

## 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 3 報)

久保 雄司\* 吉浦 貴紀\*

## 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、かつ、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認すれば、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・熟成速度に関与する遺伝子領域の解明と、既存の菌株よりも賞味期限を延長可能な納豆菌株の育種を目的とする。

## 2. 目的

本研究では、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認することを目的とする。

## 3. 研究内容

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いる。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ることから、大豆タンパク質の分解速度は納豆の品質保持に効果があると考えた。

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しすぎること、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<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>。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。

ターゲットとするペプチダーゼ遺伝子として、納豆の発酵過程で転写量の多い遺伝子を RT-qPCR で検討して決定した。既報<sup>2)</sup>のとおり、*ybaC*, *yjbG* では非特異

的な増幅が起こってしまい、転写量を評価できなかったため、本年度はこの 2 つの領域を遺伝子組み換えのターゲットとした。

また、納豆の成分は、納豆菌が増殖し生活環を経る中で形成される。つまり、納豆菌の増殖や代謝が納豆の品質を決定づけることになるため、納豆菌の増殖スピードや数に変化が生じれば、納豆の品質にも変化が生じる可能性が高い。

細菌の増殖に関与する物質としてポリアミンが知られている<sup>3)</sup>。そこで、本年度は、ペプチダーゼ遺伝子に加え、ポリアミンの代謝に関与する遺伝子領域である *bltD* と *paiA* も検討することとした。

加えて、昨年度までに作成した宮城野菌のペプチダーゼ遺伝子破壊株 ( $\Delta ywaD$ ,  $\Delta pepA$ ,  $\Delta yf1G$ ,  $\Delta yqjE$ )<sup>2,4)</sup> も一部の試験において評価対象に含めた。

## 3.1 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

遺伝子組み換え株の作成方法は、既報<sup>4)</sup>と同様であるため、概略のみを記す。なお、遺伝子組み換えのベースとして、昨年度までと同様、宮城野菌を選択した。

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. 5+No. 6, No. 7+No. 8, No. 11+No. 12, No. 13+No. 14, No. 17+No. 18) を利用した PCR によりターゲット領域を増幅した。抗生物質耐性マーカーは、pDG1726<sup>3)</sup> を鋳型にして、表 1 中の No. 3+No. 4, No. 9+No. 10, No. 15+No. 16 のプライマーセットにてスペクチノマイシン耐性カセット (*Spc<sup>R</sup>*)<sup>5)</sup> を増幅した。なお、プライマーは、増幅末端が 15 塩基ずつ重なる様配慮しつつ、GENETYX ((株)ゼネティックス) のプライマー設計支援機能を利用して構築した。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。

DNA を連結するライゲーション反応とコンピテントセル (形質転換受容性細胞) への形質転換は、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用した。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み、ベクターに 1 ステップで繋ぎ、コンピテントセルに導入後、遺伝子の増幅 (クローニング) を行った。クローニングした DNA は次の行程の形質転換に使用するため、*DraIII* で消化後、一本鎖になっていることをアガロースゲル電気泳動で確認した。

表1 PCRに使用したプライマー一覧

No.	上段: プライマー名称 下段: 配列	mer
1	INF(pKF19+paiA-289)Fw.1.1 5'-GCATGCCTGCAGGTGCATCATCGTTAAGGGAGGCGT	35
2	INF(paiA+271)Rv.1.1 5'-GTGATTCAGCACCCA	15
3	INF(paiA+M69221)Fw.1.1 5'-TGGGTGCTGAATCACATCGATTTTCGTTTCGTGA	33
4	INF(M69221+paiA)Rv.1.1 5'-ATGTTTTTGAAGCTCATATGCAAGGGTTTATTG	34
5	INF(paiA+301)Fw.2.1 5'-AGCTTTCAAAAACATGGGCT	20
6	INF(paiA+759+pKF19) Rv.2.1 5'-GGATCCTCTAGAGTCCATCTTCACAGGCTTC	31
7	INF(pKF19+ybaC-151)Fw.1 5'-GCATGCCTGCAGGTGCTGAAGGCGGACGTA	32
8	INF(ybaC+446)Rv.1 5'-GATTCTTCATCGTGAGGG	18
9	INF(ybaC+M69221)Fw.1 5'-TCACGATGAAGAATCATCGATTTTCGTTTCGTGA	33
10	INF(M69221+ybaC)Rv.1 5'-CCAATGAAAGCTGTGCATATGCAAGGGTTTATTG	34
11	INF(ybaC+510)Fw.2 5'-CACACGTTTCATTTGGTGCTC	20
12	INF(ybaC+1111+pKF19)Rv.2 5'-GGATCCTCTAGAGTGGGTGTGTCAGCAACC	31
13	INF(pKF19+yjbG+165)Fw.1 5'-GCATGCCTGCAGGTGACAGCAGGGGGATCA	30
14	INF(yjbG+920)Rv.1 5'-TTCACAGTGCCGCTAAGCGT	20
15	INF(yjbG+M69221)Fw.1 5'-TAGCGGCACTGTGAAATCGATTTTCGTTTCGTGA	33
16	INF(M69221+yjbG)Rv.1 5'-GTAGAAGTTGCTCTCATATGCAAGGGTTTATTG	34
17	INF(yjbG+922)Fw.2 5'-AAGGACAACCTTCTACGCGAG	20
18	INF(yjbG+2002+pKF19)Rv.2 5'-GGATCCTCTAGAGTGCAGCTTTCATCAGCAGCTC	33

### 3.1.2 宮城野菌への形質転換

最終的なターゲットとなる宿主は宮城野菌(WT) (以下、「WT」と記載する。)であるが、形質転換効率が低く、クローニングしたベクター遺伝子を直接導入することが難しいため、一旦、*degQ*を破壊してコンピテンスを高めた*B. subtilis* NAFM73( $\Delta degQ::Er^R$ )<sup>5)</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、3.1.1で調製したDNAの形質転換を行った後、そのゲノムDNAを使用して宮城野菌へ形質転換するという、二段階で菌株を作成した。試験手順は既報<sup>4)</sup>のとおりである。

選択マーカーとして使用したスペクチノマイシン(Spc)添加培地中での生育の良い菌株を単離し、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(*paiA*及び*bltD*+*paiA*の二重破壊株: No.1+No.6, *ybaC*: No.7+No.12, *yjbG*: No.13+No.18)を用いてPCRを行った後、アガロースゲル電気泳動で結果を確認した。

### 3.2 試験菌株での納豆試作

国産大豆(スズマル)を0.18MPaで23分蒸煮した後、容器に入れて121°Cで15分オートクレーブすることで完全滅菌した。種菌は、遺伝子を破壊した5株の宮城野菌株( $\Delta ybaC$ ,  $\Delta yjbG$ ,  $\Delta bltD$ ,  $\Delta paiA$ ,  $\Delta bltD+\Delta paiA$ の二重破壊株)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°Cで20時間程度振盪培養し、滅菌水で100倍希釈した。50g程度の蒸煮大豆をPSP容器に充填し、種菌の水溶液を500 $\mu$ lずつ添加した。被膜を掛けた状態で良く混合

し、42°Cの恒温器中で18時間発酵した。

### 3.3 遺伝子破壊納豆菌株を使用した納豆の評価

#### 3.3.1 糸引き、チロシンの析出度合い

3.2に記載の、対照株を含めて6株で試作した納豆について、4°Cで10日間及び、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。

#### 3.3.2 前処理

3.2に記載の納豆について、①発酵終了直後、4°Cで保存し、②10日間及び③20日間経過した段階でサンプリングを行った。30メッシュの裏ごし器で2回裏ごしし、各種分析に使用するサンプルとした。

#### 3.3.3 アンモニア態窒素含量測定

3.3.2で裏ごしした納豆について、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。約100mgを秤量した後、50mlにメスアップし、試験サンプルとして用いた。なお、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。

また、原料である蒸し大豆に起因する差を無くした場合にどうなるかについて評価する目的で、LB培地中、37°C、110rpmの条件で振盪培養して24時間、48時間経過した時点における培養液中のアンモニア態窒素含量を測定した。今回の様な評価は、これまでに行っていないため、納豆の試作に用いた6株に加え、過去に作成した4株( $\Delta ywaD$ ,  $\Delta pepA$ ,  $\Delta yf1G$ ,  $\Delta yqjE$ )<sup>2,4)</sup>を加えた10株について試験を実施した。なお、遺伝子を組み換えていないWTを対照とした。

#### 3.3.4 遊離アミノ酸含量測定

3.3.2で裏ごしした納豆について、遊離アミノ酸含量の測定を行った。ターゲットとするアミノ酸は、アミノ酸混合標準液、AN-II型及びB型(富士フィルム和光純薬(株))を合わせた35種とした。実験操作は、既報<sup>6)</sup>を参考に実施した。

##### 3.3.4.1 抽出操作

裏ごし納豆を遠心チューブに約0.5gずつ秤量した。70%エタノールで抽出操作を3回繰り返した後、10mlにメスアップした。シリンジフィルター(ADVANTEC 13CP020AS)にて濾過し、不溶物及び菌体を除去した。pH2.2クエン酸リチウムバッファーと混合、15,000 $\times$ gにて遠心分離し、上清を試験サンプルとした。

##### 3.3.4.2 HPLC分析

HPLC(Prominence20シリーズ, 島津製作所)のアミノ酸分析システムを使用し、ポストカラムOPA誘導体化法にて実施した。詳細な条件は、以下のとおり。

アンモニアトラップ : Shim-pack ISC-30/S0504Li  
 分析カラム : Shim-pack Amino-Li  
 移動相 : アミノ酸移動相キットLi(島津)  
 (AA-MA(Li), AA-MB(Li), AA-MC(Li))  
 反応液 : 分析キットOPA試薬(島津)  
 (AA-RA, AA-RB)

流速 : 0.6ml (グラジエント)  
 カラム温度 : 39°C  
 検出 : 蛍光検出器  
 (励起350nm, 蛍光450nm)  
 定量 : 標準品を用いた検量線法

### 3.4 有意差検定

アンモニア態窒素含量, 総遊離アミノ酸量について, エクセル統計2015を使用し, Tukey kramer法により標準品である宮城野菌を使用したサンプルとの有意差検定を実施した。

## 4. 研究結果と考察

### 4.1 遺伝子破壊株の作成

3.1.2で実施した形質転換結果の確認を行った。*ybaC*を組み換えた宮城野菌の当該領域を表1のプライマーNo. 7及びNo. 12で増幅したPCR産物は, 約2,460bpとなる(*ybaC*領域が約1,260bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bp)。*yjbG*を組み換えた場合, 表1のプライマーNo. 13及びNo. 18で増幅したPCR産物は, 約3,040bpとなる(*yjbG*領域が約1,840bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bp)。*paiA*を組み換えた場合, 表1のプライマーNo. 1及びNo. 6で増幅したPCR産物は, 約2,250bpとなる(*paiA*領域が約1,050bp, スペクチノマイシンカセットが約1,200bp)。*bltD*+*paiA*の二重破壊株については, *bltD*領域についても同様にPCRとアガロースゲル電気泳動を行い, 目的通りに遺伝子組み換えが起こっていることを確認した。

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, 図2)ことから, 目的の遺伝子組み換え株が得られていることを確認した。

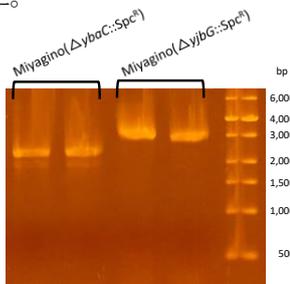


図1 *ybaC*, *yjbG*部分の遺伝子組み換え結果

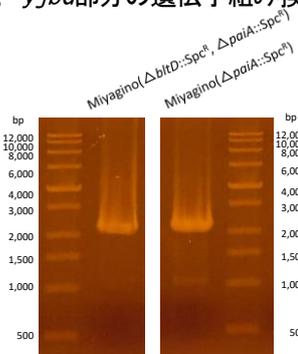


図2 *paiA*部分の遺伝子組み換え結果

### 4.2 遺伝子破壊納豆菌株を使用した納豆の評価

#### 4.2.1 糸引き, チロシンの析出度合い

3.2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, 全ての菌株で, 菌膜, 糸引

きが良好な納豆ができることを確認した。

4°Cで10日及び20日間保存した後, 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について, 目視にて非組み換え体であるWTと比較した(表2)。対照(宮城野菌)より糸引きが弱くなる株はなかったが, 大豆表面のチロシンの析出が宮城野菌より顕著に少なくなる株も見られなかった。

表2 チロシンの析出及び糸引きの強さの評価結果

菌株	10日保存時点		20日保存時点	
	チロシンの析出	糸引きの強さ	チロシンの析出	糸引きの強さ
Miyagino(Δ <i>ybaC</i> )	-	++	± ~ +	++
Miyagino(Δ <i>yjbG</i> )	-	++	+	++
Miyagino(Δ <i>bltD</i> )	-	++	+	++
Miyagino(Δ <i>paiA</i> )	-	++	- ~ ±	++
Miyagino(Δ <i>bltD</i> , Δ <i>paiA</i> )	-	++	+	++
Miyagino(WT)	-	++	- ~ ±	++

#### 4.2.2 アンモニア態窒素含量測定

全ての菌株で, 製造直後から20日間保存時点までにアンモニア態窒素含量が増加することが確認された。その中で, 10日時点においてWTが215mg/100gであったのに対して*paiA*遺伝子を破壊した株が175mg/100gという結果となり, 唯一, WTに対し1%の危険率で有意に少ないことが認められた(図3)。製造直後及び20日間保存においても, *paiA*遺伝子を破壊した株で, 宮城野菌のよりやや低い値を示したものの, 有意差はないという結果になった。保存期間中のアンモニア態窒素含量の増加分を見ると, *yjbG*破壊株は, 製造直後の208mg/100gから20日間保存時点の248mg/100gと, 40mg/100gの増加にとどまり, WTの増加分, 75mg/100gよりも低い値を示し, 変化が少ないことが伺えた。

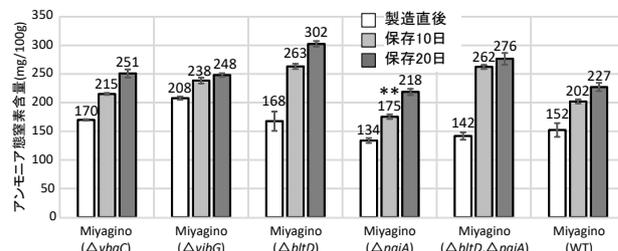


図3 納豆のアンモニア態窒素含量 (\*\*\*)は宮城野菌に対し, 1%の危険率で有意差が認められることを示す

液体培養を行った際には, 培養24時間時点でWTに対して有意にアンモニア態窒素含量が少ない株は見受けられなかった(図4)。48時間時点で, 唯一, 昨年度に作成した*ywaD*を破壊した株<sup>4)</sup>のみ, 74mg/100mlという結果を示し, WTの80mg/100mlと比較し5%の危険率で有意に少ないという結果になった。但し, *ywaD*破壊株は, 過去に納豆の試作試験で, WTに対してアンモニア含量やチロシンの析出が増える傾向を示した<sup>4)</sup>。合成培地などと異なり, 生物試料である大豆を使用した納豆では, 同じ条件で加工処理した蒸し大豆であっても, 品質的に全く均一とはならず, 発酵容器ごとに差が生じてしまい, その差が最終的な結果に影響を与えた可能性が考えられた。図3に示した納豆の保存試験の結果, *paiA*破壊株においてWTに対してアンモニア態窒素含量が低い傾向が確認されたが, 同一菌株で試作した別パックのサンプルでは, WTよりも高いアンモニア態窒素含量を示すものも確認された。WTよりも熟成が進み

やすいと結論付けた *ywaD* 破壊株の結果<sup>4)</sup>を含め、納豆の評価については、蒸し大豆の状態を揃えつつ、サンプル数を増やしてその平均をとるなど、より配慮しながら再度の検討が必要である。

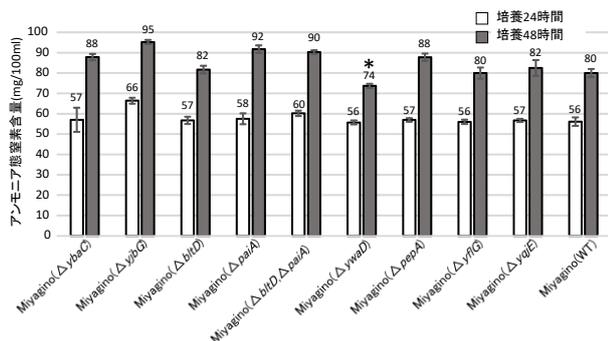


図4 LB培養液のアンモニア態窒素含量（「\*」は宮城野菌に対し、5%の危険率で有意差が認められることを示す）

#### 4.2.3 遊離アミノ酸含量測定

製造直後の納豆を比較すると、遺伝子組み換えを行っていないWTで納豆100g当たり751mgの遊離アミノ酸含量だったのに対し、これよりも少ない結果となったのは、*paiA* 破壊株の665mg及び***b1tD + paiA*** 二重破壊株の702mgだった(図5)。一方、4℃で10日間保存した際の比較では、WTで納豆100g当たり1524mgの遊離アミノ酸含量となったのに対し、これを下回ったのは、*ybaC* 遺伝子破壊株の1,242mgと、*paiA* 破壊株の981mgの2つとなり長期保存でも品質変化が少ない可能性が示された。製造直後には宮城野菌よりも遊離アミノ酸の少なかった *b1tD + paiA* 二重破壊株は1841mgとなり、保存によりタンパク質の分解が進んだことが確認された。

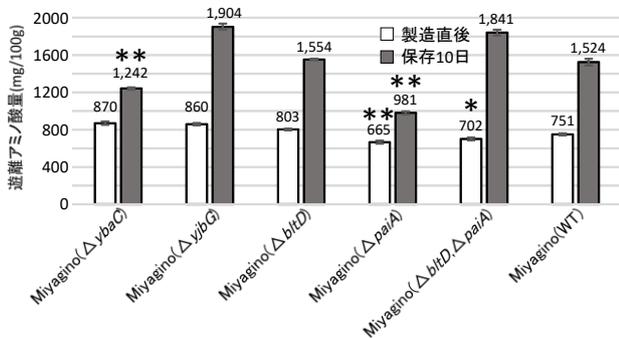


図5 遊離アミノ酸総量の比較（「\*」は宮城野菌に対し、5%、「\*\*」は1%の危険率で有意差が認められることを示す）

### 5. まとめ

#### 5.1 ペプチダーゼ遺伝子破壊納豆菌株の作成

ペプチダーゼ遺伝子 (*ybaC*, *yjbG*) 及びポリアミン代謝関連遺伝子 (*paiA*, *b1tD + paiA*) を破壊した宮城野菌株を作成した。最終目的株が得られていることを、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。

#### 5.2 遺伝子を破壊した納豆菌株を使用した評価

本年度に作成した、遺伝子を破壊した宮城野菌株 ( $\Delta ybaC$ ,  $\Delta yjbG$ ,  $\Delta b1tD$ ,  $\Delta paiA$ ,  $\Delta b1tD + \Delta paiA$ ) で試作した納豆を4℃で保存した後、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、遊離アミノ酸量を測定した。対照で

ある宮城野菌(WT)よりも顕著に糸引きが弱くなる株はなかったが、大豆表面のチロシンの析出がWTより少なくなる株も見られなかった。アンモニア態窒素量については、10日保存時点で *paiA* 破壊株においてWTに対し有意差が見られ、保存期間中の増加量では *yjbG* 破壊株が最も少ないという結果になった。総遊離アミノ酸量については、保存10日時点で *paiA* 破壊株や *ybaC* 破壊株においてWTよりも有意に少なくなる傾向が見られた。但し、合成培地と異なり、納豆の評価については、蒸し大豆の状態が結果に影響を与えるため、再現性等の検討が必要である。

上記の5株に加え、これまでに作成した遺伝子を破壊した4株の宮城野菌株 ( $\Delta ywaD$ ,  $\Delta pepA$ ,  $\Delta yjiG$ ,  $\Delta yjaE$ )<sup>2,4)</sup>を含め、液体培養にてアンモニア態窒素含量の増加を評価すると、48時間培養時点において  $\Delta ywaD$  株でアンモニア態窒素含量が少ない傾向を示した。

以上の結果から、 $\Delta paiA$ ,  $\Delta ybaC$ ,  $\Delta yjbG$ ,  $\Delta ywaD$  の4株が有望株として挙げられると考える。

### 6. 今後の課題

納豆、培養液を用いた評価について再現性の検討が必要。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

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ユニット長に感謝致します。

### 8. 参考文献

- 久保雄司, 中川力夫, 納豆菌フェ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)
- 五十嵐一衛, 柏木敬子, 細胞増殖必須因子ポリアミンと代謝物アクロレインの生理作用と臨床応用, 化学と生物, 49, 32-39 (2011)
- 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, 茨城県産業技術イノベーションセンター平成29年度研究報告, 46, 23-26 (2018)
- Guerout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N. and Stragier, P., Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 167, 335-336 (1995).
- 永井利郎, 西村和典, 鈴木英也, 番場康夫, 佐々木裕, 木内幹, 高旨味高粘性納豆用菌株の開発, 日本食品工業学会誌, 41, 123-128 (1994).