

## 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<sup>1</sup>・高澤 俊英

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

Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA, Izumi SAITO<sup>1</sup>, 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

<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.

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 (Tomiyama 1955)、芝草であるペントグラス (Groves and Bowerman 1955; Jamalainen 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  $\alpha$ -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/cm<sup>2</sup>), 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 (A<sub>280</sub>) 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 A<sub>280</sub> の測定により確認し、A<sub>280</sub> 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 A<sub>280</sub> 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 (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 ( $\phi$ 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

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 ( $\phi$ 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 ( $\phi$ 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  $\alpha$ -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 ( $\phi$ 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。 $\gamma$ -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  $28.1 \pm 0.6$  (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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ molの還元糖を遊離する酵素量 (1  $\mu$ 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  $\mu$ gの範囲で作成した。標準曲線の傾きすなわちBSA 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

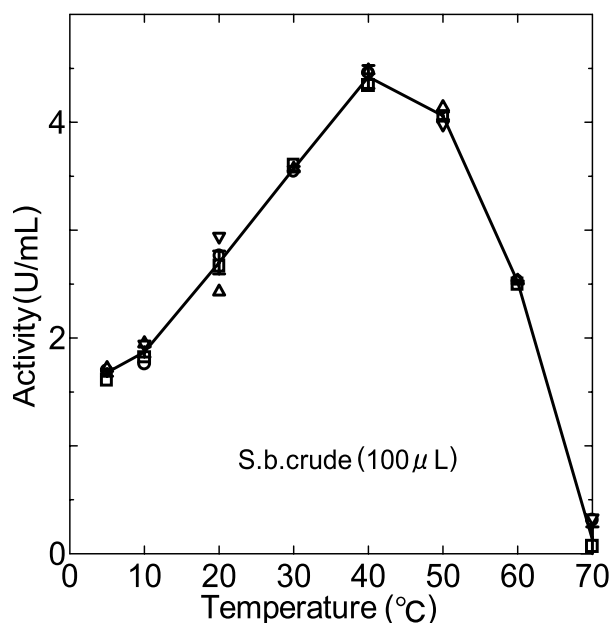


図1 *S.borealis* フスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性の温度依存性。 *S.borealis* 由来の粗抽出液中における PGase 活性を5°C~70°Cの範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4。

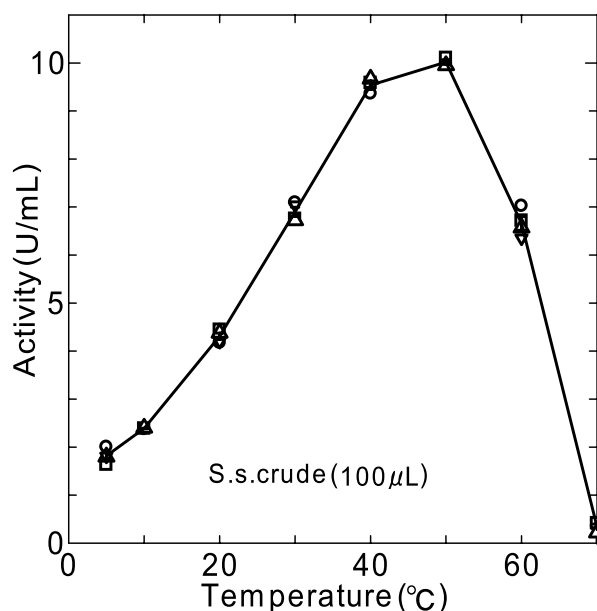


図2 *S. sclerotiorum* フスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性の温度依存性. *S. sclerotiorum* 由来の粗抽出液中における PGase 活性を 5 °C ~70 °C の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした. ○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4.

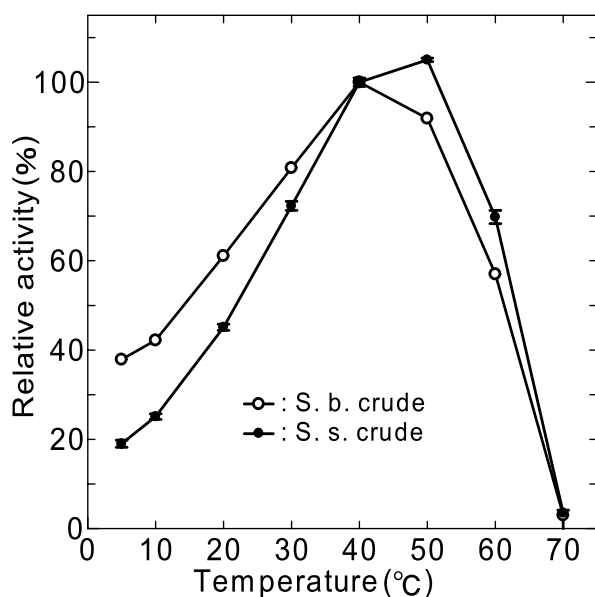


図3 *S. borealis* および *S. sclerotiorum* 各々のフスマ培養物由来粗抽出液中の PGase 活性. 各温度での PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40°Cでの活性値を100%とした相対活性値としてプロットし、エラーバー(±S.E.)と共に示した. ○, *S. borealis* 由来粗抽出液; ●, *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液.

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。

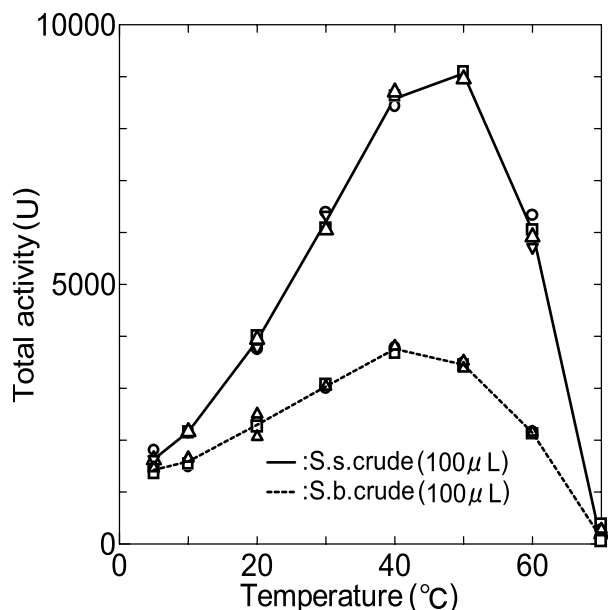


図4 *S. borealis* および *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液における全 PGase 活性. 各々の粗抽出液中における各温度での PGase 活性を、それぞれのフスマ培養物5フラスコから得られた粗抽出液の総体積中の活性として示した. ---, *S. borealis* 由来粗抽出液(総体積850mL); —, *S. sclerotiorum* 由来粗抽出液(総体積900mL); ○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4.

#### 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

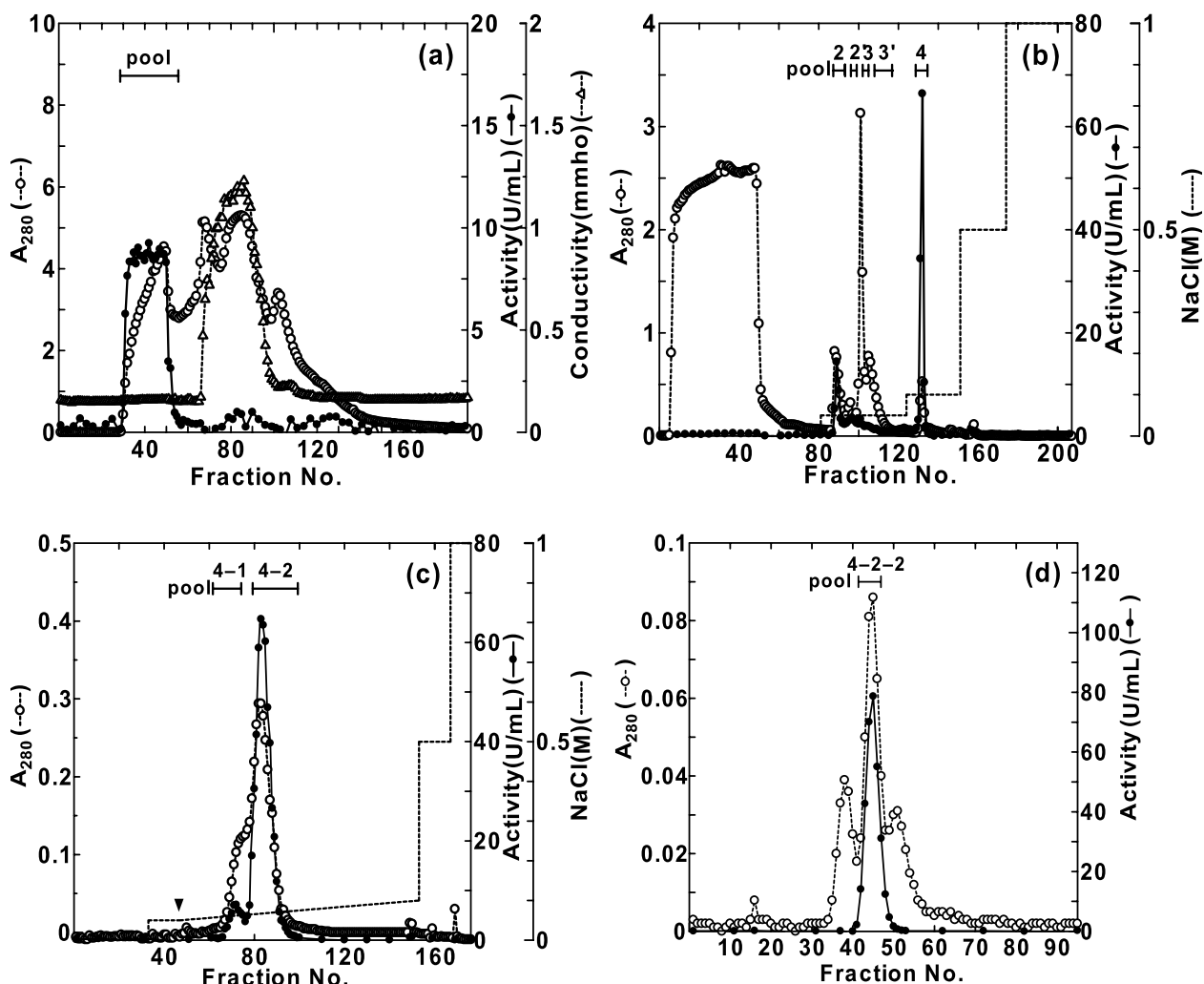


図5 *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) のクロマトグラフィー。(a) Gel filtration on Bio-Gel P-6 DG ( $\phi$  4.4cm  $\times$  95cm, 1444mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 78.0mL/h. (b) Chromatography in a stepwise manner (50mM, 0.1M NaCl) on CM-Toyopearl 650M ( $\phi$  2.6  $\times$  34cm, 180mL bed). Fraction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

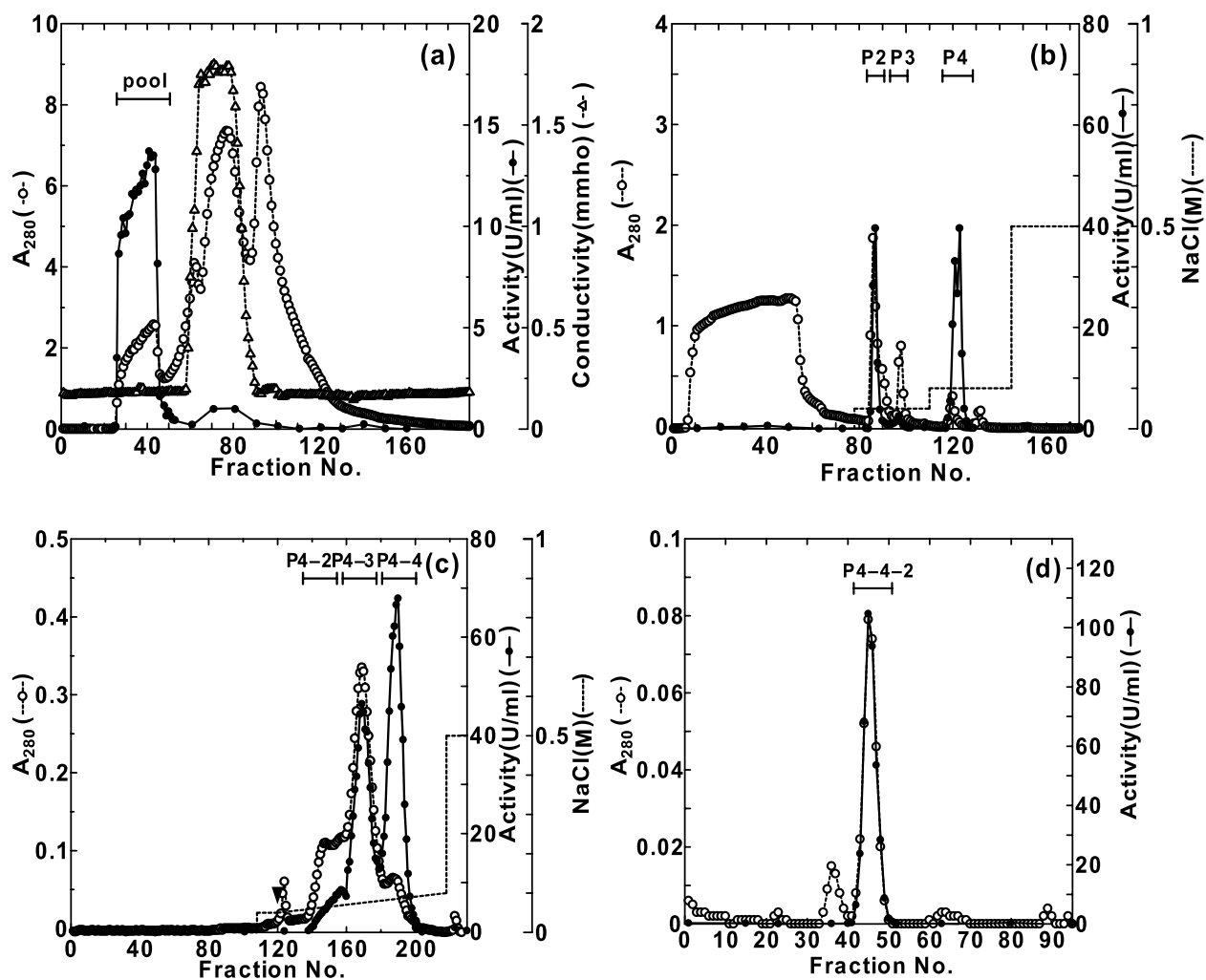


図6 *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) のクロマトグラフィー。(a) Gel filtration on Bio-Gel P-6 DG ( $\phi 4.4\text{cm} \times 95\text{cm}$ , 1444mL bed). Fraction size: 20mL/tube, flow rate: 86.0mL/h. (b) Chromatography in a stepwise manner (50mM, 0.1M NaCl) on CM-toyoppearl 650M ( $\phi 2.6 \times 34\text{cm}$ , 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-toyoppearl 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  $41.3\text{kDa}$ , *S.sclerotiorum*

由来 PGase I は  $40.2\text{kDa}$  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  $40.2\text{kDa}$ ) を持つことが SDS-PAGE の場合 ( $39.8$  および  $39.8\text{kDa}$ ) 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。



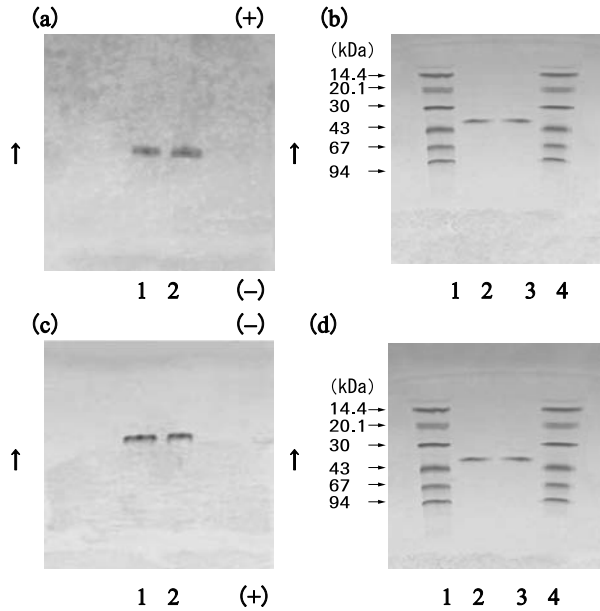


図7 *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I のポリアクリルアミドゲル電気泳動. 8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い, CBB R-250で染色した. (a) *S.borealis* P4-2-2 の nondenaturing PAGE (pH8.8). レーン 1, 2 : P4-2-2, 0.31  $\mu$ g. (b) *S.borealis* P4-2-2 の SDS-PAGE (pH8.5). レーン 1, 4 : 分子質量マーカータンパク質; レーン 2, 3 : P4-2-2, 0.20  $\mu$ g.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

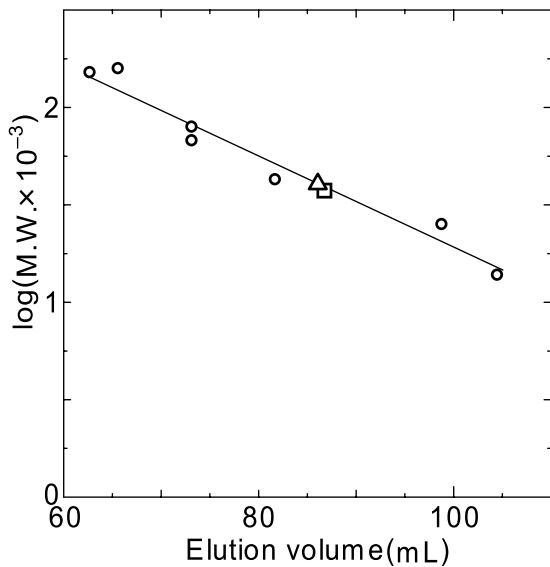


図9 Sephacryl S-200ゲルろ過カラム法による *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の溶出体積に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした. 標準曲線一次回帰式は  $y = -0.0239x + 3.67$  であった. 一次回帰式の相関係数は  $R = 0.9807$  であった. 各々の酵素の天然における分子質量は, *S.borealis* 由来 PGase I ( $\Delta$ ; 溶出体積 85.95 mL) は 41.3 kDa, *S.sclerotiorum*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

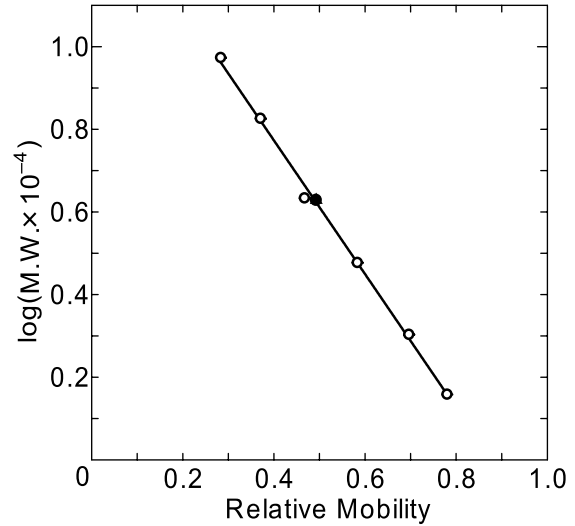


図8 SDS-PAGE による *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の移動度 (6データの平均値) に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした. 標準曲線一次回帰式は  $y = -1.62x + 1.42$  であった. 一次回帰式の相関係数は  $R = 0.9988$  であった. この電気泳動によって, 各々の試料の分子質量は *S.borealis* 由来 PGase I (p4-2-2 :  $\bullet$ ) は  $39.8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

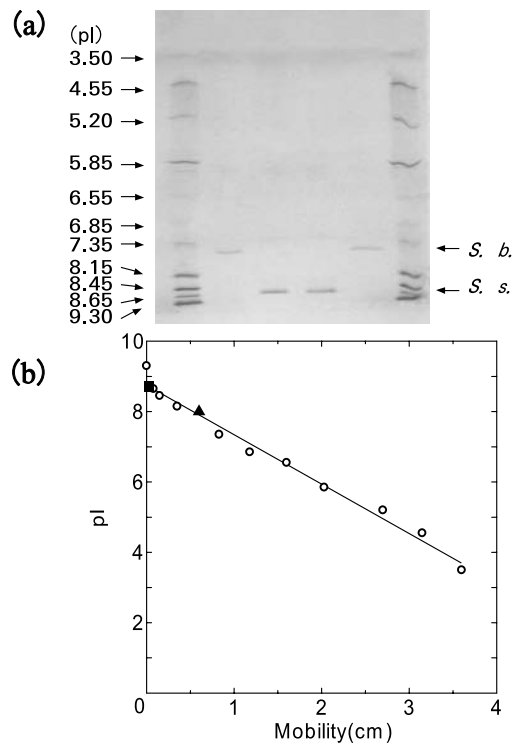


図10 IEF-PAGE による *S.borealis* および *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の等電点の決定. (a) IEF は, 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて, pH3-9の範囲で行い, ゲルは CBB R-250染色で染色した. レーン 1, 6 : pI マーカータンパク質; レーン 2, 5 : *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2); レーン 3, 4 : *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2). (b) pI マーカータンパク質の移動度に対して各々の pI をプロットした. 標準曲線の一次回帰式は  $y = -1.41x + 8.77$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L) に BSA 溶液 (0.520mg/mL, 0.468mg in 900  $\mu$ 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  $\mu$ 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

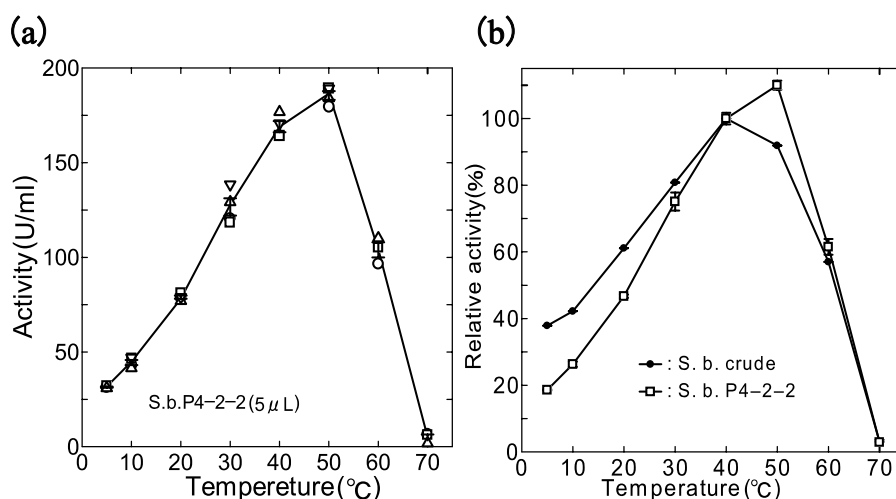


図11 *S.borealis* 由来 PGase I (P4-2-2) の活性の温度依存性. (a) *S.borealis* 由来 PGase I の PGase 活性を 5℃~70℃の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。○, データ1; □, データ2; △, データ3; ▽, データ4. (b) 各温度での *S.borealis* 由来 PGase I 及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40℃での活性値を100%とした相対活性値としてプロットし、エラーバー (±S.E.) と共に示した。—●—, *S.borealis* 由来粗抽出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

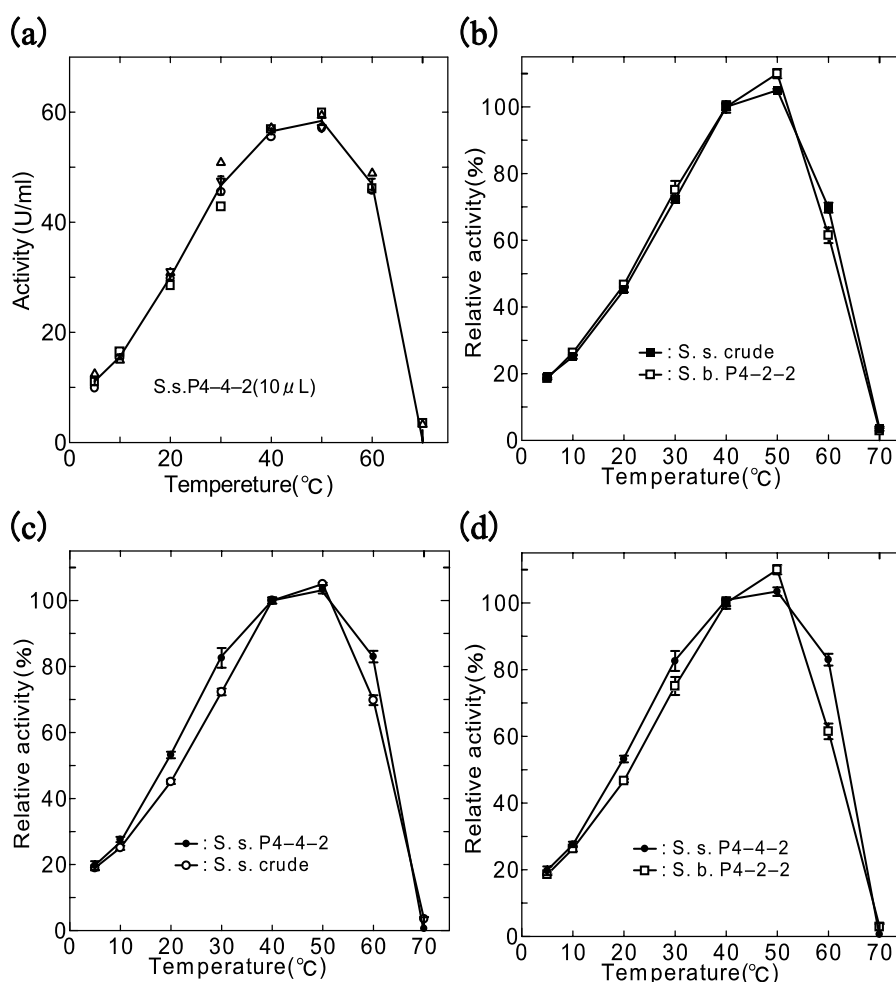


図12 *S.sclerotiorum* 由来 PGase I (P4-4-2) の活性の温度依存性. (a) *S.sclerotiorum* 由来 PGase I の PGase 活を 5°C~70°C の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした。O, データ1;  $\square$ , データ2;  $\triangle$ , データ3;  $\nabla$ , データ4. (b) 各温度での *S.sclerotiorum* 由来粗抽出液及び *S.borealis* 由来 PGase I の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40°C での活性値を 100% 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。— $\blacksquare$ —, *S.sclerotiorum* 由来粗抽出液; — $\square$ —, *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。— $\bullet$ —, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I; — $\circ$ —, *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。— $\bullet$ —, *S.sclerotiorum* 由来 PGase I; — $\square$ —, *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  $\mu$ 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 V<sub>0</sub> 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

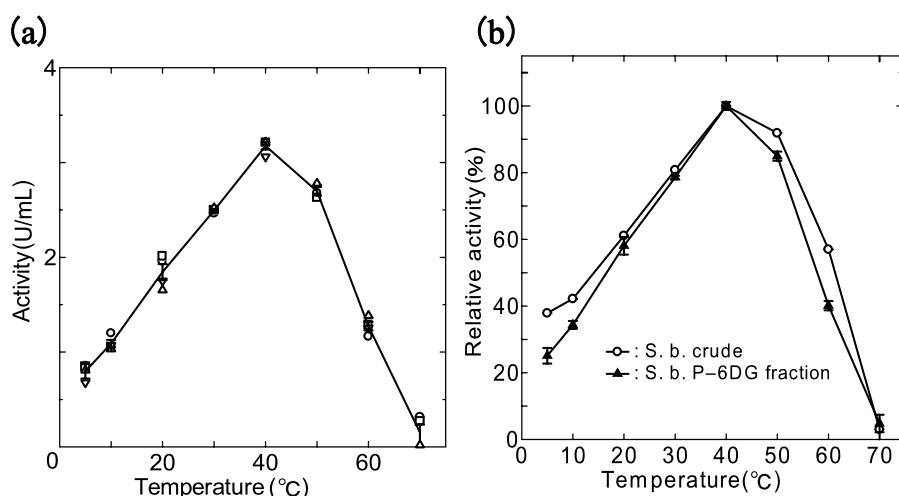


図13 *S.borealis* 由来 PGase の Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性. (a) *S.borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過クロマトグラフィー活性画分中における PGase 活性を 5℃~70℃の範囲で測定し、活性値(U/mL)をプロットした. ○, データ 1; □, データ 2; △, データ 3; ▽, データ 4. (b) 各温度での *S.borealis* 由来 PGase の P-6 DG 活性画分及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40℃での活性値を 100%とした相対活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/cm<sup>2</sup>) 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  $\mu$ 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 ( $\phi$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L, 3.84U, Total  $A_{280}$  : 3.57, Total protein : 0.238  $\mu$ g) と  $P_{II}$  (600  $\mu$ L, Total  $A_{280}$  : 7.45, Total protein : 48.8  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L, Total  $A_{280}$  : 4.47, Total protein : 27.4  $\mu$ g) を  $P_I$  (400  $\mu$ 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<br>(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<sub>I</sub> 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<sub>II</sub> 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<sub>I</sub> 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<sub>II</sub> (950 μL, Total A<sub>280</sub> : 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<sub>I</sub>) と低分子画分 (P<sub>II</sub>) 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 (V<sub>0</sub> 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 A<sub>280</sub> : 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 A<sub>280</sub> を測定して溶出曲線 (結果は示さない。) を作成し、V<sub>0</sub> ピークを活性画分 (8.2mL, Total activity : 23.0U, Total A<sub>280</sub> : 16.73, Total protein : 1.39mg) (活性回収率104%, A<sub>280</sub>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 V<sub>0</sub> 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

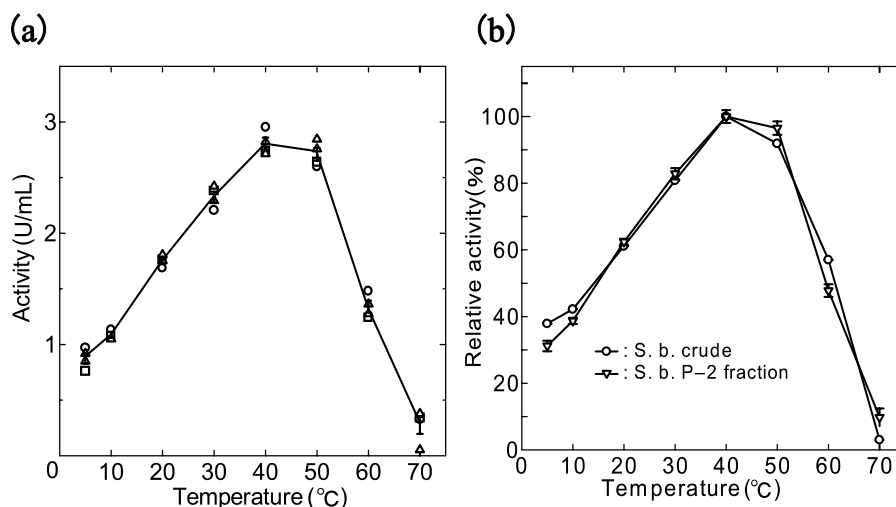


図14 *S. borealis* 由来 PGase 活性の Bio-Gel P-2 活性画分の温度依存性. (a) *S. borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-2 ゲルろ過クロマトグラフィー活性画分中における PGase 活性を 5℃~70℃ の範囲で測定し、活性値 (U/mL) をプロットした. ○, データ 1; □, データ 2; △, データ 3; ▽, データ 4. (b) 各温度での *S. borealis* 由来 PGase の P-2 活性画分及び粗抽出液の PGase 活性の 3 ないし 4 データの平均値を、40℃での活性値を 100% とした相対活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  $\mu$ 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（ $\phi$ 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  $\mu$ 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<br>(mL) | Activity<br>yield<br>(%) | Protein<br>yield<br>(%) | $A_{280}$<br>yield<br>(%) | Electric<br>conductivity<br>(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 <sup>a</sup><br>(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 <sup>b</sup><br>(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                                |

<sup>a</sup>Elution buffer：S.buffer containing 50mM NaCl. <sup>b</sup>Elution 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 ( $\phi$ 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*  $\alpha$ -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<br>(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<br>(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<br>(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%   |

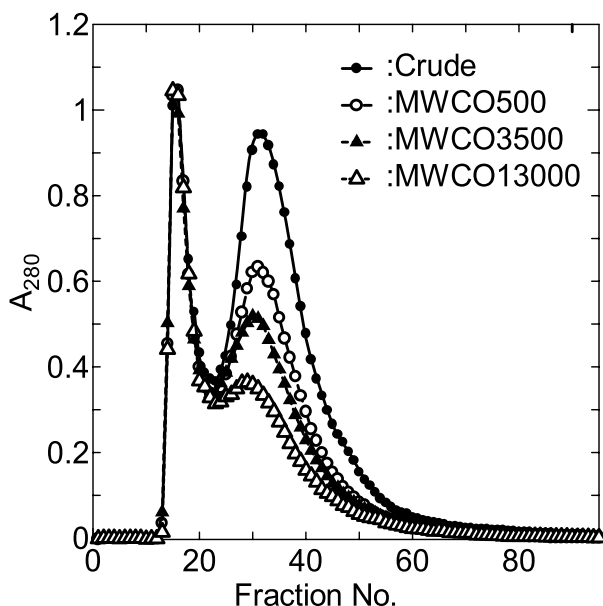


図15 保持限界分子量の異なる透析に供された *S.borealis* 由来粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。Column: Bio-Gel P-6 DG ( $\phi$  1.5cm  $\times$  11cm, 19.6mL bed), fraction size: 0.6mL/tube, flow rate: 45.0 mL/h. 透析された粗抽出液それぞれの1.0mLをカラムに供し, S.buffer で溶出した。各々の溶出曲線は粗抽出液溶出曲線 tubeNo.15の  $A_{280}$  値にノーマライズした。



- 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  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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