クローバ根粒菌A6R1株の細胞外多糖とその分解酵素の特性解析

著者	内野 良昭, 東 四郎, 阿部 美紀子, 内海 俊樹
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	25
ページ	111-123
別言語のタイトル	Characteristics of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii A6R1 Exopolysaccharide and its Depolymerase
URL	http://hdl.handle.net/10232/00006949

鹿児島大学理学部紀要（地学・生物学）
No. 25, 111-123, 1992.

クローバ根粒菌 A6R1 株の細胞外多糖とその分解酵素の特性解析

内野　良昭・東　四　郎・阿部美紀子・内海　俊樹[1)]

(1992年 9 月10日受理)

Characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* A6R1 Exopolysaccharide and Its Depolymerase

Ryo-sho UCHINO, Shiro HIGASHI, Mikiko ABE, and Toshiki UCHIUMI

Abstract

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* A6R1 is a useful inoculant strain for pastures of clover by reason of its high nitrogen fixing ability. However, this strain secretes high viscous exopolysaccharide (EPS) into culture medium. The production of EPS disturbs the centrifugal efficiency for collection of the bacterial cells.

4S phage EPS-depolymerase (4S-DPase) is induced from *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S by virulent 4S-phage infection. 4S-DPase has depolymerizing function for strain A6R1-EPS without bacteriolysis.

4S-DPase was purified to about 20.6 times of activity units by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation, DEAE-cellulose, and Toyopearl HW-75F column FFLC. Its molecular weight was estimated as 350,000 by gel permiation chromatography (Toyopearl HW-75F column). The stability of the enzyme activity was increased by the Ca^{2+} addition. The DPase activity was also detected from the purified phage particle fraction on Toyopearl HW-75F column FFLC.

While, it was clarified that an oligosaccharide repeating unit of the fragmentated A6R1-EPS by 4S-DPase was consist of glucose, glucuronic acid and galactose from the result by using gas chromatography. The molecular weight of oligosaccharide repeating unit was determined as 1466 by ^{1}H-NMR and Anion FAB-mass spectrometry.

More available technique for DPase activity measurement during the degradation process of A6R1-EPS was proposed that a measurement of UV absorbance at 234 nm instead of viscometrical method.

Key words: *Root nodule bacteria, Exopolysaccharide (EPS), Bacteriophage, EPS-depolymerase (DPase), Repeating unit*

1) 鹿児島大学　理学部　生物学科, 〒890　鹿児島市 郡元 1-21-35　Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University. 1-21-35 Korimoto, Kagoshima 890, Japan.

緒　論

根粒菌はマメ科植物の根に根粒を形成し，根粒細胞内でペリバクテロイド膜に包まれ，バクテロイドへと形態変化する．その後，根粒細胞内の嫌気的条件下で根粒菌の保有するニトロゲナーゼが発現し，大気中の窒素を固定する．クローバ根粒菌である *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* A6R1 株は，クローバに安定した感染力と高い窒素固定能を保有していることから，牧草生産のための実用菌株として利用されている．しかし，根粒菌一般に言えることであるが，液体培養すると，細胞外多糖（exopolysaccharide; EPS）を大量に分泌するため，遠心分離による集菌の際，集菌効率が極めて悪い．したがって，菌体を活性のある状態で効率よく集菌する事を目的として，EPS を低分子へと分解する酵素を見いだし，培養液の粘性を低下させることは重要な課題であった．そこで，クローバ根粒菌 4S 株に感染する bacteriophage（4S phage）を吸着感染させて得られる phage-lysate の中に産生される 4S phage EPS-depolymerase（4S-DPase）を利用することを考えた．

一方，EPS は根粒菌とマメ科植物との共生成立において，感染初期過程に，ある役割を有していると考えられている（Caetano-Anollés *et al.*（1990），Ko and Gayda（1990），Mody *et al.*（1990），Putnoky *et al.*（1990），Zhan and Leigh（1990），Gray *et al.*（1991））．遺伝的に細胞外多糖の合成能に欠陥を生じた菌株においては根粒菌の植物細胞内への侵入が見られないとの報告もあり，そのため EPS そのものの組成分析も行われている（Robertsen *et al.*（1981），Hollingsworth and Dazzo（1988））．4S-DPase は根粒菌の EPS を，同一の構造を持つオリゴ糖（repeating unit）に分解する（Higashi and Abe（1978））．DPase のこのような性質は EPS の構造解析に有用な手段となると考えられる．特に根粒着生能の高い A6R1 株の EPS は興味のあるところである．

本研究では，4S-DPase が A6R1 株の細胞外多糖を分解することを見いだし，4S-DPase とその基質である A6R1 株の EPS についてその特性解析を行ったので報告する．

材料と方法

バクテリアとバクテリオファージ

菌株は *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* A6R1 株（Tokachi Federation of Agricultural Cooperative）および 4S 株（Higashi and Abe（1978））を用いた．4S 株に対する virulent phage である 4S-phage は当研究室で分離した（Higashi and Abe（1978））．

4S-phage lysate からの 4S-DPase の調製

4S 株をイースト・マニトール（YM）培地にて28℃，一夜前培養し，500 μl の培養液を400 ml の YM 液体培地を入れた500 ml の坂口フラスコに接種し，28℃で振盪培養した．early log phase に増殖した時点で，4S-phage（約10^{10}PFU/ml）を500 μl を加え，さらに振盪を続け，溶菌後（phage 感染後，およそ 8 ～12 h），5,000 × *g*，10 min，4 ℃で遠心し，上清を集めた．以後のすべての操作は 4 ℃で行った．上清を80％飽和 $(NH_4)_2SO_4$ を用いて塩析し，生じた不溶物を集め，20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）に溶解，20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）にて一夜透析した．得られたタンパク試料を20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）で平衡化した DEAE-cellulose（約50 ml）にバッチ法にて吸着させ，1.5～3.0 h 静置した．非吸着分画をブッフナー濾斗上でろ過洗浄した後，吸着分画は0.2 M NaCl を含んだ20 mM Tris-HCl（pH 7.3）に懸濁し，1.5-3.0 h 静置

して溶離した．さらに，0.5 M NaCl を含んだ同緩衝液に懸濁し，静置後ブッフナー濾斗で濾液を回収し，これを20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.3)で一夜透析して脱塩した．タンパク試料は分子量10,000の限外ろ過膜にて濃縮した後，FFLC（東ソー，送液システム）を用い，Toyopearl HW-75F カラム（カラムサイズ，22 × 500 mm），0.1 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）にて溶出，5 ml にて分画した．各分画は粘度測定によって DPase 活性を測定し，活性を有する画分を集め酵素標品とした．

DPase の活性測定

DPase 活性はキヤノンフェンスケ型の粘度計（Dunn and Karr (1990)），或いは234 nm における吸光度で測定した．

粘度計で測定する場合には，32℃における基質のEPS溶液（0.5 mg/ml in 20 mM Tris-HCl 緩衝液，pH 7.3）の粘度計通過時間を Control time (sec.) とし，酵素液0.5 ml を添加した後の時間経過毎の通過時間（Sample time (sec.)）を測定した．粘度減少率は次の式で求めた．また，粘度を 1 %減少させる時の活性を 1 unit とした．

$$\text{Viscosity reduction}(\%) = \frac{\text{Control time (sec.)} - \text{Sample time (sec.)}}{\text{Control time (sec.)} - \text{D.W. time (22 sec.)}} \times 100$$

吸光度法で測定する場合には，4.5 ml の EPS（0.5 mg/ml in 50 mM Tris-HCl 緩衝液，pH 7.3）に対して0.5 ml の酵素を加え，32℃で一定時間反応させた後，50％トリクロロ酢酸（TCA）を 50 μl を加えて停止させた．対照は反応開始と同時に TCA を加えた反応液とした．

細胞外多糖の分離

A6R1 株の前培養液 5 ml を YM 液体培地400 ml の坂口フラスコに注入し，28℃にて振盪培養した．stationary phase に達したところで，遠心分離（20,000 × *g*，20 min，20℃）し，上清に，2 倍量の冷エタノールを加え，4 ℃に静置した後，生じた細胞外多糖の沈澱を遠心分離（6,000 × *g*，4 ℃，20 min）して集めた．沈澱を蒸留水に溶解し，等量のクロロホルム：n-ブタノール＝3：1混合液を加えて除タンパクした後，一夜流水にて透析した．再度，冷エタノールを加えて多糖分画を沈澱させ，遠心分離にて沈澱を集め，蒸留水に再溶解し，それを凍結乾燥して，細胞外多糖標品とした．

EPS の酸加水分解

単離した A6R1 株の EPS 1 mg を 1 N トリフルオロ酢酸（TFA）1 ml に溶解し，封管したアンプル中にて湯煎することにより 6 h 加水分解した．加水分解後，トリフルオロ酢酸はエバポレーターにて減圧除去した．サンプルは少量の水を加えて，回収した．

EPS構成糖のペーパークロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーによる分析

EPS の加水分解した試料はペーパークロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーにて分析した．トーヨー濾紙No.50を用い，酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水＝5：5：1：3を展開溶液として上昇法にて展開した．発色はアルカリ性硝酸銀法を用いた．また，ガスクロマトグラフィーによる A6R1-EPS 構成糖の分析は，Nishitani and Nevins (1988) の方法に準じた．

EPS-DPase 分解産物の ^{1}H-NMR，質量スペクトル，紫外線吸収スペクトル分析

終濃度0.5 mg/ml になるように20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）に溶解した EPS 100 ml に，4S-DPase（タンパク量約600 μg）を加え，0.02％アジ化ナトリウムを添加，37℃で24 h 反応させた．

EPS 分解産物は2通りの方法で精製した．1つは反応液を10 mM イミダゾール緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B（カラムサイズ，2.6 × 14 cm）に吸着させ，0～0.1 M NaCl 濃度勾配の10 mM イミダゾール緩衝液（pH 7.0）にて溶出，分解産物を含んだ分画を，Bio-gel P4（カラムサイズ，2.6 × 41 cm）で脱塩した後，凍結乾燥した．その後，50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）に再溶解（A6R1 株 EPS 分解産物；27 mg）し，Bio-gel P-4カラム（カラムサイズ，1.5 × 103.5 cm）にてゲルろ過（50 mM 酢酸緩衝液，pH 5.5）した．EPS-分解産物を含んだオリゴ糖分画は，Bio-gel P2カラム（カラムサイズ，1.5 × 100 cm）で脱塩，再度凍結乾燥して分解産物とした．この方法での分解産物オリゴ糖は，^{1}H-NMR 分析（Nishitani and Nevins (1991)），FAB mass spectrum 分析（Anion FAB-MS，VG 社 Auto Spec 質量分析計）の試料とした．他の1つの分解産物の調製法は，DPase 反応後，2倍量の冷エタノールを加えて高分子分画を沈澱させ，遠心分離（7,000 × *g*，10 min，4℃）して除き，上清を減圧濃縮した．その後，サンプルは Toyopearl HW-55F（カラムサイズ22 × 500 mm）カラム，50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）の展開溶液を用い，ゲルクロマトグラフィーを行った．オリゴ糖分画はさらに Bio-gel P-2カラム（カラムサイズ，1.5 × 100 cm）にて脱塩，凍結乾燥した．この方法での分解産物オリゴ糖は紫外線吸収スペクトル分析のための試料とした．分解産物調製の両方法とも，カラムから溶出するオリゴ糖分解産物はフェノール硫酸法（Dubois *et al.* (1956)）にて追跡し決定した．

4S-phage の調製

4S-phage 粒子の調製には，Vande Woude *et al.* (1979) の方法に基づいた．4S 株をトリプトン・イースト（TY）液体培地で前培養し，新しい液体培地（400 ml）に接種，early log phase（12～15 h）に達したところで，4S-phage（約10^{10}PFU/ml）500 μl を加え溶菌させた．溶菌後，終濃度0.5 M NaCl 及び数滴のクロロホルムを加え，さらに30 min 振盪した．遠心分離（8,000 × *g*，10 min，4℃）し，上清に polyethylene glycol（PEG）♯6,000を終濃度10％になるように溶かし，4℃で2h 静置して，phage 粒子を析出させた．以後の操作は4℃で行った．懸濁液を遠心分離（10,000 × *g*，10 min）して得た沈澱を，5～10 ml の蒸留水に再懸濁し，等量のクロロホルムを加えて除タンパク，遠心分離（5,000 × *g*，60 min）して，水層を20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）中で一夜透析した．その後，超遠心（100,000 × *g*，60 min）して phage 粒子を沈澱させ，20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）に懸濁して4S-phage 分画とした．

4S-phage 粒子と DPase 活性分画

4S-phage 活性分画と DPase 活性分画の分離には，上述した phage 粒子分画をポアサイズ0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後，Toyopearl HW-75F FFLC カラム（カラムサイズ，22 × 500 mm）にて，0.1 M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.3）を溶出液として分画した．

実験結果

4S-DPase の A6R1 株 EPS に対する活性

4S-DPase を A6R1 株を塗布した plate に滴下すると，滴下した部分にハローが出現した．このことにより，4S-DPase が A6R1 株の細胞外多糖を分解可能であると判断した．ちなみに，4S-phage は A6R1 株を溶菌しなかった．また，4S-DPase を直接 A6R1 株の EPS 溶液に反応させると，顕著な粘度の低下がみられた（Fig. 1）．以上のことから，4S-DPase が A6R1 株の EPS を分解することを確認した．

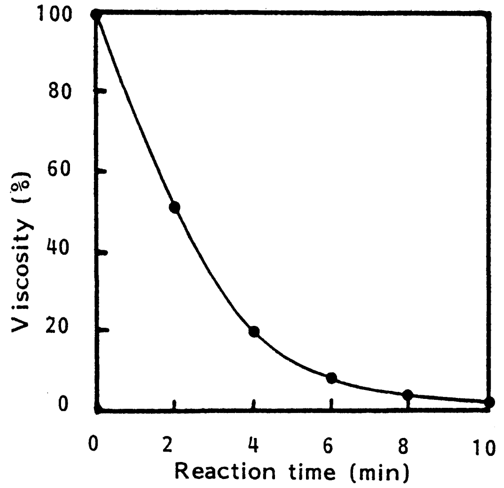

Fig. 1　Viscosity-descent of EPS from strain A6R1 with 4S-DPase addition. DPase activity was measured by viscometry according to the method of Higashi and Abe (1978). Reaction mixture and conditions were described in the Text.

4S-DPase の単離

4S-DPase は 4S-phage 溶菌液上清の硫安による塩析，バッチ法による DEAE-cellulose への吸着，溶離，Toyopearl HW-75F FFLC にて精製した．Fig. 2 は Toyopearl HW-75F カラムの elution profile である．タンパク質は280 nm の吸収で，DPase 活性は各フラクションの粘度減少率で示した．酵素活性は単一のピークで示された．Toyopearl HW-75F カラムのゲルろ過により，最高の活性を示した分画の elution volume から酵素の分子量を求めた（Fig. 3）．標準タンパク質として thyroglobulin (MW. 669,000)，ferritin (MW. 440,000)，catalase (MW. 320,000) を用いた．その結果，4S-phage DPase は350,000の分子量を持つことが分かった．また，酵素精製の各段階における酵素活性の濃縮の度合いを Table 1 に示した．なお，タンパク量は Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて定量した．調製最終段階では DPase 活性は20.6倍に濃縮された（Table 1）．

A6R1 株の EPS の解析

4S-DPase は 4S-phage が A6R1 株に対して非感染性であるにも関わらず，A6R1 株の EPS を分解した．そこで，A6R1 株の EPS の構造を，4S 株の EPS と対比させて分析を行った．

TFA で加水分解した EPS のペーパークロマトグラムより，A6R1 株の EPS が glucose, galactose および glucuronic acid からなることが分かった（データは示さず）．これらの構成糖に関し

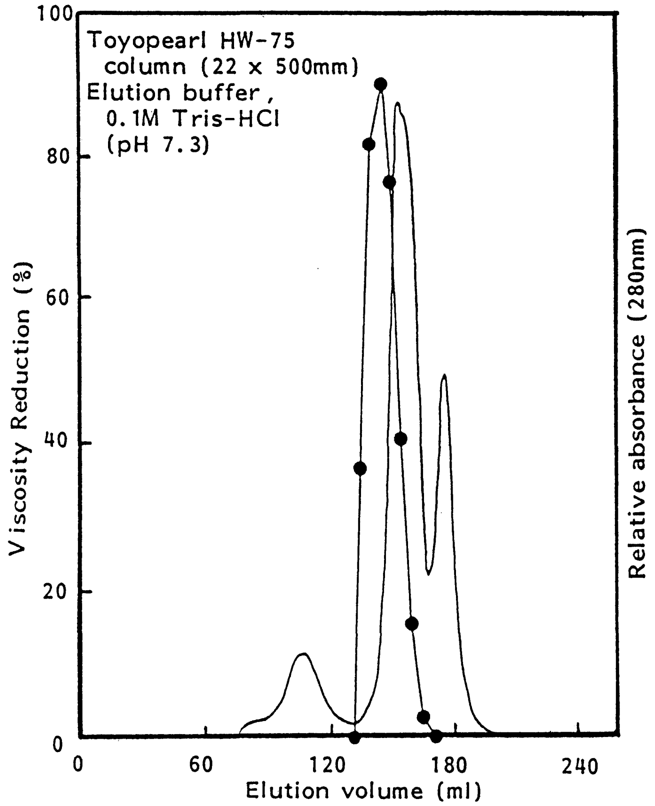

Fig. 2 Elution profile of 4S-DPase on Toyopearl HW-75F column FFLC. The column was equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.3) and eluted with the same buffer. Protein content was quantified by the absorbance at 280 nm and DPase activity was measured by viscometry.

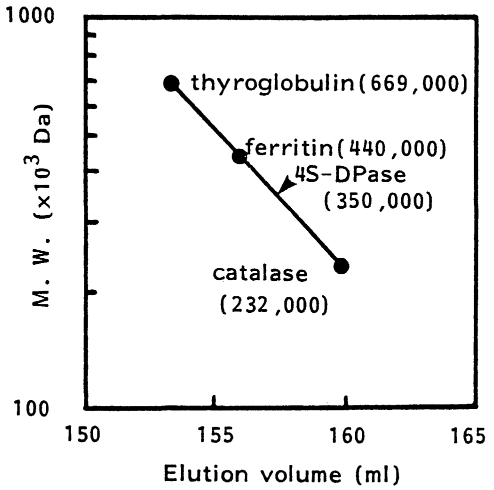

Fig. 3 Molecular weight estimation of 4S-DPase by gel permiation chromatography. Toyopearl HW-75 column (22 × 500 mm) was used. Eluent was 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.3. Molecular weight was estimated by the fraction of enzyme activity. Thyroglobulin (MW. 669,000), ferritin (MW. 440,000) and catalase (MW. 232,000) were submitted to calibration proteins.

Table 1 Partial purification of polysaccharide-depolymerase (4S-DPase)

purification step	total volume (ml)	* DPase activity (unit)	total activity (unit)	protein amt. (μg/ml)	specific activity (unit/mg Pro./ml)	purification (fold)
culture sup.	2000	3.1	6200	164.68	18.82	1
$(NH_4)_2SO_4$ ppt.	128	9.2	1177.6	268.08	34.32	1.82
DEAE-cellulose	245	12.8	3136	305.24	41.93	2.23
Toyopearl HW-75F	30	25.1	753	104.44	240.34	12.77
Rechromatography HW-75F	28.5	34.3	977.6	88.38	388.09	20.62

* DPase activity was measured by viscometry. Details were described in the Text.
The viscosity was measured after 10 min reaction at 32℃.

てより詳しく確認するために，ガスクロマトグラフィーを行った．その結果，4S 株の EPS が glucose と glucuronic acid からなるのに対して，A6R1 株の EPS は glucose, glucuronic acid 及び galactose からなることが明確になった．

4S-DPase は，4S-EPS を単一構造を持つ repeating unit オリゴ糖に分解する（Higashi and Abe (1978), Amemura *et al.* (1983)）．そこで，A6R1 の EPS についても同様の分解様式に従うかを調べた．A6R1 株と 4S 株の分解産物を Bio-gel P-4 カラムにてゲルろ過（溶出液，50 mM 酢酸緩衝液，pH 5.5）したときの elution profile を Fig. 4 に示す．4S 株，A6R1 株のどちらの分解産物もそれぞれ単一のピークを生じたことから，4S-DPase は A6R1 株の EPS においても一定の分子量の repeating unit オリゴ糖よりなることが予想された．しかし，A6R1 株の分解産物が 4S 株の場合よりわずかに高分子側にシフトしていることから，repeating unit を構成している糖残基数に違いがあることが予想された．さらに，分解産物の糖残基数と分子量を決定するために，^{1}H-NMR 分析（Fig. 5）と FAB mass spectrum 分析（Fig. 6）を行った．^{1}H-NMR 分析において分解産物の不斉炭素原子由来と思われるタブレットのケミカルシフトが 7 つ生じたことから，A6R1 株の EPS の分解産物は 8 糖残基からなることが判明した．また FAB mass spectrum 分析より質量数1465の分子イオンピークを得た．したがって，A6R1 株の EPS のオリゴ糖 repeating unit は，プロトンの質量数を加えて分子量1466であることが分かった．以上の結果より，A6R1 株の EPS 分解産物断片が 8 糖残基からなることを確認した．また，4S-DPase は 4S 株の EPS の分解産物オリゴ糖の非還元末端側の分析より，リアーゼであることが報告されている（Hollingsworth *et al.* (1984)）．すなわち，この酵素が分解した産物においては非還元末端に 4-deoxy-L-*threo*-hex-4-enopyranosyluronic acid 残基が生じるために，C＝C 結合に特異的な 230-240 nm 付近の吸収を生じる．そこで A6R1 株の EPS 分解産物においても 230 nm 付近の吸収の出現の有無を分解前と後の EPS の吸収スペクトルを調べた結果，Fig. 7 に示すように A6R1 株 EPS へ 4S-DPase を反応させた反応液では230 nm 付近に吸収のピークが出現した．また，4S-DPase と EPS を一定時間反応させた後，Hollingsworth *et al.* (1984) に倣い234 nm の吸収を測定したところ，反応時間に従って234 nm の吸光度の上昇がみられた（Fig. 8）．

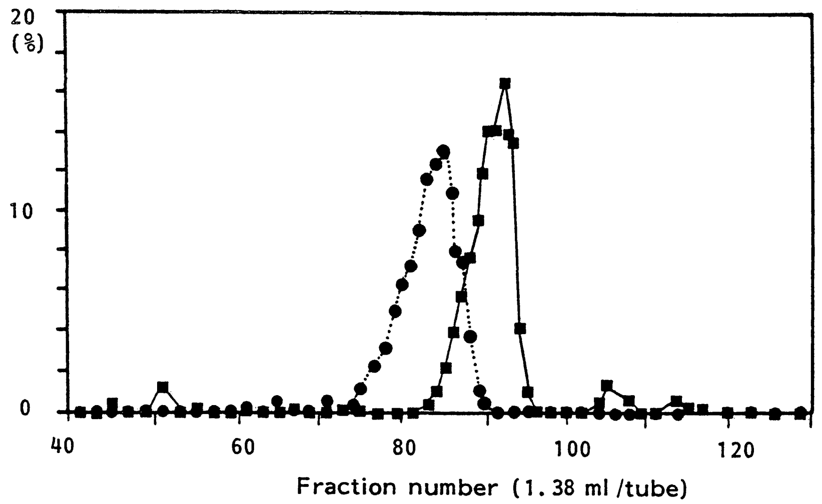

Fig. 4 Elution profiles of fragmented 4S-EPS and A6R1-EPS by 4S-DPase on Bio-gel P-4 column. The elution buffer was used 50 mM acetate buffer, pH 5.5. The column size was 15 x 1000 mm. ■, profile of depolymerized 4S-EPS; ●, profile of depolymerized A6R1-EPS. The fragmented EPS was detected by absorbance at 490 nm of phenol-H_2SO_4 reaction.

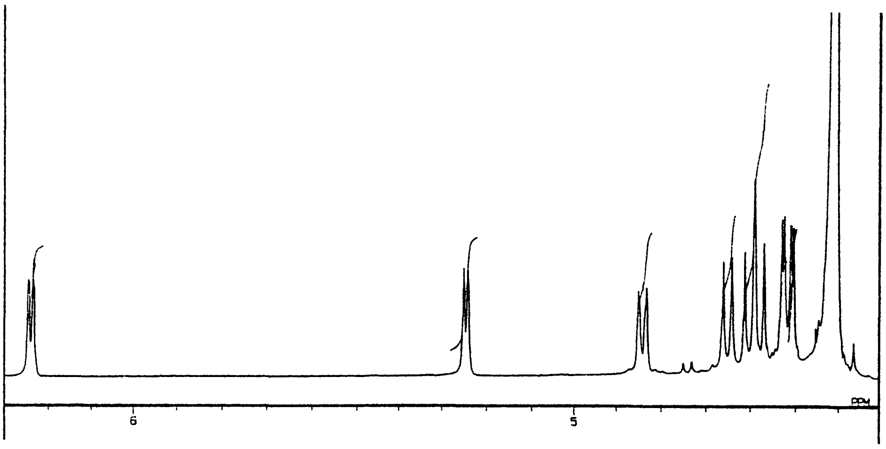

Fig. 5 ^{1}H-NMR spectrum of A6R1-EPS oligosaccharide repeating unit.

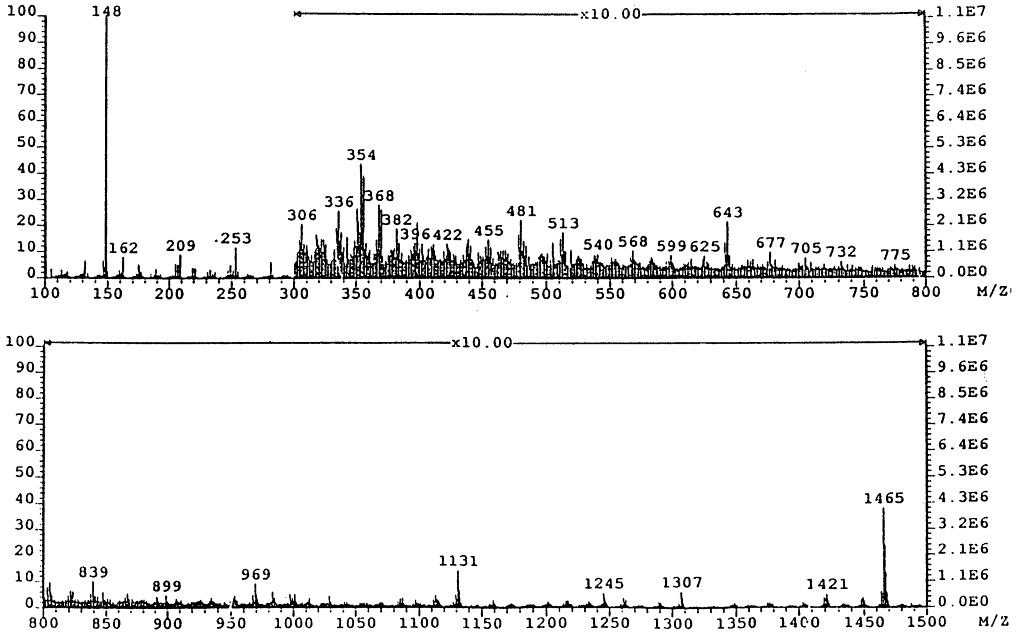

Fig. 6 Annion FAB mass specturm of A6R1 EPS oligosaccharide repeating unit.

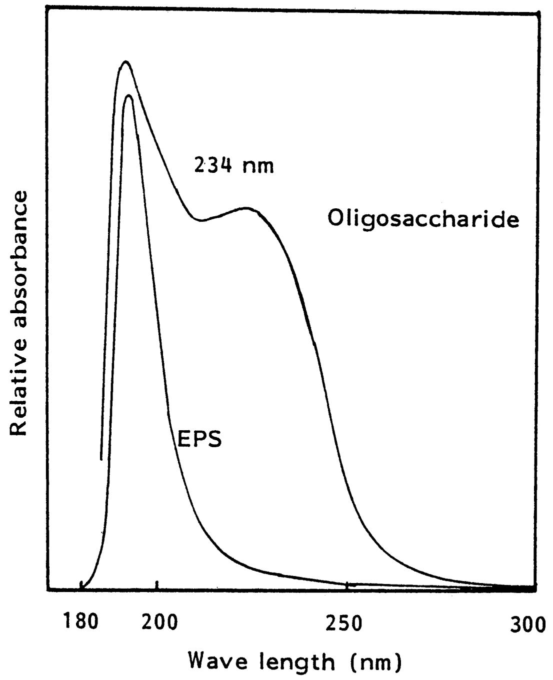

Fig. 7 Absorption profiles of untreated A6R1 EPS and depolymerized A6R1-EPS by 4S-DPase at wave length region from 180 to 300 nm. Condition of the reaction was indicated in the Text.

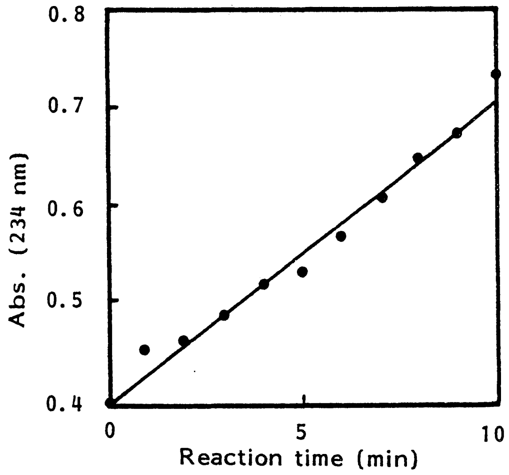

Fig. 8 Increase of UV-absorbance (234 nm) on EPS depolymerization with 4S-DPase addition.

Phage 粒子における EPS-DPase 活性

純化調製した Phage 粒子を Toyopearl HW-75F FFLC を行い，Fig. 2 に示された DPase 活性分画に相当する分画を集め，限外ろ過にて濃縮したものを A6R1 株 EPS に対して反応させたところ，充分な粘度低下がみられた．また，酵素活性分画より高分子側に phage 活性分画（4S 株に対して重層寒天培養法により plaque 形成の認められる分画）が存在しており，この分画を234 nm における吸光度法で測定したところ，DPase 活性があることが判明した（Fig. 9）．

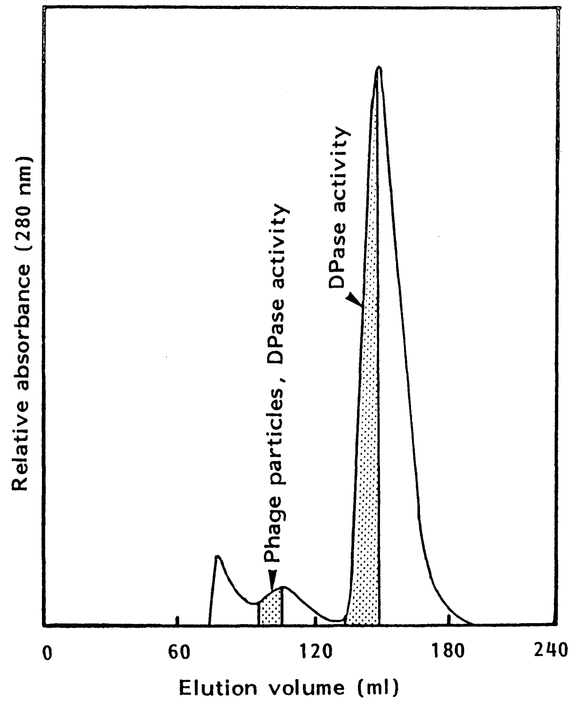

Fig. 9 Fractionations of 4S-phage particles and 4S-DPase activities on FFLC by Toyopearl HW-75F column. Shadow regions indicate DPase activity fractions. Phage activity was tested by plaque formation for strain 4S on double layer agar method. Eluent and column size were the same as in Fig. 2.

考　察

微生物の産生する EPS を分解する酵素で，宿主の菌に感染する phage により誘導される例として *Bradyrhizobium japonicum* (Dunn and Karr (1990)), *Bacillus palustris* (Torriani and Pappenheimer (1962)) について報告されている．*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S に 4S-phage が感染し，その溶菌液に 4S-EPS を分解する DPase 活性を持っていることは Higashi and Abe (1978) により報告された．本実験において，4S-DPase が A6R1 株の EPS を分解したことは，重要な意味を持つ．その理由として，4S-DPase は A6R1 株の EPS を分解するが，A6R1 株それ自体の細胞は 4S-phage によって溶菌されない．したがって，有用菌株である A6R1 株の大量培養時に 4S-DPase を添加し，遠心分離法による集菌効果を向上させる上で有用であると考えられる．

また，4S-phage の 4S 株への感染によって誘導生産される 4S-DPase が，A6R1-EPS を分解したことから，A6R1-EPS と 4S-EPS の分子構造的比較を行うことも可能であると考えられる．すなわち，4S 株の EPS では 2 分子の glucuronic acid と 2 分子の glucose からなる主鎖に，3 分子の glucose からなる側鎖を持つ repeating unit から構成されているが (Amemura *et al.*, (1983)), A6R1-EPS でも同様な骨格を持つオリゴ糖の repeating unit が考えられ，それに 4S-EPS には含まれていない galactose が加わり，計 8 残基の repeating unit から構成されているものと推察される．A6R1 株の EPS の galactose 残基の含有はガスクロマトグラフィー，ペーパークロマトグラフィーからも確認された．一方，*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 0403株の EPS では，glucose, galactose, glucuronic acid および 4-deoxy-L-*threo*-hex-4-pyranosyluronic acid が 5：1：1：1 の比で構成される repeating unit 構造が Hollingsworth *et al.*, (1984) により報告されている．この構造は，Dudman (1984) によって分類されている根粒菌の EPS の基本構造のうち，*R. leguminosarum* bv. *trifolii* の EPS に位置づけられている類型のひとつである．また 4S-DPase は4S-EPS を 4-*O*-α-D-glucosyl-β-D-glucuronic acid の部位で切断する特性を有しており (Amemura *et al.*, (1983))，また0403株の EPS においても切断した非還元末端に4-deoxy-L-*threo*-hex-4-pyranosyluronic acid 残基の産生による234 nm における吸光度の増加が確認されている (Hollingsworth *et al.*, (1984))．A6R1-EPS についても DPase による分解後，234 nm の吸光度の増加がみられたことより，切断部位は同じ構造であると思われる．以上のことから，A6R1 株の EPS は基本の糖鎖については0403株と同一である可能性が示唆された．

DPase による EPS の分解後，分解産物のオリゴ糖が230 nm 付近に極大吸収を生じることは (Fig. 7)，酵素活性測定法として有用である．また，吸光度測定による DPase 活性の測定は粘度計による活性測定に比較して有利な点が多い．すなわち，粘度計による測定では，測定時の厳密な温度コントロール条件，粘度計のメンテナンスが要求され，多量の基質，および酵素を必要とし，さらに，細管の通過時間の計測には，実験者の技術的差が出る可能性が高いことなどである．ところが，4S-DPase が EPS を切断することにより，分解産物のオリゴ糖鎖の非還元末端に1ヶ所の炭素二重結合 (4-deoxy-L-*threo*-hex-4-enopyranosyluronic acid 残基生成による) を生じるので，この構造に特異的な234 nm における吸光度での測定は，EPS の切断により生ずる切断部位数に正比例する (Hollingsworth *et al.* (1984))．

Phage によって誘導される EPS-DPase の種類についてはいくつかの報告がある．すなわち，DPase が phage 粒子に結合しているタイプ (Sutherland *et al.*, (1974), Thurow *et al.* (1974)), phage lysate 中に完全に溶解している可溶性タイプ (Bartell *et al.* (1968))．そして，同じく phage lysate 中に可溶性酵素として存在するが，同時に phage 粒子にも結合している 2 形態をと

るタイプ（Yurewicz *et al.* (1971), Bessler *et al.* (1973), Bessler *et al.* (1975)）である．4S-DPase は phage の感染によって lysate 中に急激にその量が増加する．そして，Fig. 9 に示したように，4S-DPase 活性は phage 粒子分画と非 phage 分画の両方に活性が存在していた．このことから，4S-DPase は phage 粒子それ自体に由来するものであり，上に述べた第3番目のタイプであることが考えられる．

バラ科の火傷病を引き起こす *Erwinia amylovora* に感染する phage から宿主菌の EPS を分解する酵素の遺伝子がクローニングされている（Hartung *et al.* (1988)）．この報告は，根粒菌の EPS-depolymerase の遺伝子のクローニングの可能性を示唆するものである．DPase 遺伝子を用いた分子レベルでの分析は，根粒菌の EPS が植物との共生関係成立に関与している役割を調べる上で，重要な手がかりを与えるものと考える．

謝　辞

本研究において糖分析に関して，終始懇切なご指導を賜りました鹿児島大学教養部 西谷 和彦博士に衷心から御礼申し上げます．また，本研究のために菌株の提供を戴きました十勝農業協同組合連合会に心より感謝申し上げます．

文　献

Amemura, A., Harada, T., Abe, M. and Higashi, S. 1983. Structural studies on extracellular acidic polysaccharide from *Rhizobium trifolii* 4S. *Carbohydr. Res.,* **115**, 165-174.

Bartell, P.F., Lam, G.K.H. and Orr, T.E. 1968. Purification and properties of polysaccharide depolymerase associated with phage infected *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.,* **243**, 2077-2080.

Bessler, W., Fehmel, F., Freund-Möbert, E., Knüermann, H. and Stirm, S. 1975. *Escherichia coli* capsule bacteriophages Ⅳ. free capsule depolymerase. *J. Virol.,* **15**, 976-984.

Bessler, W., Freund-Möbert, E., Knüermann, H., Rudolph, C., Thurow, H. and Stirm, S. 1973. A bacteriophage depolymerase active on *Klebsiella* K11 capsular polysaccharide. *Virology,* **56**, 134-151.

Caetano-Anollés, G., Lagares, A. and Bauer, W.D. 1990. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants elicit feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Plant Physiol.,* **91**, 368-374.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.,* **28**, 350-356.

Dudman, W.F. 1984. The polysaccharides and oligosaccharides of *Rhizobium* and their role in the infection process. *In*: Veeger, C. and Newton, W. E. (eds.), *Advances in Nitrogen Fixation Research,* 397-405. Nijhoff/Junk Publishers.

Dunn, M.F. and Karr, A.L. 1990. Isolation of an extracellular polysaccharide (EPS) depolymerase produced by *Bradyrhizobium japonicum*. *Curr. Microbiol.,* **20**, 359-363.

Gray, J.X., Zhan, H., Levery, S.B., Battisti, L., Rolfe, B.G. and Leigh, J.A. 1991. Heterologous exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234 and consequences for nodule development. *J. Bacteriol.,* **173**, 3066-3077.

Hartung, J.S., Fulbright, D.W. and Klos, E.J. 1988. Cloning of a bacteriophage polysaccharide depolymerase gene and its expression in *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.,* **1**, 87-93.

Higashi, S. and Abe, M. 1978. Phage induced depolymerase for exopolysaccharide of *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.,* **24**, 143-153.

Hollingsworth, R.I., Abe, M., Sherwood, J.E. and Dazzo, F.B. 1984. Bacteriophage-induced acidic heteropolysaccharide lyases that convert the acidic heteropolysaccharides of *Rhizobium trifolii* into oligosaccharide unit. *J. Bacteriol.,* **160**, 510-516.

Hollingsworth, R.I. and Dazzo, F.B. 1988. The complete structure of the trifoliin a lectin-binding capsular

polysaccharide of *Rhizobium trifolii* ANU843. *Carbohydr. Res.*, **172**, 97-112.

Ko, Y.H. and Gayda, R. 1990. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium fredii* USDA191. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 105-113.

Mody, B.R., Bindra, M.O. and Modi, V.V. 1990. Capsule development and structural characterization of acidic extracellular polysaccharides secreted by cowpea rhizobia. *Curr. Microbiol.*, **20**, 145-152.

Nishitani, K. and Nevins, D.J. 1988. Enzymic analysis of feruloylated arabinoxylans (feraxan) derived from *Zea mays* cell walls Ⅰ. *Plant Physiol.*, **87**, 883-890.

Nishitani, K. and Nevins, D.J. 1991. Glucuronoxylan xylanohydrolase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6539-6543.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskoph, E., Ha, D.C., Banfalvi, Z. and Kondorosi. A. 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.*, **172**, 5450-5458.

Robertsen, B.K., Åman, P., Darvill, A.G., McNeil, M. and Albersheim, P. 1981. Host-symbiont interactions. *Plant Physiol.*, **67**, 389-400.

Sutherland, I.W. 1976. Highly specific bacteriophage-associated polysaccharide hydrolases for *Klebsiella aerogenes* type 8. *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 211-216.

Thurow, H., Niemann, H., Rudolph, C. and Stirm, S. 1974. Host capsule depolymerase activity of bacteriophage particles active on *Klebsiella* K20 and K24 strains. *Virology*, **58**, 306-309.

Torriani, A. and Pappenheimer, Jr. A.M. 1962. Inducible polysaccharide depolymerases of *Bacillus palustris*. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3-13.

Vande Woude, G.F., Oskarsson, M., Enquist, L.W., Nomura, S., Sullivan, M. and Fischinger, P.J. 1979. Cloning of integrated *Moloney sarcoma* proviral DNA sequences in bacteriophage λ. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4464-4468.

Yurewicz, E.C., Ghalambor, M.A., Duckworth, D.H. and Heath , E.C. 1971. Catalytic and molecular properties of a phage-induced capsular polysaccharide depolymerase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5607-5616.

Zhan, H. and Leigh, J.A. 1990. Two gene that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **86**, 5254-5259.