

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14848

研究課題名(和文) 未利用生物資源であるルーメン内好アルカリ性細菌の分離と同定

研究課題名(英文) Separation and identification of alkaliphilic bacteria as unutilized biological resources isolated from rumen

研究代表者

片山 欣哉 (Katayama, Kinya)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60344298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒツジのルーメン液からアルカリ性に調製した培地を用いて好アルカリ性細菌の分離・培養を行い、質量分析計および16S rRNA配列解析により、好アルカリ性細菌を同定した。ヒツジルーメン液から分離された好アルカリ性細菌はヒツジの糞からも分離された。好アルカリ性細菌にはヒトのプロバイオティクスとして利用されている株やキシラナーゼやセルラーゼといった有用酵素を生産する有用菌が多く知られていることから、これらの好アルカリ性微生物が新たな生物資源となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alkaliphilic bacteria were isolated from rumen fluid of sheep and cultured using an alkaline medium. Alkaliphilic bacteria were identified by mass spectrometer and 16S rRNA sequence analysis. Alkaliphilic bacteria isolated from sheep rumen fluid were also isolated from sheep feces. Among these alkaliphilic bacteria include strains used as human probiotics and xylanase and/or cellulase producer strains are known, it was suggested that these alkaliphilic microorganisms can be new biological resources.

研究分野：農学

キーワード：好アルカリ性細菌 ルーメン 羊

1. 研究開始当初の背景

反芻動物の共生栄養生理を解明するために、ルーメン(第1胃)に生息するルーメン微生物に関する様々な研究が国内外の多くの研究者によって行われている。しかしながら、アルカリ性の培養条件による分離・分類という研究はこれまでに行われておらず、ルーメン内の好アルカリ性細菌の生態は全く知られていない。一方、好アルカリ性細菌は土壌をはじめとして様々な分離源から分離が報告されており、それらの生産するアルカリプロテアーゼやアルカリセルラーゼといった酵素は、洗剤の添加剤等として工業的な利用もされている。ルーメン内の好アルカリ性細菌の生態を解明することは、ルーメン微生物の新たな領域を開くのみならず、未利用の生物資源あるいはプロバイオティクスへの応用にもつながるものと考えられる。

2. 研究の目的

これまでに行われてきた培養法によるルーメン微生物の分離と分類は、ルーメン内の pH 環境にあわせ、主に酸性～中性の培養条件で生育する微生物を対象としてきた。本研究の目的は、これまでのルーメン微生物の研究において未踏査の領域であるルーメン内に生息する好アルカリ性細菌を分離・同定し、その生態を明らかにするとともに、未利用生物資源の発見ならびにその活用を目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) 質量分析計による微生物迅速同定システムを用いた微生物の同定

微生物の同定には、近年、臨床微生物検査の現場で利用されるようになってきた、質量分析計による微生物迅速同定システム(MALDI Biotyper)を利用することとした。測定サンプルの調製はエタノール・ギ酸抽出法で行い、測定と同定は自動化プログラム MALDI Biotyper RTC により行った。

(2) 質量分析計を用いた微生物同定システムのための好アルカリ性細菌培養条件の最適化

質量分析計を用いた微生物同定システムでは微生物の持つタンパク質の質量スペクトルを測定し、そのパターンを比較することで微生物を同定するが、微生物はその生育環境が異なれば細胞内で異なるタンパク質(酵素)を作り環境に適應するため、正確な同定のためには、適切な培養条件の最適化が必要である。好アルカリ性細菌の基本的な培養条件をトリプチケースソイ寒天培地、37℃として、pH 調整のための炭酸ナトリウム添加量及び培養時間が質量スペクトルパターンに与える影響を調べた。

(3) 好アルカリ性細菌ライブラリの構築

(2) で最適化された培養条件で菌株保存機関より入手した好アルカリ性細菌の基準株を含む 20 菌株について培養し、質量スペ

クトルの測定を行い、新規に好アルカリ性細菌ライブラリを構築した。

(4) ルーメン液及び糞からの好アルカリ性細菌の分離と同定

ルーメン液及び糞は、日本獣医生命科学大学富士アニマルファームで飼育されていた羊(マンクスロフタン種、)から採取し、-80℃で保存しておいたものを使用した。ルーメン液及び糞を(2)で最適化された条件である 1%炭酸ナトリウムを含むトリプチケースソイ寒天培地(約 pH 10)で 37℃、24 時間培養し、得られたコロニーを(3)のライブラリを用い(1)に従い同定した。

(5) 16S rRNA 配列解析

MALDI Biotyper で同定不可能であった菌については、DNA シーケンサーにより 16S rRNA 配列を読み、データベース検索することで同定を行った。また、このような菌については質量スペクトルを(3)の好アルカリ性細菌ライブラリに追加し、ライブラリの補強を行った。

(6) 羊ルーメン液中の好アルカリ性細菌存在量の推定

リアルタイム PCR を用い、全バクテリアと好アルカリ性細菌の 1 種である *Bacillus clausii* の 16S rRNA をそれぞれ定量、比較することでルーメン液中の好アルカリ性細菌の存在量を推定した。

(7) 分離された好アルカリ性細菌の酵素活性及び抗菌活性

分離された菌はスキムミルク添加培地によるプロテアーゼ活性、カルボキシメチルセルロース添加培地によるセルラーゼ活性の有無を調べた。抗菌活性は抗生物質を生合性するための遺伝子の有無を調べ、推定した。

4. 研究成果

(1) 質量分析計を用いた微生物同定システムのための好アルカリ性細菌培養条件の最適化

炭酸ナトリウムの濃度の違いと培地の pH の変化を調べたところ、24-48 時間で安定しており(図 1)、質量分析のスペクトルパターンは 1.0%炭酸ナトリウム、48 時間のものが

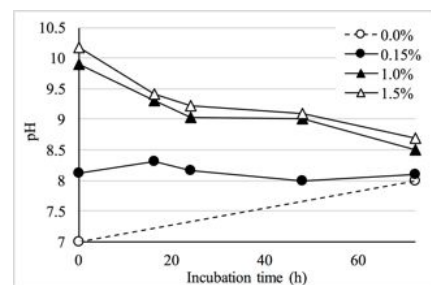


図 1 培地 pH の経時変化

平均的であった(図 2)ので、ライブラリ構築のための培養条件は、1.0%炭酸ナトリウムを含むトリプチケースソイ寒天培地、37℃、48 時間と決定した。

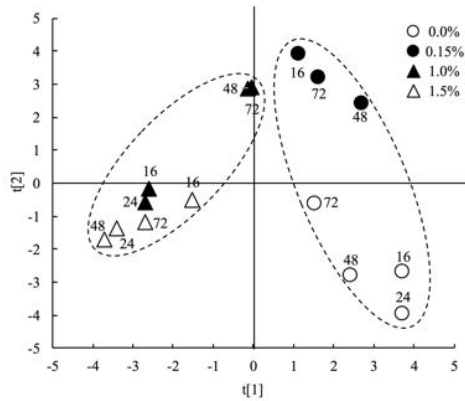


図 2 炭酸ナトリウム及び培養時間によるスペクトルパターンの変化

(2) 新規に構築した好アルカリ性細菌ライブラリを用いた分離株の同定

新規に構築した好アルカリ性細菌ライブラリに含まれていない、通常中性菌として知られている細菌の MALDI Biotyper による同定率は低かったが、これらの細菌についても質量スペクトルをライブラリに登録することでライブラリの補強を行った。

図 3 に示すように、*B. sonorensis* では 16S rRNA 配列が全く同一の場合でも MALDI Biotyper では区別することが可能であった。

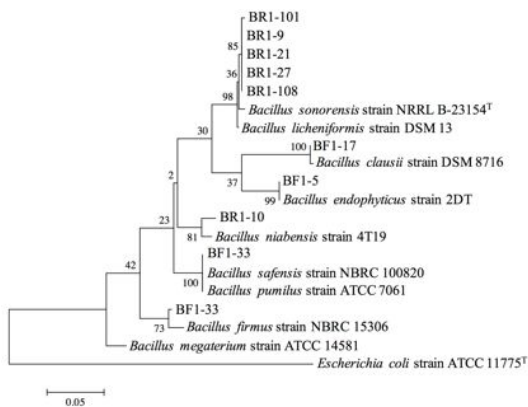


図 3 ルーメン及び糞より分離された好アルカリ性細菌の 16S rRNA 系統樹

(3) ルーメン液及び糞からの好アルカリ性細菌の分離と同定

ルーメン液及び糞より分離培養したコロニーを MALDI Biotyper により同定したところ、*Bacillus pumilus*、*Bacillus sonorensis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus clausii*、*Bacillus endophyticus* が共通して同定された(図 4)。

これらの中で、*B. clausii*を除く菌は主に中性菌として知られているが、同種の中に好アルカリ性を示す菌株も多く知られている。また、*B. clausii*にはヒトの整腸剤として利用されているものもある。各菌の存在比率は異なるもののルーメンと糞の両方で共通に見られるということは、ルーメンから直腸に至るまで生存したまま到達したことを意味す

る。

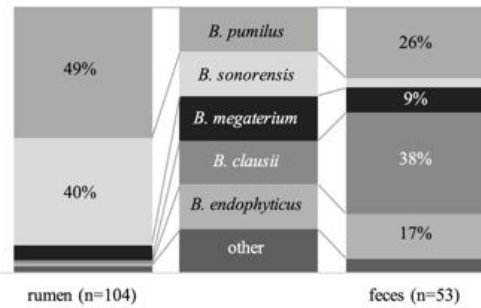


図 4 羊ルーメン及び糞より分離された好アルカリ性細菌

(4) ルーメン液中の好アルカリ性細菌存在量の推定

ルーメン液中の *B. clausii* の存在量をリアルタイム PCR による定量で推定したところ全ルーメン細菌の 0.0013%であったが、図 4 に示した通り、*B. clausii*はルーメン液から分離された好アルカリ性細菌の 1%程度であるため、好アルカリ性細菌が全ルーメン細菌に占める割合はおよそ 0.13%であると予想される。

(5) 羊ルーメンより分離された *Bacillus clausii* の酵素活性と抗菌活性

本研究で分離された *Bacillus clausii* についてプロテアーゼ活性並びにセルラーゼ活性を調べたところ、いずれも寒天培地上にハローが認められ、分泌酵素の存在が確認された。ヒトの整腸剤として利用されている株はクラウシンと呼ばれるペプチド系抗生物質を生産することが知られており、その生合成遺伝子も明らかになっている。本研究で分離された *B. clausii* についてクラウシン生合成遺伝子の有無を調べた結果、生合成遺伝子を有しており、培養液の質量分析では、クラウシンと同じ分子量のペプチドが検出された。

(6) まとめ

羊のルーメン液及び糞から、好アルカリ性細菌を分離、同定した。ルーメン液中の好アルカリ性細菌の分離、同定はこれまで報告されておらず、本研究が初めての報告である。ルーメン液は弱酸性から中性であるが、反芻動物の唾液はルーメン内の pH 調節の為に弱アルカリ性を示し、反芻、再咀嚼により好アルカリ性細菌が活性化される可能性も考えられる。今後、再咀嚼中の好アルカリ性細菌の挙動を含め、好アルカリ性細菌のルーメン発酵への寄与をより詳細に調べる必要がある。また、本研究で羊ルーメン液から分離された *Bacillus clausii* については家畜のプロバイオティクスとしての利用を視野に入れ、この菌の安全性や有用性についてさらに深く研究を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

片山 欣哉、羊ルーメン中の好アルカリ性細菌について、日本農芸化学会関東支部 2016 年度支部大会、2016 年 10 月 15 日、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 欣哉 (KATAYAMA, Kinya)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60344298