技術解説

納豆菌（枯草菌）の遺伝育種

― 高付加価値納豆の開発 ―

Molecular Breeding of *Bacillus subtilis* (Natto)
― Product Development of Fine Natto ―

安藤　記子
Ando Noriko

糸引き納豆は日本古来の伝統食品であり，最近では様々な健康機能が明らかにされ，健康食品としても注目されている。しかし，糸引き納豆は独特の臭いを有し，この臭いが原因で納豆を食さない人が多く存在する。我々は，納豆臭の原因となる揮発性代謝成分のうち，短鎖分岐脂肪酸に着目し，短鎖分岐脂肪酸の非生産納豆菌を遺伝子工学的技術を用いて効率的に育種した。その後，遺伝子工学的技術を用いて育種した菌の特徴を利用し，従来の菌育種技術を用いて低臭納豆製造に適した納豆菌を育種した。

Fermented-soybeans (natto) is traditional food in Japan and can contribute to good health. But, there are many people who dislike natto because of its distinctive smell. Our objective was to produce a light-smell natto, especially branched short-chain fatty acids (BCFAs) non-producing natto bacteria. We constructed a mutant strain which lacked leucine-dehydrogenase using insertion mutation. Finally we were able to use fewer BCFAs to produce natto bacteria in the traditional method.

キーワード：短鎖分岐脂肪酸，低臭納豆，ゲノム解析，遺伝子相同組換え，遺伝子破壊

1　低臭納豆開発の背景

1.1　納豆の嗜好性

糸引き納豆は日本古来の伝統食品である。最近では，骨粗鬆症・脳梗塞・心筋梗塞等に対する予防機能が明らかにされ，健康食品としても注目されている。近年の健康ブームも後押しし，納豆の市場は1997年には1,659億円であったものが，2005年には2,005億円（家庭向け市場のみ）と大きく成長しており，その注目度が窺える。

しかし，納豆は非常に好き嫌いがはっきりしている食品ともいえる。納豆に関する嗜好性の調査によると，東日本にくらべて西日本では納豆が「嫌い」「非常に嫌い」と答える人が多く，納豆の好き嫌いには地域性があることがわかる。また，納豆が嫌いな理由としては「臭いが嫌い」が第1の理由として挙げられており，そのほかに「ネバネバするから嫌い」「息に臭いが残る」というような理由が挙げられている。一方で，納豆が好きな理由においては「健康によいから」と挙げる人が多い。これらのことから考えると一般消費者が納豆を食する際には，納豆自身の持つ「おいしさ」よりも，納豆にまつわる健康情報の方に関心があることがわかる[1)]。

そこで，我々は納豆の健康機能を保持したままで，臭いの少ない納豆の開発を目指し，低臭納豆の製造に適した納豆菌を育種することとした。

1.2　ゲノム解析と低臭納豆製造菌の育種

納豆臭（納豆の揮発性代謝産物）の原因としては，アセトイン・ジアセチル，短鎖分岐脂肪酸，アンモニア，ピラジン類等が報告されており，これらの混合により納豆臭は成り立っている。納豆の代表的な揮発性代謝産物について，その特徴とともに図1に示した。過去にも低臭納豆をうりにした納豆は開発されてきたが，従来の低臭納豆においてはアンモニアの発生しにくい納豆菌の開発に勢力がつぎ込まれてきた。われわれは納豆の揮発性代謝成分のうち，「不精香・嫌な臭い・ムレ臭」とされる短鎖分岐脂肪酸，特にイソ酪酸，イソ吉草酸，2－メチル酪酸に着目した。

●アセトイン系
（アセトイン，ジアセチル，ブタンジオール）
→ 納豆らしい臭い。さわやかな臭い。

●短鎖分岐脂肪酸
（イソ酪酸，イソ吉草酸，2－メチル酪酸）
→ 不精香。嫌な臭い。ムレ臭。

●アンモニア
→ ツンとする臭い。過発酵時に生成。

図1　納豆の揮発性代謝産物

12-15技術解説.indd　12　　2006/12/13　2:40:22

近年，生物の設計図といわれるゲノム解析が多種の生物において進められており，2003年に「ヒトゲノム配列解読完了」の報告がされたことは記憶に新しい。微生物におけるゲノム解析に関していうと，初期にそのゲノム配列が解読された微生物に枯草菌（*Bacillus subtilis*）がある。納豆菌は，枯草菌の中で納豆製造能を有する菌の俗称であり，そのゲノム配列は酷似している。そこで，短鎖分岐脂肪酸の非生産菌を，1997年に公的データベースとして公開された枯草菌ゲノム情報を利用し，遺伝子工学的技術（遺伝子相同組換え技術）を用いて効率的に育種することとした。つまり，イソ酪酸，イソ吉草酸，2－メチル酪酸の生成に関与する酵素（タンパク質）を規定する遺伝子（ロイシン脱水素酵素をコードする遺伝子：*yqiT*）をターゲットとして，その機能を破壊することによって低臭納豆製造に適した納豆菌を育種することを目的とした。（図2）

2 高付加価値納豆菌育種と遺伝子機能の破壊

2.1 遺伝子相同組換えとは？

低臭納豆製造に適した納豆菌の育種に際し，遺伝子の「相同組換え」という現象を大いに利用している。相同組換え（homologous recombination）とは，DNA組換え機構のことをいい，DNAの塩基配列が同じか非常に類似している二つのDNAの間で起こる組換えのことをいう（図3）。人工的に相同組換えを行う場合には，標的とする遺伝子の配列と相同なDNA配列を有するDNA断片を取得し，菌の中に導入する。この人工的に作成したDNA断片がゲノム上の相同なDNA配列を有する領域との組換えを起こすことにより，標的遺伝子の機能を破壊することができる。これらの技術は微生物の育種だけでなく，高等動物においてはトランスジェニック・マウスの作製にも用いられる。

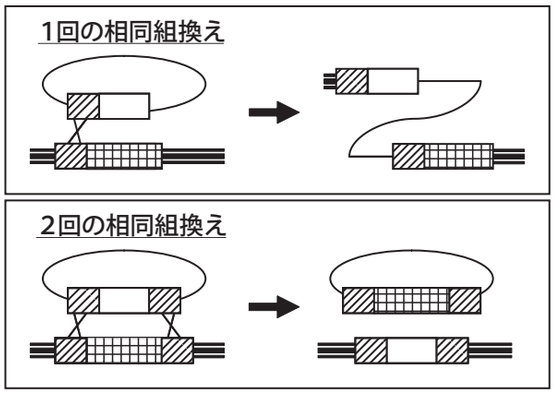

図3　相同組換えによる遺伝子置換の概念図

2.2 短鎖分岐脂肪酸生成に関与する遺伝子のターゲティング（組換え菌の育種）

図2に示すように，ロイシン脱水素酵素は，ロイシン，イソロイシン，バリンといった分岐アミノ酸から短鎖分岐脂肪酸の生成に関与する酵素であり，*yqiT*はロイシン脱水素酵素をコードする遺伝子である。そこで我々は，*yqiT*遺伝子の一部の配列を組み込んだ人工的に作製したベクターと呼ばれるDNA配列（遺伝子破壊用ベクター）を用いて，*yqiT*を相同組換え法により納豆菌ゲノム内で破壊した（図4）。この*yqiT*遺伝子破壊株で納豆を試作したところ，いわゆる「納豆臭のしない」納豆を製造することができた。これは，試作した納豆に短鎖分岐脂肪酸の生成量が少なかったためであり[2]，当初の予想通りの結果を得ることができた。しかし，こうして育種された菌は外来遺伝子（本来，納豆菌のゲノム配列に含まれない遺伝子・DNAのこと）を含む遺伝子組換え菌である。

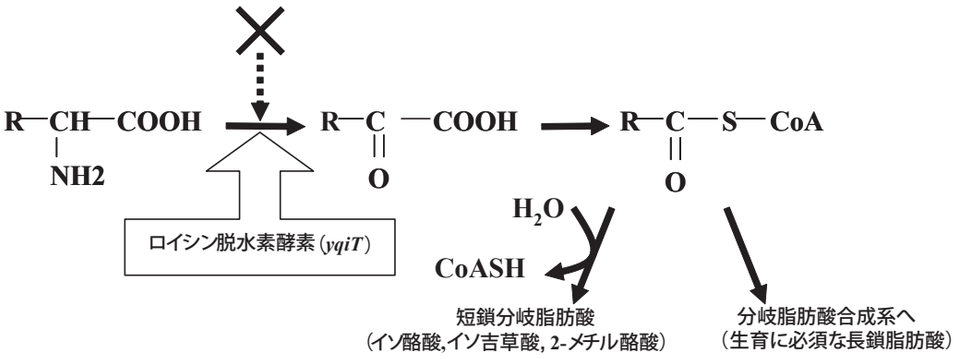

図2　短鎖分岐脂肪酸の生成

12-15技術解説.indd　13　　2006/12/13　2:40:23

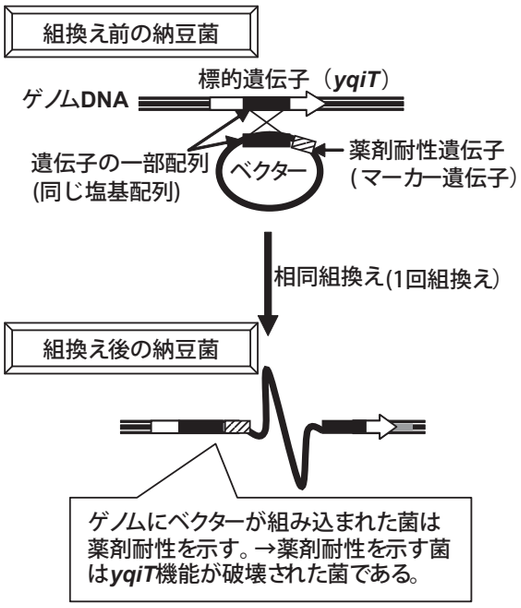

図４　相同組換えによる遺伝子破壊（外来遺伝子含む）

2.3　遺伝子工学的技術を用いた外来遺伝子を含まない菌の育種（非組換え菌の育種）

そこで，ロイシン脱水素酵素遺伝子破壊株を，遺伝子組換え菌でない，すなわち「外来遺伝子を含まない」ように育種することとした。図５に示すように遺伝子破壊用ベクターを構築し，納豆菌ゲノム内の遺伝子内部配列を脱落させた[2)]。遺伝子の内部配列を脱落させるということは，その遺伝子自体が完全な構造を持たないということとなり，そこから合成される酵素は完全な構造を有さなくなる。このことにより，酵素の活性を欠損させることが可能となる。図５には例として，遺伝子内部配列を脱落させる手法の概念図を２種類掲載したが，方法はこれらに限られるものではない。この手法においても，遺伝子相同組換えの現象が効率的に利用されている。こうして育種したロイシン脱水素酵素脱落株B2株を用いて納豆を試作したところ，B2株を用いて作成した納豆は，親株よりも短鎖分岐脂肪酸の生成量が少なく，官能検査の結果からも，「臭いの少ない納豆である」と評価された。

2.4　従来の育種技術を用いた菌の育種

ここで育種されたB2株は外来遺伝子を含まない非遺伝子組換え株であるが，当時の社会状況から，組換え技術を用いて育種した菌を用いて製造した納豆は，パブリックアクセプタンスが得られない可能性が大きいため，*yqiT*の変異株を従来の育種法である人工変異導入法で得ることとした。これは，従来の育種技術を用いてはいるが，

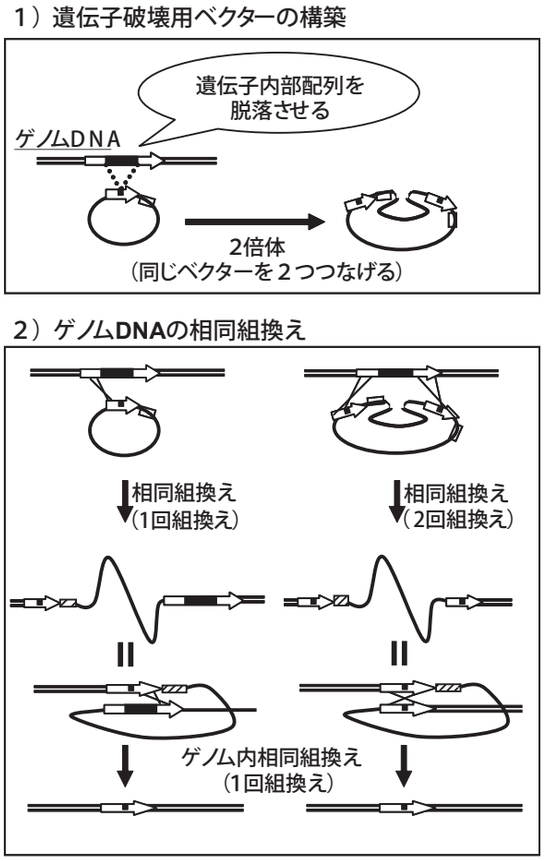

図５　相同組換えによる遺伝子破壊（外来遺伝子含まない）

やみくもに低臭納豆に適した菌を探索するのではなく，菌のもつ特徴（ロイシン脱水素酵素活性が低いもしくは無い）に着目してスクリーニングを行っているため，効率的に我々の目的とする菌を獲得することができた。具体的には，完全栄養培地上では生育できるが，短鎖分岐脂肪酸を含まない培地上で生育することができない納豆菌を選択した。これは，納豆菌が生育に短鎖分岐脂肪酸を必要とするため，ロイシン脱水素酵素活性が低いもしくは無い納豆菌は，自ら分岐アミノ酸を分解して短鎖分岐脂肪酸を合成することができないという特徴に着目したということである。この人工変異法で得られた変異株N64株は，ロイシン脱水素酵素活性を失っており，N64株を用いて製

12-15技術解説.indd　14　　2006/12/13　2:40:24

造した納豆は，やはり「納豆臭のしない」納豆であった。

3 低臭納豆への評価

このようにして，従来から存在したアンモニア臭を低減した低臭納豆とは異なる新規な低臭納豆を製品化することが可能となった。現在，このN64株を用いて製造した納豆は，（株）ミツカンから「金のつぶ におわなっとう」として市販されるに至っている。筆者自身，もともと納豆を食べることができなかったが，その後も納豆を食べられるようにはなっていない。納豆に対する先入観によるものであるとは思うが，その「見た目」がどうも苦手なようである。一般消費者においても，もともと納豆は食しているがその臭いが苦手だったユーザーや，食べた後の口臭が気になるユーザーからの支持を受けているようであり，元来納豆を食さなかった人だけでなく，広く市場に受け入れられたようである。

また，この低臭納豆の技術的な評価としては，平成17年度日本醸造協会技術賞を受賞したことから[3]，発酵醸造分野において高い評価をいただいたと感じている。

4 遺伝子組換え技術の今後

本技術により，枯草菌の相同組換え法を用いた育種法が実用納豆菌においても利用が可能であることが示され，納豆菌の育種改良が効率よく実施できるようになったといえる。

今回，遺伝子組換え技術の中でも，食品微生物における応用技術について紹介した。最終的に，商品に利用された微生物は遺伝子組換え技術を用いた菌ではなく，その開発過程において遺伝子組換え技術を用いているのみである。遺伝子組換え食品を取り巻く状況としては，現在，海外では商業的作付けがなされているものの日本では行われておらず，遺伝子組換え食品の安全性に関する議論については，今後も続くと思われる。

バイオテクノロジーとは「Bio＋Technology」であり，元来「生物の機能を利用した技術」のことを指す。日常生活になじみの深い清酒醸造・アミノ酸発酵・食酢発酵といった「発酵技術」は古くから利用されてきているバイオテクノロジーである。近年盛んな遺伝子組換え技術は，このバイオテクノロジーに革新的な進歩をもたらした技術である。クローン技術，ES細胞，遺伝子治療などは，読者にも聞き及んだ言葉であると思われるが，その技術的利用に関しては大きな期待がされるものの，同時に大きな倫理的問題を引き起こす可能性を含んでいる。

では，技術士として，バイオサイエンス・バイオテクノロジーにおける技術倫理についてどのように考えていくべきか？ 現状については参考文献[4] を参照されたい。我々は，バイオテクノロジーにおける倫理的・法的・社会的問題点について適正な情報を収集し，それらについて真摯に考え，不適正な利用が行われないよう日々取り組んでいく必要があると考える。

本技術解説は，筆者が（株）中埜酢店（現ミツカングループ本社）在社中に携わった研究開発について述べたものである。筆者が退社後にもかかわらず，快く本技術解説執筆をご許可いただいた（株）ミツカングループ本社に深く感謝する。

＜引用文献＞

1）高増雅子：納豆についての一考察－地域性と健康意識について―国際学院埼玉短期大学研究紀要，Vol.20，pp.121-130，1999

＜参考文献＞

2）竹村浩，安藤記子，塚本義則：短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への利用，日本食品科学工学会誌，Vol.47，pp.773-779，2000
3）竹村浩，安藤記子，塚本義則：低臭納豆の開発，平成 17 年度日本醸造学会大会講演要旨集，pp.18-19，2005
4）石井一夫，矢田美恵子：バイオサイエンス，バイオテクノロジーにおける技術倫理，『技術士』 日本技術士会創立 55 周年記念特集号，pp.44-47，2006

安藤　記子（あんどう　のりこ）
技術士（生物工学部門）

北里大学大学院医療系研究科
医学専攻博士課程

12-15技術解説.indd　15　　2006/12/13　2:40:25