

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580377

研究課題名(和文) 亜硝酸還元の増強とメタン生成の低減に向けたルーメン微生物の分子制御機構の解析

研究課題名(英文) Molecular characterization of ruminal microbes for the augmentation of nitrite reduction and for the suppression of methane emission

研究代表者

浅沼 成人 (Asanuma, Narito)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：50366902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：野菜残渣の飼料化をはかり、食品リサイクル率の向上と飼料コストの削減を狙うと同時に、反芻家畜からのメタン生成を低減させることを最終目的として、ルーメン内微生物の亜硝酸還元能の増強に着目した。本研究期間では、高濃度の硝酸を給与した場合の反芻胃内における共生微生物生態系について解析し、*Selenomonas ruminantium*という細菌のうち、特に硝酸・亜硝酸還元能を持つ菌株が増加し、反芻胃内の亜硝酸還元において主要な役割を担うことを見出した。

研究成果の概要(英文)：The effects of dietary nitrate addition on ruminal fermentation characteristics and microbial populations in goats were investigated. Addition of nitrate resulted in a decrease in the total concentration of ruminal volatile fatty acids, an increase in the acetate:propionate ratio, and increases in the ammonia and lactate concentrations. Populations of methanogens, protozoa, and fungi were greatly decreased as a result of nitrate inclusion in the diet. There was modest or little impact of nitrate on the populations of prevailing species or genus of bacteria in the rumen, whereas *Selenomonas ruminantium* greatly increased. Quantification of the genes encoding nitrate reductase and nitrite reductase of *S. ruminantium* showed that these genes were increased by feeding nitrate, suggesting that the growth of nitrate- and nitrite-reducing *S. ruminantium* is stimulated by nitrate addition. Thus, *S. ruminantium* is likely to play a major role in nitrate and nitrite reduction in the rumen.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：ルーメン ルーメン微生物 反芻動物 メタン抑制 メタン菌 亜硝酸中毒 亜硝酸還元 硝酸態窒素

## 1. 研究開始当初の背景

ルーメンにおけるメタン生成は飼料エネルギーの損失となるばかりでなく、地球の温暖化につながるため、その生成を減らすことは極めて重要である。これまでに種々の薬剤を用いたメタン生成の抑制が試みられてきたが、ルーメン発酵、特に繊維消化を抑制するといったマイナス面が生ずる危険性があった。このため、微生物の発酵機能を低下させずにメタン生成を減少させるためには、メタン生成以外の他の有効な還元反応系に電子を利用させることにより  $H_2$  生成を減少させることが得策と考えられる。そのような還元反応の一つとして硝酸から亜硝酸を経由してアンモニアを生成する一連の還元反応がある。反芻動物が摂取する植物飼料の多くは硝酸を含んでおり、硝酸還元は電子伝達リン酸化による ATP 生成と共役すると考えられるので、資源の有効利用にもなる。更に、最終生成物はアンモニアなので、この反応にはルーメン微生物が利用可能な窒素源への転換という意義もある。このような種々の意義があることから、硝酸・亜硝酸還元能の増強によるメタン生成の抑制を狙う。この場合、硝酸還元よりも亜硝酸還元の方が遅く、亜硝酸の蓄積は宿主動物の中毒を引き起こすので、亜硝酸還元を速くすることが主要課題である。なお、亜硝酸は発癌物質であるニトロソアミンを生成させることから、その蓄積を防ぐことは重要である。従って、亜硝酸還元能の増強が最も重要であり、これはメタン生成の抑制という目的だけでなく、硝酸含量の高い飼料が安全かつ有益となるようにする目的も兼ねる。また、

農場や食品製造の過程で生じる野菜残渣の量は多く（外食産業からだけでも約 175 万 t/年）、その栄養価は高いが、硝酸態窒素含量が高いために飼料化は進んでいない。亜硝酸還元能の増強は、そのような残渣の飼料化をはかり、食品リサイクル率の向上と同時に、飼料自給率の向上と飼料コストの削減による畜産経営の改善が期待される。

## 2. 研究の目的

これまでに、ルーメン微生物における硝酸・亜硝酸還元について細胞レベルおよび酵素レベルでの検討を行い、その結果を種々の論文に報告してきたが、遺伝子レベルの解析には至らなかった。また、最新の分子生物学的手法を用いる事で、数多くの未知菌が存在すると考えられるルーメン微生物の生態系解析への応用が期待される。このようなことを背景に、亜硝酸還元を増強する方法に対して、次の 2 点からアプローチを行う。

研究(1) “硝酸含有飼料給餌下でのルーメン内の微生物生態系の解析”；硝酸塩の給与限界量を調べ、亜硝酸中毒を引き起こさずに安全に給与できる量を調べる。そして、その条件下でのルーメン微生物の遺伝子情報を網羅的に解析し、ルーメン内で硝酸・亜硝酸還元を主に担う菌群および代謝経路を解明し、給与飼料と宿主動物とルーメン微生物との関連性を明らかにする。得られた情報を基に未知の有用微生物や酵素を単離し、プロバイオティクスや添加剤としての利用を検討し、野菜残渣の飼料化を図る。

研究(2) “亜硝酸還元能の高い新規単離ルー

メン菌における亜硝酸還元酵素の活性の調節”；亜硝酸還元能の高い新規単離菌を見つけ出し、その亜硝酸還元酵素遺伝子を明らかにする。そしてその菌が硝酸存在下で、どのような発現調節を行うかを調べ、亜硝酸還元酵素の活性を増大させるように育種・改良することを狙う。

### 3. 研究の方法

研究(1) 日本在来のヤギ(平均体重約 30 kg)に硝酸塩を含む飼料を給餌し、硝酸中毒を引き起こさないような添加限界量をプレ実験として検討した。本試験として、硝酸塩を添加しない飼料でヤギを 2 週間飼育し、引き続き 6 g (/日)の硝酸塩を添加した飼料で 3 週間飼育した。その後、9 g (/日)の硝酸塩を添加した飼料で更に 3 週間飼育し、各濃度の硝酸塩添加飼料を給餌した場合のヤギの生理的反応を観察した。これらのヤギからルーメン内容物を回収し、有機酸濃度を調べ、ルーメン内の微生物全体の発酵への影響について調べた。また、ルーメン内容物から混合微生物のゲノム DNA を抽出し、主要微生物種に特異的な DNA 領域に基づいて設計したプライマーを用いて、特定の微生物の遺伝子のみを PCR で増幅させた。その増幅効率は遺伝子量、すなわち菌数と相関するので、微生物を培養しなくても、サンプル中の微生物量を推測できる。各硝酸塩添加飼料を給餌した場合の種々のルーメン微生物を計数し、飼料中の硝酸濃度がルーメン微生物の構成にどのような影響を及ぼすかを調べた。

研究(2) 硝酸塩を添加した飼料を給餌したヤギのルーメン内から亜硝酸還元能の高い新規菌を単離した。すなわち、亜硝酸を含む嫌気性富栄養培地でルーメン内溶液を集積培養し、0.8 % (w/v)の寒天を添加した固形培地でコロニーを形成させ、単一コロニーを同組成の液体培地で培養し、亜硝酸の還元能を調べた。単離された亜硝酸還元菌の 16S rRNA の塩基配列情報を基に菌の同定を行った。その菌の亜硝酸還元酵素の単離・精製を行ない、酵素遺伝子の塩基配列を決定する予定であったが、精製が上手くいかなかったので、ドラフトゲノムの作成を行った。即ち、本菌の染色体 DNA を断片化し、ペアエンドライブラリーを作製した。エマルジョン PCR により各断片を増幅し、パイロシーケンスを行った。

### 4. 研究成果

研究(1) ヤギに硝酸塩を含む飼料を給餌し、その添加限界量を調べたところ、10 g/日の硝酸塩を給餌すると亜硝酸中毒症が引き起こされることを確認した。そこで、6 g/日および 9 g/日量の硝酸塩を給与し、ルーメン内微生物叢への影響を調べた。計 6 週間の硝酸塩給与により、ヤギの体重が有為に変化することはなかった。ルーメン液の成分について解析したところ、硝酸塩の添加量の増加に伴い、揮発性脂肪酸の総生成量は低下した。しかし、酢酸 /プロピオン酸濃度比、アンモニア濃度、および乳酸濃度は増加した。これより、硝酸塩の添加は微生物叢の構成に大きな影響を及ぼす事が示唆された。しかし、いずれの濃度の硝酸塩を添加した場合においても、ルーメン液中の亜硝酸濃度は 0.5 mM(検出限

界)以下であり、この程度の硝酸添加量であれば、亜硝酸は速やかに還元されると考えられた。リアルタイム PCR によるルーメン内微生物数への影響を調べたところ、メタン菌、プロトゾア、および真菌類の総数が硝酸塩の給与により大きく減少することが示された。メタン菌画分におけるメタン生成およびプロトゾア画分におけるその生存数と発酵は、亜硝酸により著しく阻害されたので、これらの微生物の亜硝酸耐性は特に低いと考えられた。一方、ルーメン内の主要な繊維分解菌 (*Fibrobacter succinogenes*、*Ruminococcus albus*、および *Ruminococcus flavefaciens*) の存在数は硝酸塩添加の影響をさして受けなかった。また、ルーメン内細菌の中で最も優勢な *Prevotella* 属の菌数への硝酸塩添加の影響も小さかった。しかし、ルーメン内の主要な乳酸生成菌である *Streptococcus bovis* の菌数は硝酸塩の添加により大きく増加した。一方、乳酸利用菌である *Megasphaera elsdenii* の菌数は硝酸塩の添加により減少した。この事は、硝酸塩の添加により乳酸濃度が増加することの一因と考えられる。ルーメン内主要菌の中で硝酸・亜硝酸還元能を有する *Selenomonas ruminantium* の菌数は硝酸塩の添加により大きく増加した。しかし、本菌の全ての菌株が硝酸・亜硝酸還元能を有する訳ではない。そこで、*S. ruminantium* の硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素の遺伝子に特異的なプライマーを設計し、ルーメン内の遺伝子量を測定したところ、どちらの遺伝子量も硝酸塩の給与により増加した。これは、硝酸塩添加により硝酸・亜硝酸還元能を持つ

*S. ruminantium* の菌株が増加したことを示唆する。また、硝酸塩の添加によりルーメン内の細菌総量あたりの硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素の活性が増加した。これは、硝酸塩添加によりこれらの酵素量が増加したことを示す。以上より、特に硝酸含量の高い飼料を反芻動物に給与した場合には、ルーメン内での硝酸・亜硝酸の還元において *S. ruminantium* が主要な役割を担うと考えられた。

研究(2) 3mM 亜硝酸の添加という選択圧のもとで 200 コロニーを単離し、その中で最も亜硝酸還元活性が高かった菌を 16S rRNA の塩基配列情報を基に系統解析を行ったところ、*S. ruminantium* であった。本結果は、研究(1)の結果と一致する。本菌の亜硝酸還元酵素の精製を試みたが、その過程で総活性値が大きく低下してしまい、単一タンパクには至らなかった。カラムの種類、酵素の保護剤、界面活性剤の種類、緩衝液等を検討したが、大きな改善は見られなかった。このため、パイロシークエンス法によるドラフトゲノムからの亜硝酸還元酵素遺伝子の単離に方法を切り替えた。*S. ruminantium* のドラフトゲノムを作成したところ、種々の遺伝子構成が明らかとなり、その中には亜硝酸還元酵素遺伝子も含まれていた。この遺伝子領域をクローニングし、タンパク質を発現させ、酵素活性を測定したところ、亜硝酸還元酵素活性を示した。従って、この遺伝子領域は亜硝酸還元酵素の活性部位をコードすると考えられた。

本研究により、ルーメン内での硝酸・亜硝酸

の還元において *S. ruminantium* が主要な役割を担い、その亜硝酸還元酵素遺伝子が明らかとなった。これらの結果は、今後のルーメン内の亜硝酸還元の増強を考える上で、重要な知見となると思われる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Hino T, Suzuki K, Ohkawara S, Miwa T, and Asanuma N. Effects of oral administration of *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 on the development and healing of atopic dermatitis in NC/Nga mice. Journal of Dermatology, 査読有, Vol.22, 2012, 211-217., 10.1684/ejd.2011.1618

Mitsumori M, Shinkai T, Takenaka A, Enishi O, Higuchi K, Kobayashi Y, Nonaka I, Asanuma N, Denman SE, McSweeney CS. Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. The British Journal of Nutrition, 査読有, Vol.108, 2012, 482-491., 10.1017/S0007114511005794

[学会発表] (計 16 件)

Asanuma N, Function of a peptide pheromone in *Streptococcus bovis* and its genome sequence, 2011 Congress on Gastrointestinal Function Meeting, 2011.04.19 松井宏樹, 浅沼成人, 他 6 名, 北海道一般農場におけるウシ糞便中の乳酸菌数、有機酸濃度および IgA 濃度の調査, 第

114 回日本畜産学会大会, 2011.08.26 浅沼成人, 反芻胃内の分子微生物学を学ぶ, 第 114 回日本畜産学会大会 若手シンポジウム (招待講演), 2011.08.26 Kawata M, Asanuma N, Function of a peptide pheromone from *Streptococcus bovis* in the goat rumen, BioMicroworld2011, 2011.09.15 Sato Y, Asanuma N, Difference of a peptide pheromone and a genomic sequence between *Streptococcus bovis* and *Streptococcus gallolyticus*, BioMicroworld2011, 2011.09.15 Asanuma N, Utilization of *Selenomonas ruminantium* for the prevention of rumen acidosis and suppression of methanogenesis in the rumen, and its genomic sequence and transcriptional analysis, BioMicroworld2011, 2011.09.15 Kawata M, Asanuma N, 4 others, Fermentation shift to utilize lactate estimated by transcriptomic analyses of *Selenomonas ruminantium*, The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, 2011.10.18 Ichikawa T, Asanuma N, Hino T, Application of ceramide produced by an isolated novel strain to the alleviation of inflammatory bowel disease, The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, 2011.10.18 Sato Y, Asanuma N, Hino T, Difference of a peptide pheromone and a genomic sequence between *Streptococcus*

*bovis* and *Streptococcus gallolyticus*, The 8th Japan-Korea-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, 2011.10.18 Asanuma N, Properties of a novel strain hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide, 8th Joint Symposium INRA, 2012.06.17 Asanuma N, Hino T, Effects of ceramide produced from plant glucosylceramide to the alleviation of inflammatory bowel disease and gut microflora, Alternatives to antibiotics, 2012.09.25 Asanuma N, Effectiveness of corn ceramide in manipulating gut microbiota in mouse with inflammatory bowel disease, II International conference on antimicrobial research, 2012.11.21 Asanuma N, Application of plant ceramide as antibacterial agent to modulate intestinal microflora and to prevent Clostridial infection, OIE Global Conference on the Prudent Use of Antimicrobial Agents for Animal, 2013.03.12 Asanuma N, Effects of corn ceramide on growth of mixed microflora and on experimental enterocolitis in mice, 2013 Congress on Gastrointestinal Function Meeting, 2013.04.15 Asanuma N, Molecular characterization of a novel bacterium hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide, 5th Congress of European Microbiologists FEMS 2013, 2013.07.21 Asanuma N, Enhancement of the

utilization of bioactive glucosylceramide by the newly strain isolated from dog feces, BioMicroworld2013, 2013.10.02

[その他]

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~asalab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅沼 成人 (ASANUMA, Narito)

明治大学・農学部生命科学科・准教授

研究者番号：50366902