

香川県立保健医療大学リポジトリ

緑膿菌線毛関連遺伝子のCaco-2細胞単層を介したバクテリアルトランスロケーションおよびキイロショウジョウバエに対する病原性への関与

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-05-11 キーワード (Ja): キーワード (En): Pseudomonas aeruginosa, pili-associated gene, Caco-2, bacterial translocation, Drosophila melanogaster 作成者: 末澤, 千草, 安田, 仁, 猪野, 楓, 國方, 千菜美, 奥田, 潤, Yasuda, Masashi, Ino, Kaede, Kunikata, Chinami メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.50850/00000336

緑膿菌線毛関連遺伝子のCaco-2細胞単層を介したバクテリア アルトランスロケーションおよびキイロショウジョウバエ に対する病原性への関与

末澤 千草¹⁾, 安田 仁¹⁾, 猪野 楓¹⁾, 國方 千菜美¹⁾, 奥田 潤¹⁾*

¹⁾ 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科微生物学

要旨

我々は以前, Caco-2細胞層単層を介した緑膿菌 PAO1 株のバクテリアアルトランスロケーションに関与する 21 の遺伝子を同定した。この研究では, 線毛関連遺伝子と Caco-2 細胞層透過活性との関連が不明なままであるため, 線毛関連遺伝子トランスポゾン挿入変異株に焦点を当てた。緑膿菌 PAO1 株および 12 の線毛関連遺伝子変異株を用いて, Caco-2 細胞層透過活性試験, IV 型線毛タンパク質 PilA の検出, Caco-2 細胞への付着実験, およびキイロショウジョウバエに対する病原性試験を行った。すべての線毛関連遺伝子変異株は, PAO1 株と比較して Caco-2 細胞層透過活性の有意な低下を示した。さらに, 線毛関連遺伝子変異株では Caco-2 細胞への付着, およびキイロショウジョウバエに対する病原性の減少がみられ, 細胞表面の IV 型線毛タンパク質 PilA の喪失が観察された。これらの結果は, IV 型線毛を介した機能が, Caco-2 細胞への細菌の付着, その後の Caco-2 細胞層への透過, およびキイロショウジョウバエにおける細菌の病原性に不可欠であることを示唆している。線毛関連遺伝子の変異は, 細胞表面の PilA の喪失を引き起こし, Caco-2 細胞層への透過に大きな影響を及ぼし, その結果, 緑膿菌の病原性を低下させる可能性がある。

Key Words : 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 線毛関連遺伝子 (pili-associated gene), ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2), バクテリアアルトランスロケーション (bacterial translocation), キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)

はじめに

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌) は, 土壌, 水系など自然界に広く分布するグラム陰性の細菌である。本菌は日和見病原体であり, 免疫機能の低下した入院患者に局所感染や播種性感染を引き起こす。本菌によって引き起こされる肺への感染症はこれらの患者の主な死因である。さらに, 腸管に病原性の高い緑膿菌株が存在することも, 免疫機能が低下している患者の菌血症と死亡の主な原因であり¹⁻³⁾, 腸管に定着した緑膿菌の腸管粘膜バリアを介した血液へのトランスロケーションは, 本菌による敗血症など重篤な感染症の発症経路として非常に重要と考えられている。

我々は最近, ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞) 層透過活性評価系およびトランスポゾン (Transposon: 以

下 Tn) 挿入変異株を用いて, 緑膿菌 PAO1 株の Caco-2 細胞層透過活性に関与する 21 の遺伝子を同定した⁴⁾。これらの遺伝子は大きく, べん毛関連遺伝子 (*flgE*, *flgK*), 線毛関連遺伝子 (*chpA*, *fimV*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilF*, *pilM*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilV*, *pilY1*), 熱ショックタンパク質遺伝子 (*dnaK*), 解糖経路関連遺伝子 (*fruK*), 生合成経路関連遺伝子 (*suhB*, *serA*, *aroA*, *purL*, *aceE*) の 5 つに分類することができた。さらに我々は, これまでに Caco-2 細胞層透過との関連性が報告されていない *serA* 遺伝子および *dnaK* 遺伝子に着目し, *serA* 遺伝子および *dnaK* 遺伝子の不活性化が, Caco-2 細胞層を介した緑膿菌の透過を有意に抑制し, さらにキイロショウジョウバエに対する病原性も減弱させることを明らかにした^{4, 5)}。また, *serA* 遺伝子がコードしている D-3-phosphoglycerate dehydrogenase

* 連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 奥田 潤

E-mail: okuda@chs.pref.kagawa.jp

<受付日 2021年9月29日> <受理日 2021年11月18日>

(PGDH) の酵素活性の Caco-2 細胞層透過活性への関与についても報告した⁶⁾。

線毛関連遺伝子が関わる IV 型線毛は、細菌にみられる糸状の表面複合体であり、付着、バイオフィーム形成および固体表面上を移動する twitching 運動性などに関与する長くて細いタンパク質繊維である⁷⁾。緑膿菌では、IV 型線毛の組立や調節に関わるタンパクとして、外膜において線毛繊維が押し出される孔の形成に関わる PilQ および PilF、線毛繊維の伸長と収縮のためにエネルギーを提供する 3 つの ATP アーゼ (PilB、PilT および PilU)、線毛繊維の主要構成タンパク質 PilA、PilA と相互作用する PilVWX、PilY1、PilE および FimU、内膜のプラットフォームタンパク質 PilC および PilMNOP などが知られている⁸⁾。線毛繊維は数百のサブユニットからなるらせん状のフィラメントであり、PilA はその主要なサブユニットである⁸⁾。

本研究では、我々の先行研究により Caco-2 細胞層透過との関連性が示唆された 12 の線毛関連遺伝子に着目し、これらの遺伝子の Caco-2 細胞層を介した透過活性との関連性および病原性への影響について解析を行った。

方 法

1. 使用菌株

菌株は緑膿菌 PAO1 (研究室保有株) および大腸菌 DH5 α (研究室保有株) を使用した。緑膿菌 PAO1 は上皮細胞層を透過する標準株として、大腸菌 DH5 α は上皮細胞層を透過しない対照として使用した^{4, 9)}。また、線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株として、*chpA* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*fimV* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilB* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilC* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilD* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilF* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilM* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilQ* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilR* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilS* 遺伝子 Tn 挿入変異株、*pilV* 遺伝子 Tn 挿入変異株および *pilY1* 遺伝子 Tn 挿入変異株の 12 株を使用した⁴⁾。

2. 増殖試験

緑膿菌 PAO1 および線毛関連遺伝子変異株 12 株の増殖試験を行った。96 穴プレートに Luria-Bertani (LB) ブロスに 175 μ L 分注し、各菌株の一晚培養菌液を 5 μ L 接種し、プレートミキサーで 30 秒混和した後、37°C で培養を開始した。培養開始後、0、1、3、6、18、および 24 時間時点の波長 610nm における光学濁度 (OD₆₁₀) 値を測定した。

3. Caco-2 細胞層透過試験

既報の方法に従って⁴⁾、トランズウェル (コーニング) 上に形成された Caco-2 細胞層単層を用いて MOI (multiplicity of infection) 100 で透過試験を実施した。緑膿菌 PAO1 および大腸菌 DH5 α をそれぞれ陽性対照

および陰性対照として使用した。

4. IV 型線毛タンパク質 PilA の検出

細胞表面 PilA タンパク質および細胞内 PilA タンパク質の検出は既報の方法に従って行った⁵⁾。細胞表面タンパク質サンプル (10 μ L) または細胞内タンパク質サンプル (15 μ g) を SDS-PAGE (ゲル濃度 18%) で分離後、ニトロセルロース膜 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) に転写し、抗 PilA ポリクローナル抗体 (ウサギ由来、株式会社スクラム) により PilA を検出した。

5. Caco-2 細胞付着実験

既報⁴⁾ に少し変更を加えた以下の方法を用いて行った。Caco-2 細胞を 4 ウェルチェンバースライド (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 内に播種し増殖させた。Caco-2 細胞上に細菌を MOI 200 で接種し、37°C、5%CO₂ の条件下で 1 時間静置した。非付着細菌を除去するために、Caco-2 細胞をサプリメント (1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 20 mM HEPES) を加えたハンクス平衡塩溶液 (Hank's Balanced Salt Solution; HBSS) 1mL で 4 回洗浄した。2.5% グルタルアルデヒドで 4°C で一晚固定し、次に 5% ホルムアルデヒド、5% 氷酢酸、70% メタノールで 1 時間固定した後、ギムザ染色で 10 分間染色した。1000 倍の倍率で光学顕微鏡を用いて観察し、異なる領域において細胞数および細菌数を数え、Caco-2 細胞あたりの細菌数を算出した。

6. キイロシヨウジョウバエ生存実験

病原性の評価には、緑膿菌の病原性評価に利用できることが過去に報告されているキイロシヨウジョウバエを用いた昆虫感染モデルを使用した^{4, 5)}。既報⁴⁾ に少し変更を加えた以下の方法を用いて行った。プラスチック容器に入った 20 ~ 64 匹のキイロシヨウジョウバエ (7 ~ 10 日齢) に、細菌の一晚培養菌液を含む 5% ショ糖懸濁液を滅菌した濾紙に染み込ませて与えた。ハエは 25°C で飼育し、25 時間後まで生存状態を観察した。

7. 統計分析

キイロシヨウジョウバエ生存実験の統計分析は、EZR 統計ソフトウェアバージョン 1.36 を使用してログランク検定を行った¹⁰⁾。その他の試験の統計分析は両側 *t* 検定により行った。

結 果

1. 増殖試験

全ての時点で、PAO1 と *pilF* 遺伝子変異株を除いた 11 の線毛関連遺伝子変異株の増殖の間に有意な差はみられなかった ($p > 0.05$)。一方、培養開始後 6、18、および 24 時間の PAO1 と *pilF* 遺伝子変異株との増殖には有意な差がみられた ($p < 0.05$) (図 1)。

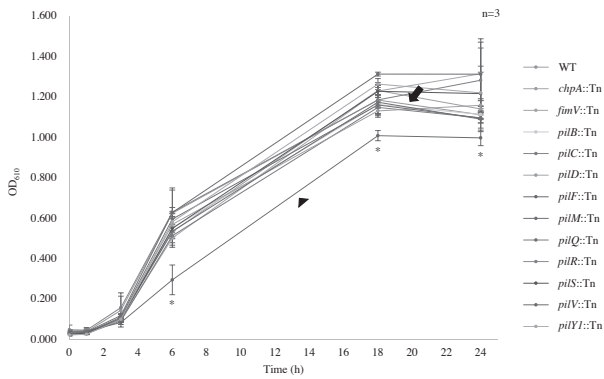


図1 緑膿菌 PAO1 と各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株の増殖曲線の比較

緑膿菌 PAO1 を WT, 各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株を *chpA* :: Tn, *fimV* :: Tn, *pilB* :: Tn, *pilC* :: Tn, *pilD* :: Tn, *pilF* :: Tn, *pilM* :: Tn, *pilQ* :: Tn, *pilR* :: Tn, *pilS* :: Tn, *pilV* :: Tn, *pilY1* :: Tn とする。培養開始後 0, 1, 3, 6, 18, 24 時間の OD₆₁₀ 値の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を表す。培養開始後 6, 18, 24 時間において、WT と *pilF* :: Tn の間に有意な差がみられた。矢印は WT, 矢頭は *pilF* :: Tn のグラフを示す。
n=3, * $p < 0.05$.

2. Caco-2 細胞層透過試験

12 の線毛関連遺伝子変異株はすべて、PAO1 と比較して感染後 6 時間における透過菌数の有意な減少を示した ($p < 0.05$) (図 2)。

3. IV 型線毛タンパク質 PilA の検出

細胞表面 PilA タンパク質は 12 の線毛関連遺伝子変異株すべてにおいて検出されなかった。一方、細胞内 PilA タンパク質は *pilR* 遺伝子変異株を除いた 11 の線毛関連遺伝子変異株では検出されたが、*pilR* 遺伝子変異株では検出されなかった (図 3)。

4. Caco-2 細胞付着実験

12 の線毛関連遺伝子変異株はすべて、Caco-2 細胞への付着が PAO1 と比較して有意に減少していた ($p < 0.05$) (図 4)。

5. キイロシヨウジョウバエ生存実験

12 の線毛関連遺伝子変異株のすべてにおいて、PAO1 と比較してキイロシヨウジョウバエに対する病原性の有意な減少がみられた ($p < 0.05$) (図 5)。

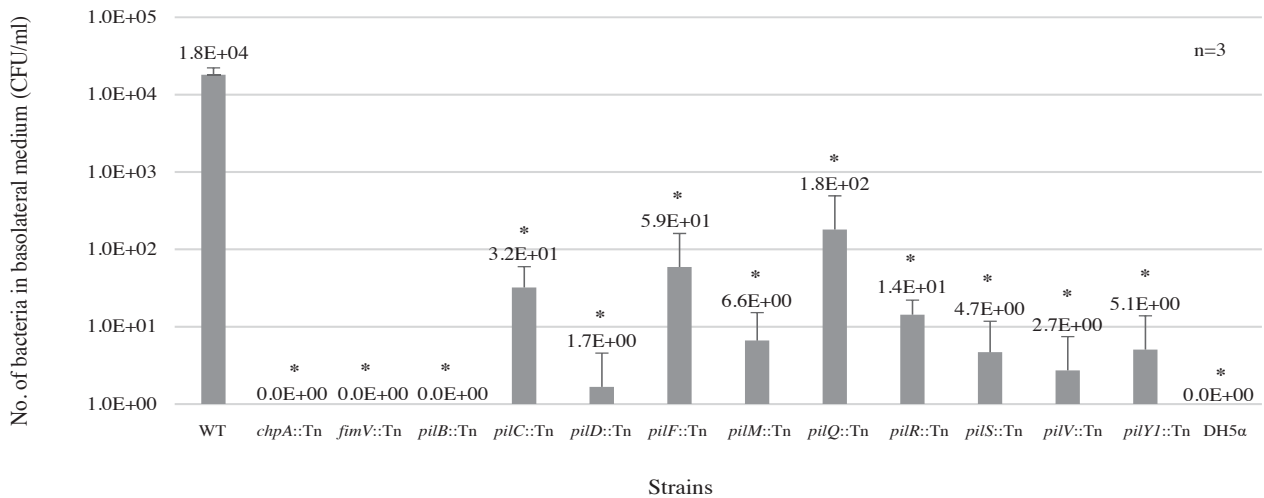


図2 Caco-2 細胞層単層透過菌数の比較

緑膿菌 PAO1 を WT, 各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株を *chpA* :: Tn, *fimV* :: Tn, *pilB* :: Tn, *pilC* :: Tn, *pilD* :: Tn, *pilF* :: Tn, *pilM* :: Tn, *pilQ* :: Tn, *pilR* :: Tn, *pilS* :: Tn, *pilV* :: Tn, *pilY1* :: Tn, 大腸菌 DH5a を DH5a とする。Caco-2 細胞層単層への菌液接種後 6 時間の透過菌数の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を表す。すべての線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株および DH5a において WT との間に有意な差がみられた。
n=3, * $p < 0.05$.

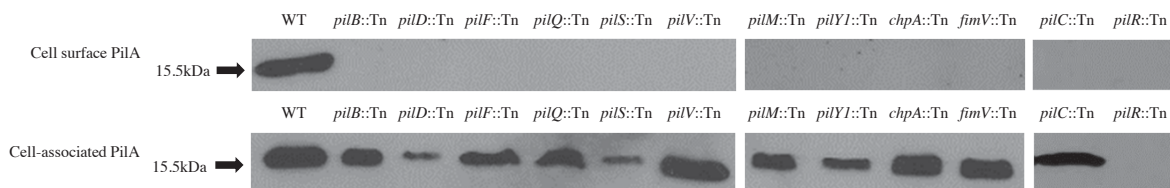


図3 ウェスタンブロットによるPilAの検出

緑膿菌 PAO1 および各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株における細胞表面および細胞内 PilA タンパク質を抗 PilA ポリクローナル抗体を使用して検出した。緑膿菌 PAO1 を WT, 各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株を *chpA* :: Tn, *fimV* :: Tn, *pilB* :: Tn, *pilC* :: Tn, *pilD* :: Tn, *pilF* :: Tn, *pilM* :: Tn, *pilQ* :: Tn, *pilR* :: Tn, *pilS* :: Tn, *pilV* :: Tn, *pilY1* :: Tn とする。Cell surface PilA は細胞表面 PilA, Cell-associated PilA は細胞内 PilA を表す。細胞表面 PilA は WT では検出されたが、線毛関連遺伝子変異株では検出されなかった。細胞内 PilA は *pilR* :: Tn のみ検出されなかった。

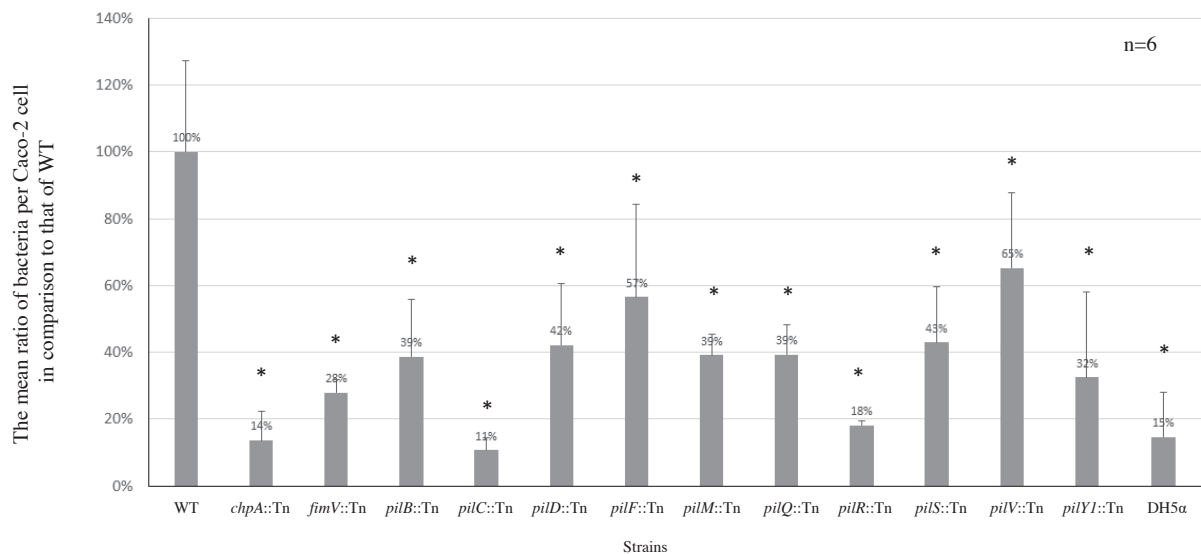


図4 Caco-2細胞への付着細菌数の比較

緑膿菌 PAO1 を WT, 各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株を *chpA* :: Tn, *fimV* :: Tn, *pilB* :: Tn, *pilC* :: Tn, *pilD* :: Tn, *pilF* :: Tn, *pilM* :: Tn, *pilQ* :: Tn, *pilR* :: Tn, *pilS* :: Tn, *pilY1* :: Tn, 大腸菌 DH5a を DH5a とする。WT の付着菌数を 100% としたときの各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株および DH5a の付着菌数の割合の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を表す。
すべての線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株および DH5a において WT との間に有意な差がみられた。
n=6, * $p < 0.05$.

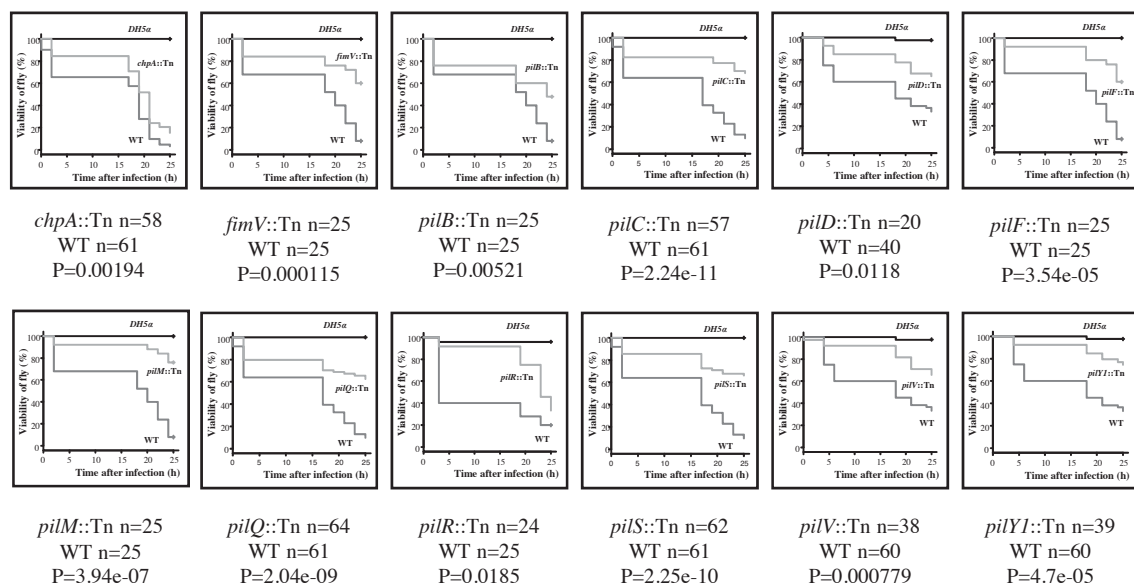


図5 キイロショウジョウバエ生存率

緑膿菌 PAO1 を WT, 各線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株を *chpA* :: Tn, *fimV* :: Tn, *pilB* :: Tn, *pilC* :: Tn, *pilD* :: Tn, *pilF* :: Tn, *pilM* :: Tn, *pilQ* :: Tn, *pilR* :: Tn, *pilS* :: Tn, *pilV* :: Tn, *pilY1* :: Tn, 大腸菌 DH5a を DH5a とする。プラスチック容器内のキイロショウジョウバエに各種菌株の一晚培養液を含む 5% ショ糖懸濁液を与え、経時的に観察した生存率を示す。すべての線毛関連遺伝子 Tn 挿入変異株において WT との間に有意な差がみられた。

考 察

腸管内の上皮細胞バリアを介した緑膿菌のトランスロケーションには、上皮細胞に到達するための運動性、上皮細胞への付着、上皮細胞を介した透過、透過後の血液中での生存と増殖など多くの細胞機能が必要である。

我々はこれまでに、緑膿菌による Caco-2 細胞層単層を介した細菌の透過と 2 つの遺伝子すなわち *serA* 遺伝子および *dnaK* 遺伝子との関係を報告し、緑膿菌の病原性とべん毛や線毛を介した上皮細胞への付着との間には重要な関係があると推測してきた^{4,5)}。実際、以前に報告した Caco-2 細胞層単層を介した緑膿菌 PAO1 の透過

に関連する 21 の遺伝子には、2つのべん毛関連遺伝子 (*flgE* および *flgK*) および 12 の線毛関連遺伝子 (*chpA*, *fimV*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilF*, *pilM*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilV*, および *pilYI*) が含まれていた⁴⁾。これは、Caco-2 細胞層単層を介した緑膿菌の透過に対するべん毛と線毛の重要性を示唆している。本研究では、線毛の重要性を確認するために、12 の線毛関連遺伝子変異株を用いて、Caco-2 細胞層透過活性、IV 型線毛タンパク質 PilA の検出、Caco-2 細胞への付着性、およびキイロシヨウバエへの病原性に対する線毛関連遺伝子の影響について解析を行った。

まず、線毛関連遺伝子の増殖への影響を調べた結果、*pilF* 遺伝子変異株において、PAO1 と比較して細菌の増殖に有意な差がみられた。緑膿菌 PilF は緑膿菌の IV 型線毛の生合成に不可欠であり、セクレチン PilQ の局在化および多量体形成に必要なピロチンとして報告されているタンパク質である¹¹⁾。しかしながら、どのような機序で PAO1 の増殖に影響を与えたかについては現時点では明らかではなく、機序を明らかにするためには *pilF* 遺伝子の null 変異株を用いた解析を行うなど今後の研究が必要である。

12 の線毛関連遺伝子変異株を用いた Caco-2 細胞層透過試験では、すべての変異株において PAO1 と比較して有意な透過活性の減少がみられた。このことは、これら 12 の線毛関連遺伝子が緑膿菌 PAO1 による Caco-2 細胞層の透過に重要な役割を果たしていることを示唆している。

IV 型線毛タンパク質 PilA の検出では、*pilR* 遺伝子変異株のみ細胞内 PilA タンパク質が検出されなかった。緑膿菌において、Boyd らは *pilA* 遺伝子プロモーターの活性化に PilS/PilR を介したシグナル伝達が関与していることを報告している¹²⁾。このことから、*pilR* 遺伝子変異株においては *pilA* 遺伝子の mRNA レベルが低下している可能性が考えられた。

これまでに、緑膿菌のヒト上皮細胞への付着については、ヒト頬膜上皮細胞 (buccal epithelial cells; BECs)、ヒト気管上皮細胞 (tracheal epithelial cells; TECs)、およびヒト肺腺癌由来上皮細胞 (A549 細胞) への付着には、IV 型線毛が必要であることが報告されている^{13, 14)}。また、Heiniger らは緑膿菌と A549 細胞との相互作用には線毛関連タンパク質 PilYI が必要であることを報告している¹⁵⁾。本研究で行った Caco-2 細胞への付着実験では、*pilYI* 遺伝子変異株を含む 12 の線毛関連遺伝子変異株すべてにおいて、PAO1 と比較して Caco-2 細胞への付着の有意な減少を示した。このことは、これら 12 の線毛関連遺伝子が緑膿菌 PAO1 による Caco-2 細胞への付着に必要であることを示唆しており、すなわち緑膿菌がヒト結腸上皮細胞に付着するためにも IV 型線毛が必要であることを示唆している。しかしながら、*pilA* 遺伝子変異株は Caco-2 細胞への付着の低下を示さなかったという報告もあり¹⁶⁾、IV 型線毛タンパク質 PilA と

Caco-2 細胞への付着との関係については、さらに検討が必要である。

キイロシヨウバエを用いた緑膿菌の病原性試験を行った結果、12 の線毛関連遺伝子変異株すべてにおいてキイロシヨウバエに対する病原性が PAO1 と比較して有意に低下していた。過去に D'Argenio らは緑膿菌 PAO1 について、線毛関連遺伝子がキイロシヨウバエに対する病原性に関与していることを報告している¹⁷⁾。D'Argenio らの背側胸部への針の穿刺による接種方法とは異なり、経口投与を用いた今回の我々の研究においても同様に、12 の線毛関連遺伝子が緑膿菌 PAO1 によるキイロシヨウバエに対する病原性に関与していることが示唆された。

以上の結果を要約すると、12 の線毛関連遺伝子 (*chpA*, *fimV*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilF*, *pilM*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilV* および *pilYI*) 変異株は、PilA タンパク質の細胞表面への発現を欠き、さらに Caco-2 細胞への付着、Caco-2 細胞層を介した透過およびキイロシヨウバエに対する病原性が、野生株 PAO1 と比較して減少していた。このことは、12 の線毛関連遺伝子の関与する IV 型線毛を介した機能が、Caco-2 細胞への付着、Caco-2 細胞層を介した透過、緑膿菌のキイロシヨウバエに対する病原性に不可欠であることを示唆している。

本研究により、緑膿菌 PAO1 について、Caco-2 細胞への細菌の付着、Caco-2 細胞への透過能力およびキイロシヨウバエへの病原性における 12 の線毛関連遺伝子の重要な役割が明らかとなった。しかしながら、IV 型線毛を介した機能には物理的に IV 型線毛を形成する成分だけでなく、環境の信号を感知しそれに応じて線毛の運動性を調節する多くの調節タンパク質も関わっており⁸⁾、本研究で明らかとなった Caco-2 細胞層透過活性の低下、細胞表面 PilA の欠失、Caco-2 細胞付着性の低下およびキイロシヨウバエに対する病原性の低下における 12 の線毛関連遺伝子それぞれの寄与の詳細なメカニズムについては、今後さらなる研究が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご協力いただきました香川県立保健医療大学大学院保健医療学研究科臨床検査学分野修了生の長田祥弥氏および山根知氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. Ann Surg 218(2): 111-119, 1993.
- 2) Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital

- mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125(2): 607–616, 2004.
- 3) Zaborina O, Kohler JE, Wang Y, Bethel C, et al. Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 14, 2006.
 - 4) Yasuda M, Nagata S, Yamane S, Kunikata C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* *serA* gene is required for bacterial translocation through Caco-2 cell monolayers. *PLoS One* 12(1): e0169367, 2017.
 - 5) Okuda J, Yamane S, Nagata S, Kunikata C, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* *dnaK* gene is involved in bacterial translocation across the intestinal epithelial cell barrier. *Microbiology* 163(8): 1208–1216, 2017.
 - 6) Okuda J, Nagata S, Yasuda M, Suezawa C. Validating the inhibitory effects of D- and L-serine on the enzyme activity of D-3-phosphoglycerate dehydrogenases that are purified from *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and human colon. *Gut Pathog* 11: 35, 2019.
 - 7) Burrows LL. Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* 57(4): 878–888, 2005.
 - 8) Leighton TL, Buensuceso RN, Howell PL, Burrows LL. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environ Microbiol* 17(11): 4148–4163, 2015.
 - 9) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Igimi S, et al. Adherence to and penetration of human intestinal Caco-2 epithelial cell monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 66(4): 1748–1751, 1998.
 - 10) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZ” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48(3): 452–458, 2013.
 - 11) Koo J, Tammam S, Ku SY, Sampaleanu LM, et al. PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. *J Bacteriol* 190(21): 6961–6969, 2008.
 - 12) Boyd JM, Koga T, Lory S. Identification and characterization of PilS, an essential regulator of pilin expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 243(5): 565–574, 1994.
 - 13) Doig P, Todd T, Sastry PA, Lee KK, et al. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 56(6): 1641–1646, 1988.
 - 14) Chi E, Mehl T, Nunn D, Lory S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect Immun* 59(3): 822–828, 1991.
 - 15) Heiniger RW, Winther-Larsen HC, Pickles RJ, Koomey M, et al. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell Microbiol* 12(8): 1158–1173, 2010.
 - 16) Hayashi N, Nishizawa H, Kitao S, Deguchi S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett* 589(8): 890–896, 2015.
 - 17) D’Argenio DA, Gallagher LA, Berg CA, Manoil C. *Drosophila* as a model host *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183(4): 1466–1471, 2001.

Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* Pili-associated Gene in Bacterial Translocation through Caco-2 Cell Monolayers and Virulence in *Drosophila melanogaster*

Chigusa Suezawa¹⁾, Masashi Yasuda¹⁾, Kaede Ino¹⁾,
Chinami Kunikata¹⁾, Jun Okuda¹⁾ *

¹⁾ Division of Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences,
Kagawa Prefectural University of Health Sciences

Abstract

We have previously identified 21 genes involved in the bacterial translocation of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain through Caco-2 cell monolayers. In this study, we focused on transposon insertion mutants of the pili-associated gene because the association of this gene with the penetration activity of *Pseudomonas* through Caco-2 cell monolayers is not clear. Using *P. aeruginosa* PAO1 and 12 pili-associated gene mutants, we investigated the adherence of *Pseudomonas* to Caco-2 cells, its permeability through the cell monolayers, detection of type IV pilus protein PilA, and bacterial pathogenicity to *Drosophila melanogaster*. Our results indicate that all of the *P. aeruginosa* pili-associated gene mutants showed significant repression of bacterial penetration through Caco-2 cell monolayers. In addition, the pili-associated gene mutants showed reduced adherence to the monolayers as well as low virulence in flies. The mutants also displayed a loss of the type IV pilus protein PilA on their cell surface. These results suggest that type IV pilus-mediated function is essential for primary bacterial adherence to Caco-2 cells, subsequent penetration of Caco-2 cell monolayers, and pathogenicity of *P. aeruginosa* in *Drosophila melanogaster*. Further, mutation of the pili-associated gene caused loss of the cell surface protein PilA, which might significantly affect bacterial penetration of the Caco-2 cell monolayers, consequently reducing the pathogenicity of *P. aeruginosa*.

Key Words : *Pseudomonas aeruginosa*, pili-associated gene, Caco-2, bacterial translocation, *Drosophila melanogaster*

*Correspondence to : Jun Okuda, Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail: okuda@chs.pref.kagawa.jp