

低温性通性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* の アルファルファ培養において産生される ポリガラクトナーゼ活性

渡辺 剛志・波川 啓士・斉藤 泉¹・高澤 俊英

Polygalacturonase activity produced by alfalfa culture of
the psychrotrophic facultative snow mold *Sclerotinia trifoliorum*

Tsuyoshi WATANABE, Yoshitada NAMIKAWA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA
(受理：2004年4月30日)

要 旨

低温性通性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* の低温適応現象を解明するために、5℃及び20℃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. trifoliorum* のアルファルファ培地での培養は5℃では160日間 (最適培養日数)、20℃では45日間 (最適培養日数) 行った。5℃及び20℃培養粗抽出液の PGase 活性は、それぞれ 30.8 ± 0.4 U/mL (抽出体積462mL, Total activity 14 200U), 36.5 ± 0.9 U/mL (抽出体積454mL, Total activity 16 600U) であり、低温においても PGase 産生量が著しく低下しないことがわかった。これら粗抽出液を Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィーによる脱塩操作後に、5℃及び20℃培養脱塩画分の PGase 活性の性質を調べた。温度依存性については、最適温度は5℃及び20℃培養 PGase 活性ともに50℃であり、50℃での活性に対する各温度での相対活性によって両者を較べると、それらの曲線は両者でほぼ一致した。温度安定性については、残存活性で比較すると、5℃培養 PGase 活性は15~35℃において僅かであるが20℃培養のものにくらべて不安定性を示した。一方、45~55℃では若干の安定性を示した。pH 依存性については、5℃培養 PGase 活性の最適 pH は4.5であり、20℃培養は4.0であった。従って、これらの結果は5℃及び20℃培養によって産生された各々の PGase アイソザイムが異なることを示した。

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

緒 論

Sclerotinia trifoliorum は子囊菌亜門 (Ascomyconia)・盤菌綱 (Discomycetes)・ピョウタケ目 (Helotiales)・菌核菌科 (Sclerotiniaceae) に属する病原性糸状菌である。菌糸成長適温は15~20℃で、本菌は常温において病原性を発現するが、33℃以上では成育できず (Matsuura 1946)、*S. trifoliorum* はこの点からは常温性菌核病菌と考えられる。しかしながら、本菌は0℃付近において

も成育可能でかつ病原性を有することから、その分布は全国的であり、中でも北海道、東北、北陸などの積雪地帯においては積雪下で発病する雪腐菌核病菌として知られているので、低温菌即ち低温性雪腐菌核病菌と考えられる。従って、*S. trifoliorum* は最終的には低温性通性雪腐菌核病菌に分類される (Matsumoto 1994)。

S. trifoliorum の宿主としては、マメ科植物 (アルファルファ、レンゲ、アカクロバ、シロクロバ、クリムソクロバ、アルサイクロバ、ソラマメ、ベッチ

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.

類), キク科植物 (ハハコグサ, ズシバリ), アブラナ科植物 (タネツケバナ) 等の双子葉植物が挙げられる。

S. trifoliorum による雪腐菌核病の発病は, 秋における子嚢胞子の宿主への感染によって始まる。冬の積雪下で菌糸成長が進行し, 春の融雪後, 気温の上昇と共に茎葉や根を灰白色に軟化, 腐敗させ, 枯死した植物の表面には綿毛状の白い菌糸と共にネズミ糞状の菌核を形成する。

S. trifoliorum の宿主への侵入は, 創傷部及び気孔や水孔等の自然開口部侵入及びクチクラ (角皮) 侵入のいずれも観察される。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によってなされると考えられている。また, 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)。

ペクチン質は D-ガラクトツロン酸 (D-GA) が -1, 4 結合によって重合したポリガラクトツロン酸を骨格として, 更にポリガラクトツ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質で, メチルエステル化率の低い方から順にポリガラクトツロン酸, 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ナーゼ, ペクチン酸リアーゼ, ペクチンリアーゼ, 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。ここではポリガラクトツロン酸またはペクチン酸の -1, 4 結合を加水分解する酵素であるポリガラクトツロナーゼ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. trifoliorum* をアルファルファにおいて 5 及び 20 でそれぞれ培養し, その粗抽出液に含まれる PGase の活性測定から, 低温域 (5) と常温域 (20) で産生される PGase 活性の性質を比較

検討した。また, 小麦フスマ培養に於いて産生されたポリガラクトツロナーゼ活性 (Watanabe et al. 2003) とも比較検討した。

試薬及び実験方法

試薬

試薬は以下の会社のものである。Potato-Dextrose-Agar (以下 PDA) (Difco Laboratories); アルファルファペレット (川西農協); Coomassie Brilliant Blue (以下 CBB) G-250 (半井化学薬品工業, 電気泳動用特製 Lot No. M 7 R3031); 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 () 酸カリウム (フェリシアン化カリウム) 特級, 硫酸鉄 () 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 (和光純薬工業); D-ガラクトツロン酸 (D-GA) 1 水和物, ポリガラクトツロン酸 (以下 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) (Sigma)。

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 (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. trifoliorum* の菌核を移植した。*S. trifoliorum* は, この PDA 培地上で 20 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 に純水 100mL 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 において 160 日間, 20 において 45 日間培養した。

粗抽出液の調製

粗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 (pH 4.5) 緩衝液 (以下 S. buffer) 200mL で行った。

ポリガラクトツロナーゼ (PGase) 活性測定法

PGase 活性は、酵素反応総体積2.2mL (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 0.2mL) 系 (サンプリング体積10 μ L) を用いて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 1 Unit は還元糖の遊離速度 1 μ mol/min と定義した。

Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィー

5 培養粗抽出液400mL (Total activity 12 320U) 及び 20 培養粗抽出液350mL (Total activity 14 700U) 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 (4.4cm \times 94cm, カラム体積 1 429mL) 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 (A_{280}) の測定によって行った。溶出画分は20mL ずつをフラクションコレクター (Pharmacia-LKB) を用いて集め、得られた各画分について PGase 活性を測定した。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, M&S Instruments Inc.) を測定した。PGase 活性画分をプールし、脱塩活性画分を得た (5 培養 441mL, 3 232U; 20 培養 584mL, 13 666U)。

pH 依存性

5 及び 20 培養についての PGase 活性の測定は各々の粗抽出液からの Bio-Gel P-6 DG 活性画分を用いて、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 2.2mL (1% (w/v) PGA 基質溶液 2 mL, 酵素溶液 0.02mL 及び S. buffer 0.18mL) 系 (サンプリング体積 10 μ L) において 40 度で行った。

温度依存性

5 培養においては粗抽出液からの Bio-Gel P-6 DG 活性画分を、20 培養においては 20 培養粗抽出液の粘度が低く、活性測定が容易だったために、この場合のみ粗抽出液を用いた。酵素反応温度を 5 ~ 70 の範囲で、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 mL 及び酵素溶液 0.02mL 及び S.

buffer 0.18mL を用いて 2.2mL 系 (サンプリング体積 10 μ L) で PGase 活性の測定を行った。

温度安定性

5 及び 20 培養における PGase 活性の温度安定性は Bio-Gel P-6 DG 活性画分を用いて 5 ~ 55 の温度にそれぞれ 30 分間暴露後、PGase 活性測定を 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 mL 及び酵素溶液 0.02mL を用いて、2.2mL 系 (サンプリング体積 10 μ L) において 40 度で行った。

結 果

5 及び 20 培養粗抽出液の PGase 活性含量

5 ・ 160 日 及び 20 ・ 45 日 アルファルファ 培養粗抽出液の PGase 活性はそれぞれ 30.8 ± 0.4 U/mL (抽出体積 462mL, Total activity 14 230U), 36.5 ± 0.9 U/mL (抽出体積 454mL, Total activity 16 570U) であり、20 培養に於いて PGase 活性の産生量が約 20% 高かった。

pH 依存性

酵素活性の酵素反応混液 pH に対する依存性を調べるために基質溶液の pH を変化させて活性を測定した。結果は図 1 に示す。5 及び 20 培養に於いて産生された PGase 活性の pH 依存性は両者の間で大きく異なっていた。5 培養において PGase 活性の最適 pH は pH 4.5 であり、20 では pH 4.0 であった。5 培養は pH 4.5 での活性に対する相対活性によって 20 培養と比較すると、低 pH 側 (pH 3.0 ~ 4.0) においては低い値を示したが、中性 pH 域 (pH 5.5 ~ 6.5) においては高い値を示した。

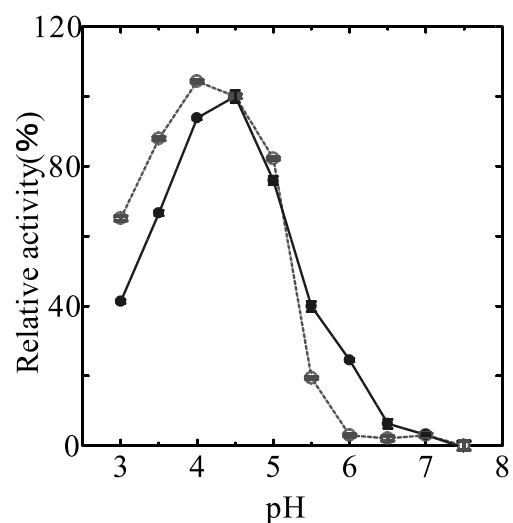


図 1. 低温性雪腐菌核病菌 *S. trifoliorum* 5 及び 20 Alfalfa 培養粗抽出液 Bio-Gel P-6 DG 活性画分の PGase 活性 (pH4.5 相対活性) の pH 依存性の比較。

●—, 5 °C Alfalfa Bio-Gel P-6 DG 活性画分.
○---, 20 °C Alfalfa Bio-Gel P-6 DG 活性画分.

温度依存性

5 及び20 アルファルファ培養において得られた 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 の温度範囲で pH4.5・2.2mL 系で PGase 活性の測定を行った。

図2に示すように、5 及び20 培養における PGase 活性の最適温度は共に50 であり、更に両者の温度依存性曲線について著しい違いは観察されなかった。

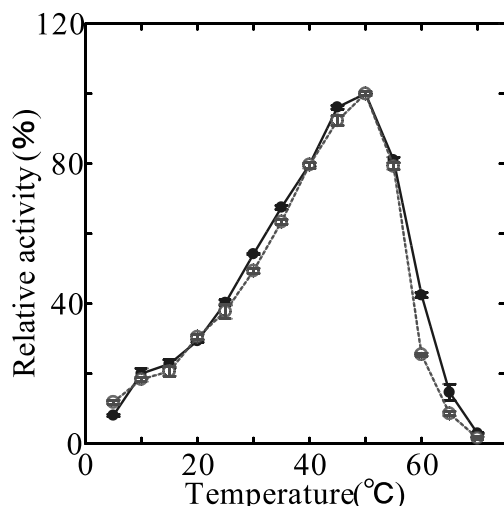


図2. 低温性雪腐菌核病菌 *S. trifoliorum* 5 Alfalfa 培養粗抽出液 Bio-Gel P-6 DG 活性画分及び20 Alfalfa 培養粗抽出液の PGase 活性 (50 相対活性) の温度依存性の比較。

—●—, 5 °C Alfalfa Bio-Gel P-6 DG 活性画分.
○....., 20 °C Alfalfa 培養粗抽出液.

温度安定性

5 及び20 培養 Bio-Gel P-6 DG 活性画分の酵素活性の温度に対する安定性を調べるために、それぞれの酵素溶液を各温度 (5 -55) に30分間暴露し、2.2mL 系・40 で酵素活性を測定した。

5 及び20 培養 Bio-Gel P-6 DG 活性画分について、5 での活性に対する残存活性によって比較した (図3)。5 培養活性画分は20 活性画分と較べると15 -35 での温度範囲すなわち常温域において若干の失活が観察された。両画分共、残存活性は40 から大きく低下し始め、20 培養活性画分については50 で完全に失活した。一方、5 培養活性画分については50 では未だ完全に失活せず、55 においても若干の残存活性を有していた。

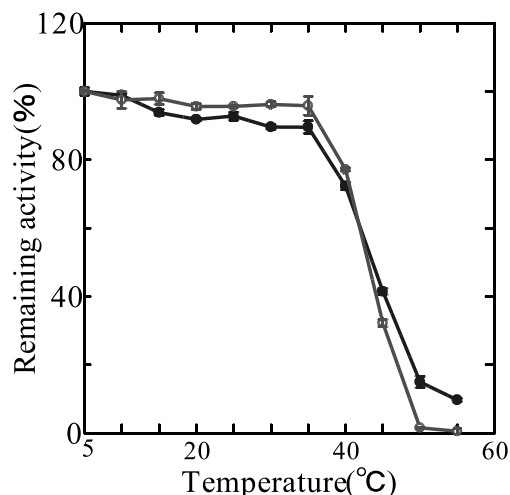


図3. 低温性雪腐菌核病菌 *S. trifoliorum* 5 及び20 Alfalfa 培養粗抽出液 Bio-Gel P-6 DG 活性画分の PGase 活性の温度安定性の比較。5 保存の PGase 活性の平均値を100%とした相対活性で示した。

—●—, 5 °C Alfalfa Bio-Gel P-6 DG 活性画分.
○....., 20 °C Alfalfa Bio-Gel P-6 DG 活性画分.

考 察

低温性通性雪腐菌核病菌 *S. trifoliorum* は、積雪下の低温において雪腐病を、更に常温に於いては菌核病を、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ツロナーゼは、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、常温 (20) 及び低温 (5) でのアルファルファ培養における最適培養条件における PGase 産生量を比較した。その結果、低温培養でも常温培養でも活性含量は大きくは変わらず、5 培養の PGase 産生量は20 のその84.4%を産生していた。以前行った小麦フスマを用いた同様の実験では5 培養の PGase 産生量は20 のその82.1%であり今回のアルファルファでの5 PGase 産生量と20 PGase 産生量の比が保存されていた。この事実は低温では雪腐病を、更に常温でも菌核病を引き起こし、何れの温度に於いても病原性を有する点と深く関連していると考えられる。

アルファルファ培養と小麦フスマ培養 (5 培養1.33 U/mL; 20 培養1.62U/mL) (Watanabe et al. 2003) では、常温培養でも低温培養においても明らかに PGase 産生量が異なり、アルファルファ培養はフスマ培養に較べて約23倍多く産生した。これは *S. trifoliorum* の宿主が小麦フスマではなくアルファルファであることと関連があると思われる。一方、双子葉類の一次細胞壁は、単子葉類にくらべてペクチン質の含量が約10倍も高く (Darvill 1980) , 従ってポリガラクトツロナーゼ誘導物質含量が高いためにアルファルファ培養におけるポリガラクトツロナーゼ産生が高かった可能性も考えられる。

S. trifoliorum は常温に於いて菌核病を発病させるだ

けでなく、低温でも雪腐病を発病することから、5 で産生される PGase は、20 培養に較べて低温において高い活性を示す、即ち、低温酵素である可能性が考えられた。それゆえに 5 培養 Bio-Gel P-6 DG 脱塩画分と 20 培養粗抽出液の温度依存性を調べ、低温域に於いて高い活性を示すかどうかを 50 での活性に対する相対活性で確認した。至適温度は共に 50 であり、両曲線はほぼ同じ傾向を示した。このことから 5 培養 PGase は、低温域に於いて高い相対活性を示さず、20 培養 PGase との違いは明らかではなかった。従って、温度依存性からは顕著な低温適応現象は観察されなかった。

一方、5 及び 20 培養 Bio-Gel P-6 DG 画分の温度安定性については、5 培養 PGase は、常温域で若干の温度不安定性を示し、低温酵素としての特徴を有しているものと思われた。しかしながら 高温域では、20 のそれと同様な傾向で失活し、変性温度は両者の間に違いがないと判断される。しかしながら、完全失活温度については 20 培養 PGase 活性は 50 で完全に失活したが、5 培養 PGase 活性は 55 においても若干残存し、5 培養 PGase 活性の失活温度は 55 より高かった。以上の点から 5 培養 PGase 活性は、常温域では 20 培養 PGase 活性に比べて不安定であったが、完全には失活しにくい構造を有しているものと考えられる。しかしながら、現時点では、その様な構造の具体性については言及できない。

5 及び 20 培養 Bio Gel P-6 DG 画分の pH 依存性については、5 培養 PGase 活性の至適 pH が 4.5、20 培養の至適 pH が 4.0 であり、両者に明らかな違いが確認された。このことから 5 及び 20 培養で産生される PGase アイソザイムは、同じものではないことが明らかであり、培養温度によって異なる PGase アイソザイムが産生された事が示された。

以上の結果をまとめると、培養温度の違い（5 及び 20）によって、産生されたポリガラクトノナーゼアイソザイムは酵素活性の pH 依存性が異なっているので構造的に異なるアイソザイムで、5 培養において産生されたアイソザイムは温度不安定性を示し、低温酵素の特徴を有していた。しかしながら、5 培養アイソザイムは温度依存性の結果からは顕著な低温適応現象は観察されなかった。この事実は前述したように *S. trifoliorum* は低温性通性雪腐菌核病菌であり、低温でも常温でもどちらに於いても病原性を有する点と関係しているのかもしれない。

しかしながら、常温培養に比べて低温培養では培養温度 5 における PGase 活性が低いので、低温積雪下での雪腐菌核病については、常温での菌核病に較べて、症状の進行速度は遅いものであると考えられる。

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 Heidelberg 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., Albersheim, 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 sugar using ferric iron reagent. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. 22: 109-116. [In Japanese.]
- Ikeura, M., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2003. Cold adaptation of polygalacturonase activity from a cultured psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis*. Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci. 23: 85-94. [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. 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.
- 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.
- 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.
- 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 root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Let.* 522: 109-112.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takaawa, T. 2002. Isolation of polygalacturonase 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*. *Biochim. 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.]

Summary

In order to clarify cold adaptation phenomenon of the psychrotrophic facultative snow mold *Sclerotinia trifoliorum*, the properties of polygalacturonase (PGase) activity produced in 5 °C- and 20 °C-culture were examined in the crude extracts. *S. trifoliorum* was cultured in the alfalfa medium at 5 °C for 160 days and at 20 °C for 45 days. The PGase activities in the crude extracts of the 5 °C- and 20 °C-culture were 30.8 ± 0.4 U/mL (Extracted volume, 462 mL; Total activity, 14 200 U), 36.5 ± 0.9 U/mL (Extracted volume, 454 mL; Total activity, 16 600 U), respectively. It was shown that PGase production did not remarkably decrease in the low-temperature environment. After desalting of these crude extracts by the Bio-Gel P-6 DG gel filtration chromatography, the properties of PGase activities of the 5 °C- and 20 °C-culture desalting fractions were examined. 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. Both cultures were compared by the relative activity against the activity at 50 °C, and both dependency-curves almost agreed within an experimental error. In the thermostability, compared with the 20

-culture by remaining activity, the 5 °C-culture PGase activity showed slightly more instability at 15 °C-35 °C, but a little more stability at 45 °C-55 °C. For the pH dependence, the optimum pH of 5 °C-culture PGase activity was 4.5, and 20 °C-culture was 4.0. Therefore, this fact shows that PGase isoenzymes produced by 5 °C- and 20 °C-culture were different from each other.

Key words : *Sclerotinia trifoliorum*; psychrotroph;
polygalacturonase; cold adaptation; cell
wall degrading enzyme