

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580326

研究課題名（和文） 機能性小分子RNAの網羅的解析による筋線維型調節機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptomic profiling of skeletal muscle microRNA involved in muscle fiber type specification

研究代表者

室谷 進 (MUROYA SUSUMU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所畜産物研究領域 上席研究員

研究者番号：50355062

研究成果の概要（和文）：骨格筋部位間に特性の違いをもたらすマイクロRNA（miRNA）の網羅的発現解析を実施したところ、計192の既知miRNAと計20の新規ウシmiRNA候補配列が得られた。このうち、半腱様筋と咬筋で比較すると、2倍以上の発現差がある分子種が62%を占めた。miR-196a, -196b, -885が半腱様筋特異的に発現することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate roles of miRNA in bovine muscle type specification and maintenance, we sought to determine differentially expressed miRNA between semitendinosus (STD) and masseter (MS) muscles from 3 Japanese black cattle by massively parallel sequencing. Differential gene expression of myosin heavy chain (MyHC) isoforms confirmed that STD and MS were MyHC-2x- and MyHC-1-abundant muscles, respectively. In total, 192 known miRNA and 20 potential new bovine miRNA were obtained from the sequencing. The differentially expressed miRNA with more than 2-fold difference in each muscle were identified. In particular, miR-196a and miR-885 were exclusively expressed in STD muscle, which was validated by quantitative reverse transcription-PCR ($P=0.045$ and $P<0.001$, respectively), whereas a slow type-directing miR-208b was highly expressed in MS compared with STD (false discovery rate <0.05). In addition, 16 potential novel miRNA were mapped and confirmed for their precursor structures by computational analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学／応用動物科学

キーワード：ウシ、筋線維型、骨格筋、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、新しい遺伝子発現調節機能をもった21-23塩基長の小分子RNA（マイクロRNA、

miRNA）が注目を集め、急速にその重要性を増している。miRNAはそれぞれ固有遺伝子から転写されプロセッシングをうけて成熟

型になり、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ことがわかってきた。現在までにおよそ 800 種類ほどの miRNA が報告されており、細胞の増殖、発生、アポトーシス、分化等の幅広い生命現象に関わることが明らかにされつつある。なかには細胞種または組織特異的に発現するものも存在し、その特異的発現機構や標的 RNA への作用が注目されている。

動物の骨格筋においては、発生源の筋芽細胞が増殖、分化の後に筋管細胞から筋線維へと成熟するプロセスで miRNA が関与する可能性が非常に高い。筋細胞の分化・成熟過程ではダイナミックな細胞形態の変化に応じ、多くの細胞内タンパク質の発現様式の切り換えが起こる。その端的な例が、骨格筋部位または運動状況に応じた収縮および代謝系タンパク質の再構築であり、たとえば骨格筋の特性（筋型または筋線維型）が遅筋型からトレーニングなどで瞬発力を要する速筋型へ移行するときに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って発現する。このときに見られるタンパク質アイソフォームの置き換えは mRNA の選択的スプライシング等を介して行われるが、2007 年に miRNA-133 が筋細胞分化でスプライシング因子 nPTB の発現を調節することが報告され、間接的でも選択スプライシング調節に関わる代表例として注目されている。

筋線維型転換時にも未知の miRNA がタンパク質構成を変えるべく機能することが予想される。骨格筋は筋型または筋線維型（速筋および遅筋型）によってタンパク質構成が異なり、そうした骨格筋は互いに肉質（やわらかさ、色調、多汁性等）が有意に異なることが知られている。したがって筋線維型制御は肉質を高める上で重要で、未知の miRNA 機能が果たす役割は大きいと予想される。また、筋線維型によって筋線維径が異なるため、筋線維型調節で家畜の骨格筋成長（肉量）をも増加させることが可能である。しかし現在までに筋線維型制御については、速筋→遅筋の移行に PGC-1 α や calcineurin などの関与が知られている程度で、メカニズムの解明が進んでおらず、miRNA の関与はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本提案課題では、骨格筋特性を調節する新規の機能性小分子 RNA (miRNA) を骨格筋 miRNA の網羅的発現解析で同定する。また、バイオインフォマティクスを用いることで目的 miRNA の機能解析を行って標的因子を明らかにし、筋線維型の違いに伴う遺伝子発現を明らかにする。肉質や肉量を変える可能性を miRNA の新規な遺伝子発現調節機能に求め、質的量的食肉生産の向上のための有効

指標の発見をめざす。

3. 研究の方法

(1) 「速筋および遅筋に発現する miRNA の網羅的発現比較、筋線維型制御 miRNA およびその標的遺伝子の予測」

対象試料として屠殺直後の 28 ヶ月齢黒毛和種去勢牛から遅筋として咬筋を、速筋として半腱様筋を採材した。各筋より抽出した全 RNA から miRNA を調製した。この小分子 RNA 試料を miRNA の配列および発現解析に用いるとともに、両骨格筋 RNA 試料についてはミオシン重鎖アイソフォーム型等の特異的マーカーによる特徴づけを行った。

特徴づけされた試料中の小分子 RNA を次世代型超高速 DNA シーケンサーにより網羅的に配列決定し、配列と発現に関する情報からなる大量の基礎データを取得した。基礎的なデータのフィルタリング処理により、rRNA や tRNA の配列情報を除去した。miRNA のデータベース (miRBase) を参照に用い、得られた miRNA 候補配列を既知と未知の 2 種に分けた。未知の配列については、ウシゲノム上でマップされた場合に pre-miRNA が生成しうるか否かを確認し、一定の条件を満たした場合に新規 miRNA 候補とした。また、既知配列については長さの違う類似配列等を調べ、個々の miRNA について最頻配列を抽出した。

(2) 追加として 2 頭の黒毛和種牛 (28 ヶ月齢) についてシーケンシングを初回同様に実施し、最終的にウシ 3 頭分の 2 筋肉に対して既知と未知の最頻配列情報を得た。

2 筋肉 (n=3) から得られた多数のマイクロ RNA (miRNA) について、各骨格筋特異的な miRNA 群の高精度な比較を行うため、false discovery rate (FDR) を基準とする順位検定を検討した。また、骨格筋間で発現差異が有意に大きい miRNA を複数特定した後、これを用いて各骨格筋特異的な標的遺伝子を解析プログラム TargetScan により効率よく予測した。さらにその結果を遺伝子オントロジー (GO) 解析等のバイオインフォマティクスで解析し、各骨格筋における miRNA とその標的遺伝子が関与する分子生物学的現象を予測した。

(3) シーケンシングにより得られた結果を確認するため、2 筋肉でリード数の異なった miRNA を選択し、それぞれの miRNA に特異的な逆転写反応の後、TaqMan プローブを用いた PCR によって定量的に発現量を測定した。また、半腱様筋と咬筋に加えて横隔膜、半膜様筋、胸最長筋についても miRNA の定量的 PCR による発現量解析を行い、miRNA の筋部位間差について調べた。

4. 研究成果

最終的に 192 種の既知 miRNA と 20 種の新

規 miRNA 候補を検出した。さらに統計的解析によって各 miRNA の筋部位間で網羅的に有意差検定を行った結果、半腱様筋および咬筋それぞれに有意に高く発現する miRNA 群を検出し、各筋部位を特徴づける miRNA 群 を把握することができた。

各骨格筋特異的な miRNA 群について、false discovery rate (FDR) を基準とする順位検定法を適用し筋肉間で miRNA のリード数を比較した。その結果、次世代シーケンサーに適した統計解析プログラム DEseq により多重検定による擬陽性データを考慮したデータを高検出力で得た。これにより各骨格筋に発現する特異的 miRNA のプロファイリングを行うことができた (表 1)。

表 1. ウシ筋肉 2 部位 (半腱様筋と咬筋) に発現するマイクロ RNA (FDR 値 < 0.01 に限定)

MicroRNA	平均リード数 (n=3)		FDR 値
	半腱様筋	咬筋	
miR-196a	1,353	0	2.52E-21
miR-885	536	0	1.47E-15
miR-196b	399	1	1.35E-13
miR-185	69	694	5.14E-06
miR-486	16,258	2,688	1.31E-05
miR-10b	49,348	10,480	7.51E-05
miR-365-3p	13,252	3,065	0.0010
miR-155	39	194	0.0022
miR-193b	13,574	3,513	0.0027
miR-504	317	48	0.0048

このうち、半腱様筋で咬筋に対して 2 倍以上発現しているものが 30%、咬筋で半腱様筋に対して 2 倍以上発現しているものが 32% であった。特に miR-196a、-196b、-885 は半腱様筋特異的に発現しており、咬筋では発現していなかった。バイオインフォマティクスによる miRNA ターゲット遺伝子解析の結果、miR-196a/b が遅筋型に多いコラーゲン関連遺伝子等を標的とすることが予測された。また、筋部位間での有意差があった miRNA 群を用い、ターゲット遺伝子の GO 解析を行った結果、半腱様筋に富む miRNA の標的遺伝子が胚時期の体構築に、一方で咬筋に富む miRNA の標的遺伝子が組織・器官の分化や再組織化などの形態形成に関与することを示した (表 2)。骨格筋型間で異なるこれら miRNA の発現が、各骨格筋特異的な組織の形成や維持に関与すると考えられた。

表 2. 予測された miR-196a/b および miR-885 の標的遺伝子群と、標的遺伝子群から得られた GO ターム

MicroRNA	予測された標的遺伝子群	標的遺伝子群から得られた GO ターム
miR-196a/b	<i>SCHIP1, HOXB7, HOXA5, COLIA2, PDGFRA, HOXA9, IGF1, COLIA1, BMPR1B, SERP1</i>	GO:0001501~skeletal system development
	<i>SCHIP1, HOXB7, HOXA5, PDGFRA, COLIA1, BMPR1B</i>	GO:0048705~skeletal system morphogenesis
	<i>COL3A1, COLIA2, COLIA1, COL24A1</i>	GO:0005581~collagen
miR-885	<i>HMGB1, BMP3, MTDH, RBBP4, LMO4, GDF6, RFX7, FZD1, NFIX, CTCF, NFYA, RORA, FOXP1, CTNBN1, UBE2N, NCOA3, TFEC, POU2F1, DNMT3B, NFIB</i>	GO:0045449~regulation of transcription
	<i>HMGB1, MTDH, FZD1, CTCF, DNMT3B, FOXP1, CTNBN1</i>	GO:0016481~negative regulation of transcription

今後、骨格筋におけるこれら miRNA の発現動態や機能についてさらに研究を進める必要があり、その計画について検討中であり、一部については培養細胞系を用いて実施中である。このウシ骨格筋 2 部位の miRNA プロファイルは、今後ウシの飼養条件のモニタリングマーカーや育種選抜指標の開発基盤となるほか、遺伝子制御による肉量・肉質改善技術の開発につながるものと考えられる。

ウシ半腱様筋 (速筋) と咬筋 (遅筋) の間で発現レベルが有意に異なる計 38 種の miRNA のうち、miR-1、miR-185、miR-196a、miR-885 の発現を定量的 RT-PCR で調べた結果、miR-185 は咬筋で半腱様筋より高く、ほか 3 種は半腱様筋で高かった。この結果は次世代 DNA シーケンサーにより得られた結果と一致した (図 1)。

さらに、ホルスタイン種雌牛より採材した咬筋、横隔膜、半膜様筋、胸最長筋、半腱様筋の 5 筋肉において miR-196a について定量的 RT-PCR で解析すると、miR-196a の発現が半腱様筋と胸最長筋で特に高い結果となった。これに対し、miR-885 の発現について同様に調べた結果、咬筋で最低値、半腱様筋で最高値を示し、他 3 種の筋で中程度の発現が認められたものの、部位間差は有意ではなかった。これらの結果は筋部位間差異が miR-885 より miR-196a と密接に関連すること

を示唆すると考えられた。また、miR-196a の標的として予測された I 型および III 型コラーゲン各 α 鎖 mRNA の発現は咬筋より半腱様筋で低い値を示し、miR-196a による両コラーゲン mRNA の発現が制御される可能性を示唆した。

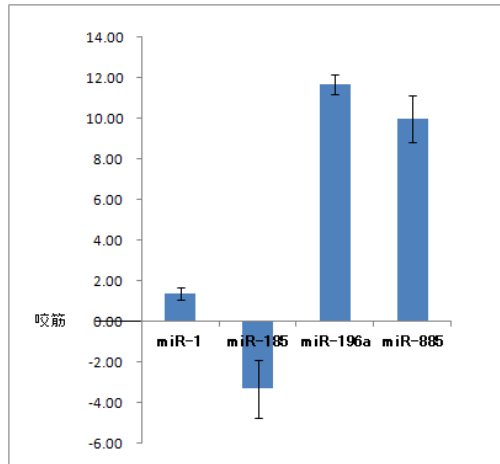


図 1. 半腱様筋における miRNA の発現相対値 (咬筋=0 とした)。

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. Muroya S, Taniguchi M, Shibata M, Oe M, Ojima K, Nakajima I, Chikuni K (2013). Profiling of differentially expressed microRNA and the bioinformatic target gene analyses in bovine fast- and slow-type muscles by massively parallel sequencing. J Anim Sci. (査読有) 91(1):90-103. doi: 10.2527/jas.2012-5371.

[学会発表] (計 1 件)

1. 室谷進, 谷口雅章(生物研), 柴田昌宏, 大江美香, 尾嶋孝一, 中島郁世, 千國幸一. 次世代シーケンサーによるウシ骨格筋 microRNA の網羅的発現解析. 日本畜産学会第 116 回大会, 2013. 03. 31, 広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室谷 進 (MUROYA SUSUMU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所畜産物研究領域 上席研究員

研究者番号：50355062