

博士論文

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

平成 26 年度

兵庫県立大学大学院環境人間学研究科

環境人間学専攻

湯浅 正洋

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

平成 26 年度

兵庫県立大学大学院環境人間学研究科

環境人間学専攻

湯浅 正洋

目次

第1章 諸言

1.1 食環境と栄養・健康	1
1.2 ビオチンについて	1
1.3 ビオチンと脳	3

第2章 ビオチン欠乏ラット母体の出産児脳におけるビオチン含量及びタンパク質発現に関する検討

2.1 背景	6
2.2 実験方法	7
2.3 結果	15
2.4 考察	22

第3章 ビオチン欠乏ラット母体の出産児における脳機能関連因子に関する検討

3.1 背景	26
3.2 実験方法	27
3.3 結果	30
3.4 考察	32

第4章 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

4.1 背景	35
4.2 実験方法	36
4.3 結果	40
4.4 考察	46

第5章 総合考察

謝辞	54
----	----

参考文献	55
------	----

第1章 諸言

1.1 食と栄養・健康

環境は、ヒトや生物を取り囲み、相互に関係し合うことで直接的もしくは間接的な影響を与え合っている。環境の1つである食環境は、ヒトにとっては主に食事や栄養素の摂取を指しており、健康状態と密接に関わっている。食環境の変化は、ヒトにおける栄養・健康状態を変化させる一因となる。近年、わが国においては、これまでの食習慣が変化することで、生活習慣病が増加していると指摘されている。その原因として、3大栄養素である炭水化物、タンパク質、脂質のバランスが変わることや、ビタミン・ミネラルの摂取不足および過剰摂取による影響が挙げられる。特に、ビタミンは、健康維持のために重要であり、最近では、健康問題や生活習慣病との関連についても注目されている。

1.2 ビオチンについて

水溶性ビタミンの1つであるビオチン (biotin, ビタミン H) は、酵母の増殖因子、窒素固定菌の発育因子、ラットの卵白障害予防因子などとして見出された (György *et al*, 1940; Du Vigneaud *et al*, 1940)。ビオチンは生体内において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および脂肪酸合成などに関与している (Zempleni *et al*, 2007)。ビオチン依存性カルボキシラーゼは、バリン、イソロイシンなどのアミノ酸の異化代謝に関与するプロピオニル CoA カルボキシラーゼ (propionyl CoA carboxylase; PCC)、ロイシンの異化代謝に関与するメチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (methylcrotonyl CoA carboxylase; MCC)、糖新生の律速酵素であるピルビン酸

カルボキシラーゼ (pyruvate carboxylase; PC) および脂肪酸合成の律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl CoA carboxylase; ACC) の 4 つが知られている。

食品中のビオチンのほとんどは、タンパク質と共有結合した状態で存在している。摂取されたタンパク質結合型ビオチンは、まず消化管内のタンパク質消化酵素によって分解され、ビオシチン (ビオチニルリジン) やビオチニルペプチドとなる。ビオシチンやビオチニルペプチドの大部分は、膵液中や小腸絨毛に存在するビオチニダーゼ (biotinidase; BTD) によってさらに分解され、遊離型のビオチンが生じる (Wolf *et al*, 1985)。遊離型ビオチンは、小腸上皮細胞のナトリウム依存性マルチビタミン輸送体 (sodium-dependent multivitamin transporter; SMVT) により体内に取り込まれる (Prasad *et al*, 1998)。ビオチンは血液中では BTD と結合して種々の組織に輸送される (Chauhan and Dakshinamurti, 1988)。末梢組織へのビオチンの取り込みは、SMVT を介して行なわれる (Prasad *et al*, 1998)。細胞内に取り込まれたビオチンは、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (holocarboxylase synthetase; HCS) により、アポカルボキシラーゼに結合し、ホロ型 (活性型) のカルボキシラーゼとなる (León-Del-Rio *et al*, 1995)。また、細胞内にも BTD は存在しており、ホロカルボキシラーゼよりビオチンを遊離させることで、ビオチンの再利用にも関わっている (Wolf *et al*, 1985)。

ビオチンの欠乏は、大量の生卵白を摂取することで発症することが知られている (Boas, 1927; Sydenstricker *et al*, 1942)。最近では、わが国の特殊調製粉乳にビオチンが含まれないため、人工栄養乳児においてビオチン欠乏症が報告されている (Watanabe *et al*, 2013; 湯浅ら, 2012)。また、ビオチン代謝に関連がある HCS (Suzuki *et al*, 2005) や BTD (Wolf, 2005) の先天性な欠損によって、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 (multiple carboxylase deficiency; MCD) と呼ばれる重度のビオチン欠

乏症が発症することが知られている。この他に、抗てんかん薬の服用により、血液中や尿中のビオチン含量が低下することが報告されている (Krause *et al*, 1985; Mock and Dyken, 1997)。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、ヒトおよびげっ歯類において明らかにされている。また、ビオチン欠乏の生化学的な影響としては、リンパ球 PCC 活性低下や (Stratton *et al*, 2006)、MCC 活性の低下によるロイシン異化代謝物である 3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-hydroxyisovaleric acid; 3-HIA) の尿中排泄量が増加すること (Mock *et al*, 1997) が報告されている。

1.3 ビオチンと脳

これまでに、脳や中枢神経系とビオチンの関連については、いくつか報告されている。ヒトにおいては、重度のビオチン欠乏症状を呈する MCD 幼児患者において、無気力、けいれん発作および脳水腫などの中枢神経系の症状が発症することが知られている (Sweetman and Williams, 1995)。また、ビオチン欠乏を呈した幼児において、神経的な衰弱や意識障害を呈したとの報告もある (Mardach *et al*, 2002)。これらの中枢神経症状は、カルボキシラーゼや HCS、BTD などのビオチン関連タンパク質の欠損により生じるが、大抵はビオチン投与により回復することから、ビオチンは中枢神経の機能維持に必須のビタミンであると考えられる。

動物実験においても、ビオチン欠乏が脳に及ぼす影響についてはいくつか報告されている。例えば、ビオチン欠乏幼若マウスの脳ではビオチン含量は低下しないこと (Yuasa *et al*, 2013; Osada *et al*, 2004) や、ビオチン欠乏幼若ラットの脳におけるビオチン含量は、低下するもののある程度保たれることが報告されている (Bhagavan and Coursin, 1970)。また、ビオチン欠乏時の脳においては、PC の酵素活性がある程度保たれるよう

である (Schrijver *et al*, 1979; Sander *et al*, 1982)。このほかの影響として、ビオチン欠乏ラットにおいて、血中コレステロールの組成が変化するなどの脂質代謝異常が確認されるが、大脳皮質および小脳においては変化しないことが明らかにされている (Suchy and Wolf, 1986)。分子レベルでの影響として、ビオチン欠乏ラットの肝臓や腎臓において PC と PCC のタンパク質発現量が低下するが、脳では低下しないことが報告されている (Rodríguez-Meléndez *et al*, 2001)。また、ビオチン欠乏ラットのホロカルボキシラーゼ、SMVT および HCS などビオチン関連遺伝子の発現量は、肝臓では著しく低下するが、脳では変化しないことが示されている (Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。これらの報告から、ビオチン欠乏時には、脳ではビオチンやビオチン関連タンパク質の機能および発現量が、ある程度維持されていると考えられる。

ビオチン欠乏が脳機能に及ぼす影響としては、ビオチン欠乏ラットの海馬において、学習や記憶と関連が深いとされる神経細胞新生数が減少すると報告されている (遠藤ら, 2007; 猪股ら, 2008)。また、ビオチン欠乏ラットの海馬を用いたマイクロアレイ解析により、情報伝達や軸索伸長に関わる複数の遺伝子発現が抑制されていたことが示されている (森ら, 2006)。さらに、海馬においては、脳の他の部位と比べてビオチンより多く含んでおり、海馬の働きにはビオチンが特異的に関与している可能性が示されている (Wang and Pevsner, 1999)。このように、ビオチンが脳機能と関与している可能性が示唆されている。

上記のように、ビオチン欠乏の生体への影響として、ヒトで中枢神経症状を呈することや、実験動物において脳内のビオチン含量が低下しないことから、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。しかし、脳におけるビオチンの役割や、ビオチン欠乏が脳へ与える影響については不明な点が多い。また、脳の形成や発達段階に当

たる胎生期および授乳期におけるビオチンの役割については、ほとんど検討されていない。そこで、本論文では、脳におけるビオチンの役割について検討した。なお、脳の形成がほとんど胎生期に終了することから、時期によりビオチンの役割が異なる可能性が考えられたため、いくつかのライフステージにおける検討を行った。具体的には、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出産児の脳機能関連因子に及ぼす影響、③幼若期のビオチン欠乏が脳に与える影響について、それぞれ検討した。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した。

第 2 章 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

2.1 背景

脳の形成は、胎生期にほとんどが完了することが知られている (Bayer *et al*, 1993)。

また、脳機能の発達、出産後年齢が小さいほど活発に行われている。そのため、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、重度の栄養障害により死亡した生後 1 年のヒト乳児において、脳重量や脳中タンパク質、DNA および RNA 含量などが低下すると報告されている (Winick and Rosso, 1969; Winick, 1970)。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 (Smithells *et al*, 1983; Vergel *et al*, 1990; Berry *et al*, 1999)、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、動物実験では、妊娠期および授乳期においてラット母体の低タンパク質食を摂取させると、離乳直後の出産児の脳重量や脳中総タンパク質含量が低下することが報告されている (Marín *et al*, 1995)。また、妊娠期および授乳期においてラット母体をビタミン B₁₂、ビタミン B₂、葉酸およびコリン欠乏状態にすると、離乳後の出産児において学習能力が低下することが報告されている (Blaise *et al*, 2009)。このような報告から、妊娠期・授乳期において母体が栄養素欠乏状態になると、出産児の脳の発育や機能が抑制されることが考えられる。

これまでに、妊娠期におけるビオチン欠乏が胎児の脳に及ぼす影響については、Taniguchi と Watanabe (2008) により検討されている。妊娠マウス母体をビオチン欠乏飼料で飼育すると、妊娠 12 日目と 15 日目の胎児脳において、ビオチン含量およびホロ

カルボキシラーゼ発現量が減少する。このように、母体のビオチン欠乏は、胎児の脳においてカルボキシラーゼの機能低下を招くと考えられる。しかし、授乳期におけるビオチン欠乏が及ぼす影響については、幼若期などと比べて報告されていない。そのため、脳の形成や発達段階におけるビオチンの役割については不明である。

このように、妊娠期や授乳期などの脳の形成・発達段階におけるビオチンの役割は重要であると考えられるが不明な点が多い。そこで、本研究では、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や遺伝子発現の変化について検討し、脳におけるビオチンの役割を明らかにした。

2.2 実験方法

2.2.1 実験動物

実験プロトコールを Fig. 2-1 に示した。本実験には、10-12 週齢の Wistar 系雌性ラット（日本クレア（株），東京）を用いた。同週齢の Wistar 系雄性ラットと 1 晩同居させて交配させた。翌朝、雌性ラットの膣スメアを採取し、精子が確認できたものを妊娠（Gestation day）0 日目（GD0）とした。ラットをコントロール群（Control group）とビオチン欠乏群（Biotin-deficient group）の 2 群に分けて飼育した（n=6）。すべてのラットは GD22 に出産した。出産日を授乳（Lactation day）0 日目（LD0）とし、母体と出産児は同居させた状態で飼育した。産児数による影響を排除するために、LD3 に 1 腹あたり 8 匹（雄雌 4 匹ずつ）に出産児を間引きした。離乳期にあたる LD21 に母体および出産児を屠殺し試料を得た。ラットの飼育は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 50%、12 時間の明暗サイクル（明期 9:00-21:00）の条件下で行なった。糞食を防ぐために、ス

テンレス網の中敷のあるプラスチックケージで母体 1 匹ずつを個別で飼育した。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。

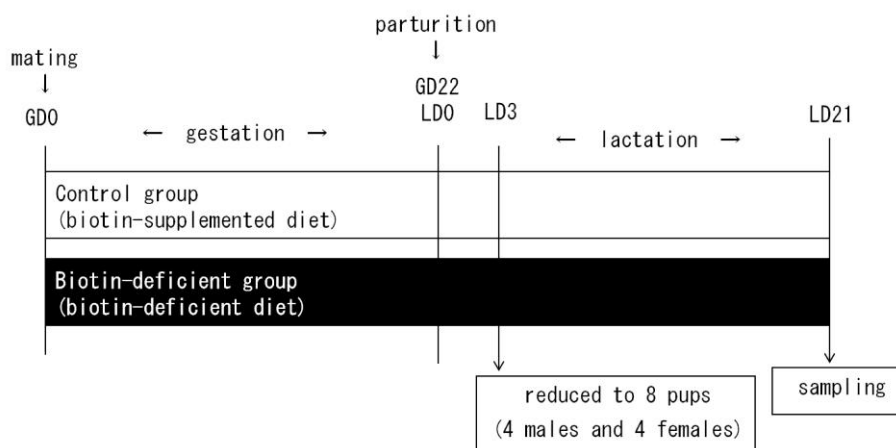


Fig. 2-1 Experimental design of gestation and lactation rat. GD, gestation day; LD, lactation day. The biotin-supplemented diet for control group was made by supplementing the biotin-deficient diet with 2.0 mg of D-biotin/kg.

2.2.2 飼料および飲料水

本実験で用いたビオチン欠乏飼料は、AIN-93G の飼料組成をベースに、タンパク質源を乾燥卵白として作製した（Table 2-1）。GD0 から LD21 までの実験期間を通して、ビオチン欠乏群にはビオチン欠乏飼料を、コントロール群にはビオチン欠乏飼料に D-ビオチンを 2 mg/kg 飼料の濃度で添加したビオチン添加飼料を与えた。飼料および飲料水（蒸留水）は自由摂取とした。

Table 2-1 Composition of the biotin-deficient diet.

Ingredient	(g/100 g)
Egg white	20.00000
L-cystine	0.30000
β -cornstarch	39.74860
α -cornstarch	13.20000
Sucrose	10.00000
Soybean oil	7.00000
Cellulose, powdered	5.00000
Mineral mixture (AIN-93G)	3.50000
Vitamin mixture (biotin free) ¹	1.00000
Choline bitartrate	0.25000
Tert-butylhydroquinone	0.00140
Total	100.00000

¹Composition of Vitamin mixture (biotin free)

Ingredient	(g/100 g)
All trans-retinol acetate (500,000IU/g)	0.08000
Cholecalciferol (400,000IU/g)	0.02500
All-rac- α -tocopheryl acetate	1.50000
Phylloquinone	0.00750
Thiamine hydrochloride	0.06000
Riboflavin	0.06000
Pyridoxine hydrochloride	0.07000
Cyanocobalamin (0.1%)	0.25000
Folic acid	0.02000
Calcium pantothenate	0.16000
Nicotinic acid	0.30000
Powdered sucrose	97.46750
Total	100.00000

2.2.3 試料採取

妊娠ラットについては、飼料摂取量の測定を毎日、体重の測定を毎週行なった。また、出産児については、体重の測定を LD3、LD6、LD13、LD20 に行なった。すべてのラットは、屠殺前日に代謝ケージ（日本クレア（株），東京）により、絶食下で 24 時間尿を採取した。採尿後、イソフルラン麻酔下で屠殺し、母体の血清および尿、出産児の血清、尿、肝臓、脳（大脳皮質および海馬）を採取した。

血清および尿はそのまま分析に用いた。その他の試料は、1% triton-X100 および 1% protease inhibitor を含む PBS (pH7.4) を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3,000 rpm、10 分、4℃) 後、上清を分析に用いた。すべての試料は測定時まで -40℃ で保存した。

2.2.4 ビオチン含量の測定

ビオチンは、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法により測定した (Fukui *et al*, 1994; 江口ら, 1990)。定量には、ビオチン定量用培地（日水製薬（株）、東京）を用いて 24 時間培養後、OD 610 nm で濁度を測定した。

血清中や組織中のビオチンの一部は、タンパク質と結合した状態で存在している。このようなタンパク質結合型ビオチンと遊離で存在するビオチンは、その機能が異なっていると考えられている。そこで、本研究では、総ビオチン、遊離型ビオチンおよび結合型ビオチンに分けて分析を行った。総ビオチン測定用の試料の前処理は以下の通りである。試料と同量の 2.25 mol/L H_2SO_4 を添加し、オートクレーブ (121℃、2 気圧、60 分) で酸加水分解することで、タンパク質結合型のビオチンを遊離させた。その後、4.5 mol/L NaOH を加えて中和し、総ビオチン測定に供した。遊離型ビオチンの測定には、酸加水分解処理を行わず、そのままの状態での測定に供した。結合型ビオチンは、総ビ

オチンと遊離型ビオチンの差し引きにより算出した。なお、尿中ビオチンはすべて遊離型であるため、尿は遊離型ビオチンのみを測定した。

2.2.5 尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸排泄量の測定

3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) は、ロイシン異化代謝経路の MCC の酵素活性が低下することによって産生される有機酸の 1 つである。ビオチン欠乏時には、MCC 活性低下により 3-HIA の尿中排泄量が増加するため、ビオチン欠乏時のマーカーとして用いられている。

3-HIA の測定には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (LC-VP 有機酸分析システム：島津製作所、京都) を用いた (Watanabe *et al*, 2009)。尿の前処理法としては、遠心分離 (10,000 rpm、5 分) 後の上清を Mini Sarto (0.45 μ m フィルター) (日本ジェネティクス (株)、東京) で限外濾過し、測定に供した。

2.2.6 ホロカルボキシラーゼ発現量の測定

ホロカルボキシラーゼ発現量は、ウエスタンブロット法で測定した (Taniguchi and Watanabe, 2008; Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。試料中のタンパク質濃度を一定に調製し、SDS 還元バッファーを加えて加熱 (95°C、5 分) したものを試料として用いた。SDS-ポリアクリルアミドゲル (8%) に試料をアプライし、Mini-PROTEAN Electrophoresis System (BIO-RAD Laboratories, カルフォルニア) により SDS-PAGE (200 V、50 分) を行なった。電気泳動後のゲルは、ZOOM® IPGRunner™ Mini-Cell (ライフテクノロジーズ・ジャパン (株)、東京) により PVDF メンブレンに転写した (30 V、90 分)。転写後のメンブレンを 1% BSA でブロッキング後、ストレプトアビジン-HRP (サーモフィッシャー

サイエンティフィック（株）、神奈川）を抗体として用い、ECL による化学発光を Image Reader LAS-1000plus（富士フイルム（株）、東京）により検出した。

2.2.7 大脳皮質におけるタンパク質発現の測定

網羅的なタンパク質発現の変化について、二次元電気泳動法により確認した (Watanabe *et al*, 2010)。大脳皮質は cell dissolution solution (7 mol/L 尿素、20 mmol/L ジチオトレイトール (DTT)、2% 3-((3-cholamidopropyl)-dimethylammonium)-1-propanesulfonate (CHAPS)) によりホモジナイズし、遠心分離 (15,000 × g、30 分、4°C) 後、上清を試料とした。タンパク質濃度を一定に調製し、carrier ampholytes (ライフテクノロジーズ・ジャパン（株）、東京) およびブロモフェノールブルー (和光純薬工業（株）、大阪) を添加し、等電点電気泳動用のストリップゲルに添加した。ゲルを試料で膨潤させ、ZOOM IPG Runner (ライフテクノロジーズ・ジャパン（株）、東京) により一次元目の等電点電気泳動を行なった。その後、SDS 還元処理およびアルキル化処理を行なった。続いて、Mini-PROTEAN Electrophoresis System (BIO-RAD Laboratories、カルフォルニア) を用いた SDS-PAGE により二次元目電気泳動 (分子量による分離) を行なった。

電気泳動後のゲルは、CBB Stain One (ナカライテスク（株）、京都) もしくは SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (ライフテクノロジーズ・ジャパン（株）、東京) を用いてタンパク質染色を行ない、タンパク質発現量の変化を確認した。

2.2.8 ビオチン関連遺伝子発現量の測定

ビオチン欠乏ラットやマウスにおいて、ビオチンと関連のある種々の遺伝子の発現量が増加することが報告されている (Rodríguez-Meléndez *et al*, 2001; Pacheco-Alvarez *et al*, 2004; Sawamura *et al*, 2014)。そこで、ビオチンと関与している PC、HCS、SMVT および BTD の mRNA 発現量を、realtimePCR 法により測定した。

試料中の RNA は、TRIzol 試薬により抽出後、Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (ニッポン・ジーン (株)、東京) を用いた DNA 分解処理を行なった。その後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (ライフテクノロジーズ・ジャパン (株)、東京) により、RNA を cDNA へと逆転写した。THUNDER BIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡 (株)、大阪) もしくは Universal SYBR Select Master Mix (ライフテクノロジーズ・ジャパン (株)、東京) を用いて、cDNA 25 ng をリアルタイム PCR Applied Biosystems StepOne (ライフテクノロジーズ・ジャパン (株)、東京) で分析し、 $\Delta\Delta C_t$ 法により相対定量値を求めた (Livak and Schmittgen, 2001)。なお、組織間における発現量の差を確認するために、コントロール群の脳皮質における遺伝子発現量を対照として、相対値を算出した。ハウスキーピング遺伝子には β -actin を用いた。

Table 2-2 Sequence of the primers, gene bank accession numbers, and the size of amplified product for the genes.

Gene	Primer sequences	Accession numbers	Amplicon length (bp)
pyruvate carboxylase (PC)	F: TCCGTGTCCGAGGTGTAAAG R: AATGCCCGCTAGGAAGTGC	NM_012744.2	76
holocarboxylase synthetase (HCS)	F: AGCGTGGACAACCTTCAGC R: CAGAGCAGGGTCCTTTAAGTG	>XM_221630.7	104
sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT)	F: TGATGCCTTCTACCCTGTCC R: ACTGCAATGACTGTGGTGG	NM_130746.1	110
biotinidase (BTD)	F: TCGAAGACGTGCCACAG R: AACAGCCGAGGAGGAAGAC	NM_001012047.1	93
β -actin	F: ACTCTGTGTGGATTGGTGGC R: TCATCGTACTCCTGCTTGCTG	NM_031144.3	81

F, Forward; R, Reverse.

2.2.9 タンパク質濃度の測定

試料中のタンパク質濃度は、BCA protein assay kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）、神奈川）を用いた BCA (bicinchoninic acid) 法により測定した。

また、「2.2.7 大脳皮質におけるタンパク質発現の測定法」で用いた試料には、還元剤である DTT を加えているため BCA 法は適用できない。そこで、これらの試料については、Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）、神奈川）を用いた Bradford 法により、タンパク質濃度を測定した。

2.2.10 尿中のクレアチニン濃度の測定

尿中のビオチン量はクレアチニン濃度で補正を行った。尿中クレアチニンは Jaffe 法により測定した。

2.2.11 統計学的解析

すべての測定値は、平均値±標準偏差 (mean±SD) で示した。データの集計には Microsoft Excel 2010 (日本マイクロソフト (株)、東京) を用い、統計処理はエクセル統計 Statcell 3 ((有) オーエムエス出版、埼玉) により行なった。統計処理法は、2 群間の差を確認する場合は Student's *t* test を用い、3 群以上の間の差を確認する場合は多重比較検定 Tukey-Kramer test により行なった。有意水準は $p<0.05$ とした。

2.3 結果

2.3.1 体重、飼料摂取量および脳重量

母体の飼料摂取量は、妊娠期 (飼育 1-3 週目) では、2 群間で差はみられなかった (Fig. 2-2A)。授乳期 (飼育 4-6 週目) では、ビオチン欠乏群において有意に低かった ($p<0.05$)。母体の体重は、全ての期間を通して 2 群間で差はみられなかった (Fig. 2-2B)。

出産児の体重は、ビオチン欠乏群において LD3 より有意に低値を示し、日数が進むにつれその差は大きくなった ($p<0.05$) (Fig. 2-2C)。

出産児の脳湿重量は、ビオチン欠乏群で有意に低下し ($p<0.05$)、相対重量ではビオチン欠乏群で有意に高値を示した ($p<0.05$) (Fig. 2-3)。

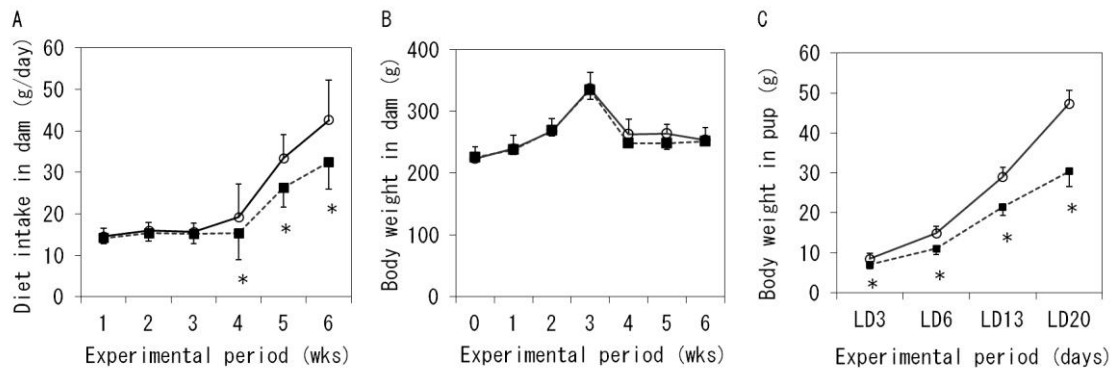


Fig. 2-2 Changes in diet intake and growth of dam and pup. A, diet intake in dam (n=6); B, body weight in dam (n=6); C, body weight in pup (n=23-30). Control group (○). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD. Diet intake and body weight were compared between groups each week. * $p < 0.05$ (Student's t test).

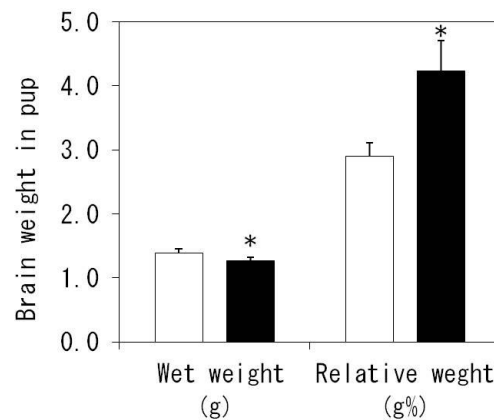


Fig. 2-3 Brain weight in pup. Relative weight (%) of brain was calculated as follow; wet brain weight (g)/body weight (g) $\times 100$. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n=15. * $p < 0.05$ (Student's t test).

2.3.2 ビオチン状態

ビオチン欠乏群の母体および出産児において、血清ビオチン含量(総量および遊離型)と尿中ビオチン排泄量は有意に低値を示した ($p<0.05$) (Table 2-3)。尿中 3-HIA 排泄量は、母体が 2.3 倍に、出産児が 59.9 倍へと増加しており ($p<0.05$)、増加率は出産児の方が高かった。

ビオチン欠乏群の出産児の肝臓については、ビオチン含量(総量、遊離型および結合型)が有意に低値を示し ($p<0.05$) (Fig. 2-4A)、ホロ型 PC、MCC および PCC 発現量は著しく減少した (Fig. 2-4B)。

Table 3 Biotin status in rat.

	Control	Biotin-deficient
Dam (n=6)		
Serum total biotin (pmol/mL)	434.53 \pm 76.43	18.06 \pm 2.65*
Serum free biotin (pmol/mL)	426.21 \pm 47.87	19.38 \pm 1.85*
Urinary biotin (μ mol/mol creatinine)	168.74 \pm 95.73	1.72 \pm 1.66*
Urinary 3-HIA (μ mol/mol creatinine)	94.98 \pm 77.72	216.72 \pm 66.84*
Pup (n=15-23)		
Serum total biotin (pmol/mL)	325.33 \pm 220.80	8.67 \pm 1.20*
Serum free biotin (pmol/mL)	312.43 \pm 67.78	9.64 \pm 1.77*
Urinary biotin (μ mol/mol creatinine)	299.83 \pm 72.37	2.39 \pm 2.19*
Urinary 3-HIA (μ mol/mol creatinine)	32.07 \pm 60.06	1921.92 \pm 900.88*

Data are mean \pm SD. * $p<0.05$ (Student's *t* test).

3-HIA, 3-hydroxyisovaleric acid.

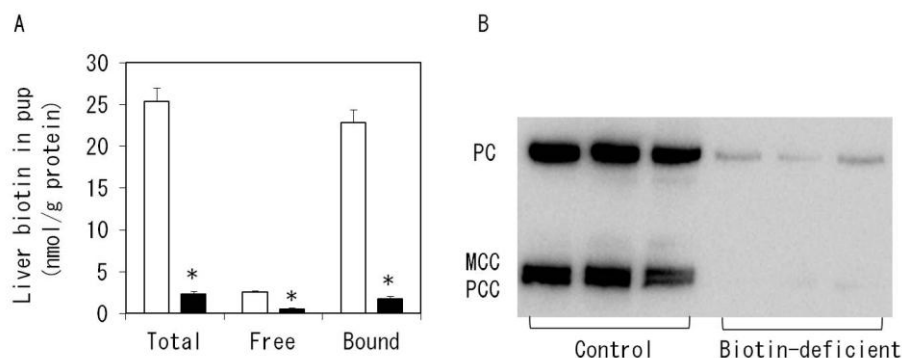


Fig. 2-4 Biotin content and holocarboxylases expression of liver in pup. A, total, free and bound biotin content (n=8). Control group (□). Biotin-deficient group (■); B, Representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass (n=3). Data are mean±SD. * $p<0.05$ (Student's *t* test). PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

2.3.3 出産児の脳におけるビオチン含量およびホロカルボキシラーゼ発現量

ビオチン欠乏群における、大脳皮質および海馬でのビオチン含量の変化をみると、総ビオチン含量がそれぞれ 0.4 倍および 0.3 倍に減少した ($p<0.05$) (Fig. 2-5A)。遊離型ビオチン含量は、それぞれの部位で 0.1 倍に減少した ($p<0.05$) (Fig. 2-5B)。一方、結合型ビオチン含量は、それぞれ 31.6 倍および 3.0 倍に増加しており ($p<0.05$)、大脳皮質でより顕著に増加が認められた (Fig. 2-5C)。

ビオチン欠乏群における脳のホロ型 PC、MCC および PCC 発現量については、大脳皮質と海馬とも著しく減少していた (Fig. 2-6A、B)。

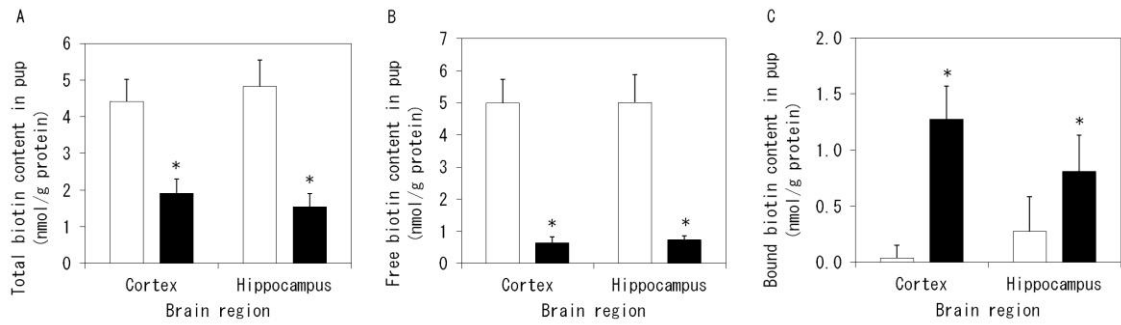


Fig. 2-5 Biotin content of brain in pup. A, total biotin content; B, free biotin content; C, bound biotin content. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean \pm SD, n=8. * p <0.05 (Student's t test).

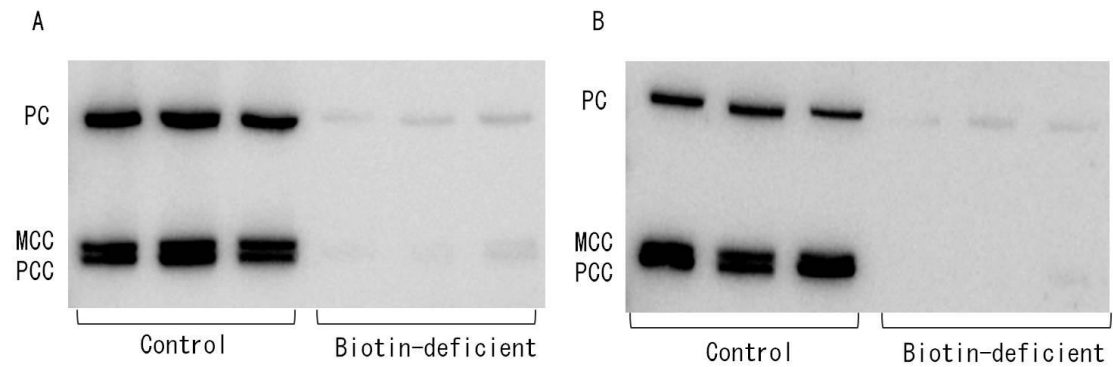


Fig. 2-6 Representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass of brain in pup. A, cortex; B, hippocampus in pup. n=3. PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

2.3.4 出産児の大脳皮質におけるタンパク質発現の変化

出産児の大脳皮質においてタンパク質発現の変化を網羅的に解析した結果、2群間でいくつかのタンパク質発現量に違いが認められた (Fig. 2-7)。このうち、ビオチン欠乏群で減少しているタンパク質は1個 (スポット1; 分子量 55-65、等電点 6.5-7.5) 確認された。また、増加しているタンパク質は3個 (スポット2、分子量 55-65、等電点 6.0-7.0; スポット3、分子量 65-75、等電点 6.0-7.0; スポット4、分子量 45-55、等電点 6.0-7.0) 確認された。

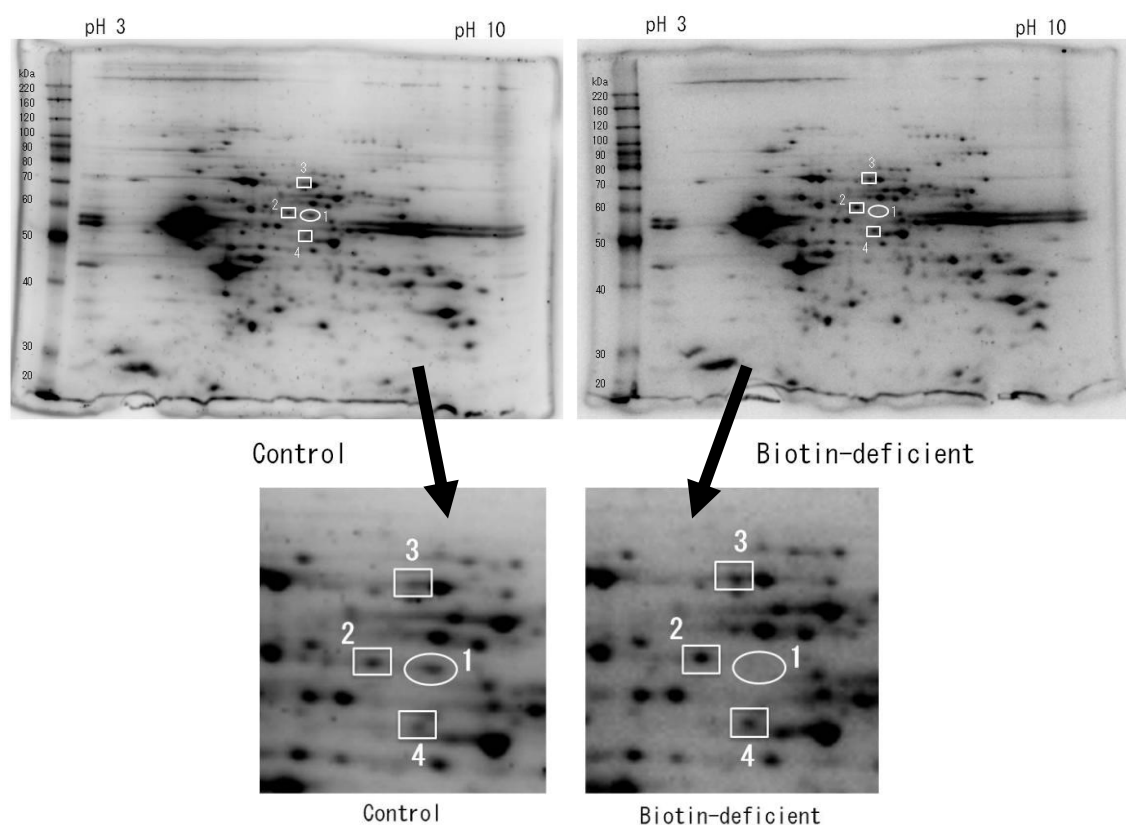


Fig. 2-7 Protein expression of cortex in pup. n=3. Decreased in biotin-deficient group (○). Increased in biotin-deficient group (□). Protein spot 1, MW: 55-65, PI: 6.5-7.5. Protein spot 2, MW: 55-65, PI: 6.0-7.0. Protein spot 3, MW: 65-75, PI: 6.0-7.0. Protein spot 4, MW: 45-55, PI: 6.0-7.0.

2.3.5 出産児の脳におけるビオチン関連遺伝子の変化

出産児の脳におけるビオチン関連遺伝子発現量を Fig. 2-8 に示した。ビオチン欠乏群の出産児の脳皮質においては、SMVT、PC、HCS および BTD の mRNA 発現量が、それぞれコントロール群の 0.6 倍、0.6 倍、0.5 倍および 0.7 倍まで低下した ($p < 0.05$) (Fig. 2-8A、B、C、D)。出産児の海馬における SMVT、PC および HCS の mRNA 発現量は、それぞれコントロール群の 1.5 倍、1.9 倍および 1.8 倍に上昇した ($p < 0.05$) (Fig. 2-8A、B、C)。海馬の BTD 発現量には変化がみられなかった (Fig. 2-8D)。

コントロール群の脳皮質において、SMVT、PC、HCS および BTD の mRNA 発現量が、海馬よりも有意に高値を示した ($p < 0.05$)。ビオチン欠乏群の脳皮質において、SMVT、PC および HCS の mRNA 発現量が海馬よりも有意に低値を示し ($p < 0.05$)、BTD 発現量では差はみられなかった。

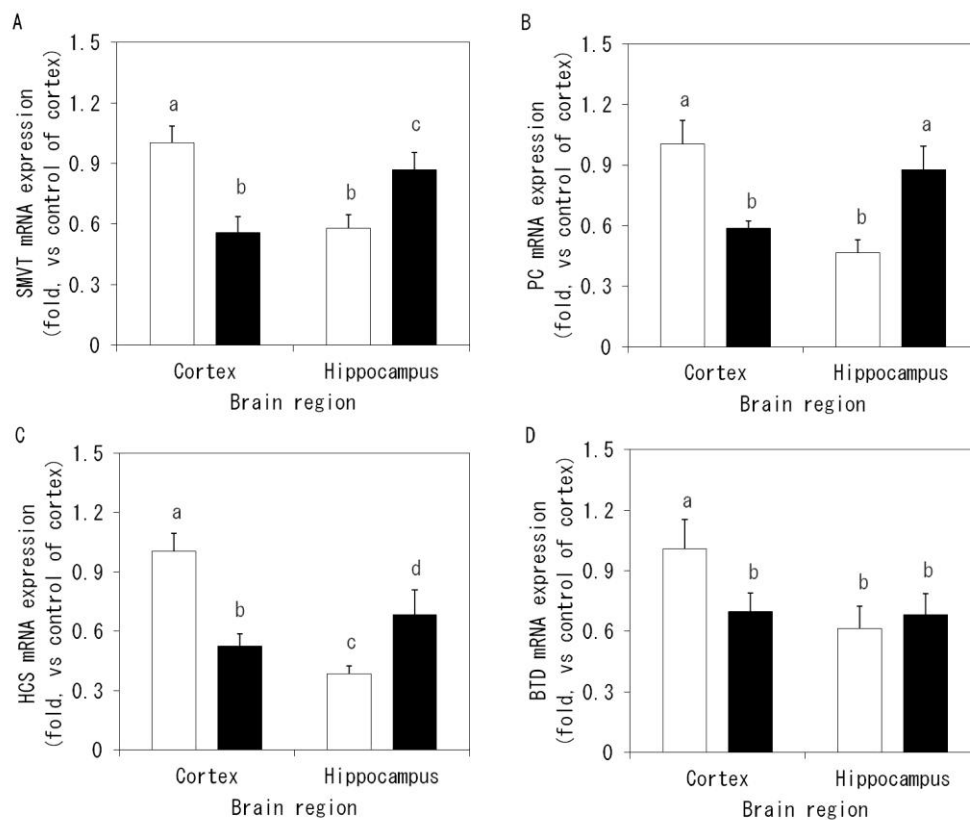


Fig. 2-8 mRNA expression of brain in pup. A, sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT); B, pyruvate carboxylase (PC); C, holocarboxylase synthetase (HCS); D, biotinidase (BTD). Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean \pm SD, n=7. ^{a-d} p <0.05 (Tukey-Kramer test).

2.4 考察

本研究では、妊娠期・授乳期における母体のビオチン欠乏状態が出産児の脳に及ぼす影響について、ビオチン含量、タンパク質および遺伝子発現の変化などから検討した。この結果、ビオチン欠乏群における出産児の脳皮質および海馬中の総ビオチンおよび遊離型ビオチン含量と、ホロカルボキシラーゼ発現量が低下した。これまでに、幼若ラットの脳において、ホロカルボキシラーゼ発現量は低下しないと報告されており

(Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)、今回の結果と一致しない。この理由として、幼若期と比べて、妊娠期・授乳期の方が、脳に対するビオチン欠乏の影響が大きいためだと考えられる。Watanabe ら (2009) や Taniguchi と Watanabe (2008) は、妊娠期の母体におけるビオチン欠乏により高頻度で胎児奇形が生じることを報告している。また、ビオチン欠乏マウスにおいて、胎児の脳におけるビオチン含量やホロカルボキシラーゼ発現量が低下することも報告されている (Taniguchi and Watanabe, 2008)。このように、母体のビオチン欠乏は、胎児や出産児に対してより大きな影響を与えと考えられる。また、ビオチン欠乏群において、大脳皮質および海馬のホロカルボキシラーゼ発現量が減少したが、結合型ビオチン含量は高値を示した。このことから、ビオチン欠乏時には大脳皮質や海馬において、ビオチンがカルボキシラーゼ以外のタンパク質と結合しているのかもしれない。

次に、出産児の大脳皮質においては、ビオチン欠乏によっていくつかのタンパク質発現が変化することが明らかとなった。これまでに、ビオチン欠乏状態の HepG2 細胞やショウジョウバエなどの *in vitro* において、マイクロアレイ解析により種々の遺伝子発現が変化すると報告されている (Rodriguez-Melendez *et al*, 2006; Smith *et al*, 2007)。また、ビオチン欠乏が海馬に及ぼす影響については、森ら (2006) がマイクロアレイ解析により神経伝達に関係する遺伝子の発現が変化したことを報告している。しかし、*in vivo* においてビオチンが欠乏した場合の、大脳皮質におけるタンパク質発現の網羅的な解析は本研究が初めてである。このように、ビオチンが脳内のタンパク質発現に関与していることが示唆された。これまでに、ヒストンにおけるビオチン化修飾が、遺伝子やタンパク質の発現量を変化させることが報告されている (Zempleni *et al*, 2008; Hassan and Zempleni, 2008)。実際に、ヒストンのビオチン化は、SMVT の発現と関連

していること (Gralla *et al*, 2008) や、ビオチン含量の低下によりヒストンのビオチン化が減少することで、カルボキシラーゼ発現量が低下する可能性について示されている (Takechi *et al*, 2008)。本研究においても、ヒストンのビオチン化などのエピジェネティックな影響により、大脳皮質における種々のタンパク質発現が変化したのかもしれない。今回変化が認められたタンパク質はビオチンとの関連が深いことが予測されるため、これらのタンパク質を同定することで脳におけるビオチンの役割を具体的に明らかにしたい。

本研究では、ビオチン欠乏群の PC、HCS および SMVT の mRNA 発現量が、大脳皮質と比べて海馬の方が高かった。ビオチン含量はどちらの部位でもほとんど差はみられなかったため、ビオチン欠乏時には大脳皮質よりも海馬の方がビオチンを要求しているのかもしれない。実際に、成獣ラット海馬では他の部位と比べてビオチンを多く含むとの報告もあり (Wang and Pevsner, 1999)、このことから、海馬はビオチンと関わりの強い部位であると推察される。Sawamura ら (2014) は、ビオチン欠乏妊娠マウスにおける SMVT のタンパク質および遺伝子発現量が胎盤では増加するが、母体肝臓では低下傾向にあるなど、組織特異性を示している。母体においてビオチンが欠乏した場合、胎児がビオチン欠乏状態とならないように、胎盤を通してビオチンを多く取り込もうとしていると推察される。このように、*in vivo* においてビオチンが欠乏した場合には、ビオチン関連遺伝子の発現量が変化させることで、ビオチンの必要性が高い組織に優先的にビオチンを取り込むことや、ビオチン関連遺伝子の機能を保つ仕組みがあるようである。これらの報告も含めて考察すると、ビオチン欠乏時には、脳では特に海馬がビオチンを必要としており、SMVT 発現量を上昇させることで不足しているビオチンの取り込みを上昇させていると考えられる。また、PC および HCS の mRNA 発現量を上昇させ、これら

ビオチン関連酵素の機能を維持しようとしていると推察される。一方、ビオチン欠乏時には大脳皮質は海馬と比べてビオチンの必要性が低いため、SMVT の発現量を低下させてビオチンの取り込みを抑えるとともに、PC や HCS の発現量を減少させることでビオチンの消費を抑制させている可能性が考えられる。つまり、ビオチン欠乏時の脳においては、特に海馬においてビオチンやビオチン関連酵素を必要としているのかもしれない。なお、大脳皮質において BTD の遺伝子発現量が低下したが、酵素活性は変化しなかったため（未掲載）、ビオチン欠乏が出産児脳の BTD に及ぼす影響は小さいと考えられる。

以上の結果から、妊娠期・授乳期においては、幼若期よりもビオチン欠乏の影響が大きく、出産児の脳におけるカルボキシラーゼ活性の低下や、種々のタンパク質や遺伝子発現を変化させることが明らかとなった。また、ビオチンは、脳では特に海馬との関連が強い可能性が示唆された。

第3章 母体のビオチン欠乏が出産児の脳機能関連因子に及ぼす影響

3.1 背景

第2章において、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などへ影響を与えていると推定されるが、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と脳機能の関連としては、ビオチン欠乏幼若ラットの海馬における神経細胞新生数が減少するという報告がある（遠藤ら，2007；猪股ら，2008）。神経細胞新生とは、脳において海馬をはじめとする一部の部位で起こっている神経細胞が新しく生まれる現象である。これまで、特に成人の脳は衰えるのみであると考えられてきたが、神経細胞が新生していることが発見され（Eriksson *et al*, 1998）、注目を集めている。新生した神経細胞は学習・記憶に関与していることが報告されている（Shors *et al*, 2001）。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考えられる。神経細胞新生と関連が深い因子としては、脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor; BDNF）が知られている。BDNFは、大脳皮質や海馬に広く発現しており（Schmidt-Kastner *et al*, 1996; Conner *et al*, 1997）、神経細胞の生存や機能維持などに重要な役割を果たしている（Thoenen, 1995; Lewin, 1996）。脳内において、BDNFは神経細胞新生を誘発することも知られており、ビオチン欠乏はBDNFの減少を招くかもしれない。また、ビオチン依存性カルボキシラーゼであるPCは、脳ではTCAサイクルを介してグルタミン酸やγ-アミノ酪酸（GABA）などの神経伝達に関与するアミノ酸の産生に関与していることが報告されている（Patel, 1974; Hertz, 2013）。また、

MCC や PCC も分枝鎖アミノ酸の異化代謝に関与しており、アミノ酸異化を介して TCA サイクルの中間体を給与することで、グルタミン酸や GABA などの産生に関与していると推定される。そのため、ビオチン欠乏時にはカルボキシラーゼ活性が低下し、脳における神経伝達に関与するアミノ酸の産生に影響を与えている可能性がある。

以上のように、ビオチン欠乏は BDNF や神経伝達に関与するアミノ酸などの脳機能関連因子を脳内で変化させることで、脳機能に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、本研究では、ビオチンと脳機能の関連を明らかにするために、母体のビオチン欠乏が、出産児の脳における脳機能関連因子に及ぼす影響について検討した。

3.2 実験方法

本実験は、第 2 章で行った実験で使用した動物を用いたため、「実験動物」、「飼料および飲料水」および「試料採取」については前述の通りである。

3.2.1 脳由来神経栄養因子の遺伝子発現量の測定法

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)) の測定方法は、「2.2.8 遺伝子発現量の測定法」と同様に realtimePCR 法により分析し、 $\Delta\Delta Ct$ 法により相対定量値を求めた (Livak and Schmittgen, 2001)。使用したプライマーは Table 3-1 に示した。ハウスキーピング遺伝子には β -actin を用いた。

Table 3-1 Sequence of the primers, gene bank accession numbers, and the size of amplified product for the genes.

Gene	Primer sequences	Accession numbers	Amplicon length (bp)
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	F: GCAGTCAAGTGCCTTTGGAG R: GCCGAACCCTCATAGACATG	M61178.1	93
β -actin	F: ACTCTGTGTGGATTGGTGGC R: TCATCGTACTCCTGCTTGCTG	NM_031144.3	81

F, Forward; R, Reverse.

3.2.2 脳内アミノ酸含量の測定法

大脳皮質および海馬のアミノ酸含量を、HPLC を用いた OPA 法により測定した。今回は、興奮性神経伝達に関与しているグルタミン酸 (GLU)、抑制性神経伝達に関与している γ -アミノ酪酸 (GABA) および GLU の前駆体であるグルタミン (GLN) について検討した。試料の前処理には、クロロホルムによる脂質の除去と、10% (w/v) トリクロロ酢酸による除タンパク処理を行い、0.45 μ m フィルターである Mini Sarto (日本ジェネテックス (株)、東京) で限外濾過し、測定に供した。

3.2.3 血清中コルチコステロン測定法

グルココルチコイドは糖新生を促進させるホルモンの 1 つで、低血糖時に上昇することが予測される。最近では、脳における BDNF 含量の低下は血中グルココルチコイドの高値に起因することが報告されている (Smith *et al*, 1995)。本研究では脳における BDNF 遺伝子発現量との関連を明らかにするために、血中グルココルチコイド濃度の分析を行った。

ラットのグルココルチコイドのうち、最も作用の強い物質はコルチコステロンである。このため、グルココルチコイドの上昇の有無を評価するために、血清中コルチコステロン濃度を HPLC により測定した (Oi *et al*, 2001; Wei *et al*, 1987)。血清の前処理法としては以下の通りである。クロロホルムによりコルチコステロンを抽出し、有機溶媒層を減圧乾固し揮発させた。残渣を 70%メタノールにより再溶解し、Mini Sarto (0.45 μ m フィルター) (日本ジェネティクス (株)、東京) で限外濾過し、測定に供した。

3.2.4 血清中グルコース測定法

ビオチン欠乏時には、血糖値が低下することが報告されている (曾根ら, 2007; Hernández-Vázquez *et al*, 2012)。低血糖によって糖新生が活性化し、血中グルココルチコイドの上昇を招いていると考え、血清中グルコース濃度を測定した。

血清中グルコース測定には富士ドライケム 3500V (富士フイルム (株)、東京) を用いた。

3.2.5 統計学的解析法

すべての測定値は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で示した。データの集計には Microsoft Excel 2010 (日本マイクロソフト (株)、東京) を用い、統計処理はエクセル統計 Statcell 3 ((有) オーエムエス出版、埼玉) により行なった。統計処理法は、Student's *t* test を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3.3 結果

3.3.1 脳における BDNF の遺伝子発現量

ビオチン欠乏群の脳皮質および海馬における BDNF の mRNA 発現量は、それぞれ 0.9 倍 ($p<0.1$) および 0.6 倍 ($p<0.05$) に減少した (Fig. 3-1)。

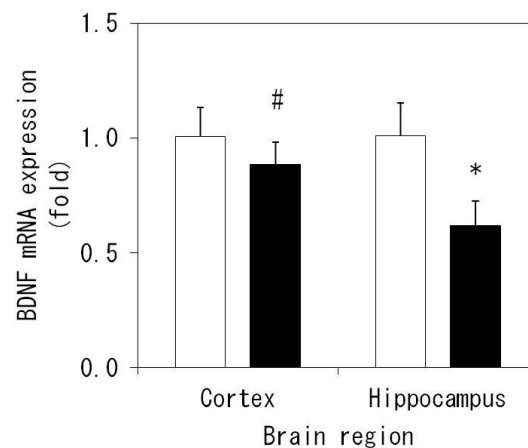


Fig. 3-1 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression of brain in pups. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean \pm SD, $n=5-7$. # $p<0.1$, * $p<0.05$ (Student's t test).

3.3.2 脳内のアミノ酸含量

コントロール群と比べて、ビオチン欠乏群においてみられた変化について Fig. 3-3 に示した。脳皮質においては、グルタミン酸およびグルタミン含量が、それぞれ 0.7 倍および 0.4 倍にまで低下した ($p<0.05$) (Fig. 3-2A)。海馬においては、グルタミン酸含量は 0.8 倍に ($p<0.1$)、グルタミン含量は 0.6 倍に ($p<0.05$)、それぞれ減少した (Fig. 3-2B)。なお、GABA 含量は、脳皮質および海馬のどちらにおいても変化が認められなかった。

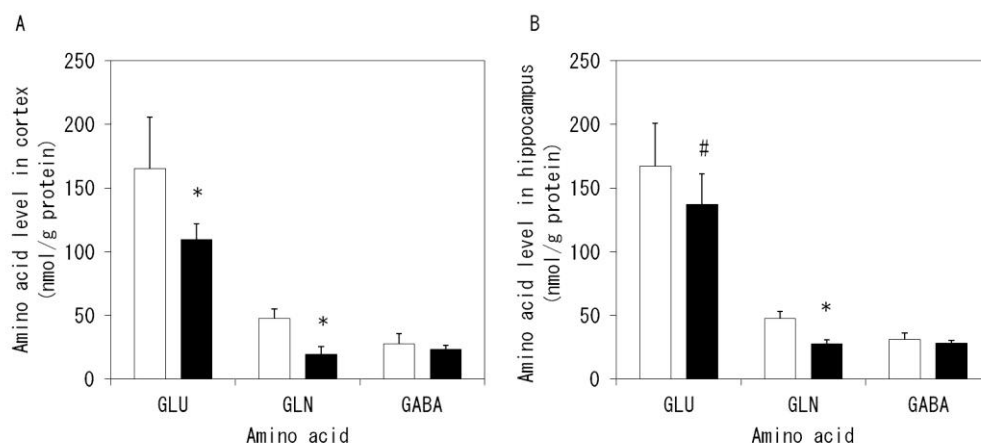


Fig. 3-2 Amino acids concentration of brain in pup. A, cortex; B, hippocampus. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Data are mean±SD, n=8. # $p<0.1$, * $p<0.05$ (Student's t test). GLU, glutamate; GLN, glutamine; GABA, γ -aminobutyric acid.

3.3.3 血清コルチコステロンおよびグルコース濃度

ビオチン欠乏群においては、血清コルチコステロン濃度は1.4倍に上昇し ($p<0.05$)

(Fig. 3-3A)、血清グルコース濃度が0.3倍に減少した ($p<0.05$) (Fig. 3-3B)。

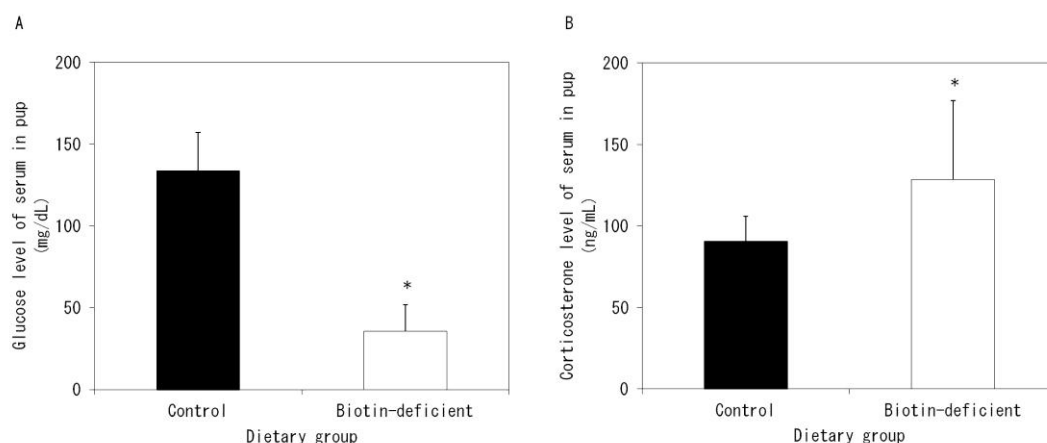


Fig. 3-3 Corticosterone and glucose level of serum in pup. A, corticosterone level (n=10); B, glucose level (n=8-9). Data are mean±SD. * $p<0.05$ (Student's t test).

3.4 考察

本研究では、ビオチン欠乏群の出産児ラットにおいて、海馬における BDNF 遺伝子発現量の低下や、大脳皮質における神経伝達に関与しているグルタミン酸などのアミノ酸濃度の低下が認められた。これまでに、ビオチン欠乏ラットの海馬において、神経細胞新生が減少することが報告されている（遠藤ら，2007；猪股ら，2008）。海馬における神経細胞新生は学習や記憶に関連しており、ビオチン欠乏はこれらの脳機能を阻害している可能性が考えられる。BDNF は神経細胞新生を調節していることから、本研究の結果より、ビオチン欠乏時には海馬の BDNF 発現量の低下に起因して、神経細胞新生が減少すると考えられる。また、脳内のグルタミン酸などの濃度の低下は、ビオチン欠乏によりカルボキシラーゼ活性の低下を招き、アミノ酸代謝が変化したため起こったと考えられる。このことから、ビオチン欠乏時には、脳のアミノ酸含量の低下を介して、神経伝達を低下させているかもしれない。

ビオチン欠乏により、海馬における BDNF 遺伝子発現量の低下がみられたため、その原因について検討したところ、血中コルチコステロン濃度の上昇と血糖値の低下が認められた。グルココルチコイドは糖新生のみでなく、ストレス時に多く分泌される抗ストレスホルモンである。近年、ストレス時に血中グルココルチコイドが上昇することで、脳内の BDNF 発現量が低下すると報告されている (Smith *et al*, 1995; Manji *et al*, 2001)。本研究でみられた BDNF 遺伝子発現量の低下は、血清中コルチコステロン濃度が上昇した結果生じたと考えられる。また、血清コルチコステロンの上昇は、低血糖に対して糖新生が活性化されたために起こったと考えられる。このように、ストレス時とは機構は異なるものの、ビオチン欠乏は低血糖と高グルココルチコイド血症を介して、海馬における BDNF の遺伝子発現量を減少させていると考えられる。

最近では、高グルココルチコイド血症が、うつ病などの精神疾患と関連していると報告されている。Hayley ら (2005) は、ヒト高齢者において血中グルココルチコイド濃度が高いほど、海馬の萎縮が激しく、記憶テストの成績が悪くなることを明らかにしている。また、血中グルココルチコイド濃度の上昇によりうつ病が発症する理由の1つとして、脳内の BDNF 発現量の低下が挙げられている (Smith *et al*, 1995)。また、Tamano ら (2009) は、低亜鉛食を与えたラットにおいて、血中グルココルチコイド濃度が増加し、うつ・不安様行動が増加すると報告している。この亜鉛欠乏によるうつ・不安様行動は、海馬におけるグルタミン酸、GABA、グルタミンなどのアミノ酸含量が低下したためであると推定されている。このように、血中グルココルチコイド濃度と脳内 BDNF 発現量およびアミノ酸含量は、うつ病やうつ様行動に関係していることが示唆されている。一方、ビオチン欠乏時には、ラットにおいて記憶・学習能力が低下することや (Stewart *et al*, 1966)、ビオチン欠乏マウスが抑うつ状態であることが示されている (Osada *et al*, 2004)。これらのことから、ビオチン欠乏は高グルココルチコイド血症と海馬の BDNF 発現量やアミノ酸含量の低下を招き、二次的にうつ症状を引き起こす可能性がある。

本研究では、脳機能関連因子の検討を行ったが、行動レベルでの影響については確認していない。今後は、ビオチン欠乏動物において行動レベルでの変化がみられるか検討することで、脳における BDNF やアミノ酸の低下との関連を明らかにすべきである。

本研究の結果、ビオチン欠乏は低血糖および高グルココルチコイド血症を介した海馬内の BDNF 遺伝子発現量の低下や、カルボキシラーゼ活性低下による脳内アミノ酸含量の減少を招くことが見出された。これらの結果から、ビオチン欠乏は、神経細胞新生や神経伝達の減少や、うつ病などの精神疾患と関与している可能性が考えられる。このように、ビオチン欠乏は低血糖状態を介して、二次的に脳機能に悪影響を与える可能性が

示唆された。

第 4 章 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

4.1 背景

第 2 章および第 3 章では、母体のビオチン欠乏が脳へ及ぼす影響について検討を行った。次に、本章では、2 つ目のライフステージとして「幼若期」を対象に、ビオチン欠乏が脳に及ぼす影響について検討を行った。

これまでに、ビオチン欠乏幼若ラットにおいて、肝臓におけるホロカルボキシラーゼ発現量やビオチン関連遺伝子の発現量が低下するが、これらの因子は脳では変化しないことが明らかにされている (Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。また、PC および PCC のタンパク質発現が変化しないことが示されている (Rodríguez-Meléndez *et al*, 2001)。さらに、ビオチン欠乏幼若マウスの脳においては、総ビオチン含量は低下しないことが示されている (Yuasa *et al*, 2013; Osada *et al*, 2004)。これらの報告から、脳においてはビオチン欠乏の影響は小さいと考えられる。しかし、ラットにおいて、海馬には脳の他の部位と比べてビオチンが多量に存在することや (Wang and Pevsner, 1999)、大脳皮質や小脳と比べて脳幹では PC の酵素活性が高いこと (Schrijver *et al*, 1979) など、部位によりビオチン量などに違いがあることが示されている。また、*in vitro* において、NB2a neuroblastoma (神経細胞由来の細胞) ではビオチニルペプチドであるビオシチンの取り込みが行われるが、C6 astrocytoma (グリア細胞由来の細胞) では行われないなど、細胞の種類によってビオチン類縁体の取り込みに違いがあることが示されている (Baur *et al*, 2002)。このような、脳の部位や細胞種の違いによってビオチンや関連因子に差異があることから、脳の部位によってはビオチンの役割や欠乏時の影

響が異なるかもしれないと考えられる。しかし、上記に示している部位以外は、ビオチン欠乏の影響については不明である。

そこで、本章では、幼若ラットを用いて、ビオチン欠乏が脳の各部位の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、脳の各部位におけるビオチンの役割について検証した。

4.2 実験方法

4.2.1 実験動物

実験プロトコールを Fig. 4-1 に示した。3 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本クレア（株），東京）を用いた。コントロール群 (Control group) とビオチン欠乏群 (Biotin-deficient group) の 2 群に分けて飼育した (n=10)。ビオチン欠乏群の飼料摂取量が 2 週目以降に低下したため、制限食群 (Pair-fed group) を設けた (n=10)。8 週間飼育後、屠殺し試料を採取した。ラットの飼育は、室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 50%、12 時間の明暗サイクル（明期 9:00-21:00）の条件下で、5 連ケージにより 1 匹ずつ個別で行なった。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。

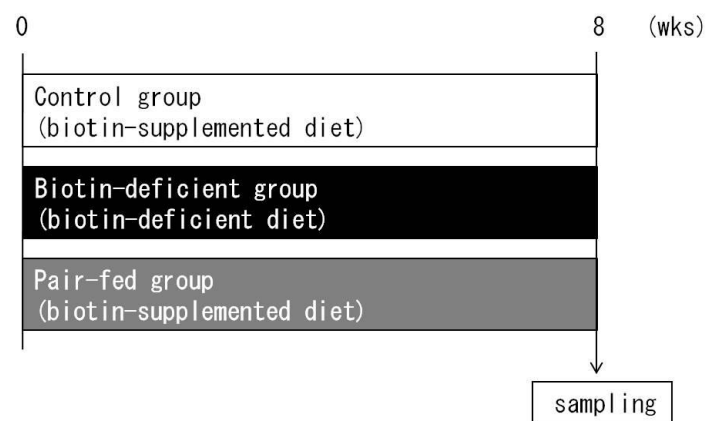


Fig. 4-1 Experimental design. The biotin-supplemented diet for control and pair-fed group was made by supplementing the biotin-deficient diet with 2.0 mg of D-biotin/kg.

4.2.2 飼料および飲料水

本実験で用いたビオチン欠乏飼料は、第2章と同様のものを使用した (Table 2-1)。ビオチン欠乏群にはビオチン欠乏飼料を、コントロール群および制限食群にはビオチン欠乏飼料に D-ビオチンを 2mg/kg 飼料の濃度で添加したビオチン添加飼料を与えた。飼料および飲料水 (蒸留水) は自由摂取とした。

4.2.3 試料採取

摂餌量の測定を毎日、体重の測定を毎週行なった。屠殺前日に代謝ケージ (日本クレア (株), 東京) を用いて、絶食下で 24 時間尿を採取した。採尿後、ジエチルエーテル麻酔下で屠殺し、血清、尿、肝臓、脳を採取した。採取後の脳は、大脳皮質、海馬、視床下部、線条体および小脳に分けて分析に用いた。

血清および尿はそのまま分析に用いた。その他の試料は、1%triton-X100 および 0.02%protease inhibitor を含む PBS (pH7.4) を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3,000

rpm、10 分、4℃) 後、上清を分析に用いた。すべての試料は測定時まで-40℃で保存した。

4.2.4 ビオチン測定法

ビオチンは、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法で測定した (Fukui *et al*, 1994; 江口ら, 1990)。第 2 章の「2.2.4 ビオチン測定法」と同様の方法により、総ビオチン、遊離型ビオチンおよび結合型ビオチンを測定した。

4.2.5 尿中 3-HIA 測定法

3-HIA の測定には、HPLC (LC-VP 有機酸分析システム: 島津製作所、京都) を用いた (Watanabe *et al*, 2009)。測定条件は「2.2.5 尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) 測定法」と同様の方法で行なった。

4.2.6 ホロカルボキシラーゼ発現量の測定法

ホロカルボキシラーゼ発現量はウエスタンブロット法により測定した (Taniguchi and Watanabe, 2008; Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。「2.2.6 ホロカルボキシラーゼ発現量の検出」の方法に従い、分析を行なった。

4.2.7 大脳皮質におけるビオチン化タンパク質発現の測定法

ビオチン欠乏群の大脳皮質において、結合型ビオチン含量が高値を示したが、ホロカルボキシラーゼ発現量はほとんど変化しなかった。このことから、ビオチン欠乏群の大脳皮質では、ビオチンがカルボキシラーゼ以外のタンパク質と結合している可能性が考

えられた。そこで、ビオチン化タンパク質の発現について網羅的な解析を行なった。

大脳皮質のタンパク質を、二次元電気泳動法により等電点および分子量で分離した。二次元電気泳動法の手技は、「2.2.7 大脳皮質におけるタンパク質発現の測定法」で行なった方法と同様である (Watanabe *et al*, 2010)。

二次元電気泳動後のゲルは、「2.2.6 ホロカルボキシラーゼ発現量の測定法」に従い PVDE メンブレンへの転写後、ストレプトアビジン-HRP を用いた抗体反応および ECL による化学発光検出により、ビオチン化タンパク質の発現状況について確認した (Taniguchi and Watanabe, 2008; Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。

4.2.8 ナトリウム依存性マルチビタミン輸送体の遺伝子発現量の測定法

ナトリウム依存性マルチビタミン輸送体 (SMVT) の遺伝子発現量は、「2.2.8 遺伝子発現量の測定法」と同様に realtimePCR 法により分析し、 $\Delta \Delta C_t$ 法により相対定量値を求めた (Livak and Schmittgen, 2001)。なお、組織間における発現量の差を確認するために、コントロール群の肝臓における遺伝子発現量を対照として、相対値を算出した。使用したプライマーは第2章の Table 2-2 に示したものと同様である。ハウスキーピング遺伝子には β -actin を用いた。

4.2.9 タンパク質濃度の測定法

試料中のタンパク質濃度は、「2.2.9 タンパク質濃度の測定法」と同様に BCA 法および Bradford 法により測定した。

4.2.10 尿中のクレアチニン濃度の測定法

尿中クレアチニンは、「2.2.10 尿中のクレアチニン濃度の測定法」と同様に、Jaffe 法により測定した。

4.2.11 統計学的解析法

すべての測定値は、平均値±標準偏差 (mean±SD) で示した。データの集計には Microsoft Excel 2010 (日本マイクロソフト (株)、東京) を用い、統計処理はエクセル統計 Statcell 3 ((有) オーエムエス出版、埼玉) により行なった。統計処理法は、2 群間の差を確認する場合は Student's *t* test を用い、3 群以上の間の差を確認する場合は多重比較検定 Tukey-Kramer test により行なった。有意水準は $p<0.05$ とした。

4.3 結果

4.3.1 飼料摂取量および体重の推移

飼料摂取量は、ビオチン欠乏群において 2 週目以降、有意に低値を示した ($p<0.05$) (Fig. 4-2A)。また、体重は、ビオチン欠乏群および制限食群において 2 週目以降有意に低値を示した ($p<0.05$) (Fig. 4-2B)。

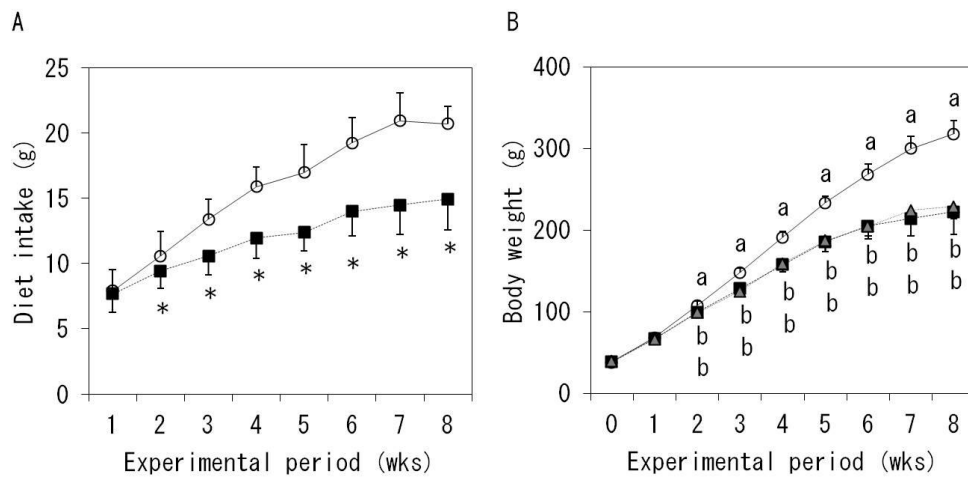


Fig. 4-2 Changes in diet intake and growth of rat. A, diet intake; B, body weight. Control group (○). Biotin-deficient group (■). Pair-fed group (▲). Data are mean±SD, n=10. Diet intake and body weight were compared between groups each week. * $p<0.05$ (Student's t test). ^{a-b} $p<0.05$ (Tukey-Kramer test).

4.3.2 ビオチン状態

ビオチン欠乏群において、コントロール群および制限食群と比較して、血清中ビオチン含量（総量、遊離型）、尿中ビオチン排泄量は有意に低下し（ $p<0.05$ ）、尿中 3-HIA 排泄量は有意に高値を示した（ $p<0.05$ ）（Table 4-1）。

ビオチン欠乏群の肝臓において、コントロール群および制限食群と比較して、ビオチン含量（総量、遊離型および結合型）の低下（ $p<0.05$ ）（Fig. 4-3A）およびホロ型 PC、MCC および PCC の発現量は顕著に減少した（Fig. 4-3B）。

Table 4-1 Biotin nutritional status in rat.

	Control	Biotin-deficient	Pair-fed
Serum total biotin (pmol/mL)	138.70±19.12 ^a	13.70±4.28 ^b	137.27±30.60 ^a
Serum free bitoin (pmol/mL)	111.57±17.33 ^a	19.83±2.47 ^b	99.52±14.27 ^a
Urinary biotin (μmol/mol creatinine)	141.29±77.37 ^a	2.68±1.88 ^b	102.31±44.81 ^a
Urinary 3-HIA (μmol/mol creatinine)	13.02±14.23 ^a	431.02±259.37 ^b	1.76±5.55 ^a

Data are mean±SD, n=9-10. ^{a-b}*p*<0.05 (Tukey-Kramer test).

3-HIA, 3-hydroxyisovaleric acid.

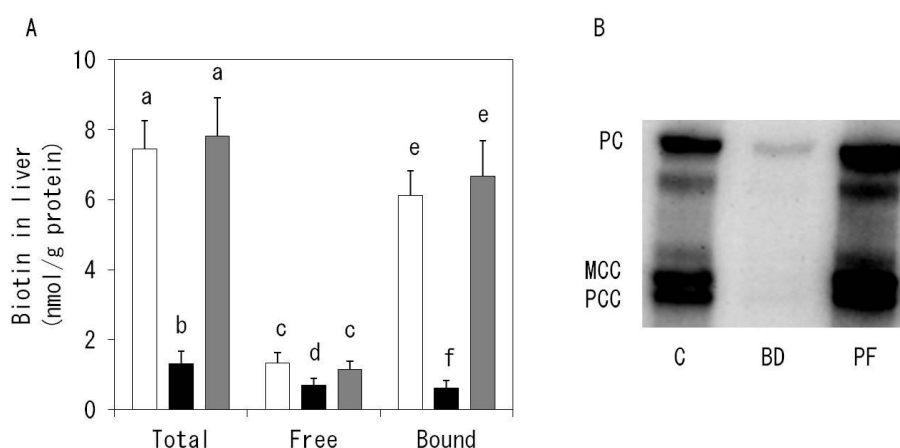


Fig. 4-3 Biotin content and holocarboxylase expression in liver. A, total, free and bound biotin content (n=10). B, representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass (n=3). Control group (□). Biotin-deficient group (■). Pair-fed group (▒). Data are mean±SD. ^{a-b}, ^{c-d}, ^{e-f} *p*<0.05 (Tukey-Kramer test). C, control group; BD, biotin-deficient group; PF, pair-fed group. PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

4.3.3 ラット脳におけるビオチン含量およびホロカルボキシラーゼ発現量

ビオチン欠乏群において、コントロール群および制限食群と比べてみられた変化をみると、大脳皮質においては、総ビオチン含量は変化せず (Fig. 4-4A)、遊離型ビオチン含量は有意ではないが 0.5 倍に減少していた (Fig. 4-4B)。結合型ビオチン含量は、コントロール群および制限食群と比べ、それぞれ 1.9 倍および 3.2 倍 ($p<0.05$) に上昇した (Fig. 4-4C)。次に、海馬、視床下部、線条体および小脳の 4 つの部位においては、総ビオチン含量が、海馬では有意ではないが 0.5-0.6 倍にまで減少し、視床下部、線条体および小脳では有意に減少した ($p<0.05$) (Fig. 4-4A)。遊離型ビオチン含量は、4 つの部位で有意に減少し ($p<0.05$) (Fig. 4-4B)、結合型ビオチン含量は 4 つのどの部位においても差は認められなかった (Fig. 4-4C)。

脳の各部位におけるホロ型 PC、MCC および PCC の発現量は、すべての部位においてビオチン欠乏群でわずかであるが低下傾向であった (Fig. 4-5)。

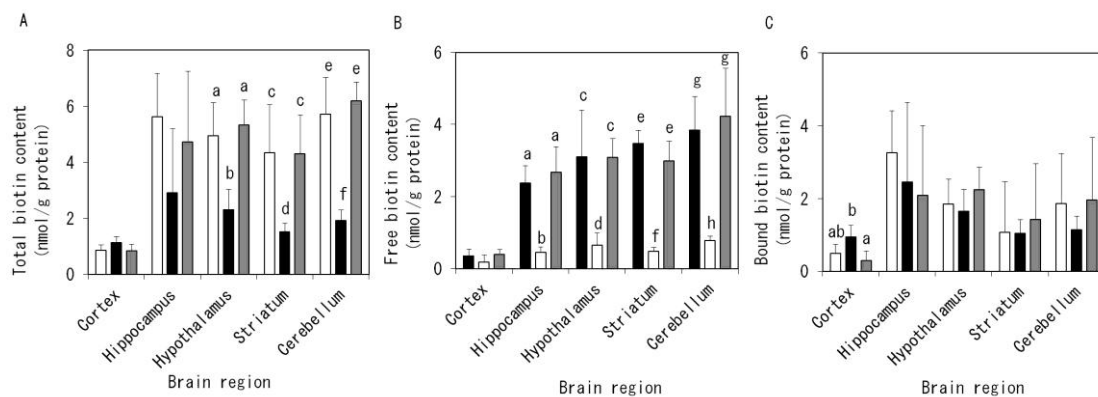


Fig. 4-4 Biotin content in brain. A, total biotin content; B, free biotin content; C, bound biotin content. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Pair-fed group (▒). Data are mean \pm SD, $n=4-5$. $a-b$, $c-d$, $e-f$, $g-h$ $p<0.05$ (Tukey-Kramer test).

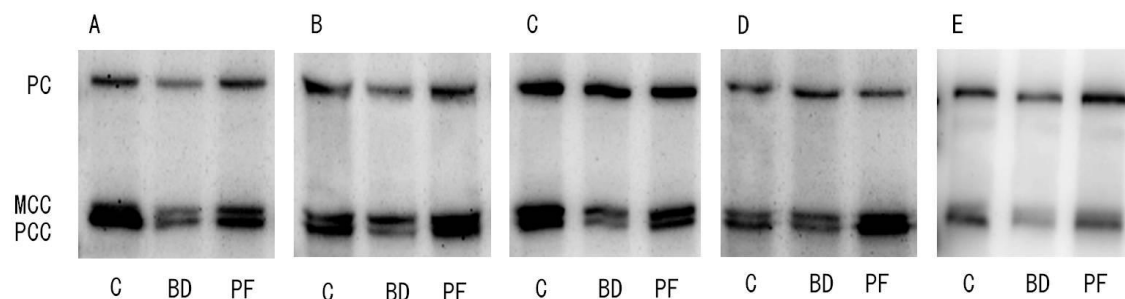


Fig. 4-5 Representative western blotting analysis with streptavidin peroxidase of biotinylated PC, MCC and PCC mass of brain. A, cortex; B, hippocampus; C, hypothalamus; D, striatum; E, cerebellum. n=3. C, control group; BD, biotin-deficient group; PF, pair-fed group; PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

4.3.4 ラット脳におけるビオチン化タンパク質の発現について

Fig. 4-6 はラット大脳皮質におけるビオチン化タンパク質の発現を示したものである。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、これ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。次に、コントロール群および制限食群においてのみ、スポット 2 (分子量 66-80、等電点 8.0-9.0) が確認された。また、制限食群においてのみ、スポット 3 (分子量 116-140、等電点 4.0-5.0) が認められた。

全ての群において、共通で 3 つのビオチン化タンパク質が発現していた。スポット 4 (分子量 116-140、等電点 6.0-7.0)、スポット 5 (分子量 66-80、等電点 5.5-6.5) およびスポット 6 (分子量 66-80、等電点 6.5-7.5) である。これらは、分子量および等電点より、それぞれ PC、MCC および PCC であると推定される。

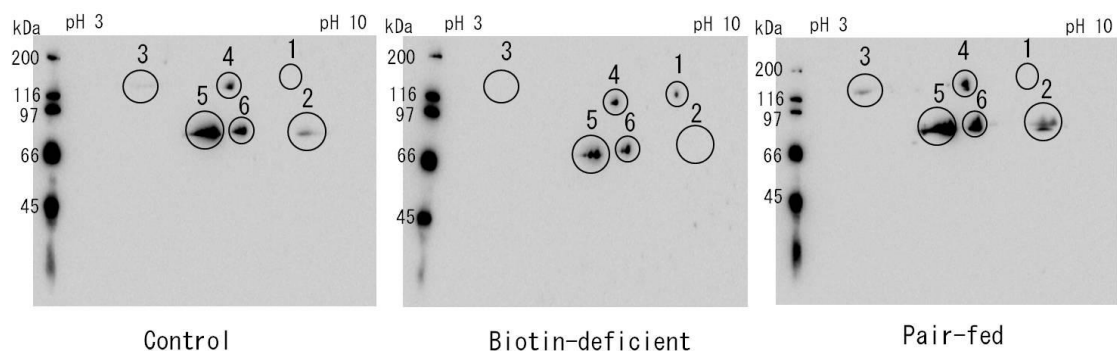


Fig. 4-6 Biotinylated protein expression by 2DE and western blotting analysis with streptavidin peroxidase in cortex. Protein spot 1 (MW: 116-140, PI: 7.5-8.5), Unknown biotinylated protein 1. Protein spot 2 (MW: 66-80, PI: 8.0-9.0), Unknown biotinylated protein 2. Protein spot 3 (MW: 116-140, PI: 4.0-5.0), 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.

4.3.5 組織別の SMVT 遺伝子発現量について

SMVT の遺伝子発現を Fig. 4-7 に示した。大脳皮質および海馬の SMVT 発現量は、肝臓と比較して、0.5 倍および 0.3 倍と低値を示した ($p < 0.05$)。また、大脳皮質と比べて、海馬の SMVT 発現量は 0.5 倍と低かった ($p < 0.05$)。なお、各組織の 3 群間においては、差は認められなかった。

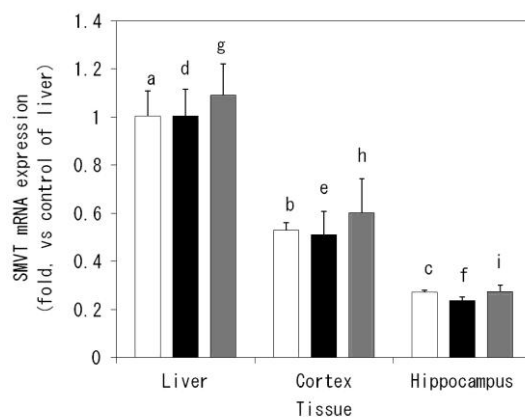


Fig. 4-7 Sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) mRNA expression of liver and brain. Control group (□). Biotin-deficient group (■). Pair-fed group (▒). Data are mean±SD, n=4-5. a-c, d-f, e-f, g-i $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

4.4 考察

本研究では、幼若期の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を明らかにした。また、ビオチン欠乏群において、大脳皮質で結合型ビオチンが増加した理由についても検討した。その結果、ビオチン欠乏時の脳におけるビオチン含量には、部位で違いがあることが示された。ビオチン欠乏群において、大脳皮質の総ビオチン含量が変化しないことと、結合型ビオチンが上昇することから、ビオチン欠乏時の大脳皮質においてビオチンと結合しているタンパク質の存在が示唆された。しかし、ビオチン欠乏群の大脳皮質では、ホロカルボキシラーゼ発現量が維持されていたため、カルボキシラーゼ以外のタンパク質とビオチンが結合している可能性が考えられた。そこで、網羅的なビオチン化タンパク質の発現状況を調べた結果、分子量 116-140 kDa、等電点 7.5-8.5 のタンパク質がビオチンと結合していることが確認された。これまでに、*in vivo* でビオチンと結合することが報告されているタンパク質はいくつか存在する。

例えば、ビオチニダーゼ (Chauhan and Dakshinamurti, 1988) や、ヒストン (Zempleni, 2005) がビオチンと結合することが知られている。しかし、ビオチニダーゼおよびヒストンの分子量は、それぞれ 58 kDa および 40 kDa 以下であることから、今回のタンパク質とは異なっている。また、今回検出できなかった ACC の分子量は 265 kDa または 280 kDa であり、これも分子量が異なっている。この他に、ビオチンと関連のあるタンパク質である SMVT と HCS の分子量は、それぞれ 69 kDa および 86 kDa であるため、これらも今回のタンパク質とは異なる。そのため、今回検出されたタンパク質は、*in vivo* においてこれまでに知られていない、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。しかし、どのようなタンパク質であるかを同定するまでに至っていない。今後は、このビオチン化タンパク質を同定し、脳におけるビオチンの役割を具体的に明らかにする必要がある。

また、ビオチン欠乏群の脳皮質ではホロカルボキシラーゼ発現量はほとんど維持されていた。これまでに、ビオチン欠乏ラットの脳におけるホロカルボキシラーゼ発現量は低下しないと報告されている (Pacheco-Alvarez *et al*, 2004)。これらの報告では、脳を各部位に分けて評価されているわけではない。しかし、ホロカルボキシラーゼ発現量は、脳のどの部位においても 3 群間でそれほど違いはみられなかった。そのため、本研究での結果とこの報告は一致しているといえる。幼若期においては、ビオチンが欠乏しても脳におけるカルボキシラーゼの機能はある程度保たれていると考えられる。

脳皮質のビオチン含量は、それ以外の部位と比べて比較的保たれていた。この理由は、ビオチンのトランスポーターである SMVT 発現量の違いであると考えられる。脳皮質と海馬における SMVT 遺伝子発現量を比較すると、脳皮質の方が約 2 倍も発現量が高かった。また、ビオチン欠乏状態でも、この部位の間の差はほとんど変わらなかった。

た。このことから、幼若期においては、ビオチン欠乏時の大脳皮質では、SMVT を介して他の部位よりもビオチンを多く取り込んでいるのかもしれない。

海馬、視床下部、線条体および小脳については、ビオチン欠乏の影響は大脳皮質とは異なっていた。これら4つの部位のすべてで、ビオチン欠乏群の総ビオチン、遊離型ビオチン含量が減少しており、結合型ビオチン含量は変化が認められなかった。また、ホロカルボキシラーゼ発現量はそれほど減少しなかったため、これらの4つの部位においては、ビオチン欠乏時でもカルボキシラーゼの機能が維持されていると考えられる。また、これら4つの部位において結合型ビオチン含量が上昇しなかったことから、大脳皮質でみられたカルボキシラーゼ以外のビオチン化タンパク質は発現していないと考えられる。

本研究では、重度のビオチン欠乏状態であっても、脳の各部位ではホロカルボキシラーゼが保たれていることを明らかにした。さらに、ビオチン欠乏時には、大脳皮質においてビオチンがある種のタンパク質と結合することが示唆された。これらの結果より、ビオチンの役割は部位により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重要であるのかもしれない。

第5章 総合考察

ビオチンは生体内において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および脂肪酸合成などに関与している (Zempleni *et al*, 2007)。最近では、胎児発育に重要であることや (Watanabe, 1983; Taniguchi and Watanabe, 2008; Watanabe *et al*, 2009; Sawamura *et al*, 2014)、遺伝子発現に関与しているとの報告がある (Rodriguez-Melendez *et al*, 2006; Smith *et al*, 2007)。しかし、ビオチンの役割については不明な点も多く、特に脳については十分に検討されていない。そこで、本研究では、脳形成・発達時期である「妊娠期・授乳期」と脳形成終了後の「幼若期」2つのライフステージにおいて、ビオチン欠乏が脳に及ぼす影響を明らかにし、脳におけるビオチンの役割について考察することとした。

本研究では、「妊娠期・授乳期」と「幼若期」では、脳におけるビオチン含量やホロカルボキシラーゼ発現量に違いがみられた。ビオチン欠乏群の脳皮質では、妊娠期・授乳期において総ビオチン含量が顕著に減少したが、幼若期において変化がみられなかった。また、ビオチン欠乏群の脳皮質および海馬におけるホロカルボキシラーゼ発現量は、妊娠期・授乳期では顕著に減少していたが、幼若期ではほとんど変化していなかった。これまでに、Taniguchi と Watanabe (2008) や Sawamura ら (2014) が、妊娠期において母体がビオチン欠乏状態になると高頻度で口蓋裂を発症すると報告しており、胎児におけるビオチン欠乏の影響の大きさが示されている。ヒトにおいても、妊娠期には潜在的なビオチン欠乏状態であることや (Mock *et al*, 1997)、授乳期後期になるとビオチン消費量が上昇することが報告されており (Perry *et al*, 2014)、妊娠期と授乳期におけるビオチンの重要性が示唆されている。このような報告からも、脳においても、

幼若期と比べて妊娠期・授乳期においてビオチンの必要性が高く、母体のビオチンが不足した場合にビオチン欠乏を誘発しやすいと考えられる。

一方、幼若期においても、食事内容によってはビオチン欠乏状態となる可能性がある。特殊な食事療法の1つである、「ケトン食療法」と呼ばれる高脂質・低炭水化物食の摂取時において、ビオチンが欠乏した場合の影響について検討した (Yuasa *et al*, 2013)。4週齢マウスをコントロール群、ビオチン欠乏群およびケトン食群（コントロールおよびビオチン欠乏）の4群に分けて10週間飼育した結果、ケトン食群の肝臓や脳におけるビオチン含量が低下した (Fig. 5-1)。ケトン食-ビオチン欠乏群では脱毛症などのビオチン欠乏症状が発症し、脳においてもカルボキシラーゼのタンパク質発現量が減少することが明らかになった (Fig. 5-2)。また、ケトン食群では、常時血糖値の有意な低下が認められ（未掲載）、ケトン食摂取時にはビオチンの消費量が上昇する可能性が示された。このように、妊娠期・授乳期でも確認された脳中のビオチン含量、タンパク質発現および血糖値の低下が、幼若期でも確認される場合がある。そのため、母体に限らず、幼若期においても、食事内容によってはビオチン欠乏が脳へ影響を与えることについて注意すべきである。

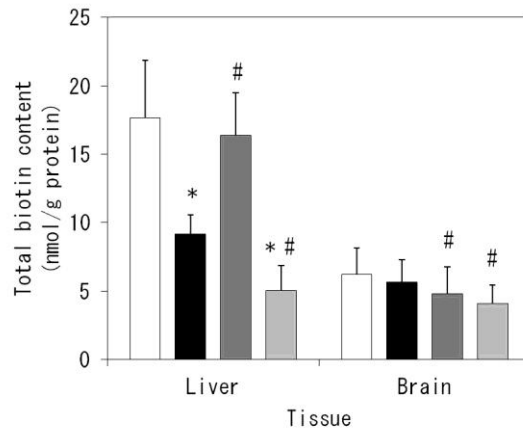


Fig. 5-1 Total biotin content in liver and brain. Control diet group (□). Biotin-deficient diet group (■). Ketogenic control diet group (▤). Ketogenic biotin-deficient diet group (▥). Data are mean \pm SD, n=8. * p <0.05, the values for the BD and KBD diet groups were significantly different from those of the C and KC diet groups according to two-way ANOVA. # p < 0.05, the values for the KC and KBD diet groups were significantly different from those of the C and BD diet groups according to two-way ANOVA.

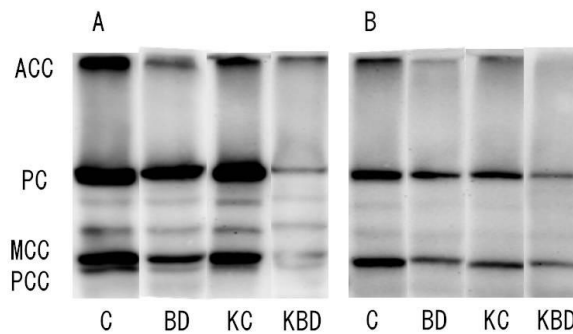


Fig. 5-2. Total mass of biotin-dependent carboxylases of liver and brain at 9 wk according to western blotting after the biotinylation of the carboxylases. A, liver; B, brain. n=3. C, Control diet group; BD, biotin-deficient diet group; KC, Ketogenic control diet group; KBD, Ketogenic biotin-deficient diet group; PC, pyruvate carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase.

また、ビオチン欠乏群の脳皮質において、出産児ラットと幼若ラットの両方で、結合型ビオチンの増加が確認された。このことから、ビオチン欠乏時には、特に脳皮質においてビオチンがタンパク質と結合していることが示唆された。また、ビオチン欠乏群の幼若ラットにおける脳皮質では、新規のビオチン化タンパク質の存在が明らかとなった。このように、ビオチン欠乏した場合、ライフステージには関係なく、脳皮質ではビオチンがタンパク質と結合することで、影響を与えている可能性が示唆された。今後は、今回明らかになったビオチン化タンパク質を同定し、脳皮質におけるビオチンの役割を明らかにすべきである。

ビオチン欠乏群の出産児の脳において、ビオチン関連遺伝子発現量が海馬においては上昇し、脳皮質においては低下した。これは、ビオチン欠乏時のビオチンの要求性の違いにより、遺伝子発現量が上昇した海馬において特にビオチンを要求していると考えられた。実際に、海馬には脳の他の部位と比べてビオチンが多量に存在することから、ビオチンとの関連がある部位であると推察されている (Wang and Pevsner, 1999)。また、ビオチン欠乏時には海馬における神経細胞新生の低下することが報告されている (遠藤ら, 2007; 猪股ら, 2008)。このように、ビオチン欠乏時には海馬への悪影響を改善するために、ビオチン関連遺伝子発現量を上昇させていたのかもしれない。海馬はビオチンと関連の強い部位であると推察される。

本研究では、ビオチン欠乏が低血糖を介して、血中グルココルチコイドの上昇、神経保護作用のある BDNF 遺伝子発現量および神経伝達に関与するアミノ酸濃度の低下させることによって、脳機能に影響を与える可能性が示された。特に、血中グルココルチコイドの上昇と脳内 BDNF 発現量の低下は、うつ病発症原因の有力な候補とされている (Smith *et al.*, 1995)。そのため、うつ病発症の原因となるストレスなどの環境要因や遺

伝的背景などとビオチン欠乏が併発した場合に、うつ病の症状の悪化をきたす可能性が考えられる。今後は、実際にビオチン欠乏ラットやマウスで抑うつ行動などの行動異常が観察されるか否かを再検討すべきである。また、うつモデル動物をビオチン欠乏状態とした場合、うつ症状や BDNF 発現量の低下などが増強されるかを明らかにすることで、今回の仮説を検証すべきである。

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こと、②欠乏時に大脳皮質である種のタンパク質と結合すること、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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました指導教官の渡邊敏明教授に深謝致します。また、学位論文の執筆にあたり、多大な助言を頂きました副査の北元憲利教授、坂上元祥教授ならびに滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科食品栄養学研究室の福渡努教授に心より御礼申し上げます。

本研究において、ラットの海馬、視床下部、線状体の採取方法をご教授頂きました、国立長寿医療研究センター研究所ラジオアイソトープ管理室の奥野海良人先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の実験についての終始ご指導、ご鞭撻を賜りました病体生理研究所の福井徹先生、宇部工業高等専門学校 of 根來宗孝教授、榎原周平助教ならびに澤村弘美先生に厚く御礼申し上げます。また、食環境解析学教室の諸氏に、深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり御支援賜りました、家族に深謝致します。

参考文献

- Baur B, Suormala T, Baumgartner ER. (2002) Biocytin and biotin uptake into NB2a neuroblastoma and C6 astrocytoma cells. *Brain Res* 925, 111-121.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14, 83-144.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Hong SX, Correa A. (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. collaborative project for neural tube defect prevention. *N Engl J Med* 341, 1485-1490.
- Bhagavan HN, Coursin DB. (1970) Depletion of biotin from brain and liver in biotin deficiency. *J Neurochem* 17, 289-290.
- Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourrié C, Guéant JL, Daval JL. (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* 216, 231-238.
- Boas MA. (1927) The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg-white. *Biochem J* 21, 712-724.
- Chauhan J, Dakshinamurti K. (1988) Role of human serum biotinidase as biotin-binding protein. *Biochem J* 256, 265-270.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17, 2295-2313.
- Du Vigneaud V, Melville DB, György P, Rose CS. (1940) On the identity of vitamin H with biotin. *Science* 92, 62-63.
- 江口 秀敏, 梨子本 幸嗣, 佐藤 純一, 川原 隆一, 岩佐 曜. (1990) マイクロプレートを用いたビオチン, ニコチンアミド及びパントテン酸の微生物学的定量. *ビタミン* 64, 653-658.
- 遠藤 伸, 吉田 しおり, 崎田 克康, 永井 哲志, 上條 信一, 前橋 賢, 柏崎 直巳, 二宮博義, 猪股 智夫. (2007) ビオチン欠乏がラット海馬に及ぼす影響. *麻布大学雑誌* 15/16, 134-137.

- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 40, 491-498.
- Gralla M, Camporeale G, Zempleni J. (2008) Holocarboxylase synthetase regulates expression of biotin transporters by chromatin remodeling events at the SMVT locus. *J Nutr Biochem* 19, 400-408.
- György P, Melville DB, Burk D, DU Vigneaud V. (1940) The possible identity of vitamin H with biotin and coenzyme R. *Science* 91, 243-245.
- Hassan YI, Zempleni J. (2008) A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr Rev* 66, 721-725.
- Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H. (2005) The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience* 135, 659-678.
- Hernández-Vázquez A, Ochoa-Ruiz E, Ibarra-González I, Ortega-Cuellar D, Salvador-Adriano A, Velázquez-Arellano A. (2012) Temporal development of genetic and metabolic effects of biotin deprivation. A search for the optimum time to study a vitamin deficiency. *Mol Genet Metab* 107, 345-351
- Hertz L. (2013) The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 59, 1-16.
- 猪股 智夫, 森 裕子, 遠藤 伸, 金剛寺 真弓, 土岐 賢司, 崎田 克康, 二宮 博義. (2008) ビオチン欠乏が及ぼすラット海馬への影響. 麻布大学雑誌 17/18, 134-137.
- Krause KH, Bonjour JP, Berlitz P, Kochen W. (1985) Biotin status of epileptics. *Ann N Y Acad Sci* 447, 297-313.
- León-Del-Río A, Leclerc D, Akerman B, Wakamatsu N, Gravel RA. (1995) Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 4626-4630.

- Lewin GR. (1996) Neurotrophins and the specification of neuronal phenotype. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 405-411.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7, 541-547.
- Mardach R, Zemleni J, Wolf B, Cannon MJ, Jennings ML, Cress S, Boylan J, Roth S, Cederbaum S, Mock DM. (2002) Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J Clin Invest* 109, 1617-1623.
- Marín MC, De Tomás ME, Serres C, Mercuri O. (1995) Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr* 125, 1017-1024.
- Mock DM, Dyken ME. (1997) Biotin catabolism is accelerated in adults receiving long-term therapy with anticonvulsants. *Neurology* 49, 1444-1447.
- Mock DM, Stadler DD, Stratton SL, Mock NI. (1997) Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* 127, 710-716.
- Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM. (1997) Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am J Clin Nutr* 65, 951-958.
- 森 裕子, 遠藤 伸, 伊藤 亨子, 柏崎 直巳, 二宮 博義, 猪股 智夫 (2006) ビオチン欠乏がラット海馬に及ぼす影響. 麻布大学雑誌 13/14, 125-127.
- Oi Y, Imafuku M, Shishido C, Kominato Y, Nishimura S, Iwai K. (2001) Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *J Nutr* 131, 2150-2156.
- Osada K, Komai M, Sugiyama K, Urayama N, Furukawa Y. (2004) Experimental study of fatigue provoked by biotin deficiency in mice. *Int J Vitam Nutr Res* 74, 334-340.
- Pacheco-Alvarez D, Solórzano-Vargas RS, Gravel RA, Cervantes-Roldán R, Velázquez A, León-Del-Río A. (2004) Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J Biol Chem* 279, 52312-52318.

- Patel MS. (1974) The effect of ketone bodies on pyruvate carboxylation by rat brain mitochondria. *J Neurochem*, 23, 865–867.
- Perry CA, West AA, Gayle A, Lucas LK, Yan J, Jiang X, Malysheva O, Caudill MA. (2014) Pregnancy and lactation alter biomarkers of biotin metabolism in women consuming a controlled diet. *J Nutr*, pii jn.114.194472. [Epub ahead of print].
- Prasad PD, Wang H, Kekuda R, Fujita T, Fei YJ, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate. *J Biol Chem* 273, 7501–7506.
- Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A. (2001) Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 131, 1909–1913.
- Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zemleni J. (2006) The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 17, 23–30.
- Sander JE, Packman S, Townsend JJ. (1982) Brain pyruvate carboxylase and the pathophysiology of biotin-dependent diseases. *Neurology* 32, 878–880.
- Sawamura H, Ishii Y, Shimada R, Yuasa M, Negoro M, Watanabe T. (2014) Low level of maternal biotin intake changes the expression biotin transporter in dams and fetuses in mice. *Int J Anal Bio-Sci* 2, 126–134.
- Schmidt-Kastner R, Wetmore C, Olson L. (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, Striaum and cortex. *Neuroscience* 74, 161–183.
- Schrijver J, Dias T, Hommes FA. (1979) Some biochemical observations on biotin deficiency in the rat as a model for human pyruvate carboxylase deficiency. *Nutr Metab* 23, 179–191.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372–376.
- Smith EM, Hoi JT, Eissenberg JC, Shoemaker JD, Neckameyer WS, Ilvarsonn AM, Harshman LG, Schlegel VL, Zemleni J. (2007) Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns.

- J Nutr* 137, 2006-2012.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 1768-1777.
- Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J. (1983) Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1, 1027-1031.
- 曾根 英行, 渡邊 敏明, 古川 勇次. (2007) ビオチンによるインスリン分泌修飾に関する研究. *Trace Nutrients Research* 24, 163-170.
- Stewart CN, Bhagavan HN, Coursin DB, Dakshinamurti K. (1966) Effect of biotin deficiency on escape and avoidance learning in rats. *J Nutr* 88, 427-433.
- Stratton SL, Bogusiewicz A, Mock MM, Mock NI, Wells AM, Mock DM. (2006) Lymphocyte propionyl-CoA carboxylase and its activation by biotin are sensitive indicators of marginal biotin deficiency in humans. *Am J Clin Nutr* 84, 384-388.
- Suchy SF, Wolf B. (1986) Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 43, 831-838.
- Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y. (2005) Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS. *Hum Mutat* 26, 285-290.
- Sweetman L, Williams JC. (1995) In the metabolic and molecular bases of inherited disease. pp. 1387-1422. McGraw-Hill, New York, USA.
- Sydenstricker VP, Singal SA, Briggs AP, Devaughn NM, And Isbell H. (1942) Observations on the "egg white injury" in man. *JAMA* 118, 1199-1200.
- Takechi R, Taniguchi A, Ebara S, Fukui T, Watanabe T. (2008) Biotin deficiency affects the proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells in culture. *J Nutr* 138, 680-684.
- Tamano H, Kan F, Kawamura M, Oku N, Takeda A. (2009) Behavior in the forced swim test and neurochemical changes in the hippocampus in young rats after 2-week zinc deprivation. *Neurochem Int* 55, 536-541.
- Taniguchi A, Watanabe T. (2008) Transplacental transport and tissue distribution of biotin in mice at midgestation. *Congenit Anom (Kyoto)* 48, 57-62.
- Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593-598.

- Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, Rodriguez PL, Martinez AJ. (1990) Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: cuban experience. *Prenat Diagn* 10, 149-152.
- Wang H, Pevsner J. (1999) Detection of endogenous biotin in various tissues: novel functions in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. *Cell Tissue Res* 296, 511-516.
- Watanabe T. (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr* 113, 574-581.
- Watanabe T, Masaki T, Yuasa M, Morimoto M, Sawamura H. (2013) Estimate of the dietary intake of biotin in infants prescribed special therapeutic infant formulas in Japan. *Int J Anal Bio-Sci* 1, 60-70.
- Watanabe T, Nagai Y, Taniguchi A, Ebara S, Kimura S, Fukui T. (2009) Effects of biotin deficiency on embryonic development in mice. *Nutrition* 25, 78-84.
- Watanabe T, Suzuki A, Ebara S, Negoro M, Fukui T. (2010) Biochemical alterations in the palatal processes in fetuses of biotin-deficient mice. *Congenit Anom (Kyoto)* 50, 21-28.
- Wei JQ, Zhou XT, Wei JI. (1987) Simultaneous measurement of eight corticosteroids by liquid chromatography, and application of the procedure to diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem* 33, 1354-1359.
- Winick M. (1970) Nutrition and nerve cell growth. *Fed Proc* 29, 1510-1515.
- Winick M, Rosso P. (1969) The effect of severe early malnutrition on cellular growth of human brain. *Pediatr Res* 3, 181-184.
- Wolf B. (2005) Biotinidase: Its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *J Nutr Biochem* 16, 441-445.
- Wolf B, Heard GS, McVoy JR, Grier RE. (1985) Biotinidase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 447, 252-262.
- Yuasa M, Matsui T, Ando S, Ishii Y, Sawamura H, Ebara S, Watanabe T (2013) Consumption of a low-carbohydrate and high-fat diet (the ketogenic diet) exaggerates biotin deficiency in mice. *Nutrition* 29, 1266-1270.
- 湯浅 正洋, 松本 希美, 渡邊 敏明. (2012) わが国の特殊調製粉乳による乳幼児におけるビオチン欠乏症の特徴. *ビタミン* 86, 678-684.
- Zempleni J. (2005) Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 25, 175-196.

Zempleni J, Chew YC, Hassan YI, Wijeratne SS.S (2008) Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin: are biotin requirements being met? *Nutr Rev* 66, S46-S48.

Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. (2007) Handbook of Vitamins. pp. 361-83, CRC Press; Boca Raton, London and New York.

