

低温性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia nivalis* の ポリガラクトンナーゼ活性の低温適応

池浦 真奈美・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity from a cultured
psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis*.

Manami IKEURA, Keiko SAGISAKA, Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA
(受理：2002年11月30日)

要 旨

低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* 菌株の培養温度及び培養期間と PGase 活性について検討を行った結果、5℃培養では2-3ヶ月で、20℃培養では2-3週間で定常期に達した。PGase 活性(40℃)は、5℃で培養した場合に、20℃培養よりも、約2倍高かった。このことは、*S. nivalis* が低温性雪腐菌核病菌であり低温での発病にポリガラクトンナーゼ(PGase)が関係していることを強く示唆している。

5℃及び20℃培養粗抽出液のPGase活性のpH依存性については両者に顕著な差はなかった。しかしながら温度依存性においては、5℃培養PGase活性が、40℃以下の温度域に於いて20℃培養のものよりも相対活性が約10%高く低温適応現象が観察された。これらの事実から、*S. nivalis* は低温で生育したときに、20℃培養とは性質の異なる、より低温に適応したPGase活性を産生することが明らかになった。5℃培養に於いて産生されるPGase活性の低温適応現象は、Bio-Gel P-6 DGゲル濾過クロマトグラフィーによって低分子を除いた後も同様に観察されたので、好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* において認められたPGase活性の低温適応現象に於ける低分子の関与の可能性は低いものと考えられる。従って低温発現PGase活性の低温適応現象はPGaseアイソザイム自身の構造に起因するものと考えられる。

温度安定性は、5℃培養PGase活性の方が20-30℃の常温域で20℃培養PGase活性より不安定であり、低温適応酵素活性の特徴(Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. *Extremophiles*. 5: 313-321; Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.)を示した。しかしながら40℃以上の高温域での安定性については20℃培養PGase活性とほぼ同様の傾向を与え、常温発現酵素活性と大きな違いは観察されなかった。

キーワード：ポリガラクトンナーゼ、低温酵素、好冷性酵素、低温適応、低温菌

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.

緒 論

地球上の生物圏の約80%が低温環境であり、多くの微生物が低温条件で生息している。低温で生育可能な菌は、通常の温度（20-30℃）にさらされると生存できない好冷菌（psychrophiles）と、常温でも生育可能な低温菌（耐冷菌；psychrotrophs）とに分類される。低温菌は低温貯蔵された食品など人工の低温環境からも分離されるが、好冷菌については極地や海洋中など、恒常的に低温を保っている環境中に生息しているものが大部分を占める。

Sclerotinia nivalis は子囊菌類・ビョウタケ目・キンカクキン科に属し、主に北海道地域に於いて雪腐菌核病を引き起こす低温菌である（Saito 1997）。*S.nivalis* による雪腐菌核病は積雪下で感染した植物が雪解け後発症し、乾燥して葉や茎が灰白色となり、枯死した茎葉には直径3-4 mmの黒色の菌核が形成される。*S.nivalis* は多犯性であり、セリ科（ニンジン、トウキ）、キク科（ゴボウ、ブタクサ、キランソウ、ジュウニヒトエ）、オオバコ科（ハラオオバコ）など多くの双子葉植物に感染する。菌糸成長の最適温度は20℃であり、この点では常温菌と考えられるが耐冷性を有する点から低温菌に分類され、この菌が天然において病原性を示すのは低温で生育したときのみである。

病原性の発現には菌体が植物細胞壁を分解し、宿主へ侵入することが必要であり、そのために細胞外酵素が分泌される。その中でも特にペクチナーゼは植物一次細胞壁の主要成分であり植物細胞間隙物質であるペクチン質を分解し、植物の組織崩壊（マセレーション）に重要な働きをすると考えられている。従って、ペクチナーゼ活性は病原菌の病原性に深く関与しているものと考えられる。

ここではペクチナーゼの1つであるポリガラクトンナーゼ活性の性質を、低温菌 *S.nivalis* について調べた。ペクチン質はD-ガラクトン酸が α -1,4結合により重合したポリガラクトン酸を骨格とし、更にポリガラクトン酸残基のカルボキシル基の一部がメチルエステル化された物で、メチルエステル化率の低い順にペクチン酸、ペクチン及びペクチニン酸に分類される。ポリガラクトンナーゼはポリガラクトン酸またはペクチン酸の非メチルエステル化 α -1,4結合を加水分解する酵素である。

この酵素は、これまでに菌類（Takahashi et al. 2002; Takasawa et al. 1997; Waksman et al. 1991; Kester and Visser 1990; Schejter and Marcus 1988）、細菌（Roberts et al. 1988; Nasuno and Starr 1966）、酵母（Gognies 2001; Blanco et al. 1994）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。

本研究では、微生物の低温環境への適応の仕組みを酵素タンパク質レベルからアプローチすることを目的として、低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の培養温度の違いがポリガラクトンナーゼ産生にどのような影響を与えるかを調べるために、5℃培養粗抽出液中に含まれるポリガラクトンナーゼ活性の性質について20℃培養のものと比較検討を行った。更に5℃培養粗抽出液については、Bio Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィーによって低分子（-6 000Da）を除いた後のポリガラクトンナーゼ活性の性質を調べた。

材料及び実験方法

試薬

試薬は以下の会社から購入したものを使用した。

Potato dextrose agar（以下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、リン酸（85%（w/w））、メタノール（MeOH）（99.8%（w/w））、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）；ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDS）（生化学用）、硫酸（精密分析用）、アジ化ナトリウム（化学用）（和光純薬工業）；ポリガラクトン酸（以下PGA）（from orange）、3-[N-morpholino] propane sulonic acid（以下MOPS）、ウシ血清アルブミン（以下BSA）（crystallized and lyophilized、窒素分14.8%（w/w））（Sigma）；クエン酸（関東化学、特級）；Coomassie brilliant blue（以下CBB）G-250（半井化学薬品、Specially prepared reagent, Lot No. M7R3031）；Bio-Gel P-6 DG（Bio-Rad）。

菌株の培養

PDA 培地における培養 3.90%（w/v）PDA 水溶液100mL をオートクレーブ（121℃, ca. 2.2kg/cm², 20分）し、滅菌済みシャーレに約20mL ずつ分注し、培地が固まった後、slant（北海三共保存株又は第一継代）からスパチュラと竹串を用いて植菌した。培地の乾燥を防ぐためシャーレの縁をパラフィルムで覆い、その後20℃で約2-3週間培養後5℃で保存した。

フスマ培地における培養 小麦フスマ約30g に、純水50mL を加え十分に混合した後、これを三角フラスコ（500mL）に移し、綿栓をし、オートクレーブ滅菌（約20分）後、PDA 培養シャーレよりシャーレ1枚当たり5フラスコの割合で植菌した（スパチュラ使用）。その

後 5℃ (60-150日) 又は 20℃ (15-29日) で所定期間培養した。ただし 20℃・62 及び 115 日間培養はフスマ 30g: 純水 75mL 系で行った。

粗抽出液の調製

フスマ培養三角フラスコ 5 個の内容物を、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) (以下 S.buffer) 1000mL (1 フラスコ当たり 200mL) と共にミキサーに加え、弱で 5 秒間 3 回攪拌し、5℃で静置した。静置後 1 時間毎に弱で 5 秒間 1 回攪拌し、2 時間 30 分経過後、軽くフラッシュ攪拌し、1 L メートルガラス上 2 枚重ねたガーゼでミキサーの内容物をろ過した。

その後ガーゼ濾液に濾過補助剤 Hyflo super-cel (4.5g/100mL) を加え、スターラーで攪拌後、吸引濾過 (定量用濾紙 No. 5 B, アドバンテック) した (pH5.85 (5℃培養) 及び pH5.15 (20℃培養))。その後、水酢酸を用いて濾液 pH を 4.5 に調整し、濾過滅菌 (0.45 μm, アドバンテック) した (約 890mL (5℃培養) 及び 825mL (20℃培養))。

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度は CBB 試薬 (0.025% (w/v) CBB-12.5% (v/v) MeOH-70.83% (w/v) リン酸) を用いたタンパク質微量定量法 (Ikuma et al. 2002) によって、BSA を標準物質として決定した。標準曲線は 3 回以上作成 (BSA 1-9 μg) し、タンパク質 (BSA) 1 μg 当たりの吸光度 (Factor) は 0.0332 ± 0.000491 (S.E.) であった。

PGase 活性の測定

PGase 活性は、1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) を基質として用い測定した。基質溶液中の PGA 濃度は、高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって全糖濃度として決定した。また高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) によって還元糖量を決定して、これらの結果から PGA の平均重合度を求めた。PGA の平均重合度は 27.4mer であった。

酵素反応は特に記述がない限り、反応総体積 2.1mL 系 (基質溶液 2.0mL, 酵素溶液 0.1mL) において 40℃で行い、酵素反応開始後 3, 6, 9 分で遊離した還元糖量 (sampling volume 20 μL) を高感度鉄試薬定量法 (Ikuma et al. 2001) を用いて D-ガラクトロン酸を標準として定量した。また、基質溶液 (20 μL) 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た。更に酵素溶液中の還元性物質量を定量し、酵素ブランク

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 回の繰り返し実験結果の平均値から求めた。

酵素活性の 1 U は、1 分当たり 1 μmol の還元糖を遊離する酵素量 (1 μmol/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。

酵素反応総体積 2.2mL 系の場合には、基質溶液 2.0mL に酵素溶液 200 μL を加え、酵素反応を開始し、それ以後の操作は酵素反応 2.1mL 系に準じて行った。

低温性雪腐菌核病菌 S.nivalis 培養期間の検討

S.nivalis を 5℃ (60-150日) 又は 20℃ (15-115日) で、任意の期間フスマ培養後抽出し、40℃での酵素活性とタンパク質濃度を測定した。

酵素活性の pH 依存性

pH2.5-7.5 の 1% (w/v) PGA-0.1M 緩衝溶液 (ただし pH2.5 及び 3.0 では 0.5% (w/v) PGA-0.1M 緩衝溶液) を基質溶液として用い、40℃での酵素活性を上記の測定方法に従って測定した。基質溶液中の PGA 濃度は高感度フェノール硫酸法 (Takeuchi et al. 2001) によって決定した。緩衝液は、pH2.5, 3.0, 及び 3.5 は酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液を、pH4.0, 4.5, 5.0 及び 5.5 は酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を、pH6.0 及び 6.5 はクエン酸-NaOH 緩衝液を、pH7.0 及び 7.5 は MOPS-NaOH 緩衝液を使用した。

温度依存性

温度 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65 及び 70℃ (恒温水槽: EL-8 COOLNIT BATH・TAITEC) に於いて、前述の酵素活性測定法に従って酵素反応 (pH 4.5) を行い活性を測定した。

酵素反応系については、S.nivalis 5℃培養の粗抽出液については 2.1mL 系で、S.nivalis 20℃培養の粗抽出液及び 5℃培養粗抽出液の Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィーの活性画分については 2.2mL 系で行った。

粗抽出液のゲル濾過クロマトグラフィー

S.nivalis の 5℃フスマ培養粗抽出液を S.buffer で予め平衡化した Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過カラム (分画分子量 6 000Da; カラムサイズ φ 4.4×86.5cm; 流速 85.5 mL/h; フラクションサイズ 20mL/tube) によって脱塩し、活性画分を pool した。

温度安定性

S.nivalis からの 5 及び 20°C 培養粗抽出液をそれぞれ 15, 20, 30, 40, 50, 60 及び 70°C で 30 分間暴露処理し、氷冷後、40°C・pH4.5 での酵素活性を測定した。なお、5°C 培養粗抽出液は 2.1mL 系で、20°C 培養粗抽出液については 2.2mL 系で活性を測定し、各々 5°C 保存粗抽出液の活性に対する残存活性を求めた。

結果と考察

低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の 5°C 及び 20°C 培養に於ける PGase 活性

S.nivalis のフスマ培養における PGase 産生量の培養温度 (5 及び 20°C) 条件による違いを調べるために、生育状況を観察しながら、5°C 培養では、60, 84 及び 150 日間、20°C 培養では 15, 21, 29, 62 及び 115 日間を行い、それら粗抽出液の活性 (U/mL) 及び specific activity (U/mg) を調べた (図 1)。

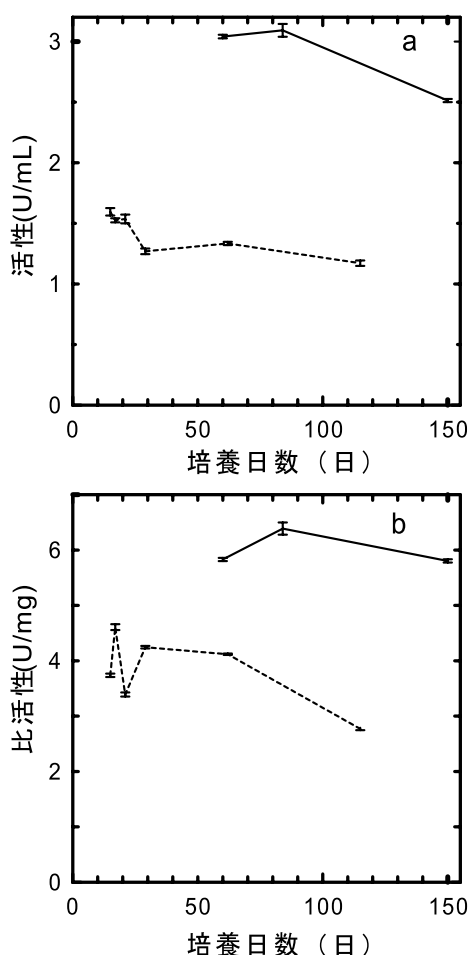


図 1 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5 及び 20°C 培養に於ける PGase 活性の培養期間による変化。活性測定は 40°C で酵素反応混液 2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 100 μ L) : 20 μ L サンプル系で行った。——, 5°C 培養; - - - - - , 20°C 培養。a, 活性 (U/mL)。b, 比活性 (U/mg)。

5°C 培養に於ける PGase 活性は 60 日培養 (3.04U/mL) と 84 日培養 (3.09U/mL) においてほとんど違いがなかったが、150 日培養 (2.51U/mL) では減少 (84 日培養に比べ 18.8% 減) しており、定常状態後期にあると思われる。Specific activity の比較では 84 日培養が最も高く PGase の産生が活発に行われている時期と考えられる。

20°C 培養では、15 日培養粗抽出液の活性 (1.60U/mL) が最も高く、その後培養期間が長くなると低下 (21 日間 1.54U/mL (3.8% 低下), 29 日間 1.27U/mL (20.6% 低下), 62 日間 1.33U/mL (16.3% 低下), 115 日間 1.17U/mL (36.8% 低下)) していた。比活性については図 1 b に示すように、20°C 培養 15 - 62 日目までは培養初期に於いて比活性が若干変動したがほぼ一定していた。一方、培養 115 日目では PGase 産生は 29 日目から 115 日目まではほぼ一定していた (図 1 a) が、比活性は 62 日目から明らかに低下し、PGase 以外の他のタンパク質分子が活発に産生されていた (図 1 b)。従って 20°C 培養に於いては、2 - 3 週間で PGase 産生が定常期に達し、その後 (21 - 115 日培養) は PGase の産生は若干低下する傾向にあると思われる。

しかし、培養期間が短い (15 日間) 場合、活性は高かった (図 1 a) が、粗抽出液中に存在する還元性物質の濃度が高く、PGase 活性測定に於ける粗抽出液のブランク還元糖量が上昇し、活性値の再現性が低くなり、活性の正確な見積もりが困難であった。それ故に、活性含量がほぼ同等な 21 日培養粗抽出液を以後の定量実験に使用した。又、異なるシリーズの培養実験に於いて生育状況の観察から 17 日間培養後も抽出を行った結果、粗抽出液の還元性物質濃度が低く定量実験に適していたので、20°C・17 日間培養粗抽出液も又、後の実験で使用した。

5°C 及び 20°C 培養に於いて PGase 産生の最も活発な 5°C・84 日培養 (3.09U/mL) と 20°C・15 日培養 (1.60U/mL) での活性 (40°C) を比較すると 5°C 培養での活性が 20°C よりも約 2 倍 (1.93 倍) 高かった。このことは、本菌の生育最適温度が 20°C であるにも関わらず、天然に於いては低温環境で生育した時のみ病原性を示すことに深く関係していると思われる。

また 20°C・62 日間培養は、5°C 培養に於ける PGase 活性を 20°C 培養のものと同量的に比較する際に 20°C 培養に於ける培養期間の長さに対する影響を調べるために行った。従って、20°C で 62 日培養 (1.34U/mL) を行い、その活性 (U/mL) を培養期間がほぼ同等な 5°C・60 日培養 (3.04U/mL) の値と比較した。その結果 20°C 培養に於いて培養期間を 62 日まで延長しても PGase 活性産生は上昇せず 5°C 培養の方が培養期間の長さに依存することなく 2.3 倍高く、*S.nivalis* が低温で生育した場合に於いてより高い PGase 活性を産生することが明らかになった。更に

20°C・115日培養 (1.17U/mL) も20°C・62日培養と同じように行ったが、活性は20°C・62日培養に較べて若干低下した。以上の事実は *S.nivalis* が天然に於いては低温で病原性を発現する低温性雪腐菌核病菌であることを強く裏付ける結果であると考えられる (Saito 1997)。

次に、5°C及び20°C培養粗抽出液中のPGase活性を各々の培養温度条件 (各々5°C及び20°Cでの活性) で測定し検討した (図3a)。5及び20°C培養粗抽出液のそれぞれの培養温度におけるPGase活性は、即ち5°C培養粗抽出液の5°Cでの活性は0.534U/mL、及び20°C培養粗抽出液の20°Cでの活性は0.635U/mLであり、5°C培養の方が15%低かったが、5°C培養粗抽出液の5°Cでの活性 (0.534U/mL) は20°C培養粗抽出液の5°Cでの活性 (0.211U/mL (同66.8%低い) に比べると非常に (約2.53倍) 高かった。又5°C培養粗抽出液の10°Cでの値は0.687U/mLであり、これは20°C培養粗抽出液の20°Cでの活性 (0.635U/mL) より8.1%高かった。即ち5°C培養粗抽出液の5-10°CでのPGase活性は20°C培養粗抽出液の20°CでのPGase活性とほぼ等しかった。以上の結果、常温 (20°C) 培養に於ける20°Cでの活性と同様に5°C培養に於ける5-10°Cでの高いPGase活性が、低温環境下で生理活性の低下した宿主への感染を可能にしているものと思われる。

S.nivalis のPGase活性含量を好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* (5°C 2ヶ月培養: 9.37U/mL) のものと比較すると、*S.nivalis* 20°C培養 (15日培養: 1.60U/mL) の場合はPGase活性含量が非常に低く *S.borealis* の約17%にすぎなかったが、*S.nivalis* 5°C培養 (84日培養: 3.09U/mL) の場合にはPGase活性含量が *S.borealis* の約33%までに即ち *S.nivalis* 20°C・15日培養に較べて約2倍に上昇した。

しかしながら低温菌 *S.nivalis* のPGase産生能は好冷菌 *S.borealis* のPGase産生能には遠く及ばず低温耐性を獲得した病原性低温菌の場合の低温適応能の限界なのかもしれない。

一方常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (20°C 14日培養: 13.6U/mL) と比較すると、*S.nivalis* 20°C 15日培養PGase活性 (1.60U/mL) は常温性菌核病菌の場合の約12%にしかならず、このことは低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* が天然に於いて常温では病原性を有しないことを更に裏付ける事実であると考えられる。

酵素活性のpH依存性

低温 (5°C) 培養に於ける低温 (5-10°C) でのPGase活性が常温 (20°C) 培養に於ける低温でのPGase活性に較べて高かったという現象、即ち低温培養に於ける低温でのPGase活性は常温培養に於ける常温での活性とほぼ

同等であったという現象は各々の温度環境 (5及び20°C) で産生されるPGase分子が異なっている事を示唆する。従って低温環境と常温環境とは異なるPGaseアイソザイム群が産生された可能性が考えられるので、各々の条件で産生されたPGase活性のpH依存性実験からその点を追跡できるかどうかを確認するために、5°C培養は84日間、20°C培養は17日間の各々の粗抽出液中のPGase活性のpH依存性を調べた。それらの結果を図2に示す。5°C及び20°C培養粗抽出液は、共にPGase活性の最適pHが4.5であり、その前後 (pH3.0-5.0) で最適pHでの活性の約90%以上の高い相対活性を示し、広いpH域で高い相対活性を与え、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 及び常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* (Takeuchi et al. 2002) の場合とは大きく異なっていた (図2)。従って、以上の結果は低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の産生するPGaseアイソザイム分子が好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* 及び常

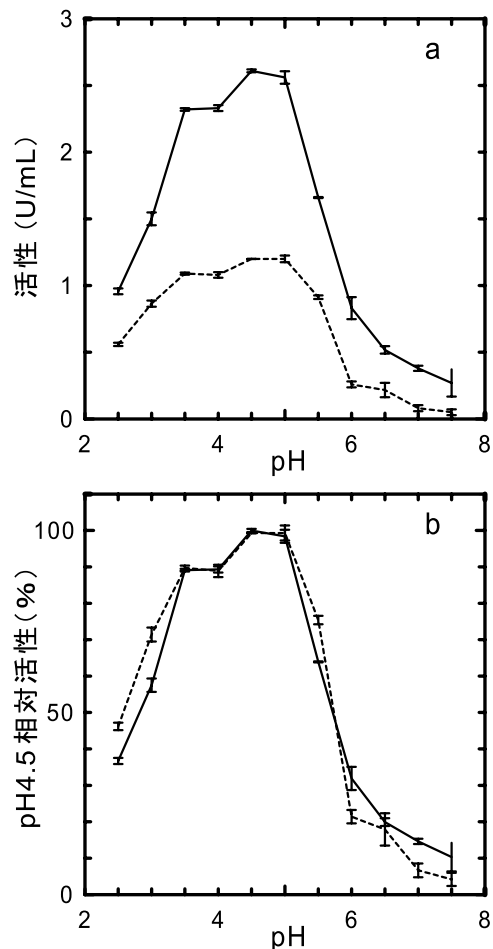


図2 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5及び20°C培養粗抽出液PGase活性のpH依存性。活性測定用緩衝液はpH2.5, 3.0及び3.5では0.1M酢酸ナトリウム/HCl緩衝液, pH4.0, 4.5, 5.0及び5.5では0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液, pH6.0及び6.5では0.1Mクエン酸/NaOH緩衝液, pH7.0及び7.5では0.1M MOPS/NaOH緩衝液を使用。——, 5°C (84日) 培養粗抽出液; - - - - - , 20°C (17日) 培養粗抽出液。a, U/mL。b, pH4.5での活性に対する相対活性。

温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の産生する PGase アイソザイム分子とは異なる事を強く示唆する。

一方、5℃と20℃培養粗抽出液とでは PGase の pH 依存性は似た傾向を示していた。この結果は *S.nivalis* の 5℃及び20℃培養に於いて産生される PGases は *S.nivalis* の生育環境の違いによって異なっていることは十分に推定されるが、各々の培養温度に於いて産生された PGase アイソザイムの活性部位構造についてはほとんど同じか又は異なっているとしても極くわずかに異なる立体構造を有している可能性を強く示唆している (Gerday et al. 1997)。

従って 5℃及び20℃培養粗抽出液 PGase 活性の各々の pH 依存性の比較検討からは低温及び常温環境の各々で産生される PGase アイソザイム群の相違について論じることは出来なかった。

PGase 活性の温度依存性

好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の産生する PGase 活性は常温性菌核病菌 *S.sclerotiorum* の産生する PGase 活性に較べて低温域に於ける40℃相対活性が高く、好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の産生する PGase 活性は低温適応現象を示した (Takeuchi et al. 2002)。

従って低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* の場合に於いても常温環境に於いては観察されなかった PGase 活性の低温適応現象が低温環境暴露即ち低温培養によって観察されるようになるかどうかを調べた。最初に、5℃培養及び20℃培養に於いて分泌された PGase 活性を、5℃及び20℃培養の、各々に於いて培養期間の異なる2種類の粗抽出液の活性 (5-70℃) を測定し、その相対活性の温度依存性を比較した。

5℃培養 (84日及び150日) 粗抽出液では、培養日数に依らず50℃以下の温度域での相対活性にはほとんど違いがなかったが、50℃以上の温度域では、培養日数の違いによって若干の差が見られた (結果は示さない)。これらの結果から、5℃培養に於いては培養日数の違いによって異なる PGase を産生しているという可能性は非常に低いと考えられる。

20℃培養 (17日及び21日) 粗抽出液では、凍結保存粗抽出液 (17日培養) と 5℃保存粗抽出液 (21日培養) について比較検討をした。50℃以下の温度域での相対活性は、未凍結 5℃保存の方が若干高かったが、5℃培養粗抽出液と比較したときの差に較べると大きな違いはなかった (結果は示さない)。従って20℃培養に於いても 5℃培養の場合と同様に培養日数の違いによって異なる PGase を産生している可能性は考えにくいと思われる。更に凍結処理によって PGase 活性は低下したが、凍結によって失活しなかった PGase 活性の温度特性は変化しなかったと結論した。

次に、5℃ (150日間) 及び20℃ (17日間) 培養粗抽出液の活性 (5-70℃) の、各々の温度依存性について、生の活性 (図 3 a) 及び相対活性 (図 3 b) で比較を行った。最適温度は培養温度の違いに依らず共に50℃であった。50℃での活性を基準 (100%) にした時の相対活性 (以下50℃相対活性) については 5℃培養粗抽出液と20℃培養粗抽出液とでは、温度依存性に明確な違いが見られた (図 3 b)。特に50℃以下の温度域では明らかな違いがあった。

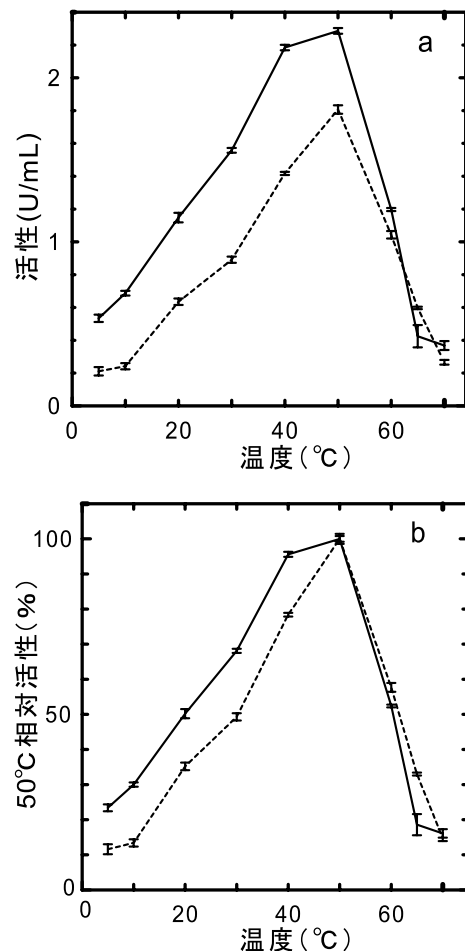


図 3 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5℃及び20℃培養粗抽出液 PGase 活性の温度依存性。酵素活性は反応混液2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液100 μ L) 系 (5℃培養) 及び2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液200 μ L) 系 (20℃培養) で行った。——, 5℃ (150日) 粗抽出液; - - - - -, 20℃ (17日) 培養粗抽出液. a, U/mL. b, 50℃での活性に対する各温度での相対活性.

5℃培養粗抽出液では40℃での活性が50℃での活性とあまり差が無かった (40℃に於ける50℃相対活性: 95%以上) が、20℃培養粗抽出液においては40℃での50℃相対活性が78.4%で、5℃培養に較べて約17%活性が低下した。更に、5℃培養粗抽出液では5-40℃温度域での相対活性が、20℃培養粗抽出液のそれらと比べ約10%高くなっ

ていた。このことは、5℃培養で分泌されるPGase活性が、20℃培養で分泌されるPGase活性に比べ、低温に対してより適応していることを示している (Gerday et al. 1997)。低温適応機構として考えられることは、発育環境温度によって性質の異なる酵素分子即ちアイソザイムが産生される可能性及び同属の好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* と同様に共存分子がPGase活性に好冷性を付与 (Takahashi et al. 2002) している可能性である。

一方、50℃を越える温度域では、図3bに示すように5℃培養粗抽出液と20℃培養粗抽出液との相対活性に顕著な差は見られなかった。これらの事から、5℃培養に於いて産生されるPGase活性は低温適応しているが、一方高温域では極端に不安定ではなく常温培養に於いて産生されるPGase活性とほぼ同じ酵素活性特性を有していたと結論できる。従って、5℃培養に於いて産生されるPGase活性は常温培養で産生されるPGaseの特性を有しかつ低温適応能をも有していたと結論できる。

Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィー PGase 活性画分の温度依存性

低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* は、低温 (5℃) で培養したとき、PGase活性は低温適応現象を示したので、この現象が *S.nivalis* PGase アイソザイム分子自身に起因するのか又は好冷性雪腐菌核病菌 *S.borealis* の場合と同様に低分子性低温適応因子の関与 (Takahashi et al. 2002) によるものかを明らかにするための第一段階として、5℃培養 (150日) 粗抽出液を Bio-Gel P-6 DG ゲル濾過クロマトグラフィー (分画分子質量 6 000Da) に供した (図4)。

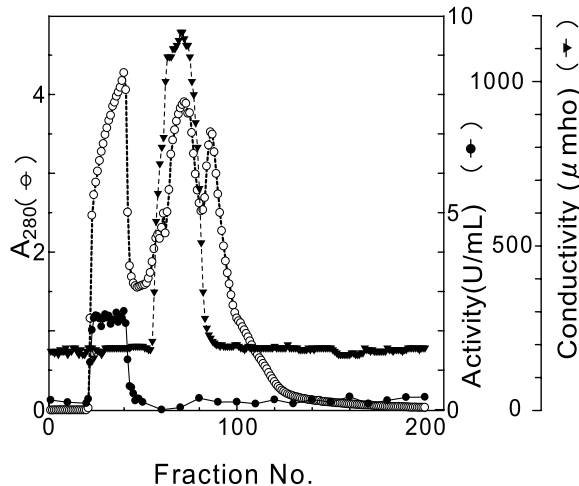


図4 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5℃培養 (150日) 粗抽出液 PGase の Bio-Gel P-6 DG カラムゲル濾過クロマトグラム。5℃ (150日) 培養粗抽出液400mLを添加し、10mM 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH4.5) 緩衝液で溶出した。カラムサイズ：φ4.4×86.5cm, 1 315mL；フラクションサイズ：20mL；流速：85.5mL/h；プールした活性画分：No.22-42 (409mL)。○, A₂₈₀；●, 酵素活性 (U/mL)；▼, 電気伝導度 (mmho)

P-6 DG 活性画分 (No.22-42 pool 画分) の温度依存性を調べ、それを5℃培養粗抽出液の温度依存性と比較した。その結果は図5aに示すように、P-6 DG 活性画分と5℃培養粗抽出液との間に差は見られなく、5℃培養粗抽出液でみられた低温-常温域 (5-40℃) での20℃培養PGase活性に較べて高い相対活性は、分子質量約6 000Da以下の低分子を除いた後も同様に観察された。しかしながら、図5bに示すように、5℃培養 Bio-Gel P-6 DG 活性画分の温度依存性は20℃培養粗抽出液 PGase活性のものとは明らかに異なっていた。以上のことから、5℃培養に於いて *S.nivalis* から分泌されたPGase活性

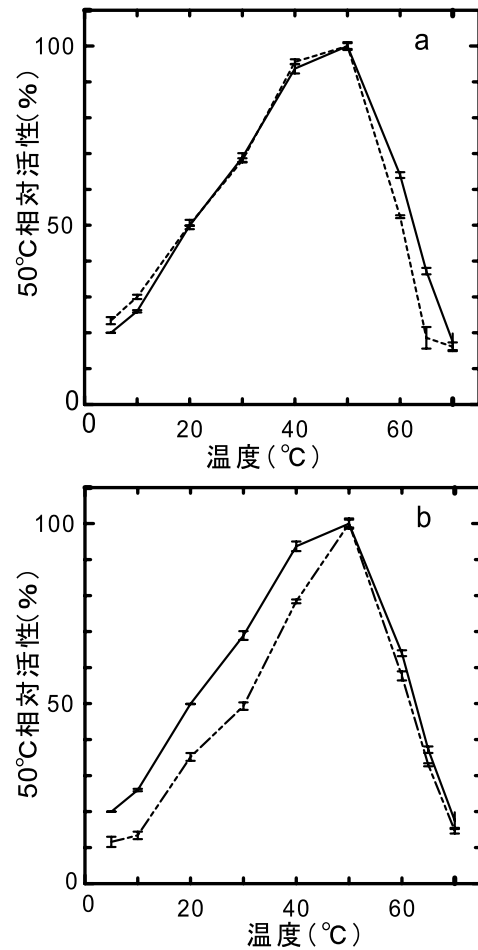


図5 低温性雪腐菌核病菌 *S.nivalis* 5℃ (150日) 培養粗抽出液 Bio-Gel P-6 DG PGase 活性画分の温度依存性。Bio-Gel P-6 DG PGase 活性画分の活性測定は2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・活性画分200μL) 系で行った。a, 5℃培養粗抽出液 PGase 活性との比較。5℃培養粗抽出液の活性測定は2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液100μL) 系で行った。——, Bio Gel P-6 DG pooled PGase active fraction (No.22-42)；-----, 5℃ (150日) 培養粗抽出液。b, 20℃培養粗抽出液 PGase 活性との比較。20℃培養粗抽出液の活性は2.2mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 200μL) 系で行った。——, Bio-Gel P-6 DG pooled active fraction (No.22-42)；-----, 20℃ (17日) 培養粗抽出液。

が示した低温適応現象が Bio-Gel P-6 DG 処理後の活性画分に於いても観察されたために、好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* の場合に推定された様な共存する低分子が PGase 活性の低温適応に関与している (Takahashi et al. 2002) 可能性は否定された。従って、低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* が低温環境に於いて産生する PGase アイソザイムの低温適応現象は、酵素分子自身の性質に起因するものと考えられる。しかしながら、共存する高分子がポリガラクトナーゼ活性の低温適応に関与する可能性は現在の所未だ否定できない。

今後、5 及び 20°C 培養に於いて産生されたポリガラクトナーゼアイソザイムを更に分離・精製し、各段階の各々の酵素活性の特性を比較検討することによって、低温環境で特異的に発現している PGase アイソザイムの低温適応機構を明らかにできると考えられる。

PGase 活性の温度安定性

低温環境に暴露された *S. nivalis* が産生する PGase アイソザイムの PGase 活性は常温環境に於いて *S. nivalis* が産生する PGase アイソザイムの PGase 活性とは異なり低温適応現象を示したため、5°C 培養で産生する *S. nivalis* の PGase アイソザイムの温度安定性が 20°C 培

養下で産生された PGase アイソザイムのものとは異なっている可能性が示唆された。それ故に、5 及び 20°C 培養に於いて産生された PGase 活性の温度暴露に対する安定性の違いを調べるために、各々の粗抽出液を 15 - 70°C に 30 分間暴露し、水冷後、40°C で活性を測定した。図 6 に 5°C 培養と 20°C 培養粗抽出液の温度安定性について生の活性 (図 6 a) と相対活性 (図 6 b) で調べたものを示す。5°C 培養粗抽出液の酵素活性は、20 - 30°C の常温域に於いて、20°C 培養粗抽出液よりも温度に対して不安定であった。このことは、5°C 培養に於いて発現される酵素が低温適応酵素であり (Russell 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Gerday et al. 1997)、常温域では 20°C 培養に於いて産生される PGase アイソザイムよりは温度に対して不安定であるが、50°C 以上の高温域に於いては両者の PGase アイソザイムの安定性には差がないことを示している。

従って、これらの事実は 5°C 培養に於いて産生された低温適応性 PGase が 20°C 培養で産生された酵素とは温度安定性に於いて異なる性質を有するアイソザイム分子であることを示している。

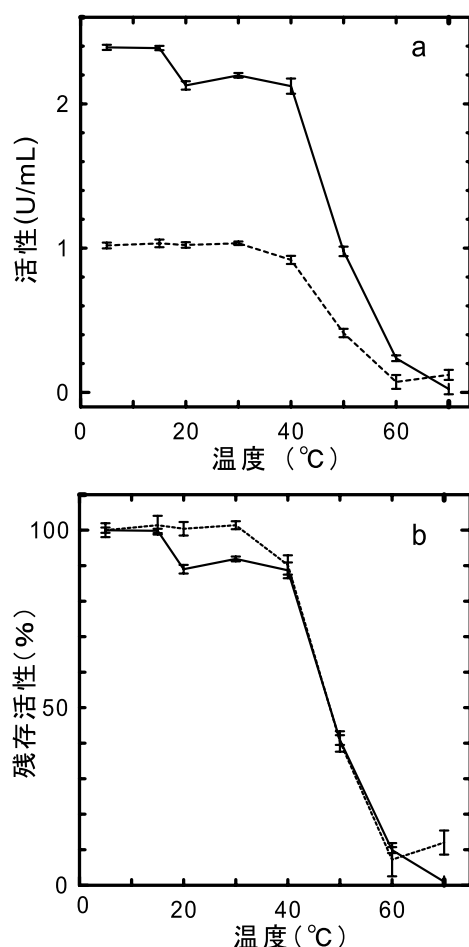


図 6 低温性雪腐菌核病菌 *S. nivalis* 5 及び 20°C 培養粗抽出液 PGase 活性の温度安定性. 5 及び 20°C 培養粗抽出液を各温度で 30 分間処理後 PGase 活性を 40°C で測定した. 活性測定は 2.1 mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 100 μ L) 系 (5°C 培養粗抽出液) 及び 2.2 mL (1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸 (pH4.5) 緩衝液 2 mL・粗抽出液 200 μ L) 系 (20°C 培養粗抽出液) で行った. —, 5°C (150 日) 培養粗抽出液; - - - - - , 20°C (21 日) 培養粗抽出液. a, 各温度で暴露後の 5 及び 20°C 培養粗抽出液 PGase 活性 (U/mL). b, 5°C で活性に対する各温度で暴露後の各々の粗抽出液 PGase 残存活性.

参考文献

- 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.
- 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. and Gerday, C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. mol. life sci.* **53**: 830-841.
- 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.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU 1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. Coomassie brilliant blue G250 dye-binding microassay for protein. 2002. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **23**: 18-26. [In Japanese.]
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. high sensitive colorimetric method of reducing suger using ferric iron reagent. *Res. Bull. obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 109-116. [In Japanese.]
- Kapoor, M., Khalil, B. Q., Bhushan, B., Dadhich, K. S., and Hoondal, G. S. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochem.* **36**: 467-473.
- Kester, H. C. 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. *J. Biol. Chem.* **274**: 11761-11767.
- Nasuno, S. and Starr, M. P. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.* **241**: 5298-5306.
- Pathak, N., Mishra, S., and Sanwal, G. G. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, **54**: 147-152.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., and Schell, M. A. 1988. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170**: 1445-1451.
- Russell, N. J. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, **4**: 83-90.
- Saito, I. 1997. *Sclerotinia nivalis*, sp. nov., the pathogen of snow mold of herbaceous dicots in northern Japan. *Mycoscience*, **38**: 227-236.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. *Methods Enzymol.* **161**: 366-373.
- Smalas, A. O., Leiros, H. K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**: 1-57.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. 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.]
- Takasawa, T., Sagisaka, K., Yagi, K., Uchiyama, K., Aoki, A., Takaoka, K., and Yamamoto, K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 417-424.
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Cold adaptation of polygalacturonase activity from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 243-255. [In Japanese.]
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 103-107. [In Japanese.]
- Waksman, G., Keon, J. P., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georlette, D., Gratia, E.,

Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles*. 5 : 313-321.

Summary

We monitored polygalacturonase (PGase) activity of the psychrotrophic snow mold *Sclerotinia nivalis* under different culture conditions, i.e. culture temperatures (5 and 20°C) and periods. It reached the steady phase in 2-3 months at 5°C culture and 2-3 weeks at 20°C, respectively. PGase activity (at 40°C) of the 5°C culture was twice higher than that of the 20°C culture. This strongly suggests that *S.nivalis* is psychrotrophic snow mold and that PGase is related to the pathogenesis at low temperature.

There was no remarkable difference between pH dependency of PGase activity in the crude extract of 5°C culture and that of the 20°C culture. However, concerning temperature dependency, relative activities below 40°C for the PGase activity of the 5°C culture-crude extract were about 10% higher than those of the 20°C culture, so cold adaptation phenomenon of the PGase activity was observed in the 5°C culture-crude extract. These facts suggest that when *S.nivalis* was grown at low temperature, it produced PGase isozymes which were distinguished from those of the 20°C culture-crude extract. Cold adaptation phenomenon of the PGase activity produced in the 5°C culture was also observed after removal of low-molecular-weight substances by Bio-Gel P-6 DG gel filtration chromatography. This fact suggests that the low-molecular-weight substances may not be involved in cold-adaptation mechanism of 5°C cultured *S.nivalis* PGase activity which were seen in the psychrophilic snow mold *S.borealis*. Therefore, it is considered that cold-adaptation mechanism for low-temperature expressed PGase activity originates from the tertiary structure of PGase isozyme itself.

With respect to thermostability, the 5°C culture PGase activity was more unstable than the 20°C culture PGase activity at moderate temperature region (20-30°C) and this feature is characteristic of cold active enzymes which have been reported (Zecchinon, L., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Delille, D., Feller, G., Georgette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Sonan, G., and Gerday, C. 2001. *Extremophiles*. 5: 313-321; Smalas, A. O., Leiros, H.

K., Os, V., and Willassen, N. P. 2000. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.) . However, at higher temperature range above 40°C, the stability tendency of 5°C culture PGase activity was similar to the 20°C's.

Key words : polygalacturonase; cold active enzyme; psychrophilic enzyme; cold adaptation; psychrotroph