

# 低温性通性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* の 小麦フスマ培養において産生される ポリガラクトナーゼ活性の低温適応

渡辺 剛志・斉藤 泉<sup>1</sup>・高澤 俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity produced by  
bran culture of the psychrotrophic facultative snow mold *Sclerotinia trifoliorum*

Tsuyoshi WATANABE, Izumi SAITO<sup>1</sup>, and Toshihide TAKASAWA

(受理：2003年4月30日)

## 要 旨

低温性通性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* 由来ポリガラクトナーゼ (PGase) 活性の性質を調べた。5℃及び20℃で小麦フスマ培地において培養を行い、適当な期間 (5℃: 65-308日間, 20℃: 28-56日間) で抽出し、酵素活性の産生量を調べた。その結果、PGase 活性量は5℃培養では65日以降で、20℃培養では28日以降で定常状態になった。5℃及び20℃培養粗抽出液 PGase 活性 (1.33U/mL±0.00750 (SE); CV0.997%及び1.62U/mL±0.0167 (SE); CV2.06%) は好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis*, 常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* 及び低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* と比べて低かった。pH 依存性については、20℃培養 PGase 活性の最適 pH は pH3.5-4.5 であり、5℃培養のもの最適 pH は pH3.5-5.0 であった。温度安定性については20℃及び5℃培養 PGase 活性の間ほとんど違いは観察されなかった。温度依存性については、5℃及び20℃培養 PGase 活性の最適温度は50℃であった。5℃培養が20℃培養に比べて5℃-10℃において相対活性が高く、低温適応性を示した。

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* は子嚢菌・ビョウタケ目・菌核菌科に属し、菌核病を引き起こす病原菌として知られている。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。菌糸生長適温は、15-20℃であるが、33℃以上では生育できず (Matsuura 1946), *S. trifoliorum* はこの点からは常温菌と考えられる。しかしながら、本菌は0℃付近においても生育可能であることから低温菌 (psychrotrophs) に分類される。従って、*S. trifoliorum* は低温性通性雪腐菌核病菌である。

*S. trifoliorum* の宿主は、マメ科植物 (アルファルファ、

レンゲ、アカクローバ、シロクローバ、クリムソクローバ、アルサイククローバ、ソラマメ、ベッチ類)、キク科植物 (ハハコグサ、ヂシバリ)、アブラナ科植物 (タネツケバナ) 等が挙げられる。

*S. trifoliorum* の発病は、秋における子嚢胞子の宿主への感染から始まる。冬の積雪下で菌糸が進行し、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* が分泌する細胞外酵素ペクチナーゼの一種ポリガラクトナーゼ (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)。

帯広畜産大学畜産科学科

School of Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

<sup>1</sup> 北海三共株式会社農業科学研究所

<sup>1</sup> Agrosience Research Laboratories, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

ペクチン質はD-ガラクトツロン酸が $\alpha$ -1,4結合により重合したポリガラクトツロン酸を骨格とし、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。ここではポリガラクトツロン酸またはペクチン酸の $\alpha$ -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*を小麦フスマ培地において5°C及び20°Cでそれぞれ培養し、その粗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の性質を比較検討した。

## 試薬及び実験方法

### 試薬

試薬は以下の会社のものを使用した。Potato-Dextrose-Agar (以下PDA) (Difco Laboratories); 小麦フスマ (十勝米穀); 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. M7R 3031); 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, 硫酸 精密分析用 (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] ethane-sulfonic 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°C(ca.2.2kg/cm<sup>2</sup>), 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°Cで約2週間培養した。

小麦フスマ培地での培養 小麦フスマ約30gにイオン交換蒸留水50mLを加え混合し、オートクレーブ滅菌を行った。クリーンベンチ内で滅菌フスマ培地に、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で65-308日間、20°Cで28-56日間培養した。

### 粗抽出液の調製

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。

### 2% (w/v) PGA 基質溶液の調製

以前に述べた方法 (Takeuchi 2002) に従って調製した。2% (w/v) PGA 保存水溶液の全糖濃度 (21.5mg/mL  $\pm$  0.176 (SE) (CV 1.40%)) は高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって、還元糖濃度 (0.780 mg/mL  $\pm$  0.00433 (SE) (CV 0.97%)) は鉄試薬高感度還元糖定量法 (Ikuma et al. 2001) によって求めた。それら結果から基質重合度 (27.6mer  $\pm$  0.361 (SE) (CV 2.26%)) を求めた。

### 1% (w/v) PGA 基質溶液の調製

1% (w/v) PGA 基質溶液の調製 (800mL) は純水180 mLに2% (w/v) PGA 溶液400mLを攪拌しながら加え、0.4M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) 200mLを加え、酢酸でpH4.5に調整後、純水で800mLにメスアップした。

### タンパク質の定量

粗抽出液のタンパク質濃度はBradford (1976) 及びRead and Northcote (1981) の方法に改良を加えた高感度CBB G-250 色素結合法 (Ikuma et al. 2002) によってBSAを標準物質として決定した。

色素試薬は0.025% (w/v) CBB G-250-12.5% (v/v) メタノール-70.8% (w/v) リン酸を使用した。BSA標準溶液は0.1mg/mL-0.04% (w/v) アジ化ナトリウムを使用した。BSA標準溶液のタンパク質濃度は $A_{280}^{1\% (w/v)}$  = 6.60 (Kirschenbaum 1970) を用いて決定した。

発色は0.8mLタンパク質溶液 (0-9 $\mu$ g protein), 0.2mL CBB G-250色素試薬で行った。BSA1 $\mu$ g当たりのFactorは0.0321  $\pm$  0.000321 (SE); (CV 1.00%) を使用した。

### PGase 活性の測定

粗抽出液の PGase 活性は、酵素反応総体積 2.1 mL (1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH 4.5) 緩衝液基質溶液 2.0 mL, 粗抽出液 0.1 mL) 系、或いは酵素反応総体積 2.2 mL (1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH 4.5) 緩衝液基質溶液 2.0 mL, 粗抽出液 0.2 mL) 系を用いて還元糖を鉄試薬高感度還元糖定量法 (Ikuma et al. 2001) 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  $1 \mu\text{mol}/\text{min}$  と定義した。

ブランク酵素活性は酵素溶液の代わりに S.buffer (100  $\mu\text{L}$ ) を基質溶液 2.0 mL に加えた酵素反応総体積 2.1 mL 系を用いて測定した。また酵素反応総体積 2.2 mL 系の場合には、S.buffer 200  $\mu\text{L}$  を加えて同様に行った。

### 低温性通性雪腐菌核病菌 S. trifoliorum 培養期間の検討

S. trifoliorum を 5°C (65-308日) 又は 20°C (28-56日) で、任意の期間フスマ培養後抽出し、40°C での酵素活性とタンパク質濃度を測定した。

### pH 依存性

pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 及び 7.5 において PGase 活性測定を行った。pH 3.0, 3.5 及び 4.0 基質緩衝液は 0.1 M 酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液を、pH 4.5, 5.0 及び 5.5 は 0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を、pH 6.0 及び 6.5 は 0.1 M MES-NaOH 緩衝液を、pH 7.0 及び 7.5 は 0.1 M MOPS-NaOH 緩衝液を用いた。酵素活性測定は 2.2 mL 系・40°C で行った。

### 温度依存性

酵素反応時の温度を 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 及び 70°C で、1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH 4.5) 緩衝液基質溶液を用いて 2.2 mL 系で PGase 活性測定を行った。

### 温度安定性

粗抽出液を 20, 30, 40, 50 及び 60°C に 30 分間暴露し、その粗抽出液を用いて、1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH 4.5) 緩衝液基質溶液を用いて、2.2 mL 系・40°C で PGase 活性測定を行った。

## 結 果

### 5°C 及び 20°C 培養における PGase 活性

S. trifoliorum のフスマ培養における PGase 産生量の推移を調べるために、20°C 培養では菌核形成が確認される 4 週 (28日) から 5 週 (35日), 6 週 (42日), 7 週 (49日) 及び 8 週 (56日) 間培養を行い、5°C 培養では 65日, 72日, 80日 及び 98日 間培養を行った後に粗抽出液を得た。PGase 活性測定は酵素反応総体積 2.1 mL (1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 2 mL, 粗抽出

液 0.1 mL) : 10  $\mu\text{L}$  サンプル系で行った。そして、粗抽出液 1 mL 当たりの活性 (U/mL) 及び Total activity を求めた。

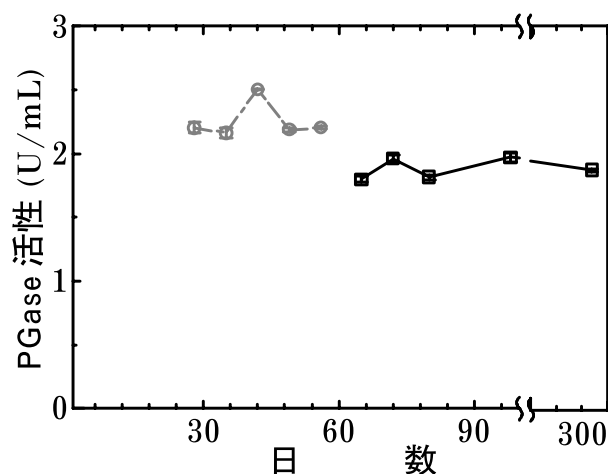


図 1. 20°C 及び 5°C 培養期間に対する粗抽出液中のポリガラクトナーゼ活性. 酵素反応総体積 2.1 mL : 10  $\mu\text{L}$  サンプル系 (40°C) で酵素活性を測定した。

—○—, 20°C 培養後抽出した粗抽出液.  
—□—, 5°C 培養後抽出した粗抽出液.

20°C 培養では、4 週間 (28日) 培養 PGase 活性及び Total activity (177 mL) は  $2.20 \text{ U/mL} \pm 0.0443$  (SE) (CV 3.48%),  $390 \text{ U} \pm 7.84$  (SE) (CV 3.48%) であった。培養期間内における時間経過に対する活性の増減は、最も高い値を示した 6 週培養 PGase 活性 ( $2.50 \text{ U/mL} \pm 0.00312$  (SE) (CV 0.249%),  $453 \text{ U} \pm 0.564$  (SE) (CV 0.249%)) を除き、ほぼ一定であった。

5°C 培養では、65日間培養 PGase 活性及び Total activity (191 mL) は  $1.80 \text{ U/mL} \pm 0.0437$  (SE) (CV 2.43%),  $344 \text{ U} \pm 4.82$  (SE) (CV 2.43%) であった。これらの培養期間内で時間経過による顕著な活性の増減は確認されなかった。PDA 培養は異なるが 5°C・44週 (308日間) フスマ培養粗抽出液 (888 mL) の PGase 活性は  $1.89 \text{ U/mL}$  であった。

### 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。そのために pH 3.0, 3.5, 4.0 (以上酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液), 4.5, 5.0, 5.5 (以上酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液), 6.0, 6.5 (以上 MES-NaOH 緩衝液), 7.0, 7.5 (以上 MOPS-NaOH 緩衝液) 基質溶液を用いて、5°C 及び 20°C 培養粗抽出液の酵素活性を 2.2 mL 系・40°C で調べた。20°C 培養 PGase 活性は、pH 4.0-4.5 において最大活性を与え、pH 3.5-4.5 の範囲において pH 4.5 での活性に対する相対活性が 90% 以上の値を示した。

5°C 培養 PGase 活性の最適 pH は pH 4.5 であり、pH 3.5-5.0 の更に広い範囲において pH 4.5 での活性に対する

相対活性が90%以上の値を示した。

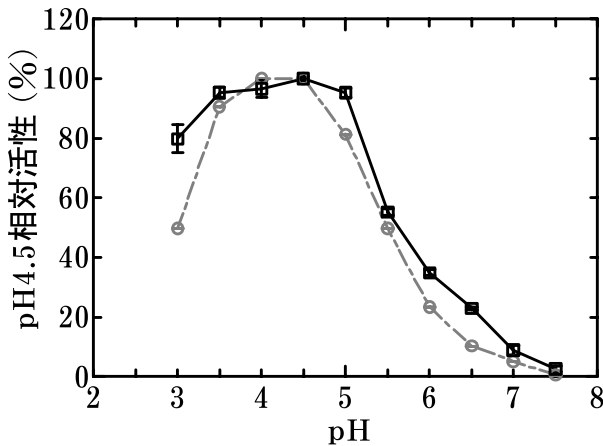


図2. 低温性通性雪腐菌核病菌 *S.trifoliorum* 5及び20°C粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性(pH4.5相対活性)のpH依存性の比較。  
 - - - - - , 20°C培養後抽出した粗抽出液.  
 ———— , 5°C培養後抽出した粗抽出液.

温度依存性

5°C及び20°Cの培養温度の違いによって得られた粗抽出液 PGase 活性が、酵素反応温度の変化に対して、特に低温域において、どのようになるかを調べるために、各温度で pH4.5・2.2mL 系で PGase 活性測定を行った。各データは、少なくとも3重実験で3回以上の実験結果の平均値を用いた。

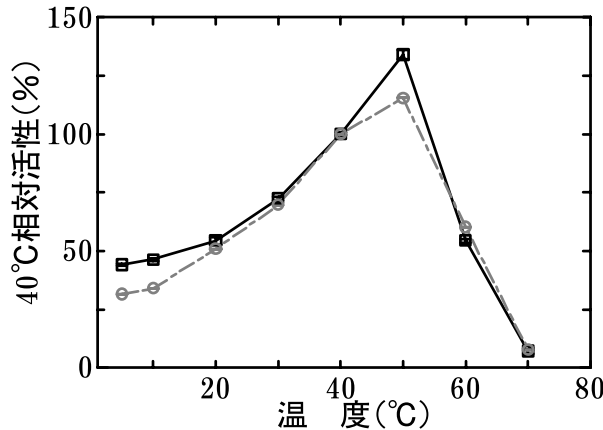


図3. 低温性通性雪腐菌核病菌 *S.trifoliorum* 5及び20°C培養粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性(pH4.5) (40°C相対活性)の温度依存性。40°Cでのポリガラクトナーゼ活性の平均値を100%とした相対活性で示した。  
 - - - - - , 20°C培養粗抽出液.  
 ———— , 5°C培養粗抽出液.

5°C及び20°C培養 PGase 活性の最適温度は共に50°Cであった。5°C及び20°C培養 PGase 活性を40°C活性に対する相対活性(40°C相対活性)で比較すると、5°C培養 PGase 40°C相対活性は、低温域(5°C及び10°C)において20°C培養のものに比べて非常に高い値を示した。

即ち、5°C培養 PGase の5°C/40°C相対活性及び10°C/40°C相対活性は、20°C培養5°C/40°C相対活性そして10°C/40°C相対活性に較べて、それぞれ12.6%及び12.3%高かった。その他の温度域(20°C-30°C)では顕著な差はなかった。50°Cでは、5°C培養の50°C/40°C相対活性が、20°C培養のものより高かった。

温度安定性

5°C及び20°C培養粗抽出液の酵素活性の温度に対する安定性を調べるために、それぞれの粗抽出液を各温度(5°C-60°C)に30分間暴露後、2.2mL 系・40°Cで酵素活性を測定した。

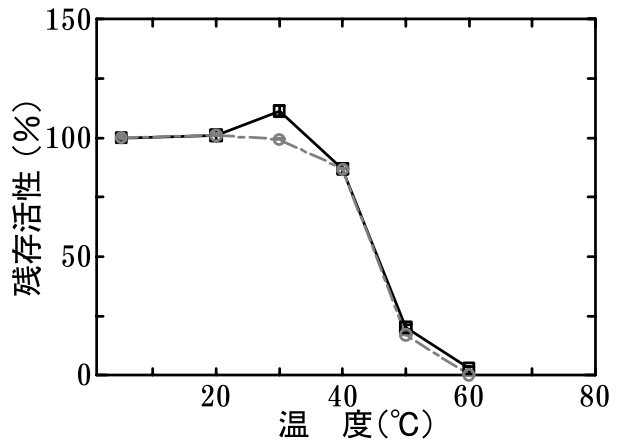


図4. 低温性通性雪腐菌核病菌 *S.trifoliorum* 5及び20°C培養粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性(pH4.5) (5°Cでの活性に対する残存率)の温度安定性。5°C保存のもののポリガラクトナーゼ活性の平均値を100%とした相対活性で示した。  
 - - - - - , 20°C培養粗抽出液.  
 ———— , 5°C培養粗抽出液.

5°C及び20°C培養粗抽出液について、5°Cでの活性に対する残存活性で比較した。5°C培養における30°C暴露後の残存活性が高いが、これは実験のばらつきと考えられる。両者共に5°C-30°Cまでの暴露温度において失活は観察されなかった。40°Cから徐々に残存活性が低下し、50°Cでの残存活性は20%で、60°Cでは完全に失活した。

考 察

*S. trifoliorum* が産生する PGase は、培養する温度によって、その性質が異なると考えられたために5°C及び20°Cでフスマ培養を行った。

培養期間によって PGase 産生量が変化することが考えられたので *S. trifoliorum* を5°C及び20°Cで任意の期間(5°C:65-308日間, 20°C:28-56日間)培養し、その粗抽出液中の PGase 活性を40°Cで測定し、PGase 産生量の比較検討を行った。培養期間は *S. trifoliorum* の菌核形成を目安にした。その結果、5°C及び20°Cともに菌核形成後では、培養期間による顕著な PGase 産生量の違い

は確認されなかった。また、5℃及び20℃培養のPGase産生量もほぼ同じであることから培養温度、培養期間に依らずPGaseは一定量産生されると考えられる。

一般的にPGase活性の最適pHは4-6である。S. trifoliorumの場合、5℃及び20℃培養粗抽出液は共にPGase活性の最適pHがpH4.5であり、その前後(5℃; pH3.5-5.0, 20℃; pH3.5-4.5)で最適pHでの活性の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た。これはpH4.5前後で急激な活性の減少を示す好冷性雪腐菌核病菌S. borealis及び常温性菌核病菌S. sclerotiorumの場合とは大きく異なっていた。一方、同じ低温性雪腐菌核病菌S. nivalisと比較すると、S. trifoliorumはS. nivalis(pH3.0-5.0)ほどではないが高い相対活性を示す広いpH範囲を有し、最適pHも同じpH4.5であることから傾向は似ているように思われる。5℃及び20℃培養PGase活性を最適pHで比較すると、5℃培養PGaseは20℃培養PGaseより最適pH範囲が広い。また、pH5.0より高い中性域における相対活性は、5℃培養PGase活性の方が20℃培養PGase活性より高い値を与えた。これらのことは5℃培養PGaseが20℃培養PGaseよりpH変化に対して安定であることを示唆している。同じ菌において温度環境によって産出される酵素の性質が変わる場合には、性質の異なるアイソザイムが産生されている可能性が示唆される。従って、S. trifoliorumは5℃及び20℃培養において各々活性部位の異なるPGaseアイソザイムを産生したものと思われる。

5℃及び20℃培養において産生された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5℃-60℃に30分間暴露し、氷冷後、40℃でPGase活性を測定した。5℃及び20℃培養PGase活性の安定性を比較すると30℃以外では両者に著しい違いは観察されず5℃及び20℃培養で産生されるPGaseアイソザイムパターンの違いに関して安定性実験からは顕著な違いは観察されなかった。

5℃及び20℃培養PGase活性の温度依存性を調べ、40℃における活性に対する相対活性(40℃相対活性)で比較検討を行った。その結果、最適温度は5℃及び20℃培養で共に50℃であり、5℃培養PGaseは20℃培養PGaseと比較すると5-10℃の低温域で40℃相対活性が高く、50℃においても50℃/40℃相対活性は高かった。

以上のことから低温性通性雪腐菌核病菌S. trifoliorumによって産生されたPGaseアイソザイムは、5℃と20℃培養ではそれらの性質が多少異なっていると考えられる。5℃培養PGaseアイソザイムは、20℃培養PGaseのものと同様に低温域における40℃相対活性が高かった。即ち5℃培養PGaseアイソザイムは低温適応能を有す

ることが示唆された。しかしながら5℃培養PGaseの温度安定性は、20℃培養PGaseと同様な傾向を示した。

低温適応現象は、5℃培養の好冷性雪腐菌核病菌S. borealis由来PGase活性については20℃培養の常温性菌核病菌S. sclerotiorum由来PGase活性との比較において観察された(Takeuchi 2002)。低温性雪腐菌核病菌S. nivalisにおいては、常温及び低温(20℃及び5℃)培養PGase活性の比較実験の結果、5℃培養の低温域におけるPGase 40℃相対活性が20℃培養のものより高い値を示した(Ikeura 2002)。更にS. nivalis 5℃培養PGase活性は、その20℃培養PGaseと較べて常温域において温度不安定性を示した。

低温適応酵素はより柔軟でルーズな分子構造をしており、低温下でも分子運動性が比較的保持されていると考えられている。このことから低温活性酵素は必然的に熱によって適切な高次構造を失いやすい、即ち温度に不安定であるとされる。ところが我々の実験では5℃及び20℃培養PGase活性の温度依存性比較で、5℃培養PGase活性は50℃における40℃相対活性が20℃培養のものより高い値を与えたが、それ以上の高温域においては20℃培養PGaseと同じ程度の活性を示した。更に、PGase活性の高温域における安定性については、5℃培養は20℃培養と同様の傾向を示した。この点に関してはS. trifoliorumが低温性通性雪腐菌核病菌であるという事実と妥当性があると思われる。好冷性雪腐菌核病菌S. borealisは低温でのみ生育することが可能であるが、S. trifoliorumはその分布が全国的であり、常温においても生育が可能で、天然においては非積雪地帯でも雪腐病又は菌核病を惹起する。このような点から、5℃培養で発現されるPGaseは20℃培養で発現されるものに較べて低温域での高い活性を有し、かつ常温-高温域でも高い温度安定性を有すると考えられる。この考え方は実験で得られた結果と良く合致する。

## 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.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding assay. *Biochem. Biophys. Acta*, **533**: 525-529.
- 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 PGU 1 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. 2003. Cold adaptition 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.
- 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.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. 1981. Minimization of variation in response to different proteins of Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- 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., and Pierre, A., Marie, N. R. 2002. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot 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.]
- 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. R., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- 松浦義. 1946. 農林省指定 "紫雲英ニ関スル研究" 第一報. pp. 1-156. 山形県立農事試験場.

## Summary

We investigated the properties of polygalacturonase (PGase) produced by bran culture of the psychrotrophic facultative snow mold *Sclerotinia trifoliorum*, and the conditions for bran culture were ex-

amined. The bran culture of *S. trifoliorum* was carried out for adequate periods at 5°C and 20°C. The PGase activities of 5°C and 20°C culture were 1.33U/mL  $\pm$  0.00750 (SE); CV0.997%, 1.62U/mL  $\pm$  0.0167 (SE); CV2.06%, respectively. The PGase of 5°C culture remained stationary for 65-308 days. Similarly, that of 20°C culture stayed constantly for 28-56 days. The activities of *S. trifoliorum* at 5°C and 20°C were lower than those of the psychrophilic snow mold *S. bovealis*, the mesophilic white mold *S. sclerotiorum* and the psychrotrophic snow mold *S. nivalis*. Optimum pH for the enzyme reaction at 40°C was 4.5 for both 5°C and 20°C culture. In addition, the 5°C culture activities between pH3.5 and 5.0 showed more than 90% of the activity at pH4.5, and the 20°C culture activities between pH3.5 and 4.5 also showed more than 90% of the activity at pH4.5. On the temperature stability of PGase activity, no difference was observed between 20°C and 5°C culture. Optimum temperature for the enzyme reaction at pH4.5 was 50°C for both 5°C and 20°C culture. In the range of 5-10°C of the enzyme reaction, the relative activity against 40°C activity of 5°C culture was higher than the relative activity of 20°C culture. Thus, the PGase activity of 5°C culture was the same stability as 20°C culture PGase activity, and showed good cold adaptation, compared with the 20°C culture PGase activity.

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