

## 幼若ラットを利用した脳におけるビオチンの役割に関する研究

HD12E005 湯浅 正洋

(指導教員 渡邊 敏明教授)

- Yuasa *et al.* Biotin deficiency during gestation and lactation in rat affects growth rate, brain development and protein and gene expression. *J Nutr.* (準備中)
- Yuasa *et al.* Effects of biotin deficiency for biotinylated protein and biotin-related gene for rat brain region. *Nutr Neurosci.* (準備中)
- Yuasa *et al.* (2013) Consumption of a low-carbohydrate and high-fat diet (the ketogenic diet) exaggerates biotin deficiency in mice. *Nutrition* 29, 1266-1270.

## 緒言

水溶性ビタミンの1つであるビオチンは、カルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、分岐鎖アミノ酸代謝及び脂肪酸合成に関与している。ビオチンが欠乏すると、皮膚炎、脱毛、神経障害などが発症することが知られている。カルボキシラーゼ欠損症のヒトにおいては、重度の中樞神経症状を呈する。また、ビオチン欠乏幼若マウスやラットの脳では、ビオチン含量はあまり低下しない。これらのことから、脳におけるビオチンの役割は大変重要であると考えられるが、未だに不明な点が多い。本論文では、①母体のビオチン欠乏が出産児の脳に及ぼす影響、②母体のビオチン欠乏が脳機能に及ぼす影響、③ビオチン欠乏が離乳期以降の脳に与える影響について検討した。これらの研究結果を総合的に評価し、脳におけるビオチンの役割について考察を行なった。

## 研究1 ラット母体のビオチン欠乏が出産児脳のビオチン含量およびタンパク質発現に及ぼす影響

脳の形成・脳機能の発達には、胎生期と出産後年齢が低いほど活発に行われている。このため、妊娠期や授乳期に母体が栄養素欠乏となった場合、出産児の脳に大きな影響を与えると考えられる。実際に、重度の栄養障害で死亡した乳児において、脳重量や脳中タンパク質含量などが低下するとされている。また、妊娠初期における十分な葉酸摂取が神経管閉鎖障害のリスクを低減させることから、葉酸の不足が神経管の発生段階において悪影響を与えることが考えられる。一方、妊娠期・授乳期におけるビオチン欠乏が脳に及ぼす影響は不明な点が多い。そこで、本研究では、妊娠期・授乳期における母体のビオチン欠乏が、出産児の脳に及ぼす影響について検討した。特に大脳皮質と海馬を対象として、ビオチン含量やタンパク質発現などについて検討した。

## 実験方法

10-12週齢のWistar系雌性ラットを妊娠させ、コントロール群とビオチン欠乏群に分けた (n=6)。ラットは妊娠22日目に産み、出産後も母体と出産児は同居させた。離乳期 (授乳21日目) に母体および出産児を屠殺し、出産児の大脳皮質および海馬を得た。測定項目は、総ビオチン含量、ホロカルボキシラーゼ発現量、大脳皮質のプロテオーム解析お

よびビオチン関連遺伝子の発現量とした。なお、本実験は、兵庫県立大学環境人間学部研究倫理委員会の承認（承認番号080号、2013）を受け実施した。

### 結果および考察

ビオチン欠乏群の出産児にみられた変化についてみると、大脳皮質および海馬における総ビオチン含量が有意に低値を示し (Fig. 2-1)、ホロカルボキシラーゼ発現量が顕著に減少した (Fig. 2-2)。大脳皮質のタンパク質発現についてプロテオーム解析を行ったところ、4つのスポットの発現量に変化がみられた (Fig. 2-3)。また、ビオチン欠乏群において、ビオチンのトランスポーターであるナトリウム依存性マルチビタミン輸送体 (SMVT) とピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) などの遺伝子発現量が、大脳皮質と比べて海馬で高値を示した (Fig. 2-4A, B)。このように、母体のビオチン欠乏は、出産児脳内のビオチン含量やカルボキシラーゼ活性を低下させることが示唆された。また、ビオチン欠乏時には、特に海馬においてビオチンや関連酵素を保つために、ビオチン関連遺伝子発現が上昇していたのかもしれない。さらに、大脳皮質においては、ビオチンや関連遺伝子発現の低下に起因して、タンパク質発現が変化していたことが推測され、脳機能などに影響を与えているかもしれない。以上のように、妊娠期・授乳期における母体のビオチン欠乏は出産児脳におけるビオチン機能の低下や、タンパク質および遺伝子発現を変化させることが示唆された。

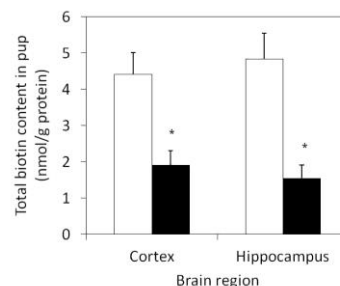


Fig. 2-1 Total Biotin content of brain in pup. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n=8. \* $p$ <0.05.

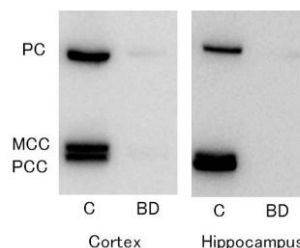


Fig. 2-2 Representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass of brain in pup. n=3. C, Control group; BD, Biotin-deficient group. PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

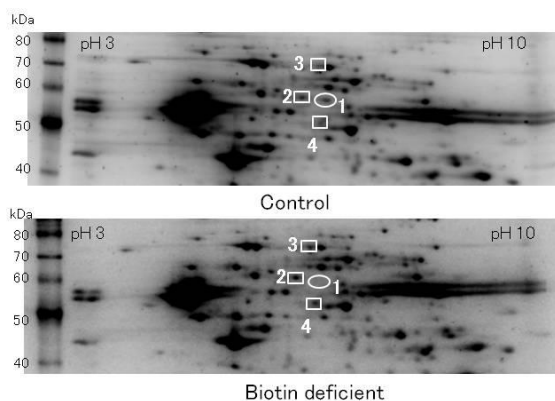


Fig. 2-3 Protein expression of cortex in pup. n=3. Decreased in biotin-deficient group (○). Increased in biotin-deficient group (□). Protein spot 1, MW: 55-65, PI: 6.5-7.5. Protein spot 2, MW: 55-65, PI: 6.0-7.0. Protein spot 3, MW: 65-75, PI: 6.0-7.0. Protein spot 4, MW: 45-55, PI: 6.0-7.0.

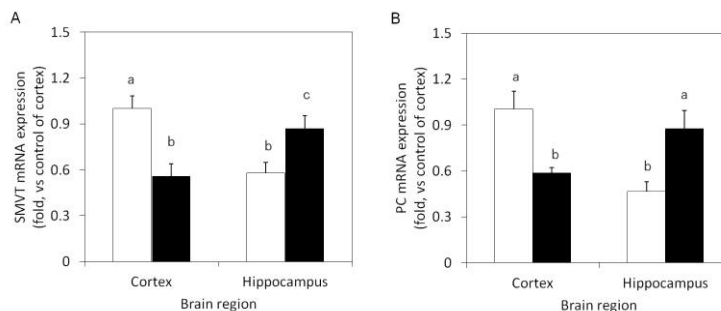


Fig. 2-4 mRNA expression of brain in pup. A, sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT); B, pyruvate carboxylase (PC). Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n=7. \* $p$ <0.05.

## 研究2 母体のビオチン欠乏が出産児の脳機能に及ぼす影響

研究1において、ラット母体のビオチン欠乏が出産児の脳においてビオチン含量の低下やタンパク質および遺伝子発現を変化させることが明らかとなった。これらのことから、

ビオチン欠乏が出産児の脳機能へ影響を与えていると考えられるが、ビオチンと脳機能の関係については不明な点が多い。これまでに、ビオチン欠乏ラット海馬において、神経細胞新生が減少すると報告されている。神経細胞新生は、海馬などの脳の一部の部位において神経細胞が新しく生まれる現象で、学習・記憶や精神疾患の発症に関与している事が知られている。ビオチン欠乏により神経細胞新生が抑制されるのであれば、ビオチンが学習・記憶能力を低下させる可能性がある。神経細胞新生には脳由来神経栄養因子 (BDNF) が関与しており、ビオチン欠乏時には脳のBDNF発現量が減少しているかもしれない。また、ビオチン依存性カルボキシラーゼの1つであるPCは、脳内では神経伝達物質であるアミノ酸の産生に関与しており、ビオチン欠乏時にはアミノ酸代謝を変化させているかもしれない。そこで、本研究では、ビオチン欠乏が上記の脳機能に関係している因子を変化させるかを検討することで、ビオチンが脳機能に及ぼす影響について考察した。

## 実験方法

本実験は、第2章で行った実験で使った動物を用いたため、実験動物や飼料、試料採取については前述の通りである。試料としては、大脳皮質、視床下部および血清を用いた。測定項目は、脳におけるBDNFの遺伝子発現量とアミノ酸含量、血清中のグルコース濃度およびコルチコステロン (グルココルチコイドの1種) とした。

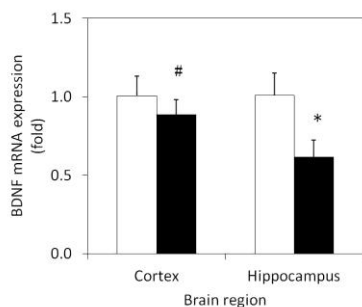


Fig. 3-1 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression of brain in pup. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n =5-7. # $p<0.1$ , \* $p<0.05$ . C, Control group; BD, Biotin-deficient group.

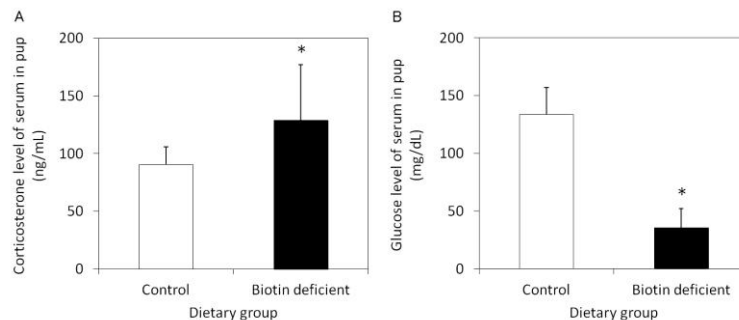


Fig. 3-2 Corticosterone and glucose level of serum in pup. A, corticosterone level (n=10); B, glucose level (n=8-9). Data are mean±SD. \* $p<0.05$ .

## 結果および考察

ビオチン欠乏群におけるBDNFの遺伝子発現量は、大脳皮質では減少傾向にあり、海馬では有意に減少した (Fig. 3-1)。脳のBDNF発現量低下の原因について検討したところ、ビオチン欠乏群において血中コルチコステロンの上昇がみられた (Fig. 3-2A)。また、血中グルコース濃度の低下も観察されたため (Fig. 3-2B)、低血糖による糖新生の活性化したため、高グルココルチコイド血症がみられたと考えられる。次に、アミノ酸含量について検討したところ、グルタミン酸および

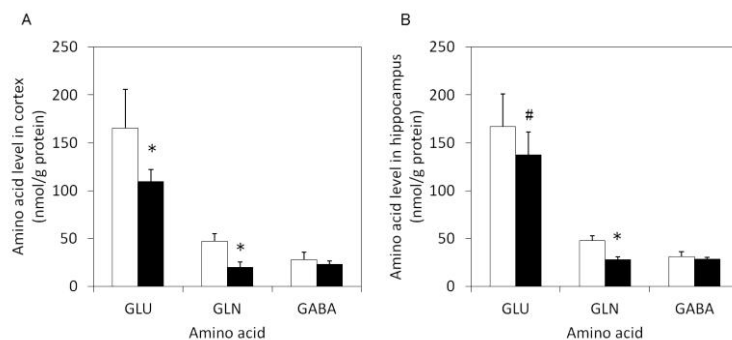


Fig. 3-3 Amino acids concentration of brain in pup. A, Cortex; B, Hippocampus. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n=8. # $p<0.1$ , \* $p<0.05$  (Student's  $t$  test). GLU, glutamate; GLN, glutamine; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid.

グルタミンの濃度がビオチン欠乏群の大脳皮質および海馬で有意に低値を示した (Fig. 3-2A、B)。これらの結果から、母体のビオチン欠乏は糖代謝異常を招き、脳内のBDNF発現量を低下させることが示唆された。BDNF発現量の低下は海馬の神経細胞新生低下を招くとされており、母体のビオチン欠乏が学習・記憶を阻害する可能性がある。また、高グルココルチコイド血症と海馬のBDNF発現量低下は、うつ病などの精神疾患の発症の原因の1つであると提唱されている。そのため、ビオチン欠乏は糖代謝異常を介して海馬のBDNF発現量の低下を招くことで、二次的にうつ症状を引き起こす可能性が示唆された。また、母体のビオチン欠乏は、カルボキシラーゼ活性を低下させることでグルタミン酸濃度の低下を招くことが示され、脳内の神経伝達の低下を引き起こしているかもしれない。以上のように、母体のビオチン欠乏は糖代謝異常やカルボキシラーゼ活性の低下に起因して、脳機能関連因子を低下させることが明らかとなった。

### 研究3 ビオチン欠乏ラット脳におけるビオチンおよびビオチン関連タンパク質に関する検討

ビオチン欠乏時には、脳におけるビオチンやビオチン関連遺伝子の発現はある程度保たれていることが報告されており、脳におけるビオチン欠乏の影響は小さいと考えられている。一方、海馬はビオチンを多く含む部位であることや、大脳皮質や小脳と比べて脳幹のピルビン酸カルボキシラーゼ活性が高いことが報告されており、部位によりビオチンの役割が異なると考えられる。しかし、脳におけるビオチンの役割については不明な点が多く、ビオチンが各部位へ及ぼす影響については不明な点が多い。そこで、本研究では、幼若ラットを用いて、ビオチン欠乏が脳の各部位におけるビオチン含量やホロカルボキシラーゼ発現量などに及ぼす影響について検討し、各部位のビオチンの役割について検証した。

#### 実験方法

3週齢のWistar系雄性ラットをコントロール群とビオチン欠乏群 (BD群) および制限食群 (PF群) に分けて飼育した (n=10)。8週間飼育後屠殺し、大脳皮質、海馬、視床下部、線条体および小脳を採取した。測定項目は、ビオチン含量 (総量および結合型)、ホロカルボキシラーゼ発現量および大脳皮質におけるビオチン化タンパク質発現とした。なお、本実験は兵庫県立大学環境人間学部研究倫理委員会の承認 (承認番号 054号、2012) を受け実施した。

#### 結果および考察

ビオチン欠乏群の大脳皮質では、総ビオチン含量は変化せず (Fig. 4-1A)、結合型ビオ

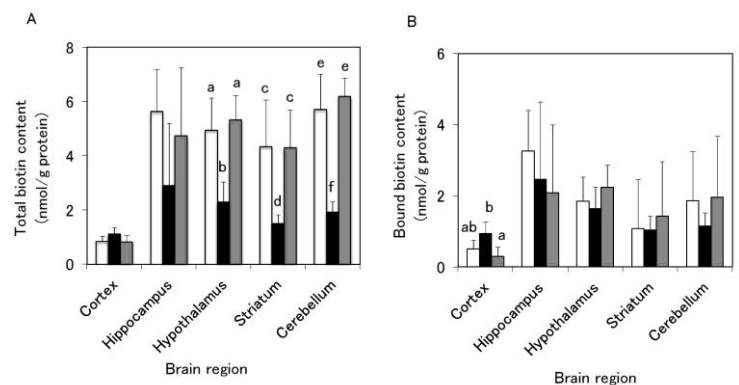


Fig. 4-1 Biotin content of brain. A, total biotin content. B, bound biotin content. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Pair-fed group (▒). Data are mean±SD, n=4-5. a-b, c-d, e-f p<0.05.

チン含量が上昇した (Fig. 4-1B)。また、ホロカルボキシラーゼ発現量はやや減少したが保たれた (Fig. 4-2)。これらのことから、大脳皮質ではビオチンが何らかのタンパク質と結合していると考え、ビオチン化タンパク質の発現状況を網羅的に解析した。その結果、ビオチン欠乏群においてスポット1 (分子量116-140、等電点7.5-8.5) が確認された (Fig. 4-3)。このスポットは、コントロール群および制限食群には認められなかった。検出されたタンパク質は、分子量からビオチン関連タンパク質とも異なっているため、新規のビオチン化タンパク質である可能性が示唆された。次に、海馬、視床下部、線条体および小脳の4つの部位については、総ビオチン含量は減少したが、結合型ビオチン含量は変化せず、ホロカルボキシラーゼ発現量はある程度保たれた。このように、ビオチン欠乏の影響は部位により異なることから、ビオチンの役割は各部位で異なる可能性があることや、幼若期においては特に大脳皮質においてビオチンが保たれることが示唆された。

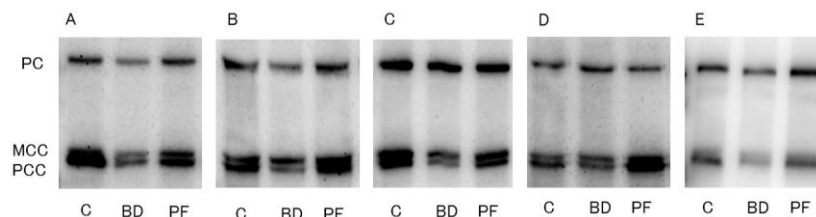


Fig. 4-2 Representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass of brain. A, cortex; B, hippocampus; C, hypothalamus; D, striatum; E, cerebellum. n=3. C, Control group; BD, Biotin-deficient group; PF, Pair-fed group; PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

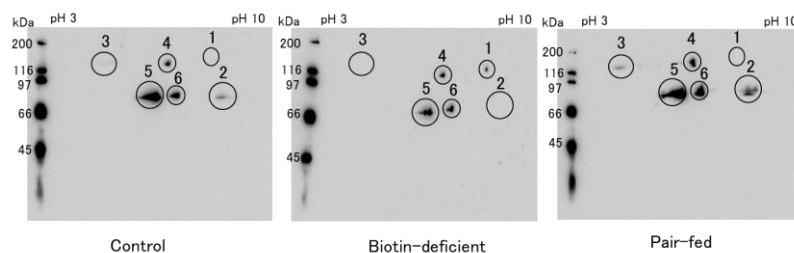


Fig. 4-3 Biotinylated protein expression by 2DE and western blotting analysis with streptavidin peroxidase of rat cortex. Protein spot 1 (MW: 116-140, PI: 7.5-8.5), Unknown biotinylated protein 1. Protein spot 2 (MW: 66-80, PI: 8.0-9.0), Unknown biotinylated protein 2. Protein spot 3 (MW: 116-140, PI: 4.0-5.0), Unknown biotinylated protein 3. Protein spot 4 (MW: 116-140, PI: 6.0-7.0), Estimated biotinylated pyruvate carboxylase. Protein spot 5 (MW: 66-80, PI: 5.5-6.5), Estimated biotinylated methylcrotonyl-CoA carboxylase. Protein spot 6 (MW: 66-80, PI: 6.5-7.5), Estimated biotinylated propionyl-CoA carboxylase.

## 総合考察

ビオチン欠乏が脳に及ぼす影響をライフステージ別にみると、総ビオチン含量やホロカルボキシラーゼ発現量は、幼若期と比べて出産児において顕著に減少することが示された。このことから、妊娠期・授乳期は他の時期と比べビオチンを必要としていると考えられる。本研究では、ビオチンの脳における役割について、①ライフステージで違いがあり、特に妊娠期・授乳期といった脳の形成・発達段階において重要なビタミンである、②欠乏時に大脳皮質である種のタンパク質と結合する、③部位によりビオチン欠乏の影響が異なること、④欠乏時に糖代謝異常を介して二次的に脳機能調節因子を減少させることなどが明らかになった。これらのことから、脳におけるビオチンの役割として、脳の形成・発達と脳機能維持のために必要不可欠なビタミンであるといえる。