

# ウシ子宮内エクソソーム中の機能的 miRNA の同定

九州大学大学院農学研究院動物繁殖生理学分野・准教授 山内 伸彦

## ■ 目的

本研究の目的は、発情周期と妊娠の異なる時期におけるウシの子宮 EVs 中の miRNA を同定することである。まず、卵胞期、黄体期、妊娠 8 日目の miRNA を網羅的に解析し、時期特異的に発現が異なる miRNA を同定した。さらに、それぞれの時期で発現量の異なる差異 miRNA の標的遺伝子を推定し、バイオインフォマティクス解析によりその特異的機能を明らかにした。

## ■ 方 法

卵胞期、黄体期および妊娠 8 日目のウシ子宮を PBS で灌流し、分析用の子宮灌流液とした。それぞれの灌流液から EVs を回収し、内包される miRNA を miRNA シークエンス解析(ダナフォーム社)にて網羅的に解析した。バイオインフォマティクス解析では、TargetScan により標的遺伝子を解析し、その情報をもとに DAVID を用いて KEGG pathway 解析を行った。

子宮 EVs 中の miRNA の内部標準遺伝子の同定には、let-7d、miR-98、miR-125b、miR-200c、miR-223、miR-224、U6 を最終的な候補として解析した。内部標準 miRNA 候補の発現レベルとばらつきを解析するため、卵胞期(n=5)、黄体期(n=5)、妊娠期(n=5)の子宮 EV を用いて qPCR による Ct 値を得た。qPCR の内部コントロールは、3 つの遺伝子発現安定性評価ツール(NormFinder、geNorm、BestKeeper)を用いて解析を行った。

## ■ 結果および考察

Small RNA シークエンス解析の結果、ウシの子宮 EV には卵胞期で 464 個、黄体期で 429 個、妊娠期で 434 個の miRNA が発現していた。卵胞期と黄体期を比較すると、卵胞期では 21 個の miRNA が高発現し、黄体期では 9 個の miRNA が高発現していた。黄体期と妊娠 8 日目を比較すると、13 個の miRNA が黄体期で高発現し、妊娠 8 日目では 21 個の miRNA が高発現していた。差異 miRNA の標的遺伝子をもとに KEGG パスウェイ解析を行った結果、卵胞期と黄体期を比較すると 195 個の KEGG パスウェイが、黄体期と妊娠 8 日目を比較すると 198 個が有意にエンリッチされていた。子宮 EVs の miRNA における内部標準遺伝子の同定では let-7d、miR-98、miR-125b、miR-200c、miR-223、miR-224、U6 を最終的な内部標準候補とした。3 つの解析ツールを用いた解析の結果、miR-125b の安定性が最も高く、U6 の安定性が最も低かった。

## ■ 結 語

以上の結果から、ウシ子宮内 EVs における時期特異的な miRNA および標的遺伝子が同定された。さらに KEGG パスウェイ解析の結果、卵胞期におけるムチンの発現および妊娠 8 日目における細胞接着因子の生成と胚の細胞分化を miRNA が制御している可能性が示唆された。本研究の結果は、EVs や miRNA を用いた新たなウシ受胎率向上技術の開発につながるものと期待される。