

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660215

研究課題名(和文) 黒毛和種肥育牛の肥育期間中に枝肉形質を推定する血中分泌型miRNAマーカーの探索

研究課題名(英文) An attempt to identify circulating exosomal miRNA biomarkers for assessment of carcass traits and meat quality characteristics of Japanese Black cattle

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) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥育期間中に枝肉形質を推定して肥育状況を予測診断するバイオマーカーとして、血清中のエクソソームに内包された分泌型miRNAマーカーを探索することを目的に、ウシ血清中のmiRNAの発現プロフィールと出荷時の枝肉形質との相関性を多変量解析によって検討し、後ろ向き評価を実施した。その結果、血清中の少なくとも8種類の分泌型miRNAが、黒毛和種肥育牛の肥育状況を生体診断するバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to identify circulating exosomal miRNA biomarkers for predicting carcass traits and meat quality characteristics of Japanese Black cattle by bioinformatics analysis, we first compared exosomal miRNA expression profiles of serum between low and high merit steers in main carcass traits. We then inferred the involvement of the lower- or higher-expressed exosomal miRNAs in metabolic pathways by computational searches of existing public databases (miRDB, and PANTHER). As a result, our study suggests the possibility of at least eight identified exosomal miRNAs as biomarker candidates for predicting carcass traits and meat quality characteristics during fattening of Japanese Black cattle.

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

肉用牛の優れた産肉成績を確保するために、肥育期間中に枝肉形質を推定し肥育状況を診断する研究が進められている。特に、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の物質により、生体内の生理的状态、疾患の病態変動などを定量的に評価するための指標)で診断することが可能となったならば、これを管理指標として肉用牛生産農家毎に適切な飼養管理指導ができるため、経営安定化に貢献すると期待される。現在、バイオマーカーとして唯一生産現場で使われている指標はBMSナンバーの向上を目的にした血中ビタミンA濃度であるが、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が明らかになっている(中西ら、日本畜産学会報 73:273-282[2002]。そのため、血中ビタミンA濃度以外の新たな肥育状況を予測診断する方法の確立が求められている。

これまで、我々は、黒毛和種肥育牛を対象に、その肥育期間中に枝肉形質を推定し、肥育状況を診断する管理指標となるバイオマーカーの開発を進めてきた。その研究成果として、黒毛和種肥育牛における大規模プロテオーム解析情報と枝肉形質情報を統合した情報管理システムを世界で初めて構築し(永井ら、日本畜産学会報 79:467[2008];池上ら、日本畜産学会報 83:281[2012])、この統合情報管理システムを運用して、肥育過程で優良な主要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)を予測診断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1件[特許第4722224号]・特許出願3件[特願2011-16289、特願2011-263214、特願2012-8036])。現在、遺伝的背景が異なると考えられる複数県の黒毛和種の集団を対象に、これらのバイオマーカータンパク質を使った肥育状況の予測診断方法の大規模な検証を実施している。

一方、ヒトにおいて、血清中 exosome (エクソソーム)の小胞に内包された分泌型 miRNA が、ガンの新たな診断バイオマーカーとなりうるということが明らかにされている(Gilad et al., PLoS One 3:e3148 [2008]、Chim et al., Clin. Chem. 54:482[2008])。具体的には、18~25ヌクレオチドの非翻訳RNA (non-coding RNA)である miRNA は標的遺伝子の発現抑制の機能を持つが、この miRNA が細胞からエクソソームの小胞に内包し分泌されることで血中の RNA 分解酵素から保護されることから、診断バイオマーカーのシーズとして血中の分泌型 miRNA が着目されている。さらに、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])が明らかになっている。

そこで、我々は、「ウシにおいて血中の分泌型 miRNA が肥育期間中の枝肉形質の推定するバイオマーカーとなりうる」との作業仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が既に同定している肥育期間中に枝肉形質を推定して肥育状況を予測診断するバイオマーカーとして、タンパク質マーカーに加えて miRNA マーカーを新しく探索することを目的に、肥育期間中のウシ血中 miRNA の発現プロファイルを解析し、既に申請者らが確立した「黒毛和種肥育牛における情報管理システム」にそれらの情報を搭載することで、血中の分泌型 miRNA が黒毛和種肥育牛の肥育状況を診断する管理指標となるバイオマーカーとしての可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

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、以下の実験1~3によりバイオマーカー候補としての分泌型 miRNA を同定した。

まず、実験1では、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、Exoquick Exosome Isolation kit (SBI製)を用いて、各血清からエクソソームを回収した。さらに、各血清エクソソーム画分にTRIzolを加え、全RNAを抽出したのちに、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多変量解析により、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。

次に、実験2では、発現量の高い上位50種類以上のバイオマーカー候補 miRNA に対し、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。

そして、実験3では、獲得したバイオマーカー候補 miRNA が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。

#### 4. 研究成果

マイクロアレイ解析結果から優良な枝肉形質に非常に高い相関性を持つ miRNA50 種類以上を第一候補として同定した。続いて、黒毛和種肥育牛(去勢)の個体群において、枝肉形質の上位群(平均+SD)と下位群(平均-SD)の選抜群で検討した結果、有意な発現量の差を示す 8 種類の血清エクソソーム miRNA を最終的なバイオマーカー候補として同定した。

さらに、miRNA の標的遺伝子群を予測した結果、枝肉形質に深く関与する代謝関連の遺伝子群の割合がとても高いことが明らかになり、8 種類の血清エクソソーム miRNA が肥育期間中に肥育牛の優良な枝肉形質を推定するバイオマーカー候補としての可能性が示唆された。これらの情報は、現在特許出願手続き中である。一報、全ての血清エクソソーム miRNA の標的遺伝子として共通する遺伝子も同定された。これらの結果から、標的遺伝子の既知の機能に基づく知見に基づく、標的遺伝子が優良な枝肉形質の獲得機構に深く関与している可能性も初めて示された。

今後、これらバイオマーカー広報分泌型 miRNA を使った黒毛和種肥育牛(去勢)の肥育期間中の出荷時枝肉形質の生体評価法を開発する。

#### 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 2 件)

池上 春香, 永井 宏平, 松橋 珠子, 小林直彦, 武本 淳史, 吉廣 卓哉, 井上 悦子, 樋口 智香, 守田 昂太郎, 内堀 翔, 天野 朋子, 田口 善智, 加藤 博己, 入谷 明, 松本 和也. 黒毛和種肥育牛の枝肉形質バイオマーカーの探索 III: 腎周囲白色脂肪組織プロテオーム解析結果に基づく肥育終了時の枝肉形質を推定するバイオマーカー候補タンパク質の同定. 日本畜産学会報 査読有 2015, 86 (2), 141-152. DOI: <http://doi.org/10.2508/chikusan.86.141>

Sugimoto H, Kida Y, Oh N, Kitada K, Matsumoto K, Saeki K, Taniguchi T, Hosoi Y. Production of somatic cell nuclear transfer embryos using in vitro-grown and in vitro-matured oocytes in rabbits. Zygote. 査読有 2015, 23(4),

494-500. DOI:

10.1017/S0967199414000082.

[学会発表](計 5 件)

池上春香, 松橋珠子, 永井宏平, 塚口智将, 内堀翔, 樋口智香, 守田昂太郎, 小林直彦, 松本和也. 黒毛和種牛の枝肉形質を生体評価するバイオマーカー候補タンパク質の解析. 日本畜産学会第 121 大会 日本獣医生命科学大学 2016 年 3 月 27 日~30 日

池上春香, 松橋珠子, 永井宏平, 塚口智将, 内堀翔, 樋口智香, 守田昂太郎, 小林直彦, 松本和也. 黒毛和種牛の枝肉形質を予測するバイオマーカー候補タンパク質の肥育期間中の動態. 日本畜産学会第 120 大会 酪農学園大学 2015 年 9 月 11 日~12 日

池上春香, 松橋珠子, 永井宏平, 塚口智将, 内堀翔, 樋口智香, 守田昂太郎, 小林直彦, 松本和也. 黒毛和種去勢牛の肥育期間における血清中バイオマーカー候補タンパク質量の動態. 第 65 回関西畜産学会大会 愛媛大学農学部 2015 年 9 月 3 日~4 日

池上春香, 丹羽尚人, 永井宏平, 塚口智将, 樋口智香, 守田昂太郎, 松橋珠子, 小林直彦, 松本和也. 黒毛和種牛の脂肪交雑度を予測する血清マイクロ RNA の探索. 日本畜産学会第 119 大会 宇都宮大学 2015 年 3 月 27 日~30 日

池上春香, 永井宏平, 武本淳史, 内堀翔, 樋口智香, 守田昂太郎, 塚口智将, 笹子奈々恵, 阿部剛, 小林栄治, 松本和也. ウシ僧房筋のプロテオーム解析により示された筋肉内脂肪の蓄積と酸化ストレスとの関連性. 第 64 回関西畜産学会大会 広島大学 2014 年 9 月 8 日~9 日

[図書]

なし

[その他]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

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・講師

研究者番号: 70500578

(3)連携協力者  
なし

(4)研究協力者  
なし