

研究報文

醤油乳酸菌における活性型トランスポゾンの発見と
アルギニン非分解性株育種への利用

脇中琢良, 渡部潤

(ヤマサ醤油株式会社 製造本部)

(令和3年1月25日受理)

Identification of Active Insertion Sequences in *Tetragenococcus halophilus*
and Application for Disruption of Arginine Deiminase System

Takura Wakinaka, Jun Watanabe

(Manufacturing Division, Yamasa Corporation)

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* において転移活性のあるトランスポゾンを見出し、これを利用してアルギニンデイミナーゼ経路を不活化した変異株を育種した。変異株は醤油諸味でアルギニンを分解しなかった。

緒言

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は、有機酸を生産して醤油に酸味や味の深みを与えるとともに、pHを降下させて酵母の生育環境を調えるなど、醤油醸造において欠かせない役割を果たしている。*T. halophilus* は、アミノ酸・糖・有機酸代謝、ファージ感受性¹⁾、凝集性²⁾ などにおいて多様な性質を示し、これらの特性は醤油の品質を大きく左右する。すべての面において好ましい特性を有する株が自然界から分離されることは稀であり、育種技術の開発が必要とされているが、麹菌や酵母と比べ醤油乳酸菌の育種の試みは少ない。過去に、ファージ感受性の親株から非感受性の変異株を選抜したことが報告されているが、変異の機構や変異が生じた遺伝子については明らかにされていない³⁾。今後 *T. halophilus* の効率的な育種を図るために、変異導入手法の確立と導入機構の解明が望まれている。

近年、醤油乳酸菌の全ゲノムやプラスミドのDNA配列が相次いで解析され、挿入配列 (insertion

sequence; IS) と推定される配列の存在が報告された^{4,5)}。ISは、トランスポザーゼをコードする遺伝子と逆向き反復配列 (inverted repeat; IR) からなる小さなトランスポゾン (動く遺伝子) である。トランスポザーゼは、ISの両末端にあるIRを認識してISを切り出し、別のDNA配列上に挿入する。ISの転移はしばしば遺伝子を不活化したり隣接遺伝子の発現を変化させたりする。また、トランスポゾン変異導入システムとして、多くの種で遺伝子のランダム破壊にも利用されている^{6,7)}。しかし *Tetragenococcus* 属において転移活性のあるISはこれまで報告がなかった。

本研究では、活性のあるISの同定と、育種への利用を試みた。育種のターゲットとしては、アルギニンを分解するアルギニンデイミナーゼ経路 (arginine deiminase system; ADS) の破壊を選択した。ADSは、アルギニンからアンモニアを遊離して諸味のpHを上昇させ、乳酸量の増加とアルコール発酵の抑制を引き起こす (図1A)。また中間代謝産物であるシトルリンが発がん性の指摘されるカルバミン酸エチルの前駆体

となるため、醤油醸造用のスターターとしてはアルギニン分解しない菌株が好まれる⁸⁾。

ADSに関与する遺伝子は、*arc*オペロンと呼ばれるオペロンを構成している⁹⁾。*T. halophilus*のゲノムにも、アルギニンデイミナーゼを含む3つの酵素 (*ArcABC*) とアンチポーター (*ArcD*) およびレギュレーター (*ArcR*) をコードする遺伝子があり、*Enterococcus faecalis* の遺伝子とアミノ酸配列で53~88%の相同性があった (図1B)。上流に位置する2つのレギュレーター (*ArgR1*, *ArgR2*) も、*arc*オペロンの発現制御に関与することが報告されている⁹⁾。

内在性のISの転移は遺伝子組み換えに当たらない自然変異であり、実用菌株の育種にも利用可能である。本研究では、IS転移によって醤油乳酸菌の性質を醸造上好ましい方向へ改変することに成功した。また、本

研究で明らかにされたISの構造や特性に関する知見は、*T. halophilus*の進化機構に関する理解を深めることに寄与し、更にトランスポゾン変異導入システムの確立にも貢献しうる。

実験方法

菌株、培地および培養条件

使用した菌株を表1に示す。培地はMRS-10、乳酸菌用醤油培地¹⁰⁾、LA13培地¹¹⁾、アルギニン指示培地を使用した。MRS-10は、10%NaClを添加したMRSブロス (Difco) である。乳酸菌用醤油培地は必要に応じて2%アルギニンを添加し、あるいはグルコースの添加を省いた。アルギニン指示培地の組成は、0.5%牛肉エキス、0.5%ハイポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.1%チオグリコール酸、10%食塩、0.1%グルコース、

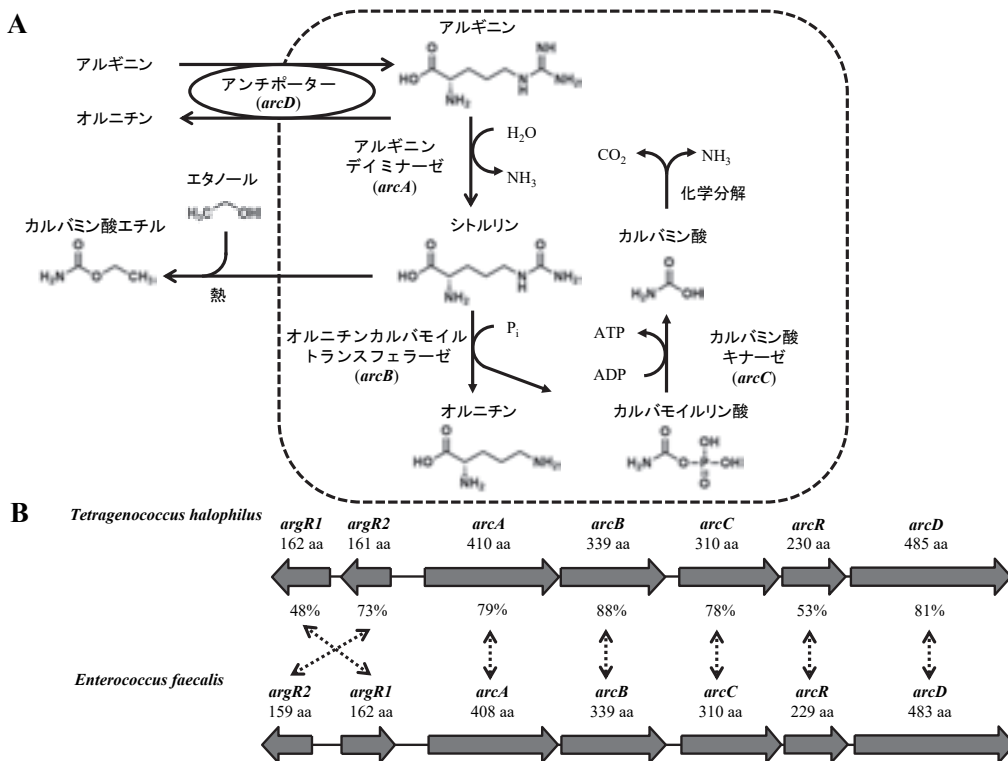


図1 *T. halophilus*のアルギニンデイミナーゼ経路およびカルバミン酸エチル生成経路の模式図 (A) と、*T. halophilus* と *E. faecalis* の *arc* オペロン周辺遺伝子の比較 (B)。A の破線は細胞膜を表しており、シトルリンの細胞外への流出はバクテリオファージ感染などの要因によって引き起こされる。B のパーセンテージはアミノ酸配列の相同性を示す。

表1 使用した菌株

株名	表現型と遺伝子型	分離源
NBRC 12172	5-FU 非耐性、アルギニン分解性	NITE バイオテクノロジーセンター
a	5-FU 耐性、 <i>upp::ISTeha3</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
b	5-FU 耐性	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
c	5-FU 耐性、 <i>upp::ISTeha4</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
d	5-FU 耐性、 <i>upp::ISTeha4</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
e	5-FU 耐性、 <i>upp::ISTeha4</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
M1	アルギニン非分解性、 <i>arcD::ISTeha3</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
M2	アルギニン非分解性、 <i>arcA::ISTeha5</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
M3	アルギニン非分解性、 <i>arcA_pr::ISTeha4</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
M4	アルギニン非分解性、 <i>arcD::ISTeha3</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
M5	アルギニン非分解性、 <i>arcD::ISTeha4</i>	本研究で作出した NBRC 12172 株の変異株
YA5	アルギニン非分解性	醤油諸味より分離
A-30	アルギニン非分解性	醤油諸味より分離

0.004%プロモクレゾールパープル, 1%アルギニンで, pHを7.5に調整しオートクレーブで滅菌した。個々の実験で使用した培地は各項に記載した。培養温度はいずれも30℃で, 特に記載がない場合は5日間培養した。

UV照射および変異株の分離

MRS-10で培養した*T. halophilus* NBRC 12172株の培養液1 mlを新たに9 mlのMRS-10に添加し, 更に16時間培養してから菌体を遠心分離(4℃, 6,000 g, 10分間)で回収した。回収した菌体は10%塩水で洗浄し, 10 mlの塩水に再懸濁した。55 mm径のシャーレに5 mlの菌体懸濁液を入れ, 殺菌ランプ(GL-15; パナソニック)で260 mmの距離から10~30秒間, 攪拌しながら0.1~0.01%の生存率になるようUV照射した。生存率は照射前後に懸濁液の一部を適宜希釈してLA13培地に塗布し, 嫌気培養後コロニー数を計測して求めた。

5-フルオロウラシル(5-FU)耐性株は, 最終濃度10 μg/mlの5-FUを含むLA13培地上で生育したコロニーを選抜した。

アルギニンデイミナーゼ活性を欠く変異株は, アルギニン指示培地で分離した。pH指示薬としてプロモクレゾールパープルを含むアルギニン指示培地は, 乳酸生成によるpHの低下で色が黄色く変わるが, アルギニンが分解されてpHが上昇すると, 色は紫色のま

まとなる。UV照射後の株を, 384穴マイクロプレート上で80 μlの培地に接種し, アルミニウムフィルム(AlumaSeal II; エクセルサイエンティフィック)で密封して培養後, 培地が黄色くなった株を, 変異株候補として選抜した。

DNAシーケンス解析

本研究で使用したプライマーを表2に示す。5-FU耐性株に対しては*uppf*および*uppr*を, アルギニンデイミナーゼ活性欠損株に対しては*lacD*および*marR*を用いて, KOD FX Neo(東洋紡)を使用したコロニー

表2 プライマー配列

プライマー名	配列(5'→3')
<i>uppf</i>	CAGGCAGTGCTTAATGAGGTC
<i>uppr</i>	TCCAATCAGGAGTTGATCTCC
<i>lacD</i>	GTTACAGAAACTGCTACACCAATTGG
<i>marR</i>	CATTCGATTGGGACTTTGTTCCG
<i>arcAf</i>	GGCATGCTTCGTGATAAAGG
<i>arcAr</i>	CCGCATGACTACGAATACCTG
16Sf	CAAAGCAACGATGCATAGCC
16Sr	TTGCCGAAGATCCCTACTG
<i>probe-arcAf</i>	TCAGAAATTGGAAAGCTTAAAACG
<i>probe-arcAr</i>	AATTGGTATTCTGGCATTTCAC

PCRによりターゲット遺伝子を増幅した。PCR産物は0.9%アガロースゲルで分離し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を使用して精製し、DNAシーケンスサービス (ファスマック) を利用して配列を解析した。

定量RT-PCRによるmRNA分析

2%アルギニンを添加した乳酸菌用醤油培地500 μ l で培養した菌体を遠心分離で回収し、1 mlのIsogen RNA抽出キット (ニッポンジーン) に懸濁した。約0.5 mgのガラスビーズ (0.1 mm径) とともに菌体を破碎機により破碎 (室温, 3,000 rpm, 3分間) し、製品のプロトコルに従ってRNAを抽出した。RNAの収量と純度は、260 nm, 280 nmの吸光度を測定して求めた。RNAは、ランダムプライマーを使用してgDNA Eraserを含むPrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ) で逆転写した。1 μ gのcDNAをテンプレートとして、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を使用して、定量RT-PCRを実施した。プライマーarcAfとarcArをarcA遺伝子発現解析に使用し、プライマー16Sfおよび16Srをハウスキーピングコントロール遺伝子として16S rRNA遺伝子の検出に使用した (表2)。結果は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP900 (タカラバイオ) を使用して分析した。Ct値は二次微分最大値法によって求め、検量線を引いてarcA遺伝子の相対発現量を決定した。反応の特異性は、解離曲線の分析とPCR産物の電気泳動によって確認した。定量RT-PCRは3連で実施した。

ノーザンブロット解析

プローブは、プライマーprobe-arcAfおよびprobe-arcAr (表2) でNBRC 12172株のゲノムDNAをテンプレートとして増幅し、PCR DIG labeling mix (ロシュ) で標識した。上記の通り抽出したRNAを、ホルムアルデヒドMOPSバッファー中で、65°Cで15分間加熱して変性させ、ホルムアルデヒドを含む0.9%アガロースゲルで電気泳動し (0.4 μ g/レーン)、エチジウムブロマイドで染色し、Hybond-N+ナイロン膜 (GEヘルスケア) に転写した。DIG標識プローブで、DIG Easy Hyb system (ロシュ) により50°Cで16時間ハイ

ブリダイゼーションを実施した。抗DIG-AP FabフラグメントおよびCDP-Star (ロシュ) で処理したナイロン膜で、BioMax light film (ケアストリームヘルス) を感光させ、Kodak GBX developer/fixer (コダック・チャイナ) で現像した。膜上のRNAのサイズは、エチジウムブロマイドで染色した16S rRNA (1.6 kb) および23S rRNA (2.9 kb) によって推定した。

醤油醸造試験

醤油諸味は過去の報告に従い用意した¹²⁾。簡単に述べると、蒸豆と炒り小麦を*Aspergillus oryzae*の分生子と混合して40時間培養して製麴し、麴と塩水を混ぜて醤油諸味とした (最終食塩濃度約17%)。発酵スターターとして使用した乳酸菌株は乳酸菌用醤油培地で培養し、醤油諸味1 lに対し培養液1 mlを加えた。諸味は15°Cで2週間、28°Cで6週間発酵させた。醸造試験は3連で実施した。

成分分析

培養液または醤油諸味は濾紙 (No.2; 東洋濾紙) で濾過し、濾液のpHをF52 pHメーター (堀場製作所) で測定した。アミノ酸組成は高速液体クロマトグラフィーHitachi ELITE LaChrom (日立ハイテックロジーズ) を用いてニンヒドリン検出により分析した。乳酸量は、有機酸分析システムShodex OA (昭和電工) で製造元のプロトコルに従い分析した。

バイオインフォマティクス解析

DNAおよびアミノ酸配列の分析にはBlastおよびISfinderを利用した¹³⁾。

結果と考察

5-FU耐性株の分離と活性型ISの発見

ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの欠損株が5-FU耐性となることを利用し¹⁴⁾、5-FU耐性株においてウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする*upp*遺伝子を解析することによって変異を探索した。NBRC 12172株を親株として5株 (a, b, c, d, e) の5-FU耐性株を得て、各株の*upp*遺伝子を含む領域をシーケンス解析したところ、b株以外

の4株でISが挿入されていた(表1, 図2A)。これは*T. halophilus*の内在性のISが転移することを確認した初めての事例である。変異株b株は*upp*遺伝子上に変異が確認できなかったが, 別の遺伝子の変異によって5-FU耐性が生じた可能性が考えられる。

アルギニンデヒミナーゼ活性を失った変異株の分離

ISの転移活性が示されたので, 実用上の育種標的として, ADSの破壊を試みた。NBRC 12172株を親株として, アルギニン指示培地に植菌して培地の色が黄色となった変異株5株(M1, M2, M3, M4, M5)を得た。各株を2%アルギニン含有乳酸菌用醤油培地で7日間培養し, 培養液のアルギニン含有量を分析したところ, 5株ともアルギニンを分解していないことが確認された(データ示さず)。変異株の*arc*オペロン周辺領域のシーケンス解析の結果, いずれもISが挿入されていることを確認した(表1, 図2B)。

ここまでで遺伝子変異が確認された全ての変異株においてIS転移による変異が生じていたという事実は, *T. halophilus*の遺伝子変異が, 数塩基の置換や欠損などよりも, IS転移によって引き起こされる場合が多いことを示唆している。いずれもUV照射後に得た変異株ではあるが, UV照射がIS転移を引き起こ

したという証拠はなく, 照射前の培養中に転移していた可能性もある。IS転移を誘導する因子については, 今後の研究による解明が期待される。

変異株における*arcA*の転写量

M1株, M2株, M4株, およびM5株は, アルギニンデヒミナーゼをコードする*arcA*またはアルギニン/オルニチンアンチポーターをコードする*arcD*上にISが転移していた。しかし, M3株では, ISは*arcA*と*argR2*の間の領域に転移しており, *arcABCRD*と2つのレギュレーター(*argR1*と*argR2*)のORF上には変異が確認されなかった(図2B)。したがって, M3株では*arc*オペロンのプロモーター領域が破壊されたと推定し, 定量RT-PCRにより, mRNAレベルで*arcA*の発現を分析した。その結果, M3株の*arcA*のmRNA発現レベルは, 親株であるNBRC 12172株の2%まで減少していた(図3)。*T. halophilus*のADS発現調節機構は未解明だが, M3では*arc*オペロンの転写に不可欠な領域へISが転移したと推定される。他の変異株でもNBRC 12172株と比べると*arcA*転写量が減少しているのは, IS転移によってmRNAが不安定化したためかもしれない¹⁵⁾。

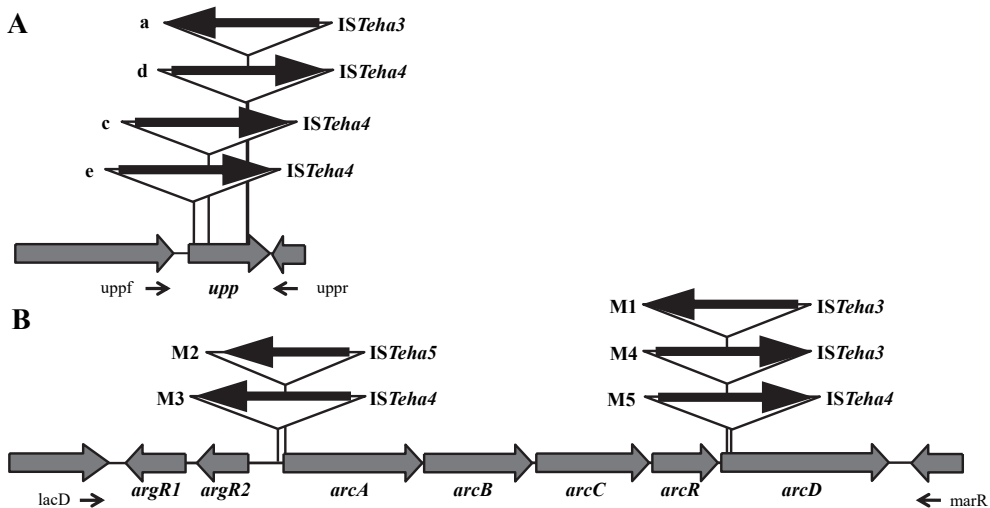


図2 *upp*遺伝子上(A)と*arc*オペロン周辺(B)のIS転移位置。黒い矢印はトランスポザナーゼのORFを表す。Aの*upp*f, *upp*rと記した矢印, Bの*lac*D, *mar*Rと記した矢印はプライマーの位置を表す。

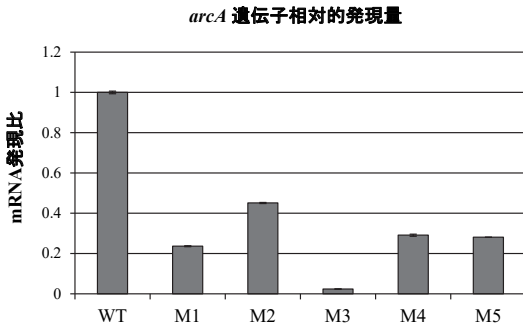


図3 定量RT-PCRによって求めた、それぞれの株の*arcA*のmRNA相対的発現量。各データとエラーバーは、三連実験の平均値±標準偏差を示している。WTはNBRC 12172株の野生株。

変異株による醤油醸造

NBRC 12172株およびアルギニンデヒミナーゼ活性を失った変異株5株を乳酸菌用醤油培地で培養し、醤油諸味へ添加した。スターターを添加しない対照区と比べ、乳酸菌添加区では諸味の急激なpH降下が確認された(図4A)。8週間経過時点でアミノ酸組成を分析したところ、変異株はいずれもアルギニンをオルニチンに変換しなかったが、NBRC 12172株は11.6 mMのオルニチンを産生し、ほぼ同量のアルギニンが減少し

た(図4B)。乳酸量は、NBRC 12172株添加区と比べ変異株添加区では少なかった(図4C)。NBRC 12172株が変異株より多く乳酸を生産したのは、アルギニン分解の結果放出されるアンモニアによってpH降下が抑制されたためと考えられる。

アルギニンデヒミナーゼ活性のない野生株の解析

醤油諸味から単離されたアルギニンデヒミナーゼ活性を欠く野生株、YA5株およびA-30株の*arc*オペロン周辺のDNA配列を解析した(図5A)。NBRC 12172株と比較したところ、YA5株の*arcABCRD*は、ArcAに6アミノ酸置換とArcBに2アミノ酸置換がある他は完全に保存されていたが、*argR2*上にISが挿入されていた。一方A-30株では、*argR1*と*arcA*の間に*argR2*が存在しなかった。A-30株とNBRC 12172株の間でArcAのアミノ酸配列の相同性は80%で、*arcBCRD*は、別の3つのORFに置き換えられていた。

*ArgR2*は、*Streptococcus pneumoniae*において*arc*オペロンの発現に必須の転写因子であると報告されている¹⁶⁾。そこで、ノーザンブロットによって*arcA*の発現を評価したところ、YA5株およびA-30株ではmRNAの生成が確認されなかった(図5B)。一方で、NBRC 12172株では、長さの異なる3本のバンドが確

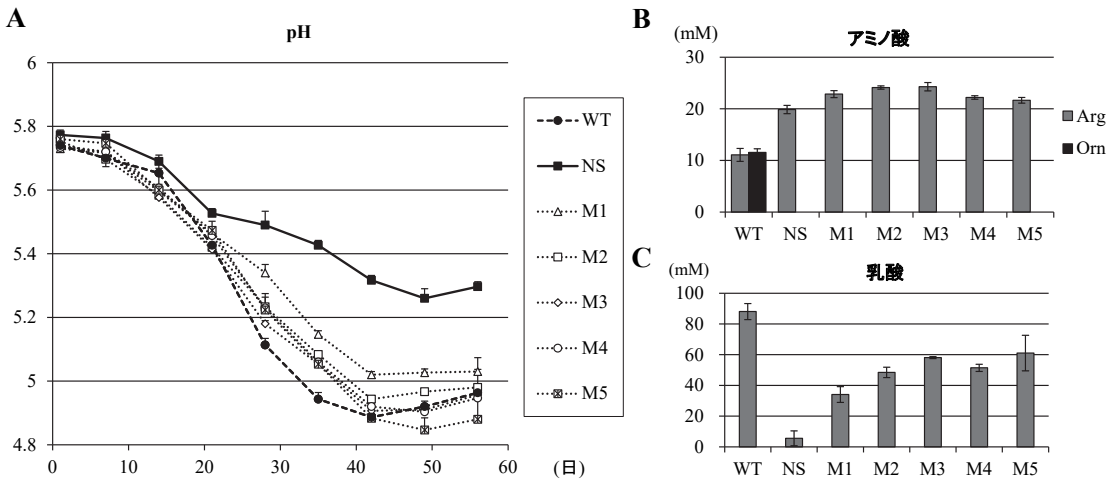


図4 各スターター株を添加した諸味のpH推移(A)と、8週間経過時のアルギニン・オルニチン含有量(B)および乳酸量(C)。各データとエラーバーは、それぞれ三連実験の平均値+標準偏差(A)、平均値±標準偏差(B, C)を示している。WTはNBRC 12172株の野生株添加区、NSはスターター非添加の対照区を表す。

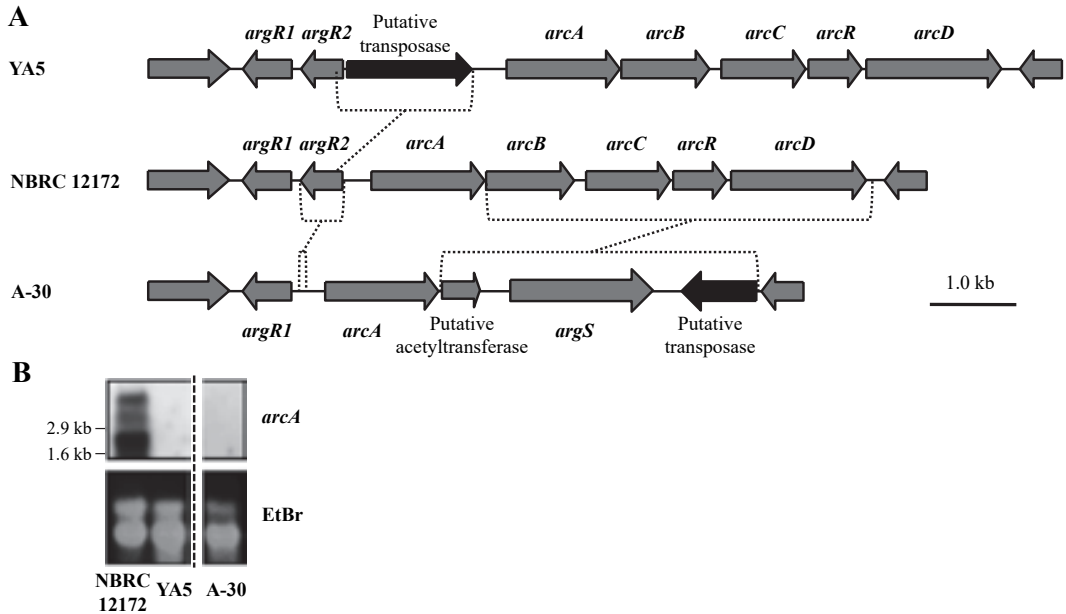


図5 各株の*arc*オペロン周辺遺伝子の比較(A)と*arcA*のノーザンブロット分析(B)。Aの破線はDNA領域の挿入や置換を表す。Bは上段がノーザンブロットによる*arcA*の検出結果、下段がエチジウムブロマイド染色した全RNA。メンブレン上のRNAのサイズは16S rRNA (1.6 kb)と23S rRNA (2.9 kb)のサイズから推定した。

認められた。これは*E. faecalis*でも同様の報告がされており、*arcABCRD*の全体または一部の転写産物に対応していると考えられる⁹⁾。すなわち、*arcD*の後にあるターミネーターに加え、*arcB*および*arcR*の後にも部分的なターミネーターが存在することで、それぞれ*arcAB*、*arcABCR*、*arcABCRD*を含む3本のmRNAが生成されるとすれば、予想されるmRNAの長さとおよびバンドの位置は矛盾しない。

ISTeha3, ISTeha4, ISTeha5の特徴

変異株a株, M1株およびM4株で転移し, YA5株の*argR2*上に存在した1522 bpのISはISTeha3と名付けた。ISTeha3はトランスポザゼをコードするORFと、両末端に15 bpのIRが含まれる。変異株c株, d株, e株, M3株およびM5株で転移した1567 bpのISはISTeha4と名付けた。ISTeha4もトランスポザゼをコードするORFと、両末端に13 bpのIRが含まれる。トランスポザゼのアミノ酸配列から, ISTeha3とISTeha4はIS4ファミリーIS*Pepr1*サブグループの新

規ISとしてISfinderデータベースに登録した。

M2株で転移した1385 bpのISはISTeha5と名付けた。ISTeha5はトランスポザゼをコードするORFと、両末端に14 bpのIRが含まれる。トランスポザゼのアミノ酸配列からIS4ファミリーIS4Saサブグループの新規ISとしてISfinderデータベースに登録した。

ISTeha3の標的配列は, AAATTTA (a株), TAAATAA (M1株), TTATTTA (M4株), ISTeha4の標的配列は, TTGAAA (c株), TATTAAA (d株) TTAACAA (e株) ATAATAA (M3株), TAACAATAA (M5株)で, ゲノム上に存在する転移の痕跡からも, 6~9 bp程度の一定でない長さの配列を標的にすると考えられる。一方でISTeha5の標的配列はGGCTTACTC (M2株)で, ゲノム上の痕跡からも, 概ね一定して9 bpの配列を標的にすると考えられる。M1株とM4株は全く同じ個所に逆向きにISが挿入されており, *arc*オペロン全体でも*arcA*と*arcD*の先頭付近の限られた領域に転移が集中している。このことから, IS転移は全くランダムに起こるのではなく, 転移しやすい配列の

傾向が存在することが示唆される。標的となる配列の条件ははっきりとは特定できていないが、比較的ATに富んだ箇所に挿入されやすいことが推定される。

M1~M5株で転移したISTeha3, ISTeha4, ISTeha5と配列が完全に一致するISが、NBRC 12172株のゲノムには1つ以上存在するため、その上流と下流に設計したプライマーを使用して、親株と各変異株でこれらのISを含むDNA領域を増幅しサイズを比較した(データ示さず)。その結果、すべての変異株は親株と同じサイズのPCR産物が増幅されたため、ISTeha3, ISTeha4, ISTeha5は元の部位にIS配列を残したまま、それらのコピーを他の部位に蓄積する、コピー&ペースト型のISであることが示唆された。

本研究で活性を示した3つのISについて、トランスポザゼやIRの特徴等に関する詳細な考察は、本稿では省略する。必要に応じて引用文献17を参照いただきたい。

本研究以前にISTeha1およびISTeha2がISfinderに登録されているが、転移活性は示されていない。今回我々は、*T. halophilus*の内在性のISが活発な転移活性を有しており、*T. halophilus*の変異機構として非常に重要な役割を果たしていることを示した。*T. halophilus*は、ISTeha1~ISTeha5の他にもISと推定される配列を多数有しており、残るISの活性の有無や特性評価について、今後の研究を待ちたい。また、活性型のISは、トランスポゾン変異導入系として遺伝子機能の包括的な解析に利用できる可能性もあり、今後の醤油乳酸菌の育種・研究に欠かせないツールとして活用されていくことが期待される。

本報は2018年10月25日に開催された日本醤油技術センター第87回醤油研究発表会(佐賀大会)において発表した内容に一部加筆したものである。なお本研究は本誌に先立ち*Applied and Environmental Microbiology*誌に掲載されている。著作権はアメリカ微生物学会が保持しており、文献17から本文と図表の一部を改変・転載している。本論文を引用する際は文献17を引用する必要がある(Copyright © American Society for Microbiology, *Appl Environ Microbiol* 85 : e00208-19, 2019)。

要 約

1. *Tetragenococcus halophilus*において、転移活性のある挿入配列を見出した。
2. NBRC 12172株を親株として、挿入配列の転移によりアルギニンデイミナーゼ経路を不活化した変異株を取得した。
3. 取得した変異株は醤油諸味中でアルギニンを分解しなかった。
4. 本研究で見出したISTeha3, ISTeha4, ISTeha5は、*Tetragenococcus*属において初めて転移活性が示された、IS4ファミリーに属する新規挿入配列である。

参 考 文 献

- 1) K. Uchida : *Jpn. J. Lactic Acid Bact.* 11, 60 (2000)
- 2) 植木達朗ら : 本誌, 26, 197 (2000)
- 3) T. Higuchi et al. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 415 (1999)
- 4) M. Satomi et al. : *Int. J. Food Microbiol.* 148, 60 (2011)
- 5) I. Nishimura et al. : *J. Gen. Appl. Microbiol.* 63, 369 (2017)
- 6) J. Gury et al. : *Arch. Microbiol.* 182, 337 (2004)
- 7) E. Maguin et al. : *J. Bacteriol.* 178, 931 (1996)
- 8) 中台忠信 : 本誌, 41, 358 (2015)
- 9) B. Barcelona-Andrés et al. : *J. Bacteriol.* 184, 6289 (2002)
- 10) 野田義治ら : 本誌, 8, 108 (1982)
- 11) T. Wakinaka et al. : *Int. J. Food Microbiol.* 292, 137 (2019)
- 12) Y. Tanaka et al. : *Food microbiol.* 31, 100 (2012)
- 13) P. Siguier et al. : *Nucleic Acids Res.* 34, D32 (2006)
- 14) H. Dong & D. Zhang : *Microb. Cell Fact.* 13, 1 (2014)
- 15) P. Skorski et al. : *J. Bacteriol.* 189, 6205 (2007)
- 16) C. Schulz et al. : *mBio* 5, e01858-14 (2014)
- 17) T. Wakinaka & J. Watanabe : *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e00208-19 (2019)