

## C-terminal Fusion of EGFP to Pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* modified its Hemolytic Activity

Kyung Tae Chung\*, Jae Heon Lee<sup>1</sup> and Hye Ju Jo<sup>2</sup>

Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received August 8, 2017 / Revised November 13, 2017 / Accepted November 17, 2017

*Streptococcus pneumoniae* is one of the major pathogens in community-acquired diseases, and it contains several factors that promote its pathogenesis, including pneumolysin (PLY). PLY is a member of the cholesterol-dependent cytolysin family, which attacks cholesterol-containing membranes, thereby forming ring-shaped pores. Thus, it is a major key target for vaccines against pneumococcal disease. We cloned the PLY gene from *S. pneumoniae* D39 and inserted it into the pQE-30 vector. Recombinant PLY (rPLY) was overexpressed in *Escherichia coli* M15 and purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. Similarly, a PLY-EGFP fusion gene was produced by inserting the EGFP gene at the 3' end of the PLY gene in the same vector, and the recombinant protein was purified. Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that both recombinant proteins were purified. rPLY exhibited significant hemolytic activity against 1% human red blood cells (RBCs). Complete hemolysis was obtained at 500 ng/ml, and 50% hemolysis was found with a 240 ng/ml concentration. In contrast, rPLY-EGFP did not show hemolytic activity. However, rPLY-EGFP did bind the RBC membrane, indicating that rPLY-EGFP lost hemolytic activity via EGFP fusion, while retaining its membrane-binding ability. These data suggest that PLY's C terminus is important for its hemolytic activity. Therefore, these two recombinant proteins can be extremely useful for investigating the toxin mechanism of PLY and cell damage during pneumonia.

**Key words** : Bacterial toxin, cytolysin, hemolysis, pneumolysin, *Streptococcus pneumoniae*

### 서 론

*Streptococcus pneumoniae*는 정상인의 비인후부에 존재하며 기도의 상부를 감염시켜 폐렴을 일으키는 전염성 원인 균이다 [6]. *Streptococcus pneumoniae*의 감염은 기도뿐만 아니라 신체의 여러 부위에 발생하여 수막염, 중이염, 패혈증 등을 일으킨다 [3]. 세균성 폐렴(Bacterial pneumonia) 중 60-70%는 이 균에 의해 일어나며, 특히 두 살 이하의 소아나 노인 그리고 면역결핍 환자들은 폐렴에 취약한 고위험 그룹에 속한다. 폐렴은 항생제를 사용하여 치료하지만 항생제를 많이 사용하면서 내성균의 증가로 치료가 힘들어지고 있다 [1, 17, 18]. 지속적으로 백신개발을 하고 예방에 힘쓰고 있지만 이러한 노력에도 불구하고 전 세계적으로 매년 400만 명 이상이 폐렴에 의해 사망하

여 급성 호흡기 질환 사망률 1위(40%)를 점유하고 있다 [7, 20].

*Streptococcus pneumoniae*에 의한 질병 유발 요인은 네 종류로 나눌 수 있다 [11]. 첫 번째로는 다당체로 구성된 캡슐로서 식균작용으로부터 폐렴균을 보호한다. 캡슐을 가진 S strain은 병원성을 가지고 있으며, 캡슐이 없는 R strain은 병원성이 약하다는 것은 아주 오래 전에 알려져 있다 [12]. 그러나 캡슐이 없는 *Streptococcus pneumoniae* 역시 질병을 유발할 수 있다는 사실이 최근 많은 연구로 제시되고 있다 [12]. 두 번째는 숙주의 상피 점액층에 부착하여 집락을 형성하는 능력이다. 이때 *S. pneumoniae*는 상피세포의 당지질을 구성하는 N-acetylglucosamine과의 상호작용으로 부착하게 된다. 또한, 점액층 상피에서 성장하기 위해 neuraminidase를 방출하여 침투성을 확보한다. 세 번째로서 autolysin이 있으며, 이것은 폐렴균 자체 분해를 일으키면서 폐렴균 세포 내에 존재하는 독성 단백질과 염증 유발 물질을 방출하는 역할을 한다. 네 번째가 autolysin에 의해 방출되는 pneumolysin으로 세포독성 및 용혈활성을 가진 독소 단백질이다.

Pneumolysin은 cholesterol 의존형 세포독소에 속한다. 이들 독소는 cholesterol을 함유한 세포막에 결합하여 원형의 구멍을 형성하여 세포사멸을 일으키는 단백질 독소이다 [9, 19]. 또한 보체경로를 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로도 알려져 있다. Pneumolysin의 분자량은 약 53 kDa으로 4 개의 도메인(domain)으로 구성되어 있으며, N-말단 쪽 첫 번째 도

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2681, Fax : +82-51-890-2622

E-mail : [kchung@deu.ac.kr](mailto:kchung@deu.ac.kr)

<sup>1</sup>Present address: Department of Diagnosis, Dongguk University Gyeongju Hospital, Gyeongju, Korea

<sup>2</sup>Present address: Department of Diagnostic Laboratory Medicine, Dong-A University Hospital, Busan, Korea

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

메인은 음전하를 가진 아미노산으로 구성되어 있어 세포막에 결합할 때 위치를 결정하는 중요한 기능을 한다. C-말단 쪽의 네 번째 도메인에 존재하는 tryptophan-rich 모티프(motif)가 cholesterol과 결합하는 중요한 역할을 하며, 이 도메인을 제거하면 결합능을 상실하는 하는 것으로 알려져 있다. 두 번째 도메인은 첫 번째와 네 번째 도메인을 연결하는 역할을 하면서, 첫 번째, 두 번째, 네 번째 도메인이 일렬로 연결되어 있으며, 세 번째 도메인은 두 번째 도메인 측면에 느슨하게 위치하고 있다[4]. Pneumolysin에 의해 세포독성을 나타내는 과정에서 2가지 주요단계는 세포막 결합과 구멍을 형성하는 독소의 중합화(oligomerization)이다[8]. 이 2단계는 온도의존성에 있어서 다른 점을 보여주고 있다. 세포막 결합에서는 온도에 의존하지 않는 반면에 중합화는 더 높은 온도에서 일어난다. 또한, 이 과정은 콜레스테롤 의존과정으로 콜레스테롤을 첨가하면 세포독성을 저해할 수 있다. 즉, 이는 세포막의 콜레스테롤이 이 독소의 수용체라는 점을 시사해준다. 단량체의 pneumolysin이 콜레스테롤과 결합하여 세포막에 끼어들어가고, 추가적으로 pneumolysin이 연속으로 결합하여 중합을 하면서 원형의 구멍을 일으킨다. 이렇게 형성된 구멍들은 삼투 메커니즘에 의해 세포용해를 유발하는 것으로 보고되어 있다 [21].

*Streptococcus pneumoniae* 병원성 유발에 pneumolysin의 역할연구는 *in vitro* 또는 *in vivo* 모델에서 다양하게 연구되었으며, 현재까지도 지속적으로 연구되고 있다. 지속적인 연구를 위해서 활성을 가진 pneumolysin 단백질이 필요하며, 또한 합당한 대조 단백질이 필요하다. 본 연구는 이를 위해 *E. coli* 시스템에서 활성적인 pneumolysin 단백질을 생산하였으며, EGFP를 융합하여 세포용해 활성을 상실하였으나 결합능은 보유한 대조 단백질로서 활용 가치가 높은 pneumolysin-EGFP 단백질을 생산한 것에 대해 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Pneumolysin 유전자 클로닝

Pneumolysin 유전자는 *Streptococcus pneumoniae* D39 균주의 genomic DNA (gDNA)를 주형으로 하여 PCR 방법으로 클로닝을 하였다. 먼저 *S. pneumoniae* D39 균주를 THY broth에서 배양하여 균체를 얻은 후 Wilson의 방법으로 gDNA를 추출하였다[22]. 추출한 gDNA는 SpeedVac (Titec Co., Japan)으로 10분간 건조시킨 후 100 µl TE buffer (pH8.0)에 녹여 사용하였다.

PCR을 위한 primer로는 forward primer에 BamHI 제한효소자리를 삽입하였고, reverse primer에는 Sac I 제한효소자리를 삽입하였다. 각 primer의 서열은 5'CTA GGA TCC ATG GCA AAT AAA GCA3'과 5'ACT GAG CTC GTC ATT TTC TAC CTT A3'로서 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 제작하였다.

PCR 반응조건으로는 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 3분간으로 하여 30 cycles를 실시했고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. DNA 증폭기로 PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Takara, Japan)을 사용하였다. PCR 후 pneumolysin 유전자 DNA는 전기영동을 실시하여 1,500 bp 산물로 확인하였다. PCR로 얻은 pneumolysin 유전자 DNA는 pQE-30 vector에 삽입하기 위해 BamHI 과 Sac I 으로 pneumolysin DNA와 pQE-30 vector를 각각 절단한 후 T4 ligase (TaKaRa, Japan)로 연결하고, *E. coli* M15에 형질전환 시켰다 [16].

### *E. coli* M15에서 pneumolysin 재조합 단백질의 발현과 정제

Pneumolysin 단백질 발현과 정제는 QIAexpressionist 방법 (Qiagen, Germany)에 따라 실시 하였다[13]. Pneumolysin 유전자가 형질전환된 *E. coli* M15를 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) 함유 LB broth에서 배양하면서 pneumolysin 단백질 발현을 유도하였다. 초음파로 균체를 파쇄한 후 4°C에서 15,000x g로 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 Ni<sup>2+</sup>-agarose affinity 컬럼에 통과시켜 재조합 pneumolysin 단백질을 흡착시켰다. Washing buffer로 컬럼을 세척한 후 흡착된 재조합 pneumolysin 단백질을 50 mM - 250 mM imidazole 농도구배로 용출하였으며, 각각의 분획은 12% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE로 확인하였다.

### 재조합 pneumolysin의 투석

Imidazole 농도구배로 정제한 pneumolysin 단백질의 기능성 분석을 위해 정제과정 buffer에 함유된 imidazole과 다른 염류를 제거하기 위해 투석을 실시하였다. 12,000 Da cutoff 투석막에 정제한 pneumolysin을 넣고 PBS로 15시간씩 2회 투석하여 염류를 제거하였다.

### Pneumolysin-EGFP fusion 유전자 제작

Pneumolysin을 세포막 부착을 용이하게 확인하기 위해 EGFP를 pneumolysin의 C-말단에 융합하였다. 이를 위해서 구축된 pneumolysin 클로닝 벡터에 EGFP 유전자를 삽입하였다. EGFP 유전자를 증폭하기 위해 본 실험실에서 보유하고 있는 EGFP 유전자를 주형으로 하여 Sac I 제한효소자리가 첨가된 forward primer 5'ATA GAG CTC ATG GTG AGC AAG GGC3'와 Xma I 제한효소자리가 첨가된 reverse primer 5'TAT ACC CGG GCT ACT TGT ACA GCT C3'를 사용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 EGFP 유전자는 앞에서 설명한 pneumolysin 클로닝과 유사한 방법을 통해 pneumolysin 유전자 3'뒤쪽에 삽입되었다.

**재조합 pneumolysin의 용혈반응**

정제된 pneumolysin과 pneumolysin-EGFP의 용혈독소 활성을 검사하기 위해 적혈구에 대한 용혈능을 측정하였다[5]. 각 농도 별로 희석된 pneumolysin 50 µl와 PBS에 1.0%(v/v)로 현탁된 O형 적혈구 50 µl를 혼합하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응액은 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 회수하여 적혈구가 용혈되어 유리된 헤모글로빈의 양을 ELISA reader (xMark Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, USA)를 사용해 415 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다. 완전용혈 대조군으로는 증류수를 사용하였고, 음성 대조군으로는 생리적 식염수를 사용하였다.

**재조합 pneumolysin-EGFP 단백질의 적혈구 부착**

재조합 pneumolysin-EGFP 단백질의 적혈구 막 부착 여부를 확인하기 위해 재조합 단백질(500 ng/ml) 50 µl와 1.0%(v/v) O형 적혈구 50 µl를 혼합하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응 후 PBS로 세 번 적혈구를 세척하고 다시 PBS에 현탁하여 형광현미경(Motic, China)으로 적혈구의 EGFP 형광 여부를 확인하였다. 재조합 pneumolysin 단백질은 반응 후 용혈이 발생하여 세척을 하지 않은 상태에서 원심분리하고 침전물을 취하여 현미경에서 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**Pneumolysin 단백질 합성과 정제**

*Streptococcus pneumoniae*에 의한 감염 메커니즘에 대한 연구는 주로 균체를 이용하여 *in vitro* 또는 *in vivo* 모델에서 진행되어 왔다. *Streptococcus pneumoniae*가 숙주를 침입하는 첫 번째 경로로서 상기도에서 neuraminidase 방출과 PsaA와 같은 다양한 폐렴균 표면 단백질에 의한 상피세포와 접촉을 통해 이루어 지는 것으로 보고 되었다[3]. 병원성을 나타내기 위한 주요한 독성인자는 pneumolysin으로 알려져 있다. 이에 대한 직접적인 증거로서는 pneumolysin 결여 돌연변이 균주는 mouse 정맥 내 감염 후 세균 수의 증가가 낮게 유지되면서 감소하였으며, 숙주 동물 역시 생존율이 매우 높았다[2]. Pneumolysin은 용혈 독소로서 오래 전에 알려졌으며 다양한 세포독성 및 면역반응 유발 등과 같은 활성이 보고되어 있으나 여전히 세포독성 유발에 대한 연구가 필요하다. 이를 위해서는 활성 pneumolysin과 여러 가지 비활성 pneumolysin이 요구되어 pneumolysin 재조합 단백질을 생산하였다. 먼저 *S. pneumoniae*로부터 gDNA를 추출하여 PCR을 통해 pneumolysin 유전자를 증폭한 후 단백질 생산 vector인 pQE-30 vector에 삽입하였다. 삽입된 pneumolysin 유전자는 DNA서열을 확인하여 wild type임을 확인하였다. pQE-30pneumolysin vector를 단백질 발현 균주인 *E. coli* M15에 형질전환시키고 1 mM IPTG를 첨가하여 약 4시간 동안 배양하여 재조합 pneu-

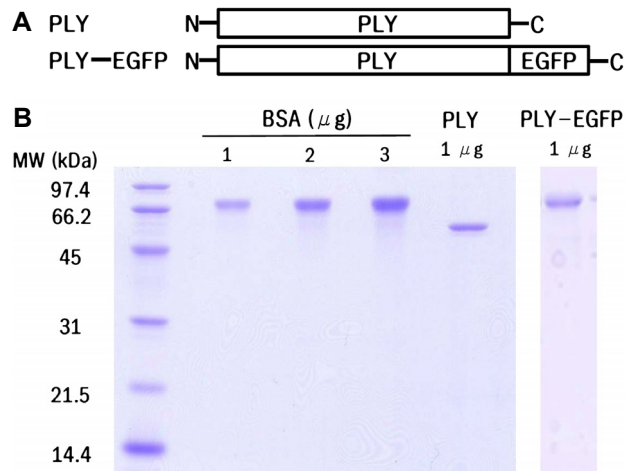


Fig. 1. SDS-PAGE of recombinant pneumolysin and pneumolysin-EGFP proteins. A. Diagram of pneumolysin and pneumolysin-EGFP. B. Purified pneumolysin and pneumolysin-EGFP proteins from Ni<sup>2+</sup>-agarose column were analyzed on SDS-PAGE. Ply : pneumolysin, Ply-EGFP : pneumolysin-EGFP, N : N terminus, C : C terminus.

molysin 단백질의 발현을 유도하였다. 재조합 pneumolysin 단백질의 정제는 Ni<sup>2+</sup>-agarose column을 사용하였으며, imidazole 100~250 mM 농도에서 column에서 분리되어 용출되었다. SDS-PAGE 상에서 pneumolysin 단백질은 거의 정제된 것으로 나타났으며, 정제된 pneumolysin은 순도와 농도를 bovine serum albumin과 비교하였다(Fig. 1). 또한, pneumolysin을 육안으로 추적하기 위해 EGFP를 pneumolysin N-말단에 융합하였다. 이를 위해 pneumolysin 유전자를 클로닝 할 때 pneumolysin 유전자의 stop codon이 결여된 상태로 pQE-30 vector에 삽입하였으며, pneumolysin 유전자의 3' 말단에 EGFP 유전자를 끼워 넣어 융합 유전자를 제작하였다. 이 융합 유전자에서 pneumolysin-EGFP 재조합 단백질을 pneumolysin 재조합 단백질과 동일한 방법으로 생산하고 정제하였다(Fig. 1). Ni<sup>2+</sup>-agarose를 사용한 정제 방법은 두 재조합 단백질 모두에서 아주 효율적이었으며, 거의 순수하게 정제 단백질을 분리하였다.

**Pneumolysin의 용혈반응과 세포막 결합**

대장균에서 생산한 pneumolysin과 pneumolysin-EGFP 단백질은 native 상태에서 정제하여 용해성이긴 하지만 활성을 보유하고 있는 지는 확인이 필요하다. 이를 위해 적혈구를 사용하여 재조합 단백질의 용혈활성을 조사하였다. 재조합 단백질은 투석을 하여 적혈구 용혈에 영향을 줄 수 있는 염을 제거한 후 사용하였다. Pneumolysin은 500 ng/ml 이상부터 약 100% 용혈활성을 나타내었으며, 약 240 ng/ml에서 약 50% 용혈활성을 나타내었다(Fig. 2). 즉, 재조합 pneumolysin은 용혈독소로서 활성을 가진 단백질로 제작되었음을 나타내었다.

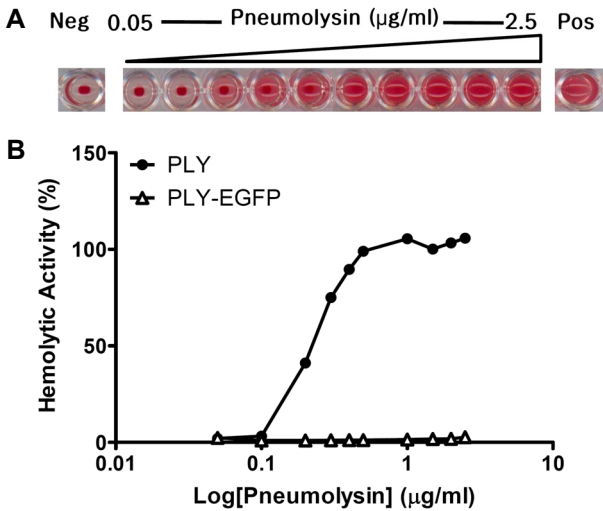


Fig. 2. Hemolytic activity of pneumolysin and pneumolysin-EGFP. The indicated concentrations of pneumolysin and pneumolysin-EGFP were mixed with 1% human red blood cell (RBC) suspension in U-shaped bottom of 96-well plate. Panel A showed hemolysis of RBC and panel B showed hemolytic activity of pneumolysin and pneumolysin-EGFP measuring the absorbance at 415 nm. Neg : negative control as saline, Pos : negative control as distilled water.

반면에 pneumolysin-EGFP는 농도와 상관없이 용혈활성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 현미경 하에서 관찰된 pneumolysin 처리 적혈구는 용혈 되어 형태가 거의 관찰되지 않았으며 관찰된 극소수 적혈구는 막이 심하게 손상된 모양으로 관찰되었다. 그러나, pneumolysin-EGFP 처리 적혈구는 온전한 적혈구의 모양을 유지하고 있었으며, 형광현미경 하에서 적혈구 막이 초록색으로 나타나 pneumolysin-EGFP가 적혈구 막과 결합하고 있음을 알 수 있었다. 즉, pneumolysin-EGFP는 용혈기능은 상실하였으나, 막 결합 기능은 가지고 있는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 용해된 EGFP가 용혈 활성을 나타내는 pneumolysin의 motifs를 입체적으로 방해하기 때문인 것으로 여겨지며, 이전에 보고된 pneumolysin의 C-말단 쪽이 용혈활성에 관여한다는 결과와도 일치하고 있다[8, 15]. 또 다른 가능성은 pneumolysin과 같은 용혈독소가 용혈을 일으키기 위해서는 세포막에서 중합화가 일어나야지만 구멍을 형성할 수 있다고 보고되어 있기 때문에[19] C-말단의 EGFP가 pneumolysin의 중합화를 방해함으로써 세포막에 구멍을 형성하는 것을 저해한다고도 생각할 수 있다[14]. 이런 가능성은 추가적으로 여러 가지 돌연변이 pneumolysin 제작과 N-말단 EGFP 융합 pneumolysin 제작을 함으로서 연구될 수 있다고 생각한다. 그러나, 현재 제작된 두 재조합 단백질을 사용하여 pneumolysin에 의한 세포 손상에 따른 다양한 생화학적 연구가 가능하며, 특히나 pneumolysin-EGFP 단백질은 용혈활성이 결여된 대조군으로써의 활용 가치가 있으며, 또한 허파상피

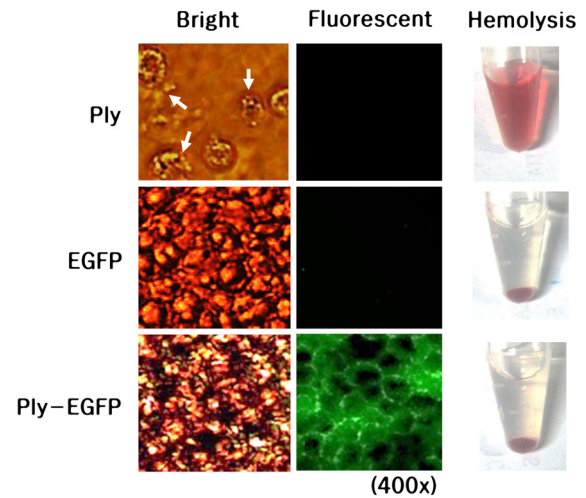


Fig. 3. Microscopic red blood cells after treatment of pneumolysin and pneumolysin-EGFP. Each pneumolysin or pneumolysin-EGFP was treated with RBC and RBC was observed under bright and fluorescent fields after three times PBS washing. Right panel showed hemolysis by pneumolysin, EGFP and pneumolysin-EGFP. EGFP protein was used as a negative hemolysis and binding activity. Left panel showed hemolytic patterns under bright field microscopy. PLY-treated RBC were hemolyzed and few ghost RBC (arrow marked) only observed while EGFP- and pneumolysin-EGFP-treated RBCs maintained their intact shape. Ply : pneumolysin, Ply-EGFP : pneumolysin-EGFP.

세포와 같은 숙주세포에서 pneumolysin의 막결합으로 유도되는 반응을 조사하는데 유용한 도구가 될 것으로 생각된다.

폐렴균은 기회 감염성 질환 중 매우 높은 사망률을 초래하며, 의료 기술의 발달함에도 불구하고 점점 더 그 위험성이 높아지고 있다. 항생제의 남용으로 인한 내성균의 증가는 현대 의학의 가장 주된 딜레마로 남아있고, 또한, pneumolysin과 같은 독소를 생산하는 세균의 경우 항생제로 치료하여도 독소에 대한 치료가 동반되어야만 한다. 그 뿐만 아니라 *Streptococcus pneumoniae* 가 비강 내에서 초기 집락을 형성하는데도 pneumolysin이 주된 역할을 하는 것으로 보고 되어[10], 면역력이 약화된 어린이나 고령자의 경우는 백신을 통한 예방과 독소에 의한 손상을 차단하거나 완화하는 치료방법이 효과적일 수 있다. 따라서, 본 연구를 통해 획득한 pneumolysin은 향후 이 독소 연구에 많이 활용되어 독성 메커니즘과 방어 연구에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

### References

- Bender, M. T. and Niederman, M. S. 2016. Principles of antibiotic management of community-acquired pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 905-912.
- Berry, A. M., Yother, J., Briles, D. E., Hansman, D. and

- Paton, J. C. 1989. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 2037-2042.
3. Bogaert, D., De Groot, R. and Hermans, P. W. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 144-154.
  4. Cockeran, R., Anderson, R. and Feldman, C. 2002. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**, 235-239.
  5. Cohen, B. Halbert, S. P. and Perkins, M. E. 1942. Pneumococcal Hemolysin: The preparation of concentrates, and their action on red cells. *J. Bacteriol.* **43**, 607-627.
  6. Cukic, V. and Hadzic, A. 2016. The most common detected bacteria in sputum of patients with community acquired pneumonia (CAP) treated In hospital. *Med. Arch.* **70**, 354-358.
  7. Feldman, C. and Anderson, R. 2016. The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 806-818.
  8. Heuck, A. P., Tweten, R. K. and Johnson, A. E. 2003. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins. *J. Biol. Chem.* **278**, 31218-31225.
  9. Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'callaghan, C. and Andrew, P. W. 2004. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 195-201.
  10. Hotomi, M., Yuasa, J., Briles, D. E. and Yamanaka, N. 2016. Pneumolysin plays a key role at the initial step of establishing pneumococcal nasal colonization. *Folia Microbiol (Praha)*. **61**, 375-383.
  11. Joklik, W. K., Hilda, P., Willett, D., Bernard, A. and Wilfert, C. M. 1992. *Zinser Microbiology*, pp432-442, 20<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, Norwalk, CT, USA.
  12. Keller, L. E., Bradshaw, J. L., Pipkins, H. and McDaniel, L. S. 2016. Surface proteins and pneumolysin of encapsulated and nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* mediate virulence in a chinchilla model of otitis media. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**, 55.
  13. Kwon, H. M., Park, J. A., Choi, B. T., Choi, Y. H. and Chung, K. T., Kwon, H. M., Park, J. A., Choi, B. T., Choi, Y. H. and Chung, K. T. 2009. Recombinant mannose-binding lectin protein and anti-mannose-binding lectin polyclonal antibody production. *J. Life Sci.* **19**, 284-288.
  14. Lawrence, S. L., Feil, S. C., Morton, C. J., Farrand, A. J., Mulhern, T. D., Gorman, M. A., Wade, K. R., Tweten, R. K. and Parker, M. W. 2015. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Sci. Rep.* **5**, 14352.
  15. Park, S. A., Park, Y. S., Bong, S. M. and Lee, K. S. 2016. Structure-based functional studies for the cellular recognition and cytolytic mechanism of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Struct. Biol.* **193**, 132-140.
  16. Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
  17. Schroeder, M. R. and Stephens, D. S. 2016 Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**, 98.
  18. Talebi, M., Azadegan, A., Sadeghi, J., Ahmadi, A., Ghanei, M., Katouli, M., Owlia, P. and Pourshafie, M. R. 2016. Determination of characteristics of erythromycin resistant *Streptococcus pneumoniae* with preferred PCV usage in Iran. *PLoS One* **11**, e0167803.
  19. Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J., Andrew, P. W. and Saibil, H. R. 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* **121**, 247-256.
  20. Tuomanen, E. 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 35-39.
  21. van Pee, K., Mulvihill, E., Müller, D. J. and Yildiz, Ö. 2016. Unraveling the pore-forming steps of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *Nano Lett.* **16**, 7915-7924.
  22. Wilson, K. 1997. *Current Protocol in Molecular Biology*, Vol1, Unit 2.4. USA.

**초록 : *Streptococcus pneumoniae*가 생산하는 pneumolysin의 EGFP 융합으로 인한 용혈활성 변화**

정경태\* · 이재현 · 조혜주  
(동의대학교 임상병리학과)

*Streptococcus pneumoniae*는 pneumolysin과 같은 병원성 인자를 가지고 있으며, 지역사회에서 전파되는 심각한 병원성균에 포함된다. Pneumolysin (PLY)은 콜레스테롤 의존적으로 세포막에 구멍을 형성하는 세포독소로서 백신의 주요한 표적 항원이다. PLY의 연구를 위하여 *Streptococcus pneumoniae* D39 균주에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 시행하였다. 합성된 PLY 유전자 DNA를 pQE-30 vector에 삽입하고, *E. coli* M15에 형질 전환 시킨 후 LB 배지에 IPTG를 첨가하여 PLY 단백질을 생산하였다. 제조합 단백질은 Ni<sup>2+</sup>-agarose column을 사용하여 정제하였다. 또한, EGFP를 PLY C-말단에 부착한 융합단백질도 동일한 방법으로 클로닝하여 제조합 단백질을 생산하였다. 500 ng/ml 농도의 제조합 PLY는 1.0% 적혈구 현탁액을 100% 용혈시켰으며, 240 ng/ml 농도는 50% 용혈을 나타내었다. 그러나 제조합 PLY-EGFP는 용혈 활성이 전혀 나타나지 않았으나 형광현미경으로 관찰하였을 때 적혈구 막에 결합되어 있었다. 즉, EGFP의 PLY C-말단 부착은 PLY의 세포막 결합능을 유지시켰으나 용혈기능은 방해하였다. PLY C-말단은 용혈기능에 아주 중요한 영역이며, 세포막 결합은 PLY의 다른 영역이 보다 중요하게 작용할 것으로 추측된다. 따라서, 육안으로 관찰이 가능한 결합능은 가졌으나 용혈 기능이 결여된 PLY-EGFP를 대조군으로 활용함으로써 두 제조합 단백질은 폐렴 유발에 있어서 PLY 작용 연구에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.