

Studies on ruminal *Prevotella* and *Treponema* : exploration of their diversity and ecology

(ルーメン内*Prevotella*属細菌および*Treponema*属細菌の多様性と生態に関する研究)

学位論文内容の要旨

反芻家畜第一胃（ルーメン）に共生する細菌は宿主家畜の栄養生理上、多大な貢献を果たすことは周知であるが、大多数の細菌は分離、定性されていない。しかしながら近年発達した分子的手法により、ルーメンで占有度が高いわりに機能情報のない *Prevotella* 属と *Treponema* 属の二つの菌群に注目が集まっている。とりわけ飼養条件に関わらず多くの動物種に共生する *Prevotella* は培養分離されていないものが大半を占め、その生態や生理機能などの解明が期待されている。本研究は、ルーメンの *Prevotella* 属および *Treponema* 属細菌の多様性を分子的解析で明らかにし、系統分類群を提唱するとともに、系統分類群ごとにルーメン内生態を給与飼料と関連付けて検証したものである。

1. ルーメンにおける *Prevotella* 属と *Treponema* 属細菌の分布

Prevotella 属細菌特異的プライマーによる real-time PCR 定量系を確立し、ルーメンでの本属細菌の存在量（全細菌に占める比率）を明らかにしたところ、最大で約 40%と高い値であった。他のルーメン内代表菌種 14 種の合計が 3-7%であったことから、*Prevotella* 属はルーメン内で極めて優勢であることを示した。しかしながら、既知の *Prevotella* 4 菌種 (*P. ruminicola*, *P. bryantii*, *P. brevis* および *P. albensis*) の存在量は約 1-6%程度と *Prevotella* 属内に占める割合は低かった。一方、*Treponema* 属菌は他の代表菌種の定量値と同等か、少し多いものの、既知 *Treponema* 種 (*T. bryantii*) は極めて少なかった。これらのことから、*Prevotella* 属および *Treponema* 属とも、ルーメンでは未知のものが大半を占めることを定量的に明示した。

2. *Prevotella* 属および *Treponema* 属細菌の多様性と飼料条件による変動

16S rRNA 遺伝子配列の相違に基づく系統分類およびフィンガープリンティング解析を用いて、両属の多様性を調べた。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動分析、遺伝子ライブラリーの系統分類群 (OTU) や多様度指数からみとめられる *Prevotella* 属および *Treponema* 属の多様

性は、濃厚飼料よりも乾草給与時にいずれも高いことを見出した。この結果はルーメン内の乾草消化には、*Prevotella* 属および *Treponema* 属においても、多様な構成員が関わっていることを初めて示唆したものである。乾草または濃厚飼料給与時にそれぞれ特徴的に見られる系統分類群が両菌属で認められ、飼料条件により両属構成員は有意に異なることを示した。これらの結果から、*Prevotella* 属および *Treponema* 属細菌のうち、乾草もしくは濃厚飼料の分解には異なる系統分類群が関与することを示唆した。

多様性解析を通じて *Prevotella* 属の中でも 4 つの系統分類群 (OTU1、OTU2、OTU3 および PUNG1) の検出頻度が高かった。これら系統分類群について特異的 PCR プライマーを設計しルーメン内での分布量を測定したところ、OTU2 および PUNG1 の分布量が他の系統分類群に比べて高いことが判明した。すなわち、これら 2 つの系統分類群が *Prevotella* 属内でも特にルーメン内において重要なグループと言える。

3. 新規 *Prevotella* 属細菌の分離培養と機能解析

生態学的解析により *Prevotella* 属細菌の大多数は未培養であることが明らかとなった事を受け、未培養 *Prevotella* 属細菌の分離培養化を試みた。形態、グラム染色性、発酵産物および 16S rRNA 遺伝子配列を利用し、総計 191 菌株の中から新たに 41 株の *Prevotella* 属菌株を分離、同定した。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、*Prevotella* 菌株は系統樹上で 11 の OTU に分かれ、新規株はこのうち 9 つの OTU に属していた。すなわち、系統分類的に多様な *Prevotella* 菌株の取得に成功した。これら新規分離株についてゲノムフィンガープリンティング解析を行った結果、大きく 2 つの遺伝子型に分かれ、既知 *Prevotella* 属菌株とは異なる遺伝子型をもつ新規菌株が多数見られた。次に繊維分解酵素活性を測定したところ、活性プロファイルは遺伝子型とおおむね一致し、既知菌株と異なる遺伝子型を示した菌株はキシラナーゼ活性が既知菌株よりも高かった。以上の結果は、新規 *Prevotella* 属菌株は既知菌株とゲノムレベルで差異があり、キシラン分解により貢献することを示唆するものである。特に、生態解析で分布量が高いことが判明した OTU2 に属する菌株はすべて新規遺伝子型を示し、高キシラナーゼ活性を保有していたことから、*Prevotella* 属内でも OTU2 が繊維分解において重要であることを明らかにした。

以上のように、*Prevotella* 属および *Treponema* 属細菌のルーメン内での重要性を生態学的視点から定量的に明らかにした。本研究では両属細菌の多様性を明確に示した上で、乾草または濃厚飼料の分解に関与する系統分類群が属内で異なることを初めて明らかにした。生態的解析に加え、新規 *Prevotella* 属菌株の分離培養と機能解析を行い、特定の *Prevotella* 系統分類群がルーメン内繊維分解に大きく貢献する可能性を突き止めた。ルーメン内で優勢な細菌群の多様性や生態を解明できたことは基礎学問的な価値のみならず、ルーメン発酵メカニズム解明に大きく貢献する知見といえる。

学位論文審査の要旨

副 査 教 授 小 林 泰 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 小 池 聡

学 位 論 文 題 名

Studies on ruminal *Prevotella* and *Treponema* : exploration of their diversity and ecology

(ルーメン内*Prevotella*属細菌および*Treponema*属細菌の多様性と生態に関する研究)

本論文は4章から構成され、表13、図13、引用文献115編を含む107頁の英文論文であり、別に12編の参考論文が添えられている。

本研究は、ルーメンの*Prevotella*属および*Treponema*属細菌の多様性を分子的解析で明らかにし、系統分類群を提唱するとともに、系統分類群ごとにルーメン内生態を給与飼料と関連付けて検証したものである。成果は次のように要約される。

第1章では、これまでのルーメン細菌研究を振り返って既知情報をまとめた上で、幅広くルーメンに存在する*Prevotella*属および*Treponema*属細菌に関する研究動向の整理と問題点の指摘を行った。とくに近年の分子的解析で明らかとなった未培養ルーメン細菌の存在とルーメン機能におけるそれらの重要性を示し、未培養*Prevotella*属および*Treponema*属細菌の生理生態を解明する必要性を強調した。

第2章では*Prevotella*属および*Treponema*属細菌について、異なる飼料条件下での分布量と構成メンバーの変化をモニタリングし、両属の多様性とルーメン内の生態を明らかにした。両属細菌のルーメン内分布量はいずれの飼料条件下においても既知ルーメン細菌と同程度かそれ以上で、特に*Prevotella*属細菌は最大で全細菌の約40%を占めることを明らかにした。一方、両属既知菌種の分布量は低く、ルーメン内*Prevotella*属および*Treponema*属細菌は未知のものが大半を占めることを定量的に明示した。また、本章では16S rRNA 遺伝子配列の相違に基づく系統分類およびフィンガープリンティング解析を用いて両属の多様

性を調べた。その結果、濃厚飼料よりも乾草給与時に *Prevotella* 属および *Treponema* 属いずれも多様性が増加することを見出した。これはルーメン内の乾草消化には、*Prevotella* 属および *Treponema* 属においても、多様な構成員が関わっていることを初めて示唆したものである。さらに、乾草または濃厚飼料給与時にそれぞれ特徴的に見られる系統分類群が両菌属で認められ、飼料条件により両属構成員は有意に異なることを示した。*Prevotella* 属では飼料条件に関わらず、特定の系統分類群（OTU 2 および PUNG1）が他の分類群にくらべて高密度で存在し、これらがルーメン内で特に重要なグループであることを明らかにした。

第 3 章では前章で指摘した未培養 *Prevotella* 属細菌の機能解明に向け、それらの分離培養を試みた。新たに分離した 41 株の *Prevotella* 属菌株は分子系統的に 11 の分類群に分かれ、新規株はこのうち 9 つの分類群に属していた。新規分離株についてゲノムフィンガープリンティング解析を行った結果、大きく 2 つの遺伝子型に分かれ、既知 *Prevotella* 属菌株とは異なる遺伝子型をもつ新規菌株が多数見られた。次に繊維分解酵素活性を測定したところ、活性プロファイルは遺伝子型とおおむね一致し、既知菌株と異なる遺伝子型を示した菌株はキシラナーゼ活性が既知菌株よりも高かった。以上の結果は、新規 *Prevotella* 属菌株は既知菌株とゲノムレベルで差異があり、キシラン分解により貢献することを示唆するものである。特に、前章の生態解析で分布量が高いことが判明した OTU2 に属する菌株はすべて新規遺伝子型を示し、高キシラナーゼ活性を保有していたことから、*Prevotella* 属内でも OTU2 が繊維分解において重要であることを明らかにした。

終章（4 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。その上で、分子的手法と古典的培養法を組み合わせるルーメン細菌の多様性、生態および機能を解明することの意義を強調した。

以上のように、*Prevotella* 属および *Treponema* 属細菌のルーメン内での重要性を生態学的視点から定量的に明らかにした。本研究では両属細菌の多様性を明確に示した上で、乾草または濃厚飼料の分解に関与する系統分類群が属内で異なることを初めて明らかにした。生態的解析に加え、新規 *Prevotella* 属菌株の分離培養と機能解析を行い、特定の *Prevotella* 系統分類群がルーメン内繊維分解に大きく貢献する可能性を突き止めた。ルーメン内で優勢な細菌群の多様性や生態を解明できたことは基礎学問的な価値のみならず、ルーメン発酵メカニズム解明に大きく貢献する知見といえる。

よって審査員一同は、ベケレ アスチャロー ゼレケが博士（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。