

好冷性雪腐菌核病菌*Sclerotinia borealis*のポリガラクツロナーゼ I の単離

高橋 裕司・井熊 武志・勾坂 慶子・斎藤 泉¹・高澤 俊英

Isolation of polygalacturonase I from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*.

Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA
(受理: 2001年11月30日)

概要

ポリガラクツロナーゼ I を、CM-Toyopearl陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびSephadryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の培養抽出物のポリガラクツロナーゼ活性主要画分から単離した。ポリガラクツロナーゼ I 精製酵素(P4-2-2)の比活性は1 960U/mgであり、粗抽出液から全體として108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±0.371kDa(S.E.)と見積もられた。

キーワード: *Sclerotinia borealis*, 好冷菌, 雪腐菌核病菌, ポリガラクツロナーゼ, 細胞壁分解酵素

緒論

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* は、北海道東部を中心とした寒冷地に分布する植物病原性糸状菌で、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°C~5°Cの積雪下で生育し、実験的に

は5°Cで最も良い成長を示す一方、20°Cでは成長を示さず、好冷菌 (Psychrophiles) に分類される (Inniss 1975)。

植物病原菌の病原性には、ポリガラクツロナーゼ (PGase) が深く関わ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、ポリガラクツロン酸を主な基質として、ガラクツロン酸残基間のα-1,4-結合を加水分解する。この酵素は、これまでに菌類 (Waksman

帯広畜産大学生物資源科学科

Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹北海三共株式会社研究部

¹Agroscience Research Laboratory, Hokkai Sankyo Co.

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。我々の以前の研究において, *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, 低溫域における40°C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。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, *S. borealis*からPGaseをまず単離しようと試みた。

また, 我々は既に*S. borealis* (5°C, 6カ月培養) から1% (w/v) ペクチン溶液を基質として用いた粘度測定法によるPGase活性測定法によってPGaseを単離 (Takasawa et al. 1997) したが, ここでは活性値の定量性が高く信頼性のある遊離還元糖高感度定量法 (Ikuma et al. 2001) によるPGase活性のモニター法を採用し, 5°C・2カ月培養*S. borealis*の粗抽出液からのPGaseの精製各段階 (クロマトグラフィー) の詳細を定量的に扱った結果を得たのでこれを報告する。

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), 水酢酸 (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 lyophilized, 窒素分 14.8% (w/v)), Bio-Gel P-6DG (Bio-Rad), CM-Toyopearl 650M (東洋曹達), Sephadryl S-200 (Pharmacia), Dialysis Membrane (Viskase Sales Co. /和光純薬工業)。

菌株の培養

*S. borealis*の菌株をまず, 寒天平板培地上で5°Cで培養した。3.9% (w/v) PDA溶液を121°C, 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。PDA斜面培地より*S. borealis*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, 5°Cで2カ月間培養した。

次に上記寒天培養物を小麦フスマ培地に移植した。即ち, 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, 小麦フスマ培地とした。*S. borealis*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, 5°Cで2カ月間静置培養した。

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ェント法を用いた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは, Bio-Gel P-6 DG及びSephadryl S-200カラムを用いて行った。精製操作は全て5°C (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) はPhast system (Pharmacia LKB) を用いて行った。

nondenaturing PAGE及びSDS-PAGEは, いずれも8-25%ポリアクリルアミドグラジェントゲルを用いて, pH8.8において行った。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タンパク質を用いた。ウサギ筋ホスホリラーゼB (94 kDa), 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イザ (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)。

酵素活性の測定

ポリガラクツロナーゼ (PGase) 活性は、1% (w/v) ポリガラクツロン酸-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ツロン酸の平均重合度 (Degree of polymerization) を求めた。ポリガラク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、酵素プ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回の繰り返し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、プ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

ステップ1. 粗抽出液の調製

*S. borealis*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*S. borealis* 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。ろ液に氷酢酸を加えpH4.5に調整した後、メンプランろ過 (0.2 μ mセルロースアセテート, Advantec) 減菌した。このろ液 (850mL; assay volume 50 μ L; total activity 7 965U) を粗抽出液として、5°Cで保存した。このうち800mL (7 496U) を用いてPGaseの精製を行った。

ステップ2. Bio-Gel P-6DG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 (1.22mmho; 約55 mM NaCl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 (total activity 3 748U) を、あらかじめS. bufferで平衡化したBio-Gel P-6DGカラム (ϕ 4.4cm × 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78.0mL/hの流速で溶出した。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_{280}) 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 μ L/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。

Bio-Gel P-6DG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。タンパク質は4ピーカーに分離して溶出されたが、酵素活性は主ピーカーである最初のピーカ (V_0 ピーカ) に存在した。電気伝導度により確認された塩ピーカ (V_t ピーカ) との相互分離は良好で、粗抽出液に含まれる活性画分は完全に脱塩された。クロマトグラフィー全体としての A_{280} 収率は101.8%であり、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。しかしながらタ

ンパク質のカラムからの溶出は約2.6カラム体積 (3 800mL) まで観察 ($A_{280} < 0.1$) され、サンプル中の一部のタンパク質とゲルマトリックスとの非特異的相互作用があったものと思われる。この様な相互作用は、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、そのためにカラムの溶出液として用いたS. bufferのイオン強度が通常 (Andrews 1965) より低かったために生じたものと考えられる。ゲルろ過カラムクロマトグラフィー全体としての活性収率は96.5%で良好な収率であった。PGase活性画分 (試験管番号30-56) 496mL (活性回収率95.8%) をプールし、同様の粗抽出液400mLのゲルろ過から得られた活性画分470mL (活性回収率97.1%) と合わせて966mL (assay volume 50 μ L; total activity 7 197U; 活性回収率96.0%) の脱塩活性画分を得た。

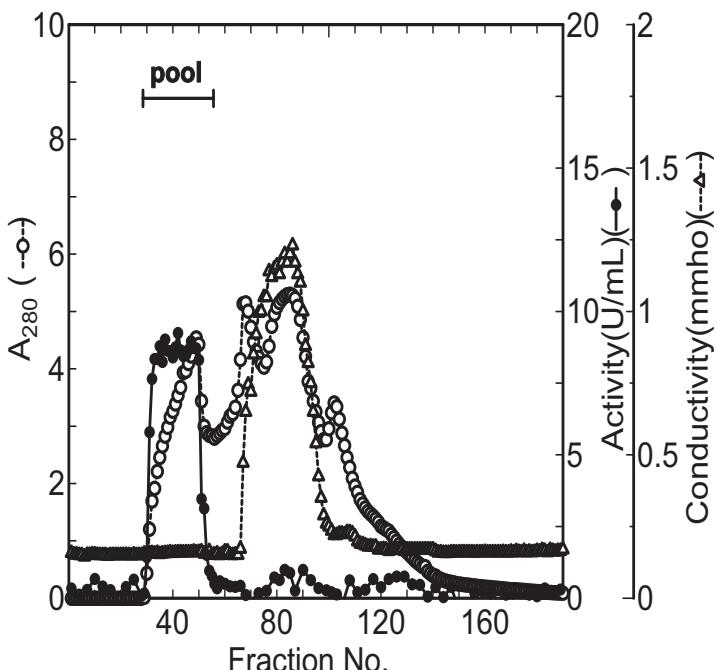


図1. Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。
粗抽出液400mLをカラムに供し、S. bufferで溶出した。No. 30-56(496mL)
のPGase活性画分をプールした。カラムサイズ: $\phi 4.4 \times 95\text{cm}$,
1444mL; 流速: 78.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase
assay volume: 50 μ L/tube. ⋯○⋯, A_{280} ; —●—, PGase活性
(U/mL); ⋯△⋯, 電気伝導度(mmho).

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から920mL (total activity 6 854U) をとり、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650Mカラム (ϕ 2.6cm \times 35cm, カラム体積186mL) に供した。引き続き、約4カラム体積 (740mL) のS. bufferで非吸着画分を溶出した後、50mM (4.5カラム体積: 840mL), 0.1M (3カラム体積: 540mL), 0.5M (2.4カラム体積: 440mL), 1.0M (3.5カラム体積: 660mL) 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_{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A₂₈₀及びPGase活性（assay volume 10-100μL/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。50mM塩化ナトリウム-S. bufferで4つの弱い活性ピーク(P₂, P_{2'}, P₃, 及びP_{3'})が溶出され、その後0.1M塩化ナトリウム-S. bufferによって1つの主活性ピーク(P₄)が溶出した。

このクロマトグラフィーにおける全体としての A_{280} 収率は 93.0% であり、タンパク質の損失は少なかったと判断されるが、一方、活性収率は 59.7% (total activity 4 090U) と低い値になり、この精製段階において活性の損失が見られた。異なる酵素

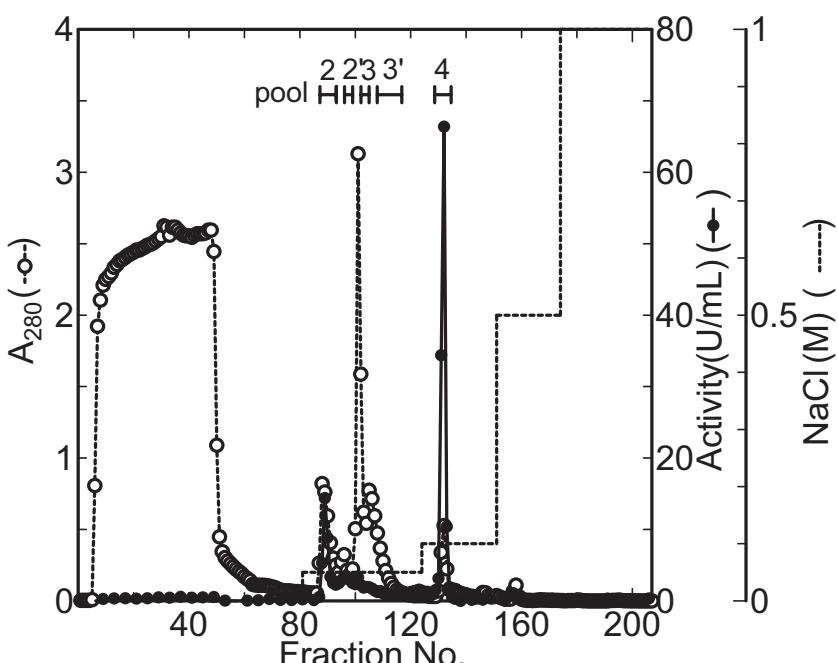


図2. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)溶出曲線

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920mLをカラムに供し、S. bufferで洗浄後、50mM, 0.1M, 0.5M, 1.0M塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P2: No. 87-92(121.2mL); P2': No. 94-99(122.8mL); P3: No. 101-102(41.9mL); P3': No. 103-117(310.0mL); P4: No. 130-135(124.0mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: ϕ 2.6 × 34cm, 186mL; 流速: 38.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 10-100 μ L/tube. …○…, A₂₈₀; —●—, PGase活性(U/mL); …, 塩化ナトリウム濃度(M).

標品の調製における同様のクロマトグラフィーにおいてもこの様な活性収率(59.1%)は再現された。活性の損失は、クロマトグラフィーにおける A_{280} 吸率が非常に高いため、ポリガラクツロナーゼのCM-Toyopearlクロマトグラフィー樹脂への非特異的吸着によるものではなく酵素活性の性質によるものと考えられる。このクロマトグラフィーは時間(5°C, 約2日間)を必要とするのでクロマトグラフィー操作中におけるCM-Toyopearl 650M樹脂と結合したことによるポリガラクツロナーゼの失活とも考えられるが、このステップでの酵素の精製倍率が大きく上昇(P2: 2.4倍; P4: 18.4倍)していること、及び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(リニアグラジェント溶出法)においての全活性収率が95.5%と非常に高かった事実から、クロマトグラフィー中の失活の可能性は低いと考えられる。この精製段階においてアイソザイム(P2, P2', P3, P3', 及びP4)が分離されたことから、粗抽出液およびBio-Gel P-6 DGゲルろ過クロマトグラフィーからの脱塩活性画分においてはポリガラクツロナーゼアイソザイム間の協働的相互作用(Bartling et al. 1995; Bhat et al. 1994; Wood et al. 1986)が存在したために高い酵素活性を有していたが、陽イオン交換クロマトグラフィーによるアイソザイムの相互分離の結果この相互作用が消失し、その結果として活性収率が低下した可能性が強く示唆される。

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(11.6%, total activity 792U (assay volume 100μL), 121.2mL), P2'(6.03%, total activity 413U (assay volume 100μL), 122.8mL), P3(1.85%, total activity 127U (assay volume 100μL), 41.9mL), P3'(6.10%, total activity 418U (assay volume 100μL), 310.0mL), P4(33.1%, total activity 2 270U (assay volume 10μL), 124.0mL)であった。クロマトグラフィー全体で回収した全活性(4 090U)に対する各プールの活性含有率は各々P2(19.4%), P2'(10.1%), P3(3.1%), P3'(10.2%), P4(55.5%)であった。主要な活性プールであるP4(2 270U, 124.0mL)についてさらに精製を行った。ステップ3での脱塩活性

画分に対するP4の活性回収率は33.1%であった。

ステップ4. CM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー(リニアグラジェント溶出法)

酵素溶液(P4)のうち110mL(total activity 2 014U)をとり、1.5LのS. bufferに対して、約20時間の透析を2回繰り返した。透析後(110mL)の回収率については、 A_{280} で81.7%, CBB法によるタンパク質量で93.4%，及び酵素活性で92.0%であり、透析操作によって若干活性の損失があったものと思われる。

透析した酵素溶液のうち100mL(total activity 1 684U)を、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M(Φ1.0cm×17cm, カラム体積13.5mL)に供した。カラムは32.8mL/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2.1カラム体積: 28mL)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ェント溶出法を行った。その後、0.5M(約2.1カラム体積: 28mL), 1.0M(約2.0カラム体積: 26mL)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(assay volume 5-100μL/tube)を測定した。

リニアグラジェント溶出法による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。タンパク質は約70mM塩化ナトリウム濃度で肩を有するひずんだ1つのピークとして溶出し、この A_{280} ピークは2つの活性ピーク(P4-1及びP4-2)を含んでいた。

このクロマトグラフィーにおける全体としての A_{280} 吸率は93.8%で、タンパク質の損失は少なかったと判断される。また、活性収率は全体として95.5%(total activity 1 608U)で高い収率が得られ、PGaseのクロマトグラフィーは定量的に行われたと考えられる。

得られた活性ピークをP4-1およびP4-2としてプールした。各プールの活性回収率は各々P4-1(14.1%: total activity 237U (assay volume 100μL), 18

mL), P4-2 (69.5% : total activity 1 170U (assay volume 10 μ L), 36mL) であった。P4-1及びP4-2のクロマトグラフィー回収全活性 (1 608U) に対する活性含有率は各々 14.7% 及び 72.8% であった。主要な活性プールである P4-2 (1 170U, 36mL) をさらに精製操作に供した。ステップ4での P4 に対する P4-2 の活性回収率 (overall) は 63.9% であった。

ステップ5. Sephadryl 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 P4-2 の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試料を CM-Toyopearl ミニカラムで濃縮した。即ち、酵素試料 (P4-2) のうち 35.0mL (total activity 1 138 U) を、CM-Toyopearl への P4-2 の吸着を促進するために 500mL の S. buffer に対して、約 24 時間の透析

を 2 回繰り返した。透析した試料を濃縮するために、あらかじめ S. buffer で平衡化した CM-Toyopearl 650M ミニカラム ($\phi 1.0\text{cm} \times 10\text{cm}$, カラム体積 8mL) に供し、S. buffer で洗浄後、0.2M 塩化ナトリウムを含む S. buffer で一段階溶出した。溶出された活性画分は濁っていたため、遠心分離 (15 000rpm, 15 分, 5°C) によって濁りを除いた後プールした (total activity 922U (assay volume 5 μ L), 透析およびミニカラム濃縮操作での活性回収率 81.0%, 5.4mL)。

濃縮酵素試料 4.5mL (total activity 768U) 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) Sephadryl S-200 ($\phi 1.6 \times 66\text{cm}$, 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 190mL (約 1.4 カラム体積) で行った。流速は 23.6mL/h で、

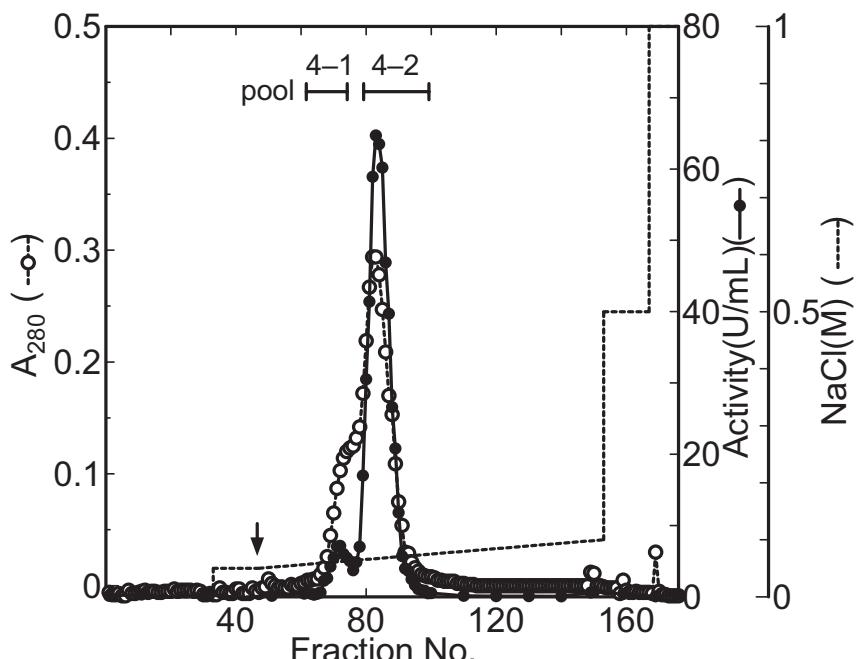


図 3. CM-Toyopearl 650M 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(リニアグラジェント溶出法)溶出曲線。

ステップ3の CM-Toyopearl 650M (ステップ4) で得られた活性画分のうち主活性画分 (P4) を透析後、その酵素試料 100mL をカラムに供し、S. buffer 及び 50mM 塩化ナトリウムを含む S. buffer でのリニアグラジェント法で溶出した。PGase 活性画分 P4-1: No. 67-76 (18mL); P4-2: No. 80-98 (36mL) をそれぞれプールした。カラムサイズ: $\phi 1.0 \times 17\text{cm}$, 13.5mL; 流速: 32.8mL/h; フラクションサイズ: 2mL/tube; PGase assay volume: 5-100 μ L/tube. ---○---, A₂₈₀; —●—, PGase活性(U/mL); ···, 塩化ナトリウム濃度(M); ↓, グラジェント開始点。

2mL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（assay volume 10-100 $\mu\text{L}/\text{tube}$ ）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。タンパク質は A_{280} で3つのピークに分離された。酵素活性は2番目の主 A_{280} ピークに存在していた。PGaseタンパク質はここでの溶出条件下ではSephacryl S-200ゲルマトリックスとの非特異的相互作用をしなかったものと思われる。

このクロマトグラフィーにおける A_{280} 収率は69.8%と低い値であり、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あったものと思われる。しかしながら、活性収率はクロマトグラフィー全体として98.3%と非常に高く、ポリガラクツロナーゼ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P4-2-2（活性回収率72.0%：total activity 553U (assay volume 10 μL)，

9.3mL）としてプールし、最終精製標品とした。精製操作の結果から、*S. borealis*からのPGaseには少なくとも6種類のアイソザイムが存在することが明らかになったので、ここで得られたPGase活性主画分からの精製標品P4-2-2をPGase Iとした。ステップ5でのP4-2に対するP4-2-2の活性回収率（overall）は58.3%であった。

*S. borealis*培養粗抽出液中のPGase活性主画分（PGase I）について各精製操作の詳細を表1に示す。

CM-Toyopearl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）における全活性収率は59.7%と低かった。この理由は、この精製段階において5つのアイソザイム（P2, P2', P3, P3', 及びP4）が相互分離されたため、アイソザイム間の協働的相互作用（Bartling et al. 1995; Bhat et al. 1994; Wood et al. 1986）が消失してクロマトグラフィー全体としての活性収率が低下したと考えられる。ま

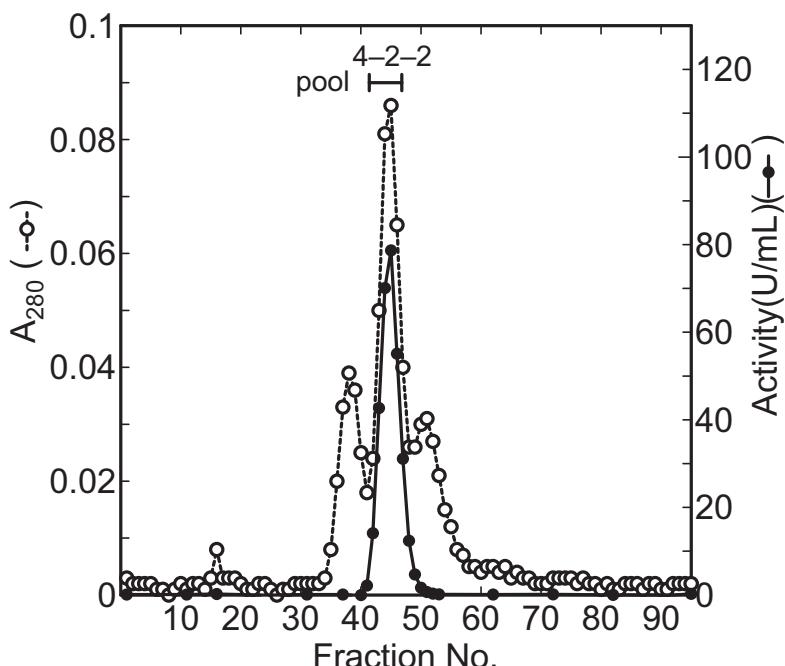


図4. Sephadryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。
ステップ4のCM-Toyopearl 650M(リニアグレード)で得られた活性主画分(P4-2)を透析の上、ミニカラム法によって濃縮した酵素試料4.5mLをカラムに供し、50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P4-2-2 : No. 43-47 (9.3mL)をプールした。カラムサイズ: $\phi 1.6 \times 66\text{cm}$, 130mL; 流速: 23.6mL/h; フラクションサイズ: 2mL/tube; PGase assay volume: 10-100 $\mu\text{L}/\text{tube}$. ⋯○⋯, A_{280} ; —●—, PGase活性(U/mL).

た、このステップではPGaseには5アイソザイムが存在したにもかかわらず活性主画分（P4、活性回収率33.1%、活性含有率55.5%）のみを集めたために、すなわち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31.8%（ステップワイズ溶出法クロマトグラフィー全活性率59.7%）となった。

CM-Toyopearl陽イオン交換クロマトグラフィー（リニアグラジェント溶出法）におけるクロマトグラフィー全体としての活性回収率は95.5%で高い収率が得られたが、このステップでもアイソザイムが相互分離され、主活性画分（P4-2、活性回収率69.5%、活性含有率72.8%）のみを集めたために、この精製段階における粗抽出液からの活性回収率（overall）は20.3%となった。

S. borealis 5°C・2カ月培養5フラスコから粗抽出液は850mL得られたが、PGase I の精製単離はそのうち800mLを用いて行った。それ故、5°C・2カ月培養 5 フラスコからの粗抽出液中のPGase全活性は7 965Uであった。表1では粗抽出液800mLを使用して各ステップについての結果をまとめてある。800 mL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。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1 960

U/mgで、粗抽出液から108倍に精製された。

*S. borealis*の5°C・6カ月培養物からのPGaseの単離（Takasawa et al. 1997）においては、5°C・2カ月培養物からにおいて見られたCM-Toyopearl 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）でのP2'およびP3'、およびCM-Toyopearl 650M 陽イオン交換クロマトグラフィー（リニアグラジェント溶出法）でのP4-1は見られなかった。これは、培養期間の違いによってアイソザイムの分布が変化したためと考えられる。また、5°C・6カ月培養物から均一な精製標品を得るためににはさらにMono S FPLC（Pharmacia）による精製操作を必要としたことから、培養期間の違いによって共存タンパク質についても違があるものと考えられる。

5°C・6カ月培養物からのPGaseの単離（Takasawa et al. 1997）においてはPGase活性を粘度測定法により測定したために、今回の還元糖の定量による結果と5°C・6カ月培養からのPGaseの活性値とを直接比較検討することは出来なかった。タンパク質量は、粗抽出液中においては454.2mg（6カ月培養、900mL）に対し440mg（2カ月培養、850mL）で大きな差はなかったが、一方最終精製標品においては1.4mg（6カ月培養、14.6mL）に対し0.454mg（2カ月培養、14.9mL）で、6カ月培養の方が活性回収率（27.6%）が高かったために約3倍多く回収されてい

表1. *S. borealis* (2カ月培養) 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	7 496	414	12 940	100	18.1	1
Bio-Gel P-6DG	966	7 197	312	2 990	96.0	23.1	1.28
CM-Toyopearl 650M(stepwise) P4	130	2 383	5.58	29.6	31.8	427	23.6
CM-Toyopearl 650M(gradient) P4-2	46.9	1 524	1.40	5.82	20.3	1 090	60.2
Sephacryl S-200 P4-2-2	14.9	889	0.454	0.820	11.9	1 960	108

た。また、PGase I 最終精製標品の粗抽出液からの精製倍率は、6カ月培養で89.6倍、2カ月培養で108倍と、2カ月培養の方が約20%高かった。これらの結果から、粗抽出液中のPGase含有率は培養期間を2カ月(4.05mg)から6カ月(5.07mg)に延長することによって活性回収率を考慮すると約20%高くなると考えられる。従って精製倍率も2カ月培養に比べて6カ月培養の方が約20%低下しているのも妥当性がある。

PGase I (P4-2-2) の純度および分子質量

カラムクロマトグラフィー精製標品 (P4-2-2) の

純度および分子質量を電気泳動を用いて調べた。

8-25%ポリアクリルアミドグリジエントゲル(pH8.8)における、*S. borealis*由来PGase活性主画分からのPGase I 精製標品 (P4-2-2) のnon-denaturing PAGE及びSDS-PAGEの結果を図5に示す。2種類の電気泳動法において、CBB染色法および銀染色法それぞれにおいて単一のバンドが検出され、精製標品P4-2-2は均一に精製された。

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のプロットの標準曲線一次回帰式(図6)からPGase I (P4-2-2) の分子質量は 39.8 ± 0.371 kDa (S.E.)

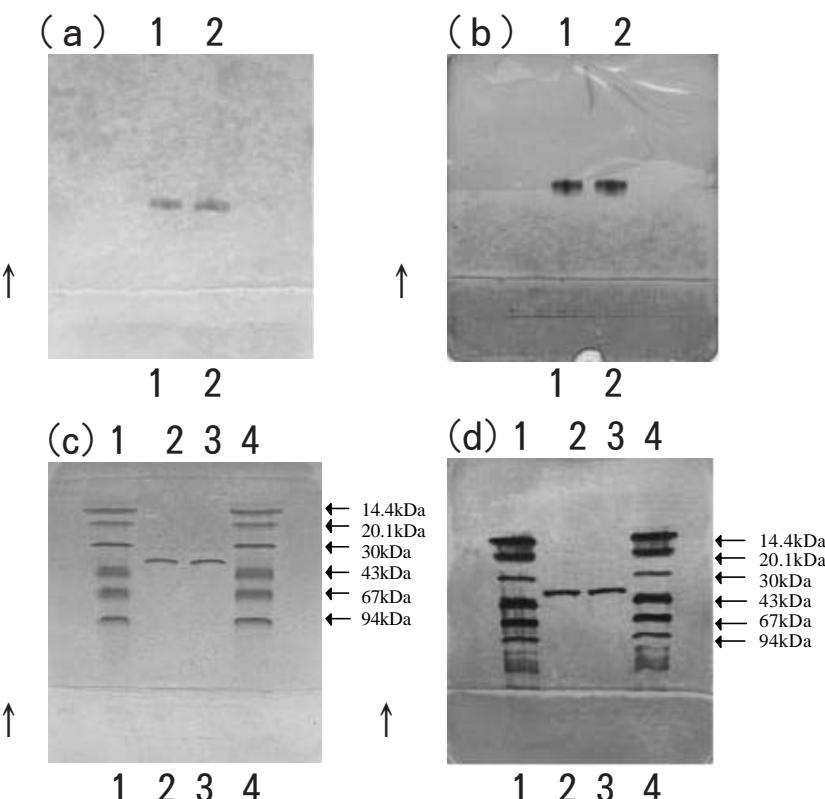


図5. PGase I 精製標品(P4-2-2)のポリアクリルアミドゲル電気泳動。
nondenaturing PAGE(a, b)は8-25%グリジエントゲルを用いてpH8.8で行い、ゲルはCBB R-250染色(a)及び銀染色(b)で染色した。レーン1, 2: P4-2-2, 0.31μg。SDS-PAGE(c, d)は、試料を2.5%(w/v)SDS, 1%(w/v)ジチオスレイトール(DTT), 及び1mM EDTAと共に100°Cで2分間インキュベートした後、0.55%(w/v)SDSの存在下8-25%グリジエントゲルを用いて泳動を行った。ゲルはCBB R-250染色(c)及び銀染色(d)で染色した。レーン2, 3: P4-2-2, 0.20μg; レーン1, 4: 分子質量マーカータンパク質; ↑: 電気泳動方向。

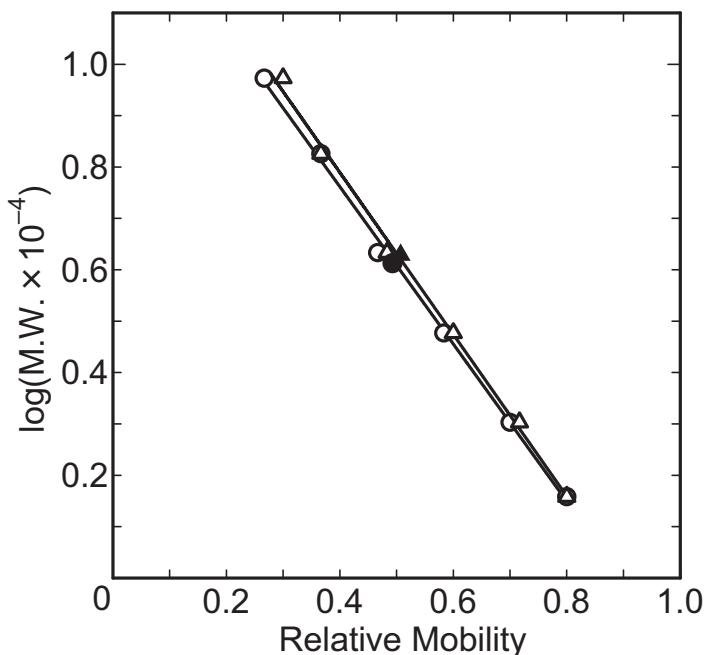


図6. SDS-PAGEによるPGase I (P4-2-2)の分子質量決定。

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値をプロットした。標準曲線一次回帰式は、 $y=-1.53x+1.37$ (CBB染色)及び $y=-1.58x+1.42$ (銀染色)であった。一次回帰式の相関係数は各々 $R=0.9989$ 及び $R=0.9982$ であった。各々の電気泳動によって求められたPGase I 精製標品(P4-2-2)の分子質量はそれぞれ、40.3kDaおよび40.1kDaであった。—○—、CBB染色；—△—、銀染色；●、▲：CBB染色(●)および銀染色(▲)各々の電気泳動でのPGase精製標品(P4-2-2)の相対移動度のプロット。

と見積もられた。

5°C・6ヶ月培養PGase I (P4-2-2-2) (Takasawa et al. 1997)の場合には、SDS-PAGEから見積もられた分子質量は40kDaで5°C・2ヶ月培養PGase I (P4-2-2) (39.8kDa)とほとんど違いがなく、またP4-2-2-2のSephadryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーから見積もられたintact分子の質量は41kDaであったので、5°C・6ヶ月培養PGase I (P4-2-2-2)は単量体酵素であったが、5°C・2ヶ月培養PGase I (P4-2-2)も同様に単量体酵素であると考えられる。

参考文献

- Andrews, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. Biochem. J. **96**: 596-606.
 Bartling, S., Wegener, C., and Olsen, O. 1995.

Synergism between *Erwinia* pectate lyase isozymes that 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 Casadore, 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.
- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. Yeast, **18**: 423-432.
- Groves, J. W. and Bowerman, C. A. 1955. *Sclerotinia borealis* in Canada. Can. J. Bot. **33**: 591-594.
- 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.
- Jamalainen, E. A. 1949. Overwintering of gramineae-plants and parasitic fungi. I. *Sclerotinia borealis* Bubak & Vleugel. J. Sci. Agric. Soc. Finl. **21**: 125-142.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. Methods Enzymol. **161**: 366-373.
- 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.]
- Tomiyama, K. 1955. Studies on the snow bright disease of winter cereals. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. Rep. **47**: 1-234. [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.

Wood, T. M. and McCrae, S. I. 1986. The cellulose of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. Biochem. J. 234 : 93-99.

Summary

Polygalacturonase I has been isolated from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis* by cation-exchange chromatography on a column of CM-Toyopearl followed by gel filtration on a column of

Sephacryl S-200. Purified enzyme (P4-2-2), polygalacturonase I had a specific activity of 1 960 units per mg of protein, that is, 108-fold purification over the crude extract of the wheat bran culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. The purified enzyme was homogeneous, as judged by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 39.8 ± 0.371kDa by the polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate.

Key words: *Sclerotinia borealis*, psychrophile, snow mold, polygalacturonase, cell wall degrading enzyme.