

生体内酸化反応機構研究における新展望

New Insight into Mechanism of Biological Oxidation Reactions

山形大学理学部 教授 西田 雄三
YUZO NISHIDA

Yamagata University, Faculty of Science, Department of Material and Biological Chemistry, Professor

1. はじめに

早石・Mason教授らによって[酸素添加酵素]が発見されてから50年がたった¹⁾。当初はキノコや緑膿菌に限られた酵素と考えられていたが、その後の研究でこれら「酸素添加酵素」は、広く地球上で酸素分子を利用する生物にとって非常に重要な酵素であることが明らかにされ、その重要性は現在でもますます広がっている^{1)~4)}。

酸素添加酵素は、いわゆる有機物に酸素分子の1個、または2個の酸素原子を導入する反応(式1、式2)を触媒する。式中、Sは基質(有機物)を指す。



もちろん空气中で酸素分子と反応する有機物も少なくはないが、我々のからだの構成成分、アミノ酸・核酸塩基などは酸素分子とは直接反応しない。しかし生体内ではこのように空气中では反応しない有機物の酸素化反応が生命活動を維持するために絶対に必要であり、我々人類を始め地球上の生物は「酸素添加酵素」とは切っても切れない関係にある。

通常では有機物とは反応しない酸素分子が酵素によって触媒され反応するので、当然その機構解明が化学者の注目の的となった⁵⁾。非常に多くの「酸素添加酵素」が発見されたいま、実に多くの機構が提案されてきた¹⁾。確かに、多くの「酸素添加酵素」が存在するので、多くの「反応機構」が存在するのも理解できるが、しかし、なにそこに「共通項」がないかを求めたいのも研究者の気

持ちである。

これまでの酸素添加酵素の反応機構解明では、まず酵素の金属イオンと酸素分子との反応からいわゆる「活性酸素種」が形成し、それが基質と反応するという考え方で研究が進められてきた。そして多くの一原子酸素添加酵素では、「活性酸素種」は高原子価金属イオンと切断された酸素分子由来の酸素原子を含むと考えられている。しかし、モデル反応および最近の生体酵素の反応に関する研究から、①ESO₂またはESCO₂複合体(E, S, 及びCは、酵素、基質、および補酵素を示す)の形成に周辺基・基質が大きく関与している、②ESO₂またはESCO₂複合体中での酸素分子誘導体の反応性は金属イオンの周りの周辺基と基質に依存しており、とくに基質の化学的性質が反応機構・生成物を決定している、ことなどが明らかにされつつある。これらの事実は、酸素添加酵素の多様な反応性は、ESO₂(またはESCO₂)複合体中での酸素分子誘導体と基質を含めた周辺有機物との相互作用が多様であることが原因であり、その相互作用の結果として酸素-酸素結合が切断されると考えるべきであることを示唆している。

ここではモデル反応に関する結果を中心にして述べるが、「まず酵素の金属イオンと酸素分子との反応からいわゆる[活性酸素種]が形成し、それが基質と反応するという従来の考え方」の是非を検討して欲しいと思う。

2. チトクロムP-450の反応機構の研究

数多くある「酸素添加酵素」研究の中でも多くの研究者が注目した酵素のひとつが表題のチトクロムP-450であろう^{6)~10)}。ヘム鉄を含むことと人体での重要な作用の

観点から、生化学者のみならず多くの化学者が機構研究に加わった。その中でも、1983年にGrovesによって提案された機構⁸⁾が注目を浴び、現在でも多くの教科書にこの機構が示されている。

Groves機構は、図1に示したとおりである。要点は中間で生成するFe(III)-O₂²⁻-鉄(III)-パーオキシド付加体が、プロトンと反応してO-O結合が切れ、高原子価鉄オキソ種(この場合Fe(V)=O)が生成し、それが基質(カンファーを基質とする酵素で最初に指摘された)と反応して、オキソ酸素原子が基質に移動して、酸素添加反応が終わるという考えである。

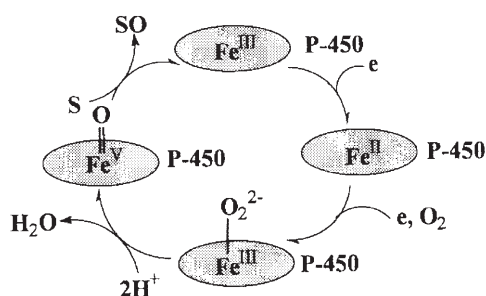
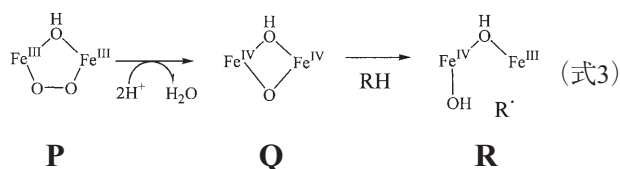


図1 Groves 機構

最初Grovesによって提案された高原子価鉄オキソ種(Fe(V)=O)は、現在ではFe(IV)-porphyrin ラジカル(Compound I)と考えるべき¹⁰⁾と修正されているが、まずO-O結合の切断を考え、そして高原子価鉄オキソ種という活性種が生成するという考え方は、現在でも多くの他の酵素反応機構解明に引き継がれている。たとえば、同じ一原子酸素添加酵素である、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)の反応機構¹¹⁾(式3)においては、Compound P(二核鉄(III)種のパーオキシド付加体)がプロトンと反応して、O-O結合が切れ、高原子価鉄種(この場合はFe(IV)のCompound Q)が生成し、それがメタンと反応すると信じられている。



同じ考え方が、チロシン水酸化酵素でも引き継がれている。この酵素に対するFitzpatrickらの機構を図2に示した¹²⁾。この場合、補酵素(プテリン)が反応に関与するが、最初

に酸素分子がプテリンと反応して、プテリン-OOH体が形成され、それが鉄(II)イオンと作用してO-O結合の切断とともに、Fe(IV)=O種が形成し、それがチロシンと反応して一つの酸素原子の添加反応が進行するというものである。

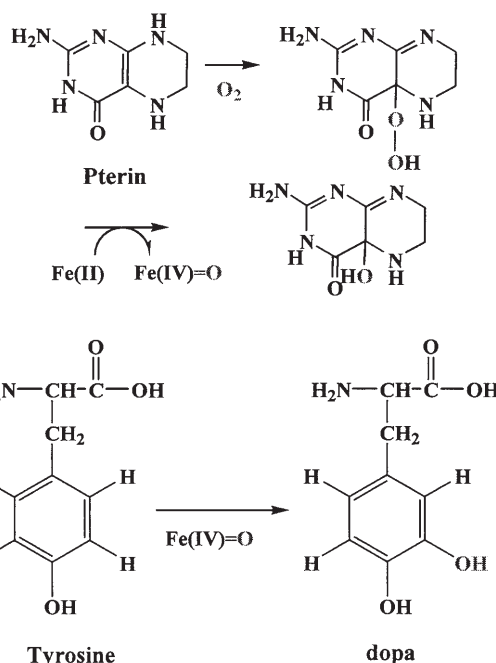


図2 Fitzpatrickらの機構

多くの「酸素添加酵素」の反応機構の解明にはそこに「共通項」を見出し、それを基にして統一的に考えたいという考えは理解できるが、ただそれが正しければである。残念ではあるが最初にGrovesによって提案された高原子価鉄オキソ種(Compound I)は、現在でもチトクロムP-450の酵素反応中では見出されていない¹⁰⁾。もちろん、反応中に見出せないから、その機構が間違っているとはいえないが、以下に示すように、もともとこの機構は大きな問題点を含んでいた。

私は化学者の立場から、このGroves機構に異議を唱えてきた。まず、第一は鉄(III)-パーオキシド付加体がプロトンと反応して、O-O結合が切れるという過程である。ご承知のように、酸素分子でO-O結合が切れるのは3電子移動が起きて始めて起きるのである。プロトンとの反応過程では、電子移動は関係していない¹³⁾。プロトンとの反応でpull and push機構が作用するという考えが出されているが、まともな議論ではない。

次に指摘したいのは、チトクロムP-450で言えば、鉄(III)-パーオキシド付加体が生成したときの周辺環境に注意すべきである。すでに知られているように、チトクロムP-

450では、反応の開始となる電子移動は基質の接近で開始される。たとえば、カンファーを水酸化するP-450 (P450_{CAM})では、電子が移動する時点(鉄(III)・パーオキサイド付加体が生成する直前の構造)では、図3のような構造になっている¹⁴⁾。

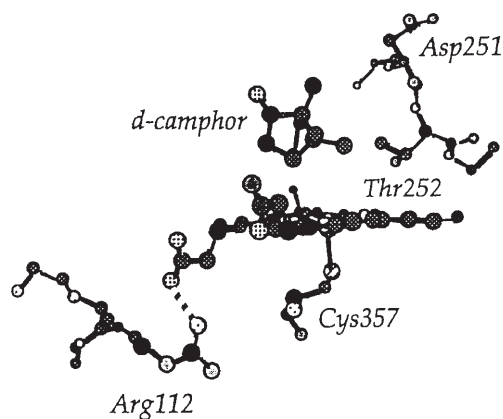


図3 カンファーを水酸化するチトクロームP-450鉄(III)・パーオキサイド付加体が生成する直前の構造

電子移動反応を伴って鉄(III)・パーオキサイド付加体が形成されたとき、それは周辺基(とくにスレオニン252など)や、基質(この場合カンファー)と相互作用できる状態にある。Groves機構ではこのような状況はいっさい考慮されていない。私は、この状態における鉄(III)・パーオキサイド付加体と基質との反応性の重要性を最初に指摘した¹⁵⁾。そして、このときの鉄(III)・パーオキサイド付加体の反応性で重要なのは、その電子親和性であることをEHMO計算で指摘した(Fe^{III}(NH₃)₅(OOH)のLUMOとFe^V=O(NH₃)₅のLUMO(図4)の挙動は非常に似ている。

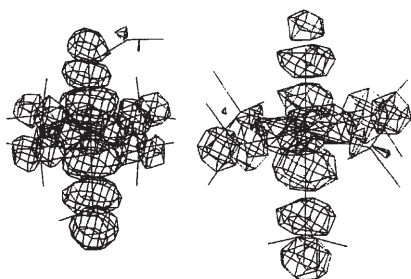


図4 Fe^{III}(NH₃)₅(OOH)(左)とFe^V=O(NH₃)₅(右)のLUMO (Polyhedron, 13(1994), 2473)

メタンモノオキシゲナーゼに関するQueの機構では、Compound P(二核鉄(III)・パーオキサイド付加体)はプロトンと反応してO-O結合が切れると主張されている。本当だろうか。いくつかのMMOの鉄(III)状態での構造は解っているが、それから判断して、私が最初に合成した、

Fe₂(HPTB)(OH)⁴⁺種(図5)は適当なモデル錯体のひとつであるといえる¹⁶⁾。

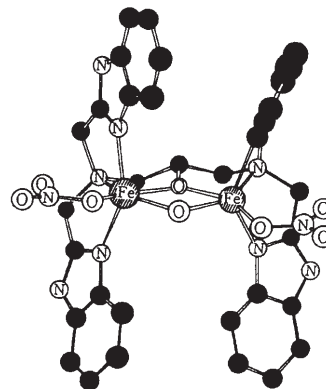


図5 Fe^{III}₂(HPTB)(OH)⁴⁺の構造

この二核鉄(III)錯体に過酸化水素を加えると、いわゆるCompound Pのモデル化合物を得ることができる(後にQue等によってその誘導体の構造決定がなされた¹⁷⁾)。ここで注目して欲しいのは、Fe₂(HPTB)(OH)⁴⁺から得られるパーオキサイド付加体は水中でも有機溶媒中でも安定で、その青色は長時間保持できる。酵素中とピーカー中とでは環境が違うといわれればそれまでではあるが、この二核鉄(III)・パーオキサイド付加体の水中での安定性からみて、それがプロトンと反応してO-O結合が解裂するという考えには、とても承服できない。O-O結合の切断には、電子供与体が必要で、それは基質・周辺基であると指摘してきた^{13), 18)-22)}。

同じようなことがチロシン水酸化酵素でも見出されている。この酵素では、基質であるチロシンが存在しなければ鉄(II)イオンと酸素、酸素とプテリンとの反応が進行しない²³⁾。この酵素の反応過程で指摘されている鉄(IV)イオン状態が生成するためには酵素の鉄イオン上の電子密度がかなり高くなる必要があるが、結晶構造¹²⁾から見てそれはリポキシゲナーゼのそれ(6章、参照)よりも少ないと推測できる。リポキシゲナーゼの反応の時さえ、鉄(IV)イオン状態のことが議論されない現状で、チロシン水酸化酵素でそれを議論することは無機化学者としては容認できない。Fitzpatrickらは、チロシン接近による蛋白の構造変化が反応の開始に重要であると述べているが、単純に彼の機構で反応が理解できるというものではないことは明らかである。

一般に酵素反応では、酵素と基質の複合体形成の重要性が指摘され、このことは常識である。これを酸素添加

酵素に当てはめれば、複合体は ESO_2 とかける。ここから反応が進行するのであるが、Groves、Que、Fitzpatrickらの機構では、この複合体形成の意義を無視し、まず EO_2 (または ECO_2)でいわゆる活性酸素種が生成し、それが基質と反応すると考えている点に問題がある。

最近になって、酵素の構造解析の結果が増え、その結果、反応過程における基質・周辺基の関与の重要性を指摘する論文が目立つようになってきた^{24)–26)}。ここでは、酸素分子が関与する反応における基質・周辺基の重要性を、モデル反応から得られた結果を中心に述べる。

3. 周辺構造・基質が支配する銅(II)–パーオキサイド付加体の反応性

チトクロムP-450、メタンモノオキシゲナーゼ、ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼなどの反応過程で金属イオン–パーオキサイド付加体が形成される場合が指摘されているが、これは電子移動を含めた一原子酸素添加酵素の反応(式4)から理解できる。式4は、反応途中で過酸化水素が形成されていることを意味するので、私は金属イオン–パーオキサイド付加体がどのような性質を持っているかを集中的に調べた。



私が研究対象としたのは銅(II)、鉄(III)錯体である。最初に銅(II)錯体から述べる。錯体では、配位子が必要であるが、議論をしやすいするために、金属イオンの配位環境は同じにして、周辺部位(過酸化水素と相互作用できる部位)だけを変えるようにした。実際のもので見ていただくとわかる。

一連の配位子の構造を図6に示した。そして代表例として $\text{Cu}(\text{bdpg})\text{Cl}^+$ 錯体の構造を図7に示した²⁷⁾。銅(II)イオンの平面配位の4つの位置は同じで、3個の窒素原子(脂肪族アミンと2個のピリジン環の窒素原子)と塩化物イオンである。そして5番目の配位座はリガンドのカルボニル酸素原子がきている。ここまでの構造は全ての配位子((tpa)は除く)で同じである。これらの錯体の溶液に、過酸化水素を加えると、平面内の塩化物イオンが過酸化水素と置き換わり、銅(II)–パーオキサイド付加体が形成するように設定されている。

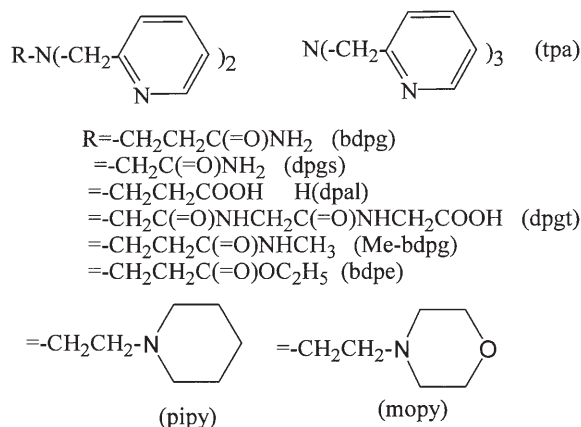


図6 銅(II)錯体合成に使用された配位子の構造

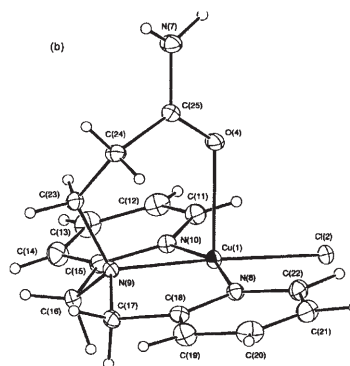
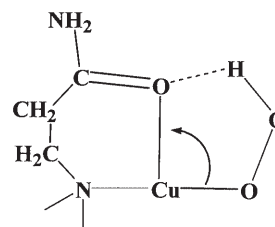


図7 $\text{Cu}(\text{bdpg})\text{Cl}^+$ の構造



スキーム1 パーオキサイド付加体

さて、このようなパーオキサイド付加体(スキームI)が形成したとき、パーオキサイドイオンは、配位子といろいろな相互作用が可能である。たとえば $\text{Cu}(\text{bdpg})$ 錯体では、水素結合が可能であるが、その可能性はO(カルボニル)–Cu–O(パーオキサイドイオン)の角度(以後角度O–Cu–Oと呼ぶ)やCu–O(カルボニル酸素)の距離に依存すると予想される。残念ではあるが、われわれはこの付加体をすべて結晶として単離できないので、角度・距離の効果をこれ以上議論できないが、この溶液に基質を加え、反応生成物を調べることで、上の議論ができる。

銅(II)錯体の溶液にシクロヘキサン・過酸化水素を加え、酸素化物(シクロヘキサノール、シクロヘキサノン)を定

量するとそこに大きな差が出てくる²⁷⁾ (図8の活性化の順序を参照されたい)。

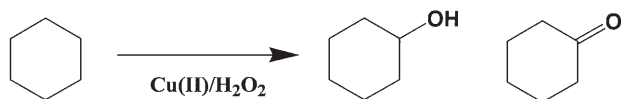
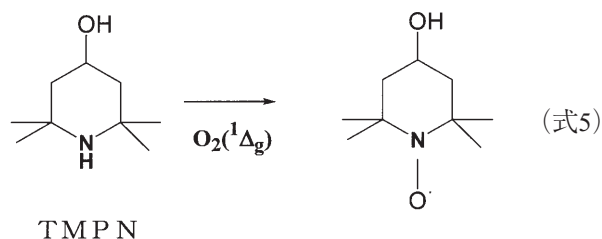


図8 錯体の活性化の順序: Cu(bdpg) > Cu(dpgs) >> Cu(tpa) ~ 0

Cu(tpa) 錯体は過酸化水素と水素結合できる部位を持たない(パーオキシド付加体形成ができない)ので、シクロヘキサンの酸素化に活性がないのは理解できる。Cu(bdpg)とCu(dpgs)の差は、後者の錯体では角度O-Cu-O(スキーム I, 参照)が大きい(101°)のでCu(bdpg)錯体と比較してパーオキシド付加体が形成しにくいことで説明されている。もちろん角度だけでは議論できないが(錯体の電荷・Cu-O距離の影響)、明らかなことは、銅(II)錯体に過酸化水素を加えて活性酸素種が生成し、それが基質(今の場合、シクロヘキサン)と反応するという単純な考えは通用しないということである。

基質としてスピントラップ剤を用いると、シクロヘキサンとはまったく異なった結果が得られる。ここではTMPNという通常一重項酸素($^1\Delta_g$)検出用の試薬を用いた結果(式5)について述べる。



ナイトロラジカル形成に伴って3本のESRシグナルが観測できる。奇妙なことに、過酸化水素とCu(bdpg)Cl、TMPNを混合しても、シグナルは見えない。ところが、Cu(tpa)Cl、TMPNの溶液に過酸化水素を加えると、ESRシグナルの増大が観測できるのである。これは、TMPNはCu(bdpg)錯体で予想されるパーオキシド付加体とは反応しないこと、Cu(tpa)錯体の溶液では、Cu(bdpg)錯体に予想されるのは違った付加体が形成され、そしてそれはTMPNの存在下で初めて形成することを示唆している²⁸⁾。

これをもう一度、Cu(mopy)ClとCu(pipy)Cl錯体で見よう。これらの2つの錯体の構造(図9)はまったく同

じで、違いといえば、Cu(pipy)錯体の周辺のシクロヘキサン環の炭素原子が、Cu(mopy)錯体では酸素原子になっているだけである²⁹⁾。

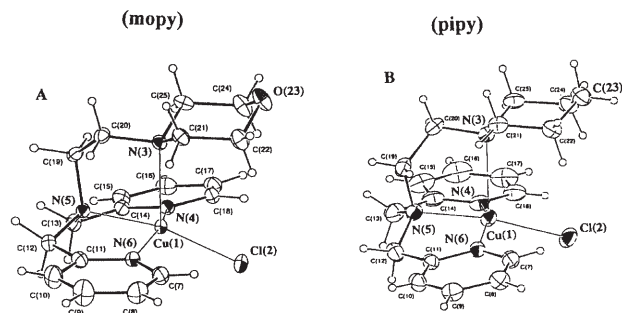


図9 Cu(mopy)ClとCu(pipy)Cl錯体の構造

しかし、この2つの錯体は、過酸化水素存在下でのTMPNとの反応でまったく違った挙動を示す。図10にあるように、大きなESRシグナルはCu(mopy)錯体に観測されるが、Cu(pipy)錯体にいっさい見られない。これは、パーオキシド付加体形成が、配位子のごくわずかな変化で誘導されてくるという事実を示し、微少な周辺基の違いが銅(II)錯体-パーオキシド付加体の形成・反応性を支配していることを示す貴重なデータである。同様な反応性における違いがDNA切断反応でも見出されていることは興味深い³⁰⁾。これらの錯体溶液のESRを詳しく見てみると、過酸化水素付加体形成は、TMPN(ここでは基質である)の添加で誘導されており、いわゆるESO₂の生成が重要であることを示している²⁸⁾、³⁰⁾。

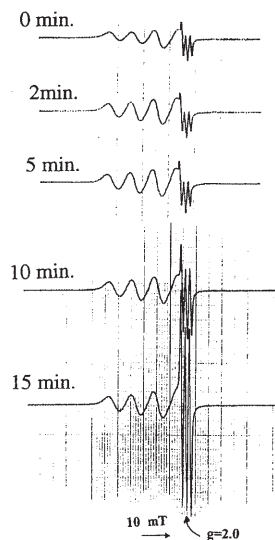


図10 Cu(mopy)Cl、TMPN及び過酸化水素混合溶液のESRスペクトル

次にパーオキサイド付加体が蛋白のC-N結合を切断できることを示す例(図11)を挙げる。Cu(Me-bdpg)Clという錯体は、(bdpg)配位子の末端にペプチド結合でメチル基がついたものである(図6)。この錯体Cu(Me-bdpg)Cl錯体に過酸化水素を加え、パーオキサイド付加体ができると、このパーオキサイドイオンは末端の基に接近する。このとき、加水分解が起きれば、Cu(Me-bdpg)錯体からCu(dpal)錯体が形成し、C-Nのペプチド結合の酸化的切断が起きればCu(bdpg)錯体が生成する。実際には、Cu(dpal)の生成は見えず、形成するのはCu(bdpg)錯体のみであった³¹⁾。これはCu(II)-OOH種は、蛋白のC-N結合を酸化的に切断できることを示している。

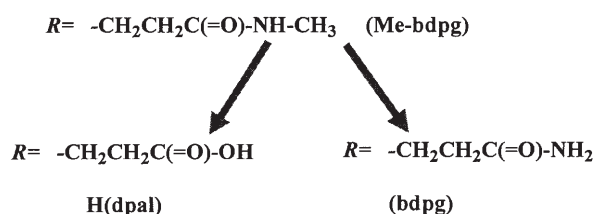


図11 パーオキサイド付加体が蛋白のC-N結合を切断する事例

これは、Cu(bdpg)Cl錯体とアミロイド蛋白(1-40)との溶液に過酸化水素を混合すると、アミロイド蛋白(1-40)が分解・消失するという事実と一致する³²⁾。Cu(tpa)錯体ではこのような変化を観測できない。このCu(II)-OOH種の反応性についてのわれわれのDFT計算によれば、角度O-O-H(スキームI、参照)に大きく依存し、この角度が小さいほど酸化的切断が可能という結果を得ている²⁰⁾。これはCu(II)-OOHの反応性は、Cu(II)-O(カルボニル酸素原子)の距離に依存することを示唆している。これを支持している例を示す。

Cu(bdpe)Cl錯体は、カルボニル酸素原子にエチル基がついている(図6参照)。構造解析の結果から、この錯体のCu(II)-O(カルボニル酸素)は、2.48 Å(平均)と、Cu(bdpg)Cl錯体のそれ(2.287 Å)よりずっと長いことがわかっている³³⁾。この環境下ではパーオキサイド付加体での角度(O-O-H:Oは過酸化水素分子の酸素原子:図12)は、Cu(bdpg)Cl錯体のそれより大きくなると予想される(図13)。この錯体と過酸化水素、アミロイド蛋白(1-40)を混合すると、Cu(bdpg)錯体とは違ってアミロイド蛋白(1-40)は分解されず、35位のメチオニンの硫黄原子の酸素化(図12)が大きく促進されることが明らかになった³³⁾。これは、Cu(II)-OOHの反応性は周辺基でコントロールされている

ことを示す格好の例である。

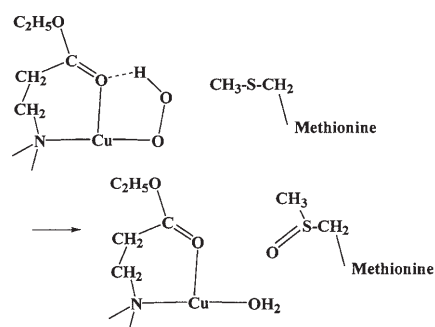


図12 35位のメチオニンの硫黄原子の酸素化

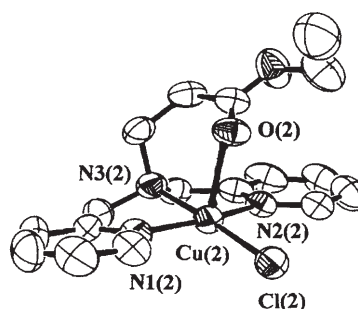


図13 Cu(bdpe)Cl錯体の構造 Cu(2)-O(2), 2.481 Å

4. 周辺構造・基質が支配する鉄(III)-パーオキサイド付加体の反応性

銅(II)錯体で見られたのと同様の結果が鉄(III)錯体でも得られているが、ここでは2-3の例を示す。最初にフェノール基を含む鉄(III)錯体に関する結果について述べる。配位子として用いたものの構造を図14に示した。

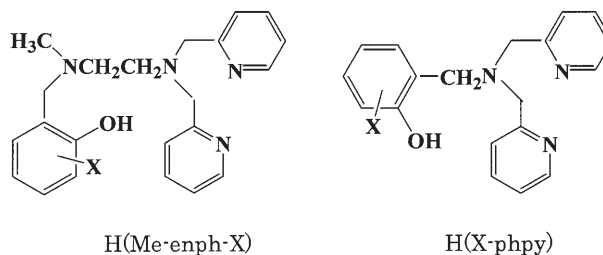


図14 フェノール基を含む鉄(III)錯体の配位子

フェノール基の配位を含むので、いずれの鉄(III)錯体も紫色系の濃い色を示す³⁴⁾。

これらの鉄(III)錯体の溶液に過酸化水素を加えていくと、いくつかの錯体ではその特有な色が消失していく。それは、鉄(III)イオンへのパーオキサイド付加体の形成を伴って、そのパーオキサイドイオンがフェノールと反応し、

フェノール環の分解によることが、マスペクトルの解析から明らかになった³⁵⁾。ここで重要なのは、パーオキシド付加体形成が、フェノール環上の置換基、Xに大きく依存していることである。電子吸引基、たとえばニトロ基 (X=5-NO₂, 3-NO₂) がつくと、フェノール環の分解は極端に遅くなり、逆に電子を押し出す基、例えば3-メキシ基の場合は、フェノール環の分解が非常に早くなる。すでに、この種のパーオキシドイオンは[電子親和性]を示すことが示唆されているが、HOMOエネルギーの高いフェノール環との電子的相互作用(図15)を介して、パーオキシド付加体の形成が促進され、フェノール環の酸素化・分解が進行するのである³⁵⁾。

このような状態でパーオキシドイオンは活性化されるので、アルカン類の酸素化反応は、フェノール環上のXにより依存すると予想される。実際、この種の錯体によるシクロヘキサンの酸素化は、X=H, 3-CH₃Oで高い活性が見られ、X=5-NO₂, 3-NO₂錯体にはその活性はない³⁶⁾。

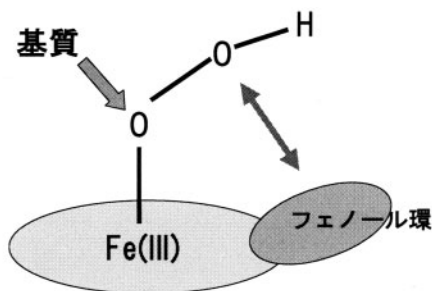


図15 HOMOエネルギーの高いフェノール環との電子的相互作用

次に二核構造鉄(III)錯体の例を挙げる。配位子の構造を下に示した。(nta)、(pac)などの鉄(III)錯体は、いずれもオキソ架橋二核構造をとっている³⁷⁾(6章)。

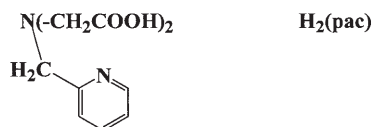
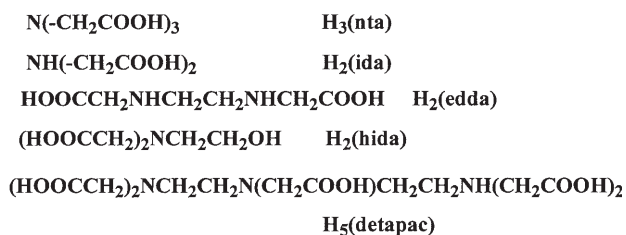


図16 二核構造鉄(III)錯体の配位子の構造

この中で、Fe(III)-(nta)錯体を動物に投与すると、100%発ガンすることが判っている。一方、構造は同じであるが、Fe(III)-(pac)錯体を動物に投与しても、発ガンも障害もまったく起きない³⁷⁾。これは、後者の(pac)配位子にピリジン骨格が存在するために起きる現象で、このように周辺基の効果が生体内での多くの病気の発症とも密接に関連している³⁷⁾(6章)。

5. 電子移動のない二原子酸素添加反応での周辺基・基質の効果

酸素添加酵素は一原子酸素添加酵素と二原子酸素添加酵素に分類されているが、反応機構から言えば、大きな違いがある。一原子酸素添加酵素では、式4で示したように、電子移動とともに過酸化水素の生成が起きている。これに対して、二原子酸素添加酵素では、式2で示されるように、純粋に酸素分子のみが反応に関与し、電子の授受は関与しない。



一例としてリポキシゲナーゼをみてみよう。この酵素は不飽和脂肪酸の過酸化反応を触媒する酵素(図17)で、その多様な機能は生体防御を研究する上で重要である。

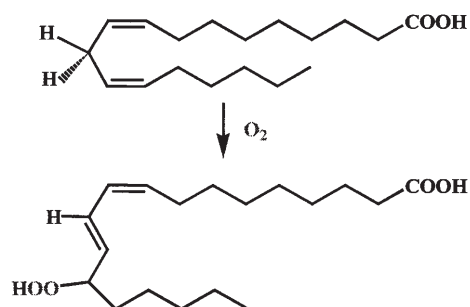


図17 不飽和脂肪酸の過酸化反応

大豆由来のリポキシゲナーゼについては構造決定がなされており、その配位構造も明らかになっている(図18)³⁸⁾。この酵素の特徴は、酵素として単離されたときの鉄イオンは2価であるが、空気中でもこの鉄(II)イオンは酸素分子とは反応しないことにある。しかし、酵素活性の出現のためには鉄(III)イオンに酸化されなければいけないが、現在でもその酸化剤は不明である。また、その鉄(III)イオンが

どのようにして酸素分子の活性化を行うのかについては、いろいろな機構が提案されているが、納得のいくものではない³⁸⁾。

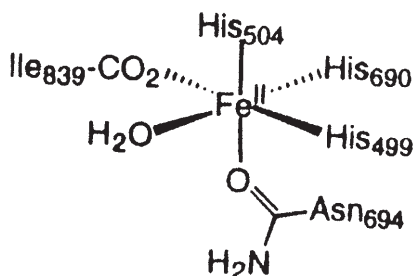
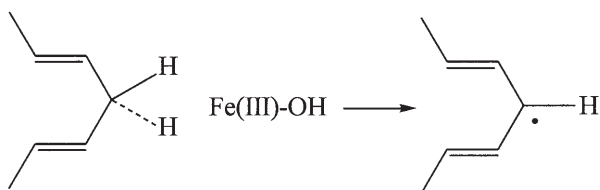


図18 大豆由来のリポキシゲナーゼの配位構造

現在認められている機構は、鉄(III)イオンが不飽和脂肪酸と相互作用して電子移動によってラジカル形成が起き(スキームII)、このラジカルが酸素分子と反応するというものであるが、①反応中の鉄(III)イオンの酸化状態の変化が明白には捉えられていないこと、②反応中に生成した鉄(II)イオンがどのようにして鉄(III)イオンに酸化されるのかが説明ができていないことなどから、納得できる機構ではない。Coreyらは、鉄(III)イオンと有機物が直接的に結合したFe(III)-C結合を推定しているが、これも化学的な原則・常識と矛盾している。Nishidaらは、鉄(III)イオンが酸素分子と相互作用する機構を提案し、それを支持するデータを発表している³⁹⁾。現時点では、ラジカル説が有力視されているが、ここではNishidaらの従来の概念とはまったく違った機構について述べる。



スキームII 鉄(III)イオンと不飽和脂肪酸との相互作用

1991年、Mukaiyamaらは、ニッケル(II)錯体がアルデヒドの存在下、オレフィンのエポキシ化に高い活性を示すことを発表した。この機構は合成化学者の注目を引いたが、最初に機構を提案したのがNishidaらである。Nishidaらは、アルデヒドのニッケル(II)イオンへの配位に伴ってアルデヒドと酸素分子との相互作用が酸素分子のニッケル(II)イオンへの配位を促進し、酸素分子のニッケル(II)イオンへの配位を介して酸素分子が一重項酸素性($^1\Delta_g$)を帯び、こ

れがオレフィンへの高いエポキシ化(図19)の原因であることを指摘した⁴⁰⁾。

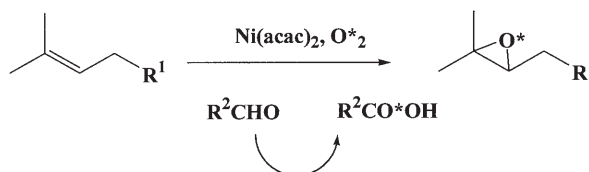


図19 一重項酸素性($^1\Delta_g$) 酸素分子のオレフィンのエポキシ化への関与

ここで注目されるのは、次の事柄である。

- ①反応中ニッケル(II)イオンの酸化状態には変化がない
- ②ニッケル(II)イオンの不対電子との相互作用を介して、酸素分子の反応性が大きく変化する
- ③この反応でコバルト(II)イオンやマンガン(II)イオンを用いるとこれらの金属イオンは酸化される(コバルト(III)イオンやマンガン(IV)イオン)

オレフィンのエポキシ化は、図20に示した中間体の生成が起きるかどうかで決まる⁴⁰⁾。通常ニッケル(II)水和物の溶液でニッケル(II)イオンの不対電子と酸素分子の不対電子との相互作用は、配位している水分子のため起きない。しかし、アルデヒド(高いHOMOエネルギーを持つ系;ニッケル(II)イオンへ配位する力が大きい)がニッケル(II)イオンに配位したとき、アルデヒド分子と酸素分子との相互作用を介して、酸素分子の不対電子とニッケル(II)イオンの不対電子との相互作用が促進され、図20で示した酸素分子がニッケル(II)イオンと結合した中間体が形成する²¹⁾。

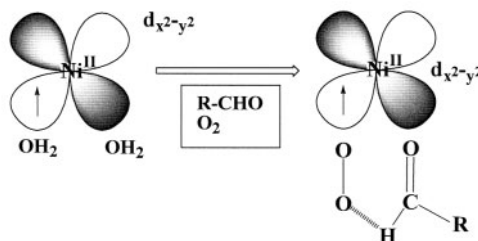
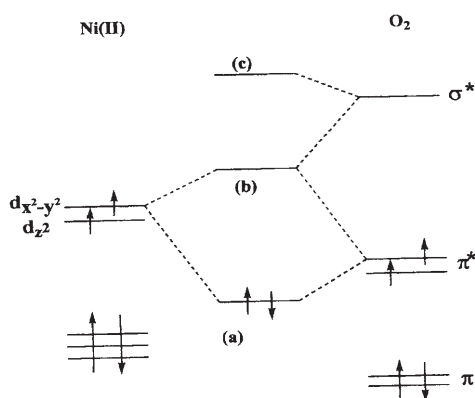


図20 オレフィンのエポキシ化に関する中間体の生成

このニッケル(II)イオンと酸素分子の不対電子との相互作用の結果、スキームIIIで示した軌道(b)が形成する。この軌道の形成は酸素分子が、部分的に一重項酸素性を帯びることを示唆し、このためこの酸素分子に高い反応性が出るようになる^{21)、40)}。我々の実験から、Ni

(*acac*)₂/aldehyde/O₂系の溶液に一重項酸素に特異的な試薬と反応する酸素分子の存在が実証されている⁴⁰⁾。



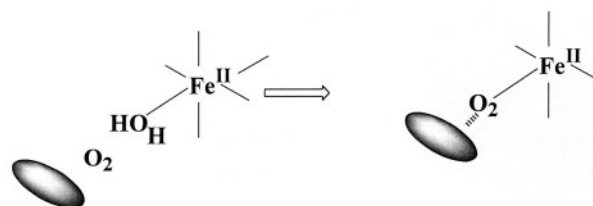
スキーム III ニッケル (II) イオンと酸素分子の対電子との相互作用による軌道の形成

この結果は、金属イオンの酸化状態が変化することなく酸素分子の活性化が可能であることが始めて明らかにされた意味で画期的な事実である。ここで大切なことは、酸素分子が活性化を受けるにはニッケル (II) イオンの対電子と相互作用しなければいけないが、そのためにはアルデヒド分子との電子的相互作用が必要であるということである^{21), 40)}。

我々は、この考えをリポキシゲナーゼの反応機構の解明に応用した。すでに述べたように大豆由来のリポキシゲナーゼの鉄 (II) イオンは、そのままでは酸素分子とは反応しない (すなわち、空气中で自動的に鉄 (III) イオンには酸化されない)。これは鉄 (II) イオンに配位している水分子が酸素分子の対電子と鉄 (II) イオンとの相互作用を妨害しているからである。実際の酵素の反応では鉄 (III) イオンで進行するので、何らかの方法で酸化されねばならない。実験室系では、13S-HPODE (13S-hydroperoxyoctadecadienoic acid:有機過酸化物) などで酸化して得るが⁴¹⁾、これらはリポキシゲナーゼの反応生成物であって生体系ではそれがいつも準備されているわけではない。

なんとかしてこれと類似の化合物を基質存在下で合成しなければいけないのであるが、それが可能なのである。上で述べた向山反応を適用すればよい。すなわち、リポキシゲナーゼ反応では、酸素分子の存在下で基質 (不飽和脂肪酸) が接近すれば、基質と酸素分子との相互作用が、酸素分子の鉄 (II) イオンへの配位を促進する。その

結果水分子の位置に酸素分子が置き換わった複合体が形成される (スキーム IV)。



スキーム IV リポキシゲナーゼ反応における基質と酸素分子の相互作用

すでに述べたように、スキーム IVにおける酸素分子は一重項酸素性を帯びる。次式のごとく、一重項酸素性は、オレフィン化合物に容易に付加することは明らかになっているので、この中間体内で不飽和脂肪酸との反応で過酸化物が生成し、この過酸化物が鉄 (II) イオンを酸化すると考えれば実験結果を合理的に説明できる⁴⁰⁾。

1,3-Addition(ene-reaction)



1,4-Addition(Endperoxide formation)

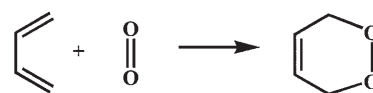


図21 一重項酸素 (¹Δ_g) に特異的な反応例

さて、つぎに鉄 (III) イオンの状態での不飽和脂肪酸の過酸化反応が問題となる。多くの論文では、活性化されている鉄 (III) イオン (その理由は不明) が、不飽和脂肪酸と反応してラジカル形成を行うと信じられている (スキーム II)³⁸⁾。しかし、われわれは、向山反応の結論が鉄 (III) 錯体にも適用できることを見出した³⁹⁾。即ち、上のスキーム IVで、鉄 (II) イオンの代わりに、鉄 (III) イオンでもこの反応が進行するのである。実際にいくつかの鉄 (III) 錯体、とくにサイクラム (図22、左) を配位子とする鉄 (III) 錯体が、その酸化状態 (+3価) を変えることなく、同様な中間体形成 (図22、右) を伴って不飽和脂肪酸の過酸化反応を触媒できる³⁹⁾。ここで興味深いのは、サイクラム錯体では2つの幾何異性体が存在するが、トランス型のみが高い活性が見られ、シス型には一切活性がない。それは図22、右に示すように、酸素分子との水素結合の存在が中間体形

成・活性化発現と関連しているようである。



図22 サイクラムを配位子とする鉄(III)錯体と基質との相互作用

実はこのような鉄(III)イオンがその酸化状態を変えずとなく、酸素分子と相互作用することはすでにNishidaらによって指摘されていた⁴²⁾。

二核鉄(III)錯体、 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})^{4+}$ の溶液にリノレン酸を加えると、多くのTBARSが検出できる⁴²⁾。このTBARSの検出は溶液内にマロンジアルデヒドが生成していること⁴³⁾を意味し、これはリノレン酸の過酸化反応が二核鉄(III)錯体 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})^{4+}$ の存在で進行したことを示している(図23)。

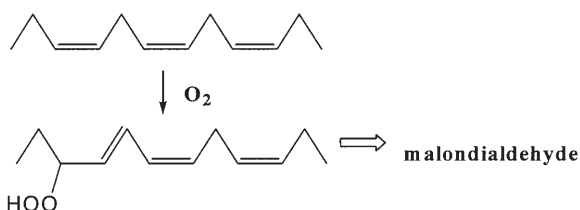


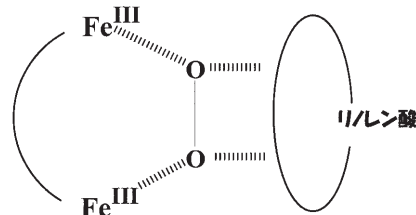
図23 二核鉄(III)錯体 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})^{4+}$ の存在で進行するリノレン酸の過酸化反応

この二核鉄(III)錯体 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})(\text{OH})^{4+}$ による過酸化反応の機構として、スキームIVで述べたのと同様な機構が提案されている。すなわち、リノレン酸の存在下で酸素分子は2個の鉄(III)イオンと相互作用し(スキームV)、一重項酸素性を示すようになり、そのために不飽和脂肪酸への付加反応が進み、過酸化物が生成し、そこからマロンジアルデヒドが生成したのである。この場合も、はじめから二核鉄(III)錯体と酸素分子が相互作用しているのではなく、リノレン酸が存在して初めて複合体(スキームV)が形成され、反応が進行するのである^{42)、44)}。

ここで推定されている基質存在下での酸素分子と金属イオンの不対電子との相互作用の存在を電気化学的手法で実証することができる。DMSO中での酸素分子とオキソバナジル(IV)錯体のサイクリックボルタンメトリー(CV)を測定すると、図24のように観測できる⁴⁵⁾。酸素分子

は -0.78 V 付近で可逆な酸化還元波を示す(図24、B)。この領域にはバナジル(IV)イオンが関与する酸化還元波はない(図24、A)。 $\text{H}_2(\text{salen})$ (図24)、 $\text{H}_2(\text{acen})$ やアセチルアセトン配位子とするオキソバナジル(IV)錯体の存在下で、酸素分子のCVを測定すると、ポルフィリンを配位子とする錯体などでは見られない奇妙なCVが観測できる(図24)。

まず第一に、酸化波が消失しているが、これは生成したスーパーオキシドイオンが、これらのオキソバナジル(IV)錯体と相互作用していることを示唆する。



スキームV リノレン酸の存在下2個の鉄(III)イオンと相互作用する酸素分子

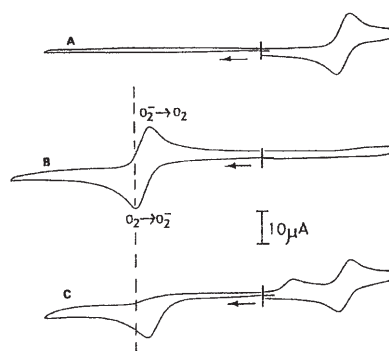


図24 DMSO中でのサイクリックボルタンメトリー
A:VO(acen)〔アルゴン下〕、B: O_2 、C:VO(salen) and O_2

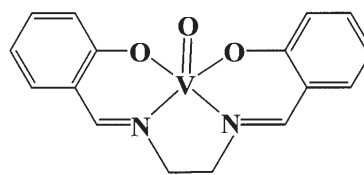


図25 VO(salen)錯体の構造

次に、還元波もかなり変化していることがわかるが、この還元波を更に詳しくみると、酸素分子の還元電位近傍で、2種類の酸素分子の存在が確認できる(図26、A、B)。図4で、 $-0.70\sim-0.80\text{ V}$ 領域に見られる酸素分子の還元波について、スキャン速度を遅くして測定すると明らかに2種類の波になる(図26、A、B)。これは他のたとえば、マンガン(II)イオン錯体の存在下でも観測できる⁴⁰⁾。2個の還元波のうち、より正側の波は、金属イオンの不対電子と

弱く相互作用した酸素分子(スキームVI) によると結論された。オキソバナジル(IV) 錯体ではその1個の対電子は配位原子のない領域に広がっているd-軌道に存在している点に特徴があり⁴⁵⁾ (スキーム VI)、H₂(salen)、H₂(acen) やアセチルアセトンを配位子とする錯体では、スキーム VIで示されたような相互作用が可能であるが、ポルフィリンの錯体ではこの相互作用が不可能(問題のd-軌道がすべて配位子で覆われてしまうため)で、ポルフィリンの錯体が存在しても、酸素分子の酸化還元波には影響がない。

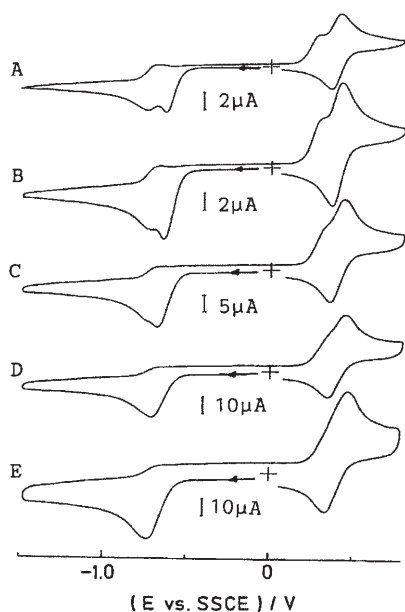
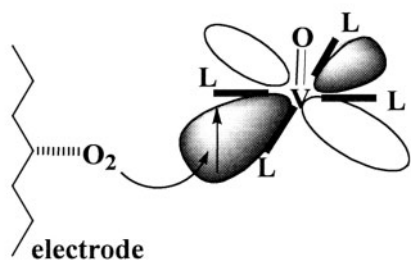


図26 スキャン速度を変化させて得られた酸素分子存在下での[VO(salen)] 錯体溶液のサイクリックボルタンメトリー
Scan speed/A:20 mVs⁻¹, B: 50 mVs⁻¹, C:200 mVs⁻¹, D:500 mVs⁻¹, E: 1000 mVs⁻¹.

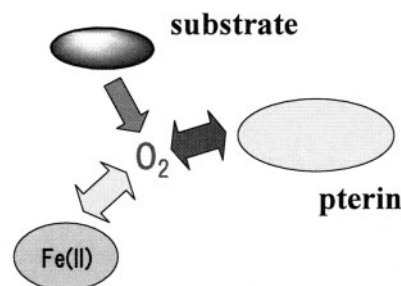


スキーム VI H₂(salen), H₂(acen) やアセチルアセトンを配位子とする錯体の相互作用

改めて述べるが、還元的条件(この場合は電極)が存在して初めてオキソバナジル(IV) 錯体と酸素分子との相互作用が起きる。同様に、スキームIVでは基質が存在して初めてESO₂複合体が生成し、酸素分子と鉄(II)イオンとの結合が生じ、酸素分子の活性化が行われ、これが

「基質と酸素分子」の共存という条件下で鉄(III) 錯体の場合でも同様に起きる、ということである。

ここでMukaiyama反応とチロシン水酸化反応を比較してみると、非常に似ていることがわかる。すなわち、チロシンとオレフィン、補酵素のプテリンとアルデヒドが、それぞれに対応している^{19), 21)}。このように考えると、チロシン水酸化酵素ではESCO₂形成(スキーム VII)に伴って酸素分子の活性化が行われると考えるのが最適であり、この機構によればFitzpatrickらが見出した事実、チロシンが無いと酸素分子は鉄(II)イオンと反応しないということも容易に理解できる。この場合、補酵素を必要としているのは、リポキシゲナーゼとチロシン水酸化酵素での鉄イオンの代わりに配位環境の違い、すなわち鉄イオン上の電子密度の違いによることを再度認識していただくと同時に、チロシン水酸化酵素でのO-O切断反応において補酵素・基質が重要な寄与をしていることを理解されたい。



スキーム VII チロシン水酸化酵素のESCO₂形成

6. 活性酸素の生成・作用に関する新しい考え方

酸素分子はエネルギー源であるATP合成や、毒物代謝・生理活性物質の合成に重要な役目を果たしていることが酸素添加酵素の発見(早石・Mason教授ら)以来、明らかにされ、その重要性はますます広がっていることはすでに述べた。その一方で、非常に寿命の短い**活性酸素**が体内で産生され、それが殺菌や物質の代謝に関与していることも、1969年のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の発見でわかったが、この活性酸素は我々の体に障害を与え、現代病といわれるガンや、心筋梗塞、糖尿病、リュウマチをはじめとする脳浮腫・白内障・神経性疾患、種々の虚血および自己免疫疾患の引き金となっていることが指摘されている⁴⁶⁾。私たちは小さいころから、「酸素は生物にとって大切なもの」と教えられてきたが、そ

の常識を変えなければいけない時代になっている。

「活性酸素」なる言葉がいろいろな学者によって語られ、それが市民権を得てから20年以上も経つ⁴⁶⁾。それ以来、マスコミや多くの著作などでお目にかかった方も多いと思う。ところで、[活性酸素とはなにか]と聞かれたときに、きちんと答えられる人もほとんどいないのでなかろうか。じつは[活性酸素]の本当の姿がわかっていないので、やたらと「活性酸素」と言っているのが現状である。この現状をこれまでの議論に基づいてより科学的に論じてみたいと思う。

まず「活性酸素」として考えられている化合物をまとめて簡単に示す。酸素分子はご承知のように不対電子2個を持つ、いわゆるラジカルである。酸素分子の誘導体であるスーパーオキシドイオンも不対電子1個を有するのでラジカルであるが、過酸化水素は不対電子を持たず、ラジカルではない。生体中の多くの有機物は不対電子を持たないが、いくつかの有機物は不対電子を持ち、ラジカルであるが、このような化合物は時々フリーラジカルと呼ばれている。例として、 $\text{LOO}\cdot$ (ペルオキシラジカル) や $\text{LO}\cdot$ (アルコキシラジカル) などがある。動物はATPを産出する過程でキサンチンオキシダーゼ(XOD)によって少量のスーパーオキシドイオンが生成する。スーパーオキシドイオンはSOD酵素で分解され、過酸化水素と水になる。過酸化水素はカタラーゼ・グルタチオンペルオキシダーゼなどで分解される。過酸化水素は白血球に含まれるミエロペルオキシダーゼによって塩化物イオンとの反応から次亜塩素酸イオンを生じ、直接的・間接的なルートで殺菌作用を示す。次亜塩素酸イオンは再度過酸化水素と反応すると一重項酸素を生成する。

さて現在でも多くの論文・著書の中で、生物に多大な障害を与える活性酸素として恐れられ、引用されているのが、ヒドロキシルラジカル($\text{OH}\cdot$)である⁴⁶⁾。ヒドロキシルラジカルの生成機構として、次に示す式Aと、Fenton反応と呼ばれる式Bが提案されているが、生体中ではどうであろうか。



一般に「活性酸素」は非常に不安定で、その検出は容易ではない。ヒドロキシルラジカルや一重項酸素の体内で

の障害がしばしば指摘されているが、注意して欲しいのは、ヒドロキシルラジカルや一重項酸素の生体内での生成・発生を考えなくても、生体内での障害発生の説明が可能であることが、これまで述べてきた議論(上述の3~5章)でおわかりいただけると思う。たとえば、 $\text{OH}\cdot$ ラジカルの検出方法としてスピントラップ法がある⁴⁶⁾。確かに、DMPOは $\text{OH}\cdot$ ラジカルと反応して、DMPO-OHを与えるかもしれないが、DMPO-OHを与えるのは、 $\text{OH}\cdot$ ラジカルのみではない。たとえば、二核鉄(III)錯体の溶液にDMPOを加えると、DMPO-OHが検出できる⁴⁷⁾。これはスキームVで述べたように、DMPO存在下での酸素分子の活性化によって生成したために観測できるのであり、DMPO-OHの検出が即、ヒドロキシルラジカルの検出とはいえない。また、二核鉄(III)錯体の溶液に過酸化水素を加え、DMPOを加えると、大量のDMPO-OHを検出できる⁴⁷⁾。これは二核鉄(III)-パーオキシド付加体とDMPOとの反応で生成するのである。しかもFenton反応ではフリーの鉄(II)イオンの存在を必要とするが、体液中ではその濃度は極端に低いので、本当に生体内で $\text{OH}\cdot$ が関与しているかは非常に疑わしい。同様に生体内反応での一重項酸素の関与も、それが発生しているのではなく金属-パーオキシド付加体の生成⁴⁸⁾やすでに述べた向山反応(5章、参照)などの例で説明が可能なのである。これが実態だと思っていただければ良いと思う。

では、いわゆる活性酸素以外に、酸化ストレスの原因となるものがあるのだろうか。事例から見たほうが早い。人工的に得られる鉄(III)-(nta)錯体溶液($\text{H}_3(\text{nta})$ -ニトリロトリ酢酸:4章)を動物に投与すると、100%発ガンすることがわかっている⁴⁹⁾。この錯体は実はオキソ架橋二核錯体(図27)であり、発ガン作用も、この二核構造に由来すること(過酸化水素存在下で容易にパーオキシド付加体が形成する(図28))が多くの研究から明らかにされている³⁷⁾、⁵⁰⁾。この鉄(III)-(nta)錯体の投与でいろいろな障害(蛋白・DNAの障害、細胞膜の損傷など)が起きるが、すべてその二核鉄(III)構造の特有な作用で説明できる¹³⁾、⁵⁰⁾。上で述べたいろいろな障害(蛋白・DNAの障害、細胞膜の損傷など)が即ち、酸化ストレスであるから、上述の3~5章で過酸化水素は金属イオンの存在下でそれ自身が持たない作用を発揮することを示してきたが、それが体内で鉄イオン、特に二核構造をもつ鉄(III)種の存在下で起きると考えれば、生体内酸化ストレスは、

なにもヒドロキシルラジカルや一重項酸素の生成を考えなくても説明が出来るのである。

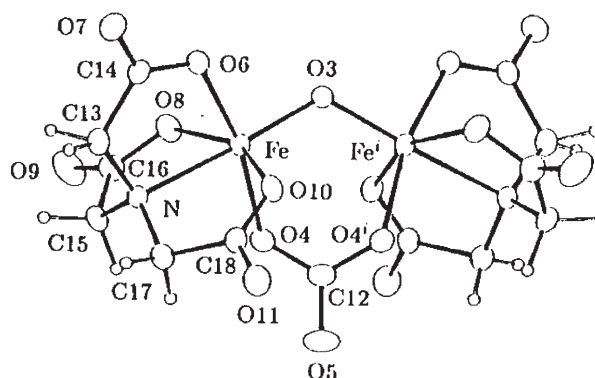


図27 オキソ架橋二核錯体 $\text{Fe}_2\text{O}(\text{nta})_2(\text{CO}_3)_4$ の構造

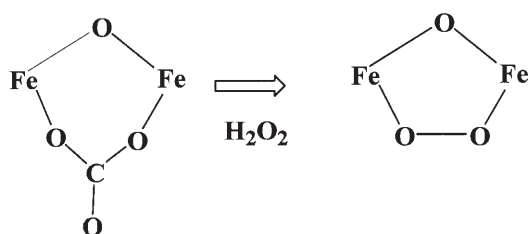


図28 オキソ架橋二核錯体 $\text{Fe}_2\text{O}(\text{nta})_2(\text{CO}_3)_4$ のパーオキシド付加体の生成

過酸化水素は、本来カタラーゼ・グルタチオンペルオキシダーゼなどで分解されなければいけないのであるが、残念なことに体内に多量の蓄積がみられる。この過酸化水素の形成・蓄積に次に述べるように鉄イオンが大きく関与している。

問題の鉄イオンであるが、いわゆるnon-specific iron ionといって、特に明らかな構造を持たない鉄イオン種の存在がいろいろな臓器で見出されており、別名labile iron pool (LIB)とも呼ばれている⁵¹⁾。non-specific iron ionは、体内では二核鉄(III)構造で存在する可能性が高いので、上で述べた鉄(III)-(nta)錯体による諸症状が体内で生じて不思議ではない。また、このような二核鉄(III)錯体の特異的な作用の一つとして、スキーム Vを示した(5章)が、スキーム Vで、基質の代わりに電子供与体(還元酵素系など)が存在すると、過酸化水素が生成する。これはモデル実験で確認されている¹⁶⁾ので、このようなnon-specific iron ionの形成が体内の多量の過酸化水素の形成・蓄積と結びついていることは間違いないことであろう。多量のnon-specific iron ionの形成は、症状的には「鉄過剰症」と呼ばれているが⁴⁹⁾、これは単に鉄イオンを過剰に摂取する以外に、他の金属イオン(例えばアルミニウム・マ

ンガンイオン)の多量の摂取によっても引き起こされるので、注意しなければいけない^{44), 52)}。最近のうつ病、キレる子供たち、若年性認知症、若年性アルツハイマー病などの原因として多量のアルミニウム、マンガンイオン取り込みによる鉄代謝異常が指摘されているので、これらの病気の予防には、日々の生活において鉄イオンへの関心を高くする必要がある^{52), 53)}。

7. 最後に

これまで、酸素添加酵素の反応機構解明にはまず、酵素の金属イオンと酸素分子との反応からいわゆる「活性酸素種」が形成し、それが基質と反応するという考え方で研究が進められてきた。しかし、 ESO_2 または ESCO_2 複合体の形成に周辺基・基質が大きく関与していることが明らかにされた現在、「最初に活性酸素種が生成するという考え」を改め、 ESO_2 または ESCO_2 複体内での酸素分子およびその誘導体の反応性に関する研究が必要である。よく知られているように、酸素添加酵素の反応性は非常に多様であるが、それは、 ESO_2 または ESCO_2 複体内でのいろいろな分子間内の相互作用が多様であるためで、とくに基質の化学的性質が反応機構・生成物を決定していることは注目すべきであろう。

二核鉄(III)種の存在下での過酸化水素・酸素分子の高い反応性の発現、過酸化水素は細胞膜を容易に通過できること、non-specific iron ionは体内では二核鉄(III)構造で存在する可能性が高いこと、などからこれまでの「活性酸素」に関する議論を、「生体内鉄キレートによる作用」に注目した議論にしなければいけない。私がここで述べた、「生体内酸化反応機構研究における新展望」が正当に評価されて始めて「鉄代謝異常・鉄過剰症」由来の酸化ストレス・ガン・神経性疾患の発症機構が正しく論じられるようになり、それに基づいてこれらの病気への正しい予防策が展開されていくものと期待している。

参考文献

- 1) O. Hayaishi, M. J. Coon, R. W. Estabrook, L. Que, and S. Yamamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338** (2005), 1-686.
- 2) 酸素と生命、早石修、東京大学出版会(1984)

- 3) 酸素添加酵素、早石修／野崎光洋編、東京大学出版会(1973)
- 4) Molecular Mechanism of Oxygen Activation, ed. By O. Hayaishi, Academic press, New York (1974).
- 5) G. A. Hamilton, Molecular Mechanism of Oxygen Activation, ed. By O. Hayaishi, Academic press, New York (1974), Chapter 10.
- 6) 吉田雄三、生化学、**75** (2003)、195–203. 城宣嗣、渡辺芳人、生化学、**76** (2004)、429.
- 7) チトクロムP-450, 武森重樹・小南思郎、東京大学出版会 (1993)
- 8) J. T. Groves and T. E. Nemo, *J. Am. Chem. Soc.*, **105** (1983), 5786.
- 9) Metal-oxo and Metal-peroxo Species in Catalytic oxidations, Structure and Bonding, 97, ed. By B. Meunier, Berlin (2000). M. J. Gunter and P. Turner, *Coord. Chem. Rev.*, **108** (1991), 115.
- 10) F. Himoto and P. E. M. Siegbahn, *Chem. Rev.*, **103** (2003), 2421.
- 11) M. Baik, M. Newcomb, R. A. Friesner, and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **103** (2003), 2385.
- 12) P. F. Fitzpatrick, *Annu. Rev. Biochem.*, **68** (1999), 355.
- 13) 西田雄三、無機生体化学、裳華房 (1994).
- 14) S. G. Sligar, et al., *Science*, **287** (2000), 1615.
- 15) Y. Nishida, *Polyhedron*, **13** (1994), 2473.
- 16) Y. Nishida et al., *Inorg. Chim. Acta*, **96** (1985), 115.
- 17) Y. Dong, S. Yan, V. G. Young, and L. Que, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35** (1996), 618.
- 18) Y. Nishida et al., *Z. Naturforsch.*, **52c** (1997), 615.
- 19) Y. Nishida, *Trends Inorg. Chem.*, **5** (1998), 89; 日本化学雑誌、**1998**、794.
- 20) Y. Nishida and S. Nishino, *Z. Naturforsch.*, **56c** (2001), 144.
- 21) Y. Nishida, *Z. Naturforsch.*, **56c** (2001), 865.
- 22) S. Nishino et al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 1509.
- 23) P. F. Fitzpatrick et al., *J. Mol. Biol.*, **359** (2006), 299.
- 24) R. Davydov, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005), 1403.
- 25) J. H. Dawson et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **436** (2005), 40.
- 26) T. Matsui, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006), 1090.
- 27) T. Okuno, S. Ohba, and Y. Nishida, *Polyhedron*, **16** (1997), 3765.
- 28) S. Nishino, et al., *Z. Naturforsch.*, **54c** (1999), 94.
- 29) T. Kobayashi et al., *Chem. Lett.*, **1996**, 347.
- 30) Nishida, *Recent Res. Devel. Pure & Applied Chem.*, **3** (1999), 123.
- 31) S. Nishino et al., *Inorg. Chem. Communications*, **3** (2000), 145.
- 32) S. Nishino et al., *Z. Naturforsch.*, **56c** (2001), 1144.
- 33) S. Nishino et al., *Inorg. Chem. Communications*, **4** (2001), 86; *Synth. React. Inorg. Metal-org. NanoMetal Chem.*, **35** (2005), 677.
- 34) Ito, et al., *Polyhedron*, **17** (1998), 4379.
- 35) Okutsu et al., *Inorg. Chem. Communications*, **2** (1999), 308.
- 36) Ito et al., *J. Chem. Soc., Dalton trans.* **1996**, 2579.
- 37) Nishida, *Recent Res. Devel. Pure & Applied Chem.*, **3** (1999), 103.
- 38) A. R. Brash, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 23679; Brash et al., *J. Biol. Chem.*, **280** (2005), 38756; Oldham et al., *J. Biol. Chem.*, **280** (2005), 39545.
- 39) Y. Nishida and N. Tanaka, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1994**, 2805.
- 40) Y. Nishida et al., *Chem. Lett.*, 1992, 1291. *Polyhedron*, **13** (1994), 2245; マンガン錯体について: *Inorg. Chem.*, **34** (1995), 3616.
- 41) G. Coffe et al., *J. Biol. Chem.*, **280** (2005), 38756.
- 42) Y. Nishida and K. Yamada, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1990**, 3639.
- 43) 過酸化脂質と生体、内山・松尾・嵯峨井著、学会出版センター[1985]、第2章。
- 44) Nishida, *Z. Naturforsch.*, **58c** (2003), 752; *Med. Hypothesis Res.*, **1** (2004), 227.
- 45) Nishida et al., *Polyhedron*, **14** (1994), 2205.
- 46) [活性酸素]、八木・中野・二木・島崎著、医歯薬出版[1987]
- 47) Y. Nishida, et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 94.
- 48) Y. Nishida and M. Takeuchi, *Z. Naturforsch.*, **42b** (1987), 52.
- 49) 岡田茂、「鉄と人体と科学」、悠飛社[2005]。
- 50) Nishida et al., *Chem. Lett.*, **1994**, 641; *Polyhedron*, **15** (1995), 2301.
- 51) C. Ferreira et al., *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), 3021; Land et al., *Molecular Brain Res.*, **133** (2005), 266.
- 52) 西田雄三、「BSEの化学」、牧歌舎[2004]。
- 53) Nishida, "Chemical Perspectives of Sporadic Prion Diseases", CIN Press (2006).