

## 酸化ストレスを克服する生体の戦略

菊川 清見

## Defense of Living Body against Oxidative Damage

Kiyomi KIKUGAWA

*School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,  
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan*

(Received July 6, 2004)

Living bodies may experience oxidative stress induced by reactive oxygen species and heavy metal ions, which may damage components in the body and cause aging and disorders. In addition to the known defense systems against oxidative damage, the author describes new defense systems. Lipid peroxidation in living bodies, which has hitherto been thought to increase oxidative damage, was found to attenuate oxidative stress-induced DNA damage. Red blood cells become senescent due to oxidative stress during circulation, where membrane band 3 becomes aggregated to anti-band 3 IgG and macrophages attached through poly-*N*-acetylglucosaminyl sugar chains, and the sugar chain attachment to macrophages is stimulated by oxidative stress in macrophages. Oxidized protein hydrolase that preferentially hydrolyzes proteins damaged by oxidative stress was newly discovered, which may play an important role in saving cells from oxidative damage.

**Key words**—oxidative stress; lipid peroxidation; DNA damage; red blood cell aging; oxidized protein hydrolase

## はじめに

活性酸素種や重金属イオンなどによる生体内の酸化ストレスは、生体成分を無差別的に障害し、老化や種々の疾患を引き起こすと考えられている。その一方で、生体には酸化ストレスを防御するシステムも存在する。Superoxide を過酸化水素に変換する superoxide dismutase, 過酸化水素を水に還元する catalase, 過酸化水素や脂質 hydroperoxide を水やアルコールに還元する glutathione peroxidase, これと連動して働く glutathione reductase 及び glucose-6-phosphate dehydrogenase, Fe イオンや Cu イオンを捕捉する ferritin, transferrin, ceruloplasmin, vitamin E や vitamin C などの抗酸化剤, 障害 DNA の修復酵素系, 酸化タンパク質を除去する proteasome が知られている。これら防御システムは連携して、生体を酸化ストレスから防御していると考えられている。

筆者らは、これまでに明らかにされている酸化ストレスの防御システムに加えて、新たに3つの防御システムが存在することを明らかにした。1つは、これまで生体内の脂質過酸化反応は酸化ストレスを増幅して酸化的傷害を助長する反応と考えられてきたが、それとは逆に、脂質過酸化反応は生体内の酸化ストレスを減弱して、DNAの酸化的傷害を軽減する作用があることを明らかにしたことである。2つ目は、ヒト循環血流中での赤血球の老化過程、老化赤血球の排除過程に酸化ストレスが機能しているということである。赤血球は酸化ストレスによって膜の band 3 糖タンパク質が凝集し、凝集体の sialylated poly-*N*-acetylglucosaminyl (PL) 糖鎖に抗 band 3 IgG 抗体やマクロファージが結合し、マクロファージ内の酸化ストレスが結合に関与していることを明らかにした。3つ目は、生体には酸化ストレスによって傷害を受けた酸化タンパク質を優先的に分解除去する酵素 oxidized protein hydrolase (OPH) が存在することを見出したことである。この酵素は酸化ストレスに対する二次的防御システムの1つと考えられた。ここでは、これらの防御システムについて紹介する。

東京薬科大学薬学部 (〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1)

e-mail: kikugawa@ps.toyaku.ac.jp

本総説は、平成16年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

### 1. 酸化ストレスによる生体内脂質過酸化反応

大気下における脂質過酸化反応は詳細な検討によって解明され、油脂の自動酸化として理解されている (Fig. 1)。油脂の自動酸化は 20% の酸素を含む大気下で、熱、光、ラジカル発生剤によって開始される。初期過程においては、油脂を構成する高度不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) 残基に存在する活性メチレン基から、熱、光、ラジカル開始剤によって水素が引き抜かれ、炭素ラジカル ( $R\cdot$ ) が生成し、ラジカルが移動したのち、酸素分子 ( $^3O_2$ ) が付加して、活性の強い peroxy radical ( $ROO\cdot$ ) が生成する。 $ROO\cdot$  は、もはや熱、光、ラジカル開始剤がなくても PUFA の活性メチレン基から水素を引き抜いて  $R\cdot$  を作り、酸素を使ってこの反応を繰り返す、いわゆるラジカルの連鎖反応が進む。活性メチレン基 1 つの linoleic acid 残基を持つ油脂の自動酸化では、40—50 回の連鎖反応が繰り返される。 $ROO\cdot$  は PUFA から水素を引き抜くことによって、自身は準安定な一次生成物の hydroperoxide ( $ROOH$ ) になる。油脂の構成脂肪酸の脂肪酸組成にその活性メチレン基の数を乗じ、その総和を過酸化指標 (peroxidizability index; PI) としているが、n-6 系の linoleic acid の多い植物油に比較して、n-3 系の eicosapentaenoic acid (EPA) や docosahexaenoic acid (DHA) の多い魚油の方が PI が大きく、自動酸化が起り易い。 $ROOH$  はさらに微量の重金属イオンによって二次的に分解し、種々のアルデヒド、炭化水素、脂肪酸

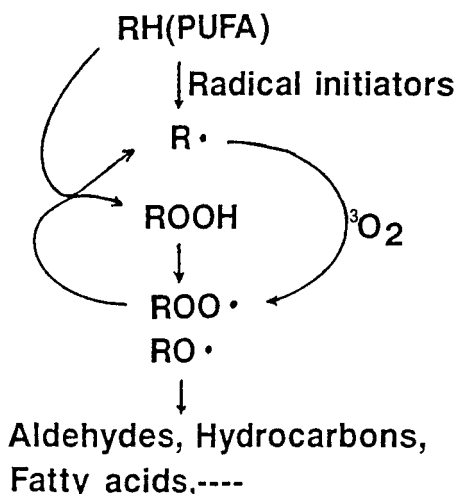


Fig. 1. Scheme of Lipid Peroxidation under Atmospheric Conditions

などになり、自動酸化を起こした油脂には極めて多くの生成物が存在することになる。油脂自動酸化の生成物のうち、タンパク質や DNA に傷害を与えるのは化学反応性の高いアルデヒド類と考えられてきたが、その化学反応は十分に解明されていなかった。また、アルデヒド類は脂質過酸化度のよいマーカーと考えられるが、マーカーとしての化学反応も十分解明されていなかった。

一方、生体内でも、細胞膜リン脂質を構成する PUFA は、酸化ストレスすなわち活性酸素種が引き金になって、大気下の油脂の自動酸化と同様にラジカルの連鎖反応が進むと考えられてきた。しかし、生体内では多くの抗酸化系が存在するうえ、大気 160 mmHg の酸素分圧に対し、生体内の酸素分圧は、肺泡 100、動脈血 40、細胞周辺 5—10、細胞内 1 mmHg と低くなるが、このように低い酸素分圧下でも、大気中の自動酸化と同様にラジカルの連鎖反応が進行するのであろうか。これまでの報告によると、生体内では酸化ストレスによって脂質過酸化が亢進するとともに、タンパク質や DNA の傷害も亢進しており、脂質過酸化反応が他成分の傷害を増幅しているかに見えていた。しかしながら、生体内の脂質過酸化反応が他成分に与える影響はほとんどといってよいほど解明されていなかった。

**1-1. 脂質過酸化反応によるタンパク質の傷害反応** 多成分を含む脂質過酸化物はタンパク質と反応して、青色の蛍光と架橋を作ることが分かっていた。1970—1990 年には、蛍光と架橋を作る成分として、脂質過酸化反応で二次的に生成すると考えられていた二価アルデヒドの malonaldehyde (MA) に関心が集まっていた。純 MA とタンパク質を反応させると蛍光と架橋が生成したからである。さらに、蛍光と架橋の化学構造は MA とタンパク質の一級アミノ基の共役シッフ塩基と考えられていた。筆者らの行った、MA と一級アミンの生理条件下での反応では、蛍光物質はユニークな構造をもつ 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehyde 誘導体であり、架橋物質は非蛍光性の共役シッフ塩基であった (Fig. 2)。<sup>1-15)</sup> しかしながら、MA から生成する蛍光物質の蛍光極大波長は 460 nm にあり、その蛍光極大波長と蛍光特性は脂質過酸化物とタンパク質から生成する蛍光とは一致しなかった。<sup>16-19)</sup> これに対して、一価アルデヒド類と一級アミンの反応も青

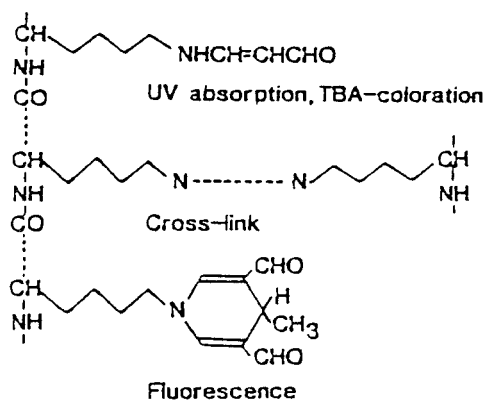


Fig. 2. Fluorescence and Cross-links Formed in the Reaction of Proteins with MA under Physiological Conditions<sup>15)</sup>

色蛍光を生成し、その極大波長は 430—440 nm を示し、蛍光特性とともに、脂質過酸化物質とタンパク質の反応に由来する蛍光と一致した。<sup>18,20—24)</sup> さらに、一価アルデヒド類もタンパク質に架橋を作ることが明らかになった。例えば一価アルデヒドの 1-butanol と benzylamine の反応では、Michael 反応と aldol 縮合を経て Fig. 3 に示す二価アルデヒドの tetrameric aldehyde を作り、一級アミンに架橋を作った。<sup>15,25)</sup> ラット組織を sodium dodecyl sulfate (SDS) で抽出し、ゲルろ過で分離して得られる青色蛍光物質の蛍光極大波長と蛍光特性は、脂質過酸化物質とタンパク質、及び一価アルデヒド類と一級アミンの反応物の蛍光物質の特性と一致した。<sup>18,26,27)</sup> また、脂質過酸化物質に一級アミンを反応させても、MA 由来の青色蛍光は検出することができず、脂質過酸化物質中に遊離の MA が存在する可能性は少なかった。<sup>17,18)</sup> このことから、脂質過酸化物質のタンパク質に蛍光と架橋を作る傷害反応では、多種の一価アルデヒド類が主役を演じていることが判明し、二価アルデヒドの MA の寄与は少ないことが分かった。

老化した個体の組織に認められる黄色蛍光を発する lipofuscin は脂質過酸化に由来し、MA の反応産物と考えられていた。筆者らは、老化ラットの腎臓から組織学的に黄色蛍光を発する成分を分離精製し、その蛍光を検討した結果、620 nm に蛍光極大波長を示す高分子物質であり、脂質過酸化に由来する物質ではないことを明らかにした。<sup>28—33)</sup>

**1-2. 脂質過酸化度測定法としてのチオバルビツール酸 (TBA) 法の確立** 1948 年に脂質過酸

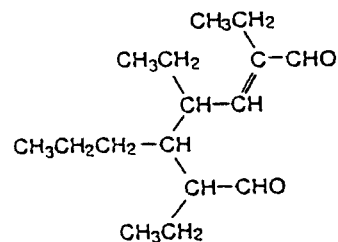


Fig. 3. Proposed Structure of Bifunctional Aldehyde Formed by Reaction of 1-Butanol with Benzylamine<sup>15)</sup>

化度の測定法としてチオバルビツール酸 (thiobarbituric acid: TBA) 法が開発されて以来、この方法は簡便で感度のよい方法として広く用いられてきた。脂質過酸化物質と TBA を酸性水溶液中で加熱すると 532 nm に極大吸収を持つ赤色色素が生成するので、その吸光度を測定し、TBA 反応陽性物質 (TBA-reactive substances: TBARS) として脂質過酸化度を測定する方法である。当初、脂質過酸化物質と TBA を反応させて生じる赤色色素の吸収スペクトルは、二価アルデヒドの MA と TBA を反応させて生じる MA : TBA = 1 : 2 縮合物の吸収スペクトルと一致するので、TBARS の本体は遊離の MA 又は酸処理で MA を遊離する成分と考えられていた。それ以来、脂質過酸化研究、特に生体試料の脂質過酸化研究の長い歴史のなかで TBA 法は常に主役を演じ、多くの変法が開発され用いられてきた。ところが、1980 年代になって、TBA 法は MA に対する選択性が疑われ始め、悪名高い方法になり、脂質過酸化研究に混乱を生じた。にも関わらず、多くの研究者が TBA 法を用いざるを得なかったのは、それに変わるべく方法にも一長一短があり、<sup>34,35)</sup> 優れた方法と言えるものが少なかったからである。

筆者らは TBA 法の特徴と限界を明らかにすべく、脂質過酸化物質と TBA の化学反応を検討した。脂質過酸化度の測定法としての TBA 法の原理と解釈の確立をはかり、その結果、数々の TBA 法をめぐる論議に終止符を打った。筆者らは、脂質過酸化物質中の一価アルデヒド類の alkenals/alkadienals と、酸によってこれらアルデヒド類を遊離する誘導体も、MA 及びその誘導体と同様に赤色の MA : TBA = 1 : 2 縮合物を作ることを明らかにした。MA からの色素生成は反応液が酸性である限り条件によらず定量的であるが、alkenals/alkadienals とその誘導体からの色素生成は、多くの条件に左右さ

れ、色素生成率は高々 30% 程度であった (Fig 4).<sup>35-43)</sup> Alkenals/alkadienals とその誘導体からの色素生成は、至適 pH が 3.5 であり、色素生成には溶存酸素や Fe イオンが必要であった。無酸素状態や ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 存在下では色素生成は完全に抑えられた。また、生体試料の TBA 法では、dibutyl hydroxytoluene (BHT) などの抗酸化剤を反応液に添加して、加熱中に脂質の過酸化が起こらないようにすることも必須であった。Alkenals/alkadienals とその誘導体からの色素生成は BHT によって影響は受けなかった。生体試料の TBARS 測定においては、SDS を含む pH 3.5 の水溶液中、かならず BHT を添加して行うのが好ましい。この条件下では、MA, alkenals/alkadienals とそれらの誘導体がともに TBARS として測定され (TBARS (-EDTA)), EDTA を添加すれば MA とその誘導体だけが TBARS として測定されることになる (TBARS (+EDTA)).<sup>44-56)</sup> これらの条件を使い分けることによって、試料中の TBARS の特定も可能である。植物油の TBARS はほとんどが alkenals/alkadienals とその誘導体,<sup>52)</sup> ラット組織の TBARS は MA, alkenals/alkadienals とそれらの誘導体,<sup>54)</sup> ヒト尿の TBARS は MA の誘導体<sup>55,57,58)</sup> であることが分かった。血漿や血清の TBA 法で得られる色素はスペクトルも異なり、色素の由来は MA や alkenals/alkadienals とは特定されず、脂質過酸化物を反映するものではないと考えられた<sup>51)</sup> TBA 法は血清や血漿には不向きであった。

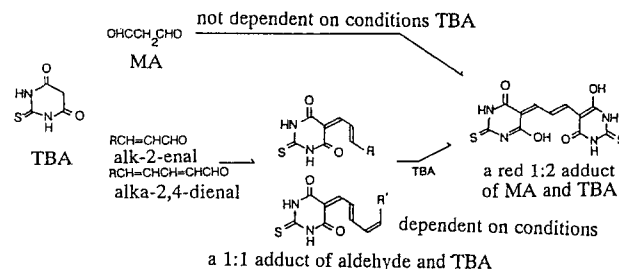
TBA 法はその原理を把握して、利用し、結果を

解釈することによって、生体試料の脂質過酸化度の測定に有効に用いることができる。TBA 法は脂質過酸化物中の特定の成分を測定する訳ではないが、多くの成分を総合的に測定する方法として優れた方法と言える。TBARS は生体内の酸化ストレスマーカーとして優れた指標と考えられる。筆者らは、生体試料の脂質過酸化度の測定に当たって、TBA 法による TBARS (-EDTA), TBARS (+EDTA), 及び宮澤らにより開発されたリン脂質 hydroperoxide 類を対象にした HPLC-chemiluminescence 法<sup>59)</sup> を併用することにしており、以下の研究においてもこれらを併用して用いた。

### 1-3. 脂質過酸化による DNA 酸化的傷害の軽減

これまでの研究では、不飽和度の高い PUFA を含む油脂を実験動物に投与すると、体内の脂質過酸化度が亢進するという結果が得られていた。しかし、多くの報告の脂質過酸化度の測定には問題があるように思えた。それは、組織を摘出した後の TBA 反応において、反応中の脂質過酸化を抑えることに注意が払われていないため、TBA 反応中に脂質過酸化が起こり、その結果を測定しているかに見えた。筆者らは、体内の脂質過酸化度を注意深く測定することにより、不飽和度の高い PUFA 投与の体内脂質過酸化に与える影響を検討した。

ラットに 5% のサフラワー油 (S) あるいは魚油 (F) を含む食餌を 6 週間投与した。投与した S は n-6 系 PUFA が、F は n-3 系 PUFA が多く、それぞれ大気下での過酸化の起こし易さの指標 PI は 78 と 114 であった。ビタミン E の含量はいずれも 33



| TBARS           | Reaction condition |                  |            |         |             |      | Yield of a red pigment (%) |
|-----------------|--------------------|------------------|------------|---------|-------------|------|----------------------------|
|                 | Water              | Dissolved oxygen | Optimal pH | t-BuOOH | Fe(III) ion | EDTA |                            |
| MA              | —                  | —                | <5         | —       | —           | —    | 100                        |
| Alk-2-enal      | ↑                  | ↑                | >5         | ↑       | ↑           | ↓    | <5                         |
| Alka-2,4-dienal | ↑                  | ↑                | 3-4        | ↑       | ↑           | ↓    | <30                        |

Fig. 4. Formation of Red 1 : 2 Adduct of MA and TBA from MA, Alkenal/Alkadienal Derivatives in the TBA Reaction<sup>35)</sup>

mg/kg 油とした。用いた S と F を有機溶媒中、大気下でラジカル開始剤 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) を添加して酸化し、TBARS を測定すると、明らかに F の方が S よりも脂質過酸化が亢進した。飼育後、赤血球の膜画分を分離し、リン脂質を抽出した。リン脂質の脂肪酸組成は食餌の油の脂肪酸組成を反映し、S 群は n-6 系、F 群は n-3 系の PUFA が多かった。S 群の膜リン脂質の PI は 110、F 群は 134 を示し、F 群の膜リン脂質の方が S 群より大気下では酸化を受け易い状態にあった。膜リン脂質画分のビタミン E レベルは F 群の方がわずかに低かった。膜リン脂質画分の TBARS ( $\pm$ EDTA) レベルは S 群と F 群の間に有意な差は認められず、リン脂質 hydroperoxide 類のレベルにも有意の差は認められなかった。<sup>60)</sup> 両食餌群の膜リン脂質画分を大気下で Fe (III) イオンによって酸化を誘導したところ、両者ともに脂質過酸化が亢進したが、F 群の方が亢進の程度が高かった。両食餌群のラットから摘出した脳、肺、肝、腎などの組織についても、両食餌間での臓器の脂質過酸化の程度に差は認められなかった。<sup>61)</sup> このことは、不飽和度の高い PUFA を投与しても、体内での通常の酸化ストレスでは脂質過酸化の程度が亢進することはないことを示していた。

体内では通常の酸化ストレス下では、抗酸化酵素系や抗酸化剤が効いているうえ、酸素分圧が低いこともあって、不飽和度の異なる PUFA による脂質過酸化度の違いは現れないと考えられた。組織の脂質の過酸化が酸素分圧によって影響を受けることを以下の試験管内の実験によって確認した<sup>62)</sup>。ビタミン E 欠乏マウスから肝ミクロソームを調製し (vitamin E 50 ng/mg protein)、酸素分圧を 160—20 mmHg の雰囲気中で Fe (III) イオンによって緩和に酸化した。TBARS (+EDTA) は 60 分で一定値に達し、160 mmHg では 14 nmol/mg protein であったのに対して、20 mmHg ではその半分の 7 nmol/mg protein であった。<sup>63)</sup> ビタミン E の添加による TBARS 上昇の抑制効果も酸素分圧が低いほど強かった。このことは、酸素分圧が低い体内の条件下では、脂質過酸化が抑制されており、抗酸化剤のビタミン E の効果もより強力であることを示している。

S と F を投与して飼育したラットの腹腔に致死量に近い量の鉄トリロキサ酢酸 (Fe-NTA) を投与し

て、体内に強制的に酸化ストレスを惹起した。肝細胞の脂質過酸化度を調べた結果、リン脂質 hydroperoxide 類のレベルには有意の差は認められなかったが、TBARS ( $\pm$ EDTA) レベルは F 群の方が S 群より有意に高かった (Fig. 5, A)。肝細胞のビタミン E レベルも F 群の方が S 群より有意に低下していた (Fig. 5, B)。このことは、体内に強制的に酸化ストレスを誘導した場合には、不飽和度の高い PUFA 投与の方が脂質の過酸化度が高く、ビタミン E の消耗も多いことを示している。ところが、肝細胞の DNA の酸化的傷害をコメット法による細胞内 DNA 切断と 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の生成量で調べたところ、双方ともに F 群の方が S 群よりも低かった (Fig. 6, A, B)。<sup>63)</sup> ラットの肝細胞を摘出したのち、試験管内で過酸化水素により酸化ストレスを惹起した場合も、F 群の肝細胞の方が S 群の肝細胞よりも脂質過酸化度は高く、逆に DNA の酸化的傷害の程度は低かった。<sup>64)</sup> このことは、不飽和度の高い PUFA を含む F の投与は酸化ストレスによって引き起こされる DNA の酸化的傷害を増幅することではなく、軽減していることを示している。生体内の脂質過酸化反応は酸化ストレスによる DNA 傷害を増悪する訳ではなく、むしろ防衛的に働いていることを示している。

試験管内の DNA 鎖切断実験でも、酸化ストレス

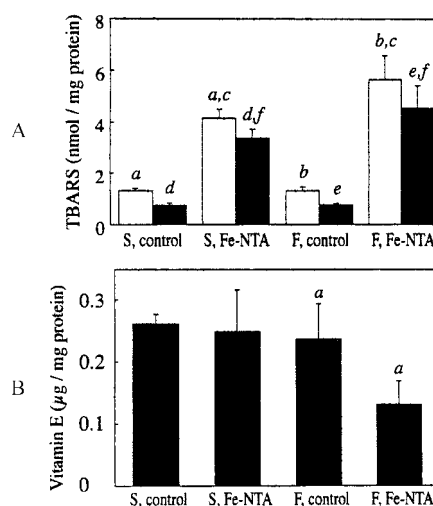


Fig. 5. TBARS (A) and Vitamin E (B) Levels of Liver Homogenate of Rats Treated by Intraperitoneal Injection of Fe-NTA<sup>63)</sup>

S and F mean liver of safflower oil and fish oil diet group, respectively. A: TBA assay was performed in the presence of BHT, with (■) and without EDTA (□). a, b, d, ep < 0.001, \*p < 0.03, and †p < 0.05. B: \*p < 0.03.

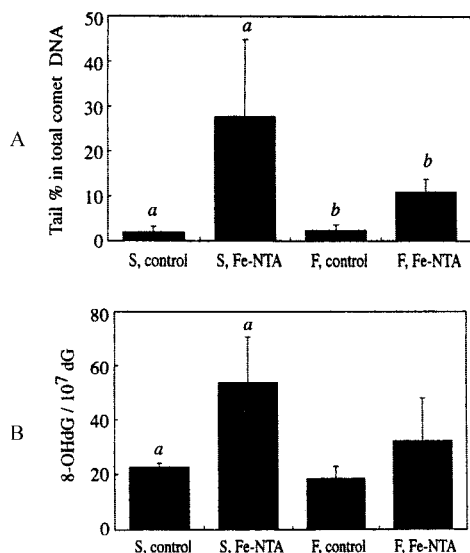


Fig. 6. Tail DNA% in Total DNA in Comet Assay of Liver Cells (A) and 8-OHdG Levels of Liver Homogenate (B) of Rats Treated by Intraperitoneal Injection of Fe-NTA<sup>63)</sup>

S and F mean liver of safflower oil and fish oil diet group, respectively. A: <sup>a</sup> $p < 0.03$  and <sup>b</sup> $p < 0.002$ . B: <sup>a</sup> $p < 0.02$ .

やフリーラジカルに起因する DNA 鎖切断が PUFA によって阻害された。<sup>65)</sup> Hydroxyl radical を発生する過酸化水素/Fe (II), ラジカル発生剤の 2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride, 炭素ラジカルを発生する 4-(hydroxymethyl) benzene diazonium 塩はスーパーコイル状の DNA の鎖切断を引き起こすが, 未酸化の linoleic acid は自身が酸化されて DNA の鎖切断を阻害した。Ascorbic acid/Cu (II), ascorbic acid/Fe (II), peroxyntirite 及び 2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride による DNA 鎖切断も, 未酸化の low density lipoprotein (LDL) の添加によって阻害され, LDL が酸化された。Linoleic acid hydroperoxide も DNA 鎖切断を引き起こしたがその切断活性は弱く, また, Cu 酸化 LDL には全く DNA 鎖切断活性がなかった。これらの実験結果から, linoleic acid や LDL 中の PUFA は自身が酸化されることによって酸化ストレスやフリーラジカルに起因する DNA 鎖切断を減弱していることが分かった。一連の実験結果から, 生体内の脂質過酸化は酸化ストレスに起因する DNA 傷害を保護する働きがあることが明らかになった。

## 2. 酸化ストレスによるヒト赤血球の老化とそのマクロファージによる認識

ヒト赤血球は骨髓で生まれて 120 日間の体内循環

ののちに脾臓マクロファージで壊される。そのメカニズムは, 自己抗体の結合を介するか, 直接的にマクロファージの貪食によって排除されるとされている。自己抗体の結合には, 膜表面糖鎖のシアル酸が脱離し, 抗 asialoglycophorin IgG が結合, 分解した band 3 に抗 band 3 IgG が結合, 抗 galactosyl IgG が結合するとの説が提唱されていたが, いずれも決定的な証拠は乏しかった。筆者らは, 赤血球の老化過程において, 酸化ストレスによって膜糖タンパク質の凝集が起り, band 3 凝集体の sialylated poly-N-actyllactosamine (PL) 糖鎖の密集体に抗 band 3 IgG が結合し, これを介してマクロファージが結合, あるいは PL 密集体にマクロファージが直接的に結合する機構を明らかにした。さらにこの PL 密集体にマクロファージが結合するにはマクロファージ細胞内の酸化ストレスが関わっていることを明らかにし, 酸化ストレスが細胞の老化と老化細胞の排除に深く関わっており, 細胞の新陳代謝に関与していることを示した。

**2-1. 老化及び酸化赤血球には膜表面の密集 Sialylated PL 糖鎖を介して抗 Band 3 IgG が結合する** ヒトの全赤血球から Percoll 密度遠心法によって, 老, 若赤血球を分離した。5 人のドナーの老, 若赤血球中の酸化ストレスの要因となる遊離 Fe イオンは, 老赤血球の方が若血球よりも高値を示した。<sup>66)</sup> 酸化ストレスマーカーとして膜リン脂質の TBARS (±EDTA) 及びリン脂質 hydroperoxide 類を測定した結果, いずれも老赤血球の方が若血球よりも高値を示した。<sup>67)</sup> このことから, 体内循環によって老化した赤血球は酸化ストレスを受けていることが分かった。

全赤血球を用いて *in vitro* における Fe による酸化を行った。酸化ストレスを受けた赤血球に抗 IgG 自己抗体が結合し易くなっているかどうかの検討を行った。<sup>68,69)</sup> 全赤血球を Fe (III) イオンで緩和に酸化すると抗 IgG 自己抗体の結合が亢進した。亢進した抗体の結合は酸化赤血球を dithiothreitol 処理すると低下したことから, 抗体の結合は可逆的であることが分かった。結合した抗体は抗 band 3 IgG であることが分かった。抗体の結合は, 赤血球膜から精製した band 3 及びヒト lactoferrin の共存下阻害され,<sup>70)</sup> これら糖タンパク質の阻害活性はタンパク質部分を protease 処理によって分解しても失わ

れなかった。抗体の結合は band 3 から単離した sialylated poly-*N*-acetylglucosamine (PL) 糖鎖の共存下阻害され、その阻害活性は neuraminidase 処理により脱シアル酸、又は PL 構造を endo- $\beta$ -galactosidase 処理によって分解することによって失活した。抗 band 3 IgG と band 3 又は lactoferrin の直接結合の検討から、抗体結合の 70% は sialylated PL 糖鎖によることが分かった。<sup>71)</sup> このことから、酸化赤血球表面上の抗 band 3 IgG に対するエピトープは sialylated PL 糖鎖であることが分かった。

Fe 酸化赤血球には、非イオン界面活性剤 C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> で溶解されずに凝集している膜タンパク質の量が多く、その凝集体のなかには SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 及び Western blot 分析によって、band 3 の凝集体も多いことが分かった。<sup>70,72)</sup> このことから、赤血球が酸化ストレスを受けると膜 band 3 が凝集をきたし、密集した表面の sialylated PL 糖鎖を抗 band 3 IgG が認識するというメカニズムが推測された (Fig. 7)。赤血球膜の band 3 が凝集すると抗 band 3 IgG の結合が亢進することは、acridine や sesamol を用いた別の band 3 の凝集実験によっても確かめられた。<sup>72,73)</sup>

体内循環で老化した赤血球には、若赤血球より多量の抗 IgG 自己抗体が結合していることが<sup>125</sup>I-抗ヒト IgG を二次抗体として用いることによって確認された。<sup>74)</sup> 結合している抗 IgG 自己抗体が抗

band 3 IgG であることは、赤血球表面の糖鎖を根元から切り離す *N*-glycosidase F や PL 糖鎖を分解する endo- $\beta$ -galactosidase で処理したり、単離した band 3 の sialylated PL 糖鎖で処理することにより解離したことから確かめられた。老化赤血球膜には band 3 凝集体も多く存在していた。<sup>72)</sup> これらのことから、赤血球は体内での循環中に酸化ストレスによって、膜脂質が過酸化を受けるとともに膜糖タンパク質が凝集して、抗 band 3 IgG が結合することが分かり、band 3 のエピトープは sialylated PL 糖鎖であることが明らかになった (Fig. 7)。<sup>75-81)</sup>

**2-2. 酸化赤血球の密集 PL 糖鎖を介するマクロファージの結合** ヒト酸化赤血球は、血清非存在下 (抗体非存在下)、マウスのマクロファージに結合した。<sup>82-86)</sup> ヒト Fe 酸化赤血球は、マクロファージに分化したヒト単球系 cell line THP-1 に結合し、その結合は band 3 及びその糖鎖、lactoferrin 及びその糖鎖によって阻害された。<sup>87-89)</sup> あらかじめ赤血球表面の band 3 糖鎖の非還元末端を endo- $\beta$ -galactosidase 処理によって除去したのち酸化しても THP-1 マクロファージへは結合しなかった。膜表面のシアル酸を neuraminidase 処理によって除去したのち酸化した場合はマクロファージへの結合に変化はなかった。このことから、酸化ヒト赤血球は膜表面の密集 band 3 の PL 糖鎖を介して直接的に THP-1 マクロファージに結合することが分かった

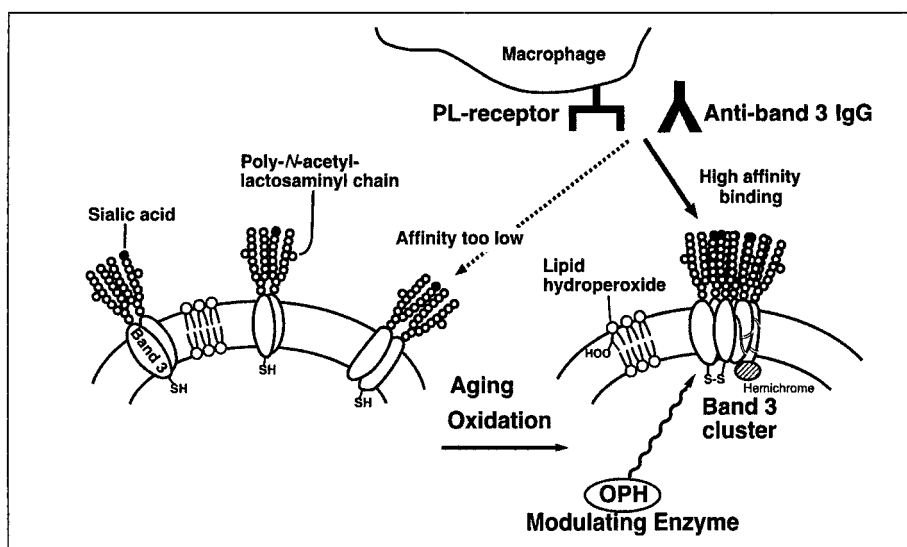


Fig. 7. A Proposed Mechanism of Binding of Anti-band 3 IgG and Macrophages to Senescent or Oxidized Red Blood Cells through PL Sugar Chains and Its Modulation by OPH

(Fig. 7). これらの結果は、酸化ストレスによる赤血球の band 3 の PL 糖鎖の凝集はマクロファージへの直接結合を惹起して循環血流中から排除される可能性を示唆している。体内老化赤血球は THP-1 マクロファージに高い結合性を示したが、この結合は抗 band 3 IgG を介する抗体依存性結合と、band 3 の凝集体を直接認識して結合する抗体非依存性結合の双方が関与していることが明らかになった (未発表)。

*In vitro* で酸化した多形核白血球<sup>90)</sup>やリンパ球<sup>91)</sup>も酸化赤血球の場合と同様に、抗 band 3 IgG の結合が亢進し、マクロファージへの直接結合も亢進した。これらの細胞の酸化においては膜の CD43 の PL 糖鎖の凝集が起こっていると考えられた。アポトーシスを起こしたリンパ球系 cell line Jurkat 膜表面にも PL 糖鎖の凝集が認められ、<sup>92)</sup> 抗 band 3 IgG の結合が亢進した。酸化ストレスによる細胞膜表面の PL 糖鎖の凝集は、赤血球のみならず、他の細胞でも起こる共通の現象と考えられた。

**2-3. マクロファージの酸化赤血球結合は細胞内の酸化ストレスによって亢進する** マウスマクロファージのスカベンジャーレセプターを介する酸化 LDL の結合と取込は、多種の抗酸化剤によって阻害された。<sup>93-98)</sup> 多くの抗酸化剤はマウスマクロファージのタンパク質リン酸化を阻害し、<sup>97)</sup> protein

kinase C, protein tyrosine kinase 及び protein serine/threonine kinase の阻害剤はマクロファージの酸化 LDL の結合を阻害し、tyrosine phosphatase や serine/threonine phosphatase の阻害剤は結合を増強した。<sup>96)</sup> このことから、酸化ストレスがマクロファージのタンパク質リン酸化を亢進し、スカベンジャーレセプターの活性を増強して、酸化 LDL 取込を亢進していると推測された。さらに、マクロファージの酸化 LDL 結合は酸素分圧によって制御されていることが分かった (未発表)。酸素分圧を大気下の 160 から 40 mmHg に下げるとマクロファージの酸化 LDL 結合は有意に低下し、再び酸素分圧を上げると結合は元のレベルまで回復した。このことからスカベンジャー活性がマクロファージ内の酸化ストレスによって増強されていることが分かった。

マウスマクロファージへの酸化赤血球の結合も、多くの抗酸化剤によって阻害され、<sup>99)</sup> 赤血球膜の凝集 PL 糖鎖を介するマクロファージの結合にも酸化ストレスが関与していることが示唆された。THP-1 マクロファージの表面には PL 糖鎖に結合する新たなレクチン様タンパク質 (PL receptor) の存在が確認され、マクロファージの酸化細胞認識に関与していることが示唆された。<sup>100)</sup> 一方、マウスマクロファージや THP-1 マクロファージを PL 糖鎖で処理すると、マクロファージ細胞内に活性酸

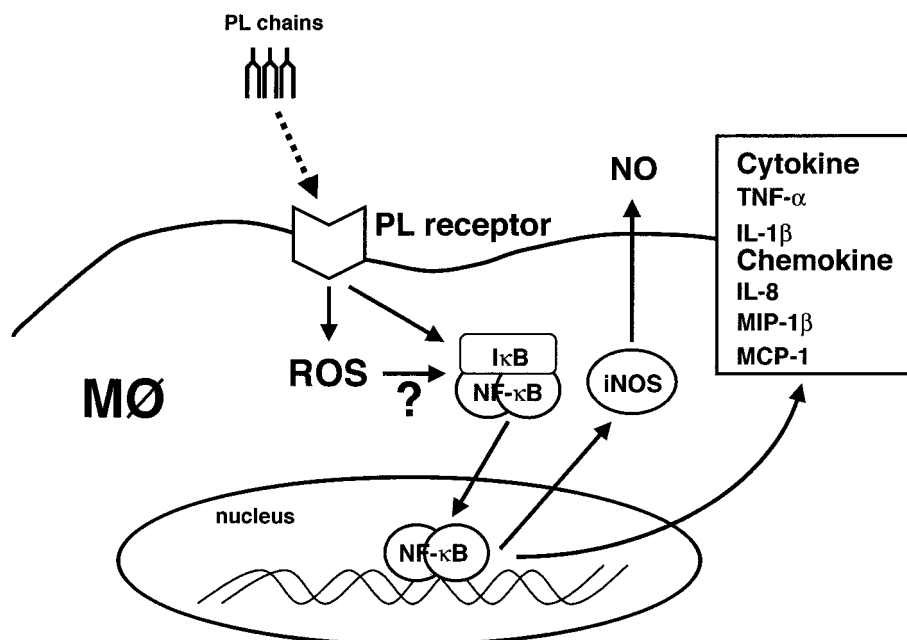


Fig. 8. Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) and NF- $\kappa$ B Activation in Macrophages (M $\Phi$ ) by PL Sugar Chains



素種が発生し、NF- $\kappa$ B の活性化、iNOS の誘導と NO の発生、種々の cytokines や chemokines の誘導が認められた (Fig. 8) (未発表). このことは、マクロファージは PL 糖鎖の結合によって、細胞内に酸化ストレスを惹起し、オートクリンのマクロファージが活性化されることを示唆している.

### 3. 酸化タンパク質を分解する新しい OPH

細胞内に酸化ストレスによって蓄積する酸化タンパク質は ubiquitine-proteasome 系によって分解除去されるとされている. 筆者らは、これとは別に酸化タンパク質を優先的に分解する新たなプロテアーゼを見出し、OPH と命名した. この酵素は多くの組織や細胞に存在し、酸化タンパク質の蓄積を防ぎ、細胞を酸化ストレス傷害から守る役割を果たしていると考えられる.

**3-1. ヒト赤血球中の OPH の発見** ヒト赤血球を xanthine/xanthine oxidase/Fe (III) で、37°C、

3 h 酸化し、膜画分を  $\alpha$ -tocopherol 存在下、37°C、6 h インキュベートした. 膜画分を SDS-PAGE によって分析した結果 (Fig. 9), band 3 を含む膜タンパク質の消失が見られた (lane b). しかし、膜画分を serine protease 阻害剤、diisopropyl fluorophosphate (DFP) (lane c) 及び phenyl methylsulfonyl fluoride (lane d), 存在下でインキュベートすると膜タンパク質の消失が抑えられた.<sup>101)</sup> 未酸化赤血球膜を同様にインキュベートした場合には膜タンパク質の消失は認められなかった. このことから、酸化赤血球膜タンパク質は膜に存在するある種の serine protease で分解を受け易くなっていることが示唆された.

[<sup>3</sup>H] DFP でラベルされる 80 kDa serine protease が赤血球の膜と細胞質に存在することが分かり、<sup>102)</sup> この酵素を oxidized protein hydrolase (OPH) と命名した. 細胞質に存在する OPH は赤血球が酸化を受けると、膜に移行し酸化膜タンパク質を分解することが分かった.<sup>103)</sup> Band 3 を含む膜タンパク質は赤血球の酸化ストレスによって凝集し、抗 band 3 IgG が結合し易くなるが、OPH は凝集膜タンパク質を分解して、酸化ストレスによる老化赤血球の排除を調節している可能性が示された (Fig. 7).<sup>103)</sup>

**3-2. OPH の精製と同定** [<sup>3</sup>H] DFP で部分ラベルした OPH を赤血球細胞質から単離、精製した.<sup>104)</sup> OPH を lysylpeptidase 処理して得られたペプチド画分のアミノ酸配列を基に行ったホモロジー検索から、OPH はこれまでに生理的機能が分かっていなかったアミノ酸残基 724 からなる 80 kDa のヒト肝 acylpeptide hydrolase (ACPH) と高い相同性があった.<sup>105)</sup> ヒト erythroleukemic cell line K-562 の cDNA から recombinant ACPH (rACPH) を作成し、精製した OPH と酵素活性の比較を行った. Recombinant ACPH と OPH はともに ACPH の基質となる N-acetyl-L-alanine-acetanilide を切断する酵素活性と、過酸化水素/peroxidase 処理によって酸化した bovine serum albumin (BSA) を切断する酵素活性を示し、ACPH と OPH が同一酵素であることが分かった.<sup>105)</sup> 酸化 BSA を OPH で消化した結果、SDS-PAGE 上に数個のペプチド画分が認められた. 未酸化 BSA は OPH で消化してもペプチド画分は現れなかった.<sup>106)</sup> 酸化 BSA のペプチド画分のアミノ酸配列の解析の結果、酸化 BSA の切

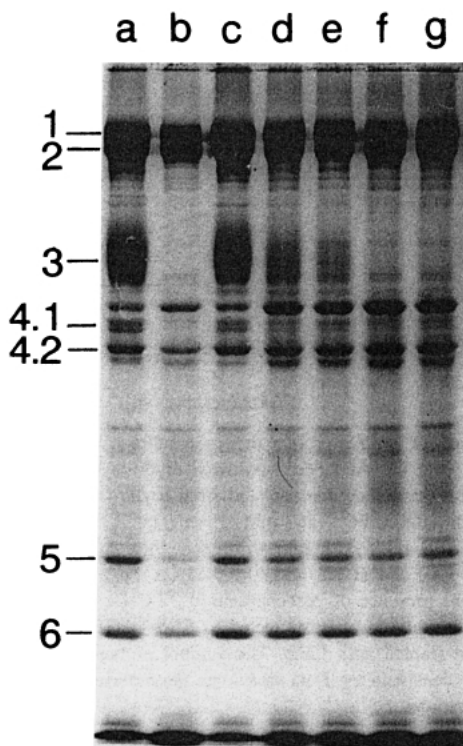


Fig. 9. SDS-PAGE of Membranes Isolated from Xanthine/Xanthine Oxidase/Fe(III)-Oxidized Red Blood Cells after the 2nd Incubation in the Presence of Protease Inhibitors<sup>101)</sup>

Membranes isolated from red blood cells oxidized at 37°C for 3 h (lane a) were incubated at 37°C for 6 h in the presence of  $\alpha$ -tocopherol with no protease inhibitor (lane b), 1 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP) (lane c), 0.2 mM phenyl methylsulfonyl fluoride (lane d), 1 mM EDTA (lane e), 10 mg/ml leupeptin (lane f) and 50 mM pepstatin A (lane g). Bands were stained with CBB.

断位置は, Leu218—219Ser, Tyr410—411Thr 及び Phe596—597Thr であり, OPH は chymotrypsin 型の endopeptidase であることが分かった. 酸化 BSA の切断位置は未酸化 BSA では内部に埋もれており, 酸化によって露出され, 疎水性の増した BSA に親和性のある OPH が結合して切断すると考えられた.

精製 OPH を用いて抗 OPH IgG を作成し, 種々のヒト cell line, ラット組織中の OPH の存在を検討したところ, OPH はヒト赤血球だけでなく, 多くの細胞や組織にも存在する酵素であることが明らかになった.<sup>107)</sup>

**3-3. OPH の機能と動態** 酸化ストレスに曝された細胞における OPH の機能を検討した. African green monkey kidney 由来の cell line COS-7 を用いて, OPH を高発現した COS-7-OPH を樹立し, 親株の COS-7 と比較することによって OPH の機能を探った. COS-7 と COS-7-OPH 細胞を過酸化水素/peroxidase 又は paraquat によって酸化ストレスを誘導すると, COS-7 では酸化ストレスの強度に応じて細胞内に酸化タンパク質の指標となるタンパク質カルボニル量が増加し, 細胞の生存率も低下したが, COS-7-OPH 細胞では同様の酸化ストレスを増大してもカルボニル量の蓄積は少なく, 細胞の生存率の低下も少なかった (Fig. 10).<sup>108)</sup> このことから, OPH は酸化ストレスによる細胞内の酸化タンパク質の蓄積を防ぎ, 細胞を酸化ストレスによる傷害から守る働きをしていると推測された. 興味あることに COS-7-OPH の細胞質内では OPH は局在することなく均一に分布しており, 酸化ストレスを誘導してもその分布に変化はなかった.

COS-7-OPH 細胞において, OPH は proteasome とは独立した酸化タンパク質の蓄積防御システムと考えられたが, 両酵素系の役割を比較検討した. Paraquat によって酸化ストレスを誘導した COS-7-OPH 細胞について, OPH 阻害剤の acetylucine chloromethyl ketone, proteasome 阻害剤の epoxomicine 及び両酵素の阻害剤 lactacystine を用いて検討した (未発表). Acetylucine chloromethyl ketone-処理 COS-7-OPH 細胞では, paraquat の濃度依存的にカルボニル量の蓄積が増加し, 生存率も低下した. これに対して, epoxomicine-処理 COS-7-OPH 細胞では, paraquat の濃度依存的なカルボニ

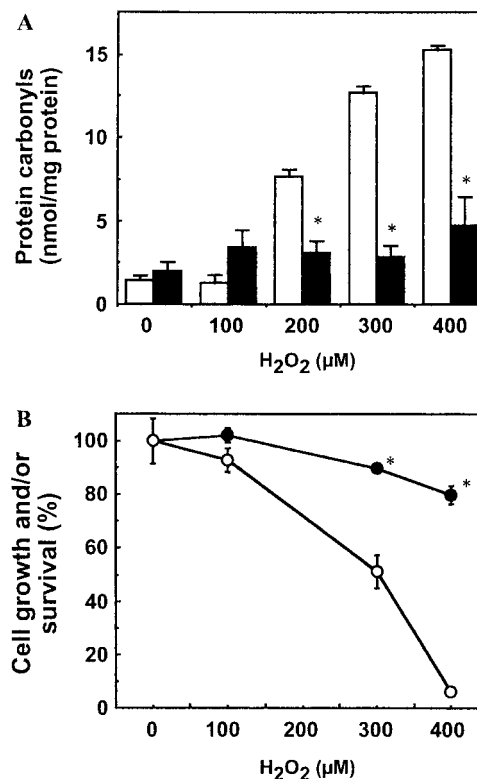


Fig. 10. The Effect of Hydrogen Peroxide Damage on COS-7 and COS-7-OPH Cells<sup>108)</sup>

A: Accumulation of protein carbonyls in trichloroacetic acid-precipitable proteins in COS-7 (□) and COS-7-OPH (■) cells treated with hydrogen peroxide at the indicated concentrations at 37°C for 24 h. B: Cell growth and/or survival of COS-7 (○) and COS-7-OPH (●) cells treated with hydrogen peroxide at the indicated concentrations at 37°C for 24 h. \*Significantly different from parental COS-7 cells at  $p < 0.01$ .

ル量の蓄積は認められず, 生存率の低下も少なかった. Acetylucine chloromethyl ketone と epoxomicine の双方で処理した COS-7-OPH 細胞, lactacystine-処理 COS-7-OPH 細胞では, paraquat の濃度依存的にカルボニル量が増加し, 生存率も低下した. COS-7-OPH 細胞では OPH は proteasome より効果的に酸化タンパク質の蓄積を防いでいることが分かった. このことから OPH は proteasome とは独立した酸化ストレスの二次的防御システムとして機能していると考えられた.

#### おわりに

筆者らが進めてきた酸化ストレスに対する生体の防御システムについて, 3つの視点からの研究結果について述べた. 生体内の脂質過酸化反応は酸化ストレスを増幅すると考えられていたが, 酸化ストレスを軽減する側面もあるということ, 赤血球の体内老化は酸化ストレスによって起こり, それを排除するのもマクロファージの酸化ストレスによって引き

起こされること、新たに見い出した OPH が酸化ストレスの二次的防御システムとして働いている可能性があるということである。生体の酸化ストレスは、生体へ傷害を与えると同時に、生体に必須の要素とも考えられる。生体には酸化ストレスを誘導するシステムとそれを防御するシステムの双方が必要で、バランスよく機能して生体の恒常性が保たれているのであろう。

酸化ストレス現象はつかみどころがなく、扱いにくい面があるが、ここで述べた研究が酸化ストレス研究の一助になれば幸いである。

**謝辞** 本研究は、東京薬科大学薬学部第一衛生化学教室別府正敏博士（現同学部公衆衛生学教室教授）、加藤哲太博士（現同学部実習 8 研究室助教授）、平本一幸博士（現就実大学薬学部助教授）、早川磨紀男博士（助教授）、安藤 堅博士（講師）、藤野智史博士（助手）、小島 尚博士、丸山哲平学士、中原亨美学士、澤村（内野）晶子学士、落合 久修士、名児耶（由良）雅子修士、村上浩二博士、岩田篤史修士、水上 淳修士、井上道晶修士、高橋琢也修士、早坂 昭修士、洞昌千代修士、林 高弘博士、八巻真司修士、渡辺充洋修士、大石憲司博士、石川哲朗修士、江田栄俊博士、葛西洋芳修士、春原覚修士、本橋正敏修士、井上直路修士、笠原成晃修士、佐藤彰秀修士、渡辺拓史修士、多田知広修士、横山慎朗修士、永田邦英修士、渡辺一臣修士、清水啓修士、安原吉信修士、古澤智康修士及び多くの学士諸君が行ったものです。ここに厚くお礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり、東京薬科大学生命科学部高橋健治教授、小島正樹博士、安田秀世教授、フェリス女学院大学小杉弘子教授、女子栄養大学長谷川恭子教授、川端輝江助教授、九州大学鈴木正夫博士にご協力いただきました。深く感謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Kikugawa K., Kurechi K., Tsukuda K., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3323-3331 (1980).
- 2) Kikugawa K., Maruyama T., Machida Y., Kurechi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1423-1432 (1981).
- 3) Kikugawa K., Machida Y., Kida M., Kurechi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3003-3011 (1981).
- 4) Kikugawa K., Ido Y., *Lipids*, **19**, 600-608 (1984).
- 5) Kikugawa K., Ido Y., Mikami A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1574-1581 (1984).
- 6) Kikugawa K., Takayanagi K., Watanabe S., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5437-5444 (1985).
- 7) Kikugawa K., Sugimura Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1794-1800 (1986).
- 8) Kikugawa K., Nakahara T., Sakurai K., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4656-4660 (1987).
- 9) Beppu M., Fukata Y., Kikugawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4519-4526 (1988).
- 10) Kikugawa K., *Eisei Kagaku*, **30**, 333-343 (1984).
- 11) Kikugawa K., *Advn. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 389-417 (1986).
- 12) Kikugawa K., Beppu M., *Chem. Phys. Lipids*, **44**(s), 277-296 (1987).
- 13) Kikugawa K., "Lipofuscin-1987, State of the Art," ed by Zs.-Nagy, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987, pp. 51-68.
- 14) Kikugawa K., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **37**, 885-892 (1988).
- 15) Kikugawa K., "Membrane Lipid Peroxidation," Vol. 2, ed by Vigo-Pelfrey C., CRC Press, Boca Raton, 1991, pp. 171-189.
- 16) Kikugawa K., Watanabe S., *Lipids*, **23**, 299-303 (1988).
- 17) Kikugawa K., Kato T., Iwata A., *Anal. Biochem.*, **174**, 512-521 (1988).
- 18) Inoue T., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 319-325 (1998).
- 19) Beppu M., Murakami K., Kikugawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 781-788 (1986).
- 20) Kikugawa K., Sawamura A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1156-1162 (1987).
- 21) Kikugawa K., Iwata A., Beppu M., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 685-692 (1988).
- 22) Kikugawa K., Kato T., Iwata A., Hayasaka A., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3061-3065 (1989).
- 23) Yamaki S., Kato T., Kikugawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2138-2142 (1992).
- 24) Kikugawa K., Kato T., Beppu M., Hayakawa A., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **266**, 345-357 (1990).

- 25) Kikugawa K., Kato T., Iwata A., *Lipids*, **24**, 962–969 (1989).
- 26) Kikugawa K., “Seibutsu Yakkagaku Zikken Koza, Lipids,” eds. by Inoue K., Nakagawa S., Hirokawa Pub., Co., Ltd., Tokyo, Japan, 2002, pp. 336–364.
- 27) Kikugawa K., “Ultrastructural and Molecular Biology Protocols for Oxidants and Antioxidants,” ed. by Armstrong D., Humana Press, Totowa, 2002, pp. 63–68.
- 28) Kikugawa K., Kato T., Yamaki S., Kasai H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 9–15 (1994).
- 29) Kikugawa K., Beppu M., Kato T., Yamaki S., Kasai H., *Mech. Age Develop.*, **74**, 135–148 (1994).
- 30) Kikugawa K., Beppu M., Sato A., Kasai H., *Mech. Age Develop.*, **97**, 93–107 (1997).
- 31) Kikugawa K., Beppu M., Kato T., Yamaki S., *Bitamin E Kenkyu Saikin no Shinpo*, **3**, 70–75 (1993).
- 32) Kasai H., Beppu M., Kikugawa K., *Bitamin E Kenkyu Saikin no Shinpo*, **5**, 152–157 (1995).
- 33) Kikugawa K., Beppu M., Kato T., *Gerontol.*, **41**, suppl. 2, 1–14 (1995).
- 34) Kikugawa K., *Farumashia*, **25**, 1246–1252 (1989).
- 35) Kikugawa K., Kosugi H., *Eisei Kagaku*, **39**, 1–19 (1993).
- 36) Kosugi H., Kikugawa K., *Free Rad. Biol. Med.*, **7**, 205–207 (1989).
- 37) Kikugawa K., *Furiirajikaru no Rinsho*, **10**, 61–66 (1996).
- 38) Kikugawa K., *J. Lipid Nutr.*, **6**, 88–91 (1997).
- 39) Kikugawa K., *Recent Res. Devel. Lipid Res.*, **1**, 73–96 (1997).
- 40) Kikugawa K., “Seibutsukagaku Jikkenho 34,” eds. by Igarashi O., Shimasaki H., Gakkai Shyuppan Senta, Tokyo, Japan, 1995, pp. 143–155.
- 41) Kikugawa K., “Shishitsu Eiyo to Kasanka Shishitsu,” eds. by Okuyama H., Kikugawa K., Gakkai Shyuppan Senta, Tokyo, Japan, 1998, pp. 55–59.
- 42) Kikugawa K., “Kiso Seikagaku Jikkenho 5,” ed. by The Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, Japan, 2000, pp. 54–57.
- 43) “Methods of Analysis in Health Science 2000,” ed. by The Pharmaceutical Society of Japan, Kanehara, Tokyo, Japan, 2000, pp. 200–202.
- 44) Kosugi H., Kikugawa K., *Lipids*, **20**, 915–921 (1985).
- 45) Kosugi H., Kikugawa K., *Lipids*, **21**, 537–542 (1986).
- 46) Kosugi H., Kato T., Kikugawa K., *Anal. Biochem.*, **165**, 456–464 (1987).
- 47) Kosugi H., Kato T., Kikugawa K., *Lipids*, **23**, 1024–1031 (1988).
- 48) Kosugi H., Kikugawa K., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **38**, 224–230 (1989).
- 49) Kosugi H., Kojima T., Kikugawa K., *Lipids*, **24**, 873–881 (1989).
- 50) Kikugawa K., Kojima T., Kosugi H., *Free Rad. Res. Commun.*, **8**, 107–113 (1990).
- 51) Kojima T., Kikugawa K., Kosugi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3414–3418 (1990).
- 52) Kosugi H., Kojima T., Kikugawa K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 51–55 (1991).
- 53) Kikugawa K., Kojima T., Kosugi H., *Eisei Kagaku*, **37**, 47–52 (1991).
- 54) Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H., *Anal. Biochem.*, **202**, 249–255 (1992).
- 55) Kosugi H., Kojima T., Kikugawa K., *Lipids*, **28**, 337–343 (1993).
- 56) Inoue T., Ando K., Kikugawa K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 597–600 (1998).
- 57) Kosugi H., Enomoto H., Ishizuka Y., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1645–1650 (1994).
- 58) Kosugi H., Asano Y., Nagayama T., Beppu M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1275–1278 (1995).
- 59) Miyazawa T., Yasuda K., Fujimoto K., *Anal. Lett.*, **20**, 915–925 (1987).
- 60) Ando K., Nagata K., Beppu M., Kikugawa K., Kawabata T., Hasegawa K., Suzuki M., *Lipids*, **33**, 505–512 (1998).
- 61) Ando K., Nagata K., Yoshida R., Kikugawa K., Suzuki M., *Lipids*, **35**, 401–405 (2000).
- 62) Hiramoto K., Mochizuki R., Kikugawa K., *J. Oleo Sci.*, **51**, 577–581 (2002).
- 63) Kikugawa K., Yasuhara Y., Ando K., Kikugawa K., Hiramoto K., Suzuki M., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6073–6079 (2002).
- 64) Kikugawa K., Yasuhara Y., Ando K., Koyama K., Hiramoto K., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1239–1244 (2003).

- 65) Hiramoto K., Yasuhara Y., Sako K., Aoki K., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1129–1134 (2003).
- 66) Ando K., Ogawa K., Misaki S., Kikugawa K., *Free Rad. Res.*, **36**, 1071–1084 (2002).
- 67) Ando K., Beppu M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 659–663 (1995).
- 68) Beppu M., Mizukami A., Nagoya M., Kikugawa K., *J. Biol. Chem.*, **265**, 3226–3233 (1990).
- 69) Beppu M., Mizukami A., Kikugawa K., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **154**, 353–358 (1992).
- 70) Beppu M., Mizukami A., Ando K., Kikugawa K., *J. Biol. Chem.*, **267**, 14691–14696 (1992).
- 71) Ando K., Kikugawa K., Beppu M., *J. Biochem.*, **119**, 639–647 (1996).
- 72) Ando K., Kikugawa K., Beppu M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 250–257 (1997).
- 73) Ando K., Sako K., Takahashi M., Beppu M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 159–164 (2000).
- 74) Ando K., Kikugawa K., Beppu M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 19394–19398 (1994).
- 75) Kikugawa K., *Farumashia*, **29**, 994–998 (1993).
- 76) Kikugawa K., *J. Lipid Nutr.*, **3**, 20–33 (1994).
- 77) Beppu M., Kikugawa K., *Eisei Kagaku*, **40**, 303–316 (1994).
- 78) Beppu M., Kikugawa K., *Seikagaku*, **67**, 303–307 (1994).
- 79) Beppu M., Kikugawa K., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, 738–750 (1995).
- 80) Beppu M., Ando K., Kikugawa K., *Cell Mol. Biol.*, **42**, 1007–1024 (1996).
- 81) Beppu M., Kikugawa K., *Rinsho to Kenkyu*, **74**, 1913–1918 (1997).
- 82) Beppu M., Ochiai H., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **930**, 244–253 (1987).
- 83) Beppu M., Ochiai H., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **979**, 35–45 (1989).
- 84) Beppu M., Takahashi T., Kashiwada M., Masukawa S., Kikugawa K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 189–197 (1994).
- 85) Beppu M., Takahashi T., Hayashi T., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 47–56 (1994).
- 86) Beppu M., Hayashi T., Hasegawa T., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1268**, 9–19 (1995).
- 87) Eda S., Kikugawa K., Beppu M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 167–175 (1996).
- 88) Beppu M., Eda S., Fujimaki M., Hishiyama E., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 188–194 (1996).
- 89) Eda S., Kikugawa K., Beppu M., *Free Rad. Res.*, **27**, 23–30 (1997).
- 90) Beppu M., Yokoyama N., Motohashi M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 19–26 (2001).
- 91) Beppu M., Ando K., Saeki M., Yokoyama N., Kikugawa K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 368–374 (2000).
- 92) Ando K., Hagiwara T., Beppu M., Kikugawa K., *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, **275**, 412–417 (2000).
- 93) Beppu M., Hora M., Watanabe M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 802–809 (1995).
- 94) Beppu M., Hora M., Watanabe T., Watanabe M., Kawachi H., Mishima W., Makino M., Kikugawa K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**, 243–252 (2001).
- 95) Beppu M., Watanabe T., Kasahara N., Watanabe M., Kikugawa K., *J. Oleo Sci.*, **50**, 225–235 (2001).
- 96) Beppu M., Ohishi K., Kasahara N., Kizaki K., Inohana Y., Kikugawa K., *J. Biochem.*, **131**, 547–555 (2002).
- 97) Beppu M., Watanabe T., Kasahara N., Kikugawa K., *J. Oleo Sci.*, **51**, 385–406 (2002).
- 98) Beppu M., Watanabe M., Sunohara M., Ohishi K., Mishima E., Kawachi H., Fujii M., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 710–717 (2002).
- 99) Beppu M., Watanabe T., Yokota A., Ohmori S., Kikugawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 575–578 (2001).
- 100) Eda S., Beppu M., Yokoyama N., Kikugawa K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **385**, 186–193 (2001).
- 101) Beppu M., Inoue M., Ishikawa T., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1196**, 81–87 (1994).
- 102) Fujino T., Ishikawa T., Inoue M., Beppu M., Kikugawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1374**, 45–47 (1998).
- 103) Fujino T., Ando K., Beppu M., Kikugawa K., *J. Biochem.*, **127**, 1081–1086 (2000).
- 104) Fujino T., Beppu M., Kikugawa K., *J.*

- Biochem.*, **124**, 1077–1085 (1998).
- 105) Fujino T., Watanabe K., Beppu M., Kikugawa K., Yasuda H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**, 102–112 (2000).
- 106) Fujino T., Kojima M., Beppu M., Kikugawa K., Yasuda H., Takahashi K., *J. Biochem.*, **127**, 1087–1093 (2000).
- 107) Fujino T., Tada T., Hosaka T., Beppu M., Kikugawa K., *J. Biochem.*, **127**, 307–313 (2000).
- 108) Shimizu K., Fujino T., Ando K., Hayakawa M., Yasuda H., Kikugawa K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 766–771 (2003).