

폐렴구균 알코올탈수소효소의 세포 특이성 및 세포내 분포

권혁영 · 박연진 · 표석능 · 이동권*

성균관대학교 약학대학

열충격 단백질(heat shock protein: HSP)은 변성된 단백질의 응집을 방지하여 가혹한 환경에서 병원균의 생존을 증가시킨다. 세균에 알코올 stress를 가하면 다량의 *DnaK*와 *GroEL*이 유도되지만 폐렴구균에서는 *DnaK*와 *GroEL*이 전혀 유도되지 않는 대신 알코올탈수소효소(alcohol dehydrogenase: ADH)가 유도되었다. 이런 특성은 폐렴구균 ADH가 HSP 처럼 chaperone 기능을 수행하고 있을 가능성을 제시하고 있으므로 본 연구에서는 일차적으로 ADH 유전자를 확인하고 ADH의 면역특성 및 세포내 분포를 측정하였다. 폐렴구균 ADH는 이질아메바 ADH2 및 대장균 ADH와 높은 유사성을 나타냈으며 883개의 아미노산으로 구성된 등전점 6.09의 단백질로 추정된다. 그러나 폐렴구균 ADH와 유사성이 높은 대장균, 유산균 및 황색포도상구균의 용해액을 폐렴구균 ADH 항체와 immunoblot을 실시하였을 때 전혀 반응하지 않았다. 또한 세포질, membrane, periplasm에 있는 단백질 분획 및 폐렴구균 배양 상등액을 ADH 항체와 immuno blot을 실시하였을 때 ADH는 열충격에 관계없이 세포 밖으로 분비되는 단백질을 확인하였다. 이런 결과는 폐렴구균 ADH가 진단용항원 및 백신으로 개발될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

Key words □ alcohol dehydrogenase, heat shock protein, localization, *Streptococcus pneumoniae*.

Alcohol dehydrogenase (ADH, alcohol:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.1)는 조효소로 NAD(H)나 NADP(H)를 이용하여 알코올을 산화시키며, 활성 부위에 대부분 아연 이온을 함유하는 metalloprotein으로서(22,35) 세균(39), 효모(42), 식물(17,48), 곤충(14), 척추동물(44), 인간(41,48,54)에 이르기까지 거의 모든 생물에 존재한다. 현재까지 아미노산 및 염기 서열분석으로부터 많은 ADH의 일차배열이 밝혀졌으며, X선 결정 해석에 의해 고차 구조도 밝혀졌다(6,29,53). 대장균 및 *B. subtilis*는 약 900개의 아미노산으로 구성된 *AdhE*가 ADH 활성, acetaldehyde dehydrogenase 활성, acetyl CoA를 알코올로 전환시키는 활성뿐만 아니라 혐기성 상태에서 pyruvate formate lyase를 불활성화시키는 활성도 갖고 있다(27). 또한 대장균 *adhE* 돌연변이가 *L. lactis adhE* 유전자에 의해 보상되므로(4) 그람음성균과 그람양성균의 ADH는 기능면에서도 매우 보존적임을 보여주고 있다. 대부분의 세균 ADH는 여러 가지 기능을 수행하고 있지만 진핵세포생물의 ADH는 크기가 작고(약 400개의 아미노산으로 구성됨) 여러 개의 *adh* 유전자가 존재하여(효모는 5개, 인간은 7개; GeneBank BLAST search) 각각의 *adh* 유전자가 서로 다른 기능을 수행할 것으로 기대된다.

폐렴구균은 정상인의 비인두부(nasopharynx)에서 서식하는 세균으로서 저항력이 약해지거나 다른 병원균에 감염되었을 때 질병을 일으켜(5) 항생제 치료 및 23가 다당류백신에도 불구하고 약 5-10%의 치사율을 나타내고 있다(2). 그러나 유아나 노약자

의 경우에는 더 높은 사망율을 나타내어 전세계적으로 매년 400만명 이상이 폐렴으로 사망하고 있다(43). 또한 류마티스성 심장병, 수막염, 중이염 등을 일으키며 특히 성인의 수막염을 일으키는 주된 원인균으로 작용하지만(23) 혈액-뇌 관문(blood brain barrier)으로 항생제가 수막안으로 수송되기 힘들어 높은 사망율을 나타내고 완치되더라도 영구적인 뇌신경장애를 갖게 된다(46,47). 그러나 어떤 과정을 통해 폐렴구균이 침투하여 병원성(pathogenesis)을 나타내게 되고 독성(virulence) 발현에는 어떤 유전자가 중요한 역할을 하는지(40) 밝혀지지 않고 있다.

모든 생물체는 열충격, DNA 손상제, 항생제 및 환경변화에 대응하기 위하여 stress 단백질(heat shock protein: HSP)들을 발현시켜 stress로 인한 단백질의 변성을 억제할 뿐만 아니라(chaperone 기능) 세포질 단백질의 세포막으로의 전이(translocation)를 돕는다(21,13). 병원균이 대식세포에 포획되면 환경변화로 HSP가 유도되어 세균의 생존율을 증가시키거나(10) 독성 발현에 영향을 주게 된다(34). 특히 폐렴구균은 비인두부에 집락을 형성(colonization)한 후 폐로 침투하여 질병을 유발시키며 비인두부에 서식할 때는 transparent strain으로 존재하여 다당류 capsule 층이 얇지만, 일단 혈액 안으로 침투하면 phase variation이 일어나 opaque strain으로 바뀌면서 capsule 층이 두꺼워진다(47). 이와 같이 폐렴구균은 환경변화에 따라 구조가 변화되며 세균에서 환경변화는 stress로 작용하여 독성 발현에 관여하며(34), 폐렴구균 *clpC* 돌연변이로 독성단백질인 pneumolysin 유전자의 발현이 억제된다(11)는 보고이외에는 전혀 밝혀진 바 없다.

현재까지 ADH에 대한 연구는 알코올발효 및 전자전달기능의 관점에서 연구되었으며 HSP 기능에 대해서는 전혀 언급된 바

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-290-7707, Fax: 031-292-8800
E-mail: dkrhee@skku.ac.kr

없다. 알코올에 의한 stress 반응은 알코올 발효에 사용되고 있는 *Zymomonas mobilis* 균(3)에서만 보고되었으며 대장균 및 *B. subtilis*에서조차 stress에 의해 *adh* 유전자가 유도되는지도 규명되지 않았다. 그러나 폐렴구균이외의 다른 세균에서는 알코올 충격에 의해 다량의 *DnaK*와 *GroEL*이 유도되지만(7-9,38,49) 폐렴구균에서는 *DnaK*와 *GroEL*이 전혀 유도되지 않는 대신 ADH가 전체단백질의 23%나 되도록 다량 유도되었다(12). 이런 연구결과는 알코올충격으로 유도된 ADH가 HSP 처럼 chaperone 기능을 수행하고 있을 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 일차적으로 ADH 단백질이 세포내의 어느 부분에 존재하는지 또한 다른 세균의 ADH와 어떤 차이가 있는지 측정하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

다당류 capsule이 없는 비병원성 폐렴구균(R type) *Streptococcus pneumoniae* CP1200(28) 균주를 사용하였다. 균주보존 및 배양에는 CAT 배지(Casitone 1%, Tryptone 0.5%, NaCl 0.5%, Yeast Extract 0.1%, 0.175 M K_2HPO_4 , 및 glucose 0.2%)를 사용하였고 고체배양배지로는 CAT 배지에 한천을 1.5% 첨가하여 사용하였다. 배지는 121°C에서 45 분간 멸균한 후 사용하기 전에 glucose와 dipotassium phosphate를 각각 0.2%와 16.6 mM 이 되도록 첨가하여 37°C에서 균을 배양하였다. 균이 자라면 Spectronic 20 spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 를 사용하여 550 nm에서 optical density (OD)를 측정하였고 OD가 0.3이 되면 배양액에 10-15%의 glycerol를 첨가하여 stock으로 저장하였다.

ADH 단백질의 분리 정제 및 항체 생산

폐렴구균을 30°C의 CAT 배지에서 흡광도가 0.2에 도달할 때까지 배양하고 42°C에서 30 분간 열충격을 가한 다음 원심 분리하여 균체를 모아 lysis buffer (5 mM Tris [pH 8.0], 30 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.025% [w/v] PMSF, 1 mM DTT)에 다시 현탁시키고 10 분간 sonication하여 균을 깨뜨렸다. 균 용해액을 원심 분리하여 상등액 중의 단백질을 Bradford method로 정량하였다. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한 후 p104 band를 잘라내어 electroelution 방법으로 분리 정제하여 2 ml의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA), USA와 잘 혼합한 후 토끼의 등에 0.5 ml 씩 나누어 피하 주사하였다. 2 주 후에 동일한 방법으로 항원을 준비하여 추가 접종하고 4 주 후 다시 추가 접종을 실시하였다. 토끼의 귀정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 immunoblot을 실시하여 항체생성 여부를 검토하였으며, titer가 가장 높은 6 주 후에 심장에서 다량의 혈액을 채취하고 상온에서 방치하여 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리하여 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 방법을 이용하여 항체의 titer를 결정하였다.

Immuno Blot Analysis

폐렴구균의 ADH의 유사성을 확인하기 위해 anti-ADH antibody와 immunoblot을 실시하였다. 폐렴구균 용해액을 11% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 anti-ADH antibody와 immunoblot 한 후 효소로 표지된 2차 항체 (secondary antibody)를 사용하여 검색하였다. 즉 nitrocellulose를 2%의 Tween 20을 함유하는 Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2) 용액으로 처리하여 비특이적인 항원-항체반응을 blocking시킨 후 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 용액에서 rabbit anti-p104 항혈청과 실온에서 1시간 동안 천천히 흔들며 주면서 반응시켰다. Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody를 2차 항체로 이용하여 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 반응시키고 과산화수소와 95% ethanol에 용해된 N',N',N',N'-tetramethylbenzidine을 각각 기질과 발색제로 반응시켰다.

세포분획을 이용한 ADH의 소재파악

Vijayakumar와 Morrison (50)의 세포 분획 방법에 따라 폐렴구균 단백질을 periplasm, spheroplast, 세포질 단백질로 분획하였다. 즉 폐렴구균 배양액을 원심분리하여 얻어진 침전물에 1/2부피의 spheroplast buffer [0.1 M Tris (pH 7.6), 2 mM $MgCl_2$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 M sucrose]를 가하였다. 30°C에서 1시간 배양하면 균체로부터 periplasmic protein이 제거되어 균이 spheroplast 형태로 된다. 10,000 rpm으로 4°C에서 원심분리하여 상등액에 periplasmic fraction과 침전물에 spheroplast fraction을 얻었다. 침전물을 spheroplast buffer에서 진탕한 후 19 배 부피의 hypotonic buffer [0.1 M Tris (pH 7.6), 1 mM PMSF, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)]를 가하여 spheroplast를 깨뜨렸다. 4°C에서 50,000×g로 30 분간 원심분리하여 상등액은 cytosol fraction으로 보관하고, 침전물은 solubilization buffer [0.05 M Tris (pH 8.0), 5 mM NaCl, 0.4% Triton x-100, 0.05% sarkosyl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF]에서 용해시켜 membrane fraction으로 사용하였다. 이들 분획을 SDS-PAGE로 전개한 후 열충격단백질에 대해 작성된 항체와 Immuno blot을 실시하여 어떤 분획에 ADH 또는 *GroEL* 열충격단백질이 다량 함유되어 있는지를 측정하였다.

결과 및 고찰

폐렴구균 ADH 유전자의 동정

p104의 N 말단 아미노산 배열 (ADKKTVTPEEKKLVA)로부터 유추된 degenerate oligonucleotide sequence (AT?GC?GA?AA?AA?AC?GT?AC?CC?GA?GA?AA?AA?CT?GT?, 3번째 염기의 wobble 현상으로 ?으로 표시)를 부분적으로 완성된 The Institute for Genomic Research (TIGR)의 폐렴구균 genomic DNA sequence와 비교했을 때 100% 일치되는 하나의 contig를 발견하였다. 이로부터 유추된 아미노산배열을 BLAST search 하였을

때 ADH family 에 속하는 단백질임을 확인하였다.

TIGR에서 완성한 병원성 *S. pneumoniae* type 4 균주의 genomic sequence를 이용하여 *in silico* chromosomal walking을 실시하여 완전한 *adh* 유전자의 염기서열을 확보하였다. *adh* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 2,652 bp의 염기로 구성되어 있으며 이로부터 883 개의 아미노산 (분자량 97,286 D), 등전점 (pI) 6.09의 단백질을 암호화하는 것으로 추정되었다. *adh* 유전자의 upstream 부분의 -35 (TTTACA)와 -10 (TATAAT)에서 sigma A type promoter sequence가 발견되었으며 *dnaK* 및 *groEL* operon에 존재하는 repressor binding site, CIRCE, 는 존

재하지 않았다(자료생략). 또한 폐렴구균 *adh* 유전자의 upstream 에는 phosphotransferase operon으로 추정되는 유전자와 기능이 알려지지 않은 open reading frame이 *adh* 유전자와 같은 방향 (5'→3')으로 배열되어 있었다. 그러나 down stream에는 *adh* 유전자와 반대 방향 (3'→5')으로 기능이 알려지지 않은 전사조절인자가 배열되어 있었다 (자료생략).

ADH의 아미노산 서열비교

BLAST search 하였을 때 *adh*의 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열은 ADH family member와 높은 유사성을 나타내었으

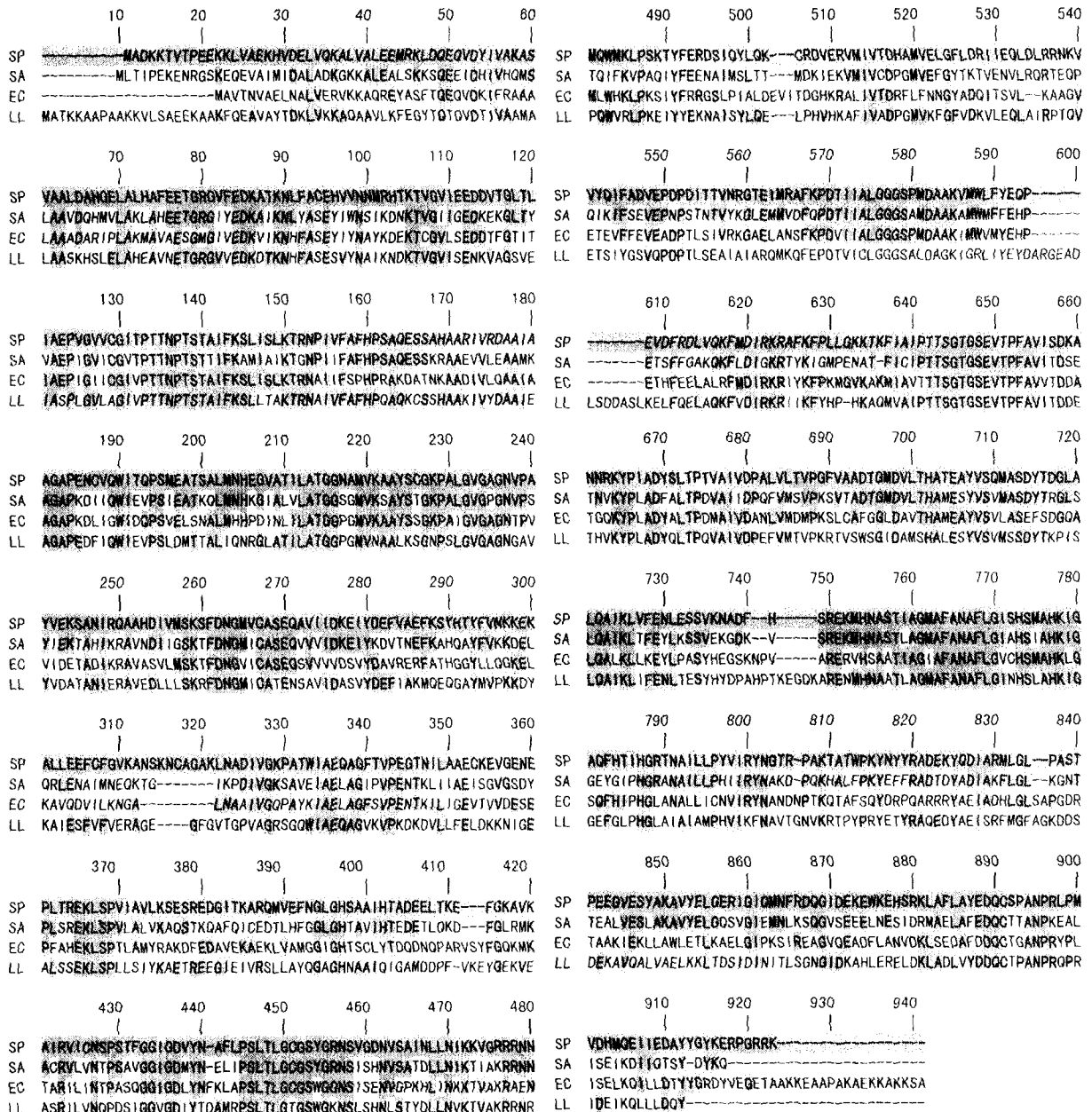


Fig. 1. Comparison of *S. pneumoniae* ADH with other bacterial ADH. ADHs from *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC), and *L. lactis* (LL) were compared with that of *S. pneumoniae* (SP). The one letter symbol is used. Characters that are shaded in gray indicate the conserved sequence.

며 *E. histolytica* ADH2와 *L. lactis* ADH와 각각 60% 및 46% 같았으며(identity) 75%와 63%의 유사성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 *E. coli* ADH와 64%, *Clostridium acetobutylicum* ADH과 60%, *C. acetobutylicum* NADPH dependent butanol dehydrogenase와 61%, *Trichomonas vaginalis* NADPH dependent butanol dehydrogenase와는 55%, *B. subtilis* ADH와는 49%의 유사성을 나타내었다(자료생략).

폐렴구균 ADH와 다른 ADH member와의 유사성

ADH 아미노산 배열 분석 결과 폐렴구균 ADH는 대장균 및 *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. aureus*와 유사성이 높으므로 폐렴구균

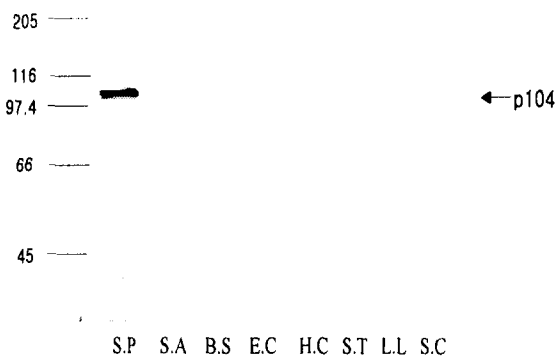


Fig. 2. Immunological cross-reactivity of anti-pneumococcal ADH with other organism's cell lysates. Western blot of heat-shocked cells lysates separated by SDS-PAGE was probed with a polyclonal antibody to pneumococcal ADH. Lane 1, *S. pneumoniae* (S.P); Lane 2, *S. aureus* (S.A); Lane 3, *B. subtilis* (B.S); lane 4, *E. coli* (E.C); lane 5, *L. lactis* (L.L); lane 6, human *HeLa cell* (H.C); lane 7, *Salmonella typhi* (S.T); lane 8, *Saccharomyces cerevisiae* (S.C).

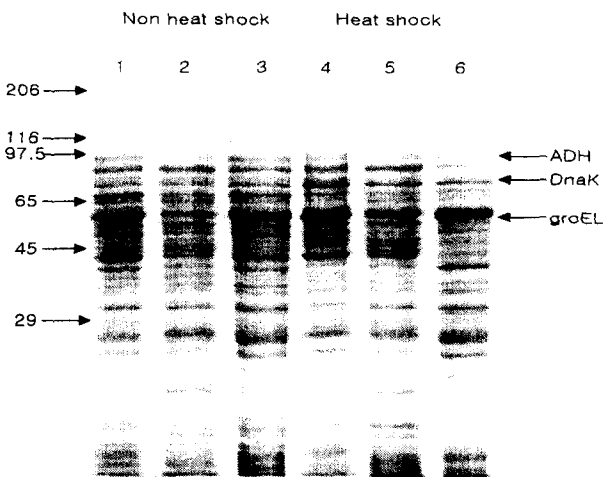


Fig. 3. Protein pattern of periplasm, membrane, and cytosol fractions in *S. pneumoniae* after heat shock. Exponentially growing *S. pneumoniae* cells exposed to 42°C were lysed and fractionated as described in Materials and Methods. Proteins were subjected to SDS-PAGE and visualized by using Coomassie-blue. Lanes 1 and 4, periplasm; lanes 2 and 5, membrane; lanes 3 and 6, cytoplasm.

ADH가 다른 생물체의 ADH와 유사한지 확인하기 위해 폐렴구균 ADH 항체를 여러 생물체의 세포 용해액과 immunoblot을 실시하였다. 그람 양성균인 *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. aureus* 뿐만 아니라 그람음성균인 *E. coli*, 진핵세포생물인 *S. cerevisiae* 및 인간 HeLa cell의 세포단백질과도 반응하지 않았다(Fig. 2). 이런 특징은 ADH family에 속하는 단백질들이 높은 보존성을 갖고 있음을 고려할 때 폐렴구균 ADH가 독특한 항원구조를 갖고 있음을 제시하고 있다.

세포분획을 이용한 ADH의 세포내 위치파악

폐렴구균 ADH 항체가 다른 생물체의 ADH와 반응하지 않았으므로 ADH를 진단시약이나 백신으로 개발할 수 있는 marker로 적합한지 규명하기 위해 ADH의 세포내 분포를 측정하였다. 열충격을 가한 것과 열충격을 가하지 않은 폐렴구균의 단백질을 분획하여 SDS-PAGE을 실시하였을 때 ADH의 크기에 해당되는 band가 열충격을 가하지 않았을 때는 periplasm과 세포질에 주로 존재하는 것으로 관찰되었으나 열충격을 가한 후에는 ADH가 membrane과 세포질보다는 periplasm 분획에서 주로 관찰되었다(Fig. 3). 이런 결과를 확인하기 위해 ADH 항체를 이용하여 immuno blot을 실시하였으며 그 결과 열충격을 가하지 않았을 때는 ADH가 세포질, membrane, periplasm에 모두 존재하지만 열충격을 가하면 ADH가 주로 periplasm에 존재하고 세포질에서는 소량만이 검출되었으며 membrane 분획에서는 전혀 검출되지 않았다(Fig. 4). 즉 열충격을 가했을 때 ADH가 열충격을 가하지 않았을 때보다 오히려 더 감소됨을 나타내고 있으며 이런 현상은 열충격으로 ADH가 세포 밖으로 분비되거나 빠르게 분해되어서 세포질내에서 소멸됨을 제시하고 있다. 따라서 열충격 후 ADH가 세포 밖으로 분비되는지 확인하기 위해 폐렴구균 배양액의 상등액을 0.45 μM filter로 여과하여 폐렴구균을 제거한 후 상등액에 함유된 단백질을 Centricon (Milipore. Co., Bedford, USA)으로 농축하여 ADH 항체를 이용하여 immuno blot을 실시하였다(Fig. 5). 열충격을 가하기 전과(Fig. 5, lane 2) 가한 후 (lane 3)를 비교하였을 때 세포 밖으로 분비되는 ADH가 증가하지 않은 것으로 보아 ADH는 열충격시 세포내에서 빠르게 소멸되는 것으로 사료된다.

세균의 병원성 및 독성유전자의 발현은 온도, 삼투압, pH, 철

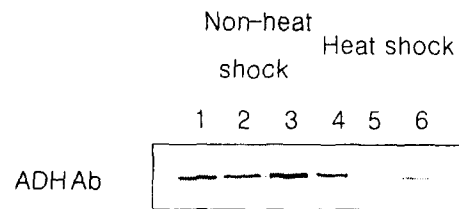


Fig. 4. Localization of ADH in *S. pneumoniae* after heat shock. Exponentially growing *S. pneumoniae* cells exposed to 42°C were lysed and fractionated as described in Materials and Methods. Proteins (10 μg) were subjected to SDS-PAGE followed by western blot analysis using polyclonal antibody. Lane 1 and 4, periplasm; Lane 2 and 5, membrane; Lane 3 and 6, cytoplasm.

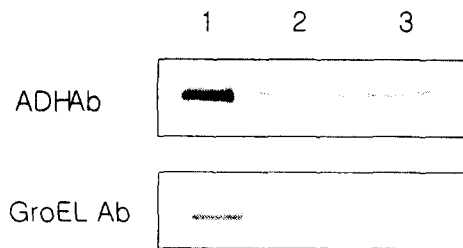


Fig. 5. Localization of ADH and GroEL in *S. pneumoniae*. Exponentially growing *S. pneumoniae* cells exposed to 42°C were separated into cell pellet and supernatant fraction. Cell pellet was lysed by sonication and supernatant was concentrated by ultrafiltration (MW cutoff 30,000). Proteins (7.5 µg) were subjected to SDS-PAGE followed by immuno blot analysis using polyclonal antibody. Lane 1, sonicated cell lysate at 42°C; lane 2, supernatant at 30°C; lane 3, supernatant at 42°C.

또는 아미노산 농도의 변화와 같은 stress에 영향을 받고 있으며 (34) 세균이 macrophage에 포획되면 분비된 소화효소 및 산화적 stress 물질들 때문에 (40) HSP를 발현시키게 된다 (10,30,32,52). 따라서 폐렴구균도 일단 macrophage에 포획되거나 숙주세포에 침투하면서 환경변화를 겪게되면 stress를 받아 HSP를 발현시켜 생존율을 높일 것으로 예상된다. 특히 병원균의 HSP는 생존율과 숙주세포에 부착하는 정도에 변화를 유발시키기 때문에 (37,20) stress 단백질에 대한 연구는 폐렴구균의 독성 및 병원성발현을 규명하는 단서를 제공할 것으로 예상된다. 본 연구결과 폐렴구균 ADH가 다른 세균이나 고등동물의 ADH와 면역학적으로 다른 양상을 나타내므로 폐렴구균 ADH를 진단용 biomarker로 이용하거나 백신으로 개발될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 모든 생물체는 환경 stress에 대응하여 일련의 유전자들을 발현시켜 적응하고 있으며 이때 생성되는 HSP는 생물체간에 높은 유사성을 나타내고 있을 뿐만 아니라 (13,18,19,36) 세균의 HSP는 숙주에서 주된 항원으로 인식되므로 (25,26) 폐렴구균 ADH가 HSP로서 숙주의 면역원성이나 면역반응에 어떤 영향을 미치는지 규명하는 것은 폐렴구균 질환의 원인을 규명하는데 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

ADH는 진핵세포생물과 원핵세포생물의 세포 내에서 다양하게 존재한다. 즉 세균에서 ADH는 주로 membrane bound 형태 (*Acetobacter pasteurianus*; 45), periplasm (*Methylobacterium* ADH, 15; *Hyphomicrobium* spp.의 methanol dehydrogenase, 24), intracytoplasmic membrane (*Methylomonas* ADH; 15), 세포질 (*Zymomonas mobilis* ADH1; 1) 등에 존재한다. 진핵세포생물체에서도 세포질 (초파리 ADH, 31; *Kluyveromyces lactis* ADH1와 ADH2, 33), mitochondria (*Kluyveromyces lactis* ADH4, 33; *Candida tropicalis* ADH, 51) 등에 존재하지만 인간의 아메바성 이질을 일으키는 진핵세포생물 *Entamoeba histolytica*에서 ADH2는 분비된다 (16). 즉 폐렴구균 뿐만 아니라 *Entamoeba histolytica*도 ADH가 세포 밖으로 분비되므로 병원성 미생물에서 ADH가 분비되어 독성인자의 일부로 작용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 따라서 ADH가 숙주인 인간세포에 어떤 영향

을 미치는지 연구가 지속되어야 할 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 경기도의 2000년도 산학연 program 연구비 및 경기 의학연구센터 (KPRC)의 일부연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Aldrich, H.C., L. McDowell, M.F. Barbosa, L.P. Yomano, R.K. Scopes, and L.O. Ingram. 1992. Immunocytochemical localization of glycolytic and fermentative enzymes in *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 174, 4504-4508.
- Alonso De Velasco, E., A.F. Verheul, J. Verhoef, and H. Snippe. 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* 59, 591-603.
- An, H., R.K. Scopes, M. Rodriguez, K.F. Keshav, and L.O. Ingram. 1991. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. *J. Bacteriol.* 173, 5975-5982.
- Arnaud, J., F. Jorgensen, S.M. Madsen, A. Vrang, and H. Israelsen. 1998. Cloning of the *Lactococcus lactis* adhE gene, encoding a multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 3049-3055.
- Atlas, R.M. 1995. *Microorganisms in our world*, p 606. Mosby Publishing Co., St. Louis.
- Benach, J., S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, and R. Ladenstein. 1998. The refined crystal structure of *Drosophila lebanonensis* at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 282, 383-399.
- Bernhardt, J., U. Volker, A. Volker, H. Antelmann, R. Schmid, H. Mach, and M. Hecker. 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*- a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* 143(Pt 3), 999-1017.
- Boutibonnes, P., B. Gillot, Y. Auffray, and B. Thammavongs. 1991. Heat shock induces thermotolerance and inhibition of lysis in a lysogenic strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 1-9.
- Boutibonnes, P., J.C. Giard, A. Hartke, B. Thammavongs, and Y. Auffray. 1993. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 47-55.
- Buchmeier, N.A. and F. Heffron. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248, 730-732.
- Charpentier, E., R. Novak, and E. Tuomanen. 2000. Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by clpC. *Mol. Microbiol.* 37, 717-726.
- Choi, I.H., J.H. Shim, S.W. Kim, S.N. Kim, S.N. Pyo, and D.K. Rhee. 1999. Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* 43, 807-812.
- Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson. 1993. Heat shock protein: Molecular chaperones of protein biogenesis. *J. Bacteriol.* 57, 402-414.
- Danielsson, O., S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmqvist, D.R. Gonzalez, and H. Jornvall. 1994. Fundamental molecular differences

- between alcohol dehydrogenase classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 4980-4984.
15. Fassel, T.A., L.A. Buchholz, M.L. Collins, and C.C. Remsen. 1992. Localization of methanol dehydrogenase in two strains of methylotrophic bacteria detected by immunogold labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2302-2307.
 16. Flores, B.M., S.L. Stanley, T.S. Yong, M. Ali, W. Yang, D.L. Diedrich, and B.E. Torian. 1996. Surface localization, regulation, and biologic properties of the 96-kDa alcohol/aldehyde dehydrogenase (EhADH2) of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 173, 226-231.
 17. Gaut, B.S. and M.T. Clegg. 1991. Molecular evolution of alcohol dehydrogenase 1 in member of the grass family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2060-2064.
 18. Georgopoulos, C. and W.J. Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9, 601-634.
 19. Gross, C.A. 1996. Function and regulation of the heat shock proteins, p. 1382-1399. In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Megasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *E. coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. *Amer. Soc. Microbiol.* Washington, D.C.
 20. Hartmann, E. and C. Lingwood. 1997. Brief heat shock treatment induces a long-lasting alteration in the glycolipid receptor binding specificity and growth rate of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 65, 1729-1733.
 21. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 349-384.
 22. Jeffery, J., L. Cummins, M. Carlquist, and H. Jornvall. 1981. Properties of sorbitol dehydrogenase and characterization of a reactive cystein residue reveal unexpected similarities to alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 120, 229-234.
 23. Joklik, W.K., H.P. Willett, D.B. Amos, and C.M. Wilfert. 1988. Zinsser Microbiology, p368-377. Prentice-Hall Inc., East Norwalk, CT.
 24. Kasprzak, A.A. and D.J. Steenkamp. 1983. Localization of the major dehydrogenases in two methylotrophs by radiochemical labeling. *J. Bacteriol.* 156, 348-353.
 25. Kaufmann, S.H.E., B. Schoel, J.D.A.V. Embden, T. Koga, A. Wand-Wurtenberger, M.E. Munk, and U. Steinhoff. 1991. Heat shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infection. *Immunol. Rev.* 121, 67-90.
 26. Kaufmann, S.H.E. and B. Schoel. 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In R.I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (ed.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. p. 495-532. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, New York.
 27. Kessler, D., I. Leibrecht, and J. Knappe. 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Lett.* 281, 59-63.
 28. Kim, S.W., I.H. Choi, S.N. Kim, Y.H. Kim, S.N. Pyo, and D.K. Rhee. 1998. Molecular cloning, expression, and characterization of *dnaK* in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 217-224.
 29. Korkhin, Y., A.J. Kalb, M. Peretz, O. Bogin, Y. Burstein, and F. Frolow. 1998. Crystal structure cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* 278, 967-981.
 30. Kwaik, Y.A., B.I. Eisenstein, and N.C. Engleberg. 1993. Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun.* 61, 1320-1329.
 31. Leal, J.F. and M. Barbancho. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in *Drosophila melanogaster* adults: evidence for cytosolic localization. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 23, 543-547.
 32. Lin, J. and T.A. Ficht. 1995. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect. Immun.* 63, 1409-1414.
 33. Mazzoni, C., M. Saliola, and C. Falcone. 1992. Ethanol-induced and glucose-insensitive alcohol dehydrogenase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* 6, 2279-2286.
 34. Mekalanos, J.J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence gene determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 1-7.
 35. Neale, A.D., R.K. Copes, J.M. Kelley, and R.E.H. Wettenhall. 1986. The two alcohol dehydrogenase of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological roles. *Eur. J. Biochem.* 154, 119-124.
 36. Parsell, D.A. and S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
 37. Parsons, L.M., R.J. Limberger, and M. Shayegani. 1997. Alterations in levels of *DnaK* and *GroEL* results in diminished survival and adherence of stressed *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 65: 2413-2419.
 38. Qoronfleh, M.W., U.N. Streips, and B.J. Wilkinson. 1990. Basic features of the staphylococcal heat shock response. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58, 79-86.
 39. Reid, M.F. and C.A. Fewson. 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenase. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 13-56.
 40. Salyers, A.A. and D.D. Whitt. 1994. Bacterial pathogenesis: A Molecular Approach. ASM, Washington, D.C.
 41. Satre, M.A., K.M. Zgombic, and G. Duester. 1994. The complete structure of human class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) determined from the ADH7 gene. *J. Biol. Chem.* 269, 15606-15612.
 42. Shain, D.H., C. Salvatore, and C.L. Denis. 1992. Evolution of the alcohol dehydrogenase (ADH) genes in yeast : characterization of a fourth ADH in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 232, 479-488.
 43. Siber, G.R. 1994. Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines. *Science* 265, 1385-1387.
 44. Sun, H.W. and B.V. Plapp. 1992. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J. Mol. Evol.* 34, 522-535.
 45. Takemura, H., K. Kondo, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *J. Bacteriol.* 175, 6857-6866.
 46. Tuomanen, E. 1993. Breaching the blood-brain barrier. *Sci. Am.* 268, 80-84.
 47. Tuomanen, E. 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 35-39.
 48. Van, D.S.D., P.R. Rodrigues, J. Gielen, and M.M. Van. 1991. Tomato alcohol dehydrogenase. expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 295, 39-42.
 49. VanBogelen, R.A., P.M. Kelley, and F.C. Neidhardt. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*

- 169, 26-32.
50. Vijayakumar, M.N. and D.A. Morrison. 1986. Localization of competence-induced proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 165, 689-695.
51. Yamada, T., H. Nawa, S. Kawamoto, A. Tanaka, and S. Fukui. 1980. Subcellular localization of long-chain alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* 128, 145-151.
52. Yamamoto, T., T. Hanawa, S. Ogata, and S. Kamiya. 1997. The *Yersinia enterocolitica GsrA* stress protein, involved in intracellular survival, is induced by macrophage phagocytosis. *Infect. Immun.* 65, 2190-2196.
53. Yang, Z.N., W.F. Bosron, and T.D. Hurley, 1997. Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase : a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 265, 330-343.
54. Yasunami, M., C.S. Chen., and A. Yoshida. 1991. A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7610-7614.

(Received July 4, 2001/Accepted September 2, 2001)

ABSTRACT: Immunological Characterization and Localization of the Alcohol-dehydrogenase in *Streptococcus pneumoniae*

Hyog-Young Kwon, Youn-Jin Park, Suhk-Neung Pyo, and Dong-Kwon Rhee* (College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea)

Heat shock proteins serve as chaperone by preventing the aggregation of denatured proteins and promote survival of pathogens in harsh environments. In bacteria, ethanol shock induced the major chaperone *GroEL* and *DnaK*, but in *Streptococcus pneumoniae*, it induced neither *GroEL* nor *DnaK* but alcohol dehydrogenase (ADH). In this study, ADH gene encoding a 104-kDa (p104) protein was identified and characterized. The deduced amino acid sequence of pneumococcal ADH shows homology with other members of the ADH family, and particularly with *Entamoeba histolytica* ADH2 and *E. coli* ADH. *S. pneumoniae adh* is composed of 883 amino acids and its estimated isoelectric point is 6.09. Although ADH is conserved between *S. pneumoniae* and *E. coli*, immunoblot analysis employing antisera raised against pneumococcus ADH demonstrated no cross-reactivity with ADH analog in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and human *HeLa* cells. Also secretion of ADH was demonstrated by subcellular fractionation and immunoblot analysis of proteins. These results suggest that *S. pneumoniae* ADH could be a highly feasible candidate for both diagnostic marker and vaccine.