

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614009

研究課題名(和文) エピジェネティクス解析によるビオチンの摂食抑制機構の解明と糖尿病改善への応用

研究課題名(英文) Biotin suppresses an appetite of mice by modifications of gene expression by enhancement of histon biotinylation in hypothalamus

研究代表者

曽根 英行 (SONE, Hideyuki)

新潟県立大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：90398511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビオチンによる摂食抑制効果と白色脂肪及び視床下部における摂食関連タンパク質遺伝子発現調節機構について検討した。摂食量はビオチンにより有意に抑制されたが、末梢組織由来関連タンパク質の血漿濃度と遺伝子発現量には変化が認められず、ビオチンの作用部位は視床下部と判断された。視床下部では、摂食抑制物質であるマロニルCoAへの変換酵素アセチルCoAカルボキシラーゼ2 (ACC2) の遺伝子発現量とACC2をコードするDNA領域ヒストンのビオチニル化頻度が有意に増加した。以上の結果から、ビオチンはヒストンビオチニル化を介しACC2遺伝子発現量を増加することで摂食行動を抑制することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether biotin suppresses the food intake of mouse by measuring nutrient and hormonal regulators in the periphery and gene expressions related to feeding regulation in hypothalamus. Food intake of biotin group was significantly less than that of control group. But, blood glucose, ghrelin, insulin, adiponectin, CCK and GLP-1 in plasma of biotin group were almost same as those of control group. The level of mRNA expression of leptin did not show a significant difference between both groups. In the hypothalamus, the ACC2 mRNA expression was augmented by 150% in biotin group compared with that in control group, though ACC1, MCD, NPY and POMC were not changed between both groups. Additionally, biotin increased the biotinylation of histons coiling DNA of coding region for ACC2. These data strongly suggest that biotin potentiate to suppress an appetite by upregulation of ACC2 mRNA by the enhancement of the histon biotinylation in hypothalamus.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ビオチン 摂食抑制 視床下部 アセチルCoAカルボキシラーゼ-2

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン B 群の一種であるピオチンは、4 種のカルボキシラーゼの補酵素として生体内の代謝に重要な役割を果たしている。ピオチンの薬理作用については、糖尿病に関する研究が盛んに行われている。

ピオチンは、肝臓および膵細胞でのグルコキナーゼ活性を上昇し、肝臓でのグルコースの取り込みと膵細胞からのインスリン分泌を増加させる。また、肝臓ではホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼとグルコース-6 ホスファターゼ活性を低下させ、糖新生を抑制する。さらに、クロムとの併用でインスリン抵抗性を改善し、末梢組織でのグルコース利用能を増加させる。これらの複合的な作用により、ピオチンは糖尿病を改善すると考えられている。

しかし、OLETF ラットをはじめ多くの 2 型糖尿病モデル動物では、過食による肥満が糖尿病発症の主因の 1 つである。そのため、摂食量を制限し肥満を解消するとインスリン抵抗性は改善される。つまり、ピオチンによる 2 型糖尿病症状改善の作用機序の 1 つとして、ピオチンが摂食行動を抑制し、肥満とインスリン抵抗性を改善するといった仮説が想定される。

我々は、飼料中に 0.5-1.0% のピオチンを添加することにより、マウス及びラットの摂食量が 15-20% 低下することを報告している。また、摂食調節ペプチドホルモンの血中濃度を測定し、ピオチンの標的部位として白色脂肪と視床下部を示唆する結果を得ている。さらに、ピオチンによる摂食抑制の発現には摂食後 2 日間以上必要であることから、ピオチンは摂食シグナル系の情報伝達物質として作用するのではなく、標的部位において摂食関連タンパク質の遺伝子発現を調節すると推察している。

視床下部におけるピオチンの作用機序としては、ピオチン酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) によるマロニル CoA 産生がその候補となる。視床下部におけるマロニル CoA の蓄積は摂食を抑制する。ピオチンはピオチニル-AMP を介し cGMP/PKG 系を活性化し、転写関連タンパク質をリン酸化することで遺伝子発現を調節する。ACC はこの経路で発現調節される。つまり、ピオチンは視床下部において ACC の発現を亢進し、マロニル CoA 産生を増加させ、摂食を抑制すると考えられる。

また近年では、ピオチンがヒストンを修飾し遺伝子発現を調節するといったピオチンによるエピジェネティクス制御が注目されている。ピオチンのヒストンアミノ末端への結合は、メチル化部位であるコアヒストン 3 の 4 番目のリジン (H3K4) と H3K9、アセチル化部位である H4K8 と H4K12 が重要である。ピオチンは、競合的にこれらの部位へ結合することによりクロマチンの微小環境を変化させ、転写活性を調節すると考えられる。そ

のため、ピオチンは白色脂肪・視床下部においてヒストンをピオチニル化することにより、摂食関連タンパク質の遺伝子発現を調節し、摂食を抑制することが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ピオチン添加食を給餌したマウスの摂食量、体重、組織中ピオチン含量及び末梢組織由来の摂食調節ペプチドホルモンの血中濃度を測定することにより、ピオチンによる摂食抑制効果とその作用部位を再検討する。ピオチン含量の増加率が高く、ピオチン摂取による血中濃度の変動が大きいペプチドホルモンの産生臓器がピオチンの標的部位と考えられる。さらに、末梢組織及び視床下部における摂食関連タンパク質の遺伝子発現量を測定し、摂食抑制効果におけるピオチンの作用機序の解明を目指す。加えて、ピオチンの作用様式を明らかにするために、標的遺伝子をコードする DNA のプロモーター領域におけるヒストンのピオチニル化頻度についても併せて検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物、体重及び摂食量の測定

実験動物には C57BL/6J マウス、雄、6 週齢を用いた。8 日間の予備飼育後、対照群とピオチン群に群分けし、9 日間実験飼育した。ピオチン群には 1.0% ピオチン添加食を給餌した。体重と摂食量は 2 日毎に測定した。

### (2) 試料採取及び調製

実験飼育 9 日目に採血し、肝臓、胃、十二指腸、白色脂肪 (精巣周囲)、褐色脂肪、視床下部、海馬、大脳皮質を摘出した。血漿及びそれぞれの臓器は、ピオチン含量、血糖値、摂食調節ペプチドホルモンの血漿濃度及び臓器中の摂食関連タンパク質の遺伝子発現量の測定まで -80 °C で保存した。

### (3) 組織中ピオチン含量の測定

試料は、0.1g 当たり 1ml の 0.1M リン酸緩衝液でホモジネートした。同量の 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて加熱酸加水分解 (121 °C、60min) した。同量の 5M NaOH で中和した溶液をピオチン測定試料とした。ピオチン含量は、ピオチン要求菌株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) を用いたマイクロプレートによる微量微生物学的定量法により測定した。

### (3) 血糖値と血漿ペプチドホルモン測定

血糖値は血糖値測定器 (アボットジャパン株式会社) で測定した。インスリン、レプチン、アディポネクチン、コレシストキニン (CCK)、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1)、グレリンの血漿濃度は、酵素免疫測定法による市販測定キットを用いて測定した。

### (4) 遺伝子発現量の測定

白色脂肪及び視床下部から TRIzol Reagent (Invitrogen 社) を用いて Total RNA を抽出し、逆転写反応により相補的 DNA (cDNA) を合成した。逆転写反応には SuperScript™ First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 社) を使用した。この cDNA を鋳型として目的タンパク質の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した (real time rt-PCR)。白色脂肪ではレプチン、視床下部ではプロオピオメラノコルチン (POMC)、ニューロペプチド Y (NPY)、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 (ACC-1)、ACC-2 及びマロニル CoA デカルボキシラーゼ (MCD) を測定し、加えて、それぞれの試料における対照遺伝子として *-actin* を測定した。

(5) 標的遺伝子のプロモータ領域におけるヒストンピオチニル化頻度の測定

標的遺伝子として ACC-2、ネガティブ対照として GAPDH のヒストンピオチニル化頻度を測定した。常法に従い、視床下部からヒストンを精製し、クロマチンからヒストンが 3-4 単位で得られるようリンカー DNA を切断した。これをアビジン抗体で免疫沈降し、ピオチニル化を受けたヒストンに巻き付く DNA のみを回収した。回収した DNA におけるピオチン標的遺伝子のプロモータ領域の存在量をリアルタイム PCR 法で測定し、当該遺伝子のヒストンピオチニル化頻度を算定した。

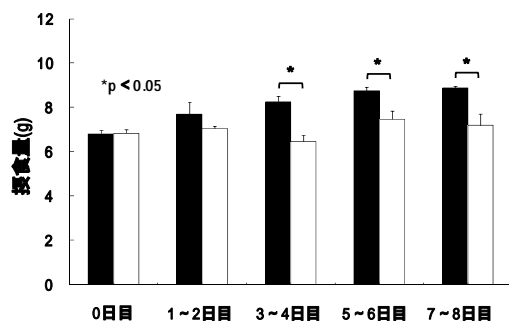
(6) 統計学的解析

全ての測定値は、平均値 ± 標準誤差 (SE) で示した。測定値の集計及び解析には、Stat View J-4.5 を用いた。対応のない t 検定あるいは分散分析 (Post-hoc test として Bonferroni 法) により検定した。

4. 研究成果

(1) 体重及び摂食量

各群における体重変化 (体重曲線) には有意な差は認められず (反復測定分散分析)。各日における体重についても同様の結果が示された。摂食量は、実験飼育開始 4 日目で対照群に対しピオチン群で有意な低下を示し ( $p < 0.05$ )。この低下は、引き続き 6 日目、8 日目にも認められた (共に  $p < 0.001$ )。



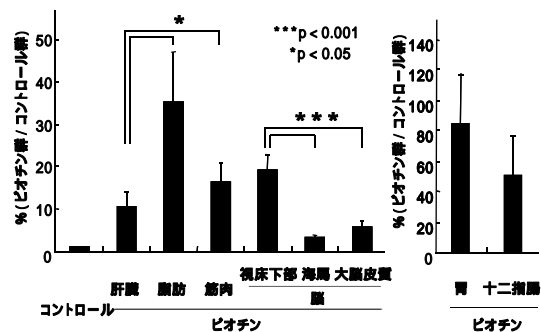
さらに、摂食量の経日変化 (摂食量曲線) に

おいても、対照群に対しピオチン群で有意な低下が示された ( $p < 0.05$ )。

これらの結果から、ピオチンは薬理作用として摂食抑制効果を有することが明らかにされた。ピオチンの効果が 4 日目以降に観察されたことから、ピオチンは、自身が摂食抑制シグナル系の情報伝達物質として作用するのではなく、おそらく標的部位において摂食関連タンパク質の遺伝子発現量を調節することでその効果を発揮すると推察される。なお、ピオチン摂取による糞排泄量や糞塊の形態に変化は認められず、ピオチンは排泄状態や排泄頻度には影響しないものと考えられる。

(2) 組織中ピオチン含量

ピオチン含量は、全ての臓器においてピオチン群で有意な増加を示した ( $p < 0.01$ )。ピオチン含量の増加率 (ピオチン群のピオチン含量 / 対照群のピオチン含量) は、肝臓で対照群の  $10.5 \pm 3.45$  倍を示した。脂肪では  $35.1 \pm 11.83$  倍、筋肉では  $16.4 \pm 4.56$  倍、胃では  $84.5 \pm 33.04$  倍、十二指腸では  $50.7 \pm 25.92$  倍であった。脳組織においては、視床下部のピオチン含量の増加率は、 $19.2 \pm 3.65$  倍、海馬では  $3.3 \pm 0.71$  倍、大脳皮質では  $5.9 \pm 1.24$  倍であった。各臓器における増加率の比較では、肝臓に対し、脂肪及び胃、十二指腸で高値を示した ( $p < 0.05$ )。また、脳組織においては、特に視床下部で高値を示しており、大脳皮質と海馬に対し、顕著な増加が観察された ( $p < 0.001$ )。視床下部の増加率



は、肝臓と比較して統計的に有意ではないものの高い傾向を示しており、脂肪、胃、十二指腸及び視床下部がピオチンの標的部位と示唆された。胃及び十二指腸は増加率の観点から有力な標的部位と考えられるが、これら臓器の内腔には濃度勾配による吸収過程でピオチンが一時的に高濃度に滞在していたことが推測される。ピオチンの標的部位としての判断には、これら臓器で産生される摂食調節ペプチドホルモンの結果と併せて検討することが必要と考える。

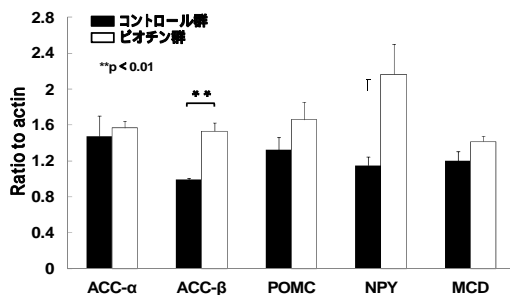
(3) 血糖値と血漿ペプチドホルモン濃度

血糖値はピオチン群で低下する傾向にあったものの、有意な差は認められなかった。

血漿ペプチドホルモン濃度は、レプチンがピオチン群で比較的高値を示したものの有意な差は認められなかった。インスリン、アディポネクチン、CCK、GLP-1、グレリンについては、ピオチン群と対照群で同程度の値を示した。インスリンやレプチン、GLP-1、グレリンは末梢由来の摂食調節ペプチドホルモンである。インスリンは、直接中枢に作用して NPY を含有するニューロン (NPY ニューロン) を抑制することで摂食を抑制すると認識されている。レプチンは、脂肪細胞から分泌され、視床下部の NPY ニューロン及び POMC ニューロンに作用し、摂食行動を抑制する。GLP-1 は、回腸から分泌され、迷走神経の求心路を活性化し、中枢神経に伝達され摂食を抑制する。グレリンは、胃から分泌され、門脈に到達する迷走神経求心路を介して摂食を亢進させる。本研究では、これら摂食調節ペプチドホルモンにおける血漿中濃度の変動が全く観察されなかった。この結果は、ピオチンがこれら末梢由来のホルモンの合成や分泌に寄与していないことを示唆している。ただし、レプチンに関しては、ピオチンによる増加傾向が観察されたため、遺伝子発現量の結果と併せて確認する必要がある。

#### (4) 遺伝子発現量

白色脂肪におけるレプチン遺伝子の発現量 (  $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量に対する比) は、対照群で  $1.06 \pm 0.21\%$ 、ピオチン群で  $1.62 \pm 0.54\%$  であり、2 群間に有意な差は認められなかった。また、褐色脂肪におけるミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP) -1、UCP-2 及び UCP-3 の遺伝子発現量についても、2 群間に有意な差は認められなかった。UCP はミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役し、非ふるえ熱産生によってエネルギーを熱として散逸する機能を有する。UCP-1 は、褐色脂肪組織、UCP-2 は白色脂肪組織や骨格筋、脾臓、小腸など全身に幅広く存在し、UCP-3 は骨格筋や褐色脂肪組織に発現することが知られている。白色脂肪組織および褐色脂肪組織における摂食関連タンパク質の遺伝子発現に変化がみられなかったことから、ピオチンの標的部位は末梢組織ではないことが示唆された。



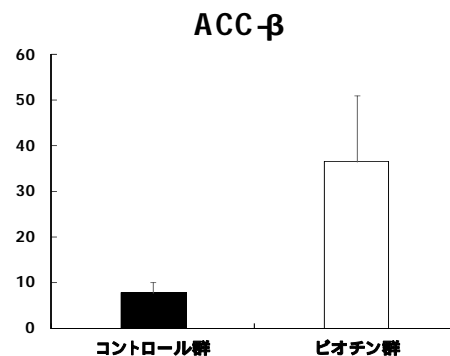
視床下部における NPY、POMC、ACC-1 及び

MCD の遺伝子発現量には 2 群間で有意な差は認められなかった。しかし、ACC-2 の遺伝子発現量は、対照群で  $0.99 \pm 0.01\%$ 、ピオチン群で  $1.53 \pm 0.09\%$  であり、ピオチン群で有意な増加を示した ( $p < 0.01$ )。

摂食行動は、視床下部のマロニル CoA により抑制されることが知られている。マロニル CoA は脂肪酸合成の中間代謝物であり、ACC によって生成される。ACC には ACC-1 と ACC-2 の 2 種類のアイソザイムが存在し、共にアセチル CoA からマロニル CoA への変換を触媒する。特に、視床下部において ACC-2 は、マロニル CoA を介して脂肪酸代謝を阻害し、摂食を抑制すると考えられている。従って、ピオチンは、視床下部において ACC-2 の発現量を増加することでマロニル CoA 合成を促進し、摂食行動を抑制すると推察される。

#### (5) 標的遺伝子におけるヒストンピオチニル化頻度

ヒストンピオチニル化頻度は、アビジン抗体による免疫沈降で得られた試料中のプロモータ領域の DNA 量 (ピオチニル化ヒストン DNA: ピオチニル化を受けたヒストンに巻き付くプロモータ領域の DNA 量) と免疫沈降前の試料中のプロモータ領域の DNA 量 (試料全体のプロモータ領域の DNA 量) で示した。ACC-2 では、対照群に対しピオチン群で有意な増加を示し、ACC-2 領域におけるピオチニル化ヒストンの増加が認められた。しかし、GAPDH は、対照群とピオチン群でピオチニル化ヒストン DNA の検出限界以下であった。この結果は、GAPDH 領域ではヒストンがピオチニル化を受けないことを示している。



本研究では、過剰量のピオチン摂取により、摂食中枢である視床下部において ACC-2 をコードする DNA 領域におけるヒストンのピオチニル化頻度の増加が明らかにされた。この作用により、ピオチンは視床下部において ACC-2 の発現量を増加させ、マロニル CoA 合成を亢進することで摂食行動を抑制すると示唆される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

曾根英行：摂食調節機構におけるビオチンの作用部位について 日本ビタミン学会(姫路市)2014年6月14日

〔図書〕(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

曾根 英行 (SONE Hideyuki)  
新潟県立大学・人間生活学部・准教授  
研究者番号：90398511

### (3)連携研究者

神山 伸 (KAMIYAMA Shin)  
新潟県立大学・人間生活学部・講師  
研究者番号：70525401