

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660220

研究課題名(和文)牛乳中microRNAの新規な食品機能性の探索

研究課題名(英文)Function of microRNAs in bovine milk

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 畜産物研究領域・上級研究員

研究者番号：50355062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ乳腺上皮細胞株(BMEC)培養系において、細胞の分化誘導後に培地に分泌されるmicroRNAを回収し、定量的PCRにより発現を解析したところ、分化誘導した細胞の培地ではmiR-339aが、細胞内ではmiR-21-5p、miR-26a、miR-320aの発現が未分化細胞に比べて有意に低かった。また、分化した細胞ではmiR-148aの発現が未分化細胞に比べて有意に高かった。分化細胞で発現が低下した3種のmicroRNAについて、予測した標的遺伝子群が関与する細胞生物学的現象について遺伝子オントロジー解析を行った結果、変動したmicroRNAが乳汁産生や乳腺形成に深く関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among major microRNAs (miRNAs) in a Holstein cow milk, expression of 18 miRNAs were analyzed in the bovine mammary epithelial cell (BMEC) culture that was treated with or without dexamethasone, insulin, and prolactin (DIP) to induce a lactogenic differentiation. Quantitative PCR results showed that the expression of miR-21-5p, miR-26a, and miR-320a was lower in the DIP-treated cells than in the untreated cells. In contrast, the expression of miR-339a in the cell culture medium were lower in the DIP-treated culture than in the untreated culture. Intriguingly, the miR-148a expression in cell culture medium was elevated by DIP treatment of BMEC culture. The medium-to-cell expression ratios of miR-103, miR-148a, and miR-223 were elevated in the DIP-treated BMECs. A bioinformatic analysis showed that the miRNAs down-regulated in the BMECs were associated with the suppression of genes related to transcriptional regulation, protein phosphorylation, and tube development.

研究分野：畜産、筋肉分子細胞生物

キーワード：マイクロRNA ウシ 牛乳 分泌

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の乳腺の発生過程では、組織が乳汁を分泌するのに適した機能と形態を獲得していく。とくに妊娠期の乳腺組織の機能的分化には、乳腺上皮細胞がプロラクチン等のホルモンの影響を受けて分化することが妊娠期の乳腺組織の機能的分化に重要である。これにより乳腺組織は乳タンパク質や脂質等、各種成分を分泌するようになる。

近年、哺乳類各種の乳中に含まれる直径 30 - 100nm ほどの小胞エクソソームに microRNA (miRNA) が含まれることが報告された。miRNA は種間で比較的良好に保存された塩基長 22bp ほどの小さなノンコーディング RNA であり、転写後の標的 mRNA の分解や不安定化をもたらすことで、さまざまな細胞生物学的現象の制御に関与することが明らかにされつつある。miRNA の標的となる mRNA は、miRNA の種によってある特定の細胞生物学的現象に関わることが少なくなく、たとえば miR-146、miR-181、miR-223 等は免疫細胞の分化や機能に関わる。乳中エクソソームに含まれる miRNA の実際の役割については現在もほとんど明らかにされていないが、乳中には免疫に関与するといわれる miR-223 等が多く含まれる。また、多くの文献で乳中含量が上位に位置するとされる牛乳中 miR-200c が、生物学的に有意義な量での経口摂取でヒトの血漿に吸収されるとした報告もあり、畜産学的には乳中 miRNA がヒトの食品としてのみならず、母牛由来の機能的因子として子牛に影響を与える可能性がある。実際、乳中の miRNA は酸や RNase に耐性があることから、消化管で吸収される割合が少なくないと考えられる。

このような個体を越えた受け手とのにおける乳中 miRNA の機能が示唆される一方、乳腺上皮細胞の分化を含む組織の構築において miRNA がどのような役割を果たすか、また乳中への分泌機構等は全く解明されていない。出産後の初乳では、感染防御因子であるラクトフェリンや IgA 同様、乳中 miRNA の濃度が高いことがウシをはじめとする家畜で知られている。しかし、その後常乳(成熟乳)でなぜ濃度が低下するかについては不明である。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、miRNA のどの分子種が乳腺細胞分化に伴ってどのように生成するのか、またその miRNA がどのような役割を担うかについて解明することを目的とした。このために、ホルスタイン種牛乳に多く含まれる miRNA について、ウシ乳腺上皮細胞株 (BMEC) が生成、分泌する miRNA の発現等を解析した。

3. 研究の方法

(1) 牛乳中 miRNA のプロファイルの解析

農研機構畜産草地研究所内で収集されたホルスタイン種牛 5 個体分の乳(いずれも常乳、体細胞数 100,000 未満)を混合し、脱脂した後に乳清を調製し、一度 -80 で保存した。その一部から市販のエクソソーム単離キットを用い、乳中エクソソームを抽出した。このサンプルから total RNA を mirVana miRNA isolation kit (Life Technology 社) により調製しマイクロアレイ用サンプルとした。

(2) BMEC の培養とサンプル収集

DMEM 培地に市販のエクソソームフリーの血清を 20% の濃度で加え、BMEC をコンフルエントになるまで 7 日間培養した。さらに 6 日間、分化誘導の有無に分けて細胞を培養した。分化誘導区ではホルモン(デキサメタゾン、インスリン、プロラクチン各 10 µg/ml) を加え、1 日おきに培地を交換しながら培養した。分化誘導後 6 日目に培地を集め、そこに含まれるエクソソームを市販キットで調製した。細胞については PBS で洗浄後、RNA protect Cell Reagent (Qiagen 社) を用いて細胞由来の RNA を回収した。分化マーカーとして GAPDH、β-カゼイン、κ-カゼインの発現を指標とした。

(3) マイクロアレイ解析

バイオラッド Experion により RNA サンプルに miRNA 画分が含まれることを確認した後、Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array を用い、GeneChip Scanner 3000 7G によりデータを取り込んだ後に解析した。

(4) 培養細胞サンプルの RNA 調製と cDNA 合成

培地上清エクソソーム画分、細胞ともに、miRNA サンプルについては、mirVana miRNA isolation kit (Life Technology 社) を用いて miRNA を含む total RNA を抽出し、Qiagen 社の miScript 系の一連の試薬を用いて cDNA を合成した。細胞については、mRNA 発現解析のためにプレートで可溶化したサンプルから cDNA を合成した。

(5) 定量的 PCR (qPCR) による発現解析

得られた培地上清および細胞中の miRNA については、それぞれ Cel-miR-39 (RNA 調製時に添加) および RNU6-6P を標準として qPCR により発現を解析した。細胞については、その GAPDH、β-カゼイン、κ-カゼインの mRNA 発現を解析した。

(6) miRNA 標的遺伝子の遺伝子オンロジー解析

qPCR により BMEC 細胞の分化による発現

量差が有意であった miRNA については、さらに miRNA の標的遺伝子を TargetScan で解析し、得られた遺伝子群について遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ホルスタイン種牛乳に含まれるエクソソーム性 miRNA のプロファイル
ホルスタイン種牛 5 個体の常乳より検出されたエクソソーム性 miRNA は計 257 種であった。(図 1)。得られた miRNA プロファイルを見ると、多いものから順に、let-7b、miR-200c、miR-26a、let-7c、let-7a-5p、miR-30a-5p、miR-320a、miR-103、miR-107、let-7d、miR-23-3p、miR-191、miR-23a 等で構成されていた。

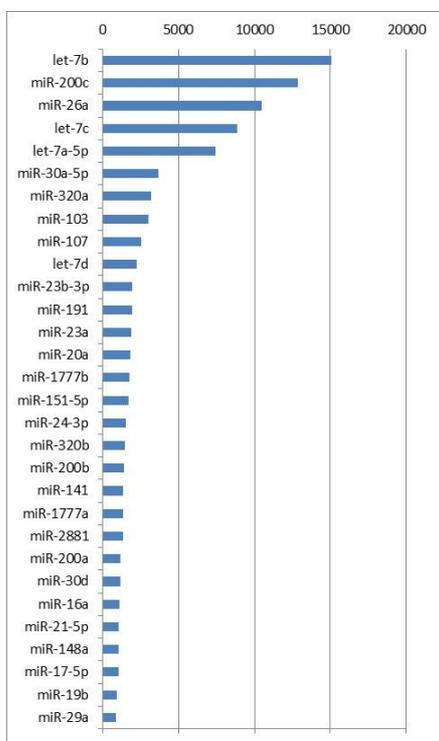


図 1 .ホルスタイン種牛乳のエクソソーム性 miRNA の構成 (一部)。

(2) BMEC 細胞の分化による miRNA の発現変動

今回の牛乳 miRNA プロファイルで量的に多いものだけでなく過去の知見から多いと報告されている分子種を中心に計 18 種の miRNA に注目した。BMEC をホルモン処理により分化誘導した際、分化マーカーである GAPDH、β-カゼイン、κ-カゼインの発現は分化誘導しない細胞に比べ有意に高く、細胞が分化したことを確認した。このとき miRNA の発現を分化誘導の有無で比較すると、細胞内では miR-21-5p、miR-26a、miR-320a の発現が分化誘導により有意に低下していた (図 2)。一方、培地上清に含まれる miRNA では、miR-148a の発現が有意に上昇し、miR-339a

の発現が有意に低下していた (図 3)。

また、培地上清 miRNA / 細胞内 miRNA の比でみると、miR-103、miR-148a、miR-223 の比が有意に分化誘導時で高く、細胞分化によりこれらの miRNA の分泌が促進されたことを示していた。一方 miR-182 および miR-339 は培地上清 miRNA / 細胞内 miRNA の比が分化誘導時で低下しており、分泌が抑制されたことを示していた。

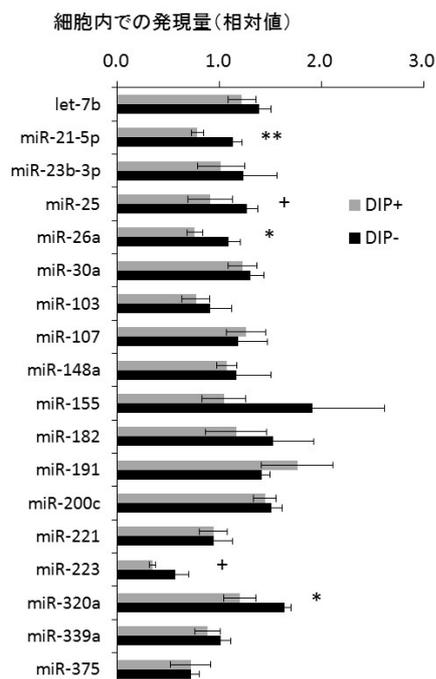


図 2 . BMEC 細胞の分化誘導の有 (DIP+) 無 (DIP-) による細胞内 miRNA の発現の違い。

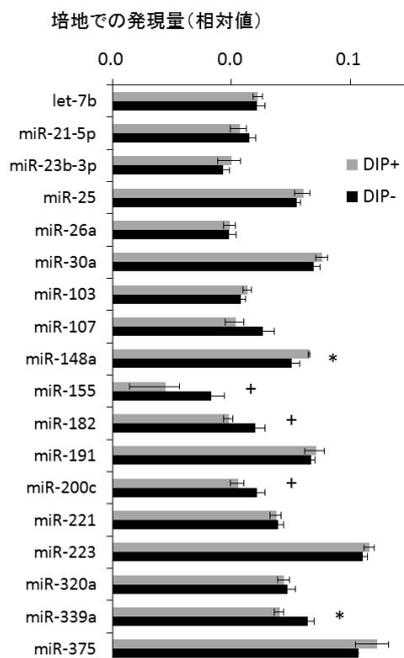


図 3 . BMEC 細胞の分化誘導の有 (DIP+) 無

(DIP-)による培地上清の miRNA 発現の違い。

(3) BMEC 細胞の分化で変動した miRNA の標的遺伝子に関する GO 解析
細胞内で分化誘導時に発現が低下した miR-21-5p、miR-26a、miR-320a の標的遺伝子群を用いて GO 解析した結果、おもにタンパク質リン酸化、リン酸代謝、胚の形態形成等が特徴的な用語として有意に抽出された。BMEC 細胞の分化時にこれらの細胞生物学的現象が miR-21-5p、miR-26a、miR-320a の発現低下で活性化することが示唆された。一方、miR-148a、また miR-103 と miR-223 を加えた場合の標的遺伝子群からは、おもに遺伝子発現や転写の調節、血管の発生、リン酸化といった用語が抽出され、BMEC が分化時に分泌した miR-148a、miR-103、miR-223 を別の細胞が取り込んだ場合に、上記のような現象に影響を及ぼす可能性が考えられた。

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)

Susumu Muroya, Tatsuro Hagi, Ataru Kimura, Hisashi Aso, Masatoshi Matsuzaki and Masaru Nomura. Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture. Journal of Animal Science and Biotechnology 2016, 7:8
DOI: 10.1186/s40104-016-0068-x

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室谷進 (MUROYA, Susumu)

国立研究開発法人農業・食品産業総合技術
研究機構・畜産研究部門・畜産物研究領域・
上級研究員

研究者番号：50355062

(2) 研究分担者

萩達朗 (HAGI, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業総合技術
研究機構・畜産研究部門・畜産物研究領域・
主任研究員

研究者番号：00510257