

포도당배지에서 DNA chip을 이용한 자일리톨 감성균주와 내성균주의 유전자 발현 비교

임상욱¹, 안상현², 박동욱², 최연희¹, 송근배¹

¹경북대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, ²대구보건대학 치위생과

Gene expression profile analysis of xylitol-sensitive and xylitol-resistant *Streptococcus mutans* in 0.5% glucose containing TYE media using DNA chip

Sang-Uk Im¹, Sang-Hun Ahn², Dong-Ok Park², Youn-Hee Choi¹, Keun-Bae Song¹

¹Department of Preventive Dentistry, Kyungpook National University School of Dentistry,

²Department of Dental Hygiene, Daegu Health College, Daegu, Korea

Received: November 21, 2012

Revised: December 4, 2012

Accepted: December 7, 2012

Corresponding Author: Keun-Bae Song
Department of Preventive Dentistry,
Kyungpook National University School
of Dentistry, 2177 Dalgubeol-daero,
Jung-gu, Daegu 700-412, Korea
Tel: +82-53-660-6870
Fax: +82-53-423-2947
E-mail: kbsong@knu.ac.kr

*본 연구는 한국연구재단 2012년도 기본
연구지원사업(유형2)(20120007828)연구비
와 2012학년도 경북대학교 학술연구비에
의하여 연구되었음.

Objectives: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is the major causative bacteria in dental caries. Xylitol is an effective anticariogenic natural sugar substitute by inhibiting the virulence of *S. mutans*. However, long-term xylitol consumption leads to the emergence of the xylitol-resistant *S. mutans* (XR). The aim of this study is to analyze the difference of gene expression profile of xylitol-sensitive *S. mutans* (XS) and XR in 0.5% glucose containing TYE media, using a DNA chip.

Methods: *S. mutans* KCTC3065 was maintained in 0.5% glucose and 1% xylitol containing TYE media, during 30 days at 37°C 10% CO₂ to form XR. The same procedures without xylitol were repeated for the formation of XS. Both XS and XR were cultured in 0.5% glucose with or without 1% xylitol containing TYE media overnight and total RNA was extracted. RNA from XS was labeled with Cy-3 dye as control, and XR were labeled with Cy-5 as references. DNA chip was hybridized for 18-20 h at 42°C.

Results: A total of 277 genes of DNA chip data were significantly increased or decreased in XR. There is a total of 174 XR up-regulated genes in 0.5% glucose and 1% xylitol containing TYE media, and a total of 103 down-regulated genes. For compare with results of DNA chip, 11 in up-regulated genes and 10 in down-regulated were verified by RT-PCR. The most abundant increased genes in XR were related to cell envelope, cellular processes, DNA metabolism, transcription, and protein folding and stabilization. The decreased genes in XR were related to amino acid biosynthesis, toxin production and resistance, energy metabolism, ribosomal proteins synthesis, and signal transduction.

Conclusions: These results indicate that the difference of gene expression profile of XS and XR may be in existence. In particular, results of this study for XR up-regulated genes have a lot of similarities with the already published xylitol-related researches and other functional studies.

Key Words: DNA chip, *Streptococcus mutans*, Virulence, XR, XS, Xylitol

서 론

구강 내 세균에 의한 감염성 질환인 치아우식증은, 치면세균막 내 존재하는 세균들이 음식에 함유된 발효성 당질을 통해 산을 생산하고, 이 산들의 지속적인 자극에 의해 치아의 법랑질이나 치근면의 탈회를 수반하는 질환이며 우식을 유발하는 세균과 식이 습관, 치아의 법랑질의 개인적 특성, 시간적 요인은 치아우식증에서 매우 중요한 요소이다. 사람의 구강 내에는 매우 다양한 종의 세균이 존재하며 그 중 치아우식증과 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 균주는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치아우식을 유발하는 대표적인 세균이다¹⁾. *S. mutans*가 가지는 광범위한 병을 일으키는 능력을 독력(virulence)이라고 하며 *S. mutans*의 독력인자는 산생성, 산내성, 세포외부 다당류의 합성, 박테리옌 생성 등이 있으며 이러한 특징들을 바탕으로 치아우식증을 유발한다²⁾.

치아우식증 발생과 관련된 이러한 독력인자들은 *S. mutans*의 특정 유전자 발현의 변화에 따라 복잡하게 조절될 것으로 예상되며 이러한 메커니즘의 차이를 이해하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있다. Shemesh 등³⁾은 다양한 탄수화물이 존재할 경우 *S. mutans* GS5에서 *ftf*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*의 발현이 탄수화물의 종류에 따라 유전자 발현의 차이가 존재함을 확인하였으며, Janda와 Kuramitsu⁴⁾는 *S. mutans* GS5에서 배지에 포함된 탄소 소스에 따라 GTF의 활성이 다르게 나타난다고 보고하였다. 이상의 연구 결과에 따르면 치아우식증을 유발하는 *S. mutans*의 독력인자들은 탄수화물의 섭취와 관련된 유전자들의 조절과 밀접한 관련이 있으므로 규칙적인 구강건강관리와 세균의 위험요인을 사전에 차단하는 것이 치아우식증의 예방 및 억제에 매우 중요하며, 그중 자일리톨(Xylitol)을 이용하는 방법이 손쉬우면서도 실험적으로 효과적인 방법이라고 하겠다.

자일리톨은 자연계에 존재하는 천연 소재 감미료로 5탄당 알코올이며, 청량한 단맛이 특징으로 설탕보다 열량이 낮아 당뇨병 환자의 대체감미료로 잘 알려져 있고 또한 치아우식증 발생억제나 예방 메커니즘과 관련하여 활발하게 연구되고 있다⁵⁾. 최근 몇몇의 임상연구들은 자일리톨의 섭취는 타액과 치면세균막 내의 *S. mutans*의 수적인 감소를 초래한다고 보고하고 있다. Holgerson 등⁶⁾은 초등학생들을 대상으로 4주간 하루에 3회씩 자일리톨 껌을 사용한 결과 치면세균막의 양이 뚜렷하게 감소하였고, 초기에 비해 MS의 수가 상당히 억제되었으며, 이러한 감소는 이전에 치아우식을 경험하지 않은 아이들 사이에서 더 강력하게 나타났다고 하였다. 만 5-6세 어린이들을 대상으로 유치우식증 예방효과를 비교 분석한 연구⁷⁾에서, 12개월간 자일리톨 껌을 씹은 군이 대조군에 비해 우식경험유치면수가 47.1% 감소하였다. 이와 같이 자일리톨에 의해 성장이 억제되는 *S. mutans*를 자일리톨 감성균주(xylitol-sensitive *S. mutans*; XS)라고 부른다⁵⁾.

자일리톨은 *S. mutans*의 fructose phosphotransferase system (fru-PTS)에 의해 세포 내부로 운반 될 때 인산화과정을 거쳐 자일리톨 5-인산(xylitol 5-phosphate; X5P)으로 흡수된다.

이들은 당 대사와 관련된 효소에 사용되지 못하고 오히려 활성을 저해하므로, 에너지를 만들지 못하고 세포 밖으로 배출되는 무의 회로(futile cycle)를 거친다. 결국, *S. mutans*는 자일리톨을 탄수화물대사에 이용하지 못하므로 당대사가 일어나지 않고 산생성이 억제되며, 에너지의 공급이 없으므로 세균의 증식도 억제되거나 지연된다⁸⁾. Holgerson 등⁶⁾은 자일리톨의 섭취는 타액과 치면세균막 내의 *S. mutans*의 숫자 뿐만 아니라 치면세균막 형성 또한 감소시킨다고 보고하였다. Lee 등⁹⁾은 장기적인 자일리톨 섭취는 구강 내 존재하는 *S. mutans*의 수적인 감소와 집락 형태를 변화시키며, 이는 *gtfB* 유전자의 발현 감소와 관련이 있다고 하였다. 그러나, Trahan과 Mouton¹⁰⁾은 자일리톨이 첨가된 배지에 *S. mutans*를 장기적으로 배양하는 경우 더 이상 자일리톨에 의한 성장억제가 관찰되지 않는 자일리톨 내성균주(xylitol-resistant *S. mutans*; XR)가 형성된다고 보고하였고, 실제로 임상연구에서 자일리톨을 5-10년간 장기적으로 섭취한 사람의 타액 내에서 자일리톨에 내성을 가지는 균주를 분리하였으며, 그 비율이 전체 분리 균주의 87%를 차지하였다. 또한 자일리톨을 섭취하지 않은 사람의 구강 내에서도 XR이 분리되기는 하였으나 전체 분리균주의 10%에 그쳤으며, 이처럼 구강 내에서 XS에 대한 XR의 비가 증가하는 것은 자일리톨에 의한 환경적인 압박에 의한 것이라고 하였다. Trahan 등¹¹⁾은 XR의 출현 및 유지를 평가한 결과, 자일리톨 비섭취군에 비해 자일리톨 껌을 2년간 섭취한 군에서 치면세균막과 타액 내에 더 많은 XR이 존재한다는 것을 확인하였으며, 자일리톨 섭취를 4년 동안 자제한 이후에도 여전히 XR이 유지되고 있었다고 하였다. XR이 자일리톨에 의한 성장억제가 더 이상 일어나지 않는다면 결국 자일리톨에 의한 치아우식증의 예방 및 억제 효과는 존재하지 않으므로 XR의 다양한 독력인자들에 대한 연구들이 진행되고 있다^{5,11)}. 최근 Lee 등¹²⁾은 실시간 중합효소연쇄반응을 통하여 XS와 XR의 *gtf* 발현을 조사한 결과, XR의 *gtfB*와 *gtfC* 발현은 XS에 비해 감소하는데 반해, *gtfD*의 발현은 오히려 증가하였다는 결과를 바탕으로 세 유전자들이 서로 독립적으로 작용하며, 이들 유전자들의 변형이 자일리톨의 치아우식 예방 효과의 작용기전 중 하나라고 밝혔다. 이밖에도 Trahan 등¹¹⁾은 치면세균막 내의 XR의 비율이 타액에 비해 현저히 낮다는 사실을 확인함으로써 XR이 XS에 비해 부착력이 낮고, 이로 인하여 치면세균막으로부터 타액으로의 유리가 용이하게 되어 세균의 분포에 영향을 줄 수 있다고 하였다. Lee 등¹³⁾도 XR은 XS와 성장 및 산생성, 수산화 인회석 부착에는 차이를 나타내지 않지만, 자당 의존성 수산화인회석 부착력은 더 낮으며, 타액 유도성 응집은 더 높은 반응성을 보인다는 것을 확인함으로써, 자당의 노출이 빈번한 구강 내 환경에서 XR이 XS에 비해 치아 표면에 대한 부착 세균수가 적게 되고, 타액에 의해 응집이 잘되어 치면세균막 내에서 탈락되기 용이하게 됨으로 치아우식유발력이 더 낮을 수 있다고 하였다. 한편, Assev 등¹⁴⁾은 XR과 XS는 다당류 생성에 차이를 보이지 않았으며, 오히려 XR이 더 많은 유산을 생산한다고 보고하여, XR의 우식유발력이 XS에 비해 약하지 않을 수도 있다고 하였다. 이와 같이 자일리톨과 *S. mutans*에 대한 연구가 최근 진행되고 있음에

도 불구하고, XS와 XR의 비교연구는 아직 초기단계이며, 두 균주 간의 독립인자에 대한 포괄적인 비교연구나 유전자 발현에 대한 기본적인 비교·분석은 전무한 실정이다.

DNA chip은 동시다발적으로 많은 양의 유전자 발현을 비교할 수 있는 실험방법으로, 특정 유전자의 oligonucleotide나 분리된 mRNA를 이용하여 만든 cDNA를 유리 기판의 표면에 규칙적으로 점적한 것을 말하며 일반적으로 DNA chip은 유리 기판 cm^2 당 수백 개에서 수만 개의 DNA를 올릴 수 있다. 이들과 형광물질로 표지된 cDNA probe를 hybridization시켜 비교하고자 하는 두 그룹간의 유전자 발현 차이를 확인하는 방법이 DNA chip 방법이다¹⁵⁾. 기존의 유전자 분석방법인 Southern, Northern, dot & slot blot 등의 방법과 유사하며, 비용이 많이 드는 단점이 있으나, 많은 수의 유전자를 동시에 비교할 수 있으며 실험에 필요한 샘플의 양도 비교적 소량이 요구되는 장점으로 인해 근래에 많이 사용하고 있는 실험 방법이다. DNA chip 방법은 두 그룹간의 mRNA의 발현을 분석함으로써 특정 조건에서 변화하는 유전자들을 확인할 수 있으며 이들 유전자들이 특정 조건에서 어떻게 연관되어 있는지를 추측할 수 있다. 현재 치의학계에서도 DNA chip 방법을 통해 특정 조건에서 변화하는 유전자 발현의 차이를 비교하는 연구들이 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

따라서 본 연구에서는 1%의 자일리톨이 첨가된 배지에서 장기간 배양을 통해 형성된 XR을 0.5% 포도당이 포함된 배지에서 DNA chip 방법을 이용하여 XS와의 유전자 발현의 차이를 비교·분석하여, 유전자의 조절들로 인한 XR과 XS의 차이가 어떻게 나타나는지 이해하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1.1. XR의 형성 및 확인

생명자원센터(Korean Collection for Type Culture; KCTC)에서 *S. mutans* KCTC3065를 분양받아 0.5% 포도당(Sigma, MO, USA)이 포함된 TYE 액체배지(Trypticase yeast extract: Difco Laboratories, MD, USA; 1.7% trypticase: Difco Laboratories, MD, USA; 0.3% yeast extract: Difco Laboratories, MD, USA; 0.5% sodium chloride: Sigma, MO, USA; 0.25% potassium phosphate: Sigma, MO, USA) 10 ml에 자일리톨(Sigma Chemical, MO, USA)이 1% (66 mM)가 되도록 첨가하여 37°C, 10% CO₂에서 24시간 배양하였다. 동일한 조성의 배지에 전날의 세균배양액 100 μl 를 잘 섞어 다시 배양하기를 30일 동안 반복·지속하였으며, XS의 경우 자일리톨을 첨가하지 않고 동일한 조건으로 배양하였다.

형성된 XR과 XS를 각각 0.5% 포도당이 포함된 TYE 액체배지 10 ml에 1%의 자일리톨을 첨가하거나 하지 않은 상태로 접종하고 12시간 동안 배양하였으며, 자일리톨을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지의 성장이 동일한 경우 이를 XR로 정의하였고 자일리톨에 의해 성장이 뚜렷하게 억제되는 경우를 XS로 정의하였

다(data not shown). 이와 같은 방법으로 두 set의 XS와 XR의 형성을 확인하고(0704, 0805) 이를 본 연구에 이용하였다.

2. 연구방법

2.1. XS와 XR의 처리

XR과 XS를 0.5% 포도당이 포함된 TYE 배지에 1% 자일리톨을 첨가하거나 하지 않은 상태로 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 접종하여 37°C, 10% CO₂에서 각각의 조건에 맞도록 총 24시간 동안 배양하고 RNA를 분리하고 이를 DNA chip 분석에 이용하였다.

2.2. RNA 분리 및 DNA chip 실시

자일리톨의 유무를 제외하고 동일한 조건으로 배양시킨 XS와 XR을 Tri-Reagent (Molecular Research Center, OH, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용, capillary electrophoresis를 실시하여 RNA의 integrity를 확인하였고 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 추가적으로 순수한 RNA 분리를 실시하고 Nanodrop ND-1000 (Kisker, Steinfurt, Germany)으로 정량하였다.

DNA chip 분석에 이용할 probe를 제작하기 위해 amino-allyl-dUTP와 random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 total RNA와 섞어 3시간 동안 반응하고 이를 Microcon YM-30 column (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 걸러준 다음 XS *S. mutans*는 녹색을 나타내는 Cy3 dye로, XR *S. mutans*는 붉은색을 나타내는 Cy5 dye (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)로 표지하였다(Fig. 1). Cy3 혹은 Cy5로 표지된 cDNA probe들은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 순수한 probe들로 걸러내었다. 걸러진 cDNA probes들을 30% formamide, 5X SSC, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA가 포함된 hybridization buffer에 다시 녹이고 이들을 chip slide (*Streptococcus mutans* UA159 Oligonucleotide 3 X 15K chip) (Mycroarray.com, Ann Arbor, MI, USA)에 hybridization 하였다. 42°C에서 18-20시간 반응한 후에 chip slide를 washing solution 1 (2X SSC, 0.1% SDS)에 42°C 5분 동안 두 번에 걸쳐 washing을 하고, 두 번째로 washing solution 2 (0.1X SSC, 0.1% SDS)에 room temperature (RT)에서 10분 동안 washing한 다음, 추가적으로 0.1X SSC solution에 RT에서 1분 동안 총 4번 washing 한다. Chip slide는 650 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 잘 말려준 다음 Axon 4000B (Axon Instrument, Union City, CA, USA)를 이용하여 hybridization image를 얻어내었다.

2.3. 결과 분석

Hybridization image는 GenePix Pro 3.0 software (Axon Instrument, Union City, CA, USA)를 이용하여 유전자 발현비 (Cy3 vs Cy5) 정도를 얻어내기 위해 분석하고 chip 결과분석은 Genowiz 4.0™ (Ocimum Biosolutions, India)를 이용하여 실

시하였다. 결과 분석값에 Normalization을 수행하기 위해 global lowess를 이용하였으며 증가 혹은 감소하는 유전자 발현비 기준은 1.5배(R/G ratio=1.5/1.0) 혹은 0.67배(R/G ratio=1.0/1.5)로 결정하였다. 두 번의 실험 결과 값의 신뢰도는 0.05로 하였으며 0.05보다 낮은 *P*-value를 보이는 유전자들로 dendrogram을 그려 두 군주간의 유전자 발현의 유사성을 확인하였다(data not shown).

2.4. RT-PCR용 RNA 분리 및 DNase I 처리

앞서 기술한 방법과 동일하게 배양된 균주를 D-PBS (Pro-tAnBio, Daegu, Korea)로 두 번 washing하고 Tri-solution (Bio Science Technology, Korea)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 DNase I (Takara, Japan)을 처리하여 genomic DNA contamination을 배제하였다. 간략하게 설명하면, 분리된 total RNA (20-50 µg)을 20 µl에 녹이고 이를 10X DNase I buffer 5 µl, DNase I 10 units 2 µl, Ribonuclease Inhibitor 20 units 0.5 µl, DEPC-treated water 22.5 µl를 섞어 37°C에서 60분 동안 반응하였다. 반응종료 후 50 µl의 DEPC-treated water를 섞고 샘플과 동량, 즉 100 µl의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution (25:24:1)과 잘 섞어준 다음 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상층액만 새 튜브로 옮겼다. 옮겨진 상층액과 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 다시 섞어 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 다시 상층액만 새로운 튜브로 옮겼다. 10 µl의 3 M sodium acetate와 250 µl의 차가운 ethanol을 섞어 -80°C에서 20분 동안 방치한 다음 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한다. 상층액을 제거하고 70% ethanol을 넣어 washing 하고 다시 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한다. 침전물을 잘 말리고 적당량의 DEPC-treated water에 녹여 정량하여 실험에 이용하였다.

2.5. 역전사(Reverse Transcription; RT)반응

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara, Japan)를 이용하여 2 µg의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 우선 2 µg의 RNA와 RNase free water가 9 µl가 되게 혼합한 후, 1X RT buffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2 U/µl ribonuclease inhibitor, 0.25 U/µl AMV reverse transcriptase XL, 0.5 µg/µl Oligo (dT) 12-18 primer (Invitrogen, CA, USA)를 포함하는 반응용액 11 µl를 첨가하였다. 반응혼합액은 30°C에서 10분, 42°C에서 90분 동안 반응시킨 후에 95°C에서 5분 동안 열을 가하

여 역전사 효소를 불활성화 시킴으로써 반응을 종료시켰다. 반응종료 후에는 열에 의한 cDNA의 손상을 방지하기 위해 4°C로 냉각하였으며 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

2.6. Primer 제작 및 PCR 반응 조건

DNA chip 결과를 검증하기 위해 두 군주에서 차이나게 발현하는 유전자들 중 XR에서 증가하는 유전자에서 11종, XR에서 감소하는 유전자에서 10종, 총 21종의 유전자를 선택하고 NCBI의 nucleotide 검색 사이트(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)를 통해 예상 sequence를 얻고 이를 기준으로 primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)에서 primer design을 하였다. PCR 반응용액의 구성은 10X PCR buffer (Invitrogen, CA, USA) 2 µl, 2.5 mM dNTP mixture 1.6 µl, 10 mM PCR primer 각각 0.4 µl, Taq DNA polymerase 0.1 µl, dH₂O 14.5 µl와 역전사된 cDNA 1 µl 포함하여 총 20 µl가 되도록 하였다. 반응 조건은 94°C, 2분 동안 initiation denaturation을 진행한 후, denaturation 94°C, 각 primer의 annealing temperature, extension 72°C에서 30초 동안 반응하였으며, 유전자들의 발현정도의 비교를 위한 standard로 이용하기 위하여, 이미 다른 논문에서 internal control primer로 사용된 *S. mutans*의 16S rRNA¹⁶⁾와 LARNA¹⁷⁾를 사용하였으며 이들 primer의 자세한 정보는 Table 1과 같다.

3. 분석방법

DNA chip의 결과는 excel 파일로 정리되었으며 유전자 발현비를 기준으로 정렬하여 비교하였으며 상황에 따라 기능별로 구분하여 비교하기도 하였다. 선별된 유전자의 예상되는 기능은 *S. mutans*의 유전자에 대한 기능과 정보가 비교적 상세하게 공개되어 있는 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg>) 웹사이트와 세계적인 유전자연구기관인 J. Craig Venter Institute의 Comprehensive Microbial Resource (CMR; <http://cmr.jcvi.org>) 웹사이트에서 검색하고 확인하였다.

연구성적

1. DNA chip 방법의 적용

Fig. 1는 DNA chip을 이용하여 XR과 XS의 유전자 발현을 비교하는 모식도이다. 본 연구에 이용한 DNA chip은 *S. mutans* UA159 chip 3 X 15K Oligonucleotide microarray이며 총

Table 1. Primer sequences for internal standard control

Gene name	Primer		Tm*	Cycle	Product
	Forward	Reverse			
16S rRNA	tggaaattccatgtgtagcgg	cctgcccggaacgtattc	60°C	16 cy	680 bp [†]
LARNA	gtgtgtccggtatttggg	gggtatctaatacctgttcgc	56°C	22 cy	248 bp

*Tm, melting temperature; [†]bp, base pair.

1,928개의 유일한 유전자가 45-47 nucleotides의 길이로 유리기 판위에 점적되어져 있다. 0.5% 포도당이 포함된 XR과 XS에서 분리한 RNA는 각각 붉은색 형광물질인 Cy5 dye와 초록색 형광물질인 Cy3 dye를 표지하여 cDNA probe로 만들어 hybridization을 실시하였다.

Fig. 2는 각각 0704, 0805 두 set를 cDNA probe를 이용하여 실험한 DNA chip의 결과이다. 그림에서 붉은색으로 표시된 유전자는 XR에서 높게 증가하는 대표적인 유전자를 나타내며 초록색으로 표시된 유전자는 XR에서 감소하는 유전자를 나타낸다. 각 실험 set에서 DNA chip의 결과에 대한 reliability와 intensity를 확인할 수 있는 MA plot (data now shown)을 통해 전체 1,928개의 유전자중 1,793개의 유전자가 믿을 수 있는 결과 값을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 각 실험 set에서 DNA chip의 결과에 대한 각각의 intensity를 보여주는 scatter plot (data not

shown)에서 1.5배 이상 증가($Cy5:Cy3=1.5:1.0$)하거나 0.67배 낮게 발현($Cy5:Cy3=1.0:1.5$)하는 유전자들은 전체 1,928개 유전자 중에 277개인 것으로 확인되었다.

2. XR에서 증가하는 유전자

0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양된 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자는 총 1,928개의 유전자 중 174개로 확인되었으며(data now shown), 증가하는 유전자들의 예상되는 기능으로 구분하고, 이들 중 총 11개의 유전자를 골라 RT-PCR용 primer로 design하여 제작하였다(Table 2).

Table 3은 0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양된 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 cell envelope과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림

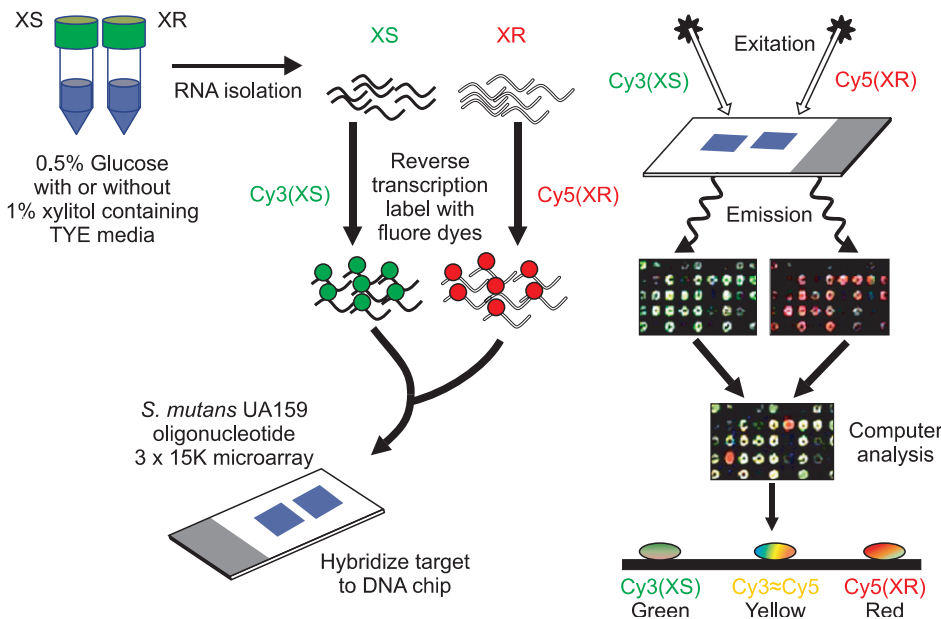


Fig. 1. The schema for XS and XR in 0.5% glucose and with or without 1% xylitol containing TYE media using DNA chip.

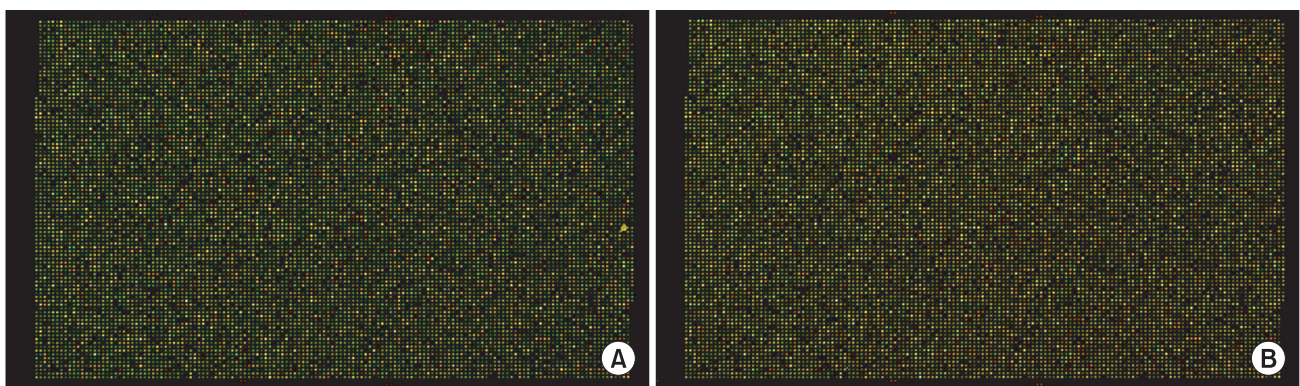
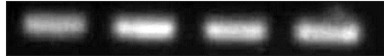


Fig. 2. A representative results of DNA chip for XS and XR in 0.5% glucose and with or without 1% xylitol containing TYE media. RNA samples from XS were labeled with Cy3 (green), and XR were labeled with Cy5 (red). DNA chip experiments were carried out two times. (A) 0704 experiment, (B) 0805 experiment.

Table 2. RT-PCR primer sequences and conditions of XR up-regulated genes in 0.5% glucose and 1% xylitol containing TYE media

Locus tag	Primer	Sequences	Tm*	Cycle	Product
SMU.10	SMU.10 F	aaaccaaacgtcgccatc	57°C	28 cy	229 bp [†]
	SMU.10 R	gcacgtgcatacttctcaac			
SMU.81	SMU.81 F	caactaccattgaaggtctt	57°C	22 cy	253 bp
	SMU.81 R	gaacgtgctcttctgttga			
SMU.253	SMU.253 F	ttgctatcgctcgctcatcac	57°C	24 cy	229 bp
	SMU.253 R	acagaaatcaggcgcatacc			
SMU.772	SMU.772 F	cgccaccattagaacacct	57°C	26 cy	308 bp
	SMU.772 R	agctattggcgggtgagaaga			
SMU.1005	SMU.1005 F	caagaaacgcagcgtcaata	55°C	28 cy	562 bp
	SMU.1005 R	caatttggagcaagtacgca			
SMU.1361c	SMU.1361c F	gcagcacaagtatctctgt	57°C	21 cy	264 bp
	SMU.1361c R	ggcaacaatggcttctgt			
SMU.1396	SMU.1396 F	gctaagcagccttgccttggcg	64°C	25 cy	308 bp
	SMU.1396 R	ctgcagcttctaccgaaggctg			
SMU.1528	SMU.1528 F	tcagctcttcttggccgtat	57°C	25 cy	344 bp
	SMU.1528 R	tcacgataacgctgaagac			
SMU.1840	SMU.1840 F	ggcacctgtcctttccataa	57°C	24 cy	308 bp
	SMU.1840 R	gcaacagctgggtgcacaat			
SMU.2027	SMU.2027 F	aggcacaggctattcttatt	55°C	30 cy	251 bp
	SMU.2027 R	tgagagaaacaagacgaagg			
SMU.2085	SMU.2085 F	gatgagttcaggaagtctgg	57°C	33 cy	333 bp
	SMU.2085 R	actaaagctgcactgagtc			

*Tm, Melting temperature; [†]bp, base pair.**Table 3.** Identification of cell envelope-related genes in XR up-regulated

Cell envelope		SMU.1396 64°C 25 cy		0704		0805	
				XS	XR	XS	XR
							
Gene	Product	XR/XS ratio	Functions				
SMU.75	Putative D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	2.062	D-glutamine and D-glutamate metabolism & peptidoglycan biosynthesis				
SMU.1718	Putative glutamate racemase	1.805	D-glutamine and D-glutamate metabolism & peptidoglycan biosynthesis				
SMU.253	Putative D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	1.762	D-glutamine and D-glutamate metabolism & peptidoglycan biosynthesis				
SMU.597	Penicillin-binding protein 2b	1.526	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism & peptidoglycan biosynthesis				
SMU.1525	Putative UDP-N-acetyl glucosamine	1.518	D-glutamine and D-glutamate metabolism & peptidoglycan biosynthesis				
SMU.1396	Glucan-binding protein C	1.667	Surface structures				

이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 cell envelope과 관련있는 유전자는 SMU.75, SMU.1718, SMU.253, SMU.597, SMU.1525, SMU.1396으로 총 6개였으며 이들 중 SMU.1396을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결

과와 비교·확인하였다.

Table 4는 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 cellular processes (cell division)와 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기

영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 cellular processes와 관련있는 유전자는 SMU.15, SMU.552, SMU.1513, SMU.10, SMU.1396으로 총 5개였으며 이들 중 SMU.10과 SMU.1396을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 5는 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 DNA metabolism (replication, repair and recombination)과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 DNA metabolism과 관련있는 유전자는 SMU.1455, SMU.1581, SMU.1873, SMU.472, SMU.1174, SMU.2085, SMU.504, SMU.2087으로 총 8개였으며 이들 중 SMU.2085와 SMU.504를 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 6은 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 energy metabolism과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상

세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 DNA metabolism과 관련있는 유전자는 SMU.1530, SMU.1528, SMU.1005, SMU.623c, SMU.772, SMU.1117, SMU.360, SMU.1840, SMU.1496으로 총 9개였으며 이들 중 SMU.1005, SMU.772, SMU.1840을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 7은 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 transcription과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 transcription과 관련있는 유전자는 SMU.2027, SMU.1165c, SMU.1607, SMU.611, SMU.458, SMU.422, SMU.1361c로 총 7개였으며 이들 중 SMU.2027, SMU.1361c를 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 8은 XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들 중 protein

Table 4. Identification of cellular processes-related genes in XR up-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Cellular processes	SMU.10 57°C 28 cy				
	SMU.1396 64°C 25 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.15	Putative cell division protein FtsH	1.769		Cell division	
SMU.552	Putative cell division protein FtsZ	1.761		Cell division	
SMU.1513	Chromosome segregation ATPase	1.574		Chromosome segregation	
SMU.10	Hypothetical protein	1.547		Cell division	
SMU.1396	Glucan-binding protein C	1.667		Conjugation	

Table 5. Identification of DNA metabolism-related genes in XR up-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
DNA metabolism	SMU.2085 57°C 35 cy				
	SMU.504 57°C 31 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.1455	Mutator protein, pyrophosphohydrolase	2.136		DNA repair and recombination	
SMU.1581	DNA polymerase III, gamma/tau subunit	1.899		DNA replication	
SMU.1873	Putative ribonuclease	1.858		DNA replication	
SMU.472	Conserved hypothetical protein; possible	1.648		DNA replication, repair and recombination	
SMU.1174	ATP-dependent DNA helicase	1.619		DNA repair	
SMU.2085	Recombination protein RecA	1.589		DNA recombination	
SMU.504	Putative site-specific DNA-methyltransferase	1.562		DNA repair	
SMU.2087	Putative 3-methyl-adenine DNA glycosylase I	1.555		DNA repair	

Table 6. Identification of energy metabolism-related genes in XR up-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Energy metabolism	SMU.1005 55°C 28 cy				
	SMU.772 57°C 26 cy				
	SMU.1840 57°C 25 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.1530	FoF ₁ membrane-bound proton-translocating ATPase, alpha subunit	2.174		Oxidative phosphorylation	
SMU.1528	FoF ₁ membrane-bound proton-translocating ATPase, beta subunit	2.003		Oxidative phosphorylation	
SMU.1005	Glucosyltransferase-SI	67.098		Starch and sucrose metabolism	
SMU.623c	Putative deacetylase	2.166		Biosynthesis and degradation of polysaccharides	
SMU.772	Glucan-binding protein D with lipase activity;	1.912		Biosynthesis and degradation of polysaccharides	
SMU.1117	NADH oxidase (H ₂ O-forming)	1.649		NADH oxidase	
SMU.360	Extracellular glyceraldehyde-3-phosphate	1.651		Glycolysis	
SMU.1840	Putative fructokinase	1.919		Fructose and mannose metabolism	
SMU.1496	Galactose-6-phosphate isomerase, subunit LacA	1.967		Galactose metabolism	

Table 7. Identification of transcription-related genes in XR up-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Transcription	SMU.2027 57°C 33 cy				
	SMU.1361c 57°C 21 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.2027	Putative transcriptional regulator	1.520		Mobile and extrachromosomal element functions	
SMU.1165c	Transcription regulator	2.527		DNA interaction	
SMU.1607	Putative exoribonuclease R (RNAase R)	1.801		RNA degradation	
SMU.611	Putative ATP-dependent RNA helicase, DEAD-box	1.706		RNA degradation	
SMU.458	Putative ATP-dependent RNA helicase	1.646		Other	
SMU.422	Ribosome binding factor A	1.648		RNA processing	
SMU.1361c	TetR family transcriptional regulator	1.767		DNA interaction	

Table 8. Identification of protein folding and stabilization-related genes in XR up-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Protein folding & stabilization	SMU.81 57°C 22 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.81	Heat shock protein GrpE (HSP-70 cofactor)	1.595		Protein folding and stabilization	
SMU.1955	Putative co-chaperonin GroES	3.577		Protein folding and stabilization	
SMU.1631	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2.718		Protein folding and stabilization	
SMU.82	Heat shock protein, DnaK (HSP-70)	2.136		Protein folding and stabilization	
SMU.1954	Putative chaperonin GroEL	2.089		Protein folding and stabilization	
SMU.1929	Putative protease HtpX, heat shock protein	1.741		Protein folding and stabilization	
SMU.83	Heat shock protein DnaJ (HSP-40)	1.721		Protein folding and stabilization	

folding 및 stabilization과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 증가하는 174개의 유전자 중 protein folding 및 stabilization과 관련있는 유전자는 SMU.81, SMU.1955, SMU.1631, SMU.82, SMU.1954, SMU.1929, SMU.83으로 총 7개였으며 이들 중 SMU.81을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

3. XR에서 감소하는 유전자

0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양된 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자는 총 1,928개의 유전자 중 103개였으며(data now shown), 이들 유전자를 기능별로 구분하고 마찬가지로 10개를 선별하여 RT-PCR용 primer list 제작하였다 (Table 9).

Table 10은 0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양된 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중 amino acid biosynthesis와 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 감소하는 103개의 유전자 중 amino acid biosynthesis와 관련있는 유전자는 SMU.533, SMU.535, SMU.537, SMU.538, SMU.317, SMU.1266, SMU.1270으로

총 7개였으며 이들 중 SMU.537과 SMU.538을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

또한 Table 11은 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중 toxin production 및 resistance와 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 감소하는 103개의 유전자 중 toxin production 및 resistance와 관련있는 유전자는 SMU.1035, SMU.654, SMU.655, SMU.745로 총 4개였으며 이들 중 SMU.1035를 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 12는 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중 energy metabolism (pyruvate metabolism, TCA cycle)과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 감소하는 103개의 유전자 중 energy metabolism와 관련있는 유전자는 SMU.310, SMU.1421, SMU.1422, SMU.1423, SMU.314, SMU.670, SMU.671로 총 7개였으며 이들 중 SMU.670과 SMU.671을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 13은 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중 ribo-

Table 9. RT-PCR primer sequences and conditions of XR down-regulated genes in 0.5% glucose and 1% xylitol containing TYE media

Locus tag	Primer	Sequences	Tm*	Cycle	Product
SMU.312	SMU.312 F	taccagccccataccaata	57°C	28 cy	224 bp [†]
	SMU.312 R	cggaccttttagcccaataca			
SMU.313	SMU.313 F	agctgaacagggaattctgc	57°C	28 cy	312 bp
	SMU.313 R	aaaagtgtctggctgttggac			
SMU.537	SMU.537 F	cgtcctgagaggcaacaat	57°C	28 cy	318 bp
	SMU.537 R	caaaggacgaccaggtgttt			
SMU.538	SMU.538 F	taacaggaccatctgccaca	57°C	28 cy	163 bp
	SMU.538 R	aaggcagaaggcaagggtct			
SMU.670	SMU.670 F	tcaattcttacggtagccgtcg	56°C	30 cy	560 bp
	SMU.670 R	tttacgcacaaccattgg			
SMU.671	SMU.671 F	gtcaggggtgtctctctatcg	56°C	30 cy	450 bp
	SMU.671 R	aatgtcatgctctgttcc			
SMU.1035	SMU.1035 F	ccagacgtgtttcatacca	57°C	24 cy	233 bp
	SMU.1035 R	ttctagcaccagagcggaat			
SMU.1421	SMU.1421 F	taaggagaaagtgagactg	57°C	35 cy	344 bp
	SMU.1421 R	ctgtaggaatgctagcagga			
SMU.2020	SMU.2020 F	gcgtgttaaaccatcgtcgtg	57°C	22 cy	251 bp
	SMU.2020 R	cacctttccagatcccata			
SMU.2022	SMU.2022 F	cagctaaagcaatggctcgt	57°C	22 cy	247 bp
	SMU.2022 R	cgtttcatcgttggctccttc			

*Tm, melting temperature; [†]bp, base pair.

Table 10. Identification of amino acid biosynthesis-related genes in XR down-regulated

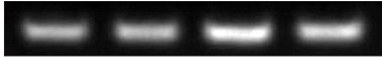

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Amino acid biosynthesis	SMU.537 57°C 28 cy				
	SMU.538 57°C 28 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.533	Putative anthranilate synthase, beta subunit	0.637		Aromatic amino acid family	
SMU.535	Putative indoleglycerol phosphate synthase	0.622		Aromatic amino acid family	
SMU.537	Putative tryptophan synthase, beta subunit	0.478		Aromatic amino acid family	
SMU.538	Putative tryptophan synthase, alpha subunit	0.427		Aromatic amino acid family	
SMU.317	Putative tetrahydrodipicolinate succinylase	0.517		Aspartate family	
SMU.1266	Putative glutamine amidotransferase HisH	0.615		Histidine family	
SMU.1270	Putative histidinol dehydrogenase	0.623		Histidine family	

Table 11. Identification of toxin production and resistance-related genes in XR down-regulated

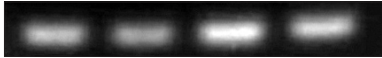
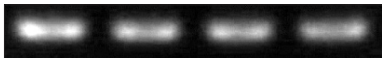

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Toxin production & resistance	SMU.1035 57°C 24 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.1035	Putative ABC transporter, ATP-binding protein	0.522		Toxin production and resistance	
SMU.654	Putative ABC transporter, ATP-binding protein	0.627		Toxin production and resistance	
SMU.655	Putative MutE	0.607		Toxin production and resistance	
SMU.745	Putative drug-export protein; multidrug	0.624		Toxin production and resistance	

Table 12. Identification of energy metabolism-related genes in XR down-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Energy metabolism	SMU.670 56°C 30 cy				
	SMU.671 56°C 30 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.310	Sorbitol operon activator	0.617		Electron transport	
SMU.1421	Putative dihydrolipoamide acetyltransferase, E2	0.638		Pyruvate metabolism	
SMU.1422	Putative pyruvate dehydrogenase E1 component	0.501		Pyruvate metabolism	
SMU.1423	Putative pyruvate dehydrogenase, TPP-dependent	0.614		Pyruvate metabolism	
SMU.314	Hypothetical protein	0.396		Pentose phosphate pathway	
SMU.670	Aconitate hydratase; aconitase	0.610		TCA cycle	
SMU.671	Citrate synthase	0.569		TCA cycle	

somal protein synthesis와 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 감소하는 103개의 유전자 중 ribosomal protein synthesis와 관련있는 유전자는 SMU.2008,

SMU.2011, SMU.2012, SMU.2014, SMU.2015, SMU.2020, SMU.2021, SMU.2022, SMU.2023c, SMU.2024c로 총 10개였으며 이들 중 SMU.2020과 SMU.2022를 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

Table 13. Identification of ribosomal protein synthesis-related genes in XR down-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Ribosomal protein synthesis	SMU.2020 57°C 22 cy				
	SMU.2022 57°C 22 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.2008	50S ribosomal protein L30	0.580		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2011	50S ribosomal protein L6 (BL10)	0.518		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2012	30S ribosomal protein S8	0.609		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2014	30S ribosomal protein S14	0.606		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2015	50S ribosomal protein L5	0.632		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2020	50S ribosomal protein L16	0.588		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2021	30S ribosomal protein S3	0.646		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2022	50S ribosomal protein L22	0.498		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2023c	30S ribosomal protein S19	0.429		Ribosomal proteins, synthesis & modification	
SMU.2024c	50S ribosomal protein L4	0.561		Ribosomal proteins, synthesis & modification	

Table 14. Identification of signal transduction-related genes in XR down-regulated

		0704		0805	
		XS	XR	XS	XR
Signal transduction	SMU.312 57°C 28 cy				
	SMU.313 57°C 28 cy				
Gene	Product	XR/XS ratio		Functions	
SMU.103	Putative PTS system, IIA component	0.603		Phosphotransferase system	
SMU.311	PTS system, sorbitol (glucitol)	0.463		Phosphotransferase system	
SMU.312	PTS system, sorbitol phosphotransferase enzyme	0.401		Phosphotransferase system	
SMU.313	Putative PTS system, sorbitol-specific enzyme	0.323		Phosphotransferase system	
SMU.980	Putative PTS system, beta-glucoside-specific EII component	0.665		Phosphotransferase system	

Table 14는 XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중 signal transduction과 관련있는 유전자들의 DNA chip의 발현비와 상세한 기능을 도표화 하고 추가적으로 RT-PCR 전기영동 사진을 비교한 그림이다. XR에서 감소하는 103개의 유전자 중 signal transduction과 관련있는 유전자는 SMU.103, SMU.311, SMU.312, SMU.313, SMU.980으로 총 5개였으며 이들 중 SMU.312과 SMU.313을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시하고 이를 DNA chip 결과와 비교·확인하였다.

고 안

자일리톨이 치아우식증의 억제 및 예방에 효과적인 이유는 크게 네 가지로 살펴볼 수 있다. 첫째, 자일리톨은 감각수용성(organoleptic) 자극을 통해 타액분비를 증가시키고 치면세균막의

pH를 높여서 법랑질의 탈회를 방지하고 재석회화를 촉진한다. 둘째, 자일리톨의 구조상 화학적 특징으로 칼슘 등 다가 이온들과 작용하여 안정적인 복합체를 형성하여 타액과 치면세균막 내의 인산칼슘의 안정화에 기여한다. 셋째, 자일리톨은 타액 내 아미노산과 glycine 농도를 증가시키고 이화선과 구개선에 있는 타액 단백질을 증가시키며, amylase의 작용과 carbonic anhydrase, lactoperoxidase, invertase-like enzymes, thiocyanate ions 등의 증가를 통해 타액 성분을 변화시키므로 타액의 완충작용과 정균작용을 증가시켜 치아우식에 대한 체내 방어기전을 증진시킨다. 마지막으로, 자일리톨은 *S. mutans*의 치면부착에 필수적인 세포벽의 lipoteichoic acid (LTA)를 감소시킨다. 그러나 XR이 형성되면 이들의 유전자 조절이 어떤식으로 달라지는지는 아는 바가 없다. XS와 XR에 대한 몇몇의 비교 연구^[11-14]에 따르면 XR이 XS에 비해 다양한 독력인자가 덜 해롭다고 결론을 내리기는 힘들며 배

양조건과 환경요인에 따라 전체적인 유전자 발현이 차이가 나며 이에 따라 장기적으로 독립인자들의 차이가 나타난다고 가정하는 것이 타당해졌다.

DNA chip은 유전자 발현을 분석하고 확인하는 방법으로 동시에 두 실험 군 이상에서 각 개체의 대부분 유전자 발현의 차이를 비교할 수 있는 방법이며¹⁵⁾ 1990년대 개발된 이후 다양한 과학 분야에서 활발하게 이용되고 있다. Chen 등¹⁶⁾은 *S. mutans*의 산 내성 조절에 영향을 미치는 acid-mediated gene repression에서 whole-genome chip과 *in silico* analysis를 이용하여 특정 유전자의 전사 억제와 관련되는 특정한 염기서열이 존재함을 확인하였으며, Motegi 등¹⁷⁾은 DNA chip을 이용하여 임상에서 분리한 두 균주끼리 차이 나는 유전자를 확인하였고, 이들 중 biofilm 형성과 관련한 유전자들을 선별하여 비교·분석하였다. 또한 Shemesh 등¹⁸⁾은 DNA chip을 이용하여 biofilm 형성에 관여하는 유전자들의 발현을 planktonic 상태와 비교하여 확인하고 real-time RT-PCR을 통해 검증하는 등 최근 치의학계에서도 다양한 접근 방법으로 사용되고 있다.

본 연구에서는 0.5% 포도당이 포함된 배지에서 배양된 XR과 XS의 유전자 발현을 DNA chip을 이용하여 비교하였다. XR에서 1.5배 이상 증가하는 유전자들과 1.5배 감소하는 유전자들을 CMR 웹사이트를 통해 집작되는 기능으로 구분하여 그룹화하였다. 기능별로 구분된 유전자들은 KEGG에서 검색되는 bio-pathway를 통해 각 유전자들이 조절되는 pathway와 메커니즘을 분석하였다.

0.5% 포도당과 1% xylitol이 포함된 배지에서 배양한 XR에서 XS보다 1.5배 이상 증가하는 유전자들의 기능적 그룹들은 cell envelope, cellular processes (cell division), DNA metabolism (replication, repair and recombination), energy metabolism, transcription, protein folding and stabilization 등이 대표적이었다.

Cell envelope와 cellular processes에 모두 관련있는 *gbcP* (glucan binding protein C; SMU.1396)는 dextran (glucan)-dependent aggregation에 관여하는 유전자로 알려져 있으며 platinic 상태의 배양에서 dextran에 의해 엉기는 현상¹⁹⁾을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 Lynch 등²⁰⁾의 연구에서 *gbcP*의 발현은 일반적으로 성장곡선의 mid-exponential phase에서 보편적인 발현을 보이다 stationary phase에서 점차 감소한다고 하였으며 이는 *gbcP*가 적절한 biofilm 구조를 성장시키는데 필수적인 유전자이기 때문이다. Sato 등²¹⁾의 연구에서 *gbcP*는 자일리톨에 의해 그 유전자의 발현이 증가하며, mutant 연구를 통해 자당이 존재하는 경우 우리 표면 부착력이 감소하는 것을 확인하였다. 본 연구실에서 진행 중인 XR과 XS의 부착력 실험에서도 0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에 24시간 배양한 XR의 부착력이 XS에 비해 약 2.5배 정도 낮은 것을 확인하였으며²²⁾ 이러한 결과는 본 연구결과 및 기존 보고와 상당히 유사함을 보인다고 하겠다.

XR에서 증가하는 유전자 중 DNA metabolism (DNA

recombination)과 관련있는 RecA (recombination protein; SMU.2085)는 deficient-mutant 연구²³⁾를 통해 acid tolerance와 biofilm 형성에 관여하는 유전자임을 밝혔으며, 이는 아마도 XR의 성장억제가 일어나지 않는 이유에 대한 실마리를 어느 정도 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 DNA metabolism (DNA repair)과 관련있는 *Dam* (SMU.504)은 DNA adenine methylation을 조절하는 유전자로 *S. mutans*의 다양한 독립인자와 관련된 유전자를 포함하는 유전자 발현에 광범위한 영향을 미치는 유전자로 알려져 있다²⁴⁾.

Energy metabolism과 관련있는 *gtfC* (SMU.1005)는 수용성 글루칸과 비수용성 글루칸의 합성 모두에 관여하는 것으로 알려져 있으며²⁵⁾ Vacca-Smith와 Bowen²⁶⁾의 연구에서 *gtfC*는 수산화인회석 표면과의 결합에 관여한다. Lee 등²⁷⁾의 연구에서 XR의 경우 XS에 비해 *gtfB*와 *gtfC*의 발현이 낮은 것으로 보고되었으며, 이러한 결과는 Im 등²²⁾의 연구처럼 XR의 부착력의 감소 결과와 유사하나, DNA chip을 이용한 본 연구는 이와는 상반되는 결과를 보여주었다. 본 연구 결과에서 0805 set의 *gtfC* 유전자 발현이 XR에서 XS에 비해 126배나 높게 발현되었으며, set 간의 발현의 차이가 상당히 컸으나(P -value=0.248) RT-PCR에서는 DNA chip 결과와 유사하였으므로 이 결과는 추후 보다 정확한 유전자의 기능적인 분석을 통한 확인이 필요하다고 하겠다. 또한 XR에서 증가하는 유전자 중 Energy metabolism과 관련있는 *gdpD* (gulcan binding protein D; SMU.772)는 *gdpA* (SMU.1005)와 함께 biofilm 유지에 도움이 되는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 본 연구 결과에서 *gdpA*는 신뢰할 만한 결과값을 보이지는 못했지만 두 set의 평균값이 XR에 0.65배 감소하였다. 역시 Energy metabolism과 관련있는 *scrK* (putative fructokinase; SMU.1840)는 insertional inactivation을 통해 fructokinase와 mannokinase의 활성을 가짐을 확인하였으며²⁸⁾, 이는 fructose를 인산화하여 glycolysis에 이용하는데 도움을 주는 것으로 생각된다.

XR에서 증가하는 유전자 중 transcription과 관련있는 SMU.2027은 정확한 기능을 아직 알 수 없으며, SMU.1361c는 일반적인 원핵생물에서 TetR family의 transcriptional regulator로 작용하며 antibiotics의 합성이나 efflux pumps, osmotic stress 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

Protein folding과 stabilization과 관련있는 *grpE* (heat shock protein GrpE; SMU.81)는 DnaK operon (*hrcA-grpE-dnaK*)를 구성하는 유전자로 acid shock의 상황이나 acidification이 지속되는 경우 증가하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 이는 XR이 성장이나 산생성이 XS와 큰 차이를 보이지 않으나 XR의 경우 세 포외다당류 합성 관련 유전자의 낮은 발현으로 인한 부착력의 저하²⁷⁾로 XS에 비해, 산성 pH에 의한 타격을 입을 것으로 판단되며 이를 견디기 위해 DnaK operon의 발현이 증가할 것으로 판단된다.

XR에서 증가하는 유전자들 중에서 RT-PCR primer-용으로 선별·제작한 총 11개 중 SMU.253 (D-glutamine and D-glutamate metabolism and peptidoglycan biosynthesis; *dacA*)

은 DNA chip 결과 값과 유사하게 증가하는 결과를 얻지는 못하였다. 비교적 높은 *P*-value를 가짐(0.049)에도 불구하고 RT-PCR을 통해 XR에서 증가하는 패턴을 확인하지 못한 이유는 아마도 RT-PCR용 primer sequence와 DNA chip에 접착된 45-47 nucleotides의 유전자와 homologous가 낮아 결과에 대한 설명력이 낮은 것으로 판단된다.

0.5% 포도당이 포함된 배지에서 배양된 XR에서 XS에 비해 1.5배 이상 감소하는 유전자들의 기능적 그룹들은 amino acid biosynthesis (aromatic amino acid family), toxin production and resistance, energy metabolism (pyruvate metabolism and TCA cycle), ribosomal protein synthesis, signal transduction 등이 대표적이었다.

XR에서 감소하는 유전자들의 기능은 아직 정확하게 알려진 바가 없으며 이들 중 toxin production과 관련있는 유전자들의 감소가 눈에 띄었는데, 이는 앞서 XR에서 증가하는 SMU.1361c가 antibiotics의 합성 등의 repressor로 작용²⁹⁾하므로, toxin의 생산과 관련된 유전자들의 발현이 억제된 것으로 생각한다. 또한 다양한 energy metabolism와 관련있는 유전자 발현이 XR에서 감소하는 경향을 보였는데 특히, pyruvate metabolism (SMU.1421, SMU.1422, SMU.1423)이나 TCA cycle (SMU.670, SMU.671)과 관련된 유전자들의 감소가 눈에 띄었다. 또한 Ribosomal protein synthesis와 관련있는 대부분의 유전자와 signal transduction (phosphotransferase system, PTS)의 몇몇 유전자의 발현이 감소하였다.

XR에서 1.5배 이상 감소하는 유전자들 중에서 RT-PCR 용으로 선별·제작한 총 10개 중 SMU.1421 (putative dihydroli-poamide acetyltransferase, E2; *pdhC*)도 XR에서 증가하는 경우와 마찬가지로 DNA chip 결과 값과 유사한 결과를 얻지 못하였다. 아마도 제작한 RT-PCR용 primer와 DNA chip 상의 sequence의 homologous가 낮거나 두 set 간의 발현 차이가 커서 (*P*-value=0.302) XR에서 감소하는 유전자가 아닐 수도 있을 것으로 판단된다.

본 연구는 두 set에 대한 실험으로 인한 *P*-value를 충족하는 유전자의 개수가 50개로 set간의 차이가 있음에도 불구하고 DNA chip 결과는 신뢰할 만하다고 판단되나, XR의 형성과 실험에 이용하기 위해 배양한 조건 모두 planktonic 상태이므로 실제 구강 내 biofilm의 환경과 완전히 유사한 결과를 보이지 않을 수도 있다. *S. mutans*의 gene ontology의 정보가 아직 밝혀진 바가 없어 정확한 기능의 유추가 어려운 유전자들 또한 많았으며, 고찰에서 살펴본 유전자 발현에 대한 가설을 입증할 수 있는 실제적인 연구 결과를 명확하게 제시하지 못한 점도 제한점이라 하겠다. 마지막으로 독력인자와 관련된 XR과 XS의 유전자 발현의 차이점을 정량적으로 보여주지 못한 점 또한 제한점이라고 할 수 있겠다.

그럼에도 불구하고 본 연구는 실험실 균주를 이용하여 0.5% 포도당과 1% xylitol이 포함된 배지에서 배양한 XR과 XS의 전체 유전자 발현을 DNA chip을 이용하여 비교·분석한 연구로서 중요한 의미를 가지며, 이는 추후 XR에서 증가 혹은 감소하는 유전

자의 기능적인 분석을 통해 XR의 유전자 발현이 어떤 방식으로 조절되는지 가늠할 수 있을 것으로 판단된다.

결론

본 연구는 1% 자일리톨의 장기적 처리로 형성된 XR과 XS를 0.5% 포도당이 포함된 배지에서 배양하고 DNA chip을 이용하여 각각의 유전자 발현을 비교한 연구로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. XR과 XS에서 분리한 RNA를 이용하여 *S. mutans* UA159 Oligonucleotide 3 X 15K chip에 hybridization을 실시한 결과 총 1,928개의 유전자중 1,793개의 유전자가 의미있는 결과 값을 나타냈으며 이들 중 277개는 1.5배 이상 증가 혹은 감소한 유전자였다.

2. 0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양한 XR에서 증가하는 유전자는 총 174개였으며 이들 중 10개를 RT-PCR을 통하여 DNA chip 결과 값과 비교 검증하였다. XR에서 증가하는 유전자들을 기능별로 구분하면 cell envelope, cellular processes (cell division), DNA metabolism (replication, repair and recombination), energy metabolism, transcription, protein folding and stabilization 등이 주를 이루었다.

3. 0.5% 포도당과 1% 자일리톨이 포함된 배지에서 배양한 XR에서 감소하는 유전자는 총 103개였으며 이들 중 9개를 RT-PCR을 통하여 DNA chip 결과 값과 비교 검증하였다. XR에서 감소하는 유전자들을 기능별로 구분하면 amino acid biosynthesis (aromatic amino acid family), toxin production and resistance, energy metabolism (pyruvate metabolism and TCA cycle), ribosomal protein synthesis, signal transduction 등과 관련된 유전자들이 주를 이루었다.

이상의 실험 결과는 자일리톨의 장기간 처리를 통해 형성된 XR과 XS의 유전자 발현 차이는 분명히 존재하며, 특히 0.5% 포도당이 포함된 배지에서 배양된 XR의 경우 기존의 자일리톨 관련 연구 및 기능적인 분석 결과와 유사한 부분이 많으므로, 본 연구를 뒷받침 할 수 있도록 반복적인 유사실험과 추가적인 실험방법 개발 등의 추가연구가 필요하겠다.

참고문헌

1. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44: 331-384.
2. Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med 1993; 4:159-176.
3. Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. Carbohydr

- Res 2006;341:2090-2097.
4. Janda WM, Kuramitsu HK. Production of extracellular and cell-associated glucosyltransferase activity by *Streptococcus mutans* during growth on various carbon sources. Infect Immun 1978;19:116-122.
 5. Trahan L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. Int Dent J 1995;45 Suppl 1:S77-92.
 6. Holgerson PL, Sjöström I, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. Int J Paediatr Dent 2007;17:79-85.
 7. Han SK, Choi YH, Son EY, Song KB, Kim YJ, Nam SH. Prevention of dental caries by xylitol gum in pre-school children during 12-months. J Korean Acad Pediatr Dent 2004;31:159-168.
 8. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, Vadeboncoeur C. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res 1985;19:53-63.
 9. Lee YE, Choi YH, Jeong SH, Kim HS, Lee SH, Song KB. Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. Curr Microbiol 2009;58:332-337.
 10. Trahan L, Mouton C. Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. J Dent Res 1987;66:982-988.
 11. Trahan L, Söderling E, Dréan MF, Chevrier MC, Isokangas P. Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. J Dent Res 1992;71:1785-1791.
 12. Kim CC, Lee MN, Kim YJ, Lee SH. Quantitative comparison of mRNA expression of glucosyltransferase (GTF) between xylitol-resistant (XR) and xylitol-sensitive (XS) mutans streptococci. J Korean Acad Pediatr Dent 2006;33:77-84.
 13. Lee HM, Kim JW, Jang KT, Lee SH, Hahn SH, Kim CC. A study on the cell property of xylitol-resistant *Streptococcus mutans* and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans*. J Korean Acad Pediatr Dent 2003;30:554-562.
 14. Assev S, Stig S, Scheie AA. Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol 2002;17:95-99.
 15. Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. Emerg Infect Dis 2000;6:513-525.
 16. Chen PM, Chen YY, Yu SL, Sher S, Lai CH, Chia JS. Role of GlnR in acid-mediated repression of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate metabolism in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 2010;76:2478-2486.
 17. Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, et al. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. Appl Environ Microbiol 2006;72:6277-6287.
 18. Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. Microbiology 2007;153:1307-1317.
 19. Biswas I, Drake L, Biswas S. Regulation of *gbpC* expression in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2007;189:6521-6531.
 20. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. FEMS Microbiol Lett 2007;268:158-165.
 21. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Xylitol-induced elevated expression of the *gbpC* gene in a population of *Streptococcus mutans* cells. Eur J Oral Sci 2000;108:538-545.
 22. Im SU, An SY, Choi YH, Song KB. Comparison of mRNA expression of *gtf* genes and adhesives ability of xylitol-sensitive and -resistant *Streptococcus mutans* by xylitol-treated concentrations. J Korean Acad Oral Health 2012;36:91-96.
 23. Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Funao J, Ooshima T. Effects of recombinase A deficiency on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol 2009;24:104-108.
 24. Banas JA, Biswas S, Zhu M. Effects of DNA methylation on expression of virulence genes in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 2011;77:7236-7242.
 25. Shiroza T, Ueda S, Kuramitsu HK. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 1987;169:4263-4270.
 26. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. Arch Oral Biol 1988;43:103-110.
 27. Lee SH, Choi BK, Kim YJ. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. Arch Oral Biol 2012;57:697-703.
 28. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H, Kuramitsu HK. Isolation,

- characterization and sequence analysis of the scrK gene encoding fructokinase of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 1993;139:921-927.
29. Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, et al. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol Mol Biol Rev 2005;69: 326-356.
 30. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. Mol Microbiol 1997;25:329-341.