

納豆菌ファージ耐性納豆菌やチロシンが析出しにくい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。製造法は確立しているが、更なる品質向上に向けて取り組むべき課題が残されている。

その一つが、納豆菌ファージ汚染の問題である。

納豆菌ファージは、納豆菌を死滅させるほか、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る。

納豆菌ファージに関する相談は当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。

また、納豆の表面にアミノ酸の一種であるチロシンという白い固体が析出するのを防ぎたいという相談も当センターにしばしば寄せられている。納豆は、流通中も菌や酵素の働きで熟成が進み続けるため、時折、賞味期限内であってもチロシンが大豆表面に析出することがある。食感が著しく悪化する他、カビと間違われることもあり、消費者からのクレームに繋がる。

もし、チロシンの析出が起こらずに熟成が進めば、現在よりも長く賞味期限を設定することが可能になる。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大きい。また、現在は海外販売用の納豆は冷凍で流通しているが、一部の国や地域には冷蔵で流通することが可能になると期待される。

2. 目的

2.1. 納豆菌ファージ耐性納豆菌の開発について

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。開発の手法や結果については既報^{2, 3)}のとおりであるが、どのように感染耐性を獲得したか不明であったため、ファージが枯草菌に感染する際の宿主の認識に関与していると報告されている *yueB*⁴⁾の遺伝子解析を行った。これにより、本研究で開発した納豆菌がどのようなメカニズムで納豆菌ファージ感染耐性を獲得したかを明らかにすると共に、開発した納豆菌の安全性を担保することを目的とした。

2.2. チロシンが析出しにくい納豆菌の開発について

昨年までの研究で、納豆菌のタンパク質分解酵素をコードする *aprE* を破壊すると納豆の熟成速度が劇的に遅くなることを確認した。しかし、作成した納豆菌

は、コード領域に抗生物質耐性マーカーを組み込むことで目的遺伝子の機能を欠損させた遺伝子組み換え微生物であるため、製品の製造に用いることが出来ない。

そこで、竹村らの報告⁵⁾に従い、最終的に開発した納豆菌株が遺伝子組み換え微生物に該当しないよう、外来遺伝子が脱離するような手順を取ることにした。

また、納豆菌は *AprE* 以外にも複数のプロテアーゼを持っており、主要なプロテアーゼの一つとして中性プロテアーゼ(*NprE*)が挙げられる。本年度は、この遺伝子にも着目し、*nprE* 破壊株を作成し、チロシン析出抑制への効果を検証した。

3. 研究内容

3.1 納豆菌ファージ耐性納豆菌の開発について

茨城県内の納豆メーカーから納豆菌ファージを収集し、それらの納豆菌ファージに感染耐性を示す納豆菌の開発を行った。納豆菌の開発自体については既に報告しているため³⁾概略のみ記載する。当センターで保有する *B. subtilis* (分類学上納豆菌と同じ種に属する) 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 株) のゲノム DNA をファージ感受性の納豆菌に対して添加し、コンピテンスにより、感染耐性株のファージ感染に関与する遺伝子領域を取り込ませることで、耐性を付与することを試みた。尚、No.8 株の G. DNA 受容体としては当センターの保有する納豆菌 3 株 (No.19 株, No.40, IBARAKI C-1) を使用した。

3.1.1 遺伝子上の変異箇所の特定制及び解析

納豆菌ファージに感染耐性を示す菌株を得ることが出来たが、当初の計画通りに No.8 株の遺伝子領域を取り込んだ結果、獲得した表現型であるのか、ファージが溶原化することにより獲得した表現型であるのか解明を試みた。No.8 株の遺伝子と相同組み換えを起こしていた場合、その箇所は *yueB* である可能性が高い。そこで、榊原らの文献⁶⁾を参考にプライマーを設計し、G. DNA の提供元と作成した納豆菌ファージ感染耐性菌について、*yueB* の解析を行った。

3.2 チロシンが析出しにくい納豆菌の開発について (*aprE* 及び *nprE* 破壊納豆菌株の作成)

竹村らの報告⁵⁾を参考に新たな菌株の作成を行った。具体的な手順は、図1に示したとおりである。尚、既報ではファージにより遺伝子導入を行っていたが、今回用いた手順では、図1の⑤及び⑥に示したとおり、*degQ* を破壊することでコンピテンスを高めた株に作成したベクターを形質転換し、その G. DNA を使用して当センターで保有する納豆菌へ形質転換を行うという2段階の方法を採用した。尚、最終的に形質転換に

用いた納豆菌として、当センターから企業への配布実績もあるNo.19株を使用した。

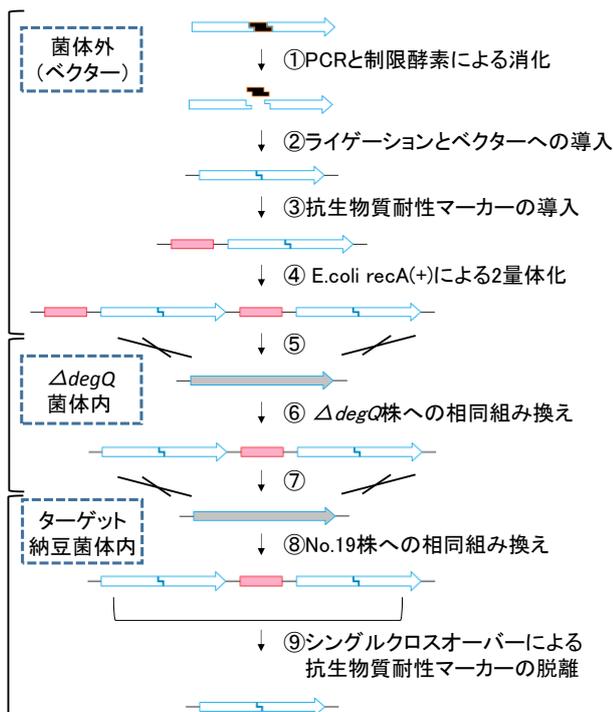


図1 納豆菌の *aprE* 及び *nprE* 破壊株の作成方法

3.2.1 ターゲット領域のPCRと制限酵素消化 (図1. ①)

No.19株についてターゲットとした *aprE* 及び *nprE* 領域のPCRを行い、PCR産物をアガロースゲル電気泳動後、精製し、制限酵素で中央付近を切り出した。*aprE* 産物については *Bsr*I (NEW ENGLAND BioLabs) で消化し、*nprE* 産物については *Hpa* II (NEW ENGLAND BioLabs) で消化した。制限酵素で消化した産物をアガロースゲル電気泳動に供し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(タカラバイオ株式会社)にて必要なバンドを精製した。

3.2.2 ターゲット領域の制限酵素消化とベクターへの導入 (図1. ②)

3.2.1で精製したバンドをLigation Pack (ニッポンジーン) を用いてライゲーションした。ライゲーション産物をPCR反応に供して増幅すると共に、ライゲーション結果の確認と精製を行った。ベクターに pBluescript II (アジレントテクノロジー株式会社) を使用し、マルチクローニングサイトの *Sma* I サイトに得られたPCR産物を導入した後、competent high DH5α(TOYOBO)に形質転換してプラスミドを増幅した。

3.2.3 抗生物質耐性マーカーの導入 (図1. ③)

抗生物質耐性マーカーとして pDG780⁷⁾ からカナマイシン耐性(Km)カセットを切り出して使用した。*aprE* ベクター用には *Hind* III で切り出し、*nprE* ベクター用には *Sma* I と *Hinc* II で切り出した。Kmカセットは *aprE* ベクターと *nprE* ベクターそれぞれで、*Hind* III サ

イトと *Eco*R V サイトを利用して組み込んだ。

3.2.4 プラスミドの2量体化 (図1. ④)

competent cell JM110(*E. coli recA*(+))に形質転換し、2量体化したプラスミドを得た。

3.2.5 *degQ*破壊株 (NAFM221) への形質転換 (図1. ⑤, ⑥)

プラスミドを精製し、*degQ* を破壊してコンピテンスを高めたNAFM221株(*degQ::Spc*) (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 発酵細菌ユニットから提供) に形質転換を行った。手法は、既報⁸⁾に記載のとおりである。増殖が見られた株をスクリーニングし、G.DNAを精製すると共に、*aprE* 及び *nprE* 領域のPCRを行い、結果を確認した。

3.2.6 茨城県工業技術センター保有納豆菌株 (No. 19 株) への形質転換 (図1. ⑦, ⑧)

3.2.5で精製したG. DNAを用いて、最終的なターゲットであるNo.19株に形質転換を行った。形質転換の方法は、SP II 培地にスペクチノマイシンを添加しないこと、SP II 培地で培養する株がNAFM221ではなくNo.19株であること以外は3.2.5と同じである。

3.2.7 シングルクロスオーバーによる抗生物質耐性マーカーの脱離 (図1. ⑨)

形質転換株をLB液体培地や、LB寒天培地で継代培養を続ける中で、抗生物質耐性マーカーを含む部分がシングルクロスオーバーにより脱離した株のスクリーニングを試みた。

脱離したかどうかの確認は、10 µg/mlのカナマイシンを含むLB培地と含まないLB培地の両方でスクリーニングした株を培養し、LB培地でのみ生育した株を目的株として選択する方法をとった。

4. 研究結果と考察

4.1 納豆菌ファージ耐性納豆菌の開発について

3株の親株から納豆菌ファージに耐性を示す新たな納豆菌株の作成を試みたところ、No.19株(菌株)-No.8株(GDNA)の候補株から1株とIBARAKI-C1(菌株)-No.8株(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³⁾。

そこで、遺伝子上の変異箇所の特定及び解析を行った。納豆菌ファージ耐性を獲得した新たな納豆菌株のうち、No.19株(菌株)-No.8株(GDNA)の組み合わせから得られた納豆菌株にP-4株と命名し、*yueB* の解析を実施した。尚、No.8株由来のG DNAにより形質転換が起こったのか、ファージが溶原化したのか判別するために、形質転換の元株であるNo.19株及びG.DNAの供与体であるNo.8株も比較のため遺伝子解析に供した。

シーケンスを行い、良好な結果が得られた332bp-3050bpの配列について比較解析を実施した。その結果、比較解析を行った範囲で23か所で変異が起きていることが確認できた(表1)。参考として記載したBEST195⁶⁾は宮城野菌に相当する菌株であり、No.19株はこの株と同じ配列を有していることが確認された。

その一方で、GDNAの供与体として用いたNo.8株はBEST195やNo.19株とは異なる配列であることが伺える。そして、今回新たに開発した納豆菌ファージ感染耐性株であるP-4株は、元株であるNo.19株とは異なり、GDNA供与体であるNo.8株と同じ*yueB*配列を持っていることが確認された。つまり、ファージが溶原化していないとは言いきれないが、P-4がファージ感染耐性を獲得したのは、No.8株のGDNAと相同組み換えが起こったためであることが確認された。今後実用化するためには、他に相同組み換えが起こっていないか明らかにすれば本菌株の安全性はより確実なものになるが、アメリカ食品医薬品局（FDA）が安全基準を示しているGRASで*B.subtilis*は安全であると記載されているほか、欧州食品安全機関（EFSA）も安全性を認めている。No.8株及びNo.19株は*B.subtilis*であり、今回新たに作成した株は遺伝子組み換え微生物ではないため、条件を変えながら納豆の試作試験を重ね、安定性や納豆の品質などの評価をクリアすれば商業レベルで利用できると期待される。

表1 *yueB*解析の結果

位置	2076	2077	2086	2089	2096	2142
P-4(ファージ感染耐性株)	A	G	T	A	A	A
No.8(G.DNA供与株)	A	G	T	A	A	A
No.19(形質転換前の株)	C	A	C	T	C	T
BEST195(参考)	C	A	C	T	C	T

位置	2148	2151	2172	2189	2190	2204
P-4(ファージ感染耐性株)	G	T	C	A	C	A
No.8(G.DNA供与株)	G	T	C	A	C	A
No.19(形質転換前の株)	A	C	A	G	T	T
BEST195(参考)	A	C	A	G	T	T

位置	2208	2269	2424	2532	2538	2565
P-4(ファージ感染耐性株)	C	A	C	C	A	T
No.8(G.DNA供与株)	C	A	C	C	A	T
No.19(形質転換前の株)	T	G	A	A	C	C
BEST195(参考)	T	G	A	A	C	C

位置	2610	2706	2814	2949	2958
P-4(ファージ感染耐性株)	A	A	C	G	T
No.8(G.DNA供与株)	A	A	C	G	T
No.19(形質転換前の株)	G	G	T	A	C
BEST195(参考)	G	G	T	A	C

4.2 チロシンが析出しにくい納豆菌の開発について (*aprE*及び*nprE*破壊納豆菌株の作成)

遺伝子組み換え前の元株に当たる納豆菌の*aprE*は1146bpであるが、*BsrF* I で切り出した166bp分短くなるため、*BsrF* I 処理株では980bpとなる。一方の*nprE*破壊株についても、本来の*nprE*の長さは1566bpであるが、*Hpa* II 処理により250bp短くなるため、*Hpa* II 処理株では1316bpとなる。図2(左の写真)は、図1.⑧の行程を終えてスクリーニングした4株について*aprE*のPCR後、アガロースゲル電気泳動を行った結果である。レーン1から3までの3株では、短絡していないものと短絡した*aprE*が混在して980bpと1146bpの両方のバンドが見えるが、レーン4の株は、目的の980bpのみのバンドが確認できこの株が目的の株であることが分かる。同様に図2(右の写真)は図1.⑧の行程を終えてスクリーニングした2株について*nprE*のPCR後アガロースゲル電気泳動を行った結果である。レーン2の株は1316bpと1566bpの両方のバンドが確認されるが、レーン1は1316bpのみのバンドが確認でき、レーン1が目

的の株であることが分かる。このことから、図1中で⑧の段階までは、*aprE*及び*nprE*破壊株の両方で実験がうまく行っていることが確認できる。

しかしながら、最終行程である⑨は、マーカーが脱離した株を選抜するネガティブスクリーニングであり、確率的にもそうした株がスクリーニングできる可能性は低い。今回は、LB寒天プレートで20回程度及び液体培養で7~8回程度植え継いだ後、培養液をLBプレートに塗布し、生育した菌株について、1000株近くの株をスクリーニングしたが、残念ながら目的の菌株を得ることは出来なかった。特に液体培地で植え継ぎを繰り返した際、寒天培地上のコロニーが*B.subtilis* 168様の表面が湿った外観となり、溶菌したような見た目になる現象がしばしば確認された。実際、よほど特殊な条件下でない限り、納豆菌が寒天培地上で溶菌したようになることはないため、継代培養中、どこかに変異が入っていたことは間違いないようだった。

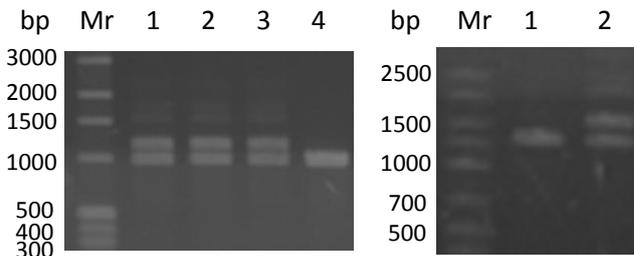


図2 *aprE*(写真左)及び*nprE*(写真右)破壊株の候補株としてスクリーニングした株のPCR増幅結果



図3 図1.⑨において継代培養した菌株(左)と通常の納豆菌(右) (継代培養した納豆菌は溶菌したような半透明の見目になった。)

図1の⑧の段階では外来の遺伝子を含み、遺伝子組み換え微生物に該当してしまうため、商業的な食品製造に用いることは出来ないが、納豆を製造した場合にどうなるか、評価を行うことは可能であるため、蒸した大豆を用意し、納豆を製造してチロシン析出への影響を評価した。

蒸煮した大豆に図1の行程⑧の段階の菌株を大よそ10³ /gになるよう添加し、42℃で20時間発酵させた。また、その後、30℃の恒温器に入れ熟成の加速試験を実施しチロシンの析出具合の評価を行った。*aprE*及び*nprE*破壊納豆菌株及び対照としてNo.19株で製造した納豆の発酵終了直後と、発酵終了後から30℃で2日間保存

熟成した納豆の写真及び評価を図4にまとめた。

*aprE*の破壊はチロシン析出抑制に効果があることが明らかになったが、糸引きが大分弱くなっている印象を受けた。また、*nprE*破壊株では、通常の納豆菌と同等の速度でチロシンが析出することも確認された。

チロシン析出を抑えつつ、従来の品質に近い納豆を製造するためには、ペプチダーゼの活性を抑えるか、単独の遺伝子を破壊するのではなく、複数の遺伝子の制御が必要であろうことが、本研究により示唆された。

	発酵終了直後	30℃保存2日後
$\Delta aprE$	 <p>・$\Delta nprE$株, No.19株と比べ、しわが少ない印象。</p>	 <p>・チロシンの析出なし。 ・発酵終了直後と見た目に大きな変化はない。 ・糸引きが大分弱くなっている印象。</p>
$\Delta nprE$	 <p>・No.19株と同様の見た目。</p>	 <p>大豆表面にチロシンの析出を確認(丸印)</p>
No.19 対照 菌株	 <p>・一般的な納豆の発酵状態。</p>	 <p>大豆表面にチロシンの析出を確認(丸印)</p>

図4 No.19株, *aprE*破壊株及び*nprE*破壊株で製造した納豆の、発酵終了直後と30℃保存2日後の様子(30℃保存2日時点において、丸で囲んだ部分にチロシンの析出が確認された。)

5. まとめ

5-1. 納豆菌ファージ耐性納豆菌の開発について

納豆菌ファージ感染耐性納豆菌株を新たに開発し、*yueB*変異により耐性を獲得したことを明らかにした。

5.2 チロシンが析出しにくい納豆菌の開発について

外来遺伝子を含まない*aprE*及び*nprE*破壊納豆菌株のスクリーニングは出来なかったものの、それぞれの遺伝子を破壊した納豆菌株を作り、*aprE*の破壊はチロシン析出抑制に効果があることを明らかにした。しかしながら、今回作成した菌株は遺伝子組み換え株であること、糸引きに不安があることが課題として残っている。今後、残された課題解決に向けて研究を続ける。

6. 今後の課題

チロシン析出を抑えつつ、従来の品質に近い納豆を製造するためには、ペプチダーゼの活性を抑えるか、単独の遺伝子を破壊するのではなく、複数の遺伝子の制

御が必要であろうことが確認されたため、そうした株の開発を進める。

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国立研究開発法人 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氏、並びに、木村啓太郎氏に感謝いたします。

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) 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の開発に関する研究, 茨城県工業技術センター平成24年度研究報告, **41**, 9-12(2013).
- 3) 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).
- 4) Baptista, C., Santos, M. A. and Sao-Jose, C., Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *J. Bacteriol.*, **190**, 4989–4996 (2008).
- 5) 竹村浩, 安藤記子, 塚本義則, 短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への利用, 日本食品科学工学会誌, **47**, 773–779 (2000).
- 6) Nishito, Y., Osana, Y., Hachiya, T., Pendorf, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Itaya, M., and Sakakibara, Y., Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data, *BMC Genomics*, **11**, 243-254 (2010).
- 7) Guerout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N. and Stragier, P., Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, **167**, 335-336 (1995).
- 8) 久保雄司, 中川力夫, 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26年度研究報告, **42**, 31-34(2015).