

第22卷 第4号

ISSN 1347-6556

Vol. 22, No. 4

帯 広 畜 産 大 学
学 術 研 究 報 告

自然科学

RESEARCH BULLETIN

OF

OBIHIRO UNIVERSITY

NATURAL SCIENCE

平成14年 8月

August 2002

帯 広 畜 産 大 学

OBIHIRO UNIVERSITY
OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE
OBIHIRO, HOKKAIDO, JAPAN

目 次

獣医学

- 電界曝露: ヒトにおける臨床的愁訴における緩解効果 (英文)
原川信二・道解冬樹・齋藤篤志 1

農 学

- コムギのWxタンパク質欠失系統における小麦粉特性の地域と年次変動
長 学・柳沢 朗・菅原章人・加藤清明・三浦秀穂 9

農 学

- イネ科牧草4種を混在させた人工草地におけるヒツジの選択採食
本江昭夫 19

環境科学

- 北海道十勝地方の鳥類11. 帯広市帯広川下流部の水鳥類
内田旬子・藤巻裕蔵 29

生化学

- 好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* のポリガラクトナーゼ I の単離
高橋裕司・井熊武志・匂坂慶子・斉藤 泉・高澤俊英 37

生化学

- 好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の産生するポリガラクトナーゼ活性の低温適応
竹内宏治・井熊武志・匂坂慶子・斉藤 泉・高澤俊英 51

Exposure to electric field (EF): Its palliative effect on some clinical symptoms in human patients

Shinji HARAKAWA^{1,2)}, Fuyuki DOGE²⁾, Atsushi SAITO³⁾

(受理 : 2001年10月29日)

ABSTRACT

The palliative effect of electric field (EF) at 50-60 Hz, which are frequency bands for commercial application was evaluated on 55 different clinical symptoms identified by users of Healthtron (Model HES-30, Hakuju Institute for Health Science Co., Ltd., Tokyo, Japan), a putative therapeutic device. During a period of approximately two years, there were 1,253 Healthtron users, and the 505 who had undergone exposure at least twice, and likewise accomplished the questionnaire, constituted the randomly selected pool of patients in this study. The patients age between 20 and 90 years old, with 85.3% comprising the >40 years age bracket, and there were 208 males and 297 females. Symptoms that were identified by at least 10 patients included cold feeling in the extremities, fatigue, headache, hypertension, insomnia, joint pain, low back pain, pain in the extremities, pruritus cutaneous, sensation of numbness in the extremities, shoulder/neck pain, and stiffness. The palliative effect of Healthtron therapy was evident with headache without accompanying fever (91.7%), joint pain (66.7%), lower back pain (57.3%), shoulder/neck pain and stiffness (56.0-57.8%), and in alleviating fatigue (55.0%). Overall, the palliative effect on pain-related symptoms affecting locomotorial organs (head, joints, shoulder, neck, extremities and abdomen), non-ascribable to trauma, was recorded in 175 (58.5 %) of 299 cases. No patients claimed palliative effect of Healthtron immediately after a single exposure, suggesting that the alleviation of pain associated with specific symptoms necessitates long period of therapy. Since there were differences in the frequency (2-several), and interval of exposure among the patients, the potential correlation between the duration and interval of exposure with palliation could not be evaluated. In future related work, well-defined exposure conditions and other evaluation criteria, and sizable number of subjects limited to a targeted set of symptoms should be instituted.

Key word:commercial power frequency;extremely low frequency;electric field;pain.

National Research Center for Protozoan Disease, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan¹⁾, Hakuju Institute for Health Science, Itabashi-ku, Tokyo 173-0014, Japan²⁾, and Department of Veterinary Physiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan³⁾

Corresponding author. Shinji Harakawa. National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan. E-mail:harakawa@bd5.so-net.ne.jp

INTRODUCTION

Electric field (EF) exists whenever a positive or negative electrical charge is present, and it exerts force on other charges within the field. Any electrical wire that is charged will produce an associated EF even when there is no current flowing. The strength of the EF is measured in volts per meter (V/m). The higher the voltage, the stronger is the EF at a given distance from the wire. Magnetic field (MF), on the other hand, arises from the motion of electrical charges. The strength of the MF is measured in amperes per meter (A/m). Generally, however in researches on electromagnetic field (EMF), scientists specify a related quantity, known as flux density (in micro tesla, μT), instead. In contrast to EF, MF is only produced once a device is switched on and current flows. The higher the current, the greater is the strength of the MF. Like EF, MF is strongest close to its origin, and rapidly decreases at greater distances from the source.

Extremely low frequency (ELF<300 Hz) electrical stimulation has been used as a form of electrical treatment to promote callus formation (Hashimoto, 1975), heal inflammation (Lee, 1993), and in the palliation of acute lower back pain (Ghonaime, 1999). The mechanism of action however has not been clarified, and its association either with EF and/or MF is unclear.

In 1972, the Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Japan approved the manufacture of Hakuju AC High Voltage Electric Field Health Device (Trade name: Healthtron with Approval number 14700BZZ00904), an apparatus that utilizes ELF EF without generating MF, and supposedly a physical therapeutic instrument in the alleviation of pain related to shoulder stiffness, insomnia, chronic constipation, and headache. In this paper, we report the findings on the palliative effect of Healthtron

pooled from inputs of patients by way of a questionnaire.

MATERIALS AND METHODS

Electric potential apparatus and method of exposure to EF

The electric field exposure apparatus, Healthtron (Model HES 30, Hakuju Institute for Health Science Co., Ltd. Tokyo, Japan) was used. Healthtron comprises a step-up transformer (a device for controlling the voltage in the circuit), a seat, and electrodes (Fig. 1). It applies high voltage to one of two opposing electrodes to make a constant potential difference and form an EF in the space between the two electrodes.

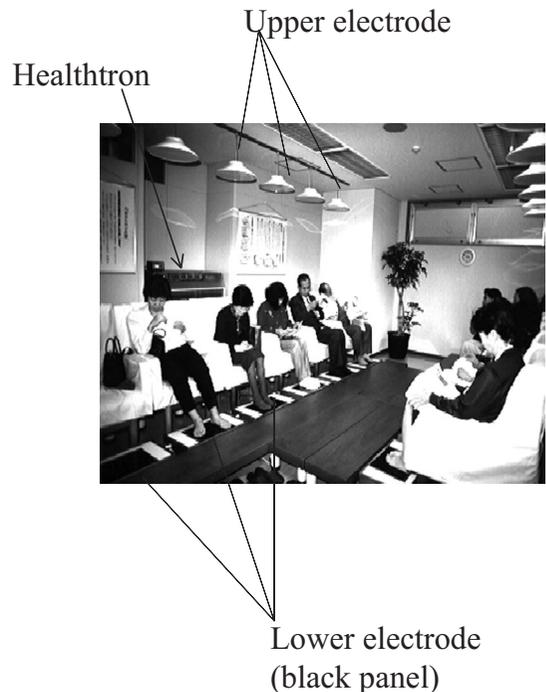


Figure 1. Electric field exposure system. Healthtron comprises a booster, a seat, and electrodes.

The users were comfortably seated and allowed to read a book or sleep during the duration of exposure. To prevent accidental electric

shocks due to formation of electric currents, the subjects were not allowed any form of bodily contact with the floor, as well as with anyone (operators and other persons exposed to electricity) during treatment. The insulator-covered electrodes were placed on the floor on which the feet were allowed to rest, and on the head of each patient. The initial power supply of 30,000-volts (ELF of 50 or 60 Hz), was applied to the electrode placed on the foot, generating an EF between the foot- and head-positioned electrodes. Exposure to electricity lasted for 30 min per session, and the frequency of exposure varied from once daily to once per week.

Administration and processing of questionnaire

The efficacy of Healthtron was assessed based on the results obtained from questionnaires administered from August 1, 1994 to June 30, 1997, at the Toranomon Clinic Minato-ku, Tokyo, Japan, under the direct supervision of Yuichi Ishikawa, MD. A total of 1,253 patients (489 males; 764 females) were administered the instrument, of which 505 (208 males; 297 females), visited the clinic and used the Healthtron device and accomplished the instrument at least twice. Others may have used the device more than twice. To reduce the extent of subjectivity of the entries in the questionnaire, the evaluation of the palliative effect of Healthtron was limited to these 505 patients.

Every Healthtron user was attended to by a physician, and interviewed on the palliative effect of the instrument during the previous visit. The instrument included questions on chief/major bodily complaints (=symptoms), past medical history and treatment, frequency of utilization of Healthtron and impressions after use, including its palliative effect, and the user's personal possession of Healthtron. The

severity of symptoms at the first hospital visit was rated a 3, and the severity after Healthtron therapy was classified into 5 grades, namely: very good (5); good (4); unchanged (3); aggravated (2); highly aggravated (1). Very good and good were classified as "palliated", and the duration of palliation in days irrespectively of the frequency/interval of exposure, was likewise recorded.

RESULTS

The patients' ages ranged between 20 and 90 years old, with 85.3% comprising the >40 years age bracket (Table 1). There were 208 (41%) males and 297 (59%) females. Fifty-five different symptoms were identified, and the proportion of those patients that reported palliation per symptom with Healthtron therapy are summarized in Table 2. Symptoms that were identified by at least 10 patients included cold feeling in the extremities, fatigue, headache, hypertension, insomnia, joint pain, low back pain, pain in the extremities, pruritus cutaneous, sensation of numbness in the extremities, shoulder/neck pain, and stiffness. The palliative effect of Healthtron therapy was evident with headache without accompanying fever, organopathy such as subarachnoidal or cerebral hemorrhage, or inflammation (91.7%), joint

Table 1. Age range and sex distribution of Healthtron users.

Age range	Number of users	Male : Female
~20	2	2:0
21~30	38	15:23
31~40	34	10:24
41~50	81	29:52
51~60	147	59:88
61~70	143	69:74
71~80	50	20:30
81~90	10	4:6
Total	505	208 (41%) : 297 (59 %)

Table 2. Palliation rate in 55 identified clinical symptoms in 505 patients.

Symptoms	No. of patients	No. of patients with palliation (%)
abdominal fullness	1	0 (0)
abdominal pain	2	1 (50)
allergic constitution	7	3 (42.9)
alopecia	3	3 (100)
arrhythmia	2	1 (50)
back pain	5	3 (60)
blurred vision	5	2 (40)
chest pain	1	0 (0)
cold feeling in the extremities	14	6 (42.9)
constipation	5	3 (60)
cough	5	3 (60)
deafness	2	1 (50)
diarrhea	3	3 (100)
dizziness	5	3 (60)
ear ringing	7	1 (14.3)
enervation	4	3 (75)
exanthema	4	1 (25)
eyestrain	5	1 (20)
facial edema	1	1 (100)
facial numbness	2	0 (0)
facial paralysis	1	1 (100)
facial stiffness	1	0 (0)
fatigue	20	11 (55)
generalized muscle stiffness	1	0 (0)
gingival pain	1	0 (0)
glycosuria	7	4 (57.1)
headache	12	11 (91.7)
heavy feeling in the body	4	2 (50)
heavy feeling in the head	1	0 (0)
heavy feeling in the legs	1	1 (100)
heavy stomach feeling	1	0 (0)
hypertension	10	4 (40)
insomnia	17	8 (47.1)
jaundice	1	1 (100)
joint pain	45	30 (66.7)
loss of appetite	1	0 (0)
loss of grip	1	0 (0)
lower back pain	89	51 (57.3)
menstrual irregularity	1	0 (0)
pain in the extremities	31	10 (32.3)
palpitation	1	1 (100)
paralysis in the extremities	3	0 (0)
plantar edema	4	2 (50)
pollakiuria	1	1 (100)
pruritus cutaneous	10	4 (40)
rigidity of the arms	1	1 (100)
sensation of numbness in the extremities	29	11 (38.0)
separation of the calx epidermis	1	1 (100)
shoulder or neck pain	25	14 (56)
shoulder or neck stiffness	90	52 (57.8)
sore throat	2	1 (50)
stomachache	5	4 (80)
swelling of joints	2	2 (100)
trembling of the extremities	1	1 (100)
urinary incontinence	1	0 (0)
total	505	268 (53.1)

pain (66.7%), low back pain (57.3%), shoulder/neck pain and stiffness (56.0-57.8%), and in alleviating fatigue (55.0%). Interestingly, the palliative effect on pain-related symptoms

affecting locomotorial organs (head, joints, shoulder, neck, extremities and abdomen) was recorded in 175 (58.5%) of 299 cases. These pain-related symptoms were not ascribable to traumas. Of the 10 patients with pruritus cutaneous, while 4 claimed to have been palliated, the clinical manifestations were aggravated in one patient after the first therapy.

Figure 2 shows mean duration of palliation per symptom irrespective of the frequency/interval of Healthtron therapy in 505 patients. Considering the small sample size in many of the symptoms identified, an inherent limitation in this study where the researchers were solely dependent on data generated from the questionnaire, we believe that the persistence of the palliative effect of therapy could be validly described only in those symptoms that were identified by at least 10 patients showing >50% palliation rate. Palliation of fatigue lasted for about 50 days; joint, lower back, and shoulder/neck pain were alleviated for 100 days or more; and headache and shoulder/neck stiffness were palliated for a little less than 100 days. The longer mean duration of palliation noted among many other symptoms could be a reflection of the sample size rather than the real effect of therapy.

DISCUSSION

In this study, the efficacy of Healthtron was merely evaluated on users' subjective answers to the questionnaire, and there were no objective evaluation criteria used. Palliation rate of >50% for a particular symptom is suggestive of the efficacy of Healthtron. Considering the insignificant number of patients who identified some specific symptoms relative to others, the evaluation as well as comparison of the effect of therapy on the 55 different symptoms is not statistically tenable. Since there were differences in the frequency (2-several) and interval

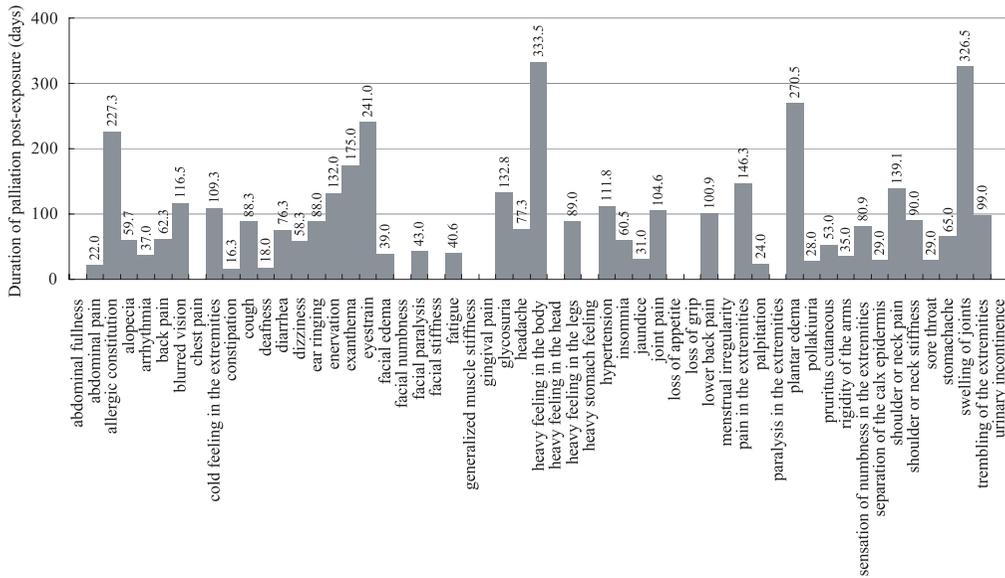


Figure 2. Mean duration of palliation of symptoms irrespective of the interval of treatment.

of exposure among the patients, the potential correlation between the duration and interval of exposure with palliation could not be evaluated, as well.

No patients claimed palliative effect of Healthtron immediately after a single exposure, suggesting that the alleviation of pain associated with specific symptoms necessitates long period of therapy. Fatigue, headache, joint, lower back and shoulder/neck pain and stiffness registered >50% palliative rate, with palliation lasting for approximately 150 days or shorter. Present data on palliation of headache and shoulder stiffness, as well as on constipation (6/14=43%), and insomnia (8/17=47%) collaborate earlier claims of the Healthtron manufacturer at the time of the product's approval.

One patient experienced exacerbation of pruritus cutaneous after initial exposure to Healthtron. It was unclear however, as to whether this was effected by exposure to EF.

It would be interesting to do a follow-up observation on this phenomenon. In another patient, numbness in the extremities due to diabetic blood circulation impairment was palliated by EF exposure. Interestingly, in NOD mice, the onset of diabetes is inhibited by EF, implying the possibility that diabetes mellitus and its symptoms were palliated by EF exposure (Sakamoto et al., 1995). This cannot be similarly concluded in the present study, since the patient manifested other symptoms, as well.

Despite certain limitations, results of the present findings clearly point to Healthtron's palliative effect principally on pains associated with the head, neck, back, shoulder, joints and extremities. Considering, however, that majority of the patients in this study had received medications in institutions other than the Toranomom Clinic, and that the interval of therapy varied among the patients, it is interesting to find out as to how Healthtron effected palliation, and the role it plays in

palliation. The limitations identified in the procedural design of the present study somehow hindered drawing out of conclusions as to the usefulness of Healthtron therapy on symptoms under-represented in terms of sample size. To help clarify the role of EF on the body, in future related work, well-defined exposure conditions and other evaluation criteria, and sufficient number of subjects limited to a targeted set of symptoms should be instituted.

Many facts about the influence of MF have been reported to clarify the potential risk of MF used in power plants and electrical products on the body. There are however fewer studies on the effect of ELF EF, such as its influence on the intracellular calcium level of cultured cells (McLeod et al., 1987; Walleczek et al., 1990; Liburdy et al., 1992, 2000; Cho et al., 1994, 1999; Kim et al., 1998). ELF EF stimulates the body through the perception of EF by the body surface via hairs, and the formation of induced current in the body (Liburdy et al., 1992). Further studies however are needed to elucidate the possible association of these two mechanisms cited to the findings of the present study, and their potential role in the palliation of bodily symptoms post-exposure to an electric potential apparatus.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by a grant-in-aid from Hakuju Health Science Foundation, Hakuju Institute for Health Science (President A. Hara). We greatly thank Dr. F. Claveria, Professor of Biology, De La Salle University, Philippines for her advice and constructive criticism in the preparation of this report.

REFERENCES

Cho, M. R., Thatte, H. S., Lee, R. C. and Golan, D. E.. 1994. Induced redistribution of

cell surface receptors by alternating current electric fields. *FASEB J* 8:771-776

Ghoname, E. A. and William, F. C. 1999. The effect of stimulus frequency on the analgesic response to percutaneous electrical nerve stimulation in patients with chronic low back pain. *Anesth Analg.* 88:841-846

Hashimoto, T. 1975. The effect of static electric field caused by high voltage alternating current on callus formation. *J Kyoto Pref Univ Med.* 84: 89-108.(in Japanese)

Kim, Y. V., Conover, D. L., Lotz, W. G. and Cleary, S. F. 1998. Electric field-induced changes in agonist-stimulated calcium fluxes of human HL-60 leukemia cells. *Bioelectromagnetics.* 19: 366-376.

Lee, R. C., Cacaday, D. J. and Doong, H. 1993. A review of the biophysical basis for clinical application of electric fields in soft-tissue repair. *J Burn Care Rehabil.* 14:319-335.

Liburdy, R.P. 1992. Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields: evidence for an electric field metric and site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett* 301:53-59.

Liburdy, R.P. 2000. Corrigendum to: Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields: evidence for an electric field metric and site of interaction involving the calcium ion channel by R. P. Liburdy. *FEBS Lett* 478:304.

McLeod, K. J., Lee, R. C. and Ehrlich, HP. 1987. Frequency dependence of electric field modulation of fibroblast protein synthesis. *Science* 236:1465-1469

Sakamoto, H., Matoba, R., Suzuki, S and Miyahara, K. 1995. Therapeutic effect of alternating current electrostatic highpotential load on insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese mice. *Medicine and Biology* 130:95-97 (in Japanese)

Walleczek, J. and Liburdy, R P. 1990. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances 45Ca^{2+} uptake in rat thymocytes:dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.* 271: 157-160.

電界曝露:ヒトにおける臨床的愁訴における緩解効果

原川信二^{1,2)}, 道解冬樹²⁾, 齋藤篤志³⁾

帯広畜産大学 (全共) 原虫病研究センター, 080-8555 北海道 帯広市¹⁾, 株式会社 白寿生科学研究所, 173-0014 東京都板橋区²⁾, 帯広畜産大学, 家畜生理学教室, 080-8555 北海道帯広市³⁾

Corresponding author. 原川 信二. 帯広畜産大学 (全共) 原虫病研究センター, 080-8555 北海道帯広市. E-mail: harakawa@bd5.so-net.ne.jp

要約

商用周波数 (50/60Hz) の電界曝露による臨床症

状に対する緩解効果を電位治療器“ヘルストロン”(白寿生科学研究所, HES-30A型)の利用者から得た55種類の症状について検討した。全利用者は2年間で1253名にのぼり, 本研究の対象者には少なくとも2回以上ヘルストロン治療を受け, 同時に無作為的に実施するアンケートに2回以上回答するという基準を満たした505名とした。対象者の年齢範囲は10-90才で, 40才以上が85.3%を占めた。また男性は208, 女性は297名であった。対象者中少なくとも10人以上が主訴と答えた症状は: 手足の冷え, 疲れやすい, 頭痛, 高血圧, 不眠, 関節痛, 腰痛, 手足の痛み, 皮膚のかゆみ, 手足のしびれ, 肩/首の痛みと肩/首のこりであった。ヘルストロン治療による緩解効果が顕著であった症状は: 発熱を伴わない頭痛 (91.7%), 関節痛 (66.7%), 腰痛 (57.3%), 肩/首の痛みおよび凝り (56.0-57.8%) と疲れやすい (55.0%) であった。全体的な傾向から, 運動器系に影響があり同時に外傷に起因していない疼痛症状に対する緩解効果が299例中175例 (58.5%) を記録した。一回の治療で緩解した例は認められなかった, これは疼痛の緩解には長期の治療期間が必要である事を示している。本研究では, ヘルストロン治療の期間, 頻度が利用者によって異なっていた為, 期間や頻度と緩解効果との相関関係についての検討は加えることができなかった。将来的に関連する研究を行なう際は, 目的症状に限定した多くの患者とよく吟味された電界条件と評価基準を設定しなければならない。
キーワード: 商用周波数; 超低周波数; 電界; 疼痛。

コムギのW_xタンパク質欠失系統における小麦粉特性の地域と年次変動

長 学¹⁾, 柳沢 朗²⁾, 菅原章人³⁾, 加藤清明¹⁾, 三浦秀穂¹⁾

(受理: 2001年11月29日)

Local and year-to-year variation in flour properties of W_x-protein deficient lines in wheat

M. Osa¹, A. Yanagisawa², A. Sugawara³, K. Kato¹ and H. Miura^{1*}

摘要

めん用コムギの育種において、アミロース合成に関わるW_xタンパク質の有無と小麦粉特性の関連を明らかにすることはめんの食感改善上重要である。本研究では春播き品種 Chinese Spring の遺伝背景を共通にもち、3種類のW_xタンパク質のいずれかを欠失する7タイプとすべて生産する野生型の計8タイプを北海道の主要な小麦産地である十勝、北見、上川で3年間にわたって栽培し、小麦粉品質の重要な形質であるアミロース含量、蛋白質含量、澱粉の糊化特性に対する個々のW_x遺伝子の効果、地域と年次の環境効果およびそれらの相互作用について解析した。アミロース含量は年次変動が認められたものの、変異の大部分はW_x座の対立遺伝子の組み合わせで決定されていた。タイプ×環境の相互作用も認められず、null対立遺伝子の違いによる変異は環境間で安定して発現していた。蛋白質含量はタイプ間の変異が小さく、環境効果を受けやすかった。澱粉最高粘度とブレイクダウンではタイプ×環境の相互作用が存在し、これら2形質の環境間での変動はタイプ間で異なっていた。特にW_x-B1タンパク質に関する二重欠失のタイプはより低いアミロース含量と高く安定したブレイクダウンを示し、うどん原料用としての澱粉特性がより向上することが窺われた。

キーワード: *Triticum aestivum* L., W_xタンパク質, アミロース含量, 粗蛋白質含量, 糊化特性, 遺伝子型×環境の相互作用

緒 言

イネ科穀類の胚乳貯蔵澱粉は、グルコース単位が直鎖状に α -1,4結合で重合したアミロースと α -1,6

結合による分枝構造を持つアミロペクチンから構成される。種子胚乳のアミロースはADPグルコースを基質としてW_xタンパク質と呼ばれる澱粉粒結合型のスターチシンターゼにより合成される。AAB

¹⁾帯広畜産大学, 帯広市, 〒080-8555, ²⁾北海道立北見農業試験場, 訓子府町, 〒099-1406, ³⁾北海道立上川農業試験場, 比布町, 〒078-0397

¹⁾Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080-8555, Japan; ²⁾Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, 099-1406, Japan; ³⁾Hokkaido Prefectural Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, 078-0397, Japan *Corresponding author (miurahm@obihiro.ac.jp)

BDDのゲノム構成をもつコムギ (*Triticum aestivum* L.) では、分子量と等電点の異なる3つのWxタンパク質 (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) が存在し (Nakamura et al. 1993a), それらをコードするWx遺伝子座は7A染色体短腕 (Wx-A1), 7B染色体短腕の一部が転座した4A染色体長腕 (Wx-B1), 7D染色体短腕 (Wx-D1) に同祖的に座乗している (Chao et al. 1989)。いずれかのWx座にnull対立遺伝子をもちWxタンパク質が生産されないとアミロース含量が低下し、アミロース/アミロペクチンの量比が変化する (Yamamori et al. 1992, Nakamura et al. 1993b, Miura and Tanii 1994)。わが国やオーストラリアの優れた食感をもつめん用コムギ品種にはWx-B1b null対立遺伝子によりWx-B1タンパク質を欠いたものが多い (Miura and Sugawara 1994, Zhao et al. 1998)。アミロース含量の多少はめん食感上重要な粘弾性に強く関わっており、数%の違いがアミログラムの最高粘度やブレイクダウンに大きく影響する (小前 1991)。3つのnull対立遺伝子のなかではWx-B1bが最もアミロース含量を低下させ (Miura and Sugawara 1996, Miura et al. 1999, Yamamori and Quynh 2000), 粘弾性を高める効果が最も大きいこと (Araki et al. 2000, Yamamori and Quynh 2000) が認められている。

めん用として優れる 'Australian Standard White' (ASW) は、小麦粉の蛋白質含量が中庸であり、アミロース含量は22%程度と低く、糊化特性や色調も

優れるため実需者や消費者から最上位の評価を受けている (平ら 1989, 天野・柳沢 1993)。このASWに匹敵する品質を持つめん用品種の育成が日本でも進められている。北海道立北見農業試験場で開発したチホクコムギやホクシンはWx-B1タンパク質を欠失しており、すぐれためん食感をもつと評価されている。

以上のことからめん用コムギの育種において、アミロース合成に関わるWxタンパク質の有無と小麦粉特性の関連を明らかにすることはめん食感改善上重要であり、最近の研究で3種類のWxタンパク質の有無によって可能な8タイプの遺伝子型が複数の研究者によって育成され、小麦粉特性の比較、解析が進められている (Zhao and Sharp 1998, Miura et al. 1999, Yamamori and Quynh 2000)。本研究では3種類のWxタンパク質のいずれかを欠失する7タイプとすべて生産する野生型の計8タイプを北海道の主要な小麦生産地である十勝, 北見, 上川で3年間にわたって栽培し、小麦粉特性に対する個々のWx遺伝子の効果、環境効果およびそれらの相互作用について解析した。

材料および方法

1. 供試材料

本実験の材料には春播き品種Chinese Spring (以下CS) を共通の遺伝背景とし、Wxタンパク質の有無により考えられる8タイプ (Table 1) を用

Table 1. Eight types of the Wx-protein deficient lines based on absence(-) of the Wx-A1, -B1, -D1 proteins

Type	Wx protein		
	A1	B1	D1
1 Wild type	+	+	+
2 wxA	-	+	+
3 wxB	+	-	+
4 wxD	+	+	-
5 wxAB	-	-	+
6 wxAD	-	+	-
7 wxBD	+	-	-
8 wxABD	-	-	-

いた。これらWxタンパク質欠失系統の育成方法はMiura and Sugawara (1996) およびMiura et al. (1999) に示した。3つのWxタンパク質のいずれかを1つ欠失した3タイプ(wxA, wxB, wxD)は、CSの7A, 4A染色体をnull対立遺伝子のWx-A1b, Wx-B1bを持つ‘関東107号’の相同染色体と、7D染色体をWx-D1bを持つ中国品種の‘Bai Huo’でそれぞれ置換した系統である。wxAとwxBは12回、wxDは9回の戻し交雑を行っていて、置換された染色体以外の遺伝背景はCSに統一されている。Wx遺伝子が二重劣性の3タイプ(wxAB, wxAD, wxBD)はCS(KT7A)×CS(KT4A)の交雑からWx-A1b, Wx-B1bを持つwxABを、CS(KT4A)×CS(BH7D)からWx-B1b, Wx-D1bを持つwxBDを、CS(KT7A)×CS(BH7D)からWx-A1b, Wx-D1bを持つwxADを単粒系統法で育成し、F7~F9世代を供試した。3Wx座いずれもWx-A1b, Wx-B1b, Wx-D1bのnull対立遺伝子をもつwxABD(モチコムギ)は、CS(KT7A)×CS(KT4A)の交雑で得られたF₂種子からWx-A1b, Wx-B1bを持つ系統を選抜し、さらにこれにCS(BH7D)を交雑し、得られた自殖F₂種子から選抜した。それぞれのタイプには3系統ずつの姉妹系統が含まれ、計24系統を供試した。

2. 栽培試験および製粉試験

これらの材料を、1997, 1998および1999年の3年間、帯広畜産大学実験圃場(以下帯広)、北海道立北見農業試験場圃場(訓子府町:以下北見)、北海道立上川農業試験場圃場(比布町:以下上川)に春播きし、標準栽培した。登熟期の8月中旬前後に収穫し、通風乾燥後、試験用小型脱穀機で脱穀した。製粉に際しては、ランダムに抽出した種子サンプルの水分含量を経時的に計測し、約14%の時点で系統当たり100gの種子をブラベンダー式小型テストミルで粉砕しA粉を得た。穂発芽の見られたサンプルについては発芽粒を取り除いて製粉した。

3. アミロース含量

A粉を木綿の袋に入れ、それを500mlのぬるま湯を張ったボールに浸し、澱粉を採み出しグルテンを取り除いた。ボールを一晩室温に静置し、上澄みを

捨てた。さらに沈澱している澱粉を少量の蒸留水で懸濁液とし3200回転/分で20分間遠心分離した。この処理を3回繰り返す、不純物を取り除き精製した。30℃に設定したインキュベーター内で十分に乾燥させた後、粉碎機で粉砕し澱粉を得た。それら澱粉はアミロース含量および糊化特性の測定時まで-20℃の冷凍庫に貯蔵した。アミロース含量の定量は、Miura et al. (1994) に従いAuto Analyzer II (BRAN+LUBBE社)を用いて、澱粉100mg中のアミロース含量として求めた。対照としてアミロース含量が22.9%であるASWを用いて、3反復で測定した。

4. 糊化特性

Rapid Visco Analyzer(RVA:Newport Scientific社)を用いて測定した。澱粉試料3.0gに対し蒸留水25mlを加えて作成した懸濁液を50℃で1分間保った後、5℃/分で95℃まで上昇させそのまま5分間保った。その後5℃/分でふたたび50℃まで下げ2分間保持した。その時の粘性のピークを最高粘度、最高粘度とピークに達した後の最低値との差をブレイクダウンとして2反復で測定した。統計解析にはそれらの平均値を用いた。

5. 蛋白質含量

Infra Analyzer (BRAN+LUBBE社)を用いた近赤外分光法によりA粉の蛋白質含量と水分を測定した。これらの値から小麦粉水分14%での蛋白質含量に換算した。測定は2反復で行い、統計解析はそれらの平均値で行った。検量線の作成は、各年次に北見で春播き栽培した蛋白質含量について変異の大きな46品種のデータを用いて行った。

6. 統計解析

Wxタンパク質欠失タイプ、地域および年次の3つの要因による3元配置分散分析を行なった。誤差分散にはタイプ内の姉妹系統間の分散を用いた。タイプ間および環境間の差異はDuncanの範囲検定で解析した。

分散分析の結果から、タイプ×環境の相互作用が有意であった形質について、Finlay and Wilkinson (1963)の方法を用いて各タイプの環境変化に対する反応性をみた。ここではX軸に環境指標としてWx

タンパク質をすべて生産するタイプ1の値をとり、Y軸に各タイプの表現型値をとり9環境分9つの点をプロットしていき一次回帰直線 ($Y=a+bX$) を求めた。回帰係数が1から有意に隔たっていないければW_xタンパク質の欠失タイプの環境間での変動が野生型とほぼ同様であり、1より有意に小さいタイプは野生型のタイプ1と比較して変動が小さく、逆に1より大きいタイプは環境反応性が高いと見なした。

結 果

1. 気象概要

試験を実施した1997, 1998および1999年の3年間の帯広, 北見, 上川のコムギ登熟期から収穫期にあたる7月下旬から8月下旬の平均気温と降水量をTable 2に示した。1997年は3地域で登熟期である

8月上旬に平年値を100mm上回る降雨量があり、収穫期の8月中旬には平均気温が15℃以下の低温に遭ったため、ほとんどの系統が穂発芽を生じた。1998年は帯広で登熟期の8月中旬に平年を上回る降雨があり、さらに収穫期の8月下旬には150mm超の降雨が観測され、一部の系統で穂発芽が見られた。他の2地域はほぼ平年並みの平均気温と降水量の推移を示した。1999年は上川で7月下旬に台風の影響で150mm超の降雨があったが、その後は40mm以下の降水量で他の2地域とともに平年値を下回っていた。この年の平均気温は3地域とも平年と比較して2~5℃程度高く推移し高温少雨の気候で、穂発芽はみられなかった。このように試験を実施した9環境は多様な気象条件であった。

Table 2. Mean temperature and precipitation from ripening time to harvesting time at three location in 1997-1999

		Late July		Early August		Middle August		August	
		Mean temp. (°C)	Precipitation (mm)						
1997	Obihiro	21.7	3.1	20.9	145.0	14.8	64.5	17.5	11.0
	Kitami	23.0	22.0	19.5	106.0	13.7	34.0	17.4	20.0
	Kamikawa	24.4	5.0	20.2	116.5	15.3	32.0	18.6	35.5
1998	Obihiro	19.0	58.0	17.9	5.0	18.5	81.0	19.9	153.0
	Kitami	17.6	60.5	17.3	20.5	17.6	54.5	19.5	134.5
	Kamikawa	20.1	62.5	19.5	27.0	19.1	25.0	20.5	92.5
1999	Obihiro	23.5	18.5	25.0	22.0	22.3	0.5	19.7	52.5
	Kitami	22.1	86.5	25.4	16.0	22.5	5.0	18.8	16.0
	Kamikawa	22.9	157.5	25.4	30.5	24.4	2.0	20.4	21.5

2. アミロース含量

アミロース含量の分散分析の結果をTable 3に示した。なお、アミロース含量がほぼ0%のモチコムギを含めた解析では、変動の大部分がモチコムギと残り7タイプ間の差異に集約されてしまい、他の要因の検定が明確でないため、モチコムギを除いて

分析した。タイプ間と環境間ともに0.1%水準の有意差があったが、タイプ間のF値は環境のそれより極めて大きく、アミロース含量の変異はタイプ間、つまりW_xタンパク質の有無に強く支配される形質であることが示された。Fig. 1に示すように、W_x-B1タンパク質とW_x-D1タンパク質を二重に欠失し

Table 3. F values in the analysis of variance for amylose content, protein content and starch-pasting viscosity in eight types of the W_x-protein deficient lines grown under nine environments

Source of variation	Amylose content ¹⁾	Protein content	Peak viscosity	Breakdown
Genotype (G)	127.33***	8.00***	0.25	6.00***
Environment (E)	5.19***	95.00***	30.53***	11.99***
Location (L)	0.08	113.85***	3.19*	2.09
Year (Y)	12.78***	182.31***	102.31***	38.27***
L×Y	3.94**	33.31***	8.31***	2.60**
G×E	1.36	1.38	3.46***	4.10***
G×L			2.28**	3.14***
G×Y			7.14***	9.56***
G×L×Y			2.21**	1.86*

1) The waxy type (wxABD) was not included.

Significant levels * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

たwxBDのアミロース含量が9環境を平均して17.47%と最も低く、ついでWx-A1とWx-B1タンパク質をともに欠失したwxABの19.34%、Wx-A1とWx-D1タンパク質を欠失したwxADの21.74%の順であった。タイプ2-4の単欠失タイプの間には有意差は見られなかった。全てのWxタンパク質を生産する野生型のタイプ1のアミロース含量は23.92%と他の6タイプより有意に高く、タイプ7のwxBDとの間には6%以上の差があった。

環境効果を詳しく見てみると、地域間に有意差はなく年次間に0.1%水準の有意差があり、地域×年次の相互作用も1%水準で有意であった。これにより年次間の変動が環境要因の中では最も大きく、おもに1997年と他の2年間の差によっていた(Fig.2)。タイプ×環境の相互作用は有意でなかった。

3. 蛋白質含量

モチコムギのwxABDが15.30%と野生型より1%ほど有意に高かったものの、他の6欠失タイプと野生型には有意差がなかった。この結果から、Wxタンパク質の欠失と小麦粉蛋白質含量のタイプ間変異には関連はみられなかった。

環境間では年次による効果が最も大きく、ついで

地域、地域×年次の効果であった。1999年の上川が12.45%と有意に低く、ついで同年の北見の順であった。逆に年次では1997年、地域では帯広で高い傾向にあった(Fig.2)。また、アミロース含量と同様にタイプ×環境に有意差はなかった。

4. 澱粉最高粘度

タイプ間に有意差が見られず、Wxタンパク質欠失による効果はタイプ×環境の相互作用を通して現れた。環境間には0.1%水準の有意差があり、年次の効果が最も大きく、ついで地域×年次であり、地域間の変異は小さかった。3地域とも穂発芽被害のあった1997年が3年間で最も低い値だった。逆に高い値を示したのが1998年であった(Fig.2)。タイプ×環境の相互作用は年次との間で0.1%水準、地域、地域×年次の間では1%水準で有意であった。

5. 澱粉ブレイクダウン

最高粘度と比べタイプ間の差異が大きく、Wxタンパク質の有無はブレイクダウンに影響を与えることが示された。8タイプ間の比較をしたFig.1の結果では、最も低い野生型の127.8RVUとwxAの137.4 RVU、wxDの141.9RVU、wxADの145.5 RVU、

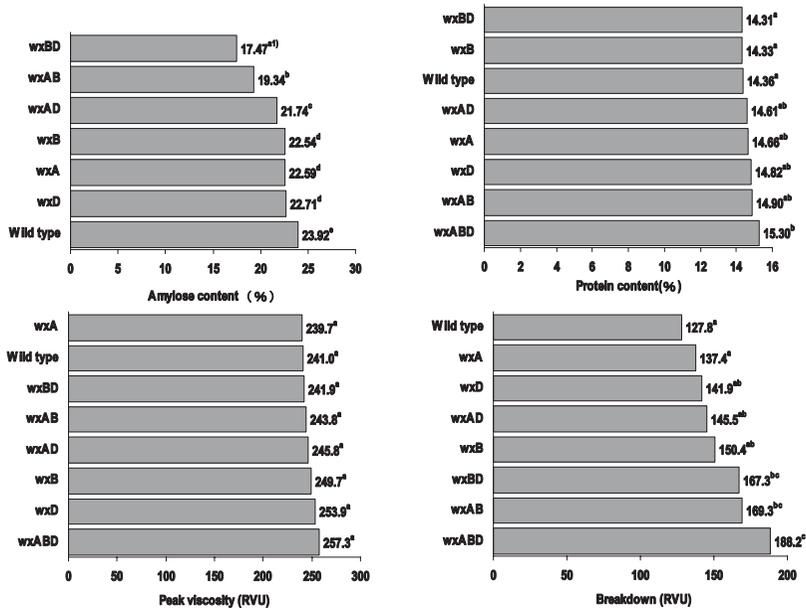


Fig.1. Mean performance of amylose content, protein content and starch-pasting viscosity across nine environments in the seven types of the Wx-protein deficient lines and Chinese Spring (wild type). The values followed by the same letter are not significantly different using Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

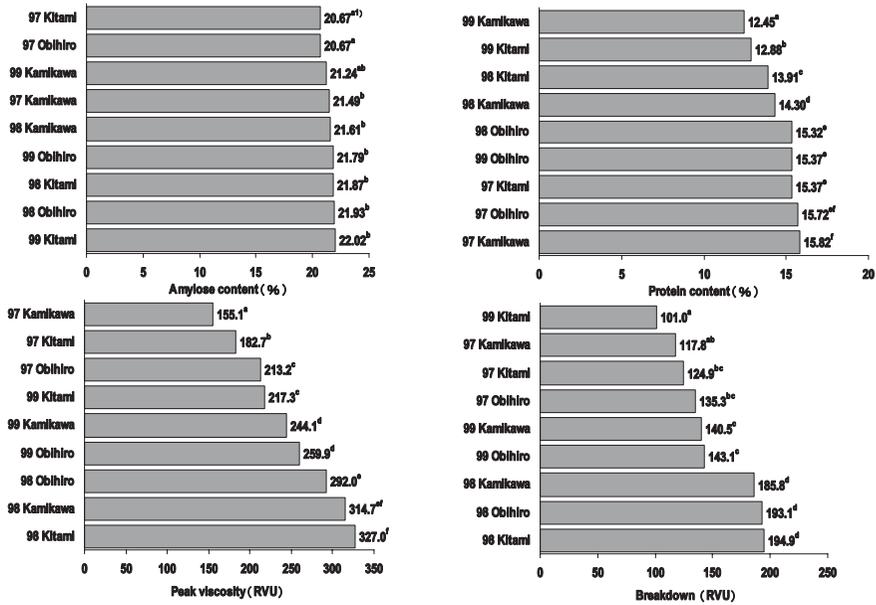


Fig.2. Comparison of the nine environments for amylose content, protein content and starch pasting viscosity as indicated by the average of the lines. The values followed by the same letter are not significantly different using Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$).

1) The waxy type (wxABD) was not included.

wxBの150.4RVUには有意差がなかった。逆に最も高い値を示したモチコムギは188.2RVUでwxBD, wxAB以外と有意差が見られた。Wx-B 1 タンパク質を欠失したタイプ, Wxタンパク質二重, 三重欠失タイプは高い値を示す傾向があった。環境間にも0.1%水準の有意差が見られた。要因としては澱粉最高粘度と同様, 年次による効果が優勢であった。また, タイプ×環境の相互作用が0.1%水準で有意であり, 地域と年次の違いに対する反応がタイプ間で異なっていた。

ブレイクダウンの環境間での変異は, 1999年の北見を除いて最高粘度と似通っていた。1999年の北見は最低の値101.0RVUであった。次いで低かったのは1997年の3地域, 1999年の上川, 帯広の順で, 1998年ほどの地域でも最も高い値を示した。

6. タイプ×環境の相互作用

Table 2の分散分析表でタイプ×環境に有意差のあった糊化特性について, Finlay and Wilkinsonの方法を用いてそれぞれのタイプの環境反応性を解

析した。X軸には各環境のWxタンパク質を全てもつ野生型3系統の平均値を, Y軸には各タイプの表現型値をとっている。

タイプ2~7の澱粉最高粘度の環境反応性をFig.3にまとめた。モチコムギ(タイプ8)はFig.5に示してある。いずれのタイプも最高粘度の環境間の変動は, 一次回帰直線で特徴づけることができた。wxAとwxDの回帰係数は $b=1.03$, 0.98 とほぼ1であったのに対し, wxB, wxAB, wxAD, wxBDでは $b=0.85$ ~ 0.54 と回帰係数が小さくなっていた。特に, wxBDの回帰係数は1と比べ有意に小さかった。タイプ3のWx-B1欠失系統およびタイプ5-7の二重欠失系統の傾きが他より小さい傾向にあり, 劣悪な環境に対してもある程度高い最高粘度を示した。

一方, Fig.4には7タイプのブレイクダウンの結果をまとめている。最高粘度と同様に, wxAとwxDの回帰係数は $b=0.93$, 0.92 とほぼ1であったのに対し, wxB, wxAB, wxAD, wxBDは $b=0.81$ ~ 0.53 と小さかった。特にwxABとwxBDは1に対して, 有意に低い回帰係数であった。この結果から環境に

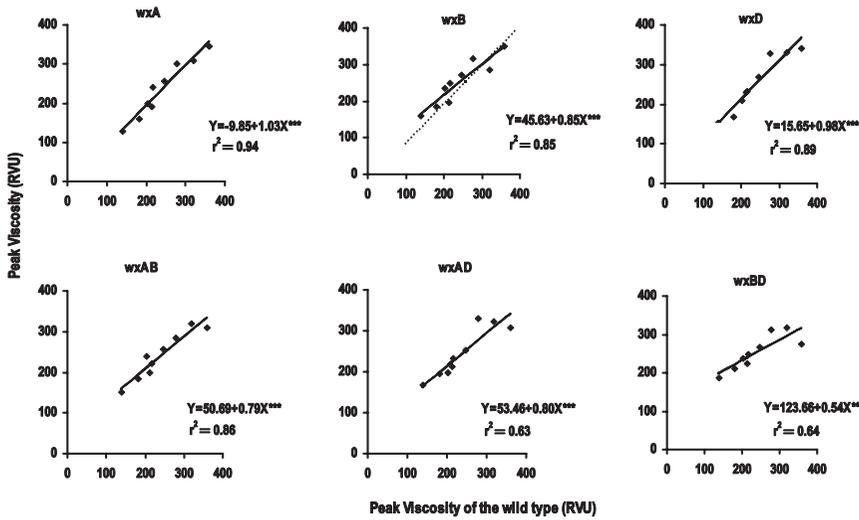


Fig.3. Regression of peak viscosity in the single and double Wx-protein deficient lines on the peak viscosity of the wild type.

r^2 :Coefficient of determination

Significant levels * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

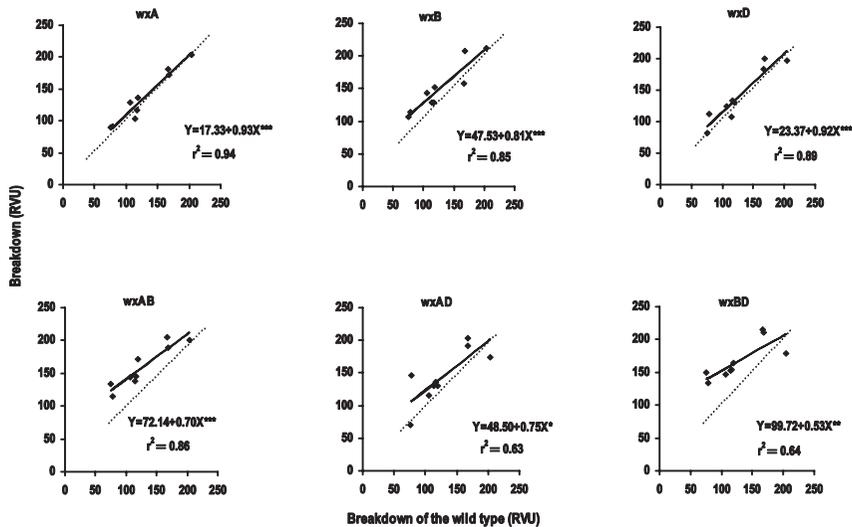


Fig.4. Regression of breakdown in the single and double Wx-protein deficient lines on the breakdown of the wild type.

r^2 :Coefficient of determination

Significant levels * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

対する安定性として、Wx-A 1 タンパク質欠失 < Wx-D 1 タンパク質欠失 < Wx-B 1 タンパク質欠失となった。ブレイクダウンの値が高かった二重欠失の

3 タイプには高い安定性があった。

タイプ 8 モチコムギの澱粉最高粘度とブレイクダウンの環境反応性を Fig.5 に示した。回帰係数はそ

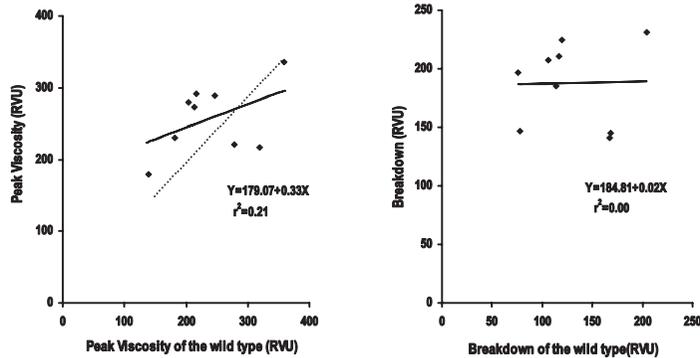


Fig.5. Regression of peak viscosity and breakdown in the waxy type on those of the wild type.
 r^2 : Coefficient of determination

れぞれ $b=0.33$, 0.02 と8タイプの中で最も小さく, かつ決定係数 (r^2) が 0.21 と 0.00 と低く, 一次回帰による環境反応性の推定は困難であった。

考 察

本実験で地域と年次を異にする計9環境で7タイプのWxタンパク質欠失系統と野生型を検討した結果, アミロース含量には年次効果があるものの, 変異の大部分はWx座の対立遺伝子の組み合わせで決定されることが示された。Wxタンパク質を二重に欠失したタイプ5, 6, 7の間にはアミロース含量に明らかな差がみられ (Fig.1), これらのタイプで発現しているWx遺伝子でみるとアミロース合成能力は $Wx-B1a > Wx-D1a > Wx-A1a$ の順でこれまでの報告と一致した (Miura et al. 1999, Yamamori and Quynh 2000)。ただし, 単欠失のタイプ2, 3, 4の間に統計的な差異はなかった。Yamamori and Quynh (2000) も3年間にわたってWxタンパク質欠失系統を圃場栽培し, 本実験同様単欠失3タイプ間のアミロース含量の差が年次によって不明瞭だったことを報告している。穂発芽被害を回避して収穫した種子を対象に分析したこれまでのわれわれの試験では, 単欠失3タイプのなかでWx-B1タンパク質の欠失がWx-A1やWx-D1タンパク質の欠失より低アミロースであった (Miura et al. 1994, Miura and Sugawara 1996, Miura et al. 1999, Araki et al. 2000)。これらの相違については, 本実験で穂発芽の見られた1997年に, Wx-A1タンパク質欠失の1系統が3場所ともアミロース含量が21

%以下で, Wx-B1タンパク質欠失系統との差が縮まったことが原因の一つにあげられる。

いずれにしろTable 2から明らかのように, アミロース含量はWx座の遺伝的制御を強く受ける。環境効果として年次間差異があったものの, 地域間に差異はなく, またタイプ×環境の相互作用も認められずnull対立遺伝子の違いによるアミロース含量の差異は, 北海道の主要な小麦生産地帯では安定して発現することが示唆された。

一方, 小麦粉の蛋白質含量は環境効果を受けやすく, 地域間, 年次間で有意に異なっていた。Wxタンパク質の有無に関する8タイプの間の変異は小さく, 単欠失および二重欠失と野生型の間には有意差はなく, またタイプ×環境の相互作用もなかった。したがって, 本実験結果で見える限り, null対立遺伝子は蛋白質含量とその環境間の変動には効果を及ぼさないと見える。蛋白質含量が栽培土壌間で変動することはよく知られており, 国産コムギでしばしば問題となる生産地や年次の違いによる小麦粉品質のばらつきの大きな原因となっている (平野ら 1963, 佐藤ら 1992)。

結果には示していないが, 各タイプからランダムに選んだ系統の α -アミラーゼ活性を測定したところ, 1997年の一部の系統で穂発芽の影響によると見られる 1000mU/g 以上の高い活性が観察された。しかし, 欠失タイプとアミラーゼ活性の間に一定した関係はなかった。また, 1999年は3地域とも成熟期が高温少雨で推移し穂発芽が観察されなかったにもかかわらず, 澱粉の最高粘度とブレイクダウンとも

に低い傾向にあった。その原因として一つには、記録的な高温で登熟が急速に進んだことで、 α -アミラーゼ活性が十分に低下する前に収穫したことが考えられる。しかし、これらの点はすべての系統の α -アミラーゼ活性を詳しく検討したものでなく、穂発芽による α -アミラーゼ活性とWxタンパク質欠失の関係については今後詳細にする必要がある。

Table 2の分散分析の結果から、澱粉の最高粘度とブレイクダウンには欠失タイプ×環境の相互作用が存在し、これら2形質の環境間での変動は欠失タイプ間で異なることがわかった。モチコムギを除く7タイプでみると、3種類のWxタンパク質を全て生産する野生型に比べ、Wx-B1タンパク質を共通に欠失したタイプ3, 5, 7は一樣に環境変化に対する反応が低く、安定した糊化特性を示すことが明らかになった (Figs. 3, 4)。前述したように、めん用品種にWx-B1タンパク質欠失タイプが高い頻度で存在することは、3つのnull対立遺伝子を比較したとき、Wx-B1bが最もアミロース含量を低下させ (Miura and Sugawara 1996, Miura et al. 1999, Yamamori and Quynh 2000)、粘弾性を高める効果が最も大きいこと (Araki et al. 2000, Yamamori and Quynh 2000) に加え、このタイプの製めん適性に関与する特性が種々の栽培条件で安定して発現することを示唆している。本実験でのタイプ3の結果はアミロース含量と澱粉糊化特性に関して上の仮説を支持するものである。

さらにWx-B1タンパク質に関する二重欠失のタイプ5と7は単欠失のタイプ3より低いアミロース含量と高く安定したブレイクダウンを示したことより、Wx-B1b遺伝子と他の2つのnull対立遺伝子のいずれかを組み合わせることで、うどん原料用としての澱粉特性がより向上することが窺われた。特に、環境を通じて約17.5%のアミロース含量を示したWx-B1bとWx-D1bの組み合わせによるタイプ7は、アミロース含量が22%程度のタイプ3より明らかに糊化特性の環境変動が小さかった。このことからWx座の遺伝的操作によりタイプ3のWx-B1タンパク質を欠失したチホコムギやホクシンより低アミロースで、環境間で糊化特性が安定した実用品種を育成することは可能であると考えられる。近年、安全性等の問題から国内産コムギへの関心が高まるなかで、一

部パンや菓子などに利用されているものの、国産コムギの大部分はうどんを主体に利用されている。したがって今後はタイプ7を含むWxタンパク質二重欠失系統について製めん適性を中心に二次加工適性を詳細に調査する必要がある。

謝 辞

本研究を実施するにあたり帯広畜産大学の沢田壮兵氏、口田圭吾氏、荒木悦子氏、紙谷志穂氏、江熊香織氏にご協力いただきました。北海道立十勝農業試験場天野洋一氏には本稿の校閲をいただきました。

引用文献

- 天野洋一, 柳沢 朗 (1993) 秋播き小麦における高品質品種の育成. 育種学最近の進歩. 35: 8-15
- Araki E., H. Miura and S. Sawada (2000) Differential effects of the null alleles at the three Wx loci on the starch-pasting properties of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:1113-1120
- Chao S., P.J. Sharp, A.J. Worland, E.J. Warham, R.M.D. Koedner and M.D. Gale (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78:495-504
- Finlay K.W. and G. Wilkinson (1963) The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.* 14:742-754
- 平野寿助, 海妻矩彦, 江口久夫 (1963) 土壌および肥料が小麦の品質に及ぼす影響. *中国農業研究* 27:50-51
- 小前幸三 (1991) 小麦の成分特性と加工特性. 1. デンプン成分. *研究ジャーナル* 14 (12): 7-15
- Miura H. and S. Tanii (1994) Endosperm starch properties in several wheat cultivars preferred for Japanese noodles. *Euphytica* 72:171-175
- Miura H. and A. Sugawara (1996) Dosage effect of the three Wx genes on amylose content in wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 92:1066-1070
- Miura H., S. Tanii, T. Nakamura and N.

- Watanabe (1994) Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three *Wx* genes. *Theor. Appl. Genet.* 89:276-280
- Miura H., E. Araki, and S. Tarui (1999) Amylose synthesis capacity of the three *Wx* genes of wheat cv. Chinese Spring. *Euphytica* 108:91-95
- Nakamura T., M. Yamamori, H. Hirano and S. Hidaka (1993a) Identification of three *Wx* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem. Genet.* 31:75-86
- Nakamura T., M. Yamamori, H. Hirano and S. Hidaka (1993b) Decrease of waxy (*Wx*) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breed.* 111:99-105
- 佐藤暁子・小柳敦史・末永一博・渡辺 修・川口數美・江口久夫 (1992) コムギ品質におよぼす土壌と窒素, リン酸施肥の影響. *日作紀* 61:616-622
- 平 春枝・田中弘美・斎藤昌義 (1989) 国内産小麦の品質. 第3報. 小麦粉およびデンプンの性質と品種・生産地・等級との関係. *日作紀* 58:24-34
- Yamamori M. and N.T. Quynh (2000) Differential effects of *Wx*-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:32-38
- Yamamori M., T. Nakamura and A. Kuroda (1992) Variations in the starch-granule bound protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 64:215-216
- Zhao X.C. and P.J. Sharp (1998) Production of all eight genotypes of null alleles at 'waxy' loci in bread wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Breed.* 117:488-490
- Zhao X.C., I.L. Batey, P.J. Sharp, G. Crosbie, I. Barclay, R. Wilson, M.K. Morell and R. Apples (1998) A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat. *J.Cereal Sci.* 27: 7-13

Abstract

It has been demonstrated that the null alleles at the three *Wx* loci of wheat confer a low amylose content and a high pasting viscosity of starch. The amylose content and pasting properties, as well as crude protein content, are important in producing marketable flour products. Variation for flour quality produced in different locations and years has frequently been noticed in domestic wheat. To verify the effects of null alleles at the *Wx* loci, environments and their interaction on flour properties, the eight possible types of recombinant lines carrying different null alleles under the 'Chinese Spring' genetic background were examined in the three main production areas in Hokkaido during 3 years. Amylose content was less variable across the nine environments than the other characters associated with flour quality. The combinations of the null alleles at the *Wx* loci explained most of the variation and no significant interaction with environment was appeared. Crude protein content was flexible in year to year and there were no effects of the *Wx* loci. Peak viscosity and breakdown of starch in the eight types were interacted by environments, with a relatively high and consistent viscosity in the double deficient lines than the wild type and single deficient lines. Especially the null allele at the *Wx*-B1 locus in the double deficient lines produced a lower amylose content and a higher starch-pasting viscosity across locations and years. The waxy type was characterized by a higher content of crude protein and higher breakdown than those of the wild type.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Wx* protein, amylose content, protein content, starch-pasting property, genotype × environment interaction

Selective grazing in leaf mixtures of four herbage grasses by sheep

Akio HONGO

(受理 : 2001年11月27日)

ABSTRACT

Grazing trials were carried out in Obihiro, Japan, in 1989 and 1990. Prehending bites were measured in leaf mixtures of four herbage grasses using hand-constructed swards, which were composed of 128 points of leaf units spaced 4 cm apart. Four grasses of the following five species were mixed in each trial: orchardgrass (*Dactylis glomerata*), timothy (*Phleum pratense*), meadow fescue (*Festuca elatior*), tall fescue (*Festuca arundinacea*) and sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum*).

The number of prehending bites, mean distance of travel between bites, traveling velocity between bites and total distance of travel for 1 min were 40-44bites/min, 8.5-8.8cm, 5.9-8.8cm/s and 3.5-3.7m/min, respectively. DM weight per bite did not differ among the four grass species. The actual area covered by one prehending bite was calculated at 18-24cm². From the analysis of frequencies of prehending bites in a pair of grass species, sheep clearly distinguished one species from another and separately prehended each species in the combinations of orchardgrass/meadow fescue and timothy/sweet vernalgrass, With respect to the transition of prehending bites among four grasses, prehension of selected species were influenced by the species prehended at the previous bite.

Key words : Herbage grasses, Hand-constructed sward, Leaf mixture, Selective grazing, Transition.

INTRODUCTION

Pasture vegetation is composed of various plant units. Grazing animals forage quite selectively using their sense organs (ARNOLD, 1966), and definitely prefer certain herbage species, stages of growth in a given species and particular parts of individual plants (HAFEZ,

1969). Animals tend to choose plant parts which can be eaten quickly (BLACK & KENNEY, 1984 : KENNEY *et al.*, 1984 : O'REAGAN, 1993). Cattle preferentially select the glabrous plants (KRUETER & TAINTON, 1988). Preference is affected by sward condition such as canopy height, plant density, and plant biomass (HODGSON, 1982 : JONES *et al.*, 1994), and by

Laboratory of Grassland Science, Department of Agro-environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido, 080-8555 Japan.

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science And Culture of Japan (No.01560281).

acceptability factors such as taste, odour and feel (KENNEY & BLACK, 1984).

Preference for herbage plant species is usually expressed as a percentage of the intake of feeds using a cafeteria fashion (BELL, 1959; HEADY & CHILD, 1994; SALEM, *et al.*, 1994). It is suggested that preference might be better defined in terms of time spent eating rather than as amount eaten (KENNEY *et al.*, 1984). In order to clarify preference for plant species, accurate measurement of the feed components selected by the animal must be carried out at the interface between the animal and the sward (LACA, *et al.*, 1992).

The present study is carried out to investigate the selective biting of grass species in the mixed sward and to observe the discriminative ability of sheep to grass species. For this purpose, new methods were developed to measure selective biting (JONES *et al.*, 1994). In this equipment, the positions of grass species which were pulled up could be stored in the computer's memory, when animals prehend plant parts at any point.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted from June to July in 1989 and 1990. Three Suffolk wethers aged 3-4 years with a mean live-weight of 62 kg were used. Sheep were held in pens and fed an adequate diet of fresh orchardgrass harvested from the same field twice daily. Fresh feed was placed in a container outside the pen. Four days before the commencement of each trial, sheep were trained to use the hand-constructed sward, which was placed at the same position as the feed container. Sheep readily grazed the artificial swards after training. Three sheep in 1989 and two sheep in 1990 were used for each treatment. Two grazing trials using one sheep were done on each day.

The sward board used was the same as the

previous report (HONGO, 1998). Four grasses of the following five species were used for hand-constructed sward: orchardgrass (OG; *Dactylis glomerata*), timothy (TI; *Phleum pratense*) and meadow fescue (MF; *Festuca elatior*) as a popular herbage plants, tall fescue (TF; *Festuca arundinacea*) as a stiff plant, and sweet vernalgrass (SVG; *Anthoxanthum odoratum*) as an odoriferous plant. These grasses were sown as a pure stand in rows 0.6 m apart in May 1988. The swards were fertilized and harvested regularly. Before each trial, fresh grasses were cut early in the morning. Vegetative tillers of suitable size were sorted out. Two leaf blades per vegetative tiller were left and all other leaves were removed. Three tillers (6 leaves) were attached to a stainless tube (8 mm diameter and 40 mm length) with cotton adhesive tape and then covered with vinyl tape which included a slender wire. Plants were sprayed with water and stored in a polyethylene bag.

When hand-constructed swards were constructed, terminal sections of leaves were clipped to yield a uniform height of 15 cm with scissors. Grazing trials were done using the leaf mixture of OG/TI/MF/SVG in 1989 and OG/TI/MF/TF in 1990. In 1989, the following four zonal arrangements were used. Each species was arranged at random at 32 points (1 point for the species) in the first experiment, at 16 points (2 adjacent points for the species) in the second experiment, at 8 points (4 adjacent points) in the third experiment, and at 4 points (8 adjacent points) in the fourth experiment. In 1990, each species was arranged randomly at 32 points. Sheep were fasted for approximately 14 hours before a grazing trial and were allowed to graze freely for about two minutes, before the entire top horizon of the sward was grazed.

Plants with stainless pipes were weighed separately at 128 points before and after trials.

Residual plant parts above an upper board were cut and weighed after trials. From these results, herbage intake was determined. Water loss from plant surface by evapotranspiration was measured for each plant parts, which were kept near sward board during a grazing trial. Herbage weight removed was corrected for moisture loss. These plant materials were then dried to obtain DM content. DM intake per bite at each point was calculated by dividing DM consumption by the total number of bites at this point.

In the statistical analysis, animals were treated as blocks. Variables of prehending bites were analyzed using an analysis of variance (SNEDECOR & COCHRAN, 1980). Total number of prehending bites, which were obtained from twelve trials in 1989, were classified into two classes according to prehending or not in a pair of grass species. The independence of two species was tested by chi-squared method in the 2 x 2 contingency table (SNEDECOR &

COCHRAN, 1980). The transition of prehending bites for four grasses was tested by chi-squared method using number of prehended points at succeeding bites in comparison with expected values (KASUYA & FUJITA, 1984).

RESULTS

The effect of bite number on bite size would be expected to decrease with increasing number, because of reduced availability of grass leaves. In the present study, results for 1 min were used in the calculation. Four zonal arrangements of four grass species did not affect selective biting, so that these treatments were included into replications.

1. Number of prehended points and DM intake

Sheep prehended 44-50% of examined 32 points per one grass species for 1 min in 1989 and 28-50% in 1990 (Table 1). In 1990, the number of prehended points of TF and MF were significantly lower than those of OG and TI, but not significant in 1989. Mean percentage of

Table 1 Number of examined and prehended points, available DM weights and grazed DM weights per point for 1 mm

Experiment	Species	Number of examined points	Number of prehended points for 1 min	Available DM weight per point (g)	Grazed DM weight per point (g/min)
Mixtures in 1989	Orchardgrass	32	16	0.18	0.10
	Timothy	32	15	0.24	0.14
	Meadow fescue	32	15	0.21	0.11
	Sweet vernalgrass	32	14	0.24	0.15
	D.F.		44	44	44
	SED ^{a)}		1.8	0.032	0.023
Mixtures in 1990	Orchardgrass	32	16	0.24	0.14
	Timothy	32	14	0.21	0.12
	Tall fescue	32	10	0.32	0.17
	Meadow fescue		9	0.16	0.08
	D.F.		12	12	12
	SED		3.8	0.033	0.014

a) SEDs : the standard error of the mean difference.

DM weights grazed for 1 min to available DM weights at a point occupied 52-63% in 1989 and 53-58% in 1990.

2. Distance and speed of travel between bites

Fig. 1 shows a diagram tracing the center of a prehending bite. The center was calculated from an average of X and Y coordinates, when more than two points were prehended at a bite. From these coordinate results and the time, mean distance of travel between bites, traveling speed were calculated (Table 2). Almost the same results were obtained from the experiments in 1989 and 1990. Mean distance of travel between bites (8.5-8.8 cm) shows that sheep tend to skip adjacent points because of a distance of 4 cm between points.

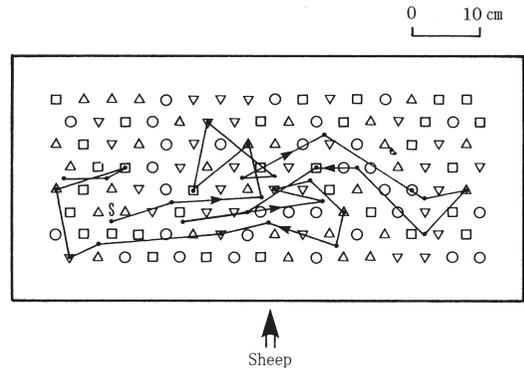


Fig. 1 Tracing of the center of a prehending bite, calculated from an average of X and Y coordinates. The first 30 prehending bites were shown in the leaf mixture of four grasses in 1990. S shows a starting point and a solid dot shows the center of a prehending bite. ○; orchardgrass, □; timothy, △; tall fescue, ▽; meadow fescue.

Table 2 Number of prehending bites for 1 min, mean distance of travel between bites, traveling velocity between bites and total distance of travel for 1 min.

Characters	1989	1990	D.F.	SED ^{a)}
Number of prehending bites for 1 min	40	44	14	2.4
Mean distance of travel between bites (cm)	8.8	8.5	14	0.36
Traveling velocity between bites(cm/s)	5.9	8.8	14	0.81
Total distance of travel for 1 min(m/min)	3.5	3.7	14	0.24

a) SEDs: the standard error of the mean difference.

3. Bite area and bite weight

DM weight per bite and intake rate were significantly lower in meadow fescue than in the other three grasses in 1990 (Table 3). These were not significantly different in four grasses in 1989. Numbers of prehended points per bite were an apparent estimation for bite area. In this hand-constructed swards, each point was uniformly spaced 4 cm apart and occupied 14cm². The actual area covered by one prehending bite was calculated at 24cm² in 1989 and 18cm² in 1990. Decreased bite area in 1989 resulted in reduction in DM weight per bite and DM intake

rate. Numbers of points simultaneously prehended per bite were significantly correlated with bite weights (Fig. 2).

4. Frequency of prehending bites

Percent frequencies of prehending bites in six pairs of 4 grass species in 1989 are shown in Fig. 3. In the combinations of OG/TI and TI/MF, one species was independent to another species. This result means that each grass was grazed at random. Conversely, a high significance was observed in the combinations of OG/MF and TI/SVG using the chi-squared analysis. In these combinations, the presence of

one species influenced prehending bite of another species because sheep clearly distinguished one species from another. Simultaneous prehension of three species at a bite was also

observed in 4.3 % of total prehending bites in 1989. This analysis was not done in the result of 1990, because of insufficient number of prehending bites.

Table 3 Number of prehended points per bite, DM weights per bite and DM intake rate for 1 min

Experiment	Species	Number of prehended points per bite	DM weight per bite (mg)	DM intake rate (g/min)
Mixtures in 1989	Orchardgrass	0.45	39	1.5
	Timothy	0.43	51	2.0
	Meadow fescue	0.44	44	1.7
	Sweet vernalgrass	0.42	50	1.9
	D.F.	33	33	33
	SED ^{a)}	0.028	4.0	0.16
	Total	1.74±0.070	184±14.3	7.1±0.76
Mixtures in 1990	Orchardgrass	0.39	51	2.2
	Timothy	0.39	39	1.7
	Tall fescue	0.23	16	0.7
	Meadow fescue	0.24	38	1.7
	D.F.	9	9	9
	SED	0.044	4.8	0.18
	Total	1.25±0.044	144±11.7	6.2±0.43

a) SEDs : the standard error of the mean difference.

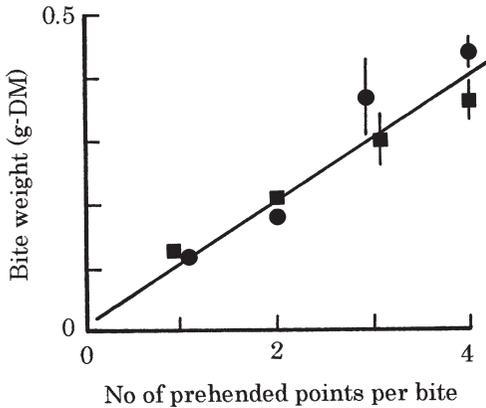


Fig. 2 Relationship between bite weight (Y) and number of prehended points per bite (X) in the mixtures of 4 grass leaves in 1989 (■) and 1990 (●). Only one observation in each number of prehended points per bite was excluded in the calculation. A vertical line attached to a symbol shows standard error. Correlation equation was as follows: $Y=0.097 \cdot X+0.020$, $r=0.961$ ($p<0.01$)

5. The transition of prehending bites

The transition of prehending bites among four grasses is shown in Table 4. Observed frequencies of transitions of OG-MF, TI-SVG, MF-OG and SVG-TI were significantly lower than expected values, and those of OG-SVG, TI-OG, MF-TI and SVG-MF were significantly higher than expected values. In these cases, selective biting of some species was influenced by another grass species prehended at the previous bite. In other cases, sheep selected grass species at random irrespective of grass species at the previous bite.

DISCUSSION

Under field conditions, it is extremely difficult to isolate the independent effects of various sward conditions on intake rate. By

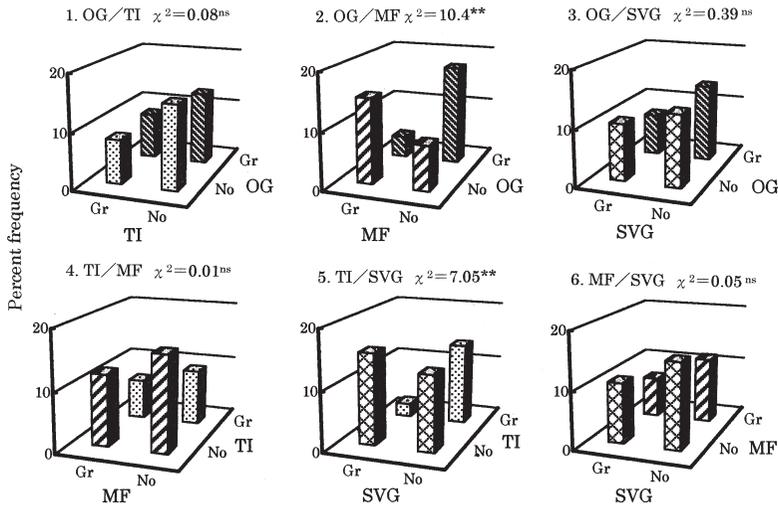


Fig. 3 Percent frequency of prehending bites for a pair of grass species. Total 484 bites of twelve trials were classified into two classes according to prehending or not in each pair of four grasses. The independence of two species was tested by chi-squared method. Zero and 1 mean no prehending and prehending of more than 1 point at each bite, respectively.

▨; OG (orchardgrass), ▩; TI (timothy), ▤; MF (meadow fescue), ▥; SVG (sweet vernalgrass), ns; not significant, *; significant at $p < 0.05$, **; significant at $p < 0.01$.

Table 4 Transition of prehending bites of four herbage grasses in 1989

Prehended species	Prehended species at a succeeding bite				
	OG	TI	MF	SVG	Sum
Orchardgrass (OG)	—	40 ^{ns}	25*	52*	117
Timothy (TI)	63**	—	41 ^{ns}	17**	121
Meadow fescue (MF)	18**	58**	—	41 ^{ns}	117
Sweet vernalgrass (SVG)	38 ^{ns}	17**	50**	—	105
Sum	119	115	116	110	460

Figures show number of prehended points of four herbage grasses at a succeeding bites, when prehended species were different from those at a previous bites. Data were obtained from measurements for 1 min in twelve trials in 1989. Significant test was done using cell-by-cell test of chi-square test.

ns; not significant, *; significant at $p = 0.05$, **; significant at $p = 0.01$.

preparing artificial swards composed of various kinds of plant materials, it was possible to measure directly bite weight and bite area. The new system under the control of a personal computer was useful in observing biting behaviour.

There were two types of experimental errors

in the overall observation (HONGO, 1998). Information recorded as biting in the computer without any DM intake occupied 4.7-6.1% of the total of 128 points in 1989 and 1990. Conversely, 10.0-13.7% were recorded as not biting in spite of DM reduction. The former type of error might be caused when plants,

initially prehended, were pulled up but escaped defoliation because leaves slipped from the mouth (FLORES et al., 1993). The latter case seems to be caused mostly by the flexible characteristics of grass leaves. When tensile force by the animals is applied at a sharp angle, grass leaves may easily bend and break at an upper edge of the insertion hole, resulting in insufficient vertical force to activate switching. This experimental error was due to the structural defect of the sward board. Data of both cases were not included in these results.

The biting areas of successive bites are said to generally overlap when cattle graze across a sward horizon (UNGAR et al., 1991). In this study, biting overlap was defined as traveling distance less than 4 cm. This means that succeeding bites remain within the zone of the previous bite. Percentage of biting overlap observed for 1 min was 10.8% of total bites in 1989 and 4.4 % in 1990. Mean distance of travel between bites was 8.5-8.8 cm. This suggests that biting overlap rarely happens when sheep graze grasses in mixed swards.

In grass/clover mixtures, there are many reports that clover is usually preferred when grazed at high stocking rates (CURLL & WILKINS, 1980; PENNING et al., 1991). In another study (BOROM & ARNOLD, 1986), some weedy species were avoided and grasses were grazed selectively between weed stubbles. In leaf/culm mixtures, sheep selected only grass leaves with a small biting area (Hongo, 1998).

The extent of preference occurring among grass species was variously reported (BAKER, 1975). In the present study, the presence of some species influenced prehension of another species in OG-MF and TI-SVG combinations. Since grazing sheep were reported to prefer OG than MF in the mixed swards (COWLISHAW & ALDER, 1960), these results seem to show the preference of one species to another in

these combinations.

With respect to the transition of prehending bites among four grasses, the selected grass species were influenced by the grass species prehended at the previous bite. In another study using the same hand-constructed swards, however, sheep prehended grass leaves at random according to total frequency of each treatment (Hongo, 1998). From the result of this study, sheep may discriminate between grass species at the biting moment and tend to prehend these leaves selectively in mixed swards.

Selective biting closely relates with herbage mass per area effectively covered by one bite (FORBES, 1988; KENNEY & BLACK, 1984). Since swards were made at low density of grass leaves in this study, further studies should be done in dense swards with different herbage mass.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. T. SATOH is acknowledged for his valuable advice in system planning of the electric circuit. The authors are grateful to Miss. A. SIGETA, Mr. T. MAE and Mr. N. KOSHIMO for invaluable assistance in conducting the experiments.

REFERENCES

- 1) ARNOLD, G.W. (1966) The special senses in grazing animals. I. Sight and dietary habits in sheep. *Aust. J. Agr. Res.* 17, 521-529.
- 2) BAKER, R.D. (1975) Effect of sward characteristics on herbage intake under grazing. In *Pasture Utilization by the Grazing Animals* (Eds. by J. HODGSON and D. JACKSON). British Grassland Society. Berkshire. pp.87-92.
- 3) BELL, F.R. (1959) Preference thresholds for taste discrimination in goats. *J. Agr. Sci.*

- 52, 125-129.
- 4) BLACK, J.L. and P.A. KENNEY (1984) Factors affecting diet selection by sheep. II. Height and density of pasture. *Aust. J. Agr. Res.* 35, 565-578.
 - 5) BOROM, D.M. and G.W. ARNOLD (1986) Selection by grazing sheep of pasture plants at low herbage availability and responses of the plants to grazing. *Aust. J. Agr. Res.* 37, 527-538.
 - 6) COWLISHAW, S.J. and F.E. ALDER (1960) The grazing preferences of cattle and sheep. *J. Agr. Sci.* 54, 257-267.
 - 7) CURLL, M.L. and R.J. WILKINS (1980) The relationship between selective grazing by sheep and the botanical composition of a grass/clover sward. *Proc. 8th Eur. Grassl. Fed.* 7, 17-23.
 - 8) FLORES, E.R., E.A. LACA, T.C. GRIGGS and M.W. DEMMENT (1993) Sward height and vertical morphological differentiation determine cattle bite dimensions. *Agron. J.* 85, 527-532.
 - 9) FORBES, T.D.A. (1988) Researching the plant-animal interface: the investigation of ingestive behaviour in grazing animals. *J. Anim. Sci.* 66, 2369-2379.
 - 10) HAFEZ, E.S.E. (Ed.) (1969) *The Behaviour of Domestic Animals*. Tindall and Cassell Ltd. London. pp. 296-348.
 - 11) HEADY, H.F. and R.D. CHILD (1994) *Range Ecology and Management*. West View Press. Boulder. pp. 39-57.
 - 12) HODGSON, J. (1982) Influence of sward characteristics on diet selection and herbage intake by the grazing animal. In *Nutritional Limits to Animal Production from Pastures*. (Ed. J.B. HACKER). Commonwealth Agricultural Bureau. London. pp.153-166.
 - 13) HONGO, A. (1998) Selective grazing in pure and leaf/culm mixtures of herbage grasses by sheep. *J. Agr. Sci.* 131, 353-359
 - 14) JONES, T.A., M.H. RALPHS and D.C. NIELSON (1994) Cattle preference for 4 wheatgrass taxa. *J. Range Manag.* 47, 119-122.
 - 15) KASUYA, E. and K. FUJITA (1984) *Statistics for Ethology*. Tokai University Press. Tokyo. pp.51-66.
 - 16) KENNEY, P.A. and J.L. BLACK (1984) Factors affecting diet selection by sheep. I. Potential intake rate and acceptability of feed. *Aust. J. Agr. Res.* 35, 551-563.
 - 17) KENNEY, P.A., J.L. BLACK and W.F. COLEBROOK (1984) Factors affecting diet selection by sheep. III. Dry matter content and particle length of forage. *Aust. J. Agr. Res.* 35, 831-838.
 - 18) KRUEGER, U.P. and N.M. TAINTON (1988) The effect of continuous and rotational grazing of sourveld on the selection of plant fractions by Simmental heifers. *J. Grassl. Soc. South. Africa* 5, 68-71.
 - 19) LACA, E.A., E.D. UNGAR, N. SELIGMAN, M.R. RAMEY and M.W. DEMMENT (1992) An integrated methodology for studying short-term grazing behaviour of cattle. *Grass and Forage Sci.* 47, 81-90.
 - 20) O'REAGAN, P.J. (1993) Plant structure and acceptability of different grasses to sheep. *J. Range Manag.* 46, 232-236.
 - 21) PENNING, P.D., A.J. ROOK, and R.J. ORR (1991) Patterns of ingestive behaviours of sheep continuously stocked on monocultures of ryegrass or white clover. *Appl. Ani. Behav. Sci.* 31, 237-250.
 - 22) SALEM, H.B., A. NEFZAOUI and H. ABDOULI (1994) Palatability of shrubs and fodder trees measured on sheep and dromedaries. I. Methodological approach. *Anim. Feed Sci. Tech.* 46, 143-153.
 - 23) SNEDECOR, G.W. and W.G. COCHRAN (1980) *Statistical Methods* (7th ed.). The Iowa State University Press. Ames.

- 24) UNGAR, E.D., A. GENIZI and M.W. DEMMENT (1991) Bite dimensions and herbage intake by cattle grazing short hand-constructed sward. *Agron. J.* 83, 973-978.

イネ科牧草 4 種を混在させた人工草地におけるヒツジの選択採食

本江昭夫

帯広畜産大学畜産環境科学科 (080-8555 北海道帯広市稲田町)

要 約

1989と1990年に、4 cm間隔で128 点にイネ科牧草 4 種を設置した人工草地を用いてヒツジの採食行動を観察した。実験にはオーチャードグラス、チモ

シー、メドゥフェスク、トールフェスク、スイートバーナルグラスのうち 4 草種を用いた。

バイト数は40~44回/分、バイト間の平均移動距離は8.5~8.8cm、バイト間の移動速度は5.9~8.8cm/秒、移動の合計距離は 3.5~3.7m/分であった。バイトあたりのDM重は混在させた 4 草種の間で差はなかった。1 バイトで採食した面積は18~24cm²と推察された。バイトの頻度について 2 草種間の関係を解析したところ、オーチャードグラスとメドゥフェスク、チモシーとスイートバーナルグラスの組みあわせでは、ヒツジは明かに2草種を識別し、別々に採食する傾向にあった。ある草種を採食した後に、残りの3草種のうちどの草種を採食したのか、その推移を検討したところ、1つの草種の採食は直前に採食した草種の影響を強く受けていた。

キーワード：イネ科牧草，人工草地，混播草地，選択採食，推移。

北海道十勝地方の鳥類11. 帯広市帯広川下流部の水鳥類

内田句子¹・藤巻裕蔵¹

(受理：2001年12月25日)

Birds of Tokachi District, Hokkaido 11. Waterfowl of the lower reaches of the Obihiro River, eastern Hokkaido

Junko UCHIDA¹ and Yuzo FUJIMAKI¹

要 約

帯広市帯広川下流(西7条~札内川合流点)に調査地4か所を設け、2000年4月中旬~9月下旬に水鳥類の調査を行なった。これらの調査地でカイツブリ、オオハクチョウ、マガモ、コガモ、ヒドリガモ、オナガガモ、ホシハジロ、キンクロハジロ、カワアイサの計10種の水鳥類が観察された。種数は、川沿いに住宅が少なかつたり川岸に遮蔽物のあるような環境、また護岸が草本類や低木類でおおわれている環境で多い傾向が見られた。個体数では、4調査地で共通して水面採餌ガモが多く、そのうちマガモとカルガモの2種は調査期間を通して主要種で、その他の水面採餌ガモは春と秋に多くなった。餌付けが行なわれている場所ではカモ科鳥類の個体数が多く、とくに積極的に餌付けが行なわれている所ではオオハクチョウが多かった。一方、釣り人の出入りが頻繁な場所では個体数が少ない傾向がみられた。

十勝地方には北は大雪山系を流れる河川やダム湖などから南は平野部の河川中・下流部や湖沼など、さまざまなタイプの水域がある。これらの水域のうち、平野部の海岸に近い湖沼では水鳥類の種数も個体数も多いが、これらの水域に比べダム湖では水鳥相が貧弱である(正富ほか 1978, 藤巻 1996, 2001a, 2001b, 奥山・藤巻 2001)。

帯広川は、日高山脈東側山麓部から十勝平野中央部を流れ、帯広市で札内川に合流した後、十勝川中流部に合流し、山間部と平野部海岸沿いのほぼ中間にある水域である。帯広川の上・中流部は農耕地を流れているが、下流部は帯広市都心部の市街地を流れ、川岸もコンクリートで護岸されている部分が目立つ。帯広川下流部のこのような位置・環境条件

にある水域では、どのような水鳥類が生息するかを明らかにするため、下流部の市街地から札内川との合流部の住宅の少なくなる部分まで、環境が少しづつ異なる調査地を4か所設け、2000年4~9月に水鳥類の生息状況を調査した。さらに、この結果と十勝地方のさまざまな水域における他の調査結果とを比較し、帯広川下流部の水鳥類の特徴について検討した。

調査地と調査方法

調査地は、帯広川下流部の4か所で、上流から下流に向けて次の通りである。

調査地1. 鎮橋上流。西7条から下流の鎮橋までの1.5kmの区間である。川幅は約25mである。

¹帯広畜産大学畜産環境学科生態系保護講座 〒080-8555 帯広市稲田町西2-11

¹Laboratory of Wildlife Ecology, Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro 080-8555, Japan

調査地 2. 帯広神社付近。鎮橋より下流の0.4kmの区間である。川幅は約27mである。なお、ここでは冬にオオハクチョウに餌付けが行なわれている。

調査地 3. 銀輪橋下流。銀輪橋からその下流の無名の橋までの1kmの区間である。川幅は約25mである。この調査地の上流端は、調査地 2 の下流端とは約1.5 km離れている。

調査地 4. 調査地 3 の無名の橋の下流で、札内川との合流点近くまでの300mの区間である。川幅は橋付近では約25mであるが、下流になるにつれて徐々に広がっている。

調査地の川沿いの環境については、住宅地、草地、林の三つに区分し、それぞれの環境の長さを歩測で測り、その割合を求めた (Table 1)。川岸は全てコンクリートまたはコンクリートブロックで護岸されており、調査地 1, 2 ではほぼ垂直、調査地 3, 4 では緩やかな斜面となっているが、コンクリートが裸出している部分、草で被われている部分、ヤナギ低木などが生育している部分があるので、これらの長さをそれぞれ歩測で測り、その割合を求めた (Table 1)。なお、調査地 2, 4 の一部では川まで降りられるように階段状になっており、後者の場合ではそこがカヌーの停泊場になっている。調査中にカヌー利用者はいなかったが、調査地 3 と 4 では5月後半以降に多くの釣り人の出入りがあった。

調査は、2000年4月には中旬に2回、5～9月には各月の前半と後半にそれぞれ2回づつ行ない、2回の平均値を各調査期の個体数とした。調査時間帯は、カモ類が採食や休息中であまり移動しない午前中とした。

調査地 1, 2 では歩きながら水鳥類の種と種ごと

の個体数を記録した。調査地の見通しが悪い場合には鳥を重複して数えないよう注意しながら、復路では往路の対岸を歩いて往復2回の記録をとり、そのうちの多かった個体数をその日の記録個体数とした。調査地 3 では川沿いに常緑針葉樹が植えられていて一部見通の悪い部分があったので、1kmの区間を3区分してそれぞれに1か所の定点を設けてそこから観察し、合計値をこの調査地の個体数とした。この調査地では数える個体の重複をできるだけさけるため、水鳥類を観察しながら定点間を移動した。調査地 4 では川岸と水面との高低差がなく、川沿いを歩くと水鳥が飛び去ってしまうため、橋付近から見渡せる範囲を観察した。調査には双眼鏡 (8倍) とフィールドスコープ (20倍) を用いた。

結 果

調査地 4 か所で観察された水鳥類は、カイツブリ、オオハクチョウ、マガモ、カルガモ、コガモ、ヒドリガモ、オナガガモ、ホシハジロ、キンクロハジロ、カワアイサの10種で、このうちカイツブリを除く9種がカモ科鳥類であった。

調査地 1 ではこのうち6種が観察された (Table 2)。マガモとカルガモは4～9月を通して観察されたが、他の種は4月と5月前半、または9月の渡り時期に出現しただけであった。マガモでは5月後半～7月後半に雌と幼鳥からなる家族群が出現し、個体数が増加した。ただし、6月前半には家族群が川岸の草むらに隠れていることが多く、個体数はその前後に比べて少なかった。7月後半頃から幼鳥が大きくなり雌成鳥と区別が困難となったので、それらは全て雌成鳥として数えた。カルガモは8月前半か

Table 1. Characteristics of study areas.

Study area	Length (km)	Environments along the river (%)			Characteristics of bank (%)		
		Wood	Grassland	Residential area	Concrete brock	Covered with grasses	Covered with bushes
No. 1	1.5	0	0	100	47	37	16
No. 2	0.4	50	0	50	56	8	36
No. 3	1.0	18	82	0	38	39	23
No. 4	0.3	50	50	0	79	21	0

ら増加し始め、個体数は4調査地の中で最も多かった。

調査地2では5種が観察された (Table 3)。このうちマガモは4月～9月を通して、カルガモは7月を除く4～9月に、カワアイサは5～6月前半と9月後半に観察されたが、その他の種は4月の渡りの時期に出現しただけであった。マガモの個体数は

5月後半からほとんど変化せず、6～7月に家族群が観察されたが、あまり多くなく、個体数は8月後半以降に増加した。カルガモの個体数は全体に少なかった。カワアイサでは5月に成鳥のつがいが、6月前半には雌のみが観察され、9月後半に観察されたのは全て雌型の個体であった。

調査地3では10種が観察された (Table 4)。こ

Table 2. Mean numbers of waterfowl observed in study area 1.

Species	April	May	June	July	August	September
<i>Tachybaptus ruficollis</i>	0.5	0	0	0	0	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	7.0	3.5	28.0	11.5	34.5	49.5
<i>Anas poecilorhyncha</i>	4.0	5.5	3.5	1.5	2.5	8.5
<i>Anas crecca</i>	0	0.5	0	0	0	0
<i>Anas acuta</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Mergus merganser</i>	0	0	0	0	0	0

Table 3. Mean numbers of waterfowl observed in study area 2.

Species	April	May	June	July	August	September
<i>Cygnus cygnus</i>	38.0	0	0	0	0	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	76.5	13.0	25.0	29.0	34.0	26.0
<i>Anas poecilorhyncha</i>	11.0	3.0	5.5	1.0	1.0	0
<i>Anas penelope</i>	16.0	0	0	0	0	0
<i>Mergus merganser</i>	0	1.0	2.0	0.5	0	0

Table 4. Mean numbers of waterfowl observed in study area 3.

Species	April	May	June	July	August	September
<i>Tachybaptus ruficollis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Cygnus cygnus</i>	5.5	0	0	0	0	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	28.5	4.0	3.0	7.0	18.0	28.0
<i>Anas poecilorhyncha</i>	0	0	0.5	0	5.0	10.0
<i>Anas crecca</i>	58.0	4.5	0	0	0	0
<i>Anas penelope</i>	57.0	13.0	2.5	0	0	0
<i>Anas acuta</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Aythya ferina</i>	1.0	0	0	0	0	0
<i>Aythya fuligula</i>	78.5	19.5	2.0	0	0	0
<i>Mergus merganser</i>	0.5	0	0	0	0	4.0

のうちマガモは4～9月を通して観察されたが、カルガモは5月以降に、カワアイサは4月後半と7月後半以降に、その他の種は4～5月または9月の渡りの時期に出現し、6月前半に種数、個体数ともに最小となった。マガモの家族群は6月頃から見られ始めたが、個体数はあまり多くならず、8月後半以降に個体数が増加した。このほか6月後半にはカルガモの家族群1組、7月後半にはカワアイサの家族群1組が観察された。この調査地では岸が緩やかな斜面になっているため、ここに上陸して休息しているカモ類も多く見られ、春と秋の個体数が増加する時期には岸沿いに林のある下流部で個体数が多かった。

調査地4では6種が観察された (Table 5)。このうちマガモとカルガモは4～9月を通して観察されたが、カワアイサは7、9月に、その他の種は5月または8月後半以降の渡りの時期に出現しただけであった。6月後半にはマガモの幼鳥が少数観察され、7月にはカワアイサとカルガモの家族群が1組づつ観察された。7月にはこれらの家族群の出現によって個体数が増加した。

観察された水鳥類の種数は、周辺が住宅地となっている調査地1、2ではそれぞれ6、5種であったが、住宅地のない調査地3、4では10、6種と、多くなる傾向が見られた。コンクリート護岸の裸出割合が50%以上の調査地2、4と裸出割合が50%未満の調査地1、3とで同様に種数を比べると、前者では5、6種、後者では6、10種で、後者で多くなる傾向が見られた。

次に個体数について検討するが、観察された水鳥類10種のうちカモ科鳥類以外はカイツブリ1種だけ

で、しかも個体数が少なかったため、カモ科鳥類9種について検討する。カモ科鳥類を、オオハクチョウ、水面採餌ガモ (マガモ、カルガモ、コガモ、ヒドリガモ、オナガガモ)、潜水ガモ (ホシハジロ、キンクロハジロ、カワアイサ) の3グループに分けて個体数をみると (Table 6)、オオハクチョウは4月だけに見られ、調査地2では多く、その他の調査地では少ないかまたはいなかった。水面採餌ガモは渡り時期の4月と9月後半に調査地2、3で多く、調査地1、4では少なかった。その他の月でも、調査地2で比較的多かった。潜水ガモは全般に少なく、多くの月で調査地1、2より調査地3、4で多かった (Fig. 1)。

他の水域における調査結果と比較するため、水面面積10ha当りの個体数を示すと、調査地1では25 (5月前半)～291羽 (9月後半)、調査地2では157 (5月前半)～1,310羽 (4月)、調査地3では28 (6月前半)～322羽 (9月後半)、調査地4では7 (6月前半)～293羽 (9月後半)であった (Fig. 1)。

考 察

帯広川下流部は、市街地とそれに隣接する住宅の少ない地域を流れており、4月中旬から9月下旬にかけて10種の水鳥がみられた。このうち4～9月を通してみられたのはマガモ、カルガモ、カワアイサの3種で、そのうちマガモとカルガモの2種が主要な種であった。その他の種は春と秋、または春と秋のいずれかにみられた。そのため種数は春と秋に多くなった。観察された水鳥類の種数は住宅地のない区域で、またコンクリート護岸の川岸が草本類や低木類で被われている区域で多い傾向がみられた。こ

Table 5. Mean numbers of waterfowl observed in study area 4.

Species	April	May	June	July	August	September					
<i>Anas platyrhynchos</i>	—	1.0	0.5	0.5	7.5	22.5	17.5	10.0	10.0	17.0	9.5
<i>Anas poecilorhyncha</i>	—	0	0.5	0	0.5	0	4.5	8.5	1.0	1.5	0
<i>Anas crecca</i>	—	2.0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	3.0
<i>Anas penelope</i>	—	5.0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aythya fuligula</i>	—	8.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mergus merganser</i>	—	0	0	0	0	4.0	0	0	0	2.5	0

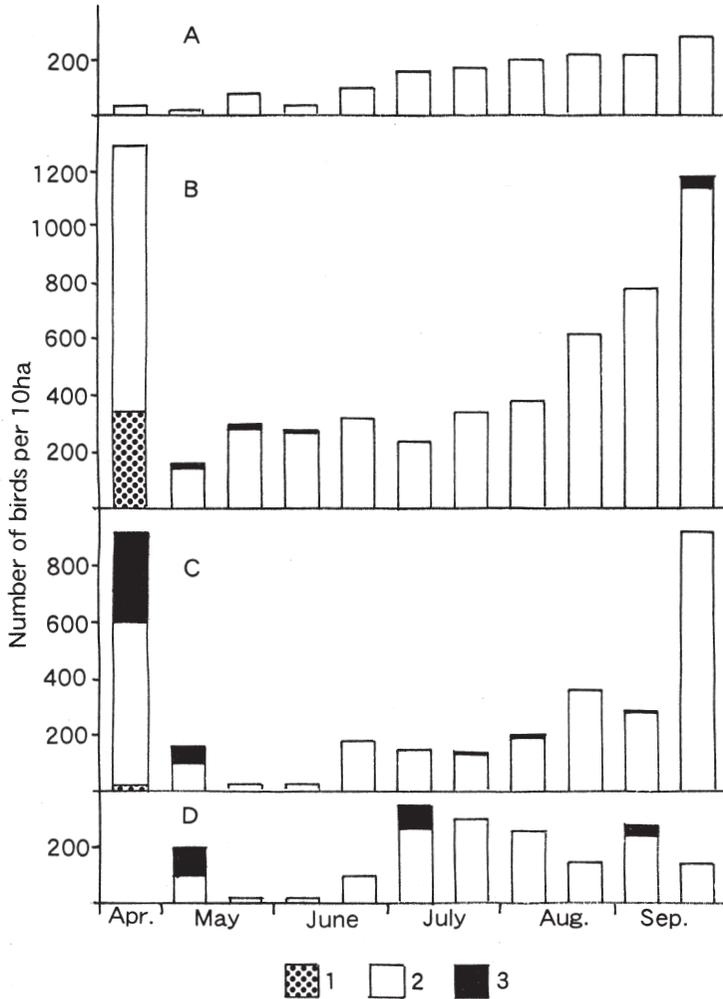


Fig. 1. Seasonal changes in numbers of anatids in study areas. A, B, C and D indicate study areas 1, 2, 3 and 3 respectively. 1=swans, 2=dabbling ducks, 3=diving ducks.

れは、餌付けで人馴れしたマガモやカルガモが住宅地のある区域でも生息していたのに対し、その他のカモ類はむしろ人を避け、できるだけ遮へいのある所を選ぶためと考えられる。なお、帯広市でカルガモがよく観察されるようになったは比較的最近のことで、例えば帯広市都心部にある緑ヶ丘公園の池で、カルガモは1985年までは、1983年と1985年に各1回、計2回見られただけであるが、1987年からは池が結氷

する時期以外は常に飛来するようになり(小沢 1992)、最近になって個体数も増加してきた(池田 1996)。

カモ科鳥類の個体数を生態グループ別にみると、いずれの調査地でも水面採餌ガモが多かった。そのため全種の個体数は水面採餌ガモの個体数変化と同じように変化した。カモ科鳥類全体の個体数は4月と9月後半には調査地2、3で多かったが、その理由として前者では餌付けの影響が考えられる。餌付

けはおもにオオハクチョウがいる4月に行なわれていたが、それ以外の月でもときどきカモ類に対して餌が与えられていた。4月にはオオハクチョウとマガモ、それ以外の月ではマガモとカルガモに餌付けの影響があったと思われる。餌付けによりカモ科鳥類が多くなる例は広く知られている。例えば、帯広市内の公園でも同様のことが見られており(池田 1996)、全国的に1月に行なわれたカモ科鳥類の調査結果によると、餌付けが実施されている場所の方で個体数が多くなっていた(樋口ほか 1988)。一方、調査地3で春と秋の渡り時期に個体数が多かったのは、この調査地の下流部分の両岸沿いに林があり、この部分に多くのカモ類が集まっていたことから、林によって周囲と遮蔽された環境が休息場として選択されたためと考えられる。このように林が遮蔽効果をもつことは、近畿地方のたぬき池の場合でも知られている(武田 1990)。一方、カモ類がダム湖で休息する場合には、植被のある部分よりない部分をよく利用するという例もある(藤原ほか 1998)。これは、ダム湖の場合には人が水際まで近づくことが少なく、遮蔽物となる植被の存在は重要ではなためかもしれない。このようなダム湖の例を除けば、多くのカモ類が生息するには人とカモ類との間に遮蔽物の存在が重要であるといえるだろう。また、調査地における釣り人の出入りについてはとくに記録しなかったが、釣り人が来るとカモ類が飛び去り個体数が少なくなることがあり、とくに調査地4でそのようなことがよく観察された。調査地4では川岸沿いの50%に林があったが、釣り人が近づくため、林の遮蔽効果が薄く、個体数が多くならなかったと思われる。釣り人の存在がカモ類の採餌や休息に影響を与える可能性があることは、たぬき池やダム湖の場合でも指摘されている(武田 1990, 藤巻 1996)。

積極的に餌付けされている調査地2以外では、カモ科鳥類はおもに休息のため調査地に飛来するとおもわれる。休息には水面のほか、川岸も使われていたが、岸が緩斜面の場合によく利用されていた。近畿地方のたぬき池の場合でも岸が緩斜面だとより多くのカモ類が定着するので(武田 1990)、飛来地水域の水際の環境条件として、上述の遮蔽物の存在とともに岸の形も重要な要因になると思われる。

今回の調査地と十勝川下流部にある沼や十勝地方

太平洋沿岸にある湧洞沼との間で生息しているカモ科鳥類を比較すると、これらの沼では調査地で観察された9種以外にマガン、ヒシクイ、ハクガン、ヨシガモ、シマアジ、ハシビロガモ、スズガモなどが観察され(日本野鳥の会十勝支部 1986, 正富ほか 1978, 奥山・藤巻 2001)、種数ははるかに多い。このような種数の違いは、帯広川下流部がかなり人工化された環境であるのに対し、これらの沼の周囲には農耕地、湿地、森林といったより自然に近い環境が残されているからであろう。一方、山間部のダム湖と比べると、ダム湖で記録されたのは7種と調査地より少なかった。種構成についてみると、繁殖期である5~7月の主要種は、オシドリ、マガモ、カワアイサの3種、それ以降10月までの主要種はこれらにコガモが加わるだけで、共通しているのはマガモとコガモの2種で、種構成にやや違いが見られた。ダム湖で種数が少ないのは、湖岸が裸地になっていたり、水深が深すぎ水面採餌型のカモ類の生息に適さないためであろう(藤巻 2001a)。

カモ科鳥類が飛来するいくつかの水域間で、水面面積10ha当りの個体数を比べてみる。水面採餌ガモの水面面積10ha当り個体数は、調査地では4月と9月には30~1,200羽、5~8月には10~400羽であったが、十勝川下流部や海岸沿いの沼ではそれぞれ100~170羽、6~8月には10~160羽と調査地におけるより少なく(日本野鳥の会十勝支部 1986, 正富ほか 1978, 奥山・藤巻 2001)、山間部のダム湖では多い月でも34羽とさらに少なかった(藤巻 2001a)。潜水ガモの水面面積10ha当り個体数は、調査地では4~5月に80~300羽になることもあったが、それ以外の月では20羽以下か、または生息しなかった。山間部のダム湖では調査地におけるより少なかった。それに対し、十勝川下流部や海岸沿いの湖沼では4~5月と9月に40羽前後とやや多く、水面採餌ガモに対するこのグループの割合は調査地におけるより多かった。

全国的に1月に行なわれたカモ科鳥類の調査結果によると、50%以上の内陸水域調査地で観察されたのは、マガモ、カルガモ、コガモ、ヒドリガモ、オナガガモの5種である(樋口ほか 1988)。これらのうちマガモとカルガモは調査地では上述のように主要種であり、その他の種はおもに春と秋に観察さ

れた。これらは冬にはさらに南下すると考えられ、調査地で渡り時期に観察されるカモ科鳥類は本州以南の内陸水域で越冬するタイプの種といえる。

帯広川下流部のような河川中流部で、都市環境にある小河川に飛来する水鳥類の種数は、より自然条件の多い環境に比べれば少ないが、個体数は山間部のダム湖、河川下流部や海岸沿いの沼に比べて多い。とくに餌付けされている場所における個体数は異常とも言える多さである。また、飛来するカモ科鳥類は、おもに内陸水域を主要な生息地とする水面採餌ガモで、このグループの潜水ガモに対する割合は河川下流部や海岸沿いの沼に比べて高いという特徴がある。

引用文献

- 藤原宣夫・百瀬浩・田畑正敏・舟久保敏・半田真理子・田中隆, 1998. ダム湖におけるカモ類の行動と環境選択. 環境システム研究 26 : 37-44.
- 藤巻裕蔵. 1996. 4. 富村調整池の鳥類. 十勝川水系上流地域の生態調査報告書XVI. 富村発電所建設の事後生態調査 (1993), 177-186.
- 藤巻裕蔵. 2001a. 北海道十勝地方の鳥類 9. 十勝川上流部ダム湖の水鳥類. 帯大研報 22 : 95-101.
- 藤巻裕蔵. 2001b. 4. 富村調整池の鳥類. 十勝川水系上流地域の生態調査報告書XVII. 富村発電所建設の事後生態調査 (1998), 135-144.
- 樋口広芳・村井英紀・花輪伸一・浜屋さと, 1988. ガンカモ類における生息地の特性と生息数の関係. Strix 7 : 193-202.
- 池田亨嘉. 1996. 北海道帯広市緑ヶ丘公園十勝池のガンカモ類. 帯広百年記念館紀要 (14) : 29-36.
- 正富宏之・藤巻裕蔵・川辺百樹・橋本正雄・中田千佳夫. 1978. 湧洞沼及びその周辺の鳥類相. 野鳥生息環境実態調査報告書-湧洞沼-, 43-76.
- 奥山美和・藤巻裕蔵. 2001. 北海道十勝地方の鳥類 10. 十勝川下流沿いの沼のカモ科鳥類. 帯大研報 22 : 135-142.
- 武田恵世. 1990. カモ科鳥類の越冬する池の条件. Strix, 9 : 89-115.
- 日本野鳥の会十勝支部. 1986. 育素多沼の鳥類. Strix, 5 : 23-29.
- 小沢敬二, 1992. 帯広市緑ヶ丘公園の野鳥. 探鳥会の記録に見る野鳥の変化. 十勝野鳥だより (100) : 84-90.

Summary

Observations on waterfowl were carried out in two urban and two suburban areas along the lower reaches of the Obihiro River, eastern Hokkaido, from mid-April to late September 2000. A total of 10 species of waterfowl were recorded; *Tachybaptus ruficollis*, *Cygnus cygnus*, *Anas platyrhynchos*, *Anas poecilorhyncha*, *Anas crecca*, *Anas penelope*, *Anas acuta*, *Aythya ferina*, *Aythya fuligula* and *Mergus merganser*. Numbers of species were larger in suburban areas than in urban areas, and in areas with shelters along the river than in areas without shelters. The number of dabbling ducks were greater than those of diving ducks in four study areas. The main species of dabbling ducks were *A. platyrhynchos* and *A. poecilorhyncha* during the study. Other species increased in numbers in spring and/or autumn. Artificial feeding contributed in increase of number of birds, but did not contribute in increase of number of species.

Key words: Hokkaido, Obihiro River, waterfowl

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* のポリガラ クツロナーゼ I の単離

高橋 裕司・井熊 武志・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英

Isolation of polygalacturonase I from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA
(受理：2001年11月30日)

概 要

ポリガラクツロナーゼ I を、CM-Toyopearl陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびSephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の培養抽出物のポリガラクツロナーゼ活性主要画分から単離した。ポリガラクツロナーゼ I 精製酵素(P4-2-2)の比活性は1 960U/mgであり、粗抽出液から全体として108倍に精製した。精製標品はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、均一であることが示された。また、SDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって本酵素の分子質量は 39.8 ± 0.371 kDa(S.E.)と見積もられた。

キーワード : *Sclerotinia borealis*, 好冷菌, 雪腐菌核病菌, ポリガラクツロナーゼ, 細胞壁分解酵素

緒 論

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* は、北海道東部を中心とした寒冷地に分布する植物病原性糸状菌で、オオムギやコムギ (Tomiyama 1955), 芝草であるペントグラス (Groves and Bowerman 1955; Jamalainen 1949), およびオーチャードグラスやライグラス (Matsumoto and Sato 1983; Noshiro 1980) 等の牧草を宿主とする。本菌は天然においては0°C~5°Cの積雪下で生育し、実験的に

は5°Cで最も良い成長を示す一方、20°Cでは成長を示さず、好冷菌 (Psychrophiles) に分類される (Inniss 1975)。

植物病原菌の病原性には、ポリガラクツロナーゼ (PGase) が深く関わることを示唆されてきた (Roberts et al. 1988; Miyairi et al. 1985)。PGase は、植物細胞壁中のペクチン質を分解するペクチナーゼの一種であり、ポリガラクツロン酸を主な基質として、ガラクツロン酸残基間の α -1,4-結合を加水分解する。この酵素は、これまでに菌類 (Waksman

帯広畜産大学生物資源科学科

Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社研究部

¹ Agrosience Reseach Laboratory, Hokkai Sankyo Co.

et al. 1991; Kester and Visser 1990; Schejter and Marcus 1988), 細菌 (Roberts et al. 1988; Nasuno and Starr 1966), 酵母 (Gognies 2001; Blanco et al. 1994), 及び植物 (Kapoor et al. 2000; Pathak et al. 2000; Bonghi et al. 1992; DellaPenna et al. 1986) 等の広い範囲にその分布が知られてきた。

*S. borealis*は積雪下, すなわち低温環境下で病原性を示すので, その病原性に密接に関係しているPGaseは低温適応性を示すものと考えられる。我々の以前の研究において, *S. borealis*からの粗抽出液中のPGase活性は*S. borealis*と同じ菌核病菌である常温菌*S. sclerotiorum*からのものと比較して, 低温域における40℃活性に対する相対活性が高いという低温適応の事実を明らかにした。この現象がPGase分子自身の性質に起因するものかどうかを明らかにするために, *S. borealis*からPGaseをまず単離しようと試みた。

また, 我々は既に*S. borealis* (5℃, 6カ月培養) から1% (w/v) ペクチン溶液を基質として用いた粘度測定法によるPGase活性測定法によってPGaseを単離 (Takasawa et al. 1997) したが, ここでは活性値の定量性が高く信頼性のある遊離還元糖高感度定量法 (Ikuma et al. 2001) によるPGase活性のモニター法を採用し, 5℃・2カ月培養*S. borealis*の粗抽出液からのPGaseの精製各段階 (クロマトグラフィー) の詳細を定量的に扱った結果を得たのでこれを報告する。

実験材料及び方法

試 薬

Potato-Dextrose-Agar (以下PDA) (Difco Laboratories), 小麦フスマ (十勝米穀), Hyflo super-cel (Celite Co. /和光純薬工業), D-ガラクトツロン酸1水和物 (Sigma), ポリガラクトツロン酸 (Sigma, From orange), 無水炭酸ナトリウム (和光純薬工業, 特級), フェリシアン化カリウム (和光純薬工業, 特級), 硫酸鉄 (Ⅲ) アンモニウム12水和物 (和光純薬工業, 特級), ラウリル硫酸ナトリウム (以下SDS) (和光純薬工業, 生化学用), 硫酸 (和光純薬工業, 精密分析用), 酢酸ナトリウム3水和物 (和光純薬工業, 特級), 氷酢酸 (和光純

薬工業, 特級), Coomassie Brilliant Blue (以下CBB) G-250 (半井化学薬品, Specially prepared reagent, Lot No. M7R3031), リン酸 (和光純薬工業, 特級, 85% (w/w)), メタノール (和光純薬工業, 特級, 99.8% (w/w)), 牛血清アルブミン (以下BSA) (Sigma, crystallized and lyophilized, 窒素分 14.8% (w/v)), Bio-Gel P-6DG (Bio-Rad), CM-Toyopearl 650M (東洋曹達), Sephacryl S-200 (Pharmacia), Dialysis Membrane (Viskase Sales Co. /和光純薬工業)。

菌株の培養

*S. borealis*の菌株をまず, 寒天平板培地上で5℃で培養した。3.9% (w/v) PDA溶液を121℃, 20分間オートクレーブ滅菌後, シャーレ (オートクレーブ滅菌) に20mLずつ分注し, PDA平板培地とした。PDA斜面培地より*S. borealis*の菌糸を竹串 (オートクレーブ滅菌) を用いて寒天ごとPDA平板培地に移植し, 5℃で2カ月間培養した。

次に上記寒天培養物を小麦フスマ培地に移植した。即ち, 小麦フスマ30gと水50mLとを十分に混和して500mL三角フラスコに入れてオートクレーブ滅菌し, 小麦フスマ培地とした。*S. borealis*のPDAシャーレ培養物を小麦フスマ上に, 1/5シャーレ分移植し, 即ち1シャーレ培養物を全部で5フラスコに移植して, 5℃で2カ月間静置培養した。

カラムクロマトグラフィー法

陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは, CM-Toyopearl 650Mカラムを用いて行い, 溶出には塩化ナトリウム濃度でのステップワイズ法およびニアグラジェント法を用いた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは, Bio-Gel P-6 DG及びSephacryl S-200カラムを用いて行った。精製操作は全て5℃ (クロマトチャンバー内) で行った。

電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) はPhast system (Pharmacia LKB) を用いて行った。

nondenaturing PAGE及びSDS-PAGEは, いずれも8-25%ポリアクリルアミドグラジェントゲルを用いて, pH8.8において行った。タンパク質は,

0.1% (w/v) CBB R-250-30% (v/v) メタノール-10% (v/v) 酢酸溶液, あるいは銀染色キット (Pharmacia LKB) を用いて染色した。

分子質量の決定には, 以下の分子質量マーカータンパク質を用いた。ウサギ筋ホスホリラーゼB (94 kDa), 牛血清アルブミン (67kDa), 卵白アルブミン (43kDa), 牛赤血球カーボニックアンヒドラーゼ (30kDa), 大豆トリプシンインヒビター (20.1kDa), 牛乳 α -ラクトアルブミン (14.4kDa)。

酵素活性の測定

ポリガラクトンナーゼ (PGase) 活性は, 1% (w/v) ポリガラクトン酸-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液 (pH4.5) を基質として用い測定した。基質溶液中のポリガラクトン酸濃度は, 高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) により全糖濃度として決定し, また高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) により還元糖量を決定して, これらの結果からポリガラクトン酸の平均重合度 (Degree of polymerization) を求めた。ポリガラクトン酸の平均重合度は 28.1 ± 0.6 (S.E.) であった。

酵素反応は反応総体積2.1mL系 (基質溶液2.0mL, 酵素溶液0.1mL) において40°Cで行い, 酵素反応開始後3, 6, 9分後に遊離した還元糖量 (sampling volume 10 μ L) を高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) を用いてD-ガラクトン酸を標準として定量した。また, 基質溶液 (10 μ L) の還元糖量を定量し, 酵素溶液の添加による基質溶液の希釈率で補正した値を, 反応0分における還元糖量として用い, 更に粗抽出液アッセイの場合にはあらかじめ粗抽出液中の鉄試薬陽性還元性物質量を定量し, 酵素ブランク値として用いた。各反応時間に対する還元糖遊離曲線の一次回帰直線の傾きから還元糖の遊離速度, すなわち酵素活性を求めた。酵素活性は4回の繰り返し実験結果の平均値から求めた。

酵素活性の1Uは, 1分当たり1 μ molの還元糖を遊離する酵素量 (1 μ mol/min) として定義した。また, ブランク酵素活性は酵素溶液の代わりに10mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液 (pH4.5) (以下S. buffer) 0.1mLを用いて求めた。

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度は, CBB色素試薬を用いたタンパク質微量定量法により決定した。CBB色素試薬は, 0.025% (w/v) CBB G-250-12.5% (v/v) メタノール-70.83% (w/v) リン酸を使用した。標準曲線はBSAを標準物質として, 0-9 μ gの範囲で作成した。標準曲線の傾きすなわちBSA 1 μ gあたりの吸光度 (A_{595}) は, $0.0351 \pm 1.33 \times 10^{-4}$ (S.E.) であった。

結果および考察

酵素の精製

ステップ1. 粗抽出液の調製

*S. borealis*の小麦フスマ培養物5フラスコを, S. bufferで抽出した。すなわち, 小麦フスマ培養*S. borealis* 5フラスコをブレンダーに加えて1LのS. bufferで5秒間, 3回攪拌し, 5°Cで1時間静置した。同様の攪拌・静置をさらに1回行い, 最後に5秒間, 3回攪拌後, 30分間静置した。この混合物を2枚に重ねたガーゼを用い手 (ビニールグローブ使用) で絞ってろ過し, ろ液を得た。更に, ろ液にろ過補助剤Hyflo super-cel 30gを加えて攪拌後, 吸引ろ過 (定量用ろ紙No. 5B, Advantec) した。ろ液に氷酢酸を加えpH4.5に調整した後, メンブランろ過 (0.2 μ mセルロースアセテート, Advantec) 滅菌した。このろ液 (850mL; assay volume 50 μ L; total activity 7 965U) を粗抽出液として, 5°Cで保存した。このうち800mL (7 496U) を用いてPGaseの精製を行った。

ステップ2. Bio-Gel P-6DGゲルろ過カラムクロマトグラフィー

粗抽出液はイオン強度が高く (1.22mmho; 約55 mM NaClを含むS. buffer相当), イオン交換クロマトグラフィーカラムへの吸着が困難と考えられたのでゲルろ過カラム法による脱塩を行った。

粗抽出液400mL (total activity 3 748U) を, あらかじめS. bufferで平衡化したBio-Gel P-6DGカラム (ϕ 4.4cm \times 95cm, カラム体積1 444mL) に供し, 約2.4カラム体積 (3 400mL) のS. bufferを用いて78.0mL/hの流速で溶出した。カラムからのタンパク質の溶出モニターは280nmでの吸光度

(A_{280}) の測定によって行った。溶出画分は20mLずつをフラクションコレクター (Pharmacia-LKB) を用いて集め、得られた各画分についてPGase活性 (assay volume 50 μ L/tube) を測定した。また、カラムからの塩の溶出状態をモニターするために電気伝導度 (CD-35MII, M & S Instruments Inc.) を測定した。

Bio-Gel P-6DGゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線を図1に示す。タンパク質は4ピークに分離して溶出されたが、酵素活性は主ピークである最初のピーク (V_0 ピーク) に存在した。電気伝導度により確認された塩ピーク (V_i ピーク) との相互分離は良好で、粗抽出液に含まれる活性画分は完全に脱塩された。クロマトグラフィー全体としての A_{280} 収率は101.8%であり、ゲルクロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。しかしながらタ

ンパク質のカラムからの溶出は約2.6カラム体積 (3 800mL) まで観察 ($A_{280} < 0.1$) され、サンプル中の一部のタンパク質とゲルマトリックスとの非特異的相互作用があったものと思われる。このような相互作用は、このクロマトグラフィーが粗抽出液の脱塩を目的としており、そのためにカラムの溶出液として用いたS. bufferのイオン強度が通常 (Andrews 1965) より低かったために生じたものと考えられる。ゲルろ過カラムクロマトグラフィー全体としての活性収率は96.5%で良好な収率であった。PGase活性画分 (試験管番号30-56) 496mL (活性回収率95.8%) をプールし、同様の粗抽出液400mLのゲルろ過から得られた活性画分470mL (活性回収率97.1%) と合わせて966mL (assay volume 50 μ L; total activity 7 197U; 活性回収率96.0%) の脱塩活性画分を得た。

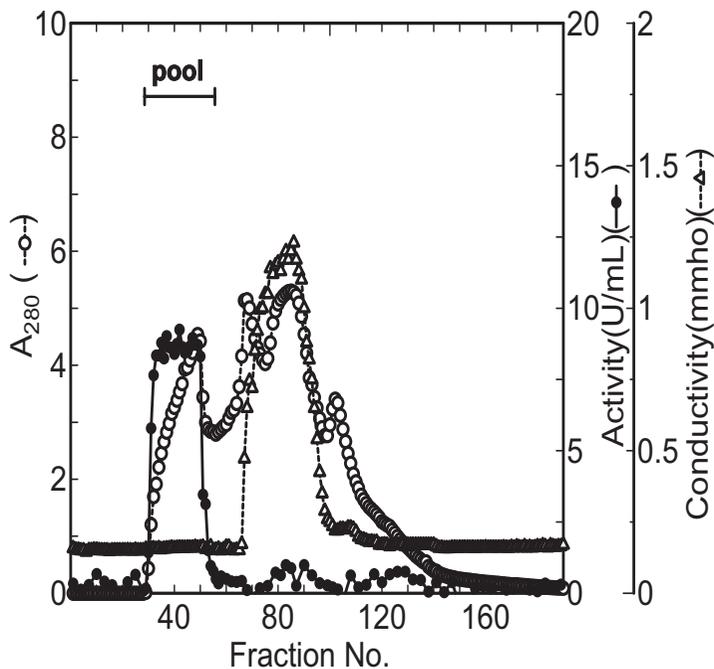


図1. Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。粗抽出液400mLをカラムに供し、S. bufferで溶出した。No. 30-56(496mL)のPGase活性画分をプールした。カラムサイズ: ϕ 4.4 \times 95cm, 1444mL; 流速: 78.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 50 μ L/tube. $\cdots\circ\cdots$, A_{280} ; $\text{---}\bullet\text{---}$, PGase活性 (U/mL); $\cdots\triangle\cdots$, 電気伝導度 (mmho)。

ステップ3. CM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー (ステップワイス溶出)

ステップ2で得た脱塩活性画分から920mL (total activity 6 854U) をとり, あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650Mカラム (ϕ 2.6cm \times 35cm, カラム体積186mL) に供した。引き続き, 約4カラム体積 (740mL) のS. bufferで非吸着画分を溶出した後, 50mM (4.5カラム体積: 840mL), 0.1M (3カラム体積: 540mL), 0.5M (2.4カラム体積: 440mL), 1.0M (3.5カラム体積: 660mL) 塩化ナトリウムを含むS. bufferを用いてステップワイス法による溶出を流速38.0mL/hで行った。タンパク質の溶出は A_{280} の測定により確認し, A_{280} が十分に下がって (<0.1) からさらに1カラム体積の各々のbufferによる溶出を行い, さらにタンパク質が溶

出されないことを確認した後, 溶出用bufferを交換した。20mLずつの画分を集め, 得られた各画分の A_{280} 及びPGase活性 (assay volume 10-100 μ L/tube) を測定した。

ステップワイス溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図2に示す。50mM塩化ナトリウム-S. bufferで4つの弱い活性ピーク (P2, P2', P3, 及びP3') が溶出され, その後0.1M塩化ナトリウム-S. bufferによって1つの主活性ピーク (P4) が溶出した。

このクロマトグラフィーにおける全体としての A_{280} 収率は93.0%であり, タンパク質の損失は少なかったと判断されるが, 一方, 活性収率は59.7% (total activity 4 090U) と低い値になり, この精製段階において活性の損失が見られた。異なる酵素

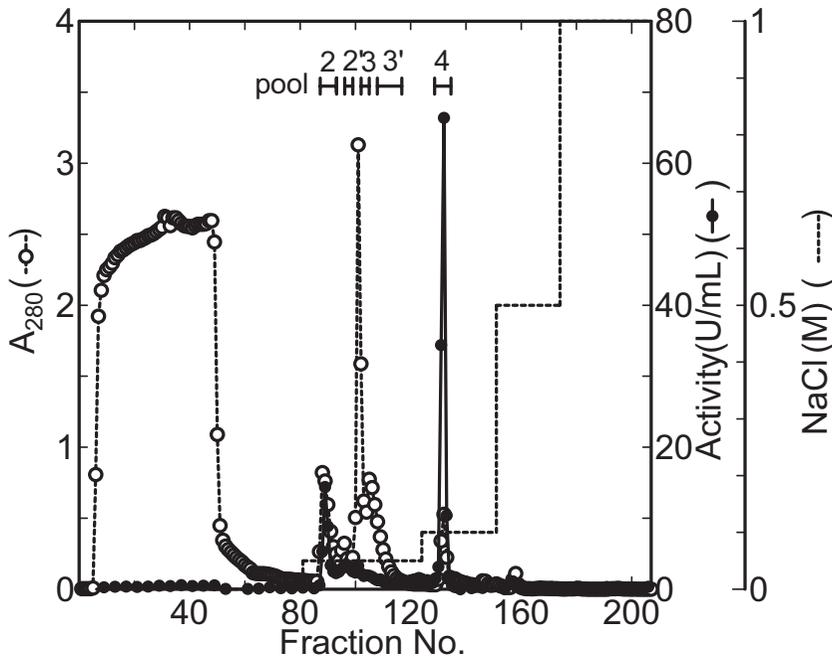


図2. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(ステップワイス溶出法)溶出曲線。

ステップ2のBio-Gel P-6 DGゲルろ過で得られた脱塩酵素試料920mLをカラムに供し, S. bufferで洗浄後, 50mM, 0.1M, 0.5M, 1.0M塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P2: No. 87-92(121.2mL); P2': No. 94-99(122.8mL); P3: No. 101-102(41.9mL); P3': No. 103-117(310.0mL); P4: No. 130-135(124.0mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: ϕ 2.6 \times 34cm, 186mL; 流速: 38.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 10-100 μ L/tube。○●, A_{280} ; ●, PGase活性(U/mL); ---, 塩化ナトリウム濃度(M)。

標品の調製における同様のクロマトグラフィーにおいてもこの様な活性収率 (59.1%) は再現された。活性の損失は、クロマトグラフィーにおける A_{280} 収率が非常に高いため、ポリガラクトソナーゼのCM-Toyopearlクロマトグラフィー樹脂への非特異的吸着によるものではなく酵素活性の性質によるものと考えられる。このクロマトグラフィーは時間 (5°C, 約2日間) を必要とするのでクロマトグラフィー操作中におけるCM-Toyopearl 650M樹脂と結合したことによるポリガラクトソナーゼの失活とも考えられるが、このステップでの酵素の精製倍率が大きく上昇 (P2: 2.4倍; P4: 18.4倍) していること、及び同じイオン交換樹脂を使用したステップ4でのCM-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー (リニアグラジエント溶出法) においての全活性収率が95.5%と非常に高かった事実から、クロマトグラフィー中での失活の可能性は低いと考えられる。この精製段階においてアイソザイム (P2, P2', P3, P3', 及びP4) が分離されたことから、粗抽出液およびBio-Gel P-6 DGゲルろ過クロマトグラフィーからの脱塩活性画分においてはポリガラクトソナーゼアイソザイム間の協動的相互作用 (Bartling et al. 1995; Bhat et al. 1994; Wood et al. 1986) が存在したために高い酵素活性を有していたが、陽イオン交換クロマトグラフィーによるアイソザイムの相互分離の結果この相互作用が消失し、その結果として活性収率が低下した可能性が強く示唆される。

得られた活性ピークをそれぞれP2からP4としてプールした。各ピークのプール後の活性回収率は各々P2 (11.6%, total activity 792U (assay volume 100 μ L), 121.2mL), P2' (6.03%, total activity 413U (assay volume 100 μ L), 122.8mL), P3 (1.85%, total activity 127U (assay volume 100 μ L), 41.9mL), P3' (6.10%, total activity 418U (assay volume 100 μ L), 310.0mL), P4 (33.1%, total activity 2 270U (assay volume 10 μ L), 124.0mL) であった。クロマトグラフィー全体で回収した全活性 (4 090U) に対する各プールの活性含有率は各々P2 (19.4%), P2' (10.1%), P3 (3.1%), P3' (10.2%), P4 (55.5%) であった。主要な活性プールであるP4 (2 270U, 124.0mL) についてさらに精製を行った。ステップ3での脱塩活性

画分に対するP4の活性回収率は33.1%であった。

ステップ4. CM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー (リニアグラジエント溶出法)

酵素溶液 (P4) のうち110mL (total activity 2 014U) をとり、1.5LのS. bufferに対して、約20時間の透析を2回繰り返した。透析後 (110mL) の回収率については、 A_{280} で81.7%, CBB法によるタンパク質量で93.4%, 及び酵素活性で92.0%であり、透析操作によって若干活性の損失があったものと思われる。

透析した酵素溶液のうち100mL (total activity 1 684U) を、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M (ϕ 1.0cm \times 17cm, カラム体積13.5 mL) に供した。カラムは32.8mL/hの流速で溶出され、2mLずつの画分が集められた。S. buffer (約2.1カラム体積: 28mL) 及び50mM塩化ナトリウムを含むS. buffer (約2.1カラム体積: 28mL) でカラムを洗浄し、非吸着画分を溶出後、50mM (100mL) および0.1M (100mL) 塩化ナトリウムを含むS. bufferによってリニアグラジエント溶出法を行った。その後、0.5M (約2.1カラム体積: 28mL), 1.0M (約2.0カラム体積: 26mL) を含むS. bufferでの溶出法によってカラムから溶出されるPGaseが存在しないことを確認した。得られた各画分について、 A_{280} および酵素活性 (assay volume 5-100 μ L/tube) を測定した。

リニアグラジエント溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図3に示す。タンパク質は約70mM塩化ナトリウム濃度で肩を有するはずんだ1つのピークとして溶出し、この A_{280} ピークは2つの活性ピーク (P4-1及びP4-2) を含んでいた。

このクロマトグラフィーにおける全体としての A_{280} 収率は93.8%で、タンパク質の損失は少なかったと判断される。また、活性収率は全体として95.5% (total activity 1 608U) で高い収率が得られ、PGaseのクロマトグラフィーは定量的に行われたと考えられる。

得られた活性ピークをP4-1およびP4-2としてプールした。各プールの活性回収率は各々P4-1 (14.1%: total activity 237U (assay volume 100 μ L), 18

mL), P4-2 (69.5% : total activity 1 170U (assay volume 10 μ L), 36mL) であった。P4-1及びP4-2のクロマトグラフィー回収全活性 (1 608U) に対する活性含有率は各々14.7%及び72.8%であった。主要な活性プールであるP4-2 (1 170U, 36mL) をさらに精製操作に供した。ステップ4でのP4に対するP4-2の活性回収率 (overall) は63.9%であった。

ステップ5. Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

ステップ4で得られた主活性画分P4-2の良好なゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行うために試料をCM-Toyopearlミニカラムで濃縮した。即ち、酵素試料 (P4-2) のうち35.0mL (total activity 1 138 U) を、CM-ToyopearlへのP4-2の吸着を促進するために500mLのS. bufferに対して、約24時間の透析

を2回繰り返した。透析した試料を濃縮するために、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650Mミニカラム (ϕ 1.0cm \times 10cm, カラム体積8mL) に供し、S. bufferで洗浄後、0.2M塩化ナトリウムを含むS. bufferで一段階溶出した。溶出された活性画分は濁っていたため、遠心分離 (15 000rpm, 15分, 5 $^{\circ}$ C) によって濁りを除いた後プールした (total activity 922U (assay volume 5 μ L), 透析およびミニカラム濃縮操作での活性回収率81.0%, 5.4mL)。

濃縮酵素試料4.5mL (total activity 768U) を、あらかじめ50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで平衡化した (Andrews 1965) Sephacryl S-200 (ϕ 1.6 \times 66cm, カラム体積133mL) に供した。溶出は平衡化に使用したバッファーと同じもの190mL (約1.4カラム体積) で行った。流速は23.6mL/hで、

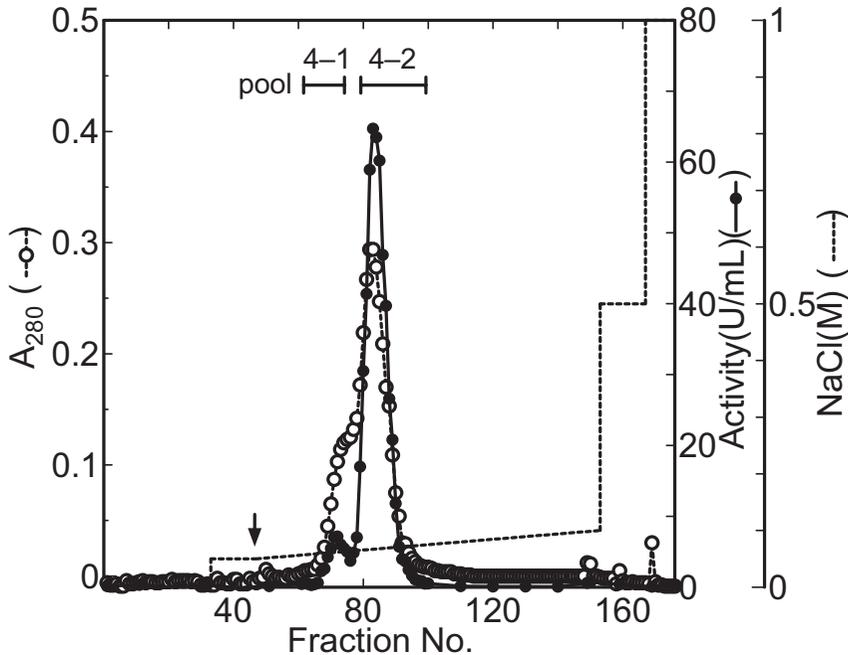


図3. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)溶出曲線。

ステップ3のCM-Toyopearl 650M(ステップワイズ)で得られた活性画分のうち主活性画分(P4)を透析後、その酵素試料100mLをカラムに供し、S. buffer及び50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで洗浄後、50mM(100mL)-0.1M(100mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferでのリニアグラジエント法で溶出した。PGase活性画分P4-1: No. 67-76(18mL); P4-2: No. 80-98(36mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: ϕ 1.0 \times 17cm, 13.5mL; 流速: 32.8mL/h; フラクションサイズ: 2mL/tube; PGase assay volume: 5-100 μ L/tube. $\cdots\circ\cdots$, A_{280} ; $\cdots\bullet\cdots$, PGase活性(U/mL); $\cdots|$, 塩化ナトリウム濃度(M); \downarrow , グラジエント開始点。

2mL画分ずつ集めた。得られた各画分について、 A_{280} および酵素活性 (assay volume 10-100 μ L /tube) を測定した。

Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線を図4に示す。タンパク質は A_{280} で3つのピークに分離された。酵素活性は2番目の主 A_{280} ピークに存在していた。PGaseタンパク質はここでの溶出条件下ではSephacryl S-200ゲルマトリックスとの非特異的相互作用をしなかったと思われる。

このクロマトグラフィーにおける A_{280} 収率は69.8%と低い値であり、ゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質の損失があったと思われる。しかしながら、活性収率はクロマトグラフィー全体として98.3%と非常に高く、ポリガラクトナーゼはゲルろ過において定量的に回収された。

得られた活性ピークをP4-2-2 (活性回収率72.0% : total activity 553U (assay volume 10 μ L),

9.3mL) としてプールし、最終精製標品とした。精製操作の結果から、*S. borealis*からのPGaseには少なくとも6種類のアイソザイムが存在することが明らかになったので、ここで得られたPGase活性主画分からの精製標品P4-2-2をPGase Iとした。ステップ5でのP4-2に対するP4-2-2の活性回収率 (overall) は58.3%であった。

*S. borealis*培養粗抽出液中のPGase活性主画分 (PGase I) について各精製操作の詳細を表1に示す。

CM-Toyopearl陽イオン交換クロマトグラフィー (ステップワイズ溶出法) における全活性収率は59.7%と低かった。この理由は、この精製段階において5つのアイソザイム (P2, P2', P3, P3', 及びP4) が相互分離されたため、アイソザイム間の協働的相互作用 (Bartling et al. 1995; Bhat et al. 1994; Wood et al. 1986) が消失してクロマトグラフィー全体としての活性収率が低下したと考えられる。ま

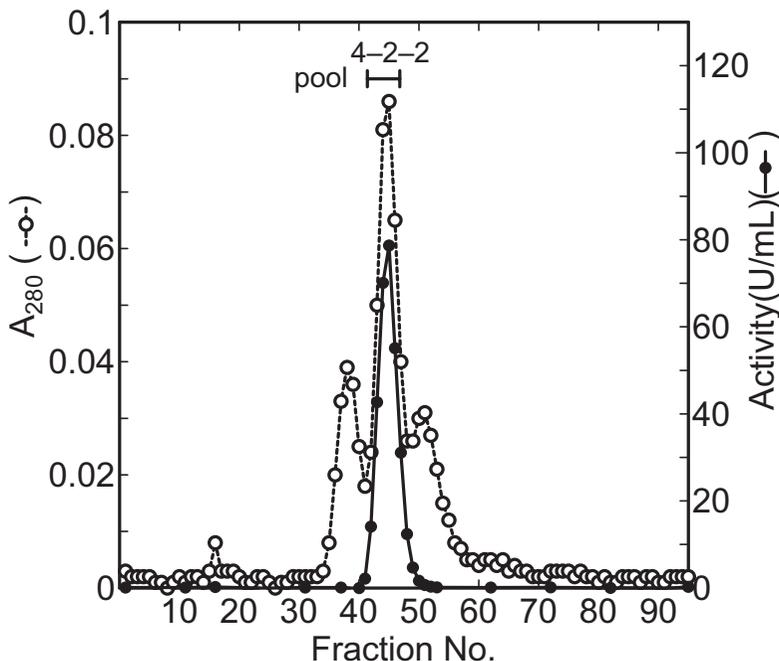


図4. Sephadex S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。ステップ4のCM-Toyopearl 650M (リニアグラジエント) で得られた活性主画分 (P4-2) を透析の上、ミニカラム法によって濃縮した酵素試料4.5mLをカラムに供し、50mM 塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P4-2-2 : No. 43-47 (9.3 mL) をプールした。カラムサイズ : ϕ 1.6 \times 66cm, 130mL; 流速 : 23.6mL/h; フラクションサイズ : 2mL/tube; PGase assay volume : 10-100 μ L/tube. $\circ\cdots\circ$, A_{280} ; $\bullet\cdots\bullet$, PGase活性 (U/mL)。

た、このステップではPGaseには5アイソザイムが存在したにもかかわらず活性主画分 (P4, 活性回収率33.1%, 活性含有率55.5%) のみを集めたために、すなわち他のアイソザイムは除かれたために、この精製段階における粗抽出液からのP4活性回収率 (overall) は31.8% (ステップワイズ溶出法クロマトグラフィー全活性回収率59.7%) となった。

CM-Toyopearl陽イオン交換クロマトグラフィー (リニアグラジエント溶出法) におけるクロマトグラフィー全体としての活性回収率は95.5%で高い回収率が得られたが、このステップでもアイソザイムが相互分離され、主活性画分 (P4-2, 活性回収率69.5%, 活性含有率72.8%) のみを集めたために、この精製段階における粗抽出液からの活性回収率 (overall) は20.3%となった。

S. borealis 5°C・2カ月培養5フラスコから粗抽出液は850mL得られたが、PGase I の精製単離はそのうち800mLを用いて行った。それ故、5°C・2カ月培養5フラスコからの粗抽出液中のPGase全活性は7965Uであった。表1では粗抽出液800mLを使用して各ステップについての結果をまとめてある。800mLの粗抽出液から、0.454mgのPGase I 最終精製標品を得た結果となった。最終精製標品 (P4-2-2) の全活性は889Uとなり、粗抽出液 (800mL) から11.9%の活性回収率であった。精製標品の比活性は1960

U/mgで、粗抽出液から108倍に精製された。

*S. borealis*の5°C・6カ月培養物からのPGaseの単離 (Takasawa et al. 1997) においては、5°C・2カ月培養物からにおいて見られたCM-Toyopearl 陽イオン交換クロマトグラフィー (ステップワイズ溶出法) でのP2'およびP3', およびCM-Toyopearl 650M 陽イオン交換クロマトグラフィー (リニアグラジエント溶出法) でのP4-1は見られなかった。これは、培養期間の違いによってアイソザイムの分布が変化したためと考えられる。また、5°C・6カ月培養物から均一な精製標品を得るためにはさらにMono S FPLC (Pharmacia) による精製操作を必要としたことから、培養期間の違いによって共存タンパク質についても違いがあるものと考えられる。

5°C・6カ月培養物からのPGaseの単離 (Takasawa et al. 1997) においてはPGase活性を粘度測定法により測定したために、今回の還元糖の定量による結果と5°C・6カ月培養からのPGaseの活性値とを直接比較検討することは出来なかった。タンパク質量は、粗抽出液中においては454.2mg (6カ月培養, 900mL) に対し440mg (2カ月培養, 850mL) で大きな差はなかったが、一方最終精製標品においては1.4mg (6カ月培養, 14.6mL) に対し0.454mg (2カ月培養, 14.9mL) で、6カ月培養の方が活性回収率 (27.6%) が高かったために約3倍多く回収されていた。

表1. *S. borealis* (2カ月培養) 由来PGase I の精製結果.

Step	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Total A ₂₈₀	Recovered activity yield (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Crude extract	800	7 496	414	12 940	100	18.1	1
Bio-Gel P-6DG	966	7 197	312	2 990	96.0	23.1	1.28
CM-Toyopearl 650M(stepwise) P4	130	2 383	5.58	29.6	31.8	427	23.6
CM-Toyopearl 650M(gradient) P4-2	46.9	1 524	1.40	5.82	20.3	1 090	60.2
Sephacryl S-200 P4-2-2	14.9	889	0.454	0.820	11.9	1 960	108

た。また、PGase I 最終精製標品の粗抽出液からの精製倍率は、6カ月培養で89.6倍、2カ月培養で108倍と、2カ月培養の方が約20%高かった。これらの結果から、粗抽出液中のPGase含有率は培養期間を2カ月(4.05mg)から6カ月(5.07mg)に延長することによって活性回収率を考慮すると約20%高くなると考えられる。従って精製倍率も2カ月培養に比べて6カ月培養の方が約20%低下しているのも妥当性がある。

PGase I (P4-2-2) の純度および分子質量

カラムクロマトグラフィー精製標品 (P4-2-2) の

純度および分子質量を電気泳動を用いて調べた。

8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲル(pH8.8)における、*S. borealis*由来PGase活性主画分からのPGase I 精製標品 (P4-2-2) のnondenaturing PAGE及びSDS-PAGEの結果を図5に示す。2種類の電気泳動法において、CBB染色法および銀染色法それぞれにおいて単一のバンドが検出され、精製標品P4-2-2は均一に精製された。

SDS-PAGEにおいて、分子質量マーカータンパク質の移動度に対する各々の分子質量の常用対数のプロットの標準曲線一次回帰式(図6)からPGase I (P4-2-2) の分子質量は 39.8 ± 0.371 kDa (S.E.)

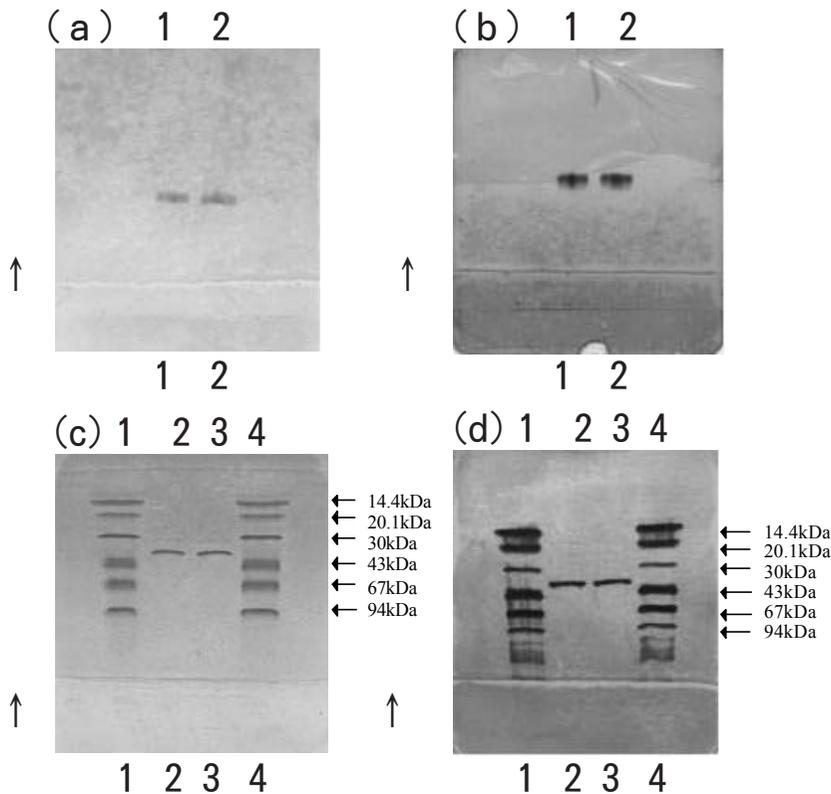


図5. PGase I 精製標品(P4-2-2)のポリアクリルアミドゲル電気泳動。nondenaturing PAGE(a, b)は8-25%グラジエントゲルを用いてpH8.8で行い、ゲルはCBB R-250染色(a)及び銀染色(b)で染色した。レーン1, 2: P4-2-2, 0.31 μ g。SDS-PAGE(c, d)は、試料を2.5%(w/v)SDS, 1%(w/v)ジチオスレイトール(DTT), 及び1mM EDTAと共に100 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした後、0.55%(w/v)SDSの存在下8-25%グラジエントゲルを用いて泳動を行った。ゲルはCBB R-250染色(c)及び銀染色(d)で染色した。レーン2, 3: P4-2-2, 0.20 μ g; レーン1, 4: 分子質量マーカータンパク質; \uparrow : 電気泳動方向。

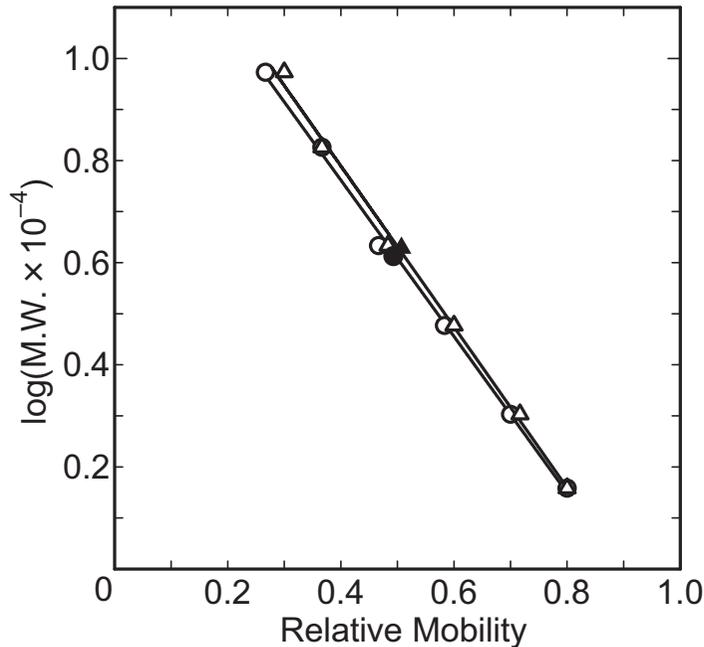


図6. SDS-PAGEによるPGase I (P4-2-2)の分子質量決定。
分子質量マーカータンパク質の移動度に対して各々の分子質量の常用対数値をプロットした。標準曲線一次回帰式は、 $y = -1.53x + 1.37$ (CBB染色) 及び $y = -1.58x + 1.42$ (銀染色) であった。一次回帰式の相関係数は各々 $R = 0.9989$ 及び $R = 0.9982$ であった。各々の電気泳動によって求められたPGase I 精製標品 (P4-2-2) の分子質量はそれぞれ、40.3kDa および 40.1kDa であった。—○—, CBB染色; —△—, 銀染色; ●, ▲: CBB染色 (●) および銀染色 (▲) 各々の電気泳動でのPGase精製標品 (P4-2-2) の相対移動度のプロット。

と見積もられた。

5°C・6カ月培養PGase I (P4-2-2) (Takasawa et al. 1997) の場合には、SDS-PAGEから見積もられた分子質量は40kDaで5°C・2カ月培養PGase I (P4-2-2) (39.8kDa) とほとんど違いがなく、またP4-2-2のSephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーから見積もられたintact分子の質量は41kDaであったので、5°C・6カ月培養PGase I (P4-2-2) は単量体酵素であったが、5°C・2カ月培養PGase I (P4-2-2) も同様に単量体酵素であると考えられる。

参考文献

Andrews, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 596-606.
Bartling, S., Wegener, C., and Olsen, O. 1995.

Synergism between *Erwinia* pectate lyase isozymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiology*, **141** (Pt 4): 873-881.

Bhat, S., Goodenough, P. W., Bhat, M. K., and Owen, E. 1994. Isolation of four major subunits from *Clostridium thermocellum* cellulosome and their synergism in the hydrolysis of crystalline cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**: 335-342.

Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., and Villa, T. G. 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **40**: 974-977.

Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., and Casadoro, G. 1992. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol. Biol.* **20**:

- 839-848.
- DellaPenna, D., Alexander, D. C., and Bennett, A. B. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase : analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 6420-6424.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. Yeast, **18**: 423-432.
- Groves, J. W. and Bowerman, C. A. 1955. *Sclerotinia borealis* in Canada. Can. J. Bot. **33**: 591-594.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive colorimetric method of reducing suger using ferric iron reagent. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. **22**: 109-116. [In Japanese.]
- Inniss, W. E. 1975. Interaction of temperature and psychrophilic microorganisms. Annu. Rev. Microbiol. **29**: 445-465.
- Jamalainien, E. A. 1949. Overwintering of gramineae-plants and parasitic fungi. 1. *Sclerotinia borealis* Bubak & Vleugel. J. Sci. Agric. Soc. Finl. **21**: 125-142.
- Kapoor, M., Khalil, B. Q., Bhushan, B., Dadhich, K. S., and Hoondal, G. S. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. Process Biochem. **36**: 467-473.
- Kester, H. C. and Visser, J. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem. **12**: 150-160.
- Matsumoto, N. and Sato, T. 1983. Factors involved in the resistance of timothy and perennial ryegrass to *Sclerotinia borealis* and *Typhula ishikariensis*. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. **136**: 23-30.
- Miyairi, K., Okuno, T., and Sakai, K. 1985. Purification and properties of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silver-leaf symptoms on apple tree. Agric. Biol. Chem. **49**: 1111-1118.
- Nasuno, S. and Starr, M. P. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. J. Biol. Chem. **241**: 5298-5306.
- Noshiro, M. 1980. On the relation between freezing injury and occurrence of *Sclerotinia* snow bright disease in grasses. J. Jpn. Grassl. Sci. **25**: 386-388.
- Pathak, N., Mishra, S., and Sanwal, G. G. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. Phytochemistry, **54**: 147-152.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., and Schell, M. A. 1988. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. J. Bacteriol. **170**: 1445-1451.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. Methods Enzymol. **161**: 366-373.
- Takasawa, T., Sagisaka, K., Yagi, K., Uchiyama, K., Aoki, A., Takaoka, K., and Yamamoto, K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. Can. J. Microbiol. **43**: 417-424.
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. **22**: 103-107. [In Japanese.]
- Tomiyama, K. 1955. Studies on the snow bright disease of winter cereals. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. Rep. **47**: 1-234. [In Japanese.]
- Waksman, G., Keon, J. P., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia Sclerotiorum*. Biochim. Biophys. Acta, **1073**:

43-48.

Wood, T. M. and McCrae, S. I. 1986. The cellulose of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. *Biochem. J.* **234**: 93-99.

Summary

Polygalacturonase I has been isolated from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis* by cation-exchange chromatography on a column of CM-Toyopearl followed by gel filtration on a column of

Sephacryl S-200. Purified enzyme (P4-2-2), polygalacturonase I had a specific activity of 1 960 units per mg of protein, that is, 108-fold purification over the crude extract of the wheat bran culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. The purified enzyme was homogeneous, as judged by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 39.8 ± 0.371 kDa by the polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate.

Key words: *Sclerotinia borealis*, psychrophile, snow mold, polygalacturonase, cell wall degrading enzyme.

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の産生する ポリガラクトンナーゼ活性の低温適応

竹内宏治・井熊武志・匂坂慶子・斉藤泉¹・高澤俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity from the culture of
the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*

Kouji TAKEUCHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA

(受理：2001年11月30日)

要 旨

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* と常温性菌核病糸状菌 *Sclerotinia sclerotiorum* とからの粗抽出液中のポリガラクトンナーゼ活性の比較検討を行った。40℃での酵素反応の最適pHは *S. borealis* と *S. sclerotiorum* において違いはなく pH4.5であった。又、両菌共に、pH4.0以下及びpH5.0以上においては活性は急激に低下し、pH6.0から7.5迄は活性はほとんど観察されなかった。pH4.5における酵素反応の最適温度は好冷菌でも常温菌においても違いはなく40℃であった。しかしながら5℃における活性については、40℃における最大活性に対する相対活性が、常温菌 *S. sclerotiorum* の場合は約18%であったが、好冷菌 *S. borealis* の場合は約35%にもなり、常温菌由来の場合と比較して約2倍も高い低温適応性を有していた。このような好冷菌のポリガラクトンナーゼ活性の低温寛容現象が寒冷地で発生する雪腐菌核病菌 *S. borealis* の病原性に深く関与しているものと考えられる。温度安定性については好冷菌 *S. borealis* 由来の酵素活性は常温菌 *S. sclerotiorum* 由来に較べて20~30℃の常温域において若干不安定であったが、50~60℃の高温域においては両者に殆ど違いが無く50℃で殆ど失活し、変性温度はほぼ同じであることを示唆している。pH安定性については両者において大きく変わらずpH7.0以上では不安定であった。

キーワード：ポリガラクトンナーゼ、低温適応、好冷菌、*Sclerotinia borealis*,
Sclerotinia sclerotiorum

緒 論

地球上の生物圏には、多くの微生物 (microbe)

がおかれた環境に適応し至る所に生息しており、生息している温度環境の違いによって微生物は高温性・中温性・低温性微生物に大別されている。最適生育

帯広畜産大学生物資源科学科

Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社研究部

¹ Agrosience Research Laboratory, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

温度が20~50°Cの範囲にある微生物は中温菌又は常温菌と呼ばれ、55°C以上で生育できる微生物は好熱菌 (thermophile) (Freeze and Brock 1970; Brock and Freeze 1969) と呼ばれ、生育温度により中等度高熱菌 (moderate thermophile) (Kademi et al. 2000; Alvarez-Macarie et al. 1999)・高度高熱菌 (extreme thermophile) (Oshima et al. 1976)・超好熱菌 (hyperthermophile) (Blochl et al. 1997; Bohlool and Brock 1974; Mosser et al. 1974) あるいは常温 (通常37°C) でも生育できないかにより通性好熱菌 (facultative thermophile) (Tsuchiya et al. 1997)・偏性好熱菌 (obligate thermophile) (Allgood and Perry 1986; Singh and Sinha 1982) に更に細分される。低温で成育できる微生物も生育上限温度と最適生育温度によって、低温菌 (psychrotroph) (通性低温菌) (Lawson et al. 1994; Ray et al. 1994) と好冷菌 (psychrophile) (偏性低温菌) (Adler and Knowles 1995; Ferroni and Kaminski 1980; Morita and Burton 1970; Eddy 1960) に更に細分され、生育限界温度20°C以下で最適生育温度15°C以下のものは好冷菌、生育限界温度20°C以上のものは低温菌と呼ばれている。好熱菌の高温環境への適応機構については数多くの報告がされ、タンパク質レベルでの適応機構 (Horikoshi and Grant 1998; Watanabe et al. 1991) の解明が進んでいるが、低温性微生物の低温環境適応機構についての報告はあまり多くはなく、タンパク質レベルでの適応機構の解明に関する報告 (Hoyoux et al. 2001; Wintrode et al. 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Davail et al. 1994) は特に少ない。

*S. sclerotiorum*及び*S. borealis*は何れも植物病原菌である。*S. sclerotiorum*は気温20°C前後で曇雨天が続いた多湿の場合に発生しやすく、多犯性で、ナス科 (ナス, トマト, 及びジャガイモ等) を始めウリ科 (キュウリ及びカボチャ等), マメ科 (大豆及び小豆等), アブラナ科 (キャベツ及びナタネ等), キク科 (レタス及びヒマワリ等), セリ科 (セルリー等) など多くの作物に菌核病を引き起こす常温性菌核病菌である。

*S. borealis*は土壤凍結期間の長い北海道東部に分布し、高い湿度に保たれている0~5°Cの積雪下で

麦類, 牧草, 及び芝草などに生育し, ネズミの糞状の菌核を作り, 雪解け直後にこれらの植物の葉や茎等に雪腐病を発症する好冷性雪腐菌核病菌である。菌核とは, 菌糸が集合して形成される固い休眠耐久性の塊状体である。

ポリガラクトツロナーゼは, 植物細胞壁構成成分の一つであるペクチンを分解するペクチナーゼの一種で, ポリガラクトツロン酸を主な基質とし, それ以外にもペクチン酸, ペクチン, 及びペクチニン酸などの α -1, 4-ガラクトツロニル結合を加水分解する酵素であり広く分布が知られている (Nagai et al. 2000; Pathak et al. 2000; Martel et al. 1998; Takasawa et al. 1997; Di Pietro and Roncero 1996; Iguchi et al. 1996; Tobias et al. 1993; Polizeli et al. 1991; Kester and Visser 1990; Shastri et al. 1988; Tucker et al. 1981; Cervone et al. 1977)。この酵素とセルロース分解酵素等が細胞間隙物質と細胞壁に作用し, 植物表面に傷を付け, 葉や茎を腐敗させると考えられる。従って, ポリガラクトツロナーゼは, *S. sclerotiorum* 及び *S. borealis*の宿主への病原性に深く関与しているものと思われる。

我々は微生物が低温環境へどのように適応しているのかを即ちその仕組みを酵素タンパク質レベルからアプローチする目的で好冷性糸状菌*S. borealis*と常温性糸状菌*S. sclerotiorum*とが産生するポリガラクトツロナーゼ活性の低温環境に対する挙動を天然に近い状態で調べるために, 好冷菌と常温菌とからの粗抽出液中のポリガラクトツロナーゼ活性の性質を比較検討した。

試薬及び実験方法

試薬

Potato dextrose agar (以下PDA) (Difco Laboratories), 小麦フスマ (十勝米穀), 酢酸 (和光純薬工業, 特級), 酢酸ナトリウム (和光純薬工業, 特級), Hyflo super-cel (Celite Co./和光純薬工業), ポリガラクトツロン酸 (以下PGA) (Sigma, From orange), クエン酸 (関東化学, 特級), 3-[N-morpholino]propane sulfonic acid (以下MOPS) (Sigma), 水酸化ナトリウム (和光純薬工業, 特級), 無水炭酸ナトリウム (和光純薬

工業, 特級), フェリシアン化カリウム (和光純薬工業, 特級), 硫酸鉄 (Ⅲ) アンモニウム12水和物 (和光純薬工業, 特級), ドデシル硫酸ナトリウム (和光純薬工業, 生化学用), 硫酸 (和光純薬工業, 精密分析用), Coomassie brilliant blue (以下CBB) G-250 (半井化学薬品, Specially prepared), リン酸 (和光純薬工業, 特級, 85% (w/w)), メタノール (和光純薬工業, 特級, 99.8% (w/w)), ウシ血清アルブミン (以下BSA) (Sigma, crystallized and lyophilized, 窒素分14.8% (w/w)), アジ化ナトリウム (和光純薬工業, 化学用)。

菌体の培養

PDA培地での培養 PDA 3.9g (オートバランス使用) を熱水80mL (100mLメートルグラス) に加え, 加熱攪拌して完全に溶解させ, これをイオン交換蒸留水 (以下純水) で100mLにメスアップし, 3.9% (w/v) PDA溶液を調製した。このPDA溶液を三角フラスコ中で, 121°C・20分間オートクレーブ滅菌した。滅菌PDA溶液を20mLずつ滅菌ペトリ皿に分注して室温まで放冷し固化させた (クリーンベンチ使用)。スラント培地に保存された菌糸を竹串を用いて無菌的に切り出し, ペトリ皿のPDA培地上に移植した。好冷性糸状菌*S. borealis*の場合は, 5°C (インキュベータ) で約6ヶ月間静置培養し, 常温性糸状菌*S. sclerotiorum*の場合には, 20°C (インキュベータ) で約2週間静置培養した。

小麦フスマ培地での培養 ビーカーに小麦フスマ30gを入れ, 純水50mLを加えて良く混和し (スパチュラ使用), 500mL三角フラスコ中で綿栓をして121°C・20分間オートクレーブ滅菌した。このフスマ培地を室温まで十分に放冷後, ペトリ皿で培養した菌糸をPDA培地とともに加え (5三角フラスコ培養/ペトリ培養1枚), *S. borealis*は5°Cで約6ヶ月間, *S. sclerotiorum*は20°Cで約2週間静置培養した。

粗抽出液の調製

小麦フスマ培地上で培養した*S. borealis*及び*S. sclerotiorum*からの粗抽出液の調製は培養三角フラスコ1個あたり10mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液 (pH4.5) (以下バッファーA) 200mLで行った。

まず, フスマ培養された菌糸とフスマ培地を共に

ミキサーに移した。三角フラスコ内壁に付着した菌糸をバッファーAを加えて削りだし (プラスチック製スパチュラ使用), ミキサー中に加えた。この操作を3回繰り返し, 三角フラスコの内容物を定量的にミキサーに移した。5個の三角フラスコ培養をミキサーに入れ, 最後に残存バッファーAをミキサーに加えた。ミキサーの内容物を5秒間攪拌 (弱) 後, 5°Cで1時間静置した。この操作を2回繰り返した。

最後に軽く攪拌後, この混合物を2重のガーゼを用い, 手 (ラテックスグローブ着用) で絞ってろ過し, そのろ液ca.950mLをメートルグラス (1L) に集めた。ガーゼろ過したろ液から更に不溶性物質を除くために, ろ過補助剤Hyflo super-cel 30gを加えて20分間攪拌後, 吸引ろ過 (アドバンテック定量用ろ紙No. 5B) した。ろ液のpHを酢酸を加えて4.5に調整した。この溶液を一晩静置 (5°C) 後, 生じた沈殿を除くため再度吸引ろ過した。

最後にメンブランろ過 (0.45 µmセルロースアセテート膜, アドバンテック) 滅菌を行った。このろ液を粗抽出液 (ca.850~880mL) として, ポリピンに分注して冷凍保存し, 使用する際は解凍後5°Cで保存した。

2% (w/v) PGA基質保存溶液の調製

PGA 20g (オートバランス使用) を熱水約800mL (1 L ビーカー) 中に攪拌しながら加え, 6時間攪拌放冷し, 室温に戻した。次に5 M水酸化ナトリウム溶液 (19.5mL) を加えpH7.0に調整した。これを一晩加熱攪拌 (ホットプレートスターラー使用) し, PGAを十分に溶解させた。この溶液を室温に戻してから純水で1 L (メスシリンダー) にメスアップし, 遠心分離 (15 000 rpm, 15分, 20°C) 後, この上澄液を吸引ろ過 (定量用ろ紙No. 5B, アドバンテック) して沈殿を更に除き, 最後にメンブランろ過 (0.45 µmセルロースアセテート膜, アドバンテック) 滅菌した。ろ液をポリピンに分注 (ca. 250mL) して冷凍保存し, 使用時に解凍して1% (w/v) PGA基質溶液の調製に用いた。

2% (w/v) PGA溶液の正確な濃度は50倍希釈後, 全糖濃度を高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) で決定した。また還元糖濃度を高感度鉄試薬法 (Ikuma et al. 2001) で決定し, これらの

結果から平均重合度を求めた。これら保存溶液の平均重合度は 29.6 ± 1.9 (S.E.) であった。

1% (w/v) PGA基質溶液の調製

純水100 mL (ビーカー) に2% (w/v) PGA溶液250mL (500mLメスシリンダー) を攪拌しながら加え、更に0.4M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) 125mLを加え、酢酸でpH4.5に調整後、純水で500 mLにメスアップした。

ポリガラクトナーゼ活性の測定

粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は、酵素反応総体積2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液2.0mL, 粗抽出液とバッファーAとを合わせて0.1mL) において経時変化における還元糖を高感度鉄試薬法 (Ikuma et al. 2001) により決定し、その遊離速度から求めた。

即ち1% (w/v) PGA溶液2.020mL (フィンピペット) を試験管 (13x100mm) に取り、40°C・10分間プレインキュベートした。その間に酵素反応停止液として試験管 (13x100mm) 6本に純水490 μ L (フィンピペット) 及び高感度鉄試薬法試薬1 (0.53% (w/v) 無水炭酸ナトリウム-0.065% (w/v) シアン化カリウム溶液) 500 μ Lを取り混合した。1本の試験管には0.1M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 μ L (エッペンドルフ) を加え鉄試薬法ブランクとした。2本の試験管にはプレインキュベートした基質溶液10 μ Lずつを加え酵素反応0分 (基質ブランク) における基質溶液の還元糖を求めるために使用した。基質溶液2.0 mLにバッファーA 50又は10 μ L (フィンピペット) 及び粗抽出液50又は90 μ Lを加え酵素反応を開始した。開始後一定時間毎 (3, 6, 及び9分) に反応混液から10 μ L (エッペンドルフピペット) を停止液にピペットアウトした。次に、試薬2 (0.05% (w/v) フェリシアン化カリウム溶液) 500 μ Lを加え、100°C (アルミドライバス) で15分間加熱し酸化還元反応を行わせた。その後-20°Cに5分間暴露し室温まで戻した後、試薬3 (0.015% (w/v) 硫酸鉄 (III) アンモニウム12水和物-0.14% (v/v) 濃硫酸-0.2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液) 2.5mL (フィンピペット) を加え、

30°C (アルミドライバス) ・15分間インキュベートしベルリン青発色操作を行った。この溶液の A_{690} (ブラックフェイスマイクロセル) からD-ガラクトロン酸を標準物質とした標準曲線に基づいて酵素反応混液10 μ L中の各時間における還元糖 (μ g) を求めた。又、0分における還元糖については、粗抽出液中に存在する鉄試薬法陽性の還元性物質をD-GA換算 μ g (酵素ブランク) で予め見積もり、それを基質溶液中の還元糖量 (基質ブランク) に加算することにより補正した。更に、それら還元糖量をD-ガラクトロン酸換算 μ molに変換後、反応混液2.1 mLにおける還元糖遊離速度 (μ mol/min) を求めた。遊離速度の再現性は3~4重の実験値の相対試料標準偏差 (CV値) によって調べた。

活性の1Uは還元糖の遊離速度1 μ mol/minと定義した。また比活性は (μ mol/min) /mgで示した。

なお酵素活性ブランク実験は1% (w/v) PGA-0.1 M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液2 mLにバッファーA 0.1mLを加え、酵素活性測定時と同様に還元糖の経時変化を追跡し、その遊離速度から活性ブランクを求めた。

酵素活性のpH依存性

pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5の基質緩衝液においてポリガラクトナーゼ活性測定法に従い粗抽出液50又は90 μ L中の活性を測定した。使用緩衝液については、pH3.5から5.5までは0.1 M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を使用し、pH6.0及び6.5は0.1Mクエン酸-NaOH緩衝液、pH7.0及び7.5は0.1M MOPS-NaOH緩衝液を用いた。活性は40°Cで求めた。

酵素活性の温度依存性

酵素反応時の温度を5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 及び65°Cで、1% (w/v) PGA-0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液を用いて粗抽出液50又は90 μ Lの酵素活性を測定した。

酵素活性のpH安定性

粗抽出液10mLを2 M NaOHを用いてpH5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5に調整して5°Cで保存後各々50 μ Lについて酵素活性測定法に従って経日による酵

素の安定性を約3週間調べた。

タンパク質濃度決定

粗抽出液のタンパク質濃度はCBB色素試薬法によりBSAを標準物質として決定した。

色素試薬はCBB (25mg:マイクロ天秤) をメタノール (12.5mL) に加え, 約2時間攪拌溶解させ, 次に濃リン酸 (85% (w/w)) (50mL:84.22g) を加え約2時間攪拌し, 純水でメスアップ (100mL) した。その後吸引ろ過 (定量用ろ紙No. 5B, アドバンテック) し, 5°Cで保存した。色素試薬の終濃度は0.025% (w/v) CBB-12.5% (v/v) メタノール-70.83% (w/v) リン酸である。

BSA (0.1mg/mL) 標準溶液は0.04% (w/v) アジ化ナトリウムを含むものをメスフラスコに調製した。BSA標準溶液のタンパク質濃度は $A_{280}^{1\%(\text{w/v})} = 6.60$ (Kirschenbaum 1970) を用いて決定した。

結果及び考察

酵素活性のpH依存性

酵素活性の酵素反応混液pHに対する依存性を調べるために基質溶液のpHを変化させて活性を測定した。そのためにpH3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 (以上酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液), 6.0, 6.5 (以上クエン酸-NaOH緩衝液), 7.0及び7.5 (以上MOPS-NaOH緩衝液) 基質溶液を用い, 粗抽出液50 μ Lと90 μ Lについて40°Cで調べた。

図1に示すように, 酵素活性は*S. borealis*及び*S. sclerotiorum*のどちらについてもpH4.5で最大活性を与え, この酵素反応における最適pHは4.5であった。又, 両菌共にpH3.5~4.5では活性が急激に上昇し, pH4.5~6.0では急激に減少し, 最適pH域が非常に狭かった。更に, pH6.0~7.5では活性は緩やかに減少し, pH7.0及び7.5ではpH4.5での最大活性の

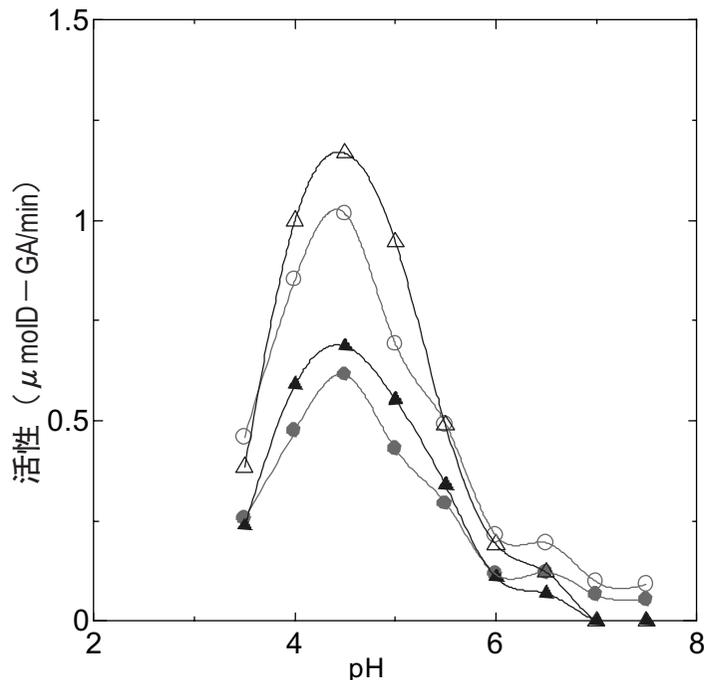


図1. 酵素活性のpH依存性。
酵素反応は, pHを3.5~7.5に調整した1% (w/v) PGA基質溶液2mL, 粗抽出液50 μ Lまたは90 μ L, 反応総体積2.1mL系, 温度40°Cで行った。
▲, *S. borealis* (50 μ L); △, *S. borealis* (90 μ L).
●, *S. sclerotiorum* (50 μ L); ○, *S. sclerotiorum* (90 μ L).

約10%の活性しか示さなかった。

以上の結果から、ポリガラクトナーゼ活性のpH依存性については好冷菌からのものも常温菌からのものもほぼ同様な傾向を示し、両者の活性部位は大きな違いがないものと結論できる。

酵素活性の温度依存性

酵素反応即ち酵素活性が温度によってどのように変化するかを、特に低温域において常温菌 *S. sclerotiorum* と好冷菌 *S. borealis* との間でどのように異なるかを明らかにするために、更に最適温度も比較するために実験を行った。図2に示すように、酵素反応における最適温度は常温菌も好冷菌も40°Cであった。又、40°C以上の高温域では両者の間に大きな違いは観察されず、温度が高くなるにつれて活性が大きく失われていき、好冷菌 *S. borealis* の場合は65°Cで完全に活性が消失し、一方常温菌 *S. sclerotiorum* では65°Cで未だ17%活性が残存した。これらの結果は、常温菌からのポリガラクトナーゼ活性が好冷菌からのものに比べて耐熱性が存在することを示している。しかしながら、好冷菌からのものが温度に対して特に不安定であるとは言えなかった。一方30°C以下の温度域では温度低下と共に活性は両者ともほぼ直線的に減少したが、常温菌ではその傾きが大きく、好冷菌では傾きが小さく、従って5°Cにおける活性は、常温菌 *S. sclerotiorum* については40°Cにおける最大活性に対しての残存活性は約18%だったのに対して、好冷菌 *S. borealis* については約35%残存し、常温菌と比較して5°Cの活性が約2倍も高く、低温耐性即ち好冷性を有していた。

以上の結果から、好冷菌のポリガラクトナーゼ活性は常温菌のものに比べて特に熱不安定ではなかったが、しかし低温域では常温菌からのものに比べて低温適応性が非常に高かったと結論できる。又、これらの事実は好冷菌 *S. borealis* が常温菌 *S. sclerotiorum* に比べてより低温適応性の高いポリガラクトナーゼアイソザイム分子を産生しているか又は、このポリガラクトナーゼ活性の高い低温適応性がポリガラクトナーゼ分子自身の性質に依るものではなく、即ち常温菌 *S. sclerotiorum* も好冷菌 *S. borealis* も同じ低温適応性のポリガラクトナーゼアイソザイム分子を産生しているが、好冷菌 *S. borealis* では

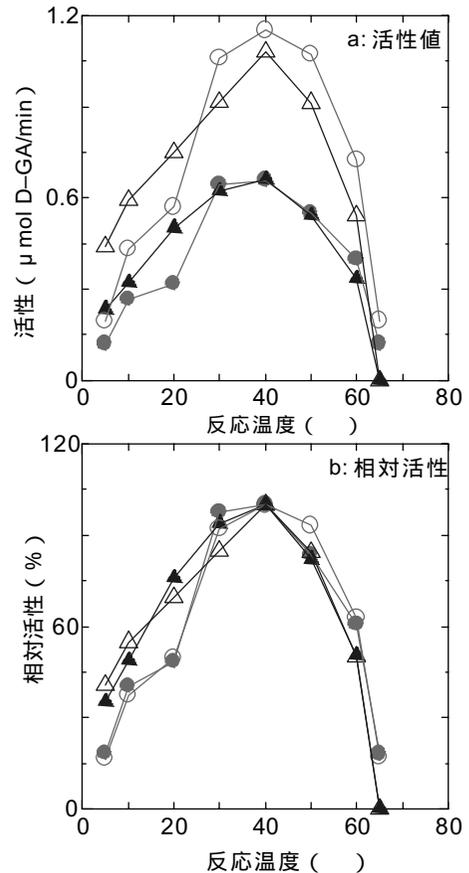


図2. 酵素活性の温度依存性。

酵素反応は、温度5～65°C、1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸バッファ (pH4.5) 2 mL、粗抽出液50 μLまたは90 μL、反応総体積2.1 mL系で行った。▲, *S. borealis* (50 μL); △, *S. borealis* (90 μL); ●, *S. sclerotiorum* (50 μL); ○, *S. sclerotiorum* (90 μL)。

ポリガラクトナーゼアイソザイム分子と相互作用してポリガラクトナーゼ活性の低温適応性を高める何らかの分子が同時に産生されている可能性を示唆している。

酵素活性の直線性及び比例性

酵素活性の定量性を確保するために *S. borealis* 及び *S. sclerotiorum* の粗抽出液10～90 μLについて最適pH4.5において最大活性を与える40°Cで活性を調べた。図3aに示すように何れの場合も高い直線

性 (*S. borealis* 一次回帰式: $y=0.0128x+0.0218$ ($r=0.9995$); *S. sclerotiorum* 一次回帰式: $y=0.0130x+0.066$ ($r=0.9991$)) が得られたが、一次回帰式には y 切片即ちブランク活性が存在したために粗抽出液量を変化させた際に活性の比例性は得られなかった。従って活性値の相互比較を行うためにはブランクアッセイを行い、ブランク活性を差し引いた活性値を求める必要があることがわかった。反応総体積 2.1 mL 系でのブランクアッセイを行った結果、ブランク活性値は $0.0164 \mu\text{mol}/\text{min} \pm 9.89 \times 10^{-3}$ (SE) であった。ブランク活性を考慮して粗抽出液量に対する比活性をまとめた結果を図 3 b) に示す。比活性は粗抽出液量 10~90 μL の間でほぼ一定値 (CV 値 ca. 2%) となり、粗抽出液量に依存しなかった。これらの結果から net 又は真の活性値には比例性が存在し、活性値が ca. $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}$ 迄はブランク活性値を補正することで定量性が得られることがわかった。

常温菌 *S. sclerotiorum* と好冷菌 *S. borealis* のポリガラクトナーゼ活性含量

常温菌は小麦フスマ培地で $20^\circ\text{C} \cdot 2$ 週間培養し、好冷菌は小麦フスマ培地上で $5^\circ\text{C} \cdot 6$ ヶ月間培養した。各々で菌の培地条件は同じであるが培養条件 (温度) は異なり、生育の速さは常温菌 *S. sclerotiorum* が速く、好冷菌 *S. borealis* は遅いが各々の菌は何れも 2 週間及び 6 ヶ月で定常状態に達していた。更に抽出条件も同じで粗抽出液体積もほぼ同じなので定常状態における両菌のポリガラクトナーゼ活性含量の相互比較を行った。

ポリガラクトナーゼは病原性に関与する鍵となる酵素であることから菌の生長に大きく影響を与えると考えられるが、定常状態に達している常温菌で約 2 週間後及び好冷菌で 6 ヶ月後には殆ど同程度の活性 (40°C 活性) が存在し、常温菌と好冷菌の間に違いはなかった (図 3 a)。

両者の菌からポリガラクトナーゼを単離していないのでポリガラクトナーゼ分子の数については言及できないが、ここで観察された両菌からの粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性含有量が各々の菌の病原性の強弱及びそれらの発現に密接に関係すると思われる。ポリガラクトナーゼ活性からこれらの点を考察する場合においては、両菌の 40°C での活

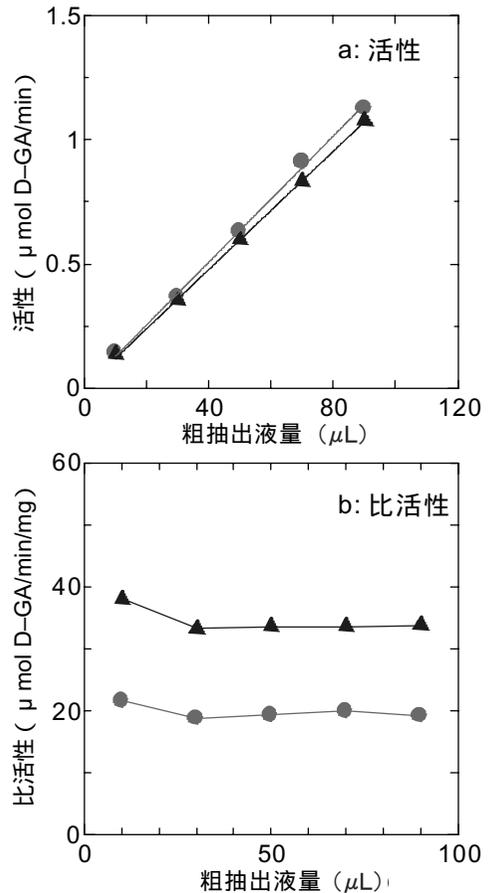


図 3. 粗抽出液の活性及び比活性。
酵素反応総体積 2.1 mL 系において、粗抽出液 10~90 μL を用い $\text{pH} 4.5 \cdot 40^\circ\text{C}$ において、活性を測定した。
▲, *S. borealis* ;
●, *S. sclerotiorum*.

性は殆ど差がないが、好冷菌 *S. borealis* は低温で生育しており、そして 5°C での活性は 40°C の約 35% (図 2 b) に減少しているので低温における宿主での生育には時間を要する点を考慮しなければならない。

以上の点から *S. sclerotiorum* と *S. borealis* との病原性の強さには大きな差はないものと考えられるが、*S. borealis* の場合は病原性の発現に時間を要するものと思われる。

酵素活性の温度安定性

常温菌 *S. sclerotiorum* 及び好冷菌 *S. borealis* からのポリガラクトナーゼ活性の温度に対する安定性を比較するために、各々からの粗抽出液を20~60℃（恒温水槽中で）迄の温度で30分間インキュベート後、粗抽出液50μLを用いて活性を測定し、5℃保存粗抽出液に対する残存活性を求めた結果を図4に示す。20℃では常温菌 *S. sclerotiorum* のポリガラクトナーゼ活性は失活しなかったが、好冷菌 *S. borealis* のポリガラクトナーゼ活性はわずかではあるが低下し、温度に対して不安定であった。30℃では、何れの菌からのポリガラクトナーゼ活性も約10%失活したため室温で使用する際は粗酵素液を氷浴させるなどして低温に保つ必要がある。40~50℃では何れの菌からの場合も活性が大きく低下し、

両者に顕著な違いは観察されなかった。

以上の点から、好冷菌 *S. borealis* からのポリガラクトナーゼは常温菌 *S. sclerotiorum* からのポリガラクトナーゼと比較すると20~30℃の室温域において不安定であることが特徴と考えられる。

ポリガラクトナーゼ活性のpH安定性

粗抽出液からポリガラクトナーゼを単離するための情報としてpH安定性を特に中性域のpHでの安定性を調べた。粗抽出液を2M NaOHを用いてpH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5に調整後5℃に保存し、活性の経日変化を約3週間追跡した。粗抽出液にNaOHを加えた事による沈殿の生成はなかった。

結果を図5に示す。各々の菌からの粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は比活性によって表した。

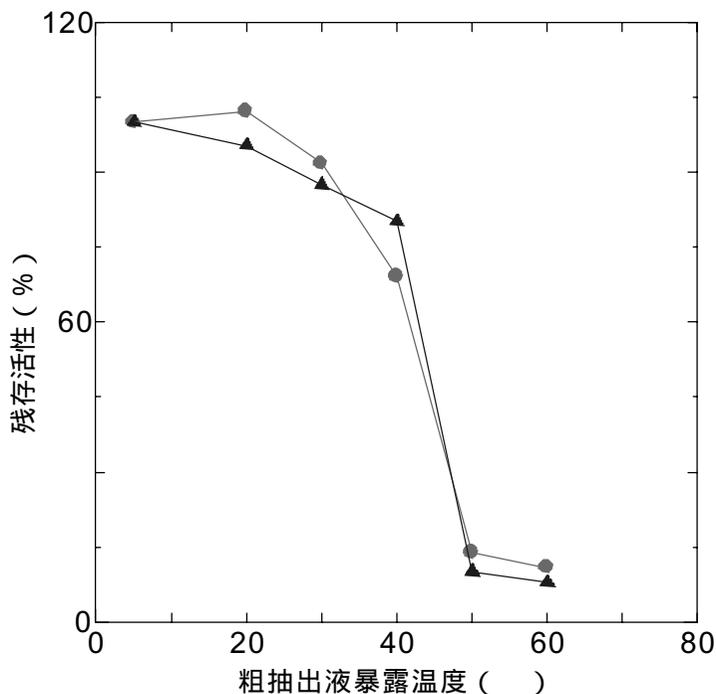


図4. 温度安定性。
粗抽出液を5~60℃に30分間暴露した後、酵素反応総体積2.1mL系において、pH4.5・40℃で各温度に暴露した粗抽出液50μLの活性を測定した。
▲, *S. borealis* ●, *S. sclerotiorum*.

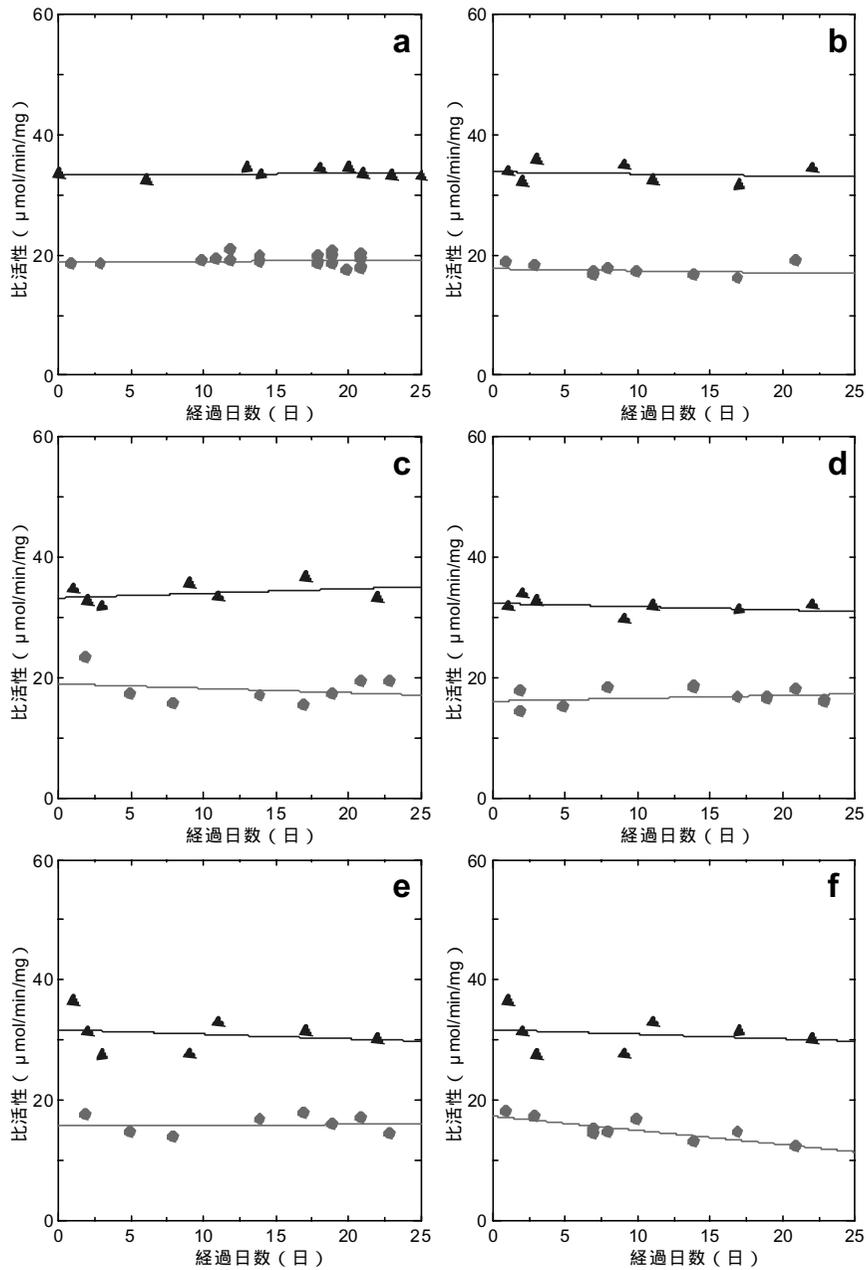


図5. pH安定性.

各々の粗抽出液を5℃で保存し経日による活性の変化を調べた。酵素反応は、1% (w/v)PGA-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸バッファ(pH4.5)2mL,粗抽出液50 μ L,反応総体積2.1mL系,温度40℃で行った。▲, *S. borealis*;●, *S. sclerotiorum*.
 a: pH4.5, b: pH5.5, c: pH6.0, d: pH6.5, e: pH7.0, f: pH7.5.

pH4.5, 5.5及び6.0では各々の菌からのポリガラクトンナーゼ活性は5℃・3週間暴露後も全く変化しなかった。pH6.5では好冷菌*S. borealis*の活性は殆ど変化しなかった(約4%減少)が, 常温菌*S. sclerotiorum*の活性は僅かに(約10%)低下した。pH7.0においては, 何れの菌からのポリガラクトンナーゼ活性も低下(*S. borealis*, 約10%減; *S. sclerotiorum*, 約15%減)した。pH7.5では両者の活性が大きく低下し, 5℃・3週間で約30%失活した。

以上の結果常温菌の場合でも好冷菌の場合でもポリガラクトンナーゼ活性はpH6.0迄は非常に安定であるが, pH6.5~7.0では若干不安定になり, pH7.5では非常に不安定になり, pH7.0以上のpH条件はポリガラクトンナーゼの単離精製操作には適当ではないと考えられる。

参考文献

- Alder, E. and Knowles, J. 1995. A thermolabile triosephosphate isomerase from the psychrophile *Vibrio* sp. strain ANT-300. Arch. Biochem. Biophys. **321**: 137-139.
- Allgood, G. S. and Perry, J. T. 1986. Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate Thermophile *thermoleophilum album*. J. Bacteriol. **168**: 563-567.
- Alvarez-Macarie, E., Augier-Magro, V., and Baratti, J. 1999. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **63**: 1865-1870.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W., and Stetter, K. O. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. Extremophiles **1**: 14-21.
- Bohlool, B. B. and Brock, T. D. 1974. Population ecology of *Sulfolobus acidocaldarius*. II. Immunological studies. Arch. Microbiol. **97**: 181-194.
- Brock, T. D. and Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol. **98**: 289-297.
- Cervone, F., Scala, A., Foresti, M., Cacace, M. G., and Noviello, C. 1977. Endopolygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae*. Purification and characterization of two isoenzymes. Biochim. Biophys. Acta, **482**: 379-385.
- Davail, S., Feller, G., Narinx, E., and Gerday, C. 1994. Cold adaptation of proteins. Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. J. Biol. Chem. **269**: 17448-17453.
- Di Pietro, A. and Roncero, M. I. 1996. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol. Lett. **145**: 295-299.
- Eddy, B. P. 1960. The use and meaning of the term "psychrophilic". J. Appl. Bact. **23**: 189-190.
- Feller, G., Zekhnini, Z., Lamotte-Brasseur, J., and Gerday, C. 1997. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. Eur. J. Biochem. **244**: 186-191.
- Ferroni, G. D. and Kaminski, J. S. 1980. Psychrophiles, psychrotrophs, and mesophiles in an environment which experiences seasonal temperature fluctuations. Can. J. Microbiol. **26**: 1184-1191.
- Freeze, H. and Brock, T. D. 1970. Thermostable aldolase from *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. **101**: 541-550.
- Georlette, D., Jonsson, Z. O., Van Petegem, F., Chessa, J., Van Beeumen, J., Hubscher, U., and Gerday, C. 2000. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*

- gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. *Eur. J. Biochem.* **267** : 3502-3512.
- Horikoshi, K. and Grant, W. D. (Eds.) 1998. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J. M., Baise, E., Feller, G., and Gerday, C. 2001. Cold-adapted beta-galactosidase from the antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 1529-1535.
- Iguchi, K., Kishida, M., and Sakai, T. 1996. Purification and characterization of three extracellular protopectinase with polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** : 603-607.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive colorimetric method of reducing sugar using ferric iron reagent. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22** : 109-116. [In Japanese.]
- Kedemi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., and Baratti, J. 2000. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** : 173-179.
- Kester, H. C. and Visser, J. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12** : 150-160.
- Kim, S. Y., Hwang, K. Y., Kim, S. H., Sung, H. C., Han, Y. S., and Cho, Y. 1999. Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *J. Biol. Chem.* **274** : 11761-11767.
- Kirschenbaum, D. M. 1970. Selected data for molecular biology. In *Handbook of Biochemistry*. Edited by H. Sober. 2nd ed., pp. C-71-C-98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- Lawson, P., Dainty, R. H., Kristiansen, N., Berg, J., and Collins, M. D. 1994. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov.. *Lett. appl. Microbiol.* **19** : 153-157.
- Martel, M. B., Letoublon, R., and Fevre, M. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158** : 133-138.
- Morita, R. Y. and Burton, S. D. 1970. Occurrence, possible significance, and metabolism of obligate psychrophiles in marine waters. *In organic matter in natural waters. Edited by D. W. Hood*. Institute of Marine Science, University of Alaska, Fairbanks. Publ. No. 1. pp. 275-285.
- Mosser, J. B., Mosser, A. G., and Brock, T. D. 1974. Population ecology of *Sulfolobus acidocaldarius*. I. Temperature strains. *Arch. Microbiol.* **97** : 169-179.
- Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K., and Sakai, T. 2000. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase. From *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** : 1729-1732.
- Oshima, T., Sakaki, Y., Wakayama, N., Watanabe, K., and Ohashi, Z. 1976. Biochemical studies on an extreme thermophile *Thermus thermophilus* : thermal stabilities of cell constituents and a bacteriophage. *Experientia Suppl.* **26** : 317-331.
- Pathak, N., Mishra, S., Sanwal, G. G. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, **54** : 147-152.
- Polizeli, M. D., Jorge, J. A., and Terenzi, H. F. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa* : purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* **137** (Pt8) : 1815-

- 1823.
- Ray, M. K., Kumar, G. S., and Shivaji, S. 1994. Phosphorylation of lipopolysaccharides in the antarctic psychrotroph *Pseudomonas syringae*: a possible role in temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **176**: 4243-4249.
- Shastri, P. N., Patil, M., and Shastri, N. V. 1988. Production, purification and properties of *Geotrichum candidum* polygalacturonase: regulation of production by pyruvate. *Indian J. Biochem. Biophys.* **25**: 331-335.
- Singh, V. P. and Sinha, U. 1982. Thermostability and turnover of phosphatases in the obligate thermophile *Thermoactinomyces vulgaris*. *Indian J. Exp. Biol.* **20**: 26-30.
- Takasawa, T., Sagisaka, K., Yagi, K., Uchiyama, K., Aoki, A., Takaoka, K., and Yamamoto, K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 417-424.
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 103-107. [In Japanese.]
- Tobias, R., Conway, W., and Sams, C. 1993. Polygalacturonase isozymes from *Botrytis cinerea* grown on apple pectin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **30**: 829-837.
- Tsuchiya, D., Sekiguchi, T., and Takenaka, A. 1997. Crystal structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the moderate facultative thermophile, *Bacillus coagulans*: two strategies for thermostabilization of protein structures. *J. Biochem.* **122**: 1092-1104.
- Tucker, G. A., Robertson, N. G., and Grierson, D. 1981. The conversion of tomato-fruit polygalacturonase isoenzyme 2 into isoenzyme 1 in vitro. *Eur. J. Biochem.* **115**: 87-90.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. 1991. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* **266**: 24287-24294.
- Wintrode, P. L., Miyazaki, K., and Arnold, F. H. 2000. Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J. Biol. Chem.* **275**: 31635-31640.

Summary

We compared the properties of polygalacturonase activity from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis* with those from the culture of the mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*. Optimum pH for both the enzyme reactions was 4.5 at 40°C. In both cases, the activities were decreased abruptly below pH4.0 and above pH5.0, and very low activities were observed at pHs 6.0 to 7.5. Optimum temperature was 40°C irrespective of psychrophile or mesophile. However, thirty five per cent of the maximum activity at 40°C was obtained at 5°C in the case of the psychrophile *S. borealis* though about eighteen per cent of the maximum activity was observed in the case of the mesophile *S. sclerotiorum*, indicating that the polygalacturonase activity of the psychrophile *S. borealis* has two-fold higher cold adaptability than that of the mesophile *S. sclerotiorum*. Thus, it is suggested that the low temperature tolerant phenomenon of the polygalacturonase activity of such a psychrophile is profoundly related to the pathogenicity of the snow mold disease caused by *S. borealis* under the snow in winter in the cold region. On the temperature stability of the enzymes, the enzyme of the psychrophile *S. borealis* was slightly unstable at 20-30°C compared with the one of the mesophile *S. sclerotiorum*, though both the enzymes were almostly inactivated at 50°C, indicating that the denaturation temperatures of the two

enzymes are similar to each other. For the pH stability of the enzymes, the profiles of the activity-day curves obtained for the two fungi at different pHs were similar to each other, and the two enzymes were unstable at pHs

above 7.0.

Key words : polygalacturonase ; cold adaptation ; psychrophile ; *Sclerotinia borealis* ; *Sclerotinia sclerotiorum*

帯大研報
RES. BULL. OBIHIRO UNIV.

編集委員（*委員長）

石井利明 宇塚雄次 加藤清明
関礼子 *種市信裕 手塚雅文
時岡裕純 柳川久

（五十音順）

平成14年8月26日 発行

編 集 帯 広 畜 産 大 学
発 行 北海道帯広市稲田町西2線11番地

製 作 中 西 印 刷 株 式 会 社
札幌市東区東雁来3条1丁目1番34号
TEL (011) 781-7501
FAX (011) 781-7516

RESEARCH BULLETIN OF OBIHIRO UNIVERSITY

NATURAL SCIENCE

CONTENTS

Veterinary Science

- Exposure to electric field (EF): Its palliative effect on
some clinical symptoms in human patients
Shinji HARAOKAWA, Fuyuki DOGE, Atsushi SAITO 1

Agronomy

- Local and year-to-year variation in flour properties of
Wx-protein deficient lines in wheat
M. Osa, A. Yanagisawa, A. Sugawara, K. Kato and H. Miura 9

Agronomy

- Selective grazing in leaf mixtures of four herbage grasses
by sheep
Akio HONGO 19

Environmental Science

- Birds of Tokachi District, Hokkaido 11. Waterfowl of the
lower reaches of the Obihiro River, eastern Hokkaido
Junko UCHIDA and Yuzo FUJIMAKI 29

Biochemistry

- Isolation of polygalacturonase I from the culture of the
psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.
Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA, 37
Izumi SAITO, and Toshihide TAKASAWA

Biochemistry

- Cold adaptation of polygalacturonase activity from the
culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*
Kouji TAKEUCHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA, 51
Izumi SAITO, and Toshihide TAKASAWA