

身近で活躍する有用微生物 食品と有用微生物－和食文化と微生物6

納豆と微生物

き むら けいたろう
木 村 啓太郎
Keitarou KIMURA

はじめに

納豆の原料は大豆、水、納豆菌の3つだけである。食塩は使われず、関与する微生物も1種類であり発酵にたった2日しか要しない(大豆発酵に1日、発酵後の低温熟成に1日)。大豆発酵食品としてはおそらく世界最短の製造工程であろう。同じ大豆発酵食品でも、食塩が添加され、熟成期間が長く発酵に複数の微生物種が関与する味噌・醤油と比べれば納豆は大変単純である。

納豆菌は孢子形成能を有するグラム陽性細菌である。微生物分類上、納豆菌は枯草菌(コウキン、*Bacillus subtilis*)に属す。納豆製造に使われる菌株であることを示すため、納豆菌を *Bacillus subtilis* (natto) と表記することが多い。納豆のネバネバ物質(グルタミン酸ポリマー、poly- γ -glutamic acid, 以下 γ PGA)を大量に作るので、納豆菌のコロニー形態は顕著な山型を示す(図1)。

納豆菌は納豆から分離された枯草菌株であり、筆者の知る限り納豆発酵菌について最初に文献が報告されたのは1894年である¹⁾。かつて納豆菌を独立した種 *Bacillus natto* として扱う文献もあったが、*Bacillus natto* が国際細菌命名規約に記載されたこ

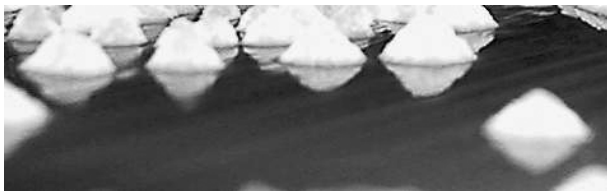


図1 納豆菌のコロニー形態

山型に盛り上がっている部分がネバネバ物質 γ PGAである。

とはなく Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第7版(1957年)以降は *Bacillus subtilis* と同一とされた。現在納豆製造に使われている主要な納豆菌株は3つあり、そのうち宮城野株とよばれる菌株がよく使われている¹⁾。納豆菌(宮城野株)の全ゲノム塩基配列が慶応大学研究チームにより2010年に公開された²⁾。これを契機として納豆菌研究の環境整備が進み、海外の論文でも Natto の文字を見かけることが多くなった。公開されたゲノム情報には繰り返し配列やGCバイアスを原因とする欠落箇所が残されていたが、昨年、解析鎖長の長い第3世代DNAシーケンサー(PacBio RS sequencer)による精度改善が行われ、いくつか新たに同定された遺伝子も見つかっている³⁾。

一方、枯草菌ではモデル細菌として分子生物学の黎明期から使われている実験室株 *Bacillus subtilis* 168がよく知られている。孢子形成に伴う細胞分化、菌体外タンパク質分泌、DNA複製過程などに関する知見の蓄積が豊富であり、比較的早い時期(1997年)に全ゲノム塩基配列が決定された⁴⁾細菌の一つである。全ゲノム解析は国際コンソーシアム方式で進められ、日本人研究者の貢献も大変大きかった⁴⁾。枯草菌は外部からDNAを積極的に細胞内へ取り込んで自己ゲノムと相同組換えすることによって形質転換する能力(natural competence)を有する。DNAの取り込みが細胞密度依存に実行されることが見出され、この現象が詳しく研究されてきた。菌体外に分泌される低分子ペプチド ComX の濃度を指標として活用する細胞密度による生体制御機構(タイプII型クォーラムセンシング、quorum sensing)が発見され、次いで ComX 受容体を介した細胞内情報伝達経路が解明されたことは1990年代微生物学の

金字塔の一つと言える。

Bacillus subtilis は土壌細菌であり、身近な水田・畑などから簡単にたくさん見つけることができる。一方、納豆製造に適した性質を持つ株は限られており *Bacillus subtilis* であれば何でもよいわけではない⁵⁾。例えば、実験室株 (*Bacillus subtilis* 168) で納豆を作ることは出来ない (表 1)。実験室株はネバネバ物質 γ PGA を作る事ができないだけでなく、煮豆上で菌膜を形成することができないのである (納豆菌は「被り」と呼ばれる納豆表面を白く覆う菌膜を形成する)。実際、実験室株が寒天プレート上で直径数ミリメートルほどのコロニーを形成するのに対し、納豆菌のコロニーは 2 日間程でプレート全体に広がってしまうほど面的増殖能が高い⁶⁾。本稿では筆者らの研究成果を交えながら、 γ PGA の生産制御機構と挿入配列 (insertion sequence, IS) によるその不活性化、納豆菌の系統的特徴とその遺伝的背景、納豆菌バクテリオファージの感染戦略、納豆の粘り物質の産業利用などに関する話題を紹介したい。

I. ネバネバ物質 γ PGA の生産制御機構

1. γ PGA 合成遺伝子

納豆発酵で最も特徴的なことは粘り物質 γ PGA の生産である。基礎研究で使われる実験室株が γ PGA を生産しないため、非常に身近な物質であるにも関わらずその合成に関与する遺伝子や発現制御機構は最近までよくわからなかった。研究が進んだきっかけは、炭疽菌 *Bacillus anthracis* である。2001 年に米国で発生した炭疽菌バイオテロリズムを覚えている読者も多いと思う。実は、炭疽菌も γ PGA を生産する。ただし、炭疽菌 γ PGA は D-グルタミン酸のみで構成され細胞壁に結合している点で納豆菌と異なる (納豆菌の γ PGA は DL-グルタミン酸の混成で細胞外に遊離している)。炭疽菌 γ PGA が病原因子であることから注目され、東京大学医科学研究所と農林水産省家畜衛生試験所 (現・農研機構動

物衛生研究所) の研究グループによってその合成酵素遺伝子 *capBCA* が突き止められた^{7,8)}。尚、病原因子であると言っても γ PGA それ自体に毒性があるわけではない。炭疽菌 γ PGA は CO₂ 濃度上昇に呼応して合成される⁸⁾。つまり、宿主体内への侵入を CO₂ シグナルとして感知し自身の細胞を γ PGA で覆い尽くすことによって、炭疽菌は宿主であるヒトや家畜の免疫系から逃れることができるのである⁸⁾ (図 2)。納豆菌の γ PGA にそのような構造的機能はなく、紙面の都合で詳細は割愛するが、むしろ菌体外貯蔵栄養としての生理的機能を有することがわかっている⁹⁾。納豆菌は一般的安全性が認められている (generally accepted as safe) 食べられる菌であるのでご安心願いたい。

capBCA 遺伝子と相同性を持つ納豆菌遺伝子 *pgsBCA* は芦内らによって機能的に同定された¹⁰⁾。前述のように枯草菌実験室株は γ PGA を生産しない。それにも関わらず、実験室株でも *pgsBCA* は無傷のまま保持されていた。その後、筆者らも加わっていくつかの研究グループにより γ PGA 合成制御機構の解明が進められた^{11~16)}。中でも、農研機構食品総合研究所の Tran、伊藤らによって γ PGA 合成がクォーラムセンシングの制御下にあることが示されてから¹²⁾ は、実験室株を用いた基礎研究では見えなかった枯草菌の隠れた一面を浮き彫りとする成果が得られた。

2. クォーラムセンシングによる γ PGA 生産制御

枯草菌が外部から積極的に DNA を細胞内へ取り込み自己ゲノムと相同組換えして形質転換する能力 (natural competence) を持ち、この現象の解析から菌体外低分子ペプチド ComX を細胞密度指標とする情報伝達経路が解明されたことはすでに述べた通りである。一方、納豆菌の natural competence は実験室株の 100 分の 1 以下で形質転換効率が非常に低いことが経験的に知られていた。Dubnau らの natural competence に関する先駆的研究によれば、濃度が閾値に達した ComX は細胞膜にある受容体

表 1 *Bacillus subtilis* 実験室株と納豆菌の主な形質差異

株名	γ PGA 生産	面的増殖能	プロテアーゼ生産	形質転換能	ビオチン合成能
<i>Bacillus subtilis</i> (natto) (納豆菌)	++	++	++	±	—
<i>Bacillus subtilis</i> 168 (実験室株)	—	—	+	++	+

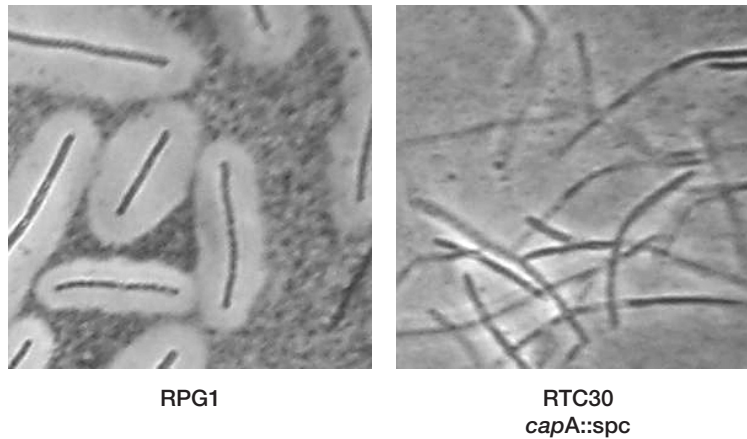


図2 炭疽菌の墨汁染色像

左、炭疽菌 RPG1 株。右、 γ PGA 合成遺伝子 *capA* の破壊株 RTC30³¹⁾。細胞に結合した γ PGAは墨汁をはじくため、その部分が白く浮き上がる。*capA*破壊株細胞周辺には白い空隙は観察されない。筆者がパスツール研究所 (Institut Pasteur) の Unité Toxines et Pathogénie Bactérienne 滞在中に撮影。墨汁染色は文献 31 に従って行った。

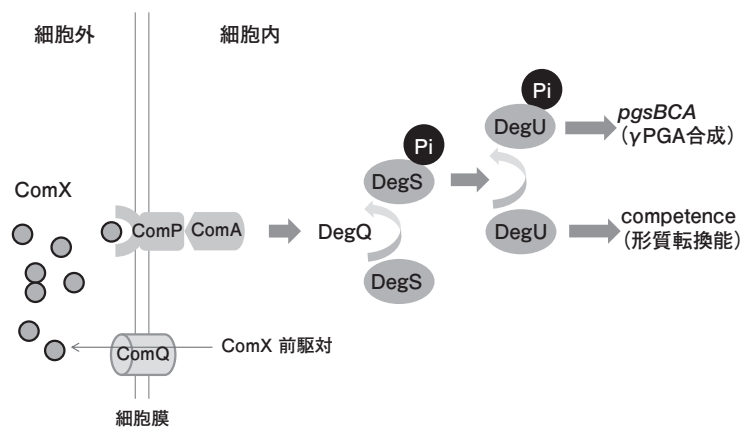


図3 細胞密度応答制御機構 (クォーラムセンシング) による γ PGA合成制御の概念図

Piはリン酸基修飾を示す。ComQは菌体外低分子ペプチドComXの修飾・排出を担う膜タンパク質。ComP, ComA, DegQ, DegS, DegUについては本文を参照。

ン酸化酵素 ComP に結合し、これを活性化することによって ComP の自己リン酸化に始まる細胞内リン酸化リレーを引き起こす¹⁷⁾。 γ PGA 合成制御に関して言えば、細胞密度情報は最終的に転写因子 DegU へ伝えられる (図 3)。遺伝子破壊株の解析の結果、DegU は natural competence と γ PGA 生産の両方に必須であることがわかった。では、なぜ納豆菌は旺盛に γ PGA を生産するにも関わらず natural competence が低いのだろうか? 逆に言えば、なぜ実験室株は natural competence が高く γ PGA を生産しないのか?

この疑問を解く鍵は *degQ* 遺伝子上流にある一塩基変異 (SNP, single nucleotide polymorphism) にあった^{13, 14)}。*degQ* は ComP によってリン酸化された ComA に依存して定常期に発現する。このとき *degQ* プロモーターは -10 位置の塩基が T であれば高発現型となり C であれば低発現型となる。たった一塩基の違いによって *degQ* 発現量に約 50 倍の違いが生じる¹⁸⁾。*degQ* が破壊されると γ PGA 生産は失われる¹³⁾。我々は *degQ* の機能を明らかにするため、まず納豆菌 *degQ* 破壊株を作成した。そして、*degQ* が破壊されている条件下で γ PGA 生産を可能とする

抑制変異 (suppressor mutation) を探した¹⁴⁾。

3. *degQ* 遺伝子破壊の抑制変異と枯草菌の生存戦略

抑制変異は DegU と二成分制御系を構成する DegS の自己リン酸化ドメインに集中して現れた¹⁴⁾。DegS は自己リン酸化能に加えてリン酸基を DegU に転移する働きを持つ。そのため、DegS リン酸化が進めばリン酸化 DegU (DegU-Pi) が増える (図 3)。アイソトープ [γ -³²P] ATP を用いた *in vitro* での詳細なリン酸化実験により、抑制変異を有する DegS (例えば DegS D250N) の自己リン酸化能が野生型 DegS に比べて非常に高いことがわかった。より正確に述べれば、変異体では自己リン酸化が促進されるとともに脱リン酸化速度が低下しリン酸化状態が安定して観察されたのである¹⁴⁾。抑制変異は DegQ の機能を模倣しており、野生型 DegS を DegQ 存在下で反応させるとやはりリン酸化反応促進と脱リン酸化抑制が観察された¹⁴⁾。

結局、DegU はそのリン酸化修飾の有無で結合できる DNA 配列を選択でき、DegQ がそのリン酸化状態を調節して多面的な表現型を生み出すことが明らかにされた¹⁶⁾。言い換えれば、環境変化 (細胞の高密度化による栄養源の枯渇、集団内での競争激化) に対応するため枯草菌は 2 つの戦略 (外部 DNA を取り込んで自己変革する or 栄養貯蔵として γ PGA 生産する) を持ち、この 2 つはあたかも二者択一のような制御を受けているのである。多細胞化した高等生物と異なり、単細胞として生き延びた細菌が獲得した興味深い生存戦略である。 γ PGA 生産以外にも大豆発酵に必要なプロテアーゼ生産をはじめ細胞運動に関わる鞭毛形成など DegU-Pi に支配される表現型が多く知られている。興味のある読者は原著を参照願いたい¹⁹⁾。

4. 挿入配列 *IS4Bsu1* による *comP* 遺伝子破壊と発酵不良

納豆業界では、納豆菌の発酵能が突如失われることが以前から知られていた。全く粘らなくなってしまうのである。農研機構食品総合研究所の永井らによって、この原因が納豆菌ゲノムに複数コピー存在する *IS4Bsu1* と名付けられた挿入配列であることが明らかにされた¹⁵⁾。挿入配列はトランスポゼースをコードしており、自身のコピーをゲノム内の別の

場所へ挿入することができる。ComX 受容体遺伝子 *comP* が *IS4Bsu1* 転移のホットスポットであり、*comP* 破壊によるクォーラムセンシングの機能不全が発酵不良の原因だったのである¹⁵⁾。

5. γ PGA の産業利用

納豆菌が生産する γ PGA は食品添加物として利用されているだけでなく、凝集剤や化粧品原料、ドラッグデリバリー・ドラッグキャリアー分子として活用することができる²⁰⁾。また、後述する納豆発酵適性株の解析中に多数選抜した株の中には *IS4Bsu1* を持たない株も存在した。蓄積した γ PGA 生産制御に関する知見と遺伝資源としての納豆発酵株は γ PGA の安定的大量生産に利用できるであろう。

II. 納豆発酵に適した枯草菌系統について

1. 納豆発酵適性の遺伝的特徴

経験的によく知られていたように、納豆製造に適した性質を持つ株は限られており *Bacillus subtilis* であれば何でもよいわけではない。近年、納豆発酵適性株の系統解析や納豆菌変異株の表現型解析によって、納豆を作るために必要な遺伝的特徴の一端が明らかとなった^{5, 6, 11~14, 21, 22)}。それは、①粘り物質 γ PGA 生産を制御する細胞密度情報伝達系の鍵遺伝子 *degQ* が高発現タイプのプロモーター配列を有すること、②細胞の運動性に関わる *surA* 遺伝子が活性化型であり、“被り”と呼ばれる菌膜を形成すること、③ビオチン合成オペロンに欠損変異を有し細胞内でビオチン合成ができないこと、④フラジェラ (鞭毛) 形成能が弱いこと、以上 4 点である。

系統解析では共同研究者の久保 (茨城県工業技術センター技師、現在は主任) らが稲わらから多数分離した枯草菌株 1 つ 1 つで実際に納豆を作り、物性試験、官能試験により適性株の選抜試験が行われた⁵⁾。寒天培地上で γ PGA 生産性を示した 424 株から 59 株の適性株が選抜され、これらを MLST 法 (multilocus nucleotide sequence type) および AFLP 法 (amplified fragment length polymorphism) で解析した。その結果、納豆発酵に適した株は *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* の中にまとまった集団として現れた。宮城野株もこの集団に含まれていた。この

59 株には明らかな多型性が見られ、宮城野株で初めて見つかった IS4*Bsu*1 や納豆菌バクテリオファージへの感受性は発酵適性の指標とならないこと、ビオチン要求性が納豆発酵適性と非常に強く連鎖 (59 株全てがビオチン要求性だった) することが判明した⁵⁾。適性株ではビオチン合成を司る *bioWAFDBI* オペロンのうち *bioB* 以外は欠失やナンセンス変異によって機能が失われていたのである⁵⁾。現状では、ビオチン要求性 (できれば、*bio* オペロンの塩基配列) を調べることが納豆発酵適性を予測する一番簡便な方法だと言うことができる。

2. ビオチン要求性と納豆発酵

ビオチンはアセチル Co-A を補酵素とする carboxylase (ACC) によるカルボキシル基転移反応に必要である。細胞増殖に必須な因子であるので納豆菌は外部 (納豆の場合は大豆) からビオチンを獲得する。ビオチン要求性と納豆発酵能の因果関係の詳細は今のところ不明である。ビオチンによる発酵制御の例としては、グルタミン酸生産菌 *corynebacterium glutamicum* がビオチン欠乏下でのグルタミン酸を多く生産することが知られる²³⁾。このことから筆者は、ビオチン要求性が細胞内グルタミン酸プールに関係している、と推測している。可能性として考えられるのは BirA タンパク質と ACC が関与するビオチンセンシングと呼ばれる遺伝子発現制御である²⁴⁾。BirA タンパク質には ACC をビオチン化する合成酵素としての役割とそれ自身が DNA 結合能を持つ転写因子としての働きがある。DNA 結合には BirA が基質ビオチン (正確には AMP 化したビオチン) と複合体を作って二量体になる必要がある。おそらく、納豆菌細胞内ではビオチン供給量が不足しているために apo 型 ACC が多くなり、結果的に BirA 二量体による転写抑制は緩慢な状態となっているだろう。これらが原因となり細胞内代謝フローが変化しグルタミン酸が (おそらく TCA サイクルの 2-ケトグルタル酸経由で) 多く蓄積して γ PGA 合成の基質として使われているのかも知れない。

納豆発酵に必要な遺伝的特徴①~④のうち、④の鞭毛形成に関しては、最近海外から相次いで報告があった^{21, 22)}。鞭毛の運動性を抗体などで抑制すると γ PGA の生産が増えるとして、納豆菌の性質についても引用して議論されている。②の *swrA* 遺伝子

表 2 アジアの納豆様食品

国・地域	名称
ネパール・インド北部・ブータン	キネマ (Kinema)
タイ北部	トゥアナオ (Thua nao)
中国	豆豉 (Douchi)*
ミャンマー北部	ペーポ (Pepok)
カンボジア	シエン (Sieng)
韓国	清国醬 (Chongkukjang)

*豆豉には塩が加えられることが多いが、塩なしで作られる場合もある。

についても研究成果が公表されている^{6, 13, 25)}。

ところで、納豆は日本特有の食品と思われがちである。しかし、実は納豆とよく似た食品は東アジア・東南アジアの国々にもある^{1, 26)}。これらを便宜的に“アジアの納豆様食品”とここでは呼ぶことにする (表 2)。アジアの納豆様食品では種菌は使用されず、昔々の日本のように植物の葉や産物の一部がスターターの役割を担っている。ここでも発酵の主役は *Bacillus subtilis* である^{26, 27)}。アジアの納豆様食品から採取した枯草菌株のゲノム解析と納豆菌との比較研究が現在進められている。比較研究によって発酵適性のみならずバクテリオファージ感受性や菌株間で著しい多様性が現れる ComX の構造¹²⁾ に関する情報が得られるであろう。今後の展開に興味を持たれる。

Ⅲ. 納豆菌バクテリオファージ

1. 納豆工場でのバクテリオファージ汚染

バクテリオファージ (細菌に感染するウイルス) 汚染はなんらかの形で微生物発酵を伴う産業にとっては永遠のテーマとも呼べる課題である。バクテリオファージの撲滅は不可能であるし、耐性株を育種したとしても早晚バクテリオファージ側にも変異が起り“いたちごっこ”となってしまう。工場あるいは発酵室の管理を強化してバクテリオファージ混入を防ぐ、汚染源を洗浄する、定期的に拭き取り検査を行う、事業者の対策としてはこうした対症療法的な対応に限られる。現在も、例え大規模納豆工場であってもバクテリオファージ汚染はまれではあるが発生している。中小規模の工場で汚染が広がって対応に労力が費やされた例もある。近年、中国あるいは東南アジア諸国への生産設備移転が多くなった。当地で国内同様の衛生管理を実行することは必

ずしも容易なことではないだろう。一方、制限酵素の発見やゲノム編集技術 (CRISPR/Cas システム) 開発の発端がバクテリオファージ研究であることが示すように、バクテリオファージには遺伝資源としての利用価値もある。

2. 納豆菌バクテリオファージの γ PGA 分解酵素

γ PGA 分解酵素 (poly- γ -glutamic acid hydrolase P, 以下 PghP) は納豆菌バクテリオファージ研究から見つかった新規酵素である²⁸⁾。納豆菌 γ PGA には栄養貯蔵としての役割に加えてバクテリオファージの蔓延を防ぐ防御壁としての機能がある^{28, 29)}。土壌や稲わらなど自然環境下では枯草菌はバイオフィーム状のコロニーを形成しており、液体培養で見られるような浮遊細胞として存在することはむしろまれである (バイオフィームからの離脱時に浮遊細胞となる)。炭疽菌と異なり、納豆菌の γ PGA は菌体に結合しているわけではない。しかし、コロニーで生産された γ PGA は粘度の高い分厚い被膜となってその構成細胞を覆うことができる (図 1)。この防御壁に対抗して、バクテリオファージは感染時に PghP を大量に生産するのである。 γ PGA 分解は感染を容易にし、更に娘ファージの拡散を促進する効果を持つ²⁸⁾。PghP は γ PGA を 3~5 量体のグルタミン酸オリゴマーに分解する強力な加水分解酵素であり、His-Glu-His 亜鉛結合モチーフを活性中心に持つ新規メタロペプチダーゼであることが結晶構造解析から最近明らかにされた³⁰⁾。

3. PghP が引き起こす生産管理上の問題

PghP はファージ粒子の一部として装備されているわけではなく、感染時に宿主細胞内で作られ菌体外へ放出される。少量のバクテリオファージによる汚染の場合、発酵は見かけ上問題なく進み目立った外観上の異常はない。しかし、消費者がかき混ぜることにより、少量の PghP が拡散し γ PGA 分解が進行する。その結果、メーカーは“粘らない欠陥品”としてクレームを受けることになる。対照的に、ファージ汚染が甚大で発酵に支障を来す、あるいは製品の外観が崩れた場合は出荷を停止できる。いずれの場合でも生産ラインの洗浄は必要であるが、消費者対応で生産者を悩ませる原因物質は PghP だったのである。

最近、東北大学の研究グループが公開した納豆菌バクテリオファージ (ϕ NIT1) のゲノム塩基配列 (NCBI accession number AP013029) によれば、*pghP* 遺伝子はいわゆるジャンク領域 (コートタンパク質遺伝子などファージ粒子複製に直接関わる遺伝子をコードする保存性の高い領域以外の領域) にあり、周辺のいくつかの機能未知遺伝子とオペロンを構成している。機能未知遺伝子が新規感染関連遺伝子である可能性があり、現在、研究課題の一つとして実体解明に取り組んでいる。

おわりに

納豆の市場規模はおおよそ 2,000 億円である。生産、消費ともにほぼ国内に限られる。国内消費量はこの数年横ばい状態であるが、納豆パテや納豆スナック、黒大豆納豆、揚げ納豆 (揚げ納豆は JAL 国際線の機内食として使われたことがある)、粘らない納豆など新商品開発努力は続けられている。また、海外展開を求めて 2015 年 1 月には国際食品見本市 (開催地リヨン) に初めて納豆が出品された。手軽で安価な大豆摂取法として納豆への理解が世界に広まることに期待したい。

文 献

- 1) 木内幹、永井利郎、木村啓太郎. 納豆の科学. 東京: 建帛社. 2008.
- 2) Nishito Y, Osana Y, Hachiya T, et al. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. BMC Genomics. 2010 ; 11 : 243.
- 3) Kamada M, Hase S, Sato K, et al. Whole Genome Complete Resequencing of *Bacillus subtilis* Natto by Combining Long Reads with High-Quality Short Reads. PLoS ONE. 2014 ; 9 : e109999.
- 4) Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. 1997 ; 390 : 249-256.
- 5) Kubo Y, Rooney AP, Tsukakoshi Y, et al. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. Appl. Environ. Microbiol. 2011 ; 77 : 6463-6469.
- 6) Kimura K, Tran L-SP, Funane K. Loss of poly- γ -glutamic Acid Synthesis of *Bacillus subtilis* (natto) Due to IS4Bsu1 Translocation to *swrA* Gene. Food Sci. Technol. Res. 2011 ; 17 : 447-451.
- 7) Makino S, Uchida I, Terakado N, et al. Molecular charac-

- terization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 1989 ; **171** : 722-730.
- 8) Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. Mol. Microbiol. 2006 ; **60** : 1091-1098.
 - 9) Kimura K, Tran LS, Uchida I, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. Microbiology. 2004 ; **150** : 4115-4123.
 - 10) Ashiuchi M, Soda K, Misono H. 1999. A poly-gamma-glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336 : gene cloning and biochemical analysis of poly-gamma-glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999 ; **263** : 6-12.
 - 11) Kimura K, Tran L-SP, Do T-H, et al. Expression of the *pgsB* encoding the poly-gamma-DL-glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*(natto). Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009 ; **73** : 1149-1155.
 - 12) Tran LS, Nagai T, Itoh Y. Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2000 ; **37** : 1159-1171.
 - 13) Stanley NR, Lazazzera BA. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. Mol. Microbiol. 2005 ; **57** : 1143-1158.
 - 14) Do T-H, Suzuki Y, Abe N, et al. Mutations Suppressing the Loss of DegQ Function in *Bacillus subtilis*(natto) Poly- γ -Glutamate Synthesis. Appl. Environ. Microbiol. 2011 ; **77** : 8249-8258.
 - 15) Nagai T, Tran LS, Inatsu Y, et al. A new IS4 family insertion sequence, IS4*Bsu1*, responsible for genetic instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 2000 ; **182** : 2387-2392.
 - 16) Ohsawa T, Tsukahara K, Ogura M. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in gamma-poly-glutamic acid synthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009 ; **73** : 2096-2102.
 - 17) Tortosa P, Dubnau D. Competence for transformation: a matter of taste. Curr. Opin. Microbiol. 1999 ; **2** : 588-592.
 - 18) Msadek T, Kunst F, Henner D, et al. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis* : expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. J. Bacteriol. 1990 ; **172** : 824-834.
 - 19) Kobayashi K. 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 2007 ; **66** : 395-409.
 - 20) Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, et al. Poly- γ -glutamic acid : production, properties and applications. Microbiology. 2015 ; **161** : 1-17.
 - 21) Cairns LS, Marlow VL, Bissett E, et al. A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis* : Flagella-mediated signal transduction. Mol. Microbiol. 2013 ; **90** : 6-21.
 - 22) Chan JM, Guttentplan SB, Kearns DB. Defects in the Flagellar Motor Increase Synthesis of Poly- γ -Glutamate in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 2014 ; **196** : 740-753.
 - 23) Kimura E. Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in coryneform bacteria. J. Biosci. Bioeng. 2002 ; **94** : 545-551.
 - 24) Beckett D. Biotin sensing : universal influence of biotin status on transcription. Annu. Rev. Genet. 2007 ; **41** : 443-464.
 - 25) Ogura M, Tsukahara K. SwrA regulates assembly of *Bacillus subtilis* DegU via its interaction with N-terminal domain of DegU. J. Biochem. (Tokyo) 2012 ; **151** : 643-655.
 - 26) Inatsu Y, Kimura K, Itoh Y. Characterization *Bacillus subtilis* Strains Isolation form Fermented Soybean Food in Southeast Asia : Comparison with *B. subtilis*(natto) Starter Strains. JARQ. 2002 ; **36** : 169-175.
 - 27) Kimura K, Inatsu Y, Itoh Y. Frequency of the Insertion Sequence IS4*Bsu1* among *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Fermented Soybean Foods in Southeast Asia. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002 ; **66** : 1994-1996.
 - 28) Kimura K, Itoh Y. Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly- γ -glutamate. Appl. Environ. Microbiol. 2003 ; **69** : 2491-2497.
 - 29) Kimura K, Fujimoto Z. Enzymatic degradation of poly-gamma-glutamic acid, p. 95-117. In Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature. 2010. Springer, Berlin Heidelberg.
 - 30) Fujimoto Z, Kimura K. Crystal structure of bacteriophage ϕ NIT1 zinc peptidase PghP that hydrolyzes γ -glutamyl linkage of bacterial poly- γ -glutamate. Proteins. 2012 ; **80** : 722-732.
 - 31) Candela T, Mock M, Fouet A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. J. Bacteriol. 2005 ; **187** : 7765-7772.