



Title	フィコビリソーム
Author(s)	近藤, 久益子; 佐藤, 桃子; 広瀬, 侑; 渡邊, 麻衣; 池内, 昌彦
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39159
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 4. タンパク質複合体の単離 e
File Information	67-044.pdf



[Instructions for use](#)

4. タンパク質複合体の単離

e. フィコビリソーム

近藤久益子¹⁾, 佐藤 桃子¹⁾, 広瀬 侑¹⁾, 渡邊 麻衣²⁾, 池内 昌彦¹⁾

フィコビリソームはシアノバクテリア, 灰色藻, 紅藻に広く存在するフィコビリタンパク質の集光超分子複合体で, 光エネルギーの捕集と光環境への順化, 分配や貯蔵タンパク質として重要な役割を果たしているが, まだ不明な点が多い。

Phycobilisome

Kumiko Kondo, Momoko Sato, Yuu Hirose, Mai Watanabe, Masahiko Ikeuchi

Phycobilisome is a light harvesting-supercomplex in rhodophytes, glaucocystophytes and cyanobacteria. It is located on the thylakoid membrane and transfers light energy to photosystems. In this chapter, we introduce methods of its isolation and analysis in cyanobacteria and glaucocystophytes. The protocol of the complementary chromatic adaptation (acclimation) was also described.

4.e.1 フィコビリソームの基本コンセプトと問題

フィコビリソームはコアとロッドからなる超複合体である^{1,2)}。そのコアやロッドは, 互いによく似たフィコビリタンパク質のドーナツ状のディスクとこれをつなぐリンカータンパク質から構成されており, さらにコアとロッドの間も別のリンカータンパク質によって連結されている (図1)。フィコビリタンパク質とは開環テトラピロールであるフィコビル色素がタンパク質に共有結合したものである (3章5参照) ディスクとは, 各フィコビリタンパク質の α/β サブユニット複合体を単位 (モノマーと呼ぶ) として, ドーナツ状の3量体もしくは $3+3=6$ 量体を形成したものである。ロッドの遠位部分はフィコエリスリン6量体 (これをもたない種もある), 近位部分はフィコシアニン6量体, コアの主成分はアロフィコシアニン3量体が中核を形成している。フィコエリスリン α サブユニット (CpeA) は, フィコシアニン α サブユニット (CpcA), アロフィコシアニン α サブユニット (ApcA) と相同で, フィコエリスリン β サブユニット (CpeB) は, フィコシアニン β サブユニット (CpcB), アロフィコシアニン β サブユニット (ApcB) と相同で, しかも α サブユニットと β サブユニットも相同性はやや低い起源をとにする。つまり, フィコビリソームの主要な構成成分は単一の色素タンパク質の遺伝子の重複によって生じたといえる。リンカータンパク

質の詳細は省くが, 通常は色素を結合せず, ドーナツ状の3/6量体ディスクの内側に入り込んでディスク同士を連結する役割をもつ (図1)。これらの成分はシアノバクテリア, 灰色藻, 紅藻に広く分布しており, よく似たフィコビリソームを形成し, 光化学系の集光装置として機能している。このようなフィコビリソームの分子質量は1MDaを越えるまさに超複合体である。また, ここでは述べないが, 束状のフィコビリソームなど多様な構造が知られている³⁾

*注: フィコビリタンパク質の分野では, 遺伝子は *cpcA* などと表記するが, タンパク質は $\alpha^{PC} \cdot \beta^{PC}$ (フィコシアニンモノマーの場合) などと表記する。これでは初心者には対応関係がわかりにくいので, 本項では $\alpha^{PC} \cdot \beta^{PC}$ を CpcA \cdot CpcB などと統一的に表記する。

上述のように, フィコビリソームのロッドの遠位にフィコエリスリン, 近位にフィコシアニン, コアにアロフィコシアニンが配置されており, それぞれが ~ 560 nm, ~ 620 nm, ~ 650 nmの吸収ピークを示す。光エネルギーが波長に反比例するので, この配置は遠位の高い光エネルギーを吸収してコアの低いエネルギー準位への励起エネルギーの効率的な伝達を実現している。しかし, ここで述べた基本成分以外の微量成分のフィコビリタンパク質や種ごとに異なる多様なリンカータンパク質の存在は, フィコビリソームの物質的理解がまだ十分でないことを示している。また, 各フィコビリタンパク質が特定波長の光を吸収するしくみ, フィコビリソームの自己会合のしくみ, フィコビリソームから光化学系複合体へ

1) 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

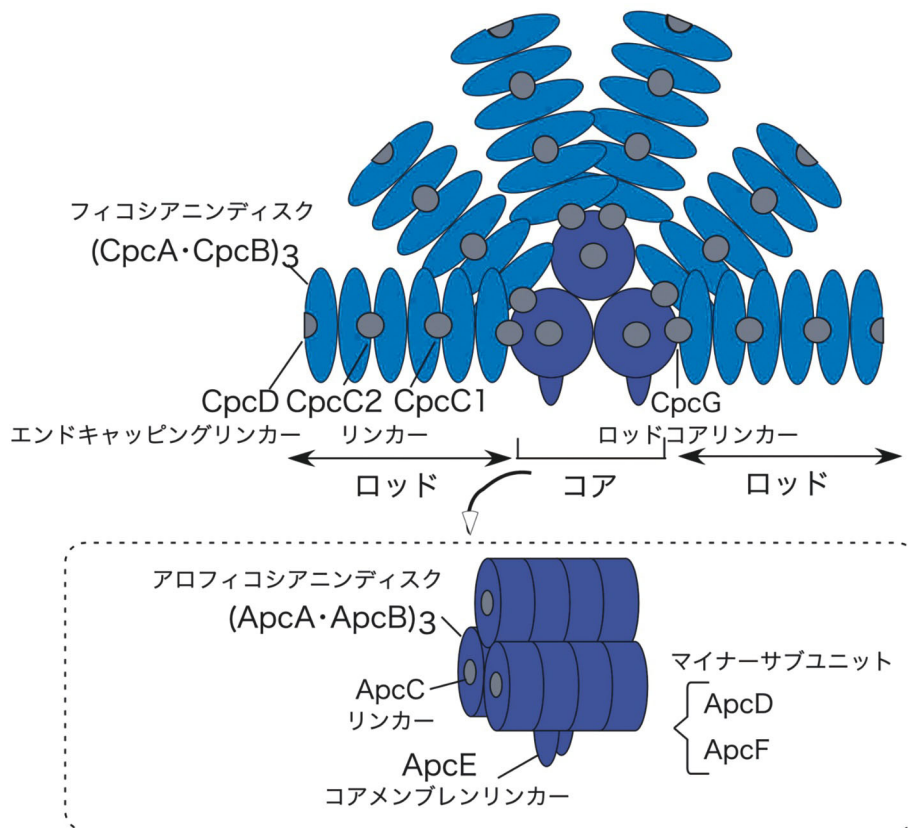


図1: *Synechocystis* sp. PCC 6803 のフィコビリソームのモデル図。

の効率のよい光エネルギー転移のしくみ、さらに栄養飢餓や光環境の変化に応じた発現や分解の誘導など、解明されていない問題が山積している。

フィコビリソームは1970年代から活発に研究されてきたが、フィコビリソームやそのフィコビリタンパク質の構造解析やゲノム解読の進展から予測されるフィコビリソーム遺伝子の機能や構造の多様性が次々に明らかになってきており、フィコビリソーム像を見直す時期に来ているといえる。

4.e.2 フィコビリソームの単離

フィコビリソームの構造を維持するにはリン酸やクエン酸などの多価アニオンの高濃度の緩衝液が必要である^{4,5,6)}。このような溶液を用いたフィコビリソームの古典的な単離法は現在でももっとも有効である。これらの溶液にはアンチカオトロピック効果があるが、シアノバクテリアの細胞内のイオン組成と関係があるかどうか明らかではない。この条件で細胞を破碎すると、フィコビリソームの一部はチラコイド膜に結合している。Triton X-100 処理はこの膜結合フィコビリソームを抽出するのにある程度有効であるが、完全には抽出しきれない。

[実験方法] フィコビリソームの単離

*以下、全ての作業は20°C付近で行う⁵⁾。

1. シアノバクテリアの細胞を0.8 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、細胞を破碎する。破碎にはフレンチプレスやビードビーターを用いる。フレンチプレスの場合、 1500 kg cm^{-3} で2回もしくは3回通す。冷却式のビードビーター (BioSpec 社) の場合、氷水のジャケットで包み、30秒で4回程度破碎する。^{#1}
- (1') 灰色藻の場合、低張ショックで単離したシアネル(色素体)を、0.8 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、リゾチーム (終濃度 1 mg mL^{-1}) を加える。ペプチドグリカン層は薄いので、すぐにシアネルは破裂するが、通常25°Cで15分間静置する。これを遠心回収して、再度リン酸溶液に懸濁し、最終2%のTriton X-100を加え、 $15,000 \text{ xg}$ 、5分間遠心し、

^{#1} フィコビリソームは熱変性しやすく、不溶性の凝集物をつくる。したがって、内部から熱を発生するビードビーターを使用するときは、過熱に注意する。容器は冷たくても、内部は過熱していて不溶化することがある。細胞は破碎できているのに、フィコビリタンパク質が沈澱するときは、破碎時間もしくは回転数を下げることが検討する。

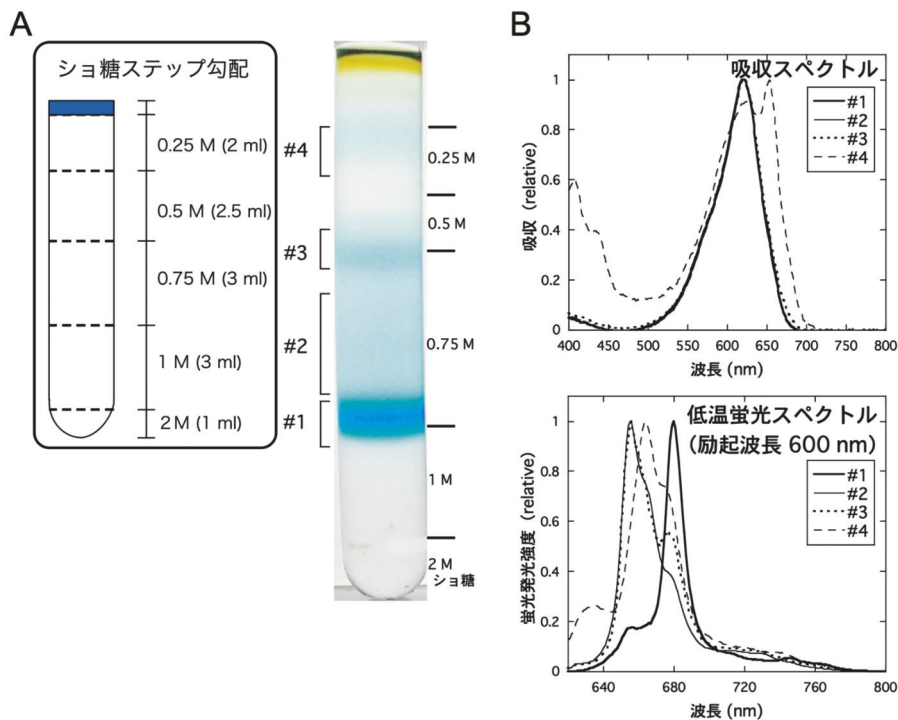


図2：シヨ糖密度ステップ勾配*と *Synechocystis* sp. PCC 6803 における分離例 (A)，および分光学的解析例 (B)。13PET チューブ (Hitachi)，スイングロータ P65ST (Hitachi) を使用。

上清を回収する。これを上記のシヨ糖密度勾配遠心法で分画する。なお、フレンチプレスや超音波処理をしているプロトコルもあるが、リゾチームで十分である。

2. 終濃度が2%になるように Triton X-100 を添加する (20% (w/v) ストックを使用)。
3. 遮光して 30 分間振盪する。
4. 遠心 (20,000 xg, 20 分間) によって層分離させる。上にクロロフィルを含む Triton X-100 層, 下にフィコビリソームを含む水層の2層に分離する。^{#2}
5. 下側の青い水層を回収し, 0.8 M リン酸 (pH 7.0) を含む 10-50% (w/v) シヨ糖密度勾配 (連続密度勾配またはステップ勾配, 図2 A) に重層する。なお, 上のステップ4で, 二層に分かれなかった場合はそのまま重層する。^{#3}
6. 超遠心 (130,000 xg, 15 時間) によってフィコビリタンパク質複合体を分画する。

結果：一般に, intact フィコビリソームが最も下に, フィ

コビリタンパク質のサブユニットが上部に回収され, Triton X-100 で可溶化されたクロロフィル類は通常は最上部に留まる (図2 A および図3)。図3は, 各種の生物のフィコビリソームの分画は, intact フィコビリソームの多様性を示す。

[実験方法] 単離フィコビリソームの解析

青色層をシリンジ等によって分画後, 構成タンパク質とその会合状態を SDS-PAGE や吸収・蛍光スペクトル測定によって推定することができる。

・SDS-PAGE

基本的にフィコビリソームの構成タンパク質は7-9 kDaのコアリンカーおよびロッドエンドキャッピングリンカー, 約15-20 kDaのフィコビリタンパク質, 30-40 kDaのロッドコアリンカーおよびロッドリンカー, 70-120 kDaのコアメンブレンリンカー (アンカーともいう) に分けられる。このうち, コアメンブレンリンカーは限定分解を受けやすく, 複数のバンドに分かれることが多い。またシアノバクテリアにおいては, フィコビリソームと相互作用している FNR も確認することができ

^{#2} 0.8 M リン酸緩衝液と2% Triton X-100 溶液は2層に分離し, 上層にはクロロフィル, 下層にはフィコビリソームが回収されるが, 試料が多すぎると層分離しなくなったり, 下層にクロロフィルが混入しやすくなるが, その場合でも次の密度勾配遠心で分画できることが多い。

^{#3} われわれは, 密度勾配の作製にグラジエントマスター (トーワ

ラボ) を使用している。これは2種の液を重層して一定時間チューブを傾けて回転させて連続勾配をつくる簡単な装置であるが, 複数のチューブを作製するとき簡便で再現性にすぐれている。

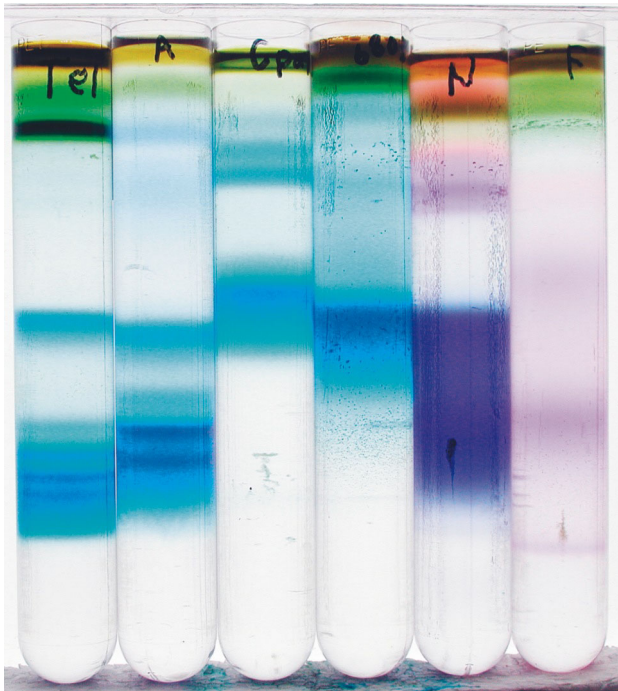


図3：数種のシアノバクテリアおよび灰色藻のフィコビリソームの分画例（10-50% ショ糖）。左から順に *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Cyanophora paradoxa* NIES-547, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Fremyella diplosiphon*. 最上部の緑色層は手順5におけるクロロフィルタンパク質の混入によるもの。

る。

尿素を含まない通常の SDS-PAGE では主要なフィコシアニン、アロフィコシアニンのタンパク質がよく分離し、代表的な種では移動度の大きい方から CpcB, ApcA, CpcA, ApcB の順に分離する（図4）⁷⁾。一方、尿素を含む SDS-PAGE（3章4eを参照）では、これらのタンパク質の分離は少し悪くなるが、コアリンカーなど低分子タンパク質や高分子のコアメンブレンリンカータンパク質すべてを分離できる。

・Zn 蛍光検出

フィコビリタンパク質は、SDS-PAGE 後に共有結合している開環テトラピロール由来の蛍光によって確認することができる。この原理は、本来ばらばらになった4個のピロール環に Zn^{2+} を配位させることでテトラピロールの平面性を保ち、吸収や蛍光効率、つまり検出感度を上げることにある⁸⁾。

1. SDS-PAGE ゲルを約10分間、ddH₂O で洗浄する。
2. 10 mM の酢酸亜鉛溶液に浸し、30分間遮光して振盪する。ストック（1 M 水溶液、pH 調整不要）を使用する。
3. 2次元蛍光検出器で検出する。励起波長 577 nm、蛍

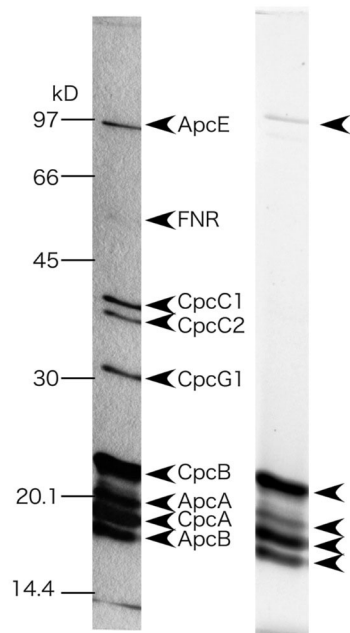


図4：Synechocystis の泳動例（15% acryl amide, Tris-Glycine 系）。左は銀染色。右は FMBIO による蛍光画像。（他の泳動条件例として低分子量リンカーに適しているのは 7.5 M urea, 16-20% アクリルアミドゲルなどがある。）

光波長 623 nm.

*筆者らは FMBIO II (Takara) を用いている。この場合、励起光（532 nm）は固定であるが、蛍光はチャンネル 2（605 nm 固定）で感度よく検出できる。蛍光像を図4に示す。感度は落ちるが DNA 検出用の UV 照射装置でも検出可能である。

・吸収・蛍光スペクトル測定

前述のようにフィコビリタンパク質の同定や部分複合体の会合状態の推測には分光学的な解析が有効である。特に液体窒素温度下における低温蛍光スペクトルでは色素タンパク質の蛍光ピークがシャープに得られ、近接した蛍光ピークを持つフィコビリタンパク質の同定に適している。エネルギー伝達が正常な無傷のフィコビリソームからは約 680 nm のピークが得られる（図2B）。一般に、光化学系複合体の低温蛍光は 685-695 nm 付近の系 2 と 720 nm 付近の系 I 由来のものに分かれるが、フィコビリソームの蛍光ピークは近接しているので注意が必要である。

4.e.3 低塩緩衝液によるフィコビリソームの部分解体

ロッドに結合しているリンカータンパク質は多種多様であり、これらの複合体内での局在を調べることは、フィ

コピリソーム全体の構造を理解するうえで重要である。フィコビリソームは高塩濃度の緩衝液中では安定だが、低塩濃度の緩衝液中ではその構造が不安定となり、ロッドとコアなど部分的に解体されることが知られている^{4,5)}。

4.e.3.1 ショ糖密度勾配遠心法による解体・分画

細胞破碎時から低塩濃度の緩衝液を用いても、フィコビリソームのサブ複合体を得ることは可能だが、フィコビリソーム構成タンパク質以外の混入をさけられない。そのため、3.4.e.2で単離した intact フィコビリソームの超複合体を解体した方が解析しやすい。回収したフィコビリソーム画分を希釈してリン酸濃度を0.3 M 以下として、超複合体を解体させショ糖密度勾配遠心法で分画する。

[実験方法]

1. 0.8 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) をもちいて単離したフィコビリソーム画分 (目安としてフィコシアニンの吸光度 $A_{630}=3.35$ くらいのを \times mL くらい用意するとよい) を、同じリン酸緩衝液を用いてショ糖濃度が10%以下になるように希釈する。
2. 限外濾過法により、元の体積まで濃縮する。
3. 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で3倍に希釈。緩衝液の濃度が約0.3 M になるように調整する。
4. 限外濾過法を用いて再濃縮。
5. 再濃縮したフィコビリソーム溶液を10-25%ショ糖密度勾配 (0.3 M リン酸緩衝液中) に重層する。
6. 遠心 (130,000 $\times g$, 15 時間)。
7. 色のついた画分をシリンジ等で分取する (図5)。

4.e.3.2 native PAGE による解体・分画

フィコビリソームのサブ複合体は native PAGE を用いることでも分離することができる^{9,10)}。以下に現在当研究室で行っている例をしめす。このときに得られるのは主にフィコビリタンパク質の三量体、もしくはそれに低分子量のリンカータンパク質がついた複合体である。電気泳動条件は低塩条件であるため、フィコビリソームは解体し、ロッド由来のディスク、コア由来のディスク、コアメンブレンリンカーを含むコア複合体のバンドなどが分離される。

[材料]

泳動用緩衝液: Tris-glycine buffer

Tris hydroxymethylaminomethane	1.515 g
Glycine	7.205 g
ddH ₂ O	1 L

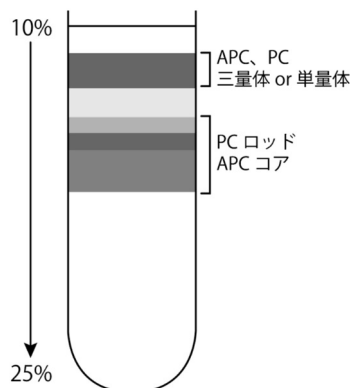


図5: *Cyanophora paradoxa* の部分解体されたフィコビリソームのショ糖密度勾配遠心法による分画例。色のついた画分は、分光学的解析や SDS-PAGE をおこなうことでロッドやコアであることを特定できる。(PC, phycocyanin; APC, allophycocyanin)

表 1:

	6-12%分離ゲル		濃縮ゲル
	6%	12%	3%
60% (w/v) アクリルアミド	0.4 mL	0.8 mL	0.1 mL
1.6% ビス			
3 M Tris/HCl pH 8.6	0.5 mL	0.5 mL	—
1.26 M Tris/HCl pH 6.8	—	—	0.2 mL
DW	3.1 mL	2.3 mL	1.7 mL
60% (w/v) ショ糖	—	0.4 mL	—
10% (w/v) 過硫酸アンモニウム	12 μ L	12 μ L	16 μ L
TEMED	2 μ L	2 μ L	3 μ L
合計	4 mL	4 mL	2 mL

アクリルアミドゲル溶液 (表1) は筆者らの処方であるが、通常の30%アクリルアミド、0.8%ビス溶液を2倍量用いてもよい。

分離パターンを図6に示す。

4.e.4 フィコビリソーム/光化学系II超複合体の調製

フィコビリソームがどのように光化学系複合体と結合し、光エネルギーを伝達しているかを知るためには、フィコビリソームと光化学系複合体の超複合体を調製する必要がある。1980年代にこれを目指した論文がいくつか報告されているが、もっとも有望な方法を以下に述べる。材料はやはり安定性が高い好熱性 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 で、高イオン強度溶液と穏和な界面活性剤ジギトニンを使用する¹¹⁾。

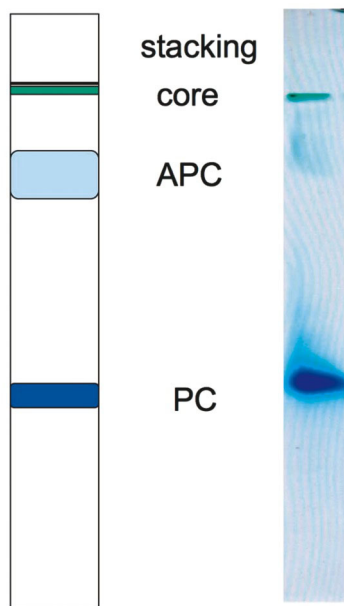


図6: *Thermozynechococcus elongatus* のフィコビリソームの native PAGE による分離例。

[実験] *Thermozynechococcus* のチラコイド膜の調製

1. 細胞を 0.15% (w/v) リゾチーム, 0.5 M ショ糖, 0.1 M リン酸カリウム (pH 7.2) に懸濁する。
 2. 40°C で 2 時間緩やかに攪拌。この処理により細胞壁が壊れ、スフェロプラストになる。
 3. スフェロプラストを遠心により回収する。
 4. SPC buffer (0.5 M ショ糖, 0.5 M リン酸カリウム, 0.3 M クエン酸ナトリウム, 0.2 mM CaCl₂, 1.5% (w/v) 牛血清アルブミン, pH 6.9) に懸濁する。
 5. フレンチプレス (12,000 kg/cm²) にかき、細胞を破碎する。
 6. 遠心 (10,000 g, 10 分間) して、非破碎の細胞を除く。上清を回収する。
 7. 上清に 0.1% (w/v) の DNase を加え 40 分間, 20°C で処理する。
 8. 遠心 (22,000 g, 20 分間) して、上清を段階的なショ糖密度勾配 (0.7, 0.8, 1.0, 1.2 M ショ糖, SPC buffer) に重層する。
- 結果: 遠心 (200,000 g, 70 分間), 0.8 M と 1.0 M ショ糖層の間にフィコビリソームを結合したチラコイド膜の層が得られる。

[実験方法] フィコビリソーム—光化学系II超複合体の単離

1. フィコビリソームを結合したチラコイド膜を懸濁

(0.4 mg Chl mL⁻¹, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) DNase, 0.5% digitonin を含む SPC buffer, このとき界面活性剤とクロロフィルの濃度比 (w/w) が 12.5 になる)

2. インキュベート (25°C で 30~60 分間)
 3. 遠心 (25,000 g, 10 分間) して、膜断片を除く。
 4. 上清を段階的なショ糖密度勾配 (0.5, 0.75, 1.0, 1.5 M ショ糖, SPC buffer) に重層する。
 5. 超遠心 (300,000 g, 70 分間, スイングロータ使用)。
- 結果: 1.0 M と 1.5 M ショ糖層の間の暗緑色のバンドがフィコビリソーム—光化学系II超複合体である。

4.e.5 窒素飢餓におけるフィコビリソームの分離

フィコビリタンパク質は全細胞タンパク質の 10~20% を占めるといわれ、いわば有機窒素の貯蔵体という側面もある。したがって、培地から窒素を除くと窒素固定ができないシアノバクテリアや藻類はフィコビリタンパク質を分解する¹²⁾。このしくみは、次に述べる補色順化とは異なり積極的な現象である。

[実験方法]

- BG11 培地から硝酸塩を除いた BG11₀ 培地を使用する。
 - 窒素飢餓の早い応答をみるためには、細胞をフィルター濾過して培地を交換する。
- 結果: フィコビリソームのサイズの減少は 3.4 e.2 の単離分画法によって追跡することができる (図 7)。

4.e.6 補色順化

ある種のシアノバクテリアのフィコビリソームには 620 nm 付近の赤色光を吸収するフィコシアニンの他に、570 nm 付近の光を吸収するフィコエリスロシアニンやフィコエリスリンといった短波長の光を吸収する集光タンパク質が含まれる。これらの種の中には、緑色光下でフィコエリスリンを蓄積し、赤色光下でフィコシアニンを蓄積するものが古くから知られており、補色適応 (Complementary chromatic adaptation) と呼ばれている^{13,14)}。この現象は慣例的に適応 (adaptation) と呼ばれているが、遺伝子の変化を伴わない環境応答現象であるので、以下、順化 (acclimation) と呼ぶ。補色順化は、フィコシアニンとフィコエリスリンを持つシアノバクテリアの性質としてよく知られており、パスツールのカル

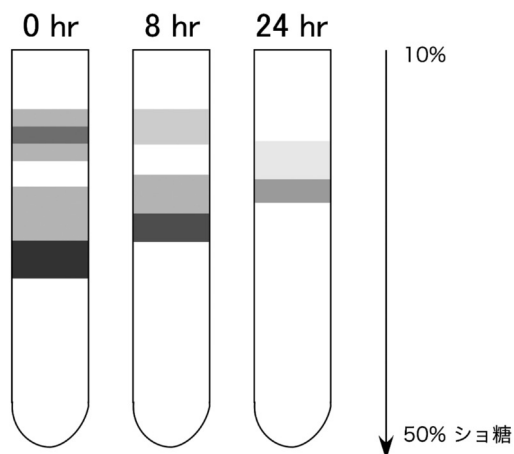


図7：窒素飢餓におけるフィコビリソームの分解過程における分離プロフィール。

チャーコレクシヨンの株も補色順化によって分類されている。補色順化の主な種類として、次の3つに分けられている¹³⁾。

- Group I：緑色光や赤色光の下でフィコエリスリンとフィコシアニンの組成を変化しない(補色順化しない)。
- Group II：緑色光の下でフィコエリスリンを増やすが、赤色光の下ではフィコシアニンを増やさない。
- Group III：緑色光の下でフィコエリスリンを増やし、赤色光の下でフィコシアニンを増やす。

これらは赤色光，緑色光を照射して培養し，その細胞の吸収スペクトルを測定することで分類が可能である。代表的な種は，Group II では *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, Group III では *Fremyella diplosiphon* UTEX 481 であるが，PCC のリストでは株ごとに記載されている。Group II と III は，発現誘導を受ける第2のフィコシアニン遺伝子があるかどうかで区別されるといわれているが，近年の遺伝子の研究によれば第2のフィコシアニン遺伝子がなくてもリンカータンパク質の発現制御によってフィコシアニンの蓄積制御が起こる可能性があり，この分類はそれほど絶対的ではないかもしれない。

[実験方法]

培養の際には以下の点に注意する必要がある。

①緑色光に 530~540 nm, 赤色光には 630~640 nm 付近の波長の光を用いる。

②約 $10 \mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の弱光で細胞を培養する。

③濃度の薄い細胞を2週間程度かけて培養する。

重要なポイントは，それぞれの光条件を弱光にすることである。フィコシアニン励起の赤色光であっても，その光強度が $30\text{--}40 \mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ より強いと，むしろフィコシアニン含量が低下する強光応答が起こる。また，一度合成されたフィコシアニンやフィコエリスリンはあまり分解しないので，弱光でできるだけ長期間培養し，培養開始時の細胞の持ち込みをできるだけ少なくすることが重要である。光源は白色光とカットフィルターやセロハン等を組み合わせてもよい。

また色付きの蛍光灯や LED 光源を利用してもよい。また，680 nm 付近の赤色光によってクロロフィルを励起すると，系 I / 系 II 比の調節が起こる可能性もあるので，注意する。

文献

- 1) 三室守, 村上明男, 菊池浩人, *蛋白質・核酸・酵素* **42** (1997) P.2613.
- 2) R. MacColl, *J. Struct. Biol.* **124** (1998) P.311.
- 3) K. Koyama, T. Tsuchiya, S. Akimoto, M. Yokono, H. Miyashita & M. Mimuro, *FEBS Lett.* **580** (2006) P.3457.
- 4) A. N. Glazer, *Methods Enzymol.* **167** (1988) P.291.
- 5) E. Gantt, C. A. Lipschultz, J. Grabowski & B. K. Zimmerman, *Plant Physiol.* **63** (1979) P.615.
- 6) G. Ajlani, C. Verrotte, L. Dimagno & R. Haselkorn, *Biochim. Biophys. Acta* **1231** (1995) P.189.
- 7) K. Kondo, X. X. Geng, M. Katayama, & M. Ikeuchi, *Photosynth. Res.* **84** (2005) P.269.
- 8) T. R. Berkelman, & J. C. Lagarias, *Anal. Biochem.* **156** (1986) P.194.
- 9) W. Reuter & W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol.* **150** (1988) P.534.
- 10) L. Sun & S. M. Wang, *J. Photochem. Photobiol. B.* **72** (2003) P.45.
- 11) M. Kura-Hotta, K. Satoh, & S. Katoh, *Arch. Biochem. Biophys.* **249** (1986) P.1.
- 12) A. R. Grossman, M. R. Schaefer, G. G. Chiang, & J. L. Collier, *Microbiol. Rev.* **57** (1993) P.725.
- 13) N. Tandeau de Marsac, *J. Bacteriol.* **130** (1977) P.82.
- 14) D. M. Kehoe & A. Gutu, *Annu. Rev. Plant Biol.* **57** (2006) P.127.