細胞融合によるビタミン B₁₂ 高生産性納豆菌の形成

長谷川喜衛*・狗田 徹**・小幡 齊*・徳山 泰*

Induction of a High Vitamin B₁₂ Productive Natto Strain through Protoplast Fusion

Yoshie HASEGAWA*, Toru INUTA**, Hitoshi OBATA* and Tai TOKUYAMA*

* Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35,
Yamate-cho, Suita-shi, Osaka, 564** Central Research Laboratory, Simazu Co. Ltd., 1,
Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto, 604

To breed a high vitamin B₁₂ producible natto strain, protoplast fusion was done between *Bacillus natto*, Takahashi No. 2 (Arg⁻ mutant), and a vitamin B₁₂ productive strain, *Bacillus megaterium* IAM 1166 (Try⁻ mutant). Lysozyme of 250 µg/ml and 500 µg/ml was adopted for the protoplast preparation of *B. natto* Takahashi No. 2 and *B. megaterium* IAM 1166, respectively, with 10% sucrose at 42°C for 30 min. Protoplast fusion was carried out with 40% polyethyleneglycol 6000, and the regeneration was performed on Sucrose-Glutamate minimal medium containing 10% sucrose and 3% polyvinylpyrrolidone. Preservation of the stringiness and vitamin B₁₂ productivity of the protoplast strains were deeply affected by the concentrations of lysozyme and sucrose. Three fusants which were capable of producing stringiness and vitamin B₁₂ were isolated on SG medium, and the strong stringiness on a steamed soybean by them were also observed in a similar manner as *B. natto*.

(Received Jun. 4, 1987)

近年、大豆食品が高蛋白源として脚光を浴びているが、日本古来から伝わる糸引き納豆はその代表的な大豆発酵食品の1つであり、年間約7~8万tが製造されている。糸引き納豆は、蒸煮大豆を納豆菌により発酵熟成させたものであり、その中には、ビタミン類(A, B₁, B₂, B₆, E, 葉酸, ビオチン等)・種々のアミノ酸・ミネラル類等が多量に含まれている。

このように、糸引き納豆は栄養価に富んだ発酵食品であるが、納豆中のビタミン類に着目した場合、ビタミンB₁₂の生産はほとんど認められない¹⁾。

そこで、我々は、糸引き納豆の食品価値の向上を目的として、遺伝学的手法により、市販の納豆の製造に使用されている納豆菌へのビタミンB₁₂生産能の付与を試みた。

本報では、納豆菌(*Bacillus natto*)高橋 No. 2 とビタミン B₁₂ 生産菌として知られている *Bacillus megaterium* IAM 1166 との細胞融合(プロトプラスト融合)により、ビタミン B₁₂ 高生産性納豆菌の形成を行ったので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

納豆菌として *Bacillus natto* 高橋 No. 2 (高橋佑蔵研究所より購入)を、ビタミン B₁₂ 生産菌として *Bacillus megaterium* IAM 1166 (東京大学応用微生物研究所より分譲)を用いた。その際、目的とする融合株の検出を容易にするため、紫外線照射により、高橋 No. 2 からアルギニン要求性変異株(Arg⁻)を、*B. mega-*

* 関西大学工学部教養化学教室(〒564 吹田市山手町3-3-35)

** 島津製作所中央研究所(〒604 京都市中京区西ノ京桑原町1)

terium IAM 1166 からトリプトファン要求性変異株 (Try⁻) を分離した。なお、分離した栄養要求性変異株の復帰変異は、認められなかった。以下の実験は、両株の変異株を用いて行った。Table 1 に、親株および変異株のビタミン B₁₂ 生産量を示した。

2. 培地および培養方法

両株の生育培地としては、Nutrient broth (Bacto-beef extract 0.3%, Bacto-peptone 0.5%, pH 7.0) を用い、37°C で 12 時間振とう培養を行った。融合株再生時の最少培地としては、原と上田の Sucrose-Glutamate 培地²⁾ (SG 培地: Sucrose 5%, L-Glutamic acid mono sodium salt 1.5%, KH₂PO₄ · 12 H₂O 0.42%, NaCl 0.05%, MgSO₄ · 7 H₂O 0.05%, Biotin 0.1 μg/ml, Agar 1.0%, pH 6.4) を用い、37°C で培養を行った。また、必要に応じて SG 培地中の Sucrose 濃度を変化させた。なお、SG 寒天培地上での糸引き試験³⁴⁾ で、両株とも糸引き能を示すことがわかった。ビタミン B₁₂ 生産用培地としては、10 ppm の CoCl₂ を添加した「ニッスイ」トリプトソーヤブイオンを用いて、30°C で 24 時間培養を行った。

3. ビタミン B₁₂ の抽出および定量

菌体中に含まれるビタミン B₁₂ の抽出は、岡田らの方法¹⁾ に準じた。すなわち、ビタミン B₁₂ 生産用培地 50 ml から得られた培養菌体を洗浄後、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 5 ml と KCN (0.5 mg/ml) 0.2 ml を加え、蒸留水で全量 40 ml とし、100°C、30 分間加熱処理を行った。冷却後、10% メタリン酸溶液 0.3 ml を加え、0°C で数分間放置後、蒸留水で全量 50 ml とし、遠心分離 (0°C、15 000 rpm、5 min) により上澄液を調製した。得られた上澄液を 20 ml ずつ採取し、一方を 1 N-NaOH で pH 6.0 に調整後、全量を 40 ml としビタミン B₁₂ の定量に供した。また、他方を 2 N-NaOH で pH 11~12 に調整し、120°C、30 分間加熱処理後、全量を 40 ml (2 N-HCl で pH 6.0 に調整) と

し、ビタミン B₁₂ 定量の際の盲検体とした。上記の方法により調製した試料中のビタミン B₁₂ の定量は、*Lactobacillus leichmanni* ATCC 7830 を用いたマイクロバイオアッセイ法により行った⁵⁾。

4. プロトプラスト融合^{6)~9)}

両株のプロトプラスト細胞の調製は、以下に示す方法で行った。*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) あるいは *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) を生育培地で 12 時間培養後、培養液 1 ml を集菌、洗浄した。次に、Sucrose 濃度を 10% とする SG 液体培地 (以後、10% SG 液体培地と略す) 中にリゾチームを添加したプロトプラスト調製液 1 ml に洗浄菌体を懸濁した。その際、リゾチーム濃度は、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) では 250 μg/ml、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) では 500 μg/ml とした。この反応液を 42°C で 30 分間インキュベート後⁶⁾、遠心分離 (4 000 rpm、4 min) によりプロトプラスト化細胞を沈降させ、1 ml の 10% SG 液体培地に再懸濁した。

両株の融合は、このようにして調製した両株のプロトプラスト懸濁液を等量混合し、8 倍容の 10% SG 液体培地 (40% ポリエチレングリコール 6000⁹⁾ と 0.02 M MgCl₂ を含む) を徐々に添加した後、室温で 3 分間静置することにより行った。

融合株の再生は、3% ポリビニルピロリドン (PVP) を含む 10% SG 軟寒天平板 (寒天濃度: 0.8%) 上に、上記の反応液を軽く塗抹して行った。37°C で 4~6 日間培養後、出現してくるコロニーから目的とする融合株の選択を行った。

目的とする融合株の選択は、栄養要求性をマーカーとした SG 軟寒天平板上での生育と糸引き能試験 (第 1 次選択)、糸引き能を示した菌株のビタミン B₁₂ 生産能 (第 2 次選択)、および第 2 次選択において多量のビタミン B₁₂ 生産の認められた菌株を用いた蒸煮大豆上での糸引き能 (第 3 次選択) について検討し行った。

Table 1 Strains used

Strain	Phenotype	Vitamin B ₁₂ Productivity (ng/g-Cell)
<i>B. natto</i> Takahashi No. 2	Wild type	<0.5
<i>B. megaterium</i> IAM 1166	Wild type	4 026
<i>B. natto</i> Takahashi No. 2 (Arg ⁻ mutant)	Arg ⁻	<0.5
<i>B. megaterium</i> IAM 1166 (Try ⁻ mutant)	Try ⁻	2 855

結果および考察

1. *B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) および *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) のプロトプラスト化条件の設定

細胞融合を行うにあたり、まず、供試菌のプロトプラ

Fig. 1 Effect of lysozyme concentration on the frequency of protoplasting

Bacillus natto Takahashi No. 2 (Arg⁻ mutant) and *Bacillus megaterium* IAM 1166 (Try⁻ mutant) were treated in the enzyme solution based on SG medium at 42°C for 30 min

—●—: *B. natto* Takahashi No. 2 (Arg⁻ mutant)
—○—: *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻ mutant)

スト化条件の設定を行った。両株のプロトプラスト化におけるリゾチーム濃度の影響について検討した結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 より明らかなように、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) では 250 μg/ml、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) では 500 μg/ml のリゾチーム濃度で 42°C、30 分間処理することにより、ほぼ 100% のプロトプラスト形成率が得られた。以後、両株のプロトプラスト化は、上記の酵素濃度で、他の条件は「実験方法」に述べたように行った。

2. 再生化条件の設定

文献報告^{10)~13)}によると、*B. subtilis* のプロトプラストの再生には、ゼラチン・PVP 等の再生刺激物質を必要とし、*B. megaterium* の場合には上記の再生刺激物質を必要とせず、軟寒天培地上で再生化が起こる。細胞融合時には、両元株が共に再生できる条件を設定することが好ましい。そこで、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) と *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) の両株に有効な再生化法を探索した。なお、再生を行う場合、一般に軟寒天塗抹法よりも軟寒天重層法で行う方が高い再生率が得られるが、本研究においては、目的とする融合株の糸引き能試験が必要であり、それを容易にするため、今回は軟寒天塗抹法を採用した。

3% のゼラチンあるいは PVP を再生刺激物質として用い、軟寒天塗抹法により SG 培地上で再生化を行ったところ、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) あるいは *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) において、ゼラチン・PVP の両添加培地共、10⁻²~10⁻³ のオーダーで再生体が得られた。しかし、ゼラチンは栄養要求マーカーを用いた融合株の直接選択には好ましくないことから、アミノ酸を含まないことが明確な PVP を再生刺激物質

Table 2 Vitamin B₁₂ productivity of the revertants of *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻ mutant) protoplasts

Strain	Stringiness on SG plate	Vitamin B ₁₂ productivity (ng/g-Cell)
(Revertant)		
R-247	+	2 902
R-338	+	2 712
R-529	+	2 950
R-36	-	<0.5
R-178	-	<0.5
R-424	-	<0.5
(Parent strain)		
<i>B. megaterium</i> IAM 1166 (Try ⁻ mutant)	+	2 855

として用いることにした。

3. プロトプラスト化・再生化に伴う糸引き能およびビタミン B₁₂ 生産能の脱落現象

プロトプラスト化・再生化操作により得られた両株の再生体中には、糸引き能の消失した株が多数観察された。本研究では、ビタミン B₁₂ 生産能をもつ納豆菌の形成を目的としていることから、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) における糸引き能の脱落現象とビタミン B₁₂ 生産能との関連について検討を行った。その結果、Table 2 に示したように、糸引き能を有する再生株は、すべてビタミン B₁₂ 生産能が認められたが、糸引き能の消失した株ではビタミン B₁₂ 生産能が消失していることがわかった。そこで、これらの脱落現象を避けるため、糸引き能に着目しながら脱落の起こる原因について検討した。脱落の原因として、浸透圧調整用として用いている Sucrose の濃度、プロトプラスト化の際作用させるリゾチームの濃度の影響が考えられることから、両者の濃度を個々に変化させ、プロトプラスト化・再生化を試みた。Table 3 に示したように、リゾチーム濃度を 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 一定とし、SG 液体培地中の Sucrose 濃度を 5~10% の範囲で変化させたところ、5% Sucrose 濃度では再生株 118 株中 37 株に糸引き能消失株が出現したが、10% Sucrose 濃度で処理することにより、再生株の糸引

き能消失現象は認められなくなった。一方、Sucrose 濃度を 5% としリゾチーム濃度を 500~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で検討したところ、糸引き能の消失は、リゾチーム濃度を高める程高頻度で起こる傾向が認められた。なお、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) の糸引き能の脱落現象についても、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) の場合と同様、リゾチーム濃度および浸透圧調整用に用いる Sucrose 濃度に依存することが明らかとなった。

以上の結果をもとに、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) と *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) との融合を目的としたプロトプラスト化の際に用いるリゾチーム濃度を、*B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) では 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) では 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、SG 培地中の Sucrose 濃度を 10% として、両株とも 42°C で 30 分間処理を行った。再生化操作は、10% SG 軟寒天培地上で、再生刺激物質として 3% PVP を添加して行った。

両株の融合は、プロトプラスト懸濁液を等量混合し、8 倍容の 10% SG 液体培地 (40% ポリエチレングリコール 6000 と 0.02 M MgCl₂ を含む) を徐々に添加後、室温で 3 分間静置して行った。Fig. 2 に、本実験で行ったプロトプラスト融合法の概略を示した。

Table 3 Effect of concentration of sucrose (A) and lysozyme (B) on stringiness elimination of *B. megaterium* IAM 1166 Try⁻ through protoplasting

(A) Effect of sucrose concentration

Sucrose concentration (%)	No. of stg ⁺ colonies	No. of stg ⁻ colonies	Total No. of revertants
5	81	37	118
7.5	108	15	123
10	124	0	124

Lysozyme concentration : 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each

(B) Effect of lysozyme concentration

Lysozyme concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of stg ⁺ colonies	No. of stg ⁻ colonies	Total No. of revertants
500	79	32	111
750	57	76	133
1 000	21	107	128

Sucrose concentration : 5% each

4. プロトプラスト融合と融合株の諸性質

融合株の一次選択は、両株の栄養要求マーカーを利用し、Arg・Try を含まない 10% SG 軟寒天平板上で生育する株として直接選択した。

融合率は 9.3×10^{-3} 程度であったが、得られた融合株中には、SG 培地上での糸引き能あるいはビタミン B₁₂ 生産能をもたない株が観察された。Table 4 に、融合株 30 株を選び、これらの菌株の SG 培地上での糸引き能およびビタミン B₁₂ 生産能の有無について検討した結果を示した。30 株中糸引き能は認められるがビタミン B₁₂ 生産能をもたない株 5 株、糸引き能・ビタミン B₁₂ 生産能とも認められた株 3 株、糸引き能・ビタミン B₁₂ 生産能とも認められない株 22 株であり、糸引き能をもたずビタミン B₁₂ 生産能を示す株は、本実験では得られなかった。

次に、ビタミン B₁₂ 高生産性納豆菌を得る目的で、糸引き能を有し、かつ、ビタミン B₁₂ 生産能の認められた 3 株 (F-18, F-25, F-46) について、ビタミン B₁₂ 生産量および蒸煮大豆上での糸引き能を調べた結果を Table 5 に示す。Table 5 から明らかなように、これ

ら 3 株のビタミン B₁₂ 生産性は良好であり、その中でも特に F-18 株は、*B. megaterium* IAM 1166 の wild type と同レベルのビタミン B₁₂ の生産が認められた。また、蒸煮大豆上での糸引きも良好であった。

本研究において、納豆菌 *B. natto* 高橋 No. 2 とビタミン B₁₂ 生産菌 *B. megaterium* IAM 1166 とのプロトプラスト融合により、蒸煮大豆上での糸引きが納豆菌と同レベルであり、かつ、ビタミン B₁₂ 生産量が *B. megaterium* IAM 1166 と同レベルの融合株を得ることができた。今後、融合株の安定性や実際に納豆菌として用いた場合の風味等について検討を加えたい。

要 約

納豆菌にビタミン B₁₂ 生産能を付与することを目的として、納豆菌 *Bacillus natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) とビタミン B₁₂ 生産菌 *Bacillus megaterium* IAM 1166 (Try⁻) とのプロトプラスト融合を試みた。

プロトプラスト化条件として、リゾチーム濃度を *B. natto* 高橋 No. 2 (Arg⁻) では 250 μg/ml、*B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻) では 500 μg/ml とし、両

Fig. 2 The process of protoplast fusion between *B. natto* Takahashi No. 2 (Arg⁻ mutant) and *B. megaterium* IAM 1166 (Try⁻ mutant)

Table 4 Classification of fusants

No. of stg ⁺ V·B ₁₂ ⁺ fusants	No. of stg ⁺ V·B ₁₂ ⁻ fusants	No. of stg ⁻ V·B ₁₂ ⁻ fusants	Total No. of fusants
3	5	22	30

stg : stringiness on SG agar plate
V·B₁₂ : vitamin B₁₂ productivity

Table 5 Stringiness and V.B₁₂ productivity of fusants

Strain	Stringiness		V · B ₁₂ productivity (ng/g-Cell)
	SG	Steamed soybean	
(Fusant)			
F-18	+	+	3 745
F-25	+	+	2 604
F-46	+	+	2 106
<i>B. natto</i> No. 2 Arg ⁻ mutant	+	+	<0.5 (<0.5) ¹⁾
<i>B. megaterium</i> Try ⁻ mutant	+	-	2 855 (4 026) ¹⁾

1) By wild type strain before mutation

株とも 42℃ で 30 分間処理を行った。また、再生刺激物質として 3% PVP を、融合促進剤として 40% ポリエチレングリコール 6000 を使用した。これら一連のプロトプラスト化・再生化操作は、10% Sucrose を含む Sucrose-glutamate (SG) 培地上で行った。糸引き能、ビタミン B₁₂ 生産能の保持に対しては、リゾチーム濃度および Sucrose 濃度の関与が認められた。

得られた融合株中、SG 培地上で糸引き能を有し、かつ、ビタミン B₁₂ 生産能をもつ株が得られ、これらの菌株は、蒸煮大豆上でも納豆菌と同程度の糸引きを有することが明らかとなった。

文 献

- 岡田憲幸・田部井英夫・森 勝美・加藤清昭・柳本正勝：食総研報，43，121 (1983).
- HARA, T. and UEDA, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 299 (1981).
- HARA, T. and UEDA, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 115 (1981).
- HARA, T. and UEDA, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **29**, 346 (1983).
- 岡田憲幸・太田輝夫：食総研報，42，97 (1982).
- AKAMATSU, T. and SEKIGUCHI, J.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887 (1981).
- 有馬賢治・高野 勇：醸酵工学，57，380 (1979).
- 長田敏行：プロトプラストの遺伝子工学（講談社サイエンティフィク）p. 27 (1986).
- FODOR, K. and ALFÖLDI, L.: *Molec. Gen. Genet.*, **168**, 55 (1979).
- LANDMAN, O.E. and FORMAN, A.: *J. Bacteriol.*, **99**, 576 (1969).
- FODOR, K., HADLACZKY, G. and ALFÖLDI, L.: *J. Bacteriol.*, **121**, 390 (1975).
- FODOR, K., HADLACZKY, G. and ALFÖLDI, L.: *J. Bacteriol.*, **125**, 1172 (1976).
- 廣川秀夫：蛋白質・核酸・酵素，28，1459 (1983). (昭和 62 年 6 月 4 日受理)