

# 低ファイブロネクチン結合性黄色ブドウ球菌変異株 における宿主細胞・組織との相互作用能の低下 および感染性との関連

弘 田 泰 久      関      啓 子      進 士 ひ と み

東京慈恵会医科大学微生物学講座第2

(受付 平成15年12月5日)

## LOW FIBRONECTIN-BINDING MUTANT OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* LOSES THE ABILITY TO INTERACT WITH HOST CELLS AND TISSUES

Yasuhisa HIROTA, Keiko SEKI, and Hitomi SHINJI

Department of Microbiology (II), The Jikei University School of Medicine

To investigate the role of fibronectin in the interaction between *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and host cells, a mutant strain with low fibronectin-binding ability was obtained with a coagglutination method. This mutant strain bound fibronectin at half the level of the parental strain. West-Western blot analysis showed that fibronectin did not bind to the factor with the highest molecular weight, which is expected to be fibronectin-binding protein A (FnBPA), a fibronectin-binding factor of *S. aureus*, although the FnBPA gene was maintained. This finding suggests that the FnBPA of this mutant strain could not bind fibronectin because of either a mutation of its gene or a modulation of its synthesis. Fibronectin had an opsonin-like effect in phagocytosis of the parental strain by macrophages but did not affect phagocytosis of the mutant strain. The ingestion of the mutant strain by mouse fibroblasts was also markedly lower than ingestion of the parental strain. Furthermore, bacterial lodgment in the mouse kidney after intravenous administration was decreased with this mutant strain. These results suggest that binding of fibronectin to FnBPA is essential for *S. aureus* to interact with the host cells and tissues.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 149-57)

Key words: *Staphylococcus aureus*, fibronectin, fibronectin-binding protein, host, adherence

### I. 緒 言

細菌感染の初期過程において、細菌は宿主個体と接し、ついで組織・細胞に付着、定着する。Adhesin は細菌が宿主の上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、白血球等の表面に接着、あるいは細胞内に侵入する際に機能する他、宿主細胞による細菌の取込みにも関与する<sup>1)-6)</sup>。黄色ブドウ球菌はそ

の細胞表面に、laminin, vitronectin, collagen, fibronectin (FN), elastin, fibrinogen のような細胞外マトリックス (ECM) 構成成分と結合する複数の adhesin を発現している<sup>7)-15)</sup>。Fibronectin binding protein (FnBP) は、ブドウ球菌表面に発現している血清および組織結合性 FN に対するレセプターである。FnBP には A, B 2 つの isoform があり、その D 領域が FN の N 末端

領域との結合部位である<sup>16)</sup>。多くの黄色ブドウ球菌は、FnBPA および FnBPB の双方を発現しており、これらを介して FN と結合する<sup>6)</sup>。黄色ブドウ球菌は FN 非存在下でもマクロファージ(M $\phi$ )によく貪食されるが、FN を結合しているものでは貪食される菌数が増加する<sup>6)</sup>。これは M $\phi$  による黄色ブドウ球菌の貪食に際して、FN がオプソニン様に働くことを示唆する。

本研究においては、FN 結合能の低下した黄色ブドウ球菌変異株とその親株との比較を通じて、細菌の FN 結合性が、宿主の食細胞あるいは非食細胞による取込み、また *in vivo* での腎定着性にどのような影響を及ぼすかを検討し、感染症との関わりについて考察した。

## II. 対象と方法

### 1. 実験材料および準備方法

#### 1) Fibronectin

既報<sup>17)</sup>に準じ、ウシ血清中の可溶性 FN を gelatin-sepharose 4B カラムにてアフィニティ精製の後、cellulofine GCL-2000-m (生化学工業、東京) column によりゲル濾過を行った。各々の cellulofine 溶出画分に含まれる FN を SDS-PAGE により解析し、二量体 FN のみを含む画分を採取した。ついでカルシウム・マグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) に対して透析し、Ultrafree C3LGC (Millipore Co., MA, USA)

にて遠心濃縮した<sup>6)</sup>。

#### 2) 細菌

黄色ブドウ球菌 Cowan I 株から分離したプロテイン A 低保有株 HLj<sup>18)</sup> を、低 FN 結合性変異株を得るための親株とした。変異株の分離は、cosedimentation 法<sup>18)</sup>を改変した coagglutination 法 (Fig. 1) によった。まず HLj を heart infusion (HI) 中にて 37°C 1 晩培養し、集菌後、生理食塩水で洗浄、PBS(-) に懸濁した。これを 2 ml の HI に  $1 \times 10^8$  CFU/ml の濃度で懸濁し、紫外線照射器 (UV-30, 平沢製作所、東京) にて 350 mm の高さから 30 秒間の紫外線照射を行い、変異を誘発した。ついで菌液にウシ血清 FN を 10  $\mu$ g/ml となるように加え、37°C 1 時間反応させた。この菌液 1 ml に対し、0.1% の抗 FN 抗血清 (LSL 社、東京) を含む HI 1 ml を添加し、先の反応で FN を結合した菌に抗体を結合させると共に凝集させた。さらに、 $2 \times 10^9$  cells の Cowan I 加熱死菌を添加し、プロテイン A と抗体 Fc 領域との結合により凝集を促進した。そのまま 37°C で 2-3 日静置の後、上清を Heart Infusion Agar に接種して増菌した。引き続き 2 度の coagglutination を繰返した結果、3 株が分離された。これらの株について既報<sup>6)</sup>に準拠し、FN 結合量、west-western blot 解析による FN 結合成分の検出、PCR 法による FnBP 遺伝子の検出を行い、結果を検討した。3 株のうち最も FN 結合量の少ない

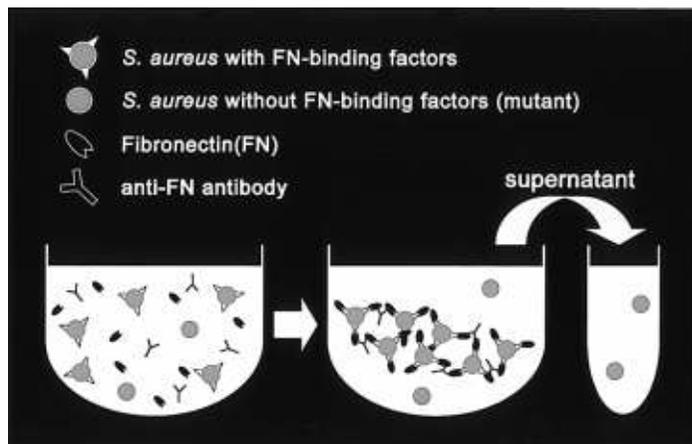


Fig. 1. Screening of low FN binding strains by coagglutination. FN was added to the HLj (protein A-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*) culture to combine with FN-receptors on HLj. Anti-FN antibody was added to the culture to capture this FN. Heat-killed Cowan I was also added to ensure the aggregate formation. And low FN binding mutants were isolated.

株を MES (Matrix Estranging Strain) と命名し、被検菌とした。

### 3) マウス

5 週齢の ICR 雌マウス(日本チャールス・リーバー, 神奈川)を用いた。実験開始まで最低 1 週間、恒常的環境下で飼育した。

### 4) 細胞

実験に供した各細胞は以下の方法により得た。

M $\phi$  の採取は既報<sup>6)</sup> によった。すなわち 3% チオグリコレート培地 (Difco, Detroit, MI, USA) 1 ml を ICR マウスに腹腔内投与し、4 日後に、氷冷した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies, NY, USA) 3 ml にて腹腔内を洗浄、浸出細胞を回収した。細胞は DMEM にて 2 度洗浄後、プラスチックディッシュ (Nunc, Roskilde, Denmark) に播いた。炭酸ガス培養器内で 37°C 2 時間培養した後、非接着性の細胞を洗浄除去し、HEPES 緩衝 RPMI-1640 培地 (GIBCO BRL, NY, USA) を加えた。ゴムザ染色による形態学的検討、および非特異的エステラーゼ染色所見より、得られた接着性細胞の 98% 以上が M $\phi$  であった。

マウス線維芽細胞 L-929 株は、10% のウシ胎児血清添加 HEPES 緩衝 RPMI-1640 培地にて継代培養したものをを用いた。

## 2. 実験方法

### 1) MES の特性分析

#### (1) SDS-PAGE

FN 結合性蛋白検出のために SDS-PAGE を行った。HLj あるいは MES を 100  $\mu$ g/ml FN にて 37°C 1 時間処理し、PBS(-) にて洗浄した。菌を 1% SDS および 0.1 M 2-mercaptoethanol を含む溶液に浮遊して 3 分煮沸後、遠心した。上清を 7.5% ゲルにて泳動し、Coomassie-brilliant blue にて染色、バンドを観察した。

#### (2) West-western blot 解析

FN 結合成分検出のため west-western blot 解析を行った。HLj あるいは MES をプロテアーゼ・インヒビターを含む 50  $\mu$ g/ml リゾスタフィンおよび 10  $\mu$ g/ml DNase I にて 37°C 20-30 分処理して溶解した。これを (1) と同様の方法により、煮沸後 SDS-PAGE で展開し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。2% non-fat

milk, 0.5% BSA および 0.01% チメロザールを含む PBS(-) にて室温で 3 時間ブロッキングした PVDF 膜を、10  $\mu$ g/ml FN にて 4°C 1 晩処理した。ついで 1/1,000 容量のウサギ抗 FN 抗血清 (Cedarlane Lab. Ltd., Ont., Canada) にて、室温 2.5 時間ないしは 4°C 1 晩処理した。この PVDF 膜を 0.1% Tween20 添加 PBS(-) にて 40 分洗浄後、1/1,000 容量の horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG (Bio-Rad Lab., CA, USA) にて室温で 1.5 時間処理した。同膜を洗浄後、0.2 mg/ml ジアミノベンジジンおよび 0.06% 過酸化水素水混合液にて処理して発色、バンドを観察した。

### (3) PCR

FnPBA, FnPBP の遺伝子である *fnbA*, *fnbB* の検出を、PCR 法により行った。HLj あるいは MES を 200  $\mu$ l の 2.5 mg/ml アクロモペプチダーゼ (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて、37°C 10 分処理し溶解した。溶液に 1 ml のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25/24/1) を加えて 1 分攪拌後、ついで室温にて 15,000 $\times$ g 5 分遠心した。上清に 3 ml のエタノール/3 M 氷酢酸ナトリウム (100/4) 混合液を添加し、-70°C 30 分以上処理した。DNA を遠心沈殿後、70% エタノールにて洗浄、室温で乾燥し、100  $\mu$ l Tris/EDTA (pH 8.0) 混合液に溶解、サンプル DNA とした。プライマーは以下の 2 組を用いた。ひと組はわれわれの設計による F (5'-GACAAAGAA-GCTGCAGCATC-3'), R (5'-CACCACCTGG-GTTTGTATCT-3') であり、同プライマー認識配列の *fnbA*, B 間における相同性は、F: 95%, R: 100% である。もうひと組は既報<sup>10)</sup> に基づく F1 (5'-GGTAATCAGTCATTCGAG-3'), R1 (5'-TGGCACACTGTCTGAAGTC-3') である。PCR 反応液の組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween-20, 1 mM DTT, 50% glycerol, 2.5 mM dNTPs, 2.5 $\times$ 10<sup>-2</sup> OD/ml primers, 50 units/ml *Taq* DNA ポリメラーゼ, 0.5  $\mu$ g/ml DNA である。DNA サーマルサイクラー (PJ2000, Perkin-Elmer, MA, USA) にて、94°C 1 分, 55°C 30 秒, 72°C 1 分 40 回の増幅を行った。

## 2) Mφ および線維芽細胞に取込まれた菌の定量

2 mM MgCl<sub>2</sub> および 50 μM CaCl<sub>2</sub> を添加した PBS(-) に、FN を最終濃度が 200 μg/ml になるように加えた。この液 500 μl に対し 1×10<sup>10</sup> CFU の黄色ブドウ球菌を加え、37°C 1 時間反応後、菌を上記 PBS にて 3 回洗浄し FN 処理菌として用いた。Mφ および L-929 線維芽細胞の培養系に FN 処理あるいは非処理の菌を、菌と Mφ の比率が 20:1、菌と線維芽細胞との比率が 500:1 になるように添加した。40 分培養後、細胞を生理食塩水で洗い、20 μg/ml リゾスタフィン 37°C 30 分の処理により Mφ および線維芽細胞表面に付着した菌を溶解除去した。洗浄・メタノール固定後ギムザ染色を施し、50 ないし 100 個の細胞を無作為に選択し、細胞に取込まれた菌を光学顕微鏡 (Optiphot-2, Nikon, 東京) にて計数した。

## 3) マウス静脈内接種菌の腎への定着

マウス静脈内接種後の腎内菌数の検討は、近藤らの方法<sup>20)</sup> に準じた。すなわち種々の量の HLj あるいは MES をマウス尾静脈内に投与し、30 分および 4 日後に両腎を摘出した。2 ml の Nutrient Broth (NB) 中でよく磨り潰して得られたホモジェネートを、さらに NB にて希釈後、普通寒天培地に接種して 1 晩培養した。コロニー数を計測し、腎内の菌数を算出した。

## III. 結 果

### 1. MES の特性

FN および抗 FN 抗体を用いた coagglutination 法により分離された FN 低結合性変異株 MES の FN 結合量は、親株 HLj の約半分であった (Fig. 2a)。HLj および MES の有する FN 結合成分に関する west-western blot 解析の結果、HLj では分子量 200, 150, 70-kDa に 3 つの特異的シグナルが認められた (Fig. 2b, lane 2)。これら 3 成分はその分子量から各々、FnBPA, FnBPB, および Broad-specificity adhesin と考えられる<sup>11)14)21)</sup>。一方 MES では、150 および 70-kDa の 2 つの成分は認められたが、200-kDa のシグナルが欠如していた (Fig. 2b, lane 3)。これは MES の FnBPA 発現に何らかの変異があることを示唆する。この点に関し、MES が FnBPA の遺

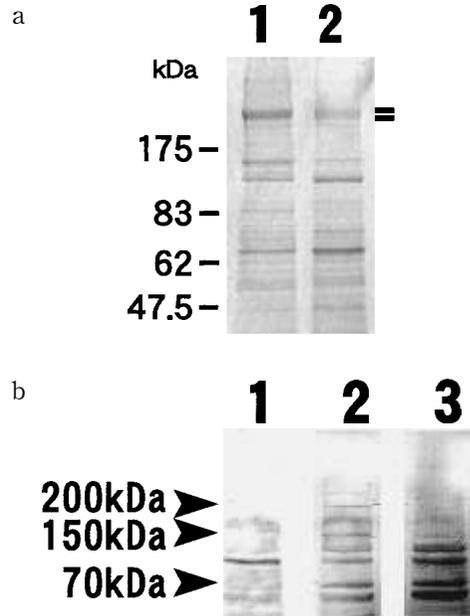
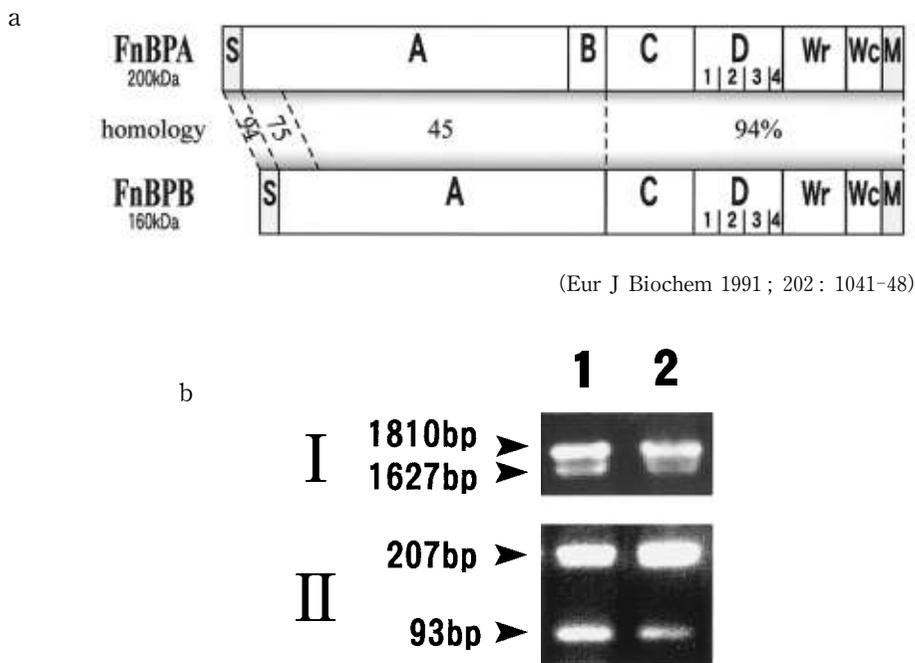


Fig. 2. Characterization of FN binding and FN binding factors of the low FN binding strain, MES.

a. The amount of bound FN on each bacteria surface. HLj, the parental strain, and HLj-derived low FN binding strain, MES, were treated with 100 μg/ml FN at 37°C for one hour, and washed. Bacteria were suspended in 1% SDS solution, boiled, and centrifuged. The supernatants were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie-brilliant blue. Lane 1: HLj, lane 2: MES. The supernatant corresponding to 3×10<sup>9</sup> CFU bacteria was loaded in each lane. The tickets beside the lane show the signals of two isoforms of FN.

b. FN binding factors of HLj and MES. Bacterial lysates, digested by lysostaphin and DNase I, was separated by SDS-PAGE. After transfer to a PVDF membrane, the blot was blocked and treated by 10 μg/ml FN. FN signals were detected by anti-FN antibody. Lanes 1 and 2: HLj, lane 3: MES. Lane 1: non-specific binding by normal rabbit IgG, lanes 2 and 3: anti-FN antibody. The lysate containing 4×10<sup>8</sup> CFU was loaded in each lane. This result was reproducible in 3 repeated experiments.

伝子 *fmbA* を保持するか否かを確認するため、PCR 解析を行った。Fig. 3a に示したように、FnBPA は主たる 5 つの領域 A, B, C, D, W から構成されており、D 領域は 3 つの相同な FN 結合部位 (D1, D2, D3) と、1 つの不完全部位 (D4) から構成される。また FnBPB には B 領域は存在し



(Eur J Biochem 1991 ; 202 : 1041-48)

Fig. 3. Analysis of *fnb* gene in MES.

a. Domain organization of FnbA and FnbPB. Domain B exists only in FnbA and not in FnbPB. Domain D is composed of three complete and one incomplete FN binding motifs.

b. Detection of *fnbA*, B, D1, and D2 by PCR analysis. Bacterial lysates were prepared by achromopeptidase digestion. I: Regions A+B in *fnbA* and only A in *fnbB* were amplified. II: Regions D1+D2 and only D1 in *fnbA* and B were amplified. Lane 1: HLj, lane 2: MES.

ない<sup>16)</sup>. よって2つの遺伝子に相同な、AおよびC領域の先頭配列を認識するプライマーのセット(F, R)を用いることにより、FnbAのA+B領域あるいはFnbPBのA領域に相当するDNA領域(各々1,810 bpおよび1,627 bp)が増幅される。またこれとは別に、D1およびD2領域先頭部に共通な配列を認識するプライマー(F1), およびD2領域の後部配列を認識するプライマー(R1)のセットにより、FnbAおよびBのD1+D2, およびD2に相当するDNA領域(各々207 bpおよび93 bp)が増幅される。これらの解析の結果、MESにおいても親株と同様のすべてのシグナルが検出された(Fig. 3b-I-II)。よってMESはFN結合能を有するD領域をも含めた、*fnbA*を保持していることが示唆された。

## 2. MφによるMES貪食におけるFNの効果

Table 1に示したように、FN処理したHLjは、非処理の場合に比べてMφによる食菌数が5倍に増加した。これとは対照的にMESの場合、FN

Table 1. Effect of FN on phagocytosis of HLj and MES by macrophages

strain	the number of ingested bacteria/macrophage	
	without FN treatment	with FN treatment
HLj	0.78±1.95	3.72±9.18
MES	1.70±4.22	1.20±5.35

FN (200 μg/ml)-treated or untreated HLj or MES was added to the macrophage cultures (bacteria/macrophages=20/1). Fifty macrophages were selected randomly, and the number of ingested bacteria was counted. The mean values±SD of ingested bacteria per macrophage are shown. Statistical significance (*p*) between FN-treated bacteria and untreated bacteria of HLj is 0.03, and that of MES is 0.41.

結合の有無はその被食数に影響を及ぼさなかった。この結果から200-kDa因子へのFNの結合が、FNの関与するMφの貪食機構に密接に関わることが示された。

### 3. 線維芽細胞による MES 取込み

線維芽細胞は黄色ブドウ球菌を取込みアポトーシスを起すことが報告されている<sup>3)</sup>が、この取込みは抗 FN 抗体の存在下では起こらないこと(私信)、また線維芽細胞自身がその表面に FN を含む ECM を形成することから<sup>22)23)</sup>、FN は線維芽細胞による黄色ブドウ球菌の取込みにも関与していると考えられた。これに関して、マウス L-929 線維芽細胞による MES の取込みについて検討したところ、FN 処理あるいは非処理のいずれの場合も、L-929 細胞に取込まれる MES 数は親株に

Table 2. Ingestion of HLj and MES by L-929 fibroblasts

strain	the number of ingested bacteria/cell	
	without FN treatment	with FN treatment
HLj	6.03±5.75	7.03±6.71
MES	0.17±0.57	0.23±0.63

FN (200  $\mu$ g/ml)-treated or untreated HLj or MES was added to the L-929 fibroblast cultures (bacteria/fibroblasts=100/1). One hundred fibroblasts were selected randomly, and the number of ingested bacteria was counted. The mean values±SD are shown. Statistical significance (*p*) between FN-treated bacteria and untreated bacteria of HLj is 0.26, and that of MES is 0.48, whereas that between untreated HLj and untreated MES is  $<10^{-16}$ .

比べ著しく低下していた。また M $\phi$  による食菌の場合とは異なり、菌の FN 前処理はその取込み数に影響を与えなかった (Table 2)。200-kDa 因子と FN の相互作用は、線維芽細胞の黄色ブドウ球菌取込みについても重要な条件であると考えられた。

### 4. マウス尾静脈内接種後の MES の腎定着

Fig. 4 は、種々の量の HLj あるいは MES をマウス尾静脈内に接種して 30 分後の腎内菌数を示す。HLj では、マウス 1 個体当たり  $4 \times 10^7$  CFU の接種で  $3 \times 10^3$  CFU/kidney の定着が認められ、 $8 \times 10^7$  CFU の接種で定着菌数は最大値(約  $10^4$  CFU/kidney)に達し、それ以上の接種量は定着菌数の増加をもたらさなかった。一方、MES では接種量が  $10^8$  CFU を越えた場合でも腎内の菌数は親株の 1/2-1/3 であり、親株に比べて定着数が顕著に低下していた。

Table 3 は、マウスに  $1.5 \times 10^8$  CFU の菌を接種して 30 分および 4 日後における、腎 1 個当たり含有菌数の平均を示したものである。接種後 30 分では腎内の MES の数は親株の 54% であったが、4 日目には 12% にまで低下した。MES は寒天培地や液体培地においては親株と同程度の増殖を示し、両株の増殖能は同等と考えられるので、この菌数の差違は MES の腎への定着能が親株に劣るためであると推察される。

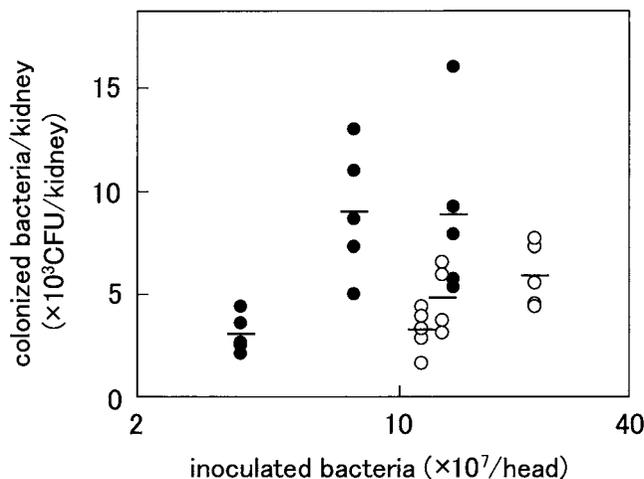


Fig. 4. Adherence of HLj and MES to mouse kidney after intravenous administration. Various numbers of bacteria were administered to mice intravenously. After 30 min of inoculation, the number of bacteria adhering to a kidney was analyzed as mentioned in the text. Closed symbols: HLj, open symbols: MES. The bars in the figure show the mean values of adhered bacteria.

Table 3. Colonization of HLj and MES to the kidney after intravenous administration

strain	the number of colonized bacteria/kidney ( $\times 10^3$ CFU/kidney)	
	30 min	4 days
HLj	8.8 $\pm$ 4.3	5,200 $\pm$ 7,600
MES	4.8 $\pm$ 1.7	640 $\pm$ 560

HLj or MES was intravenously administered to mouse ( $1.5 \times 10^8$  CFU/head). After 30 min and 4 days of administration, both kidneys were taken out and the number of colonized bacteria was counted. The mean values $\pm$ SD are shown. Statistical significance ( $p$ ) between HLj and MES at 30 min is 0.11, and that on the 4th day is 0.25.

この結果から、200-kDa 因子は黄色ブドウ球菌の宿主組織への定着においても重要な役割を有すると考えられる。

#### IV. 考 察

黄色ブドウ球菌は、おもな FN 結合因子として FnBPA, FnBPB および Broad-specificity adhesin を発現している<sup>11)16)</sup> これらの因子は FN との相互作用を通じ、黄色ブドウ球菌の宿主細胞・組織への付着に関与している。FnBPA, FnBPB は FN に対する特異的レセプターであり、各々遺伝子 *fnbA*, *fnbB* にコードされている。Broad-specificity adhesin は FN のみならず、vitronectin, collagen, fibrinogen, thrombospondin 等、他の ECM タンパクや血漿タンパクに結合することが知られている<sup>21)</sup>。本研究では、このような因子による黄色ブドウ球菌の FN 結合性と、宿主組織・細胞との相互作用の関連性について調べるため、FN 結合性の低い変異株を調製して検討を行った。

Coagglutination 法により選択された変異株 MES の FN 結合量低下は、west-western blot 解析の結果から、200-kDa 因子の欠損あるいは変異に起因すると考えられた。分子量からこの因子は FnBPA であると考えられたので、PCR 法によりこの蛋白をコードする *fnbA* の有無を検討したところ、親株と同様の結果が検出された。このことは west-western blot 解析でみられた 200-kDa 因子の不全が、*fnbA* の欠損ではなく FnBPA の発現低下、あるいは FN 結合部位の変異に起因す

ることを示唆する。この点は今後の検討課題である。

M $\phi$  による黄色ブドウ球菌の貪食において、FN はオプソニン様の効果を示す<sup>6)</sup>。これは M $\phi$  表在のインテグリンが、菌表面に結合した FN と結合することで M $\phi$  が活性化されるためであると報告されており<sup>24)</sup>、抗体や補体といった典型的なオプソニンとは異なる機序による。MES では 200-kDa 因子の変異による FN の結合不全のため、上記の活性化が誘導されず、貪食活性の増加も認められなかったと考えられる。

食細胞のみでなく、上皮細胞や線維芽細胞が黄色ブドウ球菌を取込むことが知られている<sup>11-3)</sup>。取込まれた菌は、ある場合にはリゾソームに入らずに細胞質中で増殖し、宿主細胞のアポトーシスを誘導する<sup>13)</sup>。これは黄色ブドウ球菌が細胞外寄生性細菌であるにもかかわらず、時として重篤な感染症を起こす一因と考えられる。これら非食細胞への取込みにおいても、200-kDa 因子の関与が予想された。結果に示したように線維芽細胞による MES 取込みは、親株に対して著しく低下した。線維芽細胞は自己の表面に FN を含む ECM を構築しているが<sup>22)23)</sup>、MES は 200-kDa 因子の変異により線維芽細胞周囲の FN に結合しにくいいため、取込みが著しく減少したと考えられる。これは菌の FN 結合因子を介した FN マトリックスとの結合が、取込みに必要であることを示唆する。

前述のように、線維芽細胞による黄色ブドウ球菌の取込みは、抗 FN 抗体存在下では起こらない。これは、線維芽細胞周囲に構築された FN マトリックスの存在が取込みに必要なことを示す。したがってあらかじめ被検菌を FN 処理することによっても、菌と FN マトリックスとの結合が阻害され、取込まれる菌数は減少する可能性が考えられた。しかし結果において FN 処理-非処理菌間に取込み数の差はなかった。このことから、FN 処理により菌と結合した FN が、何らかの機序により線維芽細胞あるいは ECM と結合して取込まれる可能性が考えられる。

近藤らは<sup>20)</sup>以前、黄色ブドウ球菌のマウス尾静脈内接種後の各臓器内菌数の推移について報告している。これによれば、肺、肝、脾の菌数は、6 日後のピークに向い漸増し、その後数日間で急激に

減少した。これに対し腎においては、最初の1-2日に急増し、その後20日以上高値を維持した。腎と他臓器間にみられたこの相違は、これら臓器中の組織M $\phi$ 数の相違によると考えられる。すなわち、細菌感染の初期防御に重要と考えられる常在性M $\phi$ 数が他臓器に比べ腎では少ない(私信)ことから、静脈内接種直後の腎においては菌の付着・定着が比較的容易なためと考えられる。したがって接種30分後の菌数は、200-kDa因子とFNとの結合度をより反映したものと考えられる。親株のFN前処理が宿主細胞との相互作用に影響することは、M $\phi$ による貪食において明らかであり、線維芽細胞による取込みの考察からも示唆される。またこれら実験時のFN処理濃度および温度は、血中の条件に近似している。したがって菌の静脈内投与後、血流中において菌と血清FNの結合が進行していると考えられ、本実験においては、すでにFNを結合した菌に対する腎組織の応答が検出されたと考えられる。得られた結果から、200-kDa因子に不全をもつ黄色ブドウ球菌は、*in vivo*における腎への定着数および増殖数の低下を示したことから、感染におけるこの因子の重要性が示唆された。

以上、ECMの一構成要素であるFNに対する細菌の親和性が、宿主細胞・組織への菌の接着・定着、さらには増殖に深く関与し、各種細胞機能の変化をもたらすばかりでなく、ひいては感染症の成立に影響を与えることが示唆された。

## V. 結 語

体内に遍在するECM成分であるFNと黄色ブドウ球菌の親和性が、宿主の食・非食細胞への黄色ブドウ球菌の取込み、さらに腎定着に影響を及ぼしたことより、細菌のFNに対する親和性が、菌の病原性の発現機序に密接に関与することが裏付けられた。また今回の被検株におけるFN低親和性は、200-kDa因子の障害に由来することから、黄色ブドウ球菌の病原性発現には、この因子が重要であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導賜りました東京慈恵会医科大学微生物学講座第2の益田昭吾教授に深謝申し上げます。また主として技術的諸面で、終始ご配慮

を頂きました同講座の方々に篤く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 336-42.
- 2) Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 1986; 54: 833-6.
- 3) Murai M, Sakurada J, Seki K, Shinji H, Hirota Y, Masuda S. Apoptosis observed in BALB/3T3 cells having ingested *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 1999; 43: 653-61.
- 4) Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 585-617.
- 5) Peterson PK, Quie PG, Kim Y, Wilkinson BJ, Verbrugh HA, Verhoef J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by human phagocytes. *Scand J Infect Dis* 1983; 41: 67-76.
- 6) Shinji H, Sakurada J, Seki K, Murai M, Masuda S. Different effects of FN on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci by murine peritoneal macrophages. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 851-61.
- 7) Flock J-I, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilson B, et al. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 1987; 6: 2351-7.
- 8) Liang OD, Ascencio F, Fransson L-Å, Wadström T. Binding of heparan surface to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1992; 60: 899-906.
- 9) Lopes JD, Reis MD, Brentani RR. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1985; 229: 275-7.
- 10) McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1994; 11: 237-48.
- 11) Palma M, Hagggar A, Flock J-I. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an en-

- dogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 1999; 181: 2840-5.
- 12) Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Rosenbloom J, Mecham RP. Molecular cloning and expression of the gene for elastin binding protein (elbS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1996; 271: 15803-9.
  - 13) Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M, et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol Chem* 1992; 267: 4766-72.
  - 14) Signäs C, Raucci G, Jönsson K, Lindgren P-E, Anantharamaiah GM, Höök M, et al. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: Use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 699-703.
  - 15) Smeltzer MS, Gillaspay AF, Pratt FL Jr, Thames MD, Iandolo JJ. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene* 1997; 196: 249-59.
  - 16) Jonsson K, Signäs C, Müller H-P, Lindberg M. Two different genes encode FN binding proteins in *Staphylococcus aureus*: the complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 1991; 202: 1041-8.
  - 17) Vuento M, Vaheri A. Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. *Biochem J* 1979; 183: 331-7.
  - 18) Masuda S, Sakurai S, Kondo I. Simple and effective method for selecting protein A-deficient mutants by cosedimentation with sensitized sheep erythrocytes. *Infect Immun* 1975; 12: 245-51.
  - 19) Minhas T, Ludram HA, Wilks M, Tabaqchali S. Detection by PCR and analysis of the distribution of a fibronectin-binding protein gene (*fbn*) among staphylococcal isolates. *J Med Microbiol* 1995; 42: 96-101.
  - 20) Kondo I, Masuda S, Kimura K, Kurosaka K, Hasegawa N. Effect of intrarenal inoculation of *Staphylococcus aureus* on mice. *Infect Immun* 1971; 4: 103-9.
  - 21) McGavin MH, Krajewska-Pietrasik D, Ryden C, Höök M. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun* 1993; 61: 2479-85.
  - 22) Chen LB, Murray A, Segal RA, Bushnell A, Walsh ML. Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. *Cell* 1978; 14: 377-91.
  - 23) Mosher DF. Assembly of FN into extracellular matrix. *Curr Opin Struct Biol* 1993; 3: 214-22.
  - 24) Shinji H, Seki K, Tajima A, Uchida A, Masuda S. Fibronectin bound to the surface of *Staphylococcus aureus* induces association of Very Late Antigen-5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. *Infect Immun* 2003; 71: 140-6.