

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07775

研究課題名(和文)速筋に発現するmicroRNAの細胞局在性と機能の解明

研究課題名(英文)Roles of fast-type skeletal muscle-specific microRNA

研究代表者

室谷 進 (MUROYA, Susumu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・ユニット長

研究者番号：50355062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生理学的特性が異なるウシ(ホルスタイン種および黒毛和種)骨格筋部位でmiR-196aおよびmiR-885の発現を解析し、部位間で比較した結果、miR-196aの発現が咬筋<横隔膜<半棘筋<最長筋<半腱様筋の順で高いことが示された。これはmyosin heavy chain (MyHC) アイソフォーム発現割合にみられる各筋の筋線維型の違いを反映しており、骨格筋におけるmiR-196aが速筋型特性に強く依存して発現する傾向が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウシ骨格筋の速筋型筋線維におけるmiR-196aの特異性が明らかになったことから、miR-196aが速筋型筋線維のマーカーとして活用が可能であり、家畜育種選抜指標の開発にもつながると期待できる。また、速筋型と遅筋型の骨格筋では、互いに肉質(やわらかさ、色調、多汁性等)が異なり、速筋型の筋線維径は遅筋型より大きい等の違いもあるため、それぞれの筋線維型特性に関わるmicroRNAの存在様式の解明の意義は大きい。microRNA制御により筋線維型調節が可能になれば家畜の骨格筋形成を介した肉質・肉量の向上も将来的に期待できる。

研究成果の概要(英文)：We clarified relationship between miR-196a and myosin heavy chain (MyHC) isoform expression in bovine masseter (MS), diaphragm (DP), semispinalis (SP), semitendinosus (ST), and longissimus dorci (LD) muscles, to investigate roles of miR-196a in bovine muscle type specification. The quantitative RT-PCR results showed that miR-196a is exclusively expressed in MyHC-2x isoform-abundant ST and LD muscles compared to the others ($P < 0.001$). The expression of miR-196a was correlated with those of MyHC-2x isoform ($r = 0.738$) and MyHC-slow ($r = -0.764$). These results revealed that miR-196a expression is highly associated with muscle type that is determined by MyHC isoform expression in bovine skeletal muscles.

研究分野：畜産

キーワード：ウシ 骨格筋 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (microRNA) は 21-23 塩基長の小分子 RNA で、標的 mRNA に作用してタンパク質の翻訳を調節する。現在までにウシでは 1000 種類以上の microRNA が報告されており、細胞の増殖、分化等の幅広い生命現象に関わっている。動物の骨格筋形成過程においては、筋芽細胞が増殖、分化の後に筋管細胞から筋線維へと成熟し、組織が作られる。一方、成熟過程では筋細胞内タンパク質の構成が骨格筋の生理学的特性に応じて構築され、成熟した筋管ではタンパク質構成が運動状況に応じて変化する。骨格筋細胞の分化初期では miR-1, miR-133, miR-206 などの microRNA が重要な役割を果たす。骨格筋の特性 (筋型または筋線維型) は遅筋型から運動のトレーニング等により瞬発力を要する速筋型へ移行し、遅筋型の収縮および代謝系のタンパク質が速筋型に置き換わる。その過程における筋線維 (型) 構成の決定にも microRNA が重要な役割を担うことがわかってきた。マウスでは、miR-208b, miR-499 遺伝子はミオシン重鎖 (MyHC) の遅筋型アイソフォーム (MyHC-slow) である Myh7, Myh7b 遺伝子のイントロンにそれぞれコードされており、遅筋型関連遺伝子を発現させ、遅筋型筋線維の形成に必須の役割を担うことが報告されている。

ウシ (黒毛和種) の半腱様筋 (速筋型) と咬筋 (ホホニク、遅筋型) では、microRNA の網羅的な発現解析により、約 30 種の microRNA の発現が半腱様筋と咬筋との間で有意に異なり、miR-196a/b と miR-885 は半腱様筋のみに発現し咬筋にはほとんど発現しないことが判明した (Muroya et al. 2013)。一方、遅筋型筋線維形成を調節する前述の miR-208b, miR-499 では各々、半腱様筋で咬筋の 1/5, 1/2 程度の発現がある。骨格筋細胞においてなぜ miR-196a/b と miR-885 の発現が半腱様筋に多く発現するのかについては不明であるが、miR-196a が皮下脂肪内で褐色脂肪細胞への分化を誘導することや、結合組織形成に関与すること等が報告されており、それを発現する細胞が半腱様筋内で脂肪交雑形成に関与する可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では、ウシ骨格筋における miR-196a を中心とした筋部位別の発現分布、また骨格筋組織の細胞レベルでの局在について解析し、miR-196a/b, miR-885 の発現様式と筋線維型との関連や、速筋型筋線維や半腱様筋の形成における機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ウシ (おもにホルスタイン種の雌 7 頭 (44 - 85 ヶ月齢) その他) を用い、屠殺直後に骨格筋組織の試料を採取した。採取する部位は互いに異なる筋線維型構成をもつ骨格筋 5 種 (咬筋、横隔膜、半棘筋、最長筋、半腱様筋) とした。

採材した試料から、microRNA を含む全 RNA を抽出した。RNA 試料から異なる市販キットで microRNA および mRNA を調製し、それぞれ逆転写反応で cDNA を合成した。これを用いて microRNA および mRNA 発現量を定量的 PCR により解析した。microRNA についてはおもに miR-196a, miR-885 の他数種、mRNA については 3 種のウシ myosin heavy chain (MyHC) アイソフォーム (slow, 2a, 2x)、I 型 collagen および II 型 collagen をターゲットとした。これらの遺伝子発現と miR-196a, miR-885 の発現を骨格筋部位間で比較した。

咬筋および半腱様筋については、遺伝子発現をマイクロアレイにより解析し、その違いについて調査した。また、日本短角種去勢牛 6 頭を用いたマイクロアレイ解析では、放牧と舎飼により生じる骨格筋の筋線維型変化に応じて miR-196a 等の発現が変化するか否かを調べた。放牧は北里大学フィールドサイエンスセンターの連携協力のもと、八雲牧場で 5 月 - 8 月の 3 ヶ月間実施し、筋試料の採取はバイオプシーにより行った。

一方、miR-196a のウシ骨格筋組織における発現を *in situ hybridization* (ISH) により咬筋および半腱様筋で検出することでその分布の解析を試みた。染色方法の条件として 組織の固定法、hybridization 温度、洗浄時の温度について検討を行った。ISH の予備実験として、マウス腎臓を用いて miR-196a のプローブの染色性を、またヒト β -actin プローブによりウシ骨格筋の品質を確認した。microRNA のネガティブコントロールとして Scramble オリゴを用いた。

一方、発現する細胞の生理学的特性を特徴づける目的のため、免疫組織化学染色法により MyHC-slow および MyHC-2x に対する抗体による筋線維を型別に染め分け、白色および褐色脂肪細胞のマーカー (C/EBP β 、UCP1 等) の検出を行った。

4. 研究成果

MyHC については、速筋型アイソフォームの発現割合が咬筋 < 横隔膜 < 半棘筋 < 最長筋 < 半腱様筋の順で高く、各筋の筋線維型の違いを反映していた。miR-196a の発現解析結果によると、miR-196a は速筋型部位に高く発現し、半腱様筋で最長筋より有意に高く、また最長筋では中間型の横隔膜や半棘筋より有意に高い発現を示した。一方、特に遅筋型傾向の強い咬筋のような骨格筋部位では発現が認められなかった (図 1、計 6 頭・5 部位間の比較結果)。一方、miR-885 は半腱様筋で発現が高く咬筋では発現しない傾向を示し、miR-196a とは異なり中間型の部位でも発現していた (図 2、計 4 頭 4 部位間の比較結果) が、いずれの差も有意ではなかった。

また、ISH ではウシ咬筋および半腱様筋組織内で miR-196a 発現は検出されなかった。これについては、RNA-seq または定量的 PCR によりウシ半腱様筋で検出されたこと、マウス腎臓では今回のプローブにより miR-196a が検出されたこと、ウシ半腱様筋でポジティブコントロールの β -actin が検出されたこと等から、ISH ではその発現レベルが検出限界以下であったと結論づけられた。なお、試料には凍結切片をホルマリン固定したもの、パラフィン包埋ブロックの薄切片の双方を用いたが、結果は同様であった。

咬筋および半腱様筋において、miR-196a が機能すると考えられた脂肪細胞を検出するために UCP1、C/EBP の免疫染色を行った結果、UCP1 は検出されず、C/EBP は核にシグナルを検出したものの、筋部位間での有意な違いは認められなかった。UCP1 はマイクロアレイによる発現解析でも咬筋、半腱様筋に検出されなかったことから、これらのウシ骨格筋部位には褐色脂肪細胞が存在しないと考えられた。

miR-196a による発現抑制ターゲットとして報告されている I 型および II 型 Collagen の発現解析の結果、ともに咬筋で他の筋部位より有意に高い発現レベルを示した。I 型および II 型 Collagen と、筋線維型の指標である MyHC アイソフォームの発現について、計 6 頭 5 部位 (28 試料) を用いて miR-196a の発現との相関を解析すると、miR-196a と MyHC-2x との間に高い相関が認められた ($r = 0.738$)。また、miR-196a と MyHC-slow との間には $r = -0.764$ の高い相関が、I 型および II 型 collagen との間の相関係数はそれぞれ -0.191 、 -0.259 であった (表 1)。以上より、骨格筋における miR-196a が速筋型に強く依存して発現する傾向が明らかとなった。これにより、速筋型特性に関連して miR-196a が I 型および II 型 collagen の発現抑制に関与する可能性は低いことが示唆された。

放牧牛の大腿二頭筋において miR-196a の発現をマイクロアレイ解析で調べた結果、舎飼区の牛に比べて有意な差が認められなかった。放牧牛の大腿二頭筋においては、miR-206、miR-208b の発現低下や MyHC-2x の発現増加等、筋線維型に関する変化が認められたが、その過程に miR-196a は関与せず、miR-196a の関与が骨格筋の部位特性の形成と、運動による生理学的特性の変化の違いを反映することが示唆された。

< 引用文献 >

Muroya S, Taniguchi M, Shibata M, Oe M, Ojima K, Nakajima I, Chikuni K. J Anim Sci. 2013, 91(1):90-103.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Muroya S, Ogasawara H, Nohara K, Oe M, Ojima K, Hojito M (2018). PSV11-25 Grazing-induced

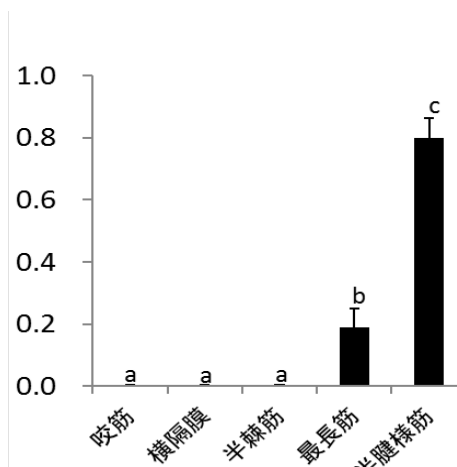


図 1 . ウシ骨格筋における miR-196a の発現 . 縦軸は内部標準の発現に対する相対値を表す . 添え字 (a,b,c) の異なる筋部位の間で発現量が有意に異なる ($p < 0.05$) .

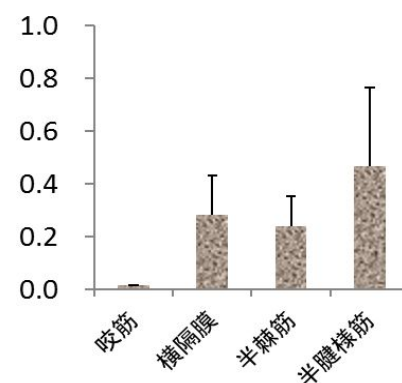


図 2 . ウシ骨格筋における miR-885 の発現 . 縦軸は内部標準の発現に対する相対値を表す .

表 1 . miR-196a の発現と、MyHC アイソフォーム、I 型および II 型 collagen の発現との間の相関係数

| | miR-196 | MyHC-s | MyHC-2a | MyHC-2x | Col1a1 | Col3a1 |
|---------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|
| miR-196 | 1 | | | | | |
| MyHC-s | -0.631 | 1 | | | | |
| MyHC-2a | 0.072 | -0.293 | 1 | | | |
| MyHC-2x | 0.956 | -0.642 | 0.063 | 1 | | |
| Col1a1 | -0.319 | 0.590 | -0.326 | -0.342 | 1 | |
| Col3a1 | -0.365 | 0.614 | -0.567 | -0.385 | 0.892 | 1 |

transcriptomic changes in bovine biceps femoris muscle, subcutaneous fat, and liver mRNAs and plasma exosome microRNAs. *Journal of Animal Science*. (査読有) 96:356. Doi: 10.1093/jas/sky404.783

Muroya S, Shibata M, Hayashi M, Oe M, Ojima K (2016). Differences in Circulating microRNAs between Grazing and Grain-Fed Wagyu Cattle Are Associated with Altered Expression of Intramuscular microRNA, the Potential Target PTEN, and Lipogenic Genes. *PLoS One*. (査読有) 11(9):e0162496. Doi: 10.1371/journal.pone.0162496.

S. Muroya, H. Ogasawara, M. Hojito (2015). Grazing Affects Exosomal Circulating MicroRNAs in Cattle. *PLoS One*. (査読有) 10(8):e0136475. doi: 10.1371/journal.pone.0136475.

Horikawa A, Ogasawara H, Okada K, Kobayashi M, Muroya S, Hojito M (2015). Grazing-induced changes in muscle microRNA-206 and -208b expression in association with myogenic gene expression in cattle. *Anim Sci J*. (査読有) 86(11):952-60. doi: 10.1111/asj.12381.

[学会発表](計6件)

室谷進, 小笠原英毅, 野原香菜, 大江美香, 尾嶋孝一, 寶示戸雅之. 放牧で変化するウシ骨格筋・脂肪・肝臓のトランスクリプトーム. 日本畜産学会第124回大会, 2018.

室谷進, 林征幸, 尾嶋孝一, 大江美香, 中島郁世, 柴田昌宏. 飼養条件で変動する黒毛和種牛の血漿中microRNA. 日本畜産学会第122回大会, 2017.

S. Muroya. Association of plasma extracellular vesicle microRNAs with feeding conditions in cattle. 2017 ISEV Workshop, 2017.

S. Muroya, H. Ogasawara, M. Hojito. Circulating microRNA expression changes during grazing in cattle. The 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 2016.

Muroya Susumu, Hayashi Masayuki, Ojima Koichi, Oe Mika, Nakajima Ikuyo, Shibata Masahiro. Difference in circulating microRNAs between grazing and concentrate-fed Japanese Black cattle. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. 2016.

室谷進, 小笠原英毅, 寶示戸雅之. ウシ血中を循環するマイクロRNAは放牧によって変動する. 日本畜産学会第120回大会, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。