

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850061

研究課題名(和文)ルーメン内細菌が合成する機能性物質による繊維分解菌群の活性化

研究課題名(英文) Enhancement of the fibrolytic consortia by the functional substances produced by rumen microbiota

研究代表者

真貝 拓三 (SHINKAI, TAKUMI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・家畜代謝栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：70510254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：反芻動物の第一胃内において細菌群集の繊維分解機能を明らかにするとともに、これらが産生している機能性物質の菌群機能への影響を評価した。エンド型繊維分解酵素の遺伝子発現が顕著であり、繊維分解の中心的役割を担っている細菌種を特定した。また、繊維分解菌群からは、 $\beta$ -ラクタム系抗菌物質の分解酵素、インドール系物質応答遺伝子などが多く遺伝子発現しており、繊維分解菌群のルーメン内での生態的地位の確立および発酵産物の生成経路の選択に影響している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The present study tried to reveal the relationship among the community member of fibrolytic consortia mediated by functional substances produced by rumen microbiota. The metatranscriptomic assembly highlighted the characteristic fibrolytic enzymes, and indicated the importance of *Fibrobacter succinogenes* for the fiber digestion. The  $\beta$ -lactamase, indole compounds were found the possibility to affect the niche and fermentation products of fibrolytic consortium in the rumen.

研究分野：農学

キーワード：ルーメン 細菌 繊維分解

### 1. 研究開始当初の背景

ウシなどの草食動物は、繊維質の多い植物飼料を主要なエネルギー源にできるという利点を持ち、ヒトとの食料競合が少ないため、古くより家畜化されてきた。この特質は、第一胃(ルーメン)内に共生する細菌群集の繊維分解機能に依存したものであり、繊維質多給時に形成される安定的に制御されたルーメン細菌叢は、動物の栄養や健康の基礎となるだけでなく、産業動物としての生産性向上についても鍵となる働きを担っている。

ルーメン細菌の機能性は、家畜としての栄養改善のみならず、植物バイオマス利用のモデルとして、特に木質系バイオマスからのエタノール利用の分野において国内外で積極的に研究されているが、ルーメン内での繊維分解機能の促進、および細菌叢の制御は達成されていない。

ルーメン内に取り込まれた植物飼料には、多種類の細菌が付着し、次第に局所的かつ組織的な細菌群集(繊維分解コンソーシアム)を形成する。報告者らは、特に *Fibrobacter succinogenes* という強力な繊維分解菌を中心として、*Butyrivibrio fibrisolvens* や *Prevotella* 属などから構成されるコンソーシアムは、繊維分解向上の鍵を握っていることを明らかにしてきた。一方、繊維分解コンソーシアムに関してこれまでに実施されてきた研究の多くは、培養可能な微生物どおしの共培養により実施されてきたが、これら菌種間の繊維分解利用の役割分担や、機能性物質を介した細菌群集内での相互作用などは、明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ルーメン内における繊維分解の鍵となる細菌種とその重要酵素を特定するとともに、これを活性化させる細菌由来の機能性物質の探索を目的として、反芻動物の第一胃内で繊維分解能力の高い *Fibrobacter succinogenes* を中心とする細菌群集(繊維分解コンソーシアム)に焦点をあて、繊維分解における酵素学的な役割分担を遺伝子発現レベルで明らかにするとともに、これら繊維分解コンソーシアムの構成細菌がルーメン内で産生している機能性物質を特定し、繊維分解コンソーシアムの機能性に与える影響を評価する。

### 3. 研究の方法

本研究では、*F. succinogenes* を中心とするコンソーシアムには、培養できない細菌種が多く含まれている。そのため、培養を介さずにコンソーシアムの代謝活動をモニタリングできる網羅的遺伝子発現解析、ならびに発酵産物の網羅解析を実施し、コンソーシアム中の繊維分解機能を明らかにするとともに、繊維分解コンソーシアムのメンバーが産生する物質について、純粋培養系にて繊維分解や代謝産物への影響を評価するため、以下

の試験を実施した。

(1) ルーメンフィステルを装着したホルスタイン種乾乳牛3頭(平均体重 547 ± 31 kg)に、チモシー乾草(*Phleum pratense*, 切断長 5 cm)および濃厚飼料の重量比 4 : 6 混合飼料を用い、日本飼養標準・乳牛 2006 年版 8)の維持エネルギー量の 1.3 倍量を一日 2 回に分けて給与し、28 日間飼養した。この牛から朝給餌前にルーメン内容物を採取した。内容物を繊維片とルーメン液に分け、DNA および RNA を抽出した。繊維固着菌群の網羅的遺伝子発現データを取得し、ルーメン液浮遊菌群のデータおよび既報のメタゲノムデータと比較することで、牛ルーメン内の繊維固着菌群において、遺伝子発現量が多く、かつ特徴的な繊維分解酵素の特定を試みた。また、繊維分解コンソーシアムで多く遺伝子発現している機能性成分の推定を行った。

(2) ルーメンおよび十二指腸にカニニューレを装着したヒツジ3頭を用い、日本飼養標準・めん羊(1996)の維持エネルギー量に設定した粗飼料多給区(エネルギーベースの粗濃比は 8 : 2, NDF57%)または濃厚飼料多給区(エネルギーベースの粗濃比は 2 : 8, NDF36%)の飼料を、1日1回朝 0900 に給与した。試験は粗飼料多給区について濃厚飼料多給区とする各区 21 日間飼養の一元配置とし、給餌から4時間おきに24時間までルーメンおよび十二指腸カニニューレからそれぞれ内容物を収集した。また試験区の最終日にルーメン内底部に 100ml の Co-EDTA 液を注入し、ルーメン液相の通過速度マーカーとした。フーリエ変換型質量分析計 LC/MS/MS を用いた腸管内容物のメタボローム解析を行い、標準物質を用いて物質同定し、定量した。

(3) (1)の試験で得られたデータを元に、-ラクタム環分解酵素、インドール系物質、およびサイクリック-di-GMP を *F. succinogenes*、*B. fibrisolvens*、および *P. ruminicola* の純菌培地、混合系、およびルーメン液中に添加し、細菌の繊維分解や代謝・発酵に与える影響を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 繊維分解菌群の網羅的遺伝子発現解析を実施し、主要繊維分解菌 *F. succinogenes*、およびこれを含めたルーメン内繊維分解菌群による繊維分解の特徴を遺伝子発現レベルで明らかにした。すなわち、*F. succinogenes* はエンド型繊維分解酵素の遺伝子発現が検出数、割合ともに顕著に多く、特に6つのエンド型セルラーゼ、および6種類のエンド型ヘミセルラーゼが繊維分解において中心的役割を担っていることが明らかになった。糖質加水分解酵素ファミリー11、26、30、44、45、および74は本菌に特徴的な遺伝子発現であったことから、これらが高い繊維分解能力を支える鍵酵素である可能性が示唆された(図1)。

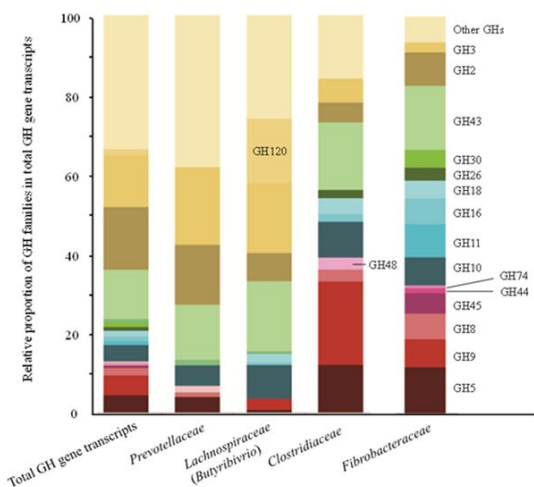


図1 ルーメン内繊維片上における代表的な細菌分解菌種の糖質加水分解酵素ファミリーの検出割合。図中の色はセルロース分解（赤）、ヘミセルロース分解（青-緑）および可溶性糖類分解（黄）に関連する糖質加水分解酵素群を示している。

*F. succinogenes* と繊維分解コンソーシアムを構成する *B. fibrisolvens* や *Prevotella* 属などの細菌種は可溶性糖類分解に関連するものがほとんどであり、繊維分解を補助的に支援している可能性が高いと考えられた。

また、網羅的遺伝子発現プロファイルから菌群間情報伝達に関連している可能性のある物質を探索したところ、これら繊維分解菌群からは、 $\beta$ -ラクタム系抗菌物質の分解酵素、インドール系物質の産生または応答に関与する遺伝子、および共通の情報伝達物質に合成遺伝子が多く発現していることが明らかになった。

(2) 粗飼料多給時に増加する微生物代謝産物の特定を目的として、粗飼料または濃厚飼料多給の条件で動物実験の実施し、採取したルーメン内不揮発性成分についてメタボロミクス解析を行った。その結果、70-80%のルーメン液成分は飼料区間で大差がないものの、濃厚飼料多給区で高い濃度を示す成分が20%、粗飼料多給区で高い濃度を示す成分が5%存在していた。粗飼料多給区において高濃度で検出される成分の一つはドデカン二酸と同定され、繊維分解菌群に特徴的な代謝産物の一つである可能性が示唆された。多くの検出物質についてはその同定が技術的に困難であったため、繊維分解コンソーシアムで産生される物質についても同定ができなかったものの、粗飼料多給時のルーメン発酵産物の一部特徴付けができるなど一定の成果を得た。

(3)  $\beta$ -ラクタム系抗菌物質の分解を制御または増強した時の繊維分解への影響を *in vitro* で評価した。その結果、 $\beta$ -ラクタム環分解酵素の阻害物を添加すると、分解酵素阻害物自体は *F. succinogenes* の増殖や纖

維分解機能に影響しないにも関わらず、多くのルーメン細菌の中で *F. succinogenes* の代謝活性だけが顕著に低下し、繊維消化率も低下することが明らかになった。一方、 $\beta$ -ラクタム環分解酵素を添加すると *F. succinogenes* の代謝活性は高まることが明らかになった（図2a）。しかし、繊維消失率に違いはなかった（図2b）。この  $\beta$ -ラクタム環分解酵素は、ルーメン内において *F. succinogenes* と共に繊維分解群集を構成する菌種（*Butyrivibrio fibrisolvens* や *Prevotella ruminicola*）で遺伝子発現量が高かったことから、ルーメン内における *F. succinogenes* のニッチ向上に貢献している可能性が示唆された。

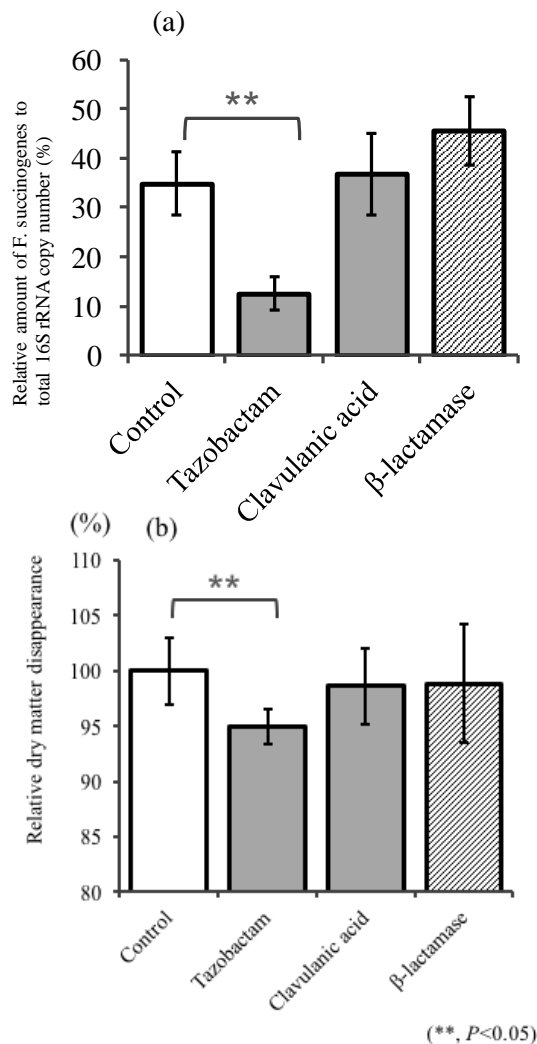


図2  $\beta$ -ラクタム環分解酵素の阻害または増強がルーメン液中の *Fibrobacter succinogenes* の活性 (a) および繊維消化率 (b) に与える影響。 $\beta$ -ラクタム環分解酵素を阻害すると(阻害力が異なる2種類、灰色)対照区(白)と比較して、*F. succinogenes* の活性が低下し、繊維消化率も低下する。逆に  $\beta$ -ラクタム環分解酵素を増強すると、*F. succinogenes* の活性が向上する。しかし繊維消化率の向上までには至らない。

繊維分解コンソーシアムを構成する細菌の純菌培地に、オーキシン（インドール-3-酢酸，IAA およびインドール-3-酪酸，IBA）およびインドールを添加したところ、*F. succinogenes* 以外の繊維分解コンソーシアム構成員である *P. ruminicola* および *B. fibrisolvens* については、濃度に依存して代謝産物に異なる影響を与えることが明らかになった。すなわち、*P. ruminicola* では高濃度 IAA 添加で発酵産物の生成が促進されるが、低濃度 IAA または IBA 添加では酢酸生成が増進した。また、*B. fibrisolvens* ではいずれの物質を添加した場合でも酪酸生成量が低下し、乳酸生成量は低濃度で増進し、高濃度で低下した。インドール系シグナルに連動すると予想されたサイクリック-di-GMP に対しては、*F. succinogenes* および *B. fibrisolvens* において細胞内での遺伝子発現は確認できたものの、細胞外濃度の増加に対しては反応が見られなかったことから、繊維分解機能を刺激する細菌種間情報伝達物質としての働きが限定的であ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1件)

Takumi SHINKAI, Makoto MITSUMORI, Ahmad SOFYAN, Hiroyuki KANAMORI, Harumi SASAKI, Yuichi KATAYOSE, Akio TAKENAKA, Comprehensive detection of bacterial carbohydrate-active enzyme coding genes expressed in the cow rumen, *Animal Science Journal*, 査読有、87 巻、(2016)、1363-1370.

##### 〔学会発表〕(計3件)

真貝拓三、樋口浩二、三森真琴、メタボローム解析による粗飼料および濃厚飼料多給与時のルーメン発酵産物比較、ルーメン研究会、2016 年 10 月 14 日、馬事畜産会館、中央区、東京都。

真貝拓三、三森真琴、オーキシン添加によるルーメン細菌およびルーメン発酵の変化、日本畜産学会、2015 年 3 月 28 日、宇都宮大学、栃木県宇都宮市。

Shinkai T, Mitsumori M, Takenaka A, Impact of the regulation of -lactamase activity on fiber digestion and microbial composition in the rumen, China-Korea-Japan Joint symposium on rumen metabolism and physiology, 2013 年 10 月 12 日、Changsha, China.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

真貝 拓三 (TAKUMI SHINKAI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・家畜代謝栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：70510254