

免疫機能を高める納豆菌の高度利用技術の開発に関する試験研究事業

飛田 啓輔* 國谷 宏輔* 澤島 真名美* 野口 友嗣* 行武 栄太郎**

1. はじめに

近年、ウイルス感染症が世界的に蔓延しており、深刻な社会問題となっている。ウイルス感染症は、高熱、倦怠、発疹、関節痛、肺炎などの様々な症状を伴うことが一般的だが、乳児、高齢者、あるいは基礎疾患を持つ患者では重篤な症状を引き起こすことがある。2019年に報告された新型コロナウイルス感染症(COVID-19)では感染者数は累計6億7千万人以上、死者数は680万人以上となり(2023年3月10日時点)、世界的なパンデミックを引き起こした。COVID-19については、WHOが「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」を宣言し、終息宣言まで3年以上の時間を要したことは記憶に新しい。このような観点からも、ウイルス感染症を予防・改善する技術開発は、極めて重要なテーマと言える。

納豆は、全国的に茨城県を代表とする特産品と知られており、生産額も日本一である。納豆は、江戸時代の医学書「本朝食鑑」に「腹中を整え、食を進め、毒を解す」と示されるなど、古くから感染防御機能を中心に、健康維持機能が経験的に知られてきた¹⁾。さらに最近、日本における45歳から74歳までの男女約9万人を対象に、約15年間追跡した多目的コホート研究の調査結果が公表された。その結果には、男女ともに「発酵性大豆食品の摂取量が多いほど、死亡全体のリスクが低下する」ことが示されている²⁾。納豆は、蒸した大豆を納豆菌によって発酵させた発酵食品であることから、納豆菌が感染防御機能や免疫賦活機能を有していることは想像に難くない。

当センターが事前に実施した文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「機能性食品開発に資する発酵食品由来微生物に関する調査(令和3年度~4年度)」において、「当センターが保有する納豆菌が、抗ウイルス効果を促進する」ことを細胞レベルで明らかになった。さらに、当センターが主催し、食品やヘルスケアに係る県内企業や団体が参画した「ヘルスケア・フーズ研究会(令和3年度)」では、企業会員38名の76%が、当該納豆菌などを活用したビジネス創出に興味を持っていることが、アンケートの結果から分かった。茨城県が策定した第2次茨城県総合計画では、新しい安心安全へのチャレンジとして「健康長寿日本一」を掲げ、新しい感染症対策を目標としており、アフターコロナを見据えて、新しいウイルス感染症対策が求められている。さらに、当該計画で「新産業育成と中小企業等の成長」も掲げ、「先端技術を取り入れた新産業の育成と新しい産業集積づくり」を目標としており、納豆菌を活用することで感染症予防を目的とした新たな機能性食品の創出が期待されている。

2. 目的

これまでに、当センターが保有する納豆菌による抗

ウイルス効果を促進する機能は、細胞レベルや試験管レベルで調製・評価したものである³⁾。感染症予防機能などの免疫賦活作用を目的としたヘルスケア製品へ利用するためには、実験動物による機能性や安全性のエビデンスの獲得と、当該納豆菌の実機生産を念頭に置いた安定生産技術の開発が必要である。

そこで、当センターは文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「免疫機能を高める納豆菌の高度利用技術の開発に関する試験研究事業(令和6年度~令和10年度)」の一環として(図1)、当センターが保有する納豆菌を、免疫賦活作用が期待できる機能性食品の原料として活用することを目的として、以下の研究に取り組む。

3. 研究内容

3.1 全体の研究計画

試験研究事業において、以下の項目について研究する計画である。

3.1.1 納豆菌の機能性と安全性のエビデンスの獲得

- 動物試験による納豆菌の機能性に関するエビデンスの獲得
納豆菌を経口投与したマウスから血液、細胞などの生体試料を採取し、納豆菌がマウスの免疫機能や菌叢に与える影響を調べる。
- 納豆菌の急性・遺伝毒性試験による安全性に関するエビデンスの獲得
納豆菌の復帰突然変異試験やマウスへの経口投与試験により、遺伝毒性と急性毒性について調べる。

3.1.2 納豆菌の培養・製剤化技術の開発

- 免疫活性の高い納豆菌の培養技術の開発
菌体製剤化システムを用いて、温度や培地組成を検討することで、免疫活性が高い納豆菌を得るための液体培養技術を開発する。
- 安全性の高いフードグレード培地の開発
納豆菌を食品として利用できるようにするために、食品素材などからなる納豆菌培養培地を開発する。
- 免疫賦活作用の高い製剤化技術の開発
納豆菌数や免疫賦活作用を指標として、粉末製剤や錠剤化の技術開発の検討を行う。

3.1.3 納豆菌の定性法の開発と活性成分の同定

- 活性成分の調査
高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて、納豆菌の免疫活性に関わる成分などの解析を行う。
- 納豆菌を特異的に検出できる技術の開発
次世代シーケンサーを用いてゲノムレベルで納豆菌の特性を解析し、特異的に検出できるPCRプライマーの開発を行う。



図1 免疫機能を高める納豆菌の高度利用技術の開発に関する試験研究事業

3.2 令和6年度の研究内容

令和6年度は、当センターが保有する納豆菌の「液体培地における増殖性の調査」、「納豆菌が保有する染色体の調査」、「納豆菌体に含まれる成分分析」などを行った。

3.2.1 納豆菌の液体培地における増殖性の調査

一般的に、納豆菌の培養には、寒天培地上に生育した納豆菌コロニーを掻きとる固形培養法が使われる。しかし、固形培養法はシャーレ1枚1枚からコロニーを掻きとり、納豆菌体を回収するため、労力とコストがかかることが課題であった。そこで、本研究事業ではコロニーの回収に手間がかからず、納豆菌を一度に大量に培養することができる液体培養法を採用した。納豆菌を液体培地中で培養し、培養液を遠心分離することで納豆菌体を得て、増殖性を調査する(図2)。

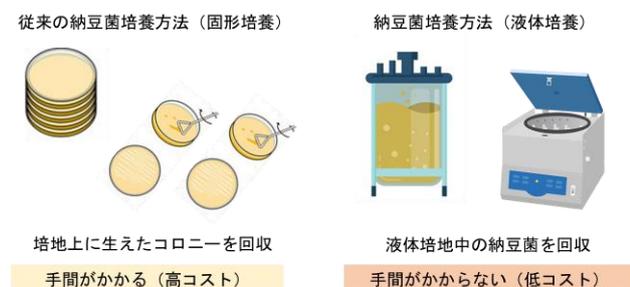


図2 納豆菌の培養法の特徴

納豆菌は、当センターで保有する菌株を実験に供した。納豆菌の培養にはLB培地(1%塩化ナトリウム、1%トリプトン、0.5%酵母エキス)を用いた。培養には、菌体制剤化システムにおける10 L容量のジャーファーマンター(ABLE社製 BMS-10NP4)を用いた(図3)。納豆菌は、攪拌速度300rpm、通気量2.0 L/min、培養温度37°Cの条件で培養した。ジャーファーマンター内における培養液のpH値測定にはハミルトンpHレドックスセンサー(HAMILTON社製)、濁度測定(CU値)にはASD12-Nセンサー(optek社製)を用いた。pH値と濁度は1分間に1回の間隔で測定した。培養液は、オートサンプラーLA-32A(ABLE社製)を用いて1時間に1回、約5 mLをサンプリングした。サンプリングした培養液の濁度(OD600)は、サンプリング培養液を純水で10倍に希釈

し、Ultrospec 2100(AMERSHAM社製)を用いて、吸光度600 nmの測定値から求めた。



図3 納豆菌の液体培養に用いた菌体制剤化システム(ジャーファーマンターとオートサンプラー)

3.2.2 納豆菌が保有する遺伝子の調査

DNA配列を理解することは、RNAだけでなくタンパク質の構造や機能を解明することに繋がり、生命の根底を理解することにもなる。次世代シーケンシング(NGS)は、数千から数百万ものDNA分子を同時に配列決定できる基盤技術と言われる。次世代シーケンシングは、複数個体を同時に配列決定できるなど、高度かつ高速な処理が可能であり、微生物学、細胞工学、臨床診断学などの多岐に渡る学問・分野に変革をもたらした。

次世代シーケンサーは、トランスクリプトーム解析*や遺伝子発現解析に役立つ。例えば、全転写産物をシーケンスすることにより、遺伝子の発現量を算出できる。一般的に、ゲノム配列が明らかになっている生物種に対して、全転写産物のシーケンスを行い、得られたリードをゲノム配列にマッピングして、マッピングされたリードをカウントすることで、遺伝子の発現量を算出することが可能となる。ゲノム配列が明らかになっていない場合には、得られたリードをアセンブルした上で、得られた配列に対してマッピングすることで、遺伝子の発現量を算出することができる。

また、次世代シーケンサーでは、タンパク質をコードしている領域だけでなく、非コーディング領域も含めて、全ゲノムをシーケンスすることができる。その結果、ゲノムの一塩基多型(SNP)、短い塩基の挿入または欠損、転座などの構造変異などを検出することができる。

さらに、次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA遺伝子をPCRにて増幅してシーケンスすることで、サンプルに含まれる細菌の種類や比率を算出することが可能となる。16S rRNA遺伝子は、細菌に普遍的に発現しており、配列に多様性があることから、細菌種を同定するために用いられる。

本研究事業において令和6年度に整備した次世代シーケンサーのIon GeneStudio S5システム(Thermo

*注釈 遺伝子発現を網羅的に解析する手法のこと

Fisher Scientific社製) は、ショートリードのシーケンサーで、大量のスループットが得られる (図4)。



図4 次世代シーケンサー
(Ion GeneStudio S5システム)

また、スループットのスケールは、シーケンス時に使用するチップにより、変更可能となっていることが特徴である (図5)。原理は、塩基が伸長する際の水素イオンによる pH 変異を読み取るといったシーケンスの手法を採用している。今回は、次世代シーケンサーを用いた当センター保有納豆菌の遺伝子解析の事例を述べる。



図5 次世代シーケンサーに使用する半導体チップ

3.2.3 納豆菌体に含まれる成分分析

細菌が合成するアミノ酸は、ヒトを含めた宿主に対して、様々な影響を及ぼすことが明らかになっている。腸内細菌によって合成される D-アミノ酸は、小腸上皮に存在する D-アミノ酸オキシダーゼによって分解されることで過酸化水素が発生し、腸管病原性細菌に対して強い抗菌活性を示す。また、一部のプロバイオティクスによって合成される D-トリプトファンは、アレルギー応答に関連するサイトカインの合成や分泌を抑制することで、アレルギー性気道疾患を改善に導くことが報告されている。さらに、D-アミノ酸が自然免疫応答に関与していることが報告されている。

本研究事業において、令和6年度に整備した高速液体クロマトグラフ質量分析計 (島津製作所社製) は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と四重極型質量分析計 (MS/MS) を組合わせた装置である (図6)。この装置に

*注釈 遺伝子発現を網羅的に解析する手法のこと

より、液中の有機成分を分離し、質量によって分析を行うことができる。今回は、当センターが保有する納豆菌体に含まれるアミノ酸類を調べるために、納豆菌の加水分解抽出液を調製し、抽出液中のアミノ酸類について分析したので、紹介する。

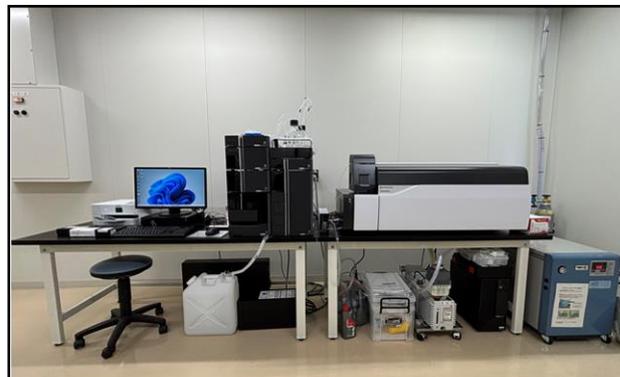


図6 高速液体クロマトグラフ質量分析計

4. 結果と考察

4.1 納豆菌の液体培地における増殖性の調査

LB培地で納豆菌を培養した時の、培地pH値と濁度センサーTurb値 (CU値) を図7に示す。培地のpH値は、培養開始では6.5付近であったが、培養開始から240分間経過した付近から上昇することが確認できた。また、培養時間の経過とともに、CU値は上昇することが確認できた。一般的に、液体培地中で細菌が増殖すると、培地の濁度は上昇することが知られている。これらの結果から、納豆菌は、培養時間の経過とともに増殖し、培地pH値は中性から弱アルカリ性に変化することがわかった。

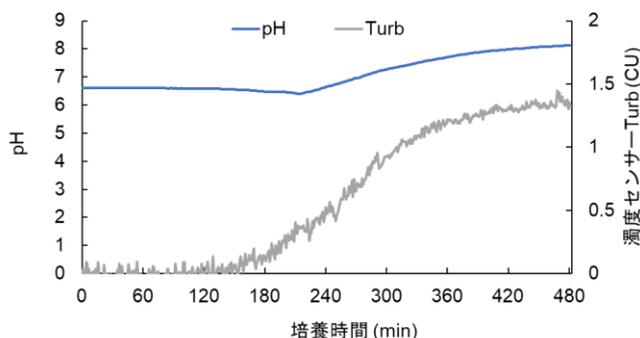


図7 納豆菌培養におけるpHと濁度の変化

LB培地で納豆菌を培養した時の培養液のOD600と濁度センサー値 (CU値) を図8に示す。OD600と濁度センサー値 (CU) には高い相関があることがわかった。これらの結果から、濁度センサーで測定した培地のCU値は、OD600に変換することが可能であることがわかった。

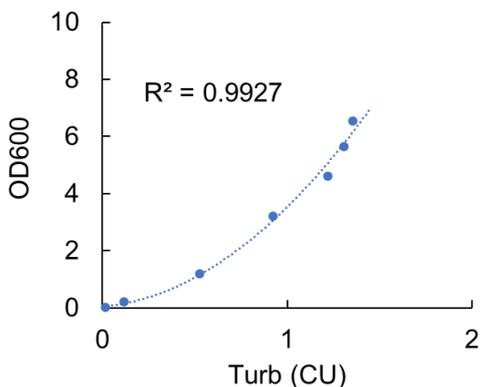


図8 OD600と濁度センサーCU値の相関

4.2 納豆菌の保有する染色体の特徴

センターが保有する納豆菌の染色体の特徴を、表 1 に示す。染色体 DNA サイズは 4.1 Mbp であり、65,992 bp のプラスミドを保有することがわかった。

表1 センター保有納豆菌の染色体

菌株	染色体 DNA サイズ[bp]	プラスミド サイズ[bp]
センター 保有納豆菌	4,117,106 (4.1 Mbp)	65,992

4.3 納豆菌体に含まれる成分分析

センターが保有する納豆菌の加水分解抽出液におけるアミノ酸類のクロマトグラフを図 9 に示す。クロマトグラフから複数のピークが検出された。これらの結果から、複数のアミノ酸が納豆菌体に含まれていることがわかった。

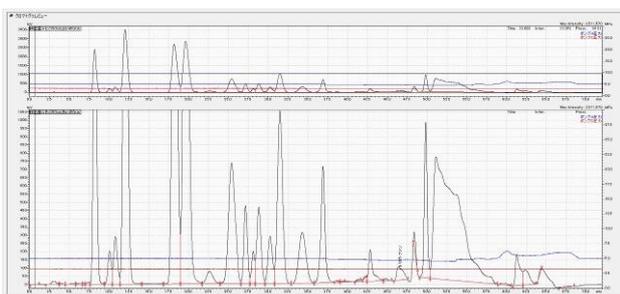


図9 納豆菌体抽出液に含まれるアミノ酸類のクロマトグラフ

5. まとめ

今年度の研究では、センターが保有する納豆菌について、以下の3点が明らかになった。

- ・ 納豆菌は、液体培地を用いた培養法において増殖した。
- ・ 納豆菌の染色体 DNA サイズとプラスミド保有が、明らかになった。
- ・ 納豆菌体には、複数のアミノ酸が含まれていた。

*注釈 遺伝子発現を網羅的に解析する手法のこと

なお、本研究は令和 6 年度から令和 10 年度まで文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業の一環として実施しているものである。

6. 今後の予定

- ・ 納豆菌のマウスへの経口投与による急性毒性を調べる予定である。
- ・ 免疫細胞を用いた評価によって、免疫賦活作用が高くなる納豆菌の培養条件を検討する予定である。
- ・ 納豆菌の全ゲノム配列の解析によって、特異的塩基配列の調査を行う予定である。

7. 参考文献等

- 1) 須見 洋行：納豆の機能性. 日本醸造協会誌、85巻、8号、518-524 (1990).
- 2) Katagiri R, Sawada N, Goto A, Yamaji T, Iwasaki M, Noda M, Iso H, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: prospective cohort study. *BMJ*. 368, m34 (2020).
- 3) Fujii K, Kubo Y, Noguchi T, Tobita K. Effects of *Bacillus subtilis* Natto Strains on Antiviral Responses in Resiquimod-Stimulated Human M1-Phenotype Macrophages. *Foods*. 12(2), 313 (2023).