

ビオチン欠乏がラット海馬に及ぼす影響

Effects of biotin deficiency on rat hippocampuses

森 裕子¹, 遠藤 伸¹, 伊藤亨子¹, 柏崎直巳², 二宮博義², 猪股智夫²

麻布大学 ¹実験動物学研究室, ²動物繁殖学研究室

Yuko Mori ¹, Shin Endo ¹, Yukiko Ito ¹, Naomi Kashiwazaki ², Hiroyoshi Ninomiya ² and Tomo Inomata ²

¹ Department of Laboratory Animal Science and ² Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. Biotin participates in gluconeogenesis, amino acid metabolism, as well as fatty acid synthesis. In former studies, we observed that long-term potentiation in the biotin-deficient rat hippocampus was inhibited and the rats' maze-learning ability deteriorated. This study examined how biotin deficiency effects the rat hippocampus using Timm's staining and DNA microarray. Wistar rats were used in this study. They were fed biotin deficient diet. Experimental (BD) group was given a vehicle and control (BS) group was given biotin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$, i.p.) by daily. Four weeks later, the rats were euthanized and their hippocampuses were removed. Six hippocampuses from each group were embedded in paraffin and were stained with HE and Timm's method to measure the neuronal cell number and synapse density of the hippocampuses. The remaining two hippocampuses were used to examine gene expression using analysis of DNA microarray. In histological observation, the cells in the dentate gyrus, CA1, and CA3 regions of the BD group were smaller than the BS group. The synapse density of ventral hippocampuses (caudal) of the BD group was significantly higher than the BS group. Also, expression of multiple intercellular signaling related genes, such as acetylcholinergic receptors, AMPA-type receptors, and nerve axon elongation related genes, was inhibited in the BD group. It is likely that biotin participates in maintaining brain functioning, especially in memory and learning functions.

【目 的】

水溶性ビタミンB群に属するビオチン (Biotin; Vitamin H) は、糖新生、分岐鎖アミノ酸代謝、脂肪酸合成に深く関与する [1]。ビオチン欠乏ラットでは海馬において記憶形成に重要とされる長期増強 (LTP; Long Term Potentiation) が抑制されること、また、Moris 式水迷路行動試験を行ったところ、ビオチン欠乏ラットの学習能力が低いこと、ビオチン欠乏培地にて培養されたPC-12細胞樹状突起の長さが有意に短くなることをそれぞれ観察している [2]。LTPは細胞レベルでの記憶形成モデルとされており、

その抑制は老齢動物やアルツハイマーモデル動物の海馬においても観察されている [3]。本研究は、ビオチン欠乏が及ぼす海馬への影響を組織学的に調べるとともに、海馬における遺伝子の発現についてDNAマイクロアレイを用いて検証した。

【材料と方法】

3週齢のWistar系雄ラットを14匹用いた。飼育は、麻布大学附置生物科学研究所 Clean エリア内にて、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、明期：7時 - 19時、暗期：19時 - 7時の環境で飼育した。動物は生後から離乳まで母ラットに哺乳させ、同一の環境で飼育

された。離乳直後から、金網を敷いたプラスチックケージにて単頭飼育し、ビオチン欠乏精製飼料（オリエンタル酵母工業株式会社，東京）を与えてペアフィーディングと体重測定を行った。ペアフィーディング期間中，対照（BS）群にはビオチン（ビオチン注射薬，扶桑薬品工業株式会社，大阪）を，ビオチン欠乏（BD）群には生理食塩水をそれぞれ毎日腹腔内投与した。投与量はラットの体重が100 g未満では100 $\mu\text{g}/\text{day}$ ，100 g以上では200 $\mu\text{g}/\text{day}$ とした。4週間後，ペントバルビタールナトリウムの50 mg/kg 腹腔内投与による麻酔下で，腹大動脈から全採血にて安楽死させた。その後，断頭して脳を取り出し，海馬を摘出した。摘出した海馬のうち，BS・BDの1ペアは遺伝子発現状況を調べるためにAgilent technology, rat Oligo マイクロアレイに，残りは組織観察に用いた。作製した組織切片の一部はH.E.染色し，一部は海馬苔状線維シナプスを選択的に検出するTimm染色を施した。H.E.染色については海馬歯状回，CA1，CA3の各領域における神経細胞数とその核面積を計測し，Timm染色についてはHilus，Lucidum，Molecular layerの各領域におけるシナプス密度を計測した。

血中ビオチン量はマイクロプレート固相化ビオチン-HRP標識アビジン競合法にて血中ビオチン濃度を測定した[4]。摘出した海馬は直ちに0.37% 硫化溶液中に15分間，次いで5% グルタルアルデヒド液35 ml中に15分間浸漬させ，10% 中性緩衝ホルマリン液で一晩固定した。固定した海馬は速やかに定法にてパラフィン包埋し，海馬頭部（頭頂部）から尾部（側頭部）に向かって等分した3箇所について4 μm の厚さで横断，組織切片を作製した。組織切片はゼラチン-硫化カリウムクロム12水和物（6.0 gゼラチン-0.5 g 硫化カリウムクロム12水和物/1,000 ml）コーティングスライドに乗せ，乾燥させた。また，作製した海馬切片をH.E.染色した。歯状回，CA3，CA1，各々の領域についてデジタルカメラで168.1 μm \times 125.6 μm の視野で4箇所撮影した。画像解析にはImage J ver.1.34 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>)を用いた。さらに，摘出した海馬組織からtotal RNAを抽出し，BDラット海馬RNAにはCy5，BSラット海馬RNAにはCy3の蛍光標識を付けAgilent Technologies, Rat Oligo Microarrayを用いて組

織中に発現している遺伝子を検討した。マイクロアレイ解析は北海道システム・サイエンス株式会社（北海道，札幌）に依頼した。

【結果と考察】

組織学的観察では，ビオチン欠乏ラットの海馬神経細胞は，対照群のそれに比べて萎縮している傾向にあった。Soneら[5]，ラットの膵臓においてビオチンがATP合成を促進していることを，また，Seguraらは糖新生に関わるピルビン酸カルボキシラーゼの突然変異がオキサロ酢酸濃度を低下させ，クエン酸回路の活性を低下させると報告している[6]。脳においても同様に，長期間のビオチン欠乏状態がオキサロ酢酸濃度を低下させ，クエン酸回路の活性を低下させたことで海馬における代謝が滞り，エネルギー源であるATPが不足したために神経細胞の生命活動が停滞したことが神経細胞萎縮の要因のひとつと考えられた。

また，ビオチン欠乏ラットのにおいて海馬苔状線維シナプス密度は海馬尾側（側頭部）のHilus，Lucidum領域で対照群のそれよりも高かった。さらに，ビオチン欠乏ラットの歯状回Hilus上端におけるMolecular layerの幅は有意（ $P < 0.01$ ）に広がった。Hilusにおけるシナプス密度の増加は側頭葉てんかんのモデル動物にも確認される現象[7]であり，ビオチンは脳・海馬機能の正常な回路形成に関与することが示唆された。

DNA マイクロアレイによる遺伝子解析では，ビオチン欠乏ラットの海馬では細胞間・細胞内情報伝達に係わる複数にわたる遺伝子（アセチルコリン作動性受容体サブユニット，AMPA; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid型受容体サブユニット，軸索伸長ガイド関連受容体等）の発現が抑制されていた。エフリンと相互作用する蛋白質がEphであり，エフリンと結合したEphはスモールG蛋白を活性化し，成長円錐の退縮を引き起こすことやリガンドの結合したNeuropilinはRac蛋白を介して細胞内cGMPレベルを低下させることで成長円錐を退縮させ，正しい投射位置へ導くことが知られている[8,9]。マイクロアレイ解析の結果より，ビオチン欠乏ラットの海馬では情報伝達や軸索伸長に係わる複数の遺伝子が抑制されていた。このことから，ビオ

チンは記憶・学習に重要な脳・海馬機能の維持・発達に重要な役割を果たしているものと推察された。

【要 約】

本研究は、ビオチン欠乏がラット海馬へ及ぼす影響について、Timm 染色法を用いて海馬組織を組織計測するとともに、DNA マイクロアレイ法を用いて海馬組織における遺伝子発現を検証した。組織学的観察では、歯状回、CA1、CA3の各エリアにおいてBD群の方がBS群より神経細胞が小さい傾向を示し、ビオチン欠乏により海馬神経細胞の代謝活性が低下していることが示唆された。また、Hilus, Lucidum 領域のシナプス密度は、背側海馬（頭側）では両群の間に差は認められなかったが、腹側海馬（尾側）ではBD群の方がBS群より有意に増加しており、ヒト側頭葉てんかんに見られる所見に類似することが示唆された。さらに海馬組織の遺伝子発現については、BD群では細胞間や細胞内情報伝達に関わる複数の遺伝子（アセチルコリン作動性受容体、AMPA型受容体、神経軸索伸張に関わる関連遺伝子）が抑制されており、ビオチンが遺伝子発現にも重要な働きを示すものと推察された。ビオチンは脳機能

の維持、特に記憶・学習に関与している可能性がある。

【文献】

- 1) Dakshinamurti, K., Chauhan, J.: *Vitamin Horm.*, 45: 337-384 (1989)
- 2) Ito, Y., Inomata, T., Sakita, K., Chida, Y., Kashiwazaki, N., Ninomiya, H., Maebashi, M.: *Exp. Anim.* 52: 261 (2003)
- 3) Bliss, T.V.P, Collingridge, G.L.: *Nature*, 361: 31-39 (1993)
- 4) Rosebrough, S.F., Hartley, D.F.: *Lab. Anim. Sci.*, 45: 544-557 (1995)
- 5) Souda, N. Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M.: *J. Neurocytol.*, 28: 541-558 (1999)
- 6) Segura, D., Esp_n, G.: *Appl Microbiol Biotechnol.*, 65: 414-418 (2004)
- 7) Polleux, F., Morrow, T., Ghosh, A.: *Nature*, 404: 567-573 (2000)
- 8) Culotti, J.G., Kolodkin, A.L.: *Curr Opin Neurobiol.*, 6: 309-345 (1996)
- 9) Polleux, F., Morrow, T., Ghosh, A. : *Nature*, 404: 567-573 (2000)