

## 鳥類の胚発育におけるビオチンの利用についての検討

谷口歩美・渡邊敏明

兵庫県立大学環境人間学部, 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12 670-0092

ビオチン欠乏状態の生殖生理学的影響として、鳥類ではヒナに形態異常が起こることが知られている。鳥類は、ビタミン要求性が高く、鳥類の卵黄にはビオチンが多量に含まれている。そこで、ニワトリの有精卵を利用し、卵黄から胚へビオチンが供給される機序を明らかにし、胚の形態形成や発育におけるビオチンの利用について検討した。

白色レグホンから得た有精卵(胚齢 1-11 日)の卵黄および胚を用いて、ビオチンの動態およびカルボキシラーゼの存在状態を分析した。卵黄では、ビオチン濃度は胚齢 1 日では  $600 \pm 200$  ng/g であったが、胚の発育に伴って減少した。ビオチンダーゼ活性においても、胚齢の経過とともに低下した。また、卵黄中の遊離型ビオチンは、全体を通して総ビオチンの 70% 以上の高値であった。一方、胚ではビオチン濃度は 3 日で最も高く、 $206 \pm 49$  ng/g であった。ビオチンダーゼ活性は、2 日に最も高値を示した。このことから、有精卵では受精後まもなく卵黄中のビオチンの遊離化が進み、3~4 日に遊離化されたビオチンが多量に胚に取り込まれることが示唆された。また、ビオチンの胚への供給は、時期や部位によって異なり、それぞれの組織や器官の形成に関与していると考えられる。

カルボキシラーゼは、卵黄ではアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) とピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) のみ確認され、ACC では胚齢の経過とともに増加傾向がみられた。胚では、PC、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC)、メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) の発現がみられ、PC は胚齢の経過とともに増加した。このように、卵黄と胚ではカルボキシラーゼに局在性がみられ、ビオチンの利用に差異があることが考えられる。

このように、ビオチンは鳥類の胚の形態形成期において多量に供給されていることが示唆された。正常な胚の発育にビオチンが重要な役割を担っており、そのために多量にビオチンを供給しているのかもしれない。

**キーワード:** ビオチン, ニワトリ, 胚, ビオチンダーゼ, カルボキシラーゼ

### 緒 言

水溶性ビタミンのひとつであるビオチンは、カルボキシラーゼの補酵素として、カルボキシル基転移反応に関与し、脂肪酸合成や糖新生、アミノ酸代謝などに重要な役割を果たしている (Mock, 2001; 古川ら, 2002)。また、動物の成長や生殖生理機能を維持するためにも、不可欠な栄養素である。ビオチン欠乏状態の生殖生理学的影響として、鳥類ではヒナに形態異常が起こることが知

られている (Cravens *et al.*, 1944)。哺乳動物においても、ビオチンが妊娠を維持したり、胎児の発育を保つのに関与していることが明らかにされている (Watanabe, 1983; Watanabe and Endo, 1989; Watanabe, 1993; Mock *et al.*, 2003)。最近の報告では、妊娠の経過に伴い、血中や尿中ビオチンが低下することや、尿中の 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA) が増加することが報告されている (Mock *et al.*, 1997; Zemleni and Mock, 2000; Mock *et al.*, 2002)。また、ヒストンのビオチン化が細胞増殖において DNA 合成に大きな役割を果たしていることが明らかにされており、Jurkat 細胞では、ビオチン欠乏状態にしてもヒストンのビオチン化が正常に保たれることが報告されている (Manthey *et al.*, 2002)。

鳥類の卵黄にはビオチンが多量に含まれている。食餌から摂取されたビオチンの多くが卵に移行し、卵黄に蓄

2006 年 10 月 6 日受付, 2007 年 1 月 5 日受理  
連絡先: 渡邊敏明  
〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12  
Tel: 079-292-9325  
Fax: 079-292-9325  
E-mail: watanabe@shse.u-hyogo.ac.jp

積している (Couch *et al.*, 1948a ; Whitehead, 1980)。このことは、ビオチンがヒナの孵化や発育に重要な役割を担っているからであると考えられている。著者らは、鳥類の胚発育や孵化に必要なビオチンが、母体で卵胞 (卵黄) に取り込まれる機序について、ニワトリを用いて検討している。これまでに、卵胞中のビオチンが卵胞の成長に伴い、とくに排卵直前に卵巣で多量に取り込まれることを明らかにした (谷口と渡邊, 2007)。また、卵胞の発生初期から中期にかけて取り込まれたビオチンは結合型で貯蔵され、排卵直前に遊離化されることを明らかにした。これは、胚の分化や成長の維持に必要なビオチンが、受精後すぐに利用できる状態にするためと考えられる。しかし、このようにして卵黄に多量に存在しているビオチンが、胚へどのように供給されているかについては知られておらず、形態形成におけるビオチンの利用についても明確ではない。そこで、本実験では、ニワトリの有精卵を用いて、卵黄から胚へのビオチンの移行について解析し、胚の形態形成や発育におけるビオチンの利用について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 実験材料

白色レグホン産卵鶏から得た有精卵 (受精卵) を用いた。有精卵では、受精後、卵管内で卵割が始まり、割球の集まりである胚盤葉が形成される (加藤, 1969 ; 白井, 1990)。胚盤葉域は未受精卵の白斑よりも大きく、輪郭も異なって見える。卵割が進むと、細胞層は、卵割腔の中に陥入し、内外 2 層の細胞層が形成される。このような胚の形成は、卵が卵管を下降している間に起こり、産卵され、体外に出ると同時に停止する。産卵後、38°C で温めると細胞分裂は再開され、約 21 日で孵化する。

ニワトリの胚の分化は受精後、産卵前から開始され、10 数日までに臓器や器官の形成がおこなわれる (加藤, 1969 ; 白井, 1990)。本実験では、胚の形成初期から中期の段階に着目した。産卵後、インキュベータへ入卵した日を胚齢 0 日とし、胚齢 1~5 日, 7 日, 9 日および 11 日のもの ( $n=5-15$ ) を用いた。胚齢 1 日の有精卵からは卵黄のみを採取し、胚齢 2 日以降のものからは卵黄および胚を採取した。胚の発生に伴い、卵黄を取り巻く環境は変化する。とくに胚齢 2~5 日の卵黄は、粘性も低く卵白が混入しやすい。この時期の卵黄嚢は、卵殻から取り出して平面状になると同時に壊れる。そこで卵黄の採取方法としては、卵殻の一部分を切除し、卵黄嚢が壊れていない状態を確認した上で、18 ゲージの注射針を卵黄部に直接挿入し、シリンジで吸い取った。胚に関しては、胚齢 2~7 日のものは胚全体を採取し、胚齢 4, 5, 7 日に

しては、頭部と体部分けて採取した。また、胚齢 9 日および 11 日に関しては、肝臓、脳、顎顔面部、四肢を採取した。

これらのサンプルに 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加えて十分にホモジナイズしたものを測定試料とした。なお、これらのサンプルはすべて、測定時まで -40 °C で凍結保存した。

### 2. ビオチンの分析

ビオチンの分析は、ビオチン要求株である乳酸菌 (*L. plantarum* ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法に従い、比濁測定した (Fukui *et al.*, 1994 ; Ronald and Landen, 1998 ; Ball, 2005)。乳酸菌は 16 時間の前培養後、洗浄し、菌濃度を濁度 ( $OD_{610}=0.15$ ) で調整したものを、接種菌液とした。定量にはビオチン定量用基礎培地 (日水製薬(株), 東京) を用い、18 時間培養後に  $OD_{610}$  nm で測定した。

生体試料や食品に含まれるビオチンの多くがタンパク結合型で存在する。本乳酸菌は、遊離型ビオチンのみ生育応答を示すため、総ビオチンと遊離型ビオチンを測定した。結合型ビオチンとは、タンパクやペプチドと共有結合した状態で存在しているビオチンであり、生体内ではそのまま利用することのできない貯蔵型のビオチンである。一方、遊離型ビオチンとはタンパクなどと結合せず、単独で存在している状態で、いわゆる酵素型のビオチンである。生体内でのビオチンの吸収や利用には、遊離型ビオチンが関与している。また、総ビオチンに対する遊離型ビオチンの割合を遊離型ビオチン率 (遊離率) とした。ビオチン測定を概略すると、サンプルに同量の 4.5 N 硫酸を加え、オートクレーブ (121°C, 2 気圧, 60 分) で酸加水分解後、4.5 N 水酸化ナトリウムで中和して測定したものを総ビオチンとした。遊離型ビオチンの定量は、サンプルを酸加水分解せず、そのままもしくは希釈して測定に供した。なお、ビオチンは ng/g または  $\mu\text{g/g}$  で表した。

### 3. ビオチニダーゼ活性の分析

ビオチン結合タンパクであるビオチニダーゼには、2 つの役割があることが知られている (Hymes and Wolf, 1996 ; Wolf, 2005)。1 つは、生体内に存在するタンパク結合型のビオチンはそのままでは利用できないため、消化管内でビオチニダーゼによって遊離化される。また、ビオチニダーゼは、血液や細胞内において、ビオチンの吸収や運搬および保持などに関与していることが明らかにされつつある。そこで、ビオチンの動態との関連について検討するために、ビオチニダーゼ活性を測定した。

ビオチニダーゼ活性は、Wolf *et al.* (1983) の比色法に従って測定した。ビオチニダーゼによって、合成基質

Biotinyl-*p*-aminobenzoate (B-PABA) から *p*-amino-benzoate (PABA) に遊離される原理を用いた方法である。遊離した PABA を、ジアゾ色素化し、比色測定をおこなった。活性は、nmol/min/g で表した。

4. カルボキシラーゼの解析

ビオチン依存性ホロカルボキシラーゼは、電気泳動で分離し、標識アビジンを用いたウエスタンブロッティングで検出した (Margaret *et al.*, 1993; Clavero *et al.*, 2002; Pacheco-Alvarez *et al.*, 2004)。サンプル中のタンパク量を一定に調整し、SDS サンプルバッファー (Invitrogen, 東京) を加えて 70°C で加熱後、NuPAGE 3-8% トリスアセテートゲルを用いて分離した (150 V, 約 60 分)。分離したカルボキシラーゼは、PVDF メンブレンに転写した (30 V, 120 分)。メンブレンは 10% のスキムミルクでブロッキングした後、HRP 標識したアビジンをホロカルボキシラーゼのビオチンに結合させ、ECL でフィルムに発光検出した。調査したカルボキシラーゼは、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC), ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC), プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC) およびメチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) である。

5. 統計学的解析

データは、平均値±標準偏差で示した。統計処理には、統計ソフト StatView Ver.5.5 (SAS Institute Inc., Cary) およびエクセル統計 Statcel (OMS 出版, 所沢市) を用いた。

卵黄および胚は、総ビオチン、遊離型ビオチンおよびビオチニダーゼ活性ごとに one-way ANOVA で検定をおこない、統計的な差異があったものに関しては Tukey または Fisher's PLSD を利用して胚齢ごとの差異を調べた。それぞれの項目において、差異のある箇所を異なるアルファベットで示した。胚齢 9 日と 11 日の胚に関しては、Mann-Whitney's U test をおこなった。また、 $p < 0.05$  を統計学的に有意な差異があると判定した。

結 果

1. 胚の発育

Figure 1 に、各胚齢における有精卵および胚の形態と重量を示した。卵黄は、胚齢 5 日までは胚の成長に伴って粘性を失い色も濃厚な黄色から白みかかった黄色へと変化した。しかし、7 日には卵黄を膜が覆い (卵黄囊)、卵黄は脱水されて再び濃い黄色を帯び、11 日では受精初

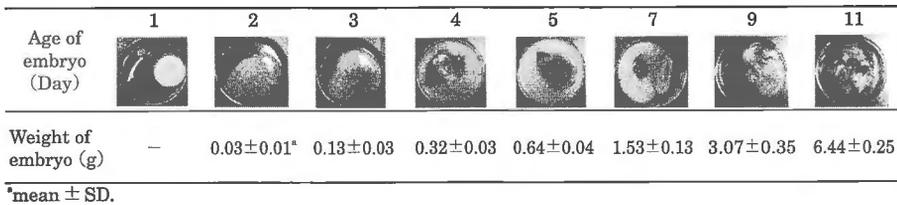


Fig. 1. Embryonic development.

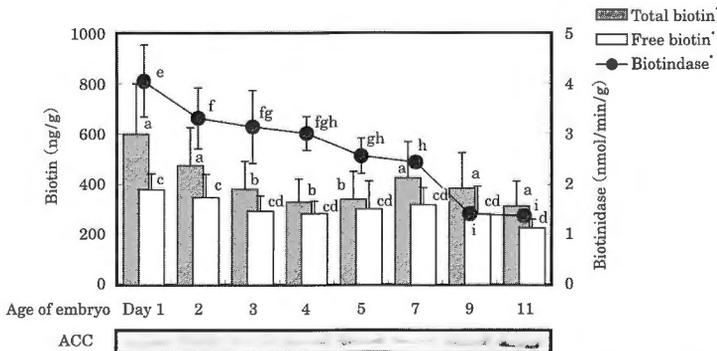


Fig. 2. Biotin contents and ACC expression of egg yolk of fertilized egg. mean±SD, n=5-15.

\* $p < 0.05$  (one-way ANOVA), a-b, c-d, e-f-g-h-i  $p > 0.05$  (Tukey-Kramer).

期の卵黄のような粘性があった。

2. 卵黄のビオチン動態とカルボキシラーゼの変化

卵黄のビオチン動態を Fig. 2 に示した。ビオチン濃度は、胚の成長に伴って減少し、胚齢 7 日で再び上昇したが、その後、再び減少した。また、2 日以降では、遊離ビオチン率は常に 70% 以上の高値であった。卵黄のビオチンダーゼ活性も、胚齢の経過とともに低下した。また、卵黄では、カルボキシラーゼは ACC と PC が確認された。ACC では、胚齢の経過とともに増加傾向がみられた (Fig. 2)。

3. 胚のビオチン動態とカルボキシラーゼの変化

Figure 3 に胚齢 2~7 日の胚のビオチン動態を示した。ビオチン濃度は、3 日で最も高く、5 日には低下した。ビオチンダーゼ活性は、2 日で最も高く、3 日以降減少した。4 日以降に関しては、頭部と体部を分けてビオ

チン動態をみた (Fig. 4)。頭部のビオチン濃度は、5 日に急激に減少した。体部でも、5 日以降減少した。また、カルボキシラーゼの変化を見た結果、胚では、PC, PCC, MCC の発現がみられ、PC は胚齢の経過に伴って増加した (Fig. 3)。4 日以降では、頭部と比較して、体部ではカルボキシラーゼの発現量は高かった (Fig. 4)。また、胚では ACC は確認されなかった。

胚齢 9 日および 11 日に関しては、肝臓、脳、顎顔面部および四肢に分けてビオチンの存在状態を確認した (Table 1)。肝臓ではビオチンは両日とも高値であった。また、遊離率は 9 日では 17.7% であったが、11 日には 8.5% に低下した。脳ではビオチンは 11 日で有意に高かった。また 9 日ではビオチンはすべて遊離型で存在したが、11 日には遊離型ビオチンは 56.5% であった。顎顔面部のビオチンは 11 日には 9 日に比して 5.4 倍に増加

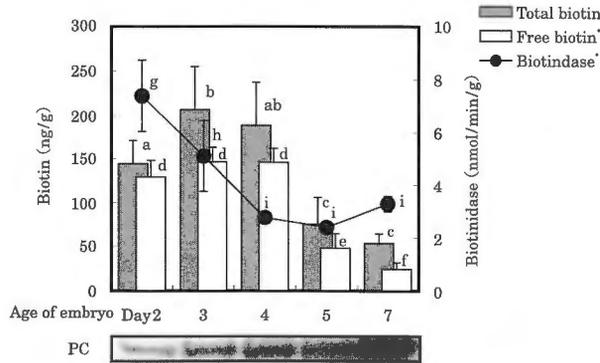


Fig. 3. Biotin contents and PC expression in embryos (Days 2-7). mean±SD, n=5-15.

\* p<0.05 (one-way ANOVA), a-b-c, d-e-f, g-h-i p>0.05 (Tukey-Kramer).

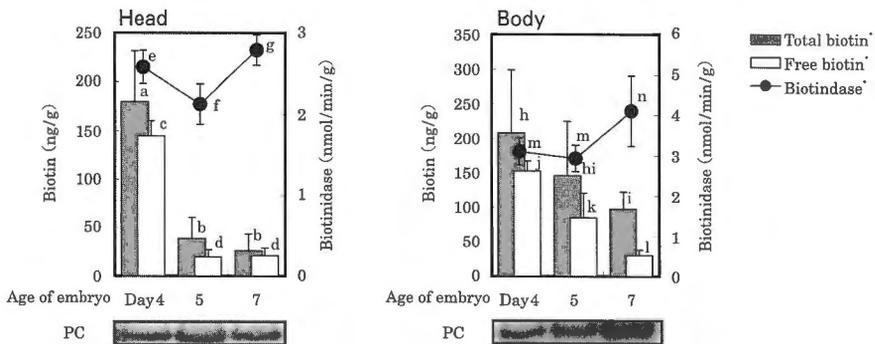


Fig. 4. Biotin contents and PC expression in embryos (Days 4-7). mean±SD, n=5-15.

\* p<0.05 (one-way ANOVA), a-b, c-d, e-f-g, h-i, j-k-l, m-n p>0.05 (Fisher's PLSD).

Table 1. Biotin contents of embryo (Days 9 and 11)

Age of embryo (Day)	Liver		Brain		Maxilloface		Extremities		
	9	11	9	11	9	11	9	11	
Biotin	Total	534.6±56.0*	605.5±51.2*	13.9±6.8	40.7±19.9*	2.1±0.8	11.3±5.7*	24.6±7.6	9.7±5.7*
	Free	94.4±31.1	80.6±30.4	13.9±4.2	23.1±9.3*	1.3±0.9	10.4±1.9*	4.1±2.7	1.9±0.7*
Biotinidase		4.4±0.3	4.6±0.5	3.3±0.2	3.7±0.2*	5.6±0.7	5.9±0.7	7.1±0.8	7.0±0.4

\* mean±SD, n=10.

\**p*<0.05, compared with day 9 (Mann-Whitney's U test).

し、遊離率も92.0%と高値であった。四肢では11日に減少した。また、ビオチニダーゼ活性は、他の部位と比較して高値であった。

## 考 察

鳥類では、ビオチン欠乏状態の生殖生理機能への影響が古くから報告されている。ニワトリやシチメンチョウは、ビタミン要求性が高く、精製飼料によって容易にビオチン欠乏状態に陥ることが知られている (Couch *et al.*, 1948a; Harms *et al.*, 1977)。ニワトリに低ビオチン精製飼料を与えると、胚の死亡率が増加し、孵化率が著しく低下するが、ビオチンを与えると孵化率が急激に回復することが報告されている (Cravens *et al.*, 1942; Cravens *et al.*, 1944; Brewer and Edwards, 1972; Atuahene *et al.*, 1984)。ビオチン欠乏のニワトリのヒナには、腱麻痺や運動失調、翼脚の骨格異常などの症状が観察されている。Cravens *et al.* (1942) は、ビオチン欠乏のヒナに軟骨異栄養症や合指症などの骨格異常を観察しているが、これらの親鳥には皮膚炎などのビオチン欠乏症状はみられていないと報告している。また、Bradly *et al.* (1976) は、ニワトリやシチメンチョウで、飼料にビオチンを0.55 mg/kg 添加した場合にも、産卵数の増加がみられ、胚の死亡率が減少し、孵化率が高くなると報告している。このように、親鳥に比べて、胚ではビオチン欠乏による影響を受けやすいと考えられる。しかし、Whitehead (1980) は、飼料にビオチンを0.06-0.40 mg/kg 添加しても、飼料の摂取量、産卵数、鶏卵の大きさ、孵化率に変化がなかったと報告している。

雌レグホン鶏では、鶏卵のビオチン含量は飼料からの摂取量に影響され易く、飼料からのビオチン摂取量と、鶏卵のビオチン含量には直線的な関係があることが報告されている (Brewer and Edwards, 1972; Whitehead, 1980; Whitehead *et al.*, 1985)。とくに卵黄にはビオチンが多量に蓄積しており、正常な胚発育を維持するため

には卵黄のビオチン濃度が150 ng/g 以上必要であることが報告されている (Couch *et al.*, 1948 b)。本研究で用いた有精卵では、胚齢1日の卵黄ビオチン濃度は600±200 ng/g であることから、正常な胚の発育に十分な量のビオチンが存在するといえる。別報で用いた卵黄のビオチン濃度は944±117 ng/g であり (谷口と渡邊, 2007)、本研究で使用した卵黄の約1.5倍と高濃度でビオチンが存在したが、これは飼料からのビオチン摂取量による差異から生じたものであろう。このように、ビオチンは、鳥類においても、胚の発育や分化を維持するのに不可欠であると考えられる。

有精卵の卵黄のビオチン動態をみると、卵黄のビオチン濃度とビオチニダーゼ活性は胚齢1~5日の間に低下した。しかし、ビオチン濃度は7日で再び増加しており、これは5日以降に卵黄が脱水され、卵黄が濃縮された状態になったためと考えられる。卵黄では、ビオチンは1~11日の全期間を通して遊離率が高く、ビオチンを胚へ供給するために遊離化が促進されている可能性が示唆される。一方、胚全体のビオチン濃度は3日で最も高かった。しかし、ビオチニダーゼ活性は、胚齢2日で最も高く、2日以降、低下した。これらの結果を総合的にみると、卵黄ではビオチンとビオチニダーゼ活性の増減の仕方が一致しており、ビオチン濃度が低下したのに従い、ビオチニダーゼ活性も減少している。ビオチン濃度とビオチニダーゼ活性の関連は明らかではないが、ビオチンは卵黄で遊離化されて、遊離型の状態で胚へ移行していることが考えられる。また、胚では、形態形成が最も盛んな時期である排卵~胚齢4日を過ぎると、5日にビオチンは急激に減少しているが、この時期に尿のうがが発達するため、胚で代謝されたビオチンが排泄されている可能性もある。また、胚齢4~7日の胚について頭部および体部別にビオチン動態をみると、体部では胚全体と同様の増減の傾向をしているのに対し、頭部ではビオチンは4日までに多量に供給されている。頭部の発達には3~4日

に急激に進み、4日では頭部が胚全体の約2/3を占める。このため、この時期に頭部ではビオチンを多量に必要としていることが考えられる。

胚齢9日および11日の胚に関しては、ニワトリの胚においても、肝臓ではビオチン濃度は高値であった。しかし、遊離率は9日、11日ともに他の器官と比較して低く、肝臓では、胚の発育や生体機能の維持のためにビオチンを蓄えていることが考えられる。また、この時期における肝臓の機能は、造血とグリコーゲンの合成および蓄積であることから、糖代謝にビオチンが多量に利用されている可能性がある。脳のビオチン濃度は9日と比較して11日に有意に減少した。脳では9日にはビオチンはほぼ100%遊離型で存在しているのに対し、11日には遊離率は56.8%であった。このことから、脳へのビオチンの供給は10日前後ではほぼ完了し、11日では結合型の状態で貯蓄していることが考えられる。顎顔面部では、ビオチン濃度は11日に顕著に増加しており、遊離率も92.0%と高値であった。哺乳動物では、ビオチンは口蓋の形成と関連があることが示唆されている(Watanabe, 1983; Watanabe and Endo, 1984; Watanabe and Endo, 1989; Watanabe, 1993; Mock *et al.*, 2003)。ニワトリの胚では、口蓋は8日頃から現れはじめ、11~12日頃に完全に癒合される(加藤, 1969)。鳥類の口蓋形成とビオチンの関連は明らかではないが、顎顔面部で11日にビオチンが増加した理由として、ニワトリの胚においても口蓋の形成にビオチンを多量に必要とし、この時期にビオチンを積極的に取り込んでいるのかも知れない。四肢では、総ビオチンは11日に有意に減少しているのに対して、遊離型ビオチンは有意に増加し、遊離率は95.9%であった。鳥類では、母体のビオチン欠乏によって、腱麻痺や翼脚の骨格異常が誘発されることが報告されている(Cravens *et al.*, 1942; Cravens *et al.*, 1944; Couch *et al.*, 1948a)。ニワトリの胚では、11日は脚鱗や羽の発生初期にあたる。四肢では、ビオチニダーゼが他の器官と比較して高い活性を示しており、この時期にビオチンを利用するために、遊離化が盛んにおこなわれているのかもしれない。このように、ビオチンの胚への供給は、時期や部位によって異なり、それぞれの組織や器官の形成に関与していると考えられる。

ビオチンは、ACC, PC, PCC および MCC の補酵素として関与している。これらのホロカルボキシラーゼについて解析した結果、卵黄では胚齢1~11日の全期間を通して、ACC および PC が確認された。PC には胚齢における差異はみられなかったが、ACC は胚の発育に伴い増加した。また、ビオチンとの関連をみると、ビオチンが減少しているにもかかわらず ACC は増加していた。ACC

は脂肪酸代謝および脂肪酸合成の調整酵素である(Dakshinamurti and Chauhan, 1989; Sweetman, 2000; Mock, 2001)。したがって、胚の成長が進むと卵黄では脂質代謝が活発におこなわれ、ビオチンが利用されていることが考えられる。一方、胚齢2~7日の胚では、PC, MCC, PCC が存在したが、ACC は確認されなかった。また、MCC および PCC は胚齢による差異はみられなかったが、PC は胚の発育に伴って増加傾向がみられた。PC はピルビン酸からオキサロ酢酸への反応を触媒することから、糖新生に関与しており(Dakshinamurti and Chauhan, 1989; Sweetman, 2000; Mock, 2001)、胚の発育にしたがって PC が増加したのは、糖代謝との関連が考えられる。このように卵黄と胚ではカルボキシラーゼに局在性がみられ、ビオチンの利用に差異があることが示唆される。

これらの結果から、有精卵では受精後まもなく卵黄中のビオチンの遊離化が進み、胚では胚齢3~4日に遊離化されたビオチンが多量に取り込まれていることが判明した。また、ビオチンの胚への移行は時期や部位によって異なり、それぞれの組織や器官の形成に関与していることが考えられる。このように、ビオチンは鳥類の胚の発育において、多量に利用されていることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、サンプルの提供にご協力いただきました株式会社ゲン・コーポレーション福崎孵化場の諸氏に深謝致します。

## 引用文献

- Atuahene YO, Bernier PE, Roush WA and Arscott GH. Effect of biotin on dermatitis and hatchability in dwarf and normal single comb white leg-horn layers. *Poultry Science*, 63 : 580-582. 1984.
- Ball GMF. Microbiological methods for the determination of the B-group vitamins : *Vitamins in Food*. pp 339-368, CRC Press. Boca Raton. 2005.
- Bradly JW, Atkinson RL and Krueger WF. Relationship of biotin to reproductive performance of leg-horn-type hens. *Poultry Science*, 55 : 2490-2492. 1976.
- Brewer LE and Edwards HM, Jr. Studies on the biotin requirement of broiler breeders. *Poultry Science*, 51 : 619-624. 1972.
- Clavero S, Martinez MA, Perez B, Perez-Cerda C, Ugarte M and Desviat LR. Functional characterization of PCCA mutations causing propionic academia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1588 : 119-

125. 2002.
- Couch JR, Cravens WW, Elvehjem CA and Halpin JG. Relation of biotin to congenital deformities in the chick. *Anatomical Record*, 100 : 29-48. 1948a.
- Couch JR, Cravens WW, Elvehjem CA and Halpin JG. Relation of carbohydrate to intestinal synthesis of biotin and hatchability in mature fowl. *Journal of Nutrition*, 35 : 57-72. 1948b.
- Cravens WW, Sebesta EE, Halpin JG and Hart EB. Effect of biotin on reproduction in the domestic fowl. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 50 : 101-104. 1942.
- Cravens WW, McGibbon WH and Sebesta EE. Effect of biotin deficiency on embryonic development in the domestic fowl. *Anatomical Record*, 90 : 55-64. 1944.
- Dakshinamurti K, Chauhan J. Biotin. *Vitamins and Hormones*, 45 : 337-384. 1989.
- Fukui T, Iinuma K and Oizumi J. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 40 : 491-498. 1994.
- 古川勇次, 大杉匡弘, 福井 徹, 鈴木洋一, 渡邊敏明, 郵次 誠. ビオチン. ビタミン. 231-250 頁. 学進出版. 大阪. 2002.
- Harms RH, Damron BL and Simpson CF. Effect of wet litter and supplemental biotin and/or whey on the production of foot pad dermatitis in broilers. *Poultry Science*, 56 : 291-296. 1977.
- Hymes J and Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 255 : 1-11. 1996.
- 加藤嘉太郎. 家畜比較発生学. 8-54 頁. 養賢堂. 東京. 1969.
- Manthey KC, Griffin JB and Zemleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *Journal of Nutrition*, 132 : 887-892. 2002.
- Margaret AE, Burle GG, John WG, David AS and Donald LW. Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiology*, 101 : 499-506. 1993.
- Mock DM, Stadler DD, Stratton SL and Mock NI. Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *Journal of Nutrition*, 127 : 710-716. 1997.
- Mock DM. Biotin : Handbook of Vitamins. pp 397-426, Marcel Dekker. New York. 2001.
- Mock DM, Quirk JG and Mock NI. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *American Society for Clinical Nutrition*, 75 : 295-299. 2002.
- Mock DM, Mock NI, Stewart CW, LaBorde JB and Hansen DK. Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. *Journal of Nutrition*, 133 : 2519-2525. 2003.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Gravel RA, Cervantes-Roldan R, Velazquez A and Leon-Del-Rio A. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 279 : 52312-52318. 2004.
- Ronald RE and Landen WO. Biotin : Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. pp478-487. CRC Press. Boca Raton. 1998.
- 白井敏雄. 発生学. 489-539 頁. 西村書店. 東京. 1990.
- Sweetman L. Pantothenic acid and biotin. In : Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. (Stipanuk MH.) pp 519-540, W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA. 2000.
- 谷口歩美・渡邊敏明. 鳥類における卵胞ビオチンの栄養学的役割についての検討. ビタミン, 81 : 42-48. 2007.
- Watanabe T. Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *Journal of Nutrition*. 113 : 574-581. 1983.
- Watanabe T and Endo A. Teratogenic effects of avidin-induced biotin deficiency in mice. *Teratology*, 30 : 91-94. 1984.
- Watanabe T and Endo A. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *Journal of Nutrition*, 119 : 255-261. 1989.
- Watanabe T. Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *Journal of Nutrition*, 123 : 2101-2108. 1993.
- Whitehead CC. Performance of laying hens fed on practical diets containing different levels of supplemental biotin during the rearing and laying stages. *British Journal of Nutrition*, 44 : 151-159. 1980.
- Whitehead CC, Pearson RA and Herron KM. Biotin requirements of broiler breeders fed diets of different protein content and effect of insufficient biotin on the viability of progeny. *British Poultry Science*, 26 : 73-82. 1985.
- Wolf B. Biotinidase : its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 : 441-445. 2005.
- Wolf B, Guier RE, Allen RJ, Goodman SI and Kien CL. Biotinidase deficiency : the enzymatic defect in late-onset carboxylase deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 131 : 273-281. 1983.
- Zemleni J and Mock DM. Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223 : 14-21. 2000.

## A study on the Utilization of Biotin in the Embryos in Domestic Fowl

Ayumi Taniguchi and Toshiaki Watanabe

Laboratory of Dietary Environment Analysis, School of Human Science and Environment,  
University of Hyogo, 1-1-12 Shinzaike Honcho, Himeji 670-0092, Japan

It is known that biotin deficiency induces both external and skeletal malformations in the embryos of fowl. Also biotin is required for maintaining reproductive function and is contained in a large amount in the egg yolk. Therefore, this study was designed to elucidate the mechanism of transport of biotin from egg yolk to embryos.

The data were obtained from the fertilized eggs of the white leghorn. In the egg yolk, biotin concentration was  $600 \pm 200$  ng/g on Day 1 and had decreased with the growth of the embryos. Biotinidase activity had also decreased after Day 1. The percentage of free biotin was above 70% in egg yolks on Days 2-11. Conversely in embryos, biotin concentration was the highest value,  $206.4 \pm 48.6$  ng/g, on Day 3. Biotinidase activity showed the highest value on Day 2. These results demonstrate that biotin is metabolized into free form soon after fertilization in the egg yolk and transported abundantly to embryos on Days 3-4. In the embryo, the way of provision of biotin is different according to developmental stage or organ, and it may be that biotin is concerned with the formation of each organ or tissue.

The expression of biotin-dependent carboxylase was shown only acetyl-CoA carboxylase (ACC) and pyruvate carboxylase (PC) in the egg yolk, and ACC increased after Day 2. In embryos, the expression of PC, propionyl-CoA carboxylase (PCC) and methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) was shown, and PC increased with the growth of the embryos. Thus, the expression is different in egg yolk and embryos, and it appears that the way of using of biotin is different.

Accordingly, this indicates that a large amount of biotin is provided from egg yolk to embryos. From these findings, biotin may be an essential nutrient and play an important role in the normal development of embryos in fowls.

*(Japanese Journal of Poultry Science, 44 : J9-J16, 2007)*

**Key words** : biotin, fowl, embryo, biotinidase, carboxylase