

納豆菌ファージに感染耐性を有する納豆菌の開発に関する研究

久保 雄司* 中川 力夫*

1. はじめに

納豆菌ファージ（以降、ファージと記載）は、納豆菌に感染するウイルスである。

人間には無害であるが、納豆菌に感染すると、宿主である納豆菌内で増えた後、溶菌して外に出るため、納豆菌を死滅させてしまう（図1）。

更に、納豆の粘り成分であるガンマ-ポリグルタミン酸(γ -PGA)を分解する酵素を生産する¹⁾。その為、製品にファージが混入すると納豆の糸引きがなくなり、クレームの原因になる。

汚染度合いが重度の場合、問題解決まで生産ラインを止めて清掃を行う等の対応が必要になるため、メーカーにとっては重大な問題となっている。

ファージに関する相談は茨城県工業技術センターにも毎年寄せられており、抜本的解決が望まれる課題であった。

そこで、当センターでこれまでに行ってきた納豆菌研究やファージ汚染に対する相談対応で培った知見・技術を活かし、課題解決に向けた取り組みを行うことにした。

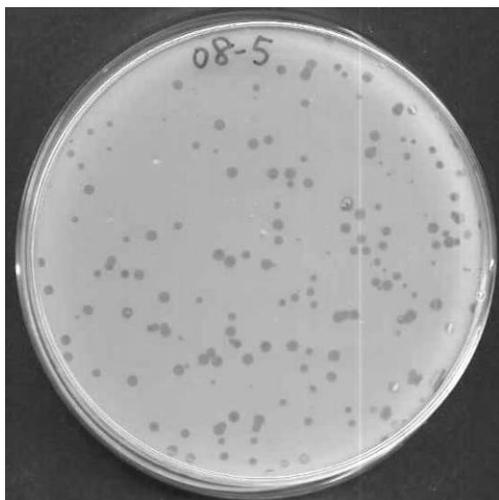


図1 納豆菌ファージが感染した納豆菌のプレート（乳白色に見える部分が納豆菌の生えている箇所、点状に抜けている部分が、ファージが感染し納豆菌が死滅した箇所。）

2. 目的

本研究では、ファージに感染耐性のある納豆菌を開発することを目的に研究を進めている。

メーカーで感染が起こった場合でも、使用する菌を一時的に感染耐性菌に変えることで、生産を続けながら納豆菌ファージ汚染箇所を特定し、清掃や除菌により事態の収束を図ることが可能になると期待される。

しかしながら、ファージと一口に言っても、茨城県内の生産現場で見つかるファージ全てが同じものと言

えるかは分からないのが現状である。

もし全て同じファージであれば、どれか一つに感染耐性を有する納豆菌株を開発すれば良く、逆に全て異なるのであれば、全てのファージに感染耐性がある納豆菌株の開発が必要になる。

そこで、今年度は、実際の製造現場にいるファージを集め、それらが同一のものか、或いは、異なるものなのか調査を行った。

3. 研究内容

3.1 生産現場からのファージ収集試験

県内の納豆メーカーを訪問し、工場内でファージ汚染が疑われる箇所を拭き取り検査用のスワブで拭き取り、ファージ汚染の有無を確認すると同時にファージの収集を行った。

工場の拭き取り以外に、干し納豆を中心に納豆加工品も数点収集し、ファージ汚染の確認と収集を並行して行った。

指示菌として用いた宮城野菌は、試験前日より LB 培地中で振盪培養しておいた。

工場内の拭き取りを行ったスワブを、1ml の SM バッファ中で洗い出した。

200 μ l の宮城野菌の培養液と、同量のスワブを洗い出した SM バッファを 0.7%LB 寒天に添加し、ボルテックスミキサーで良く混和した後、全量を LB 寒天培地に重層した。

37°Cで一晩インキュベートし、プラークの有無を確認した。

プラークが生じた場合、滅菌チューブに 0.7%寒天部分を回収し、少量のクロロホルムと SM バッファを添加した。

振盪してファージを抽出した後、遠心分離で寒天を除き、ファージを含む上清を回収した。

尚、本研究では、(独)農研機構 食品総合研究所 発酵細菌ユニットよりご提供いただいた NIT1 を試験の対照ファージとして用いた。

3.2 ファージのDNA精製

ファージの違いの確認は表現型からも行うが、分子生物学的手法を用いた実験も行う為、実験に必要な DNA の精製を行った。

300ml バッフルフラスコに入れた 50ml LB broth に宮城野菌培養液と 3.1 で抽出したファージ液を 100 μ l 添加し 37°C, 150rpm でインキュベートした。

1 時間ごとに吸光度(600nm)を測定し、吸光度が一度上昇後、下降してくるまで振盪培養を行い十分にファージの数を増やしてから DNA 精製に取りかかった。

振盪培養液にクロロホルムを添加して残った納豆菌を死滅させた後、増えたファージをポリエチレングリ

*地場食品部門

コールで沈殿させて回収した。

DNase I と RNaseA 処理を行い不必要な DNA や RNA を分解してから、0.5M EDTA (PH8.1), 10% SDS, proteinaseK を添加し 1 時間振盪してファージの DNA を溶出させた。フェノールクロロホルム抽出とクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿を行い、ファージ DNA を得た。

3.3 ファージのグルーピング

3.3.1 収集ファージのセンター保有納豆菌への感染試験

当センターでは過去の研究により、全国の藁から収集した納豆菌株と、それらの菌を元に遺伝子の一部を変異させた株を併せて数十株保有している²⁾。

それらに収集したファージを意図的に感染させ、感染する株に違いがあるのか検証した。ファージ間で感染する株に違いがあれば、お互いに異なると言える。

感染試験には、センター保有株の中から、由来や状態が異なる株である Ibaraki C-1, Ibaraki P-1, S1, No. 8 を選択して感染試験に用いた。

IBARAKI P-1 と S-1 の 2 株は藁から採取した納豆菌、IBARAKI C-1 は IBARAKI P-1 に変異処理を施し、幾つかの物質生産量が向上した納豆菌³⁾、No. 8 は納豆菌と同一種 (*Bacillus subtilis*) であるが納豆は作れない株である。

また、納豆メーカーで最も使用件数の多い宮城野菌を比較対照として用いた。

指示菌は実験前日より LB 培地中で振盪培養しておいた。

3ml の 0.7%LB 寒天に 200pfu 相当量(200 個のプラークを作る液量の意味。)のファージと、指示菌の培養液を 100 μ l 添加した。ボルテックスミキサーで良く混和した後、全量を LB 寒天培地に重層した。37°C でインキュベートし、21~22 時間後のプラークの有無を確認し、感染するか否かを判定した。

また、NIT1 に対してのみ、上記以外にセンターで収集し保管している全 70 株に対して感染試験を実施した。

3.3.2 DNA の制限酵素消化パターンの比較⁴⁾

3.2 で精製した DNA を滅菌水で 10 倍希釈した。4 μ l の希釈した DNA, 1 μ l の HindIII, 2 μ l の 10 \times M バッファ及び滅菌水を 13 μ l 混和し、トータルボリューム 20 μ l の反応溶液を調製した。

反応溶液を 37°C で 1 時間インキュベートした後、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲル濃度を 1%とし、5 μ l の消化 DNA と 1 μ l の 6 \times dye をゲルにマウントし 100V, 約 35 分泳動した。

泳動終了後、エチジウムブロマイドによる染色と脱染を行い UV で検出した。

泳動結果のフラグメントパターン比較から、グルーピングを試みた。

3.3.3 サザンブロット

NIT1 の γ -PGA を切断する酵素 (PghP)⁵⁾ をコードした遺伝子をプローブにして、収集したファージと NIT1 の合計 18 株のファージ DNA に対するサザンブロットを行った。

これにより、納豆の粘性物質分解に関わる酵素の有無及び、NIT1 との類似性を確認することを期待した。

まず、プローブを作成すべく、NIT1 の PghP 領域について PCR を実施した。PCR 後、アガロースゲル電気泳動で生成物の確認とゲルの切り出しを行い、MACHEREY-NAGEL Nucleo Spin Extract II を使用してプローブとなる PCR 産物を精製した。

次に、バキューマーにブロット用シートをセットし、その上にメンブレン (Hybond-N+, Amersham Biosciences 社) と 3.3.2 で電気泳動したゲルをセットした。

表面が乾かないよう 0.5M NaOH, 1.5M NaCl 混合溶液を滴下しつつ 2 時間減圧を続け、変性 DNA をメンブレンに移し込んだ。

2 時間後減圧を停止し、10 分間 20 \times SSC でメンブレンを振盪・リンスした後、UV クロスリンカーで処理し、サザンブロット用のメンブレンを準備した。

プローブのラベリングとハイブリダイゼーションは Amersham Biosciences 社 Gene Images Random Prime II を使用し、操作は添付の説明書に従って実施した。

検出は、Amersham Gene Images CDP-star Detection Kit を使用した。

4. 研究結果と考察

4.1 生産現場からのファージ収集試験

茨城県内の 8 社の工場ですり取り試験を行った。

トータル 173 箇所ですり取りを行った結果、4 社、28 箇所からファージが検出された。

また、干し納豆関連の製品 6 品を調べたところ、全てからファージが検出された。

経験的に知られていたことであるが、製品の性格上干し納豆にはファージが感染しやすいこともあり、干し納豆や関連製品を製造している工場からは納豆菌ファージが多く検出された。

納豆製造工場内でも、比較的乾燥状態にありながら、普段清掃が行き届かない所でファージが検出される傾向が見られた。

今後の試験は、収集した 17 のファージに加え、対照となる NIT1 の計 18 のファージで試験を行った。

4.2 ファージの DNA 精製

前述のプロトコルのおり DNA を精製し、実験サンプルとして用いた。

4.3 ファージのグルーピング

4.3.1 収集ファージのセンター保有納豆菌への感染試験

試験を行った結果を表 1 にまとめた。

全 18 のファージは、今回実験を行った 4 株の納豆菌 (IBARAKI P-1, S1, IBARAKI C-1, 宮城野菌) 全て

に感染することが確認された。

また、センターで保有している 70 株に対する NIT1 感染試験の結果も同様で、一株として感染耐性を有する株はなかった。

この結果から、何らかの形で手を加え、感染抵抗性を獲得させる必要があることが分かった。

一方、No. 8 は納豆菌と同じ *B. subtilis* に属する菌株であることを、16S rRNA の解析から確認している(データ未掲載)が、同時に、この菌株で納豆を製造しても納豆にはならないことも確認している。

同じ *Bacillus subtilis* でも納豆製造能が無い No. 8 には、どの納豆菌ファージも感染しないことは興味深い。

つまり、納豆菌ファージは、納豆菌と *Bacillus* 近縁種で細胞構造の異なる部位を認識して感染すると考えられる。

今後の指針として、目的とするファージ感染耐性株を開発するには、ファージが感染の際に認識している部位の形成に関与する遺伝子領域を変異させれば良いことが示唆された。

表 1 センター保有株に対するファージ感染試験結果

ファージ	指示菌					
	<i>B. subtilis</i> (natto)				<i>B. subtilis</i>	
	No.	IBARAKI P-1	S1	IBARAKI C-1		宮城野菌
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	+	-

※表中“+”は、指示菌がファージに感染したことを示し、“-”は感染しなかったことを示します。

4.3.2 DNA の制限酵素消化パターンの比較

ファージの DNA を HindIII で消化し、電気泳動した結果を図 2 に示す。

レーン 1, 2 及びレーン 6, 7, 10, 11 及びレーン 13 ~ 18 はそれぞれ同じ製品(ロット違い)又は同じ工場から収集したファージである。

レーン 3, 4, 5, 8, 9 はそれぞれ独立の工場や製品

から検出されたファージである。

また、レーン 12 が対照ファージとして用いたファージ NIT1 である。

レーン 9 は DNA の純度が低かったのか、スター活性が出てしまったのか断言は出来ないが、バンドパターンが不鮮明であった。その為、他のレーンについて結果の確認と考察を行った。

バンドパターンを比較すると、同じ製品(ロット違い)及び同じ工場から採取されたファージは、かなり似た泳動パターンを示していることが分かった。

尚、別の制限酵素(EcoRV)で消化したパターンの比較も行ったが、同じ傾向を示した(データ非公開)。

しかし、図 2 ではレーン 1, 2 に対して他のレーンのサンプルは異なるパターンを示していることが確認できることから、収集したファージは、同じ製造所内で収集する限り、かなり系統的に近い関係にある一方で、他の製造所から採取すると系統的に異なった遺伝子情報を持っていることが示唆された。

全てのファージが同一でないことが確認された為、今後、何れかのファージに感染耐性のある納豆菌が出来た場合、タイプの異なるファージで感染抵抗性を確認する必要がある。

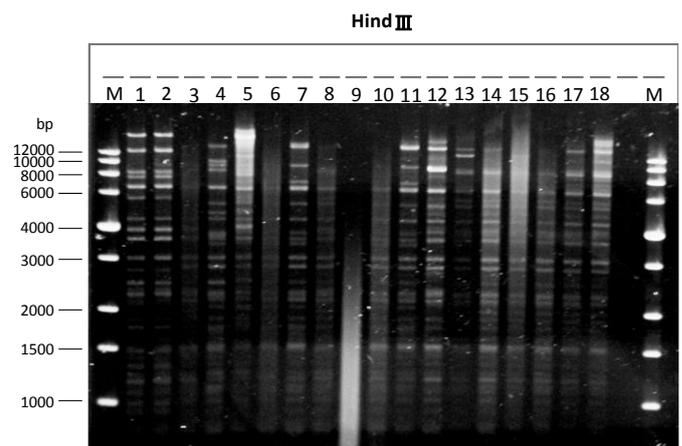


図 2 ファージ DNA の制限酵素消化パターンの比較 (M はマーカー、レーン 1~18 がファージ DNA)

4.3.3 サザンブロット

3.3.2 で泳動したゲルをメンブレンに転写し、PghP をプローブにして、サザンブロットを行った結果を図 3 に示した。

図 3 ではレーン 6, 8, 9, 10 でははっきりとしたバンドが確認できなかった。

しかしながら、4.3.2 と同様、EcoRV で消化・泳動したゲルを用いてサザンブロットを行った結果を見るとバンドの位置はレーン 1, 2 が他の 16 サンプルと異なるものの、全 18 サンプルでバンド自体は明瞭に確認でき(データ非公開)、何れのファージも PghP を持っていることが確認された。

更に、今回プローブとなる PghP のテンプレート DNA は NIT1 のものを用いたが、他の 17 株、全てのファージ

ジでバンドが確認されたことから、PghPをコードする遺伝子配列の保存性が高いことが示唆された。

図3の結果を見ると、レーン4は他と異なる位置にバンドが確認できる他、レーン5と18は同じバンドパターンを示していることが確認できる。

収集した場所が異なるサンプル間で、サザンブロットのバンドパターンや位置が異なる結果が得られたことは、製造所が異なると得られるファージの遺伝子的系統が異なる4.3.2の結果を裏付けるものである。

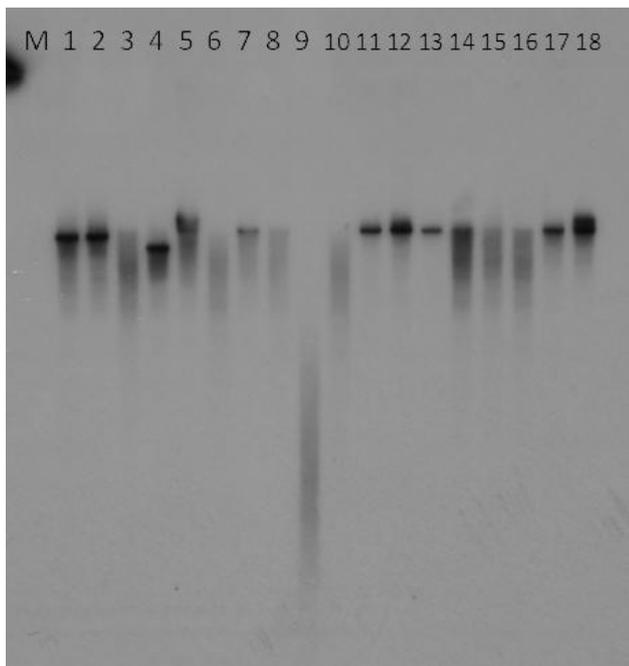


図3. HindIII消化ファージDNAのPghPIによるサザンブロットの結果
(レーン毎のサンプルの並びは図2と同じ)

5. まとめ

1. 茨城県内の納豆工場の拭き取りと、メーカーが製造した納豆関連製品から納豆菌ファージを収集した。
8社、173箇所での拭き取りを行った結果、4社、28箇所からファージが検出された。
また、干し納豆関連の製品6品を調べたところ、全てからファージが検出された。
2. 保有している納豆菌株や同種の株に対するファージの感染試験を行った。
保有している納豆菌にファージ感染耐性を示す株はなく、人為的な方法で感染抵抗性を獲得させる必要があることが明らかになった。
3. ファージDNAの制限酵素消化パターンやサザンブロットから系統解析を行った。
同一製造現場で存在するファージは、お互いにかかなり近い遺伝子情報を持ち、製造現場毎に系統が異なる遺伝子情報を持つ傾向があることが示唆さ

れた。

また、納豆の生産現場に生息するファージは何れも γ -PGA分解酵素を生産することも確認した。

6. 今後の課題

目的とするファージ感染耐性株を開発するには、ファージが感染の際に認識している領域をコードした遺伝子領域を変異させれば良いと考えられる。

幾つかの変異処理法を試すなどして、感染耐性を有する納豆菌を開発すると共に、感染メカニズムの解明を目指し、認識部位の特定を進めていく。

7. 謝辞

研究推進に御協力頂きました(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 発酵細菌ユニットの舟根和美様、並びに、木村啓太郎様に感謝いたします。

8. 参考文献

- 1) 藤井久雄, 沖邦子, 牧原ミヨ子, 芥野諄子, 武谷立子, 納豆菌による粘質物の生成に関する研究(第7報), 日本農芸化学会誌, 41, 39-43(1967)
- 2) 久保 雄司, 中川 力夫, 長谷川 裕正, 有色素大豆加工に適した納豆菌に関する試験研究, 茨城県工業技術センター研究報告, 40, 21-24 (2011)
- 3) Kubo Y, Inaoka T, Hachiya T, Miyake M, Hase S, Nakagawa R, Hasegawa H, Funane K, Sakakibara Y, Kimura K., Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J. Biosci. Bioeng.* doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.012. [Epub ahead of print] (2013).
- 4) Nagai T, Yamasaki F., *Bacillus subtilis* (natto) Bacteriophages Isolated in Japan. *Food Sci. Technol. Res.*, 15, 293-298(2009)
- 5) 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.*, 69, 2491-2497(2003)