

第23卷 第2号

ISSN 1347-6556
Vol. 23, No. 2

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15年 6 月

June 2003

帯 広 畜 産 大 学

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

目 次

生化学

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 由来ポリガラクトナーゼ活性の低温適応因子

高橋 裕司・匂坂 慶子・斉藤 泉・高澤 俊英…………… 1

生化学

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* ポリガラクトナーゼ活性. 硫酸アンモニウムによる活性阻害

井熊 武志・高橋 裕司・匂坂 慶子・斉藤 泉・高澤 俊英…………… 21

生化学

低温性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia nivalis* のポリガラクトナーゼ活性の低温適応

池浦 真奈美・匂坂 慶子・斉藤 泉・高澤 俊英…………… 29

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 由来 ポリガラクトナーゼ活性の低温適応因子

高橋 裕司・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英

Cold adaptation factor for polygalacturonase activity
from a cultured psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA, Izumi SAITO¹, Toshihide TAKASAWA

(受理：2002年11月30日)

概 要

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* フスマ培養由来の粗抽出液においては、ポリガラクトナーゼ (PGase) 活性は常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* 由来のものと比較して低温での活性が高く、低温酵素としての性質を示した。微生物の低温適応機構について調べるため、我々は好冷菌 *S.borealis* から PGase を単離し、その性質について常温菌 *S.sclerotiorum* の PGase との比較検討を行った。PGase 主活性画分からの精製標品においては両者 (*S.borealis* P4-2-2および *S.sclerotiorum* P4-4-2) の間で低温での活性には差が見られず、*S.borealis* の低温適応活性は消失した。*S.borealis* 由来 PGase の精製過程の最初のステップである Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー活性画分において低温での活性は大きく低下した。このような現象は *S.sclerotiorum* においては観察されなかった。さらに、*S.borealis* の P-6 DG PGase 活性画分と P-6 DG 低分子画分との混合実験において低温活性の回復が観察された。また *S.borealis* 由来の粗抽出液を、異なる分画分子量を有する透析膜を用いて透析した後も低温活性の低下が観察されたが、透析膜の分画分子量が小さいほど低下の割合は小さかった。以上の結果から、*S.borealis* 由来の粗抽出液において低分子質量 (1.8~6 kDa) 分子が、低温適応因子として PGase の低温での活性を高める役割を果たしていると考えられる。

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

緒 論

地球上の生物圏の約80%は15°Cないしはそれ以下の低温環境である。このような環境下においても様々な生物が生息しており、これらの生物は低温環境に適応した特徴を示すと考えられる。

これらの微生物のさまざまな低温適応戦略には、細胞膜の流動性の保持 (Russell and Fukunaga 1990; Herbert 1986), 抗凍結因子の産生 (Kawahara et al. 2001; Sun et al. 1995), 低温ショックタンパク質と総

称される様々なタンパク質の合成 (Julseth and Inniss 1990; Jones et al. 1987), および低温での高い活性を持つ酵素を産生すること (Gerday et al. 2000), などが知られている。

このような低温での高い活性を持つ酵素は低温酵素 (cold-enzyme) と呼ばれ、これらの低温酵素は洗浄効果の向上を目的とした衣類用洗剤への添加がなされている (Ohgiya and Hoshino 2001) ほか、海産物や果物の加工などの食品工業や、廃棄物処理やバイオレメディエーションなど自然環境下での酵素反応プロセスなどへ

帯広畜産大学畜産科学科

Department of Animal Science and Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社農業科学研究所

¹ Agrosience Research Laboratories, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

の応用が期待されている。

また、学術的にも分子進化の観点から強い関心を持たれ、これまでに多くの低温適応微生物由来の低温酵素が単離され、常温性の相同な酵素との比較検討がなされてきた (Hoyoux et al. 2001; Mayordomo et al. 2000; Chessa et al. 1999; Tsuruta et al. 1998)。

これらの酵素が低温で高い活性を示す機構は、主にタンパク質分子の高次構造の柔軟性の高さに関連付けられている。すなわちこれらの酵素タンパク質分子は、常温性のものと比較してより柔軟でルーズな分子の構造をもっているために、低温においてより効率的な触媒反応を示し得ると考えられる。この推定は、低温酵素の多くが熱に不安定で、常温酵素に比べて熱失活しやすい性質を持つことから裏付けられる。

現在までに、低温酵素の推定アミノ酸配列の常温酵素のものとの比較やコンピュータによる二次構造予測の結果の比較から、低温酵素に柔軟な高次構造を与える要因となる構造上の特徴を見いだそうとする試みがなされている (Wallon et al. 1997; Devail et al. 1994; Gutshall 1995)。また、いくつかの低温酵素が結晶化され、X線結晶構造解析によって三次元構造が決定され、そして常温酵素との構造比較がなされている (Kim et al. 1999; Aghajari 1998; Alvertz 1998; Russell et al. 1998)。

これらの研究から、低温酵素に柔軟性を与える構造上のさまざまな要因が指摘されてきた (Aghajari et al. 1998; Alvarez et al. 1998; Gerday et al. 1997; Gerike et al. 1997; Feller et al. 1996) が、未だ研究成果が少なく、また低温酵素と常温酵素の間には低温適応とは関係がないと思われる変異も多く蓄積していることなどの研究上の困難さから、未だ明確な結論を得るには至っていない。

本研究では、植物病原性糸状菌である、好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の病原性に深く関与していると考えられる PGase 活性に着目した。本菌は、北海道東部を中心とした寒冷地に分布し、オオムギやコムギ (Tomiya 1955)、芝草であるペントグラス (Groves and Bowerman 1955; Jamalain 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℃～5℃の積雪下で生育し、実験的には 5℃で最も良い成長を示す一方、20℃では成長を示さず、好冷菌 (Psychrophiles) に分類される。

植物病原菌の病原性には、ポリガラクトンナーゼ (PGase) が深く関与することが示唆されてきた (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、ポリガラクトン酸を主な基質として、ガラクトン

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 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 は陸生の菌としては例の少ない好冷菌であり、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。

比較対象としては、菌核病菌として広く知られた菌株である、常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Walker 1969) を選んだ。本菌は、広範な地域に分布する植物病原性糸状菌で、その宿主も多くの種が知られている (Nicholson et al. 1973; Wu et al. 1972; Pawlowski and Hawn 1964; Partyka and Mai 1962)。本菌は 5℃～35℃の温度範囲で生育可能であるが、20℃付近で最も生育が早く (Walker 1969)、天然においても気温が 20℃付近で湿潤状態において本菌による病害が多く見られ、常温菌 (mesophiles) としての性質を示す。

我々の以前の研究において、好冷菌 *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 (Takeuchi et al. 2002)。本研究においては、まずこの現象が 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、好冷菌 *S. borealis* および常温菌 *S. sclerotiorum* それぞれから PGase をまず単離した (Takahashi et al. 2002a; Takahashi et al. 2002b)。さらに、各々の精製標品および *S. borealis* PGase 精製段階途上の部分精製標品についての PGase 活性の好冷性の比較検討から、好冷菌 *S. borealis* 由来 PGase 活性の好冷性には PGase 分子自身以外の要因、すなわち低温適応因子の存在が示唆されたので、この点について調べた。

実験材料及び方法

試薬

D-ガラクトン酸 1 水和物、ポリガラクトン酸 (From orange)、牛血清アルブミン (以下 BSA) (Crystallized and liophilized, 窒素分 14.8% (w/w)) は Sigma から入手した。Potato-Dextrose-Agar (以下 PDA) は Difco Laboratories から入手した。小麦フスマは十勝米穀から入手した。Bio-Gel P-6 DG は Bio-Rad から、CM-Toyopearl 650M は東洋曹達から、

Sephacryl S-200はPharmacia からそれぞれ入手した。Coomassie Brilliant Blue (以下 CBB) G-250 (Specially prepared reagent, Lot No.M7R3031) は半井化学薬品から入手した。Hyflo super-cel (Celite Co.), 無水炭酸ナトリウム (特級), フェリシアン化カリウム (特級), 硫酸鉄 (Ⅲ) アンモニウム12水和物 (特級), ラウリル硫酸ナトリウム (以下 SDS) (生化学用), 硫酸 (精密分析用), 酢酸ナトリウム 3 水和物 (特級), 氷酢酸 (特級), リン酸 (特級, 85% (w/w)), メタノール (特級, 99.8% (w/w)), Dialysis Membrane (Viskase Sales Co.), および Dialysis Membrane (SPECTRA/POR 3 (MWCO3500) および SPECTRA/POR 6 (MWCO500), Spectrum Medical Industries Inc.) は和光純薬工業より入手した。

菌株の培養

S. borealis および *S. sclerotiorum* の菌株は、まず寒天平板培地上で培養した後、小麦フスマ培地で培養した。

3.9% (w/v) PDA 溶液を121°C (約2.2kg/cm²), 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。菌株保存用 PDA 斜面培地より *S. borealis* または *S. sclerotiorum* 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、*S. borealis* は 5°C で 2 カ月、*S. sclerotiorum* は 20°C で 2 週間それぞれ培養し、その後使用時まで 5°C で保存した。

次に上記寒天培養物を小麦フスマ培地に移植した。小麦フスマ培地は、小麦フスマ30g と水50mL とを充分に混和して500mL 三角フラスコに入れてオートクレーブ滅菌した。*S. borealis* または *S. sclerotiorum* 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、*S. borealis* は 5°C で 2 または 3 ヶ月間、*S. sclerotiorum* は 20°C で 2 週間静置培養し、粗抽出液の調製時まで 5°C で保存 (約 1 カ月) した。

好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* および常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* 由来 PGase I の精製

精製操作は特に断らない限りは氷浴上またはクロマトチャンバー (5°C) 中で行った。

ステップ 1. 粗抽出液の調製

S. borealis または *S. sclerotiorum* の小麦フスマ培養物 5 フラスコを、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 緩衝溶液 (S.buffer) で抽出した。すなわち、小麦フスマ培養物 5 フラスコをブレンダーに加えて 1 L 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. 5 B, 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 μm セルロースアセテート, Advantec) 滅菌した。このろ液を粗抽出液として、5°C で保存した。

ステップ 2. Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

S. borealis および *S. sclerotiorum* 由来の粗抽出液 400 mL (*S. borealis* 3 748U; *S. sclerotiorum* 5 440U) をそれぞれ、あらかじめ S.buffer で平衡化した Bio-Gel P-6 DG カラム (φ4.4cm×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 (A₂₈₀) 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 μL/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-35M II, M & S Instruments Inc.) を測定した。PGase 活性画分をプールし、同様の粗抽出液 400mL (Total 800mL) のゲルろ過から得られた活性画分と合わせて脱塩活性画分 (*S. borealis* 966mL, 7 197U; *S. sclerotiorum* 1 084mL, 8 032U) を得た。

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

ステップ 2 で得た脱塩活性画分それぞれ (*S. borealis* 920mL, 6 854U; *S. sclerotiorum* 950mL, 7 039U) を、あらかじめ S.buffer で平衡化した CM-Toyopearl 650M カラム (φ2.6cm×35cm, カラム体積 186mL) に供した。引き続き、S.buffer で非吸着画分を溶出した後、50mM, 0.1M, 0.5M, 1.0M 塩化ナトリウムを含む S.buffer を用いてステップワイズ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 A₂₈₀ の測定により確認し、A₂₈₀ 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、次の溶出 Buffer と交換した。20mL ずつの画分を集め、得られた各画分の A₂₈₀ 及び PGase 活性を測定した。

得られた活性ピークをそれぞれ P2 から P4 (*S. borealis*: P2, P2', P3, P3' および P4; *S. sclerotiorum*: P2, P3 および P4) としてプールした。*S. borealis* と *S. sclerotiorum* のそれぞれについて、0.1M NaCl を含む S.buffer により溶出された、主要な活性プールである P4 (*S. borealis* 124 mL, 2 270U; *S. sclerotiorum* 199mL, 3 403U) につい

てさらに精製を行った。

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) (*S.borealis*: 110mL, 2 014U, *S.sclerotiorum*: 190mL, 3 249U) を透析し、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13.5mL) に供した。カラムは32.8 mL/h の流速で溶出され、2 mL ずつの画分が集められた。S.buffer 及び 50mM 塩化ナトリウムを含む S.buffer 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, 1.0M 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} および酵素活性を測定した。

S.borealis については、得られた活性ピークを P4-1 (18.0mL, 237U) および P4-2 (36.0mL, 1 170U) としてプールし、主要な活性プールである P4-2 をさらに精製操作に供した。

S.sclerotiorum については、得られた活性ピーク P4-2 (42.5mL, 212U), P4-3 (37.0mL, 1 066U), および P4-4 (48.0mL, 1 186U) をプールし、もっとも比活性の高い画分である P4-4 をさらに精製操作に供した。

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

酵素試料 (*S.borealis*: P4-2, *S.sclerotiorum*: P4-4) を透析し、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 8 mL) 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、濃縮した。

濃縮酵素試料 (*S.borealis* 4.5mL, 768U; *S.sclerotiorum* 3.0mL, 813U) 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で行った。流速は 23.6mL/h で、2 mL 画分ずつ集めた。得られた各画分について、 A_{280} および酵素活性を測定した。

S.borealis については、得られた活性ピークを P4-2-2 (9.3mL, 553U) としてプールし、最終精製標品 (PGase I) とした。*S.sclerotiorum* でも同様に、得られた活性ピークを P4-4-2 (19.2mL, 753U) としてプールし、最終精製標品 (PGase I) とした。

電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及び等電点電気泳動 (IEF) は Phast system (Pharmacia LKB)

を用いて行った。

nondenaturing PAGE は、8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて、pH8.8 (*S.borealis* P4-2-2) もしくは pH4.2 (*S.sclerotiorum* P4-4-2) において行った。SDS-PAGE 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°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 pH8.5 において泳動を行った。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 (94kDa), 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)。

IEF は、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、pH 3-9 の範囲で行った。タンパク質は 0.02% (w/v) CBB R-250-0.1% (w/v) 硫酸銅-30% (v/v) メタノール-10% (v/v) 酢酸溶液を用いて染色した。

等電点 (pI) の決定には、以下の pI マーカータンパク質を用いた。トリプシノーゲン (pI9.30), レンチルレクチン-塩基性バンド (pI8.65), レンチルレクチン-ミドルバンド (pI8.45), レンチルレクチン-酸性バンド (pI8.15), ミオグロビン塩基性バンド (pI7.35), ミオグロビン酸性バンド (pI6.85), ヒトカルボニックアンヒドラーゼ B (pI6.55), 牛カルボニックアンヒドラーゼ B (pI5.85), b-ラクトアルブミン A (pI5.20), 大豆トリプシンインヒビター (pI4.55), アミログリコシダーゼ (pI3.50)。

ゲルろ過法による分子質量の決定

ゲルろ過法による *S.borealis* および *S.sclerotiorum* PGase I の天然での分子質量の見積もりは、Andrews (1965) の方法により行った。タンパク質試料溶液を 50 mM NaCl を含む S.buffer で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (ϕ 1.6cm \times 65.5cm, 131.6mL bed) に供し、23.4mL/h の流速で溶出した。1.90mL ごとの画分を集め、各画分の A_{280} を測定して得られた溶出曲線によって各タンパク質試料の溶出体積を求めた。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。 γ -グロブリン (160kDa), アルコールデヒドロゲナーゼ (150kDa), アポトランスフェリン (80kDa), 牛血清アルブミン (67kDa), オボアルブミン (43kDa), キモトリプシン (25kDa), リボヌクレアーゼ A (14kDa)。Vt の決定には 1 M NaCl を用いた。各分子質量マーカー

タンパク質の溶出体積に対するそれぞれの分子質量の常用対数のプロットによって得られる溶出体積に対する直線の一次回帰式から、各酵素試料の分子質量を求めた。

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, 酵素溶液およびS.buffer 0.1mL) において40°C (または5°C~70°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重実験結果の平均値から求めた。

酵素活性の1Uは、酵素反応系 (2.1mL) において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

PGase 活性の温度依存性

Takeuchi et al. (2002) は、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* および常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* 由来 PGase 活性の温度依存性を調べ、*S.borealis* 由来 PGase 活性が *S.sclerotiorum* 由来 PGase 活性と比較して顕著な低温適応現象を示すことを明らかにした。ここではその点を追試する目的で *S.borealis* 由来および *S.sclerotiorum* 由来の粗抽出液中における PGase 活性を5°C~70°Cの範囲で測定し、その温度依存性を比較した。結果を図1, 図2, 及び図3に示す。

S.borealis 由来の粗抽出液中の PGase 活性の最適温度は40°Cであった (図1)。5°Cにおける40°Cでの活性値をコントロールとした相対活性値は、37.9% (enzyme solution volume: 100 μ L, 1.68U/mL at 5°C, 4.42U/mL at 40°C) であった (図3)。

一方、*S.sclerotiorum* 由来の粗抽出液中の PGase 活性は、*S.borealis* の場合と異なり、最適温度が50°Cであった (図2)。また、40°Cでの活性値をコントロールとした相対活性値は、30°C以下の低温域で *S.borealis* よりも低く、5°Cではコントロールの19.0% (enzyme solution volume: 100 μ L, 1.82U/mL at 5°C, 9.54U/mL at 40°C) であった (図3)。このことから、粗抽出液中においては、*S.borealis* 由来の PGase 活性は *S.sclerotiorum* 由来の PGase 活性と比べて最適温度が低温側にシフト

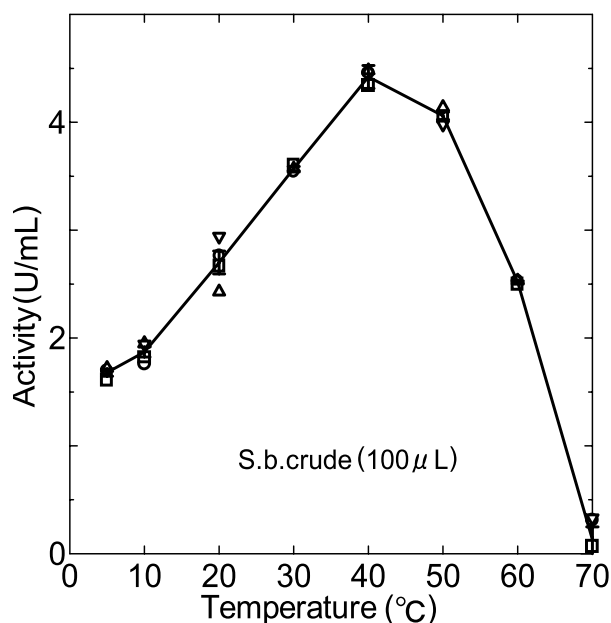


図1 *S.borealis* フスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性の温度依存性。 *S.borealis* 由来の粗抽出液中における PGase 活性を5°C~70°Cの範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4。

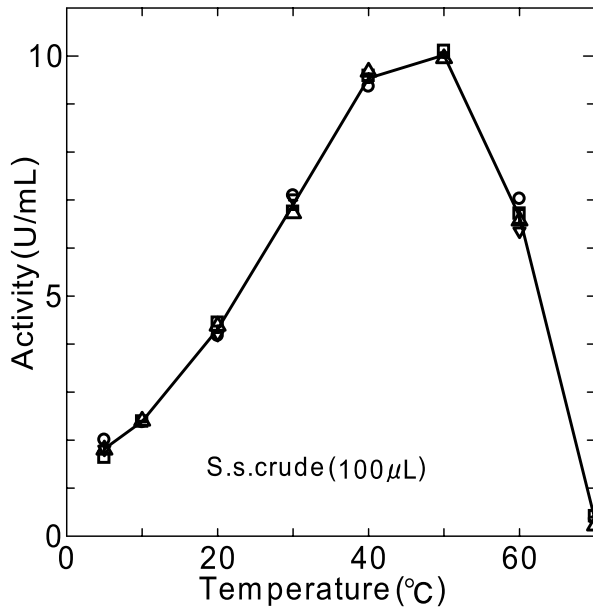


図2 *S. sclerotiorum* フスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性の温度依存性. *S. sclerotiorum* 由来の粗抽出液中における PGase 活性を 5 °C ~70 °C の範囲で測定し, 活性値 (U/mL) をプロットした. ○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4.

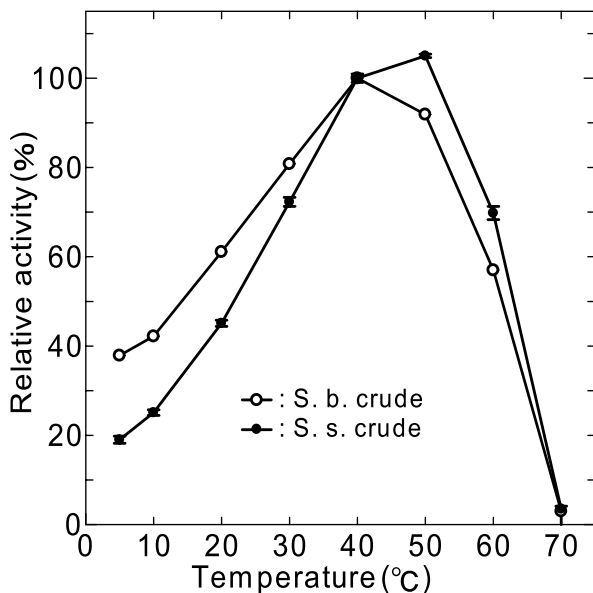


図3 *S. borealis* および *S. sclerotiorum* 各々のフスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性. 各温度での PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を, 40°C での活性値を 100% とした相対活性値としてプロットし, エラーバー (\pm S.E.) と共に示した. ○, *S. borealis* 由来粗抽出液; ●, *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液.

し, また低温域での 40°C 相対活性が高く, 特に 5°C では *S. sclerotiorum* 由来 PGase 活性に比べて 2 倍の相対活性を持つことが明らかとなり, Takeuchi et al. (2002) と同様に好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来の PGase 活性は低温に適応した性質を持つことが追試された。

また, *S. borealis* および *S. sclerotiorum* それぞれの固

体培養物 (5 フラスコ) から得られた粗抽出液 (850mL および 900mL) の全活性を比較すると (図 4), *S. borealis* 由来 PGase 活性は常温域 (20~30°C) では *S. sclerotiorum* 由来 PGase 活性と比べて 1/2 ないしはそれ以下の活性値しか見られなかった。一方, 低温域 (5~10°C) ではこの 2 種類の活性はほぼ同様な値になり, *S. borealis* PGase 活性は常温菌 *S. sclerotiorum* PGase 活性に比べて低温域では活性の低下が抑制され, PGase 活性の低温適応現象が観察された。好冷菌 *S. borealis* はその極限的な生育環境のゆえに PGase 産生能が常温菌に比べて低いが, *S. borealis* 由来 PGase 活性が低温適応現象を示すことは, その低い PGase 産生能を補うための低温適応戦略の一つの役割を持っていると考えられる。

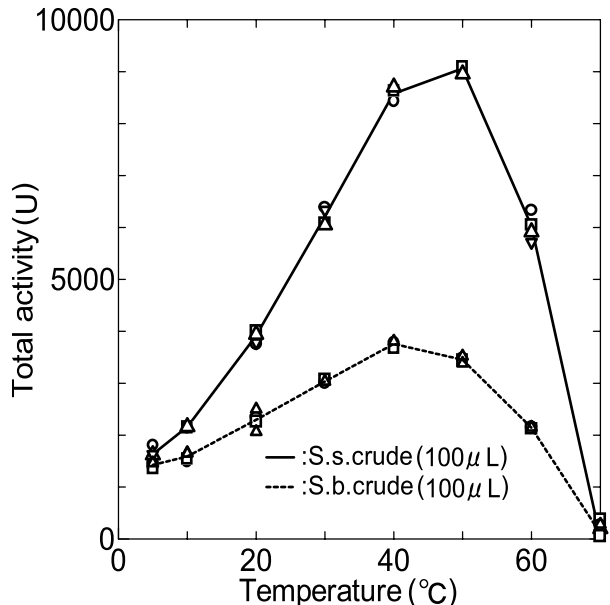


図4 *S. borealis* および *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液における全 PGase 活性. 各々の粗抽出液中における各温度での PGase 活性を, それぞれのフスマ培養物 5 フラスコから得られた粗抽出液の総体積中の活性として示した. ---, *S. borealis* 由来粗抽出液 (総体積 850mL); —, *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液 (総体積 900mL); ○, データ 1; □, データ 2; △, データ 3; ▽, データ 4.

好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* および常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* 固体培養からの PGase I の精製

Takeuchi et al. (2002) が好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* および常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* の各々の培養粗抽出液中の PGase 活性の温度依存性の比較検討によって, 好冷菌 *S. borealis* の培養粗抽出液中の PGase 活性は, 常温菌 *S. sclerotiorum* の場合には観察されない低温適応現象または低温寛容現象すなわち好冷性を示すことを明らかにし, 我々もその事実を確かな現象として確認した。この *S. borealis* における PGase 活

性の低温適応現象が *S.borealis* 由来 PGase 分子においても観察されるかどうかを調べる目的で、好冷菌 *S.borealis* および常温菌 *S.sclerotiorum* の各々の固体培養粗抽出液中の主要 PGase 活性画分から、実験材料及び方法で述べたように、*S.borealis* 固体培養 (5℃, 2カ月) から PGase I (P4-2-2) (図5) を、*S.sclerotiorum* 固体培養 (20℃, 2週間) から PGase I (P4-4-2) (図6) を Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー, CM-Toyopearl 650M クロマトグラフィー (NaCl ステップワイズ溶出法および NaCl リニアグラジエント溶出法), および Sephacryl S-200ゲルろ過クロマトグラフィーによって単離精製した。

各々の精製操作におけるクロマトグラフィーを、図5および図6に示す。

好冷菌 *S.borealis* においては、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。PGase I 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1 960U/mg で、粗抽出液から108倍に精製された。これに対して常温菌 *S.sclerotiorum* においては、800mL の粗抽出液から、0.337mg の最終精製標品 PGase I を得た結果となった。PGase I 最終精製標品 (P4-4-2) の全活性は1 235U となり、粗抽出液 (800mL) から11.3%の活性回収率で、*S.borealis* の場合と同様であった。一方、*S.sclerotiorum* PGase I 精製標品の比活性は3 662U/mg で、粗抽出液から116倍の精製倍率であり、*S.borealis* の場合と比較して精製倍率は同様であったが、比活性は約1.8倍高かった。

これらの精製標品は図7に示すように、どちらも8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにおける nondenaturing PAGE (各々pH8.8および pH4.2) およ

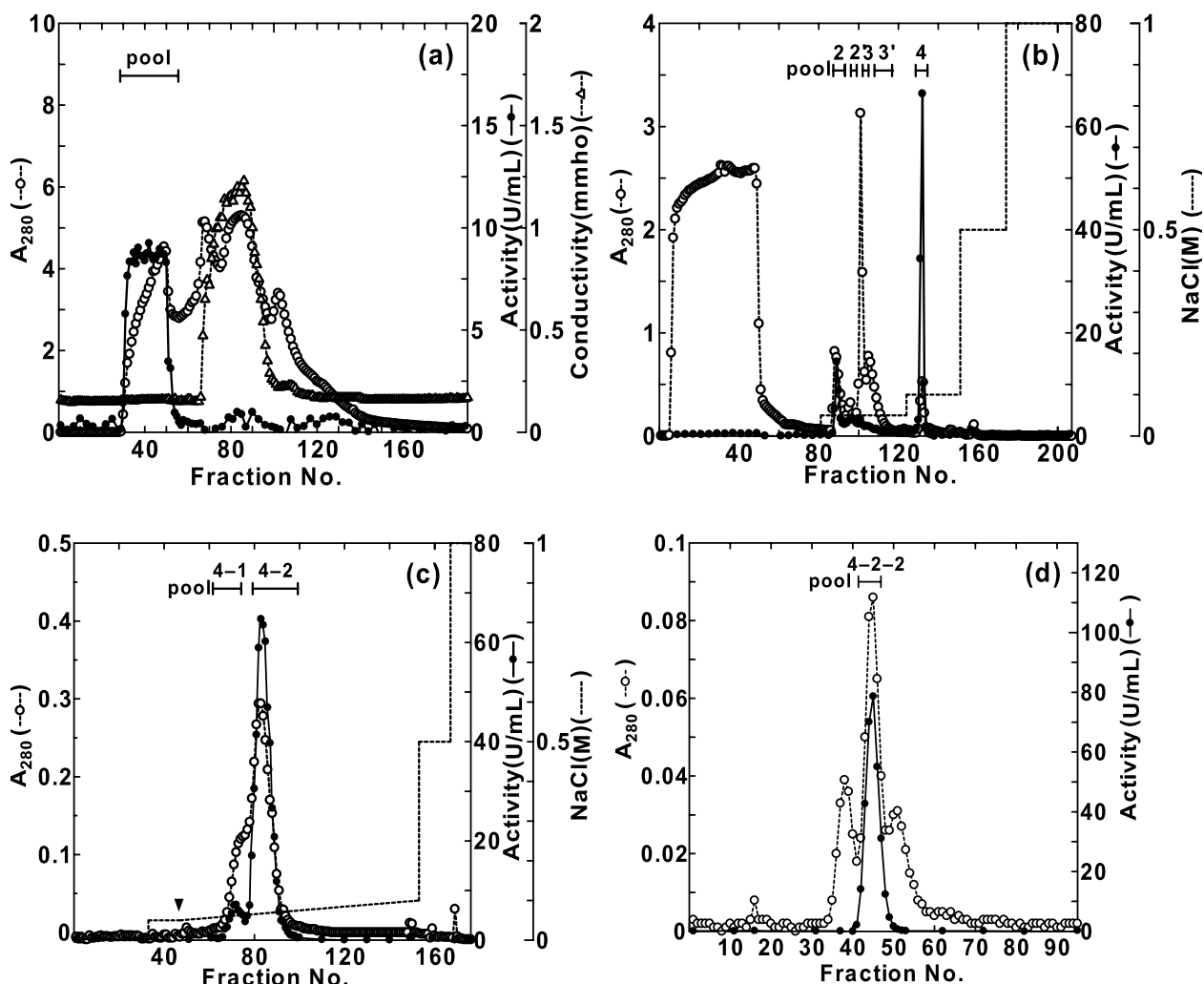


図5 *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) のクロマトグラフィー. (a) Gel filtration on Bio-Gel P-6 DG (ϕ 4.4cm \times 95cm, 1444mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 78.0mL/h. (b) Chromatography in a stepwise manner (50mM, 0.1M NaCl) on CM-Toyopearl 650M (ϕ 2.6 \times 34cm, 180mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 38.0mL/h. (c) Chromatography with a linear concentration gradient (50mM-0.1M NaCl, total volume 200mL) on CM-Toyopearl 650M (ϕ 1.0cm \times 17cm, 13mL bed). Fraction size: 2mL/tube, flow rate: 32.8mL/h. (d) Gel filtration on Sephacryl S-200 (ϕ 1.6cm \times 66cm, 133mL bed). Fraction size: 2mL/tube, flow rate: 23.6mL/h

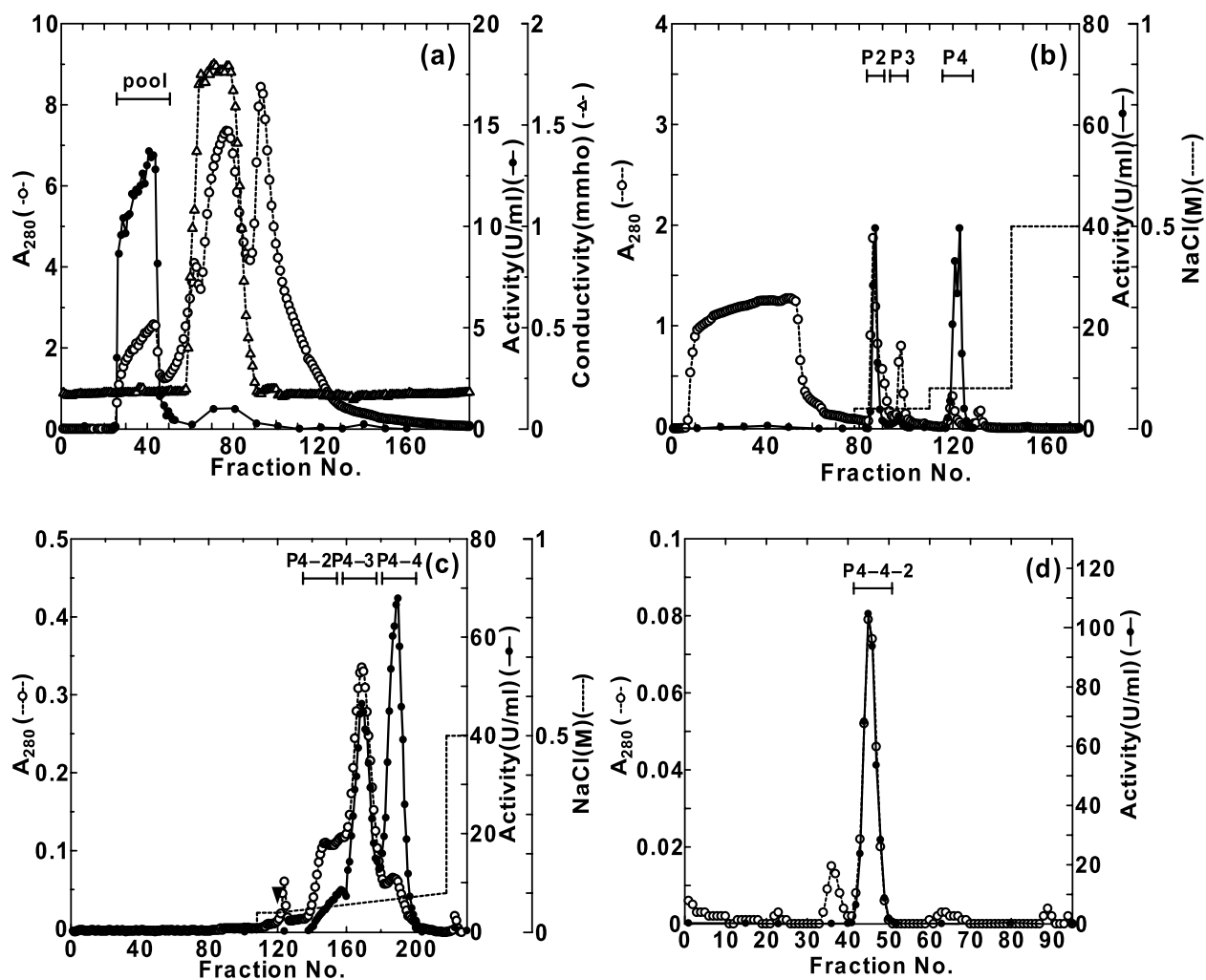


図6 *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) のクロマトグラフィー。(a) Gel filtration on Bio-Gel P-6 DG ($\phi 4.4\text{cm} \times 95\text{cm}$, 1444mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 86.0mL/h. (b) Chromatography in a stepwise manner (50mM, 0.1M NaCl) on CM-toyopearl 650M ($\phi 2.6 \times 34\text{cm}$, 180mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 78.4mL/h. (c) Chromatography with a linear concentration gradient (50mM-0.1M NaCl, total volume 200mL) on CM-toyopearl 650M ($\phi 1.0\text{cm} \times 17\text{cm}$, 13mL bed). Fraction size: 2mL/tube, flow rate: 32.0mL/h. (d) Gel filtration on Sephacryl S-200 ($\phi 1.6\text{cm} \times 66\text{cm}$, 133mL bed). Fraction size: 2mL/tube, flow rate: 23.6mL/h.

び SDS-PAGE (pH8.5) の結果, 単一のバンドが CBB 染色によって検出され, 均一な精製標品であることが示された。

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プロットの標準曲線一次回帰式 (図 8) から各々の酵素の分子質量は, *S.borealis* 由来 PGase I は $39.8 \pm 0.371\text{kDa}$ (S.E.), *S.sclerotiorum* 由来 PGase I は $39.8 \pm 1.10\text{kDa}$ (S.E.) と見積もられ, 単離された二つの PGase は同様の分子質量を持つことが明らかになった。

さらに, Sephacryl S-200ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて, 分子質量マーカータンパク質の溶出体積に対する各々の分子質量の常用対数プロットの標準曲線一次回帰式 (図 9) から, 各々の酵素の天然における分子質量は *S.borealis* 由来 PGase I は 41.3kDa , *S.sclerotiorum*

由来 PGase I は 40.2kDa と見積もられ, SDS-PAGE で得られた値と各々の酵素についてはほとんど同様であることから二つの酵素は天然においては単量体酵素であることが明らかになった。また病原性に関係すると考えられる二つの PGase が天然において同様の分子質量 (41.3 および 40.2kDa) を持つことが SDS-PAGE の場合 (39.8 および 39.8kDa) と同様にここでも確認された。

また, IEF において, pI マーカータンパク質の移動度に対する各々の pI のプロットの標準曲線一次回帰式 (図 10) から, *S.borealis* 由来 PGase I は pI7.88, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I は pI8.70 と見積もられた。従って, 2 種類の PGase は pI においては相違が見られ, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I は *S.borealis* 由来 PGase I と比べて, より塩基性が強いタンパク質分子であることが示された。

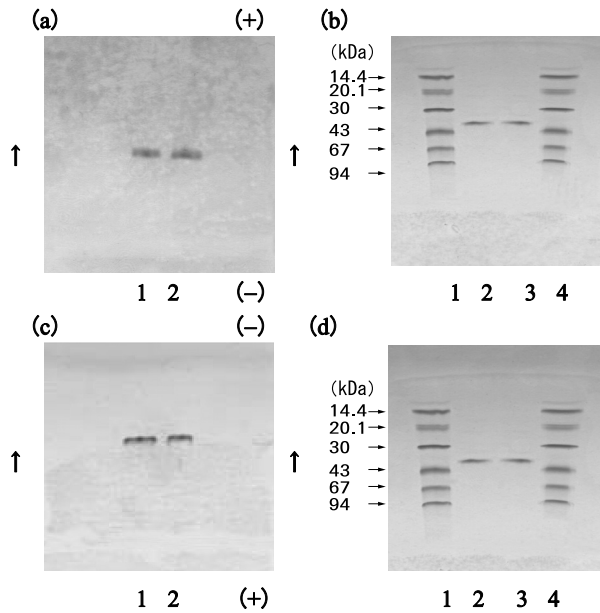


図7 *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I のポリアクリルアミドゲル電気泳動. 8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い, CBB R-250で染色した. (a) *S.borealis* P4-2-2 の nondenaturing PAGE (pH8.8). レーン 1, 2 : P4-2-2, 0.31 μ g. (b) *S.borealis* P4-2-2 の SDS-PAGE (pH8.5). レーン 1, 4 : 分子質量マーカータンパク質; レーン 2, 3 : P4-2-2, 0.20 μ g. (c) *S.sclerotiorum* P4-4-2 の nondenaturing PAGE (pH4.2). レーン 1, 2 : P4-4-2, 0.31 μ g. (d) *S.sclerotiorum* P4-4-2 の SDS-PAGE (pH8.5). レーン 1, 4 : 分子質量マーカータンパク質; レーン 2, 3 : P4-4-2, 0.21 μ g.

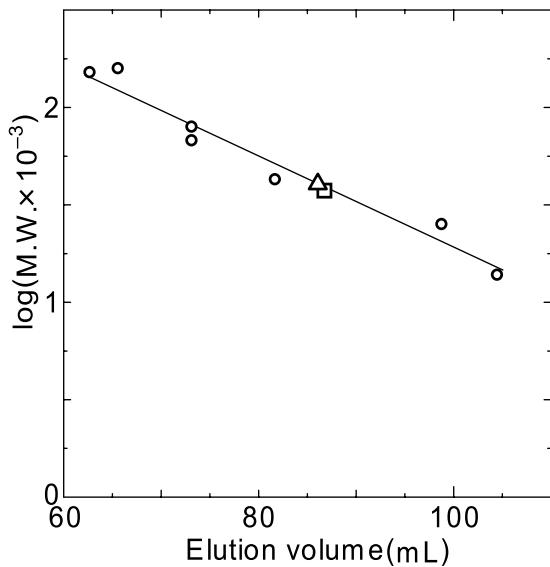


図9 Sephacryl S-200ゲルろ過カラム法による *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の溶出体積に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした. 標準曲線一次回帰式は $y = -0.0239x + 3.67$ であった. 一次回帰式の相関係数は $R = 0.9807$ であった. 各々の酵素の天然における分子質量は, *S.borealis* 由来 PGase I (Δ ; 溶出体積 85.95 mL) は 41.3 kDa, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (\square ; 溶出体積 86.45 mL) は 40.2 kDa と見積もられた.

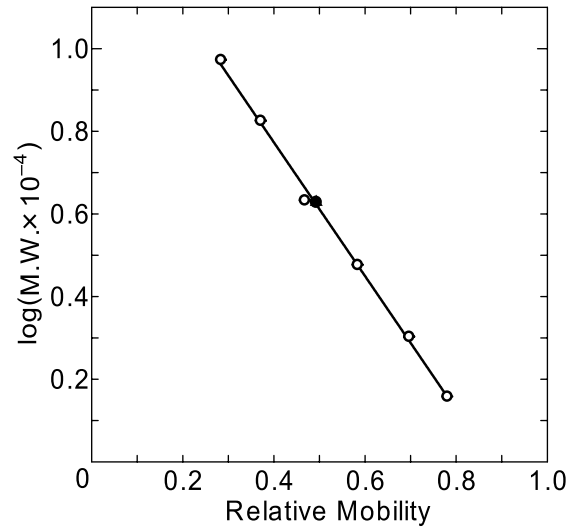


図8 SDS-PAGE による *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の移動度 (6データの平均値) に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした. 標準曲線一次回帰式は $y = -1.62x + 1.42$ であった. 一次回帰式の相関係数は $R = 0.9988$ であった. この電気泳動によって, 各々の試料の分子質量は *S.borealis* 由来 PGase I (p4-2-2 : \bullet) は 39.8 ± 0.371 kDa (S.E.), *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-4 : \blacktriangle) は 39.8 ± 1.10 kDa (S.E.) と見積もられた.

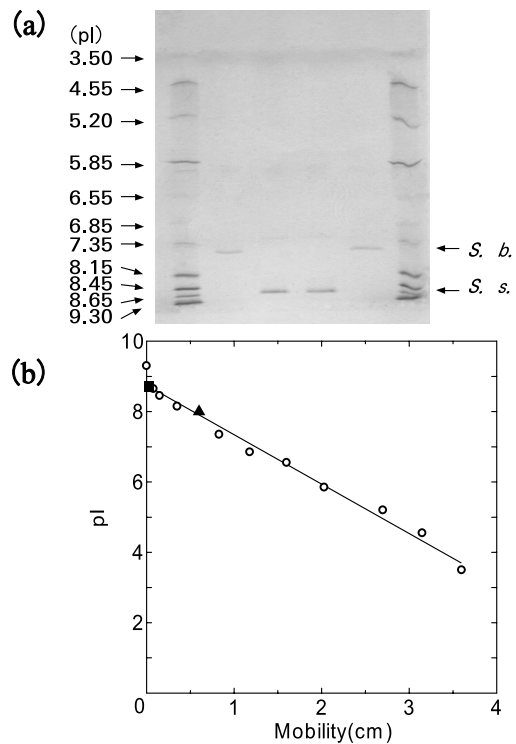


図10 IEF-PAGE による *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の等電点の決定. (a) IEF は, 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて, pH3-9の範囲で行い, ゲルは CBB R-250染色で染色した. レーン 1, 6 : pI マーカータンパク質; レーン 2, 5 : *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2); レーン 3, 4 : *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2). (b) pI マーカータンパク質の移動度に対して各々の pI をプロットした. 標準曲線の一次回帰式は $y = -1.41x + 8.77$ であった. 一次回帰式の相関係数は $R = 0.9914$ であった. \circ : pI マーカータンパク質; \blacksquare : *S.sclerotiorum* 由来 PGase I 精製標品 (P4-4-2); \blacktriangle : *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2).

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* PGase I (P4-2-2) の PGase 活性の温度依存性

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来の PGase 活性が持つ高い好冷性が、PGase 分子自身によるものであるかどうかを調べるために、*S.borealis* 由来の PGase 主活性画分の PGase I 精製標品 (P4-2-2) の活性を粗抽出液と同様に測定した (図11)。この精製標品の活性の温度依存性は、粗抽出液中の活性の場合とは異なり、最適温度が50℃ (粗抽出液 PGase 活性最適温度：40℃) にシフトし、また、各温度での活性の40℃の活性値をコントロールとした40℃相対活性は低温域で粗抽出液の場合よりも大きく低下し、5℃での40℃相対活性は18.6% (enzyme solution volume : 5 μ L, 31.4U/mL at 5℃, 169U/mL at 40℃) であった。この結果は常温菌 *S.sclerotiorum* の PGase 活性の温度依存性 (図12b) に類似しており、この *S.borealis* PGase I 精製標品 (P4-2-2) には顕著な好冷性が見られないことが示された。

このような現象は、好冷菌 *S.borealis* PGase I (1960U/mg) および常温菌 *S.sclerotiorum* PGase I (3662U/mg) の比活性の違いにおいても観察された。一般的に好冷性酵素は低温での酵素反応速度の低さすなわち酵素活性の低さを、酵素の比活性の高さすなわち分子活性または反応回転数の高さで補い低温適応していると考えられるが、好冷菌 *S.borealis* PGase I の40℃における比活性は常温菌 *S.sclerotiorum* の1/2程度で非常に低く、この傾向は *S.borealis* の最適生育温度 (5℃) においても変わらず、*S.borealis* PGase I は好冷性酵素としての特徴を示さなかった。

さらに pI の違いにおいても、*S.borealis* PGase I

(pI7.88) および *S.sclerotiorum* PGase I (pI8.70) は PGase 活性の最適 pH 条件 (pH4.5) においていずれの PGase も電荷をもち親水性ではあるが、その程度については *S.borealis* に比べて *S.sclerotiorum* の方が高かった (Lonhienne et al. 2001)。従って極性環境における PGase I 分子の立体構造の柔軟性については *S.borealis* PGase I の方が常温菌 *S.sclerotiorum* PGase I に比べて特に高いと思われる事実は観察されなかった。

次に、粗抽出液中には PGase 分子の他に多くのタンパク質分子が共存しているため、この共存タンパク質が非特異的な低温保護材として働き、PGase が高い低温活性を示す可能性について BSA を用いた添加実験によって検討した。すなわち、粗抽出液のタンパク質濃度 (0.517mg/mL) とほぼ同じ濃度 (0.474mg/mL) になるように、PGase 精製標品 (P4-2-2, 0.0607mg/mL, 0.0607mg in 100 μ L) に BSA 溶液 (0.520mg/mL, 0.468mg in 900 μ L) を添加 (0.474mg/mL, Total 1mL) し、この試料の好冷性を活性の測定によって調べた。その結果、この試料 (0.474mg/mL) の5℃での40℃相対活性は19.0% (enzyme solution volume : 100 μ L, 25.6U/mL at 5℃, 135U/mL at 40℃) で、精製標品のみで得られた値 (18.6%) からほとんど変化しなかった。従って、非特異的タンパク質分子の存在によっては PGase 活性の低温適応現象は観察されなかった。

常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* PGase I (P4-4-2) の PGase 活性の温度依存性

好冷菌 *S.borealis* において粗抽出液中の PGase 活性が低温適応現象を示したが、その PGase I 精製標品

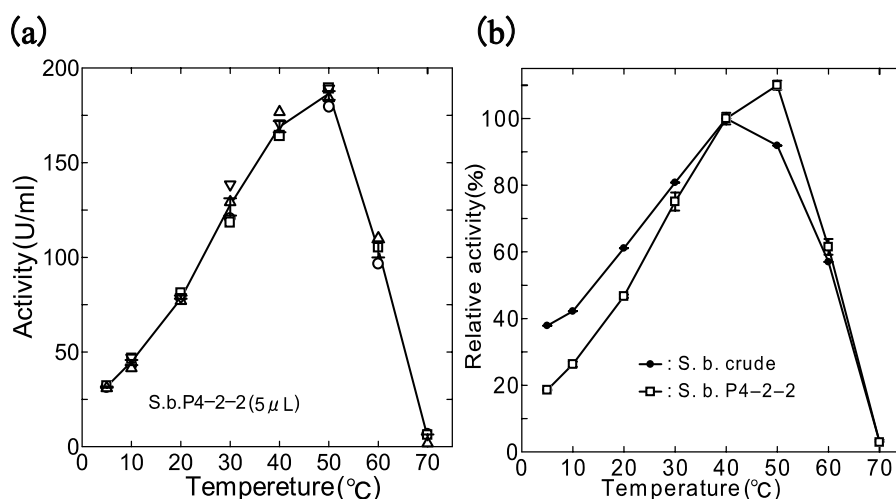


図11 *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) の活性の温度依存性. (a) *S.borealis* 由来 PGase I の PGase 活性を 5℃~70℃の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4. (b) 各温度での *S.borealis* 由来 PGase I 及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40℃での活性値を100%とした相対活性値としてプロットし、エラーバー (±S.E.) と共に示した。—●—, *S.borealis* 由来粗抽出液; —□—, *S.borealis* 由来 PGase I.

(P4-2-2) の PGase 活性の温度依存性は低温適応現象を示さなかったために、常温菌 *S.sclerotiorum* においても同様に単離精製によって PGase 活性の温度依存性が変化する可能性が考えられたので、常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* 由来の PGase I 精製標品 (P4-4-2) の活性の温度依存性を調べた (図12a)。その結果、最適温度は精製後も粗抽出液における場合と同様に50°Cで、5°Cにおける40°Cに対する相対活性は粗抽出液の場合の19.0%に対して17.5% (enzyme solution volume : 10 μ L, 11.1U/mL at 5°C, 63.6U/mL at 40°C) であり、常温菌 *S.sclerotiorum* の場合には PGase 活性の温度依存性は粗抽出液と精製標品とで同様の傾向を与え、ほとんど変化しなかった (図12c)。さらに *S.sclerotiorum* PGase I (P4-4-2) と

S.borealis PGase I (P4-2-2) の温度依存性を比較すると (図12d)、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* PGase I の最適温度が常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* のもの (40°C) に比べて高くなり50°Cであったが、40°C以下の温度域における温度依存性は両者の間に大きな違いはほとんど観察されなかった。これらのことから、精製操作による好冷性の消失は、高い好冷性を示す好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来の粗抽出液の場合においてのみ観察される特異的な現象であることが明らかになった。

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来 PGase 活性の Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 培養粗抽出液の

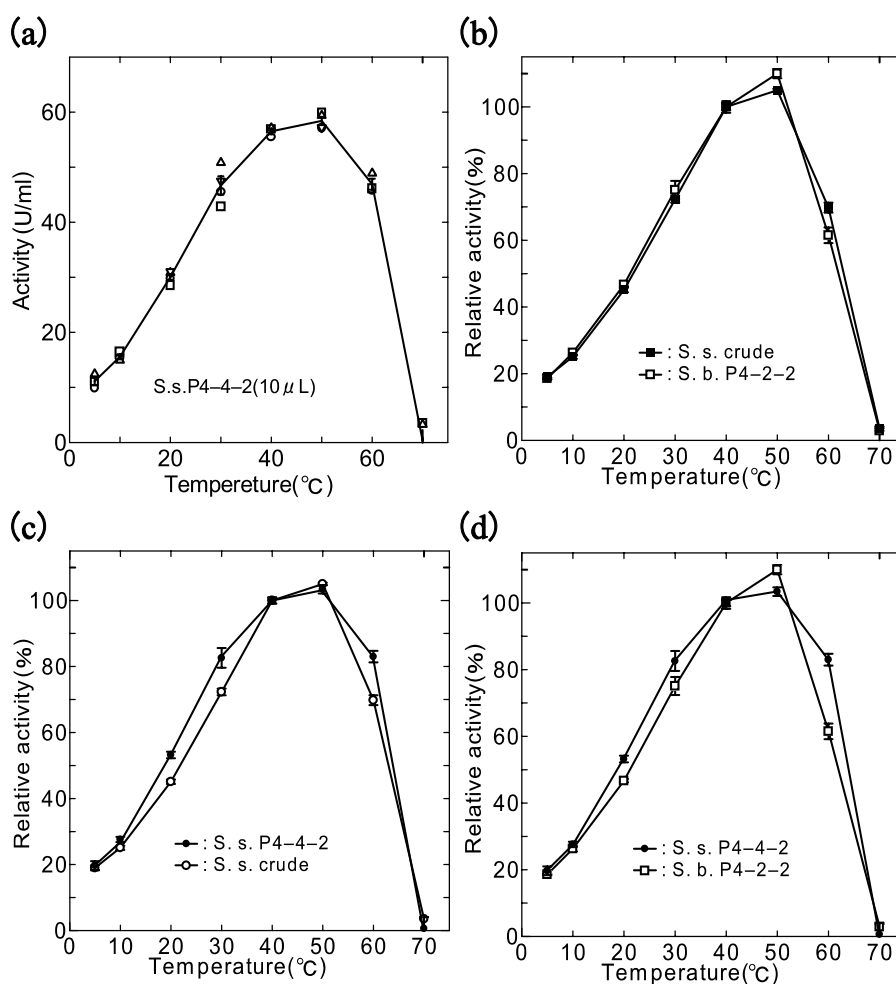


図12 *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) の活性の温度依存性. (a) *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の PGase 活を 5°C~70°C の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。O, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4. (b) 各温度での *S.sclerotiorum* 由来粗抽出液及び *S.borealis* 由来 PGase I の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40°C での活性値を 100% とした相対活性値としてプロットし、エラーバー (\pm S.E.) と共に示した。—■—, *S.sclerotiorum* 由来粗抽出液; —□—, *S.borealis* 由来 PGase I. (c) 各温度での *S.sclerotiorum* 由来 PGase I 及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40°C での活性値を 100% とした相対活性値としてプロットし、エラーバー (\pm S.E.) と共に示した。—●—, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I; —○—, *S.sclerotiorum* 由来粗抽出液. (d) 各温度での *S.sclerotiorum* 由来 PGase I 及び *S.borealis* 由来 PGase I の活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40°C での活性値を 100% とした相対活性値としてプロットし、エラーバー (\pm S.E.) と共に示した。—●—, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I; —□—, *S.borealis* 由来 PGase I.

PGase 活性において低温適応現象が観察されたが、その主活性画分からの精製標品 PGase I (P4-2-2) においては粗抽出液 PGase 活性で観察された低温適応現象が消失していた (図11b)。したがって、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来の粗抽出液中の PGase 活性に好冷性を与える要因は、精製操作の各段階のいずれかにおいて失われたと考えられるので、各精製段階での活性画分それぞれについて、PGase 活性の好冷性を調べた。

まず粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィーによる脱塩処理によって低分子 (分子質量: < 6 kDa) が除かれた P-6 DG 活性画分について、PGase 活性の温度依存性 (図13) を調べた。その結果、低温適応現象を 5℃における40℃に対する相対活性 (40℃相対活性) を基準として考察すると、粗抽出液中の PGase 活性の 5℃における40℃相対活性が37.9%であったが、P-6 DG 活性画分ではその相対活性が25.1% (enzyme solution volume: 100 μ L, 0.797U/mL at 5℃, 3.18U/mL at 40℃) まで低下し、PGase 活性の好冷性は減少していた (図13b)。

この現象は、粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー処理によって分子質量約 6 kDa 以下の低分子が除かれることから、粗抽出液中の PGase 活性の低温適応現象に関与していた分子が P-6 DG 処理によって除かれ、これによって PGase 活性の好冷性の大部分が失われたために観察されたと考えられる。このことから、*S.borealis* 由来の粗抽出液中における低温域での高い相対活性には、ゲルろ過によって粗抽出液から除かれた特異的な低分子が関与し、この低分子が PGase 活性に好冷性を付与すると予想される。

しかしながら、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来 P-6 DG 活性画分の 5℃における40℃相対活性 (25.1%) を *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) の 5℃における40℃相対活性 (18.6%) および常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) の 5℃における40℃相対活性 (17.5%) と比較すると、P-6 DG 活性画分の 5℃における40℃相対活性は高く、P-6 DG 活性画分には PGase 活性の好冷性が依然として存在していると考えられる。

この Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィーにおける活性回収率は96.0%で、操作は定量的に行われたので、粗抽出液の PGase 活性の発現に関与していた特定の構成アイソザイム群の損失は無いものと考えられる。さらに、PGase アイソザイムは相互分離されていないので、特に高い好冷性を持つ PGase アイソザイムが粗抽出液からの Bio-Gel P-6 DG 活性画分の PGase 活性の低温適応に寄与している可能性が、または Bio-Gel P-6 DG 活性画分中に PGase 分子とともに存在する高分子性低温適応因子が PGase 活性の低温適応に関与する可能性も、精製のこの段階において考えられる。

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来 PGase の Bio-Gel P-6 DG 活性画分と P-6 DG 低分子画分の混合実験

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* PGase P-6 DG V₀ 活性画分の温度依存性実験の結果 (図13) から P-6 DG 活性画分の 5℃における40℃相対活性 (25.1%) が *S.borealis* 培養粗抽出液中における 5℃での40℃相対活性 (37.9%) と比較すると大きく低下したので、好冷菌 *S.borealis* の PGase 活性の低温域での相対活性が常温

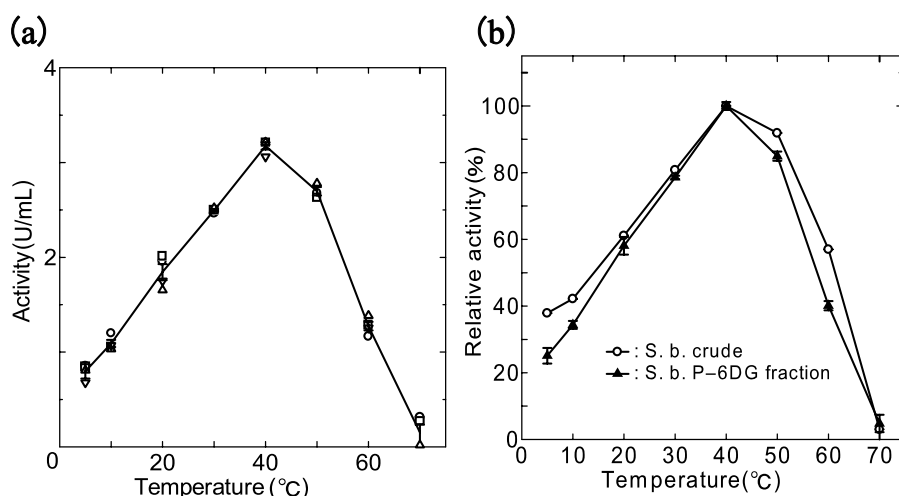


図13 *S.borealis* 由来 PGase の Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性. (a) *S.borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー活性画分中における PGase 活性を 5℃~70℃の範囲で測定し、活性値(U/mL)をプロットした. ○, データ 1; □, データ 2; △, データ 3; ▽, データ 4. (b) 各温度での *S.borealis* 由来 PGase の P-6 DG 活性画分及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40℃での活性値を 100%とした相対活性値としてプロットし、エラーバー(±S.E.)と共に示した. —▲—, *S.borealis* 由来 PGase P-6 DG 活性画分; —○—, *S.borealis* 由来粗抽出液.

性菌核病菌 *S.sclerotiorum* のものに比較して高い現象、すなわち好冷菌 *S.borealis* PGase 活性の低温適応現象に参与していた因子が Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィーによって相互分離されたと考えられる。

以上の点から、好冷菌 *S.borealis* 粗抽出液から Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィーによって V_0 PGase 活性画分 (P_I) と V_t 低分子画分 (P_{II}) を相互分離し、P-6 DG 活性画分に対する低分子画分の混合効果を調べた (表 1)。

S.borealis 粗抽出液のゲルろ過クロマトグラフィー処理および P-6 DG V_0 画分と V_t 低分子画分との混合実験による PGase 活性量の低下が実験上不都合であったので、まず粗抽出液を限外ろ過法によって濃縮した。限外ろ過膜には、低分子ができる限り除かれないようにするために保持限界分子質量 500Da (セルロースアセテート, NMWL500, Millipore) のものを用いた。

粗抽出液 195mL (Total activity : 819U, Total A_{280} : 3 666, Total protein : 71.6mg) を、5 °C で 12 日間加圧 (1.0kg/cm²) によって限外ろ過し、体積比で 3.98 倍 (49.0mL) 濃縮溶液 (Total activity : 774U, Total A_{280} : 2 712, Total protein : 61.6mg) を得た。この操作における回収率は、 A_{280} 回収率 74.0%、活性回収率 94.5%、タンパク質回収率 86.0% であった。

この濃縮液中の PGase 活性の好冷性は、5 °C における 40°C 相対活性が 28.3% (enzyme solution volume : 50 μ L, 2.24U/mL at 5 °C, 7.91U/mL at 40°C) であり、粗抽出液中のもの (37.9%) からは低下したが、P-6 DG V_0 活性画分 (25.1%) より高く、このことから好冷性が濃縮処理後も少なくともある程度は保持されていると考えられた。

この濃縮された *S.borealis* 粗抽出液 5.0mL (Total activity : 79.0U, Total A_{280} : 276.7, Total protein : 6.30 mg) を、Bio-Gel P-6 DG カラム (ϕ 1.5 cm \times 11 cm, 19.6mL bed) に供し、S.buffer で 45.0mL/h の流速で溶出した。得られた A_{280} ピーク (結果は示さない) を P_I (7.0mL, Total activity : 67.2U, Total A_{280} : 62.47, Total protein : 4.17mg) および P_{II} (11.0mL, Total ac-

tivity : 5.87U, Total A_{280} : 136.62, Total protein : 0.894mg) としてプールした。各々の回収率は、 P_I (活性回収率 85.0%, A_{280} 回収率 22.6%, タンパク質回収率 66.2%), P_{II} (活性回収率 : 7.44%, A_{280} 回収率 49.4%, タンパク質回収率 14.2%) であった。したがって、 P_{II} 中には PGase 活性が若干量存在した。

得られた P_I について PGase 活性の好冷性を調べた結果、5 °C における 40°C 相対活性が 23.8% (enzyme solution volume : 40 μ L, 2.24U/mL at 5 °C, 9.41U/mL at 40°C) であり、濃縮液の 40°C 相対活性 (28.4%) から低下し、濃縮未処理粗抽出液の P-6 DG V_0 活性画分 (P_I 画分相当) のもの (25.1%) より低かった。この事実は、粗抽出液中の低温適応因子は粗抽出液の限外ろ過濃縮処理によって Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィーにおける PGase とのより厳密な相互分離が可能になったことを示している。

次に、 P_I (400 μ L, 3.84U, Total A_{280} : 3.57, Total protein : 0.238 μ g) と P_{II} (600 μ L, Total A_{280} : 7.45, Total protein : 48.8 μ g) を、各々のプール時の体積比 (7 : 11) と同様の混合比となるように混合 (4 : 6 (v:v), Total 1 mL) し、5 °C で一晩静置した。この混合試料について活性を測定し、好冷性について調べた。

($P_I + P_{II}$) 混合試料の好冷性は、5 °C における 40°C 相対活性が 31.2% (enzyme solution volume: 100 μ L, 1.34U/mL at 5 °C, 4.29U/mL at 40°C) となり、 P_I 単独の値 (23.8%) から大きく上昇した。このことから、 P_I 中の PGase 活性は低分子画分 P_{II} の共存によりその好冷性を回復することが明らかになった。この結果は、好冷菌 *S.borealis* 由来粗抽出液中の PGase 分子と共存する因子が、PGase 活性の低温適応現象に参与していることを強く支持している。

次に、 P_{II} に含まれる低温適応因子の温度安定性を調べるために、 P_{II} (1.0mL) を加熱処理 (100°C, 15min.) 後、生じた沈殿を遠心分離 (15krpm, 15min., 20°C) して得られた上清 (600 μ L, Total A_{280} : 4.47, Total protein : 27.4 μ g) を P_I (400 μ L) に混合した試料を調製し、同様の実験を行った。この試料の 5 °C における 40

表 1. *S.borealis* 粗抽出液 (4 倍濃縮) の Bio-Gel P-6 DG 画分 P_{II} を用いた PGase 活性の好冷性の回復.

Sample	PGase activity (U/mL) (Mean \pm S.E.)		Relative activity (5 °C/40°C)
	5 °C	40°C	
<i>S.borealis</i>			
UF concentrated crude enzyme	4.48 \pm 1.42 $\times 10^{-1}$	15.8 \pm 1.25 $\times 10^{-1}$	28.4%
Bio-Gel P-6 DG fraction			
P_I	2.24 \pm 9.56 $\times 10^{-3}$	9.41 \pm 3.55 $\times 10^{-2}$	23.8%
$P_I + P_{II}$ (4 : 6) (v : v)	1.34 \pm 2.91 $\times 10^{-2}$	4.29 \pm 2.51 $\times 10^{-2}$	31.2%
P 4 - 2 - 2 + P_{II} (5 : 95) (v : v)	1.53 \pm 9.73 $\times 10^{-2}$	7.77 \pm 8.11 $\times 10^{-2}$	19.7%

℃相対活性は25.1% (1.08U/mL at 5℃, 4.31U/mL at 40℃) で、P_I 単独の値 (23.8%) より若干高かったがほぼ近い値で、PGase 活性の高い好冷性は観察されなかった。このことから、P_{II} に含まれる低温適応因子が加熱処理によって失活し、遠心分離によって溶液から除かれ、そのために P_I の好冷性が回復しなかったと考えられる。それゆえに、*S. borealis* 由来粗抽出液中の好冷性因子は熱に不安定な分子であると結論できる。

さらに、*S. borealis* 由来精製標品 PGase I (P4-2-2) (50 μL, 7.77U) に P_{II} (950 μL, Total A₂₈₀ : 11.8, Total protein : 77.2 μg) を混合 (5 : 95 (v : v)) した試料について同様の実験を試みたところ、この試料の 5℃における 40℃相対活性は19.7% (enzyme solution volume: 100 μL, 1.54U/mL at 5℃, 4.29U/mL at 40℃) で、PGase I 単独のもの (18.6%) と同様の値となり、この場合には好冷性の回復は見られなかった。このことから、*S. borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) は、主活性画分ではあるが粗抽出液において見られる PGase 活性の低温適応現象には直接的に関与していないことが明らかになった。従って、粗抽出液中の他の PGase アイソザイムが、あるいは PGase I を含む PGase アイソザイム群と低温適応因子との相互作用が PGase 活性の低温適応発現に関与しているものと考えられる。

好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来 PGase 活性の Bio-Gel P-2 活性画分の温度依存性

好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来の粗抽出液中の PGase 活性に好冷性を与える因子は、Bio-Gel P-6 DG

ゲルろ過クロマトグラフィーによる脱塩処理によって除かれたことから低分子であると考えられる。また、この Bio-Gel P-6 DG 高分子画分 (P_I) と低分子画分 (P_{II}) との混合実験の結果から、この因子は熱に不安定な分子であると考えられる。

次に、粗抽出液を Bio-Gel P-6 DG (排除限界分子質量: >6 kDa) とは異なる分画分子量で分画し、その分画酵素試料の低温での活性からこの低温適応因子の分子量について調べた。すなわち、*S. borealis* 由来の粗抽出液を Bio-Gel P-2 (排除限界分子質量: >1.8kDa) ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、その PGase 活性画分 (V₀ 画分) の好冷性を調べた。

S. borealis 由来の粗抽出液 5.0mL (Total activity : 22.1U, Total A₂₈₀ : 94.0, Total protein : 1.84mg) を、Bio-Gel P-2 カラム (φ1.5cm×67cm, 118mL bed) に供し、50mM NaCl を含む S.buffer で 12.8mL/h の流速で溶出した。各画分 (2 mL/tube) の A₂₈₀ を測定して溶出曲線 (結果は示さない。) を作成し、V₀ ピークを活性画分 (8.2mL, Total activity : 23.0U, Total A₂₈₀ : 16.73, Total protein : 1.39mg) (活性回収率104%, A₂₈₀回収率17.8%, タンパク質回収率76.0%) としてプールした。

この Bio-Gel P-2 V₀ 活性画分について PGase 活性の温度依存性 (図14) を調べた結果、PGase 活性の最適温度は40℃であり、粗抽出液と同様であった。さらに、Bio-Gel P-2 活性画分と粗抽出液それぞれの温度依存性を40℃に対する相対活性で比較すると、P-2 活性画分は5℃~10℃の温度範囲で粗抽出液よりも若干低い相対

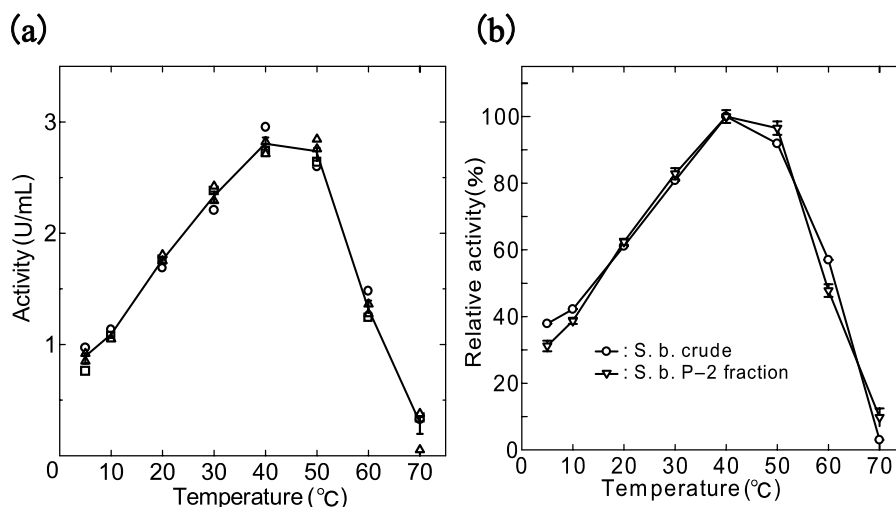


図14 *S. borealis* 由来 PGase 活性の Bio-Gel P-2活性画分の温度依存性. (a) *S. borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-2ゲルろ過クロマトグラフィー活性画分中における PGase 活性を 5℃~70℃の範囲で測定し、活性値(U/mL)をプロットした。○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4. (b) 各温度での *S. borealis* 由来 PGase の P-2活性画分及び粗抽出液の PGase 活性の3ないし4データの平均値を、40℃での活性値を100%とした相対活性値としてプロットし、エラーバー(±S.E.)と共に示した。—□—, *S. borealis* 由来 PGase P-2活性画分; —○—, *S. borealis* 由来粗抽出液。

活性（5℃での40℃相対活性：31.1%）（enzyme solution volume：100 μ L, 0.875U/mL at 5℃, 2.81U/mL at 40℃）を示したが、20℃～40℃の範囲では粗抽出液とほぼ等しい値であり、全体の傾向としては粗抽出液と同様の活性の温度依存性を示した（図14b）。また、Bio-Gel P-2 活性画分は、Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性と比較すると低温域（5～30℃）での相対活性が高く、より PGase 活性の好冷性を保持していた。

また、濃縮された粗抽出液を Bio-Gel P-2 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて脱塩処理（溶出液：S.buffer）した場合の PGase 活性の好冷性を調べるため、以下の実験をおこなった。

限外ろ過（保持限界分子質量500Da）により濃縮された粗抽出液5.0mL（Total A_{280} ：276.7, Total activity：79.0U, Total protein：6.30mg）を Bio-Gel P-2 ミニカラム（ ϕ 1.0cm \times 25cm, 19.6mL bed）に供し、S.buffer を用いて10.8mL/h の流速で溶出した。得られた PGase 活性画分（結果は示さない。）をプールし、その活性の好冷性を調べた。

この Bio-Gel P-2 ミニカラム PGase 活性画分の 5℃における40℃相対活性は32.6%（enzyme solution volume：50 μ L, 3.40U/mL at 5℃, 10.43U/mL at 40℃）であり、濃縮粗抽出液の値（28.4%）および濃縮粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG 画分（ $P_I + P_{II}$ ）の値（31.2%）と同様で、 P_I 単独の値（23.8%）よりも高く、好冷性が保持されていると判断した。

これらの結果から、S.borealis 由来の粗抽出液での PGase 活性の好冷性は、Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー（溶出液：S.buffer）による処理では V_0 画分から除かれるが、Bio-Gel P-2 ゲルろ過クロマトグラフィーでは溶出バッファのイオン強度によらずに V_0 画分に保持されていたと結論できる。従って、粗抽出液中に存在する低温適応因子は分子質量1.8kDa～

6 kDa の分子であると考えられる。さらにこの因子は熱処理によって失活するために、タンパク質またはペプチド分子であると推定される。

好冷性雪腐菌核病菌 S.borealis 由来 PGase 活性の透析処理による好冷性の変化

S.borealis 由来の粗抽出液中に含まれる低温適応因子は1.8kDa～6 kDa の低分子であると考えられ、ゲルろ過クロマトグラフィーにより PGase 活性と相互分離が可能であることが明らかになった。そこで、この低温適応因子についてさらに検討を加えるために、粗抽出液を保持限界分子質量の異なる膜を用いた透析に供し、それぞれの低温（5℃）での活性を調べた。

粗抽出液5.0mL を、保持限界分子量500, 3 500, 13 000の透析膜を用いて、それぞれ500mL の S.buffer に対して2回透析した。この透析操作における A_{280} , Total protein, Total activity の各回収率は表2に示す。回収された各々の試料溶液について、PGase 活性の好冷性を調べた。

保持限界分子量の異なる膜を用いて透析した各々の S.borealis 由来粗抽出液の PGase 活性の 5℃における40℃相対活性を表3に示す。PGase 活性の 5℃における40℃相対活性は、保持限界分子量が大きくなるに従って減少した。透析膜の保持限界分子量は厳密なものではなく、示された分子量以上の分子も若干は除かれると考えられることから、5℃における40℃相対活性が漸減していることは、透析内液に存在した低温適応因子の物質量が保持限界分子量の増大にしたがって減少したためであると考えられる。

各々の透析された粗抽出液中の低分子の挙動を調べるために、透析した粗抽出液の各々の酵素試料を Bio-Gel P-6 DG カラムに供し、得られた2ピーク（ V_0 および V_t ピーク）の高さを比較した。

表2. S.borealis 由来の粗抽出液の透析またはゲルろ過クロマトグラフィーにおける PGase 活性画分の回収率.

Sample	Volume (mL)	Activity yield (%)	Protein yield (%)	A_{280} yield (%)	Electric conductivity (mmho)
Crude enzyme	5.0	100	100	100	1 580
Dialysis MWCO 500	7.25	81.4	64.1	61.4	330
Gel filtration Bio-Gel P-2 ^a (exclusion limit 1 800)	8.20	104		17.8	1 350
Dialysis MWCO 3 500	5.55	77.9	78.0	85.0	280
Gel filtration Bio-Gel P-6 DG ^b (exclusion limit 6 000)	7.0	96.0	75.4	23.1	210
Dialysis MWCO 13 000	5.30	79.6	73.7	76.6	205

^aElution buffer：S.buffer containing 50mM NaCl. ^bElution buffer：S.buffer.

S.borealis 由来粗抽出液, および透析された粗抽出液それぞれ5.0mLを, Bio-Gel P-6 DG カラム (ϕ 1.5cm \times 11cm, 19.4mL bed) に供し, S.buffer を用いて45.0 mL/h の流速で溶出した。それぞれ得られた画分の A_{280} 溶出曲線を作成し, 比較検討を行った。

各々の試料の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線を図15に示す。図15に示すように, 粗抽出液の透析処理における透析膜の保持限界分子質量が大きくなるに従って, Bio-Gel P-6 DG 溶出曲線の V_0 ピークに対する V_t ピークの高さは減少していた。

これらの結果から, 粗抽出液中に含まれる, 透析等によって除き得る低分子 (分子質量1.8kDa \sim 6 kDa) が, PGase 活性の好冷性に関与することがこれらの実験によっても示された。

参考文献

- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., and Haser, R. 1998. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure*, **6**: 1503-1506.
- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the Psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**: 2199-2206.
- Andrews, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.
- Bartling, S., Wegener, C., and Olsen, O. 1995. Synergism between *Erwinia* pectate lyase isozymes that

表3. *S.borealis* 由来の PGase 活性の透析またはゲルろ過クロマトグラフィーによる好冷性の変化.

Sample	PGase activity (U/mL) (Mean \pm S.E.)		Relative activity (5 $^{\circ}$ C/40 $^{\circ}$ C)
	5 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	
<i>S.borealis</i>			
Crude enzyme	2.32 \pm 1.08 \times 10 $^{-2}$	6.63 \pm 5.67 \times 10 $^{-2}$	35.0%
Dialysis MWCO 500	1.24 \pm 3.55 \times 10 $^{-2}$	4.13 \pm 5.04 \times 10 $^{-2}$	30.0%
Gel filtration Bio-Gel P-2 (exclusion limit 1 800)	0.875 \pm 4.50 \times 10 $^{-2}$	2.81 \pm 5.40 \times 10 $^{-2}$	31.1%
Dialysis MWCO 3 500	1.50 \pm 7.18 \times 10 $^{-2}$	5.33 \pm 3.55 \times 10 $^{-2}$	28.1%
Gel filtration Bio-Gel P-6 DG (exclusion limit 6 000)	0.843 \pm 1.50 \times 10 $^{-1}$	3.17 \pm 3.79 \times 10 $^{-2}$	26.6%
Dialysis MWCO 13 000	1.25 \pm 1.30 \times 10 $^{-2}$	5.79 \pm 5.72 \times 10 $^{-2}$	21.6%
Purified PGase (P 4 - 2 - 2)	31.4 \pm 1.57 \times 10 $^{-2}$	169 \pm 1.49 \times 10 $^{-1}$	18.6%

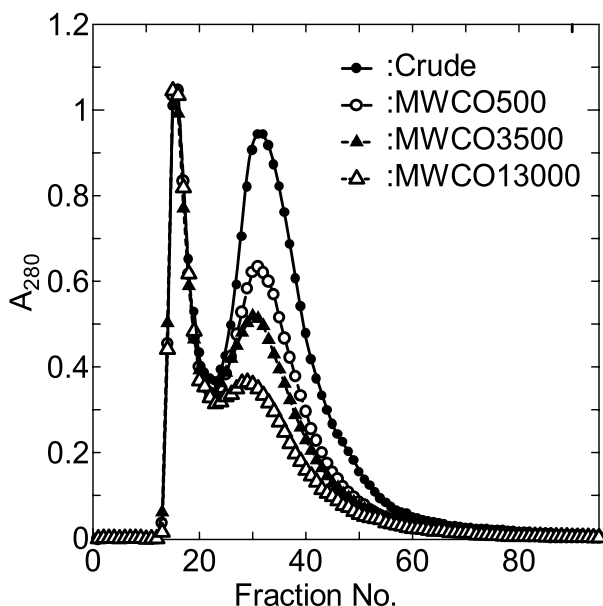


図15 保持限界分子量の異なる透析に供された *S.borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。Column: Bio-Gel P-6 DG (ϕ 1.5cm \times 11cm, 19.6mL bed), fraction size: 0.6mL/tube, flow rate: 45.0 mL/h. 透析された粗抽出液それぞれの1.0mLをカラムに供し, S.buffer で溶出した。各々の溶出曲線は粗抽出液溶出曲線 tubeNo.15の A_{280} 値にノーマライズした。

- 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.
- Chessa, J.-P., Feller, G., and Gerday, C. 1999. Purification and characterization of the heat-labile α -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. *Can. J. Microbiol.* **45**: 452-457.
- 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.
- 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.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., and Gerday, C. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 189-202.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., Baise, E., Chessa, J. P., Garsoux, G., Petrescu, I., and Feller, G. 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta*, **1342**: 119-131.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.-P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.-A., and Feller, G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**: 103-107.
- Gerike, U., Danson, M. J., Russell, N. J., and Hough, D. W. 1997. Sequencing and expression of the gene encoding a cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium, strain DS 2 - 3 R. *Eur. J. Biochem.* **248**: 49-57.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU 1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- Groves, J. W. and Bowerman, C. A. 1955. *Sclerotinia borealis* in Canada. *Can. J. Bot.* **33**: 591-594.
- Gutshall, K. R., Trimbur, D. E., Kasmir, J. J., and Brenchley, J. E. 1995. Analysis of a novel gene and β -galactosidase isozyme from a psychrotrophic *Arthrobacter* isolate. *J. Bacteriol.* **177**: 1981-1988.
- Herbert, R. A. 1986. The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. *In* *Microbes in Extreme Environments*. Edited by R. A. Herbert and G. A. Codd. Academic Press. London. pp. 1-23.
- Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J. M., Baise, E., Feller, G., and Gerday, C. 2001. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanctis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1529-1535.
- 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.]
- 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.
- Jones, P. G., VanBogelen, R. A., and Neidhardt, F. C. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 2092-2095.
- Julseth, C. R. and Inniss, W. E. 1990. Induction of protein synthesis in response to cold shock in the psychrotrophic yeast *Trichosporon pullulans*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 519-524.
- 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.
- Kawahara, H., Li, J., Griffith, M., and Glick, B. R. 2001. Relationship between antifreeze protein and

- freezing resistance in *Pseudomonas putida* GR12-2. *Curr. Microbiol.* **43**: 365-370.
- Keon, J. P. R. and Waksman, G., 1990. Common amino acid domain among endopolygalacturonases of Ascomycete fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2522-2528.
- Kester, H. C. M. 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.
- Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C. E., Feller, G., Gerday, C., and Bouriotis, V. 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* **310**: 291-297.
- Marciano, P., Di Lenna, P., and Magro, P. 1982. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* **20**: 201-212.
- Martel, M.-B., Letoublon, R., and Fevre, M. 1996. Purification of endo polygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. *Curr. Microbiol.* **33**: 243-248.
- 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.
- 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.
- Mayordomo, I., Randez-Gil, F., and Prieto, J. A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 105-109.
- 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.
- Nicholson, J. F., Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1973. Soil temperatures and inoculation techniques affect emergence and reisolation of *Sclerotinia sclerotiorum* from soybean. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **50**: 179-182.
- 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.
- Ohgiya, S. and Hoshino, T. 2001. Application of cold-active enzymes. *BIO INDUSTRY*, **18**: 16-22. [In Japanese.]
- Partyka, R. E. and Mai, W. F. 1962. Effects of environment and some chemicals on *Sclerotinia sclerotiorum* in laboratory and potato field. *Phytopathology*, **52**: 766-770.
- Pathak, N., Mishra, S., and Sanwal, G. G. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, **54**: 147-152.
- Pawlowski, S. H. and Hawn, E. J. 1964. Host-parasite relationships in sunflower wilt incited by *Sclerotinia sclerotiorum* as determined by the twin technique. *Phytopathology*, **54**: 33-35.
- 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.
- Russell, N. J. and Fukunaga, N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**: 171-182.
- Russell, R. J., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W., and Taylor, G. L. 1998. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, **6**: 351-361.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. *Methods Enzymol.* **161**: 366-373.
- Sun, X., Griffith, M., Pasternak, J. J., and Glick, B. R. 1995. Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* **41**: 776-784.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002a. Isolation of polygalacturonase

- I from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. **22**: 229-241. [In Japanese.]
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002b. Isolation of polygalacturonase I from the culture of the mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. **23**: 7-17. [In Japanese.]
- 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., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Cold adaptation of polygalacturonase activity from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. **22**: 243-255. [In Japanese.]
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenolsulfuric 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.]
- Tsuruta, H., Tsuneta, S. T., Ishida, Y., Watanabe, K., Uno, T., and Aizono, Y. 1998. Purification and some characteristics of phosphatase of a psychrophile. J. Biochem. **123**: 219-225.
- Waksman, G., Keon, J. P. R., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. Biochim. Biophys. Acta, **1073**: 43-48.
- Walker, J. C. 1969. Diseases incited by ascomycetes. In Plant pathology third edition. Edited by J. C. Walker. McGraw-Hill Inc. New York. pp. 348-424.
- Wallon, G., Lovett, S. T., Magyar, C., Svingor, A., Szilagy, A., Zavodszky, P., Ringe, D., and Petsko, G. A. 1997. Sequence and homology model of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the Psychrotrophic bacterium *Vibrio* sp. I 5 suggest reasons for thermal instability. Protein Eng. **10**: 665-672.
- Wu, C. M., Koehler, P. E., and Ayres, J. C. 1972. Isolation and identification of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) and bergapten (5-methoxypsoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Microbiol. **23**: 852-856.

Summary

The polygalacturonase (PGase) activity at low temperature of the crude extract from the wheat bran culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis* was higher than that of the mesophilic white mold *S. sclerotiorum*, and it appeared that *S. borealis* PGase had a property of a cold active enzyme. We isolated PGase of *S. borealis* and compared with the counterparts of *S. sclerotiorum*, in order to investigate a cold adaptation mechanism of the microorganism at the level of protein synthesis. Difference in the activity at low temperature was not observed between both purified enzymes (*S. borealis* P4-2-2 and *S. sclerotiorum* P4-4-2) that were prepared from the major active fractions respectively, and thus cold adaptation phenomenon of the activity disappeared in the purified PGase I of *S. borealis*. The cold adaptation of the PGase activity of *S. borealis* greatly lowered in the active fraction from Bio-Gel P-6 DG gel filtration chromatography which was the first step of the purification, and such a result was not observed with *S. sclerotiorum* PGase. The lost cold adaptation of PGase activity of *S. borealis* was restored by the mixing of the PGase active fraction with a low-molecular weight fraction of Bio-Gel P-6 DG gel chromatography. After dialysis of the crude extract of *S. borealis* using various membranes with different molecular cutoffs, the cold adaptation of PGase activity also decreased, the smaller the molecular cutoff of dialysis membrane was, the smaller a degree of decreasing cold adaptation was. From these results, It seems that the low-molecular mass (1.8~6 kDa) molecule in the crude extract of *S. borealis* plays as the cold adaptation factor which raises the PGase activity at low temperature.

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

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* ポリガラクトナーゼ活性。 硫酸アンモニウムによる活性阻害

井熊 武志・高橋 裕司・匂坂 慶子・齊藤 泉¹・高澤 俊英

Polygalacturonase activity of the wheat bran culture of
the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Apparently irreversible inhibition of enzyme activity by ammonium sulfate

Takeshi IKUMA, Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹ and Toshihide TAKASAWA
(受理：2002年11月30日)

摘 旨

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* からの粗抽出液中のポリガラクトナーゼ活性に対する硫酸アンモニウム及び塩化アンモニウムの影響を調べた。ca.1.2M 硫酸アンモニウム暴露によって ca.90%の活性が阻害された。そしてその阻害は一見不可逆的だった。一方、塩化アンモニウムは ca.3.7-4.7M 存在下において活性を完全に阻害したが、その阻害は可逆的だった。更に PGase 活性に対する硫酸アンモニウム分画法によって、活性を定量的に回収出来なかったため、PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの不可逆的阻害の仕組みは非常に強い slow-binding inhibition 即ち時間依存性可逆阻害であると思われる。

キーワード：ポリガラクトナーゼ、活性阻害、抗カオトロピックイオン、
psychrophile, *Sclerotinia borealis*

緒 論

硫酸アンモニウムはタンパク質分子の精製・単離において粗分画法の試薬として非常に繁用されている。硫酸アンモニウム法はタンパク質の溶解度の違いによる分別沈殿法である。分別沈殿法には有機溶剤に対する溶解性の違いを利用したものもあり、有機溶剤としてはエタノール及びアセトン等が使用される。しかしながら、エタノール及びアセトン等の有機溶剤に対して不安定なタンパク質も数多くあり、この点からも硫酸アンモニウム分画法は非常に多くのタンパク質の分離・精製に於いて用いられてきた。

我々は好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 及び

常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* の宿主での発症においてポリガラクトナーゼ (PGase) がどのように関与するのかを調べてきた。

PGase 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、ポリガラクトン酸 (PGA) 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; Martel et al. 1996; Tobias et al. 1993; Polizeli et al. 1991; Waksman et al. 1991; Keon and Waksman 1990; Kester and Visser 1990;

帯広畜産大学畜産科学科

Department of Animal Science and Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社農業科学研究所

¹ Agrosience Research Laboratories, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

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、PGase は、*S. borealis* 及び *S. sclerotiorum* の宿主への病原性に深く関与しているものと思われる。

更に好冷性雪腐病菌 *S. borealis* は低温下で発症するので、雪腐病菌の低温適応機構が発症機構にも密接に関係していると思われる。従って我々は雪腐菌核病菌 *S. borealis* PGase 活性の低温適応機構の解明も進めている。

低温性微生物の低温適応機構に関する報告はあまり多くなく、更にタンパク質レベルでの適応機構 (Hoyoux et al. 2001; Wintrode et al. 2000; Georlette et al. 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Davail et al. 1994) の解明に関しては特に少ない。

これらの目的のためには、好冷菌 *S. borealis* 及び常温菌 *S. sclerotiorum* から PGase を単離精製することが必要不可欠である。それ故に本研究では硫酸アンモニウム分画法が *S. borealis* フスマ培養 PGase の単離に於いて用いることが出来るかどうかを明らかにするために *S. borealis* 粗抽出液 PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響を調べた。

実験材料及び方法

試薬

試薬は以下のものを使用した。Potato dextrose agar (PDA) (Difco Laboratories); 小麦フスマ (十勝米穀); 酢酸, 酢酸ナトリウム, 水酸化ナトリウム, 無水炭酸ナトリウム, フェリシアン化カリウム, 硫酸鉄 (III) アンモニウム・12水和物 (和光純薬工業, 特級); Hyflo super-cel (Celite Co./和光純薬工業); PGA (Sigma, From orange); ドデシル硫酸ナトリウム (生化学用), 硫酸 (精密分析用) (和光純薬工業); 硫酸アンモニウム, 塩化アンモニウム (関東化学, 特級)。

菌体の培養

PDA 培地での培養 PDA 3.9 g を熱水80mL 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した (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、5°C で約6ヶ月間静置培養した。

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、500mL 三角フラスコ中で綿栓をして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、これに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), 5°C で約6ヶ月間静置培養した。

粗抽出液の調製

小麦フスマ培地上で培養した *S. borealis* 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回繰り返して、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 (ビニルグローブ着用) 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 (定量用ろ紙 No. 5 B, アドバンテック) 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 μ m セルロスアセテート膜, 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、ポリビ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。

PGase 活性の測定

PGA 基質溶液の正確な濃度は、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。平均重合度は 29.6 ± 1.9 (S.E.) であった。

粗抽出液の PGase 活性は、酵素反応総体積2.1mL (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2.0mL, 粗抽出液とバッファー A とを合わせて0.1 mL) 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 2.020 mL (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 0.1 M 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 μ L 及び粗抽出液 50 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 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) 2.5 mL を加え、30°C・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 1 U 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-0.1M 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 0.1 mL 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。

酵素活性に対する硫酸アンモニウム及び塩化アンモニウムの影響

粗抽出液の塩への暴露については、塩を粗抽出液に溶解して、2 時間経過後に、PGase 活性の測定法に従っ

て粗抽出液 50 μ L の酵素活性を測定した。暴露処理ブランク活性については、塩をバッファー A に溶かし、酵素活性測定時にバッファー A の代わりに添加 (50 μ L) した。その後無処理抽出液 50 μ L を加えて酵素反応を開始した。

暴露塩濃度に等しい、塩存在下活性測定実験においては、硫酸アンモニウムでは 0.03 M、塩化アンモニウムでは 0.1 M を超える濃度については基質溶液中に塩を溶解する系で行った。それ以下の濃度では、塩をバッファー A に溶解したものを暴露処理ブランク活性測定と同様に添加した。

硫酸アンモニウム分画法

粗抽出液各 1 mL に硫酸アンモニウムを加えて各々 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, および 90% 飽和度にした。氷浴中で 2 時間静置後、遠心分離 (15k rpm, 15min, 5°C) して沈殿を集めた。これらの沈殿にバッファー A を加えて溶解させて 1 mL にメスアップした。遠心分離後これらの溶液 50 μ L の活性を測定して、無処理活性に対して回収された活性の割合を求めた。

結果及び考察

PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響

粗抽出液中の PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響を図 1 に示す。

好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来 PGase の精製ステップにおいて、硫酸アンモニウム 90% 飽和による濃縮

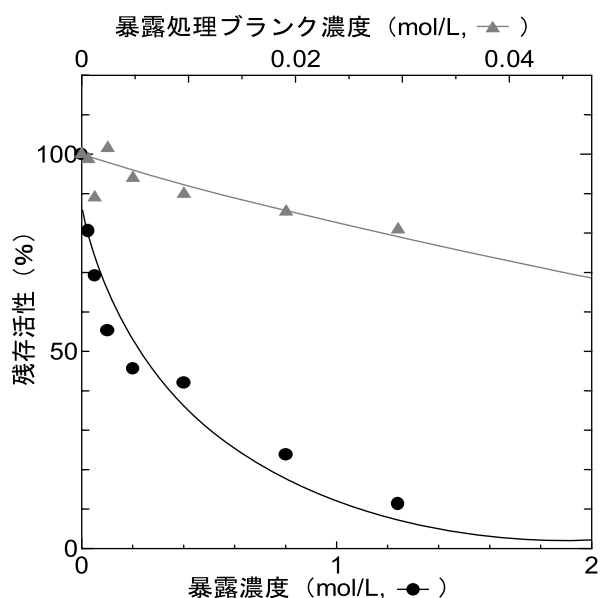


図 1 粗抽出液の硫酸アンモニウム暴露後の活性および処理ブランク濃度における活性。酵素活性の測定は 2.1 mL 系において各濃度の硫酸アンモニウムを含む粗抽出液 50 μ L で行った。処理ブランク測定は、硫酸アンモニウムを溶解した 0.01 M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 50 μ L を添加して、粗抽出液 50 μ L で行った。

操作を行った後、サンプルの PGase 比活性が直前のステップのものに比べて大きく低下した。その後、精製ステップを経るに従って比活性が徐々に回復した。このような事実は、硫酸アンモニウムが PGase 活性を阻害し、且つそれは PGase に一旦結合してしまうと PGase 分子から遊離しにくい性質を有することによって説明可能である。

それ故に、*S.borealis* 粗抽出液に硫酸アンモニウムを溶解して、PGase を硫酸アンモニウムに 5℃・2 時間暴露後、それら各 50 μ L の PGase 活性を測定した。活性は硫酸アンモニウム無添加の粗抽出液中の PGase 活性をコントロールとした残存活性として求めた。粗抽出液中の硫酸アンモニウム濃度は 2.1mL 活性測定系において 1/42 希釈されるので、図 1 の結果は各濃度の硫酸アンモニウム暴露に対する PGase 活性の硫酸アンモニウム濃度低下による回復の割合を示している。図 1 に示すように、暴露濃度が ca.25-50mM では残存活性は 70-80% で、低濃度暴露によって活性が強く阻害され、*S.borealis* PGase 活性は *S.sclerotiorum* のものに比べて硫酸アンモニウムに対する感受性が高かった。ca.0.1-0.2M では ca.50% の残存活性を示し、0.8M 暴露では残存活性は ca.25% しかなかった。更に ca.1.2M 暴露では、残存活性は約 10% で、約 90% の活性が阻害された。一方、常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の場合には、暴露濃度 0-ca.50mM では活性はほとんど阻害されず、*S.borealis* に比べて硫酸アンモニウムに対する感受性が低かった。暴露濃度 ca.1.2M においては、残存活性は ca.20% で、高濃度暴露では *S.borealis* の場合に比べて残存活性が ca.10% 高く、阻害されにくかった。以上の結果 PGase 活性は硫酸アンモニウム暴露によって阻害を受けることが判った。

次に、粗抽出液中の硫酸アンモニウム濃度は活性測定時には 1/42 に希釈されるので、暴露濃度の 1/42 に相当する活性測定時濃度即ち暴露処理ブランク濃度では PGase 活性がどの程度阻害を受けるのかを調べた。暴露濃度相当量をバッファー A 50 μ L に溶解して活性測定直前に基質溶液に加え、その後粗抽出液 50 μ L を添加して酵素反応を開始した。活性測定時硫酸アンモニウム濃度（暴露処理ブランク濃度）ca.0.6-30mM においてこれら PGase 活性はかなり阻害を受け、ca.30mM において残存活性は ca.80% で、活性は 20% 阻害された（図 1）。これらの結果を総合的に判断すると、もし硫酸アンモニウムによる活性阻害が可逆的であれば、硫酸アンモニウム暴露による活性阻害は、活性測定時には暴露処理ブランク濃度の活性まで回復すると考えられるが、図 1 から明らかなように、硫酸アンモニウム暴露によって阻害された活性は、活性測定時においても阻害されたままで、

暴露処理ブランク濃度での活性値まで回復しなかった。

次に、硫酸アンモニウム暴露による活性阻害が、活性測定時にもし回復しているとするれば、どの程度回復しているかを調べた。即ち活性測定時の硫酸アンモニウム濃度を暴露処理に於ける硫酸アンモニウム濃度と同濃度添加した場合の PGase 活性を測定した。結果は図 2 に示す。図 2 では、図 1 での硫酸アンモニウム暴露後の残存活性も同時に示してある。図 2 から明らかなように、PGase 活性は、活性測定時に存在する硫酸アンモニウムによって濃度依存的に阻害された。そして、阻害の程度は硫酸アンモニウム暴露の場合より若干強かった。これらの事実から、硫酸アンモニウム暴露によって阻害された PGase 活性は活性測定時に硫酸アンモニウム濃度が 1/42 に低下してもほとんど回復しなかったと結論できる。以上の結果、PGase 活性は抗カオトロピック硫酸アンモニウムによって強く阻害を受け、この阻害は不可逆的であったと結論される。

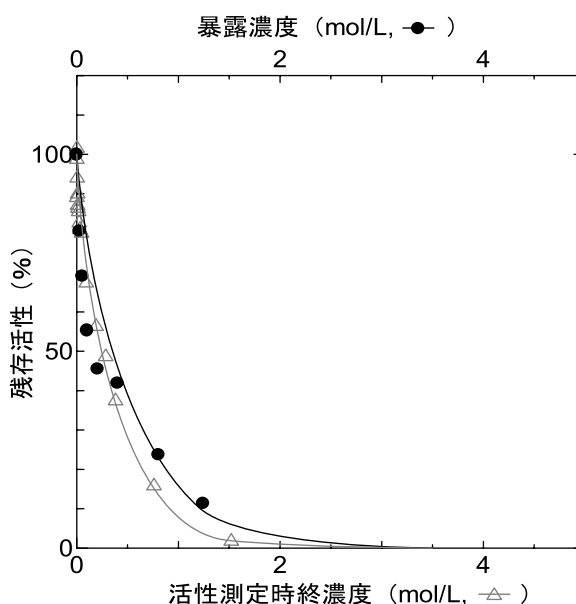


図 2 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性測定時硫酸アンモニウム濃度が暴露濃度と同じ場合の活性。酵素活性の測定は 2.1mL 系において粗抽出液 50 μ L で行った。活性測定時硫酸アンモニウム終濃度については、終濃度 0.03M 未満は硫酸アンモニウムを溶解した 0.01M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 50 μ L を用い、終濃度 0.03M を超えるものは硫酸アンモニウムを溶解した 1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 2mL を使用した。硫酸アンモニウム暴露実験の結果も同時に示してある。

PGase 活性に対する塩化アンモニウムの影響

粗抽出液中 PGase 活性の塩化アンモニウムによる影響は図 3 及び図 4 に示す。

図 1 及び図 2 から明らかなように、PGase 活性は硫酸アンモニウム暴露によって強く阻害を受け、その阻害は不可逆的であった。それ故に、同様にアンモニウムイオンを含む塩化アンモニウムによって PGase 活性がど

のような影響を受けるかを調べた。まず図3に示すように、塩化アンモニウム暴露によって活性が阻害されるかを調べた。その結果、ca.3.7M 塩化アンモニウム暴露でさえも活性測定時における活性阻害はca.15%にしかならず、塩化アンモニウム暴露による活性阻害は小さいものと結論できる。更に、塩化アンモニウム暴露濃度は活性測定時1/42に希釈される。それ故、活性測定時、暴露濃度の1/42の終濃度（暴露処理ブランク濃度）（0-ca.0.09M）の塩化アンモニウムを含むように調製した、即ち暴露濃度を含むバッファーAを活性測定時に添加（50 μ L）し、活性阻害の程度を調べた。その結果、暴露処理ブランク濃度によるPGase活性の阻害の傾向は塩化アンモニウム暴露濃度による阻害のものとほとんど同じであった。従って、これらの事実からは塩化アンモニウム暴露によるPGase活性に対する強い阻害があったかどうかは結論できなかった。

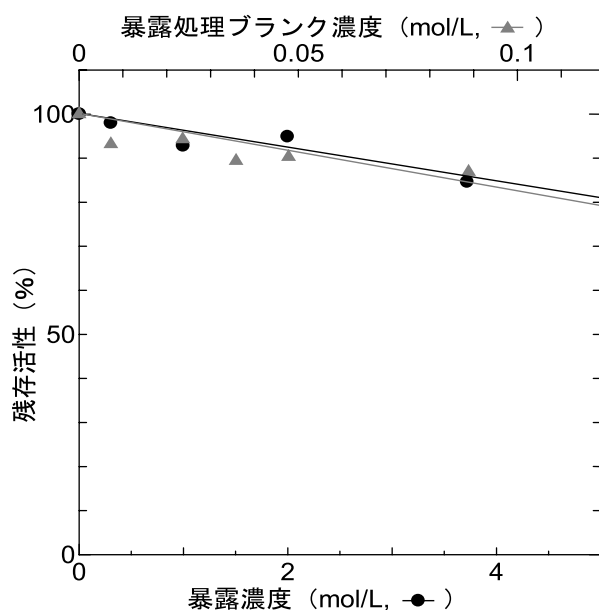


図3 粗抽出液の塩化アンモニウム暴露後の活性および処理ブランク濃度における活性。酵素活性の測定は2.1mL系において各濃度の塩化アンモニウムを含む粗抽出液50 μ Lで行った。処理ブランク測定は、塩化アンモニウムを溶解した0.01M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)50 μ Lを添加して、粗抽出液50 μ Lで行った。

次に、PGase活性が塩化アンモニウムの存在によって強い阻害を受けるかどうかを明らかにするために、活性測定系に暴露濃度と同濃度の塩化アンモニウムを添加して残存活性を調べた。図4に示すように、暴露処理ブランク濃度（0-ca.0.09M）の塩化アンモニウム存在下では、PGase活性はca.15%までの阻害しか観察されなかったが、ca.0.6M 塩化アンモニウムによってca.50%の活性阻害がかかり、2Mで96%が阻害され、ca.3.7-4.7Mではほぼ完全に阻害された。図4には比較のために塩化アンモニウム暴露に対する残存活性の推移も同時

に示してある。図4の結果から、PGase活性は塩化アンモニウムに対する暴露によって阻害されたが、その後、活性測定系において塩化アンモニウム濃度が低下した場合には活性は回復したと結論できる。従って、PGase活性に対して塩化アンモニウムは可逆的に阻害したことが明らかになった。

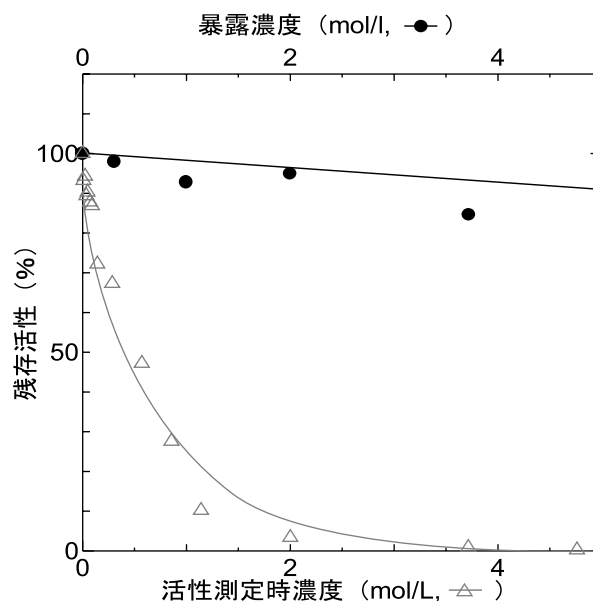


図4 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性測定時塩化アンモニウム濃度が暴露濃度と同じ場合の活性。酵素活性の測定は2.1mL系において粗抽出液50 μ Lで行った。活性測定時塩化アンモニウム終濃度については、終濃度0.1M未満は塩化アンモニウムを溶解した0.01M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)50 μ Lを用い、終濃度0.1Mを超えるものは塩化アンモニウムを溶解した1%(w/v)PGA-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)2mLを使用した。塩化アンモニウム暴露実験の結果も同時に示してある。

以上の結果をまとめると、硫酸アンモニウムも塩化アンモニウムもPGase活性を阻害するが、前者は不可逆的で後者は可逆的であると結論される。

更に、この阻害様式の違いを両者の構成イオンの違いに求めると、 SO_4^{2-} イオンがPGaseに不可逆阻害的に作用し、一方 Cl^- イオンはPGaseに可逆阻害的に作用するものと推定される。

硫酸アンモニウム分画法

粗抽出液1mLを20, 30, 40, 50, 60, 70, 80及び90%飽和度に暴露した。生じた沈殿を遠心分離によって集め、それらの沈殿をバッファーAに溶解後1mLにした。その後、それらの溶液50 μ Lを用いて活性を測定した。結果は表1に示す。表から明らかのように、30-40%飽和度においてはPGase及びその他のタンパク質は殆ど回収されなかった。80%飽和度においては活性のca.42%が回収されたが、90%飽和度によってca.59%の活性しか回収出来なかった。80-90%飽和度におけるタンパク

表 1. 硫酸アンモニウム分画法における PGase 活性及びタンパク質の回収率. 粗抽出液 1 mL を処理後, 10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) に溶解して 1 mL にした. それらの溶液から 50 μ L の活性を測定した.

飽 和 度 (%)	0	20	30	40	50	60	70	80	90
活 性 (U)	9.25	0.410	0.310	0.576	1.55	2.22	3.01	3.88	5.43
回 収 率 (%)	100	4.43	3.35	6.22	16.8	24.0	32.5	41.9	58.7
タンパク質 (mg)	0.49	0.00478	0.00618	0.0163	0.191	0.326	0.362	0.430	0.435
回 収 率 (%)	100	0.972	1.26	3.31	38.8	66.3	73.6	87.4	88.4

質の回収率は87-88%であったので, 粗抽出液中のタンパク質の殆どが90%飽和度にするによって回収されたと考えられる。従って, PGase 活性の回収率が低かったのは硫酸アンモニウム分画法の不手際によるものではない。以上の結果, *S. borealis* から PGase を単離する際に硫酸アンモニウム分画法を採用しない方がよいと結論される。

硫酸アンモニウム30%飽和暴露後の残存活性が ca.10%で不可逆的活性阻害が観察されたにもかかわらず, 硫酸アンモニウム分画法において PGase 活性が ca.59%回収されたのは分画処理後活性測定までの時間を要したことが理由と考えられる。

従って硫酸アンモニウムによる PGase 活性の一見不可逆的阻害は SO_4^{2-} イオンの PGase への slow-binding inhibition 即ち時間依存性可逆阻害であると思われる。更に, その程度は, 常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* PGase に対する slow-binding inhibition に較べて非常に強いと考えられる。その理由としては, *S. borealis* 硫酸分画法に於ける活性回収率は *S. sclerotiorum* の場合 (ca.90%) (unpublished data) に較べて非常に低かった点が挙げられる。

参考文献

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 exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.*

145: 295-299.

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.

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.

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.]

Keon, J. P. and Waksman, G. 1990. Common amino acid domain among endopolygalacturonases of ascomycete fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2522-2528.

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.
- 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.
- Martel, M. B., Letoublon, R., and Fevre, M. 1996. Purification of endo polygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: Multiplicity of the complex enzyme system. Curr. Microbiol. **33**: 243-248.
- 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.
- 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** (Pt 8) : 1815-1823.
- 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.
- 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.
- 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.
- Waksman, G., Keon, J. P., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. Biochim. Biophys. Acta, **1073**: 43-48.
- 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 examined the effect of ammonium sulfate and ammonium chloride on polygalacturonase activity of crude extract from a cultured psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. About 90% activity was inhibited by the ca. 1.2M ammonium sulfate exposure, and the interference was apparently irreversible. In the meantime, though ammonium chloride at the concentrations of ca. 3.7-4.7M perfectly inhibited the activity, the interference was reversible. In addition, the mechanism of the apparently irreversible interference of ammonium sulfate with the PGase activity seems to be a very strong slow-binding inhibition, namely, a time dependent reversible inhibition, because the activity was not recovered quantitatively by ammonium sulfate fractionation to the PGase activity.

Keywords: polygalacturonase; activity inhibition; anticaotropic ion; psychrophile; *Sclerotinia borealis*

低温性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia nivalis* の ポリガラクトナーゼ活性の低温適応

池浦 真奈美・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity from a cultured
psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis*.

Manami IKEURA, Keiko SAGISAKA, Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA
(受理：2002年11月30日)

要 旨

低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* 菌株の培養温度及び培養期間と PGase 活性について検討を行った結果、5℃培養では2-3ヶ月で、20℃培養では2-3週間で定常期に達した。PGase 活性(40℃)は、5℃で培養した場合に、20℃培養よりも、約2倍高かった。このことは、*S. nivalis* が低温性雪腐菌核病菌であり低温での発病にポリガラクトナーゼ(PGase)が関係していることを強く示唆している。

5℃及び20℃培養粗抽出液のPGase活性のpH依存性については両者に顕著な差はなかった。しかしながら温度依存性においては、5℃培養PGase活性が、40℃以下の温度域に於いて20℃培養のものよりも相対活性が約10%高く低温適応現象が観察された。これらの事実から、*S. nivalis* は低温で生育したときに、20℃培養とは性質の異なる、より低温に適応したPGase活性を産生することが明らかになった。5℃培養に於いて産生されるPGase活性の低温適応現象は、Bio-Gel P-6 DGゲル濾過クロマトグラフィーによって低分子を除いた後も同様に観察されたので、好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* において認められたPGase活性の低温適応現象に於ける低分子の関与の可能性は低いものと考えられる。従って低温発現PGase活性の低温適応現象はPGaseアイソザイム自身の構造に起因するものと考えられる。

温度安定性は、5℃培養PGase活性の方が20-30℃の常温域で20℃培養PGase活性より不安定であり、低温適応酵素活性の特徴(Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. *Extremophiles*. 5: 313-321; Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.)を示した。しかしながら40℃以上の高温域での安定性については20℃培養PGase活性とほぼ同様の傾向を与え、常温発現酵素活性と大きな違いは観察されなかった。

キーワード：ポリガラクトナーゼ、低温酵素、好冷性酵素、低温適応、低温菌

帯広畜産大学畜産科学科

Department of Animal Science and Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社農業科学研究所

¹ Agrosience Research Laboratories, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

緒 論

地球上の生物圏の約80%が低温環境であり、多くの微生物が低温条件で生息している。低温で生育可能な菌は、通常の温度（20-30℃）にさらされると生存できない好冷菌（psychrophiles）と、常温でも生育可能な低温菌（耐冷菌；psychrotrophs）とに分類される。低温菌は低温貯蔵された食品など人工の低温環境からも分離されるが、好冷菌については極地や海洋中など、恒常的に低温を保っている環境中に生息しているものが大部分を占める。

Sclerotinia nivalis は子囊菌類・ビョウタケ目・キンカクキン科に属し、主に北海道地域に於いて雪腐菌核病を引き起こす低温菌である（Saito 1997）。*S.nivalis* による雪腐菌核病は積雪下で感染した植物が雪解け後発症し、乾燥して葉や茎が灰白色となり、枯死した茎葉には直径3-4 mmの黒色の菌核が形成される。*S.nivalis* は多犯性であり、セリ科（ニンジン、トウキ）、キク科（ゴボウ、ブタクサ、キランソウ、ジュウニヒトエ）、オオバコ科（ハラオオバコ）など多くの双子葉植物に感染する。菌糸成長の最適温度は20℃であり、この点では常温菌と考えられるが耐冷性を有する点から低温菌に分類され、この菌が天然において病原性を示すのは低温で生育したときのみである。

病原性の発現には菌体が植物細胞壁を分解し、宿主へ侵入することが必要であり、そのために細胞外酵素が分泌される。その中でも特にペクチナーゼは植物一次細胞壁の主要成分であり植物細胞間隙物質であるペクチン質を分解し、植物の組織崩壊（マセレーション）に重要な働きをすると考えられている。従って、ペクチナーゼ活性は病原菌の病原性に深く関与しているものと考えられる。

ここではペクチナーゼの1つであるポリガラクトナーゼ活性の性質を、低温菌 *S.nivalis* について調べた。ペクチン質はD-ガラクトロン酸が α -1,4結合により重合したポリガラクトロン酸を骨格とし、更にポリガラクトロン酸残基のカルボキシル基の一部がメチルエステル化された物で、メチルエステル化率の低い順にペクチン酸、ペクチン及びペクチニン酸に分類される。ポリガラクトナーゼはポリガラクトロン酸またはペクチン酸の非メチルエステル化 α -1,4結合を加水分解する酵素である。

この酵素は、これまでに菌類（Takahashi et al. 2002; Takasawa et al. 1997; Waksman 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。

本研究では、微生物の低温環境への適応の仕組みを酵素タンパク質レベルからアプローチすることを目的として、低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の培養温度の違いがポリガラクトナーゼ産生にどのような影響を与えるかを調べるために、5℃培養粗抽出液中に含まれるポリガラクトナーゼ活性の性質について20℃培養のものと比較検討を行った。更に5℃培養粗抽出液については、Bio Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィーによって低分子（-6 000Da）を除いた後のポリガラクトナーゼ活性の性質を調べた。

材料及び実験方法

試薬

試薬は以下の会社から購入したものを使用した。

Potato dextrose agar（以下PDA）（Difco Laboratories）；小麦フスマ（十勝米穀）；酢酸、酢酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、無水炭酸ナトリウム、フェリシアン化カリウム、リン酸（85%（w/w））、メタノール（MeOH）（99.8%（w/w））、硫酸鉄（Ⅲ）アンモニウム12水和物（和光純薬工業、特級）；Hyflo super-cel（Celite Co./和光純薬工業）；ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDS）（生化学用）、硫酸（精密分析用）、アジ化ナトリウム（化学用）（和光純薬工業）；ポリガラクトロン酸（以下PGA）（from orange）、3-[N-morpholino] propane sulonic acid（以下MOPS）、ウシ血清アルブミン（以下BSA）（crystallized and lyophilized、窒素分14.8%（w/w））（Sigma）；クエン酸（関東化学、特級）；Coomassie brilliant blue（以下CBB）G-250（半井化学薬品、Specially prepared reagent, Lot No. M7R3031）；Bio-Gel P-6 DG（Bio-Rad）。

菌株の培養

PDA 培地における培養 3.90%（w/v）PDA 水溶液100mL をオートクレーブ（121℃, ca. 2.2kg/cm², 20分）し、滅菌済みシャーレに約20mL ずつ分注し、培地が固まった後、slant（北海三共保存株又は第一継代）からスパチュラと竹串を用いて植菌した。培地の乾燥を防ぐためシャーレの縁をパラフィルムで覆い、その後20℃で約2-3週間培養後5℃で保存した。

フスマ培地における培養 小麦フスマ約30g に、純水50mL を加え十分に混合した後、これを三角フラスコ（500mL）に移し、綿栓をし、オートクレーブ滅菌（約20分）後、PDA 培養シャーレよりシャーレ1枚当たり5フラスコの割合で植菌した（スパチュラ使用）。その

後 5℃ (60-150日) 又は 20℃ (15-29日) で所定期間培養した。ただし 20℃・62及び 115日間培養はフスマ 30g: 純水 75mL 系で行った。

粗抽出液の調製

フスマ培養三角フラスコ 5 個の内容物を、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) (以下 S.buffer) 1000mL (1 フラスコ当たり 200mL) と共にミキサーに加え、弱で 5 秒間 3 回攪拌し、5℃で静置した。静置後 1 時間毎に弱で 5 秒間 1 回攪拌し、2 時間 30 分経過後、軽くフラッシュ攪拌し、1 L メートルガラス上 2 枚重ねたガーゼでミキサーの内容物をろ過した。

その後ガーゼ濾液に濾過補助剤 Hyflo super-cel (4.5g/100mL) を加え、スターラーで攪拌後、吸引濾過 (定量用濾紙 No. 5 B, アドバンテック) した (pH5.85 (5℃培養) 及び pH5.15 (20℃培養))。その後、水酢酸を用いて濾液 pH を 4.5 に調整し、濾過滅菌 (0.45 µm, アドバンテック) した (約 890mL (5℃培養) 及び 825mL (20℃培養))。

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度は CBB 試薬 (0.025% (w/v) CBB-12.5% (v/v) MeOH-70.83% (w/v) リン酸) を用いたタンパク質微量定量法 (Ikuma et al. 2002) によって、BSA を標準物質として決定した。標準曲線は 3 回以上作成 (BSA 1-9 µg) し、タンパク質 (BSA) 1 µg 当たりの吸光度 (Factor) は 0.0332 ± 0.000491 (S.E.) であった。

PGase 活性の測定

PGase 活性は、1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) を基質として用い測定した。基質溶液中の PGA 濃度は、高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって全糖濃度として決定した。また高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) によって還元糖量を決定して、これらの結果から PGA の平均重合度を求めた。PGA の平均重合度は 27.4mer であった。

酵素反応は特に記述がない限り、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℃で行い、酵素反応開始後 3, 6, 9 分で遊離した還元糖量 (sampling volume 20 µL) を高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) を用いて D-ガラクトロン酸を標準として定量した。また、基質溶液 (20 µL) 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た。更に酵素溶液中の還元性物質量を定量し、酵素ブランク

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 1 U は、1 分当たり 1 µmol の還元糖を遊離する酵素量 (1 µmol/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 S.buffer 0.1mL を用いて求めた。

酵素反応総体積 2.2mL 系の場合には、基質溶液 2.0mL に酵素溶液 200 µL を加え、酵素反応を開始し、それ以後の操作は酵素反応 2.1mL 系に準じて行った。

低温性雪腐菌核病菌 S.nivalis 培養期間の検討

S.nivalis を 5℃ (60-150日) 又は 20℃ (15-115日) で、任意の期間フスマ培養後抽出し、40℃での酵素活性とタンパク質濃度を測定した。

酵素活性の pH 依存性

pH2.5-7.5 の 1% (w/v) PGA-0.1M 緩衝溶液 (ただし pH2.5 及び 3.0 では 0.5% (w/v) PGA-0.1M 緩衝溶液) を基質溶液として用い、40℃での酵素活性を上記の測定方法に従って測定した。基質溶液中の PGA 濃度は高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって決定した。緩衝液は、pH2.5, 3.0, 及び 3.5 は酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液を、pH4.0, 4.5, 5.0 及び 5.5 は酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を、pH6.0 及び 6.5 はクエン酸-NaOH 緩衝液を、pH7.0 及び 7.5 は MOPS-NaOH 緩衝液を使用した。

温度依存性

温度 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65 及び 70℃ (恒温水槽: EL-8 COOLNIT BATH・TAITEC) に於いて、前述の酵素活性測定法に従って酵素反応 (pH 4.5) を行い活性を測定した。

酵素反応系については、S.nivalis 5℃培養の粗抽出液については 2.1mL 系で、S.nivalis 20℃培養の粗抽出液及び 5℃培養粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィーの活性画分については 2.2mL 系で行った。

粗抽出液のゲル濾過クロマトグラフィー

S.nivalis の 5℃フスマ培養粗抽出液を S.buffer で予め平衡化した Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過カラム (分画分子量 6 000Da; カラムサイズ φ 4.4×86.5cm; 流速 85.5 mL/h; フラクションサイズ 20mL/tube) によって脱塩し、活性画分を pool した。

温度安定性

S.nivalis からの 5 及び 20°C 培養粗抽出液をそれぞれ 15, 20, 30, 40, 50, 60 及び 70°C で 30 分間暴露処理し、氷冷後、40°C・pH4.5 での酵素活性を測定した。なお、5°C 培養粗抽出液は 2.1mL 系で、20°C 培養粗抽出液については 2.2mL 系で活性を測定し、各々 5°C 保存粗抽出液の活性に対する残存活性を求めた。

結果と考察

低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の 5°C 及び 20°C 培養に於ける PGase 活性

S.nivalis のフスマ培養における PGase 産生量の培養温度 (5 及び 20°C) 条件による違いを調べるために、生育状況を観察しながら、5°C 培養では、60, 84 及び 150 日間、20°C 培養では 15, 21, 29, 62 及び 115 日間を行い、それら粗抽出液の活性 (U/mL) 及び specific activity (U/mg) を調べた (図 1)。

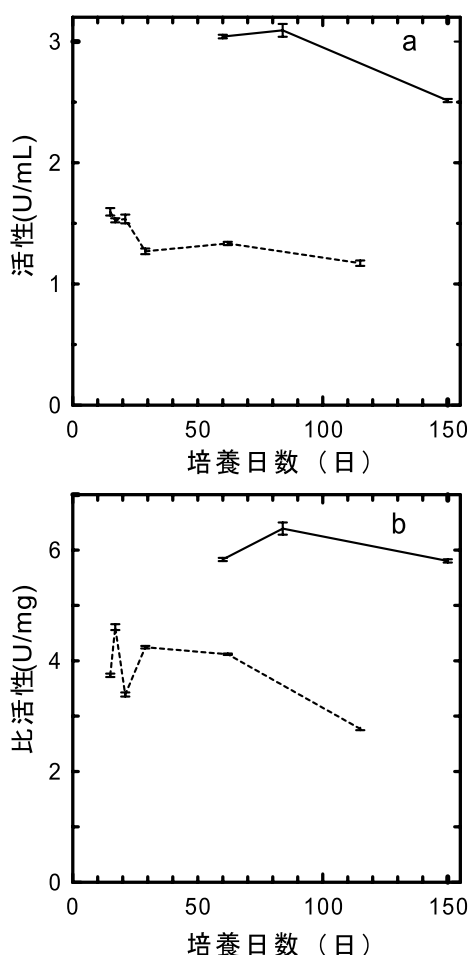


図 1 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5 及び 20°C 培養に於ける PGase 活性の培養期間による変化。活性測定は 40°C で酵素反応混液 2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 100 μ L) : 20 μ L サンプル系で行った。——, 5°C 培養; - - - - - , 20°C 培養。a, 活性 (U/mL)。b, 比活性 (U/mg)。

5°C 培養に於ける PGase 活性は 60 日培養 (3.04U/mL) と 84 日培養 (3.09U/mL) においてほとんど違いがなかったが、150 日培養 (2.51U/mL) では減少 (84 日培養に比べ 18.8% 減) しており、定常状態後期にあると思われる。Specific activity の比較では 84 日培養が最も高く PGase の産生が活発に行われている時期と考えられる。

20°C 培養では、15 日培養粗抽出液の活性 (1.60U/mL) が最も高く、その後培養期間が長くなると低下 (21 日間 1.54U/mL (3.8% 低下), 29 日間 1.27U/mL (20.6% 低下), 62 日間 1.33U/mL (16.3% 低下), 115 日間 1.17U/mL (36.8% 低下)) していた。比活性については図 1 b に示すように、20°C 培養 15 - 62 日目までは培養初期に於いて比活性が若干変動したがほぼ一定していた。一方、培養 115 日目では PGase 産生は 29 日目から 115 日目まではほぼ一定していた (図 1 a) が、比活性は 62 日目から明らかに低下し、PGase 以外の他のタンパク質分子が活発に産生されていた (図 1 b)。従って 20°C 培養に於いては、2 - 3 週間で PGase 産生が定常期に達し、その後 (21 - 115 日培養) は PGase の産生は若干低下する傾向にあると思われる。

しかし、培養期間が短い (15 日間) 場合、活性は高かった (図 1 a) が、粗抽出液中に存在する還元性物質の濃度が高く、PGase 活性測定に於ける粗抽出液のブランク還元糖量が上昇し、活性値の再現性が低くなり、活性の正確な見積もりが困難であった。それ故に、活性含量がほぼ同等な 21 日培養粗抽出液を以後の定量実験に使用した。又、異なるシリーズの培養実験に於いて生育状況の観察から 17 日間培養後も抽出を行った結果、粗抽出液の還元性物質濃度が低く定量実験に適していたので、20°C・17 日間培養粗抽出液も又、後の実験で使用した。

5°C 及び 20°C 培養に於いて PGase 産生の最も活発な 5°C・84 日培養 (3.09U/mL) と 20°C・15 日培養 (1.60U/mL) での活性 (40°C) を比較すると 5°C 培養での活性が 20°C よりも約 2 倍 (1.93 倍) 高かった。このことは、本菌の生育最適温度が 20°C であるにも関わらず、天然に於いては低温環境で生育した時のみ病原性を示すことに深く関係していると思われる。

また 20°C・62 日間培養は、5°C 培養に於ける PGase 活性を 20°C 培養のものと定量的に比較する際に 20°C 培養に於ける培養期間の長さに対する影響を調べるために行った。従って、20°C で 62 日培養 (1.34U/mL) を行い、その活性 (U/mL) を培養期間がほぼ同等な 5°C・60 日培養 (3.04U/mL) の値と比較した。その結果 20°C 培養に於いて培養期間を 62 日まで延長しても PGase 活性産生は上昇せず 5°C 培養の方が培養期間の長さに依存することなく 2.3 倍高く、*S.nivalis* が低温で生育した場合に於いてより高い PGase 活性を産生することが明らかになった。更に

20°C・115日培養 (1.17U/mL) も20°C・62日培養と同じように行ったが、活性は20°C・62日培養に較べて若干低下した。以上の事実は *S.nivalis* が天然に於いては低温で病原性を発現する低温性雪腐菌核病菌であることを強く裏付ける結果であると考えられる (Saito 1997)。

次に、5°C及び20°C培養粗抽出液中のPGase活性を各々の培養温度条件 (各々5°C及び20°Cでの活性) で測定し検討した (図3a)。5及び20°C培養粗抽出液のそれぞれの培養温度におけるPGase活性は、即ち5°C培養粗抽出液の5°Cでの活性は0.534U/mL、及び20°C培養粗抽出液の20°Cでの活性は0.635U/mLであり、5°C培養の方が15%低かったが、5°C培養粗抽出液の5°Cでの活性 (0.534U/mL) は20°C培養粗抽出液の5°Cでの活性0.211U/mL (同66.8%低い) に比べると非常に (約2.53倍) 高かった。又5°C培養粗抽出液の10°Cでの値は0.687U/mLであり、これは20°C培養粗抽出液の20°Cでの活性 (0.635U/mL) より8.1%高かった。即ち5°C培養粗抽出液の5-10°CでのPGase活性は20°C培養粗抽出液の20°CでのPGase活性とほぼ等しかった。以上の結果、常温 (20°C) 培養に於ける20°Cでの活性と同様に5°C培養に於ける5-10°Cでの高いPGase活性が、低温環境下で生理活性の低下した宿主への感染を可能にしているものと思われる。

S.nivalis のPGase活性含量を好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* (5°C 2ヶ月培養: 9.37U/mL) のものと比較すると、*S.nivalis* 20°C培養 (15日培養: 1.60U/mL) の場合はPGase活性含量が非常に低く *S.borealis* の約17%にすぎなかったが、*S.nivalis* 5°C培養 (84日培養: 3.09U/mL) の場合にはPGase活性含量が *S.borealis* の約33%までに即ち *S.nivalis* 20°C・15日培養に較べて約2倍に上昇した。

しかしながら低温菌 *S.nivalis* のPGase産生能は好冷菌 *S.borealis* のPGase産生能には遠く及ばず低温耐性を獲得した病原性低温菌の場合の低温適応能の限界なのかもしれない。

一方常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (20°C 14日培養: 13.6U/mL) と比較すると、*S.nivalis* 20°C 15日培養PGase活性 (1.60U/mL) は常温性菌核病菌の場合の約12%にしかならず、このことは低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* が天然に於いて常温では病原性を有しないことを更に裏付ける事実であると考えられる。

酵素活性のpH依存性

低温 (5°C) 培養に於ける低温 (5-10°C) でのPGase活性が常温 (20°C) 培養に於ける低温でのPGase活性に較べて高かったという現象、即ち低温培養に於ける低温でのPGase活性は常温培養に於ける常温での活性とほぼ

同等であったという現象は各々の温度環境 (5及び20°C) で産生されるPGase分子が異なっている事を示唆する。従って低温環境と常温環境とは異なるPGaseアイソザイム群が産生された可能性が考えられるので、各々の条件で産生されたPGase活性のpH依存性実験からその点を追跡できるかどうかを確認するために、5°C培養は84日間、20°C培養は17日間の各々の粗抽出液中のPGase活性のpH依存性を調べた。それらの結果を図2に示す。5°C及び20°C培養粗抽出液は、共にPGase活性の最適pHが4.5であり、その前後 (pH3.0-5.0) で最適pHでの活性の約90%以上の高い相対活性を示し、広いpH域で高い相対活性を与え、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 及び常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* (Takeuchi et al. 2002) の場合とは大きく異なっていた (図2)。従って、以上の結果は低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の産生するPGaseアイソザイム分子が好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 及び常

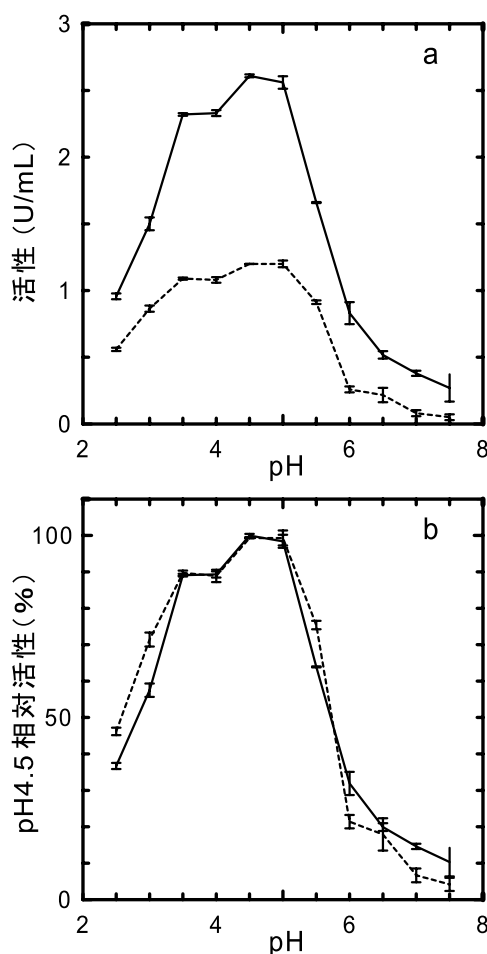


図2 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5及び20°C培養粗抽出液PGase活性のpH依存性。活性測定用緩衝液はpH2.5, 3.0及び3.5では0.1M酢酸ナトリウム/HCl緩衝液, pH4.0, 4.5, 5.0及び5.5では0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液, pH6.0及び6.5では0.1Mクエン酸/NaOH緩衝液, pH7.0及び7.5では0.1M MOPS/NaOH緩衝液を使用。——, 5°C (84日) 培養粗抽出液; - - - - - , 20°C (17日) 培養粗抽出液。a, U/mL。b, pH4.5での活性に対する相対活性。

温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の産生する PGase アイソザイム分子とは異なる事を強く示唆する。

一方、5℃と20℃培養粗抽出液とでは PGase の pH 依存性は似た傾向を示していた。この結果は *S.nivalis* の 5℃及び20℃培養に於いて産生される PGases は *S.nivalis* の生育環境の違いによって異なっていることは十分に推定されるが、各々の培養温度に於いて産生された PGase アイソザイムの活性部位構造についてはほとんど同じか又は異なっているとしても極くわずかに異なる立体構造を有している可能性を強く示唆している (Gerday et al. 1997)。

従って 5℃及び20℃培養粗抽出液 PGase 活性の各々の pH 依存性の比較検討からは低温及び常温環境の各々で産生される PGase アイソザイム群の相違について論じることが出来なかった。

PGase 活性の温度依存性

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の産生する PGase 活性は常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の産生する PGase 活性に較べて低温域に於ける40℃相対活性が高く、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の産生する PGase 活性は低温適応現象を示した (Takeuchi et al. 2002)。

従って低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の場合に於いても常温環境に於いては観察されなかった PGase 活性の低温適応現象が低温環境暴露即ち低温培養によって観察されるようになるかどうかを調べた。最初に、5℃培養及び20℃培養に於いて分泌された PGase 活性を、5℃及び20℃培養の、各々に於いて培養期間の異なる2種類の粗抽出液の活性 (5-70℃) を測定し、その相対活性の温度依存性を比較した。

5℃培養 (84日及び150日) 粗抽出液では、培養日数に依らず50℃以下の温度域での相対活性にはほとんど違いがなかったが、50℃以上の温度域では、培養日数の違いによって若干の差が見られた (結果は示さない)。これらの結果から、5℃培養に於いては培養日数の違いによって異なる PGase を産生しているという可能性は非常に低いと考えられる。

20℃培養 (17日及び21日) 粗抽出液では、凍結保存粗抽出液 (17日培養) と 5℃保存粗抽出液 (21日培養) について比較検討をした。50℃以下の温度域での相対活性は、未凍結 5℃保存の方が若干高かったが、5℃培養粗抽出液と比較したときの差に較べると大きな違いはなかった (結果は示さない)。従って20℃培養に於いても 5℃培養の場合と同様に培養日数の違いによって異なる PGase を産生している可能性は考えにくいと思われる。更に凍結処理によって PGase 活性は低下したが、凍結によって失活しなかった PGase 活性の温度特性は変化しなかったと結論した。

次に、5℃ (150日間) 及び20℃ (17日間) 培養粗抽出液の活性 (5-70℃) の、各々の温度依存性について、生の活性 (図 3 a) 及び相対活性 (図 3 b) で比較を行った。最適温度は培養温度の違いに依らず共に50℃であった。50℃での活性を基準 (100%) にした時の相対活性 (以下50℃相対活性) については 5℃培養粗抽出液と20℃培養粗抽出液とでは、温度依存性に明確な違いが見られた (図 3 b)。特に50℃以下の温度域では明らかな違いがあった。

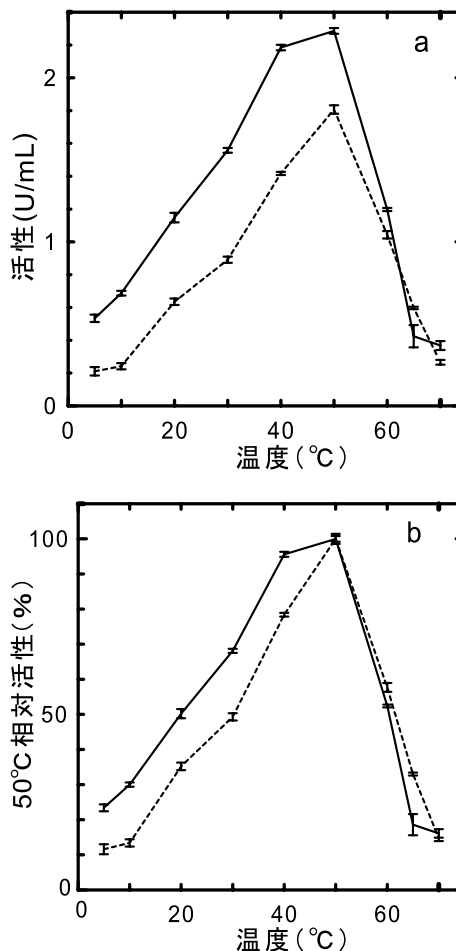


図 3 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5 及び 20℃ 培養粗抽出液 PGase 活性の温度依存性。酵素活性は反応混液 2.1 mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 100 μ L) 系 (5℃培養) 及び 2.2 mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 200 μ L) 系 (20℃培養) で行った。——, 5℃ (150日) 粗抽出液; - - - - -, 20℃ (17日) 培養粗抽出液. a, U/mL. b, 50℃での活性に対する各温度での相対活性。

5℃培養粗抽出液では40℃での活性が50℃での活性とあまり差が無かった (40℃に於ける50℃相対活性: 95%以上) が、20℃培養粗抽出液においては40℃での50℃相対活性が78.4%で、5℃培養に較べて約17%活性が低下した。更に、5℃培養粗抽出液では 5-40℃温度域での相対活性が、20℃培養粗抽出液のそれらと比べ約10%高くなっ

ていた。このことは、5℃培養で分泌されるPGase活性が、20℃培養で分泌されるPGase活性に比べ、低温に対してより適応していることを示している (Gerday et al. 1997)。低温適応機構として考えられることは、発育環境温度によって性質の異なる酵素分子即ちアイソザイムが産生される可能性及び同属の好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* と同様に共存分子がPGase活性に好冷性を付与 (Takahashi et al. 2002) している可能性である。

一方、50℃を越える温度域では、図3bに示すように5℃培養粗抽出液と20℃培養粗抽出液との相対活性に顕著な差は見られなかった。これらの事から、5℃培養に於いて産生されるPGase活性は低温適応しているが、一方高温域では極端に不安定ではなく常温培養に於いて産生されるPGase活性とほぼ同じ酵素活性特性を有していたと結論できる。従って、5℃培養に於いて産生されるPGase活性は常温培養で産生されるPGaseの特性を有しかつ低温適応能をも有していたと結論できる。

Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィー PGase 活性画分の温度依存性

低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* は、低温 (5℃) で培養したとき、PGase活性は低温適応現象を示したので、この現象が *S.nivalis* PGase アイソザイム分子自身に起因するのか又は好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の場合と同様に低分子性低温適応因子の関与 (Takahashi et al. 2002) によるものかを明らかにするための第一段階として、5℃培養 (150日) 粗抽出液を Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィー (分画分子質量 6 000Da) に供した (図4)。

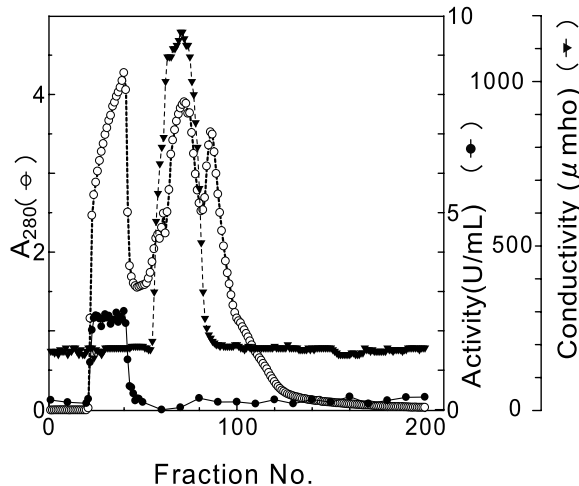


図4 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5℃培養 (150日) 粗抽出液 PGase の Bio-Gel P-6 DG カラムゲル濾過クロマトグラム。5℃ (150日) 培養粗抽出液400mLを添加し、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 緩衝液で溶出した。カラムサイズ：φ4.4×86.5cm, 1 315mL；フラクションサイズ：20mL；流速：85.5mL/h；プールした活性画分：No.22-42 (409mL)。○, A₂₈₀；●, 酵素活性 (U/mL)；▼, 電気伝導度 (mmho)

P-6 DG 活性画分 (No.22-42 pool 画分) の温度依存性を調べ、それを5℃培養粗抽出液の温度依存性と比較した。その結果は図5aに示すように、P-6 DG 活性画分と5℃培養粗抽出液との間に差は見られなく、5℃培養粗抽出液でみられた低温-常温域 (5-40℃) での20℃培養PGase活性に較べて高い相対活性は、分子質量約6 000Da以下の低分子を除いた後も同様に観察された。しかしながら、図5bに示すように、5℃培養 Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性は20℃培養粗抽出液 PGase 活性のものとは明らかに異なっていた。以上のことから、5℃培養に於いて *S.nivalis* から分泌されたPGase活性

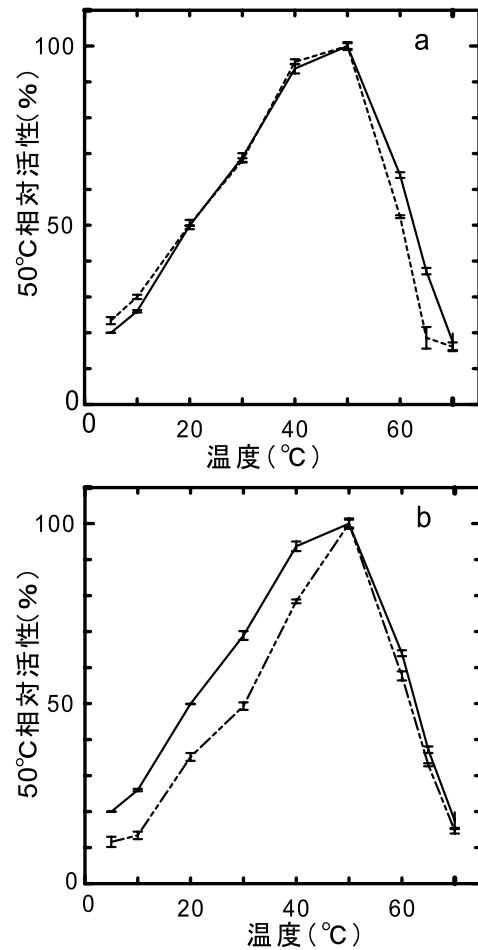


図5 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5℃ (150日) 培養粗抽出液 Bio-Gel P-6 DG PGase 活性画分の温度依存性。Bio-Gel P-6 DG PGase 活性画分の活性測定は2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・活性画分200μL) 系で行った。a, 5℃培養粗抽出液 PGase 活性との比較。5℃培養粗抽出液の活性測定は2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液100μL) 系で行った。——, Bio Gel P-6 DG pooled PGase active fraction (No.22-42)；-----, 5℃ (150日) 培養粗抽出液。b, 20℃培養粗抽出液 PGase 活性との比較。20℃培養粗抽出液の活性は2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 200μL) 系で行った。——, Bio-Gel P-6 DG pooled active fraction (No.22-42)；-----, 20℃ (17日) 培養粗抽出液。

が示した低温適応現象が Bio-Gel P-6 DG 処理後の活性画分に於いても観察されたために、好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* の場合に推定された様な共存する低分子が PGase 活性の低温適応に関与している (Takahashi et al. 2002) 可能性は否定された。従って、低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* が低温環境に於いて産生する PGase アイソザイムの低温適応現象は、酵素分子自身の性質に起因するものと考えられる。しかしながら、共存する高分子がポリガラクトナーゼ活性の低温適応に関与する可能性は現在の所未だ否定できない。

今後、5及び20°C培養に於いて産生されたポリガラクトナーゼアイソザイムを更に分離・精製し、各段階の各々の酵素活性の特性を比較検討することによって、低温環境で特異的に発現している PGase アイソザイムの低温適応機構を明らかにできると考えられる。

PGase 活性の温度安定性

低温環境に暴露された *S. nivalis* が産生する PGase アイソザイムの PGase 活性は常温環境に於いて *S. nivalis* が産生する PGase アイソザイムの PGase 活性とは異なり低温適応現象を示したため、5°C培養で産生する *S. nivalis* の PGase アイソザイムの温度安定性が20°C培

養下で産生された PGase アイソザイムのものとは異なっている可能性が示唆された。それ故に、5及び20°C培養に於いて産生された PGase 活性の温度暴露に対する安定性の違いを調べるために、各々の粗抽出液を15-70°Cに30分間暴露し、水冷後、40°Cでの活性を測定した。図6に5°C培養と20°C培養粗抽出液の温度安定性について生の活性(図6 a)と相対活性(図6 b)で調べたものを示す。5°C培養粗抽出液の酵素活性は、20-30°Cの常温域に於いて、20°C培養粗抽出液よりも温度に対して不安定であった。このことは、5°C培養に於いて発現される酵素が低温適応酵素であり (Russell 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Gerday et al. 1997)、常温域では20°C培養に於いて産生される PGase アイソザイムよりは温度に対して不安定であるが、50°C以上の高温域に於いては両者の PGase アイソザイムの安定性には差がないことを示している。

従って、これらの事実は5°C培養に於いて産生された低温適応性 PGase が20°C培養で産生された酵素とは温度安定性に於いて異なる性質を有するアイソザイム分子であることを示している。

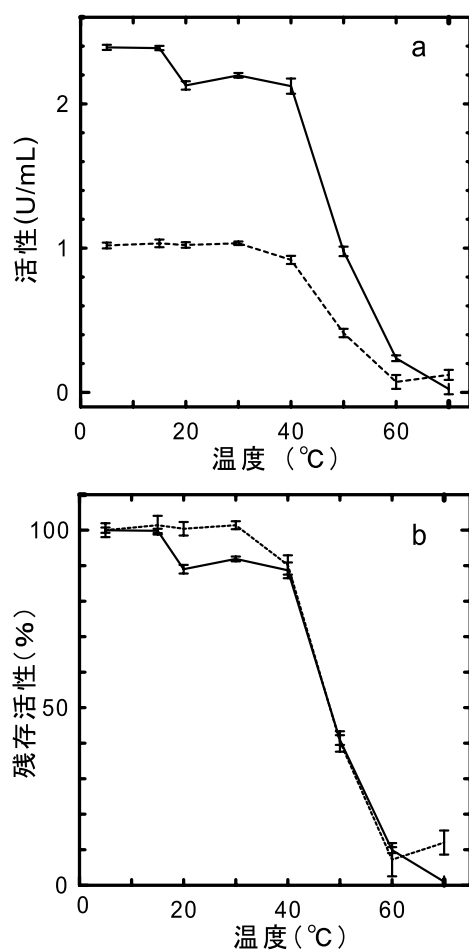


図6 低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* 5及び20°C培養粗抽出液 PGase 活性の温度安定性. 5及び20°C培養粗抽出液を各温度で30分間処理後 PGase 活性を40°Cで測定した. 活性測定は2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液100 μ L) 系 (5°C培養粗抽出液) 及び2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液200 μ L) 系 (20°C培養粗抽出液) で行った. —, 5°C (150日) 培養粗抽出液; - - - - -, 20°C (21日) 培養粗抽出液. a, 各温度で暴露後の5及び20°C培養粗抽出液 PGase 活性 (U/mL). b, 5°Cでの活性に対する各温度で暴露後の各々の粗抽出液 PGase 残存活性.

参考文献

- 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.
- Feller, G. and Gerday, C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. mol. life sci.* **53**: 830-841.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J. L., Baise, E., Chessa, J. P., Garsoux, G., Petrescu, I., and Feller, G. 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta*, **1342**: 119-131.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU 1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. Coomassie brilliant blue G250 dye-binding microassay for protein. 2002. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **23**: 18-26. [In Japanese.]
- 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.]
- 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.
- Kim, S.-Y., Hwang, K. Y., Kim, S.-H., Sung, H.-C., Han, Y. S., and Cho, Y. 1999. Structural Basis for Cold Adaptation. *J. Biol. Chem.* **274**: 11761-11767.
- Nasuno, S. and Starr, M. P. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.* **241**: 5298-5306.
- 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.
- Russell, N. J. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, **4**: 83-90.
- Saito, I. 1997. *Sclerotinia nivalis*, sp. nov., the pathogen of snow mold of herbaceous dicots in northern Japan. *Mycoscience*, **38**: 227-236.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. *Methods Enzymol.* **161**: 366-373.
- Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**: 1-57.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Isolation of polygalacturonase I from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 229-241. [In Japanese.]
- 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., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Cold adaptation of polygalacturonase activity from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 243-255. [In Japanese.]
- 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.]
- Waksman, G., Keon, J. P., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georgette, D., Gratia, E.,

Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles*. 5 : 313-321.

Summary

We monitored polygalacturonase (PGase) activity of the psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis* under different culture conditions, i.e. culture temperatures (5 and 20°C) and periods. It reached the steady phase in 2-3 months at 5°C culture and 2-3 weeks at 20°C, respectively. PGase activity (at 40°C) of the 5°C culture was twice higher than that of the 20°C culture. This strongly suggests that *S.nivalis* is psychrotrophic snow mold and that PGase is related to the pathogenesis at low temperature.

There was no remarkable difference between pH dependency of PGase activity in the crude extract of 5°C culture and that of the 20°C culture. However, concerning temperature dependency, relative activities below 40°C for the PGase activity of the 5°C culture-crude extract were about 10% higher than those of the 20°C culture, so cold adaptation phenomenon of the PGase activity was observed in the 5°C culture-crude extract. These facts suggest that when *S.nivalis* was grown at low temperature, it produced PGase isozymes which were distinguished from those of the 20°C culture-crude extract. Cold adaptation phenomenon of the PGase activity produced in the 5°C culture was also observed after removal of low-molecular-weight substances by Bio-Gel P-6 DG gel filtration chromatography. This fact suggests that the low-molecular-weight substances may not be involved in cold-adaptation mechanism of 5°C cultured *S.nivalis* PGase activity which were seen in the psychrophilic snow mold *S.borealis*. Therefore, it is considered that cold-adaptation mechanism for low-temperature expressed PGase activity originates from the tertiary structure of PGase isozyme itself.

With respect to thermostability, the 5°C culture PGase activity was more unstable than the 20°C culture PGase activity at moderate temperature region (20-30°C) and this feature is characteristic of cold active enzymes which have been reported (Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georgette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. *Extremophiles*. 5: 313-321; Smalas, A. O., Leiros, H.

K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.) . However, at higher temperature range above 40°C, the stability tendency of 5°C culture PGase activity was similar to the 20°C's.

Key words : polygalacturonase; cold active enzyme; psychrophilic enzyme; cold adaptation; psychrotroph

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 関川三男 手塚雅文
時岡裕純 柳川久

(五十音順)

平成15年6月25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 SCIENCES

CONTENTS

Biochemistry

Cold adaptation factor for polygalacturonase activity

from a cultured psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA, 1

Izumi SAITO, Toshihide TAKASAWA

Biochemistry

Polygalacturonase activity of the wheat bran culture of the

psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Apparently irreversible inhibition of enzyme activity by ammonium sulfate

Takeshi IKUMA, Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA, 21

Izumi SAITO, and Toshihide TAKASAWA

Biochemistry

Cold adaptation of polygalacturonase activity from a cultured

psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis*.

Manami IKEURA, Keiko SAGISAKA, 29

Izumi SAITO, and Toshihide TAKASAWA