

常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 由来のポリガラクトツロナーゼ I の単離

高橋 裕司・井熊 武志・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英
(受理：2002年5月31日)

Isolation of polygalacturonase I from the culture of the
mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*

Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA

摘 要

CM-Toyopearl陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびSephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、常温性菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*の20℃培養抽出物のポリガラクトツロナーゼ活性画分からポリガラクトツロナーゼ I を単離した。ポリガラクトツロナーゼ I 精製標品(P4-4-2)の比活性は3 662U/mgであり、粗抽出液から全体として116倍に精製した。精製標品はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、均一であることが示された。また、SDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって本酵素の分子質量は39.8±1.10kDa(S.E.)、さらに等電点電気泳動によって本酵素の等電点はpH8.70と見積もられた。

キーワード: *Sclerotinia sclerotiorum*、常温菌、菌核病菌、ポリガラクトツロナーゼ、細胞壁分解酵素

結 論

常温性菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*(Walker 1969)は、広範な地域に分布し、多くの種が宿主として知られる植物病原性糸状菌である(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、20℃付近で最も生育が早い常温菌(mesophiles)(Walker 1969)である。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る。

植物病原菌の病原性には、ポリガラクトツロナーゼ (PGase)が深く関わることを示唆されてきた(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、ポリガラクトツロン酸を主な基質として、ガラクトツロン酸残基間の α -1,4-結合を加水分解する。これまでに菌類 (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

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 北海三共株式会社研究部

¹ Agrosience Reseach Laboratory, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

(Kapoor et al. 2000; Pathak et al. 2000; Bonghi et al. 1992; DellaPenna et al. 1986) 等の広い範囲にPGaseの分布が知られてきた。

我々は好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来のPGaseの低温適応性を明らかにする目的で、*S. borealis* と *S. sclerotiorum* のPGaseの性質を比較してきた。これまでに *S. borealis* からの粗抽出液中のPGaseにおいて低温域における40℃活性に対する相対活性が、*S. sclerotiorum* 由来のものより高いという事実を明らかにした(Takeuchi et al. 2002)。さらに、この差異がPGase分子自身の性質に起因するかどうかを明らかにするために、*S. borealis* 粗抽出液の活性主要画分からPGase(PGase I)を精製単離した(Takahashi et al. 2002)。本研究では、*S. borealis* 由来PGase Iと同様にゲルろ過クロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーによって *S. sclerotiorum* からPGase Iを単離し、既報の *S. borealis* 由来PGase I との比較検討を行った。

さらに、より天然に近い状態と考えられる小麦フスマ培地における固体培養抽出液から精製したPGase Iを、*S. sclerotiorum* 液体培養ろ液から単離されたPGase(Martel et al. 1998, 1996; Waksman et al. 1991; Marciano et al. 1982)とと比較検討した。

実験材料及び方法

試薬

Potato-Dextrose-Agar(以下PDA)(Difco Laboratories)、小麦フスマ(十勝米穀)、Hyflo super-cel(Celite Co. /和光純薬工業)、D-ガラクトロン酸1水和物(Sigma)、ポリガラクトロン酸(Sigma, From orange)、無水炭酸ナトリウム(和光純薬工業、特級)、フェリシアン化カリウム(和光純薬工業、特級)、硫酸鉄(III)アンモニウム12水和物(和光純薬工業、特級)、ラウリル硫酸ナトリウム(以下SDS)(和光純薬工業、生化学用)、硫酸(和光純薬工業、精密分析用)、酢酸ナトリウム3水和物(和光純薬工業、特級)、氷酢酸(和光純薬工業、特級)、Coomassie Brilliant Blue (以下CBB)G-250(半井化学薬品、Specially prepared reagent, Lot No. M7R3031)、リン酸(和光純薬工業、特級、85%(w/w))、メタノール(和光純薬工業、特級、99.8%(w/w))、牛血清アルブミン(以下BSA)(Sigma, crystallized and liophilized, 窒素分 14.8%(w/w))、Bio-Gel P-6DG(Bio-Rad)、CM-Toyopearl 650M(東洋曹達)、Sephacryl S-200(Pharmacia)、Dialysis Membrane(Viskase Sales Co. /和光純薬工業)。

菌株の培養

*S. sclerotiorum*の菌株をまず、寒天平板培地上で20℃で培養した。3.9%(w/v)PDA溶液を121℃(約2.2kg/cm²)、20分間オートクレーブ滅菌後、シャーレ(オートクレーブ菌)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. 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、20℃で2週間培養し、その後使用時まで5℃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とを十分に混和して500mL三角フラスコに入れてオートクレーブ滅菌した。*S. 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、20℃で2週間静置培養し、粗抽出液の調製時まで5℃で保存(約1カ月)した。

カラムクロマトグラフィー法

陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、CM-Toyopearl 650Mカラムを用いて行い、溶出には塩化ナトリウム濃度でのステップワイズ法およびリニアグラジエント法を用いた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは、Bio-Gel P-6 DG及びSephacryl S-200カラムを用いて行った。精製操作は全て氷浴上または5℃(クロマトチャンバー内)で行った。

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pH4.2において、またSDS-PAGEはpH8.5において、いずれも8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて行った。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、あるいは銀染色キット(Pharmacia LKB)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トンパク質を用いた。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 α -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、pH3-9の範囲で行った。タンパク質は0.1%(w/v)CBBR-250-30%(v/v)メタノール-10%(v/v)酢酸溶液を用いて染色した。

pIの決定には、以下の等電点マーカートンパク質を用いた。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)、ヒトカーボニックアンヒドラーゼB(pI6.55)、牛カーボニックアンヒドラーゼB(pI5.85)、 β -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)。

酵素活性の測定

ポリガラクトツロンナーゼ(PGase)活性は、1%(w/v)ポリガラクトツロン酸-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ツロン酸濃度は、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ツロン酸の平均重合度(Degree of polymerization)を求めた。ポリガラクトツロン酸の平均重合度は 28.1 ± 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0.1mL)において40°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 μ L)を高感度鉄試薬定量法(Ikuma et al. 2001)を用いてD-ガラクトツロン酸を標準として定量した。また、基質溶液(10 μ L)の還元糖量を定量し、酵素溶液の添加による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、1分当たり1 μ molの還元糖を遊離する酵素量(1 μ 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10mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液(pH4.5)(以下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 μ gの範囲で作成した。標準曲線の傾きすなわちBSA 1 μ 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

酵素の精製

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. sclerotiorumの小麦フスマ培養物5フラスコを、S. bufferで抽出した。すなわち、小麦フスマ培養(20°C)S. sclerotiorum 5フラスコをブレンダーに加えて1L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.5B, Advantec)した。ろ液はpH5.5であったので、7.7mLの氷酢酸を加えてpH4.5に調整した。その後、メンブランろ過(0.2 μ mセルロースアセテート, Advantec)滅菌した。このろ液(900mL; assay volume 50 μ L; total activity 12 240U)を粗抽出液として、5°Cで保存した。このうち800mL(10 880U)を用いてPGaseの精製を行った。

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

粗抽出液はイオン強度が高く(1.8mmhos; 約90mMNaClを含むS. buffer相当)、イオン交換クロマトグラフィーカラムへの吸着が困難と考えられたのでゲルろ過カラム法による脱塩を行った。

粗抽出液400mL(5 440U)を、あらかじめS. bufferで平衡化したBio-Gel P-6 DGカラム(ϕ 4.4cm \times 88cm、カラム体積1 338mL)に供し、約2.5カラム体積(3 400mL)のS. bufferを用いて76.0mL/hの流速で溶出した。カラムからのタンパク質の溶出は280nmでの吸光度(A_{280})の測定によってモニターした。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 μ L/tube)を測定した。また、カラムからの塩の溶出状態は電気伝導度(CD-35M II, M & S Instruments Inc.)を測定することによってモニターした。

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を図1に示す。4つの A_{280} ピークが得られ、酵素活性は最初のピーク(V_0 ピーク)に存在した。電気伝導度測定によって確認された塩ピーク(V_t ピーク)は2番目および3番目の A_{280} ピークの位置に存在し、活性ピークとの相互分離は良好であった。従って、粗抽出液中の活性画分は完全に脱塩された。4番目の A_{280} ピークは塩ピークの後に

溶出された。このピークは、このクロマトグラフィーが粗抽出液の脱塩を目的としており、カラムの溶出液として用いたS. bufferのイオン強度が通常のゲルろ過(Andrews 1965)より低かったため、タンパク質とゲルマトリックスとの非特異的相互作用によるリターデーション画分と思われる。

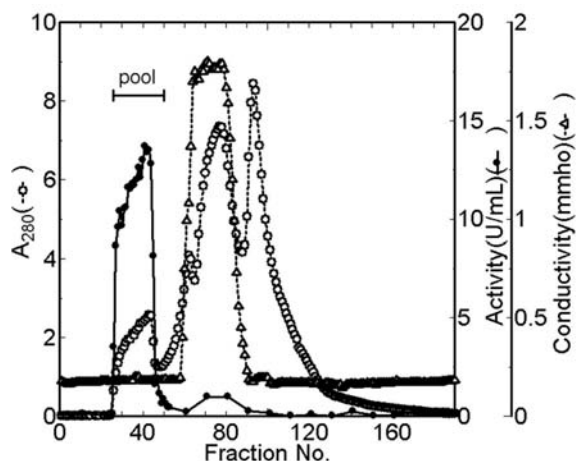


図1. Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。粗抽出液400mLをカラムに供し、S. bufferで溶出した。No. 22-49(528mL)のPGase活性画分をプールした。カラムサイズ: $\phi 4.4 \times 88$ cm(1 338mL); 流速: 76.0mL/h; フラクシオンサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 50 μ L/tube. $\cdots \circ \cdots$, A_{280} ; $\cdots \bullet \cdots$, PGase活性(U/mL); $\cdots \triangle \cdots$, 電気伝導度(mmho)。

クロマトグラフィー全体としての A_{280} 収率は102.4%であった。しかしながら、活性画分において試験管中で濁りを生じたものがあったので、これらについて一部を遠心分離(15 000rpm, 15min, 5°C)し、得られた上清の A_{280} を再度測定した。その結果、 A_{280} 収率は100.3%となり、懸濁物質による吸光度への影響は少なく、ゲルクロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。一方、クロマトグラフィー全体としての活性収率は88.4%で、若干の活性の損失が見られた。S. borealis由来PGaseの精製における同様のクロマトグラフィーにおいては画分中に濁りを生じず、その活性収率は96.5%と高かったことから、この活性の損失は、若干量のPGaseが不溶化した共存タンパク質に吸着したことによって溶液から除かれたためと思われる。

PGase活性画分(試験管番号22-49)528mLをプールし、メンブランろ過(0.2 μ mセルロースアセテート、Advantec)によって濁りを除いた。このプールの活性回収率は67.3%となり、メンブランろ過処理による失活によって更に活性の損失があったものと思われる。今後は活性の損失を抑えるために沈殿の除去はメンブランろ過処理ではなく遠心分離による方がより適当と思われる。同様の粗抽出液400mLのゲルろ過から得られた活性画分556mL(活性回

収率76.3%)とあわせて1 084mL(assay volume 50 μ L; total activity 8 032U; 活性回収率73.8%)の脱塩活性画分を得た。

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法)

ステップ2で得た脱塩活性画分から950mL(7 039U)をとり、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650Mカラム($\phi 2.6 \times 34$ cm、カラム体積186mL)に供した。引き続き、3.2カラム体積(600mL)のS. bufferで非吸着画分を溶出した後、50mM(3.4カラム体積; 640mL)、0.1M(3.8カラム体積; 700mL)、0.5M(3.1カラム体積; 580mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferを用いたステップワイズ法による溶出を78.4mL/hの流速で行った。タンパク質の溶出は A_{280} の測定により確認し、 A_{280} 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、溶出用bufferを交換した。20mLずつの画分を集め、得られた各画分の A_{280} およびPGase活性(assay volume 10-100 μ L/tube)を測定した。

ステップワイズ溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図2に示す。

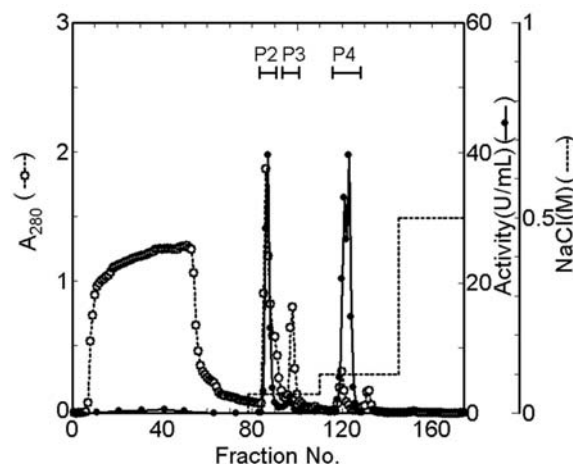


図2. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)溶出曲線。ステップ2のBio-Gel P-6 DG ゲルろ過で得られた脱塩酵素試料950mLをカラムに供し、S. bufferで洗浄後、50mM、0.1M、0.5M塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P2: No.85-92(159mL); P3: No.93-100(160mL); P4: No.118-127(199mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: $\phi 2.6 \times 34$ cm(186mL); 流速: 38.0mL/h; フラクシオンサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 10-100 μ L/tube. $\cdots \circ \cdots$, A_{280} ; $\cdots \bullet \cdots$, PGase活性(U/mL); $\cdots \triangle \cdots$, 塩化ナトリウム濃度(M)。

50mM塩化ナトリウム-S. bufferで2つの活性ピーク(P2及びP3)が溶出され、その後0.1M塩化ナトリウム-S. bufferによって2重に重なった主活性ピーク(P4)が溶出された。

このクロマトグラフィー全体における A_{280} 収率は98.8%であり、クロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。一方、活性収率は82.3%(5 792U)であり、若干の

活性の損失が見られた。活性収率の低かった理由としては、このクロマトグラフィーは時間(5℃、2日間)を必要としたので、長時間CM-Toyopearlイオン交換樹脂と結合したことによるPGaseの失活とも考えられる。しかしながら同じイオン交換樹脂を使用したステップ4でのCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)における活性収率が97.5%と非常に高かったため、クロマトグラフィーの条件が不適当であった可能性は低いと考えられる。また、*S. sclerotiorum*由来の異なる酵素標品の調製(培養粗抽出液1600mL使用)において、同様のステップワイズクロマトグラフィーでの活性収率は92.5%と高く、特にP4の活性回収率が向上していた(P2: 32.0%(5344U)、P3: 3.32%(553U)、P4: 57.1%(9525U)、Bio-Gel P-6 DG脱塩活性画分16675U使用)。以上のことから、クロマトグラフィー中におけるPGaseの失活の可能性は非常に低いと結論できる。

*S. borealis*由来のPGase Iの精製における同様のクロマトグラフィーにおいては、クロマトグラフィー全体での活性収率は59.6%ないし59.1%と低く、相互分離された*S. borealis*由来のPGaseアイソザイム間に協働的相互作用が存在することが示唆された。しかしながら、*S. sclerotiorum*由来のPGaseの単離においては、このクロマトグラフィーにおける活性収率は*S. borealis*の場合に比べて明らかに高かったため、このステップにおいて相互に分離されたアイソザイム間の協働的相互作用は存在しないか、あるいは存在しても極めて弱いものと考えられる。

得られた活性ピークをそれぞれP2からP4としてプールした。各ピークのプール後の活性回収率は各々P2(30.9%, total activity 2178U(assay volume 10 μ L), 159mL)、P3(3.00%, total activity 211U(assay volume 100 μ L), 160mL)、P4(48.3%, total activity 3403U(assay volume 10 μ L), 199mL)であった。クロマトグラフィー全体で回収した全活性(5792U)に対する各プールの活性含有率は各々P2(37.6%)、P3(3.64%)、P4(58.8%)であった。主要な活性プールであるP4(3403U, 199mL)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ー(リニアグラジエント溶出法)

活性画分P4のうち190mL(3249U)をとり、2LのS. bufferに対して約12時間の透析を2回繰り返した。透析後(192mL)の回収率は、 A_{280} で80.6%、酵素活性で84.5%(2746U)であり、透析操作によって活性が若干失われたものと思われる。これらの結果から、*S. sclerotiorum*のPGase分子の一部(P4)はクロマトグラフィー樹脂や透析膜等に吸着されやすい性質をもち、試料が少ない場合には特に

その影響を受けるものと考えられる。

透析した酵素溶液のうち190mL(total activity 2717U)を、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M(ϕ 1.0cm \times 17cm、カラム体積13.5mL)に供した。カラムは32.0mL/hの流速で溶出され、2mLずつの画分が集められた。S. buffer(約2.1カラム体積: 28mL)及び50mM塩化ナトリウムを含むS. buffer(約1.8カラム体積: 24mL)でカラムを洗浄し、非吸着画分を溶出後、50mM(100mL)及び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塩化ナトリウムを含むS. buffer(約1.8カラム体積: 24mL)によって、カラムに残存するタンパク質の溶出を行った。得られた各画分について、 A_{280} 及び酵素活性(assay volume 5-100 μ L/tube)を測定した。

リニアグラジエント溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図3に示す。

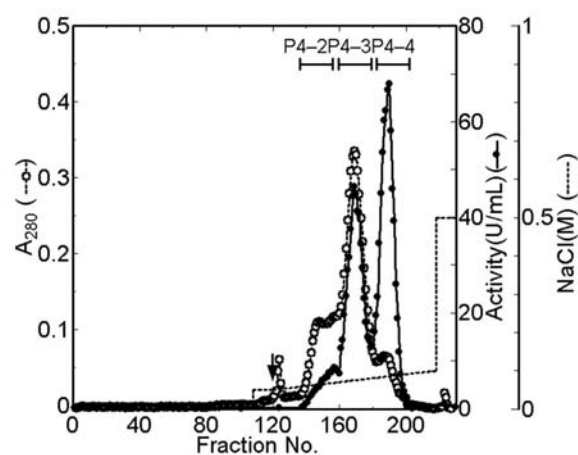


図3. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)溶出曲線。ステップ3のCM-Toyopearl 650M(ステップワイズ)で得られた活性画分のうちP4を透析後、その190mLをカラムに供し、S. bufferおよび50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで洗浄後、50mM(100mL)-0.1M(100mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferでのリニアグラジエント法で溶出した。PGase活性画分P4-2: No.138-160(42.5mL); P4-3: No.161-179(37.0mL); P4-4: No.180-203(48.0mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: ϕ 1.0 \times 17cm(13.5mL); 流速: 32.0mL/h; フラクションサイズ: 2mL/tube; PGase assay volume 5-100mL/tube。...○..., A_{280} ; -●-, PGase活性(U/mL); ---, 塩化ナトリウム濃度(M); ↓, グラジエント開始点。

50mM-0.1M塩化ナトリウム濃度でのリニアグラジエント溶出法により4つの A_{280} ピークが溶出し、これらのピークのうち3ピークがPGase活性を有していた。このクロマトグラフィーにおける全体での A_{280} 収率は102%で、クロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。また、活性収率は全体として97.5%(total activity 2648U)で高い収率が得られ、このクロマトグラフィーにおいてPGase活性は定量的に回収された。

得られた活性ピークをP4-2、P4-3、及びP4-4としてプールした。各プールの活性回収率は各々P4-2(7.80%: total

activity 212U (assay volume 100 μ L), 42.5mL), P4-3 (39.2%: total activity 1 066U (assay volume 10 μ L), 37.0mL), P4-4 (43.7%: total activity 1 186U (assay volume 10 μ L), 48.0mL)であった。クロマトグラフィー回収全活性(2 648U)に対する、P4-2、P4-3、及びP4-4の活性含有率は各々8.01%、40.3%、及び44.8%であった。最も比活性が高く、活性含量も高い活性プールであるP4-4(1 186U, 48.0mL)をさらに精製操作に供した。ステップ4でのP4に対するP4-4の活性回収率(overall)は36.9%であった。

ステップ5. Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

ステップ4で得られた主活性画分P4-4を、良好なゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行うためにCM-Toyopearl ミニカラムで濃縮した。すなわち、酵素試料のうち45.0mL (total activity 1 112U)を、CM-Toyopearl へのP4-4の吸着を促進するために500mLのS. bufferに対して、約12時間の透析を2回繰り返した。透析におけるA₂₈₀回収率は97.4%、活性回収率は93.5%(1 040U)であった。透析した試料(45.0mL)のうち43.0mL(994U)をとり、これを濃縮するために、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M ミニカラム(ϕ 1.0cm \times 10cm、カラム体積8mL)に供し、S. bufferでカラムを洗浄後、0.2M塩化ナトリウムを含むS. bufferでタンパク質を一段階溶出した。溶出した活性画分をプールした (total activity 989U (assay volume 5 μ L), 3.65mL、ミニカラム濃縮操作での活性回収率99.5%)。

濃縮酵素試料3.0mL (total activity 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Sephacryl S-200(ϕ 1.6cm \times 66cm、カラム体積133mL)に供した。溶出は平衡化に用いたバッファーと同じもの190mL(約1.4カラム体積)で行った。流速は23.6mL/hで、2mLずつの画分を集めた。得られた各画分について、A₂₈₀及び酵素活性(assay volume 10-100 μ L/tube)を測定した。

Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線を図4に示す。2つのA₂₈₀ピークが溶出し、酵素活性は2番目の主A₂₈₀ピークに存在した。

このクロマトグラフィーにおけるA₂₈₀収率は88.0%であり、ゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質の損失が若干あったものと考えられる。しかし、活性収率はクロマトグラフィー全体として96.2%(total activity 782U)と十分に高く、PGase活性はゲルろ過において定量的に回収された。

得られた活性ピークをP4-4-2(活性回収率92.6%: total activity 753U (assay volume 10 μ L), 19.2mL)としてプールし、

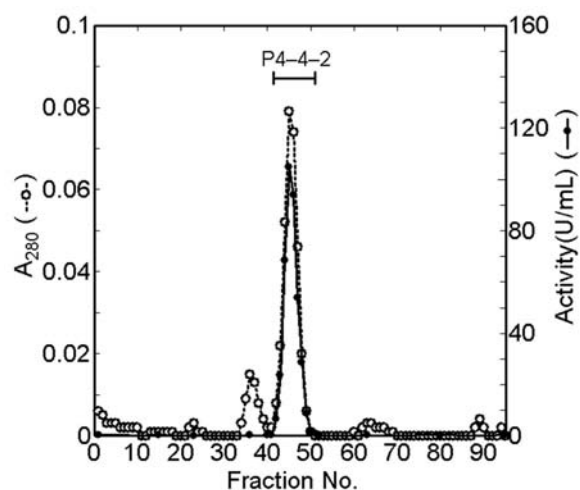


図4. Sephacryl S-200 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。

ステップ4のCM-Toyopearl 650M(リニアグラジエント)で得られた活性画分P4-4を透析し、ミニカラム法によって濃縮した酵素試料3.0mLをカラムに供し、50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P4-4-2: No.42-51(19.2mL)をプールした。カラムサイズ: ϕ 1.6 \times 66cm(133mL); 流速:23.6mL/h;フラクションサイズ:2mL/tube;PGase assay volume: 10-100 μ L/tube. $\cdots\circ\cdots$, A₂₈₀; $\text{---}\bullet\text{---}$, PGase活性(U/mL)。

これを最終精製標品PGase I とした。ステップ5でのP4-4に対するP4-4-2の活性回収率(overall)は86.2%であった。

S. sclerotiorum培養粗抽出液中の活性画分P4-4-2について各精製操作の詳細を表1に示す。

表1. S. sclerotiorum (2週間培養) 由来PGase I の精製結果。

Step	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Total A ₂₈₀	Recovered activity yield (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Crude extract	800	10 880	343	14 336	100	31.7	1
Bio-Gel P-6DG	1 084	8 032	258	1 647	73.8	31.1	0.981
CM-Toyopearl 650M(stepwise) P4	227	3 882	5.63	22.2	35.7	690	21.8
CM-Toyopearl 650M(gradient) P4-4	58.0	1 433	0.766	2.20	13.2	1 871	59.0
Sephacryl S-200 P4-4-2	31.5	1 235	0.337	1.07	11.3	3 662	116

S. sclerotiorum 20 $^{\circ}$ C \cdot 2週間培養5フラスコから粗抽出液は900mL得られたが、PGaseの精製単離はそのうち800mLを用いて行った。それ故、20 $^{\circ}$ C \cdot 2週間培養5フラスコからの粗抽出液中のPGase全活性は12 240Uであった。表1では粗抽出液800mL(10 880U)を使用した各ステップについての結果をまとめてある。

S. sclerotiorum 20 $^{\circ}$ C \cdot 2週間培養物より調製された全粗抽出液(900mL)の活性は12 240Uで、その比活性は31.7U/mg(全タンパク質量386mg)であった。これに対して、S. borealis 5 $^{\circ}$ C \cdot 2カ月培養物より調製された全粗抽出液

(850mL)の活性は7 969Uで、比活性は18.1U/mg(全タンパク質量440mg)であった(Takahashi et al. 2002)。S. borealisは成長が遅く、培養期間中に培地が乾燥しやすい傾向があり、S. sclerotiorumと比較して同様の抽出法によって得られる粗抽出液の体積は少なかった。このS. borealisの成長がS. sclerotiorumと比較して遅い理由は、培養温度が至適温度ではあるが5℃と低く、菌の成長にとって過酷な条件であること、及びPGase活性量自体がS. sclerotiorumの約65%と低く、さらにS. borealisの生育温度5℃でのPGase活性(2996U)ではS. sclerotiorumの約24%まで低下し、従って培地の分解には時間がかかるためと思われる。

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73.8%と低く、またこのステップで得た脱塩活性画分の比活性(31.1U/mg)が粗抽出液の比活性(31.7U/mg)よりもごくわずかに低下しており、精製倍率は0.981倍となった。この理由は、粗抽出液中のPGaseを含む全タンパク質がBio-Gel P-6 DGゲルろ過クロマトグラフィーによってほぼ完全に回収されたが、イオン強度の低下によってゲルろ過クロマトグラフィー後に生じた共存タンパク質の沈殿にPGaseが共に吸着し、このためPGaseが溶液から除かれたこと、およびメンブランろ過処理によってPGaseの失活が引き起こされた可能性も考えられる。一方、S. borealis由来のPGase Iの精製における同様の操作においては、ゲルろ過クロマトグラフィー後のタンパク質の沈殿やPGaseの失活は見られなかった。このような結果から、S. sclerotiorum由来のPGaseはS. borealis由来のものに比べて、物理的な吸着などを起こしやすい性質をもつものと考えられる。

CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)における活性収率は82.3%であり、活性の損失が若干あったが、S. borealis由来のPGase Iの精製(Takahashi et al. 2002)における同ステップでの活性収率(59.6%)と比較して明らかに高かった。また、CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)においてS. sclerotiorum由来のPGase(P4)は更に2アイソザイム(P4-3及びP4-4)に分離されたが、このクロマトグラフィー全体での活性収率は97.5%と高く、活性の損失は見られなかった。これらの点から、Martel et al.(1998)がS. sclerotiorumのPGaseアイソザイムにおいて言及しているアイソザイム間の協同的相互作用が、S. borealis由来のPGasesにおいては存在したが、この作用がアイソザイムの相互分離によって消失したことによってステップワイズクロマトグラフィー全体の活性収率が低下したと考えられる。一方、S. sclerotiorum由来のPGasesにおいては、Martel et al. (1998)によって述べら

れたようなアイソザイム間の相互作用(P2、P3及びP4の間の、及びP4-3とP4-4との間の協同的相互作用)はS. borealisの場合に比べごく弱いものと思われる。

このステップにおけるPGaseアイソザイムの分離パターンは、同様の溶出法(ステップワイズ)であるにもかかわらず、S. sclerotiorumとS. borealisとの間で異なっていた。50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferによって、S. sclerotiorumの場合にはPGaseの2アイソザイム(P2及びP3)が溶出された。一方、S. borealisでは4アイソザイム(P2、P2'、P3、及びP3')の溶出が観察された。次に、0.1M塩化ナトリウムを含むS. bufferによって、S. sclerotiorumのPGaseは2重に重なったピーク(P4)として溶出されたが、S. borealisにおいては単一のピーク(P4)として溶出された。さらに、S. sclerotiorumの場合にはステップワイズ溶出法で溶出された2重に重なった活性ピーク(P4)はリニアグラジエント溶出法によりほぼ等活性含有量の2アイソザイム(P4-3(活性含有率40.3%)及びP4-4(活性含有率44.8%))に相互分離され、一方S. borealisの場合には、グラジエント溶出法によってもほぼ単一の活性ピーク(P4-2、活性含有率72.8%)として溶出された。

S. sclerotiorum由来のPGaseはステップワイズ溶出法によって3アイソザイム(P2、P3、及びP4)に分離されたが、活性主画分(P4、活性回収率48.3%、活性含有率58.8%)のみをさらに精製に供し、他のアイソザイムは除かれたために、この精製段階における粗抽出液からのP4活性回収率(overall)は35.7%(ステップワイズ溶出法クロマトグラフィー全活性収率82.3%)となった。

CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)におけるクロマトグラフィー全体での活性収率は97.5%で、高い回収率が得られた。このクロマトグラフィーにおいて得られた2アイソザイム(P4-3(活性含有率40.3%、比活性395U/mg)及びP4-4(活性含有率44.8%、比活性1 871U/mg))はほぼ等活性含有量であったが、比活性は大きく異なっていた。

このステップにおいても、PGaseアイソザイムの分離パターンはS. sclerotiorumとS. borealisとの間で異なっていた。このステップにおけるS. borealis由来のPGase(P4-2、活性含有率72.8%、比活性1 090U/mg)は約70mM塩化ナトリウムを含むS. bufferにより、ほぼ単一のピークとして溶出された。これと比較して、S. sclerotiorum由来のPGase 2アイソザイム(P4-3及びP4-4)はそれぞれ約75mM及び約85mM塩化ナトリウムを含むS. bufferにより溶出された。

このクロマトグラフィーで得られたPGaseアイソザイムの内、活性含有率及び比活性が最も高いP4-4のみをさらに精製に供し、他のアイソザイムは除かれたために、

この精製段階における粗抽出液からの活性回収率(overall)は13.2%となった。

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。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%の活性回収率であった。精製標品の比活性は3 662U/mgで、粗抽出液から116倍に精製された。

同様の精製操作によって得られた*S. borealis*由来のPGase I (Takahashi et al.2002)は、比活性が1960U/mgであり、*S. sclerotiorum*由来のPGase Iは*S. borealis*由来PGase Iと比較して約2倍の比活性を与え、強い活性を有していた。一方、*S. borealis*由来PGase Iの活性回収率は11.9%、また、精製倍率は108倍であり、*S. sclerotiorum*由来のPGase Iの精製の結果とほぼ同様の値であった。しかしながら、*S. borealis*由来のPGaseアイソザイム間には協同的相互作用が強く見られ、粗抽出液中の全活性は相互分離されたアイソザイムそれぞれの活性の和よりも高い値となっているにもかかわらず、その粗抽出液の比活性は*S. sclerotiorum*由来の粗抽出液の比活性の約6割程度の値であった。

*S. sclerotiorum*20°C・2週間フスマ培養物は、菌糸が完全にフスマ培地に蔓延し、菌核を形成していたことから、生育段階の定常状態後期にあると考えられる。この培養物から抽出されたPGasesはpH4.5でCM-Toyopearl 陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて陽イオン交換樹脂に吸着したことから、中性または塩基性PGaseアイソザイムと考えられ、素通り画分のPGase活性(酸性PGases)は痕跡量(活性含有率約3%)しか見られなかった(図2)。一方、Martel et al. (1998)は、*S. sclerotiorum*の液体培養期間のそれぞれ異なる培養ろ液から9種類のPGaseアイソザイムを相互分離し、定常期(22°C・10日間培養)の培養ろ液からは、pH5においてEcono-Pac S陽イオン交換樹脂に吸着しないアイソザイム(酸性PGases)が主活性画分として得られ、さらに対数増殖期(22°C・4日間培養)において主に得られる、陽イオン交換樹脂に吸着するPGaseアイソザイムにおいてもそのpIは酸性側にあることを報告した。また、Waksman et al. (1991)は*S. sclerotiorum*の培養ろ液(25°C・12日間培養)から、主なPGase活性画分としてpI4.8及び4.9を持つ2アイソザイム(酸性PGases)を単離した。我々が陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによって相互分離したPGaseアイソザイムについては、素通り画分の酸性PGasesはごく低い含有率であり、ほとんどが中性または塩基性PGaseであると思われる、これらの報告とは異なっていた。

Marciano et al.(1982)は、PGAまたはペクチンを加えた液

体培地での*S. sclerotiorum*培養(25°C・4及び8日間)ろ液からはそれぞれpI4.8(exo型; PGA存在下)または5.1(endo型; ペクチン存在下)の酸性PGaseアイソザイムをそれぞれ主な活性画分として得た。一方、*S. sclerotiorum*に感染した植物組織からはpI8.3(endoまたはexo型)を持つPGaseアイソザイムの存在を確認した。また、Fraissinet-Tachet et al.(1995)及びReymond et al.(1996)は、*S. sclerotiorum*において中性PGaseアイソザイムをコードする遺伝子が*in vivo*の腐生条件下(ペクチン又はPGA存在下での液体培養法)では発現しない一方、植物組織への感染中には発現することを示した。

これらの事実から、このような違いが生じた原因は、培養条件(液体培養と固体培養)の違いによるものと考えられる。すなわち、液体培地での培養においてはPGA(またはペクチン)は存在しているが天然の状態とは異なっており腐生(死物寄生)状態に近く、*S. sclerotiorum*が病原性を発現せず、低いpIを持つ酸性PGaseアイソザイムが産生され、一方、より天然に近い状態と考えられるフスマ培養においては*S. sclerotiorum*が存在環境刺激によって病原性を示し、その結果として中性ないしは塩基性側のpIを持つアイソザイムの産生が惹起されると考えられる。Keon and Waksman(1990)は、液体培養条件(25°C・12日間培養)においてごく微量ではあるが中性および塩基性PGasesが存在していることを確認した。このような事実は、我々の培養条件が*S. sclerotiorum*の病原性発現を刺激し、その結果、中性ないし塩基性PGaseアイソザイムの産生を促していることを強く示唆しているものと思われる。

PGase I (P4-4-2)の純度および分子特性

カラムクロマトグラフィー精製標品PGase I (P4-4-2)の純度、分子質量および等電点を電気泳動を用いて調べた。

8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにおける、*S. sclerotiorum*由来PGase I 精製標品(P4-4-2)のnondenaturing PAGE(pH4.2)及びSDS-PAGE(pH8.5)の結果を図5に示す。2種類の電気泳動法において、CBB染色法により単一のバンドが検出され、精製標品P4-4-2は均一に精製されたことが示された。P4-4-2は塩基性タンパク質であったため、銀染色法においては明瞭な染色バンドが得られなかった。

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6)から酵素の分子質量は 39.8 ± 1.10 kDa(S.E.)と見積もられた。

*S. borealis*由来PGase I において同様に見積もられた分子質量は 39.8 ± 0.37 kDaであり、この2種類のPGaseは類似の分子質量を持つことが明らかにされた。

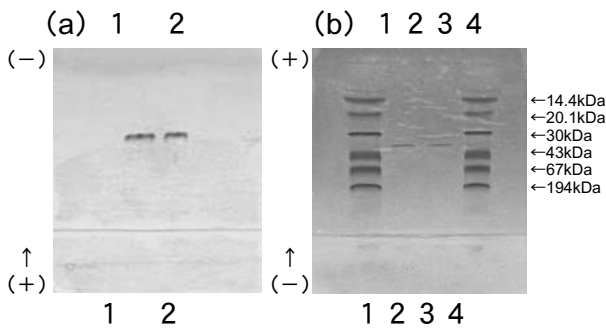


図5. *S. sclerotiorum* PGase I 精製標品(P4-4-2)のポリアクリルアミドゲル電気泳動. nondenaturing PAGE(a)は8-25%グラジエントゲルを用いてpH4.2で行い、ゲルはCBB R-250で染色した。レーン1, 2: P4-4-2, 0.07 μ g. SDS-PAGE(b)は、試料を2.5%(w/v)SDS、1%(w/v)ジチオスレイトール(DTT)、及び1mM EDTAと共に100°Cで2分間インキュベートした後、0.55%(w/v)SDSの存在下8-25%グラジエントゲルを用いてpH8.5で泳動を行った。ゲルはCBB R-250で染色した。レーン2, 3: P4-2-2, 0.04 μ g; レーン1, 4: 分子質量マーカータンパク質; \uparrow : 電気泳動方向。

また、IEFにおいて、等電点マーカータンパク質の移動度に対する各々の等電点のプロットの標準曲線一次回帰式(図7)から、酵素のpIは8.70と見積もられ、*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-2-2)は塩基性タンパク質であることが示された。一方、*S. borealis*由来のPGase IはpI7.88であり、2種類のPGaseにはpIにおいて相違が見られた。

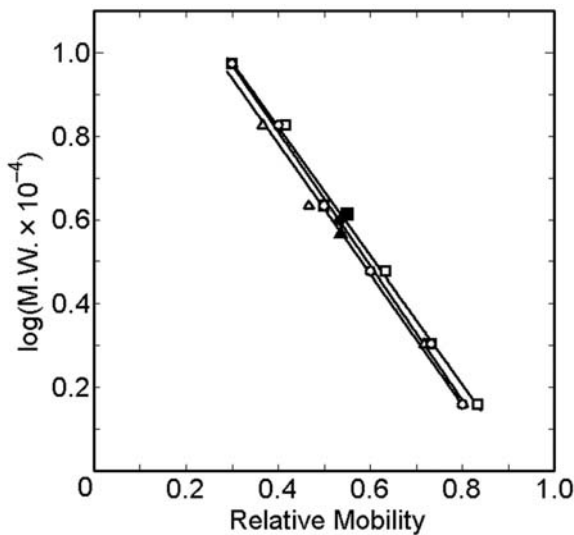


図6. SDS-PAGEによる*S. sclerotiorum* PGase I (P4-4-2)の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の移動度に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした。標準曲線一次回帰式は、 $y = -1.61x + 1.45$ (—○—)、 $y = -1.56x + 1.41$ (—△—)、及び $y = -1.54x + 1.44$ (—□—)であった。一次回帰式の相関係数は各々 $R = 0.9984$ 、 $R = 0.9963$ 、及び $R = 0.9976$ であった。●、▲、■: 各々の電気泳動でのPGase精製標品(P4-4-2)のプロット。この電気泳動によって求められたPGase I (P4-4-2)の分子質量は各々40.0kDa、37.8kDa、及び41.6kDaであった。

しかしながら、*S. borealis*由来のPGase Iの等電点は*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-4-2)と比較すると若干酸性側にシフトしているものの、なお塩基性側であった。すなわち、*S. borealis*由来のPGase Iは塩基性PGaseであり、

本研究で精製単離された*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-4-2)と同様に、*S. borealis*による雪腐菌核病の病原性に深く関与するPGaseアイソザイムであると考えられる。

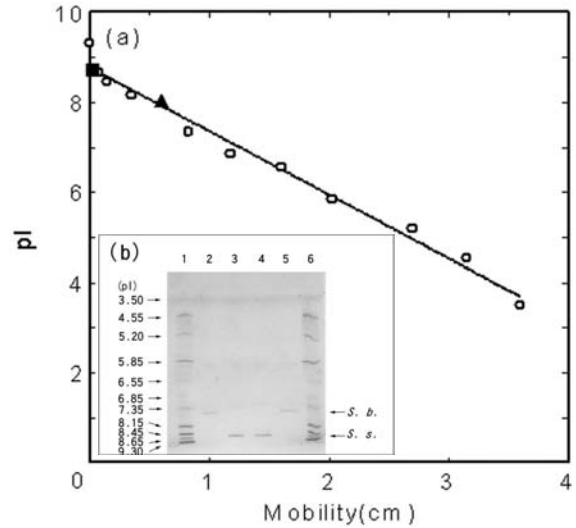


図7. IEFによる*S. sclerotiorum* PGase I (P4-4-2)の等電点の決定. (a) pIマーカータンパク質の移動度に対して各々のpIをプロットした。標準曲線の一次回帰式は $y = -1.41x + 8.77$ であった。一次回帰式の相関係数は $R = 0.9914$ であった。○: pIマーカータンパク質; ■: *S. sclerotiorum*由来PGase I 精製標品(P4-4-2); ▲: *S. borealis*由来PGase I (P4-2-2). (b)IEFは、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、pH3-9の範囲で行い、ゲルはCBB R-250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).

参考文献

Andrews, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.

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.

Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., and Fevre, M. 1995. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* **29**: 96-99.

- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- 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.]
- 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.
- 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. and Visser, J. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**: 150-160.
- 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.
- 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.
- 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.
- Reymond-Cotton, P., Fraissinet-Tachet, L., and Fevre, M. 1996. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase pg1 gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr. Genet.* **30**: 240-245.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., and Schell, M. A. 1988. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170**: 1445-1451.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. *Methods Enzymol.* **161**: 366-373.
- 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 cultures of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 243-255. [In Japanese.]
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 103-107. [In Japanese.]
- Waksman, G., Keon, J. P. R., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- 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.
- Wu, C. M., Koehler, P. E., and Ayres, J. C. 1972. Isolation and identification of xanthotoxin(8-methoxyysoralen) and bergapten(5-methoxyysoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Microbiol.* **23**: 852-856.

Summary

Polygalacturonase I has been isolated from the mesophilic white mold *Sclerotinia Sclerotiorum* by cation-exchange chromatography on a column of CM-Toyopearl followed by gel filtration on a column of Sephacryl S-200. Purified enzyme preparation(P4-4-2) had a specific activity of 3 662 units per mg of protein, that is, 116-fold purification over the crude extract of the wheat bran culture of the mesophilic fungus *S. sclerotiorum*. The purified enzyme was determined to be homogeneous by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 39.8 ± 1.1 kDa(S.E.) by the polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate, and its isoelectric point was estimated to be pH 8.70 by isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, mesophile, white mold, polygalacturonase, cell wall degrading enzyme