

84-kDa의 폐렴구균 열충격단백질 ClpL의 Cloning 및 면역특성에 관한 연구

권혁영 · 김용환 · 최혜진 · 박연진 · 표석능 · 이동권*
성균관대학교 약학대학

Cloning and Immunological Characterization of the 84-kDa Heat Shock Protein, ClpL, in *Streptococcus pneumoniae*

Hyo-young KWON, Yong-Hwan KIM, Hye-Jin CHOI, Youn-Jin PARK,
Suhk-Neung PYO and Dong-Kwon RHEE*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received May 1, 2001; accepted June 18, 2001)

Abstract – Heat shock proteins serve as chaperone by preventing the aggregation of denatured proteins and promote survival of pathogens in harsh environments. In this study, heat shock gene encoding a 84-kDa (p84) protein, which is one of the three major heat shock proteins in *S. pneumoniae*, was cloned and characterized. PCR with a forward primer derived from N-terminal amino acid sequence of the p84 and a reverse primer derived from the conserved second ATP-binding region of Clp family was used for amplification of the gene encoding the p84 and subsequently the PCR product was used for sequence determination. Sequence analysis of the p84 gene demonstrated that it is a member of ClpL. The deduced amino acid sequence of pneumococcal ClpL shows homology with other members of the Clp family, and particularly, even in variable leader region, with bovine Clp-like protein and *L. lactis* ClpL. *S. pneumoniae* clpL is the smallest clp member (701 amino acids) containing the two conserved ATP-binding regions, and hydrophilic N-terminal variable region of pneumococcal Clp ATPase is much shorter than any known Clp ATPases. Histidine tagged ClpL was overexpressed and purified from *E. coli*. Immunoblot analysis employing antisera raised against pneumococcus p84 demonstrated no cross-reactivity with Clp analog in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and human HeLa cells. Preimmunization of mice with ClpL extended mice life partially but did not protect them from death.

Key words □ *Streptococcus pneumoniae*, heat shock protein, immunity, ClpL

모든 생물체는 환경변화에 대응하기 위하여 일련의 stress 단백질들을 발현시킨다. 이런 stress 단백질들 중에서 열충격 단백질(Heat Shock Protein: HSP)은 열충격 및 DNA 손상, virus 침투 등에 의해서도 유도되며 molecular chaperone 기능을 하여 단백질이 제대로 접어지거나 전이(translocation) 되도록 한다. 즉 HSP는 변성되거나 stress로 손상된 단백질이 응집되는 것을 방지하여 원래의 단백질 구조로 되게 하거나 분해를 촉진시켜 비정상적인 단백질의 축적을 방지하는 기능을 갖고 있다(Hendrick과 Hartl, 1993; Craig 등, 1993; Neihardt & VanBogelen, 1987; Zeilstra-Ryalls 등, 1991). 또한 HSP 들은 여러가지 병원균에 대한 면역반응에서 주된 항원으로 인식되고 있다(Kaufmann 등, 1991; Kaufmann 과 Schoel, 1994).

HSP는 여러 생물체 간에 유사성이 높으며 크기에 따라서 hsp100, hsp90, hsp70, hsp60 및 small hsp family 등으로 분류된다. Hsp100 family는 세균, 곰팡이, 식물 및 인간을 포함한 동물에서 관찰되고 있으며 stress에 대한 저항성을 부여하거나 proteolysis, DNA transcription, 유전자 조절 등에 관여하고 있다. 이런 여러 가지 작용은 모두 단백질의 quaternary protein structure와 응집된 구조(agggregates)를 풀어주는(disassembling 또는 resolubilization) 작용에 의한 것이다(Schirmer 등, 1996). Hsp100 family에서 대표적인 것이 yeast Hsp104 및 대장균의 ClpB 등이며 고온 또는 고농도의 ethanol 등에 노출되었을 때 유도되어 변성된 단백질을 가수분해하여 세포를 보호하며 hsp70 family와 기능상 상호보완 되지만 중금속에 의한 세포손상은 보호하지 못한다(Sanches 등, 1992; Schirmer 등, 1996).

열충격유전자의 발현조절에 대한 연구는 대장균에서 가

*To whom correspondence should be addressed.

장 활발히 연구되어 왔으나 최근에서야 그람양성균 특히 고초균(*Bacillus subtilis*)에서도 연구가 진행되고 있다(Homuth 등, 1997; Li와 Wong, 1992; Yuan 과 Wong, 1995; Schmidt 등, 1992; Schulz와 Schumann, 1996; Wetzstein과 Schumann, 1990; Wetzstein 등, 1992). 그람음성균인 대장균은 σ^E (*htrA* 유전자의 발현에 필요)와 σ^{32} (*htrA* 유전자 이외의 다른 모든 열충격유전자의 발현에 필요)에 의해 발현이 조절되지만(Yura 등, 1993; Mager 와 Kruijff, 1995) 그람양성균인 고초균에서는 HrcA repressor(Schultz와 Schumann, 1996)와 CIRCE(Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression: Zuber 와 Schumann, 1994; Yuan과 Wong, 1995; Mogk 등, 1997)에 의해 발현이 억제되는 Class I 열충격유전자(*groE*와 *dnaK* operon 등이 있으며 sigma A [σ^A] type promoter 를 갖고 있음)와 sigma B(σ^B) type promoter를 갖고 있는 Class II 열충격유전자(*clpP*, *clpC*, *lon* 등) 및 Class III 열충격유전자(*htpG* 유전자)로 구분된다(Homuth 등, 1997).

폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 정상인의 비인두부(nasopharynx)에서 30~50% 까지 검출되는 세균으로서 폐렴, 류마티스성 심장병, 수막염, 중이염 등의 원인균이며(Joklik 등, 1988) 항생제 치료 및 23 가 다당류 백신에도 불구하고 약 5~10%의 치사율을 나타내고 있다(AlonsoDeVelasco 등, 1995). 특히 유아나 노약자의 경우에는 더 높은 사망율을 나타내어 전세계적으로 매년 400 만명 이상이 폐렴으로 사망하고 있으며(Siber, 1994; ASM News 62, 15-16 [1996]) 폐렴구균의 항생제 내성이 높은 Spain에서는 폐렴구균 질환의 사망률이 23%에 이르고 있다(Pallares 등, 1995). 폐렴구균은 침투과정중에 영양분이 부족한 비인두부(nasopharynx)에서 영양분이 풍부한 혈액 안으로 침투하면서 큰 환경변화를 겪게되며 이에 따라 구조가 크게 바뀐다. 즉 비인두부에 존재할 때는 Transparent strain 으로 존재하여 Surface Choline 과 Adhesin인 CbpA를 다량 발현시키고 다당류 Capsule 층이 얇지만, 일단 혈액 안으로 침투하면 Opaque strain으로 바뀌면서 Surface Choline과 CbpA는 적게 발현되고 Capsule 층이 두꺼워진다(Tuomanen, 1999). 또한 여러 세균에서 이런 환경변화가 독성발현에 큰 영향을 미치고 있으므로(Buchmeier 와 Heffron, 1990; reviewed in Mekalanos, 1992) 폐렴구균에서도 스트레스 반응이 구조 변화나 독성발현에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 특히 세균의 병원성발현에는 환경인자가 중요한 역할을 하고 있어서 대장균에서는 온도, 철이온 농도, 탄소원의 농도변화에 따라서 독성유전자의 발현이 영향을 받고 *Salmonella typhimurium*에서는 온도, 삼투압, pH, 철 또는 아미노산 농도의 변화 등에 영향을 받는다(Mekalanos, 1992).

폐렴구균에서 열충격에 의해 유도되는 주된 HSP는 65,

73, 84 kDa의 열충격단백질(각각 p65, p73, p84로 표기)이며 p65와 p73은 각각 GroEL, DnaK 유사체로 확인되었다. 또한 *groEL*과 *dnaK* 유전자가 클로닝되어 발현조절 기전이 일부 규명되고(Choi 등, 1999; Kim 등, 1998, 2001) DnaK 가 항체생성을 유도하며(Hamel 등, 1997) 폐렴구균 DnaK 항체는 인간 단백질과 반응하지 않으므로(Kim 등, 1998) 백신 후보물질(세계특허 WO 9640928 A1)로 연구가 진행중 이다. 그러나 p84에 대해서는 보고된바 없으므로 본 연구에서는 p84를 클로닝하고 p84 항체가 다른 생물체의 단백질과 유사한지 immunoblot 분석을 하였을 때 대장균, 황색포도상구균 및 인간단백질과 전혀 반응하지 않았으므로 ClpL의 백신효과를 측정하였다.

실험방법

균주 및 배양

다당류 capsule이 없는 비병원성 폐렴구균(R type) *Streptococcus pneumoniae* CP1200(Kim 등, 1998) 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 고체평판배지로는 CAT 배지에 한천을 1.5% 첨가하여 사용하였다. 다당류 capsule을 함유하는 병원성 폐렴구균은 type 3 균주를 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)으로부터 구입하여 사용하였으며 배양에는 0.5% yeast extract를 첨가한 Todd-Hewitt broth 배지를 사용하였다.

폐렴구균의 stress 반응

폐렴구균을 30°C에서 세포수가 4×10^8 /ml이 될 때까지 CAT 배지에서 배양한 다음 42°C에서 30분간 stress를 가한 후 즉시 4°C에서 15,000 g로 5분간 원심분리하여 얻은 cell pellet에 200 μ l의 lysis buffer(5 mM Tris, pH 8.0, 30 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.025% [w/v] phenyl methane sulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM dithiothreitol [DTT])를 가해 현탁시키고, 0°C에서 90초씩 2회 sonication 하였다. 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액을 취해 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분리한 후 Coomassie Blue 로 염색하였다.

폐렴구균 p84 유전자의 클로닝

폐렴구균 p84 유전자를 cloning 하기 위해서 본 실험실에서 확보된 p84 단백질 N-말단 아미노산 서열 (MN-NNFNFN)의 degenerate primer(27-mer 5'-G/ATG/AAY/AAY/AAY/TTY/AAY/AAY/TTY/AA-3', Y=T or C, N=A, C, G or T)와 Clp family에서 잘 보존된 2번째 ATP binding

자리의 아미노산 PTGVGKT로부터 degenerate primer (20-mer 5'-GT/YTT/NCC/NAC/NCC/NGY/NGG-3' 여기서 Y=T or C, N=A, C, G or T)를 각각 forward와 reverse primer로 이용하여 Pfu polymerase(Stratagene)와 Perfect match enhancer(Stratagene)를 사용하여 30 cycle의 PCR 반응(매 PCR cycle 은 93°C에서 1분간 변성, 54°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 5분간 extension)을 실시하여 폐렴구균 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응으로 증폭된 DNA 절편을 직접 pGEM-T vector(Promega)에 클로닝하였다.

p84 유전자의 염기서열 결정

폐렴구균 p84 유전자를 함유하는 클론의 DNA를 Exonuclease III를 이용한 nested deletion을 통해 p84 단백질의 amino 말단으로부터 연속적인 deletion set를 제조하여(Erase-a Base®, Promega) 얻어진 각 subclone의 DNA를 template로 이용하여 universal sequencing primer를 이용하여 dideoxy chain termination방법(Sequenase kit; USB Inc.USA)으로 sequencing 하고 두 strand에 대한 염기서열을 결정하였다.

p84 단백질의 분리 정제 및 항체 생산

이미 본 실험실에서 확립한 방법(최 등, 1998)을 이용하여 p84 단백질을 분리하였다. 즉 폐렴구균을 30°C의 CAT 배지에서 파장 550 nm에서 흡광도가 0.2에 도달할 때까지 배양하고 42°C에서 30분간 열충격을 가한 후 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 현탁한 다음 10분간 sonication 하여 균을 깨뜨렸다. 균 용해액을 원심 분리하여 상등액 중의 단백질을 Bradford method로 정량하였다. SDS-PAGE를 실시하여 단백질을 분리한 후 p84 band를 잘라내어 electroelution 방법으로 분리 정제하여 2 ml의 Freund's complete adjuvant (Sigma)와 잘 혼합한 후 토끼의 등에 0.5 ml씩 나누어 피하 주사하였다. 2주 후에 동일한 방법으로 항원을 준비하여 추가 접종하고 4주 후 다시 추가 접종을 실시하였다. 토끼의 귀정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 immunoblot을 실시하여 항체생성 여부를 검토하였으며, titer가 가장 높은 6주 후에 심장에서 다량의 혈액을 채취하고 상온에서 방치하여 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리하여 Enzyme Linked Immunosorbant Assay 방법을 이용하여 항체의 titer를 결정하였다.

Immuno blot analysis

폐렴구균의 p84 단백질의 유사성을 확인하기 위해 anti-p84 antibody와 immunoblot을 실시하였다. 폐렴구균 용해액을 11% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocel-

lulose membrane에 전이시킨 후 anti-p84 antibody와 immunoblot 한후 효소로 표지된 2차 항체(secondary antibody)를 사용하여 검색한다. 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 blocking 시킨 후 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 용액에서 rabbit anti-p84 항혈청과 실온에서 1시간 동안 천천히 흔들어 주면서 반응시킨다. Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G(IgG) antibody를 2차항체(secondary antibody)로 이용하여 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 반응시키고 과산화수소와 95% ethanol에 용해된 N', N', N', N'-tetramethyl benzidine을 각각 기질과 발색제로 반응시켰다.

폐렴구균 ClpL의 대량발현

N 말단에 histidine 이 표지된 ClpL을 대장균에서 대량 발현시키기 위해 2.1 kb의 clpL 유전자를 KpnI 자리를 삽입한 forward primer(5'-CGG TAC CAT GAA CAA TAA TTT TAA C-3') 및 SacI 자리를 삽입한 reverse primer(5'-TGA GCT CTT AGA CTT TCT CAC GA-3')를 이용하여 염색체 DNA를 PCR로 증폭시킨 후 KpnI 및 SacI으로 절단된 pET32(a) (Novagen)에 삽입하여 recombinant plasmid pClpL를 작성하였다. pClpL는 clpL의 N 말단에 His tag와 thioredoxin 유전자(trxA)를 함유하고 있으며 clpL을 대량 발현시키기 위해 pClpL을 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환시켜 얻은 클론을 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.6에 도달할 때까지 배양하고 100 mM의 isopropyl-β-D-galactoside(IPTG)를 첨가하여 유도하였다. IPTG로 유도된 단백질을 분리정제하기 위해 균을 원심분리하여 초음파분쇄하여 용해시킨 후 제조회사(Novagen)의 지시대로 nickel column chromatography를 실시하여 ClpL을 분리하였다.

백신효과 측정

폐렴구균에 대한 백신효과를 측정하기 위해 암컷 생쥐 (BALB) 8 마리를 한 군으로 하여 20 μg의 ClpL 단백질을 함유한 50 μl의 phosphate buffered saline, pH 7.5(PBS)을 50 μl의 complete Freund adjuvant 와 혼합하여 피하주사 하였으며 대조군에는 PBS와 complete Freund adjuvant 만을 혼합하여 피하주사 하였다. 2주 후에 다시 10 μg의 ClpL 단백질을 incomplete Freund adjuvant 와 혼합하여 피하주사 하였으며 대조군에는 PBS 와 incomplete Freund adjuvant를 주사하였다. 3주와 4주 때에 ClpL 단백질을 2주 때 투여한 것과 동일하게 주사하고 5주 때에 폐렴구균을 복강 투여하여 생존일수를 매일 측정하였다.

실험결과

폐렴구균 열충격단백질 p84의 분리 동정

p84의 분자량이 대장균 및 *B. subtilis*의 Clp와 유사함을 고려할 때 Clp family member일 것으로 추정되었다. Clp 단백질의 N 말단부위는 생물체마다 차이가 있는 부위(variable region)임에도 불구하고 폐렴구균 p84의 N 말단 아미노산 서열의 17개의 아미노산(MNNNFNNFNMDL-LFNQ) 중 7개가 다른 생물체의 Clp 단백질과 유사하였으므로 Clp member 일 가능성이 높을 것으로 예상되었다.

폐렴구균 p84 유전자의 클로닝

폐렴구균에서 열충격에 의해 유도되는 열충격 단백질(Fig. 1) p84의 N-말단 아미노산(MNNNFNNFN)과 *clp* 유전자의 가장 보존적인 부분인 두 번째 ATP-binding site의 아미노산(PTGVGKT)으로부터 유래된 degenerate primer를 forward 및 reverse primer로 이용하여 PCR을 실시하여 약 1.3 kb의 DNA 조각을 얻어(결과제시 안함) pGEM-T vector에 삽입하여 pG8403 클론을 얻었다. pG8403 클론으로부터 얻어진 insert DNA에 대한 nested deletion체를 작성하여 DNA 염기서열을 결정하여 BLAST search 하였을 때 소(bovine)의 Clp-like protein과 *L. lactis clpL*과 유사함을 확인하였다. 그러나 1.3 kb의 클론에는 promoter와 C 말단 부분이 결핍되어 있으므로 *clpL*의 open reading frame 및

promoter를 함유하는 부분을 확보하기 위해 폐렴구균염색체 DNA를 여러 가지 제한효소로 절단한 후 35S 로 표지된 1.3 kb의 DNA를 탐침으로 사용하여 Southern blot을 실시하였을 때 hybridize 되는 가장 작은 DNA band는 *ClaI*로 절단된 3.8 kb의 염색체 DNA 이었다(결과제시 안함). 따라서 폐렴구균 염색체 DNA를 *ClaI*으로 절단하고 agarose gel 전기영동을 실시하여 3-4 kb의 DNA band를 agarose gel에서 잘라내어 DNA를 분리 정제하여 같은 제한효소로 절단된 pBluescript SK(-)에 삽입한 후 대장균에 형질전환시키고 얻어진 클론을 이용하여 *in situ* colony hybridization을 실시하였으나 hybridization되는 clone이 없었다. 이때 사용된 클론의 수는 폐렴구균 genome 크기의 6 배에 해당되는 많은 숫자였다. 따라서 λ ZAP II phagemid DNA(Stratagene, La jolla, CA)를 이용하여 평균 9 kb의 DNA를 함유하는 genomic DNA library를 작성한 후 재차 *in situ* colony hybridization을 실시하였으나 hybridization 되는 clone을 얻는데 실패하였다. 즉 *clpL* promoter를 함유하는 clone이 대장균 vector에서 매우 불안정함을 확인하였으며 이런 불안정성은 이미 다른 여러 폐렴구균 유전자에서도 보고되었다(Dillard와 Yother 1991; Stassi와 Lacks 1982). 따라서 The Institute for Genomic Research(TIGR)에서 완성한 병원성 *S. pneumoniae* type 4 균주의 genomic sequence를 이용하여 *in silico* chromosomal walking을 실시하여 완전한 *clpL* 유전자의 염기서열을 확보하였다. *clpL* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 2103 bp의 염기로 구성되어 있으며 이로부터 701개의 아미노산(분자량 77,699 dalton), 등전점(pI) 4.99의 단백질을 암호화하는 것으로 추정되었다. *clpL* 유전자의 upstream 부분의 -35(TTGAAA)와 -10(AATAGT)에서 sigma A type promoter sequence가 발견되었으며 *dnaK* 및 *groEL* operon에 존재하는 repressor binding site, CIRCE는 존재하지 않았다(결과제시 안함).

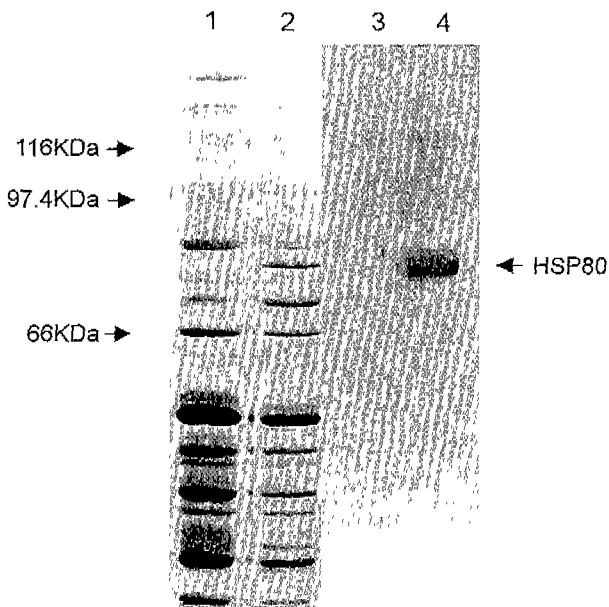


Fig. 1. Sequence alignments of *S. pneumoniae* Clp (SPclpL), bovine Clp-like protein (*Bos taurus*), *L. lactis* ClpL (LLclpL), and *S. pneumoniae* ClpC (SPclpC). The one letter symbol is used. The ATP consensus sites are indicated by Part A. Characters that are shaded in gray indicate the conserved sequence between *S. pneumoniae*, *L. lactis* and bovine.

ClpL의 아미노산 서열비교

BLAST search 하였을 때 *clpL*의 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열은 Clp family member와 높은 유사성을 나타내어 121번(GDAGVGKT)과 451번(GSTGVGKT) 위치의 아미노산에 2개의 잘 보존된 ATP-binding region(p-loop)을 갖고 있었으며 bovine Clp-like protein과 *L. lactis* ClpL 과 각각 76% 및 59% 같았으며(identity) 88% 와 76% 의 유사성(similarity)을 나타내었다(Fig. 2). 또한 *L. lactis* ClpE와 69%, *B. subtilis* ClpE 및 *M. tuberculosis* ClpC와 66%, *B. subtilis* MecB와 65%, *L. lactis* ClpC 와는 63%, *E. coli* ClpB와는 60%의 유사성을 나타내었다. 폐렴구균의 ClpL ATPase는 다른 세균의 Clp ATPase 보다 짧은 variable leader sequence를 갖고

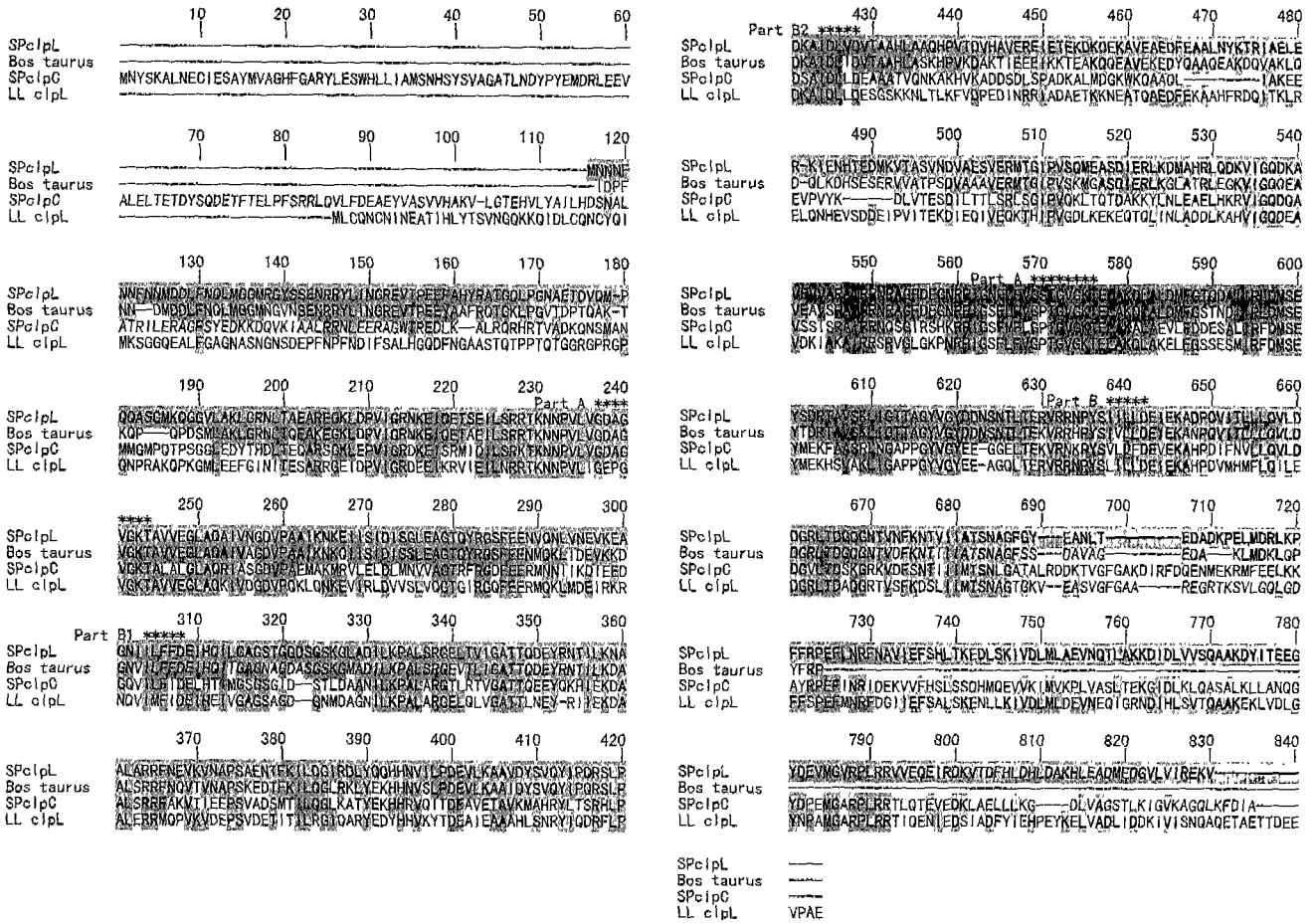


Fig. 2. Induction of *S. pneumoniae* ClpL after heat shock at 42°C. Exponentially growing cells were exposed for 30 min after a shift from 30 to 42°C. Proteins separated by 10% SDS-PAGE were stained with 0.1% Amido black solution [A]. Lanes 1 and 3, non-heat-shocked lysate; lanes 2 and 4, heat-shocked lysate. Immunoblot of cellular proteins separated by 10% SDS-PAGE was reacted with anti-pneumococcal heat shock protein p84 antibody [B].

있었다(Fig. 2). N 말단 아미노산 11-18 번의 8개 아미노산은 소(bovine)의 Clp-like protein 과 *L. lactis* ClpL에서도 관찰된 잘 보존된 아미노산 서열로서 아마도 새로운 기능을 갖고 있을 것으로 추정된다. 아미노산 535-541번(ITLLLQV)에는 transmembrane segment로 추정된다. ClpL 아미노산 N 말단에는 분비되는 단백질에서 발견되는 hydrophobic signal sequence가 있었으며 아미노산 11번과 12번 사이에 절단부위(·NM-DD·)로 추정되는 서열이 관찰되었다(Fig. 2).

폐렴구균 ClpL의 대량발현

폐렴구균 clpL을 함유한 대장균에 IPTG를 첨가하지 않았을 때는 ClpL이 유도되지 않았으나(Fig. 3, lane 1) IPTG를 100 mM 첨가하였을 때는 ClpL이 대량 유도되었다(Fig. 3 lane 2). 대량 발현된 ClpL을 nickel column chromatography를 실시하여 100 mM의 imidazole을 함유하는 용액으로 elution 하였을 때 ClpL만이 분리되었다(Fig. 3, lane 3).

폐렴구균 ClpL과 다른 Clp member와의 유사성

폐렴구균 DnaK가 항원성이 높고(Hamel 등, 1997) 폐렴구균 DnaK 항체가 인간 단백질과 반응하지 않았으며(Kim 등, 1998) 백신 후보물질로 평가되고 있으므로(세계특허 WO 9640928 A1) ClpL 단백질이 다른 생물체의 Clp 유사체와 유사한지 확인하기 위해 다른 세균 또는 고등 생물체의 세포 용해액과 immunoblot을 실시하였다. Gram-양성 균인 *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. pyogenes*의 Clp 유사체와 반응하였으나, *E. coli*, *S. aureus* 및 인간 HeLa cell의 세포 단백질과는 반응하지 않았다(Fig. 4).

폐렴구균에서 발현되는 ClpL이 대장균에서 발현되는 ATP-dependent protease ClpA, HslU, HslV, ClpP와 유사성이 있는지 확인하기 위하여 대장균 ClpA, HslU, HslV, ClpP에 대해 만들어진 polyclonal antibody를 사용하여 immunoblot을 실시하였다. 대장균 ClpA 항체를 반응시켰을 때 Fig. 5에서와 같이 single band로 폐렴구균의 Clp 유사체와 반응하였으며 반응한 폐렴구균 ClpA 유사체는 대장균

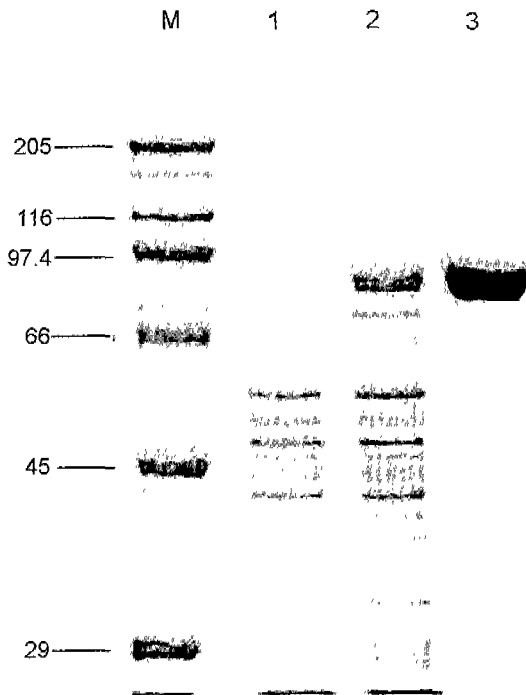


Fig. 3. Overexpression of ClpL in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Proteins were analyzed by SDS-PAGE on a 10% PAGE gel and Coomassie blue-stained. Lanes 1 and 2, total cellular proteins from uninduced and induced cells, respectively. Lane 3, 94-kDa fusion protein purified by affinity chromatography on His-Bind metal chelation resin.

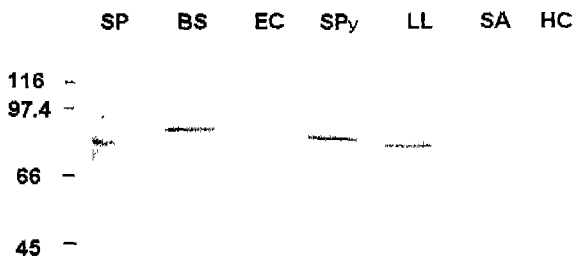


Fig. 4. Immunological cross-reactivity of anti-pneumococcal Clp ATPase with other organism's cell lysates. Western blot of heat-shocked cells lysates separated by SDS-PAGE was probed with polyclonal antibody to pneumococcal Clp ATPase. Lane 1, *S. pneumoniae* (SP); Lane 2, *B. subtilis* (BS); Lane 3, *E. coli* (EC); lane 4, *S. pyogenes* (SPy); lane 5, *L. lactis* (LL); lane 6, *S. aureus* (SA); lane 7, human HeLa cell (HC).

과는 대조적으로 정상온도에서는 거의 발현되지 않지만 열 충격에 의해 발현이 현저히 증가되었다. 그러나 폐렴구균 ClpL에 대한 항체가 대장균 단백질과는 전혀 반응하지 않았으므로 대장균 ClpA 항체와 반응한 폐렴구균 ClpA 유사체는 폐렴구균 ClpL과는 다른 ClpA임을 제시하고 있다. 대장균 HslV 항체는 폐렴구균 단백질과 반응하였으나 대장균 HslV 보다는 크기가 작았다(Fig. 5). 그러나 대장균의 ClpP 또는 HslU 항체는 폐렴구균 단백질과 전혀 반응하지

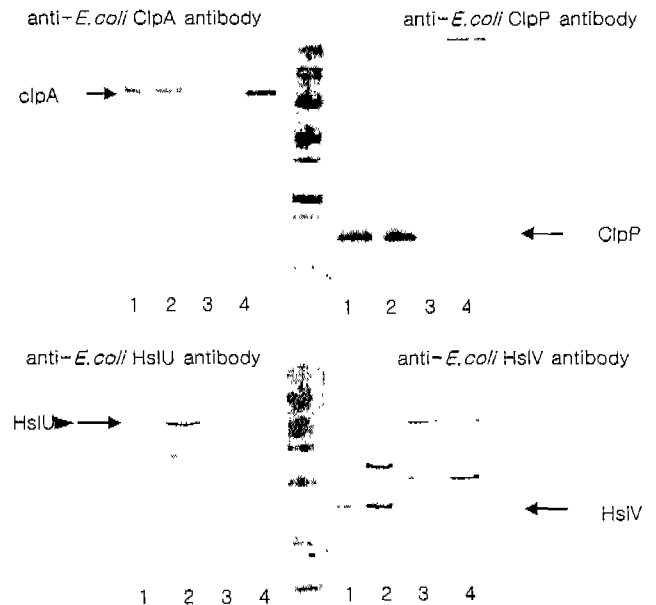


Fig. 5. Immuno blot analysis of cell lysates from *E. coli* and *S. pneumoniae* after heat shock. Lane 1: 30°C culture of *E. coli*; lane 2: heat shocked (at 42°C for 30 min) *E. coli*; lane 3: 30°C culture of *S. pneumoniae*; lane 4: heat shocked (at 42°C for 30 min) *S. pneumoniae*.

않았으며 이런 특징은 Clp family에 속하는 단백질들이 높은 보존성을 갖고있음을 고려할 때 특이한 현상이다.

또한 폐렴구균 배양액에 여러 가지 약물(indomethacin 0.1 mg/ml, aspirin 0.1 mg/ml, phenobarbital 0.3 mg/ml) 들을 첨가한 후 ClpL 단백질이 유도되는지를 SDS-PAGE 및 immunoblot analysis를 실시하였으나 전혀 유도되지 않았다(결과제시 안함).

폐렴구균 ClpL의 백신효과

폐렴구균 ClpL 항체가 인간 및 대장균 단백질과 반응하지 않았으므로 백신효과를 측정하였다. 폐렴구균 3700 colony forming unit를 복강 내에 투여했을 때는 대조군과 ClpL을 투여한 실험군에서 생존시간을 차이가 없었으나 폐렴구균 37,000 colony forming unit를 복강 내에 투여했을 때는 평균생존시간이 대조군은 35 ± 5 시간이지만 ClpL을 투여한 실험군에서는 39 ± 5 시간으로 약한 방어효과가 있었으나 유의성은 없었다(결과 제시 안함).

고 찰

모든 생물체는 환경 stress에 대응하여 일련의 유전자들을 발현시켜 적응하고 있으며 이때 생성되는 열충격단백질들은 생물체 간에 높은 유사성을 나타내고 있다(Craig 등, 1993; Georgopoulos와 Welch, 1993; Gross, 1996; Lindquist와 Parsell, 1993). 그러나 각 생물체마다 열충격단백질의

발현을 유도하는 온도 조건은 각 생물체의 최적온도와 밀접한 관계가 있다. 즉 광범위한 온도에서 자라는 개체는 최적온도보다 10~15°C 높은 온도에서 최대 열충격반응이 나타나며 좁은 온도 범위에서 성장하는 개체는 최적온도보다 5°C 높은 온도에서 최대 열충격반응이 일어난다(Lindquist, 1986). 폐렴구균의 최적 성장 온도 조건은 37°C 이지만 30→37°C로 열충격을 가하더라도 열충격단백질 GroEL과 DnaK가 유도되었으나 p84는 30→40°C의 고온으로 열충격을 가했을 경우에만 유도되었다(Choi 등, 1999). 본 연구에서 확인된 ClpL로 확인된 p84는 30→42°C로 열충격을 가할 때에만 유도되고 정상온도에서는 검출되지 않을 정도로 전혀 발현되지 않았다(Fig. 1).

Hsp100 family는 nucleotide binding domain(NBD)을 두개 함유하고 있는 Class I과 하나만 함유하고 있는 Class II로 구분된다. Class I에 속하는 ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, 및 Hsp104 등은 NBD1과 NBD2 사이의 중간에 있는 spacer의 크기에 따라 ClpA, B, C, D로 분류된다. Class I NBD sequence의 높은 보존성 때문에 서로 다른 subfamily에 속하는 대장균의 ClpA와 yeast의 Hsp104 조차도 51%의 유사성을 나타내며 여러 가지 생리작용에서도 유사한 기능을 나타낸다. 대장균의 Clp는 ClpA(83 kDa)와 ClpP(21.5 kDa)의 두 component로 구성되어 있으며 ClpA는 ClpP 및 기질인 unfolded protein이 존재할 때 ATPase 활성이 증가되어(Grimaud 등, 1998) ATP 존재 시에 protease 활성을 갖고 있는 ClpP가 기질을 가수분해하도록 촉진시킨다(Schirmer 등, 1996; Schirmer 등, 1998). 즉 단백질 가수분해에서 ClpA는 기질의 구조를 변화시켜 pretease인 ClpP가 쉽게 접근할 수 있도록 하여 serine protease인 ClpP가 FAPHMALVPV 서열을 갖고 있는 casein 및 다른 단백질들을 인식하여 Met과 Ala 사이를 절단하여 작은 peptide로 분해한다. 그러나 ClpB는 열로 손상된 unfolded protein을 가수분해하지 않고 원래상태로 회복(refolding)시키는 것을 촉진시킨다. 폐렴구균 ClpL은 두 개의 NBD를 갖고 있으므로 Class I에 속하는 hsp100 member로 예상되며 ClpL 단독으로 protease 활성을 나타내지 않고 ClpP가 존재할 때만 활성을 나타낼 것으로 예상된다.

clpA, clpB 및 clpC를 포함한 clp 유전자들은 ORF 내부에 또 다른 번역시작점(internal translation signal)이 존재하여 N 말단이 절단되어 생성된 polypeptide가 clp ATPase 활성을 저해하는 것으로 추정되고 있다(Seol 등, 1994). 따라서 폐렴구균 clp 유전자가 ORF 내에 또다른 번역시작점을 갖고 있는지 확인하기 위해 염기서열분석과 immunoblot 분석을 하였다. 폐렴구균의 세포 용해액에 ClpL 항체와 immunoblot을 실시하였을 때 84 kDa 위치에 하나의 단백질 band가 관찰되었으므로 폐렴구균 ClpL은 대

장균 clpA 또는 clpB 처럼 ORF 내에 또 다른 번역시작점이 있어서 150개의 아미노산이 탈락된 polypeptide가 생성되는 것과는 매우 다른 양상을 나타내었다(Seol 등, 1994). 열충격을 가한 폐렴구균 세포 용해액과 ClpL 항체를 반응시켰을 때 *S. pyogenes*와 *L. lactis*도 하나의 band만이 관찰되었다. 그러나 폐렴구균에서 열충격을 가하지 않았을 때는 열충격단백질 DnaK나 GroEL과는 다르게 ClpL은 거의 검출되지 않았다(Fig. 1).

폐렴구균 열충격단백질 중에서 DnaK는 항체생성을 유도할뿐만 아니라(Hamel 등, 1997) 폐렴구균 DnaK 항체는 대장균, *Staphylococcus aureus*, 인간 세포주의 세포용해액과 반응하지 않았서(Kim 등, 1999) 백신후보물질로 대두되고 있다. 본 연구결과 폐렴구균 ClpL 항체의 반응성을 측정하였을 때 대장균, *Staphylococcus aureus*, 인간 세포주의 세포용해액과 반응하지 않았으므로 폐렴구균 DnaK 항체와 같은 반응양상을 나타내었다. 따라서 ClpL의 백신효과를 측정하였으나 경미한 생명연장효과만 있었을 뿐 백신으로서의 방어효과는 없었다.

ClpL의 작용기전에 대한 연구는 전혀 보고된 바 없으므로 본 연구결과는 ClpL의 세포 내 기능, 즉 단백질의 분해 및 조립(chaperone 기능), thermotolerance, 뿐만 아니라 폐렴구균의 병원성, 항생제에 대한 저항성에 발현에서 ClpL이 어떤 기능을 수행하는지 규명하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 성균관대학교의 1999년도 삼성학술연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F., Verhoef, J. and Snippe, H. (1990). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev.* **59**, 591-603.
- Buchmeier, N. A. and Heffron, F. (1990). Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science.* **248**, 730-732.
- Choi, I. H., Shim, J. H., Kim, S. W., Kim, S. N., Pyo, S. N. and Rhee, D. K. (1999). Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Immunol.* **43**(8), 807-812.
- Craig, E. A., Gambill, B. D., and Nelson, R. J. (1993). Heat shock protein: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 402-414.
- Dillard, J. P. and Yother, J. (1991). Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequence cloned into *Escherichia coli*: Effect of promoter strength and transcription terminators. *J. Bacteriol.* **173**, 5105-5109.
- Georgopoulos, C. and Welch, W. J. (1993). Role of major heat

- shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-635.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C. and Maurizi, M. R. (1998). Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent protease, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* **273**, 12476-12481.
- Gross, C. A., Neidhardt, F. C. and Curtiss III, R. (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology*. Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E.(ed). vol. 1. p408-433. ASM press., Washington, D. C.
- Hamel, J., Martin, D. and Brodeur, B. B. (1997). Heat shock response of *Streptococcus pneumoniae*: identification of immunoreactive stress proteins. *Microb. Pathog.* **23**, 11-21.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Homuth, G., Masuda, S., Mogk, A., Kobayashi, Y., and Schumann, W.(1997). The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* in heptacistronic. *J. Bacteriol.* **179**, 1153-1164 .
- Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B., and Wilfert, C. M. (1988). In *Zinsser Microbiology*, p368-377, Prentice-Hall Inc., East Norwalk, CT.
- Kaufmann, S. H. E., and Schoel, B. (1994). Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C.(ed) p495-532, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Kaufmann, S. H., Schoel, B., van Embden, J. D., Koga, T., Wand-Wurtenberger, A., Munk, M. E. and Steinhoff, U. (1991). Heat shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infection. *Immunol. Rev.* **121**, 67-90.
- Kim, S. W., Choi, I. H., Kim, S. N., Kim, Y. H., Pyo, S. N., and Rhee, D. K. (1998). Molecular cloning, expression, and characterization of *dnaK* in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 217-224.
- Kim, S. N., Kim, S. W., Pyo, S. N., and Rhee, D. K. (2001). Molecular cloning and characterization of *groESL* operon in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Cells.* **11**(4), *in press*.
- Li, M., and Wong, S. L. (1992). Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3981-3992 .
- Lindquist, S. (1986). The Heat-Shock Response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
- Lindquist, S., and Parsell, A. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degredation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
- Mager, W. H., and De Kruijff, A. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59**(3), 506-531.
- Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence gene determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**, 1-7.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F. X., and Schumann, W. (1997). The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **16**, 4579-4590.
- Neidhardt, R. C., and Van Bogelen, R. A. (1987). In "*E. coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*". Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E.(eds), p.1334-1345. ASM press, Washington, D. C.
- Pallares, R., Linares, J., Vadillo, M., Cabellos, C., Manresa, F., Viladrich, P. F., Martin, R., and Gudiol, F. (1995) Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N. Engl. J. Med.* **333**(8), 474-480.
- Sanches, Y. J., Taulien, K. A., Borkovich, K. A., and Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**, 2347-2364.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends In Biochem. Sci.* **21**, 289-296.
- Schirmer, E. C., Queitsch, C., Kowal, A. S., Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1998). The ATPase activity of hsp104, effects of environmental conditions and mutations. *J. Biol. Chem.* **273**, 15546-15552.
- Schmidt, A., Schiesswohl, M., Volker, U., Hecker, M., and Schumann, W. (1992). Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3993-3999.
- Schulz, A., and Schumann, W. (1996). *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.* **178**, 1088-1093.
- Seol, J. H., Yoo, S. J., Kim, K. I., Kang, M. S., Ha, D. B., and Chung, C. H. (1994). The 65-kDa protein derived from the internal translational initiation site of the *clpA* gene inhibits the ATP-dependent protease Ti in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**(47), 29468-29473.
- Siber, G. R. (1994). Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines. *Science.* **265**, 1385-1387.
- Stassi, D. L., and Lacks, S. A. (1982). Effects of strong promoter on the cloning in *E. coli* of DNA fragments from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **18**, 319-328.
- Tuomanen, E. (1999). Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(1), 35-39.
- Wetzstein, M., and Schumann, W. (1990). Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* gene homologous to the *grpE* gene of *E.coli* located immediately upstream of the *dnaK* gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1289.
- Wetzstein, M., Volker, M. U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiessvohl, M., Herget, C., Hecker, M., and Schumann, W. (1992). Cloning, sequencing and Molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3300-3310.
- Yuan, G., and Wong, S. (1995). Isolation and characterization

- of *Bacillus subtilis* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J. Bacteriol.* **177**, 6462-6468.
- Yura, T., Nagai, H., and Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 321-350.
- Zeilst-Ryalls, J., Fayet, O., and Georgopoulos, C. (1991). The universally conserved GroE (HSP60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 301-325.
- Zuber, U., and Schumann, W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 1359-1363.
- 최인화, 심재현, 김승환, 김수남, 표석능, 이동권. (1998). 폐렴구균 열충격단백질 GroEL 의 특성. *한국미생물학회지.* **34**, 43-50.