

好冷性雪腐小粒菌核病菌 *Typhula ishikariensis* の 産生するポリガラクトナーゼ活性の低温適応

田中 明良・齊藤 泉¹・高澤 俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity produced by
culture of the psychrophilic snow mold *Typhula ishikariensis*

Akira TANAKA, Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA

(受理：2003年4月30日)

摘 要

好冷性雪腐小粒菌核病菌 *Typhula ishikariensis* のフスマ培養粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性の性質を調べ、フスマ培養条件の検討を行った。*Typhula ishikariensis* のフスマ培養に於いて産生するポリガラクトナーゼ活性 (40°C・pH4.5) は $0.261\text{U/mL} \pm 4.43 \times 10^{-3}$ (SE) ; CV8.98%であった。この活性含量は、好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 及び常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* に較べて各々2.19%及び2.07%で非常に低かった。しかしながら、5°Cにおける活性については、50°Cに於ける最大活性に対する相対活性は42.1%で、40°Cに於ける活性に対する相対活性に至っては50.7%の非常に高い値になり、常温菌 *S. sclerotiorum* に於ける場合は勿論のこと好冷菌 *S. borealis* に於ける場合に較べても非常に高い低温適応性を有していた。40°Cでの酵素反応の最適 pH は、5.0であった。しかしながら、pH4.5-5.5の範囲に於ける活性は pH 5.0での最大活性の ca.97-98%を有し、最適 pH 範囲は広がった。フスマ培養条件については、*Typhula ishikariensis* は好冷菌 *S. borealis* に較べて、より湿潤な条件に於いてよく生育した。

キーワード：*Typhula ishikariensis*, 好冷菌, ポリガラクトナーゼ, 低温適応, 細胞壁分解酵素

緒 論

好冷性雪腐小粒菌核病菌 *Typhula ishikariensis* は担子菌類に属する植物病原菌である。土壤凍結期間が短く多雪地帯である北海道西部に分布し、オオムギやコムギ、芝草であるペントグラス、マメ科のアルファルファや赤クローバおよびイネ科のオーチャードグラス等の牧草に対し広く病原性を示す。

Typhula ishikariensis によって引き起こされる雪腐小粒菌核病は、晩秋降雨量が多く、そして冬季の積雪量も多く、又積雪下の地温が高かつ土壤凍結期間が短時間である、等の場合において発病するとされ、病徴は融雪直後から現れ、茎葉は水浸状になり、ゆでたように軟

化して、乾くと灰褐色に変色する。この上に暗褐色～黒色、球形～不整形、直径0.5-1 mm程度の菌核を多数形成する。従って菌の成長にとっては湿潤状態及び低温環境(0°C以上の非凍結状態)が必要であり、雪腐菌核病菌のなかでも特に *Typhula ishikariensis* は低温下における増殖性は高いとされている(星野ら 1997)。

我々はこれまで、雪腐大粒菌核病 (*Sclerotinia* snow blight) の原因菌である好冷菌 *Sclerotinia borealis* (以下 *S. borealis*) を用いて、*S. borealis* 由来のペクチン分解酵素であるポリガラクトナーゼの低温活性を調べてきた。低温性微生物の低温環境適応機構についての報告はあまり多くはなく、タンパク質レベルでの適応機構の解明に関する報告 (Hoyoux et al. 2001 ; Georlette

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 Sanky Co. Ltd.

et al. 200; Wintrode et al. 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Davail et al. 1994) は特に少ない。我々は微生物が低温環境へどのように適応しているのかを即ちその仕組みを酵素タンパク質レベルからアプローチする目的で好冷性糸状菌が産生するポリガラクトンナーゼ活性の低温環境に対する挙動を天然に近い状態で調べるために、好冷菌からの粗抽出液中のポリガラクトンナーゼ活性の性質を比較検討する事を進めている。

ポリガラクトンナーゼは、植物細胞壁構成成分の一つであるペクチンを分解するペクチナーゼの一種で、ポリガラクトン酸を主な基質とし、それ以外にもペクチン酸、ペクチン、及びペクチニン酸などの α -1, 4-ガラクトン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 et al. 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; Shastri et al. 1988; Tucker et al. 1981; Cervone et al. 1977)。植物病原菌は菌体外にペクチン分解酵素であるペクチナーゼやセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等を分泌し、これらの酵素の作用によって植物細胞の細胞壁成分であるペクチン質やセルロース等の多糖を分解し、植物体の表層に傷害を与え宿主に侵入すると考えられる。

酵素は通常 35°C ~ 60°C の中温域に至適温度を持つが、寒冷地に適応した *S. borealis* や *Typhula ishikariensis* などの微生物ではより低温域 (0°C ~ 25°C) で高い活性を示す酵素 (低温活性酵素) を生産している可能性がある。

我々が行った以前の研究 (Takeuchi et al. 2002) において、*S. borealis* の常温でのポリガラクトンナーゼ活性に対する低温での相対活性 (5°C での 40°C に対する相対活性値:ca. 35%) は高い値を示し、ポリガラクトンナーゼ活性の低温適応現象が観察された。雪腐小粒菌核病 (*Typhula snow blight*) の原因菌 *Typhula ishikariensis* は、*S. borealis* と同じく好冷菌であるので、*Typhula ishikariensis* の産生するペクチン分解酵素においても常温での活性に対する低温での相対活性が同様に高い値を示すのではないかと考えられた。

雪腐病は、その病原菌によって紅色雪腐病、雪腐小粒菌核病、雪腐大粒菌核病、雪腐褐色菌核病に分類されるが、*Typhula ishikariensis*, *Typhula incarnata* などの *Typhula* 属菌は多湿、暗黒、低温 (0°C 以上の非凍結状態) を好み雪腐小粒菌核病を引き起こす。一方、雪腐大粒菌核病を引き起こす *S. borealis* は、低温、暗黒、そして多湿の代わりに凍結状態を必要とする。従って *Typhula ishikariensis* が主に多雪地帯である道西にお

いて麦類雪腐病を発生させるのに対して、*S. borealis* は土壤凍結期間が長く、少雪地帯である道東に主に分布している (Tomiyama 1955)。

従って低温環境下における植物への感染の際、*Typhula ishikariensis* と *S. borealis* とは異なった挙動を示すものと考えられ、両菌が分泌するペクチン分解酵素の低温でのポリガラクトンナーゼ活性についても何らかの異なる挙動を示すものと思われる。

それ故に本研究では *Typhula ishikariensis* の培養条件および *Typhula ishikariensis* が産生するペクチン分解酵素であるポリガラクトンナーゼ活性の性質を明らかにするために最適 pH, 温度依存性等の性質を調べた。

材料及び実験方法

菌株

Typhula ishikariensis は、北広島市に於いて (1998.5.15) ベントグラスより採取した。

試薬

試薬は以下の会社からのものを使用した。Potato-Dextrose-Agar (以下 PDA) (Difco Laboratories); コムギフスマ (十勝米穀); 無水炭酸ナトリウム 特級, クエン酸 特級 (関東化学); シアン化カリウム 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 (以下鉄ミョウバン) 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, Hyflo super-cel, 水酢酸 特級, 酢酸ナトリウム 特級, リン酸 特級 (85% (w/w)), メタノール 特級 (99.8% (v/v)), アジ化ナトリウム 化学用 (90.0% (w/w)) (和光純薬工業); 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 R 3031); D-ガラクトン酸 1 水和物, ジガラクトン酸 (以下 Di-GA) (Approx.98%), ポリガラクトン酸 (From Orange; Loss on drying 7.2%; Purity 89%), Bovine Serum Albumin (以下 BSA) (Crystallized and lyophilized), MOPS (3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid) (Sigma); MES (2-Morpholinoethane sulfonic acid) 特級 (Merck)。

PDA 培地での *Typhula ishikariensis* の培養

3.9% (w/v) PDA 溶液を三角フラスコ中で 121°C ・2.2 Kg/cm², 20分間オートクレーブ滅菌した。この PDA 溶液を、クリーンベンチ内でオートクレーブ滅菌済みのシャーレに20mL ずつ分注して室温まで放冷し、固化させた。スラント培地中に保存された *Typhula ishikariensis* の菌糸を、滅菌竹串を用いて無菌的に切り出し、シャーレ上の PDA 培地上に移植した。これを 5°C (インキュベーター内) で約3ヶ月間静置培養した。

小麦フスマ培地での *Typhula ishikariensis* の培養

小麦フスマ30g 及び水50mL を混和し500mL 三角フラスコ中に入れた。これをオートクレーブ滅菌したのち、クリーンベンチ内で室温まで十分に放冷後、シャーレ上で培養した *Typhula ishikariensis* の菌糸を PDA 培地とともに加え (500mL 三角フラスコ培養 / 1 枚のシャーレ培養), 5°C で約 7 ヶ月間静置培養した。

培養期間の異なる PDA 培養からの小麦フスマ (ペトリディッシュ) 培養

フスマをほぼ粉末状になるまでミキサーを用いて破碎し, それをふるいにかけてフスマ破碎物を集めた。シャーレ (最大外径×全高 94×21mm) にふるい破碎物 9g と純水15mL を加え, 均質に混合した後, オートクレーブ前のフスマ, 水分, 及びシャーレの総重量を記録した。シャーレをアルミホイルで包み, オートクレーブ滅菌し, クリーンベンチ内で重量を測った。そしてオートクレーブ前後の重量の差分を, オートクレーブによって蒸発した水分量として, 滅菌水を滅菌後のフスマ培地に加えた。その後, PDA 培地上で約 1 ヶ月間および, 約 7 ヶ月培養した *Typhula ishikariensis* を直径 1 cm のコルクボーラーを用いて培地ごとくり抜き, 作成したフスマ培地上に移し, 5°C に静置した。成長の度合いはノギスを用いてコロニーの長径と短径を測り面積を求めることによつて見積った。

湿潤条件を変化させた小麦フスマ (ペトリディッシュ) 培養

フスマはミキサーを用いて破碎し, それをふるいにかけて。破碎フスマ:水 (w:v) についてそれぞれ, 3:2, 3:3, 3:5, 3:7, 3:9, 即ちフスマ 9g に対し, 純水 6 mL, 9 mL, 15mL, 21mL, 27mL を加え, 均質に混合後シャーレ (最大外径×全高 94×21mm) に移し各湿潤条件について 4 枚作成し, オートクレーブ滅菌した。その後 PDA 培地上で約一ヶ月間培養した *Typhula ishikariensis* を直径 1 cm のコルクボーラーを用いて培地ごとくり抜き, 作成したフスマ培地上に移し, 5°C に静置した。

粗抽出液の調製

500mL 三角フラスコ内において小麦フスマ培地上で培養した *Typhula ishikariensis* からの粗抽出液の調製は, 三角フラスコ 1 個当たり 10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー-200mL を用いて行った。

まず 5°C においてフスマ培地上で培養した *Typhula ishikariensis* の菌糸とフスマ培地に 10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファーを加えて 2 フラスコの内容物を定量的にミキサーに移した。ミキサーの内容物を 5 秒間攪拌し, 5°C で 1 時間静置後, 5 秒間攪拌した。さらに同様の静置と攪拌を 1 回行い, 最後に 5°C で 30分

間静置し, 軽く攪拌した。これを 2 枚重ねのガーゼを用い, 手 (ビニールグローブ着用) で絞って濾過し, その濾液 390mL を集めた。これに, 濾過補助剤として Hyflo super-cel (和光純薬工業) 約 12g (3 g/100mL) を加えて攪拌後, 吸引濾過 (定量用濾紙 No. 5 B, Advantec) した (濾液 pH7.15)。その後, 濾液を 5°C で 15 000rpm・15分間遠心分離した。上澄み液に氷酢酸を加え, pH4.5に調整した後, 再び遠心分離した。最後に, メンブラン (セルロースアセテート膜: 0.45 μ m, Advantec) 濾過滅菌を行った。この濾液を粗抽出液として, ポリボトルに分注して 5°C で保存した。

1% (w/v) ポリガラクトン酸 (pH4.5) 基質溶液の調製

1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液は以前述べた方法 (Takeuchi et al. 2002) に従って調製した。この溶液の全糖濃度は Hodge and Hofreiter (1962) 法を改良した高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって, 還元糖濃度は Park and Johnson (1949) 及び Ikuma et al. (2001) の方法を改良した高感度鉄試薬改良法によって, D-ガラクトン酸を標準物質として決定した。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) (平均重合度 26.2 ± 0.45 (SE); (CV4.19%)) を求めた。

ポリガラクトンナーゼ活性測定法

粗抽出液中のポリガラクトンナーゼ活性は, 酵素反応総体積 2.2mL 系 (1% (w/v) ポリガラクトン酸-0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質溶液 2.0mL, 粗抽出液 200 μ L) において, 還元糖量を高感度鉄試薬改良法により定量し, その遊離速度から求めた。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希釈率で補正した値を酵素反応 0 分における基質溶液の還元糖量として使用した。

基質溶液 2.0mL に粗抽出液 200 μ L を加えて, 酵素反応を 40°C (恒温槽: THERMO MINDER DX-10, TAITEC) で開始した。

開始後 10分, 20分及び 30分で反応混液 (10 μ L) を取り, 酵素反応停止液 (純水 490 μ L 及び高感度鉄試薬改良法試薬 1 (0.05M 炭酸ナトリウム-0.01M シアン化カリウム) 500 μ L) の入った試験管に加えて, 酵素反応をアルカリへの暴露によって停止した。

次に高感度鉄試薬改良法試薬 2 (0.0015M フェリシアン化カリウム) 500 μ L を加えて攪拌し, 100°C で 15分間加熱した。

その後 -20°C に 5 分間暴露して室温程度まで冷却した後, 高感度鉄試薬改良法試薬 3 (0.075% 鉄ミョウバン-0.3% (w/v) SDS-0.03N 硫酸) 2.5mL を加え, 30°C で 15分間インキュベートし, 発色させた。

この溶液の A₆₉₀ を測定し, D-ガラクトン酸を標準物

質とした標準曲線 (D-ガラクトツロン酸 $1\mu\text{g}$ 当たりの $A_{690} : 0.09221 \pm 1.90 \times 10^{-4}$ (SE) (CV 0.62%)) に基づいて酵素反応溶液 ($10\mu\text{L}$) 中の各時間での還元糖量 (μg) を求めた。

また、酵素反応 0 分における還元糖量は、予め測定した粗抽出液の還元糖濃度から反応混液 ($10\mu\text{L}$) 中に存在する粗抽出液由来の還元糖量を計算して、その値 ($0.9982\mu\text{g} \pm 2.41 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 6.84%)) を酵素ブランクとして、0 分における基質溶液 ($10\mu\text{L}$) 中に存在する還元糖量に加えた。

それぞれの還元糖遊離量をガラクトツロン酸換算 μmol (in $10\mu\text{L}$) に変換後、酵素反応混液 2.2mL 中の還元糖の遊離速度 ($\mu\text{mol}/\text{min.}$) を求めた。各実験の再現性は 4 重の実験値の相対試料標準偏差によって調べた。

酵素活性の 1 U は還元糖の遊離速度 $1\mu\text{mol}/\text{min.}$ と定義した。

1% (w/v) ポリガラクトツロン酸 (pH4.0~7.5) 基質溶液の調製

2% (w/v) ポリガラクトツロン酸水溶液を 100mL 、 0.4M 酢酸ナトリウム-酢酸バッファー 50mL を 200mL メートルグラスに加え、 5M 水酸化ナトリウム溶液あるいは水酢酸を用いて pH4.0、5.0 及び 5.5 にあわせた後、純水で 200mL にメスアップした。

また、 0.4M クエン酸-NaOH バッファーを用いて pH 5.5、6.0、6.5 及び 7.0 の基質溶液を、 0.4M MOPS-NaOH バッファーを用いて pH6.5、7.0 及び 7.5 基質溶液を調製した。また 0.25M MES-NaOH バッファー 40mL 、2% (w/v) ポリガラクトツロン酸溶液 50mL を加え純水で 100mL にメスアップし、pH6.0 及び 6.5 基質溶液を調製した。

調製した 1% (w/v) ポリガラクトツロン酸基質溶液を遠心分離 ($15\ 000\text{rpm} \cdot 15\text{分} \cdot 20^\circ\text{C}$) 後、上澄み液をビーカーに集めた。これをさらにメンブラン (セルロースアセテート膜: $0.45\mu\text{m}$, Advantec) 濾過によって濾過滅菌した。その後これらを基質として酵素活性を測定した。

ポリガラクトツロナーゼ活性の pH 依存性

種々のバッファーを使って調製した pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.5、7.0 及び 7.5 基質溶液を使用し、ポリガラクトツロナーゼ活性を求めるために、酵素反応総体積 2.2mL 系 (1% (w/v) ポリガラクトツロン酸- 0.1M 各バッファー基質溶液 2.0mL 、粗抽出液 $200\mu\text{L}$) において酵素反応を行った。

クエン酸バッファー使用酵素活性測定系の高感度鉄試薬改良法への影響

ポリガラクトツロナーゼ活性測定法における酵素反応体積 2.2mL 系のクエン酸ナトリウム-クエン酸バッファー濃度に対応させるために、(1.7mL 純水及び 0.5mL 0.4M クエン酸ナトリウム-クエン酸 (約 pH 6.1) バッ

ファー) 混合溶液を調製した。

D-ガラクトツロン酸が $0 \sim 10\mu\text{g}$ 含まれるように $0 \sim 100\mu\text{L}$ の $0.1\text{mg}/\text{mL}$ D-ガラクトツロン酸標準溶液をそれぞれの試験管に取り、混合溶液 $10\mu\text{L}$ を添加し、純水を加えて試料体積を $500\mu\text{L}$ にした。

これらの試料を用いて高感度鉄試薬改良法によって標準曲線を作成し、Factor を求めた。この実験操作を 3 重に 3 回行った。

ポリガラクトツロナーゼ活性の温度依存性

1% (w/v) ポリガラクトツロン酸- 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質溶液を用いて 5、10、20、30、40、50、60 及び 70°C における、*Typhula ishikariensis* 粗抽出液の酵素活性を活性測定法に従って測定した。

粗抽出液中のエキソポリガラクトツロナーゼ活性の測定

0.0496% (w/v) ポリガラクトツロン酸- 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質溶液または 0.1% (w/v) Di-GA- 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質溶液 2.0mL に粗抽出液 $200\mu\text{L}$ を加えて、酵素反応を 40°C で開始した。

開始後 10、20、30、40、50 及び 60 分で反応混液 $10\mu\text{L}$ を取り、酵素反応停止液 (純水 $490\mu\text{L}$ 及び高感度鉄試薬改良法試薬 $1\ 500\mu\text{L}$) に入れて攪拌し、酵素反応をアルカリへの暴露によって停止させ、各反応時間での還元糖を PGase 活性測定法に従って発色した。この溶液の A_{690} を測定し、D-ガラクトツロン酸を標準物質とした標準曲線に基づいて酵素反応混液 $10\mu\text{L}$ 中の各時間での還元糖量 (μg) を求めた。

次にこれら還元糖量から 0 分における基質由来還元糖量 (還元末端量) の酵素反応混液 $10\mu\text{L}$ 相当分を差し引いた。

更に、10、20、30、40、50 及び 60 分における反応混液中に存在する還元糖量から粗抽出液由来の還元糖量を、予め測定した粗抽出液の還元糖濃度を用いて反応混液 $10\mu\text{L}$ 中に存在する粗抽出液由来の還元糖量を計算して、その値 ($0.9982\mu\text{g} \pm 2.41 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 6.84%)) を更に差し引いた。

各時間における還元糖遊離量をガラクトツロン酸換算量の μmol (in $10\mu\text{L}$) に変換後、10、20、30、40、50 及び 60 分における還元糖 mol 数を、はじめから基質溶液 2.0mL 中に存在していたグリコシド結合の mol 数 ($5.4\mu\text{mol}$: ポリガラクトツロン酸保存溶液の平均重合度 27.4 及び各基質の分子量から計算) に対する相対値即ち切断したグリコシド結合の割合 (%) として表した。

0.1% (w/v) Di-GA 基質の場合には、最初から Di-GA 基質溶液 2.0mL 中に存在していたグリコシド結合の mol 数は秤量重量から計算した Di-GA の mol 数を使用した。

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-70.83% (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 μ g protein), 0.2mL CBB G-250色素試薬で行った。

結果及び考察

タンパク質含量

Typhula ishikariensis 培養粗抽出液のタンパク質濃度を決定するために、BSA を標準物質として CBB 色素試薬を用いた高感度タンパク質定量法 (Ikuma et al. 2002) による標準曲線を作成し、タンパク質 1 μ g 当たりの A_{595} を決定した。標準曲線作成実験は 3 重に行い、Factor は $0.03414 \pm 8.50 \times 10^{-4}$ (SE); (CV 4.32%) で、相関係数は 0.9986 となり高い直線性を示した。この Factor を用いて、粗抽出液のタンパク質濃度を求めた。その結果、粗抽出液に含まれるタンパク質濃度は $0.328 \text{ mg/mL} \pm 1.56 \times 10^{-2}$ (SE); (CV 1.35%) となった。

ポリガラクトンナーゼ活性含量

Typhula ishikariensis が産生するポリガラクトンナーゼ活性の含有量を明らかにするため、常法 (Takeuchi et al. 2002) に従い rate-assay 法によって反応時間 9 分間 (0, 3, 6 及び 9 分) の酵素活性測定を行った。培養粗抽出液のポリガラクトンナーゼ活性測定は酵素反応総体積 2.2mL 系 (1% (w/v) ポリガラクトン酸 (pH4.5) 基質溶液 2.0mL および粗抽出液 200 μ L) において 40 $^{\circ}$ C で行った。

反応混液 10 μ L における 1 分間あたりの還元糖増加量は、0.08763, 0.04480, 0.05725, 及び 0.05548 μ g/min (平均値 $0.06129 \mu\text{g}/\text{min} \pm 9.20 \times 10^{-3}$ (SE), CV 30.02%) となり活性が低く、9 分間の rate-assay 法による酵素活性の測定では十分な再現性が得られなかった。それ故に活性測定時間を 30 分間に延長し、10, 20 及び 30 分における反応混液中の還元糖量を測定し、還元糖増加量を見積もった。その結果活性値は低下したが、 $0.04601 \mu\text{g}/\text{min}$ (in 10 μ L) $\pm 7.81 \times 10^{-4}$ (SE); (CV 8.98%) となり CV 値は 1/3 以下になり再現性は大きく向上した。従って、*Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液の酵素活性に関しては、10 分間隔法によって測定を重ねることで真値を推定することができると判断し、酵素反応時間を 30 分

間に設定し、10, 20 及び 30 分における反応混液中の還元糖量を測定することによって酵素活性を見積もった。

結果として *Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液 1 mL 当たりの酵素活性は $0.2607 \mu\text{mol}/\text{min} \pm 4.43 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 8.98%) と見積もられた。雪腐菌核病菌 *S. borealis*, 及び菌核病菌 *S. sclerotiorum* の培養粗抽出液 1 mL 当たりのポリガラクトンナーゼ活性 $11.87 \mu\text{mol}/\text{min}$ 及び $12.61 \mu\text{mol}/\text{min}$ (Takeuchi et al. 2002) に対して、*Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液 1 mL 当たりのポリガラクトンナーゼ活性は $2.19\% \pm 3.73 \times 10^{-2}$ (SE); (CV 8.98%), 及び $2.07\% \pm 3.51 \times 10^{-2}$ (SE); (CV 8.98%) の値を示し、*Typhula ishikariensis* のポリガラクトンナーゼ活性の含有量は *S. borealis* 及び *S. sclerotiorum* に較べて非常に少なかった。

Typhula ishikariensis の小麦フスマ培養において菌糸が生長するためには *S. borealis* と較べて長期間の培養を必要とすることと、ポリガラクトンナーゼ活性が *S. borealis* に比べて著しく低いこととの間には相関関係があると思われる。*Typhula ishikariensis* の植物感染においてはポリガラクトンナーゼ以外の他の酵素系が関与している可能性も考えられるが、*Typhula ishikariensis* は腐生性即ち死物寄生性が高いこと、換言すると病原性が弱いこととポリガラクトンナーゼ活性が低いことは強く関連するものと思われる。従って、これまでに報告 (Tomiyama 1955) された *Typhula ishikariensis* の雪腐菌核病についての結果を考慮すると、ポリガラクトンナーゼが本菌の病原性に深く寄与しているものと思われる。

ポリガラクトンナーゼ活性の温度依存性

1% (w/v) ポリガラクトン酸-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質溶液を用いて 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 及び 70 $^{\circ}$ C (恒温槽: THERMO MINDER DX-10, TAITEC) における、*Typhula ishikariensis* 粗抽出液のポリガラクトンナーゼ活性を測定した (図 1)。結果は、60 $^{\circ}$ C 最大活性 ($0.365 \text{ U/mL} \pm 9.80 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 14.2%)) に対して、各温度における活性値の相対値 (%) で示した (図 2)。図 1 に示すように、65 $^{\circ}$ C 及び 70 $^{\circ}$ C での活性値 (65 $^{\circ}$ C ($0.240 \text{ U/mL} \pm 7.44 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 16.4%)), 70 $^{\circ}$ C ($0.107 \text{ U/mL} \pm 5.96 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 29.3%))) は 60 $^{\circ}$ C 最大活性に較べて著しく減少した。65 及び 70 $^{\circ}$ C での活性測定において、10, 20 及び 30 分における還元糖量の増加量は 10 分以後、次第に増加の割合が減少していたことから、酵素は 65 $^{\circ}$ C 以上の温度においては 10 分以後は緩やかに失活したものと思われる。60 $^{\circ}$ C から 5 $^{\circ}$ C までの範囲においては、活性は温度の低下とともに緩やかに低下し、5 $^{\circ}$ C における活性は $0.144 \text{ U/mL} \pm 3.47 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 12.7%) であった。結果として 5 $^{\circ}$ C での 60 $^{\circ}$ C に対する相

対活性は約 $39.5\% \pm 9.49 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 12.7%) であり、 50°C に対する相対活性は $42.2\% \pm 1.01 \times 10^{-2}$ (SE); (CV 12.7%), 及び 40°C に対する相対活性は $50.9\% \pm 1.22 \times 10^{-2}$ (SE); (CV 12.7%) であった (図2)。

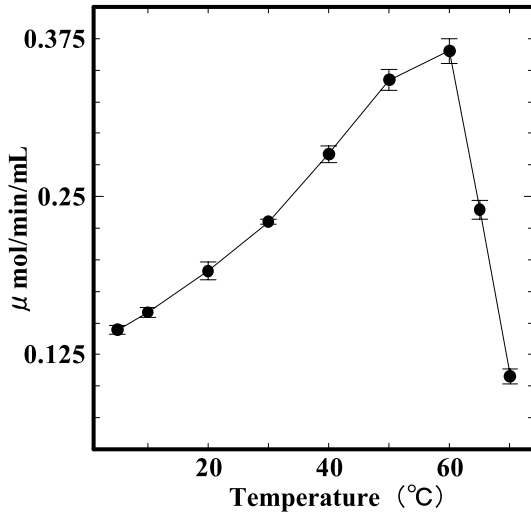


図1. 粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性の温度依存性. 反応総体積2.2mL系 (2.0mL 1% (w/v) ポリガラクトン酸 (pH4.5) 基質溶液及び200μL 粗抽出液) において酵素活性を測定した。

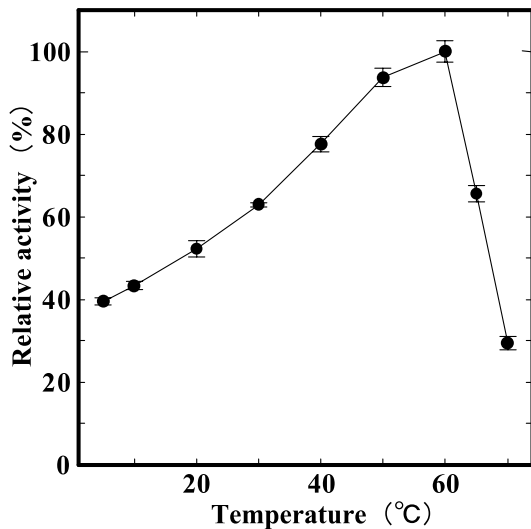


図2. 粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性の温度依存性における 60°C に対する相対活性. 反応総体積2.2mL系 (2.0mL 1% (w/v) ポリガラクトン酸 (pH4.5) 基質溶液及び200μL 粗抽出液) において酵素活性を測定した。

従って *Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液の 5°C における 40°C 相対活性は、*S. borealis* 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性についての 5°C での 40°C 相対活性 (ca. 35% : Takeuchi et al. 2002) にくらべて非常に高い値を示した。この事実から *Typhula ishikariensis* のポリガラクトナーゼ活性は好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* に比べて非常に高い好冷性、即ち低温適応性を有していると結論できる。また、最大活性温度につい

ては好冷菌 *S. borealis* の場合は 40°C であったが、*Typhula ishikariensis* においては 60°C で、 20°C も高くなり *Typhula ishikariensis* のポリガラクトナーゼ活性は低温での活性も高かったが、高温域においても高く、温度安定性が非常に高かった。

しかし *Typhula ishikariensis* の場合、最大活性を与える 60°C における粗抽出液 1mL 当たりの酵素活性の値は $0.365 \mu\text{mol/min}$ すなわち $0.365\text{U/mL} \pm 9.80 \times 10^{-3}$ (SE); (CV 14.2%) であり、*S. borealis* 粗抽出液における 40°C 最大活性 (pH4.5) 11.87U/mL (Takeuchi et al. 2002) に対して約3.24%の値しか示さず、*Typhula ishikariensis* のポリガラクトナーゼ活性含有率は *S. borealis* に比べて非常に低かった。

以上の結果、培養粗抽出液中に微量ながら存在するポリガラクトナーゼ活性の低温適応性によって、*Typhula ishikariensis* は温度変化にさらされても環境変化を克服して、安定した酵素の働きを維持し、植物感染の際に、*Typhula ishikariensis* がより確実に宿主へ侵入する事を可能にしているものと思われる。

ポリガラクトナーゼ活性の pH 依存性

Typhula ishikariensis 培養粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性の最適 pH を、pH の異なる 1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を使用して調べた (図3)。

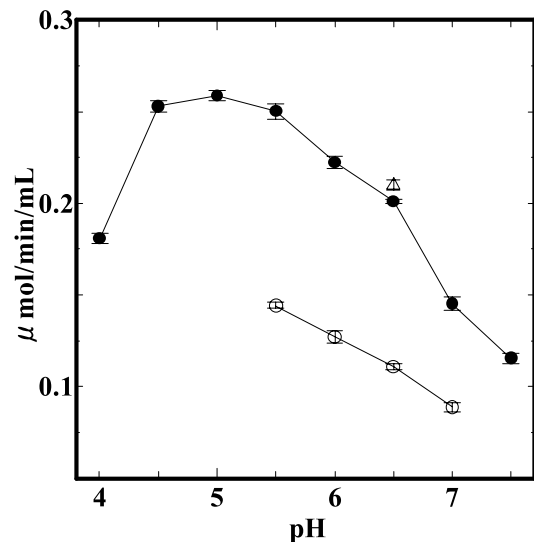


図3. 粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性の pH 依存性. 反応総体積2.2mL系 (1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液2mL, 粗抽出液200μL) において、 40°C での酵素活性を測定した。●: 各バッファーを用いて調製した 1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて、pH4.0~5.5, pH6.0~6.5, 及び pH7.0~7.5での酵素活性を測定し、各々の基質調製に使用したバッファーは、酢酸ナトリウム-酢酸バッファー, MES-NaOH バッファー, 及び MOPS-NaOH バッファーであった。△: MOPS-NaOH バッファーを用いて調製した 1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて pH6.5での酵素活性を測定した。○: クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いて調製した 1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて pH5.5~7.0での酵素活性を測定した。

pH6.0及び6.5の基質溶液は0.1M クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いて調製したが、その過程において基質溶液中に白濁が生じたため、懸濁（サスペンション）系で酵素活性測定を行った結果、粗抽出液 1 mL 当たりの活性値は pH6.0では $0.127\mu\text{mol}/\text{min} \pm 3.43 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 14.3%) で、pH6.5では $0.111\mu\text{mol}/\text{min} \pm 1.59 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 7.62%) であった。各々の pH での活性値は pH4.5における粗抽出液 1 mL 当たりの活性値 $0.2528\mu\text{mol}/\text{min}$ に対してそれぞれ約50%及び44%であった。

一方、0.1M MOPS-NaOH (pH7.0) バッファー基質溶液を用いて得られた活性値 $0.145\mu\text{mol}/\text{min} \pm 3.84 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 13.9%) は、pH4.5における活性値に対して約57.3%であった。

pH7.0における粗抽出液のポリガラクトンナーゼ活性が pH6.0及び pH6.5における粗抽出液のポリガラクトンナーゼ活性に比べて高かったため、アルカリ性及び中性付近で最適活性を持つアイソザイム群が粗抽出液中に存在するのではないかと考えられた。これを確認するために、0.1M クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファー (pH6.0及び6.5) の代替バッファーとして0.1M MES-NaOH バッファーを用いて、酵素活性を測定した。

その結果0.1M MES-NaOH バッファー pH6.0及び6.5の基質溶液で得られた活性値 (pH6.0は $0.222\mu\text{mol}/\text{min} \pm 3.21 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 7.67%)、及び pH6.5は $0.201\mu\text{mol}/\text{min} \pm 1.28 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 3.37%)) は、pH4.5における活性値と比較して pH6.0では87.2%、および pH6.5では79.1%であった。これらの活性値は、0.1M クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いた pH6.0及び6.5活性値に対してそれぞれ172.9%、及び179.4%で、0.1M MES-NaOH バッファーを使用した場合には活性値が大きく上昇した。

以上の結果、基質溶液に用いたバッファーの違いによって活性値の差が生じたため、pH5.5~7.0の範囲においては異なるバッファーを用いた基質溶液で活性測定を行い、活性値を見積もることが必要であると判断した。

そこで更に pH6.5は0.1M MOPS-NaOH バッファーを用いた基質溶液で酵素活性を測定した。その結果得られた活性値 ($0.210\mu\text{mol}/\text{min} \pm 2.27 \times 10^{-3}$ (SE) ; (CV 6.99%)) は pH4.5における活性値と比較して82.4%の値を示し、0.1M MES バッファーを用いた基質溶液 (pH6.5) を使って測定した活性値 ($0.201\mu\text{mol}/\text{min}$) と比較して約4%ほどの違いはあったが、バラツキの範囲内でほぼ一致した。

従って pH6.5での活性値は0.1M MES-NaOH バッファー及び0.1M MOPS-NaOH バッファーでの値の信頼性が高いと思われる。

これらの結果によって0.1M クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いた活性値は低く見積もられることが明らかになったため、同バッファーを用いて pH5.5及び7.0基質溶液を作成し、調製過程で生じる白濁による沈殿を遠心分離によって除去したものを、および除去しないものについて高感度フェノール硫酸法を用いた全糖量の決定を行った。その結果、沈殿が除去されていないクエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いて調製した1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液の全糖濃度は MOPS-NaOH バッファー及び酢酸ナトリウム-酢酸バッファーを用いて調製した基質のものと同程度であった。一方、遠心分離により沈殿除去したクエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いて調製した基質溶液の全糖濃度は MOPS-NaOH バッファー及び酢酸ナトリウム-酢酸バッファーを用いて調製したものに比べて約68~71%の低下を示した。これらの結果は、クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いての基質溶液調製時に生じる白濁沈殿がポリガラクトン酸由来のものであるということを示唆する。従って1%ポリガラクトン酸-0.1M クエン酸ナトリウム-クエン酸 (pH6.0及び6.5) バッファー基質溶液での活性値の低下は基質濃度の低下に起因していると考えられる。

更にクエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーに含まれるクエン酸が、高感度鉄試薬定量法において Fe^{3+} を阻害、或いは拮抗的に作用し、その結果活性値が低く見積もられる可能性も考慮して、クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを添加した高感度鉄試薬定量法において D-ガラクトン酸を標準物質として標準曲線を作成した。その結果、 A_{690} はクエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを添加した場合約2%上昇したが、Factor については約1%しか増加せず、クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーの高感度鉄試薬定量法に対する顕著な影響は観察されなかった (結果は示さない)。

結果として、クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファー基質溶液で測定したポリガラクトンナーゼ活性が低く見積もられた原因は確定できたと考えられる。

以上の結果から、*Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液の pH6.0及び pH6.5の活性値としては MES-NaOH バッファーを用いて得られた値を採用した。

また、pH4.0における活性測定において基質ブランクの吸光度が pH4.5のものに対して約85%程度であった。この原因としては、低い pH をもつ試料によって高感度鉄試薬改良法における A_{690} の発色が減衰する事が挙げられる。よって pH4.0における活性値については、発色が100%得られた場合における吸光度で、すなわち測定により得られた吸光度を0.85で補正 (割算) して、還元糖増加量を求めた。図4に示すように、*Typhula*

ishikariensis 培養粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は pH5.0において最大であり、pH4.5から5.5の範囲にかけては、最大活性と同等の値 (ca.97-98%) を示した。またポリガラクトナーゼ活性についての pH3.5以下の測定は行わなかったが、pH4.5から4.0において活性は減少していた事から、pH3.5以下の活性についても同様に減少することが予想される。一方最大活性を示す pH5.0からは、pHの上昇に伴い活性値は徐々に減少した。しかし pH6.5においては活性値は pH5.0の約80%を示し、*Typhula ishikariensis* 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は中性付近の pH においても安定していたことを示している。

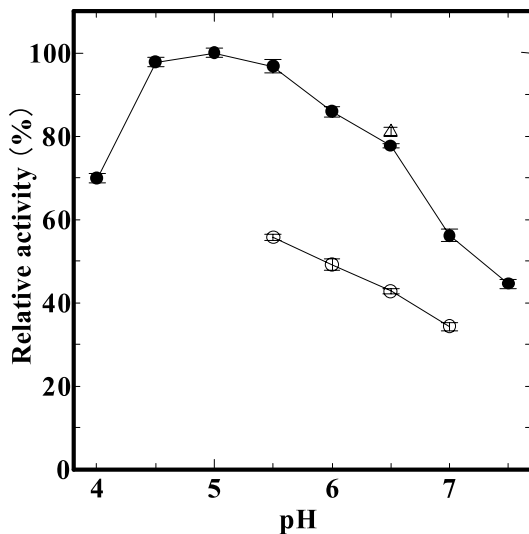


図4. 粗抽出液ポリガラクトナーゼ活性の pH 依存性における pH5.0に対する相対活性. 反応総体積2.2mL系 (1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液 2mL, 粗抽出液 200 μ L)において、40 $^{\circ}$ Cでの酵素活性を測定した. ●: 各バッファーを用いて調製した1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて、pH4.0~5.5, pH6.0~6.5, 及び pH7.0~7.5での酵素活性を測定し、各々の基質調製に使用したバッファーは、酢酸ナトリウム-酢酸バッファー、MES-NaOH バッファー、及び MOPS-NaOH バッファーであった. △: MOPS-NaOH バッファーを用いて調製した1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて pH6.5での酵素活性を測定した. ○: クエン酸ナトリウム-クエン酸バッファーを用いて調製した1% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液を用いて pH5.5~7.0での酵素活性を測定した.

以上の結果は、*Typhula* 属菌の pH5.0以下での生育抑制及び、*S.borealis* の pH6.0以上での生育抑制を報告した富山 (1955) の結果を、培養条件は異なるが裏付けるものであると思われる。更に、*Typhula ishikariensis* が産生するリパーゼ (脂質の重合体であるクチクラ層を分解するものと考えられる) 活性において、至適 pH が中性またはアルカリ性であり、広い pH 範囲 (pH4.5~8.5) において活性が見られることが星野ら (1997) によって報告されていることから、*Typhula ishikariensis* は幅広い pH 域において安定であり、従って植物への感染

においても安定した酵素の働きを幅広い pH 域において確保しているものと想像される。

エキソポリガラクトナーゼ活性

好冷性雪腐菌核病菌 *Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* のものに較べると非常に低く、また小麦フスマ培養には長期間を要する (*Typhula ishikariensis*: 7ヶ月, *S.borealis*: 2ヶ月) ことから、酵素の挙動について調べる必要があると考えられた。

ポリガラクトナーゼには end 及び exo 型が存在するため、*Typhula ishikariensis* の場合にはどのポリガラクトナーゼを産生しているのかを調べた。更に、エキソポリガラクトナーゼ活性をエンド活性と定量的に比較検討するために、エンドアッセイは通常基質 1% (w/v) ポリガラクトン酸-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファーの代わりに、0.1% (w/v) Di-GA-酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) バッファー基質とグリコシド結合濃度が同じ 0.0496% (w/v) ポリガラクトン酸基質を使用して行った。図5に時間経過に伴う 0.0496% (w/v) ポリガラクトン酸基質溶液及び 0.1% (w/v) Di-GA 基質溶液に対するグリコシド結合の切断割合をプロットしたものを示す。*Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液は、ポリガラクトン酸に対して時間経過に伴って A_{690} 、即ち遊離還元糖量の一定した増加を与えるエンドポリガラクトナーゼ活性を示した。一方 Di-GA に対しては一定の時間経過に伴う A_{690} 、即ち遊離還元糖の増加は全く見られず、60分間の酵素活性測定において実験バラツキの範囲内で目だった活性を示さなかった。

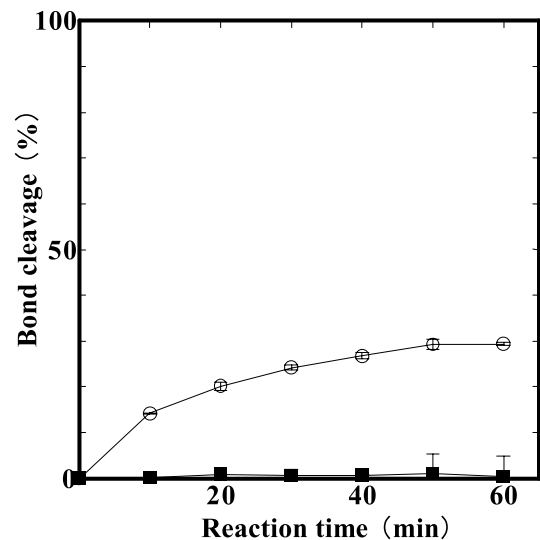


図5. エキソポリガラクトナーゼ活性. 各時間における 0.0496% (w/v) ポリガラクトン酸 (pH4.5) 基質溶液および 0.1% Di-GA (pH4.5) 基質溶液に対する、粗抽出液のグリコシド結合切断割合をプロットした. ○: 0.0496% ポリガラクトン酸基質. ■: 0.1% Di-GA 基質.

従って *Typhula ishikariensis* 培養粗抽出液中にはエキソポリガラクトナーゼ活性は含まれず、ポリガラクトナーゼ活性は低い、すべての活性はエンドポリガラクトナーゼによるものと判断した。

小麦フスマ（ペトリディッシュ）培養における PDA 前培養期間の影響

PDA 培養（5℃）における *Typhula ishikariensis* の菌糸生長は *S.borealis*（約2ヶ月）に比べて非常に遅く、シャーレ（最大外径×全高 94×21mm）上に菌糸が繁茂するまで3～4ヶ月を必要とした。また、約3ヶ月を過ぎると菌核を形成するため、小麦フスマ培地への移植の際、PDA 培養の期間によって、*Typhula ishikariensis* のフスマ培地への移植後の生育の挙動が変わるものと思われる。従って、*Typhula ishikariensis* の PDA 培養について、長期間（約7ヵ月半）培養によって菌核が形成されたもの、及び未だ菌糸伸長が活発で菌核を形成していない1ヶ月間培養のものをフスマ培地に移植し、その後の菌糸伸長の速さを調べた。

シャーレごとの生長のばらつきを調べるために、各湿潤条件について4シャーレずつ作成した。各湿潤条件における4シャーレの菌糸面積の平均値を培養日数に対してプロットしたものを図6に示す。

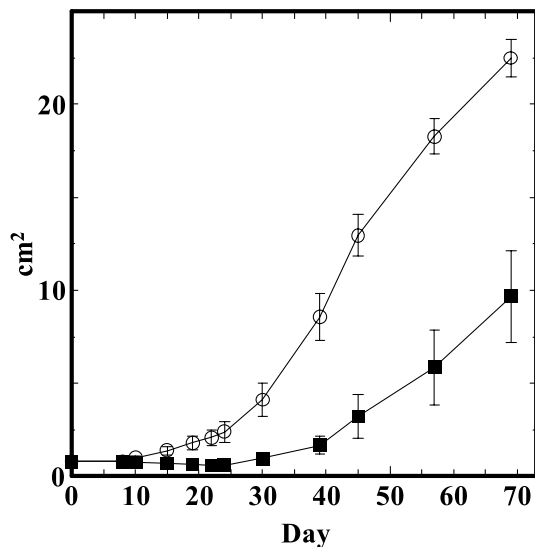


図6. 小麦フスマ（ペトリディッシュ）培養における PDA 培養期間の影響。培養日数に対して4シャーレの平均値をそれぞれプロットした。どちらも直径1cmのコルクボーラーを用いてPDA培地ごとフスマ培地（フスマ：水（w/v）=3：5）に移した。○：PDA培地上で約1ヶ月間培養された *Typhula ishikariensis*。■：PDA培地上で約7ヶ月間培養された *Typhula ishikariensis*。

長期間 PDA 培養した後、フスマ培地上に移植したものの伸長の速さは、PDA 培地1ヶ月培養のものに比べて非常に遅かった。長期間 PDA 培養されたものは、フスマ培地上で1ヶ月間菌糸伸長が開始されず、1ヶ月以上経過後ようやく菌糸伸長が開始された。一方、PDA

培地において未だ菌核を形成していない活発に生長している1ヶ月培養のものは、フスマ培地に移植後、約1週間で菌糸伸長を開始し、その後菌糸面積はスムーズに増加した。

このことは、PDA 培地上において長期間培養し菌核を形成した *Typhula ishikariensis* は休眠状態にあり、フスマ培地上へ移植後も未だ代謝活動が十分に行われていないことを示唆している。一方、PDA 培地上で1ヶ月間培養され、未だ菌糸伸長が活発に行われているものは、フスマ培地上に移植後も、より早期にフスマを分解することが可能である。よって長期間 PDA 培養されたものは、菌核を形成したために、フスマ培地移植後も代謝活動が十分に行われていないので、代謝エネルギー要求性が低くペクチン分解酵素の産生が遅延し、菌糸伸長が行われにくいものと思われる。

小麦フスマ（ペトリディッシュ）培養における最適湿潤条件

培養粗抽出液作成の為に小麦フスマ培地上（小麦フスマ30g及び純水50mL（フスマ：純水=3：5（w:v））で *Typhula ishikariensis* を培養したところ、培養後1～2ヶ月経てようやく培地上で菌糸生長を開始し、菌糸確認後三角フラスコ（500mL）中に菌糸が繁茂するまでにはさらに5～6ヶ月と非常に長期間を要した。

この培養条件（フスマ：純水（w/v）=3：5）で *S.borealis* が約2ヶ月間で三角フラスコ中に菌糸を繁茂させるのに対し、*Typhula ishikariensis* が7ヶ月間と非常に長い期間を要することから、*Typhula ishikariensis* の成長はこの培養条件では抑制されているものと思われる。

Typhula ishikariensis は湿度を好み、また光が成長を阻害すると報告（Tomiyama 1955）されてきたので、フスマ培地における湿度が低い為に *Typhula ishikariensis* の成長が抑制されていると考え、湿潤条件の異なる小麦フスマ培地を作成し *Typhula ishikariensis* を冷暗所、低温（5℃）において培養することによって、*Typhula ishikariensis* にとってより好ましい湿潤条件を検討した。

図7（69日間）は各湿潤条件における4シャーレの菌糸面積の平均値及び標準誤差を培養日数に対してプロットしたものである。3：5（フスマ：水（w:v））の割合で作成したフスマ培地で1ヶ月間培養した菌糸面積の平均値を100%として、各湿度条件のシャーレにおける菌糸面積の相対値（%）は、3：2、3：3、3：7、及び3：9について各々31.7%±4.52（SE）；（CV 28.52%）、36.9%±3.00（SE）；（CV 16.25%）、263%±51.6（SE）；（CV 39.2%）、及び316%±57.4（SE）；（CV 36.3%）であった。1ヶ月間の培養結果からは、培養日数の経過に伴い水分含量の多いフスマ培地ほど菌糸生長の速さが大きくなること示され、最も水分含量の多い3：9（フ

スマ：水 (w:v) 培養において菌糸生長が最も早かった。しかしながら、それ以後になった場合には、3 : 7 (フスマ：水 (w:v)) の割合で作成したフスマ培地における菌糸生長が、最も水分含量の多い 3 : 9 (フスマ：水 (w:v)) のものを追い越した。従って *Typhula ishikariensis* の最適フスマ培養条件はフスマ：水 (w:v) = 3 : 7 であると結論した。

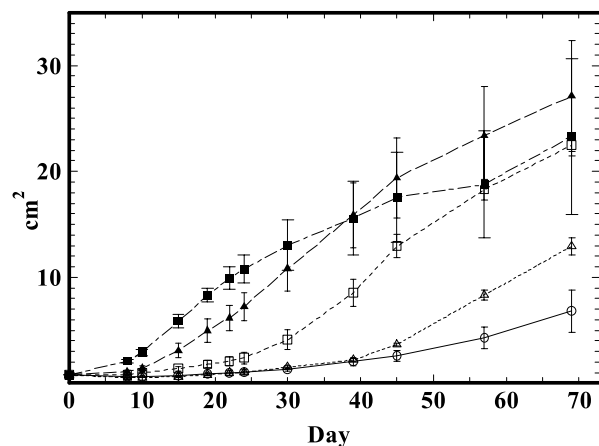


図7. 小麦フスマ (ペトリディッシュ) 培養における湿潤条件. 培養日数に対して4シャーレの平均値をそれぞれプロットした. フスマ：水 (w/v) の割合は以下の通りである. ○, 3 : 2 ; △, 3 : 3 ; □, 3 : 5 ; ▲, 3 : 7 ; ■, 3 : 9.

この様な結果は、*Typhula ishikariensis* が湿度を好み、従って湿度が低い培地においてはその成長が著しく抑制されることを示す。これは余り湿度を好まない *S.borealis* とは対照的に、湿度を好むとされる *Typhula ishikariensis* 特有の性質であり、Tomiyama (1955) が得た結果を裏付けるものと思われる。

参考文献

- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- 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* A 5. *Eur. J. Biochem.* **244**: 186-191.
- Georgette, 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.
- Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. *In Methods in carbohydrate chemistry. Edited by R. L. Whistler and M. L. Wolfrom. Academic press, New York, Vol. 1 pp.380-394.*
- 星野保, 松本直幸, Anne Marte Tronsmo, 島貫忠幸, 坂本智美, 扇谷悟, 石崎紘三. 1997. 雪腐病菌 *Typhula ishikariensis* の生産する低温活性リパーゼ. 低温領域における新しい工学 講演要旨集. 通商産業省工業技術院北海道工業技術研究所. pp39-40.
- 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.
- Kirschenbaum, D. M. 1970. Selected data for molecular biology. In Handbook of Biochemistry. Edited by H. Sober. 2nd ed., pp. C-71-C-98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- 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.
- Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. A submicro-determination of glucose. J. Biol. Chem. **181**:149-151.
- 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.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. **116**: 53-64.
- 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., 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.]
- Tobias, R., Conway, W., and Sams, C. 1993. Polygalacturonase isozymes from *Botrytis cinerea* grown on apple pectin. Biochem. Mol. Biol. Int. **30**: 829-837.
- Tomiyama, K. 1955. Studies on the snow blight disease of winter cereals. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. Rep. **47**: 1-234. [In Japanese.]
- 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

The properties of polygalacturonase activity produced by bran culture of the psychrophilic snow mold *Typhula ishikariensis* were investigated, and conditions for bran culture were examined. Polygalacturonase activity (40°C • pH4.5) which was produced in the bran culture of *Typhula ishikariensis* was 0.261 U/mL ± 4.43x10⁻³ (SE); CV8.98%. This activity was correspondent to 2.19% of the content of the psychrophilic snow mold *S. borealis* and 2.07% of the content of the mesophilic white mold *S. sclerotiorum*, so the value was very much low. However, for the activity at 5°C, the relative activity to the maximum activity at 50°C was 42.1%, in addition, the relative activity to

the activity at 40°C was 50.7%, indicating very high values. Thus, polygalacturonase activity of *Typhula ishikariensis* showed good cold adaptation which was very higher than not only the mesophile *S.sclerotiorum* but also the psychrophile *S.borealis*. Optimum pH for the enzyme reaction at 40°C was 5.0. On the other hand, the activity between pH4.5 and 5.5 showed ca. 97-98% of the activity at pH5.0, and therefore optimum pH range seemed to be wide. For the bran culture condition, *Typhula ishikariensis* grew well in the wetter condition than the psychrophile *S.borealis*.

Key words : *Typhula ishikariensis*; Psychrophile;
Polygalacturonase; Cold adaptation;
Cell wall degrading enzyme