

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* ポリガラクトナーゼ活性。 硫酸アンモニウムによる活性阻害

井熊 武志・高橋 裕司・匂坂 慶子・齊藤 泉¹・高澤 俊英

Polygalacturonase activity of the wheat bran culture of
the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.
Apparently irreversible inhibition of enzyme activity by ammonium sulfate

Takeshi IKUMA, Yuji TAKAHASHI, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹ and Toshihide TAKASAWA
(受理：2002年11月30日)

摘 旨

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* からの粗抽出液中のポリガラクトナーゼ活性に対する硫酸アンモニウム及び塩化アンモニウムの影響を調べた。ca.1.2M 硫酸アンモニウム暴露によって ca.90%の活性が阻害された。そしてその阻害は一見不可逆的だった。一方、塩化アンモニウムは ca.3.7-4.7M 存在下において活性を完全に阻害したが、その阻害は可逆的だった。更に PGase 活性に対する硫酸アンモニウム分画法によって、活性を定量的に回収出来なかったため、PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの不可逆的阻害の仕組みは非常に強い slow-binding inhibition 即ち時間依存性可逆阻害であると思われる。

キーワード：ポリガラクトナーゼ、活性阻害、抗カオトロピックイオン、
psychrophile, *Sclerotinia borealis*

緒 論

硫酸アンモニウムはタンパク質分子の精製・単離において粗分画法の試薬として非常に繁用されている。硫酸アンモニウム法はタンパク質の溶解度の違いによる分別沈殿法である。分別沈殿法には有機溶剤に対する溶解性の違いを利用したものもあり、有機溶剤としてはエタノール及びアセトン等が使用される。しかしながら、エタノール及びアセトン等の有機溶剤に対して不安定なタンパク質も数多くあり、この点からも硫酸アンモニウム分画法は非常に多くのタンパク質の分離・精製に於いて用いられてきた。

我々は好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* 及び

常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* の宿主での発症においてポリガラクトナーゼ (PGase) がどのように関与するのかを調べてきた。

PGase 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 (PGA) 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 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;

帯広畜産大学畜産科学科

Department of Animal Science and Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社農業科学研究所

¹ Agrosience Research Laboratories, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

Shastri et al. 1988; Tucker et al. 1981; Cervone et al. 1977)。この酵素とセルロース分解酵素等が細胞間隙物質と細胞壁に作用し、植物表面に傷を付け、葉や茎を腐敗させると考えられる。従って、PGase は、*S. borealis* 及び *S. sclerotiorum* の宿主への病原性に深く関与しているものと思われる。

更に好冷性雪腐病菌 *S. borealis* は低温下で発症するので、雪腐病菌の低温適応機構が発症機構にも密接に関係していると思われる。従って我々は雪腐菌核病菌 *S. borealis* PGase 活性の低温適応機構の解明も進めている。

低温性微生物の低温適応機構に関する報告はあまり多くなく、更にタンパク質レベルでの適応機構 (Hoyoux et al. 2001; Wintrode et al. 2000; Georlette et al. 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Davail et al. 1994) の解明に関しては特に少ない。

これらの目的のためには、好冷菌 *S. borealis* 及び常温菌 *S. sclerotiorum* から PGase を単離精製することが必要不可欠である。それ故に本研究では硫酸アンモニウム分画法が *S. borealis* フスマ培養 PGase の単離に於いて用いることが出来るかどうかを明らかにするために *S. borealis* 粗抽出液 PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響を調べた。

実験材料及び方法

試薬

試薬は以下のものを使用した。Potato dextrose agar (PDA) (Difco Laboratories); 小麦フスマ (十勝米穀); 酢酸, 酢酸ナトリウム, 水酸化ナトリウム, 無水炭酸ナトリウム, フェリシアン化カリウム, 硫酸鉄 (III) アンモニウム・12水和物 (和光純薬工業, 特級); Hyflo super-cel (Celite Co./和光純薬工業); PGA (Sigma, From orange); ドデシル硫酸ナトリウム (生化学用), 硫酸 (精密分析用) (和光純薬工業); 硫酸アンモニウム, 塩化アンモニウム (関東化学, 特級)。

菌体の培養

PDA 培地での培養 PDA 3.9 g を熱水80mL に加え、加熱攪拌して完全に溶解させ、これをイオン交換蒸留水 (以下純水) で100mL にメスアップし、3.9% (w/v) PDA 溶液を調製した。この PDA 溶液を三角フラスコ中で、121°C・20分間オートクレーブ滅菌した。滅菌 PDA 溶液を20mL ずつ滅菌ペトリ皿に分注して室温まで放冷し固くさせた (クリーンベンチ使用)。スラント培地に保存された菌糸を竹串を用いて無菌的に切り出し、ペトリ皿の PDA 培地上に移植し、5°C で約 6 ヶ月間静置培養した。

小麦フスマ培地での培養 ビーカーに小麦フスマ30g を入れ、純水50mL を加えて良く混和し、500mL 三角フラスコ中で綿栓をしてオートクレーブ滅菌した。このフスマ培地を室温まで十分に放冷後、これにペトリ皿で培養した菌糸を PDA 培地とともに加え (5 三角フラスコ培養/ペトリ培養 1 枚), 5°C で約 6 ヶ月間静置培養した。

粗抽出液の調製

小麦フスマ培地上で培養した *S. borealis* からの粗抽出液の調製は培養三角フラスコ 1 個あたり10mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) (以下バッファー A) 200mL で行った。

まず、フスマ培養された菌糸とフスマ培地を共にミキサーに移した。三角フラスコ内壁に付着した菌糸をバッファー A を加えて削りだし (プラスチック製スパチュラ使用), ミキサー中に加えた。この操作を 3 回繰り返して、三角フラスコの内容物を定量的にミキサーに移した。5 個の三角フラスコ培養をミキサーに入れ、最後に残存バッファー A をミキサーに加えた。ミキサーの内容物を 5 秒間攪拌 (弱) 後、5°C で 1 時間静置した。この操作を 2 回繰り返した。

最後に軽く攪拌後、この混合物を 2 重のガーゼを用い、手 (ビニルグローブ着用) で絞ってろ過し、そのろ液 ca.950mL をメートルグラス (1 L) に集めた。ガーゼろ過したろ液から更に不溶性物質を除くために、ろ過補助剤 Hyflo super-cel 30g を加えて 20 分間攪拌後、吸引ろ過 (定量用ろ紙 No. 5 B, アドバンテック) した。ろ液の pH を酢酸を加えて 4.5 に調整した。この溶液を一晩静置 (5°C) 後、生じた沈殿を除くため再度吸引ろ過した。

最後にメンブランろ過 (0.45 μ m セルロスアセテート膜, アドバンテック) 滅菌を行った。このろ液を粗抽出液 (ca.850~880mL) として、ポリビンに分注して冷凍保存し、使用する際は解凍後 5°C で保存した。

PGase 活性の測定

PGA 基質溶液の正確な濃度は、高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) で決定した。また還元糖濃度を高感度鉄試薬法 (Ikuma et al. 2001) で決定し、これらの結果から平均重合度を求めた。平均重合度は 29.6 ± 1.9 (S.E.) であった。

粗抽出液の PGase 活性は、酵素反応総体積 2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液 2.0mL, 粗抽出液とバッファー A とを合わせて 0.1 mL) において経時変化における還元糖を高感度鉄試薬法 (Ikuma et al. 2001) により決定し、

その遊離速度から求めた。

即ち 1% (w/v) PGA 溶液 2.020 mL (フィンピペット) を試験管 (13x100mm) に取り、40°C・10分間プレインキュベートした。その間に酵素反応停止液として試験管 (13x100mm) 6本に純水 490 μ L (フィンピペット) 及び高感度鉄試薬法試薬 1 (0.53% (w/v) 無水炭酸ナトリウム-0.065% (w/v) シアン化カリウム溶液) 500 μ L を取り混合した。1本の試験管には 0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 μ L (エッペンドルフ) を加え鉄試薬法ブランクとした。2本の試験管にはプレインキュベートした基質溶液 10 μ L ずつを加え酵素反応 0 分 (基質ブランク) における基質溶液の還元糖を求めるために使用した。基質溶液 2.0 mL にバッファー A 50 μ L 及び粗抽出液 50 μ L を加え酵素反応を開始した。開始後一定時間毎 (3, 6, 及び 9 分) に反応混液から 10 μ L を停止液にピペットアウトした。次に、試薬 2 (0.05% (w/v) フェリシアン化カリウム溶液) 500 μ L を加え、100°C (アルミドライバス) で 15 分間加熱し酸化還元反応を行わせた。その後 -20°C に 5 分間暴露し室温まで戻した後、試薬 3 (0.015% (w/v) 硫酸鉄 (III) アンモニウム 12 水和物-0.14% (v/v) 濃硫酸-0.2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液) 2.5 mL を加え、30°C・15 分間インキュベートしベルリン青発色操作を行った。この溶液の A_{690} (ブラックフェイスマイクロセル) から D-ガラクト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 μ L 中の各時間における還元糖 (μ g) を求めた。又、0 分における還元糖については、粗抽出液中に存在する鉄試薬法陽性の還元性物質を D-GA 換算 μ g (酵素ブランク) で予め見積もり、それを基質溶液中の還元糖量 (基質ブランク) に加算することにより補正した。更に、それら還元糖量を D-ガラクトン酸換算 μ mol に変換後、反応混液 2.1 mL における還元糖遊離速度 (μ mol/min) を求めた。遊離速度の再現性は 3~4 重の実験値の相対試料標準偏差 (CV 値) によって調べた。

活性の 1 U は還元糖の遊離速度 1 μ mol/min と定義した。また比活性は μ mol/min/mg で示した。

なお酵素活性ブランク実験は 1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液 2 mL にバッファー A 0.1 mL を加え、酵素活性測定時と同様に還元糖の経時変化を追跡し、その遊離速度から活性ブランクを求めた。

酵素活性に対する硫酸アンモニウム及び塩化アンモニウムの影響

粗抽出液の塩への暴露については、塩を粗抽出液に溶解して、2 時間経過後に、PGase 活性の測定法に従っ

て粗抽出液 50 μ L の酵素活性を測定した。暴露処理ブランク活性については、塩をバッファー A に溶かし、酵素活性測定時にバッファー A の代わりに添加 (50 μ L) した。その後無処理抽出液 50 μ L を加えて酵素反応を開始した。

暴露塩濃度に等しい、塩存在下活性測定実験においては、硫酸アンモニウムでは 0.03 M、塩化アンモニウムでは 0.1 M を超える濃度については基質溶液中に塩を溶解する系で行った。それ以下の濃度では、塩をバッファー A に溶解したものを暴露処理ブランク活性測定と同様に添加した。

硫酸アンモニウム分画法

粗抽出液各 1 mL に硫酸アンモニウムを加えて各々 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, および 90% 飽和度にした。氷浴中で 2 時間静置後、遠心分離 (15k rpm, 15min, 5°C) して沈殿を集めた。これらの沈殿にバッファー A を加えて溶解させて 1 mL にメスアップした。遠心分離後これらの溶液 50 μ L の活性を測定して、無処理活性に対して回収された活性の割合を求めた。

結果及び考察

PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響

粗抽出液中の PGase 活性に対する硫酸アンモニウムの影響を図 1 に示す。

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 由来 PGase の精製ステップにおいて、硫酸アンモニウム 90% 飽和による濃縮

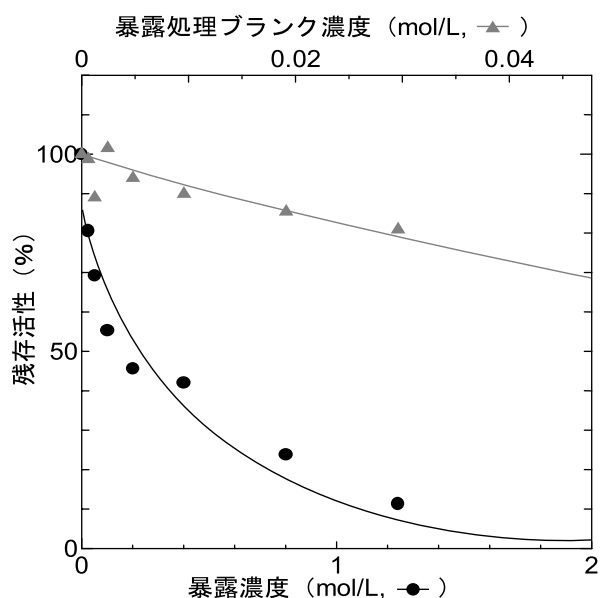


図 1 粗抽出液の硫酸アンモニウム暴露後の活性および処理ブランク濃度における活性。酵素活性の測定は 2.1 mL 系において各濃度の硫酸アンモニウムを含む粗抽出液 50 μ L で行った。処理ブランク測定は、硫酸アンモニウムを溶解した 0.01 M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 50 μ L を添加して、粗抽出液 50 μ L で行った。

操作を行った後、サンプルの PGase 比活性が直前のステップのものに比べて大きく低下した。その後、精製ステップを経るに従って比活性が徐々に回復した。このような事実は、硫酸アンモニウムが PGase 活性を阻害し、且つそれは PGase に一旦結合してしまうと PGase 分子から遊離しにくい性質を有することによって説明可能である。

それ故に、*S.borealis* 粗抽出液に硫酸アンモニウムを溶解して、PGase を硫酸アンモニウムに 5℃・2 時間暴露後、それら各 50 μ L の PGase 活性を測定した。活性は硫酸アンモニウム無添加の粗抽出液中の PGase 活性をコントロールとした残存活性として求めた。粗抽出液中の硫酸アンモニウム濃度は 2.1mL 活性測定系において 1/42 希釈されるので、図 1 の結果は各濃度の硫酸アンモニウム暴露に対する PGase 活性の硫酸アンモニウム濃度低下による回復の割合を示している。図 1 に示すように、暴露濃度が ca.25-50mM では残存活性は 70-80% で、低濃度暴露によって活性が強く阻害され、*S.borealis* PGase 活性は *S.sclerotiorum* のものに比べて硫酸アンモニウムに対する感受性が高かった。ca.0.1-0.2M では ca.50% の残存活性を示し、0.8M 暴露では残存活性は ca.25% しかなかった。更に ca.1.2M 暴露では、残存活性は約 10% で、約 90% の活性が阻害された。一方、常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の場合には、暴露濃度 0-ca.50mM では活性はほとんど阻害されず、*S.borealis* に比べて硫酸アンモニウムに対する感受性が低かった。暴露濃度 ca.1.2M においては、残存活性は ca.20% で、高濃度暴露では *S.borealis* の場合に比べて残存活性が ca.10% 高く、阻害されにくかった。以上の結果 PGase 活性は硫酸アンモニウム暴露によって阻害を受けることが判った。

次に、粗抽出液中の硫酸アンモニウム濃度は活性測定時には 1/42 に希釈されるので、暴露濃度の 1/42 に相当する活性測定時濃度即ち暴露処理ブランク濃度では PGase 活性がどの程度阻害を受けるのかを調べた。暴露濃度相当量をバッファー A 50 μ L に溶解して活性測定直前に基質溶液に加え、その後粗抽出液 50 μ L を添加して酵素反応を開始した。活性測定時硫酸アンモニウム濃度（暴露処理ブランク濃度）ca.0.6-30mM においてこれら PGase 活性はかなり阻害を受け、ca.30mM において残存活性は ca.80% で、活性は 20% 阻害された（図 1）。これらの結果を総合的に判断すると、もし硫酸アンモニウムによる活性阻害が可逆的であれば、硫酸アンモニウム暴露による活性阻害は、活性測定時には暴露処理ブランク濃度の活性まで回復すると考えられるが、図 1 から明らかなように、硫酸アンモニウム暴露によって阻害された活性は、活性測定時においても阻害されたままで、

暴露処理ブランク濃度での活性値まで回復しなかった。

次に、硫酸アンモニウム暴露による活性阻害が、活性測定時にもし回復しているとするれば、どの程度回復しているかを調べた。即ち活性測定時の硫酸アンモニウム濃度を暴露処理に於ける硫酸アンモニウム濃度と同濃度添加した場合の PGase 活性を測定した。結果は図 2 に示す。図 2 では、図 1 での硫酸アンモニウム暴露後の残存活性も同時に示してある。図 2 から明らかなように、PGase 活性は、活性測定時に存在する硫酸アンモニウムによって濃度依存的に阻害された。そして、阻害の程度は硫酸アンモニウム暴露の場合より若干強かった。これらの事実から、硫酸アンモニウム暴露によって阻害された PGase 活性は活性測定時に硫酸アンモニウム濃度が 1/42 に低下してもほとんど回復しなかったと結論できる。以上の結果、PGase 活性は抗カオトロピック硫酸アンモニウムによって強く阻害を受け、この阻害は不可逆的であったと結論される。

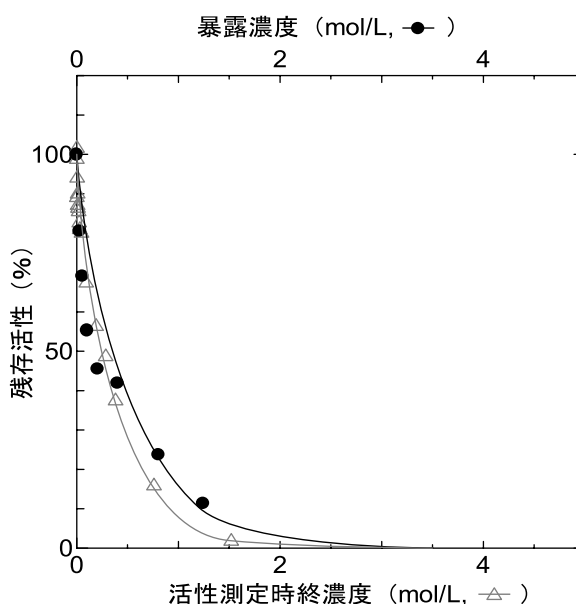


図 2 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性測定時硫酸アンモニウム濃度が暴露濃度と同じ場合の活性。酵素活性の測定は 2.1mL 系において粗抽出液 50 μ L で行った。活性測定時硫酸アンモニウム終濃度については、終濃度 0.03M 未満は硫酸アンモニウムを溶解した 0.01M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 50 μ L を用い、終濃度 0.03M を超えるものは硫酸アンモニウムを溶解した 1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 2mL を使用した。硫酸アンモニウム暴露実験の結果も同時に示してある。

PGase 活性に対する塩化アンモニウムの影響

粗抽出液中 PGase 活性の塩化アンモニウムによる影響は図 3 及び図 4 に示す。

図 1 及び図 2 から明らかなように、PGase 活性は硫酸アンモニウム暴露によって強く阻害を受け、その阻害は不可逆的であった。それ故に、同様にアンモニウムイオンを含む塩化アンモニウムによって PGase 活性がど

のような影響を受けるかを調べた。まず図3に示すように、塩化アンモニウム暴露によって活性が阻害されるかを調べた。その結果、ca.3.7M 塩化アンモニウム暴露でさえも活性測定時における活性阻害はca.15%にしかならず、塩化アンモニウム暴露による活性阻害は小さいものと結論できる。更に、塩化アンモニウム暴露濃度は活性測定時1/42に希釈される。それ故、活性測定時、暴露濃度の1/42の終濃度（暴露処理ブランク濃度）（0-ca.0.09M）の塩化アンモニウムを含むように調製した、即ち暴露濃度を含むバッファーAを活性測定時に添加（50 μ L）し、活性阻害の程度を調べた。その結果、暴露処理ブランク濃度によるPGase活性の阻害の傾向は塩化アンモニウム暴露濃度による阻害のものと同様であった。従って、これらの事実からは塩化アンモニウム暴露によるPGase活性に対する強い阻害があったかどうかは結論できなかった。

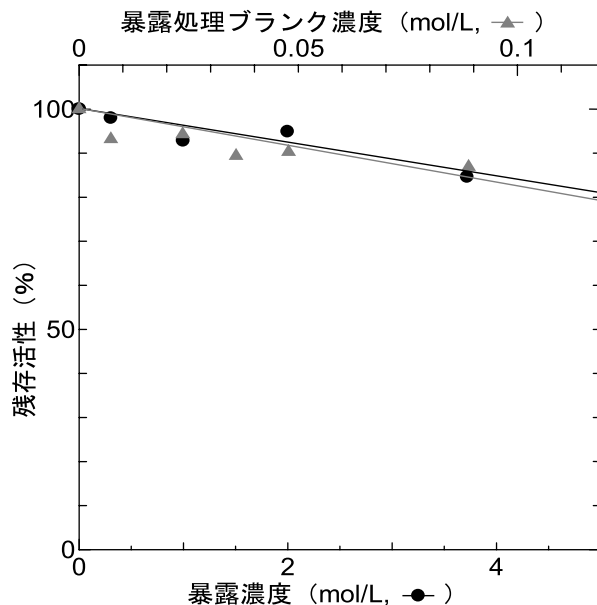


図3 粗抽出液の塩化アンモニウム暴露後の活性および処理ブランク濃度における活性。酵素活性の測定は2.1mL系において各濃度の塩化アンモニウムを含む粗抽出液50 μ Lで行った。処理ブランク測定は、塩化アンモニウムを溶解した0.01M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)50 μ Lを添加して、粗抽出液50 μ Lで行った。

次に、PGase活性が塩化アンモニウムの存在によって強い阻害を受けるかどうかを明らかにするために、活性測定系に暴露濃度と同濃度の塩化アンモニウムを添加して残存活性を調べた。図4に示すように、暴露処理ブランク濃度（0-ca.0.09M）の塩化アンモニウム存在下では、PGase活性はca.15%までの阻害しか観察されなかったが、ca.0.6M 塩化アンモニウムによってca.50%の活性阻害がかかり、2Mで96%が阻害され、ca.3.7-4.7Mではほぼ完全に阻害された。図4には比較のために塩化アンモニウム暴露に対する残存活性の推移も同時

に示してある。図4の結果から、PGase活性は塩化アンモニウムに対する暴露によって阻害されたが、その後、活性測定系において塩化アンモニウム濃度が低下した場合には活性は回復したと結論できる。従って、PGase活性に対して塩化アンモニウムは可逆的に阻害したことが明らかになった。

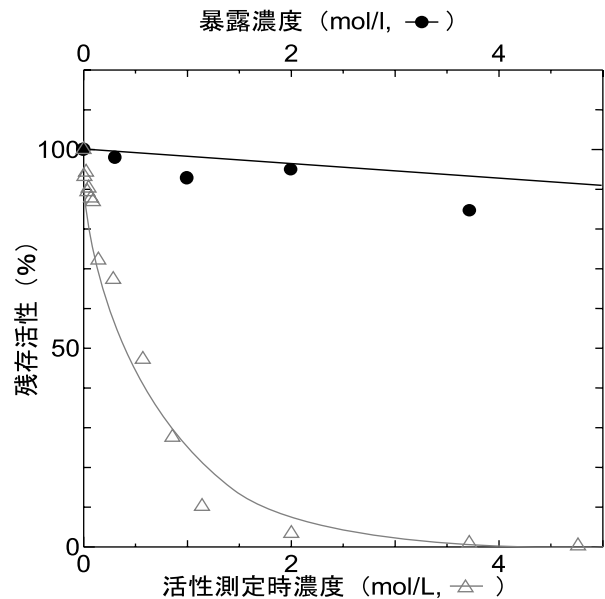


図4 粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性測定時塩化アンモニウム濃度が暴露濃度と同じ場合の活性。酵素活性の測定は2.1mL系において粗抽出液50 μ Lで行った。活性測定時塩化アンモニウム終濃度については、終濃度0.1M未満は塩化アンモニウムを溶解した0.01M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)50 μ Lを用い、終濃度0.1Mを超えるものは塩化アンモニウムを溶解した1%(w/v)PGA-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.5)2mLを使用した。塩化アンモニウム暴露実験の結果も同時に示してある。

以上の結果をまとめると、硫酸アンモニウムも塩化アンモニウムもPGase活性を阻害するが、前者は不可逆的で後者は可逆的であると結論される。

更に、この阻害様式の違いを両者の構成イオンの違いに求めると、 SO_4^{2-} イオンがPGaseに不可逆阻害的に作用し、一方 Cl^- イオンはPGaseに可逆阻害的に作用するものと推定される。

硫酸アンモニウム分画法

粗抽出液1mLを20, 30, 40, 50, 60, 70, 80及び90%飽和度に暴露した。生じた沈殿を遠心分離によって集め、それらの沈殿をバッファーAに溶解後1mLにした。その後、それらの溶液50 μ Lを用いて活性を測定した。結果は表1に示す。表から明らかのように、30-40%飽和度においてはPGase及びその他のタンパク質は殆ど回収されなかった。80%飽和度においては活性のca.42%が回収されたが、90%飽和度によってca.59%の活性しか回収出来なかった。80-90%飽和度におけるタンパク

表 1. 硫酸アンモニウム分画法における PGase 活性及びタンパク質の回収率. 粗抽出液 1 mL を処理後, 10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) に溶解して 1 mL にした. それらの溶液から 50 μ L の活性を測定した.

飽和度 (%)	0	20	30	40	50	60	70	80	90
活性 (U)	9.25	0.410	0.310	0.576	1.55	2.22	3.01	3.88	5.43
回収率 (%)	100	4.43	3.35	6.22	16.8	24.0	32.5	41.9	58.7
タンパク質 (mg)	0.49	0.00478	0.00618	0.0163	0.191	0.326	0.362	0.430	0.435
回収率 (%)	100	0.972	1.26	3.31	38.8	66.3	73.6	87.4	88.4

質の回収率は87-88%であったので, 粗抽出液中のタンパク質の殆どが90%飽和度にするによって回収されたと考えられる。従って, PGase 活性の回収率が低かったのは硫酸アンモニウム分画法の不手際によるものではない。以上の結果, *S. borealis* から PGase を単離する際に硫酸アンモニウム分画法を採用しない方がよいと結論される。

硫酸アンモニウム30%飽和暴露後の残存活性が ca.10%で不可逆的活性阻害が観察されたにもかかわらず, 硫酸アンモニウム分画法において PGase 活性が ca.59%回収されたのは分画処理後活性測定までの時間を要したことが理由と考えられる。

従って硫酸アンモニウムによる PGase 活性の一見不可逆的阻害は SO_4^{2-} イオンの PGase への slow-binding inhibition 即ち時間依存性可逆阻害であると思われる。更に, その程度は, 常温性菌核病菌 *S. sclerotiorum* PGase に対する slow-binding inhibition に較べて非常に強いと考えられる。その理由としては, *S. borealis* 硫酸分画法に於ける活性回収率は *S. sclerotiorum* の場合 (ca.90%) (unpublished data) に較べて非常に低かった点が挙げられる。

参考文献

- 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* A5. *Eur. J. Biochem.* **244**: 186-191.
- Georlette, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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

We examined the effect of ammonium sulfate and ammonium chloride on polygalacturonase activity of crude extract from a cultured psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. About 90% activity was inhibited by the ca. 1.2M ammonium sulfate exposure, and the interference was apparently irreversible. In the meantime, though ammonium chloride at the concentrations of ca. 3.7-4.7M perfectly inhibited the activity, the interference was reversible. In addition, the mechanism of the apparently irreversible interference of ammonium sulfate with the PGase activity seems to be a very strong slow-binding inhibition, namely, a time dependent reversible inhibition, because the activity was not recovered quantitatively by ammonium sulfate fractionation to the PGase activity.

Keywords: polygalacturonase; activity inhibition; anticaotropic ion; psychrophile; *Sclerotinia borealis*