

好冷性雪腐菌核病菌 *Sclerotinia borealis* の産生する ポリガラクトンナーゼ活性の低温適応

竹内宏治・井熊武志・匂坂慶子・斉藤泉¹・高澤俊英

Cold adaptation of polygalacturonase activity from the culture of
the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*

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

要 旨

好冷性雪腐病糸状菌 *Sclerotinia borealis* と常温性菌核病糸状菌 *Sclerotinia sclerotiorum* とからの粗抽出液中のポリガラクトンナーゼ活性の比較検討を行った。40℃での酵素反応の最適pHは *S. borealis* と *S. sclerotiorum* において違いはなく pH4.5であった。又、両菌共に、pH4.0以下及びpH5.0以上においては活性は急激に低下し、pH6.0から7.5迄は活性はほとんど観察されなかった。pH4.5における酵素反応の最適温度は好冷菌でも常温菌においても違いはなく40℃であった。しかしながら5℃における活性については、40℃における最大活性に対する相対活性が、常温菌 *S. sclerotiorum* の場合は約18%であったが、好冷菌 *S. borealis* の場合は約35%にもなり、常温菌由来の場合と比較して約2倍も高い低温適応性を有していた。このような好冷菌のポリガラクトンナーゼ活性の低温寛容現象が寒冷地で発生する雪腐菌核病菌 *S. borealis* の病原性に深く関与しているものと考えられる。温度安定性については好冷菌 *S. borealis* 由来の酵素活性は常温菌 *S. sclerotiorum* 由来に較べて20~30℃の常温域において若干不安定であったが、50~60℃の高温域においては両者に殆ど違いが無く50℃で殆ど失活し、変性温度はほぼ同じであることを示唆している。pH安定性については両者において大きく変わらずpH7.0以上では不安定であった。

キーワード：ポリガラクトンナーゼ、低温適応、好冷菌、*Sclerotinia borealis*,
Sclerotinia sclerotiorum

緒 論

地球上の生物圏には、多くの微生物 (microbe)

がおかれた環境に適応し至る所に生息しており、生息している温度環境の違いによって微生物は高温性・中温性・低温性微生物に大別されている。最適生育

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

¹ Agrosience Research Laboratory, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

温度が20~50°Cの範囲にある微生物は中温菌又は常温菌と呼ばれ、55°C以上で生育できる微生物は好熱菌 (thermophile) (Freeze and Brock 1970; Brock and Freeze 1969) と呼ばれ、生育温度により中等度高熱菌 (moderate thermophile) (Kademi et al. 2000; Alvarez-Macarie et al. 1999)・高度高熱菌 (extreme thermophile) (Oshima et al. 1976)・超好熱菌 (hyperthermophile) (Blochl et al. 1997; Bohlool and Brock 1974; Mosser et al. 1974) あるいは常温 (通常37°C) でも生育できないかにより通性好熱菌 (facultative thermophile) (Tsuchiya et al. 1997)・偏性好熱菌 (obligate thermophile) (Allgood and Perry 1986; Singh and Sinha 1982) に更に細分される。低温で成育できる微生物も生育上限温度と最適生育温度によって、低温菌 (psychrotroph) (通性低温菌) (Lawson et al. 1994; Ray et al. 1994) と好冷菌 (psychrophile) (偏性低温菌) (Adler and Knowles 1995; Ferroni and Kaminski 1980; Morita and Burton 1970; Eddy 1960) に更に細分され、生育限界温度20°C以下で最適生育温度15°C以下のものは好冷菌、生育限界温度20°C以上のものは低温菌と呼ばれている。好熱菌の高温環境への適応機構については数多くの報告がされ、タンパク質レベルでの適応機構 (Horikoshi and Grant 1998; Watanabe et al. 1991) の解明が進んでいるが、低温性微生物の低温環境適応機構についての報告はあまり多くはなく、タンパク質レベルでの適応機構の解明に関する報告 (Hoyoux et al. 2001; Wintrode et al. 2000; Kim et al. 1999; Feller et al. 1997; Davail et al. 1994) は特に少ない。

*S. sclerotiorum*及び*S. borealis*は何れも植物病原菌である。*S. sclerotiorum*は気温20°C前後で曇雨天が続いた多湿の場合に発生しやすく、多犯性で、ナス科 (ナス, トマト, 及びジャガイモ等) を始めウリ科 (キュウリ及びカボチャ等), マメ科 (大豆及び小豆等), アブラナ科 (キャベツ及びナタネ等), キク科 (レタス及びヒマワリ等), セリ科 (セルリー等) など多くの作物に菌核病を引き起こす常温性菌核病菌である。

*S. borealis*は土壤凍結期間の長い北海道東部に分布し、高い湿度に保たれている0~5°Cの積雪下で

麦類, 牧草, 及び芝草などに生育し, ネズミの糞状の菌核を作り, 雪解け直後にこれらの植物の葉や茎等に雪腐病を発症する好冷性雪腐菌核病菌である。菌核とは, 菌糸が集合して形成される固い休眠耐久性の塊状体である。

ポリガラクトツロナーゼは, 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, ポリガラクトツロン酸を主な基質とし, 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-ガラクトツロ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; Tobias et al. 1993; Polizeli et al. 1991; Kester and Visser 1990; 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, ポリガラクトツロナーゼは, *S. sclerotiorum* 及び *S. borealis*の宿主への病原性に深く関与しているものと思われる。

我々は微生物が低温環境へどのように適応しているのかを即ちその仕組みを酵素タンパク質レベルからアプローチする目的で好冷性糸状菌*S. borealis*と常温性糸状菌*S. sclerotiorum*とが産生するポリガラクトツロナーゼ活性の低温環境に対する挙動を天然に近い状態で調べるために, 好冷菌と常温菌とからの粗抽出液中のポリガラクトツロナーゼ活性の性質を比較検討した。

試薬及び実験方法

試薬

Potato dextrose agar (以下PDA) (Difco Laboratories), 小麦フスマ (十勝米穀), 酢酸 (和光純薬工業, 特級), 酢酸ナトリウム (和光純薬工業, 特級), Hyflo super-cel (Celite Co./和光純薬工業), ポリガラクトツロン酸 (以下PGA) (Sigma, From orange), クエン酸 (関東化学, 特級), 3-[N-morpholino]propane sulfonic acid (以下MOPS) (Sigma), 水酸化ナトリウム (和光純薬工業, 特級), 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), ドデシル硫酸ナトリウム (和光純薬工業, 生化学用), 硫酸 (和光純薬工業, 精密分析用), Coomassie brilliant blue (以下CBB) G-250 (半井化学薬品, Specially prepared), 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)), ウシ血清アルブミン (以下BSA) (Sigma, crystallized and lyophilized, 窒素分14.8% (w/w)), アジ化ナトリウム (和光純薬工業, 化学用)。

菌体の培養

PDA培地での培養 PDA 3.9g (オートバランス使用) を熱水80mL (100mLメートルグラス) 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化させた (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培地上に移植した。好冷性糸状菌*S. borealis*の場合は, 5°C (インキュベータ) で約6ヶ月間静置培養し, 常温性糸状菌*S. sclerotiorum*の場合には, 20°C (インキュベータ) で約2週間静置培養した。

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 (スパチュラ使用), 500mL三角フラスコ中で綿栓をして121°C・20分間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, 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), *S. borealis*は5°Cで約6ヶ月間, *S. sclerotiorum*は20°Cで約2週間静置培養した。

粗抽出液の調製

小麦フスマ培地上で培養した*S. borealis*及び*S. sclerotiorum*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-酢酸緩衝溶液 (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, 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 (ラテックスグローブ着用) で絞ってろ過し, そのろ液ca.950mLをメートルグラス (1L) 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 (アドバンテック定量用ろ紙No. 5B) 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 µmセルロースアセテート膜, 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, ポリピ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。

2% (w/v) PGA基質保存溶液の調製

PGA 20g (オートバランス使用) を熱水約800mL (1 L ビーカー) 中に攪拌しながら加え, 6時間攪拌放冷し, 室温に戻した。次に5 M水酸化ナトリウム溶液 (19.5mL) を加えpH7.0に調整した。これを一晩加熱攪拌 (ホットプレートスターラー使用) し, PGAを十分に溶解させた。この溶液を室温に戻してから純水で1 L (メスシリンダー) にメスアップし, 遠心分離 (15 000 rpm, 15分, 20°C) 後, この上澄液を吸引ろ過 (定量用ろ紙No. 5B, アドバンテック) して沈殿を更に除き, 最後にメンブランろ過 (0.45 µmセルロースアセテート膜, アドバンテック) 滅菌した。ろ液をポリピンに分注 (ca. 250mL) して冷凍保存し, 使用時に解凍して1% (w/v) PGA基質溶液の調製に用いた。

2% (w/v) PGA溶液の正確な濃度は50倍希釈後, 全糖濃度を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。これら保存溶液の平均重合度は 29.6 ± 1.9 (S.E.) であった。

1% (w/v) PGA基質溶液の調製

純水100 mL (ビーカー) に2% (w/v) PGA溶液250mL (500mLメスシリンダー) を攪拌しながら加え、更に0.4M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH4.5) 125mLを加え、酢酸でpH4.5に調整後、純水で500 mLにメスアップした。

ポリガラクトソナーゼ活性の測定

粗抽出液のポリガラクトソナーゼ活性は、酵素反応総体積2.1mL (1% (w/v) PGA-0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液2.0mL, 粗抽出液とバッファーAとを合わせて0.1mL) 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2.020mL (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0.1M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又は10 μ L (フィンピペット) 及び粗抽出液50又は90 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 (エッペンドルフピペット) 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) 2.5mL (フィンピペット) を加え、

30°C (アルミドライバス) ・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-ガラクトツロ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-ガラクトツロン酸換算 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1U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-0.1 M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 0.1mL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。

酵素活性のpH依存性

pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5の基質緩衝液においてポリガラクトソナーゼ活性測定法に従い粗抽出液50又は90 μ L中の活性を測定した。使用緩衝液については、pH3.5から5.5までは0.1 M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液を使用し、pH6.0及び6.5は0.1Mクエン酸-NaOH緩衝液、pH7.0及び7.5は0.1M MOPS-NaOH緩衝液を用いた。活性は40°Cで求めた。

酵素活性の温度依存性

酵素反応時の温度を5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 及び65°Cで、1% (w/v) PGA-0.1M酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH4.5) 基質溶液を用いて粗抽出液50又は90 μ Lの酵素活性を測定した。

酵素活性のpH安定性

粗抽出液10mLを2 M NaOHを用いてpH5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5に調整して5°Cで保存後各々50 μ Lについて酵素活性測定法に従って経日による酵

素の安定性を約3週間調べた。

タンパク質濃度決定

粗抽出液のタンパク質濃度はCBB色素試薬法によりBSAを標準物質として決定した。

色素試薬はCBB (25mg: マイクロ天秤) をメタノール (12.5mL) に加え, 約2時間攪拌溶解させ, 次に濃リン酸 (85% (w/w)) (50mL: 84.22g) を加え約2時間攪拌し, 純水でメスアップ (100mL) した。その後吸引ろ過 (定量用ろ紙No. 5B, アドバンテック) し, 5°Cで保存した。色素試薬の終濃度は0.025% (w/v) CBB-12.5% (v/v) メタノール-70.83% (w/v) リン酸である。

BSA (0.1mg/mL) 標準溶液は0.04% (w/v) アジ化ナトリウムを含むものをメスフラスコに調製した。BSA標準溶液のタンパク質濃度は $A_{280}^{1\% (w/v)} = 6.60$ (Kirschenbaum 1970) を用いて決定した。

結果及び考察

酵素活性のpH依存性

酵素活性の酵素反応混液pHに対する依存性を調べるために基質溶液のpHを変化させて活性を測定した。そのためにpH3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 (以上酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液), 6.0, 6.5 (以上クエン酸-NaOH緩衝液), 7.0及び7.5 (以上MOPS-NaOH緩衝液) 基質溶液を用い, 粗抽出液50 μ Lと90 μ Lについて40°Cで調べた。

図1に示すように, 酵素活性は*S. borealis*及び*S. sclerotiorum*のどちらについてもpH4.5で最大活性を与え, この酵素反応における最適pHは4.5であった。又, 両菌共にpH3.5~4.5では活性が急激に上昇し, pH4.5~6.0では急激に減少し, 最適pH域が非常に狭かった。更に, pH6.0~7.5では活性は緩やかに減少し, pH7.0及び7.5ではpH4.5での最大活性の

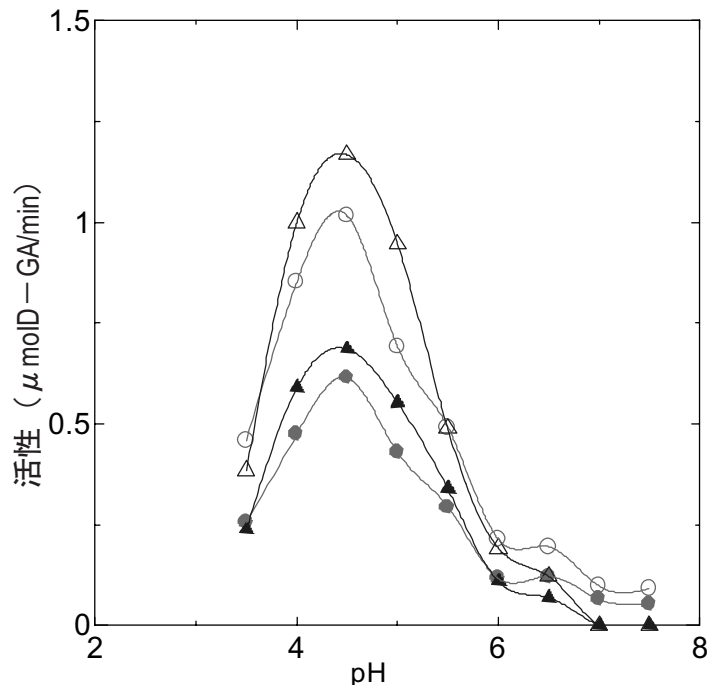


図1. 酵素活性のpH依存性。
酵素反応は, pHを3.5~7.5に調整した1% (w/v) PGA基質溶液2mL, 粗抽出液50 μ Lまたは90 μ L, 反応総体積2.1mL系, 温度40°Cで行った。
▲, *S. borealis* (50 μ L); △, *S. borealis* (90 μ L).
●, *S. sclerotiorum* (50 μ L); ○, *S. sclerotiorum* (90 μ L).

約10%の活性しか示さなかった。

以上の結果から、ポリガラクトツロナーゼ活性のpH依存性については好冷菌からのものも常温菌からのものもほぼ同様な傾向を示し、両者の活性部位は大きな違いがないものと結論できる。

酵素活性の温度依存性

酵素反応即ち酵素活性が温度によってどのように変化するかを、特に低温域において常温菌*S. sclerotiorum*と好冷菌*S. borealis*との間でどのように異なるかを明らかにするために、更に最適温度も比較するために実験を行った。図2に示すように、酵素反応における最適温度は常温菌も好冷菌も40°Cであった。又、40°C以上の高温域では両者の間に大きな違いは観察されず、温度が高くなるにつれて活性が大きく失われていき、好冷菌*S. borealis*の場合は65°Cで完全に活性が消失し、一方常温菌*S. sclerotiorum*では65°Cで未だ17%活性が残存した。これらの結果は、常温菌からのポリガラクトツロナーゼ活性が好冷菌からのものに比べて耐熱性が存在することを示している。しかしながら、好冷菌からのものが温度に対して特に不安定であるとは言えなかった。一方30°C以下の温度域では温度低下と共に活性は両者ともほぼ直線的に減少したが、常温菌ではその傾きが大きく、好冷菌では傾きが小さく、従って5°Cにおける活性は、常温菌*S. sclerotiorum*については40°Cにおける最大活性に対しての残存活性は約18%だったのに対して、好冷菌*S. borealis*については約35%残存し、常温菌と比較して5°Cの活性が約2倍も高く、低温耐性即ち好冷性を有していた。

以上の結果から、好冷菌のポリガラクトツロナーゼ活性は常温菌のものに比べて特に熱不安定ではなかったが、しかし低温域では常温菌からのものに比べて低温適応性が非常に高かったと結論できる。又、これらの事実は好冷菌*S. borealis*が常温菌*S. sclerotiorum*に比べてより低温適応性の高いポリガラクトツロナーゼアイソザイム分子を産生しているか又は、このポリガラクトツロナーゼ活性の高い低温適応性がポリガラクトツロナーゼ分子自身の性質に依るものではなく、即ち常温菌*S. sclerotiorum*も好冷菌*S. borealis*も同じ低温適応性のポリガラクトツロナーゼアイソザイム分子を産生しているが、好冷菌*S. borealis*では

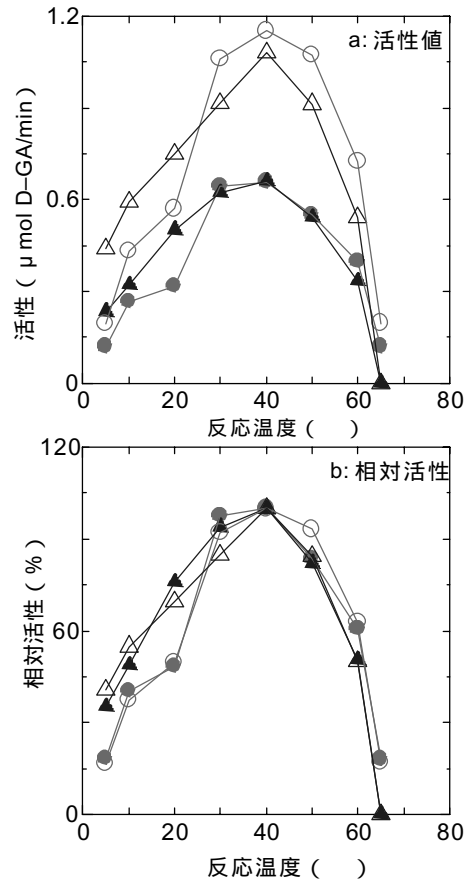


図2. 酵素活性の温度依存性。

酵素反応は、温度5～65°C、1% (w/v) PGA-0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸バッファ (pH4.5) 2 mL、粗抽出液50 μLまたは90 μL、反応総体積2.1 mL系で行った。▲, *S. borealis* (50 μL); △, *S. borealis* (90 μL); ●, *S. sclerotiorum* (50 μL); ○, *S. sclerotiorum* (90 μL)。

ポリガラクトツロナーゼアイソザイム分子と相互作用してポリガラクトツロナーゼ活性の低温適応性を高める何らかの分子が同時に産生されている可能性を示唆している。

酵素活性の直線性及び比例性

酵素活性の定量性を確保するために*S. borealis*及び*S. sclerotiorum*の粗抽出液10～90 μLについて最適pH4.5において最大活性を与える40°Cで活性を調べた。図3aに示すように何れの場合も高い直線

性 (*S. borealis* 一次回帰式: $y=0.0128x+0.0218$ ($r=0.9995$); *S. sclerotiorum* 一次回帰式: $y=0.0130x+0.066$ ($r=0.9991$)) が得られたが、一次回帰式には y 切片即ちブランク活性が存在したために粗抽出液量を変化させた際に活性の比例性は得られなかった。従って活性値の相互比較を行うためにはブランクアッセイを行い、ブランク活性を差し引いた活性値を求める必要があることがわかった。反応総体積 2.1mL 系でのブランクアッセイを行った結果、ブランク活性値は $0.0164 \mu\text{mol}/\text{min} \pm 9.89 \times 10^{-3}$ (SE) であった。ブランク活性を考慮して粗抽出液量に対する比活性をまとめた結果を図 3 b) に示す。比活性は粗抽出液量 10~90 μL の間でほぼ一定値 (CV 値 ca. 2%) となり、粗抽出液量に依存しなかった。これらの結果から net 又は真の活性値には比例性が存在し、活性値が ca. $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}$ 迄はブランク活性値を補正することで定量性が得られることがわかった。

常温菌 *S. sclerotiorum* と好冷菌 *S. borealis* のポリガラクトナーゼ活性含量

常温菌は小麦フスマ培地で $20^\circ\text{C} \cdot 2$ 週間培養し、好冷菌は小麦フスマ培地上で $5^\circ\text{C} \cdot 6$ ヶ月間培養した。各々で菌の培地条件は同じであるが培養条件 (温度) は異なり、生育の速さは常温菌 *S. sclerotiorum* が速く、好冷菌 *S. borealis* は遅いが各々の菌は何れも 2 週間及び 6 ヶ月で定常状態に達していた。更に抽出条件も同じで粗抽出液体積もほぼ同じなので定常状態における両菌のポリガラクトナーゼ活性含量の相互比較を行った。

ポリガラクトナーゼは病原性に関与する鍵となる酵素であることから菌の生長に大きく影響を与えると考えられるが、定常状態に達している常温菌で約 2 週間後及び好冷菌で 6 ヶ月後には殆ど同程度の活性 (40°C 活性) が存在し、常温菌と好冷菌の間に違いはなかった (図 3 a)。

両者の菌からポリガラクトナーゼを単離していないのでポリガラクトナーゼ分子の数については言及できないが、ここで観察された両菌からの粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性含有量が各々の菌の病原性の強弱及びそれらの発現に密接に関係すると思われる。ポリガラクトナーゼ活性からこれらの点を考察する場合においては、両菌の 40°C での活

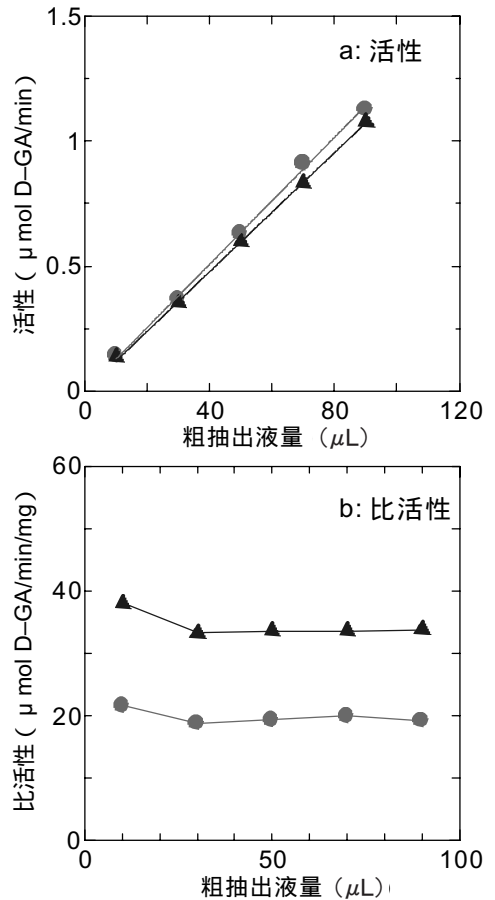


図 3. 粗抽出液の活性及び比活性。
酵素反応総体積 2.1mL 系において、粗抽出液 10~90 μL を用い $\text{pH}4.5 \cdot 40^\circ\text{C}$ において、活性を測定した。
▲, *S. borealis* ;
●, *S. sclerotiorum*.

性は殆ど差がないが、好冷菌 *S. borealis* は低温で生育しており、そして 5°C での活性は 40°C の約 35% (図 2 b) に減少しているため低温における宿主での生育には時間を要する点を考慮しなければならない。

以上の点から *S. sclerotiorum* と *S. borealis* との病原性の強さには大きな差はないものと考えられるが、*S. borealis* の場合は病原性の発現に時間を要するものと思われる。

酵素活性の温度安定性

常温菌 *S. sclerotiorum* 及び好冷菌 *S. borealis* からのポリガラクトナーゼ活性の温度に対する安定性を比較するために、各々からの粗抽出液を20~60℃（恒温水槽中で）迄の温度で30分間インキュベート後、粗抽出液50μLを用いて活性を測定し、5℃保存粗抽出液に対する残存活性を求めた結果を図4に示す。20℃では常温菌 *S. sclerotiorum* のポリガラクトナーゼ活性は失活しなかったが、好冷菌 *S. borealis* のポリガラクトナーゼ活性はわずかではあるが低下し、温度に対して不安定であった。30℃では、何れの菌からのポリガラクトナーゼ活性も約10%失活したため室温で使用する際は粗酵素液を氷浴させるなどして低温に保つ必要がある。40~50℃では何れの菌からの場合も活性が大きく低下し、

両者に顕著な違いは観察されなかった。

以上の点から、好冷菌 *S. borealis* からのポリガラクトナーゼは常温菌 *S. sclerotiorum* からのポリガラクトナーゼと比較すると20~30℃の室温域において不安定であることが特徴と考えられる。

ポリガラクトナーゼ活性のpH安定性

粗抽出液からポリガラクトナーゼを単離するための情報としてpH安定性を特に中性域のpHでの安定性を調べた。粗抽出液を2M NaOHを用いてpH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 及び7.5に調整後5℃に保存し、活性の経日変化を約3週間追跡した。粗抽出液にNaOHを加えた事による沈殿の生成はなかった。

結果を図5に示す。各々の菌からの粗抽出液のポリガラクトナーゼ活性は比活性によって表した。

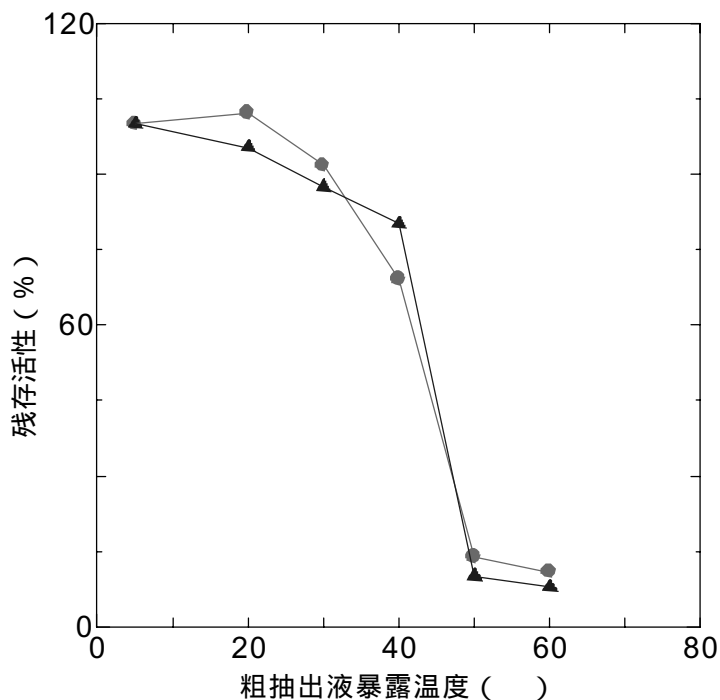


図4. 温度安定性。
粗抽出液を5~60℃に30分間暴露した後、酵素反応総体積2.1mL系において、pH4.5・40℃で各温度に暴露した粗抽出液50μLの活性を測定した。
▲, *S. borealis* ●, *S. sclerotiorum*.

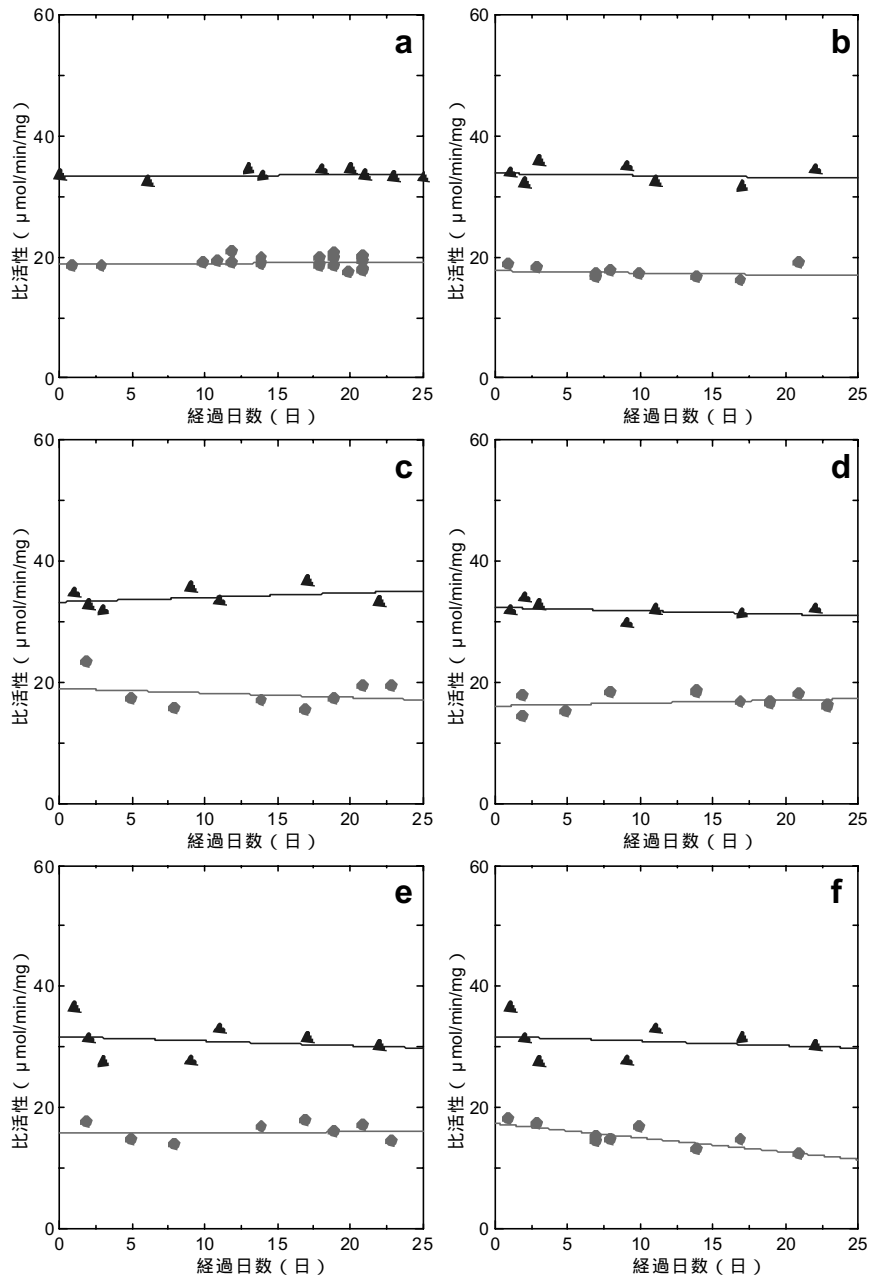


図5. pH安定性.

各々の粗抽出液を5℃で保存し経日による活性の変化を調べた。酵素反応は、1% (w/v) PGA-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸バッファ(pH4.5) 2 mL, 粗抽出液50 μL , 反応総体積2.1 mL系, 温度40℃で行った。▲, *S. borealis*; ●, *S. sclerotiorum*.
 a: pH4.5, b: pH5.5, c: pH6.0, d: pH6.5, e: pH7.0, f: pH7.5.

pH4.5, 5.5及び6.0では各々の菌からのポリガラクトツロナーゼ活性は5℃・3週間暴露後も全く変化しなかった。pH6.5では好冷菌*S. borealis*の活性は殆ど変化しなかった(約4%減少)が, 常温菌*S. sclerotiorum*の活性は僅かに(約10%)低下した。pH7.0においては, 何れの菌からのポリガラクトツロナーゼ活性も低下(*S. borealis*, 約10%減; *S. sclerotiorum*, 約15%減)した。pH7.5では両者の活性が大きく低下し, 5℃・3週間で約30%失活した。

以上の結果常温菌の場合でも好冷菌の場合でもポリガラクトツロナーゼ活性はpH6.0迄は非常に安定であるが, pH6.5~7.0では若干不安定になり, pH7.5では非常に不安定になり, pH7.0以上のpH条件はポリガラクトツロナーゼの単離精製操作には適当ではないと考えられる。

参考文献

- Alder, E. and Knowles, J. 1995. A thermolabile triosephosphate isomerase from the psychrophile *Vibrio* sp. strain ANT-300. Arch. Biochem. Biophys. **321**: 137-139.
- Allgood, G. S. and Perry, J. T. 1986. Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate Thermophile *thermoleophilum album*. J. Bacteriol. **168**: 563-567.
- Alvarez-Macarie, E., Augier-Magro, V., and Baratti, J. 1999. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **63**: 1865-1870.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W., and Stetter, K. O. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. Extremophiles **1**: 14-21.
- Bohlool, B. B. and Brock, T. D. 1974. Population ecology of *Sulfolobus acidocaldarius*. II. Immunological studies. Arch. Microbiol. **97**: 181-194.
- Brock, T. D. and Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol. **98**: 289-297.
- 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 exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol. Lett. **145**: 295-299.
- Eddy, B. P. 1960. The use and meaning of the term "psychrophilic". J. Appl. Bact. **23**: 189-190.
- 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.
- Ferroni, G. D. and Kaminski, J. S. 1980. Psychrophiles, psychrotrophs, and mesophiles in an environment which experiences seasonal temperature fluctuations. Can. J. Microbiol. **26**: 1184-1191.
- Freeze, H. and Brock, T. D. 1970. Thermostable aldolase from *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. **101**: 541-550.
- 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.
- Horikoshi, K. and Grant, W. D. (Eds.) 1998. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- 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.]
- Kedemi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., and Baratti, J. 2000. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** : 173-179.
- 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.
- Kirschenbaum, D. M. 1970. Selected data for molecular biology. In *Handbook of Biochemistry*. Edited by H. Sober. 2nd ed., pp. C-71-C-98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- Lawson, P., Dainty, R. H., Kristiansen, N., Berg, J., and Collins, M. D. 1994. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov.. *Lett. appl. Microbiol.* **19** : 153-157.
- 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.
- Morita, R. Y. and Burton, S. D. 1970. Occurrence, possible significance, and metabolism of obligate psychrophiles in marine waters. *In organic matter in natural waters. Edited by D. W. Hood*. Institute of Marine Science, University of Alaska, Fairbanks. Publ. No. 1. pp. 275-285.
- Mosser, J. B., Mosser, A. G., and Brock, T. D. 1974. Population ecology of *Sulfolobus acidocaldarius*. I. Temperature strains. *Arch. Microbiol.* **97** : 169-179.
- 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.
- Oshima, T., Sakaki, Y., Wakayama, N., Watanabe, K., and Ohashi, Z. 1976. Biochemical studies on an extreme thermophile *Thermus thermophilus* : thermal stabilities of cell constituents and a bacteriophage. *Experientia Suppl.* **26** : 317-331.
- 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** (Pt8) : 1815-

- 1823.
- Ray, M. K., Kumar, G. S., and Shivaji, S. 1994. Phosphorylation of lipopolysaccharides in the antarctic psychrotroph *Pseudomonas syringae*: a possible role in temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **176**: 4243-4249.
- 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.
- Singh, V. P. and Sinha, U. 1982. Thermostability and turnover of phosphatases in the obligate thermophile *Thermoactinomyces vulgaris*. *Indian J. Exp. Biol.* **20**: 26-30.
- 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.
- Tsuchiya, D., Sekiguchi, T., and Takenaka, A. 1997. Crystal structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the moderate facultative thermophile, *Bacillus coagulans*: two strategies for thermostabilization of protein structures. *J. Biochem.* **122**: 1092-1104.
- 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.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. 1991. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* **266**: 24287-24294.
- 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 compared the properties of polygalacturonase activity from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis* with those from the culture of the mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*. Optimum pH for both the enzyme reactions was 4.5 at 40°C. In both cases, the activities were decreased abruptly below pH4.0 and above pH5.0, and very low activities were observed at pHs 6.0 to 7.5. Optimum temperature was 40°C irrespective of psychrophile or mesophile. However, thirty five per cent of the maximum activity at 40°C was obtained at 5°C in the case of the psychrophile *S. borealis* though about eighteen per cent of the maximum activity was observed in the case of the mesophile *S. sclerotiorum*, indicating that the polygalacturonase activity of the psychrophile *S. borealis* has two-fold higher cold adaptability than that of the mesophile *S. sclerotiorum*. Thus, it is suggested that the low temperature tolerant phenomenon of the polygalacturonase activity of such a psychrophile is profoundly related to the pathogenicity of the snow mold disease caused by *S. borealis* under the snow in winter in the cold region. On the temperature stability of the enzymes, the enzyme of the psychrophile *S. borealis* was slightly unstable at 20-30°C compared with the one of the mesophile *S. sclerotiorum*, though both the enzymes were almostly inactivated at 50°C, indicating that the denaturation temperatures of the two

enzymes are similar to each other. For the pH stability of the enzymes, the profiles of the activity-day curves obtained for the two fungi at different pHs were similar to each other, and the two enzymes were unstable at pHs

above 7.0.

Key words : polygalacturonase ; cold adaptation ; psychrophile ; *Sclerotinia borealis* ; *Sclerotinia sclerotiorum*