学位論文題名

Contribution of the anaerobic bacterium
Selenomonas ruminantium to rumen fiber digestion

(嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* の)
反芻家畜第一胃内繊維消化に対する貢献)

学位論文内容の要旨

反芻家畜第一胃 (ルーメン) は、多様かつ膨大な数の微生物を宿し、家畜が自ら消化できない植物繊維質の分解を微生物にゆだねている特異な消化器官である。ルーメンで数的に最優勢菌として知られる非繊維分解性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* は代謝生理上多様な細菌種であることが指摘されてきているが、系統学的な位置づけと保有機能の関係は明確に整理されず今日に至っている。とくに植物繊維質を分解できない本菌種が草食動物の消化管に数多く生息していることは、以前より説明のつかない事象のひとつである。このような最優勢菌の役割りを明らかにすることに加え、他の細菌との相互関係を特定することは、ルーメンの飼料消化メカニズムを理解し、その有効制御法の構築につなげる上で極めて有益であろう。

本研究は独自にヒツジルーメンから分離した菌株を用い、*S. ruminantium* の分類と保有機能を明らかにし、本菌種の飼料消化への貢献について、定量的および視覚的に明らかにしようとしたものである。

1. 分子系統と機能のグルーピング

供試材料を得るため、新たにヒツジルーメンから *S. ruminantium* の分離を試みた。形態、グラム染色性、発酵産物、および 16SrDNA 遺伝子配列を利用し、総計 990 菌株の中から新たに 19 株の *S. ruminantium* を分離した。これらの菌株の遺伝子配列情報とデータベース上の既存株のそれを比較し分子系統解析を実施したところ、すべての *S. ruminantium* 菌株は系統樹上で3つのクラスター (Ia, Ib および II) に分類できた。これまで知られていた *S. ruminantium* 菌株はすべてクラスターIaに入ることで、新しいクラスターIbとIIは本研究で分離した菌株だけで構成されることを示した。とりわけクラスターIbとIIに属する菌株は、全て高い植物繊維付着能をもつことから、これらのクラスターは機能的にも新規なものとして提言できることを示した。さらに繊維消化能をうらづけるセルラーゼ酵素活性はとくにIbに属する菌株が高いことを示し、繊維消化への関与を示唆するに十分な証拠をみつけた。

2. 繊維消化への貢献とその様式

*S. ruminantium*の繊維消化への貢献を定量的に評価したところ、いずれの菌株も単独では植物繊維質をごくわずか(0.1-4.0%)しか消化できなかった。しかしルーメンに生息する代表的な繊維分解菌 *Fibrobacter succinogenes* や *Ruminococcus flavefaciens* と *S. ruminantium* を共培養すると、繊維分解菌単独の時(28.1%)よりも有意に繊維消化率が上昇した(最大34.7%)。この上昇は、クラスターIbやIaの *S. ruminantium* 菌株と繊維分解菌が共存した時にとくに顕著であった。本相乗作用は、繊維分解菌の代謝産物であるコハク酸やセロオリゴ糖を *S. ruminantium* が迅速に消費することで、繊維分解菌の活性維持がはかれることに由来すると考えられた。実際、*S. ruminantium* によりコハク酸は極めて迅速にプロピオン酸に転換され、繊維分解菌が生成したセロオリゴ糖は *S. ruminantium* の増殖基質となった。これらの代謝産物利用能もクラスターIbに属する菌株で高いことがわかった。プロピオン酸は糖原生物質であり、ルーメン壁から吸収後、宿主家畜のエネルギー源として有益に利用される。以上のことから、*S. ruminantium* はルーメン内で繊維分解性細菌による繊維消化を間接的にサポートしながら、家畜のエネルギー代謝にも多大な貢献していることが判明した。

3. 形態と分布からみた生態学的地位

生態学的情報から繊維消化への関与を明示するため、繊維分解菌と *S. ruminantium* の共培養系およびルーメンに浸漬培養した植物繊維片上での細菌数の定量と形態観察を行なった。まず培養に依存しない *S. ruminantium* のクラスター別定量系(Real-time PCR)を開発し、これを利用して生態を調べた。定量系は10-100細胞を定量下限とする感度の高いもので、2時間程度で測定が完了する迅速なものであり、また測定内・測定間誤差が10%内の精度の高いものであった。クラスターIbは繊維分解における最重要細菌 *F. succinogenes* とルーメン内繊維片上で同調的な動態を示すことを明らかにした。これは上で指摘した二菌種間の協調関係の存在を支持するものであった。

一方、走査電顕観察により、これら両菌はきわめて近い位置に分布しており、お互いの代謝産物の交換に有効な位置関係にあることを明らかにした。とくに繊維分解において *F. succinogenes* との相乗効果の高かった *S. ruminantium* クラスターIbおよびIaに属する菌株は、密接な *F. succinogenes* との関係が、菌体どうしの密着にまで発展していた。運動性のない *F. succinogenes* が運動性の高い *S. ruminantium* と直接密着することで集団としての移動が可能となり、植物組織内および組織間の菌群移動に有利と推察される。つまり *S. ruminantium* のルーメンでの役割に新しい概念を導入した。

最後に、ヒツジで特定した新規クラスターIbとIIは、他の主要反芻家畜であるウシのルーメンにも、また野性反芻獣のエゾシカのルーメンにもヒツジのルーメンと同等レベルで存在し、飼料消化に同様の役割を担っていると推察した。

以上のように、*S. ruminantium* がルーメン内繊維消化に果たしている貢献を、定量的かつ視覚的に示した。本研究ではルーメン内最優勢菌種 *S. ruminantium* の新たな分類群を提唱し、分類群ごとに機能的な違いはあるものの、総じて既知の繊維分解菌と生態的協調関係を築くことで、間接的に繊維消化に関与していることを初めて明らかにした。繊維を消化できない細菌がなぜ大量に存在するのかという基礎学問上の問いに、明快に答えを引きだした一方、反芻家畜機能の根幹である繊維消化メカニズムの一端を解明したことで、消化制御法の構築に貢献できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 泰 男
副 査 教 授 近 藤 誠 司
副 査 助 教 授 上 田 宏 一 郎

学 位 論 文 題 名

Contribution of the anaerobic bacterium *Selenomonas ruminantium* to rumen fiber digestion

(嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* の
反芻家畜第一胃内繊維消化に対する貢献)

本論文は6章から構成され、表14、図25、引用文献113編を含む104頁の英文論文であり、別に3編の参考論文が添えられている。

本研究は、反芻家畜第一胃(ルーメン)で最優勢菌として知られる非繊維分解性細菌 *Selenomonas ruminantium* の系統学的な位置づけと保有機能を指摘し、これまで知られていなかった繊維消化への貢献について定量的にあきらかにしたものである。成果は次のように要約される。

第1章では、*S. ruminantium* に関する研究動向の整理と問題点の指摘を行った。とくに従来の研究であきらかにされた本菌の生理学的特性やそれらから推定される飼料消化へのかかわりなどを指摘した。本菌はひとつの系統分類群に一括してまとめられていること、それにもかかわらず保有酵素やその活性は多様なこと、植物片に付着して存在するものもあることから、繊維消化へのかかわりがうかがわれることなどを指摘した。これらを網羅してルーメンでの本菌の役割を結論づけるには、まず菌株の収集が必須で、それを材料に生理および生態学的解析を積み重ねることの重要性を強調した。

第2章では *S. ruminantium* の分離、同定と定性結果について考察した。新たに分離した19株は、分子系統上で3つのクラスター (Ia, Ib および II) に分類できた。これまで知られていた *S. ruminantium* 菌株はすべてクラスターIaに入ることで、クラスターIbとIIは本研究で分離した菌株だけで構成され、機能的にも高い植物繊維付着能をもつことから、新規のクラスターとして提言できることを示した。繊維消化能をうらづけるセルラーゼ酵素活性はとくにIbに属する菌株が高いことを示し、繊維消化への関与を示唆するに十分な証拠をみつけた。

第3章では、繊維消化への貢献を定量的に評価した。いずれの菌株も単独では植物繊維をごく

わずかしか消化できなかつた。しかし既知繊維分解菌 *Fibrobacter succinogenes* や *Ruminococcus flavefaciens* と *S. ruminantium* を共培養すると、繊維分解菌単独の時よりも有意に繊維消化率が上昇した。とくにクラスターIb と Ia の菌株で顕著であった。この相乗作用は、繊維分解菌の代謝産物であるコハク酸やセロオリゴ糖を *S. ruminantium* が迅速に消費することで、繊維分解菌の活性維持がはかられることに由来すると考察した。実際、*S. ruminantium* によりコハク酸はプロピオン酸に転換され、セロオリゴ糖は *S. ruminantium* の増殖基質となった。プロピオン酸は糖原生物質であり、宿主家畜のエネルギー源として非常に有益なことから、*S. ruminantium* は繊維消化を間接的にサポートしながら、家畜のエネルギー代謝にも貢献していることが判明した。

生態学的情報から繊維消化への関与を明示したのが第4章である。まず迅速で精度の高い *S. ruminantium* のクラスター別定量系 (Real-time PCR) を確立し、これを利用して生態を調べた。クラスターIb は繊維分解における最重要細菌 *F. succinogenes* とルーメン内繊維片上で同調的な動態を示すことを明らかにした。これは前章で指摘した二菌種間の協調関係の存在を支持するものであった。一方、走査電顕観察により、これら両菌はきわめて近い位置に分布しており、お互いの代謝産物の交換に有効な位置関係にあることがわかった。とくに繊維分解において *F. succinogenes* との相乗効果の高かったクラスターは、密接な両菌の関係が菌体どうしの密着にまで発展していた。運動性のない繊維分解菌が運動性の高い *S. ruminantium* と密着することで、植物組織内および組織間の移動に有利になるものと推察した。

総合考察 (第5章) では、本研究で得られた重要な知見の相互関係を図示し、*S. ruminantium* がルーメン内繊維消化のどの界面でいかなる貢献をしているか網羅的に論じた。終章 (第6章) では一連の結果を要約し、深まった知見と課題を整理した。

以上のように、本研究ではルーメン内最優勢菌種 *S. ruminantium* の新たな分類群を提唱し、分類群ごとに機能的な違いはあるものの、総じて既知の繊維分解菌と生態的協調関係を築くことで、間接的に繊維消化に関与していることを初めて明らかにした。繊維を消化できない細菌がなぜ大量に存在するのかという基礎学問上の問いに、明快に答えを引きだした点で、高く評価できる。一方、反芻家畜機能の根幹である繊維消化に対し、そのメカニズムの一端を解明したこれらの成果は、消化制御への道を開くもので、応用上も極めて重要である。

よって審査員一同は、サワノン スリヤが博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。