

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03937

研究課題名(和文) なぜネコは肉ばかり食べても健康でいられるか？新規代謝経路の解明と創薬応用

研究課題名(英文) Studies of the novel metabolic pathway down-regulating cholesterol biosynthesis in domestic cats

研究代表者

宮崎 雅雄 (Miyazaki, Masao)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：20392144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：食の欧米化で高コレステロール血症に困っている現代人とは対照的に、完全肉食のネコは、高脂肪食を食べ続けても健康を保持できる。我々はネコに特化した脂質代謝があると考えて研究を始め、コレステロール合成を抑制する新たな代謝経路を発見した。この発見でネコは高脂肪食を食べていると餌から十分量のコレステロールを摂取できるので、フェリニン生成量を増やして余分となるコレステロールの生合成を防いでいる事、逆に低脂肪食を食べているとコレステロール摂取量が減少するので、フェリニン生成量を減らして不足分のコレステロールを生合成で補っていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は新規性が非常に高い独創的な研究であり、完全肉食が可能なネコ科動物の脂質代謝の理解向上に大きく寄与するものである。比較生理学的な研究で、ヒトを含めた他の動物の病気克服などにも寄与すると考える。高脂血症は動脈硬化の危険因子の一つでもある。スタチンは高脂血症の治療薬として最も普及している。しかし、一部の患者で薬効が不十分であることや、副作用の問題もあり、異なる作用機序を持つ新薬開発が現在も盛んに行われている。ネコが進化の過程で獲得した分岐経路亢進による高脂血症予防法を現代人が薬剤で獲得して治療に役立terるといふ我々の発想は極めて斬新であり、将来的に革新的な創薬展開に発展すると考える。

研究成果の概要(英文)：An excessive intake of lipid-rich diets may lead humans to hypercholesterolemia, a risk factor for cardiovascular disease. In contrast to humans, domestic cats, which evolved to strict carnivores, can consume such diets without increasing serum cholesterol levels. However little is known about the mechanism for preventing hypercholesterolemia in cats. Here, we report a specialized metabolic system enabling cats to minimize cholesterol biosynthesis. When dietary cholesterol intake is low, cats increase cholesterol biosynthesis, as do other mammals. In cholesterol-rich conditions, dimethylallyl diphosphate, a cholesterol precursor, is sidetracked from the cholesterol biosynthesis pathway. The precursor is finally excreted into the urine as non-proteinogenic amino acid felinine, a putative pheromone precursor, via the glutathione detoxification pathway.

研究分野：生化学・動物科学・獣医学

キーワード：コレステロール ネコ メバロン酸経路 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

なぜネコは、ヒトで問題になるような高脂肪食を毎日食べても血中コレステロール値が上昇せず健康でいられるか？ 完全肉食に適応したネコ科動物の脂質代謝機構は、長年謎であった。ネコは、アラキドン酸やタウリンを生合成できないので、ネズミや野兔、鳥など肉を食べてこれらの化合物を餌から補う必要がある(Annu.Rev.Nutr.4:521-62.1984)。また、コレステリルエステル転送蛋白を欠損しているため、ヒトと異なり LDL より HDL コレステロールが高い(Am.J.Vet.Res.64, 299-303.2003)。ネコのゲノム解析で、脂質代謝に関連する遺伝子群に正の選択圧が強く働いたことも分かった(PNAS.111:17230-5.2014)。これらの知見は、ネコの脂質代謝が種に特化したことを示す根拠である。しかし高脂肪食耐性(Am.J.Vet.Res.73:62-7.2012)の代謝機構は未解明であった。我々は、ネコの肉食に特化した代謝機構の解明は、肉食動物の進化や生理を理解する上で極めて重要であり、食肉文化の進んだ現代人で問題になっているメタボリック症候群や高脂血症の解決策を見つける糸口にもなり、学術的価値が非常に高いと考えた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ネコがなぜ高コレステロールの食餌を食べても高コレステロール血症にならないか、その背景には未だ未解明のネコ科動物に特異な代謝システムがあると考え、肉食に特化したネコの脂質代謝メカニズムを明らかにすることを目的にした。

#### 3. 研究の方法

まずネコのコレステロール合成能を調べた。ヒトでは生体内コレステロールの 7 割が生合成で供給される。コレステロール生合成を開始するメバロン酸経路の律速酵素であるヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ(HMGCR)の阻害剤であるスタチンは、高脂血症の治療薬として広く普及している。そこでまずスタチンを投与して、その前後における血中コレステロール値の変動について解析した。またその結果、明らかになった脂質代謝物の臓器ごとの含有量について研究した。なお本研究において、試料採取や代謝実験に関する全ての動物実験の操作については、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省)に基づき運用されている「岩手大学動物実験に関する指針」にそって実施した。

#### 4. 研究成果

##### 【ネコのコレステロール生合成から派生するフェリニン生合成経路の発見】

まずネコのコレステロール合成能を調べた。ヒトでは生体内コレステロールの 7 割が生合成で供給される。コレステロール生合成を開始するメバロン酸経路の律速酵素ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ(HMGCR)の阻害剤であるスタチンは、高脂血症の治療薬として広く普及している。そこでネコのコレステロール合成能を調べるために、高脂肪食で飼育したネコにスタチンを投薬して投与前後の血中コレステロール値の変動を調べた。その結果、ネコのスタチンを投薬してもヒトのように血中コレステロール値が減少しないことが分かった。一方、低脂肪食で飼育したネコにスタチンを投薬すると血中コレステロール値が有意に減少することが分かった。以上の結果、ネコは餌から十分なコレステロールを摂取すればメバロン酸経路でコレステロール以外の化合物を生成し、コレステロール合成を抑制できると仮説を立て、スタチンで減少する化合物を探索した。その結果、高脂

肪食で飼育したネコにスタチンを投薬するとフェリニンというネコ特異なアミノ酸の尿中排泄量が減少することを見出した。よってネコのコレステロール生合成は、ネコ特異なアミノ酸の生合成に関係していることが明らかになり、そのフェリニン生合成経路が高コレステロール血症の予防に重要であることが分かった。フェリニン生合成経路の代謝物および関連する酵素の全容については引き続き研究中である。

#### 【フェリニン定量法の確立および生体内局在の解析】

ネコのコレステロール生合成の抑制にフェリニンが関与していることが明らかになった。フェリニンは、その前駆体として 3-メチルブタノール-システニルグリシン (MBCG)、更にその前駆体である 3-メチルブタノール-グルタチオン (MBG) というペプチドが知られている。フェリニンの生合成が、生体内のどの臓器で起きているかを明らかにする目的で、フェリニンとその前駆体の定量法確立、および生体内の各臓器におけるフェリニン生合成能について調べた。

次にネコの各組織 (湿重量 0.5g) を MQ でホモジナイズ後、15000 回転で 20 分遠心分離した。遠心分離した上清を限外ろ過膜 (MW 3000) を使い、除タンパクした後、ろ過膜を通過した液を遠心濃縮した。乾固させたら 80 $\mu$ l の 0.1%ギ酸に溶解し LC-MS/MS (LCMS 8040、島津製作所) に供しフェリニンとその前駆体の各組織含有量を定量した。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードでイオン化を行った。化合物の分離は逆相カラム (L-columm2 ODS 2.1 $\times$ 100mm、化学物質評価研究機構) を用いて、40 の恒温条件で行った。移動相には A 液に 0.1%ギ酸、B 液に 100%アセトニトリル 0.1%ギ酸を使用し、流速は 0.4ml/min とした。グラジエント溶出条件は、以下の通りである。0% B, 0–2.5 min: 10% B for 2.5–10.0 min: 100% B 10.0–10.1 min: 100% B, 10.1–17.0 min, 0% B, 17.0–17.1: and 0% B, 17.1–25.0 min、流速 400  $\mu$ L/min。定量には多重反応モニタリング法 (MRM 法) を用いた。

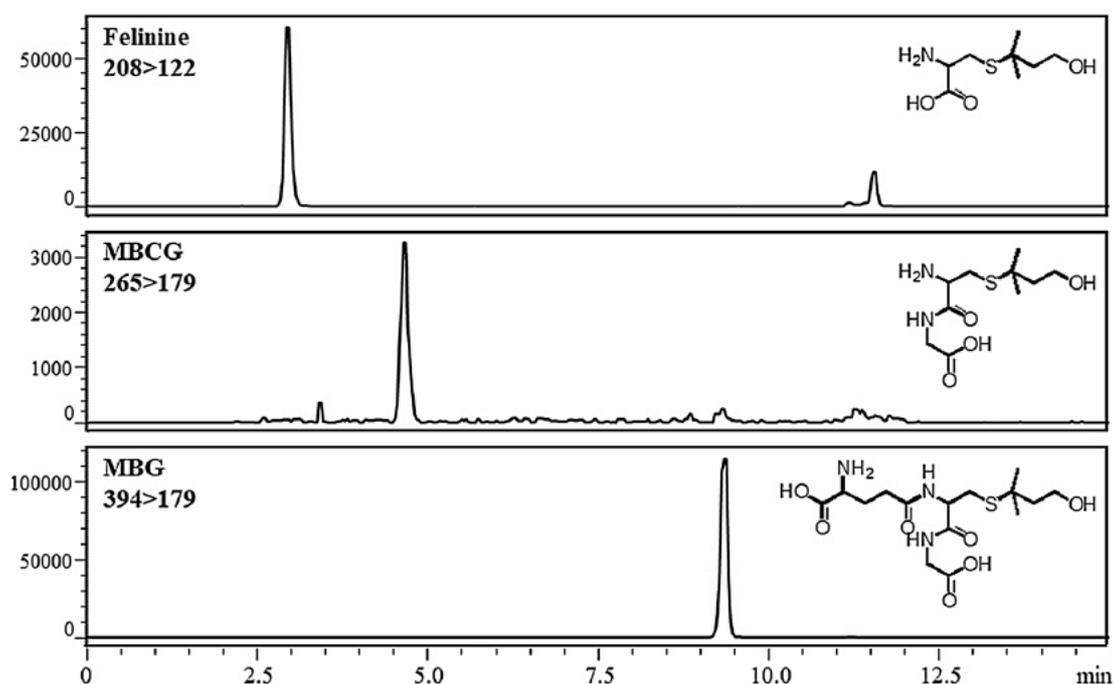


図 1 . フェリニン、フェリニン前駆体の 3-メチルブタノール-システニルグリシン (MBCG)、その前駆体の 3-メチルブタノール-グルタチオン (MBG) を LC-ESI-MS/MS した時のクロマトグラム。

表 1 . フェリニン代謝物の LC-ESI-MS/MS 時のトランジション

化合物	質量転移 ( m/z )	CE
Felinine	208.20>122.20	-11.0
	208.20>69.25	-17.0
	208.20>41.05	-36.0
MBG	394.20>179.15	-20.0
	394.20>265.25	-14.0
	394.20>162.15	-24.0
MBCG	265.10>179.20	-11.0

本研究で、生体内フェリニン含量を高感度且つ高精度で定量する LC-ESI-MS/MS 分析計が構築できた。定量下限値は、シグナルノイズ比 10 で 10fmol であった。ピーク分離も良好であり、この手法を使ってネコの各主要臓器から試料を調整し、フェリニンとその前駆体の含量について定量を行った。その結果、図 1 に示すように、調べた全ての臓器でフェリニンを検出することができた。また調べた殆どの臓器でフェリニン前駆体である MBCG や MBG を検出することができ、コレステロール生合成を抑制するフェリニン経路が脂質代謝の盛んなネコの肝臓のみならず、ほぼ全身臓器で行われていることが明らかになった。今後は、コレステロール生合成に重要なメバロン酸経路がどのようにフェリニン代謝物の生合成に繋がるか、明らかにする予定である。

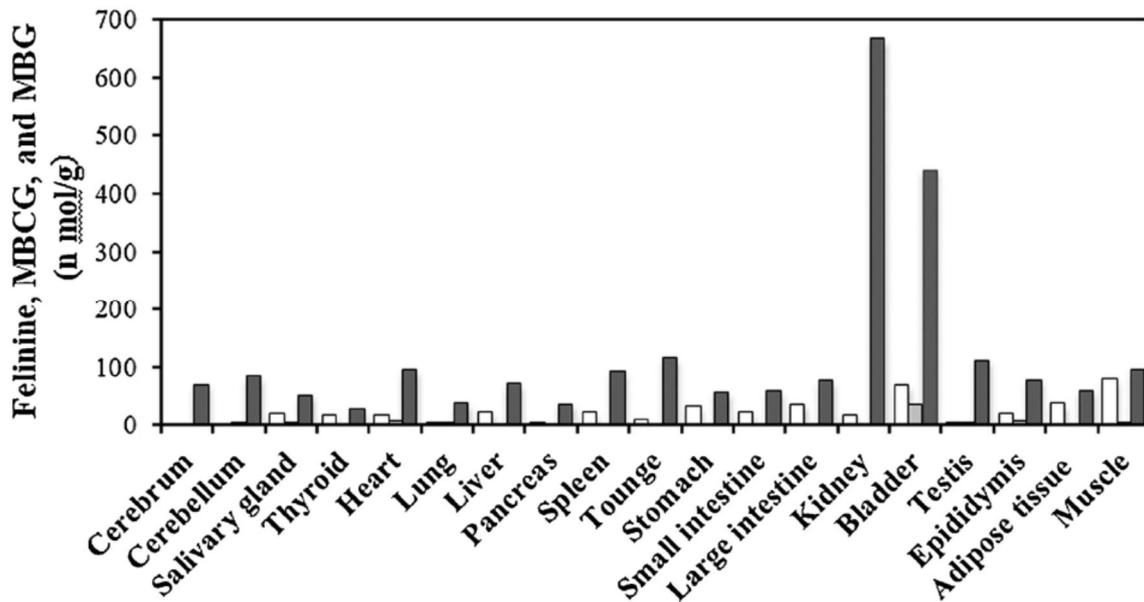


図 2 .フェリニンとその前駆体である 3-メチルブタノール-システイニルグリシン (MBCG)、3-メチルブタノール-グルタチオン (MBG) の各臓器含有量。MBG(open box)、MBCG(light grey box)、フェリニン(dark grey box)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masao Miyazaki, Tamako Miyazaki, Takashi Nishimura, Wataru Hojo, Tetsuro Yamashita	4. 巻 44
2. 論文標題 The Chemical Basis of Species, Sex, and Individual Recognition Using Feces in the Domestic Cat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of chemical ecology	6. 最初と最後の頁 364-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s10886-018-0951-3">https://doi.org/10.1007/s10886-018-0951-3</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Tamako, Nishimura Takashi, Yamashita Tetsuro, Miyazaki Masao	4. 巻 36
2. 論文標題 Olfactory discrimination of anal sac secretions in the domestic cat and the chemical profiles of the volatile compounds	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Ethology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s10164-017-0532-x">https://doi.org/10.1007/s10164-017-0532-x</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Futsuta Ayami, Hojo Wataru, Miyazaki Tamako, Yamashita Tetsuro, Miyazaki Masao	4. 巻 1072
2. 論文標題 LC-MS/MS quantification of feline metabolites in tissues, fluids, and excretions from the domestic cat ( <i>Felis catus</i> )	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.006">https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.006</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三浦 舞音、弗田 彩心、北条 渉、宮崎 珠子、山下 哲郎、宮崎 雅雄
2. 発表標題 ネコ特異的なケミカルシグナルの生合成経路解明
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 舞音, 弗田 彩心, 山下 哲郎, 宮崎 雅雄
2. 発表標題 コレステロール生合成を抑制するフェリニン経路に関する遺伝子群の組織間発現解析
3. 学会等名 2018年度生化学会東北支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki, M.
2. 発表標題 Small felids decrease cholesterol biosynthesis by enhancing the shunt of the mevalonate pathway
3. 学会等名 2nd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyazaki, M., Futsuta, A., Hojo, W., Miyazaki, T., and Yamashita, T.
2. 発表標題 Novel lipid metabolism system developed in cats produces a species-specific chemosignal
3. 学会等名 2017 Meeting of the Chemical Signals in Vertebrates (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyazaki, M., Hojo, W., Miyazaki, T., and Yamashita, T.
2. 発表標題 A mercaptan emitted from excretions of domestic cats alerts other animals to their presences
3. 学会等名 ECRO 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki, C., Maita, M., Miyazaki, T., Yamashita, T., Miyazaki, M.
2. 発表標題 Two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry-based temporal fingerprints of volatile compounds emitted from domestic cat urine
3. 学会等名 ECRO 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 弗田彩心、山下哲郎、宮崎雅雄
2. 発表標題 regulatory mechanisms of the feline pathway that is a branch of the mevalonate pathway and downregulates cholesterol biosynthesis
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木千春、Caspers Jana、山下哲郎、Schulz Stefan、宮崎雅雄
2. 発表標題 ネコの個体識別に関与する尿中分岐鎖脂肪酸組成の経日的変化と食餌による影響
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦舞音、片山理恵子、山下哲郎、宮崎雅雄
2. 発表標題 コレステロール生合成抑制経路を亢進させたネコ型マウスの作成
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦舞音、片山理恵子、山下哲郎、宮崎雅雄
2. 発表標題 コレステロール生合成抑制経路を亢進させたネコ型マウスの表現型解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦舞音、山下哲郎、宮崎雅雄
2. 発表標題 ネコの排泄物に種や性の情報を付加する嗅覚シグナルの同定とその生合成機構
3. 学会等名 第38回日本動物行動学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miura, M., Nakajima, O., Yamashita, T., and Miyazaki, M.
2. 発表標題 Analysis of transgenic mice upregulating the feline pathway for downregulating the cholesterol biosynthesis in cats
3. 学会等名 International Symposium on "Environmental Response Mechanisms in Plants and Animals" (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyazaki, M.
2. 発表標題 Small felids decrease cholesterol biosynthesis by enhancing the shunt of the mevalonate pathway
3. 学会等名 2nd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎雅雄
2. 発表標題 完全肉食への適応で獲得したネコ特有なにおい生成機構
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会嗅覚シンポジウム「身近な動物達の嗅覚」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎雅雄
2. 発表標題 ネコの縄張り行動を化学的見地から紐解く
3. 学会等名 におい・かおりを科学する2018(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎雅雄
2. 発表標題 身近な動物の嗅覚～においやフェロモンを介した動物の行動制御～
3. 学会等名 福島県高等学校教育研究会理科部会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎雅雄
2. 発表標題 ネコ腎臓に蓄積する脂肪滴の正体
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会獣医解剖分科会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	福田 智一  (Fukuda Tomokazu)  (40321640)	岩手大学・理工学部・教授   (11201)	
研究 分担者	片山 泰章  (Katayama Masaaki)  (70436054)	岩手大学・農学部・准教授   (11201)	