

## gtf 유전자 발현에 대한 xylitol의 영향

염정현 · 정진\* · 정태성 · 김신

부산대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강미생물학교실\*

### 국문초록

천연의 당알콜계 감미료인 자일리톨을 사용하여 자당으로부터 글루칸을 합성하는 효소인 glucosyltransferase(GTF)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 Fluorescent in situ hybridization(FISH)과 유식세포측정기를 이용하여 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. FISH 분석결과 1% 자당이 함유된 BHI 배지에 1%, 5%, 10% 자일리톨을 첨가하였을 때 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제되었고, *gtfB* 보다는 *gtfC* 및 *gtfD*의 발현이 더 크게 억제되었다.
2. 유식세포측정기로 분석한 결과 자당의 농도가 0.1%, 0.5%, 1%로 증가함에 따라 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 증가하였다.
3. 유식세포측정기로 분석한 결과 자당이 1% 함유되었을 때 1%, 5%, 10% 자일리톨을 첨가한 경우 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 유사하게 억제되었으며, 10% 자일리톨을 첨가한 경우 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 가장 크게 억제되었다.

이상의 결과를 종합하면 자일리톨은 자당첨가에 의한 *Streptococcus mutans*의 *gtf* mRNA 발현을 억제하여 항우식효과에 기여하는 것으로 생각된다.

**주요어** : 자일리톨, *Streptococcus mutans*, *gtf* 유전자, mRNA, FISH, 유식세포측정

### I. 서론

치아 우식증과 치주 질환의 독립인자인 글루칸은 수용성과 비수용성 글루칸으로 나누어지며 구강 내 연쇄상구균이 생산하는 glucosyltransferase(GTF)에 의해 자당으로부터 생산된다<sup>1,2)</sup>. 치아 우식증의 원인균으로 알려진 *S. mutans*는 GTFB, GTFC, 및 GTFD를 생산하는데 이들은 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자의 발현에 의해 만들어진다. *gtfB* 와 *gtfC*는 비수용성 글루칸을 합성하는 GTFB와 GTFC를 지정하는 유전자이고 *gtfD*는 수용성 글루칸을 합성하는 GTFD를 지정하는 유전자이다<sup>3-7)</sup>. 수용성 글루칸은 치면세균막으로 확산되어 들어감으로써 치면

세균막을 구성하는 세균들의 에너지원으로 작용하며, 비수용성 글루칸은 물에 녹지 않는 성질 때문에 치면세균막을 이루는 골조역할을 한다. 따라서, 수용성 및 비수용성 글루칸은 치면세균막 형성에 중요한 인자라고 할 수 있다<sup>8-12)</sup>.

자일리톨(xylitol)은 천연 당알콜계 감미료로서 설탕 대체물로 널리 이용되고 있다. 자일리톨은 시험관에서 에너지원으로 포도당, 젓당, 소비톨, 만니톨이 존재할 때 *Streptococcus mutans* (이하 *S. mutans*)의 증식을 억제하며<sup>13-15)</sup>, 혼합배양에서 *S. mutans*에 대한 증식을 선택적으로 억제한다고 알려져 있다<sup>16,17)</sup>. 작용기전으로는 자일리톨이 *S. mutans*의 항상 존재하는 phosphoenolpyruvate (PEP):fructose phosphotransferase system (fru-PTS)에 의해 세포 내로 운반되어 대사가 되지 않는 xylitol 5-phosphate (X5P) 형태로 축적되며 이 X5P가 당 대사와 관련한 효소의 활성을 저해함으로써 세균 증식과 산 생산을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>18)</sup>. 또, 세포 내 축적된 X5P가 탈인산화되면서 자일리톨이 만들어지고 이 자일리톨은 세포 밖으로 배출되는데, 이렇게 세포 밖과 안으로의 운반이 계속되는 무모한 회로 (futile cycle)을 만들어 냄으로써 세

교신저자 : 김신

부산시 서구 아미동 1-10

부산대학교 치과대학 소아치과학교실

Tel : 051-240-7450

E-mail : shinkim@pusan.ac.kr

균의 능동당질운반체인 PEP:sugar-PTS이 소모되어 *S. mutans*의 증식이 억제 될 수 있다고 알려져 있다<sup>18)</sup>. 또, 자일리톨 섭취에 의해 타액이나 치면세균막의 *S. mutans*의 숫자가 감소 될 뿐 아니라 치면세균막의 형성이 감소한다고 보고되었다<sup>19,20)</sup>. 그러나, *S. mutans*의 GTF에 관련해서는 아직 보고된 바 없다. 따라서, 본 실험에서는 치면세균막 형성에 중요한 GTF의 mRNA 발현에 대한 자일리톨의 영향을 Fluorescent in situ hybridization (FISH)과 유식세포측정기 (flow cytometry)를 이용하여 관찰하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세균 배양

*S. mutans* Ingbritt (serotype c)를 brain heart infusion (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) broth에 접종하여 37°C 탄산가스 배양기에서 하룻밤 배양한 후 증식한 *S. mutans* Ingbritt를 동일 배지에 2회 연속 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

### 2. 생균수의 측정

1% 자당이 첨가 또는 첨가되지 않은 BHI 액체 배지에 자일리톨을 0%, 1%, 5%, 10% 되도록 첨가한 후 *S. mutans* Ingbritt를 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양액을 생리 식염수로 희석하여 BHI 한천 배지에 도말한 후 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후 증식한 집락의 수를 산정하였다.

### 3. Oligonucleotide probe 제조

*gtf* 유전자의 mRNA에 대한 oligonucleotide probe는 Fujiwara 등<sup>21)</sup>의 보고에 따라 제조되었다. RT-B1117(5'-cataaggcgttaatttccttca-3'), RT-C1195(5'-cctgtgaagttagcttgctattg-3') 및 RT-D1164(5'-ataggctgtctatcgctgttgcta-3') probe는 *S. mutans* MT8148의 *gtfB* (GeneBank Acc. No. D88651), *gtfC* (D88652) 및 *gtfD* (D88653) 유전자의 catalytic domain의 5' 말단부위의 염기서열에 상보적으로 제조하였다. 바이오니아에 의뢰하여 제조된 probe의 5' 말단에 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 부착하였다. 제조된 형광 probe는 적정농도로 멸균수에 희석하여 사용하기까지 -70°C에 보관하였다.

### 4. 세균 전처리, Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) 및 분석

1% 자당과 1%, 5%, 10% 자일리톨을 첨가한 BHI 액체배지에 *S. mutans* Ingbritt를 접종하여 37°C 배양기에서 9시간 배양한 후 3배 volume의 차가운 4% paraformaldehyde 용액을 첨가하여 4°C에서 16시간 방치하여 고정시켰다. 인산완충용액 (PBS, phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 3000 rpm에서 10분간 세척한 후 얻은 침전물에 동량의 PBS와 에탄

올이 혼합된 용액 100 $\mu$ 를 첨가한 후 -20°C에서 1시간 이상 방치하였다. 슬라이드 글래스 위에 20 $\mu$ 씩 점액하여 37°C에서 2시간 지난 후 50%, 80%, 100% 에탄올에 3분간 담가 탈수시켰다. 슬라이드에 고정된 세균에  $\mu$ 당 10ng의 형광 probe가 함유된 hybridization 용액 (0.9 M sodium chloride, 0.01 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 5mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH7.2), 35% formamide)을 첨가하여 46°C에서 2시간 반응시킨 후 세척액 (180mM sodium chloride, 0.01% SDS, 5mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH7.2)으로 씻고 48°C로 가온한 세척액에 20분간 담구고 멸균수로 씻은 후 건조하여 3시간 내에 공초점레이저 현미경 confocal laser scanning microscopy (CLSM, Leica, Heidelberg, Germany)를 이용하여 형광강도를 분석하였다.

### 5. 유식세포 측정기를 이용한 분석

0.1, 0.5%, 1% 자당이 함유된 BHI 액체배지와 0.2% 및 1% 자당에 1%, 5%, 10% 되도록 자일리톨을 첨가한 BHI 액체배지에 *S. mutans* Ingbritt를 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. PBS로 3000 rpm에서 10분간 세척한 후 얻은 침전물에 50% 에탄올 100 $\mu$ 를 첨가한 후 -20°C에서 1시간 이상 방치하였다. PBS로 다시 세척하여 상청액을 제거한 후  $\mu$ 당 10 ng의 형광 probe가 함유된 hybridization 용액 (0.9M sodium chloride, 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH7.2), 35 % formamide)을 첨가하여 46°C에서 2시간 반응시킨 후 3000 rpm에서 5분간 원심하여 상청액을 버리고 침전물에 PBS 1ml을 넣어 현탁시킨 후 유식세포측정기 (FACSCalibur, Becton-Dickison, San Jose, USA)의 Cell Quest software를 이용하여 분석하였다.

## III. 연구 성적

### 1. 자일리톨의 *S. mutans* Ingbritt의 증식에 대한 영향

1% 자당이 함유된 BHI 액체배지에 자일리톨을 1%, 5%, 10% 첨가하였을 때의 생균수가  $3.32 \times 10^6$  c.f.u./ml,  $1.68 \times 10^6$  c.f.u./ml,  $9.2 \times 10^7$  c.f.u./ml로 첨가하지 않은 대조군의  $3.36 \times 10^8$  c.f.u./ml에 비해 10% 자일리톨 첨가에 의해 약간 감소하였다. BHI 액체배지에 자당을 첨가하지 않고 자일리톨만을 1%, 5%, 10% 첨가하여 *S. mutans* Ingbritt를 배양한 경우 생균수가  $1.46 \times 10^8$  c.f.u./ml,  $1.03 \times 10^8$  c.f.u./ml,  $9.54 \times 10^7$  c.f.u./ml로 대조군의  $5.64 \times 10^8$  c.f.u./ml에 비해 10% 자일리톨이 첨가된 경우 약간의 감소를 나타내었다.

### 2. FISH에 의한 *gtf* 유전자 발현의 관찰

BHI 액체배지에 자당을 첨가하지 않은 경우에 비해 1% 자당을 첨가한 경우 *gtfB* 유전자의 mRNA 발현이 현저하게 증가하였다. *gtfC* 와 *gtfD*의 경우 자당을 첨가하지 않는 경우 발현되지 않았고, 1% 자당을 첨가한 경우 발현이 증가하였다(Fig. 1).

BHI 액체배지에 자당을 첨가하지 않고 자일리톨만을 첨가한 경우 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자가 발현되지 않았다 (Fig. 1). 1% 자당이 첨가된 BHI 액체배지에 자일리톨을 1%, 5%, 10% 되게 첨가한 경우 1% 자일리톨을 첨가한 경우 *gtfB* 및 *gtfC* 의 mRNA에 대한 형광강도가 절반정도 감소한 반면 *gtfD* 에서는 자일리톨을 첨가하지 않았을 때와 비슷하였다. 자일리톨을 5%, 10% 첨가한 경우 형광강도가 농도 의존적으로 감소되었는데 *gtfB* 보다는 *gtfC* 및 *gtfD* mRNA에 대한 형광강도가 크게 억제되었다(Fig. 2). 각각의 형광강도의 변화는 Table 1에 요약하였다.

3. 유식세포 측정기를 이용한 *gtf* 유전자 발현의 관찰

BHI 액체배지에 0.1%, 0.5%, 1% 자당을 첨가했을 때 평균 형광강도가 각각 *gtfB*의 경우 9.96, 28.20, 29.84, *gtfC*의 경우 10.34, 22.51, 32.10, *gtfD*의 경우 10.03, 20.52, 30.24로 자당을 첨가하지 않은 대조군의 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD*의 10.09, 13.76, 9.12보다 5%와 10% 자당첨가에 의해 증가하였다(Fig. 3, 4 및 Table 2). 1% 자당이 첨가된 BHI 액체배지에 자일리톨을 1%, 5% 및 10%되게 첨가한 경우 평균형광강도가 *gtfB*의 경우 19.78, 13.46, 6.73, *gtfC*의 경우 15.73, 16.22, 7.69, *gtfD*의 경우 17.03, 12.44, 6.53으로 자일리톨

**Table 1.** FITC fluorescence observed by the confocal laser scanning microscope.

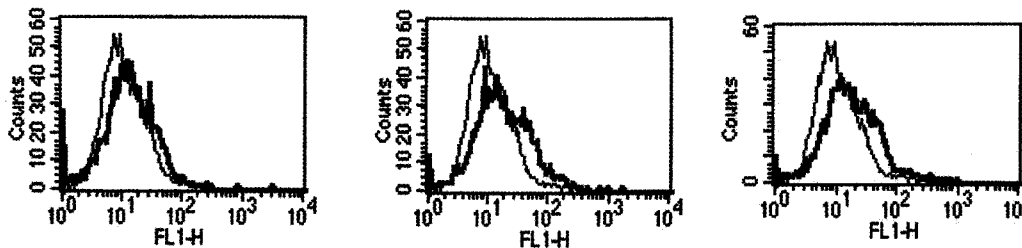
Media	<i>gtfB</i>	<i>gtfC</i>	<i>gtfD</i>
BHI	92.3	9.0	10.7
BHIS (1%)	696.7	511.5	355.3
BHIS (1%) + xylitol (1%)	362.0	257.2	451.7
BHIS (1%) + xylitol (5%)	272.3	68.9	137.4
BHIS (1%) + xylitol (10%)	152.3	38.6	55.4
BHIX (1%)	17.3	2.2	10.7
BHIX (5%)	6.1	2.5	7.4
BHIX (10%)	3.7	2.9	2.9

BHIS : BHI + sucrose, BHIX : BHI + xylitol

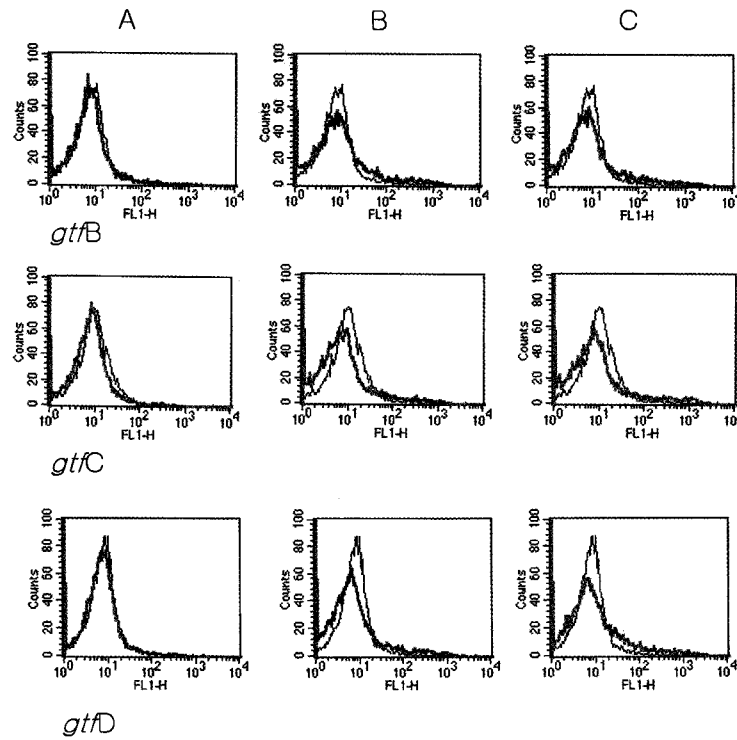
**Table 2.** The expression of *gtf* mRNA of *S. mutans* Ingbritt detected by flow cytometry. Mean fluorescence intensity of FITC-stained bacterial cells expressing the mRNA of *gtf* genes.

Media	Mean Fluorescence Intensity		
	<i>gtfB</i>	<i>gtfC</i>	<i>gtfD</i>
BHI	10.09	13.76	9.12
BHIS (0.1%)	9.96	10.34	10.03
BHIS (0.5%)	28.20	22.51	20.52
BHIS (1%)	29.84	32.10	30.24
BHIS (1%) + xylitol (0%)	34.62	37.25	33.41
BHIS (1%) + xylitol (1%)	19.78	15.73	17.03
BHIS (1%) + xylitol (5%)	13.46	16.22	12.44
BHIS (1%) + xylitol (10%)	6.73	7.69	6.53

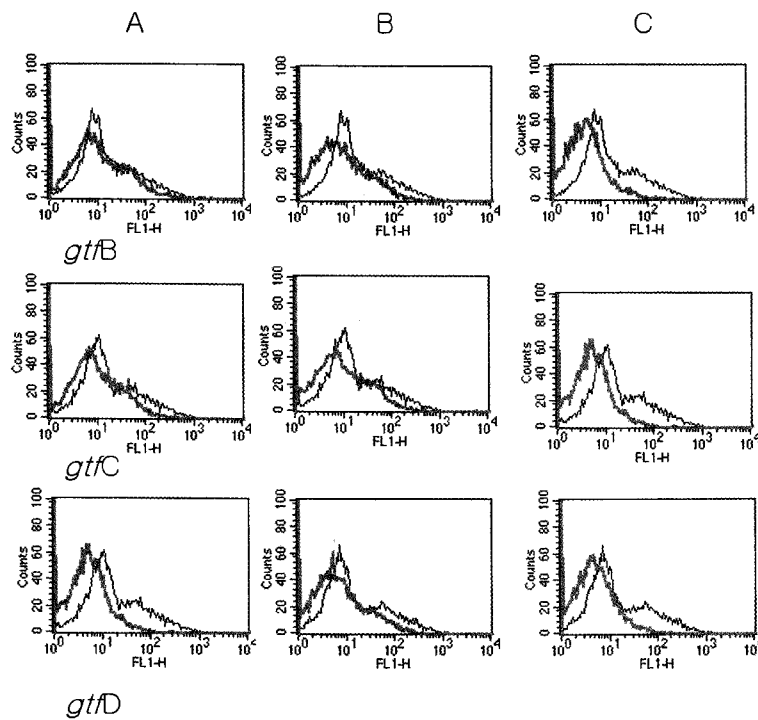
BHIS : BHI + sucrose, BHIX : BHI + xylitol



**Fig. 3.** The expression of *gtf* mRNA of *S. mutans* Ingbritt grown in BHIS broth for 24 hr was detected by the hybridization with each probe. Thin lines for the control and thick lines for the mRNA of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD*.



**Fig. 4.** Flow cytometric analysis of the mRNA expression of *gtf* gene of *S. mutans* Ingbritt grown for 24 h in BHI broth containing 0.1% (A), 0.5% (B), and 1% (C) sucrose. Thin line for the control grown in BHI broth without sucrose and thick line for the experimental group grown in BHI broth containing each concentration of sucrose. Upper, middle and lower panels indicate the mRNA expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* gene, respectively.



**Fig. 5.** Flow cytometric analysis of the mRNA expression of *gtf* gene of *S. mutans* Ingbritt grown for 24 h in BHI broth containing 1% sucrose plus 1% (A), 5% (B), and 10% (C) xylitol. Thin line for the control grown in BHI broth without xylitol and thick line for the experimental group grown in BHI broth with each concentration of xylitol. Upper, middle and lower panels indicate the mRNA expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* gene, respectively.

을 첨가하지 않고 1% 자당만 있는 대조군의 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 의 34.62, 37.25, 33.41 보다 감소하였으며, 자일리톨 농도가 증가함에 따라 *gtf*의 발현정도가 더 크게 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 5 및 Table 2).

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 자일리톨이 *S. mutans* Inbritt의 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자의 mRNA 발현을 억제한다는 것을 FISH와 유식세포추정기로 관찰하였다.

자일리톨은 1890년 독일의 화학자 Fischer 와 Stahel에 의해 너도밤나무에서 처음으로 분리된 5탄당 당알콜(polyol) 감미료로 설탕과 비슷한 당도를 지니며 입안에서 녹을 때 뛰어난 쿨링효과(cooling effect)가 있어 치약, 제과, 의약품 및 구강 위생제품 등 다양한 무설탕 제품에 널리 사용된다. 1972년부터 1974년에 시행된 Turku Sugar Study는 자일리톨의 치아 우식증 발생에 대한 감소 효과를 보고한 중요한 연구결과이다<sup>22,23</sup>. 이 연구에서 2년 동안 감미료를 설탕, 과당, 자일리톨로 각각 대체하여 제조한 음식을 공급한 결과 자일리톨로 대체한 경우 설탕과 과당군에 비해 치아 우식증의 발생이 감소하였는데 설탕군보다는 무려 85% 이상이나 우식 발생이 감소하였음을 보고하였다. 그 후 Hungary에 거주하는 6~11세 아동을 대상으로 3년간 실시한 연구에서 자일리톨군은 설탕제과를 섭취한 대조군에 비해 우식 발생률이 45% 감소하였고<sup>24</sup>, Polynesia에 거주하는 6~12세 아동을 대상으로 한 실험에서는 하루 20g의 자일리톨을 섭취한 군에서 설탕제품을 먹는 대조군에 비해 우식 발생률이 37% 감소하였다고 보고되었다<sup>25</sup>. 핀란드의 Ylivieska에서 시행된 연구결과 하루 3개 또는 2개의 자일리톨 껌을 씹은 경우 우식 발생이 각각 60%, 30% 감소함이 보고되었다<sup>26,27</sup>. 치면세균막과 관련해서는 자일리톨을 함유한 껌을 2개월 동안 씹었을 때 치면세균막의 평균 무게가 감소한 것과 치면세균막 지수가 감소함이 보고되었다<sup>19,28,29</sup>. 구강 내 미생물과 관련하여서는 1984년 Loesche 등<sup>30</sup>이 자일리톨 껌을 씹은 군에서 타액 내 *S. mutans* 숫자가 유효하게 감소됨을 보고한 반면, 다른 보고에서는 자일리톨을 장기간 섭취하였을 때 타액 내 *S. mutans* 숫자가 감소하지 않았고, 대신에 *S. mutans* 와 치면세균막의 부착력이 약해졌다고 하였다<sup>31</sup>. 자일리톨의 치면세균막의 *S. mutans* 에 관한 작용을 요약한다면 다음과 같다. (1) 세균에 의해 발효되지 않아 세균 증식에 기여할 수 없다. (2) 자일리톨에 노출되면 구강 환경에서 독성이 약한 자일리톨 내성 균주가 출현된다. (3) 아미노산과 암모니아의 농도를 증가시켜 치면세균막의 산을 중화시킨다. (4) 세균 내에서 X5P로 바뀌어 세포 내 공포 형성 및 세균막 파괴를 초래한다. (5) futile cycle을 만들어 자일리톨의 세포 내로의 유입과 유출을 반복한다. 즉, 세균 내로 유입되지만 이용할 수 없는 X5P의 생성으로 당대사가 억제되거나, futile cycle의 반복에 의한 에너지 고갈로 세균의 증식이 억제된다는 것이다.

본 실험에서는 1% 자당을 첨가하거나 첨가하지 않은 경우 모두에서 자일리톨 10%에 의해 *S. mutans* Inbritt의 증식이 약간 감소하였으나, 1%와 5%에서는 자일리톨을 첨가하지 않은 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았다. 이는, 본 연구에서 사용한 농도의 자일리톨에 의한 실험결과가 *S. mutans*의 증식 억제에 의한 것이 아님을 알 수 있다.

글루칸을 합성하는 효소인 GTFB, GTFC, 및 GTFD는 각각을 지정하는 유전자인 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD*의 발현에 의해 합성된다. GTFB와 GTFC는  $\alpha$ -1,3 결합이 풍부한 비수용성 글루칸을 합성하는 효소로, GTFB는 주로 세균표면과의 결합에 관여하고 GTFC는 hydroxyapatite 표면과의 결합에 관여한다고 보고되었다<sup>32</sup>. GTFD는  $\alpha$ -1,6 결합이 풍부한 수용성 글루칸을 합성하는 효소이다. 본 실험에서는 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자의 mRNA에 대한 FITC가 부착된 형광 probe를 제조하여 *gtf* 유전자의 mRNA 발현을 FISH를 이용하여 관찰한 결과, 자당이 없는 경우에 비해 1% 자당이 있을 때 세 유전자의 발현이 모두 증가하였고, 자일리톨을 첨가한 경우 발현이 감소되는 것을 관찰하였다. 특이한 점은, 10% 자일리톨을 첨가한 경우 mRNA 발현이 현저하게 저하되었음에도 불구하고 강한 형광을 나타내는 몇몇 세균이 세 유전자 모두에서 관찰되었는데 이는 자일리톨 노출에 의해 *gtf* 유전자를 발현하는 내성균주가 출현한 것으로 생각된다. 이 결과는 자일리톨 노출에 의해 내성균주가 출현한다는 이전의 보고와 관련된다 할 수 있다<sup>33-36</sup>.

유식세포추정기에 의한 분석결과 FISH에 의한 관찰과 마찬가지로 자당첨가에 의한 *gtf* 유전자의 mRNA 발현이 세 유전자 모두 자일리톨 첨가에 의해 감소되었는데 그 효과는 1%에서도 현저하게 나타났다. 이는 저농도의 자일리톨만으로도 *gtf* 유전자 발현이 효과적으로 감소됨을 나타내는 결과로 글루칸이 치면세균막의 주요 성분이고 치아우식증과 밀접한 관련이 있음을 생각할 때 저농도의 자일리톨이 우식발생을 낮춘다는 이전의 보고와 유사하다고 볼 수 있다<sup>37</sup>. 또, GTF는 세균의 구강 내 부착을 돕는 adhesin의 일종이므로 자일리톨에 의한 *gtf* mRNA의 발현억제는 자일리톨이 자당첨가에 의한 *S. mutans*의 응집을 억제한다는 보고<sup>38</sup> 및 자일리톨 첨가에 의해 *S. mutans* 와 치면세균막의 부착력이 저하된다는 보고<sup>34</sup>와 밀접하게 연관된다고 할 수 있다.

자일리톨은 PEP:Cfru-PTS에 의해 세포 내로 운반된 후 X5P 형태로 축적되어 당 대사와 관련한 효소의 활성을 저해한다고 알려져 있으나, GTF에 대한 영향은 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 자일리톨이 *gtf* 유전자의 발현을 억제하며 그 정도는 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자에서 비슷함을 관찰하였다. 또, *S. mutans*의 증식이 억제되지 않는 농도에서도 *gtf* 유전자 발현이 억제되며 그 정도는 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* 유전자 모두에서 유사하였다. 결론적으로 자일리톨은 *S. mutans*의 증식과는 독립적으로 *gtf* 유전자에 직접 작용하여 mRNA 발현을 억제시킨 것으로 사료된다.

V. 결 론

천연의 당알칼계 감미료인 자일리톨을 사용하여 자당으로부터 글루칸을 합성하는 효소인 glucosyltransferase (GTF)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 Fluorescent in situ hybridization (FISH)과 유식세포추정기를 이용하여 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. FISH 분석결과 1% 자당이 함유된 BHI 배지에 1%, 5%, 10% 자일리톨을 첨가하였을 때 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제되었고, *gtfB* 보다는 *gtfC* 및 *gtfD*의 발현이 더 크게 억제되었다.
2. 유식세포추정기로 분석한 결과 자당의 농도가 0.1%, 0.5%, 1%로 증가함에 따라 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 증가하였다.
3. 유식세포추정기로 분석한 결과 자당이 1% 함유되었을 때 1%, 5%, 10% 자일리톨을 첨가한 경우 *gtfB*, *gtfC* 및 *gtfD* mRNA 발현이 유사하게 억제되었으며, 10% 자일리톨을 첨가한 경우 가장 크게 억제되었다.

이상의 결과를 종합하면 자일리톨은 자당첨가에 의한 *S. mutans*의 *gtf* mRNA 발현을 억제하여 항우식효과에 기여하는 것으로 생각되었다.

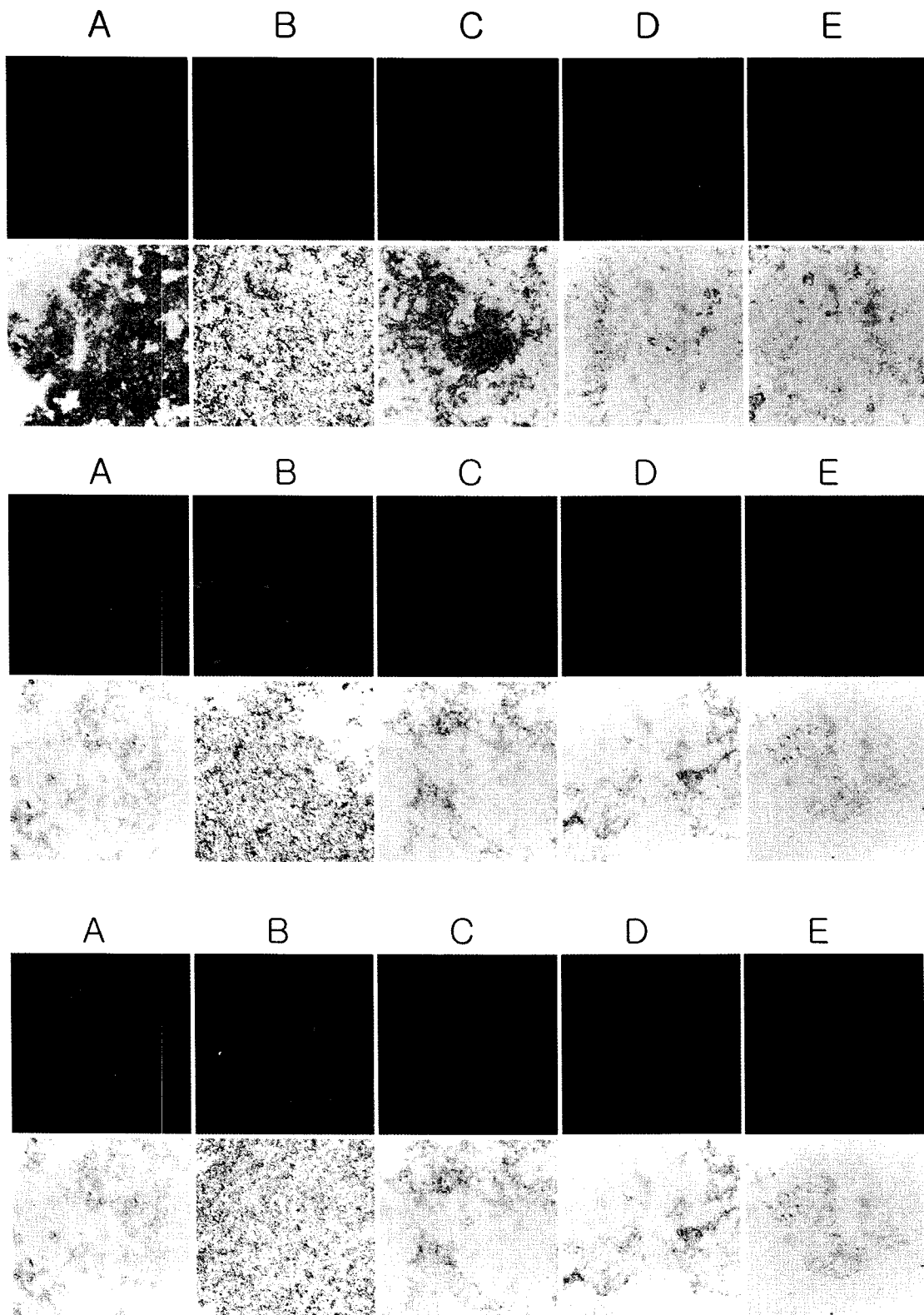
참고문헌

1. Gibbons RJ, Banghart SB : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs Oral Biol*, 12:11-24, 1967.
2. Tsumori H, Mukasa H, Zinnaka Y : Synthesis of glucan on the cell surface of *Streptococcus mutans* : chemical and scanning electron microscopic studies. *Microbiol Immunol*, 26(8):677-688, 1982.
3. Honda O, Kato C, Kuramitsu HK : Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans gtfD* gene encoding the glucosyltransferase S-enzyme. *J Gen Microbiol*, 136:2099-2105, 1990.
4. Shiroza T, Ueda S, Kuramitsu HK : Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 169:4263-4270, 1987.
5. Ueda S, Shiroza T, Kuramitsu HK : Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene*, 69:101-109, 1988.
6. Hanada N, Kuramitsu HK : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene coding for primer-dependent soluble glucan synthesis.

- Infect Immun*, 57:2079-2085, 1989.
7. Aoki HT, Shiroza M, Hayakawa, S, et al. : Cloning of a *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect Immun*, 53:587-594, 1986.
8. Wenham DG, Davies RM, Cole JA : Insoluble glucan synthesis by mutansucrase as a determinant of the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 127(Pt 2):407-415, 1981.
9. Shimamura A, Tsumori H, Mukasa H : Three kinds of extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* 6715 (serotype g). *FEBS Lett*, 157(1):79-84, 1983.
10. Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE : Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent Res*, 93:105-111, 1985.
11. Guggenheim B : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int Dent J*, 20:657-678, 1970.
12. Hamad S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44:331-384, 1980.
13. Loesche WJ : The effect of sugar alcohols on plaque and saliva level of *Streptococcus mutans*. *Swed Dent J*, 8(3):125-135, 1984.
14. Rolla G, Oppermann RV, Waaler SM, et al. : Effect of aqueous solutions of sorbitol-xylitol on plaque metabolism and on growth of *Streptococcus mutans*. *Scand J Dent Res*, 89(3):247-50, 1981.
15. Knuuttila ML, Makinen K : Effect of xylitol on the growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 9(3):177-89, 1975.
16. Bradshaw DJ, Marsh PD : Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries Res*, 28(4):251-6, 1994.
17. Rogers AH, Pilowsky KA, Zilm PS, et al. : Effects of pulsing with xylitol on mixed continuous cultures of oral streptococci. *Aust Dent J*, 36(3):231-5, 1991.
18. Trahan L : Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J*, 45(Suppl 1):77-92, 1995.
19. Makinen KK, Isotupa KP, Kivilompolo T, et al. : Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans streptococci. *Caries Res*, 35(2):129-35, 2001.
20. Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, et al. : The effect of chewing xylitol gum on the plaque and sali-

- va levels of *Streptococcus mutans*. J Am Dent Assoc, 108(4):587-9, 1984.
21. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, et al. : S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. J Dent Res, 81(2):109-113, 2002.
  22. Makinen KK, Scheinin A : Turku sugar studies. VI. The administration of the trial and the control of the dietary regimen. Acta Odontol Scand, 34(4):217-39, 1976.
  23. Scheinin A, Makinen KK, Ylitalo K : Turku sugar studies. V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. Acta Odontol Scand, 34(4):179-216, 1976.
  24. Scheinin A, Banoczy J. : Xylitol and caries: the collaborative WHO oral disease preventive programme in Hungary. Int Dent J, 35(1):50-57, 1985.
  25. Scheinin A. : Field studies on sugar substitutes. Int Dent J, 35(3):195-200, 1985.
  26. Isokangas P, Alanen P, Tiekso J, et al. : Xylitol chewing gum in caries prevention: a field study in children. J Am Dent Assoc, 117(2):315-20, 1988.
  27. Isokangas P, Tiekso J, Alanen P, et al. : Long-term effect of xylitol chewing gum on dental caries. Community Dent Oral Epidemiol, 17(4):200-3, 1989.
  28. Mouton C, Scheinin A, Makinen KK : Effect of a xylitol chewing gum on plaque quantity and quality. Acta Odontol Scand, 33(5):251-7, 1975.
  29. Larmas M, Scheinin A, Gehring F, et al. : Turku sugar studies XX. Microbiological findings and plaque index values in relation to 1-year use of xylitol chewing gum. Acta Odontol Scand, 34(6):381-96, 1976.
  30. Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, et al. : The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of *Streptococcus mutans*. J Am Dent Assoc, 108(4):587-92, 1984.
  31. Soderling E, Isokangas P, Tenovuo J, et al. : Long-term xylitol consumption and mutans streptococci in plaque and saliva. Caries Res, 25(2):153-7, 1991.
  32. Vacca-smith AM, Bowen WH : Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite and bacterial surfaces. Arch Oral Biol, 43(2):103-110, 1998.
  33. Trahan L, Mouton C : Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. J Dent Res, 66(5):982-8, 1987.
  34. Soderling E, Isokangas P, Tenovuo J, et al. : Long-term xylitol consumption and mutans streptococci in plaque and saliva. Caries Res, 25(2):153-7, 1991.
  35. Trahan L, Soderling E, Drean MF, et al. : 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, 71(11):1785-91, 1992.
  36. Assev S, Stig S, Scheie AA. : Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol, 17(2):95-9, 2002.
  37. Hietala EL, Larmas M : Effects of xylitol and carbohydrate diets on dental caries, dentine formation and mineralization in young rats. Arch Oral Biol, 40(12):1137-41, 1995.
  38. Verran J, Drucker DB : Effects of two potential sucrose-substitute sweetening agents on deposition of an oral streptococcus on glass in the presence of sucrose. Arch Oral Biol, 27(8):693-5, 1982.

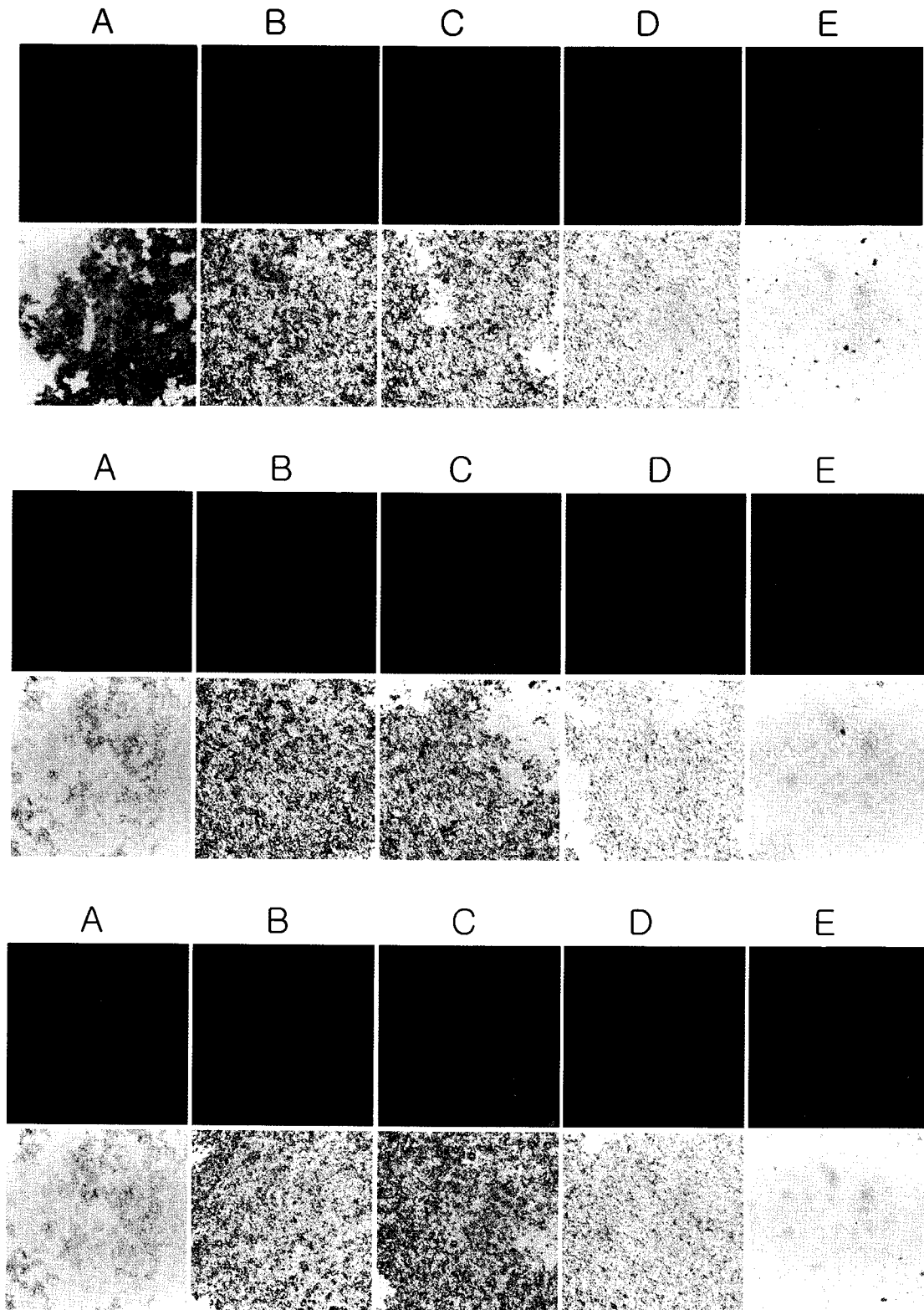
사진부도 ①



**Fig. 1.** Photomicrograph of FITC fluorescence observed by the confocal laser scanning microscope before and after replacing sucrose with xylitol. (A) BHI broth; (B) BHI broth containing 1% sucrose (BHIS); (C) BHI broth containing 1% xylitol; (D) BHI broth containing 5% xylitol (E) BHI broth containing 10% xylitol. Upper, middle and lower panels indicate the mRNA expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* gene, respectively.



사진부도 ②



**Fig. 2.** Photomicrograph of FITC fluorescence observed by the confocal laser scanning microscope before and after the addition of xylitol. (A) BHI broth; (B) BHI broth containing 1% sucrose (BHIS); (C) BHIS broth containing 1% xylitol; (D) BHIS broth containing 5% xylitol; (E) BHIS broth containing 10% xylitol. Upper, middle and lower panels indicate the mRNA expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* gene, respectively.

Abstract

THE EFFECT OF XYLITOL ON THE EXPRESSION OF GTF GENE

Chung-Hyun Yeom, Jin Chung\*, Tae-Sung Jeong, Shin Kim

*Department of Pediatric Dentistry and Oral Microbiology\*, College of Dentistry, Pusan National University*

Xylitol, a five-carbon natural sugar alcohol, is widely used non-cariogenic sugar substitute. In present study, the effects of xylitol on the expression of mRNA for glucosyltransferase which synthesizes glucan from sucrose were detected by Fluorescent in situ hybridization (FISH) and flow cytometry. FITC fluorescences for mRNA of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* were decreased further with increasing concentration of xylitol from 1% to 10% when detected by FISH. Flow cytometric analysis also showed that the expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* was increased by the addition of sucrose and decreased by the addition of xylitol to BHI broth containing 1% sucrose. In conclusion, the expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* mRNA was decreased by the addition of xylitol.

**Keywords** : Xylitol, *Streptococcus mutans*, *gtf* gene, mRNA, FISH, Flow cytometry