

Streptococcus sanguis I の菌体表層核酸分解酵素 と菌体外核酸分解酵素の比較検討

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9月19日〕

抄録: *Streptococcus sanguis* I を好気培養し, lysozyme で消化後, Brij 58 で処理, そして Sephadex G-100 によるゲル濾過で菌体表層から DNase 活性分画である Fr. I と Fr. II を得た。これらの酵素の至適 pH 域値は 8.5 であった。また, 酵素活性は Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} の存在によって影響されなかった。一方, 菌体外 DNase は Mg^{2+} と Mn^{2+} の添加によって活性化され, Ca^{2+} , Cu^{2+} ではその活性が抑制された。特に Cu^{2+} の高濃度 (0.1 mol/ml) では完全に阻害された。SDS-PAGE による分子量測定で Fr. I の分子量は約 85,000~90,000, Fr. II のそれは約 40,000~45,000 であった。これらの値は菌体外 DNase の分子量 24,000 とは大きくかけ離れている。0.8% アガロースゲル電気泳動分析において, Fr. I と Fr. II はともに native thymus DNA, λ DNA, fd viral DNA そして熱変性 thymus DNA を分解したことを示した。さらに native thymus DNA に対しこの比活性は Fr. I が Fr. II よりも大であったが, λ DNA, fd DNA そして熱変性 thymus DNA に対するそれは, Fr. II が Fr. I より大であった。

以上のことから, 菌体表層 DNase は native thymus DNA だけに作用する菌体外 DNase と比較して, 数種の DNA 基質を分解することから特異性の低い酵素であり, さらに Fr. I と Fr. II はそれぞれ異なる酵素活性を有することが示唆された。

Key words: *Streptococcus sanguis* I, cell surface DNase, extracellular DNase, Isolation.

結 言

著者らはヒト口腔内に常在する *Streptococcus sanguis* I の菌体外核酸分解酵素 (DNase) について, DNase 産生能の検討や酵素の分離精製, DNA 基質に対する反応性および生化学的性状など一連の知見を報告してきた¹⁾²⁾³⁾。

しかしながら, Starosciak ら⁴⁾ の報告した *S. sanguis* I Challis 株の菌体表層に存在するとされる 3 種類の DNase と, 著者らの分離した DNase との関連性についてはまだ不明である。両酵素間には 2 価金属イオンの要求性やその酵素活性に若干の類似点はあるが, 彼らが分離した 3 酵素の分子量はいずれも 50,000 付近に

あって, 著者らが分離した酵素のそれと大きく異っている。また彼らの分子量の決定方法においてゲル濾過の結果と電気泳動の結果とに矛盾があり, 菌体表層にある DNase が donor ではないかという疑いがもたれる。すなわち, *S. sanguis* I の菌体表層には 1) 複数の DNase が存在し, 嫌気状態で, ある特定のユニットのみが遊離される, 2) 巨大 DNase 分子種が存在し, それはいくつかの活性ユニットの集合体からなり, その中のユニットが嫌気状態で遊離される, という可能性が考えられる。今回著者らはこれらの 2 点のいずれであるかを解明するため, *S. sanguis* I の菌体表層 DNase の分離精製を行い, 菌体外 DNase との比較検討を試

Comparative studies on the cell surface DNase and the extracellular DNase of *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 1-3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 8 : 203-211, 1983

みた。

材料と方法

(1) 使用菌株と培養

Streptococcus sanguis I Challis 株および T5 (分離株) を用いた。培養は Todd Hewitt Broth (BBL), 125ml を 500ml の三角コルペンに入れ、 1×10^6 /ml 濃度の新鮮培養菌液 1.0 ml を接種し 37℃, 42時間振盪培養した。

(2) 菌体表面 DNase の分離

培養後、遠沈して菌体を集め PBS (-) 50ml で 3 回洗浄した。これに Lysozyme (Sigma) を 2 mg/ml 濃度に溶解した 0.05M Tris-HCl buffer (pH7.0) 50ml を加え室温で 90分間消化し、Brij 58 (花王アトラス) を 0.1% になる様に加えさらに 90分間放置した。これを 4℃, 6,000rpm, 30分間遠沈し、上清に硫酸プロタミン (関東化学) を 0.25 g 加え、4℃ に 60分間放置した。さらに 3,000rpm で遠沈して沈澱物を除き、0.05M Tris-HCl buffer (pH7.0) 1,000ml に 24時間透析した。つづいてポリエチレングリコール 20,000 (関東化学) で $\frac{1}{10}$ 容に濃縮した (図 1)。

(3) 菌体外 DNase

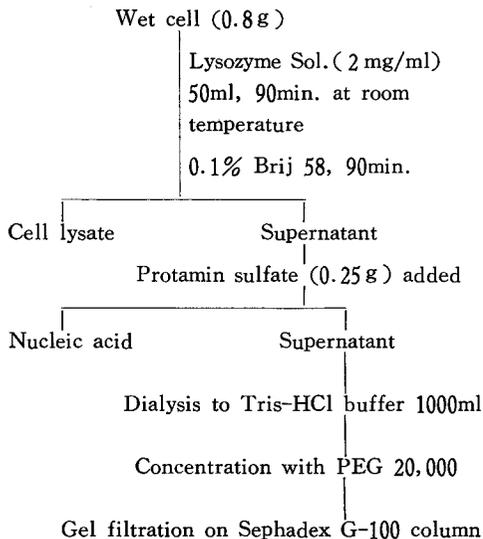


Fig. 1. Isolation of the cell surface DNase from *S. sanguis* I.

菌体外 DNase は *S. sanguis* I Challis 株を 37℃ で嫌気培養した培養液上清に 90% 飽和になるように固型硫酸を加え、生じた沈澱物を PBS に溶解、透析し、DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) および Sephadex G-100 (Pharmacia) で精製した分子量約 24,000 の分画を使用した²⁾。

(4) ゲルクロマトグラフィー

ゲル濾過剤は Sephadex G-100 を用いた。カラムは 1.5×50cm, Blue dextran 2,000 (Pharmacia) で Vo を測定した。1 fraction = 2.0ml ずつフラクションコレクターで集め、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。

(5) 分子量の測定

既知分子量の標準蛋白質を用いて Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)³⁾ を行った。

a) 標準蛋白質

SDS Molecular Weight Markers (Sigma) の MW-SDS-70 Kit と Combithek (Boehringer Mannheim) を用いた。

b) 試薬および緩衝液

A液 (Sample buffer)

NaH ₂ PO ₄	0.34 g
Na ₂ HPO ₄	1.02 g
SDS	1.00 g
2-mercaptoethanol	1.0ml
Bromcresol Green	0.0015 g
尿素	36 g

以上 100ml の精製水に溶解。

B液 (Gel buffer)

NaH ₂ PO ₄	6.8 g
Na ₂ HPO ₄	20.45 g
SDS	2.0 g

以上 1,000ml の精製水に溶解。

C液 (Acrylamide gel)

10%ゲルの調製用として 22.2 g Acrylamide monomer と 0.6 g N, N'-Methyl-bis-acrylamide (和光純薬) を 100ml の精製水に溶解した。5%ゲルはこの半分の量を 100

ml の精製水に溶解した。

D液

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TMEDA) 液。

E液

Ammonium persulfate (100mg/15ml) 溶液。

F液 (Fixative solution)

メタノール	400ml
酢酸	70ml
精製水	530ml
	全量 1,000ml

G液 (Staining reagent)

50%メタノール	454ml
酢酸	46ml
Brilliant Blue R	1.25 g
	全量 500ml

c) ポリアクリルアミドゲルの作製

アクリルアミド (5~10%) 13.5ml

B液 (Gel buffer) 15.0ml

E液 (Ammonium persulfate) 1.5ml

D液 (TMEDA) 0.05ml

各溶液を混和し泳動用ガラス管に注入し、室温でゲル化させた。

d) 試料の調製

試料の蛋白質含量が 1.0 mg/ml になる様に A液で溶解後、100℃, 10分間加熱処理後急冷して泳動用試料とした。

e) 泳動

泳動槽は DISC 電気泳動装置 CD-12F (TOYO), 泳動管は内径 0.6cm, 長さ10cm のガラス製を用い、オートマチック定電流定電圧装置 PAV-200 (常光) を使用した。泳動条件はカラム 1本あたり 5 mA, B. C. G. tracking dye がカラム下端 1 cm のところまで移動したとき (約 5時間) 通電を停止した。

f) 固定・染色・脱色

ゲルを F液で10時間固定し、G液で3時間染色後、F液で脱色し、7%酢酸で保存した。

g) 分子量の算出

分子量マーカー中の蛋白質の移動距離を B. C. G. tracking dye の移動距離で除した相対移動距離と各蛋白質の分子量から検量線を作製して算出した。

(6) DNA 基質液

a. thymus DNA (仔牛胸腺; P-L) は 1mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で 0.5 mg/ml 濃度に溶解した。

b. λ phage DNA (ニッポンジーン) は 0.68 mg/ml 濃度に 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9), 1 mM EDTA で溶解した。

c. fd viral DNA (Miles) は 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 10 unit (OD) / 0.8 ml 濃度のものを用いた。

d. 熱変性 DNA は thymus DNA 基質液を 100℃, 10分間加熱後急冷して調製した。

(7) アガロースゲル電気泳動

SeaKem HGT アガロース (Marine Colloids) を 40 mM Tris-酢酸, 20 mM 酢酸ナトリウム, 2 mM EDTA buffer (pH 7.8) で 0.8 %濃度に加熱溶解した。泳動には同緩衝液を用い、50 V, 10 mA, 5時間通電後 0.5 μg/ml 濃度の Ethidium bromide (Aldrich) で 20分間染色し紫外線照射下で検出した⁹⁾。DNA 分子量マーカー II (Boehringer Mannheim) をコントロールとして使用した。

(8) 蛋白質の定量

紫外部 260 nm による吸収および Bio-Rad Protein Assay を使用した。

(9) その他

DNase 活性, RNase 活性の測定, 酵素の至適 pH 域値の測定および 2 価金属イオンの影響などについては濱田ら²⁾ の方法に準じた。

成 績

1. *S. sanguis* I の好気培養における菌体の収量は Challis 株, T 5 株ともに約 0.8 g であった。lysozyme 消化, Brij 58 処理後, Sephadex G-100 によるゲル濾過で 3 種の蛋白質分画である, Fr. I, Fr. II, Fr. III を得た。Fr. I,

Fr. II は DNase 活性を有するが, Fr. III には認められなかった (表1, 図2, 3)。また RNase 活性はいずれの分画にも認められなかった。

2. native thymus DNA を基質として用いた UV 法による DNase 活性測定から, Fr. I と Fr. II の至適 pH 域値はともに pH 8.5 で,

Table 1. Total recovery of cell surface DNases and protein contents

Strains	Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)
Challis	Fr. I	24	2.05
	Fr. II	10	1.07
T 5	Fr. I	22	2.30
	Fr. II	12	0.98

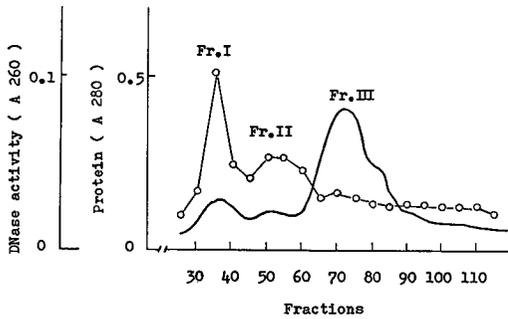


Fig. 2. Gel filtration on Sephadex G-100 column of Challis DNase.
Solid line : Protein,
○—○ : DNase activity

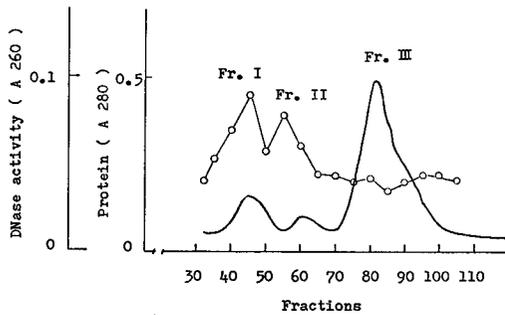


Fig. 3. Gel filtration on Sephadex G-100 column of T 5 DNase.
Solid line : Protein,
○—○ : DNase activity

菌体外 DNase のそれは 9.5 であった。なお Fr. I と Fr. II の DNase 活性は Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} の存在によって影響されなかったが, 菌体外 DNase は Mg^{2+} , Mn^{2+} で活性化され, Ca^{2+} , Cu^{2+} では抑制された。特に Cu^{2+} の

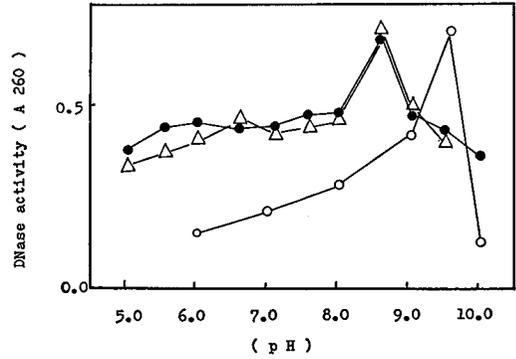


Fig. 4. Optimal pH ranges of the extracellular DNase, Fr. I and Fr. II.
○—○ : extracellular DNase,
●—● : Fr. I
△—△ : Fr. II

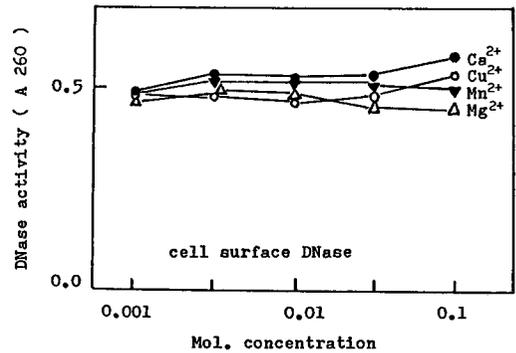
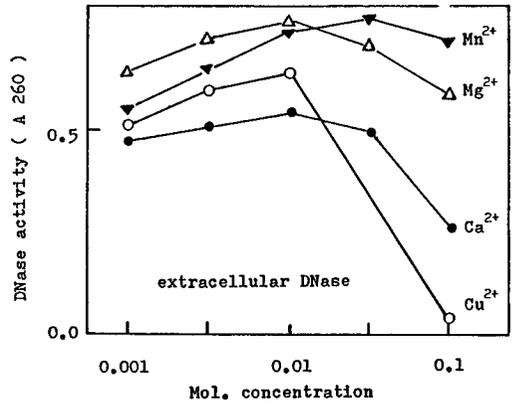


Fig. 5. Effects of metal ions on the DNase activity.

高濃度で完全に阻害された(図5)。

3. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis による分子量測定で Fr. I の分子量は約 85,000~90,000, Fr. II のそれは約 40,000~45,000 の値を得た(図6, 7)。

4. 0.8% アガロースゲル電気泳動析において, Fr. I と Fr. II はともに native thymus DNA λ DNA, fd DNA そして熱変性 DNA に対して活性を示した(図8, 9, 10, 11)。さらに菌体表層 DNase の native thymus DNA に対しての酵素活性は Fr. I が Fr. II より大であるが(図8), λ DNA や fd DNA に対しては Fr. II が Fr. I より大という結果を得た(図

8, 9, 10)。また, 熱変性 thymus DNA に対して Fr. I は native thymus DNA に対するよりもその活性は低下したが, Fr. II では活性低下は認められなかった(図11)。

考 察

Starosciak⁹⁾ らの報告した *S. sanguis* I Challis 株の菌体表層の DNase の存在を確認すべく, 彼らと同様な抽出操作で *S. sanguis* I Challis 株と分離株 T 5 を用いて菌体表層 DNase を分離した。しかし, DNase 活性分画 Fr. I と Fr. II の分子量はそれぞれ, 約 85,000~90,000 と約 40,000~45,000 であり, 彼らの報告

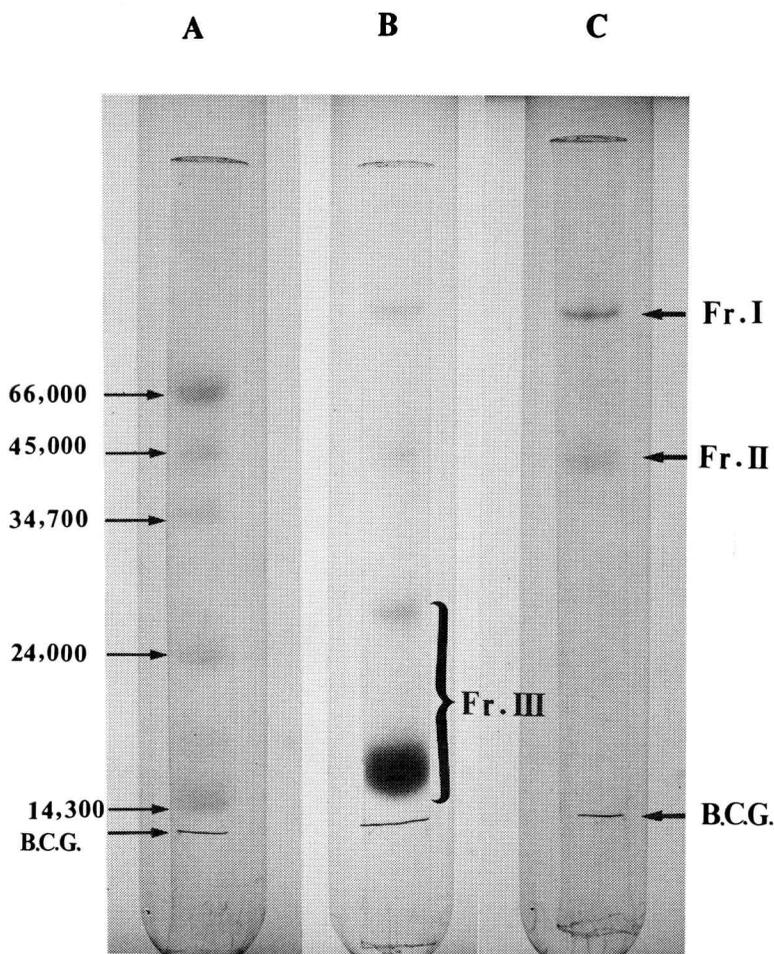


Fig. 6 .SDS-PAGE of cell surface DNase and marker proteins.
A : marker proteins, B : crude fraction, C : Fr.I and Fr.II

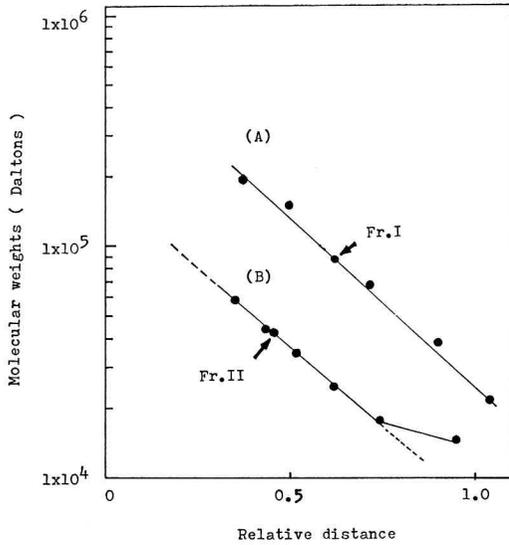


Fig. 7. Calibration lines of Combithek marker on 5% SDS-PAGE (A) and Dalton maker VI on 10% SDS-PAGE (B).

した3種類のDNaseの分子量はそれぞれ55,000~57,000, 55,000~56,000, 52,000~53,000でまったく異っている。また, Fr. IおよびFr. IIはともにpH 8.5の至適pH値を有し, それらのDNase活性は Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} の2価金属イオンによって影響されない点なども彼らの報告と異っていた。このことは著者らの*S. sanguis* I Challis保存株と彼らの保存株との単なる株間の差異なのか, あるいは培地などの培養条件の差異なのか明らかでないが, Challis株と分離株のT5株で差異が認められないことより株間の違いによるものではないと考えられる。

また, さきに著者らが報告した嫌気的条件下でのみ産生される菌体外DNaseと菌体表層DNaseとの関係では, 分子量, 2価金属イオンの影響, 至適pH域値そして各種DNA基質

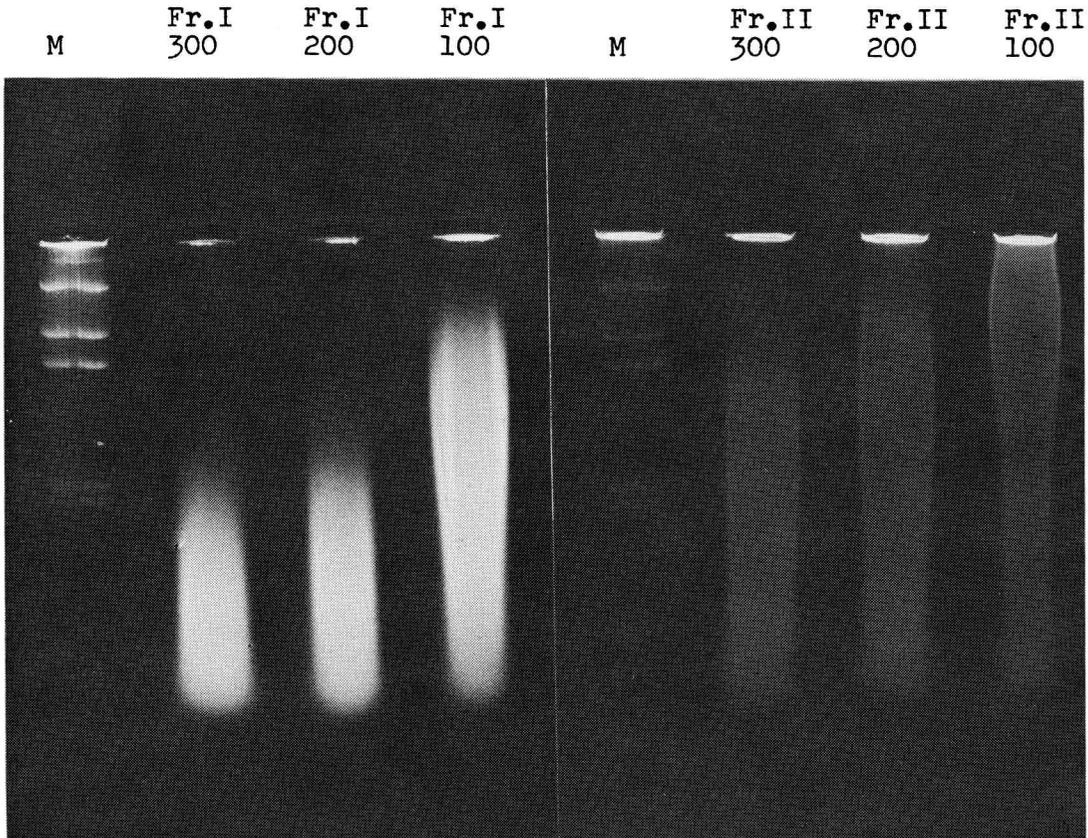


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of native thymus DNA treated with Fr. I and Fr. II.
M: DNA molecular weight marker II

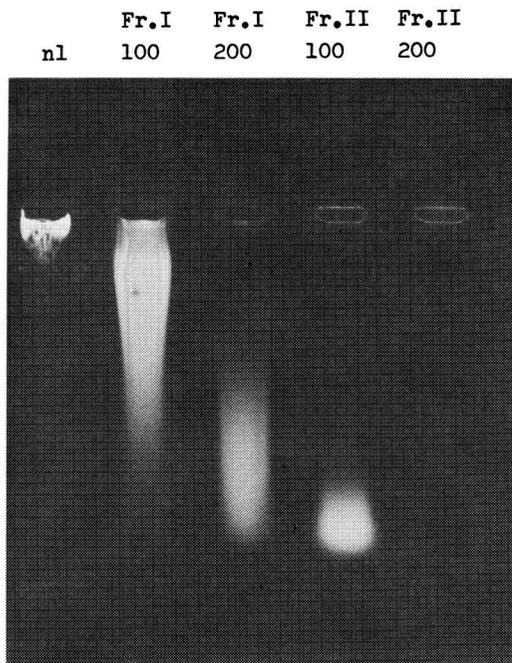


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of native lambda DNA treated with Fr. I and Fr. II.
nl : native lambda DNA

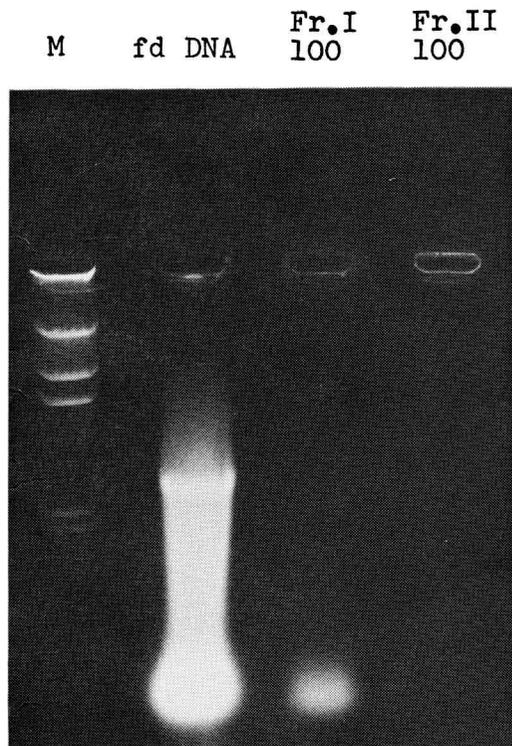


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of fd DNA treated with Fr. I and Fr. II.

に対する反応性など多くの点で異っている。今回、これら酵素の比較検討では嫌気培養した菌体の表層には、培養液中に DNase が放出されたため存在しないのではないかということ的前提にしていた。

しかし、両酵素が全く別個のものとするならば、当然嫌気培養菌体に DNase の存在が予想されるので、今後は *S. sanguis* I の嫌気培養菌体について、lysozyme 消化、Brij 58 処理を行って DNase を分離し、その存在を確認する必要があると思われる。

現時点で両酵素のアミノ酸組成の分析は行っていないので一次構造の違いについてはまだ不明である。しかし、両酵素は本質的に別のものと考えられ、それぞれが菌体表層で複数の DNase として存在し、それぞれの機能分担を想像させ、菌の増殖と環境の変化において重要な役割を担っていると思われる。今後さらに、菌体外 DNase と Fr. I および Fr. II の違いや

それらの最少活性ユニットの存在を検討する予定である。

結 論

1. *S. sanguis* I Challis 株と T 5 株のいずれから菌体表層 DNase の Fr. I と Fr. II を分離した。なお、両株間に差は認められなかった。
2. Fr. I と Fr. II の分子量はそれぞれ約 85,000~90,000 と約 40,000~45,000 であり、菌体外 DNase の分子量 24,000 とはまったく異っていた。
3. Fr. I と Fr. II の至適 pH 域値は 8.5 であり、それらの酵素活性に 2 価金属イオンは影響をおよぼさなかった。
4. Fr. I と Fr. II はともに、native thymus DNA, λ DNA, fd DNA, 熱変性 thymus DNA を分解した。Fr. I は native thymus

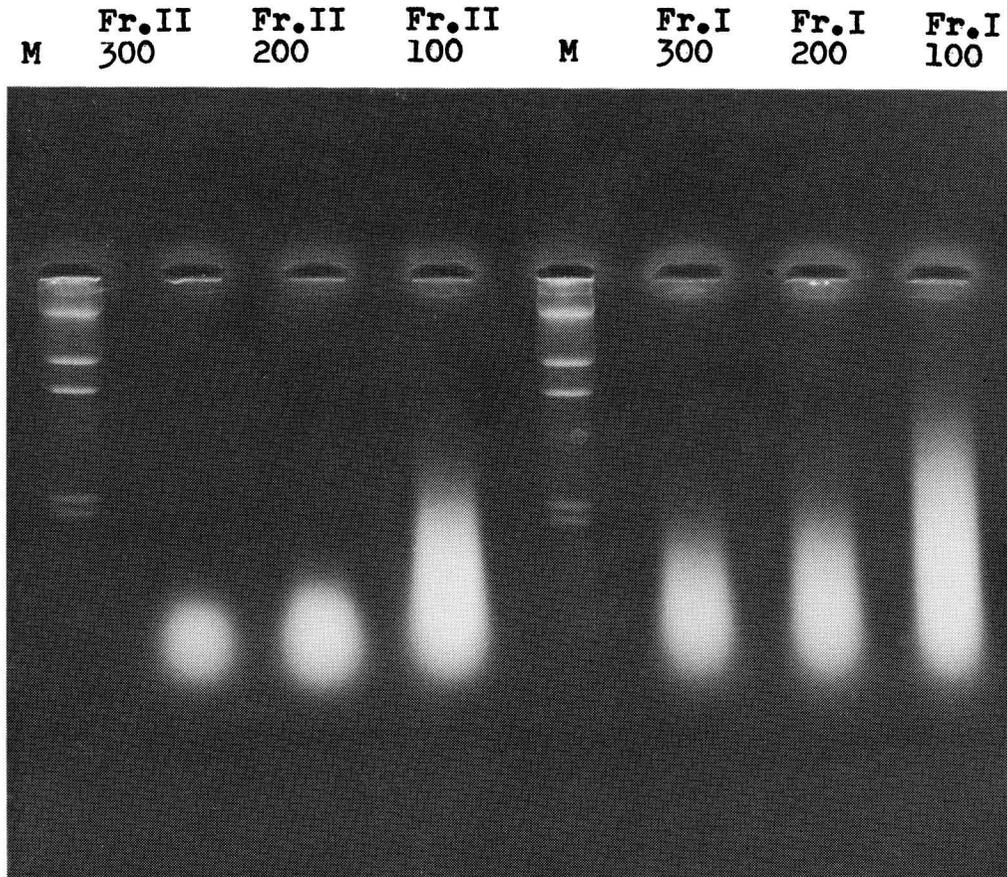


Fig. 11. Agarose gel electrophoresis of thermally denatured thymus DNA treated with Fr. I and Fr. II.

M: DNA molecular weight maker II

DNA に対して Fr. II より高い活性を示し、他 た。
の DNA においては Fr. II が高い活性を示し

ABSTRACT : DNase fractions, designated here Fr. I and Fr. II were isolated by the lysozyme digestion and Brij 58 treatment from aerobically cultured *Streptococcus sanguis* I.

Optimal pH value of both enzymes was 8.5 and metal ions such as Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} did not have any effect on their activity.

On the other hand, the extracellular DNase activated by the addition of Mg^{2+} or Mn^{2+} but was inhibited by Ca^{2+} or Cu^{2+} . DNase activity was inactivated especially with high concentration Cu ion (0.1 mol/ml).

Molecular weight of these DNases was determined by SDS-PAGE. Fr. I was about 85,000~90,000 daltons and Fr. II about 40,000~45,000 daltons. Molecular weight of the extracellular DNase was different from that of cell surface DNase. On 0.8% agarose gel electrophoresis both Fr. I and Fr. II hydrolyzed native thymus DNA, lambda DNA, fd DNA, and thermally denatured thymus DNA. The specific activity of Fr. I was higher than that of Fr. II when the substrate was native thymus DNA, while in another substrate it was smaller in Fr. I than in Fr. II.

From these results it can be concluded that the cell surface DNases have poor uniqueness on

enzymatic activity, while the extracellular DNase has special activity that the enzyme hydrolyzed native thymus DNA only. There were differences in the DNase activity between Fr. I and Fr. II.

文 献

- 1) 本田寿子, 濱田育男, 田近志保子, 柳原 敬, 金子 克: *Streptococcus sanguis* 1 の菌体外核 酸分解酵素 (DNase) について, 岩手医大歯誌, 7 : 118-123, 1982.
- 2) 濱田育男, 本田寿子, 田近志保子, 柳原 敬, 金子 克: *Streptococcus sanguis* 1 DNase の 分離精製, 岩手医大歯誌, 7 : 124-130, 1982.
- 3) 濱田育男, 金子 克: *Streptococcus sanguis* 1 の産生する Deoxyribonuclease の反応性につ いて, 岩手医大歯誌, 8 : 29-33, 1983.
- 4) Starosciak, B. J and Dobrzanski, W. T. : Deoxyribonuclease of *Streptococcus sanguis*, *Acta Microbiol. Pol.* 29 : 35-48, 1980.
- 5) Weber, K. and Osborne, M. : The reliabi- lity of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrop- horesis, *J. Biol. Chem.* 244 : 4406-4412, 1969.
- 6) Aaij, C. and Brost, P. : The gel electrop- horesis of DNA, *Biochem. Biophys. Acta.* 269 : 192-200, 1972.