



Title	黒毛和種牛の生産性とリンクする第一胃共生細菌群に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	三浦, 広卓
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 <a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14821号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85533">https://hdl.handle.net/2115/85533</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Miura_Hiroto_summary.pdf



## 学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 三 浦 広 卓

### 学 位 論 文 題 名

黒毛和種牛の生産性とリンクする第一胃共生細菌群に関する研究

反芻動物が摂取した飼料は第一胃（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。反芻動物の維持エネルギーの約 70%はルーメン発酵によって産生される短鎖脂肪酸に由来することから、ルーメン細菌が反芻動物の栄養獲得の根幹を担っているといえる。近年、ルーメン細菌叢の個体差が宿主の飼料効率や乳生産、メタン産生量といった生産性とリンクする可能性が示唆されている。もし、特定のルーメン細菌群の分布量と生産性との関連について普遍的な法則性を見いだすことができれば、そうした細菌群の分布を制御することで、反芻動物の生産性を向上させることができる可能性がある。

本研究では、黒毛和種牛の生産性向上が求められるという背景のもと、本品種の飼料効率（飼料摂取量に対する増体量）にリンクするルーメン細菌群の特定を目的とした。まず黒毛和種牛のルーメン細菌叢に関する基盤情報として、①本品種の飼料分解に重要な役割を担うコアルーメン細菌群の特定を行った。ついで、コアルーメン細菌群とルーメン発酵および飼料効率との関連を探索するために、②より簡便かつ高解像度なルーメン細菌叢解析手法を検討し、この手法を用いて③黒毛和種牛の飼料効率とルーメン細菌叢の関連を探索した。

#### 1. 黒毛和種肥育牛における重要コアルーメン細菌群の分布量モニタリングおよび発酵パラメータとの関連探索

飼料条件の異なる 5 つの牧場で飼養された黒毛和種牛 74 頭から、肥育前期（14-17 ヶ月

齢)、中期 (21-22 ヶ月齢) および後期 (26 ヶ月齢) にルーメン内容物を経口採取し、MiSeq プラットフォームを用いて 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる細菌叢解析を行なった。肥育ステージや飼料条件を問わず、総ルーメン細菌の 1%以上の分布量で検出された 10 細菌群を黒毛和種肥育牛のコアルーメン細菌群として特定した。コアルーメン細菌群は、飼料や肥育ステージに関わらず、ルーメン細菌叢の大部分(全細菌の約 80%) を占めたが、その構成は肥育期間中に変動した。肥育前期から中期にかけて *Prevotella* spp. および o\_Bacteroidales が減少した一方で、o\_Clostridiales、f\_Ruminococcaceae、*Ruminococcus* spp. および f\_Christensenellaceae は増加した。これは肥育ステージの進行に伴う濃厚飼料の増給によって *Prevotella* spp. および o\_Bacteroidales が減少し、そのニッチを他の 4 細菌群が補完したためと推察された。以上より、肥育期間中の黒毛和種牛ルーメン内では、コアルーメン細菌群の分布量は肥育期間を通して変動するものの、補完的に合計分布量が維持されることで健全なルーメン発酵が担保されると考えられた。

ついで、コアルーメン細菌群の分布バランスとルーメン発酵パラメータの関連を検討した。その際、各細菌群のルーメン発酵への関与を具体的に検討するため、特定したコアルーメン細菌群のうち、系統分類位置から機能が類推可能な 5 細菌群 *Prevotella* spp.、*Ruminococcus* C1 group、*Butyrivibrio* group、Christensenellaceae R-7 group および Ruminococcaceae OTU 8 を選抜 (以降、選抜コア細菌群とする) し、解析のターゲットとした。選抜コア細菌群の分布量とルーメン発酵パラメータの関連を検討した結果、*Prevotella* spp. はプロピオン酸産生に、Christensenellaceae R-7 group はメタン生成古細菌群と協調関係を構築してメタン産生に、それぞれ関与すると推察された。したがってこれら 2 細菌群は、ルーメン発酵パターンの変化を通して宿主の飼料効率に影響を及ぼす可能性が明らかになった。

## 2. 簡便かつ高解像度なルーメン細菌叢解析手法の検討

本研究では、ルーメン内容物の代替として反芻残渣を活用し、MinION プラットフォームで細菌叢解析を行うことで、ルーメン細菌叢解析の簡便化および高解像度化を目指した。MiSeq、MinION および PacBio プラットフォームを用いてルーメン内容物と反芻残渣の細菌叢解析を行い、MinION プラットフォームと反芻残渣の組み合わせでルーメン細菌叢構成を種レベルで同定可能であることを確認した。ついで、黒毛和種牛のルーメン内容物を用いて MinION プラットフォームの有効性をさらに検証し、2つのコアルーメン細菌群 (*Prevotella* spp. と Christensenellaceae R-7 group) の分布バランスに明確な個体差があることを明らかにした。さらに、MinION プラットフォームと反芻残渣を組み合わせ、ルーメン細菌叢構成の個体差を種レベルで解析した。その結果、ルーメン内容物を用いた場合と同様に、*Prevotella* group (未培養の *Prevotella* spp. 2 細菌群を含む) と、Clostridiales group (未培養の Christensenellaceae R-7 group など 5 細菌群を含む) の分布バランスの個体差が検出された。以上、反芻残渣と MinION プラットフォームを組み合わせることで、ルーメン細菌叢の個体差を簡便かつ高解像度にモニタリングできることを示した。これにより、本手法を活用することで、ルーメン細菌叢と宿主の生産性の関連を探索するための大規模野外試験が可能となった。

### 3. 黒毛和種牛の飼料効率にリンクするルーメン細菌群の探索

同一の農場で飼養された黒毛和種牛 83 頭から、肥育中期の開始時 (肥育中期 1) と中間時 (肥育中期 2) に反芻残渣を採取し、MinION プラットフォームを用いて細菌叢解析を行った。全 83 個体を肥育中期 1 から中期 2 にかけての飼料効率 (飼料摂取量に対する増体量) に基づいて、高飼料効率 (High Feed Efficiency, HFE) 群 (n = 12)、中間的な飼料効率 (Medium Feed Efficiency, MFE) 群 (n = 59) および低飼料効率 (Low Feed Efficiency, LFE) 群 (n=12) としてグルーピングし、ルーメン細菌叢を比較した。LFE 群において、中期 1 から中期 2 にかけて *Prevotella* spp. の増加と Christensenellaceae R-7 group の減少が観察された。

コアルーメン細菌群以外で中期 1 から中期 2 にかけて分布量の変動した細菌群に着目して解析を行ったところ、乳酸産生細菌群 *Saccharofermentans* spp. および乳酸利用細菌群 NK4A214 group の減少が LFE 群でのみ確認された。通常、ルーメン内で産生された乳酸はこれを利用する細菌によって揮発性脂肪酸へと代謝され、宿主のエネルギー源として利用される。したがって、LFE 群の個体では肥育中期 1 から中期 2 にかけて乳酸産生・利用に関わる細菌群の分布量が連動して減少したことで、宿主へのエネルギー供給が減少し、結果的に飼料効率の低下につながった可能性が考えられた。以上より、肥育中期の黒毛和種牛ルーメン内において、コアルーメン細菌群の増減に加えて、乳酸代謝に関わる細菌群の分布量変動によりルーメン発酵パターンが変化し、これが宿主の飼料効率に影響する可能性を明らかにした。

以上、本研究では黒毛和種牛の飼料効率とリンクする細菌群を特定した。本品種のルーメン内で重要な役割を担うコアルーメン細菌群のうち、*Prevotella* spp. と Christensenellaceae R-7 group の分布動態がルーメン発酵、ひいては宿主の飼料効率に影響することを示唆した。加えて、高解像度かつ簡便なルーメン細菌叢解析手法を応用することで、ルーメン内で乳酸代謝に関係する細菌群の減少が黒毛和種牛の飼料効率低下を導く可能性を明らかにした。