

· 综 述 ·

# IV 型菌毛可视化方法及其在菌毛功能研究中的应用

罗艳<sup>1</sup>, 张静超<sup>2\*</sup>

1 天津大学化工学院 合成生物学前沿科学中心和系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

2 电子科技大学 四川省人民医院 医学遗传中心, 四川 成都 610054

罗艳, 张静超. IV 型菌毛可视化方法及其在菌毛功能研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4534-4549.

LUO Yan, ZHANG Jingchao. Visualization method of type IV pili and its application in the study of pili function[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4534-4549.

**摘 要:** IV 型菌毛(type IV pili, TFP)作为细菌表面的重要蛋白结构, 是细菌的感知器官及运动器官, 在细菌生理学、细胞黏附、宿主细胞入侵、DNA 摄取、蛋白质分泌、生物被膜形成、细胞运动和电子传递等方面发挥着多种作用。近年来, 随着研究方法的深入和技术设备的发展, 尤其是随着多种菌毛可视化工具的开发, 越来越多的研究揭示了它在生命活动中的各种功能, 大大加快了微生物单细胞领域的研究步伐。本文重点讨论了 TFP 可视化方法及其在菌毛功能研究中的应用, 为更好地研究和利用 TFP 功能提供更多的思路, 为其未来在生物学、医学以及生态学中的应用提供一定的理论基础。

**关键词:** IV 型菌毛; 可视化; 功能

## Visualization method of type IV pili and its application in the study of pili function

LUO Yan<sup>1</sup>, ZHANG Jingchao<sup>2\*</sup>

1 Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

2 Medical Genetics Center, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, Sichuan, China

**Abstract:** As an important protein structure on the surface of bacteria, type IV pili (TFP) is the sensing and moving organ of bacteria. It plays a variety of roles in bacterial physiology, cell

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0902102)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902102).

\*Corresponding author. E-mail: 2015207553@tju.edu.cn

Received: 2023-02-07; Accepted: 2023-04-13

adhesion, host cell invasion, DNA uptake, protein secretion, biofilm formation, cell movement and electron transmission. With the rapid development of research methods, technical equipment and pili visualization tools, increasing number of studies have revealed various functions of pili in cellular activities, which greatly facilitated the microbial single cell research. This review focuses on the pili visualization method and its application in the functional research of TFP, providing ideas for the research and application of TFP in biology, medicine and ecology.

**Keywords:** type IV pili; visualization; function

细菌的运动性和致病能力与细胞的表面附属物尤其是突出的纤维结构密切相关。突出纤维结构主要包括菌毛、淀粉样纤维和纳米线<sup>[1-3]</sup>。其中菌毛是细菌表面的线状结构聚合物,由共价或非共价相互作用的重重复菌毛亚基组成。菌毛的分类方法多样,例如根据凝血能力、血清学或结构等进行分类<sup>[4-7]</sup>,其中基于菌毛组装系统的生物化学和遗传学的分类方法是应用较多且最普遍的方法<sup>[8]</sup>。这种方法是基于菌毛组装机制,并根据编码菌毛生物发生所需基因序列的同源性对菌毛进行分类。

菌毛结构广泛存在于革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及古细菌中,对于革兰氏阴性菌,其菌毛可分为伴侣蛋白-推进蛋白途径类菌毛、V型菌毛、IV型菌毛、细菌淀粉样纤维和IV型分泌菌毛。其中,IV型菌毛(type IV pili, TFP)是最常见的形式之一,它可以通过胞质三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)驱动其反复伸展、黏附和收缩,灵活地完成不同生物功能。现有研究表明,TFP在细胞黏附、宿主细胞入侵、DNA摄取、蛋白质分泌、生物被膜形成、细胞运动和电子传递中都发挥了重要作用。此外,TFP还是坚固的分子机器,可通过一种跨越两层革兰氏阴性菌膜的复杂蛋白质机制,每秒完成约1 000个亚单位的伸展和收缩<sup>[9]</sup>,并以微小结构(6-9 nm)承受超过100 pN的力<sup>[10]</sup>。TFP丰

富的生物功能与优秀的力学特性吸引着广大学者不断探索,而活细胞中的TFP可视化技术则为研究TFP相关功能和机制提供了重要支持和关键性证据。

本课题组长期从事TFP在细菌运动行为方面的研究。本文根据课题组当前研究重点以及对TFP的已有研究,并结合文献报道介绍了TFP可视化方法及其在功能方面的应用。图1为TFP的可视化方法及主要生物学功能示意图,本文首先介绍了TFP从显微镜的直接观察发展到通过分子生物学方法包括基因改造和外援物辅助进行TFP动态化捕捉。TFP可视化技术的不断提升,为探究TFP功能及机制提供了有力的支持。其次在TFP可视化的基础上介绍了其主要的生物学功能,包括介导细菌运动、生物被膜形成、DNA摄取、电子传递以及作为毒力因子在致病菌中的作用。最后对TFP未来发展的方向提出了展望,期待为利用其生物学功能开发出更加全面多元的应用奠定基础 and 提供思路。

## 1 TFP 可视化方法

TFP最初是由电子显微镜直接观察,常见的电子显微镜,如扫描电子显微镜、透射电子显微镜和冷冻电子显微镜,通常需要固定细胞和干扰菌毛活性来表征菌毛(图2A)<sup>[15]</sup>。这种方法会错失菌毛活性以及部分结构的真实性。后

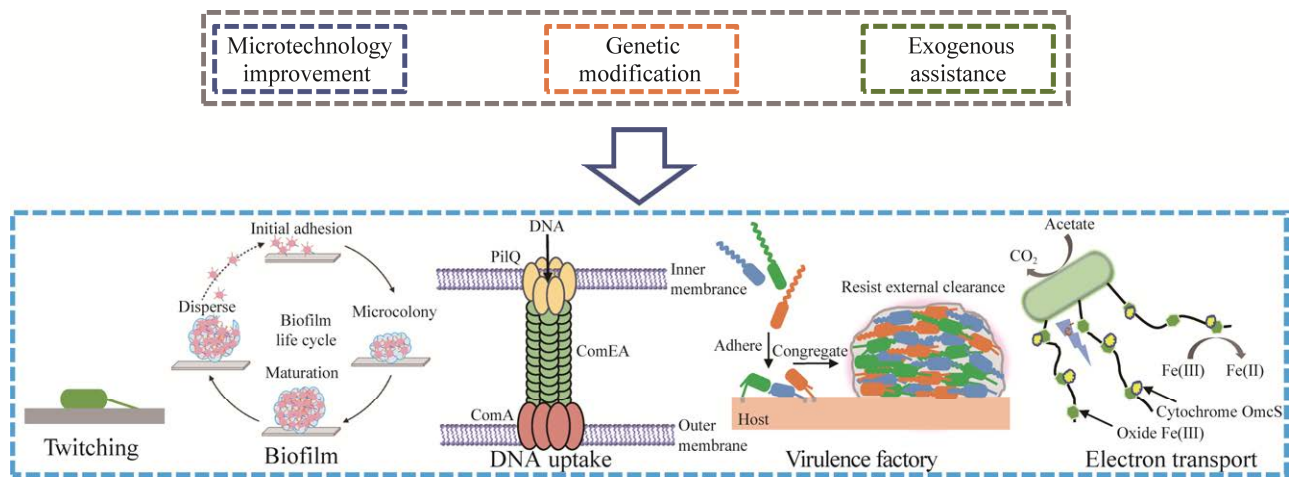


图 1 TFP 的可视化方法及主要生物学功能(图片改自文献[11-14])

Figure 1 Visualization methods and main biological functions of TFP (modified from references [11-14]).

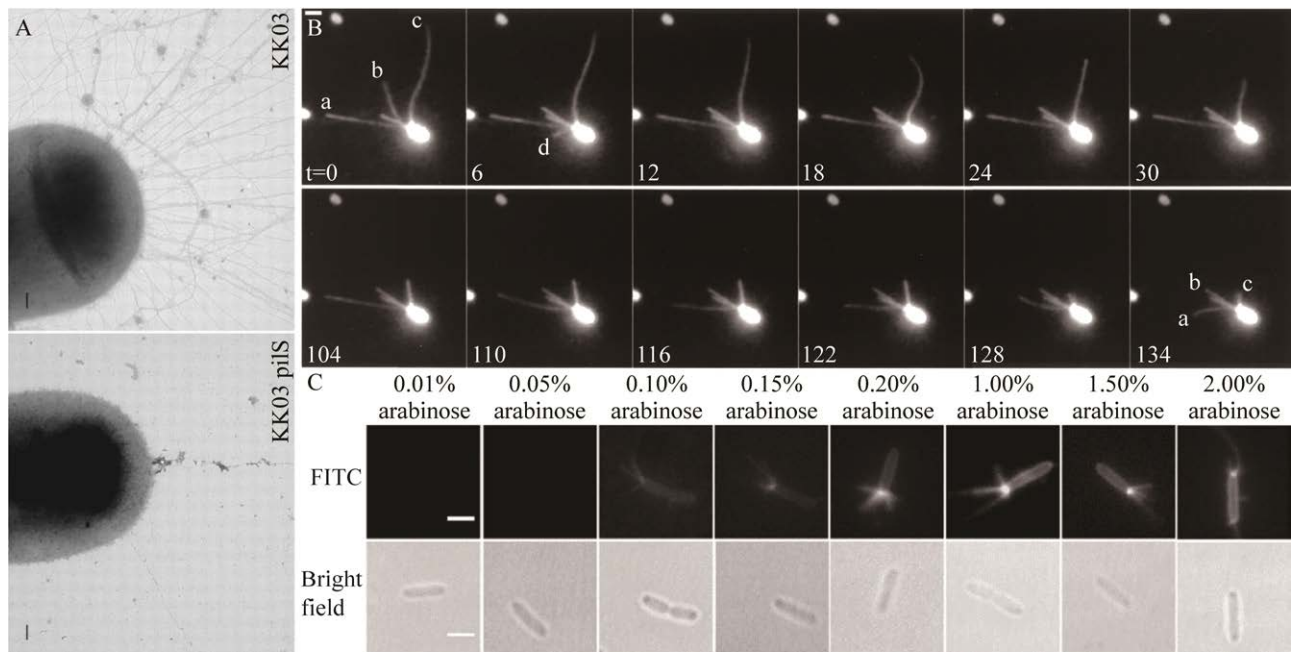


图 2 TFP 可视化方法 A: PilS 对菌毛的贡献, 金黄色葡萄球菌 KK03 和 KK03*pilS* 的负染色透射电镜观察<sup>[15]</sup>. B: 铜绿假单胞菌非鞭毛细胞 Cy3 标记 TFP 的观察<sup>[26]</sup>. C: 不同浓度阿拉伯糖诱导下铜绿假单胞菌 *P*<sub>BAD</sub>-*pilAS99C* 菌株染色菌毛的荧光图像<sup>[29]</sup>

Figure 2 TFP visualization methods. A: Contribution of PilS to pili, negative staining transmission electron microscopy of *Staphylococcus aureus* KK03 and KK03*pilS*<sup>[15]</sup>. B: Observation of Cy<sub>3</sub>-labeled TFP on nonflagella cells of *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[26]</sup>. C: Fluorescence image of stained TFP of *P. aeruginosa* *P*<sub>BAD</sub>-*pilAS99C* strain induced at different concentrations of arabinose<sup>[29]</sup>.

来低温电子显微镜的使用极大地缓解了细胞表面剪切的缺点, 并提供了菌毛分子机器复杂结构和高分辨率 3D 模型<sup>[16-18]</sup>。然而, 这种方法需要通过冷冻来固定细胞, 并要对大量结构图像进行平均以编译结构模型, 而无法提供有关菌毛的机械动力学信息。随着显微成像技术的提高, 几种光学显微镜技术也可以用来观察菌毛, 其中最简单的方法是使用免疫荧光显微镜技术, 该方法使用连接荧光的抗体标记 TFP, 但荧光抗体会与延长的菌毛结合, 导致菌毛聚集并阻碍细胞活动<sup>[19]</sup>。以上观察菌毛的技术都会对菌毛正常生理功能造成一定干扰, 为解决这一问题, 后来出现一种称为干涉散射显微镜(interference scattering microscope, iSCAT)的无标记光学技术<sup>[20-21]</sup>, 可以在无需标记的情况下以高空间和时间分辨率直接可视化活细胞的菌毛运动<sup>[21]</sup>。然而, 这种非遗传方法需要特定的光学仪器, 该方法只能观测到细菌在表面运动时 TFP 的动态, 不能观察 TFP 在液体环境的动态, 目前尚缺乏运用该方法在溶液中对于菌毛在表面的运动进行观测的报道。也有研究报道了使用荧光纳米珠可视化蓝藻(Cyanobacteria) TFP 的方法, 并展示了在趋光运动中菌毛的时空动态与细胞运动方向的相关性<sup>[22]</sup>。同时光学陷阱(optical trap)也被用于表征菌毛的运动特性和测量 TFP 与表面之间的吸引力<sup>[10,23-25]</sup>。

通过荧光染料染色是一种较好的菌毛可视化方法, 根据染色机理不同分为两种方法。一种是对菌毛附件进行染色, 例如使用氨基特异性花青素荧光染料(cyanine 3, Cy3)标记(图 2B)<sup>[22,26]</sup>。该方法荧光染料与菌毛的结合特异性低, 表面积远大于菌毛的细胞体也会与荧光染料结合并具有更强的荧光强度, 从而影响对菌毛的观察。另一种方法是 TFP 的氨基特异性荧光标记, 实现 TFP 伸长和收缩的直接可视化。有研究表明,

通过将甘露糖敏感的血凝素 IV 型菌毛(mannose sensitive hemagglutinin, MSHA)或霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) IV 型菌毛的主要菌毛蛋白的丝氨酸改为半胱氨酸, 用特异性较好的马来酰亚胺染料进行染色<sup>[27-28]</sup>。但是使用文献报道的方法会修改细菌基因组, 通过这种遗传操作在细菌基因组中获得的 PilA 无法还原为原始 PilA, 并且在研究 pilin 池的补充动态方面有一定限制。

笔者团队基于半胱氨酸替代方法, 以铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为例, 引入了一种简单的、可切换的方法, 在保持原有细菌基因组的情况下, 使用含有诱导启动子和半胱氨酸替代菌毛基因的质粒能够在需要时标记菌毛, 此方法是对 *P. aeruginosa* 来源的 *pilA* 基因进行定点突变, 用半胱氨酸替代丝氨酸并以重组质粒的形式导入宿主 *P. aeruginosa* 中, 由于重组质粒本身含有阿拉伯糖诱导型启动子 *araBAD* 序列, 因此只有阿拉伯糖存在时, 才能诱导目的基因的表达。由此突变 *pilA* 组装后的 TFP 可以成功地用硫醇反应性马来酰亚胺染料染色, 而从培养基中去除阿拉伯糖后, 具有突变 TFP 的细胞则可以转换回具有原始 TFP 的类型, 从而实现菌毛可视化(图 2C), 此外, 本团队还探究了菌毛牵引的 *P. aeruginosa* 在介质表面的蹭行运动行为, 以及生物被膜形成过程中菌毛的作用<sup>[29]</sup>。同样地, 基于这种便捷的菌毛标记方法, 本团队也实现了多种细菌的菌毛可视化, 并在此基础上针对菌毛介导的各种生物行为进行了深入探究, 例如通过 *V. cholerae* 的菌毛可视化, 本团队详细记录并分析了其黏附表面的过程及其在液体环境中的菌毛驱动机制<sup>[30]</sup>; 通过黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)的菌毛可视化, 探究其运动以及捕食行为等。

在多种菌毛可视化工具涌现的背景下, 着眼于微观单细胞层面的研究蓬勃发展, 而 TFP

这一亚细胞结构的功能和机理也变得更加清晰直观。下文将对 TFP 的功能进行综述。

## 2 TFP 的功能研究进展

TFP 是多功能细胞器, 通过可逆聚合和解聚而具有灵活的伸缩能力。随着菌毛可视化工具的开发和应用, 对于 TFP 的功能研究从宏观走向微观, 从表象转向细节。它们在细胞运动、生物被膜形成、DNA 摄取、电子转移和毒力因子中发挥的重要作用也逐渐被揭示。

### 2.1 运动

原核生物使用 TFP 在固体表面的爬行称为蹭行运动<sup>[31-32]</sup>。早期研究提出蹭行运动是由细菌表面的菌毛系统完成的: 菌毛伸展与表面结合, 然后收缩, 从而拉动细菌运动<sup>[33]</sup>。在多种细菌中都可以观察到 TFP 的蹭行运动, 如 *P. aeruginosa*、*M. xanthus*、*V. cholerae* 等。其中 *P. aeruginosa* 的运动行为是典型的蹭行运动, 它利用 TFP 作为线性致动器进行表面探索, 实现定向爬行。细菌附着到表面后, TFP 驱动两种表面运动机制: 当细菌平行于表面时, 沿着其身体轴线“爬行”, 方向持久性高; 当它处于站立状态, 身体轴线垂直于表面时, 可向任意方向“行走”, 方向持续性低<sup>[31]</sup>。并且不同的运动机制在特定场景中发挥优势, 直立行走对细菌即时搜索环境更有效, 而爬行运动对远距离趋化行为更有效<sup>[34]</sup>, 此外, TFP 与其他运动器官的博弈与配合决定细菌的运动模式, 细菌的站立状态更有利于细菌的表面脱离, 细菌首先通过菌毛的收缩由匍匐状态转变为站立状态, 然后通过鞭毛的旋转实现表面脱离。在 *V. cholerae* 中, 菌毛还能够运动中起到锚定的作用<sup>[30]</sup>, 然而对于 TFP 如何从鞭毛介导的游泳运动到靠近表面从而依靠 TFP 的牵引黏附于表面的具体机制尚不清楚。

得益于 TFP 可视化质粒工具的开发, 结合细菌显微追踪技术, 可以直观地观测到 TFP 在细胞运动中的牵引方式。在细胞运动中存在少数主导菌毛, 它们的伸缩可以牵动细胞的移动, 也存在着一些菌毛进行无效伸缩, 无法牵动细胞的移动, 而这些无效伸缩的 TFP 是否能够介导其他的生物功能, 则需要更详细的研究。

除了蹭行运动, TFP 还介导细菌完成一些其他形式的运动, 如群集运动。该运动发生在黏度低于标准蹭行运动的介质上, 例如 0.3% 的琼脂板上。群集运动的特征是群集扩展形成精细的树枝状图案<sup>[35-36]</sup>。在特定的营养条件下, TFP 是群集运动所必需的, 但在某些条件下, TFP 缺失的菌株不会失去群集运动, 反而表现出超群集表型<sup>[37]</sup>。TFP 在不同营养条件下对群集运动的影响不同, 可能是因为在不同条件下细菌的代谢路径和信号转导机制不同。TFP 对群集运动影响的确切机制尚不清楚, 但计算机模拟表明 TFP 是促进细胞间相互作用、限制单个细菌运动和减缓群集运动扩张的主要机制。尽管 TFP 减缓了群集运动的扩张, 但体外研究表明 TFP 有助于改变群集运动的方向, 以避免有毒化合物的伤害, 如抗生素羧苄青霉素<sup>[38]</sup>, TFP 除了作为运动器官发挥功能外, 可能在细菌群体感应中也具有一定作用。

*M. xanthus* 具有单独(A)和社会(S)运动系统, TFP 是 S 运动所必需的, 但不是 A 运动所必需。没有菌毛的细胞在聚集、S 运动和细胞凝集方面存在缺陷<sup>[39]</sup>。S 运动系统主要负责群体协调运动, 该运动中极性定位可能是由 TFP 延伸、黏附到原纤维部分以及随后的收缩所驱动的<sup>[40]</sup>。位于前导细胞极的 TFP 将自身锚定在相邻细胞的碳水化合物部分(或 A 运动细胞留下的黏液轨迹上), 并通过延伸、附着和缩回的循环来推进细胞。为了扭转方向, 细菌将一极的

TFP 解聚, 另一极重新组装<sup>[41]</sup>。

TFP 驱动的蹭行运动在细菌趋化、趋光性中具有控制运动方向的作用。在 *P. aeruginosa* 中, 随着趋化因子浓度的改变, TFP 介导的运动方向会发生逆转, 细胞会向二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)或琥珀酸浓度增加的方向运动。细胞运动中的方向反转如细胞停止运动随后向相反的方向运动与活跃的 TFP 有关(图 3A)<sup>[42]</sup>。细长聚球菌(*Synechococcus elongatus*) PCC 6803 的蹭行运动方向受 TFP 定位控制。有学者通过荧光纳米珠吸附的方式来标记 Syn6803 的 TFP, 进而研究细胞在趋光过程中的 TFP 行为, Syn6803 通过 TFP 定位到远离光源的一侧来实现负趋光运动, TFP 的伸展和收缩在照明的前侧被激活以远离光源(图 3B)<sup>[22]</sup>, 该趋光运动依赖于 IV 型粗菌毛<sup>[43]</sup>。单个细胞的运动性是有限的, 但当细胞分裂或聚集到一定的群体大小时, 可以观察到运动性和趋光性的增加。在运动的后期, 会有明显的趋光性, 呈现手指状突出<sup>[44]</sup>。

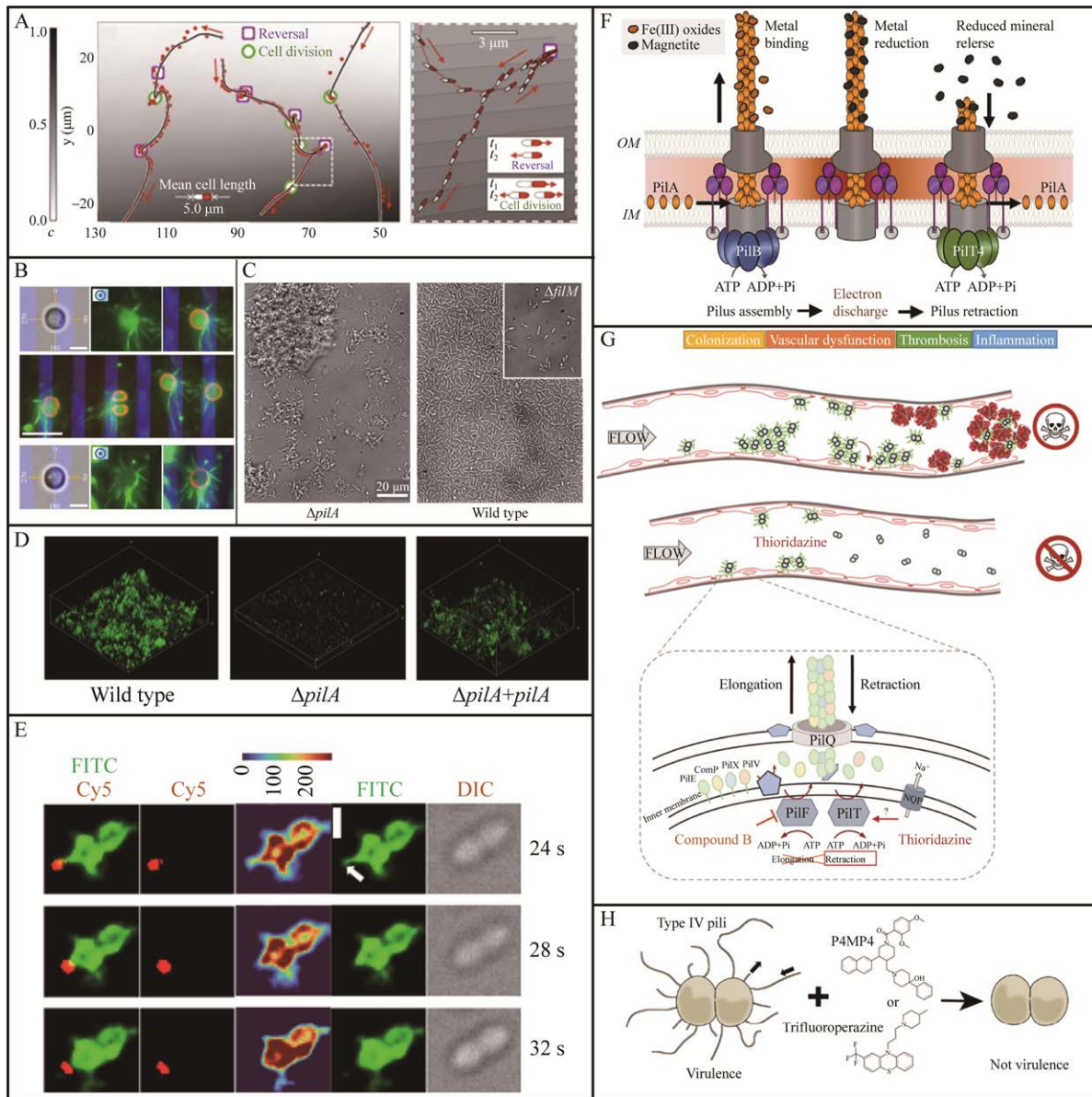
## 2.2 生物被膜

TFP 是一种重要的黏附素, 有助于细菌最初附着到各种固体表面, 在这些表面上附着、聚集, 逐步形成有组织的、多细胞甚至是多物种的群落, 这种群落又被称为生物被膜。TFP 在生物被膜的形成中起关键作用, 它参与了表面黏附和微菌落的形成。没有菌毛的细胞会形成异常的生物被膜, 这表明完整功能的 TFP 对生物被膜结构很重要(图 3C)<sup>[31]</sup>。而更有趣的是, 在实验过程中, 经常观察到在生物被膜微聚体会有很多断裂菌毛的存在, 它们虽然脱离了菌体, 但互相搭建, 辅助细菌及胞外聚合物形成了生物被膜基础骨架。通过菌毛标记, 可以追踪生物被膜微聚体中的菌毛细胞, 细胞在 TFP 的牵动下规避其他细胞, 不断爬行从而扩大繁殖领地, 逐渐形成成熟的生物被膜。也有研究者将半胱氨

酸残基引入主要菌毛 ComP, 再用硫醇反应性马来酰亚胺荧光染料进行标记以观察贝利不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)的 TFP, 发现 TFP 的亚细胞定位可以驱动复杂细菌群落的多细胞发育, 控制多细胞相互作用<sup>[45]</sup>。*P. aeruginosa* 能够形成蘑菇状多细胞结构, 帽子和柄由不同亚群组成。之前的研究表明 *P. aeruginosa* 生物被膜中蘑菇状结构帽子部分是通过细菌运动导致的, 并取决于 TFP; 据后续研究报道, TFP 连接的化学感觉系统中的 PilH 和 ChpA 突变体在帽子形成中也显示出轻微缺陷<sup>[46-48]</sup>, 因此 TFP 以及相关的调控对 *P. aeruginosa* 生物被膜均有一定影响。有研究表明 TFP 在生物被膜形成的早期具有重要作用, 在艰难梭菌(*Clostridium difficile*)中, TFP 缺乏菌株在其初始生物被膜中存在缺陷, 形成了厚度和生物量降低的生物被膜, 并且与野生菌株相比具有较低的聚集趋势<sup>[49]</sup>。此后, 在许多细菌和古菌中也发现了类似的现象, 包括 *V. cholerae*、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、新月弯曲杆菌(*Campylobacter crescent*)、气单胞假单胞菌(*Aeromonas pseudomonas*) 和嗜酸链球菌(*Streptococcus acidophilus*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) (图 3D)等<sup>[50-55]</sup>。

生物被膜的形成不仅需要菌毛的表达, 还需要菌毛收缩<sup>[39]</sup>。在 *P. aeruginosa* 中, 缺乏 PilT 的突变细胞形成变厚且未分化的生物被膜<sup>[56]</sup>。TFP 的正常回缩对生物被膜结构的影响具有重要意义, 有计算机模拟研究了淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)菌毛收缩蛋白缺失菌株( $\Delta pilT$ )和野生菌共培养后形成微菌落的状态, TFP 不能收缩的细菌分布在微菌落的边缘, 而能够进行收缩的细菌则分布在微菌落的中心<sup>[57]</sup>。TFP 的收缩状态会影响细菌的分布位置, 因此, 收缩蛋白不仅会影响 TFP 的动态活性, 而且 TFP-TFP 的相互作用还可能有助于细菌完成不同种类细菌的分选。





**图3 TFP 功能举例** A: 当细菌离开趋化剂溶液时, 细菌通过蹭行运动逆转运动方向进行趋化<sup>[42]</sup>. B: TFP 主要分布在光照区<sup>[22]</sup>. C:  $\Delta pilA$  生物被膜有簇(左边), WT 生物被膜均匀(右边)<sup>[31]</sup>. D: 不锈钢上不动杆菌 CLSM 成像生物被膜的三维重建<sup>[55]</sup>. E: 用 AF488 mal 标记的  $pilA$  和荧光标记的 DNA 共培养的延时成像<sup>[61]</sup>. F: 金属呼吸过程中的 TFP 动力学<sup>[73]</sup>. G: 菌毛在脑膜炎球菌发病机制中作用的示意图<sup>[86]</sup>. H: 新药导致几种病原菌 TFP 解体<sup>[91]</sup>

**Figure 3** Examples of TFP functions. A: Twitching bacteria chemotax by reversing their motility when traveling away from the chemoattractant source<sup>[42]</sup>. B: TFP are mainly distributed in the light area<sup>[22]</sup>. C:  $\Delta pilA$  biofilm has clusters (left), WT biofilm uniform (right)<sup>[31]</sup>. D: Three-dimensional reconstruction of *Acinetobacter* CLSM imaging biofilms on stainless steel<sup>[55]</sup>. E: Time-lapse imaging of co-culture with AF488 mal-labeled  $pilA$  and fluorescently labeled DNA<sup>[61]</sup>. F: TFP dynamics during metal respiration<sup>[73]</sup>. G: Schematic diagram of the role of TFP in the pathogenesis of *Meningococcus*<sup>[86]</sup>. H: The new drug led to the disintegration of several pathogenic bacteria TFP<sup>[91]</sup>.

TFP 的存在以及动态收缩都会影响生物被膜的结构, TFP 介导的蹭行运动也对于生物被膜具有一定影响, 丧失蹭行运动和过度的蹭行运动都会破坏生物被膜的形成<sup>[58]</sup>, 菌毛的完整生理功能对于生物被膜的形成具有重要作用, 可能包括以下原因: (1) 菌毛的正常伸缩以及相互作用有助于细菌选择适合的空间位置; (2) 菌毛伸展感应到外界变化收缩, 从而产生的信号转导对于细菌形成生物被膜具有指示作用。由于细菌显微追踪技术很难追踪生物被膜中的单个细菌以及 TFP 的状态, 因此 TFP 在生物被膜形成中的具体作用阶段或机制仍然未知, 未来可通过可视化技术来捕捉 TFP 在生物被膜形成中的动态过程。

### 2.3 DNA 摄取

自然转化是细菌从环境中吸收 DNA 的水平基因转移形式之一。TFP 除了拉动细菌在表面进行运动, 还能够辅助细菌摄取细胞外 DNA 完成自然转化, 菌毛介导的 DNA 摄取对于细菌产生耐药性具有重要作用, 且可能对感染期间体内和非生物表面的生物被膜形成很重要。有研究表明 DNA 摄取是 TFP 的保守功能, TFP 有助于细菌吸收细胞外 DNA 以供自己使用<sup>[12,59]</sup>, 这种现象发生在许多细菌中, 包括 *N. gonorrhoeae*、脑膜炎球菌(*Neisseria meningitidis*)、*V. cholerae* 等。

TFP 在不同细菌中 DNA 摄取的机制也有差异。肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是第一个被报道自然转化现象的革兰氏阳性菌, 研究者提出 2 种 DNA 摄取模型: 回缩模型和墙孔模型, 收缩模型中, 转化的菌毛将直接捕获 DNA, 在收缩的 ATP 酶的帮助下, DNA 被拉过细胞壁, 在细胞质膜中被 ComEA 捕获<sup>[60]</sup>。菌毛可视化技术使回缩模型更具有说服力, 将半胱氨酸密码子基因引入 ComGC 后用 AF488-mal 标记肺炎链球

菌菌毛, 发现它是高度动态的结构<sup>[61]</sup>。TFP 与细胞外 DNA 结合, 并通过收缩 ATP 酶的作用将 DNA 拉入周质空间, 然后 DNA 进一步转移到胞质溶胶中, 在那里可以发生同源重组, 由此说明菌毛的收缩对于自然转化至关重要<sup>[61]</sup>。革兰氏阳性菌其他物种的菌毛也可能具有可伸缩性, 且在 DNA 摄取中发挥积极作用(图 3E)<sup>[61]</sup>。在革兰氏阳性菌中, DNA 摄取机制与 IV 型菌毛和 II 型分泌系统有基本相似之处。革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌在构成转化机制所需的蛋白质方面具有基本的相似性, 在大多数细菌中, 所需蛋白质与 II 型分泌(T2S)系统和 IV 型菌毛(TFP)系统同源, 这些系统的关键成分主要是和次要的蛋白、前肽酶和 ATP 酶<sup>[62-64]</sup>。虽然这 3 个系统在功能上有很大的不同, 但它们都是由主要的菌毛蛋白组成的纤维结构。

TFP 在 DNA 摄取过程中的具体作用机制不断被发现。在革兰氏阴性菌中, *N. meningitidis* 膜分离的菌毛复合物能够与 DNA 显著结合, PilQ 的 N-末端区域能够与 DNA 相互作用, 并且 ssDNA 比 dsDNA 与 PilQ 结合具有更高的亲和力, TFP 在伸缩过程中, PilQ 蛋白打开通道, 外源 DNA 可进入通道与相应受体结合并被转运进细胞周间质<sup>[65-66]</sup>。天然活性的 *V. cholerae* 对 DNA 的摄取至少经历 2 个步骤: 进入的 DNA 通过外膜依赖于菌毛的易位, 以及 DNA 通过周质进入细胞质的不依赖于菌毛的穿梭。Ellison 等利用 TFP 可视化明确了 TFP 在自然转化过程中介导 DNA 摄取的机制, TFP 通过其尖端与细胞外双链 DNA 结合, 菌毛收缩将尖端结合的 DNA 带到细胞表面, 菌毛收缩与 DNA 内化时空耦合<sup>[9,67]</sup>。随后的研究中发现 *V. cholerae* 的 DNA 摄取菌毛与几丁质表面结合, 是几丁质定殖所必需的, 并通过序列特异性的自我相互作用实现亲属识别<sup>[68]</sup>。



TFP 在自然转化中发挥的作用已在很多菌株中有详细研究,但不同菌株的摄取机制不同,尚有许多菌株自然转化机制不明。自然转化导致细菌产生耐药,甚至多重耐药,并且多重耐药菌株可能具有更强的自然转化能力,因此在多种耐药菌中关于 TFP 在 DNA 摄取中的功能是未来研究的一个重点。

## 2.4 电子传递

TFP 还在特定时期起着导电的作用,它能够在细胞和细胞外电子受体间传递电子,这对土壤和沉积物中有机物的降解和养分循环至关重要。目前已报道的 TFP 导电的细菌包括硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)和氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*),然而这 2 种菌 TFP 导电的电子受体和供体不同。有研究报道 *T. ferrooxidans* TFP 可能作为生物纳米线将电子从氧化亚铁表面转移到细胞表面<sup>[69]</sup>。在固体介质上,*T. ferrooxidans* 需要 TFP 来氧化 Fe(II),TFP 是细胞表面与 Fe(II)氧化物之间的电子连接,负责将 Fe(II)氧化物表面的电子转移到细胞表面<sup>[69]</sup>,然而 *T. ferrooxidans* 中哪些 pilin 蛋白参与了 Fe(II)氧化物向细胞的电子转移,以及进行电子转移过程中是否有其他物质的参与尚不明确。

与 *T. ferrooxidans* 相比,*G. sulfurreducens* 以其 TFP 的“金属样”导电性而闻名<sup>[70]</sup>,早期有学者使用导电探针原子力显微镜观察发现 *G. sulfurreducens* 菌毛具有很高的导电性,它能够将电子从细胞表面转移到氧化物表面,菌毛缺陷突变体不能还原铁(III)氧化物并且芳香族氨基酸在菌毛导电中起关键作用<sup>[71-72]</sup>。有研究者提出电子传递中 PilT 发挥重要作用<sup>[73]</sup>。TFP 回缩释放了还原的矿物质,并回收了膜中的菌毛蛋白,为新一轮的菌毛蛋白聚合和电子释放做好了准备,菌毛伸出和缩回的拮抗循环允许

细胞继续“呼吸”(图 3F)<sup>[73]</sup>。除了作为电子转移到 Fe(III)氧化物的通道外,菌毛还可能参与其他电子转移反应。例如,单个地杆菌细胞的菌毛通常缠绕在一起,增加了细胞间电子通过菌毛转移的可能性<sup>[74-75]</sup>。然而近期有几项研究报道 *G. sulfurreducens* 中真正发挥导电作用的是细胞色素而不是 TFP<sup>[76-78]</sup>,打破了人们的固有认知,但不论是 TFP 还是其负载的色素蛋白具有导电功效,未来可以通过基因编辑改变菌毛结构和组成,进而产生功能多样的生物纳米线。生物纳米线具有许多吸引人的材料特性,很容易大规模生产且不含有毒成分,可回收<sup>[79]</sup>。此外,生物纳米线能够对其他环境参数作出反应,将来可应用于纳米线传感装置中<sup>[72]</sup>。生物纳米线具有在细胞之间或细胞与传统电子设备之间建立电子连接的潜力,为生物电子应用提供了广阔的可能性。

## 2.5 致病因子

TFP 是许多致病菌的毒力因子,促进其黏附宿主细胞、形成生物被膜并激活炎症通路。多项研究中发现 TFP 是细菌致病的重要因素。在土拉热弗朗西斯菌(*Francis tularensis*)皮下感染中,无菌毛突变体致死感染所需的剂量是野生型菌株的  $10^5$  倍<sup>[80-82]</sup>。在 *P. aeruginosa* 中,TFP 通过结合宿主来源的 N-葡聚糖介导与肺上皮细胞的黏附从而引起感染,但相关的糖蛋白尚不清楚<sup>[83]</sup>。TFP 介导的蹭行运动参与 *P. aeruginosa* 的发病机制,在体外使用多层角膜上皮细胞证实,在上皮细胞易位过程中,*pilT* 或 *pilU* 突变体的蹭行运动受损,表现出类似菌毛缺失菌株的表型,因此与细胞的相互作用减弱,细胞逃逸感染<sup>[84-85]</sup>。

*N. meningitidis* 可有效黏附在宿主上,该能力与多种细胞成分有关,包括外膜蛋白,如 TFP、Opa 和 Opc 等,其中 TFP 的作用已得到

了充分研究。*N. meningitidis* 依靠 TFP 黏附后, 在宿主内皮细胞表面快速复制, 形成大而封闭的微菌落, 进而引起血管内凝固和过度炎症, 迅速导致坏死(图 3G)<sup>[86]</sup>。也有研究表明菌毛回缩在脑膜炎球菌致病和感染中具有重要作用, 菌毛回缩缺陷型脑膜炎球菌( $\Delta pilT$ )能有效地在人体移植微血管上繁殖, 但这种突变菌由于减弱了与宿主的黏附, 进而使细菌从定殖的微血管中释放出来, 因此不会引发持续的菌血症导致小鼠死亡, 毒性较低<sup>[87]</sup>。在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中, 有菌毛菌株在全身感染期间诱发更高的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)反应<sup>[88]</sup>。因此 TFP 不仅有助于黏附和毒力, 而且能够刺激宿主的炎症反应。

TFP 协助细菌感染的过程包括菌毛收缩并与宿主细胞紧密接触, 从而促进细菌毒素通过 III 型分泌系统转移; 蹭行运动使细菌在感染组织中传播; TFP 转导传递宿主细胞黏附的信号, 然后触发导致细菌感染的基因表达。最近的几项研究报道了几种化合物能够抑制 TFP 活性, 一种是三氟拉嗪和相关的吩噻嗪, 它们通过改变钠梯度快速诱导 TFP 的分解(图 3H), 另一种是能够抑制 TFP 组装所需的 PilF 活性分子供给(化合物 B)<sup>[89-91]</sup>。基于 PilF 的模型结构, 有学者发现 2 种化合物(COCONUT IDs CNP0030078 和 CNP0051517)具有抑制 ATP 酶潜力, 以上化合物不仅能够指导今后开发抗 TFP 药物, 也可能具有对抗神经系统相关疾病的生物活性<sup>[92]</sup>。除化学药物外, 也有研究报道天然产物也能够抑制 TFP 功能, 有研究通过高通量筛选鉴定出槲皮素是 *M. xanthus* PilB 的抑制剂, 能够降低 TFP 依赖运动性和 TFP 组装<sup>[93]</sup>。也有研究表明天然产物侧柏叶颗粒剂能够抑制产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) TFP 相关基因的转录, 阻止菌毛蛋白的合成, 进而抑制 TFP 介导的功

能<sup>[94]</sup>。许多细菌病原菌使用其 TFP 促进和维持对人类宿主的感染, 因此研发抑制 TFP 组装或功能的药物在治疗和预防感染方面具有广阔的应用前景。

### 3 总结与展望

在日益进步的观测技术加持下, TFP 这一纳米级的亚细胞结构的神秘面纱逐渐被揭开, 人们开始了解该细微结构在微生物运动、聚集、导电、捕获外源 DNA 和侵染宿主等方面发挥的至关重要的作用。但是, 关于 TFP 还有更多已知方面需要去挖掘和探索。例如, (1) 引入自动化图像识别与处理技术提高数据采集效率, 总结 TFP 在执行具体行为(如 DNA 摄取)时的状态变化, 在纳米尺度与毫秒量级展示 TFP 分子机器的工作方式;(2) 在不断开发的可视化方法基础上测量其长度、数量和力等物理量, 进而通过计算机构建其不同状态中的运动模型, 探究 TFP 在不同条件(如 pH、温度、溶液浓度等)的运动模式, 为合成和开发仿生运动体、微型机器人等提供理论模型;(3) TFP 的不断伸展和收缩使细菌在表面上的运动已经被详细地描述, TFP 介导的细菌在表面的蹭行运动已有较多研究, 但对于 TFP 在液体环境中的作用及其动力学研究较少, 未来有望与更有效的 TFP 可视化工具相结合, 进而了解 TFP 在液体环境中的对细菌游泳运动的贡献;(4) 将微流控技术与显微追踪技术相结合, 在短时间、有限空间且不受其他因素干扰的情况下更加详细观察 TFP 在趋化、趋光以及细胞相互作用中发挥的具体作用;(5) TFP 的导电性实现了微生物与其胞外环境之间的长距离电子交换, TFP 的导电性具有易产生、可降解和可改性的优点, 未来可作为电子传感元件和可再生电子材料;(6) TFP 的毒力在于黏附、蹭行运动以及生物被膜, 目前已经

开发出几种药物可以阻断 TFP 的功能, 在未来的致病菌的防治研究中, 可以开发更多针对 TFP 的药物以及结合包括 TFP 在内的多种蛋白质疫苗, 与抗生素的联合将有助于解决细菌耐药性问题; (7) TFP 的研究大多聚焦于单种菌株, 对于不同菌株相互作用中 TFP 会发生哪些行为变化以及作用机制研究较少。目前有研究报告 *P. aeruginosa* 感应到 *S. aureus* 分泌物后从集体运动转变为单细胞运动, 同时速度和方向性都有所增加, 并发现这种探索性运动是由 TFP 所驱动<sup>[95]</sup>, 但具体机制尚不清楚。研究不同菌属之间以及病原菌与宿主之间的相互作用将有助于理解致病菌的侵染方式以及为细菌耐药性的治疗提供策略; (8) 目前关于 TFP 的调控研究多基于测序、代谢组学等宏观生物手段, 或用细胞运动等侧面表征 TFP, 缺乏基于实时直观可视化的 TFP 调控研究, 探究 TFP 的调控将有助于更深入地了解其生理活动。

综上所述, TFP 的研究在多个领域取得了长足发展, 人们对于 TFP 的形态结构、生物功能等已有一定的了解, 但都处在早期基础研究阶段, 还未得到实际的应用, 相信在未来的研究中, 随着科技的发展与进步, TFP 的更多功能和机制将被揭示, TFP 有望在生物学、医学以及生态学等领域具有广泛的应用。

## REFERENCES

- [1] WAKSMAN G, HULTGREN SJ. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(11): 765-774.
- [2] CHAPMAN MR, ROBINSON LS, PINKNER JS, ROTH R, HEUSER J, HAMMAR M, NORMARK S, HULTGREN SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 851-855.
- [3] GORBY YA, YANINA S, MCLEAN JS, ROSSO KM, MOYLES D, DOHNALKOVA A, BEVERIDGE TJ, CHANG IS, KIM BH, KIM KS, CULLEY DE, REED SB, ROMINE MF, SAFFARINI DA, HILL EA, SHI L, ELIAS DA, KENNEDY DW, PINCHUK G, WATANABE K, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(30): 11358-11363.
- [4] ØRSKOV I, ØRSKOV F. Serologic classification of fimbriae[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1990, 151: 71-90.
- [5] PIATEK R, ZALEWSKA B, BURY K, KUR J. The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis: from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, 52(3): 639-646.
- [6] ZAVIALOV A, ZAV'YALOVA G, KORPELA T, ZAV'YALOV V. FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4): 478-514.
- [7] ZAV'YALOV V, ZAVIALOV A, ZAV'YALOVA G, KORPELA T. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(3): 317-378.
- [8] WERNEBURG GT, THANASSI DG. Pili assembled by the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*[J]. *EcoSal Plus*, 2018, 8(1): 10.1128.
- [9] ELLISONCK, DALIA TN, VIDAL CEBALLOS A, WANG JCY, BIAIS N, BRUN YV, DALIA AB. Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(7): 773-780.
- [10] MAIER B, POTTER L, SO M, SEIFERT HS, SHEETZ MP. Single pilus motor forces exceed 100 pN[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 16012-16017.
- [11] SCHILCHER K, HORSWILL AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2020, 84(3): 36.
- [12] AVERHOFF B, FRIEDRICH A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(6): 385-393.

- [13] LOVLEY DR. Electrically conductive pili: biological function and potential applications in electronics[J]. *Current Opinion Electrochemistry*, 2017, 4(1): 190-198.
- [14] CHARLES-ORSZAG A, TSAI FC, BONAZZI D, MANRIQUEZ V, SACHSE M, MALLET A, SALLES A, MELICAN K, STANEVA R, BERTIN A, MILLIEN C, GOUSSARD S, LAFAYE P, SHORTE S, PIEL M, KRIJNSE-LOCKER J, BROCHARD-WYART F, BASSEREAU P, DUMENIL G. Adhesion to nanofibers drives cell membrane remodeling through one-dimensional wetting[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4450.
- [15] KEHL-FIE TE, PORSCHE EA, MILLER SE, StGEME JW III. Expression of *Kingella kingae* type IV pili is regulated by  $\sigma^{54}$ , PilS, and PilR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(15): 4976-4986.
- [16] CRAIG L, VOLKMANN N, ARVAIAS, PIQUE ME, YEAGER M, EGELMAN EH, TAINER JA. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(5): 651-662.
- [17] CHANG YW, RETTBERG LA, TREUNER-LANGE A, IWASA J, SØGAARD-ANDERSEN L, JENSEN GJ. Architecture of the type IVA pilus machine[J]. *Science*, 2016, 353(6296): 229.
- [18] WANGFB, COUREUIL M, OSINSKI T, ORLOVA A, ALTINDAL T, GESBERT G, NASSIF X, EGELMAN EH, CRAIG L. Cryoelectron microscopy reconstructions of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili at sub-nanometer resolution[J]. *Structure*, 2017, 25(9): 1423-1435.e4.
- [19] MAHMOUDKK, KOVAL SF. Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(4): 1040-1051.
- [20] ORTEGA ARROYO J, ANDRECKA J, SPILLANE KM, BILLINGTON N, TAKAGI Y, SELLERS JR, KUKURA P. Label-free, all-optical detection, imaging, and tracking of a single protein[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(4): 2065-2070.
- [21] TALÀ L, FINEBERG A, KUKURA P, PERSAT A. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(5): 774-780.
- [22] NAKANE D, NISHIZAKA T. Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(25): 6593-6598.
- [23] RIBBE J, BAKERAE, EULER S, O'TOOLE GA, MAIER B. Role of cyclic di-GMP and exopolysaccharide in type IV pilus dynamics[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(8): e00859-16.
- [24] MARATHE R, MEEL C, SCHMIDT NC, DEWENTER L, KURRE R, GREUNE L, ALEXANDER SCHMIDT M, MÜLLER MJI, LIPOWSKY R, MAIER B, KLUMPP S. Bacterial twitching motility is coordinated by a two-dimensional tug-of-war with directional memory[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3759.
- [25] CLAUSEN M, JAKOVljeVIC V, SØGAARD-ANDERSEN L, MAIER B. High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(14): 4633-4638.
- [26] ERKERJM, BERG HC. Direct observation of extension and retraction of type IV pili[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(12): 6901-6904.
- [27] ELLISON CK, KAN JB, DILLARD RS, KYSELA DT, DUCRET A, BERNE C, HAMPTON CM, KE ZL, WRIGHT ER, BIAIS N, DALIA AB, BRUN YV. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing[J]. *Science*, 2017, 358(6362): 535-538.
- [28] ELLISON CK, DALIA TN, DALIA AB, BRUN YV. Real-time microscopy and physical perturbation of bacterial pili using maleimide-conjugated molecules[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(6): 1803-1819.
- [29] ZHANG JC, LI SB, SUN T, ZONG YW, ZHANG WW, ZHAO K. A simple, switchable pili-labelling method by plasmid-based replacement of pilin[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(5): 2692-2703.
- [30] ZHANG WC, LUO M, FENG CY, LIU HQ, ZHANG H, BENNETT RR, UTADA AS, LIU Z, ZHAO K. Crash landing of *Vibrio cholerae* by MSHA pili-assisted braking and anchoring in a viscoelastic environment[J]. *eLife*, 2021, 10: 60655.
- [31] GIBIANSKYML, CONRAD JC, JIN F, GORDON VD, MOTTO DA, MATHEWSON MA, STOPKA WG, ZELASKO DC, SHROUT JD, WONG GCL. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 197.
- [32] JIN F, CONRAD JC, GIBIANSKY ML, WONG GC. Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(31): 12617-12622.

- [33] BRADLEY DE. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1980, 26(2): 146-154.
- [34] CONRAD JC, GIBIANSKY ML, JIN F, GORDON VD, MOTTO DA, MATHEWSON MA, STOPKA WG, ZELASKO DC, SHROUT JD, WONG GC. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*[J]. Biophysical Journal, 2011, 100(7): 1608-1616.
- [35] OVERHAGE J, BAINS M, BRAZAS MD, HANCOCK REW. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2671-2679.
- [36] YEUNG ATY, TORFS ECW, JAMSHIDI F, BAINS M, WIEGAND I, HANCOCK REW, OVERHAGE J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(18): 5592-5602.
- [37] SHROUT JD, CHOPP DL, JUST CL, HENTZER M, GIVSKOV M, PARSEK MR. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(5): 1264-1277.
- [38] ANYANME, AMIRI A, HARVEY CW, TIERRA G, MORALES-SOTO N, DRISCOLL CM, ALBER MS, SHROUT JD. Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(50): 18013-18018.
- [39] ROBERTS MA, PAPACHRISTODOULOU A, ARMITAGE JP. Adaptation and control circuits in bacterial chemotaxis[J]. Biochemical Society Transactions, 2010, 38(5): 1265-1269.
- [40] LI Y, SUN H, MA X, LU A, LUX R, ZUSMAN D, SHI W. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(9): 5443-5448.
- [41] MUÑOZ-DORADO J, MARCOS-TORRES FJ, GARCÍA-BRAVO E, MORALEDA-MUÑOZ A, PÉREZ J. *Myxobacteria*: moving, killing, feeding, and surviving together[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 781.
- [42] OLIVEIRA NM, FOSTER KR, DURHAM WM. Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(23): 6532-6537.
- [43] YOSHIHARA S, GENG XX, IKEUCHI M. *pilG* gene cluster and split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(5): 513-521.
- [44] Burriesci M, Bhaya D. Tracking phototactic responses and modeling motility of *Synechocystis* sp. strain PCC6803[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008, 91(2/3): 77-86.
- [45] ELLISON CK, FEI C, DALIA TN, WINGREEN NS, DALIA AB, SHAEVITZ JW, GITAI Z. Subcellular localization of type IV pili regulates bacterial multicellular development[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 6334.
- [46] KLAUSEN M, AAES-JØRGENSEN A, MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(1): 61-68.
- [47] KLAUSEN M, HEYDORN A, RAGAS P, LAMBERTSEN L, AAES-JØRGENSEN A, MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1511-1524.
- [48] BARKEN KB, PAMP SJ, YANG L, GJERMENSEN M, BERTRAND JJ, KLAUSEN M, GIVSKOV M, WHITCHURCH CB, ENGEL JN, TOLKER-NIELSEN T. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(9): 2331-2343.
- [49] MALDARELLI GA, PIEPENBRINK KH, SCOTT AJ, FREIBERG JA, SONG Y, ACHERMANN Y, ERNST RK, SHIRTLIFF ME, SUNDBERG EJ, DONNENBERG MS, von ROSENINGE EC. Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*[J]. Pathogens and Disease, 2016, 74(6): ftw061.
- [50] BÉCHET M, BLONDEAU R. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas*

- caviae* on glass surfaces[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 1072-1078.
- [51] BERNARD CS, BORDI C, TERMINE E, FILLOUX A, de BENTZMANN S. Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* tad locus, involved in flp pilus biology[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(6): 1961-1973.
- [52] COIL DA, ANNÉ J. Twitching motility in *Legionella pneumophila*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 293(2): 271-277.
- [53] ENTCHEVA-DIMITROV P, SPORMANN AM. Dynamics and control of biofilms of the oligotrophic bacterium *Caulobacter crescentus*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(24): 8254-8266.
- [54] HENCHE AL, KOERDT A, GHOSH A, ALBERS SV. Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(3): 779-793.
- [55] RONISH LA, LILLEHOJ E, FIELDS JK, SUNDBERG EJ, PIEPENBRINK KH. The structure of PilA from *Acinetobacter baumannii* AB5075 suggests a mechanism for functional specialization in *Acinetobacter* type IV pili[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(1): 218-230.
- [56] MORADALI MF, DONATI I, SIMS IM, GHODS S, REHM BHA. Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mBio, 2015, 6(3): e00453-e00415.
- [57] PÖNISCH W, WEBER CA, JUCKELAND G, BIAIS N, ZABURDAEV V. Multiscale modeling of bacterial colonies: how pili mediate the dynamics of single cells and cellular aggregates[J]. New Journal of Physics, 2017, 19(1): 015003.
- [58] SINGH PK, PARSEK MR, GREENBERG EP, WELSH MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development[J]. Nature, 2002, 417(6888): 552-555.
- [59] van SCHAİK EJ, GILTNER CL, AUDETTE GF, KEIZER DW, BAUTISTA DL, SLUPSKY CM, SYKES BD, IRVIN RT. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 1455-1464.
- [60] MUSCHIOL S, BALABAN M, NORMARK S, HENRIQUES-NORMARK B. Uptake of extracellular DNA: competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*[J]. BioEssays, 2015, 37(4): 426-435.
- [61] LAM T, ELLISON CK, EDDINGTON DT, BRUN YV, DALIA AB, MORRISON DA. Competence pili in *Streptococcus pneumoniae* are highly dynamic structures that retract to promote DNA uptake[J]. Molecular Microbiology, 2021, 116(2): 381-396.
- [62] PEABODYCR, CHUNG YJ, YEN MR, VIDAL-INGIGLIARDI D, PUGSLEY AP, SAIER MH. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella[J]. Microbiology, 2003, 149(11): 3051-3072.
- [63] HOBBS M, MATTICK JS. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes[J]. Molecular Microbiology, 1993, 10(2): 233-243.
- [64] AYERS M, HOWELLPL, BURROWS LL. Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries[J]. Future Microbiology, 2010, 5(8): 1203-1218.
- [65] ASSALKHOU R, BALASINGHAM S, COLLINS RF, FRYE SA, DAVIDSEN T, BENAM AV, BJØRÅS M, DERRICK JP, TØNJUM T. The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA[J]. Microbiology, 2007, 153: 1593-1603.
- [66] KRÜGER NJ, STINGL K. Two steps away from novelty-principles of bacterial DNA uptake[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(4): 860-867.
- [67] SEITZ P, BLOKESCH M. DNA-uptake machinery of naturally competent *Vibrio cholerae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(44): 17987-17992.
- [68] ADAMS DW, STUTZMANN S, STOUDEMANN C, BLOKESCH M. DNA-uptake pili of *Vibrio cholerae* are required for chitin colonization and capable of kin recognition *via* sequence-specific self-interaction[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(9): 1545-1557.
- [69] LIYQ, LI HY. Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* can transfer electrons from extracellular electron donors[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(3): 226-231.
- [70] SHU CJ, ZHU Q, XIAO K, HOU Y, MA HB, MA J, SUN X. Direct extracellular electron transfer of the *Geobacter sulfurreducens* pili relevant to interaromatic distances[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 6151587.
- [71] REGUERA G, MCCARTHY KD, MEHTA T, NICOLL JS, TUOMINEN MT, LOVLEY DR. Extracellular electron transfer *via* microbial nanowires[J]. Nature,



- 2005, 435(7045): 1098-1101.
- [72] ADHIKARI RY, MALVANKAR NS, TUOMINEN MT, LOVLEY DR. Conductivity of individual *Geobacter* pili[J]. RSC Advances, 2016, 6(10): 8354-8357.
- [73] CLARK MM, REGUERA G. Biology and biotechnology of microbial pilus nanowires[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2020, 47(9/10): 897-907.
- [74] SAYLER G, SIMPSON M, COX C. Emerging foundations: nano-engineering and bio-microelectronics for environmental biotechnology[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(3): 267-273.
- [75] FELICIANO GT, STEIDL RJ, REGUERAG. Structural and functional insights into the conductive pili of *Geobacter sulfurreducens* revealed in molecular dynamics simulations[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015, 17(34): 22217-22226.
- [76] WANG FB, MUSTAFA K, SUCIU V, JOSHI K, CHAN CH, CHOI S, SU ZL, SI D, HOCHBAUM AI, EGELMAN EH, BOND DR. Cryo-EM structure of an extracellular *Geobacter* OmcE cytochrome filament reveals tetrahem packing[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(8): 1291-1300.
- [77] WANG FB, GU YQ, O'BRIEN JP, YI SM, YALCIN SE, SRIKANTH V, SHEN C, VU D, ING NL, HOCHBAUM AI, EGELMAN EH, MALVANKAR NS. Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers[J]. Cell, 2019, 177(2): 361-369.e10.
- [78] WANG FB, CHAN CH, SUCIU V, MUSTAFA K, AMMEND M, SI D, HOCHBAUM AI, EGELMAN EH, BOND DR. Structure of *Geobacter* OmcZ filaments suggests extracellular cytochrome polymers evolved independently multiple times[J]. eLife, 2022, 11: 81551.
- [79] TAN Y, ADHIKARI RY, MALVANKAR NS, PI S, WARD JE, WOODARD TL, NEVIN KP, XIA QF, TUOMINEN MT, LOVLEY DR. Synthetic biological protein nanowires with high conductivity[J]. Small, 2016, 12(33): 4481-4485.
- [80] FORSLUNDAL, KUOPPA K, SVENSSON K, SALOMONSSON E, JOHANSSON A, BYSTRÖM M, OYSTON PCF, MICHELL SL, TITBALL RW, NOPPA L, FRITZH-LINDSTEN E, FORSMAN M, FORSBERG Å. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(6): 1818-1830.
- [81] CRAIG L, TAYLORRK, PIQUE ME, ADAIR BD, ARVAI AS, SINGH M, LLOYD SJ, SHIN DS, GETZOFF ED, YEAGER M, FOREST KT, TAINER JA. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin[J]. Molecular Cell, 2003, 11(5): 1139-1150.
- [82] TAYLOR RK, MILLER VL, FURLONG DB, MEKALANOS JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(9): 2833-2837.
- [83] BUCIOR I, PIELAGE JF, ENGEL JN. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(4): e1002616.
- [84] ALARCON I, EVANS DJ, FLEISZIG SMJ. The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, 50(5): 2237.
- [85] ZOLFAGHAR I, EVANS DJ, FLEISZIG SMJ. Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(9): 5389-5393.
- [86] dos SANTOS SOUZA I, MAÍSSA N, ZIVERI J, MORAND PC, COUREUIL M, NASSIF X, BOURDOULOUS S. Meningococcal disease: a paradigm of type-IV pilus dependent pathogenesis[J]. Cellular Microbiology, 2020, 22(4): e13185.
- [87] BARNIERJP, EUPHRASIE D, JOIN-LAMBERT O, AUDRY M, SCHONHERR-HELLEC S, SCHMITT T, BOURDOULOUS S, COUREUIL M, NASSIF X, EL BEHI M. Type IV pilus retraction enables sustained bacteremia and plays a key role in the outcome of meningococcal sepsis in a humanized mouse model[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(2): e1009299.
- [88] BAROCCHI MA, RIES J, ZOGAJ X, HEMSLEY C, ALBINGER B, KANTH A, DAHLBERG S, FERNEBRO J, MOSCHIONI M, MASIGNANI V, HULTENBY K, TADDEI AR, BEITER K, WARTHA F, von EULER A, COVACCI A, HOLDEN DW, NORMARK S, RAPPUOLI R, HENRIQUES-NORMARK B. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America, 2006, 103(8): 2857-2862.
- [89] DENIS K, LE BRIS M, LE GUENNEC L, BARNIER JP, FAURE C, GOUGE A, BOUZINBA-SÉGARD H, JAMET A, EUPHRASIE D, DUREL B, BAROIS N, PELISSIER P, MORAND PC, COUREUIL M, LAFONT F, JOIN-LAMBERT O, NASSIF X, BOURDOULOUS S. Targeting type IV pili as an antivirulence strategy against invasive meningococcal disease[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(6): 972-984.
- [90] AUBEY F, CORREJP, KONG YX, XU XM, OBINO D, GOUSSARD S, LAPEYRERE C, SOUPHRON J, COUTURIER C, RENARD S, DUMÉNIL G. Inhibitors of the *Neisseria meningitidis* PilF ATPase provoke type IV pilus disassembly[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(17): 8481-8486.
- [91] DUMÉNIL G. Type IV pili as a therapeutic target[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(8): 658-661.
- [92] OZCAN A, KESKIN O, SARIYAR AKBULUT B, OZBEK P. Piperidine-based natural products targeting type IV pili antivirulence: a computational approach[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2023, 119: 108382.
- [93] DYE KJ, VOGELAAR NJ, SOBRADO P, YANG ZM. High-throughput screen for inhibitors of the type IV pilus assembly ATPase PilB[J]. *mSphere*, 2021, 6(2): e00129-21.
- [94] 吴玉臣, 朱先鹏, 李有志, 侯云峰, 聂婧, 尚小雷, 邓旭明, 高丰, 吕强华. 侧柏叶颗粒剂对产气荚膜梭菌IV型菌毛系统功能的抑制作用及其机制[J]. *中国兽医学报*, 2022: 1-6.
- WU YC, ZHU XP, LI YZ, HOU YF, NIE J, SHANG XL, DENG XM, GAO F, LYU QH. Inhibitory effect and action mechanism of *Platycladi cacumen* granules on type IV pili of *Clostridium perfringens*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022: 1-6 (in Chinese).
- [95] LIMOLI DH, WARREN EA, YARRINGTON KD, DONEGAN NP, CHEUNG AL, O'TOOLE GA. Interspecies interactions induce exploratory motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *eLife*, 2019, 8: 47365.

(本文责编 郝丽芳)