

納豆菌による新しい発酵豆の創製

京都大学大学院 農学研究科

橋本 渉

納豆は伝統的な発酵食品の一つであり、蒸し大豆上で納豆菌を生育させて製造される¹⁾。蒸し操作により大豆は枯死体となっている。一方、当研究室の先行研究により、吸水した非蒸し大豆（生命体）上では納豆菌の生育は顕著に抑制されることが明らかとなり、生命体大豆は抗菌物質を分泌していることが示唆される²⁾。納豆菌が生物枯死体を良好な栄養源とし、顕著に生育する性質は腐生性とよばれる。細菌による植物への作用様式には、主に共生、感染、及び腐生の三種類が知られている³⁾。共生と感染に関しては、細菌と植物との間に特異的な組み合わせが存在することが多いが、腐生性は必ずしも該当しないため、腐生にかかる分子機構には不明な点が多い。

これまでに、納豆菌が蒸し大豆に作用する際の本菌の遺伝子発現解析を通して、納豆菌が大豆の細胞壁多糖（ペクチンの一種であるラムノガラクトナン-I⁴⁾）を標的として、その分解・輸送（取り込み）機構を顕著に活性化し、生育していくことを明らかにした²⁾。本研究では、納豆用小粒大豆をはじめとする各種豆類と納豆菌との相互作用を分子レベルで明らかにすることを目的とする。具体的には、各種豆類枯死体上での納豆菌の生育可否を調べる。生育可能な場合、納豆菌が各種豆類表面上で生育するプロセスにおいて、納豆菌が豆類のどの成分を認識し、分解・代謝することにより、独特の風味を醸し出すのかを遺伝子発現（トランスクリプトミクス）と代謝物変動（メタボロミクス）の解析に基づいて、分子レベルで明らかにする。さらに、発酵豆の食品機能性を評価し、新しい発酵豆の創製に資することを目指した。

実験方法

材料

納豆用小粒大豆（スズマル）、大粒大豆（トヨマサリ）、鞍掛豆、小豆、白小豆、青エンドウ、及び赤エンドウは豆平（志満屋商会）より、落花生は亀井商店より、キヌアはスーパーフードジャパンよりそれぞれ購入した。なお、本稿ではキヌアを含めた上記材料を各種豆類とする。

納豆菌と培養

納豆菌は、独立行政法人 製品技術評価基盤機構 生物遺伝資源センター（NBRC）より購入した *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (BBRC 16449) を用いた。Luria-Bertani (LB) 液体培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1% NaCl: pH 7.2）を用いて、納豆菌を 37°C で好氣的に前培養し、遠心分離により培養菌体（約 2.0×10^7 cells）を回収した。回収菌体を生理食塩水（0.85% NaCl）1 ml で洗浄し、再び遠心分離と生理食塩水 1 ml による懸濁を行い、

納豆菌溶液を調製した。

豆類上での納豆菌生育評価

各種豆類約 4 g を滅菌水で洗浄後、室温で 5 時間以上、滅菌水に浸漬した。残存水を廃棄した後、オートクレーブ処理により蒸し豆類を調製した。各種蒸し豆類に、納豆菌懸濁液 500 μ l を添加し混合した後、37°C で静置培養した。経時的に豆 1 粒を取り出し、生理食塩水 1 ml に懸濁し、懸濁液中の納豆菌数を LB 寒天培地で生育するコロニー数を計測することにより、豆 1 粒あたりの納豆菌数を算出した。さらに、豆を近似的に球と見なし、豆 1 粒の表面積を豆 1 粒の体積より求めた。なお、一定量の純水を入れたシリンダーに、一定数の各種豆類を添加し、その体積変化を計測することにより、各種豆類の 1 粒あたりの体積を算出した。

発酵豆のプレバイオティクス性

発酵豆のプレバイオティクス性を評価するため、プロバイオティクス乳酸菌として *Lactocaseibacillus rhamnosus* (NBRC 3425) を de Man-Rogosa-Sharpe 培地 (Becton, Dickinson and Company 製) を用いて、30°C で嫌気培養した。蒸し小粒大豆と納豆をそれぞれ-80°C で凍結した後、凍結乾燥 (IWAKI 製) を行い、ビーズ破砕機 (タイテック製) で粉砕した。粉末状試料の添加の有無が *L. rhamnosus* の生育へ及ぼす影響を調べた。なお、嫌気培養の際にはアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学製) を用いて、乳酸菌の生育は波長 600 nm における濁度 (OD₆₀₀) で評価した。

メタボローム解析

蒸し小粒大豆と蒸し鞍掛豆のそれぞれに、生理食塩水あるいは納豆菌懸濁液を加えよく混合し、37°C で 48 時間静置培養した。培養後、-80°C で凍結した後、凍結乾燥 (IWAKI 製) を行い、ビーズ破砕機 (タイテック製) で粉砕した。粉末状試料 30~50 mg をメタボローム解析に供した。なお、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析 (CE-TOF MS) による本解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社へ委託した。

トランスクリプトーム解析

蒸し鞍掛豆上で対数増殖期 (培養約 5 時間後) にある納豆菌を回収し、菌体よりホットフェノール法により RNA を抽出した。得られた RNA を RNAsequence (RNAseq) 解析に供した。RNA 抽出は株式会社日本遺伝子研究所に、RNAseq 解析は株式会社マクロジェン・ジャパンに委託した。

実験結果及び考察

納豆菌は各種豆類表面上に生育し、納豆に変化させる

蒸し操作を行った各種豆類 [納豆用小粒大豆 (スズマル)、大粒大豆 (トヨマサリ)、鞍掛豆、小豆、白小豆、青エンドウ、赤エンドウ、落花生、及びキヌア)] に対して、納豆菌を接種し、静置培養した。その結果、全ての豆類で粘性物質の生成が確認され、納豆に変化した。鞍掛豆の例を図1に示す。納豆菌無添加の鞍掛豆は容器を反転すると重力にしたがって落下するが (図1左)、納豆菌を添加して発酵させた鞍掛豆では粘性物質の生成により容器の底面に付着し、反転させても落下しなかった (図1右)。



図1. 納豆菌による鞍掛豆の性状変化 (静置培養後、容器を反転して撮影)

粘性物質の生成により、蒸し各種豆類表面上で納豆菌の生育が示唆された。そこで、各種豆類上での納豆菌の生菌数を測定した (図2)。各種豆類の大きさが異なるため、豆1粒あたりの納豆菌生菌数では若干のバラツキが認められる (図2左側の二つのグラフ)。一方、豆の表面積あたりに換算すると、納豆菌は、納豆用小粒大豆をはじめとして全ての豆類に同程度で良好に生育することが判明した (図2右側の二つのグラフ)。これは、細菌による植物への腐生作用に特異的な組み合わせが見られないことを裏付ける結果である。

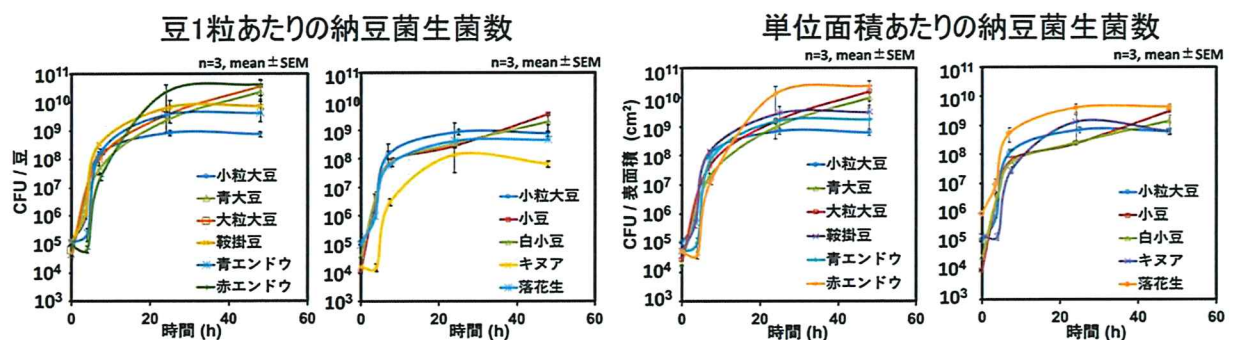


図2. 各種豆類上での納豆菌の生菌数 (左側二つ: 豆1粒あたり、右側二つ: 単位面積あたり)

蒸し大豆の納豆菌発酵によるプロバイオティクスの生育への影響

納豆のプレバイオティクス性を評価するため、プロバイオティクス乳酸菌の一種である *L. rhamnosus*⁵⁾ の増殖促進効果を調べた。具体的には、納豆菌を接種していない蒸し小粒大豆と納豆菌を接種し発酵させた納豆をそれぞれ調製し、凍結乾燥後の各粉末試料の存在下で、*L. rhamnosus* の生育を評価した。その結果、納豆菌無添加の小粒大豆粉末試料は、*L. rhamnosus* の生育を顕著に抑制した。一方、納豆の粉末試料ではその抑制効果が低減されたが、生育促進効果は認められなかった。本実験結果から、納豆菌による発酵がプロバイオティクス乳酸菌の生育促進に直接機能するわけではないが、素材大豆による生育阻害を緩和する効果があることが明らかになった。

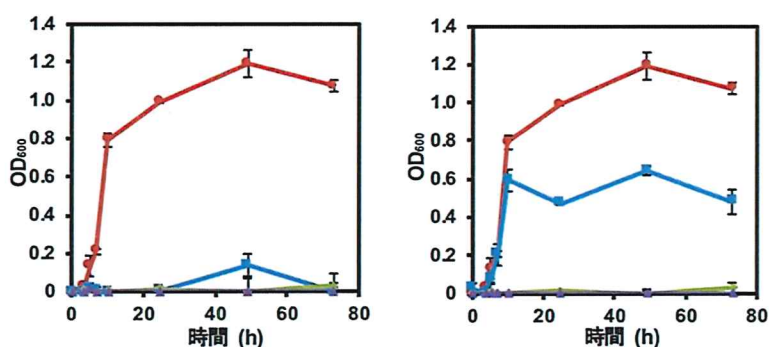


図 3. 粉末試料存在下でのプロバイオティクスの生育 (左: 蒸し小粒大豆、右: 納豆)

納豆菌発酵による小粒大豆と鞍掛豆の成分変化

各種発酵豆を試食したところ、鞍掛豆納豆が風味に優れていることがわかった。そこで、蒸し小粒大豆 [大豆 (-)]、蒸し小粒大豆+納豆菌発酵 [大豆 (+)]、蒸し鞍掛豆 [鞍掛豆 (-)]、蒸し鞍掛豆+納豆菌発酵 [鞍掛豆 (+)] の4種類の試料について、メタボローム解析により代謝産物 (約 400 種類の化合物) を網羅的に調べ、納豆菌の発酵作用による成分変動を明らかにした。

主成分分析の結果、納豆菌による発酵の有無の相違により、代謝産物が大きく区別されることがわかった。つまり、納豆菌を接種していない [大豆 (-)] と [鞍掛豆 (-)] は互いに近隣に位置するのに対し、納豆菌発酵した [大豆 (+)] と [鞍掛豆 (+)] はその位置から離れた箇所に互いに近接している (図 4 左)。また、階層的クラスタリング解析によるヒートマップ表示でも、納豆菌による発酵の有無が判別できることが示された。したがって、納豆菌による発酵により、豆の種類が異なっても、類似の代謝変動が生じることが示唆された。

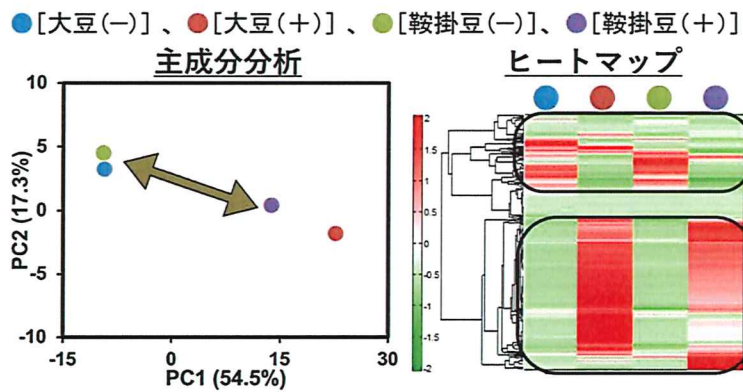


図 4. メタボローム解析 (左:主成分分析、右:ヒートマップ)

成分別に比較すると、納豆菌発酵した [大豆 (+)] と [鞍掛豆 (+)] では、納豆菌を接種していない [大豆 (-)] と [鞍掛豆 (-)] と比較すると、多くのアミノ酸とその代謝産物及び核酸塩基の各レベルが 10 から 1,000 倍程度にまで上昇していた。このことから、納豆菌が小粒大豆と鞍掛豆のタンパク質や DNA などの高分子物質を低分子レベルまで分解し、自身の生育に利用していることが示された。ナトリウム塩とリン酸塩がそれぞれ旨味成分となるグルタミン酸とイノシンの含量も納豆菌の発酵により増大していたことから、納豆の風味に関連していることが示唆された。

豆の種類による代謝変動に関して調べてみると、[大豆 (+)] と [鞍掛豆 (+)] との間では、アルギニン含量が [鞍掛豆 (+)] では [鞍掛豆 (-)] と比較すると顕著に減少し、オルニチン (尿素) 回路⁶⁾におけるアルギニンの代謝産物であるオルニチンやシトルリンの含量が増大していた (図 5)。**[大豆 (+)]** でもオルニチンやシトルリンの含量増大が認められるが、**[大豆 (-)]** と比較すると、アルギニンレベルも上昇している。したがって、鞍掛豆納豆では、アルギニンからオルニチンに代謝されるオルニチン回路が活発に作動していることが考えられる。

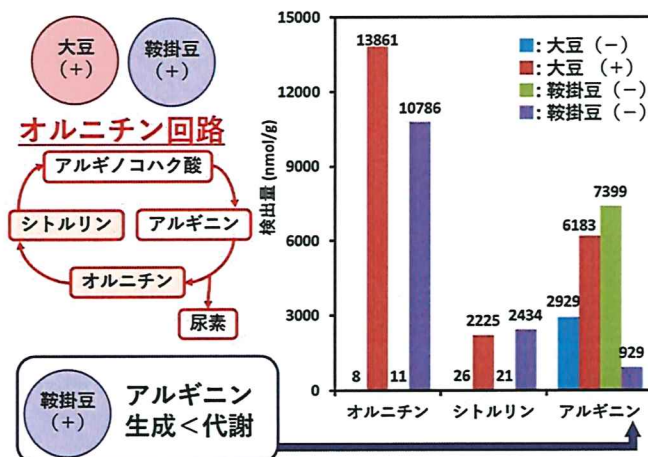


図 5. オルニチン回路(アルギニン代謝とオルニチン)

納豆菌の作用により、[大豆 (-)] と [鞍掛豆 (-)] の両者に存在していたコリンが、[大豆 (+)] と [鞍掛豆 (+)] では著しく減少し、ベタイン含量が増大していた。ベタインからメチオニンが合成されるが、[大豆 (+)] と [鞍掛豆 (+)] ではメチオニンレベルも上昇している。このことから、納豆菌は豆類の細胞膜に存在するコリン⁷⁾を標的としてメチオニン合成系⁸⁾を働かせていることが示唆された。

納豆菌の鞍掛豆への作用

これまでに、納豆菌が蒸し小粒大豆に作用する際の遺伝子発現変動を明らかにしている。納豆菌は、大豆の細胞壁成分であるペクチンの分子種ラムノガラクトuronan-I を栄養源の標的として、その分解、取り込み、及び代謝に関わる分子機構を誘導発現する²⁾。今回は、鞍掛豆への作用機構を明らかにするため、蒸し鞍掛豆上での納豆菌の遺伝子発現をRNAseqにより網羅的に解析し、これまでのデータ (LB 固体培地と蒸し小粒大豆上での遺伝子発現変動) と比較した。

LB 固体培地と比較して、小粒大豆と鞍掛豆で共通して、2 倍以上発現上昇する遺伝子は約 100 種類あり、その内 5 倍以上発現上昇する遺伝子は約 10 種類であった。5 倍以上発現上昇する遺伝子はバイオフィルムの形成に関わる遺伝子群が含まれており、豆類に作用する納豆菌は、バイオフィルムの合成を積極的に行う生存戦略を採っていると考えられる。一方、小粒大豆と鞍掛豆上での相違について調べたところ、小粒大豆に作用する際に顕著に誘導発現していたラムノガラクトuronan-I の分解、取り込み、及び代謝に関わる遺伝子群は、鞍掛豆上での納豆菌では発現上昇していないことがわかった。一方、コリンの取り込みに関わる遺伝子群が小粒大豆と比較して鞍掛豆上では著しく発現上昇していた。この結果は、メタボローム解析の結果とよく一致していた。

要約

納豆菌は、蒸した各種の豆類 [納豆用小粒大豆 (スズマル)、大粒大豆 (トヨマサリ)、鞍掛豆、小豆、白小豆、青エンドウ、赤エンドウ、落花生、及びキヌア] を栄養源として良好に生育し、粘性物質を産生することなどにより納豆化した。鞍掛豆納豆は優れた風味を示した。鞍掛豆上で生育する納豆菌は、鞍掛豆の細胞膜に存在するコリンをよい栄養源として積極的に取り込み、ベタインやメチオニンを産生していた。また、オルニチン回路を活発にしてアルギニンからオルニチンやシトルリンの生産量も増大していた。以上のことから、納豆菌の鞍掛豆への作用機構の一端が明らかになるとともに、鞍掛豆納豆の食品

としての有用性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団 様に厚くお礼申し上げます。また、実験を行った当研究室の皆様へ感謝いたします。

文献

- 1) Y. Kubo, A. P. Rooney, Y. Tsukakoshi, R. Nakagawa, H. Hasegawa, K. Kimura (2011) Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6463-6469.
- 2) H. Sugiura, A. Nagase, S. Oiki, B. Mikami, D. Watanabe, W. Hashimoto (2020) Bacterial inducible expression of plant cell wall-binding protein YesO through conflict between *Glycine max* and saprophytic *Bacillus subtilis*. *Sci. Rep.*, **10**, 18691.
- 3) J. Hacker, E. Carniel (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.*, **2**, 376-381.
- 4) K. H. Caffall, D. Mohnen (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **344**, 1879-1900.
- 5) D. Hill, I. Sugrue, C. Tobin, C. Hill, C. Stanton, R. P. Ross (2018) The *Lactobacillus casei* Group: History and health related applications. *Front. Microbiol.*, **9**, 2107.
- 6) V. M. Hernández, A. Arteaga, M. F. Dunn (2021) Diversity, properties and functions of bacterial arginases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **45**, fuab034.
- 7) S. H. Zeisel, M. H. Mar, J. C. Howe, J. M. Holden (2003) Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.*, **133**, 1302-1307.
- 8) C. G. Figueroa-Soto, E. M. Valenzuela-Soto (2018) Glycine betaine rather than acting only as an osmolyte also plays a role as regulator in cellular metabolism. *Biochimie*, **147**, 89-97.