

【成果情報名】 ウシ半腱様筋および咬筋の microRNA 発現プロファイル

【要 約】 ウシ半腱様筋（そとももの一部）および咬筋（ほほにく）では、牛肉質に影響する遺伝子発現調節因子 microRNA の発現プロファイルが異なる。両筋で計 192 種の microRNA が発現し、このうち miR-196a/b および miR-885 は半腱様筋でのみ発現する。

【キーワード】 ウシ、骨格筋、次世代シーケンサー、microRNA、網羅的解析

【担 当】 加工流通プロセス・品質評価保持向上

【代表連絡先】 電話 029-838-8611

【研 究 所】 畜産草地研究所・畜産物研究領域

【分 類】 研究成果情報

【背景・ねらい】

microRNA は長さ 22 塩基長程度（成熟型）の翻訳調節機能をもつ RNA であり、ウシでは現在 783 種の成熟型がデータベースに登録されている。microRNA の成熟型はタンパク質との複合体を形成し、標的 mRNA が分解や翻訳阻害される際に mRNA の配列を認識する役割を果たす。近年、骨格筋の発生を調節する microRNA が報告されている。

骨格筋は収縮に必要な ATP の生産を解糖系に依存する速筋型と、ミトコンドリア内酸化的リン酸化に依存する遅筋型の 2 種に大別される。ウシでは速筋型の半腱様筋と遅筋型の咬筋の間でタンパク質や代謝物質等の構成が異なり、このことが保水性等の肉質に部位間差をもたらしている。骨格筋構成成分の含有量は遺伝子発現の変化によって大きく変動するため、microRNA の発現が食肉構成成分の変動に影響すると考えられる。そこで本研究では、肉質の異なる両筋間で microRNA の網羅的発現解析を行い、発現プロファイルの違いを明らかにする。

【成果の内容・特徴】

1. 骨格筋に発現する microRNA の配列は、黒毛和種牛（去勢、28 ヶ月齢）3 頭の骨格筋試料（半腱様筋（そとももの一部）および咬筋（ほほにく））から市販キットにより調製した small RNA を含む total RNA を試料とし、次世代 DNA シーケンサー（Illumina Genome Analyzer II）により網羅的に決定、カウントされたものである。
2. 骨格筋 microRNA 発現プロファイルは、網羅的に決定された配列データから、以下の条件で得られたものである。すなわち、（1）18-45 塩基長の配列のみについて、microRNA 以外の配列情報を除去した後に microRNA のデータベース miRBase (<http://www.mirbase.org/>) で既知配列との照合を行う。（2）各 microRNA について、それぞれの最頻配列を決定する。（3）配列毎のカウント数を発現量とした定量結果を試料間で 75 パーセントイルにより正規化する。
3. ウシ骨格筋には計 192 種の既知 microRNA のほか、新規候補 microRNA が存在する。
4. 網羅的発現解析用の統計的有意差検定プログラム DESeq による網羅的定量比較の結果によれば、各筋で有意に高く発現する microRNA が計 10 種存在する（擬陽性確率 < 0.05、表 1）。
5. miR-196a/b および miR-885 は半腱様筋に特異的に発現する（表 1）。網羅的定量比較の結果は、定量的 PCR で得られる代表的な microRNA の発現傾向と一致し、今回の microRNA 発現プロファイルとその比較方法が妥当であるといえる（図 1）。

【成果の活用面・留意点】

1. 得られた microRNA プロファイルは、牛肉の部位を特徴づけるマーカー開発や、品質差を解明する研究基盤として活用可能。
2. 次世代 DNA シーケンサーによるカウント数を発現定量に用いる際は、データの信頼性確保のため、少なくとも全解析検体のうち 3 試料でカウント数 5 以上の配列のみを対象とするなど、一定の基準を設ける必要がある。

[具体的データ]

表1. ウシ骨格筋2部位(半腱様筋と咬筋)に発現するmicroRNA
 青字は半腱様筋に多い種、赤字は咬筋に多い種

MicroRNA	平均リード数 (n=3)		擬陽性確率
	半腱様筋 (そとももの一部)	咬筋 (ほほにく)	
bta-miR-196a	1,353	0	2.52E-21
bta-miR-885	536	0	1.47E-15
bta-miR-196b	399	1	1.35E-13
bta-miR-185	69	694	5.14E-06
bta-miR-486	16,258	2,688	1.31E-05
bta-miR-10b	49,348	10,480	7.51E-05
bta-miR-365-3p	13,252	3,065	0.0010
bta-miR-155	39	194	0.0022
bta-miR-193b	13,574	3,513	0.0027
bta-miR-504	317	48	0.0048
bta-miR-1	1,918,437	602,618	0.0577

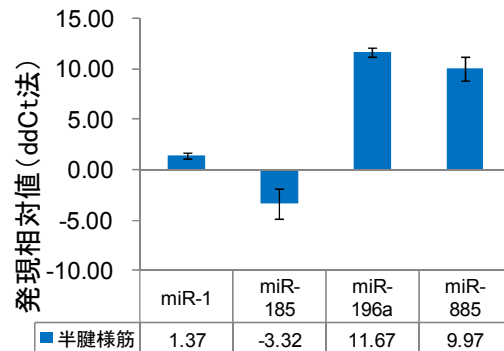
半腱様筋に
限定的

計192種の既知配列
と計20種の新規候
補配列が得られた。

bta-はウシの microRNA であることを表す。参考までに骨格筋特異的な miR-1 も記載。

図1. 定量的PCRによる、半腱様筋におけるmicroRNAの発現相対値(ddCt法で咬筋=0とした)

相対的発現傾向は、次世代シーケンサーでカウントされたリード数の結果(表1)と合致した。miR-1は筋肉形成に重要で発現量の多いmicroRNA。



(室谷進)

[その他]

中 課 題 名 : 農畜産物の品質評価・保持・向上技術の開発

中課題番号 : 330a0

予 算 区 分 : 科研費、交付金

研 究 期 間 : 2010~2013 年度

研究担当者 : 室谷進、谷口雅章、柴田昌宏、大江美香、尾嶋孝一、中島郁世、千国幸一

発表論文等 : Muroya S, et al. (2013). J Anim Sci. 91(1):90-103