

平成10年度 厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）研究報告書

研究課題名

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性に関与する因子の遺伝的解析
(H10 - 特別 - 022)

主任研究者：小松澤 均
(広島大学・歯学部)

1999年 3月

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

総括研究報告書

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性に関与する因子の遺伝的解析に関する研究

主任研究者 小松澤 均 広島大学歯学部助手

研究要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）のメチシリン耐性遺伝子（*mecA*）は既に報告されているが臨床分離のMRSAの耐性度の多様性は*mecA*にコードされるペニシリン結合タンパク（PBP2'）の産生量だけでは説明がつかない。本研究においてMRSAのメチシリン耐性度が減少する変異株をトランスポゾン挿入により分離し、そのトランスポゾン挿入領域の遺伝子（*fmtA, B, C*）を明らかにした。これらの因子を不活化することでMRSAのメチシリンに対する耐性度は減少した。また、バンコマイシン耐性MRSAにこれらの因子を変異させることでバンコマイシンに対する耐性度も減少した。以上の結果より、本研究において明らかにした因子（*fmtA, B, C*）は細胞壁合成系に関与しており、細胞壁合成系に作用する抗生物質の感受性に影響を与える因子であることが示された。

分担研究者 藤原 環
広島大学歯学部助手

A. 研究目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）のβ-ラクタム系抗生物質の耐性度に影響を及ぼす因子を遺伝的に解明することを目的とする。それら因子を解明することは細胞壁合成系に関わる因子についても検討することであ

り、現在までに報告されている因子とあわせて黄色ブドウ球菌の細胞壁合成系を総括的に明らかにしていくことができる。また、近年問題視されてきたバンコマイシン耐性MRSAのバンコマイシン耐性機序とこれら因子との関連性についても検討する。

B. 研究方法

高度メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

(MRSA) よりメチシリンの耐性度が減少する変異株をトランスポゾン (Tn551) 挿入により分離する。分離した変異株について以下の実験を行った。

(1) 変異株のトランスポゾン挿入領域の遺伝子のクローニング・シーケンス

変異株の染色体DNAを分離後、適当な制限酵素で切断し大腸菌のプラスミド(pUC19)にクローニングしライブラリーを作製する。トランスポゾンのDNA配列より作成したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法により変異株のトランスポゾン及びその近傍領域の遺伝子をクローニングする。その後、トランスポゾンの近傍付近のシーケンスより得られた配列より再度プローブを作成する。そのプローブを用いて親株のDNAよりその領域をクローニングする。クローニングした断片が変異株をコンプリメントするかどうかを検討し、トランスポゾン挿入部位の遺伝子の領域を決定する。得られたDNA断片のシーケンスを行い遺伝子の本態を明らかにする。決定したDNA配列を基にDNAデータベースを用いて他の蛋白質等との相同性の検討、モチーフの検索を行う。

(2) 得られた遺伝子の機能解析

得られた変異株およびその親株より細胞壁ペプチドグリカンを経験する。細胞壁分解酵素によりペプチドグリカンのグリカン鎖の部分の特異的に切断

後、高速液体クロマトグラフィーにより分取したピークを親株と変異株で比較することでその構造的変化を解析する。

また、各リコンビナントタンパクを作製、精製後、ウサギに免疫し抗血清を得る。その抗血清を用いて各因子の菌体での局在性について検討を行う。

(3) バンコマイシン耐性菌における各因子の不活化による影響

得られた変異株のトランスポゾンを形質導入法によりバンコマイシン耐性株の同じ遺伝子領域に挿入し、バンコマイシンの感受性について検討しバンコマイシン耐性と本実験で得た遺伝子との関連性について明らかにする。

C. 研究成果

(1) 変異株のトランスポゾン挿入領域の遺伝子のクローニング・シーケンス

変異株3株 (TS111、TS1、TS4株) のトランスポゾン挿入領域のクローニングを試みた。TS111株の場合、染色体DNAを分離後、制限酵素 *Pst*Iおよび *Hind*IIIで切断し大腸菌のプラスミド(pUC19)にクローニングしライブラリーを作製する。トランスポゾンのDNA配列より作成したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法により変異株のトランスポゾン及びその近傍領域の遺伝子をクローニングし、5.4 kbpのフラグメントを得た。その後、そ

のフラグメントをプローブに用いて親株のDNAより同様の方法で約 8.9 kbpの *Xba*Iフラグメントをクローニングした。得られたDNA断片のシーケンスを行いトランスポゾン挿入周辺領域の遺伝子を決定した。TS1およびTS4株においてはPCR クローニング法によりトランスポゾン挿入領域のクローニングを行った。得られたフラグメントをシーケンスした結果、2つの株は同じ遺伝子領域内にトランスポゾンの挿入を認めたため、TS4株より得たフラグメントをプローブに用いて親株より上述した方法によりクローニングを行い、約4.2 kbpの *Hinc*IIフラグメントをクローニングした。そのフラグメントをシーケンスした結果、トランスポゾン挿入が認められる遺伝子がN末端が不完全な形で認められた。以上より、TS111株のトランスポゾン挿入遺伝子領域を *fmtB*、TS4およびTS1株の遺伝子領域を *fmtC*と名付けた。

(2) 得られた遺伝子のモチーフ ・ 相同性検索

*FmtB*タンパク：2478のアミノ酸からなる分子量263kDaのタンパクで、中央部分に75個のアミノ酸からなる17回の繰返し構造が認められた。C末端にはcell wallに結合するモチーフが認められた。相同性検索の結果、病原性因子として報告されている *Streptococcus suis* のEFタンパクや *Mycoplasma hominis*

のLymp1と相同性が認められたがその機能を示唆するタンパクは認められなかった。

FmtC：不完全な形であるが、その機能を示唆するような相同性のあるタンパクは認められなかった。

(3) *fmtA*および *fmtB*の機能解析

*fmtA*および *fmtB*の機能解析を行うため、それぞれの変異株の細胞壁ペプチドグリカンの構造解析を行った結果、*fmtA*変異株のペプチドグリカンは親株に比べ架橋度がやや減少しており、グルタミン酸のアミド化が抑制されていた。*fmtB*変異株においては親株と比較して顕著な差は認められなかった。

抗*FmtA*および抗*FmtB*血清を用いたImmunoblottingの結果、*FmtA*タンパクは細胞膜にまた*FmtB*タンパクは細胞壁にその局在を認めた。

(4) バンコマイシン耐性菌へのトランスポゾンの導入

*fmtB*および *fmtC*に挿入したトランスポゾンを形質導入法によりバンコマイシン耐性株の同じ遺伝子領域に挿入し、バンコマイシンの感受性について検討した結果、両変異株ともバンコマイシンの耐性度は減少し感受性化した。また、両変異株ともメチシリンに対する耐性度も減少していた。

D. 考察

本研究において明らかにしたMRSAのβ-ラクタム剤耐性に影響を及ぼす因子*fmtB*および*fmtC*は過去に報告のない新しい因子である。*fmtB*遺伝子は非常に大きいタンパク(263 kDa)をコードしており細胞壁ペプチドグリカンにC末端が結合するモチーフが認められた。Immunoblottingの結果からもこのタンパクがcell wall anchoring proteinである可能性が強く示唆される。しかし、このタンパクの機能を示唆するタンパクとのホモロジーは認められず、細胞壁の構造的変化も認められなかった。*fmtB*遺伝子のすぐ上流には耐性に影響を与える因子の一つである*glmM*遺伝子がありこの遺伝子との関連についても検討する必要があると考えられる。また、今まで報告されている耐性に影響を与える因子において細胞壁に局在している因子はなく*fmtB*が初めてであり、このタンパクがどのようにメチシリン耐性あるいは細胞壁合成に関与しているかを明らかにしていきたい。

*fmtC*因子についてはその機能を示唆するような相同性のあるタンパクが認められず、まず完全な形の遺伝子としてクローニングをしていく必要がある。

*fmtA*因子についてはその因子を不活性化した変異株の細胞壁の構造解析からグルタミン酸のグルタミンへのアミド化に関与していることが考えられたが、その反応を触媒する因子は既に明らか

になっており、今回の因子はその酵素との相同性も認められなかったことから、間接的にアミド化の抑制に関与していると考えられた。

E. 結論

本研究において明らかになった新たな2つのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌におけるβ-ラクタム剤に影響を及ぼす因子(*fmtB*、*fmtC*)は、以前に明らかにした因子(*fmtA*)とともにこれら遺伝子を不活化することでβ-ラクタム剤の耐性を減少させた。また、*fmtA*および*fmtB*遺伝子の不活化はバンコマイシン耐性をも減少させた。細胞壁の構造解析の結果から*fmtA*の不活化は細胞壁の構造に影響を及ぼしていることが認められた。以上の結果から、FmtBおよびFmtCタンパクにおいてはその機能を示唆するタンパクとの相同性が認められなかったものの、これら3つの遺伝子は細胞壁合成系に直接的あるいは間接的に関与していると考えられる。今後、さらにこれら3つの遺伝子の機能について検討し、細胞壁合成系にどのように関与しているのかを調べていく。また、現在既に明らかにされているいくつかの耐性に関与する因子との相互関連についても検討していくことで、黄色ブドウ球菌の細胞壁合成系のカスケードについて遺伝子、タンパクレベルで明らかにできると考えられ、今後の新たな細胞壁合成阻害

剤に対する耐性菌の耐性メカニズムの
解明に大きく寄与すると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Ohta, H. Komatsuzawa, M. Sugai, and H. Suginaka. 1998. Zymographic characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall. *Microbiol. Immunol.* 42(3), 231-235.

小松澤均、杉中秀寿 1998. MRSAのβ-ラクタム剤耐性に影響を及ぼす種々の因子 臨床と微生物 25(6), 827-832.

H. Komatsuzawa, K. Ohta, H. Labischinski, M. Sugai, H. Suginaka. 1999. Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. submitted.

H. Komatsuzawa, K. Ohta, M. Sugai, T. Fujiwara, P. Glanzmann, B. Berger-Baechi, and H. Suginaka. 1999. Disruption of *fmtB*, coding for a cell wall associated protein, reduces methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. submitted.

2. 学会発表

小松澤均、太田耕司、菅井基行、杉中秀寿。 MRSAのβ-ラクタム剤耐性度に影響を与える因子-*fmt*-の遺伝子解析。 1998 第71回日本細菌学会総会

太田耕司、小松澤均、藤原環、菅井基行、杉中秀寿。 β-ラクタム剤に対する耐性度が減少したTn挿入変異株（TS111株）のTn挿入領域の解析。

1998 第71回細菌学会総会

太田耕司、小松澤均、藤原環、菅井基行、杉中秀寿。 MRSAのβ-ラクタム剤耐性度に影響を及ぼす遺伝子（*fmtB*）の解析。 1998 第43回ブドウ球菌研究会

小松澤均、太田耕司、菅井基行、杉中秀寿。 MRSAのβ-ラクタム剤耐性度に影響を与える因子*fmtB*の不活化による*glmM*発現の影響。 1999 第72回日本細菌学会総会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性に関与する因子の遺伝的解析に関する研究

分担研究者 藤原 環 広島大学歯学部助手

研究要旨

本研究においてMRSAのメチシリン耐性度が減少する変異株をトランスポゾン挿入により分離し、そのトランスポゾン挿入領域の明らかになった因子 (*fmtA*, *B*) の変異株の性状を検討し、その因子の機能について検討した。両変異株の細胞壁分解酵素に対する感受性は親株と変らなかつたことから、顕著な構造的変化は認められなかつた。しかし、高速液体クロマトグラフィーによる構造解析の結果、*fmtA*の不活化は細胞壁ペプチドグリカンの架橋度を減少させ、グルタミン酸のグルタミンへのアミド化を抑制したが、*fmtB*の不活化では変化は認められなかつた。また、各因子の局在化について検討したところ、FmtAは細胞膜にFmtBは細胞壁に局在化していることが示された。

A. 研究目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の β -ラクタム系抗生物質の耐性度に影響を及ぼす因子の機能解析を目的とする。メチシリン耐性度の減少した変異株の性状について検討することで本研究において明らかにした因子の機能について予測する。それら因子を解明することで細胞壁合成系の一端を解明し、現在までに報告されている因子とあわせて黄色ブドウ球菌の細胞壁合成系を総括的に明らかにしていくことができると考える。

B. 研究方法

高度メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) よりメチシリンの耐性度が減少する変異株をトランスポゾン (Tn551) 挿入により分離した。分離した変異株のトランスポゾン挿入領域が完全に明らかになった2株 (TS339株: *fmtA*::Tn551、TS111株: *fmtB*::Tn551) について性状の検討を行った。

(1) ペプチドグリカンの構造解析

得られた変異株およびその親株より細胞壁ペプチドグリカンを精製する。細胞壁分解酵素によりペプチドグリカンのグリカン鎖の部分の特異的に切断

後、高速液体クロマトグラフィーにより分取したピークを親株と変異株と比較することでその構造的変化を解析する。

(2) 細胞壁の溶菌酵素感受性試験

細菌細胞壁の構造的変化により細胞壁分解酵素（溶菌酵素）の感受性が変化する場合がある。そこで、作用点の異なる細胞壁分解酵素4種類（lyso-staphin、lysozyme、51kDa-endo-beta-N-acetylglucosaminidase、62kDa-N-acetyl-muramyl-L-alanine amidase）の感受性について親株と変異株において検討した。

各菌の加熱死菌を調整し、細胞壁分解酵素を添加後の菌液の濁度を測定した。

(3) FmtAおよびFmtBタンパクの局在化についての検討

各リコンビナントタンパクを作製、精製後、ウサギに免疫し抗血清を得る。親株より、培養上清画分、細胞壁画分、細胞膜画分および細胞質画分を調整する。各画分を電気泳動後、セルロース膜に転写し、各抗血清を用いてImmunoblottingを行いどの画分に局在しているかを明らかにする。

C. 研究成果

(1) 変異株のペプチドグリカンの構造的変化

*fmtA*変異株のペプチドグリカンは親株に比べ架橋度がやや減少しており、ペプチドグリカンのグルタミン酸のグ

ルタミンへのアミド化が抑制されていた。*fmtB*変異株においては親株と比較して顕著な差は認められなかった。

(2) 細胞壁の溶菌酵素感受性試験

4種類いずれの酵素においても*fmtA*および*fmtB*変異株の感受性は親株と変化が認められなかった。

(3) FmtAおよびFmtBタンパクの局在化

抗FmtAおよび抗FmtB血清を用いたImmunoblottingの結果、FmtAタンパクは細胞膜にまたFmtBタンパクは細胞壁にその局在を認めた。

D. 考察

本研究においてMRSAのβ-ラクタム剤耐性に影響を及ぼす因子*fmtA*および*fmtB*は細胞壁合成阻害剤の感受性を変化させる因子であることから、細胞壁合成に関与していると考えられる。したがって、それら因子を不活化した変異株の細胞壁は何らかの影響を受けていると考えられる。過去に報告されているいくつかの因子においては細胞壁分解酵素の感受性が変化するという報告があるが、本研究における両変異株とも親株と違いが認められなかった。さらに、ペプチドグリカンの構造解析においても*fmtA*変異株において若干の架橋度の減少およびグルタミン酸のアミド化の抑制は認められたものの顕著な変化は認められなかった。今回行った細胞壁の解析は架橋構造を主として検討する方法であり、この方法ではわ

からない構造的変化（グリカン鎖、タイコ酸等）についても検討を加える必要がある。*fntB*遺伝子は細胞壁ペプチドグリカンにC末端が結合するモチーフ（LPXTGモチーフ）が存在しており、Immunoblottingの結果からもこのタンパクがcell wall anchoring proteinである可能性が強く示唆された。*fntA*遺伝子のコードするタンパクはpenicillin binding protein（PBP）と相同性があり、Immunoblottingの結果から膜タンパクであることが示されたため、このタンパクはPBP様の機能をもつ、細胞壁合成系に参与する酵素であることが考えられた。

E. 結論

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌におけるβ-ラクタム剤に影響を及ぼす因子（*fntA*、*fntB*）は、細胞壁合成系に参与している因子として考えられるが、本研究において行った実験系ではそれら因子の詳細な機能については判明しなかった。しかし、他の報告されている因子についても本研究の場合と同じように著明な細胞壁の変化を検出できないものもある。今後、細胞壁ペプチドグリカンの構造だけでなく細胞壁に結合するタイコ酸などの付加産物についても検討し、また細胞壁前駆体の構造および代謝について検討していく必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Komatsuzawa, K. Ohta, M. Sugai, T. Fujiwara, P. Glanzmann, B. Berger-Baechi, and H. Suginaka. 1999. Disruption of *fntB*, coding for a cell wall associated protein, reduces methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. submitted.

2. 学会発表

太田耕司、小松澤均、藤原環、菅井基行、杉中秀寿。β-ラクタム剤に対する耐性度が減少したTn挿入変異株（TS111株）のTn挿入領域の解析。

1998 第71回細菌学会総会

太田耕司、小松澤均、藤原環、菅井基行、杉中秀寿。MRSAのβ-ラクタム剤耐性度に影響を及ぼす遺伝子（*fntB*）の解析。1998 第43回ブドウ球菌研究会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

参 考 文 献

19980054

以降の 1.ページまでは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

MRSA の β -ラクタム剤耐性に影響を及ぼす種々の因子. [治療薬]

小松澤均, 杉中秀壽

臨床と微生物, 25 巻 6 号 Page827-832. 1998.11

Zymographic characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall.

Ohta K, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H.

Microbiol Immunol. 1998;42(3):231-5.

Disruption of *fmtB*, coding for a cell wall associated protein,
reduces methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*

Hitoshi Komatsuzawa^{1*}, Kouji Ohta¹, Motoyuki Sugai¹, Tamaki
Fujiwara¹, Philip Glanzmann², Brigitte Berger-Bächi² and
Hidekazu Suginaka¹

Department of Microbiology, Hiroshima University School of
Dentistry, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima City, Hiroshima
734-8553, Japan¹ and Institute for Medical Microbiology,
University of Zürich, Gloriastr.32, CH-8028 Zürich, Switzerland²

*Address correspondence to: Dr. H. Komatsuzawa,
Department of Microbiology,
Hiroshima University School of Dentistry,
Kasumi 1-2-3, Minami-ku,
Hiroshima City Hiroshima 734-8553, Japan
Phone:81 82 257 5636 Fax:81 82 257 5639
E-mail:hkomatsu@ipc.hiroshima-u.ac.jp

ABSTRACT

Triton X-100 reduces the oxacillin resistance level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), although the degree of reduction varies among strains. One Tn551-insertion mutant, with enhanced susceptibility to oxacillin or Triton X-100, named COL-TS111, was isolated from MRSA COL. Genetically outcrossed MRSA mutants, KSA8-TS111 and NCTC10443-TS111, also had enhanced susceptibility to oxacillin or Triton X-100, while one outcrossed methicillin-susceptible (MSSA) mutant, RN450-TS111, did not. Sequence analysis revealed that Tn551 had inserted in the N-terminal region of an *orf* designated as *fmtB*. The *fmtB* gene of COL consisted of 7437 bp coding for a protein of 263 kDa interpositioned by 17 tandem repeats of 75 amino acids. The putative FmtB protein has LPXTG motif at C-terminal, indicating that this protein anchors to peptidoglycan. Immunoblotting analysis revealed that FmtB was found at cell wall fraction. The mutation of the mutant was not restored by *fmtB* gene on plasmid, but restored by *glmM* gene, which located closely upstream of *fmtB* and is the factor responsible for methicillin resistance, although GlmM expression was not affected in the mutant. In the presence of N-acetylglucosamine (1 to 100 mM) or glucosamine (10 mM), the MIC of oxacillin in this mutant was increased. These results indicate that *fmtB* mutation affects cell wall synthesis, especially early step, like *glmM*.

INTRODUCTION

The intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in methicillin resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) is mediated by PBP2' (PBP2A) which is active in the presence of an otherwise inhibitory concentration of β -lactam antibiotics (9, 31). PBP2' has a low affinity for β -lactam antibiotics and is encoded by the *mecA* gene which is located within the *mec* element (42). Although *mecI-mecR1* regulates the production of PBP2' (40, 41), the amount of PBP2' does not always correspond with the methicillin resistance level (27). This suggests that factors other than *mecA* are involved in methicillin resistance. Indeed, there are multiple genetic loci associated with the expression for methicillin resistance, such as the series of *fem* and *aux* factors (1, 7, 22), *llm* (26), *fmt* (19) and gene for a transcription factor, *sigB* (46). Some of these were demonstrated to be involved in the peptidoglycan metabolism (5, 12, 17, 24, 25, 28, 29, 37, 38). Investigation of the factors associated with methicillin resistance is revealing thus the complex mechanism of cell wall metabolism and resistance.

We previously reported that 0.02% Triton X-100 reduced the oxacillin (methicillin) resistance level in MRSA, without affecting cell viability, growth, production of PBP2', or the binding of β -lactam antibiotics to PBPs (20, 21). The degree of Triton X-100-induced sensitization varies among strains, suggesting that besides PBP2' the factors responsible for expression of the methicillin resistance varies among strains. To identify the factor responsible for the resistance, several investigators isolated transposon-insertional mutants from MRSA

strains, which reduced the resistance by screening the susceptibility to methicillin. de Lencastre et al isolated 41 Tn551-insertional mutants by this procedure. We previously tried to isolate the Tn551-insertional mutants by screening the susceptibility to oxacillin in the presence of Triton X-100, and isolated the one mutant, which differed from other reported mutants. Then, we determined the gene (*fmt*) responsible for methicillin resistance. Therefore, our screening procedure may isolate different mutants with those screened by only methicillin susceptibility. Here, using our screening procedure, we isolated another Tn551-insertional mutant from MRSA COL strain, which decreased the methicillin resistance, and identified a novel factor which affects methicillin resistance level and Triton X-100 susceptibility.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were grown in Trypticase soy broth (TSB)(Beckton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md) and Luria Bertani broth, respectively. Erythromycin (EM) (30 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (CP) (50 $\mu\text{g/ml}$) or ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) were added when necessary to maintain the transposon in the chromosomal DNA or plasmids in the cell.

Transposon mutagenesis. Tn551 mutagenesis was performed as described (22). Briefly, strain COL harboring pRN3208, a thermosensitive plasmid carrying Tn551 with the erythromycin resistance determinant (*ermB*), was grown overnight at 30°C. Then the overnight culture was diluted at different cell concentrations and plated on trypticase soy agar (TSA) containing erythromycin (30 µg/ml). The plates were incubated at 42°C for 48 h. The colonies that grew on this plate were replated on three TSA plates containing erythromycin (100 µg/ml), cadmium (50 µg/ml) or neither at 42°C for 24 h. The colonies that grew in the presence of erythromycin but not cadmium were used for further study. The approximate curing efficiency of the plasmid was 1×10^{-5} .

Screening of mutants with decreased oxacillin resistance in the presence of Triton X-100. Tn551 mutagenized COL was used to screen for mutants which showed decreased oxacillin resistance in the presence of Triton X-100 as described earlier (19). One mutant, which could not grow on TSB containing 0.02 % Triton X-100 plus 16 µg/ml of oxacillin, strain COL-TS111, was kept for further analysis.

Transduction. Transductions were done with phage 80 alpha (30) using COL-TS111 as donor and COL, KSA8, NCTC10443 or RN450 as recipient. Transductants were selected for growth on 10 µg/ml of erythromycin.

MICs and population analysis. MICs of various antibiotics were determined by a microdilution method as described before

(21). Population analysis profiles were determined by plating aliquots of an overnight culture on TSA containing various concentrations of oxacillin or Triton X-100. Colonies were counted after 48 h incubation at 37°C (20).

DNA manipulations. Routine DNA manipulations, DNA digestion with restriction enzymes, shrimp alkaline phosphatase, DNA ligations, gel electrophoresis, Southern blotting of DNA and hybridization, and DNA sequencing were performed essentially as described (32). Restriction enzymes and shrimp alkaline phosphatase were purchased from Boehringer Mannheim Biochemica, Tokyo, Japan, and T4 DNA ligase was from New England BioLab, Beverly, MA. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was carried out as described (16). Hybridization was performed by means of a chemiluminescent procedure (ECL direct labelling kit or 3'-oligolabelling kit; Amersham Life Science, Bucks, UK). DNA sequences of both strands were determined by the dideoxy chain termination method with Autoread sequencing kit (Pharmacia Biotech., Tokyo, Japan). PCR reagents were from Boehringer Mannheim, and PCR was performed with the GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Cloning of Tn551 insertional region. The 4 kb *Pst*I-*Hind*III fragment containing the left portion of Tn551 and its flanking region from KSA8-TS111 chromosomal DNA were identified by using the oligonucleotide probe, 5'-AGC GCC TAC GGG GAA TTT GT-3' derived from the known Tn551 sequence (33). *Pst*I-*Hind*III digests of KSA8-TS111 chromosomal DNA were ligated into pUC19 and transformed into *E. coli* XL-1 Blue. The desired clone was

identified from this library by colony hybridization. The cloned fragment was in turn used to probe a *Xba*I library of KSA8 strain cloned into pUC19. Finally, a corresponding 8.9 kb *Xba*I fragment covering the Tn551 insertional region was isolated from wild type KSA8. DNA sequencing of the fragment was performed using synthesized primers.

Since we originally isolated the mutant from COL, we determined the DNA sequence of the corresponding regions of COL, and COL-TS111, using PCR fragments as template DNA with the same primers used for KSA8 DNA sequencing.

Primer extension. Total cellular RNAs were extracted from *S. aureus* COL by the procedure of Cheung et al. using a FastRNA kit (BIO 101, Vista, CA) (4). Primer extension was carried out with AMV Reverse Transcriptase Primer Extension System (Promega, Madison, WI). The synthetic oligonucleotide primer (5'-TTTTCTGATACTAAATTTTTGTTGTCT-3') was end labeled with ³²P-ATP. The labeled primer was then mixed with 100 µg or 50 µg of RNA. Annealing was at 58°C for 20 min, then at room temperature for 10 min, and extension at 42°C for 30 min. The reaction mixture was loaded on a 6% polyacrylamide gel, together with sequencing reaction samples using the same primer. After electrophoresis, the gel was dried and exposed to a Fuji imaging plate (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan), then detected with BAS2000.

Complementation test. For complementation experiments, we constructed a plasmid, pHK4357 (Table 1). pHK4357 has a 8 kb DNA fragment of COL containing *fmtB*, generated by PCR with primers (5'-CTGATGAAGATGCTGAAAGA-3' and 5'-TGTTATGTATGAAAGGAGTA-

3'), in the shuttle vector pCL8. The plasmid, pHK4176, which contained the *glmM* gene, were generated from COL by PCR amplification with two primers (5'-GTAAACAGAAAGGTAGT-3' and 5'-CGTTAAAAACACAAAGCA-3'). Also, we constructed the plasmid, pHK4251, which contained *glmM* and *fmtB* originating from COL. All plasmids were transformed into RN4220, then transduced into COL-TS111. Complementation was determined by measuring the MIC of oxacillin.

Antiserum. To analyze the protein expression of FmtB and GlmM, we generated antiserum against FmtB and GlmM. First, we prepared the recombinant proteins of FmtB and GlmM by using the *E. coli* FLAG Expression System (Eastman Kodak Company, New Haven, CT). The repeated sequence region of the *fmtB* gene was amplified by PCR with two primers (5'-CAAGCGAAACAAGATATTATCCAA-3' and 5'-GCTTGGTTCGCTTTAGGTTTA-3'), and the full *glmM* gene was amplified with primers (5'-ATGGGAAAATATTTTGGT-3' and 5'-GCTTGGTTCGCTTTAGGTTTA-3') from KSA8 chromosomal DNA, then cloned into pFLAG MAC vector (Eastman Kodak Company) to generate pHK4148 and pHK4203, respectively. These plasmids were electroporated into *E. coli* BL21, and used to produce the recombinant proteins. Recombinant proteins were purified from *E. coli* lysates with the anti-FLAG affinity gel according to the manufacturer's manual. The purified proteins were used to immunizing rabbits. The antiserum was diluted 1,000 fold for immunoblotting.

Extraction of total proteins from *S. aureus* cells and fractionation of cells. *S. aureus* cells growing to early

stationary phase were collected by centrifugation at 10,000 X g. After washing with PBS, cells were suspended in PBS containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and digested with lysostaphin (final concentration 100 µg/ml) for 30 min at 37°C. After the centrifugation at 10,000 X g, the supernatant was used as crude fraction. Various fractions of *S. aureus* cells were prepared as follows: (i) culture supernatant was obtained by centrifugation at 10,000 X g for 30 min and concentrated 60 times by 80 % saturated ammonium sulfate precipitation, (ii) cell wall extracts, and (iii) cytoplasmic fractions were obtained as follows: Cells were suspended in digestion buffer (30 % raffinose in 0.05 M Tris [pH 7.5] with 0.145 M NaCl) containing 1 mg of lysostaphin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 100 µg of DNase (Sigma), and phenylmethanesulfonyl fluoride (1 mM). The cell mixture was incubated for 1 h at 37°C. Protoplasts were removed by centrifugation at 8,000 x g for 10 min, and the supernatant was used as cell wall extract. The protoplasts were lysed in PBS, and used as cytoplasmic fraction.

Chemicals and reagents. Triton X-100 was purchased from Nacalai tesque, Kyoto, Japan. Oxacillin, methicillin, bacitracin, vancomycin, N-acetylglucosamine and glucosamine were from Sigma Chemical Co, St Louis, MO. Cefoxitin, imipenem, chloramphenicol, fosfomycin and tetracycline were from Daiichi Seiyaku (Tokyo, Japan), Banyu Seiyaku (Tokyo, Japan), Sankyo (Tokyo, Japan), Wako Chemicals (Osaka, Japan) and Lederle Japan (Tokyo, Japan), respectively.