

## 特集 I

「活性酸素の基礎と臨床」

(臨床環境 6 : 7 ~ 13, 1997)

## 活性酸素および活性窒素の病態生化学

谷口 直之<sup>1)</sup>

1) 大阪大学医学部生化学教室

## I. はじめに

活性酸素は酸素から1電子還元を受けて $O_2^-$ 、更に $H_2O_2$ を経て $\cdot OH$ 、そして水になる反応が主たる反応である。上流にある $O_2^-$ を消去するのがSOD (superoxide dismutase) である (図1)。

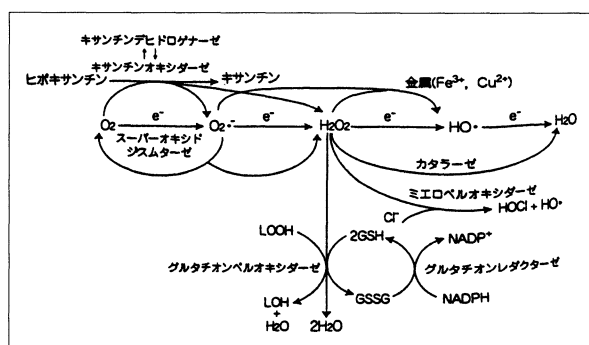


図1 活性酸素の主な代謝

$H_2O_2$ を消去するのは、主としてcatalaseやGPX (glutathione peroxidase) である。通常は $O_2^-$ から $H_2O_2$ ができてこのような消去系で消去されていくが、いろいろな原因で、例えば、SODあるいはGPXが不活性化されると、 $O_2^-$ からフェントン反応と言われる鉄や銅の介在する反応で、 $\cdot OH$ ができる。 $\cdot OH$ は非常に反応性の高い活性酸素であり、簡単にDNAや蛋白を切断したり、脂質の過酸化を起こす。ヒトにはSODは3種類存在する<sup>1)</sup>。すなわちCu,Zn-SOD、Mn-SOD、およびEC-SODである。Cu,Zn-SODは構成的に発現するSODである。一方、Mn-SODは、サイトカインなどによって誘導される酵素である。Cu,Zn-SODはマイヤー反応(糖化)を受けて失活してだけでなく<sup>2)</sup>、分子が切断されること<sup>3)</sup>、また、最近このSODが筋萎

縮性側索硬化症amyotrophic lateral sclerosis (ALS) の中で、特に家族性ALSの原因遺伝子の一つであるということが明らかになった<sup>4)</sup>。もう一つは、GPX自身が活性窒素種であるNOによって特異的に不活性化を受けることが明らかになった<sup>5)</sup>。

## II. Cu,Zn-SODとマイヤー反応

マイヤー反応は正常な老化反応のプロセスの一つであるだけでなく糖尿病のような血糖値の上がる時に起こる反応である。この反応は、還元糖であるグルコースあるいはフルクトース、リボースなどと蛋白質のアミノ基、特にN末端のアミノ基やリジンのε-アミノ基が反応し Schiff塩基アルデヒドを形成する。これがいわゆるアマドリ化合物を作りケトアミン構造をとって安定化する。これが更に進むとAGE (Advanced Glycation Endproduct) を形成する。

この反応で重要なことはアマドリ化合物は、その後、最終的にはAGEになるが、二つの主要なルートがあり、enediolやalkoxy radicalを生成する時に活性酸素を出すという点である<sup>6,7)</sup>。ここで $O_2^-$ が生成するがこの反応には遷移金属である銅や鉄が関与する。もう一つ、あまり活性酸素は関与していないが、デオキシグルコソンと言われるdicarbonyl化合物ができる反応があり、これがAGE生成の方に進行する。いずれにしても還元糖のカルボニル基が非常に重要である (図2)。

マイヤー反応によって起こる糖化SODの量は、正常なAgingの過程や糖尿病のような高血糖を反映する。従って、ヘモグロビンのAlcと同じような反応であるが、このSODは著しく構造上の変化

別刷請求宛先: 谷口 直之

〒565 吹田市山田丘2-2 大阪大学医学部生化学教室

Reprint Requests to Naoyuki Taniguchi, Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565 Japan

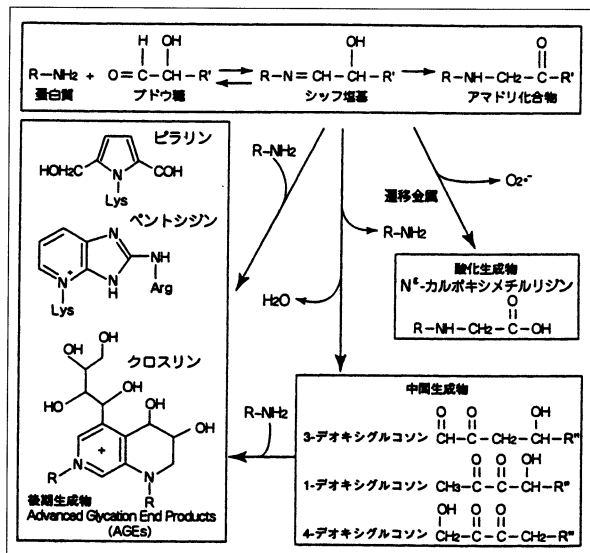


図2 マイヤー反応の概略

を伴うことが異なっている。SODは糖化によって活性を失うだけでなく、ある特定の部位で分子が切断される。Cu,Zn-SODのリジン121およびリジン128は分子の表面にあって、ここがかなり特異的に糖化を受ける。試験管の中でグルコースとSODを反応させた後、電気泳動で時間を追って見ると3日目ぐらいから切断されたfragmentが出現する。2週間反応されると、原点のバンドが減ってきてrandomなfragmentationが見られる。これをもう少し糖化力の強いフルクトースを使って同様の実験を行うとほとんどSODはばらばらになって跡形がなくなってしまう。ソルビトールは糖アルコールでcarbonylを持っていないのでこのような切断は起こらない。これを分子のモデルで考えると、リジンは122と128番目に糖化されるか、この糖化部位から10Å付近にある62番目と63番目のプロリンとヒスチジンの間が特異的に最初切断される。その後、銅がこの分子から遊離すると、フェントン反応により、 $\cdot\text{OH}$ が次々と生成し、今度はrandomな切断が起こる。銅はヒスチジンとキレートしているが、亜鉛自身は分子の形態を維持するだけで、あまり活性に影響はない。O<sub>2</sub><sup>-</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>から銅は自らが還元され、O<sub>2</sub><sup>-</sup>は酸化される。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は $\cdot\text{OH}$ に還元され、銅は酸化される。overallの反応はMetal-driven Haber-Weiss reactionと言われる、生体の中でもこういうことが起こっている。

それでは実際に、 $\cdot\text{OH}$ が試験管の中でできているかどうかを、電子スピン共鳴法を用いてDMPO-アドクトの生成をみると、確かにSODとブドウ糖を反応させると、このように1:2:2:1という $\cdot\text{OH}$ ができている証拠であるspin trappingのピークが見られる。金属をキレートさせるため、EDTAを入れたり、catalaseでH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をなくしてやると、ピークは消失するので一旦H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ができてから $\cdot\text{OH}$ ができていることを示している。では実際、生体の中でもこのようなCu,Zn-SODの切断が起こっているだろうか。ストレプトゾドシンで糖尿病ラットを作成し、水晶体で糖化SODの量を測ると水晶体では蛋白質がturnoverをほとんどしないので、その量は予測された通り非常に多い。正常のネズミですでに4割ぐらいのCu,Zn-SODが糖化を受けている。糖尿病では、どんどんこの量は増加し、最大では8割もの糖化SODが見い出される。最近、我々は水晶体のCu,Zn-SODは、試験管の中で起こると同じようなfragmentを受けていて、ちょうど14kDaに一致するfragmentを同定することができた<sup>9)</sup>。生体の中にもこのような切断片が蓄積することを示す。通常赤血球とか、肝臓とか、蛋白質のturnoverが比較的速いところでは、恐らくプロテアソームのようなプロテアーゼによってすぐ分解を受けてしまうので、なかなか断片を見い出すことができないが、水晶体ではほとんど蛋白質がturnoverしないため見い出されたと考えられる。Cu,Zn-SODと糖化させて、クローン化されたDNAと混ぜてやると、DNAも切断されてしまう<sup>10)</sup>。フルクトースではもっとその反応は強い。この反応にもやはり $\cdot\text{OH}$ は関与していることはいろいろな $\cdot\text{OH}$ のscavengerであるマニトール、エタノール、DMSOを入れると、この反応が抑えられることからあきらかであった。この反応もやはりフェントン反応によっている。

また、同じような銅を持った蛋白であるセルロプラスミンでもこのようなfragmentが起こることを見い出している<sup>11)</sup>。恐らくフェリチンとかcytochromeCとか、銅や鉄を持った蛋白質は同じような断片化を受けるだろうと思われる。特に糖尿病の状態の時は、後述するようにpolyol

pathwayが活性化されてフルクトースができることはよく知られている。フルクトースやグルコースにより糖化を起こすと、銅が多分遊離するため、一方でフェントン反応を起こす(図3)。銅が核の中でフェントン反応を起こすか、あるいは、この銅が核へ移行するか、あるいは、ヒストンに銅が非常にたくさんあるので、この銅を使ってフェントン反応が起こり、DNAを切断する可能性がある。このようなことが、糖尿病の合併症などの促進、進展に関与しているのではないかと我々は考えている。

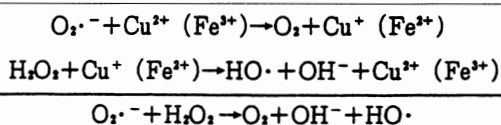


図3 フェントン反応

### Ⅲ. Cu,Zn-SODの変異と筋萎縮性側索硬化症

3年前に家族性の筋萎縮性側索硬化症(ALS)ではCu,Zn-SODの変異によるということがわかった<sup>9)</sup>。しかし、ALSというのほとんど90%はsporadicに起こり、10%ぐらいが家族性と言われている。今までこのmutationが見つかっているのは、家族性の中の大体1/4ぐらいであり、我々が注目したのは、一つは、なぜこのように運動ニューロンに特異的にそのようなことが起こるのか。もう一つ大きな問題は、これだけmutationが見つかって、実際に発症するのは40~50代である。これは恐らくagingというプロセスが関与しているのだろうと考えた。

ニューヨーク・ヤンキースの往年の4番バッター、ルー・ゲーリックは鉄人と言われた野球人であったが、1938年に突如ホームランが打てなくなり、結局ジョージ・ホプキンス大学でALSと診断された。アメリカではLou Gehrig病という別名がある。最近まで、このmutationはおおよそ40ぐらいが見つかっていて、我が国でも4つぐらいのmutationが見つかる。我々も共同研究で2つのmutationの同定<sup>12,13)</sup>のお手伝いをした。Cu,Zn-SODの遺伝子というのは5つのエクソンからなるが、第3エクソンは活性部位をコードしている部

位であるが、mutationはほとんど見つかっていない。ただ一つ東北大学のグループの方がヒスチジンの43番目のmutationが見つかっているだけである<sup>14)</sup>。Cu,Zn-SODはdimerで存在する。ほとんど今まで見つかっているmutationは、monomerとmonomerの会合面の変異で活性部位にはほとんど見られない。このことは、dimerizationがうまくいかない、あるいは、monomerとmonomerがdimerにならないと活性は持たないので、そういったところの会合面にあること、あるいはstabilityに影響しているのではないかということが言われている。事実、Cu,Zn-SODの活性を患者と正常人と比べてみると、健常人は大体3,500単位であるが、こういうmutationを持った患者では赤血球のCu,Zn-SODはたかだか半分ぐらいの不活性化しか見られない。mutationを起こしたCu,Zn-SODをバキュロウイルス系で発現し、mutantに関して、糖化反応がどう影響するかということを見た。mutantとwild typeを電気泳動上で比較するとG85Rの変異SODは非常に易動度は変わっているが、それ以外はほとんどバキュロウイルスで発現させたmutantの電気泳動度の異常はなかった。実際に比活性を見てみると、wild typeに比べてたかだか6~7割の不活性化しかなかった<sup>15)</sup>。つまり、このぐらいのmutationがあり、しかも不活性であり、しかも40才か50才になって発病するということになる。

予測された通り、このmutant enzymeを糖化させてやると、wild typeに比べてほとんどの酵素が糖化を非常に受けやすいことがわかる。グルコースと反応させて非活性を見てみると、特にG85Rというのは著しい不活性化を受ける。アマドリ化合物を定量するために、これはヘキシトールリジンを合成して、それに対する抗体を作り、その抗体を作ってELISAでこの量を測ってみると、wild typeに比べて多くのmutantはアマドリ化合物の生成量は多いことがわかる。つまり、これらのmutantはほとんどが糖化を受けやすい。しかも、不活性化されやすいことになる。では、銅を遊離するかということ、銅の遊離、銅のaffinityを見ているが、やはりこれもすべてではないが、mutantは銅の遊離をしやすい。一つの可能性としては、

ALSによる不活化の可能性として、mutantというのは、通常は $O_2^-$ をこのような方向で消去していくわけだが、mutantはやはり数10%の不活化が長い間続く。しかもglycationによってagingに伴ってどんどん不活化を受けるために、その時には前述のように銅が遊離してきて、これがフェントン反応によってヒドロキシラジカルを作る。もう一つ、 $O_2^-$ とNOからはONOO<sup>-</sup> (peroxynitrate) という非常にpotentな活性酸素種ができることが最近いろいろな方面で明らかになってきている<sup>16)</sup>。ONOO<sup>-</sup>もあるいは一つの原因である可能性がある。それは、神経にはご承知のように、constitutiveのNOSがあるので、NOを終始出しているわけで、片方でSODが不活化を受けるということは、 $O_2^-$ の蓄積を起こすので、やはりこれもONOO<sup>-</sup>の生成に傾く。つまり、OH radicalか、あるいはONOO<sup>-</sup>がかなり特異的にneuronal deathを起こしているのではないかと考えられる。また、もう一つ、後述するが、このNOはグルタチオンペルオキシダーゼをかなり特異的に不活化する。このこともやはりこちらへの方向への進展を促すことになる。

糖尿病の時のglycationは通常はSODが恐らくフェントン反応を抑えるように $O_2^-$ を消去しているが、何らかの原因つまりglycationによってSODが不活化を受ける。あるいはfragmentationを受けると、フェントン反応をますます促進するし、lipid peroxidationも進むであろうし、DNAの切断、蛋白の切断も起こすことになる。FALS、特に家族性のALSの場合には、やはり同じような機構が働いている可能性がある。事実、Cu,Zn-SODのmutantは非常にアポトーシスを起こしやすいということがわかっている。そういったことも一つの理由であろう。

#### IV. 糖化とアポトーシス

このようにCu,Zn-SODを介したglycationは重要な反応と考えられる。更に重要なことは最近我々は膵臓のβ細胞に糖化反応を介したアポトーシスがあることを見出した<sup>17)</sup>。前述したようにフルクトース、リボースはグルコースよりさらに強い

還元糖であり、これは膵臓のβ細胞、これは培養細胞でもisolateしたβ細胞でも、islet cellでもアポトーシスを起こす。フルクトース、リボースは非常に強いladder formationを起こす<sup>18)</sup>。ここにグルタチオンを増加させるN-アセチルシステイン、マイヤー反応の抑制剤であり、iNOS inhibitorでもあるアミノグアニジンを加えると、これが阻止される。つまり、redox regulationが効いていることがわかる。形態学的に見ると、やはりいろいろな特徴的なapoptotic cellとか、chromatinのcondensationというのが見られるが、N-アセチルシステインで抑えられる。もう一つ重要なことは、マイヤー反応の中間体は、間接的に脂質の過酸化を起こす可能性がある。例えばマロンジアルデヒドを見ると細胞をフルクトースで処理すると非常に増加する。また、当然これはアミノグアニジンとかN-アセチルシステインで抑制される。もう一つ、dichlorofluoresceinという色素を使ってFACSを行いperoxideの定性をすると、やはりこれも増加する。このDCFHというのはperoxideを測る方法である。DCFHは細胞の中に入るとエステラーゼでエステル結合が切れてperoxideと反応し蛍光を出す。やはり、N-アセチルシステインで抑制を受ける。

このように、膵臓のβ細胞もマイヤー反応の中間体やpolyol pathwayによって作られてくるフルクトースがますます蛋白のglycationをするので、それにより $O_2^-$ さらには $H_2O_2$ を出す。さらにこれが細胞のアポトーシスを起こす。あるいは、β細胞のdysfunctionを起こすことが考えられる。

#### V. NOとアポトーシス

NO自身も膵臓のβ細胞のアポトーシスを起こすことを我々は見い出している<sup>17)</sup>。β細胞障害には活性酸素が関与しているということは多くの報告がある。例えば消去系が少ないとか、あるいはサイトカインによってβ細胞障害が起こるが、それはradicalの消去剤で抑えられる。IDDMのモデル動物では、確かにradical消去剤で抑えられるというようなデータが蓄積していた。IDDMの発症の機構としてβ細胞が何らかの膵島炎によって破

壊されるということが一つの誘因とされている。事実、NOを細胞の外側から加えるためにNOドナーであるSNAPを加えると、ladder formationが観察される。またIL-1でこの細胞を刺激すると、iNOS、誘導性のNOSが増えてくるため、それと同時にnitrateすなわちNOのproductが増えてきて、それと同時にcell viabilityが減り、ladder formationが増えてくる。アクチノマイシンDとか、cycloheximideでタンパク合成やRNA合成を阻害すると、これが抑えられるので、やはりde novoのiNOSが関与していることが示している。同時にNO合成酵素のinhibitorであるNMMAでも抑制されるし、アミノグアニジン、ここではiNOSのinhibitorとして使っているが、これでも抑制される。形態学的にもきれいなアポトーシス小体、chromatinのcondensationなどが見い出されていて、それはNMMAで抑えられる。一方、確かにグルコースを高濃度にやるとDCFHによるFACSでシフトが起こっていて、peroxideが溜まってくるのがわかる。このようにフルクトースやリボースというようなメイヤー反応を起こすもの、あるいはpolyol pathwayの中間体、product自身もこういうperoxideを多く出し、NO自身もperoxideを出すことがわかる。膵臓の $\beta$ 細胞は、NOによって恐らくマクロファージから出るこういうサイトカインによって、あるいはNOそのものによって、iNOSが誘導されてできるNOによって、これが細胞のアポトーシスを起こす。同じ様なことは実はストレプトゾシンでも見い出されていて、このNOは細胞、特に膵臓の $\beta$ 細胞のアポトーシスを起こして、これがあるいは膵島炎に移行し、最終的にIDDMへ移行する可能性があるという報告がされている。

## VI. NOによるグルタチオンペルオキシダーゼの阻害

最後に、このようなNOによる細胞のアポトーシスということと、もう一つ我々が見出したことは、NOはGPXを非常に特異的に阻害することを記す<sup>19)</sup>。GPXは細胞のアポトーシスを抑えるcandidateであるという報告がされた。一方で、

RO2634細胞をLPSで刺激してNOを高めてやると、確かに細胞はほとんどがアポトーシスを起こす。GPXはglutathioneを基質にするが、2個のアルギニンでactive siteを形成している。最も大事なことはセレノシステイン、システインのSHのところはセレンに変わっており、セレノシステインとグルタチオンが結合して活性を持つわけで、いわゆるセレノプロテインである。GPXをNOのdonorであるSNAPと反応させてやると、GPXは不活性化される。すでにNOで阻害されることが知られているグリセロールアルデヒド3-リン酸脱水素酵素に比べてはるかにこの阻害は強い。他の消去系酵素であるMn-SODやCu,Zn-SODや、catalaseでは見られない。GPXがかなり特異的にNOによって阻害を受けることがわかる。では、細胞の中で、こういうことが実際にNOによるGPXの阻害があるのかを見るためU937細胞を使って、NO donorを加えると確かにこの阻害は多くはないが、有意に1時間ぐらいでGPXの活性は下がり、徐々に回復する。この下がりが低いのは、細胞の中にはグルタチオンやいろいろなNOのtrapperがあるので、そういうことによって試験管の中ほどのinactivationは見られない。DCFHでperoxideを定量すると確かに1時間とか3時間とか、非常に早い時間にすでにperoxideの蓄積が見られる。最近になって、我々は分子機構を少し検討し、その結果、GPXは4個のSH基を持ち、そのうちの1個、もう1個はセレノシステインだが、これをNOと反応させると、おそらくnitroso compoundでニトロシレーションが起こり、恐らくセレン、あるいはセレンの近傍のチオールがニトロシレーションを起こす。この後、ニトロシレーションは可逆的で、NOが外れてしまうとセレンとその近傍のSHが結合してセレノイルシステイン化合物になることがわかった。実際にODNBというSHに特異的な試薬反応させてやるとセレンとSHの反応性というのは非常に似ていて区別がなかなか難しいが、ここでは5個の定量ができる。ところが、不活性化されると、この数字は3に変わるので、少なくとも2個、1個のセレノシステインと近傍のSHの1個が結合して酸化型になる。そのため、GPXが

不活化を受けるということがわかった。

## VII. $O_2^-$ とNOのインタープレイの重要性

活性酸素による細胞のアポトーシスやあるいはマイヤー反応による細胞のアポトーシスというのは、恐らく一つは $O_2^-$ を本来はSODが除去するのが糖尿病や老化による糖化、あるいはALSなどによってCu,Zn-SODが不活化を受けると、局所的に $O_2^-$ がたぶん蓄積するであろう。これはフェントン反応を加速する。しかも、通常はCu,Zn-SODが不活性化されても、後はGPxが除去するはずであるが、これもNOによって不活化を受けてしまう。そうすると、ますます $\cdot OH$ がフェントン反応によって生成される。もう一方で、NOSというのは特に神経細胞あるいは $\beta$ 細胞、神経細胞の場合には、いわゆるconstitutiveのNOS、NOが産生される。それから、炎症の場合にはiNOSによってNOができる。NOSが活性化される状態では、恐らく $O_2^-$ とNOからONOO $^-$  (peroxynitrate) ができる。これは非常に反応性が強いわけで、これも直接、あるいは細胞のニトロシレーションもしくは

チリシンのニトロシレーションがBeckmanら<sup>16)</sup>の主張するように起こるかもそれない。一方で、本来はMn-SODというのはiNOSと同様に非常に誘導性の酵素であるが、これも最近になってONOO $^-$ によって不活化を受けるということが言われている。つまり、Cu,Zn-SODもMn-SODもONOO $^-$ や、あるいはglycationというような反応によって不活化を受ける。一方でNOSのcNOSによるconstitutiveなNOの上昇、あるいはiNOSによる誘導によってNOができる。この両者のインタープレイがたいへんこのような反応に重要であるということ強調したい。これらの関係を図4にまとめた。また、最近の総説<sup>20)</sup>を参照していただけると幸いである。

謝辞：本稿は第5回日本臨床環境医学会（旭川医科大学）の特別講演の要旨をまとめたものであり、これまで記した総説と重複することをお許しいただきたい。作成にあたり大阪大学医学部生化学教室の福井由美子さんに感謝いたします。

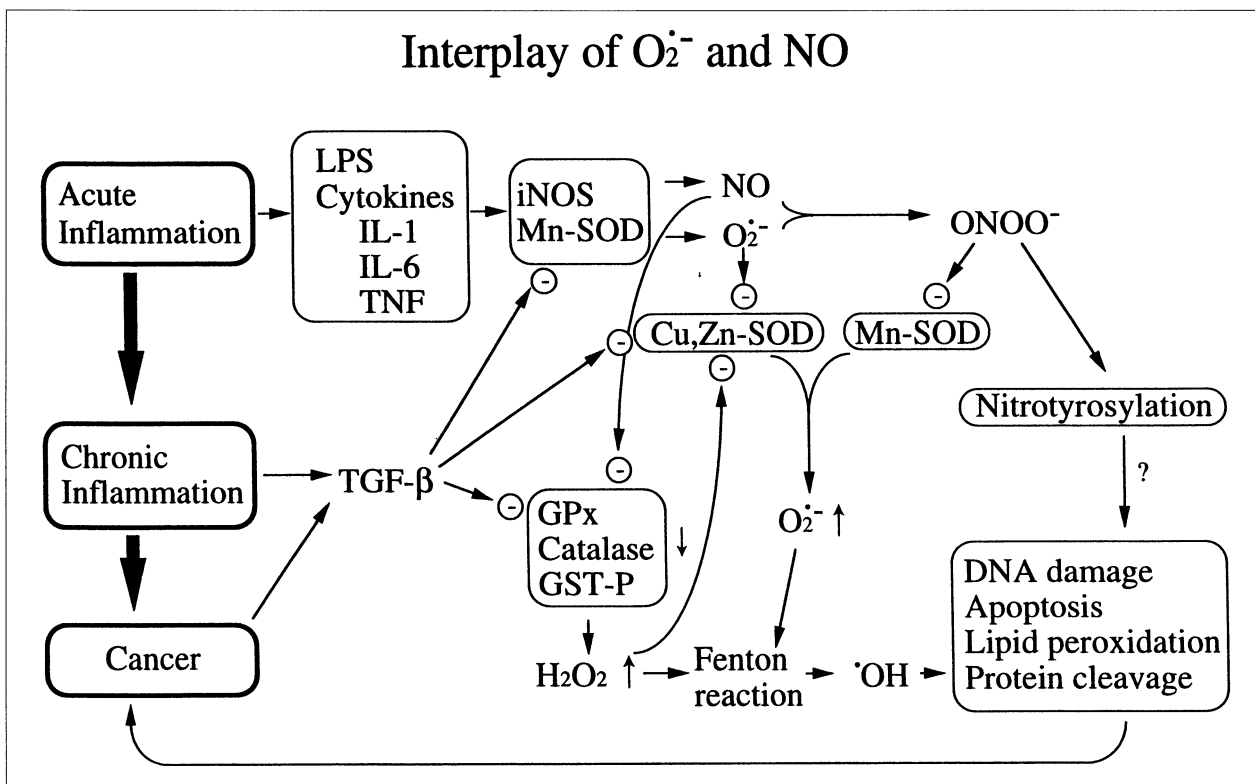


図4  $O_2^-$ とNOのインタープレイの重要性

## 文献

- 1) Taniguchi N : Clinical significances of superoxide dismutase : Changes in aging, diabetes, ischemia and cancer. *Advances in Clinical Chemistry* 29 : 1-59, 1992
- 2) Arai K, Maguchi S, et al : *J Biol Chem* 262 : 16969, 1989
- 3) Ookawara T, Kawamura N, et al : Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction : implication of reactive oxygen species. *J Biol Chem*
- 4) Deng H X Hentati A, et al : Pericak-Vance M. A. and Siddique T. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261 : 1047-1051, 1993
- 5) Asahi M, Fujii J, et al : Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide : Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270 : 21035-21039, 1995
- 6) Brownlee M, Vlassara H : *Diabetic complications*. New York, Churchill Livingstone 94, 1987
- 7) Monnier V M : *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. New York, Alan R. Liss, Inc. 1, 1989
- 8) Kawamura N, Ookawara T, et al : Increased glycated Cu, Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin Endocrinol Meta* 74 : 1352, 1992
- 9) Takata I, Kawamura N, et al : Glycated Cu, Zn-superoxide dismutase in rat lenses : evidence of fragmentation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 219 : 243-248, 1996
- 10) Kaneto H, Fujii J, et al : DNA cleavage induced by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Biochem J* 304 : 219-225, 1994
- 11) Islam K N, Takahashi M, et al : Fragmentation of ceruloplasmin following non-enzymatic glycation reaction. *J Biochem* 118 : 1054-1060, 1995
- 12) Nakano R, Sato S, et al : A novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 200 : 695-703, 1994
- 13) Hirano M, Fujii J, et al : A new variant Cu/Zn superoxide dismutase (Val7→Glu) deduced from lymphocyte mRNA sequences from Japanese patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 204 : 572-577, 1994
- 14) Ogasawara M, Matsubara Y, et al : Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nature Genet* 5 : 323-324, 1993
- 15) Fujii J, Myint T, et al : Characterization of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-related mutant Cu, Zn-superoxide dismutases overproduced in baculovirus-infected insect cells. *J Neurochem* 64 : 1456-1461, 1995
- 16) Beckman J, S, Ichiropoulos H, et al : Kinetics of superoxide dismutase and iron catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 298 : 438-445, 1992
- 17) Kaneto H, Fujii J, et al : Reducing sugar triggers oxidative modification and apoptosis in pancreatic b-cells by provoking oxidative stress through glycation reaction. *Biochem J* in press, 1996
- 18) Kaneto H, Fujii J, et al : Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic b-cells. *Diabetes* 44 : 733-738, 1995
- 19) Asahi M, Fujii J, et al : Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide : inactivation for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270 : 21035-21039, 1995
- 20) 谷口直之 : 活性酸素研究のプレリユード 細胞工学15 : 1370-1379