

Streptococcus sanguis I の産生する Deoxyribonuclease の反応性について

濱田 育男 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：1983年1月17日]

抄録：*Streptococcus sanguis* I の産生する DNase は thymus DNA を分解し、mono-, di-, tri-, tetra- としてさらに大きな oligonucleotide を産生した。これらの nucleotide は Sephadex G-25 によるゲルクロマトグラフィーと 7M 尿素存在下での DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによって検出された。また、0.8%アガロースゲル電気泳動分析において、native thymus DNA だけに作用して、約 2.2×10^5 dalton までに分解した。

しかしながら、 λ phage DNA, fd phage DNA, 熱変性 thymus DNA, 熱変性 λ DNA には全く作用しなかった。

この結果は *Streptococcus sanguis* I の産生する DNase が thymus DNA に対して高い特異性を有していることを示唆する。

Key words : *Streptococcus sanguis* I, reactivity of deoxyribonuclease, gel electrophoresis.

結 言

われわれは、ヒト口腔内に常在する *Streptococcus sanguis* I の菌体外核酸分解酵素 (Extracellular deoxyribonuclease, 以下 DNase と略す。) を分離精製し、いくつかの特徴ある生化学的性状を検討し報告した¹⁾。

DNase の多くのものはその作用の違いから大きく2つに分類されている。ひとつは核酸の内側にあるヌクレオシド間のリン酸エステル結合を加水分解するもので Endonuclease と呼称される。もうひとつは、核酸あるいはポリヌクレオチドの末端に位置するヌクレオチドだけに作用して順序良くモノヌクレオチドを切り出して行く Exonuclease である²⁾。

Streptococcus sanguis I から分離した DNase は RNA にはまったく活性を示さず、熱変性

DNA に対して活性が弱く、native DNA を良く分解する¹⁾ことから endo- 型の酵素と推察される。

そこでわれわれは、本酵素による DNA 分解物の同定ならびに、仔牛胸腺以外の DNA を用いて反応性を検討したので報告する。

材 料 と 方 法

(1) DNase の分離精製

Streptococcus sanguis I (Challis) を 37°C で嫌気培養した液体培地の上清を濃縮し、90%飽和になる様に固型硫酸を加えて沈殿させ、DEAE-Sephadex A-50 で精製したものをを用いた。この酵素分画は 627.3 units/ml の活性を有している¹⁾。

Reactivity of Deoxyribonuclease from *Streptococcus sanguis* I.

Ikuo HAMADA 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. 8 : 29-33, 1983

(2) DNA 基質

native thymus DNA (仔牛胸腺由来, P-L) は0.0001M $MgCl_2$ 加 0.0001M Tris-HCl buffer (pH 7.0) で500 μ g/ml 濃度に溶解した。

λ phage DNA (Miles) は10units/1.1ml 濃度に0.001M Tris, 0.001M NaCl, 0.001M EDTA buffer (pH 7.5) で溶解した。

fd phage DNA (Miles) は0.001M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で10units/0.8ml 濃度に溶解した。

熱変性 DNA は thymus DNA 200 μ l, λ DNA は0.27units/30 μ l を100°C, 10分間加熱したものをを用いた。

(3) アガロースゲル電気泳動

支持体は SeaKem HGT アガロース (Marine Colloids) を用い0.04M Tris, 0.02M CH_3COONa , 0.002M EDTA buffer (pH 7.8) で0.8% (W/V) 濃度に加熱溶解した³⁾。泳動槽は15cm(L)×15cm(W)×0.3cm(H) の大きさのガラス製プレートを用い, 試料孔は0.1cm(L)×1cm(W)×0.3cm(H) とした。電源はオートマチック定電流定電圧装置 PAV-100 (常光) を用い, 室温で50V, 5時間通電した。なお, tracking

dye として0.2% Bromcresol Green (BCG) 溶液を使用した。泳動終了後0.5 μ g/ml の Ethidium bromide で20分間染色し紫外線照射下で DNA バンドを検出し⁴⁾, RI フィルターで写真撮影した。

(4) Sephadex G-25ゲル濾過法および DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー
thymus DNA 200 μ l (500 μ g/ml) と DNase 200 μ l を37°C, 18時間反応させた後, 0.2N $HClO_4$ 溶液2.0ml を加え, 遠心して上清をとり Sephadex G-25 (Pharmacia) カラム (1.5×50cm) でゲル濾過した。最多収量の分画を集め DEAE-Sephacel (Pharmacia) カラム (0.8×15cm) を用いて 7M 尿素存在下で NaCl 濃度0.14~0.3 Mまで linear gradient 溶出を行った。溶出には 7M 尿素を含む0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.0) を用い⁵⁾, 開始 buffer および終了 buffer の合計は600ml であった。

(5) DNA 基質と DNase の反応条件

DNA 基質と DNase の反応条件は表1に示す通りである。

Table 1. Various conditions on the reaction of DNase against DNA substrates

DNA	Volume of DNA(μ g or units)	Volume of DNase	Reaction time at 37°C
native thymus DNA	10 μ l (5 μ g)	200 μ l	18hr
native thymus DNA	10 μ l (5 μ g)	500 μ l	18hr
native thymus DNA	10 μ l (5 μ g)	200 μ l	3hr
native λ DNA	30 μ l (0.27units)	200 μ l	18hr
native λ DNA	30 μ l (0.27units)	500 μ l	3hr
native λ DNA	30 μ l (0.27units)	500 μ l	18hr
native λ DNA	30 μ l (0.27units)	500 μ l	24hr
fd DNA	30 μ l (0.37units)	200 μ l	18hr
fd DNA	30 μ l (0.37units)	500 μ l	18hr
thermally denatured thymus DNA	200 μ l (100 μ g)	200 μ l	18hr
thermally denatured thymus DNA	200 μ l (100 μ g)	500 μ l	3hr
thermally denatured thymus DNA	200 μ l (100 μ g)	500 μ l	18hr
thermally denatured λ DNA	30 μ l (0.27units)	500 μ l	3hr
thermally denatured λ DNA	30 μ l (0.27units)	500 μ l	18hr

clease *Hind* IIIで切断して得られたもので、それぞれ、15.58, 6.36, 4.38, 2.86, 1.49, 1.31, 0.37, 0.092×10^6 dalton の分子量を有する⁶⁾。

成 績

1. Sephadex G-25および DEAE-Sephacel によるクロマトグラフィーの結果から *Streptococcus sanguis* I (Challis) の DNase は thymus DNA に作用し、その分解産物は mononucleotide を含め di-, tri-, tetra- そしてさらに大きな oligonucleotide であった (図1, 図2)。
2. 0.8%アガロース電気泳動分析の結果から DNase は thymus DNA を約 2.2×10^5 dalton (約300 base pair) までに分解した (図3)。図4に DNA 分子量マーカーIIの calibration curve を示す。
3. 本酵素は λ phage DNA (linear duplex) や, fd phage DNA (single stranded circular) に対して、いくつかの反応条件で試みたがいずれの

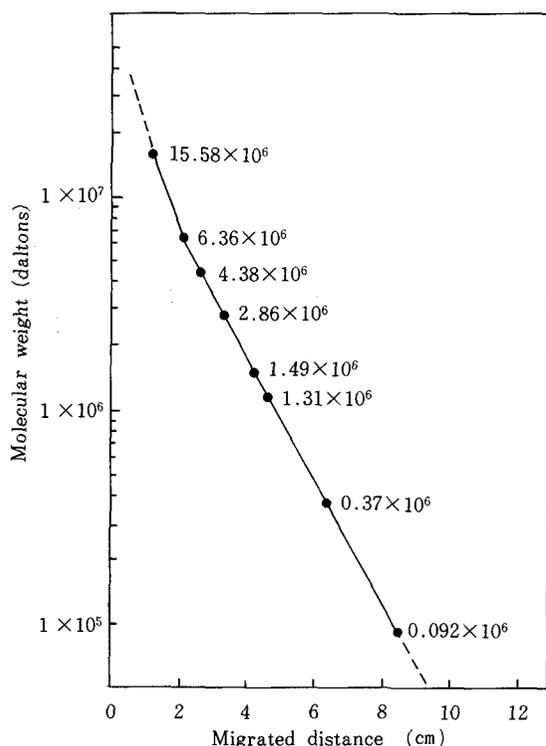


Fig. 4 Calibration curve of DNA-molecular weight marker II on 0.8% agarose gel.

基質に対しても活性を示さず、分子量の低下、および restriction fragment は検出されなかった。

4. 熱変性 thymus DNA, 熱変性 λ phage DNA に対しても同様に反応性は認められなかった。

考 察

Streptococcus sanguis I (Challis) の産生する DNase による Calf thymus DNA の分解で monomer を含めていくつかの oligonucleotide が見いだされた。さらに0.8%アガロースゲル電気泳動分析では大部分 2.2×10^5 dalton 付近まで分解されることから、本酵素の DNA に対する作用は endo- 型に作用すると思われる。

また、通常 DNase 活性を測定する場合、酵素反応の結果生ずる酸可溶性物質を定量することによりその酵素活性を知る方法がとられているが、 2.2×10^5 dalton の分子量をもつ DNA は当然のことながら酸可溶性物質とはならず沈殿してしまうので分解産物として定量されない。このことから、ゲル電気泳動分析を同時に行う必要があると思われる。

一定の分子量からなる linear duplex DNA で約 3.2×10^7 dalton の分子量を有する λ phage DNA に本酵素を作用させて電気泳動分析を試みた。しかしながら、酵素量、反応時間などの条件を変えてみても λ DNA は分解されなかった。同様に single stranded circular DNA である fd phage DNA にも作用させたがまったく活性を示さなかった。さらに thymus DNA, λ DNA を熱処理したものについても試みたが、本酵素による分子量の低下あるいは特定の fragment は検出されなかった。このことは、本酵素は thymus の二本鎖 DNA に作用するが phage 由来の二本鎖 DNA には作用しない。さらに、一本鎖や熱変性 DNA などにも作用せず、native thymus DNA に特異的な活性を有するものと思われる。しかしながら、今回検討した DNA 基質は市販のもので比較的入手しやすく、数が限られたものであるため今後は

いくつかの DNA について検討を加える必要がある。

さらに、本酵素が thymus DNA 以外の動物細胞由来の DNA, あるいは組織培養細胞などの DNA に共通して活性を示し、ウイルス由来の DNA にまったく働かないとすれば、ウイルス DNA を損うことなく組織培養細胞由来の DNA だけを消化し、電気泳動分析におけるバックグラウンドの除去に利用して、ウイルス genome typing の中の有力な手段のひとつとして応用できる可能性がある。

結 論

1. *Streptococcus sanguis* I (Challis) の産生する DNase は thymus DNA を分解し, mono-, di-, tri-, tetra- さらに大きな oligonucleotide を産出した。
2. DNase は, 0.8%アガロースゲル電気泳動分析の結果, native thymus DNA を約 2.2×10^5 dalton までに分解した。
3. λ phage DNA, fd phage DNA, 熱変性 thymus DNA そして熱変性 λ DNA にはまったく作用しなかった。

本研究の要旨は第24回歯科基礎医学会総会(鶴見大学)で発表した。

Abstract : An extracellular deoxyribonuclease separated from *Streptococcus sanguis* I destroyed the thymus DNA and then produced mono-, di-, tri-, tetra- and other oligonucleotides.

These oligonucleotides were determined by the combination of Sephadex G-25 gel filtration and DEAE-Sephacel ion exchange chromatography in the presence of 7M urea.

The results were summarized as follows : Only thymus DNA was hydrolyzed by the DNase and its molecular weight decreased to 2.2×10^5 daltons on 0.8% agarose gel electrophoresis. However, the DNase showed no enzymatic activity for λ phage DNA, fd phage DNA, thermally denatured thymus DNA or thermally denatured λ DNA.

It suggests that the DNase has high specific activity for native thymus DNA.

文 献

- 1) 濱田育男, 本田寿子, 田近志保子, 柳原 敬, 金子 克 : *Streptococcus sanguis* I DNase の分離精製, 岩医大歯誌, 7 : 124-130, 1982.
- 2) Mac Faddin, J. F. : Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams & Wilkins., Baltimore, 94-113, 1980.
- 3) Hayward, G. S. and Smith, G. M. : The chromosome of Bacteriophage T5, I. Analysis of the single stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 63 : 383-395, 1972.
- 4) Aaij, C. and Brost, P. : The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 269 : 192-200, 1972.
- 5) Terner, G. M. : Ion-exchange chromatography in the presence of urea. *Methods in Enzymology.* 12 : 398-404, 1968.
- 6) Philippses, P., Thomas, M. and Kramer, K. : Unique arrangement of coding sequences for 5s, 5.8s, 18s and 25s ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-Loop and hybridization analysis. *J. Mol. Biol.* 123 : 287-404, 1978.