

## *Streptococcus sanguis* I DNase の分離精製

濱田 育男 本田 寿子 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15日]

**抄録:** *Streptococcus sanguis* I の嫌気培養液上清から DNA を分解する DNase を分離し, その生化学的性状を検討した。

DEAE-Sephadex A-50イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過法によりその精製度は約6倍であった。さらに Sephadex G-100によるゲル濾過で fr. a と fr. b が分画された。各々の分子量は約24,000と約8,000であった。これらの DNase の至適 pH域は pH7.0~9.0にあり, その間に2つのピークが存在した。

Mg イオンの添加により活性化され, Ca イオンでは阻害された。一方, RNA に対しては活性を示さず native DNA に高い活性を示し, 熱変性 DNA に対しては30%ほど活性が低下した。

### 緒 言

我々はヒト口腔内より分離したレンサ球菌の中で *Streptococcus sanguis* I のみが嫌気的条件下で DNA 分解をする Deoxyribonuclease (以下 DNase と略す。) を産生することを見だし報告した<sup>1)</sup>。細菌の産生する DNase に関してはすでに A 群レンサ球菌<sup>2)</sup>をはじめとし, 大腸菌, ブドウ球菌<sup>3)</sup>, 緑膿菌<sup>4)</sup>およびセラチア<sup>5)</sup> など数多くの微生物があげられており, その生化学的性状が詳細に検討されている。特に A 群レンサ球菌の産生する DNase はその特異抗体が本菌感染症の患者血清中に見いだされることから臨床的に血清診断に利用されている<sup>6)</sup>。

一方, ヒト口腔内に常在するレンサ球菌のひとつである *Streptococcus sanguis* の DNase についての報告は少なく, 特に菌体外に放出される DNase については全く知られていない。今回, 我々は *Streptococcus sanguis* I の嫌気培養液上清中に見いだされた DNase の分離お

よび精製を試み, その生化学的性状を検討したので報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1) 使用菌株および培養方法

使用菌株は *Streptococcus sanguis* I Challis (NCTC 7868), 分離株として *Streptococcus sanguis* I T5 (いずれも当教室保存株) を使用した。培養は Todd Hewitt Broth (BBL) 500ml に  $1 \times 10^6$ /ml 濃度の菌液 1.0 ml を接種し 37°C, 18時間 GasPak 法による嫌気培養を行った<sup>1)</sup>。

#### 2) 酵素の分離および精製

培養液を 4°C, 6,000r.p.m. 20分間遠心して菌体を除き, 上清約 500ml を減圧下で約 150 ml に濃縮した。これに固型硫酸を 90% 飽和になる様に加えて, 4°C で一夜静置後, 生じた沈殿を 4°C, 6,000r.p.m. 30分間遠心し, 飽和硫酸水で数回洗浄後, 生食水約 40ml に溶解し, これを粗酵素 (crude fraction) とした。

Isolation and purification of extracellular deoxyribonuclease from *Streptococcus sanguis* I

Ikuo HAMADA, Hisako HONDA, 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り1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7 : 124-130, 1982

### 3) DEAE-Sephadex A-50イオン交換クロマトグラフィー

Crude fraction を DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) カラム (2.5×15cm) に吸着させ、step wise に 0.1M, 0.2M, 0.3M NaCl 塩濃度で溶出した。1 fraction, 3.0ml ずつフラクションコレクターで集めた。

### 4) ゲルクロマトグラフィー

ゲル濾過剤は Sephadex G-100 (Pharmacia) を用い、カラムは 1.5×50cm のものを使用した。void volume の算出は Blue dextran 2,000 (Pharmacia) を使用し、溶出した蛋白は UV モニター (ATTO) で検出しレコーダー上に記録した。また、1 fraction, 1.0ml ずつフラクションコレクターで集め DNase 活性の測定も行った。以上の操作は全て 4°C で行った。

### 5) 分子量の測定

既知分子量の標準蛋白質を用い Sephadex G-50 fine (Pharmacia) でゲルクロマトグラフィーを行い、その溶出容量から検量線を作製した。使用した標準蛋白質は Molecular Weight Markers. Sigma, (Lysozyme: 14,300Mw,  $\beta$ -Lactoglobulin: 18,400Mw, Trypsinogen: 24,000Mw, Pepsin: 34,000Mw, Egg Albumin: 45,000Mw, Bovine Albumin: 66,000Mw) である。

これらを、0.02M 2-mercaptoethanol 加 0.02M phosphate buffer に 10mg/ml 濃度に溶解し、おのおのの混合あるいは単独でクロマトグラフィーを行いレコーダー上のピークの位置から溶出容量を算出した。使用したカラムは 1.5×50cm,  $V_0=44.0$ ml, Flow rate=9.3ml/hr (平均) である。

### 6) 酵素活性の測定

#### a) DNA 寒天平板法

DNA 寒天培地 (栄研) を用いてシャーレに平板を作製し酵素液を入れる well ( $\phi=5$ mm) をあけ、酵素液をマイクロピペットで注入した。37°C, 60分間反応後 1.5N HCl を平板上に十分に満たし well の周囲に透明帯が認められたものを DNase 活性陽性とした。

#### b) RNA 寒天平板法

RNA (トルラ酵母製: 和光) を 0.5% となる様に、2% 濃度に Bact agar (Difco) を加えた 0.001M MgCl<sub>2</sub> 加 PBS (pH 7.0) で、十分に加熱溶解後、シャーレに注ぎ平板を作製した。DNA 寒天平板法と同様に酵素液を入れる well ( $\phi=5$ mm) をあけた。37°C, 2時間反応後、1.5N HCl を注ぎ well 周囲に透明帯が認められたものを活性陽性とした。また、Ribonuclease コントロールとして Ribonuclease (牛脾臓製: 和光) 10mg/ml PBS を使用した。

#### c) UV 測定法

DNA (仔牛胸腺製:P-L) を 0.0001M MgCl<sub>2</sub> 加 0.001M Tris-HCl buffer (pH 7.0) に 500 $\mu$ g/ml 濃度に溶解した。この DNA 基質液 200 $\mu$ l に酵素液 50 $\mu$ l を正確に加え、37°C で一定時間反応させた。さらに 4°C に冷やした 0.2N HClO<sub>4</sub> 液 2.0ml を加えて 10分間静置し 3,000r.p.m. 15分間遠心後、上清を取り分光光度計 (島津 UV-210) で紫外部 260nm の吸光度を測定し、37°C, 60分間に吸光度が 0.001 増加する酵素量を 1 unit とした。

#### 7) 蛋白質の定量

紫外部 280nm における吸光度と Lowry-Folin 法<sup>7)</sup> で、標準蛋白質は Bovine Serum Albumin F-V (Armour) を用い、検量線を作成した。

#### 8) 至適 pH 域値の測定

あらかじめ調製しておいた 0.0001M MgCl<sub>2</sub> を加えた 0.05M phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0) のそれぞれの溶液に DNA を 500 $\mu$ g/ml 濃度に溶解し、これを DNA 基質液とした。

酵素液 50 $\mu$ l に対し、DNA 基質液 200 $\mu$ l を加え 37°C, 60分間反応後、0.2N HClO<sub>4</sub> 液 2.0ml を加え 10分間静置後、3,000r.p.m. 15分間遠心し上清を取り 260nm での吸光度を測定した。

#### 9) Mg イオンおよび Ca イオンの影響

MgCl<sub>2</sub> および CaCl<sub>2</sub> は十分乾燥したものを使用し、それぞれの 0.1M, 0.05M, 0.01M, 0.005

M, 0.001M の 5 段階の希釈溶液を作った。そして DNase 50 $\mu$ l に対し同量を加え DNA 基質液 200 $\mu$ l と 37°C, 60 分間反応させ 8) と同様の方法で活性を測定した。

#### 10) 熱変性 DNA の調製

DNA を 0.0001M MgCl<sub>2</sub> 加 0.001M Tris-HCl (pH7.4) に 500 $\mu$ g/ml 濃度に溶解し 100°C, 10 分間加熱した。加熱後は急冷し 4°C に保存した。

#### 11) 電気泳動法

電気泳動は澱粉ブロックを支持体とした。Hydrolyzed starch (Mann) を phosphate buffer に 4°C, 3 時間以上平衡化して泳動槽に充填した。緩衝液は phosphate buffer I = 0.1, pH=7.8, 泳動槽は 0.5(H) × 1.5(W) × 24(L)cm, 泳動は 200V, 3 時間の条件で行った。通電終了後、澱粉ブロックを 1cm ずつ切り出し、蒸留水 2.0ml で抽出し蛋白量と DNase

活性を測定した。

## 実験成績

### 1. DNase の収量と活性

*Streptococcus sanguis* I Challis (NCTC 7868) 株と T 5 株(分離株)の培養液上清中から硫酸沈殿法で DNase を分離し、さらに DEAE-Sephadex A-50 とゲル濾過で精製した。収量と活性との関係は表 1 の通りである。Challis 株, T 5 株とも同様であり、精製度は 5~6 倍であった。(表. 1)

### 2. DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィー

step wise に各 NaCl 塩濃度で溶出したが最初に溶出する neutral 画分に高い DNase 活性ならびに蛋白量が認められた。また、Challis 株, T 5 株とも収量, 活性ともに同様であり、差異は認められなかった。(図. 1, 2)

Table 1. Activity of DNase at various stages of purification

Strain	Preparation	Volume(ml)	DNase activity(units/ml)	Protein(mg/ml)	Activity(units/mg)
T 5	Crude fraction	35	5440	3.38	1611.9
	DEAE fraction	104	982.8	0.54	1820
	fr. a	13	390	0.15	2600
	fr. b	4	750	0.08	9375
Challis	Crude fraction	38	1720	1.13	1522
	DEAE fraction	122.5	627.3	0.41	1530
	fr. a	10.5	400	0.12	3333
	fr. b	3	850	0.09	9444

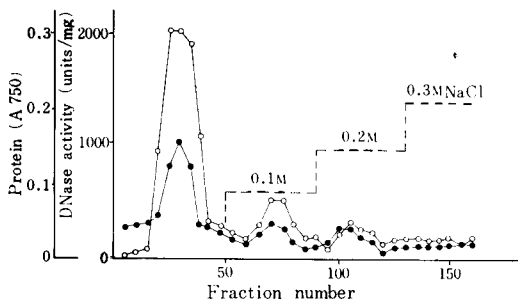


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of T 5 crude fraction

○—○ : Protein  
●—● : DNase activity

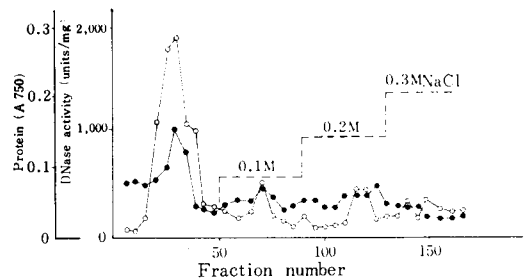


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of Challis crude fraction

○—○ : Protein  
●—● : DNase activity

3. Sephadex G-100, G-50カラムクロマトグラフィー

DEAE-Sephadex カラムで得られた neutral 画分を Sephadex G-100でゲル濾過を行った。分画々分は2つあり、それぞれに活性が認められ、fr.a, fr.bとした。(図. 3, 4)

また, Sephadex G-50カラムで既知分子量の標準蛋白の溶出容量より見かけの分子量を算出した。fr.a は約24,000, fr.b は約 8,000 付近であった。(図. 5)

4. DNA および RNA に対する反応性

DNA に対して crude fraction を用いて10分から60分まで活性を測定した。その結果、時間の経過とともに吸光度が増加し60分ではほぼ当量域に達した。(図. 6)

DEAE-Sephadex 画分, fr.a, fr.b ともに経時的に O. D. 値が上昇した。一方、寒天平板法においても各画分とも透明帯を形成した。ま

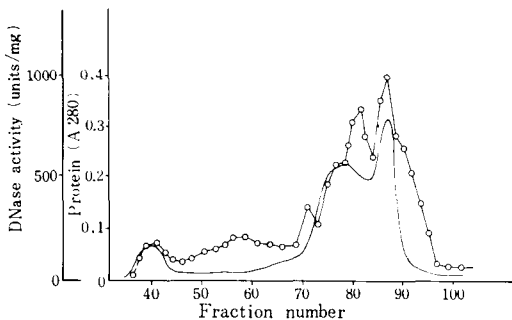


Fig. 3. Gelfiltration on Sephadex G-100 column of T 5 DNase  
Solidline : Protein  
○—○ : DNase activity

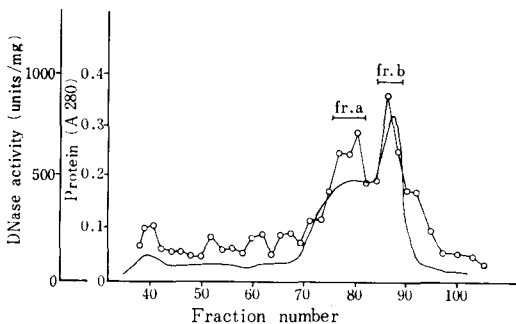


Fig. 4. Gelfiltration on Sephadex G-100 column of Challis DNase  
Solidline : Protein  
○—○ : DNase activity

た, RNA に対して本酵素は活性を示さず DNA のみと反応した。(図. 7)

5. Mg および Ca イオンの影響

MgCl<sub>2</sub> および CaCl<sub>2</sub> の 0.001M, 0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M 溶液を添加して反応を行なったところ, MgCl<sub>2</sub> の添加によって本酵素は活性化された。その至適濃度は60分反応時間で 0.005M~0.01M 濃度付近であった。一方, CaCl<sub>2</sub> の添加では変化は見られず, 高濃度では逆に阻害される傾向が見られた。(図. 8)

6. DNase の至適 pH 域値の測定

pH 5.5から pH10.0の10段階で DNase 活性

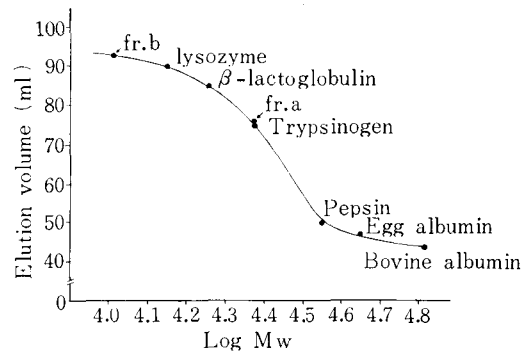


Fig. 5. Calibration curve of standard proteins on Sephadex G-50 column

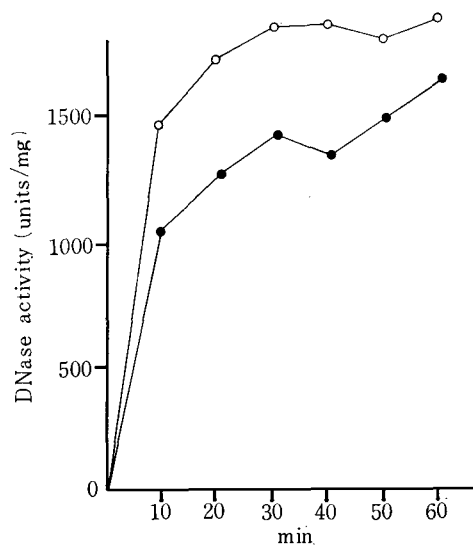
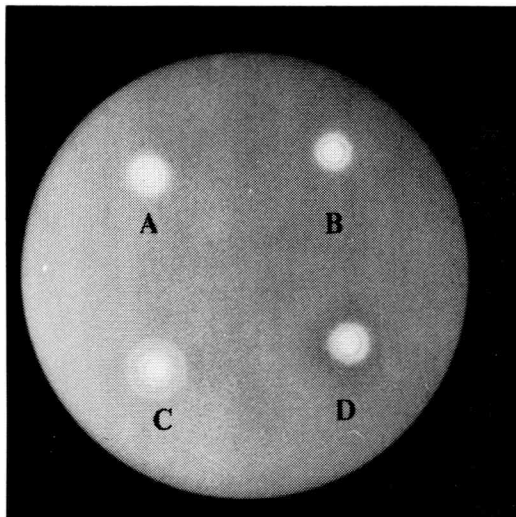
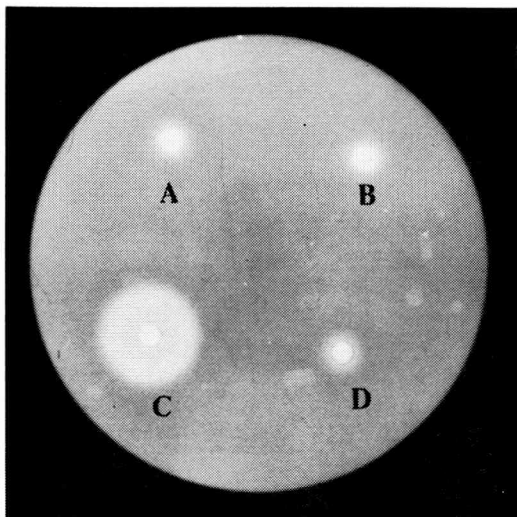


Fig. 6. Activity of DNase crude fraction  
●—● : Challis  
○—○ : T 5



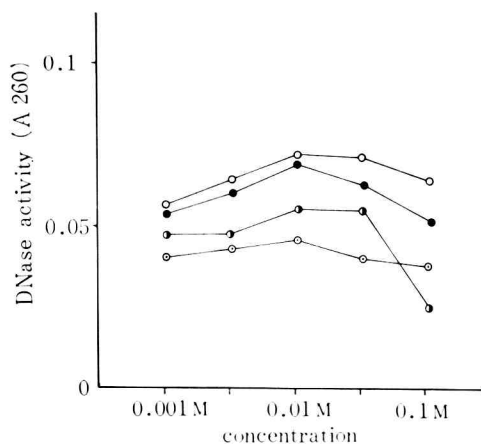
DNA agar plate



RNA agar plate

**Fig. 7.** Enzymatic activity of various stages of DNase preparations on DNA and RNA agar plate

A : fr. b, B : fr. a, C : RNase, D : crude fr.

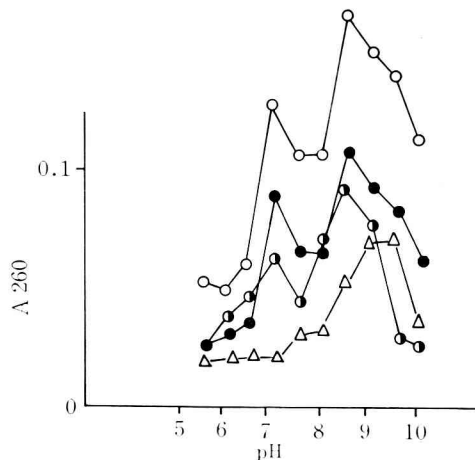


**Fig. 8.** Effects of MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> on DNase activity

- : T 5 + MgCl<sub>2</sub>
- : Challis + MgCl<sub>2</sub>
- ⊙—⊙ : T 5 + CaCl<sub>2</sub>
- ⊙—⊙ : Challis + CaCl<sub>2</sub>

を測定したところ、それぞれの精製画分で少しずつ異なった動向を示した。すなわち、DEAE-Sephadex 画分においては pH 6.5~pH 7.0 付近および pH 8.0~pH 9.5 の二相性のピークを持ち pH の高いところに活性が高く現われた。

fr. a は pH 8.5~pH 9.5 付近のシングルピークを示し pH の低い領域での活性は示さなかつ



**Fig. 9.** Effect of pH on T 5 DNase and Challis DNase activity

- : T 5
- : Challis
- ⊙—⊙ : fr. b
- △—△ : fr. a

た。fr. b においては DEAE-Sephadex 画分と同じ様な二相性のピークを示した。(図. 9)

### 7. 電気泳動法による画分

DEAE-Sephadex の neutral 画分の澱粉ブロック電気泳動を試みた。200V, 3時間の泳動で Fr. A, Fr. B の2つの画分を得た。Fr. A は原点付近に位置し、全体の蛋白量の80%以上で

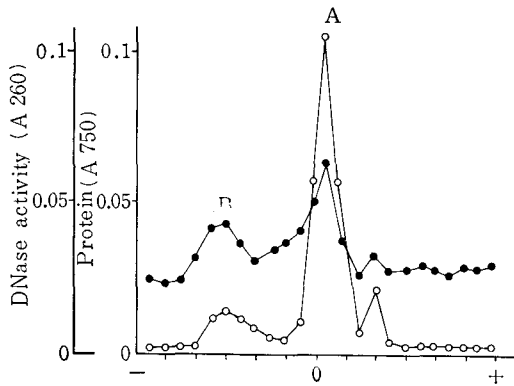


Fig. 10. Electrophoresis of Challis DNase

○—○ : Protein  
●—● : DNase activity

あった。一方 Fr. B は anode 側に移動した。

これらの画分の分子量分布は Sephadex G-50によるゲル濾過の結果 Fr. A は fr. a および fr. b に相当する画分を含むが, Fr. B は低分子量である fr. b に相当するピークを得た。(図. 10)

8. 熱変性 DNA に対する作用

未変性 DNA と加熱変性 DNA に対する本酵素の反応性を比較したところ, 明らかに熱変性 DNA に対する作用は20~30%減弱した。(図. 11)

考 察

*Streptococcus sanguis* の DNase に関する研究は Starosciak ら<sup>6)</sup> の報告のみである。彼らの分離した *Streptococcus sanguis* I Challis 株の DNase は Lysozyme 処理で容易に溶出可能な細胞膜表層に存在し, Sephadex G-200, G-100, G-75そして CM セルロース, 電気泳動による分画の結果, DNase 1, 2, 3 の三酵素画分を得ている。分子量はおおの55,000~57,000, 55,000~56,000, 52,000~53,000という比較的高い分子量であるとしている。さらに, DNase 1, 2の至適 pH 域は pH 7.0であり, DNase 3は pH10.0付近であり三酵素とも Mg イオンで活性化され, Ca イオンでは活性化されず阻害される成績を得ている。また, 熱変性 DNA に対する反応も検討を加え, 未処理の

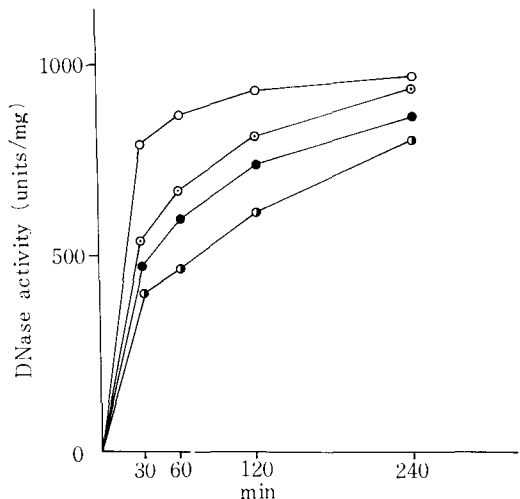


Fig. 11. Response of T5 DNase and Challis DNase activity for thermally denatured DNA

○—○ : T5 DNase+native DNA  
●—● : Challis DNase+native DNA  
○—● : T5 DNase+denatured DNA  
●—● : Challis DNase+denatured DNA

DNA よりも変性 DNA の方が基質になりにくいとしている。

我々が *Streptococcus sanguis* I Challis 株および T5 株の嫌気培養液上清中に見いだした DNase の分離精製を試みて得た成績から, 菌体外に放出される DNase はいくつかの microheterogeneity があるにしても分子量的には2種存在すると思われる。すなわち fr. a, fr. b である。各々の分子量は fr. a が約24,000 fr. b が約 8,000と Starosciak ら<sup>6)</sup> が報告した DNase とは大きく異なった値を示している。しかし, 他の生化学的性状はいくつか似かよった点がある。すなわち Mg イオンで活性化され, Ca イオンでは活性化されない。酵素活性にあたる pH の影響, さらに熱変性 DNA に対する作用が弱く, RNA には作用しないなどである。これらの事柄から菌体表層に存在する DNase と嫌気培養液上清中に見いだされた DNase とは何らかの関わりを持つものと思われる。特に我々の見いだした DNase は好気的条件下では菌体外に放出されず, またこの現象は菌体の糖の分解能など現在まで我々の行なった

実験結果からは代謝系と関わり合いが少ないことなどより、前述の細胞膜表層の DNase が嫌氣的条件下で細胞膜の酸化還元電位の変化により何らかの機構で菌体外へ放出されたものと思われるが現段階では不明である。

今後は Challis 株および T5 株を好気培養し、その菌体を Lysozyme 処理して細胞膜表層に存在する DNase を分離し、我々が得た酵素との関連、すなわち donor であるか否かの点を検討し、合わせて菌体外に放出されるメカニズムを解明したいと考える。さらに、DNase の分離および精製には DNAcellulose あるいは、Cepharose 4 B に DNA を coupling させた Affinity column を作成して、酵素活性の低下を防ぐ上でも特異的に精製する必要があると思われる。

**Abstract :** DNase was separated from culture fluid of *Streptococcus sanguis* I and another biochemical properties of DNase were examined.

The enzymatic activity was purified about 6 fold by DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and further Gelfiltration on a Sephadex G-100 column. Two DNase which designated fr. a and fr. b were fractionated. Molecular weights of these enzyme were determined by Sephadex G-50 gelchromatography, fr. a is 24,000 apporoximately and fr. b is 8,000.

Optimal pH range is 7.0~9.0, there are double peak. This enzyme was activated by the addition of Mg ion, but inhibited by Ca ion.

On the other hand, the enzyme has not activity for RNA (Yeast) and has specific activity for native DNA. The thermally denatured DNA is poor substrate, 30% of activity decreased.

## 文 献

- 1) 本田寿子, 濱田育男, 田近志保子, 柳原 敬, 金子 克 : *Streptococcus sanguis* I の菌体外核酸分解酵素 (DNase) について, 岩医大歯誌. 7 : 〇—〇, 1982.
- 2) Wannamaker, L. W. : The differentiation of three distinct deoxyribonuclease of group A streptococci. *J. Exp. Med.* 107 : 797-814, 1958.
- 3) Macfaddin, J. F. : Biochemical test for identification of medical bacteria., 2nd ed, Williams and Wilkins, Baltimore, 94-113, 1980.
- 4) Streifeld, M. M., Hoffman, M. M., and Janklow, H. M. : Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*.

## 結 論

1. *Streptococcus sanguis* I の嫌気培養液上清から DNase を分離精製した。精製度は 5~6 倍であった。DNase は大別して二種存在し、いくつか isozyme も存在する。
2. 分子量は fr. a 約 24,000, fr. b 約 8,000 であった。
3. 至適 pH 域は pH 7.0 と pH 8.0~pH 9.5 であった。
4. Mg イオンによって活性化され、Ca イオンの高濃度では阻害された。
5. Ribonuclease 活性は見られなかった。
6. DNA に特異性が高く、熱変性 DNA に対して活性が低下する。

*J. Bacteriol.* 84 : 77-80, 1962.

- 5) Nestle, M., and Roberts, W. K. : An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. 1. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244 : 5213-5218, 1969.
- 6) 山田俊彦, 設楽政次, 佐藤 恭, 菊地百合子, 奥田 稔 : 溶血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.
- 7) Lowry, O. H. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 8) Starosciak, B. J., and Dobrzanski, W. T. : Deoxyribonuclease of *Streptococcus sanguis*. *Acta Microbiol. Pol.* 29 : 35-48, 1980.