

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：10105
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K15960
研究課題名（和文）反芻家畜用新規シンバイオティクスの開発をめざしたフラボノイド分解細菌の分離培養

研究課題名（英文）Isolation of flavonoid-degrading bacteria aimed at development of novel synbiotics for ruminants

研究代表者
福間 直希（Fukuma, Naoki）
帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：90793977
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：フラボノイドは植物の二次代謝産物として知られ、抗酸化作用や抗菌作用をはじめとした様々な機能を有することから、家畜生産現場においても有効利用が求められている。本研究課題は、反芻胃（ルーメン）内のフラボノイド分解細菌の特定を行うとともに、新規細菌の分離培養および分類群の同定を行うことを目的とした。嫌氣的集積培養物から合計141菌株を分離培養し遺伝子解析を行った結果、Bacteroidetes門 Bacteroides属に属する細菌株1菌株を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、畜産現場では国内未利用資源の有効利用が求められている。フラボノイドはルーメン内で発酵基質として利用され、微生物により宿主動物のエネルギー源へと転換されるため、フラボノイドを含有する未利用植物資源の飼料化が期待される。しかしながら、現段階ではどの種のフラボノイドの分解にどの細菌種が関与しているのかが明確にされておらず、フラボノイド投与がルーメン発酵に与える影響を予測することが困難となっている。本研究成果は、特定のフラボノイドを含む未利用植物資材と、それを効果的に分解する細菌種とを組み合わせた「新規シンバイオティクス」の開発に向けた重要な基盤情報となる。

研究成果の概要（英文）：Flavonoids, known as plant secondary metabolites, are expected to apply to animal production as they have antioxidative and antibacterial activities. This study was aimed to reveal the flavonoids degrading bacterial group and to isolate and identify the novel bacterial strain from the cattle rumen. Total of 141 isolates were obtained from enriched culture fluids and analysed to identify the taxonomy, and one bacterial strain belonging to phylum Bacteroidetes, genus Bacteroides has been identified.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：ウシ ルーメン 細菌 フラボノイド 分離培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) フラボノイドは植物の二次代謝産物として知られ、抗酸化作用や抗菌作用をはじめとした様々な効能を有することから、家畜生産現場においても有効利用が求められてきた。反芻胃(ルーメン)内発酵においても多くの試みがなされており、フラボノイドを豊富に含む植物抽出液が、ルーメン内微生物叢の変化を介して反芻家畜の飼料効率を改善することが示唆されている(Ramos-Morales et al., FEMS Microbiology Ecology, 2018)。しかしながら、各種フラボノイドの効果は一様ではなく、その添加によりどのようにしてルーメン内微生物叢が変化するのか、そのメカニズムは明らかにされていない。

(2) 一方で、フラボノイドはルーメン内微生物の発酵基質として用いられ、速やかに分解・代謝されることが報告されている(Simpson et al., Can. J. Microbiol., 1969; Lowry & Kennedy, Proc. Aust. Soc. Anim. Prod., 1996; Berger et al., J. Dairy Sci., 2015)。よって、ルーメンにおいてフラボノイドは、特定の微生物の活性を選択的に抑えるだけでなく、特定の微生物種の増殖基質となることで、微生物叢に変化を引き起こすと考えられる。そのような背景から、フラボノイドの分解に関わるルーメン内微生物の分離培養もなされている。これまでに分離培養された *Butyrivibrio* sp. C3 は、ルチン、ケルシトリン、ナリンギンを分解するもののケルセチンは分解しないこと(Cheng et al., Can. J. Microbiol., 1969)、また *Eubacterium oxidoreducens* はケルセチンを分解するものの、分解には水素もしくはギ酸を要求すること(Krumholz & Bryant, Arch. Microbiol., 1986)が報告されている。このように、フラボノイドの分解経路は複雑であるため、ただ一種の微生物がフラボノイドのすべての分解ステップに関与している可能性は低い。実際のルーメン内では多様な微生物が役割を分担し複合的に分解に関わっていると示唆されているものの、その全容は把握されていない(McSweeney & Mackie, CGRFA, 2012)。さらに、これまでにフラボノイド分解性細菌として報告されている種は5種のみであり、ルーメン内微生物生態系の大部分を占める難培養性微生物については研究対象から外されたままである。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題は、上記の課題を解決するため、フラボノイド分解細菌の特定を行うとともに、新規細菌の分離培養および分類群の同定を行うことを目的とした。

(2) 現段階において、既知のフラボノイド分解性細菌は古典的な嫌気的分離培養法による同定に限られるが、これに加えて本研究では、核酸を標的とした分子的手法を活用することにより未培養細菌からの新規細菌種の分離培養を目的とした。

3. 研究の方法

(1) フラボノイド分解細菌の集積培養

各種の精製フラボノイドを用いた嫌気的集積培養を行った。培養のイノキュラムとして、ウシルーメンから採取したルーメン液を用いた。培養素材として代表的なフラボノイドであるルチンおよびケルセチンを用いた。

(2) 16S rRNA 遺伝子の網羅的解析によるフラボノイド分解細菌の遺伝情報の特定

集積した培養物から DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる 16S rRNA の解析を行った。塩基配列を解析して分類群の同定を行い、各種の精製フラボノイドにより存在比が高まる細菌種を同定し、以降の研究計画の標的細菌とした。

(3) フラボノイド分解細菌の分離培養

上記集積培養物を用いて、フラボノイド分解細菌群からの標的細菌の分離培養を行った。分離株の DNA を抽出したのちに 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読し、細菌種の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 新たに導入した嫌気培養装置を用いて、フラボノイドを基質とする培地を作製し、嫌気的集積培養をおこなった。培養物から DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる 16S rRNA の塩基配列解析を通して、細菌分類群の推定を行い、フラボノイドにより存在密度が高まる細菌種を特定した。培養のイノキュラムとして用いたルーメン液中の存在密度と比較し、特に密度が高まり、かつ既知菌との塩基配列相同性が 97%未満の菌群を、次年度の研究の標的細菌群とした。

(2) 複数のフラボノイド分解性細菌群の候補菌群を標的とし、分離培養試験を行った。嫌気培養装置を用いて、各種フラボノイドを基質とする培地を作製し、嫌気的集積培養をおこなった。

集積培養物をイノキュラムとして嫌氣的に調製した希釈液により段階希釈し、10 倍系列でのイノキュラム希釈液を作製した。それぞれの希釈段階の菌液を同様の組成の培地に接種したのちにロールチューブを作製し、39°C で 1 日から 10 日培養を続け、嫌氣的条件下で細菌株のコロニーを形成させた。シングルコロニーを釣菌したのちに単離株を培養し、培養後の菌液をサンプリングして顕微鏡により形態およびグラム染色性を観察するとともに純菌かどうかを評価した。

(3) 分離株から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の部分配列の塩基配列を解読することで分類群の特定を行った。合計 141 菌株の遺伝子解析の結果、*Bacteroidetes* 門 *Bacteroides* 属に属する細菌株 1 菌株を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 福間直希、藤森美帆	4. 巻 25
2. 論文標題 産業動物の消化管内微生物叢を調節する機能性飼料素材	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ルミナコイド研究	6. 最初と最後の頁 11-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miho Fujimori, Masaaki Hanada, Takehiro Nishida, Naoki Fukuma
2. 発表標題 Effect of buckwheat hull extract on in vitro rumen fermentation and microbial profile
3. 学会等名 The 12th China-Japan-Korea Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間直希
2. 発表標題 産業動物と消化管内細菌叢 機能性飼料素材の探索
3. 学会等名 日本食物繊維学会第24回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Wisconsin-Madison			