

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22580308
 研究課題名 (和文) ルーメン内における水素生成微生物および水素利用微生物の分子生態学的解析
 研究課題名 (英文) Molecular ecological analysis of hydrogen-producing and hydrogen-utilizing microorganisms in the rumen.
 研究代表者
 松井 宏樹 (MATSUI HIROKI)
 三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
 研究者番号： 30346001

研究成果の概要 (和文)：

ルーメン内容物から抽出した環境 DNA から、機能遺伝子 (*mcrA*; メタン生成菌、*fhs*; 還元的酢酸生成菌; 以上水素利用微生物、*hyd*; 水素生成菌) のクローンライブラリーを構築した。全てのライブラリーから多くの未知配列を含め多様な配列が得られた。本研究に供したウシとヒツジでは種構成が異なると考えられた。ルーメン内の *hyd* 配列の多様性について明らかにしたのは本研究が初めてである。

研究成果の概要 (英文)：

Clone libraries of functional genes of hydrogen-utilizing microbes such as methanogen (*mcrA*) and homoacetogen (*fhs*), and hydrogen-producing bacteria (*hyd*) were constructed from environmental DNA extracted from rumen contents. Various sequences including unknown sequences were recovered from all libraries. Species composition were different between cattle and sheep. This is the first report of diversity of *hyd* gene in the rumen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：消化管微生物学

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：栄養・飼養

1. 研究開始当初の背景

ウシやヒツジなどの反すう家畜のルーメン内にはメタン生成菌が生息し、メタンを生成している。生成されたメタンはあい気 (ゲップ) として大気中に放出される。反すう家畜のルーメンから排出されるメタンの量は総メタン排出量の約 20% を占めるため、反すう家畜からの排出抑制は急務である。

ルーメン内では動物によって摂取された飼料成分はルーメン微生物によって発酵を受け、短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸、酪酸) や二酸化炭素および水素などの発酵産物を生じる。短鎖脂肪酸は宿主動物のエネルギー源として利用される。発酵によって生じる二酸化炭素と水素はメタン生成菌によってメタンに変換されたあと、大気中へと放出さ

れる。メタンとして排出された場合、飼料中のエネルギーの損失となる。したがって、ルーメンからのメタン排出を抑制できれば、温室効果ガスの減少と飼料効率の向上の両面が期待できる。

ルーメン内にはメタン生成菌以外にも水素を利用する細菌が生息しており、水素を巡ってメタン生成菌と競合している。水素利用菌が優先的に水素を利用することができれば、メタン生成菌が利用できる水素の量が減ることになり、結果としてルーメン内におけるメタン生成を減らすことが可能である。また、そのためにはルーメン内における水素利用微生物の多様性を解明する必要がある。また、水素利用微生物のみならず、水素を生成する微生物の多様性や挙動についても把握する必要がある。しかしながら、これまでルーメン内における水素生成微生物の多様性について解析をしたという報告はなされていない。

2. 研究の目的

本研究は反すう動物のルーメンに生息する水素生成菌およびメタン生成菌と競合する水素利用細菌の多様性・動態について機能遺伝子を指標として分子生態学的手法により把握し、各微生物群の相互作用を理解することを目的として行う。

3. 研究の方法

(1) 水素利用微生物および水素生成菌の多様性解析

ヒツジおよびウシのルーメン内容物を採取し、内容物から環境 DNA を抽出した。抽出した環境 DNA から水素利用微生物および水素生成菌それぞれの代謝の鍵酵素をコードする遺伝子、すなわち *mcrA* (メタン生成菌)、*fhs* (還元的酢酸生成菌)、*hyd* (水素生成菌) を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 増幅産物は電気泳動により断片長を確認後、大腸菌にクローニングし、クローンライブラリーを構築した。各クローンについて塩基配列を DNA シーケンサーにより解読した。解読した塩基配列からアミノ酸配列に変換し、その配列に基づき系統樹を作成した。また、Blast 検索により塩基配列のデータベース中の配列との相同性を調べた。

(2) インビトロルーメン培養系によるメタン生成菌の定量

ルーメン液を MacDaugall バッファで 3 倍に希釈し、希釈したルーメン液を接種物としてインビトロ培養を行った。基質には粉碎したチモシー乾草およびコーンスターチを用いた。米ヌカを基質に対して 5, 10 15%の割

合で添加した。ルーメン液の希釈や接種は全て嫌気下で行った。培養器には 120mL バイアル瓶を用い、ふたにはブチルゴム栓を用いた。培養は 39°C で嫌気状態で振とう培養を行った。培養開始後 48 時間に培養を止め、気相中のメタン生成量、培養液中の短鎖脂肪酸の組成および濃度、培養液中のメタン生成菌数の測定を行った。培養中に生成したガス量はガラスシリンジで測定した。気相中のメタン濃度はガスクロマトグラフィーにより分析した。培養液中の短鎖脂肪酸濃度は高速液体クロマトグラフィーにより分析した。培養液中のメタン生成菌数は、DNA を抽出後、*mcrA* 遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR により測定した。

(3) 嫌気性真菌に付着したメタン生成菌の解析

ウシルーメン内容物から嫌気性真菌を分離し、嫌気性真菌に付着したメタン生成菌の多様性を *mcrA* クローンライブラリーにより解析する。同時にルーメン液から構築した *mcrA* クローンライブラリーの解析を行い、嫌気性真菌に付着したメタン生成菌の種構成と比較した。

4. 研究成果

(1) 水素利用微生物および水素生成菌の多様性解析

ルーメン内容物から抽出した環境 DNA から、代謝関連機能遺伝子 (*mcrA*; メタン生成菌、*fhs*; 還元的酢酸生成菌; 以上水素利用微生物、*hyd*; 水素生成菌) のクローンライブラリーを構築した。全てのライブラリーから多様な配列が得られた。また、未知配列も多数得られた。本研究に供したウシとヒツジでは種構成が異なると考えられた。ルーメン内の *hyd* 配列の多様性について明らかにしたのは本研究が初めてである。

(2) インビトロルーメン培養系によるメタン生成菌の定量

インビトロルーメン培養系に米ヌカを添加し (添加量は基質に対して 5, 10, 15 %), メタン抑制効果を検討した。10%添加区においてメタン生成量の減少が観察され、その培養液中のメタン生成菌数は対照区に比べて有意に低かった (Figure 1)。

(3) 嫌気性真菌に付着したメタン生成菌の解析

ウシルーメン内容物から嫌気性真菌をメタン生成菌が付着した状態で分離し、その培養液の DNA から、*mcrA* クローンライブラリーを構築し、塩基配列を解読した。また、同じ個体からルーメン液の DNA から *mcrA* クローンライブラリーを構築し、塩基配列を

解読した。これらのライブラリーを比較し、両サンプル間に違いについて検討した。ルーメン液ライブラリーでは *Methanobrevibacter ruminantium* に近縁の配列が 70% を占めた。一方、嫌気性真菌ライブラリーでは *Methanomicrobium mobile* に近縁の配列が 70% を占めた。このことから、メタン生成菌の種類は、ルーメン液と嫌気性真菌に付着しているものとは異なることが示唆された。

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 4 件)

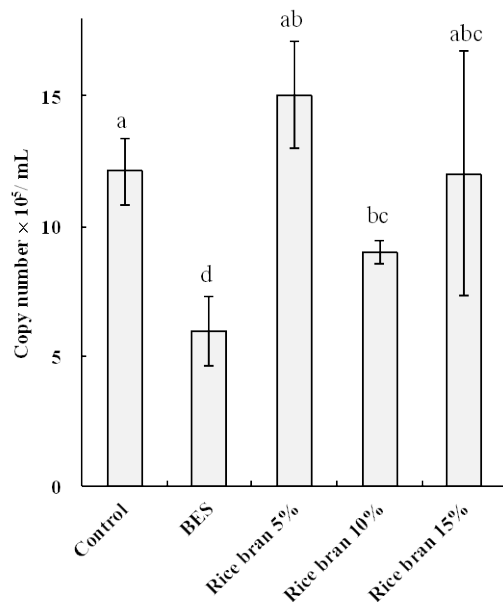


Figure 1. The copy number of *mcrA* gene fragment in a batch culture of *in vitro* rumen fermentation after incubation for 24 h (n=3). The error bars indicate standard deviation. Bars with different letters (a, b, c and d) indicate the presence of significant differences ($p < 0.05$).

① Mitsumori, M., H. Matsui, K. Tajima, T. Shinkai, A. Takenaka, S. Denman, C. McSweeney. Effect of bromochloromethane and fumarate on phylogenetic diversity of the formyltetrahydrofolate synthetase gene in the bovine rumen. *Animal Science Journal* 査読有 掲載決定 2013 年

② Lwin, K. O., H. Matsui, T. Ban-Tokuda, M. Kondo, R. M. Lapitan, J. R. V. Herrer, A. N. Del-Barrio, and T. Fujihara. Comparative analysis of methanogen diversity in the rumen of crossbred buffalo and cattle in the Philippines by using the functional gene *mcrA*. *Molecular*

Biology Report. 査読有 39 巻 2012 年 ページ : 10769-10774 (DOI: 10.1007/s11033-012-1969-1)

③ Lwin, K. O., M. Kondo, T. Ban-Tokuda, R. M. Lapitan, A. N. Del Barrio, T. Fujihara, and H. Matsui. Ruminal fermentation and microbial ecology of buffaloes and cattle fed the same diet. *Animal Science Journal* 査読有 83 巻 2012 年 ページ : 767-776. (DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01031.x)

④ Matsui, H., S. Yoneda, T. Ban-Tokuda, M. Wakita. Diversity of the formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) gene in the proximal and mid ostrich colon. *Current Microbiology*. 査読有 62 巻 2011 年 ページ : 1-6. (DOI:10.1007/s00284-010-9661-y)

[学会発表] (計 8 件)

① 松井宏樹, 水谷麻里菜, 伴(徳田)智美. フマル酸および米ヌカ添加がインビトロルーメン発酵におけるメタン生成菌数に及ぼす影響. 第 41 回ルーメン研究会 発表年月日 : 2012 年 10 月 27 日 明治大学(東京)

② Abrar, A., T. Tsukahara, N. Matsukawa, T. Ban-Tokuda, W. Chau, and H. Matsui. Studies on monensin clearance trait and its effect on methanogenesis and methanogen population in bovine rumen. 第 41 回ルーメン研究会 発表年月日 : 2012 年 10 月 27 日 明治大学(東京)

③ Matsui, H., Fukushima, N., Ito, K., Nhishikawa, A., Yoshimi, R., Wakabayashi, H., Ogawa, Y., Yoneda, S., Ban-Tokuda, T., Wakita, M. The effect of raw rice bran supplementation on the population density of ruminal methanogens and short chain fatty acid profiles during *in vitro* rumen fermentation. The 4th Japan-China-Korea Grassland Conference. 発表年月日 : 2012 年 3 月 31 日. セントレアホール(常滑)

④ Lwin, K. O., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., Lapitan, R. M., Del Barrio, A. N., Fujihara, T., and Matsui, H. Ruminal fermentation and microbial ecology of buffaloes and cattle fed the same diet. The 4th Japan-China-Korea Grassland Conference. 発表年月日 : 2012 年 3 月 31 日. セントレアホール(常滑)

⑤ 松井宏樹、三村彩有実、土屋朋代、前川紗貴子、伴智美. エネルギー給与レベルがブタ大腸内における還元的酢酸生成菌およびメタン生成菌の多様性および菌数に与える影響. 日本畜産学会第115回大会 発表年月日 2012年3月28日名古屋大学(名古屋)

⑥ Lwin, K. O., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., Lapitan, R. M., Del Barrio, A. N., Fujihara, T., Matsui, H. Molecular diversity of the rumen bacterial and fungal communities in cattle and buffaloes fed same diet. The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. 発表年月日: 2011年10月18日北海道大学(札幌)

⑦ Lwin, K. O., 近藤誠、伴智美、Lapitan R. M., Del Barrio A. N., 藤原勉、松井宏樹. Ruminant fermentation and microbial ecology of buffaloes and cattle. 日本畜産学会第114回大会 発表年月日: 2011年8月26日、北里大学(十和田)

⑧ 土屋朋代・前川紗貴子・伴(徳田)智美・松井宏樹. エネルギー給与レベルの違いが豚糞便中 *mcrA* 遺伝子の多様性におよぼす影響 第41回ルーメン研究会 発表年月日: 2010年9月17日 筑波大学法科大学院(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 宏樹 (MATSUI HIROKI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号: 30346001