

## 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る。製造技術は、ほぼ確立しているが、メーカーより改善を求める問題点が幾つか存在する。

その一つが、チロシン析出による食感の悪化に伴う賞味期限の問題である。納豆は製品がメーカーから発送された後も菌や酵素が働くために、熟成が進み続ける。熟成が一定の期間を超えると、アミノ酸の一種であるチロシンが大豆表面に析出し、食感が著しく悪化する。

時折、賞味期限内でもこうした現象が起こることがあり、消費者からのクレームに繋がることもある。

納豆は、冷蔵で流通させる製品であり、多くの場合、賞味期限は製造後 10 日程度で設定される。もし、チロシンの析出が起こらずに熟成が進めば、賞味期限の延長が可能になる。それにより、製造や流通の負担軽減と賞味期限切れによる食品ロスへの減少が期待できる。特に、茨城県内には、土産物として納豆を製造販売しているメーカーも多く、賞味期限延長に期待する声が大い。

## 2. 目的

納豆菌は、チロシンを含まない合成培地中で培養した場合、培養上清中からチロシンは検出されない。つまり、納豆上で析出するチロシンは、大豆由来であるということが言える。

大豆のタンパク質が分解され遊離アミノ酸が増えた結果、チロシンが析出してくると考えられる。大豆を発酵し、納豆にするには納豆菌の各種酵素の働きが必須であるが、必要以上に働かないような製造法又は納豆菌を用いれば、チロシンの析出が起こりにくくなるはずである。しかし、多くのメーカーで複数の製品を同じ発酵室で発酵させており、特定のアイテム向けの条件で製品の製造を行うのが難しいことが多い。そこで本研究では、チロシンの析出に関与する遺伝子が機能しない納豆菌株を作り、一般的な製造条件で製造した場合においてチロシン析出の低減を含む日持ち改善効果が見られるか評価を行った。今回の検討では、特に納豆菌の主要な酵素の一つであり、大豆を納豆に発酵する過程でも重要な役割を果たすアルカリプロテアーゼ(AprE)に着目した。納豆菌は他にも幾つかのプロテアーゼを持っており、主要プロテアーゼが機能しなくても、もし納豆の製造が可能であれば、日持ちは格段に向上すると考え、*aprE*を破壊したモデル株を作り、納豆の出来に与える影響を評価することにした。

## 3. 研究内容

3.1 *aprE*破壊納豆菌株の作成3.1.1 *aprE*をKm<sup>R</sup>マーカーで破壊したプラスミドの作成と確認

既報<sup>1)</sup>によりNAFM5のG. DNAを鋳型にして増幅した*aprE*をpBlueScript IIへライゲーションし、コンピテントセルへ導入後、プラスミドの精製まで行ったことを報告した。

精製した 70 µl のプラスミド、1 µl の *Mro* I、10 µl の 10×L バッファー及び 19 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。制限酵素消化後、エタノール沈殿により精製した。

Takara DNA Blunting kit (タカラバイオ) を用い、末端の平滑化を行った。

0.17 pmol のプラスミド *Mro* I 処理産物、1 µl の 10×バッファーを混合し、70°C で 5 分処理した後、37°C で 1~2 分保持した。そこに 1 µl の T4 DNA polymerase を添加し、ピペットで良く混合した。37°C で厳密に 5 分インキュベートした後、直ちにボルテックスミキサーでしっかり混合し、酵素を失活させた。その後、フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、サンプルを精製して次の実験に供した。

70 ng の末端を平滑化したベクター、 $1.1 \times 10^{-4}$  nmol の両端に平滑末端を持つ Km<sup>R</sup> カセット及び 10 µl の 2×Ligation mix(日本ジーン)を混合して合計 20 µl とし、16°C で 1 時間インキュベートした。100 µl の Competent high DH5α(TOYOBO)にライゲーション反応液を 10 µl 添加し、氷上で 10 分間保持した。その後、37°C で予温しておいた 1 ml の SOC 培地に反応液を全量添加し、37°C で 1 時間振盪培養を行った。培養後、カナマイシンを 30 µg/ml となるよう添加した LB 寒天培地に 200 µl ずつ塗布し、37°C で 1 晩培養した。

生育が見られたコロニーを、30 µg/ml のカナマイシンを添加した LB 液体培地で培養した後、Amersham Flexiprep Kit を用い、添付のマニュアルに従いプラスミドの精製を行った。

10 µl の精製したプラスミド、2 µl の 10×H バッファー、1 µl の *Sca* I 及び 7 µl の滅菌水を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、60°C で 5 分間処理して酵素を失活させた。反応の成否は、1%アガロースゲル電気泳動で確認した。

## 3.1.2 コンピテンスの高い株への形質転換

過去の試験で当センターが保有する納豆菌にプラスミドベクターを直接導入することで形質転換を試みた場合、成功率が極めて低いことが多かった。これは、当センターが保有する納豆菌は稲わらから集めた野生株であり、コンピテンスが高くないことに起因すると考えられた。そこでまず、*degQ*を破壊することでコンピテンスを高めた株 NAFM221(*degQ::Spc<sup>R</sup>*)を親株とし

\*地場食品部門

て 3.1.1 で調製したベクターで用いて形質転換体を得た後、そのゲノム DNA を精製して、工業技術センターの保有納豆菌株への形質転換を行うことにした。

300 µg/ml となるようスペクチノマイシンを添加した SP II 培地に NAFM221 株を植え、37°C で 1 晩振盪することで前培養を行った。翌日、前培養液を新たな 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 ×g, 20°C で 10 分間遠心分離し、菌体を含む液を 200 µl 程度残して上清を廃棄した。ここに 3.1.1 で調製したベクターを 1 µg になるよう添加してピペットで良く懸濁し、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 µl の LB 液体培地を添加し更に 1 時間振盪培養を行った。300 µg/ml のスペクチノマイシン及び 10 µg/ml のカナマイシンを添加した LB 寒天培地に 100 µl ずつ塗布し、37°C で 1 晩培養した。

翌日、順調に生育したコロニーを 300 µg/ml のスペクチノマイシン及び 10 µg/ml のカナマイシンを添加した LB 寒天培地及び液体培地に植菌して培養した。この菌株を NAFM221-2 とする。液体培地で培養した菌体より、G DNA を精製した。

精製した G DNA を鋳型として、表 1 のプライマー及び、KOD-Plus (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR の条件は、95°C で 4 分熱変性後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、68°C で 3 分 40 秒のセットを 25 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
<i>aprE</i> -434 Fw	5'-CTTATTTCTTCCTCCCTCTCAATA-3'
<i>aprE</i> +1645 Rv	5'-ATTATGGGGCCACGAAATGGGCCA-3'

### 3.1.3 工業技術センター保有株への形質転換

3.1.1 で精製した NAFM221-2 (*degQ::Sp<sup>R</sup>, aprE::Km<sup>R</sup>*) の G DNA を用いて、工業技術センターの保有する納豆菌 No.19 株 (以降 No.19 と呼称) へ形質転換を行った。

SP II 培地に No.19 株を植え、37°C で 1 晩振盪することで前培養を行った。翌日、前培養液を新たな 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 ×g, 20°C で 10 分間遠心分離し、菌体を含む液を 200 µl 程度残して上清を廃棄した。ここに 3.1.1 で精製した NAFM221-2 の G DNA を約 1 µg 添加してピペットで良く懸濁し、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 µl の LB 液体培地を添加し更に 1 時間振盪培養を行った。10 µg/ml のカナマイシンを添加した LB 寒天培地に 100 µl ずつ塗布し、37°C で 1 晩培養した。

翌日、順調に生育したコロニーを 10 µg/ml のカナマ

イシンを添加した LB 寒天培地及び液体培地に植菌して培養した。この菌株を No.19-1 とする。液体培地で培養した菌体より、G DNA を精製した。

精製した G DNA を鋳型として、表 1 のプライマー及び、KOD-Plus (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR の条件は、95°C で 4 分熱変性後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、68°C で 3 分 40 秒のセットを 25 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した。

### 3.1.4 サザンブロットによる形質転換結果の確認

NAFM5 の *aprE* をプローブにして、3.1.2 で採取した菌株の G DNA の制限酵素消化物に対するサザンブロットを行った。

これにより、No.19 株の *aprE* 領域がカナマイシンマーカーを組み込んだ NAFM5 由来の *aprE* と相同組み換えを起こしているか確認した。

G DNA は *Not I* で消化した後、1% アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、プロットング装置にセットし、0.5M NaOH, 1.5M NaCl 混合溶液を滴下しつつ 2 時間減圧を続け、メンブレン (Hybond-N+, Amersham Biosciences 社) へプロットングを行った。

2 時間後、10 分間 20×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。

次に、PCR で増幅した NAFM5 の *aprE* を用いプローブを作成した。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。

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

### 3.1.5 No. 19 の *aprE* 破壊株を用いた納豆の試作と評価

使用する菌株は、シェファール寒天培地で培養することであらかじめ胞子化した。大豆は北海道産スズマルを用いた。大豆を 20°C で 16 時間浸漬し、0.18 MPa で 30 分蒸煮したものを冷凍保存しておいた。オートクレーブ中 110°C で 15 分蒸煮後、約 50 g ずつポリスチレンバック (PSP) に盛り込んだ。そこに、蒸煮大豆 1 g に対して胞子数が 10<sup>4</sup> 個になるよう納豆菌を添加した。42°C の恒温器に入れ 18 時間発酵させた。発酵完了後、納豆の糸引き、香り及び外観をチェックした。

## 4. 研究結果と考察

### 4.1 *aprE* 破壊納豆菌株の作成

#### 4.1.1 *aprE* を Km<sup>R</sup> マーカーで破壊したプラスミドの作成と確認

作成したプラスミドを *Mro I* で処理した後、処理前の産物と電気泳動で確認した様子を図 1 に示した。pBlueScript II は約 3 Kbp で、導入した増幅した *aprE* が約 2 kbp である。泳動結果を確認すると、*Mro I* 処理産物は 5 Kbp の位置にバンドがあり、目的産物が得られていることが確認された。

*Mro* I サイトに  $Km^R$  カセットをライゲーションし、コンピテントセルでクローニング後、精製したプラスミドを *Sca* I 処理した泳動写真を図2に示した。 $Km^R$  カセットは約1.5Kbpであり、pBlueScript II の約3 Kbp、*aprE* の約2 kbp と合わせ、合計6.5Kbp となり、目的産物が得られたことが確認された。

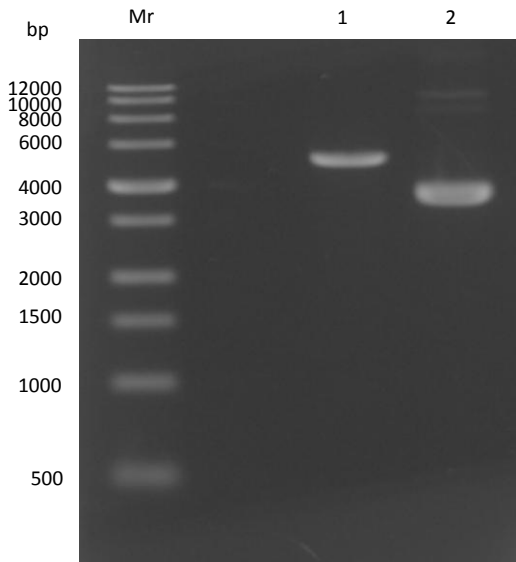


図1. 生成したプラスミドの電気泳動結果  
Mr, 分子量マーカー; 1, *Mro* I 処理後; 2, *Mro* I 処理前

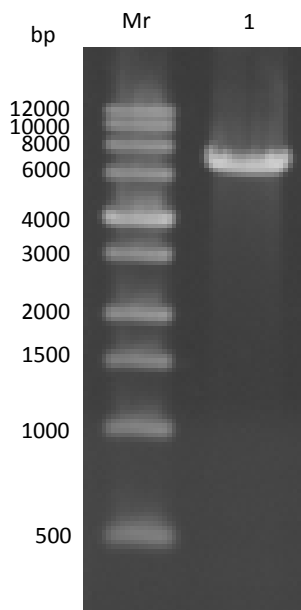


図2. pBluescript II に *aprE* :  $Km^R$  を導入した産物のアガロース電気泳動結果  
Mr, マーカー; 1, pBluescript II に *aprE* :  $Km^R$  をライゲーションし, *Sca* I 処理した産物

#### 4.1.2 コンピテンスの高い株への形質転換

NAFM221-2のG. DNAを鋳型とし、*aprE*をPCRで増幅したものの電気泳動結果を図3に示した。NAFM5を鋳型として同様の条件でPCRを行った場合、生成産物は約2Kbpとなるが、NAFM221-2では*aprE*の2Kbpに $Km^R$

カセット1.5Kbを加え、3.5Kbpとなった。

このことから、NAFM221-2は、自身が元々持っていた*aprE*と3.1.1で生成した $Km^R$ カセットで破壊した*aprE*との間で相同組み換えを起こし、*aprE*の機能を失ったことが確認された。

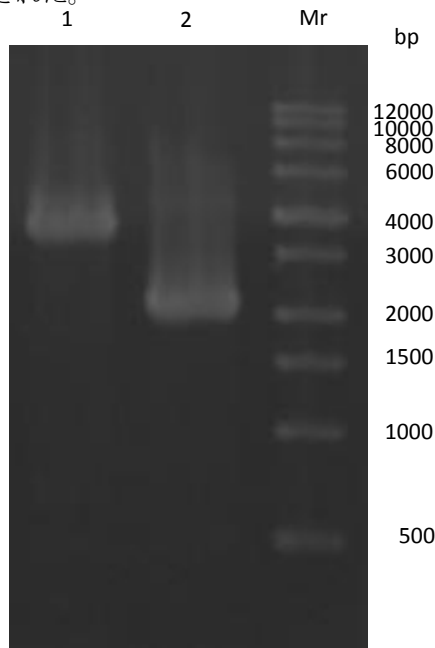


図3. *aprE*増幅産物の電気泳動結果  
1, NAFM221-2のG. DNAを鋳型とした場合; 2, NAFM5のG. DNAを鋳型とした場合

#### 4.1.3 工業技術センター保有株への形質転換

3.1.2と同様の手法でNo.19-1のG. DNAを鋳型とし、*aprE*をPCRで増幅したものの電気泳動結果を図4に示した。NAFM221-2の場合と同様に3.5Kbpの増幅産物が確認された。

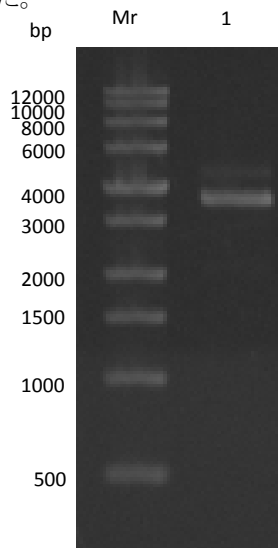


図4. No. 19-2 の G. DNA を鋳型とした *aprE* 増幅産物の電気泳動結果

#### 4.1.4 サザンブロットによる形質転換結果の確認

4.1.3の結果から、相同組み換えが正しく起こっている可能性は高いものの、より確実にその事実を確認することが必要である。

*Not* I は *aprE* 増幅断片の約 1,000bp 付近に認識配列

を持ち、 $Km^R$ カセット内には認識配列を持たない。その為、親株、遺伝子組み換え株共にバンドは2本生じ、大きい方の断片の長さが  $Km^R$  カセットの分長くなるはずである。Not I で切断した結果を図5に示した。親株である No.19 の断片は、約 1,000bp と 6,000bp であるのに対し、形質転換を行った No.19-1 では約 1,000bp と 7,500bp であった。これは、図6に示した位置で切断が起こったことを示している。このことから No.19-1 では正しく遺伝子組み換えが起こり、AprE の機能を失った納豆菌株であることが確認された。

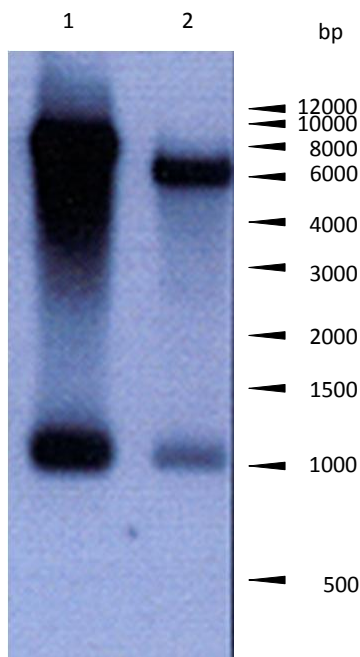


図5. No. 19 の *aprE* 増幅産物をプローブとしたサザンブロットの結果  
1, No. 19-1 の G. DNA に対する結果; 2, No. 19 の G. DNA に対する結果

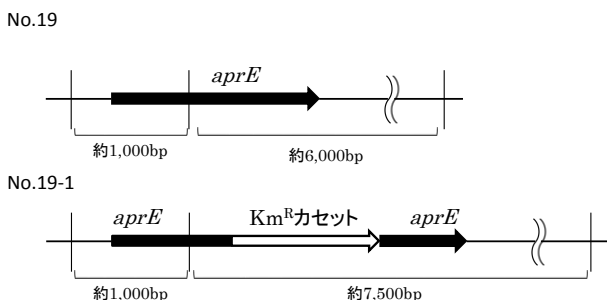


図6. No. 19 と No. 19-1 におけるサザンブロットのバンド長さと切断位置の概略

#### 4.2 No. 19 の *aprE* 破壊株を用いた納豆の試作と評価

4.1.4 で No.19-1 は工業技術センター保有納豆菌株である No.19 の *aprE* 破壊株であることが確認されたため、該納豆菌株と親株を使用して納豆の製造を行い、見た目、臭いの違いを評価した(図7)。No.19-1 で納豆を製

造すると、従来の納豆菌株よりも大豆表面のしわが少なく、アンモニア臭も感じにくい印象だった。糸引きも弱くなるものの、発酵不良と言うわけではなく、日持ち延長には有利な発酵が浅い状態で仕上がることが示唆された。



図7. 従来菌株による納豆(左)と本研究で作成した菌株による納豆(右)

#### 5. まとめ

- (1)工業技術センターが保有する納豆菌株をベースに *aprE* 破壊納豆菌株を作成した。
- (2)*aprE* を破壊した納豆菌株で試作と評価を行ったところ、発酵が浅い状態で仕上がることが確認され、日持ち延長には有利であろうことが示唆された。

#### 6. 今後の課題

今回作成した納豆菌株は遺伝子組み換え体であり、食品製造に用いることはできない。遺伝子組み換えに該当しない方法での菌株開発が必要である。また、発酵が浅いことは日持ち延長には有利であるものの発酵が浅くなり過ぎないように製造条件の検討が必要である。

#### 7. 謝辞

本研究は、文部科学省の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) 久保雄司, 中川力夫, 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, 茨城県工業技術センター平成25年度研究報告, 42, 21-24(2014).