



DAY 4 CGD

図3. *L. pneumophila*感染後の肺組織 (HE染色)

血球に菌がとりこまれている像が認められた(データ示していない)。

考 察

L. pneumophila は人の単球/マクロファージの貪食腔で増殖する細胞内寄生細菌である。感染により宿主の細胞性免疫が働き、単球/マクロファージが活性化されると菌が増殖できなくなる⁵⁾。その中の重要な殺菌機構がスーパーオキシドであることを我々はすでに報告した²⁾。一方では、*L. pneumophila* は、このスーパーオキシドを除去する機構をもっており、ある程度は耐えられるものと考えられる⁶⁾(詳しくは、渡辺、前川らの別の報告を参照)。

そこで、Mφ様細胞株あるいは単離マウス腹腔Mφではなく、個体レベルでもスーパーオキシドの産生がレジオネラ感染防御に重要であろうと予想し、検討することにした。これには、米国のDinauer MC博士らによるNADPH活性欠損マウス、慢性肉芽腫症のモデルマウスが有効で早々に入手した。このマウスは、*Aspergillus fumigatus*⁷⁾、*Listeria monocytogenes*⁸⁾、*Salmonella typhimurium*⁹⁾にも感受性であることが最近報告された。今回、*L. pneumophila* 感染において検討したが、そのままではMφが*L. pneumophila*の増殖を許さなかった(*Lgn1^{-/-}*)ので、*L. pneumophila*の増殖を許す(*Lgn1^{+/+}*) A/Jマウスとの交配により子孫を選択した。作製されたマウスは、予想通り、顕著な肺炎を

示すことが判明した。

レジオネラ肺炎の危険因子の中には、老齢や飲酒癖がある¹⁰⁾。ヒトの好中球のスーパーオキシドの産生が、加齢^{11, 12)}により、またin vitroでエタノール処理¹³⁾により低下するという報告があり興味深い。また、レジオネラ肺炎患者では下痢、脳神経症、横紋筋崩壊などの肺炎以外の症状が見られることがあるが¹⁰⁾、今回のマウスモデルでも早期に菌が血流に移行し肝臓や脾臓に検出されたことと対応している。

以上のように、このマウス系は今後診断と治療の研究に有用であると思われる。

結 論

食細胞のスーパーオキシド産生酵素であるNADPH oxidaseを欠損する自然感受性マウスを用いると、肺における*L. pneumophila*の増殖と顕著な肺炎が認められた。このマウス系は今後レジオネラ肺炎の診断と治療の研究に有用であると思われる。

発 表

学会：

- 1) Kura F, Goto N, Tsukano H, et al: Systemic infection of *Legionella pneumophila* in mice lacking phagocyte superoxide production: 10th International Congress of Immunology, (New Delhi), November 1998.
- 2) 倉 文明、後藤紀久、前川純子、他：NADPH oxidase 欠損マウスを用いたレジオネラ感染の研究、第71回日本細菌学会総会(松本)、1998年4月。
- 3) 前川純子、倉 文明、渡辺治雄：*Legionella pneumophila*のKatG遺伝子の解析、第71回日本細菌学会総会(松本)、1998年4月。
- 4) 倉 文明、後藤紀久、渡辺治雄：X-linked CGDモデルマウスにおける*Legionella pneumophila*感染、第6回食細胞機能異常症

研究会、1998年12月、東京。

- 5) 前川純子、倉 文明、渡辺治雄 : *Legionella pneumophila* のユニークなカタラーゼ-ペルオキシダーゼについて、第72回日本細菌学会総会(東京)、1999年3月。
- 6) 倉 文明、後藤紀久、前川純子、他 : 自然抵抗性あるいはスーパーオキシド産生に依存するマウスレジオネラ肺炎防御、第72回日本細菌学会総会(東京)、1999年3月。



文 献

- 1) Yamamoto Y, Klein TW, Newton C, et al: Differing macrophage and lymphocyte roles in resistance to *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol* 1992;148:584-589.
- 2) Kura F, Suzuki K, Watanabe H, et al: Difference in *Legionella pneumophila* growth permissiveness between J774.1 murine macrophage-like JA-4 cells and lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant cells, LPS1916, after stimulation with LPS. *Infect Immun* 1994; 62:5419-5423.
- 3) Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, et al : Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* 1995;9:202-209.
- 4) Dietrich WF, Damron DM, Isberg RR, et al: Lgn1, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13. *Genomics* 1995; 26:443-450.
- 5) 倉 文明 : 細菌感染症における細胞性免疫の関与 (8) マクロファージの活性化と殺菌機構、最新医学 1993;48:2117-2123.
- 6) Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Cloning and nucleotide sequences of iron and copper-zinc superoxide dismutase genes of *Legionella pneumophila* and their distribution among *Legionella* species. *Jpn J Med Sci Biol* 1996;49:167-186.
- 7) Morgenstern DE, Gifford MA, Li LL, et al: Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 1997;185:207-218.
- 8) Dinauer MC, Deck MB, Unanue ER: Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1997;158:5581-5583.
- 9) De Groote MA, Ochsner UA, Shiloh MU, et al: Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13997-14001.10) Bernstein MS, Locksley RM: *Legionella* Infections, p634-637. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al.(ed.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th ed. McGRAW-HILL, Inc., Tokyo, 1991.
- 11) Polignano A, Tortorella C, Venezia A, et al: Age-associated changes of neutrophil responsiveness in a human healthy elderly population. *Cytobios* 1994;80:145-153.
- 12) Nakaya Y, Hashimoto S, Hagiwara T, et al: Role of neutrophil and T cell functions in host defense mechanisms of the elderly. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1992; 29:938-944.
- 13) Tamura DY, Moore EE, Partrick DA, et al: Clinically relevant concentrations of ethanol attenuate primed neutrophil bactericidal activity. *J Trauma* 1998; 44:320-324.

Respiratory burst に抵抗する レジオネラの因子について

分担研究者：

国立感染症研究所細菌部

渡辺 治雄

研究協力者：

国立感染症研究所細菌部

前川 純子、倉 文明

The resistant factors of *Legionella pneumophila* against the respiratory burst of host cells
Haruo Watanabe, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura
Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases

研究要旨

活性酸素であるスーパーオキシド、過酸化水素をそれぞれ消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼはほとんどの生物に普遍的に存在する酵素だが、レジオネラのような宿主細胞の食胞内で増殖可能な細菌においては特にその生存に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、*Legionella pneumophila* の SOD とカタラーゼについて解析を行ったところ、本菌は SodB (Fe-SOD) と SodC (Cu, Zn-SOD) の 2 種類の SOD と、KatA と KatB の 2 種類のカタラーゼ-ペルオキシダーゼをもち、SodC と KatA はシグナル配列を有していることがわかった。SodC と KatA は、菌体膜外に分泌され、宿主細胞の産生する活性酸素の消去に働いている可能性が示唆された。

目 的

細胞内寄生細菌であるレジオネラは、本来食作用をもち、生体にとって異物を排除する働きをもつマクロファージの中で増殖するという特徴がある。すなわちレジオネラは活性酸素等によるマクロファージの殺菌機構に抵抗し、増殖するための手段を備えていると考えられる。マクロファージの殺菌機構の1つに、活性酸素の放出がある。食細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼにより放出される O_2^- は SOD により H_2O_2 に不均化され、 H_2O_2 はさらにカタラーゼにより無害な H_2O に変えられる。したがって、SOD やカタラーゼはレジオネラのような細胞内寄生細菌の殺菌抵抗性において重要な役割を果たしていると考えられる。本報告では *L. pneumophila* の SOD とカタラーゼについて解析を行い、その病原因子としての意義について考察する。

材料と方法

菌株：*L. pneumophila* serogroup 1, AM511¹⁾ を解析に用いた。*L. pneumophila* 染色体ライブラリーの作製および、プラスミド構築には大腸菌 K-12 株、DH5 α (Bethesda Research Labs) を用いた。Fe-SOD 遺伝子クローニングには大腸菌 K-12、SOD 欠損株 QC774 (GC4468 *sodA*, *sodB*)²⁾ を用い、SOD 活性染色の際の大腸菌 K-12 株としてその親株 GC4468²⁾ を用いた。

DNA 操作：DNA クローニングおよびその他の DNA 操作は基本的には Sambrook³⁾ に従った。DNA の塩基配列の決定には Deletion Kit (宝酒造) と Sequenase (東洋紡)、あるいは ABI PRISM 310 (Perkin Elmer) を用いた。コロニーハイブリダイゼーションには DIG Labeling and Detection Kit (RDJ) を用いた。PCR には Thermocycler 2400 (Perkin Elmer) を用いた。

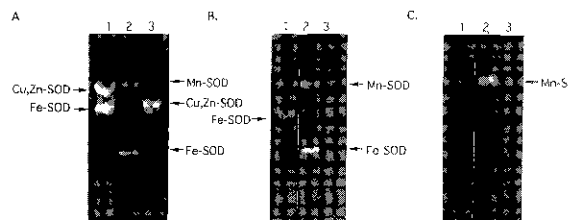
活性染色：SOD の活性染色は Beauchamp と Fridovich⁴⁾ の方法、カタラーゼの活性染色は Claret⁵⁾ の方法に従った。

結 果

1. *L. pneumophila* の SOD⁶⁾

L. pneumophila Philadelphia 1 株由来の AM511 株の菌体ライゼートを SDS を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、活性染色を行うと 2 本のバンドが検出される。泳動度の遅い方のバンドは KCN によっても H_2O_2 によっても活性が阻害されることから Cu, Zn-SOD であり、泳動度の速い方のバンドは KCN によってものみ活性が阻害されることから Fe-SOD であることがわかった (図 1)。

図 1 SOD 活性の検出



電気泳動は10%ネイティブ-ポリアクリルアミドゲルで行った。泳動後、A. 阻害剤非添加； B. 5mM KCN 添加； C. 20mM H_2O_2 添加で、それぞれNBT染色を行った。レーンは A. B. C. とも共通で、1. *L. pneumophila* AM511株菌体ライゼート； 2. 大腸菌 K-12 GC4468 株菌体ライゼート (Mn-SOD と Fe-SOD を含む)； 3. 牛赤血球 Cu, Zn-SOD 標品である。

2. Fe-SOD 遺伝子 (*sodB*) のクローニング⁶⁾

大腸菌の Mn-SOD と Fe-SOD をそれぞれコードする *sodA*, *sodB* に挿入変異がはいった QC774 株が好氣的には最小培地で生存不能であること²⁾ を利用して、*L. pneumophila* の SOD 遺伝子のクローニングを行った。この方法により、*Listeria ivanovii* や *Streptococcus mutans* の SOD 遺伝子のクローニングが成功している^{7, 8)}。

L. pneumophila AM511 染色体 *Sau3AI* 部分消化プラスミドライブラリーを作製し、大腸菌の SOD 変異を相補するようなクローンのスクリーニングを行った。約17,000クローン中8クローンがその変異を相補したが、すべて Fe-SOD 活性を示すもので、

図2 *L. pneumophila* の Fe-SOD と他の細菌の Fe-SOD および Mn-SODとのアミノ酸配列の比較

	1	51	
L.pn. (Fe)	MTFTLPGQYALDIALAFVSKETLEYHKGKENTVTLKLIPTG-EFESMTLEEII-----KRAKGGVNAAGVSTFTYVHSMSP--N		
E.co. (Fe)	SFEPLPALPYAKDALAFHSISETIYHYGKHEQTYVTLNKLKIGT-AFEOKSLEEII-----RSSEGGVNAAGVSTFTYVHCLAP--N		
C.bu. (Fe)	MAFELPOLPYKLNALPEHSISETLEYHUGKHEATVTKLKLIEGT-PFEKEPLEEII-----RKSDGGVNAAGVSTFTYVHCHSP--D		
P.ov. (Fe)	AFELPPLPYADALQPEISKETLEYHDKGENTVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--D		
P.le. (Fe)	AFELPALFAMNALLEPHISQETLEYHYGKENTVTLKLVGEGT-ELAEKSLEEII-----KTSKGGVNAAGVSTFTYVHSMSP--N		
S.sp. (Fe)	MSYELPALFPDYALAPYITKLETLEFHDKHEAAYVNYHNAVDKT-DLGGQIEAVI--KATAGDASKGGVNAAGVSTFTYVHSMSP--N		
B.gi. (Fe/Mn)	MTRELIISLPAVDALAPVSKETVEFHBGKELKATVDNKLKLIIGT-EFENADLNTIV-----QRSEGGVNAAGVSTFTYVHCLAP--G		
M.sp. (Fe/Mn)	AYTLPLOYAYTLEPHIDAQIMEIISTTBSQTYINWNAALEGT-SFANEVPEALLQKLDLSPENLRGPPVRRNGGGEANSILFHWLTP--H		
E.co. (Mn)	SYTLPSLPAVDALPEFQKQMEIISHTKHEQTYVNNNAALESLPEANLVEELITKLDLPADKATVLRNNGAGGRANESLFWKGL---K		
B.st. (Mn)	PFELPALPYPDALPEIISQETLEYHDKGENTVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
L.iv. (Mn)	TYELKLPYTYDALLEPNDKEMEIHYTKHEQTYVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
M.th. (Mn)	MHDLEKFPYELPELPPYDALEPHISQETLEYHYGKHEQTYVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
T.aq. (Mn)	PPYKLEPDLQYTYDALEPHISQETLEYHYGKHEQTYVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
M.tu. (Mn)	MAEYTLPOLQWYDALEPHISQETLEYHYGKHEQTYVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
H.ha. (Mn)	MSQELPELFPDYDALEPHISQETLEYHYGKHEQTYVTLNKLKIPGTFEFGKTEEIV-----KSSGGVNAAGVSTFTYVHCLSP--N		
	101	151	201
L.pn. (Fe)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
E.co. (Fe)	AGGEPKRVAAEALAAKSPGSAFADPKAQTDAAIKSPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
C.bu. (Fe)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
P.ov. (Fe)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFADPKAQTDAAIKSPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
P.le. (Fe)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
S.sp. (Fe)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
B.gi. (Fe/Mn)	KGGAPKRLGAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
M.sp. (Fe/Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
E.co. (Mn)	KGTTLQKDLKAAEDPFGSDVNTKAEFEKAAASRPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
B.st. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
L.iv. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
H.th. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
T.aq. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
M.tu. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		
H.ha. (Mn)	GGGEPKRLAEAINKSPGSAFAPKQPSQTAATPPGSGWAWLVQDQ-SGALKIINTSNSTPTMTE---GLN--ALLSDVMEHAYIIDYRNRPPDYIEAFWS-LVWDFASNLK		

図中に略記した種名は次の通り。L.pn.: *L. pneumophila*, E.co.: *Escherichia coli*⁽¹⁰⁾, C.bu.: *Coxiella burnetii*⁽¹¹⁾, P.ov.: *Pseudomonas ovalis*⁽¹⁰⁾, P.le.: *Photobacterium leignathi*⁽¹⁰⁾, S.sp.: *Synecho-coccus species*⁽¹²⁾, B.gi.: *Bacteroides gingivalis*⁽¹³⁾, M.sp.: *Methylomonas species*⁽¹⁴⁾, B.st.: *Bacillus stearothermophilus*⁽¹⁰⁾, L.iv.: *Listeria ivanovii*⁽¹⁵⁾, M.th.: *Methanobacterium thermoautotrophicum*⁽¹⁶⁾, T.aq.: *Thermus aquaticus*⁽¹⁰⁾, M.tu.: *Mycobacterium tuberculosis*⁽¹⁷⁾, H.ha.: *Halobacterium halobium*⁽¹⁸⁾.

すべての SOD において保存されているアミノ酸は網掛けし、Fe-SOD 特異的に保存されているアミノ酸は四角で囲んだ。金属リガンド部位のアミノ酸残基の上に星印をつけた。

図3 *L. pneumophila* の Cu, Zn-SOD と他の細菌およびウシの Cu, Zn-SOD とのアミノ酸配列の比較

	signal peptides	50		100
L.p.	NKSGIYLIG TILFS.S.M AIA.....	DDLTAP IYTTGPKPVA IGVVTFQTPT YQVLITPDLT NLPEGPKGPH LKHTADCGNS		GM
P.l.	MNKAKTLLFT ALAFGLSGB. ALA.....	QDLTVK MTD.LQTKPK VGTIELSONK YGVVTFPELA DLTPGMBGPH IEQNGSCASS EKDQKVVLLG		
B.p.	MNKKMPTLLAL AISGICAAGV ANABDHMAKP AGPSIEVKVQ QLDPANGND VGTVTITESN YGLVFTPNLQ GLAEGLEGPH IGENPSCDPK EKDGLKLSGL			
B.i.	MNKKMPTLLAL AISGICAAGV ANABDHMAKP AGPSIEVKVQ QLDPANGND VGTVTITESN YGLVFTPNLQ GLAEGLEGPH IYENPSCDPK EKDGLKIAGL			
B.a.	(not submitted)	ESTTVKMY EALPTGPKGE VGTVVISEAP GGLHFKVME KLTGPGYGFH VHENPSCAPG EKDQKIVPAL		
C.c.	MIRLSAAAAL GLAALAASP ALA.....	QTSATA VVK.AGDCRD AGAVVTVEAP HGVLKLELKL GLTPGWHAAH FHEKGDGCTP ..DFK.....		
Bov		ATKAVC VLK.GDGPV QGTHFEARG DTVVVTGSIT GUTEQGGPH VHQFGDNTQG		CT
			primerN	
	#	150		200
L.p.	HREGHYDPQN TNSHOGFY.G NQHLSDLEVL YVTSNGKAMI PTLAER..LK	LSD MHLAVMIHA NGQTYG... DNP.PGGGG DRIACGVI..		.K
P.l.	AKGCHYDPEH TNKGGFPWTD DNKGGDLAL FVSANGLATN PVLAER..ET	LIKE LKGAHMIHA GGDNHS... DMPKALGGG ARVACGVI..		.Q
H.p.	AKGCHWDPKG AKQGGYFQD DAHLGDLAL TVLHDTATN PVLAER..LK	LIKE LKGAHMIHA GGDNHS... DMPKALGGG ARVACGVI..		.Q
B.i.	AKGCHWDSKG AKQGGYFQD DAHLGDLAL TVLHDTATN PVLAER..LK	KLDE VRGHSIMIHA GGDNHS... DBPAPLGGG PRMACGVI..		.K
B.a.	AKGCHYDPQN THHLGF.EG DQHLGDLAL SANADKQVSE TVVAER..LK	KLAE IKORSLHVIV GGDNYS... DKPEPLGGG ARVACGVI..		.K
C.c.	SAGAHVHTAA TTVHGLNPD ANDSGLENI FAAAQGAATA EYSPVLSK GAGGRPALD ADCSSTVVAH NPDDH....	KTQPIGGAG ARVACGVI..		.K
Bov	SAGAHFNPL. SKKGGGPKDE ERVVDGLGNV TADRNGVAIV DIVDPLISHS GEY.....S	IIGRTMVBEE KFDLGRGN EESTKTKNAQ SRLACGVI AK		
			primerC	

図中に略記した種名は次の通り。L.p.: *L. pneumophila*, P.l.: *Photobacterium leignathi*⁽¹⁹⁾, H.p.: *Haemophilus parainfluenzae*⁽²²⁾, H.i.: *Haemophilus influenzae*⁽²²⁾, B.a.: *Brucella abortus*⁽²⁰⁾, C.c.: *Caulobacter crescentus*⁽²³⁾, Bov.: *bovine erythrocyte*.

6種以上の Cu, Zn-SODで保存されているアミノ酸を網掛けした。銅と亜鉛の結合部位のアミノ酸残基の上には各々 * と # をつけた。primerN および primerC は逆翻訳して、degenerate プライマー作製に用いた配列である。

Cu, Zn-SOD 遺伝子を含むクローンは得られなかった。筆者らとは独立に Steinman がコスミドライブラリーを用いて、同様の結果を得ている⁹⁾。得られた Fe-SOD 遺伝子の塩基配列を決定した (DDBJ/EMBL/Gen Bank databases, D12922)。予想されるアミノ酸配列を今まで報告されている細菌の Fe-SOD および Mn-SOD と比較したところ、Fe-SOD 特異的なアミノ酸残基は *L. pneumophila* においてもすべて保存されていた (図 2)。

3. Cu, Zn-SOD 遺伝子 (*sodC*) のクローニング⁹⁾

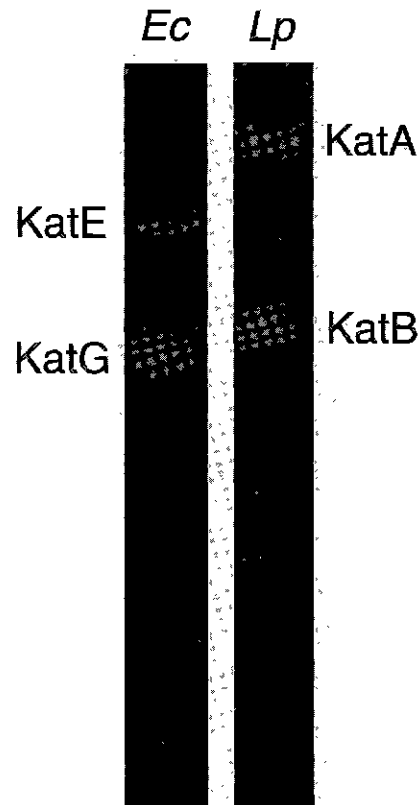
大腸菌の SOD 変異を相補するようなクローンとして Cu, Zn-SOD 遺伝子は得られなかったため、既知の Cu, Zn-SOD との相同性からクローニングを行うことにした。*Photobacterium leignathi*¹⁹⁾ と *Brucella abortus*²⁰⁾ の Cu, Zn-SOD のアミノ酸配列でよく保存されている領域を 2 か所選び、それをもとに、degenerate プライマーを合成した (アミノ酸配列上のプライマーの位置は図 3 を参照)。そのプライマーを用いて、*L. pneumophila* AM511 染色体を鋳型として PCR を行ったところ、得られた増幅物は既知の Cu, Zn-SOD と相同性をもつアミノ酸配列をコードしていた。その PCR 産物をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行ったが、完全長のクローンを得ることはできなかった。そこで IPCR²¹⁾ を行い、その上流域をクローニングし、コロニーハイブリダイゼーションで得たクローンとつなぎ合わせることで、大腸菌内で Cu, Zn-SOD 活性を示す *sodC* 遺伝子の完全長のクローンを得、その全塩基配列を決定した (DDBJ/EMBL/Gen Bank databases, D29953)。予想されるアミノ酸配列を今まで報告されている細菌の Cu, Zn-SOD と比較したところ、全域にわたってよく保存されており、金属リガンドと考えられるアミノ酸残基は完全に保存されていた (図 3)。

4. *L. pneumophila* のカタラーゼ

Pine らの生化学的研究によると、レジオネラ属の他の種にはカタラーゼが存在するが、*L. pneumophila* Philadelphia 1 にはカタラーゼではなくカタラーゼ-ペルオキシダーゼが存在する^{24, 25)}。*L. pneumophila* Philadelphia 1 株由来の AM511 株の菌体ライゼートを SDS を含まないポリアクリル

アミドゲル電気泳動にかけて、活性染色を行うと 2 本のバンドが検出された (図 4)。Bandyopadhyay と Steinman²⁶⁾ により泳動度の遅い方のバンドは KatA、泳動度の速い方のバンドは KatB と名付けられている。彼らにより、*katB* 遺伝子はクローニングされている²⁶⁾ので、*katA* 遺伝子のクローニングを行った。

図 4 カタラーゼ活性の検出



電気泳動は 7.5% ネイティブ-ポリアクリルアミドゲルで行った。レーンの説明、Ec. 大腸菌 K-12 D H5 α 株菌体ライゼート; Lp. *L. pneumophila* A M511 株菌体ライゼート。

5. *katA* 遺伝子のクローニング

sodC の場合と同様に既知のカタラーゼ-ペルオキシダーゼ遺伝子との相同性からクローニングを行うことにした。*Escherichia coli*²⁷⁾、*Salmonella typhimurium*²⁸⁾、*Mycobacterium intracellulare*²⁹⁾、*Bacillus stearothermophilus*³⁰⁾ のカタラーゼ-ペルオキシダーゼ遺伝子のアミノ酸配列でよく保存されている領域を 2 か所選び、それをもとに、degenerate プライマーを合成した (アミノ酸配列上のプライマーの位置は図 5 を参照)。そのプライマーを用い

図5 カタラーゼペルオキシダーゼのアミノ酸配列の比較

KatA	1	---MFKRTIP--LFAAFTLAISSPFIFFNYMAHQEDKPKTNQYVWFRLDLSPLRQFNATSNPMGEKFNFAEFPNSLDELNAVIDLKKLMTTSQDMWPAQYNGYGLPIRMSWHAAGTYR	114
CpeB	1	---MTFEMHAIIVTDAKSESGGCPVAH--DRALHPTQGGNRCMWERLNLKILAKNPAVANLDEDFDYAEAFKALDLAAUKRDIAEVLTTSDMWPADFGNYGPMIRMAVHAGTYR	115
KatP	1	---MIKKTLP--VL-IL-LALSGS-FST-A-VAADKKEITQNYFYPETLDTPLRLHSPESNPMGADFDYATRFQQLDMALKKDIKDLTTSDMWPADYGYGFFIRMAVHAGTYR	109
KatB	1	M--D---GK---VGSST--TGC--PVIHGGTST--GT--SNTAMWPAWLNALDLIHLQHTKTNMPEKDFNYRBEVKLLDFEALKKDLHALMTDSQAWPADWGHYGLMIRMSWHAAGTYR	105
MI85	1	MSSDTSSSRPQPDGASKSESENPATPSPKPKAHAPLNRDWWPDQVIVSLSLHPSLNSPLGDDDFYAAEFKALDVEALKADMI SLMTTSQDMWPADYGYGGLFIRMSWHAAGTYR	120
KatG	1	---MSTSD--I--H--NTTATKCPFHGGHDSAGAQTTRDWWPNQLRVLDLNLQNSNRNPLGDFDFYRKEFSKLDYGLKDLKALTTESQWPAWADWGYAGLPIRMAVHAGTYR	112
* * * * *			
KatA	115	IYDGRGGAGGQRFQAPQNSWPDNANLDKARRLLWPIKQYGRKISWADLLVLGNVAMNESGFKTIGFAGGREDAWA--AININMGPEGKVL---ESKRQDKGKLEKPLAATVWGLIYV	230
CpeB	116	ISDGRGGAGAGQRFAPLNSWPDNGLDKARRLLWPKKIKYQSSISWADLLITGNVALETMGFKTIFGPGGRADVWBAEEDVWVWGPETTWL---DDRRTYTCRELENPLAOWMGLIYV	232
KatP	110	TYDGRGGAGGQRFZPLNSWPDNVLNDKARRLLWPKKIKYQSSISWADLLVLTGNVALETMGFKTIFGPGGRADVWBAEEDVWVWGPETTWL---ADNR--DKNGKLPAAATQWGLIYV	224
KatB	106	VADGRGGAGTGNQRFAPLNSWPDNVLNDKARRLLWPKKIKYQSSISWADLLVLTGNVALETMGFKTIFGPGGRADVWBAEEDVWVWGPETTWL---ADNR--DKNGKLPAAATQWGLIYV	224
MI85	121	IHDGRGGAGGQRFAPLNSWPDNVLNDKARRLLWPKKIKYQSSISWADLLVLTGNVALETMGFKTIFGPGGRADVWBAEEDVWVWGPETTWL---ADNR--DKNGKLPAAATQWGLIYV	224
KatG	113	SIDGRGGAGGQRFAPLNSWPDNVLNDKARRLLWPKKIKYQSSISWADLLVLTGNVALETMGFKTIFGPGGRADVWBAEEDVWVWGPETTWL---ADNR--DKNGKLPAAATQWGLIYV	227
* * * * *			
Eimerin			
KatA	231	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	349
CpeB	233	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	351
KatP	225	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	344
KatB	225	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	343
MI85	236	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	356
KatG	226	NPEFGNGPDPPLAAAEKIRTEPGRMAMNDEETVALIAGGHAFGKTHGAAS--GKYLGAPEAAGIEBQQFGWNSYSGSGKGDITITSGLEGAWTVTPTMNSHMYLQNLFNWPKYSKPG	346
* * * * *			
KatA	350	AIQWVPESSNASSMVPDAPDPSKRHAPVMLTDLALKFDVYKSKIAKRFIDNPKFDDAFARAWFKLTHRDMGPRSRVLSLVPKEMIQDQVFPVYQKLVLDANDIANLKGKILNSGLT	469
CpeB	352	AHQWVA--KNAPEIIPDAHDPSPKRRPRMLTDLALKFDVYKSKIAKRFIDNPKFDDAFARAWFKLTHRDMGPRSRVLSLVPKEMIQDQVFPVYQKLVLDANDIANLKGKILNSGLT	469
KatP	345	AIQWVPE--K--KAANTVQDAPHSVLRHLMFTTDLALKFDVYKSKIAKRFIDNPKFDDAFARAWFKLTHRDMGPRSRVLSLVPKEMIQDQVFPVYQKLVLDANDIANLKGKILNSGLT	462
KatB	344	AIQWVPEIHIKEEDKPVVDEDPARHNPIMDADAMKMDPVYKSKIAKRFIDNPKFDDAFARAWFKLTHRDMGPRSRVLSLVPKEMIQDQVFPVYQKLVLDANDIANLKGKILNSGLT	459
MI85	357	AMQVTKADKAGAGTIPDFPQAGGR--APTMLVTDLSLRESPIYADITRMLDHEPELADAFKAWKYLHHRDMGPIRSLVLPVVAEPQL--WQDFVFAVDELVDNDVAALKKVLDSGLS	474
KatG	347	AIQWVPE--VDAPEIIPDFPQAGGR--APTMLVTDLSLRESPIYADITRMLDHEPELADAFKAWKYLHHRDMGPIRSLVLPVVAEPQL--WQDFVFAVDELVDNDVAALKKVLDSGLS	463
* * * * *			
KatA	470	TSELVKTAWASASTFACTDMRGGANGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	589
CpeB	470	VSQLVTTAWASASTFRASDRGGANGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	586
KatP	463	ASELKTAWASASTFRVTRVTRGGNGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	582
KatB	460	IGENVSTAWASARTFRGSDRGGANGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	571
MI85	475	IPQLVKTAWASAAAYRNDRGGANGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	594
KatG	464	VSELVSVWASASTFRGSDRGGANGARIRLAPQKDWPNDFQELAKVLKTLSEIQQNFNNAQADGKKISLADLIVLGGNAIEQAARKAGYDIIIVPFTPGRTDNTQVTDVTSFVLEP	574
* * * * *			
KatA	590	KADGFRNYDKS--NNMSPPEMVERASLLKLSVPEMTVLVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	708
CpeB	589	TADGFRNY--LQKGNRLPAEYLLDFANLNLGAPMTVLVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	707
KatP	583	TADGFRNYDKS--NNMSPPEMVERASLLKLSVPEMTVLVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	701
KatB	572	LHDGFRN--MLKTTDVRPEMLDRTQLMGLTAHEMTVLVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	688
MI85	595	RADGFRN--YIRPEKAPLEQLLIERAYLLGVTPPEMTVLVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	713
KatG	575	IADGFRN--RARLVDSTESGLIDKQQQLTAFEMTALVGGMRVNLNANTQNYGVFTDKPGLTNDNDFINLLMSSTEWKSSSETEGIYEGYKTFGKLVKATSVLDLFGANSRLAV	693
* * * * *			
Eimerin			
KatA	709	AEAYATDDAKEKFIQDFINAWKVMADRFDIIKAAANINS	749
CpeB	708	AEVYASDDAKEKFKDFVAAMVHVMADRFDLV-----	740
KatP	702	AEVYASDDARKNFIHDFVKSVMKNSDRFDLNNK-----	736
KatB	689	AEVYAQDDNKGKFIQDFVAAMVHVMADRFDLA-----	721
MI85	714	AEVYAQDDAHGKFEVDFVAAMVHVMADRFDLK-----	746
KatG	694	AEVYASDDAHEKFKDFVAAMVHVMADRFDLL-----	726
* * * * *			

L. pneumophilaの今回クローニングされたカタラーゼペルオキシダーゼ (KatA) の予想されるアミノ酸配列を Streptomyces reticuliのカタラーゼペルオキシダーゼ (CpeB) (Borobok I. EMBL accession no.37 58890)、腸管出血性大腸菌 O157:H7 のプラスミド pO157由来のカタラーゼペルオキシダーゼ (KatP)³¹⁾、L. pneumophilaのもう1つのカタラーゼペルオキシダーゼ (KatB)、Mycobacterium intracellulare のカタラーゼペルオキシダーゼ (MI85)²⁹⁾、大腸菌のカタラーゼペルオキシダーゼ (KatG)²⁷⁾のアミノ酸配列と比較した。

て、L. pneumophila AM511染色体を鋳型としてPCRを行ったところ、得られた増幅物は既知のカタラーゼペルオキシダーゼと相同性をもつアミノ酸配列をコードしており、katB 遺伝子とは異なる配列であった。katA 遺伝子内の領域が増幅されたと考えられた。katB遺伝子領域が増幅されなかったのは degenerate プライマー C 上の 2番目のアミノ酸が KatB ではバリン(V)ではなくトレオニン(T)となっているためと考えられる。

得られたPCR産物をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い、katA遺伝子の完

全長のクローンを得た。その全塩基配列を決定したところ (DDBJ/EMBL/Gen Bank databases, AB017595)、予想されるアミノ酸配列からアミノ末端にシグナル配列を有していると考えられた。今まで報告されている細菌のカタラーゼペルオキシダーゼと比較した結果を図5に示す。

また、得られたクローンを大腸菌に導入するとKatAに相当する電気泳動度を示すカタラーゼ活性をもつたんぱく質を発現することを確認した(データは示さない)。

考 察

SODはその活性中心に含まれる金属によりMn-SOD、Fe-SOD、Cu,Zn-SODの3種類に分類される³²⁾。Mn-SODは細菌およびミトコンドリアのマトリックスに存在し³³⁾、Fe-SODは細菌およびある種の植物の葉緑体に存在する³⁴⁾。Mn-SODとFe-SODはアミノ酸配列およびその構造が互によく似ている¹⁰⁾。Cu, Zn-SODはそれらとは構造が異なっており、真核生物特有のSODであると考えられていたが、近年、多くのグラム陰性菌にも存在することが明らかとなった³⁵⁾。哺乳類においては細胞質性のものがCu, Zn-SOD活性の中心で、アイソザイムとして分泌型のCu, Zn-SODが存在する³⁶⁾が、細菌のCu, Zn-SODはすべてシグナル配列をもつ分泌型蛋白質である。

また、カタラーゼは酸素存在下で生育する生物に普遍的に存在するが、細菌にはそれに加えて、ペルオキシダーゼ活性をあわせもつアイソザイム、カタラーゼ-ペルオキシダーゼが存在する。たとえば大腸菌K-12株は真正カタラーゼ (KatE) およびカタラーゼ-ペルオキシダーゼ (KatG) をもつ (図4参照)。

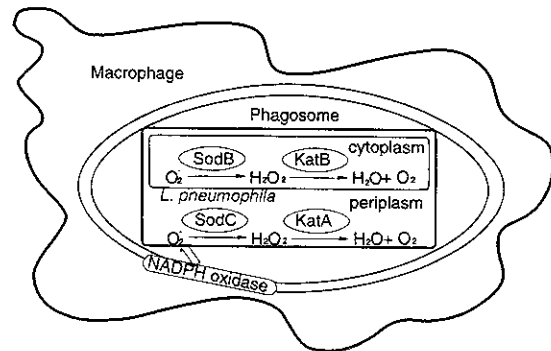
*L. pneumophila*のSODとカタラーゼについて解析を行ったところ、本菌はSodB (Fe-SOD) と Sod C (Cu, Zn-SOD) の2種類のSODと、KatAとKatBの2種類のカタラーゼ-ペルオキシダーゼをもつことがわかった。また、真正カタラーゼの活性は存在しない。SodCは他の細菌のもの同様、シグナル配列をもつ分泌型蛋白質であり、KatAもシグナル配列をもつ分泌型蛋白質だった。腸管出血性大腸菌O157:H7のプラスミドpO157由来のカタラーゼ-ペルオキシダーゼ (KatP)³⁷⁾以外はシグナル配列を有するカタラーゼ-ペルオキシダーゼは知られておらず、染色体性のものであることは本報告が初めてで、他の病原性細菌におけるその存在に興味を持たれる。

結 論

*L. pneumophila*のSodBおよびKatBは細胞質に

存在し、自己のさまざまな代謝反応の際に生じる活性酸素の消去に働き、シグナル配列を有しているSodC および KatAは、菌体膜外に分泌され、宿主細胞の産生する活性酸素の消去に働いている可能性が示唆された (図6)。

図6 宿主細胞の NADPH



オキシダーゼ、あるいは菌体内での代謝により生じるスーパーオキシドに対する *L. pneumophila* のSODとカタラーゼ-ペルオキシダーゼによる防御メカニズムについての模式図。

発 表

学会：

前川 純子、倉 文明、渡辺 治雄：*Legionella pneumophila*のkatG 遺伝子の解析。第71回日本細菌学会総会（松本）、1998年4月。

文 献

- 1) Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, et al: Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:9607-9611.
- 2) Carlouz A, Touati D: Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? EMBO J 1986;5:623-630.

- 3) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1992.
- 4) Beauchamp CO, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-287.
- 5) Clare DA, Duong MN, Darr D, et al: Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal Biochem* 1984;140:532-537.
- 6) Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Cloning and nucleotide sequences of iron and copper-zinc superoxide dismutase genes of *Legionella pneumophila* and their distribution among *Legionella* species. *Jpn J Med Sci. Biol* 1996;49:167-189.
- 7) Hass A, Goebel W: Cloning of a superoxide dismutase gene from *Listeria ivanovii* by functional complementation in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Mol Gen Genet* 1992;231:313-322.
- 8) Nakayama K: Nucleotide sequence of *Streptococcus mutans* superoxide dismutase gene and isolation of insertion mutants. *J Bacteriol* 1992;174:4928-4934.
- 9) Steinman HM: Construction of an *Escherichia coli* K-12 strain deleted for manganese and iron superoxide dismutase genes and its use in cloning the iron superoxide dismutase gene of *Legionella pneumophila*. *Mol Gen Genet* 1992;232:427-430.
- 10) Parker MW, Blake CCF: Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett* 1988;229: 377-382.
- 11) Heinzen RA, Franzier ME, Mallavia LP: *Coxiella burnetii* superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992;60:3814-3823.
- 12) Laudenbach DE, Trick CG, Straus NA: Cloning and characterization of an *Anacystis nidulans* R2 superoxide dismutase gene. *Mol Gen Genet* 1989;216:455-461.
- 13) Nakayama K: The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Gene* 1990;96:149-150.
- 14) Matsumoto T, Terauchi K, Isobe T, et al: Iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Methylomonas* J: identity of the protein moiety and amino acid sequence. *Biochemistry* 1991;30:3210-3216.
- 15) Hass A, Goebel W: Cloning of a superoxide dismutase gene from *Listeria ivanovii* by functional complementation in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Mol Gen Genet* 1992;231:313-322.
- 16) Takao M, Oikawa A, Yasui A: Characterization of a superoxide dismutase gene from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Biochem Biophys* 1990;283:210-216.
- 17) Zhang Y, Lathigra R, Garbe T, et al: Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1991; 5:381-391.
- 18) Takao M, Kobayashi T, Oikawa A, et al: Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 1989;171:6323-6329.
- 19) Steinman HM: Bacteriocuprein superoxide dismutase of *Photobacterium leiognathi*. isolation and sequence of the gene and evidence for a precursor form. *J Biol Chem* 1987;262:1882-1887.
- 20) Beck BL, Tabatabai LB, Mayfield JE: A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* 1990;29:372-376.

- 21) Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ: A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* 1988;16:8186.
- 22) Kroll JS, Langford PR, Loynds, BM: Copper-zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. *J Bacteriol* 1991;173:7449-7457.
- 23) Steinman HM, Ely B: Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J Bacteriol* 1990;172:2901-2910.
- 24) Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, et al: Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus *Legionella*. *J Clin Microbiol* 1984; 20:421-429.
- 25) Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, et al: Whole cell peroxidase test for identification of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1984;19:286-290.
- 26) Bandyopadhyay P, Steinman HM: *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *J Bacteriol* 1998;180:5369-5374.
- 27) Triggs-Raine BL, Doble BW, Mulvey MR, et al: Nucleotide sequence of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1988;170:4415-4419.
- 28) Loewen PC, Stauffer GV: Nucleotide sequence of katG of *Salmonella typhimurium* LT2 and characterization of its product, hydroperoxidase I. *Mol Gen Genet* 1990; 224:147-151.
- 29) Morris SL, Nair J, Rouse DA: The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1992;138:2363-2370.
- 30) Loprasert S, Negoro S, Okada H: Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus stearothermophilus* peroxidase gene (perA). *J Bacteriol* 1989;171:4871-4875.
- 31) Brunder W, Schmidt H, Karch H: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996;142:3305-3315.
- 32) Fridovich I: Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 1986;58:61-97.
- 33) Weisiger RA, Fridovich I: Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 1973;248:3582-3592.
- 34) Van Camp W, Bowler C, Villarroel R. et al: Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9903-9907.
- 35) Kroll JS, Langford PR, Wilks KE, et al: Bacterial [Cu, Zn] superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology* 1995;141:2271-2279.
- 36) Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, et al: Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6340-6344.

Legionella pneumophila 感染によるヒト単球系 THP-1細胞由来マクロファージのapoptosis

分担研究者：

長崎大学医学部内科学講座第二

河野 茂

研究協力者：

長崎大学医学部臨床検査医学講座
同 内科学講座第二

泉川公一, 宮崎義継, 上平 憲
朝野和典

Legionella pneumophila induces the apoptosis of human monocytic cell THP-1 derived macrophage

Shigeru Kohno¹⁾, Koichi Izumikawa²⁾, Yoshitsugu Miyazaki²⁾, Kazunori Tomono¹⁾,
And Shimeru Kamihira²⁾

¹⁾ Second Department of Internal Medicine and ²⁾ Department of Laboratory Medicine,

Nagasaki University School of Medicine

研究要旨

*Legionella pneumophila*の、その宿主であるマクロファージや、感染防御に携わるリンパ球に対するapoptosis誘導能をFITC標識されたAnnexin V抗体を用い、フローサイトメーターにて解析・検討した。Virulent株ではヒト単球系THP-1細胞由来マクロファージに対しapoptosisの誘導能が認められたが、avirulent株では認められなかった。また、ヒトTリンパ球系由来Jurkat細胞に対してもapoptosisの誘導はみられなかった。ヒト単球系THP-1細胞由来マクロファージに対するapoptosisの誘導能の結果から、hostに対するapoptosis誘導能は菌の病原性と相関することが示唆された。



目 的

振興・再興感染症のひとつである *Legionella pneumophila* による呼吸器感染症は急激かつ重篤な臨床経過をたどり、治療開始時期のおくれが生命を脅かすことがある。本菌は細胞内寄生菌のひとつで、ヒトにおける細菌感染症の主要な感染防御機構から逃れ、マクロファージ内で増殖するという特殊な性質をもつ。マクロファージやリンパ球などのヒトの感染防御機構とapoptosisがどのように関わっているのか解明することを目的とする。



材料と方法

1. 細胞

ヒト単球系THP-1細胞とヒトTリンパ球系細胞Jurkat細胞を、10% FCS (Gibco BRL)、100 U/mlのペニシリンG (Sigma)、10 mg/mlのストレプトマイシン (Sigma) を含有するRPMI1640 (Gibco BRL) をmediumとし、37℃、5% CO₂下にて培養する。

2. 菌株

Virulent株として、*Legionella pneumophila* serogroup 1 (SG1) (Horwitz株: Dr. Marcus A. Horwitz, Department of Medicine, School of Medicine, University of Californiaより分与) と *L. pneumophila* SG1 (ATCC 33152株) を用いた。また、avirulent株として *L. pneumophila* SG1 (D25株: Dr. Howard Shuman, Department of Microbiology, College of Physicians and Surgeons of Columbia Universityより分与) を用いた。

3. 細胞調整

THP-1細胞は 2×10^6 /mlの濃度に調整し、12-o-tetradecanonylphorbol-13-acetate (Sigma) を最終濃度10ng/mlになるように接種し、24穴のplastic well (Falcon) に1 mlづつ入れ、48時間、37℃、5% CO₂下にて培養。48時間後の浮遊している非付着細胞を、抗生剤不含のmediumで

3回洗浄し、新しい抗生剤不含のmediumで満たし、これをTHP-1細胞由来マクロファージとする。

Jurkat細胞は 2×10^6 /mlに調整し、24穴のplastic well (Falcon) に1 mlづつ入れ浮遊したままの状態を実験に使用した。

4. *L. pneumophila* 菌液・培養上清液の作成

BCYE- α 寒天培地で、35℃、5% CO₂にて4日間培養した菌を使用し、抗生剤不含のmediumに懸濁し、McFarland barium sulfate standard set (Difco) にて適当な菌量に調整して実験に用いた。培養上清液はBYE- α 液体培地で、37℃にて4日間、振盪培養し、得られた菌液を3000/ml in、15分間遠心し、得られた上清を用いた。

5. THP-1細胞由来マクロファージに対する *L. pneumophila* 菌のapoptosis誘導能

THP-1細胞由来マクロファージに 2×10^6 CFU/mlに調整した菌液を接種。接種後、2時間非感染菌(マクロファージ内に侵入していない菌)をwash outする目的で、抗生剤不含のmediumで3回洗い、35℃、5% CO₂存在下にて培養した。培養開始後、48時間にてmediumを除去、PBSを1ml加え、水中で30分間incubateし、pipettingにて細胞を剥がし、得られた細胞を検体とした。

6. THP-1細胞由来マクロファージに対する *L. pneumophila* の培養上清のapoptosis誘導能

THP-1細胞由来マクロファージに100 μ lの培養上清液を接種。35℃、5% CO₂にて培養する。培養開始後、48時間にてmediumを除去、PBSを1ml入れ、水中で30分間、incubateし、pipettingにて細胞を剥がし、得られた細胞を検体とした。

7. Jurkat細胞に対する *L. pneumophila* の培養上清のapoptosis誘導能

Jurkat細胞に25、75、100 μ lの培養上清液を接種。接種後、35℃、5% CO₂にて20時間培養する。培養後に得られた細胞を検体とした。陽性コントロールとしてanti-Fas monoclonal Antibody (MBL) を最終濃度1 μ g/mlになるように接種した検体を用いた。

8. apoptosis検出

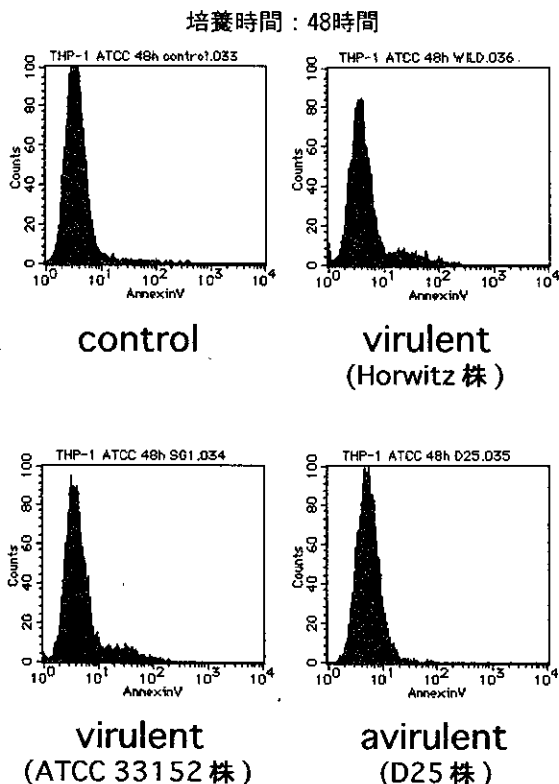
Annexin V-FITC Kit (TaKaRa) を使い、フローサイトメトリーにて検出する。上記3、4、5にて得られた検体をPBSにて1回洗浄し、Annexin Binding Bufferに懸濁後、FITC標識されたAnnexin V5 μ lとpropidium iodide10 μ lを加え、暗所で10分間反応させる。再び、PBSにて洗浄。洗浄後、PBSに懸濁しapoptosis細胞を検出し、ヒストグラムにて解析した。

結 果

1. THP-1細胞由来マクロファージに対する *L. pneumophila* 菌のapoptosis誘導能

図1に示す。Virulent株では、Horwitz株、ATCC 33152株ともにapoptosis細胞が検出された。一方、avirulent株のD25株では、全く検出されなかった。

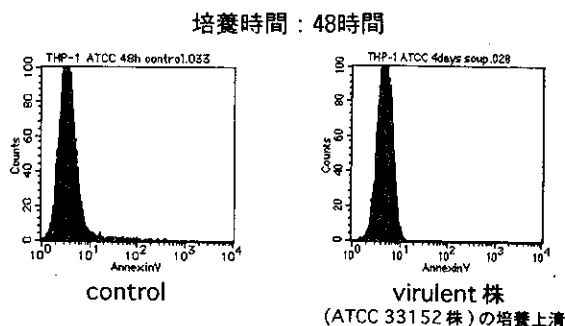
図1. ヒト単球系THP-1細胞由来マクロファージに対する *Legionella pneumophila* 菌のapoptosis誘導能



2. THP-1細胞由来マクロファージに対する *L. pneumophila* の培養上清のapoptosis誘導能

図2に示す。ATCC 33152株の培養上清を用いた場合、THP-1細胞由来マクロファージにapoptosisは誘導されなかった。

図2. ヒト単球系THP-1細胞由来マクロファージに対する *Legionella pneumophila* 菌の培養上清のapoptosis誘導能



3. Jurkat細胞に対する *L. pneumophila* の培養上清のapoptosis誘導能

図3に示す。20時間の培養で、Jurkat細胞は抗Fas抗体により、apoptosisが誘導されているが、ATCC 33152株の培養上清を25、75、100 μ l接種した場合、いずれの量においても、Jurkat細胞のapoptosisは誘導されなかった。

考 察

*Shigella flexneri*¹⁾や *Mycobacterium tuberculosis*^{2, 3)}などの細胞内寄生菌が host に感染し、host に apoptosis を誘導することが報告され、*L. pneumophila* についても、近年、同様の報告^{4, 5)}があるが、apoptosis が誘導される意義について不明な点が多い。現在のところ、その解釈には2つの仮説がある。すなわち、宿主側よりみると、apoptosis 誘導により、細胞内寄生菌の viability が減少したり⁶⁾、その増殖能を抑制、さらに増殖の場を失わせて感染防御に働くという考えと、菌側からは、菌がapoptosis細胞の中に取り込まれたままであることにより免疫機構よりescapeできる。つまり、別のマクロファージに貪食されて、新しいhost

に免疫の影響を受けずに侵入できる、という仮説もある。

今回、我々は、フローサイトメーターを用い apoptosis 細胞を定量的に検出可能な実験系にて実験を行った。この系について、生細胞は、元々、細胞膜内側に phosphatidylserine を有しているが、細胞が apoptosis を起こした場合、この phosphatidylserine が細胞外側に表出される⁷⁾。この phosphatidylserine に対し選択的な親和性がある Annexin V⁸⁾ というタンパクを FITC で標識し蛍光させて、フローサイトメーターで apoptosis 細胞を検出・解析するという方法である。

In vitro における *L. pneumophila* のヒト単球系 THP-1 細胞由来マクロファージへの感染において、host に対する apoptosis 誘導能は菌の病原性と関係があることが示唆される。さらに、apoptosis には菌そのものが必要で、菌体外成分のみでは apoptosis は誘導されないことも明らかにされた。しかし、この in vitro の感染系では、培養開始後、48 時間で菌が細胞内で十分に増殖していることは確認している (data not shown) が、中には増殖が悪い細胞もある。apoptosis が誘導される条件として、菌が細胞内に侵入することが必要であるのか、

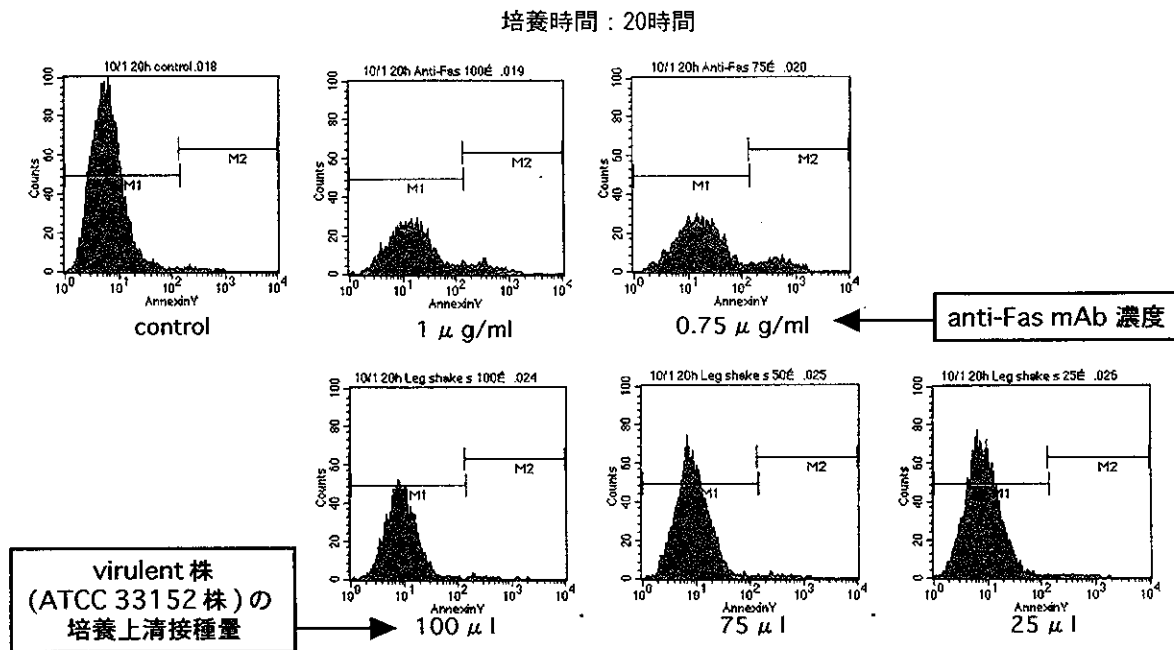
あるいは付着するだけでも apoptosis が誘導されるのかなどの点については、電子顕微鏡などを用いた他の顕微鏡学的な検討も必要である。

また、*L. pneumophila* に対するヒトでの免疫機構において細胞性免疫が重要な役割を果たしているのは言うまでもないが、その主な担い手であるリンパ球に対し *L. pneumophila* がどのように関わっているかについては、菌体外成分はリンパ球に対しては apoptosis の誘導能はないと思われる。また、菌そのものと incubate しても apoptosis は誘導されなかった (data not shown)。

結 論

L. pneumophila がその host に対し、apoptosis を誘導していることは、今回の実験結果や他の研究者の報告からも明らかであるが、その意義などについて、今後、さらなる研究が必要である。また、その解明に Annexin V を用いたフローサイトメーターによる解析は有用な手段になると考えられる。

図3. ヒトTリンパ球系 Jurkat 細胞に対する *Legionella pneumophila* 菌の培養上清の apoptosis 誘導性





文 献

1. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. Nature 1992;358(6382):167-169.
2. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, et al: Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. J Immunol 1998;161:2636-2641.
3. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG et al: Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 1997; 65:298-304.
4. Gao LY, Abu Kwaik Y: Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. Infect Immun 1999;67:862-870.
5. Muller A, Hacker J, Brand BC: Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. Infect Immun 1996;64:4900-4906.
6. Oddo M, Renno T, Attinger A et al: Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1998;160:5448-5454.
7. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 1992;148:2207-16.
8. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R et al: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J Biol Chem 1990; 265:4923-8.

レジオネラ肺炎のCT所見

研究協力者：

倉敷チェストカンファレンスグループ

松島敏春、中島正光、宮下修行、吉田耕一郎、沖本二郎、原 宏紀
石田 直、里見和彦、杉村 悟

分担研究者：

川崎医科大学呼吸器内科学講座

二木芳人

Computed tomography manifestations of *Legionella* pneumonia

Toshiharu Matsushima¹⁾, Masamitsu¹⁾ Nakajima, Nobuyuki¹⁾ Miyashita, Koichiro Yoshida, Jiro Okimoto, Hiroyuki Hara, Tadashi Ishida, Kazuhiko Satomi, Satoru Sugimura and Yoshito Niki

¹⁾ Kurashiki Chest Conference Group and ²⁾ Kawasaki Medical School Respiratory Medicine

研究要旨

肺炎を診断するには画像所見が必要である。胸部単純X線写真より胸部CT写真がより微細な陰影を描出し、より詳細に陰影を解析できることが知られている。私どものグループで経験したレジオネラ肺炎のうち、写真が撮影されていた7例を検討した。その結果、キルト様外観を呈する淡い浸潤性陰影と気管支透亮像の明瞭な均等性陰影が全ての症例で認められ、前者の炎症が強くなるにつれ、不均等性陰影を経て均等性陰影へ移行するものと思われた。また、レジオネラ肺炎の基本陰影であるキルト模様の淡い浸潤性陰影を来す機序として気管支血管系の拡張、肥厚を主体とするキルト模様と軽度の滲出物による肺胞性病変の存在が推察された。胸部X線単純写真で認められない微細な陰影をCT画像は示していたが、陰影分布に関しては単純X線写真所見とCT所見の間にそれ程の差がないように思われ、強い低酸素血症を説明できるか否かに疑問が残った。



はじめに

胸部画像所見として浸潤陰影を認めることは、肺炎を診断する際の必須事項である。肺炎は胸部単純X線所見から、主に均等性陰影を呈する大葉性肺炎、主に不均等性陰影を呈する気管支肺炎、主に間質性陰影を呈する急性間質性肺炎の三つに通常分けられている。

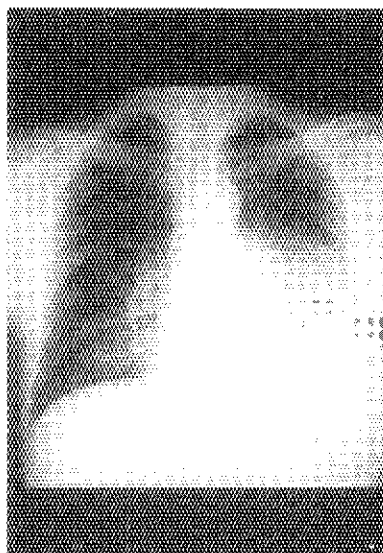
CT写真は単純X線写真よりも、より鮮明に、より詳細に病変を描出できる。そこで今回はレジオネラ肺炎のCT写真を観察し、レジオネラ肺炎の基本となる陰影は何であるか、間質性陰影とされている陰影はどの様に解釈できるか、レジオネラ肺炎の特徴の一つである強い低酸素血症をCT像から説明できるか、などのことを検討したいと考え本研究を行った。



対象並びに方法

対象としたのは、倉敷 Chest カンファレンスグループに属する6施設で経験したレジオネラ肺炎のうち、CT写真が撮影されていた7症例である。年齢は36歳から88歳まで、全例男性であった。診断の

図1. 症例4の胸部正面像左中、下肺野に浸潤影があり、右中、下肺野にも僅かに認められる

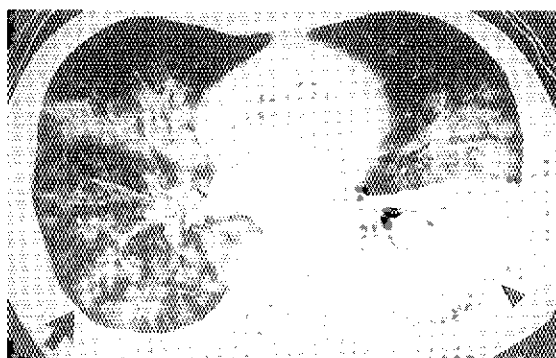
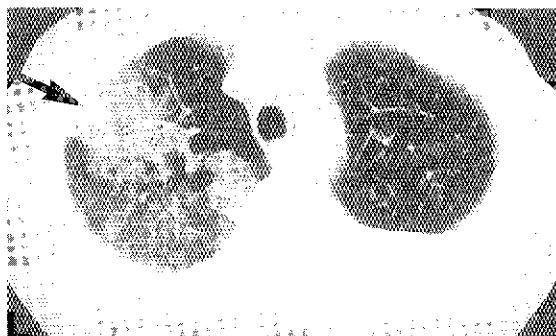


根拠は血清抗体価の上昇をもってなされており、菌が分離されたのは1例のみであった。臨床症状や検査所見などもレジオネラ肺炎として矛盾しないものであった。

臨床所見、画像所見ともにretrospectiveな検討であり、チャートを調べて貰い、胸部単純X線写真とCT写真を読影した。

CT所見を次のように分類した。図1は色々の所見を呈した症例4の胸部正面像である。そのCT所見が図2で、最も広く存在する陰影で、右上肺野でその特徴が最もよく分かるキルト模様(あるいはレース模様)を持った淡い濃度上昇が見られ、これをキルト様外観を呈する淡い浸潤性陰影とした。この陰影は間質の病変を示すものとされている陰影に近いものである。右下肺に見られる陰影は気管支の走行に沿った不均等の陰影であり、気管支肺炎を思わせる陰影である。左下肺葉で認められるのは明らかな気管支透亮像を伴った均等性の陰影で、広がり問題があるとはいえ、大葉性肺炎で見られるものである。この、大葉性肺炎、気管支肺炎、間質性肺炎様

図2. 上肺野のCT像(上の図)でキルト模様の陰影(長い矢印)が、下肺野のCT像(下の図)の右肺野で気管支の走行に沿った不均等陰影(短い矢印)と気管支透亮像を伴った均等影(矢頭)が認められる



の3つの型にCT陰影を分類した。陰影の程度に関しては、著明にみとめられるもの(+++)、明らかに認められるもの(++)、認められ得るもの(+)、認められないもの(-)の4段階で表現した。

病変の広がりには、単純X線写真では左右肺を上、中、下肺野に分けて6等分し、CT写真では、更にこれに腹側、背側を加えて12等分した。

結 果

1. レジオネラ肺炎のCT陰影

レジオネラ肺炎6例がどのような陰影を呈したかを見たのが表1である。キルト様模様の浸潤陰影と気管支透亮像を伴った均等性陰影は全ての症例で認められていた。一方気管支肺炎様の不均等陰影は半数にしか認められず、著明な所見でもなかった。その他の陰影として粒状陰影や線状陰影の認められた症例もあった。なお、この所見は肺炎病巣の陰影を検討したものであり、胸水やリンパ節腫脹などは入っていない。

表1 レジオネラ肺炎の基本病変 (CT所見)

症例	キルト様外観を呈する 淡い浸潤陰影	気管支の走行に沿う 不均等性陰影	air-bronchogramの 明瞭な均等性陰影	その他
1	+	-	+++	
2	++	++	+	
3	++	-	++	
4	++	+	+++	
5	+	-	+++	粒状影
6	+++	+	++	線状影
7	+	-	++	

図3は症例1の胸部レントゲン正面像である。右上、中、下肺野に淡い浸潤陰影があり、横隔膜の変形、挙上を来している。その中肺野をCT像(図4)で見ると、気管支透亮像を伴った均等性陰影が明らかに見られ、その周囲にキルト模様の淡い濃度上昇域があり、血管陰影の拡張も認められる。図5はその下肺野のCT像である。正面写真では明らかでない小さい血管の拡張と淡い濃度上昇域が限局性無気肺像の周囲や、更にその腹側の方まで広範囲に広がっている様子が見られる。同じく胸部正面像では陰影が明らかでない上肺野のCT(図6)を見ると、末梢

図3. 症例1の胸部正面像 右横隔膜の変形、挙上を伴って右上、中、下肺野に淡い浸潤陰影を認める

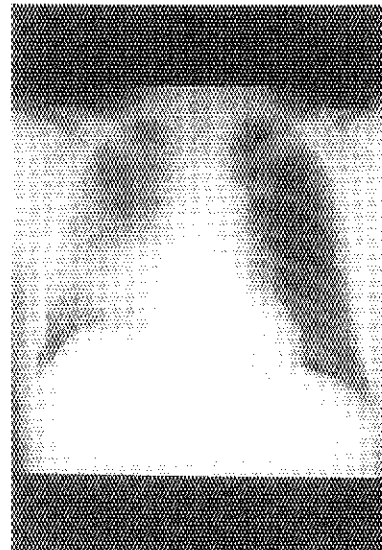


図4. 症例1の中肺野のCT像 気管支透亮像を伴った均等性陰影が辺縁部に認められ、その周囲に広範囲にキルト模様の陰影が認められる。血管陰影は拡張肥厚している

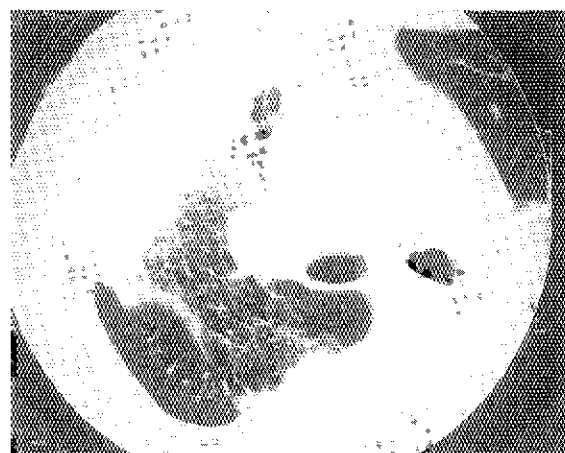
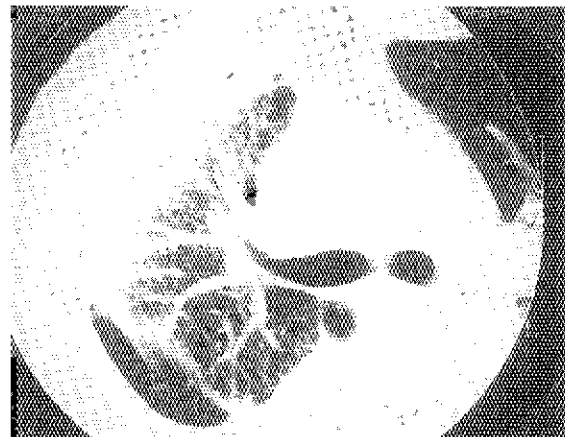


図5. 症例1の下肺野のCT像

胸部正面像では明らかでない。左下肺野の陰影（血管の拡張と淡い濃度上昇）

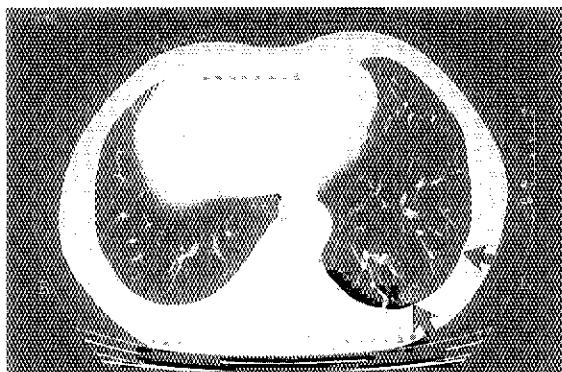


図6. 症例1の下肺野のCT像

同様に淡い濃度上昇域が広がっている。

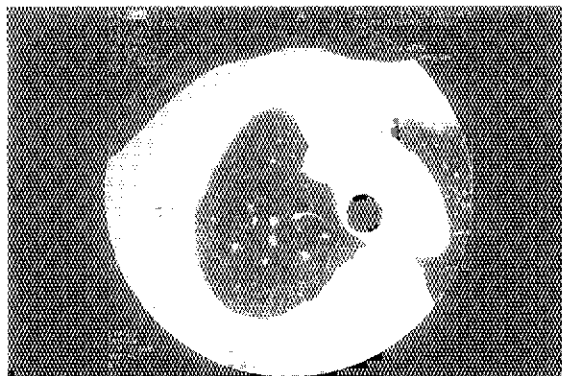
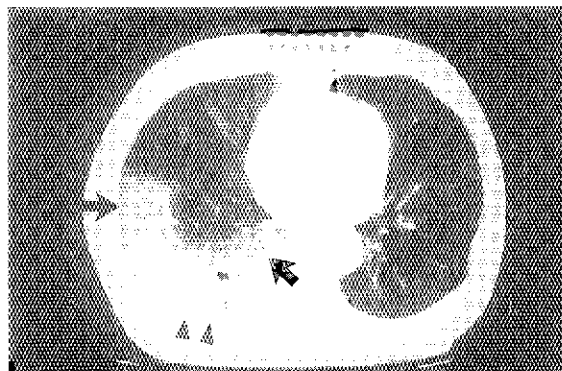


図7. 症例2のCT像

背側に不均等陰影（矢頭）があり、その周囲、殊に腹側にキルト模様の陰影（矢印）があり、気管支血管束の肥厚がみられる。



側に小さい血管の拡張と、小葉間隔壁の肥厚と、淡い濃度上昇域が認められる。

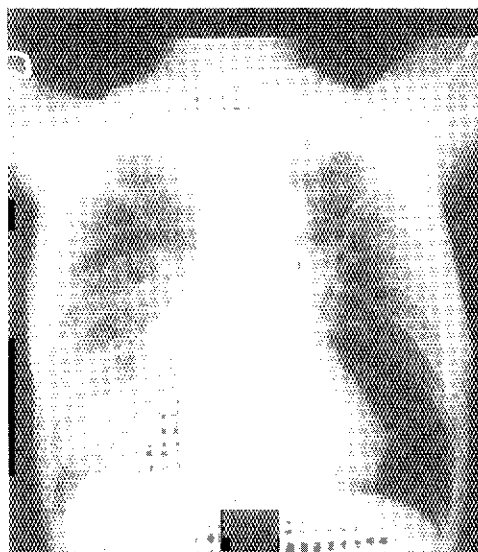
図7は症例2のCT像である。右肺背側に、気管

支血管に沿った不均等性陰影が見られその周囲、腹側にキルト模様の陰影があり、その中に血管陰影の拡張した像があり、最前方の葉間膜に接する部分でそれが最も良く認められている。

図8は症例6の胸部正面像である。本患者はレジオネラ肺炎で40℃を越える発熱があり、来院途中に交通事故を起こしていた。従って、左第6肋骨に骨折があり、右中、下肺野に不均等性の浸潤陰影が認められる。その下肺野のCT像（図9）では均等性陰影、不均等性陰影があり、その周囲広範にキルト模様の陰影が認められる。両側に胸水があり、左肺の血管も拡張しているように見える。同側中肺野のCT像（図9）ではキルト模様の陰影が主体となっており、また左肺広範に小さい血管の拡張と極めて淡い濃度上昇域がある。

図8. 症例6の胸部正面像

右中下肺野に核状影を主体とした浸潤影が認められる。



2. キルト模様の陰影

図10は症例5のCT像である。キルト模様の所はもとより、正常のように見える右肺腹側でも血管陰影の拡張が見られる。更にその上方（図11）で見ると、血管陰影の拡張がより鮮明で、接線方向では粒状に見える。更に上方（図12）でもなお、血管陰影の拡張が見られる。すでにしめした、図5、図6、図7などでも血管陰影の拡張が見られていた。すなわち、キルト模様の陰影、あるいはその周辺で血管

陰影の増強のあり、これがキルト模様の枠、ある

図9. 症例6のCT像

均等影（矢頭）。不均等影（短い矢印）も認められるが、その周囲に広範囲にキルト模様の浸潤影（長い矢印）を認める。胸部正面像で異常のないような左肺にも血管影の拡張と淡い濃度上昇を認める（太い矢印）

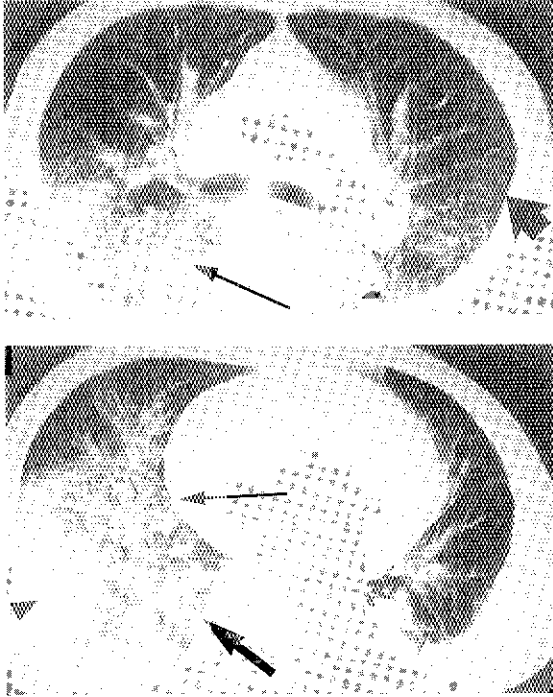


図11. 症例5の右中肺野のCT像

血管陰影の拡張像が著明で、接線方向では粒状に見える。



図10. 症例5のCT像（下肺野）

キルト模様の浸潤影が広汎に広がる。気管支血管束肥厚が透見される。



図12. 症例5の上肺野のCT像

上肺野に至っても血管陰影の拡張像を認める

