

Effects of Excess Pantothenic Acid Administration on the Other Water-Soluble Vitamin Metabolisms in Rats

Katsumi SHIBATA, Chisato TAKAHASHI, Tsutomu FUKUWATARI and Ryuzo SASAKI

Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures,
The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522–8533, Japan

(Received May 19, 2005)

Summary To acquire the data concerning the tolerable upper intake level which prevents health problems from an excessive intake of pantothenic acid, an animal experiment was done. Rats of the Wistar strain (male, 3 wk old) were fed on a diet which contains 0%, 0.0016% (control group), 1%, or 3% calcium pantothenate for 29 d. The amount of weight increase, the food intake, and the organ weights were measured, as well as the pantothenic acid contents in urine, the liver and blood. Moreover, to learn the influence of excessive pantothenic acid on other water-soluble vitamin metabolism, thiamin, riboflavin, a vitamin B₆ catabolite, the niacin catabolites, and ascorbic acid in urine were measured. As for the 3% addition group, enlargement of the testis, diarrhea, and hair damage were observed, and the amount of weight increase and the food intake were less than those of the control group. However, abnormality was not seen in the 1% addition group. The amount of pantothenic acid in urine, the liver, and blood showed a high correlation with intake level of pantothenic acid. It was only for 4-pyridoxic acid, a vitamin B₆ catabolite, in urine that a remarkable difference was observed against the control group. Moreover, the (2-Py+4-Py)/MNA excretion ratio for these metabolites of the nicotinamide also indicated a low value in the 3% pantothenic acid group. As for the calcium pantothenate, it was found that the 3% level in the diet was the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) and the 1% level was the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL).

Key Words pantothenic acid, excess administration, rat, urine, vitamin

Pantothenic acid (PaA), a vitamin, is essential for humans and animals for growth and normal physiological functions. It is an integral part of the acylation carriers, CoA and acyl carrier proteins, which are involved in more than 100 different metabolic pathways including energy metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, and the synthesis of lipids, neurotransmitters, and steroid hormones (1, 2).

It was reported that PaA deficiency induced in experimental animals when fed on a diet without PaA led to growth retardation with reduced food intake (3, 4) and functional impairments in all systems (5–13). PaA deficiency has also been induced in humans by use of a metabolic antagonist, ω -methyl PaA along with a PaA-deficient diet (14): Signs and symptoms reported include depression, personality changes, cardiac instability, frequent infection, fatigue, abdominal pains, sleep disturbances and neurological disorders including numbness, paresthesia (abnormal sensation such as “burning feet” syndrome), muscle weakness and cramps. Naturally occurring PaA deficiency in humans is very rare and has been observed only in cases of severe malnutrition: World War II prisoners in the Philippines, Burma, and Japan experienced numbness and painful burning and tingling in their feet (“burning

feet” syndrome), which was relieved specifically by PaA administration (15). The cause of this syndrome must originate from stresses because PaA involves the formation of adrenocortical hormones (16). Therefore, the specific PaA deficiency in humans would be “burning feet” syndrome. There is an interesting hypothesis that the formation of ketone bodies under fasting conditions induces a deficiency of cellular PaA (17). Supplementation of this vitamin would facilitate complete catabolism of fatty acids and thus the formation of ketone bodies could be circumvented. Oral contraceptives (birth control pills) containing estrogen and progestin may increase the requirement for PaA (18). Recently, a report that PaA protects cells and organs against peroxidative damage by increasing the content of cell glutathione was published (19).

The reports (17–19) that pantothenic acid prevents stresses, peroxidation reactions and the formation of the ketone bodies predict a possibility that the intake of pantothenic acid will increase more and more in the future.

PaA is not known to be toxic in humans. The only adverse effect noted was diarrhea resulting from very high intakes of 10 to 20 g/d of calcium D-pantothenate (18). However, there is one case report of life-threatening eosinophilic pleuropericardial effusion in an elderly woman who took a combination of 10 mg/d of biotin

E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp

and 300 mg/d of PaA for 2 mo (20). In rats, there are two reports on the effect of excess PaA: one details changes in hepatocellular lipid production because of an excess of PaA (21) and the other is a report on adrenocortical alterations induced by deficiency and excess of PaA (22). In the present paper, we report the effects of administering excess PaA to rats to acquire data concerning the tolerable upper intake level to prevent health problems especially the effects on the other water-soluble vitamin metabolisms.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Vitamin-free milk casein, sucrose, and L-methionine were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Corn oil was purchased from Ajinomoto (Tokyo, Japan). Gelatinized cornstarch, the mineral mixture (AIN-93M) (23) and the vitamin mixture (AIN-93-VX containing 25% choline bitartrate) (23) were obtained from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Thiamin hydrochloride ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl = 337.27$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6 = 376.37$), nicotinamide ($C_6H_6N_2O = 122.13$), calcium pantothenate (PaA-Ca, $C_{18}H_{32}N_2O_{10} \cdot Ca = 476.54$), and L(+)-ascorbic acid ($C_6H_8O_6 = 176.13$) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 4-Pyridoxic acid (4-PIC, $C_8H_9NO_4 = 183.16$) was made by ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, California, USA) and obtained through Wako. N¹-Methylnicotinamide (MNA) chloride ($C_7H_9N_2O \cdot HCl = 159.61$) was purchased from Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan). N¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py, $C_7H_8N_2O_2 = 152.15$) and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-Py, $C_7H_8N_2O_2 = 152.15$) were synthesized by the methods of Pullman and Colowick (24) and Shibata et al. (25), respectively. All other chemicals used were of the highest purity available from commercial sources.

Animals and diets. The care and treatment of the experimental animals conformed with the University of Shiga Prefecture guidelines for the ethical treatment of laboratory animals.

Male rats of the Wistar strain (3 wk old with a body weight of around 40 g) were obtained from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; CLEA Japan, Inc.). They were then divided into four groups and fed ad libitum

for 29 d, one group with a PaA-free, 20% casein diet, and the others with the same diet+0.0016% PaA-Ca (used as the control group), +1.0% PaA-Ca, or +3.0% PaA-Ca (Table 1).

The room temperature was maintained at around 22°C and about 60% humidity, and a 12-h light (06:00–18:00)/12-h dark (18:00–06:00) cycle was maintained. Body weight and food intake were measured every 2 d at around 10:00. Urine samples (24-h; 10:00–10:00) were collected in amber bottles containing 1 mL of 1 mol/L HCl on the last day of the experiment, and were stored at –25°C until needed. The rats were killed by decapitation at around 10:00 on the last day (day 29) after the collection of the urine sample had been completed, and the various tissues were removed and measured. The liver of each animal was removed, and a portion (approximately 0.2 g) was immediately treated as described in the literature to measure PaA (26) and CoA (27).

Analyses.

Vitamin B₁ (thiamin): The determination of vitamin B₁ in urine was measured by the HPLC-post labeled fluorescence method of Kimura et al. (28).

Vitamin B₂ (riboflavin): Urinary concentration of riboflavin was analyzed according to the method of Ohkawa et al. (29).

4-PIC: Urinary excretion of 4-PIC, which is a catabolite of vitamin B₆, was determined according to the method described by Gregory and Kirk (30).

Niacin: The quantities of Nam, 2-Py and 4-Py in urine were measured simultaneously by the HPLC method of Shibata et al. (25). The content of MNA was measured by the method of Shibata (31).

Pantothenic acid: The content of free pantothenic acid in urine was directly measured by using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (26).

Ascorbic acid: The contents of the reduced and oxidized ascorbic acids and 2,3-diketoglutaric acid were measured by the method of Kishida et al. (32).

CoA: The content of CoA in liver was measured by the methods of Alled and Guy (33).

Statistical analysis. For the statistical evaluation, the significance of the differences in the mean concentrations among groups was treated with ANOVA and when the analysis of ANOVA was significant, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was performed. Dif-

Table 1. The composition of the diets.

	0% PaA-Ca diet	0.0016% PaA-Ca diet	1% PaA-Ca diet	3% PaA-Ca diet
Vitamin-free milk casein	20	20	20	20
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized-cornstarch	45.9	45.9	45.4	44.4
Sucrose	22.9	22.9	22.4	21.4
Corn oil	5	5	5	5
Mineral mixture (AIN-93M)	5	5	5	5
Vitamin mixture (PaA-Ca free) (AIN-93-VX containing 25% choline bitartrate)	1	1	1	1
PaA-Ca	0	0.0016	1	3

ferences of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Instat software (version 2.00; obtained from GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used for all analyses.

RESULTS

Effects of excessive PaA administration on the body weight gain and food intake in rats

The diet containing 0.0016% PaA-Ca was considered as the control. The body weight gain and food intake were almost the same between the control and the 0% PaA-Ca groups in the first 5–7 d; however, these significantly decreased in the 0% group compared with the control after that day as shown in Fig. 1. The result means that some days are needed for appearance of PaA-deficiency. On the other hand, the body weight gain and food intake of the rats fed on the 3% PaA-Ca diet were significantly lower than those in the control group, especially in the initial 5 d of the experiment with the food intake (Fig. 1). The food intakes in the 3% group became similar in amount with those of the control group from around day 20 of the experiment. The body weight gains in the control and the 3% PaA groups were almost the same from day 7. This finding complies with the possibility that the rats acquire a detoxification process of PaA by exposure to an excess amount of PaA. No adverse effects were observed in the rats fed on the 1% PaA-Ca diet.

Effects of excessive PaA administration on the tissue weights of rats

Table 2 shows the tissue weights of the rats fed on the

diets supplemented with various amounts of PaA-Ca. The values were expressed as g/100 g of body weight of rat. The weights of heart, liver, and kidneys revealed no significant difference among the four groups. In the present experiment, the group fed on the 0.0016% PaA-Ca diet is the control group. The brain and testis weights were significantly higher in the PaA-deficient group than in the other PaA-containing groups. In the comparison between the control and 1% PaA-Ca groups, all of the measured tissue weights were almost the same. But the weights of lung and spleen were significantly higher in the 3% group than in the control group.

Effects of excessive PaA administration on the PaA contents in urine and liver and the CoA content in liver

The urinary excretion of PaA increased with the intake of PaA as shown in Fig. 2A. The PaA content in the liver also increased with the intake of PaA as shown in Fig. 2B; however, the degree of the increase was not so dramatic compared with the result of the urine samples, while the CoA content in the liver did not increase with the intake of PaA as shown in Fig. 2C. The saturation of CoA in the liver of rats was attained by feeding the diet containing 0.0016% PaA-Ca, namely by feeding the control diet. The excessive administration to the rats did not yield any significant increase in CoA level in the liver although the PaA level in the liver increased with the excessive administration of PaA.

Effects of excessive PaA administration on the other B-group vitamins concerned with energy metabolism

The coenzymes such as TDP (thiamin diphosphate), FAD (flavin adenine dinucleotide), PLP (pyridoxal phos-

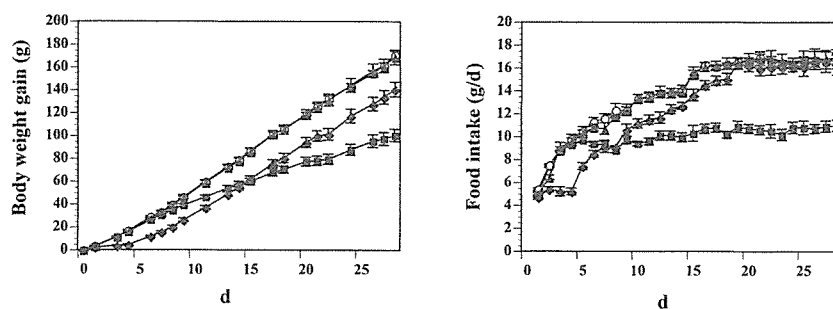


Fig. 1. Effects of PaA-Ca administration on the body weight gain (A) and food intake (B) of the weaning rats. Male rats of the Wistar strain (3 wk old) were obtained and immediately placed in individual metabolic cages (CT-10; Clea Japan). They were fed ad libitum (Table 1) for 29 d. ■, 0% PaA-Ca diet; ○, 0.0016% PaA-Ca diet (control group); ▲, 1% PaA-diet; ◆, 3% PaA-Ca diet. Values are means \pm SE for five rats.

Table 2. Effect of PaA-Ca administration on the tissue weights in rats.

	Body weight (g)	Brain (g/100 g BW)	Heart (g/100 g BW)	Lung (g/100 g BW)	Liver (g/100 g BW)	Spleen (g/100 g BW)	Kidney (g/100 g BW)	Testis (g/100 g BW)
0% PaA-Ca	139 \pm 7.7 ^a	1.14 \pm 0.06 ^a	0.38 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01 ^a	4.96 \pm 0.33	0.27 \pm 0.02 ^a	0.96 \pm 0.03	1.30 \pm 0.08 ^a
0.0016% PaA-Ca*	211 \pm 4.5 ^b	0.74 \pm 0.07 ^b	0.37 \pm 0.00	0.51 \pm 0.01 ^a	4.67 \pm 0.06	0.32 \pm 0.01 ^{a,c}	0.85 \pm 0.00	1.03 \pm 0.01 ^b
1% PaA-Ca	217 \pm 6.7 ^b	0.78 \pm 0.07 ^b	0.37 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01 ^{a,c}	4.73 \pm 0.15	0.35 \pm 0.03 ^{a,c}	0.89 \pm 0.02	1.09 \pm 0.02 ^b
3% PaA-Ca	185 \pm 5.4 ^c	0.87 \pm 0.05 ^b	0.39 \pm 0.01	0.61 \pm 0.03 ^{b,c}	5.19 \pm 0.14	0.39 \pm 0.03 ^{b,c}	0.96 \pm 0.02	0.99 \pm 0.04 ^b

*Control group.

Values are means \pm SE for five rats. Different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ in the Tukey-Kramer multiple comparisons test.

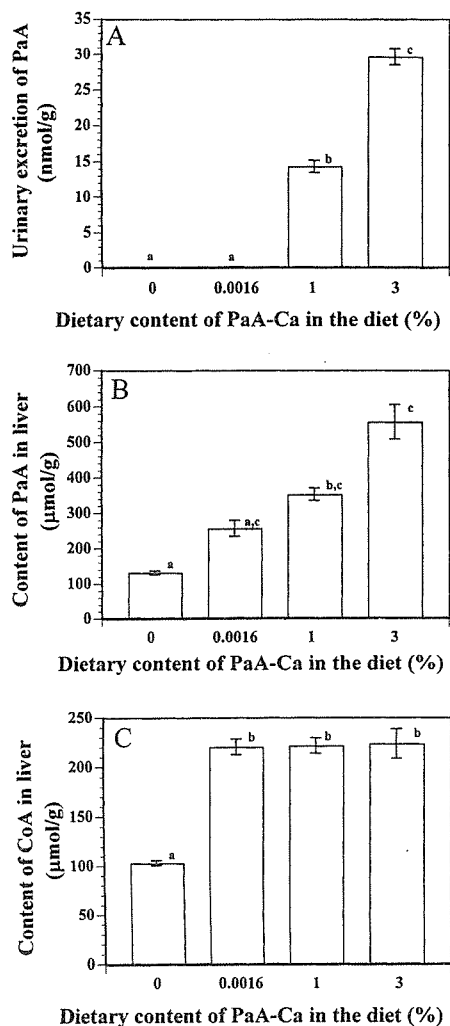


Fig. 2. Effects of PaA-Ca administration on the urinary excretion of PaA (A), the content of PaA in liver (B), and the content of CoA in liver (C). A: Twenty-four hour urine samples were collected on the last day of the experiment. The PaA content in urine samples were measured. B, C: The rats were killed after urine samples had been collected and the livers removed. The livers were treated as described in "Materials and Methods," and total PaA and CoA contents in the liver measured. Values are means \pm SE for five rats; different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ in the Tukey-Kramer multiple comparisons test.

phate) and NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) were concerned in the metabolism of glucides, amino acids, and fatty acids as well as CoA. Thus, the excessive PaA administration had effects on the metabolism of vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, and niacin (vitamin B₃).

Niacin and PaA are especially concerned with energy metabolism. The effects of excessive administration of PaA on the metabolism of the de novo nicotinamide synthetic pathway (tryptophan-quinolinic acid pathway) were investigated. As results, the respective urinary excretion of kynurenic acid, anthranilic acid, xanthurenic acid, 3-hydroxyanthranilic acid, and quinolinic

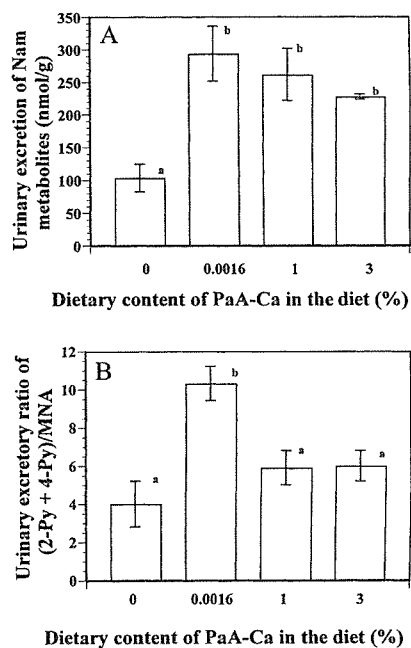


Fig. 3. Effects of PaA-Ca administration on the urinary excretion of sum of Nam and its metabolites such as MNA, 2-Py, and 4-Py (A) and the excretory ratio of the (2-Py+4-Py)/MNA (B). Twenty-four urine samples were collected on the last day of the experiment. A: The contents of Nam, MNA, 2-Py, and 4-Py were measured. B: The excretory ratio of the (2-Py+4-Py)/MNA was calculated. Nam, nicotinamide; MNA, N¹-methyl-nicotinamide; 2-Py, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide; 4-Py, N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide. Values are means \pm SE for five rats; different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ in the Tukey-Kramer multiple comparisons test.

acid was not changed by the administration of excessive PaA (data not shown). The excessive PaA administration did not affect the total urinary excretion of nicotinamide, MNA, 2-Py, and 4-Py (Fig. 3A), though it did affect the urinary excretory ratio of (2-Py+4-Py)/MNA (Fig. 3B), in comparison with the control group. The decreased ratio means that the excessive PaA induced some adverse effects in the rats, because the low value of the ratio of (2-Py+4-Py)/MNA indicates retrogression of the metabolism of nicotinamide.

Furthermore, the present data (Fig. 3) show that the deficiency of PaA affects the nicotinamide metabolism. The decreased total urinary excretion in the 0% PaA group compared with the control means that PaA deficiency increases the demand for niacin requirement.

Figure 4 shows the effects of PaA administration on the urinary excretion of vitamin B₁, vitamin B₂, and 4-PIC (a catabolite of vitamin B₆). The urinary excretion of vitamin B₁ and 4-PIC decreased according to the increase in the intake of PaA, while that of vitamin B₂ did not.

Effects of excessive PaA administration on the urinary excretion of ascorbic acid

In rats, ascorbic acid can be made from glucose, so ascorbic acid is not a vitamin. Therefore, many reports

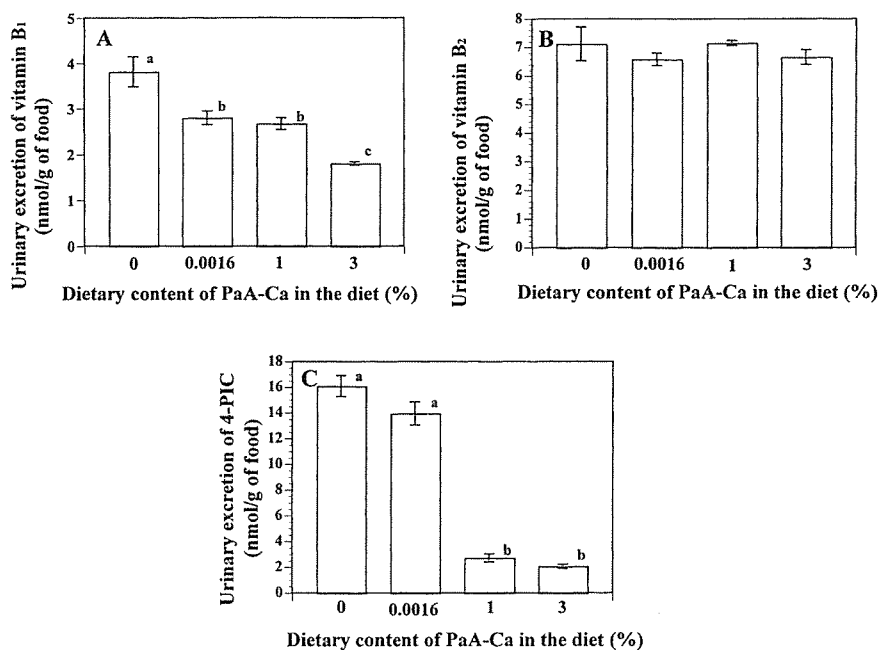


Fig. 4. Effects of PaA-Ca administration on the urinary excretion of vitamin B₁ (A), vitamin B₂ (B), and vitamin B₆ metabolites 4-PIC (C). Twenty-four hour urine samples were collected on the last day of the experiment. The contents of vitamin B₁ (A), vitamin B₂ (B), and 4-PIC (C) were measured. Values are means \pm SE for five rats; different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ in the Tukey-Kramer multiple comparisons test.

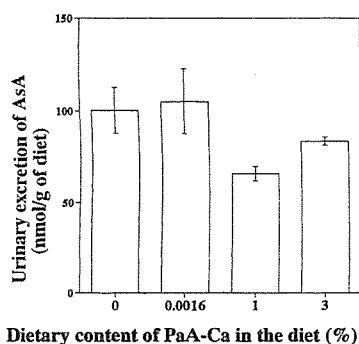


Fig. 5. Effects of PaA-Ca administration on the urinary excretion of ascorbic acid. Twenty-four hour urine samples were collected on the last day of the experiment. The content of ascorbic acid was measured. Values are means \pm SE for five rats.

have been published that the production of ascorbic acid is changeable by many factors. In the present experiment, the urinary excretion of ascorbic acid was not different among the four groups as shown in Fig. 5.

DISCUSSION

PaA is an integral part of CoA, which is an essential coenzyme in a variety of reactions that sustain life. CoA is required for biochemical reactions that generate energy from food (fats, carbohydrates, and proteins). The synthesis of essential fats, cholesterol, and steroid hormones requires CoA, as does the synthesis of the neurotransmitter, acetylcholine, and the hormone, melatonin (2). Metabolism of a number of drugs and toxins by the liver requires CoA (34). Most acetylated

proteins in the body have been modified by the addition of an acetate group that was donated by CoA. Protein acetylation affects the 3-dimensional structure of proteins, potentially altering their function, the activity of peptide hormones, and appears to play a role in cell division and DNA replication. Protein acetylation also affects gene expression by facilitating the transcription of mRNA. A number of proteins are also modified by the attachment of long-chain fatty acids donated by CoA. These modifications are known as protein acylation, and appear to play a central role in cell signaling (1, 2).

As mentioned in the introduction, supplementation of PaA would facilitate complete catabolism of fatty acids (17) and oral contraceptives (birth control pills) containing estrogen and progestin may increase the requirement for PaA (18). Furthermore, PaA protects cells and organs against peroxidative damage by increasing the content of cellular glutathione (19). These findings induce use of excessive PaA for prevention against stresses, peroxidation, the formation of ketone bodies and so on.

The present experiments in rats clearly indicated that excessive intake of PaA had an adverse effect on body weight gain (Fig. 1A), food intake (Fig. 1B), the excretory ratio of (2-Py+4-Py)/MNA (Fig. 3B), the urinary excretion of vitamin B₁ (Fig. 4A), and the urinary excretion of 4-PIC (Fig. 4C) as well as PaA deficiency. The level causing the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in the rats was 1% in the diet and that causing the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) was 3% in the diet. The rats in the 1% PaA group consumed around 16 g/d of their diet during day 20 to day 29 and the mean body weight during the days was about

160 g. So, the PaA intake was calculated as 3,000 mg/kg body weight a day. The rats in the 3% PaA group consumed around 16 g/d during day 20 to day 29 and the mean body weight during the days was about 180 g. So, the PaA intake was calculated as 1,000 mg/kg body weight a day, which is a proposed acceptable daily intake of PaA-Ca for rats. Although the data were not shown in the present experiments, we also done an experiment in which rats were fed on a 5% PaA diet. But, four of the five rats died with sever diarrhea within 2 d of starting the diet. The surviving rat, although maintaining the same diet, was restored to vigor after 1 wk and gained as much weight as the control. This phenomenon looked like the results in the 3% PaA group (Fig. 1A).

The excessive intake of PaA affected the metabolism of other B-group vitamins. The decreased excretory ratio of (2-Py+4-Py)/MNA, but no effect on the sum of the nicotinamide catabolites, MNA+2-Py+4-Py, means that excessive PaA inhibits the activity of MNA oxidase, which catalyzes the reactions of MNA → 2-Py and 4-Py (35), although the conversion pathway of tryptophan to nicotinamide was not affected. The excess intake of PaA also decreased the urinary excretion of 4-PIC, a catabolite of pyridoxal. The reaction of pyridoxal → 4-PIC is catalyzed by a similar enzyme, aldehyde oxidase (35). So, the excess intake of PaA might influence the oxidases. The urinary excretion of vitamin B₁ decreased in the 3% PaA group compared with that in the control and 1% groups. The decreased excretion indicated that the rats fed on the 3% PaA diet required a higher amount of vitamin B₁ compared with those fed on the control and 1% diets. The mechanism is not clear.

It is known that the ascorbic acid formation increases when the rats are exposed to xenobiotics to metabolize and excrete into urine (36). A large amount of PaA administration to the rats did not induce the formation of ascorbic acid (Fig. 5). So, excess amount of PaA is not recognized as xenobiotic in the rats.

In conclusion, the NOAEL of PaA, an essential part of CoA that sustains life was 1% in the dietary level and the LOAEL was 3% in the dietary level. In a daily intake per kg of body weight of rat, the NOAEL was around 1,000 mg, while the LOAEL was around 3,000 mg. If a safety factor would be 100 (species difference 10, individual difference 10) (37), the tolerable upper intake level is around 10 mg/kg body weight a day. We would propose 10 mg of PaA-Ca/kg body weight a day as a tentative tolerable upper intake level.

Acknowledgments

This report is a part of the studies on the Japanese Dietary Reference Intakes (Principle investigator, Katsumi Shibata) and the investigation was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Comprehensive Research on Cardiovascular Diseases).

REFERENCES

- 1) Plesofsky-Vig N. 1999. Pantothenic acid. In: Nutrition in Health and Disease (Shils M, ed), 9th ed, p 423-432.

- Williams & Wilkins, Baltimore.
- 2) Tahiliani AG, Beinlich CJ. 1991. Pantothenic acid in health and disease. *Vitam Horm* **46**: 165-228.
- 3) Kimura S, Furukawa Y, Wakasugi J, Ishihara Y, Nakayama A. 1980. Antagonism of L(-)pantothenic acid on lipid metabolism in animals. *J Nutr Sci Vitaminol* **26**: 113-117.
- 4) Reibel DK, Whyse BW, Berkich DA, Neely JR. 1982. Coenzyme A metabolism in pantothenic acid-deficient rats. *J Nutr* **112**: 1144-1150.
- 5) Hatano N. 1962. Pantothenic acid deficiency in rats. *J Vitaminol* **10**: 143-159.
- 6) Puddu P, Budini R, Caldarella CM. 1965. Liver DNA and RNA in pantothenic acid deficiency. *Experimentia* **21**: 119-120.
- 7) Roy AK, Axelrod AE. 1971. Protein synthesis in liver of pantothenic acid-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **138**: 804-807.
- 8) Eida K, Kubota N, Nishigai T, Kikutani M. 1975. Harderian gland. V. Effect of dietary pantothenic acid deficiency on porphyrin biosynthesis in Harderian gland of rats. *Chem Pharm Bull* **23**: 1-4.
- 9) Mahboob S. 1976. Thymic weight in pantothenic acid deficiency. *Nutr Metab* **20**: 272-277.
- 10) Ramakrishnan CV, Subramoniam A. 1978. Effect of prenatal and neonatal pantothenic acid deficiency on rat intestinal phosphatases. *Experimentia* **34**: 435-437.
- 11) Mahboob S, Estes LW. 1978. Effect of pantothenic acid deficiency on rat hepatocytes. *Nutr Metab* **22**: 177-180.
- 12) Schwabedal PE, Pietrzik K, Wittkowski W. 1985. Pantothenic acid deficiency as a factor contributing to the development of hypertension. *Cardiology* **72** (Suppl 1): 187-189.
- 13) Wittwer CT, Beck S, Peterson M, Davidson R, Wilson DE, Hansen RG. 1990. Mild pantothenic acid deficiency in rats elevates serum triglyceride and free fatty acid levels. *J Nutr* **120**: 719-725.
- 14) Hodges RE, Bean WB, Ohlson MA, Bieiler R. 1959. Human pantothenic acid deficiency produced by omega-methyl pantothenic acid. *J Clin Invest* **38**: 1421-1425.
- 15) Gopalan C. 1946. The "Burning-feet" syndrome. *Ind Med Gaz* **81**: 22-26.
- 16) Eisenstein AB. 1957. Pantothenic acid and adrenocortical hormone secretion. *Endocrinology* **60**: 298-302.
- 17) Leung LH. 1995. Pantothenic acid as a weight-reducing agent: fasting without hunger, weakness and ketosis. *Med Hypotheses* **44**: 403-405.
- 18) Flodin N. 1988. Pharmacology of Micronutrients. Alan R. Liss, Inc, New York.
- 19) Slyshenkov VS, Dymkowska D, Wojtczak L. 2004. Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett* **569**: 169-172.
- 20) Debourdeau PM, Djeddar S, Estival JL, Zammit CM, Richard RC, Castot AC. 2001. Life-threatening eosinophilic pleuropericardial effusion related to vitamins B₅ and H. *Ann Pharmacother* **35**: 424-426.
- 21) Wirtschafter ZT, Walsh JR. 1962. Hepatocellular lipid changes produced by pantothenic acid excess. *Ann Surg* **156**: 97-104.
- 22) Wirtschafter ZT, Walsh JR. 1963. Adrenocortical alterations induced by deficiency and excess of pantothenic acid. *Endocrinology* **72**: 725-734.
- 23) Reeves PG. 1997. Components of the AIN-93 diets as

- improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* **127**: 838S–841S.
- 24) Pullman ME, Colowick SP. 1954. Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* **206**: 121–127.
- 25) Shibata K, Kawada T, Iwai K. 1988. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**: 23–28.
- 26) Skeggs HR, Wright LD. 1944. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* **156**: 21–26.
- 27) Allred JB, Guy DG. 1969. Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. *Anal Biochem* **29**: 293–299.
- 28) Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. 1982. Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin Chem* **28**: 29–31.
- 29) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1983. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* **258**: 5623–5628.
- 30) Gregory JF 3rd, Kirk JR. 1979. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* **32**: 879–883.
- 31) Shibata K. 1987. Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins* **61**: 599–604.
- 32) Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. 1992. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**: 1505–1507.
- 33) Alled JB, Guy DG. 1969. Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. *Anal Biochem* **29**: 293–299.
- 34) Hodges RE, Ohlson MA, Bean WB. 1958. Pantothenic acid deficiency in man. *J Clin Invest* **37**: 1642–1657.
- 35) Stanulovic M, Chaykin S. 1971. Aldehyde oxidase: catalysis of the oxidation of *N*¹-methylnicotinamide and pyridoxal. *Arch Biochem Biophys* **145**: 27–34.
- 36) Horio F, Yoshida A. 1982. Effects of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J Nutr* **112**: 416–425.
- 37) Joint FAO/WHO (Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy/World Health Organization of the United Nations, Geneva, Switzerland). 2004. Development of a scientific collaboration to create a framework for risk assessment of nutrients and related substances. Background paper and request for comment/call for information.

総合論文：「高齢者と B 群ビタミン」

寿命とニコチンアミド*

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻**

柴田 克己

Vitamins(Japan), 79(11), 531-538(2005)

Senior Citizen and B-group Vitamins: Longevity and Nicotinamide

Katsumi SHIBATA

Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies, School of Human Cultures,
The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassakacho, Hikone, Shiga, Japan, 522-8533

The research on the relation between the reactions of acetylation and deacetylation of histone and suppression and activation of the transcription has been recently preceded. In 1999, it was reported that yeast which had one extra copy of *Sir2* was found having 1.4 times longevity, while, the mutant to lack *Sir2* being shortened to 1/2 compared with the wild types. In addition, in 2002, it was clarified that *Sir2* (= NAD⁺-dependent histone deacetylase) was inhibited by nicotinamide that was one of the products. In 2003, as for the extension of the longevity that induced by the energy restriction, it was reported that it happened through increasing the appearance of *PNC1* (a gene that codes nicotinamidase), and however, the effect disappeared due to the lack of *Sir2*. Well, the mammal has the *sirtuin* (*SIRT*) family, and it is known that *SIRT1* is homolog that is the nearest to the yeast *Sir2*. In 2004, it was reported that the appearance of *SIRT1* had increased with the brain, fat tissues, the kidney, and the liver, when the rat was kept for 12 months under the energy restriction of 60%. From these reports, I have thought that it becomes a key that extends longevity that the relation between the *Sir2* protein (NAD⁺-dependence histone deacetylase) and nicotinamidase controls aging. The nicotinamide metabolism in the nuclei was presumed in relation to *Sir2* and nicotinamidase. Moreover, it was reported that the activities of rat liver nicotinamidase, and nicotinamide methyltransferase which is another nicotinamide metabolizing enzyme were increased by the energy restriction. In mammals, the catabolism of nicotinamide being increased by the dietary restriction (limitation of amount of level that the weight of the maturity rat is maintained constantly) becomes clear.

Keywords: longevity, nicotinamide, NAD, metabolism, energy restriction

(Received May 2, 2005)

1. 緒 論

「腹八分に医者いらず」ということわざがある。摂取エネルギー制限により老化が抑制され、寿命が延びることは、ラットやマウスで繰り返し証明されているし、酵母、線

虫、クモなどでも認められている¹⁾。したがって、摂取エネルギーの制限が老化を抑制し、寿命を延ばすことは動物にとって共通的に認められる現象のようである。では、どれだけエネルギー摂取を制限しなくてはならないかということ、動物実験では自由摂取群の1/2～2/3に制限する必

* 本論文はビタミン B 研究委員会シンポジウム(平成 16 年度)(平成 17.2.18, 東京)の発表内容をまとめたものである。

** 〒 522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

要がある。酵母では通常の 2 % グルコース培地で培養したものに對して 0.5 % 培地で培養するとその寿命が 1.25 倍にもなる²⁾。かなりきびしいエネルギー制限のように思えるが、人で考えれば、20 歳代の体重を生涯維持することと同じ程度のエネルギー制限である。最近、エネルギー制限により得られる寿命の延長にニコチンアミドの代謝が重要な役割を果たしていることがわかってきた。

2. なぜニコチンアミドの代謝が寿命と関わっていると考えられるようになったのか？

2-1. クロマチン構造におけるヒストンのアセチル化と脱アセチル化の重要性

この研究がなぜ行われるようになったのか、そのいきさつを紹介する。

「転写が活発に行われている遺伝子領域では、ヒストンのアセチル化が亢進している」という現象は古くから知られていた。しかしながら、これは単なる副産物的な結果にすぎないとされ、ヒストンのアセチル化と転写活性の調節との関係に興味を持つ研究者は少なかった。ところが、1996 年に転写のコアクチベーターとして同定されていた分子である CBP/p300 にヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性が報告され³⁾、また同年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) として精製されていたタンパク質が出芽酵母の転写抑制因子 RPD3 のホモログであることが明らかにされた⁴⁾ ことなどから、「ヒストンのアセチル化・脱アセチル化反応」と「転写の活性化・抑制」という二つの現象が繋がってきた。さらに、1997 年、DNA 結合性の転写因子 p53 が CBP/p300 によってアセチル化されるという報告⁵⁾ がきっかけとなり、タンパク質のアセチル化・脱アセチル化の問題は、転写修飾の中心的命題となってきた。

2-2. Silent information regulator 2 は NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素活性をもつ

そのような中で、2000 年、Sir2 (Silent information regulator 2: 酵母において転写のサイレンシングに関与していることが 1995 年に報告されていたタンパク質) に⁶⁾、NAD⁺ 依存性のヒストン脱アセチル化酵素活性があることが報告された⁷⁾。この酵素は、NAD⁺ とアセチル化されたヒストン(この状態では活性クロマチン構造をとっている)を基質として、脱アセチル化されたヒストン、ニコチンアミドおよび O-アセチル ADP リボースを産生する (NAD⁺ + アセチル化ヒストン → ニコチンアミド + O-アセチル ADP リボース + 脱アセチル化ヒストン)。ヒストンが脱アセチル化されるとサイレンシング、すなわち不活性クロマチン構造となる。その結果、老化が抑制され、寿命がのびるという仮説である。

たとえば、Sir2 を 1 コピー余分に持つ酵母は野生型の酵

母 (21 ~ 23 回分裂) よりも 1.4 倍の寿命を持つのに對し、Sir2 を欠く変異体の寿命は野生型の 1/2 にまで短縮する⁸⁾。つまり、Sir2 遺伝子の産物である Sir2 タンパク質は、酵母の老化・寿命の制御に必須であることが明らかとなった。この Sir2 の機能は酵母におけるエネルギー制限による寿命延長効果にも必須であることが明らかにされている⁹⁾。すなわち、酵母をグルコース制限培地 (0.5 % グルコース) で培養すると非制限培地 (2 % グルコース) と比較して寿命が 1.25 倍程度延長されるが、Sir2 を欠損させた変異株では延長されない¹⁰⁾。さらに、Sir2 のホモログである sir-2.1 の高発現が線虫の *Caenorhabditis elegans* の寿命を延ばすこと¹¹⁾、ヒトにおいて Sir2 に最も近いホモログである SIRT1 が p53 の脱アセチル化を介してアポトーシスを阻害することが報告された¹²⁾¹³⁾。これらの報告から、Sir2 とそのホモログは生物界に広く保存された寿命に関わる因子であることを示唆している。従って、ヒトにおいてもエネルギー制限による老化の抑制と寿命の延長の可能性がでてきた。

ここで、Sir2 が核内に存在することおよび Sir2 が NAD⁺ の存在下でアセチル化ヒストンを脱アセチル化することを思い出していただきたい。NAD⁺ は NADH に還元されるのではなく、ニコチンアミドと O-アセチル ADP リボースに分解されてしまう。この Sir2 の脱アセチル化反応は生成物のニコチンアミドにより強く阻害される¹⁴⁾。以上の結果から、野生型酵母においてエネルギー制限下で Sir2 活性が上昇する機構として次の三つの可能性が考えられる。① Sir2 タンパク質レベルが上昇する。② Sir2 による脱アセチル化反応の基質 NAD⁺ の供給が高まり、Sir2 活性が上昇する。③ 脱アセチル化反応によって阻害物質であるニコチンアミドが迅速に代謝され、Sir2 活性が上昇する。このうち①の可能性については、エネルギー制限下でも Sir2 レベルが変化しないことが判明している¹⁵⁾ ので除外される。そのような背景からハーバード大学医学部の Sinclair らの研究グループは、出芽酵母を用いて、Sir2 と NAD⁺ 代謝との関連を研究し始め、以下に示すことを明らかにしている²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。なお、出芽酵母においては、3 種類 (接合型遺伝子、テロメア、rDNA) のサイレンシング遺伝子座 (転写抑制遺伝子座) が同定されている。

2-3. NAD⁺ 生合成との関連性¹⁵⁾

理解を助けるために、図 1 に出芽酵母の NAD⁺ 代謝の概要を示した。NAD⁺ 代謝と寿命とエネルギー制限との関係については、以下のことが明らかにされた。

① Nicotinate phosphoribosyltransferase をコードする *NPT1* を高発現させた酵母では寿命が通常の酵母よりも 1.6 倍も延びた。しかしながら、NAD⁺ 濃度と NAD⁺/NADH 比は変化していなかった。

② NAD⁺ 生合成に関わる酵素をコードする遺伝子であ

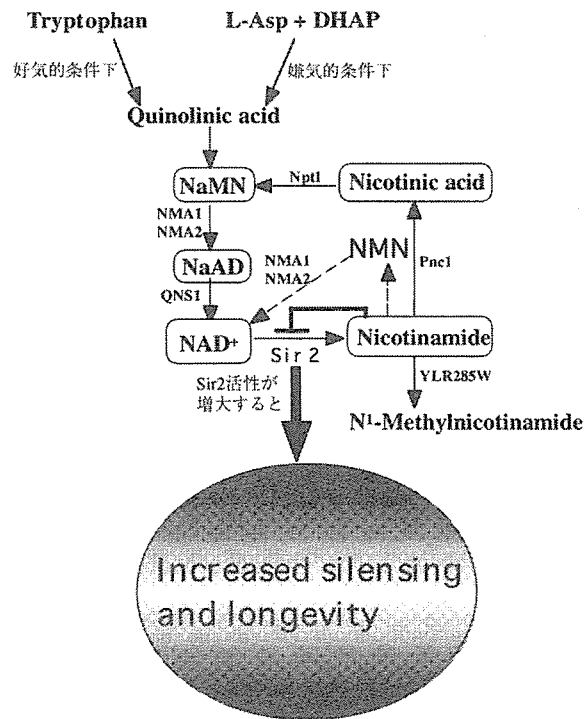


図1. NAD⁺代謝の概要(出芽酵母).

Sir2(NAD⁺依存性脱アセチル化酵素の一つ)はNAD⁺代謝からみれば、NAD⁺分解酵素の一つである。Sir2の欠損は酵母のNAD⁺含量に影響を及ぼさないことから、NAD⁺分解酵素としての役割は重要ではない。しかし、Sir2活性が増大すると、活性型クロマチンを不活性型クロマチンに変換し、転写が抑制(サイレンシング)され、寿命が延びる。なお、点線の矢印で示したニコチンアミド→NMN(ニコチンアミドモノヌクレオチド)→NAD⁺の経路はほ乳類では主要なNAD⁺生合成経路であるが、出芽酵母で存在するか否かは不明である。DHAP=Dihydroxyacetonephosphate.

るPNC1(Nicotinamidase)、NMA1(Nicotinic acid mononucleotide and nicotinamide mononucleotide adenyltransferase)、あるいはNMA2(Nicotinic acid mononucleotide and nicotinamide mononucleotide adenyltransferase)を導入すると、rDNA(rRNA遺伝子)の安定化が増し、すなわちrRNAの合成量の低下が起こった。また、テロメア領域のサイレンシング(転写抑制)が高まった。しかし、QNS1(NAD⁺ synthetase)の導入はサイレンシングに影響を与えなかった。

③ Sir2欠損酵母菌におけるNAD⁺量は通常の酵母と変動がなかった(このことは、Sir2はNAD⁺の主要な分解酵素ではないことを意味している。)

④ エネルギー制限によって、Nicotinate phosphoribosyltransferase量は増大せず、局も変動しなかった。これらの結果から、彼らは、Sir2活性はsalvage NAD⁺生合成経路(ニコチンアミド→ニコチン酸→ニコチン酸モノヌクレオチド→ニコチン酸アデニンジヌクレオチド→ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺))から流入するNAD⁺レベル、あるいはNAD⁺に由来する物質によって調節されている可能性を示唆した。つまり、NAD⁺そのもの

の量は寿命とは関係ないらしい。

2-4. ニコチンアミドはSir2の阻害剤¹⁴⁾

さらに、重要なことが見いだされた。

① Sir2の反応産物の一つであるニコチンアミドは酵母のサイレンシングを強く阻害した。

② ニコチンアミドはSir2タンパク質の生成を抑制していなかった。

③ ニコチンアミドは野生型酵母のrDNAの組み換え頻度を高めたが、元々rDNAの組み換え頻度の高いSir2欠損酵母では影響を及ぼすことはなかった。

④ 野生型の酵母を5 mMニコチンアミド含有培地で培養すると寿命が非含有培地の寿命の約半分にまで低下した。この低下した寿命はSir2欠損酵母と同じであった。

⑤ Sir2欠損酵母をニコチンアミド過剰含有培地で培養しても寿命の低下は認められなかった。

⑥ ニコチンアミドは*in vitro*でSir2とSIRT1(ヒトのSir2ホモログ)の非拮抗阻害剤であることが証明された。IC₅₀は50 μM程度であった。

つまり、核内におけるニコチンアミドのすみやかな除去が寿命と関わりがあることがわかってきた。

2-5. Nicotinamidase の重要性²⁾

つまり、Nicotinamidase がヒストンの脱アセチル化反応に重要な役割を果たしている可能性がでてきた。そこで、この点に関する研究の進展をまとめると、

①野生型の酵母を 0.5 % グルコース培地で培養すると寿命が延びるが、この延長は Nicotinamidase をコードする遺伝子 *PNC1* を欠損させると消失した。

②野生型の酵母を 37°C で生育させると(熱ショック処理)、通常の培養温度の 30°C と比べて寿命が延びるが、この延長も Nicotinamidase をコードする遺伝子 *PNC1* を欠損させると消失した。

③野生株に 5 倍量の *PNC1* を導入した酵母の寿命は、約 2 倍も延長した。

④ *Pnc1* レベルは培地中のグルコース濃度が低下するに従って増大した。

⑤ *cdc25-10* アレル(エネルギー制限の模倣を引き起こす)の導入は *Pnc1* レベルの上昇を引き起こした。

⑥アミノ酸制限、塩ストレス、熱ストレス、ソルビトール添加はすべて、*Pnc1* レベルの上昇を引き起こした。

⑦実際に Nicotinamidase 活性も *Pnc1* タンパク質レベルに応じて認められた。

⑧ニコチン酸の添加は rDNA のサイレンシングを増大させなかった。

⑨ *de novo* NAD⁺ 生合成経路を欠損させた酵母(*bnaf6* Δ; quinolinate phosphoribosyltransferase を欠く酵母)をさらに *pnc1* Δにしても通常の培地で生育した。このことは *Pnc1* すなわち Nicotinamidase は、NAD⁺ 生合成において決定的な役割を果たしていないことを意味している。

⑩ *npt1* Δ (nicotinate phosphoribosyltransferase の遺伝子欠損株)はサイレンシング欠陥株であるが、*PNC1* (nicotinamidase の遺伝子)を導入すると若干欠陥が回復する。ちなみに、*npt1* Δ (nicotinate phosphoribosyltransferase の遺伝子欠損株)の細胞内 NAD⁺ レベルは野生株の 1/2 程度である。そこで、培地に *de novo* 生合成経路の中間体であるキノリン酸を添加して NAD⁺ レベルを正常にすると、*npt1* Δ、3×*PNC1* 株の rDNA のサイレンシング(すなわち rRNA の転写抑制)を野生株のレベルまで回復させた。

⑪ヒトの *NNMT* (nicotinamide methyltransferase をコードする遺伝子)を酵母に導入すると、rDNA のサイレンシングが上昇した。また、酵母の *NNMT* 遺伝子と推定される YLR285W の導入もサイレンシングを上昇させた。

⑫ YLR285W の導入は酵母の寿命を延ばしたが、グルコース飢餓培地で培養しても、さらに寿命は延びなかった。しかしながら YLR285W 欠損株は野生株と同じようにグルコース飢餓により寿命が延びることから、YLR285W は *PNC1* と異なり、本当の寿命調節因子ではない。

ここまでのことを、想像も含めて図示すると、図 2 のような代謝図がかかる。

3. ほ乳動物における Sir2 ファミリー

では、酵母のような細胞レベルの寿命と、人などの高等動物の個体としての寿命とを同一に論じることには多少の疑問を感じていたが、ほ乳動物のエネルギー制限と Sir2 ファミリーに関する論文^{16),24)}がでた。

ほ乳動物には Sir2 のホモログとして sirtuin (SIRT) ファミリーが存在し、SIRT1 が酵母 Sir2 に最も近いホモログである。となると、ヒトにおいても SIRT1 によって寿命を延長することが可能であるのか、そして、NAD⁺ やニコチンアミド代謝を調節することによって SIRT1 の活性を制御できるのか大変興味深い。

3-1. ラットでのエネルギー制限と SIRT1 の発現量との関係

Cohen ら¹⁶⁾は、自由摂取群の 60 % に制限した食餌で離乳直後から 12 ヶ月間飼育したラットを用い、各組織における SIRT1 の発現量を調べたところ、脳、脂肪組織、腎臓、肝臓など多くの組織で自由摂取群に比べて発現量が増加していたことを報告している。したがって、酵母と同様にほ乳動物においてもエネルギー制限によって SIRT1 が活性化することを示している。15 時間絶食したマウスの肝臓、骨格筋においても SIRT1 発現量が増加することから¹⁷⁾、SIRT1 の標的となる転写因子として p53^{12),13)}、フォークヘッド転写因子^{18),21)}、NF-κB²²⁾が報告されている。これらの転写因子はいずれも細胞周期、アポトーシスに関与する。SIRT1 発現量の増加には p53、フォークヘッド転写因子の Foxo3a を必要とすることから¹⁷⁾、ネットワークを形成した複雑な制御機構かもしれないが、SIRT1 はこれらの転写因子を制御あるいは相互作用を介して細胞を死から生存の方向へ切り替える役割を持つようである。

3-2. SIRT1 は脂肪の蓄積を抑制し糖新生を活発にする
出芽酵母では、培地のグルコース濃度を通常の 2 % から 0.5 % に下げると、その寿命が 1.25 倍にのびることを²⁾、またほ乳動物でも無制限に食べさせたものよりも、成熟動物の体重を維持できるだけの摂取量に制限したものの方が、SIRT1 (Sir2 のホモログ)の発現量が高くなること^{16),17)}を紹介した。Sir2 も SIRT1 は NAD⁺-依存性脱アセチル化酵素である。では、脱アセチル化されるタンパク質には、どのようなものがあるのか。上述のように、アセチル化されたヒストンが最も有名である。アセチル化されたヒストンからアセチル基が取れると、ヒストンは DNA と強固に結合して不活性クロマチン状態となる。この脱アセチル化が NAD⁺ 依存であることがきわめて重要である。一方、アセチル化はアセチル CoA が関与する。つまり、SIRT1 は細胞のエネルギー代謝に関与する情報をアセチル

CoA と NAD⁺ を介して受け取り、遺伝子のサイレンシングにはたらいっていると考えることができる。

では、この NAD⁺-依存性脱アセチル化酵素の基質特異性はどの程度厳密なのか。実は、あまり厳密ではない。FOXO4 も基質となり²³⁾、脱アセチル化されることで転写活性が増大し、脂肪細胞においては、成熟脂肪細胞への分化が抑制される。繊維芽細胞を筋芽細胞に形質転換する因子として発見された転写因子である MyoD も SIRT1 によって脱アセチル化され、筋芽細胞への分化が促進される²⁴⁾。一方、転写調節因子である p53 というタンパク質はアセチル化を受けて活性を有する状態となるが、p53 の脱アセチル化も触媒する¹³⁾。つまり、SIRT1 は p53 活性を抑制することで、アポトーシスを抑制する。また、リガンド依存型核内受容体転写因子群の PPAR γ による転写活性化は脱アセチル化されることで抑制され、脂肪組織における脂肪の蓄積が抑制される²⁵⁾。さらに、PPAR γ の転写共役因子として同定された PGC1 (PPAR γ coactivator 1) も SIRT1 によって脱アセチル化される。脱アセチル化された PGC1 は糖新生に関わる遺伝子を誘導し、グルコース量を高める²⁶⁾。

これらの報告から、SIRT1 の活性増大は、脂肪が蓄積しないような代謝変動をもたらす。その一方で、糖新生、グルコース代謝を盛んにするような代謝変動をもたらすことで寿命を延長するらしい。しかしながら、なぜ、このような代謝変動によって寿命がのびるのか。精力的な研究が続いているので、近いうちに明らかにされるであろう。

3-3. ニコチンアミド代謝と SIRT1 との関係

ニコチンアミド代謝、NAD 代謝と SIRT1 との関係については、ワーラー変性遅延マウスという、神経損傷後の軸索変性(ワーラー変性)を起こしにくいマウスの解析から見つかった。

このマウスでは、ユビキチン鎖の伸長に関与する Ufd2a (ubiquitin fusion degradation protein 2a) と NAD⁺ 合成酵素であるニコチンアミドモノヌクレオチド腺ニリルトランスフェラーゼ (Nmnat1: ニコチンアミドモノヌクレオチド(ニコチン酸モノヌクレオチド) + ATP → NAD⁺ (NaAD⁺) + PPi。本酵素は核内に局在する)とのキメラタンパク質が過剰発現している。Araki らは²⁷⁾初代後根神経節細胞を用いて Nmnat1 の過剰発現が軸索変性を遅延することを明らかにした。軸索変性遅延は NAD⁺ 添加によっても認められ、この作用は SIRT1 siRNA によって抑制された。すなわち、ワーラー変性遅延マウスに見られた神経保護作用は、Nmnat1 によって核内 NAD⁺ レベルが上昇し、その結果、SIRT1 が活性化されたことに起因するものであると思われた。

Revollo ら²⁸⁾は、マウス繊維芽細胞を用い、ニコチンアミドをニコチンアミドモノヌクレオチドに変換するニコチン

アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(Nampt: 本酵素は生理的濃度の NAD⁺ によりフィードバック阻害を受けることにより、細胞内の NAD⁺ 濃度を一定に維持する機能を有する)の過剰発現によって細胞内 NAD⁺ レベルと SIRT1 発現が上昇したが、Nmnat の過剰発現およびニコチンアミド添加のいずれにもこの効果が認められなかったことを明らかにした。ニコチンアミド代謝が SIRT1 活性にどのような影響をあたえるのか明らかではないが、少なくともほ乳動物においても NAD⁺ 代謝を調節することによって SIRT1 の活性調節が可能であるようだ。

3-4. エネルギー制限による他の効果

エネルギー制限の効果には寿命延長のみならず、腫瘍形成、神経変性、自己免疫疾患、糖尿病など様々な疾病を防ぐことが知られている²⁹⁾。上述したように、Araki らの報告²⁷⁾は SIRT1 による神経保護作用を示している。また、SIRT1 の過剰発現により脂肪細胞形成が抑制され、脂肪細胞の脂肪分解が促進されることは、インスリン抵抗性、2 型糖尿病、アテローム性動脈硬化など肥満に関連した疾病の治療・予防に重要な知見を与えるものである³⁰⁾。このように、今後は、様々な疾病を SIRT1 がどのように防ぐことができるのかという研究が広く行われるようになることが予想される。さらに、NAD⁺ 代謝、ニコチンアミド代謝によって SIRT1 を制御できるようになることを期待したい。

4. ラットにおけるエネルギー制限がニコチンアミドの異化代謝におよぼす影響³¹⁾

このようなことを背景にして、今まで私どもが明らかに

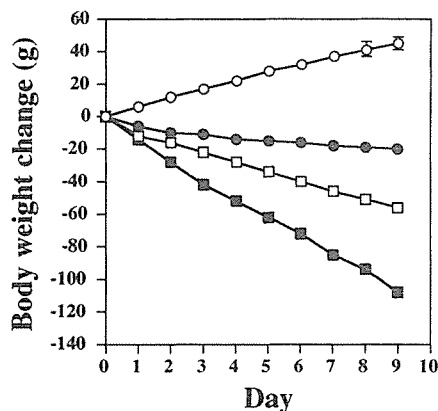


図3. エネルギー制限下で飼育したラットの体重変化。13週齢の雄 Wistar 系ラットを、通常食で10日間飼育した。飼料の摂取量を図中に示したように制限した。Control 群は、自由に摂取させた群、2/3 群は自由摂取群の飼料摂取量の 2/3 量を摂取させた。1/2 群は自由摂取群の飼料摂取量の 1/2 量を摂取させた。0 群は飼料を与えなかった飢餓群である。数値は平均値 ± SEM (n=5) で示した。○, CONTROL 群; ●, 2/3 群; □, 1/2 群; ■, 飢餓群。

してきたニコチンアミド代謝とその調節機構、核内での Sir2 とニコチンアミダーゼの反応機構の推測を紹介する。

図3は、ラットをエネルギー制限下で飼育した時の体重の変化を示したものである。全く飼料を与えないと、10日間ほどで死亡する。成熟ラットでは自由摂取群の2/3程度の制限で体重が一定に維持される。この2/3に食事を制限(体重が一定に維持される量)するとニコチンアミダーゼ活性が自由摂取群に比して、有意に高くなることを見いだした(図4)。また、ニコチンアミドを代謝する酵素であるニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ活性も有意に高くなることを見いだした(図5)。ほ乳動物でも食事制限(成熟ラットの体重が一定に維持される量程度の制限)で、ニコチンアミドの異化代謝が促進されることが明らかとなった。

事実として、ヒストンのアセチル化にはアセチル-CoAが必要、脱アセチル化にはNAD⁺が必要、しかし脱アセ

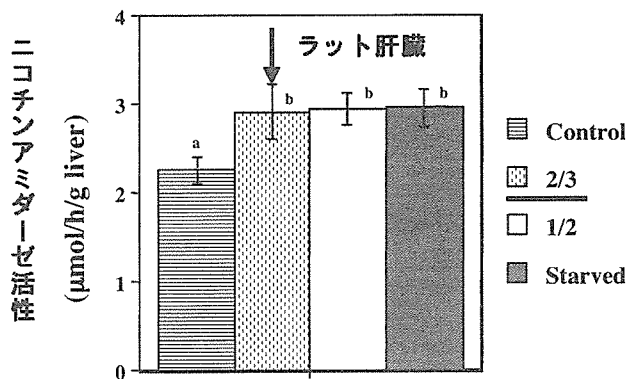


図4. エネルギー制限がラット肝臓のニコチンアミダーゼ活性におよぼす影響。値は平均値 ± SEM (n=5)で示した。異なる添え字は、Tukeyの多重比較試験で(p<0.05)で有意差が認められたことを示す。

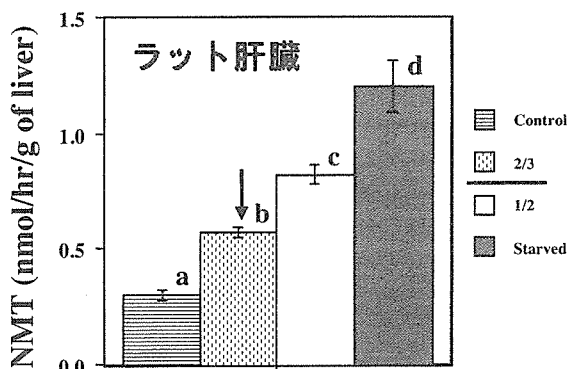


図5. エネルギー制限がラット肝臓のニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ活性におよぼす影響。値は平均値 ± SEM (n=5)で示した。異なる添え字は、Tukeyの多重比較試験で(p<0.05)で有意差が認められたことを示す。

チル化反応はニコチンアミドによって阻害される。ニコチンアミドはNAD⁺の前駆体である、一方で、NAD⁺が行った脱アセチル化をじゃまする。非常に奥が深い栄養素である。これ以降は将来のことであるが、ニコチンアミドの代謝とパントテン酸の代謝、この二つのB群ビタミンはエネルギー代謝と深く関わることをふまえ、年齢区分による最適PFC比(タンパク質:脂肪:炭水化物エネルギー比)を調べ、その上で年齢区分による適正なニコチンアミドの必要量とパントテン酸の必要量との関係を明らかにし、最終的に老化を抑制できる適正なB群ビタミン必要量にせまりたい。

最後に、結論が飛躍しているが、成熟後は、その体重を維持できるように食事量(エネルギー量)をコントロールすることが、老化を抑制し寿命を延ばすことに良いと思われた。では、B群ビタミンの摂取量はどうしたら良いかであるが、中年以降(40~50歳以上)では、仕事量も増え、緊張する仕事も増えるので、単位時間当たりの代謝が亢進する。このような時にはB群ビタミンの必要量が瞬間的に高まる。このような有事のために体内のB群ビタミンを飽和させておくことが重要となるのではと考えている。女子学生を被検者としたデータ(20歳ぐらいの女子での飽和摂取量)はすでにビタミンB研究委員会(第396回)³²⁾で報告したが、中高年を被検者とした実験を今後は是非行いたい。

おわりに

エネルギー制限や適度な刺激による寿命の延長は、酵母では*PNC1* (nicotinamidaseをコードする遺伝子)の発現を高めることを介して起こることが明らかとなった。つまり、Sir2のNAD⁺依存性脱アセチル化酵素活性により生ずる反応産物の1つであるニコチンアミドをニコチン酸としてすばやく除去することが、生物の寿命を支配している可能性がでてきた。ニコチンアミドをN¹-メチルニコチンアミドに変換する酵素 nicotinamide methyltransferase 活性の増大も寿命を延ばす。

ビタミン剤には主にニコチンアミドが使用されている。ニコチン酸には血管壁を拡張させ、皮膚を発赤させる副作用が100 mg/回の摂取で起こる危険性があるためである。しかし、細胞内に遊離のニコチンアミドが蓄積すると老化の抑制が阻害され、寿命が短縮される危険性がでてきた。ニコチンアミドの代謝を加齢という時間軸を入れた研究が必要となってきた。

(平成17.5.2受付)

文 献

- 1) Arking R (2000) 老化のバイオロジー (鍋島陽一, 北徹, 石川冬木 監訳) メディカル・サイエンス・インターナショナル

- 2) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**, 181-185
- 3) Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959
- 4) Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411
- 5) Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **87**, 953-959
- 6) Brachman CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**, 2888-2902
- 7) Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800
- 8) Kaerberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* **13**, 2570-2580
- 9) Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-2128
- 10) Lin S-J, Kaerberlein M, Andalls AA, Sturtz LA, Defossez P-A, Culotta VC, Flink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**, 344-348
- 11) Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230
- 12) Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-148
- 13) Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai S, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA (2001) hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-159
- 14) Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen H, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**, 45099-45107
- 15) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Cohen H, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI., Sinclair DA (2002) Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ level. *J Biol Chem* **277**, 18881-18890
- 16) Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, Cabo R, Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**, 390-392
- 17) Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**, 2105-2108
- 18) Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarante L (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factor. *Cell* **116**, 551-563
- 19) Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011-2015
- 20) Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukumizu A (2004) Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10042-10047
- 21) van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smith LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (SIRT1). *J Biol Chem* **279**, 28873-28879
- 22) Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* **23**, 2369-2380
- 23) Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* **16**, 237-243
- 24) Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y (2005) Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2alpha). *J Pharmacol Sci* **98**, 200-204
- 25) Picard F, Guarente L (2005) Molecular links between aging and adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **29** Suppl 1, S36-39
- 26) Rogers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118
- 27) Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* **305**, 1010-1013
- 28) Revello JR, Grimm AA, Imai S (2004) The NAD biosynthesis mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 50754-50763
- 29) Koubova J, Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes Dev* **17**, 313-321
- 30) Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* **429**, 771-776
- 31) Shibata K, Kondo T, Miki A (1998) Increased conversion ratio of tryptophan to niacin in severe food restriction. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 580-583
- 32) 柴田克己, 福渡 努, 佐々木隆造 (2004) ヒトにおける水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関係, ビタミン **78**, 374-375

ビタミン研究のプレクスルー：「パントテン酸」(II)

(2) パントテン酸 —発見とその栄養特性—

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻*

柴田 克己

Vitamins(Japan), 79(11), 539-542(2005)

1. 発見にいたる歴史

パントテン酸研究のはじまりを明確に何時からということとは難しいが、今、その歴史を振り返ってみると、20 世紀のはじまりの 1901 年の Wildiers¹⁾の酵母発育因子ピオスの研究に端を発したと考えるのが妥当であろう。それ(1901 年)以来、約 40 年間にわたって多くの研究者が様々な角度から、酵母発育因子ピオスに関する研究を続けてきた。

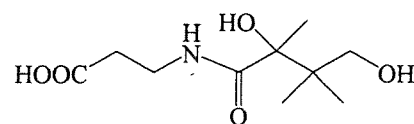
パントテン酸が高等動物の栄養素であることの発見は、ナイアシンやビタミン B₆ と同じく、ビタミン B₂ 複合体の欠乏に関する研究から始まったものである。1930 年代のビタミン研究者は、ビタミン B₂ 複合体の欠乏は人のペラグラや、ラットやニワトリなどの動物のペラグラ様症状を起こすものと考えていた。そして、ペラグラに対してはナイアシン(ビタミン B₃)の欠乏として解決され、ラットのペラグラ様症状はビタミン B₆ の欠乏として解決された。ニワトリのペラグラ様皮膚炎に関しては、ナイアシンやビタミン B₆ では治癒せず、濾液因子(filtrate factor)と呼ばれていたもので治癒することがわかっていた。そのような時期の、1939 年、Jukes²⁾および Woolley ら³⁾が、ほぼ同時に、ニワトリの皮膚炎に有効な因子が、すでに 1933 年に Williams ら⁴⁾により酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育因子群“ピオス”として発見され、パントテン酸(Pantothenic acid)と名付けられていたものと同じ化合物であることを証明した。この 1939 年が、ビタミンとしてのパントテン酸の発見であるといえる。ちなみに、パントテン酸という名前は、「いたるところに存在する酸」という意味である。構造式については、1938 年に、Williams⁵⁾によって、パントテン酸カルシウム塩の単離が、ついで 1940 年に化学合成の成功が報告され、構造が確定した⁶⁾。化学名は D-(+)-N-(2,4-ジヒドロキシ-3,3-ジ

メチルブチル-1)-β-アラニン)である(図 1)。

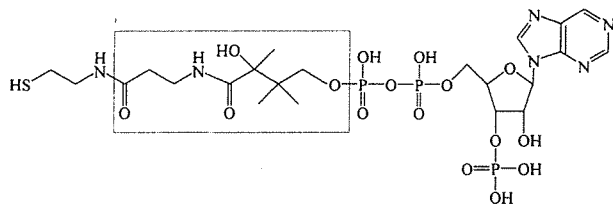
ペラグラの治癒因子がナイアシンであることの発見を Elvehjem の功績とする記述が多くあるが、正しくない。彼は農芸化学者であるので、人のペラグラの治癒に関する研究は行っていない。彼が行ったのは、黒舌病(人のペラグラに相当する)の犬にナイアシンを投与して治癒することに成功した、というのが正確な記述である。ニワトリの皮膚炎の治癒因子がパントテン酸であることの発見も彼が first author ではないが(Woolley が first author)、last author には Elvehjem の名前が付いている。彼の研究室では、ビタミンの発見だけではなく、さらにビタミンの微生物学的測定方法を考案し、食品のビタミン含量を測定し、人の必要量を検討し、公衆栄養学に貢献した。筆者は、1981 年から 1982 年にかけて米国ミネソタ大学にて研究活動を行ってきたが、その時に指導を受けた先生は LaVell M. Henderson で、彼は Elvehjem 先生の高弟である。したがって、筆者は Elvehjem 先生の孫弟子となる。ミネソタ大学では、筆者の得意なナイアシンではなく、パントテン酸の研究を行ってきた。市販されている C¹⁴-パントテン酸から市販されていない C¹⁴-CoA の合成には、「パントテン酸(I)パントテン酸およびコエンチーム A の合成と製造法に関する研究の展開」⁷⁾を書かれた清水昌先生が開発された *Brevibacterium ammoniagenesis* の乾燥菌体を利用した方法で合成した。帰国後は、ナイアシンに関する研究しか行っていなかったが、不思議な役回りでもパントテン酸に関する研究も 2002 年からはじめた。

では、人のペラグラをナイアシンで最初に治癒した人は、誰かという特定するのは難しい。パントテン酸に関しても、人におけるパントテン酸欠乏に特異的な欠乏症状が見いだされていないこともあり、誰が何時と特定することは困難である。しいていえば、パントテン酸の生体内における機能について、1947 年に Lipmann ら⁸⁾が、グルコース・脂肪酸・アミノ酸代謝に関わる補酵素 A (略称名

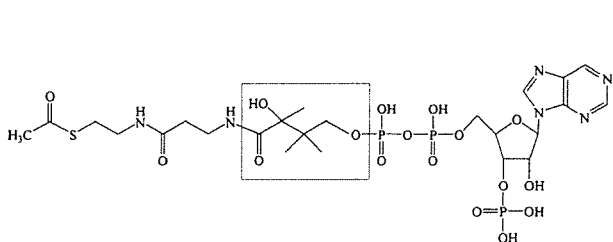
* 〒 522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500



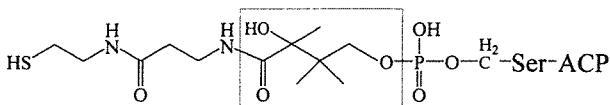
パントテン酸



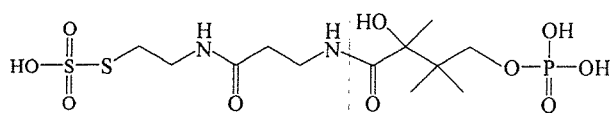
コエンザイム A=補酵素 A (CoA)



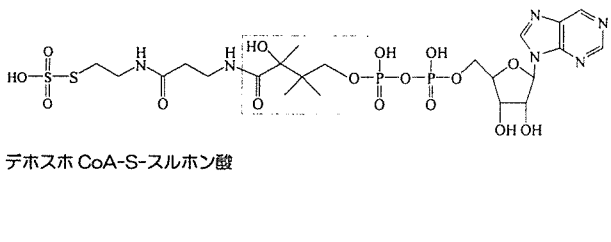
アセチル CoA



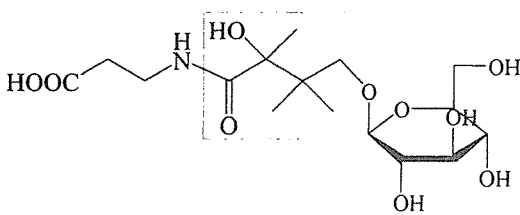
ACP の 4'-ホスホパンテテイン補因子



ホスホパンテテイン-S-スルホン酸



デホスホ CoA-S-スルホン酸



4'-O-(β-D-グルコピラノシル) D-パントテン酸

図 1. パントテン酸およびその誘導体の構造式²⁰⁾²¹⁾. □内がパントテン酸部分.

は CoA (図 1) がパントテン酸を含んでいることを発見したことを、あげることができる。

2. 栄養特性

2-1. きわめて現れにくい欠乏症

上述のように、パントテン酸は「いたるところに存在する酸」という意味である。筆者らが、女子学生を対象として調査した結果によれば、名の由来のごとく、多くの食品群からパントテン酸を摂取しており(図 2)⁹⁾、この報告によれば、エネルギー摂取量とパントテン酸摂取量の Pearson の相関係数は $r=0.658$ で、Fisher の相関係数の z 変換検定では $p < 0.0001$ であり、両者には有意な相関関係が認められた。このようにエネルギー摂取量と高い相関関係を有する栄養素の欠乏はきわめて現れにくい。

生化学的には、パントテン酸は、アセチル CoA (図 1) としてエネルギー代謝の中心代謝産物として、あるいはアシルキャリアタンパク質(ACP)の 4'-ホスホパンテテイン(図 1)補因子として脂肪酸合成の必須因子として機能している。生命の根幹に関わっている生体成分である。この

ような重要な生体成分を、なぜヒトを含む高等動物が栄養素として外部から摂る道を選んだのか、疑問である。パントテン酸と同等に生命の根幹に関わるビタミンがナイアシンである。ナイアシンはビタミンといいながら、トリプトファンからの生合成経路を有している。ヒトはパントテン酸の生合成経路を有していないのであろうか。Fry ら¹⁰⁾の報告によれば、ヒトに 9 週間もの間、パントテン酸を含まない食事を与えると、尿中の値はほとんど 0 となったが、血液中のパントテン酸濃度は低下せず、何ら欠乏症状も現れず、終始健康であったことが報告されている。きわめて欠乏しにくい機構がそなわっているのであろう。一例だけ、パントテン酸欠乏と思われる症例報告がある。Gopalan¹¹⁾によれば、第二次世界大戦中に栄養障害により多発したいわゆる Burning feet 症候群は、神経症状が著明であるが、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ニコチン酸の投与では改善されず、パントテン酸の投与が有効であった点から、パントテン酸欠乏がその原因であるという。Hodges ら¹²⁾の論文の中に、 ω -メチルパントテン酸を投与した一人の被験者が感覚異常となり、足の底が焼け

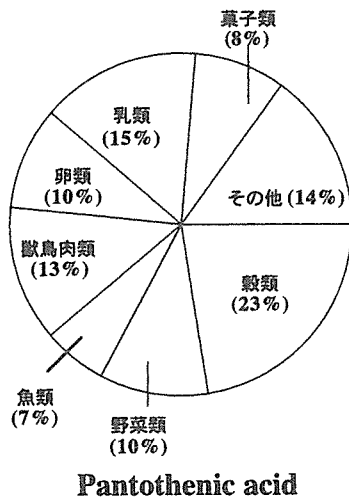


図2. 総パントテン酸の食品群別摂取量⁹⁾.

付くような感覚を持ったが、症状がでた数日後に自然に消えた、という記載がある。この足が焼け付くような感覚異常が、人におけるパントテン酸欠乏の特徴的な症状である可能性がある。

動物を使用した欠乏実験では、脂質代謝に障害があらわれ、脂肪肝を起こし、その他の組織中の脂質やコレステロール量も影響される。パントテン酸欠乏動物が各種のストレスに対し、抵抗力が弱いことは副腎機能を通して推定することができる。また、塩類および水分代謝の障害も、下垂体-副腎系の障害を介するものと推定できる。ストレスや環境悪化ではパントテン酸の消費が高まることが知られている。たとえば、ラットを寒冷下におくと、肝臓のCoAレベルが上昇する¹³⁾¹⁴⁾。一方、老化した動物の組織・臓器のCoA含量が低下することが報告されている¹⁵⁾。がん組織は正常な対照の組織と比較してCoAおよび総パントテン酸値が低い。例えば、正常なマウス肝臓の総パントテン酸量は285 μmol/gであるが、マウスの肝がんであるHepatoma MH-134では36 μmol/gと1/8という低い値である¹⁶⁾。

2-2. 乳児期は脂質エネルギー比率が高いためパントテン酸の必要量が高い

母乳中の総パントテン酸含量は5.0 mg/l程度である¹⁷⁾。他のB群ビタミン含量に比してきわめて高い。総パントテン酸と書いたのは、遊離型のパントテン酸と補酵素型(おそらくCoA)が乳中に存在するからである。補酵素型の存在割合はおおむね総パントテン酸の1/3程度である。CoAは吸収する前に、消化されてパントテン酸となる必要がある¹⁸⁾と思われるが、なぜ母乳中に補酵素型が存在するのであろうか。乳児は補酵素型をそのままの形で吸収できるのであろうか。

乳児期のパントテン酸必要量が高いのは、CoAが脂肪

代謝と深い関わりがある事と関係がある。乳児期では、総エネルギーの50%は脂質から供給される。また、馬杉¹⁹⁾によれば、全血中の総パントテン酸濃度は新生児が最も高く、成人になるにつれて漸減していくことが報告されている。したがって、パントテン酸必要量は、脂質摂取量当たりで考えた方がよいのかもしれない。

2-3. 食品中から見出された種々のパントテン酸誘導体とその生体利用率

天然にはパントテン酸はCoAや4'-ホスホパンテテイン以外にも、パントテン酸-CoA生合成系中間体が見いだされている。さらに、ニンジンにはホスホパンテテイン-S-スルホン酸(図1)、デホスホCoA-S-スルホン酸(図1)が見いだされている²⁰⁾。トマトには4'-O-(β-D-グルコピラノシル)D-パントテン酸(図1)が見いだされている²¹⁾。動物・植物中に存在するパントテン酸の形態は遊離型のパントテン酸よりも結合型の方が多い。従って、食事として摂取するパントテン酸は、主としてCoAやパンテテイン誘導体の形が多い。しかし、腸管から吸収される時には、小腸内の酵素によってパンテテインにまで加水分解され、血液中にあらわれる主な形はパントテン酸である¹⁸⁾。合成品のパントテン酸を摂取させた時の尿中総パントテン酸排泄量と米国で通常食されている食事由来のパントテン酸を摂取させた時の尿中排泄量の比較から、食事中的パントテン酸の生体利用率は40~61%(平均値は50%)であることが報告されている²²⁾。

2-4. パントテン酸の血液中の濃度は加齢により低下する

筆者ら²³⁾は、5 mg/日のパントテン酸を投与した一定の食事管理下での実験で、男女間で差異はなく、全血中の値は2.5 nmol/ml程度と報告している。馬杉ら¹⁹⁾は、全血中の総パントテン酸および遊離パントテン酸含量が加齢にともなって低下することを報告している。これは、脂肪酸の代謝能力と関係があると推測される。石黒²⁴⁾は40歳以上の農村婦人約200名の全血中の総パントテン酸濃度を測定した結果、結合型パントテン酸含量のみが、加齢につれて減少する傾向を示し、その傾向は40歳代の婦人(4.5 nmol/ml程度)と50歳代の婦人(3.6 nmol/ml程度)の間において最も著明であった、と報告している。

2-5. パントテン酸の栄養状態の指標としての尿中排泄量

18~24歳の女性を被験者とした時のパントテン酸摂取量と尿中へのパントテン酸排泄量との関係²⁵⁾を図3に示した。この図の関係式を読みとって、筆者が、最小二乗法で計算すると $y = 0.362x + 2.76$ となり、Pearsonの相関係数は $r = 0.866$ で、Fisherの相関係数のz変換検定では $p < 0.0001$ となり、パントテン酸摂取量と尿中へのパントテン酸排泄量との間には有意な相関関係が認められた。

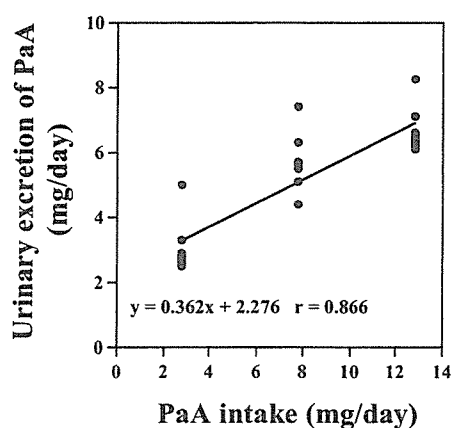


図3. 18～24歳の女性を被験者とした時のパントテン酸摂取量と尿中への総パントテン酸排泄量との関係²⁵⁾。

つまり、尿中のパントテン酸排泄量は、摂取パントテン酸量を鋭敏に反映していることを示している。筆者ら²³⁾は、日本人の若年成人男女を被験者として、5 mg/日のパントテン酸を投与した時の尿中排泄量は、約3 mg/日であったと報告している。

肝障害時のパントテン酸の尿中排泄量に関して、植嶋²⁶⁾により肝疾患患者の尿中パントテン酸の排泄量が調べられている。肝疾患患者においては、健常人に比して、パントテン酸負荷前尿のパントテン酸排泄量ならびにパントテン酸カルシウム20 mg筋注後の排泄増加量はいずれも低値を示し、これら肝疾患患者ではパントテン酸の絶対的ないし相対的な欠乏があるものと思われた。つまり、肝障害時にはパントテン酸の必要量が高まることを意味している。

文 献

- Wildiers E (1901) Nouvelle substance indispensable au developpement de la levure. *Cellule* **18**, 313-331
- Jukes TH (1939) Pantothenic acid and the filtrate (chick antidermatitis) factor. *J Am Chem Soc* **61**, 975
- Woolley DW, Waisman HA, Elvehjem CA (1939) Nature and partial synthesis of the chick antidermatitis factor. *J Am Chem Soc* **61**, 977-978
- Williams RJ, Lyman CM, Goodyear GH, Trusdail JH, Holaday D (1933) "Pantothenic acid," a growth determinant of universal biological occurrence. *J Am Chem Soc* **55**, 2912-2927
- Williams RJ (1938) A Textbook of Chemistry, New York, Van Nostrand
- Williams RJ, Mitchell HK, Weinstock HH, Jr, Snell EE (1940) Pantothenic acid. VII. Partial and total synthesis studies. *J Am Chem Soc* **62**, 1784-1790
- 清水 昌 (2003) (1) パントテン酸およびコエンザイム A の合成と製造法に関する研究の展開. *ビタミン* **77**, 95-99
- Lipmann F, Kaplan NO, Novelli GD, Tuttle L C, Guirard BM (1947) Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative. *J Biol Chem* **167**, 869-870
- Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, Hayakawa F, Shibata K (2003) Vitamin intakes in Japanese college women students. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**, 149-155
- Fry PC, Fox HM, Tao HG (1976) Metabolic response to a pantothenic acid deficient diet in humans. *J Nutr Sci Vitaminol* **22**, 339-346
- Gopalan C (1946) The burning-feet syndrome. *Ind Med Gaz* **81**, 22-26
- Hodges RE, Ohlson MA, Bean WB (1958) Pantothenic acid deficiency in man. *J Clin Invest* **37**, 1642-1657
- Campbell J, Green GR, Socol H (1960) Effects of exposure to cold on acetylation in the rat. *Can J Biochem Physiol* **38**, 171-174
- Tsujikawa M, Kimura S (1981) Effect of exposure to cold on pantothenic acid metabolism in rat liver. *Tohoku J Exp Med* **133**, 457-460
- Mascitelli-Coriandoli E, Citterio O (1960) Pantothenäure und Hoden-coenzym A bei alternden Tieren. *Naturwissenschaften* **47**, 183-184
- 木村修一, 有山 恒 (1967) パントテン酸代謝に及ぼす粗トキソホルモンの影響. *ビタミン* **36**, 293-295
- 渡邊敏明, 谷口歩美, 福井 徹, 太田万理, 福渡 努, 米久明得, 西牟田 守, 柴田克己 (2004) 日本人女性の母乳中ピオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量. *ビタミン* **78**, 399-407
- Shibata K, Gross CJ, Henderson LM (1983) Hydrolysis and absorption of pantothenate and its coenzymes in the rat small intestine. *J Nutr* **113**, 2207-2215
- 馬杉矣三 (1972) 小児および幼若動物におけるパントテン酸代謝 (I) 小児の血液および尿中パントテン酸量. *ビタミン* **46**, 261-265
- Yoshioka M, Tamura Z (1971) Bifidus factors in carrot. II. The structure of factor in fraction IV. *Chem Pharm Bull* **19**, 178-185
- Amachi T, Imamoto S, Yoshizumi H (1971) A growth factor for malo-lactic fermentation bacteria. Part II. Structure and synthesis of a novel pantothenic acid derivative isolated from tomato juice. *Agric Biol Chem* **35**, 1222-1230
- Tarr JB, Tamura T, Stokstad EL (1981) Availability of vitamin B₅ and pantothenate in an average American diet in man. *Am J Clin Nutr* **34**, 1328-1337
- Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N (2005) Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**(5), 319-328
- 石黒弘三 (1971) 婦人の血中パントテン酸量と加齢について. *ビタミン* **44**, 96-99
- Fox HM, Linkswiler H (1961) Pantothenic acid excretion on three levels of intake. *J Nutr* **75**, 451-454
- 植嶋達之 (1957) 肝障害時におけるパントテン酸代謝. (I) 健康人ならびに肝疾患患者の尿パントテン酸排泄量について. *ビタミン* **10**, 108-114

ニコチンアミド代謝による寿命延長の可能性

摂取エネルギー制限によって寿命が延びることは酵母、線虫、クモ、昆虫、魚類、哺乳類などで認められており、生物に共通した現象のようである。既に本誌のトピックスで紹介したが¹⁾、酵母ではエネルギー制限による寿命の延長には NAD⁺ 依存性ヒストン脱アセチル化酵素である silent information regulator 2 (Sir2) が必須であり、Sir2 阻害作用を持つニコチンアミドを除去することによって寿命が延長する²⁾³⁾。ほ乳動物には Sir2 のホモログとして sirtuin (SIRT) ファミリーが存在し、SIRT1 が酵母 Sir2 に最も近いホモログである。となると、ヒトにおいても SIRT1 によって寿命を延長することが可能であるのか、また、SIRT1 の活性は NAD やニコチンアミド代謝を調節することによって制御できるのかは大変興味深い。しかし、酵母のような細胞レベルの寿命と、ヒトなど高等動物の個体としての寿命とを同一に論じることには多少の疑問も感じる。前稿¹⁾に引き続き、本稿では 2004 年に入ってから続々と発表されている SIRT1 に関する報告について紹介する。

Cohen らは⁴⁾、自由摂取群の 60% に制限した食餌で離乳直後から 12 ヶ月間飼育したラットを用い、各組織における SIRT1 の発現量を調べたところ、脳、脂肪組織、腎臓、肝臓など多くの組織で自由摂取群に比べて発現量が増加していたことを報告している。また、彼らは、食餌制限ラットの血清でヒト腎細胞を培養すると SIRT1 発現量が増加したが、この血清で低値を示したインスリンあるいは IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) を添加するとこの効果は消失した。食餌制限ラットの血清はストレス性アポトーシスを抑え、この作用はドミナントネガティブ SIRT1 の発現および SIRT1 siRNA によって消失したことを報告している。これらの結果は、酵母と同様にはほ乳動物においてもエネルギー制限によって SIRT1 が活性化することを示している。15 時間絶食したマウスの肝臓、骨格筋においても SIRT1 発現量が増加することから⁵⁾、SIRT1 の標的となる転写因子として p53⁶⁾⁷⁾、フォークヘッド転写因子⁸⁾¹¹⁾、NF- κ B¹²⁾ が報告されており、これらの転写因子はいずれも細胞周期、アポトーシスに関与する。SIRT1 発現量の増加には p53、フォークヘッド転写因子の Foxo3a を必要とすることから⁵⁾、ネットワークを形成した複雑な制御機構かもしれないが、SIRT1 はこれらの転写因子を制御あるいは相互作用を介して細胞を死から生存の方向へ切り替える役割を持つようである。

NAD 代謝と SIRT1 との関係については、ワラー変性遅延マウスという、神経損傷後の軸索変性(ワラー変性)を起こしにくいマウスの解析から見つかった。このマウスでは、ユビキチン鎖の伸長に関与する Ufd2a (ubiquitin

fusion degradation protein 2a) と NAD 合成酵素であるニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (Nmnat1: ニコチンアミドモノヌクレオチド(ニコチン酸モノヌクレオチド) + ATP \rightarrow NAD⁺ (NaAD⁺) + PPi。本酵素は核内に局在する) とのキメラタンパク質が過剰発現している。Araki らは¹³⁾ 初代後根神経節細胞を用いて Nmnat1 の過剰発現が軸索変性を遅延することを明らかにした。軸索変性遅延は NAD 添加によっても認められ、この作用は SIRT1 siRNA によって抑制された。すなわち、ワラー変性遅延マウスに見られた神経保護作用は、Nmnat1 によって核内 NAD レベルが上昇し、SIRT1 が活性化されたことに起因するものであった。Revollo らは、マウス繊維芽細胞を用い、ニコチンアミドをニコチンアミドモノヌクレオチドに変換するニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (Nampt: 本酵素は生理的濃度の NAD⁺ によりフィードバック阻害を受けることにより、細胞内の NAD⁺ 濃度を一定に維持する機能を有する) の過剰発現によって細胞内 NAD レベルと SIRT1 発現は上昇するが、Nmnat の過剰発現およびニコチンアミド添加のいずれにもこの効果が認められないことを明らかにした¹⁴⁾。ニコチンアミド代謝が SIRT1 活性にどのような影響を受けるのか明らかではないが、少なくともほ乳動物においても NAD 代謝を調節することによって SIRT1 の活性調節が可能であるようである。

エネルギー制限の効用には寿命延長のみならず、腫瘍形成、神経変性、自己免疫疾患、糖尿病など様々な疾病を防ぐことが知られている¹⁵⁾。上に紹介した Araki らの報告¹³⁾ は SIRT1 による神経保護作用を示している。また、SIRT1 の過剰発現により脂肪細胞形成が抑制され、脂肪細胞の脂肪分解が促進されることは、インスリン抵抗性、2 型糖尿病、アテローム性動脈硬化など肥満に関連した疾病の治療・予防に重要な知見を与えるものである¹⁶⁾。このように、今後は、様々な疾病を SIRT1 がどのように防ぐことができるのかという研究が広く行われるようになることが予想される。さらに、NAD 代謝、ニコチンアミド代謝によって SIRT1 を制御できるようになることを期待したい。

(滋賀県大 人間文化 生活文化 食生活
福渡 努, 柴田 克己)

文 献

- 1) 柴田克己, 福渡 努, 佐々木隆造 (2003) ニコチンアミド代謝が寿命を支配する. *ビタミン* 77, 465-470
- 2) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Cohen H, Lin SS, Manchester JK, Gordon JI, Sinclair DA (2002)