

Isolation and Characterization of the *Streptococcus mutans* from Korean Children with Caries

Kyung-Hee Kang^{1,3,†}, Ji-Young Kim¹, Jin-Sik Nam² and Ingn-yol Jin

¹Department of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology, Busan 617-701, Korea.

²Department of Food&Nutrition, Suwon Women's College, Hwasung 445-890, Korea.

³Department of Microbiology, Graduate School, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Streptococcus mutans, one of a major causal agents of dental caries, is component of the dental plaque and produces various organic acids such as lactic acid as the end-product of glycolysis. In this study, we isolated *S. mutans* from Korean children with caries and also investigated the expression of protein under acid stress. *S. mutans* was identified at the species level using a 16S ribosomal DNA sequencing comparison method. The primer specificity was tested on eleven *S. mutans* strains isolated from Korean children with caries. The data showed that eleven strains are *S. mutans*. At treatment of concentration of 20 mM lactic acid in the mid-log phase, K-7 exhibited the highest maximum culture OD compared with those of other groups. As a consequence, we examined the expression of protein under 20 mM lactic acid stress using *S. mutans* K-7. The results of 2D gel electrophoresis by image analysis showed that thirteen proteins are up-regulated under the stress. Further study is being focused on amino acid analysis by mass spectrometry in order to analyze those spots.

Key Words: Acid stress, Korean children, *Streptococcus mutans*

서 론

치주질환과 함께 구강 내에서 빈번하게 발생하는 양대 구강병의 하나인 치아우식증은 치면에 부착된 치면세균막에 축적되어진 산에 의해 치질이 탈회됨으로써 치아조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직 질환이다. 특히, *Streptococcus mutans*는 치면세균막에 존재하고 있으면서 산생성능을 갖고 있을 뿐만 아니라 우식병소내의 강한 산성 환경에서도 생존할 수 있는 내산성을 가지고 있어 인간의 우식 원인 균으로 가장 주목받고 있다 (Li et al., 2002). *S. mutans*는 동일한 조상으로부터 파생된 수많은 유전적 가계를 이루고 있으나 유전적 특징에 따라서 구조적 생리적 및 기능적으로 차이가 있으며 (Lenski, 1993), 숙주에 따라서 각각의 유전적 상이성에 의해 특정 환경에 대한 적응성, 친화성 및 독성에 있어서 차이를

나타내며 산생성능, 부착능 등에 있어서도 차이를 나타낸다 (Nakano and Kuramitsu, 1992).

*S. mutans*는 구강 내에 상재하는 통성 혐기성 균으로 치면의 피막에 부착 후 sucrose를 기질로 하여 glycolysis의 end-product로서 lactic acid를 생산하며, glucosyl transferase를 분비하여 glucose 중합체인 불용성 glucan을 형성한다. 이러한 glucan은 불용성의 점액성물질로서 치아 표면에 부착하여 치면에 세균부착을 도우며 생성된 유기산을 국소적으로 체류시킴으로써 치질의 탈회를 가속화시키는 역할을 한다. 결과적으로 *S. mutans*는 치면에 부착하여 당질 대사를 통하여 고농도의 산을 생산하고 법랑질을 탈회시킴으로써 치아우식을 유발시킨다 (Trahan, 1995).

많은 연구들은 *S. mutans*가 탄수화물 분해에 의해서 생성되는 산에 의해 형성되는 낮은 pH에서도 당질 대사를 수행하며 생존할 수 있는 산에 대하여 가장 잘 견디는 균주로 보고해 왔으며 (Mcneill and Hamilton, 2003), *S. mutans*의 이러한 능력은 다른 구강 내 세균과 구분되는 특성으로서 충치의 진행에 있어서 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Inoue and Koga, 1979). 내산성 세균의 산저항기작에 대한 많은 연구들을 통하여 산에 대

* 논문 접수: 2007년 11월 28일

수정재접수: 2007년 12월 13일

† 교신저자: 강경희, (우) 617-701 부산광역시 사상구 주례 2동 167, 경남정보대학 치위생과

Tel: 051-320-2922, Fax: 051-320-2920

e-mail: kangkh@kit.ac.kr

한 적응 및 방어기작은 병원성을 나타내는데 중요한 요소로 작용한다는 결과가 보고되고 있으며 (Lee et al., 1994), *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 보고되어졌으며 (Zhu et al., 2006), 현재 국내에서 진행되는 *S. mutans* 관련 연구는 항균 및 유기산 억제효과를 지니는 천연물질의 탐색에 관한 것이 대부분이다 (Kim et al., 2006). 국내에서도 한국인의 치면으로부터 *S. mutans*의 분리에 관한 연구는 이루어지고 있으나 (Kim et al., 2006), 치아우식의 발생과 관계있는 단백질 및 이와 관련된 유전자에 관하여는 glucosyltransferase와 fructosyltransferase를 coding하는 glucosyltransferase gene (*gtf*)와 fructosyltransferase gene (*fff*)외에는 거의 보고된 바가 없다 (Song et al., 2001).

치아우식증에 대한 근본적인 원인해결을 위해서는 *S. mutans*에 의한 치아우식증 발병과정의 분자생물학적 기작과 *S. mutans*가 구강 내부 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 우식치아를 대상으로 세균을 채취하여 16S ribosomal RNA coding gene의 핵산염기서열 분석을 통하여 *S. mutans*를 분리하고, acid stress하에서 분리한 *S. mutans*의 내산성 능력과 관련된 단백질 발현양상을 조사하고자 하였다. 본 연구 결과는 한국인의 구강 내에 존재하는 *S. mutans*의 내산성과 관련된 단백질 및 이와 관련된 유전자규명에 기초적인 자료를 제공해 줄 수 있을 뿐만 아니라 이를 바탕으로 앞으로 수행되어질 산에 대한 stress에 저항하는 방어기작에 관한 주요한 단서를 제시할 것으로 생각된다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

우식이 진행되고 있는 12세 미만 아동 32명의 치아우식부위로부터 가압멸균된 면봉을 이용하여 치면세균막을 채취하여 다음의 실험에 사용하였으며 대조균주는 한국

유전자은행 (KCTC, Daejeon, Korea)으로부터 분양받은 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였다.

2. 균주분리 및 배양

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

3. Growth test

순수 배양된 각각의 균주를 BHI 액체배지에 1 loop 접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 전 배양한 균주로 사용하였다. 고압 멸균한 BHI 액체배지에 전 배양한 균주를 1% 접종하여 37°C에서 대수증식기까지 배양한 후, 20 mM의 lactic acid를 첨가하여 배양하면서 spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다.

4. DNA의 추출 및 정제

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

5. 16S rDNA의 PCR 증폭

16S rDNA를 증폭하기 위하여 *S. mutans* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 설계된 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGTCGTAACAAGGTAACC-3') primer를 이용하였다. PCR 반응은 분리한 genomic DNA 50 ng에 25 µM forward 및 reverse primer (Bioneer, Korea)를 각각 4 µl, 10× PCR reaction buffer를 5 µl, 2.5 mM dNTP를 2 µl, 2.5 units Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea)를 0.5 µl 첨가하였으며 나머지는 증류수를 이용하여 최종 50 µl로 맞추었다. 이를 PCR 반응 tube에 넣고 다음 조건에 따라 PCR 반응을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 반응한 다음 denaturation을 94°C에서 45초, annealing을 55°C에서 1분, extension을

72°C에서 1분을 30회 반복하고, final extension을 72°C에서 10분 실시하였다. Thermal cycler는 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하였다. PCR 반응물은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 16S rDNA의 증폭 유무와 농도를 확인하였으며, PCR product는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다.

6. 16S rDNA의 전체 염기서열 결정

정제된 PCR products은 전체 염기서열 결정을 위해 518F (5'-CCAGCAGCCGCG GTAATACG-3') primer와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primer를 사용하였다. 염기서열 분석은 Macrogen (Seoul, Korea) service를 이용하여 결정하였다.

7. 유전학적 연관관계의 분석

각각의 16S rDNA 염기서열들은 PHYDIT program을 이용한 ribosomal RNA의 1차, 2차 구조를 고려하여 CLUSTAL X software로 비교 분석하였다. 염기서열들의 homology는 DDBJ/EMBL/GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석하였다. 분석된 균주들의 진화학적인 연관관계는 PHYLIP version 3.5c program을 이용한 neighbor-joining method에 의해 분석되었다.

8. 단백질 추출

균체를 세척한 후 10배 부피의 7 M urea, 2 M Thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% (w/v) dithiothreitol (DTT), 2% (v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer (PowerGen125, Fisher Scientific, USA)에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질을 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 하였으며, 15°C에서 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford법 (Bradford, 1976)으로 수행하였다.

9. 2D gel electrophoresis

일차 isoelectric focusing (IEF)을 위하여 IPG strips은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12~16시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200 µg씩을 사용하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달시간을

3시간 되게 하였으며, 3,500 V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96 kVh가 되도록 설정하였다.

이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation하였다. Equilibration이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels (20×24 cm, 10~16%) 위에 배열시키고, 2D gel electrophoresis system (Hofer DALT slab gel unit, Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 은 염색으로 시각화되었으며 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 Genomine (Pohang, Korea) service를 이용하였다.

결 과

1. 균주분리 및 16S rDNA의 PCR 증폭

우식이 진행되고 있는 12세 미만 아동 32명의 치아우식부위로부터 가압멸균된 면봉을 이용하여 치면세균막을 채취하고 *S. mutans*의 선택배양을 위하여 MSB 평판배지에 도말 후 배양하였다. 배양결과 7개의 평판배지에서는 균 집락을 볼 수 없었으며, 균 집락을 형성한 25개의 평판배지 중 형성된 균 집락의 수가 비교적 많은 11개의 평판배지로부터 각각 1종류의 대표적인 colony를 채취하여 Brain Heart Infusion (BHI) agar plate에 도말한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하고 이를 다시 BHI 액체배지에 배양하여 균주동정에 이용하였다.

분리한 11개 균주로부터 chromosomal DNA를 분리하고

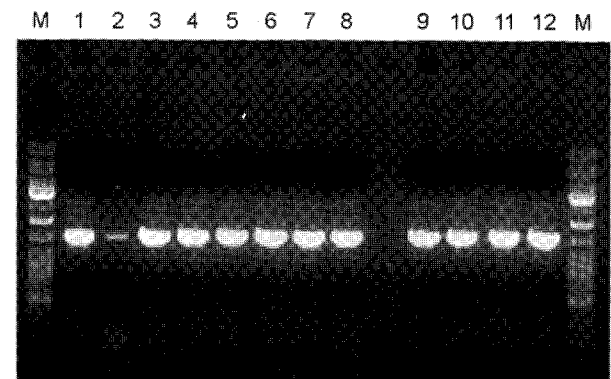


Fig. 1. PCR amplification of 16S rDNAs from isolated strains. M, Generuler DNA ladder mix; Lane 1, K-1; 2, K-2; 3, K-3; 4, K-4; 5, K-5; 6, K-6; 7, K-7; 8, K-8; 9, K-9; 10, K-10; 11, K-11; 12, *S. mutans* KCTC 3065.

정확한 동정을 위하여 PCR을 통하여 16S rDNA 증폭을 수행하였으며, 모든 균주에서 PCR product는 약 1,500 bp로 나타났다 (Fig. 1). 증폭된 PCR products의 농도의 차이는 있었지만 실험한 모든 균주에서 정상적으로 16S rDNA가 증폭된 것을 확인할 수 있었다. PCR의 정확한 증폭을 확인하기 위하여 대조균으로써 *S. mutans* KCTC 3065를 사용하였다.

2. 16S rDNA의 염기서열분석

PCR product를 이용하여 direct sequencing을 수행하였으며 PCR primer 부위를 제외한 sequence length는 Table 1에 나타났다. 기존의 표준균주와 비교 조사한 11균주의 16S rDNA의 크기는 모든 균주에서 1,388 bp로 나타났다. 불확실한 sequence 부위는 제외하였으므로 실제적인 16S rDNA의 크기는 나타낸 것보다 클 수 있다. 또한 sequencing 결과들을 DDBJ/EMBL/GenBank database를 이용한 blast search를 통하여 균주동정과 기존 균주와의 similarity를 분석하였다. 11균주 모두가 기존에 보고된 *S. mutans* KCTC 3065와 99.9~100% homology를 나타내었다 (Table 2).

Table 1. PCR and Sequencing primers for the detection of *S. mutans*

	Primers	Nucleotide sequences (5' → 3')
PCR	27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
	1492R	AAG TCG TAA CAA GGT AAC C
Sequences	518F	CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG
	800R	TAC CAG GGT ATC TAA TCC

3. 유전학적 연관분석

분리된 균주들 간의 homology와 진화학적인 연관관계를 조사하기 위하여 PHYDIT program을 이용하였다. 16S ribosomal RNA의 1차 및 2차 구조를 고려하여 최종적으로 sequence를 확정하였으며, 분리된 11개 균주와 표준균주의 sequence를 비교 분석하였다. 표준균주인 *S. mutans* KCTC 3065의 16S rDNA와 분리된 4개 균주는 100% 일치하는 identity를 나타내었으며, 7개 균주는 1개의 sequence 차이만 나타내었다 (Fig. 2). 본 조사에서 샘플링한 11명의 아동들에서 치아우식부위로부터 채취한 11개 균주들은 16S rDNA sequencing을 통하여 *S. mutans*로 판명되었으며, 기존에 보고된 표준균주와 99.9~100% 일치하였다.

Table 2. Similarity and identification of *S. mutans* among isolated strains

No.	Strains and similarity	Length of 16r DNA sequences (bp)
K-1	<i>S. mutans</i> (100%)	1388
K-2	<i>S. mutans</i> (100%)	1388
K-3	<i>S. mutans</i> (100%)	1388
K-4	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-5	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-6	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-7	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-8	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-9	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388
K-10	<i>S. mutans</i> (100%)	1388
K-11	<i>S. mutans</i> (99.9%)	1388

KCTC 3065	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-GAACAC-AC-TGTG-CT
K-10	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-GAACAC-AC-TGTG-CT
K-2	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-GAACAC-AC-TGTG-CT
K-3	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-GAACAC-AC-TGTG-CT
K-1	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-GAACAC-AC-TGTG-CT
K-6	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-4	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-9	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-11	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-5	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-8	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT
K-7	G-TG-GG-ACG-CA-AGG-AACAC-AC-TGTG-CT

Fig. 2. Alignment of the 16S rDNA nucleotide sequences among isolated strains. KCTC 3065: *S. mutans* KCTC 3065.

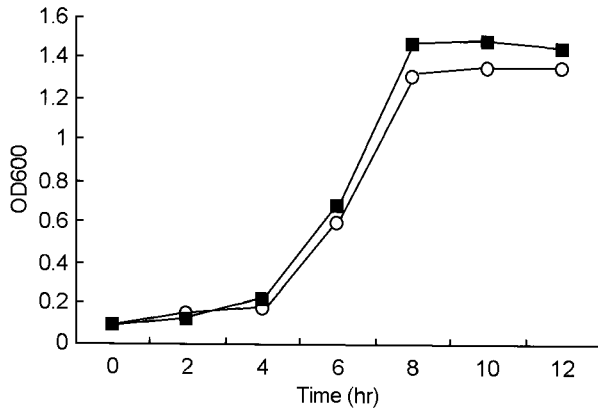


Fig. 3. The growth curve in response to 20 mM lactic acid at exponential phase. -■-, K-7; -○-, KCTC 3065.

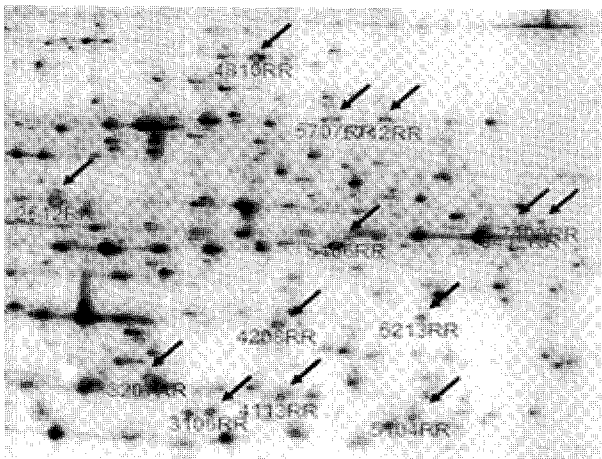


Fig. 4. 2D gel image analysis in *S. mutans* K-7 under 20 mM lactic acid stress. Arrows: Higher expression proteins compared with those of non-treatment cells.

4. Lactic acid 존재하의 분리균주의 성장패턴

분리한 균주들의 산에 대한 내성정도를 알아보하고자 40~50% 정도 성장이 저해되는 20 mM의 lactic acid 농도를 본 실험의 mild-shock으로 결정하였다. 20 mM의 lactic acid를 유도기와 대수증식기에 배지에 첨가하여 성장패턴을 조사한 후, 생육이 가장 활발한 균주인 K-7을 산에 대한 내성이 가장 뛰어난 균주로 판단하고 표준균주를 대조균주로 하여 비교하였다. KCTC 3065와 선별된 K-7 균주를 대수증식기 (OD 600=0.65)까지 배양 후 20 mM 농도의 lactic acid를 처리하여 37°C에서 2시간 단위로 흡광도를 측정하였다. Fig. 3에서 보듯이 산을 첨가한 배지에서 K-7의 성장속도는 대조균보다 약간 활발하였으며, 대조균과 K-7 모두 lactic acid를 첨가한 후 약 2시간이 경과하여 정지기에 도달하였다. 최대흡광도는 대조균의

Table 3. 2D gel spot analyzed by PDQuest software

Protein No.	MW(kDa) / pI	Quantity	
		Treatment	Non-treatment
2512RR	47.66/4.45	3802.91	4430.59
3106RR	29.36/5.00	1289.24	1771.13
3207RR	31.37/4.80	1258.20	2142.76
4113RR	30.32/5.19	549.28	688.40
4208RR	35.73/5.20	1010.56	1886.75
4810RR	77.41/5.12	660.58	1193.44
5104RR	29.16/5.57	1463.83	1651.08
5213RR	36.09/5.60	1037.39	1214.68
5406RR	44.40/5.40	246.24	320.64
5707RR	61.45/5.35	135.11	215.57
5712RR	61.26/5.51	496.02	804.34
6415RR	45.23/6.48	657.32	1534.43
7402RR	45.90/6.63	49.29	161.15

경우 1.35, K-7의 경우 1.47로 대조균에 비하여 K-7이 약간 높게 나타났다.

5. 2D gel electrophoresis에 의한 단백질 발현 분석

K-7을 BHI 액체배지에서 대수증식기까지 배양시켜 20 mM의 lactic acid를 1시간 동안 처리한 cell과 처리하지 않은 cell을 가지고 2D gel electrophoresis를 수행하였다. PDQuest를 통해 image analysis를 해 본 결과, 단백질의 발현이 차이가 나는 것을 확인할 수 있었으며 발현량이 뚜렷이 증가한 단백질은 13개로 나타났다 (Table 3 and Fig. 4).

고 찰

*S. mutans*를 동정하기 위한 방법으로 많은 방법들이 고안되어 사용되고 있으며, 가장 고전적인 방법은 *S. mutans*의 선택배지인 MSB agar plate에 도말하여 균락의 모양과 생화학적 검사를 시행하는 것이다. 세균배양법을 기본으로 하는 이러한 방법은 많은 시간과 노동력이 필요하므로 간편하고, 정확성이 뛰어난 방법의 필요성이 요구되어 경제적 면에서도 효과적이고 종-특이적으로 동정 및 검출할 수 있고, 민감도가 뛰어난 PCR법 (Igarash et al., 2001)이 개발되어 연구에 많이 이용되고 있다. 현재 *S. mutans*를 검출 및 동정하기 위해 이용되는 표적유전자로는 돌연변이가 잘 일어나지 않고, 진화론적 측면에서 종간에 잘 보존되는 특성을 지닌 16S rDNA 유전자가 대표적으로 이용되고 있다.

본 연구에서 *S. mutans*의 16S rDNA 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하고 16S rDNA sequencing을 실시한 결과, 샘플링한 11개 균주들은 기존에 보고된 표준균주와 99.9~100% 일치하는 결과를 나타내 *S. mutans*로 판명되었다. Sequencing 결과에서 11균주는 한 개의 nucleotide sequence 차이를 보이는 2개의 그룹으로 나누어졌다. 두 개의 그룹으로 나누어지는 것은 Taq DNA polymerase error에 의한 결과로는 판단되지 아니하며 11명의 아동으로부터 분리한 결과에 의한 것으로 여겨진다. 반면에 11명의 다른 사람에 존재하는 *S. mutans* 일지라도 16S rDNA 상에서 돌연변이가 거의 일어나지 않은 것으로 동일한 strain인지는 생리생화학적 및 분자생물학적인 동정실험들이 추가적으로 필요하다고 생각된다.

분리된 균주들의 산에 대한 내성 정도를 알아보고자 40~50% 정도 성장이 저해되는 20 mM 농도의 lactic acid를 첨가하여 농도에 따른 생육저해현상을 조사하고 분리된 균주 중 가장 생육이 활발한 K-7 균주를 선별하였다. K-7을 표준균주와 비교하였을 때 최대흡광도가 1.47로 표준균주의 1.35에 비하여 K-7이 약간 높게 나타났다. 한국인의 구강 내에 존재하는 *S. mutans*의 내산성과 관련된 단백질 발현을 알아보고자 선별된 K-7의 생육이 가장 활발한 대수증식기에 20 mM의 lactic acid로 처리하고 2D gel electrophoresis를 수행한 결과 산을 처리하지 않은 cell과 비교 시 단백질 발현에 있어 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 발현량이 뚜렷이 증가한 단백질은 13개로 이들 단백질은 acid stress에 관여하는 단백질들로 추정되며, 다른 논문에서 발표된 많은 stress proteins들과도 연관성이 큰 것으로 판단된다 (Svensater et al., 2001). 이미 알려진 acid stress protein 중에는 Hsp90, Hsp70, Hsp60, DnaK, GroEL 등이 보고되고 있으며 이러한 분자 chaperones들이 단백질 폴딩을 포함하여 단백질의 조합 및 분해 등의 다양한 세포질 과정에 관여하면서 환경적인 스트레스에 대한 내성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Lemos et al., 2007). Acid stress protein은 heat shock stress, oxidative stress 등과 같은 stress response와도 서로 관련이 있다고 보고되고 있다 (Svensater et al., 2000). 또한, Ssb (single-stranded DNA-binding protein), GreA (transcription elongation factor), PnpA (polyribonucleotide nucleotidyltransferase), PepD 등의 단백질도 낮은 pH 환경에서 *S. mutans*의 생존과 증식에 주요한 생리적인 역할을 담당하는 것으로 보고되어 졌다 (Len et al., 2004).

*S. mutans*가 다른 구강 내 미생물들과는 달리 내산성을 가질 수 있는 요인으로 스트레스환경 아래에서 단백질의 발현은 매우 중요하며 따라서 앞으로의 연구에서는 본 연구에서 밝혀진 acid stress에 관여하는 스트레스 단백질로 추정되는 단백질을 동정하고 유전자 발현형태 및 관련 대사를 밝혀내는 연구가 계속적으로 이루어 질 것이다. 또한 이들 단백질의 발현과 *S. mutans*의 내산성을 결정하는 또 다른 중요한 요인인 세포질막의 물리적 성질, 그와 관련되는 지방산 조성의 변화 및 H⁺-ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 활성 등과의 상관관계를 밝히는 통합적인 연구들도 수행되어져야 할 것으로 생각된다. *S. mutans*가 다른 구강 내 미생물들과는 달리 내산성을 가질 수 있는 이러한 생리적인 원인의 규명은 치아우식증 예방에 지대한 기여를 할 수 있을 것이라 기대되어진다.

REFERENCES

- Bardford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-54.
- Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. *J Microbiol Methods.* 2001. 46: 99-105.
- Inoue M, Koga T. Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1979. 25: 922-931.
- Kim HS, Kwon HK, Choi CH, Kim BI. Effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract containing xylitol on *Streptococcus mutans* biofilms. *J Korean Acad Dent Health.* 2006. 30: 497-505.
- Kim GS, Song JH, Yang TC, Jeon JG, Chang KW. Comparison of virulence factors of *Streptococcus mutans* between the groups free and high risk in dental caries. *J Korean Acad Dent Health.* 2006. 30: 12-22.
- 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: 6333-6342.
- Lee IS, Slonczwski JL, Foster JW. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1994. 176: 1422-1426.
- Lemos JA, Luzardo Y, Burne RA. Physiologic effects of forced down-regulation of *dnaK* and *groEL* expression in *Strepto-*

- coccus mutans*. J Bacteriol. 2007. 189: 1582-1588.
- Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are up-regulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. Microbiology 2004. 150: 1339-1351.
- Lenski RE. Assessing the genetic structure of microbial populations. Proc Natl Acad Sci USA. 1993. 90: 4334-4336.
- McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2003. 221: 25-30.
- Nakano YJ, Kuramitsu HK. Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. J Bacteriol. 1992. 174: 5639-5646.
- Song YH, Kim DS, Jung SR, Seo YS, Chang KW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. J Korean Acad Dent Health. 2001. 25: 299-306.
- Svensater G, Sjogreen B, Hamilton I. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. Microbiology 2000. 146: 107-117.
- Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2001. 205: 139-146.
- Trahan L. Xylital: a review of its action on Mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. Int Dent J. 1995. 45: 77-92.
- Zhu I, Kreth J, Cross SE, Gimzewski JK, Shi W, Oi F. Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. Microbiology 2006. 152: 2395-2404.
-