

令和元年6月19日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07191

研究課題名(和文)発酵槽である盲腸をもたない哺乳類(真無盲腸目)の消化管内微生物叢の多様性と進化

研究課題名(英文) Diversity of gastrointestinal microbiota of Eulipotyphlan mammals

研究代表者

篠原 明男 (Shinohara, Akio)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号：50336294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：真無盲腸目は前胃や盲腸といった発酵槽を持たない哺乳類である。昆虫食性を示し、形態学的には原始的な形質を多く保持している。本研究では、日本に生息する真無盲腸目4種(コウベモグラ *Mogera wogura*、ヒミズ *Urotrichus talpoides*、ジャコウネズミ *Suncus murinus*およびワタセジネズミ *Crocidura watasei*)の消化管内微生物叢を明らかにしたところ、Bacteroidetes目を欠く特殊な微生物叢構成を持っていた。さらにモグラを除く3種の消化管内微生物叢の多様性の度合いは他の小型哺乳類よりも低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真無盲腸目は、哺乳類の原始的な形態学的形質を有していることが知られてきたが、本研究ではその消化管内に生息する微生物叢が、他の哺乳類とは大きく異なる構成をしており、さらに多様性も低いことを示した。この結果から、本分類群の消化管内に生息している微生物叢構成が哺乳類のより原始的な微生物叢構成を反映していることが期待される。本分類群の消化管内微生物叢をさらに研究することで、哺乳類の栄養代謝および恒常性維持のために必要な微生物叢構成の最小構成を明らかに出来る可能性がある。また、飼育動物との比較から、ジャコウネズミが微生物叢構成の変遷を調べる良いモデル動物となる可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：Eulipotyphlan mammals have no fermentative chamber as like fore-stomach or cecum, are insectivorous, and possess many primitive morphological characters. In this study, we analyzed the gastrointestinal microbiota of 4 eulipotyphlan mammals (*Mogera wogura*, *Urotrichus talpoides*, *Suncus murinus*, and *Crocidura watasei*). Interestingly, our analyses could not detect Bacteroidetes that is one of the major bacterial group within mammalian gastrointestinal tract. Furthermore, the level of diversity of microbiota is lower than other small mammals those have fermentative chambers. These results suggest that eulipotyphlan mammals have a characteristic consortium of gastrointestinal microbiota having the potential of primitive consortium of gastrointestinal microbiota of mammals.

研究分野：生物多様性、進化

キーワード：消化管内微生物 盲腸 真無盲腸目 食虫類 スンクス モグラ ヒミズ ジネズミ

## 1. 研究開始当初の背景

消化管内に生息する微生物叢の大きな役割の一つは、消化管の持ち主である宿主が分解できない食物成分を分解することにある。特に近年では、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によって、消化管内微生物叢を網羅的に解析することが可能になり、2012年にはヒトの健康な状態の消化管内微生物叢の全貌が明らかにされた。その結果、ヒトの消化管内には少なくとも100種以上の微生物が生息し、それらの微生物ゲノムから膨大な種類のタンパク質が産生され、ヒトにおける食物の栄養利用だけでなく、免疫、疾病などに大きく関与していることが明らかにされた。さらには、ヒトの消化管内微生物叢には3種類の典型的なパターンが存在することも明らかとなった。

一方で野生動物においては、その食性や生息環境の多様性の高さから、より多様な消化管内微生物叢パターンが存在することが予想されるが、その解析は実験動物や大型の展示動物等において成果が発表されているものの、野生の小型哺乳類においては殆ど解析が行われていなかった。そこで申請者は、小型哺乳類の消化管内微生物叢を調べたところ(若手研究(B) 課題番号22770234)、モグラの消化管内微生物叢がこれまでに報告されてきた哺乳類の一般的な消化管内微生物叢とは、その主要構成微生物が門レベルにおいてさえも大きく異なっていることを発見した。モグラは真無盲腸目モグラ科に属する食虫性で地下に生息する哺乳類である。我々が発見したモグラの消化管内微生物叢が、昆虫食性に由来するものなのか、それとも地下生活という生活環境に由来するものなのかは現時点では不明である。そもそも真無盲腸目は頭骨や歯の形態から極めて原始的な哺乳類の特徴を有する分類群と考えられている。さらに真無盲腸目は、微生物発酵槽となる盲腸のない極めてシンプルな消化管を有している。

そこで本研究では、真無盲腸目に属する地下生活への適応度が異なる種の消化管内微生物叢を16S rRNA 遺伝子を指標に用いて明らかにすることによって、食性や地下への適応度が消化管内微生物叢に与える影響を解明するとともに、微生物発酵槽となる器官を持たない哺乳類の消化管内微生物叢の多様性と進化を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、真無盲腸目に属する地下生活への適応度が異なる種の消化管内微生物叢の多様性を明らかにすることによって、食性や地下への適応度が消化管内微生物叢の多様性に与える影響、微生物発酵槽となる器官をもたない真無盲腸目の消化管内微生物叢パターン、の2点を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究材料は、地下生活型の種としてコウベモグラ (*Mogera wogura*)、半地下生活型の種としてヒミズ (*Urotrichus talpoides*)、地上生活型の種としてワタセジネズミ (*Crocidura watasei*) およびジャコウネズミ (*Suncus murinus*) を野外捕獲して研究に用いた。また、真無盲腸目から実験動物化されているスunks (*Suncus murinus*) のKATシステムを、給餌飼料が同一で個体差のない場合の参考データとして解析に用いた。消化管内容物から微生物叢のDNAを含む全DNAを抽出し、細菌の16S rRNA 遺伝子をPCR法によって網羅的に増幅し、得られたPCR産物の塩基配列を決定して微生物種を同定した。

一般的に微生物叢に含まれる微生物種の同定には16S rRNA 遺伝子の配列長と配列数が重要となる。これまで全く解析が行われていない野生小型哺乳類においては未同定の細菌が含まれている可能性もあることから、本研究では、配列長を重視したサブクローニング法による16S rRNA 遺伝子(全長約1600bpのうち1400bp)の同定と、配列数を重視した次世代シーケンサーによる解析(約430bp)の両者を組み合わせることで、消化管内微生物叢の網羅的な解析を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) サブクローニング法による解析

地下生活型の種としてコウベモグラ (*Mogera wogura*)、半地下生活型の種としてヒミズ (*Urotrichus talpoides*) および地上生活型の種としてジャコウネズミ (*Suncus murinus*) の消化管内微生物叢を比較した。

その結果、ヒミズおよびジャコウネズミの消化管内微生物叢は、Firmicutes 門と、Proteobacteria 門で、その9割が占められていたのに対して、コウベモグラにおいては、Actinobacteria 門が多く検出され、多様な微生物が検出された。一方で、ヒトやマウスにおいては主要な消化管内微生物構成群のひとつである Bacteroidetes 門が3種とも検出されなかった(図1)。また、消化管内微生物叢の多様性指数(シャノン指数、シンブソン指数)を求め、これまでに本研究で用いた手法と同じ手法を使用して報告されている齧歯目、兔型目の多様性指数と比較したところ、こ

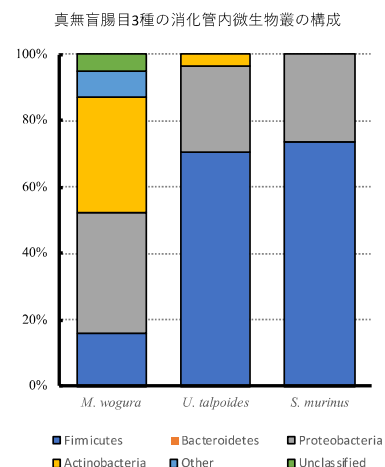


図 1

れら3種の微生物叢の多様性は低いことが示された。また興味深いことに、地下生活に最も適応したコウベモグラにおいて多様性が最も高く、地上性のジャコウネズミの多様性が最も低いという結果が示された(図2)。

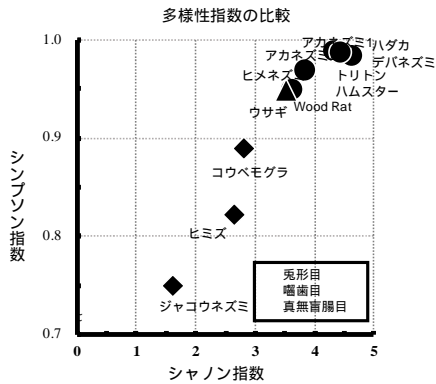


図 3

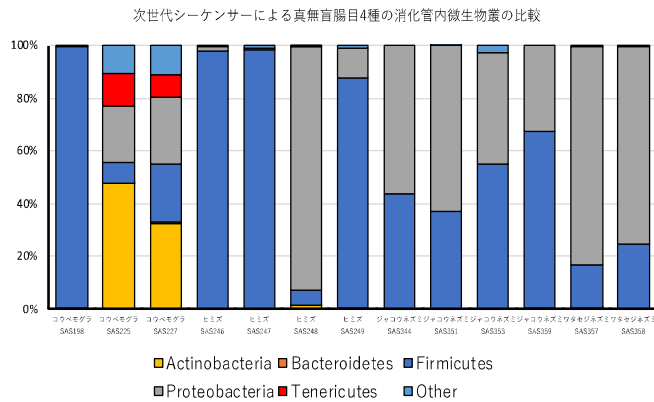


図 2

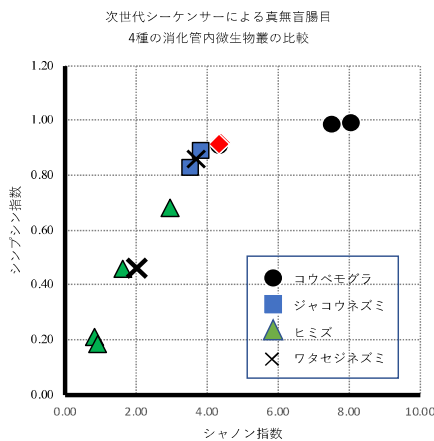


図 4

### (2) 次世代シーケンサーを用いた解析

次に次世代シーケンサーを用いて、地下生活型のコウベモグラ (*Mogera mogura*)、半地下生活型のヒミズ (*Urotrichus talpoides*)、地上生活型のジャコウネズミ (*Suncus murinus*) およびワタセジネズミ (*Crocidura watasei*) の消化管内微生物叢を解析した(図3)。その結果、ヒミズ、ジャコウネズミ、ワタセジネズミの消化管内微生物叢は、Firmicutes 門と Proteobacteria 門で、その9割が占められていたのに対して、コウベモグラにおいては、Actinobacteria 門および Tenericutes 門など多様な微生物群が検出された。さらに、これらのデータから多様性指数(シャノン指数、シン普森指数)を算出したところ、コウベモグラにおける微生物叢の多様性が高く、ヒミズにおいて低い傾向が観察されたが、ジャコウネズミやワタセジネズミなどの数値はばらついており、地下生活への適応度との具体的な関連性を見いだすことが出来なかった。

ミなどの数値はばらついており、地下生活への適応度との具体的な関連性を見いだすことが出来なかった。

### (3) 実験動物のスクスおよび野生捕獲したジャコウネズミの消化管内微生物叢の比較

さらに実験動物として飼育および系統化されたジャコウネズミ(実験動物名スクス)の Kat 系統と野外捕獲したジャコウネズミの消化管内微生物叢を、消化管部位(小腸もしくは大腸)ごとにサブクロニング法を用いて比較したところ、実験動物のスクスにおいては小腸と大腸の部位間で微生物叢構成に違いが検出されたが、野生スクスでは検出されなかった。さらに、消化管内微生物叢の多様性指数は実験動物よりも野生動物の方が高い値を示した(Shinohara et al., in press, Experimental Animals)。さらに、消化管内微生物叢の構成群のうち、飼育下の動物において増加する傾向が報告されている *Streptococcus* 属の割合が実験動物で多く、野生動物で低いことが示された。同様の傾向は次世代シーケンサーを用いた解析によっても得られた。

### (4) まとめ

これらの結果から、真無盲腸目の消化管内微生物叢は、ヒトやマウスなどとは大きく異なることが示された。特に、発酵槽を持つ哺乳類の消化管内微生物叢の主要な構成群である Bacteroidetes 目」を欠くことに特徴がある。また、モグラを除いて、その多様性は発酵槽を持つ他の小型哺乳類よりも低いことが示された。食虫性の真無盲腸目には、発酵槽がないシンプルで原始的な消化管構造をしている。食性および消化管構造が、このような微生物叢の構成を導いていると考えられた。しかしながら、モグラだけが微生物叢の多様性が高い理由は現在のところ不明である。一方で、実験動物と野生のジャコウネズミを比較すると、実験動物のジャコウネズミでは、その微生物叢の多様性が低下していることが明らかとなった。これは、他の哺乳類を飼育した場合でもしばしば報告されている現象であるが、ジャコウネズミのような極めてシンプルな消化管をもつ哺乳類においても同様の現象が観察されることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- A. Shinohara, M. Nohara, Y. Kondo, T. Jogahara, G. A. Nagura-Kato, M. Izawa, and C. Koshimoto (2019) Comparison of the gut microbiotas of laboratory and wild Asian house shrews (*Suncus murinus*) based on cloned 16S rRNA sequences. *Experimental Animals* (in press). (査読有り)
- T. Nakamura, O. Ichii, T. Irie, T. Mizoguchi, A. Shinohara, H. Kouguchi, Y. Sunden, S. Otsuka-Kanazawa, Y. H. A. Elewa, C. Koshimoto, K. Nagasaki, Y. Kon (2018) Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) possess pharyngeal pouch remnants originating from different primordia. *Histology and Histopathology* **33**: 555-565. (査読有り)
- H. Kai+, A. Shinohara+, K.M. Helgen, M.S. Springer, J. Xue-Long and K.L. Campbell (2017) Talpid mole phylogeny unites shrew moles and illuminates overlooked cryptic species diversity. *Molecular Biology and Evolution* **34**:78-87 (+equally contributed). (査読有り)
- M. Satou, H. Kaiya, Y. Nishi, A. Shinohara, S-i. Kawada, M. Miyazato, K. Kangawa, H. Sugimoto (2016) Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. *General and Comparative Endocrinology* **232**: 199-210. (査読有り)
- A. Shinohara, E. Uchida, H. Shichijo, S. H. Sakamoto, T. Morita, C. Koshimoto (2015) Microbial diversity in forestomach and caecum contents of the greater long-tailed hamster *Tscherskia triton* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Biology* **81**: 46-52. (査読有り)
- A. Shinohara, S-I. Kawada, N. T. Son, D. N. Can, S. H. Sakamoto, C. Koshimoto (2015) Molecular phylogenetic relationships and intra-species diversities of three *Euroscaptor* spp. (Talpidae: Lipotyphla: Mammalia) from Vietnam. *Raffles Bulletin of Zoology* **63**: 366-375. (査読有り)

〔学会発表〕(計 16 件)

- Akio Shinohara (2019年6月) Evolution and phylogeny of moles, and some notes about their gut microbiota. 12th Seminar on Asian Vertebrate Species Diversity Research (Kyoto university)
- 篠原明男、林扶充子、城ヶ原貴通、名倉悟郎、伊澤雅子、越本知大(2019年5月) 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を指標としたスunksの消化管内微生物叢、第66回日本実験動物学会総会(福岡国際会議場、福岡市)
- 篠原明男、野原諒、近藤優太、城ヶ原貴通、名倉悟郎、伊澤雅子、越本知大(2018年9月) 実験動物のスunksと野生のジャコウネズミの消化管内微生物叢の比較、日本哺乳類学会2018年度大会(信州大学、長野県上伊那郡南箕輪村)
- 林扶充子、篠原明男、渡部大介、古根村幸恵、城ヶ原貴通、越本知大(2018年9月) アマミトゲネズミの域外保全における腸内微生物叢の構造と多様性の変遷、日本哺乳類学会2018年度大会(信州大学、長野県上伊那郡南箕輪村)
- 岡部晋也、篠原明男、本川雅治(2018年9月) 頭骨形態計測によるヒミズの地理的変異、日本哺乳類学会2018年度大会(信州大学、長野県上伊那郡南箕輪村)
- 篠原明男、七條宏樹、増元圭三、猪倉順子、越本知大(2017年11月) 宮崎大学において発生したネズミ大腸蠕虫汚染とイベルメクチン長期噴霧による駆除効果、第35回九州実験動物研究会(指宿市)
- 櫻村敦、上村龍星、篠原明男、伊藤秀一、プラダンラジブ、岡本智伸(2017年9月) コウベモグラによる土壌攪乱に関する研究、日本哺乳類学会2017年度大会(富山大学、富山市)
- 篠原明男、井上比加里、稲留健人、櫻村敦、江藤毅、加藤悟郎、坂本信介、越本知大(2017年9月) コウベモグラおよびヒミズの消化管内微生物叢の比較、日本哺乳類学会2017年度大会(富山大学、富山市)
- 中村鉄平、市居修、入江隆夫、篠原明男、孝口裕一、越本知大、長崎健一、寸田祐嗣、Yaser Hosny Ali Elewa、辰巳治、昆泰寛(2017年9月) 雌性コットンラットの胸腺にみられる加齢性変化、第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島大学、鹿児島市)
- 篠原明男(2017年6月) モグラ科の系統進化と消化管内微生物叢、自然科学研究機構分野融合型共同研究事業「地下からの声：モグラは人間に何を語るか？」第一回ワークショップ(生理学研究所、岡崎市、愛知県)
- A. Shinohara, S-I. Kawada, T. Jogahara, C. Koshimoto (Dec. 2016) Molecular phylogeny of Southeast Asian moles; Interesting pieces of research in Myanmar. The Third Myanmar-Japan Symposium, Patheingyi, Myanmar
- 篠原明男(2016年11月6日) モグラ科の系統進化と、その生物学的面白さ、第535

回三学会合同宮崎例会（宮崎市）（招待講演）

A. Shinohara, H. Inoue, Y. Ogura, M. Nohara, S. H. Sakamoto, T. Hayashi, C. Koshimoto (2016) Influence of captivity on cecum microbial diversity in the large Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*). Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ) & the 87th meeting of the ZSJ, Okinawa, Japan.

M. Nohara, S. H. Sakamoto, T. Jogahara, A. Kashimura, C. Koshimoto, A. Shinohara (Nov. 2016) Gut microbiota of Asian musk shrew (*Suncus murinus*) revealed by 16S rRNA gene sequences. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ) & the 87th meeting of the ZSJ, Okinawa, Japan.

篠原明男, 稲留健人, 江藤毅, 加藤悟郎, 大久保慶信, 坂本信介, 越本知大 (2016年9月) アカネズミおよびヒメネズミの消化管内微生物叢の比較、日本哺乳類学会2016年度大会（筑波大学、つくば市）

中本あずさ、原田正史、篠原明男、土屋公幸、鈴木仁（2016年9月）ミトコンドリアDNA および核遺伝子に基づくコウベモグラの地域系統群の調査、日本哺乳類学会2016年度大会（筑波大学、つくば市）

〔図書〕(計1件)

篠原明男「脊椎動物(哺乳類) 恐竜絶滅後の地球を制した覇者」(日本動物学会 編) 『動物学の百科事典』pp 102-103, 丸善出版、東京、日本(分担執筆、2018年9月30日)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：櫻村 敦（東海大学）  
ローマ字氏名：Atsushi Kashimura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。