

研 究

Mycoplasma salivarium における
ヌクレアーゼの存在とその特性

小川 恵子, 加茂 政晴, 水城 春美*, 客本 斉子

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(主任: 石崎 明 教授)

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座*

(主任: 水城 春美 教授)

(受付: 2008年10月23日)

(受理: 2008年11月28日)

Abstract : Mycoplasmas depend on the host cells for various nutrients such as nucleic acid precursors and steroids. It has been mentioned that the acquisition of the nucleotides from the host cells is probably mediated through their own nucleases. However, in *Mycoplasma salivarium*, the existence of nuclease has not yet been known.

In this study, we examined the nuclease activity in *M. salivarium*, and analyzed the properties of the enzyme. The Triton X-114 solubilized supernatant (Tx) obtained from lysate of *M. salivarium* was used for the enzymatic analysis. The nuclease activity was detected as a specific band of 25 kDa by SDS-PAGE and the following in-gel digestion (SDS-PAGE nuclease assay). The nuclease activity of Tx was strictly dependent on Ca^{2+} . The nuclease was heat-stable, and the optimum pH was in the range of 7-9. The nuclease showed a low substrate specificity. From these findings, it was revealed that *M. salivarium* has a novel type of 25 kDa and Ca^{2+} dependent nuclease.

Moreover, we examined whether Tx could cleave the chromatin DNA in the nuclei originated from eukaryote cells. Consequently, Tx cleaved the DNA of HS-72 B cell nuclei *in vitro*.

From these results, it has been suggested that *M. salivarium* in the host cells, obtains nucleotides by the digestion of DNA and RNA from the host cells with their own nuclease, and these cleavage results in injury in host cells and the following various pathogenesis of the oral region.

Key words : *Mycoplasma salivarium*, nuclease, Mycoplasma, pathogenicity

Existence of the nuclease in *Mycoplasma salivarium* and its characterization

Keiko OGAWA, Masaharu KAMO, Harumi MIZUKI*, Seiko KYAKUMOTO

Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry

*First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Iwate Medical University School of Dentistry

1-3-27 Chuodori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

緒 言

マイコプラズマは自己複製能を持つ細菌類の中では0.2~0.8 μm と最も小さく, その遺伝子サイズも580~1,380 kbpと大腸菌のおよそ1/10である^{1, 2)}。分類学的には, 細胞壁を持たない多形態の微生物 *Mollicutes* に属する^{1, 2)}。*Mollicutes* は *Mycoplasma*, *Acholeplasma* など5科に分類され, さらに *Mycoplasma* 科は *Mycoplasma* と *Ureaplasma* の2属からなる。現在, *Mycoplasma* 属にはおよそ100種類以上のマイコプラズマ種の存在が明らかとなっている。

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ている³⁻⁷⁾。マイコプラズマは宿主生物中で増殖する際に, 宿主細胞のグアニン, チミン, ウラシルの各塩基を利用して生存に必要なヌクレオチドを合成する。また, 自身のヌクレアーゼを用いて宿主細胞のDNA, RNAを分解し, ヌクレオチドを得ているとも言われている^{5, 8-10)}。さらに, マイコプラズマの形質膜上には核酸前駆体の運搬に関わる輸送体が存在することも明らかとなっている^{2, 9-14)}。これまでに, 種々のマイコプラズマ種においてヌクレアーゼの存在が報告されており^{5, 8-10)}, ヌクレオチドを得るのに関与していると考えられているが, このヌクレアーゼの生化学的特性など, その詳細については明らかではない。また, マイコプラズマが寄生した宿主に対して, ヌクレアーゼが病原因子となるか否かについても未だ不明な点が多い。

現在, 病原性があるマイコプラズマとしては, マイコプラズマ肺炎を引き起こす *M. pneumoniae*¹⁴⁻¹⁷⁾ や泌尿生殖器感染症を引き起こす *M. fermentans*¹⁸⁾, *M. genitalium*¹⁹⁻²¹⁾ や *M. hominis*²¹⁾ などが知られている。それらが, 宿主に対し病原性を起こす原因の一つとして, ヌクレアーゼの存在が知られている^{13, 22-25)}。しかし, 口腔内に存在している *M. salivarium* や *M. orale* ではヌクレアーゼの存在が明らかになっていない。口腔内で優勢である *M.*

*salivarium*²⁶⁻³¹⁾ は, 主に歯肉溝やプラーク中に多く存在しており²⁹⁾, 宿主となる口腔内の細胞に接着し核酸前駆体をはじめいくつかの栄養素を宿主細胞から得て生存するものの, 病原性はないと考えられていた⁵⁾。しかし最近, これら口腔マイコプラズマにおいても, 歯周疾患^{30, 31)} や胃潰瘍³²⁾ の原因にもなるとの報告がなされた。さらに, 白板症の上皮細胞内で *M. salivarium* が検出されたこと^{33, 34)} から, *M. salivarium* が細胞内寄生性であることが示唆された。加えて, *Bendjennat* ら²²⁾ は, *M. penetrans* のヌクレアーゼが宿主細胞にアポトーシスを誘導することを示した。

以上の知見は *M. salivarium* が口腔粘膜上皮細胞より栄養素を得る際や, 口腔内においてその病原性を発現する際に, *M. salivarium* 由来のヌクレアーゼが影響している可能性を示唆するものである。しかし, *M. salivarium* においては未だヌクレアーゼについての報告はなく, ヌクレオチドの獲得に自身のヌクレアーゼが関与するかについても明らかではない。

そこで, *M. salivarium* が宿主細胞内に寄生した際に病原因子となるか, またこの際にヌクレアーゼが関与するかを知ることを目的とし, 本研究では *M. salivarium* の菌体を界面活性剤で処理後, 得られた各画分を用いてヌクレアーゼ活性の有無を調べた。また, 酵素の特性について分子量, 金属イオン要求性, 温度安定性, 至適pHおよび基質特異性の面から検討した。さらに, マウス血球系細胞から取り出した裸核を用いて核クロマチンDNAに対する本酵素の切断活性を調べた。

材料ならびに方法

1. 細胞・試薬

M. salivarium ATCC 33130 株は, ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) から購入した。マウスB細胞ハイブリドーマHS-72細胞は, 九州歯科大学西原達次博士より恵与された。

Polyoxyethylene (8) octylphenyl ether (Triton

X-114) は、和光純薬 (大阪), サケ精子 DNA Type III ならびにウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma (St. Louis, MO, USA), プラスミド pBluescript II KS (-) は Stratagene (Santa Clara, CA, USA), λ DNA, M13 mp18 single strand DNA (ssDNA) と *EcoR* I は、タカラバイオ (滋賀) からそれぞれ購入した。CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, MnCl₂ は、和光純薬より購入した。

pBluescript II KS (-) は EndoFree[®] RPlasmid Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) を用いて調製した。pBluescript II KS (-) を制限酵素 *EcoR* I で 37°C, 2 時間反応させて DNA を切断後、クロロホルム処理, ついでエタノール沈殿を行い, クローニングサイトで切断された直鎖状二本鎖 DNA を得た。また, ヒト唾液腺由来腺癌細胞株 (HSG)³⁵⁾ より RNA 調製キット ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo) を用いて全 RNA を抽出した。ssDNA と RNA の電気泳動用ローディングバッファーには DynaMarker RNA Easy Measurement N (Bio Dynamics Laboratory, Tokyo) を用いた。

2. 菌の培養と菌体からのヌクレアーゼ含有画分の調製

ウマ血清ならびに酵母エキスを含有するペニシリン無添加マイコプラズマエンリッチメント (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を PPLO 液体培地 (BD, Sparks, MD, USA) に添加した後, これに 10 mg/ml L-arginine (Sigma) と 500 U/ml ペニシリン G (明治製菓, 東京) を加え培養液を作製した。*M. salivarium* は 37°C, 7 日間, 嫌氣的条件下にて静置培養を行った。培養終了後, 4°C で 12,000 × g, 30 分間の遠心分離により菌を回収した。得られた菌体に phosphate-buffered saline (PBS (-)) (日水製薬, 東京) を加えて 2 回洗浄した。菌体は必要に応じて -80°C にて保存した。1 リットルの培養より得られた菌体を Tris-buffered saline (TBS) (和光純薬) で, 4°C にて 10,000 × g, 40 分間, 遠心洗浄し, 1% Triton-X114, 1 mM EDTA を含む TBS 5 ml を加えて, 4°C, 2.5 時間静置し, さらに, 37°C, 10 分間振盪を行い, 可溶化を行った³⁶⁾。

ここで得られた画分を lysate (Lys と略す) とした。また, Lys を 4°C にて 2,000 × g, 5 分間の遠心分離を行い, 上から順に水性層, 界面層, 沈殿物の 3 層を得た。上層 2 層を, それぞれ Triton-X114 抽出画分 (Tx と略す) ならびに界面層画分 (detergent phase を Det と略す) とした。また, 沈殿物には 2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA を含む TBS 5 ml を加え, 37°C, 10 分間振盪し, 再度抽出を行った。これを 4°C にて 2,000 × g, 5 分間遠心分離し, 得られた上清と沈渣をそれぞれ SDS 抽出画分 (SDS と略す) および残渣とした。

3. ヌクレアーゼ活性測定法

菌体より得られた各画分 (Lys, Tx, Det, SDS) を用いて, ヌクレアーゼ活性の測定を行った。各画分は適宜希釈後, 基質緩衝液すなわち最終濃度 1.25 mg/ml サケ精子 DNA, 2.5 mM CaCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で 37°C, 30 分間反応を行った (全反応液量は 100 μ l)。反応終了後, 50 μ l の 7% HClO₄ (pH 3.0) を添加し, 10 分間氷中に静置して反応を停止させた。これを 4°C にて 10,000 × g, 20 分間遠心分離を行った。得られた上清, すなわち酸可溶性画分中に含まれる切断された DNA を, 分光光度計を用いて 260 nm の吸光度として定量した。ここでヌクレアーゼ活性は 37°C, pH 8.0 において基質 DNA と 30 分間反応させた際に, 1 OD₂₆₀ の酸可溶化物を生じる酵素量を 1 unit として表した³⁷⁾。

4. SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイ

菌体の各抽出画分 (Lys, Tx, Det, SDS) におけるヌクレアーゼの活性の有無, ならびに分子量を SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイ^{38, 39)} により調べた。初めに, 菌体の各抽出画分に対して, 1/3 容量の β -mercaptoethanol 含有 SDS サンプルバッファー (第一化学薬品, 東京) を添加し, 5 分間の煮沸処理により SDS 化を行いサンプルとした。これらサンプルをサケ精子 DNA 5 mg/ml を基質として分離ゲル中に含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルに添加し, Laemmli ら⁴⁰⁾ の方法に従い 4°C にて 10 mA で

2 時間 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を行った。電気泳動後、ゲル容積の 10 倍量の 0.01% カゼイン, 0.04% β -mercaptoethanol を含む 0.04 M Tris-HCl (pH 7.5) にて 15 分間, 4 回ゲルを洗浄した。続いて、上述の洗浄バッファーに 1 mM CaCl_2 を添加した反応液 (ゲル容積の 10 倍量) 中で 37°C, 8 時間インキュベートし、ゲル内ヌクレアーゼ消化反応を行った。反応終了後、ゲルを 0.005% エチジウムブロマイド (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で 15 分間染色、ついで蒸留水で 1.5 時間洗浄後、UV 照射下でゲルの撮影を行った。電気泳動の分子量マーカーには、All Blue standards (Bio-Rad) を用いた。写真の各バンドの強度は、Image J 1.40g (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量化した。

二価金属イオン要求性、至適 pH の検討は、Tx 画分を用いて上述の SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにより行った。すなわち、通常通り Tx 画分同量を各レーンにロードし、SDS-PAGE 電気泳動を行った。その後、ゲルを切断し、二価金属イオンの濃度や pH など、それぞれ異なる条件下にてゲル内ヌクレアーゼ消化反応を行った。温度安定性の検討は、Tx 画分をそれぞれの温度と各時間前処理し、氷中に 5 分間静置後、SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイを行った。

5. 基質特異性の解析

基質特異性の解析には、ヌクレアーゼ含有画分として Tx 画分を使用した。基質 DNA には二本鎖 plasmid DNA (pBluescript), 直鎖状二本鎖 DNA (λ DNA), pBluescript-*EcoR* I cut, 一本鎖の ssDNA ならびに RNA の 5 種を用いた。反応バッファー (50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl (pH 7.5)) を用いて、pBluescript, pBluescript-*EcoR* I cut は 0.1 mg/ml, λ DNA は 0.01 mg/ml となるようそれぞれ希釈し、37°C, 10 分間のプレインキュベーションを行った。その後、Tx 画分と基質 DNA を 1:1 (v/v) になるよう混合 (全反応液 50 μ l) し、37°C にて反応を行った。その後、10 mM

EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を反応液と等量加え反応を停止した。これらをエチジウムブロマイド含有 1.2% アガロースゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中にて電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルは UV 照射下で撮影を行った。なお、泳動の分子量マーカーには 1 kb DNA plus Ladder (Invitrogen) を用いた。

ssDNA ならびに RNA は 1 mg/ml となるよう希釈し、Tx 抽出画分と 37°C, 5 分間反応を行った。その後、DynaMarker RNA Easy Measurement N キット添付のホルムアルデヒド含有 loading buffer を加え、75°C, 3 分間処理を行った後、1.2% アガロースゲル中にて電気泳動を行った。分子量マーカーには、同キット添付の AGN マーカーを用いた。

6. 核クロマチン DNA の切断活性の解析

HS-72 細胞は、L-グルタミンと 25 mM HEPES 含有の Iscove's modified Dulbecco's medium (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に 10% fetal calf serum と Antibiotic-Antimycotic (GIBCO) を添加した培地中で培養を行った。1 \times 10⁶ cells/ml で細胞を播種し、4 日間培養した後、回収し PBS(-) で洗浄した。

裸核の調製は Bendjennat³⁹⁾らの方法を改変して行った。1 \times 10⁷個の細胞当たり、氷冷したバッファー (150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, 3% glycerol (pH 7.4)) 1 ml を加え懸濁し、300 \times g, 1 分間遠心分離を行った。沈渣すなわち細胞を、最終濃度 0.5% Nonidet[®] P-40 (ナカライテスク, 京都) を含む同バッファー中でホモジナイズした。

ホモジネートを、10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 25% glycerol (pH 7.4) 上に重層し、200 \times g, 5 分間遠心分離を行った。得られた沈渣を TKC バッファー (25 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 2 mM CaCl_2 (pH 7.5)) に懸濁し 200 \times g, 5 分間再度遠心分離し裸核を得た。裸核は 100 μ l の TKC バッファーに懸濁した後、等量の Tx 画分を加えて 37°C にて反応を行った。その後、10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5%

Triton X-100 (pH 8.0) を加えて反応を停止をさせ、 $16,000 \times g$ で 30 分間遠心分離した。切断 DNA は主として遠心上清に回収されるため上清を回収した。上清に対しプロテナーゼ K ($100 \mu\text{g/ml}$) を加え 50°C に 4 時間、続いて 4°C にて一晩静置した後、通法に従いフェノールクロロホルム処理とイソプロパノール沈殿を行い DNA を得た。DNA はエチジウムブロマイド含有 1.2% アガロースゲル (Invitrogen) 中にて電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルは UV 照射下で撮影を行った。なお、泳動の分子量マーカーには 1 kb DNA plus Ladder を用いた。

7. タンパク質定量と比活性の算出

ビシンコニン酸 (BCA) 法⁴¹⁾によるタンパク質定量には BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いた。標準タンパク質には BSA を用いた。

なお、菌体から得られた各画分のタンパク質定量の結果を用いてそれぞれの比活性を 1 mg タンパク質当たりの活性 (unit) として求めた。

結 果

1. *M. salivarium* におけるヌクレアーゼの存在ならびに活性の検討

初めに、*M. salivarium* より得られた各画分 (Lys, Tx, Det, SDS) についてヌクレアーゼ活性の有無を検討した。Table 1 に示すように、ヌクレアーゼ活性はすべての画分で認められた。Lys や SDS 画分に比べ、Tx と Det 画分におい

Table 1. Nuclease activity of the various fractions from *M. salivarium*.

fraction	total activity (units)	total protein (mg)	specific activity (units/mg)
Lys	648.0	18.8	34.5
Tx	237.5	4.7	50.5
Det	268.6	5.3	50.7
SDS	53.0	3.1	17.1

One unit is the amount of enzyme that produce 1 OD₂₆₀ of acid-soluble products in 30 min at 37°C and pH 8.0, with salmon sperm DNA as the substrate.

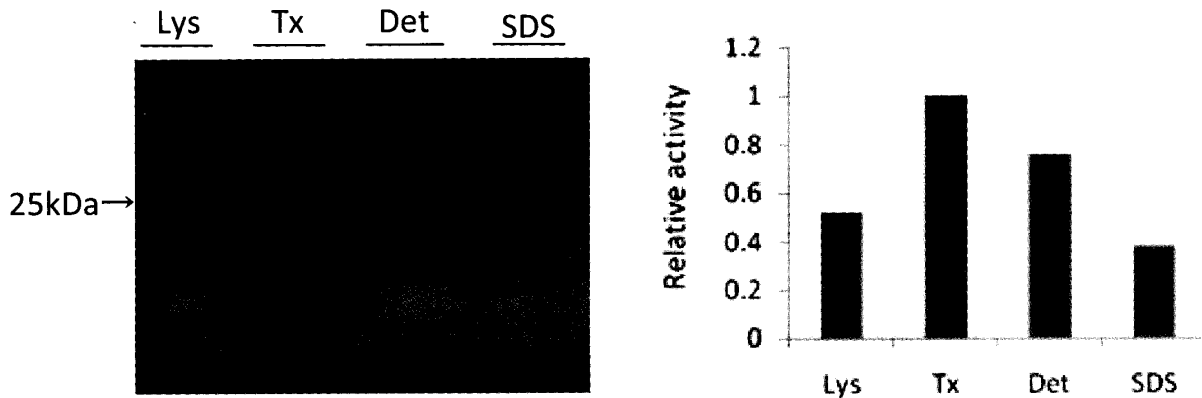


Fig. 1. SDS-PAGE nuclease assay of various fractions from *M. salivarium*.

M. salivarium was lysed with Triton X-114. Fractions were obtained by centrifugation and the following solubilization with SDS. The fractions were electrophoresed on the 12.5% SDS-PAGE gel containing 5 mg/ml salmon sperm DNA as a substrate. After electrophoresis, the gel was soaked in the reaction buffer containing 1 mM Ca^{2+} for 8 h at 37°C . The gel was stained with ethidium bromide and observed on the UV transilluminator. Details were described in the "Materials and Methods".

Lys, cell lysate; Tx, Triton X-114-solubilized supernatant; Det, detergent phase; SDS, SDS-solubilized protein. The histogram shows the relative activity of nuclease in each fraction. The nuclease activity of Tx fraction was defined as 1 nuclease activity.

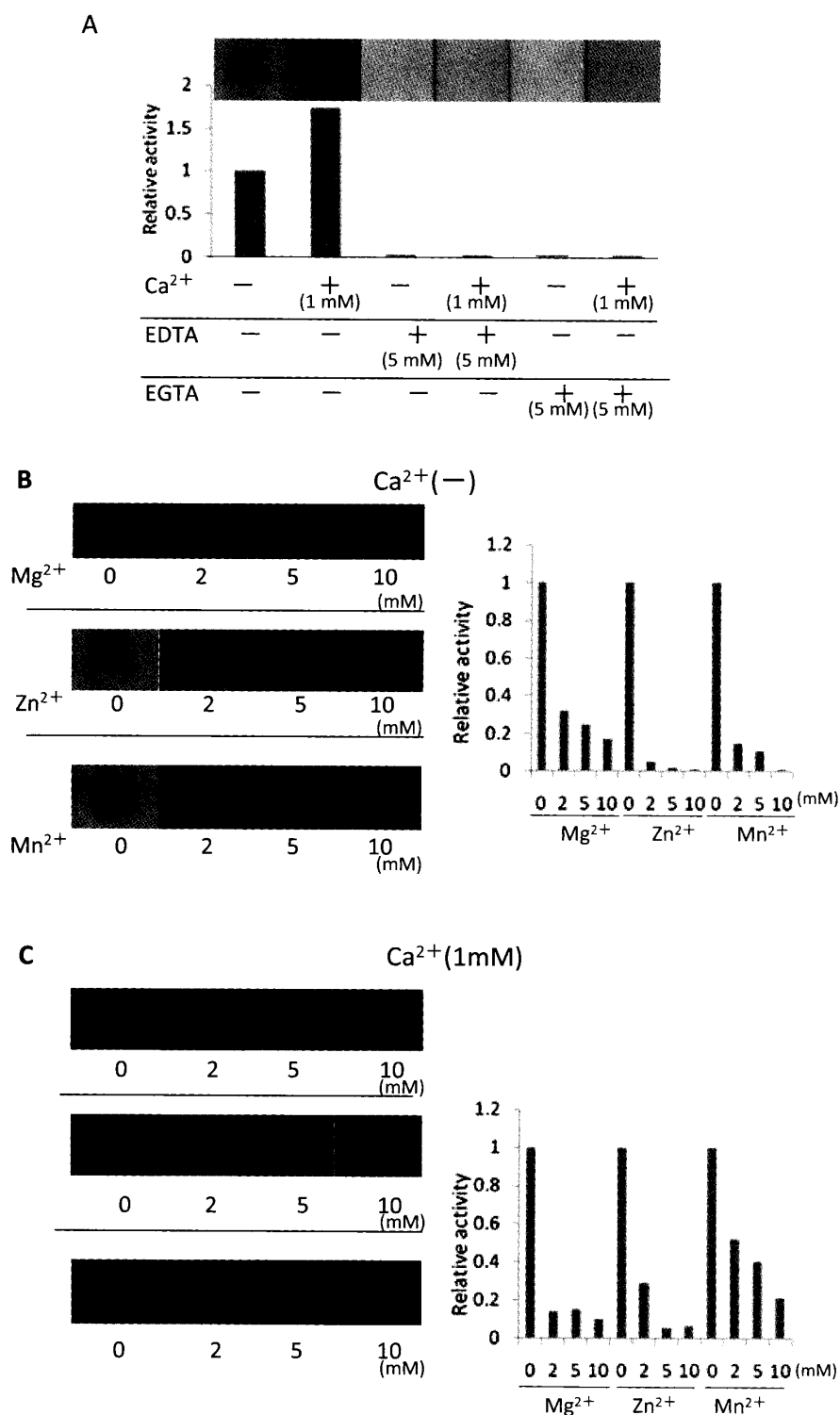


Fig. 2. Effect of various divalent cations on the nuclease activity of the Tx fraction from *M. salivarium*.

The SDS-PAGE nuclease assay was performed using the Tx fraction with the following modifications. In A, EDTA or EGTA was contained in the reaction buffer with or without 1 mM Ca²⁺. In B and C, various concentrations of MgCl₂, ZnCl₂ or MnCl₂ were contained in the reaction buffer with (C) or without (B) 1 mM Ca²⁺. The histogram shows the relative activity of nuclease in Tx fraction with the modifications. In A and B, the nuclease activity without any modifications was defined as 1 nuclease activity. In C, the nuclease activity with 1 mM Ca²⁺ was defined as 1 nuclease activity.

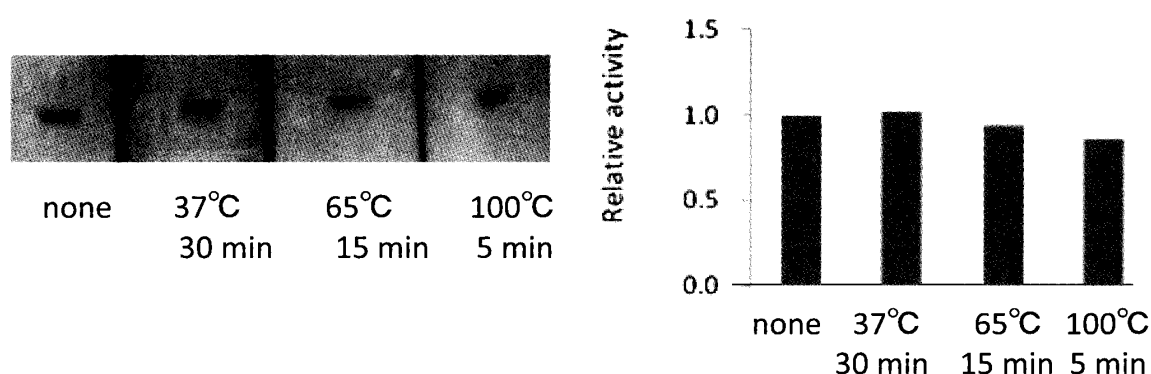


Fig. 3. Temperature stability of the nuclease activity of the Tx fraction from *M. salivarium*.

The SDS-PAGE nuclease assay was performed using the Tx fraction with the following modifications. The Tx fraction was pretreated at 37°C for 30 min, at 65°C for 15 min or at 100°C for 5 min and then the enzyme activity was analyzed at 37°C. The histogram shows the relative activity of nuclease in Tx fraction with the modifications. The nuclease activity without any pretreatments was defined as 1 nuclease activity.

て総活性ならびに比活性は高かった。Lys 画分すなわち lysate では総活性は最も高いものの、比活性は Tx や Det 画分に較べやや低かった。一方、SDS 画分においては総活性ならびに比活性とも低かった。これらの結果から、Tx と Det 画分に主として酵素活性が存在することが示された。

Table 1 の結果から、*M. salivarium* の各抽出画分にヌクレアーゼ活性の存在が明らかとなったため、次にこれらのヌクレアーゼの分子量ならびに酵素の性質を調べる目的で、SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイを行った。基質 DNA を均一に含むゲル中で試料を電気泳動するとヌクレアーゼは分子量に応じて分離される。その後ゲルを反応液に浸漬することにより、ヌクレアーゼはゲル内 DNA を切断する。このため反応後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し UV 照射を行うと、ヌクレアーゼの存在部位はゲル中に黒く抜けたバンドとして認められる。本アッセイの結果、すべての画分において、主として分子量 25 kDa の位置にヌクレアーゼのバンドが検出された (Fig. 1)。また、Table. 1 の活性測定法の結果と同様に、Tx と Det 画分に高い活性が認められた。これらの結果から、以下の酵素の特性の解析には、Det 画分に比べ、粘性が少なく透明で取り扱いが容易な Tx 画分を用いた。

2. マイコプラズマヌクレアーゼの酵素学的特性の検討

現在知られているヌクレアーゼの多くはその活性発現に二価金属イオンを必要とする^{13, 36, 37)}。そこで、*M. salivarium* ヌクレアーゼの二価金属イオン要求性について SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにより調べた。

まず、酵素反応時の Ca^{2+} の存在が活性に及ぼす影響を検討した (Fig. 2A)。最初に添加する Ca^{2+} すなわち CaCl_2 の量を最終濃度 1~5 mM とし、 Ca^{2+} 未添加の場合と比較した。 Ca^{2+} 未添加サンプルに較べ、 Ca^{2+} 1 mM 添加サンプルではヌクレアーゼ活性が増加した (Fig. 2A)。また 2~5 mM Ca^{2+} 存在下においても、1 mM の場合と同程度の活性が維持された (データは示さない)。EDTA ならびに EGTA (Mg^{2+} に対してキレートしていない) を用いて二価金属イオンをキレートし、その効果を調べたところ、1 mM Ca^{2+} 添加の有無に関わらず、5 mM の EDTA あるいは EGTA は活性をそれぞれ完全に抑制した (Fig. 2A)。

その他の二価金属イオンとして Mg^{2+} 、 Zn^{2+} ならびに Mn^{2+} について検討した。1 mM Ca^{2+} 未添加 (Fig. 2B)、添加 (Fig. 2C) それぞれの場合において、 MgCl_2 、 ZnCl_2 、 MnCl_2 をそれぞれ最終濃度、0, 2, 5, 10 mM となるよう添加した。その結果、 Ca^{2+} 未添加サンプルにおいて Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、

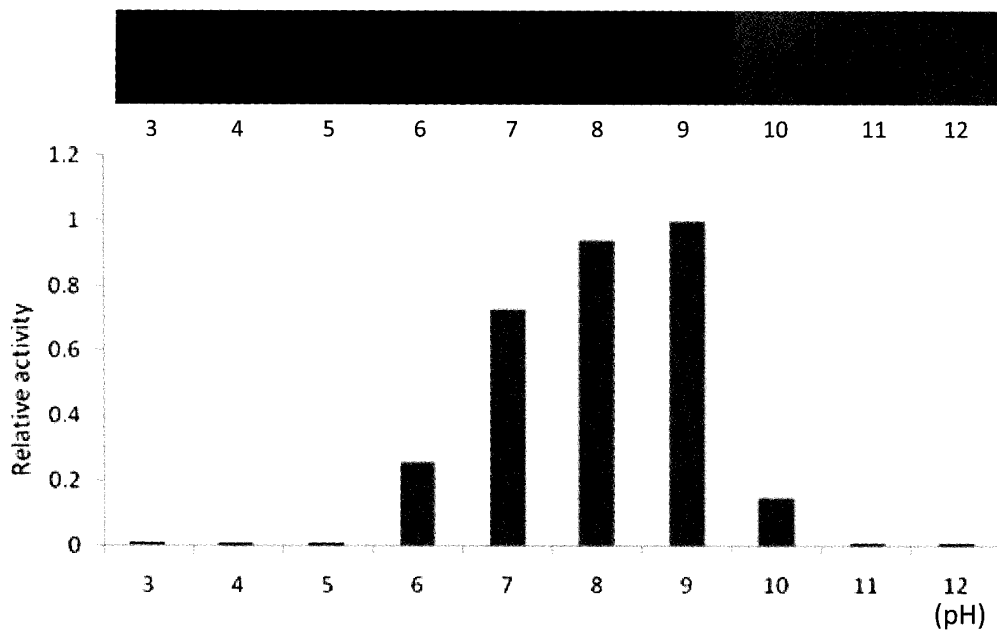


Fig. 4. Effect of pH on the nuclease activity of the Tx fraction from *M. salivarium*.

The SDS-PAGE nuclease assay was performed using the Tx fraction with the following modifications. The gels were soaked in the reaction buffer with various pH as indicated. For the preparation of the reaction buffers with various pH, Tris acetate (for pH range of 3-5) or Tris-HCl (for pH range of 6-12) was respectively used. The histogram shows the relative activity of nuclease in Tx fraction with the modifications. The maximal level of the nuclease activity was defined as 1 nuclease activity.

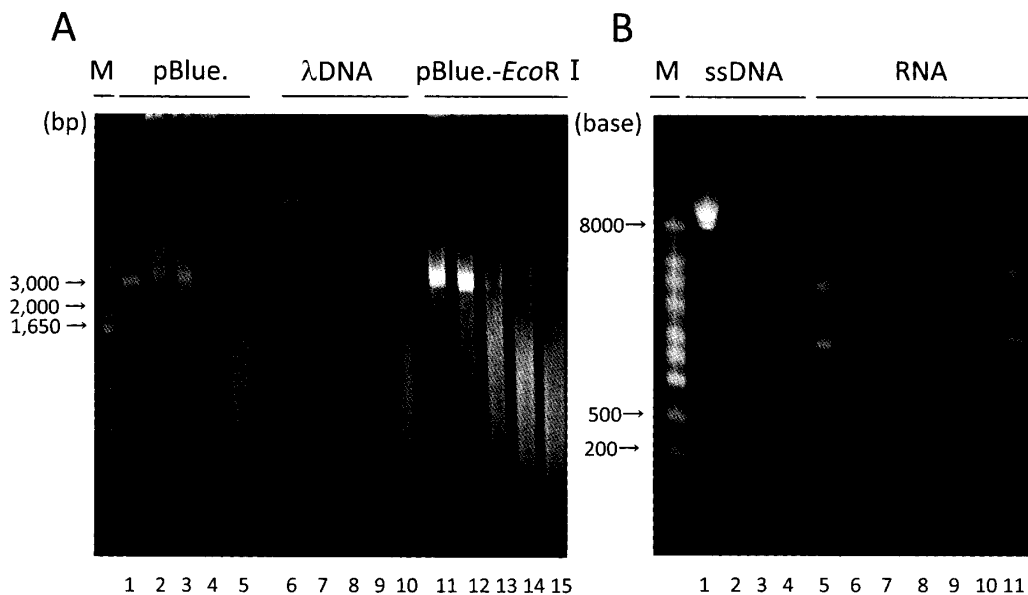


Fig. 5. Substrate specificity of the nuclease activity of the Tx fraction from *M. salivarium*.

The Tx fraction was incubated at 37°C with pBluescript, λ DNA and the linealized pBluescript cut with *EcoR* I for 10 min (lanes 2, 7, 12), 30 min (lanes 3, 8, 13), 60 min (lanes 4, 9, 14) and 120 min (lanes 5, 10, 15) in panel A. The same fraction was incubated with single stranded DNA for 1, 3 and 5 min (lanes 2-4) and with RNA for 1, 2, 3, 4, 5, 10 and 15 min (lanes 6-10, respectively) in panel B. RNase inhibitor was included in the reaction mixture (lane 11 in panel B). In control, the Tx fraction was not included in the reaction mixture (lanes 1, 6, 11 in panel A ; lanes 1, 5 in panel B). After the reaction, the samples were electrophoresed on the 1.2% agarose gel containing the ethidium bromide and the cleavage of each substrate was observed.

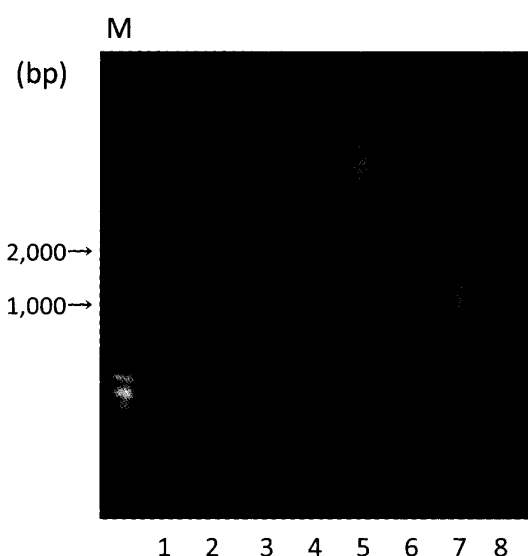


Fig. 6. Chromatin digestion with the Tx fraction from *M. salivarium*.

The crude nuclei obtained from HS-72 cells was incubated in the Tx fraction at 37°C for 0, 10, 30 and 60 min (lanes 1, 3, 5 and 7, respectively). After the solubilization of nuclei, the supernatant obtained by the centrifugation was treated with proteinase K. Then, the fragmented DNA in the supernatant was precipitated with isopropanol. The DNA was electrophoresed on the 1.2% agarose gel. As control experiment, the crude nuclei was incubated with Tx-extraction buffer (1% Triton X-114 and 1 mM EDTA in TBS buffer) for 0, 10, 30 and 60 min (lanes 2, 4, 6 and 8, respectively). M, molecular weight marker

Mn²⁺ともに活性を濃度依存的に阻害した (Fig. 2B)。また, 1 mM Ca²⁺により促進された活性は Mg²⁺あるいは Zn²⁺の存在により著しく阻害された (Fig. 2C)。一方, Mn²⁺添加による活性の抑制の程度は低かった。

マイコプラズマヌクレアーゼの温度安定性は Tx 画分をあらかじめ 37°C で 30 分, 65°C で 15 分, あるいは 100°C で 5 分それぞれ前処理した後, SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにより調べた (Fig. 3)。その結果, 65°C, 15 分の前処理のみならず, 100°C, 5 分の前処理においても活性はほぼ維持された。また, SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにおいて, 酵素と基質を反応させる際の温度を変化させて酵素活性を調べたと

ころ, 至適温度は 37~65°C の範囲にあった。一方, 100°C における活性は有意に減少した (データは示さない)。

SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにおける反応時の至適 pH を調べた (Fig. 4)。活性は pH6~10 の広範囲で認められ, 至適 pH は 7~9 であった。一方, pH 3, 4, 5 の酸性条件下, ならびに pH 11, 12 のアルカリ条件下において活性は認められなかった。

次に, *M. salivarium* ヌクレアーゼの基質特異性について実験を行った。基質としては pBluescript, λ DNA, pBluescript-EcoR I cut, ssDNA ならびに RNA を用いた。Tx 画分とそれぞれの基質を 37°C にて反応を行い, その後, 1.2% アガロースゲル電気泳動法により切断活性を検討した (Fig. 5 A, B)。pBluescript (lanes 1-5 in A), λ DNA (lanes 6-10 in A), pBluescript-EcoR I cut (lanes 11-15 in A) では UV 照射下においてスメア状に切断バンドが確認され, かつ, スメアは反応時間の延長に伴い低分子領域に移行した。ssDNA (lanes 1-4 in B) ならびに RNA (lanes 5-11 in B) では, 反応 1 分で共に切断され, バンドの消失が確認されたものの, 低分子領域にシフトするスメア状の切断バンドはほとんど見られなかった。

3. クロマチン DNA に対する切断活性の検討

HS-72 細胞の裸核を, Tx 画分とそれぞれ 0, 10, 30, 60 分間反応を行い, クロマチン DNA に対する切断活性を調べた (Fig. 6)。その結果, 反応 10 分において DNA の切断バンドがスメア状に出現した (lane 3)。また, 反応 30, 60 分においても同様の切断バンドが検出された (lanes 5, 7)。一方, それぞれの時間におけるコントロールすなわち, 1% Triton-X 114, 1 mM EDTA 含有 TBS と裸核をともにインキュベートした場合にはバンドは見られなかった (lanes 2, 4, 6, 8) ことから, Tx 画分中のヌクレアーゼが HS-72 細胞の核クロマチン DNA を切断することが示された。

考 察

マイコプラズマは自身の生存に必要な栄養素や多くの代謝経路を欠く³⁻¹⁰⁾。中でもプリン骨格の新合成経路やピリミジン環合成のオロチン酸経路などの生合成経路を欠如するため、プリン塩基のグアニン、ピリミジン塩基のウラシルやチミンを合成できない。そのため、宿主のこれら生合成経路を利用したり、また、宿主のDNAやRNAからヌクレオチドを獲得することで生存している。その際、マイコプラズマはヌクレアーゼを利用して、ヌクレオチド前駆体を獲得していると考えられる。そのため、すべてのマイコプラズマにおいてヌクレアーゼはその生存や増殖に不可欠である^{5, 8-10)}。

これまで、*M. pneumoniae* や *M. fermentans*, *M. pulmonis* など、種々のマイコプラズマにおいてヌクレアーゼの報告があり^{8-10, 13, 22-25)}、中でも Ca^{2+} 要求性で分子量 33 kDa の *M. hyopneumoniae* ヌクレアーゼ¹³⁾ や、二種類の二価金属イオン 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^{22, 39)}、同じく Mg^{2+} と Ca^{2+} を必要とする分子量 47-54 kDa の *M. hyorhinae* ヌクレアーゼ^{24, 25)} などが知られている。

本研究において、ヌクレアーゼの解析に用いた画分は粗酵素ではあるが、SDS-PAGE ヌクレアーゼアッセイにおいて 25 kDa 付近のヌクレアーゼ活性が最も高かった (Fig. 1)。そこでこの 25 kDa のバンドに着目して酵素学的検討を行った。しかしながら、時により 25 kDa 以外のバンドがみられることがあり、複数のヌクレアーゼの存在も示唆された。さらに本研究では、 Ca^{2+} 添加実験ならびにキレート剤の効果により、*M. salivarium* ヌクレアーゼは Ca^{2+} 要求性であることが明らかになった (Fig. 2A)。また、同じく Fig. 2 において Ca^{2+} 未添加の Tx 画分が Ca^{2+} を添加したものより弱いながらもヌクレアーゼ活性を示したことは、Tx 画分抽出前に既にその酵素内に Ca^{2+} を取り込んでいたためと考えられた。さらに、本研究にて見出さ

れたヌクレアーゼは、 Mg^{2+} や Zn^{2+} および Mn^{2+} により活性が抑制される (Fig. 2B, C) ことなど、他のマイコプラズマヌクレアーゼとは異なる特徴を有していた^{13, 22-25)}。一方、細菌類のヌクレアーゼに関しては長年に渡り、多くの研究がなされており、代表的なヌクレアーゼとして Ca^{2+} のみ要求性で分子量 16 kDa の Micrococcal ヌクレアーゼ³⁷⁾ がある。それと二価金属イオン要求性の点で比較すると、本研究において検出された *M. salivarium* ヌクレアーゼは、これに類似していた。マイコプラズマヌクレアーゼにおいては、要求する二価金属イオンや、分子量のみならず温度安定性や至適 pH についても菌種あるいは菌株ごとに様々な特徴をもつことが報告されている^{13, 22-25)}。本研究の結果、*M. salivarium* ヌクレアーゼは 100°C の高温下においても活性は失われず、至適 pH は 7-9 であった (Figs. 3, 4)。これらの結果は、耐熱性を有し至適 pH が 7-8 という *M. penetrans* のヌクレアーゼに対する報告³⁹⁾ と類似していた。また、基質特異性の解析結果から、*M. salivarium* ヌクレアーゼは環状二本鎖 DNA、直鎖状二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、さらに RNA をも基質として切断し (Fig. 5)、特異性は低いことが示された。興味深いことに本酵素は、一本鎖 DNA に対しては、二本鎖 DNA に対する活性よりも強い活性を有することが示唆された。基質特異性に関しては、*M. hyopneumoniae* や *M. penetrans* においても一本鎖、二本鎖 DNA のみならず RNA をも基質とする、特異性の低いヌクレアーゼの存在が知られていることから、マイコプラズマヌクレアーゼは、宿主の種々のタイプの DNA や RNA を基質として用いることで、宿主細胞中での自身の生存を有利にしているものと推測された。

また、ほとんどのマイコプラズマのヌクレアーゼは膜上に存在していることが知られている³⁸⁾。本研究において、*M. salivarium* の菌体を Triton X-114 で可溶化して得られた lysate を遠心分離した際の界面層画分 (Det) に、可溶性画分 (Tx) と同様にヌクレアーゼ活性が見られ

たこと (Table 1, Fig. 1), また, 培養上清中には活性がほとんど検出されなかったこと (データは示さない) などから, *M. salivarium* においても膜結合型のヌクレアーゼであることが推測された。実際, DNA と whole cell での *M. salivarium* をインキュベートした際にも DNA の断裂が確認された (データは示さない) ことから, ヌクレアーゼは細胞膜の外側に存在する可能性が示唆された。

マイコプラズマが寄生した宿主に対して病原性を示すことについては, これまでに多くの報告がある^{5-7, 11-25)}。*M. pneumoniae* や *M. argnini*, *M. bovis* がヒトの免疫細胞にアポトーシスを誘導すること, また *M. fermentans* や *M. penetrans* が宿主の細胞にクロモゾーム DNA の異常, すなわち不安定化を誘導し, 増殖や生存に影響を与えることで発癌を引き起こすことなどが知られている^{18, 22, 42, 43)}。*M. salivarium* においては, 培養細胞を用いた実験で, *M. salivarium* の膜上に存在するリポプロテインに病原性があることを Shibata ら^{30, 44)}が報告している。この中で著者らは *M. salivarium* のリポプロテインにより, Toll-Like Receptor 2 を介した免疫系の活性化, すなわち防御反応が起こり, その結果, 免疫系細胞にアポトーシスが誘導されることを示している³⁰⁾。また膜表面にアミノペプチダーゼが存在することも明らかになった^{30, 44)}ことから, 著者らはアミノペプチダーゼの作用が宿主側の免疫細胞に対しアポトーシスを引き起こすとともに, 歯周病の原因となり得るということを推測している。以上の知見から, マイコプラズマは宿主の細胞外に寄生し, その病原性を発現すると考えられてきた。

一方, Mizuki⁴⁵⁾は, 口腔白板症の組織切片を用いて DNA 特異的蛍光色素 H33258 による染色を行い, 白板症の上皮細胞中に, 顆粒状構造を呈することから微生物が存在する可能性を推測した。続いて, Mizuki らは, *M. salivarium* のポリクローナル抗体を用いた免疫染色法³³⁾, ならびに *M. salivarium* 特異的プライマーを用いた PCR 法³⁴⁾により, 白板症で観察された顆粒

状構造がマイコプラズマであること, すなわち口腔白板症の上皮細胞中に *M. salivarium* が存在することを確認した。つまり, Mizuki らの報告から *M. salivarium* が上皮細胞内に寄生することも考えられた。本研究にて見出されたように, *M. salivarium* のヌクレアーゼが膜上に存在することは, 細胞内に寄生した場合, 宿主からの DNA の獲得, 利用という点において, 有利, かつ, 合理的である。また, *M. salivarium* の細胞内寄生は, 細胞内において *M. salivarium* のヌクレアーゼが直接核クロマチン DNA を切断し, これが病原性発現に関与することを示唆するものである。本研究において, 免疫系 B 細胞の HS-72 の裸核を用いて, Tx 画分の DNA 切断活性を調べた結果, Tx 画分がクロマチン DNA を切断することを明らかにした (Fig. 6)。このことは, Tx 画分中のヌクレアーゼが宿主の核クロマチンに直接作用することにより, DNA が切断されることを示している。つまり, *M. salivarium* の細胞膜上にトラップされているヌクレアーゼが宿主細胞内で何らかの作用により細胞膜から遊離し, 核内に移行した場合においては, 宿主細胞の核内 DNA に傷害を与える可能性が示唆された。また, この作用が宿主細胞に対する病原性発現の一因になる可能性が考えられた。

今後, 口腔白板症や口腔癌の発症, 歯周病の進行などこれら口腔疾患を, マイコプラズマとの関連で検索, 追求していくことは, 大変意義深いものと思われる。

結 語

本研究では *M. salivarium* のヌクレアーゼ活性の有無とそれらの特性について検討した。その結果, *M. salivarium* には分子量 25 kDa の, DNA や RNA を基質とする基質特異性の低いヌクレアーゼが存在することが明らかになった。このヌクレアーゼは, Ca^{2+} イオンで活性が促進されるが, Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} では抑制された。また耐熱性で, 至適 pH は pH 7~9 であった。さらに, このヌクレアーゼと血球系細胞の

裸核をインキュベートしたところ、核クロマチン DNA の断裂を引き起こすことが判明した。*M. salivarium* はこのヌクレアーゼ活性により、宿主細胞の DNA や RNA からヌクレオチドを獲得し、さらには、その DNA, RNA に対する傷害性から病原性を発現することが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご指導いただきました、岩手医科大学名誉教授、前口腔生化学講座教授佐藤詔子先生に謝意を表すとともに、ご協力いただきました帖佐直幸先生はじめ本学口腔生化学講座の皆様、ならびに口腔外科学第一講座の皆様に感謝いたします。なお、本論文の一部は第 49 回歯科基礎医学会学術大会（平成 19 年 8 月 29~31 日、札幌）、第 62 回日本口腔科学会学術集会（平成 20 年 4 月 17, 18 日、福岡）、ならびに第 45 回日本口腔組織培養学会（平成 20 年 11 月 15 日、松本）において発表した。また、本研究は日本私学振興財団大学院重点研究費および文部科学省私立大学ハイテクリサーチ・センター事業（平成 17~21 年）補助金ならびにオープン・リサーチ・センター事業（平成 19~23 年）による研究助成金を受けて行われた。

文 献

- Johansson, K. E., and Pettersson, B.: Taxonomy of *Mollicutes*. Razin, S., and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp1-29, 2002.
- Rzin, S., Yogeve, D., and Naot, Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 1094-1156, 1998.
- Rottem, S., and Naot, Y.: Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 6 : 436-440, 1998.
- Willett, H. P.: Mycoplasma. Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B., and Wifert, C. M.: Zinsser microbiology. 20th ed., Prentice-Hall International, London, pp730-737, 1992.
- Blanchard, A., and Bebear, C. M.: Mycoplasmas of humans. Razin, S., and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp45-71, 2002.
- Frey, J.: Mycoplasmas of animals. Razin, S., and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp73-90, 2002.
- Rottem, S.: Invasion of Mycoplasmas into and fusion with host cells. Razin, S., and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp391-401, 2002.
- Razin, S., Knyszynski, A., and Lifshitz, Y.: Nucleases of mycoplasma. *J. Gen. Microbiol.* 36 : 323-332, 1964.
- Pollack, J. D., and Hoffmann, P. J.: Properties of the nucleases of mollicutes. *J. Bacteriol.* 152 : 538-541, 1982.
- Neale, G. A., Mitchell, A., and Finch, L. R. : Uptake and utilization of deoxynucleoside 5' - monophosphates by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J. Bacteriol.* 158 : 943-947, 1984.
- Wieslander, A., and Rosen, M.: The cell membrane and transport. Razin, S., and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp131-161, 2002.
- Youli, R., and Finch, L. R.: Isolation and characterization of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* mutants deficient in nucleoside monophosphate transport. *J. Bacteriol.* 170 : 5922-5924, 1988.
- Schmidt, J. A., Browning, G. F., and Markham, P. F.: *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J. Bacteriol.* 189 : 3414-3424, 2007.
- Waldo, R. H. 3rd., Popham, P. L., Romero-Arroyo, C. E., Mothershed, E. A., Lee, K. K., and Krause, D. C.: Transcriptional analysis of the *hmw* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181 : 4978-4985, 1999.
- Chanock, R. M., Hayflick, L., and Barile, M. F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48 : 41-49, 1962.
- Into, T., Dohkan, J., Inomata, M., Nakashima, M., Shibata, K., and Matsusita, K.: Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 75 : 2253-2259, 2007.
- Cassell, G. H. and Cole, B. C.: Mycoplasmas as agents of human disease. *N. Engl. J. Med.* 304 : 80-89, 1981.
- Hall, R. E., Agarwal, S., and Kestler, D. P.: Induction of leukemia cell differentiation and

- apoptosis by recombinant P48, a modulin derived from *Mycoplasma fermentans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 : 284-289, 2000.
- 19) Tully, J. G., Taylor-Robinson, D., Cole, R. M., and Rose, D. L.: A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1 : 1288-1291, 1981.
- 20) Reddy, S. P., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B.: Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.* 177 : 5943-5951, 1995.
- 21) Gdoura, R., Kchaou, W., Chaari, C., Znazen, A., Keskes, L., Rebai, T., and Hammami, A.: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis.* 7 : 129, 2007.
- 22) Bendjennat, M., Blanchard, A., Loutfi, M., Montagnier, L., and Bahraoui, E.: Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infect. Immun.* 67 : 4456-4462, 1999.
- 23) Minion, F. C., and Goguen, J. D.: Identification and preliminary characterization of external membrane-bound nuclease activities in *Mycoplasma pulmonis*. *Infect. Immun.* 51 : 352-354, 1986.
- 24) Paddenbergh, R., Weber, A., Wulf, S., and Mannherz, H. G.: Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. *Cell Death Differ.* 5 : 517-528, 1998.
- 25) Paddenbergh, R., Wulf, S., Weber, A., Heimann, P., Beck, L. A., and Mannherz, H. G.: Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. *Eur J Cell Biol.* 71 : 105-119, 1996.
- 26) Watanabe, T., Matsuura, M., and Seko, K.: Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). *J. Clin. Microbiol.* 23 : 1034-1038, 1986.
- 27) Taylor, P.: Medical significance of mycoplasmas. Miles, R. and Nicholas, R.: *Mycoplasma protocols*. Human Press, Totowa, pp7-15, 2002.
- 28) Kumagai, K., Iwabuchi, T., Hinuma, Y., Yuri, K., and Ishida, N.: Incidence, species and significance of Mycoplasma species in the mouth. *J. Infect. Dis.* 123 : 16-21, 1971.
- 29) Uchida, A.: Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 28 : 117-123, 1981.
- 30) Into, T., Nodasaka, Y., Hasebe, A., Okuzawa, T., Nakamura, J., Ohata, N., and Shibata, K.: Mycoplasma lipoproteins induce Toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. *Microbiol. Immunol.* 46 : 265-276, 2002.
- 31) Shibata, K., Hasebe, A., Into, Y., Yamada, M., and Watanabe, T.: The N-Terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J. Immunol.* 165 : 6538-6544, 2000.
- 32) Kwon, H. J., Kang, J. O., Cho, S. H., Kang, H. B., Kang, K. A., Kim, J. K., Kang, Y. S., Song, B. C., Kang, H. W., Shim, M. J., Kim, H. S., Kim, Y. B., Hahm, K. B., Kim, B. J., Kook, M. C., Chung, M. H., and Hyun, J. W.: Presence of human mycoplasma DNA in gastric tissue samples from Korean chronic gastritis patients. *Cancer Sci.* 95 : 311-315, 2004.
- 33) 長澤 大: 口腔白板症上皮細胞におけるマイコプラズマ感染-抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫組織化学による検討-. 岩医大歯誌, 33 : 1-17, 2008.
- 34) 川村貴史: 口腔白板症上皮細胞へのマイコプラズマの侵入. 岩医大歯誌, 33 : 18-30, 2008.
- 35) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48 : 745-752, 1981.
- 36) Bordier, C.: Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 : 1604-1607, 1981.
- 37) Pelham, H. R. and Jackson, R. J.: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67 : 247-256, 1976.
- 38) Minion, F. C., Jarvill-Taylor, K. J., Billings, D. E., and Tigges, E.: Membrane-associated nuclease activities in Mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 175 : 7842-7847, 1993.
- 39) Bendjennat, M., Blanchard, A., Loutfi, M., Montagnier, L., and Bahraoui, E.: Purification and characterization of *Mycoplasma penetrans* Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease. *J. Bacteriol.* 179 : 2210-2220, 1997.
- 40) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 41) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 : 76-85, 1985.
- 42) Tsai, S., Wear, D. J., Shih, J. W., and Lo, S. C.: Mycoplasmas and oncogenesis : persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 : 10197-10201,

- 1995.
- 43) Lo, S. H.: Apoptotic, antiapoptotic, clastogenic and oncogenic effects. Razin, S. and Herrmann, R.: Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp403-416, 2002.
 - 44) Shibata, K., and Watanabe, T.: Purification and characterization of aminopeptidase from *Mycoplasma salivarium*. *J. Bacteriol.* 169 : 3409-3413, 1987.
 - 45) Mizuki, H.: In situ staining with DNA-binding fluorescent dye, Hoechst 33258, to detect microorganisms in the epithelial cells of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 37 : 521-526, 2001.