

培養細胞モノレイヤの透過における
緑膿菌のIV型線毛の機能に関する研究

2015 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

四方 基嗣

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1). Naoki Hayashi, Hideyuki Nishizawa, Seiya Kitao, Sakurako Deguchi, Takano Nakamura, Akiyo Fujimoto, Mototsugu Shikata, and Naomasa Gotoh : *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett.* **589**, 890-896 (2015). [第 1 章]
- 2). Mototsugu Shikata, Naoki Hayashi, Akiyo Fujimoto, Takano Nakamura, Naoyuki Matsui, Ayana Ishiyama, Yui Maekawa, and Naomasa Gotoh : The *pilT* gene contributes to type III ExoS effector injection into epithelial cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* in press (doi : 10.1016/j.jiac.2015.12.012). [第 2 章]

目次

要旨	1
緒論	3
1. 第1章 上皮細胞透過経路の形成におけるIV型線毛の必要性の解析	7
1.1 緒言	7
1.2 材料および方法	7
1.3 結果	14
1.4 考察	19
2. 第2章 宿主上皮細胞への ExoS 注入におけるIV型線毛構成因子の解析	21
2.1 緒言	21
2.2 材料及び方法	21
2.3 結果	25
2.4 考察	29
総括	31
謝辞	32
参考文献	33

要旨

はじめに

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌) は、水系や土壌、植物表面などの自然環境から、医療施設内環境に長期定着するグラム陰性の好気性桿菌である。本菌は、医療従事者の手指や医療器具を介した接触感染により、呼吸器や泌尿器に難治性の日和見感染を引き起こす日和見感染菌として問題になっている。さらに、腸管腔のバリア機構であるムチン層を超えて腸管上皮細胞間の接着部位から生体内に転移する(トランスロケーション)ことによって、呼吸器や血液感染症が発症すること(Vincent *et al.* *JAMA***302**:2323-2329, 2009)から、免疫不全患者では、糞便の監視培養が行われている。

緑膿菌のトランスロケーションは、①腸管上皮の感知、②腸管上皮ムチン層の透過、③上皮細胞への付着、④上皮細胞透過経路の形成および⑤上皮細胞層の透過といった、少なくとも5つの連続した段階に分けることができる。上皮細胞透過経路の形成の段階では、本菌が有するⅢ型分泌装置によるエフェクター分子 ExoS の腸管上皮細胞への注入によって、上皮細胞透過経路が形成されること(Okuda *et al.* *Infect. Immun.* **78**:4511-4522, 2010) が明らかにされている。私は、上皮細胞透過経路の形成におけるⅣ型線毛の役割を解析した。

第1章 上皮細胞透過経路の形成におけるⅣ型線毛の必要性の解析

緑膿菌 PAO1 株でのⅣ型線毛構造分子をコードする *pilA* 遺伝子の欠損($\Delta pilA$)は、人工ムチン層の透過とヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞への付着に影響を与えなかった。しかし、この欠損は、細胞間接着の破綻による Caco-2 細胞層の透過を減少させたことから、Ⅳ型線毛は上皮細胞透過経路の形成に必要であると考えられた。そこで、ExoS の注入による透過経路形成へのⅣ型線毛の関与を調べた。 $\Delta pilA$ 株に加えて、 $\Delta exoS$ 株および $\Delta pilA \Delta exoS$ 株を作製し、Caco-2 細胞接着の破綻と透過菌数を測定したところ、*pilA* 欠損株と *exoS* 欠損株でも上皮細胞透過経路の形成が抑制され、さらにこの抑制は両欠損株の混合によっても復帰しなかった。これらの結果は、上皮細胞透過経路の形成には ExoS とⅣ型線毛の両方が必要であることを示唆した。さらに、*pilA* 遺伝子の欠損は、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞内への ExoS 注入量を減少させたことから、ExoS の上皮細胞内への注入にはⅣ型線毛の機能が必要であると考えられた。これらの培養細胞を用いた緑膿菌透過実験の結果は、カイコ幼虫を宿主とする感染実験によって検証した。 $\Delta pilA$ 、 $\Delta exoS$ および $\Delta pilA \Delta exoS$ は、ヒトにおける血液に相当するヘモリンフ内の菌数の減少をもたらし、カイコ致死活性を低下させた。しかし、ヘモリンフへの接種では、致死活性の低下は見られなかったことにより、Ⅳ型線毛は腸管上皮細胞を透過したのちに到達するヘモリンフ内でのカイコ免疫防御機構を逃れるために機能しているのではなく、上皮細胞の透過経路の形成に必要な ExoS の注入に必要な因子であると結論された。

第2章 宿主上皮細胞への ExoS 注入におけるIV型線毛構成因子の解析

第1章で記したように、Ⅲ型分泌装置による ExoS の上皮細胞への注入にはIV型線毛が必要であることが示唆された。そこで、本章では、ExoS の上皮細胞への注入におけるIV型線毛の運動機能について解析した。IV型線毛の伸縮運動における ATPase をコードする *pilT* または *pilU* 欠損株を作製したところ、正常な線毛構造体は観察された。しかし、これらの欠損株では、IV型線毛依存的な twitching motility が消失していた。これらの株を用いて HeLa 細胞への ExoS の注入量を調べたところ、*ApilT* および *ApilU* のいずれの場合も、ExoS 注入量の有意な減少をもたらしたが、減少レベルは *ApilT* の方が高かった。この減少レベルは、*ApilT* および *ApilU* とともに、上皮細胞透過経路の形成レベルと相関した。しかし、緑膿菌の上皮細胞層透過では、*ApilT* および *ApilU* とともに *ApilA* と同じレベルまで減少した。これらの結果から、形成された透過経路を通過するためには *pilT* が必要であることが推測された。この推測を検証するために、PAO1 株を用いて培養液中での浮遊時と Caco-2 細胞付着時での *pilA*、*pilT*、*pilU* の発現を半定量的 RT-PCR によって測定したところ、付着によって *pilU* の発現は大きく減少したが、*pilA* および *pilT* は変化しなかった。これらの結果から、*pilU* は付着に重要な役割を果たしていないこと、または *pilU* の発現低下が必要である可能性が考えられた。以上の結果より、緑膿菌はIV型線毛の *pilT* に起因する運動能を介して ExoS を上皮細胞に注入することが明らかとなった。

総括

固相表面上での運動を司り、付着能力をもつ細胞器官である緑膿菌のIV型線毛は、バイオフィルムの形成・維持や上皮細胞への障害に機能することが報告されてきた。本研究で、緑膿菌はIV型線毛の運動能を介する事でⅢ型分泌装置によりエフェクター分子 ExoS を上皮細胞へ注入し、透過経路を形成することを新たに明らかにした。これは、緑膿菌のトランスロケーションにおけるIV型線毛の機能を示すものであり、免疫力の低下した患者において腸管での緑膿菌の定着が2次的な感染症の一因であるというレトロスペクティブな研究結果に科学的根拠を与えるものである。

本研究成果を基盤にして、IV型線毛とその機能を標的にした2次的な緑膿菌感染症の発症予防法および治療法の開発をすることは、IV型線毛によるバイオフィルムの形成・維持を阻害し、慢性化を防止すること、またバイオフィルムによる抗菌薬に対する感受性の低下の防止にも繋がることであると考えられた。さらに、Ⅲ型分泌装置による細胞レベルでのエフェクター分子の注入メカニズムの解明は、細胞レベルでの薬物の投与手段の開発に繋がることでもあると期待される。

緒論

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌) は、水系や土壌、植物表面などの自然環境から、医療施設内環境に長期定着するグラム陰性の好気性桿菌である。本菌は、医療従事者の手指や医療器具を介した接触感染により、呼吸器や泌尿器に難治性の日和見感染症を引き起こし伝播することで問題になっている。一方、緑膿菌は人の腸内に定着する場合があります、その保菌率は健康人よりも入院患者に、特に、ICU 入院患者や、がん患者などの、免疫不全患者において高いことが報告されている (1, 2, 3)。また、糞便試料中に緑膿菌が検出された免疫不全患者では本菌による呼吸器や血液感染症を発症する事がある (4, 5)。それは、腸管腔のバリア機能であるムチン層を超えて腸管上皮細胞の接着部位から血中に転移する (トランスロケーション) 内因性の感染経路であると議論されてきた。それ故、医療施設では免疫不全患者を対象とした糞便の監視培養が行われることがある。

ヒトはその腸管において、糖タンパク質であるムチンを主成分として形成された粘液層であるムチン層と細胞間接着により連なった上皮細胞層によって、外界から異物が生体内に侵入するのを制限するバリア機能をもつ (6, 7)。そのため、緑膿菌がトランスロケーションするためにはこれらのバリアを通過する必要がある。腸管上皮細胞を含む多くの上皮細胞の細胞間隙には細胞の頂端側から、タイトジャンクション (tight junction)、アドヘレンスジャンクション (adherens junction)、デスモソーム (desmosome) の順に三種類の接着構造がある (8) (Fig. 1)。タイトジャンクションの細胞間接着部位にはオクルディン (occluding)、クロロディン (claudin)、junctional adhesion molecules (JAM) といったタンパク質が存在し、これらタイトジャンクションの細胞間接着部位のタンパク質に ZO-1、ZO-2、ZO-3 といった細胞質内にあるタンパク質が裏打ちすることで強固な結合を築いている (8, 9)。Na,K-ATPase が阻害されることによって、オクルディンが過剰にリン酸化されることで、タイトジャンクションの構造が変化し、その透過性が上昇することが報告されている (10)。

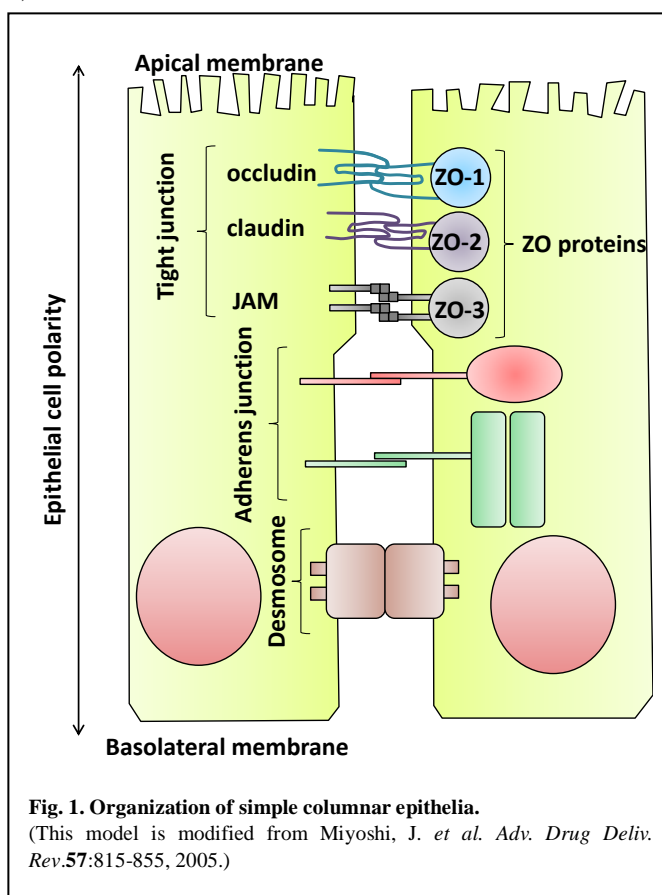
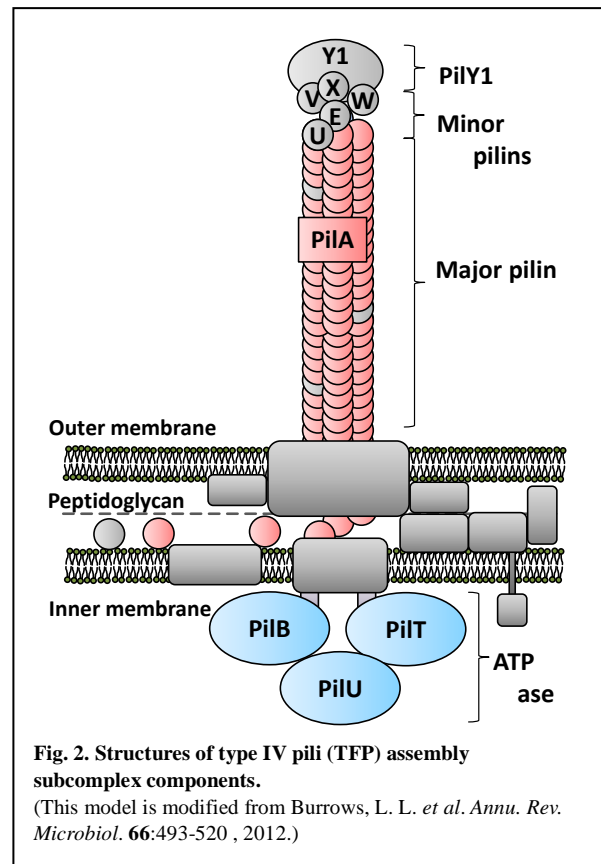


Fig. 1. Organization of simple columnar epithelia.
(This model is modified from Miyoshi, J. et al. Adv. Drug Deliv. Rev.57:815-855, 2005.)

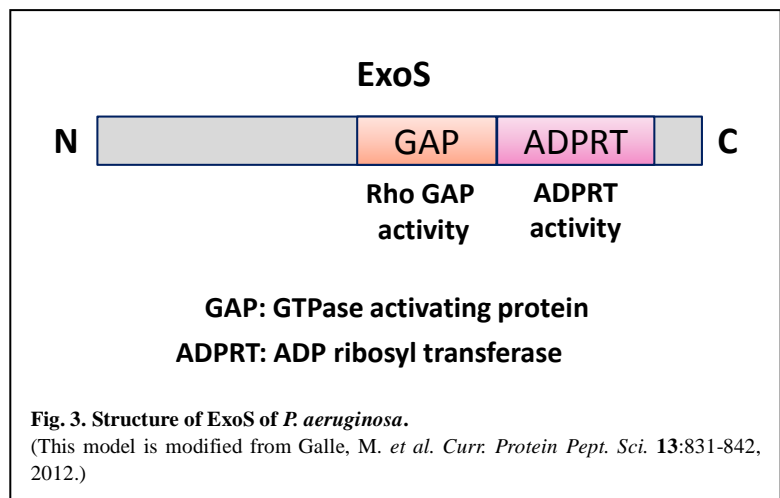
微生物は周囲の環境に適応するために、栄養物質への接近、有害物質からの忌避、また同菌種間での競争の回避といった行動などをする。それ故、細菌の運動能は生存のために必要

不可欠な要因だと考えられている。緑膿菌は鞭毛とIV型線毛の2種類の運動器官をもっていることが知られており、そのうちIV型線毛はグラム陰性菌である緑膿菌の内膜 (inner membrane) からペプチドグリカン層 (peptide glycan) 、外膜 (outer membrane) を通り、菌体外にまで至るフィラメント状の細胞器官である(11) (Fig. 2) 。菌体外のフィラメント構造は主要構成分子であり、アドヘジンでもある PilA (major pilins) 、いくつかのマイナーピリン (minor pilins) (FimU, PilVWXE)と (12, 13) 、その先端にある PilY1 で構成されており (12) 、内膜にある ATPase の PilB によって生み出されたエネルギーによってIV型線毛は伸長し、PilT と PilU によって生み出されたエネルギーによって縮退する (14, 15) (Fig. 2) 。緑膿菌のIV型線毛には二つの機能があることが知られている。1 つは、運動能である。IV型線毛は水分の少ない固体培地上でその伸縮運動に起因する運動である twitching motility を示す (16) 。もう1つは、付着能である。IV型線毛は無機物から宿主細胞まで多岐に渡った基質と付着する (17, 18) 。そして少なくともこれら2つの機能を介してIV型線毛は、本菌の病原性において、バイオフィルムの形成・維持による慢性化 (19, 20) 、抗菌薬耐性の獲得と上皮細胞障害性に貢献していることが報告されている (18, 21) 。



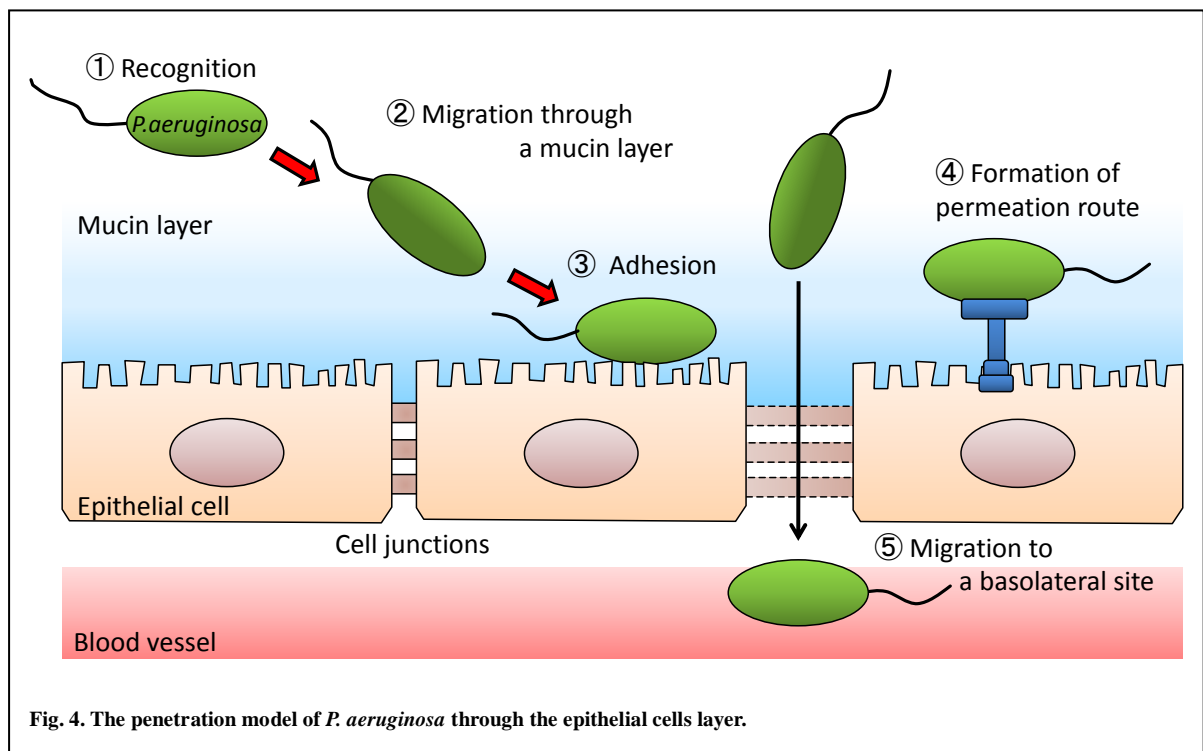
グラム陰性菌の多くは、植物、昆虫、動物などの宿主となる真核細胞生物に対する病原性の一因としてⅢ型分泌装置を有する (22, 23) 。Ⅲ型分泌装置は、菌体の内膜内に ATPase 複合体、外膜と内膜に渡って存在する筒状の基底小体、細胞外に突出するニードル状構造の3つの部位からなる (22, 24) 。そして、Ⅲ型分泌装置のニードル状構造を宿主細胞に突き刺し、エフェクター分子を宿主細胞内に直接注入することで様々な障害を引き起こす (23) 。緑膿菌もまたⅢ型分泌装置を有するグラム陰性菌として知られている。抗体を用いた免疫染色によって、緑膿菌のⅢ型分泌装置のニードル状構造の先端部のタンパク質 PscF は菌体表面にランダムに存在することが示されたが (25) 、Ⅲ型分泌装置が緑膿菌の菌体表面のどの部分に局在しているかはまだ定かではない。緑膿菌の場合、Ⅲ型分泌装置から分泌されるエフェクター分子は ExoS、ExoT、ExoY、および ExoU の4種類が知られており (26) 、これら4種類のエフェクター分子の病原性に関して以下の事が分かっている。ExoS はその構造の N 末端側に宿主細胞のアクチン骨格を崩壊させる Rho GTPase-activating protein (Rho GAP) 活性を、C 末端側に宿主細胞のアクチン骨格の崩壊、DNA 合成阻害、などを引き起こす ADP-ribosylation (ADPRT) 活性をもち、宿主細胞を死に至らしめる (Fig. 3) 。ExoT は ExoS とよく似ており、

N 末端側に GAP 活性を、C 末端側に ADPRT 活性をもつ。ExoS は強いホスホリパーゼ活性をもち、真核細胞を急速に死に至らしめる。ExoY はアデニル酸シクラーゼであり、哺乳類の細胞内に注入されることで細胞内 cyclic AMP (cAMP) を上昇させるが、感染におけるその重要性はまだ不明である (26)。緑膿菌のⅢ型分泌装置がエフェクター分子を分泌・注入するメカニズムに関しては、プロトン駆動力の阻害と、溶液の粘性がⅢ型分泌装置のニードル状構造の回転とエフェクター分子の分泌を減少させることや



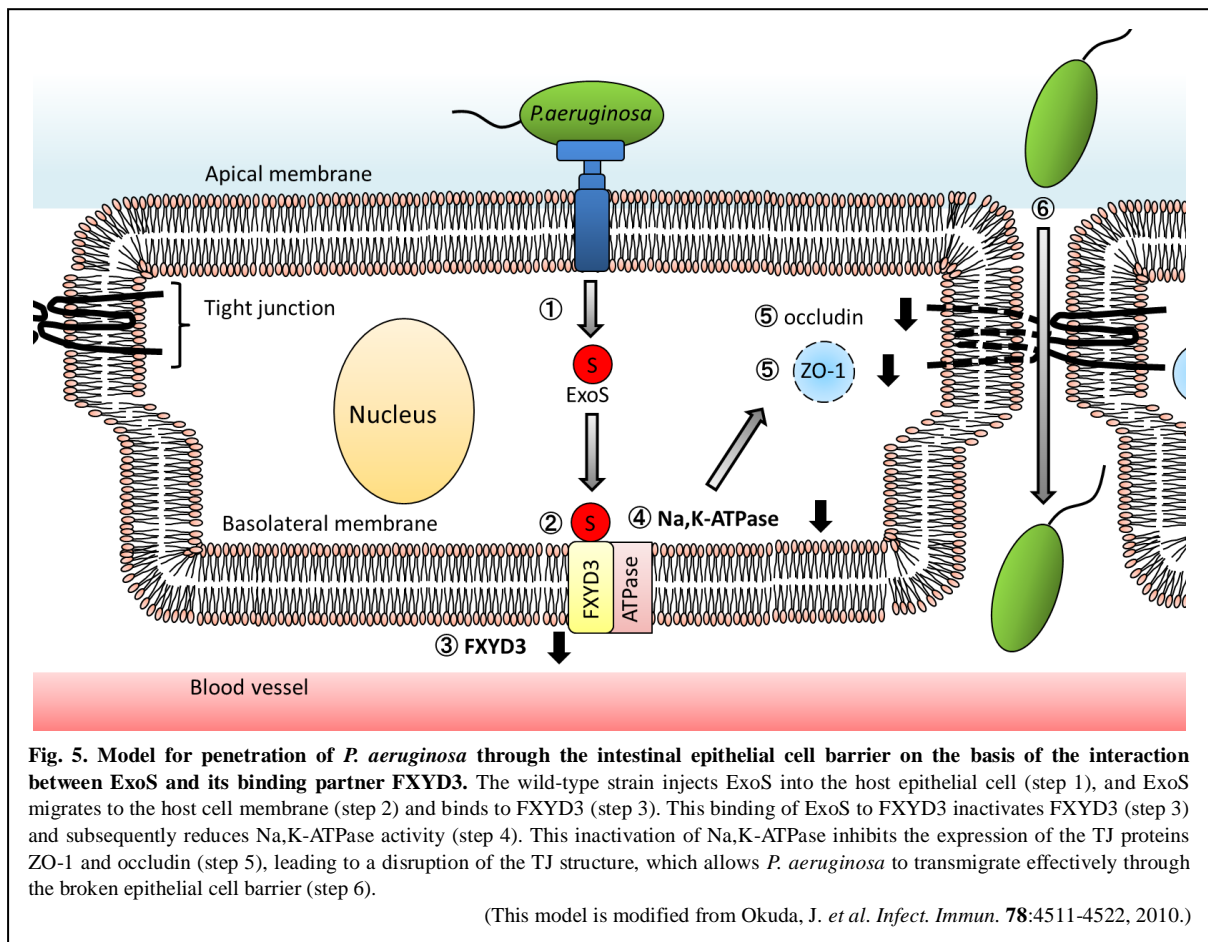
(27, 28)、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の Madin-Darby canine kidney cell (MDCK 細胞) において、宿主細胞の近くに菌体が存在することが必要であることが報じられている (29)。

私は、緑膿菌のトランスロケーションは①腸管上皮の感知、②腸管上皮ムチン層の透過、③上皮細胞への付着、④上皮細胞透過経路の形成および⑤上皮細胞層の透過といった、少なくとも 5 つの連続した段階に分けることが出来ると考えている (Fig4)。そして、腸管上皮ム



チン層の透過の段階において、緑膿菌は鞭毛と *mucD* を介した少なくとも 2 つの機能を協力的に作用させてムチン層を透過することと (30)、上皮細胞透過経路の形成の段階において、緑膿菌のⅢ型分泌装置を介して腸管上皮細胞内に注入された ExoS が Na,K-ATPase 制御タンパク質として知られている FXYD family (31) の 1 つ、FXYD3 (32) の Na,K-ATPase と相互作用するドメインと結合し、その働きを阻害することでタイトジャンクションを破綻し、透過経

路を形成することが報告されている (33) (Fig. 5)。ここで、トランスロケーションとは腸管腔内から生体内に菌が移動する現象であることと、緑膿菌の主要な運動器官である鞭毛がトランスロケーションに関与していることから (30)、私は鞭毛とともに緑膿菌の主要な運動器官として知られているIV型線毛に着目し、培養細胞モノレイヤを用いて、トランスロケーションにおけるIV型線毛の必要性和その役割を解析した。



第1章 上皮細胞透過経路の形成におけるIV型線毛の必要性の解析

1.1 緒言

医療施設内環境において、難治性の日和見感染を引き起こす緑膿菌の、腸管腔のバリア機能であるムチン層を超えて腸管上皮細胞の接着部位から血中に転移する（トランスロケーション）内因性の感染経路の重要性が議論されている（34）。トランスロケーションのメカニズムに関して、緑膿菌は鞭毛と *mucD* を介してムチン層を透過することや（30）、上皮細胞内に注入した ExoS によってタイトジャンクションを破綻させることなどが報告されているが（33）、未だその全貌は解明されていない。

緑膿菌のIV型線毛はフィラメント状の細胞外器官で（Fig 2）、その機能として固相表面上における運動能と付着能の2つが知られている（11, 35）。これらIV型線毛の2つの機能は本菌の病原性において重要な要因の1つとなっている（18-21）。

本章では、緑膿菌の主要な運動器官である鞭毛がトランスロケーションに関与していることから（30）、鞭毛とともに緑膿菌の主要な運動器官として知られているIV型線毛に着目し、培養細胞を用いて、トランスロケーションにおけるIV型線毛の必要性を解析した。

1.2 材料および方法

1. 使用菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドは Table 1 に示した。培養には LB Broth, Lennex (Difco) (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)、LB Agar, Lennox (Difco) (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) または、BM2 agar (0.7% K₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 1.08% sodium succinate, 1.5% agar) を使用し培養した。また、プラスミドを保持した株の培養にはプラスミドの選択マーカーに対応した抗菌薬テトラサイクリン (SIGMA-ALDRICH) (36, 37)、アンピシリン (SIGMA-ALDRICH) (38) を加えて 10 µg/ml および 75 µg/ml に調整した培地を使用した。

Table 1. 第1章で使用した菌株及びプラスミド

Strains and plasmids	Characteristics	reference
Strains		
<i>Paeruginosa</i>		
PAO1	Prototroph	(39)
PAO1 <i>pexoS-bla</i>	PAO1 strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study
Δ <i>exoS</i>	PAO1 of the <i>exoS</i> gene was knocked out	(33)
Δ <i>exoS pexoS-bla</i>	Δ <i>exoS</i> strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study

<i>ΔfliC</i>	PAO1 of the <i>fliC</i> gene was knocked out	(30)
<i>ΔpilA</i>	PAO1 of the <i>pilA</i> gene was knocked out	(36)
<i>ΔpilA</i> pexoS- <i>bla</i>	<i>ΔpilA</i> strain harbouring pexoS- <i>bla</i> plasmid	this study
<i>ΔpilA</i> ppilA	<i>ΔpilA</i> strain harbouring ppilA plasmid	(36)
<i>ΔpilAΔexoS</i>	PAO1 of the <i>pilA</i> gene and <i>exoS</i> gene was knocked out	this study
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>el4⁻</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK⁻mK⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>mcrB</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' (<i>traD36</i> <i>proAB⁺lacI^qlacZΔM15</i>)	(40)
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA</i> , <i>tra⁺</i>	(41)
Plasmids		
pEX18Tc	cloning vector; Tc ^r	(37)
pME6032	expression vector with an IPTG-inducible promoter; Tc ^r	(37)
pME6032- <i>pilA</i>	Tc ^r : <i>pilA</i> gene on pME6032	(36)
pME6032- <i>exoS-bla</i>	Tc ^r : <i>exoS-bla</i> gene on pME6032	this study
pGEX-6p-1	expression vector with an IPTG-inducible promoter; Ap ^r	(38)

2. 遺伝子クローニング

a) ゲノム DNA の抽出

LB broth 中 37℃で一晩振盪培養した緑膿菌液 2 ml から遠心分離 (10,000×g、1 分間、4℃) により菌体を集めた。得られた菌体からは Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて添付マニュアルに従ってゲノム DNA を抽出した。菌体に 600 μl の Nuclei Lysis Solution (promega) を加えて懸濁した後、80℃で 5 分間加熱、転倒混和した。室温に戻した懸濁液に 3 μl の RNase Solution (promega) を加え転倒混和後、37℃で 1 時間加熱し、200 μl の Protein Precipitation Solution (promega) を加え、迅速に激しく混和した後 5 分氷冷した。5 分後、遠心分離 (15,000×g、5 分間、室温) により回収した上清に 600 μl のイソプロパノール (Wako) を加え、遠心分離 (15,000×g、5 分間、室温) し、上清を除去した。ゲノム DNA を含む沈殿物を 600 μl の 70%エタノールで洗浄後、遠心分離 (15,000×g、5 分間、室温) し、上清を除去した。乾燥後の沈殿物を 100 μl の TE buffer に懸濁し、ゲノム DNA として使用した。

b) polymerase chain reaction (PCR)法による DNA 断片の増幅

PCR による対象遺伝子領域の増幅は、*Ex Taq* polymerase (Takara) もしくは PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara) を用いて、それぞれの添付マニュアルに従って行った [0.1 μl *Ex Taq* polymerase, 2 μl 10×*Ex Taq* buffer, 1.6 μl 2.5 mM dNTP mix, 1 μl DMSO, 10 pmol primer F, 10 pmol primer R, 100 ng ゲノム DNA, 精製水で 50 μl にメスアップ) (1 μl PrimeSTAR GXL DNA Polymerase, 10 μl 5×PrimeSTAR GXL buffer, 4 μl 2.5 mM dNTP mix, 10 pmol primer F, 10 pmol primer R, 100 ng ゲノム DNA, 精製水で 50 μl にメスアップ)]。94℃で 5 分間加熱後、94℃で

30 秒間、63℃で 30 秒間、および 72℃で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル、さらに 72℃で 2 分間の反応を加えた条件で行った。反応後の PCR 産物は、フェノールクロロホルム法によりタンパク質を取り除き、エタノール沈殿法により精製した (42)。精製後の DNA 断片は、アガロース電気泳動法によって分画後、エチジウムブロマイドで染色し、Dolphin view (Kurabo) を用いて検出した。

c) プラスミドの抽出

プラスミドの選択マーカーに応じた抗菌薬を加えた LB broth 中、37℃で一晩振盪培養した菌液 10 ml を遠心分離 (8,500×g、5 分間、4℃) により菌体を集め、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) の添付マニュアルに従ってプラスミドを抽出した。集めた菌体に 250 µl の Cell Resuspension Solution (promega) を加えて、激しく混和した後、さらに 250 µl の Cell Lysis Solution (promega) を加えて、4 回転倒混和し、室温で 5 分間静置した。5 分後、10 µl の Alkaline Protease Solution (promega) を加え、4 回転倒混和した後、室温で 5 分静置し、350 µl の Neutralization Solution (promega) を加え、4 回転倒混和後、遠心分離 (15,000×g、10 分間、室温) した。回収した上清は Collection Tubes (promega) の上に Wizard® SV Minicolumns (promega) を重ねた二重のカラムに移し、遠心分離 (15,000×g、1 分間、室温) した。プラスミドをトラップした Wizard® SV Minicolumns (promega) は 750 µl の Column Wash Solution (promega) で洗浄後、遠心分離を (15,000×g、1 分間、室温) を 2 回繰り返した。洗浄後の Wizard® SV Minicolumns (promega) に 50 µl の TE buffer を加え、遠心分離 (15,000×g、1 分間、室温) によって溶液を回収し、プラスミド溶液として使用した。

d) 制限酵素処理およびライゲーション反応

PCR で増幅させたそれぞれの DNA 断片と抽出したプラスミドは対応した制限酵素で処理した。制限酵素は New England Biolabs 製の制限酵素を使用した。20,000 pmol の DNA 断片、20 ユニット分の制限酵素、5 µl の制限酵素に対応した buffer の混合溶液を精製水により 50 µl にメスアップし、37℃で 2 時間水浴した。制限酵素処理後のサンプルは DNA Ligation Kit ver. 2.1 (Takara) の添付マニュアルに従ってライゲーションを行った。制限酵素処理した DNA 断片溶液とプラスミド溶液が 8 : 1 の mol 比で全量 5 µl 以下になるように混和し、60℃で 2 分加熱後、氷冷した。急冷後 DNA 断片とプラスミドの混合溶液と同量の I 液 (Takara) を加えて 16℃で 2 時間静置した。

e) 大腸菌へのプラスミド導入

Molecular cloning (42) に記載された方法を参考にして行った。大腸菌 JM109 株のコンピテンとセル 100 µl にライゲーション産物全量を混合した。30 分間氷冷後、42℃の水浴で 45 秒間ヒートショックを行った。ヒートショック後の菌液に 1 ml の LB broth を加え 37℃の水浴で 1 時間培養後、その 100 µl をプラスミドの選択マーカーに応じた抗菌薬を加えた LB Agar [10 µg/ml のテトラサイクリン (SIGMA-ALDRICH)] に塗抹し、37℃で一晩培養した。

f) 緑膿菌へのプラスミド導入

LB broth 中 37℃で一晩振盪培養した緑膿菌液 1 ml から遠心分離 (10,000×g, 3 分間、室温) により菌を集めた。集めた菌体に 1 ml の 300 mM スクロース溶液を加えて懸濁後、再び遠心分離 (10,000×g, 3 分間, 4℃) した。この操作を 2 回繰り返した後、100 µl の 300 mM スクロース溶液に懸濁した菌液に 1 µg のプラスミドを加え氷冷した。エレクトロポレーションによるプラスミドの導入は Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) (25 µF、2.5 kV、200 Ω) で行った。エレクトロポレーション後の菌液に 1 ml の LB broth を加え、37℃の水浴で 1 時間培養後、その 100 µl をプラスミドの選択マーカーに応じた抗菌薬を加えた LB Agar [10 µg/ml のテトラサイクリン (SIGMA-ALDORICH)] に塗抹し、37℃で一晩培養した。

3. 欠損株の作製

pilA 遺伝子 *exoS* 遺伝子欠損株の作製には *exoS* 遺伝子欠損株 (33) を親株とし、*pilA* 遺伝子欠損株作製用プラスミドの $\Delta pilA$ -pEX18Tc (36) を使用した。 $\Delta pilA$ -pEX18Tc は大腸菌 S-17 株に導入した。LB broth [10 µg/ml のテトラサイクリン (SIGMA-ALDORICH)] 中で 30 度一晩振盪培養した $\Delta pilA$ -pEX18Tc を導入した S-17 株培養液 1 ml から遠心分離 (7,000×g, 5 分間、室温) によって菌を集め、20 µl の生理的食塩水に懸濁した。LB broth 中で 37℃一晩振盪培養した緑膿菌培養液 100 µl から遠心分離 (7,000×g, 5 分間、室温) によって菌を集め、20 µl の生理的食塩水に懸濁した。調整したそれぞれの菌液を全量混和した溶液を LB agar 上にスポットし、30℃で 8 時間培養した。増殖した菌体を白金耳でかき集め、200 µl の生理的食塩水に懸濁し、その 100 µl を BM2 agar [80 µg/ml テトラサイクリン (SIGMA-ALDORICH)] に塗抹した。30℃で 2 日間培養後、出現したコロニーを再び BM2 agar [80 µg/ml テトラサイクリン (SIGMA-ALDORICH)] 上で分離培養し、さらに 37℃で一晩培養後に出現したコロニーから PCR によって 1 回目の相同的組み換えを確認した。PCR は、対象遺伝子の前後 500 bp 領域に設計されたプライマーと *EX Taq* polymerase を用いて、94℃で 5 分間加熱後、94℃で 30 秒間、63℃で 30 秒間、および 72℃で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル、さらに 72℃で 2 分間の反応を加えた条件で行った。1 回目の相同的組み換えを起こした菌体を選択し、15% ショ糖含有 LB agar に塗抹し、37℃で一晩培養した。出現したコロニーを、再び 15% ショ糖含有 LB agar 上で分離培養し、37℃で一晩培養した。出現したコロニーからゲノム DNA を抽出後、対象遺伝子の前後 500 bp 領域に設計されたプライマーを用いた PCR によって、対象遺伝子の欠損を調べた。PCR は、*EX Taq* polymerase を用いて、94℃で 5 分間加熱後、94℃で 30 秒間、63℃で 30 秒間、および 72℃で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 25 サイクル、さらに 72℃で 2 分間の反応を加えた条件で行った。また、作製した遺伝子欠損株を Table 1 に、使用したプライマーを Table 2 にそれぞれ示した。

Table 2. 第 1 章で使用したプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	reference
For deletion		
pilA-F1	CGCGAAGCTTTTTTCCTTGTCAGGCTATTCAGGTCGCAATAGGCG	(36)
pilA-R2	TGCCTCTAGAATCGCATCGGCCTCTACGATGCCTTCCTGATCAAG	(36)
For exoS-bla		
<i>Bam</i> HI- <i>exoS</i>	GCGCGGATCCACCTGCAGGCTGAGTACGCTCTCCTCG	this study
<i>exoS</i> -Fu	TTTCTGGGTGTCTAGACACTTCGGCGTCACTGTGGATGCCACC	this study
<i>bla</i> -Fu	CGCCGAAGTGTCTAGACACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAG	this study
<i>Eco</i> RI- <i>bla</i>	ATATGAATTCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC	this study

4. Caco-2 細胞および HeLa 細胞の培養と懸濁液の調整

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞およびヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞の培養は、細胞培養フラスコ (75 cm²; Nunc) を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で行った。細胞の培養にはゲンタマイシン (100 µg/ml) およびカナマイシン (60 µg/ml) を加えた DMEM-FBS 培地 [10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) を加えた Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma)] を用いた。培養細胞は、培養容器面積の約 80% が細胞に覆われるまで増殖した時点で継代した。細胞の継代培養は以下の方法で行った。フラスコ中の細胞培養上製を除去後、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Sigma) で 2 回洗浄し、0.25% trypsin-EDTA (Gibco) 処理により細胞を剥離後に新しい培地を加えて懸濁した。得られた細胞懸濁液を適度に希釈し、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

5. Caco-2 細胞モノレイヤの作製

上皮細胞層モデルは、1.12 cm² の多孔性の filter membrane (3.0 µm pores) の 12 well Transwell® (Corning) を用いて作製した。Caco-2 細胞を DMEM-FBS 培地に浮遊後、細胞密度を 40×10⁴ cells/ml に調製した。調製した細胞懸濁液 0.5 ml を Transwell® の管腔側に添加した。また、基底側には DMEM-FBS 培地 1.5 ml を加えて、37°C、5%CO₂ 条件下で 14-21 日間培養した。

6. Caco-2 細胞モノレイヤを用いた透過菌数の測定

Caco-2 細胞モノレイヤの管腔側に、LB broth 中で 37°C 一晩振盪培養した緑膿菌培養液を 1×10⁷ cfu/well となるように接種し 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。また、LB broth のみを添加したものをコントロールとした。透過菌数の測定は、接種後経時的に Transwell® の基底側の培養液を回収後に生理的食塩水で適宜希釈した。その希釈液 50 µl を LB agar に塗抹し、37°C で一晩培養後に出現したコロニー数を計測した。

7. Caco-2 細胞モノレイヤを用いた付着菌数の測定

Caco-2 細胞モノレイヤの管腔側に、LB broth 中で 37°C 一晩振盪培養した緑膿菌培養液を

1×10^7 cfu/well となるように接種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。また、LB broth のみを添加したものをコントロールとした。接種後 1、2、3 時間目に DPBS で 3 回洗浄し、DPBS を用いて 1% に調整した tritonX-100 で細胞を溶解した。回収した菌液中の菌数を測定するために、生理的食塩水で適宜希釈した。その希釈液 50 μl を LB agar に塗抹し、 37°C で一晚培養後に出現したコロニー数を計測した。

8. 人工的ムチン層を用いた透過菌数の測定

ムチン透過モデルの作製は Okuda らの論文を参考に行った (30) 。DMEM-FBS 培地を用いて、ウシ顎下腺由来ムチン (Sigma) を 2% になるよう調製した。次に、2% ムチン溶液を 0.33 cm^2 の filter membrane (3.0 μm pores) を含む 96 well transwell filter units (Costar) に 50 μL /well になるよう充填した、人工的ムチン層を作製した。LB broth 中で 37°C 一晚振盪培養した緑膿菌培養液を DMEM-FBS 培地で 4.0×10^5 cfu/ml に希釈し、充填したムチン層上部に 25 μl を重層し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。重層後 1 時間目の下層の培養液を生理的食塩水で適宜希釈した。その希釈液 50 μl を LB agar に塗抹し、 37°C で一晚培養後に出現したコロニー数を計測した。

9. Caco-2 細胞モノレイヤの transmonolayer electrical resistance (TER)測定

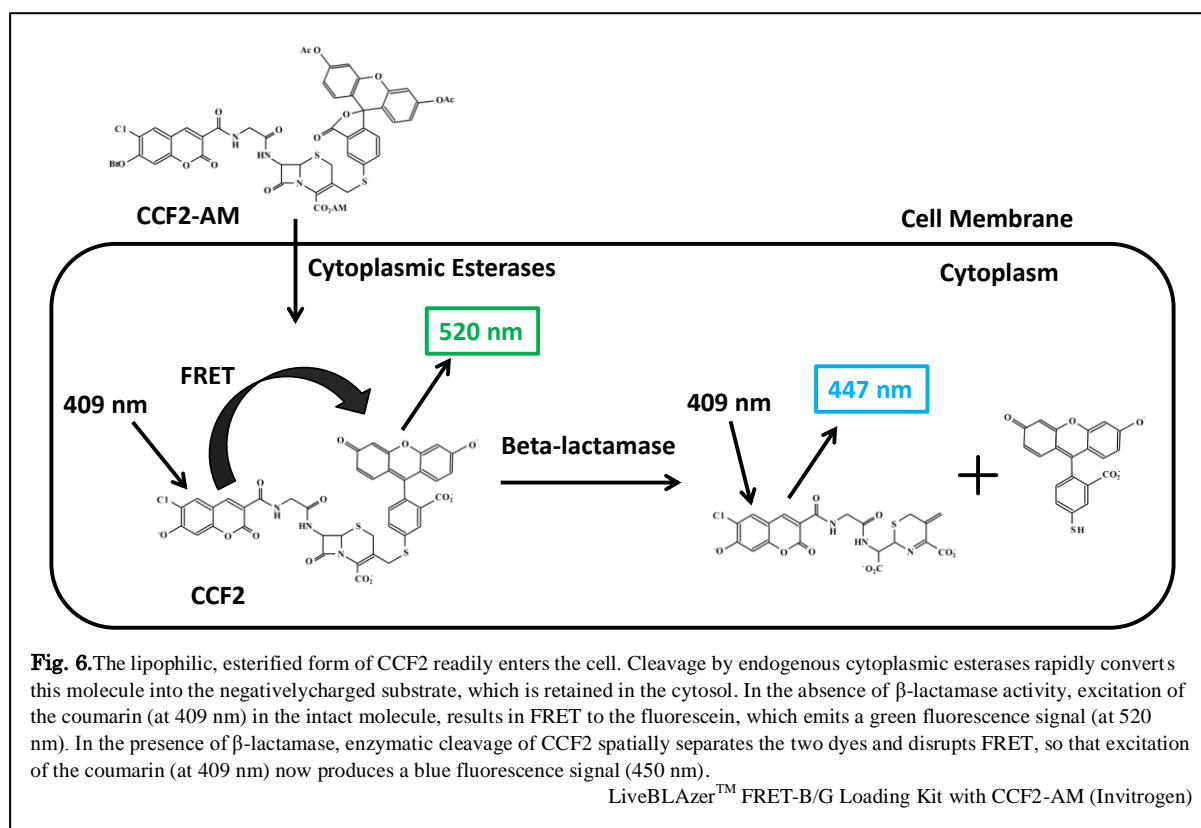
Caco-2 細胞モノレイヤの管腔側に、LB broth 中で 37°C 一晚振盪培養した緑膿菌培養液を 1×10^7 cfu/well となるように接種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。また、LB broth のみを添加したものをコントロールとした。TER の測定は Millicell-ESR apparatus (Millipore) を用いて、菌接種 8 時間目まで 1 時間毎に測定した。

10. オクルディンタンパク質の検出

Caco-2 細胞モノレイヤの管腔側に、LB broth 中で 37°C 一晚振盪培養した緑膿菌培養液を 1×10^7 cfu/well となるように接種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。また、LB broth のみを添加したものをコントロールとした。培養後 4 時間目と 8 時間目の Caco-2 細胞を DPBS で 2 回洗浄し、Lysis buffer [RIPA Buffer (Thermo) , complete (25 \times conc. in DPBS, Roche)] を加えて懸濁した。懸濁液は Handy Sonic UR-20P (TOMY SEIKO) を用いて超音波処理 (power control 5, 15 sec sonic, 15 sec interval) を 4 サイクル行った。超音波処理後の懸濁液と 20 μl の 5 \times SDS dye [0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.5) 、10% SDS、20% glycerol、0.01% bromo phenol blue、5% 2-mercaptoethanol] を加え攪拌した。その後、 100°C で 5 分間加熱したサンプル 16 μl を 12% SDS-PAGE で分画し、trans-blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio Rad) を用いてニトロセルロース膜 (0.45 μm pores, Bio-Rad) に 2 mA、10 V で 50 分間転写した。転写後、TBS-T [0.125 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), 8% NaCl, 0.05% Tween 20] で洗浄し、抗体の非特異的結合を防ぐため、5% skim milk を加えた TBS-T 中 1 時間以上室温で振盪した。その後ニトロセルロース膜を TBS-T で洗浄し、TBS [0.125 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), 8% NaCl] 5 ml 中に一次抗体 [オクルディン: anti occludin rabbit polyclonal antibody (Novex) 10 μl , β -アクチン : anti actin clone C4 MAB (chemicon) 1.25 μl] を入れ、一晚室温で振盪した。TBS-T で洗浄後、二次抗体として

オクルディンには 1000 倍に希釈した anti-rabbit-IgG, Horse radish peroxidase linked whole antibody (Sigma) 62.5 μ l を、 β -アクチンには anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat (Sigma) 5 μ l をそれぞれ加えた TBS 中 2 時間室温で振盪した。これを TBS-T で洗浄し、AmershamTM ECL-plus western blotting detection system (GE Healthcare) を用いて Varsa Doc 5000 (Bio-Rad) によって結合抗体のシグナルを検出した。また、検出したシグナル強度の測定には imageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) を使用した。

11. 上皮細胞内に注入された ExoS の定量



HeLa 細胞内に注入された ExoS-Bla の測定は Verove らの論文を参考に行った (43) 。HeLa 細胞を DMEM-FBS 培地に浮遊後、細胞密度が 4×10^5 cells/ml になるように調整した。調整した細胞懸濁液 200 μ l を蛍光強度測定用に Black 96-well plate, Flat bottom (Nunc) に、また 100 μ l を蛍光顕微鏡観察用に High Content Imaging Plate Black with 0.2 mm Glass Bottom 96 well Half Area (Corning) にそれぞれ播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。培養 2 日目の Black 96-well plate, Flat bottom (Nunc) には、LB broth 中 37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した緑膿菌培養液を 1×10^5 cfu/well となるように接種し、培養 2 日目の High Content Imaging Plate Black with 0.2 mm Glass Bottom 96 well Half Area (Corning) には、LB broth 中 37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養した緑膿菌培養液を 5×10^4 cfu/well となるように接種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。両方のプレートは培養 4 時間目および 2.5 時間目に DPBS で洗浄し、LiveBLAzerTM FRET-B/G Loading Kit with CCF2-AM (Invitrogen) を用いて添付マニュアルに従い処理した。6 μ l の CCF2-AM in SolutionA (Invitrogen) 、60 μ l の SolutionB (Invitrogen) と 934 μ l の SolutionC (Invitrogen) を混合した溶液とその 5 分の 3 量の DMEM 培地を激しく混和し、試薬を調整した。調整した試薬は Black

96-well plate, Flat bottom (Nunc) の各 well に 80 μ l 、 High Content Imaging Plate Black with 0.2 mm Glass Bottom 96 well Half Area (Corning) の各 well に 40 μ l ずつ加え、37°C、5%CO₂ 条件下で 2 時間静置した。2 時間後、Varioskan™ microtiter plate reader (Thermo) を用いて Black 96-well plate, Flat bottom (Nunc) に培養した HeLa 細胞内に取り込まれた CCF2 が発する緑色蛍光強度を Ex=410 nm, Em=530 nm で、細胞内の β -ラクタマーゼによって分解された CCF2 が発する青色蛍光強度を Ex=410 nm, Em=450 nm で測定した (Fig. 6)。そして、High Content Imaging Plate Black with 0.2 mm Glass Bottom 96 well Half Area (Corning) に培養した HeLa 細胞は蛍光顕微鏡 (Olympus, U-LH100L-3) を用いて観察した。

12. カイコ感染実験

経口感染モデルとして 5 齢のカイコの幼虫に、一晩振とう培養した緑膿菌培養液 200 μ l (10^{10} CFU/ml) を塗布した抗菌薬フリーの人工飼料 Silkmate (an approximately 1.0 cm³ block; Katakura) を給餌した。コントロール群には、0.6%の食塩水 200 μ l を塗布し、給餌した。飼料を与えたカイコ幼虫はそれ以降給餌せず、5 日間経時的に死亡したカイコ幼虫の数を測定した。感染後 6 時間で、カイコ幼虫のヘモリンフを 1 ml テルモシリンジ® (TERUMO) (27G×3/4 注射針 ; TERUMO) を用いて採取し、採取したヘモリンフは生理的食塩水を用いて適切な希釈を行った後、LB agar にそれぞれ 50 μ l 塗抹し、37°Cで一晩培養した。培養後、それぞれのコロニー数を計測した。また、ヘモリンフ感染モデルとして 5 齢のカイコ幼虫のヘモリンフ内に緑膿菌培養液を 1 ml テルモシリンジ® (TERUMO) (27 G×3/4 注射針 ; TERUMO) を用いて 10^3 - 10^7 CFU/silkworm になるよう接種した。コントロール群には、0.6%の食塩水 50 μ l を接種した。そして、菌接種後 5 日間経時的に死亡したカイコ幼虫の数を測定した。

1.3 結果

1. トランスロケーションにおけるIV型線毛の機能の検討

緑膿菌のIV型線毛がトランスロケーションに関与しているか調べるために、Caco-2 細胞モノレイヤを用いて、緑膿菌の透過菌数と付着菌数を測定した。*pilA* の欠損は感染 3 時間目以降の透過菌数を減少させた ($P < 0.05$) (Fig. 7A)。そして、この減少は pME6032-*pilA* での形質転換によって回復した (Fig. 7A)。IV型線毛の主要構成分子であり、アドヘジンでもある PilA の抗体による処理によって PAO1 株の透過菌数は測定したいずれの時間においても減少された ($P < 0.05$) (Fig. 7D)。これらの結果より (Fig. 7A, D)、IV型線毛はトランスロケーションに必要とされることが考えられた。IV型線毛の機能、付着能と運動能のうち、付着能がトランスロケーションに関与しているか調べるために、Caco-2 細胞への付着菌数を測定した。*pilA* の欠損は計測したいずれの時間においても PAO1 株と *pilA* 欠損株の付着菌数の間に有意な差はなかった ($P > 0.1$) (Fig. 7B)。そして、感染 2 時間目における PAO1 株と *pilA* 欠損株の両方の付着菌数は抗 PilA 抗体による処理によって変化しなかった ($P > 0.1$) (Fig. 7C)。これらの結果より (Fig. 7B, C)、IV型線毛は Caco-2 細胞への付着菌数に影響を及ぼさないと考えられ

た。IV型線毛がムチン層の透過に関与しているか調べるために、人工ムチン層を用いて、緑膿菌の透過菌数を測定した。過去の実験において、鞭毛フィラメントタンパク質の FliC をコードする遺伝子 (*fliC*) の欠損は菌接種後 1 時間の時点の透過菌数を PAO1 株の透過菌数と比較して有意に減少させることから緑膿菌は鞭毛を介してムチン層を透過することを明らかにしている ($P < 0.05$) (Fig. 7E) (31)。本実験において、PAO1 株と *pilA* 欠損株のムチン層透過菌数の間に有意な差はなかった ($P > 0.1$) (Fig. 7E)。この結果より (Fig. 7E)、IV型線毛はムチン層の透過に必要とされないことが考えられた。ここまでの実験は (Fig. 7A-E)、トランスロケーションにおける緑膿菌の上皮細胞への付着段階までを検討するものであった。そして、ここからは緑膿菌の上皮細胞への付着段階より後の段階においてIV型線毛が関与しているか調べた。Caco-2 細胞モノレイヤの管腔側に菌を接種し、感染 8 時間目までのモノレイヤの管腔側と基底側の電気抵抗 TER を測定したところ、PAO1 株では経時的な TER の減少がみられたが ($P < 0.05$) (Fig. 7F)、*pilA* 欠損株では TER は変化しなかった ($P > 0.1$) (Fig. 7F)。そして、この TER は pME6032-*pilA* での形質転換によって回復された (Fig. 7F)。この結果より (Fig. 7F)、IV型線毛は上皮細胞透過経路の形成に必要とされることが考えられた。この TER 測定で得られた結果を裏付けるために (Fig. 7F)、タイトジャンクションの構成タンパク質であるオクルディンを western blotting によって検出した。検出したオクルディンのバンド強度は β -アクチンのバンド強度によって比を取り標準化した。PAO1 株の感染 4 時間目と 8 時間目において、非感染細胞で検出されたオクルディンのバンド強度比と比較して 99%の減少が測定された (Fig. 7G)。そして、*pilA* 欠損株ではそのオクルディンのバンド強度比の減少は抑制され、この抑制は pME6032-*pilA* での形質転換によって、非感染細胞で検出されたオクルディンのバンド強度比と比較して 4 時間目は 60%、8 時間目は 98%の減少が測定されるまで回復された (Fig. 7G)。これらの結果より (Fig. 7A-G)、IV型線毛はタイトジャンクションを破綻させ、透過経路を形成するのに必要とされることが考えられた。

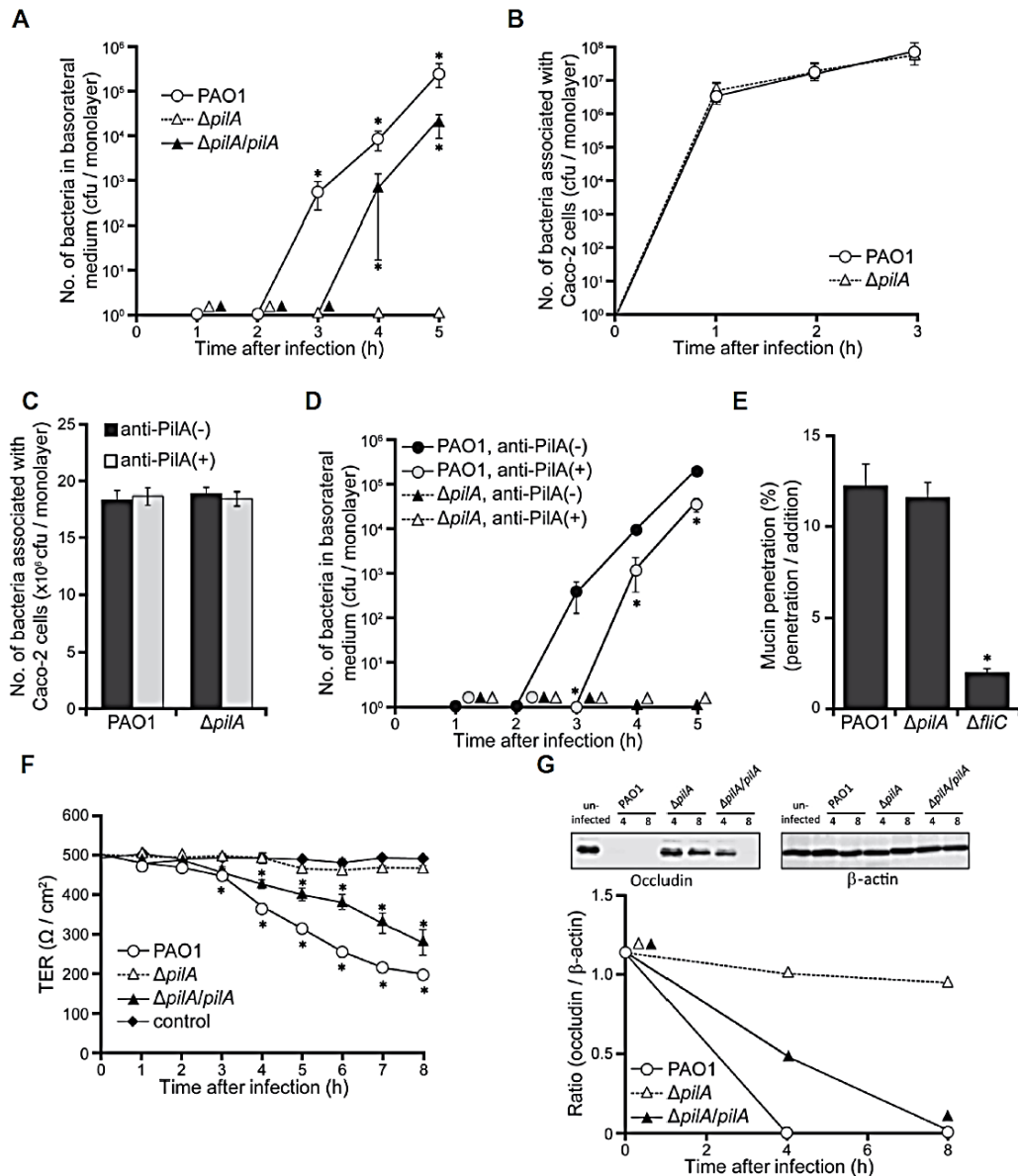
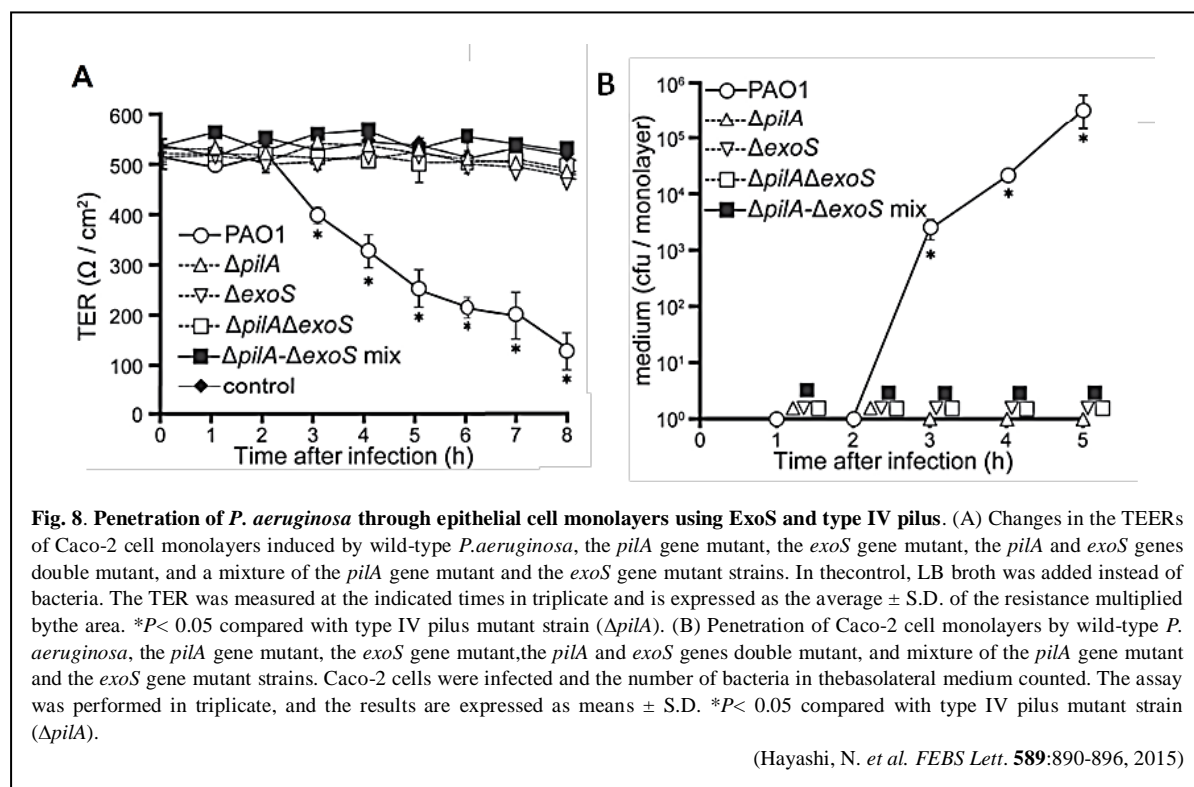


Fig. 7. Penetration of *P. aeruginosa* through epithelial cell monolayers in vitro. (A) Penetration of Caco-2 cell monolayers by wild-type *P. aeruginosa* (PAO1) and pilus mutant strains. Caco-2 cells were infected, and the number of bacteria in the Transwell basolateral medium counted. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. $*P < 0.05$ compared with TFP mutant strain ($\Delta pilA$). (B) Association of wild-type and pilus mutant strains with Caco-2 cells. Bacteria were inoculated onto the apical surface of Caco-2 cells. The number of associated bacteria was evaluated by lysis of Caco-2 cells with Triton X-100 after washing of the Transwell with DPBS. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. (C) *P. aeruginosa* strains were pretreated for 30 min with an anti-PilA antibody (1.6×10^5 CFUs/40 μ g of antibody) then inoculated onto the apical surface of the Caco-2 cells. The number of associated bacteria was evaluated by lysis of Caco-2 cells with Triton X-100 after washing of the Transwell with DPBS. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. (D) *P. aeruginosa* strains were pretreated for 30 min with an anti-PilA antibody (1.6×10^5 CFUs/40 μ g of antibody) then inoculated onto the apical surface of Caco-2 cells in Transwells, and the number of bacteria in the basolateral medium counted. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. $*P < 0.05$ compared with the wild-type strain (PAO1) without anti-PilA antibody treatment. (E) Penetration of the mucin layer by the wild-type and flagellar and pilus mutant strains. Bacteria were loaded on top of 2% bovine submaxillary mucin, and the number of bacteria in the bottom medium counted at 1 h. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. $*P < 0.05$ compared with the wild-type strain (PAO1). (F) Changes in the TERs of Caco-2 cell monolayers. In the control, LB broth was added instead of bacteria. The TER was measured at the indicated times in triplicate and is expressed as the average \pm S.D. of the resistance multiplied by the area. $*P < 0.05$ compared with type IV pilus mutant strain ($\Delta pilA$). (G) Expression of occludin protein in Caco-2 cell monolayers infected with wild-type *P. aeruginosa* and pilus mutant strains. Caco-2 monolayers were infected and incubated. The cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-occludin and anti- β -actin antibodies.

(Hayashi, N. et al. *FEBS Lett.* **589**:890-896, 2015)

2. 透過経路形成におけるIV型線毛と ExoS の必要性の検討

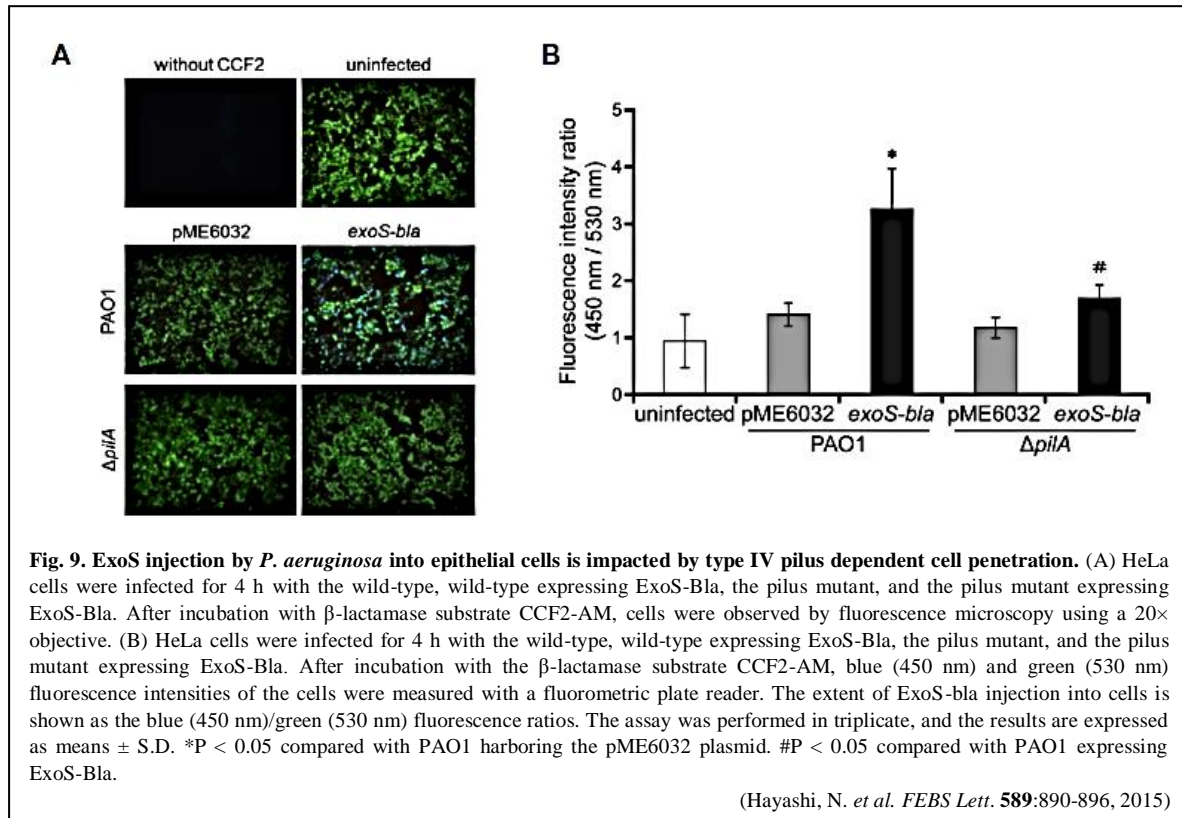
緑膿菌はⅢ型分泌装置によって上皮細胞に注入したエフェクター分子 ExoS によりタイトジャンクションを破綻させ、上皮細胞透過経路を形成することより (33) (Fig. 5)、IV型線毛によるタイトジャンクションの破綻と ExoS によるタイトジャンクションの破綻に関連性があるかどうか調べた。Caco-2 細胞モノレイアの管腔側に菌を接種し、感染 8 時間目までのモノレイアの管腔側と基底側の電気抵抗 TER を測定したところ、PAO1 株において TER は経時的に減少したが (Fig. 8A)、*pilA*、エフェクター分子 ExoS をコードする遺伝子 *exoS*、そしてその両方の遺伝子の欠損によって TER は変化しなかった (Fig. 8A)。そしてこれは、*pilA* 欠損株と *exoS* 欠損株の混合感染によっても回復されなかった (Fig. 8A)。同じ変異株を用いて Caco-2 細胞モノレイアの透過菌数を測定したところ、*pilA* および *exoS* の欠損と、*pilA* と *exoS* の両方の欠損は、測定したいずれの時間においても透過菌数の有意な減少をもたらした ($P < 0.05$) (Fig. 8B)。そして、この透過菌数の減少は *pilA* 欠損株と *exoS* 欠損株の混合感染によって回復されなかった (Fig. 8B)。この透過菌数の測定結果は TER の測定結果と一致するものだった。これらの結果より、緑膿菌が上皮細胞透過経路を形成するためには同じ細胞での IV 型線毛と ExoS の発現が必要だと考えられた。



3. 上皮細胞内への ExoS 注入におけるIV型線毛の必要性の検討

IV型線毛が ExoS の上皮細胞内への注入に関与しているか調べるために、CCF2-AM 試薬を用いて HeLa 細胞内に注入された ExoS 量を測定した。本実験では Caco-2 細胞を用いたところうまくいかなかったため、過去の文献において実績のあったヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いて実験した (43)。感染 4 時間目の HeLa 細胞の蛍光顕微鏡観察像において、*exoS-bla* (β -lactamase) 融合遺伝子をクローニングした pME6032-*exoS-bla* を導入した PAO1 株で青色蛍

光を発する細胞が観察され (Fig. 9B) 、その蛍光強度比 (青色蛍光強度/緑色蛍光強度比) はコントロールである pME6032 のみを導入した緑膿菌 PAO1 株の蛍光強度比と比較して約 2.7 倍になった (Fig. 9C) 。そして、*pilA* の欠損によって、PAO1 株と比較して、観察された青色蛍光を発する細胞は減少され (Fig. 9B) 、検出された蛍光強度比は約 50%減少された (Fig. 9C) 。これらの結果より、IV型線毛は ExoS の上皮細胞内への注入に必要とされることが考えられた。



4.カイコ幼虫に対する致死活性

ここまでの培養細胞を用いた実験結果を (Fig. 7-9) 、カイコ幼虫を宿主とした感染実験によって検証した。カイコ幼虫の経口感染において、PAO1 株でみられるカイコ幼虫の経時的な生存率の低下は *pilA* , *exoS* そして、その両方の遺伝子の欠損により抑制された (Fig. 10A) 。そして、経口感染 6 時間目の、ヒトにおける血液に相当するヘモリンフ内の菌数は *pilA* , *exoS* そして、その両方の遺伝子の欠損により減少された ($P < 0.05$) (Fig. 10B) 。これらのデータにおいて (Fig. 10A, B) 、*pilA* , *exoS* の単独遺伝子欠損のデータと、この両方の遺伝子の欠損のデータの間に有意な差がなかったため、カイコ幼虫においてもIV型線毛は ExoS の上皮細胞内への注入に必要であることが考えられたが、これらの遺伝子の欠損によるカイコ幼虫の経時的な生存率低下の抑制はヘモリンフ内で欠損株がセレクションを受けて減少した結果、カイコ幼虫の経時的な生存率の低下が抑制された可能性が考えられる。そこで、緑膿菌をカイコ幼虫のヘモリンフに直接接種し、経時的なカイコ幼虫の生存率を調べた。結果、緑膿菌のヘモリンフ接種において、PAO1 株と各欠損株の生存率に有意な差はなかった (Fig. 10C) 。これらの結果より (Fig. 10) 、カイコ幼虫においてもIV型線毛は上皮細胞層の透過経路形成に必要であることが考えられた。

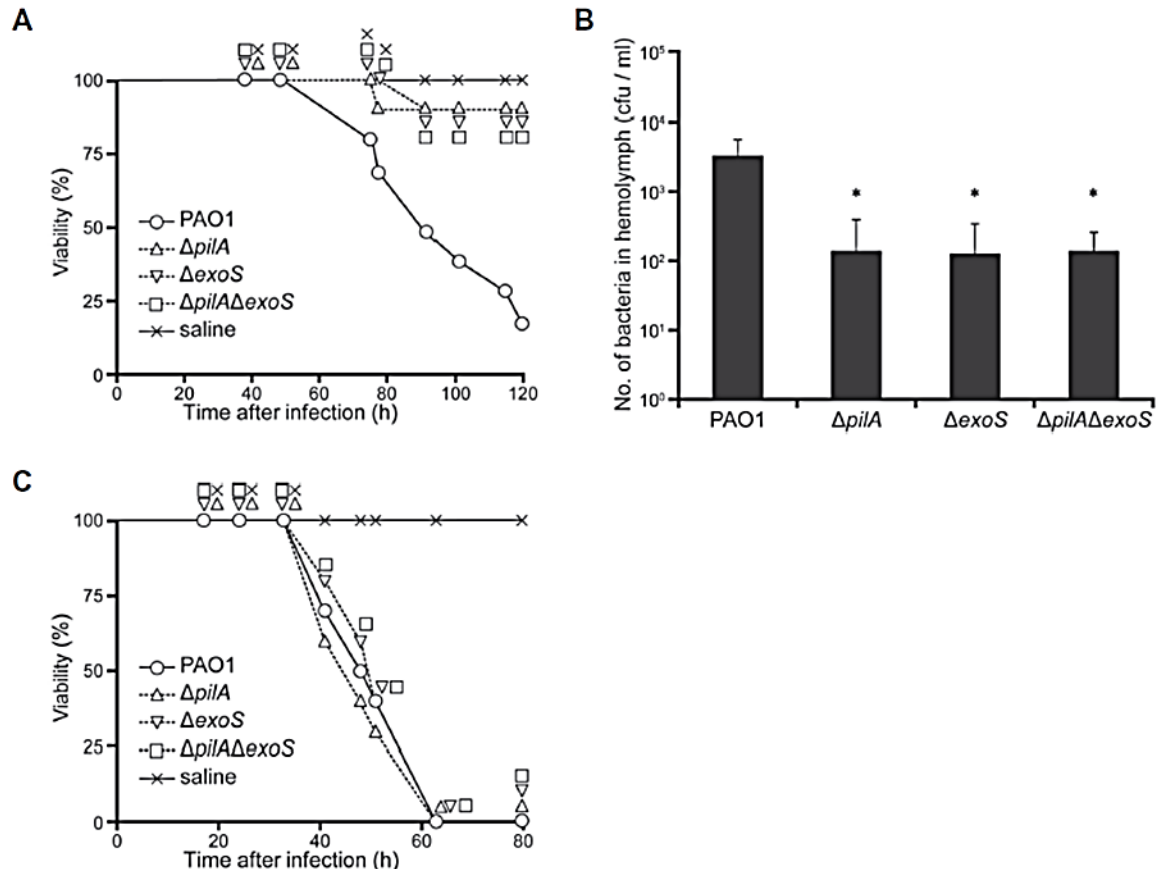


Fig. 10. Pili are essential for *P. aeruginosa* virulence in silkworms because of its ability to mediate penetration through the midgut epithelial barrier. (A) Comparison of the virulence of wild-type *P. aeruginosa*, *pilA* gene mutant, *exoS* gene mutant, and the *pilA* and *exoS* genes double mutant strains following oral administration to 10 silkworms. Saline was used as a control. (B) Numbers of bacteria in the hemolymph at 6 h after oral administration of wild-type *P. aeruginosa*, *pilA* gene mutant, *exoS* gene mutant, and the *pilA* and *exoS* genes double mutant strains to 10 silkworms. The assay was performed in duplicate, and the results are expressed as means \pm S.D. * $P < 0.05$ compared with the wild-type strain (PAO1). (C) Comparison of the virulence of wild-type *P. aeruginosa*, *pilA* gene mutant, *exoS* gene mutant, and the *pilA* and *exoS* double mutant strains following injection into the hemolymph (10^3 CFU per silkworm) of 10 silkworms. Saline was used as a control.

(Hayashi, N. et al. *FEBS Lett.* **589**:890-896, 2015)

1.4 考察

糞便試料中に緑膿菌が検出された免疫不全患者では本菌による呼吸器や血液感染症を発症する事があるという臨床的なレトロスペクティブな研究結果によって (4, 5)、緑膿菌が腸管腔から血中に転移する (トランスロケーション) 内因性の感染経路の重要性が議論されてきた。そして、緑膿菌がトランスロケーションするためにはムチン層と細胞間接着により連なった上皮細胞層の少なくとも二つのバリア機能を超える必要がある (6, 7)。本実験において、緑膿菌のIV型線毛はムチン層の透過と Caco-2 細胞への付着に必要とされず、上皮細胞の透過経路形成に必要とされることが示されたことから (Fig. 7)、緑膿菌のIV型線毛はトランスロケーションの過程において腸管上皮細胞に透過経路を形成する段階において機能していることが示唆された。

緑膿菌のIV型線毛は細胞間接着の1つであるタイトジャンクションを破綻させ、上皮細胞に透過経路を形成するのに必要とされることが示された (Fig. 7F, G)。そして、緑膿菌は上皮

細胞内にエフェクター分子 ExoS を注入することでタイトジャンクションを破綻させ、上皮細胞に透過経路を形成することが報告されている (33)。緑膿菌は上皮細胞に透過経路を形成するためには同じ細胞でIV型線毛と ExoS を発現する必要があった (Fig. 8)。そしてIV型線毛の欠損は上皮細胞内に注入された ExoS の量を減少させた。これらのことより、トランスロケーションにおける腸管上皮細胞に透過経路を形成する段階で、緑膿菌はIV型線毛の何らかの機能を介して腸管上皮細胞内に ExoS を注入することで、タイトジャンクションを破綻させ、透過経路を形成し、血中へと透過することが示唆された。

培養細胞を用いた緑膿菌の感染実験によって、緑膿菌のIV型線毛は上皮細胞の透過経路の形成に必要とされることが示された (Fig. 7-9)。そして、カイコ幼虫を宿主とした感染実験によってIV型線毛はカイコの人における血液に相当するヘモリンフ内での免疫防御機構を回避するためではなく、カイコの腸管上皮細胞に透過経路を形成させるために必要であることが示された (Fig. 10)。これらの *in vitro* な結果と *in vivo* な結果から、緑膿菌のIV型線毛はヒトの生体内においてもトランスロケーションにおける腸管上皮細胞に透過経路を形成させるのに必要とされることが考えられた。

緑膿菌のIV型線毛には運動能と付着能の 2 つの機能があることが知られている (16-18)。そして、本章では緑膿菌のIV型線毛は Caco-2 細胞の付着菌数に影響を及ぼさないという結果を得ている (Fig. 7B, E)。つまり、緑膿菌がIII型分泌装置によって上皮細胞内に ExoS を注入するためにはIV型線毛の運動能が必要とされる可能性が考えられた。そこで、第 2 章では、ExoS の上皮細胞への注入におけるIV型線毛の必要性を検討するために、IV型線毛伸縮運動における ATPase をコードする *pilT* および *pilU* の欠損株を作製し、培養細胞を用いた実験を行った。

第 2 章宿主上皮細胞への ExoS 注入におけるIV型線毛構成因子の解析

2.1 緒言

緑膿菌を含む多くのグラム陰性菌は宿主となる真核細胞生物に対する病原因子の 1 つとしてⅢ型分泌装置を有する (22, 23) 。そして、緑膿菌はⅢ型分泌装置によって 4 種類のエフェクター分子 (ExoS、ExoT、ExoY、および ExoU) を上皮細胞内に注入し、アクチン骨格の崩壊、DNA 合成阻害などの障害を引き起こす (25) 。そして、Ⅲ型分泌装置とエフェクター分子を発現している緑膿菌が分離された呼吸器と血液感染症の患者の致死率は、それらを発現していない緑膿菌が分離された患者の致死率の約 6 倍であると報告されていることから (44) 、緑膿菌のⅢ型分泌装置とエフェクター分子は緑膿菌感染症において重要な因子であると考えられる。

第 1 章では、緑膿菌はIV型線毛を介してⅢ型分泌装置により ExoS を上皮細胞内に注入することで、タイトジャンクションが破綻され、透過経路が形成されることが示唆された。しかし、IV型線毛が Caco-2 細胞の付着菌数に影響を及ぼさなかったことより (Fig. 7B, E) 、ExoS の上皮細胞内への注入にはIV型線毛の付着能以外の機能、おそらくは運動能が必要である可能性が見出された。そこで本章では、IV型線毛の運動能に着目し、Ⅲ型分泌装置を介した ExoS の上皮細胞内への注入におけるIV型線毛の機能を解析した。

2.2 材料および方法

1. 使用菌株およびプラスミド

本章で使用した菌株およびプラスミドは Table 3 に示した。培養には LB Broth, Lennex (Difco) (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 、LB Agar, Lennox (Difco) (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) または、BM2 agar (0.7% K₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 1.08% sodium succinate, 1.5% agar) を使用し培養した。また、プラスミドを保持した株の培養にはプラスミドの選択マーカーに対応した抗菌薬テトラサイクリン (SIGMA-ALDRICH) (37) 、アンピシリン (SIGMA-ALDRICH) (38) を加えて 10 µg/ml および 75 µg/ml に調整した培地を使用した。

Table 3. 第 2 章で使用した菌株及びプラスミド

Strains and plasmids	Characteristics	reference
Strains		
<i>Paeruginosa</i>		
PAO1	Prototroph	(39)
PAO1pexoS-bla	PAO1 strain harbouring pexoS-bla plasmid	this study
ΔexoS	PAO1 of the exoS gene was knocked out	(33)

<i>ΔexoS pexoS-bla</i>	<i>ΔexoS</i> strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study
<i>ΔfliC</i>	PAO1 of the <i>fliC</i> gene was knocked out	(30)
<i>ΔpilA</i>	PAO1 of the <i>pilA</i> gene was knocked out	(36)
<i>ΔpilA pexoS-bla</i>	<i>ΔpilA</i> strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study
<i>ΔpilT</i>	PAO1 of the <i>pilT</i> gene was knocked out	this study
<i>ΔpilT pexoS-bla</i>	<i>ΔpilT</i> strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study
<i>ΔpilT ppilT</i>	<i>ΔpilT</i> strain harbouring <i>ppilT</i> plasmid	this study
<i>ΔpilU</i>	PAO1 of the <i>pilU</i> gene was knocked out	this study
<i>ΔpilU pexoS-bla</i>	<i>ΔpilU</i> strain harbouring <i>pexoS-bla</i> plasmid	this study
<i>ΔpilU ppilU</i>	<i>ΔpilU</i> strain harbouring <i>ppilU</i> plasmid	this study
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>el4</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK⁻mK⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>mcrB</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' (<i>traD36</i> <i>proAB⁺lac^flacZΔM15</i>)	(40)
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA</i> , <i>tra⁺</i>	(41)
Plasmids		
pEX18Tc	cloning vector; Tc ^r	(37)
pME6032	expression vector with an IPTG-inducible promoter; Tc ^r	(37)
pME6032- <i>pilT</i>	Tc ^r : <i>pilT</i> gene on pME6032	this study
pME6032- <i>pilU</i>	Tc ^r : <i>pilU</i> gene on pME6032	this study
pME6032- <i>exoS-bla</i>	Tc ^r : <i>exoS-bla</i> gene on pME6032	this study
pGEX-6p-1	expression vector with an IPTG-inducible promoter; Ap ^r	(38)

2. 欠損株の作製

PAO1 株のゲノムを鋳型として、対象とする遺伝子上流のフランキング領域 500 bp、下流のフランキング領域 500 bp を polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。以下の操作は第 1 章材料および方法と同様に行った。また、作製した遺伝子欠損株を Table 3 に、使用したプライマーを Table 4 にそれぞれ示した。

Table 4. 第 2 章で使したプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	reference
For deletion		
<i>pilT</i> -F1	CACCAAGCTTAAATGCTCGGCGATGGGCCG	this study
<i>pilT</i> -R1	GGCGCCAGGAGGGACTCCCCAATTACAAGC	this study
<i>pilT</i> -F2	GGGGAGTCCCTCCTGGCGCCGATCCGCCGC	this study
<i>pilT</i> -R2	TCCGTCTAGATCAGCTCTTCCAGGGTCGGG	this study
<i>pilU</i> -F1	GCGAAAGCTTTCGACCGGGTGGTCGACGTG	this study
<i>pilU</i> -R1	TGAAGACGGTGATGTTCTCGCTCACTCAGG	this study

<i>pilU</i> -F2	CGAGAACATCACCGTCTTCAGTAGGCCAGC	this study
<i>pilU</i> -R2	GGCCTCTAGATGAACCTGGCCAGCATGCGCC	this study
For expression		
<i>pilT</i> -F- <i>SacI</i>	GAGAGAGCTCATGGATATTACCGAGCTGCTCGCC	this study
<i>pilT</i> -R- <i>KpnI</i>	GAGAGGTACCTCAGAAGTTTTCCGGGATCTTCGCC	this study
<i>pilU</i> -F- <i>KpnI</i>	CGAGGGTACCATGGAATTCGAAAAGCTGCTGCGCC	this study
<i>pilU</i> -R- <i>BglII</i>	TGAAAGATCTTCAGCGGAAGCGCCGGCCG	this study
For RT-PCR		
<i>gyrB</i> -RT-F	TGCTGAAGGGGCTGGATGCCGTACGCAAGC	this study
<i>gyrB</i> -RT-R	TATCCACCGGAATACCGCGTCCATTGTCCG	this study
<i>pilA</i> -RT-F	CTTGGAATTCTGTATGATCGTGGTTGCGATCATCGG	this study
<i>pilA</i> -RT-R	TTAGTTATCACAACCTTTCCGGAGTGAACATCGG	this study
<i>pilT</i> -RT-F	CAACCTGCCACCGCTGGAACACAAG	this study
<i>pilT</i> -RT-R	ATCTCGCCGACCAGGATGATGTCCG	this study
<i>pilU</i> -RT-F	CGAGGGTACCATGGAATTCGAAAAGCTGCTGCGCC	this study
<i>pilU</i> -RT-R	TGGGTGACGATGCAGCCCTGGTGC	this study

3. 相補プラスミドの構築と形質転換

PAO1 株のゲノム DNA を鋳型とし、*SacI* と *KpnI* (*pilT* 遺伝子) 、*KpnI* と *BglII* (*pilU* 遺伝子) の制限酵素認識配列を 5'末端に付加したプライマー (Table 4) を用いた PCR によって *pilT* 遺伝子および *pilU* 遺伝子を増幅した。PCR による対象遺伝子領域の増幅は、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara) を用いて、添付マニュアルに従って行った (1 μ l PrimeSTAR GXL DNA Polymerase, 10 μ l 5 \times PrimeSTAR GXL buffer, 4 μ l 2.5 mM dNTP mix, 10 pmol primer F, 10 pmol primer R, 100 ng ゲノム DNA, 精製水で 50 μ l にメスアップ)。94°C で 5 分間加熱後、94°C で 30 秒間、63°C で 30 秒間、および 72°C で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の反応を加えた条件で行った。反応後の PCR 産物は、フェノールクロロホルム法によりタンパク質を取り除き、エタノール沈殿法により精製した (42)。精製した DNA 断片は *SacI* と *KpnI* (*pilT* 遺伝子) 、*KpnI* と *BglII* (*pilU* 遺伝子) の制限酵素でそれぞれ処理し、同じ組み合わせの制限酵素で処理した pME6032 とライゲーションすることで遺伝子相補用プラスミド pME6032-*pilT* と pME6032-*pilU* を構築した。構築したプラスミドを Δ *pilT* 株と Δ *pilU* 株に導入し、遺伝子相補株 Δ *pilTppilT* 株と Δ *pilUppilU* 株を作製した。制限酵素による処理、ライゲーションおよび緑膿菌へのプラスミドの導入は第 1 章材料および方法と同様に行った。

4. 透過電子顕微鏡による IV 型線毛の観察

LB broth 中 37°C で一晩振盪培養した PAO1 株および欠損株を 4% glutaraldehyde (in リン酸緩衝液, pH 7.4) で固定し、銅の格子で覆われたフォルムバル膜 (400 size mesh) に吸着させた後、リン光体タングステン酸溶液 (pH 7.0) で数秒染色した。調整したサンプルは透過電子顕

微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL Ltd.) によって、加速電位 80 v、デジタルイメージ (2,048 × 2,048 pixels) で、CCD カメラ (VELETA; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) で撮影した。

5. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による菌体表面の PilA の測定

ELISA は Kazmierczak らの論文を参考に行った (45) 。リン酸緩衝食塩水に OD₆₀₀=1.0 になるよう懸濁した菌液を 96 well ELISA plates (Thermo) に分注し、37°C で 2 時間培養し、メタノールで 30 分間固定した。96 well ELISA plates (Thermo) を TBS-T で 3 回洗浄し、anti-PilA polyclonal antibody (1:125, スクラム) を加えた。再度、ELISA plates を TBS-T で 3 回洗浄し、goat anti-rabbit IgG H&L (1:1000, Abcam) を加えた。検出は TMB-ELISA solution (Thermo) を加え、VarioskanTM microtiter plate reader (Thermo; absorbance 450 nm) を用いて測定した。

6. twitching motility の観察

Rashid らの論文を参考に行った (46) 。LB broth 中 37°C で一晩振盪培養した緑膿菌培養液を 5.0×10³ cfu となるように twitching agar [1% (w/vol) Bacto-agar (Difco) , LB broth (Difco)] に爪楊枝で穿刺し、37°C で 2 日間静置培養した。2 日間培養後、シャーレから twitching agar を取り除き、1% crystal violet で 5 分間、室温でシャーレに付着した菌を染色した。染色後、余分な染色液は水で洗い流した。

7. Caco-2 細胞および HeLa 細胞の培養

第 1 章材料および方法と同様に行った。

8. 上皮細胞内に注入された ExoS の定量

第 1 章材料および方法と同様に行った。

9. Caco-2 細胞モノレイヤの作製

第 1 章材料および方法と同様に行った。

10. Caco-2 細胞モノレイヤの transmonolayer electrical resistance (TER) 測定

第 1 章材料および方法と同様に行った。

11. オクルディンタンパク質の検出

第 1 章材料および方法と同様に行った。

12. Caco-2 細胞モノレイヤ透過実験

第 1 章材料および方法の項と同様に行った。

13. 半定量的 reverse transcriptase (RT)-PCR による *pilA*, *pilT*, *pilU* 遺伝子発現量の比較

RT-PCR は Okuda らの論文を参考に行った (47) 。NuncloTM delta surface (Thermo) に培養

した Caco-2 細胞に、LB broth 中 37°C で一晩振盪培養した緑膿菌培養液を multiplicity of infection of 10 (MIC 10) になるよう感染させ、37°C で 2 時間培養後、Caco-2 細胞培養液中の菌を回収した。次に、Caco-2 細胞を DPBS で 6 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞ごと付着している菌を回収した。コントロールには Caco-2 細胞を培養していない DMEM-FBS 培地のための Nunclon™ delta surface (Thermo) に緑膿菌液を接種し、37°C で 2 時間培養後、培養液中の菌と容器に付着している菌を回収した。回収した菌のトータル RNA は ISOGEN (Nippon gene) の添付マニュアルに従って抽出した。回収した菌体に 1 ml の ISOGEN (Nippon gene) を加え、激しく混和した後、50°C で 2 分間加熱した。次に、100 µl のクロロホルムを加え激しく混和した後、2 分間室温で静置し、遠心分離 (15,000×g、5 分間、室温) によって上清を回収した。回収した上清に 250 µl のイソプロパノール (Wako) を加え、遠心分離 (15,000×g、5 分間、室温) し、上清を除去した。RNA を含む沈殿物を 250 µl の 70% エタノールで洗浄後、遠心分離 (15,000×g、2 分間、室温) し、上清を除去した。乾燥後の沈殿物を 10 µl の DEPC (Nippon gene) に懸濁した。懸濁した溶液は RNase free DNase I (Takara) を用いてその添付マニュアルに従って精製した。懸濁した溶液 10 µl に 10 ユニットの DNase I (Takara)、5 µl の 10×DNase I buffer を加え、DEPC (Nippon gene) で全量 50 µl にメスアップし、37°C で 1 時間水浴した。1 時間後 100 µl の DEPC (Nippon gene) を加えた後、フェノールクロロホルム法によりタンパク質を取り除き、エタノール沈殿法により精製した (42)。RNA を含む沈殿物を 500 µl の 70% エタノールで洗浄後、遠心分離 (15,000×g、1 分間、室温) し、上清を除去した。乾燥後の沈殿物を 20 µl の DEPC (Nippon gene) に懸濁し、トータル RNA として使用した。トータル RNA は NanoDrop (Thermo) を用いて absorbances 260 nm and 280 nm でその量と純度を測定した。100 ng のトータル RNA を元に、*pilA* 遺伝子と *pilT* 遺伝子と *pilU* 遺伝子と *gyrB* 遺伝子 (internal control) の転写物は PrimeScript One Step RT-PCR Kit (Takara) を用いて RT-PCR によって増幅された。50°C で 30 分間加熱、94°C で 2 分間加熱後、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、および 72°C で 30 秒間を 1 サイクルとした反応を 35 サイクル行った。RT-PCR に使用したプライマーは Table 4 に示した。半定量的 RT-PCR 産物は、アガロース電気泳動法によって分画後、エチジウムブロマイドで染色し、Dolphin view (Kurabo) で検出した。検出したバンド強度の測定には ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) を使用した。

2.3 結果

1. *pilT*, *pilU* 欠損株の作製と表現型の確認

IV 型線毛伸縮運動における ATPase をコードする *pilT* および *pilU* の欠損株を作製し、その表現型を調べた。PAO1 株で観察された IV 型線毛が *pilT*, *pilU* 欠損株においても観察された (Fig. 11A)。次に、ELISA によって菌体表面の PilA を測定した結果、*pilT*, *pilU* 欠損株の菌体表面の PilA 量と PAO1 株の菌体表面の PilA 量に有意な差は無かった ($P > 0.1$) (Fig. 11B)。しかし、IV 型線毛の伸縮運動に起因する twitching motility を調べたところ、PAO1 株では広がるような twitching motility が観察されたのに対して、*pilT*, *pilU* の欠損は twitching motility を消失させた

(Fig. 11C)。そしてこの消失はそれぞれ pME6032-*pilT*、pME6032-*pilU* での形質転換によって回復された (Fig. 11C)。これらの結果より (Fig. 11)、*pilT*、*pilU* 欠損株は菌体表面にIV型線毛構造体を有しているが、twitching motility を消失した変異株であることを確認した。以降の実験にはこれら変異株を用いた。

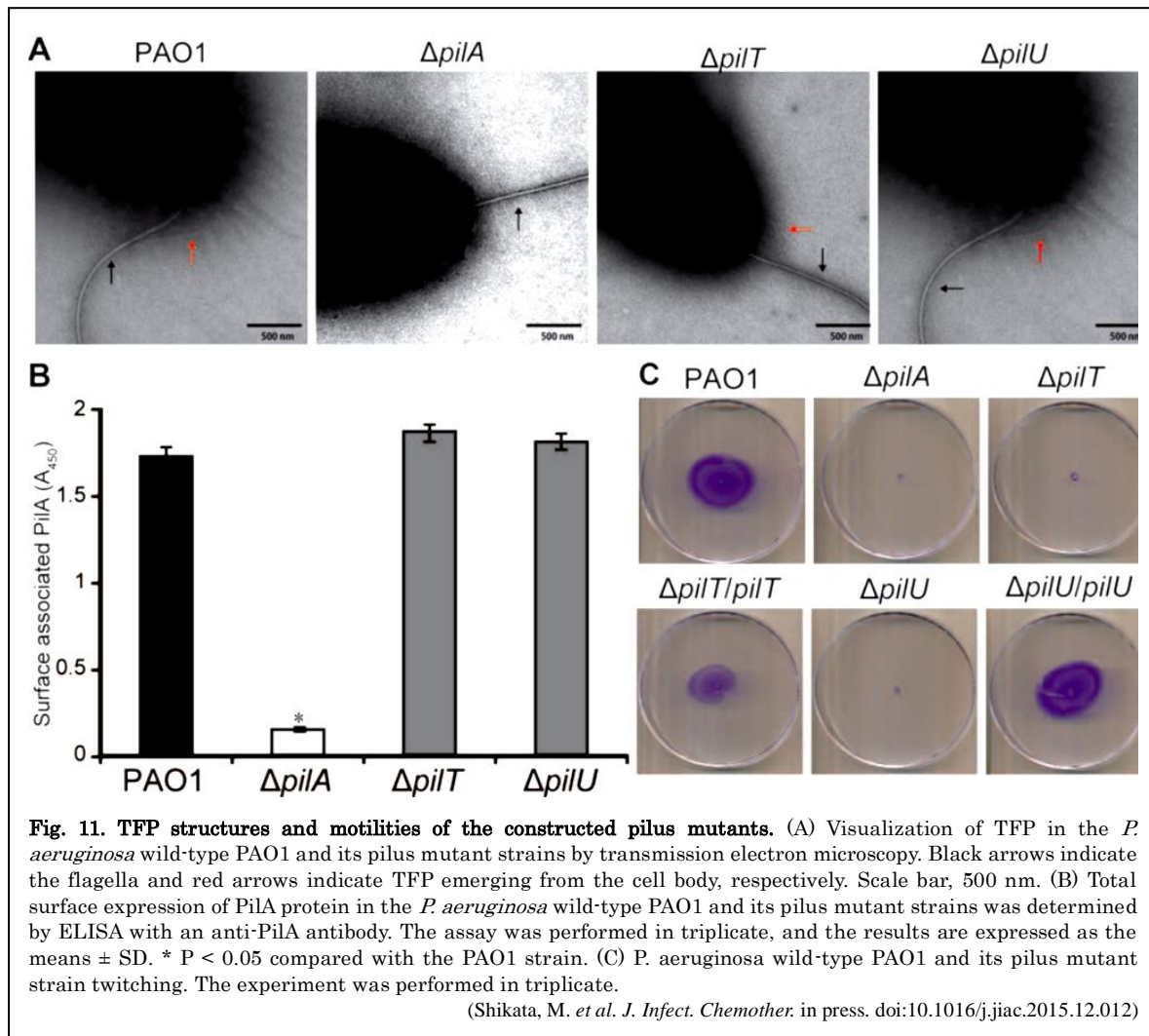
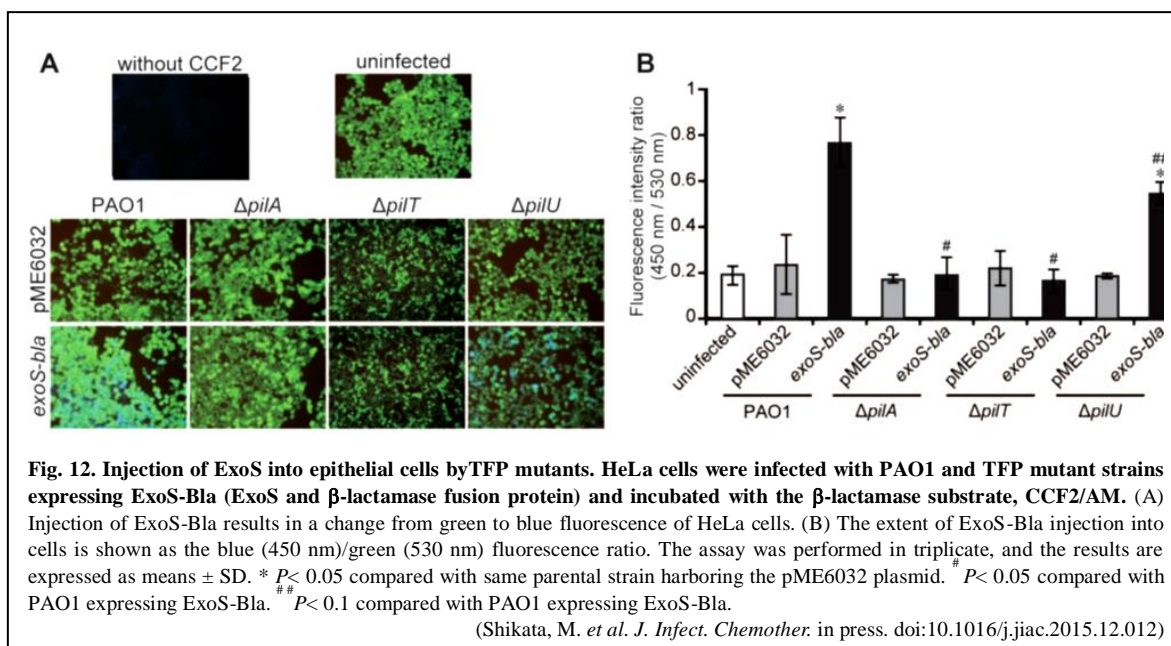


Fig. 11. TFP structures and motilities of the constructed pilus mutants. (A) Visualization of TFP in the *P. aeruginosa* wild-type PAO1 and its pilus mutant strains by transmission electron microscopy. Black arrows indicate the flagella and red arrows indicate TFP emerging from the cell body, respectively. Scale bar, 500 nm. (B) Total surface expression of PilA protein in the *P. aeruginosa* wild-type PAO1 and its pilus mutant strains was determined by ELISA with an anti-PilA antibody. The assay was performed in triplicate, and the results are expressed as the means \pm SD. * $P < 0.05$ compared with the PAO1 strain. (C) *P. aeruginosa* wild-type PAO1 and its pilus mutant strain twitching. The experiment was performed in triplicate.

(Shikata, M. et al. *J. Infect. Chemother.* in press. doi:10.1016/j.jiac.2015.12.012)

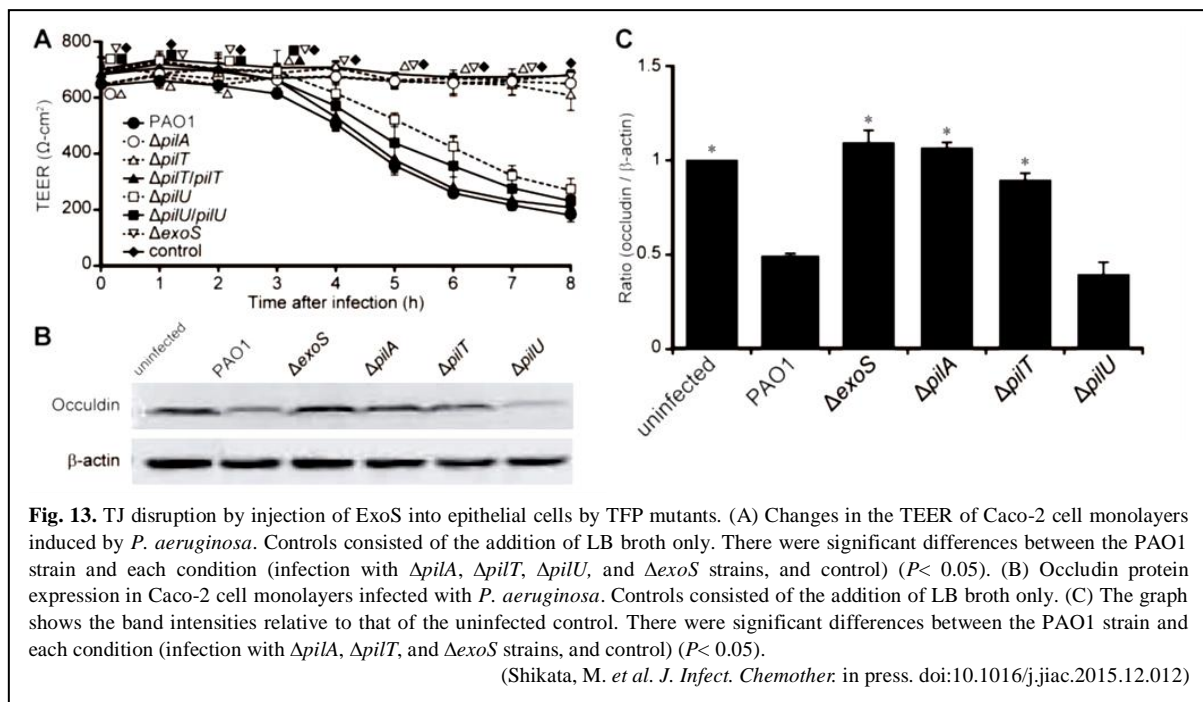
2. 上皮細胞内への ExoS 注入におけるIV型線毛の運動能の必要性の検討

緑膿菌のIV型線毛の運動能が ExoS の上皮細胞内への注入に関与しているか調べるために、CCF2-AM 試薬を用いて HeLa 細胞内に注入された ExoS 量を測定した。感染 2.5 時間目において、*exoS-bla* (β -lactamase) 融合遺伝子をクローニングした pME6032-*exoS-bla* を導入した PAO1 株において青色蛍光を発する細胞が観察された (Fig. 12A)。そしてその細胞は *pilA*、*pilT*、*pilU* の欠損によって減少した (Fig. 12A)。また、pME6032-*exoS-bla* を導入した PAO1 株で検出された蛍光強度比 (青色蛍光/緑色蛍光) は *pilA*、*pilT*、*pilU* の欠損によって、それぞれ 80%、75%、30% 減少された ($P < 0.05$) (Fig. 12B)。



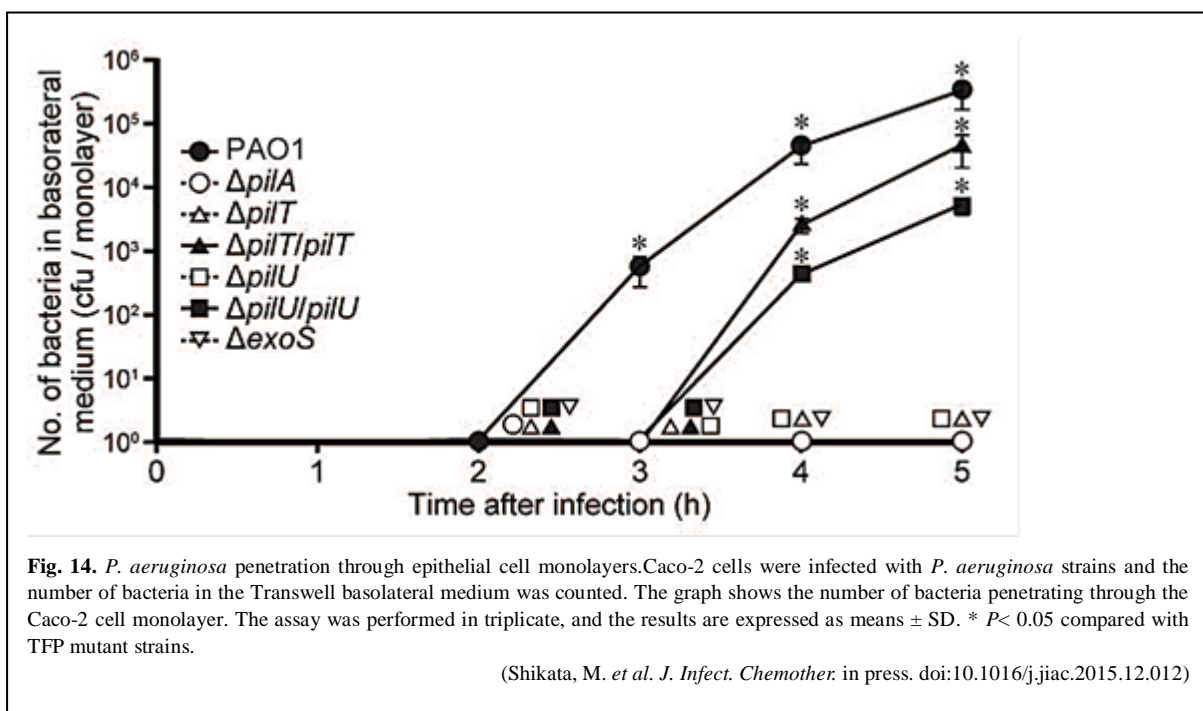
3. *pilT*, *pilU* 欠損株感染時の透過経路形成レベルの測定

ExoS の注入量と透過経路形成レベルが相関しているか調べるために、Caco-2 細胞モノレイアの管腔側に菌を接種し、感染 8 時間目までのモノレイアの管腔側と基底側の電気抵抗 TER を測定した。PAO1 株では経時的な TER の減少がみられたが、*pilT* 欠損株では TER は変化しなかった ($P < 0.05$) (Fig. 13A)。一方、*pilU* 欠損株では経時的な TER の減少がみられたが、それは、PAO1 と比べると抑制されたものだった ($P < 0.05$) (Fig. 13A)。これら欠損株による表現型はそれぞれ pME6032-*pilT*、pME6032-*pilU* での形質転換によって回復された (Fig. 13A)。次に、感染 4 時間目のオクルディンを western blotting によって検出した。検出したオクルディンのバンド強度は β -アクチンのバンド強度によって比を取り標準化した。PAO1 株と *pilU* 欠損株においてオクルディンのバンドの減少が観察され (Fig. 13B)、そのバンド強度比の減少度合いはそれぞれコントロールである非感染細胞の 51%、61% の減少だった ($P < 0.05$) (Fig. 13C)。そして、*pilT* の欠損によっては PAO1 で観察されたオクルディンのバンドとバンド強度比の減少は抑制された (Fig. 13C)。この結果は TER の測定結果と一致するものだった。これら透過経路形成レベルを示すデータ (Fig. 13) は ExoS の注入量 (Fig. 12) と相関するものだった。以上の結果より (Fig. 12, 13)、ExoS の上皮細胞内への注入と、それに付随する透過経路の形成には IV 型線毛の運動能が必要とされることが示された。



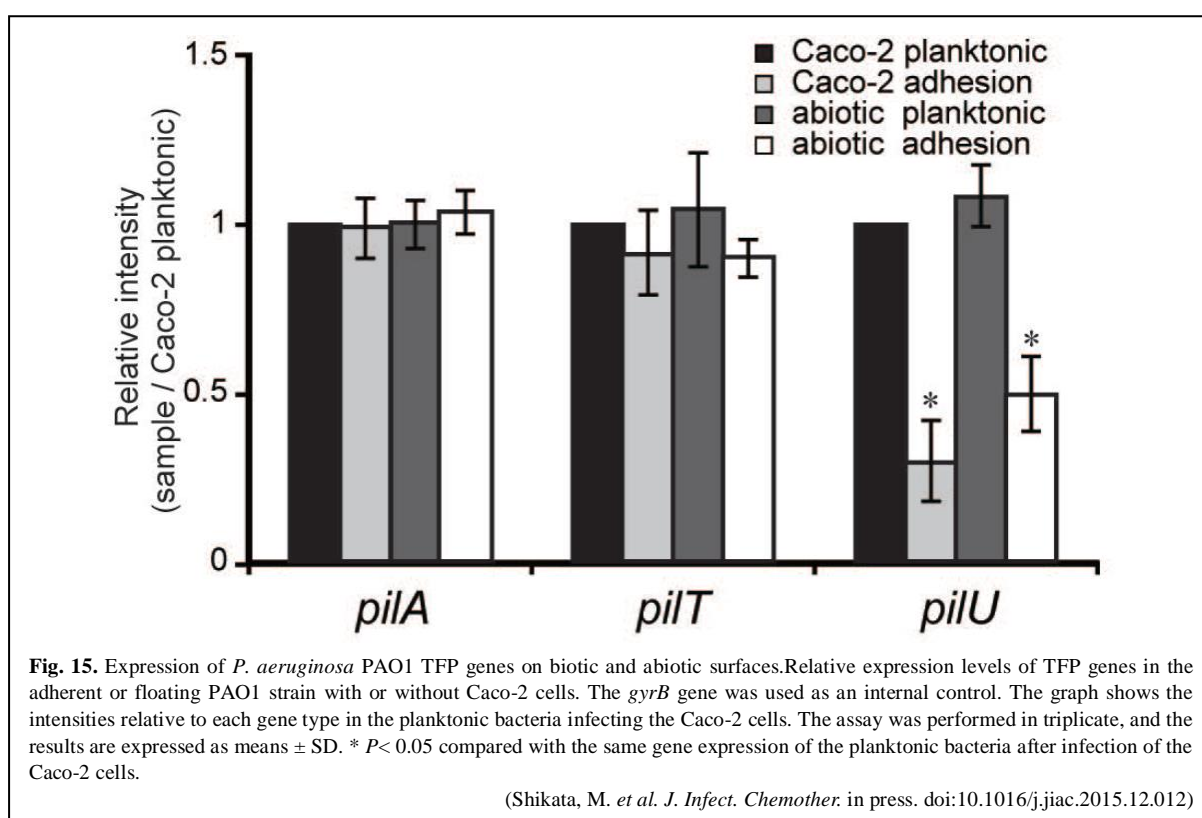
4. Caco-2 細胞モノレイヤ透過菌数の測定

上皮細胞の透過におけるIV型線毛の運動能の必要性を調べるために、Caco-2 細胞モノレイヤを用いて、緑膿菌の透過菌数を測定した。PAO1 株でみられた透過菌数は *pilT*, *pilU* の欠損によって、*pilA*, *exoS* の欠損と同レベルまで減少された ($P < 0.05$) (Fig. 14)。そしてこの透過菌数の減少は pME6032-*pilT*、pME6032-*pilU* での形質転換によって回復された (Fig. 14)。この結果 (Fig. 14) より、*pilT*, *pilU* は Caco-2 細胞モノレイヤの透過に必要とされることがわかった。



5.上皮細胞感染時における *pilA*, *pilT*, *pilU* の発現強度の比較

ここまでの結果より、*pilT*, *pilU* の欠損はどちらもIV型線毛の伸縮運動に起因する twitching motility を消失させた (Fig. 11C)。しかし、これら遺伝子の欠損における、ExoS 注入量 (Fig. 12) と透過経路形成レベル (Fig. 13) には違いがみられた。これらの遺伝子の欠損による表現型の違いを検証するために半定量的な RT-PCR によって、*pilA*, *pilT*, *pilU* の発現強度を比較した。Caco-2 細胞 (+) の浮遊状態の緑膿菌を基準とした遺伝子の発現強度比において、*pilA*, *pilT* は今回検討したすべての条件において有意差が無かったが ($P > 0.1$)、*pilU* は付着によってその発現強度比を減少させた ($P < 0.05$) (Fig. 15)。



2.4 考察

本章では第 1 章の結果より、IV型線毛の運動能に着目したため、菌体表面にIV型線毛構造体を保持しているが、その伸縮運動に起因する twitching motility を消失している、緑膿菌のIV型線毛の運動ATPaseをコードする *pilT* および *pilU* 欠損株 (Fig. 11) を用いて培養細胞を用いた実験を行った。

IV型線毛伸縮運動における ATPase である PilT と PilU はどちらもIV型線毛の縮退に必要なエネルギーを生み出すという共通した機能を持っているが (14, 15)、その表現型にはいくつかの違いがあることが知られている。PilT は緑膿菌の細胞の両端に局在しているのに対し、PilU は片側に局在している (48)、また、*pilT* 遺伝子の欠損株と比較して、*pilU* 遺伝子の欠損株はIV型線毛の伸縮運動を介して感染する PO4 フェージに対する耐性が低い (49, 50)、

さらに、PilT のもつ ATPase 活性は PilU の ATPase 活性の約 1.5 倍である (51) 、などの違いだ。これらの報告から、IV型線毛伸縮運動において、PilU (*pilU*) よりも PilT (*pilT*) が主となって機能していることが考えられる。そこで、本実験において、*pilT*, *pilU* 欠損株間にみられた、上皮細胞内に注入された ExoS 量の減少と、それに相関した上皮細胞透過経路の形成レベルの違いの原因として (Fig. 12, 13) 、ExoS の上皮細胞内への注入に必要とされるIV型線毛の運動能における *pilT* と *pilU* の寄与度の違い、つまり、ExoS の注入において、*pilU* よりも *pilT* に起因する運動の方が主となって機能していることが考えられた。

緑膿菌のIV型線毛は、その伸縮運動に起因する twitching motility などによって、固相表面上での運動を司ることが知られている (11) 。本実験では、PAO1 株と比較して抑制的ではあるが、上皮細胞に ExoS を注入し (Fig. 12) 、上皮細胞に透過経路を形成した (Fig. 13) *pilU* 欠損株における Caco-2 細胞モノレイヤの透過菌数の減少レベルは *pilA*, *exoS* 欠損株における透過菌数の減少レベルと有意な差が無かった (Fig. 14) 。この結果より、上皮細胞間隙に形成された、固相である細胞と細胞に挟まれた透過経路を通過するためには少なくとも *pilU* に起因するIV型線毛の伸縮運動が必要であることが考えられた。

ExoS の上皮細胞内への注入量の測定結果と (Fig. 12) 、上皮細胞透過経路の形成レベルの結果から (Fig. 13) 、緑膿菌が上皮細胞に付着した後、ExoS を注入する際に、*pilU* よりも *pilT* に起因する運動の方が主となって機能している可能性が考えられた。そして、半定量的な RT-PCR による、*pilU* のみ付着によってその発現量が減少されたという結果は (Fig. 15) 、この可能性を支持するものであった。PilT と PilU の表現型の違いに関する報告から考えられた (48-51) 、PilU (*pilU*) よりも PilT (*pilT*) が主となって機能しているという考えと、本実験の結果より (Fig. 15) 、*pilU* は緑膿菌の付着時に重要ではない可能性と、*pilU* の発現低下が緑膿菌の付着時には必要とされる可能性の二つが考えられた。緑膿菌はIV型線毛の PilY1 を介して宿主非特異的である機械的な付着の刺激を感知し、細胞への病原性を示すことが報告されている (52) 。そのため、この付着による *pilU* の発現量の低下は PilY1 を介した機械的な付着の刺激の感知によって引き起こされることが考えられた。

以上の結果より、本章では、緑膿菌は *pilU* よりも、主に *pilT* に起因するIV型線毛の伸縮運動を介してⅢ型分泌装置により ExoS を上皮細胞に注入することが示された。

総括

本研究では、免疫不全の入院患者にとって致命的な感染症を引き起こす緑膿菌の感染経路の 1 つである、緑膿菌が腸管腔内から血中に転移するトランスロケーションのメカニズムを解明するために、緑膿菌の主要な運動器官の一つである IV 型線毛に着目し、培養細胞を用いた実験によって、トランスロケーションにおける IV 型線毛の必要性和機能を解析した。

第 1 章では、IV 型線毛構造体自体を欠損しているため、IV 型線毛の機能である付着能と IV 型線毛の伸縮運動に起因する *twitching motility* を欠損した *pilA* 欠損株を用いて、培養細胞を用いた実験によって、IV 型線毛のトランスロケーションにおける必要性を解析した。結果、緑膿菌が III 型線毛を用いて上皮細胞内に ExoS を注入し、透過経路を形成するためには IV 型線毛が必要とされることが示唆された。そして、第 1 章において IV 型線毛は Caco-2 細胞への付着菌数を変化させなかったことより、IV 型線毛の機能である付着能と運動能のうち、運動能がトランスロケーションに関与している可能性が見出された。

そこで、第 2 章では IV 型線毛の運動能に着目し、IV 型線毛構造体を菌体外に有しているため付着能も有しているが、*twitching motility* を消失している *pilT*, *pilU* 欠損株を用いて、上皮細胞内への ExoS 注入における IV 型線毛の機能を解析した。結果、緑膿菌が III 型分泌装置を用いて上皮細胞内に ExoS を注入し、透過経路を形成するためには主に *pilT* に起因する IV 型線毛の伸縮運動が必要とされたと結論された。

緑膿菌の III 型分泌装置がエフェクター分子を分泌・注入するメカニズムに関して、プロトン駆動力の阻害と、溶液の粘性が III 型分泌装置のニードル状構造の回転とエフェクター分子の分泌を減少させることや (27, 28)、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞において、宿主細胞の近くに菌体が存在することが必要であることが報じられている (28)。本研究の成果と、III 型分泌装置に関する報告から、おそらく、緑膿菌は腸管上皮細胞上で、III 型分泌装置の回転と IV 型線毛の伸縮運動によって ExoS を分泌・注入し、その ExoS によってタイトジャンクションが破綻され、透過経路が形成されるというメカニズムが考察された。

また、本研究の成果は、緑膿菌の III 型分泌装置によるエフェクター分子の分泌・注入メカニズム解明の端緒を開くものでもあった。緑膿菌を含むグラム陰性菌が有する III 型分泌装置の構造体は共通して、菌体の内膜内に ATPase 複合体、外膜と内膜に渡って存在する筒状の基底小体、細胞外に突出するニードル状構造の 3 つの部位からなる (22, 24)。そのため本研究の成果は、緑膿菌のトランスロケーションにおける透過経路形成のメカニズムの解明に貢献するだけでなく、緑膿菌以外のグラム陰性菌における III 型分泌装置によるエフェクター分子の分泌・注入メカニズムの解明にも繋がることが期待される。

今後、本研究成果を基盤とし、IV 型線毛とその機能を標的とした 2 次的な感染症の予防法と治療法および III 型分泌装置によるエフェクター分子の注入メカニズムを利用した新規薬物投与手段が開発されることが期待される。

謝辞

本研究の遂行から論文の作製に至るまで終始熱心なご指導頂きました本学の微生物・感染制御学分野 後藤直正教授、林直樹助教に深謝いたします。後藤教授には懇切丁寧なる研究の御指導を賜りましたこと、さらに人として、社会人としての在り方について、厳しくも熱心に根気強く御指導御鞭撻を頂きましたことに深甚なる敬意と謝意とを表します。林助教には研究技術や考え方など基礎から細部にわたり優渥な御指導頂きましたこと、また、皆川助教には学部生の頃から研究技術や本研究室の規則などを御指導頂きましたことを衷心より感謝いたします。本学微生物・感染制御学分野の椿原千香子さんには日々の研究生活の環境を整えて頂き、深く感謝いたします。

本論文の査読ならびに御指導賜りました本学病態生理学分野 芦原英司教授、細胞生物学分野 藤室雅弘教授に篤く御礼申し上げます。

大学院生活における経済的支援を賜り、本学リサーチ・アシスタント制度に心より御礼申し上げます。

最後に、研究生活を共に過ごした卒業生の皆様ならびに学部生の皆様、そして本学での大学院生活を様々な面で支えて頂きました家族や友人達に心から感謝いたします。

参考文献

1. **Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Lipman, J., Gomersall, C., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K. and EPIC II Group of investigators.** : International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. **302**, 2323-2329 (2009).
2. **Andremont, A., Marang, B., Tancrede, C., Baume, D. and Hill, C.** : Antibiotic Treatment and Intestinal Colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. **33**, 1400-1402 (1989).
3. **Stoodley, B. J. and Thom, B. T.** : Observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol*. **3**, 367-375 (1970).
4. **Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D., Capellier, G., Floriot, C. and Helias, J. P.** : Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med*. **27**, 1263-1268 (2001).
5. **Ohara, T. and Itoh, K.** : Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. *Intern. Med*. **42**, 1072-1076 (2003).
6. **Corfield, A. P.** : Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*. **1850**, 236-252 (2015).
7. **Tlaskalová-Hogenová, H., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Rossmann, P., Hrnčíř, T., Kverka, M., Zakostelská, Z., Klimesova, K., Pribylova, J., Bartova, J., Sanchez, D., Fundova, P., Borovska, D., Srutkova, D., Zidek, Z., Schwarzer, M., Drastich, P. and Funda, D. P.** : The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol*. **8**, 110-120 (2011).

8. **Miyoshi, J. and Takai, Y.** : Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 815-855 (2005).
9. **Runkle, E. A. and Mu, D.** : Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer Lett.* **337**, 41-48 (2013).
10. **Rajasekaran, S. A., Barwe, S. P., Gopal, J., Ryazantsev, S., Schneeberger, E. E. and Rajasekaran, A. K.** : Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G124-G133 (2007).
11. **Burrows, L. L.** : *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 493-520 (2012).
12. **Nguyen, Y., Sugiman-Marangos, S., Harvey, H., Bell, S. D., Charlton, C. L., Junop, M. S. and Burrows, L. L.** : *Pseudomonas aeruginosa* Minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin. *J. Biol. Chem.* **290**, 601-611 (2015).
13. **Giltner, C. L., Habash, M. and Burrows, L. L.** : *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. *J. Mol. Biol.* **398**, 444-461 (2010).
14. **Shen, Y., Siryaporn, A., Lecuyer, S., Gitai, Z. and Stone, H. A.** : Flow directs surface-attached bacteria to twitch upstream. *Biophys. J.* **103**, 146-151 (2012).
15. **Chiang, P., Sampaleanu, L. M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P. L. and Burrows, L. L.** : Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology.* **154**, 114-126 (2008).
16. **Merz, A. J., So, M. and Sheetz, M. P.** : Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* **407**, 98-102 (2000).

17. **Chi, E., Mehl, T., Nunn, D. and Lory, S.** : Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **59**, 822-828 (1991).
18. **Zolfaghar, I., Evans, D. J. and Fleiszig, S. M. J.** : Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **71**, 5389-5393 (2003).
19. **O'Toole, G. and Kolter, R.** : Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* **30**, 295-304 (1998).
20. **Chiang, P. and Burrows, L. L.** : Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**, 2374-2378 (2003).
21. **Comolli, J. C., Hauser, A. R., Waite, L., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S. and Engel, J. N.** : *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.* **67**, 3625-3630 (1999).
22. **Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V. and Economou, A.** : Type III secretion: Building and operating a remarkable nanomachine. *Trends Biochem. Sci.* (2015) in press.
23. **Galan, J. E.** : Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe.* **5**, 571-579 (2009).
24. **Marlvits, T. C. and Stebbins, C. E.** : Type 3 secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol.* **13**, 47-52 (2013).
25. **Sato, H., Hunt, M. L., Weiner, J. J., Hansen, A. T. and Frank, D. W.** : Modified needle-tip PcrV proteins reveal distinct phenotypes relevant to the control of type III secretion and intoxication by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* **6**, e18356 (2011).
26. **Galle, M., Carpentier, I. and Beyaert, R.** : Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 831-842 (2012).

27. **Ohgita, T., Hayashi, N., Gotoh, N. and Kogure, K.** : Suppression of type III effector secretion by polymers. *Open. Biol.* **3**, 130133-130133 (2013).
28. **Ohgita, T., Hayashi, N., Hama, S., Tsuchiya, H., Gotoh, N. and Kogure, K.** : A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force-dependent type III secretion apparatus rotation. *FASEB. J.* **27**, 2862-2872 (2013).
29. **Comolli, J. C., Waite, L. L., Mostov, K. E. & Engel, J. N.** : Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **67**, 3207-3214 (1999).
30. **Hayashi, N., Matukawa, M., Horinishi, Y., Nakai, K., Yoneko, Y., Yoshida, N., Minagawa, S. and Gotoh, N.** : Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *J. Infect. Chemother.* **19**, 305-315 (2013).
31. **Geering, K.** : FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *AJP - Ren. Physiol.* **290**, F241-F250 (2006).
32. **Bilbert, S., Aebischer, D., Desgranges, F., Roy, S., Schaer, D., Kharoubi-Hess, S., Horisberger, J. D. and Geering, K.** : A link between FXYD3 (Mat-8)-mediated Na,K-ATPase regulation and differentiation of Caco-2 intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **20**, 1132-1140 (1994).
33. **Okuda, J., Hayashi, N., Okamoto, M., Sawada, S., Minagawa, S., Yano, Y. and Gotoh, N.** : Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na,K-ATPase regulator, FXYD3. *Infect. Immun.* **78**, 4511-4522 (2010).
34. **Markou, P. and Apidianakis, Y.** : Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1-5 (2014).

35. **Bucior, I., Pielage, J. F. and Engel, J. N. :** *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog.* **8**, e1002616 (2012).
36. **Okuda, J., Hayashi, N., Arakawa, M., Minagawa, S. and Gotoh, N. :** Type IV pilus protein PilA of *Pseudomonas aeruginosa* modulates calcium signaling through binding the calcium-modulating cyclophilin ligand. *J. Infect. Chemother.* **19**, 653-664 (2013).
37. **Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. :** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene.* **212**, 77-86 (1998).
38. **Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R. and Sasakawa, C. :** Shigella effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF35 to modulate host immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 531-539 (2005).
39. **Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. -S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson, M. V. :** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**, 959-964 (2000).
40. **Wood, T. K., González Barrios, A. F., Herzberg, M. and Lee, J. :** Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 361-367 (2006).
41. **Ovadis, M., Liu, X., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I. and Chernin, L. :** The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: Cloning, sequencing, and functional studies. *J. Bacteriol.* **186**, 4986-4993 (2004).

42. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. A.** : Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3rd edition. NY, U. S. A, Cold Spring Harbor (1989).
43. **Verove, J., Bernard, C., Bohn, Y. S., Boulay, F., Rabiet, M. J., Attree, I. and Cretin, F.** : Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PLoS One*. **7**, e30488 (2012).
44. **Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. and Wiener-Kronish, J. P.** : Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. infect. Dis.* **183**, 1767-1774 (2001).
45. **Kazmierczak, B. I., Lebron, M. B. and Murray, T. S.** : Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1026-43 (2006).
46. **Rashid, M. H. and Kornberg, A.** : Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4885-4890 (2000).
47. **Okuda, J., Okamoto, M., Hayashi, N., Sawada, S., Minagawa, S. and Gotoh, N.** : Complementation of the *exoS* gene in the *pvdE* pyoverdine synthesis gene-deficient mutant of *Pseudomonas aeruginosa* results in recovery of the *pvdE* gene-mediated penetration through the intestinal epithelial cell barrier but not the *pvdE*-mediated virulence . *J. Infect. Chemother.* **18**, 332-340 (2012).
48. **Chiang, P., Habash, M. and Burrows, L. L.** : Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility. *J. Bacteriol.* **187**, 829-839 (2005).
49. **Bradley, D. E.** : Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. *J. Virol.* **12**, 1139-1148 (1973).

50. **Whitchurch, C. B. and Mattick, J. S.** : Characterization of a gene, *pilU*, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. **13**, 1079-1091 (1994).
51. **Chiang, P., Sampaleanu, L. M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P. L. and Burrows, L. L.** : Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology*. **154**, 114–126 (2008).
52. **Siryaporn, A., Kuchma, S. L., O'Toole, G. A. and Gitai, Z.**: Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16860–16865 (2014).