

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780254

研究課題名(和文) 黒毛和牛のルーメン微生物相と産肉成績の関連探索

研究課題名(英文) Exploration of relationship between rumen microflora of Japanese Black cattle and its beef production

研究代表者

小池 聡 (Koike, Satoshi)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90431353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の重要肉用牛品種である黒毛和種について、その栄養獲得の根幹を担う第一胃内(ルーメン)微生物相を明らかにするとともに産肉成績との関連を探った。黒毛和種ルーメン内の主要細菌群は23菌群あり、そのうち2菌群は黒毛和種に特徴的と考えられた。筋肉中脂肪酸不飽和度を基準に24個体を選抜し、次世代シーケンサーによる網羅的ルーメン菌叢解析を行ったところ、筋肉中脂肪酸不飽和度が高い個体は特有のルーメン細菌叢を保有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Japanese Black cattle are the most popular beef breed and accounts for 60% of beef cattle in Japan. In the present study, rumen microbial community of Japanese Black cattle was explored. A analysis of 16S rRNA gene clone library revealed that twenty three bacterial groups represent 40% of rumen bacterial community in the rumen of Japanese Black cattle. Particularly, two of them belonging Ruminococcus ceae seemed to be higher population size compared to the other cattle breeds. Based on the extent of unsaturated fatty acids in the muscle, twenty four individuals were selected and subjected to comprehensive analysis of rumen microbial community by pyrosequencing. Individuals showing higher unsaturated fatty acids in the muscle tended to possess different rumen microbial flora.

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：ルーメン 微生物 黒毛和種

### 1. 研究開始当初の背景

反芻動物は維持に必要なエネルギーの70%を第一胃(ルーメン)に棲息する微生物が産生する短鎖脂肪酸により得ており、ルーメン微生物が反芻動物の栄養獲得の根幹を担っていることは間違いない。そのため、これまでにルーメン微生物相に関する数多くの研究がなされておりデータが蓄積しつつある。特に1990年代後半に16S rRNA 遺伝子をマーカーとする分子生物学的手法がルーメン微生物相解析に応用されて以降、ルーメン微生物多様性に関する膨大なデータが得られている。Kimら(FEMS Microbiol. Ecol.76:49-63, 2011)はこれまでに報告されているルーメン細菌由来16S rRNA 遺伝子塩基配列を網羅的に系統解析し、ルーメン細菌叢の概観をまとめている。それによると、これまでに日本、北米、ヨーロッパの研究グループにより乳牛、肉牛、ヒツジなどのルーメンから13,478塩基配列が報告されており、ルーメン内には少なくとも3,500種の細菌が棲息すると推定されている。なかでも*Prevotella*属細菌といくつかの未培養細菌群の分布量が多く、これらがルーメン内のコアメンバーである可能性を指摘している。

これまでの研究を通し、申請者のグループを含め世界各国の研究グループがルーメン微生物相は個体差が大きいことを指摘している。その中で、カナダの研究グループは肥育効率の高い牛と低い牛ではルーメン微生物相に違いが見られ、「肥育効率の高い牛に特有の微生物相」があることを報告している(Zhouら, Appl. Environ. Microbiol. 76:3776-3786, 2010)。個体差は通常の家畜生産においてはデメリットと受け取られがちであるが、もし我が国の代表的な肉用牛品種である黒毛和種でも産肉成績の良い個体に特有のルーメン微生物が存在するのであれば、それを活用して高品質牛肉生産に応用するための戦略が立てられるのではないかとこの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、黒毛和種牛の栄養特性を理解し高品質牛肉の安定生産に資するための知見を得ることである。反芻動物の栄養獲得において第一胃(ルーメン)内に棲息する微生物が根幹を担っていることから、これまでにルーメン内微生物に関する多くの研究がなされてきており、どのような微生物がどの程度棲息しているのかについて概観がわかってきている。一方、本国の重要肉牛品種である黒毛和種牛のルーメン微生物解析については未だに手つかずの状態である。本研究では黒毛和種牛ルーメン微生物相を網羅的に解析し、既知他品種の情報と比較することで黒毛和種牛の栄養特性の基盤となる知見の取得をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) 供試動物として黒毛和種肥育牛42頭を用いた。これを2群(各21頭)に分け、対照区にはイナワラと市販配合飼料を慣行にならって給与し、試験区は配合飼料の最大15%を飼料用米に置き換えて給与した。ルーメン液を14、18、22および26ヶ月齢の時点経口採取した。

(2) ルーメン液より総微生物DNAを抽出し、rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子生態学的解析を実施した。すなわち、クローンライブラリーによる真正細菌およびメタン生成古細菌の群集構造解析をおこなった。また、クローンライブラリー解析で検出頻度が高かった菌群についてはReal-time PCR 定量を実施し、定量的に分布密度を特定した。

(3) 産肉成績とルーメン細菌叢との関連を探索するために、供試42個体から筋肉内脂肪の脂肪酸不飽和度が高かった個体(n=9)、中程度の個体(n=7)および低かった個体(n=8)の計24個体を選抜し、次世代シーケンサーによる網羅的細菌叢解析を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 取得した全608クローンについて塩基配列相同性97%を基準に分類したところ、280菌群が検出された。そのうち、5クローン以上で構成される菌群が23菌群みられこれらが全クローンの約40%を占めた。この結果はこれら23菌群が黒毛和種のルーメンのコアメンバーであることを示している。コアメンバーのほとんどは*Prevotellaceae*科、*Rikenellaceae*科、*Ruminococcaceae*科もしくは*Lachnospiraceae*科のいずれかに属していた(図1)。特に、*Ruminococcaceae*科細菌の検出割合は他品種のウシでの既報値と比べて高い特徴が見られた。さらに本科に属するデンプン分解菌*Ruminococcus bromii*に近縁なクローンが多数検出され、これらが黒毛和種ルーメン内でのデンプン分解に大きく貢献している可能性が示唆された。また、14ヶ月齢では*Prevotella*属細菌が、26ヶ月齢では*Bacteroidetes*門に属する未培養細菌群の検出割合が高く、肥育段階の進行に伴う濃厚飼料割合の増加により菌叢変化がみられた(図1)。

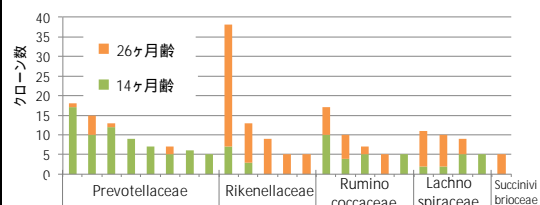


図1. 16S rRNA 遺伝子クローン解析で検出された黒毛和種牛ルーメン内のコア細菌グループ

(2)メタン生成古細菌を対象に 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づくクローンライブラリー解析を実施したところ、取得した 167 クローンのうち既知メタン菌種と 97%以上の塩基配列相同性を示すクローンはなかったが、157 クローン(全クローンの 94%)はこれまでに報告例のある未培養クローンと 97%以上の塩基配列相同性を示した。取得クローンのうち、*Methanobrevibacter millerae* に近縁なクローンが最も多く全クローンの 42.4%を占め、次いで *Methanobrevibacter ruminantium*、*Methanobrevibacter gottschalkii* および *Methanobrevibacter woesei* に近縁なクローンがそれぞれ 23.4%、14.4%および 11.4%であった。したがって、黒毛和種牛ルーメンでは *Methanobrevibacter* 属に近縁な未培養メタン菌が主要構成員であることが明らかとなった。*Methanobrevibacter* 属優勢型のルーメン内メタン菌叢構成は他のウシ品種と類似していたが、*M. woesei* に近縁なクローンはこれまでにルーメンからの検出例は少なく、他のウシ品種ルーメン内ではマイナーなグループと考えられる。

さらにメタン生成に必須な Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析を実施したところ、全クローンの 92% (154 クローン) が *Methanobrevibacter* 属に属することを確認した(図 2)。このうち、OTU9 および OTU17 (JBC cluster m1) は既知の *Methanobrevibacter* 属とは系統位置が離れており、最近縁既知メタン菌との塩基配列相同性も 90%未満であった。一方、ルーメンから検出例が少ない *M. woesei* 近縁クローンで構成される OTU3、OTU23 および OTU27 も系統的に独立したクラスター (JBC cluster m2) を形成していた(図 2)。したがって、JBC cluster m1 および m2 は新規性の高いグループと考えられ、黒毛和種ルーメンには他のウシ品種と異なるメタン菌が分布している可能性が示唆された。

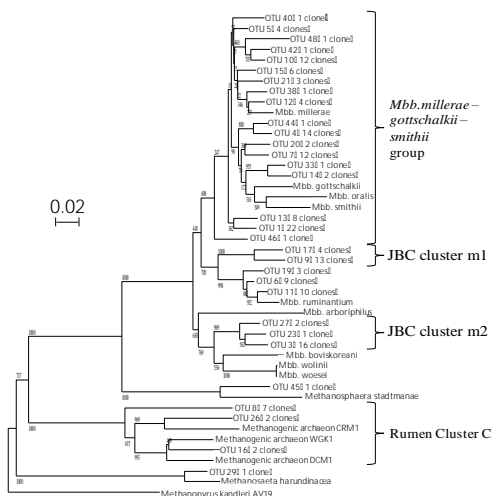


図2. *mcrA* 遺伝子塩基配列に基づく黒毛和種ルーメン由来未培養メタン菌の分子系統樹

(3)次世代シーケンサーによる網羅的細菌叢解析では Prevotellaceae 科、Lachnospiraceae 科、Ruminococcaceae 科が主要な細菌群として検出され、クローンライブラリー解析の結果と一致した。細菌群の検出割合に基づきクラスター解析を行ったところ、4 つのクラスターに分かれた(図 3)。クラスター および は主に筋肉中脂肪酸不飽和度が高かった個体が含まれていたのに対し、クラスター および は不飽和度が中程度もしくは低い個体で形成されていた。クラスター と に属する個体では *Prevotella* 属細菌の分布量がクラスター と の個体に比べて高く、未培養菌種 TM7、*Streptococcus* 属および *Mogibacterium* 属細菌の検出割合が低いという特徴が見られた。筋肉内脂肪酸不飽和度とルーメン細菌叢の関連については不明であるが、本研究により筋肉内脂肪酸不飽和度が高い個体は特徴的なルーメン菌叢を保有する可能性が示唆された。ヒトでは腸内における *Bacteroidetes* 門 (*Prevotella* 属を含む) と *Firmicutes* 門の割合と肥満に関連性があると報告されており、*Firmicutes* 門が増加し、*Bacteroidetes* 門が減少すると肥満につながると指摘されている。ウシにおいては、ルーメン細菌相と宿主の成長や筋肉内脂肪合成に関する明確な関連性はこれまでに明らかとなっていない。今後、ルーメン細菌叢と宿主の栄養生理の関連性を探っていく必要があると考えられる。

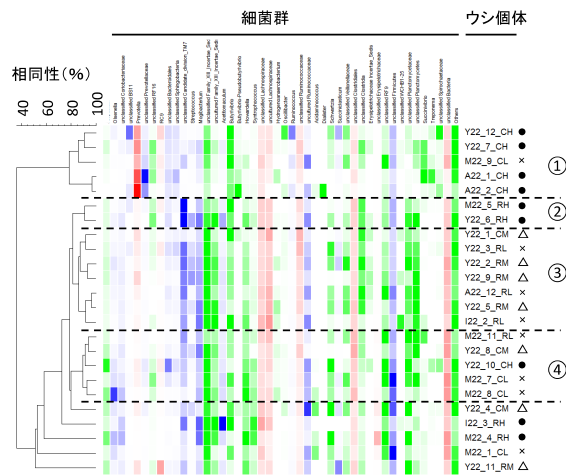


図3 筋肉中脂肪酸の不飽和度を基準に選抜した供試牛のルーメン細菌叢

※ ヒートマップは各細菌群の検出割合(%)により色分けした



※ ウシ個体に付したシンボルは筋肉中脂肪酸不飽和度が高い(●)、中程度(△)または低い(×)ことを示す

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

川西由希子、河内博貴、庄司則章、小池

聡、小林泰男、飼料用米の給与が黒毛和種ルーメン細菌叢に及ぼす影響、日本畜産学会第 118 回大会、エポカルつくば、茨城県、2014 年 3 月 27 日

H. Kawauchi, S. Koike, Y. Kobayashi, Analysis of rumen bacterial community of Japanese Black cattle, The 9th China-Korea-Japan Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, Hunan Provincial Hotel, Changsha, China, 2013 年 10 月 12 日

川西由希子、小池聡、小林泰男、黒毛和種ルーメン内メタン菌叢の解析、北海道畜産草地学会第 2 回大会、紋別市文化会館、北海道、2013 年 8 月 31 日

河内博貴、小池聡、小林泰男、黒毛和種ルーメン内主要細菌群の特定、日本畜産学会第 116 回大会、安田女子大学、広島県、2013 年 3 月 30 日

河内博貴、小池聡、小林泰男、黒毛和種ルーメン内真正細菌叢の解析、北海道畜産草地学会第 1 回大会、北海道大学、北海道、2012 年 12 月 15 日

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :