技術論文

recA 遺伝子の破壊による曳糸性の安定化した納豆菌の分子育種

加田茂樹^{1*}, 関根靖彦², 吉川博文³

¹ 株式会社 Mizkan Holdings 中央研究所

² 立教大学大学院理学研究科

³ 東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科

Stabilization of γ -PGA Production by a *recA* Mutant in *Bacillus subtilis*

Shigeki Kada^{1*}, Yasuhiko Sekine² and Hirofumi Yoshikawa³

¹ Central Research Institute, Mizkan Holdings Co., Ltd., 2-6 Nakamura-cho, Handa, Aichi 475-8585

² Department of Life Science, College of Science, Rikkyo University, 3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501

³ Department of Bioscience, Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Natto is a traditional Japanese food with a unique viscous property. The viscous property mainly derives from the poly- γ -glutamate (γ -PGA) produced by *Bacillus subtilis*, the so-called natto bacterium, during the fermentation of steamed soybeans. However, the γ -PGA-producing ability of *B. subtilis* is easily lost by insertion sequence (IS) transposition to the *comP* locus. We isolated a *recA*-deficient mutant, and evaluated the γ -PGA production and IS transposition in *B. subtilis*. After repeated passages, the parent strain lost the γ -PGA-producing ability whereas the *recA*-deficient strain retained it; IS transposition to the *comP* locus was observed in the parent strain, but not in the *recA* mutant. Furthermore, the amount of γ -PGA produced by the parent strain in natto was reduced to less than 1/10 that of the *recA* mutant. These findings suggest that the *recA* mutant may stabilize the viscous property of natto fermented food.

(Received Jun. 17, 2020; Accepted Sep. 2, 2020)

Keywords : Natto, natto bacterium, poly- γ -glutamic acid, insertion sequence, *recA*

キーワード : 納豆, 納豆菌, ポリ- γ -グルタミン酸, 挿入配列, *recA* 遺伝子

納豆は日本の伝統的な発酵食品の一つであり、特有の糸引き、すなわち曳糸性を特徴としている。この曳糸性は納豆の品質を決定づける大きな要素であり、発酵の過程において納豆菌 *Bacillus subtilis* の作用によって生じる¹⁾²⁾。この糸の主成分はグルタミン酸が α 位のアミノ基と γ 位のカルボキシル基がアミド結合により重合したポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA) である³⁾。納豆菌ゲノムには転移性遺伝因子の1種である挿入配列 (IS) が複数種散在して存在することが明らかとなっている⁴⁾。このことは、納豆菌と同種で遺伝学的な解析に汎用される実験室株 (枯草菌 168 株) との違いの1つとなっており、168 株ゲノム中には IS は存在しない⁵⁾。また、納豆菌の γ -PGA 生産能は継代等によって容易に喪失することが報告されており、その原因はゲノム中の IS が γ -PGA 生産に関与する遺伝子座 (二成分制御系センサーキナーゼをコードする *comP* 遺伝子等) に転移することによる⁶⁾。

IS を持たない 168 株に納豆菌 IS を人為的に導入した実

験から、168 株中の納豆菌 IS の 1 種 IS4*Bsu*1 がコンピテンスを誘導した条件 (コンピテンス誘導時には *recA* 遺伝子が発現する) 下で転移しやすいこと⁷⁾、および別の納豆菌 IS (IS256*Bsu*1)⁸⁾ の 168 株中での転移が *recA* 遺伝子に強く依存することが報告された⁹⁾。しかし、これらは γ -PGA 生産能を持たず納豆を製造できない実験室株を宿主とした解析であり、*recA* 遺伝子が納豆菌の γ -PGA 生産性や納豆の曳糸性へ与える影響は確認されていない。また、これまで IS の転移を抑制して納豆の曳糸性を安定化させる技術に関する知見もなかった。*recA* 遺伝子産物は、納豆菌に近縁な枯草菌 168 株内で IS 転移を促進する機能を持つと考えられるので、納豆菌において *recA* 遺伝子を破壊することにより IS 転移が抑制されると予想された。そこで、本研究では納豆菌を用いて、*recA* 遺伝子の破壊が γ -PGA 生産能や納豆品質に与える影響を解析した。

¹ 〒475-8585 愛知県半田市市村町 2-6, ² 〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1, ³ 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

*連絡先 (Corresponding author), stoneborer@yahoo.co.jp

実 験 方 法

1. 使用菌株と培地

市販納豆より分離した納豆菌 *Bacillus subtilis* を変異原処理して得られた形質転換効率の向上した r22 株を親株として用いた。本株は通常の納豆を製造することが可能である¹⁰⁾。この株を親株として形質転換を行い、本研究に使用した *recA* 遺伝子破壊株を単離した。形質転換のために改変 Spizizen 形質転換培地 (2.50 mg/mL グルコース (関東化学), 1.23 mg/mL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 6.00 mg/mL KH_2PO_4 (関東化学), 14.0 mg/mL K_2HPO_4 (関東化学), 1.00 mg/mL クエン酸ナトリウム (Sigma), 0.10 mg/mL ビオチン (Sigma), 0.50 mg/mL 酵母エキス (BD))¹¹⁾ を用いた。γ-PGA 生産のために GSP 培地 (15.0 mg/mL グルコース (関東化学), 15.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウム (Sigma), 15.0 mg/mL フィトンペプトン (BD))¹²⁾ を用いた。孢子形成のために孢子形成培地 (68.0 μg/mL KH_2PO_4 (関東化学), 0.535 mg/mL NH_4Cl (Sigma), 0.106 mg/mL Na_2SO_4 (関東化学), 96.5 μg/mL NH_4NO_3 (Wako), 0.06 μg/mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Wako), 12.6 μg/mL $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Wako), 9.34 mg/mL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 2.38 mg/mL グルタミン酸ナトリウム (Sigma), 1.52 mg/mL 酵母エキス (BD))¹³⁾ を用いた。通常の培養のために LB 培地 (10.0 mg/mL バクトトリプトン (BD), 5.00 mg/mL 酵母エキス (BD), 5.00 mg/mL NaCl (Wako))¹⁴⁾ を用いた。寒天 (BD) を添加する場合には、1.5% (w/v) となるように添加した。

菌株の培養は、37℃にて行い、振とう培養する場合には 150 rpm にて実施した。濁度は、分光光度計を使用して、660 nm の濁度を測定した。孢子形成は、LB 培地にて前培養を行った後、孢子形成培地に 1% (v/v) となるように植菌し、37℃、24 時間振とう培養を行って孢子液を調製した。孢子液を 75℃ 15 分間加熱処理し、LB 寒天培地上に得られる耐熱性コロニー数を計測して孢子数とした。

2. DNA 操作

納豆菌からのゲノム DNA の抽出および精製には、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を使用した。PCR には、TaKaRa ExTaq (TaKaRa) を使用した。PCR 産物のクローニングには、インサートとなる目的のバンドをアガロースゲルから切り出して、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) を使用して精製を行った後、TA クローニングベクター pT7Blue (Novagen) 上の *EcoRV* サイトに T4 DNA リガーゼ (TaKaRa) を用いて挿入した。得られたベクターを大腸菌 DH5α (TaKaRa) に導入し、ブルーホワイトセクションを行ってインサートの挿入された形質転換体を選抜した。形質転換体から QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) を使用してプラスミドを抽出した。プラスミドベクター中のインサート DNA 配列をサンガー法によりシーケンスした。

3. *recA* 遺伝子破壊株の単離

ダブルクロスオーバータイプの相同組換えにより *recA* 遺伝子のコード領域をスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換して *recA* 遺伝子破壊株を単離した。以下にその方法を示す。

まず、スペクチノマイシン耐性遺伝子 *aadII* を増幅するように設計した一対のプライマー (5'-GTATAATAAA GAATAATTATTATCC-3' および 5'-TAAATTAAAG TAATAAAGCGTTCTC-3') を用いて、トランスポゾン Tn554 を鋳型として PCR を行い、プロモーターを含んだ形でスペクチノマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。次に納豆菌 BEST195 株⁴⁾ ゲノムの配列を基に設計した一対のプライマー (5'-TCACACTAGCTAGAAT CGC-3' および 5'-TACAGATTAATAATTATTCTTTA TTATTATATCTAGATAAGGCTGCCTGACGATCAC TC-3') を用いて、r22 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*recA* 遺伝子上流領域を含む 2 kb を増幅した。なお、リバースプライマーにはスペクチノマイシン耐性遺伝子を相同な配列 (下線部) および相同組換えの確認のための *XbaI* 認識部位 (点線部) を付加した。更に、BEST195 株ゲノムの配列を基に設計した一対のプライマー (5'-TTAGAGAACGCTTTATTACTTTAATTTAGGATCC CAAGAAGAAGCTCGAATTTGAAG-3' および 5'-AATA TGTTGTTGTCGTTTCATTC-3') を用いて、r22 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*recA* 遺伝子下流領域を含む 2 kb を増幅した。なお、フォワードプライマーにはスペクチノマイシン耐性遺伝子を相同な配列 (二重下線部) および相同組換えの確認のための *BamHI* 認識部位 (斜体部) を付加した。

得られた上記 3 種の DNA 断片を混合して鋳型とし、*recA* 遺伝子上流を増幅するのに用いたフォワードプライマー (5'-TCACACTAGCTAGAATCGC-3') と *recA* 下流を増幅するのに用いたリバースプライマー (5'-AAT ATGTTGTTGTCGTTTCATTC-3') を用いて融合 PCR を行い、*recA* 遺伝子上流領域、スペクチノマイシン耐性遺伝子、*recA* 遺伝子下流領域の順に連結された 5 kb から成る PCR 産物を得た。

次に、納豆菌 r22 株を改変 Spizizen 形質転換培地にて形質転換が可能となるように培養し、連結された PCR 産物を使用して形質転換を行い、スペクチノマイシン耐性を示す株を複数株取得した。これらの株からゲノム DNA を抽出して、相同組換えが正しく起こったことを確認するために、*recA* 遺伝子上流を増幅するのに使用したフォワードプライマー (5'-TCACACTAGCTAGAATCGC-3') と *recA* 遺伝子下流を増幅するのに用いたリバースプライマー (5'-AATATGTTGTTGTCGTTTCATTC-3') を用いて *recA* 遺伝子座を増幅し、上述の相同組換え確認用に導入した *BamHI* および *XbaI* で消化した。これら制限酵素処理に

図 1 納豆菌 γ -PGA 非生産性コロニーの出現

納豆菌の継代を繰り返すと γ -PGA 生産性を評価できる GSP 寒天培地上に非生産性コロニーが出現する。矢頭で示したコロニーは γ -PGA 生産性を喪失したコロニーであり、生産性を目視で容易に識別できる。

より消化を受け相同組換え領域 (2 kb) とスペクチノマイシン耐性遺伝子部分 (1.2 kb) とに分解された場合に正しく相同組換えが起こったと判断した。以上のようにして確認した *recA* 遺伝子がスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換された株を 1 株選んで、以降の解析に供した。

また、形質転換時に PCR 産物を添加しなかった対照区を設定して、形質転換と同一の操作を行って同じ継代数を経た株を 1 株選び、これを対照となる r22 株として使用した。

4. γ -PGA 非生産コロニー出現率の測定

納豆菌の γ -PGA 生産性は目視にて容易に識別可能である (図 1)。すなわち、 γ -PGA 生産性を持つ株はしわのある盛り上がったコロニーを形成するのに対し、それを失った株は扁平で盛り上がりがないコロニーを形成する (図 1 矢頭)。そこで、形質転換操作および継代回数を同等とするために、形質転換直後の単一コロニーおよび形質転換用 DNA を加えず形質転換操作のみを行った対照区の単一コロニーをそれぞれ 5 mL の LB 液体培地に OD₆₆₀ が 0.05 となるように植菌し、37℃、150 rpm にて終夜振とう培養して前培養物を得た。この前培養物を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて希釈して GSP 寒天培地 2 枚に塗抹すると共に、新たな 5 mL の LB 液体培地に OD₆₆₀ が 0.05 となるように植菌して 12 時間培養した。これを 1 代とカウントし、同様の植菌操作を 12 代繰り返し、合計 144 時間継代培養を行った (図 2)。また、24 時間ごとに GSP 寒天培地に塗抹培養した。得られた GSP 寒天培地上のコロニーを目視にて確認し、コロニー全体数に占める γ -PGA 非生産コロニーの数を計測することにより、 γ -PGA 非生産コロニーの出現割合を算出した。なお、計測には 100 から 300 程度のコロニーが出現したプレートを使用した。

5. *comP* 遺伝子座の遺伝子長測定

継代培養 3 代目以降の細胞集団からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型 DNA として、*comP* 遺伝子座を増幅するように設計した一対のプライマー (5'-ATGTACAGAT-

図 2 本研究のデザイン

納豆菌親株と *recA* 遺伝子破壊株について OD₆₆₀ が 0.05 となるように 12 時間毎に LB 液体培地にて継代を行い、12 代合計 144 時間培養を行った。24 時間毎に γ -PGA 非生産性コロニーの出現頻度を測定した (太い黒矢印)。また、3 代目以降 12 時間毎に *comP* 遺伝子長を測定した (黒矢印)。さらに、12 代目の培養物を用いて納豆製造を行った (白矢印)。

ATATTAACGTCTATA-3' および 5'-TTACAATTTCGA TTTCAATATCAGCC-3') を用いて PCR を行った。その後、1% アガロースを含むゲル電気泳動を行って、増幅された *comP* 遺伝子を含む DNA 断片の長さを測定した。

6. 納豆の製造と γ -PGA の定量

上記 12 代培養後の培養物を孢子形成培地に 1% (v/v) 植菌し、37℃、150 rpm で振とう培養を行って孢子形成を誘導した。蒸煮した米国産極小粒大豆に孢子液を接種し (5×10^3 cfu/g)、自動納豆発酵装置 SY-N0/20 (鈴与産業) を用いて、39℃、60% 加湿下にて 18 時間発酵させた。得られた納豆を 4℃ にて 24 時間熟成し、曳糸性の官能評価を実施すると共に、 γ -PGA の抽出および定量を菅野と高松の方法¹⁵⁾ にしたがって行った¹⁾。すなわち、2.5% (w/v) トリクロロ酢酸 20 mL に懸濁した熟成後の納豆 10 g を 50℃ にて 10 分間処理した後、ナイロン製メッシュにて懸濁液から大豆を除去し、遠心操作 (12000 rpm, 4℃, 15 分間) により上清 20 mL を回収した。水酸化ナトリウムを加えて pH を 7.0 に調整した後、水で 25 mL とし、そのうち 5 mL を 20 mL の冷エタノールと混合して、遠心操作 (12000 rpm, 4℃, 10 分間) により沈澱を取得した。沈澱を 20 mM リン酸緩衝液 20 mL (pH 7.0) にて懸濁して γ -PGA 粗画分とし、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (Wako) と反応させ、420 nm の吸光度を測定して定量を行った。

実験結果および考察

1. *recA* 遺伝子破壊株の生育と孢子形成

LB 液体培地における生育を OD₆₆₀ および 7 時間培養後

図 3 納豆菌親株および *recA* 遺伝子破壊株の増殖曲線

納豆菌親株 r22 および *recA* 遺伝子破壊株の LB 液体培地 (5 mL) における増殖曲線を示した。1 時間ごとに 660 nm における濁度を測定した。

の生菌数で評価した。その結果、*recA* 遺伝子破壊株と親株の LB 液体培地における増殖にはほとんど差がなかった (図 3)。また、孢子形成培地における孢子数についても親株は 4.5×10^8 cfu/mL であったのに対し、*recA* 遺伝子破壊株では 2.3×10^8 cfu/mL であり、*recA* 遺伝子破壊は孢子形成に影響を及ぼさないことが確認された。

2. *recA* 遺伝子破壊が γ -PGA 生産性および納豆の曳糸性に与える影響

親株と *recA* 遺伝子破壊株の γ -PGA 生産性を、(1) GSP 寒天培地上における γ -PGA 非生産性コロニーの出現割合、(2) *comP* 遺伝子の増幅断片長、および (3) 継代後の納豆曳糸性の 3 つにより評価した。

(1) γ -PGA 非生産性コロニーの出現割合

r22 株および *recA* 遺伝子破壊株を 12 時間ごとに継代した結果、対照となる親株では 8 代目から γ -PGA 非生産性コロニーの出現 (27%) が確認され、10 代目では 89%、12 代目では 91% のコロニーが非生産性となった (図 4)。一方で、*recA* 遺伝子破壊株では、12 代目まで継代を繰り返しても γ -PGA 非生産性コロニーは検出されず、親株に比べて継代による影響を極めて受けにくいことが確認された。12 代目の寒天培地上のコロニー形態を図 5 に示した。*recA* 遺伝子破壊株は、 γ -PGA 生産を示す特徴的な盛り上がったコロニー形態を示したのに対し (図 5B)、親株は γ -PGA を生産せず扁平で盛り上がりがないコロニー形態を示した (図 5A)。このことから、*recA* 遺伝子が γ -PGA 生産性に影響を及ぼす IS の転移に関与していることが示唆された。

図 4 継代培養中の納豆菌親株および *recA* 遺伝子破壊株の γ -PGA 非生産性コロニーの出現率

親株 r22 および *recA* 遺伝子破壊株を LB 液体培地 (5 mL) にて 12 時間ごとに継代を行い、24 時間ごとに培養物を GSP 寒天培地上に塗抹してコロニー形態を目視にて確認した。全コロニーに占める γ -PGA 非生産性コロニーの割合 (%) を示した。

図 5 12 代継代後の親株 (A) および *recA* 遺伝子破壊株 (B) のコロニー形態

親株 r22 および *recA* 遺伝子破壊株を LB 液体培地 (5 mL) にて 12 時間ごとに継代を行い、12 代経過後の培養物を GSP 寒天培地上に塗抹してコロニー形態を目視にて確認した。

(2) *comP* 遺伝子の増幅断片長

継代による γ -PGA 非生産性コロニーの出現が IS の転移によって生じたことを確認するために、3 代目以降の各細胞集団の *comP* 遺伝子座を分析した。もし IS が転移した場合には、*comP* 遺伝子 (約 2.3 kb) に、IS 分が追加されて全長が長くなることが予想される。対照区では 7 代目以

図 6 継代培養中の納豆菌親株および *recA* 遺伝子破壊株の *comP* 遺伝子の増幅断片長

親株および *recA* 遺伝子破壊株を LB 液体培地 (5mL) にて 12 時間ごとに継代を行い、3 代目以降の 12 時間ごとに培養物全体からゲノム DNA を抽出し、*comP* 遺伝子座を増幅した。増幅産物 10 μ L を 1% アガロースを含むゲル電気泳動に供した。親株 r22 (レーン 1-10) および *recA* 遺伝子破壊株 (レーン 11-20) について、3 代 36 時間 (レーン 1,11)、4 代 48 時間 (レーン 2,12)、5 代 60 時間 (レーン 3,13)、6 代 72 時間 (レーン 4,14)、7 代 84 時間 (レーン 5,15)、8 代 96 時間 (レーン 6,16)、9 代 108 時間 (レーン 7,17)、10 代 120 時間 (レーン 8,18)、11 代 132 時間 (レーン 9,19)、12 代 144 時間 (レーン 10,20) 継代した時の結果をそれぞれ示した。

降、84 時間培養したあたりから *comP* 遺伝子本来の長さである 2.3kb に加えて、約 4kb の PCR 産物が検出されるようになった (図 6)。その割合は継代するごとに増加し、11 代以降には 4kb の PCR 産物の量が 2.3kb の産物量よりも多くなった。4kb の PCR 産物が検出されるようになった継代回数は、 γ -PGA 非生産性コロニーの出現時期とほぼ一致しており、 γ -PGA 非生産性コロニーの出現は IS の *comP* 遺伝子座への転移によるものと考えられた。4kb 周辺の PCR 産物をゲルから切り出して精製し、これを鋳型としてこれまで *comP* 遺伝子座に転移が確認されている IS4Bsu1 (1406bp)⁶⁾、IS256Bsu1 (1369bp)⁸⁾ に特異的なプライマーを設計して PCR を行ったところ、いずれの IS も増幅が確認された (データは示さない)。さらに、4kb の PCR 産物を大腸菌プラスミド (pT7Blue) にクローニングして 10 クローンのシーケンスを行ったところ、いずれも IS4Bsu1 の挿入が確認された (データは示さない)。このことから、この約 4kb 周辺の PCR 産物は *comP* 遺伝子に IS が転移したものと結論づけた。一方、*recA* 遺伝子破壊株では 2.3kb の PCR 産物のみが検出され、*comP* 遺伝子への IS 転移は認められなかった。以上から、*recA* 遺伝子は IS、特に IS4Bsu1 の *comP* 遺伝子座への転移を促進する因子として作用し、その遺伝子破壊株では IS4Bsu1 の転移が著しく低下することが示唆された。

(3) 継代後の納豆曳糸性

継代 12 代目の細胞集団に由来する胞子を用いて納豆を製造し、熟成後に曳糸性の官能評価を行った。その結果、*recA* 遺伝子破壊株では良好な曳糸性が確認されたのに対し、対照区では曳糸性がほとんど確認されなかった。そこで、製造された納豆中の γ -PGA 生産量を測定したところ、*recA* 遺伝子破壊株では 9.38mg/g であったのに対し、r22 株では 0.53mg/g と 1/10 未満に低下していることが確認された。培地上のみならず、納豆中においても親株では γ -PGA 生産性は低下していたのに対し、*recA* 遺伝子破壊株

では 12 代継代しても良好な曳糸性が維持されていることが確認された。

以上の結果から、*recA* 遺伝子破壊株は納豆における曳糸性を安定化させる株として有用であることが示された。ただし、本研究では遺伝子組換え操作のために形質転換能の向上した納豆菌変異株を親株として使用した。実際に納豆製造に利用する菌株と本変異株との IS の転移頻度には差がある可能性があるため、実用株における転移頻度を測定することも重要である。明石らによると、*recA* 遺伝子産物はゲノム上の IS 転移標的位置 (*comP* 遺伝子等) に ATP 加水分解を伴う形でトランスポザーゼと IS をリクルートすることが推定されている⁹⁾。*recA* 遺伝子を破壊することにより、このような IS 転移の過程が阻害されることで転移が抑制されると推察される。これまで、納豆菌の γ -PGA 生産性を安定化させる技術は知られていない。本研究は、*recA* 遺伝子の破壊により γ -PGA 生産性を安定化する手法を提供するものである。遺伝子組換え体の産業利用には制約があることから、今後 *recA* 遺伝子を標的とした変異株スクリーニング法が確立され、納豆製造に利用できる菌株が育種されることが期待される。

要 約

納豆は特有の曳糸性を大きな特徴とする日本の伝統的な発酵食品である。この糸の主成分はポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA) であり、発酵中に納豆菌によって生産される。納豆菌の γ -PGA 生産能は、ゲノム中に存在する挿入配列 IS が二成分制御因子をコードする *comP* 遺伝子座に高頻度に転移することによって容易に喪失する。納豆菌の IS 転移が形質転換培地で高頻度に生じることや *recA* 遺伝子依存的な転移が見られる納豆菌 IS が存在することから、納豆菌 *recA* 遺伝子破壊株を単離して解析を行った。継代培養を繰り返すと、親株では 12 代継代後に 91% のコロニーが γ -PGA 生産性を喪失したのに対し、*recA* 遺伝子破

壊株では γ -PGA 生産性を喪失したコロニーは検出されなかった。また、*comP* 遺伝子座への転移を PCR にて確認したところ、親株では IS の転移が確認されたが、*recA* 遺伝子破壊株では転移は検出されなかった。更に 12 代継代後の菌株集団を用いて納豆を製造したところ、*recA* 遺伝子破壊株に比べて親株の γ -PGA 生産量が 1/10 未満に低下していた。以上のことから、*recA* 遺伝子破壊は納豆製造における曳糸性を安定化させる技術として有用であると考えられた。

文 献

- 1) Kada, S., Ishikawa, A., Ohshima, Y., and Yoshida, K. (2013). Alkaline serine protease AprE plays an essential role in poly- γ -glutamate production during Natto fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 802–809.
- 2) Kubo, Y., Rooney, P.R., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H., and Kimura, K. (2011). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to Natto (fermented soybean) production. *Appl. Environment. Microbiol.*, **77**, 6463–6469.
- 3) Ashiuchi, M. (2013). Microbial production and chemical transformation of poly- γ -glutamate. *Microbial. Biotechnol.*, **6**, 664–674.
- 4) Nishito, Y., Osana, Y., Hachiya, T., Podendorf, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Itaya, M., and Sakakibara, Y. (2010). Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* from very short read data. *BMC Genomics*, **11**, 10.1186/1471-2164-11-243.
- 5) 高橋 究, 吉川博文 (2008). 枯草菌 168 株にはどうして挿入配列 IS がないのか? 同種の納豆菌研究から見えてきた事実. *化学と生物*, **46**, 302–303.
- 6) Nagai, T., Tran, L.S., Inatsu, Y., and Itoh, Y. (2000). A new family insertion sequence, IS4*Bsu*1, responsible for genetic instability of poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **182**, 2387–2392.
- 7) Takahashi, K., Sekine, Y., Chibazakura, T., and Yoshikawa, H. (2007). Development of an intermolecular transposition assay system in *Bacillus subtilis* 168 using IS4*Bsu*1 from *Bacillus subtilis* (natto). *Microbiology*, **153**, 2553–2559.
- 8) Kimura, K. and Itoh, Y. (2007). Determination and characterization of IS4*Bsu*1-insertion loci and identification of a new insertion sequence element of the IS256 family in a natto starter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **10**, 24582–2464.
- 9) Akashi, M., Harada, S., Moki, S., Okouji, Y., Takahashi, K., Kada, S., Yamagami, K., Sekine, Y., Watanabe, S., Chibazakura, T., and Yoshikawa, H. (2017). Transposition of insertion sequence IS256*Bsu*1 in *Bacillus subtilis* 168 is strictly dependent on *recA*. *Genes Genet. Syst.*, **92**, 59–71.
- 10) Takemura, H., Ando, N., and Tsukamoto, Y. (2000). Breeding of branched short-chain fatty acids non-producing natto bacteria and its application to production of natto with light smells. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **47**, 773–779 (竹村 浩, 安藤記子, 塚本義則. 短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への応用, 日本食品科学工学会誌).
- 11) Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **81**, 741–746.
- 12) Nagai, T., Koguchi, K., and Itoh, Y. (1997). Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto) : Evidence that plasmids are not involved in poly- γ -glutamic acid production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 139–143.
- 13) Kada, S., Yabusaki, M., Kaga, T., Ashida, H., and Yoshida, K. (2008). Identification of two major ammonia releasing reactions involved in secondary natto fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 1869–1876.
- 14) 納豆試験法研究会 (1990). 「納豆試験法」第 1 版, 光琳, 東京.
- 15) Kanno, A. and Takamatsu, H. (1995). Determination of γ -polyglutamic acid in “Natto” using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on “Natto” Part V). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **47**, 773–779 (菅野彰重, 高松晴樹. 納豆に関する研究 (第 5 報) セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いた納豆の γ -ポリグルタミン酸の定量, 日本食品科学工学会誌).

(令和 2 年 6 月 17 日受付, 令和 2 年 9 月 2 日受理)