

ビオチンによるインスリン分泌修飾に関する研究

曾根英行¹⁾, 渡邊敏明²⁾, 古川勇次³⁾
(¹⁾県立新潟女子短大*, ²⁾兵庫県立大・環境人間**, ³⁾東北大院・農***)

Biotin as an Essential Factor for Normal Glucose-induced Insulin Secretory Response in Rats

Hideyuki SONE¹⁾, Toshiaki WATANABE²⁾ and Yuji FURUKAWA³⁾

¹⁾Course of food and nutrition, Department of Human life and environmental science, Niigata Woman's College

²⁾School of Human Science and Environment, Himeji Institute of Technology, University of Hyogo

³⁾Department of Science of Food Function and Health, Tohoku University

Summary

We studied the effect of biotin deficiency on insulin secretion from pancreas in rats with varying degrees of biotin-deficiency: moderate biotin deficiency (MBD), biotin deficiency (BD), and severe biotin deficiency (SBD). The plasma insulin levels were reduced with the severity of the deficiency. There was a significant positive correlation between the plasma insulin and plasma biotin levels. ($r = 0.723, p < 0.001$). To investigate the insulin secretion from pancreas, the isolated pancreas was perfused with 20 mM glucose or 10 mM arginine, which is a non-metabolic stimulus for insulin secretion. Compared to the control, the levels of insulin response to glucose in MBD, BD, and SBD rats were approximately 43 %, 35 %, and 22 %, respectively ($p < 0.01$). However, in MBD rats, the insulin content of the pancreas did not decrease significantly as compared with the control, and no retrogressive pathological change was observed in pancreas. In contrast, the level of insulin response to 10 mM arginine in MBD rats was approximately 76 % of the control (not significant). These results indicate that biotin directly acts in the glucose metabolic pathway for ATP production, which is a key mediator of nutrient-induced insulin secretion. Our study suggests that biotin is an essential factor and plays a pivotal role in the normal glucose-induced insulin secretory response.

ビオチンは、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) やアセチル CoA-カルボキシラーゼ (ACC) の補因子として、糖代謝系において重要な働きをしている。我々はこれまでに、ビオチン欠乏ラットのインスリン分泌能が極めて低下することを報告してきた。しかし、PCやACCは、肝臓や筋肉、脳など多くの臓器に分布し、全身性のエネルギー代謝に影響を与える。そのため、ビオチンのインスリン分泌への関与については、欠乏にともなう二次的な結果と否定的な報告もあり、こうした矛盾を解明することが今後の課題として残されていた。近年、膵臓以外での代謝変動を排除した単離膵灌流や膵ランゲルハンス島 (膵島) を用いた検討により、ビオチン欠乏によるインスリンの分泌障害が報告された^{1, 2)}。しかし、これらの報告についてもすべて重篤な欠乏動物による検討であり、インスリン分泌への関与がビオチンの直接的な生理作用によるものかについては疑問の余地が残る。そこで本研究では、潜在的な欠乏を含めた程度の異なる3種のビオチン欠乏ラットを作成し、インスリン分泌へのビオチンの関与の有無を明確にするとともに、インスリン分泌におけるビオチンの作用部位について検討を行った。

*所在地：新潟県新潟市東区海老ヶ瀬471 (〒950-8680)

**所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

***所在地：宮城県仙台市堤通雨宮町1-1 (〒981-8555)

実験方法

1. 実験動物

実験動物には、Wistar系♂3週齢ラットを用い、タンパク質源として乾燥卵白20%含むビオチン欠乏食で8週間飼育した。食餌は、ビオチン欠乏群には実験食を自由摂食させ、対照群には前日にビオチン欠乏群が摂食した平均重量の実験食を与えた。対照群には、4日に一度100 µgのビオチンを腹腔内投与した。実験群は、飼育期間の違いにより、潜在的欠乏を想定した4週間飼育のビオチン欠乏群(4W-def群)、6週間飼育のビオチン欠乏群(6W-def群)、8週間飼育の重度のビオチン欠乏群(8W-def群)を設けた。

2. 血漿グルコース濃度、インスリン濃度およびビオチン濃度測定

実験飼育4, 6, 8週間後、ラットを12時間絶食させた後、無麻酔下で尾静脈より採血を行った。グルコース負荷試験では、12時間絶食させた後、グルコース3 gを完全に摂食してから30分後に無麻酔下で尾静脈より採血を行った。血漿グルコース濃度の測定には、血糖値測定キット(グルコースC-IIテストワコー; 和光純薬)、血漿インスリン濃度の測定には、インスリン放射免疫測定用キット(シオノリアインスリン; 塩野義製薬)を用いた。血漿ビオチン濃度は、*Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)を用いた微生物定量法により測定した。

3. 単離膵灌流³⁾

ラットに麻酔を施した後、膵臓へと繋がる複数の動静脈および総胆管を結紮し、小腸の一部と脾臓が付いた状態で膵臓を単離した。灌流は、1分間に1.8 mLの流速で腹腔動脈から投与し、門脈から排出させた。灌流液には、KRBB(1% BSA, 5% Dextranを含有, pH7.4, 37°C)を用い、95% O₂ + 5% CO₂混合ガスで飽和させてから灌流に供した。刺激液には、20 mMグルコース溶液、10 mMアルギニン溶液、灌流液中のCa²⁺濃度を細胞内Ca²⁺濃度と一致させた20 mMグルコース - 10⁻⁷M Ca²⁺溶液を用いた。

4. 膵臓中インスリンおよびビオチン含量測定⁴⁾

実験飼育4, 6, 8週間後、ラットを12時間絶食下に置いた。断頭屠殺後、膵臓を速やかに摘出し、40 mM PBS-aprotinin (50 KUT/mL)でホモジナイズ-超音波破碎により調整した。インスリンは、ホモジネートから酸エタノール法により調整した。インスリンおよびビオチンは上述した方法で測定した。

結果と考察

1. ビオチンの体内充足度と血漿インスリン濃度との相関

12時間絶食時およびグルコース摂食後30分経過時の血漿ビオチン濃度とインスリン濃度を測定することで、ビオチンの体内充足度とインスリン分泌能の関係について検討した。

絶食時における血漿インスリン濃度と血漿グルコース濃度をFig. 1に示した。4W-def, 6W-def, 8W-defのビオチン欠乏群を比較すると、4W-def群に対し6W-def群でインスリン濃度、ビオチン濃度は有意に低値を示した。また、8W-def群に対し6W-def群では、ビオチン濃度、インスリン濃度が有意に、4W-def群では著しい低下を示した。この結果は、ビオチン欠乏状態の進行が血漿インスリン濃度を低下させることを示している。しかし、以下については既に周知の事実として認識されている：(i) 血中のインスリン濃度は血糖レベルに濃度依存すること、(ii) 体内ビオチン量の低下は糖新生酵素であるPC活性を減弱させ絶食時血糖値の低下をもたらすこと。実際、本実験においても、ビオチン欠乏群では血漿グルコース濃度の低下が観察され、血漿ビオチン濃度との間にはインスリン濃度と同様に正の相関($r = 0.662$, $p < 0.0001$; Data not shown)が認められた。

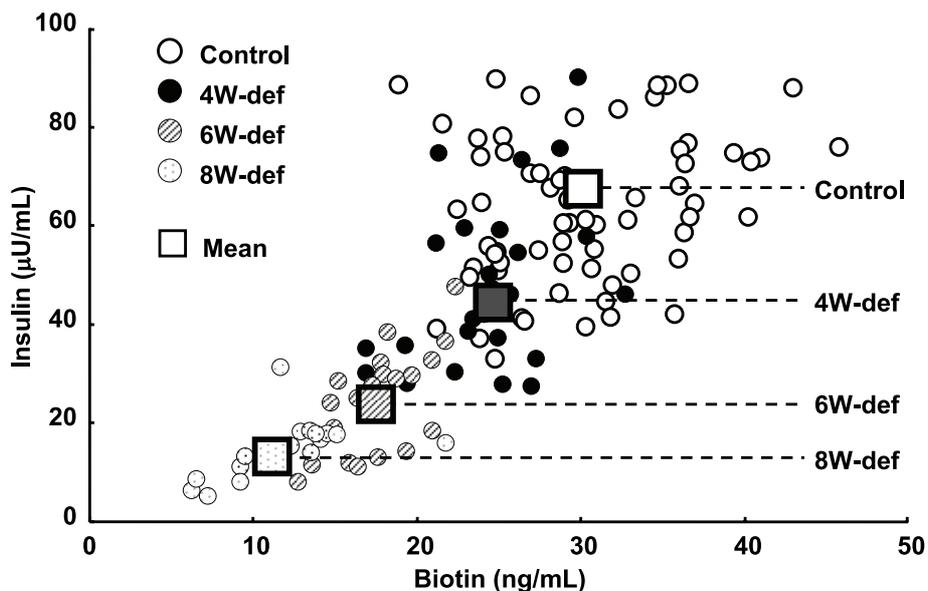


Fig. 1 Plasma biotin and plasma insulin levels of biotin deficient rats fasted for 12 h.

そこで、ビオチン欠乏に伴う生体への影響、とくに絶食時血糖レベルへの影響を排除するためにグルコース負荷による検討を行った。ビオチン欠乏群では、絶食時に認められた血漿グルコース濃度と血漿ビオチン濃度との相関が観察されなかった ($r = 0.187$, $p < 0.159$; Fig. 2 (b))。この結果は、体内ビオチン量の低下による絶食時血糖レベルへの影響がグルコースの摂食により取り除かれたことを示している。対照群では、血漿インスリン濃度と血漿グルコース濃度の間に正の相関 ($r = 0.701$, $p < 0.0001$) が認められたのに対し、ビオチン欠乏群では観察されなかった ($r = 0.173$, $p < 0.188$; Fig. 2 (a))。同程度のグルコース濃度にも関わらず、ビオチン欠乏群において血漿インスリン濃度が低下したことは、ビオチン欠乏がインスリン分泌に負の影響を与えていることを示唆している。血漿インスリン濃度と血漿ビオチン濃度を Fig. 2 (c) に示した。ビオチン欠乏群では、対照群に対し、血漿ビオチン濃度だけでなく、血漿インスリン濃度においても低下が観察された。さらに、これらの間には、正の相関 ($r = 0.723$, $p < 0.0001$) が認められた。こ

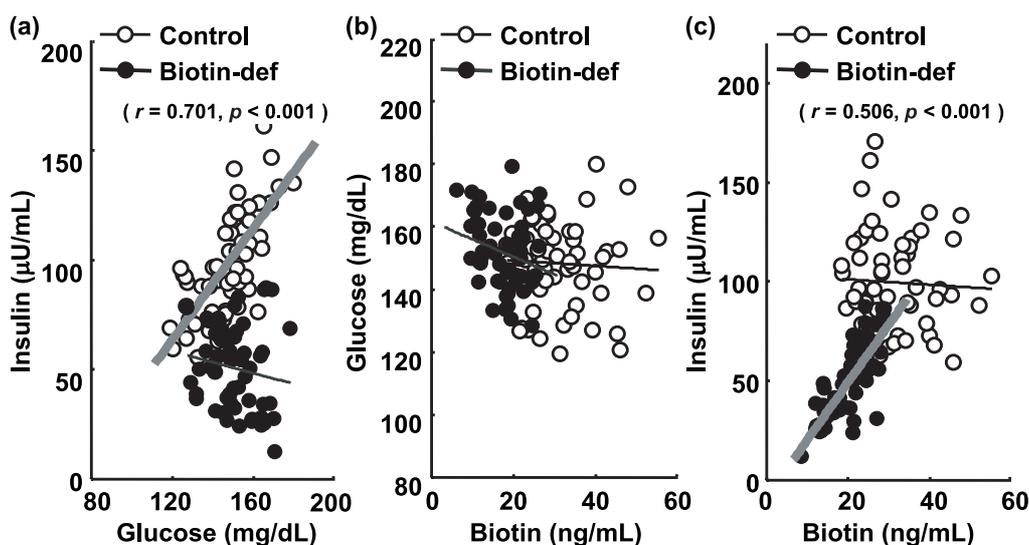


Fig. 2 Correlations between plasma glucose and insulin (a), plasma glucose and biotin (b), and plasma biotin and insulin (c) of the rats orally administered glucose.

のことから、血漿インスリン濃度はビオチン欠乏状態の進行にともない低下することが明らかにされた。

以上の結果から、ビオチンの体内充足度の低下は膵臓からのインスリン分泌量を低下させ、ビオチンがインスリン分泌に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

2. グルコース応答性インスリン分泌に及ぼすビオチンの影響

ビオチンの糖代謝系酵素への影響をみると、ビオチン欠乏により解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼ (GK) 活性やPC活性の顕著な低下が観察される^{2, 5)}。このため、ビオチンの体内充足度の低下は、肝臓や筋肉、その他の器官での糖代謝を変動させ、インスリン分泌に影響を及ぼすことが予想される。*In vivo*での検討では、血漿ビオチン濃度と血漿インスリン濃度の関係を明らかにし、ビオチンがインスリン分泌に何らかの影響を及ぼすことを示唆したが、これらの点については検討の余地が残る。そこで、ビオチン欠乏に伴う他器官での二次的な要因を排除した単離膵灌流法により、インスリン分泌に及ぼすビオチンの影響について検討を行った。

グルコース応答性インスリン分泌とその積算値をFig. 3に示した。グルコース刺激に対するインスリンの分泌量は、対照群に対し4W-def群で55% ($p < 0.001$), 6W-def群で36% ($p < 0.001$), 8W-def群で19% ($p < 0.001$)と有意な低下を示した。ビオチン欠乏群間での比較では、インスリン分泌量は、4W-def群に対し6W-def群では44% ($p < 0.01$), 8W-def群では22% ($p < 0.01$)と欠乏の進行に従い低下した。6W-def群と8W-def群の間に有意差は認められなかったが ($p < 0.07$), 8W-def群での分泌量は6W-def群の50%であった。これらの結果は*in vivo*の結果と一致しており、ビオチンの体内充足度の低下がインスリン分泌能を低下させることを明確に示している。

哺乳動物のグルコース応答性インスリン分泌を観察すると、インスリン分泌刺激開始からおよそ10分までのピークとそれ以降の高レベルに維持された応答の二相性が観察される。第一相は、細胞外からの Ca^{2+} の移行速度と細胞膜近傍で放出準備状態にあるインスリン分泌顆粒の量に依存し、第二相は、細胞外からの Ca^{2+} の移行と小胞体からの Ca^{2+} の放出および貯蔵プールから細胞膜近傍へのインスリン分泌顆粒の移動速度によって調節される^{6, 7)}。ビオチン欠乏群のインスリン分泌応答では、こうした二相性は観察されなかった。とくに、6W-def群と8W-def群のような重度のビオチン欠乏では、インスリン分泌応答の第一相がまったく観察されず、第二相も極端な低レベルを示していた。このことから、重度のビオチン欠乏では、インスリン分泌機構中での障害のみならずインスリンの合成経路にも支障をきたし、十分な速度でのインスリン合成が困難であると推察される。

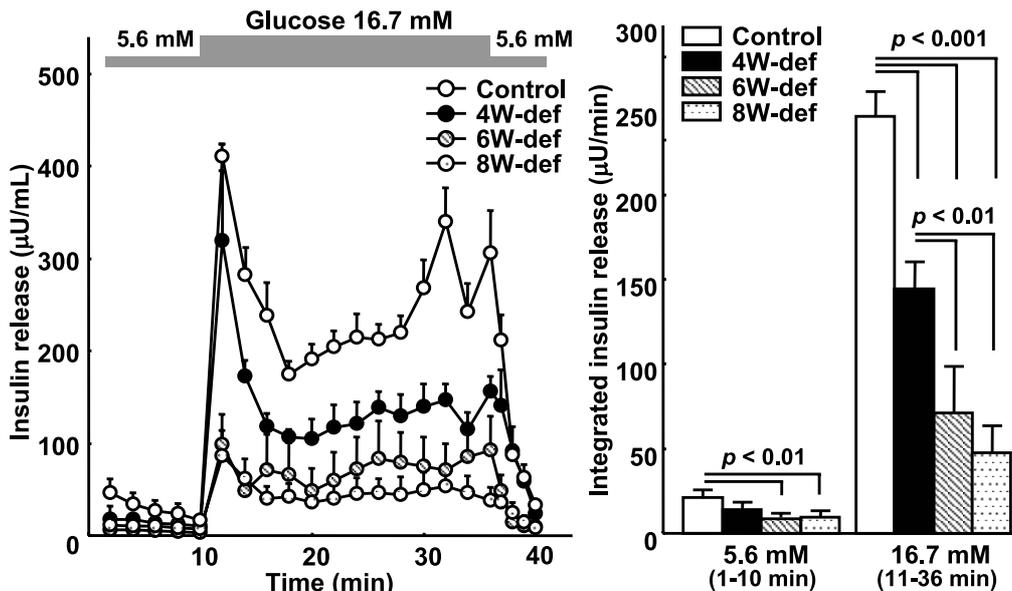


Fig. 3 Effect of biotin deficiency on glucose-induced insulin release from the rat perfused pancreas.

3. アルギニン応答性インスリン分泌に及ぼすビオチンの影響

アルギニンは、グルコースと共に膵臓からのインスリン分泌能力を測定する際に用いられる一般的な刺激因子である。アルギニンは、複雑な経路を経るグルコース応答性インスリン分泌機構とは異なり、エネルギー生成系を介さず、アルギニン自身の+電荷により直接的に細胞膜を脱分極しインスリン分泌を促す (Fig. 7)。アルギニンによるインスリン分泌機構の特徴である脱分極以降の過程は、グルコース応答性インスリン分泌機構と共通する反応系である。アルギニン応答性インスリン分泌を測定することで、この反応系におけるビオチンの影響について検討した。

アルギニン応答性インスリン分泌とその積算値を Fig. 4 に示した。10 mM アルギニンによる応答は、対照群と比較して 6W-def 群, 8W-def 群で有意な低下 (分泌量は対照群の 43%, 26%) を示したが, 4W-def 群 (分泌量は Cont 群の 76%) では, 低下傾向がみられたものの有意差は認められなかった。

糖尿病モデルラットのインスリン分泌応答は, GK (Goto-Kakizaki) ラットや n-STZ ラット (neonatal STZ diabetic rat) の場合, 膵島の形態やインスリン合成能は正常に保持され, グルコース以外のインスリン分泌刺激因子に関しては正常な分泌応答を示す。しかし, db/db マウスや STZ (streptozotocin), アロキサン (alloxan monohydrate) を投与した動物では, 膵島β細胞は, 遺伝的もしくは投薬により消失し, グルコースに限らず他の分泌因子に対しても分泌応答は低値を示す。グルコース刺激とアルギニン刺激は, 6W-def 群ではそれぞれ 36%, 43%, 8W-def 群に至ってはそれぞれ 19%, 26% と双方に対して有意な低下を示した。この結果から判断すると, 6W-def 群, 8W-def 群のように重度のビオチン欠乏では, db/db マウスや STZ を投与した動物のように膵島は萎縮もしくは破壊されていることが推察される。一方, 潜在的ビオチン欠乏である 4W-def 群では, グルコース刺激によるインスリン分泌量は対照群の 55% に減少していたのに対し, アルギニン刺激の場合には, インスリン分泌量は対照群の 76% と有意な低下を示さなかった。このことから, 4W-def 群のような潜在的ビオチン欠乏では, GK ラットや n-STZ ラットと同様に膵島は正常に保持されており, また細胞膜の脱分極以降の反応系がグルコースとアルギニン応答性インスリン分泌に共通する機構であることを考慮すると, ビオチンは, インスリン分泌機構中の細胞膜脱分極反応よりも上流, つまり解糖系からミトコンドリアでの ATP 生成までの反応系と小胞体からの Ca^{2+} の放出系に影響を与えていることが示唆された。

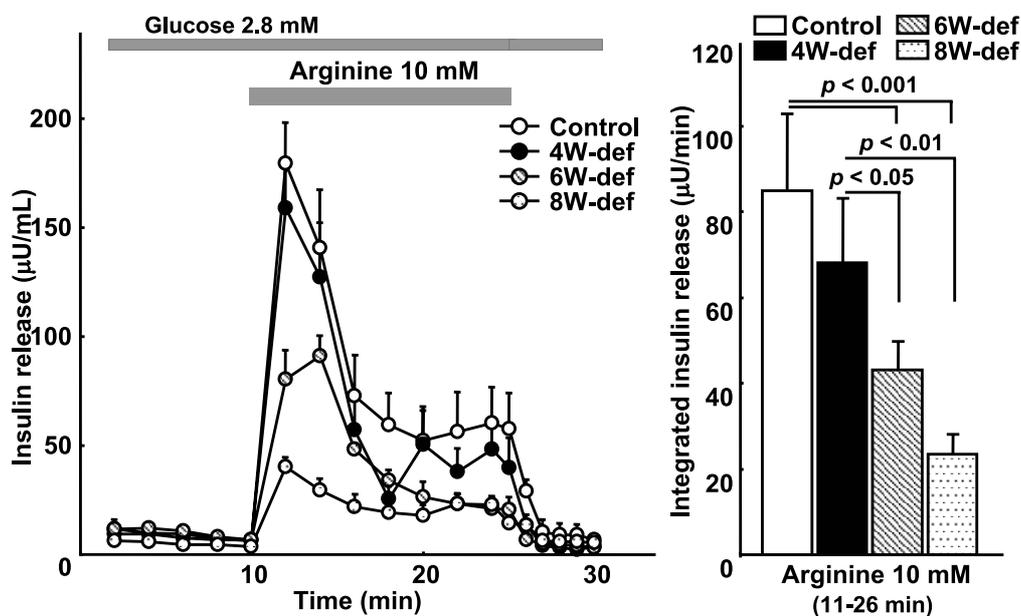


Fig. 4 Effect of biotin deficiency on arginine-induced insulin release from the rat perfused pancreas.

4. 小胞体からのCa²⁺放出に及ぼすビオチンの影響

小胞体からのCa²⁺の放出に注目し、灌流液中のCa²⁺濃度を細胞内Ca²⁺濃度(10⁻⁷ M)と一致させることにより細胞内外でのCa²⁺の影響を無くし、グルコース応答性インスリン分泌を観察することで小胞体からのCa²⁺放出へのビオチンの影響を検討した。

グルコース応答性インスリン分泌とその積算値をFig. 5に示した。小胞体から放出されたCa²⁺は、主にインスリン分泌の第二相に反映される⁷⁾。グルコース刺激に対するインスリンの分泌量は、対照群と比較して6W-def群で44%、8W-def群で32%と顕著な低下を示した。さらに、潜在的欠乏である4W-def群でも対照群と比較して65%と有意な低下を示した。このことから、ビオチンの体内充足度の低下は、小胞体からのCa²⁺の放出に影響を与えることが示された。

小胞体からのCa²⁺の放出には、イノシトール1, 4, 5-三リン酸、サイクリックAMP、サイクリックADPリボース(cADP-r)やCa²⁺誘発性Ca²⁺放出系、長鎖脂肪酸アシルCoAなどが関与する。

細胞内cADP-rの合成にはミトコンドリア内で生成されるATPを必要とし、この反応が細胞内ATP/ADP比によって調節されている⁸⁾。これは、グルコース応答性インスリンの分泌機構と合致し、本実験結果においてもまったくの矛盾を認めない。また、長鎖脂肪酸アシルCoAは、ACCによってアセチルCoAから生成されるマロニルCoAを初発分子として合成される。このことから判断して、体内ビオチン量の低下は、cADP-r生成系や長鎖脂肪酸アシルCoA生成系を悪化させることで小胞体からのCa²⁺の放出に影響を及ぼすと推察される。

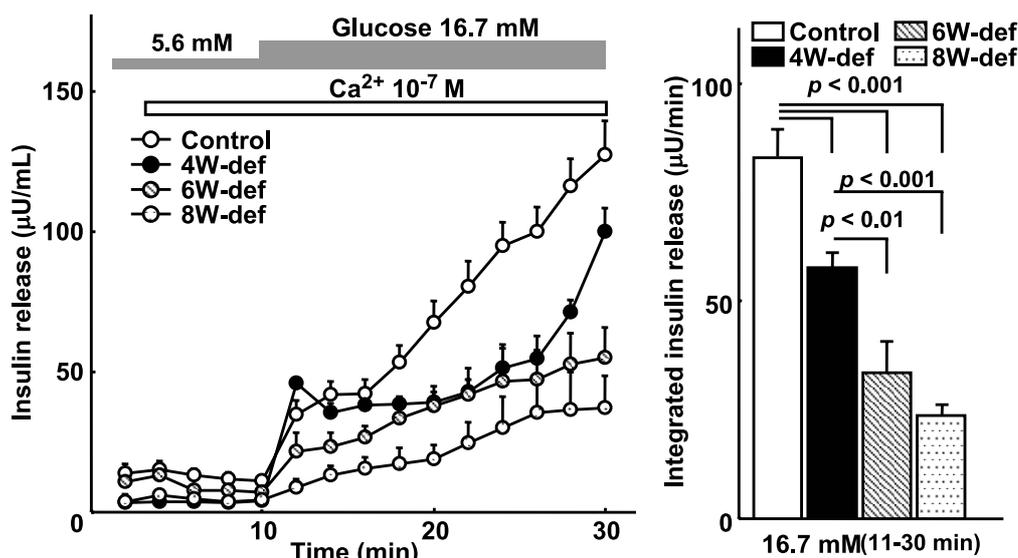


Fig. 5 Effect of biotin deficiency on insulin release induced by glucose containing 10⁻⁷ M Ca²⁺ from the rat perfused pancreas.

5. インスリン貯蔵量に及ぼすビオチンの影響

膵臓中のビオチン量、インスリン量、DNA量をFig. 6に示した。膵臓ビオチン量は、対照群と比較してすべての群で有意な低値を示し、さらにビオチン欠乏の進行に従い低下した。4W-def群の膵臓中インスリン含量は、対照群と同程度であった。さらに、DNA量についても対照群との差は観察されなかった。このことから、潜在的なビオチン欠乏では、インスリン貯蔵量に影響を与えないことが示された。しかし、欠乏の進行した6W-def群、8W-def群では、膵臓中インスリン含量とDNA量は、それぞれ52%、32% (インスリン含量)と52%、31% (DNA量)と有意な低下を示し、その減少率は同程度であった。一般的に、臓器中のDNA量はその臓器での細胞数を反映する。このことから、6W-def群、8W-def群では、膵臓は重度のビオチン欠乏により障害を受け、インスリン合成細胞である膵β細胞数の減少した

状態にあると推察される。事実、これらのラットでは、組織学的解析により単位面積当たりの膵島内分泌細胞数の減少が観察された (Data not shown)。

本研究は、インスリン分泌へのビオチンの関与の有無を明確にし、さらに、インスリン分泌機構でのビオチンの作用部位を解明することを目的として行われた。その結果、ビオチンは、正常なインスリン分泌能力を維持する上で重要な役割を果たす因子であり、その作用部位は分泌機構中のミトコンドリアでのATP生成系よりも上流の反応系と小胞体からの Ca^{2+} 放出系であることが明らかにされた。今後、インスリン分泌機構でのビオチンの作用点を解明するために、作用部位でのビオチンの関与が予想されるGK, PC, ACC, cADP-rやマロニルCoA (Fig. 7) の潜在性ビオチン欠乏状態での変化について詳細な検討が必要と考えられる。

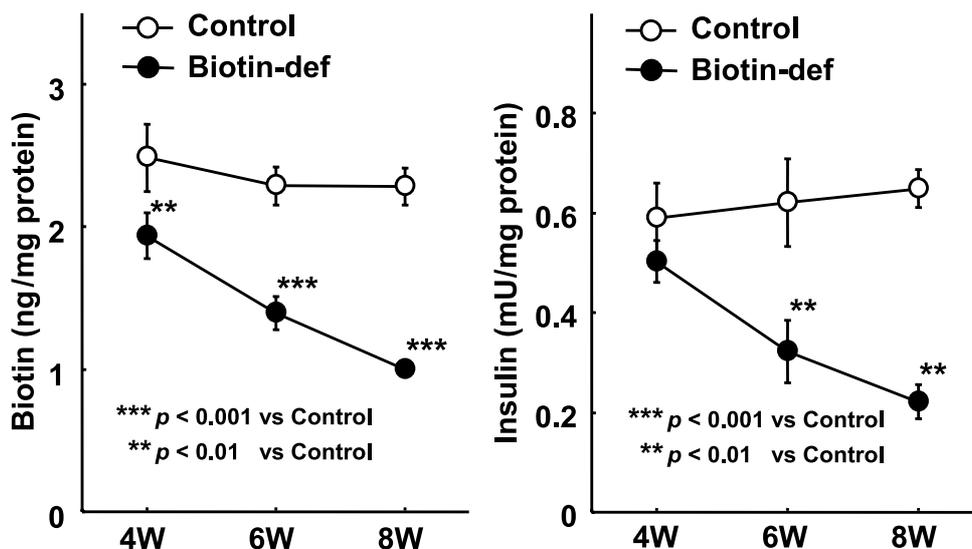


Fig. 6 Biotin and insulin contents in pancreas of biotin deficient rats.

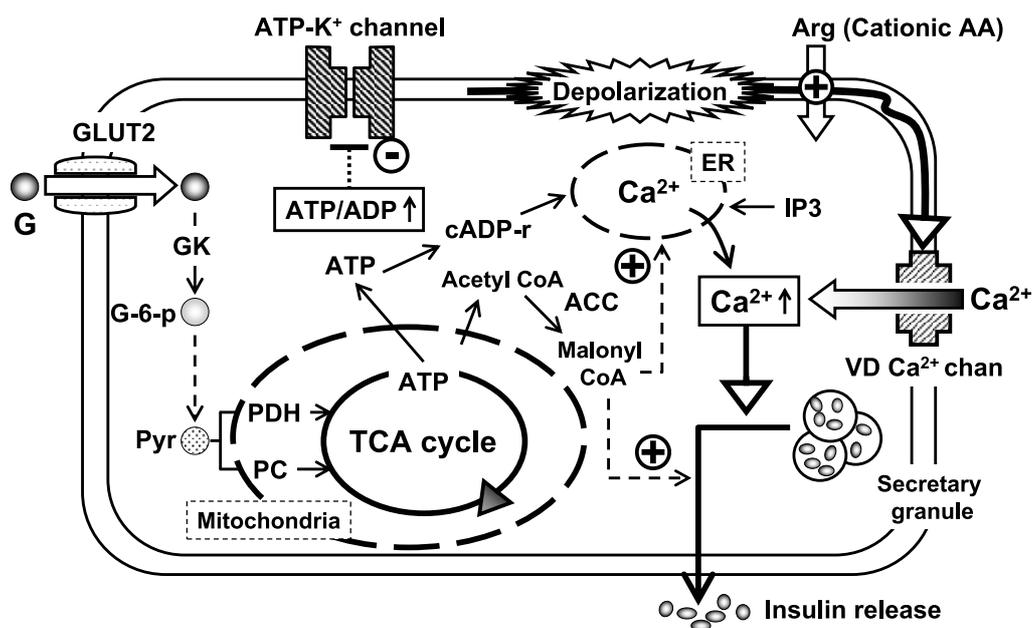


Fig. 7 Machinery of glucose-induced insulin release.

参考文献

- 1) Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y (1999) Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* 10: 237 - 243.
- 2) Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 140: 4595 - 4600.
- 3) Grodsky GM, Fanska RE (1975) The in vitro perfused pancreas. *Methods Enzymol* 39: 364 - 372.
- 4) Wood SP, Pitts JE, Blundell TL, Tickle IJ, Jenkins JA (1977) Purification, crystallisation and preliminary X-ray studies on avian pancreatic polypeptide. *Eur J Biochem* 78: 119 - 126.
- 5) Dakshinamurti K, Litvak S (1970) Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* 245(21): 5600 - 5605.
- 6) Prentki M, Matschinsky FM (1987) Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67: 1185 - 1248.
- 7) Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S (2000) The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15: 72 - 77.
- 8) Okamoto, H (1999) The CD38-cyclic ADP-ribose signaling system in insulin secretion. *Mol Cell Biochem* 193(1-2): 115 - 118.