



第4回 納豆菌

永井利郎

独立行政法人農業生物資源研究所 (NIAS) ジーンバンク (MAFF) 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

Natto bacilli

Toshirou Nagai

Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

1. はじめに

発酵食品に関わる微生物には、乳酸菌（ヨーグルト）をはじめ、酢酸菌（酢）、酵母（味噌・醤油・パン・酒）、麹菌（味噌・醤油・酒）などがある。そのような発酵微生物の一つである、納豆菌について解説していきたい。

納豆菌はいうまでもなく納豆を作る細菌で、グラム陽性の有孢子桿菌である。かつては長時間煮た大豆を稲わらで包み、稲わらに付着している納豆菌を利用して納豆を作っていた。現在では、蒸煮した大豆に納豆菌孢子の懸濁液をスプレーして、容器に充填した後に発酵させる方法が採られている（図1, 2）。味噌や醤油といった発酵食品に比べると、非常にシンプルな発酵工程であり、そのため小規模の生産が可能である。大手企業による寡占化が進んでいるとはいえ、地域に根付いた納豆屋はかなり多い。最近の健康志向ブームに乗り、納豆の消費量は年々増加傾向にあり、平成16（2004）年では納豆生産量25万トン、総販売額1100億円（平成18年農林水産省総合食糧局）にもなる。

味噌・醤油とは異なり納豆のように食塩を添加しない大豆発酵食品を無塩大豆発酵食品と呼んでいるが、このような発酵食品は日本だけではなく、東南アジアを中心とする広い地域に見られる。例えば、キネマ（ネパール）、トゥアナオ（タイ）などが挙げられる。また、アジア以外では、アフリカにもローカストビーンを発酵させたダワダワという発酵食品が存在し、それから納豆菌の1種が分離されている（原，1990）。最近では、ダワダワも大豆を発酵して作られてきていると

いう。キネマ、トゥアナオというのは生産過程や発酵微生物の観点から納豆の仲間といえるが、外見は似ても似つかない黒褐色のペーストもしくは乾燥品である（図3）。従って、食べ方も日本の納豆とは異なり、味噌のような調味料としてスープなどに使われる。「発酵途中の大豆は納豆のように糸を引き、良く糸を引くものが良いキネマとなる」と、シッキムの食品微生物学研究者である Tamang 氏は語っていた。納豆も冷蔵庫に長期間放っておくと、次第に褐変が進み、色が黒くなっていくので、お互いに外見は違えども似たような食品であることが分かる。

なお、その他に無塩大豆発酵食品としてよく採り上げられるのがインドネシアのテンペであるが、このテ

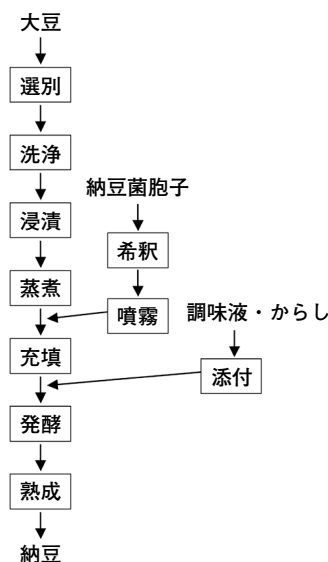
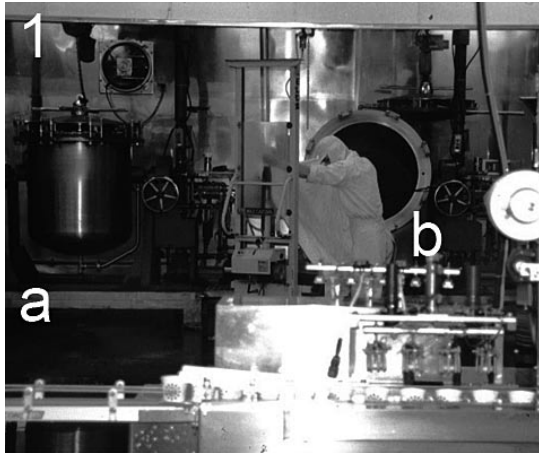


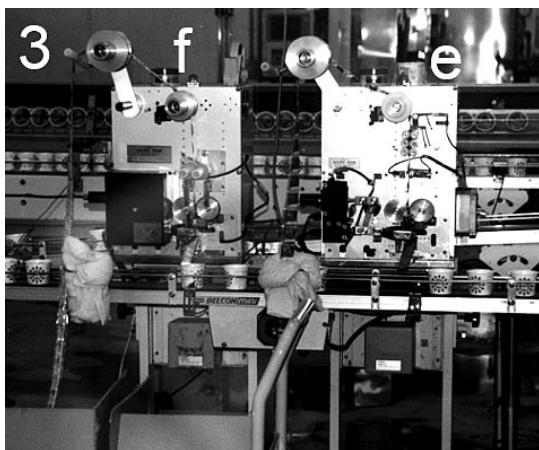
図1 納豆の製造工程



蒸煮. 圧力釜 (a) で大豆を蒸煮し, 釜を倒して大豆を回収する (b).



充填. 右から容器が流れて, 納豆菌が接種された大豆が充填される (c). 大豆にはシート (d) がかぶせられる.



調味液・からし添付. 更に調味液 (e) とカラシ (f) がカップに添えられる. そのまま, 発酵室に入れられ発酵工程に移る.

図2 納豆工場

やさと農業協同組合 (茨城県石岡市) にて



図3 トウアナオ

1996年, タイ・バンコックで開かれた国際大豆加工利用会議の展示会場にて入手. 真空パック, 5枚入り.

ンペは糸状菌である *Rizopus oligosporus* により発酵される (Kuswanto, 2004; 堀井, 2008). 納豆は納豆でも, 塩辛納豆 (浜納豆・大徳寺納豆) と呼ばれる食品が関西・東海地方に見られるが, それは主に麹菌・酵母・乳酸菌により発酵され, 更に食塩を添加した大豆発酵食品である (伊藤, 2008). これらは本総説の範疇外なので詳細はそれぞれの文献を参照して頂きたい.

2. 納豆菌とは

沢村博士が納豆から *Bacillus* 属細菌を分離し, それを新種として *Bacillus natto* という学名で発表した (Sawamura, 1906). この研究から納豆製造の近代化が始まった. しかしながら *B. natto* は, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, eighth edition (Gibson & Gordon, 1974) で *B. subtilis* (枯草菌) と “identical” であると明記され, *B. subtilis* に統合された. *B. natto* と *B. subtilis* の染色体 DNA 間に約 70% の相同性が示され (Seki & Oshima, 1975), また *B. natto* の染色体 DNA で *B. subtilis* を形質転換できる (Marmur *et al.*, 1963) ことから, そのことが支持される.

しかしながら一般には納豆菌という名称 (俗称) が使われており, そこには分類学とは別の次元で, 産業的に納豆を作る微生物という意味が込められている. また, 納豆菌であることを明示するために学術論文では *B. subtilis (natto)* のように表記されることがある (例えば, 文献に挙げた Koehler & Thorne, 1987).

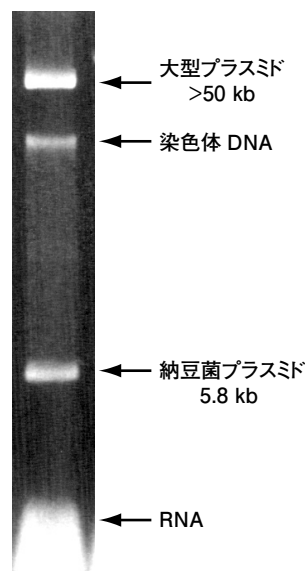


図4 典型的な納豆菌のプラスミド

納豆菌と枯草菌は分類学上同じ種になっているが、詳細に比較するといくつかの異なる点（分類学的に重要ではないが）が見付かる。以下では、全ゲノム配列が明らかとなっている枯草菌 168 株 (Kunst *et al.*, 1997) と納豆種菌（市販の納豆に利用されている典型的な菌株）（木内ら, 1987）の比較を DNA 因子に焦点をあてて話を進めたい。

3. プラスミド

まず、168 株はプラスミドを有していないが納豆菌はプラスミドを有している点が挙げられる。納豆菌は 5.8 kb のプラスミドと、50 kb を超えるサイズの大きなプラスミドの 2 種類を保有している（図4）。納豆菌のプラスミドは既に Tanaka & Koshikawa (1977) により報告されているが、納豆の糸（ポリグルタミン酸）の生合成遺伝子が 5.8 kb のプラスミド上に存在するという報告がなされて以来、「納豆菌プラスミド」として有名になった (Hara *et al.*, 1981; 1982)。この納豆菌プラスミドと相同性のある部位を持つプラスミドが東南アジアの大豆発酵食品から分離される *B. subtilis* からも分離されており（原, 1990）、進化や伝搬の観点から興味を持たれている。なお、ポリグルタミン酸合成遺伝子は納豆菌プラスミド上にコードされていると報告されていたが、納豆菌プラスミドを除去してもポリグルタミン酸生産性は変わらないことから現在では否定されている (Nagai *et al.*, 1997)。そして合成遺伝子そのものも高知大学のグループが染色体

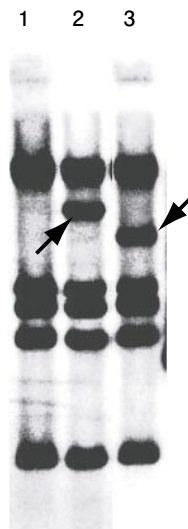


図5 納豆菌の挿入配列

1: 親株の染色体 DNA を *IS4BsuI* をプローブとしてサザンプロットングして得られたバンドパターン。2, 3: 変異株についてのパターン。矢印は新たに挿入された *IS4BsuI* を示す。

DNA からのクローニングに成功している (Ashiuchi *et al.*, 1999)。なお納豆菌プラスミドの機能は明らかにされていないが、そこにコードされている遺伝子はグラム陽性細菌の伝達性プラスミドの *mob/pre* 遺伝子と相同性が高い (LeBlanc *et al.*, 1993)。

50 kb を超えるプラスミドについては、Koehler & Thorne (1987) の研究により、プラスミドの種間転移に関わることが明らかとなっている。この大型のプラスミドを除去しても、ポリグルタミン酸の生産性には影響がない (Nagai *et al.*, 1997)。

4. 挿入配列

納豆菌はゲノム上に挿入配列 (IS) を持っているが、Marburg 株はゲノム配列から見て 200 bp ほどの IS の残渣らしき配列はあるものの (Kasahara *et al.*, 1997)、IS は保有していない。

納豆菌は保存中にポリグルタミン酸非生産性変異 (PGA⁻) 株が高い頻度で生じることが知られている。そこで筆者は変異が生じるメカニズムの解明を目指し、まずはポリグルタミン酸合成遺伝子のクローニングを試みた。最終的には合成遺伝子そのものではなく、その制御遺伝子をクローン化することに成功した (Nagai *et al.*, 2000)。その遺伝子をプローブとして、PGA⁻ 株の染色体 DNA と親株の染色体 DNA を制限酵素で切断した後にサザン解析を行った。その結果、

PGA⁻株のポジティブのバンドの大きさが親株のそれよりも1.4 kbほど大きくなっていることを見いだした。その断片の塩基配列を調べた結果、制御遺伝子内にISが挿入されていることを確認した。*B. subtilis*では初めて報告されたISで、IS4ファミリーのトランスポザゼをコードしていることからIS4*BsuI*と命名した。

IS4*BsuI*は、納豆菌の染色体上に複数個のコピーがある(図5)。複製を作りながら転移するタイプのISで、例えば、納豆菌のコロニー形状の自然突然変異体の染色体DNAをサザン解析すると、新たに別のサイトに複製されたIS4*BsuI*を確認することができた(図5レーン2, 3)。東南アジアの納豆様発酵大豆より分離した菌株のIS4*BsuI*を調べたところ、やはりIS4*BsuI*が存在しており、中には1コピーしか存在しない菌株もあった(Inatsu *et al.*, 2002)。

最近、納豆菌には更にもう一つのIS、IS256*BsuI*が存在することが確認された(Kimura & Itoh, 2007)。

謝 辞

納豆工場の撮影と写真の使用を快諾して頂いたやさと農業協同組合(茨城県石岡市)に感謝致します。

文 献

Ashiuchi, M., Soda, K. & Misono, H. (1999). A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 6-12.

Gibson, T. & Gordon, R.E. (1974). Genus I. *Bacillus*. In Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth edition, p. 529-550, Williams & Wilkins, Baltimore.

Hara, T., Aumayr, A. & Ueda, S. (1981). Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus natto*: Evidence for plasmid-linked PGA production. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **27**: 299-305.

Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y. & Ueda, S. (1982). Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis (natto)* with acridine orange. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1456-1458.

原 敏夫(1990). 納豆のルーツを求めて. *化学と生物* **28**: 676-681.

堀井正治 (2008). テンペ, 木内 幹, 永井利郎, 木村啓太郎 (編), 納豆の科学: 最新情報による総合的考察, p. 234-237, 建帛社, 東京.

Inatsu, Y., Kimura, K. & Itoh, Y. (2002). Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia: Comparison with *B. subtilis (natto)* starter strains. *Jpn. Agric. Res. Q.* **36**: 169-175.

伊藤 寛 (2008). 寺納豆・塩辛納豆 (浜納豆・大徳寺納豆), 木内 幹, 永井利郎, 木村啓太郎 (編), 納豆の科学: 最新情報による総合的考察, p. 237-238, 建帛社, 東京.

Kasahara, Y., Nakai, S. & Ogasawara, N. (1997). Sequence analysis of the 36-kb region between *gntZ* and *trnY* genes of *Bacillus subtilis* genome. *DNA Res.* **4**: 155-159.

Kimura, K. & Itoh, Y. (2007). Determination and characterization of IS4*BsuI*-insertion loci and identification of a new insertion sequence element of the IS256 family in a natto starter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2458-2464.

木内 幹, 田谷直俊, ジョコ スリスチヨ, 舟根和美 (1987). 市販納豆菌の分離と同定. *食品総合研究所研究報告* **50**: 18-21.

Koehler, T.M. & Thorne, C.B. (1987). *Bacillus subtilis (natto)* plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **169**: 5271-5278.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V. *et al.* (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kuswanto, K.R. (2004). Industrialization of tempe fermentation, In Steinkraus, K.H. (ed.), *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*, p. 587-635, Marcel Dekker, NY.

LeBlanc, D.J., Chen, Y.-Y.M. & Lee, L.N. (1993). Identification and characterization of a mobilization gene in the streptococcal plasmid, pVA380-1. *Plasmid* **30**: 296-302.

Marmur, J., Seaman, E. & Levine, J. (1963). Interspecific transformation in *Bacillus*. *J. Bacteriol.* **85**: 461-467.

Nagai, T., Koguchi, K., & 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.
- Nagai, T., Tran, L-S., Inatsu, Y. & Itoh, Y. (2000). A new IS4 family insertion sequence, IS4*BsuI*, responsible for genetic instability of poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**: 2387-2392.
- Sawamura, S. (1906). On the micro-organisms of natto. *Bull. Coll. Agric., Tokyo Imp. Univ.* **7**: 107-110.
- Seki, T. & Oshima, Y. (1975). Taxonomic study of *Bacillus* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization and interspecific transformation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**: 258-270
- Tanaka, T. & Koshikawa, T. (1977). Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto). *J. Bacteriol.* **131**: 699-701.
- (担当編集委員：青木孝之)