

修士論文

ダチョウ糞からの新奇バクテリアの
分離、特徴付けおよびゲノム解析

令和2年度

三重大学大学院 生物資源学研究科

資源循環学専攻 農業生物学講座

小川 裕美子

目次

緒言.....	1
材料および方法.....	9
結果.....	32
考察.....	49
要約.....	51
引用文献.....	52
謝辞.....	56

緒言

ダチョウとは

ダチョウ (*Struthio camelus*) はダチョウ目 (Struthioniformes) ダチョウ科 (Struthionidae) に分類される、世界最大の鳥である。ダチョウには、マサイダチョウ (Massai ostrich; *Struthio camelus maassaicus*)、キタアフリカダチョウ (Mali ostrich あるいは Barbary ostrich; *Struthio camelus camelus*)、ソマリダチョウ (Somali ostrich; *Struthio camelus molybdophanes*)、ミナミアフリカダチョウ (South African ostrich あるいは Zulu ostrich; *Struthio camelus australis*) の4つの亜種がいる (樋口 2013)。オスの羽毛は黒で、尾と短い翼は白色、メスは全体に灰褐色をしている。頭高はオスで 210~275 cm、メスで 175~190 cm、また、体重はオスで 130~150 kg、メスで 90~110 kg である。ダチョウは群れで生活し、日中に採食する。生息環境は砂漠のほずれで半乾燥性の地域やサバンナの林などの開けた空間で、主に広い草原に生息する。分布域はアフリカのサハラ砂漠以南である。生息域の南部と北部では数が少なく絶滅が危惧されているが、一方、東アフリカには多数生息している。ダチョウは多肉植物、葉、芽、種子、果実を食べる。まれに昆虫、小型哺乳類や爬虫類を捕食することもある。家禽として飼育されているのは人為的に作出されたアフリカンブラック種 (African Black; *S. camelus domesticus*) が主である。卵重 1.2~1.5 kg の世界最大の卵を産む (唐澤 2001)。

ダチョウの産業的意味

ダチョウが我が国に産業動物として導入されたのは、昭和 63 年 (1988 年) のことである (日本農業研究所 2008)。日本で一般的に飼養されているダチョウの品種はアフリカンブラック種であり、その長所は、①他の品種より多く産卵する (40 個/年)、②おとなしくて扱いやすい、③羽根の品質が高い、④皮革の品質が高い、⑤早熟性である (2 歳以下で産卵を開始することもある)、などである。古い情報ではあるが、平成 16 年度 (2004 年度) における都道府県別の飼養羽数は、茨城県が 1,177 羽と最も多く、次いで北海道 1,052 羽、鹿児島県 1,026 羽、青森県 904 羽である。ウシ、ブタ、ニワトリなどの主要な家畜とは異なり、ダチョウは特有家畜として扱われている。

日本におけるダチョウ飼養の主な収入は食肉の販売によるものであるが、国内における肉の生産は安定的な生産体制が整備されているとはいえない。日本はダチョウの皮を世界で最も多く消費する国で、年間の消費量は40～50万枚であるが、そのほとんどを輸入に頼っている。消費量の多さに反して、国産の皮は品質が悪いため、十分利用されていないのが現状である。皮下や内臓の脂肪は小規模ながら商品化されており、通販や地域特産品として販売されている。食用卵としての卵の需要はあるが、生産者と消費者が個別に相対で取引する程度である。近年では、抗体の生産にダチョウの卵が利用され、その抗体をつけた抗菌マスクが商品化され、話題となった。国内で飼養されているダチョウによってもたらされる産出額は不明であるが、ウシ、ブタ、ニワトリに比べるとはるかに小さいのが現状である。

ダチョウの消化管とそこに生息する微生物と発酵

ダチョウは鳥類では珍しく、体長に比べて非常に長い消化管を有し、その全長はおよそ18mにも及ぶ(表1)。ダチョウはニワトリのように素嚢を持たないが、食道のはじめの部分は小袋に似ていて、伸縮しそこへ摂取した飼料を貯めておくことができる(日本農業研究所2008)。胃はニワトリと同様に腺胃と筋胃からなり、筋胃には成体では1.5kgの小石が入っていて飼料の物理的な消化を助けている。この小石は一定時間筋胃に止まったのちに排泄される。ダチョウは一對の長い盲腸をもつ。ダチョウの結腸は長く、近位部では多数の膨起が観察され、後腸発酵動物の消化管の特徴を備えている(図1)。ダチョウの盲腸や結腸にはウマなどの後腸発酵動物と同様に、微生物が多数存在している。当研究室ではダチョウ大腸内の消化管微生物の多様性を分子生態学的手法により解析し、明らかにした(Matsui et al. 2010a & b; Matsui et al. 2011)。ダチョウ盲腸内容物から抽出したDNAから16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)クローンライブラリーを構築し、310の配列を解析した結果、110のphylotypeに分類され、ダチョウ大腸内の微生物生態系における種構成は非常に多様であることが明らかとなった(Matsui et al. 2010b)。また、細菌の門レベルでの割合を求めたところ、反芻動物のルーメン、後腸発酵者の大腸のそれと類似していた。(表2)。盲腸および結腸では、大腸内微生物による繊維の分解と発酵が行われている。ダチョウ

大腸内における繊維の消化の程度はウシルーメンやウマ大腸と同程度であり、ダチョウの繊維分解能力は非常に高いことがうかがえる (Matsui et al. 2009)。また、ダチョウ盲腸内容物の短鎖脂肪酸濃度は 100mM 以上にもなり、ウシルーメンやウマ大腸における濃度に匹敵し、嫌気性の微生物による発酵が盛んであることは明白である (表 3)。ダチョウ大腸内微生物発酵により産生される主要な短鎖脂肪酸は酢酸、プロピオン酸、酪酸であり (表 3)、その比率についてもウシルーメンやウマ大腸の値と近い (Matsui et al. 2010b)。したがって、ダチョウ大腸内における微生物による代謝は、図 2 に示すような、他の動物の大腸内における代謝と同様であると考えられる。発酵によって生じた短鎖脂肪酸は大腸上皮から吸収され、ダチョウのエネルギー源として利用される。ダチョウの揮発性短鎖脂肪酸生産は、成人のダチョウの代謝エネルギーの 56.5~66%をまかなうと推定されている (Fievez et al. 2001)。したがって、大腸内における発酵はダチョウの栄養を考える上で重要になる。

我々の研究室では、これまでにダチョウ盲腸内容物中の細菌叢の群集構造の解析を 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S rDNA)クローンライブラリー法により行ってきた (Matsui et al. 2010b)。その結果、ダチョウ盲腸内には多数の未知細菌が存在することが明らかとなった。ダチョウの消化管から未知菌種を分離し、その特徴づけを行うことでダチョウ大腸内細菌の宿主に対する役割を知ることができると考えられる。よって、本研究ではダチョウ大腸内からの未知菌種を分離・培養を試み、機能や生態および全塩基配列を明らかにすることを目的として行った。

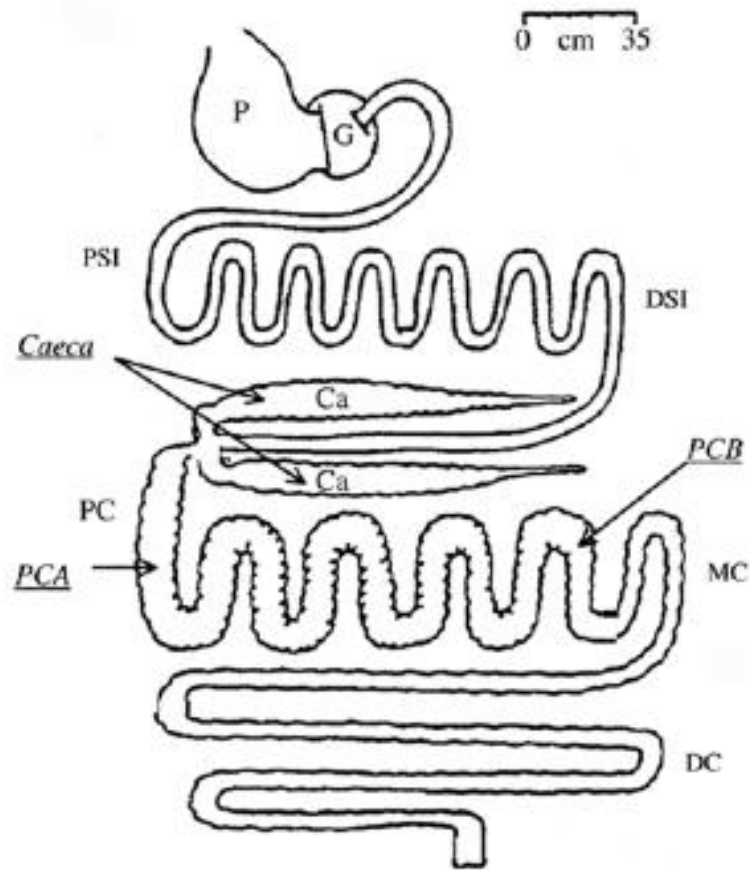


図1. ダチョウの消化管の写真 (a)および概略図 (b) (Fievez et al. 2001)。P：腺胃,G：筋胃, PSI：小腸近位部,DSI：小腸遠位部,Ca：盲腸,PC：結腸近位部,MC：結腸中位部,DC：結腸遠位部

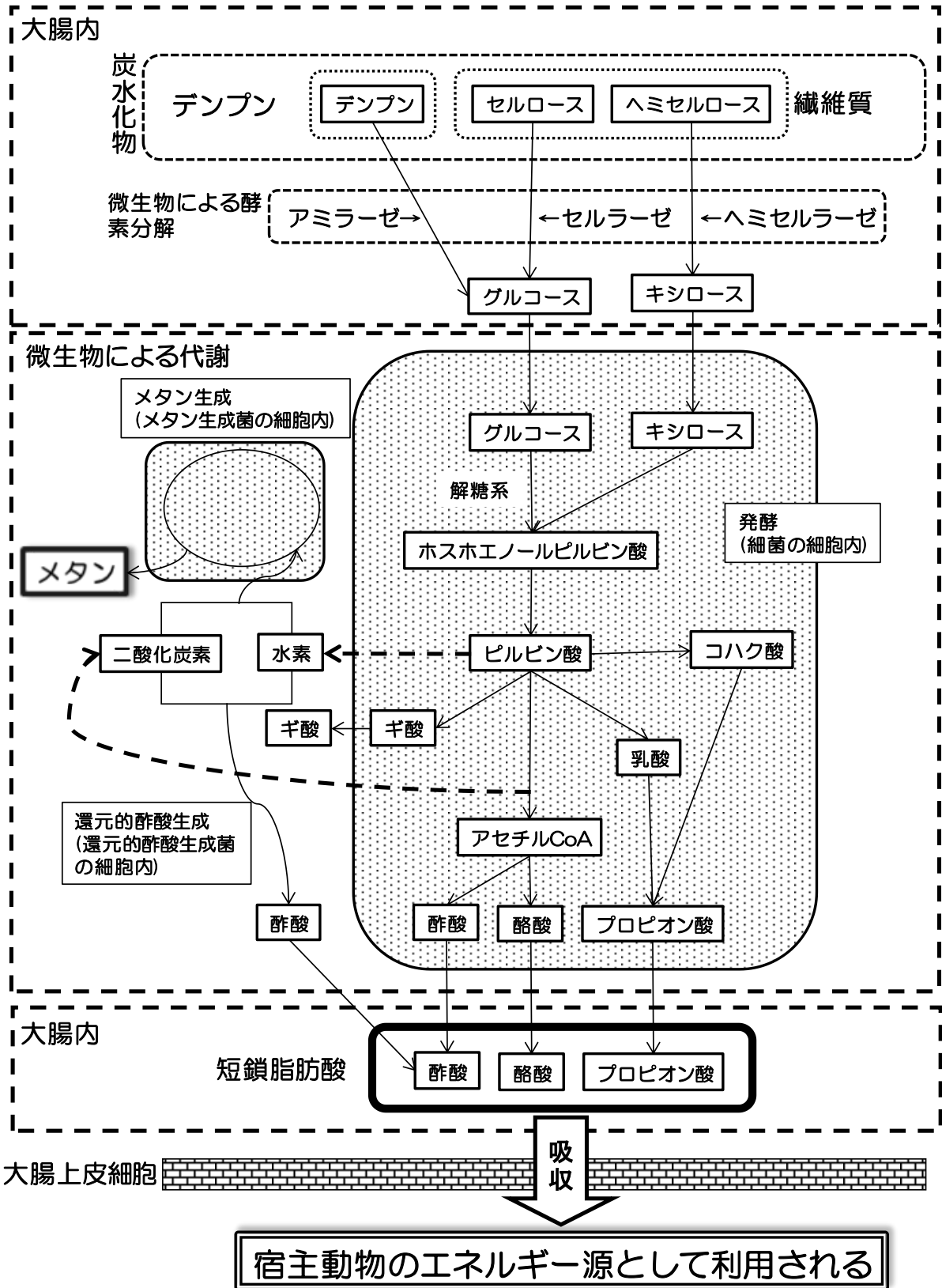


図2. 大腸内における微生物による炭水化物の代謝経路。

表 1. ダチョウ消化管各部位の長さ (Matsui et al. 2009)。

消化管の部位	長さ (cm)
小腸	676
盲腸 (2本の合計)	152
結腸	926
合計	1,754

表 2. 哺乳類と鳥類の消化管における *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門およびその他の門の割合 (Matsui et al. 2010b より)。

Source	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>	Others	Reference
Turkey ceca (average of wild and domestic)	54.0	30.0	16.0	Scupham et al. 2008
Equine large intestine (Hokkaido native horse, Japan)	47.4	36.8	15.8	Yamano et al. 2008
Pig feces	47.2	45.1	7.7	Leser et al. 2002
Jinnan cattle rumen	39.6	22.3	38.1	An et al. 2005
Ostrich ceca	39.4	50.9	9.7	Matsui et al. 2010b
Cow rumen	32.0	62.0	6.0	Tajima et al. 1999
Human feces	31.0	64.1	4.9	Suau et al. 1999
Yak rumen	30.9	54.1	14.9	An et al. 2005
Cow rumen	27.0	67.5	5.4	Whitford et al, 1998
Equine large intestine (United Kingdom)	20.7	71.5	7.7	Daly et al. 2001
Reindeer rumen	22.9	74.6	2.5	Sundset et al. 2007
Mouse feces	18.7	75.9	5.5	Kibe et al. 2004
Dugong feces	15.0	83.1	1.9	Tsukinowa et al. 2008
Chicken ceca	4.7	93.9	1.8	Lan et al. 2002
Chicken ceca	4.4	92.0	3.5	Bjerrum et al. 2006
Chicken ceca	1.9	71.7	26.4	Zhu et al. 2002
Wild gorilla feces	1.1	71.0	27.9	Frey et al. 2006.

表3. ダチョウ盲腸内における発酵様相 (Matsui et al. 2010b より)。

パラメーター	値
pH	6.7
総短鎖脂肪酸濃度 (mM)	108
酢酸：プロピオン酸：酪酸比率	72：21：7

材料および方法

1. 供試動物

三重県立久居農林高等学校で飼育されている雄ダチョウ 3 羽を供試動物として用いた。給与飼料については表 4 に示した。

2. 糞の採取

ダチョウが糞をした際の新鮮糞を取り、ポリエチレン袋に入れ、39°Cで保温しながら研究室へ持ち帰った。

3. 分離と培養

新鮮糞からの細菌分離を Shinkai et al. (2009)の方法で行った。培地の作製、培養および接種は嫌気的に行った。採取した糞 1g を嫌気性検体希釈液に入れ、よく混合した。この希釈液 0.2mL をセルロース培地Iに接種し、39°Cで~96 時間培養を行った。培養後、分解の見られたろ紙片を検体希釈液(表 6-1)に移し、30 分間氷冷後ボルテックスにかけた。それを検体希釈液により 10^{-6} 倍まで段階希釈し、希釈液 0.2mL をロールチューブ(RC)用培地に接種後、39°Cで 72~96 時間培養した。出現したコロニーを任意に選択し、先端を曲げた滅菌パスツールピペットでセルロース培地IIに移し、39°Cで培養した。細菌の生育を確認した後、DNA 抽出まで冷蔵庫で保存した。

4. 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S rDNA)配列による分離株の同定

DNA を抽出の為に、RGC 培地(表 7)で 39°Cで 24~36 時間培養した。培養液 10mL を遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)し、この上清を取り除いた後、Nucleo Spin MicrobialDNA (Macherey-Nagel)を用いて添付のマニュアルに従い DNA 抽出を行った。

抽出した DNA をテンプレートとして用い、プライマーとして 27F および 1544R(表 11

)を加えた反応液(表 12)をサーマルサイクラー(PCRThermal Cycler Dice, TaKaRa)により反応させ、16S rDNA 断片を増幅した。サーモサイクルは図 3 に示した。PCR 反応後、1.5%アガロースゲル(Agarose H 14, TaKaRa)中で電気泳動し、エチジウムブロマイドにより DNA を染色後、Printgraph(ATTO)で DNA 断片の増幅の有無を調べた。16S rDNA の増幅が確認されたサンプルについては PCR 産物の精製を行った(表 13)。これをシーケンシング反応のテンプレートとし、シーケンシング用プライマーと混合した(表 14)。プライマーは B35rev(表 11)を用いた。それらを三重大学遺伝子実験施設のシーケンシングサービスによって塩基配列の解読を行った。また、B35rev による解読により得られた配列のうち、新奇性の高いものについてはさらに 926F と C01R の 2 種類のプライマー(表 11)を用いて 16S rDNA のほぼ全長の解読をした。

16SrRNA 遺伝子配列分析は、DDBJ の BLAST プログラムを使用して実行した。また、細菌の同定は RDPII の Classifier を用いて行った。CLUSTAL W プログラムを使用して、Lachnospiraceae 科内の最も近い近縁種で HNost1016 株の 16SrRNA 遺伝子配列のマルチプルアラインメントを実行した。系統樹は近隣結合法によって構築した。

5. 細菌増殖における至適 pH

HNost1016 株の増殖に対する pH の影響を、Kobayashi et al.,(2017)の方法をもとに測定した。培養液 0.2mL を pH 2、4、6.8、8 および 11 に HCl または NaOH 溶液で調製した 10mLRGC 培地に接種し 39°C で 48 時間培養した。デジタル比色計 (miniphoto 518R, TAITEC) を使用して 660nm での吸光度を測定することにより、培養開始から 3、6、9、12、24、36 および 48 時間での菌の増殖を評価した。

6. 細菌増殖における至適温度

HNost1016 株の増殖に対する温度の影響を測定した。培養液 0.2mL を 10mLRGC 培地を 10、20、30、39 および 50°C それぞれの温度で 48 時間培養した。デジタル比色計 (miniphoto 518R,

TAITEC) を使用して 660nm での吸光度を測定することにより、培養開始から 3、6、9、12、24、36 および 48 時間での菌の増殖を評価した。

7. 細菌の糖利用性

HNost1016 株の糖利用性を 16 種類の糖(グルコース、セロビオース、スクロース、グルシトール、キシロース、マンノース、リボース、アラビノース、ラクトース、ラムノース、トレハロース、ガラクトツロン酸、ペクチン、ポリガラクトツロン酸、マンニトール、マルトース)を用いて測定した。各糖 20mg をあらかじめ糖を除いて調製した RGC 培地に添加した後、培養液 0.2mL を 10mLRGC 培地に接種し、39°C で 72 時間培養した。デジタル比色計 (miniphoto 518R, TAITEC) を使用して 660nm での吸光度を測定することにより、培養開始から 3、6、9、12、24、48 および 72 時間での菌の増殖を評価した。

8. グラム染色

HNost10 菌株の細胞をグラム染色液フェイバーG (NISSUI、日本) を用いて、製造元のマニュアルに従って実施し、染色された細胞を顕微鏡で観察した。

9. 菌体脂肪酸組成分析

RGC 培地を用いて 39°C で 48~36 時間、培養液が十分に白く濁るまで培養した培養液中の HNost1016 株の菌体脂肪酸組成を分析した。培養液 50mL を遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)し、この上清を取り除いた。沈殿物の湿重量が 0.5 g 以上になるまで同じチューブに培養液 50mL を添加し遠心分離を繰り返して集菌した。集菌したチューブを生理食塩水(0.9%)で 2 回洗浄し遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)したあと -30°C で凍結保存した。洗浄したサンプルはテクノスルガ・ラボの分析サービスによって、Sherlock Microbial Identification System (Version 6.0),(MIDI, USA) の菌体脂肪酸組成分析操作マニュアル (Version 6) に従い脂肪酸抽出した。

得られたデータは Calculation Method TSBA6 およびライブラリ TSBA6 を用いてプロファイリングした。

10. ゲノム DNA 中の G+C 含量

RGC 培地を用いて 39°C で 48~36 時間、培養液が十分に白く濁るまで培養した培養液中の HNost1016 株のゲノム DNA 中のグアニン (G) とシトシン (C) の含量を測定した。培養液 50mL を遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)し、この上清を取り除いた。沈殿物の湿重量が 1g 以上になるまで同じチューブに培養液 50mL を添加し遠心分離を繰り返して集菌した。集菌したチューブを 5mM EDTA バッファー(表 16)で 2 回洗浄し遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)した後、-30°C で凍結保存した。洗浄したサンプルはテクノスルガ・ラボの分析サービスによって NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL, DE)によって DNA 抽出おける精製を行った。精製 DNA を Katayama et al.(1984)に従って酵素処理をし、標準試料 DNA-GC Kit (Yamasa Corporation, Japan)を用いて ACQUITY UPLC System (Waters, USA)でヌクレオチドの測定を 3 回行った。標準ヌクレオチド試料と検体由来 DNA 試料より得られた各ヌクレオチドのピーク面積を基に G+C 含量 (mol%) を算出した。

11. 全ゲノム解析

HNost1016 株から DNA 抽出を行い、全ゲノム配列を解読した。まず、Lysozyme(SIGMA)を滅菌 MilliQ 水で 100mg/ml に調製した。培養液 50mL を遠心分離(8,000×g、4°C、10 分)し、この上清を取り除いた後、キット NucleoBond Buffer Set III、AXG20 (Macherey Nagel)を用いて添付のマニュアルに従い DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして用い、0.7%アガロースゲル(Agarose H 14, TaKaRa)中で電気泳動し、エチジウムブロマイドにより DNA を染色後、Printgraph(ATTO)で DNA の有無を調べた。DNA が確認されたサンプルを生物技研のシーケンシングサービスによって全塩基配列の解読を行った。シーケンシングは DNBSEQ によるショートリード解析と GridION によるロングリード解析のハイブリッドで行

った。データ解析は次のように行った。ショートリードについてはまず Cutadpt (Ver 2.7)を用いてアダプター配列の除去を行った。次に Seqkit (Ver 0.011.0)を用いて、アダプター配列を除去した配列から約 350 万リードペア(1.05Gbp)の配列をサンプリングした。その後、Sickle (Ver. 1.33)を用いてクオリティ値が 20 未満の塩基を取り除き、127 塩基未満になったリードとそのペアリードを破棄した。ロングリードについては、Poreshop (Ver 0.2.3)を用いてアダプター配列を除去した。次に Filtrlong (Ver 0.2.0)を用いて 1,000 塩基以下のリードを削除した。ショートリードとロングリードのアッセンブルは Unicycler (Ver 0.4.7)のデフォルト条件で、高品質のショートリードとロングリードをアッセンブルした。

遺伝子の予測は DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST),(Tanizawa et al. 2018)により行った。

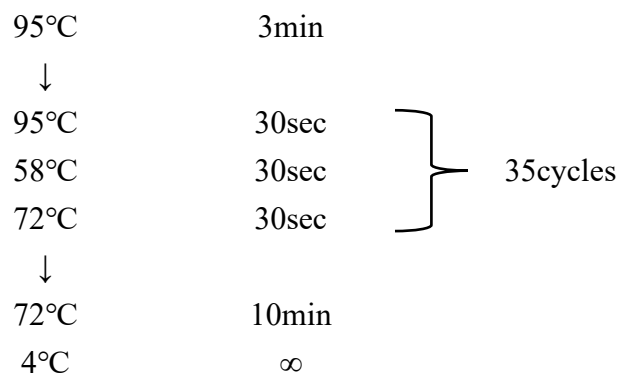


図 3. ExTaq による 16Sr RNA 遺伝子増幅のためのサーモサイクル

表 4.給与飼料の原材料

原材料名	組成(%)
トウモロコシ	27.23
ふすま	11.98
大豆粕	2.18
ルーサンピペット	43.57
ルーサンミール	10.89
リン酸カルシウム	1.09
炭酸カルシウム	2.18
食塩	0.44
ビタミン(鶏用)	0.44

表 5-1. RF15 セルロース培地Iの組成(105.5ml 当たり)

成分	量
Hungate solution A (表 5-2)	17 mL
Hungate solution B	17 mL
ルーメン液	15 mL
0.1%レサズリン (表 5-3)	300 μ L
0.05%ヘミン (表 5-4)	280 μ L
イーストエクストラクト	50 mg
トリプチケース	100 mg
蒸留水	73 mL
Antifoam emulsion (表 5-5)	50 μ L
ろ紙(Whatman No. 1)(1.2cm \times 1.2cm)	1 枚/試験管
炭酸水素ナトリウム	500 mg
L-システインー塩酸塩(一水和物)	50 mg

Hungate solution B は K_2HPO_4 3g を蒸留水で 1 L へメスアップ

表 5-2. Hungate solution A

成 分	量
NaCl	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	600 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	400 mg
蒸留水で 1 L へメスアップ	

表 5-3. 0.1%レサズリン

成 分	量
レサズリン	100 mg
蒸留水で 100 mL へメスアップ	

表 5-4. 0.05%ヘミン

成 分	量
ヘミン	50 mg
1mL の 1N NaOH に溶解する	
蒸留水で 100 mL へメスアップ	

表 5-5. Antifoam emulsion

成 分	量
Antifoam emulsion	10 g
蒸留水	40 mL
よく混合する	

表 6-1. 検体希釈液の組成(1000mL 当たり)

成 分	量
塩類溶液 1	75 mL
塩類溶液 2 (表 6-2)	75 mL
0.1%レサズリン (表 5-3)	1 mL
蒸留水	887 mL
Antifoam emulsion (表 5-5)	50 μ L
寒天(Difco Bacto Agar)	500 mg
8%炭酸ナトリウム	37 mL
L-システインー塩酸塩(一水和物)	500 mg

塩類溶液 1 は K_2HPO_4 6g 蒸留水で 1L へメスアップ

表 6-2. 塩類溶液 2

成 分	量 (g)
NaCl	12
KH ₂ PO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	12
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.6
蒸留水で 1L へメスアップ	

表 7. RC 寒天培地の組成(105.5ml 当たり)

成 分	量
Hungate solution A (表 5-2)	17 mL
Hungate solution B	17 mL
ルーメン液	15 mL
0.1%レサズリン (表 5-3)	300 μ L
0.05%ヘミン (表 5-4)	280 μ L
イーストエクストラクト	50 mg
トリプチケース	100 mg
グルコース	100 mg
セロビオース	100 mg
蒸留水	56 mL
Antifoam emulsion (表 5-5)	50 μ L
寒天(Difco Bacto Agar)	1800 mg
炭酸水素ナトリウム	500 mg
L-システイン一塩酸塩(一水和物)	50 mg

Hungate solution B は K_2HPO_4 3g を蒸留水で 1 L へメスアップ

表 8. RF15 セルロース培地IIの組成(105.5ml 当たり)

成分	量
Hungate solution A (表 5-2)	17 mL
Hungate solution B	17 mL
ルーメン液	15 mL
0.1%レサズリン (表 5-3)	300 μ L
0.05%ヘミン (表 5-4)	280 μ L
イーストエクストラクト	50 mg
トリプチケース	100 mg
蒸留水	56 mL
Antifoam emulsion (表 5-5)	50 μ L
ろ紙(Whatman No. 1)(3 mm \times 3 mm)	1 枚/試験管
炭酸水素ナトリウム	500 mg
L-システインー塩酸塩(一水和物)	50 mg

Hungate solution B は K_2HPO_4 3g を蒸留水で 1 L へメスアップ

表 9.RGC 培地の組成(105.5ml 当たり)

成 分	量
Hungate solution A (表 5-2)	17 mL
Hungate solution B	17 mL
ルーメン液	15 mL
0.1%レサズリン (表 5-3)	300 μ L
0.05%ヘミン (表 5-4)	280 μ L
イーストエクストラクト	50 mg
トリプチケース	100 mg
グルコース	100mg
セロビオース	100mg
蒸留水	56mL
Antifoam emulsion (表 5-5)	50 μ L
炭酸水素ナトリウム	500 mg
L-システインー塩酸塩(一水和物)	50 mg

Hungate solution B は K_2HPO_4 3g を蒸留水で 1 L へメスアップ

表 10. 分離株の 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S rDNA)の増幅と塩基配列解読に用いたプライマーの配列

プライマー	目的	配列(5'→3')	文献
16S 27F	16S rDNA 増幅	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Lane, 1991.
16S 1544R	16S rDNA 増幅	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	Lane, 1991.
B35 rev	塩基配列解読	GGTATGGGATGAGCTTGC	Guettler et al., 1999.
C01 rev	塩基配列解読	GGTTGCGCTCGTTGCGGG	Guettler et al., 1999.
926f	塩基配列解読	AAACTCAAAGGAATTGACGG	Leser et al., 2002.

表 11. Ex Taq (TaKaRa)による PCR 反応液組成

1 反応(20 μ L)当たり	量(μ L)
テンプレート	1.0
10X Ex Taq バッファー	2.0
dNTP Mix	1.6
16S 27F(20pmol/ μ L)	0.5
16S 1544R(20pmol/ μ L)	0.5
滅菌 MilliQ 水	14.3
酵素(Takara ExTaq、0.375unit)	0.1
合計	20.0

表 12. シーケンスのための PCR 反応液精製

	1 反応(7 μ L)当たり	量(μ L)
PCR 反応液		5.0
アルカリフォスファターゼ		1.0
エキソヌクレアーゼ		1.0
合計		7.0

表 13. シーケンス反応の反応液組成

1 反応(18 μ L)当たり	量(μ L)
精製 PCR 反応液	1.0
16S B35 rev(5 pmol/ μ L)	1.0
滅菌 MilliQ 水	16.0
合計	18.0

表 14. 生理食塩水(0.9w/v%)

成分	量(g)
NaCl	0.9
蒸留水で 100mL にメスアップ	

表 15. EDTA バッファー

成分	量(g)
EDTA・2Na	0.18612
蒸留水で 100mL にメスアップ	

結果

1. 分離と培養

Shinkai et al. (2009)の方法により、ダチョウ大腸内細菌の培養および分離を試みた。その結果、RF15 セルロース培地Iでろ紙の分解が確認できた試験管の数は4本であった。RC 寒天培地からコロニーをピックアップし、RF15 セルロース培地IIに接種した数は18本あり、18本の試験管で細菌の増殖が確認できたそのうち2本の試験管でろ紙分解が見られた。

2. 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S rDNA)配列による分離株の同定

本研究で分離できた18菌株について16S rDNA の塩基配列を解読した結果、正常に解読できた菌株は10菌株であった。B35rev によるシーケンス結果からこれらの配列について相同性検索と系統解析を行った(表18)。得られた10菌株のうち、1菌株が *Bacteroides ovatus* と、4菌株が *Bacteroides uniformis* と、2菌株が *Enterococcus hirae* との16S rDNA 配列と最も高い相同性を示し、*Bacteroides uniformis* においては最も高い相同性(100%)を示した。HNost1002株については既知菌種では *Ruminococcus bicirculans*、HNost1003 および HNost1008 株については *Clostridium lentocellum* との16SrDNA 配列と最も高い相同性を示したが、それぞれ92.15%、96.14%、96.15%と97.0%よりも低い相同性を示し、新奇性の高い細菌であることが示唆された。

そこで、これらの3菌株と配列の解読できたが同定不能だった HNost1016 株の16S rDNA のほぼ全長を解読した、このうち HNost1016 株の16S rDNA 全塩基配列を示した(図6)。これらの配列を Blast 検索した結果、相同性が最も高かった既知菌種は HNost1002 株では *Ruminococcus albus* と94.46%、HNost1003 株では *Clostridium lentocellum* と96.14%、HNost1008 株では *Clostridium lentocellum* と94.63%、HNost1016 株では *Clostridium saccharolyticum* と93.56%の相同性を示した(表19)。また、HNost1003 株および HNost1008 株は同種の細菌であった。4菌株とも97.0%よりも低い相同性を示すことから、新奇の細菌であるとわかった。

HNost1016 株の16S rRNA 遺伝子配列を RDPII の Classier で分類したところ、Lachnospiraceae 科の細菌であることがわかった(図7)。また同遺伝子配列に基づき系統樹を作成したところ、

Eisenbergiella yati, *Eisenbergiella massiliensis* および *Kineothrix alysoides* と比較的近縁である (図 8) が DDBJ の blast 検索では低い相同性(<95%)を示した。

3. 細菌増殖における至適 pH

HNost1016 株の増殖に対する pH の影響を、Kobayashi et al.(2017)の方法をもとに測定した。吸光度測定の結果から、HNost1016 株は pH6.8~8 で増殖し特に pH8 で最適な増殖を示した (表 20)。

4. 細菌増殖における至適温度

HNost1016 株の増殖に対する温度の影響を測定した。吸光度測定の結果から、HNost1016 株は 39°Cで増殖を示し、その他の温度では増殖を示さなかった(表 21)。

5. 細菌の糖利用性

HNost1016 株の糖利用性を 16 種類の糖を用いて測定した。吸光度測定の結果から、HNost1016 株は単糖であるアラビノース、グルコース、マンノース、ラムノース、キシロースと二糖であるセロビオース、ラクトース、マルトース、スクロースで増殖を示した(表 22)。また、ガラクトツロン酸、ペクチン、ポリガラクトツロン酸といったペクチン関連の糖利用性は低かった。

6. グラム染色

HNost1016 株の細胞をグラム染色し顕微鏡で観察した結果、グラム陽性に染色された。

7. 菌体脂肪酸組成分析

HNost1016 株の菌体脂肪酸組成を測定した結果、C16:0 を 24.22%、C15:0 anteiso を 8.83% C18:0 を 8.47%、C18:1 w7c DMA を 6.07%、C18:0 DMA を 5.17%、C14:0 を 4.82%、C16:0 DMA を 4.47%を含んでいた(表 23)。

さらに、HNost1016 株が持つ脂肪酸組成に対し MIDI のデータベースの中で最も類似した脂肪酸組成を持つ菌種は示されなかった。

8. G+C含量

HNost1016株のG+C含量を測定した結果、44.6 (mol%)であった。

9. 全ゲノム解析

ゲノムアノテーションの結果(表 24)から、アセンブルされた配列は全部で 3,480,563(bp)、全体の G+C 含量は 42.9%。また、タンパク質に翻訳されるコーディング領域(CDS)は 3,303 個、rRNA は 8 遺伝子、および tRNA は 55 遺伝子予測された。細菌ゲノム上に 1 カ所ないし複数箇所に限局して存在する反復配列領域である CRISPR 領域は 1 つ見つかった。

更に HNost1016 株と既知の種との ANI (相同値)解析では高い相同性を示す菌種は確認できなかった。

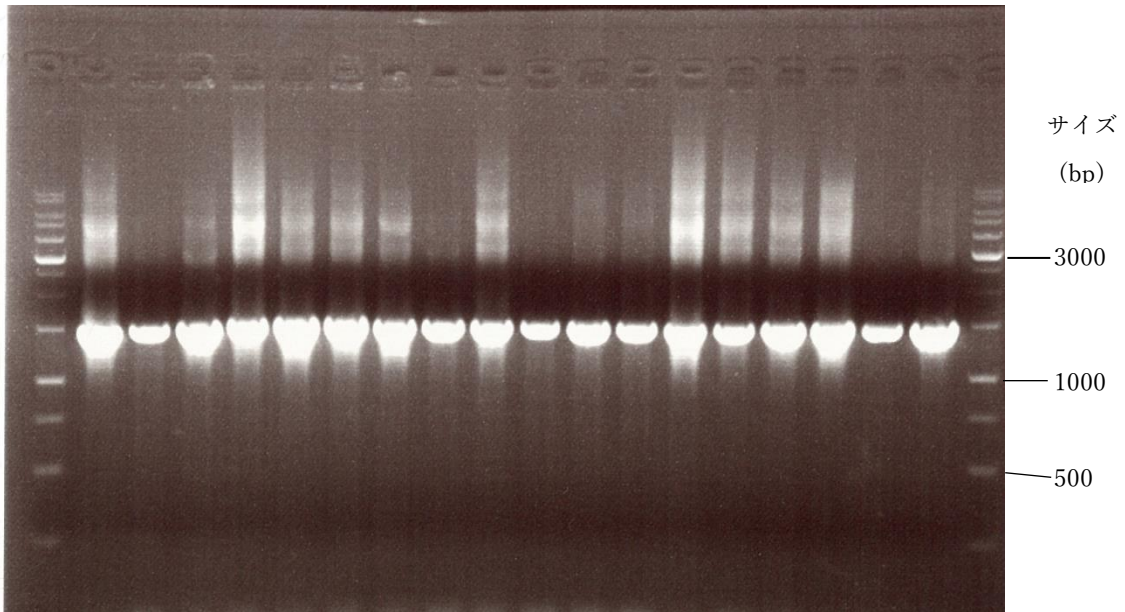


図4. PCR による 16S rDNA 断片の検出(菌株)

左から、HNost1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、
1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018

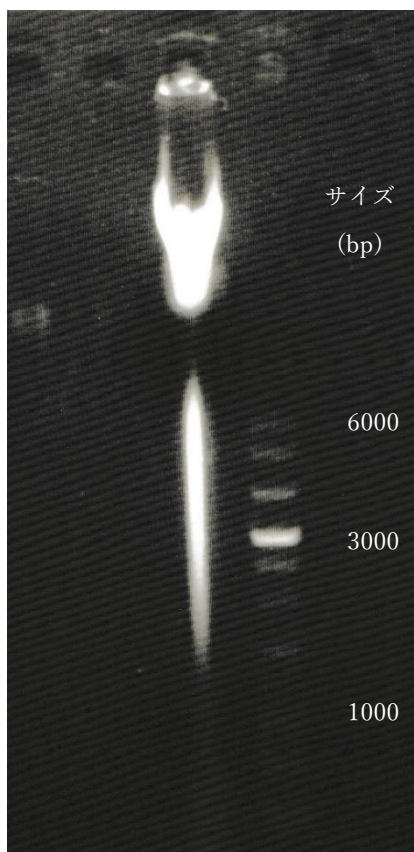


図 5. HNost1016 株から抽出した DNA の検出

1	GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGATGTTATGTGAGCGGAGTT	50
51	AGCTTGCTAATGACAATCTTTTAACATTTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAA	100
101	CGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGAATAACACTTAGAAATAGGTGC	150
151	TAAAGCCGCATAAGCGCACAGCTTCGCATGAAGCAGTGTGAAAACTCCG	200
201	GTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC	250
251	CCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATT	300
301	GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT	350
351	TGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGT	400
401	ATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGA	450
451	GTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG	500
501	GGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCAGG	550
551	GCAAGTCTGAAGTGAAAGGCGGGGGCTCAACCCCCGGACTGCTTTGGAAA	600
601	CTGTCCGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGGT	650
651	GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGG	700
701	ACTGTAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA	750
751	TACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCACTAGGTGTCTGGGGGTTA	800
801	ATAAACCTTCGGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGTGATCCACCTGGGGAGT	850
851	ACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG	900
901	GTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCT	950
951	TGACATCCCGTTGACCCGGTCCGTAATGGGACCTTCTCTTCGGAGCAATGG	1000
1001	AGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT	1050
1051	AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTAGCCAGCAGTAAGATG	1100
1101	GGAACCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGAC	1150
1151	GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1200
1201	CGTAAACAAAGGGAAGCGAGAGTGTGAGCTTAAGCAAATCCCCAAAATAA	1250
1251	CGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATC	1300
1301	GCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG	1350
1351	TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCGGAAATGCCCGAAGTCGGTGA	1400
1401	CCCAACCGAAAGGAGGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGGTAACTGGGGTGA	1450
1451	AGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA (1493bp)	

図 6. HNost1016 株の 16S rDNA の全塩基配列

RDP: Release 11



login

Classifier :: Hierarchy View

[start over | assignment detail | help]

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015

Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training setNo 18 07/2020

Query File: classifier_seq_upload2248018905690457604.FASTA

Query Submit Date: Thu Dec 10 05:14:42 EST 2020

Display depth: Auto ▾ Confidence threshold: 80% ▾ CopyNumber Adjusted: No ▾ Refresh

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] [download entire hierarchy as text file](#)

» » domain Bacteria (1)

» » » phylum Firmicutes (1)

» » » » class Clostridia (1)

» » » » » order Clostridiales (1)

» » » » » » family Lachnospiraceae (1)

» » » » » » » unclassified_Lachnospiraceae (1)

Questions/comments: rdpstaff@msu.edu



図 7. RDPII における Classifier による HNost1016 株の分類

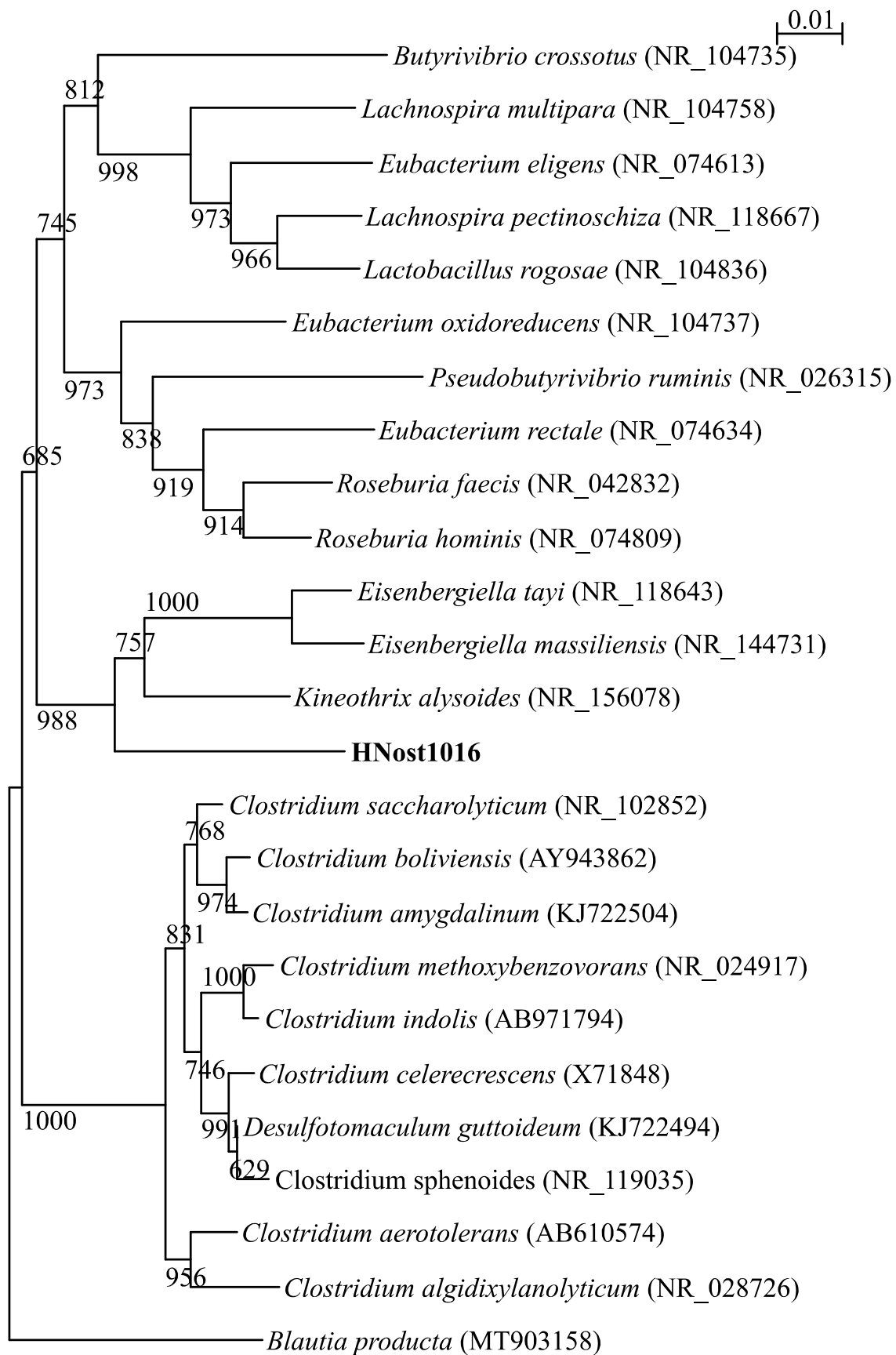


図 8. HNost1016 株の 16Sr RNA 遺伝子配列に基づく系統樹

表 16. RF15 セルロース培地IIで細菌の生育が確認された数

RF15 セルロース培地II	
ピックアップしたコロニー	18
細菌増殖が確認できた試験管数	18
ろ紙分解が確認できた試験管数	2

表 17. 分離した菌株の 16SrRNA 配列の相同性検索の結果

菌株名	菌種名	相同性 (%)
HNost1001	読めていない	
HNost1002	<i>Ruminococcus bicirculans</i>	92.15
HNost1003	<i>Clostridium lentocellum</i>	96.14
HNost1004	読めていない	
HNost1005	<i>Enterococcus hirae</i>	99.78
HNost1006	<i>Enterococcus hirae</i>	99.38
HNost1007	読めていない	
HNost1008	<i>Clostridium lentocellum</i>	96.15
HNost1009	読めていない	
HNost1010	<i>Bacteroides uniformis</i>	100.00
HNost1011	<i>Bacteroides uniformis</i>	100.00
HNost1012	<i>Bacteroides ovatus</i>	99.58
HNost1013	読めていない	
HNost1014	読めていない	
HNost1015	読めていない	
HNost1016	読めているが同定不能	
HNost1017	<i>Bacteroides uniformis</i>	100.00
HNost1018	<i>Bacteroides uniformis</i>	100.00

表 18. 表 15 の新奇性の高い 4 菌株の 16S rDNA 配列全長の相同性検索の結果

菌株名	菌種名	相同性 (%)
HNost1002	<i>Ruminococcus albus</i>	94.46
HNost1003	<i>Clostridium lentocellum</i>	93.73
HNost1008	<i>Clostridium lentocellum</i>	94.63
HNost1016	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	93.56

表 19. HNost1016 株の増殖至適 pH

pH	増殖
2	—
4	—
6.8	+
8	+
11	—

表 20. HNost1016 株の増殖至適温度

温度(°C)	増殖
10	—
20	—
30	—
39	+
50	—

表 21. HNoSt1016 株の増殖至適 pH

糖	増殖
アラビノース	+
セロビオース	+
ガラクトツロン酸	-
ポリガラクトツロン酸	-
グルシトール	-
グルコース	+
ラクトース	+
マルトース	+
マンニトール	-
マンノース	+
ペクチン	-
ラムノース	+
リボース	-
スクロース	+
トレハロース	-
キシロース	+

表 22. HNost1016 株の菌体脂肪酸組成

脂肪酸	割合(%)
C16:0	24.22
C15:0 anteiso	8.83
C18:0	8.47
C18:1 w7c DMA	6.07
C18:0 DMA	5.17
C14:0	4.82
C16:0 DMA	4.47
UN 16.107	4.27
C15:0	3.50
C15:0 iso	2.98
Sum In Feature 13	2.76
C16:0 3OH	2.62
Sum In Feature 10	2.20
C16:0 iso	2.12
C17:0	2.00
Sum In Feature 11	1.71
C17:0 anteiso	1.56
C17:0 anteiso DMA	1.20
C15:0 iso DMA	1.13
C16:1 w7c DMA	1.11
C14:0 DMA	0.98
C17:0 iso	0.84
C16:1 w7c	0.82
C18:1 w9c	0.76
Sum In Feature 8	0.59
Sum In Feature 5	0.50
C17:0 DMA	0.48
C16:0 aldehyde	0.42
Sum In Feature 12	0.39
C18:1 w9c DMA	0.38
C17:0 3OH	0.38
UN 17.103	0.31
C20:0	0.29
C17:1 w6c	0.23
Sum In Feature 3	0.14
Sum In Feature 4	0.13

Sum In Feature 1	0.13
C18:2 w6,9c	0.12
C18:1 at 17.254 DMA	0.12
C16:1 w5c	0.10
C18:1 w5c	0.09
C13:0 iso	0.09
C13:0 anteiso	0.09
C13:0	0.08
c12:0	0.07
C19:0 cyclo 9,10 DMA	0.06
C14:1 w7c DMA	0.06
C13:0 iso 3OH	0.06
Sum In Feature 6	0.04
Sum In Feature 2	0.03
C11:0 DMA	0.03

UN : Unknow

MIDI 法において脂肪酸種の特定ができない脂肪酸については、その分解物等のピークを含めた合計を Summed Feature として表記した。

Calculation Method MOORE6 では、Summed Feature は以下のとおり。

Summed Feature 1 : C13:1 at 12-13、C14:0 aldehyde と C11:1 2OH

Summed Feature 2 : C12:0 3OH と C13:0 DMA

Summed Feature 3 : C15:0 ISO aldehyde と unknown 13.570

Summed Feature 4 : unknown 14.762、C15:2 FA、C15:2 と C15:1 ω8c

Summed Feature 5 : C15:0 DMA と C14:0 3OH

Summed Feature 6 : C15:0 anteiso 3OH と C16:1 ω9c DMA

Summed Feature 7 : C17:2 at 16,760 と C17:1 ω9c

Summed Feature 8 : C17:1 ω8c と C17:2 at 16.801

Summed Feature 9 : C16:0 iso 3OH と unknown 17.157 DMA

Summed Feature 10 : C18:1 ω7c と unknown 17.834

Summed Feature 11 : C17:0 iso 3OH と C18:2 DMA

Summed Feature 12 : unknown 18.622 と C19:0 iso

Summed Feature 13 : C15:0 anteiso DMA と 14:0 2OH

表 23. HNost1016 株の全ゲノム解析結果

総塩基数(bp)	3,480,563
配列数	1
G+C 含量(%)	42.9%
N50	3,480,563
Gap Ratio (%)	0.0%
No. of CDSs	3,303
No. of rRNA	8
No. of tRNA	55
No. of CRISPRS	1
Coding Ratio (%)	89.9%

考察

今回の研究では、ダチョウ糞から 18 菌株が分離された。さらに、16S rDNA の塩基配列が正常に解読された 10 菌株から相同値が 97%未満であった 4 菌株の 16S rDNA の全長を解読した。16S rDNA 全長解読の結果より、最も相同値が低かった HNost1016 株を選び、さらに特徴付けと全ゲノム解析を行った。同定および系統樹の結果では HNost1016 株は、*E. yati*、*E. massiliensis* および *K. alysoides* を近縁種とし、Lachnospiraceae 科に属していた。Lachnospiraceae 科の細菌は哺乳類、特に反芻動物とヒトにおける消化管細菌叢で主要な細菌群の一つであるクロストリジウム綱に属する(Meehan et al.,2014)。また、Lachnospiraceae 科はグラム陽性、中温性、偏性嫌気性、低 G+C 含量および炭水化物による発酵性増殖の生理学的特性を持つ(Kusada et al.,2017)。ここで、HNost1016 株の生理学的特性の結果と比較すると、グラム陽性、中温性、偏性嫌気性、42.9%の G+C 含量および糖を利用した増殖(アラビノース、セロビオース、グルコース、ラクトース、マルトース、マンノース、ラムノース、スクロース、キシロース)において、一般的な Lachnospiraceae 科細菌の特性と一致している。増殖至適 pH において HNost1016 株は pH6.8~8 で増殖した。特に pH8 の培地で pH6.8 の培地と比べ細菌増殖速度が高く、pH8 の培地で最適な増殖を示した。しかし、Matsui et al.(2010b)の報告によると、ダチョウの盲腸内 pH は pH 6.9~7 であることから、ダチョウの盲腸内は HNost1016 株の増殖に最も適した環境ではないと考えられる。HNost1016 株と最も近縁な菌種である *K. alysoides* (Haas et al.,2017)、(図 8)との特性を比較すると、糖の利用性については 8 種の糖(アラビノース、セロビオース、グルコース、ラクトース、マルトース、マンノース、スクロース、キシロース)において共通した糖利用性を示したが、ラムノースのみ 1016 株が利用することができた。また、*K. alysoides* がポリガラクトン酸を利用できるのに対して、HNost1016 株はガラクトン酸、ポリガラクトン酸、ペクチンの利用性が低く、ペクチン関連糖を分解する能力が低いと考えられる。全ゲノム解析の比較において、*K. alysoides* がゲノムの長さ 4,676,087 bp、42.74%の DNA G+C 含量、4,176 個の CDS、87 個の RNA 遺伝子、2 つの CRISPR 領域をもつのに対して HNost1016 株はゲノムサイズが小さく(3,480,563 bp)、CDS、RNA 遺伝子および CRISPR の数が少なかったが、DNA G+C 含量については約 43%と類似していた。DDBJ の blast 検索で HNost1016 株と *K. alysoides* との相同性をしらべると 95%未満の低い相同性を示した。

このことから、HNost1016 株が *K. alysoides* と遺伝的および表現型的に異なる菌種と考えられる。菌体脂肪酸組成について、HNost1016 株の主要な脂肪酸はヘキサデカン酸(C16:0)、anteiso ペンタデカン酸(C15:0 anteiso)およびオクタデカン酸(C18:0)だったが、HNost1016 株の脂肪酸組成に対し MIDI のデータベースの中で最も類似した脂肪酸組成を持つ菌種は示されなかった。ただし、C16:0 は近縁種である *E. yati*、*E. massiliensis* および *K. alysoides* も同様に C16:0 を主成分としていた(Haas et al., 2017; Togo et al., 2018)。

今回の実験でダチョウの新鮮糞から新奇バクテリアの分離を試みたところ HNost1016 株が分離された。HNost1016 株は Lachnospiraceae 科のバクテリアの特徴を備えているが、比較的近縁な *E. yati*、*E. massiliensis* および *K. alysoides* との相同性の低さ(<95%)から Lachnospiraceae 科の新奇性の高いバクテリアであると考えられる。

これまでにダチョウ盲腸内容物中の細菌叢の群集構造の解析を 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S rDNA)クローンライブラリー法により行ってきた (Matsui et al., 2010b)。この研究から、本実験では繊維分解能を持つ *Fibrobacter* 属の未分類の菌種の分離が期待されていたが残念ながら分離されず、代わりに HNost1016 株を含め 3 種の新奇細菌と考えられる菌株が分離された。このことから、ダチョウ消化管細菌叢にはまだ未分類の細菌が存在していると大いに考えられる。*Fibrobacter* 属未知菌種の分離が成功しなかった理由として、培養基質を含め、培地の成分や培養条件が未知菌種の増殖に適していなかったことが考えられる。特に今後、培地の成分や、培養の条件に関する検討が必要である。*Fibrobacter* 属はグラム陰性細菌である。そこで、グラム陽性細菌に対して抗菌作用を示すモノニンシンを添加した培地を用いることで、グラム陽性細菌の増殖を抑制でき、*Fibrobacter* 属の未知菌種分離の確率が高まると考えられる。今後は、*Fibrobacter* 属を含め他にも機能的に重要な細菌を分離および同定するための努力が必要である。

要約

ダチョウは鳥類にも関わらず結腸が長く、後腸発酵動物の消化管の特徴を備え、盲腸や結腸にはウマなどと同様に多種多様の微生物が高密度で存在している。これまで、本研究室ではダチョウ盲腸内細菌叢の群集構造解析を 16S rRNA 遺伝子(16S rDNA)クローンライブラリー法により行い、多数の未知菌種が存在することを明らかにした。ダチョウの消化管から未知菌種を分離し、その特徴づけを行うことでダチョウ大腸内細菌の宿主に対する役割を知ることができる。そこで、本研究ではダチョウ糞より未知菌種を分離・培養し、その特徴付を行うことを目的とした。雄ダチョウ 3 羽を供試動物として用い、ダチョウの新鮮糞からバクテリアの分離を行った。分離したバクテリアから DNA を抽出し、16S rDNA 配列による分離株の同定を行った結果、HNost1002 株、HNost1003 株、HNost1008 株および HNost1016 株の 4 菌株 3 種の新奇バクテリアを分離することができた。次に、分離された新奇バクテリアのうち HNost1016 株の 16S rDNA 配列を RDP II の Classifier で分類したところ、Lachnospiraceae 科の細菌であることがわかった。また同遺伝子配列に基づき系統樹を作成したところ、*Eisenbergiella yati*、*Eisenbergiella massiliensis* および *Kineothrix alysoides* と比較的近縁関係にあった。HNost1016 株は 9 種の糖(グルコース、セロビオース、スクロース、キシロース、マンノース、アラビノース、ラクトース、ラムノース、マルトース)を利用でき、培養温度 39°C を最適温度、pH6.8~8 を最適 pH として増殖を示した。HNost1016 株は Lachnospiraceae 科のバクテリアの特徴を備えているが、新奇性の高いバクテリアであると考えられた。

引用文献

- An D, Dong X, Dong Z. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe*. 11, 207–215.
- Bjerrum L, Engberg RM, Leser TD, Jensen B, Finster K, Pedersen K. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chicken as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science*. 85, 1151–1164.
- Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 38, 141–151.
- Fievez V, Mbanzamihigo L, Piatton F, Demeyer D. 2001. Evidence for reductive acetogenesis and its nutritional significance in ostrich hindgut as estimated from *in vitro* incubations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 85, 271–280.
- Frey JC, Rothman JM, Pell AN, Nizeyi JB, Cranfield MR, Angert ER. 2006. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 3788-3792.
- Guettler MV, Rumler D, Jain MK. 1999. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 207-216.
- Haas KN, Blanchard JL. 2017. *Kineothrix alysoides*, gen. nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family Lachnospiraceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 67, 402-410.
- Katayama-Fujimura Y, Komatsu Y, Kuraishi H, Kaneko T. Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. 1984. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, :3169–3172.
- Kibe R, Sakamoto M, Hayashi H, Yokota H, Benno Y. 2004. Maturation of the murine cecal microbiota as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries. *FEMS Microbiology Letters*. 235, 139–146.

- Kobayashi H, Nakasato T, Sakamoto M, Ohtani Y, Terada F, Sakai K, Ohkuma M, Tohno M. 2017. *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric-acid-producing organism isolated from high-moisture grass silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67, 4974–4978.
- Kobierecka PA, Wyszyńska AK, Aleksandrak-Piekarczyk T, Kuczkowski M, Tuzimek A, Piotrowska W, Górecki A, Adamska I, Wieliczko A, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. 2017 In vitro characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen*. 6:e512.
- Kusada H, Kameyama K, Meng XY, Kamagata Y, Tamaki H. 2017. *Fusimonas intestini* gen. nov., sp. nov., a novel intestinal bacterium of the family Lachnospiraceae associated with diabetes in mice. *Scientific reports*. 7, 1–9.
- Lan PTN, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and Immunology*. 46, 371–382.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley; pp. 115-175.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindencrona RH, Boye M, Møller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 673–690.
- Matsui H, Ban-Tokuda T, Wakita M. 2009. Microbial community in the ostrich (*Struthio camelus*) large intestine revealed by PCR-derived clone libraries. In “Biotechnology of lignocellulose degradation and biomass utilization” (Eds. Sakka, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, M., Matsui, H., Miyake, H., Tanaka, H.), pp. 304–309.
- Matsui H, Ban-Tokuda T, Wakita M. 2010a. Detection of fiber-digesting bacteria in the ceca of ostrich using specific primer sets. *Current Microbiology*. 60, 112–116.
- Matsui H, Kato Y, Chikaraishi T, Moritani M, Ban-Tokuda T, Wakita M. 2010b. Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe*. 16, 83–93.

- Matsui H, Yoneda S, Ban-Tokuda T, Wakita M. 2011. Diversity of the formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) gene in the proximal and mid ostrich colon. *Current Microbiology*. 62, 1–6.
- Meehan CJ, Beiko RG. 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome biology and evolution*. 6, 703–713.
- Schleifer KH, Ludwig W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*. 18, 461–467.
- Scupham AJ, Patton TG, Bent E, Bayles DO. 2008. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microbial Ecology*. 56, 322–331.
- Shinkai T, Ohji R, Matsumoto N, Kobayashi Y. 2009. Fibrolytic capabilities of ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* in relation to its phylogenetic grouping. *FEMS Microbiology Letter*. 294, 183–190.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4799–4807.
- Sundset MA, Prasteng KE, Cann IKO, Mathiesen SD, Mackie RI. 2007. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microbial Ecology*. 54, 424–438.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*. 29, 159–169.
- Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics*. 34, 1037–1039.
- Togo AH, Awa D, Matthieu M, Lagier JC, Robert C, Pinto FD, Raout D, Fournier PE, Bittar F. 2018. Draft genome and description of *Eisenbergiella massiliensis* strain AT11T: A new species isolated from human feces after bariatric surgery. *Curr Microbiol* 75:1274–1281.
- Tsuchida S, Kitahara M, Nguema PP, Norimitsu S, Fujita S, Yamagiwa J, Ngomanda A, Ohkuma M, Ushida K. 2014. *Lactobacillus gorillae* sp. nov., isolated from the faeces of captive and wild western lowland

- gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64: 4001 – 4006.
- Tsukinowa E, Karita S, Asano S, Wakai Y, Oka Y, Furuta M, Goto M. 2008. Fecal microbiota of a dugong (*Dugong dugong*) in captivity at Toba Aquarium. Journal of General and Applied Microbiology. 54, 25–38.
- Whitford MF, Foster RJ, Beard CE, Gong J, Teather RM. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobe. 4, 153–163.
- Yamano H, Koike S, Kobayashi Y, Hata H. 2008. Phylogenetic analysis of hindgut microbiota in Hokkaido native horses compared to light horses. Animal Science Journal. 79, 234 – 242.
- Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology. 68, 124–137.
- 唐澤豊. 2001. ダチョウ. 動物の栄養. 唐澤豊編. 文永堂出版. 東京. pp. 260 – 267.
- 力石 透. 2007. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法によるダチョウ大腸内 *Fibrobacter* 属未知菌種の検出. 三重大学生物資源学部 卒業論文.
- 日本農業研究所. 2008. ダチョウ飼養管理マニュアル. 日本農業研究所編. 東京.

謝辞

本研究を進めるにあたり、松井宏樹教授、伴智美准教授には懇切丁寧なご指導、助言をいただき深く感謝いたします。特に松井先生には実験、研究に際してあらゆる指導を持っていただき深く感謝しております。また、ゼミにおいても、幅広くご指導いただき、深く感謝しております。ダチョウの糞を採取するにあたり、三重県久居農林高等学校の教職員の皆様には糞の採取の許可をいただき、感謝いたします。塩基配列のシーケンスを行うにあたり、本学生命科学研究支援センター・遺伝子実験施設のサービスを利用させていただきました。深く感謝いたします。

また、同時期研究室に配属になった4年生の西田幸平君、國岡せりさん、武藤美南さん、藤田美来さんにはいつも研究室の雰囲気をもっと明るくしてくれました。心より感謝いたします。ありがとうございました。