

## 국내 임상 분리주 *Streptococcus pneumoniae* KNIH1156으로부터 PspA 단백질 항원의 정제 및 면역원성 확인

정경석 · 배송미<sup>1</sup> · 이광준<sup>1\*</sup>

안산 1 대학 임상병리과, <sup>1</sup>국립보건원 세균부 호흡기세균과

국내 분리 침습성 균주 중 선별된 *S. pneumoniae* KNIH1156 (type 19F) 으로부터 폐렴구균의 병원성인자이며 항원학적으로 다양한 표면단백항원인 pneumococcal surface protein A (PspA)를 분리·정제하였다. 폐렴구균을 CDM-ET 배지에서 배양하게 되면 배지내로 PspA가 방출된다는 점과 PspA가 인간의 lactoferrin에 특이적으로 결합한다는 사실을 이용하여 CDM-ET 배지에서 *S. pneumoniae* KNIH1156을 배양한 후 배양액을 농축하여 lactoferrin affinity chromatography에 통과시켜 PspA를 분리, 정제하였다. 정제 후 anti-PspA antiserum으로 PspA를 확인하여 순수분리, 정제되었음을 확인하였으며 또한 인간의 lactoferrin과의 결합능력을 유지하고 있음을 확인하였다. 순수하게 분리하여 정제된 PspA의 면역원성을 확인하기 위하여 ICR mice에 복강주사하였을 때 LD<sub>50</sub>가 1×10<sup>7.5</sup> CFU/ml에서 1×10<sup>10</sup> CFU/ml로 약 500배 증가함을 관찰하였다. 따라서 본 실험에서 *S. pneumoniae* KNIH1156 으로부터 분리·정제한 PspA가 면역원성과 방어능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

**Key words** □ antigen, PspA, purification, *Streptococcus pneumoniae*, virulence

*Streptococcus pneumoniae* (폐렴구균)는 감염성 질환 중 발병률과 사망률이 가장 높은 폐렴(pneumonia)의 주요 원인균이다. *S. pneumoniae*는 정상인의 5-60%에 해당하는 사람들의 상기도에 상재하며 폐렴이외에도 패혈증(bacteremia), 뇌수막염(meningitis) 등의 침습성 질환 및 중이염(otitis media), 부비강염(sinusitis) 등의 질환을 유발한다(6,8).

현재 전세계적으로 *S. pneumoniae*에 의한 폐렴으로 인한 사망자가 해마다 약 60만명에 이르는 것으로 추정되고 있으며 미국 질병관리센터(CDC)의 조사에 따르면 세균성 폐렴의 50%, 뇌수막염의 50%, 패혈증의 70-90%, 중이염의 30-50%정도가 *S. pneumoniae*에 의해 발생한다고 보고하였다(4).

최근 노인연령층의 증가와 만성질환자 및 면역력 저하 환자들의 증가로 인해 *S. pneumoniae*에 의한 감염질환 발생이 증가하고 있고 또한 치료제인 페니실린에 내성을 보이는 *S. pneumoniae*가 전세계적으로 급속하게 증가, 확산되고 있어 치료에 많은 어려움을 겪고 있다. 국내의 경우 역시 페니실린 내성 *S. pneumoniae*의 비율이 70-80%에 이르고, 다제 내성 *S. pneumoniae*의 비율도 높아 항생제 치료시 간과할 수 없는 실정이다(9,15,16).

한편, 국내의 경우 90여종의 *S. pneumoniae* 혈청형 중 23종 혈청형의 헵막 다당체를 복합하여 제조한 23가 백신을 전량, 수입하여 사용하고 있다. 이들 백신은 면역성 및 방어력에서 문제점을 가지고 있음이 보고되어 있으며 또한 외국 유행형에 기초

하여 제조된 백신이기 때문에 국내 발병 유형에 적합한지 여부도 아직 확실하지 않은 실정이다. 또한 23가 헵막 다당체 백신의 단점을 해결하기 위하여 개발된 단백질 접합 백신(protein-conjugate vaccine) 역시 7종의 혈청형만이 포함되어 있어 전세계를 대상으로 범용적으로 사용하기에는 제한점이 있으며 비용면에서도 지나치게 값이 비싸다는 취약점이 있다.

오늘날 *S. pneumoniae*에 대한 예방 백신 개발은 임상분리균주에 공통적으로 존재하며 병원성을 나타내는 공통 단백질 항원을 이용한 단백질-다당 접합 백신이나 단백질 백신을 목표로 하여 잠재력이 있는 공통 단백질 항원을 찾는 데 그 노력이 집중되고 있다. 특히, 여러 병원성 관련 단백질에 대한 집중적인 연구가 진행되고 있으며, 대표적으로 pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal surface adhesin A (PsaA) 등에 대한 백신 후보로서의 가능성에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이 중 PspA는 모든 폐렴구균에서 생산되지만 균주에 따라 분자량의 변이가 심하고 세포벽에 단단히 부착되어 있어 단백질 분리가 쉽지 않다(5,17,19). PspA의 독성에 관한 정확한 기능은 아직 밝혀지지 않았으나 중요한 병독성 인자로 알려져 있으며 *S. pneumoniae*의 항 침식작용에 관계하는 것으로 추측된다(1,3,12). 특히 PspA에 대한 항체는 혈액으로부터 *S. pneumoniae*를 빠르게 제거하는 결과를 초래하는데 이는 항체를 접종시킨 후 방어력 관찰을 통해서 입증되었으며, mice에서 *S. pneumoniae*에 대한 방어적 면역을 일으키는 것으로 보고되어 있다(2,3,13,14). PspA는 성인과 어린이 모두의 혈청에서 항체를 생산하는 것으로 알려져 있는데 만일 인체에서 유발된 항체들이 *S. pneumoniae* 감염시에 대해 유효하다면 백신으로 사용되어질 가능성이 제시

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 02-380-1474, Fax: 02-385-8043  
E-mail: kwangjun@nih.go.kr

되고 있다. 이와 같이 PspA의 병독성과 항원성 그리고 면역성이 알려짐에 따라 가장 효과적인 백신 후보로 대두되고 있으며, 최근 이와 관련된 새로운 단백질 접합 백신의 개발을 위한 연구가 선진 각국에서 활발히 진행되고 있으나, 국내에서는 아직 이에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 국내 대학병원에서 *S. pneumoniae* 관련 질환 의심 환자로부터 분리한 침습성 *S. pneumoniae* 균주 중 국내 우세 혈청형인 19F에 해당하며 독력이 강한 KNIH1156 균주(Table 1)로부터 PspA 단백 항원을 분리, 정제하여 그 면역원성을 동물 임상 모델을 통하여 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 배양

Table 1의 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 실험에 사용하였으며 균주의 계대 및 기본 배양은 5% 면양혈액(sheep blood)을 첨가한 혈액 한천배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 18~24 시간 수행 하였다.

### 2. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry (11)의 방법을 이용하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin (Sigma kit No. P5656)을 사용하였다.

### 3. SDS-PAGE and Immunoblotting

전기영동은 Laemmli법(10)에 따라 SDS-PAGE를 수행하였으며, separating gel은 10% acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 4% acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동은 80 V에서 4 시간동안 실시하였으며 Commassie 염색하여 확인하였다.

SDS-PAGE gel 상에서 분리된 단백질들은 electrotransfer system (NOVEX XCellIII)을 이용하여 30 V에서 1 시간 30 분 동안 nitrocellulose membrane (Bio-Rad)으로 옮긴 후 Towbin (18)의 방법에 준하여 immunoblotting을 실시하였다. Marker로는 pre-stained SDS-PAGE low range marker (Bio-Rad)를 사용하였다.

### 4. PspA의 확인

#### 1) Whole cell lysate 제조

*S. pneumoniae* KNIH1156을 THY broth 10 ml에 접종하여

**Table 1.** Characterization of *S. pneumoniae* KNIH1156 isolated from patients

Property	<i>S. pneumoniae</i> KNIH1156
Sex	M
Age	5 months
Source	Blood
Serotype	19F
Antibiotic resistance pattern	PEN <sup>a</sup> , CTX, CLM, ERY, TET, SXT

<sup>a</sup>PEN, penicillin; CTX, ceftriaxone; CLM, clindamycin; ERY, erythromycin; TET, tetracycline, SXT, Trimethoprim-sulfamethoxazole.

37°C로 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 하룻밤 배양한 후 배양액을 THY broth 40 ml에 재접종하여 흡광도(600 nm)가 0.6에 이를때까지 배양한 후 균체를 회수하였다. 균체를 PBS buffer (pH 7.2)로 세척한 후 150 µl lysis buffer (0.1% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.15 M sodium citrate)로 재현탁한 후 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 250 µl dilution buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate)를 첨가한 후 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

### 2) Polyclonal antisera를 이용한 PspA의 확인

미국 Alabama University의 Dr. David E. Briles로부터 제공받은 pneumococcal strain WG44.1 (13)의 PspA에 대한 항혈청을 사용하여 PspA를 확인하는데 사용하였다. 단백질 항원이 전이된 nitrocellulose membrane (Bio-Rad)에 anti-PspA polyclonal antiserum을 첨가하여 37°C에서 3 시간동안 항원항체 반응을 시켰다. TTBS (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) buffer로 5 분간 3회씩 세척한 후 1:3,000으로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad)로 1 시간 반응시킨 다음 TTBS buffer로 5 분씩 4회 세척하였다. 최종적으로 p-nitroblue tetrazolium choloride (NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate p-poulidine salt (BCIP)로 발색하였다.

### 3) Lactoferrin binding 특성을 이용한 PspA의 확인

PspA가 human lactoferrin과 결합하는 특성을 이용하여 PspA를 확인하였다(7). 단백질 항원이 전이된 nitrocellulose membrane에 lactoferrin (human milk 유래, Sigma)을 10 ng/ml이 되도록 첨가하여 37°C에서 3 시간 동안 반응시켰다. 이어서 TTBS buffer로 5 분간 3회 세척한 후 1:1,000으로 희석한 anti-human lactoferrin antiserum (rabbit, Sigma)과 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. TTBS buffer로 5 분간 3회 세척한 후 1:3,000으로 희석한 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad)로 1 시간 반응시켰다. TTBS buffer로 5 분씩 4회 세척한 후 p-nitroblue tetrazolium choloride (NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate p-poulidine salt (BCIP)로 발색시켰다.

### 5. PspA 정제

#### 1) 배양여액 준비

0.03% ethanolamine과 0.000001% choline이 첨가된 CDM (chemically defined medium)-ET 배지에서 *S. pneumoniae*를 배양하면 PspA가 배지내로 방출된다는 원리(2)를 이용하여 PspA를 대량 정제하고자 하였다. CDM 배지는 PC&S (Paree Chemical and Science, Korea)사에 의뢰하여 주문 제조하여 사용하였다 (Table 2).

먼저 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 THY broth와 0.03% choline, 0.03% ethanolamine이 첨가된 CDM broth를 1:9로 혼합한 배지에 접종하여 배양한 후 얻어진 배양액을 0.003% choline, 0.03% ethanolamine이 첨가된 CDM broth에 재접종하여 배양하였다. 다시 0.000001% choline, 0.03% ethanolamine 첨가된 CDM (CDM-ET) broth에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 배양하였다. 배양액을 동일한 CDM-ET broth에 다시 접종하여

**Table 2.** Composition of CDM (chemically defined medium) media<sup>a</sup>

Component	Concn. (mg/l)	Component	Concn. (mg/l)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5	L-Tyrosine	100
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 9H <sub>2</sub> O	1	L-Valine	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200	p-Aminobenzoic acid	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,000	Biotin	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	700	Folic acid	0.8
MnSO <sub>4</sub>	5	Niacinamide	1
DL-Alanine	100	β-Nicotinamide Adenine dinucleotide	2.5
L-Arginine	100	Pantothenate calcium salt	2
L-Aspartic acid	100	Pyridoxal	1
L-Cystine	50	Pyridoxamine dihydrochloride	1
L-Glutamic acid	100	Riboflavin	2
L-Glutamine	200	Thiamine hydrochloride	1
Glycine	100	Vitamin B <sub>12</sub>	0.1
L-Histidine	100	Glucose	10,000
L-Isoleucine	100	Adenine	20
L-Leucine	100	Guanine hydrochloride	20
L-Lycine	100	Uracil	20
L-Methionine	100	CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10
L-Phenylalanine	100	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	4,500
L-Proline	100	L-Cysteine	500
Hydroxy- L-proline	100	NaHCO <sub>3</sub>	2,500
L-Serine	100	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3,195
L-Threonine	200	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,350
L-Tryptophan	100		

<sup>a</sup>provided by PC&S (Paree Chemical and Science, Korea).

37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하면서 시간별로 배양액을 회수하여 immunoblot 분석을 하여 PspA 생성능을 확인하였다. 단백질의 대량정제를 위하여서는 CDM-ET 배지에서 균주를 대량배양한 후 원심분리(12,000 rpm, 20 분)하여 배양액만을 회수한 다음 농축하여 PspA를 정제하는데 사용하였다.

## 2) Affinity chromatography

PspA가 human lactoferrin에 결합하는 성질을 이용하여 정제하였다(7). 10 mg human lactoferrin (hLf, Sigma)을 CNBr-activated sepharose 4B (Pharmacia biotech)에 제조회사에서 명시된 방법에 따라 결합시켰다. Binding buffer (1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4)로 미리 평형시킨 hLf-CNBr-activated sepharose 4B column (0.8-4 cm, bed volume 2 ml)에 위에서 준비한 농축된 배양액을 가하고 elution buffer (1 M Tris-HCl buffer, 1 M NaCl, pH 7.4)로 용출시켰다. 각 분획마다 2 ml씩 받아 농축한 후 단백질을 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 western blotting을 수행하였다. 단백질 농축시에는 ultra-filtrator (TCF10/TCF10A)를 이용하였으며, 막여과지는 amicon PM 30 (>30,000 MW)을 사용하였다.

## 6. Virulence 시험

균주의 병독성을 측정하기 위하여 생후 4~8주된 정상 ICR female mice에 생균 *S. pneumoniae* KNIH1156을 0.85% NaCl에 현탁하여 1×10<sup>5</sup> CFU/ml에서 1×10<sup>8</sup> CFU/ml까지 계단 희석시킨 후 0.2 ml씩 복강주사하고 10일간 관찰하여 Reed-Muench 법으로 LD<sub>50</sub>를 결정하였다. 복강 주사한 균수는 평판희석법에 의해 생균수를 측정하였다.

## 7. 방어력 확인 시험

생후 4~8주된 정상 ICR mice (18-20 g)에 정제한 PspA 100 ng을 incomplete Freud's adjuvants와 1:1로 혼합하여 0.2 ml를 복강주사하여 면역시켰다. 면역 4주 후 mice에 *S. pneumoniae* KNIH1156 (19F)을 복강주사하고, 10일까지 생존한 mice의 수로 방어력을 결정하였다.

## 결과 및 고찰

*S. pneumoniae*에 의한 감염 질환은 전세계적으로 발병률과 사망률이 가장 높은 질환중의 하나로 최근 항생제 내성 균주의 급증과 백신의 효율성 등에서 많은 문제점을 나타내고 있다.

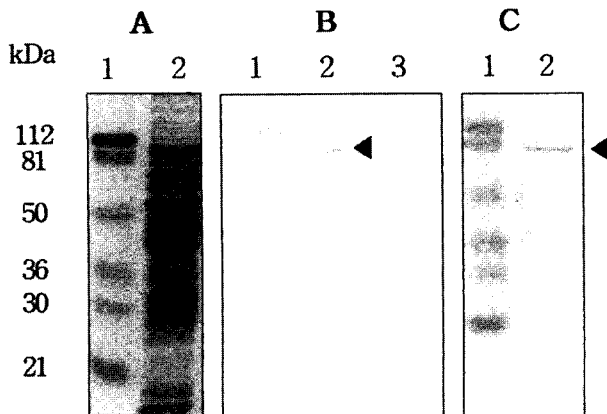
본 연구에서는 분자 생물학적 진단 도구와 백신 후보 단백질로 주목을 받고 있는 PspA에 대한 특성을 확인하기 위하여 국내 임상 분리주 중 혈액으로부터 분리된 침습성 균주이며 우세 혈청형인 19F에 해당하며 PspA의 발현 양상이 높게 나타나는 *S. pneumoniae* KNIH1156를 선택하여 PspA를 분리, 정제하고 면역학적 특성을 살펴보았다.

## PspA 단백질 함원의 확인

*S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 THY 배지에서 배양한 후 원심 분리하여 얻은 균체를 파쇄하여 SDS-PAGE를 수행하였으나 PspA가 균주에 따라 60~200 kDa 범위에서 다양한 분자량을 보인다고 알려져 있어서 총 단백질 양상만으로는 PspA 존재 여부를 확인할 수 없었다(Fig. 1A).

따라서 본 실험에서는 SDS-PAGE상에서 PspA를 확인하기 위하여 anti-PspA polyclonal rabbit antiserum을 이용하여 immunoblotting을 수행한 결과 약 81kDa 정도에서 밴드를 확인하였다(Fig. 1B lane 2).

세균의 성장을 위한 필수 인자인 iron은 인체내에서 대부분 단백질과 결합한 형태로 존재하며 free iron의 농도는 매우 낮다(~10<sup>-18</sup>M). 세포내 iron은 heme 함유물의 일부나 ferritin에 결합한 상태로 존재하며 세포의 iron은 sideropholins과 같은 iron 수송 단백질에 결합한 상태로 존재하는 것으로 알려져 있다(7). 인체내에서 iron 수송 단백질로 알려진 lactoferrin과 *S. pneumoniae*의 PspA와의 결합특성은 인체내에 침입한 후 PspA가 iron 획득에 관련되어 있지 않을까 하는 추측을 가능하게 하지만 아직까지 *S. pneumoniae*에서 인체내에서의 iron 획득에 관련된 기작에 관해서는 sideropholin을 합성하지 않는다는 사실을 제외하고는 구체적으로 확인된 사실은 없다.



**Fig. 1.** Characterization of the PspA of *S. pneumoniae* KNIH1156(19F). (A) SDS-PAGE of the whole cell lysates of *S. pneumoniae* KNIH1156 grown in THY broth. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, cell lysates of *S. pneumoniae* KNIH1156. (B) Western blot analysis of PspA of *S. pneumoniae* KNIH1156 and WG44.1 (PspA<sup>-</sup> mutant) with anti-PspA polyclonal antiserum. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, *S. pneumoniae* KNIH1156; lane 3, *S. pneumoniae* WG44.1(PspA<sup>-</sup> mutant). (C) Analysis of human lactoferrin binding to PspA of *S. pneumoniae* KNIH1156. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, cell lysates of *S. pneumoniae* KNIH1156.

본 실험에서는 PspA가 human lactoferrin과 결합하는 특성을 이용하여 *S. pneumoniae* KNIH1156균주의 PspA가 lactoferrin과 결합하는지를 확인하고 이후 PspA를 분리, 정제하는데 이용하였다. 총 단백질을 SDS-PAGE한 후 lactoferrin과 anti-human lactoferrin antiserum을 가지고 immunoblot을 한 결과 anti-PspA polyclonal rabbit antiserum으로 확인된 결과와 동일하게 81 kDa 근처에서 밴드를 확인할 수 있어 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주의 PspA가 human lactoferrin과의 결합능력을 가짐을 알 수 있었다(Fig. 1C).

또한 PspA를 인위적으로 결실시킨 균주인 *S. pneumoniae* WG44.1 (13)는 anti-PspA polyclonal rabbit antiserum에 의해 PspA 단백 항원 확인 실험 결과 밴드가 나타나지 않음으로 본 실험에 사용한 antiserum이 PspA에 특이적으로 반응함을 확인할 수 있었다(Fig. 1B lane 3).

**CDM-ET배지에서 PspA 분리 양상 확인**

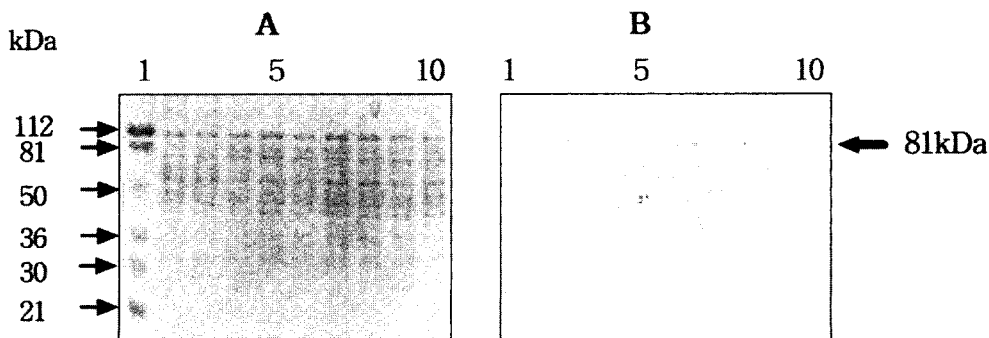
*S. pneumoniae*의 PspA는 cell wall protein으로 쉽게 응집되고 한편, THY 배지 같은 일반 영양배지에서 배양시 균주가 정지기가 되면 자가용해가 일어나기 시작하여 PspA의 생산량이 급격히 감소하여 정제가 어렵다고 알려져 있다. 본 실험실에서도 일반 배지인 THY 배지에서 배양한 균주로부터 PspA를 정제하여 보았으나 균체 파쇄 후 얻은 총 단백질로부터 PspA를 분리하는 과정이 매우 복잡하고 특히, 수율이 매우 낮아 PspA 단백질 정제의 어려움이 있었다. PspA는 cell wall의 phosphocholine에 위치하는 choline과 결합하여 cell wall에 연결되어 있어 choline을 대신하여 ethanolamine을 첨가시킨 CDM-ET 배지에서 균주를 배양하면 cell wall상의 phosphocholine이 phosphoethanolamine으로 치환되게 되고 이로인해 PspA가 결합할 수 있는 choline 부위가 결여되어 배지내로 PspA가 방출 된다는 사실과 CDM-ET 배지에서 균주를 배양할 경우 자가용해가 일어나지 않아 세포벽 성분이나 세포내 단백질에 의한 배지내 오염을 최소화할 수 있어 배양액으로부터 PspA의 분리, 정제를 극대화할 수 있다(16).

*S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 CDM-ET 배지에서 배양한 후 배양여액을 농축하여 SDS-PAGE를 통하여 확인하여 보았을 때 THY 배지에서 얻은 균체 파쇄 후 확인된 총 단백질에 비해 확실히 적은 수의 단백질 밴드만을 확인할 수 있었다(Data not shown).

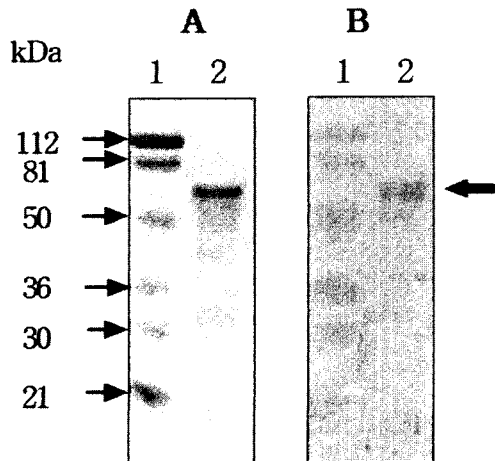
CDM-ET 배지에서 배양시 시간별로 배양여액을 농축하여 SDS-PAGE를 한 결과 28 kDa부터 106 kDa정도 범위에 해당하는 단백질들이 배지 내로 방출됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 이 중 PspA를 확인하고자 anti-PspA antiserum을 이용하여 immunoblotting한 결과 배양 후 2 시간 정도부터 81 kDa부위에서 PspA가 배지내로 방출됨을 확인할 수 있었고, 특히 배양 4-5 시간 정도부터 비교적 많은 양의 PspA가 배지내로 방출됨을 확인하였다(Fig. 2B).

**PspA 정제**

*S. pneumoniae* KNIH1156으로부터 CDM-ET 배지로 PspA가 방출됨을 확인하여 배양여액으로부터 PspA를 분리, 정제하기 위하여 PspA와 human lactoferrin과 결합하는 특성을 이용하였다.



**Fig. 2.** Detection of PspA from CDM-ET culture supernatant of *S. pneumoniae* KNIH1156. (A) SDS-PAGE and (B) Immunoblot analysis of CDM-ET culture supernatant of *S. pneumoniae* KNIH1156 at some various growth times. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, 1 hr; lane 3, 2 hr; lane 4, 3 hr; lane 5, 4 hr; lane 6, 5 hr; lane 7, 6 hr; lane 8, 10 hr; lane 9, 15 hr; lane 10, 20 hr.



**Fig. 3.** Purification of PspA from CDM-ET culture supernatant after the growth of *S. pneumoniae* KNIH1156. (A) SDS-PAGE and (B) immunoblot analysis of the eluted fraction from column. The PspA isolated from *S. pneumoniae* KNIH1156 shows approximately 63 kDa (arrow). Lane 1, molecular weight marker; lane 2, eluted fraction from column.

CDM-ET 배지에서 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 대량 배양한 후 상등액을 회수하여 농축한 후 human-lactoferrin affinity column을 통해 정제하였다. Column 용출액을 모아 SDS-PAGE로 확인한 결과 약 63 kDa 정도에 위치하는 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Anti-PspA antiserum으로 확인한 결과 affinity column으로부터 얻은 약 63 kDa에 해당하는 단일 밴드가 PspA임을 확인할 수 있었고(Fig. 3B) 이런 간단한 정제 과정을 통해 높은 수율의 PspA를 분리 정제할 수 있었다. *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 파쇄하여 SDS-PAGE를 실시한 후 항혈청으로 확인한 이전 실험에서 약 81 kDa으로 확인되었던 것과는 달리 정제 후 PspA의 분자량이 감소된 것처럼 보여 초기에는 정제과정에서 단백질의 변성에 의한 것이 아닌가 생각되었으나 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주의 PspA 유전자 염기서열 분석 결과 ORF가 1,824 bp이며 608개의 아미노산으로 이루어진 약 68 kDa의 PspA를 암호화하고 있음이 확인되어(in press) 정제 후 얻은 최종 산물이 PspA임을 확인할 수 있었다. 한편, 이런 현상은 이미 몇몇 외국 논문에서 보고되고 있는데 고농도의 PspA가 SDS와의 상호작용에 의해 생기는 4차원 구조의 형성에 의해 분자량의 증가가 나타난다고 추정하고 있다(20).

### PspA의 면역원성 및 방어능

PspA가 *S. pneumoniae* 감염에 대한 방어력을 보인다는 결과가 이미 Briles 등에 의해서 *S. pneumoniae* type 3 균주로부터 분리한 PspA를 가지고 mice를 대상으로 한 실험을 통해 LD<sub>50</sub>의 100배까지 방어효과를 보인다고 보고가 되어졌다(2). 이에 본 실험에 사용한 국내 임상 분리 균주이며 국내 우세 혈청형인 19F에 해당하는 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주로부터 분리, 정제된 PspA의 면역원성을 확인하기 위하여 mice를 대상으로 동물 시험

**Table 3.** Survival time of ICR mice after i.p. immunization of *S. pneumoniae* KNIH1156(19F)

CFU <sup>a</sup> /ml	Day after bacterial inoculation			
	1	2	5	10
1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	1/4 <sup>b</sup>	0/4	0/4	0/4
1×10 <sup>7</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4
1×10 <sup>6</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4
1×10 <sup>5</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4

<sup>a</sup>Colony forming unit.

<sup>b</sup>No. of survived mice/No. of inoculated mice.

**Table 4.** Immunization with isolated PspA (100 ng) and challenge with pneumococcal type 19 strain KNIH1156

CFU <sup>a</sup> /ml	Day after bacterial inoculation			
	1	2	5	10
1×10 <sup>11</sup> CFU/ml	2/4 <sup>b</sup>	1/4	0/4	0/4
1×10 <sup>10</sup> CFU/ml	3/4	2/4	2/4	2/4
1×10 <sup>9</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4
1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4
1×10 <sup>7</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4
1×10 <sup>6</sup> CFU/ml	4/4	4/4	4/4	4/4

<sup>a</sup>Colony forming unit.

<sup>b</sup>No. of survived mice/No. of inoculated mice.

을 수행하였다. 먼저 선발 균주인 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주의 독성 확인 실험을 하고자, ICR female mice를 대상으로 1×10<sup>7</sup> CFU/ml의 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 복강 주사하였을 때 4마리의 mice가 모두 생존하였으나 1×10<sup>8</sup> CFU/ml의 균주를 주사한 후 2일째부터 모두 치사하여 *S. pneumoniae* KNIH1156의 LD<sub>50</sub>는 1×10<sup>7.5</sup> CFU/ml임을 확인하였다(Table 3).

분리, 정제한 PspA의 면역원성과 방어능을 확인하기 위하여 정제한 PspA를 복강 주사한 후 *S. pneumoniae* KNIH1156 균주를 접종하였다. 1×10<sup>10</sup> CFU/ml의 균주로 공격하였을 때 2일부터 2마리가 치사하였으므로 LD<sub>50</sub>가 1×10<sup>7.5</sup> CFU/ml에서 1×10<sup>10</sup> CFU/ml로 약 500배 증가된 것으로 나타나 본 실험에서 분리, 정제한 PspA가 mice에서 면역원성과 감염 방어능을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 4).

본 실험에서 사용한 국내에서 분리율이 매우 높은 혈청형 19F에 해당하는 균주의 PspA가 LD<sub>50</sub>의 500배 정도까지 방어효과를 보이는 것을 통해 본 실험에 사용한 국내 임상 분리주(19F)의 PspA도 폐렴구균 중 병원성과 관련성이 매우 높다고 알려져 있는 혈청형 3에 해당하는 균주의 PspA와 비교할 때 높은 면역원성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Briles, D.E., J. Yother, and L.S. McDaniel. 1988. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 10 (sup.2), s372-s374.
2. Briles, D.E., D.K. Janice, M.A. Gray, L.S. McDaniel, E. Swiatlo, and K.A. Benton. 1996. PspA, a protecting-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine*. 14, 858-867.
3. Briles, D.E., R.C. Tart, E. Swiatlo, J.P. Dillard, P. Smith, K.A. Benton, B.A. Ralph, A.B. Walter, M.J. Crain, S.K. Hollingshead, and L.S. McDaniel. 1998. Pneumococcal diversity: consideration for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 645-657.
4. Centers for Disease Control, and Prevention. 1997. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 46, 1-24.
5. Crain, M.J., W.D. Waltman II, J.S. Turner, J. Yother, D.F. Talkington, L.S. McDaniel, B.M. Gray, and D.E. Briles. 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58, 3293-3299.
6. Gray, B.M., G.M. Converse III, and H.C. Dillon, 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: Acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* 142, 923-933.
7. Hammerschmidt, S., G. Bethe, P.H. Remane, and G.S. Chhatwal. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67, 1683-1687.
8. Hendley, J.O., M.A. Sande, P.M. Stewart, and J.M. Gwaltney Jr., 1975. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. *J. Infect. Dis.* 132, 55-61.
9. Kim, S.N., S.W. Kim, I.H. Choi, S.N. Pyo, and D.K. Rhee. 1996. High incidence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in South Korea. *Microb. Drug Resist.* 2, 401-406.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
12. McDaniel, L.S., J. Yother, M. Vijayakumar, L. McGarry, W.R. Guild, and D.E. Briles. 1987. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J. Exp. Med.* 165, 381-394.
13. McDaniel, L.S., J.S. Sheffield, P. Delucchi, and D.E. Briles. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* 59, 222-228.
14. McDaniel, L.S., D.O. McDaniel, S.K. Hollingshead, and D.E. Briles. 1998. Comparison of the PspA sequence from *Streptococcus pneumoniae* EF5668 to the previously identified PspA sequence from strain Rx1 and ability of PspA from EF5668 to elicit protection against pneumococci of different capsular types. *Infect. Immun.* 66, 4748-4754.
15. Song, J.H., J.W. Yang, N.Y. Lee, K.R. Peck, S. Kim, and C.H. Pai. 1996. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Korea: evidence for a clonal origin of multidrug-resistant strains. *Kor. J. Infect. Dis.* 28, 393-404.
16. Song, J.H., N.Y. Lee, S. Ichijama, and the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study Group. 1999. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Clin. Infect. Dis.* 28, 1206-1211.
17. Talkington, D.F., D.C. Voellinger, L.S. McDaniel, and D.E. Briles. 1992. Analysis of pneumococcal PspA microheterogeneity in SDS polyacrylamide gels and the association of PspA with the cell membrane. *Microb. Pathogen.* 13, 343-355.
18. Towbin, H.T., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
19. Waltman, W.D., L.S. McDaniel, B.M. Gray, and D.E. Briles. 1990. Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathogen.* 8, 61-69.
20. Yother J. and D.E. Briles. 1992. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J. Bacteriol.* 174, 601-609.

(Received January 24, 2002/Accepted February 26, 2002)

---

**ABSTRACT: The Purification and Immunogenicity of Pneumococcal Surface Protein (PspA) from Invasive *Streptococcus pneumoniae* KNIH1156 Isolated in Korea**  
**Kyung-Suk Chung, Song-Mee Bae<sup>1</sup>, and Kwang-Jun Lee<sup>1\*</sup>** (Department of Clinical Pathology, Ansan College, Ansan 425-701, Korea, <sup>1</sup>Division of Respiratory Infections, National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea)

Pneumococcal surface protein A (PspA) is an important virulence factor and an antigenically variable surface protein of the pneumococci. To purify the PspA from *S. pneumoniae* KNIH1156, a clinical isolate (type 19F), we have taken advantage of the fact that PspA is released from the surface of pneumococci into the medium by growing in a CDM-ET medium and PspA is capable of binding human lactoferrin, the iron carrier protein. PspA of *S. pneumoniae* KNIH1156 was purified from culture supernatant by human lactoferrin (hLf) affinity chromatography. The purified PspA was confirmed with anti-PspA antiserum and also had the binding capacity to hLf specifically. To determine whether the purified PspA could elicit protection in mice against pneumococcal infection, we immunized the mice with purified PspA and subsequently challenged with *S. pneumoniae* KNIH1156. Immunization with purified PspA protected mice from 500 times the LD<sub>50</sub> of *S. pneumoniae* KNIH1156. Therefore, it has been shown that purified PspA from *S. pneumoniae* KNIH1156 (type 19F) is a protective immunogen.