

# 納豆菌の発酵・熟成に関わる遺伝子の機能解析と制御に関する試験研究事業

久保 雄司\* 中川 力夫\*

## 1. はじめに

納豆の賞味期限は製造後 10 日程度で設定されることが多く、作り置きが難しい製品であるため、メーカーは季節や時期を問わず生産を続けなければならない。賞味期限を既存製品よりも長く設定できる技術を確立すれば、①～④の効果が期待される。①小売店は、売れ残りによる値引きや廃棄のリスクがある製品は取り扱いを避けるために仕入れ量を抑えるが、そうしたリスクがなくなればチャンスロス回避のために取扱量を増やすことが期待され、メーカー側の収益が増える。②一度に配送する量を増やし、配送回数を減らすことで物流コストを抑えることが出来る。③食品ロスの問題は、国際機関でも議題として取り上げられるなど世界的に関心が高まっており、国内でも農林水産省と各種業界団体が協力して食品ロスの発生を抑制しようと努めているが、賞味期限切れで生じる食品ロスを減らすことができる。④近年、納豆は輸出が増加傾向であるが、長く品質を保持できることで輸出にも有利な納豆を製造することができる。

他にも、メーカーの製造計画にゆとりが生じて休日や勤務時間帯などの面で従業員の雇用条件が改善されることによる企業価値の向上や、水戸市周辺で特に多い土産ものやギフトとしての製品開発の促進に繋がることと期待される。

納豆は製造後も菌が生きた状態で存在し、酵素も穏やかに働き続けるため、貯蔵流通の過程で熟成が進み続ける。納豆菌が生産する酵素のうち、納豆の発酵熟成には様々な酵素が相互作用しながら働いており、納豆の熟成速度を制御するためには、納豆の発酵及び熟成に関与する主要な酵素の影響を精査する必要がある。

## 2. 目的

納豆の品質保持に関わる大きな要因として、納豆表面に生じるチロシンの結晶の問題があるが、当センターでは、これまでの研究でチロシンの析出が起こりにくい納豆菌の開発及びその納豆菌で製造した納豆の評価を行ってきた。その結果、大豆のタンパク質分解に関与する主要酵素であるアルカリプロテアーゼ活性を抑制すると納豆の発酵を穏やかにし、チロシンの析出が抑制されるものの、問題点として通常の納豆よりも糸引きが極端に弱くなることを確認した<sup>1)</sup>。納豆菌の働きで大豆タンパク質が分解される過程で、納豆らしい味わいや風味が出てくるが、発酵が過剰に進むと、チロシンが析出し、アンモニア臭が強くなるなど味や香りでマイナスの影響が生じる。そこで、本研究事業では、納豆の発酵及び熟成に大きく関与すると思われる酵素をコードする遺伝子の発現を制御した場合における納豆への影響を評価して各遺伝子の機能解析を進めること、併せて、発酵及び熟成に関与する遺伝子の

発現を制御することで納豆の熟成速度を適度に緩やかにし、既存の納豆の 2 倍となる 20 日程度まで賞味期限を延長できる技術を確立することを目的とした。これまでの研究でターゲットとしたアルカリプロテアーゼはエンドプロテアーゼであるため、大豆タンパク質はアミノ酸に近い状態までは分解されにくいと考えられる。ペプチドまで分解した後、現状よりも緩やかにアミノ酸まで分解されるようにコントロールできれば、熟成速度は緩やかになるはずである。そこで、本研究では、プロテアーゼではなくペプチダーゼに着目して、納豆の品質保持との関係性を明らかにすることとした。

## 3. 研究内容

### 3.1 大豆タンパク質分解に関与する酵素の発現量評価

必ずしも発現量と酵素活性は比例しないが、納豆の発酵過程におけるペプチダーゼ遺伝子の発現量を測定し、特に発現量の多い領域をターゲットにしようと考えた。そこで、原料大豆にスズマル、種菌に宮城野菌(宮城野納豆製造所)及び当センターの保有納豆菌株である No.19 株を用い納豆を試作した。発酵 7 時間と 18 時間の段階で直ちに冷凍したものをサンプルとした。RNA を扱う作業は、全て RNase free な器具、消耗品を使用して実施した。

50 ml の滅菌チューブに、凍ったままの納豆サンプルを約 3.5 g 計り取り、滅菌水を 10 ml 添加し、振り混ぜながら大豆表面を洗い出した。3,600 ×g, 4℃で 30 秒間、遠心分離した。上清を回収し、9,300 ×g, 4℃で 5 分間、遠心分離し沈殿した菌体を回収した。RNA の精製は、TRIzol Reagent(Thermo Fisher Scientific)を使用した。回収した沈殿を 1ml の TRIzol Reagent で懸濁して、マイクロチューブに移し、0.2 ml のクロロホルムを添加した。15～30 秒ボルテックスミキサーで激しく攪拌した後、30℃で 3 分間インキュベートした。12,000×g, 4℃で 15 分間、遠心分離し、上清を回収した。2-プロパノールを 0.5 ml 添加し、30℃で 10 分間インキュベートした。12,000×g, 4℃で 10 分間、遠心分離し、上清を廃棄した。得られた沈殿を 75%エタノールで洗浄、風乾した後、滅菌水で溶解し、納豆菌の RNA を得た。

逆転写反応は PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(タカラバイオ)を使用し、操作は試薬に添付されているマニュアルに従った。得られた cDNA を滅菌水で 10 倍希釈し、RT-qPCR の鋳型とした。

RT-qPCR 反応には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を用い、操作は試薬に添付されているマニュアルに従った。RT-qPCR の装置には 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。そのため、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix

\*地場食品部門

の 50×ROX の濃度は装置に合わせ最終濃度を 1 倍に合わせて使用した。また、検量線は 16S rDNA を使用して作成した。

既報 <sup>2)</sup>によりターゲットとするペプチダーゼ遺伝子を *ampS*, *map*, *mlpA*, *pepA*, *pepV*, *ybaC*, *ycIE*, *ydiC*, *yfiG*, *yjbG*, *ykvY*, *ypwA*, *yqhT*, *yqjE*, *ytXM*, *yuxL*, *twaD* の 17 箇所とし、16S rDNA と合せて、RT-qPCR プライマーを表 1 の通り作成した。反応サイクルは 95℃で 1 分熱変性した後、95℃で 15 秒、続いて 60℃で 40 秒のサイクルを 40 回繰り返した。その後、解離曲線解析を行うために、95℃で 15 秒、60℃で 30 秒、95℃で 15 秒のサイクルを設定した。データ解析は、16S rDNA に対する相対定量で行った。

### 3.2 ペプチダーゼ遺伝子破壊株の作成

#### 3.2.1 ターゲット領域の制限酵素消化とベクターへの導入(図 1①, ②, ③, ④)

遺伝子破壊納豆菌株の作成概略を図 1 に示す。

3.1 で発現量の多かった遺伝子を破壊した納豆菌株の作成を行った。遺伝子組み換えを行う対象の菌株として、宮城野菌を使用した。宮城野菌のゲノム DNA を鋳型として、表 2 に示したプライマーを利用してターゲット領域の PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で結果を確認すると共に、目的バンドを切り出し、Nucleo Spin Extract II (MACHEREY・NAGEL)にて精製した。

Hinc II 処理した pKF19 ベクター(50ng)と精製した PCR 産物をモル比で 1:10 程度になるよう混合し、Ligation Pack (ニッポンジーン) を用いてライゲーション反応を行った。

50μl の *E. coli* DH5α Competent Cells(タカラバイオ)とライゲーション反応液10μlを混合し、直ちに氷上に移して、10分間保った。その後、37℃で予温しておいた500μlのSOC培地に反応液を全量添加して37℃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℃で24時間インキュベートした。ホワイコロニーを選択してLB液体培地(30 μg/mlのカナマイシン添加)に植菌し37℃で振盪培養した。培養後、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (Viogene)を用いてプラスミドを精製した。

*yqjE* を連結したベクターを *Nhe* I (NEW ENGLAND BioLabs), *pepA*を連結したベクターを *Spe* I (NEW ENGLAND BioLabs) で消化することで、1か所切断して1本鎖にした。その後、DNA Blunting kit (タカラバイオ)を用い、末端の平滑化を行った。*ywaD*を連結したベクターは *Hinc* II (NEW ENGLAND BioLabs)で消化し、1本鎖にした。

表1 RT-qPCRに使用したプライマー一覧

| オリゴ名               | 配列                     | mer |
|--------------------|------------------------|-----|
| RT-qPCR 16S-F      | 5'-atcttcgcgaatggacga  | 18  |
| RT-qPCR 16S-R      | 5'-gccgtggctttctggtta  | 18  |
| RT-qPCR ampS-956F  | 5'-ttggcaagctcttctctg  | 18  |
| RT-qPCR ampS-1065R | 5'-gtgaattggcaggatgac  | 18  |
| RT-qPCR map-221F   | 5'-aactcgttcacggcatac  | 18  |
| RT-qPCR map-323R   | 5'-catgcagagtcacatga   | 18  |
| RT-qPCR mlpA-648F  | 5'-tgagaagcctgagttcca  | 18  |
| RT-qPCR mlpA-748R  | 5'-gttcattggccaacctcta | 18  |
| RT-qPCR pepA-118F  | 5'-gcctgcaatatcaaggtg  | 18  |
| RT-qPCR pepA-224R  | 5'-cggatctcagcaattcac  | 18  |
| RT-qPCR pepV-420F  | 5'-cgctgatttcacctcac   | 18  |
| RT-qPCR pepV-522R  | 5'-cttgacgatgcaggaaag  | 18  |
| RT-qPCR ybaC-653F  | 5'-agtatggagtcgggaaca  | 18  |
| RT-qPCR ybaC-734R  | 5'-aaccggtacaactcacca  | 18  |
| RT-qPCR yclE-73F   | 5'-atccttgtgatcgggagt  | 18  |
| RT-qPCR yclE-176R  | 5'-ggcttagcaaatcccta   | 18  |
| RT-qPCR ydiC-159F  | 5'-accgcaggacctttctaa  | 18  |
| RT-qPCR ydiC-254R  | 5'-gaccaggcaagtgttttg  | 18  |
| RT-qPCR yfiG-541F  | 5'-tacgctgatgatgtcac   | 18  |
| RT-qPCR yfiG-653R  | 5'-gcatgagcacaagacc    | 18  |
| RT-qPCR yjbG-1053F | 5'-ccgctatattgcgctaag  | 18  |
| RT-qPCR yjbG-1143R | 5'-catcccagcatctttcac  | 18  |
| RT-qPCR ykvY-245F  | 5'-cgtgggagctgatagaga  | 18  |
| RT-qPCR ykvY-351R  | 5'-atgcttcagctgttctgc  | 18  |
| RT-qPCR ypwA-244F  | 5'-cgcataggatgggaagta  | 18  |
| RT-qPCR ypwA-332R  | 5'-tagggattacaccgcaga  | 18  |
| RT-qPCR yqhT-705F  | 5'-attcagccacaggcacta  | 18  |
| RT-qPCR yphT-798R  | 5'-cgtctcgggtttgaacag  | 18  |
| RT-qPCR yqjE-866F  | 5'-tttccgggtacaactgtg  | 18  |
| RT-qPCR yqjE-956R  | 5'-gagccggtaacctgattt  | 18  |
| RT-qPCR ytxM-203F  | 5'-cagaaggaaggctgtgaa  | 18  |
| RT-qPCR ytxM-301R  | 5'-tattcggcacaggatagc  | 18  |
| RT-qPCR yuxL-694F  | 5'-ctcaccttcatttctgc   | 18  |
| RT-qPCR yuxL-799R  | 5'-gtcaggagcatatcgat   | 18  |
| RT-qPCR ywaD-1097F | 5'-cacaggaggatcatctg   | 18  |
| RT-qPCR ywaD-1202R | 5'-tgataccacggctcaact  | 18  |

表2 PCRに使用したプライマー一覧

| オリゴ名        | 配列                              | mer |
|-------------|---------------------------------|-----|
| pepA +20F   | 5'-tccaatgtaaatcgtccgcaagtgtag  | 28  |
| pepA +1491R | 5'-gttcaacaatcagagcatagagaaccc  | 28  |
| yfiG-459F   | 5'-atctgaaagagccgggctgt         | 20  |
| yfiG+922R   | 5'-taccatccccctcataccc          | 20  |
| yqjE-179F   | 5'-ctgcaaaacgtgaagcgga          | 20  |
| yqjE+1682R  | 5'-ctgacgattgacgtgtgta          | 20  |
| ywaD +26F   | 5'-cgatggctgttttaactgccggcacact | 28  |
| ywaD +1271R | 5'-gctgtcacaagatcgctgtgtgct     | 25  |

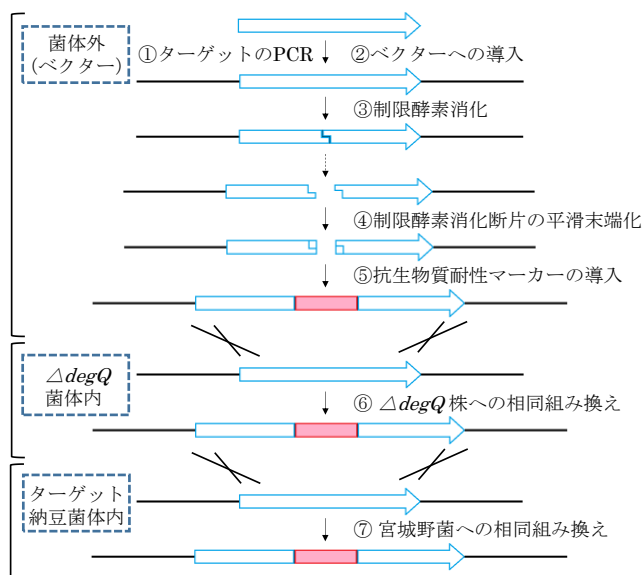


図1 遺伝子組み換え納豆菌株の作成概略図

### 3.2.2 抗生物質耐性マーカーの導入(図1 ⑤)

抗生物質耐性マーカーとして、pDG1726<sup>3)</sup>からスペクチノマイシン耐性(Spc<sup>R</sup>)カセットを *EcoRV* (NEW ENGLAND BioLabs) 及び *HincII* (NEW ENGLAND BioLabs) で切り出して使用した。

3.2.1 で、ターゲット遺伝子領域を導入し 1 本鎖状にした pKF19 ベクターへの Spc<sup>R</sup> カセットの導入は、3.2.1 と同様の方法で実施した。ベクター(50ng)と Spc<sup>R</sup> カセットをモル比で 1:10 程度になるよう混合し、Ligation Pack (ニッポンジーン) を用いて、ライゲーションを行った。 *E. coli* DH5a Competent Cells(タカラバイオ)への形質転換を行い、300µg/ml のスペクチノマイシンを添加した LB 寒天培地に植菌し 37°C で培養した。生育したコロニーを 300µg/ml のスペクチノマイシンを添加した LB 液体培地中で培養し、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (Viogene)を用いてプラスミドを精製した。

pKF19(*yqjE*::Spc<sup>R</sup>) 及び pKF19(*ywaD*::Spc<sup>R</sup>) は *Sma I* (NEW ENGLAND BioLabs) で消化し、1 本鎖にした。

### 3.2.3 *degQ*破壊株(NAFM73)への形質転換(図1 ⑥)

*degQ*を破壊してコンピテンスを高めた株 *B. subtilis* NAFM73(*degQ*::Er<sup>R</sup>) (国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 微生物機能ユニットから提供) に形質転換を行った。

リンコマイシンを 12.5 µg/ml 及びエリスロマイシンを 1 µg/ml となるよう添加した SP II 培地<sup>4)</sup>に NAFM73 株を植え、37°C で 24 時間振盪して前培養を行った。前培養液を新たな SP II 培地に植え継ぎ、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 3.2.2 で調製したベクターを約 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、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を添加した LB 寒天培地に 200 µl ずつ塗布し、37°C で 24 時間培養した。

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を添加した LB 寒天培地及び液体培地に植菌して培養し、ゲノム DNA を精製した。

### 3.2.4 宮城野菌への形質転換(図1 ⑦)

3.2.3 で精製したゲノムDNAを用いて、最終的なターゲットである宮城野菌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NAFM73ではなく宮城野菌であること以外は3.2.3と同じである。*yqjE* と *ywaD* を破壊したそれぞれの試験において、生育の見られた菌株を単離し、遺伝子組み換えのターゲットとした領域について、表2のプライマーを用いてPCRを行った後、アガロースゲル電気泳動にて結果を確認した。

## 4. 研究結果と考察

### 4.1 大豆タンパク質分解に関与する酵素の発現量評価

宮城野菌及びNo.19株におけるペプチダーゼの16SrDNAに対する発現量評価の結果を表3に示す。

*ybaC* 及び *yjbG* のプライマーを用いたRT-qPCRの結果については、解離曲線解析の結果、非特異的な増幅が確認され、今回は評価を行うことが出来なかった。プライマーを再度検討する必要がある。

それ以外の15遺伝子の結果を見ると、No.19株の発酵7時間では、map以外の発現量が少ないものの、それ以外の試験区分においては、共通して *map*, *pepA*, *yflG*, *yqjE* の発現量が相対的に高いことが確認された。ところが、*map* は methionine aminopeptidase をコードしている遺伝子で、生育に必須であるため、破壊することはできない。

また、発現量はそれほど高くないが、加田の報告<sup>2)</sup>によると、*ywaD* は菌体外に分泌されている可能性が高い。大豆タンパク質の分解は菌体外で起こっているため、*ywaD* の影響を評価することには意味があると考えられる。加えて、*ywaD* の重要性について記載した報告もある<sup>5)</sup>。そこで、破壊株のターゲット遺伝子は、*pepA*, *yflG*, *yqjE* 及び *ywaD* とすることにした。

表3 16SrDNAに対するペプチダーゼの発現量評価

| 解析遺伝子       | 発現量(対16SrDNA比) |             |             |             |
|-------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
|             | 宮城野菌           |             | No.19株      |             |
|             | 発酵7時間          | 発酵18時間      | 発酵7時間       | 発酵18時間      |
| <i>ampS</i> | 0.22           | 0.23        | 0.13        | 0.30        |
| <i>map</i>  | <b>6.86</b>    | <b>2.26</b> | <b>5.38</b> | <b>2.48</b> |
| <i>mlpA</i> | 0.42           | 0.20        | 0.30        | 0.28        |
| <i>pepA</i> | <b>0.58</b>    | <b>0.84</b> | 0.18        | <b>1.57</b> |
| <i>pepV</i> | 0.27           | 0.29        | 0.17        | 0.34        |
| <i>yclE</i> | 0.11           | 0.11        | 0.06        | 0.13        |
| <i>ydiC</i> | 0.18           | 0.04        | 0.11        | 0.05        |
| <i>yflG</i> | <b>0.46</b>    | <b>0.45</b> | 0.33        | <b>0.41</b> |
| <i>ykvY</i> | 0.24           | 0.15        | 0.14        | 0.16        |
| <i>ypwA</i> | 0.12           | 0.12        | 0.09        | 0.11        |
| <i>yqhT</i> | 0.20           | 0.12        | 0.19        | 0.11        |
| <i>yqjE</i> | <b>0.76</b>    | <b>0.41</b> | <b>0.53</b> | <b>0.56</b> |
| <i>ytxM</i> | 0.06           | 0.04        | 0.04        | 0.04        |
| <i>yuxL</i> | 0.28           | 0.11        | 0.25        | 0.15        |
| <i>ywaD</i> | 0.14           | 0.20        | 0.11        | 0.15        |

(*map*は生育に必須)

#### 4.2 ペプチダーゼ遺伝子破壊株の作成

作成を試みた*pepA*, *yflG*, *yqjE*及び*ywaD*を破壊した納豆菌株のうち、*yqjE*及び*ywaD*の破壊株については完成した。3.2.4で行ったPCRで*yqjE*, *ywaD*共にそれぞれの増幅産物の長さに、スペクチノマイシンカセットの約1100bpを加えた大きさの増幅産物が得られたことをアガロースゲル電気泳動で確認できたことから、目的遺伝子の破壊株が取得できたと判断した。

次年度は、これらの株を使用してタンパク質の分解を評価することで、*yqjE*及び*ywaD*が納豆の熟成に与える影響について検証を行う。

*pepA*破壊株については、図1中の⑤抗生物質耐性マーカーの導入においてライゲーション反応が進まないのか、スペクチノマイシン耐性マーカーとコンピテントセルの相性が悪いのか、耐性マーカーを導入した大腸菌を得られていない。

*yflG*破壊株については、宮城野菌に相当するBEST195株の*yflG*の全長が750bpと短く、ORFの前後を含んで増幅した産物をベクターに導入するようプライマーを設計したため、大腸菌内で発現してしまい不都合が生じるためではないかと思われるが、図1中の②ベクターへの導入がうまく行っていない状況である。*yflG*領域をスタートコドンを含まない状態で増幅してベクターに導入することも試しているが、それでも反応が進行しない場合は更に別の手立てを講じる必要がある。

近年は、遺伝子組み換え微生物を簡便に作成するためのGibson Assembly システム(NEW ENGLAND BioLabs)やIn-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ)などのキットも市販されているため、今後はそうした方法も検討する予定である。

#### 5. まとめ

##### 5.1 大豆タンパク質分解に関与する酵素の発現量評価

納豆の発酵過程において、7時間時点(発酵初期段階)

と18時間(発酵完了段階)において、mRNAの発現量をRT-qPCRで評価し、*map*, *pepA*, *yflG*, 及び*yqjE*の発現量が高いことを明らかにした。

#### 5.2 ペプチダーゼ遺伝子破壊株の作成

RT-qPCRの結果を受けて、*pepA*, *yflG*, *yqjE*に加え、既報から評価の価値があると判断した*ywaD*を破壊した宮城野菌株の作成に取り組んだ。その結果、*yqjE*及び*ywaD*の破壊株の作成に成功した。残り2株については次年度作成を継続して行う。

#### 6. 今後の課題

ターゲットとして定めた*map*, *pepA*, *yflG*, 及び*yqjE*の4つの遺伝子が納豆のタンパク質分解に与える影響を評価する。また、ターゲット遺伝子が確定できた後に、X線照射などにより変異処理を施し、熟成速度を緩やかにすることで賞味期限が延長できるような納豆菌の開発を進める。

#### 7. 謝辞

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 食品研究部門 微生物機能ユニットの木村啓太郎氏、並びに酵素機能ユニットの舟根一美氏に感謝いたします。

#### 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, 茨城県工業技術センター平成27年度研究報告, 第44号, p45-48(2016)
- 2) 加田茂樹, 納豆発酵過程の分子生理学的研究, 博士論文(2013)
- 3) Guerout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N. and Stragier, P., Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, **167**, 335-336 (1995).
- 4) Albano, M., Hahn, J., and Dubnau, D., Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3110-3117 (1987).
- 5) Liu Z, Gao X, Zhou L, Cui W, Tian Y, Zhou Z., An extracellular aminopeptidase encoded by *ywaD* gene plays an important role in supplying nitrogen nutrition for the growth of *Bacillus subtilis* 168. *Can. J. Microbiol.* doi: 10.1139/cjm-2016-0602 . [Epub ahead of print].