

## 学位論文題名

# 微生物検出・定量の新規手法開発及び 動物消化管微生物群集解析への応用に関する研究

## 学位論文内容の要旨

本研究では、分子生物学的技術に基づく、微生物群集中の特定グループ定量に適した手法を開発した。さらに、開発した手法を用いて動物消化管微生物群集の解析を行い、様々な環境変化に対応して迅速に群集構造が変化していることを明らかにした。

### 1. 微生物検出・定量新規手法の開発

本研究では現在の分子生物学的技術をもとにした、微生物群集中の特定グループの定量を迅速に行える手法を考案し、その有用性を検証した。本手法は、リボヌクレアーゼ H (RNase H) と DNA プローブを用いた反応系により、すべての微生物に由来する小サブユニットリボソーム RNA (SSU rRNA) の中から特定微生物に由来するものだけを選択的に切断し、ほかの微生物由来の rRNA と区別して検出することを特徴とする。この着想に基づいて、微生物群集から標的微生物を特異的に検出するための条件検討を行った。大腸菌 rRNA を用いて、DNA プローブと RNase H による配列特異的 rRNA 切断が起こることを確認後、切断反応条件を最適化した。反応液中にホルムアミドを添加することにより、既に開発されている DNA プローブを使用した配列特異的 rRNA 切断が可能であることを示し、本手法によるさまざまな分類レベルのグループ検出を可能にした。また、開発手法により廃水处理汚泥・牛糞において形成されている微生物群集中の特定グループを定量し、実環境サンプルへの利用が可能であることを示した。以上より、本手法は、環境サンプルや医療サンプル中に含まれる特定微生物を、検出、定量するための手法として有用であることを明らかにした。

### 2. 動物消化管微生物群集解析への応用

#### (1) 配列特異的 SSU rRNA 切断法によるルーメン微生物群集の定量的解析

開発手法の動物消化管微生物群集解析への応用として、ウシルーメン微生物群集のグループ別定量を行った。まず、現在知られているルーメン微生物の分子的解析結果を系統分類の観点から詳細に検討し、ルーメン内の代表的な細菌群を検出できる DNA プローブの開発を行った。これらのプローブを使用して、ウシルーメン内溶液から抽出した RNA 溶液を試料とし、本手法に供した結果、ルーメン内に存在する微生物(細菌及び古細菌)の70%以上をグループ別に定量可能であった。本試験は、ウシルーメン微生物群集の主要メンバーを定量した最初の実例であり、種々の条件設定下での飼養試験における、ルーメン微生物群集の動態解析に利用可能であることを示した。

## (2) 暑熱ストレスがウシルーメン細菌叢に及ぼす影響の評価

暑熱ストレスがウシルーメン細菌叢に及ぼす影響を調査するため、乳牛育成牛4頭を用いた飼養試験を行った。本手法を用いた定量的解析により、暑熱ストレスによってルーメン細菌叢の構成が、グループレベルで変化していることを示した。つまり、気温の上昇に伴って *E. rectale*-*C. coccoides* グループ及び *Streptococcus* が増加した一方で、*Fibrobacter* が減少した。さらに、*Firmicutes* に属する未培養細菌群である Unknown *Clostridium* cluster が、ルーメン細菌叢の主要メンバーとして存在していることを示すとともに、その一部については暑熱ストレスの影響で量的に変動する傾向にあることを明らかにした。このようなルーメン細菌叢の変動は、環境温度の上昇に応じて粗飼料の採食量が減少し、相対的に配合飼料の採食比率が高くなるといった採食内容の変化と関係していることを明らかにした。

## (3) 配列特異的 SSU rRNA 切断法による子牛糞便細菌叢推移の解析

乳牛雌子牛4頭について、出生後1週齢から12週齢までの糞便を定期的に採取し、本手法により細菌叢構造を解析した。その結果、この時期の子牛糞便細菌叢が2つの主要な門である *Bacteroidetes*、*Firmicutes* に属している菌で占められていることを明らかにした。そのほかの門に属するグループでは、出生時～離乳前の時期に *Faecalibacterium*、*Atopobium* が主要なメンバーであった。他に *Enterobacteriaceae*、*Lactobacillus-Enterococcus* 及び *Bifidobacterium* も検出された。離乳後はこれらに代わって、*Firmicutes* に属する未培養ルーメン細菌群や *Fibrobacter* が検出されるようになった。こうした消化管細菌叢の変動は、特に離乳前後で顕著であり、子牛は成熟した反芻動物になるまでの機能的、形態的な消化管の発達と対応して、細菌叢が変化していることが示唆された。また本試験の結果、哺育期の子牛において、ビフィズス菌や乳酸桿菌が離乳前後の時期に消失していることを明らかにした。

## (4) プロバイオティック乳酸桿菌含有ヨーグルトの摂取がヒト糞便細菌叢に及ぼす影響の評価

本手法は、ヒト糞便細菌叢を構成する主要グループの定量にも利用可能であることを示した。すなわち、成人男女ボランティア15名によるヨーグルト摂取試験を実施し、市販のプロバイオティック乳酸菌含有ヨーグルトを摂取することによる糞便細菌叢への影響について調査した。20日間のヨーグルト摂取により、プロバイオティック乳酸桿菌含有ヨーグルトを摂取したボランティアでは、消化管におけるプロバイオティック株の生存が認められた。また、多くのボランティアにおいて、ヨーグルトの摂取期間中に *Bacteroides-Prevotella* が減少し、*E. rectale* - *C. coccoides* グループが増加する傾向が観察された。また、ヨーグルト摂取前に *Bifidobacterium* の割合が低かった3名のボランティアにおいて、ヨーグルト摂取期間中にその比率が増加していたことが観察された。これらの傾向は、プロバイオティック乳酸菌含有の有無とは無関係に観察されたことから、特定種類のヨーグルトを摂取することによる糞便細菌叢への影響は軽微であり、ヨーグルト摂取自体の影響のほうが大きいと推察した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 泰 男  
副 査 客員教授 鎌 形 洋 一  
副 査 教 授 玖 村 朗 人  
副 査 助 教 小 池 聡

学 位 論 文 題 名

## 微生物検出・定量の新規手法開発及び

### 動物消化管微生物群集解析への応用に関する研究

消化管微生物は宿主動物の健康や栄養に多大な貢献を果たしているが、その解析は対象が複雑であり困難を極めている。本研究はこれら微生物群集の解析に有効な手法を開発し、その応用を図ったものであり、内容は以下のように要約される。

微生物群集中の特定グループの定量を迅速に行える手法を考案し、その有用性を検証した。すなわちと DNA プローブと微生物に由来するリボソーム RNA (rRNA) を反応させ、その中から特定微生物に由来するものだけをリボヌクレアーゼ H (RNase H) で選択的に切断し、ほかのものとの区別を図った。まず大腸菌 rRNA を DNA プローブと反応させ、RNase H による配列特異的切断が起こることを確認後、ホルムアミドの適量添加により切断反応条件を最適化することで、様々な細菌グループの検出が可能であることを実証した。さらに本手法により廃水処理汚泥や牛糞の特定細菌グループを定量し、実環境サンプルへの利用が可能であることを示した。

本手法を用いウシルーメン微生物群集のグループ別定量を行うべく、ルーメン内の代表的な細菌群を検出できる DNA プローブの開発を行った。ウシルーメン内容液から抽出した RNA を試料とし、本手法に供したところ、ルーメン内に存在する微生物（細菌及び古細菌）の 70%以上をグループ別に定量可能であった。この成果はウシルーメン微生物群集の主要メンバーを定量した最初の実例である。

次に暑熱ストレスがウシルーメン細菌叢に及ぼす影響を調査するため、乳用育成牛 4 頭を用いた飼養試験に本手法を応用した。気温の上昇に伴ってルーメンの *E. rectale*-*C. coccoides* グループ及び *Streptococcus* が増加した一方で、*Fibrobacter* が減少した。さらに、*Firmicutes* に属する未培養細菌群である Unknown *Clostridium* cluster が、主要メンバーとして存在していることを示した。また、その一部については暑熱ストレスの影響で量的に変動する傾向にあることを明らかにした。このような変動は、環境温度の上昇に

応じて粗飼料の採食量が減少し、相対的に配合飼料の採食比率が高くなるといった採食内容の変化と関係していることを明らかにした。

さらに乳牛雌子牛4頭について、出生後1週から12週齢までの糞便を定期的に採取し、本手法により細菌叢を解析した。その結果、子牛糞便細菌叢が2つの主要な門である *Bacteroidetes*、*Firmicutes* に属している菌で占められていることを明らかにした。そのほかの門に属するグループでは、出生時～離乳前の時期に *Faecalibacterium*、*Atopobium* が主要なメンバーであった。離乳後はこれらに代わって、*Firmicutes* に属する未培養ルーメン細菌群や *Fibrobacter* が検出されるようになった。こうした細菌叢の変動は、特に離乳前後で顕著であり、子牛は成熟した反芻動物になるまでの機能的、形態的な消化管の発達と対応して、細菌叢が変化していることが示唆された。また哺育期の子牛において、ビフィズス菌や乳酸桿菌が離乳前後の時期に消失していることを明らかにした。

最後に、プロバイオティック乳酸桿菌含有ヨーグルトの摂取がヒト糞便細菌叢に及ぼす影響の評価に本手法を応用した。成人男女ボランティア15名によるヨーグルト摂取試験を実施し、市販のヨーグルトを摂取することによる糞便細菌叢への影響について調査した。20日間のヨーグルト摂取により、消化管におけるプロバイオティック株の生存が認められた。また、多くのボランティアにおいて、ヨーグルトの摂取期間中に *Bacteroides-Prevotella* が減少し、*E. rectale* - *C. coccoides* グループが増加する傾向がみられた。また、ヨーグルト摂取前に *Bifidobacterium* の割合が低かった3名のボランティアにおいて、ヨーグルト摂取期間中にその比率が増加していたことが観察された。これらの傾向はプロバイオティック乳酸菌含有の有無とは無関係に観察されたことから、特定のヨーグルトを摂取することによる糞便細菌叢への影響は軽微であり、ヨーグルト摂取自体の影響のほうが大きいと推察した。

以上の成果は、分子生物学的情報を駆使し、動物消化管の微生物群集を占める主要なグループの定量に適した手法を新たに開発できたことを明示しているばかりでなく、開発した手法を用い、諸環境に対応して変化する消化管細菌の群集構造をとらえたものである。手法は応用性が高く、動物の消化管生理に関わる多くの情報を提供できると期待される。

よって、審査員一同は、上野豊が博士（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。