

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770234

研究課題名(和文)消化管内微生物叢からみた食性の適応進化に関する研究

研究課題名(英文) Analysis on the relationships between feeding habit and gastrointestinal microbiota of small 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・助教

研究者番号：50336294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、あまり明らかにされてこなかった野生小型哺乳類の消化管内微生物叢を16S rRNAを用いた分子生態学的解析を行うことによって同定し、その役割を推定した。その結果、草食性小型齧歯類の前胃内微生物叢の多様性は極めて低く、大型草食哺乳類の前胃のように繊維質の分解には寄与していないと考えられること、雑食性小型齧歯類の盲腸内微生物叢の多様性は極めて高く、食物の消化に大きく貢献していると考えられること、食虫性モグラ類の消化管内微生物叢の多様性は高いものの、哺乳類において報告されている消化管内微生物叢とは目レベルにおいて構成比が異なること、が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Symbiotic microorganisms in mammalian gastrointestinal tract are unimaginably diverse and contribute on the nutrition, but those of the small mammals are not well understood. To investigate the relationships between the feeding habit and gastrointestinal microbiota of the small mammals, we identified the microbiota by using molecular ecological analyses with 16S rRNA clone libraries. As a result, we found that 1) biodiversity of microbiota in a forestomach of herbivorous rodents is very poor, indicating that the forestomach has no similar roles as large plant-eating mammals, 2) biodiversity of microbiota in the cecum of small rodents is extensively rich, suggesting that the microbiota has an important role for food digestion and nutrition, 3) biodiversity of microbiota in lower digestive tract of mole is also very high, but shows a very discriminative composition ratio, even in the order level, compared to those of other mammals.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：食性 消化管内微生物叢 16S rRNA アカネズミ コウベモグラ 多様性 前胃 盲腸

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類における食物からの栄養利用は、消化管内に生息する微生物が大きく寄与していることが明らかとなっている。例えば、反芻動物などの大型草食獣はルーメンなどの消化管内に共生している微生物の働きによって、本来は利用することの出来ない植物性繊維質を分解して栄養利用している。また、穀物などの種子中に多く含まれるフィチンは、生物にとって必須であるにも関わらず産生することが出来ないリンを多く含んでいる。このフィチンの分解には、消化管内微生物が産生する酵素のフィターゼが寄与していることが明らかにされており、現在では家畜用の飼料にあらかじめフィターゼを添加することによって飼料効率を上げることが一般的に行われている。

このように消化管内に共生する微生物は哺乳類の栄養利用に重要な役割を担っているが、消化管内の微生物叢の解析は、ヒト以外では産業的に重要な家畜動物や、実験動物として確立されたマウスやラット、および動物園にいる一部の展示動物などに限られており、それらの種は雑食性もしくは草食性に集中している。一方で、自然界には多種多様な食性が存在している。ユーカリしか食べないコアラや、笹しか食べないパンダなどの偏食的な種もあれば、豊かな食性を示す分類群も多い。小型哺乳類を例にしてみれば、げっ歯目にはマウスやラットのように雑食性の種だけではなく、アカネズミのように堅果を好んで食する種もいれば、ハタネズミのように草食性の種も含まれている。その一方でモグラに代表される食虫目は昆虫食性であり、コウモリなどの翼手目は昆虫食性と果実食性の大きな二つのグループに分かれている。これらの食性は、分類群毎に特徴が見られるグループ(例えば、食虫目や翼手目など)と、同じ分類群内において多様性が観察されるグループ(例えば、げっ歯目など)に大別できることから、なんらかの進化学的因果関係が存在していることが考えられるが、不明なままであった。

近年の分子生物学的手法の発達により、微生物の分類の指標となり得る 16S rRNA 遺伝子の配列を利用することによって、特定の環境中に含まれる微生物叢の同定が網羅的に行えるようになった。これらの技術を応用した先行研究から、哺乳類における消化管内微生物叢は、肉食<雑食<草食の順で多様性が高くなることや、分類群と食性および消化管内微生物叢の間には進化学的な関係性があることが示されつつある。しかし、これらの先行研究は主に大型動物から導かれたものであり、より原始的であり、より多様な食性を示す小型哺乳類の消化管内微生物叢は謎のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、野生由来の食虫目やげっ歯目

の消化管内微生物叢を 16S rRNA 遺伝子を用いて分子生態学的に同定し、食性の進化について消化管内微生物叢の多様性の観点から検討した。

## 3. 研究の方法

小型哺乳類は分類群内で食性が統一されるグループ(例えば、食虫目や翼手目など)と、同じ分類群内において多様性が観察されるグループ(例えば、げっ歯目など)に大別できる。そこで本研究においては、前者の例として食虫目のモグラ科のコウベモグラ *Mogera mogura* を、後者の例としてげっ歯目から雑食性のアカネズミ *Apodemus speciosus* を選定し、材料として用いた。消化管内微生物叢の解析は、消化管内容物から全 DNA を抽出し、微生物叢の DNA を PCR 法にて網羅的に増幅し(およそ 1400bp)、サブクローニングすることによって行った。また、哺乳類の草食化は様々な分類群で見られる適応的な形質だと考えられているが、分類群間の消化管内微生物叢の違いについては今まで評価されてこなかった。そこで、げっ歯目をを用いた実験においては、大型草食獣と比較可能な消化管形態を持つ種として飼育下のトリトンハムスター *Tscherskia triton* を利用し、前胃および盲腸の微生物叢を同定した。

得られた配列は、Ribosomal Database Project (RDB) の微生物種同定プログラムである Classifier を用いて微生物種の同定を行い、さらに微生物叢の多様性解析ソフトウェアである Mothur を用いて、その多様性の度合いを評価した。

## 4. 研究成果

動物種毎に得られた消化管内微生物叢の 16S rRNA ライブラリーから 200 クローン以上の配列を決定し、微生物種の同定を試みた。さらに得られた配列の多様性を、これまでの研究において報告された大型哺乳類と比較したところ、下記3点の結論を得るに至った。

(1) 小型齧歯類における前胃は、大型哺乳類のルーメンのように繊維質の分解には寄与していない

トリトンハムスターの前胃および盲腸からバクテリアの 16S rRNA ライブラリーを作成し、微生物叢の同定を試みた。その結果、前胃では 226 クローンの配列が得られ、そのうち Firmicutes 門が 182 クローン(80.5%) を占めており、次に Bacteroidetes 門が 36 クローン(15.9%) を占めていた。盲腸(259 クローン)でも同様に、Firmicutes 門(185 クローン:71.4%) および Bacteroidetes 門(59 クローン:22.8%) が多く、この2部門のバクテリアが優占的に生息していることが明らかとなった。しかし、Firmicutes 門と同定されたバクテリアの科レベルでの内訳をみると、前胃ではその殆どを Lactobacillaceae が占めていた(98.4%) の

に対して、盲腸では、Lactobacillaceae は僅か 18.4%に過ぎず、Lachnospiraceae( 46.5% )、Ruminococcaceae ( 25.9% ) など多様なバクテリアが検出された。

さらに前胃から得られた微生物叢の多様性の度合いを、大型反芻動物のルーメンから同様の手法で得られた研究成果と比較したところ、その多様性が極めて低いことが明らかとなった。

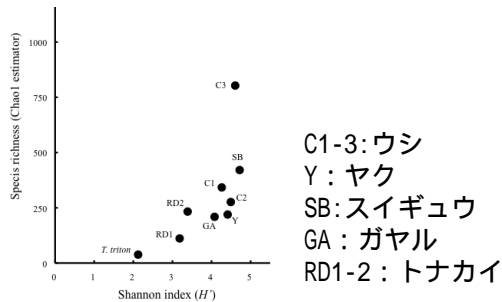


Fig. 1 : 前胃内微生物叢の多様性の比較

これらの結果から、小型齧歯類の前胃に生息する微生物叢の多様性は極めて低く、前胃の機能は大型動物のルーメンとは異なることが推測された。これらの結果は、野外捕獲したハタネズミ *Microtus montebelli* の前胃内微生物叢の解析によっても同様であった。その一方で盲腸には多様な微生物が生息しており、小型齧歯類において前胃と盲腸を併せ持つ場合、繊維質などの難消化性物質の分解には盲腸が主に寄与していることが推測された。

( 2 ) 雑食性齧歯類における消化管内微生物叢の多様性は極めて高い

雑食性の小型齧歯類の代表種として、日本の野山に普遍的に生息しているアカネズミを用いた。宮崎県宮崎市の清武側河口で捕獲したアカネズミ 5 頭を用いて盲腸内の微生物叢を解析した。

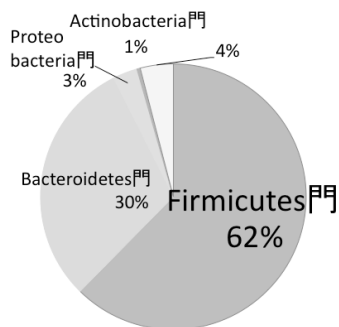


図 2 : アカネズミの盲腸内微生物叢における門レベルの構成比

210 クロンの配列を解析した結果、Firmicutes 門が 130 クロン( 61.9% )、Bacteroidetes 門が 64 クロン( 30.4% ) で大部分を占め、Proteobacteria 門が 7 クロン

( 3.3% )、Actinobacteria 門が 1 クロン( 0.5% ) 検出された。さらに、門レベルまで同定できなかったものが 8 クロン( 3.8% ) あった ( Fig. 2 )。

また、その多様性の度合いを評価したところ、シャノン指数(  $H'$  )は 4.41 と推測され、さらに推定される総微生物種数 ( Chao1 estimates ) は 224 と推測された。これは、これまでに報告されている大型の雑食動物の糞から得られた微生物叢 ( Ley et al. 2008 Science 320: 1647-1651 ) の値と比較しても遜色のない数値であった。また、トリトンハムスターの盲腸においても、同様の結果が得られていることから(  $H'$  =4.45、Chao1=214 )、雑食性齧歯類の盲腸内微生物叢の多様性は極めて高い事が示された。

( 3 ) 食虫性モグラ類における消化管内微生物叢の構成は他の分類群とは大きく異なるものの多様性は高い

食虫性の代表種としては、西日本に広く分布しているコウベモグラを用いた。コウベモグラは、真無盲腸目( Eulipotyphla )に属し、盲腸がないため、下部消化管より内容物を採取し、微生物叢の解析に用いた。得られた 206 クロンの配列を解析した結果、Proteobacteria 門が 75 クロン( 36.4% ) で最も多く、次いで Actinobacteria 門が 71 クロン( 34.5% ) であり、優先的に存在していることが明らかになった。また、Firmicutes 門は 33 クロン( 16.0% ) 検出され、さらに Acidobacteria 門が 6 クロン( 2.9% )、Chloroflexi 門が 4 クロン( 1.9% )、Armatimonadetes 門が 2 クロン( 1.0% )、Verrucomicrobia 門が 1 クロン( 0.5% ) と僅かではあるが検出された。興味深いことに、門レベルまでをも同定できなかったものが 14 クロン ( 6.8% ) あった。

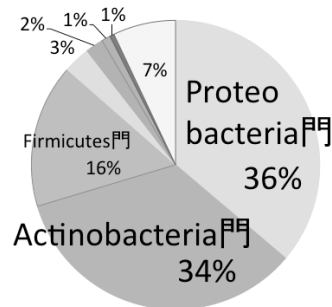


図 3 : コウベモグラの下部消化管内微生物叢における門レベルの構成比

これらの微生物叢の構成は、これまでに報告されている一般的な哺乳類の消化管内微生物叢とは大きく異なっている。実際に、同じ手法によって解析された本研究のトリトンハムスターやアカネズミなどとも異なっている。しかしながら、その多様性の度合いを評価すると、シャノン指数(  $H'$  )は 4.67

と推測され、さらに推定される総微生物種数 (Chao1 estimates) は 223 と推測された。すなわち、コウベモグラの消化管内微生物叢は、一般的な哺乳類の微生物叢の構成とはやや異なるものの、極めて多様性に富んだ構成であることが明らかとなった。さらに、門レベルですらも分類群を特定出来ないクローンの配列もあり、未知のバクテリアが生息している可能性も示された。

#### (4) まとめ

本研究の結果から、これまで殆ど調べられてこなかった小型野生哺乳類の消化管内微生物叢に関する新たな知見が集約された。特に、日本の野山に普遍的に存在する齧歯類や食虫目においては、食性に関係なく多様な微生物叢を保持していることが明らかとなった。これは、展示動物などの大型哺乳類を主として用いることによって導かれた知見である“消化管内微生物叢の多様性は、肉食<雑食<草食の順で高くなる傾向がある (Ley et al. 2008)”とは、やや異なる結果となった。しかしながら、解析した種数は決して多くはなく、今後さらに解析種数を増やしていくことが重要であると考えられる。

また、アカネズミ類はドングリなどの堅果を食べることで知られているが、根茎類などの繊維質が豊富な植物性食物だけでなく、昆虫類なども捕食する雑食性である。本実験で使用したアカネズミは河川敷で捕獲したアカネズミであり、食物利用としては堅果を利用出来ない環境であった。小型齧歯類の食物利用は、地域性や季節によって変化することが想像され、微生物叢もそれらに応じて異なることが想像される。今後は生息環境や捕獲季節が異なるアカネズミの微生物叢を調べることによって、雑食性齧歯類の微生物叢を明らかにする必要があるだろう。

一方で食虫性の種はモグラ類の他にコウモリ類が挙げられる。残念ながら本研究ではコウモリを解析することは適わなかったが、モグラ類にみられたような特異的な微生物叢が地下生活という生活環境に由来しているのか、それとも昆虫食という食性に由来しているのかを考察するためには、食虫性のコウモリ類との比較解析が必要で有効であると考えられる。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

篠原明男, 内田栄太, 井上比加里, 七條宏樹, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大 (2013年9月) 微生物叢の 16S rRNA 遺伝子解析からトリトンハムスターの大きな前胃の役割を推測する, 第 29 回日本霊

長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度 合同大会 (岡山県岡山市)

井上比加里, 酒井悠輔, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大, 篠原明男 (2013年9月) 食性の異なる小型哺乳類の消化管内微生物叢の分子生態学的比較解析, 第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会 (岡山県岡山市)

井上比加里, 井手麻佑子, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大, 篠原明男 (2012年11月) アカネズミ (*Apodemus speciosus*) の盲腸内微生物叢の解析, 第 30 回九州実験動物研究会総会 (長崎大学, 長崎市)

内田栄太, 篠原明男, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大 (2011年11月) トリトンハムスター (*Tscherskia triton*) の盲腸内微生物叢の解析, 第 29 回九州実験動物研究会総会, 鹿児島県民交流センター (鹿児島市)

[その他]

ホームページ等

井上比加里, 酒井悠輔, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大, 篠原明男 (2013) 食性の異なる小型哺乳類の消化管内微生物叢の分子生態学的比較解析. 霊長類研究 29 supplement p.215.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/primate/29/0/29\\_258\\_2/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/primate/29/0/29_258_2/_article/-char/ja/)

篠原明男, 内田栄太, 井上比加里, 七條宏樹, 坂本信介, 森田哲夫, 越本知大 (2013) 微生物叢の 16S rRNA 遺伝子解析からトリトンハムスターの大きな前胃の役割を推測する. 霊長類研究 29 supplement p.220.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/primate/29/0/29\\_261\\_1/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/primate/29/0/29_261_1/_article/-char/ja/)

#### 6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号: 50336294