

## 폐렴구균 ClpP 의 면역 교차 반응과 방어효과

권혁영 · 이선숙 · 이순복 · 표석능 · 이동권\*

성균관대학교 약학대학

(Received December 27, 2003; Revised February 12, 2004)

### Cross-reactivity and Protective Immunity of *Streptococcus pneumoniae* ClpP

Hyog-Young Kwon, Sun-Suk Lee, Soon-Bok Lee, Suhk-Neung Pyo and Dong-Kwon Rhee\*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 4440-746, Korea

**Abstract** — ClpP is a stress-inducible protein and proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease in prokaryotes and eukaryotes. Although its physiological roles in bacterial virulence were widely studied in various organisms, including *Streptococcus pneumoniae*, until now the immunological effect has not been investigated. Here, we have examined the cross reactivity of *S. pneumoniae* ClpP antibody with other organisms's cell lysate proteins. Although the protein sequence of *S. pneumoniae* ClpP was highly conserved among various organisms including human, the antibody raised by *S. pneumoniae* ClpP was not cross-reacted with other organism's cell lysates, which were *Saccharomyces cerevisiae*, human lung A549 cell, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, and *Salmonella typhi*. It was only reacted with *S. pneumoniae* and *Lactobacillus thermophilus*. Thus we examined the immunoprotective effect of ClpP by immunizing mice with the purified ClpP. The mean survival time of mouse was significantly increased with the ClpP immunization. These results suggest that *S. pneumoniae* ClpP could be used as a vaccine candidate for prevention of *S. pneumoniae* infection.

**Keywords** □ *Streptococcus pneumoniae*, ClpP, immunity, cross-reactivity

폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 정상인의 비인두부(nasopharynx)에서 30~50% 까지 검출되는 세균으로서 폐렴, 류마티스성 심장병, 수막염, 중이염 등의 원인균이며<sup>13)</sup> 항생제 치료 및 23 가 다당류 백신에도 불구하고 약 5~10%의 치사율을 나타내고 있다.<sup>2)</sup> 특히 유아나 노약자의 경우에는 더 높은 사망율을 나타내어 전세계적으로 매년 400만명 이상이 폐렴으로 사망하고 있으며<sup>33)</sup> 폐렴구균의 항생제 내성이 높은 Strain에서는 폐렴구균 질환의 사망률이 23% 에 이르고 있다.<sup>30)</sup> 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 strain으로 존재하여 Surface Choline과 Adhesin인 CbpA를 다량 발현시키고 다당류 Capsule 층이 얇지만, 일단 혈액 안으로 침투하면 Opaque strain으로 바뀌면서 Surface Choline과 CbpA는 적게 발현되고 Capsule 층이 두꺼워진다.<sup>34)</sup>

또한 폐렴구균이 코 점막(30~42°C)<sup>18)</sup> 에서 혈액또는 수막(37°C)으로 침투할 때 온도의 변화를 겪게되는데 이로인해 상당히 보존된 열충격 단백질(Heat shock proteins, HSPs)이 급격히 유도된다.<sup>27)</sup> 고열이나 에탄올, 산화적 스트레스, 또는 중금속에 의한 노출로 유도되는 HSPs는 박테리아가 유해한 환경으로부터 생존할수 있도록 돕기때문에<sup>27)</sup> 열충격 반응에 대한 철저한 이해는 유해한 환경에 적응하는 폐렴구균에 대한 유용한 정보를 제공해줄수 있을것이다.

HSP은 모든 생물체에서 매우 보편적으로 존재하며 일부 heat shock protein은 스트레스 환경 뿐만 아니라 정상 상태에서도 세포의 항상성 유지와 대사 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> HSP의 일차적 기능은 높은 온도나 환경적 스트레스와 같은 나쁜 성장 조건으로부터 세포를 보호하여 세포가 생존할 수 있도록 하는 것이다.<sup>19)</sup> 이들 HSP들은 새롭게 합성되어 지는 단백질이 제대로 접어지거나 전이(translocation) 되도록 유도하고, 또한 proteolytic activity를 이용하여 비정상적인 protein을 분해 시키는 역할을 한다.<sup>8)</sup> HSP는 크기에 따라서 hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, 및 small hsp family 로 분류한다.<sup>22)</sup> 이중에서 hsp100/Clp family 단백질은 높은 온도에 대한 내성

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-290-7707 (팩스) 031-290-7727  
(E-mail) dkrhee@skku.edu

(thermotolerance), 세포내 기질의 분해(proteolysis) 촉진 및 transcription 조절 등 다양한 기능을 담당한다.<sup>32)</sup> 이 family에서 처음 그 특성이 밝혀진 것은 *E. coli* ClpA이며, ClpA는 ATP-dependent protease의 구성 성분으로서 *in vitro*에서 ClpP protease와 복합체(Ti, ClpAP)를 형성하여 casein을 분해하는 능력(caseinolytic protease) 으로부터 유래하였다.<sup>32)</sup> ClpA, ClpB, ClpC, ClpX, ClpY 단백질은 원핵 생물과 진핵 생물에 공통적으로 발견되는 단백질 family이며<sup>32)</sup> ClpP와 연합하여 특정 단백질의 분해에 관여한다.<sup>8)</sup> ClpP 단독으로는 peptidase 활성만을 나타내지만, Clp family 단백질과 연합하여 생성된 Clp complex는 serine protease 활성을 갖는다.<sup>20)</sup>

세균의 병원성 및 독성 유전자의 발현은 온도, 삼투압, pH, 철 또는 아미노산 농도등의 변화와 같은 stress에 영향을 받고 있으며<sup>21)</sup> 세균이 macrophage에 포획되면 분비된 산화효소 및 산화적 stress 물질들 때문에 HSP를 발현시키게 된다.<sup>1,5)</sup> 따라서 *S. pneumoniae*의 pathogenesis에서 HSP의 역할을 규명하는 것은 질병의 치료와 예방에 매우 중요하다. 특히 세균의 Protease 는 세균 질환을 크게 악화시킬 수 있으므로<sup>24)</sup> Protease 활성을 갖고 있는 ClpP 단백질의 기능을 규명하는 것은 폐렴구균의 독성을 이해하거나 치료하는데 중요한 의미를 갖고 있다. 현재 폐렴구균의 DnaK 가 항체생성을 유도하며<sup>10)</sup> 폐렴구균 DnaK 항체는 인간 단백질과 반응하지 않으므로<sup>14)</sup> 백신 후보물질로<sup>9)</sup> 연구가 진행중 이다. 그러나 ClpP 대해서는 보고된바 없으므로 본 연구에서는 폐렴구균의 ClpP 항체가 다른 생물체의 단백질과 유사한지 immunoblot 분석을 하였으며 폐렴구균의 ClpP 항체가 대장균, 고초균, 인간 폐암세포주 단백질등과 전혀 반응하지 않았다. 또한 분리정제된 ClpP의 백신 효과를 확인하여 백신으로서의 개발 가능성을 확인하였다.

## 실험방법

### 균주 및 배양

다당류 capsule이 없는 비병원성 폐렴구균(R type) *Streptococcus pneumoniae* CP1200<sup>23)</sup> 균주는 CAT 배지(Casitone 1%, Tryptone 0.5%, NaCl 0.5%, Yeast Extract 0.1%, 0.175 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 및 glucose 0.2%)에서, 다당류 capsule을 함유하는 병원성 폐렴구균 D39(type 2)<sup>3)</sup>와 임상에서 분리한 Spn1049 균주는 0.5% yeast extract를 첨가한 Todd-Hewitt broth 배지에서 배양하였다. *Saccharomyces cerevisiae*는 glucose가 2% 포함된 YNB 배지에서, *Lactobacillus thermophilus*는 MRS 배지에서, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Samonella typhi*, *E. coli*는 Nutrient 배지에서, A549는 10% FBS와 2% penicillin streptomycin 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다.

### 폐렴구균 ClpP의 대량발현

처음에는 N 말단에 histidine 이 표지된 ClpP를 대량발현하여 분리 정제를 하였으나 ClpP 자체에 의해 histidine tag과 ClpP 사이의 연결부위가 분해되는 현상을 보였기에 나중된 사용된 ClpP는 C 말단에 histidine이 표지된 ClpP를 분리 정제하여 사용하였다. 우선 N 말단에 histidine이 표지된 ClpP를 대장균에서 대량 발현시키기 위해서 591 bp의 *clpP* 유전자를 *EcoRI* 자리를 삽입한 forward primer(5'-CGA ATT CAT GAT TCC TGT AGT TAT-3') 및 *SacI* 자리를 삽입한 reverse primer(5'-CGA GCT CTT AGT TCA ATG AAT TGT TG-3')를 이용하여 염색체 DNA를 PCR로 증폭시킨 후 *KpnI* 및 *SacI*으로 절단된 pET32(a) (Novagen)에 삽입하여 recombinant plasmid pClpP (pKHY202)를 작성하였다. C 말단에 histidine 이 표지된 ClpP를 대장균에서 대량 발현시키기 위해서는 *NdeI* 자리를 삽입한 forward primer(5'-CCG GCA TAT GAT TCC TGT AGT TAT TGA AC-3') 및 *XhoI* 자리를 삽입한 reverse primer(5'-CCG GCT CGA GGT TCA ATG AAT TGT CC-3')를 이용하여 염색체 DNA를 PCR로 증폭시킨 후 *NdeI* 및 *XhoI*으로 절단된 pET30(a) (Novagen)에 삽입하여 recombinant plasmid pClpP(pBCY202)를 작성하였다. 이들 plasmid을 대량 발현시키기 위해 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 얻은 클론을 550 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 ClpP를 분리하였다.

### ClpP 단백질의 항체 생산

분리 정제된 ClpP를 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 (ELISA) 방법을 이용하여 항체의 titer 를 결정하였다.

### Immuno blot analysis

폐렴구균의 ClpP가 다른 생물체 단백질과의 유사성을 확인하기 위해 anti-ClpP antibody와 immunoblot을 실시하였다. 폐렴구균과 여러 생물체의 용해액을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 anti-

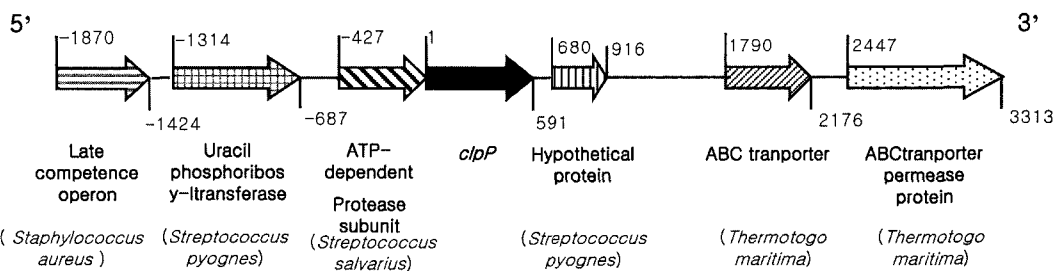


Fig. 1 - Physical map of the *S. pneumoniae* *clpP* locus.

ClpP antibody와 immunoblot한 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 blocking 시킨 후 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 용액에서 rabbit anti-ClpP 항혈청과 실온에서 1시간 동안 천천히 흔들어 주면서 반응시켰다. 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.

**ClpP 단백질을 이용한 생쥐의 면역화와 혈청 분석**

ClpP 단백질을 이용한 생쥐의 면역화는 이미 발표된 방법대로<sup>28)</sup> 실시하였다. 5~6주령의 암컷 CBA/N 생쥐(군당 12마리)를 3군으로 나누어 AIPO<sub>4</sub> 단독, 유전적으로 약독화시킨 pneumolysin (PdB)와 AIPO<sub>4</sub>, ClpP와 AIPO<sub>4</sub>를 각각 복강주사하여 면역화시켰다. 생쥐에게 각각의 단백질 항원 10 ug을 12~14일 간격으로 3회 주사하였으며 세 번째 주사 1주 후에 안구채혈하여 혈청을 얻었다. 각각의 혈청을 군단위로 모아서 각각의 항원에 대한 ELISA를 실시하였으며 또한 폐렴구균 용해액으로 immunoblot를 하였다.

**백신효과 측정**

각각의 단백질 항원으로 면역화시킨 생쥐에게 복강으로 type2 starin(D39)를 감염시켰다. 감염시키는 마지막으로 면역화시키고 나서 2주 후에 실시하였다. 감염시키기전에 폐렴구균을 혈액한 천 배지에서 37°C에서 12~16시간 배양한 후 10%(vol/vol) 말혈청을 함유한 meat extract broth에 접종하였다. 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 생쥐 한 마리당 7.5×10<sup>5</sup> CFU를 감염시켰다. 감염후 처음 7일 동안은 4시간 간격으로 확인하였으며 21일까지는 매일 확인하여 생쥐 생존시간을 기록하였다. 각 군사이의 중간 생존시간 차이는 t-test로 분석하였다.

**실험결과**

**clpP 주변 유전자의 확인과 ClpP 단백질의 아미노산 서열비교**  
National Center of Biotechnology Information(NCBI, U.S.)에서 제공하는 BLAST search를 이용하여 *clpP*와 인접한 유전자를 확인하였으며 또한 다른 생물의 ClpP 단백질과 유사성을 확인하였다(Fig. 1과 2). *clpP* 유전자의 Open reading frame 앞쪽에 α<sup>A</sup> 형태의 promoter가 발견되었으며 또한 class III heat shock protein regulator인 CtsR이 결합하는 자리(A/GGTCAAANANA/GGTCAAA)가 promoter 자리와 중첩되어 존재하였다. 이것으로 보아 폐렴구균의 *clpP* 유전자는 positive regulator로 δ<sup>A</sup> 조절을 받으나 negative regulator로 CtsR에 의해 억제되는 것으로 추정된다. BLAST search 하였을 때 *clpP*의 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열은 다른 생물의 ClpP member와 높은 유사성을 나타내었다. 특히 *Streptococcus salivarius*와 *Streptococcus agalactiae*의 ClpP 단백질과는 각각 88% 및 87% 일치하였으며(identity) 91% 및 92%의 유사성(similarity)을 나타내었다(Fig. 2). 또한 *L. lactis* ClpP와 89%, *Enterococcus faecalis* ClpP와 81%, *Staphylococcus aureus* ClpP와 79%, *B. subtilis* ClpP와 75%의 유사성을 나타내었다. 특히 *Homo sapiens*와는 70%의 유사성을 나타내었다.

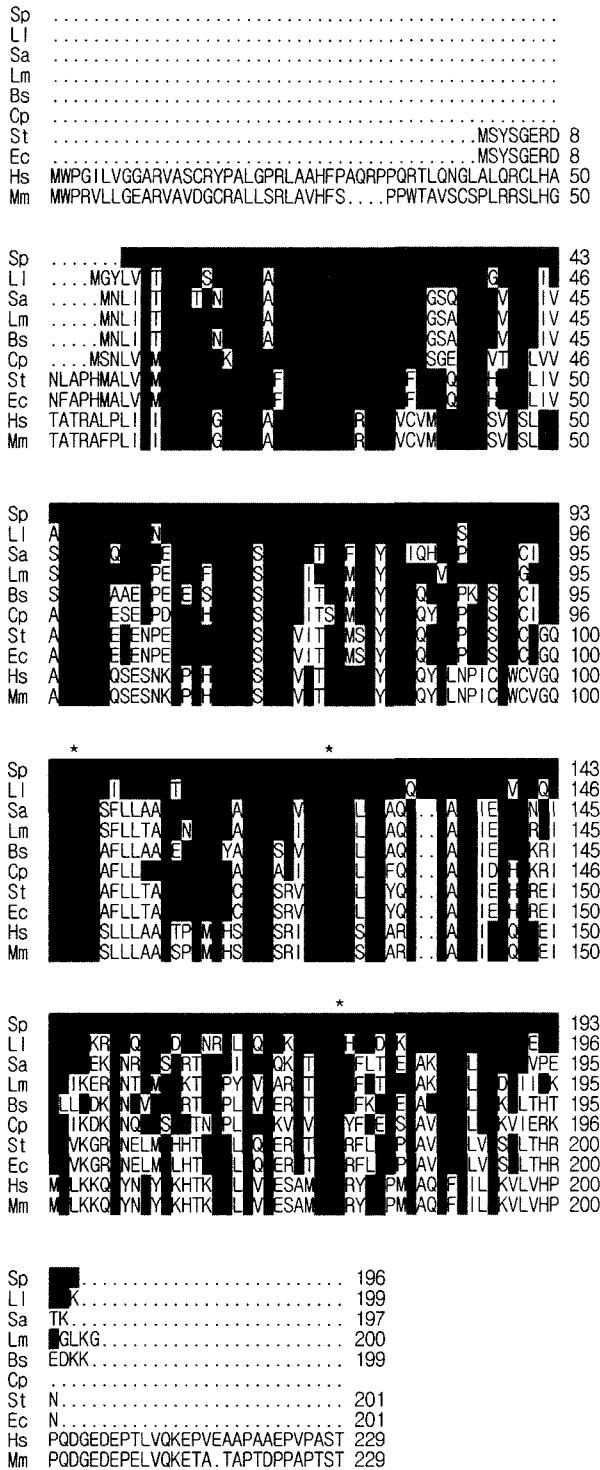
ClpP 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과 전체적으로 높은 수준의 유사성을 나타내었으며(Fig. 2) 특히 serine protease의 활성부위로 추정되는 serine-96, histidine-121, aspartate-172 잔기 부분이 매우 높은 수준의 보존성을 나타내었다.

**폐렴구균 ClpP의 대량발현 및 순수분리**

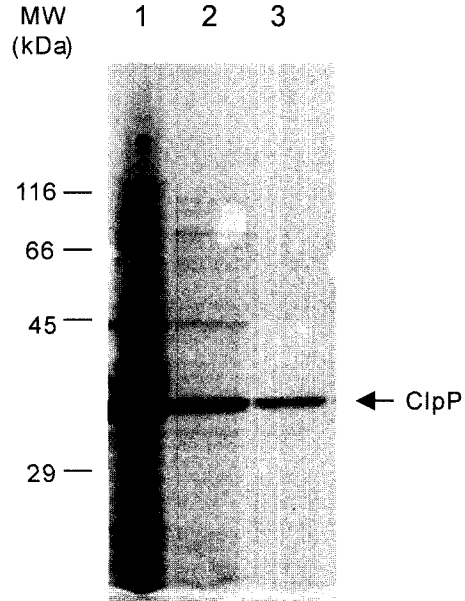
폐렴구균 *clpP* 유전자를 함유한 대장균에 IPTG를 첨가하여 다량의 ClpP를 유도한 후(Fig. 3) nickel column chromatography를 실시하여 250 mM의 imidazole을 함유하는 용액으로 elution하였을 때 ClpP 만이 분리되었다(Fig. 3).

**폐렴구균 ClpP와 다른 ClpP member와의 유사성**

현재 폐렴구균 DnaK가 항원성이 높고<sup>10)</sup> 폐렴구균 DnaK 항



**Fig. 2** – Sequence alignments of *S. pneumoniae* ClpP (Sp), *S. pyogenes* ClpP (Spy), *L. lactis* ClpL (Ll), *S. aureus* ClpP (Sa), *Listeria monocytogenes* ClpP (Lm), *B. subtilis* ClpP (Bs), *C. perfringens* ClpP (Cp), *S. typhimurium* ClpP (St), *E. coli* ClpP (Ec), *Homo sapiens* ClpP (Hs), and *Mus musculus* ClpP (Mm). The one letter symbol is used. Characters that are shaded in gray indicate the conserved sequence. \* indicates the highly conserved catalytic triad of serine protease.



**Fig. 3** – Overexpression of the *S. pneumoniae* ClpL in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Proteins were analyzed by SDS-PAGE on a 10% PAGE gel and Coomassie blue-stained. Lane 1, total cellular proteins from IPTG-induced cells; Lane 2, cell lysates applied to the His-bind resin and washed with 60 mM imidazole; Lane 3, 35-kDa fusion protein eluted with 250 mM imidazole.

체가 인간 단백질과 반응하지 않았으며<sup>14)</sup> 백신 후보물질로 평가되고 있기에<sup>9)</sup> ClpP에 대해서도 이런 가능성을 조사하였다. 우선 ClpP 단백질이 다른 생물체의 ClpP family와 유사한지 확인하기 위해 다른 세균 또는 고등 생물체의 세포 용해액과 immunoblot을 실시하였다. 예상밖으로 Gram-양성균인 *Latobacillus thermophilus*와 폐렴구균 D39 및 임상에서 분리된 폐렴구균(Spn1049)과는 반응하였으나, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* 및 인간 폐암세포주 A549의 세포단백질과는 전혀 반응하지 않았다(Fig. 4). 이결과는 폐렴구균의 ClpP 단백질이 DnaK와 같이 백신 후보물질로서의 가능성을 제시하고 있다.

**폐렴구균 ClpP의 백신효과 측정**

폐렴구균 ClpP 항체가 인간 및 대장균 단백질과 반응하지 않았으므로 ClpP의 백신효과를 측정하였다. Pneumolysin을 유전적으로 약독화한 PdB는 현재 약간의 백신효과가 있다고 보고되었기에<sup>4)</sup> 대조군으로 PdB 단백질을 사용하였다. 폐렴구균의 ClpP와 PdB 단백질을 복강으로 면역화한 생쥐로부터 인구체혈을 실시하여 이들에 대한 항체 생성여부를 폐렴구균의 세포단백질과 immunoblot을 실시하여 확인하였다. AIPO<sub>4</sub>를 가한 음성 대조군의 생쥐에서 분리된 혈장은 폐렴구균의 세포용해액 단백질과 전혀 반응하지 않는것에 비해(Fig. 5, lane 1), ClpP와 PdB 단백질



## 고 찰

현재 HSP 100/Clp protein의 연구는 그람음성균인 *E. coli*에서 가장 활발히 보고 되어지고 있으며, 그람양성균에서는 *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*와 *Listeria monocytogenes* 등에서 연구 되어지고 있다.<sup>15,25,26)</sup> 뿐만아니라 여러가지 eukaryotic cell에서 HSP 100/Clp protein과 homology를 갖는 protein들에 대한 연구가 진행 중이다.<sup>11,29)</sup> Hsp100/Clp family는 하나 또는 두개의 nucleotide binding domain을 가지고 있고 각각의 domain에는 ATP binding과 hydrolysis를 위한 Walker A, B motif를 포함하고 있다. 이와 같은 특성의 HSP100/Clp family는 AAA<sup>+</sup>(ATPase associated with a variety of cellular activities) family로 불리워진다.<sup>29)</sup> 이들 Hsp100 family는 ClpP와 결합하여 변성된 단백질을 정상으로 다시 되돌려주는 chaperone 기능을 하거나 심하게 변성된 단백질을 분해하는 단백질분해효소(serine protease)로 작용한다.<sup>32)</sup> 폐렴균에서 Clp family에 관한 연구는 주로 ClpC, ClpE 그리고 ClpL에 대해서 연구가 진행되었으나 아직까지 ClpP와 중합체를 형성하는 단백질에 대해서는 밝혀진바가 없고 다만 ClpL이나 ClpX가 이런 역할을 할 가능성이 있다고 추정되고있을 뿐이다.<sup>6)</sup>

HSP 유전자의 돌연변이로 많은 병원성 균주의 숙주 부착과 병원성에 큰 영향을 미친다. 스트레스에 의해 유도되는 ClpP serine protease가 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium의 병원성에 영향을 미치고<sup>35)</sup> *Yersinia enterocolitica*에서는 adhesion invasion locus(*ail*) 유전자의 발현을 조절한다고 보고 되었다.<sup>31)</sup> 그리고 *Listeria monocytogenes*에서는 ClpP가 세포내 기생과 병원성에 필수적이라고 보고되었다.<sup>7)</sup> 본 연구팀도 폐렴균 *clpP* 유전자의 돌연변이로 병원성이 현저히 감소하였으며 다른 독성유전자의 발현에 영향을 미친다는 것을 보고 하였다.<sup>16)</sup> 이와같이 *clpP* 유전자의 병원성에 대한 연구는 많이 이루어졌지만 본 연구에서같이 백신효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서 폐렴균의 ClpP가 다른 생물체의 ClpP와 아미노산 서열상 높은 보존성을 나타내지만 이로부터 생성된 항체는 오히려 다른 생물체의 단백질과 교차반응을 하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2와 4). 또한 ClpP로 면역화한 생쥐에서 폐렴균에 대한 방어효과가 현저함을 확인하였으며(Fig. 6), 이런 결과로 폐렴균의 ClpP가 백신 후보 물질로 이용될수 있는 가능성을 제시한다. 폐렴균 ClpL의 백신효과에 대한 본연구팀의 보고<sup>17)</sup> 이외에 Clp family에 속하는 단백질중에서 백신효과에 대한 보고는 거의 전무한 상태이다. 그 실험에서 폐렴균 3,700 colony forming unit를 복강 내에 투여했을 때는 대조군과 ClpL을 투여한 실험군에서 생존시간의 차이가 없었으나 폐렴균 37,000 colony forming unit를 복강 내에 투여했을 때 평균생존시간이 대조군은 35±5시간이지만 ClpL을 투여한 실험군에서는 39±

5시간으로 약한 방어효과가 있었으나 유의성있는 차이는 없었다.<sup>17)</sup> 이와 반면 폐렴균 7.5×10<sup>5</sup> CFU를 복강 내에 투여했을 때는 ClpP로 면역화하지 않은 대조군의 중간 생존시간은 56시간이지만 ClpP로 면역화한 실험군에서는 114.3시간으로 현저한 방어효과가 있었으며 ClpL과 비교해서도 현저한 백신 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 6).

폐렴균 감염으로 약 5~10%의 치사율을 나타내고 있으므로<sup>2)</sup> 폐렴균 질환을 예방하기 위해서는 효과적인 백신이 요구된다. 그러나 현재 사용되고있는 23가 다당류 백신은 영유아에게는 백신 효과가 매우 낮고 최근 시판되기 시작한 7가 conjugate 백신은 94가지 이상의 serotype 중 7가지 type에 대해서만 방어효과가 있고 가격이 매우 고가인 단점을 갖고 있다. 따라서 폐렴균 협막 다당류보다는 모든 폐렴균에 공통적으로 존재하는 단백질 항원을 이용한 백신 개발이 요구된다. 이런면에서 볼 때 면역성이 우수한 ClpP와 같은 단백질을 백신으로 개발하는 것은 폐렴균 질환의 예방에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2002년도 성균관대학교 해외 연구비와 2003년도 두뇌 한국 21사업(권혁영, 이선숙, 이순복)에 의해 지원되었음.

## 문 헌

- 1) Abu Kwaik, Y., Eisenstein, B. I. and Engleberg, N. C. : Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 1320 (1993).
- 2) AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F., Verhoef, J. and Snippe, H. : *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vacciness. *Microbiol. Rev.* **59**, 591 (1990).
- 3) Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarty, M. : Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137 (1944).
- 4) Briles, D. E., Hollingshead, S. K., Paton, J. C., Ades, E. W., Novak, L., van Ginkel, F. W. and Benjamin, W. H. Jr. : Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **188**(3), 339 (2003).
- 5) Buchmeier, N. A. and Heffron, F. : Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**, 730 (1990).
- 6) Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J. P. and Msadek, T.

- : Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J. Bacteriol.* **183**, 7295 (2001).
- 7) Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S. and Berche, P. : The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**, 1286 (2000).
  - 8) Gottesman, S., Wickner, S., Maurizi, MR. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**, 815 (1997).
  - 9) Hamel, J., Brodeur, B., Martin, D. and Rioux, C. : Streptococcal heat shock proteins members of the HSP70 family. WO-9640928 A1 (1996).
  - 10) Hamel, J., Martin, D. and Brodeur, B. B. : Heat shock response of *Streptococcus pneumoniae*: identification of immunoreactive stress proteins. *Microb. Pathog.* **23**, 11 (1997).
  - 11) Hattendorf, D. A. and Lindquist, S. L. : Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.* **21**, 12 (2002).
  - 12) Hunt, C. R. and Morimoto, R. I. : Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6455 (1985).
  - 13) Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert, C. M. : In Zinsser Microbiology, Prentice-Hall Inc., East Norwalk, CT. p. 368 (1988).
  - 14) Kim, S. W., Choi, I. H., Kim, S. N., Kim, Y. H., Pyo, S. N. and Rhee, D. K. : Molecular cloning, expression, and characterization of *dnaK* in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 217 (1998).
  - 15) Kruger, E., Zuhlke, D., Witt, E., Ludwig, H. and Hecker, M. : Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is auto-regulated by the stability of a repressor. *EMBO J.* **20**, 852 (2001).
  - 16) Kwon, H. Y., Kim, S. W., Choi, M. H., Ogunniyi, A. D., Paton, J. C., Park, S. H., Pyo, S. N. and Rhee, D. K. : Effect of heat shock and mutation in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71**, 3757 (2003).
  - 17) Kwon, H. Y., Kim, Y. W., Choi, H. J., Park, Y. J., Pyo, S. N. and Rhee, D. K. : Cloning and immunological characterization of the 84-kDa heat shock protein, ClpL, in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 79 (2001).
  - 18) Lindemann, J., Leiacker, R., Rettinger, G. and Keck, T. : Nasal mucosal temperature during respiration. *Clin. Otolaryngol.* **27**, 135 (2002).
  - 19) Lindquist, S. : The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151 (1986).
  - 20) Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S. H. and Gottesman, S. : ClpP represents a unique family of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **265**, 12546 (1990).
  - 21) Mekalanos, J. J. : Environmental signals controlling expression of virulence genes determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**, 1 (1992).
  - 22) Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. : Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1990).
  - 23) Morrison, D. A., Lacks, S. A., Guild, W. R. and Hageman, J. M. : Isolation and characterization of three new classes of transformation deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J. Bacteriol.* **156**, 281 (1983).
  - 24) Mottram, P. L., Han, W. R., Purcell, L. J., McKenzie, I. F. and Hancock, W. W. : Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation.* **59**, 559 (1995).
  - 25) Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M. L., Denizot, F. and Rapoport, G. : ClpP of *Bacillus subtilis* required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* **27**, 899 (1998).
  - 26) Nair, S., Milohanic, E. and Berche, P. : ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**, 7061 (2000).
  - 27) Neidhardt, F. C. and VanBogelen, R. A. : Heat shock response, In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *E. coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C., p. 1334 (1987).
  - 28) Ogunniyi, A. D., Folland, R. L., Briles, D. E., Hollingshead, S. K. and Paton, J. C. : Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**, 3028 (2000).
  - 29) Ogura, T. and Wilkinson, A. J. : AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells.* **6**, 575 (2001).
  - 30) Pallares, R., Linares, J., Vadillo, M., Cabellos, C., Manresa, F., Viladrich, P. F., Martin, R. and Gudiol, F. : Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N. Engl. J. Med.* **333**(8), 474 (1995).
  - 31) Pederson, K. J., Carlson, S. and Pierson, D. E. : The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates ail gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **26**, 99 (1997).
  - 32) Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. and Lindquist, S. : HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse

- functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289 (1996).
- 33) Siber, G. R. : Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines. *Science* **265**, 1385 (1994).
- 34) Tuomanen, E. : Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(1), 35 (1999).
- 35) Webb, C., Moreno, M., Wilmes-Riesenberg, M., Curtiss III, R. and Foster, J. W. : Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **34**, 112 (1999).