

Ⅳ 納豆菌の発酵能力をアップグレード

1. はじめに

納豆菌 [*Bacillus subtilis* (natto)] は納豆製造および食品添加物としてのポリ- γ -グルタミン酸（いわゆる納豆のネバネバ物質，以下 γ PGA とする）生産に利用されている。最近，筆者らは異なる2つのアプローチから納豆菌の発酵能力増強に取り組んだ¹⁾⁻³⁾。その目的は，種皮の硬い黒大豆など有色大豆を用いた納豆製造に適した種菌の開発と γ PGA の収量向上である。

市販されている納豆の多くは黄大豆納豆である。黄大豆と比して有色大豆は種皮が硬い。そのため，糸引きが充分で且つ柔らかい納豆に仕上げるには，大豆蒸煮圧を上げる又は蒸煮時間を長くするなどの工夫が必要である^{4),5)}。しかし，蒸煮条件を厳しくすれば皮むけが生じやすく発酵ムラの原因となる。そこで，蒸煮条件は変えずに，納豆菌の菌体外分解酵素（プロテアーゼ，セルラーゼなど）生産能力を増強して種皮の酵素的分解を促進することを目論んだ。新たな納豆種菌を育種し¹⁾ ポリフェノール類を多く含むことから潜在需要が大きいと考えられた黒大豆を用いてその評価を行った³⁾。

γ PGA の収量向上に関しては，分子遺伝学的な手法で研究を進めた。納豆菌は膜タンパク質複合体 PgsBCA によって ATP 分解を伴うグルタミン酸重合反応を行い，菌体外へ γ PGA を放出する^{6),7)}。この PgsBCA による γ PGA 合成は細胞密度による制御（クォーラムセンシング，quorum sensing）を受ける^{8),9)}。つまり，細胞密度の低い対数増殖期には PgsBCA は発現せず，増殖が定常期に達してからのみ発現する。著者らは，細胞密度情報を伝達する細胞内鍵因子の働きを明らかにした²⁾。その研究過程で，細胞密度情報伝達系に依存せずに γ PGA を合成できる変異株を得ることが出来た²⁾。この変異株では γ PGA と同様に細胞密度制御下にある菌体外分解酵素群の発現も亢進した。

2. 黒大豆発酵に適した納豆菌

(1) 納豆種菌の探索

やみくもに菌体外分解酵素活性が高い株を探しても，その株で納豆が作れる保証はない。何故ならば，煮豆成分の消化性を向上させる菌体外分解酵素生産は納豆発酵の必要条件の一つに過ぎないからである。分解酵素生産以外の必要条件として納豆の品質評価基準の一つでもある“被り”の形成が挙げられる。“被り”は発酵後に煮豆上に形成される白っぽい菌膜のことで，納豆菌が作る樹状構造をもつコロニー（菌の集団）（図1）に由来する。英語文献ではこの構造は fruiting body と呼ばれることもある。被りを形成しない株は納豆発酵適性がない。また， γ PGA は菌体と一体となって存在するのが良く，例え量が多くても水飴状に垂

れるのは好ましくないとされる。納豆発酵適性は細胞の運動性とも密接に関係することも報告されている^{10)–13)}。そこで、筆者らは納豆発酵適性株の系統的な特徴の解明、つまり納豆菌の分類上の位置づけを明確にすることから研究に着手し¹⁴⁾、その過程で納豆発酵適性を有する多くの *Bacillus subtilis* 株を稲わらから分離することに成功した。当初、得られた株の中から高い菌体外分解酵素活性を示すものを探した。しかし、現在使われている主要な納豆種菌（宮城野株）を上回る株はなかった。

(2) *rpoB* 変異

環境中から種菌候補を探すことは諦め、別の方法を採用ことにした。文献調査をしたところ、*Bacillus subtilis* や近縁の *Bacillus licheniformis* において RNA ポリメラーゼ β -サブユニット遺伝子 *rpoB*（細菌の遺伝子名は *abcX* のように表記する）変異によるリファンピシン耐性獲得に伴って2次代謝産物やアミラーゼの生産量が向上する報告があった^{15)–18)}。特に、*Bacillus subtilis* 実験室株 (*Bacillus subtilis* 168) のリファンピシン耐性に関する情報が大変参考になった^{17),18)}。しかしながら、実験室株は γ PGA を生産しない株であり“被り”も形成しない。加えて、実験室株の菌体外分解酵素生産量は納豆菌より遙かに低いので、納豆製造には全く適さない。実験室株のリファンピシン耐性株はNTD (neotrehalosadiamine, 2次代謝産物でアミノ糖抗生物質の一種) の生産量を増大させるが、プロテアーゼ生産は影響を受けなかった。そのため、実験室株の知見をそのまま納豆菌に当てはめることが出来るか不明であった。この点、納豆菌のゲノム情報が公開されたこと¹⁹⁾により実験室株との比較検討が遺伝子レベルで可能になったことが研究推進の一助となった。例えば、NTD 合成オペロンが

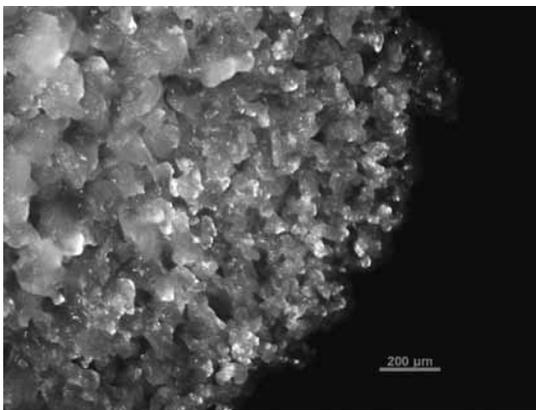


図1. 納豆菌が作る樹状構造をもつコロニー形態 (fruiting body)

撮影協力：今場司朗博士

納豆菌にも存在することが容易に判断できたので、リファンピシン耐性獲得の影響評価を行うことができたのである。菌体外分解酵素生産に関しては、実験室株では細胞密度情報伝達に必要な *degQ* 遺伝子（後述）の発現調節領域内一塩基変異が原因でそもそも非常に低いレベルに発現量が抑えられていること^{20), 21)} や、主要なプロテアーゼ遺伝子が実験室株と納豆菌の間で保存されていることなどが既に明らかであった。

上述の新たに稲わらから採取した納豆発酵適性株をリファンピシン含有寒天培地に塗布すると、自然変異による耐性株がいくつか得られた。次世代シーケンサーで全ゲノム塩基配列を比較し変異箇所を *rpoB* 遺伝子内に同定した。リファンピシン耐性を獲得した株はすべて *rpoB* に変異があったが、その中で同時に菌体外分解酵素生産が増えたものは *rpoB* 遺伝子の 1460 番目の C が T に置換した変異株 (*rpoB5* 変異株) だけだった。他の耐性変異 (1406A → G, 1444C → T) では菌体外分解酵素生産への影響はなかった¹⁾。

(3) *rpoB5* 変異と遺伝子発現制御

rpoB5 変異株の菌体外分解酵素活性を表 1 に示した。プロテアーゼ活性の上昇が顕著で約 3.5 倍となった。セルラーゼ (Azo-CMC 分解酵素) や γ -グルタミルペプチダーゼ活性も有意に上昇し、実験室株同様 NTD の生産も増えた。一方、納豆の粘性に関わる多糖であるレバンの合成酵素 (levansucrase) 活性は逆に低下して検出限界以下となった (表 1)。

rpoB5 変異が遺伝子発現へ及ぼす影響は実験室株を用いて詳細に研究され、2 つの作用機作 (メカニズム) が提唱されている¹⁸⁾。1 つは RNA ポリメラーゼと結合して DNA 配列認識を司る σ 因子 A を介した転写の促進であり、もう一つは、転写終結シグナルの認識強化による転写終結シグナルのリードスルー (読み飛ばし) 減少である。NTD 生産が増えたことから、納豆菌細胞内においても *rpoB5* 変異は実験室株と同様の作用機作で遺伝子発現に影響していると考えられた。実験室株ではレバン合成酵素の発現が見られなかったため両菌株を直接比較することはできないが、レバン合成酵素の発現量低下は転写終結シグナル認識

表 1 *rpoB5* 変異株 (Miyagi-4100) とその親株 (Miyagi-4) の菌体外分解酵素と NTD の生産

| 菌株名 | プロテアーゼ (U/ml) | セルラーゼ (U/ml) | γ -グルタミルペプチダーゼ (mU/ml) | レバンシュークララーゼ (mU/ml) | NTD (μ g/ml) |
|--------------------------------|---------------|--------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>B. subtilis</i> Miyagi-4 | 22.2 | 0.14 | 0.7 | 73 | <5 |
| <i>B. subtilis</i> Miyagi-4100 | 78.0 | 0.21 | 1.9 | <2 | 40 |

文献 1 の表 1 を改変。

強化から合理的な説明が可能であった（図2）。すなわち、レバン合成酵素遺伝子（*sacB*）の転写開始点と翻訳領域（ORF）の間に転写終結シグナルが存在する。*sacB*はシヨ糖で発現誘導される遺伝子である。シヨ糖存在下では転写終結シグナルのすぐ隣にあるアンチターミネーション配列にSacYタンパク質（遺伝子*abcX*がコードするタンパク質はAbcXと表記する）が結合することによってmRNAの構造が変化し、転写終結シグナルのリードスルーが促進される²²⁾。おそらく、*rpoB5*変異を有するRNAポリメラーゼの転写終結シグナル認識が強いためSacYが存在してもリードスルーが起こらないのであろう。

(4) 黒大豆納豆の試作と評価

実際に納豆を試作してみた³⁾。

原料大豆として黒大豆（品種名：黒大豆小粒）を用いた。スターター株として、*rpoB5*変異を有する納豆菌Miyagi-4100株とその親株（Miyagi-4）、比較検討のため現在広く使用されている宮城野株の3株を用いた。

独立に3回試作を行い（ $n = 3$ ）出来た納豆について硬さ試験などの評価を行った（表2, 3）。Miyagi-4100株ではレバン合成酵素活性が検出限界以下まで低下していたので、レバン量にも着目して納豆の評価を行った。その結果、親株および宮城野株と比べ、Miyagi-4100株で作った黒大豆納豆では有意に γ PGAが増え、発酵状態が改善されたことがわかった。意外なことにレバン量はMiyagi-4100株で顕著に増大した（表2）。納豆切断用のアダプターとピークホールD型の重量計を用いて硬さ試験を行ったところ、P値はやや高かったもののMiyagi-4100株でより柔らかく仕上がる傾向があった（切断強度が約8グラム低下）（表3）。柔らかさについては官能検査でも良い成績が得られている（久保ら、未発表データ）。

予想に反してレバン量が増えた理由は定かでない。レバン合成酵素活性は液体培地にシヨ糖（1% w/v）を添加し発現誘導される条件で測定した。大豆にはシヨ

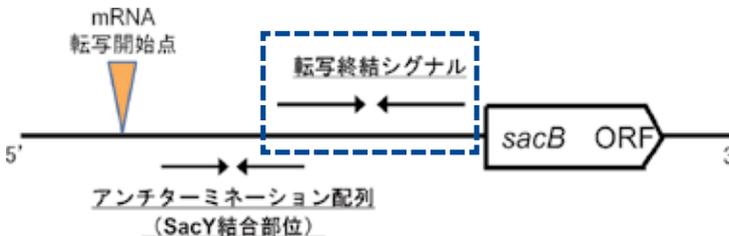


図2. レバンシュクララーゼ遺伝子の発現制御（模式図）

レバンシュクララーゼ遺伝子（*sacB*）とその上流の発現調節領域を模式的に表した。矢印は逆向き反復配列を示す。*sacB* ORFは*sacB*遺伝子の翻訳領域を示す。

表 2 黒大豆納豆のレバンと γ PGA の含量

| 使用種菌名 | 成分量(mg/g 納豆) | | |
|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | レバン | γ PGA | 全糖量 |
| Miyagino | 0.73 ± 0.02 ^A | 13.33 ± 0.04 ^A | 1.65 ± 0.04 ^A |
| Miyagi-4 | 0.53 ± 0.03 ^A | 13.08 ± 0.02 ^A | 1.37 ± 0.02 ^A |
| Miyagi-4100 | 4.52 ± 0.16 ^B | 16.16 ± 0.42 ^B | 6.60 ± 0.42 ^B |

含量の数値は平均値 ± 標準偏差 (n=3).

各列数値の上付き文字の違いは、Tukey-Kramer 法により有意に (P<0.05) 異なることを示す。

文献 3 の表 1 を改変。

表 3 黒大豆納豆の硬さ試験

| 試料名 | 使用菌株 | 切断強度 (g) | P 値 |
|-------|---------------|--------------|---------|
| 黒大豆煮豆 | | 225.7 ± 12.5 | |
| 黒大豆納豆 | (Miyagino) | 163.3 ± 12.9 |] 0.236 |
| 黒大豆納豆 | (Miyagi-4100) | 155.8 ± 11.9 | |

サンプルの納豆については、括弧内に使用した納豆菌を示した。

納豆 50 粒を測定し、中間 30 粒分のデータを用いて算出した。

文献 3 の表 2 を改変。

糖が約 5% (乾物重量当たり) 含まれる。納豆発酵過程で *sacB* 遺伝子発現が誘導され得るか調べていないが、少なくとも Miyagi-4100 株では誘導なしの基礎的レベルの合成酵素発現量でレバンが生産されたと考えられる。納豆菌は SacC (エキソ型レバナーゼ) と LevB (エンド型レバナーゼ) の 2 つのレバン分解酵素を菌体外に生産することがゲノム情報から予想される。*rpoB5* 変異によって分解系が抑制されたためにレバンが蓄積したのかも知れない。あるいは、液体培地で得られた実験結果をそのまま納豆に当てはめられない可能性も考えられた。煮豆上でコロニーを形成しながら生育する納豆菌と液体培地中の納豆菌では違った遺伝子発現制御があるのかも知れない。尚、レバンにはプレバイオティクスとしての機能性報告がある^{23),24)}。本株を利用した黒大豆納豆の生産が 2013 年末に始まった。

3. 細胞密度応答制御系の改変と γ PGA 生産

(1) 納豆菌の γ PGA 合成制御機構

発酵法による γ PGA の工業生産はすでに数社が行っている。発酵生産プロセスにはいくつかの重要点 (シード培養, 培地組成, 連続培養, 通気, 培養液の粘性制御, 生産物の回収・精製, 残存孢子除去など) があるが, 納豆菌自身の γ

PGA 生産性が収量に最も影響するであろう。筆者らは変異株による γ PGA 高生産を目指し、納豆菌の γ PGA 合成制御機構、特に細胞密度応答による制御について研究を進めてきた^{8), 9), 25)}。

納豆菌自身が菌体外へ分泌する低分子ペプチド ComX の濃度を指標とした細胞密度情報はその受容体膜タンパク質である ComP-ComA 二成分制御系を介して細胞内へ伝達される (図3)。*degQ* 遺伝子は細胞密度情報の直接の受け手である ComP-ComA 二成分制御系依存的に発現誘導される。つまり、細胞内で細胞密度情報の2次的伝達 (あるいは増幅) の役割を担う。DegQ は γ PGA 生産に必須であるだけでなくプロテアーゼなどの菌体外分解酵素生産や鞭毛の形成にも必要で、尚且つ細胞のコンピテンス (competence, 細胞増殖の定常期において外部から DNA を取り込んで形質転換する能力) を負に制御する働きが知られている^{2), 13), 20), 21), 26)}。つまり、DegQ は細胞表層にある ComP が感知した細胞密度情報の伝達を担う定常期の細胞生理を多面的に制御する鍵因子なのである。

γ PGA 合成は PgsBCA 膜タンパク質複合体が担う (遺伝子 *abcX*, *abcY*, *abcZ* がオペロンを構成する場合は *abcXYZ* と表記する)。*pgsBCA* 遺伝子上流の遺伝子間領域は約 700 bp あり、細菌の遺伝子間領域としては非常に長い。*pgsBCA* 遺伝子の発現調節にはこの 700 bp のほぼ全長が必要で⁸⁾ その中に DNA 結合タンパク質の一つである DegU の結合部位が含まれる²⁷⁾。 γ PGA 合成遺伝子 *pgsBCA* の転写を直接制御するのがこの DegU である²⁷⁾。DegU は細胞内でリン酸化された状態あるいは脱リン酸化された状態で存在し、リン酸化の有無に

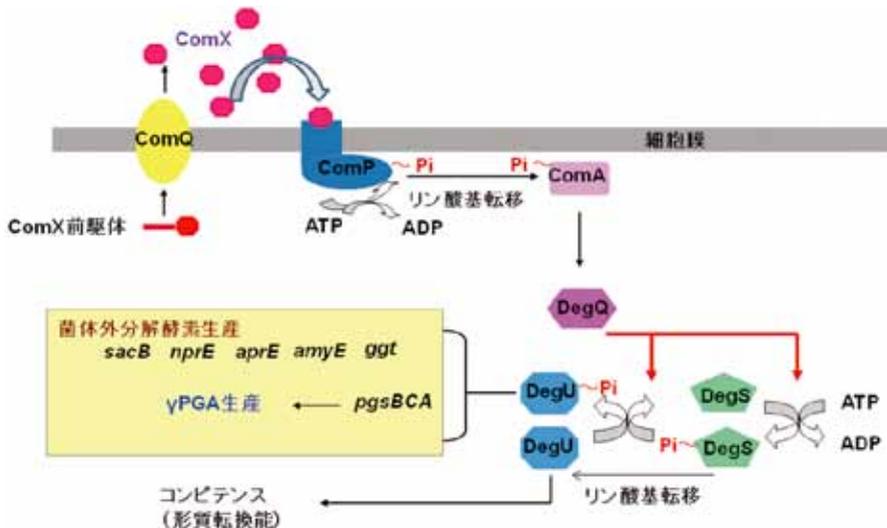


図3. γ PGA 生産を制御する細胞密度情報の伝達経路 (模式図)

よって結合できる DNA 配列が異なる性質を持つ。言い換えれば、DegU のリン酸化状態によって発現する遺伝子が変わるのである²⁸⁾。筆者らは、*degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験および精製したタンパク質を用いた *in vitro* のリン酸基転移実験によって、DegQ による細胞密度情報伝達と DegU リン酸化の関係の詳細を明らかにした²⁾。

(2) *degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験 — *degQ* 遺伝子破壊株の表現型—

DegQ はアミノ酸 46 個からなるとても小さなタンパク質である。*degQ* 遺伝子を破壊すると細胞密度情報伝達が滞り、その結果、 γ PGA は生産されなくなる (図 3)。 γ PGA 生産の他にもプロテアーゼなど定常的に誘導される菌体外分解酵素の生産量も激減する (表 4)。一方、コンピテンス (形質転換能) は逆の影響を受け、*degQ* 遺伝子破壊によって向上する (表 4)。ComP-ComA 二成分制御系の名称 Com がコンピテンス (*competence*) に由来することが示すように、元々、外部から DNA を自己ゲノムに取り込んで形質転換する現象の解析から *Bacillus subtilis* の細胞密度応答機構は見つかった。納豆菌のコンピテンスは実験室株に比べてかなり低いのであるが、*degQ* 遺伝子を破壊すると改善される (表 4)。実験室株には *degQ* 遺伝子の転写開始点から約 10 塩基上流に一塩基変異 (T → C) がある。この変異によって実験室株では *degQ* 遺伝子の発現量が約 50 分の 1 に低下している²¹⁾。そのため、実験室株のコンピテンスは高いのである (逆に言えば、形質転換実験し易い株が実験室株として選ばれたことになる)。納豆菌の場合、*degQ* 遺伝子破壊株であっても実験室株と比べればまだコンピテンスは低い。納豆菌の形質転換効率の低さ (実験室株の高さ) は *degQ* 遺伝子の発現量の違いに加え、その他の遺伝的多型 (例えば *comS* 遺伝子の多型²⁹⁾ など) との相乗効果の結果であると考えられる。

表 4 *degQ* 破壊株とその抑制変異株の γ PGA 生産、菌体外分解酵素生産およびコンピテンス

| 菌株名 | GGT* | アミラーゼ | アルカリ プロテアーゼ | γ PGA | レバン シュークラーゼ (形質転換能) | コンピテンス ($\times 10^{-6}$) |
|---------------------------|---------|--------|----------------|--------------|------------------------|--------------------------------|
| | (mU/ml) | (U/ml) | (U/ml) | (mg/ml) | (mU/ml) | |
| BS168 実験室株 | <0.01 | 2400 | 8.2 | <0.01 | <2 | 1218 |
| NAFM5 納豆菌 (野生型) | 0.5 | 218.0 | 50.2 | 11.2 | 173.1 | 11 |
| NAFM73 <i>degQ</i> 遺伝子破壊株 | 0.1 | <10 | 3.0 | <0.01 | 4.9 | 116 |
| NAFM735 グループ I 抑制変異株 | 2.0 | 2696.2 | 60.4 | 14.0 | 324.7 | 27 |
| NAFM736 グループ II 抑制変異株 | 0.2 | <10 | 14.8 | 0.7 | 111.9 | 135 |

* γ -グルタミルペプチダーゼ

文献 2 の表 2 を改変。

(3) *degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験 — *degQ* 遺伝子破壊の抑制変異—

筆者らは *degQ* 遺伝子破壊の抑制変異（サプレッサー変異, suppressor mutation）をスクリーニングし、細胞密度応答の制御を受けない γ PGA 生産が可能となる変異株の育種を行った²⁾。この研究では、抑制変異箇所の同定・解析を通じて細胞密度情報伝達に関わる新たな因子が見つかる可能性にも期待できた。具体的には、*degQ* 遺伝子破壊株を変異原処理し γ PGA 生産が回復した株を寒天培地上のコロニーを1つ1つ目視で観察して探す、という地道な作業を行った。 γ PGA 生産が回復したと思われる表面が盛り上がったコロニーを爪楊枝でつついて粘性物質生産を確認し、最終的には液体培地で培養してHPLC法、電気泳動法等で γ PGA 生産量を求めた。観察した約4万のコロニー中、9つに γ PGA 生産を認めた。

この9株についてより詳細な分析を行ったところ、9株はその表現型から2つのグループに分かれた。即ち、グループI抑制変異株（6株）では γ PGA 生産が野生型並に回復しておりコンピテンスも野生型並に戻ったのに対し、グループII（3株）では γ PGA 生産の回復は部分的でコンピテンスは変化せずに野生型よりも高いままであった（表4）²⁾。詳細は省略するが、グループI変異は連鎖解析が可能であったので変異箇所を同定することができた。グループI変異は全て *degS* 遺伝子内にあった（図4）。DegSとDegUは二成分制御系を構成し、DegSタンパク質によってDegUタンパク質がリン酸化される（図3）（正確に言うと、DegSは189番目のヒスチジン残基を自己リン酸化し、次いでそのリン酸基をDegUに転移する）。6つのグループI変異は、DegS内の異なるアミノ酸変異：M195I（アミノ酸残基195番目のメチオニンがイソロイシンに変わった変異）、R208Q（208番目のアルギニン→グルタミン）、P245S（245番目のプロリン→セリン）、L248F（248番目のロイシン→フェニルアラニン）、D249G（249番目のアスパラギン酸→グリシン）、およびD250N（250番目のアスパラギン酸→アスパラギン）であった。これらは全てDegSの自己リン酸化部位とその周辺

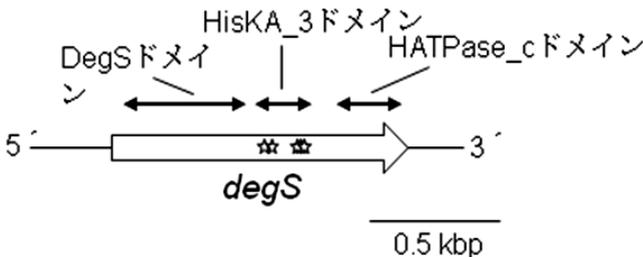


図4. DegS 変異箇所の模試図

星印は6つのグループI抑制変異箇所を示す。

のアミノ酸配列からなる HisKA_3 ドメイン内にあった (図4)。グループ II 変異に関しては、納豆菌で遺伝的マーカーが整備されていないこともあり連鎖解析による変異箇所同定に苦慮した。しかし、ようやく最近になって、変異株の全ゲノム配列を解読することにより原因変異を推定できた (木村ら, 未発表データ)。次世代シーケンサーの解析コストが低下し、食品微生物分野でも利用できるようになったのである。

(4) 精製したタンパク質を用いた *in vitro* でのリン酸基転移実験 – DegQ による DegS- DegU 二成分制御系のリン酸化制御–

次にアイソトープ (^{32}P) 標識した ATP を基質とした *in vitro* でのリン酸基転移実験に取り組むことにした。Kobayashi の先行研究²⁸⁾で、DegS から DegU へのリン酸基転移反応が DegQ 存在下で促進されることが報告されていた。そこで、変異型の DegS を精製して DegQ, DegS, DegU の 3 者共存下でのリン酸化反応を確かめることにした。しかし、ここで問題が生じた。*in vitro* 実験に必要な DegS を大腸菌細胞内で発現すると、その全てが不溶性画分 (インクルージョンボディ) に回収されたのである。不溶性のままではタンパク質は適正な立体構造を失っているため実験に使うことはできない。Kobayashi の先行研究では、不溶性画分を界面活性剤で溶解し、その後徐々に界面活性剤を除去して適正な構造を回復させた (リホルディングさせた) DegS が使われた。リホルディング法では全ての分子の立体構造が適正に回復しているわけではなく、タンパク質分子は <不溶性⇔中間構造体⇔適正構造> の間で平衡状態にある。そのため、複数の変異体タンパク質と元の野生型タンパク質との比較検討にはリホルディング化効率は勿論のこと、残存する不溶性や中間構造状態にある分子種の影響を見極める必要がある (との、厳しい指摘を論文査読レフェリーから受けた)。そこで、様々な手法 (低温発現, 分子シャペロンとの共発現, 枯草菌細胞内での発現, 融合タンパク質として発現, DegS と DegU の共発現…… ∞ (×_×) $^{\infty}$) を試したが、なかなか上手くいかなかった。研究を登山に例えれば、正に胸突き八丁の上り坂にさしかかったのである。この間、“ネガティブではあるが重要なデータ” を粘り強く出していただいた共同研究先の修士課程院生に感謝いたします。幸い努力は報われた。可溶性 DegS の発現に成功し、いよいよ変異体 DegS の解析を行う段になって院生は希望企業へ就職。その後のアイソトープ実験は私自身で行った。数週間夜遅くまで、時には夢の中でも実験した。

in vitro でのリン酸基転移実験結果をまとめると、DegQ は DegS と DegS-Pi (自己リン酸化した DegS) 間の平衡を右側に保つ機能を持つこと、および DegQ と DegS-DegU 二成分制御系の 3 者会合状態で DegU-Pi が安定的に存在できることが明らかとなった²⁾。加えて、DegQ 非存在下であっても、抑制変異を持つ DegS があたかも DegQ が存在するかの様に振る舞う (リン酸化を促進し、脱リ

ン酸化を抑える)ことがわかった(図5)²⁾。おそらく変異アミノ酸残基は DegS と DegQ との会合部位に位置し, DegQ と同様な影響をもたらすのであろう。これらはリホールディング法ではわからなかった新規な知見であったので, 研究論文は海外の有力研究者にも引用されている^{11), 12)}。

DegU の *pgsBCA* 遺伝子上流の発現調節領域への結合にそのリン酸化が必須であることは Ogura らの研究²⁷⁾ で明らかであり, ComP から始まる γ PGA 生産制御に関わる一連のリン酸化反応リレーは終点へ到達した。DegS 変異株は活発に γ PGA を生産する。次の課題は, 変異株を用いた γ PGA 生産のスケールアップである。

4. おわりに

納豆発酵適性株の系統解析では, 多数の異なる納豆発酵菌を得ることができた。これらは遺伝資源として貴重である。バクテリオファージ耐性や香気成分の改良等の課題に取り組むための研究材料となるであろう。また, 得られた多くの納豆発酵菌をまとめてゲノム解析することによって, 納豆発酵とピオチン要求性や運動性との関連性^{10)–12), 14)} をより明確に議論できるようになる可能性もある。

全く触れなかったが, γ PGA の生産コストには生産物の回収・精製過程の寄与が大きく, 克服すべき課題として残されている。グループ II 抑制変異の研究を通じた更なる納豆菌アップグレードが生産性向上に繋がると考え, 現在研究を鋭意進めている。

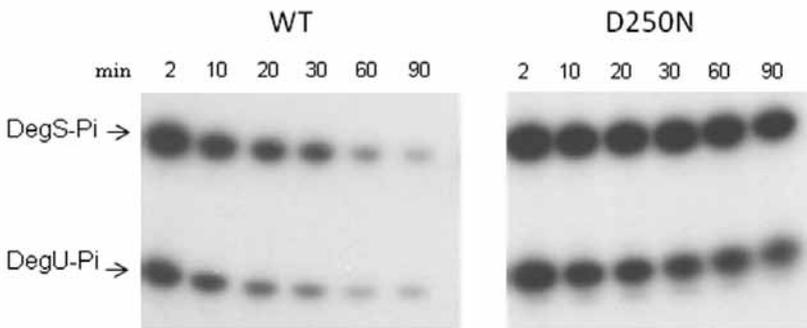


図5. DegS から DegU への ³²P で標識したリン酸基の転移反応
(文献2の図4を改変)

DegS タンパク質を [γ -³²P]ATP を用いて自己リン酸化した後に DegU と大過剰の非標識 ATP を加え, 経時的にサンプリングしてポリアクリルアミド電気泳動に供した。野生型 DegS (左, WT) と比べ抑制変異を持つ DegS (右, D250N) では脱リン酸化反応が遅くなり, リン酸化した状態で安定化している。

謝辞

納豆発酵適性株の系統解析および黒大豆用納豆菌の開発に関する研究は、茨城県工業技術センターとの共同研究であり、久保雄司博士がその多くに貢献しました。USDA の Rooney 博士には MLST 系統解析を手伝って頂きました。東北大学の金子淳先生、阿部直樹先生、大学院生の鈴木由貴さんには可溶性 DegS タンパク質の発現でご支援を頂きました。舟根和美ユニット長と斉藤勝一主任研究員から糖分析に関する多くのご助言を頂きました。発酵細菌ユニットの皆様のご協力・ご支援に感謝いたします。

(応用微生物研究領域 発酵細菌ユニット 木村 啓太郎)

引用文献

- 1) Kubo Y, Inaoka T, Hachiya T, Miyake M, Hase S, Nakagawa R, Hasegawa H, Funane K, Sakakibara Y, Kimura K. 2013. Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 654-657.
- 2) Do T-H, Suzuki Y, Abe N, Kaneko J, Itoh Y, Kimura K. 2011. Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly-glutamate synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8249-8258.
- 3) 久保雄司, 斉藤勝一, ダニエル ホルヴェック, 舟根和美, 中川力夫, 木村啓太郎. 菌体外分解酵素が増強された納豆菌 *rpoB* 変異株による黒大豆納豆の製造. *日本食品科学工学会誌* **60**: 557-581.
- 4) Hu Y, Ge C, Yuan W, Zhu R, Zhang W, Du L, Xue J. 2010. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 1194-1202.
- 5) Juan M-Y, Wu C-H, Chou C-C. 2010. Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. *Food Microbiol.* **27**: 918-923.
- 6) Ashiuchi M, Misono H. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly-gamma-glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 9-14.
- 7) Candela T, Fouet A. 2006. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**: 1091-1098.
- 8) Kimura K, Tran L-SP, Do T-H, Itoh Y. 2009. Expression of the *pgsB* encoding the poly-gamma-DL-glutamate synthetase of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 1149-1155.
- 9) Tran L-SP, Nagai T, Itoh Y. 2000. Divergent structure of the ComQXPA

- quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **37**: 1159-1171.
- 10) Kimura K, Tran L-SP, Funane K. 2011. Loss of poly-gamma-glutamic acid synthesis of *Bacillus subtilis* (*natto*) Due to IS*ABsu1* translocation to *swrA* gene. *Food Sci. Technol. Res.* **17**: 447-451.
 - 11) Chan JM, Guttenplan SB, Kearns DB. 2014. Defects in the flagellar motor increase synthesis of poly- γ -Glutamate in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **196**: 740-753.
 - 12) Cairns LS, Marlow VL, Bissett E, Ostrowski A, Stanley-Wall NR. 2013. A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*: Flagella-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* **90**: 6-21.
 - 13) Stanley NR, Lazazzera BA. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **57**: 1143-1158.
 - 14) Kubo Y, Rooney AP, Tsukakoshi Y, Nakagawa R, Hasegawa H, Kimura K. 2011. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to Natto (Fermented Soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6463-6469.
 - 15) Adrio JL, Demain AL. 2006. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 187-214.
 - 16) Inaoka T, Ochi K. 2011. Activation of dormant secondary metabolism neotrehalosadiamine synthesis by an RNA polymerase mutation in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 618-623.
 - 17) Inaoka T, Takahashi K, Yada H, Yoshida M, Ochi K. 2004. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-Neotrehalpsadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 3885-3892.
 - 18) Inaoka T and Ochi K. 2007. Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of Neotrehalosadiamine, a novel autoinducer production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**: 65-75.
 - 19) Nishito Y, Osana Y, Hachiya T, Popendorf K, Toyoda A, Fujiyama A, Itaya M, Sakakibara Y. 2010. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. *BMC Genomics* **11**: 243.
 - 20) Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* **172**: 824-834.
 - 21) Msadek T, Kunst F, Klier A, Rapoport G. 1991. DegS-DegU and ComP-ComA

- modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. J. Bacteriol. **173**: 2366-2377.
- 22) Shimotsu H and Henner DJ. 1986. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. J. Bacteriol. **168**: 380-388.
 - 23) Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. J. Nutr. Biochem. **10**: 13-18.
 - 24) Marx SP, Winkler S, Hartmeier W. 2000. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. FEMS Microbiol. Lett. **182**: 163-169.
 - 25) Nagai T, Tran L-SP, Inatsu Y, Itoh Y. 2000. A new IS4 family insertion sequence, *IS4Bsu1*, responsible for genetic instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **182**: 2387-2392.
 - 26) Murray EJ, Kiley TB, Stanley-Wall NR. 2009. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour. Microbiology **155**: 1-8.
 - 27) Ohsawa T, Tsukahara K, Ogura M. 2009. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in gamma-polyglutamic acid synthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73**: 2096-2102.
 - 28) Kobayashi K. 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **66**: 395-409.
 - 29) Ashikaga S, Nanamiya H, Ohashi Y, Kawamura F. 2000. Natural genetic competence in *Bacillus subtilis* natto OK2. J. Bacteriol. **182**: 2411-2415.