

納豆研究の新展開～納豆菌とファージの共進化から探る～

木村啓太郎

納豆菌（宮城野株，図1）は，自身のゲノム中にいくつかのプロファージ配列（ファージゲノム由来の塩基配列）を持っている。また，ファージ側のゲノムにも宿主由来と思われる配列が含まれている。これらは宿主株とファージ間で過去にゲノムの交換が起こったことを示唆し，ファージ感染や溶原化，耐性獲得といった長期に渡る生存競争がもたらした共進化の産物と言える。納豆種菌に限らず多くの宿主細菌とファージにも同様の事例がみられる。

本シンポジウムでは，納豆菌ファージが共進化の結果獲得したと考えられる PghP (poly-gamma-glutamic acid hydrolase P) について，筆者らが（独）農研機構・食品総合研究所で行っている研究を紹介した。学部学生の参加も多いということだったので，ファージ関連の研究に加えて，意外に知られていない納豆種菌の由来や微生物分類上の位置づけ，納豆の粘性物質（いわゆるネバネバ）の合成制御などについても，最新の知見を含めて解説した。

納豆菌ファージの粘り物質分解酵素 PghP

“粘らない”発酵不良納豆の原因は，ファージ感染である。納豆菌自身の変異によって粘り物質 γ PGA (poly-gamma-glutamic acid) が生産されない場合あるいはファージ汚染が重症な場合は，出荷前に問題が発覚する。検品をすり抜ける発酵不良納豆は見かけ上は正常な納豆と変わりなく，被り（白く見える被膜状の納豆菌コロニー）

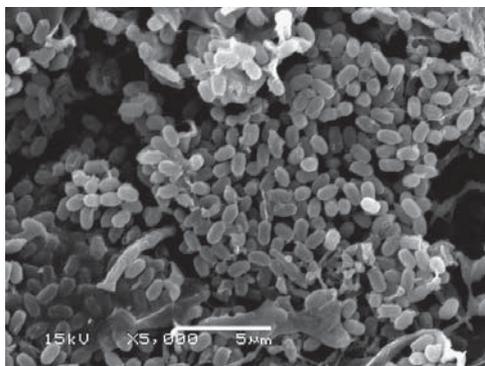


図1. 納豆菌（宮城野株）胞子の電子顕微鏡像。（独）国際農林水産業研究センター八田珠郎博士 提供。

も粘り物質 γ PGAも存在する。ところが，かき混ぜることによって少数のファージが生産した粘り物質分解酵素 PghP が拡散し，あっという間に粘りが失われてしまう。

筆者らは， Φ NIT1 ファージに感染した納豆菌培養上清から PghP を精製し，最近その立体構造を明らかにした^{2,3)}。PghP の基質である γ PGA は，グルタミン酸の高分子ポリマーである^{4,5)}。通常のペプチドと異なり， γ PGA では γ 位のカルボキシル基とアミノ基が連結している。また，構成グルタミン酸にD体が非常に多く含まれている（50–80%）。こうした珍しい特徴を有する高分子を加水分解する PghP とアミノ酸配列相同性を持つ既知の酵素は見あたらなかった。そのため，構造が明らかになる以前はその触媒機作がよくわからなかった。

pghP 遺伝子は， Φ NIT1 ファージゲノム上のいわゆるジャンク領域（ファージのライフサイクルに直接必要ないと考えられる領域で，宿主由来である可能性が示唆されている）に存在し，その近傍にはトランスポゼースと相同性のある遺伝子があった⁶⁾。また，これまでに発酵不良納豆から分離されたファージはすべて *pghP* を持っていた⁶⁾。

PghP は CPA (carboxyl peptidase A) と似ている

アミノ酸配列の相同性はないが，PghP と CPA の構造は非常によく似ていることがわかった（図2）。両者は，活性中心に Zn イオンとそのリガンド His-Glu-His モチーフを持つ点（図2B），これらが4本の並行 β -sheet からなるコア構造上同一のトポロジーで位置している点で非常によく似ている³⁾。従って，CPA が C 末端カルボキシル基を認識するのと似た機構によって，PghP が γ PGA の側鎖のカルボキシル基を認識して加水分解する可能性が考えられた。しかし，PghP にカルボキシペプチダーゼ活性はなく， γ グルタミルペプチドに特異的な反応を示す。

構造類似性は明らかになったが，PghP の基質認識の詳細には不明な点がまだ多く残されている。例えば，PghP は納豆菌が作る γ PGA (DL- γ PGA) を切断するが，病原微生物 *Bacillus anthracis* が作る D 体グルタミン酸のみで構成される D- γ PGA は切断できない⁷⁾。PghP 消化性の有無が，酵素側の基質特異性によるのか，あるいは基

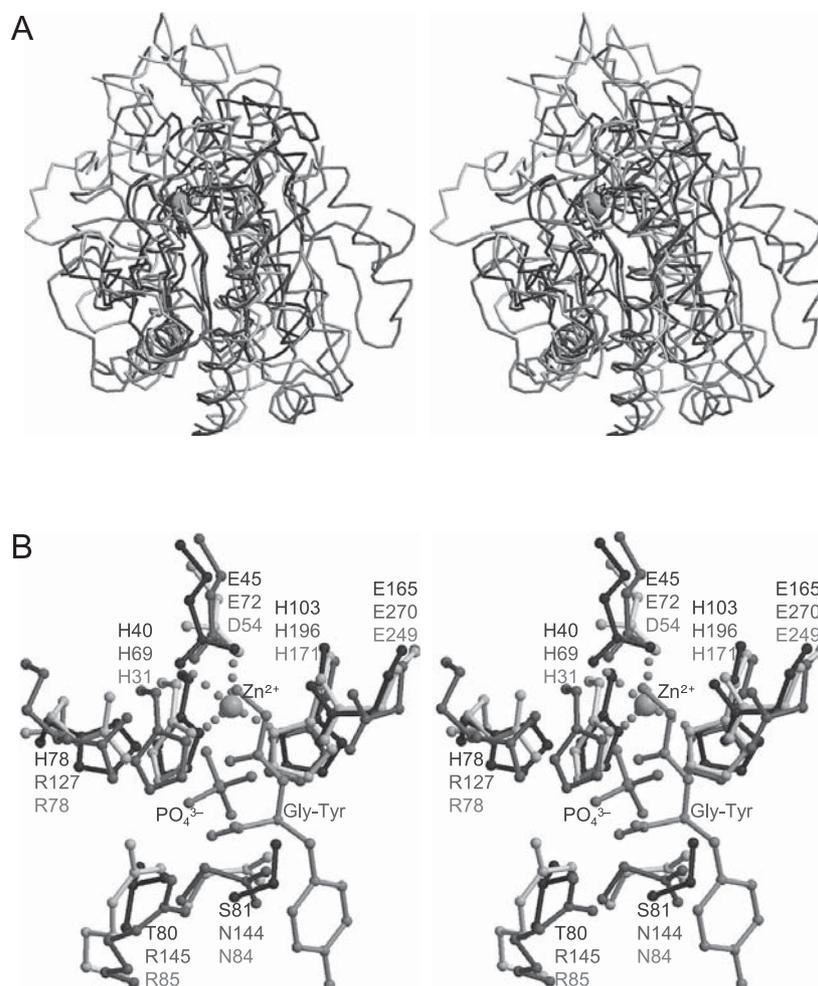


図2. PghP, CPA, FSG (putative N-formylglutamate amidohydrolase) の構造比較. A, Ca 描画全体像 (重ね書き, 黒線がPghPを示す). B, 活性中心部のアミノ酸残基と亜鉛イオン. CPAに結合した基質のGly-TyrジペプチドおよびPghPに結合した基質アナログのリン酸イオンを含む. ©Wiley Periodicals, Inc., *Proteins*. 参考文献3の図3を改変.

質側のD- γ PGAとDL- γ PGAがまったく異なる構造を持つためなのか, 今のところ明瞭な議論はできない. *B. anthracis*のD- γ PGAは病原因子であり, 薬剤開発の標的分子となっている^{5,7)}. 鏡像体認識機構の解明が今後の課題の一つである.

食品加工酵素としてのPghP活用を提唱

納豆は発酵食品としては例外的な日配食品 (日々作り日々出荷する在庫を多く持たない食品) であり, 栄養価や独特の風味を生かした潜在的な加工用途が見込まれるにもかかわらず, 加工食品への展開は進んでいない. つまり, 納豆の粉末化や溶解成形, 凍結乾燥などによる保存性の向上や調味食材としての活用が進んでいない. その原因のひとつとして, 納豆の粘り成分 γ PGAの存在が考えられる.

γ PGAはグルタミン酸が1万個以上直鎖状に繋がった高分子であり, 水溶液中で非常に高い粘性を持つ. この粘性が, 加工の際の攪拌や充填, 混合などの作業の障害になる. 製造ラインの洗浄も困難であろう. PghPは γ PGAをエンド型に切断し, 最終的に3~5量体のオリゴマーまで分解することができる. PghP処理によって納豆は急激に粘性を失い, 煮豆同様に加工用として扱うことが可能となる. PghPを用いて作成した“粘らない納豆”は, 粘性以外の風味, 臭い, 栄養価などの諸性質がまったく変化してないだけでなく, 分解産物のグルタミン酸オリゴマーが残存するため, 豆表面には γ PGAの保湿性に由来するしっとり感, 光沢感がある. このような製品は, 単純に γ PGA合成変異株では作ることができない. 本方法では既存の発酵設備・発酵条件をそのまま変更せずに使うことができるのも利点の一つである.

納豆種菌の由来と系統解析

2010年に公開された納豆菌ゲノム解析では宮城野株が使われた¹⁾。この宮城野という名称は、仙台市の「宮城野納豆製造所」に由来する。純粋培養した宮城野株をスターターとする近代納豆の製造は約100年前に商業化され、同時期に、経木などの衛生的容器の使用も推奨されるようになった。この近代納豆の成立は、宮城野納豆製造所の創設者である三浦二郎氏と北大教授だった半澤洵博士を初めとする多くの人々の尽力によるところが大きい。より詳細な経緯を知りたい方は、堀田らの総説を参照されたい⁸⁾。

納豆菌は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に分類される。原著論文では、他の枯草菌株と区別するために *B. subtilis* (natto) あるいは *B. subtilis* var. natto などと標記されるが、枯草菌の亜種として認められているわけではない。とは言え、納豆を製造できる枯草菌に限られることは経験的に明らかであり、枯草菌の中に“納豆菌”と呼ぶことができるグループがある。筆者らは、納豆発酵菌の系統的な位置づけを明らかにするため、宮城野株のことはいったん忘れて、新たに稲わらから枯草菌をサンプリングし、分離した株で一つ一つ実際に納豆を作ってみた⁹⁾。まず、茨城県を中心に日本各地から集めた稲わらを分離源とし、寒天培地上で γ PGAを作る枯草菌を400株以上収集した。次いで、これらすべての株で納豆を作成し、分離株の煮豆上での生育と γ PGA生産力、納豆の固さ試験および官能評価を指標に納豆発酵適性を検討した⁹⁾。その結果、59株に納豆発酵適性があった。この59株は AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 解析で互いに区別できたので、系統樹を作製することができた⁹⁾。ちなみに、59株の中に宮城野株とまったく同じ AFLP パターンを示す株が一つ含まれていた。

ところで、宮城野株ゲノムは枯草菌実験室株 (Marburg 168株) にはない特有の配列を持つ¹⁾。宮城野株に顕著な特徴は、挿入配列 (insertion Sequence, IS) が多数存在すること、ビオチン合成オペロンが壊れているためビオチン要求性であること、 γ PGA生産に重要な役割を果たす *degQ* 遺伝子のプロモーターに高発現型の一塩基変異を持つことなどである。ISは挿入箇所での遺伝子破壊や発現量変化を引き起こしている可能性があり、納豆発酵との関連が考えられた。また、少なくとも2種の IS, *IS4BsuI* と *IS256BsuI* が保存的複製によってゲノム内転移する能力を持つこと¹⁰⁾、*IS4BsuI* が γ PGA合成に必要な *comP* 遺伝子へ転移しやすく、結果として γ PGA生産能を失わせて種菌の安定的生産上問題となること

知られていた¹¹⁾。

納豆発酵適性があった59株について、ISの有無、ビオチン要求性、ファージ感受性を検討した。その結果、59株すべてがビオチン要求性を示し、ビオチン合成オペロンは宮城野株と同様に破壊されていた⁹⁾。一方、ISについては持つ株、持たない株が約半々で、予想に反して納豆発酵とは直接関係ないことが示唆された⁹⁾。また、59株はすべて納豆菌ファージ Φ NIT1に感受性であったが、納豆発酵適性のなかった株や *Bacillus amyloliquefaciens* にも感受性株が見つかることから、 Φ NIT1感受性が納豆発酵株の指標にならないことも判明した。

ビオチン要求性が納豆発酵能と非常に強くリンクしていた。ビオチンは補酵素として働くだけでなく、転写因子に直接結合して細胞内代謝フラックスを変えることが知られている (biotin sensing)¹²⁾。これに関連する現象として、ビオチン欠乏が *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸高生産を誘発することが報告されている¹³⁾。ビオチン欠乏が納豆菌細胞内のグルタミン酸濃度を高め、それが γ PGAの高生産につながっているのかも知れない。

次に、納豆発酵適性株の枯草菌種内での分布を調べるため、MLST (Multi-Locus Sequence Type) 解析を行った⁹⁾。系統樹上、納豆発酵適性株は *B. subtilis* subsp. *subtilis* のある部分に集中して現れた。

以上の結果によって、納豆発酵株の分類上の位置づけを以前よりは明瞭にすることができたと考えている。取得した59株は、遺伝資源として新たな種菌の開発に活用することができる。現在、ISを持たない種菌や黄大豆以外の有色大豆 (紅大豆など) 用種菌の育種を試験中である。納豆発酵菌の特徴や実験室株との違いについての詳細は、拙著を参照されたい¹⁴⁾。

納豆は日本特有の食品であると思われがちだが、*B. subtilis* は日本以外のアジアの国々で大豆発酵食品の製造に関わっている。たとえば、韓国の清国醬、中国の豆豉、タイのトゥアナオ、ミャンマーのペポ、ネパールのキネマなどである。これら納豆とよく似た食材の食べ方

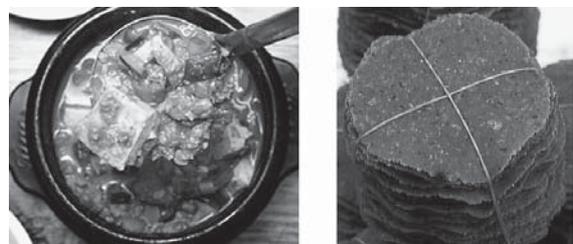


図3. 韓国の清国醬 (左) とタイのトゥアナオ (右)

は多様で、韓国では煮物（納豆汁）であり、タイでは成形乾燥品（納豆せんべい）として食されている（図3）。納豆菌とアジアの納豆様食品製造に關与する枯草菌との比較ゲノム研究が行われている¹⁵⁾。

γPGAの合成制御

γPGAの様々な用途での活用が提唱され¹⁶⁾、効率のよいγPGA生産法が望まれている。一方、納豆菌は常にγPGAを生産するわけではなく、γPGA生産は遺伝的制御と環境条件の影響を受ける。従って、γPGAの合成制御研究が重要となる。

γPGA合成は細胞密度応答機構（quorum sensing）の制御下にあり、細胞増殖が定常期に入ってから始まる^{17,18,19)}。γPGA合成開始シグナルは、ComXと呼ばれる菌体外低分子ペプチドによって細胞内へ伝えられる（図4）。細胞密度が高くなって自身が生産したComXの環境中濃度が閾値を超えると、ComXは細胞表層にあるComX受容体2成分制御系のComPに結合し、ComPを活性化して自己リン酸化を引き起こす。次いで、ComPは転写因子ComAへリン酸基を転移する。

このようにして細胞内へ伝達された細胞密度情報は、さらに様々な調節を受けてγPGA合成オペロンの発現誘導に至る。ComAで正の転写制御を受けるタンパク質の一つに、γPGA合成に必須なDegQがある。筆者らは最近、degQ遺伝子破壊によるγPGA欠損の抑制変異を同定し、DegQタンパク質が一連の情報伝達系の中で果たす役割について新規な知見を得た¹⁹⁾。解析結果の詳細は紙面の都合により割愛するが、アミノ酸46個の小さなタンパク質であるDegQがγPGA合成オペロンpgsBCA

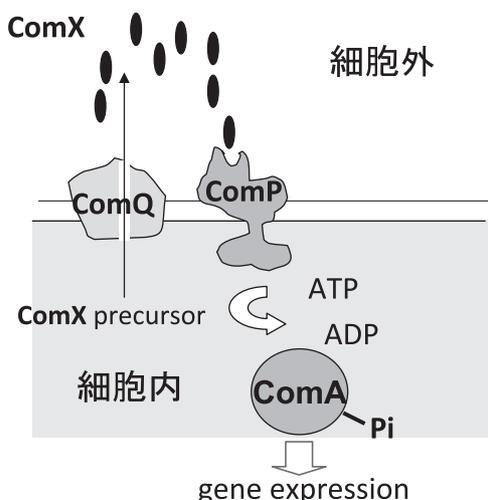


図4. 細胞密度応答制御開始機構の模式図

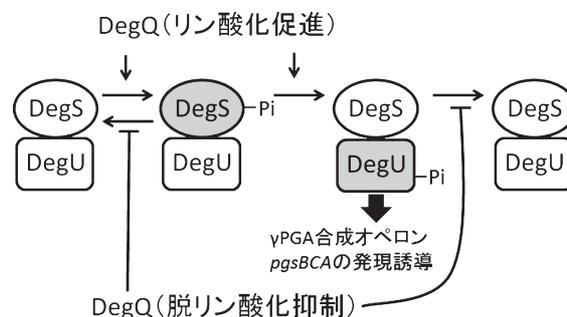


図5. 納豆菌のγPGA合成制御系。矢印は正の制御、垂線は負の制御を示す。©ASM, *Applied and Environmental Microbiology*, 文献19の図7を改変。

の直接の転写制御因子であるDegS-DegUリン酸リレー系の脱リン酸化を抑制するという大変興味深い結果が*in vitro*リン酸化実験から得られた¹⁹⁾（図5）。

γPGA生産は、細胞密度だけでなく栄養条件によっても影響される。例えば、宮城野株は同じ富栄養な培地であってもGSP培地では活発に生産する一方、LB培地ではまったく生産しないことが知られている¹⁷⁾。DegS-DegU2成分制御系が、栄養条件に応答する働きを持つのかも知れない。今後更に研究を深めれば、培地条件によらないγPGAの大量生産と生産コスト低減が可能になるだろう。

γPGAとPghPの生理的機能

ここまで、納豆菌が作るγPGAを人間側の都合で論じてきた。ここで、納豆菌の立場でこれを考えてみたい。納豆菌は、細胞密度が高くなった定常期にコロニーを覆い尽くすようにγPGAを作る。保水性を持つγPGAはコロニーの水源として働く他、貯蔵栄養（後述）、ファージ感染への防御壁としての機能を有する（γPGAがある場合、ファージは細胞表面に容易には到達することができない^{2,20)}）。γPGAは納豆菌の集団安全保障策と言えるかも知れない。ファージのPghPは、γPGAの感染防御機能と競合し、共進化した結果獲得されたのであろう。まず、ファージはγPGA合成が始まっていない若い細胞集団に感染し、宿主のタンパク質合成系を使って大量にPghP生産する。そして、生産されたPghPが周囲に存在する防御壁（γPGA）を破壊して娘ファージの感染を可能にするのである。関連する事例として、大腸菌ファージがファージ粒子自体に莢膜分解酵素を持つことが知られている。納豆菌ファージの場合、ファージ粒子自体にPghPを装備するよりも、納豆菌γPGA合成システムの“弱点”を捉えた間接的な戦略が効果的なのであろう。

話は変わるが、納豆を室温で保管する間に粘りがなくなつた経験をもつ読者がいるかも知れない。納豆菌は合成した γ PGAを自分で分解することができる²⁰。試験管培養で観察すると、自己分解は1週間程度かけて非常にゆっくり進行する。この遅い分解は、 γ PGAをグルタミン酸に戻して栄養源として再利用するために行われ、それに関与する因子が同定された^{20,21,22}。 γ PGAに含まれるD-グルタミン酸を栄養として使うためには、グルタミン酸ラセマーゼ (Glr) やD-アミノ酸オキシダーゼなどの代謝酵素が必要である。通常、Glrはペプチドグリカン構成要素であるD-グルタミン酸を作るためのアナポリック酵素であり、 γ PGAに含まれるD-グルタミン酸もGlrによって供給されたとする報告もある^{23,24}。納豆菌は他の微生物に比べて高いGlr活性を有し²⁵、しかも、納豆菌のGlrはカタボリック酵素であるかのような発現調節を受け、細胞分裂が盛んな富栄養な条件よりもむしろ定常期後期のような貧栄養な条件で強く発現する²¹。筆者は、納豆菌Glrのこの風変わりな発現制御は、Glrが γ PGA由来のD体グルタミン酸をL体に変換するためだと考えている。グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子破壊株を使った実験結果もこの仮説と矛盾しなかった²¹。

さて、人間の話に戻ろう。人間は、納豆菌がせっせと作った“保存食” γ PGAを知ってか知らずか横取りして、これを食べていることになる。食べ残して廃棄するのは誠にもったいないことだ。

本稿で紹介した研究は、茨城県工業技術センターの皆様、東北大学大学院農学研究科 微生物機能開発科学講座の皆様、農業生物資源研究所生体分子研究ユニットの皆様、農研機構・食品総合研究所発酵細菌ユニットに在籍した皆様のご協力を得て遂行することができました。心より感謝申し上げます。納豆菌胞子の電子顕微鏡像は、国際農林業研究センターの八田博士に撮影いただきました。

文 献

- 1) Nishito, Y. *et al.*: *BMC Genomics*, **11**, 243 (2010).
- 2) Kimura, K. and Itoh, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2491 (2003).
- 3) Fujimoto, Z. and Kimura, K.: *Proteins*, **80**, 722 (2012).
- 4) Ashiuchi, M. and Misono, H.: *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 9 (2002).
- 5) Candela, T. and Fouet, A.: *Mol. Microbiol.*, **60**, 1091 (2006).
- 6) 尾崎達郎ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, 3C28a15 (2011).
- 7) Scorpio, A. *et al.*: *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **51**, 215 (2007).
- 8) 堀田国元, 佐々木博：化学と生物, **49**, 57 (2011).
- 9) Kubo, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6463 (2011).
- 10) Kimura, K. and Itoh, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2458 (2007).
- 11) Nagai, T. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **182**, 2387 (2000).
- 12) Beckett, D.: *J. Nutr.*, **139**, 167 (2009).
- 13) Kimura, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 545 (2002).
- 14) 木村啓太郎, 久保雄司：醸協, **11**, 756 (2011).
- 15) 三宅正透ら：日本ゲノム微生物学会年会講演要旨集, p.67 (2012).
- 16) Hamano, Y. ed.: *Amino-acid Homopolymer Occurring in Nature*, Microbiology Monograph, Springer, Heiderberg (2010).
- 17) Tran, L. S. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **37**, 1159 (2000).
- 18) Kimura, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1149 (2009).
- 19) Do, T. H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 8249 (2011).
- 20) Kimura, K. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 4115 (2004).
- 21) Kimura, K. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 2911 (2004).
- 22) 伊藤義文, 木村啓太郎：化学と生物, **44**, 502 (2006).
- 23) Kada, S. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**, 13 (2004).
- 24) Jiang, F. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1837 (2011).
- 25) Ashiuchi, M. *et al.*: *J. Biochem.*, **123**, 1156 (1998).