

氷核細菌とその食品工学における応用

芝 恒男

Ice-Nucleating Bacteria: a Freezing Agent in Food Processing

Tuneo Shiba

Ice nucleating bacteria is an attractive material in the fields of molecular biology and food processing. The article intends to summarize the information, and discuss the problems around biological aspect and application of this biological ice nuclei. Several species of *Pseudomonas*, *Erwinia* and *Xanthomonas* are effective in freezing supercooled water at sub-zero temperature. The property is dependent on an outer-membrane protein which acts as an ice-nuclei. Effective temperature changes with the degree of polymerization of this protein. The proteins are encoded on a single structure gene, and *Escherichia coli* transformed with the gene has an ice nucleating activity. Genes isolated from different species of bacteria showed more than 70% homology with each other. Ice-Nucleating bacteria is effective as a freezing agent or a dehydration agent in food processing.

1. はじめに

大気圧下での氷の融点は0℃であるが、純粋な水であれば0℃以下でも凝固しない準安定な状態の存在することが知られている。この状態を過冷(supercooling)と呼ぶが、少量の純水は-40℃まで過冷することが可能だとされている¹⁾。

凍結は、水分子が氷核(ice nuclei)の周りに氷の結晶構造に配列することから始まる。-40℃では瞬時に凍結が完了するが、このときの氷核は水分子そのものであり、これを homogeneous ice nuclei と呼ぶ。一方、-40℃以上の温度での凍結では水分子以外の物質が氷核となるが、

これを heterogeneous ice nuclei と呼ぶ¹⁾。heterogeneous ice nuclei には金属粒子やホコリ、結晶状の有機物、さらには本論の主題である氷核細菌などがある。金属粒子やホコリ、結晶状の有機物は-8~-15℃の範囲で氷核として有効であるが、氷核細菌には-5℃以上での氷結能力が見られ、現在までに知られる氷核としては最も効果の高いものである²⁾。この氷核細菌を使うことで、0℃に近い高温域での緩やかな凍結が可能となり、食品製造あるいは保存での利用が試みられている。本論では、氷核細菌とその氷核物質、さらには応用についてのこれまでの知見をまとめてみたい。

水産大学校研究業績 第1495号, 1994年10月31日受付。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1495. Received Oct. 31, 1994.

水産大学校製造学科微生物学講座(Laboratory of Microbiology, Department of Food Science and Technology, Shimonoseki University of Fisheries).

2. 氷核細菌の種類と分布

これまでに報告された氷核形成能を持った細菌種を Table 1 にまとめた。

氷核細菌の分布は主に、霜害との関係から、栽培植物について調べられている。北アメリカでは95種の被検植物のうち75種から氷核細菌が分離され、オレゴン、ワシントン州では被検果樹の30~70%について氷核細菌が認められている。氷核細菌の密度はおよそ 10^6 細胞/cm²であり、葉体上の全細菌数のおよそ10%であったという。これらの氷核細菌はすべてが、*P. syringae* と同定されている¹⁷⁾。一方日本では、茶の葉や芽から *Erwinia ananas*, *Xanthomonas campestris* が分離されているが、*P. syringae* の分離例は少ない。氷核細菌の密度は、一芽当たり、*X. campestris* が 5.5×10^4 細胞、*E. ananas* が 3.1×10^2 細胞個で

Table 1. Ice-Nucleating Bacteria

Species	Distribution	References
<i>Pseudomonas syringae</i>	orchard	3, 4, 5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	vegetable	6, 7
	orchad	8
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	orchad	9, 10
	vegetable	3
<i>Erwinia hebicola</i>	orchad	5, 11, 12
	vegetable	11
<i>Erwinia anans</i>	tea tree	13
<i>Erwinia uredovora</i>	orchad	13
<i>Enterobacter taylorae</i>	insects	15
<i>Enterobacter agglomerans</i>	insects	15
<i>Xanthomoas campestris</i>	orchad	16

あったと報告されている¹⁸⁾。氷核細菌は、冬や初春に多く、乾燥した夏に減少することが報告されている¹⁸⁾。氷核細菌は近年昆虫の腸内からも分離され、それらは昆虫の体液を -1.5°C で凍結させ、昆虫の越冬を困難にするとと思われる¹⁵⁾。また変わったところでは、氷核能が不完全菌類の *Fusarium* からも見つかり¹⁹⁾、氷核能がかなり広範な生物に分布することが示唆されている。

3. 細菌氷核能の分類

細菌の氷核能は、およそ $-13 \sim -2^\circ\text{C}$ までの広い温度範囲で認められている。氷核能を持つ細胞が一つでもあればその液体は凍結する反面、細胞集団の中で氷核能を示す細胞の割合、すなわち氷核頻度は、多くても通常 10^{-2} ほどでしかなく、高温での氷核能を持つものほどその頻度は小さくなる。Yankofsky²⁰⁾やTurner²¹⁾らはそれぞれ氷核能を凍結温度によって三つのカテゴリーに分類している (Table 2) が、これは連続的に変化するものを人為的に3分割したものではない。100%濃度のD₂Oの融解温度は通常 3.8°C であるが、Turnerら²¹⁾はD₂OおよびH₂Oの凍結温度の差が、氷核細菌の細胞密度を変化させた場合に、不連続的に変化し、明らかに氷核能が三つのカテゴリーに分かれること (Fig. 1)、さらにはそれぞれのカテゴリー毎に薬剤感受性、pH特性が異なることを示し、三つのカテゴリーの氷核能がそれぞれに構造的に異なった物質によっておこることを示唆した²¹⁾。*P. syringae*, *Erwinia hebicola*, さらには氷核遺伝子を導入した *Escherichia coli* の形質転換株のいずれにおいても氷核能は同様な三つのカテゴリーに分類が可能である。

Table 2. Differentiation of Ice-Nuclei

Category	Yankofsky (1981)		Turner et al (1990)		
	Freezing Point	Frequency* ¹	Category	Freezing Point	Frequency* ²
Type 1	$-2 \sim -5^\circ\text{C}$	$10^{-6} \geq$	Class A	$-4.4^\circ\text{C} \leq$	$10^{-3} \geq$
Type 2	$-5 \sim -7^\circ\text{C}$	$10^{-4} \geq$	Class B	$-4.8 \sim -5.7^\circ\text{C}$	$10^{-1} \geq$
Type 3	$-7 \sim -10^\circ\text{C}$	$10^{-2} \geq$	Class C	$-7.6^\circ\text{C} \geq$	1

* 1 Frequency was calculated with an un-identified strain. Total number of cell was $2 \times 10^8/\text{ml}$.

* 2 Frequency was calculated with *Pseudomonas syringae*. Total number of cell was $1 \times 10^9/\text{ml}$.

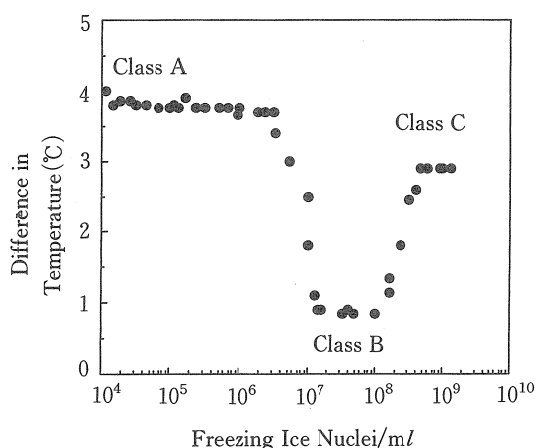


Fig. 1. Freezing difference spectrum in D_2O versus H_2O at the same number of ice nucleus indicates the existence of different three classes of ice nucleus.
Adapted from Turner²¹⁾.

4. 氷核能の細胞内での分布

氷核細菌を利用するうえで、まずその氷核能質を特定する必要がある。細菌の氷核能は細胞外分泌液中には見られず、その細胞外膜上に分布することが *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescence*, *Erwinia herbicola* についての試験結果で明らかとなっている^{8, 17, 22)}。特に $-5^{\circ}C$ 以上での高温域での氷核能では、細菌細胞を機械的に破壊して得られた各分画について調べてみても、その活性は破壊前の細胞分画にしか見られない²⁰⁾。Phelpsら¹²⁾によれば、比較的低温($15^{\circ}C$)で培養した *E. herbicola* の細胞外液には $-5^{\circ}C$ 以上での氷核形成物質が存在するが、この活性は細胞表層から自然に遊離した細胞外膜に由来することが確かめられている。細胞表層からループ状に突き出た細胞外膜が、自然に細胞から遊離することは飢餓状態の *Vibrio* などについても知られている²³⁾。

5. 氷核遺伝子とタンパクの構造

細菌の氷核能は細胞外膜上に分布する特定のタンパク、すなわち氷核タンパクに由来することが明らかとなっている²⁴⁾。この氷核遺伝子 *ina* はすでにクローニングされ、この遺伝子を挿入した *E. coli* は氷核を形成し²⁴⁾、*E. coli* の

細胞外膜タンパク中にあらたに氷核タンパクが形成されていることが、*P. syringae* の氷核タンパクの抗体との反応で確かめられている²⁵⁾。形質転換した *E. coli* は *P. syringae* と同様に、type 1, type 2, type 3 のすべてのカテゴリーの氷核を形成するので、氷核能に関してはその複雑な働きにもかかわらず、*ina* 以外の他の遺伝子の関与は考えられない。

ina 遺伝子は5種の細菌についてクローニングされているが、いずれも4149~3600bpの単一遺伝子によってコードされ、種や属が異なるにも関わらず互いの相同性が高く、アミノ酸配列の相同性が70%以上にも達する²⁶⁾。これら単一遺伝子はN末端領域、繰り返し領域、C末端領域に分けることができ、N、C末端領域は比較的菌株間の相同性が低く、逆に繰り返し領域は菌株間の相同性がきわめて高い²⁶⁾。N末端領域には氷核タンパク中唯一の疎水性部分があり、ここでタンパクが細胞外膜に固定されている可能性がある²⁷⁾。このN末端部分を破壊すると、type 1, type 2 の氷核能が失われる²⁸⁾。一方繰り返し領域はいずれも Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr の8鎖オリゴペプチドを基本とした繰り返し構造となっている²⁹⁾(Fig. 2)。この繰り返し領域はさらに4つの亜領域に分かれ、亜領域2および3では、8鎖オリゴペプチドに微小な変異が組み込まれ、これら8鎖オリゴペプチドを最小単位として、全体が16鎖、48鎖、さらには144鎖の高次の繰り返し構造が形成されている³⁰⁾。亜領域2および3の間では、亜領域2の酸性部分が亜領域3では塩基性に、また逆の相関が見られ、これらがタンパクの高次構造の内で対をなしている可能性がある²⁶⁾。この繰り返し構造が、水分子を結晶格子状に配列するのに有効だと考えられている³⁰⁻³²⁾。この繰り返し構造における人為的な欠損は氷核能を低下させるものの、氷核能に対する致命的なダメージとはならない。氷核能の欠損なしに、68×8鎖オリゴペプチドまで人為的に除去することも可能だとされている³¹⁾。C末端領域は、N末端領域が強陽イオン性なのに反して強陰イオン性であり、この両末端部分で氷核タンパクが大きく折りたたまれている可能性がある³⁰⁾。C末端領域を破壊すると、すべての温度での氷核能が失われるとの報告もある²⁸⁾。

さて単一の遺伝子にコードされたタンパクからどのようにして、異なった三つのカテゴリーの氷核能が生まれるのであろうか。*P. syringae*, *E. herbicola*, および *ina* 遺伝子が導入された *E. coli* 生細胞上の氷核タンパクの大きさを γ 線放射法で調べると、いずれも $-12^{\circ}C$ から $-13^{\circ}C$ で活性を示す氷核タンパク、すなわち Type 3 の氷核タンパクは、

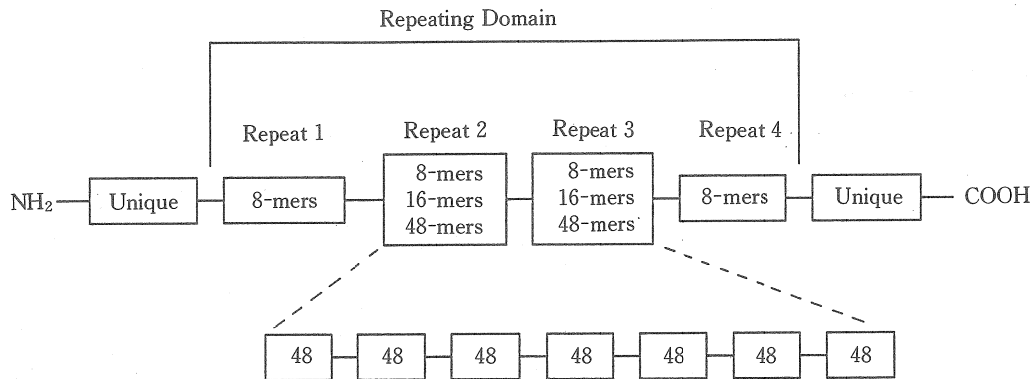


Fig. 2. Repeated structure of ice-nucleating protein.
Adapted from P. K. Wolber²⁶⁾.

およそ150 kDであるが、 -2°C で活性を示す Type 1 の氷核タンパクは19,000kDにも達することが報告されている³¹⁾。Ruggleら³³⁾は、type 1 の巨大氷核タンパクが type 3 の氷核タンパクが集合したものであることを示している。他の遺伝子の関与無しに巨大化するのだから、物理的自立性によって巨大分子へと集合するものと考えられる。

氷核能の発現には脂質が必要であることが知られている。このことは3600bpの *ina* 遺伝子にコードされる氷核タンパクのモノマーの分子量が計算上118,610であるにもかかわらず、*ina* 遺伝子を持った *E. coli* の膜タンパクの電気泳動上で観察される氷核タンパクモノマーの大きさが、150 kDであることから示唆される²⁵⁾。Class A (Type 1 に相当)の氷核タンパクはホスファチジルイノシトールおよびマンナンにより、さらには Class B (Type 2 に相当)の氷核タンパクはマンナンやグルコサミンによって細胞外膜上に固定されていることが推測されている³⁴⁻³⁷⁾。また Type 3 の氷核タンパクは細胞外膜に陥入していることが推測されている²⁹⁾。

氷核遺伝子はこれまでに *P. syringae* の他に、*P. fluorescense*、や *Erwinia herbicola*、*E. ananas*、*Xanthomonas campestris* からクローニングされているが、いずれもが4149~3600bpの単一遺伝子である。これら細菌種は Proteobacteria 網の β および γ グループに分布し、その系統進化的類縁性は必ずしも高くない。それにもかかわらず、すべての氷核遺伝子は、*P. syringae* の氷核遺伝子との相同性が70%にも達している。さて、このように氷核遺伝子の相同性が高いのは、収れん的進化あるいは氷核遺伝子の水

平伝播(horizontal transfer)のいずれによるのであろうか。

セリンのコドンには6種、すなわち AG(Py)と TCN とがある。このコドンの使い方を各氷核遺伝子について見ると、48塩基の繰り返し配列の8N-3番目のセリンは、いずれの遺伝子においても AG(Py)が使われ、11, 14, 30番目のセリンは TCN でコードされていることが明らかとなっている³⁰⁾。また各アミノ酸のコドンの3番目の塩基は多くはナンセンスのために淘汰圧(selective pressure)を受けず、変異の激しいことが知られているが、この塩基についても各遺伝子間で高い相同性が認められている。したがって遺伝子の収れん的進化によって相同な構造が発生した可能性はきわめて低く、細菌菌種間での水平伝播(horizontal transfer)が行われてきた可能性が強い²⁶⁾。しかしながら、水平伝播された遺伝子が受容体側の cDNA の中に組み込まれるためには、伝播された遺伝子が受容体 cDNA の内の相同配列と入れ替わる必要があり、またそのための相同配列が伝播される氷核遺伝子の両端に存在しなければならないが、氷核遺伝子の上流、下流域のいずれにもそのような相同な配列は見つかっていない。また各コドンの3番目の塩基について見られる高い相同性は、氷核遺伝子の発生・水平伝播が進化的には最近の出来事、あるいは、遺伝子内で組み換え修復(recombination repair)が起きているかのいずれかを示しているのであろう。いずれにせよ各遺伝子間の相同性が高いのは、これらが淘汰圧を受けてきたことを示し、氷核能が各細菌の自然界での生存に欠かせない機能であることを示している。

6. 氷核タンパクの発現

つぎに氷核遺伝子の発現調節について考えてみたい。細菌の全遺伝子量はおよそ4,000 Kbpであり³⁸⁾、氷核遺伝子の大きさはその全遺伝子量のおよそ0.1%である。仮に氷核遺伝子が構成的(constitutive)に合成されるのであれば、その氷核タンパクの全タンパク量に対する割合も0.1%に近い値となるはずである。この場合にさまざまな氷核能が発揮されるのであれば、何ら制御系は必要ないことになるが、氷核の構造遺伝子のみを、ベクターのプロモーター領域の影響を受けない状態で *E. coli* に形質導入すると、そのタンパク量はおよそ0.15%となるが、その場合は-6℃以下での氷核しか観察されず、しかも氷核頻度(氷核能を持つ細胞の割合)は 10^{-6} 以下である³⁹⁾。明らかに氷核能の発現には構成的に合成されるよりも多くの氷核タンパク量が必要であり、何らかの制御系が関与していることになる。このことは氷核能をもつ細胞が同じ培養細胞中の、多くても 10^{-2} 程度でしかないことから、かなり早い時期から明確に示されていた⁵⁾。

しかしながら氷核能の発現調節に関する培養研究には、上記の基礎的データを理解していないものが多い。Pooley and Brown⁴⁰⁾やYankofsky²⁰⁾らが氷核形成能は指数増殖期の細胞で高く、増殖停止期になると低下することを報告しているが、その時の氷核頻度は、 10^{-3} ~ 10^{-7} にすぎず、また差も10倍以下である。低レベルの氷核頻度は、制御系が抑制的に働いていたか、あるいは作動していなかったかを示唆しているし、10倍以下の差で生理学的考察を加えるのは危険である。またObataら¹¹⁾は氷核形成能に対する培地組成やpHの影響について研究しているが、この場合は氷核頻度すらも調べられていない。

氷核遺伝子の発現調節を調べるには、制御系が促進的な時に氷核頻度が1になっていることが望ましい。Nemeck-Marshall³⁴⁾らは、32℃で培養した増殖停止期の *P. syringae* T1株を15℃に急激に冷やすと、Type 1の形質を示す細胞の割合が、わずか2~3時間の間に 10^{-7} から1にまで増大したことを報告している³³⁾。この場合氷核頻度は指数増殖期の細胞で低下し、N, P, S, Feの欠乏によるストレスで促進されている。抗体を用いた研究でも²⁵⁾、氷核タンパクは *P. syringae* の増殖停止期に出現し、氷核能はそれに伴うことが確認されている。一方4℃以下での冷却では氷核頻度の上昇は見られない⁴⁰⁾が、これは生理的な温度限界を越えて冷却されたためと考えられる。氷核頻度の増大はクロラムフェニコールやナリジキシン酸などのタン

パクやRNA合成阻害剤によって抑制され、氷核タンパクの合成制御が転写レベルで行われていることが示唆されている。以上を総合すると、氷核タンパクの合成制御には飢餓や低温などのストレスが有効であるが、それを支持するのよう氷核タンパク遺伝子上流域に、増殖が低下するときにタンパクの合成を促進する gear-box promoter の存在が示唆されている^{41, 42)}。一方 *P. fluorescence* の氷核タンパクレベルは培養条件を変えてもほとんど変化しないことが報告されているが、氷核頻度が 10^{-2} であることから、氷核タンパクが構成的に合成されている²⁵⁾のではなく、単に制御系が促進的に働く培養条件が解明されていないだけではなからうか。飢餓と言うストレスにより氷核タンパクが誘導され、この氷核タンパクによる凍結によって植物組織が破壊され、植物養分が溶出するとしたら、氷核は細菌の生存に意味のあることかもしれない。

Pooley and Brown⁴⁰⁾は *P. syringae* を寒天平板上で培養すると、液体培地中で培養した時よりも、10~100倍も氷核頻度が増大することを報告している。このデータは絶対氷核頻度が 10^{-4} 程度の依然低い値で観察されたものであるが、氷核細菌の生態学的側面、すなわち氷核細菌が葉体表面に生息していることを反映しているのかもしれない。ちなみに氷核細菌を無菌の葉体表面に接種し、その生残率を調べた実験では、葉体表面から集めた氷核細菌株の生残率が最も高く、これに寒天平板上で培養した株が続き、液体培地で培養した株の生残率が最も低いことが報告されている⁴³⁾。

7. 霜害とその防除

植物の組織内の水には種々の溶質成分があるため、その過冷温度は-8℃ぐらいだとされている²⁹⁾。しかしながら植物の表面に分布する氷核細菌のため、-1℃ほどでも凍結し、組織内に形成される氷核によって細胞内膜が破壊され、融解後の植物は色あせたり、グニャグニャとして著しく商品価値が下落する。植物体表面の氷核の95%が細菌由来だったとの報告もある⁴⁴⁾。霜害は表面に付着する氷核細菌の氷核量に影響される。植物体の表面の氷核細菌のうち実際に氷核を有するのは、100~200細胞につき1細胞でしかない⁴⁵⁾。

霜害は、草体表面に分布する氷核細菌を除去することでかなり防ぐことができる。*Ina* 遺伝子の欠損した *P. syringae* を植物に感染させることで、氷核細菌を駆除することが検討されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。氷核細菌はグリーンハウス

栽培の植物には分布しない。

8. 氷核細菌の食品工学における利用

植物や動物タンパク溶液から凍結凝固法によりゲルを作る場合に、氷核細菌を用いる方法が検討されている。氷核細菌は、タンパク溶液の過冷現象を阻止することで、冷凍にかかるコストを低下させることができる一方、*E. ananas* を溶液中に混ぜて形成された卵白、牛血清、大豆、コーン澱粉の結晶には、平行に走る氷結晶によるテクスチャーが見られ、新しい食品製造法として注目されている⁴⁹⁾。

氷核細菌は、ジュースの濃縮などに利用することも検討されている。Watanabeら⁵⁰⁾は、*E. ananas* をアルギン酸ナトリウムや、ガラスビーズと混ぜて氷核ゲルを作り、これをジュースを満たした容器内につるして-3℃で保存し、ジュースを粉末にまで濃縮出来たことを報告している。この方法では減圧濃縮法で見られる揮発成分の減少も見られないことが分かっている。

海水環境からの氷核細菌の分離は今のところ *P. fluorescence* の一例だけであるが、水産生物起源の食糧についても氷核細菌の利用が考えられるのではなかろうか。

氷核細菌についてはこれまでのところ毒素産生能は認められていないが、氷核細菌にも当然のことながらグラム陰性細菌特有のリポ多糖が認められ、これが食品衛生検査を困難にする恐れがある。氷核細菌を食品製造に利用するためには、氷核タンパクを活性のある状態で単離するか、あるいは氷核細菌を決して食品に混入させないための何らかの工夫が必要と思われる。

文 献

- 1) E. K. Bigg: *Proc. Phys. Soc. B* **66**, 688-694 (1953).
- 2) S. E. Lindow: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **21**, 363-384 (1983).
- 3) S. E. Lindow, D. C. Army, and C. D. Upper: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 831-838 (1978).
- 4) D. C. Gross, Y. S. Cody, E. L. Proebsting, Jr., G. K. Rademaker, and R. A. Spotts: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1370-1379 (1983).
- 5) S. E. Lindow, D. C. Army, and C. D. Upper: *Plant Physiol.*, **70**, 1084-1089 (1982).
- 6) M. Goto, T. Goto, and Inaba: *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **55**, 330-335 (1989).
- 7) S. S. Hirano, and C. D. Upper: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 623-630 (1989).
- 8) L. R. Maki, and K. J. Willoughby: *J. Appl. Meteorol.*, **17**, 1049-1053 (1978).
- 9) S. A. Anderson, and E. N. Ashworth: *Plant Physiol.*, **80**, 956-960 (1986).
- 10) J. P. Paulin, and J. Luisetti: *Station de pathologie Vegetale et Phytobacteriologie. Institute National Recherche Argonomique, Beaucouze, France.* pp. 725-731 (1978).
- 11) H. Obata, T. Tokuyama, S. Kawate, H. Hori, and Y. Higashi: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2171-2174 (1990).
- 12) P. T. Phelps, H. Giddings, M. Prochoda, and R. Fall: *J. Bacteriol.*, **167**, 496-502 (1986).
- 13) S. A. Yankofsky, Z. Levin, and A. Mosche: *Curr. Microbiol.*, **5**, 213-217 (1981).
- 14) T. Makino: *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **49**, 32-37 (1982).
- 15) R. E. Lee, J. M. Strong-Gunderson, M. R. Lee, K. S. Grove, and T. J. Riga: *J. Exp. Zool.*, **257**, 124-127 (1991).
- 16) H. K. Kim, C. Orser, S. E. Lindow, and D. C. Sands: *Plant Dis.* **71**, 994-997 (1987).
- 17) S. E. Lindow: *Phytopathogenic Prokaryotes. New York*, Academic Press, pp.344-362 (1982).
- 18) M. Goto, M. Komaba, T. Horikawa, and T. Nakamura: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **59**, 535-543 (1993).
- 19) S. C. Pouleur, R. Richard, J. Martin, and H. Antoun: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2960-2964 (1992).
- 20) S. A. Yankofsky, Z. Levin, T. Bertol, and N. Sandlerman: *J. Appl. Meteorol.*, **20**, 1013-1019 (1981).
- 21) M. A. Turner, F. Arellano, and L. M. Kozloff: *J. Bacteriol.*, **172**, 2521-2526 (1990).
- 22) M. L. Sprang, and S. E. Lindow: *Phytopathol.*, **71**, 111-115 (1981).
- 23) P. Marden, A. Tunlid, K. Malmcrona-Friberg, G. Odham, and S. Kjelleberg: *Arch. Microbiol.*, **142**, 326-332 (1985).
- 24) C. Orser, B. J. Staskawicz, N. J., Panopoulos, D. Dahlbeck, and S. E. Lindow: *J. Bacteriol.*, **164**: 359-366 (1985).
- 25) C. A. Deininger, G. M. Mueller, and P. K. Wolber: *J. Bacteriol.*, **170**, 669-675 (1988).

- 26) P. K. Wolber: *Advance of Microbial Physiology* 34, 203-237 (1993).
- 27) G. V. Heijne: *J. Mol. Biol.*, 184, 99-104 (1985).
- 28) K. Abe, S. Watanabe, Y. Emori, M. Watanabe, and S. Arai: *FEBS Lett.*, 258, 297-300 (1989).
- 29) G. Warren, and L. Gorotto: *Gene* 85, 239-242 (1989).
- 30) R. L. Green, and G. J. Warren: *Nature (London)* 317, 645-648 (1985).
- 31) A. G. Govindarajan, and S. E. Lindow: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1334-1338 (1988).
- 32) G. Warren, Gorotto, and P. Wolber: *Nucleic Acids Research* 14, 8047-8060 (1986).
- 33) J. A. Ruggles, M. Nemecek-Marshall, and R. Fall: *J. Bacteriol.*, 175, 7216-7221 (1993).
- 34) M. Nemecek-Marshall, R. LaDuca, and R. Fall: *J. Bacteriol.*, 175, 4062-4070 (1993).
- 35) L. M. Kozloff, M. A. Turner, F. Arellano, and M. Lute: *J. Bacteriol.*, 173, 2053-2060 (1991).
- 36) L. M. Kozloff, M. A. Turner, and F. Arellano: *J. Bacteriol.*, 173, 6528-6536 (1991).
- 37) M. A. Turner, F. Arellano, and L. M. Kozloff: *J. Bacteriol.*, 173, 6515-6527 (1991).
- 38) S. Krawiec, and M. Riley: *Microb. Rev.*, 54, 502-539 (1990).
- 39) M. W. Southworth, P. K. Wolber, and G. J. Warren: *J. Biol. Chem.*, 263, 15211-15216 (1988).
- 40) L. Pooley, and T. A. Brown: *FEMS Microb. Lett.*, 77, 229-232 (1991).
- 41) M. Vincente, S. R. Kushner, T. Garrido, and M. Aldea: *Mol. Microbiol.*, 5: 2058-2091 (1991).
- 42) P. G. Jones, R. A. VanBogelen, and F. C. Neidhardt: *J. Bacteriol.*, 169, 2092-2095 (1987).
- 43) M. Wilson, and S. E. Lindow: *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 410-416 (1993).
- 44) D. C. Arny, S. E. Lindow, and C. D. Upper: *Nature (London)* 262, 282-284 (1972).
- 45) S. S. Hirano, L. S. Baker, and C. D. Upper: *Plant Physiol.*, 77, 259-265 (1985).
- 46) S. E. Lindow: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2520-2527 (1987).
- 47) G. A. Beattie, and S. E. Lindow: *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3790-3798 (1994).
- 48) M. Wilson, and S. E. Lindow: *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3128-3137 (1994).
- 49) S. Arai, S., and M. Watanabe: *Agric. Bio. Chem.*, 50, 169-175 (1986).
- 50) M. Watanabe, K. Kumeno, N. Makahama, and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2055-2059 (1990).