

納豆菌ファージに感染耐性を有する納豆菌及び チロシン結晶の析出低減化納豆菌に関する研究

久保 雄司* 中川 力夫*

1. はじめに

茨城県は、納豆の産地として全国的に有名であり、水戸市の平成25年の1世帯あたりの納豆購入額が全国で1位となるなど消費も盛んである。このように、茨城県民には馴染み深い納豆であるが、製造現場においては以前より指摘されてきた問題がいくつかある。

一つ目は納豆菌ファージ（以降、ファージと記載）の問題である。ファージは、人間には無害だが納豆菌に感染し、納豆菌を死滅させてしまう。更に、ファージが生産する酵素により納豆の粘り成分であるガンマポリグルタミン酸(γ -PGA)が分解されて糸引きがなくなり¹⁾、クレームの原因になる等、メーカーにとっては重大な問題となっている。

もう一つ、チロシンが析出する²⁾という問題がある。日配品である納豆の賞味期限は製造から10日程度が一般的だが、日が経つに連れ、納豆の表面に白い粒が生じてくることがある。チロシンが主成分の固体であるため食べて害は無いが、生じる前に比べて著しく食味が劣化する。チロシンの結晶が生じることなく熟成が進めば、賞味期限の延長が可能になるだけでなく、納豆の旨みそのものが向上することが期待できる。

上記2点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。

2. 目的

本研究では製品の製造ラインに万が一ファージが混入しても大事に至らず製品製造が続けられるよう、ファージに対し感染耐性がある納豆菌を開発することを目的とした。納豆菌とは、*B. subtilis*の中で納豆を製造できる特徴を持った菌株を指す。一方、分類学上同じ種に属し、ファージに感染しない株も存在する。そこで効率は高くないが、納豆菌のコンピテンス³⁾を利用して、感染しない株のファージ感染に関与する遺伝子領域を取り込ませ、耐性を付与することを計画した。

納豆菌はアルカリプロテアーゼ(AprE)を始めとして、複数のプロテアーゼを生産する⁴⁾。チロシンの結晶は、納豆菌が持つプロテアーゼにより、大豆のタンパク質が分解されて生じてくると予想された。納豆製造にはプロテアーゼの働きが必須であるが、必要以上の働きを抑えることが出来ればチロシンの析出を抑制し、日持ちのする納豆が製造可能だと考えた。

以上の知見や予測を基に、納豆菌ファージに感染耐性を有する納豆菌及びチロシン結晶の析出が低減する納豆菌の開発に取り組むこととした。

本年度は、納豆菌ファージの課題に関しては、耐性菌株の開発に取り組み、チロシンの課題については、納豆菌の持つプロテアーゼがチロシン析出に与える影

響の検証に取り組んだ。

3. 研究内容

3.1 ファージ感染耐性納豆菌株の開発について

3.1.1 ファージ感染耐性菌株の開発

当センターで保有する*B. subtilis*の中で、LBプレート上におけるコロニー形状が納豆菌と似ていながらファージには感染しない株(No.8と呼称)及びM220株(食品総合研究所提供)のG DNAを形質転換に利用した。納豆菌株を試験管に分注した2 mlのSP II 培地に植え、37°C、150回/分で振盪しながら一晩前培養した。翌日新たなSP II 培地に植え継いだ。600 nmの吸光度が0.6程度になったところで、培養液をエッペンチューブに回収した。2,800 \times g、20°Cで10分間遠心分離し、菌体を含む液を200 μ l程度残して上清を廃棄した。あらかじめ精製しておいたG DNAを1 μ g添加し、滅菌試験管に移した。37°C、150回/分で30分間振盪培養した。500 μ lのLB液体培地を添加し更に2時間振盪培養を行った。NIT1ファージ¹⁾を50 μ l (20 pfu/ μ l)添加し、更に1時間振盪培養を行った。培養後、LB寒天培地に100 μ lずつ培養液を塗布し、37°Cで一晩培養した。

翌日、溶菌が起こらず菌の増殖が確認できた箇所を釣菌し、試験管に注いだ2 mlのLB 液体培地に植菌した。ここに、NIT1ファージ¹⁾を5 μ l (20 pfu/ μ l)添加し、37°C、150回/分で一晩振盪培養した。菌の増殖が見られた株を耐性株の候補株として単離した。

3.1.2 ファージ感染耐性候補株のファージ感染試験

3.1.1で単離した株とファージ(NIT1¹⁾及び本研究で茨城県内メーカーが販売する干し納豆製品より収集したファージを、滅菌後 55°C 程度まで温度を下げた0.7% LB 寒天 3 ml に添加した。ボルテックスミキサーで混合し、素早く LB 寒天培地に重層した。37°Cで一晩培養し、ファージの感染によりプラークが出来るか否か評価を行った。

3.1.3 ファージ感染耐性株の納豆試作試験

ファージ感染耐性株を用いて、納豆の試作試験を行った。使用する菌株は、シェファー寒天培地で培養することであらかじめ孢子化した。大豆は北海道産ズマルを用いた。大豆を20°Cで16時間浸漬し、0.18 MPaで30分蒸煮した。蒸煮後、蒸煮大豆1gに対して孢子数が 10^4 個になるよう納豆菌胞子液を添加した。約50gずつポリスチレンパック(PSP)に盛り込み、39°C、90%RHで18時間、その後20°C、50%RHで2時間発酵させた。5°Cで1日熟成し、納豆の糸引きや香り外観をチェックした。

*地場食品部門

3.2 チロシン析出低減化納豆菌株の開発について

3.2.1 AprE 破壊納豆菌株の作成 (過程)

3.2.1.1 aprE の PCR による増幅と精製

NAFM5¹)を培養し、G DNA を精製した。aprE の増幅には表 1 のプライマー及び、KOD-Plus (TOYOBO) を用いた。PCR の条件は、95°C で 5 分熱変性後、95°C、30 秒、50°C、30 秒、68°C、4 分のセットを 30 サイクル行った。反応終了後、1%アガロースゲル電気泳動により結果を確認すると共にゲルを切り出し、Nucleo Spin Extract II (MACHEREY-NAGEL)を用いて PCR 産物を精製した。

表 1 aprE の PCR に用いたプライマー

プライマー名	プライマーの塩基配列
aprE - 434 Fw	5'-CTTATTTCTTCCTCCCTCTCAATA-3'
aprE + 1645 Rv	5'-ATTATGGGCCACGAAATGGGCCA-3'

3.2.1.2 増幅した aprE の pBlueScript II へのライゲーション、コンピテントセルへの導入及びプラスミドの精製

Sma I 処理した pBlueScript II (50ng)と PCR 産物をモル比で 1:4 程度になるよう混合し、トータルを 10 µl に調整した。そこに、2×Ligation convenience kit(ニッポンジーン)を 10 µl 添加し、16°C で 1 時間インキュベートしてライゲーションを行った。Escherichia coli DH 5α(RecA(-))を 150 µl に、ライゲーション反応液を 10 µl ずつ添加し混合した。氷上で 10 分間保った後、37°C で予温しておいた SOC 培地に上記 160 µl の反応液を添加して 37°C で 1 時間振盪しながらインキュベートした。LB 寒天培地(1 µmol/ml のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG), 40 ng/ml の 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(X-GAL), 及び 100 µg/ml のアンピシリンを添加)にインキュベートした SOC 培地を 200 µl ずつ塗布し 37°C で一晩インキュベートした。ホワイトコロニーを選択して LB 液体培地(100 µg/ml のアンピシリン添加)に植菌し 37°C で振盪培養した。翌日、FlexiPrep Kit(Amersham Biosciences)を用いてプラスミドを精製した。

3.2.1.3 カナマイシン耐性(Km^R)カセットの精製

5 µl の pDG780, 2 µl の 10×L バッファー, 1 µl の Sma I 及び 12 µl の滅菌水を混合し、30°C で 1 時間インキュベートした。その後、1.1 µl の 10×H バッファー及び 1 µl の Hinc II を添加し 37°C で 1 時間インキュベートした。反応終了後、1%アガロース電気泳動に供し結果を確認すると共に、カナマイシン耐性(Km^R)カセットを切り出し、Nucleo Spin Extract II (MACHEREY-NAGEL)を用いて精製した後、濃度を測定した。

3.2.1.4 aprE : Km^R を持つプラスミドの構築

FlexiPrep Kit(Amersham Biosciences)を用いて 3.2.1.2 で培養した菌からプラスミドを精製した。5 µl の精製

したプラスミド, 1 µl の Mro I, 2 µl の 10×L バッファー及び 12 µl の滅菌水を混合し、37°C で 1 時間インキュベートしてプラスミドを消化した。熱処理とエタノール沈殿により精製した後、KOD で処理して消化末端の 5'突出部分のギャップを埋め、平滑末端化した。平滑末端化したプラスミド消化物と Km^R カセットがモル比で 1:4 程度になるよう混合し、トータルを 10 µl に調整した。そこに、2×Ligation convenience kit(ニッポンジーン)を 10 µl 添加し、16°C で 1 時間インキュベートしてライゲーションを行った。150 µl の E. coli DH 5α(RecA(-))に、ライゲーション反応液を 10 µl 添加し混合した。氷上で 10 分間保った後、37°C で予温しておいた SOC 培地に上記の反応液を添加して 37°C で 1 時間振盪しながらインキュベートした。LB 寒天培地(30 µg/ml のカナマイシンを添加)にインキュベートした SOC 培地を 200 µl ずつ塗布し 37°C で一晩インキュベートした。翌日生育したコロニーから FlexiPrep Kit(Amersham Biosciences)を用いてプラスミドの精製を行った。精製後、5 µl のプラスミド, 2 µl の 10×TOYOBO TA バッファー, 2 µl の 0.1% BSA, 1 µl の Ahd I 及び 10 µl の滅菌水を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。65°C で 20 分処理した後、エタノール沈殿を行い消化したプラスミドを精製した。結果は 1%アガロースゲルを用いた電気泳動で確認した。

4. 研究結果と考察

4.1 ファージ感染耐性納豆菌株の開発について

4.1.1 ファージ感染耐性菌株の開発

ファージ耐性を獲得させる元株として、当センター保有の納豆菌株 No.19, No.40 及び IBARAKI-C1 を使用した。ファージ耐性候補株として合計 50 株の菌株を釣菌した。ファージ感染に使用した菌株菌株, G.DNA の採取元となる株及びファージ耐性候補株として採取した菌株数を表 2 に示した。

表 2 ファージ耐性候補株の元株と使用 G. DNA の組み合わせ

試験 No.	ファージ感染に使用した菌株	G.DNA の採取元となる株	ファージ耐性候補株として採取した菌株数
1	No.19	No.8	12
2	No.19	M220	7
3	No.40	No.8	12
4	No.40	M220	10
5	IBARAKI-C1	No.8	5
6	IBARAKI-C1	M220	4

4.1.2 ファージ感染耐性候補株のファージ感染試験

4.1.1 で得たファージ耐性候補株について、改めてファージに感染試験を実施したところ、表 2 に記載の試験の中で、試験 No.1 (No.19(菌株)- No.8(GDNA))の候補株から 1 株と試験 No.5 (IBARAKI-C1(菌株)- No.8(GDNA))の候補株から 4 株の合計 5 株について、プレー

ト上で菌の溶原化によるプラークが出来ず、ファージ感染耐性を持つことが確認された(図1)。

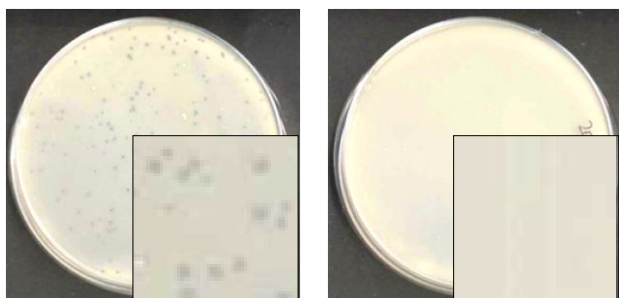


図1 従来の納豆菌(左)とファージ感染耐性菌(右)のファージ感染試験
左のシャーレのみファージによる溶菌(プラーク)が見られた。

4.1.3 ファージ感染耐性株の納豆試作試験

4.1.2で得られた5株で納豆を試作したところ、全ての納豆菌株において、糸引きや香り外観に関して問題なく納豆を製造することが可能だった。特にこの内の1株で製造した納豆の糸引きは他よりも強い印象だった。試作品の評価及び分析については、今後の課題である。

また、安全性を担保する意味から、菌株のどこに変異が入ったのか明らかにすることも、今後取り組むべき重要な課題である。

4.2 チロシン析出低減化納豆菌株の開発について

4.2.1 AprE破壊納豆菌株の作成(過程)

4.2.1.1 aprEのPCRによる増幅と精製

PCRによるaprEの増幅後、アガロースゲル電気泳動を実施した結果を図2に示した。2,100bp付近に産物のバンドが確認され、増幅反応が進行したことが確認された。

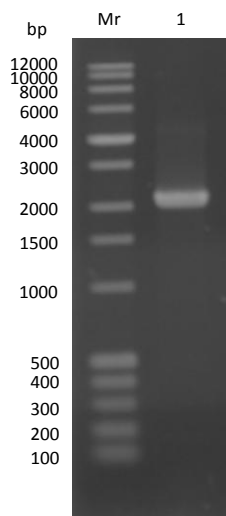


図2 aprEのPCR実施後のアガロース電気泳動結果
Mr, マーカー; 1, aprE増幅産物

4.2.1.2 増幅したaprEのpBlueScript IIへのライゲーション, コンピテントセルへの導入及びプラスミドの精製

pBluescript IIにaprEをライゲーションしたベクターをE. coli DH 5α(RecA(-))に導入したところ、形質転換体が得られたため、プラスミドを精製した。精製したプラスミドをBamH Iで消化し、アガロースゲル電気泳動に供して、目的のプラスミドが得られているか確認した(図3)。pBluescript IIは約3 kbpで増幅したaprEは約2 kbpであり、5 kbp付近にバンドが確認できたことから、ライゲーション反応が上手く行ったことが確認できた。

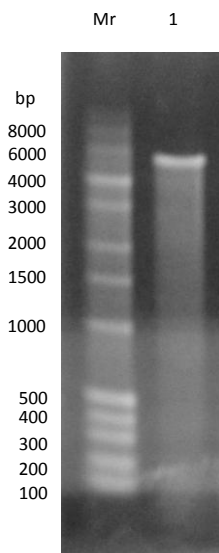


図3 pBluescriptにaprEをライゲーションした産物のアガロース電気泳動結果

Mr, マーカー; 1, pBluescriptにaprEをライゲーションした産物(BamH I消化)

4.2.1.3 カナマイシン耐性(Km^R)カセットの精製

pDG780を制限酵素消化した後、アガロースゲル電気泳動で確認した(図4)。Km^Rカセットは約1,500bpであり、制限酵素による反応が上手く行き、目的の産物が得られていることが確認できた(図4の矢印)。

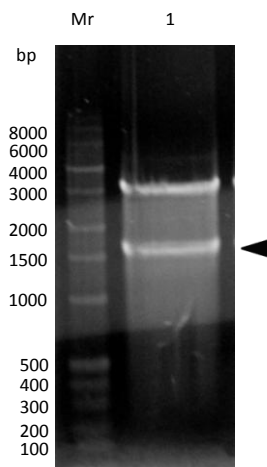


図4 pDG780をSma I及びHinc II消化した産物のアガロース電気泳動結果

Mr, マーカー; 1, pDG780をSma I及びHinc II消化した産物
矢印で示したバンドが目的のKm^Rカセット

4.2.1.4 *aprE*:*Km^R*を持つプラスミドの構築

精製したプラスミドを*Ahd I*処理し、電気泳動した結果を図5に示した。反応が想定したとおりに進めば、6.6 kbp付近にバンドが確認できるはずであるが、3.4 kbp付近に主要なバンドがあるのみで、目的とする反応産物は生成していないことが明らかになった。全く想定していない大きさであるため、どういう配列の産物であるか想定できないが、反応が上手く行かなかった理由として、3.2.1.4で実施したKODによるインサート末端の平滑化が進行しなかった可能性が疑われた。

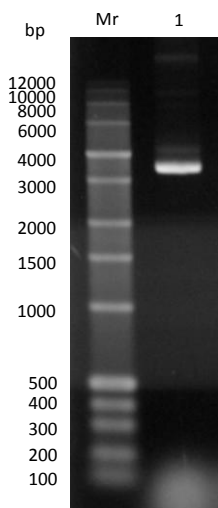


図5 精製したプラスミドの泳動結果
Mr, マーカー; 1, 作成したプラスミド(*aprE*:*Km^R*配列を持っていることを期待した。)

5. まとめ

5.1 ファージ感染耐性納豆菌株の開発について

- (1)納豆菌の持つコンピテンスを利用し、納豆菌と同種で、納豆製造能はないがファージ耐性を持つ菌株のG. DNAを取り込ませることで、ファージ耐性納豆菌株の開発を行った。
- (2)プレート上で確認した限りにおいてファージの感染が起こらない株を5株育種し、全ての株で納豆の製造が可能であることを確認した。

5.2 チロシン析出低減化納豆菌株の開発について

- (1)プロテアーゼがチロシンの蓄積と析出に与える影響を検証すべく、納豆菌の*aprE*破壊株作成に取り組んだ。
- (2)*aprE*を*Km^R*マーカーで破壊し、pBluescript IIに組み込みベクターを構築することを試みた。しかし、ライゲーションが上手く行かず、本年度中の完了には至らなかった。

6. 今後の課題

6.1 ファージ感染耐性納豆菌株の開発について

今回育種した5株のファージ耐性納豆菌株は、当初の予想通りであれば、ファージの感染に関与する遺伝子が、性質の変換に利用したG. DNAと入れ替わった可能

性が高い。しかし、それがどの領域か分かっておらず、また、場合によっては予想とは違った機構でファージ耐性を獲得した可能性がある。今後、遺伝子の変異箇所の解析を進め、ファージ耐性を獲得した要因を明らかにする。

6.2 チロシン析出低減化納豆菌株の開発について

*aprE*破壊納豆菌株の作成が完了しなかったため、次年度、続きから再挑戦するか、別な方法で*aprE*破壊納豆菌株を作成し、プロテアーゼがチロシンの蓄積と析出に与える影響を検証する。最終的に、組み換えに依らない方法で、既存納豆菌株よりもチロシン析出が起りにくい納豆菌株を育種する。

7. 謝辞

本研究は、特別電源所在県科学技術振興事業補助金により行ったものであり、感謝いたします。

また、本研究の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) Kimura, K. and 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).
- 2) 木内幹, 品質管理, 「納豆の研究法」, 初版, 永井利郎, 木村啓太郎, 小高要, 村松芳多子, 渡辺杉夫編, (恒星社厚生閣, 東京), p.130 (2010).
- 3) Ashikaga, S., Nanamiya, H., Ohashi, Y. and Kawamura, F., Natural genetic competence in *Bacillus subtilis* natto OK2. *J. Bacteriol.*, **182**, 2411–2415 (2000).
- 4) Nagami, Y., and Tanaka, T., Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from *Bacillus natto* that enhances production of extracellular proteases and levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **166**, 20–28 (1986).