

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

(第 2 報)

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、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り、企業価値の向上が期待される。

また、納豆は茨城県の特産品として広く認知されており、土産ものやギフトとしての製品も多く、賞味期限延長技術が確立すれば、土産もの等の製品開発の促進にも繋がる。

本研究では、納豆の発酵・熟成速度を制御して賞味期限延長をめざす。

2. 目的

本研究では、納豆の発酵及び熟成に大きく関わ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際の納豆への影響を評価して各遺伝子の機能解析を進める。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。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。

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ことが知られており、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。チロシンの析出と納豆菌が持つタンパク質分解酵素の働きは非常に深くかかわっており、大豆タンパク質の分解速度を制御することが出来れば、チロシンの析出を抑制でき、大豆タンパク質の分解速度と納豆の品質保持が密接に関わっていることを確認した。

これまでの研究では、納豆菌が生産する主要プロテアーゼであるアルカリプロテアーゼと中性プロテアーゼをターゲットに試験を行ったが、アルカリプロテアーゼ活性を抑制すると納豆の発酵を抑制することは可能になるものの、やや抑制が強すぎることで、また通常の納豆よりも糸引きが極端に弱くなることが問題点として残った¹⁾。また、中性プロテアーゼ活性を単独で抑制した場合は、日持ちへの影響がほとんど見られな

いことも明らかになった¹⁾。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 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株の作成

3.1.1 ターゲット遺伝子の破壊とクローニング

既報²⁾のとおり、遺伝子破壊のターゲットは、*pepA*, *yf1G*, *yqjE*, *ywaD* の4遺伝子とした。*yqjE*及び*ywaD*を破壊した納豆菌株は、昨年度に作成が完了しているため、残り2遺伝子を破壊した納豆菌株作成を行った。

ライゲーション反応とコンピテントセルへの形質転換は、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ)を使用した。遺伝子組み換えのゲノム受容体には、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1に示したプライマー(No.1+No.2, No.3+No.4, No.7+No.8, No.9+No.10)を利用してPCRを行いターゲット領域を増幅した。抗生物質耐性マーカーとして、pDG1726³⁾を鋳型にして、スペクチノマイシン耐性カセット(*Spc^R*)を表1に示したプライマーセット(No.5+No.6, No.11+No.12)で増幅した。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。

PCRで増幅した遺伝子の上流部分と下流部分の間にマーカーとなる抗生物質耐性カセットを挟んで連結した。反応はベクターと3つのPCR産物を1ステップで繋ぎ、コンピテントセルに導入して、クローニングする方法で実施した。

【クローニング手順】

①HincII処理したpKF19ベクター(50ng)と、モル比でベクターの2倍量のPCR産物、2μlの5×In-Fusion HD Enzyme mix(TAKARA BIO)を混合し、滅菌水で全量を10μlとした。

②50℃で15分間加温した後、2.5μlの反応液と50μlのStellar Competent Cells(タカラバイオ)を混合し、直ちに氷上に移して、30分間保持。

③42℃で45秒間インキュベートして、氷上で1分間冷却後、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℃で振盪しながらインキュベート。

④1時間後、30μg/mlのスペクチノマイシンを添加したLB寒天培地に200μlずつ塗布し、37℃で24時間インキュベート。

⑤ホワイトコロニーを選択してLB液体培地(30μg/mlのスペクチノマイシン添加)に植菌し37℃で振盪培

*地場食品部門

養後、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (Viogene)を用いてプラスミドを精製。

⑥精製したプラスミドの内、pKF19-*pepA*::Spc^Rは *Sma* I (NEW ENGLAND BioLabs)で、pKF19-*yflG*::Spc^Rは *EcoR* I (NEW ENGLAND BioLabs)で消化し、次からの形質転換に使用。

表1 PCRに使用したプライマー一覧

No.	上段：オリゴ名 下段：配列	mer
1	pepA +50F1(In-Fusion pKF19) 5'-GCATGCCTGCAGGTCCAAATACCCATTACGTTAGG	35
2	pepA +852R1(In-Fusion pKF19) 5'-TCCGACGACGTCCTTCCCAT	20
3	pepA +858F2(In-Fusion pKF19) 5'-CGGGAAAGGAATTACCTTTGACAC	24
4	pepA +1570R2(In-Fusion pKF19) 5'-GGATCCTCTAGAGTCCTTCTTCCAATGTAAATCGC	35
5	pepA +M69221F3(In-Fusion) 5'-GGAAGACGTCGTCGGAATCGATTTTCGTCGTGA	34
6	pepA +M69221R3(In-Fusion) 5'-GGTAATTCCTTTCCCGCATATGCAAGGGTTTATTG	35
7	yflG +82F1(In-Fusion pKF19) 5'-GCATGCCTGCAGGTCTTCCCAGGCCCGTGTGTTTC	35
8	yflG +339R1(In-Fusion pKF19) 5'-ACCGAGCACAAATGAGATGCCTG	23
9	yflG +340F2(In-Fusion pKF19) 5'-GAAGGAGAAGAAGCGCTTCA	20
10	yflG +839R2(In-Fusion pKF19) 5'-GGATCCTCTAGAGTCCTGTGCATTGCAAGACCTCCTC	37
11	yflG +M69221F1.1(In-Fusion) 5'-TCTCATTTGTGCTCGGTATCGATTTTCGTTTCGTGA	35
12	yflG +M69221R1(In-Fusion) 5'-GCGTTCTTCTCCTTCCATATGCAAGGGTTTATTGT	35

3.1.2 *degQ*破壊株 (NAFM73) への形質転換

*degQ*を破壊してコンピテンスを高めた*B. subtilis* NAFM73 ($\Delta degQ::Er^R$) (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)の形質転換を行った。

リンコマイシンを 12.5 μ g/ml 及びエリスロマイシンを 1 μ g/ml となるよう添加した SP II 培地⁴⁾に NAFM73 株を植え、37℃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 $\times$ g, 20℃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。ここに 3.1.1 で調製したサンプルを約 1 μ g 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℃, 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 1 時間振盪培養を行った。300 μ g/ml のスペクチノマイシンを添加した LB 寒天培地に 200 μ l ずつ塗布し、37℃で 24 時間培養した。

順調に生育したコロニーを 300 μ g/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。

3.1.3 宮城野菌への形質転換

3.1.2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3.1.2と同じである。*pepA*と*yflG*を破壊した、それぞれの試験区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1のプライマー (*pepA*: No. 1+No. 4, *yflG*: No. 7+No. 10)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。

3.2 合成ペプチド基質への分解活性

4箇所のペプチダーゼ遺伝子を破壊した宮城野菌株 ($\Delta yqjE$, $\Delta ywaD$, $\Delta yflG$ 及び $\Delta pepA$)と、対象としてプロテアーゼ遺伝子を破壊した宮城野菌株 ($\Delta aprE$ 及び $\Delta nprE$)¹⁾、及び非遺伝子組み換えの宮城野菌株 (WT) の合計7株を試験に供した。

基質には、3つの合成ペプチド (①L-Proline p-nitroanilide trifluoroacetate salt (Pro-pNA), ②Glycyl-L-proline p-nitroanilide hydrochloride (Gly-Pro-pNA), ③L-Leucine p-nitroanilide (Leu-pNA)) を使用し、試験菌株の培養上清(粗酵素液)が基質に対し、どの程度の分解活性を示すか測定を行った。Pro-pNA及びGly-pro-pNAは滅菌水に、Leu-pNAは50%メタノールに溶解し、1mMの溶液を調製した。粗酵素液となる培養上清は、必要な抗生物質を添加した30mlのLB培地中、37℃で1晩、振盪しながら前培養した後、同様に新たな30mlのLB培地中で18時間培養し、遠心分離して調製した。

200 μ l の 1M Tris-Cl (pH7.5), 1, 100 μ l の滅菌水, 200 μ l の培養上清及び500 μ l の基質を混合して反応液とした。

分光光度計にスターラーバーを入れたセルをセットし、セルを37℃に温調した。セル内で反応液を調製し、410nmで15分間測定を行った。測定は3連で実施し、WTを1とした場合の比で基質に対する分解活性を評価した。

3.3 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株での納豆試作

国産のスズマルを0.18MPaで23分蒸煮した後、容器に入れて121℃で15分オートクレーブすることで完全滅菌した。種菌は、4株のペプチダーゼ遺伝子破壊宮城野菌株 ($\Delta yqjE$, $\Delta ywaD$, $\Delta yflG$ 及び $\Delta pepA$) 及び対照として非遺伝子組み換えの宮城野菌株 (WT) を使用した。それぞれの菌株をLB培地中、37℃で振盪培養後、滅菌水で600nmの吸光度が0.02程度になるよう合わせた。蒸煮大豆をPSP容器に50g充填し、種菌の水溶液を500 μ l ずつ添加した。被膜を掛けた状態で良く混合し、42℃の恒温器中で18時間発酵した。発酵終了後、4℃で20日間保存し、チロシンの析出やアンモニア態窒素の発生量を測定するためのサンプルとした。

3.4 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株を使用した納豆の評価

3.3の納豆について、4℃で20日間保存した後、目視によるチロシンの析出の有無及びかき混ぜた際の糸引

きの強さを評価した。また、納豆の貯蔵中に増加するアンモニア態窒素の量を、アンモニアテストワコー(和光純薬)を使用して測定した。サンプルとなる納豆は、30メッシュの裏ごし器で2回裏ごしし、約100mgを秤量した後、50mlにメスアップした。この素溶液を試験サンプルとして用いた。尚、測定のプロトコルは添付のマニュアルに従い、3連で測定を実施した。

4. 研究結果と考察

4.1 ペプチダーゼ遺伝子破壊株の作成

3.1.1で実施したクローニング結果の確認を行った。計画通りのクローニング産物が得られていれば、*pepA*を導入したベクターは、約4,920bpとなるはずである(表1のプライマーセットのNo.1+No.2から約800bp, No.3+No.4から約720bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bp, pKF19 K-2が約2200bpなので、合計で約4,920bp)。一方の*yflG*を導入したベクターは、約4,310bpとなるはずである(表1のプライマーセットのNo.7+No.8から約420bp, No.9+No.10から約490bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bp, pKF19 K-2が約2200bpなので、合計で約4,310bp)。

アガロースゲル電気泳動で確認すると計算通りの大きさのPCR産物がシングルバンドで得られた(図1)ことから、目的のクローニング産物が得られていることを確認した。

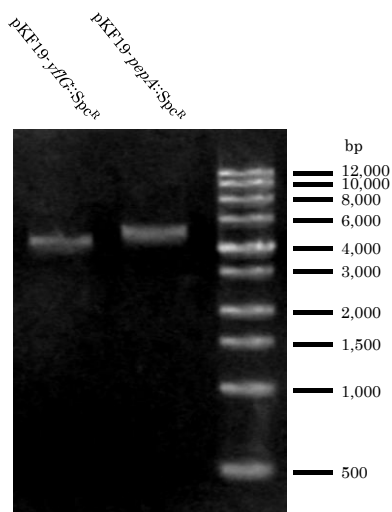


図1 クローニング結果の確認

宮城野菌へ形質転換を行った際にも、最終目的株が得られているか否かについて、ターゲット遺伝子のPCRとアガロースゲル電気泳動で確認した。先述のとおり、 $\Delta pepA$ 株は、表1のプライマーセットのNo.1+No.4で増幅した場合、約2,720bpとなるはずである(表1のプライマーセットのNo.1+No.2から約800bp, No.3+No.4から約720bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bpなので、合計で約2,720bp)。一方の $\Delta yflG$ 株は、表1のプライマーセットのNo.7+No.10で増幅した場合、約2,110bpとなるはずである(表1のプライマーセットのNo.7+No.8から約420bp, No.9+No.10から約490bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bpなので、合計で約2,110bp)。

アガロースゲル電気泳動で確認すると計算通りの大きさのPCR産物がシングルバンドで得られ(図2)、*pepA*及び*yflG*を破壊した納豆菌株が完成したことを確認した。

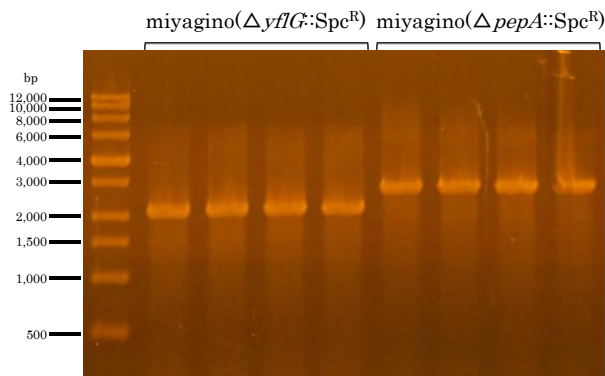


図2 宮城野菌への形質転換結果の確認

このことから、昨年度作成した $\Delta yqjE$ 及び $\Delta ywaD$ 株と共に、納豆の日持ち向上に寄与するか否かの試験に供した。

4.2 合成ペプチド基質への分解活性

ペプチダーゼ遺伝子を破壊した宮城野菌株($\Delta yqjE$, $\Delta ywaD$, $\Delta yflG$ 及び $\Delta pepA$)と、対象としてプロテアーゼ遺伝子を破壊した宮城野菌株($\Delta aprE$ 及び $\Delta nprE$)¹⁾、及び非遺伝子組み換えの宮城野菌株(WT)の合計7株全ての試験サンプルで、600nmの吸光度を測定すると最も生育の遅い*pepA*破壊株で2.13、最も生育の良い*aprE*破壊株で2.67となり、特に生育速度に大きな差や生育が不良な株は無かったが、比活性を算出する際、WTの菌数に合わせて結果を補正した。

試験した4株全ての破壊株で合成基質①Pro-pNA、②Gly-Pro-pNA、には分解活性を示さず、③Leu-pNAに対してのみ分解活性を示すことが確認された。

3つの合成ペプチド基質に対する試験菌株の活性の測定結果を図3に棒グラフで示した。結果は、WTの活性を1とした場合における、それぞれの株の活性を比で表している。また、菌の増殖具合を示す、O.D.(600nm)の結果を図3に折れ線グラフで示した。

WTと比較して、程度は互いに異なるもののLeu-pNAに対して分解活性が抑制される傾向にあることが確認されたが、試験結果のバラつきは大きかった。唯一、 $\Delta ywaD$ 株でLeu-pNAの分解活性が極端に低くなっており、納豆のタンパク質分解が抑制されることで発酵終了後の品質の変化が抑制され、賞味期限延長に寄与することが期待された。

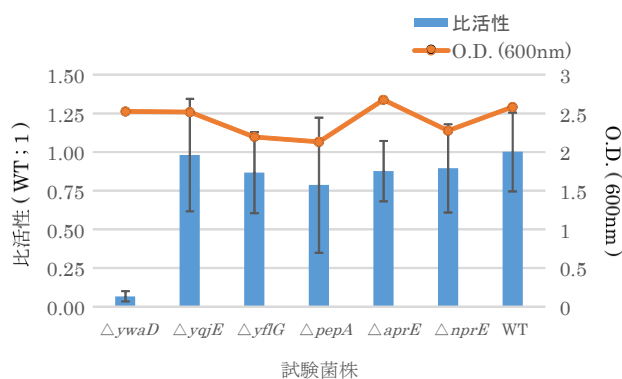


図3 遺伝子破壊株のLeu-pNAに対する分解活性

4.3 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株を使用した納豆の評価

3.3の納豆について、発酵終了直後の納豆の見た目、糸引きを確認したところ、大豆表面に均一に菌膜が張り、十分な糸引きが確認されたことから、試験サンプルとして申し分ないと判断した。

4℃で20日間保存した後、目視によるチロシンの析出の有無、かき混ぜた際の糸引きの強さ及びアンモニア態窒素含量を測定した結果を表2に示す。

試験に供した4株全てのペプチダーゼ破壊納豆菌株で、量の多少はあるもののアンモニア態窒素の量がWTよりも増加する結果となった。かき混ぜた際の粘りの強さは、ΔyqjE株でやや弱く感じた以外はWTと遜色なかったものの、大豆表面のチロシンの析出は、多くなっている印象だった。合成基質であるLeu-pNAに対する分解活性はΔywaD株で大幅に低下していたため、大豆由来のタンパク質の分解が抑制され、アンモニア態窒素の生産減少を始めとして、賞味期限の延長に寄与することを期待したが、期待とは異なる結果となった。

表2 アンモニア態窒素含量、チロシンの析出及び糸引きの強さの評価結果

菌株	アンモニア態窒素含量 (mg/100g 納豆)	チロシンの析出	糸引きの強さ
ΔywaD	253 ± 8	++	++
ΔyqjE	278 ± 7	++	+
ΔyflG	219 ± 3	++	++
ΔpepA	237 ± 1	++	++
WT	205 ± 2	+	++

5. まとめ

5.1 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株の作成

宮城野菌へ形質転換を行った後、最終目的株が得られているか否かについて、ターゲット遺伝子のPCRとアガロースゲル電気泳動で確認した。アガロースゲル電気泳動の結果、計算通りの大きさのPCR産物がシングルバンドで得られた(図2)ことから、*pepA*及び*yflG*を破壊した納豆菌株が完成したことを確認した。

5.2 合成ペプチド基質への分解活性

ペプチダーゼ遺伝子を破壊した4株の宮城野菌株(ΔyqjE, ΔywaD, ΔyflG及びΔpepA)は、合成基質①

Pro-pNA, ②Gly-Pro-pNA, には分解活性を示さず, ③Leu-pNAに対してのみ分解活性を示すことが確認された。また, ΔywaD株でLeu-pNAの分解活性が大幅に低くなっており, 納豆のタンパク質分解が抑制されることで発酵終了後の品質の変化が抑制され, 賞味期限延長に寄与することが期待された。

5.3 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株を使用した納豆の評価

ペプチダーゼ遺伝子を破壊した4株の宮城野菌株(ΔyqjE, ΔywaD, ΔyflG及びΔpepA)で試作した納豆を4℃で20日間保存した後、目視によるチロシンの析出の有無、かき混ぜた際の糸引きの強さ及びアンモニア態窒素含量を測定したところ、全体にアンモニア態窒素の量がWTよりも増加した他、大豆表面のチロシンの析出は、多い印象であった。合成基質であるLeu-pNAに対する分解活性はΔywaD株で大幅に低下していたため、賞味期限の延長に寄与することを期待したが、期待とは異なる結果となった。

6. 今後の課題

引き続き、納豆菌の遺伝子の中で、賞味期限延長に寄与する領域の特定を進める。同時に、紫外線処理などにより、変異を誘発し、賞味期限延長を可能にする納豆菌の育種を進める。

7. 謝辞

本研究の研究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(現山梨大学)に感謝致します。

8. 参考文献

- 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, **44**, 45-48 (2016)
- 久保雄司, 中川力夫, 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, 茨城県工業技術センター平成28年度研究報告, **45**, 17-20 (2017)
- Guerout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N. and Stragier, P., Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, **167**, 335-336 (1995).
- Albano, M., Hahn, J., and Dubnau, D., Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3110-3117 (1987).