




納豆菌の耐熱性・薬剤耐性

本研究は、平成 21(2009)年度日本農芸化学会大会(開催地福岡)での「ジュニア農芸化学会」において“優秀賞”に選ばれた。わが国の代表的な発酵食品である納豆の製造に使用される納豆菌を対象として、その熱や薬剤に対する挙動を解析することにより、微生物がその生活環において異なる細胞形態をとる生理的意義、ならびに微生物を殺菌する場合の問題点を考察した研究である。

 本研究の目的、方法および結果(講演要旨集を部分的に改変して記載した)

【緒論】 わが国の代表的な発酵食品の一つである納豆は、蒸煮大豆を、同じく加熱処理した藁に包んで製造される。これは、藁に付着している細菌のうち、熱に強い耐性胞子をつくる納豆菌だけが残存する現象を利用して、納豆菌は、グラム陽性細菌である枯草菌(*Bacillus subtilis*)の一種(*B. subtilis* (*natto*))であり、熱に抵抗性を示す耐熱胞子をつくる。この生命力の強い納豆菌の性質を理解するため、納豆菌の様々な状態での耐熱性の強さや、アルコールなど化学物質に対する耐性について調べた。

【方法】

〈納豆培地の作製〉スキムミルク 2g を滅菌水 400 ml に溶解させた培地(納豆培地)に寒天 8g を加え、加熱溶解した後、シャーレに分注した〔納豆(平板)培地〕。一日放置し、雑菌汚染のないことを確認した。

〈納豆菌の植菌と計測〉市販納豆 2 粒を 40 ml の滅菌水中で攪拌して得られた液を原液とし、その 1,000 倍希釈液を A 液とした。A 液 100 μ l を納豆(平板)培地に塗布し、35 $^{\circ}$ C で 2 日間培養後のコロニー数を計測した。

〈生菌の培養〉納豆(平板)培地に生じたコロニーから少量の細胞をとり、これを納豆(液体)培地にて一昼夜

培養した。培養液を 1,000 倍に希釈し、B 液とした。B 液 100 μ l を納豆(平板)培地に塗布し、35 $^{\circ}$ C で 2 日間培養後のコロニー数を計測した。

〈耐熱性の調査〉A 液および B 液をそれぞれ 2 ml ずつ試験管に分注し、沸騰水中にて 2 分、4 分、6 分、8 分、10 分間処理した。冷却後、100 μ l を納豆(平板)培地に塗布し、35 $^{\circ}$ C で 2 日間培養後のコロニー数を計測した。

〈アルコール、逆性石鹼耐性の調査〉A 液および B 液を塗布した直後の上記平板培地に 70% アルコール、あるいは逆性石鹼〔原液とその希釈液(1/2, 1/4, 1/100, 1/200)〕をスプレーした後、35 $^{\circ}$ C で 2 日間培養後のコロニー数を計測した。

【結果】 ①市販納豆(A 液)は、煮沸によってもコロニー数に変化は見られなかった(図 1)。②液体培地で培養した場合(B 液)は、2 分の煮沸でほとんどの菌が死滅した(図 2)。③70% アルコールスプレーでは、コロニーの形成が著しく阻害されたが、一部は形成も認められた

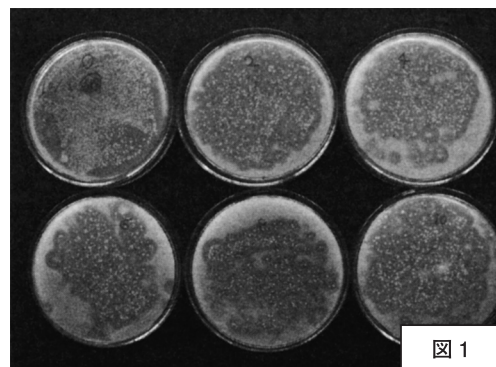


図 1 ■ 市販納豆(A 液)の煮沸によるコロニー数の変化
上段：左から 0, 2, 4 分間処理、下段：左から 6, 8, 10 分間処理

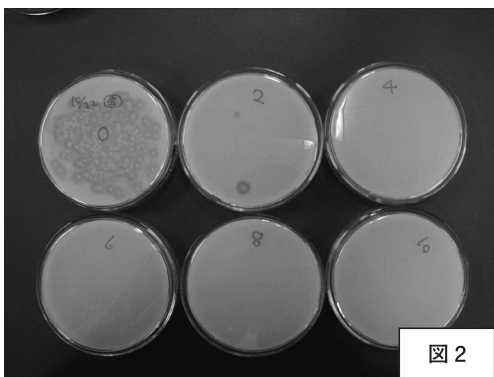


図2 ■ 液体培地で培養した場合 (B液) の煮沸によるコロニー数の変化
 上段：左から 0, 2, 4 分間処理, 下段：左から 6, 8, 10 分間処理

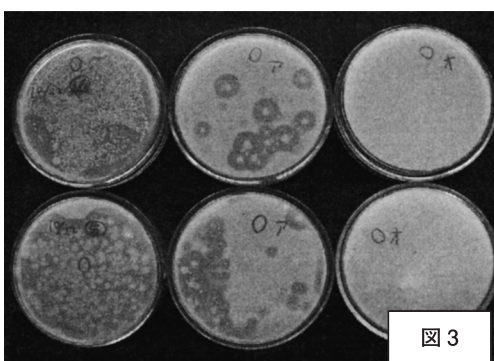


図3 ■ 70% アルコールスプレーおよび逆性石鹼処理によるコロニー数の変化
 上段：市販納豆液 (A液), 下段：液体培地培養液 (B液), 各段とも, 左：無処理, 中央：70% アルコール処理, 右：1/200 希釈逆性石鹼処理

(図3-中). ④逆性石鹼では, 1/200 希釈まではほぼ完全な滅菌効果がみられた (図3-右).

【討論】市販納豆は, 販売されている状態ですでにほとんどの納豆菌が耐性孢子になっていると考えられる. 懸濁培養したものでは, 増殖期に入り, 生菌 (孢子をまだつくっていない) 状況のものがほとんどであるため, 熱に弱かったと考えられる. 少数のコロニーが出現したことは, 懸濁培養中でも一部は孢子になっているためかも知れない. 消毒効果が強いといわれている 70% アルコールでも生き残るものがあることから, 納豆菌の滅菌は容易なことではないと思われる. これに対して, 逆性石鹼は 1/200 でも完全に効いている. 通常, 器具の洗浄に使用しているのは 1/100 倍くらいであることから, この効果は十分であると考えられる.

*耐熱性の芽胞をもつ細菌を死滅させる方法. まず, 加熱して栄養細胞を死滅させ, 次いで栄養培地で孢子を発芽させて栄養細胞に転換し, 再度加熱してこの栄養細胞を死滅させる. 孢子の多い枯草菌浸出液を用いた滅菌実験に基づいて, チンダルによって考案された.

本研究の意義と展望

納豆菌 *B. subtilis* (*natto*) は, 増殖に適した環境下では栄養細胞 (桿菌) として 2 分裂法で倍加する. しかし, 水分, pH, 温度, 栄養など細胞外の環境が生育に適さなくなると, 孢子 (芽胞) を形成して休眠状態となる. 環境が好転すると芽胞は出芽し, 再び栄養細胞となって増殖を始める. 本研究は, このような細胞形態の変化と熱および薬剤感受性との関係を, 発酵食品である納豆から分離した納豆菌を用いて確認した内容であり, 微生物学の基本的な実験である.

納豆から分離した納豆菌は耐熱性を示すが, この納豆菌を栄養培地で培養すると耐熱性は失われるという観察から, 孢子は耐熱性であり, 栄養細胞は熱に弱いという結果を導いている. 顕微鏡観察があれば, さらによく理解できたであろう. この観察結果に基づいて, チンダル (Tyndall) の間欠殺菌法* の原理に触れるまでもなく, “納豆から調製した耐熱性芽胞を含む液を, 完全滅菌するにはどうすればよいか” というところまで考察できれば有意義であったであろう.

パスツールは, 「白鳥の首フラスコ」を用いた新鮮肉汁の加熱実験によって, 生物の自然発生説を葬り去った (生物発生説を不動のものにした). もし, 彼が納豆抽出液を用いて実験していたら, それでも “生物は生物から発生する” と主張したであろうか. 本研究は, 生物実験における材料選定の重要性をも内包している. また, すべての生物は, 外部環境からの擾乱に対し恒常性 (ホメオスタシス) を維持しようとする. にもかかわらず, 環境が変化すると敢えて恒常性を捨て, 別の方法 (孢子形成) で延命を図ろうとする納豆菌の “生命システム” の

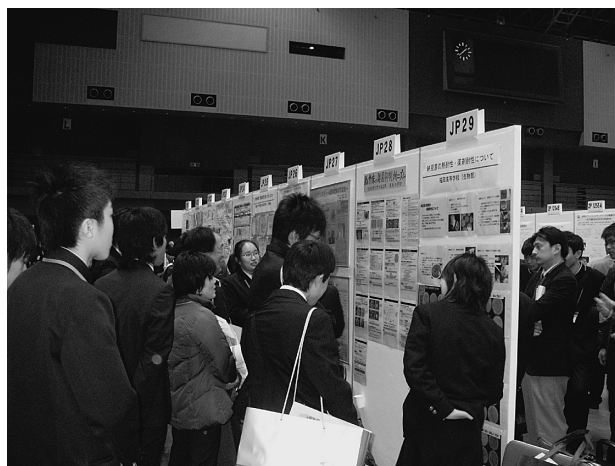


写真1 ■ 優秀賞受賞ポスターの発表風景

頑健性（ロバストネス）にも、欲を言えば、思いを馳せて欲しかった。

耐熱孢子と栄養細胞の薬剤に対する感受性については、もう一步踏み込んだ定量的な実験が望まれた。ただ、器具の洗浄などに使用されている薬剤（逆性石鹼）の濃度が微生物を死滅させるに十分な濃度であることなどを

確認したことは、普段の生活で用いられている消毒剤（「消毒」と「殺菌」の違いにも明確な理解が望まれる）が科学的な根拠に基づいてつくられていることを認識する上で重要な一歩になったであろう。

（文責「化学と生物」編集委員会）

プロフィール

長澤 寛道 (Hiromichi Nagasawa) <略歴> 1971年東京大学農学部農芸化学科卒業/1978年同大学大学院農学系研究科農芸化学専門課程博士課程修了/1981年同大学農学部助手/1991年同大学海洋研究所助教授/1994年同教授/1997年同大学大学院農学生命科学研究科教授、現在にいたる<研究テーマと抱負> バイオミネラリーションの分子機構の解明<趣味> 囲碁, スポーツ観戦

永田 裕二 (Yuji Nagata) <略歴> 1989年東京大学農学部農芸化学科卒業/1991年同大学大学院農学生命科学研究科修士課程修了後、同大学大学院農学生命科学研究科助手を経て、2000年東北大学助教授/2007年同准教授、現在にいたる<研究テーマと抱負> 細菌の難分解性物質分解能に焦点をあてた生物の環境適応・進化機構、および酵素進化。研究成果の実際の環境浄化への応用を進めたい<趣味> 旅行して写真を撮ること

西田 栄介 (Eisuke Nishida) <略歴> 現在、京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学研究科シグナル伝達学分野教授

原 弘志 (Hiroshi Hara) <略歴> 1979年東京大学理学部植物学教室卒業/1984年同大学大学院理学系研究科博士課程単位取得退学/同年国立遺伝学研究所微生物遺伝部門助手/1998年埼玉大学理学部分子生物学科助教授/2007年同准教授、現在にいたる。この間、1990~92年米国タフツ大学医学校博士研究員、1985年理博(東京大学)<研究テーマと抱負> 細菌細胞表面構造(特に大腸菌と枯草菌の細胞膜脂質と細胞壁ポリマー)の生合成と機能<趣味> パーボンをなめながらモダンジャズを聴くこと

原 義令 (Yoshinori Hara) <略歴> 2004年東洋大学生命科学研究科生命科学研究科卒業/2006年埼玉大学大学院理工学研究科分子生物学専攻博士前期課程修了/同年同

博士後期課程入学、現在にいたる<研究テーマと抱負> 細菌の脂質合成初期に関する研究<趣味> 読書

藤木 亮次 (Ryoji Fujiki) <略歴> 2001年早稲田大学理工学部科学科卒業/2003年東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻修士課程修了/2007年同博士課程修了/同年科学技術振興機構ERATO加藤核内複合体研究プロジェクト博士研究員/2009年東京大学分子細胞生物学研究所助教、現在にいたる<研究テーマと抱負> 核内イベントにおけるタンパク質糖修飾の役割。プロテオミクス解析技術やクロマチン構造変換の試験管内評価系を駆使し、核内糖修飾の重要性を明らかにしていきたい<趣味> 登山

本城咲季子 (Sakiko Honjoh) <略歴> 2009年京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学研究科博士後期課程修了、現在、同研究科統合生命科学研究科シグナル伝達学分野特命助教

松岡 聡 (Satoshi Matsuoka) <略歴> 2000年埼玉大学理学部分子生物学科卒業/2005年同大学大学院理工学研究科博士後期課程修了(理博)/2008年同研究科助教、現在にいたる。この間、2005~2007年米国カリフォルニア大学デービス校博士研究員<研究テーマと抱負> 細胞膜構造体の機能解明、枯草菌を用いた有用物質生産<趣味> テニス、サイクリング、風景撮影

松本 幸次 (Kouji Matsumoto) <略歴> 1971年埼玉大学理工学部生化学科卒業/1978年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了(理博)/同年上智大学理工学部助手、同講師を経て、1991年埼玉大学理学部分子生物学科助教授/1996年同同学部分子生物学科教授、現在にいたる<研究テーマと抱負> 細菌細胞の膜構造体の形成と機能の分子遺伝学的研究<趣味> 音楽、散歩

山口 正洋 (Masahiro Yamaguchi) <略歴> 1994年京都大学大学院医学研究科博士課程修了(医博)/1996年科学技術振興事業団さきがけ研究21専任研究員/1999年東京大学大学院医学系研究科細胞分子生理学教室助手/2000年同講師、現在にいたる<研究テーマと抱負> 可塑性の基盤としての成体嗅覚系の神経新生、動物の行動と神経細胞・神経回路の働きを結びつけて理解したい<趣味> 音楽鑑賞、スポーツをしたいが最近では年単位で運動不足

山下 純 (Atsushi Yamashita) <略歴> 1985年広島大学医学部総合薬学科卒業/1990年同大学大学院医学系研究科生命薬学系専攻博士課程後期修了(薬博)/同年帝京大学薬学部助手、同講師、准教授を経て、2009年同教授、現在にいたる<研究テーマと抱負> リン脂質の脂肪酸分子種の生合成機構の解明とリン脂質から派生する生理活性物質の生合成および生理活性の解明。地味でもオリジナリティの高い研究がしたい<趣味> テニス

吉田 真子 (Naoko Yoshida) <略歴> 1998年東京大学農学部応用生物化学専攻卒業/2000年同大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻修士課程修了/2003年同博士課程修了、(独)理化学研究所発生・再生科学総合研究センター研究員/2008年立命館大学生命科学研究科生命医科学研究科助教、現在にいたる<研究テーマと抱負> 哺乳類初期胚発生機構の解明<趣味> 旅行、食べ歩き

吉村 和也 (Kazuya Yoshimura) <略歴> 2001年近畿大学大学院農学研究科博士後期課程修了(農博)後、NEDO養成技術者、奈良先端科学技術大学院大学ポスドクを経て、2006年中部大学応用生物学部講師、現在にいたる<研究テーマと抱負> 植物における環境ストレス耐性機構の解明、植物におけるビタミン生合成/分解機構の解明<趣味> 映画鑑賞、スポーツ観戦、ドライブ