

Rapid Cell Death Phenotype of *Streptococcus mutans* under Prolonged Growth Conditions

Jeong Nam Kim^{1,2*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Integrated Biological Science, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received August 30, 2021 / Revised November 1, 2021 / Accepted November 1, 2021

The oral pathogen *Streptococcus mutans* is considered a major causative agent of dental caries in humans. The use of dental hygiene products, including toothpaste and mouthwash, is used for caries control. However, food intake can lead to the recurrence of oral microorganisms. This study aimed to explore why this bacterium dies so quickly during prolonged incubation and to assess whether this growth characteristic is closely associated with the secretion of metabolic products. Notably, the number of live *S. mutans* cells rapidly declined after 24 hr during the entire period tested, whereas the number of *Escherichia coli* cells, an indicator strain, remained steady over the same period. To test whether the *S. mutans* supernatants contained possible signals that accelerated the death of neighbor cells, we obtained the individual supernatants at the above time points. Following pH neutralization, the cells in which the supernatant was supplemented with glucose grew well. However, pH adjustment alone could not fully recover cell growth in conditions in which the supernatant was supplemented, with or without glucose. These phenotypes of *S. mutans* may be associated with signaling, not only resulting from nutrient depletion. The findings on the survival phenotype of *S. mutans* provide new insights into cell-cell communication in the biology of this bacterium.

Key words : Cell Death, dental Caries, oral pathogen, signaling, *Streptococcus mutans*

서 론

프로그램된 세포사(Programed Cell Death, PCD)는 미생물의 여러 발달 과정(팔세포형성에 의한 모세포의 용해, 점액세균[Myxobacteria]의 자실체 형성 시 영양 세포의 분해, 연쇄상구균 세포에서 DNA 형질전환 시의 자발적 분해, 등)에서 중요한 역할을 한다. 다양한 연구결과는 미생물이 생장과정에서 효율적인 영양분 획득과 에너지 생산을 위해 결함을 나타내는 세포의 프로그램된 세포사를 진화시켰음을 제안하고 있다[4, 21, 22, 28, 29, 32]. 아마도 PCD에 대한 가장 일반적인 관찰은 세균 세포가 항생제 및 기타 유해한 환경에 노출 시, 세포들이 자신의 분해를 유도하는 것이다. 이러한 자가분해는 자가분해인자(autolysins)라고 불리는 peptidoglycan hydrolases에 의해 세포벽을 분해하는 과정을 예로 들 수 있다[12, 27]. 펩티도글리칸의 합성과 가수 분해는 세포벽을 구축하는데 필수적이며, autolysins은 이러한 정상적인 세포 생장 활동에 한 부분으로써 작용한다. 일반적으로 자가분해는 세포 생장과정에서 환

경에 적응하지 못한 세포의 생장 억제로 인해 발생하는 작용으로 간주해 왔다. 다른 연구에서 이러한 자가분해와 관련성은 낮지만 PCD 프로세스와 유사한 세포사가 관찰되었다. 예로, *Staphylococcus aureus* 균주에서 오페론(*lrgAB*와 *cidAB*)이 세포사에 주요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[11, 25].

구강의 단단한 조직에 형성되는 구강감염균 *Streptococcus mutans*의 생물막은 치아의 탈염(demineralization)을 일으키는 산성화 과정을 유도한다. 이러한 산성화는 다시 알칼리화 단계로 넘어가며, pH는 거의 중성으로 되돌아가는 과정을 반복하게 되고 치태의 알칼리화와 식간 동안 치아 법랑질의 재석회화(reminerization)는 타액(saliva)에 의해 복구된다[9]. 그러나 치아우식은 탈염의 과정이 재석회화의 과정보다 가속화될 때 나타나거나 또는 증상이 더욱 악화될 수 있다. 치아의 건강한 표면에 있는 미생물 군집의 조성은 충치성 병변에서 발견되는 개체군과 많은 차이가 있다는 것이 알려졌다. 특히, cariogenic microflora는 *S. mutans*, lactobacilli 및 다른 내산성 박테리아[1, 14, 33]와 같은 종이 높게 나타나는 특징이 있으며, 그중에서도 *S. mutans*는 치아 충치 유발과 가장 밀접한 연관성을 보이는 것으로 알려져 있다. 또한, *S. mutans*와 공생하는 박테리아 종 사이의 양방향 상호 작용은 충치의 진행에도 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되었다[16, 20].

다양 종 박테리아에 의한 생물막 형성에 있어 핵심적인 과정은 개체에서 분비된 작은 분자를 효율적으로 감지하는 세포간 커뮤니케이션이다. 이 과정을 퀴럼센싱(quorum sensing)

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2269, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : kimjn@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이라 일컬으며, 단일종 및 다양종 생물막의 형성 및 유지에 필요한 다양한 기능을 제공한다[5, 6]. 또한, 퀴럼센싱은 박테리아의 발병기전에 필수적인 생리학적, 생화학적 및 세포 표면 특성도 조절한다. 특히, 펩타이드 매개 퀴럼센싱은 치아우식 병원체인 *S. mutans*에게 있어 중요한 신호 전달 시스템이다. 이러한 시스템의 하나로 *comC* 유래 펩타이드(CSP)는 분비 경로(ComAB)에 의해 세포 외부로 분비되고 ComDE 신호 전달 시스템(two-component signal transduction system; TCS)에 의해 다시 감지될 수 있다[17, 30]. 최근에 *comR*에 의해 암호화된 Rgg 전사 활성화자와 *comS*에 의해 암호화된 소수성 펩타이드로 구성된 ComRS 신호 전달 경로에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며[8, 19], 18개 아미노산으로 이루어진 ComS 펩타이드는 세포 외부로 분비되어 7개 아미노산인 XIP 펩타이드로 활성화되고 ComX (SigX)는 DNA 흡수 및 물질 대사를 위한 단백질을 암호화하는 후기 유전자의 활성화에 필요한 시그마 인자로서 역할 한다. 구강 생물막 내에서 *S. mutans*의 다양한 표현형(스트레스 저항성, 박테리옌 생산, competence, 세포 외 DNA [eDNA] 방출 및 세포 사멸)과 관련된 유전자 발현 및 병원성의 조절에 있어 CSP 및 XIP 펩타이드는 필수적인 요소로 작용한다[8, 15, 23, 24].

본 연구자는 실험실 환경에서 *S. mutans*를 이용한 다양한 유전자 발현 또는 생리학적 실험을 수행하던 중, 장시간 배양 시 상당한 개체 수 감소 현상을 관찰하였다. 이러한 현상은 세포의 성장곡선에서 관찰되는 세포 사멸기로 간주할 수 있으나, 그 생균수의 감소가 그람음성균과는 크게 다른 특징이 있음을 발견하였다. 특히, 본 연구에서 *S. mutans*의 급감하는 생균수가 세포 외부로 분비된 펩타이드 또는 대사물질을 매개로 한 신호전달체계에 의한 PCD와 관련이 있는지를 확인하고자 하였다. 또한, 새로운 영양배지와 성장억제가 관찰된 시간의 배양액을 다양한 비율로 혼합하여 세포 외부로 분비된 물질의 여부와 함께 그 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

Table 1. List of strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Genotype	Reference
<i>Streptococcus mutans</i>		
UA159	Wild Type	Laboratory Stock
PK084	Chromosomal integration of pPM _{veg} -sfgfp	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	Wild type	Laboratory Stock
PK082	pPM _{veg} -sfgfp	This work
Plasmids		
pPM _{veg} -sfgfp	<i>phnA'</i> P _{veg} -sfgfp Ωkm ^r <i>'mtlA</i> Km ^r Em ^r	[26]
pPMZ	<i>S. mutans</i> integration vector	[18]

본 연구에서는 그람양성 균주 *Streptococcus mutans* UA159와 그람음성 균주 *Escherichia coli* DH10B를 사용하였다(Table 1). 일반적으로 *S. mutans* 균주는 Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. *E. coli* 균주는 Luria Bertani (LB, Difco Laboratories, Detroit, MI) 배지를 사용하여 37°C에서 호기성 조건으로 배양하였다. 형광현미경 관찰을 위한 green fluorescent protein (GFP) 발현 균주는 *S. mutans* UA159 내로 pPM_{veg}-sfgfp (Addgene number: 121503) 플라스미드를 형질전환하여 계능 내 *phnA*-*mtlA* 영역에 GFP 유전자가 삽입하도록 하였고, *E. coli* DH10B에도 형질전환 하여 GFP 발현 균주를 제작하였다[26].

성장곡선과 생균수 측정

본 연구에서 균주의 성장 측정을 위해 37°C, 5% CO₂ 조건으로 18시간 배양한 *S. mutans*을 새로운 BHI 배지에 접종하여 흡광도(optical density at 600 nm; O.D.₆₀₀)가 0.3이 될 때까지 본 배양한 후, 새로운 BHI 배지에 1:100으로 희석하였다. 동일하게 *E. coli* 균주도 산소조건에서 OD₆₀₀의 값이 0.3이 될 때까지 배양한 후, LB 배지에 1:100으로 희석하였다. 두 균주 모두 37°C에서 배양하고 *S. mutans*의 경우 혐기적 조건을 유지하기 위해 멸균한 미네랄 오일로 배양액 상부에 층을 만들어 주었다. 성장곡선 측정을 위해 Bioscreen C plate reader (Bioscreen, Helsinki, Finland)를 이용하여 24시간 동안 1시간 간격으로 600 nm 파장에서 시간별 흡광도(O.D.₆₀₀)를 측정하였다.

또한, 장시간 배양에 의한 *S. mutans*와 *E. coli*의 생균수 비율을 측정하기 위해 상기 실험과 동일하게 본 배양액을 준비하고 새로운 배지(BHI 또는 LB)에 1:100으로 희석하였다. 각 정해진 시간 간격(0, 8, 16, 24, 26, 28, 30, 32, 40, 48, 56, 64 또는 72 hr)마다 배양액을 채취하여 직렬 희석(serial dilution)한 후, 50 µl를 BHI 한천 플레이트에 도말하고 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 배양하였다. 배지에 형성된 집락(colony)의 수를 세어 집락형성단위(colony forming units)를 계산하였다[34].

형광현미경을 이용한 세균세포 관찰

장시간 배양이 *S. mutans*의 세포사멸에 미치는 영향을 살펴 보기 위해 배양시간에 따른 형광유전자 발현 세포의 생장을 관찰하였다[26, 31]. 37°C, 5% CO₂ 조건 또는 호기성 조건하에 18시간 배양한 GFP를 발현 *S. mutans*와 *E. coli* 균주를 각각 새로운 BHI 또는 LB 액상 배지에서 초기 대수성장기까지 (O.D.₆₀₀=0.3~0.5) 배양하였다. 이 배양액을 다시 새로운 BHI 또는 LB 액상배지를 이용하여 1:100의 비율로 희석한 후, 5% CO₂ 조건 또는 호기성 조건으로 배양하였다. 설정한 시간 간격(0, 8, 16, 24, 48 또는 72 hr)마다 각 배양액에서 20 µl를 회수하여 슬라이드 글라스 위에 도말하고 상온에서 건조하여 고정 시켰다. 건조한 샘플은 Axio observer 3 모듈이 장착된 Carl Zeiss DE 형광역상현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 100× 배율로 확대하여 시각화되었다.

배양액의 세포사 활성성분 여부의 관찰

배양액을 이용한 성장곡선 측정을 위해 초기 대수성장기 (O.D.₆₀₀=0.3)로 배양한 *S. mutans*를 40 ml BHI 액상배지에 1:100으로 희석한 후, 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 4,000×g, 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수하고 0.2 µm 주사기 필터(GVS north America Sanford, ME, USA)를 이용하여 여과했다. 회수한 배양액은 새로운 BHI 액상배지를 이용하여 여러 농도(0, 30, 50, 70 또는 100%)로 희석되었다. 새로 배양 (OD₆₀₀=0.3)한 *S. mutans* 균주를 각 농도의 희석액에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 농도별 희석액 내 *S. mutans*의 시간별 흡광도(O.D.₆₀₀)는 Bioscreen C plate reader (Bioscreen, Helsinki, Finland)를 이용하여 24시간 동안 1시간 간격으로 측정하였다. 산성인 희석 배양액은 NaOH를 첨가하여 pH7.0으로 조정하였고, 탄소원 보충조건을 위해 20 mM의

포도당(glucose)를 첨가하였다.

통계분석

모든 실험은 동일한 과정으로 3번 이상 반복 실행되었다. 실험 결과의 통계분석은 SPSS (statistical package for social science) 프로그램을 이용하여 analysis of variance (ANOVA) 분석법을 적용하였으며, least significant difference (LSD)로 신뢰수준 95% ($p<0.05$)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

***Streptococcus mutans*의 급격한 세포사멸 시간 및 생균수 측정**

실험실 배양조건에서 치아우식증 원인균인 *S. mutans*의 성장곡선은 다른 세균들과 유사하게 지연기, 대수성장기, 정체기를 거쳐 사멸기에 이르게 된다[35]. 흥미롭게 본 연구자는 24시간 이상 성장한 배양액을 새로운 배지에 접종 시, 세포의 생존율이 현저히 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 *S. mutans*의 세포사멸이 어떠한 양상을 나타내는지 실험적으로 측정하기 위해 시간대별 성장과 생균수를 측정하였다(Fig. 1). 세포생장의 비교군으로 그람음성균인 *Escherichia coli*를 사용하여 특징적 차이를 다음과 같이 비교하였다. 결과를 보면 *S. mutans*의 경우 16시간 배양(생균수: 3.53±09 CFU/ml)과 비교 시 24시간 배양(1.37±09 CFU/ml) 후에 생균수는 2배 이하로 급감하는 구간이 나타났으며($p<0.05$)(Fig. 1A, bars), 상대적으로 동일 시간대에서 *E. coli*는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1B, bars). 그러나 흡광도(O.D.₆₀₀) 값을 기준으로 측정된 성장곡선에서 두 균주 사이의 이러한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 1A and Fig. 1B, dot lines). 즉, *S. mutans*는 *E. coli*와 유사하게

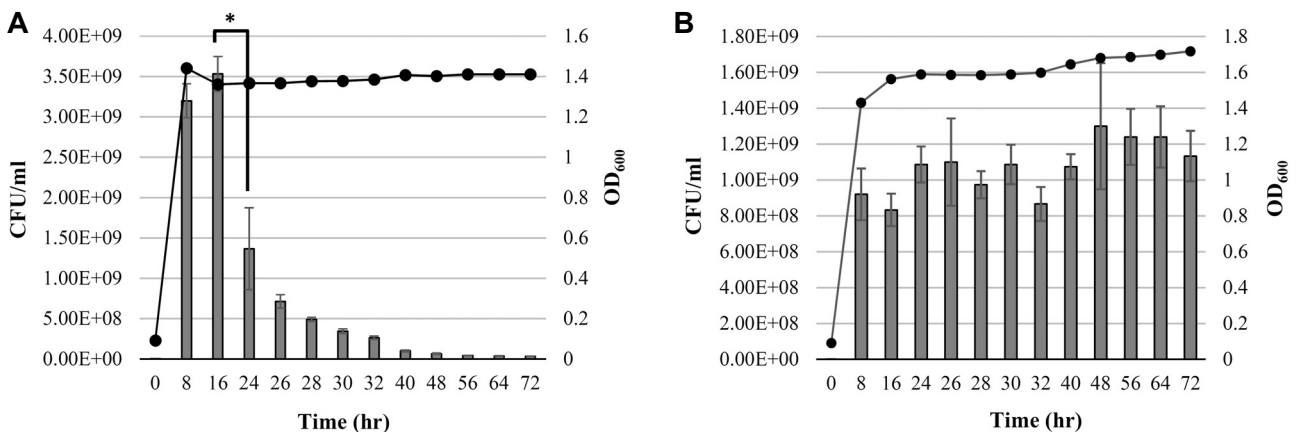


Fig. 1. Growth and survival measurements. *S. mutans* (A) and *E. coli* (B) wild-type strains were grown to early-exponential phase in BHI or LB media and diluted 1:100 ratio in fresh medium. The growth was monitored at 1-hr intervals for 72 hr under aerobic or anaerobic conditions, indicated by dot lines. The survival rate was determined by colony-forming units (CFUs) at each time point tested, indicated by bars. *, differs the number of live cells between 16-hr and 24-hr incubation at $p<0.05$. The results are expressed as mean values for three biological repeats, with error bars indicating the standard deviation.

배양 시작 후 8시간에서 16시간 사이에 최대 증식에 도달하지만 24시간 이후 상대적으로 빠르게 세포사멸이 일어난다. 이를 바탕으로 본 연구자는 두 가지 가설을 제시하였다. 첫 번째로, *S. mutans*는 상대적으로 빠른 대사작용을 통해 배양액 속의 탄소원과 기타 영양소를 지연기와 대수성장기 동안 소진한다. 두 번째로, 최대 성장 시점 이후 모세포를 자가분해하는 물질의 발현이 급격히 상승한다. 특히, 이러한 분해작용은 *Bacillus subtilis*가 영양분을 요구하는 포자형성과정(sporulation)을 위해 모세포를 급격히 자가분해하는 결과로 설명할 수 있다[13]. 이런 분해과정은 추가적인 활성자가 요구되는 것으로 보이며, 세포 내 저농도의 ATP가 촉발 원인이기보다 양성자 구동력의 감소로 자가분해과정이 활성화된다고 보고되었다.

생균수 감소현상을 형광단백질 발현을 이용하여 관찰

성장과정 중에 회수한 세균 세포를 고체 배지에 도달하여 CFU를 측정하는 위의 실험방법과 병행하여 실시간으로 살아있는 세포를 시각화하는 방법으로 시간대별 성장 차이를 관찰하였다. 특히, 본 연구에서 제작한 계능 삽입 또는 플라스미드 형태로 GFP 유전자를 발현하는 *S. mutans*와 *E. coli* 균주는 그들의 야생형이 나타내는 대사작용 또는 생장에 영향을 전혀 주지 않는 재조합체[26]로서 특정 유전자의 발현 또는 살아있는 균집을 실시간으로 시각화하는데 유용하다. 위의 실험과 동일한 조건에서 *S. mutans*와 *E. coli* 재조합 균주를 배양하고 시간대별로 GFP의 발현을 현미경을 활용하여 관찰하였다(Fig. 2). *E. coli*의 시간대별 결과를 보면 모든 시간 구간에 GFP 발현이 뚜렷하게 관찰되었으며 CFU 측정결과와 유사하게 72시간 후에도 다수의 살아있는 세포가 있음을 확인하였다(Fig. 2A). 반면에 *S. mutans*의 경우 24시간 이후 GFP의 신호 세기가 급감하는 현상을 관찰할 수 있었고 이 배양시간은 앞서 CFU 측정(Fig. 1A)에서 제시한 동일한 배양시간임이 확인되었다

(Fig. 2B). 비록 배양시간 24시간에도 강한 GFP 신호 세기를 관찰할 수 있지만, 이는 이전에 발현된 GFP의 형광활성이 지속한 현상일 수 있다[26, 31]. 즉, *S. mutans*의 세포사는 24시간 배양 후 앞서 제시한 두 가지 가설에 의해 유도될 수 있으며, 그 양상이 *E. coli*의 성장과는 분명한 차이가 있음을 확인하였다.

신호전달체계의 활성 여부를 관찰

진핵생물의 프로그램된 세포사와 유사하게, 세포사 조절 과정은 *S. mutans*의 CSP 매개 competence와 생물막(biofilm) 형성에 중요한 역할을 한다[10]. 특히, 앞서 언급했듯이 분자적 수준에서 조절된 autolysin의 발현 및 활성에 의한 *Streptococcus* spp. 세포사가 증명되었다[13, 23, 24, 27, 30]. 그러나 이러한 세포사는 특정 환경(예로, 환경적 또는 항생제 스트레스)에 대한 반응으로 성장억제와 외부 인자에 의해 파손된 세포에 국한하고 있다. 본 연구자는 외부자극 없이 *in vitro* 배양상태에서 24시간 배양 후, 세포사 유도 물질의 분비 여부를 확인하고자 배양액을 회수하여 새로운 배지와 혼합하여 배양액의 여러 농도에서 성장실험을 수행하였다(Fig. 3). *S. mutans* 균주를 24시간 배양한 후, 원심분리기로 상층액을 회수한 후 여과하였고 여과된 상층액의 pH는 산성인 5.37로 측정되었다. 이는 *S. mutans*의 당대사과정을 통한 젖산(lactic acid)의 생성 때문이다[7]. 결과를 살펴보면 새로운 BHI 배지와 30~70% 배양액 농도의 비교 시 성장수율(growth yield)에서 차이가 나타나지만, 모든 농도에서 세포 생장이 관찰되었다. 반면에 24시간 배양액만을 100% 사용한 경우 세포가 전혀 성장하지 않았다(Fig. 3A). 배양액의 산성 pH를 중성 pH로 조절한 후, 같은 성장 실험을 수행한 결과 동일한 성장수율 차이만 측정되었다($p < 0.05$)(Fig. 3B). 이는 pH 변화가 이 배양액에 의한 세포사 조절에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 다음으로 본 연구자는 여과된 배양액 내 당원의 고갈이 빠른 세포사의 원인으

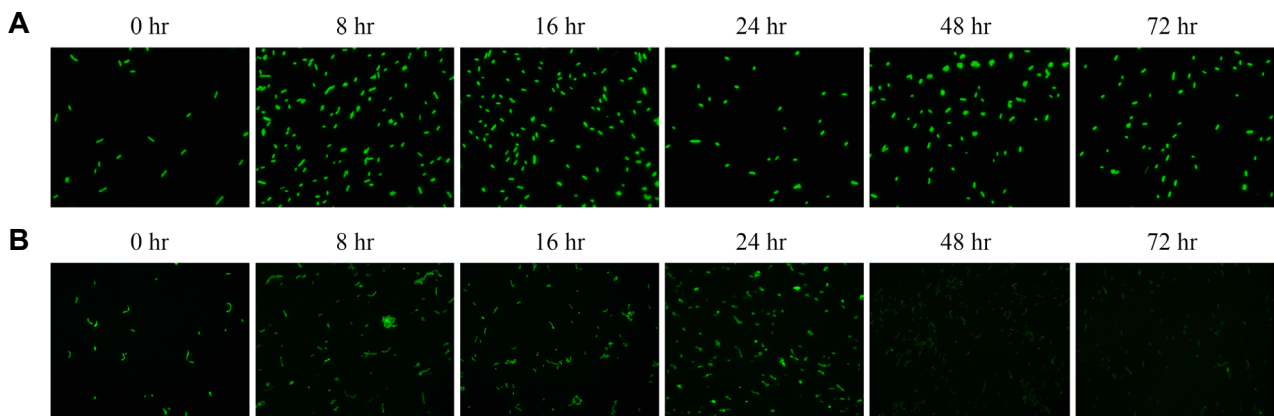


Fig. 2. Microscopy observation of GFP-expressing cells. The *E. coli* (A) and *S. mutans* (B) cells were grown in BHI or LB medium, respectively, and obtained at different time points. The cultures were fixed on a glass slide and observed at 100 \times magnification using a Carl Zeiss DE with Axio observer 3.

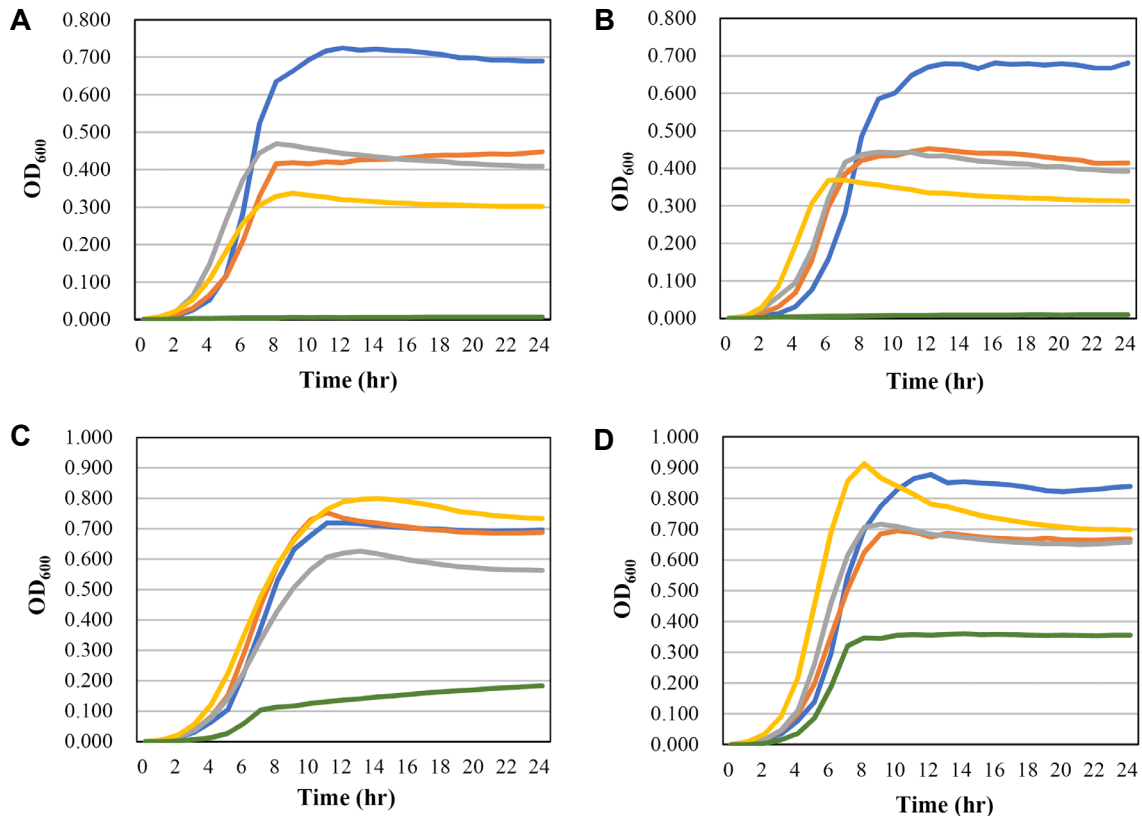


Fig. 3. Growth phenotypes of a *S. mutans* strain in BHI medium precultured for 24 hr. Cells were grown in triplicate to mid-exponential phase in BHI medium and diluted 1:100 into the 24-hr precultured BHI medium with only a mineral oil overlay (A), adjusted to pH7 (B), supplemented with 20 mM glucose (C), or supplemented with 20 mM glucose and adjusted to pH7 (D). The color lines (blue, orange, gray, yellow, and green) indicate the ratio (0, 30, 50, 70, and 100%, respectively) of the precultured medium to fresh BHI.

로 추측하여, 최초 여과된 pH5.37 배양액과 pH7로 중화된 배양액에 20 mM 포도당(glucose)을 추가하고 성장을 측정해 보았다. 배양액에 당원의 주입 시, 30~70%의 배양액 농도에서 *S. mutans*의 생장은 새로운 BHI 매지 내 성장과 동일한 성장률로 회복하였다(Fig. 3C and Fig. 3D). 그러나 100% 배양액 농도에서는 *S. mutans*의 생장은 다른 농도의 배양액과 확연한 차이를 보이며 회복하지 못했다. 이는 공급된 당원 이외에도 세포 성장을 억제하는 요소가 존재하며, 특히 이러한 성장 억제는 앞서 관찰된 세포사와 유사하게 24시간 배양액을 사용할 때 뚜렷하게 관찰되었다.

본 연구자는 이런 성장 표현형의 차이의 원인으로 장시간 배양에 따른 자연돌연변이(spontaneous mutation)의 발생 가능성을 추론하였다. 그러나 각 측정 시간대에서 회수한 *S. mutans* 세포를 접종하여 정상 또는 스트레스 조건에서 성장 실험을 수행하였으나 유의미한 변화가 발견되지 않았으며, 이는 *S. mutans*의 세포사와 관련된 주요한 유전적 돌연변이가 발생하지 않았음을 시사한다(data not shown).

배양 시간에 따른 영양분 감소는 *S. mutans*의 세포사에 직접적인 영향을 주며 서론에서 기술한 신호전달 시스템의 발현

과 밀접한 관련이 있다. 본 연구의 결과를 바탕으로 시험관 내 세포가 성장하는 동안 지연된 정체가 어떻게 세포사에 영향을 주는지 또는 어떠한 신호전달체계가 활성화되는지 분자적으로 설명하는데 한계가 있다. 그러나 장시간 배양은 영양분의 고갈을 초래하고 이는 환경적 스트레스로 작용할 수 있으며, 이러한 환경적 신호가 세포사와 직접적으로 연관된 유전자의 발현변화를 유도할 수 있다[2, 3, 12, 13]. 그러므로 측정된 배양조건에서 후보 유전자(예로, *cidAB*, *lrgAB* 또는 *atfA*)의 발현을 비교하여 배양액 농도에 의존적인지를 확인해야 하며, 배양액에 단백질 분해효소(e.g. protease)를 처리하여 펩타이드를 매개로 한 퀴럼센싱과의 연관성을 규명할 필요가 있다. 또한, 신호전달에 관여하는 유전자 발현이 배양 시간 및 특정 영양분과 양적 상관관계를 이루는지 후속 연구를 통해 증명할 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)의 지원으로 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

The author declares that there is no conflict of interest with the contents of this article.

References

- Aamdal-Scheie, A., Luan, W. M., Dahlen, G. and Fejerskov, O. 1996. Plaque pH and microflora of dental plaque on sound and carious root surfaces. *J. Dent. Res.* **75**, 1901-1908.
- Ahn, S. J. and Burne, R. A. 2006. The *atIA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis. *J. Bacteriol.* **188**, 6877-6888.
- Ahn, S. J. and Rice, K. C. 2016. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg System through CidB Function. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 6189-6203.
- Aravind, L., Dixit, V. M. and Koonin, E. V. 1999. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 47-53.
- Bassler, B. L. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.
- Camilli, A. and Bassler, B. L. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113-1116.
- Colby, S. M. and Russell, R. R. B. 1997. Sugar metabolism by mutans streptococci. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 80S-88S.
- Desai, K., Mashburn-Warren, L., Federle, M. J. and Morrison, D. A. 2012. Development of competence for genetic transformation of *Streptococcus mutans* in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **194**, 3774-3780.
- Dowd, F. J. 1999. Saliva and dental caries. *Dent. Clin. North Am.* **43**, 579-597.
- Dufour, D. and Levesque, C. M. 2013. Cell death of *Streptococcus mutans* induced by a quorum-sensing peptide occurs via a conserved streptococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **195**, 105-114.
- Groicher, K. H., Firek, B. A., Fujimoto, D. F. and Bayles, K. W. 2000. The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**, 1794-1801.
- Holtje, J. V. 1995. From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**, 243-254.
- Jolliffe, L. K., Doyle, R. J. and Streips, U. N. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* **25**, 753-763.
- Keltjens, H. M., Schaeken, M. J., van der Hoeven, J. S. and Hendriks, J. C. 1987. Microflora of plaque from sound and carious root surfaces. *Caries Res.* **21**, 193-199.
- Kim, J. N., Stanhope, M. J. and Burne, R. A. 2013. Core-gene-encoded peptide regulating virulence-associated traits in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **195**, 2912-2920.
- Kreth, J., Zhang, Y. and Herzberg, M. C. 2008. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **190**, 4632-4640.
- Li, Y. H., Hanna, M. N., Svensater, G., Ellen, R. P. and Cvitkovitch, D. G. 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.* **183**, 6875-6884.
- Liu, Y., Zeng, L. and Burne, R. A. 2009. *AguR* is required for induction of the *Streptococcus mutans* agmatine deiminase system by low pH and agmatine. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2629-2637.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D. A. and Federle, M. J. 2010. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol. Microbiol.* **78**, 589-606.
- Merritt, J. and Qi, F. 2012. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol. Oral. Microbiol.* **27**, 57-69.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M. and Horvitz, H. R. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* **14**, 410-416.
- Mueller, C. and Dworkin, M. 1991. Effects of glucosamine on lysis, glycerol formation, and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**, 7164-7175.
- Nagasawa, R., Yamamoto, T., Utada, A. S., Nomura, N. and Obana, N. 2020. Competence-stimulating-peptide-dependent localized cell death and extracellular DNA production in *Streptococcus mutans* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**, e02080-20.
- Perry, J. A., Cvitkovitch, D. G. and Levesque, C. M. 2009. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **299**, 261-266.
- Rice, K. C., Firek, B. A., Nelson, J. B., Yang, S. J., Patton, T. G. and Bayles, K. W. 2003. The *Staphylococcus aureus* *cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **185**, 2635-2643.
- Shields, R. C., Kaspar, J. R., Lee, K., Underhill, S. A. M. and Burne, R. A. 2019. Fluorescence tools adapted for real-time monitoring of the behaviors of *Streptococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e00620-19.
- Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R. and Massidda, O. 1996. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.* **2**, 95-98.
- Smith, T. J. and Foster, S. J. 1995. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **177**, 3855-3862.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. and Lenski, R. E. 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* **387**, 703-705.
- Song, L., Sudhakar, P., Wang, W., Conrads, G., Brock, A., Sun, J., Wagner-Dobler, I. and Zeng, A. P. 2012. A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains. *BMC Genomics* **13**, 128.
- Sullivan, M. J. and Ulett, G. C. 2018. Stable expression of modified green fluorescent protein in group B streptococci to enable visualization in experimental systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e01262-18

32. Tomasz, A. and Waks, S. 1975. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 4162-4166.
33. Williams, N. B. 1963. Microbial ecology of the oral cavity. *J. Dent. Res.* **42(1)Pt 2**, 509-520.
34. Zhang, C., Xin, Y., Wang, Y., Guo, T., Lu, S. and Kong, J. 2015. Identification of a novel dye-decolorizing peroxidase, EfeB, translocated by a twin-arginine translocation system in *Streptococcus thermophilus* CGMCC 7.179. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6108-6119.
35. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and van 't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875-1881.

초록 : 장시간 생장 조건에서 *Streptococcus mutans*의 급격한 세포사 표현형 분석

김정남^{1,2*}

(¹부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ²부산대학교 자연과학대학 생명시스템학과)

구강 병원체 *Streptococcus mutans*는 인간 충치를 일으키는 주요한 원인균 중 하나로 알려져 있다. 효과적인 구강 건강관리를 위해 치약과 구강 청결제를 포함한 다양한 치과 위생 제품을 사용하고 있지만, 음식 섭취 후 구강 미생물의 재발은 빈번하게 발생한다. 본 연구는 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*를 장시간 배양 시, 관찰된 급격한 세포사가 어느 시점에 유도되는지 분석하고 이러한 생장특성이 특히 대사물질의 분비와 밀접한 관련이 있는지 평가하고자 하였다. 특히, *S. mutans*의 생균수는 전체 72시간의 배양 중 24시간 이후에 급격히 감소한 반면, 지표 균주인 대장균은 동일한 시간에 일정한 수준의 생균수를 유지하였다. 다음으로 *S. mutans* 배양액에 동종의 세포사를 유도하는 특정 신호물질이 포함되어 있는지를 확인하기 위해 균주의 배양 24시간 후에 배양액을 회수하였다. 비록 세포의 성장이 완전히 복구되지 않았지만, 배양액의 산성 pH를 중화하고 포도당을 보충한 조건에서 복구된 표현형이 일부 관찰되었다. 그러나 배양액의 낮은 pH의 중화만으로는 세포 생장이 전혀 회복되지 않았다. 이러한 *S. mutans*의 세포사는 영양소 고갈뿐만 아니라 신호전달과 밀접하게 연관될 수 있으므로 이러한 생존 표현형에 대한 이해는 *S. mutans*의 생물학에서 세포 간 신호전달체계에 대한 새로운 지식을 제공할 수 있다.