

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450371

研究課題名(和文) 黒毛和種牛の安定生産を保障するルーメン発酵と微生物機能の特定

研究課題名(英文) Determination of core microbiota and its function in the rumen of Japanese Black cattle

研究代表者

小池 聡 (Koike, Satoshi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90431353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では黒毛和種牛の第一胃(ルーメン)発酵と微生物機能を網羅的に解析し、本品種の生産において真に重要なルーメン微生物機能の特定を目指した。黒毛和種牛ルーメン内では Lachnospiraceae科、Prevotellaceae科、Ruminococcaceae科、Unclassified BacteroidalesおよびUnclassified Clostridialesに属する細菌が全細菌の約70%を占めることを明らかにした。さらに、主要細菌群に属する澱粉分解菌株を分離培養し、菌株間で低pH耐性や可溶性糖類利用菌と協調関係が異なり、コア微生物群には機能的な差違があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to determine the core microbiome and its function in the rumen of JB cattle. MiSeq analysis of the microbiota revealed that Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, unclassified Bacteroidales and unclassified Clostridiales occupied more than 70% of rumen microbiota in JB cattle. Therefore, these five phylotypes were considered as core members of the microbiota, and we attempted to isolate starch degrading bacteria belonging to these phylotypes. Among 178 newly isolated strains, 12 strains were classified into either of target phylotypes; 5 strains for Lachnospiraceae, 5 strains for Ruminococcaceae and 2 strains for Prevotellaceae. Under different pH conditions, Lachnospiraceae strain grew at pH 5.5; meanwhile, strains of Prevotellaceae and Ruminococcaceae did not. Therefore, the strains belonging to core phylotypes of rumen microbiota in JB cattle might be involved in feed digestion in different manners.

研究分野：家畜栄養学、消化管微生物学

キーワード：黒毛和種 ルーメン発酵 ルーメン細菌 菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

現在、日本で飼養されている肉用牛は約270万頭でそのうち65%は黒毛和種が占める。また、海外でも Wagyu として認知されるなど、黒毛和種は我が国を代表する重要な肉用牛品種である。黒毛和種の特筆すべき特徴は脂肪交雑の多い霜降り肉の作りやすさにあるが、その生産には1年半以上の長期にわたる濃厚飼料の多給や飼料中ビタミンA含量の調節など黒毛和種牛に特有の飼養管理が必須である。反芻家畜が摂取した飼料の大部分は第一胃(ルーメン)で分解、発酵され宿主の栄養源に転換されることから、黒毛和種牛生産において安定したルーメン機能を維持することは極めて重要である。申請者は黒毛和種牛の生産とルーメン微生物の関連に着目して先行研究に着手しており(科研費若手(B)、H24~25年度)これまでに黒毛和種牛ルーメン微生物相を構成する主要微生物群について基礎的な知見を得ている。一方、食糧自給率の向上、安全な食料生産、または価格変動に左右されない農家経営といった複合的な観点から自給飼料を積極活用した家畜飼養の必要性が高まっている。濃厚飼料の自給率は10%程度であり、大部分を輸入に頼っている。そのため、飼料用米を利活用した黒毛和種牛の生産について活発な研究がなされており、濃厚飼料の10%程度は飼料用米で置き換え可能との成果が得られている。また、乳牛に広く普及しているグラス・コーンサイレージの黒毛和種牛への給与についても普及への道が模索されている。このように黒毛和種牛の生産は国内自給飼料の活用を中心に多様な飼養技術が開発されつつある。しかし、異なる飼料給与が黒毛和種牛のルーメン発酵に及ぼす影響に関する知見は乏しい。代替飼料による遜色ない黒毛和種牛生産が可能であることは産肉成績をみれば明らかであるが、その裏ではルーメン機能が安定的に発揮されているからこそ期待通りの生産に結びついているのは間違いない。しかし、ルーメン機能を担保する微生物群については未だ解明されていないことが多い。

2. 研究の目的

どのような飼養管理でも普遍的に見られるルーメン微生物群、すなわち黒毛和種牛においてコアな機能を果たす真に重要なルーメン微生物群とその機能を特定することは多様化する黒毛和種生産における重要な基礎的知見になり得る。そこで本研究では異なる飼料を給与した黒毛和種牛における重要ルーメン微生物群(コア微生物)を特定するとともにこれら微生物群の機能を解析することで、本品種の生産において真に重要なルーメン微生物機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 網羅的解析によるコア微生物の特定

供試動物は北海道、秋田県、岩手県、宮城

県および福島県で飼養された黒毛和種肥育牛90頭とした。給与飼料は牛群により異なり、一般的な慣行飼料、濃厚飼料の一部を飼料用米もしくはコーンサイレージと置き換えた飼料を給与した。供試牛の出荷月齢は28~30ヶ月齢で、肥育前期(14~17ヶ月齢)、肥育中期(21~22ヶ月齢)および肥育後期(26ヶ月齢)の時点で給餌4時間後のルーメン内容物を経口採取した。採取したルーメン内容物は液相と固相を分離せずに分析まで-80℃で凍結保存した。ルーメン内容物より総微生物DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子をターゲットとする次世代シーケンシング解析に供した。取得した遺伝子配列データは解析ソフトウェアQIIMEを用いて微生物分類群を特定した。

(2) コア微生物の機能解析

肥育中期(20ヶ月齢)の黒毛和種牛8頭からルーメン内容物を経口採取し、等量ずつ混合した。これを分離源としてデンブン分解菌の分離培養を実施した。取得した菌株については、検鏡および16S rRNA 遺伝子解析により純菌であることを確認し、遺伝子配列データベースと照合した。本研究において特定したコア微生物群に属する分離株を選抜し生理機能を解析した。すなわち、低pH条件下での増殖、デンブン分解能および可溶性糖類利用菌との協調関係について検討した。

4. 研究成果

(1) 網羅的解析によるコア微生物の特定

網羅的ルーメン細菌叢解析により、肥育前期から後期にかけて202科の細菌群が検出され、そのうち119科はいずれの肥育ステージにおいても共通で見られた(図1a)。このうち、総細菌の1%以上を占める細菌群につい

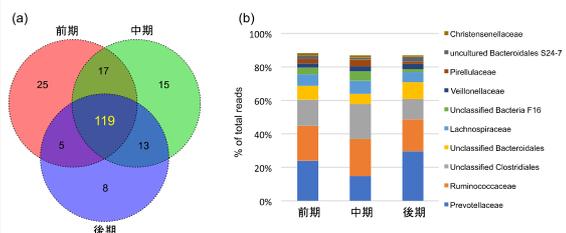


図1 異なる肥育ステージにおける黒毛和種牛ルーメン内細菌叢構成
(a) 各肥育ステージで検出された細菌科の数
(b) 肥育ステージを通じて検出された119細菌科のうち主要菌群の構成比

てそれぞれの分布量を比較したところ、Prevotellaceae 科、Ruminococcaceae 科、Unclassified Clostridiales、Unclassified Bacteroidales および Lachnospiraceae 科の5科がいずれの肥育ステージにおいても総細菌の約70%を占めていた(図1b)。また、これら5科の合計分布量は肥育ステージを問わず概ね同程度であった。一方、それぞれの細菌群の分布量を肥育ステージ間で比較したところ、いずれにおいても変動が認められた(図2)。Prevotellaceae 科と Unclassified Bacteroidales は肥育前期から中期にかけて

減少し、後期には分布量が再度増加するのに対し、その他の3科は肥育中期での増加が認められた(図2)。これらの結果より、黒毛和種ルーメン内では Prevotellaceae 科、Ruminococcaceae 科、Unclassified Clostridiales、Unclassified Bacteroidales

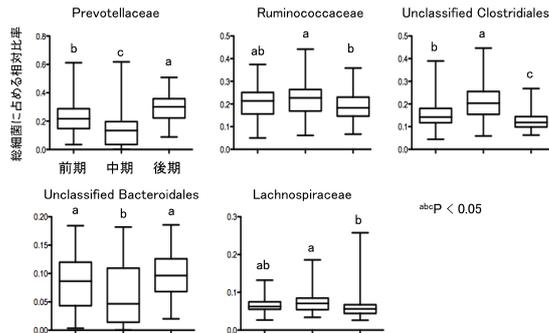


図2 異なる肥育ステージにおける黒毛和種牛ルーメン内主要細菌群の分布量変化

および Lachnospiraceae 科に属する細菌群が重要な役割を担うコア微生物群と特定された。一方、肥育ステージ間で主導的に働くコア微生物群は変動することが示唆された。

(2) コア微生物の機能解析

コア微生物に属する分離株を取得し、それらの機能の特定をめざした。本研究では 178 株を分離し、そのうち 12 株がコア微生物群に属していた。分子系統解析の結果、Lachnospiraceae 科の 1 株 (YAB-26 株)、Prevotellaceae 科の 1 株 (YAB-131 株) および Ruminococcaceae 科の 2 株 (YAB-117 株と YAB-127 株) が先行研究において検出された黒毛和種牛ルーメン由来の未培養クローンと近縁関係にあることがわかった (図3)。

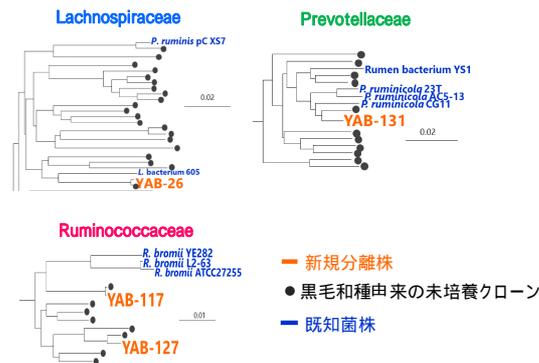


図3 黒毛和種肥育牛ルーメンから分離培養した細菌株の分子系統位置

したがって、これら 4 株は実際に黒毛和種ルーメン内に分布し、機能している可能性が極めて高いものと推定された。肥育期の黒毛和種牛は濃厚飼料を多給するため、ルーメン内 pH は低く推移する。そこで、新規分離株の低 pH における増殖をモニタリングした(図4)。いずれの菌株も中性付近ではデンプン培地において良好な増殖を示したが、Prevotellaceae YAB-131 株 および

Ruminococcaceae 科の 2 株 (YAB-117 株と YAB-127 株) は pH5.5 において増殖が認められなかった。一方、Lachnospiraceae YAB-26 は pH5.5 においても増殖がみられたことから、本菌株は他の 3 菌株にくらべて低 pH 耐性が高いことが明らかとなった。

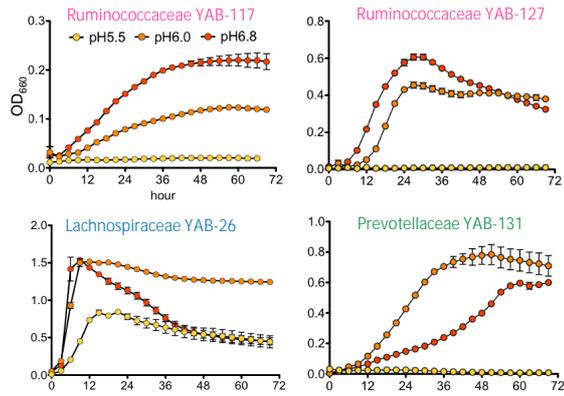


図4 黒毛和種牛ルーメン由来新規細菌株の異なる pH 条件下での増殖

ルーメン内のデンプン分解においてはデンプン分解菌とデンプン分解産物 (可溶性糖類) を利用する細菌が協調的に働くことが知られているため、本研究において新規分離株と可溶性糖類利用菌 (*Succinivibrio dextrinosolvens*) との協調関係について検討した (図5)。濃厚飼料多給を模した培地で

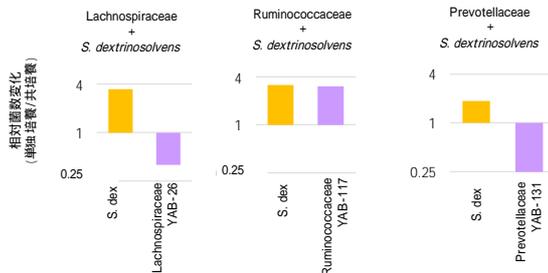


図5 黒毛和種牛ルーメン由来新規菌株と可溶性糖類利用菌の共培養下における各菌株の相対分布量変化

新規分離株と *S. dextrinosolvens* を共培養し、それぞれの増殖をモニタリングした結果 *S. dextrinosolvens* はいずれの分離株との共培養においても、単独培養時にくらべて良好な増殖が確認された (図5)。この結果は、新規分離株が分解した可溶性糖類を *S. dextrinosolvens* が利用したことを示すものである。一方、新規分離株においては Ruminococcaceae YAB-117 株のみ共培養下において単独培養時よりも良好な増殖を示した。この結果は Ruminococcaceae 科の菌株が可溶性糖類利用菌と協調的にデンプンを分解・発酵することを示唆している。

以上、本研究では飼料条件を問わず黒毛和種ルーメン内で重要な役割を担うコア微生物群とそれらの機能の一部を特定した。

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)

[学会発表](計 2 件)

S. Koike, Y. Akiyama, T. Hashimoto, R. Inoue, T. Endo, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, Isolation and partial characterization of starch degrading bacteria belonging to core phylotypes of rumen microbiota in Japanese Black cattle, 2017 Congress on Gastrointestinal Function, 2017年4月10日～2017年4月12日、Chicago (USA)

秋山 瑤子、小池 聡、小林 泰男、黒毛和種牛ルーメン由来デンプン分解菌の分離培養および生理機能解析、第49回ルーメン研究会、2016年10月14日、馬時畜産会館(東京都)

S. Koike, Y. Kawanishi, T. Hashimoto, Y. Kobayashi, A core microbiome and its compositional changes during fattening period in the rumen of Japanese Black cattle, Gut Microbiology, 2016年6月20日～2016年6月23日、Clermont-Ferrand (France)

川西 由希子、橋本 拓弥、河内 博貴、遠藤 哲代、糟谷 広高、庄司 則章、小池 聡、小林 泰男、黒毛和種牛ルーメン細菌叢の網羅的解析と重要細菌群の特定、日本畜産学会第121回大会、2016年3月28日～2016年3月29日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

秋山 瑤子、小池 聡、小林 泰男、黒毛和種牛未培養ルーメン細菌の培養化と機能解析、日本畜産学会第119回大会、2015年3月27日～2015年3月30日、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)

Y. Kawanishi, H. Kawauchi, S. Koike, Y. Kobayashi, Exploration of rumen bacterial flora in Japanese Black cattle, Rowett-INRA 2014 Gut Microbiology, 2014年6月16日～2014年6月19日、Aberdeen (UK)

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・准教授
研究者番号：90431353

(4)研究協力者

遠藤 哲代 (ENDO, Tetsushiro)
北海道立総合研究機構畜産試験場