

## ビオチン欠乏マウスにおけるロイシン大量摂取による有機酸代謝への影響

安藤 沙織<sup>1)</sup>, 松井 朝義<sup>1)</sup>, 榎原 周平<sup>2)</sup>,

湯浅 正洋<sup>1)</sup>, 福井 徹<sup>3)</sup>, 渡邊 敏明<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>兵庫県立大学環境人間学部食環境解析学教室\*, <sup>2)</sup>兵庫県立大学環境人間学部栄養生理学教室\*\*, <sup>3)</sup>病体生理研究所\*\*\*)

### Effect on organic acid metabolism with high intake of leucine and biotin deficiency in mice

Saori ANDO<sup>1)</sup>, Tomoyoshi MATSUI<sup>1)</sup>, Shuhei EBARA<sup>2)</sup>, Masahiro YUASA<sup>1)</sup>, Toru FUKUI<sup>3)</sup> and Toshiaki WATANABE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Dietary Environmental Analysis, School of Human Science and Environment, University of Hyogo

<sup>2)</sup>Department of Nutritional Physiology, School of Human Science and Environment, University of Hyogo

<sup>3)</sup>Byotai-seiri Laboratory

#### Summary

Biotin belongs to the one of the water-soluble vitamin B groups, and it is a cofactor of carboxylase, such as acetyl-CoA carboxylase (ACC), pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC) and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC). 3-Hydroxyisovaleric acid (3-HIA) which is a metabolite of leucine catabolism is a kind of organic acid in urine. The leucine degradation pathway often works to create acetyl-CoA and acetoacetate. When biotin is deficient, an alternative metabolic pathway produces 3-HIA. In this study, when the activity of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase decreased, 3-HIA excretion increased in the urine. The urinary excretion of 3-HIA was determined by HPLC. Feeding an additional two-fold increase of leucine had no effect on urinary 3-HIA but urinary biotin was increased due to the leucine. In addition, leucine had effects on relative weight and biotin levels in some tissues. From these findings, although 3-HIA is a sensitive indicator of biotin deficiency, we have to pay attention when evaluating biotin deficiency.

ビオチンは水溶性ビタミンの一種であり、ビタミンB群に分類される。ビオチンの欠乏症状として、皮膚炎、脱毛、神経障害などが挙げられ、妊娠動物においては胎児の形態形成への影響も報告されている<sup>1)</sup>。ビオチンは様々な食品に分布し、レバーや卵黄などに多く含まれている<sup>2)</sup>。生卵白中に含まれるアビジンと非常に強固に結合し、吸収が阻害され、ビオチン欠乏が起こることが知られているが、一般にビオチン欠乏は通常の食生活では起こらない。しかし、近年の報告では、妊婦<sup>3,4)</sup>、抗てんかん剤を服用している患者<sup>5)</sup>、一般調製粉乳や治療用特殊ミルクを与えられている乳児<sup>6,7)</sup>において、ビオチン欠乏が起こるとされており、臨床症状が見られない境界型ビオチン欠乏の存在も認められている。

ビオチンは、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC)、3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) の補酵素として機能している<sup>8,9)</sup>。

PCは糖新生、ACCは脂肪酸合成、PCCおよびMCCはアミノ酸異化代謝に関わっている。ビオチン欠乏状態になるとカルボキシラーゼ活性が低下し、MCC活性の低下においては、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) のロイシンの異化代謝が阻害される。通常、ロイシンの異化代謝が起こると、アセチル CoA やケトン体であるアセト酢酸を産生する<sup>10)</sup>が、ビオチン欠乏状態では有機酸の一種である3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) の尿中排泄量が増加する。このことから、ビオチン欠乏の指標として3-HIAの有用性が示唆されている。

Mockらのこれまでの報告によると<sup>11)</sup>、ヒトにおける境界型ビオチン欠乏状態では、オレンジジュースに平均一日摂取量の2倍のロイシンを添加し、飲用後の随時尿を採取したところ、尿中3-HIA排泄量が有意に増加した。また、著者らもビオチン欠乏マウスに一般飼料であるCE-2に含まれる約7倍量のロイシンを飼料中に添加したところ、尿中3-HIA排泄量が増加することを見出した<sup>12)</sup>。一

\*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

\*\*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

\*\*\*所在地：東京都板橋区熊野町47-11 (〒173-0025)



### 3. 統計解析

統計解析には、Microsoft Office Excel 2007 (マイクロソフト株, 東京), 統計ソフトウェア SPSS Statistics 17.0 for Windows (SPSS 株, 東京) を用いて検定を行った。データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で表し, 有意水準  $p < 0.05$  のとき統計的に有意であるとした。

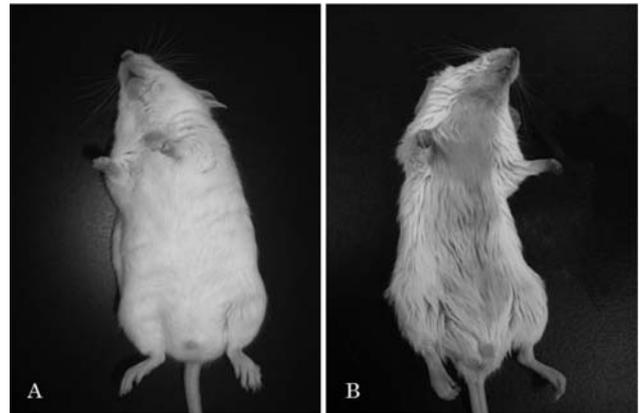
### 実験結果

本実験では, マウスの体重に関しては, 3 週目までは全ての群において, ほぼ同様の成長曲線を示したが, 5 週目以降, D 群において有意な減少を示した (Fig. 2)。飼育 7 週目から, D 群のマウスに脱毛が見られた (Fig. 3)。飼料摂取量は, 飼育 1, 2, 4 週目では C 群が有意に多く飼料を摂取し, ロイシン添加を開始した 9 週目以降, ビオチン欠乏による有意な飼料摂取量の増加が見られた (Fig. 4)。

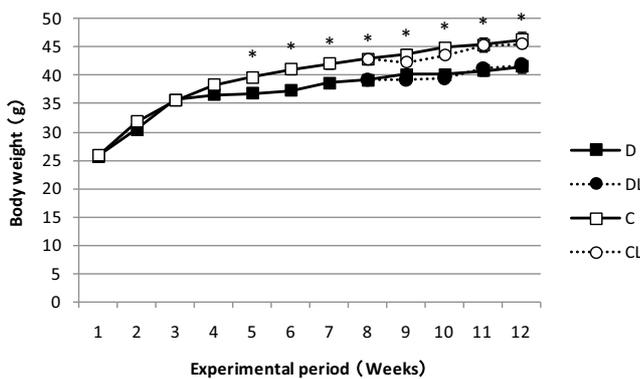
組織の相対重量においては, 腎臓, 大脳, 膵臓, 肺において, ビオチン欠乏による有意な増加が認められた (Table 2)。心臓においては, ビオチン欠乏による有意な

増加, ロイシン添加による有意な減少が見られた。肝臓では, D 群が最も有意な増加を示し, 精巣では CL 群が有意な減少を示した。

尿中 3-HIA 量は, 9 週目以降, D 群で有意に増加したが,

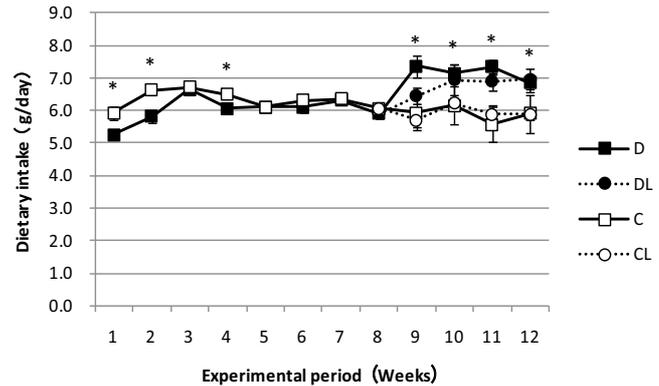


**Fig. 3** The representative biotin deficient mice. Hair loss was observed in the biotin deficient group. (A: control group, B: biotin deficient group)



**Fig. 2** Changes of body weight in biotin deficiency and leucine addition mice.

Values are mean ± SEM.  
\*t-test (0-8wk): 5-8wk.  $p < 0.05$ .  
Post hoc test after two-way ANOVA repeated measures (9-12wk): There was no interaction between biotin and leucine. Biotin deficiency groups (D and DL) showed statistically significant differences in comparison with control groups (C and CL).  $p < 0.05$ .  
\*Values in biotin deficiency groups (D and DL) and Control groups (C and CL) are significantly different ( $p < 0.05$ ) at the same point. Every point has shown a significant difference. (D and DL vs. C and CL: 9-12wk.)



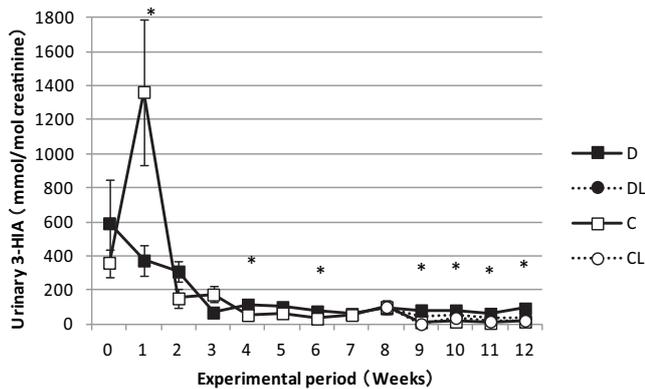
**Fig. 4** Changes of dietary intake in biotin deficiency and leucine addition mice.

Values are mean ± SEM.  
\*t-test (0-8wk): 1-2, 4wk.  $p < 0.05$ .  
Post hoc test after two-way ANOVA repeated measures (9-12wk): There was no interaction between biotin and leucine. Biotin deficiency groups (D and DL) showed statistically significant differences in comparison with control groups (C and CL).  $p < 0.05$ .  
Values in biotin deficiency groups (D and DL) and Control groups (C and CL) are significantly different ( $p < 0.05$ ) at the same point. Every point has shown a significant difference. \* (D and DL vs. C and CL: 9-12wk.)

**Table 2** Relative weight in biotin deficiency and leucine addition mice.

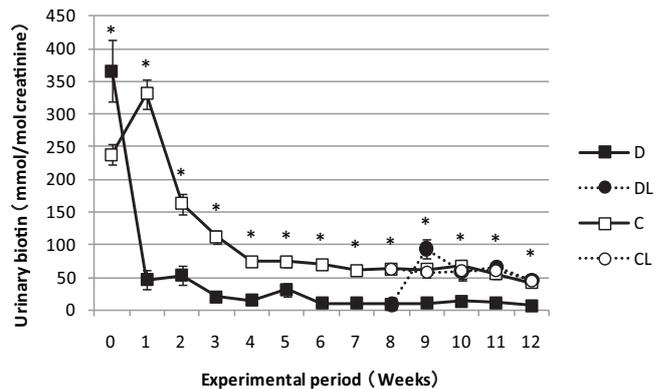
Relative weight (/g%)	Dietary groups				Two-way ANOVA		
	D	DL	C	CL	Biotin	Leucine	Interaction
Liver	4.54 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.42 ± 0.06 <sup>c</sup>	3.61 ± 0.06 <sup>c</sup>	*	n.s.	*
Kidney	2.35 ± 0.12	2.01 ± 0.07	1.68 ± 0.10	1.70 ± 0.05	*	n.s.	n.s.
Heart	0.58 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.01	*	*	n.s.
Soleus	1.12 ± 0.03	1.18 ± 0.09	1.09 ± 0.03	1.13 ± 0.04	n.s.	n.s.	n.s.
Testis	0.80 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>b</sup>	*	*	*
Brain	0.99 ± 0.07	0.89 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.77 ± 0.02	*	n.s.	n.s.
Pancreas	0.58 ± 0.08	0.62 ± 0.05	0.53 ± 0.01	0.52 ± 0.02	*	n.s.	n.s.
Spleen	0.29 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01	n.s.	n.s.	n.s.
Lung	0.54 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.01	*	n.s.	n.s.

Values are mean ± SEM.  
Each sample was analyzed by two-way ANOVA. \* $p < 0.05$ . In the liver and testis, there were interactions between biotin and leucine. Hence, each group was analyzed by multiple comparisons. <sup>ab, a, b</sup> $p < 0.05$ .



**Fig. 5** Urinary 3-HIA in biotin deficiency and leucine addition mice.

Values are mean  $\pm$  SEM.  
 \*t-test (0-8wk): 1, 4, 6wk.  $p < 0.05$ .  
 Post hoc test after two-way ANOVA repeated measures (9-12wk):  
 There was an interaction between biotin and leucine. Hence, each group was analyzed by repeated measures of ANOVA and multiple comparisons. The D group showed statistically significant differences in comparison with the DL group and control groups (C and CL).  $p < 0.05$ .  
 Each groups' values are significantly different at the same point. ( $p < 0.05$ )  
 \*(D vs. DL:9wk, D vs. C:9, 11-12wk, D vs. CL:9-12wk)



**Fig. 6** Urinary biotin in biotin deficiency and leucine addition mice.

Values are mean  $\pm$  SEM.  
 \*t-test (0-8wk): 0-8wk.  $p < 0.05$ .  
 Post hoc test after two-way ANOVA repeated measures (9-12wk):  
 There was an interaction between biotin and leucine. Hence, each group was analyzed by repeated measures of ANOVA and multiple comparisons. The D group showed statistically significant differences in comparison with the DL group and control groups (C and CL).  $p < 0.05$ .  
 Each groups' values are significantly different at the same point. ( $p < 0.05$ )  
 \*(D vs. DL:9-12wk, D vs. C:9-12wk, D vs. CL:9-12wk)

ロイシン添加による影響は見られなかった (Fig. 5)。尿中ビオチン量は、ビオチン欠乏により有意に減少した (Fig. 6)。しかし、ロイシン添加が行われた9週目において、D群の尿中ビオチン量は低値を維持したが、DL群の尿中ビオチン量の増加が認められた。10週目以降は、DL群の尿中ビオチン量はC群およびCL群と同程度まで増加した。

組織中のビオチン量では、精巣において、ビオチン欠乏による有意なビオチン量の減少、ロイシン添加による有意なビオチン量の増加が見られた (Table 3)。肝臓、脾臓では、ビオチン欠乏による有意なビオチン量の減少、ロイシン摂取によりDL群で特異的なビオチン量の増加が確認された。

### 考察

本研究では、ビオチン欠乏飼料により飼育5週目で、D群においてビオチン欠乏を示し、体重の有意な低下、脱毛を生じた。しかし、ビオチン欠乏による尿中3-HIA量の

有意な増加は、体重の有意な低下や、尿中ビオチン量で見られたビオチン欠乏による有意な減少と、必ずしも一致しなかった。

尿中3-HIA排泄量は、体重増加が比較的著しい飼育3週目まで、ビオチン欠乏の有無によらず、高い傾向を示した。これは、体重増加が比較的安定する飼育4週目以降に比べ、尿中クレアチニン量が少なく、クレアチニン補正された尿中3-HIA排泄量が高値となるためである。尿中クレアチニンは、ロイシン代謝と関連する因子ではなく、尿の希釈性を現す指標であり、筋肉量に比例する<sup>15-16</sup>。クレアチニン補正を行った尿中3-HIA量を用いることは、成体期の尿中3-HIA量と比べ、尿濃縮能の未熟な幼若期において高値を示す原因となる。横断的に検討する場合は、クレアチニン補正が有用であるものの、縦断的に検討する場合、尿濃縮能や筋肉量により影響を受ける。今後、他のバイオマーカーとの比較や、ロイシン異化代謝における他の中間代謝産物との比較について、検討する必要がある。

また、C群とD群の間で、有意な体重の差を認めない時期であるにも関わらず、第1週において尿中3-HIA排

**Table 3** Biotin concentration of tissues in biotin deficiency and leucine addition mice.

Biotin	Dietary groups				Two-way ANOVA		
	D	DL	C	CL	Biotin	Leucine	Interaction
Liver ( $\mu\text{g/g}$ )	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.75 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.60 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	*	*	*
Kidney ( $\mu\text{g/g}$ )	0.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.20 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	*	n.s.	*
Heart ( $\mu\text{g/g}$ )	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.74 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	*	n.s.	*
Soleus ( $\mu\text{g/g}$ )	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	n.s.	n.s.	n.s.
Testis ( $\mu\text{g/g}$ )	0.14 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.02	*	*	n.s.
Brain ( $\mu\text{g/g}$ )	0.24 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.02	n.s.	n.s.	*
Pancreas ( $\mu\text{g/g}$ )	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	*	*	*
Serum ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.05 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	n.s.	n.s.	n.s.

Values are mean  $\pm$  SEM.  
 Each sample was analyzed by two-way ANOVA. \* $p < 0.05$ . In the liver, kidney, heart, brain and pancreas, there were interactions between biotin and leucine. Hence, each group was analyzed by multiple comparisons.  
<sup>a-d, ab, b</sup>  $p < 0.05$ .

泄量は、C群のほうが高値となっている。このことは、体重増加の著しい時期において、何かしらの要因により、尿中3-HIA排泄量が、ビオチン欠乏のみのバイオマーカーとしては、信頼性に欠ける可能性を示唆している。ロイシンは飼料摂取より得られ、これは同化により体構成タンパクなどを合成するのに用いられる。一方、飢餓などの異化亢進時には、体筋肉の崩壊によりロイシンは導入され、アセチル CoA やアセト酢酸まで分解され、エネルギー源として利用される<sup>10)</sup>。この過程において、ビオチン欠乏により、ビオチン依存性酵素である MCC の活性の低下が生じると、3-HIA が産生され、尿中に排泄される。一般的にアミノ酸やタンパク質は、同化に必要な摂取量を越えた場合、余剰分をアミノ酸の形で体に貯蔵することは出来ない。同化必要量を越えたタンパク質やアミノ酸であるロイシンを過剰に摂取すると、同化時であってもエネルギー源として利用され得る。第1週目から第2週目において、C群はD群よりも、飼料を有意に多く摂取している。このことが、幼若期の体重増加に著しく、同化作用の活発な時期に、一過性にビオチン欠乏群より過剰にタンパク摂取を来たし、尿中3-HIA量の値が高値を示した可能性がある。

本研究では、DL群の尿中3-HIA量が最も高値を示すと予測していたが、Mockら<sup>11)</sup>および著者ら<sup>12)</sup>による先行研究とは異なり、尿中3-HIA量はロイシン添加後、概ねD群、DL群、C群、CL群の順で低くなった。その原因として考えられるのが、以下の2点である。

まず、2倍量のロイシン添加では、尿中3-HIA量への影響が確認出来なかった。Mockらの研究では、ヒトにおいて平均一日摂取量の2倍量のロイシンをオレンジジュースに添加し、飲み干した後の採尿により、尿中3-HIA量を測定した<sup>11)</sup>。その結果、尿中3-HIA量の増加が見られている。この理由として、体内のロイシン量が急激に増加することにより、境界型のビオチン欠乏において活性の低下したMCCをオーバーフローし、3-HIA排泄量が増加したと指摘されている。著者らの研究においても、ビオチン欠乏マウスに一般飼料CE-2に含まれるロイシンの約7倍量の飼料添加で、尿中3-HIA量が増加した<sup>12)</sup>。これらのことから、マウスにおいて、体重増加がある程度恒常化した時期には、食餌中に2倍量のロイシンが添加されても、尿中3-HIA量に影響を及ぼす十分量の過剰摂取とは言えないのかもしれない。

次に、尿中、組織中において、C群およびCL群では、ビオチン量に大きな差が見られなかったが、D群およびDL群では、DL群で特異的なビオチン量の増加が確認出来た。これらのことから、ビオチンが充足している状況では、2倍量のロイシン添加は、ビオチン量には影響を与えないことが示唆された。一方、ビオチン欠乏状態においては、ロイシン添加がビオチンの体内動態に影響を及ぼしていることも示唆された。ビオチン欠乏状態でのロイシン摂取が、腸内細菌叢のビオチン産生に関与しているのかもしれない。DL群のビオチン量の増加は、本研究の尿中

3-HIA量の減少との間で関連があるものと推測される。

尿中3-HIA排泄量は、異化亢進時において、境界型ビオチン欠乏のみを示すバイオマーカーである。しかし、同化亢進時においては、ロイシンの過剰摂取を示す可能性も示唆され、尿中3-HIA量が、ビオチン欠乏の単独のバイオマーカーとして評価するには問題があると思われる。以上のことから、尿中3-HIA量はビオチン欠乏の指標として有用ではあるが、より有用な指標として利用するためには、今後さらに検討を重ねる必要がある。

## 参考文献

- 1) Toshiaki Watanabe (1983) Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J. Nutr.* 113 : 574-581.
- 2) 日本ビタミン学会 (2010) ビタミン総合事典, 株式会社朝倉書店, 東京 : pp. 355-390.
- 3) Donald M. Mock, Diane D. Stadler, Shawna L. Stratton, Nell I. Mock (1997) Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J. Nutr.* 127 : 710-716.
- 4) Donald M. Mock, J. Gerald Quirk, Nell I. Mock (2002) Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 75 : 295-299.
- 5) Klaus-Henning Krause, Jean-Pierre Bonjour, Peter Berlit, Walter Kochen (1985) Biotin status of epileptics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 447 : 297-313.
- 6) 渡邊敏明, 福井徹 (1996) わが国の調製粉乳に含まれているビオチン量の分析. *日本栄養・食糧学会誌* 49 : 343-347.
- 7) 福井徹, 石盛嘉浩, 榎原周平, 木村幸子, 渡邊敏明 (2006) 母乳および人工栄養乳児におけるビオチンの体内動態の検討. *微量栄養素研究* 23 : 5-12.
- 8) Janos Zemleni, Robert B. Rucker, Donald B. McCormick, John W. Suttie (2007) *Handbook of Vitamins -4th ed.*, CRC Press Taylor & Francis Group, Florida: pp.361-383.
- 9) Charles R. Scriver, Arthur L. Beaudet, William S. Sly, David Valle (1995) *The metabolic and molecular bases of inherited disease. -7th ed.*, McGraw-Hill Inc., New York : vol.2. pp.3151-3177.
- 10) Charles R. Scriver, Arthur L. Beaudet, William S. Sly, David Valle (1995) *The metabolic and molecular bases of inherited disease. -7th ed.*, McGraw-Hill Inc., New York : vol.1. pp. 1387-1422.
- 11) Donald M Mock, Cindy L. Henrich, Nadine Carnell, Nell I Mock (2002) Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans : validation of 3-hydroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge. *Am. J. Clin. Nutr.* 76 : 1061-1068.
- 12) 香西彩加 (2009), マウスにおける微量栄養素のビオチン吸収への影響, 兵庫県立大学環境人間学部学位論文

- 13) 清水章, 中西豊文 (1992) 尿有機酸定量分析による病態診断. 臨床病理 40 : 743-750.
- 14) Philip G. Reeves, Forrest H. Nielsen, George C. Fahey, JR (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J. Nutr. 123 : 1939-1951.
- 15) 上代淑人 (2007) イラストレイテッドハーバー・生化学 原書 27 版, 丸善株式会社, 東京 : pp.294-302.
- 16) Thomas Remer, Annette Neubert, Christiane Maser-Gluth (2002) Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. Am. J. Clin. Nutr. 75 : 561-569.