

平成22年 4月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780196
 研究課題名（和文） ルーメン細菌の同調調節によるルーメンアシドーシスの防御
 研究課題名（英文） Prevention of rumen acidosis by the modification of quorum sensing in ruminal bacteria
 研究代表者：
 浅沼 成人（ASANUMA NARITO）
 明治大学・農学部・講師
 研究者番号：50366902

研究成果の概要（和文）：反芻家畜にデンプン飼料を多給した場合に生じるルーメンアシドーシスという病状の予防に、多量の薬剤が用いられてきたが、食肉への残留の問題があるので、新たな予防法の開発を目指した研究を行った。本研究では、原因菌の増殖を制御する化学シグナル分子を見出し、その遺伝子を同定した。更にその機能を解析し、種々のタンパク発現を制御することを示した。今後、このシグナル分子を応用し、病気を予防する方法について検討する。

研究成果の概要（英文）：It is desirable to consider a new strategy to prevent rumen acidosis, which is caused when ruminants are fed high-concentrate diets, because the dose of antibiotics and ionophores may cause the risk of residual antibiotics in animal products. Therefore, to prevent the overgrowth of the bacterium causing rumen acidosis (*Streptococcus bovis*), I identified a chemical signaling molecule to control the growth, which may be related to the change in the expression of several proteins, in *S. bovis*. This result may contribute to the development of a new strategy for the control of *S. bovis* overgrowth and the prevention of rumen acidosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2009年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：畜産学、栄養学、細菌学、遺伝子、応用微生物

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜への濃厚飼料の多給は、ルーメン内の主要な乳酸生成菌である *Streptococcus bovis* をしばしば急増させる。これによりルーメン内の乳酸生成が増加すると、ルーメン

内 pH が低下する。急激なルーメン内 pH の低下は、他菌の生育を阻害し、ルーメンアシドーシスを引き起こすことがあることから、*S. bovis* の過剰な乳酸生成や増殖を制御する必要がある。この予防法としてイオノフォアな

どの薬剤が用いられてきたが、繊維の消化率の低下やプロトゾア数の減少などだけでなく、食肉への残留の問題もあるので、新たな予防・防御法を考える必要がある。

ある種の細菌は低分子量の化学シグナル分子を放出し、その蓄積を感知して病原性や増殖に関わる遺伝子の発現を調節する。このような細胞同調調節機構を利用すれば、*S. bovis* の過増殖を抑制し、ルーメンアシドーシスを防ぐことも可能と考えられる。

2. 研究の目的

ルーメンアシドーシスの予防・防御を目的に、主要原因菌である *S. bovis* における、増殖制御ペプチドによる細胞の同調調節機構を解析し、薬剤利用の代替となる新たな治療法の確立を目指す。このための基礎的知見を得るため、本研究期間内では、*S. bovis* における増殖制御ペプチドの存在を明らかにし、その遺伝子配列を決定する。更に、増殖制御ペプチドがどのように増殖制御に関わるかをその欠損変異株を用いて解析する。特に、プロテオーム解析によりどのようなタンパクの発現に影響するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 増殖制御オリゴペプチドおよびその受容体タンパクをコードする遺伝子のクローニングと全塩基配列の決定

増殖制御オリゴペプチドおよびその受容体として作用する二成分制御系の構成タンパクをコードする遺伝子の一部をゲノムライブラリーからスクリーニングした。それらの塩基配列をキャピラリーシークエンサーを用いて解析した。

(2) 増殖制御オリゴペプチドの精製

S. bovis の培養上清から、フィルター濾過、コードする遺伝子を決定することを目的に、その精製を行う。滅菌フィルターおよび限外濾過フィルター、HPLC などを用いて、増殖制御オリゴペプチドを培養上清液から抽出した。タンデムマス (MS/MS) を用い、分子質量を測定した。

(3) 増殖制御オリゴペプチドと受容体タンパクの欠損変異株の作製

増殖制御オリゴペプチドとその受容体の遺伝子に薬剤耐性遺伝子を組み込んだハイブリッド DNA を作製した。この遺伝子断片を電気穿孔法により *S. bovis* 内に導入し、遺伝子相同組換え法でこれらの遺伝子の欠損変異株を作製した。

(4) 増殖制御オリゴペプチドの機能解析

上記の様に作製した欠損変異株と親株を比較することで、増殖制御オリゴペプチドが増殖に及ぼす影響を調べた。また、タンパク発現制御に及ぼす影響を 2 次元電気泳動と MS/MS を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 増殖制御オリゴペプチドおよびその受容体タンパクをコードする遺伝子のクローニングと全塩基配列の決定

増殖制御因子の一つであるペプチドフェロモン ComC の遺伝子の塩基配列を明らかにした。その近隣の遺伝子座には、ComC の受容体として作用する、膜固定ヒスチジンキナーゼとその応答因子の遺伝子が存在したので、シグナル伝達に関与する遺伝子群はクラスターとして存在すると考えられた。*S. bovis* の ComC シグナルペプチドのアミノ酸配列は本菌に特異的であったことから、その構造やシグナルとしての役割は *S. bovis* に特有と考えられた。

(2) 増殖制御オリゴペプチドの精製

培養上清から増殖制御オリゴペプチドの精製を行った。精製したペプチドの分子質量やペプチド鎖のアミノ酸配列の情報から、精製したペプチドは ComC と同定された。従って、ComC は情報伝達物質として機能する可能性が示唆された。

(3) 増殖制御オリゴペプチドと受容体タンパクの欠損変異株の作製

上記の方法で欠損変異株を作製し、目的の遺伝子が欠損したことを塩基配列解析により確認した。

(4) 増殖制御オリゴペプチドの機能解析

ComC ペプチド欠損株の増殖速度は親株よりも低かったため、ComC ペプチドは *S. bovis* の増殖を促進すると考えられた。欠損株と親株におけるタンパク発現には違いが見られたので、*S. bovis* において ComC により発現が制御されるタンパクがいくつかあると考えられた。

以上の研究結果から、*S. bovis* において増殖を制御するペプチドフェロモンが存在することが明らかとなった。ルーメン微生物における増殖制御ペプチドの機能解析は国内外通して最初の報告である。今後は、ComC の合成または分解を制御することにより、ルーメン内の ComC 濃度を適度に調節し、ルーメンアシドーシスを防御する方法について検討する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Asanuma, N., K. Yoshizawa, K. Kanada and T. Hino. Molecular and biochemical characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. Current Microbiology, 査読有, 58:416-420, 2009

②Asanuma, N., K. Yoshizawa and T. Hino. Properties and role of pyruvate kinase in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. Current Microbiology, 査読有, 58:283-287, 2009

③Furuya, H., S. Ohkawara, K. Nagashima, N. Asanuma and T. Hino. Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. International Journal for vitamin and nutrition research, 査読有, 78:41-49, 2008

④Asanuma, N., K. Kanada and T. Hino. Molecular properties and transcriptional control of the phosphofructokinase and pyruvate kinase genes in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. Anaerobe, 査読有, 14:237-241, 2008

〔学会発表〕(計 23 件)

①金田和大・市川達也・川村顕子・浅沼成人・日野常男、ルーメン細菌 *Streptococcus bovis* におけるペプチドホルモン ComC の特性とその役割、日本畜産学会第 112 回大会、2010 年 3 月 28 日、明治大学

②Kanada, K., N. Asanuma and T. Hino. Molecular properties and significance of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. BioMicroWorld2009. 2009 年 12 月 3 日、ポルトガル リスボン

③Asanuma, N., T. Ichikawa, A. Kawamura and T. Hino. Auto-inducing peptides, comC, D, and E, in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. BioMicroWorld2009. 2009 年 12 月 3 日、ポルトガル リスボン

④浅沼成人、ルーメン共生微生物の情報伝達による環境応答、極限環境微生物学会第 10 回大会、2009 年 10 月 28 日、明治大学

⑤金田和大・浅沼成人・市川達也・川村顕子・日野常男、*Streptococcus bovis* におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの特性とその役割、日本畜産学会第 111 回大会、2009 年 9 月 29 日、琉球大学

⑥Ichikawa, T., N. Asanuma and T. Hino. Presence of sensor histidine kinase and its response regulator in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. The 7th Korea Japan China joint symposium on rumen metabolism and physiology. 2009 年 8 月 6 日、韓国 ソウル

⑦Kanada, K., N. Asanuma and T. Hino. Oxaloacetate-producing enzymes in several ruminal bacteria, with special reference to phosphoenolpyruvate carboxykinase. 2009 年 8 月 6 日、韓国 ソウル

⑧Kawamura, A., N. Asanuma and T. Hino.

Effect of *Selenomonas ruminantium* and *Wolinella*

succinogenes addition on the suppression of nitrosation in the cultures of mixed intestinal bacteria from dogs and cats. 2009 年 8 月 6 日、韓国 ソウル

⑨Asanuma, N. Quorum sensing system in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*; Possible strategy for controlling overgrowth of *Streptococcus bovis* in the rumen. The 7th Korea Japan China joint symposium on rumen metabolism and physiology. 2009 年 8 月 5 日、韓国 ソウル

⑩金田和大・浅沼成人・日野常男、ルーメンバクテリアにおけるコハク酸経路に関する酵素の解析、第 8 回微生物研究会、2009 年 5 月 30 日、日本大学

⑪市川達也・浅沼成人・日野常男、*Streptococcus bovis* における二成分制御系タンパクの分子生物学的解析、第 8 回微生物研究会、2009 年 5 月 30 日、日本大学

⑫内山嵩雄・藤原悠・鈴木健太・古谷英樹・三輪岳宏・浅沼成人・日野常男、*Butyrivibrio fibrisolvens* の経口投与が動物の増体に及ぼす影響、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑬末永万里・川又憲二・佐藤薫・安嶋達郎・浅沼成人・日野常男、脂肪酸取込み能の高いビフィズス菌株の脂肪酸取込み機構の解明、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑭川又憲二・執行百子・末永万里・安嶋達郎・浅沼成人・日野常男、乳肉中の共役リノール酸の増加を目的としたルーメンからのバクセン酸流出量の増加法、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑮金田和大・市川達也・浅沼成人・日野常男、ルーメン細菌 *Streptococcus bovis* における二成分制御系ホモログタンパクの分子生物学的解析、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑯吉澤仁雄・市川達也・浅沼成人・日野常男、ルーメンバクテリアにおける PEP carboxykinase の特性とコハク酸経路との関連、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑰新井雄介・市川達也・浅沼成人・日野常男、*Selenomonas ruminantium* の添加による大腸内におけるニトロソアミン生成の抑制、第 110 回日本畜産学会大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学

⑱Asanuma, N., K. Yoshizawa, K. Kanada and T. Hino. Molecular properties and transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in a ruminal bacterium, *Ruminococcus albus*. 2009 Conference on gastrointestinal function meeting. 2009

年 3 月 21 日, アメリカ シカゴ

⑱ 古谷英樹・井出由香里・浜本牧子・浅沼成人・日野常男、天然グルコシルセラミド分解能を持つ新種菌の単離・同定、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド

⑳ Kanada, K., N. Asanuma and T. Hino. Molecular properties and transcriptional control of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. The 13th Animal science congress of the Asian - Australasian association of animal production societies. 2008 年 9 月 23 日～24 日, ベトナム ハノイ

㉑ 金田 和大・浅沼成人・日野常男、*Selenomonas ruminantium* の F_1F_0 -ATP 合成酵素 (F_1F_0 -ATP synthase) の遺伝子構造とその転写発現の解析、第 37 回ルーメン研究会、2008 年 9 月 7 日、三重大学

㉒ 吉澤仁雄・浅沼成人・金田 和大・新井雄介・日野常男、*Streptococcus bovis* におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの分子生物学的特性と酵素特性、第 37 回ルーメン研究会、2008 年 9 月 7 日、三重大学

㉓ Kanada, K., N. Asanuma and T. Hino. Presence of the two-component regulatory system ComDE, and influence of peptide pheromone ComC on the growth of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. 6th INRA-RRR Symposium Gut Microbiome. 2008 年 6 月 18 日～20 日, フランス クレルモンフェラン

[その他]

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~asalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅沼 成人 (ASANUMA NARITO)

明治大学・農学部・講師

研究者番号 : 50366902