

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05636

研究課題名(和文) 腸内細菌叢から見た在来家畜アグー豚の独自性の解明

研究課題名(英文) Characterization of indigenous Agu pigs based on their gut microbiome

研究代表者

和智 伸是 (Wachi, Nakatada)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：40635299

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)：本研究では、宿主特異的な腸内細菌群に着目し、日本唯一の在来豚であるアグー豚の「粗食で育つ」という性質に関連する腸内細菌群の探索を試みた。当時沖縄県内で登録されていたアグー豚個体のおよそ1割にあたる個体の糞便試料を収集することができ、また、糞便を元にした細菌叢メタバーコーディング解析の実験系をほぼ確立することができた。予想に反して、アグー豚を特徴づけるような細菌群の候補を見出すことができなかった。また、コロナ禍や研究代表者の所属の異動などの理由により、当初想定していた状態の研究環境や研究体制の整備に時間がとられてしまい、予測メタゲノム解析まで期間内に行うことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、宿主特異的な腸内細菌群に着目し、在来家畜の特徴的な性質を説明することを目指した。そのために、日本唯一の在来豚であるアグー豚の「粗食で育つ」という性質に関連する腸内細菌群を探索した。アグー豚の「粗食で育つ」という生理機能の一端を担う細菌叢を明らかにすることで、未知の細菌群を含む、特徴的な生理機能をもった新規の細菌群を見出すことができる可能性がある。海外の在来豚で知られているもののそのような例は少ない。そのため、一連の研究を通して、アグー豚のような地域固有の在来家畜それ自体だけでなく、その腸内細菌も遺伝資源として貴重であることが示唆できるはずである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on host-specific gut bacterial groups and investigated those associated with the fiber-rich fed nature of the Agu pig, indigenous pig of Japan. We collected fecal samples from approximately 10% of all registered Agu pigs in Okinawa Prefecture at the time. Additionally, we established an experimental system for flora metabarcoding analysis using these fecal samples. Contrary to our expectations and the preliminary experiments, we did not identify any candidate bacterial groups that characterize Agu pigs from this data. Moreover, due to the COVID-19 pandemic and the principal investigator's change of affiliation, there were delays in establishing the research environment and system. Consequently, we were unable to complete the predictive metagenomic analysis as originally planned.

研究分野：分子生態学

キーワード：在来家畜 アグー 腸内細菌叢 メタバーコーディング メタゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

細菌は多様な環境に生息し適応放散を遂げており、地球上のバイオマスの 1/2 から 1/3 を占めている。動物の腸管内も細菌が適応を遂げた環境の一つで、多種多様な細菌が生息している。例えばヒトでは 500-1,000 の種・ $10^{13-14}$  の個体が生息すると推定されている(Xu & Gordon, 2003)。これらの腸内細菌群は、宿主ゲノムが持つ代謝系のみでは利用出来なかった有機物を代謝している。そのため、**宿主は腸内細菌の代謝産物を利用することで結果的に宿主自身が持たない生物的機能を補っている**。この腸内細菌叢の代謝産物は宿主にとって欠かせないものになっており、腸内細菌叢は一つの器官として捉えられる。また、特定の細菌が腸管内に定着でき、腸内細菌として機能しうるかどうかは宿主側の形質の一つと考えることができる。このように**宿主と密接な関係をもつ腸内細菌は宿主ごとに特異的であり、宿主はその特別な機能の恩恵にあずかっている**場合がある。例えば、シロアリは、セルロースなど難消化物の分解を腸内細菌などに頼っている(Brume & Dietrich, 2015)。また、ヒトでも肉食主義者の腸内細菌叢は特徴的であり、*Prevotella* 属など炭水化物や食物繊維の分解に関連する細菌群が多い(Precup & Vodnar, 2019)。また、水平伝播によって獲得した、海藻を分解する酵素を持つ特徴的な細菌群が海藻をよく食べる日本人の腸内細菌叢にのみ存在する(Hehemann et al., 2010)。ヒトや操作実験の行いやすい実験動物を除けば、**宿主特異的な腸内細菌群やその特徴的な代謝産物の生理機能に関する知見は少ない**(Moeller & Sanders, 2020)。

アグー豚は沖縄在来のブタである(高田ら, 2008)。戦後に西洋品種(ランドレース・大ヨークシャーなど)が大量に導入されたことで、その個体数が激減した。また、導入された品種との交雑が進み、一時は系統が途絶える寸前まで数を減らした。アグー豚の肉質は、西洋品種と比べて脂の口溶けがよく美味いいため、ブランド豚として近年注目されている。このアグー豚の特徴の一つは、一般的な西洋品種に比べて粗食(食物繊維の多い貧栄養餌)で育つ点である(峰澤, 2005)。一方で西洋品種と同様の配合飼料で育てると、過剰な脂肪が蓄積する。

### 2. 研究の目的

本研究の見据える最終的な目標は、遺伝的背景と腸内細菌叢の相互作用が宿主の形質に与える影響を解明することである。そのための第一歩として、本研究では、**特徴的な性質をもつアグー豚に着目し、まずその腸内細菌叢の特徴の有無を明らかにする**。そして特異的な細菌群の代謝産物の機能とアグー豚に特徴的な性質との関連の有無について明らかにすることを旨とする。具体的には、糞中 DNA

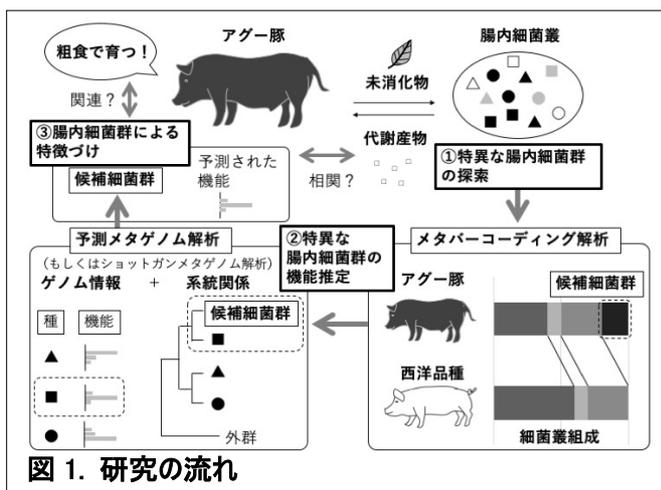


図 1. 研究の流れ

をもとにしたメタバーコーディング解析・メタゲノム解析を行うことで、アグー豚の腸内細菌叢の機能を明らかにする(図 1)。

### 3. 研究の方法

宿主であるアグー豚が影響を受けている腸内細菌叢の代謝のうち、**宿主特異的な細菌群が担う役割の解明について本研究は取り組む**。一方で代謝に関わる宿主側の遺伝的要因の解明に

については、一連の研究の最終的な目標ではあるが本研究課題では範疇外とする。具体的には、**複数環境下のアグー豚を対象にした網羅的解析・西洋品種との比較解析を行うことで、腸内細菌から見たアグー豚の独自性を解明すること**を本研究の目標とする。さらに、予測メタゲノム解析もしくはショットガンメタゲノム解析を行うことで、「粗食で育つ」というアグー豚の特徴に関連した機能を持つ細菌群を見出す。

### 研究① アグー豚の腸内細菌叢の解明

材料:アグー豚と西洋品種の糞便

方法:糞中の DNA をもとに腸内細菌叢の種構成を明らかにする。具体的には 16s rRNA 遺伝子の一領域 (V3-V4 領域) の PCR を行う。次世代シーケンサにより得られた PCR 産物の塩基配列決定を行う。既知の細菌の塩基配列に対する類似性検索により、得られた配列をもとに種同定を試みる。日齢や餌・離乳後の期間が腸内細菌叢に影響を与えると考えられることから、できる限り条件を揃える。アグー豚については複数の環境で

飼育されている個体間で共通して見出される腸内細菌群を明らかにすることで、その一般性を明らかにする。西洋品種については、自らで試料を収集することが難しい場合は、先行研究の情報を参考にする。これまでの予備的解析では、**1)門レベルでは他の品種に似ていること・2)属レベルでは *Prevotella* 属が多いこと・3)未同定種が多いこと**が示唆されている (図 2)。この予備的解析では一つの畜産農家から得られた試料のみを用いている。見出された特徴がアグー豚に一般的なものなのか、特定の環境に由来するものなのか今後明らかにする必要がある。また未同定種が多い点は未知の細菌群の存在を示唆している。しかし解析手法による誤検出の可能性があるので、閾値を変更する・複数の手法を用いるなどの慎重な検討を行う。

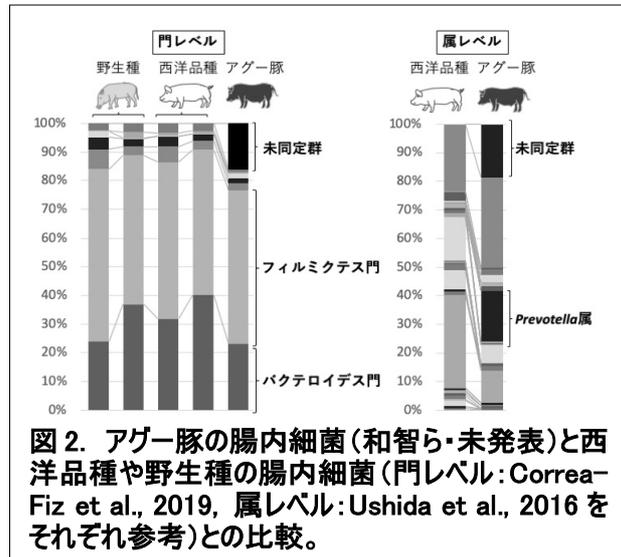


図 2. アグー豚の腸内細菌 (和智ら・未発表) と西洋品種や野生種の腸内細菌 (門レベル: Correa-Fiz et al., 2019, 属レベル: Ushida et al., 2016 をそれぞれ参考) との比較。

### 研究② アグー豚に特異的な腸内細菌群の探索

材料:アグー豚と西洋品種の糞便

方法:①で得られた情報をもとに、アグー豚にのみ見られる腸内細菌群の一覧を作成する。得られた細菌群の組成と近縁種のリファレンスゲノムデータにより、仮想のショットガンメタゲノム情報を構築する (予測メタゲノム解析)。得られた情報から細菌群の生理機能を推定する。また、属レベルなどの同じ分類群に属する近縁種との系統関係を推定することで進化的起源についても考察する。ブタの代謝に直接関わるような生理機能が予想された場合は、さらに詳細な解析を行う。具体的には、糞中 DNA をもとにライブラリを作成し、実際にショットガンメタゲノム解析を行う。得られた情報をもとに、機能遺伝子の具体的な特定を目指す。これまでの予備的な解析でセルロース分解能を持つ細菌群 (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) がアグー豚に特異的である可能性が示唆されている (図 3)。

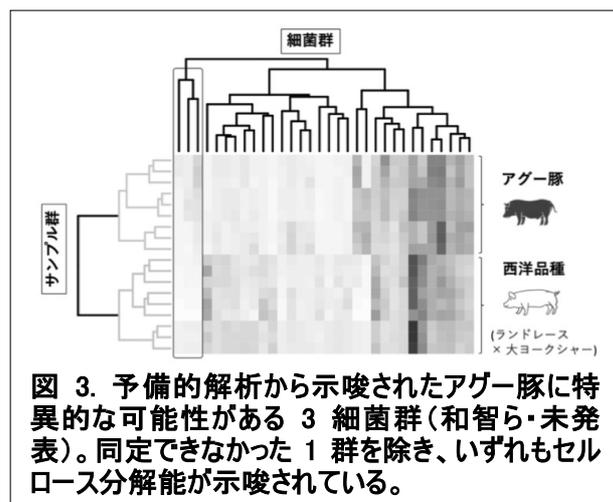


図 3. 予備的解析から示唆されたアグー豚に特異的な可能性のある 3 細菌群 (和智ら・未発表)。同定できなかった 1 群を除き、いずれもセルロース分解能が示唆されている。

化的起源についても考察する。ブタの代謝に直接関わるような生理機能が予想された場合は、さらに詳細な解析を行う。具体的には、糞中 DNA をもとにライブラリを作成し、実際にショットガンメタゲノム解析を行う。得られた情報をもとに、機能遺伝子の具体的な特定を目指す。これまでの予備的な解析でセルロース分解能を持つ細菌群 (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) がアグー豚に特異的である可能性が示唆されている (図 3)。

### 研究③ アグー豚の腸内細菌叢で中心的な役割を担う細菌群の探索

材料:アグー豚と西洋品種の糞便

方法:①②で得られた情報をもとに、相対頻度から中心的役割を担う細菌群を特定する。その細菌群とアグー豚に特異的な細菌群それぞれの生理機能を比較し、両者が協調関係にあるのか競合関係にあるのかを明らかにする。そして、**アグー豚に特異的な細菌群の生理機能の重要性を考察する。**

#### 4. 研究成果

本研究では、宿主特異的な腸内細菌群に着目し、日本唯一の在来豚であるアグー豚の「粗食で育つ」という性質に関連する腸内細菌群の探索を試みた。当時沖縄県内で登録されていたアグー豚のおよそ 1 割にあたる個体の糞便試料を収集することができ、また、糞便を元にした細菌叢メタバーコーディング解析の実験系をほぼ確立することができた。予想に反して、アグー豚を特徴づけるような細菌群の候補を得られたデータから見出すことができなかった。また、コロナ禍や研究代表者の所属の異動などの理由により、当初想定していた状態の研究環境や研究体制の整備に時間がとられてしまい、予測メタゲノム解析まで期間内に行うことができなかった。そのため、得られた結果の多くは予備的なものであり、論文出版に耐えられる結果が得られているとは言い難いのが実情である。今後、再解析もしくは同様の方法での試料の再収集の必要があると思われる。

予備的研究では、一つの畜産農家由来の試料を用いた点、糞便を個体から直接採取した点、サンプルあたりのデータ量が多い点などが異なっている。環境の違いが腸内細菌叢の組成に影響していることは今回の結果からも示唆されており、今回十分な試料を得ることができていないアグー豚と同じ環境中で飼育されている西洋品種の試料を検討する必要がある。また、より多くのデータ量を伴った解析だけでなく、今回期間内に実施することができなかった予測メタゲノム解析を今後の研究計画に盛り込み、さらに詳細な腸内細菌叢の機能的な特徴を明らかにする必要がある。

#### 成果① 県内のアグー豚糞便試料の収集

2021 年度中に県内 2 箇所の畜産農家でアグー豚の糞便試料を収集した。前年度までに収集していた試料と合わせ、合計 111 (2 研究機関・5 畜産農家) の試料を得た。またアグー豚と同じ敷地で飼育されている西洋品種の糞試料についても合わせて収集し、合計 22 (2 研究機関・3 畜産農家) の試料を得た。沖縄県内でのアグー豚の登録数は 1000 頭前後 (2019 年: 983 頭, 2020 年: 790 頭, 2021 年: 689 頭, <https://okinawa-agu.com/producers-distributors/statistical-data/>) を推移しており、今回得た試料は登録個体のおよそ 1 割にあたる。

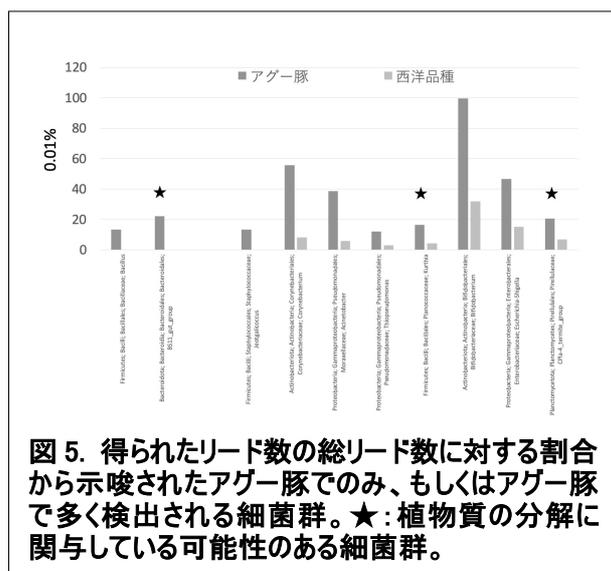
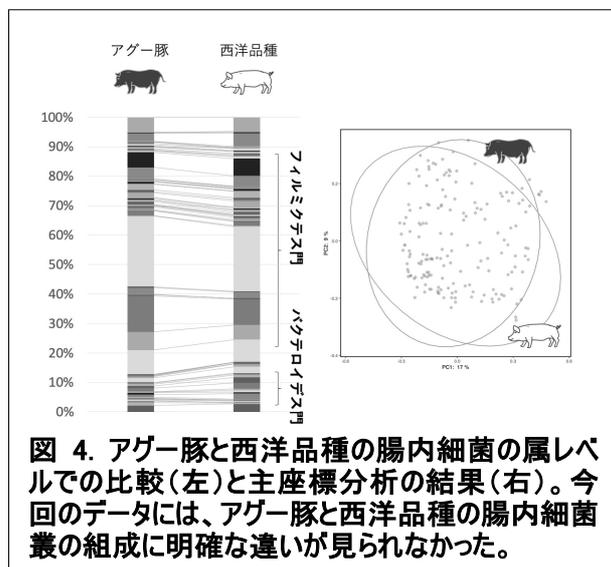
#### 成果② アグー豚糞便試料からの細菌叢解析系の確立

すでに所属機関で確立していた細菌叢のメタバーコーディング解析系を、得られた試料の解析に適用したところ、NGS ライブラリの構造に起因すると考えられる実験の不備があった。そこで、NGS ライブラリの作成手順の改良を検討し、従来手法との比較が必要ではあるものの、今回の試料でも良好な結果が得られるように改良した実験系を確立した。具体的には 1) 使用領域の変更(16s rDNA の V3-V4 領域から V4 領域)、2) 人為的

にスリッページを起こすことにより、NGS での読み取り時の塩基の多様性を高める、などである。

### 成果③ アグー豚と西洋品種間の腸内細菌叢の比較

これまでの予備的解析ではアグー豚の腸内細菌叢は 1) 門レベルでは他の品種に似ていること・2) 属レベルでは *Prevotella* 属が多いこと・3) 未同定種が多いことが示唆されていた。今回得られたデータをもとに、アグー豚と西洋品種の腸内細菌叢を比較したところ、Firmicutes 門が優占するなど門レベルで似ていることについては同様の結果が得られた (図 4)。ところが、今回得られたデータでは属レベルでもアグー豚と西洋品種が似ていることが示唆された (図 4)。少なくとも予備的結果で示唆されたような *Prevotella* 属が多いことは再現が得られなかった。このことは生育環境や餌の組成によってアグー豚の腸内細菌叢も影響を受けている可能性を示唆していると考えている。実際、今回のアグー豚試料でのみ、もしくはアグー豚で多く検出された細菌群について、特定の畜産農家由来の試料から検出されている傾向があることが示唆された。また、特定の畜産農家でのみ検出されている傾向があるものの、Bacteroidales BS11 gut group や Pirellulaceae CPLa-4 termite group, *Kurthia* など植物質の分解に関与している可能性のある細菌群がアグー豚でのみ多く検出されている (図 5)。これらは、予備的解析で示唆されたセルロース分解能を持つ細菌群 (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) とともにアグー豚特異的な細菌群の候補である。



み多く検出されている (図 5)。これらは、予備的解析で示唆されたセルロース分解能を持つ細菌群 (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) とともにアグー豚特異的な細菌群の候補である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	平良 東紀  (Taira Toki)	琉球大学・農学部・教授  (18001)	
研究協力者	伊村 嘉美  (Imura Yoshimi)	琉球大学・農学部・准教授  (18001)	
研究協力者	佐藤 行人  (Sato Yukuto)	琉球大学・医学部・准教授  (18001)	

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