

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660219

研究課題名(和文)野生ライチョウ由来の新規生菌剤開発：厳しい環境に対抗する野生生物の潜在能力活用

研究課題名(英文)Development of novel probiotics from wild Japanese rock ptarmigans

研究代表者

牛田 一成 (Ushida, Kazunari)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50183017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：立山の野生ニホンライチョウの腸内菌叢を網羅解析したところ、Synergistesなど飼育下のスパールバルライチョウから失われている菌群を優勢に検出した。解毒効果や保健効果を示す菌群が含まれると推測されたので、これらの細菌を分離し、毒性成分の一つであるロドデノール分解活性を検定した。野生ライチョウの糞便細菌は、被検物質を完全に分解したが、飼育ライチョウのものは全くなかった。野生ライチョウから単離したLactobacillus plantarumについては24時間で最大30%程度の分解率を示したが、大腸菌群には分解能がなかった。終了後の現在も、有用細菌の探索を続けている。

研究成果の概要(英文)：Ultra-deep sequencing of SSU rRNA retrieved from cecal feces of wild Japanese rock ptarmigans in Mt. Tateyama detected predominant bacterial species which were essentially absent in captive rock ptarmigans. From the literature, these specific bacteria were suggested to degrade toxic compounds in their natural foods and to be health beneficial. We isolated a range of intestinal bacteria from cecal feces of wild rock ptarmigans to test their capacities of toxin degradation. Strains of Lactobacillus plantarum showed the up to 30% of degradation rhododenol, a toxic compound in Rhododendrons which is a natural food for wild rock ptarmigans. Other isolates, namely Enterobacteriaceae, did not show the degradation of rhododenol. After the project, we are still searching beneficial intestinal bacteria from cecal feces of wild rock ptarmigans.

研究分野：腸内細菌学・動物生理学

キーワード：ニホンライチョウ 腸内細菌 毒物分解 保健効果

1. 研究開始当初の背景

ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*: 以下、ライチョウ) はキジ目ライチョウ科に属する日本固有亜種の鳥類で、日本アルプスを中心とした高山帯にのみ生息する。ライチョウは生息個体数が減少しており、絶滅危惧 IB 類に指定されている (環境省, 2012)。環境省は本種の絶滅回避のため増殖事業を開始しており、現在、国内の動物園数園が別亜種であるノルウェー産ライチョウ (*L. m. hyperboreus*) をモデル動物にして飼育下繁殖に取り組んでいる。しかし、飼育下繁殖個体群では、コクシジウム症や大腸菌症などによる死亡が大きな問題となっている (村田浩一 2008 *JVM* 61,361)。野生条件下と異なり、飼育下のライチョウでは、頻繁に下痢症状が認められ死に至ることもあるうえ、鳥類の中では体長比で最大の盲腸が退縮し、腎臓にシュウ酸塩も沈着する (Murai, Murata et al. 2011. *AAAP* 55, 709)。これらは、野生のライチョウと共生関係にある腸内菌叢が飼育下で破綻することが原因で生じていると推測されている。実際、飼育下のライチョウは、同じキジ目のニワトリの感染症 (コクシジウムやヒナ白痢、ニューカッスル、マレック、ポックスなどのウイルス病) に容易に感染する。研究代表者らは、これまで家畜やヒト用のプロバイオティクスの開発や機能評価を行ってきた (Oshashi & Ushida, 2009, *Anim Sci J.* 80, 361.)。近年では、野生動物の食物の特性や野生種に固有の腸内微生物を単離し、新種提唱や機能評価を行っている (Tsuchida, Ushida et al. 2014 *IJSEM* 64(2)および 64(12); Irbis, Ushida et al. 2008. *J Gen Appl Microbiol.* 54, 409; Uenishi, Ushida et al. 2007 *Am J Primatol.* 69, 367 ほか)。これらの成果より、野生のライチョウから飼育下のライチョウに移植できる有用腸内細菌があると考え、その単離同定と機能評価を目的とする本研究を着想した。単離される有用細菌は、同じキジ目のニワトリにも適用可能と期待されるため、単離に成功すれば希少動物の保護ばかりでなく減投薬養鶏技術にも応用展開でき、産業的意義が極めて大きい。

2. 研究の目的

野生動物には、様々な環境微生物にさらされても生き延びられるように、宿主と共生関係を確立した腸内菌叢が発達している。一方、飼育下では腸内菌叢が破綻し、様々な消化器症状を発症することが経験的に知られている。そこで本研究では、野生生物の環境適応性や感染抵抗性の大きな要因が「共生腸内細菌」にあることを次世代技術による腸内菌叢の網羅解析で明らかにする。具体的には、野生ライチョウ糞便を対象とし、次世代技術によって抵抗性の原動力となる腸内細菌情報を獲得し、それに基づいてプロバイオティクス候補菌を分離するこ

とを第一の目的とする。これらの細菌を飼育下ライチョウの健康な保護増殖管理に役立てるとともに、ライチョウと同じキジ目のニワトリに新規なプロバイオティクスとして応用し、無薬畜産システムの確立を目指す。野生ライチョウの正常細菌叢は飼育下個体群では変化しているが、どのような菌群、どのような機能性が失われているのかを、次世代技術を駆使して網羅的に明らかにし、その情報にもとづいて「ライチョウ腸内細菌」共生系の核心、防御的菌叢の中心を担うと考えられる菌群を定める。その情報に基づいてプロバイオティクス候補菌を分離・選抜し、飼育下ライチョウ個体群にくわえてニワトリの腸症状の緩和予防に効果のある細菌 (群) を確定する。

3. 研究の方法

「腸内菌叢の網羅解析」

野生ニホンライチョウを、北アルプス山塊の生息地である立山で探索し、その新鮮盲腸糞を核酸保護液中に採取した。飼育下ライチョウの新鮮糞は、横浜市立繁殖センターの協力を得て、同園で飼育中のノルウェー産ライチョウ個体群より採取した。

試料より DNA を抽出し、細菌 16S rRNA 遺伝子の網羅解析をおこなうため、Illumina 社のプロトコールに従い、アダプター付きのプライマーセットを用いて PCR 増幅し、さらにインデックス PCR を行った。濃度調整後 Miseq 機によってペアエンドシーケンス解析を行った。得られた配列をアセンブルを行ったのち、Qiime パイプラインの中で、質の悪い配列を削除するとともに、キメラ配列も削除した。得られた配列を USEARCH でクラスター化し、Greengene データベースに対して BLAST 検索を行った。

「毒物分解能の検定」

野生ライチョウの糞物として、ツツジ科、バラ科、カバノキ科など様々なものが挙げられているが、それらには毒性物質を含むものが数多くある。そのうち、入手が容易なシャクナゲを用いて毒性成分の分解を定量化した。

シャクナゲ葉の粉末を基質とした PY シャクナゲ培地を作成した。培地中に放出された成分を、分析するため、まず、培地の分取薄層クロマトグラフィー (PTLC) を行った。Y シャクナゲ培地 100 ml を 4 °C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を回収し、クロロホルム：メタノール=4：1 の展開溶媒で PTLC を行った。確認できた分画をそれぞれスパチュラで掻取り、クロロホルム：メタノール=4：1 の溶媒で抽出したのちロータリーエバポレーターで濃縮し、5 °C、明所で保存した。濃縮したそれぞれの分画を、NMR を用い解析した。PY シャクナゲ培地抽出物の NMR 解析では、配糖体ロドデンドリンのピークが検出

された一方、TLC 分析ではロドデンドリンのアグリコンであるロドデノールのスポットは検出されなかった。このことより PY シャクナゲ培地にはシャクナゲ葉由来のロドデンドリンのアグリコンは生成していないということが確認された。野生および飼育下ライチョウの新鮮盲腸糞 0.1~0.2 g を PY シャクナゲ培地 10 ml に接種して 41°C で嫌気培養した。12 時間ごとに 0.1 ml を新しい PY 培地に加え、同様に 41°C で 12 時間培養した。この操作を 5~7 回繰り返して、ライチョウ盲腸糞中の細菌を集積培養した。植え継ぎと同時に培養後の培地から 2.0 ml を抜き取り、25 mm メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm, Pall corporation) で濾過し、盲腸糞培養サンプルとした。盲腸糞培養サンプルは酢酸エチル:2-プロパノール:水=65:24:11 の展開溶媒で TLC を行った。

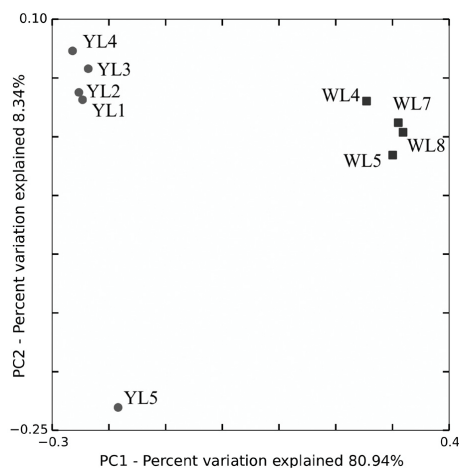
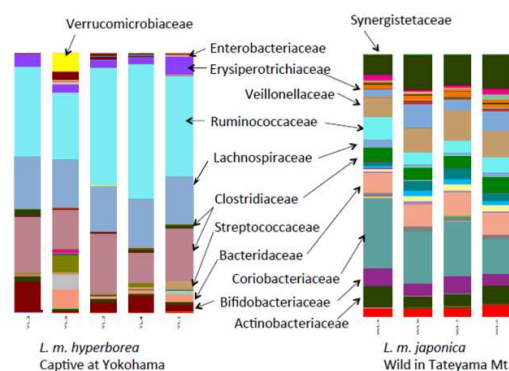
野生個体の盲腸糞培養サンプルのうち、植え継ぎ回数が 4~7 回のもをそれぞれ DHL 寒天培地 (和光純薬)、5% 馬血加 BL 寒天培地 (ニッスイ) に植菌し 41°C、嫌気状態で一晚培養した。生育したコロニーを新しい培地に植菌し、菌の分離を行った。分離した細菌は、16S rRNA シーケンスで同定した。分離された *Escherichia coli* 18 株、*Lactobacillus plantarum* 25 株、*Streptococcus gallolyticus* 1 株のうち、*E. coli* 1 株、*L. plantarum* 4 株を用いて以下のロドデノール分解検定を行った。

GAM 寒天培地 (ニッスイ) に植菌した *E. coli* 1 株 (T38)、*L. plantarum* 4 株 (T5、T17、T19、T21) をそれぞれ、ミュラーヒントン培地 (MERCK) でマックファーランド No.0.5 に調製し、PY ロドデノール培地に 1.0 ml 接種し 37°C で静置、培養した。菌接種前 (0 時間後)、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後の培養培地をそれぞれ酢酸エチル:ヘキササン=1:1 の展開溶媒で TLC に供した。

4. 研究成果

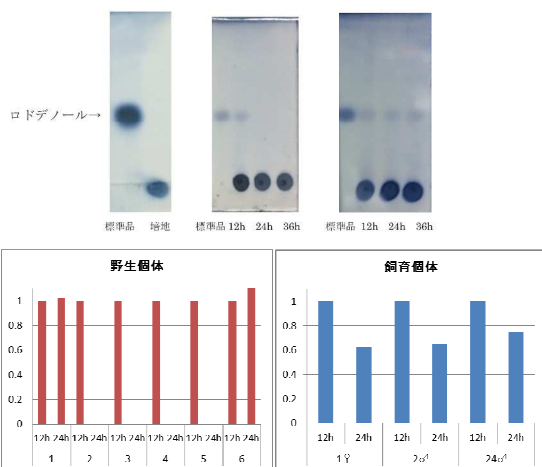
野生ニホンライチョウの腸内菌叢の特徴を明らかにした。飼育下のスバルライチョウには基本的に失われてしまった細菌が優勢に検出された (下図)。門レベルでは、Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Synergistetes が野生ニホンライチョウで優勢であったのに対し、飼育下のライチョウでは、Firmicutes だけで全菌叢の 80% を占めていた。科レベルでは、Coriobacteriaceae, Synergistaceae, Bacteroidaceae, Actinomycetaceae, Veillonellaceae Clostridiales が野生ライチョウでは優勢であったのに対し、飼育下ライチョウでは Ruminococcus, Blautia, Faecalibacterium および Akkermansia が優勢であった。このように、野生下ライチョウではライチョウ特異的と思われる菌

群が検出されたにもかかわらず、飼育下ライチョウではニワトリ由来やシチメンチョウ由来、ブタおよびヒト由来の細菌が多く検出された。また、野生ニホンライチョウ由来の細菌種のうち複数 (6 種/存在比上位 20 種) が野生ヨーロッパオオライチョウ (*Tetrao urogallus*) の糞からも検出されているが、飼育スバルライチョウからは検出されなかった。野生個体と飼育個体ではその生育環境に違いがあり、野生個体は孵化後、母鳥の糞を食べる姿が目撃されており、それにより垂直感染菌を獲得していると思われるが、飼育個体は人工孵化のため、母鳥から垂直感染菌が獲得できない上、孵化後 10~20 日間にコクシジウム症や腸炎予防のため抗生物質オキシテトラサイクリンを給与されるため、ライチョウ特有の細菌を失っているものと思われる。



ライチョウの盲腸糞培養サンプルの TLC における分析では、野生個体群と飼育個体群の両群で培養開始 12 時間後に、培地に含まれていた配糖体ロドデンドリンの消失が認められ、培養 12 時間後からアグリコンであるロドデノールのスポットが出現した。野生個体では 6 サンプル中 4 サンプルで培養 24 時間後までにロドデノールのスポットの消失が確認されたのに対し、飼育個体では全てのサンプルで最大培養時間である 60 時間後までにロドデノールのスポット消失は確認できなかった。下図に示すようにデンストグラム測定から相対

濃度を算出したところ飼育個体サンプルでもわずかに濃度低下が認められたが、野生個体サンプルほど大幅な濃度低下は認められなかった。



野生個体の集積培養菌群から分離した菌のうち *E. coli* ではロドデノール相対濃度減少が認められなかったのに対し、*L. plantarum* は、培養 6 時間～24 時間でロドデノール濃度が 30%程度低下した。このことは乳酸菌 *L. plantarum* がロドデノール分解能を持つことを示唆しているが、野生個体の盲腸培養菌群の段階では、ロドデノールの分解が見られるサンプルで培地中のロドデノールをその出現から 12 時間後にはほぼ完全に分解しているの、野生個体の盲腸内ではロドデノールの分解を単一の菌種が行っているのではなく、細菌群が合同で行っているという可能性が考えられた。

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 2 件)

① Ushida K., Segawa T, Tsuchida S, Murata K. 2016. Cecal bacterial communities of wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *J Vet Med Sci* 78:251-257.

(査読有)

② 牛田一成・土田さやか 2016. 野生動物の腸内細菌研究の意義と展望. *ルーメン研究会報* 27:23-29.

(査読無し)

[学会発表] (計 7 件)

①牛田一成 ニホンライチョウ保護に資する腸内細菌の研究 ライチョウ域外保全研究会 2016年3月10日

②牛田一成 人工孵化ライチョウへの野生ライチョウ由来細菌の投与試験 ライチョウ

ウ域外保全研究会 2015年10月24日

③土田さやか 野生由来腸内細菌接種の試み 死亡個体の死因究明にむけて細菌学的観点から ライチョウ域外保全研究会 2015年10月24日

④牛田一成 次世代シーケンサーによる立山雷鳥の腸内細菌の網羅解析 ライチョウ域外保全研究会 2015年3月2日

⑤土田さやか ライチョウから単離された *Streptococcus gallolyticus* の正常と野生ライチョウの生存への貢献 ライチョウ域外保全研究会 2015年3月2日

⑥牛田一成 野生ニホンライチョウの腸内細菌の特徴と飼育下スバルバルライチョウの腸内菌叢再構築の試み 第16回ライチョウ会議静岡大会(招待講演)2015年10月25日

⑦牛田一成・土田さやか 厳しい生存環境に耐える野生動物の腸内細菌-プロバイオティクスとしての応用可能性 宮崎大学産業動物防疫センターシンポジウム(招待講演)2015.3.6.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://seika.kpu.ac.jp/~k_ushida/ushida_intro.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田一成 (USHIDA, Kazunari)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183017

(2) 研究分担者

村田浩一 (MURATA, Koichi)

日本大学・生物資源学部・教授

研究者番号：00339285