HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ルーメン内繊維分解コンソーシャムにおける細菌間相互作用に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	福間, 直希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11820号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58654
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Fukuma_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）　　氏名　福 間 直 希

学 位 論 文 題 名

ルーメン内繊維分解コンソーシャムにおける細菌間相互作用に関する研究

研究背景および目的

反芻動物が摂取した植物繊維は第一胃（ルーメン内）共生細菌により分解および発酵を受け、宿主の栄養源に転換される。ルーメンで産生される発酵産物は宿主維持エネルギーの 70%をまかなう主要な栄養源となる。よって、ルーメン細菌による植物繊維分解、発酵メカニズムを解明することは反芻家畜の栄養獲得システムを理解し、生産性の向上を図る上で重要な基礎的知見となる。植物繊維の一次分解者となる繊維分解性細菌はルーメン内繊維分解において特に重要な存在である。一方で、繊維分解菌は非繊維分解菌とコミュニティを築き協調的に繊維分解を行うことが知られており、このような細菌集団を繊維分解コンソーシャムという。

これまでに繊維分解菌 *Fibrobacter succinogenes*、非繊維分解菌 *Selenomonas ruminantium*、新規細菌群 U2 の 3 者が繊維分解コンソーシャムにおける重要構成要員であることを特定した。本研究ではこれら 3 菌種の分離菌株を用いた 2 者および 3 者共培養試験により繊維分解コンソーシャムモデルを構築し、①繊維分解促進の検証、②網羅的遺伝子発現解析による活性化要因の探索、③機能遺伝子の発現定量による活性モニタリング、によりルーメン内繊維分解コンソーシャムにおける細菌間相互作用の解明を試みた。

繊維分解コンソーシャムにおける繊維分解促進の検証

F. succinogenes S85 株、新規細菌群 U2 に属する R-25 株、*S. ruminantium* S137 株の 3 菌株およびイナワラを基質とした培地を用い、各菌株の単独培養試験、いずれかの 2 菌株による 2 菌共培養試験、およびすべての菌株を混合した 3 菌共培養試験を行った。イナワラの乾物消化率は *F. succinogenes* S85 単独培養時よりも R-25 あるいは *S. ruminantium* S137 との 2 菌共培養時で有意に高く、3 菌共培養によりさらに繊維消化は促進した。3 菌共培養においては、*F. succinogenes* S85 と R-25 の主要発酵産物であるコハク酸および乳酸が *S. ruminantium* S137 によりプロピオン酸に転換され、総発酵産物量の増加も認められた。いずれの共培養においても 3 菌は互いに増殖を阻害することなく共存することが確認された。共培養下では *F. succinogenes* S85 がイナワラを分解しながら増殖する一方で、非繊維分解菌はイナワラ分解産物や他菌の代謝産物を利用して増殖するものと考えられた。以上より、*F. succinogenes* S85、R-25 および *S. ruminantium* S137 は協調的に働くことで繊維分解発酵が促進されることを確認し、これら 3 菌の共培養系を繊維分解コンソーシャムモデルとして以下の試験に供した。

網羅的遺伝子発現解析による繊維分解コンソーシャム活性化要因の探索

繊維分解コンソーシャムモデルを対象とした網羅的な遺伝子発現解析を行い、繊維分解活性化の要因を探索した。*F. succinogenes* S85 単独培養区と 3 菌共培養区での *F. succinogenes* S85 の遺伝子発現量を比較し、3 菌共存下で発現変動した遺伝子を特定した。*F. succinogenes* S85 の繊維分解

酵素遺伝子のうち、大部分の遺伝子の発現量変動は 2 倍未満であり、3 菌共培養時において特定の繊維分解酵素遺伝子の発現誘導は認められなかった。3 菌培養により発現量が高まった *F. succinogenes* S85 の遺伝子の中では、シグナル伝達や転写制御因子などの転写調節に関わる遺伝子が検出された。中でも、diguanylate cyclase や regulatory protein LysR といった、細菌において幅広く多様な遺伝子の発現を調節する因子の遺伝子発現が向上した。この結果から、3 菌共培養時における *F. succinogenes* S85 では、転写調節因子の発現向上を介して mRNA およびタンパク質の全体的な合成が活性化されたことが示唆された。一方で、3 菌共培養区で発現量が低下した遺伝子の中では、シャペロンに関連する遺伝子が多く検出された。*F. succinogenes* S85 単独培養区では還元糖やコハク酸の蓄積が見られたことから、*F. succinogenes* S85 の繊維分解産物および発酵代謝産物がストレッサーとなり、シャペロンの発現を誘導している可能性が示された。高レベルでのシャペロンタンパク質の発現は ATP の浪費につながることから、*F. succinogenes* S85 単独培養時には自身の代謝産物がストレッサーとなり代謝活性や繊維分解活性が制限されている可能性が考えられた。

以上より、繊維分解コンソーシャムにおいて、*F. succinogenes* S85 から生じる繊維分解産物および発酵代謝産物は非繊維分解菌により速やかに消費され、このことが *F. succinogenes* S85 のシャペロン発現の低下および転写調節因子の発現向上を導くものと考えられた。その結果、本菌の全体的なタンパク質産生が活性化され、繊維分解の促進につながる可能性を明らかにした。

機能遺伝子の発現定量による繊維分解コンソーシャム構成メンバーの活性モニタリング

3 菌共培養下での網羅的遺伝子発現解析においては、*F. succinogenes* S85 の繊維分解酵素遺伝子に相対発現量の変動は見られず、本菌の全体的なタンパク質産生の増強が示唆された。本研究ではこれを検証するため、培養サンプルより DNA と RNA を同時に抽出し、16S rDNA、16S rRNA および 8 つの繊維分解酵素遺伝子の mRNA を絶対定量し、rDNA コピー数（菌数に相当）あたりの各遺伝子発現量を算出することで、1 細胞あたりの代謝活性および繊維分解活性の査定を試みた。*F. succinogenes* S85 の菌数は単独培養区および非繊維分解菌との共培養区で同様の推移を示したが、rDNA コピーあたりの 16S rRNA および 7 つの繊維分解酵素遺伝子の発現量は単独培養時よりも共培養時で有意に高い値を示した。この結果により、非繊維分解菌との共培養下では *F. succinogenes* S85 の 1 細胞あたりの代謝活性および繊維分解活性が増加することを確認した。

また、繊維分解コンソーシャム活性化の要因と考えられる非繊維分解菌による繊維分解産物の取り込みを検証するため、R-25 および *S. ruminantium* S137 の糖トランスポーター遺伝子の発現解析を行った。その結果、3 菌共培養時に高い発現量を示す 4 種の遺伝子が見られ、それらはキシロオリゴ糖を基質とした培養条件下でグルコースやセロビオースに比べて有意に高い発現量であった。このことより、非繊維分解菌の糖トランスポーター遺伝子は *F. succinogenes* S85 の分解産物により発現誘導され、繊維分解の阻害因子となる繊維分解産物を活発に取り込むことを示唆した。

以上、本研究ではルーメン内繊維分解コンソーシャムにおいて繊維分解菌と非繊維分解菌の分解・代謝産物のクロスフィーディングが、円滑な繊維分解において重要であることを示した。また、繊維分解の促進は特定の繊維分解酵素遺伝子の発現誘導ではなく、繊維分解菌の全体的な活性化に起因することを遺伝子発現の側面から示唆した。