納豆菌胞子形成変異株が納豆の品質に及ぼす影響

三ッ井陳雄^{*,**,§}, 村澤久司^{**}, 関口順一^{*}

^{*} 信州大学大学院総合工学系研究科

^{**} 旭松食品株式会社研究所

The Quality of Natto Produced by the Sporulation Mutants of *Bacillus subtilis* (natto)

Nobuo Mitsui^{*,**,§}, Hisashi Murasawa^{**}
and Junichi Sekiguchi^{*}

^{*} Department of Bioscience and Textile Technology,
Interdisciplinary Graduate School of Science and
Technology, Shinshu University, 3-15-1,
Tokida, Ueda, Nagano 386-8567

^{**} Food Research Laboratory, Asahimatsu Foods
Co., Ltd., 1008, Dashina, Iida, Nagano 399-2561

The effects of spore formation on natto qualities were investigated using the *spo0A*, *sigH*, *sigE*, *sigF*, *sigK* and *sigG* mutants of *Bacillus subtilis* (natto). None of mutants formed heat-resistant spores. The glutamic acid contents of the natto produced by *spo0A* and *sigH* mutants were less than that of the wild-type strain. The glutamic acid and the ammonia contents of the natto produced by the *sigE*, *sigF*, *sigK* and *sigG* mutants tended to increase, but the organoleptic tests showed that the natto produced by them were the same as for the natto produced by the wild-type strain. The natto produced by these mutants did not contain the heat-resistant spores. Therefore, these natto may have a potential to be used in the processed food industry that wants to avoid contamination due to spores. (Received Jun. 1, 2010 ; Accepted Jul. 7, 2010)

Keywords : natto, *Bacillus subtilis* (natto), sporulation, sigma factor

キーワード : 納豆, 納豆菌, 胞子形成, シグマ因子

納豆菌は *Bacillus* 属の細菌であり、物理化学的に安定な胞子を形成する¹⁾。従って、納豆菌を用いて作られる納豆中にも、 $10^{8\sim 9}$ 個/g 程度の胞子が含まれる。この胞子は、除菌殺菌が困難であるため、残存胞子による製造ラインの汚染が問題となり、原材料としての納豆の利用がなかなか進まない要因の一つとなっている。しかし、納豆菌胞子を含まない納豆であれば、このような問題を解決できる可能性がある。既に、発芽変異株の納豆への応用が報告されているが²⁾、胞子形成変異株によっても納豆菌胞子を含まない納豆を製造することが可能であると考えられる。しかし、

胞子形成期にはプロテアーゼなどの納豆の品質上重要な酵素の産生も行われており³⁾、納豆の品質に影響を与えない変異株の利用が必要である。

Bacillus 属の胞子形成には数多くの遺伝子に関係しており、これらの遺伝子が順序よく発現していくことが必要である⁴⁾。胞子形成の段階は形態学的には、第 I 期から第 VII 期の 7 つの段階に区別することができる。また、生化学的にはリン酸リレー系による胞子形成開始のシグナル伝達の段階と、シグマ因子カスケードとよばれる胞子形成遺伝子の逐次的発現の段階とに大別される。栄養源枯渇などの胞子形成開始のシグナルは、最終的に Spo0A タンパク質のリン酸化として伝わり胞子形成が開始される。また、栄養細胞増殖期ではほとんどの遺伝子はシグマ A で転写されているが、胞子形成が開始されると、特有のシグマ因子が活性化され特定の遺伝子の転写を誘導する。すなわち、初期ではシグマ H が活性化され、中期では母細胞側でシグマ E が forespore 側でシグマ F が活性化される。また、後期では母細胞側でシグマ K が、forespore 側でシグマ G が活性化され、各シグマ因子によって転写された遺伝子が胞子形成を行う。すなわち、Spo0A、シグマ H、シグマ E、シグマ F、シグマ K、シグマ G は胞子形成に重要な働きをしており、これらのタンパク質をコードする *spo0A*, *sigH*, *sigE*, *sigF*, *sigK* および *sigG* を破壊すれば、それぞれのタンパク質が関わっている段階で胞子形成を止めることが可能となる。先述したように納豆の品質には胞子形成が重要であると考えられているが、胞子形成のどの段階までが納豆の品質に重要であるかはわかっていない。そこで本研究では、胞子形成変異株の納豆への利用を目指し、納豆品質への胞子形成の影響を検討した。

1. 実験方法

(1) 使用菌株

実験に使用した、*B. subtilis* (natto) NAFM5 株⁵⁾ および NAFM5 株由来の遺伝子破壊株を表 1 に示した。NAFM5 株は市販納豆菌の宮城野菌から分離された株である。*B. subtilis* (natto) は LB 培地⁶⁾あるいは胞子形成培地である DSM 培地⁷⁾を用い、37℃で振盪培養した。また、必要に応じて 20 μg/ml のカナマイシンを添加した。

(2) 破壊株の構築

spo0A 破壊株 (SPDA 株) を構築するため、*spo0A* の 5' 領域および 3' 領域をプライマー *spo0AUP1* と *spo0AUP2*、および *spo0ADW1* と *spo0ADW2* を用いて、NAFM5 の染色体 DNA をテンプレートに PCR を行い増幅した。なお、使用したプライマーのリストは表 2 に示した。また、カナマイシンカセットを、PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて、pUC-Km プラスミドをテンプレートとして PCR により増幅した。pUC-Km は pDG783 (*Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio State University) のカナマイシンカセットを pUC119 (タカラバイオ) の *EcoRI* サイ

^{*} 〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

^{**} 〒399-2561 長野県飯田市駄科 1008

[§] 連絡先 (Corresponding author), mitsui@asahimatsu.co.jp

表 1 使用菌株

Strain	Genotype
<i>B. subtilis</i> (natto)	
NAFM5	Rif ^r bio
SPDA	Rif ^r bio Δ <i>spo0A</i> :: <i>kan</i>
SPDH	Rif ^r bio Δ <i>sigH</i> :: <i>kan</i>
SPDE	Rif ^r bio Δ <i>sigE</i> :: <i>kan</i>
SPDF	Rif ^r bio Δ <i>sigF</i> :: <i>kan</i>
SPDK	Rif ^r bio Δ <i>sigK</i> :: <i>kan</i>
SPDG	Rif ^r bio Δ <i>sigG</i> :: <i>kan</i>

トに組み込んで構築されたプラスミドである。また、使用したプライマー spo0AUP2 と PB-M13-20 および spo0ADW1 と PB-M13Rev の 5'側の配列はそれぞれ相補配列となっている。spo0A の 5'領域、カナマイシンカセット、spo0A の 3'領域を spo0AUP1 および spo0ADW2 プライマーを用いて PCR ライゲーションにより連結した⁸⁾。得られた断片では spo0A がカナマイシンカセットにより置換されている。この断片を用いて、NAFM5 株を形質転換し、spo0A がカナマイシンカセットに置換された SPDA 株 (spo0A::kan) を構築した。なお形質転換は、Anagnostopoulos and Spizizen⁹⁾の方法に従って行った。目的どおり破壊株が構築されていることを確認するため、形質転換体から染色体 DNA を抽出し、これをテンプレートとしてプライマー spo0AUP1 と spo0ADW2 を使用した PCR により破壊された領域を増幅した。同様に、sigH 破壊株 (SPDH 株) を sigHUP1 と sigHUP2, sigHDW1 と sigHDW2, および PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて、sigE 破壊株 (SPDE 株) を sigEUP1 と sigEUP2, sigEDW1 と sigEDW2, および PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて、sigF 破壊株 (SPDF 株) を sigFUP1 と sigFUP2, sigFDW1 と sigFDW2, および PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて、sigK 破壊株 (SPDK 株) を sigKUP1 と sigKUP2, sigKDW1 と sigKDW2, および PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて、sigG 破壊株 (SPDG 株) を sigGUP1 と sigGUP2, sigGDW1 と sigGDW2, および PB-M13-20 と PB-M13Rev プライマーを用いて構築した。

(3) 胞子数の計測

B. subtilis (natto) NAFM5 株および破壊株を LB 培地に接種し一晚 37℃ で前培養した。前培養液を DSM 培地に接種し、37℃ で 3 日間振盪培養し、耐熱性菌数を求めて胞子数とした。即ち、培養液を 80℃ で 10 分間加熱し、適宜希釈したものをサンプルとした後、標準寒天培地に混釈して 37℃ で 3 日間培養し、生育してきたコロニー数を胞子数として計測した。

(4) 納豆の分析

B. subtilis (natto) NAFM5 株および破壊株を LB 培地で

表 2 使用プライマー

Primer	Sequence (5'→3')
spo0AUP1	aaaaggctgggaaaactggt
spo0AUP2	cactggccgctggttttacgcaacacaaactttaattttctcc
spo0ADW1	catggtcatagctgttctctgaggttagagcataaggcttc
spo0ADW2	tttgacggtgtcgaaattca
sigHUP1	tcgatcaaatggtgacagga
sigHUP2	cactggccgctggttttacttccctgtgttctctgtagattca
sigHDW1	catggtcatagctgttctctggaattcgcaaatcagt
sigHDW2	cacggccaacatattaacg
sigEUP1	gactttccacagagcttgc
sigEUP2	cactggccgctggttttacgtgctgcaaccgtaatttca
sigEDW1	catggtcatagctgttctctgagaaaagagttcaacaaaatgg
sigEDW2	tcacgtgtgtctctctcttt
sigFUP1	ggcggagatatgaacgatgt
sigFUP2	cactggccgctggttttacgcccgtttttcttaacctcca
sigFDW1	catggtcatagctgttccaaggttcaaatggatcatacgg
sigFDW2	tcacgatggccattaacaga
sigKUP1	gtatgtgtgctgggatttg
sigKUP2	cactggccgctggttttacacctgtcaccatcgtcacct
sigKDW1	catggtcatagctgttcccgaaggggaaataatgcaga
sigKDW2	tttcaatcccggaaaatgag
sigGUP1	tcgatattcctttcgcttt
sigGUP2	cactggccgctggttttaccgccgagatttcgactttat
sigGDW1	catggtcatagctgttccgctgctatcaacaaaatgaa
sigGDW2	tccgatgtactccgcttttc
PB-M13-20	gtaaaacgacggccagtg
PB-M13Rev	ggaaacagctatgaccatg

一晚培養後、10⁵ cells/ml となるように生理食塩水で希釈し種菌液とした。また、米国産極小大豆を 10℃ で一晚浸漬し、200 ml の三角フラスコに 50 g の浸漬大豆を入れて、121℃、50 分間オートクレーブして煮豆を作製した。納豆を作製するため、1 ml の種菌液を、50 g の煮豆に接種し、40℃ で 17 時間発酵した。接種は煮豆が冷めてから行った。

できた納豆を 4℃ で 3 日間熟成させた後、菌膜の被り、糸引き、豆の色および香りを官能的に 5 段階で評価した。また、100 ml の生理食塩水を納豆に加えて、4℃ で 1 時間攪拌して得た懸濁液の上清を用いて、総菌数および胞子数を計測した。総菌数は加熱前のサンプルを用いて測定した。また、L-グルタミン酸含量とアンモニア含量の測定を行い納豆の品質評価を行った。L-グルタミン酸含量およびアンモニア含量は F-キット (J.K. インターナショナル) を用いて付属のマニュアルに従い行った。

2. 実験結果および考察

(1) 液体培養時の胞子数

納豆の品質と胞子形成の関係を評価するために、Spo0A, シグマ H, シグマ E, シグマ F, シグマ K およびシグマ G の遺伝子破壊株を構築した。構築した破壊株が胞子を形成しているかどうかを、耐熱性菌数で調べた結果、野生株では 1.2×10⁹ cfu/ml の胞子を形成していたが、破壊株

表 3 納豆中の菌数 (cfu/g)

	Wild	$\Delta spo0A$	$\Delta sigH$	$\Delta sigE$	$\Delta sigF$	$\Delta sigK$	$\Delta sigG$
総菌数	1.2×10^{10}	4.7×10^9	2.8×10^9	3.9×10^7	4.0×10^7	1.4×10^7	1.9×10^7
孢子数	9.1×10^9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 検出限界 (90 cfu/g) 以下

表 4 官能評価

	Wild	$\Delta spo0A$	$\Delta sigH$	$\Delta sigE$	$\Delta sigF$	$\Delta sigK$	$\Delta sigG$
菌膜の被り	4	1	2	4	4	4	4
糸引き	4	1	2	3	3	4	4
色	4	4	4	4	4	4	4
香り	4	2	3	4	4	4	4

菌膜の被り: (白色状の菌膜が 厚い 5-4-3-2-1 薄い),

糸引き: (強い 5-4-3-2-1 弱い), 色: (明るい 5-4-3-2-1 暗い),

香り: (アンモニア臭や煮豆臭などの不快臭が 弱い 5-4-3-2-1 強い)

Wild の評価を 4 として破壊株を評価した

図 1 納豆中の L-グルタミン酸含量 (a) とアンモニア含量 (b)

では全ての株で耐熱性菌を検出することができず (30 cfu/ml 以下), 目的どおり孢子を形成していないことが明らかとなった. 孢子の耐熱性は第 V 期に起こるとされており¹⁰⁾, 今回用いた破壊株はそれ以前の第 IV 期までにストップすると考えられるため妥当な結果であった.

(2) 孢子形成変異株で作製した納豆の評価

作製した破壊株が耐熱性のある孢子を形成していないことが確認できたので, 実際に納豆を試作し品質を評価した. まず, 野生株および破壊株で試作した納豆中の総菌数と孢子数を調べた (表 3). その結果, 総菌数は野生株では 1.2×10^{10} cfu/g であり, $\Delta spo0A$ と $\Delta sigH$ の破壊株では 10^9 cfu/g オーダーで野生株と同程度であった. しかし, $\Delta sigE$, $\Delta sigF$, $\Delta sigK$, $\Delta sigG$ の各破壊株では 10^7 cfu/g オーダーと野生株よりも少なかった. また, 孢子数は野生株で 9.1×10^9 cfu/g であったが, 破壊株では全ての株で孢子を検出することができず (90 cfu/g 以下), 液体培養と同様の結果であった.

菌膜の被り, 糸引き, 豆の色, 香りについて官能的に 5

段階で評価した結果を表 4 に示した. その結果, $\Delta spo0A$ の破壊株では菌膜の被り, 糸引きが非常に悪く, 香りも煮豆臭を強く感じ低い評価結果であった. また, $\Delta sigH$ の破壊株についても菌膜の被り, 糸引きの評価が野生株よりも低かった. しかし, $\Delta sigE$, $\Delta sigF$ の各破壊株では糸引きが野生株よりも若干弱く感じたが, 菌膜の被り, 色, 香りは野生株と同程度であった. また, $\Delta sigK$, $\Delta sigG$ の各破壊株ではすべての項目で野生株と同じ評価であった. 糸引きにはポリ- γ -グルタミン酸の生産が関与しているが, ポリ- γ -グルタミン酸の生産と孢子形成の詳細な関係については明らかにされていない. *B. subtilis* の biofilm 形成にはポリ- γ -グルタミン酸が深く関わっているが¹¹⁾, Spo0A も biofilm の形成に関与していることが報告されており¹²⁾ ポリ- γ -グルタミン酸合成への Spo0A の関与が推察された.

また, 納豆の品質に関係する, L-グルタミン酸含量およびアンモニア含量について測定した結果を図 1 に示した. その結果, $\Delta spo0A$ の破壊株では, L-グルタミン酸含量およびアンモニア含量が野生株よりも少なかった. L-グルタミ

ン酸含量の増加は大豆タンパク質の分解によるものであり、この分解は菌体外に分泌されたプロテアーゼによるものである。プロテアーゼの分泌は孢子形成の初期に起こり、Spo0A がその調節に関わっていると報告されている¹⁰⁾。このことから *spo0A* の破壊株では L-グルタミン酸含量は増加しないと考えられたが、予想どおりの結果となった。*sigH* の破壊株では、L-グルタミン酸含量が低いわりにはアンモニア含量が高かった。また、孢子形成が中期でストップする *sigE*, *sigF*, および後期でストップする *sigK*, *sigG* の各破壊株では、L-グルタミン酸含量およびアンモニア含量が野生株よりも増加する傾向がみられた。これらの理由は不明であるが、各成分に関わる酵素活性や菌数などを経時的に調べることで解明できる可能性があり、今後の課題である。

なお、独立した実験から得た遺伝子破壊株を用いても同様の結果を得ている。

3. 要 約

納豆菌孢子を含まない納豆の開発および、孢子形成と納豆の品質の関係を明らかにするため、納豆菌孢子形成変異株である *spo0A*, *sigH*, *sigE*, *sigF*, *sigK* および *sigG* の破壊株を用いて納豆を作製し評価した。その結果、孢子形成初期の変異株である *spo0A* および *sigH* の各破壊株では菌膜の被り、糸引きが弱く、L-グルタミン酸含量も少なかった。しかし、孢子形成中期以降の変異株である *sigE*, *sigF*, *sigK*, *sigG* の各破壊株では、L-グルタミン酸含量およびアンモニア含量の増加傾向がみられたが、官能評価では野生株との明確な差はみられなかった。これらの結果から、納豆製造には孢子形成の初期が重要であること、納豆菌孢子を含まない納豆を製造するためには、孢子形成が中期以降でストップする納豆菌変異株の利用が有効であることが示された。これらの変異株で作製した納豆は孢子を含まないため、孢子の汚染を避けたい加工食品工業で利用できる可能性がある。

本研究を行うにあたり、貴重な菌株の譲渡を賜いました、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総

合研究所 木村啓太郎博士に謝意を表します。

文 献

- 1) 渡部一仁, 細菌スポアの UV 抵抗性とスポアコート蛋白質, 防菌防黴, **25**, 79-90 (1997).
- 2) Mitsui, N., Murasawa, H. and Sekiguchi, J., Development of natto with germination-defective mutants of *Bacillus subtilis* (natto). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 741-748 (2009).
- 3) 吉川博文, 枯草菌の孢子形成と蛋白質分泌遺伝子の機能に関する研究, 農化, **67**, 137-143 (1993).
- 4) 佐藤 勉, 七宮英晃, 大橋由明, 河村富士夫, 高松宏治, 児玉武子, 渡部一仁, 石川 周, 関口順一, 枯草菌の孢子形成, 孢子, 発芽, 蛋白質・核酸・酵素, **44**, 1460-1466 (1999).
- 5) Kimura, K., Tran, L.S., Uchida, I. and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiology*, **150**, 4115-4123 (2004).
- 6) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor), (1989).
- 7) Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J.P., Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 704-711 (1965).
- 8) Kodama, T., Endo, K., Sawada, K., Ara, K., Ozaki, K., Kakeshita, H., Yamane, K. and Sekiguchi, J., *Bacillus subtilis* AprX involved in degradation of a heterologous protein during the late stationary growth phase. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 135-143 (2007).
- 9) Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J., Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **81**, 741-746 (1961).
- 10) 菅江謹一, 池原健二, *Bacillus* 属細菌孢子の生化学, 化学と生物, **31**, 187-194 (1993).
- 11) Stanley, N.R. and Lazazzera, B.A., Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, **57**, 1143-1158 (2005).
- 12) Hamon, M.A. and Lazazzera, B.A., The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **42**, 1199-1209 (2001).

(平成 22 年 6 月 1 日受付, 平成 22 年 7 月 7 日受理)