성도를 비교하였을 때 같은 환자에서 분리한 모든 균주가 거의 비슷한 활성도

Table 1. Isolation of *S. salivarius* strains from different sites in the oral cavity of individual patients with dental caries.

Patients	Caries-active site	Caries-free site	Tongue	Patients	Caries-active site	Caries-free site	Tongue
P 1	-	-	+ ^b	P26	+	-	-
P 2	-	-	+	P27	-	-	+
P 3	-	-	+	P28	-	+	+
P 4	-	-	+	P29	+	+	+
P 5	-	+	-	P30	-	-	-
P 6	-	-	-	P31	-	-	-
P 7	-	-	+	P32	-	-	-
P 8	-	+	-	P33	-	-	-
P 9	+	-	+	P34	-	-	-
P10	+	-	-	P35	-	-	-
P11	-	-	-	P36	-	-	+
P12	-	-	-	P37	-	-	+
P13	+	+	+	P38	+	+	+
P14	+	+	+	P39	+	-	+
P15	-	-	+	P40	-	-	-
P16	-	-	-	P41	-	-	-
P17	-	-	-	P42	+	+	+
P18	-	-	-	P43	-	-	-
P19	-	-	+	P44	-	+	+
P20	-	-	-	P45	-	+	+
P21	-	-	-	P46	-	+	+
P22	-	-	-	P47	+	+	+
P23	-	+	-	P48	-	-	+
P24	+	+	+	P49	-	-	-
P25	-	-	+	P50	-	-	+

^a : *S. salivarius* strains were isolated from caries-active site, caries-free(healthy) site of the tooth, and the dorsum of the tongue.

^b : +, isolated; -, not isolated.

를 보이는 경우는 환자 13명 중 4명(환자 P13, P14, P28, P46)이었으며 나머지 환자에서는 *S. salivarius* 균주가 다양한 요소분해 활성도를 보였다. 한편, 부위별로 봤을 때, 같은 부위에서 분리된 *S. salivarius* 균주는 대개의 경우 비슷한 요소분해 활성도를 보였는데, 우식부위에서는 1명(P42), 정상치아부위는 2명(P42, P45), 설배부위에서는 4명(P9, P24, P39, P47)이 같은 부위내에서도 *S. salivarius*의 요소분해 활성도에 큰 차이를 나타냈다(Table 2).

3. PCR 산물

총 61개 균주 중 *ureC* 유전자를 증폭하기 위한 primer를

사용하여 PCR를 시행한 결과(Fig. 1) 22개 균주가 산물을 생성하지 않았다. 이 중 1명의 환자(P42)에서 분리된 2 균주만을 제외하고 나머지 20 균주는 모두 40 μ mol/min/mg 이하의 낮은 요소분해 활성도를 보였다. 한편 40 μ mol/min/mg 이하의 낮은 활성도를 갖는 27개 균주 중 1개 균주만 0.54Kbp 산물을 생성했고 나머지 26개 균주 모두 PCR 산물이 생성되지 않았거나(20개 균주), 1.3Kbp의 PCR 산물만을 생성하였다(6개 균주). 이들 1.3Kbp의 PCR 산물은 EcoRV로 처리하였을 경우 이 절단효소에 의해 잘게 분쇄되어 agarose gel에서 절편이 관찰되지 않았다.

나머지 40 μ mol/min/mg 이상의 요소분해 활성도를 갖는

Table 2. Ureolytic and genetic characterizations of *S. salivarius* isolates from different environments of 13 patients harboring *S. salivarius* in more than two bacterial collection sites^a.

Patients	Caries-active site			Caries-free site			Tongue		
	Ureolytic activity ^b	Size(Kbp) of PCR product ^c	No. of fragment ^d	Ureolytic activity	Size(Kbp) of PCR product	No. of fragment	Ureolytic activity	Size(Kbp) of PCR product	No. of fragment
P9	17.3	—	—	—	—	—	729.7	0.54	1
	16.3	—	—	—	—	—	16.9	—	—
P13	727.3	0.54	2	660.8	0.54	2	695.1	0.54	2
	704.7	0.54	2	—	—	—	635.0	0.54	1
P14	13.6	1.3	—	5.5	1.3	—	7.1	1.3	—
	7.3	1.3	—	5.3	1.3	—	9.3	1.3	—
P24	850.7	0.54	1	1078.0	0.54	1	216.5	0.54	1
	859.4	0.54	1	1047.3	0.54	1	12.0	—	—
P28	—	—	—	15.9	—	—	13.2	—	—
	—	—	—	14.6	—	—	13.6	—	—
P29	334.9	0.54	1	650.3	0.54	1	645.9	0.54	1
	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P38	1248.8	0.54	2	800.6	0.54	2	284.2	0.54	2
	1262.8	0.54	2	686.5	0.54	2	391.9	0.54	2
P39	420.1	0.54	2	—	—	—	475.6	0.54	2
	307.6	0.54	2	—	—	—	1340.3	0.54	2
P42	163.1	—	—	42.9	0.54	2	162.1	0.54	2
	530.6	—	—	1165.6	0.54	2	150.4	0.54	2
P44	—	—	—	686.8	0.54	1	31.2	—	—
	—	—	—	693.6	0.54	1	—	—	—
P45	—	—	—	35.2	—	—	32.2	—	—
	—	—	—	999.3	0.54	1	30.4	—	—
P46	—	—	—	27.3	—	—	24.8	—	—
	—	—	—	25.7	—	—	26.8	—	—
P47	21.6	—	—	24.8	—	—	23.5	0.54	1
	24.6	—	—	21.8	—	—	121.8	0.54	1

^a : A total of 61 *S. salivarius* strains were isolated from 13 patients harboring *S. salivarius* in two or more than two out of the three bacterial collection sites, caries-active site, caries-free site of the tooth, and the dorsum of the tongue.

^b : Ureolytic activity(mol/min/mg) represents an amount of ammonium produced from urea per min by 1mg of *S. salivarius* (protein) used for the experiment. The urea hydrolysis experiments were repeated several times and almost identical results were obtained from the experiments. The results shown here are the representative ureolytic activity of the several experiments. —: no *S. salivarius* isolate.

^c : The numbers indicate the size of products obtained from PCR amplification. —: no PCR product.

^d : The numbers represent the number of fragments produced from the PCR products after *EcoRV* restriction. 1: no endonuclease cleavage left the product as it was (one fragment), 2: one endonuclease cleavage made two fragments, —: multiple cleavage by *EcoRV* endonuclease made many small fragments which were not detectable on an agarose gel.

Table 3. Distribution of *S. salivarius* isolates based on the range of their ureolytic activities^a.

Urease activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Number of isolates from :		
	Caries-active site	Caries-free site	Tongue
< 40	6	9	12
40 ~ 100 <	0	1	0
100 ~ 200 <	1	0	3
200 ~ 400 <	2	0	3
400 ~ 800 <	4	5	5
800 ~ 1200 <	2	5	0
1200 <	2	0	1

^a : The result represented here is the modification of Table 2.

Table 4. Variation in the size of the PCR products from *ureC* gene of the *S. salivarius* isolates and number of restriction fragment of the PCR products^a.

Strains	Urease activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	PCR products		No. of fragments by <i>EcoRV</i> restriction	Strains	Urease activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	PCR products		No. of fragments by <i>EcoRV</i> restriction
		0.54Kbp	1.3Kbp				0.54Kbp	1.3Kbp	
P14-H2 ^b	5.3	-	+	-	P42-T1	162.1	+	-	2
P14-H1	5.5	-	+	-	P42-C1	163.1	-	-	
P14-T1	7.1	-	+	-	P24-T1	216.5	+	-	1
P14-C2	7.3	-	+	-	P38-T1	284.2	+	-	2
P14-T2	9.3	-	+	-	P39-C2	307.6	+	-	2
P24-T2	12.0	-	-	-	P29-C1	334.9	+	-	1
P14-C1	13.6	-	+	-	P38-T2	391.9	+	-	2
P28-T1	13.2	-	-	-	P39-C1	420.1	+	-	2
P28-T2	13.6	-	-	-	P39-T1	475.6	+	-	2
P28-H2	14.6	-	-	-	P42-C2	530.6	-	-	
P28-H1	15.9	-	-	-	P13-T2	635.0	+	-	1
P 9-C2	16.3	-	-	-	P29-T1	645.9	+	-	1
P 9-T2	16.9	-	-	-	P29-H1	650.3	+	-	1
P 9-C1	17.3	-	-	-	P13-H1	660.8	+	-	2
P47-C1	21.6	-	-	-	P38-H1	686.5	+	-	2
P47-H2	21.8	-	-	-	P44-H1	686.8	+	-	1
P47-T1	23.5	-	-	-	P44-H2	693.6	+	-	1
P47-C2	24.6	-	-	-	P13-T1	695.1	+	-	2
P46-T1	24.8	-	-	-	P13-C2	704.7	+	-	2
P47-H1	24.8	-	-	-	P13-C1	727.3	+	-	2
P46-H2	25.7	-	-	-	P 9-T1	729.7	+	-	1
P46-T2	26.8	-	-	-	P38-H2	800.6	+	-	2
P46-H1	27.3	-	-	-	P24-C1	850.7	+	-	1
P45-T2	30.4	-	-	-	P24-C2	859.4	+	-	1
P44-T1	31.2	-	-	-	P45-H2	999.3	+	-	1
P45-T1	32.2	-	-	-	P24-H2	1047.3	+	-	1
P45-H1	35.2	-	-	-	P24-H1	1078.0	+	-	1
P42-H1	42.9	+	-	2	P42-H2	1165.6	+	-	2
P47-T2	121.8	+	-	1	P38-C1	1248.8	+	-	2
P42-T2	150.4	+	-	2	P38-C2	1262.8	+	-	2
					P38-T2	1340.3	+	-	2

^a : The result was derived from Table 2.

^b : P means patient, H means healthy (caries-free) site, T means the dorsum of the tongue, and C means caries-active site. For example, P14-H2 indicates the second strain isolated from the healthy (caries-free) site of the tooth of patient P14.

34개 균주는 앞에서 언급한 P42 환자의 2 균주를 제외하고 모두 0.54 Kbp의 PCR 산물을 생성하였다. 이들 0.54 Kbp PCR 산물은 EcoRV로 처리했을 때 절단되지 않아 PCR 산물 크기 그대로 1개의 절편으로 나타나거나 한군데가 절단되어 2개의 절편을 형성하는 두가지 양상 중 한가지를 보였다(Fig. 2, Table 4).

4. 단백질 profile

3개 부위 모두에서 *S. salivarius* 균주가 분리되고 요소분해 활성도가 부위별로는 큰 차이를 보이거나 같은 부위에서는 차이가 별로 없는 P24와 P38 환자에서 분리한 12 균주의 단백질 profile을 관찰하였다. P24 환자의 우식부위 균주들간의 단백질 profile은 크게 다르게 나타난 반면 정상치아부위의 균주들간의 profile, 설배부위 균주들간의 profile은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 한편 한 부위 균주를 다른 부위 균주들과 비교했을 때 단백질 profile은 부위별로 모두 다르게 나타났다(Fig. 3). P38 환자의 우식부위 균주들간의 단백질 profile은 크게 다르게 나타났고, 정상치아부위 균주들간의 단백질 profile은 비슷했으나 설배부위의 균주들간에는 큰 차이를 보였다(Fig. 4).

IV. 총괄 및 고찰

구강내에서 요소는 분해되어 암모니아를 생성하면서 구강의 pH를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다²⁹⁾. 구강내 요소의 대부분은 구강세균에 의해 사용되기¹³⁾ 때문에 구강의 pH가 낮아지고 치아우식증이 유발되는 과정에서 요소분해 효소 생성균들의 분포는 중요할 것으로 예상되고 있다. 그러나 실제 인체의 구강내에서 이들 요소분해효소 생성균들이 구강생태계나 치아우식증에 어떤 영향을 미치는지를 관찰한 연구는 없었다.

*S. salivarius*는 구강세균 중 가장 강력한 요소분해능력을 가지는 것으로 알려져 있고 따라서 치아우식 과정에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측되고 있다¹⁷⁾. 본 연구는 이같은 가능성을 확인하기 위한 방법으로 동일한 환자에서 우식부위를 포함해 환경이 다른 부위에서 분리한 *S. salivarius*가 요소분해 활성도에 있어 부위에 따라 어떤 특징적 차이가 있는지를 관찰하였다. 이를 위해 치아우식증 환자에서 C2 이상의 우식부위, 그리고 우식부위와 비교하기 위해 같은 환자에서 우식부위와는 다른 환경을 대표하는 정상치아부위와 설배를 선택하였다. 각 부위에서 치태를 채취하여 배양한 결과 나타난 *S. salivarius*의 특징을 갖는 집락을 2개씩 선택하여 API 20 Strep kit로 동정하였다. 그 결과 *S. salivarius*가 존재하는 것으로 확정된 경우가 우식부위는 50명 중 11명, 정상치아부위는 14명, 설배에서는 26명이었다(Table 4). 이 결과는 *S. salivarius*가 주로 치아표면보

다는 설배에 존재하는 균이라는 사실^{38,39)}을 반영하는 것으로 생각된다. 예상과는 달리 우식부위에서 오히려 *S. salivarius*가 분리된 환자수가 가장 적었는데 이는 *S. salivarius*가 낮은 pH의 우식부위에서 발견되기도 하지만 항상 나타나는 것은 아니라는 van Houte의 연구결과⁴⁰⁾로 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 환경에 따라 *S. salivarius*의 요소분해 활성도에서 차이가 날 수 있는가를 관찰하기 위해 두 부위 이상에서 *S. salivarius*가 분리된 환자들의 균주들만 선택해 연구에 사용하였다. 사용된 총 61개 균주 중 40 μ mol/min/mg 미만의 아주 낮은 활성도를 보인 균주가 27개 균주로써 44.3%를 차지하였다. 정 등³²⁾은 우식부위와 정상치아에서 분리한 75개 균주의 26.7%인 20개 균주가 40 μ mol/min/mg 이하의 요소분해 활성도를 나타낸다고 보고하였다. Felthan과 Sneath⁴¹⁾, Hardie 등⁴²⁾도 *S. salivarius* 분리균주 중 약 75%만이 요소분해 활성도를 나타낸다고 보고하는 것으로 보아, 모든 *S. salivarius* 균주가 요소분해 효소를 생산하는 것은 아닌 것으로 생각된다.

분리균주의 요소분해 활성도를 일정범위로 구분하여 비교했을 때 200 μ mol/min/mg 이상의 활성도를 보이는 균주가 우식부위에서 58.8%, 정상치아 및 설배부위에서 43.2%로 정 등³²⁾이 보고한 것과 같이 우식부위에서 요소분해 활성도가 높은 균주가 다른 부위보다 비율이 높게 나타나고 있다. 그러나 환경이 각기 다른 이들 3개 부위에서 균주들의 요소분해 활성도를 개인별로 비교했을 때는 우식부위에서 *S. salivarius*가 분리된 9명 중 3명만이 활성도가 다른 부위 균주들 보다 높게 나타났다. 그 중 1명은 3개 부위에서 모두 활성도가 매우 낮은 균주들(5.3~13.6 μ mol/min/mg)만 분리되었기 때문에 이 정도의 활성도의 차이를 무시한다면 결국 2명만이 우식부위 균주의 활성도가 높게 나타났다고 볼 수 있다. 또한 가장 높은 요소분해 활성도를 보인 균주도 우식부위가 아닌 설배부위로 관찰되었다. 많은 연구들^{22, 29, 30, 31)}이 *S. salivarius*는 낮은 pH 환경에서 요소분해효소의 발현이 크게 증가하는 것을 관찰하였기 때문에 pH가 상대적으로 낮을 가능성이 큰 우식부위에서 분리된 *S. salivarius* 균주가 다른 부위에서 분리된 균주보다 요소분해 활성도가 클 것이라는 일반적인 예상이 가능하다. 그러나 본 연구는 이 예상과는 오히려 반대되는 결과를 보여주고 있다. 앞서 진행된 정 등³²⁾과 최³³⁾의 연구결과에서도 정상치아 부위의 *S. salivarius* 균주들도 다양한 요소분해 활성도를 보였고, 우식부위에서 가장 높은 요소분해 활성도를 보인 균주와 비슷한 정도의 활성도를 보인 균주들도 정상치아부위에서 발견된 바있다. 이런 사실들로 미루어 우식부위의 균주들이 다른 부위의 균주들보다 요소분해 활성도가 높다고 보기는 어려운 것으로 생각된다.

지금까지 발표된 연구결과에 따르면 요소분해효소는 우식부위와 같이 낮은 pH 환경에서 요소를 분해하여 pH를 높

힘으로써 이 부위에 존재하는 세균들의 생존뿐만 아니라 구강내 여러 세균의 생존, 그리고 결과적으로 치아우식증에 커다란 영향을 미칠 것이라고 가정이 가능하다^{3,10,13~15,17,29}. 그러나 본 연구결과에 의하면 *S. salivarius* 요소분해효소가 치아우식증과 직접적인 연관성이 없는 것으로 생각된다. 그러나 Van Houte⁴⁰는 치태의 pH를 낮추는데 기여할 수 있는 mutans streptococci 이외의 중요한 구강세균 중 하나가 *S. salivarius*라고 지적한 바있다. *S. salivarius*에 의해 요소가 분해되어 pH가 증가하여 치아우식증이 억제될 수도 있겠지만, 또 한편으로는 요소분해에 의해 pH가 올라감으로 해서 산내성이 없거나 약한 산내성을 갖는 산생성 균들이 생존이 가능하여 장기적으로 봤을 때 오히려 치아우식증이 진행될 수도 있다는 예상도 가능하다. 만약 구강내에 소량의 요소가 존재하는 상황을 가정했을 때 우식부위에서 발견되는 *S. salivarius*는 낮은 pH의 우식부위에서 요소분해효소를 이용하여 pH를 증가시켜 적응하며 생존해 나간 특정 균주라기 보다는 설배나 정상치아의 치태내에 존재하다 유리되어 우연히 우식부위에 정착하여 치아우식 과정 중에 관여했을 가능성도 배제할 수는 없다. 따라서 *S. salivarius*의 요소분해 활성도와 치아우식증과의 관련성 여부는 여러 가지 환경요인을 고려한 다양한 실험 후 면밀한 검토를 거쳐 판단해야 할 것으로 생각된다.

본 연구결과에서 보듯이 동일 환자에서 우식부위 균주의 요소분해 활성도가 설배나 정상치아부위의 균주와 비슷한 경우가 많았다. 설배에서 분리한 균주들은 동일 환자에서 분리한 우식부위나 정상치아부위에서 분리한 일부, 또는 모든 균주들의 요소분해 활성도와 일치하는 경우가 많아 설배가 *S. salivarius*의 주 서식지이고 구강내 다른 부위에 존재하는 *S. salivarius*의 공급처가 된다^{38,39}는 사실을 뒷받침하고 있다.

분리균주들의 clonal 변이성(diversity)를 관찰하기 위해 *ureC* 유전자를 PCR 방법으로 증폭시켜 생성된 PCR 산물을 비교하였다. 40 μ mol/min/mg 이하의 활성도를 보인 27개 균주들 중 1개 균주를 제외하고 PCR 산물을 생성하지 못했거나 1.3Kbp 크기의 PCR 산물을 생성하였다. 반면 40 μ mol/min/mg 이상의 활성도를 보인 34개 균주들은 PCR 산물을 생성하지 않은 2개 균주를 제외하고는 모두 0.54Kbp의 PCR 산물을 생성하였다. 최³⁹의 연구에서도 40 μ mol/min/mg 이하의 활성도를 보인 균주는 *ureC* 유전자가 검출되지 않았거나 1.3Kbp 크기의 PCR 산물을 생성하는 것으로 나타났다. 최³⁹의 연구에서 요소분해 활성도가 높은 균주들이 생성한 PCR 산물의 크기는 0.54Kbp로 Chen과 Burne³¹이 발표한 *S. salivarius* 57.1 균주의 *ureC* 유전자 염기서열로 예상한 538bp와 일치하고 염기서열도 57.1 균주와 95% 유사성을 보였다. 반면 1.3Kbp PCR 산물은 57.1 균주의 *ureC* 염기서열과 매우 다른 것으로 나타났다. 따라서 40 μ mol/min/mg 이하의 요소분해 활성도를

보인 균주들은 요소분해효소 유전자가 없거나 있더라도 돌연변이 유전자로 요소분해효소가 발현되지 않았거나 요소분해효소가 발현되었더라도 재기능을 발휘하지 못하는 것으로 추측된다. 한편 본 연구나 정 등³² 및 최³⁹의 연구에서 측정된 40 μ mol/min/mg 정도의 활성은 배경활성이거나 돌연변이 유전자와 비정상적 요소분해효소에 의해 약하게 나타난 요소분해 활성이 반영된 것으로 사료된다.

본 연구에서 일부 환자는 같은 구강내에 *ureC*의 유전적 성상이 다른 *S. salivarius* 균주가 존재하는 것으로 나타났다. 한 개인에서 *S. salivarius* 균주의 유전적 성상의 차이를 관찰한 보고가 없어 본 연구결과와 비교할 수 없지만 다른 세균의 경우⁴¹ 한 개인에서 여러개의 다른 clonal type이 나타날 수도 있는 것으로 알려지고 있다. *ureC* 유전자의 PCR, 그리고 PCR 산물의 *EcoRV* 절단양상만으로는 유전적 성상을 정확히 판단하기는 어려워 본 연구에서는 clonal 변이성을 관찰하는 한 방법으로 *S. salivarius* 분리균주들의 단백질 profile을 관찰하였다. 특별히 3개 부위 모두에서 *S. salivarius*가 분리되었고 분리균주의 요소분해 활성도가 부위별로는 큰 차이를 보이나 동일 부위에서는 활성도 차이가 별로 없는 P24와 P38 환자를 대상으로 하였다. P24환자의 우식부위 균주(균주명 P24-C1, C2; Table 2, 4)는 각각 850.7, 859.4 μ mol/min/mg로 비슷한 요소분해 활성도를 보였으나 단백질 profile은 다르게 나타났다. PCR에서 P24-C1 균주는 0.54Kbp PCR 산물을 생성했으나 P24-C2 균주는 0.54Kbp 이외에 1.3Kbp PCR 산물도 미약하게나마 생성하여 서로 다른 clone으로 판단된다. 한편, P24-H1과 H2 균주는 요소분해 활성도(각각 1078.0, 1047.3 μ mol/min/mg), PCR 산물 크기, *EcoRV* 절단양상, 단백질 profile도 비슷한 것으로 봐서 같은 clone으로 추측되나, P24-T1과 P24-T2는 이들 양상이 모두 다르게 나타나 다른 clone으로 생각된다. 한 부위의 균주가 다른 부위의 균주와 단백질 profile이 같은 경우는 없었다.

P38 환자의 경우 우식부위균주 P38-C1, C2는 각각 1248.8, 1262.8 μ mol/min/mg 요소분해 활성도를 보였고, PCR 산물크기, *EcoRV* 절단양상은 같게 나타났으나, 단백질 profile은 크게 다른 것으로 나타나 다른 clone으로 생각된다. 반면 P38-H1과 H2는 요소분해효소 활성에 약간의 차이를 보이나 PCR 산물크기, *EcoRV* 절단양상이 같고, 단백질 profile도 동일하게 나타나 같은 clone으로 추정된다. P38-T1과 T2는 PCR 산물크기와 *EcoRV* 절단양상이 동일하나 요소분해활성에서 약간의 차이가 나고 특히 단백질 profile에서 뚜렷하게 차이가 나 다른 clone으로 생각된다. 다른 부위의 분리균주들과 단백질 profile을 비교했을 때 P38-H1, H2와 P38-T1이 비슷하나 P38-T1은 P38-H1, 2와 다르게 0.54Kbp 이외에, 약하게 1.3Kbp PCR 산물을 만들어 P24-T1은 P24-H1, 2와 다른 clone으로 판단된다.

따라서 이상의 결과들은 *S. salivarius* 균주들의 요소분해

활성도가 부위 또는 환경에 따라 달라지는 것이 아니라 그 균주가 갖는 고유 요소분해활성도에 따라 달라지는 것으로 사료된다. 본 연구에서 이들 균주로부터 chromosome을 추출하여 절단효소를 사용하여 유전적 차이를 관찰하기 위한 fingerprinting을 시도하였으나 거의 대부분의 *S. salivarius* 균주들로부터 실험에 필요한 양만큼 충분한 chromosome을 얻지 못해 fingerprinting을 진행하지 못했다. *ureC* 유전자의 PCR 산물크기 및 *EcoRV* 절단양상과 추가적으로 단백질 profile로 clonal type의 다양성을 판단했으나 같은 clone의 균주라 하더라도 배양의 조건이 약간 달라졌을 때 단백질 profile이 변할 가능성을 배제할 수 없기 때문에 보다 면밀한 관찰이 필요할 것이다. 예를 들어 충분한 양의 chromosome을 추출할 수 있는 방법을 개발하여 chromosome의 제한효소 절단양상을 관찰하거나 이것이 불가능할 경우 다양한 PCR 방법⁴²⁾을 통해 *S. salivarius*의 유전적 성상을 관찰할 수 있다면 앞으로 *S. salivarius*의 요소분해 활성도와 치아우식증 및 구강환경 차이와의 관련성을 보다 면밀히 연구하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

V. 결 론

요소는 구강내에서 세균에 의해 분해되어 암모니아를 생성함으로 산성화된 구강의 pH를 높여 구강 pH의 항상성을 유지할 뿐만 아니라 결과적으로 치아우식증을 억제하는 역할을 한다. 구강의 요소분해 세균중에서 *S. salivarius*가 가장 강력한 요소분해효소 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. *S. salivarius*의 요소분해효소의 활성은 산성 pH에서 크게 증가하기 때문에 우식부위에 존재하는 *S. salivarius* 균주는 동일치아의 다른 구강부위에 존재하는 *S. salivarius* 균주들보다 요소분해활성이 클 것이라고 일반적으로 추측하고 있다. 그러나 아직까지 인간의 구강환경속에서 이 추측을 입증할 만한 연구가 진행된 것은 없었다. 본 실험은 치아우식증 환자의 우식부위(>C2), 정상치아 부위 및 설배 등 3개 부위에서 분리한 *S. salivarius* 균주의 요소분해활성과 치아우식증과의 관련성을 확인하기 위하여 50명의 치아우식증 환자로부터 상기 3개 부위에서 *S. salivarius*를 분리하였고, 3개 부위중 두 부위 이상에서 *S. salivarius*가 확인·동정된 균주들의 요소분해 활성도를 측정하였다. 또한 유전적 변이를 관찰하기 위해 이들 균주의 *ureC* 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였고, 이 PCR 산물의 제한효소 절단양상과 단백질 profile을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다:

1. 50명의 환자 중 두 부위 이상에서 *S. salivarius*가 분리된 환자는 13명이었고, 이들로부터 총 61개의 균주가 분리되었다.

2. 우식부위를 포함해 두 부위 이상에서 *S. salivarius*가 분리된 환자는 9명이었고, 여기서 분리된 17개 균주 중 10개 균주(58.8%)가 200 μ mol/min/mg 이상의 요소분해 활성도를 보였다. 반면, 13 환자의 정상치아와 설배에서 분리된 44개 균주 중 19개 균주가 200 μ mol/min/mg 이상의 활성도를 나타내었다.
3. 우식부위를 포함해 두 부위 이상에서 *S. salivarius*가 분리된 9명의 환자에서 6 환자는 우식부위 균주의 요소분해 활성도가 다른 부위의 균주들 보다 낮게 나타났다.
4. 요소분해 활성도가 40 μ mol/min/mg 이상인 34개 균주 중 2개 균주를 제외하고 모두 부위에 관계없이 0.54 Kbp 크기의 PCR 산물을 생성하였다. 반면 요소분해 활성도가 40 μ mol/min/mg 이하인 27개 균주는 1개 균주를 제외하고 부위에 관계없이 1.3Kbp 크기의 PCR 산물을 생성하거나 PCR 산물을 생성하지 않았다.
5. 동일인의 동일 부위에서도 요소분해 활성도 및 유전적 성상이 다른 균주가 발견되었다.
6. 요소분해 활성도에서 큰 차이가 나타난 경우 *S. salivarius* 균주의 clonal type이 동일한 경우는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 *S. salivarius*의 요소분해 활성도는 치아우식증과 직접적인 관련성이 없는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Burne, R.A.: Oral streptococci... Products of their environment. *J. Dent. Res.* 77:445-452, 1998.
2. Bradshaw, D.J., 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.* 68:1298-1302, 1989.
3. 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. *Arch. Oral Biol.* 16:759-780, 1971.
4. Singer, D.L., and Kleinberg, I.: Ammonia and urea content of human incisor tooth plaque. *Arch. Oral Biol.* 23:1083-1087, 1978.
5. Kleinberg, I., Jenkins, G.N., Chatterjee, R., and Wijeyweera, L.: The antimony pH electrode and its role in the assessment and interpretation of dental plaque pH. *J. Dent. Res.* 61:1139-1147, 1982.
6. Kopstein, J., and Wrong, O.M.: The origin and fate of salivary urea and ammonia in man. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52:9-17, 1977.
7. Golub, L.M., Borden, S.M., and Kleinberg, I.: Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodontal disease in humans. *J. Periodont. Res.* 6:243-251, 1971.
8. Mobley, H.L.T., and Hausinger, R.P.: Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53:85-108, 1989.
9. Kleinberg, I.: Effect of urea concentration on human plaque pH level *in situ*. *Arch. Oral Biol.* 12:1475-1484, 1967.

10. Sissons, C.H., and Cutress, T.W.: pH changes during simultaneous metabolism of urea and carbohydrate by human salivary bacteria *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 33:579-587, 1988.
11. Peterson, S., Woodhead, J., and Crall, J.: Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatr. Res.* 19:796-799, 1985.
12. Woodhead, J.C., Nowak, A.J., Crall, J.J., and Robillard, J.E.: Dental anomalies in children with chronic renal failure. *Pediatr. Dentistry* 4:281-285, 1982.
13. Sissons, C.H., and Cutress, T.W., and Pearce, E.I.F.: Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques. *Arch. Oral Biol.* 30:781-790, 1985.
14. Sissons, C.H., Hancock, E.M., and Cutress, T.W.: The source of variation in ureolysis in artificial plaques cultured from human salivary bacteria. *Arch. Oral Biol.* 33:721-726, 1988.
15. Salako, N.O., and Kleinberg, I.: Incidence of selected ureolytic bacteria in human dental plaque from sites with differing salivary access. *Arch. Oral Biol.* 34:181-189, 1987.
16. Morou-Bermudez, E., and Burne, R.A.: Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.* 67:504-512, 1999.
17. Sissons, C.H., Hancock, E.M., Perinpanayagam, H.E.R., and Cutress, T.W.: The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. *Arch. Oral Biol.* 33:727-733, 1988.
18. Braude, A.I., and Sieminski, J.: Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. *J. Bacteriol.* 80:171-179, 1960.
19. Leusmann, D.B., and Sabinski, F.: Potential contribution of optional urease-positive bacteria to idiopathic urinary calcium stone formation. II. Microlith formation kinetics in a fermenter model of the urinary tract infected by optional urease-positive microorganisms. *Urol. Res.* 24:73-78, 1996.
20. Flazell, S.L., and Lee, A.: *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *Lancet* ii:15-17, 1996.
21. Chen, X.G., Correa, P., Offerhaus, J., Rodriguez, E., Janner, F., Hoffman, E., Fox, J., Hunter, F., and Diavolitsis, S.: Ultrastructure of the gastric mucosal harboring *Campylobacter*-like organisms. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:575-582, 1986.
22. Mobley, H.L.T., Island, M.D., and Hausinger, R.-P.: Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59:451-480, 1995.
23. Rosenstein, I., Hamilton-Miller, J.M.T., and Brumfitt, W.: Role of urease in the formation of infection stones: comparison of ureases from different sources. *Infect. Immun.* 32:32-37, 1981.
24. Collins, C.M., and Falkow, S.: Genetic analysis of *Escherichia coli* urease gene: evidence for two distinct loci. *J. Bacteriol.* 172:7138-7144, 1990.
25. Cussac, V., Ferrero, R.L., and Labigne, A.: Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 174:2466-2473, 1992.
26. Allison, C., Lai, H.-C., and Hughes, C.: Co-ordinate expression of virulence genes during swarm cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 6:1583-1591, 1992.
27. 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.* 175:465-473, 1993.
28. Miederer, S.E., and Grubel, P.: Profound increase of *Helicobacter pylori* urease activity in gastric antral mucosa at low pH. *Dig. Dis. Sci.* 41:944-949, 1996.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 정상백, 민병순, 최호영, 박상진, 이진용, 최기운: *Streptococcus salivarius*의 요소분해효소 활성에 관한 연구. 경희치대논문집 19:535-545, 1997.
33. 최혜진: *Streptococcus salivarius*의 요소분해효소 유전자 변이에 관한 연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1999.
34. 浜田 幸, 増田典男, 鳥居光男: 触原性シソカ球菌の分離 同定法. 日本歯醫評論 415:125-131, 1977.
35. 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.
36. 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.
37. Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Strihl, K.: Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and John Wiley and Sons, Brooklyn, N.Y.
38. 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.
39. Scheie, A.A.: Mechanisms of dental plaque formation. *Adv. Dent. Res.* 8:246-253, 1994.
40. Van Houte, J.: Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.* 73:672-681, 1994.
41. Loos, B.G., van Winkelhoff, A.J., Dunford, R.G., Genco, R.J., de Graaff, J., Dickinson, D.P., and Dyer, D.W.: A statistical approach to the ecology of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* 71:353-358, 1992.
42. Mouton, C., and Menard, C.: DNA fingerprinting of *Porphyromonas gingivalis* by arbitrarily primed PCR. In Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease, R.J. Genco, S. Hamada, T. Lehner, J. McGhee, and S. Mergenhagen (ed.), p33-p46. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1994.
43. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 256:495-497, 1970.

사진부도

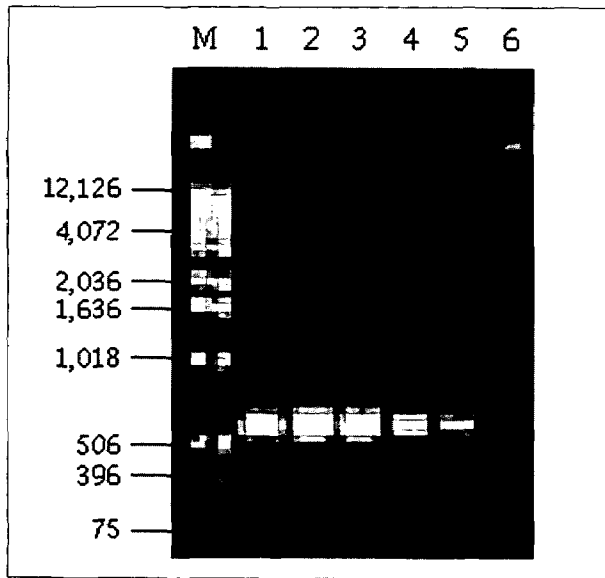


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of the PCR-amplified *ureC* genes from the *S. salivarius* strains of a representative patient P24. M, DNA molecular markers. Lanes: 1, strain P24-C1; 2, P24-C2; 3, P24-H1; 4, P24-H2; 5, P24-T1; 6, P24-T2.

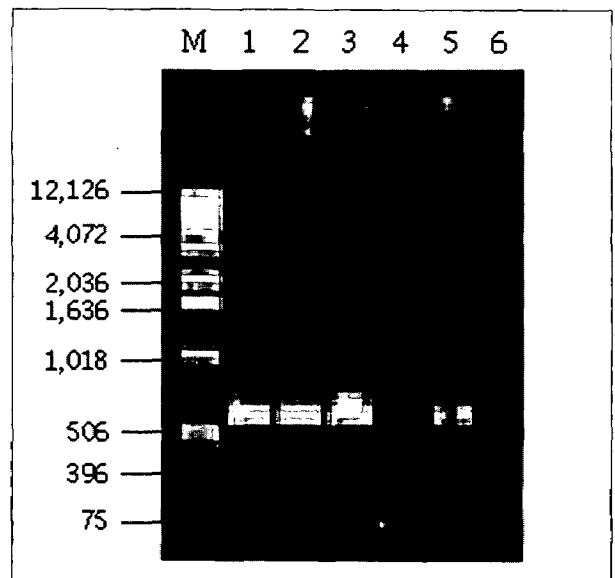


Fig. 2. *EcoRV* restriction pattern of the PCR-amplified *ureC* genes from the *S. salivarius* strains of a representative patient P24. The lanes were the same as those presented in Fig. 1.

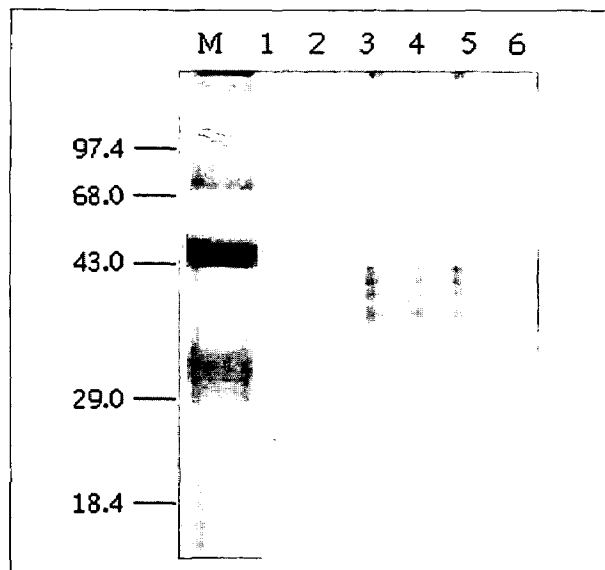


Fig. 3. Protein profiles of the *S. salivarius* strains of patient P24 by SDS-PAGE. The strains from patient P24 were grown for 2 days, washed, and adjusted the cell density to optical density 1.5 at 540nm. The cell suspension (100 μ l) was centrifuged and the cell pellet was treated with sample buffer at 100 $^{\circ}$ C under reducing conditions, and then subjected to SDS-PAGE using an SDS-10% polyacrylamide gel. M, protein molecular markers. Lanes: 1, P24-C1; 2, P24-C2; 3, P24-H1; 4, P24-H2; 5, P24-T1; 6, P24-T2.

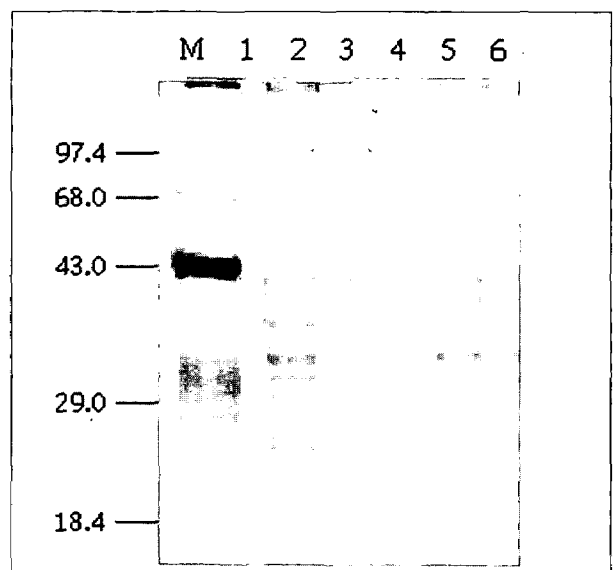


Fig. 4. Protein profiles of the *S. salivarius* strains of patient P38 by SDS-PAGE. The experimental procedure and lanes were the same as those described in Fig. 3 except that P24 was replaced by P38.