

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14849

研究課題名(和文) microRNAによる放牧牛の骨格筋特性の解明とマーカーの開発

研究課題名(英文) Roles of circulating microRNAs in skeletal muscle gene expression in grazing cattle

研究代表者

林 征幸 (Hayashi, Masayuki)

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 家畜代謝栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：80355106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAは22塩基長程度のRNAで、標的mRNAに作用してタンパク質の翻訳を調節する機能をもつ。microRNAは様々な組織に分布するが、血液など体液中では小胞エクソソーム中に含まれた状態で安定的に存在する。黒毛和種において、放牧した場合と濃厚飼料を多給した場合の血中microRNAの発現を比較したところ、miR-10b、miR-17-5p等の発現の異なるmicroRNAが同定できた。また、筋肉においても両者においてDNAJB2、PTEN等の上記のmicroRNAと関係があると考えられる遺伝子の発現量が異なっていた。飼養条件の違いがこれらの発現に影響を与えたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are around 22 nt-long small RNAs. MicroRNAs have roles on RNA degradation or inhibition of translation of the target genes. MicroRNAs are present in several solid tissues and body fluids, including blood in which they are packed in small extracellular vesicles, called exosomes. To explore miRNAs characterizing feeding condition, we compared blood microRNAs between pastured and concentrate-fed Japanese Black cattle. We consequently determined differently expressed microRNAs, including miR-10b and miR-17-5p, between the feeding conditions. Furthermore, gene expression including DNAJB2 and PTEN, potential targets of those miRNAs, were different between the feeding conditions. We conclude that difference in feeding condition between pasture and high concentrate feeding affected blood microRNAs and skeletal muscle gene expression in Japanese Black cattle.

研究分野：畜産

キーワード：黒毛和種 肉用牛 放牧 microRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (microRNA) は 22 塩基長程度の RNA で、標的 mRNA に作用してタンパク質の翻訳を調節する機能をもつ。ウシでも約 800 種類ほどの microRNA があり、細胞の増殖、分化等の幅広い生命現象に関わっている。microRNA は様々な組織に分布し、血液など体液中では、小胞エクソソームに含まれ、タンパク質との複合体として血液中に安定的に存在する。そのため、血中 microRNA は、関節リウマチにおける miR-146 等のように疾患により変動する分子種がマーカーとして注目されている。

肥育期の黒毛和種牛では、放牧の運動により骨格筋特性が変化する。一方、放牧を持続的運動と考え、最適な持続的運動は免疫能を高める効果があるので、放牧牛でも免疫能が高まる可能性がある。このように、適度な放牧は健康性や産肉性の面で潜在的付加価値があるため、放牧牛の生体情報把握とモニタリング指標の開発は有用であり、放牧を特徴づける因子を特定する必要がある。しかし、これまでに放牧を特徴づけるような明快な指標が得られていない。一方、家畜の血中 microRNA については未だ報告例がないが、我々は、血中エクソソーム性 microRNA プロファイルが、おもに運動による放牧の影響を受けて変化すると考えた。また同時に、血中 microRNA が骨格筋形成に影響し、肉質変化とも関連する可能性がある。しかし、家畜の放牧を特徴づける microRNA と、その血中・筋中の動態については全く解明されていない。

2. 研究の目的

放牧は肉用牛の骨格筋特性と肉質に影響を与える。本研究では、放牧中の黒毛和種牛における血中の分泌型マイクロ RNA (microRNA) と肉質との関係を解明する。そのため、放牧牛の血中および骨格筋組織で microRNA プロファイルの変動を網羅的に解析する。また、同時に解析する骨格筋組織の遺伝子発現や肉質特性から、microRNA の血中および骨格筋における意義、肉質特性との関係を明らかにし、放牧や赤身肉生産性を特徴づける血中 microRNA マーカーを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

本課題では、黒毛和種去勢牛を用い放牧が血中 microRNA と骨格筋組織の遺伝子発現に与える影響を解析する。18 ヶ月齢前後の去勢牛 8 頭を用い、放牧の有無で放牧区と舎飼区へと各 4 頭振り分け、5 ヶ月間飼養する。舎飼区では濃厚飼料を多給する。放牧区はイタリアンライグラス草地で放牧する。半腱様筋

のバイオプシーを 22 ヶ月齢時に行い、また採血を行う。血液より microRNA の含まれるエクソソーム画分を分離し、得られた microRNA を用いマイクロアレイ法により血液中 microRNA の網羅的解析を行うとともに、microRNA の標的と想定される遺伝子の機能解析を行う。マイクロアレイの結果を解析し放牧によって変動する microRNA をスクリーニングする。さらに、放牧が筋肉組織の筋特異的遺伝子発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法により解析する。これらの結果から、放牧が血中 microRNA の変動に及ぼす影響と、血中 microRNA と筋肉における遺伝子発現の関係を明らかにする。

4. 研究成果

血中エクソソーム由来 microRNA の発現量をマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、202 種の miRNA が検出された。発現量が多かった microRNA としては miR-2478 などがあり、発現量の上位 20 位までの発現量の合計が総 microRNA 発現量の 80% を占めていた。しかし、これらの高発現 microRNA の発現量には試験区間では差が見られなかった。試験区間で差の見られた microRNA としては、miR-652, miR-30d など 12 種類が放牧区よりも舎飼区において発現量が多く、miR-10b など 4 種類は逆に放牧区において発現量が多かった。

血中の microRNA 発現量を定量的 PCR により確認したところ、miR-10b の発現が放牧区で高かったのに対して、miR-17-5p, miR-19b, miR-29b, miR-30b-5p, miR-98, miR-142-5p, miR-301a, miR-374b, miR-425-5p および miR-652 の発現は放牧区の方で低かった (図 1)。これによりマイクロアレイ解析の結果を検証できた。

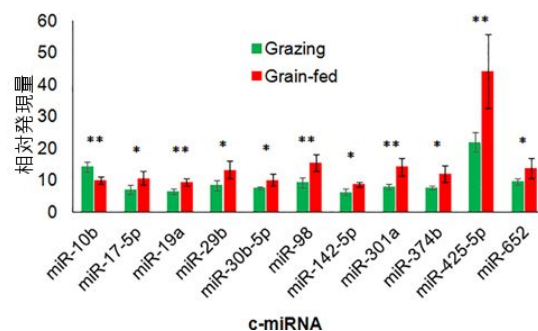


図 1. 放牧区および舎飼区の黒毛和種における循環血中エクソソーム画分の microRNA 発現量(定量的 PCR により相対定量)。Grazing が放牧区、Grain-fed が舎飼区を示す。**: $p > 0.01$, *: $p > 0.05$

機能解析の結果、これらの miRNA が発現調

節をすると考えられる遺伝子は、血管形成 (blood vessel morphogenesis)、細胞膜 (plasma membrane)、接着斑 (focal adhesion)、細胞外分泌 (endocytosis)、コラーゲン (collagen)、細胞外マトリクス-受容体相互作用 (ECM-receptor interaction)、リン酸化 (phosphorylation) 等の機能に関与しているものが多い事が明らかになった。

筋肉においても定量的 PCR で microRNA 発現量を測定したところ、放牧区の方が舎飼区よりも miR-10b の発現量が多かった。また、miR-374b, miR-652 およびにウシに特異的な microRNA である miR-2478 の発現量については、放牧区の方が舎飼区よりも多い傾向が見られた (図 2)。

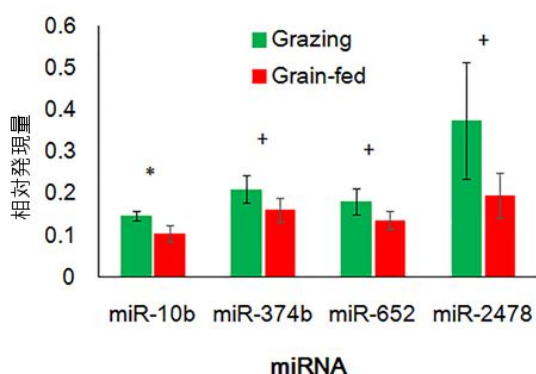


図 2. 放牧区および舎飼区の黒毛和種における最長筋の microRNA 発現量 (定量的 PCR により相対定量)。Grazing が放牧区、Grain-fed が舎飼区を示す。*: $p < 0.05$, +: $p < 0.10$

筋肉における遺伝子発現量を定量的 PCR により測定したところ、miR-10b や miR-2478 の標的であると予想されている遺伝子である DNAJB2, PTEN, SCD1 などの発現量が舎飼区よりも放牧区において少なかった (図 3)。

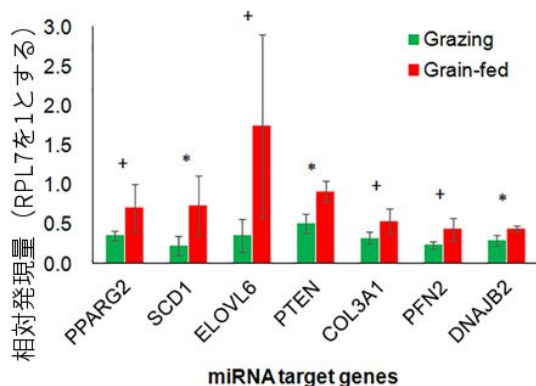


図 3. 放牧区および舎飼区の黒毛和種における最長筋の microRNA 標的遺伝子の発現量

(定量的 PCR により相対定量)。Grazing が放牧区、Grain-fed が舎飼区を示す。*: $p < 0.05$, +: $p < 0.10$

本研究の結果、放牧と濃厚飼料多給という飼養条件の違いが血中や筋肉の microRNA 発現量に影響を与え、また筋肉においてもそれらの microRNA の標的と考えられる遺伝子発現量にも影響を与える事が明らかになった。今回明らかになった血中 microRNA の発現量が放牧牛のマーカーとなる可能性がある。また、これらの microRNA は骨格筋において肉質に関連する遺伝子の発現量に影響を与えている可能性がある。

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 1 件)

1. Susumu Muroya, Masahiro Shibata, Masayuki Hayashi, Mika Oe, Koichi Ojima. 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, 査読あり、11(9), 2016, e0162496. doi:10.1371/journal.pone.0162496

[学会発表](計 1 件)

1. 室谷進、林征幸、尾島孝一、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 年 3 月 29 日、神戸大学鶴甲第 1 キャンパス (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 征幸 (HAYASHI, Masayuki) 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 家畜代謝栄養研究領域・主任研究員

研究者番号: 80355106

(2) 研究分担者

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 畜産物研究領域・ユニット長

研究者番号: 50355062

柴田 昌宏 (SHIBATA, Masahiro) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

構・西日本農業研究センター 畜産草地・鳥
獣害研究領域・上級研究員

研究者番号： 60370631