

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292165

研究課題名(和文) 宿主との共進化をメルクマールとした家畜用プロバイオティクスの選抜と機能開発

研究課題名(英文) Selection and functionality of candidate strains for probiotics in terms of co-evolution with host livestock

研究代表者

牛田 一成 (Ushida, Kazunari)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50183017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：家畜用のプロバイオは、ヒト用に開発された菌株を転用したものが多く、家畜に適しているかどうか曖昧である。宿主と共進化してきた菌種を分離し、ゲノム解析と抗菌作用検定を組み合わせた。飼養形態と品種を異にする、野生と飼育下のアジアイノシシ、アカカワイノシシ、イボイノシシの新鮮糞のNGSによるメタゲノム解析のほか、単離乳酸菌の全ゲノム解析を行った。ブタ用プロバイオ候補菌として、イノシシ科の共生乳酸菌 *B. thermacidophilum* や *L. mucosae* の可能性が高いと判断した。*B. t* は、薬剤耐性を伝播するので、抗菌性に優れた菌株も存在した *L. mucosae* が有力であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Probiotics for livestock become popular, but most of products were derived from human-oriented products without verification in livestock. We isolated intestinal bacteria, which co-evolved with host pig during evolution of Suidae. We collected fresh feces from various animals of Suidae: domestic pigs (Japan and Africa), wild boar in Japan in wild or captivity, Red-river hogs and Wild hogs in wild or captivity. NGS-metagenome was done to identify dietary- and host-effect. *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Lactobacillus mucosae* were identified as Suidae-specific lactic acid bacteria and *L. amylovorus* is one became predominant with cereal feeding. Among co-evolved lactic acid bacteria, *B. thermacidophilum* often acquired tetracycline resistance, suggesting inappropriateness of *Bifidobacterium* as probiotics in pigs. *L. mucosae* is a better candidate of probiotics for pigs; one strain showed anti-pathogenic activity.

研究分野：動物生理学

キーワード：共進化 腸内細菌 ブタ イノシシ

1. 研究開始当初の背景

①生菌製剤開発とゲノム解析の現状

抗生物質耐性菌出現のリスクや安全安心な食品への要求から抗菌剤を使わない家畜生産システムの開発が求められている。生菌製剤いわゆるプロバイオティクスは、抗菌剤による疾病予防の代替法として注目されている。事実、これまでに多くの細菌株が飼料メーカーや食品メーカーによって生菌剤として開発され、それぞれ、多種多様な形態で販売されている。しかし、トライアンドエラーによるスクリーニングが開発の方法論であるため畜産現場においては、効果ははっきりしないことが多く、企業横断的な商品の比較も実施することが困難で、「いったいどの商品(菌株)が有効か」という質問を多く受けるのが現状である。また、ヒト用に開発されたものを家畜に転用しているだけのものが多いことも効果ははっきりしない理由と思われる。

近年のシーケンス技術の進歩によって生物の全ゲノム解析が進められており、細菌では、主として病原菌が対象とされている。一般細菌であるビフィズス菌は、申請当時 13 種(13 株)の全ゲノム情報が公開されており(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>)、そのほとんどは NCBI が主導するヒトの腸内細菌全ゲノム解読計画の一部である。従って、家畜ないしは家畜の起源となった野生動物由来のものは、ここには含まれていない。

②宿主と腸内細菌の共進化

ヒト由来のビフィズス菌は、古くから単離作業が進んでおり、全ゲノム解析によって、アミノ酸栄養における独立栄養性、効率的な糖取込みなどが明らかにされている。代表者は、これまでヒトや家畜を対象とした生菌製剤の開発評価を行うとともに、ゴリラやチンパンジー、ゾウを対象としたビフィズス菌の検索を行ってきた。これまで新規なビフィズス菌の単離に成功しておりヒトで優勢に検出される「ヒト型ビフィズス菌」との系統的な違いを見出している。これらの「草食動物型ビフィズス菌」(類人猿では、葉食果実食型ビフィズス菌)とヒト型の菌種にみられる大きな違いは、繊維成分の資化性と核酸利用性およびデンプン資化性である。我々の祖先が、森の中の果実食から、*Homo habilis*, *H. erectus* を経て、狩猟採集による肉食デンプン食に移行し、現生人類が農耕社会に移行するにつれて一段とデンプン摂食量が増加した経緯があり、宿主の食性の変化に適応して繊維分解力や窒素スカベンジング能力を失い、デンプン資化性を獲得することで現在のヒト型に進化したものと推測できる。いっぽう、過去に日本のブタから単離された一部のビフィズス菌(*Bifidobacterium pseudolongum*)にもデンプン資化性を持つ株が存在し、家畜化の進行のなかで安定的なデンプン食が次第に確立したことに本菌種が適応した可能性

がある。ビフィズス菌は、高 GC 放線菌の仲間であり腸内菌としてはかなり特殊な系統であるため、ビフィズス菌が獲得したアミラーゼ遺伝子を中心としたオペロン構造の起源について十分に解析をおこなうことが、共進化を明らかにするうえで必要である。また、ヒトでは優占しないが、ブタでは乳酸桿菌が、優占種として存在する。ブタを対象とする場合、ビフィズス菌よりも、乳酸桿菌のほうが、共進化を考察する上で有用であるかもしれない。

③生菌剤と腸内増殖性および抗菌性

ビフィズス菌や乳酸桿菌ラクトバシラスなどの乳酸菌は、生菌剤として繁用されるが、一部のデンプン資化性ビフィズス菌ではヒトやラットの腸管における増殖性が認められるものの、それ以外の生菌剤ビフィズス菌は腸管内の増殖がほとんど期待されておらず、生理効果を得るために投与菌数を増加する方向で技術開発が進んでいる。小腸における粘膜免疫刺激効果をもつばら想定するのであれば、この方向性も有効と考えられるが、一方、大腸における効果を想定するには、大腸内の増殖性が担保されている菌株が有利である。デンプンは、ブタなど単胃家畜用飼料の主成分であるが、よく知られているように難消化性部分を含んでいるために、相当量が未消化のまま大腸に流入し、そこで腸内細菌の発酵作用を受ける。そのため、デンプン給与量の多いブタで、デンプン資化性による大腸増殖性を評価のメルクマールとし、その他の生理活性機能を二次的な要素として選抜するストラテジーは合理的である。ビフィズス菌と並んで生菌剤に使用されるラクトバシラスは、あまりデンプン資化性を高くないことが知られている。

生菌製剤に期待される効能のうち最も大きなものは腸症状の改善緩和である。家畜の病原性下痢の原因は多岐にわたるが、抗菌性薬剤に頼る現状から脱するために、生菌製剤に対する期待が高い。ラクトバシラスをはじめとする乳酸菌は、乳酸の分泌による pH 低下や抗菌性ペプチド生産によって、とくに日和見感染に対する防御効果が期待できる。抗生物質の予防的使用が認められていないために、とくに養豚や養鶏に適した菌株の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、プロバイオティック細菌として多用される *Bifidobacterium* 属 *Lactobacillus* 属について、生理機能を生化学的に解析するとともに、宿主との共進化という観点から対象家畜とそれに類縁の野生動物種より単離した当該菌の比較解析をおこなうことで、生感性や抗菌性などの有用形質、薬剤耐性などの非有用形質の可視化を進める。すなわち、古典細菌学的手法と次世代シーケンサー等を用いたメタゲノム解析と単離菌の全ゲノムシーケンス技術を融合し、菌の宿主「家畜化」

に対する適応と進化、有用形質の獲得や喪失を明らかにすることで、対象家畜に適合したプロバイオティック乳酸菌選抜の指標を明らかにするものである。

3. 研究の方法

本研究では、ブタを直接の対象としたのでブタの家畜化の影響を評価するために、ブタの直接の祖先種であるイノシシから乳酸菌分離を試みた。また、同じ観点で、野生動物が飼育されることによっておこる共生腸内細菌の変化を評価するために、イノシシ類については、野生下と飼育下の両方の個体から乳酸菌を分離した。

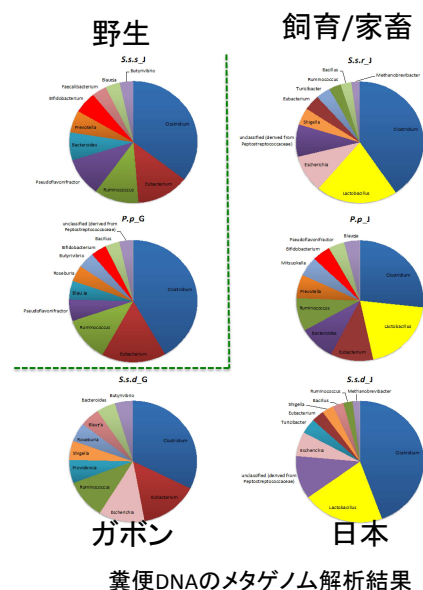
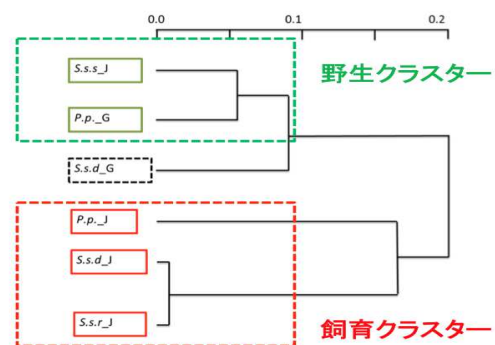
イノシシ科(Suidae)には、ブタの直接の祖先であるヨーロッパイノシシ(*Sus scrofa scrofa* ヨロッパ品種家畜ブタの祖先)、アジアイノシシ (*Sus scrofa scrofa* アジア品種家畜ブタの祖先)のほか、数百万年前にユーラシアで現生イノシシ属から分離し、アフリカ大陸に進出したカワイノシシ属(*Potamochoerus*)、イボイノシシ属(*Phacochoerus*)、モリイノシシ属(*Hylochoerus*)が現存しており、アカカワイノシシ(*Potamochoerus porcus*)およびイボイノシシ (*Phacochoerus africanus*) の野生個体と飼育個体の糞から BS 培地、LBS 培地、MRS 培地を用いて乳酸菌の分離と同定を行い、その一部を選抜してゲノム解析を実施した。野外での細菌分離については、土田らの方法(Tsuchida et al. 2014. IJSEM)に従った。

分離株の抗菌性をブタ由来の大腸菌を標的として実施した。MRS 液体培地で *L. mucosae* 分離株を培養し、培養液上清を中和したのち、大腸菌をあらかじめ塗抹したミュラーヒントン平板に孔をあけ、そこに注入し、静置培養した。ハローが形成された場合、抗菌性ありと判定した。

4. 研究成果

2013 年度には、家畜ブタ (日本産ヨーロッパ種 10 頭、ガボン産アフリカ在来種 2 頭)、飼育リュウキュウイノシシおよび交雑イノシシ 8 頭、野生ニホンイノシシ 4 頭、アカカワイノシシ飼育個体 5 頭、ガボン共和国野生個体群 3 群から新鮮糞便を採取し、*Lactobacillus* 属細菌約 200 株および *Bifidobacterium* 属細菌約 30 株を単離した。16S rRNA 遺伝子による系統解析を行い、全ゲノム解析に供する菌株を選抜した。48 菌株のゲノムをシーケンスし、マッピングの後、COG データベースに基づいて遺伝子の有無を判定した。すべての分離ビフィズス菌は *B. thermacidophilum* であり、*B. t. thermacidophilum* と *B. t. porcinum* の 2 亜種のいずれかに分類された。乳酸桿菌は、*L. mucosae*、*L. amylovorus*、*L. reuteri*、*L. ruminis*、*L. delbreuckii* のいずれかに属していた。*L. mucosae* が最も単離例が多く、ついで *L. amylovorus* であった。*L. mucosae* が野生・飼育を問わず *Sus* 属と *Potamochoerus* 属の個体

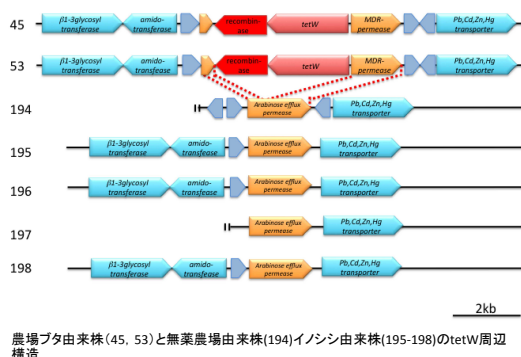
から分離されたのに対し、*L. amylovorus* は、飼育された個体からしか単離されなかった。2014 年度には、ガボン産アフリカ種ブタ 2 頭、野生アカカワイノシシ 1 頭、野生ニホンイノシシ捕獲個体滋賀県 1 頭および京都府南部地域 2 頭、ガーナ共和国イボイノシシ野生個体 3 頭およびアクラ動物園飼育個体 6 頭より糞便試料を採取した。それぞれからを用いて乳酸菌約 100 菌株を分離し、純粋化ののち DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列にもとづいて同定をおこない、昨年度に引き続きイノシシ科に共通する乳酸菌として *L. mucosae* を、飼育個体に共通する乳酸菌として *L. amylovorus*、*L. reuteri* を得た。26 年度もゲノム支援の援助を受けて、上記 3 種乳酸菌の合計 80 株の全ゲノムシーケンスを宮崎大学医学部において実施した。これらの乳酸菌単離状況から、イノシシ科に共通する乳酸菌として *L. mucosae* が存在することが明らかとなった。*L. amylovorus* は、飼育によって優勢化した乳酸菌であることがわかった。また、*B. thermoacidophilum* がイノシシ科に共通するビフィズス菌である事がわかった。2015 年度には、ウガンダ共和国ムピジ県のアフリカ在来種家畜ブタ 2 頭より乳酸菌 16 株を分離した。2016 年には、おなじウガンダ共和国ムピジ県とワキソ県の農家で形容されている在来種ブタ 2 頭より 40 株の乳酸菌を分離した。



糞便DNAのメタゲノム解析結果

2013年度に実施したイノシシ科6種動物の新鮮糞のDNAメタゲノムデータを解析することで原核生物の分布と真核生物の分布を数量化した。食物由来と考えられる真核生物のメタゲノム情報には種間および飼育条件間に大きな違いがなかったものの、原核生物由来の遺伝子の構成には、1) 野生個体か飼育個体か、2) 家畜ブタであるかイノシシ(あるいはアカカワイノシシ)であるかの間に大きな差異を認めた。飼育個体では、種にかかわらず *Lactobacillus* 属が優勢化しているのに対し、野生個体では *Bifidobacterium* 属が最優勢の乳酸菌であった。一方、家畜ブタではアカカワイノシシおよび野生ニホンイノシシと比較して大腸菌群が優勢化していることが明らかとなった。

両亜種に共通して検出されるビフィズス菌 *B. thermoacidophilum* のゲノム解析結果から、本菌のコアゲノム配列によって飼育由来株と野生由来株が、系統的に分離することがわかった。アセンブルおよびアノテーション後の比較ゲノム解析の結果、養豚場のブタ由来のビフィズス菌についてのみ、薬剤耐性遺伝子の存在が示唆された。テトラサイクリン耐性遺伝子の *tetW* を始め、リンコマイシンやエリスロマイシン耐性遺伝子の存在が推定されたが、ディスクディフュージョン法で検討した結果、テトラサイクリンに対してのみ耐性を示した。*tetW* 周辺の構造を解析した結果、*tetW* 上流には、水平移動を可能にするトランスポザーゼ(セリンリコンビナーゼ)の存在が検出された。*tetW* の水平移動によって、分断された遺伝子が、耐性遺伝子を持たない野生イノシシ由来株と無薬飼育をしている大学農場飼育ブタ由来株との比較の結果、アラビノース輸送タンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。この他、家畜化することに対応して、野生イノシシ由来のビフィズス菌のゲノムから、キシラナーゼやキチナーゼ遺伝子が欠損した可能性が示唆された。



イノシシ科に共通する *L. mucosae* の抗菌性を合計 66 株について判定したところ、京都府立大学精華農場で害獣駆除のために捕獲されたニホンイノシシ分離株 26-11 に顕著な抗菌性が認められた。

以上の結果より、ブタ用のプロバイオティクスの有力な候補菌として、イノシシからブタが家畜化された過程でも、腸管内に定着し続けた *B. thermoacidophilum* や *L. mucosae* がイノシシ科の共生乳酸菌として最も可能性があると判断された。穀類の多給条件で優占するようになった *L. amylovorus* は、飼養条件によって定着してきた細菌と考えられること、*B. thermoacidophilum* は、薬剤耐性遺伝子を獲得してしまうことやフードチェーンに乗った際に、ヒトで優先するビフィズス菌に薬剤耐性を付与してしまう可能性があることなどからプロバイオティクス候補菌としては *L. mucosae* のほうが有力であると推察された。実際、本菌の中から抗菌性に優れた菌株も見いだすことができた。

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3件)

① 土田さやか・牛田一成 2016. 様々な動物から分離される乳酸菌・ビフィズス菌～ゴリラにはゴリラの乳酸菌、ヒトにはヒトの乳酸菌～. 日本乳酸菌学会誌 27: 25-33. (査読有)

② Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Toyoda A, Maruyama F. 2016. Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of Suidae. Anim Sci J 87: 835-841. (査読有)

③ 牛田一成・土田さやか 2016. 野生動物の腸内細菌研究の意義と展望. ルーメン研究会報 27: 23-29. (査読なし)

[学会発表] (計5件)

① 牛田一成 土田さやか 丸山史人 大熊盛也 イノシシとブタに共通するビフィズス菌のゲノム解析と薬剤耐性遺伝子の偏在について 日本畜産学会第121回大会 2016年3月26日「日本獣医生命科学大学(東京都)」

② 牛田一成 様々な動物から分離される乳酸菌・ビフィズス菌 日本乳酸菌学会 2015年11月27日「昭和女子大学(東京都)」

③ Ushida K, Tsuchida S, Maruyama F. Domestication developed the pig-type intestinal microbiota. International symposium on Genome Science 2015. 2015年1月20日～21日「一橋会館(東京都)」

④ 牛田一成 土田さやか 宿主の家畜化が腸内細菌にもたらすインパクト-乳酸桿菌のゲノム解析で見えてきたもの ルーメン研究会 2014年9月27日「明治大学(東京都)」

⑤ 牛田一成 土田さやか 丸山史人 大熊盛也 宿主との共進化をメルクマールとした家畜用プロバイオティクスの選抜と機能開発. ゲノム支援拡大班会議 2014年8月20日「ポートピアホテル(兵庫県神戸市)」

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://seika.kpu.ac.jp/~k_ushida/ushidaintro.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

牛田一成 (USHIDA, Kazunari)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183017

(2)研究分担者

大熊盛也 (OHKUMA, Moriya)

理化学研究所・微生物材料開発室・室長

研究者番号：10270597

丸山史人 (MARUYAMA, Fumito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30423122

(3)連携研究者

塚原隆充 (TSUKAHARA, Takamitsu)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・特任講師

研究者番号：90562091

井上亮 (INOUE, Ryo)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926

(4)研究協力者

土田さやか (TSUCHIDA, Sayaka)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・特任講師

研究者番号：40734687