

—総説—

O₂, NO, CO —ヘムタンパクとの反応—

足立 哲夫

要約: 酸素分子 (O₂)、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) は、ヘム (鉄-プロトポルフィリン IX) に対して親和性を持つ分子種であり、近年、これらがシグナル伝達物質として重要な役割を担っていることが明らかになってきた。NO を産生する NO シンターゼ (NOS)、CO を産生するヘムオキシゲナーゼ (HMOX)、活性酸素の 1 種であるスーパーオキシドを消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) には恒常型 (constitutive) と誘導型 (inducible) のアイソザイムが存在し、誘導型酵素はリポポリサッカライド (LPS) やサイトカイン類により誘導される。NO は血管弛緩や神経系情報伝達などのシグナル分子として多彩な生理活性を持つことが明らかになってきた。NO による情報伝達の標的分子はヘムタンパクである細胞質グアニル酸シクラーゼ (cGC) であるが、最近、CO も cGC 活性化能を有することが報告された。チトクロム P450 (P450) は異物代謝に重要な役割を担っているヘムタンパクであるが、炎症、感染という病態では、この P450 の活性阻害または mRNA やタンパク発現の down regulation に起因する薬物代謝活性の低下が認められる。NO は、このような病態時での LPS やサイトカイン類による P450 制御の重要なメディエーターであることが判明した。以上、O₂、NO、CO は蛋白分子内のヘムとの相互作用により、cGC や P450 の酵素活性を制御していると言える。

索引用語: 活性酸素、一酸化窒素、一酸化炭素、NO シンターゼ、ヘムオキシゲナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、グアニル酸シクラーゼ、チトクロム P450

O₂, NO, CO —Interaction with Heme Proteins—

Tetsuo ADACHI

Abstract: Oxygen molecule (O₂), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) have affinity toward heme (Fe-protoporphrin IX). The importance of these molecules in signal transduction is becoming increasingly evident. NO synthase (NOS) which produces NO, heme oxygenase (HMOX) which produces CO and superoxide dismutase (SOD) which dismutates the superoxide, each consist of two types of isozymes, constitutive and inducible isozymes. The expression of inducible enzymes is regulated by lipopolysaccharides (LPS) and inflammatory cytokines. NO is a signaling agent which plays a role in many biological processes such as vasodilation and neuronal synaptic transmission. Intercellular communication with NO is mediated by the direct activation of cytosolic guanylate cyclase (cGC). Recently CO also has been shown to activate cGC. Cytochromes P450 (P450) are heme proteins that catalyze the oxidative metabolism of xenobiotics. During infection or inflammatory stress, the capacity of the liver to metabolize many drugs is impaired due to inhibition of P450 activity or down regulation of mRNA and/or protein expression of P450 apoprotein. NO is suggested to be an important mediator for the regulation of P450 by LPS and cytokines under the above pathological conditions. Interactions of O₂, NO and CO with the heme moiety on enzymes regulate enzymatic activity.

Keyphrases: active oxygen, nitric oxide, carbon monoxide, NO synthase, heme oxygenase, superoxide dismutase, guanylate cyclase, cytochrome P450

ヘモグロビンに代表されるヘムタンパクは、鉄-プロトポルフィリン IX 錯体 (ヘムは鉄-ポルフィリン錯体の慣用名) を有するタンパクであり、その機能は多岐にわた

り、多くはヘムが活性中心を形成している。分子状酸素 (O₂) とヘムとの相互作用については、血液中でのヘモグロビンの O₂ 運搬をはじめ、古くから多くの研究がなさ

岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東5丁目6-1)

Laboratory of Clinical Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University
(5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

れてきた。生物の進化の過程でタンパクにヘムが取り込まれた結果、タンパクは O₂ を酸化還元反応や酸素添加反応など多くの反応に利用する機能を獲得した。しかし、この機能を遂行するためには、ヘムとその周囲のタンパク部分が協調し、ヘムでの反応を受容、増幅、伝達して活性を発現する必要がある。近年のタンパク解析法の進歩によりこれらの一連の反応が解明されてきた。

体内に取り入れられた O₂ は、種々の反応により活性化されて利用される。これら活性化された酸素は、一般的に寿命が短く、利用された後、消去酵素や低分子抗酸化剤により速やかに消去される。活性酸素種は反応性が高いが故に、その毒性が強調され各種病態への関与が報告されてきたが、最近、これらの活性酸素が生体内のシグナル伝達物質として生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた¹⁾。

一酸化窒素 (NO) は O₂ と同じ 2 原子分子であり、不対電子をもつ活性酸素種である。NO は大気汚染の原因物質として生体に毒性を示すガスとして知られていたため、NO が体内で恒常的に産生され、生命維持に必須であるということは、それ以前には予想されなかったことである。1980 年に発見された内皮由来血管弛緩因子 (EDRF)²⁾ の本体が NO であることが報告されて以来³⁾、その多彩な生理機能に関する論文数は、指数関数的に増加し、1992 年の Science 誌では “The Molecule of the Year” という評価を得た⁴⁾。NO は細胞膜脂質二重層を自由に透過し、ヘムタンパクであるグアニル酸シクラーゼ (GC) の活性化という反応を通してシグナル伝達物質としての生理機能を発揮する。

一酸化炭素 (CO) は不対電子を持たない安定な 2 原子分子である。不完全燃焼時に発生する中毒ガスとして有名であるが、これは CO とヘモグロビンとの結合により O₂-ヘモグロビン結合が阻害されるためである。近年、CO も NO と同様に生体内の酵素により恒常的に産生され、GC 活性化という機能を持つことがわかってきた。

O₂, NO, CO という 2 原子分子は、常温常圧ではガスであるが、水にかなり溶け、生体内では溶解した状態で^{5,6)}、ヘムタンパクに結合してその活性を制御することにより、多彩な生体内反応のトリガーとなる。Table 1 にこれら 2 原子分子の性質を示す。

Table 1. Properties of O₂, NO and CO

	O ₂	NO	CO
Melting pt/°C	-218.4	-163.6	-215.0
Boiling pt/°C	-182.96	-151.8	-191.5
X-O distance/Å	1.2075	1.1508	1.1282
X-O dis. energ./KJ/mole	493.6	626.8	1071.8
Solubility/100 g water	0.00434	0.00617	0.00284
Affinity for metal	(+)	(++++)	(++)

チトクロム P450 は薬物代謝反応の大部分に関与する酵素であるが、これもヘムタンパクであるため、生体内における NO や CO 産生量の変動はその活性に大きく影響を及ぼす可能性がある。

本稿では、(1) O₂ 代謝、NO 産生、CO 産生を司っている酵素の構造と活性制御機構、(2) シグナル伝達の第 1 段としての GC と上記 2 原子分子メディエーターとの反応機構、(3) 生体内で産生された NO のチトクロム P450 活性に及ぼす影響についての研究を紹介する。

1. O₂ 代謝酵素、NO 産生酵素、CO 産生酵素

1.1. 活性酸素とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

1.1.1. 活性酸素

活性酸素とは、狭義には三重項酸素 (³O₂) が励起してできる一重項酸素 (¹O₂)、酸素が 1 電子還元されたスーパーオキシド (O₂⁻)、O₂ が不均化して生ずる 2 電子還元種である過酸化水素 (H₂O₂)、H₂O₂ より生成するヒドロキシラジカル ([•]OH) の 4 種を指す。[•]OH は活性酸素の中でも最も反応性が高い分子であり、タンパクや脂質をはじめ多くの生体分子と速やかに反応する。その反応速度定数は 1×10⁹ M⁻¹s⁻¹ と拡散律速に近い⁷⁾ため、[•]OH はその発生部位に存在する生体物質と非特異的に反応する。従って、[•]OH を特異的に効率よく消去する物質はなく、[•]OH の毒性を軽減するためにはその発生自体を抑制する必要がある。[•]OH は過酸化水素への紫外線の照射の他、金属が触媒する O₂⁻ と H₂O₂ との反応である Haber-Weiss 反応により産生される⁷⁾。また最近、O₂⁻ と NO との反応により生成されるペルオキシナイトライト (ONOO⁻) とプロトンとの反応から[•]OH が産生されるという経路も報告されたが⁸⁾、これについては熱力学的観点から否定的な報告もある⁹⁾。つまり Fig. 1 に示すように、[•]OH は生体内の様々な反応において産生される O₂ からの二次生成物と言える。

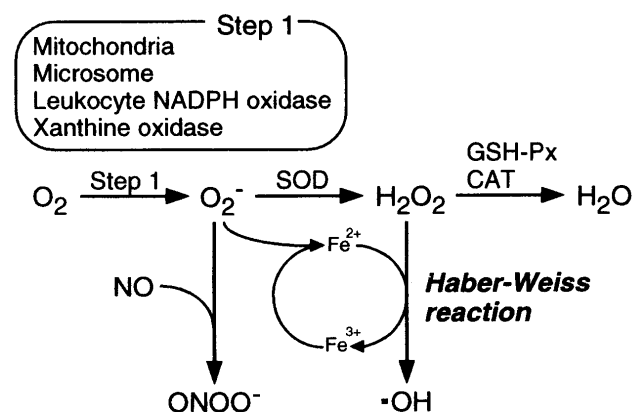


Fig. 1. Metabolic map of active oxygens.

このことから $\cdot\text{OH}$ の量は、(1) O_2^- の産生、(2) SODによる O_2^- の消去、(3) カタラーゼ (CAT) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) による H_2O_2 の消去に依存すると考えられるが、これらの内、種々の外来刺激による制御がよく検討されているSODについて記述する。

1.1.2. SODの分類

生体内で発生した O_2^- は生理的条件下において非酵素的不均化反応により H_2O_2 と酸素分子に変換されるが、その反応速度定数は $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度である。SODの存在下ではその反応速度が $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と約2万倍加速され拡散律速に近くなる¹⁰⁾。1969年のSODの発見は¹¹⁾、医学生物学の領域に活性酸素を導入するきっかけとなった。SODは分子内に含まれる金属により、銅と亜鉛を含むCu,Zn-SOD (SOD-1)¹¹⁾、マンガンを含むMn-SOD (SOD-2)¹²⁾、鉄を含むFe-SODの3種類に分類されていたが、これらの内、Fe-SODは哺乳動物には存在しない。1982年に哺乳動物における第3のSODとして分泌タンパクである細胞外型 (extracellular) SOD、略してEC-SOD (SOD-3) が発見された¹³⁾。

1.1.3. SODの構造

その構造および特徴はTable 2に示す。Cu,Zn-SODは活性中心を形成する銅と構造を保持する亜鉛を含有する酵素であり、細胞の可溶性画分に存在する。近年、アミノ酸変異を伴うCu,Zn-SOD遺伝子のミスセンス点変異と家族性筋萎縮性側索硬化症との関係がトピックスになっている¹⁴⁾。Mn-SODはミトコンドリアに存在する酵素であり、そのアミノ酸配列はCu,Zn-SODのそれと相同性はない。一方、高等動物のMn-SODと細菌のMn-SODとの間でもアミノ酸配列が類似しており、高等動物が進化の過程でミトコンドリアを自分の体に共生させることにより効率よくATPを産生する系を獲得したという説を支持している。以上のCu,Zn-SODとMn-SODについては多く総説に詳述されているので参考にされたい^{15,16)}。EC-SODは血漿とリンパ液中で発見されたためその名がつけられたが、実際には体液中に存在するのは1%以下で、血管壁に広く分布するヘパリン硫酸プロテオグリカン類に結合して存在する¹⁷⁾。分子内に銅と亜鉛を含み、これらの金属に配位しているアミノ酸はCu,Zn-SODの対応する位置と同じであることから活性中心の構造はCu,Zn-SODと類似しているものと考えられている¹³⁾。C末端には塩基性アミノ酸のクラスターがあり、この部位がヘパリン様物質との親和性に寄与しており¹⁸⁾、血管腔内ではこのC末端ドメインを介して内皮細胞に結合している¹⁹⁾。近年、このヘパリン結合部位内のアミノ酸置換 (Arg213→Gly) を伴う遺伝子変異が認められ^{20,21)}、腎疾患透析患

者ではその出現頻度が高い²²⁾。

Table 2. Comparison of SOD Isozymes

	Cu,Zn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
Chromosome	21q22.1	6q25.2	4p16.3-q21
Amino acid length	153	198	222
Predicted MW	32 kDa	80 kDa	135 kDa
Subunit	dimer	tetramer	tetramer
Glycosilation	(-)	(-)	(+)
Heparin-affinity	(-)	(-)	(+)

1.1.4. SODの制御

Cu,Zn-SODは発現量の変動が小さい恒常型酵素であるのに対し、Mn-SODはリポポリサッカライド (LPS) や炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-1、IL-2、Cキナーゼ活性化剤であるホルボールエステル類により誘導される酵素である²³⁾。Mn-SOD遺伝子のプロモーター部分にはSP-1、AP-1、AP-2、NF-KBなどの転写因子認識コンセンサス配列がある²⁴⁾。EC-SODについてはIFN- γ によりタンパク発現が誘導されるものの、TNF- α 、TGF- β によっては発現が抑制されると報告されている²⁵⁾。

1.2. NOとNOシンターゼ (NOS)

1.2.1. NOSの分類

NO産生酵素 (NOS) には少なくとも3種類のアイソザイムが存在することがタンパクおよび遺伝子レベルで確認されている。各アイソザイムはさまざまな細胞、臓器によって複雑な調節機構のもとに発現している。3種のアイソザイムは国際命名法により、NOS-1、NOS-2、NOS-3という名称が用いられているが、その内、NOS-1とNOS-3は、それぞれ主に神経系細胞 (neuronal cell)、内皮細胞 (endothelial cell) で共に恒常的 (constitutive) に発現しているため、ncNOS、ecNOSと呼ばれ、NOS-2は細菌エンドトキシンやサイトカインに応答し誘導される (inducible) ことより、iNOSと呼ばれている⁵⁾。

1.2.2. NOSの構造

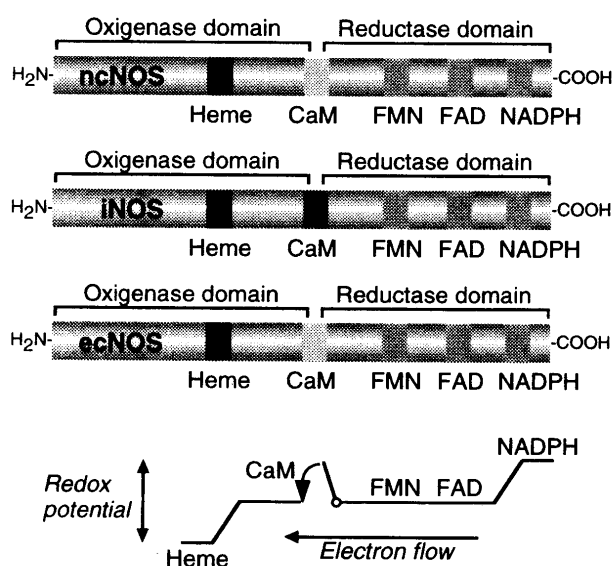
3種のアイソザイムのアミノ酸配列は互いに約50%の相同性であるが、タンパクとしての基本構造は類似している。N末端側にヘムと基質であるL-アルギニンの結合部位を含むオキシゲナーゼ領域、中央部にカルモジュリン結合部位、C末端側にNADPH、FAD、FMN結合部位を含みチトクロムP-450還元酵素と相同性が高いレダクターゼ領域を持つ。また、これらの結合部位の位置関係も3種のアイソザイム間でよく保存されている²⁶⁾。一方、それぞれのアイソザイムをコードする遺伝子の染色体上の位置は異なっており²⁷⁾、mRNAの大きさも異なる。各アイソザイムの比較をTable 3およびFig. 2に示す²⁸⁾。

Table 3. Comparison of NOS Isozymes

	ncNOS (NOS-1)	iNOS (NOS-2)	ecNOS (NOS-3)
Chromosome	12q24.2-24.31	17q11-12	7q35-36
Amino acid length	1433	1153	1202
Subunit MW	160970	131117	133157
Predicted MW	160 kDa	130 kDa	133 kDa
mRNA length	8.5-9.9 kb	4.2-4.5 kb	4.3-4.8 kb
Ca ²⁺ dependence	(+)	(-)	(+)
Expression	constitutive	inducible	constitutive

1.2.3. NOS の制御

ncNOS と ecNOS は constitutive という名の通り、遺伝子の転写レベルでの制御機構はなく（関与は小さい）、恒常的に発現されているものの、通常は不活性型として存在する。そして ncNOS は神経細胞の脱分極、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のグルタミン酸による刺激に反応し²⁹⁾、ecNOS は内皮細胞でアセチルコリン、サブスタンス P、ブラジキニンなどの作用や³⁰⁾血流に起因するズリ応力に反応し³¹⁾、共に細胞内への Ca²⁺流入に伴うカルモジュリンタンパクの結合を介して活性化される。しかし、最近、ncNOS mRNA の発現が発生や分化の過程で誘導されること³²⁾、ecNOS mRNA の発現はプロテインキナーゼ C 活性化剤、エストロゲン、酸化 LDL、低酸素、血流刺激などにより誘導されることが報告された³³⁾。ncNOS と ecNOS は、通常、レダクターゼ領域とオキシゲナーゼ領域間の電子伝達が不可能な不活性化体として存在するが、中間領域に Ca²⁺/カルモジュリンが結合すると立体構造が変化し、両領域間の電子の受け渡しが可能になり、NO 産生能が活性化される³⁴⁾。(Fig. 2 参照)

**Fig. 2.** NOS domains and electron transfer.

iNOS には Ca²⁺非依存性にカルモジュリンが強固に結合し、その酵素活性には Ca²⁺を必要としないため、NO 産生量は、主に iNOS 遺伝子の発現量に依存する。普段、iNOS はほとんど発現されていないが、外来刺激により転写誘導が起きた場合、他の NOS アイソザイムに比べ、数百~数千倍も大量の NO を産生し、種々の病態の発症原因になっていると考えられている³⁵⁾。iNOS の誘導は炎症反応と密接に関わっており、炎症性サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β など) の刺激により数時間かけ iNOS mRNA とタンパクが誘導されることが報告されている³⁶⁾。ヒト肝からクローニングされた iNOS 遺伝子の 5'側プロモーター領域にはサイトカイン類やエンドトキシンに反応するコンセンサス配列 (NF-KB, AP-1, TNF-RE, NF-IL-6 など) が存在し、転写活性が制御されていると考えられている³⁷⁾。一方、IL-4 や TGF- β などのサイトカイン類、グルココルチコイド、Cキナーゼ、免疫抑制剤 (シクロスポリン、FK506) は転写抑制因子として働く³⁸⁾。

1.3. CO とヘムオキシゲナーゼ (HMOX)

1.3.1. HMOX の分類と構造

生体内における CO 産生のほとんどはヘムの分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HMOX) の酵素反応による。この反応では、ヘムのポルフィリン環が酸素添加反応により開裂し CO と鉄-ビリルジン錯体が生成される³⁹⁾。この錯体は、さらに NADPH-チトクロム P450 レダクターゼにより還元され、鉄とビリルビンとになる。HMOX にも、誘導型 (inducible) の HMOX-1 と恒常型 (constitutive) の HMOX-2 の 2 種類のアイソザイムが存在する⁴⁰⁾。HMOX-2 は HMOX-1 の N 末端側に約 20 のアミノ酸残基からなるペプチドが余分に結合した構造を持ち、アミノ酸配列の相同性は 42%であるが、高次構造はよく似ており、両者とも C 末端部の疎水性領域でミクロソーム膜に結合している⁴¹⁾。両アイソザイムの比較を Table 4 に示す。

Table 4. Comparison of HMOX Isozymes

	HMOX-1	HMOX-2
Chromosome	22q12	16p13.3
Amino acid length	288	316
Subunit MW	32818	36033
Predicted MW	32 kDa	130 kDa
Expression	inducible	constitutive
Distribution (abundant)	liver, spleen	brain, testis

1.3.2. HMOX の制御

HMOX-1 は誘導型酵素であり、ヘム、重金属イオン、過酸化水素、熱ショック (HMOX-1 は熱ショックタンパク、Hsp32 と同一)、紫外線照射、虚血というような外部

刺激により著明に誘導される^{40,42,43)}。一方、HMOX-2は恒常型といわれているが、最近、この遺伝子のプロモーター部位にグルコシルチコイドに応答するコンセンサス配列が存在すること、実際にHMOX-2の転写を活性化することが明らかにされた⁴⁴⁾。

2. グアニル酸シクラーゼ (GC) 活性化機構

2.1. NOとCOの生理活性

2.1.1. NOの生理活性

NOは初め血管内皮由来平滑筋弛緩因子として発見された^{23,45)}。血管系において内皮細胞に存在するeNOSは、血流に起因するズリ応力 (shear stress) などの刺激に対し敏感に感応して、NOを産生し、血管壁の平滑筋細胞に対して弛緩作用や増殖抑制作用を示す他、血管腔側に放出されたNOは血小板凝集接着抑制作用、白血球接着抑制作用を示す。また、血管の外膜側から分布し、中膜で終わる非アドレナリン・非コリン (NANC) ニューロンにはncNOSの発現がみられる。つまり、血管系においてeNOSやncNOSから恒常的に産生されるNOは抗血栓性、抗動脈硬化性の維持に重要な役割を果たしていると言える²⁶⁾。一方、血管系のマクロファージ、白血球、平滑筋細胞など多数の細胞に存在するiNOSは感染、炎症などの病態下でLPSや炎症性サイトカイン類の刺激を受けて誘導され、多量のNOを放出する⁴⁶⁾。このNOは外来性の異物に対する生体防御機構の役割を果たしているものの、iNOS発現の遷延化による過剰なNOは周囲の組織に傷害を及ぼしたり、エンドトキシンショック時にみられるような著明な血管弛緩作用による血圧降下を引き起こすなど、生体にとって逆に不都合な作用をもたらす。NOは、言わば、他の活性酸素種と同様、両刃の剣と言える²⁶⁾。

また、NOは脳内でも恒常的に産生され、シナプス伝達の可塑性 (シナプス伝達効率が使用状況に依存して増強または減弱し、この変化が長時間持続する現象で学習・記憶の基礎過程と考えられている) に関与している可能性が示唆された⁴⁷⁾。特に海馬の長期増強現象 (LTP) における逆行性伝達物質として働いている可能性が示され、その産生についてはncNOSとeNOSの両方が関与している^{48,49)}。一方、初代培養マイクログリア、アストロサイトにおいてLPSおよびIFN- γ の処理によりiNOS活性の誘導が報告されている。脳内でも虚血やウイルス感染などが原因となり産生されたサイトカイン類によりiNOSの発現が制御されている可能性がある⁵⁰⁾。

2.1.2. COの生理活性

NOと同様にCOも血管トーン調節に関与している可能性が報告された⁵¹⁻⁵³⁾。COが平滑筋弛緩作用や血小

板凝集抑制作用を有し、特に肝では毛細血管に相当する類洞でのトーン調節にNOよりも優位に関与している可能性が示された⁵⁴⁾。脳内においてもCO産生酵素であるHMOXが海馬CA1領域の錐体細胞に存在し、COがNOと同じように、LTPにおける逆行性伝達物質として働いている可能性を示唆する報告があるが、それを否定する報告もある⁵⁵⁻⁵⁷⁾。

2.2. ヘム鉄とNOとの結合

ヘムの基本構造は4個のピロール環がメチン基 (-CH=) でつながった環状化合物であるポルフィリンの中心に鉄イオン (ヘム鉄) を有するものである。代表的なヘムタンパクであるヘモグロビンの赤い色はヘム鉄そのものによるものではなく、共役二重結合の部分に存在する π 電子の遷移に由来する⁵⁸⁾。ヘムは面内に4個の配位子 (N原子) をもち、この平面の下と上の第5、第6配位座は空いている。多くのヘムタンパクでは、第5配位座にはグロビン部分 (タンパク部分) に由来する配位子 (内在性配位子、endogenous ligand) が入る。ヘムタンパクの内、ヘモグロビン、ミオグロビン、ペルオキシダーゼのヘム第5配位座はヒスチジンのイミダゾール基の窒素原子であり、チトクロムP450ではシステイン残基のSである⁵⁹⁾。ヘム鉄が還元型Fe(II)の場合、面の反対側の第6配位座には外部からの配位子 (外来性配位子、exogenous ligand) として分子状O₂、NO、COなどが結合する。これらの配位子のヘム鉄への親和性はO₂<CO<NOである。この親和性の差がCO中毒を引き起こす。鉄ポルフィリン錯体を用いた実験より、ヘム鉄の位置は第5配位座、第6配位座の結合によりポルフィリン平面から上下にわずかに移動することが明らかになっている。Figure 3に示すように、5配位型Fe(II)ヘムのヘム鉄は第5配位座側に0.4~0.5Å変位している (不活性型)。この第6配位座にNOが結合し、6配位型NOヘムを生じた場合、ヘム鉄はポルフィリン平面へと0.4~0.5Å移動し (中間型)、次に第5配位座とヘム鉄との結合が開裂し5配位型NOヘムを生じた場合、第6配位座であるNOの方へ更に0.6~0.8Å移動する (活性型)⁶⁰⁾。

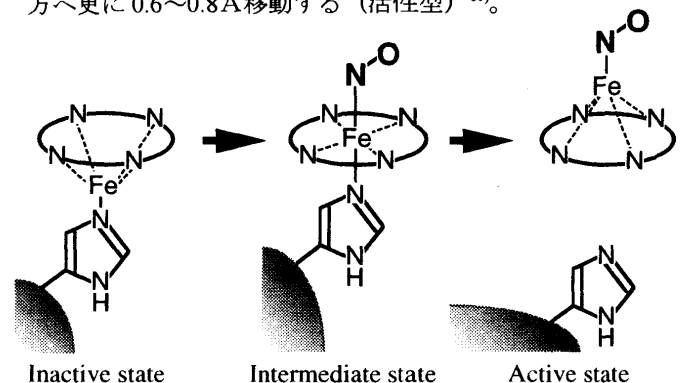


Fig. 3. Activation of heme protein by NO.

2.3. GCの活性化

2.3.1. GCの分類と構造

NO や CO は血管系あるいは脳内で種々の生理活性を示すが、これらのメディエーターの標的タンパクは、いずれの反応においてもグアニル酸シクラーゼ (GC) である。GC はグアノシン-5'-3'リン酸 (GTP) から環状グアノシン-3',5'-1リン酸 (cGMP) を生成する反応を触媒する酵素であり、細胞膜結合型酵素と可溶性画分に存在する酵素とがあるが、NO や CO により活性化される酵素は可溶性 GC (cGC 又は sGC) である⁶¹⁾。

本酵素は α -サブユニット (分子量約 82000) と β -サブユニット (分子量約 70000) のヘテロダイマーであり、両サブユニットの C 末端領域のアミノ酸配列は相同性が高い^{28,62)}。cGC はヘムタンパクであるが、タンパク中でのヘムの数およびヘムが配位しているヒスチジンの場所については2つの異なる説が唱えられ、統一した見解を得るには至っていない。すなわち、ヘテロダイマーあたり1つのヘムを持ち、 β -サブユニットの His105 がヘムの結合部位を構成しているという報告と⁶³⁻⁶⁵⁾、 α -サブユニットと β -サブユニットの各々に1つずつのヘムが結合し、 β -サブユニットの His220 又は β -サブユニットの His346 およびそれに対応する位置である α -サブユニットの His290 または His407 がヘムとの結合に関与しているという報告がある^{66,67)}。

2.3.2. NO、COによるcGCの活性化

シクラーゼ活性の反応触媒部位は α -、 β -サブユニット両方の C 末端領域に存在する⁶³⁾。一方、NO あるいは CO は cGC の N 末端側のヘム鉄に結合する。この反応を cGC において考えてみると、NO が結合していないときヒスチジン (文献 63 では His105) のイミダゾール環の窒素原子が鉄に配位し、鉄はポルフィリン平面より His105 に近い位置をとる (Fig.3 参照)。NO が空位の第 6 配位座に結合した状態、さらに Fe(II)とイミダゾール窒素との結合が開裂あるいは弱くなり 5 配位型 NO-ヘムが形成された状態を考えると、この一連の反応による His105 を含む立体構造の変化がシグナルとなって cGC のシクラーゼ部位の活性化が起こると推察できる⁶⁸⁾。実際 cGC に NO が結合した場合、5 配位型 NO 錯体が形成されることが共鳴ラマン散乱法、ESR 法により証明されている^{69,70)}。一方、cGC ヘムと CO との結合については、6 配位型スペクトルが得られ、Fe(II)とイミダゾール窒素との間の結合は開裂せず、そのため CO 結合による cGC 立体構造の変化は小さいことが示唆された⁷¹⁾ (Fig. 4)。これらの結果は cGC が basic 活性に比べ、NO 存在下では 100 倍以上活性化されるのに対し、CO 存在下では 3~4 倍であるという報告と一致する⁷²⁾。しかし、このことから、すぐに CO の生体内での機能が NO に比べ非常に小さいと結

論づけることはできない。CO を産生する HMOX、NO を産生する NOS の分布や発現量を考慮する必要があるし、CO は NO に比べ安定である⁵⁷⁾。NO、CO は共に細胞膜を自由に透過できるため (ちなみに O₂ は細胞膜を透過できない)、NO および CO は細胞内で産生された後、自由拡散するが、そのスピードに違いがある可能性もある。また NO の方が CO よりヘムタンパクとの結合性が強いということは、標的酵素である cGC に到達する前に他のヘムタンパクにトラップされる可能性も高いということもある。

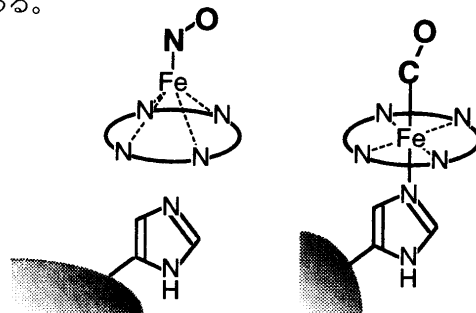


Fig. 4. Models for NO-ligated and CO-ligated cGC.

2.3.3. \cdot OHによるcGCの活性化

\cdot OH も cGC 活性に影響を及ぼすことが報告された。しかし、活性化するという報告と阻害するという報告があり、 \cdot OH 濃度などにより複雑に制御されているようである。また、この反応は \cdot OH と cGC のチオール基との反応によると考えられている^{73,74)}。cGC の β -サブユニットの Cys78 と Cys214 をセリン残基に置換した変異体は不活性型であることより、両システイン残基が cGC 活性発現に関与していることが推察されているが⁷⁵⁾、 \cdot OH の影響がこれらの Cys 残基の修飾によるものか不明である。

2.4. NO と CO の相互の産生制御

NO と CO は、cGC の活性化を介して同様な生理機能を示しているが、両者の活性化力および安定性は異なり、互いに産生酵素の発現を制御することにより生体の恒常性を維持している可能性がある。種々の細胞において NO (NO ドナーの添加) により HMOX-1 mRNA やタンパクの発現が誘導されることが報告されている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。一方、HMOX-2 mRNA の発現は誘導されない。HMOX-1 発現活性化機構については、NO 産生 \rightarrow cGC 活性化 \rightarrow cGMP 産生系シグナル伝達を介するという説だけでなく、多量に発生する NO がヘムタンパクを変性させ、遊離したヘムにより HMOX-1 遺伝子転写活性化が引き起こされるという説がある^{77,80)}。一方、内皮細胞において、NOS 阻害剤は HMOX-2 mRNA レベルを上昇させ、HMOX 阻害剤は ecNOS mRNA レベルを上昇させるという NO と CO の相互補填による制御機構の存在が示唆された⁸¹⁾。逆に CO 量の制御 (HMOX の阻害、CO ガス添加) はその濃度に

依存して NO 依存性の神経伝達に正負の影響を与えることも報告されている⁸²⁾。

2.5. 病態時の O₂⁻、NO、CO の産生

病態時に多量に産生される炎症性サイトカイン(TNF、IL-1、IFN-γ)、LPS という外来刺激は、好中球やマクロファージなどに存在する NADPH オキシダーゼを活性化し多量の O₂⁻を放出させる。また、同時にこれらの細胞の iNOS を誘導し NO を発生させる。即ち多量の NO と O₂⁻が同時に発生し、これらから ONOO⁻が生じる可能性がある。NO が多量に発生した場合のその毒性については NO 自身によるものか ONOO⁻によるものかは統一した見解が得られていないが、タンパク中のチロシン残基のニトロ化、グルタチオンなどのチオール酸化を介して毒性を発現するといわれている⁸³⁾。また最近 ONOO⁻がシクロオキシゲナーゼを活性化することによりプロスタグランジン産生を誘導する起炎物質である可能性が示唆された⁸⁴⁾。この ONOO⁻の生成反応速度定数は 4.3~6.7×10⁹ M⁻¹s⁻¹であり、SOD による O₂⁻の消去反応の速度定数 2×10⁹ M⁻¹s⁻¹と同オーダーである。一方、上記のような外来刺激は、3 種の SOD の内の Mn-SOD を誘導する⁸⁵⁾。この状況での Mn-SOD の誘導は、O₂⁻に由来する種々活性酸素による傷害から生体を防御する機構となる。

サイトカイン類や LPS は、iNOS の他に HMOX-1 も活性化する⁸⁶⁾、HMOX-1 の誘導機構は、NO によりヘムタンパクからの脱離したヘムの増大を介する系と、サイトカイン類による HMOX-1 の up regulation の系が報告されている。HMOX-1 の誘導はヘムの分解と CO、ビリルジン、ビリルビンの産生を促進させ、できたビリルビン等は生体内の有効な低分子抗酸化剤として働く⁸⁷⁾。

このように考えると炎症性サイトカインや LPS による iNOS 誘導と同時に引き起こされる Mn-SOD、HMOX-1 の発現誘導は、活性酸素が原因となる生体酸化反応に対する防御機構と言える。

3. NO による薬物代謝活性の変動

3.1. 薬物代謝とチトクロム P450

薬物代謝に関与する酵素は、元来、ステロイド、脂肪酸、胆汁酸という生体内物質の代謝、生合成を触媒する酵素であるが、外来性の異物(薬物を含む)を代謝し排泄する役目をもつ。薬物代謝反応は、ほとんどが異物排泄のための極性化反応であり、薬物に極性官能基を導入する第 1 相(酸化、還元、加水分解など)と、グルタチオン、グルクロン酸、硫酸などと抱合させることにより水溶性を付加し、体外に排泄され易くする第 2 相(抱合反応)に大別できる。P450 は薬物代謝第 1 相の主代謝酵

素であり、代謝反応の約 8 割に関与している。

P450 は酵素らしくない名称であるが、これは肝ミクロソーム懸濁液を亜ジチオン酸ナトリウムで還元し、CO を通気したときに現れるスペクトルから「450 nm に極大吸収を持つ色素 (pigment)」という意味で仮につけられた名であった(1958 年、Klingenberg)⁸⁸⁾。すべての P450 の遺伝子は共通の祖先から進化した超遺伝子群(スーパーファミリー)を形成している。P450 のそれぞれの名称は CYP (cytochrome P450 の略)の後にファミリー(アラビア数字)およびサブファミリー(アルファベット)をつけた系統的名称である。アミノ酸配列の相同性が 40% を超える分子種を 1 つのファミリーとし、55% の相同性を超えるグループをサブファミリーとして分類している。1 つのサブファミリーに属する複数の分子種はアルファベットの後にアラビア数字を入れて表示している(例えば、CYP1A1)。同一のサブファミリーに属する P450 遺伝子は知られている限り染色体上で隣接しているのに対し、同一のファミリー内でも異なるサブファミリーに属する分子種は別々の染色体に乗っていることが多い⁸⁹⁾。近年、各薬物の代謝に関与する P450 分子種が明らかになり、ヒト肝ミクロソームでは CYP3A、2C、1A2、2E1 の 4 種で P450 全体の 60~70% を占める⁹⁰⁾。

3.2. P450 の活性

P450 は主に肝のミクロソームに局在するモノオキシゲナーゼ(一原子酸素添加酵素)型の膜酵素である。



式 (1) のように、P450 は NADPH の存在下、分子状 O₂ を活性化し、その 1 原子は薬物分子中に取り込まれ、他の 1 原子は水分子に還元される。つまり、Fig. 5 のようなサイクル⁹¹⁾により薬物の酸化が進行するためには不活性な酸素分子を活性化し有機基質と反応させること、2 電子を用いて O-O 結合を開裂させ、同時にプロトンの供給を受け触媒反応をサイクルさせることが必要となる⁹²⁾。

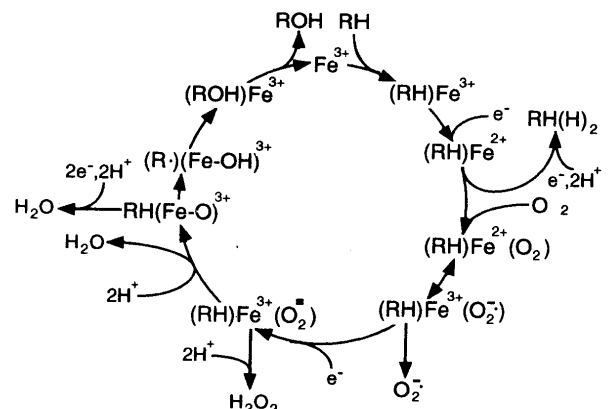


Fig. 5. Mechanism of action of P450. RH: the substrate, RH(H)₂: a reduction product, and ROH: a monooxygenation product.

V G G L	D251	T252	V V N F	————	G S H L	C357	L G Q H	<i>Pseudomonas</i>	P450	414 aa	46538 MW
G A G F	D320	T321	V T T A	————	G K R K	C457	I G E T	human	CYP 1A1	512 aa	58165 MW
G A G F	D320	T321	V T T A	————	G K R R	C458	I G E V	human	CYP 1A2	515 aa	58294 MW
I G G T	E304	T305	V S T T	————	G K R N	C439	F G E G	human	CYP 2A6	494 aa	56541 MW
F A G T	E301	T302	T S T T	————	G K R I	C436	L G E G	human	CYP 2B6	491 aa	56278 MW
G A G T	E300	T301	T S T T	————	G K R I	C435	V G E A	human	CYP 2C9	490 aa	55574 MW
G A G T	E300	T301	T S T T	————	G K R I	C435	V G E G	human	CYP 2C19	490 aa	55945 MW
S A G M	V308	T309	T S T T	————	G R R A	C433	L G E P	human	CYP 2D6	497 aa	55801 MW
F A G T	E301	T302	T S T T	————	G K R V	C437	A G E G	human	CYP 2E1	493 aa	56849 MW
F A G Y	E308	T309	T S S V	————	G P R N	C442	I G M R	human	CYP 3A3	503 aa	57428 MW
F A G Y	E307	T308	T S S V	————	G P R N	C441	I G M R	human	CYP 3A4	502 aa	57299 MW
G A G F	D324	T325	I T T A	————	G K R K	C461	I G E T	rat	CYP 1A1	524 aa	59393 MW
G A G F	E318	T319	V T T A	————	G K R R	C456	I G E I	rat	CYP 1A2	513 aa	58293 MW
F A G S	E302	T303	V S S T	————	G K R F	C437	L G D G	rat	CYP 2A1	492 aa	56009 MW
F A G Y	E309(P)	T311	S S T L	————	G P R N	C443	I G M R	rat	CYP 3A1	504 aa	57917 MW

Fig. 6. Amino acids surrounding heme in P450s. aa: number of amino acid, MW: molecular weight.

3.3. P450 の構造と機能

P450 は分子量約 50,000 で、補欠分子族として 1 つのプロトヘムを有するタンパクである。哺乳動物の肝ミクロソームなどに存在する P450 は膜タンパクであるため、X線解析による立体構造については報告されていないが、*Pseudomonas* 属^{93,94})や *Bacillus* 属⁹⁵)P450 の結晶構造、多種の P450 について判明しているアミノ酸配列、アミノ酸 1 置換体の酵素活性の変化⁹⁶⁻⁹⁸)などについての情報から活性中心を構成するヘム鉄周囲の構造と活性発現機構が推定されている。Figure 6 に示すように、第 5 配位子であるシステインの N 末側には塩基性アミノ酸が多く、第 6 配位子となる O₂ に隣接する酸性アミノ酸-スレオニン配列も種を越えてよく保存されていることがわかる。

P450 のヘム鉄の第 5 配位子はシステイン残基の S⁻であり、強い電子押し出し効果 (push effect) を持つ。この軸配位子から鉄を通して O-O 結合に提供される電子は、鉄と結合している酸素原子にカチオン性を付加し、脱離する側の酸素原子をよりアニオン性にするにより O-O 結合をイオン開裂し易くする⁹⁹)。一方、遠位側の酸素原子に比較的近い部位にスレオニンの水酸基 (*Pseudomonas* 属の場合 Thr252) があり、それに続く酸性アミノ酸 (Asp251、この部位が Glu である P450 もある) や立体的に近い位置をとる塩基性アミノ酸 (*Pseudomonas* 属の場合 K178 や R186) とともに電子吸引効果 (pull effect) を持つプロトンチャンネルを形成しているものと推定されている⁹⁹) (Fig. 7 に模式図を示す)。P450 に NO が反応する場合、ヘム鉄と Glu318 (ラット CYP1A2 の場合、Fig. 6 に示すように、この位置は *Pseudomonas* 属 P450 の Asp251 に相当する位置) の間に鉄-N-O-H bridge が形成され、これが鉄-NO complex を安定化する¹⁰⁰)。このような P450 ヘム鉄と O₂ あるいは NO との反応性の違いが、後述する NO による P450 活性阻害の機序と考えられる。

3.4. P450 の制御

炎症、感染という病態が薬物代謝能の低下を引き起こ

すことは以前より報告されており¹⁰¹⁻¹⁰³)、起炎物質としての LPS をヒト^{104,105})や実験動物¹⁰⁶)に投与した場合に P450 活性 (薬物代謝活性) が低下することは既に明らかにされており、これは炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ など) の上昇を伴うものである¹⁰⁷)。

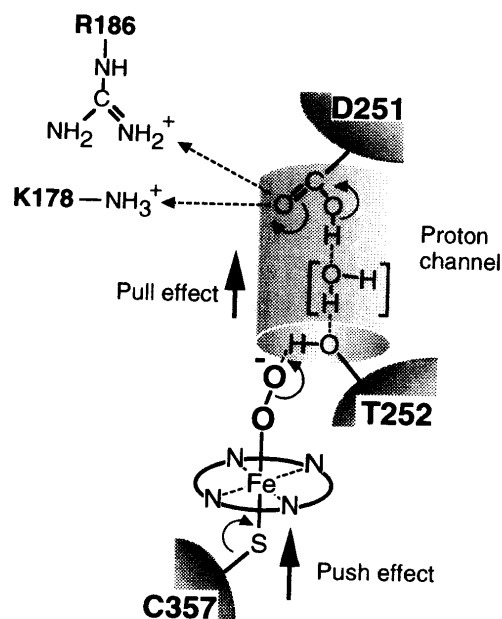


Fig. 7. Mechanism for oxygen bond cleavage in P450.

細菌や真菌などが原因となって引き起こされる全身性の炎症病態である敗血症において認められる LPS や炎症性サイトカインによる P450 依存性薬物代謝能の低下の機序として、上記の刺激物により多量に発生する NO の作用を介するという報告が多い^{108,109})。現在推定されている NO による P450 活性低下の機序を大別すると、(1) NO が P450 のヘム鉄と結合することによるヘム鉄-O₂ 結合の阻害¹¹⁰⁻¹¹²)、(2) NO がヘムやチオール基のニトロシル化を引き起こすことによる P450 タンパクの変性^{110,112})、(3) NO による P450 mRNA やタンパク発現の抑制¹¹³⁻¹¹⁸)の説に分けられる。この内 NO による P450 発現抑制の機序についてはヘムタンパク発現制御因子 (iron responsive factor、

IRF) が関与しているという報告¹¹³⁾はあるが詳細は不明である。また、これらの報告を総合すると P450 サブファミリーの内、1A1、1A2、2B1/2、2C11、3A2、3A4 では LPS により発現が抑制され、逆に 4A1、4A2、4A3 では発現が亢進されるようである。2E1 については結果が分かれ、CYP が存在する臓器によっても挙動が異なる。一方、LPS やサイトカイン類による薬物代謝活性の低下が NO 阻害剤添加により防止できなかった結果より、NO 関与について否定する論文もある¹¹⁹⁻¹²¹⁾。

薬物のタンパク結合¹²²⁾や腎からの排泄¹²³⁻¹²⁵⁾に対しても NO が変化をもたらすことが報告されており、病態時における NO 量の変動は薬物の体内動態に大きな変化をもたらす重要な因子であると考えられる。

引用文献

- 1) J. T. Hancock, *Br. J. Biochem.*, **54**, 38-46 (1997).
- 2) R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki, *Nature*, **288**, 373-376 (1980).
- 3) R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige and S. Moncada, *Nature*, **327**, 524-526 (1987).
- 4) D. E. Koshland, Jr., *Science*, **258**, 1861 (1992).
- 5) J. F. Kerwin, Jr., J. R. Lancaster, Jr. and P. L. Feldman, *J. Med. Chem.*, **38**, 4343-4362 (1995).
- 6) 吉村哲彦, “NO とスーパーオキシド”, 井上正康、佐藤英介、谷口直之、浅田浩二編、日本アクセルシュプリンガー、東京、1995、pp. 10-18.
- 7) C. Walling, *Acc. Chem. Res.*, **8**, 125-131 (1975).
- 8) J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1620-1624 (1990).
- 9) S. Pou, S. Y. Nguyen, T. Gladwell and G. M. Rosen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1244**, 62-68 (1995).
- 10) 浅田浩二 “SOD の新知見”, 勝部幸輝、谷口直之編、メディカルトリビューン、東京、1990、pp. 11-20.
- 11) J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
- 12) B. B. Keele, Jr., J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176-6181 (1970).
- 13) S. L. Marklund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7634-7638 (1982).
- 14) P. M. Anderson, P. Nilsson, M.-L. Karänen, L. Forsgren, J. Hägglund, M. Karlsborg, L.-O. Ronnevi, O. Gredal and S.L. Marklund, *Brain*, **120**, 1723-1737 (1997).
- 15) 大柳善彦, “SOD と活性酸素調節剤”, 日本医学館、東京、1989.
- 16) 谷口直之、勝部幸輝、浅田浩二、井上正康編, “SOD の基礎と臨床”, メディカルトリビューン、東京、1992.
- 17) J. Sandström, K. Karlsson, T. Edund and S. L. Marklund, *Biochem. J.*, **294**, 853-857 (1993).
- 18) T. Adachi and S. L. Marklund, *J. Biol. Chem.*, **264**, 8537-8541 (1989).
- 19) T. Adachi, T. Kodera, H. Ohta, K. Hayashi and K. Hirano, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 155-161 (1992).
- 20) J. Sandström, P. Nilsson, K. Karlsson and S. L. Marklund, *J. Biol. Chem.*, **269**, 19163-19166 (1994).
- 21) T. Adachi, H. Yamada, Y. Yamada, N. Morihara, N. Yamazaki, T. Murakami, A. Futenma, K. Kato and K. Hirano, *Biochem. J.*, **313**, 235-239 (1996).
- 22) H. Yamada, Y. Yamada, T. Adachi, H. Goto, N. Ogasawara, A. Futenma, M. Kitano, K. Hirano and K. Kato, *Jpn. J. Human Genet.*, **40**, 177-184 (1995).
- 23) J. Fujii and N. Taniguchi, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23142-23146 (1991).
- 24) B. B. Warner, L. Stuart, S. Gebb and J. R. Wispe, *Am. J. Physiol.*, **271**, L150-L158 (1996).
- 25) S. L. Marklund, *J. Biol. Chem.*, **267**, 6696-6701 (1992).
- 26) 平田結喜緒, “NO とスーパーオキシド”, 井上正康、佐藤英介、谷口直之、浅田浩二編、日本アクセルシュプリンガー、東京、1995、pp. 56-65.
- 27) <http://www/gdb.org/survey/survey.html>
- 28) <http://expasy.hcuge.ch/sprot/enzyme.html>
- 29) V. L. Dawson, T. M. Dawson, E. D. London, D. S. Bredt and S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6368-6371 (1991).
- 30) N. R. Sharma and M. J. Davis, *Am. J. Physiol.*, **266**, H156-H164 (1994).
- 31) J. Ando and A. Kamiya, *Front. Med. Biol. Eng.*, **5**, 245-264 (1993).
- 32) D. S. Bredt and S. H. Snyder, *Neuron*, **13**, 301-313 (1994).
- 33) 割石精一郎、宮原 馨, “別冊医学のあゆみ、NO のすべて”, 平田結喜緒編、医歯薬出版、東京、1996、pp. 139-143.
- 34) 松岡有樹、斎藤正男, “化学総説 No30、NO-化学と生物”, 日本化学会編、学会出版センター、東京、1996、pp. 89-98.
- 35) C. Nathan and Q.-W. Xie, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13725-13728 (1994).
- 36) M. Tsujino, Y. Hirata, T. Imai, K. Kanno, S. Eguchi, H. Ito and F. Marumo, *Circulation*, **90**, 375-383 (1994).
- 37) Q.-W. Xie, R. Whisnant and C. Nathan, *J. Exp. Med.*, **177**, 1779-1784 (1993).
- 38) G. M. Buga, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and L. J. Ignarro, *Circ. Res.*, **73**, 808-812 (1993).
- 39) M.-C. Broillet and S. Firestein, *J. Neurobiol.*, **30**, 49-57 (1996).
- 40) T. Morita, M. A. Perrella, M.-E. Lee and S. Kourembanas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1475-1479 (1995).
- 41) M. D. Maines, *FASEB J.*, **2**, 2557-2568 (1988).
- 42) R. Zakhary, S. P. Gaine, J. L. Dinerman, M. Ruat, N. A. Flavahan and S.H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 795-798 (1996).
- 43) 柴原茂樹, “現代化学増刊 27、ポルフィリンヘムの生命科学”, ポルフィリン研究会編、東京化学同人、

- 1995, pp. 48-56.
- 44) V. S. Raju, W. K. McCoubrey, Jr. and M. D. Maines, *Biochim. Biophys. Acta*, **1351**, 89-104 (1997).
- 45) R. F. Furchgott, *Circ. Res.*, **53**, 557-573 (1983).
- 46) 平田結喜緒, “別冊医学のあゆみ、消化器疾患とNO”、石井裕正編、医歯薬出版、東京、1997、pp. 3-8.
- 47) 金子周司, “NO と病態・治療”、戸田昇編、メジカルビュー、東京、1995、pp. 110-121.
- 48) J. L. Dinerman, T. M. Dawson, M. J. Schell, A. Snowman and S.H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4214-4218 (1994).
- 49) B. Wendland, F. E. Schweizer, T. A. Ryan, M. Nakane, F. Murad, R. H. Scheller and R.W. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2151-2155 (1994).
- 50) M. L. Simmons and S. Murphy, *J. Neurochem.*, **59**, 897-905 (1992).
- 51) J. Utz and V. Ullrich, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1195-1201 (1991).
- 52) B. Brune and V. Ullrich, *Mol. Pharmacol.*, **32**, 497-504 (1987).
- 53) K. S. Ramos, H. Lin and J. J. McGrath, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1368-1370 (1989).
- 54) M. Suematsu, S. Kashiwagi, T. Sato, N. Goda, Y. Shinoda and Y. Ishimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1333-1337 (1994).
- 55) A. Verma, D. J. Hirsch, C. E. Glatt, G. V. Ronnett and S. H. Snyder, *Science*, **259**, 381-384 (1993).
- 56) C. F. Stevens and Y. Wang, *Nature*, **364**, 147-149 (1993).
- 57) M. Zhuo, S. A. Small, E. R. Kandel and R. D. Hawkins, *Science*, **260**, 1946-1950 (1993).
- 58) 飯塚哲太郎, “薬物代謝の比較生化学”、加藤隆一、鎌滝哲也編、丸善、東京、1983、pp. 193-204.
- 59) 島田秀夫、石村 巽, “現代化学増刊 27、ポルフィリンヘムの生命科学”、ポルフィリン研究会編、東京化学同人、1995、pp. 105-115.
- 60) 吉村哲彦, “化学総説 No30、NO-化学と生物”、日本化学会編、学会出版センター、東京、1996、pp. 8-19.
- 61) 牧野 龍, “化学総説 No30、NO-化学と生物”、日本化学会編、学会出版センター、東京、1996、pp. 99-106.
- 62) M. Nakane, K. Arai, S. Saheki, T. Kuno, W. Buechler and F. Murad, *J. Biol. Chem.*, **265**, 16841-16845 (1990).
- 63) B. Wedel, P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Böhme, G. Schultz and D. Koesling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2592-2596 (1994).
- 64) B. Wedel, C. Harteneck, J. Foerster, A. Friebe, G. Schultz and D. Koerling, *J. Biol. Chem.*, **270**, 24871-24875 (1995).
- 65) J. Foerster, C. Harteneck, J. Malkewitz, G. Schultz and D. Koesling, *Eur. J. Biochem.*, **240**, 380-386 (1996).
- 66) J. R. Stone and M. A. Marletta, *Biochemistry*, **34**, 14668-14674 (1995).
- 67) J. R. Stone and M. A. Marletta, *Biochemistry*, **35**, 1093-1099 (1996).
- 68) 小坂博昭, “化学総説 No30、NO-化学と生物”、日本化学会編、学会出版センター、東京、1996、pp. 107-115.
- 69) J. R. Stone, R. H. Sands, W. R. Dunham and M. A. Marletta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 572-577 (1995).
- 70) J. R. Stone and M. A. Marletta, *Biochemistry*, **34**, 16397-16403 (1995).
- 71) G. Deinum, J. R. Stone, G. T. Babcock and M. A. Marletta, *Biochemistry*, **35**, 1540-1547 (1996).
- 72) J. R. Stone and M. A. Marletta, *Biochemistry*, **33**, 5636-5640 (1994).
- 73) X.-B. Wu, B. Brüne, F. von Appen and V. Ullrich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 75-82 (1992).
- 74) H. H. H. W. Schmidt, *FEBS Lett.*, **307**, 102-107 (1992).
- 75) A. Friebe, B. Wedel, C. Harteneck, J. Foerster, G. Schulz and D. Koesling, *Biochemistry*, **36**, 1194-1198 (1997).
- 76) R. Foresti, J. E. Clark, C. J. Green and R. Motterlini, *J. Biol. Chem.*, **272**, 18411-18417 (1997).
- 77) K. Takahashi, E. Hara, K. Ogawa, D. Kimura, H. Fujita and S. Shibahara, *J. Biochem.*, **121**, 1162-1168 (1997).
- 78) K. Takahashi, E. Hara, H. Suzuki, H. Sasano and S. Shibahara, *J. Neurochem.*, **67**, 482-489 (1996).
- 79) E. Hara, K. Takahashi, T. Tominaga, T. Kumabe, T. Kayama, H. Suzuki, H. Fujita, T. Yoshimoto, K. Shirato and S. Shibahara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 153-158 (1996).
- 80) Y.-M. Kim, H. A. Bergonia, C. Müller, B. R. Pitt, W. D. Watkins and J. R. Lancaster, Jr., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5710-5713 (1995).
- 81) T. Seki, M. Naruse, K. Naruse, T. Yoshimoto, A. Tanabe, T. Imaki, H. Hagiwara, S. Hirose and H. Demura, *Eur. J. Pharmacol.*, **331**, 87-91 (1997).
- 82) T. Ingi, J. Cheng and G. V. Ronnett, *Neuron*, **16**, 835-842 (1996).
- 83) 加柴 (岩槻) 美里、井上正康, “別冊医学のあゆみ、NO のすべて”、平田結喜緒編、医歯薬出版、東京、1996、pp. 8-11.
- 84) L. M. Landine, B. C. Crews, M. D. Timmons, J. D. Morrow and L. J. Marnett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15069-15074 (1996).
- 85) 藤井順逸、谷口直之, *実験医学*, **13**, 984-989 (1995).
- 86) S. Kurata, M. Matsumoto and U. Yamashita, *J. Biochem.*, **120**, 49-52 (1996).
- 87) W. Durante, N. Christodoulides, K. Cheng, K. J. Peyton, R. K. Sunahara and A. I. Schafer, *Am. J. Physiol.*, **273**, H317-H323 (1997).
- 88) M. A. Klingenberg, *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386 (1958).
- 89) D. R. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus and D. W.

- Nebert, *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42 (1996).
- 90) 北田光一、“月刊薬事増刊、薬物間相互作用と医薬品の適正使用”、澤田康文編、薬業時報社、東京、1996、pp. 47-59.
- 91) T. D. Porter and M. J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469-13472 (1991).
- 92) 生越久瑞、“化学総説 No 2、有機電子移動プロセス”、日本化学会編、学会出版センター、1988、pp. 152-164.
- 93) T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner and J. Kraut, *J. Biol. Chem.*, **260**, 16122-16130 (1985).
- 94) T. L. Poulos, B. C. Finzel and A. J. Howard, *Biochemistry*, **25**, 5314-5322 (1986).
- 95) S. S. Boddupalli, C. A. Hasemann, K. G. Ravichandran, J. Y. Lu, E. J. Goldsmith, J. Deisenhofer and J. A. Peterson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5567-5571 (1992).
- 96) N.C. Gerber and S.G. Sligar, *J. Biol. Chem.*, **269**, 4260-4266 (1994).
- 97) M. Imai, H. Shimada, Y. Watanabe, Y. Matsushima-Hibiya, R. Makino, H. Koga, T. Horiuchi and Y. Ishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7823-7827 (1989).
- 98) M. Ishigooka, T. Shimizu, K. Hiroya and M. Hatano, *Biochemistry*, **31**, 1528-1531 (1992).
- 99) 渡辺芳人、石森浩一郎、森島 績、“化学総説 No24、生物無機化学の新展開”、日本化学会編、学会出版センター、東京、1995、pp. 61-86.
- 100) R. Nakano, H. Sato, A. Watanabe, O. Ito and T. Shimizu, *J. Biol. Chem.*, **271**, 8570-8574 (1996).
- 101) R. Gorodischer, J. Krasner, J. J. McDevitt, J. P. Nolan and S. J. Yaffe, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 351-353 (1976).
- 102) E. T. Morgan, *Mol. Pharmacol.*, **36**, 699-707 (1989).
- 103) B. R. Sonawane, S. J. Yaffe and C. M. Witmer, *Xenobiotica*, **12**, 303-313 (1982).
- 104) S. I. Shedlofsky, B. C. Israel, C. J. McClain, D. B. Hill and R.A. Blouin, *J. Clin. Invest.*, **94**, 2209-2214 (1994).
- 105) S. I. Shedlofsky, B. C. Israel, R. Tosheva, and R. A. Blouin, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **43**, 627-632 (1997).
- 106) A. O. El-Kadi, H. Maurice, H. Ong and P. du-Souich, *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 1164-1170 (1997).
- 107) J. F. Williams, *J. Fla. Med. Assoc.*, **78**, 517-519 (1991).
- 108) C. A. Müller, A. Scierka, R. L. Stiller, Y.-M. Kim, D. R. Cook, J.R. Lancaster, Jr. and C. W. Buffington, *Anesthesiology*, **84**, 1435-1442 (1996).
- 109) J. B. Ochoa, A. O. Udekwu, T. R. Billiar, R. D. Curran and F. B. Cerra, *Ann. Surg.*, **214**, 621-626 (1991).
- 110) O. G. Khatsenko, S. S. Gross, A. B. Rifkind and J. R. Vane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11147-11151 (1993).
- 111) D. Gergel, V. Misík, P. Riesz and A. I. Cederbaum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 239-250 (1997).
- 112) D. A. Wink, Y. Osawa, J. F. Darbyshire, C. R. Jones, S. C. Eshenaur and R. W. Nims, *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 115-123 (1993).
- 113) O. G. Khatsenko, A. R. Boobis and S. S. Gross, *Toxicol. Lett.*, **90**, 207-216 (1997).
- 114) O. Khatsenko and Y. Kikkawa, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 1463-1470 (1997).
- 115) T. J. Carlson and R. E. Billings, *Mol. Pharmacol.*, **49**, 796-801 (1996).
- 116) J. Stadler, J. Trockfeld, W. A. Schmalix, T. Brill, J. R. Siewert, H. Greim and J. Doehmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3559-3563 (1994).
- 117) M. B. Sewer, D. R. Koop and E. T. Morgan, *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 401-407 (1996).
- 118) M. T. Donato, M. I. Guillen, R. Jover, J. V. Castell and M.J. Gomez-Lechon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 484-490 (1997).
- 119) P. D. Hodgson and K. W. Renton, *Int. J. Immunopharmacol.*, **17**, 995-1000 (1995).
- 120) M. B. Sewer and E. T. Morgan, *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 729-737 (1997).
- 121) M. Monshouwer, R. F. Witkamp, S. M. Nijmeijer, J. G. Van-Amsterdam and A.S.J.P.A.M. Van-Miert, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **137**, 237-244 (1996).
- 122) F. J. Burczynski, G. Q. Wang and M. Hnatowich, *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 91-96 (1995).
- 123) J. N. Bech, C. B. Nielsen and E. B. Pedersen, *Am. J. Physiol.*, **270**, F845-F851 (1996).
- 124) N. M. Atucha, J. Garcia-Estan, A. Ramirez, M. C. Perez, T. Quesada and J. C. Romero, *Am. J. Physiol.*, **267**, R1454-R1460 (1994).
- 125) T. Wang, *Am. J. Physiol.*, **272**, F242-F248 (1997).