

**岩手医科大学
学位審査報告**

氏 名 お が わ け い こ
小 川 恵 子
学 位 の 種 類 博士（歯学）
学 位 授 与 番 号 岩医大院歯博第242号
学 位 授 与 の 日 付 平成21年3月11日
学 位 論 文 題 目 *Mycoplasma salivarium* におけるヌクレアーゼの存在とその特性

論文内容の要旨**I 研究目的**

マイコプラズマは、核酸塩基をはじめ多くの生合成経路を欠くため、動植物に寄生しヌクレオチドを宿主細胞から得ており、この獲得の際にヌクレアーゼが関与するものと考えられている。これまでに種々のマイコプラズマでヌクレアーゼの存在が明らかにされているが、口腔マイコプラズマ *M. salivarium* においては、その存在は明らかになっていない。そこで本研究では、*M. salivarium* が宿主細胞内に寄生した際に病原性の発現に寄与するかどうかを知ることを目的として、ヌクレアーゼ活性の有無とその酵素学的特性について検討すると共に、真核細胞の核クロマチン DNA に対する、ヌクレアーゼによる切断活性を調べた。

II 研究方法

菌体を回収後、1% Triton X-114 を含む TBS にて可溶化しライゼート (Lys) を得た。これを遠心分離し、上から上清 (Tx)、界面層 (Det) とした。さらに残った沈殿を 2% SDS を含む TBS で抽出し可溶性画分 (SDS) を得た。各画分を 1 mM Ca^{2+} を含む緩衝液中にてサケ精子 DNA と反応を行い酵素活性を測定した。さらに各画分のヌクレアーゼ活性とその分子量を調べるために、基質としてサケ精子 DNA を含むゲルにて電気泳動後 1 mM Ca^{2+} 存在下で 37°C 8 時間ゲル内消化を行い、ゲルをエチジウムブロマイド染色しヌクレアーゼにより切断、分解された DNA を黒く抜けたバンドとして観察した (SDS-PAGE nuclease assay)。この方法により、粘性が少なく操作の容易な Tx を酵素画分として用い、二価金属イオン要求性、温度感受性、至適 pH の検討を行った。基質特異性の検討は、Tx とそれぞれの基質を直接反応させ、アガロースゲル電気泳動法により解析した。また、HS-72 細胞より裸核を調製し、これを Tx 画分と各時間反応させた後、通常通りイソプロパノール沈殿を行い、同じくアガロースゲル電気泳動法により核クロマチン DNA の切断を検討した。

III 研究成績

活性測定を行った結果、Tx, Det 画分において比活性が高値を示した。SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイを行った結果、Lys, Tx, Det, SDS の 4 つの画分すべてに主として 25 kDa のヌクレアーゼ活性を認めた。活性測定と SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイの結果より Tx と Det 画分に主に活性が存在した。2 価金属イオン要求性では、 Ca^{2+} (1 mM) 存在下にて活性が促進されることが示された。他の 2 価金属イオンでは、 Mg^{2+} , Zn^{2+} や Mn^{2+} で活性は抑制された。また、5 mM の EDTA や EGTA の添加により Ca^{2+} による活性上昇は完全に阻害された。温度安定性においては、65°C, 15 分や 100°C, 5 分処理においても活性は維持されたことから耐熱性が示された。また、至適 pH を調べたところ、活性は 6~10 と広範囲で認められ、至適 pH は 7~9 であった。さらに、基質特異性の検討を行った。基質に、環状二本鎖 DNA のプラスミド pBluescript, 直鎖状二本鎖 DNA の λ DNA, Eco RI で切断した pBluescript, 一本鎖 DNA の ssDNA と RNA を用い、Tx 画分と共に各時間反応を行い、アガロースゲル電気泳動により切断活性を調べたところ、すべての基質に対し、時間の経過とともに、切断活性がみられた。最後に、ヌクレアーゼが真核細胞の核内クロマチン DNA を切断するかどうかを HS-72 細胞を用いて検討を

行った。核と Tx 画分をインキュベートすると、DNA の切断活性を認めた。以上の結果より、*M. salivarium* には他の細菌類で報告されているものとは異なる Ca^{2+} 依存性で、分子量 25 kDa のヌクレアーゼが存在することが明らかになった。

IV 考察及び結論

これまでに知られているマイコプラズマヌクレアーゼには、 Ca^{2+} 要求性で分子量 33 kDa の *M. hyopneumoniae* ヌクレアーゼや Mg^{2+} と Ca^{2+} を活性発現に必要とする分子量 40 kDa の *M. penetrans* ヌクレアーゼなどがあるが、本研究において *M. salivarium* ヌクレアーゼは Ca^{2+} のみを活性発現に必要とし、分子量 25 kDa の新規のヌクレアーゼであることが明らかになった。さらに本酵素は、真核細胞の核クロマチン DNA を切断することから、宿主細胞に寄生した際に病原因子となり得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 石 崎 明 (口腔生化学講座)

副査 教授 水 城 春 美 (口腔外科学第一講座)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔微生物学講座)

マイコプラズマは、核酸塩基の生合成経路を欠くため、動植物に寄生した際に、自身のヌクレアーゼを利用して宿主細胞の核酸を切断することにより、その生存に必要な核酸塩基成分を獲得すると考えられている。これまでに種々のマイコプラズマにおいてヌクレアーゼ活性の存在が確認されているが、口腔マイコプラズマ *M. salivarium* においては、その存在は明らかではない。そこで、本研究では SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイを用いて、*M. salivarium* 菌体可溶化成分中にヌクレアーゼ活性が認められるかについて調査した。その結果、*M. salivarium* 菌体可溶化成分中には、分子量約 25 kDa のヌクレアーゼが存在していることが明らかとなった。さらに、本ヌクレアーゼの特徴を生化学的に分析したところ、 Ca^{2+} によりその活性が促進されること、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} ならびに Mn^{2+} ではその活性が抑制されることが判明した。加えて、 65°C で 15 分、あるいは 100°C で 5 分処理しても酵素活性は保たれたことから、この酵素は耐熱性を有すること、また、その至適 pH は 7.9 であることや、二本鎖 DNA ならびに一本鎖 DNA と RNA の全てに対しヌクレアーゼ活性を示すことが判明した。最後に、真核細胞から裸核を調製し、これと本ヌクレアーゼをインキュベートしたところ、核内クロマチン DNA に対しても切断活性を有することが判明した。

以上の結果より、本研究ではこれまでに報告のある *M. hyopneumoniae* における Ca^{2+} 要求性で分子量 33 kDa のヌクレアーゼや *M. penetrans* における Ca^{2+} ならびに Mg^{2+} 要求性で分子量 40 kDa のヌクレアーゼとは異なる新規のマイコプラズマヌクレアーゼであることが判明した。さらに、本酵素は真核細胞の核クロマチン DNA を切断することから、*M. salivarium* が宿主細胞に寄生した際、宿主細胞 DNA に傷害を与える可能性が示唆された。このように、本研究が口腔マイコプラズマの病原性発現を解明する基盤となるものと期待されることから、本研究成果を学位に値するものと評価した。

試験・試問の結果の要旨

学位申請者本人より、本研究の背景、目的、研究結果、ならびに今後の研究活動の方向性について詳細な説明がなされた後、これらの事項に関連する試問を行った結果、いずれも的確な解答が得られた。また、学位申請者は豊富な生化学的知識を有し、熟練した研究手技を身につけていると判断されることから、学位を得るに十分な学識と研究能力を有すると判定した。