

ルーメン内繊維分解細菌 *Fibrobacter succinogenes* の 系統，生理および生態学的研究

学位論文内容の要旨

持続的な反芻家畜生産を行う上で、粗飼料の高度利用は必須である。しかし植物繊維は反芻家畜第一胃（ルーメン）内における消化速度が遅く、これが粗飼料の栄養価値を低下させる主因となっている。ルーメン内での植物繊維の分解・発酵は、ルーメン内に多様かつ著量に棲息する細菌が担っているが、そのメカニズムにかかわる生理・生態を系統立てて明らかにした研究はない。

繊維分解性細菌 *Fibrobacter succinogenes* は、ルーメン内繊維分解に主導的な役割を担っているとされる細菌種で、生理機能や生態が異なることが示唆される 4 つの系統グループから構成される。ルーメン内繊維分解の促進を図る上で中心となり得る系統グループを特定し、生息数および活性の維持または増強ができれば、ルーメン内における繊維分解を最大化することが期待できる。

本研究は、*F. succinogenes* 系統グループ間の繊維分解機能およびルーメン内生態の違いを明らかにし、本菌種内でルーメン内繊維分解に重要な役割を担う系統グループを特定することを目的としたものである。さらに本菌を取り巻くコンソーシウム構成細菌種を特定し、協調的菌群としてのルーメン内繊維分解への関わりについて明らかにすることも視野に入れている。

1. 分子系統と繊維分解関連機能

植物片への迅速な付着能および結晶性セルロース分解能をもつという生理特徴を活用し、世界的に数株のコレクションしかなかった *F. succinogenes* を 32 株取得することに成功した。菌株が大幅に増えたことにより、16SrRNA 遺伝子配列に基づく菌種内の分子系統的關係が明確に示され、グループ 1 は A から D までの 4 つのサブグループに、グループ 2 は 2 つのサブグループに分かれた。菌体外エンドグルカナーゼ活性をもとに各サブグループの代表株を選抜し、複数の植物繊維への付着率および消化率を比較したが、グループ間での違いはさほど明瞭ではなかった。しかし、グループ 1 のサブグループ D に含まれる菌株が他よりも植物繊維分解能力が優れていることが判明し、遺伝系統と生理機能の關係を部分的に明らかにできた。

2. 植物片上での分布様式

植物片の自家蛍光を抑制した新規の FISH 法を確立し、植物片上での特定細菌の分布および存在様相を視覚的に明らかにすることが初めて可能となった。本法を用いオーチャードグラス乾草茎部および葉鞘部上の *F. succinogenes* 各系統グループを検出したところ、グループ 1 は茎部および葉鞘部上を問わず多くの植物片から検出され、さらに他の細菌の付着量が少ない植物片でも多く検出された。また、乾草の切断面のみならず組織内側の非損傷面にも密集して存在するなど、付着箇所が多様であった。一方、グループ 2 は検出頻度が低く、他の菌が多く付着する植物片に他菌と混在して分布していた。グループ 3 は検出されなかった。細胞の代謝活性を反映する FISH 検出法を用いた本観察結果から、グループ 1 がルーメン内繊維分解において主導的な役割を担うと同時に、茎部のような他のルーメン細菌が好まない組織の分解においても貢献度が高いことを視覚的に明示した。

3. 植物片上での動態

リアルタイム PCR による系統グループ別の定量系を確立し、感度、精度ともに高い動態追跡が初めて可能になった。本法によりルーメン内の液状部と固形部における分布、ならびに分解性の異なる植物繊維片上での付着動態を検討することで、各グループの生態と機能を評価した。ウシおよびヒツジのルーメン内では、液状部と固形部にかかわらず、グループ 1 が最優勢で存在し、次いでグループ 2 および 3 の順であった。グループ 1 は通常の乾草茎部のみならず、あらかじめセルラーゼ処理を施した難分解性繊維上でも経時的に付着量を増加させ、明らかに増殖していた。同繊維上での他のグループの分布量は経時的に不変もしくは減少であった。以上の定量結果からも、グループ 1 がルーメン内繊維分解に大きく貢献しているだけでなく、唯一難分解性繊維の分解をも担う能力があることが明らかとなった。

4. コンソーシウム構成細菌種の特定

F. succinogenes を高密度に付着させた植物片をルーメン液中で浸漬培養することで、人工的なコンソーシウムを形成させ、DGGE 法により *F. succinogenes* と生理的関係の深い細菌の特定を試みた。グループ 1 および 2 とコンソーシウムを形成する可能性の高い細菌として *Treponema bryantii* および *Butyrivibrio fibrisolvens* が特定された。グループ 1 ではこの他に *Pseudobutyrvibrio ruminis*、多数の *Clostridium* 属細菌および新規の *Bacteroides* 属細菌を見出した。一方、グループ 3 のコンソーシウムからは *F. succinogenes* グループ 1 や *Ruminococcus albus* など強力な繊維分解菌が多く取得されたことから、グループ 3 がルーメン内繊維分解に主導的な役割を担う可能性は低いと推察した。

以上のように、植物繊維に対する付着・分解能といった生理情報、植物片上の分布様式および密度といった生態情報から、グループ 1 がルーメン内繊維分解に重要な役割を担うことを明確に

示した。さらにグループ 1 とコンソーシヤムを形成する可能性の高い細菌種を特定し、本菌と他のルーメン内細菌との関わりを解明する糸口を示した。これらの情報の解析と活用を通し *F. succinogenes* の活性維持または促進を保障するルーメン内環境を整えることで、低質粗飼料の高度利用が図られるものと期待できる。

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 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

ルーメン内繊維分解細菌 *Fibrobacter succinogenes* の 系統, 生理および生態学的研究

本論文は6つの章から構成され、表 24、図 22、引用文献 110 編を含む 112 頁の和文論文であり、別に 3 編の参考論文が添えられている。

反芻家畜第一胃（ルーメン）における繊維分解に主導的な役割を担うとされる細菌種 *Fibrobacter succinogenes* の系統分類に着目し、繊維分解に特に貢献度の高い系統グループを特定するために、グループごとに生理・生態を明らかにしようとした研究である。成果は次のように要約される。

第 1 章では、*F. succinogenes* に関する研究動向の整理に加え問題点の指摘を行った。すなわち、*F. succinogenes* は機能的差異が示唆される異なる 4 つの系統グループ（グループ 1～4）から構成される遺伝的に多様な種であるにもかかわらず、各系統グループの生理・生態が未だに整理されていないこと、反芻家畜の繊維消化を高めるためには機能的に優れた菌群にとって最適なルーメン環境を作り出す必要があることなどを指摘し、研究の目的を明確化した。

第 2 章では *F. succinogenes* 野生株の分離、系統分類および繊維分解能の評価を行った。これまで世界的に 14 株のみであった *F. succinogenes* を新たに 32 株分離し、全菌株の系統的位置を明らかにするとともに、各グループ内に新たにサブグループと呼べる集団が形成されることを指摘した。繊維への付着および繊維分解能は、系統グループ間よりもむしろサブグループ間で差が大きく、特にグループ 1 の特定サブグループに含まれる菌株が、有意に高い消化率を示したことから、系統と生理機能の関係を部分的に明らかにできた。

第 3 章では、植物片の自家蛍光抑制下での FISH 検出法の確立に初めて成功し、*F. succinogenes* 各系統グループの植物片上での分布を視覚的に明らかにした。さらに FISH 検出結果とリアルタイム PCR による各細菌種の定量値を比較・考察した。*F. succinogenes* に次ぐ繊維分解能をもつとされる *Ruminococcus flavefaciens* は、*F. succinogenes* よりも易分解性繊維（葉鞘）上での存在比率が有意に高く、明瞭な分解痕跡と共存する様子を繊維

片上に確認したが、難分解性繊維（茎）上ではほとんど蛍光検出されなかった。これに対し *F. succinogenes* グループ 1 は植物片上に広く分布し、難分解繊維片上でも多く蛍光検出されたことから、本系統グループ 1 が、ルーメン内繊維分解、とりわけ難分解性繊維の分解に主導的な役割を担うことが判明した。

第 4 章では各系統グループを高精度・高感度に定量できる方法（リアルタイム PCR）を確立し、分布および増殖の違いを明らかにした。ウシおよびヒツジのルーメンの固形部および液状部のいずれにおいてもグループ 1 が最優勢であることが明らかとなった。また通常の茎部ではグループ 1 および 2 が増殖するが、難分解性の茎部（あらかじめセルラーゼ処理したもの）ではグループ 1 のみが増殖することが判明した。これらの知見は、ルーメン内における難分解性繊維の分解にグループ 1 が極めて重要であることを定量的に明示したものである。

第 5 章では各系統グループと協調的集団（コンソーシヤム）を形成する可能性の高い細菌種を、DGGE 法を駆使して特定した。グループ 1 および 2 とコンソーシヤムを形成する可能性の高い細菌として *Treponema bryantii*、*Butyrivibrio fibrisolvens*、*Clostridium polysaccharolyticum* などの既知細菌、さらには *Bacteroides* 属に属する未知細菌が特定された。これらと *F. succinogenes* との生理的關係、特にグループ 1 との關係を解明することで、繊維分解の強化に最も適したルーメン内環境を推定できるものと期待される。

総合考察（第 6 章）では、本研究で得られた重要な生理・生態情報を系統グループ別にまとめ、グループ 1 がルーメン内繊維分解に重要な系統グループであることを明確化した。さらにルーメン内繊維分解能向上をはかるには、コンソーシヤム形成細菌群との關係強化によるグループ 1 の活性維持に向けた研究が必要なことを提言した。またグループ 1 が何故ルーメン内の優勢グループとして存在し得るかという生態学的優位性に言及するなど、*F. succinogenes* の特性について網羅的に述べた。結論では一連の成果を要約し、深まった知見と課題を整理した。

以上のように、本研究は *F. succinogenes* 種内系統グループの繊維消化へのかかわりを生理および生態学的視点から明らかにしており、高く評価できる。その解析に際し、植物片上で標的菌の特異的検出を可能とする FISH 法の確立に初めて成功したことは特筆すべきである。さらに、主要な系統グループとコンソーシヤムを形成する細菌を特定した成果は、ルーメン内の繊維分解をめぐる生態系の一端を明らかにしただけでなく、反芻家畜繊維消化の改善といった応用を見据えた場合、極めて重要な知見と言える。

よって、審査員一同は、真貝 拓三が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。