

〈原著〉

*Clostridium perfringens*のフィブロネクチン結合タンパク FbpAおよびFbpBの局在と機能

山崎 勤¹⁾、櫃本 泰雄²⁾、片山 誠一²⁾、野上 祐作³⁾

Localization and function of the fibronectin binding protein of *Clostridium perfringens*

Tsutomu Yamasaki¹⁾, Yasuo Hitsumoto²⁾, Seiichi Katayama²⁾ and Yusaku Nogami³⁾

Summary The *Clostridium perfringens* strain 13 genome contains two genes (CPE0737: *fbpA* and CPE1847: *fbpB*) that encode the fibronectin (Fn)-binding proteins (FbpA and FbpB). *C. perfringens* bound to immobilized Fn, which was inhibited by the presence of either recombinant FbpA (rFbpA) or recombinant FbpB (rFbpB). The results of an enzyme-linked immunosorbent assay and a flow cytometry showed no clear evidence of the expression of these Fbps on the bacterial surface. However, rFbps not only bound to the bacterial surface but also drove the pre-bound Fn from it, suggesting a competitive binding between Fbps and Fn to an unknown Fn-receptor expressed on the bacterium. Those results suggest that these Fbps may play a role in dissemination of the bacterium by promoting the dissociation of Fbps adhering to the tissue by virtue of Fn.

Key words: *Clostridium perfringens*, Fibronectin, Fibronectin-binding protein

I. 緒言

病原細菌には、宿主のマトリクスタンパクの一つであるフィブロネクチン (Fn) を結合するものがあり^{1,5)}、それらは菌体表層にFn結合タンパク (Fbp) を持っている。Fnは、220 kDaのポリペプチド鎖2本からなる糖タンパクで、血漿中や細胞表面、細胞外マトリクスなどに存在する。Fnは、type I、type II、type IIIと呼ばれる三

種類のモジュールが複数個連なった分子形態を有し、様々な分子と相互作用して創傷治癒や病原細菌の感染に関与することが知られている⁶⁾。*Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) は、ガス壊疽や食中毒の原因菌として知られているグラム陽性有芽胞嫌気性菌であり⁷⁾、菌体表層にFnが結合することがわかっている⁸⁾。最近、他菌のFbp遺伝子の相同性より、ウェルシュ菌のFbpと考えられるタンパクをコードする二つの遺伝子

¹⁾岡山理科大学大学院 理学研究科 材質理学専攻
〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1

²⁾岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科

³⁾岡山理科大学 理学部 生物化学科

受領日 平成21年12月21日

受理日 平成22年 1月 5日

Department of ¹⁾Material Science, ²⁾Life Science, and
³⁾Biochemistry, Faculty of Science, Okayama University
of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005,
Japan

fbpA (CPE0737)、*fbpB* (CPE1847) が見出された⁹⁾。*fbpA*、*fbpB*遺伝子は、ガス壊疽患者から分離されたウェルシュ菌3株すべてで発現していた。組み換えタンパクrFbpAおよびrFbpBは、プレートに乾燥固定した菌とFnの結合を阻害した¹⁰⁾。rFbpA、rFbpBはいずれもFnのtype III_r-C部位に結合すること、しかも血清Fn中の1%のFn分子にしか結合しないことがわかった¹¹⁾。今回、FbpA、FbpBがウェルシュ菌の菌体表層に局在するか否かを調べると共に、これらFbpが菌とFnの結合を阻害するメカニズムについて検討した。

II. 方法と材料

1. rFbpAおよびrFbpB

ウェルシュ菌strain13の遺伝子*fbpA*、*fbpB*にHis-tagをコードする配列を付加したものをpET16-b vectorに組み込み、大腸菌に発現させた¹⁰⁾。

2. Fnの精製

ヒトプール血清よりゲラチンセファロースカラムを用いてFnを精製した。カラムからの溶出は4 M尿素を含む10 mMペロナル緩衝生理食塩水 (VBS: pH 7.3) で行なった。

3. 抗rFbpA、抗rFbpBポリクローナル抗体の作製

rFbpA、rFbpBをフロイト完全アジュバントと共に、マウスおよびウサギに免疫した。二次免疫後、採血により得た血清を抗Fbp血清として用いた。ウェルシュ菌strain 13をFrench press (10,000 p.s.i.) で溶菌し、遠心後の沈殿をウサギに免疫して抗ウェルシュ菌血清 (抗st13抗体) を得た。

4. ウェルシュ菌の培養および乾燥固定菌プレートの作製

ウェルシュ菌strain 13をGifu anaerobic medium (GAM培地) により嫌気条件でOD₆₀₀=0.5になるまで培養を行なった。菌を洗浄後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: pH 6.8) に浮遊 (OD₆₀₀=0.3) させ、それをEIAプレートの各ウェルに100 μlずつ注ぎ、37℃で一晩乾燥固定した。

5. ビオチン化

Fn、rFbpA、rFbpB、ウェルシュ菌は、0.1 mM biotinamidohexanoic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt含有VBSに1時間反応することでビオチン化した。反応後、液量の1/5量の0.5 Mトリス-グリシン緩衝液 (pH 7.5) を加え1時間反応させ、desalting columnまたは遠心により、結合していないビオチンを取り除いた。

6. rFbpAおよびrFbpBによる固相化Fnへの菌の結合阻害

Fn (1 μg) をコーティングしたEIAプレートの各ウェルに、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSに浮遊させたビオチン化菌浮遊液 (OD₆₀₀=0.3) 100 μlの中に一定量のrFbpA、rFbpBを共存させ1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.02% Tween 20含有PBS (PBST) で洗浄後、HRP標識streptavidinを反応させ、発色液 (0.91 mM 2,2'azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)、0.04% H₂O₂、0.1 M citrate、pH 4.1) を100 μl加えて発色させ、波長405 nmにおける吸光度を測定した。

7. ELISA

乾燥固定菌プレートの各ウェルに、250倍希釈抗血清100 μlを反応させた。PBSTで洗浄後、HRP標識抗マウスIgG反応させ、発色液を加え、波長405 nmにおける吸光度を測定した。

8. FACS解析

菌浮遊液に抗st13、抗rFbpA、抗rFbpB、コントロール用血清を反応させた後、FITC標識抗ウサギIgG抗体を反応させ、FACS caliburで測定した。

9. 菌体へのrFbpA、rFbpBの結合実験

乾燥固定菌プレートの各ウェルに、0.1%BSAを含むVBS (BVBS) に溶解した1 μgのビオチン化rFbpAあるいはビオチン化rFbpBを反応させた。PBSTで洗浄後、HRP標識streptavidinを反応させ、発色液を加え、波長405 nmにおける吸光度を測定した。

10. 菌体に結合したFnに対するFbpA、FbpBの影響

乾燥固定菌プレートの各ウェルに、BVBSに

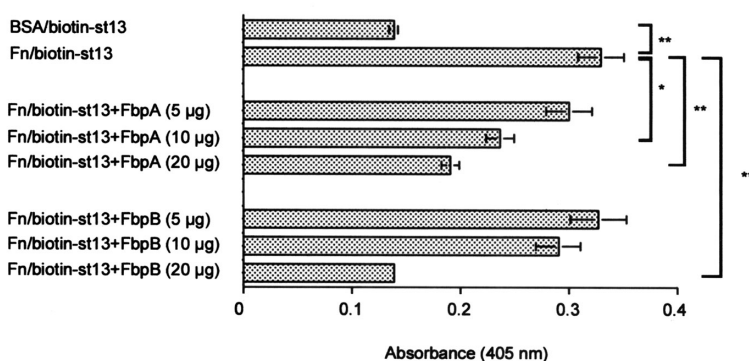


Fig. 1 Inhibition of the binding of biotinylated *C. perfringens* to Fn by rFbps. Binding of biotinylated *C. perfringens* to Fn was measured in the presence of the indicated doses of rFbpA, rFbpB. A microplate well was coated with either BSA or Fn. Biotinylated *C. perfringens* (st13) was then added in the presence of the indicated dose of rFbps. Binding of *C. perfringens* was estimated by the A405 value determined during a colorimetric assay. All assays were performed in triplicate. Statistical significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared to the control was assessed by Student's two-tailed t-test and is indicated by an asterisk, double asterisk, respectively.

溶解した1 µgのビオチン化Fnを反応させた。PBSTで洗浄後、BVBSに溶解したrFbpA、rFbpBを一定量反応させた。反応後、PBSTで洗浄し、HRP標識streptavidinを反応させ、発色液を加え、波長405 nmにおける吸光度を測定した。

Ⅲ. 結果

1. rFbpAおよびrFbpBによる固相化Fnへの菌の結合阻害

ビオチン化菌は固相化したFnに有意に結合した。この系にrFbpAあるいはrFbpBを共存させると、菌の結合は濃度依存的に抑制された (Fig. 1)。

2. FbpA、FbpB表出の有無

抗rFbpA、抗rFbpB血清を用いてELISAを行った。乾燥固定したウェルシュ菌に対して、抗FbpA、抗FbpB抗体の結合は認められなかった (Fig. 2A)。また、FACSによる解析でも、菌体表面に対する抗FbpA、抗FbpB抗体の結合は検出できなかった (Fig. 2B)

3. 菌体表面に結合するrFbpA、rFbpBとFnの相互作用

rFbpA、rFbpBはFnと菌の結合を阻害する

(Fig. 1)。当初、この阻害は菌体上のFbpAおよびFbpBと、共存させたrFbpA、rFbpBが競合阻害したものだと考えた。しかし、菌体表面にFbpAおよびFbpBが検出できなかったことから (Fig. 2A、Fig. 2B)、それらが菌体上のFnレセプターである可能性は低くなった。そこで、ビオチン化rFbpAおよびビオチン化rFbpBを菌体表面に反応させたところ、いずれも有意に結合することが明らかになった (Fig. 3)。さらに、rFbpAまたはrFbpBを加えることにより、あらかじめ菌体に結合していたビオチン化Fnの結合量を減少させた (Fig. 4)。

Ⅳ. 考察

FbpAおよびFbpBはleader sequenceを持たず、膜貫通部分と思われるアミノ酸配列も持たない。そして、LPXTG配列などの細胞壁への結合に必要なとされる特殊なアミノ酸配列も持たない (PSORT Prediction, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)。また、菌体表面に、FbpA、FbpBは検出されなかった (Fig. 2A、Fig. 2B)。これらの事実は、FbpA、FbpBが菌体上に表出していないことを示唆している。

固相化Fnへの菌の結合がrFbpAおよびrFbpBによって阻害された (Fig. 1)。これは生体内で結

合組織のFnに菌が付着するのを、FbpAおよびFbpBが阻害することを示唆している。この阻害が起こる原因として、Fnに直接rFbpA、rFbpBが結合して阻害したことによるものか、あるいは菌体上のFnレセプターにFnが結合するのをrFbpA、rFbpBが競合し阻害したことによるものであると考えられた。rFbpA、rFbpBは血清Fnの約1%程度を占める特殊なFn分子にしか結合しない¹⁰⁾。しかし、その特殊なFn分子も、それ以外のFnも菌体表層には同様に結合する事が明らかになった(結果不掲載)。よって、固相化した

Fnおよび菌体上に結合したFnの大部分にはrFbpA、rFbpBは結合しないと考えられる。また、驚いたことに、菌体表層にrFbpA、rFbpBが特異的に結合すること(Fig. 3)、さらには、あらかじめ菌と結合していたFnが、後から加えたrFbpAおよびrFbpBによって遊離することが明らかになった(Fig. 4)。以上のことから、固相化Fnと菌の結合を阻害するメカニズムは、菌体表層のFnレセプター上でFnとrFbpA、rFbpBが競合するためだと考えられ、今後より詳しく調べてゆく必要がある。

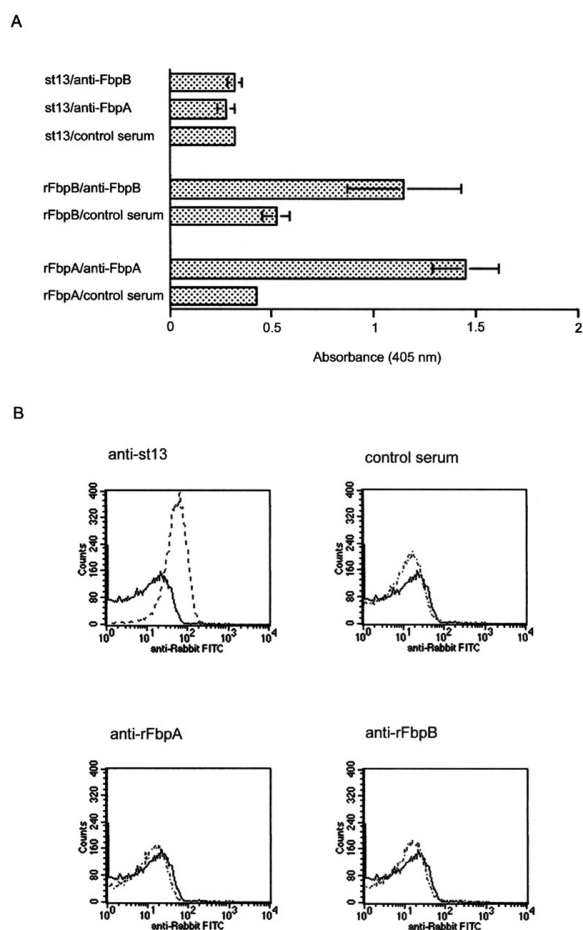


Fig. 2 Reactivity of anti-Fbp polyclonal antibodies towards *C. perfringens*. (A) The wells coated with either *C. perfringens* or rFbps were incubated with 100 μ l of 250-fold diluted anti-Fbp sera. After washing, the wells were reacted with HRP-conjugated anti-mouse IgG and were then subjected to a colorimetric assay. All assays were performed in triplicate. (B) *C. perfringens* were reacted with anti-rFbpA, anti-rFbpB, anti-*C. perfringens* strain 13 (anti-st13) and control sera (shown by a dotted line). The negative control, during which cells were reacted without serum, is indicated by a solid line. After washing, the cells were reacted with FITC-conjugated anti-rabbit IgG and measured by FACS calibur.

Fnは創傷を受けた組織に結合し、繊維芽細胞などを接着させる働きをもつことが知られている。ウェルシュ菌はこれら損傷部位のFnに結合し、感染巣を形成すると考えられる。菌の増殖に伴って引き起こされる溶菌などにより、菌体外へ放出されたFbpAおよびFbpBが、一旦Fnに結合した菌を剥がす事になるであろう。このこ

とにより、組織に付着した菌が遊離し、播種や感染巣の拡大につながると考えられる。

V. 結語

今回、FbpAおよびFbpBがウェルシュ菌の表面に表出していないことが示唆された。また、

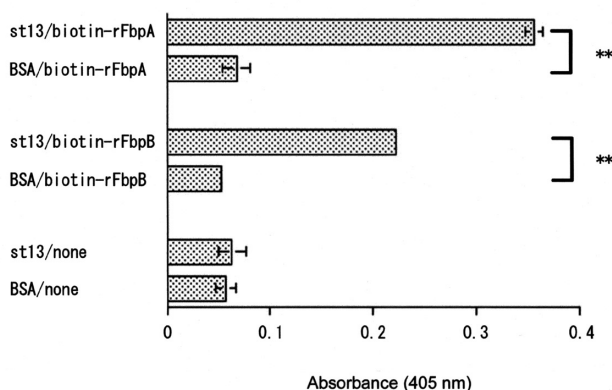


Fig. 3 Reactivity of rFbps with *C. perfringens*. The wells coated with either *C. perfringens* or BSA were incubated with 1 μ g of biotinylated rFbps. After washing, HRP-streptavidin was added. All assays were performed in triplicate. Statistical significance ($P < 0.01$) compared to the control was assessed by a Student's two-tailed *t*-test and is indicated by a double asterisk.

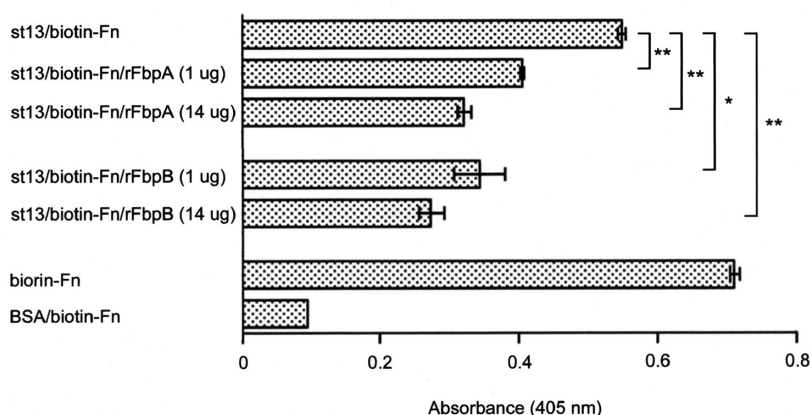


Fig. 4 Effect of the added rFbps to the bound Fn on *C. perfringens*. The wells coated with *C. perfringens* strain 13 (st13) were incubated with 1 μ g of biotinylated Fn. After washing, the wells were incubated with 1 μ g or 14 μ g of Fbps. After washing, HRP-streptavidin was added. Biotinylated Fn binding was calculated as the A405 value determined during a colorimetric assay. All assays were performed in triplicate. Statistical significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared to the control was assessed by a Student's two-tailed *t*-test, and is indicated by an asterisk and a double asterisk, respectively.

FbpAとFbpBは菌体と結合したFnを剥がすことがわかった。今後、これらの現象が、ウェルシュ菌の病原性にどのように関わるかをより詳しく調べていく必要がある。

謝辞

この研究を行なう上で、様々な協力をしていただいた春摘佳奈さんと山添良介さんに感謝いたします。

文献

- 1) Menzies BE: The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis*, 16: 225-229, 2003.
- 2) Terao Y, Kawabata S, Nakata M, Nakagawa I, Hamada S: Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem*, 277: 47428-47435, 2002.
- 3) Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, Jenkinson HF: The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol*, 41: 1395-1408, 2001.
- 4) Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D, Lecuit M, Fsihi H, Cossart P: FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol*, 53: 639-649, 2004.
- 5) Hennequin C, Janoir C, Barc MC, Collignon A, Karjalainen T: Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 149: 2779-2787, 2003.
- 6) Hynes RO and Yamada KM: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*, 95: 369-377, 1982.
- 7) Rood JI and Cole ST: Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev*, 55: 621-648, 1991.
- 8) Katayama S, Nozu N, Yokoyama M, Hitsumoto Y: Detection of Fibronectin-Binding Proteins in *Clostridium perfringens*. *Acta Med Okayama*, 60: 351-355, 2006.
- 9) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H: Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 996-1001, 2002.
- 10) Katayama S, Nozu N, Okuda M, Hirota S, Yamasaki T, Hitsumoto Y: Characterization of two putative fibronectin-binding proteins of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 15:155-159, 2009.
- 11) Yamasaki T, Hitsumoto Y, Katayama S, Nogami Y: Fibronectin-binding proteins of *Clostridium perfringens* recognize the III₁-C fragment of fibronectin. *Microbiol Immunol*, in press 2010.