

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-57388

(P2010-57388A)

(43) 公開日 平成22年3月18日(2010.3.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 O
A 2 3 L 1/20 (2006.01)	A 2 3 L 1/20 1 O 9 Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B O 6 5
C 1 2 R 1/125 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	
	C 1 2 R 1:125	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)		

(21) 出願番号	特願2008-223990 (P2008-223990)	(71) 出願人	398065531
(22) 出願日	平成20年9月1日(2008.9.1)		株式会社ミツカングループ本社
			愛知県半田市の中村町2丁目6番地
		(74) 代理人	100097825
			弁理士 松本 久紀
		(74) 代理人	100137925
			弁理士 松本 紀一郎
		(74) 代理人	100158698
			弁理士 水野 基樹
		(72) 発明者	吉川 博文
			東京都世田谷区桜丘1-1-1 学校法人
			東京農業大学内
		(72) 発明者	高橋 究
			東京都世田谷区桜丘1-1-1 学校法人
			東京農業大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 転移因子の転移が抑制された納豆菌、該納豆菌を用いて製造された納豆

(57) 【要約】

【課題】 転移因子の転移が抑制されていることにより、植え継ぎを繰り返した場合でも、 γ -PGA生産性などの納豆製造に重要な性質が安定に保持された納豆菌を育種、開発し、該納豆菌を用いて製造された品質の良い納豆を安定して提供する。

【解決手段】 *recA* 遺伝子を欠損させて、*comP* 遺伝子への転移因子の転移を抑制することにより、植え継ぎを繰り返した場合でも γ -PGA非生産性株の出現頻度が低い納豆菌を得る。また、該納豆菌を用いて納豆を製造する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

rec A 遺伝子を欠損させることにより、転移因子の転移が抑制されたことを特徴とする納豆菌。

【請求項 2】

com P 遺伝子への転移因子の転移が抑制されたことを特徴とする請求項 1 に記載の納豆菌。

【請求項 3】

12 世代培養後も γ -PGA 非生産株が出現しないことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の納豆菌。

【請求項 4】

バシラス・サチリス REC 7 (Bacillus subtilis REC 7) 株 (FERM ABP-10994) であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の納豆菌。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の納豆菌を用いて製造されたことを特徴とする納豆。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、転移因子の転移が抑制された納豆菌及び該納豆菌を用いて製造された納豆に関する。さらに詳細には、rec A 遺伝子を欠損させることにより、転移因子の転移が抑制された納豆菌、com P 遺伝子への転移因子の転移が抑制された納豆菌、及び、ポリグルタミン酸の非生産性株の出現が抑制された納豆菌、及び該納豆菌を用いて製造された納豆に関する。

【背景技術】

【0002】

納豆を製造する際に使用される納豆菌はバシラス・サチリス (Bacillus subtilis) に分類されるグラム陽性の細菌であるが、同じバシラス・サチリスに分類されている枯草菌とは異なる性質を持つことが知られている。

【0003】

例えば、納豆菌は納豆の大きな特徴である系引物質（粘物質）をつくり出すことができ、また生育にビオチンを要求するなどの実験室で正在されている枯草菌、特に 168 株とは異なる特徴を有しており、また最近では、枯草菌 168 株は転移因子を持たないのに対して、納豆菌は少なくとも 2 種以上の転移因子をその染色体上に保持していることが知られてきた（例えば、非特許文献 1 及び 2 参照）。

【0004】

転移因子としては、トランスポゾン（以下、Tn と称する場合もある）や挿入配列（以下、IS と称する場合もある）などが一般に知られている。

このうち IS は比較的単純な遺伝子構造であり、IS 自身を染色体の別の位置に転移させる酵素（トランスポザーゼ）をコードするトランスポザーゼ遺伝子と、それが逆方向反復塩基配列によって挟まれた構造を有しており、染色体上の別の位置に転移して、転移先に元々存在していた遺伝子を破壊したりする特性を持っている。

【0005】

従来から納豆菌は自然に変異しやすい性質を有しているとされており、普通に培養しているだけで納豆菌の性質が大きく変化する場合があるが、このような自然変異に関して納豆菌の転移因子が関与している場合のあることが知られてきた。

【0006】

例えば、納豆菌 IS の 1 種である IS 4 Bsu1 は、納豆の大きな特徴である系引物質の主成分であるポリグルタミン酸（以下、 γ -PGA と称する場合もある）の合成に関わ

10

20

30

40

50

る遺伝子群の一つ (comP 遺伝子) に高頻度で転移し、comP 遺伝子を破壊してしまう結果、γ-PGA の合成が停止して系引物質を生産できない納豆菌が出現することが知られている (例えば、非特許文献 1 参照)。

【0007】

また、転移因子 IS4Bsu1 とは別に、comP 遺伝子中に転移して γ-PGA の合成を停止させる転移因子 IS256Bsu1 も同定されており (例えば、非特許文献 2 参照)、これらの IS は染色体上に複数、そして散在していることが知られている。

【0008】

このように、納豆菌中に存在する IS が染色体上を転移することにより、納豆菌の性質が大きく変化し、例えば、納豆菌を特徴付ける重要な性質である系引物質を生産できない納豆菌が出現したりする結果、種菌を調製する際や納豆の発酵工程において重大な支障が生じる場合があった。

【0009】

そこで、納豆菌から IS を除去する方法や、納豆菌中での IS の転移を抑制する方法などの開発が求められていたが、未だ有効な方法は全く開発されていなかった。

【非特許文献 1】ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.)、182 巻、p. 2387 - 2392、2000 年

【非特許文献 2】バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotechnol. Biochem.)、71 巻、p. 2458 - 2464、2007 年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、転移因子の転移が抑制されていることにより、植え継ぎを繰り返した場合でも、γ-PGA 生産性などの納豆製造に重要な性質が安定に保持された納豆菌を育種、開発し、該納豆菌を用いて製造された品質の良い納豆を安定して提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、納豆菌の転移因子の転移機構について鋭意検討を重ねた結果、納豆菌の組換え酵素 (以下、RecA と称する場合も有る) が、転移因子の転移を促進していることを見出した。

【0012】

そこで、納豆菌の RecA をコードする遺伝子 (以下、recA 遺伝子と称する場合もある) を欠損させた結果、植え継ぎを繰り返した場合でも、転移因子の転移が抑制されることを見出した。

【0013】

さらに、このような recA 遺伝子を欠損させた納豆菌においては、通常の納豆菌では comP 遺伝子中に高頻度で転移する従来既知の 2 種類の転移因子 (IS4Bsu1、IS256Bsu1) 転移因子が転移しなくなることを確認し、その結果、γ-PGA の生産性が安定して維持できることも確認して目的の納豆菌を開発しうることを見出して本発明を完成した。

【0014】

すなわち、本発明は以下の納豆菌及び納豆に関する。

(1) recA 遺伝子を欠損させることにより、転移因子の転移が抑制されたことを特徴とする納豆菌。

(2) comP 遺伝子への転移因子の転移が抑制されたことを特徴とする (1) に記載の納豆菌。

(3) 12 世代培養後も γ-PGA 非生産株が出現しないことを特徴とする (1) 又は (2) に記載の納豆菌。

10

20

30

40

50

(4) バシラス・サチリス *Bacillus subtilis* REC7 株 (FERM ABP-10994) であることを特徴とする(1)~(3)のいずれか1つに記載の納豆菌。

(5) (1)~(4)のいずれか1つに記載の納豆菌を用いて製造されたことを特徴とする納豆。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、*recA* 遺伝子を欠損させて挿入因子の転移を抑制することにより、*y-PGA* 非生産性株の出現頻度が低下した納豆菌を育種開発することが可能となり、該納豆菌を用いて納豆を製造することにより、品質の良い納豆を安定して製造することが可能となる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

本発明で育種改良に用いる元の納豆菌には特に制限はないが、納豆工業で使用されている発酵能力に優れた納豆菌、自然界から分離取得された納豆菌や、さらに改良を重ねた優れた納豆菌を用いるのが望ましい。

【0018】

納豆菌は、枯草菌が属するバシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) に分類されているが、系引物質 (粘質物) などの納豆としての特徴をつくり出すことができ、納豆発酵での主体をなす細菌であって、また生育にビオチンを要求するとされるなどの特性を有していることなどから、バシラス・ナットウ (*Bacillus natto*) として分類されたり、枯草菌の変種として *Bacillus subtilis* var. *natto* あるいは *Bacillus subtilis* (*natto*) などと、枯草菌と区別して分類する場合もある。

20

【0019】

本発明で用いる納豆菌としては、*Bacillus natto* IFO3009株、*Bacillus subtilis* IFO3335株、同IFO3336株、同IFO3936株、同IFO13169株などがあるほか、各種の納豆菌が広く使用できる。

30

【0020】

具体的には、市販納豆から分離したO-2株や、該株の形質転換効率を向上させた変異株であるr22株 (例えば、特開2000-224982号公報参照) が挙げられ、また市販の納豆用種菌である高橋菌 (T₃株、東京農業大学菌株保存室) や宮城野菌 (宮城野納豆製作所) など各種の納豆菌が適宜使用可能である。

【0021】

本発明では、納豆菌 *recA* 遺伝子の機能を欠損させた株を取得するものである。

【0022】

育種の方法のひとつとしては、*recA* 遺伝子を遺伝子組換え法により欠損させ、その機能を欠損させる方法がある。

40

例えば、pUC19などの多コピー数プラスミドベクターに対して当該 *recA* 遺伝子中に薬剤耐性遺伝子を挿入した遺伝子破壊用プラスミドを作製し、該プラスミドを適当な制限酵素により直線化した後、既存のコンピテンス形質転換法 (例えば、フェムス・マイクロバイオリジカル・レター (FEMS Microbiol. Lett.))、236巻、p.13-20、2004年参照) を利用して納豆菌に導入して相同組換えを行わせ、当該 *recA* 遺伝子を欠損させる方法が採用される。

【0023】

さらに、本発明においては、*recA* 遺伝子の上流域にあるプロモーター領域を遺伝子組換え法や突然変異法などにより変異させて、*recA* 遺伝子の発現を欠損させる方法も有効である。

50

【 0 0 2 4 】

また、既に *recA* 遺伝子が欠損している納豆菌を自然界から選抜するいわゆるスクリーニング法や、変異剤や紫外線、放射線などの人工的な手段により、*recA* 遺伝子を欠損させる突然変異法などの、従来から実施されているような方法によっても育種が可能である。

【 0 0 2 5 】

なお、人工的な突然変異には物理的方法と化学的方法が用いられる。物理的方法としては、紫外線照射、放射線照射などがあり、化学的方法としては、例えばエチルメタンスルホン酸 (EMS) や N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (NTG) などの変異剤の溶液に菌体を懸濁させる方法などがあり、これらの方法を単独または組み合わせて適宜実施することができる。このような化学的方法で *recA* 遺伝子を欠損させる場合は、*recA* 遺伝子の内部に点突然変異が導入されることにより *recA* 遺伝子の機能が欠損した株を選択すればよい。

10

【 0 0 2 6 】

例えば、一晚 37℃ で培養した納豆菌を、遠心分離して集菌し、滅菌生理食塩水で洗浄して洗浄菌体を得る。この約 10^7 cfu/ml の濃度の洗浄菌体に、160 mg/l となるように N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (NTG) を添加し、60 分間振とうして、変異処理を行う。なお、この時の生存率は約 1 % 程度である。

【 0 0 2 7 】

変異処理した菌体を培養して形質を発現させ、その後に滅菌生理食塩水で洗浄して、平板培地に塗抹し、37℃ で 1 ~ 2 日間培養してコロニーを形成させる。

20

【 0 0 2 8 】

recA 遺伝子の機能を欠損すると DNA 複製阻害剤であるナリジキシン酸やマイトマイシン C に感受性を示すことから、例えばナリジキシン酸またはマイトマイシン C を含む培地と含まない培地に変異処理したコロニーを植菌し、ナリジキシン酸またはマイトマイシン C に感受性を示すコロニーを選択することによって、*recA* 遺伝子が欠損した納豆菌を取得可能である。また、*recA* 遺伝子を欠損すると運動性も喪失するので、0.7 % 寒天を含む軟寒天培地に植菌した場合において、形成されるコロニーが小さく運動性が阻害されたと見られる納豆菌を選択することによっても、*recA* 遺伝子の機能が欠損した納豆菌を取得可能である。

30

【 0 0 2 9 】

このようにして *recA* 遺伝子の機能が欠損した納豆菌を取得することにより、転移因子の転移が抑制された納豆菌が開発できるが、開発された転移因子の転移が抑制された納豆菌と従来から利用されている通常の納豆菌の植え継ぎを繰り返した後、それぞれの納豆菌を用いて製造した納豆の系引性を比較すると、転移因子の転移が抑制された納豆菌を用いて製造した納豆では十分な系引きが確認され、植え継ぎによる系引きの低下がほとんどないことが確認される。

【 0 0 3 0 】

本発明は、このような目的を達成するためになされたものであり、*recA* 遺伝子を欠損させることにより、転移因子の転移が抑制され、特に *comp* 遺伝子への転移因子の転移が抑制された納豆菌が取得でき、その結果、12 世代植え継いでも γ - PGA 非生産性株の出現頻度が 0 % である新規納豆菌を開発することができたのであって、そのうちの 1 株をバシラス・サチリス REC7 (*Bacillus subtilis* REC7) 株と命名した。

40

【 0 0 3 1 】

バシラス・サチリス REC7 (*Bacillus subtilis* REC7) 株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305 - 8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に、2008 年 (平成 20 年) 8 月 12 日付けで受領されており、その受領番号は FERM A BP - 10994 である。

【 0 0 3 2 】

50

なお、本発明における世代と γ -PGA 非生産性株の出現頻度とは、以下の方法によって測定したものであると定義できる。

【0033】

すなわち、納豆菌を LB 培地に濁度が 0.05 となるように接種し、37 で 12 時間振とう培養し、これを第 1 世代とする。そして、第 1 世代で培養された納豆菌を再び LB 培地に濁度が 0.05 となるように接種し、同様に 12 時間培養する。これを第 2 世代とする。

【0034】

さらに、同様に 12 世代まで植継ぎを継代して、各世代の納豆菌の培養液を適当な希釈倍率にて希釈後、 γ -PGA 生産培地である GSP 寒天培地に塗抹培養し、全コロニーに占める γ -PGA 非生産性コロニーの割合 (%) を γ -PGA 非生産性株出現頻度とする。なお、 γ -PGA 非生産性株は、上記の GSP 寒天培地で培養すると、 γ -PGA が生産されたことによる盛り上がった納豆菌特有のコロニーを形成せず、扁平で乾いたコロニーを形成することを指標にして、目視により区別した。

10

【0035】

このようにして開発された納豆菌を用いた納豆の製造方法は、従来から実施されている方法を採用すれば良く、何ら制限がない。

【0036】

納豆は丸大豆を原料として製造されたいわゆる丸大豆納豆が一般的であるが、一部には予め挽割った大豆を原料とする挽割り納豆もある。

20

【0037】

丸大豆納豆の製造方法は、一般に原料である丸大豆を冷水に十数時間浸漬した後、蒸煮釜で加圧蒸気を用いて加圧蒸煮 ($1.5 \sim 2.0 \text{ Kg/cm}^2$ 、 $128 \sim 133$) して得られた蒸煮大豆に対して、高温状態 ($70 \sim 100$) で納豆菌を接種し混合した後、所定の容器に充填してから発酵室に搬入して比較的高温度 ($40 \sim 55$ 程度) で所定時間 ($12 \sim 48$ 時間程度) 発酵させた後、5 前後で冷蔵熟成 ($12 \sim 72$ 時間程度) して完成させるのが一般的である。

【0038】

また、挽割り納豆の場合は、予め挽割った大豆を水に浸漬する以外は、通常の丸大豆納豆の場合と同様の方法で製造される。

30

【0039】

このような従来の納豆の製造方法において、本発明では発酵工程で用いる納豆菌を、前記方法によって育種改良した *recA* 遺伝子を欠損させた納豆菌に代えて使用することによって製造される。

【0040】

このようにして、*recA* 遺伝子を欠損させて転移因子の転移頻度を抑制した納豆菌を用いて納豆を製造すると、 γ -PGA の生産量が多く、系引き性が高い高品質の納豆を安定して製造することが可能となる。

【実施例】

【0041】

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

40

【0042】

(実施例 1: *recA* 欠損株の調製)

(1) 使用菌株等

使用した納豆菌 r22 株は、市販納豆から分離された親株 O-2 株の形質転換能を高めた変異株であり、親株 O-2 株をニトロソグアニジン (NTG) を用いて化学変異処理することにより取得された株である (例えば、特開 2000-224982 号公報参照)。

【0043】

培地は、納豆試験法 (例えば、「納豆試験法」、光琳出版、p. 85-97、1990 年参照) に記載の肉汁培地 (1% ポリペプトン、0.5% NaCl、0.3% 肉工

50

キス)、LB培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム)、孢子形成培地(0.068% KH_2PO_4 、0.0535% NH_4Cl 、0.0106% Na_2SO_4 、0.00006% $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.00126% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.934% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.238% グルタミン酸ナトリウム一水和物、0.025% CaCl_2 、0.152% 酵母エキス、1mg/ml ビオチン)、Spizizenらの形質転換培地(0.5% グルコース、5mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% 酵母エキス、0.6% KH_2PO_4 、1.4% K_2HPO_4 、0.1% クエン酸ナトリウム二水和物、0.2% 硫安、0.1μg/ml ビオチン)、GSP寒天培地(1.5% グルコース、1.5% グルタミン酸ナトリウム、1.5% フィトンペプトン、2.0% 寒天)を用いた。ただし、

10

【0044】

なお、スペクチノマイシン耐性遺伝子(GenBank ACCNo. X02588)はトランスポゾンTn554から、PCRにより増幅して用いた。PCRは、マニュアルに従い、サーマルサイクラーを用いて実施した。

【0045】

(2) recA欠損株の作製

以下に記載のごとく、まずrecA遺伝子を欠損させるために必要なDNA断片(recA欠損用断片)を、PCRを組み合わせた方法(例えば、ヌクレック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Research)30巻、p.1-5、2002年参照)で構築し、納豆菌にコンピテンス法により導入して、相同組換えを起こさせることによってrecA欠損株を作製した。

20

【0046】

i) recA遺伝子欠損用DNA断片の調製

染色体上のrecA遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子と置換してrecA遺伝子を欠損させるために、recA遺伝子欠損用DNA断片を、図1に示すごとく、PCRを組み合わせた以下の方法により作製した。

まず、置換に用いたスペクチノマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片は、以下のように調製した。すなわち、GenBankに登録されているスペクチノマイシン耐性遺伝子の塩基配列(GenBank登録番号X02588)を基に、プライマー1(5'-GTATATAAAGAATAATTATAATC-3'、図4及び配列表の配列番号1参照)及びプライマー2(5'-TAAATTAAAGTAATAAAGCGTTCTC-3'、図5及び配列表の配列番号2参照)の2種のオリゴDNAを調製した。

30

【0047】

これらのプライマー1及びプライマー2を用い、トランスポゾンTn554を鋳型にしてPCRを行い、スペクチノマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片(1077塩基)を増幅した。

【0048】

続いて、recA遺伝子の上流域を増幅するために、GenBankに登録されているBacillus subtilis subsp. subtilis str. 168株の塩基配列(登録番号NC000964)を基に、プライマー3(5'-TCACACTAGCTAGAAATCGC-3'、図6及び配列表の配列番号3参照)及びプライマー4(5'-TACAGATTATAATAATTATTCTTTATTATAATCTAGATAAGGCTGCCTGACGATCACTC-3'、図7及び配列表の配列番号4参照)の2種のオリゴDNAを調製した。

40

【0049】

これらのプライマー3及び4を用い、r22株の全DNAを鋳型にしてPCRを行い、recA遺伝子の上流域(2058塩基)を含むDNA断片を増幅した。

【0050】

さらに、recA遺伝子の下流域についても、GenBankに登録されているBac

50

illus subtilis subsp. subtilis str. 168 株の塩基配列（登録番号 NC000964）を基に、プライマー 5（5′ - TTAGAGAACGCTTTATTACTTTAATTTAGGATCCCCAAGAAAGAAAGAACTCGAATTGTGAAG - 3′、図 8 及び配列表の配列番号 5 参照）及びプライマー 6（5′ - AATATGTTGTTGTTGTCGTTTCATTTC - 3′、図 9 及び配列表の配列番号 6 に記載）の 2 種のオリゴ DNA を調製した。

【0051】

これらのプライマー 5 及び 6 を用い、上流域と同様に、*r22* 株の全 DNA を鋳型にして PCR を行い、*recA* 遺伝子の下流域（2061 塩基）を含む DNA 断片を増幅した。

10

【0052】

これらの増幅した、スペクチノマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片（1077 塩基）、*recA* 遺伝子の上流域を含む DNA 断片（2058 塩基）、及び、*recA* 遺伝子の下流域を含む DNA 断片（2061 塩基）、を回収した後、これら 3 つの断片を鋳型として、プライマー 3 及びプライマー 6 を再び用いて、上流域を含む DNA 断片及び下流域を含む DNA 断片がスペクチノマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片の両端にアニールされるのと同時に PCR を行うことで 3 断片を連結し、*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 *recA* 遺伝子欠損用 DNA 断片を得た。

【0053】

i i) 形質転換

20

上記のようにして調製した *recA* 遺伝子欠損用 DNA 断片を用いて、コンピテンス法により *r22* 株を形質転換した。形質転換株の選択は、スペクチノマイシン耐性を指標に行った。

【0054】

多数得られた形質転換株のうちの 8 株からゲノム DNA を回収して、スペクチノマイシン耐性遺伝子と置換されて、*recA* 遺伝子が欠損していることが電気泳動により確認できた 5 株のうち、さらに *recA* 遺伝子（1044 塩基）中の N 末端の 24 塩基と C 末端の 23 塩基以外の 997 塩基が欠損して、スペクチノマイシン耐性遺伝子に置換されていることをシーケンスにより確認できた 1 株をバシラス・サチリス *REC7* (*Bacillus subtilis REC7*) 株と命名し、FERM ABP - 10994 として、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国〒305 - 8566 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 つくばセンター 中央第 6）に寄託した。

30

【0055】

（実施例 2： γ - PGA 非生産株の出現頻度の測定）

納豆菌 *r22* 株および *REC7* 株を、5 ml の LB 培地を入れた試験管中で、37℃ で 12 時間振とう培養し、これを第 1 世代とした。第 1 世代の培養液中の納豆菌を、濁度が 0.05 となるように新たな LB 培地に植菌し、再び 37℃ で 12 時間振とう培養し、これを第 2 世代とした。以下、同様にして、第 12 世代まで培養を継続した。

このようにして培養を継続する中で、24 時間ごと、すなわち 2 世代毎に、培養液を 3 枚の GSP 寒天培地に 100 μ l 塗抹し、全コロニー数と、 γ - PGA 非生産コロニー数をそれぞれ測定した。

40

得られた全コロニー数と γ - PGA 非生産コロニー数とから、全コロニー数に占める γ - PGA 非生産コロニーの割合を算出し、これを非 γ - PGA 生産株の出現頻度（%）とした。表 1 に、結果を示した。

【0056】

【表 1】

(γ-PGA非生産株の出現頻度)

納豆菌株	r 2 2 株	R E C 7 株
第 2 世代	0 %	0 %
第 4 世代	0 %	0 %
第 6 世代	0 %	0 %
第 8 世代	2 7 %	0 %
第 1 0 世代	8 9 %	0 %
第 1 2 世代	9 1 %	0 %

【 0 0 5 7 】

その結果、対照とした r 2 2 株では第 8 世代で 2 7 % が γ - P G A 非生産性株となっており、さらに第 1 2 世代では 9 1 % もが γ - P G A 非生産性株となっていた。

これに対して、R E C 7 株では第 1 2 世代まで植え継いでも、γ - P G A 非生産株の出現頻度は常に 0 % である事が確認され、r e c A 遺伝子を欠損させることにより、γ - P G A 非生産性株の出現を抑制させることが出来ることが確認できた。

【 0 0 5 8 】

(実施例 3 : r e c A 遺伝子欠損により転移が抑制された I S の確認)

i) c o m P 遺伝子への I S 転移の確認

実施例 2 における第 3 世代 ~ 第 1 2 世代の各世代において、納豆菌 r 2 2 株および R E C 7 株について、I S 4 B s u 1 及び I S 2 5 6 B s u 1 が高頻度に転移することが報告されている c o m P 遺伝子への転移を P C R を用いて以下のように確認した。

【 0 0 5 9 】

すなわち、第 3 世代 ~ 第 1 2 世代の各世代の r 2 2 株及び R E C 7 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、Gen Bank に登録されている納豆菌 B a c i l l u s s u b t i l i s N A F 4 の c o m P 遺伝子の塩基配列 (登録番号 A B 0 3 1 5 5 2) を基にして作製したプライマー 7 (5 ' - A T G T A C A G A T A T A T T A A C G T C T A T A - 3 ' 、図 1 0 及び配列表の配列番号 7 参照) 及びプライマー 8 (5 ' - T T A C A A T T C G A T T T C A A T A T C A G C C - 3 ' 、図 1 1 及び配列表の配列番号 8 参照) を用いて P C R を行い、各々の c o m P 遺伝子を含む DNA 断片を増幅した。

このようにして増幅された各世代ごとの DNA 断片を電気泳動して、分子量を測定した。結果を、図 2 に示す。

【 0 0 6 0 】

その結果、対照とした r 2 2 株では、第 8 世代以降において、正常な c o m P 遺伝子を含む DNA 断片 (約 2 . 3 k b) よりも長くなっていて、c o m P 遺伝子中に I S が転移したと予想される長さの DNA 断片 (約 3 . 7 k b) の存在が確認された。

これに対して、R E C 7 株では第 8 世代以降も正常な c o m P 遺伝子を含む DNA 断片 (約 2 . 3 k b) のみが増幅したことが確認され、R E C 7 株では c o m P 遺伝子への I S の転移は確認されなかった。

【 0 0 6 1 】

i i) c o m P 遺伝子へ転移する I S 種の同定

上記 i) における第 1 2 世代の r 2 2 株で検出された c o m P 遺伝子に I S が転移したと予想される約 3 . 7 k b の DNA 断片、及び、P C R 操作の対照として r 2 2 株のゲノム DNA を鋳型にして、I S 4 B s u 1 と I S 2 5 6 B s u 1 が有する各トランスポザーゼ遺伝子を P C R により増幅した。

【 0 0 6 2 】

なお、I S 4 B s u 1 のトランスポザーゼ遺伝子の増幅にはプライマー 9 (5 ' - A T G G A T A A G T T T A C A C G A - 3 ' 、図 1 2 及び配列表の配列番号 9 参照) 及びプライマー 1 0 (5 ' - G C T T T C T T G T T T T T G C T C A T G A A - 3 ' 、図 1 3 及び配列表の配列番号 1 0 参照) を用い、また、I S 2 5 6 B s u 1 のトランスポザーゼ遺伝子の増幅にはプライマー 1 1 (5 ' - T G G G G A A A T T G A A A G A G - 3 ' 、図 1 4 及び配列表の配列番号 1 1 参照) 及びプライマー 1 2 (5 ' - T T A T T C T A

10

20

30

40

50

G A T A T T T C T T C A C A C G - 3'、図 1 5 及び配列表の配列番号 1 2 参照)を用いた。

【0063】

その結果、図 3 に示した通り、対照として用いた r 2 2 株のゲノム DNA を鋳型とした場合、両 IS のトランスポザーゼ遺伝子が増幅された DNA 断片が検出され、PCR は適切に実施できたことが確認できた。一方、c o m P 遺伝子に IS が転移したと予想される約 3 . 7 k b の DNA 断片においても、同様に、両 IS のトランスポザーゼ遺伝子の存在が確認され、c o m P 遺伝子中に高頻度で転移するとされている IS 4 B s u 1 と IS 2 5 6 B s u 1 が r 2 2 株でも c o m P 遺伝子中に転移していることが確認された。

【0064】

以上の結果から、r e c A 遺伝子を欠損させていない通常の納豆菌では、IS 4 B s u 1 及び IS 2 5 6 B s u 1 が c o m P 遺伝子に高頻度で転移するのに対して、r e c A 遺伝子を欠損させることにより、これらの IS の c o m P 遺伝子への転移を完全に抑制できることが確認された。

【0065】

(実施例 4：納豆製造)

1 2 世代培養後の r 2 2 株及び R E C 7 株から、それぞれ、常法により調製した胞子を用いて納豆を製造した。

製造された納豆について、糸引性を官能的に評価する一方、納豆 1 g 当たりの γ - P G A 量を測定した。

なお、 γ - P G A は、納豆 1 0 g からトリクロロ酢酸により抽出後、エタノールにより回収し、菅野らの方法(例えば、日本食品工学会誌、4 2 巻、p . 8 7 8 - 8 8 6、1 9 9 5 年参照)に従い、 γ - P G A が臭化セチルトリメチルアンモニウムに結合する性質を利用して分光学的に定量した。

表 2 に結果を示した。

【0066】

【表 2】

(γ -PGA 量と糸引性)

納豆菌株	γ -PGA 量 (mg/g 納豆)	糸引性
r 2 2 株	0. 5 3	不良
R E C 7 株	9. 3 8	良好

【0067】

その結果、第 1 2 世代培養後の r 2 2 株を用いて製造した納豆は、r e c A 遺伝子を欠損させた R E C 7 株を用いて製造した納豆と比較して、 γ - P G A 量は約 5 % 程度と少なく、その結果、ほとんど糸を引かなくて納豆としての品質をなしていなかった。

これに対して、R E C 7 株を用いて製造した場合は、納豆の γ - P G A 量は十分であり、良好な糸引きが見られ、品質のよい納豆が安定して製造できることが確認できた。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図 1】r e c A 遺伝子破壊用の DNA 断片作製の概略を示した図である。

【図 2】c o m P 遺伝子への IS の転移を確認した結果を示す電気泳動図である(図面代用写真)。

【図 3】c o m P 遺伝子へ転移した IS を確認した電気泳動図である(図面代用写真)。

図 3 中のレーン 1 は鋳型として 3 . 7 k b の DNA 断片を使用した場合の結果を示す。図 3 中のレーン 2 は鋳型として全ゲノムを使用した場合の結果を示す。

【図 4】プライマー 1 の塩基配列を示す図である。

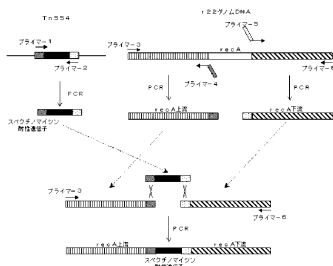
【図 5】プライマー 2 の塩基配列を示す図である。

【図 6】プライマー 3 の塩基配列を示す図である。

【図 7】プライマー 4 の塩基配列を示す図である。

- 【図 8】プライマー 5 の塩基配列を示す図である。
 【図 9】プライマー 6 の塩基配列を示す図である。
 【図 10】プライマー 7 の塩基配列を示す図である。
 【図 11】プライマー 8 の塩基配列を示す図である。
 【図 12】プライマー 9 の塩基配列を示す図である。
 【図 13】プライマー 10 の塩基配列を示す図である。
 【図 14】プライマー 11 の塩基配列を示す図である。
 【図 15】プライマー 12 の塩基配列を示す図である。

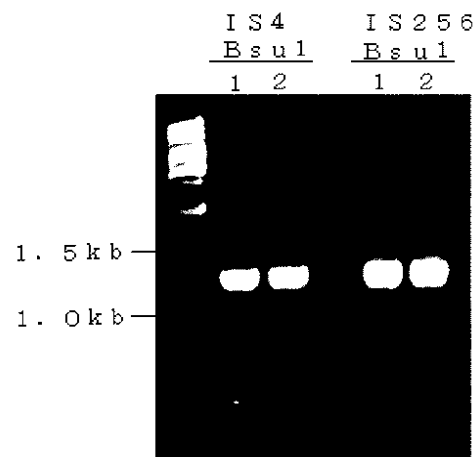
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

GTATAATAAAGAATAATTATTAATC

【図 5】

TAAATTAAAGTAATAAAGCGTTCTC

【図 6】

TCACACTAGCTAGAATCGC

【図 7】

TACAGATTAAATAATTATTCTTTATTATATCTAGATA
 AGGCTGCCTGACGATCACTC

【図 8】

TTAGAGAAGCGCTTTATTACTTTAATTTAGGATCCCA
 AGAAGAAGAAGCTCGAATTTGAAG

【図 9】

AATATGTTGTTGTCGTTTCATTC

【図 10】

ATGTACAGATATATTAACGTCTATA

【図 11】

TTACAATTGATTTCAATATCAGCC

【図 12】

ATGGATAAGTTTACACGA

【図 13】

GCTTTCTTGTTTTTGCTCATGAA

【図 14】

TGGGGAAATTGAAAAGAG

【図 15】

TTATTCTAGATATTTCTTCACACG

【配列表】

2010057388000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 関根 靖彦

東京都豊島区西池袋 3 - 3 4 - 1 学校法人立教大学内

(72)発明者 加田 茂樹

愛知県半田市中村町 2 丁目 6 番地株式会社ミツカングループ本社内

F ターム(参考) 4B020 LB14 LC04 LG01 LK17 LP18 LY04

4B024 AA05 CA04 CA09 DA07 EA04 GA11 GA25 HA12

4B065 AA19X AB01 AC10 AC14 BA02 BA18 CA16 CA42