

# ルーメン内 *Prevotella* 属新規菌株の分離培養化と生理機能解析

家畜生産生物学講座 家畜栄養学

松井大典

## 【背景と目的】

反芻動物のルーメン内には、多種多様な細菌が複雑かつ安定的な微生物生態系を形成しており、宿主動物が摂取した植物繊維の分解・発酵を担っている。ルーメン内の最優占菌種の一つとして *Prevotella* 属細菌が知られており、これらは現時点で *Prevotella ruminicola*、*Prevotella albensis*、*Prevotella brevis* および *Prevotella bryantii* の4菌種に分類されている。近年、16S rDNA 塩基配列に基づくルーメン細菌の群集構造解析によって *Prevotella* 属細菌が従来知られているよりもきわめて遺伝的な多様性に富むことが明らかとなった。さらにルーメン内に存在する *Prevotella* 属細菌のうち、大部分が未培養 *Prevotella* グループによって占められていることが real-time PCR を用いた定量解析により報告されている。このように *Prevotella* 属未培養細菌はルーメン内に高密度で存在すると考えられるが、それらの生理情報は不足しており、ルーメン内繊維分解における働きは分かっていない。本研究では、めん羊ルーメン内から *Prevotella* 属菌株を分離し、生理機能を一部明らかにした。

## 【方法】

めん羊ルーメン内容物を、天然植物素材および抗グラム陽性菌剤を含む液体培地に接種して 37°C で嫌気培養し、*Prevotella* 属細菌を集積した。集積効果を *Prevotella* 属特異的プライマーを用いた real-time PCR により確認した。集積効果が確認された培養物を用い、嫌気性ロールチューブ法にて菌株の分離を行なった。分離株を *Prevotella* 属特異的 PCR および RFLP に供し、*Prevotella* 属菌株をスクリーニングし、16S rDNA 塩基配列全長を解読して同定を行なった。得られた *Prevotella* 属分離株および既知 *Prevotella* 4 菌種の基準株について、発酵産物の測定および繊維分解酵素の活性測定を行なった。

## 【結果および考察】

天然植物素材および抗グラム陽性菌剤による *Prevotella* 属細菌の集積効果を検討したところ、培養 24 時間後の *Prevotella* 属細菌密度がイノキュラムとして用いたルーメン内容物と比較して有意に上昇した。従って、本集積培養法によって *Prevotella* 属新規菌株の分離が促進されるものと考えられた。この集積培養物を用いてロールチューブを作成し、493 菌株を釣菌した。そのうち 27 菌株をスクリーニングし、同定した。その結果、20 菌株は *P. ruminicola* 種、4 菌株は *P. brevis* 種に属する菌株であった。一方、3 菌株は最近縁配列が未培養クローンであり、遺伝系統的に既知 *Prevotella* 属菌種とは明確に区別された。このように、本研究では系統的に新規性の高い *Prevotella* 属菌株の分離に成功した。生理機能解析の結果、分離株および既知 *Prevotella* 4 菌種の基準株の低級脂肪酸産生パターンはいずれも同様であった。一方、繊維分解酵素活性は菌株間で差異が見られ、*Prevotella* 属細菌は遺伝型のみならず表現型においても多様である可能性が示された。特に、新規性の高い 3 菌株はエンドグルカナーゼ、キシラナーゼおよびアラビノフラノシダーゼ活性において既知菌株より顕著に高い値を示し、ルーメン内繊維分解への関与が示唆された。