

## *Rhizobium fredii* Pectate Lyase 유전자의 Marker-Exchange 변이

정민화 · 박용우 · 윤한대\*

경상대학교 농화학과

### Marker-Exchange Mutagenesis of Pectate Lyase Gene in *Rhizobium fredii*

Chung, Min-Hwa, Yong-Woo Park and Han-Dae Yun\*

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**Abstract** — *Rhizobium fredii* USDA193 is one of the causal organism for root nodule formation in soybean (peking). Previously we cloned the pectate lyase gene (SY1) of *R. fredii* USDA193. The *pel*<sup>-</sup> mutants (SY1 $\Omega$  and SY1 $\Omega$ 1) of SY1 were obtained using the *in vitro* insertional omega mutagenesis of *RpelB* (of *Rhizobium pel*) and fill-in reaction of *RpelE* (of *Rhizobium pel*) gene respectively, and we constructed two mutants (*R. fredii* USDA193 $\Omega$  and *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1) in pectate lyase function by marker-exchange with *pelB*:: $\Omega$  and *R. fredii* USDA193 strain (*rif*). The pectate lyase activity of two *pel*<sup>-</sup> mutant of *R. fredii* USDA193 was determined by spectrophotometric method. However, all pectate lyase activity of these mutants was not lost upon the mutagenesis by marker-exchange. This suggests that other pectate lyase genes may be present on the plasmid or the chromosome of *R. fredii*. As yet we do not have evidence linking *RpelB* and *RpelE* genes of *R. fredii* directly to the early nodulation process.

*Rhizobium fredii*는 대두(Peking)에 근류를 형성하며 Keyser 등(2,3)에 의해 맨처음 중국에서 분리 보고된 이래 저자 등(4,5)에 의해서도 보고되었다. 근류균이 근류를 형성하는 과정에서 기주식물의 근 모세포로 들어가는 과정을 전자현미경으로 관찰하였는데, 이 때 근모의 세포벽질이 이완되어 근류균이 기주식물로 들어가는데 용이하게 된다(6). 이러한 세포벽질을 구성하는 polymer 성분은 근류균 혹은 식물에 의해 생성되는 가수분해효소에 의해 이완작용을 받을 것이다(7,8). 펙틴질 분해효소나 섬유소 분해효소가 뿌리나 어린식물의 분비물에서 존재한다는 것이 확인되었다(7). 마찬가지로 근류균에서도 pectate lyase, cellulase, hemicellulase 등의 세포벽 분해에 관련되는 효소들이 분비된다는 것이 보고된 바가 있다(8,9). 이를 근거로 하여 저자들은 *R. fredii*

USDA193에서 cellulase 유전자(10) 및 pectate lyase 유전자(1)를 클로닝하여 보고한 바가 있으며 이에 대한 연구를 계속 중이다.

한편 근류형성 초기단계에서 근류균에 의해 생성되는 세포벽 분해효소는 극히 미량으로 초기단계에서 순간적으로 생성될 것이며 기주식물과 상호 관련되어 그 활성이 조절되어 있을 것으로 생각된다. 만약 이들이 조절되어 있지않고 이들 효소들이 계속적으로 분비되면 식물병원균과 같이 기주식물의 세포벽을 분해하여 근류형성을 유산시키는 결과를 초래할 것이다. 이런 관점에서 지금까지 근류균이 식물과 상호작용시에 세포벽 분해효소에 관련되는 효소활성 측정의 어려움 때문에 생화학적인 연구가 진척되지 못하다가 최근의 분자생물학적 기법의 발달로 이에 대한 접근이 가능하게 되었다.

본 실험에서는 전보(1)에서 보고한 *R. fredii* USDA 193의 *pel* 유전자를 가진 pSY1의 4.0 kb insert DNA와 *Erwinia chrysanthemi* EC16의 *pelB*와 *pelE*(11)와의 상동성을 가진 부위를  $\Omega$  mutagenesis 및 fill-in 반

**Key words:** *Rhizobium*, pectate lyase(*pel*) gene,  $\Omega$  mutagenesis, marker-exchange, southern hybridization.

\*Corresponding author

응으로 double mutants를 만들어 marker-exchange시켜 얻은 *R. fredii*의 *pel*<sup>-</sup> mutant를 얻어 근류형성 과정에서 이들이 관련되는 정도를 보고하는 바이다.

**재료 및 방법**

**사용균주**

근류균 배양은 Beringer의 방법(12)에 준하였으며 *Escherichia coli* 균주는 LB 배지에 적절한 항생제를 첨가하였다. 본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1과 같다. Ω 변이 및 marker-exchange를 위한 *pel* 유전자를 함유한 pSY1의 유전자 지도 및 *E. chrysanthemi* EC16의 *pelB* 및 *pelE*(11)과의 상동성을 가진 부위는 Fig. 1과 같다.

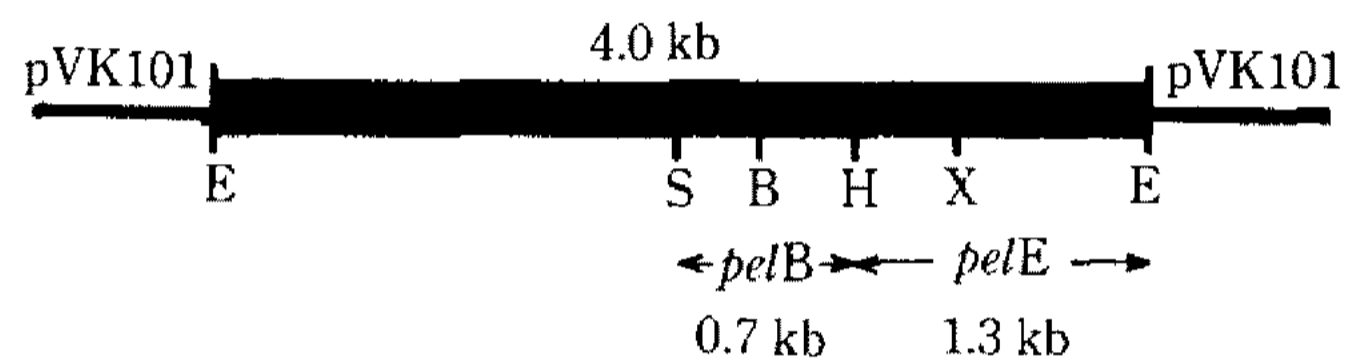
**Pectate lyase 활성측정**

Starr 등의 방법(13)에 준한 것으로 분광광도법에 의해 235 nm에서 polygalacturonic acid가 불포화 uronides로 분해되는 정도에 따라서 효소활성을 측정하였다. 고체배지에서 효소활성 측정방법(11)으로

는 0.7% sodium polypectate(Sigma, P-1879)를 TY 배지(12)상에 0.7%되게 첨가하여 균을 배양시켜 10% CuOAc 용액에 30분간 염색시킨 다음 생성되는 환의 크기에 따라 효소활성을 비교하였다.

**Total DNA 및 plasmid DNA 분리**

*Rhizobium*의 total DNA는 Hirsh 방법(14)에 의하여 분리하였으며 플라스미드 DNA는 Holmes와 Quigley 방법(15)에 준하였고 제한효소 절단 등 일반적인 것은 Sambrook 등(16) 및 Ausubel 등(17)의 방법에 준하였다.



**Fig. 1. The restriction maps of the 4 kb *EcoRI* fragment of pSY1. The lights bars represent the cloning sites of pVK101.**

Abbreviation for restriction enzyme sites are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X, *Xba*I.

**Table 1. Bacterial strains and plasmids employed**

Strains/Plasmids	Chracteristics	Sources
<i>R. fredii</i> USDA193 Wild type	Rif; Nod <sup>+</sup> ; Fix <sup>+</sup> on soybean cv. Peking	H.D. Yun (1)
<i>R. fredii</i> IA728	Rif; pSym cured derivative of <i>R. fredii</i> USDA193	H.D. Yun (1)
<i>E. coli</i> DH5 α	φ80d/ <i>lac</i> Z Δ M15; <i>endA</i> 1; <i>recA</i> 1; <i>hsdR</i> 17 (r <sup>-</sup> k, m <sup>+</sup> k), <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, λ <sup>-</sup> <i>gyrA</i> , <i>relA</i> 1, Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	BRL
pVK101	Broad host range cosmid vector; Km, Tc	
pSY1	4.0 kb <i>EcoRI</i> fragment of pSym USDA193 carrying the <i>pelA</i> and <i>pelB</i> of <i>R. fredii</i> USDA193 cloned into pVK101; Km, Tc.	H.D. Yun (1)
pSY2	pSY1 in pUC19; Amp	H.D. Yun (1)
pSY2.1	pSY1 in pUC18; Amp	H.D. Yun (1)
pSY3	0.7 kb <i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III fragment of pSY1 carrying the <i>pelA</i> gene of <i>R. fredii</i> in pUC18; homologous to <i>pelB</i> of <i>E. chrysanthemi</i> EC16	H.D. Yun (1)
pSY4	pSY3 in pUC19; Amp	H.D. Yun (1)
pSY5	1.3 kb <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI fragment carrying the <i>pelB</i> of <i>R. fredii</i> USDA193 cloned into pUC18; homologous to <i>pelE</i> gene of <i>E. chrysanthemi</i> EC16; Amp	H.D. Yun (1)
pSY6	pSY5 in pUC19.	H.D. Yun (1)
pHP45Ω	Donor of the Ω fragment, Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	P. Prentki (19)
pSY1Ω	<i>pelB</i> ::Ω derivative of pSY1, Tc <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	This work
pSY1Ω1	<i>pelE</i> derivative of pSY1Ω, Tc <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	This work
<i>R. fredii</i> USDA193Ω	Rif <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup> ; <i>pelB</i> ::Ω derivative of <i>R. fredii</i> USDA193	This work
<i>R. fredii</i> USDA193Ω1	Rif <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup> ; <i>pelE</i> derivative of <i>R. fredii</i> USDA193Ω	This work

Nonradioactive Southern hybridization

본 실험에서는 Boehringer Mannheim Kit의 사용 방법에 준하였다. DNA labeling은 random primed

labeled DNA를 nylon membrane(Micron Separation Inc.)에 옮겨진 target DNA에 표준 hybridization 방법으로 행하였으며 immunoassay법에 의해 발색시켰다.

Ω 변이 및 fill-in 반응

Ω 변이는 Prentki 등(19) 및 Frey 등(20)의 방법에 준하였으며 fill-in 반응은 Erase-base system(Pro-mega)을 사용하였다(Fig. 2).

Marker-exchange 실험

Marker-exchange 실험은 Roeder 등(21)의 방법에 따라 Ω 및 fill-in 변이된 플라스미드(*pel*<sup>-</sup> mutants ; pSY1::Ω 및 pSY1::Ω1)를 분리하여 An 등의 freeze-thaw 방법(21)에 따라 *R. fredii* USDA193(*rif*)에 형질전환시켰으며 transformants는 Ty배지(12)에 항생물질을 첨가하여 선별하였다.

접종실험

근류형성 실험으로 대두(*G. max.* L CV. "Peking")를 표면 살균한 후 암 상태에서 48시간 발아시킨 다음 무질소 수경재배 고체배지에 이식하고 근류균(10<sup>9</sup> cells)을 접종하여 근류형성 정도를 관찰하였다.

결 과

Ω mutagenesis

전보(1)에서 보고한 *R. fredii* USDA193의 Sym plasmid상에 *pel* 유전자를 함유한 pSY1(Fig. 1)에는 *Erwinia chrysanthemi* EC16의 *pelE*와 *pelB*(11)와 각각의 상동성을 가진 부위를 나타낸 것이다. 즉 *pelB*는 0.7 kb의 *SalI-HindIII* 부위에 있고 *pelE*는 1.3 kb의 *HindIII-EcoRI* 부위(Fig. 3, Small fragment of lane D)에 있다. 이들 부위들을 변이시켜 야생형 *R. fredii* USDA193에 marker-exchange시키기 위하여 Ω 변이 및 fill-in 반응을 시켜 mutant를 얻었다(Fig. 2). *In vitro*하에서 SY1의 *BamHI* site에 Prentki 등(19)이 만든 Ω cassette의 *BamHI* 부위를 절단하여 삽입시켰다. 이 때 원하는 clone의 선별법으로 LB 배지에 항생물질을 첨가한 배지에 자라는 균을 선별하여 pSY1Ω로 명명하였다. 이것을 다시 플라스미드를 분리하여 해당되는 제한효소로 절단하여 확인한 결

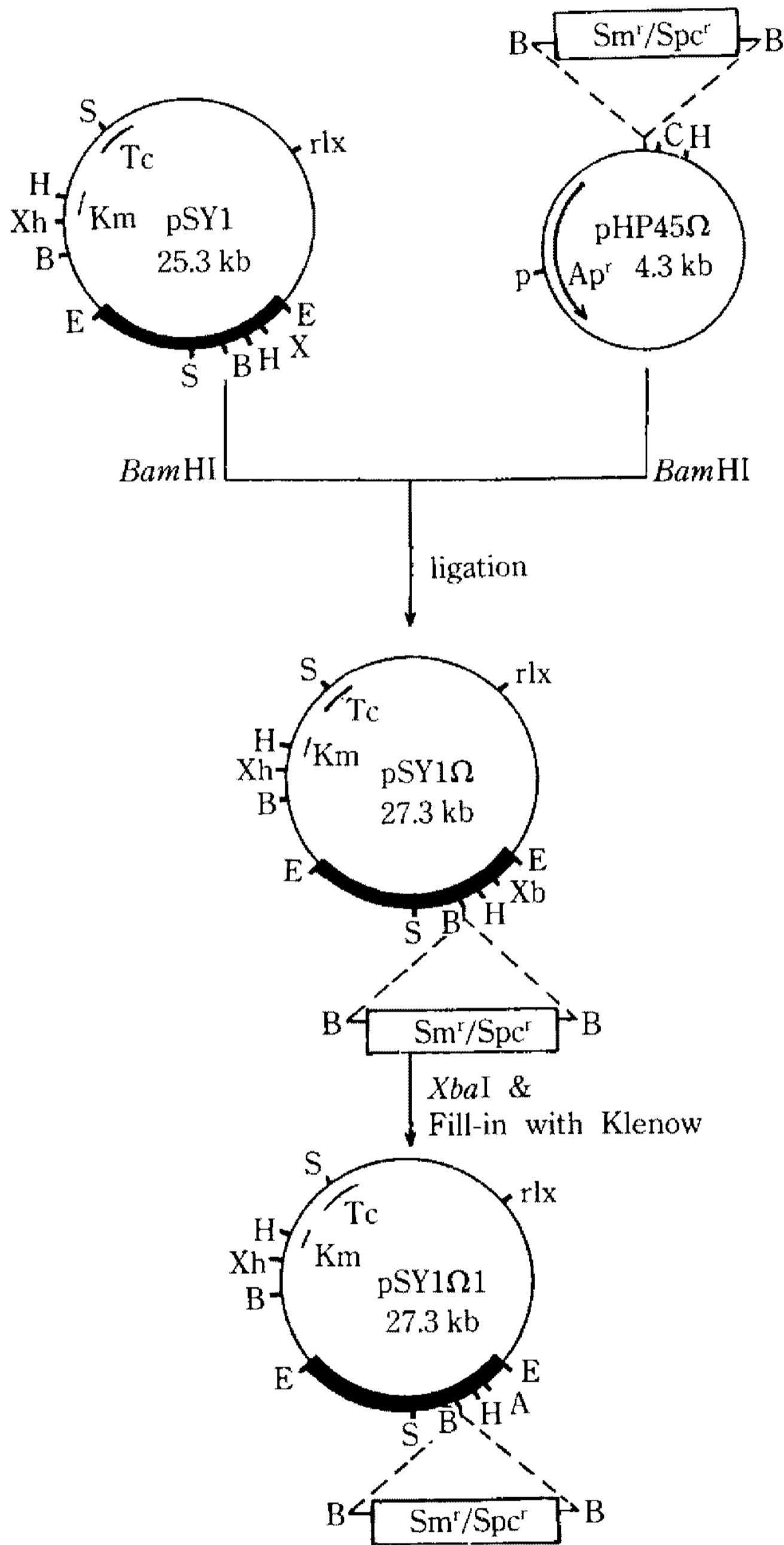
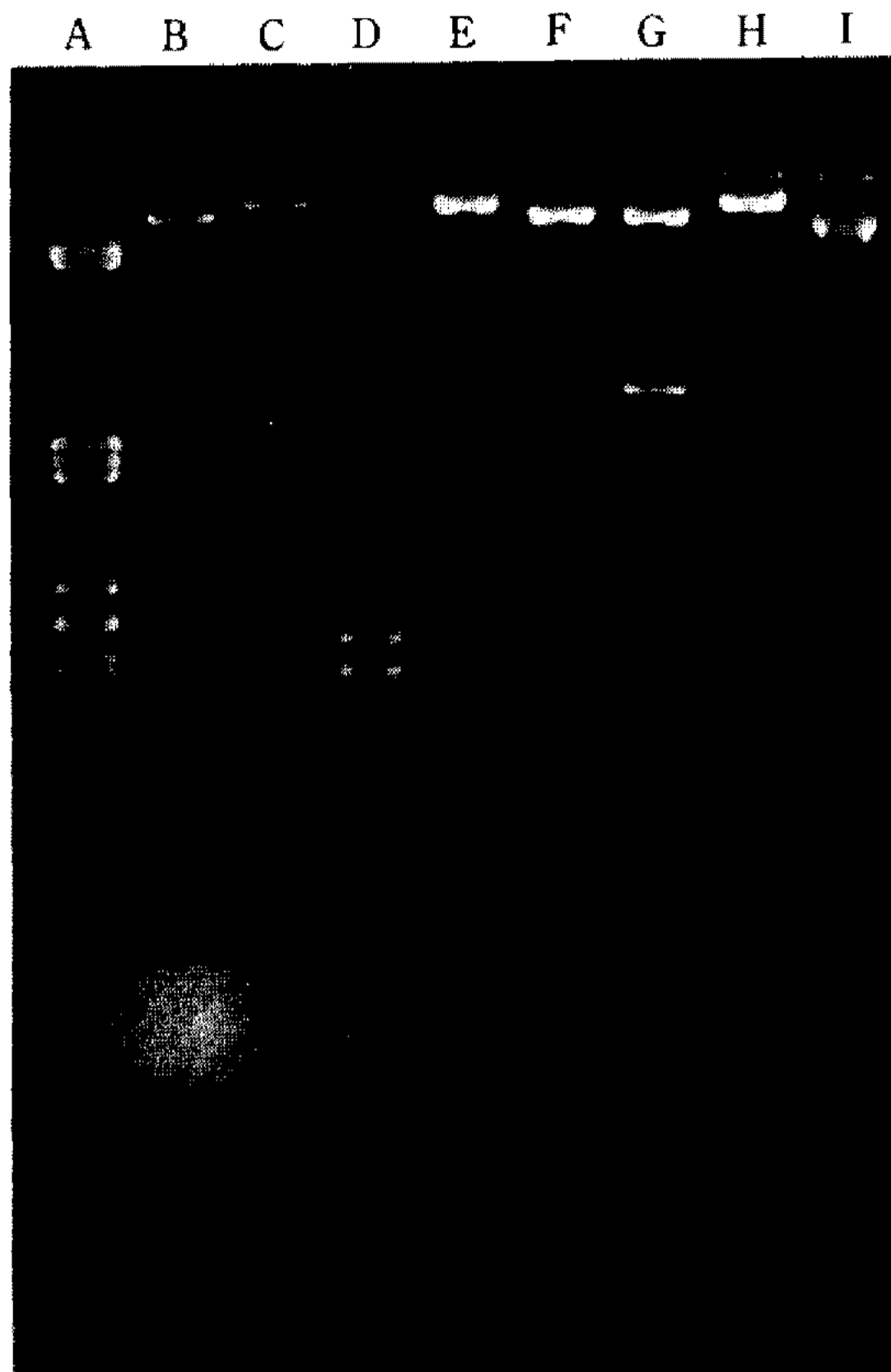


Fig. 2. Construction of Ω mutagenesis of pSY1 on *Bam*HI site of *pelB* (pSY1Ω) and fill-in treatment of PSY1 Ω on *Xba*I site of *pelE* (pSY1Ω1).

pHP45Ω has pHP45 vector in circular form and the Ω fragment in linear form. The Sm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup> segment from R100.1 is flanked by short inverted repeats carrying the T<sub>4</sub> transcriptional stop signals, and the polycloning sites (19).

Abbreviations: A, *Alu*I; B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Xb, *Xba*I; Xh, *Xho*I, Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Km, kanamycin; Spc, spectinomycin.

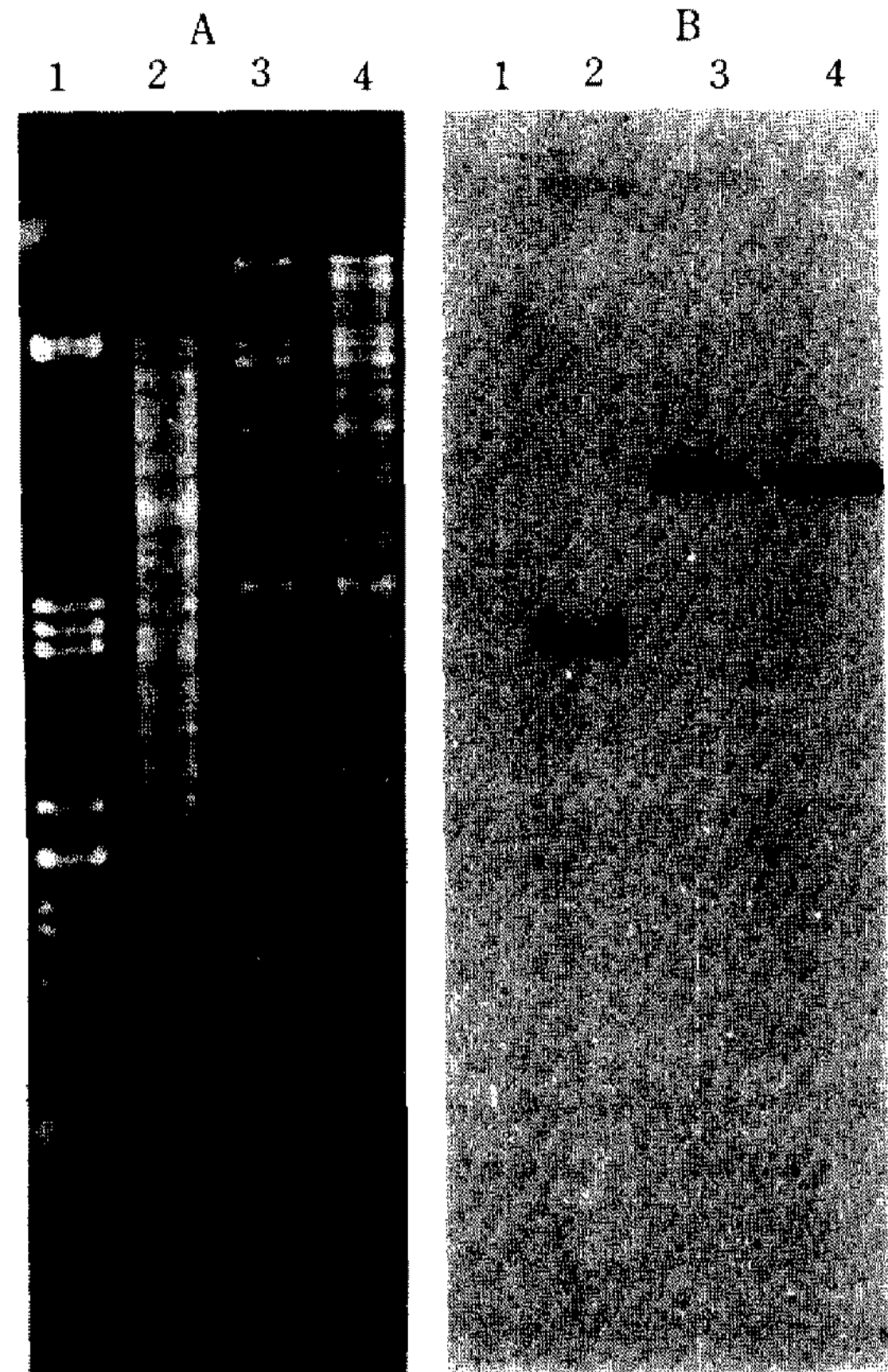


**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid DNA carrying *pel* gene of *Rhizobium fredii* USDA193 and  $\Omega$  fragment from pHP45 $\Omega$ . Lane A,  $\lambda$ /PstI; B, pSY1/EcoRI; C, pSY1/BamHI; D, pHP45 $\Omega$ /BamHI; E, pSY1 $\Omega$ BamHI; F, pSY1 $\Omega$ /BamHI-EcoRI; G, pSY1 $\Omega$ /EcoRI; I, uncut pSY1.

과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서와 같이 lane E에서 fragment 위치와 일치하였으며 다시 이를 *EcoRI* 및 *EcoRI-BamHI*으로 절단하였을 때 fragment와 해당하는 부위가 확인되었다(Fig. 3, lane G and F). 다시 *Erwinia pel*와 상동성이 있는 부위를 변이시키기 위하여 *XbaI* site가 단일로 존재하는 것이 확인되어, *XbaI*으로 절단한 후 Klenow 효소로 fill-in 반응시켰으며 이를 pSY $\Omega$ 1으로 명명하였다(Fig. 3, lane H). 이들 clone의 pectate lyase 활성을 조사한 결과 Table 2에서 처럼 SY1 $\Omega$ 는 SY1에 비하여 효소활성이 다소 약화되었으며 SY1 $\Omega$ 1은 활성을 나타내지 않았다.

**Marker-exchange 실험**

상기 변이실험에서 얻은 pSY1 $\Omega$  및 pSY1 $\Omega$ 1을 *R. fredii* USDA193(*rif*)에 marker-exchange시키기 위하여 An 등의 freeze-thaw법(22)에 따라 plasmid를 형질전환시켜 선별하여 얻은 균주를 *R. fredii* USDA193 $\Omega$  및 *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1으로 각각 명명하였다.



**Fig. 4.** (a) Agarose gel electrophoresis of *EcoRI* digested total DNA isolated from *R. fredii* strains. Lane 1,  $\lambda$ /PstI; 2, *R. fredii* USDA193; 3, *R. fredii* USDA193 $\Omega$ ; 4, *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1 (b) Hybridization of nonradioactive digoxigenin-dUTP labelled pSY1 $\Omega$ /EcoRI insert DNA (Fig. 3, small fragment of lane G) to *EcoRI* digested total DNA of Fig. 1 A.

Marker-exchange된 이들 균주들이 해당되는 항생제 배지에서 안정하게 생육하였으며 이들이 *Rhizobium fredii* USDA193내에 존재하는가를 확인하기 위하여 high-stringency hybridization 조건인 50% formamide-1% SDS-1 M NaCl, 42°C에서 상동성 반응을 시켰다. Probe로 SY1/EcoRI의 insert 단편을 분리하여 elution한 다음 재차 전기영동 및 정제하여 사용하였다. Fig. 4A와 4B에서처럼 Fig. 4A의 lane 2, 3과 4는 *R. fredii* USDA193, *R. fredii* USDA193 $\Omega$  및 *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1의 total DNA를 분리하여 *EcoRI* 제한효소로 완전 절단하여 전기영동한 것이며 이것에 상기 분리된 probe DNA로 상동성 실험을 한 결과는 Fig. 4 B와 같다. Fig. 4B에서처럼 본래의 *pel* 유전자와 강한 상동성을 보여주었으며 lane 3과 4에서 fragment가 *Rhizobium* 내로 도입된 것을 보여주고 있다. pSY1 $\Omega$

및 pSY $\Omega$ 1의 *pelB* 및 *pelE*의 변이된 부분이 *R. fredii*의 *pel* 유전자 homology 부위가 서로 marker-exchange되어 나타난 것으로 생각된다.

## 고 찰

전보(1)에서 저자들은 *R. fredii* USDA193에 내재하는 pSym 플라스미드상에 pectate lyase 유전자가 존재한다는 것을 보고한 바가 있다. 이들은 *Erwinia chrysanthemi* EC16의 *pelE*와 *pelB*(11)가 나란하게 상동성을 가지는 부위를 가지고 있어 이들을 pUC vector에 클로닝하였다. 본 실험에서는 이들 *pel* 유전자들이 근류형성 초기과정에서 관련될 것으로 추측되어 얻어진 clone(SY1)을  $\Omega$  mutagenesis에 의한 mutants를 얻었으며 이를 marker-exchange에 의한 *R. fredii*의 부분적인 *pel* mutants를 얻어 근류형성 실험을 하였다. 본 실험의 결과 얻어진 mutant들의 효소활성을 비교한 결과 *pelB* mutant인 SY1 $\Omega$ 는 SY1에 비해 효소활성이 감소되는 것을 볼 수 있었으며 *pelB* 및 *pelE*의 double mutant인 SY1 $\Omega$ 1에서는 효소활성을 볼 수가 없었다(Table 2). 또한 이들 mutants의 marker-exchange 실험으로 얻은 *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1의 mutants는 효소활성이 완전히 감소되지 않고 약한 활성을 보이고 있다. 이러한 현상은 *R. fredii* 내에서는 다른 *pel* 유전자가 존재할 것으로 추측되어서 이들 유전자들을 변이시키지 못한 결과로 생각된다. *Erwinia* spp.에서는 pectate lyase의 isoz-

yme이 4개 이상 존재하는 것으로 알려져 있으며 현재까지 5개 유전자가 확인되었다. 즉 *pelA*, B, C, D 및 E로써 이들의 pI가 서로 다른 것으로 알려져 있다(23-25). *pelB*와 C와의 sequence homology는 80~90%이며, *pelA*와 *pelE*는 많은 상동성이 있는 것으로 보고되었다(26). 한편 *pelA*, D 및 E는 약 2 kb내에 모여 있고, *pelC*와 B는 약 11 kb 떨어져 있는 것으로 보고되었으며, *pelE*는 pectin질 효소활성의 50~60%를 차지하는 것으로 알려져 있다(27). 이런 관점에서 본 실험의 결과와 비교해 볼 때 *R. fredii* 내에서는 *pelB*와 E 유전자 외의 다른 pectate lyase 활성이 있는 것으로 생각하며 이에 대한 연구를 계속 중이다.

한편, *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 와 *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1의 *pel*<sup>-</sup> mutants의 근류형성 정도를 관찰한 결과 이들이 근류형성 초기과정에서는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데 이러한 현상은 *Rhizobium*내에 pectate lyase 활성이 완전히 block되지 않았기 때문으로 생각되며 이 효소외에 cellulase 등 식물 세포벽 분해효소와 상호작용이 관련될 것으로 추측된다. 그리고 저자 등(10)은 *Rhizobium fredii*로부터 *cel* 유전자를 클로닝하여 근류형성 과정에서 미치는 영향을 조사 중에 있으며 *pel* 유전자와 병행하여 근류균의 근류형성의 세포벽 분해효소들의 초기 작용 기작을 이해하는데 더욱 접근하고자 한다.

## 요 약

*Rhizobium fredii* USDA193은 대두(Peking)의 근모 세포벽에 침투하여 근류를 형성한다. 본 실험에서는 전보(1)에서 분리 보고한 *R. fredii*의 pectate lyase 유전자 clone(SY1)으로부터  $\Omega$  변이를 시켰다. 이것을 *R. fredii* USDA193에 다시 marker-exchange시켜 얻은 변이균주(*R. fredii* USDA193 $\Omega$ 와 *R. fredii* USDA193 $\Omega$ 1)의 pectate lyase 활성이 완전히 block되지 못하였다. *R. fredii* 내에서는 다른 종류의 *pel* 유전자가 존재할 것으로 생각되며 *pelB* 및 *pelE*의 *Rhizobium* mutants들은 근류형성 초기단계에서 직접적으로 영향을 미치지 못하였다.

## 감사의 말

이 논문은 한국과학재단 연구비(SRC for PMBRC)

**Table 2. Pectate lyase activity of *Rhizobium fredii* USDA193 and clones of the pectate lyase gene in *E. coli*.**

Strains	Enzyme activity ( $\mu$ moles/min/ml)
<i>R. fredii</i> USDA193 (wild type)	2.30
<i>R. fredii</i> IA728	0.00
<i>R. fredii</i> USDA193 $\Omega$	1.10
<i>R. fredii</i> USDA193 $\Omega$ 1	0.90
pSY1	3.71
pSY1 $\Omega$	1.80
pSY1 $\Omega$ 1	0.00
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	0.00

\*The enzyme reaction mixture were incubated for 24 hours period at 30°C

에 의하여 연구되었으며, 귀 재단의 연구비 지원에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Lim, S.T., M.H. Chung, Y.W. Park and H.D. Yun: *Molecules and Cells*, **1**, 151 (1991)
2. Keyser, H.H., B.B. Bohlool, T.S. Hu and D.F. Weber: *Science*, **215**, 1631 (1982)
3. Sadowsky, M.J., H.H. Keyser and B.B. Bohlool: *Int. J. Sys. Bacterial.*, **33**, 716 (1983).
4. Yun, H.D., M.J. Cho and K.H. Lee: *J. Kor. Agri. Chem.*, **30**, 153 (1987)
5. Yun, H.D., M.J. Cho and K.H. Lee: *J. Kor. Agri. Chem.*, **30**, 163 (1987)
6. Callaham, D.A. and J.G. Torrey: *Can. J. Bot.*, **59**, 1647 (1981).
7. Verma, D.P.S., V. Zogbi and A.K. Bal: *Plant Sci. Lett.*, **13**, 137 (1978)
8. Plazinski, J. and B.G. Rolfe: *J. Plant Physiol.*, **120**, 181 (1985)
9. Planzinski, J. and B.G. Rolfe: *Appl. Environ. Microbial.*, **49**, 990 (1985)
10. Yun, H.D., S.T. Lim and K.Y. Kang: *J. Kor. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 203 (1990)
11. Keen, N.T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz and W. Weber: *J. Bacteriol.*, **159**, 825 (1984).
12. Beringer, J.E.: *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 188 (1974)
13. Starr, M.P., A.K. Chatterjee, P.B. Starr and G.E. Buchanan: *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 379 (1977)
14. Hirsch, P.R., M. Van Montagu, A.W.B. Jhonston, N.J. Brewin and J.F. Schell: *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 403 (1980)
15. Holmes, D.S. and M. Quigley: *Anal. Biochem.*, **120**, 403 (1980)
16. Sambrook, J., E.F. Fritsch and M. Maniatis: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor, New York (1989)
17. Ausubel, F.M. et al.: *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, New York (1987)
18. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein: *Anal. Biochem.*, **132**, 6 (1983)
19. Prentki, P. and H.M. Krisch: *Gene*, **29**, 303 (1984)
20. Frey, J. and H.M. Krisch: *Gene*, **36**, 143 (1985)
21. Roeder, D.L. and A. Collmer: *J. Bacteriol.*, **164**, 51 (1985)
22. An G.H., P.R. Ebert, A. Mitra and S.B. Ha: *Plant Molecular Biology Manual*, A3, 1, Kluwer Academic Pub., Belgium (1988)
23. Barras, F. and A.K. Chatterjee: *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 614 (1987)
24. Chatterjee, A.K. and A.K. Vidaver: *Advances in Plant Payhology* Vol. 4, Academic Press, New York (1986)
25. Wills, J.W.: *Phytopathol.*, **77**, 1199 (1987)
26. Lei, S.P., H.C. Lim, S.S. Wang, J. Callaway and G. Wilcox: *J. Bacteriol.*, **169**, 4379 (1987)
27. Reverchon, S. and J. Robert-Baudouy: *J. Bacteriol.*, **169**, 2417 (1987)

(Received April 11, 1991)