

技術解説

醤油乳酸菌に感染するバクテリオファージの
レセプターに関する研究 (1)

脇中琢良¹, 松谷峰之介², 渡部潤³, 茂木喜信¹, 徳岡昌文⁴, 大西章博⁴
(ヤマサ醤油株式会社・製造本部¹, 東京農業大学・生物資源ゲノム解析センター²,
福島大学・農学群食農学類³, 東京農業大学・応用生物科学部醸造科学科⁴)

Studies on the binding receptors for bacteriophages
that infect *Tetragenococcus halophilus* (1)

Takura Wakinaka¹, Minenosuke Matsutani², Jun Watanabe³, Yoshinobu Mogi¹,
Masafumi Tokuoka⁴, and Akihiro Ohnishi⁴
(Manufacturing Division, Yamasa Corporation¹; NODAI Genome Research Center,
Tokyo University of Agriculture²; Faculty of Food and Agricultural Sciences,
Fukushima University³; Department of Fermentation Science, Faculty of Applied
Biosciences, Tokyo University of Agriculture⁴)

要 旨

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* WJ7 に感染するバクテリオファージ phiWJ7 が結合するレセプターが、リビトールタイコ酸であることを特定した。phiWJ7 はリビトールタイコ酸の欠損株には感染しなかった。

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* に感染するバクテリオファージ (以下ファージ) が醤油諸味から分離されており、このファージの感染は *T. halophilus* を溶菌させて乳酸発酵を阻害するため、醸造上大きな問題とされてきた¹⁾。*T. halophilus* に感染するファージは宿主範囲が狭く、異なる菌株に感染することは稀で、ファージ耐性変異株も比較的容易に育種できると報告されている²⁾。しかし、*T.*

halophilus のファージ感受性を決定する要因は明らかにされていなかった。近年、*T. halophilus* のゲノムに CRISPR 配列が見出され、ファージに対する防御機構として機能している可能性も示唆されたが³⁾、これまでファージ感受性の決定要因が実験的に示された事例はなかった。

ファージの結合レセプターは、ファージの宿主範囲を決定する重要な因子である。ファージは、宿主の細胞表面に存在するレセプター分子を特異的に認識し結合するため、特定のレセプター分子を有しない宿主には感染できない。ファージの宿主に対する結合は、可逆的な結合と不可逆的な結合の2段階がある⁴⁾。ファージはまず、宿主細胞に可逆的に結合するが、この段階ではまだ宿主から離れ、細胞表面の別の場所へ移動することもできる。宿主の細胞表面で不可逆的結合に適した部位を見つけると、ファージは宿主細胞に不可逆的に結合する。これにより、ファージは宿主細胞から離脱できなくなり、その後ファージゲノムが宿主細胞内へ注入される。可逆的結合と不可逆的結

合に関与するレセプターは、必ずしも同一の分子ではない。例えば、大腸菌に感染するλファージは、外膜のタンパク質OmpCが可逆的結合のレセプターで、マルトース輸送体LamBが不可逆的結合のレセプターである⁵⁾。

乳酸菌を含むグラム陽性菌においてもファージの結合レセプターがいくつか特定されており⁶⁾、その一つにタイコ酸がある。タイコ酸は主として、グリセロールリン酸またはリビトールリン酸が結合したポリマーであり（それぞれグリセロールタイコ酸、リビトールタイコ酸と呼ぶ）、ペプチドグリカンに共有結合している。タイコ酸は多くのグラム陽性菌によって生産され、主鎖の成分と修飾残基が菌種や菌株ごとに異なる^{7,8)}。

タイコ酸合成酵素遺伝子は、黄色ブドウ球菌

*Staphylococcus aureus*においてよく研究されており、グリセロールタイコ酸の生産に関わるtag遺伝子群と、リビトールタイコ酸の生産に関わるtar遺伝子群がある（以下本稿では、Xia & Peschel⁹⁾の方針に従い、両タイプのタイコ酸合成に共通して必要な遺伝子にはtagの名称を使用する）。*S. aureus*におけるタイコ酸合成経路を図1に示す。*T. halophilus*においては、タイコ酸の構造と合成経路についてこれまで調べられていなかった。

筆者らは、ファージphiWJ7の不可逆的な結合レセプターがリビトールタイコ酸であることを特定した。本研究は、*T. halophilus*に感染するファージが宿主を決定する機構の一端を明らかにしたものである。

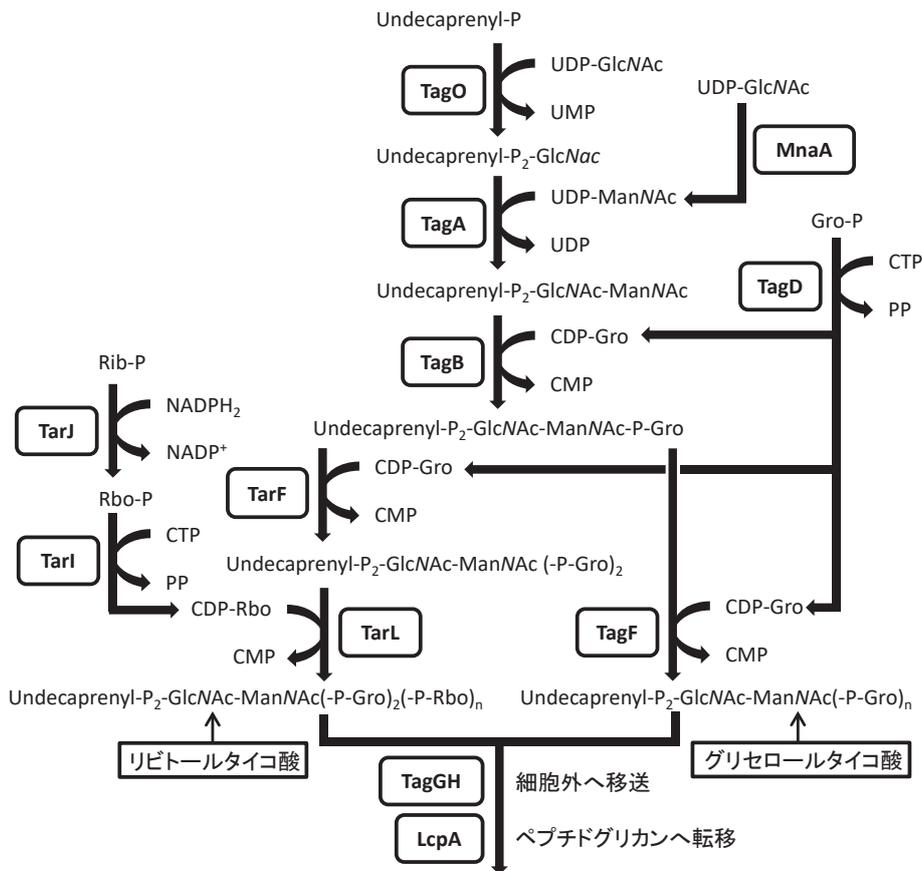


図1 *S. aureus*におけるタイコ酸の生合成経路¹⁰⁻¹³⁾。細胞内でウンデカプレニルリン酸に各転移酵素が糖を付加し、完成した糖鎖は細胞外へ送られ、ペプチドグリカンに結合される。主鎖が糖やD-アラニンなどで修飾されることもある。(GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, ManNAc: N-アセチルマンノサミン, Gro: グリセロール, Rbo: リビトール, Rib-P: リブローズ5-リン酸, P: リン酸, PP: ニリン酸。)

実験方法

1. 菌株, 培地および培養条件

本研究で主として使用した乳酸菌, ファージを表1に示す。培地はMRS-10またはLA13培地¹⁴⁾を使用した。MRS-10は, NaClを10%添加したMRSプロス (Difco) である。寒天培地の寒天濃度は1.5%とした。液体培地は攪拌せずに静置し, 寒天培地はアネロパック (三菱ガス化学) を使用し嫌氣的に培養した。培養温度は30°Cで, 特に記載がない場合は5日間培養した。

2. ファージの取り扱いとファージ耐性変異株の取得

Uchida & Kanbeは, 一般的な軟寒天によるプラークアッセイでは*T. halophilus*のファージ検出ができなかったため, 寒天培地上にコンラージ棒で宿主とファージを直接塗布する検出法を開発した¹⁾。本研究ではこの方法を修正して用いた。MRS-10で定常期まで培養した宿主菌株を, ソニケーター (AUS-01 ;超音波工業) で30秒間超音波処理し, 得られた均一な細胞懸濁液を10%食塩水で6倍希釈し, 希釈した懸濁液600 μLをファージ検体と混合した。寒天表面に均一に菌体を塗布するため, コンラージ棒は使用せず, プ

レートを開けることで宿主とファージの混合液をLA13寒天培地 (径85 mm) の表面に広げ, クリーンベンチ内で乾燥させた。この培地を3日間培養し, プラークを形成させた。ファージスポットアッセイでは, 宿主懸濁液を前もって寒天培地上に広げ, その後10 μLのファージ検体をスポットした。ファージをプラークから回収する際は, 10%食塩水に懸濁し, 遠心分離で細胞を除去した後, 上清をポリエーテルスルホン膜 (0.2 μm; アドバンテック) でろ過した。グリセロールストックは終濃度16% (v/v) となるようグリセロールを添加し, -80°Cで保存した。ファージ耐性変異株は, 親株の培養液 (約10⁶ cfu) をLA13寒天培地上に10⁷ pfu以上のファージとともに塗布し, 生育したコロニーを分離した。

3. ゲノム解析

*T. halophilus*のゲノムDNA抽出には, DNeasy PowerSoil Pro KitおよびQIAcube (QIAGEN) を使用した。ゲノムDNAライブラリーの調製には, Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina) を用いた。ゲノムシーケンスはIllumina MiSeqシーケンスプラットフォームを利用し, 300 bp×2のペアエンドシーケンス解析を実施した。

表1 本研究で主に使用した乳酸菌株とファージ

株名	説明	分離源
乳酸菌 (<i>T. halophilus</i>)		
WJ7	phiWJ7に感受性	糠漬けより分離 ¹⁵⁾
WJ7R1	phiWJ7に非感受性 <i>tarL::ISTeha3</i>	本研究で作出したWJ7の変異株
WJ7R2	phiWJ7に非感受性 <i>tarL::ISTeha4</i>	本研究で作出したWJ7の変異株
NBRC 12172	phiWJ7に非感受性	NITE バイオテクノロジーセンター
YA5	phiWJ7に非感受性	醤油諸味より分離 ¹⁹⁾
YA163	phiWJ7に非感受性	醤油諸味より分離 ¹⁵⁾
YG2	phiWJ7に非感受性	醤油諸味より分離 ¹⁵⁾
バクテリオファージ		
phiWJ7	WJ7に感染し, WJ7R1, WJ7R2には感染しない	醤油諸味より分離
phiWJ7_2	WJ7, WJ7R1, WJ7R2 いずれにも感染する	醤油諸味より分離
phiWJ7_3	WJ7, WJ7R1, WJ7R2 いずれにも感染する	醤油諸味より分離

公開済みの*T. halophilus* WJ7のゲノム配列³⁾をリファレンス配列として、変異株WJ7R1, WJ7R2のリードをゲノムマッピングツールであるBWAを用いてマッピングし、Genome Analysis Toolkit (GATK) とbreseqにより変異箇所を特定した。

タイコ酸合成酵素遺伝子を含む領域の変異を確認するためには、プライマーセットWJ7contig68とasnS, tagOfとtagOr, mnaAfとmnaAr, tagGHDrとtagGHDF, tagABrとtagABf, tagFrとtagFf, asnSとtarIJLr (表2) を使用し、KOD FX Neo (東洋紡) を用いてPCRでDNA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 (Promega) を用いて精製、必要に応じて外注分析によりシーケンス解析を実施した (Fasmac/Eurofins Genomics)。

表2 プライマー配列

プライマー名	配列 (5'→3')
WJ7contig68	GAGGAACATACATCATAATTAATAAATAACTCGC
asnS	CGTTTATTGAATCGGATTATCCG
tagOf	TGAATGCTTCGATGGAAGAG
tagOr	TCCATTTCGGAATCGC
mnaAf	GGCAAAGACCTAGATTCTATCCG
mnaAr	CAATGCTTGAAAGTCAATCGTC
tagGHDr	GCGTCGAACCTTGCGG
tagGHDF	GGTTTAGACGTATGGGAACATGC
tagABr	TCTTCTGATTGGTTCTTGTCACTC
tagABf	AGGTGAATATCGCTCAAGGG
tagFr	GCCATTCATCGCCTAACTG
tagFf	CAGGCCCACTGGACAC
tarIJLr	TCGTAACCTTGTAGCCTATCGG

4. タイコ酸の抽出と分析

*T. halophilus*の細胞壁は、概ね既報¹⁵⁾に従い抽出した。細胞をMRS-10で定常期まで増殖させ、遠心分離 (8,000 ×g, 5分) で回収、ペレットを水で洗浄後、4% SDSに再懸濁し、30分間煮

沸、室温で一晩静置した。懸濁液を再度10分間煮沸し、遠心分離でペレットを回収して、水で4回洗浄し、DNase, RNase, およびトリプシンで処理した。最終的に水で洗浄した後、遠心分離により細胞壁を回収、凍結乾燥した。

タイコ酸の抽出はBronらの手法¹⁶⁾に従った。細胞壁を10% TCAで処理することで遊離したタイコ酸を、3倍量のエタノールを添加して4℃で24時間静置し沈殿させた。遠心分離でタイコ酸を回収し、70%エタノールで2回洗浄し、凍結乾燥した。

構成糖を分析するため、50 mgのタイコ酸を、6 M HClで100℃、3時間加水分解し、4 M NaOHで中和した。内部標準として、20 μlの[1, 1, 2, 3, 3-D₅]グリセロール (D₅-グリセロール; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) 1,000 ppm溶液を200 μlの加水分解物に加え、Bornøら¹⁷⁾の手順に従い塩化ベンゾイルで誘導体化し、誘導体化されたリビトールおよびグリセロールをLC/MSで分析した。LCはACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation) を使用した。カラムはACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm) で、移動相として10 mMギ酸アンモニウムを含むMilli-Q水 (pH 3.5) とアセトニトリルをグラジエント溶出させ、MS分析はXevo G2-XS Q-TOF MS (Waters Corporation) で実施した。

5. ファージ結合アッセイ

細胞壁へのファージの結合は、Baptistaらの方法¹⁸⁾に従い評価した。上述のように調製した細胞壁を、10 μg/mlになるようLA13に再懸濁し、ファージと混合して30℃で10分間インキュベートした。細胞壁を含まないLA13を対照区として用意した。細胞壁とファージの混合物を遠心分離 (6,000 ×g, 5分) し、上清中の遊離ファージ数を、WJ7を宿主菌としてプラークアッセイにより求めた。

不可逆的結合を評価する際は、細胞壁とファージの混合物を10%食塩水で100倍に希釈し、5

秒間ボルテックスすることで可逆的に結合したファージを遊離させ、遠心分離して同様に遊離ファージ数を評価した。この場合、上清中の遊離ファージは、細胞壁に結合していなかったものと、可逆的に結合していたものが含まれる。

統計解析にはR (バージョン 3.6.0; www.r-project.org) を使用し、一元配置分散分析とTukey法による事後検定によってデータを評価した。

結果と考察

1. phiWJ7 耐性変異株の取得

T. halophilus WJ7 をLA13 寒天培地上にファージphiWJ7 とともに播種し、生育したコロニーを分離して、phiWJ7 耐性変異株WJ7R1 とWJ7R2 を得た。変異株に対して、phiWJ7 はプラークを形成しなかった (図2)。しかし、phiWJ7 とは別のファージであるphiWJ7_2 とphiWJ7_3 は、変異株に対してもプラークを形成した。phiWJ7_2 は、親株に対しても変異株に対しても同様のプラークを形成したが、phiWJ7_3 は、親株よりも変異株に対してプラークサイズが大きく、プラーク数も多かった。

2. 変異株の変異個所の特定

WJ7R1 とWJ7R2 がファージ耐性を獲得した要因を調べるため、全ゲノム配列を解析し親株WJ7 のゲノムと比較したところ、両方の変異株で同一のORFにインサクションシーケンス (IS) が転移していた (図3A)。WJ7R1 で転移していたのはISTeha3, WJ7R2 ではISTeha4 であった。ISが転移していたORFのアミノ酸配列は、*S.*

*aureus*においてリビトールタイコ酸の主鎖を重合させるTarLと68%の相同性を示し、その上流に位置する2つのORFも、重合反応の基質を合成するTarIおよびTarJと高い相同性を示した (図1, 3A)。

*T. halophilus*のゲノム上をISが高頻度で転移していることは、既報の通りである¹⁹⁾。本研究では変異を誘発する紫外線照射や薬剤処理は施しておらず、単に継代培養するのみでISが転移していることが示された。

3. *T. halophilus*のタイコ酸合成遺伝子の解析

*tarL*遺伝子へのIS転位が2つの変異株で独立に発生していることから、リビトールタイコ酸合成経路の破壊がファージ耐性獲得に寄与した可能性が非常に高い。しかし、*T. halophilus*のタイコ酸合成酵素遺伝子に関しては過去にほとんど検討されていなかったため、まずゲノム全長の配列が公開されている*T. halophilus* NBRC 12172において、タイコ酸生合成経路の*in silico*解析を実施することとした。すなわち、*S. aureus* COLのタイコ酸合成酵素のアミノ酸配列に相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を、NBRC 12172のゲノムで探索した。その結果、NBRC 12172は*tagO*, *mnaA*, *tagADB*, *tarF*および*tagGH*に相同な遺伝子を有しており、これらは4か所に分散して存在した (図3B)。また、*tagF*および*lcpA*の相同遺伝子も複数存在したため、NBRC 12172はグリセロールタイコ酸合成に必要な遺伝子を一通り有していると推定された。しかし、リビトールタイコ酸合成に必要な*tarIJL*は存在しなかつ

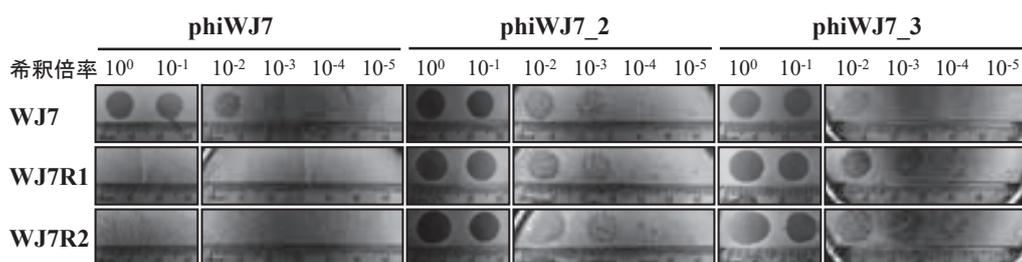


図2 phiWJ7, phiWJ7_2, phiWJ7_3 によるスポットアッセイ。各ファージを段階的に希釈し、左側に示した各宿主株に対してスポットした。

た。NBRC 12172で見出された遺伝子のカウンターパートを、WJ7のゲノムで探索したところ、WJ7もグリセロールタイコ酸合成に必要な遺伝子を有していると推定され、かつリビトールタイコ酸合成に必要な*tarIJL*も、*tagAB*などの近傍に存在した(図3B)。*tagAB*周辺の配列を、他の3株、YA5, YA163, YG2と比較した。NBRC 12172と同様に、これら3株はゲノム上に*tarIJL*が存在せず、いずれの株もphiWJ7に感染しなかった(図4)。

4. タイコ酸の分析

WJ7はグリセロールタイコ酸およびリビトールタイコ酸の合成に必要な遺伝子を有していると推定され、WJ7R1ではリビトールタイコ酸合成酵素遺伝子が破壊されていたことから、WJ7およびWJ7R1からタイコ酸を抽出し、グリセロー

ルとリビトールの存在を評価することとした。トリクロロ酢酸で細胞壁から遊離させたタイコ酸を塩酸加水分解し、塩化ベンゾイルで誘導体化してLC/MSで分析した。その結果、グリセロールはWJ7とWJ7R1の両方で検出されたのに対し、リビトールはWJ7でのみ検出された(図5)。つまり、WJ7がグリセロールタイコ酸およびリビトールタイコ酸をいずれも生産する一方、WJ7R1はリビトールタイコ酸を欠損していることが示唆された。

5. ファージ結合アッセイ

グラム陽性菌のタイコ酸は、ファージ結合のレセプターになることが報告されているため⁶⁾、タイコ酸欠損変異株はファージの細胞壁への結合が損なわれている可能性が考えられた。そこで、WJ7と変異株の細胞壁を用いたファージ結合

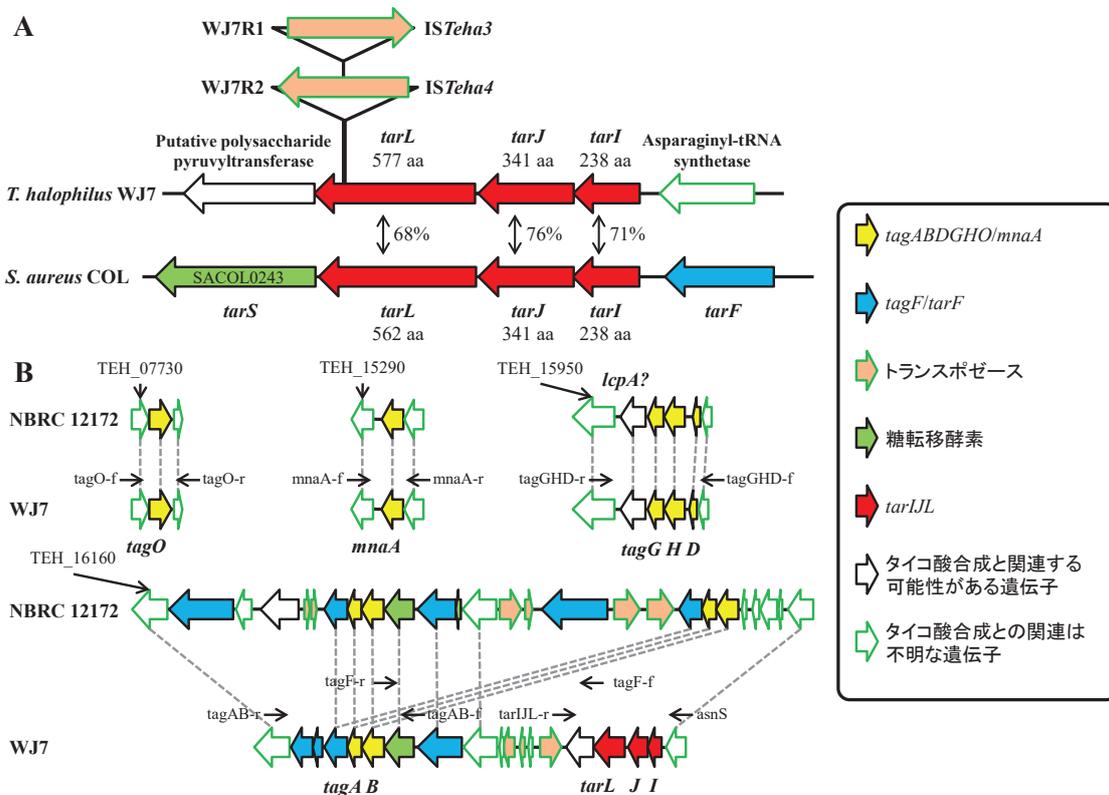


図3 WJ7のタイコ酸合成遺伝子。(A) *T. halophilus* WJ7と*S. aureus* COLの*tarIJL*の比較。%はアミノ酸配列の相同性を表す。*tarL*上に示されているのは、変異株でISが転移した位置。(B) NBRC 12172とWJ7のタイコ酸合成に関与する遺伝子。破線で結ばれている遺伝子は、アミノ酸配列の相同性が90%を超える(トランスポゼースは除く)。ORF上の黒い矢印は、プライマーの位置を表す。

アッセイを実施した。各菌株の細胞壁をphiWJ7と混合し、細胞壁に結合したファージを遠心分離で除去して、上清の遊離ファージ数から細胞壁に結合したファージの割合を求めた。WJ7の細胞壁と混合したphiWJ7の約99%が細胞壁に結合しており(図6A)、この結果はWJ7がphiWJ7の結合レセプターを有していることを明確に示している。ただし、phiWJ7はWJ7R1とWJ7R2にも34-39%程度結合した。次に、細胞壁とファージの混合物を100倍に希釈してボルテックスをかけることで可逆的に結合したファージを遊離させた後、遠心分離で不可逆的に結合したファージを除去した。これによって遊離ファージ数は増加したが、phiWJ7の89%は依然としてWJ7の細胞壁に結合していた。一方で、WJ7R1とWJ7R2に結合したphiWJ7はほぼ完全に遊離した(図6B)。

結合アッセイの結果と、変異株で*tarL*が変異し

ていたこと、WJ7R1がリビトールタイコ酸を欠損していたことなどを総合すると、リビトールタイコ酸がphiWJ7の感染に不可欠な結合レセプターであると結論された。ただしphiWJ7はリビトールタイコ酸欠損変異株に対しても可逆的には結合したため、可逆的結合のレセプターとしてリビトールタイコ酸以外に別のレセプターが存在すると思われる。

6. phiWJ7 耐性株の追加取得と変異箇所の特定

リビトールタイコ酸欠損株がphiWJ7に対し耐性を得るのであれば、*tarL*以外にもリビトールタイコ酸合成に関与する遺伝子の欠損株が、phiWJ7耐性株として得られると期待される。*T. halophilus*の遺伝子破壊はISの転位が原因となることが多く、その場合、当該遺伝子をPCRで増幅すれば親株とPCR産物の長さが異なるので、容易

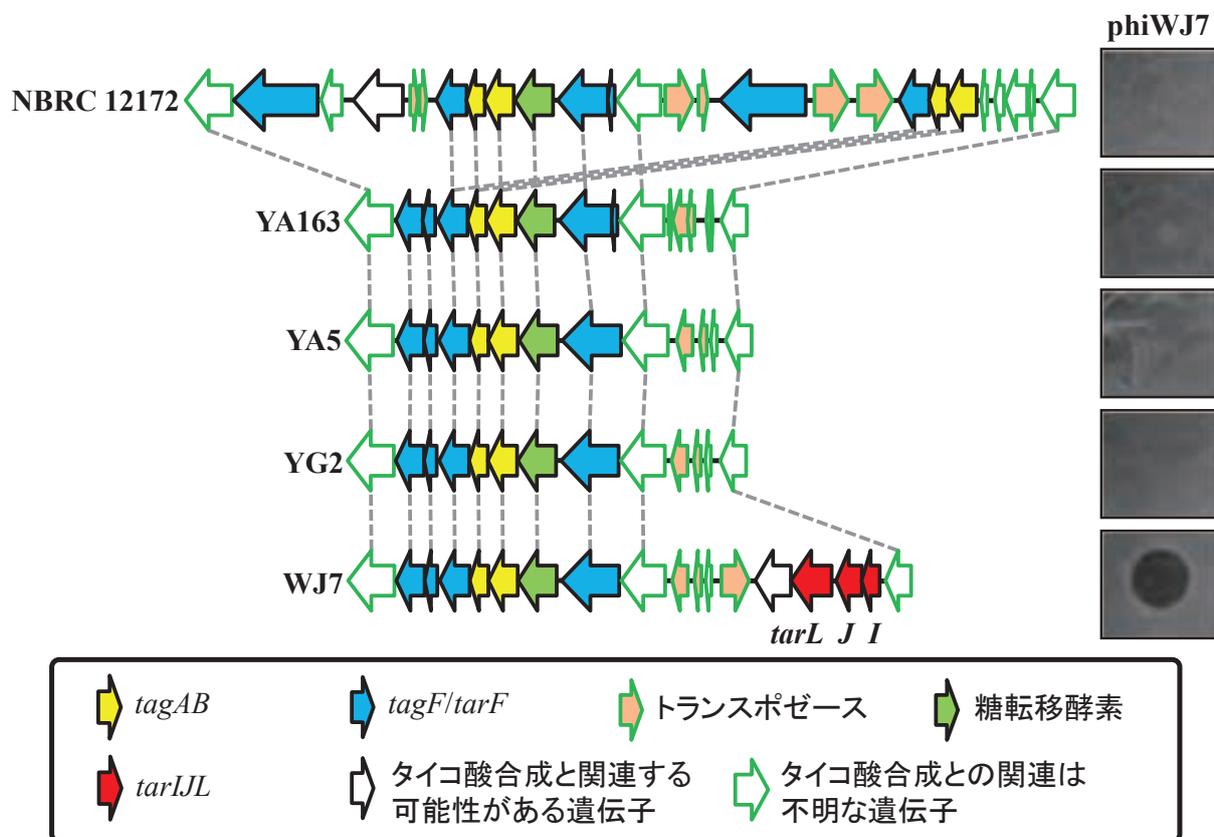


図4 5つの菌株間の*tagAB*周辺配列の比較と、各株のphiWJ7に対する感受性。破線で結ばれている遺伝子は、アミノ酸配列の相同性が90%を超える(トランスポゼースは除く)。右側のスポットアッセイでは、 4.3×10^7 pfuのphiWJ7を各宿主株にスポットした。

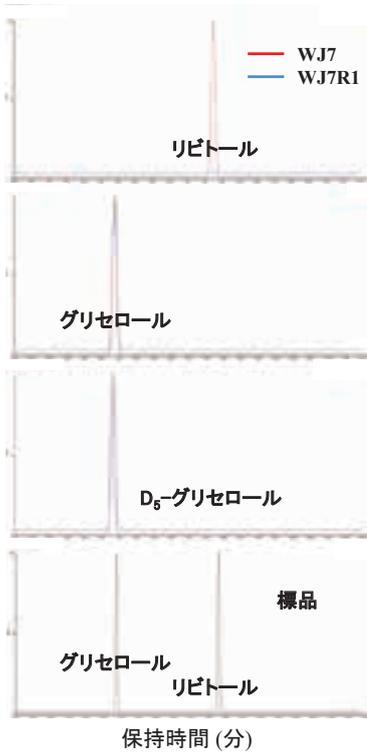


図5 WJ7とWJ7R1のタイコ酸加水分解物に含まれるリビトール (m/z 690.23), グリセロール (m/z 422.16), およびD₅-グリセロール (m/z 437.19)のベンゾイル誘導体のクロマトグラム。D₅-グリセロールはサンプルの誘導体化効率を比較するために添加した。最下段にはグリセロールとリビトールの誘導体のクロマトグラムを示す。

に判別できる¹⁹⁾。そこで、WJ7R1とWJ7R2を得たのと同様に、追加で25株のphiWJ7耐性変異株を取得した(WJ7R3-WJ7R27)。これらの株で、タイコ酸合成酵素遺伝子を含む領域を増幅したところ、25株のうち21株は、*tarL*を含む領域へのIS転移が示唆された。DNAシーケンス解析の結果、この21株では、*tarI*, *tarJ*, または*tarL*のいずれかにISが転位していることが明らかになった(図7)。

残る4株のうち、2株はphiWJ7_2とphiWJ7_3に対する感受性が親株より低く、他の耐性株とは耐性獲得機構が異なると考えられた(データ示さず)。他の2株については*tarIJL*のDNAシーケンス解析を実施したところ、*tarJ*の1アミノ酸置換または102 bpの欠失を起こしていた(図7)。つまり、追加で取得したphiWJ7耐性株のうち、WJ7R1やWJ7R2と同じファージ感受性を示した23株全てが、*tarIJL*に変異を有していたことになる。

以上の結果より、リビトールタイコ酸がphiWJ7の結合レセプターであり、その有無が*T. halophilus*のファージ感受性を決定する一因であることが

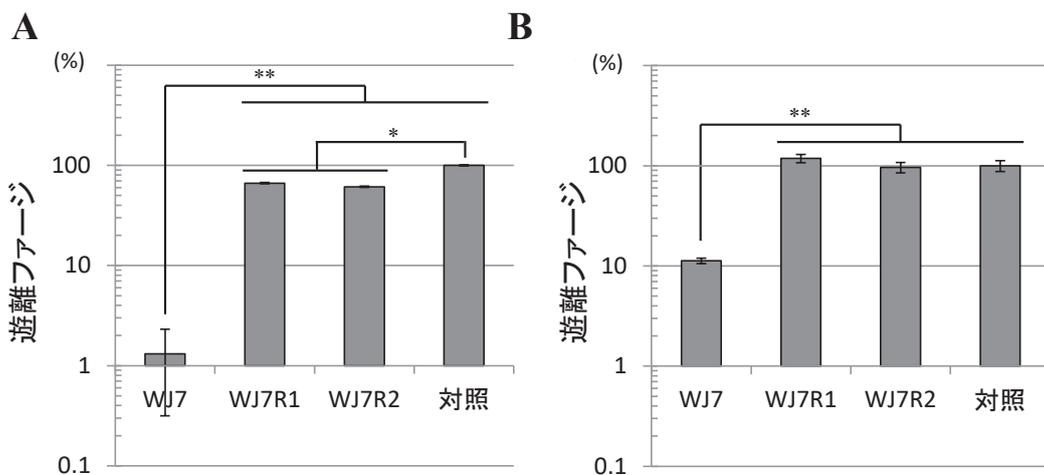


図6 WJ7とその変異株に対するphiWJ7の結合アッセイ。細胞壁を加えない対照区における遊離ファージ数を100%として、各試験区の遊離ファージ数を比で示している。各データとエラーバーは、三連実験の平均値±標準偏差を示した。アスタリスクは、試験区間の有意差を表す(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。(A) 可逆的に結合したファージと不可逆的に結合したファージをいずれも遠心分離で除去した。(B) 可逆的に結合したファージを遊離させ、不可逆的に結合したファージのみを遠心分離で除去した。

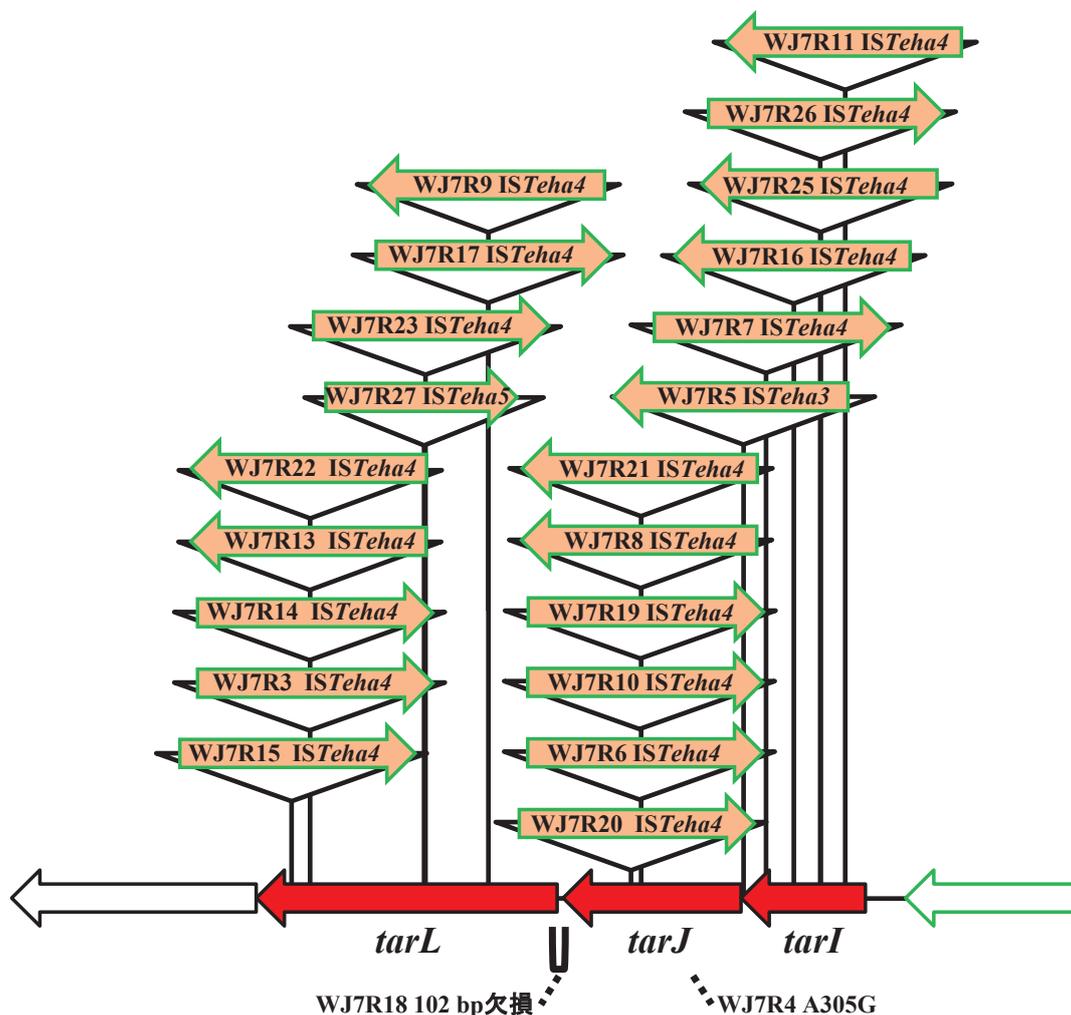


図7 追加で取得したphiWJ7 耐性変異株の変異箇所。

示された。タイコ酸構造の違いがファージ感受性を決定する例は他菌種でも見られ、例えば *S. aureus* のファージはタイコ酸構造が共通する菌株に広く感染することが知られている²⁰⁾。しかし、*T. halophilus* のファージは宿主範囲が狭く、ほとんど菌株特異的に感染すると言われているため¹⁾、構造的多様性があまり高くないタイコ酸によってのみ宿主が決定されるとは考え難い。

その後の研究で筆者らは、ファージの宿主認識に関与する、タイコ酸より構造的多様性に富んだレセプターを特定したので、続報にて述べたい。

本稿は2022年10月20日に開催された日本醤油技術センター第90回醤油研究発表会(東京大会)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 *Microbiology Spectrum* 誌に掲載されており、本文と図表の一部を本報へ改変・転載している。本報の内容を引用する際は、当該文献を引用する必要がある(T. Wakinaka et al.: *Microbiol Spectr* 10: e00336-22, 2022)。

要 約

1. *Tetragenococcus halophilus* WJ7 を親株として、WJ7 に感染するバクテリオファージ phiWJ7 に対し非感受性になった変異株を取得した。
2. ファージ耐性変異株のゲノム解析の結果、リビトールタイコ酸の合成酵素遺伝子の変異していることが明らかになった。

3. タイコ酸を加水分解して分析したところ、親株には含まれるリビトールが変異株には含まれていなかった。
4. phiWJ7 は親株に不可逆的に結合したが、変異株にはしなかったため、リビトールタイコ酸がphiWJ7 の不可逆的結合レセプターだと結論付けられた。

参 考 文 献

- 1) K. Uchida & C. Kanbe: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**, 429 (1993)
- 2) T. Higuchi et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 415 (1999)
- 3) M. Matsutani et al.: *Front. microbiol.* **12**, 1605 (2021)
- 4) RW. Hancock & V. Braun: *J. Bacteriol.* **125**, 409 (1976)
- 5) AV. Letarov & EE. Kulikov: *Biochemistry* **82**, 1632 (2017)
- 6) J. Bertozzi Silva et al.: *FEMS Microbiol. lett.* **363**, fnw 002 (2016)
- 7) S. Brown et al.: *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 313 (2013)
- 8) S. Tomita et al.: *Microbiology* **158**, 2712 (2012)
- 9) G. Xia & A. Peschel: *Chem. Biol.* **15**, 95 (2008)
- 10) G. Xia et al.: *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 148 (2010)
- 11) V. Winstel et al.: *mBio* **5**, e00869 - 14. (2014)
- 12) K. Schaefer et al.: *Nat. Chem. Biol.* **13**, 396 (2017)
- 13) R. van Dalen et al.: *Trends Microbiol.* **28**:985 - 998 (2020)
- 14) T. Wakinaka et al.: *Int. J. Food Microbiol.* **292**, 137 (2019)
- 15) D. Shirakawa et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1724 (2020)
- 16) PA. Bron et al.: *Microb. Cell Fact.* **11**, 123 (2012)
- 17) A. Bornø et al.: *J. Mass Spectrom.* **49**, 980 (2014)
- 18) C. Baptista et al.: *J. Bacteriol.* **190**, 4989 (2008)
- 19) T. Wakinaka & J. Watanabe: *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e00208 - 19 (2019)
- 20) AH. Azam & Y. Tanji: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 4279 (2019)