

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380156

研究課題名(和文)低メタン産生牛の特定をめざしたルーメン菌叢プロファイリング指標の確立

研究課題名(英文)Development of rumen microbial profiling to identify low methane-producing cattle

研究代表者

小林 泰男(Kobayashi, Yasuo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50153648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：低メタン生成牛を特定する指標開発をみすえ、カシューナッツ殻液給与によるメタン低減と連動して増減を示すルーメン菌叢を探索した。メタン古細菌群mOTU35は、ホルスタイン乾乳牛、タイ在来牛および水牛のメタン生成と高い正の相関を示した。一方、真正細菌群OTU95は乾乳牛ルーメンでのみメタン生成と負の相関、プロピオン酸と正の相関があった。以上より、両菌群がカシューナッツ殻液のメタン低減効果に直接・間接的に関わること、特にmOTU35はメタン生成程度に深く関わるコア菌群であることが示唆された。よって本菌群のルーメン内モニタリングがウシ個体ごとのメタン生成程度を把握する指標をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Toward the development of rumen microbial profiling to identify low methane-producing cattle, rumen bacteria and archaea showing specific changes with methane-inhibiting cashew nut shell liquid were explored. The abundance of methanogenic archaeal mOTU35 was found to be positively correlated to methane production of Holstein dry cows, Thai native cattle and swamp buffaloes. Meanwhile, the abundance of eubacterial OTU95 showed negative correlation with methane production and positive correlation with propionate production only in dry cows. These results suggest that both microbial groups, especially mOTU35, is a core member controlling methane production in the rumen. Therefore, the monitoring of mOTU35 could offer an index for estimating methane production of individual cattle.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：メタン低減 地球温暖化 ルーメン 菌叢 個体差

### 1. 研究開始当初の背景

反芻家畜が生成するメタンは地球上で発生する全メタンの15-20%程度を占める。CO<sub>2</sub>換算すると全温暖化ガスの約5%であるが、豪、ニュージーランドなどウシやヒツジの多い国では10-30%にも及ぶ。過去10年ほどの間にメタン低減のための資材が世界各国で試験されてきているが、抗生物質にかわり植物抽出物など安全性に配慮した添加物が試験対象となっている。しかしいずれも低減率は5-10%程度にとどまっている。我々のグループではカシューナッツ殻液(CNSL)を飼料に添加することで、牛のメタン生成を人工ルーメンで70%(Watanabe et al., J. Dairy Sci. 93:5258-5267.2010)、給与試験で最大55%低減させることに成功した(Shinkai et al., J. Dairy Sci. 95:5308-5316.2012)。これは従来のメタン低減剤の中で出色の効果であり、今後の普及に期待がよせられている。ただし、多くのメタン低減試験で認められてきたように、ウシ個体間でメタン低減率は大きく異なる。これは各々のウシのルーメン菌叢の低減剤への反応の違いと推定される。一貫した効果を期待通り得られないのは飼養技術としての課題点であり、政策目標の実現においても不安要素となる。このため、ウシ個体間の低減率の違いを最小化し、一律に近い形で最大低減をはかることが必要である。しかしメタン低減化においてこのような反応の違いは、動物個体間差としてやむをえないものと判断され、これまで放置されてきた。

### 2. 研究の目的

「メタン低減に個体差を生み出す要因は各々のウシ固有のルーメン菌叢の違いにあり、それが低減剤への反応の大小をもたらす」という仮説を立てると考えられる。カナダ・アルバータ大のグループが、「肥育効率の高いウシと低いウシは固有のルーメン菌叢に違いがある」という説をPCR産物のグラディエントゲル電気泳動のバンドパターン解析で実証しており(Zhou et al., Appl. Environ. Microbiol. 76:3776-3786.2010)、これも仮説のよりどころとなりうるものである。もし、ウシ個体固有の菌叢の違いがメタン低減反応を左右するのであれば、菌叢プロファイリングにより、低メタン生成牛を事前に選抜できることになる。このプロファイリング情報を活用することで低メタン生成牛群の編成も可能となり、飼料エネルギーの効率的利用、メタン低減剤の一律効果発現を期待できることにつながるだろう。このようなルーメン菌叢プロファイリングのための遺伝子情報を整備し、判別キット様の物(例えばDNAチップ等)の開発の礎とすることが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

<メタン低減個体差を導く菌叢の特定>

2つの試験(試験1および2)で同じ3頭

のホルスタイン種乾乳牛を供試した。濃厚飼料と乾草を6:4の割合で、体重維持量の1.3倍になるよう給与した。試験1では、最初の2週間を対照期(CNSL製剤給与なし)、次の2週間をCNSL期(CNSL原物換算給与量を4g/d/100kg体重とする)とした。試験2では、最初の2週間を対照期(CNSL製剤給与なし)、次の2週間をCNSL1期(3g/d/100kg体重)、最後の2週間をCNSL2期(4g/d/100kg体重)とした。ルーメン液は、各試験期最終日の飼料給与前に採取した。ただし試験2のCNSL1期のサンプルは分析から除外した。メタン産生量の測定には、開放式呼吸実験装置を用いた。

真正およびメタン古細菌遺伝子のcDNAクローンライブラリは、各ウシ個体、試験期ごとに作成した。ルーメン液からビーズ破砕法により全RNAを抽出し、これを鋳型にcDNAを合成した。このcDNAを用い、真正細菌については16S rDNAプライマー、メタン古細菌についてはmcrA標的プライマーを用い標的物を増幅後クローニングした。その後16S rRNAおよびmcrAの塩基配列解読を行った。

得られた塩基配列は、BLAST(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>)により、GenBankに登録されている既知配列との相同性比較を行った。また、FastGroup(<http://biome.sdsu.edu/fastgroup/>)を用いて、全配列を97%以上の相同性でグループ化し、OTUとした。解読した配列および主要既知ルーメン細菌の標的遺伝子塩基配列を、MEGA5を用いてCLUSTALWによるマルチアライメントに供し、近隣接合法により系統樹を作成した。ウシ個体別に各OTUの検出頻度の増減とメタン生成の増減を照合し、メタン低減およびその個体差をもたらす菌叢を推定した。

<着目菌叢存在量と代謝産物量の相関>

in vitroでの検討は以下のとおりである。バッチ培養においては、ルーメン液と緩衝液をそれぞれ5mlずつ試験管に分注した。基質として、粗飼料粉末と濃厚飼料粉末を添加した。ホルスタイン種乾乳牛(雪印種苗北海道研究農場)、ヒツジ(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)、タイ在来牛および水牛(Kasetsart大学 Kamphaeng Saen 校農場)から採取したルーメン液を使用した。CNSLを段階的に添加し、20-24時間閉鎖培養した。連続培養(RUSITEC)試験では上記乾乳牛2頭より得たルーメン液を用い、7日間培養した。いずれの培養もCNSL添加有無の条件下で実施した。バッチ培養終了後、圧力計を用いてヘッドスペースの内圧を測り、総ガスを算出した。連続培養時は常時ガスをバックに捕集し総ガスを測定した。ガスサンプルはTCDガスクロマトグラフによる分析に供し、水素、CO<sub>2</sub>およびメタンを測定した。SCFA濃度はFIDガスクロマトグラフを用いて測定した。培養液サンプルより全DNAを抽出・精

製し、濃度調整後 real-time PCR による各菌群の定量を行った。着目菌群 (mOTU35 および OTU95 : 成果参照) の存在量とメタン生成量およびプロピオン酸濃度について相関係数を算出した。

in vivo 試験は以下のとおりである。乾乳牛のデータは上述のものから得た。泌乳牛については3頭のホルスタイン種泌乳牛に粗濃比 6 : 4 の TMR を体重維持量の3倍になるよう給与した。試験期間は9週で、最初の3週間を対照期、次の3週間を中濃度 CNSL 期 (6.5 g/d/100 kg 体重) 最後の3週間を高濃度 CNSL 期 (8.8 g/d/100 kg 体重) とした。メタン産生量の測定は上述のとおりである。ヒツジについては、粗濃比 3 : 7 の割合で給与した4頭からデータを得た。最初の2週間を対照期、次の2週間を低濃度 CNSL 期 (2 g/d/100 kg 体重) 最後の2週間を高濃度 CNSL 期 (4 g/d/100 kg 体重) とした。タイ在来牛と水牛については各4頭にイナワラと濃厚飼料を9:1の割合で給与し、最初の2週間を対照期、続く4週間 CNSL 給与期 (4 g/d/100 kg 体重) とした。これらいずれの給与試験も各期の終わりにルーメン液をとり、メタン生成能、SCFA 濃度やルーメン菌群の測定に供し、in vitro と同様にメタン低減要因を評価した。

#### 4. 研究成果

3頭の乾乳牛に CNSL 製剤を与えたところ、明確なメタン低減効果が認められる一方で、CNSL の効果が大きい、すなわちメタン低減の顕著な個体が存在することを、二度の実験で反復確認した。3頭個体ごとに真正およびメタン古細菌を標的とする cDNA ライブラリを構築し、解読した全 2156 配列 (真正細菌, 1063; メタン古細菌, 1093) を系統解析することで、メタン低減の差を生む要因となる菌群の特定を目指した。

供試した3頭とも CNSL 給与で真正細菌叢は大きく変化し、多様性は低下した。3頭で共通した変動を示す菌群 (OTU1 および 95) も存在したが、その変化の様相は個体ごとに大きく異なっていた。試験1ではメタン低減効果の大きい個体のみで検出割合の増加する菌群 (OTU5, 18, 92, 94 および 192) が多く得られ、一部の菌群 (OTU5 および 94) の変動は試験2でも再現された。

またメタン古細菌叢においても、CNSL 給与にともない各個体で大きな変化および多様性の低下が見られ、変化する菌群は個体によって異なった。3頭で共通して大きく増減する菌群 (mOTU9, 10, 35 および 54) がある一方で、メタン低減効果の大きい個体でのみ減少を示す菌群 (mOTU6, 12, 14 および 28) が多く存在した。これらの変化は二つの実験で同様の傾向が認められた。

以上の結果から、メタン低減効果の程度と個体差の要因は真正およびメタン古細菌の両菌叢にあり、要因となる菌群のルーメン内における存在の有無、占有率の大きさ、およ

び代謝活性が、ウシ個体間で異なるメタン低減割合を生んだと考えられた。

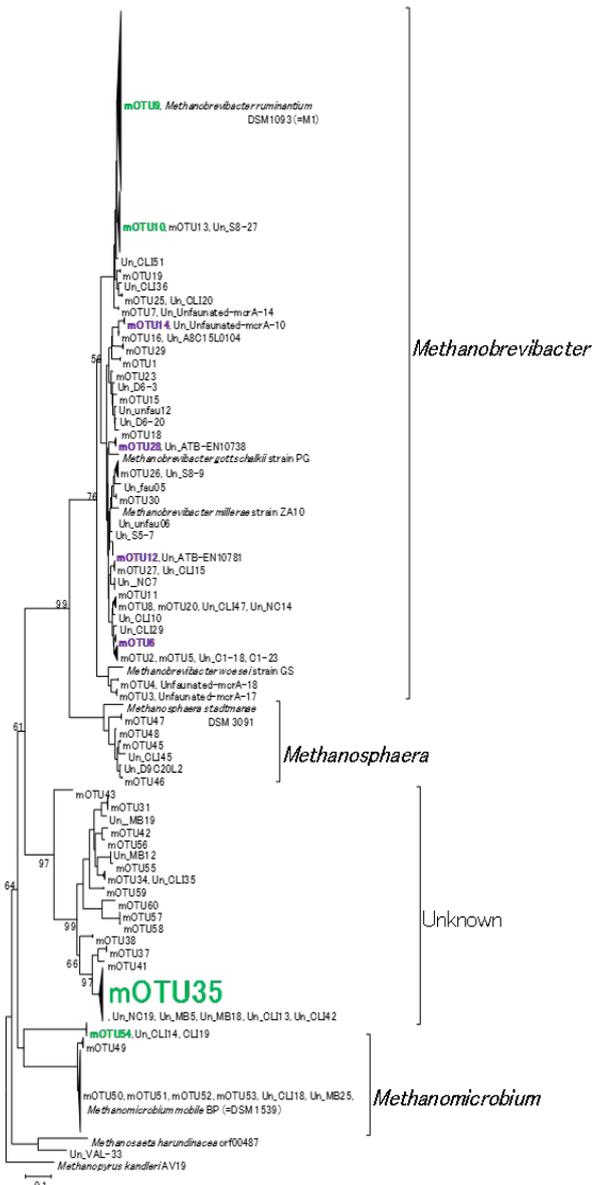


図1. *mcrA* に基づくメタン生成古細菌の分子系統樹と mOTU35 の系統位置。緑: 3頭共通して増減した OTU。紫: ウシC 特異的に増減した OTU。

表1. メタン生成に深く関与すると特定したルーメン菌群

		mOTU35		OTU95	
		vs. CH4	vs. Propionate	vs. CH4	vs. Propionate
乾乳牛	in vitro	0.90	NS	-0.99	NS
	in vivo	0.78	-0.69	-0.789	0.76
泌乳牛	in vitro	NS	NS	NS	NS
	in vivo	NS	NS	NS	NS
ヒツジ	in vitro	0.94	NS	NS	NS
	in vivo	NS	NS	NS	NS
タイ在来牛	in vitro	0.96	-0.96	NS	NS
	in vivo	0.73	-0.60	NS	NS
水牛	in vitro	0.87	-0.84	NS	NS
	in vivo	0.72	NS	NS	NS

mOTU35は未培養のメタン生成古細菌群、OTU95は *Succinivibrio dextrinosolvens* の近縁真正細菌群で、それぞれメタン低減率に応じて減少または増加することを確認

CNSL によるメタン低減と連動して増減を示す未培養菌群のうち、真正細菌群 OTU95 お

よびメタン古細菌群 mOTU35 (図 1) に着目した。これらの菌群の存在量とメタン生成量およびプロピオン酸濃度との関係を分析し以下のような成果を得た(表 1)。まず着目菌群に特異性の高いプライマーの作成に成功し、real-time PCR 定量系を確立できた。これらの定量系を用い、一連の in vitro 試験について着目菌群の定量を行ったところ、mOTU35 は、様々な宿主動物のルーメン液(乾乳牛、ヒツジ、タイ在来牛および水牛)のメタン生成量と高い正の相関を示した。一方、OTU95 については乾乳牛ルーメン液でのみ、メタン生成量との相関があった。続いて一連の in vivo 試験においても着目菌群を定量したところ、mOTU35 は、様々な供試動物(乾乳牛、タイ在来牛および水牛)でメタン生成量と高い正の相関を示した。一方、OTU95 は乾乳牛ルーメン液でのみ、メタン生成量と負の相関、プロピオン酸濃度と正の相関が認められた。

以上の結果より、両菌群が CNSL のメタン低減効果に直接的、間接的に関わることが強く示唆された。特にルーメン内メタン生成量との正の相関に再現性が見られた mOTU35 は、CNSL によるメタン低減効果を発現するためのコア菌群として位置づけられるものと思われる。本菌群のモニタリングにより、ウシ各個体のメタン生成量を推測できる可能性も考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Mitsumori M., O. Enishi, T. Shinkai, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, K. Nagashima, M. Mochizuki, and Y. Kobayashi. Effect of cashew nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. *Animal Science Journal*, 85: 227-32. 2014. 査読有。
2. Shinkai T, O. Enishi, M. Mitsumori, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, K. Nagashima, M. Mochizuki, and Y. Kobayashi. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *Journal of Dairy Science*, 95: 5308-5316. 2012. 査読有。
3. 小林 泰男, 新しいルーメン発酵調節物として期待されるカシュー殻液製剤, MP アグロ ジャーナル, 2012 年 7 月号. 査読なし
4. Kobayashi, Y., T. Shinkai, and S. Koike, Agricultural by-products as modulators of rumen microbiota. In: *International Colloquium on Rumen Microbiology* (ISBN 978-85-63273-12-3, ISSN 1983-4357), pp.49-60. 2012. 査読なし

[学会発表](計 22 件)

1. Konda, S., R. Onodera, E. Kanchanasatit, P. Boonsaen, S. Sawanon, K. Nagashima, M. Mochizuki, S. Koike and Y. Kobayashi. Effect of cashew nut shell liquid feeding on rumen fermentation of Thai native cattle and swamp buffaloes. The 9<sup>th</sup> China-Korea-Japan Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Changsha, China, Oct. 11-14, 2013.
2. 松永文吾・田森航也・小池聡・小林泰男・ウシ糞便の発酵産物におよぼすカシューナッツ殻液の影響 2013 年度北海道畜産草地学会第 2 回大会紋別市文化会館 2013 年 8 月 30 日-9 月 1 日。
3. 小林泰男・カシューナッツ副産物給与によるウシからのメタン生成低減・環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会シンポジウム・北九州国際会議場・2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日。
4. 近田周磨・小野寺緑也・Ekkapan Kanchanasatit・Phoompong Boonsaen・Suriya Sawanon・長嶋協・望月正巳・小池聡・小林泰男・カシューナッツ殻液給与がタイ在来牛および沼沢水牛のルーメン発酵に及ぼす影響・日本畜産学会第 116 回大会・安田女子大学・2013 年 3 月 28 日-30 日。(講演要旨 P115)
5. 永西修・真貝拓三・樋口浩二・三森真琴・小林洋介・長嶋協・望月正巳・小林泰男・カシューナッツ殻液給与による泌乳牛のメタン抑制・日本畜産学会第 116 回大会・安田女子大学・2013 年 3 月 28 日-30 日。(講演要旨 P115)
6. 松井宏樹・服部啓太・玉木貴幸・近藤誠・伴智美・王超・長嶋協・望月正巳・塚原隆充・小林泰男・カシューナッツ殻液給与がウシルーメン内発酵、メタン産生量および有効成分の分布に及ぼす影響・日本畜産学会第 116 回大会・安田女子大学・2013 年 3 月 28 日-30 日(講演要旨 P115)
7. 望月正巳・長嶋協・小林泰男・カシューナッツ殻液による鼓脹症発症率およびクロストリディウム・コクシジウムの感染低減の検証・日本畜産学会第 116 回大会・安田女子大学・2013 年 3 月 28 日-30 日。(講演要旨 P115)
8. 若井真規実・林秀輔・小池聡・小林泰男・長嶋協・望月正巳・各種ルーメン真正細菌およびメタン古細菌におよぼすカシューナッツ殻液及びその含有フェノール成分の影響・第 43 回ルーメン研究会・明治大学・2012 年 10 月 27 日。(講演要旨 P9)
9. 宮澤のどか・嵩千里・小池聡・小林泰男・真貝拓三・三森真琴・永西修・長嶋協・望月正巳・カシューナッツ殻液給与牛のメタン低減とリンクするルーメン内真正細菌群および古細菌群の特定と定量・第 43 回ルーメン研究会・明治大学・2012 年 10 月 27 日。(講演要旨 P3)

10. Kobayashi, Y. Mitigation of methane gas from cattle: toward greener, healthier and more efficient animal production. International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability 2012. Hokkaido, Japan. August 27-29. 2012.
  11. Kobayashi Y, T. Shinkai and S. Koike, Agricultural by-products as modulators of rumen microbiota. International Colloquium on Rumen Microbiology, 49th Annual Meeting of the Brazilian Animal Society, Brasilia, Brazil, July 22-27. 2012.
  12. 小林泰男. 家畜消化管の細菌叢の制御: 生産・健康の増進と環境調和にむけて. 2012年日本水産学会春季大会シンポジウム「水産プロバイオティクスの創成」. 東京海洋大学. 2012年3月30日.
  13. 小酒井貴晴・安部紗織・遠藤翔子・小笠原実咲・長島協・望月正巳・新居彦治・小池聡・小林泰男. カシューナッツ殻液給与がマウスの増体、一般血液成分および腸内発酵に及ぼす影響. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日.(講演要旨 P147)
  14. 長島協・望月正巳・小酒井貴晴・永西修・小林泰男. 反芻家畜用カシューナッツ殻液製剤の開発および機能性フェノール成分の保持. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日(講演要旨 P146)
  15. 若井真規実・林秀輔・小池聡・小林泰男・長島協・望月正巳. カシューナッツ殻液およびその含有フェノール成分がルーメン細菌に及ぼす影響. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日.(講演要旨 P146)
  16. 嵩千里・宮澤のどか・小池聡・小林泰男・真貝拓三・三森眞琴・永西修・長島協・望月正巳. カシューナッツ殻液を給与したウシのルーメン真正細菌およびメタン菌叢. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日.(講演要旨 P146)
  17. 真貝拓三・三森眞琴・永西修・長島協・望月正巳・小林泰男. カシューナッツ殻液を給与したウシのルーメン発酵と代表ルーメン菌種の動態. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日.(講演要旨 P146)
  18. 永西修・樋口浩二・野中最子・小林洋介・真貝拓三・三森眞琴・長島協・望月正巳・小林泰男. カシューナッツ殻液がウシのメタン産生量および消化率に及ぼす影響. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日(講演要旨 P145)
  19. 小林泰男・鈴木亮・渡部優・小池聡・永西修・樋口浩二・野中最子・小林洋介・真貝拓三・三森眞琴・竹中昭雄・長島協・望月正巳. カシューナッツ殻液給与がヒツジとヤギのメタン生成、ルーメン発酵と消化率に及ぼす影響. 日本畜産学会第115回大会. 名古屋大学. 2012年3月28日-30日.(講演要旨 P145)
  20. 小林泰男. カシュー殻液: 反芻家畜におけるメタン低減剤としての作用機序と応用. ランチョンセミナー. 平成23年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 札幌コンベンションセンター. 2012年2月3-5日.
  21. 若井真規実・林秀輔・小池聡・長島協・望月正巳・小林泰男. ルーメンメタン低減物質カシューナッツ殻液に対するメタン菌の反応. 北海道畜産学会・北海道草地研究会・北海道家畜管理研究会2011年合同大会. 北海道大学. 2011年12月6日-7日.(講演要旨 P21)
  22. Kobayashi, Y. A new additives for mitigation of methane production from ruminants. The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Sapporo, Japan. October 16-20, 2011.
- 〔図書〕(計1件)  
 小林泰男. 第7章「動物と微生物」環境と微生物の事典, 朝倉書店, 東京, 印刷中.
- 〔その他〕  
 報道関係
1. 2012年7月27日 北海道新聞 「温暖化原因 牛のゲップ抑制」
  2. 2012年10月15日 財界さっぽろ 「健康食品から宇宙開発まで 北大イチオン研究」
  3. 2013年7月26日 北海道テレビ 「胃からメタン抑える研究進む」 2012年度HBC制作環境CM (全国CMコンクール優秀賞受賞)
- ホームページ等  
 北海道大学リサーチ&ビジネスパークマガジン: 気になる数字をチェック第2回「5000」  
<http://www.hokudai-rbp.jp/check-data/414/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 小林 泰男 (KOBAYASHI YASUO)  
 北海道大学・大学院農学研究院・教授  
 研究者番号: 50153648
  - (2) 研究分担者  
 小池 聡 (KOIKE SATOSHI)  
 北海道大学・大学院農学研究院・助教  
 研究者番号: 90431353