

納豆菌バクテリオファージのタイピングと特性調査

永井 利郎

農業生物資源研究所

[〒305-8602 つくば市観音台 2-1-2]

Typing and characterization of *Bacillus subtilis* (*natto*) bacteriophages

Toshirou NAGAI

National Institute of Agrobiological Sciences

1. 目的

製造した納豆が糸を引いていない、または徐々に引かなくなることがある。1960年代に糸を引かない納豆からバクテリオファージが分離され、糸引きの消失の原因がそのファージの混入によることが解明された（藤井ら, 1969）。その後、日本各地の納豆工場ではファージの汚染調査が行われた。その結果、多くの工場からファージが検出され、ファージ汚染が深刻であることが報告された（吉本ら, 1970）。当時の納豆工場は家内制が多く、そのような納豆工場では醗酵室の壁が土塀で作られており、効果的な施設の洗浄が行いにくかったことが汚染の原因と考えられた。しかしながら納豆工場の近代化に伴い醗酵室の壁も土塀からステンレス製に替わり、衛生的環境が整備されるにつれ、糸引きに関わるトラブルも減少していった。それでも工場によっては床や排水溝からファージが検出されることもあり、ファージ根絶は今も難しい問題である（田部井, 1985b; 滝口ら, 1999; 古口, 2008）。

NIAS ジーンバンクには（故）田部井英夫氏（当時食品総合研究所）のファージコレクション（田部井, 1985a）が登録されているが、これらファージについてタイピングと特性調査を行った。また、藤井ら（藤井ら, 1975）が分離したファージとの比較も行い、日本産の納豆菌ファージは2種類に大別できることを明らかにした。なお、本成果の一部は発表済みである（Nagai and Yamasaki, 2009）。

2. 材料および方法

1) 増殖・宿主域・電子顕微鏡観察

使用したバクテリオファージを表 1 に示した（グループについては後述する）。ファージと宿主（納豆菌 HM 株）を 0.6% アガロースに混ぜ、それを 10 mM 硫酸マグネシウム入りの LB（1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl）寒天培地に重層した。一晚 37°C に置いた後、SM バッ

ファ (Sambrook et al. 1989) を寒天表層に加えてファージ粒子を懸濁液として回収した。

ファージの宿主域はスポット法により調べた。0.6%アガロースに指示菌である *B. subtilis* 株 (主に NIAS ジーンバンクの *B. subtilis* 株を使用した) の一晚培養液を混合したものを下層寒天培地に重層した。それにファージ懸濁液を滴下し、37°Cで一晚培養後、溶菌斑 (プラーク) が生じるかどうかを観察した。

電子顕微鏡による形態観察は、ファージ粒子をネガティブ染色した後に 25000 倍の倍率で行った。

2) サザンハイブリダイゼーション

ファージ懸濁液にポリエチレングリコールおよび NaCl を加え、ファージ粒子を沈澱させた。バッファに懸濁後、DNase, RNase ついでプロテナーゼ K で消化し、DNA を調製した。HindIII で DNA を分解し、1%アガロースゲル電気泳動により切断片を分離した後、ナイロン膜に転写した。プローブとして MAFF 270105 と MAFF 270115 の DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。シグナルは ECL direct nucleic acid labeling and detection system (GE ヘルスケア・ジャパン) を用い、X線フィルム上で検出した。

表 1. ジーンバンク保存の納豆菌ファージ

MAFF番号	株名	分離源・年月	グループ
270101	P-1	醗酵異常納豆, 1980.1	II
270102	DMP	納豆, 1980.5	II
270103	MIP	納豆, 1980.5	II
270104	JN厨P	納豆, 1980.10	I
270105	JNDMP	納豆, 1981.2	I
270106	JNHMP	納豆, 1981.2	I
270107	MOP	醗酵異常納豆, 1981.7	II
270108	THP	醗酵異常納豆, 1981.7	II
270109	THAP	醗酵異常納豆, 1981.12	II
270110	SUP	醗酵異常納豆, 1981.12	II
270111	KKP	醗酵異常納豆, 1982.3	II
270112	KKP下	工場下水, 1982.3	II
270113	SS1P	醗酵異常納豆, 1983.12	II
270114	SS2P	醗酵異常納豆, 1983.12	II
270115	ONPA	醗酵異常納豆, 1984.8	II
270116	ONPB	醗酵異常納豆, 1984.8	II
270117	ONPC	醗酵異常納豆, 1985.9	II
270118	副将軍P	醗酵異常納豆, 1985.10	II
270119	ONPD	醗酵異常納豆, 1986.9	II
270120	SUP-SS1P	記載無し	II

3. 結果

1) 宿主域

MAFF 保存の *B. subtilis* (一部 ATCC, IFO からの分譲菌を含む) を用いて納豆菌ファージの宿主域を調べ (表 2), クラスタ解析により大きく 2 つのグループに分けることができた (次項のサ

表 2. 納豆菌ファージの宿主域

グループ	ファージ	宿 主 (アクロニムのないものはNIASジーンバンク保存菌株)														
		118079~118098, 118101~118103, 118105, 118106, 118108, 118110~ 118117, 118119, 118121~118130, 118143, 118145, 118173, 118201, 301002	118180	118100, 118156	118109	118181	118164	118179	118146, 118147	302081	118209	118118	118132	118133	118182	118107, 118120, 118131, 118134~118141, 118149, 118151~118154, 118158~ 118163, 118165, 118166, 118168, 118170, 118172, 118175~118177, 118183~ 118196, 118200, 118202~ 118205, 118207, 118208, 118215~118218, 118228, 118255, 301702~301704, 302070~302080, 302082~ 302085, 520025, IFO14144, ATCC9945, ATCC9945A
I	270104	+	+-	-	-	-	-	+-	+	-	-	-	-	-	-	-
	270105	+	+-	-	-	-	-	+-	+	-	-	-	-	-	-	-
	270106	+	+-	-	-	-	-	+-	+	-	-	-	-	-	-	-
II	270101	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	270102	+	+	+	+	+	+	+	+-	-	-	-	-	-	-	-
	270103	+	+	+	+-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	270107	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	270108	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	270109	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	270110	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	270111	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	270112	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	270113	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+-	+-	-	-	-
	270114	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+-	+-	+-	-	-
	270115	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	270116	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+-	-	+-	-	+	-
	270117	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+-	+	+	+-	+	-
270118	+	+	+	+-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	
270119	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+-	+	+	+-	+	-	
270120	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	

+, 溶菌斑形成; -, 溶菌斑非形成; +-, 本文参照

ザンハイブリダイゼーションの結果も参照). 納豆菌ファージは, 納豆や醗酵物から分離された菌株 (食品産業的な意味での納豆菌) に感染するが, 土壌から分離された *B. subtilis* (枯草菌) には感染しない傾向にあった. このことは, 納豆菌ファージを用いると納豆菌と枯草菌を区別できる可能性を示している. なお, 表中「+」は「2. 材料および方法」で示した簡易的な方法ではプラーク形成の判断が付きにくかったことを意味する. その理由は現在調査中であるが, 培養液中に含まれる抗菌性物質もしくは欠損ファージによる生育阻害とファージ増殖によるプラーク形成が区別できなかつたためと考えている (Seaman et al., 1964; Tsutsumi et al., 1990).

2) 基本的性質

ファージ DNA のサザンハイブリダイゼーションの結果 (図 1) より, ファージは互いに独立した 2 つのグループ I および II からなることが明らかとなった. グループ間では DNA の切断パターンも異なっていた. それぞれのグループの代表株 (MAFF 270105 および 270115) を電子顕微鏡で観察したところ, MAFF 270105 (グループ I) は幅 60nm の頭部とフレキシブルな尾部 (幅 7 nm × 長さ 200 nm) を有していた (図 2). 尾部の先端には根状の構造物が見られた. MAFF 270115 (グループ II) は幅 79nm の頭部と有鞘 (幅 23 nm) の尾部 (幅 9 nm × 長さ 200 nm) を有していた. 鞘の末端に微細な構造物が認められた. それぞれのゲノム DNA の大きさは, MAFF 270105 が 42 kb, MAFF 270115 が 91 kb であった. 指示菌の培地として LB のみを使用する場合, グループ I のファージのプラーク形成にはマグネシウムイ

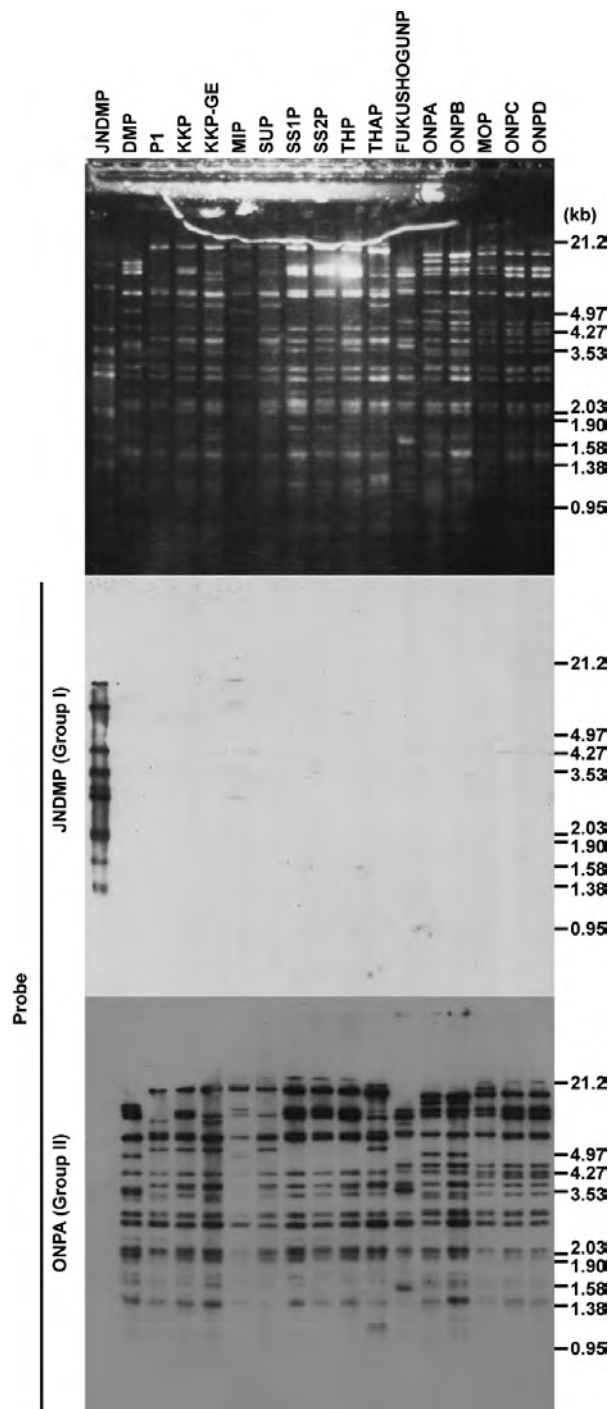


図1. 納豆菌ファージDNAのサザンハイブリダイゼーション

JNDMP (MAFF 270105) と ONPA (MAFF 270115) の DNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った. ここにはその結果の一部を掲載した.

〔日本食品科学工学会の許可を得て転載 (Nagai and Yamasaki, 2009)〕

オン (10 mM) の添加が必要だが, グループ II では必要としなかった。

4. 考察

藤井らの研究では納豆菌ファージは血清学的に 4 つのグループ, 宿主域で 3 つのグループに分けられることを示した(藤井ら, 1975)。また, 吉本ら(1970)のグループは日本全国から収集した納豆菌ファージを, プラークの形態から 4 つ, ファージの形態から 2 つのグループに分けた。田部井(1985a)も自ら収集したファージを諸性質(大きさ, 潜伏期, 放出数など)をもとに 4 グループに分けた。本研究では同じ田部井のファージを用いて DNA 相同性をもとに全く独立の 2 つのグループに大別できることを示した。さらに, 藤井らが提唱した 4 つの血清グループに属する代表株を取り寄せてサザンハイブリダイゼーションにより解析したところ, それらはグループ I またはグループ II のいずれかと相同性があることが分かった(Nagai and Yamasaki, 2000)。

以上の結果を総合すると, これまでに分離された日本産納豆菌ファージはゲノム DNA および形態が全く異なる 2 つのグループ(グループ I および II)に分けられると結論づけられた。

5. 参考文献

- 藤井久雄・沖邦子・牧原ミヨ子・芥野諄子・武谷立子 (1969). 納豆菌による粘質物の生成に関する研究(第 7 報): 納豆菌ファージの分離とその一般的性質. 農化 41: 39-43.
- 藤井久雄・白石淳・椛裕子・柴垣道子・高橋佐代子・本多昭子 (1975). 糸引納豆における異常醗酵と納豆菌ファージ. 醸工 53: 424-428.
- 古口久美子 (2008). ファージ・その他微生物汚染対策. 納豆の科学—最新情報による総合的考察—(木内幹ほか編). pp.191-194. 建帛社, 東京.
- Nagai, T. and Yamasaki, F. (2009). *Bacillus subtilis* (*natto*) bacteriophages isolated in Japan. Food Sci. Technol. Res. 15: 293-298.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Seaman, E., Tarmy, E. and Marmur, J. (1964). Inducible phages of *Bacillus subtilis*. Biochemistry, 3, 607-612.
- 田部井英夫 (1985a). バクテリオファージとファージ・タイピング. 昭和 59 年度農林水産試験研究年報農業編林業編国立: 968.

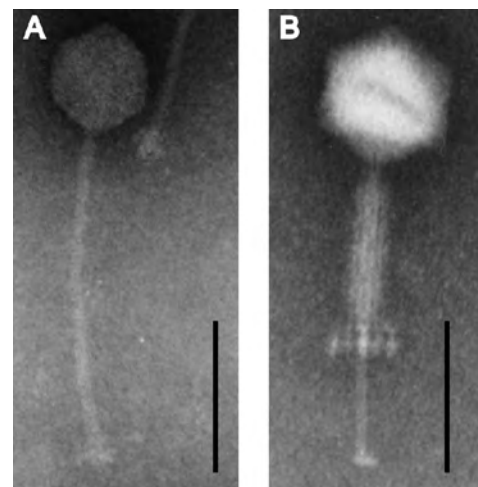


図 2. 納豆菌ファージ

A, JNDMP (MAFF 270105); B, ONPA (MAFF 270115). バーは 100 nm を示す.
〔日本食品科学工学会の許可を得て転載 (Nagai and Yamasaki, 2009)〕

- 田部井英夫 (1985b). フェージ汚染の実態調査. 昭和 59 年度農林水産試験研究年報農業編林業編 国立: 968.
- 滝口強・吉野功・湯浅秀子・川野郁夫・青木義篤 (1999). 納豆製造工場のフェージ汚染対策. 群馬県工業試験場研究報告 1999: 35-39.
- 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.
- 吉本明弘・野村繁幸・本江元吉 (1970). 納豆菌フェージ (第 4 報): 納豆製造工場のフェージ. 発工, 48: 660-668.

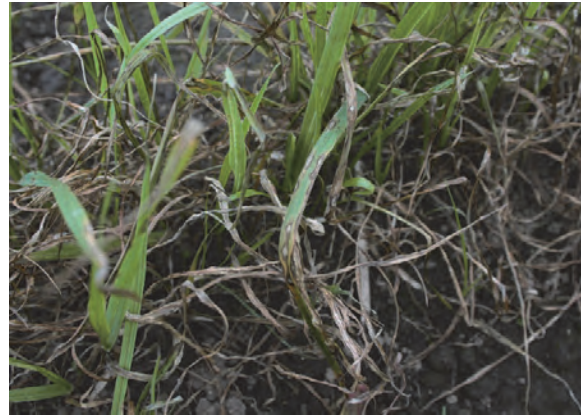
Summary

Contamination of bacteriophages in natto, Japanese fermented soybeans, results in loss of “strings of natto” (polyglutamate) on the beans. Twenty *Bacillus subtilis* (*natto*) phages, some of which were isolated from natto without “strings of natto”, are deposited at NIAS Genebank. Host ranges and Southern hybridization analysis of the phages indicated that the phages were classified into 2 groups, Groups I and II. *Bacillus subtilis* (*natto*) phage, MAFF 270105 (Group I) had a head (dia., 60 nm) and a flexible tail (width, 7 nm × length, 200 nm) and required magnesium ion for formation of plaques. *Bacillus subtilis* (*natto*) phage, MAFF 270115 (Group II) had a head (dia., 79 nm) and a tail (width, 9 nm × length, 200 nm) with a sheath (width, 23 nm). Genomic DNAs of *Bacillus subtilis* (*natto*) phages MAFF 270105 and MAFF 270115 were 42 kb and 91 kb in size, respectively.

微生物遺伝資源の調査プロフィール



Beauveria bassiana MAFF 635036 株に感染して死亡したクリシギゾウムシ成虫 (井原)



ライグラスいもち病の病徴 (栃木県那須塩原市) (月星)



モモ樹に発生した材質腐朽菌 3 種の子実体 (1, カワラタケ; 2, アラゲカワラタケ; 3, スエヒロタケ) (中村)



キクピシウム立枯病の病徴 (茨城県東海村) (月星)



ダイズシストセンチュウが寄生したダイズ根 (相場)



納豆菌ファージ MAFF 270115 (永井)