

アルギニン応答性インスリン分泌機構におけるビオチンの作用部位について

曾 根 英 行, 神 山 伸

(新潟県立大・健康栄養)*

Bitoin does not directly act in the mechanism of arginine-induced insulin secretion

Hideyuki SONE and Shin KAMIYAMA

*Department of Health and Nutrition, University of Niigata Prefecture***Summary**

Insulin secretion is regulated by a number of factors, including a rise in a ATP/ADP ratio, cAMP production and plasma membrane depolarization, leading to an increase in intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Arginine, like glucose, is a well-known insulin secretagogue. It is recognized that arginine stimulates insulin secretion by a membrane depolarization with their positive charge. As another possible mechanism, it is proposed that arginine enhances a nitric oxide (NO) production as its metabolites, which can activate several pathways and increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Our previous study indicates that biotin directly acts in the glucose metabolic pathway for ATP production and modulates glucose-induced insulin secretion. But, it remains to clear whether biotin acts as a regulator of arginine-induced insulin secretion. We studied the effect of biotin deficiency on arginine-induced insulin secretion by isolated pancreas perfusion of rats. Insulin secretion was stimulated with L-arginine, N-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) which does not work as an NO-donor for NO production, and D-arginine which is not metabolized in the mammalian cells. In the moderate biotin deficient rats, the level of insulin response was significantly lower than that in the control rats only when insulin was stimulated with D-arginine. In the severe biotin deficient rats, insulin secretions stimulated with each of every secretagogues markedly diminished. These results indicate that arginine-induced insulin secretion was actually impaired by biotin deficiency, but biotin did not directly act as a regulator of arginine-induced insulin secretion. It may be caused by a histologic dysfunction in pancreatic β cells by biotin deficiency.

ビオチンは4種のカルボキシラーゼの補酵素として糖代謝、脂肪酸合成、アミノ酸の異化で重要な役割を果たしている。

ビオチン酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼは、肝臓や筋肉、脳組織に多く存在し、糖新生の主要酵素としての役割だけでなく、TCA サイクルを円滑に機能させるために必須の酵素である。グルコース由来のピルビン酸は、一部は脱炭酸反応によってアセチル CoA に代謝され、一部はミトコンドリアのピルビン酸カルボキシラーゼによってオキサロ酢酸へと代謝される。オキサロ酢酸は、糖新生に利用されると同時にアセチル CoA と結合してクエン酸を生成する。クエン酸が過度に生成される条件下では、クエン酸は、ビオチン酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼを活性化し、脂肪酸合成を促進する。また、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性の低下は、糖新生を減少させるばかりでなく、オキサロ酢酸の減少に伴うクエン酸生成を障害し、さらにアセチル CoA の蓄積をもたらす。一方、

ビオチン欠乏にともなう解糖系酵素への影響をみると、解糖系律速酵素であるグルコキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ活性の低下やグアニル酸シクラーゼ活性の低下が報告されている。グルコキナーゼやホスホフルクトキナーゼは解糖系の律速酵素としてグルコースのピルビン酸への代謝速度を調節し、グアニル酸シクラーゼはGTPからサイクリックGMPを生成し、RNA合成やタンパク質合成を上昇させるのに貢献している¹⁻³⁾。このため、ビオチンの体内充足度の低下は、肝臓や筋肉、一般組織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。これまでに我々は、潜在的欠乏から重篤な欠乏まで欠乏状態の異なる3種ビオチン欠乏ラットを作成し、血漿インスリン濃度や膵臓中インスリン含量が血漿ビオチン濃度や膵臓中ビオチン濃度と正の相関を示すこと、単離膵灌流による検討から、グルコース応答性インスリン分泌がビオチン欠乏状態の進行にともない低下すること明らかにし、ビオチンがグルコース刺激に対する正常なインスリン分泌

*所在地：新潟市東区海老ヶ瀬471 (〒950-8680) 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

能力を維持する上で重要な役割を果たす因子であることを報告した^{4,5)}。さらに、単離膵島など一連の解析から、グルコース応答性インスリン分泌におけるビオチンの作用部位は分泌機構中のミトコンドリアでのATP生成系よりも上流にあることを明らかにした^{4,6)}。

アルギニンは、グルコースととも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。アルギニン応答性インスリン分泌の分泌機構は、自身が持つ陽性電荷による膜電位の変化や代謝過程で生成される一酸化窒素(NO)の増加が引き金と考えられている。アルギニンは膵β細胞内では代謝を受けないため、グルコースとは異なりアルギニン由来のATPがインスリン分泌に影響することはない⁷⁾。塩基性アミノ酸の陽性荷電によ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。また、NOについては、膵β細胞ではアルギニンからNOは生成されず細胞内Ca²⁺濃度にも何ら影響を与えないことから否定的な結果⁸⁾が優勢である。さらに、サイトカインや高濃度グルコースによって誘導される誘導型NO合成酵素(iNOS)や構成型NO合成酵素(cNOS)から生成されるNOはインスリン分泌に抑制的に作用することが報告されている^{9,10)}。高濃度グルコースによるこうした作用は過剰なインスリン分泌を回避するためのネガティブフィードバック制御として理解されている。しかし一方で、アルギニンはcNOSにより低濃度のNOを産生し、cGMP系を介して細胞内Ca²⁺濃度を増加させ、インスリン分泌を促進することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。

グルコースと共に代表的な刺激因子でありその分泌機構もよく研究されているアルギニンではあるが、アルギニン応答性インスリン分泌に対するビオチンの影響についてはグルコースほど詳細な検討がなされていない。本研究では、ビオチン欠乏ラットを作成し、単離膵灌流法でインスリン分泌応答を経時的に観察することにより、アルギニン応答性インスリン分泌におけるビオチンの影響とその作用部位について検討を行った。先行研究である単離膵島や膵β細胞株での解析と異なり、膵島内微小循環系が反映される単離膵灌流法では、アルギニンによる膵島内血流量の変化に対するビオチン欠乏の影響についても併せて検討することができる。

実験方法

(1) 実験動物及び飼育環境

実験動物には、Wistar系ラット、雄、3週齢(体重30-50g)を用い、タンパク質源として乾燥卵白20%を含むビオチン欠乏食で8週間飼育した。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100μg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。実験動物は、室温25℃、湿度50±5%に保たれた動物舎で飼育し、午前8時点灯、午後8時消灯の明暗サイクルの条件下に置いた。なお、本研究は東北大学農学部動物実験委員会の許可を受け、同大学における動物実験に関する指針に従い、実施された。

(2) 単離膵灌流

ラットに麻酔を施した後、膵臓へと繋がる複数の動静脈及び総胆管を結紮し、小腸の一部と脾臓を付けた状態で膵臓を単離した。灌流は、1分間に1.8ml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、Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB: 1% BSA, 5% Dextranを含有, pH 7.4, 37℃)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。刺激溶液には、10 mM L-arginineに加え、NOを生成しない10 mM N-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME)と代謝を受けない10 mM D-arginineを用いた。さらに潜在的ビオチン欠乏を想定した4W-defでは、ビオチンを添加した10 mM L-arginine + 1 mM D-biotinを刺激溶液として用い、ビオチンの薬理効果についても検討した。

(3) インスリン濃度測定と統計解析

インスリン濃度は二抗体法によるラジオイムノアッセイキット(塩野義製薬)を用いて測定した。統計解析はStat View 5.0を用いて、対応のないt検定あるいは一元配置分散分析(Post-hoc: Bonferroni)により行なった。

結果と考察

アルギニン応答性インスリン分泌の結果をFig. 1-4に示した。

ビオチン欠乏群と対照群とのインスリン分泌を比較すると、潜在的ビオチン欠乏を想定した4W-defではD-argi-

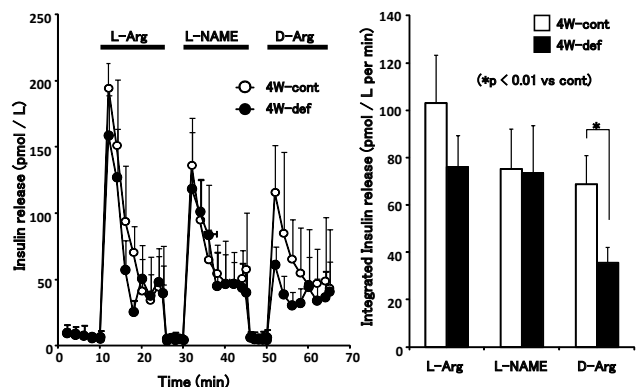


Fig. 1 Effect of biotin deficiency on insulin secretion from isolated perfused pancreas of rats fed a biotin-deficient diet for 4 weeks. Insulin secretions were stimulated with 10 mM L-arginine, 10 mM L-NAME or 10 mM D-arginine. Data are expressed as mean ± SEM (n=5).

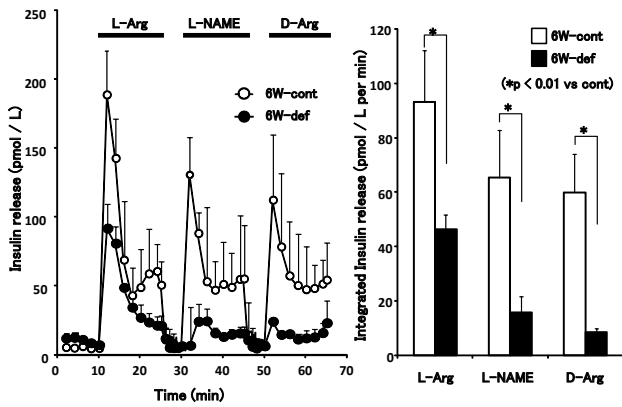


Fig. 2 Effect of biotin deficiency on insulin secretion from isolated perfused pancreas of rats fed a biotin-deficient diet for 6 weeks. Insulin secretions were stimulated with 10 mM L-arginine, 10 mM L-NAME or 10 mM D-arginine. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5).

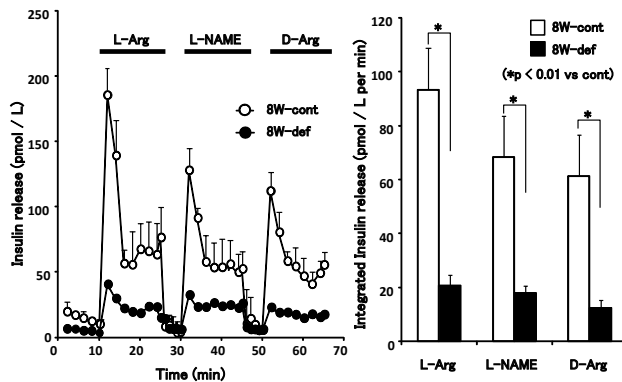


Fig. 3 Effect of biotin deficiency on insulin secretion from isolated perfused pancreas of rats fed a biotin-deficient diet for 8 weeks. Insulin secretions were stimulated with 10 mM L-arginine, 10 mM L-NAME or 10 mM D-arginine. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5).

nine においてのみインスリン分泌の顕著な減少が観察された (Fig. 1)。ビオチン欠乏では、グアニレートシクラーゼ活性と mRNA 発現量の低下が広く知られている。また近年では、ビオチンは用量依存的に eNOS の発現量と NO 産生を増加させ、cGMP 量を上昇させることが報告されている¹³⁾。そのため、ビオチン欠乏によるアルギニン応答性インスリン分泌の低下が観察されれば、その原因は即ち、ビオチンの体内充足度の低下にともなう cGMP 量の減少にあると結論付けることができる。しかし、本研究から得られた結果は、L-arginine や L-NAME 応答性のインスリン分泌は潜在的なビオチン欠乏による影響を一切受けないといったものであった。D-arginine は NO を生成せず呼吸燃料としても利用されない。そのため、本実験で観察された D-arginine に対するインスリン分泌応答性の低下はアルギニン分泌機構中での直接的な潜在的ビオチン欠乏による影響とは考え難い。D-arginine のみで認められたインスリン分泌の低下については、軽度ビオチン欠乏に伴う膵 β 細胞内での分泌待機状態にある readily releasable pool (RRP) に属するインスリン分泌顆粒の減少に起

因するものと考えられる¹⁴⁾。膵 β 細胞に存在するインスリン分泌顆粒には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に応じて分泌されうる RRP (細胞膜近傍に存在) と直ちには分泌されない reserve pool (RP) の 2 種類が存在する。RP から RRP への移行は、細胞膜の脱分極とは異なる刺激で産生もしくは活性化されるシグナル分子 (PKC, glutamate, 長鎖脂肪酸 CoA) によって誘導される¹⁵⁾。これまでに我々は、潜在的ビオチン欠乏の膵臓内インスリン含量が対照群と同程度であることを報告している⁴⁾。そのため、D-arginine 刺激時のインスリン分泌の低下は、RRP のインスリン分泌顆粒の不足が原因と考えられる。RRP への移行を刺激する長鎖脂肪酸 CoA は、ビオチン酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼで変換されるマロニル CoA の上昇によって誘導される。つまり、ビオチン欠乏ではアセチル CoA カルボキシラーゼ活性 (マロニル CoA 産生) の低下とそれに伴う長鎖脂肪酸 CoA の減少により、RP から RRP へのインスリン分泌顆粒の移行が低下したものと推察される。

一方、6W-def と 8W-def では、インスリン分泌は L-arginine, L-NAME, D-arginine の全ての刺激において顕著な低下が観察された (Fig. 2, 3)。これまでに我々は、重篤なビオチン欠乏では膵臓中インスリン含量と DNA 量は著しく低下し、1 型糖尿病に似たインスリン分泌様式を示すことを報告している。事実、重度のビオチン欠乏では膵 β 細胞数は減少した状態にある⁴⁾。そのため、ビオチン欠乏の進行した 6W-def や 8W-def では、アルギニンに対する正常なインスリン分泌応答は維持できなかったと考えられる。

アルギニン応答性インスリン分泌に対するビオチンの薬理効果の結果を Fig. 4 に示した。ビオチンによるインスリン分泌増強効果はグルコース刺激時に認められる^{5, 6)}。しかし、アルギニン応答性インスリン分泌では対照群のみならずビオチン欠乏群においてもグルコース刺激のようなビオチン添加による増強効果は観察されなかった。この結

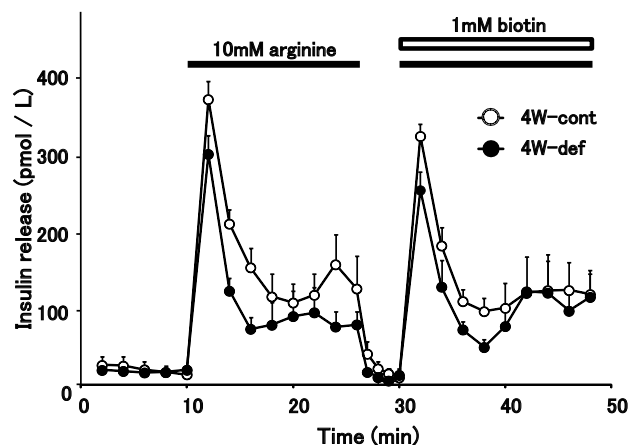


Fig. 4 Insulin secretory responses to 10 mM L-arginine and 10 mM L-arginine + 1 mM biotin evoked from the isolated perfused pancreas of rats fed a biotin-deficient diet for 4 weeks. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5).

果は、ビオチンがアルギニン応答性インスリン分泌機構中で直接的には作用しないことを示唆している。

本研究は、アルギニン応答性インスリン分泌機構でのビオチンの関与の有無とその作用部位について明らかにすることを目的として実施された。その結果、ビオチン欠乏状態ではアルギニン応答性インスリン分泌は低下するものの、その主因はビオチン欠乏にともなう膵臓の組織障害にあり、ビオチンはその分泌機構中には作用点を持たないことが示唆された。また、それに加えて、ビオチン欠乏に伴うインスリン分泌低下の一因として、RPからRRPへのインスリン分泌顆粒の移行障害も推察される。

近年、アルギニン応答性インスリン分泌の新たな分泌機構として、Gタンパク質共役受容体C6A (GPCR6A)が膵β細胞膜上でアルギニン受容体として作用し、細胞内cAMP濃度を増加させることでインスリン分泌を促進するといった経路が提唱された^{16, 17)}。ビオチンはプロテインキナーゼGやヒストンのビオチニル化によりグルコキナーゼや糖タンパク質受容体の遺伝子発現を調節することが知られており^{2, 3, 18)}、これらの機序を介してGPCR6Aの発現に影響を及ぼすことが予想される。これらについては今後の検討が必要と考える。

参考文献

- 1) Dakshinamurti K, Litvak S (1970) Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* 245(21): 5600-5605
- 2) Rodriguez-Melendez R, Zemleni J (2003) Regulation of gene expression by biotin. *J Nutr Biochem* 14(12): 680-690
- 3) Zemleni J (2005) Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 25: 175-196
- 4) 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 *微量栄養素研究* 24: 163-170
- 5) Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, and Furukawa Y (1999) Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* 10: 237-243
- 6) Sone H, Sasaki Y, Komai M, Toyomizu M, Kagawa Y, and Furukawa Y (2004) Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets of the rat, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 824-829
- 7) Malaisse WJ, Blachier F, Mourtada A, Camara J, Albor A, Valverde I, Sener A (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. *Metabolism of L-arginine and L-ornithine in pancreatic islets. Biochim Biophys Acta* 1013(2): 133-143
- 8) Weinhaus AJ, Poronnik P, Tuch BE, Cook DI (1997) Mechanisms of arginine-induced increase in cytosolic calcium concentration in the beta-cell line NIT-1. *Diabetologia* 40(4) 374-382
- 9) Thams P, Capito K (1999) L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. *Eur J Endocrinol* 140: 87-93
- 10) Kaneko Y, Ishikawa T, Amano S, Nakayama K (2003) Dual effect of nitric oxide on cytosolic Ca²⁺ concentration and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(5): C1215-1222
- 11) Nakata M, Yada T (2003) Endocrinology: nitric oxide-mediated insulin secretion in response to citrulline in islet beta-cells. *Pancreas* 27(3): 209-213
- 12) Smukler SR, Tang L, Wheeler MB, Salapatek AM (2002) Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. *Diabetes* 51(12): 3450-3460
- 13) Rodriguez-Melendez R, Zemleni J (2009) Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *J Nutr* 139(3): 429-433
- 14) Aizawa T, Komatsu M (2005) Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* 115(2): 227-230
- 15) Prentki M, Tornheim K, Corkey BE (1997) Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 Suppl 2: S32-41
- 16) Pi M, Zhang L, Lei SF, Huang MZ, Zhu W, Zhang J, Shen H, Deng HW, Quarles LD (2010) Impaired osteoblast function in GPCR6A null mice. *J Bone Miner Res* 25: 1092-1102
- 17) Pi M, Quarles LD (2012) Multiligand specificity and wide tissue expression of GPCR6A reveals new endocrine networks. *Endocrinology* 153(5): 2062-2069
- 18) Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C (2010) Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* 21: 606-612