

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06363

研究課題名（和文）オミクスによるウシルーメン環境概日リズムの解明とルーメン発酵安定化への応用

研究課題名（英文）Applying mixed omics-based approach for elucidation of diurnal changes in the rumen fermentation

研究代表者

上野 豊（Uyeno, Yutaka）

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：00542911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では2回の肉用牛肥育牛飼養試験を行い、第一胃（ルーメン）発酵のモニタリングに適した指標化合物として、数種類のアミノ酸を指標化合物として利用可能であることを見出した。また、ルーメンにおける特定した焦点化合物と既存の指標化合物の濃度、ルーメン微生物群集構成の日内変動解明に取り組み、ルーメン液VFA総量とその組成、細菌叢構成について大きな日内変動が見られた。2回給与区4回給与区では、どの指標も1日を通じて安定していた。1日1回の飼料給与では、個体それぞれが持つ細菌叢によって、時間帯によっては偏った胃内発酵が生じるが、給与回数を増やすことで時間変動の少ない安定した発酵となることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反芻動物における胃内発酵の最適化は、効率的な肉乳生産だけでなく、動物由来地球温暖化ガス低減にも有効である。その実現には、これまでとは異なる胃内発酵の評価指標が求められており、今回課題の達成により、新たな指標物質の可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted two feeding trials and found that multiple amino acids can be used as indicator compounds suitable for monitoring rumen fermentation. In addition, we investigated diurnal changes in the concentration of identified compounds and other index compounds in the rumen, and in the composition of rumen microbial communities. All indicators were stable throughout the day in the 2-time and 4-time feeding procedure, while feeding once a day caused excess rumen fermentation in a day, depended on the bacterial flora of each animal.

研究分野：動物栄養学

キーワード：反芻胃 地球温暖化ガス 指標化合物 日内変動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肉牛肥育牛飼養における濃厚飼料多給は効率的な増体の確保に不可欠である一方で、第一胃(ルーメン)で起こる過度の発酵が様々な疾患原因となり、増体の停滞や産肉成績低下を招く。近年では、効率生産にはルーメン発酵を重視した飼育方法が不可欠であるとの理解が進んでいる。但馬牛は、黒毛和種牛のなかでも高い肉質を持つと同時に、その能力を発揮するためには精密で高度な飼料設計管理(粗飼料の機能性の違い、飼料中アミノ酸バランスとルーメン微生物の関係)が必要とされ、ルーメン内発酵の調節・最適化を可能とする給与技術の開発が強く望まれている。ルーメン発酵の正常性を評価する指標化合物として主にVFA、乳酸、アンモニア態窒素が用いられてきたが、複雑な発酵過程の解明には、これらの指標だけでは不十分で、新たな指標が必要である。ルーメン発酵解析にメタゲノムおよびメタボローム解析すなわちオミクス手法の導入によって、発育段階、飼料などにより微生物群集構造とその代謝が大きく変化することが分かり、これらの結果を統合することで新たな指標が見出され、ルーメン内環境の推移をより詳細に表せる可能性がある。一日の活動の中でどのようにルーメン環境は変化するか、すなわち「どのような微生物が」「いつ」「どのような代謝産物を作っているか」について、さまざまな指標を利用して解釈しその調節を図ることで効率的生産が可能となる。

2. 研究の目的

【目的 ルーメン機能の見える化促進】ルーメン内微生物発酵により生成する化合物の中で、ルーメンの発達や発酵状態と相関があり、容易にモニタリングが可能である指標化合物(焦点化合物)を特定する。

【目的 ルーメン機能最適化手法開発】ルーメンにおける特定した焦点化合物と既存の指標化合物の濃度、ルーメン微生物群集構成は、日内でどのようにリズムを作って変化しているかを明らかにして、飼料給与回数の違いが第一胃内環境変動に及ぼす影響を解明する。本研究では、まずルーメン発酵をモニタリング可能な指標化合物を探索し、ルーメン微生物環境がどのように変動するか、またその変動は宿主生産性にどのように反映されるかを評価するための、2回の飼養試験と試料分析を実施した。

3. 研究の方法

第1回飼養試験 研究分担者所属機関飼養牛4頭を用いて、フィステルからの胃液採取を行った。肥育後期(23か月齢)のルーメン液を1か月おきに25か月齢まで採取し、次世代シーケンシングによる微生物叢解析を行い、各試料における微生物群集構成を測定した。並行してメタボローム解析による微生物代謝物プロファイル解析を行った。ゲノムDNA抽出は、DNA抽出キットQIAmp Fast DNA Stool Mini kit(QIAGEN)に添付のプロトコルに従って行った。抽出ゲノムDNAを用いて次世代シーケンシングは既報[Uyeno, Matsumoto, 2019]をもとに実施した。細菌16SrRNA遺伝子V4領域をカバーしているプライマーセット(515Fおよび806R)を用いて、DNAポリメラーゼ(Ex Taq Kit)を指定条件で用い、T-100サーマルサイクラー(Bio-Rad)で増幅した。産物を精製してライブラリを構築したのちMiSeq(Illumina)によるシーケンシングを行った。シーケンシング後

QIIME ソフトウェアを用いてキメラ配列の除去を行った。除去後の全シーケンスに対して 97% 配列相同の基準として operational taxonomic units (OTUs) を特定後、各 OUT 配列について Ribosomal Database Project (RDP) により属レベルまで特定を行った。ルーメン液の有機酸分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、既報 [Kido et al,2019] をもとにして実施した。

第 2 回給与試験 複数の測定対象化合物のルーメン液中濃度日内変動を評価するための試験を実施した。研究分担者機関において飼養試験 (但馬牛フィステル装着牛・12 頭) を行い、この際、日内の発酵変動の影響を捉えられるように、1 日の給餌量は同量であり、飼料給与回数を変化 (毎日 1 回、2 回、または 4 回) させた試験を実施した。肥育前期 (12 か月齢) ~ 肥育中期 (22 か月齢) のなかでルーメン液を 4 か月おき、都度 24 時間あたり 7 回採材した。採取ルーメン液から細菌ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンシングによる微生物構造解析を実施した。また、各ルーメン液サンプルの VFA 濃度を HPLC で測定した。

4 . 研究成果 (公表可能な部分のみ掲載)

第 1 回飼養試験では、午後給餌後 5 時間 (21 時サンプリング) で飼料微生物発酵による有機酸生成が亢進した。第 2 回飼養試験では、飼料摂取量および発育において、処理区間に差が認められなかった。

今後はメタボローム解析を行い、微生物との関連を調べることで、さらに詳細な日内変動を可視化できると考える。また、日内変動と関連する細菌や代謝産物を特定し (焦点化合物) それを測定、モニタリングすることでルーメン発酵のメタデータを蓄積する。それを応用した適切な給餌時間、給餌量などを判断する技術と、昼夜問わず飼養管理可能な給餌システムの導入を組み合わせることで、反芻動物生産技術の向上につなげることが可能となるだろう。

引用文献

Kido K, Tejima S, Haranishi M, Uyeno Y, Ide Y, Kurosu S, Kushibiki S, Provision of beta-glucan prebiotics (cellooligosaccharides and kraft pulp) to calves from pre- to post-weaning period on pasture, *Animal Science Journal*, 90, 1537-1543, 2019

Uyeno Y, Matsumoto Y, Changes in bacterial composition during in vitro oil degradation experiments using activated sludge from different sources, *Water Practice & Technology*, 14, 931-936, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Yutaka Uyeno
2. 発表標題 Heat Stress on the rumen fermentation and its consequence
3. 学会等名 Australia-India Council Sponsored 3 Days International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤野瑞生・正木達規・生田健太郎・上野豊
2. 発表標題 黒毛和種牛のルーメン内環境概日リズムの評価
3. 学会等名 北信越畜産学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yutaka Uyeno	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Verlag	5. 総ページ数 321
3. 書名 Climate Change and Livestock Production: Recent Advances and Future Perspectives	

〔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
研究分担者	正木 達規 (Masaki Tatsunori) (20762701)	兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター・上席・主任研究員 (84508)	

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
---------	---------