

低温性雪腐病菌 *Sclerotinia nivalis* の

アルファルファ培養ポリガラクトナーゼ活性の低温適応

渡辺剛志・島田幹男・波川啓土・斉藤泉¹・高澤俊英

(受理: 2005年4月26日)

Cold adaptation of polygalacturonase activity from the alfalfa-cultured psychrotrophic snow mold

*Sclerotinia nivalis*Tsuayoshi WATANABE, Mikio SHIMADA, Yoshitada NAMIKAWA, Izumi SAITO¹, and
Toshihide TAKASAWA

要 旨

低温性雪腐病菌 *Sclerotinia nivalis* の低温適応現象を解明するために、5°C及び20°Cで産生するポリガラクトナーゼ(PGase)活性の性質を調べた。*S. nivalis* のアルファルファ培地での培養は5°Cでは187日間、20°Cでは195日間行った。5°C及び20°C培養粗抽出液のPGase活性は、それぞれ57.9±0.4 U/mL(抽出体積740mL, Total activity 42 800U), 20.4±0.4 U/mL(抽出体積655mL, Total activity 13 400U)であり、5°C培養は20°C培養より2.8倍高くPGaseを産生した。温度依存性については、5°C及び20°C培養PGase活性ともに最適温度は50°Cであった。5°C培養粗抽出液PGase活性含量(U/mL)は、5-70°Cのほぼ全域の温度範囲において20°C培養粗抽出液PGase活性に較べてかなり高かった。50°Cでの活性に対する各温度での相対活性での比較においては、5°C培養粗抽出液PGase活性は、5-40°Cの低温域温度範囲において20°C培養粗抽出液より約1.5倍(40°C)-3.5倍(5°C)高かった。pH依存性については、最適pHはいずれもpH4.0-4.5であったが、pH5.0-6.0においては傾向は異なっていた。温度安定性については、5°C培養粗抽出液は5から30°Cまでは安定であった。一方、20°Cのものは、40°Cまで安定であった。

これらのことから、*S. nivalis* は、5°Cでの低温培養においては、熱不安定な低温活性PGaseを大量に産生することによって低温に適応していることが示された。

キーワード: *Sclerotinia nivalis*, 低温菌, ポリガラクトナーゼ, 低温適応, 細胞壁分解酵素。

結 論

Sclerotinia nivalis は子囊菌亜門(Ascomyconia)・盤菌綱(Discomycetes)・ビョウタケ目(Helotiales)・菌核菌科(Sclerotiniaceae)に属し、主に北海道地域において雪腐病を引き起こす植物病原性糸状菌である(Saito 1997)。菌糸成長の適温は20°Cであり、この点では常温菌と考えられるが、耐冷性を有する事から低温菌に分類される。更に

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。

S. nivalis は積雪下で越冬中の根菜類や宿根花卉など双子葉植物に感染してその組織を腐敗させ、菌核を形成する。融雪後の病徴としては、罹病植物上に黒色、不定形の直径3-4mmの菌核が多数付着し、枯死した茎葉は灰白色を呈する。宿主は、主にはセリ科(ニンジン、トウキ)、キ

帯広畜産大学畜産科学科

School of Agriculture, 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.

ク科(ゴボウ, ブタクサ, キランソウジュウニヒトエ), 及びオオバコ科(ハラオオバコ)等の双子葉植物であるが, 更には, ユリ科(チューリップ)やアヤメ科(ジャーマンアイリス)等の単子葉植物も宿主となる。

Sclerotinia 菌の宿主への一次感染は, 創傷部侵入及び気孔や水孔等の自然開孔部侵入又はクチクラ(角皮)侵入によって行われる。特に角皮侵入においては, 植物細胞上皮を穿孔する菌糸の物理的な力と植物細胞壁を分解する一連の酵素群による化学的な力とによって行われると考えられている。植物細胞壁の一次細胞壁や植物細胞壁間隙物質の主要成分であるペクチン質を分解する細胞外酵素ペクチナーゼの一種ポリガラクトツロンナーゼ(PGase)は, 植物の病原性, 即ち植物の腐化(マセレーション)に深く関与している(Bateman and Basham 1976)。リンゴの銀葉病では PGase が病原性に関与していることが Miyairi 等(1985)によって明らかにされている。植物細胞はペクチン質やセルロースなどの多糖を細胞壁の成分としており, 病原菌は化学的にはペクチナーゼ, セルラーゼ, 及びヘミセルラーゼなどの酵素群を分泌することによって, 植物体表層に傷害を与えて, 宿主に侵入すると考えられる。また, ペクチナーゼの分解産物である宿主自身のペクチン質断片が宿主植物の病原性微生物に対する防御反応を惹起することが知られており, このことから植物病原菌由来のペクチナーゼに関する研究は重要であると考えられる。

ペクチン質は D-ガラクトツロン酸(D-GA)が α -1, 4 結合によって重合したポリガラクトツロン酸(PGA)を骨格として, 更にPGA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質で, メチルエステル化率の低い方から順にPGA, ペクチン酸, ペクチン及びペクチニン酸に分類される。ペクチナーゼにはポリガラクトツロンナーゼ, ペクチン酸リアーゼ, ペクチンリナーゼ, 及びペクチンエステラーゼ等がある。ペクチナーゼは細胞間隙物質であるペクチン質に作用し, マセレーションを引き起こすと考えられる。ここではPGA またはペクチン酸の α -1, 4 結合を加水分解する酵素であるPGaseの活性の性質について調べた。

この酵素は, これまでに菌類(Takahashi et al. 2002; Nagai et al. 2000; 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), 植物(Kapoor et al. 2000; Pathak et al. 2000; Bonghi et al. 1992; DellaPenna et al. 1986)及び線虫(Stephanie et al. 2002)等の広い範囲にその分布が知られてきた。

我々は, PGase を標的にして, 低温菌の低温環境への適応機構を酵素分子レベルで解明することを目的としている。本研究では, *S. nivalis*をアルファルファ培地において5°C・187日及び20°C・195日それぞれ培養し, その粗酵素抽出液中に含まれるPGaseの活性測定から, 低温域(5°C)と常温域(20°C)で産生されるPGase活性の性質を比較検討した。

試薬及び実験方法

試薬

Potato-Dextrose-Agar (以下PDA)はDifco Laboratoriesから, アルファルファペレットは川西農協から, Coomassie Brilliant Blue(以下CBB) G-250 電気泳動用特製 Lot No. M7R3031 は半井化学薬品工業から, リン酸 特級(85%(w/w)), メタノール 特級(99.8%(w/w)), アジ化ナトリウム 化学用(90.0%(w/w)), Hyflo Super-Cel, 氷酢酸 特級, 酢酸ナトリウム 特級, フェノール アミノ酸分析用, 硫酸 精密分析用, 無水炭酸ナトリウム 特級, シアン化カリウム 特級, ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム(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 生化学用は和光純薬工業から, D-GA 1水和物, PGA(From orange; Loss on drying 7.2%; Purity 89%), 3-[N-Morpholino]propane sulfonic acid (以下MOPS), 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid(以下MES), Bovine Serum Albumin (以下BSA) Crystallized and lyophilized はSigmaから, 各々購入したものを使用した。

菌体の培養

PDA培地での培養: PDA粉末3.9gをイオン交換蒸留水(以下純水)100mL中で加熱攪拌し溶解させ, オートクレーブ滅菌(121°C(ca. 2.2kg/cm²), 20分間)した。クリーンベンチ内で1シャーレ当たり約20mLのPDA水溶液を分注し, *S. nivalis*の菌核を移植した。*S. nivalis*は, このPDA培地上で20°Cで約2週間培養した。

アルファルファ培地での培養: アルファルファ約70gに

S. nivalis PGase 活性の低温適応

純水 50mL を加え混合し、次に、これを 500mL 三角フラスコに移し、オートクレーブ滅菌を行った。クリーンベンチ内で滅菌アルファルファ培地に、PDA 培地 1 シャーレ当たり 5 フラスコに移植した。その後 5°C において 187 日間、20°C において 195 日間培養した。

粗酵素抽出液の調製

粗酵素抽出液は以前に述べた方法(Takeuchi 2002)に従って調製した。抽出は 1 フラスコ当たり、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)緩衝液(以下 S. buffer) 200mL で行った。

PGase 活性測定法

PGase 活性は、酵素反応総体積 2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)緩衝液基質溶液 2.0mL, 酵素溶液及び S. buffer 0.1mL)系(サンプリング体積 10 μ L)を用いて 40°C において酵素反応を行い、酵素反応液中の還元糖を鉄試薬高感度還元糖定量法(Ikuma et al. 2001; Ikeura et al. 2003)によって決定し、その遊離速度から求めた。遊離速度は rate-assay 法(0, 3, 6 及び 9 分)によって決定した。酵素活性の 1Unit は還元糖の遊離速度 1 μ mol/min と定義した。

温度依存性

活性測定は 5°C 及び 20°C 培養粗抽出液を用いて、酵素反応温度 5-70°C の範囲で行った。基質溶液 2mL を使用し、5°C 培養については粗抽出液酵素溶液 0.10mL を用いて、20°C 培養については粗抽出液酵素溶液 0.04mL 及び S. buffer 0.06mL を用いて、2.1mL 系(サンプリング体積 10 μ L)で、PGase 活性の測定を行った。

pH 依存性

5°C 及び 20°C 培養についての PGase 活性の測定は各々の粗抽出液を用いて、pH3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 及び 7.5 において行った。pH3.0, 3.5 及び 4.0 基質緩衝液は 0.1M 酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液を、pH4.5, 5.0 及び 5.5 は 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を、pH6.0 及び 6.5 は 0.1M MES-NaOH 緩衝液を、pH7.0 及び 7.5 は 0.1M MOPS-NaOH 緩衝液を用いた。酵素活性測定は 2.1mL (基質溶液 2mL, 5°C 培養: 粗抽出液酵素溶液 0.02mL 及び S. buffer 0.08mL, 20°C 培養: 粗抽出液酵素溶液 0.04mL 及び S.

buffer 0.06mL)系(サンプリング体積 10 μ L)において 40°C で行った。

温度安定性

5°C 及び 20°C 培養粗抽出液の PGase 活性の温度安定性は各々の粗抽出液を 5-55°C の温度にそれぞれ 30 分間暴露後、PGase 活性を、pH4.5 \cdot 2.1mL 系(基質溶液 2mL 及び 5°C 培養: 酵素溶液 0.02mL 及び S. buffer 0.08mL, 20°C 培養: 酵素溶液 0.04mL 及び S. buffer 0.06mL))(サンプリング体積 10 μ L)において 40°C で測定した。

タンパク質の定量

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って決定した。CBB 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、 $0.0363 \pm 2.43 \times 10^{-4}$ (S. E.) であった。

結果

5°C 及び 20°C 培養粗酵素抽出液の PGase 活性含量

5°C \cdot 187 日及び 20°C \cdot 195 日アルファルファ培養粗抽出液の PGase 活性はそれぞれ 57.9 ± 0.4 U/mL (抽出体積 740mL, Total activity 42 800U), 20.4 ± 0.4 U/mL (抽出体積 655mL, Total activity 13 400U) であり、5°C 培養 PGase 活性は、20°C 培養 PGase 活性と較べると 2.8 倍高かった。

温度依存性

5°C 及び 20°C アルファルファ培養において産生された PGase 活性の酵素反応温度に対する変化を調べるために、5-70°C の温度範囲で pH4.5 \cdot 2.1mL 系で PGase 活性を測定し、両者を比較した。それらの結果を図 1 に示す。5°C 及び 20°C 培養の何れにおいても PGase 酵素反応の最適温度は 50°C であった。5°C 培養粗抽出液 PGase 活性は、如何なる温度においても 20°C 培養粗抽出液活性より高い値を示した。特に低温度 5°C においては、5°C 培養 PGase 活性 (7.48 ± 0.11 U/mL) は、20°C 培養 PGase 活性 (1.60 ± 0.15 U/mL) より 4.7 倍高かった。一方、5°C 培養粗抽出液の 5°C での活性 (7.48 ± 0.11 U/mL) は 20°C 培養粗抽出液の 20°C での活性 (7.36 ± 0.03 U/mL) よりも若干高かったがほぼ同等であった。

5°C及び20°C培養粗抽出液 PGase 活性の温度依存性を50°Cでの活性に対する相対活性によって比較した(図2)。5°C培養 PGase 活性は20°C培養 PGase 活性に較べて40°Cでは約1.5倍, 30°Cでは約1.7倍, 20°Cでは約1.9倍, 10°Cでは約2.0倍, 特に5°Cでは約3.5倍高かった。更に, 高温域の60°Cでは, 5°C培養 PGase 活性は20°C培養 PGase 活性に較べて約2.7倍高かった。従って図2において示されるように *S. nivalis* 5°C培養 PGase 活性は, 20°C培養のものに較べて, 低温域でも高温域でも高く, 広い温度範囲(約35-60°C)において最大活性の約80-90%以上の高い活性を有していた。

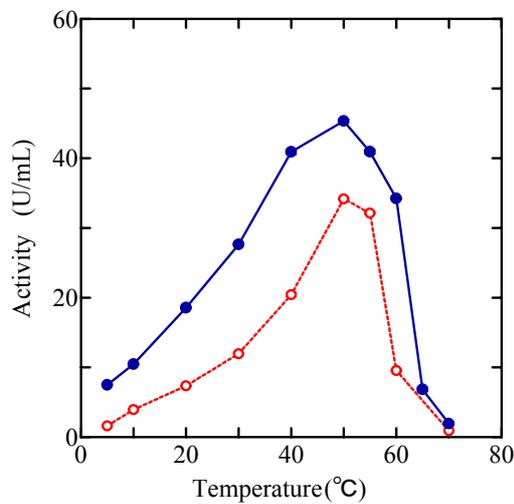


図1. 低温性雪腐病菌 *S. nivalis* 5°C・187日及び20°C・195日アルファルファ培養粗抽出液 PGase 活性含量の温度依存性。

—●—, 5°C・187日培養粗抽出液。
---○---, 20°C・195日培養粗抽出液。

pH 依存性

S. nivalis 5°C及び20°C培養 PGase 活性の酵素反応混液 pH に対する依存性を調べるために基質溶液の pH を変化させて活性を測定した。それらの結果を pH4.5 での活性に対する各 pH での相対活性として図3に示す。最適 pH は5°C及び20°C培養の何れにおいても pH4.0-4.5 であった。5°C培養 PGase 活性は pH3.0 及び5.0 では20°C培養のものに較べて低い値を示したが, 弱酸性域(pH5.5-6.0)では逆に高い活性を示した。また, pH7.0 及び pH7.5 の中性域においては何れの培養のものも活性を示さなかった。

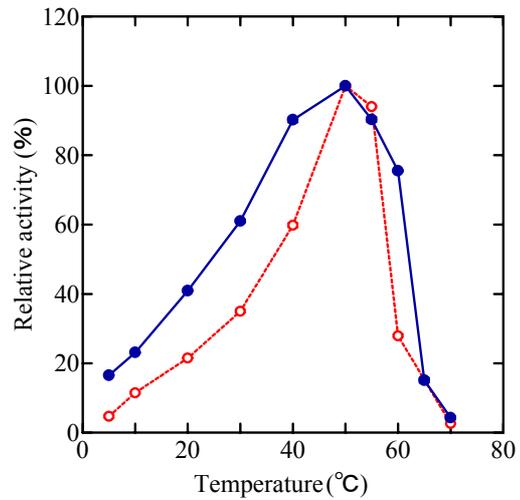


図2. 低温性雪腐病菌 *S. nivalis* 5°C・187日及び20°C・195日アルファルファ培養粗抽出液 PGase 活性(50°Cでの活性に対する各温度での相対活性)の温度依存性。

—●—, 5°C・187日培養粗抽出液。
---○---, 20°C・195日培養粗抽出液。

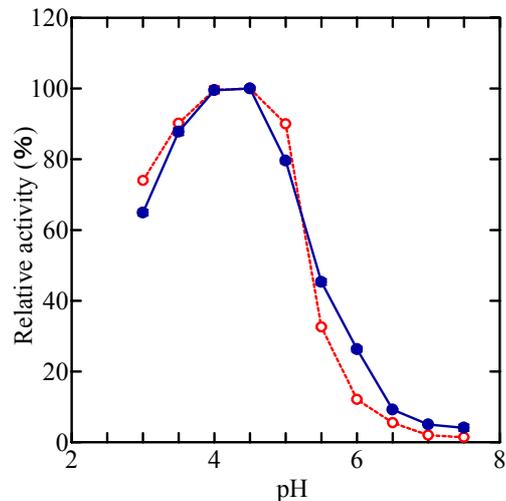


図3. 低温性雪腐病菌 *S. nivalis* 5°C・187日及び20°C・195日アルファルファ培養粗抽出液の PGase 活性(pH4.5での活性に対する各 pH での相対活性)の pH 依存性。 pH3.0, 3.5 及び4.0 基質緩衝液は0.1M 酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液を, pH4.5, 5.0 及び5.5 は0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を, pH6.0 及び6.5 は0.1M MES-NaOH 緩衝液を, pH7.0 及び7.5 は0.1M MOPS-NaOH 緩衝液を用いた。

—●—, 5°C・187日培養粗抽出液。
---○---, 20°C・195日培養粗抽出液。

温度安定性

S. nivalis の 5°C 及び 20°C 培養 PGase 活性の温度に対する安定性を調べるために、それぞれの粗酵素溶液を各温度 (10°C–70°C) に 30 分間暴露し、2.1 mL 系・40°C で酵素活性を測定した。それらの結果を残存活性として図 4 に示す。

20°C 培養 PGase は 5–40°C では安定であったが、50°C では残存活性が 40% で大幅に活性が減少し、60°C 及び 70°C ではそれぞれ 5%、3% となり失活した。一方、5°C 培養 PGase は 5–30°C では安定であったが、40°C では残存活性が 80% と減少傾向を示し、50°C、60°C、及び 70°C ではそれぞれの残存活性は、7%、1%、及び 1% となり、急激に失活した。

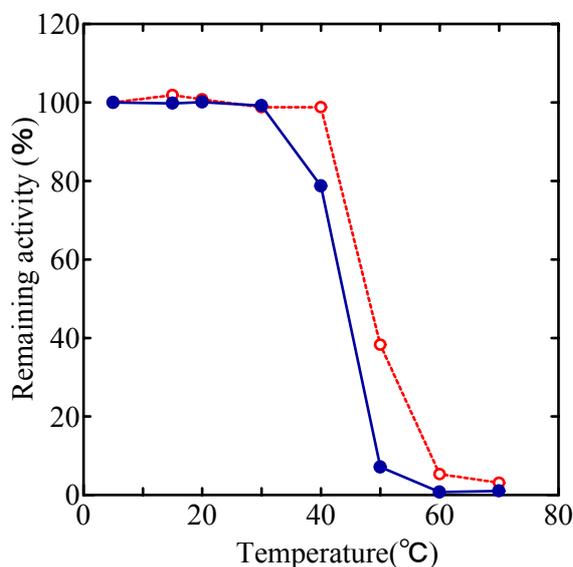


図 4. 低温性雪腐病菌 *S. nivalis* 5°C・187 日及び 20°C・195 日アルファルファ培養粗抽出液の PGase 活性の温度安定性。5°C 保存の PGase 活性の平均値を 100% とした残存活性で示した。

—●—, 5°C・187 日培養粗抽出液。
 ---○---, 20°C・195 日培養粗抽出液。

考察

低温性雪腐病菌 *S. nivalis* は、積雪下の低温において雪腐病を引き起こす病原菌である。この菌が産生するポリガラクトナーゼは、植物の腐化に深く関与していると考えられる。

まず我々は、低温 (5°C) 及び常温 (20°C) でのアルファルファ培養における PGase 産生量の比較から、5°C 培養が 20°C 培養に較べて 2.8 倍 (5°C 培養において 57.9 ± 0.4 U/mL; 20°C 培養において 20.4 ± 0.4 U/mL) 高く PGase を産生する

ことを示した。このことから低温環境下において病原性発現のために何らかの PGase 産生機構が作動することが明らかになった。*S. nivalis* は同じく低温菌に属する低温性通性雪腐病菌 *Sclerotinia trifoliorum* と比較してより低温に適応していると考えられる。*S. trifoliorum* の場合には、5°C 培養粗抽出液 PGase 活性 (30.8 ± 0.4 U/mL) は 20°C 培養の場合 (36.5 ± 0.9 U/mL) の約 80% で、かなり低かった。

5°C 及び 20°C 培養において産生される PGase 活性の温度依存性の比較によって、*S. nivalis* は 5°C で培養することによって PGase 寒冷酵素を産生することが明らかになった。20°C 及び 5°C 培養粗抽出液の酵素反応における最適温度は共に 50°C であったが、それぞれの温度依存性の傾向は全く異なっていた。低温域 (5–40°C) に関しては、特に 5°C においては、5°C 培養 PGase 活性は、図 2 において明らかのように、20°C 培養に較べて約 3.5 倍高かった。なおかつ、高温である 60°C においても約 2.7 倍高かった。これらの事実は、5°C 培養において産生された PGase 寒冷酵素は耐熱性をも有していると結論できる。

pH 依存性は 20°C 及び 5°C 培養ともに最適 pH が pH 4.0–4.5 であった。5°C 培養 PGase 活性は酸性域 (pH 5.5–6.0) で 20°C 培養 PGase 活性に較べて高い活性を示した。この事実は 5°C において産生された PGase 活性は、20°C 培養のものに較べて異なっていることを示している。

温度安定性に関しては、暴露実験によって *S. nivalis* の 5°C 培養 PGase 活性は熱に対して不安定であることを示した。これらの結果は、温度依存性実験における 60°C での相対活性の高さ即ち耐熱性を有することとは一見矛盾するものと考えられる。しかしながら、一見矛盾すると思われる相反する結果は実験方法の違い (温度依存性実験暴露時間 9 分; 安定性実験暴露時間 30 分) に起因するものと思われる。

低温性雪腐病菌 *S. nivalis* は、5°C で培養することによって、低温域で高活性を有するアイソザイムを産生し、それらは熱不安定性であり、PGase 寒冷酵素であることを示している。我々は、5°C 培養粗抽出液中から PGase 寒冷酵素を精製・単離をすることによって、*S. nivalis* の低温適応機構を更に詳細に明らかにすることができるものと考えている。

参考文献

- Bateman D. F. and Basham H. G. 1976. *In* Encyclopedia of Plant Physiology New series, vol.4 Degradation of Plant Cell Walls and Membranes by Enzymes. *Edited by* R. Heitefuss and P. H. Williams. pp. 316-355. Springer-Verlag Berlin Heiölelberg New York.
- 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.
- Darvill, A., McNeil, M., Albrsheim, P., Delmer, D. P. 1980. The primary cell walls of flowering plants. *In* The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. *Edited by* P. K. Stump and E. E. Conn. Vol. 1: The plant cell. *Edited by* N. E. Tolbert. Academic Press, New York, pp. 91-162.
- DellaPenna, D., Alexander, D. C., and Bennett, A. B. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6420-6424.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- 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.]
- Ikeura, M., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Cold adaptition of polygalacturonase activity from a cultured psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.*
- Kapoor, M., Khalil, B. Q., Bhushan, B., Dadhich, K. S., and Hoondal, G. S. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermoalkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochem.* **36**: 467-473.
- 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.
- Kirschenbaum, D., M. 1970. Selected data for molecular biology. *In* Handbook of Biochemistry. *Edited by* H. sober. 2nd ed., pp. C71-C98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- Matsumoto N. 1994. Ecological adaptations of low temperature plant pathogenic fungi to diverse winter climates. *Can. J. Plant Pathol.* **16**:237-240.
- McNeil, M., Darvill, A. G., and Albersheim, P. 1980. Rhamnogalacturonan I. A structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension cultured sycamore cell. *Plant Physiol* **66**: 1128-1134.
- Miyairi, K., Okuno, T., and Sawai, K. 1985. Purification and properties of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silverleaf symptoms on apple trees. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1111-1118.
- Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K., and Sakai, T. 2000. Purification and characterization of an endopolygalacturonase. From *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1729-1732.
- 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 Solana-*

- cearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170**: 1445-1451.
- 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.
- Stephanie, J., Jean, B. L., Pierre, A., Marie, N. R. 2002. A polygalacturonase of animal origin isolated from the rootknot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett.* **522**: 109-112.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. 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.]
- Waksman, G., Keon, J. P. R., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- Watanabe, T., Saito, I., and Takasawa, T. 2003. Cold adaptation of polygalacturonase activity produced by bran culture of the psychrotrophic facultative snow mold *Sclerotinia trifoliorum*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **24**: 7-13. [In Japanese.]
- the psychrotrophic snow mold, *Sclerotinia nivalis*, We examined the properties of polygalacturonase (PGase) activity produced at 5°C- and 20°C-culture. *S. nivalis* was cultured in the alfalfa medium at 5°C for 187 days and at 20°C for 195 days. The PGase activities in the crude extracts of the 5°C- and 20°C-culture were 57.9 ± 0.4 U/mL (Extracted volume, 740 mL; Total activity, 42 800 U), 20.4 ± 0.4 U/mL (Extracted volume, 655 mL; Total activity, 13 400 U), respectively. Activity of 5°C-culture was 2.8 times higher than that of 20°C-culture. As to the temperature dependence, the optimum temperature for the enzyme reaction at pH 4.5 was 50°C for both 5°C- and 20°C-culture. 5°C-culture crude extract PGase activities were considerably higher than those of 20°C-culture in the measured range between 5°C and 70°C. In the comparison of the relative activity at each temperature to the activity at 50°C, in low temperature range(5-40°C), the 5°C-culture crude extract PGase activities were about 1.5 times (40°C)- 3.5 times (5°C) higher than those of the 20°C-culture crude extract. On the pH dependence, optimum pH for 5°C- and 20°C-culture were 4.0-4.5, however the tendency of the curves was different at pH5.0-6.0. On enzyme stability, activity of the 5°C-culture crude extract was stable from 5°C to 30°C, though that of the 20°C-culture crude extract was stable until 40°C. From these results, it was shown that *S. nivalis* which was cultivated at a low temperature 5°C, produced much amount of thermolabile, cold active PGase to adapt to the low temperature conditions.

Key words: *Sclerotinia nivalis* ; psychrotroph;
polygalacturonase; cold adaptaition; cell-wall degrading enzyme.

Summary

In order to clarify cold adaptation phenomenon of

Res. Bull. Obihiro.,26(2005):27~33