

Streptococcus sanguis I の菌体外核酸 分解酵素 (DNase) について

本田 寿子 浜田 育男 田近 志保子
柳原 敬 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座* (主任: 金子 克教授)

[受付: 1982年5月17日]

抄録: 細菌の産生する菌体外 deoxyribonuclease (以下 DNase と略す) は *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus pyogenes* などで良く知られているが口腔レンサ球菌についてはまだ報告がない。

私たちは *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* I, II, *S. mitis*, *S. salivarius* の DNase 産生能について検討したところ, 以下の成績を得た。

1. *S. mutans*, *S. sanguis* I, II, *S. mitis*, *S. salivarius* の中で *S. sanguis* I のみが嫌気性培養下で DNase を産生したが, 好気性, 5% CO₂ 培養, ローソク法では DNase を産生しなかった。
2. *S. sanguis* I Challis 株を液体培養し, 培養液上清から得た粗酵素画分を DNA に作用させ, 活性を測定したところ, 粗酵素画分は DNA と反応し, 反応10分後には 260nm での吸収がみられ, 活性は時間の経過と共に高まった。

この成績から粗酵素画分は菌体外 DNase であることが確認された。

緒 言

細菌の産生する菌体外 DNase は *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens* についての報告が多くみられる。

Staphylococci では *S. aureus* の性状の1つである coagulase 産生能と DNase 産生能の一致率が非常に高いことから *S. aureus* の鑑別上有用な性状¹⁾ として重要視されている。

また *S. pyogenes* を他の溶血レンサ球菌から²⁾, *Serratia marcescens* を Enterobacteriaceae から鑑別³⁾ する性状として DNase 産生能が注目されてきた。

私たちは口腔レンサ球菌の DNase 産生能について検討したところ *S. sanguis* I が菌体外 DNase を産生する事を見い出したので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株: *S. mutans* E 49, Fa-1, GS 5, 6715, LM 7, 分離菌株11株, *S. sanguis* I ATCC 10556, Challis, 分離菌株85株, *S. sanguis* II ATCC 10557, 分離菌株17株, *S. mitis* ATCC 9811, 分離菌株23株, *S. salivarius* ATCC 13412, 分離菌株20株, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 6302, *Serratia marcescens* 分離菌株の各1株, 計169株である。
2. 培地: Todd Hewitt broth (以下 TH broth と略す, BBL), DNA 培地 (栄研), Toluidine blue O-DNA 培地 (0.01% Toluidine blue O-DNA 培地), Methyl green DNA 培地 (0.05% Methyl green-DNA 培地), 6.5% 食塩加 Trypticase soy broth (BBL),

Extracellular deoxyribonuclease of *Streptococcus sanguis* I

Hisako HONDA, Ikuo HAMADA, Shihoko TAJIKA, Takashi YANAGIHARA and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate medical University, Morioka, 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7 : 118-123, 1982

40%胆汁加血液寒天培地, Arginine 培地 (tryptone 5 g, yeast extract 10 g, K₂HPO₄ 2 g, glucose 5 g, arginine 3 g, 精製水 1000ml), Methylene blue milk 培地 (skim milk 100 g, 1% methylene blue 水溶液 100ml, 精製水 1000ml), 糖分解用基礎培地 (beaf extract 1 g, proteose peptone No. 3 10 g, NaCl 5 g, phenol red 0.018 g, 精製水 1000ml)

3. 培養: 前培養はすべて TH broth を用い, 37°C, 20時間培養した。

4. DNase 産生能の検討¹⁾: DNA 寒天培地を用い塩酸で判定する方法—DNA 寒天培地に前培養菌を1白金耳接種し, 37°C, 20時間培養後, 1 N塩酸を寒天平板全面に注ぎ, 発育した集落の周囲に透明帯の生じたものを陽性とした。

Toluidine blue O-DNA 寒天培地による方法—接種, 培養法は上記の方法に従い, 培養後, 発育した集落の周辺が青色からピンク色に変色したものを陽性とした。

Methyl green-DNA 寒天培地による方法—接種, 培養法は上記の方法に従い, 培養後, 発育した集落の周囲が無色になったものを陽性とした。

4. 生物学的性状検査: 10°C, 45°C での発育—TH broth に前培養菌を1白金耳接種し, 10°C, 45°C で培養, 発育の有無を観察した。40%胆汁加血液寒天培地上での発育—40%胆汁加血液寒天培地に前培養菌を画線培養し, 37°C, 48時間培養後, 発育の有無を判定した。Arginine の加水分解性—Arginine 培地に前培養菌を1白金耳接種し, 37°C, 48時間培養後, ネスラー試薬 0.1ml を滴下し, 培養液が褐色になったものを陽性とした。Methylene blue milk 還元性—Methylene blue milk 培地に前培養菌を接種, 37°C, 24時間培養後, 青色が消えたものを陽性とし, 変色しなかったものを陰性とした。糖分解性—糖分解用基礎培地に glucose, maltose, lactose, sucrose, trehalose, salicine, maltose, inuline, arabinose, xylose, glycerine, mannit, sor-

bit, raffinose を1%に加えて用い, 前培養菌1白金耳を接種し, 37°C で培養, 7日間観察し, 培養液が黄色になったものを陽性とした。

5. 培養法の検討:

好気性, ローソク法による培養, 5%CO₂培養(炭酸ガス培養ふらん器による), GasPak法による嫌気性培養の4つの方法による培養条件で検討した。

6. DNase の分離と活性測定

DNase の分離—図1に示した方法に従って *S. sanguis* 1 Challis 株を 500mlのTH broth で37°C, 18時間培養後, 4°C, 6000 r. p. m. 30分間, 遠心し, その上清を減圧下で150mlに濃縮した。これに固型硫酸アンモニウム 110 g を加え, 90%飽和し, 4°C 1夜静置後, 遠心してその沈澱を飽和硫酸水で洗浄し, 生理食塩水 40ml に溶解したものを粗酵素画分とした。DNase 活性の測定—0.0001 M Mgcl を含む 0.001 M Tris-HCl buffer で 500μg/ml に調整した(仔牛胸線, P-L) 0.2ml と粗酵素画分 0.05ml を37°C で反応させ, 10分毎に 0.2 N 過塩素酸 2 ml で反応を停止させて, 分光光度計(島津 UV210)を用い, 260nm で吸光度を測定した。

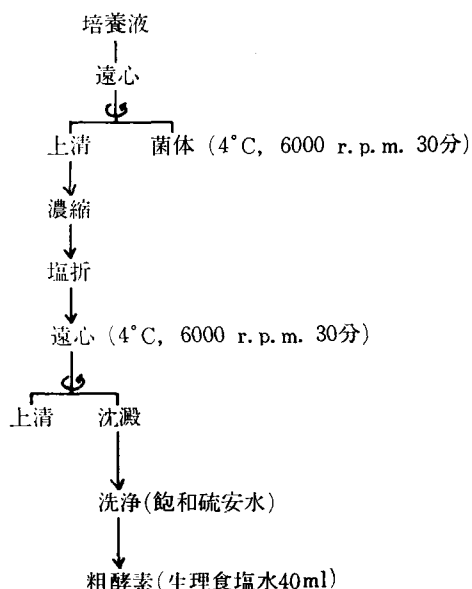


図1 菌体外 Deoxyribonuclease の分離

実験成績

1. 口腔レンサ球菌の DNase 産生能

はじめに *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* の産生能を Toluindine blue O-DNA 培地を用いて調べた。

培養は好気性、嫌気性の2方法で行い、表1に示す成績を得た。すなわち *S. sanguis* I では ATCC 10556, Challis 株のみが DNase を産生し、この DNase 産生能は嫌気性培養法でのみ認められ、好気性培養法では認められなかった。DNase を産生する菌として従来知られている *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Serratia marcescens* を対照として DNase 産生能を調べたが、*S. aureus*, *S. pneumoniae* は好気性、嫌気性いずれの培養法でも DNase を産生し、*S. pneumoniae*, *Serratia*

表1 口腔レンサ球菌の DNase 産生能

供試菌株	培養法	
	好気性	嫌気性
<i>Streptococcus mutans</i>		
E49	-	-
Fa-1	-	-
GS5	-	-
6715	-	-
LM7	-	-
<i>Streptococcus sanguis</i> I		
ATCC 10556	-	+
Challis	-	+
<i>Streptococcus sanguis</i> II		
ATCC 10557	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>		
ATCC 9811	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>		
ATCC 13412	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>		
ATCC 25923	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
ATCC 10389	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
ATCC 6302	+	-
<i>Serratia marcescens</i>		
	+	-

表2 口腔レンサ球菌分離株の DNase 産生能

分離菌株 (175株)	培養法	
	好気性	嫌気性
<i>Streptococcus mutans</i> 30株	-	-
<i>Streptococcus sanguis</i> I 85株	-	+
<i>Streptococcus sanguis</i> II 17株	-	-
<i>Streptococcus mitis</i> 23株	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> 20株	-	-

marcescens では好気性培養法でのみ DNase を産生した。以上の成績は塩酸法や、Methyl green-DNA 培地による判定でも同じであった。

S. sanguis I ATCC 10556, Challis 株が嫌気性培養法でのみ DNase を産生することがわかったので口腔レンサ球菌分離株についても DNase 産生能を調べた。その成績をまとめると(表2) *S. sanguis* I 分離株85株は全て嫌気性培養で DNase を産生し、*S. sanguis* II と他の *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* の分離株は好気、嫌気いずれの培養法でも DNase を産生しなかった。

2. DNase 産生能に及ぼす O₂, CO₂ の影響

O₂, CO₂ の存在と DNase 産生能との関係調べてみた。いずれも37°C, 20時間培養したが *S. sanguis* I ATCC 10556, Challis 株, 分離菌株85株は好気性培養法, ローソク法, 5% CO₂ 培養法で十分な発育を示しているにもかかわらず DNase 産生は陰性で GasPak 法による O₂ の全く存在しない嫌気性培養法でのみ DNase 産生が陽性となった。*S. sanguis* II ATCC 10557, 分離菌株17株はいずれの培養法でも DNase を産生しなかった。(表3)。また *S. mutans* E49, Fa-1, GS5, LM7, 6715, 分離菌株30株, *S. mitis* ATCC 9811, 分離菌株23株, *S. salivarius* ATCC 13412, 分離株20株ではいずれの培養法でも DNase を産生しなかった。

表3 DNase 産生能に及ぼす O₂, CO₂ の影響

供試菌株	培養法	O ₂ (好気性)	CO ₂ (ローソク法)	5% CO ₂ (CO ₂ 培養法)	CO ₂ +H ₂ (GasPaK 法)
<i>Streptococcus sanguis</i> I ATCC 10556 Challis		—	—	—	+
		—	—	—	+
	分離菌株 85株	—	—	—	+
<i>Streptococcus sanguis</i> II ATCC 10557		—	—	—	—
	分離菌株 17株	—	—	—	—

3. 好気性, 嫌気性培養法による生物学的性状の比較

O₂ の存在が *S. sanguis* I の DNase 産生能だけでなく代謝にも影響を及ぼしているのではないかと考え, 好気性, 嫌気性培養下で *S. sanguis* I ATCC 10556, Challis 株と分離菌株85株について生物学的性状を比較検討した。10°C, 45°Cでの発育, 6.5%食塩加培地, 40%胆汁加血液寒天培地上での発育の有無, Arginine 水解性, Methylene blue milk の還元性, glucose, maltose, sucrose, inuline, lactose, arabinose, xylose, glycerine, mannit, sorbit, raffinose の糖分解能の成績は *S. sanguis* I ATCC 10556, Challis 株, 分離菌株85株, すべて好気性, 嫌気性培養での結果は一致するものであった。

4. *S. sanguis* I Challis 株の菌体外 DNase についての検討

DNA 培地上で認められた DNase 産生株 *S. sanguis* I Challis 株の DNase が菌体外 DNase であるかどうかを検討した。*S. sanguis* I Challis 株を TH broth で培養し, 遠心により菌体を除いた培養液上清部分について DNase 活性を測定した。その結果, 図2に示したように反応10分後には O.D. 260nm での吸収がみられ, DNase 活性を示した。また活性は時間の経過とともに高まる傾向を示した。

菌体を除いた培養液上清部分に DNase 活性を認めたので, この DNase は菌体外 DNase である事が明らかになった。

考 察

S. sanguis の産生する DNase についての研究はこれまでに Starosciak, B. J.⁹⁾ らによる報告があり, 彼らは *S. sanguis* I Challis 株の endonuclease について検討している。しかし菌体外 DNase についての報告は未だみられない。

私たちは口腔レンサ球菌の DNase 産生能について検討し *S. sanguis* I のみが DNase 産生能をもつという結果を得た。この DNase 活性は菌体を除いた培養上清中に認められ DNA 基質を含む寒天平板培地上でも確認され, 菌体外 DNase と考えられる。

S. sanguis では *S. sanguis* I ATCC 10556, Challis, 分離菌株は全て DNase を産生したが *S. sanguis* II ATCC 10557, 分離菌株17株

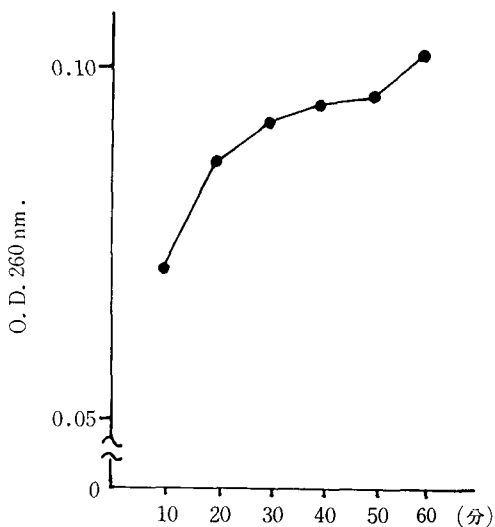


図2 菌体外 Deoxyribonuclease 活性

は DNase を産生しなかった。*S. sanguis* I は Arginine を水解し, inuline, raffinose 非分解の性状を示し, *S. sanguis* II は Arginine を分解せず, inuline 非分解, raffinose 分解性を示すものとして分類されている⁶⁾。*S. aureus*, *S. pyogenes* や *Serratia marcescens* などでは DNase 産生能を鑑別の 1 指標として用いているが, *S. sanguis* I の DNase 産生能も他の口腔レンサ球菌の中から *S. sanguis* I を鑑別する 1 つの性状になり得るのではないだろうか。

また DNase 産生能の機構については Joeje, H.⁷⁾らは *Bacillus subtilis* について noncompetent cell では DNase を菌体外に放出しないが,これを初期培養42°Cから37°Cに切り換えて培養したところ competent cell になり, DNase を菌体外に放出したと報告している。同時に彼らはこの noncompetent, competent の状態における細菌の形態を光学顕微鏡で観察し, competent cell は球菌様に膨化し, noncompetent cell とは著しく異なることを報告している。

私たちは *S. sanguis* I を好気性, 嫌気性培養条件下で培養したところ, 嫌気性培養下での

み DNase 産生を見出したが, これらの条件下での細菌の形態を光学顕微鏡で観察すると, 嫌気性培養下で DNase を産生している場合はレンサ球菌としての形態を示したが, 好気性培養下で DNase を産生しない状態では著しく膨化し, 球桿菌状を呈しているのが観察された。Starosciak, B. J.⁸⁾らが noncompetent cell の *S. sanguis* I からとり出している DNase と, 私たちが嫌気性培養下で見出した菌体外 DNase を考えあわせると, 先に述べた *B. subtilis* の noncompetent cell と competent cell のように細菌細胞の形態や機能的変化が菌体外に DNase を放出する一因になっているとも考えられる。

結 論

S. mutans, *S. sanguis* I, II, *S. mitis*, *S. salivarius* の菌体外 DNase を検討したところ, *S. sanguis* I のみが菌体外 DNase を産生し, この DNase 産生能は好気性培養, ロック培養, 5%CO₂ 培養では見られず, Gas-Pak法による嫌気性培養でのみ産生がみられた。

Abstract : Deoxyribonuclease of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens* has been known.

However, the production of DNase by oral streptococci, hitherto have not been reported.

In this report the production of extracellular DNase by oral streptococci, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis* and *S. salivarius* was examined, and the following results were obtained.

1. Only *S. sanguis* produced when incubated under anaerobic condition, but not under aerobic condition, in CO₂ incubater or candle jar. On the other hand, *S. mutans*, *S. mitis* and *S. salivarius* did not produced any condition.

2. Crude enzyme fraction of *S. sanguis* I Challis strain was obtained from supernatant of culture broth, and its DNase activity was determined.

From these results it was concluded that the crude enzyme fraction isolated culture of *S. sanguis* I was extracellular DNase.

文 献

- 1) Barbara, G. W. : Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bact.* 73:747-753, 1956.
- 2) 山田俊彦, 設楽政次, 佐藤 恭, 菊池百合子, 奥田 稔: 溶血性連鎖球菌の核酸分解酵素に関する

臨床細菌学的研究. 感染症学雑誌, 53:329-333, 1979.

- 3) Janice, B.S. : Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Amer. J. Clin. Path.* 51:711-716, 1968.
- 4) Macfaddin, J. F. : Biochemical tests for

- identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams & Wilkins., Baltimore, 94-113, 1980.
- 5) Starosciak, B.J. and Dobrzanski, W.T. : Deoxyribonuclease of *Streptococcus sanguis*. *Acta Microbiol. pol.* 29 : 35-48, 1980.
- 6) Lennet, E. H., Balous, A., Hausler, W. Jr., and Trauant, J. P. : Manual of clinical microbiology, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 88-110, 1980.
- 7) Joenje, H. and Venema, G. : Different nuclease activities in competent and noncompetent *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 122 : 25-33, 1975.
- 8) Espinosa, M., Joenie, H. and Venema, G. : DNA binding and deoxyribonuclease activity in *Bacillus subtilis* during temperature-induced competent development. *J. Gen. Microbiol.* 121 : 79-84, 1980.