

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292191

研究課題名(和文)尿主要タンパク質コーキシンの遺伝子欠損ネコ作製と機能解明

研究課題名(英文) Studies of physiological function of cauxin, a major urinary protein, by development of cauxin-knocking out cats

研究代表者

山下 哲郎 (Yamashtia, Tetsuro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20202377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：ネコは尿に分子量7万でエステラーゼ活性を持つコーキシンを大量に分泌している。我々はこれまでにネコの尿に含まれる特異なアミノ酸フェリニンの生産にコーキシンの関与していることを見いだした。しかしネコがなぜコーキシンを尿に大量分泌してフェリニンを生産しているか、他に生理機能があるか未解明である。そこで本研究では、コーキシンの遺伝子欠損ネコを作成し、コーキシンの機能解明を目指すための基礎的研究を行った。具体的にはネコ尿主要タンパク質コーキシンの機能解明を行うために人工DNA制限酵素「TALEN」をネコの受精卵に作用させコーキシン配列の破壊を行い、コーキシン遺伝子欠損ネコ作成を試みた。

研究成果の概要(英文)：The domestic cat excretes cauxin with carboxylesterase activity as a major urinary protein. Our previous studies demonstrated that cauxin hydrolyzes 3-methylbutanol-cysteinylglycine and produces glycine and felinine, a cat-specific amino acid. However little is known whether cauxin has functions other than peptidase in the urine. In this study, we aimed to produce cauxin-knocking out cats to examine the functions of cauxin in cats. We used transcription activator-like effector nucleases (TALEN) that are restriction enzymes to cut specific sequences of cauxin exon 1 and 2. Our analysis indicated that TALENs targeting exon 2 could destroy the cauxin gene in cat kidney cultured cells. On the other hand, we also found that felinine metabolites are excreted into the urine of humans, mice, and dogs that excrete no cauxin. The results suggest that cauxin excretion is necessary to excrete free felinine that is decomposed to volatile compounds for scent communication.

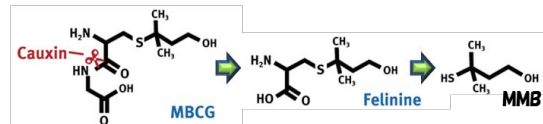
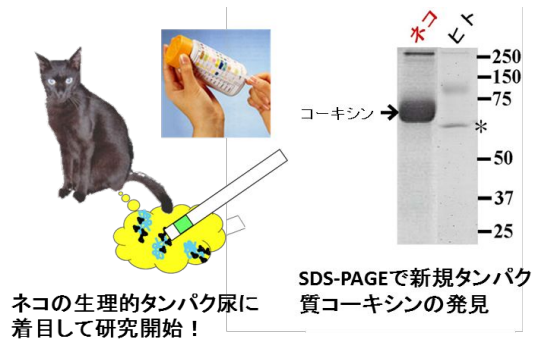
研究分野：生化学

キーワード：遺伝子改変動物 酵素 尿タンパク質

1. 研究開始当初の背景

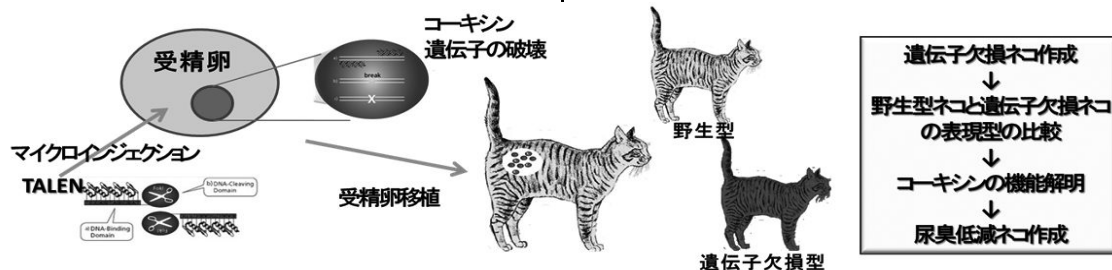
健康ネコの尿には大量のタンパク質が含まれる。この現象は獣医師の間でよく知られていたが特に着目されておらず原因も不明だった。ネコが生理的にタンパク尿を排泄しているなら、タンパク尿は腎臓病の兆候という従来の概念と矛盾していて興味深いと考え、我々は、ネコの生理的タンパク尿の原因と機能を探る研究を開始した。この結果、ネコの腎臓の近位尿細管上皮細胞から尿にエステラーゼ活性を有する分子量7万の新規タンパク質が大量に分泌されていることが分かった (Biochem. J. 370, 101-10.2003)。我々は、コーキシンと命名し、コーキシンの機能解析へ取り組んだ。

コーキシン遺伝子はヒトを含め様々な哺乳動物のゲノムでも発見されたが、尿にコーキシンを大量分泌している動物はネコとヤマネコ、ボブキャットなどネコに近縁な一部のネコ科動物だけであった。コーキシンの排泄は生後3ヵ月頃から開始され、性成熟したオスはメスの約4倍量のコーキシンを分泌していること、コーキシンの発現量にテストステロンが関与していることも分かった。そこでコーキシンが尿中酵素として機能しているなら酵素反応産物も種性、年齢特異的にネコの尿に分泌されていると考えた。この仮説を基に、除タンパクした尿をゲル濾過クロマトグラフィーで分画して分子量の異なるいくつかの画分に対して精製したコーキシンを働かせた後、消失する化合物、新生される化合物があるか調べた。この結果、3-methylbutanolicysteinyglycine (MBCG)



がコーキシンで加水分解され消失し、フェリニン (2-amino-7-hydroxy-5,5-dimethyl-4-thiaheptanoic acid) とグリシンが新生されることが分かった。ネコの尿中でフェリニンとコーキシンの排泄量が正に相関しており、コーキシンがフェリニン生産に重要であると考えられた。またフェリニンが尿で更に分解され独特のにおいを有する 3-mercapto- 3-methyl-1-butanol (MMB) が生じることが分かり、ネコの生理的タンパク尿の原因であるコーキシンが種特有なにおいの生産に関わっていることが示唆された。これまで得られた研究成果より、コーキシンがフェリニンの生産に関わる重要な酵素であると考えられた。我々は、コーキシンの機能を解明する為に、コーキシン遺伝子を欠損したネコの尿を解析してフェリニンが尿から消失していることを確認することが有効と考えた。生まれつきコーキシン遺伝子を欠損しているネコは発見できていない。そこで我々は、遺伝子工学の技術を駆使してコーキシン遺伝子欠損ネコの作成を考えた。

遺伝子欠損動物の作製技術は、30年以上



前にマウスで確立した。これまでに様々な遺伝子ノックアウトマウスが作成されタンパク質の機能解析に活用されてきた。しかしマウス以外の動物種で遺伝子欠損動物が作られた例は殆どなく、ラットでわずかに報告されているだけである。これは、遺伝子改変するために必要な胚性幹細胞(ES細胞)がマウスなどでしか開発されていないためである。また2010年にES細胞由来のノックアウトラットが誕生したが、ラットES細胞における遺伝子組み換え効率はマウスと比べて著しく低い。つまりマウス以外の動物で従来の技術を使い遺伝子欠損動物を作る為には、さらなる技術改善が必要である。ところが近年、全く新しい遺伝子改変技術が開発され、様々な哺乳動物で遺伝子欠損動物が作成できる可能性が高まった。これは、Zinc Finger Nucleases (ZFN) や Transcription Activator-Like Effectors Nucleases (TALEN) などの DNA 結合ドメインと DNA 切断ドメインからなる人工 DNA 制限酵素が開発され、任意のゲノム配列の改変や破壊が容易に行えるようになった。受精卵に人工 DNA 制限酵素を作用させ標的遺伝子を破壊すれば、遺伝子欠損動物が作成可能となった。

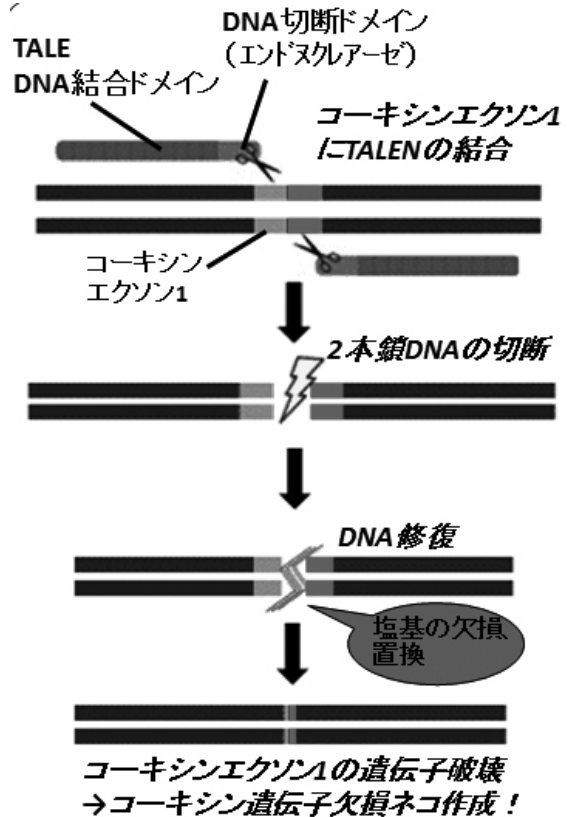
## 2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、革新的ゲノム改変技術 TALEN を活用してネコ特異的な尿主要タンパク質「コーキシン」の遺伝子欠損ネコを作成し、表現型を解析して、コーキシンの機能解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) Transcription Activator-Like Effectors Nucleases (TALEN) の合成

コーキシン遺伝子欠損ネコを作成する為の TALEN の原理を簡単に説明する。TALEN は、DNA 結合ドメイン Transcription



Activator-Like Effectors (TALEs)と DNA 切断ドメイン (エンドヌクレアーゼ)から成る人工 DNA 制限酵素である。DNA 結合ドメインは、34 アミノ酸残基から成るペプチド (TALE ユニット) からなる。各ユニットは Repeat-Variable-Diresidues (RVD) と呼ばれる可変領域 (2 アミノ酸残基)を持ち、この RVD を変えることで A・T・G・C に特異的な4種類の TALE ユニットを作製でき、DNA 上の任意の配列に TALEN を結合させ DNA2 本鎖を切断できる。切断された DNA は、修復の際に切断部位への塩基の挿入や欠失が高頻度に起こる。このため欠失、フレームシフトやエキソンスキップ等が生じ、結果的に翻訳阻害や遺伝子ノックアウトが起きる。

コーキシン遺伝子をコードする全長ゲノム配列は、既に明らかになっている。そこでコーキシンのエクソン 1、エクソン 2 を破壊するために2種類の TALEN を作成した。コーキシンのエクソン 1 とエクソン 2 には、小胞体移行シグナルのアミノ酸配列がコードされており、これはコーキシンの尿中分

泌に必要不可欠な配列である。よってエクソン 1 や 2 を破壊は効果的と考えた。なお TALEN をコードする遺伝子ベクターの合成をフランスの Collectis Bioresearch 社に外注し TALEN 遺伝子は、CMV プロモーターと T7 プロモーターを有する発現ベクターにサブクローニングして使った。

#### (2) ネコ培養細胞を用いた TALEN の標的遺伝子コーキシンエクソン 1 の切断活性確認

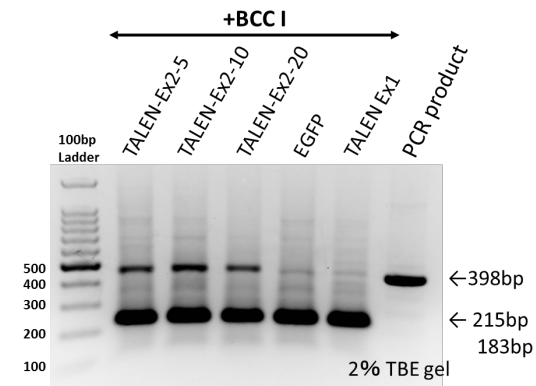
ネコの培養細胞を使い、ネコ DNA に対する TALEN の標的遺伝子切断活性を確認する。我々が樹立したネコの腎臓尿管由来培養細胞に TALEN の遺伝子発現ベクターをトランスフェクションして培養細胞内で TALEN を発現させ、ネコゲノム上の標的遺伝子(コーキシンエクソン 1) に対する切断を Cell アッセイで調べた(サーベイヤー遺伝子変異検出キット使用、Transgenomic 社)。

#### (3) ネコの受精卵を用いた TALEN のコーキシンエクソン 1 の切断活性確認

まず T7 RNA Polymerase 使い、in vitro transcription 反応で TALEN の mRNA を合成する。次にネコ受精卵(1 細胞期)の準備する。ネコの発情は、日照時間に影響する。ネコの発情期は、イヌのように年 2 回と決まってなく、日照時間が長くなると発情が誘起され、日照時間が短くなると発情が終結する。そこで飼育舎の日照時間を短くし、メスの発情を終結させ、発情期をホルモン剤で制御できるようにする。非発情のメスネコに PMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)と hCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を投与して過剰排卵誘起処置をする。そしてオスネコと自然交配させ、交配 12~24 時間に卵管を摘出し、生理食塩水で卵管内を洗浄して 1 細胞期の受精卵を採取する。

#### 4. 研究成果

ネコのゲノム配列を参照してエクソン 1 およびエクソン 2 から TALEN のターゲット部位をそれぞれ作成して、TALEN 発現ベクターを構築した。その後、完成した発現ベクターをネコ腎臓上皮培養細胞に遺伝子導入して、Transgenomic 社のサーベイヤー遺伝子変異検出キットを使用し、コーキシン遺伝子の切断活性を調べた。その結果、エクソン 1 に対する DNA 切断活性は認められなかったが、エクソン 2 に対する DNA 切断活性は認められた。よってエクソン 2 をターゲットとする TALEN の発現ベクターを以サーベイヤー遺伝子変異検出キットによる切断活性の比較



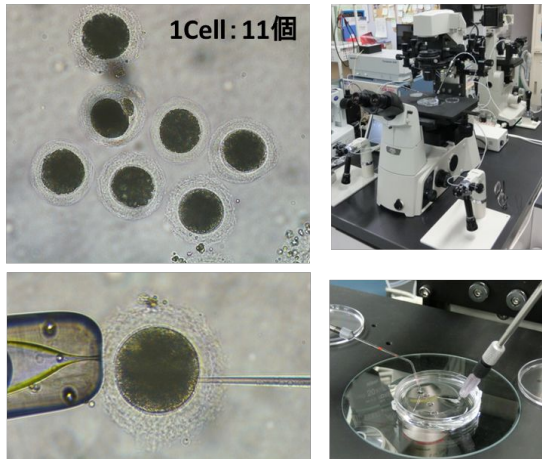
降の実験に用いることができることになった。

次に TALEN のコーキシン遺伝子切断活性の向上について検証した。TALEN のゲノム切断活性を向上させる因子としてエクソヌクレアーゼ (ExoI) を共発現させることが有効と報告 (Scientific Reports 3 : 1253 doi: 10.1038/srep01253, 2013) されたので、我々もネコ ExoI 遺伝子をクローニングして発現ベクターを構築し、コーキシンのエクソン 2 をターゲットにした TALEN と ExoI をネコ CRFK 細胞で共発現させた。その結果、ExoI 切断活性の効果は認められなかった。

そこでエクソン 2 をターゲットにした TALEN のみをネコ受精卵に導入することにした。メスネコにホルモン処置を施し、過排卵させた後、オスネコと交尾させ、避

妊手術で卵管を採取し、卵管洗浄でネコ受精卵を採取した。顕微鏡下で1細胞期の受精卵にTALENのmRNAをマイクロインジェクションしてコーキシン遺伝子欠損卵の作製を試みた。しかし処置3日後に細胞

#### ネコの受精卵へのTALENマイクロインジェクション

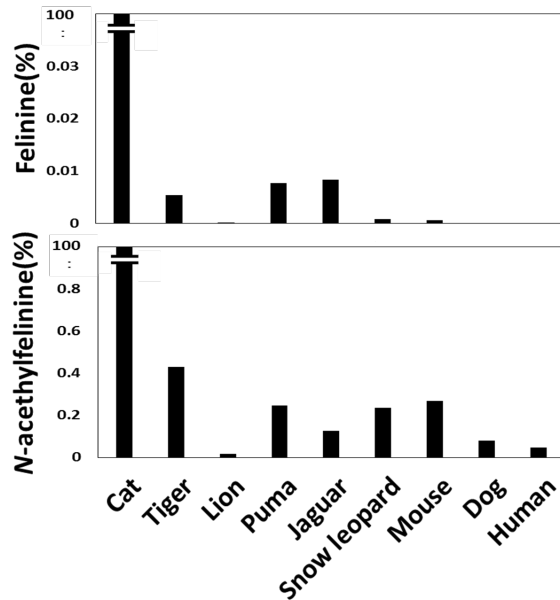


の卵割が停止してしまい、コーキシン遺伝子欠損卵を作成することができなかった。

研究期間内にコーキシンの遺伝子欠損ネコの作製が完成しなかった為、これまでコーキシンが排泄されていないことが確認されているマウスやイヌの尿中にフェリニン代謝産物が排泄されているか高感度LC-MS/MS法で調べ、研究継続を試みた。これまでフェリニンの尿中排泄がないと言われていたこれらの動物の尿中からフェリニン代謝産物のN-アセチルフェリニンがネコの100分の1以下で検出することができた。一般にフェリニン前駆体のジペプチドは、ジペプチダーゼで分解され生じたシステイン抱合物は直ちに細胞で吸収されアセチル化された後に尿に再分泌されて排泄されると言われている。よってイヌやマウスの尿にN-アセチルフェリニンが検出されたと考えられる。一方、ネコの場合、一部のフェリニン前駆体はイヌやマウスと同様の代謝系で処理されるが、大部分が比活性の低いコーキシンによってゆっくり分解される為、再吸収を免れたフェリニンが尿

にそのまま分泌され、更に分解され揮発性の化合物ができ、それが尿に特有なネコ尿臭を与えていると考えられた。よってコー

#### Felinine and N-acetylfelinine levels in large felids, dogs, mice, and humans



Each average of felinine and N-acetylfelinine to urinary creatinine ratio in three male cats is shown as 100%.

キシンの尿中分泌は、フェリニン生産に重要である可能性が強く示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Katayama M, Ogaya H, Shunsuke S, Uzuka Y. Kite shield-shaped wedge recession for treatment of medial patellar luxation in seven small-breed dogs. *Vet. Surg.* 2016 45(1):66-70
2. Iwama R, Sato T, Katayama M, Shimamura S, Satoh H, Ichijo T, Furuhashi K. Relationship of glomerular filtration rate based on serum iodixanol clearance to IRIS staging in cats with chronic kidney disease. *J Vet Med Sci.* 2015 77(8):1033-5.
3. Takahashi K, Sakurai N, Emura N, Hashizume T, Sawai K. Effects of

downregulating GLIS1 transcript on preimplantation development and gene expression of bovine embryos. J Reprod Dev. 2015 61(5):369-74.

〔学会発表〕(計9件)

1. 米田稔、山下 哲郎、宮崎雅雄 . ネコのフレーメン誘起フェロモン候補物質である新規遊離分岐鎖脂肪酸の同定、第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会(神戸). 2015年12月2日
2. 弗田 彩心、北條 涉、宮崎 珠子、土谷 和平、木村 賢一、山下 哲郎、宮崎雅雄 . 過剰なコレステロール生合成を抑制する新規代謝経路の解明、第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会(神戸) 2015年12月1日
3. 宮崎雅雄 . 完全肉食動物への進化で獲得したネコ特有なケミカルシグナルの生合成機構、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム(名古屋) 2015年5月14日、招待講演
4. 宮崎雅雄 . 完全肉食動物への進化で獲得したネコ特有なケミカルシグナルの生合成機構、第12回農薬バイオサイエンス研究会(神戸) 2014年12月5日、招待講演
5. 中野晴日、山下哲郎、宮崎雅雄 . ネコのマーキング尿から放出される嗅覚シグナルの探索第87回日本生化学会大会(京都) 2014年10月16日
6. 宮崎雅雄、北條涉、西村貴志、山下哲郎 . ネコのマーキング物質と体から放出される嗅覚シグナルの大きな違い、第87回日本生化学会大会(京都) 2014年10月16日
7. 宮崎雅雄、北條涉、西村貴志、山下哲郎 . ネコの嗅覚コミュニケーションに重要なマーキング臭と体臭の有意な違い、日本農芸学会 2014年度大会(明治大学) 2014年3月29日
8. 中野晴日、加藤恭子、山下哲郎、宮崎雅雄 . ネコの尿臭識別能力と尿臭の個体差を作り出す揮発性化合物の探索、日本農芸学会 2014年度大会(東京) 2014年3月29日
9. 宮崎雅雄、Significant differences between scent signals emitted from marking materials and bodies in the domestic cat. Behaviour Meets Biochemistry (London), 2014年2月18日

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 哲郎 (YAMASHITA TETSURO)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：20202377

(2)研究分担者

宮崎 雅雄 (MIYAZAKI MASAO)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：20392144

片山 泰章 (KATAYAMA MASAOKI)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：70436054

澤井 健 (SAWAI KEN)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：90390864