

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、 $\Delta pilT$ および $\Delta pilU$ 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 $\Delta pilT$ の方が高かった。この減少レベルは、 $\Delta pilT$ および $\Delta pilU$ 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、 $\Delta pilT$ および $\Delta pilU$ とともに $\Delta pilA$ 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りと期待される。

審査の結果の要旨

水系や土壌、植物表面などの自然環境、医療施設内環境に生息するグラム陰性の好気性桿菌である *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) による難治性の日和見感染症が問題になっている。呼吸器や泌尿器における持続的な緑膿菌感染症は、限局した部位での感染症に留まらず、致死的な血液感染症に至ることもある。また、コンプロマイズド・ホストでは腸管からの血液への移行による内因性の血液感染症も警戒すべき課題である。

申請者は、腸管を経由した緑膿菌の内因性感染の一過程である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、つぎの知見を明らかにした。

1. 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* 遺伝子の欠損を作成したところ、人工ムチン層の透過とヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞への付着能は変化しなかったが、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞層の透過が減少したこと、さらにこの原因は、Caco-2 細胞間の接着の破綻によることを見出され、IV型線毛は上皮細胞透過経路の形成に必要であることを示した。さらに、この原因が、IV型線毛の欠損によるIII型エフェクター ExoS 注入量の減少に起因することを、新たに作成した *DexoS* 株および *DpilA DexoS* 株を用いた実験により明らかにした。これらの *in vitro* 実験での結果は、カイコ幼虫を宿主とする感染実験により検証された。こうして、IV型線毛は上皮細胞層での透過経路の形成に必要な ExoS の注入に必須の因子であると結論した。

2. 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

IV型線毛は、宿主細胞への付着と菌体運動に機能していることが明らかにされている。しかし、先の研究で、IV型線毛が Caco-2 細胞層の透過過程での付着に機能していないことが示されたことから、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エネルギーを供給する因子である ATPase をコードする *pilT* または *pilU* 遺伝子を欠損させたところ、正常な線毛構造体は観察されたものの、IV型線毛依存的な運動能である *twitching motility* が消失することが分かった。また、これらの欠損は、モデル宿主細胞に使用した HeLa 細胞への ExoS 注入量の有意な減少をもたらした。しかし、この減少レベルは、*pilT* 欠損の方が高かった。この減少レベルの違いは、Caco-2 接着時における両遺伝子の発現レベルの差に起因することを明らかにした。

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。これらの知見に加えて、IV型線毛は、その運動能を介することによりエフェクター分子 ExoS を上皮細胞へ注入することによって、透過経路を形成することを新たに明らかにした。これは、コンプロマイズド・宿主における腸管での緑膿菌の定着が血液感染成立の一因であるというレトロスペクティブな研究結果に実験的根拠を与えるものであり、さらに、緑膿菌による血液感染の発生の予防の開発に貢献する知見であると評価される。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。