

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：H21～H23

課題番号：21580149

研究課題名（和文）：非肝臓組織におけるパンテテイン-コエンザイム A 生合成経路の解明とその役割

研究課題名（英文）：Synthesis of Coenzyme A from pantetheine in non-hepatic tissues and its role

研究代表者

柴田克己 (Shibata Katsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：40131479

研究成果の概要（和文）：

- (1) Demoz らのアシル CoA 測定方法を参考にして、移動相、カラム、検出波長、流速、カラム温度を検討し、分離能が高く機器に負担をかけない測定条件を検討した。分離用カラムとして、Tosoh TSK-GEL ODS-100V を、移動相として 100 mmol/L NaH₂PO₄-75 mmol/L CH₃COONa (pH は H₃PO₄ で 4.6 に調整)-acetonitrile (94:6, v/v) を用いて、流速 1.0 ml/分で流すことで、CoA、アセチル CoA、デホスホ CoA の分離に成功した。各々の定量限界は同じで、すべて 10 pmol であった。測定時間は 25 分であった。
- (2) 開発した方法を用いて、仮想酵素であるパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ（パンテテイン + ATP → デホスホ CoA + Pi）の検索を行ったが、in vitro では酵素活性を検出することはできなかった。
- (3) 開発した方法が実際に生体試料に実用できるかを、パントテン酸欠乏動物と正常動物中の種々の臓器・組織中の CoA、アセチル CoA、デホスホ CoA 含量を測定したところ、小腸を除く他のすべてにおいて測定が可能であることがわかった。
- (4) 幼若ラットをパントテン酸欠乏食で 47 日間飼育し、パントテン酸欠乏ラットを作成した。この欠乏ラットをパントテン酸含有食あるいはパンテチン（パンテテインが 2 分子結合した化合物）含有食を投与し、回復速度を比較した。その結果、種々のパントテン酸栄養状態を示す指標は、パントテン酸含有食とパンテチン含有食と差異は認められず、パントテン酸はパンテチンと同等の生体有効性を持つということが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

- (1) We developed a simultaneous HPLC method for practical and rapid determination of coenzyme A, dephospho-coenzyme A, and acetyl-coenzyme A in tissues. These coenzymes are biosynthesized from a vitamin pantothenic acid, which are involved in the metabolism of fatty acids, amino acid catabolism and other many nutrients. The method employs a Tosoh TSK-GEL ODS-100V (250 mm × 4.6 mm I.D., particle size 5 μm) column eluted with 100 mmol/L NaH₂PO₄ and 75 mmol/L CH₃COONa (pH was adjusted to 4.6 by addition of concentrated H₃PO₄)-acetonitrile (94:6, v/v) at a flow-rate of 1.0 mL/min. The UV detector was set at 259 nm. The analysis time of one sample was 25 min. The quantification

limits for coenzyme A, dephospho-coenzyme A, and acetyl-coenzyme A were all 10 pmol.

(2) We challenged to detect in vitro the activity of a hypothetical enzyme pantethine adenylyltransferase, but we could not detect the enzyme activity.

(3) The technique was applied to the analyses of several tissues of rats fed normal and pantothenic acid-free diets. The present results show that the technique was suitable for the simultaneous determination of coenzyme A, dephospho-coenzyme A, and acetyl-coenzyme A in liver, heart, kidney, spleen, testis, large colon, and muscle, but not for small intestine.

(4) The rats made by feeding a pantothenic acid-free diet for 47 days were fed either the diet containing pantothenic acid or pantethine to compare which compounds are suitable for recovery from the pantothenic acid-deficiency. The indices for various pantothenic acid nutritional status revealed that pantothenic acid and pantethine had exactly the same activity as precursors of CoA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：パントテン酸, CoA, ビタミン, 定量, パンテチン, パンテテイン, HPLC

1. 研究開始当初の背景

(1) パントテン酸からすべての細胞内でCoAが生合成されるとされている。この根拠は、肝細胞を用いた研究からの推定にすぎない。パントテン酸からCoAへの生合成経路は5ステップもあり(図1)、ビタミンの補酵素への生合成経路では最も多くのステップを必要とする。申請者はNAD生合成経路の研究を30年間している。その成果により、肝臓と非肝臓組織ではNADの生合成経路が異なることを見出した(1)。肝臓ではニコチン酸からもニコチンアミドからもNADを生合成することができる。一方、非肝臓組織では、ニコチンアミドのみがNADの前駆体となりうる。ニコチン酸がニコチンアミドと同等のビタミン活性を有するのは、肝臓がニコチン酸を素早く取り込み、NADを経てニコチンアミドとしたのち、血液中にニコチンアミドとして放出しているためであることを明らかにした。さらに、肝臓が障害をうけた時には、ニコチン酸とニコチンアミドには当価のビタミン活性がないことも明らかにした(1)。

(2) パントテン酸の測定は、今まで微生物を利用した方法で測定していたが、最近になっ

て、ようやくHPLCを利用した方法を開発することができた(2)。

(3) 老化した動物の非肝臓組織のCoAレベルは低いことが、昔から知られている(3)。これは、単なるパントテン酸→CoA生合成能力が低下した結果であると考えてきたが、上記のNAD生合成経路に関する研究成果から考えると、非肝臓組織では、パントテン酸→CoA生合成経路が存在しないのではないかと考えるようになった。この背景は、申請者らが25年前に行ったCoAの消化管における実験結果からである(4)。このCoA消化実験で、血液中に現れるCoA消化産物は、パントテン酸だけではなくパンテテインも検出された。さらに、最近、パンテチン(パンテテインが2分子結合した化合物で、体内で容易にパンテテインとなる)は老齢ラットの腸管蠕動改善作用に有効であるが、パントテン酸では有効ではなかったことが報告された(5)。つまり、これらのことは、非肝臓組織ではパンテテイン→CoAの生合成経路(図2)のみが存在していると仮定することで、説明することが可能であると考えられるようになった。

2. 研究の目的

(1) HPLC を用いた CoA, デホスホ-CoA, アセチル-CoA の簡便な同時定量法を開発

水溶性ビタミンの一つであるパントテン酸は食物に多く分布していることから、ヒトでは欠乏症になりにくいとされ、栄養学的に関心が低く、他の水溶性ビタミンに比べ研究が遅れているビタミンである。パントテン酸の活性型である CoA はアシル化酵素の補酵素で、TCA 回路や脂肪酸の β 酸化など、様々な代謝に関わる。CoA の機能性についての研究は進んでいるが、パントテン酸摂取と CoA 分布の関係は未だ明らかにされていない。必要量の策定や欠乏症の解明において、これからは栄養学的観点からパントテン酸と CoA の量的関係を明らかにすることが課題となる。それには CoA の定量法は必要不可欠で、簡便に多数のサンプルを測定する方法が求められる。そこで本研究では、遊離の CoA, CoA の直接の前駆体であるデホスホ CoA, 様々な代謝の鍵物質であるアセチル CoA を標的として同時定量法の開発を行うことを目的とした。

(2) 仮想酵素であるパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (パンテテイン + ATP \rightarrow デホスホ CoA + Pi) の検索

全ての組織でパントテン酸から 5 段階の酵素反応を受けて CoA が生合成されると考えられている (図 1)。

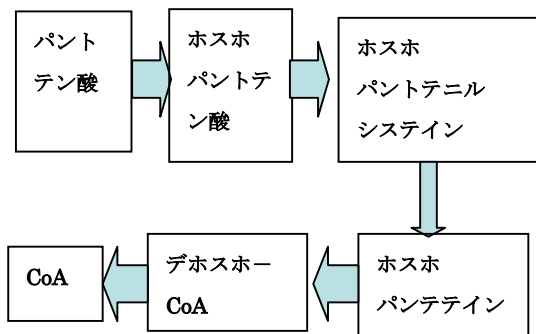


図 1. パントテン酸から CoA の生合成経路

また、パンテテインも 3 段階の酵素反応を経なければ CoA に生合成されない (図 2)。

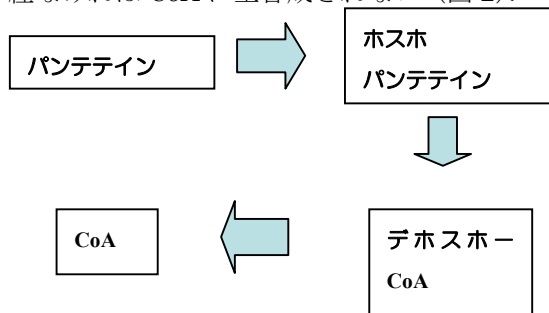


図 2. パンテテインから CoA の生合成経路

血液中には CoA の代謝産物としてパントテン酸だけではなく、パンテテインも含まれることや、老齢ラットの腸管蠕動運動改善作用にパンテチン (パンテテイン 2 分子のジスルフィド結合で、体内で容易にパンテテインに分解される) は有効であるが、パントテン酸は有効ではないといった報告がある(5)。これは肝臓と非肝臓組織では、パントテン酸とパンテテインはニコチン酸、ニコチンアミドと同等の関係にあると考えることで説明が可能となる。肝臓と非肝臓組織で NAD の生合成経路が異なり、肝臓ではニコチン酸から主に NAD が生合成されるが、非肝臓組織では一旦肝臓で生合成された NAD がニコチンアミドまで代謝されてから血中に放出され、これが直接的に NAD の前駆物質となる。これと同様に肝臓では PaA が CoA の直接の前駆体となり、非肝臓組織では CoA がパンテテインにまで代謝されてから血液を介して、非肝臓組織に取り込まれた後、CoA へと生合成されるのではないか。パントテン酸がニコチン酸に、パンテテインがニコチンアミドに相当するならば、ニコチンアミドアデニリルトランスフェラーゼと同様にパンテテインアデニリルトランスフェラーゼが存在してもおかしくはない (図 3)。

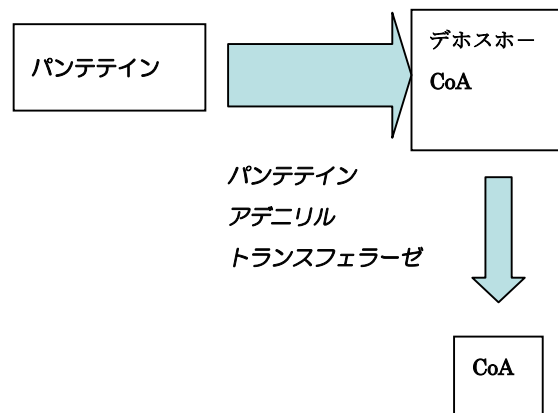


図 3. CoA 生合成経路上のパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (パンテテイン \rightarrow デホスホ CoA) の位置

そこで、肝臓と非肝臓組織として心臓を用い、パンテテインの酵素反応を *in vitro* で観察することで、新規仮想酵素パンテテインアデニリルトランスフェラーゼを発見できないかと考えた。非肝臓組織における CoA 生合成系の前駆体は、パントテン酸ではなく、パンテテインであることを証明する。仮想酵素であるパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (パンテテイン + ATP \rightarrow デホスホ CoA + Pi)

を見出す。具体的には、新鮮なラット肝臓組織・非肝臓組織（心臓）を用いて、パンテテインアデニリルトランスフェラーゼの活性を検索する。

(3) パントテン酸欠乏ラットの遊離型パントテン酸, 総パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 濃度

パントテン酸欠乏症に関する病理学的研究は進んでいるものの、栄養学的研究は遅れている。パントテン酸欠乏食を投与したラットの各臓器中の遊離型パントテン酸, 総パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 濃度の関係を比較した報告がないことから、我々が開発したデホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 同時定量法を用いて、パントテン酸欠乏食を投与したラットの体内の遊離型パントテン酸, 総パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 濃度の関係を網羅的に測定することを目的とした。

(4) パントテン酸欠乏ラットの回復にはパントテン酸とパンテチンのどちらが有効か?

In vitro において、パンテテインがパントテン酸よりも CoA 前駆体としての優位性を証明することができなかつたので、まるごとの動物を使用して、このことを調べてみた。

パントテン酸欠乏ラットへのパントテン酸あるいはパンテチンのどちらら投与が欠乏からの回復におよぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) HPLC を用いた CoASH, De-CoA, Ac-CoA の簡便な同時定量法を開発

HPLC を用いた CoA の定量法はいくつも報告されているが、サンプル 1 本の定量に 40 分以上を要するもの(6-11)、サンプルの処理に pH 調整が必要でその処理が煩雑なもの(12-15)、感度は良いがランニングコストの高い液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) を用いているもの(16-18)など、多量なサンプルを定量するには不向きなものが多い。また、CoA と CoA の直接の前駆物質であるデホスホ-CoA, そしてエネルギー代謝の鍵物質であるアセチル-CoA を同時に定量した報告はない。そこで、逆相クロマトグラフィーを用いた短時間での短鎖アシル CoA 定量方法を報告した Demoz らの方法(19) を基に、CoA, De-CoA, Ac-CoA を、HPLC を用いて簡便に同時定量を行う方法を考案した。

(2) 仮想酵素パンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (パンテテイン + ATP → デホ

スホ CoA + Pi) の検索

7 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、固形食 (オリエンタル酵母 動物用飼料 MF) で 7 日間飼育した。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後、6:00 ~ 18:00 を明、18:00 ~ 6:00 を暗とした。

断頭屠殺し、肝臓と心臓を摘出して生理食塩水で洗浄後、5 倍量の 50 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を加えた後、ホモジナイズし、これを酵素源とした。

(3) パントテン酸欠乏ラットの遊離型パントテン酸, 総パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 濃度

3 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 30 ~ 50 g) を日本クレア (株) より購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージに入れて飼育した。ラットは、パントテン酸欠乏群、パントテン酸欠乏群の飼料摂取量とそろえた Pair-fed 対照群の 2 群に分けた。飼料組成は表 1 に示した。なお、各群 5 匹とした。動物飼育室は恒温恒湿 (22±2°C, 50~60%), 12 時間の明暗サイクル (6:00~18:00 を明) で管理した。飼料 (表 1) は毎朝 9:00 に新しいものと交換した。水は 2 群とも自由に飲ませた。

表 1. 飼料組成

	対照食 群 (%)	パントテ ン酸欠乏 食群 (%)
ビタミンフリーカゼイン	20.0	20.0
L-メチオニン	0.2	0.2
α-コーンスターチ	43.5	43.5
スクロース	21.8	21.8
セルロース	5.0	5.0
コーン油	5.0	5.0
ミネラル混合 (AIN-93-G)	3.5	3.5
ビタミン混合 (AIN-93)	1.0	-
パントテン酸フリービ タミン混合 (AIN-93)	-	1.0
合計	100	100

統計処理

数値はすべて平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には対応のない t 検定を行った。3 群間の比較には一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 未満のとき、

統計学的に有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5 (GraphPad Software 社) を使用した。

(4) パントテン酸欠乏ラットの回復にはパントテン酸とパンテチンのどちらが有効か?

3週齢の雄 Wistar 系ラットを日本クレアから購入し、直ちに 1 匹ずつ代謝ケージに入れ、表 1 に示した対照食群の飼料 (10 匹) あるいはパントテン酸欠乏食群の飼料 (20 匹) を自由摂取させた。投与期間は 47 日間である。47 日目の 24 時間尿を集めた。採尿後、対照群とパントテン酸欠乏群の各 5 匹のラットをと殺し、臓器中のパントテン酸並びに関連化合物量を測定した。

次に、パントテン酸欠乏からの回復が、パントテン酸あるいはパンテチンのどちらが有効かを調べるために、3 週齢のラットを、パントテン酸欠乏食を 47 日間与えたラットを 3 群 (パントテン酸欠乏食群、パン含有食群、パンテチン含有食群) にわけ、7 日間の回復実験を行った。そのときの体重、体重増加量と臓器中 CoA など濃度を測定し、パントテン酸群とパンテチン群の間で、臓器中 CoA 濃度回復に差が認められるかを調べた。

4. 研究成果

(1) HPLC を用いた CoA, デホスホ CoA, アセチル CoA の簡便な同時定量法を開発

① 生体試料からの CoA, デホスホ CoA, アセチル CoA の抽出

臓器・組織重量に対して 10 倍量の 50 $\mu\text{mol/L}$ ジチオトレイトールを含む 5% スルホサリチル酸を加えて、ホモジナイズし、遠心分離にて、上清を得た。得られた上清は 0.45 μm のマイクロフィルターでろ過した。そのろ液を HPLC に注入した。

② HPLC の分析条件の検討

検討した結果を表 2 に示した。

表 2. CoA, デホスホ CoA, アセチル CoA の同時定量法

ポンプ	L-2130 (HITACHI)
オートサンプリング	L-2200 (HITACHI)
UV 検出器	L-7400 (HITACHI)
プロセッサ	D-2500 (HITACHI)
カラム	Tosoh TSK-GEL ODS-100V (5 μm , 4.6 i.d. \times 250 mm)
検出波長	259 nm

カラム温度	22°C
流速	1.0 ml/min
溶出システム	アイソクラティック
移動相	100 mM リン酸ナトリウム-75 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) 6% アセトニトリル
保持時間	CoA, 9.8 分. De-CoA, 20.1 分. Ac-CoA, 23.2 分.

図 4 にラット肝臓を試料とした時に得られたクロマトグラムを示した。



図 4. ラット肝臓試料の HPLC クロマトグラム

CoA : 145 nmol/g, De-CoA : 37 nmol/g, Ac-CoA : 13 nmol/g. CoA とデホスホ CoA, アセチル CoA の定量限界は、各々 10 pmol/injection であった。

HPLC 注入用試料中の CoA の安定性を図 5 に示した。-80°C では 60 日間の保存でも安定であったが、-20°C では 60 日間で約 60% にまで低下していた (図 5)。

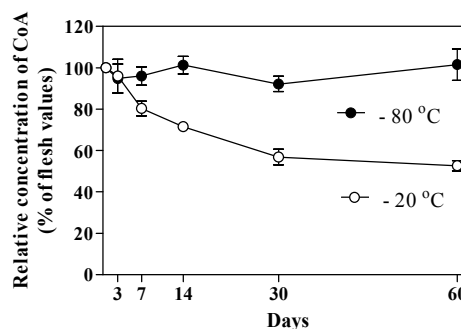


図 5. 保存温度による肝臓サンプル中 CoA の

安定性

処理直後の値を 100 %とした。

アイソクラティック HPLC 法による臓器中の CoA, デホスホ CoA, アセチル CoA の同時定量法を開発した。高感度で 1 サンプルあたり 25 分を切る, 短時間の定量が可能となった。種々の臓器・組織中の 3 種類の CoA が同時定量可能となったため, パントテン酸摂取量と体内 CoA などの量的関係を明らかにする研究に役立つものと思われる。

(2) 仮想酵素パンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (パンテテイン + ATP → デホスホ CoA + Pi) の検索

表 2 のように試薬を混ぜ, 37°C の恒温水槽に浸して, 0 分, 30 分, 60 分間インキュベートした後, 遠心分離(12,000×g, 4°C, 5 min)して得られた上清を, 0.45 μm フィルターで濾過し, 生成した CoA, デホスホ-CoA を HPLC にて測定した。デホスホ CoA も CoA に相当するピークはインキュベーション時間の増大とともに高くなり, 検出することはできなかった。

結論として, 肝臓・心臓を用いた酵素活性実験ではパンテテインアデニリルトランスフェラーゼを発見することはできなかった。

表 2. 仮想酵素パンテテインアデニリルトランスフェラーゼ活性の酵素反応組成

50 mM	Tris-HCl, pH 7.0	50 μl
50 mM	パンテチン	10 μl
5 mM	DTT	10 μl
50 mM	ATP	10 μl
50 mM	MgCl ₂	20 μl
	水	300 μl
	酵素源	100 μl
合計		500 μl

(3) パントテン酸欠乏ラットの遊離型パントテン酸, 総パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, およびアセチル CoA 濃度

① 体重増加量と臓器重量

飼育期間中の最終体重と臓器重量を表 3 に示した。飼育期間中の両群間の変数は飼料中のパントテン酸の有無だけであるが, 両群間に有意な差はみられなかった。肝臓および腎

臓周囲脂肪重量は Pair-fed 対照群と比較してパントテン酸欠乏群で有意に重かった。精巣重量はパントテン酸欠乏群の方が有意に軽かった。

表 3. 実験最終日の体重と臓器重量

	Pair-fed 対照群	パントテン酸 欠乏群
最終日 体重 (g)	358. ± 0.4 2	359. ± 0.57 0
臓器重 量 (g)		
肝臓	9.05 ± 0.4 0	11.70 ± 0.57* 0
心臓	1.03 ± 0.0 3	1.04 ± 0.05 3
腎臓	2.19 ± 0.1 2	2.19 ± 0.12 2
脾臓	0.72 ± 0.0 6	0.65 ± 0.03 6
精巣	3.28 ± 0.1 1	2.24 ± 0.27* 1
ヒラメ 筋	0.13 ± 0.0 1	0.12 ± 0.00 1
腓腹筋	2.17 ± 0.1 0	1.99 ± 0.06 0
腎臓周 囲脂肪	3.49 ± 0.7 9	6.49 ± 0.63* 9

値は平均値±標準誤差を示す。

*は Ctrl 群と比較して有意差があることを示す。

② 尿中・血漿中パントテン酸

尿中パントテン酸排泄量と血漿中パントテン酸濃度を表 4 に示した。尿中パントテン酸排泄量はパントテン酸欠乏群で顕著に減少していた。血漿中パントテン酸濃度も顕著に減少しており, 体内を移動する遊離型のパントテン酸, すなわち有効性パントテン酸濃度が非常に少ない状況であった。

表 4. 尿中および血漿中のパントテン酸値は平均値±標準誤差を示す.

	総パントテン酸 (nmol/g of tissue)			
	Pair-fed 対照群		パントテン酸 欠乏群	
肝臓	507. ± 71.2	195. ± 7	± 30.9*	
心臓	227. ± 37.3	75.9 ± 4	± 9.8*	
腎臓	254. ± 29.9	132. ± 5	± 5.9*	
脾臓	36.8 ± 4.3	19.0 ± 2.3*		
精巣	46.1 ± 3.2	96.9 ± 5.6*		
小腸	76.1 ± 2.4	53.1 ± 3.8		
大腸	68.7 ± 3.9	51.9 ± 5.6*		

	遊離パントテン酸 (nmol/g of tissue)			
	Pair-fed 対照群		パントテン酸 欠乏群	
肝臓	26.4 ± 6.4	18.1 ± 1.6		
心臓	62.9 ± 7.5	26.2 ± 3.9*		
腎臓	82.4 ± 9.6	60.2 ± 5.4		
脾臓	11.2 ± 3.0	3.6 ± 0.7*		
精巣	25.5 ± 2.8	12.1 ± 1.1*		
小腸	41.2 ± 6.8	31.4 ± 2.5		
大腸	25.2 ± 6.2	6.6 ± 2.9*		

	遊離パントテン酸の割合 (%)	
	Pair-fed 対照群	パントテン酸 欠乏群
肝臓	5.2	9.2
心臓	27.7	34.5
腎臓	32.3	45.4
脾臓	30.4	18.9
精巣	55.3	12.5
小腸	54.1	59.1
大腸	36.7	12.7

*は Ctrl 群と比較して有意差があることを示す.

③ 組織中総パントテン酸と遊離パントテン酸

組織中の総パントテン酸, 遊離パントテン酸濃度を表 5 に示した. パントテン酸欠乏群の総パントテン酸濃度は小腸を除くすべての組織で低かった. 大腸では Pair-fed 対照群に対して 77%と比較的維持されていたが, その他の組織は肝臓 (39%), 心臓 (33%), 腎臓 (52%), 脾臓 (52%), 精巣 (48%) で大きな濃度低下がみられた. Pair-fed 対照群と

比較して遊離パントテン酸濃度の低下がみ

	Pair-fed 対照群	パントテン酸 欠乏群
尿中 PaA 排泄量 (nmol/day)	716 ± 166	15. ± 2.5* 1
尿中 Cort 排泄量 (ng/day)	36. ± 6.1	54. ± 8.3
血漿 PaA (nmol/ml)	4.4 ± 0.2	0.7 ± 0.08* 0

られたのは, 心臓 (42%), 脾臓 (32%), 精巣 (47%), 大腸 (25%) であった.

表 5. 組織中の総パントテン酸および遊離パントテン酸濃度

値は平均値±標準誤差を示す.

*は Ctrl 群と比較して有意差があることを示す.

④ 組織中のデホスホ CoA, アセチル CoA, および CoA

組織中デホスホ CoA, アセチル CoA, および CoA 濃度を表 6 に示した. パントテン酸欠乏群で有意に減少していたのは, 精巣のアセチル CoA (43%にまで低下), ヒラメ筋の CoA (48%), アセチル CoA (19%), 大腸のアセチル CoA (32%) であった. 逆に心臓のデホスホ CoA (157%), 脾臓の CoA (134%), では増加していた. これらの補酵素型は総パントテン酸濃度 (表 5) と比較して, Pair-fed 対照群とパントテン酸欠乏群間で大きな差異が認められないことが明らかとなった.

表 6. 組織中のデホスホ CoA, アセチル CoA, および CoA 濃度

	デホスホ CoA (nmol/g of tissue)	
	Pair-fed 対照 群	パントテン酸欠 乏群
肝臓	42.0 ± 2.0	32.9 ± 4.71
	0	9
心臓	4.27 ± 0.3	6.69 ± 0.32* 7
腎臓	8.27 ± 0.8	6.29 ± 0.88
	4	

脾臓	5.86 ± 0.6	4.70 ± 0.40
	8	
精巣	3.35 ± 0.2	4.54 ± 0.94
	6	
ヒラメ筋	3.24 ± 0.8	2.41 ± 0.06
	3	
腓腹筋	2.43 ± 0.3	2.80 ± 0.65
	6	
大腸	2.58 ± 0.6	2.28 ± 0.58
	8	

CoA (nmol/g of tissue)		
	Pair-fed 対照群	パントテン酸欠乏群
肝臓	161. ± 19.0	121. ± 9.39
	9	8
心臓	27.2 ± 3.5	29.7 ± 4.05
	2	8
腎臓	67.8 ± 8.6	56.0 ± 7.30
	2	2
脾臓	9.77 ± 1.1	13.0 ± 0.90*
	9	6
精巣	23.3 ± 3.9	28.8 ± 3.57
	7	9
ヒラメ筋	16.6 ± 0.8	7.94 ± 1.47*
	2	0
腓腹筋	4.30 ± 0.0	3.24 ± 0.65
	7	
大腸	10.3 ± 1.8	9.69 ± 1.91
	0	2

Ac-CoA (nmol/g of tissue)		
	Pair-fed 対照群	パントテン酸欠乏群
肝臓	8.83 ± 1.7	8.63 ± 1.75
	0	
心臓	4.57 ± 4.7	4.76 ± 0.84
	6	
腎臓	4.99 ± 0.5	3.70 ± 0.29
	5	
脾臓	ND	ND
精巣	11.51 ± 2.0	5.05 ± 1.81*
	2	
ヒラメ筋	2.66 ± 0.7	0.51 ± 0.35*

筋	1	
腓腹筋	ND	ND
大腸	1.49 ± 0.2	0.47 ± 0.27*
	4	

値は平均値±標準誤差を示す。
*は Ctrl 群と比較して有意差があることを示す。

(4) パントテン酸欠乏ラットの回復にはパントテン酸とパンテチンのどちらが有効か?

幼若期から 47 日間パントテン酸欠乏食を与えて臓器中 CoA 濃度を低下させたラットを、パントテン酸投与群とパンテチン投与群に分けて、7 日間の回復実験を行った。そのときの体重、体重増加量と臓器重量を表 7 に示した。パントテン酸含有食群とパンテチン含有食群間には差異は認められなかった。

表 7. パントテン酸欠乏からの回復にはパントテン酸とパンテチンのどちらが有効か
— 体重増加量と臓器重量 —

	パントテン酸欠乏群* ¹	パントテン酸含有群	パンテチン含有群
体重	239.7 ± 9.5 ^a	268.2 ± 10.1 ^b	269.3 ± 13.0 ^b
肝臓	9.15 ± 0.57 ^a	11.46 ± 0.53 ^b	10.37 ± 0.49 ^{a,b}
心臓	0.68 ± 0.07	0.75 ± 0.02	0.76 ± 0.04
腎臓	1.60 ± 0.07	1.82 ± 0.04	1.84 ± 0.07
脾臓	0.50 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.04
精巣	2.16 ± 0.09	2.08 ± 0.24	2.28 ± 0.13
小腸	1.71 ± 0.06	1.90 ± 0.13	1.85 ± 0.11
大腸	0.78 ± 0.04	0.87 ± 0.09	0.71 ± 0.04
ヒラメ筋	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01
腓腹筋	1.32 ± 0.05	1.37 ± 0.05	1.39 ± 0.05

値は g で示し、平均値± SEM (5 ラット) で表した。異なる添え字は有意差が認められたことを示す。

*¹パントテン酸欠乏ラットは、パントテン酸欠飼料を 47 日間投与することで作成した。そのパントテン酸欠乏ラットは、3 群に分け、7 日間、引き続きパントテン酸欠食を投与し

たラット (パントテン酸欠乏群), パントテン酸含有食を投与したラット (パントテン酸含有群), パンテチン含有食を投与したラット (パンテチン含有群) に分けた.

尿中のパントテン酸, 臓器中の遊離型パントテン酸, デホスホ CoA, CoA, アセチル CoA および総パントテン酸濃度を, パントテン酸欠食を投与したラット (パントテン酸欠乏群), パントテン酸含有食を投与したラット (パントテン酸含有群), パンテチン含有食を投与したラット (パンテチン含有群) で比較した (表 8). これらの値も, パントテン酸含有群とパンテチン含有群の間に差は認められなかった.

表 8. パントテン酸欠乏からの回復にはパントテン酸とパンテチンのどちらが有効か
—尿中排泄量と組織中のパントテン酸および関連化合物濃度—

	パントテ ン酸欠乏 群	パントテ ン酸含有 群	パンテチ ン含有群
尿中 PaA (nmol/day)	9.2 ± 1.9 ^a	66.6 ± 23.0 ^b	78.8 ± 17.3 ^b
血漿 PaA (nmol/mL)	0.5 ± 0.1 ^a	3.4 ± 0.20 ^b	4.1 ± 0.1 ^b
肝臓			
遊離 PaA	0.4 ± 0.2 ^a	4.4 ± 0.7 ^b	3.4 ± 0.7 ^b
	26.3 ± 5.0	19.7 ± 2.3	34.0 ± 7.6
Dephospho-CoA	79.4 ± 9.2 ^a	101.1 ± 10.2 ^b	136.7 ± 11.1 ^c
CoA	32.5 ± 1.0 ^a	59.8 ± 5.8 ^b	47.7 ± 7.0 ^b
Acetyl-CoA	236.9 ± 27.3 ^a	315.4 ± 11.4 ^b	309.4 ± 28.6 ^b
総 PaA			
心臓			
遊離 PaA	2.9 ± 0.3 ^a	62.6 ± 5.8 ^b	69.4 ± 4.0 ^b
	9.2 ± 7.5	8.2 ± 4.5	10.8 ± 3.8
Dephospho-CoA	26.3 ± 3.1 ^a	39.2 ± 2.1 ^b	43.1 ± 4.5 ^b
CoA	16.2 ± 4.2	12.6 ± 0.7	14.4 ± 2.2
Acetyl-CoA	69.2 ± 6.8 ^a	104.0 ± 17.1 ^b	112.5 ± 31.1 ^b
総 PaA			
腎臓			
遊離 PaA	16.5 ± 2.6 ^a	67.6 ± 4.9 ^b	74.5 ± 3.8 ^b
	18.7 ± 5.1	20.5 ± 1.0	19.3 ± 3.2
Dephospho-CoA	88.0 ± 21.1 ^a	132.2 ± 22.0 ^b	120.1 ± 10.1 ^b
CoA			

Acetyl-CoA	10.0 ± 2.5	9.7 ± 0.6	8.7 ± 3.3
総 PaA	180.9 ± 3.8	205.2 ± 17.1	227.0 ± 15.4
脾臓			
遊離 PaA	0.1 ± 0.0 ^a	7.1 ± 0.5 ^b	7.3 ± 0.7 ^b
	N.D.	N.D.	N.D.
Dephospho-CoA	9.1 ± 2.7	11.9 ± 2.9	6.8 ± 1.3
CoA	5.2 ± 1.4 ^a	2.7 ± 0.4 ^b	9.3 ± 3.6 ^a
Acetyl-CoA	25.1 ± 2.7 ^a	38.6 ± 1.0 ^b	40.2 ± 2.7 ^b
総 PaA			
精巣			
遊離 PaA	0.5 ± 0.1 ^a	26.3 ± 2.9 ^b	28.9 ± 1.5 ^b
	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2
Dephospho-CoA	12.3 ± 1.3	9.2 ± 0.8	10.3 ± 1.3
CoA	7.8 ± 1.0	7.7 ± 0.9	7.7 ± 1.3
Acetyl-CoA	34.4 ± 2.8 ^a	85.0 ± 12.6 ^b	98.0 ± 11.7 ^b
総 PaA			
小腸			
遊離 PaA	12.09 ± 1.45 ^a	26.64 ± 2.33 ^b	34.26 ± 3.34 ^b
Dephospho-CoA	6.92 ± 3.42 ^a	2.53 ± 0.79 ^b	1.71 ± 0.41 ^b
CoA			
Acetyl-CoA	31.25 ± 10.03	32.60 ± 8.70	37.40 ± 5.46
総 PaA	3.90 ± 1.12 ^a	3.54 ± 0.70 ^a	5.39 ± 0.20 ^b
	60.3 ± 14.8 ^a	73.1 ± 20.0 ^{ab}	80.7 ± 5.8 ^b
大腸			
遊離 PaA	2.18 ± 0.55 ^a	24.43 ± 2.92 ^b	33.34 ± 0.12 ^c
Dephospho-CoA	3.48 ± 1.30 ^a	7.78 ± 3.49 ^b	7.86 ± 1.34 ^b
CoA			
Acetyl-CoA	7.07 ± 2.13 ^a	10.30 ± 2.14 ^b	12.08 ± 2.34 ^b
総 PaA	3.40 ± 1.49	4.08 ± 1.13	3.19 ± 0.20
	62.4 ± 14.7 ^a	138.1 ± 20.5 ^b	127.4 ± 16.1 ^b
ひらめ筋			
遊離 PaA	0.94 ± 0.63 ^a	46.57 ± 3.14 ^b	41.37 ± 7.49 ^b
Dephospho-CoA	N.D.	N.D.	N.D.
CoA	13.16 ± 3.26	14.69 ± 5.62	9.29 ± 0.56
Acetyl-CoA	3.32 ± 0.50	2.63 ± 0.29	3.37 ± 0.43
総 PaA	34.7 ± 9.8 ^a	94.9 ± 7.4 ^b	82.2 ± 5.3 ^b
腓腹筋			
遊離 PaA	0.36 ± 0.22 ^a	20.28 ± 3.19 ^b	19.2 ± 2.31 ^b
Dephospho-CoA	N.D.	N.D.	N.D.
CoA	7.47 ± 2.22	5.32 ± 1.49	6.30 ± 0.67
Acetyl-CoA	6.2 ± 0.55	8.32 ± 0.74	5.01 ± 1.08
総 PaA	13.9 ± 3.6 ^a	0.74	

35.7 ± 2.5^b 36.9 ± 6.6^b

値は nmol/g で示し、平均値 ± SEM (5 ラット) で表した。異なる添え字は有意差が認められたことを示す。

*¹ パントテン酸欠乏ラットは、パントテン酸欠飼料を 47 日間投与することで作成した。そのパントテン酸欠乏ラットは、3 群に分け、7 日間、引き続きパントテン酸欠食を投与したラット (パントテン酸欠乏群)、パントテン酸含有食を投与したラット (パントテン酸含有群)、パンテチン含有食を投与したラット (パンテチン含有群) に分けた。

以上の結果から、パントテン酸欠乏状態にしたラットでは、パントテン酸投与とパンテチン投与で差が見られず、パントテン酸欠乏による臓器中 CoA 濃度回復にパントテン酸を投与すれば、パンテチンに劣らない効果が得られるということがいえる。つまり、パントテン酸欠乏ラットの臓器中 CoA 回復において、パンテチンはパントテン酸よりも有効であるとはいえなかった。

引用論文

1. 柴田克己, ラットの各臓器におけるナイアシン代謝経路ならびにナイアシン栄養の判定法 (総説) ビタミン, 61, 39-5 (1987).
2. Takahashi K, Fukuwatari T, Shibata K. Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr*, 877, 2168-2172 (2009).
3. Mascitelli-Coriandoli E, Citterio C. Pantothen Säure und Hoden-Coenzyme A bei alternden Tieren. *Naturwissenschaften*, 47, 183-184 (1960).
4. Shibata K, Gross CJ, Henderson LK. Hydrolysis and absorption of pantothenic acid and its coenzymes in the rat small intestine. *J Nutr*. 113, 2207-2215 (1983).
5. Ohta M, Kimura S. Nutritional physiology of pantothenic acid deficiency with regard to intestinal motility aging rats. 国際学院埼玉短期

大学研究紀要, 28, 53-56 (2007)..

6. Hosokawa Y, Shimomura Y, Hassis RA, Ozawa T. Determination of short-chain acyl-coenzyme A esters by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 153, 45-49 (1986).
7. Corkey BE. Analysis of acyl-coenzyme A esters in biological samples. *Methods Enzymol* 166, 55-70 (1988).
8. King MT, Reiss PD, Cornell NW. Determination of short-chain coenzyme A compounds by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Methods enzymol*, 166, 70-79 (1988).
9. Golovko MY, Murphy EJ. An improved method for tissue long-chain acyl-CoA extraction and analysis. *J Lipid Res*, 45, 1777-1782 (2004).
10. Corkey BE, Deeney JT. Acyl CoA regulation of metabolism and signal transduction. *Prog Clin Biol Res*, 321, 217-232 (1990).
11. Bartlett K, Causey AG. Radiochemical high-performance liquid chromatography methods for the study of branched-chain amino acid metabolism. *Methods Enzymol*, 166, 79-92 (1988).
12. Halvorsen O, Skrede S. Separation of coenzyme A and its precursors by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 107, 103-108 (1980).
13. Corkey BE, Brandt M, Williams RJ, Williamson JR. Assay of short-chain acyl coenzyme A intermediates in tissue extracts by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem*, 118, 30-41 (1981).
14. King MT, Resiss PD. Separation and measurement of short-chain coenzyme A compounds in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 146, 173-179 (1985).
15. Woldegiorgis G, Spennetta T, Corkey BE, Williamson JR, Shrago E. Extraction of tissue long-chain acyl-CoA esters and measurement by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 150, 8-12 (1985).
16. Magnes C, Sinner FM, Regitting W, Piber TR.

LC/MS/MS Method for quantitative determination of long-chain fatty acyl CoAs. *Anal. Chem*, 77, 2889-2894 (2005).

17. Gao L, Chiou W, Tang H, Cheng X, Camp H, Burns DI. Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *J Chromatogr*, 853, 303-13 (2007).

18. Mabnes C, Suppan M, Piber TR, Moustafa T, Trauner M, Haemmerle G, Sinner FM. Validated comprehensive analytical method for quantification of coenzyme A activated compounds in biological tissues by online solid-phase extraction LC/MS/MS. *Anal Chem*, 80, 5736-5742 (2008).

19. Demoz A, Garras A, Asiedu DK, Netteland B, Berge RK. Rapid method for the separation and detection of tissue short-chain coenzyme A esters by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 667, 148-152 (1995).

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)

① 中井拓海, 高橋圭, 佐野光枝, 福渡努, 柴田克己. 第 64 回日本栄養・食糧学会 (平成 22 年 5 月 21 日～23 日, 徳島). 高速液体クロマトグラフィーを用いた尿中パントテン酸定量法の開発.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田克己 (Shibata Katsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号 : 40131479

(2)研究分担者

なし

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし

研究者番号 :