

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15027

研究課題名(和文)エクソソームmiRNAマーカーによる黒毛和種肥育牛の枝肉形質の生体評価は可能か？

研究課題名(英文)Is it possible to evaluate the carcass trait of fattened Japanese black cattle with exosomal microRNA markers?

研究代表者

松本 和也 (Matsumoto, Kazuya)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20298938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥育期間中にと畜時の枝肉成績を予測診断する指標として、血中に含まれるエクソソームに内包された分泌型miRNAからバイオマーカーの探索を実施した。miRNAマイクロアレイ解析の結果、18種類の分泌型miRNAをバイオマーカー候補としてリストアップし、さらに血中miRNAの定量分析と枝肉形質との関連の解析により、バイオマーカー候補のうち2種類のmiRNAについて再現性が確認された。国内3地域の肥育中血清を比較した結果、miRNA量に地域差が検出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, relations between carcass traits and exosomal miRNA expression profiles in serum were analyzed to identify circulating exosomal miRNA biomarkers for predicting carcass traits and meat quality characteristics of Japanese Black cattle by bioinformatics analysis. Eleven secreted microRNAs were listed as biomarker candidates as a result of microRNA microarray analysis using serum of fattening cattle. Subsequently, reproducibility was confirmed for the two biomarker candidate microRNAs by the association analysis between the amount of blood microRNA quantified by real-time PCR analysis and the carcass traits. Those selected microRNAs were inferred to affect the expression of genes related to differentiation and development of cells constituting muscle tissue by computational searches of existing public databases.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

肉用牛の産肉形質に関する遺伝的資質を肥育期間中に発揮させるためには、肥育期間の早期の段階で産肉形質を推定して、肥育状況を生体評価することが重要である(肉用牛の科学、肉用牛研究会刊行、養賢堂)。例えば、超音波診断装置により、肥育期間中に肉量や肉質の成長度合いを経時的に測定して生体のまま評価する研究が進められている。また、生産現場で使われている肉質の改善の指標としてBMSナンバーの向上を目的とした血中ビタミンA濃度があるが、その制御は非常に難しく、さらに低濃度期間を長期にした場合脂肪交雑は向上せず枝肉重量の低下を招くことも明らかになっている(中西ら、日本畜産学会報 73:273-282[2002])。今後、肥育牛の肥育状況をバイオマーカー(生体試料に含まれる生体由来物質を使って、生体内の生理的状態などを定量的に評価することを目的とした指標)で生体評価することが可能となったならば、これを肥育牛の管理指標として生産農家毎にその状態に応じた適切な飼養管理の改善ができるため、肉用牛を生産する農家経営の安定化に貢献すると考えられる。

これまで、申請者らは、プロテオーム・データを基盤にした解析によって、黒毛和種肥育牛(去勢)の肥育期間中に優良な主要6項目の枝肉形質(枝肉重量・ロース芯面積・バラの厚さ・皮下脂肪厚・歩留基準値・BMSナンバー)を生体のままでそれぞれ評価するバイオマーカータンパク質102種類を同定している(主張する特許権4件:特許取得2件[特許第4722224号、特許第5688381号]・特許出願2件[特願2011-016289、特願2011-263214])。さらに、血清中の exosome (エクソソーム)に内包された分泌型マイクロRNA(血清エクソソーム miRNA)を対象にしたマイクロアレイ・データを基盤にした解析により、黒毛和種肥育牛(去勢)のロース芯面積・バラの厚さ・BMSナンバーの3つの枝肉形質を生体評価するバイオマーカー候補として、8種類の血清エクソソーム miRNA を同定した(特許出願準備中)。特に、後者の血清エクソソーム miRNA の同定は、

動物において、miRNA は転写後翻訳抑制の微調整機能を果たしていること(He and Hannon, Nat. Rev. Genet. 5:522[2004])、miRNA は動物の脂肪合成など代謝に影響を及ぼす遺伝的制御因子であること(Krutzfeldt and Stoffel, Cell Metabolism 4:9[2006])、エクソソームに内包された分泌型 miRNA は血中を循環して他の細胞に取り込まれてからも機能することが明らかにされたこと(Valadi et al., Nat. Cell. Biol. 9:654[2007])、ウシ個体レベルで皮下脂肪や内臓脂肪で発現する miRNA の種類とその発現量が、給餌飼料によって変化すること(Romao et al., PLoS One 7: e40605[2012])に基づいて、仮説「遺伝子発現抑制機能を有

する miRNA がエクソソームに内包されて血中に分泌されて、ウシ生体内の様々な代謝に関与する」を立てて実験した成果である。

2. 研究の目的

本研究では、肥育期間中のウシ血中 miRNA の発現プロファイルを解析し、遺伝的背景が異なると考えられる3県(G県・M県・T県)の黒毛和種肥育牛(去勢)の集団を対象に、肥育期間の早期・中期・後期に経時的に採取した血清サンプルを供試して、バイオマーカー候補として同定した血清エクソソーム miRNA を使った黒毛和種肥育牛(去勢)の肉質の生体評価方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、採材された黒毛和種肥育牛(去勢)の血清と血統情報・出荷時枝肉形質情報を供試して、バイオマーカー候補としての分泌型 miRNA を選定した。まず、市場に出荷された黒毛和種肥育牛(去勢)から屠畜時に血液を採取し、血清を得た。次に、枝肉形質について成績上位および下位の個体を選抜し、miRCURY™ Exosome Isolation Kit (EXIQON 製)を用いて、各血清からエクソソームを回収した。さらに、miRNeasy Micro Kit (QIAGEN 製)を用いて miRNA を抽出したのち、Agilent 2100 Bioanalyzer で Agilent Small RNA Kit (Agilent 製)により miRNA の QC チェックを実施し、GeneChip® miRNA 4.0 Array に供することで、各 miRNA の発現量を得た。最後に、枝肉形質によって選抜した黒毛和種肥育牛(去勢)の屠畜時血清中の miRNA の包括マイクロアレイ解析情報と優良枝肉形質情報との関連解析により、枝肉形質と高い相関性を示すバイオマーカー候補 miRNA を探索した。獲得したバイオマーカー候補 miRNA は、miRNA データベース(miRBase、<http://www.mirbase.org/index.shtml>)とエクソソーム内胞データベース(Exosomes、<http://exocarta.org/>)に基づくバイオインフォマティクス解析によって検証・スクリーニングした。さらにバイオマーカー候補 miRNA とウシの枝肉形質との関係を検討するために、miRNA の標的遺伝子の予測を miRDB (<http://mirdb.org/mirDB/>)等の公共データベースで行うとともに、標的遺伝子群については PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System、<http://www.pantherdb.org/>) を使った代謝パスウェイにおける機能分類を行った。

獲得したバイオマーカー候補 miRNA は、新たに採材された黒毛和種肥育牛(去勢)の屠畜時血清と出荷時枝肉形質情報を用いて効果の検証を行った。前出の方法を用いて各血清からエクソソームを回収し miRNA を抽出したのち、miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (EXIQON 製)を用いて Applied Biosystems

7300 real-time PCR system で血清中のエクソソーム内包 miRNA 量を相対定量し、枝肉形質との関連解析を行った。

次に、3 県 (G 県・M 県・T 県) 内の複数の特定農家で採材された黒毛和種肥育牛 (去勢) の血清とその出荷時枝肉形質情報を供試し、肥育期間中の肥育前期・肥育中期・肥育後期の計 9 区において、各肥育牛の血清サンプルより回収したエクソソーム中の miRNA を抽出した。その後、前出の工程においてと畜時血清におけるバイオマーカーとしての検証を行った血清エクソソーム miRNA を用い、それぞれの発現量を定量的 RT-PCR で求めた。その結果得られた各肥育牛の肥育期間中の各血清エクソソーム miRNA の発現プロファイル情報と出荷時枝肉形質情報 (枝肉重量・ロース芯面積・バラの厚さ・皮下脂肪の厚さ・BMS ナンバー) の相関性を多変量解析によって検討した。

4. 研究成果

miRNA マイクロアレイ (Affymetrix 社) による網羅的スクリーニング解析の再評価の結果、新たに 40 種類の血清エクソソーム miRNA をバイオマーカー候補としてリストアップした。このうち 24 種類の miRNA について新たな肥育牛集団で効果検証を行った結果、BMS ナンバー上位集団と下位集団との間で特定時期の血清中含有量に有意な差がある miRNA を 3 種類特定した。このうち 2 種類の miRNA はロース芯面積でも関連が確認された。次に国内 3 地域 (3 県) で肥育された牛の肥育時血清を用い、特定された 3 種類の miRNA について肥育期間を通じた効果の検証を行った。その結果、肥育前期の血清中含有量とと畜時の枝肉成績 (BMS ナンバー) と関連する傾向を示した miRNA が 1 種類存在した。また、2 種類の miRNA の血清中含有量は特定の肥育時期において明確な地域差を示し、1 種類の miRNA は肥育中期以降に比べて肥育前期に血清中含有量が高値を示した。次に個体差を考慮して新たなバイオマーカー候補 miRNA を同定するため、肥育牛集団から枝肉成績上位下位それぞれ 3 検体を抽出し miRNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、本研究で枝肉成績との関連が示された 2 種類の miRNA が再度検出され、一連の解析の信頼性の高さが示された。加えてバイオマーカー候補として新たに 18 種類の miRNA が同定された。以上のように、肥育期間中のと畜時枝肉成績の予測や、肥育牛の地域差の検出に有効な可能性がある miRNA が複数選出された。今後は新たな診断技術として現場へ普及するために、飼料や病歴などの環境要因との関係を調査し実証試験を進める必要がある。将来的には、複数のバイオマーカーを組み合わせ信頼性と安定性を確保し、血液や分泌液を用いた侵襲性の低い新たな診断技術 (リキッドバイオプシー) の確立につながると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

池上春香、松橋珠子、永井宏平、宮本圭、大林賢伍、坂口慎一、松本和也、黒毛和種去勢牛の脂肪交雑を生体評価するバイオマーカー候補タンパク質の血清プロテオーム解析による探索、関西畜産学会報、査読有、Vol.175、2018、pp.1-9

松橋珠子、着床期の胚子宮間相互作用に關与するマイクロ RNA、近畿大学先端技術総合研究所紀要、査読有、Vol.23、2018、pp.31-35

Morita K, Tokoro M, Hatanaka Y, Higuchi C, Ikegami H, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Taguchi Y, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Peroxiredoxin as a functional endogenous antioxidant enzyme in pronuclei of mouse zygotes. J Reprod Dev. 査読有, 2018, Vol.64(2), pp.161-171. DOI: 10.1262/jrd.2018-005

Higuchi C, Shimizu N, Shin SW, Morita K, Nagai K, Anzai M, Kato H, Mitani T, Yamagata K, Hosoi Y, Miyamoto K, Matsumoto K. Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. J Reprod Dev. 査読有, 2018, Vol. 27, No.64(1), PP.65-74. DOI: 10.1262/jrd.2017-127.

Hatanaka Y, Tsusaka T, Shimizu N, Morita K, Suzuki T, Machida S, Satoh M, Honda A, Hirose M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Inoue K, Hosoi Y, Dohmae N, Nakano T, Kurumizaka H, Matsumoto K, Shinkai Y, Ogura A. Histone H3 Methylated at Arginine 17 Is Essential for Reprogramming the Paternal Genome in Zygotes. Cell reports. 査読有, 2017, Vol.20(12), pp.2756-2765. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.088

Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, Tsujikawa T, Tsukaguchi T, Bradshaw CR, Jullien J, Yamagata K, Matsumoto K, Anzai M, Imai H, Gurdon JB, Yamada M. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. Biology open 査読有, 2017, Vol.6(4), pp. 415-424. DOI: 10.1242/bio.023473

Amano T, Anzai M, Matsumoto K. The Clock mutation reduces reproductive performance of mice by affecting the implantation

capacity: Maternal Clock mutation is not the only factor affecting implantation. Theriogenology 査読有,2016, Vol. 86(7) pp.1670-1684. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.027

〔学会発表〕(計 11 件)

越智浩介、池上春香、松橋珠子、大林賢伍、永井宏平、坂口慎一、松本和也。畜産領域へのリキッドバイオプシーの展開1：牛の血清中タンパク質の同時定量解析方法の確立。日本畜産学会第124回大会，東京大学，2018年3月27日～30日

松橋珠子、池上春香、越智浩介、大林賢伍、佐野文美、森隆史、本廣多胤、奥野智美、神谷拓磨、永井宏平、宮本圭、吉廣卓哉、坂口慎一、松本和也。畜産領域へのリキッドバイオプシーの展開2：牛の枝肉成績を肥育中に予測する血清バイオマーカータンパク質の探索。日本畜産学会第124回大会，東京大学，2018年3月27日～30日

牧野加奈子、池上春香、松橋珠子、永井宏平、松本和也。SWATH 質量分析法によるウシ血清タンパク質の網羅的な定量法の開発。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)，神戸ポートアイランド，2017年12月6日～9日

越智浩介、池上春香、松橋珠子、大林賢伍、神谷拓磨、奥野智美、永井宏平、宮本圭、坂口慎一、松本和也。黒毛和種牛の脂肪交雑のバイオマーカー候補タンパク質 HP25 の解析。第67回関西畜産学会大阪大会，大阪府立大学，2017年9月18日～19日

池上春香、越智浩介、松橋珠子、佐野文美、森隆史、奥野智美、神谷拓磨、大林賢伍、永井宏平、宮本圭、吉廣卓哉、坂口慎一、松本和也。質量分析 SWATH-MS 法を用いた黒毛和種去勢牛の血清中タンパク質網羅的解析。第67回関西畜産学会大阪大会，大阪府立大学，2017年9月18日～19日

松橋珠子、池上春香、米澤康滋、大林賢伍、越智浩介、奥野智美、神谷拓磨、宮本圭、坂口慎一、松本和也。黒毛和種における Annexin A5 遺伝子多型と繁殖成績との関連性の検討。第67回関西畜産学会大阪大会，大阪府立大学，2017年9月18日～19日

Hisami Sano, Takatoshi Fujiki, Takuya Yoshihiro, Haruka Ikegami, Tamako Matsuhashi, and Kazuya Matsumoto. Statistical prediction of wagyu beef quality with bayesian hierarchical modeling. International Workshop on Informatics (IWIN2017), Zagreb, Croatia, September 3-6,2017.

松橋珠子、小林栄治、池上春香、森本学、笹子奈々恵、松本和也。黒毛和種のプロテオーム解析から検出された AnnexinA5 遺伝子多型と経済形質との関連。日本畜産学会第122回大会，神戸大学，2017年3月26日～30日

池上春香、松橋珠子、森本学、永井宏平、山口壮輝、塚口智将、樋口智香、守田昂太郎、宮本圭、坂口慎一、松本和也。肥育期間中の黒毛和種牛の血清中バイオマーカー候補タンパク質の動態と出荷時の枝肉形質の相関性の検討。平成28年度(第66回)関西畜産学会香川大会，香川大学，2016年10月15日

松橋珠子、池上春香、森本学、永井宏平、山口壮輝、塚口智将、樋口智香、守田昂太郎、宮本圭、坂口慎一、松本和也。黒毛和種去勢牛の枝肉成績と関連する血清中バイオマーカー候補マイクロRNAの探索。平成28年度(第66回)関西畜産学会香川大会，香川大学，2016年10月15日

池上春香、松橋珠子、永井宏平、森本学、塚口智将、山口壮輝、樋口智香、守田昂太郎、坂口慎一、松本和也。肥育中の血清中タンパク質の変化量を用いた肉用牛の枝肉形質値予測の試み。日本プロテオーム学会2016年度大会，北里大学，2016年07月28日～29日

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本和也 (MATSUMOTO Kazuya)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20298938

(2)研究分担者

永井宏平 (NAGAI Kouhei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：70500578

松橋珠子 (MATSUHASHI Tamako)

近畿大学・先端技術総合研究所・講師

研究者番号：60504355

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者
なし