

納豆菌欠損ファージ生産変異株の作出

永井 利郎^{a)}

農業生物資源研究所

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

A Bacillus subtilis (natto) mutant on defective phage production

Toshirou NAGAI^{a)}

National Institute of Agrobiological Sciences

1. 目的

納豆菌[*Bacillus subtilis* (*natto*)]は、日本の伝統的醗酵食品である納豆を生産する細菌である(Nagai and Tamang, 2010). 納豆菌や枯草菌(*B. subtilis*)は菌体外に欠損ファージを生産することが知られている(Seaman et al., 1964, Tsutsumi et al., 1990). これら欠損ファージの構造蛋白質

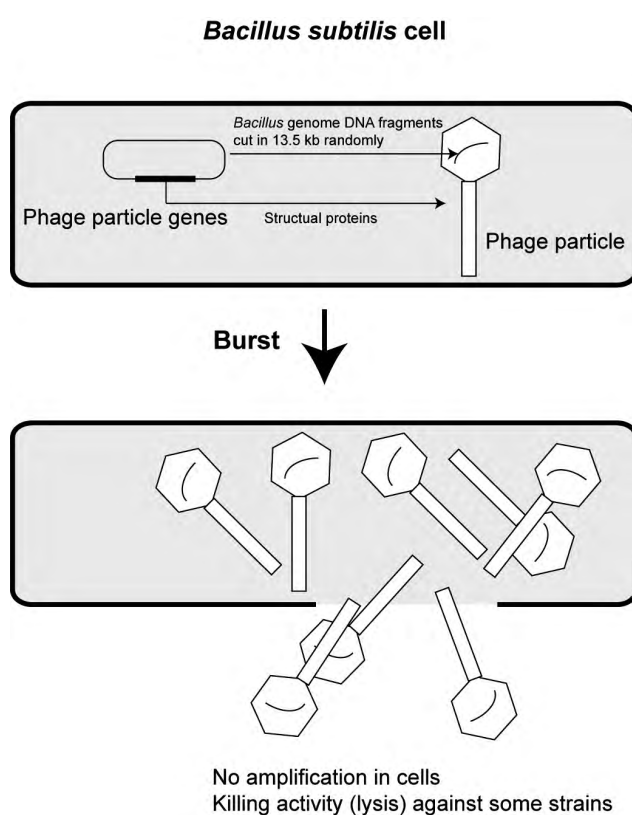


図 1. 欠損ファージ粒子の生成

は納豆菌のゲノム上にコードされており、納豆菌体内でファージ粒子が作られる。しかしながら、ファージ頭部にはそのファージゲノムではなく、納豆菌自身のゲノムをある大きさにランダムに切りそろえられた断片がパッケージングされる。したがって、この欠損ファージは、増殖することができない(図 1)。しかしながら、欠損ファージは、この欠損ファージに感受性のある納豆菌株を溶菌する、または生育を阻害することができる。通常のファージの場合、そのファージ懸濁液を希釈し、感受性の菌株にスポットすると、低希釈倍率ではスポットしたところ全体が溶菌し、大きな溶菌斑を形成するが、希釈倍率を高めるにつれ、個々のプラークが観察されるようになる。しかし、欠損ファージでは、低希釈倍率では溶菌斑を形成するが、希釈率を高め

a) (現所属) 農研機構 遺伝資源センター Genetic Resources Center, NARO

[〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2]

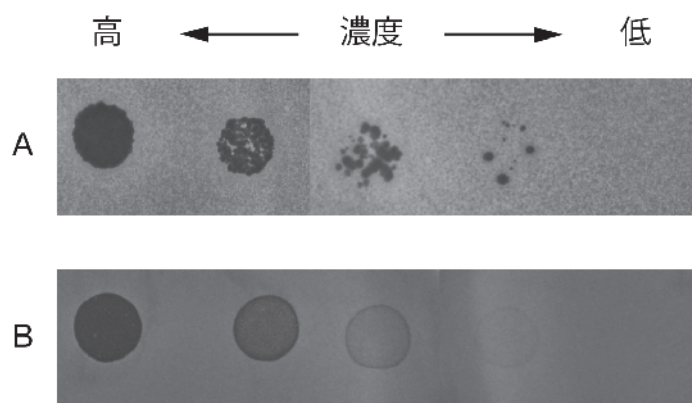


図 2. 通常のファージ(上)と欠損ファージ(下)の
各希釈段階での溶菌斑形成の違い

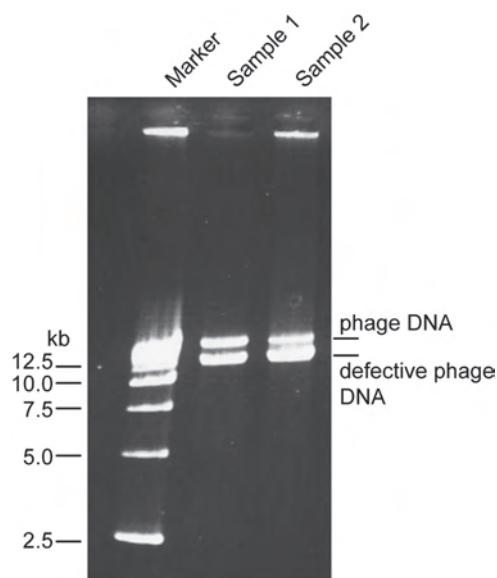


図 3. 欠損ファージのサンプルへの
混入の例

るとその溶菌斑全体が薄れていくだけであり、個々のプ
ラークを形成することはない (図 2)。

多くの納豆菌を調べると、それぞれの欠損ファージに
感受性・非感受性の菌株が存在しており、感受性の違いを利用することにより、ある程度は納豆菌の
菌株レベルでの識別が可能になる。その一方で、通常の納豆菌ファージを、欠損ファージを生成す
る納豆菌を用いて増殖すると、欠損ファージが混入し、目的とする納豆菌ファージのみからなるサ
ンプルを調製することができないという不都合が生じる。図 3 は、ある納豆菌ファージサンプルか
ら抽出した DNA の電気泳動像であるが、目的のファージの DNA (高分子側) 以外に欠損ファージ
由来の DNA が確認できる。このような場合、実験によっては障害となるので欠損ファージを取り
除くことが必要であり、それには困難が伴う。

そこで、そのような障害を取り除く目的で、欠損ファージ生産性変異株の作出を行った。ここで
は、著者の行った研究 (Nagai, 2014) 中心に解説する。

2. 材料および方法

1) 使用した微生物と培養条件

本研究に使用した主要な菌株及び作出した変異株は表 1 にまとめた。本研究により作出した変異

表 1. 実験に使用した菌株

株名	特性	分離源・由来	MAFF登録番号
MAFF 118147	PGA ⁺ , DP118147 ⁺	宮城県, 発酵食品	
MAFF 302078	Rif ^S	埼玉県, 土壌	
NA1	PGA ⁻ , DP118147 ⁺	MAFF 118147 の自然突然変異体	MAFF 211989
NA2	PGA ⁻ , DP118147 ⁻	NA1 をアクリジンオレンジにより変異処理	MAFF 211990
NA3	Rif ^R	MAFF 302078 の自然突然変異体	MAFF 211991

PGA⁺: ポリグルタミン酸生産能あり, PGA⁻: ポリグルタミン酸生産能なし,

DP118147⁺: 欠損ファージ産生, DP118147⁻: 欠損ファージ非産生,

Rif^S: リファンピシシン感受性, Rif^R: リファンピシシン耐性 (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

株はすべてジーンバンクに登録した。培養は LB 培地に 10 mM 硫酸マグネシウムを添加した培地または、ニュートリエントブロス(日水製薬)を使用し、37℃で 16–24 時間、または 30℃で 1–2 日間の条件で行った。以下に書かれてある以外の方法については、常法を用いた。

2) アクリジンオレンジによる変異処理

アクリジンオレンジ存在下で *B. subtilis* を液体培養し、段階希釈後プレートに展開し、コロニーを得た(Hara et al., 1982)。マイクロタイタープレートを用いて一晚、液体培養した後、遠心分離を行い、上清を回収し、指示菌入り軟寒天(リファンピシン含有)上にスポットした。一晚培養後、溶菌斑形成を観察した。

3) 電子顕微鏡観察

酢酸ウラニウムによるネガティブステイン法によった。観察は株式会社花市電子顕微鏡技術研究所(愛知, 岡崎市)で行った。

3. 結果と考察

1) 納豆菌 MAFF 118147 の欠損ファージ

納豆菌 MAFF 118147 の培養上清から欠損ファージを検出し、そのファージを DP118147 (欠損ファージ Defective Phage にちなむ)と命名した。DP118147 はこれまでの欠損ファージ(Seaman et al., 1964 ; Tsutsumi et al., 1990)と同様に非常に小さな頭部(直径 40 nm)と収縮性の尾部(17 × 264 nm)より構成される(図 4)。欠損ファージ粒子からは 13.5 kb の DNA が検出された(図 5 A)。

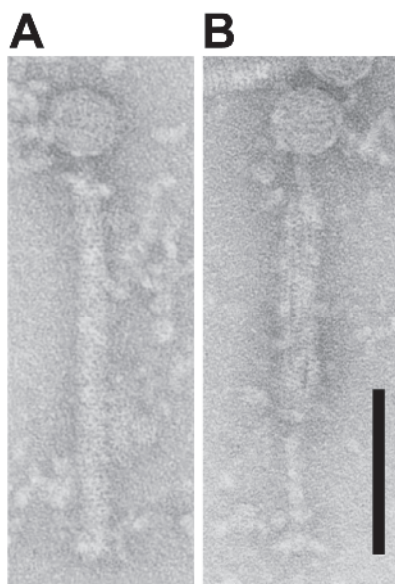


図4. 欠損ファージDP118147 (A)と尾部が収縮した形態(B)の電顕写真

バー=100 nm. (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

2) 指示菌

140 株の *B. subtilis* について、納豆菌 MAFF 118147 の培養上清により、生育阻害される菌株を検索したところ、73 株(52%)が生育阻害を受けた。その中から、軟寒天中できめの細かい菌叢を形成する *B. subtilis* MAFF 302078 を以降の実験に使用することとした。なお、納豆菌 MAFF 118147 は低分子の抗生物質を生産する可能性もあったが、生育阻害活性は 200 kDa 以上の画分に存在しており、低分子の生育阻害活性物質はほとんど作られていなかった。

B. subtilis MAFF 302078 は、欠損ファージ生産変異株のスクリーニングに便利のように抗生物質(リファンピシ

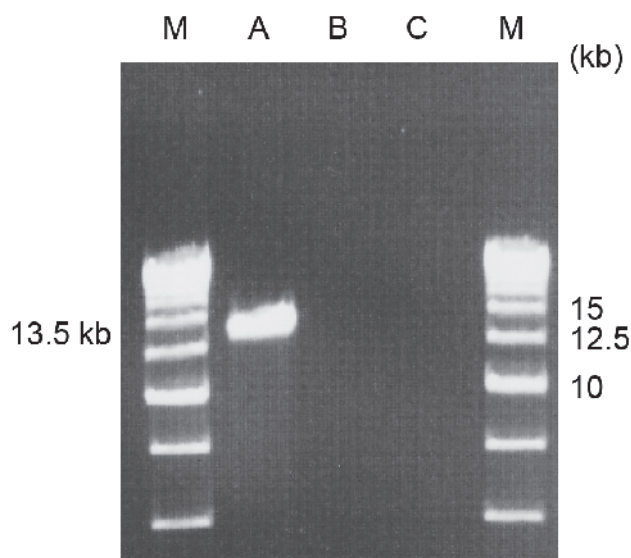


図 5. 欠損ファージ DNA の電気泳動像

M, マーカ; A, DP118147 DNA(MAFF 118147 培養液由来); B, NA2 培養液由来; C, NA2 溶菌液由来 (日本食品科学工学会より許可を得て転載)

分離し, NA1 と命名した.

NA1 を変異剤アクリジンオレンジで処理し, 平板に展開後, 生じた 96 個のコロニーを, マイクロタイタープレートにて液体培養した. 培養液を遠心分離した後, 得られた上清を, NA3(リファンピシン耐性)を含む二重平板にスポットした. なお, 二重平板の下層培地にはリファンピシンを加えておき, 上清に含まれる, 遠心分離で除去しえなかった細菌の増殖を抑えた. 以上の結果, 96 個中 1 個の溶菌斑を形成しないコロニーを見出し, これを NA2 と命名した.

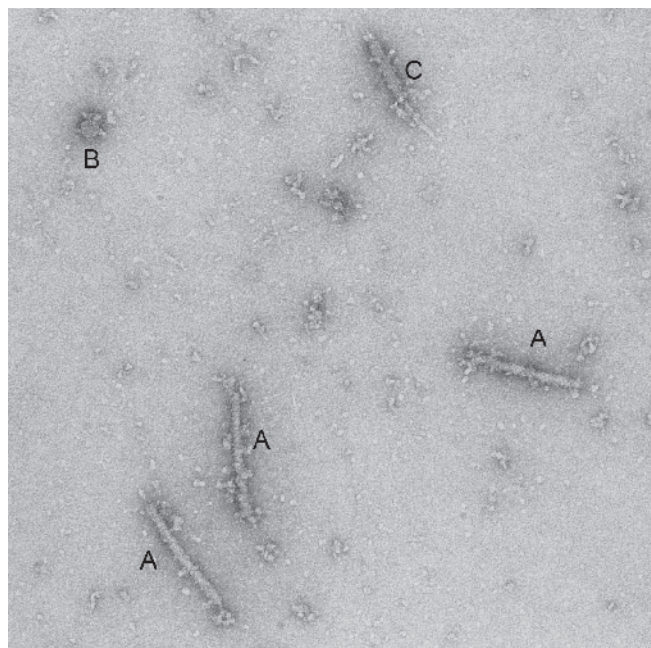


図 6. NA2 の電顕写真

A, 尾部; B, 頭部; C, 収縮した尾部. バー=200 nm
(日本食品科学工学会より許可を得て転載)

ン)耐性を自然突然変異により付与し(詳細は次節で詳述), NA3 と命名した.

3) 欠損ファージ生産変異株の取得

納豆菌が生産するポリグルタミン酸(納豆の糸の主成分であり, 曳糸性のあるグルタミン酸ポリマー. 以下 PGA)は非常に粘性が高く, また DNA と非常に似通った物理化学的性質を有しているために, DNA 調製の際に混入する. 納豆菌 MAFF 118147 も PGA を生産するが, 以上の理由のため以下の操作がしにくくなるので, まずは PGA 非生産株を取得した. 納豆菌の PGA 生産能はゲノム上の挿入配列により高頻度に欠落しやすい性質をもつので, PGA 生産培地に普通に培養したコロニーを展開すると, 曳糸性を示さない PGA 非生産株が容易に生じてくる(Nagai et al., 2000). そのような株を純粋

4) 欠損ファージ生産変異株の性質

NA2 の培養液から DNA を抽出し, アガロース電気泳動により分析したところ, 欠損ファージ由来の 13.5 kb の DNA は検出できなかった(図 5 B). また, NA2 の溶菌液から DNA は検出できなかった(図 5 C)NA2 とその親株である MAFF 118147 の増殖曲線を調べたところ, 変化はなかった(データ省略). アクリジンオレンジ処理により, 生育に影響のある変

異は受けていないと考えられた。

NA2 の培養液について電顕観察したところ、頭部と尾部が結合した完成形の欠損ファージ(図 4)を見出すことはできず、分離した頭部と尾部が観察された(図 6)。すなわち、生じた変異はファージ粒子のアセンブリの過程において、頭部と尾部を結合する段階で生じていることが示唆された。すなわち、NA2 では完全には欠損ファージの発現が阻害されてはいなかった。NA2 の欠損ファージの尾部は、頭部と結合していなくても収縮する能力は保持しており(図 6 C, 図 4 B)、尾部の機能は完全には損なわれてはいなかった。NA2 菌体内で欠損ファージ粒子の検出を試みたが、菌体内容物が妨害し電顕観察を行うことはできなかった。頭部に含まれるはずの DNA は培養液中からも菌体内からも検出されなかったが(図 5 B,C)、頭部に最初からパッケージングされていなかったのか、パッケージングはされたが頭部から漏れ出て DNase により分解されたか、またはゲノムからの DNA の切り出し自体が行われなかったのかは不明である。表現型として正常な欠損ファージ粒子を形成しない変異株の取得に成功したが、遺伝子のどこにどのような変異が生じたのか、その変異によりなぜ頭部と尾部は結合されないのかについては、今後詳細な検討が必要である。

4. 参考文献

- Hara, T., Aumayr, A., Fujio, Y. and Ueda, S. (1982). Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (*natto*) with acridine orange. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1456–1458.
- Nagai, T., Tran, L.S.P., Inatsu, Y. and Itoh, Y. (2000). A new IS4 family insertion sequence, IS4*Bsu1*, responsible for genetic instability of poly-γ-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 2387–2392.
- Nagai, T. and Tamang, J. (2010). Fermented legumes: Soybean and non-soybean products. *In* Fermented Foods and Beverages of the World (Tamang, J.P. and Kailasapathy, K., eds.). pp 191–224, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nagai, T. (2014). A defective bacteriophage produced by *Bacillus subtilis* MAFF 118147 and a mutant producing no normal particles of the defective bacteriophage. *Food Science and Technology Research* 20:1229–1234.
- Seaman, E., Tarmy, E. and Marmur, J. (1964). Inducible phages of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 3: 607–613.
- Tsutsumi, T., Hirokawa, H. and Shishido, K. (1990). A new defective phage containing a randomly selected 8 kilobase-pairs fragment of host chromosomal DNA inducible in a strain of *Bacillus natto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:41–46.