

Dental Plaque Streptococci가 생산하는 세포외다당류에 관한 연구

Ⅲ. 다당류의 세포화학적 관찰

서울대학교 치과대학 구강생화학교실

정 태 영

.....> Abstract <.....

STUDIES ON THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES PRODUCED BY ISOLATED DENTAL PLAQUE STREPTOCOCCI

Ⅲ. MORPHOLOGICAL OBSERVATION OF POLYSACCHARIDES

Tai-Young Chung

Dept. of Oral Biochemistry, College of Dentistry, S.N.U.

For this investigation, author isolated *Streptococcus mitis* strain SD-9 from the bacterial flora in the human dental plaque, which was incubated in brain-heart infusion media containing 5% sucrose at 37°C for 24 hours. For the cytochemical demonstration of polysaccharide produced by this strain, a modified thiosemicarbazide osmium method (Critchley et al., 1967) was used.

After fixation with this reagent, the harvested cells was suspended in 1% agar for the higher concentration of cells(Kellenberger et al., 1964). And they were dehydrated in the various concentration of ethanol, and embedded in Epon 812(Luft, 1961). Sectioning was done with the Sorvall MT-2 Porter Blum ultramicrotome by means of a glass knife, and the sections were stained with saturated uranyl acetate and lead citrate (Raynolds, 1963). All preparations were examined in a electron microscope, Hitachi HU-11 E-1 type.

The morphological features of extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus mitis* strain SD-9 were appeared in 3 structurally different forms, those are, electron dense fibrillar material linearly arranged adjacent to the outer surface of cell wall, highly electron dense globular material adjacent to the outer surface of cell wall, and structureless fluffy meshwork of possible very fine filament.

서 론

세포외다당류는 dental plaque내에 존재하는 세균에 의해 생산되므로 구강미생물에 의한 세포외다당류합성은 dental plaque 형성 뿐 아니라 치아우식 발생에 중요한 요인이 될수 있다는 보고는 많이 있다. (Niven, Smiley와 Sherman, 1941; Dain, Neal과 Seely, 1956; Carlsson, 1965; Krasse, 1966; Gibbons et al., 1966; von Houte, 1957; Wood와 Critchley, 1966; Gibbons와 Banghart, 1967; de Stoppelaar et al., 1967).

또한 구강내에 상주하는 streptococci에 의해 액체배지에서 합성된 다당류의 불용성 분획을 화학적분석방법과 전자현미경을 이용하여 분석하였다는 보고도 있다 (Guggenheim과 Schroeder, 1967). 그리고 dental plaque 형성과 탄수화물 특히 sucrose와의 관계를 화학적 또한 전자현미경을 이용하여 세포화학적으로 분석한 보고도 있다 (Critchley et al., 1967).

본 실험은 dental plaque에서 분리한 *Streptococcus mitis* strain SD-9 (Chung, 1971)를 대상으로 세포화학적으로 세포외 다당류를 검출기 위하여 주로 thiosemicarbazide-osmium법(Hanker et al., 1964; Critchley et al., 1967)을 이용하여 전자현미경적으로 관찰하여 지질을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1) 균주

균주는 저자가 dental plaque에서 분리한 *Streptococcus mitis* 유사균 strain SD-9를 사용하였다.

2) 배양조건

5.0% sucrose가 함유된 brain-heart infusion을 배지로 사용하여 37°C에서 24시간 배양 하였다. 그후 배양액을 3000 r. p. m으로 원심하여 세균을 수확 하였다.

3) 전자현미경 시료의 준비

polysaccharide를 세포화학적으로 검출하기 위하여 대부분 thiosemicarbazide-osmium법 (Hanker et al., 1964; Critchley et al., 1967)을 사용하였다. 즉 원심 침전시켜서 수집한 세균을 1% periodic acid를 이용하여 직접산화시킨후 3% glutaldehyde로서 2시간동안 고정된 다음 0.067 M phosphate buffer에 침적하여 하루밤을 방치하였다.

이를 다시 2.5% thiosemicarbazide (in acetate bu-

ffer pH 4.5, 50°C)로서 처리한 후 여분의 thiosemicarbazide를 제거하기 위해 증류수로서 수회 세척한다음 2% osmium tetroxide로서 3시간동안 고정하였다. 이를 Kellenberger와 Ryter(1964)의 방법에 의하여 1% 가운 환천을 첨가하고, 환천이 응고된 다음 1mm³로 세절하여 60% ethanol로 부터 무수 ethanol까지의 농도상승순으로 탈수시켰다. 이를 epon 812(Luft, 1961)로 포매하여 glass knife를 사용한 Sorvall MT-2 Porter Blum ultramicrotome으로서 500~600Å의 초박편을 만들었다. 절편은 포화 uranyl acetate와 lead citrate (Raynolds, 1963)로서 중염색하여 Hitachi 계 HU-11E-1형 전자현미경으로 75 KVF에서 관찰하였다.

실험결과

5% sucrose가 함유된 brain-heart infusion에 배양한 *Streptococcus mitis* strain SD-9의 균체를 원심으로 집약하여 thiosemicarbazide-osmium법 (Hanker, et al., 1964; Critchley, 1967)으로 처리후 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1~4에서 보는 바와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 41,000배로 관찰한 결과는 세포내다당류(ip)가 electron dense하고, 세포외다당류(ep)는 세포막에 부착되어 있거나, 혹은 세포에서 떨어져 스펀트모양 무정형의 상을 나타내고 있다.

Fig. 2는 68,800 배율로 관찰한 결과로서, 세포분열시 나타나는 nuclear material(nm)과 mesosome(M)이 선명하게 보이며, 세포막에 부착되어있는 세포외다당류가 아주 강렬한 electron dense globular homogenous material로 관찰 되었고, 세포막 주위에는 중등도의 electron-dense한 스펀트모양의 상을 나타내고 있다.

Fig. 3은 68,800배율로 관찰한 결과로서, 세포내다당류는 균등하게 electron dense한 과립으로 나타나고 세포외다당류는 세포막 외벽에서 선상으로 배열된 섬유상구조를 나타내며, 그주위는 균등하게 electron dense granule 상을 나타내고 있다.

Fig. 4는 68,800 배율로 관찰한 결과로서, 세포외다당류가 세포사이에 균등하게 스펀트모양으로 나타나고 세포내다당류는 세포진체에 균등하게 퍼져있는 상을 나타낸다.

고 찰

세포외다당류는 일반적으로 dental plaque에 존재하는 미생물에 의해 합성할수 있다고 알려져 있다(Keyes, 1960; Fitzgerald와 Keyes, 1961; Gibbons et al., 1966;

Gibbons와 Banghart, 1967; Critchley et al., 1967).

본 실험에서는 저자가 dental plaque에서 분리한 streptococci 중에서 dextransucrase 활성이 비교적 높은 *Streptococcus mitis* Strain SD-9를 대상으로 (Chung, 1971), sucrose가 함유된 brain-heart infusion에 37°C 24시간 배양하여 이 균주를 원심분리하여 균체를 thiosemicarbazide-osmium법(Hanker, 1964; Critchley et al.)으로 처리하여 세포외다당류의 구조를 전자현미경으로 관찰하였다.

본 실험에서 관찰한 결과를 요약하면 *Streptococcus mitis* strain SD-9가 생산하는 세포외다당류는 세포막에 부착되어 선상으로 배열된 섬유상 구조를 나타내거나, 세포막외벽에 밀접히 부착되어 균등히 electron dense globular형을 나타내거나, 또한 세포막에서 떨어져 스펀털모양을 나타내는 것을 볼 수 있다. 그리고 세포내다당류가 세포막 근처에 편재되어 세포외다당류와 연결되는 상을 관찰할 수도 있고 세포내에 균등하게 분포되어 있는 상을 관찰할 수도 있었다.

이러한 관찰은 sucrose를 첨가한 액체 배지에서 배양한 *Streptococcus mutants* 에서 생산하는 세포외다당류가 전자현미경으로 관찰한 결과 3형으로 나타날 수 있다는 Guggenheim과 Schroeder(1967)의 보고와 일치하는 것이 많다. 즉 이 관찰에서 첫째 electron dense globular형으로 세포외주위에서 직접 관찰되거나, 둘째 선상으로 배열된 망상의 섬유상을 나타내는 것으로 이들 fibril은 균등하게 electron-dense상을 나타내고 globular상의 외면을 둘러싸고 있는 상을 관찰하였고 셋째 무정형의 강한 electron-dense상을 나타내고 세포막외벽에 부착되어 있는 것이 많다고 보고 하고 있다.

또한 Critchley 등 (1967)은 정상 dental plaque와 starved plaque가 sucrose를 이용하여 세포내외의 다당류합성을 행하는 것을 전자현미경으로 관찰하였는데 starved plaque가 정상 dental plaque보다 sucrose를 많이 이용하고 세균은 급격히 세포내다당류의 저장과립을 공급하고 세포외에 소량만의 다당류를 형성한다 하였다. 즉, starved plaque는 sucrose와 서서히 작용하나 세포내나 세포외다당류합성에 sugar의 이용을 계속 한다는 것이다.

본 실험에서 관찰한 streptococci가 생산하는 세포외다당류생산량이 다른 연구자들의 보고와 차이가 나는 것은 발육조건, 세포외다당류를 합성하는 세균에 의해 생산되는 dextransucrase효소활성에 영향을 줄수있는 인자들과 또한 전자현미경표본제작과정에서 다당류의 손실 등에 의해 일어날수있다고 본다.

결론

저자가 dental plaque에서 분리한 *Streptococcus mitis* strain SD-9를 대상으로 5% sucrose가 함유된 brain-heart infusion 배지에서 37°C 24시간 배양후 배양된 세균이 생산하는 다당류의 구조를 구명키 위하여 대부분 thiosemicarbazide-osmium법으로 처리하여 전자현미경적 관찰을 하였다.

관찰한 결과는 세포외다당류에 있어서 세포막에 부착되어 있는 선상으로 배열된 섬유상구조와 세포막외벽에 부착되어 밀접된 과립상구조를 관찰할 수 있고 세포막에서 떨어져 스펀털모양의 무정형구조를 관찰할 수 있다.

REFERENCES

- Carlsson, J.: Zooglea-forming streptococci, resembling streptococcus sanguis, isolated from dental plaque in man. *Odont. Revy.* 16:348, 1965.
- Chung, T. Y.: Studies on the extracellular polysaccharides produced by isolated dental plaque streptococci. II. Chemical nature of purified extracellular polysaccharide. *J. of Korean dent. Assoc.* 9: 812, 1971.
- Critchley, P., Wood, J. M., Saxton, C. A. and Leach, S. A.: The polymerisation of dietary sugars by dental plaque. *Caries Res.* 1:112, 1967.
- Dain, J. A., Neal, K. L. and Seely, W. H.: The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by streptococcus bovis. *J. Bact.* 72:204, 1956.
- de Stoppeelaar, J. D., von Houte, J. and de Moor, C. E.: The presence of dextran forming bacteria, resembling streptococcus bovis and streptococcus sanguis, in human dental plaque. *Archs oral Biol.* 12:1199, 1967.
- Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H.: Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. am. dent. Ass. dent. Cosmos.* 61:9, 1960.
- Gibbons, R. J., Berman, K. S., Knoetner, P. and Kapsimalis, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human orig-

- in. *Archs oral Biol.* 11:549, 1966.
- Gibbons, R. J., and Banghart, S.B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs oral Biol.* 12:11, 1967.
- Guggenheim, B. and Schroeder, H.E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. odont. Acta.* 11:131, 1967.
- Hanker, J.S., Seaman, A.R., Weiss, I.P., Ueno, H., Bugman, R.A. and Seligman, A.N.: Osmophilic reagents. New cytochemical principle for light and electron microscopy. *Science* 146:1039, 1964.
- Kellenberger, E. and Ryter, A.: *Bacteriology; in Modern developments in electron microbiology.* B.M. Siegel, ed. Academic Press, New York, p.335, 1964.
- Keyes, P.H.: Recent advances in dental caries research. Bacterial findings and biological implications. *Internat. dent. J.* 12:443, 1960.
- Krasse, B.: Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Archs oral. Biol.* 11 : 429, 1966.
- Luft, J.M.: Improvements in epoxyresin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9:409, 1961.
- Niven, C.F., Smiley, K.L. and Sherman, J.M.: The polysaccharide synthesized by streptococcus salivarius and streptococcus bovis. *J. biol. Chem.* 140:105, 1941.
- Raynolds, E.S.: The use of lead acetate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. cell Biol.* 17:208, 1963.
- von Houte, J.: Iodophilic polysaccharide in bacteria from the dental plaque. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands. 1967.
- Wood, J.M. and Critchley, P.: The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. *Archs oral Biol.* 11:1039, 1966.
-

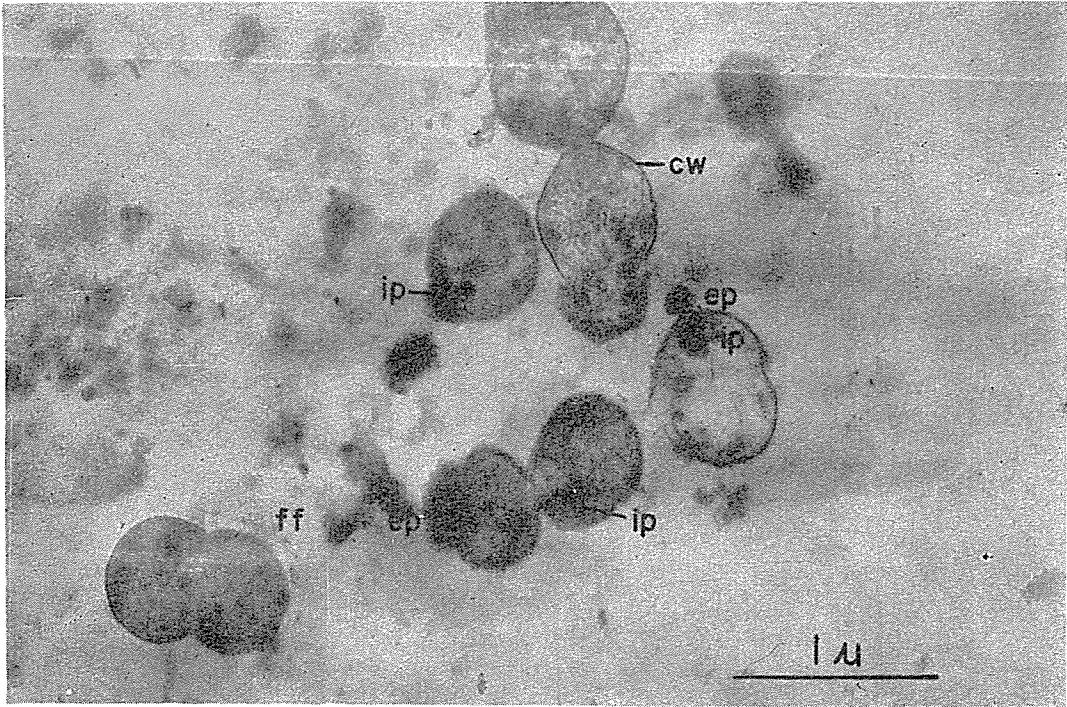


Fig 1. Sucrose - grown cells. (x41, 000)
ip : intracellular polysaccharides ep : extracellular polysaccharides
cw : cell wall ff : a fluffy meshwork of possible fine filament

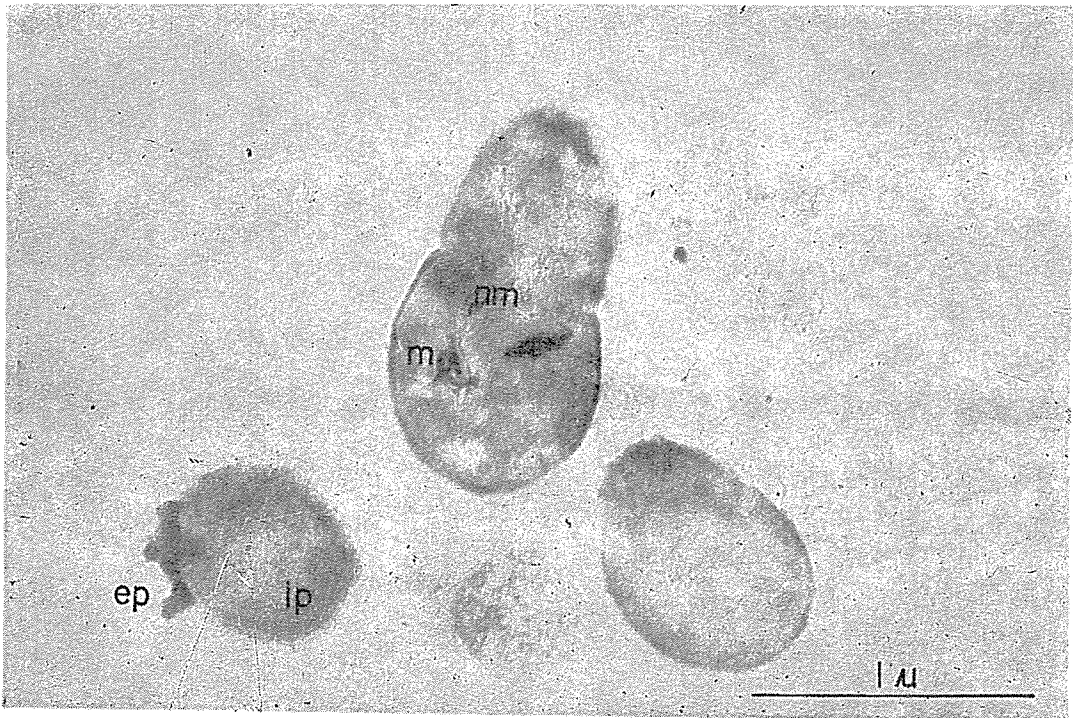


Fig 2. Sucrose - grown cells. (x 68, 800)
m : mesosomes nm : nuclear materials

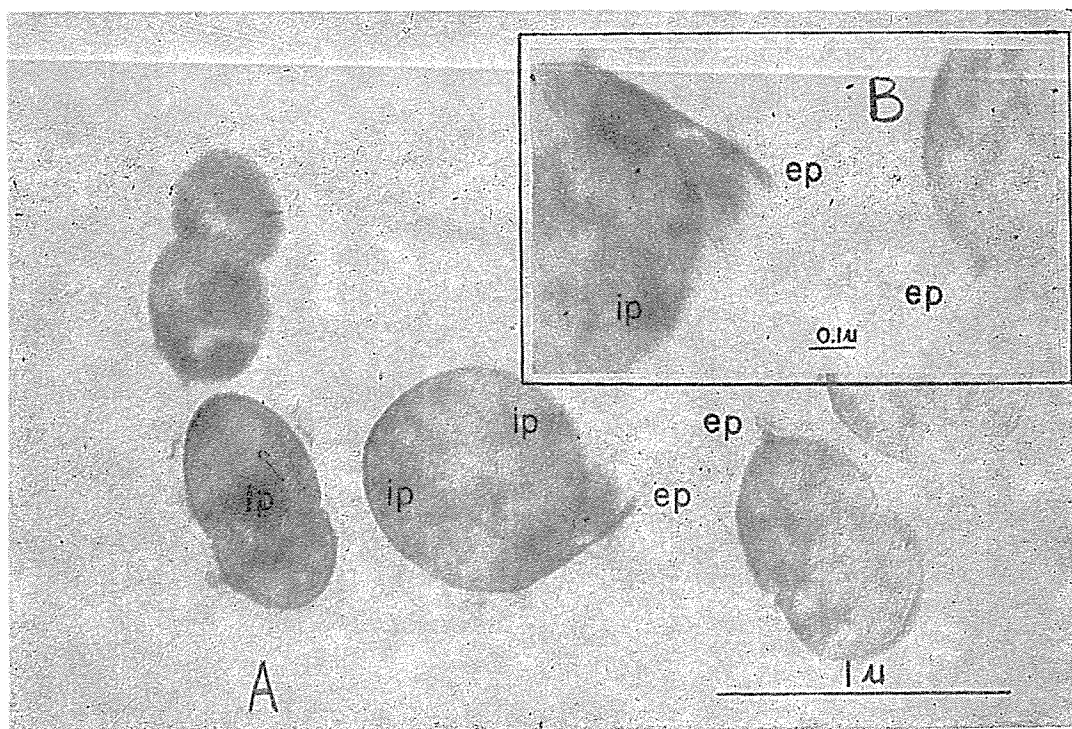


Fig 3. Sucrose - grown cells. (A. x 68, 800, B. x 103, 00)

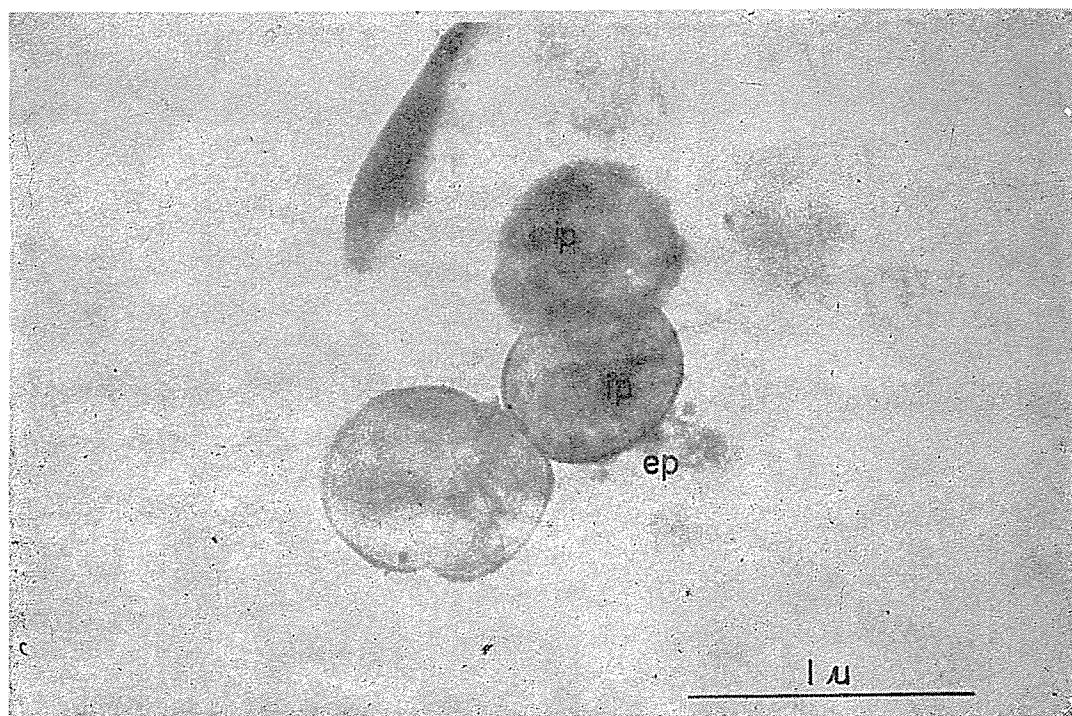


Fig 4. Suerose - grown cells. (x 68, 800)