

栄養源としての納豆菌が真核細胞における生命現象
に与える影響とその分子機構の解明

千葉工業大学 先進工学部 生命科学科

成田 隆明

納豆には機能性成分が豊富に含まれており、このような成分（＝物質）の機能性をより理解するため、現在も盛んに研究が進められている。納豆に含まれるナットウキナーゼ、ポリ- γ -グルタミン酸 (γ PGA)、ビタミン K₂ といった機能性成分は、血液凝固や骨形成への関与など、さまざまな機能性が確認されているが¹⁻³、納豆に含まれる成分として、納豆菌の存在も無視はできない。納豆菌も重要な「納豆という食品」の構成成分であるが、納豆菌そのものの機能性、すなわち、栄養源としての納豆菌の摂取がからだに与える分子レベルでの効果というのは、ほとんど研究が進んでいない。納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) を仔牛や鳥に摂取させることで、その成長や免疫力、腸内フローラの形成に良い影響を与えるなど、プロバイオティクスとしての *B. subtilis natto* に関する報告はいくつかあるが⁴⁻⁶、「栄養源としての *B. subtilis natto*」が生命現象やそれに関わる代謝システムにどのような影響を与えるのか、分子レベルではほとんど分かっていない。

細胞性粘菌は、他のバクテリアを捕食しながら単細胞アメーバとして生息しているが、飢餓状態になると単細胞アメーバが集合して多細胞体となり、最終的に柄と胞子の細胞に分化して子実体を形成する。この一連の発生過程は、24 時間という極めて短時間で完了する⁷。また、細胞性粘菌はヒトと同じ真核生物であるため、ヒト相同遺伝子も数多く有しており、一次代謝経路もヒトと共通している点が多い。加えて、細胞性粘菌アメーバは「納豆菌のみ」を捕食して生存することが可能であることから、栄養源としての納豆菌が真核細胞の代謝システムなどに与える影響を解析するための非常に優れたモデルとなる。

そこで本研究では、細胞性粘菌に *Bacillus subtilis natto* を唯一の栄養源として捕食させた際に現れる変化に着目し、栄養源としての *B. subtilis natto* の摂取が真核細胞の生命現象に与える影響を明らかにしたのち、その分子機構の解明を目指す。

【実験方法】

1. 細胞性粘菌及びバクテリア

本研究では、3 種類の細胞性粘菌を使用した。*Polysphondylium violaceum* QSvil1 と *Dictyostelium purpureum* (Kay lab strain) は、5LP (0.5%ラクトース、0.5%ペプトン) 寒天培地で *Klebsiella aerogenes* とともに 22°C で二員培養した。*Dictyostelium discoideum* Ax2 は、HL-5 (Formedium, Hunstanton, UK) を用いて 22°C で無菌培養を行なった。*Bacillus subtilis natto* BEST195 はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP *Bacillus subtilis*)、納豆非生産性 *B. subtilis* は齊藤玉緒教授 (上智大学) よりご提供いただき、通常は LB 寒天培地を用いて 37°C で培養した。

2. 納豆菌を栄養源とした細胞性粘菌の形態形成の観察

非発酵条件として 1LP (0.1%ラクトース、0.1%ペプトン) または 5LP 寒天培地を、発酵条件として 1LPP (0.1%ラクトース、0.1%大豆ペプトン)、5LPP (0.5%ラクトース、0.5%大豆ペプトン)、1GPP (0.1%グルコース、0.1%大豆ペプトン) または 5GPP (0.5%グルコース、0.5%大豆ペプトン) 寒天培地を用いて、*B. subtilis natto* BEST195 を 37°C で 24 時間培養した。その後、*B. subtilis natto* BEST195 を培養した各寒天プレートの中央に細胞性粘菌の単細胞アメーバをスポットすることで、*B. subtilis natto* BEST195 を捕食させた。スポットから 2~3

日後、*B. subtilis natto* BEST195 を補食し終えて飢餓状態になり、発生した各細胞性粘菌種の子実体を実体顕微鏡により観察した。コントロールとして、納豆非生産性 *B. subtilis* を用いて同様の実験を行なった。

3. メナキノン-7 が細胞性粘菌に与える影響の検証

D. discoideum Ax2 または *P. violaceum* QSvi11 の対数増殖期における単細胞アメーバを回収し、 KH_2PO_4 緩衝液 (16.5 mM KH_2PO_4 /3.9 mM K_2HPO_4) を用いて 3 回洗浄することで飢餓処理を行ない、100 μM メナキノン-7 (MK-7) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) を含む無栄養寒天上に 1×10^6 cells/cm² の細胞密度で発生させた。また、増殖期における MK-7 が細胞性粘菌の発生過程に与える影響を調べるため、*D. discoideum* Ax2 を 10 μM または 100 μM MK-7 を含む HL-5 を用いて振盪培養し、対数増殖期 ($3\text{--}5 \times 10^6$ cells/mL) で単細胞アメーバを回収し、洗浄後、無栄養寒天上で 1×10^6 cells/cm² の細胞密度で発生させた。

MK-7 が *D. discoideum* Ax2 の細胞増殖に与える影響を検証するため、10 μM または 100 μM MK-7 を含む 30 mL の HL-5 中に *D. discoideum* Ax2 の単細胞アメーバを 1×10^5 cells/mL となるように懸濁させ、22°C、150 rpm で振盪培養した。振盪培養は、MK-7 の分解を防ぐために遮光条件下で行なった。12 時間ごとにヘモサイトメーターを用いて細胞数をカウントし、MK-7 存在下における *D. discoideum* Ax2 の増殖曲線を作成した。

【実験結果及び考察】

<納豆菌を唯一の栄養源とした細胞性粘菌における子実体の観察>

非発酵条件下または発酵条件下で培養した *B. subtilis natto* BEST195 及び納豆非生産性 *B. subtilis* を唯一の栄養源として細胞性粘菌アメーバに補食させ、その各細胞性粘菌アメーバが形成する子実体の様子を観察した。細胞性粘菌には *D. discoideum* Ax2、*D. purpureum* (Kay lab strain)、*P. violaceum* QSvi11 の 3 種を使用した。

B. subtilis natto BEST195 と納豆非生産性 *B. subtilis* (以下、*B. subtilis* とする) を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 では、子実体における孢子塊の色及び孢子塊の大きさに違いが生じることが分かった (図 1)。非発酵条件下で培養した *B. subtilis natto* BEST195 や *B. subtilis* を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 の子実体と比べ、発酵条件下 (1LPP 寒天培地) で培養した *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 の子実体では、孢子塊がより大きくなることが分かった。また、発酵条件下 (1LPP 及び 5LPP 寒天培地) で培養した *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 の子実体は、孢子塊の色が通常より薄くなる様子が観察された。

D. purpureum では、孢子塊の大きさに違いが観察された (図 2)。非発酵条件下で培養した *B. subtilis natto* BEST195 や *B. subtilis* を栄養源とした *D. purpureum* の子実体と比べ、発酵条件下 (特に、5LPP 及び 5GPP 寒天培地) で培養した *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. purpureum* の子実体で、より大きな孢子塊を形成することが分かった。

P. violaceum QSvi11 では、子実体の孢子塊の大きさに加え、枝分かれ構造 (side branch) の形成に違いが生じた (図 3)。非発酵条件下で培養した *B. subtilis natto* BEST195 や *B. subtilis* を栄養源とした *P. violaceum* QSvi11 の子実体と比べ、発酵条件下で培養した *B.*

subtilis natto BEST195 を栄養源とした *P. violaceum* QSvi11 では子実体の孢子塊がより大きくなると同時に、side branch 形成能が高くなることが分かった。

以上の結果から、発酵条件で培養された *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした細胞性粘菌は、同条件で培養された *B. subtilis* を栄養源とした場合と比べ、その子実体形成に明確に変化が見られることが分かった。特に、「*P. violaceum* QSvi11 における side branch 形成能」に顕著な変化が見られたため、今回使用した3種の細胞性粘菌のうち、*P. violaceum* QSvi11 は今後の分子レベルでの解析に用いる種として有力な候補となる。

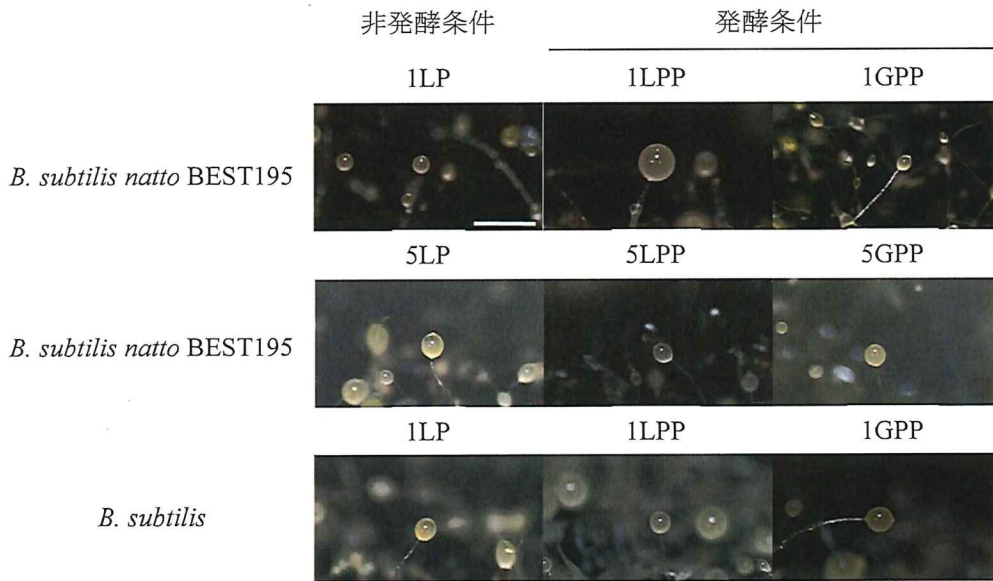


図 1. *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 の子実体
スケールバー: 500 μ m

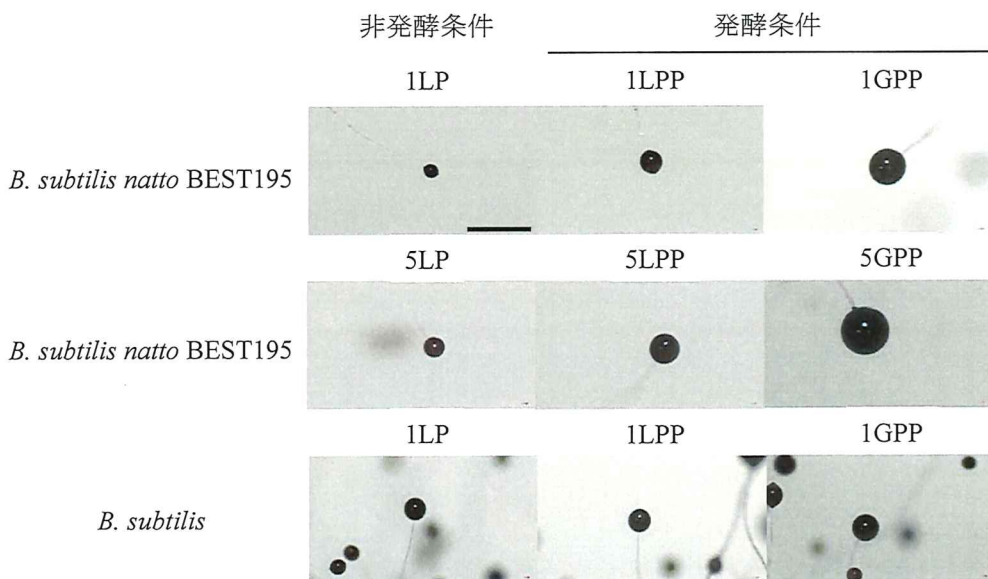


図 2. *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. purpureum* の子実体
スケールバー: 500 μ m

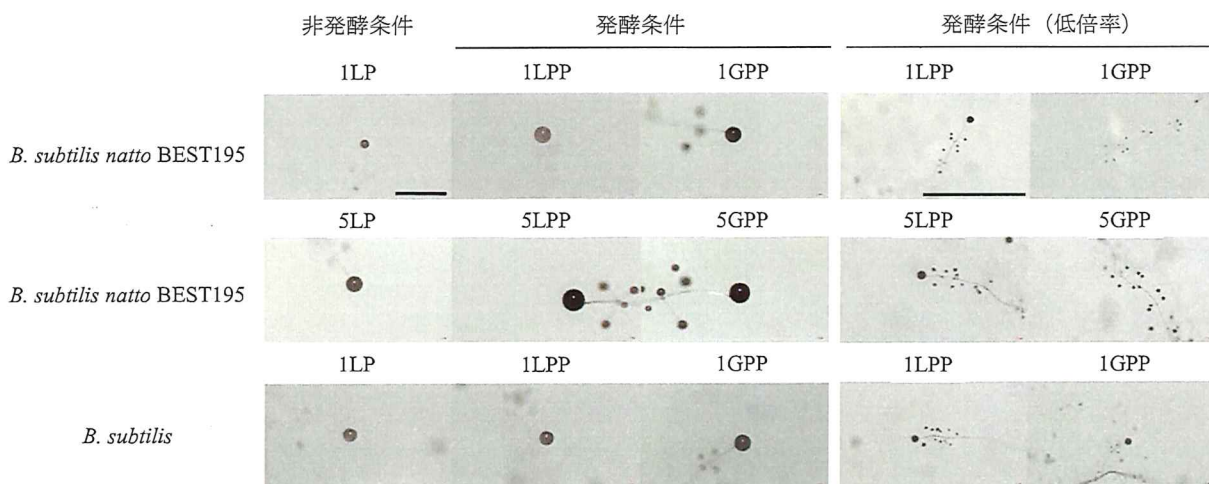


図 3. *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *P. violaceum* QSVi11 の子実体
スケールバー: 500 μ m

<メナキノロン-7 が *D. discoideum* Ax2 に与える影響の検証>

「栄養源」としての納豆菌が細胞性粘菌（真核細胞）の生命現象に与える影響を厳密に特定するためには、納豆菌が産生する機能性成分の影響についても理解する必要がある。そこでまずは、最も広く研究に用いられており、発生・分化のモデル生物として知られている *D. discoideum* Ax2 を用いて、納豆菌が産生する機能性成分の一つであるメナキノロン-7 (MK-7) が発生過程や細胞増殖に与える影響を検証した。

その結果、100 μ M MK-7 存在下では、*D. discoideum* Ax2 が形成する子実体の数が増える傾向が観察された。これは、MK-7 の存在によって細胞の集合範囲が狭くなった結果と考えられる。また、100 μ M MK-7 存在下で形成される *D. discoideum* Ax2 の子実体は、胞子塊が小さくなる傾向が見られた (図 4A)。さらに、*D. discoideum* Ax2 は発生中期である移動体期において、子実体形成に適した環境条件を求めて移動する性質をもつが、100 μ M MK-7 存在下では移動体がほとんど動き回らない傾向が見られた (図 4B)。これら結果から、*D. discoideum* Ax2 においては、MK-7 は子実体形成（細胞集合、細胞分化）や移動体の運動性に影響を与えることが示唆された。

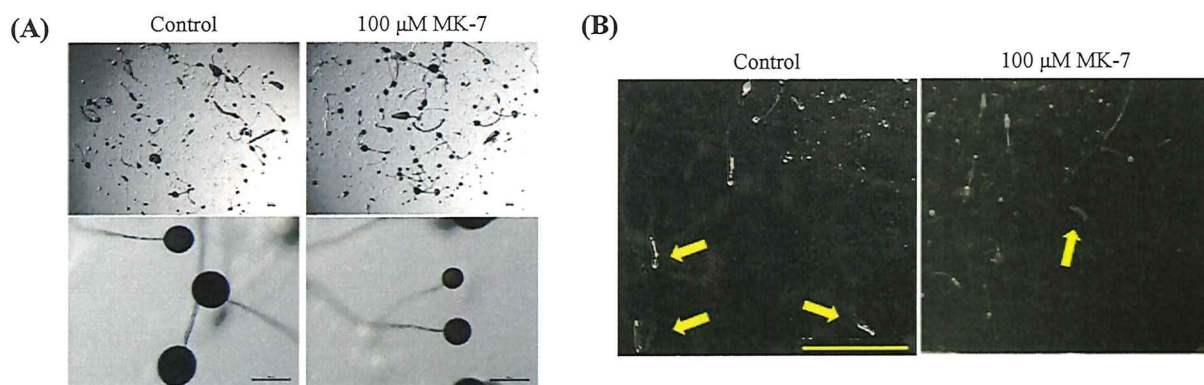


図 4. MK-7 が *D. discoideum* Ax2 の発生過程に与える影響
(A)子実体 (B) 発生中期 (矢印は移動体を示す)、スケールバー: 200 μ m

続いて、増殖期における MK-7 の存在が *D. discoideum* Ax2 の発生過程にどのような影響を与えるのかを検証するため、*D. discoideum* Ax2 を 10 μ M または 100 μ M MK-7 存在下で振盪培養した後、MK-7 非存在下で発生させた。その結果、MK-7 存在下で培養された *D. discoideum* Ax2 では、形成される子実体の数が少なくなると同時に、柄の根元部分に細胞塊のようなものが残ってしまう様子が観察された (図 5A)。なお、MK-7 は *D. discoideum* Ax2 の細胞増殖にも影響を与え、MK-7 存在下では定常期における細胞密度が低下することが分かった (図 5B)。

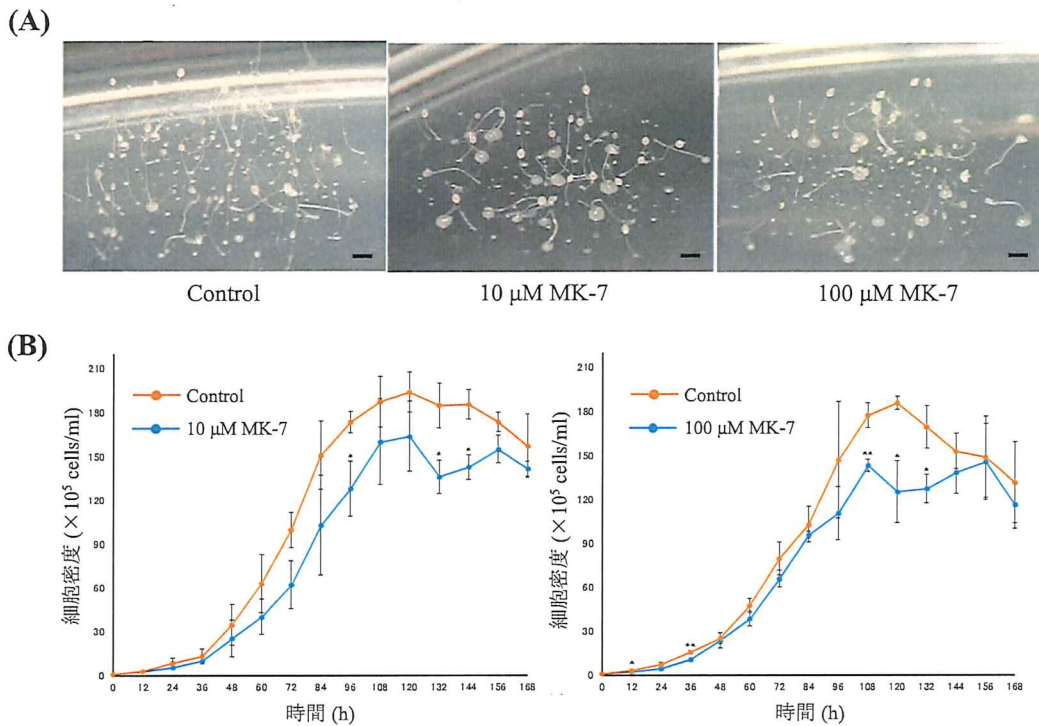


図 5. 増殖期における MK-7 が *D. discoideum* Ax2 の発生過程と細胞増殖に与える影響
(A) 子実体 (スケールバー :500 μ m)、(B) 細胞増殖曲線 (* p <0.05, ** p <0.01)

以上の結果から、*D. discoideum* Ax2 においては、MK-7 は細胞増殖や細胞分化、細胞集合に影響を与えられ。しかしながら、MK-7 存在下で見られる変化 (形成される子実体の数が変化する、柄の根元部分に細胞塊が残る) は、発酵条件で培養した *B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *D. discoideum* Ax2 で観察される変化 (胞子塊が大きくなり、色が薄くなる) とは異なっている。したがって、図 1 で確認された結果は、*B. subtilis natto* BEST195 が産生した MK-7 による影響ではないと考えられる。

<メナキノン-7 が *P. violaceum* QSvi11 の発生過程に与える影響の検証>

図 3 の結果から、*B. subtilis natto* BEST195 を栄養源とした *P. violaceum* QSvi11 では、*B. subtilis* を栄養源とした場合と比較して side branch 形成能に顕著な違いが見られた。そこで、この変化が「*B. subtilis natto* BEST195 を栄養源としたこと」によって引き起こされることを証明する第一歩として、MK-7 が *P. violaceum* QSvi11 の発生過程に与える影響を検

証した。その結果、MK-7 存在下における *P. violaceum* QSvi11 は、細胞集合の範囲が狭くなり、形成される子実体の数が多くなった (図 6)。これは、*D. discoideum* Ax2 における結果 (図 4A)と同じような結果であった。一方で、MK-7 存在下における *P. violaceum* QSvi11 の子実体では side branch 形成能に変化は見られなかったことから、図 3 の結果は、*B. subtilis* natto BEST195 が産生した MK-7 の影響によるものではないと考えられる。

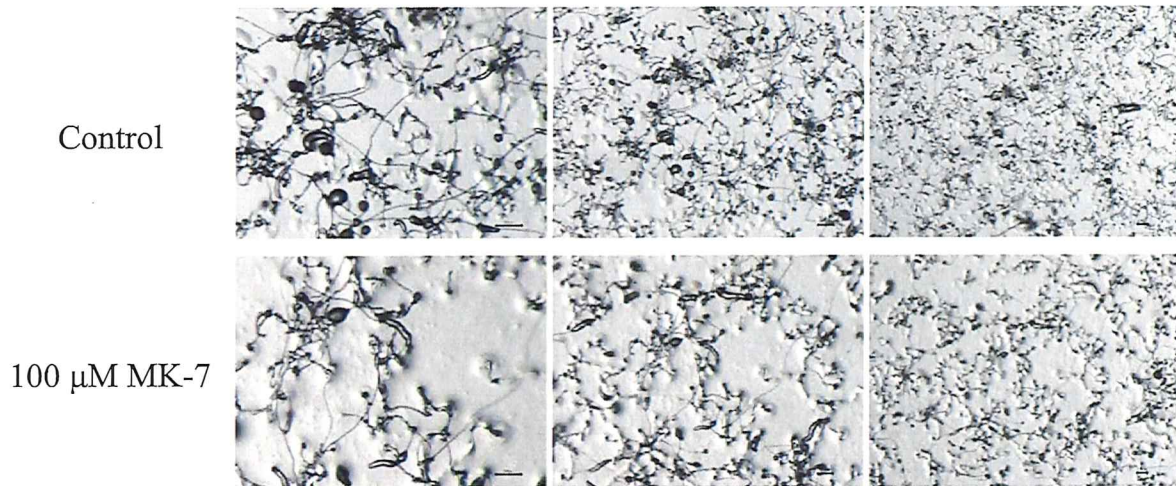


図 6. MK-7 が *P. violaceum* QSvi11 の発生過程に与える影響
スケールバー: 100 μ m

本研究により、発酵条件で培養した *B. subtilis* natto BEST195 を栄養源とした *P. violaceum* QSvi11 では side branch 形成能に顕著な変化が見られたこと、そしてこの変化は MK-7 による影響ではないことが示唆された。これらの結果を踏まえ、今後は *P. violaceum* QSvi11 に焦点を当て、納豆に含まれる他の機能性成分 (ナットウキナーゼや γ PGA)が *P. violaceum* QSvi11 に与える影響を検証したのち、納豆菌を栄養源とした真核細胞 (*P. violaceum* QSvi11)の細胞内で生じる分子レベルでの変化を解析してゆく予定である。

【要約】

栄養源としての納豆菌が真核細胞の生命現象に与える影響を明らかにするため、真核微生物である細胞性粘菌に *B. subtilis* natto を補食させることで、細胞性粘菌の子実体形成に現れる変化を観察した。その結果、本研究で用いた 3 種の細胞性粘菌すべてにおいて、納豆非生産性 *B. subtilis* や非発酵条件で培養した *B. subtilis* natto BEST195 を栄養源とした細胞と比較して、発酵条件で培養した *B. subtilis* natto BEST195 を栄養源とした細胞が形成する子実体に (粘菌種によって異なるものの)変化が確認された。*D. discoideum* Ax2 と *P. violaceum* QSvi11 における MK-7 の影響を調べたところ、MK-7 は細胞性粘菌の細胞増殖や細胞集合、細胞分化に影響を与えることが示唆されたが、*B. subtilis* natto BEST195 を栄養源とした際に見られた子実体の変化は確認されなかった。このことから、発酵条件で培養した *B. subtilis* natto BEST195 を栄養源とした細胞で見られた子実体形成の変化は、納豆菌が豊富に産生することで知られる MK-7 の影響によるものではないと考えられる。今後は、

ナットウキナーゼや γ PGA などが細胞性粘菌に与える影響も検証したのち、「納豆菌を栄養源とすること」によって変化が生じる生命現象を明確に特定し、その分子機構解明に向けて、分子レベルでの解析を行ってゆく。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成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ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

【文献】

1. Yamaguchi M, Taguchi H, Gao YH *et al.* Effect of vitamin K2 (menaquinone-7) in fermented soybean (natto) on bone loss in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 1999;17(1):23-9. doi: 10.1007/s007740050059.
2. Kurosawa Y, Nirengi S, Homma T *et al.* A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. *Sci Rep* 2015;5:11601. doi: 10.1038/srep11601.
3. Lee SW, Park HJ, Park SH *et al.* Immunomodulatory effect of poly- γ -glutamic acid derived from *Bacillus subtilis* on natural killer dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443(2):413-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.
4. Sun P, Wang JQ, Zhang HT. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *J Dairy Sci* 2010;93(12):5851-5. doi: 10.3168/jds.2010-3263.
5. Sheng-Qiu T, Xiao-Ying D, Chun-Mei J *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* natto on Growth Performance in Muscovy Ducks. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2013;15:191-197.
6. Ruiz Sella SRB, Bueno T, de Oliveira AAB *et al.* *Bacillus subtilis* natto as a potential probiotic in animal nutrition. *Crit Rev Biotechnol* 2021;41(3):355-369.
7. Kessin RH. *Dictyostelium: evolution, cell biology, and the development of multicellularity.* Cambridge University Press, 2001.