鉄の生物無機化学

三野 芳紀

Bioinorganic Chemistry of Iron

Yoshiki Mino

Osaka University of Pharmaceutical Sciences; 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan.

(Received June 28, 2017)

The X-ray crystallographic analysis of the single-crystal mugineic acid-Cu(II) complex showed that mugineic acid acts as a hexadentate ligand. Mugineic acid, a typical phytosiderophore, shows a marked stimulating effect on ^{59}Fe -uptake and chlorophyll synthesis in rice plants. A salient feature is the higher reduction potential of the mugineic acid-Fe(III) complex than those of bacterial siderophores. X-ray diffraction study of the structurally analogous Co(III) complex of the mugineic acid-Fe(III) complex demonstrates that the azetidine nitrogen and secondary amine nitrogen, and both terminal carboxylate oxygens, coordinate as basal planar donors, and the hydroxyl oxygen and intermediate carboxylate oxygen bind as axial donors in a nearly octahedral configuration. The iron-transport mechanism in gramineous plants appears to involve the excretion of mugineic acid from the roots, which aids Fe(III)-solubilization and reduction of Fe(III) to Fe(II). Manganese peroxidase (MnP) is a component of the lignin degradation system of the basidiomycetous fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. To elucidate the heme environment of this novel Mn(II)-dependent extracellular enzyme, we studied its ESR and resonance Raman spectroscopic properties. Consequently, it is most likely that the heme environment of MnP resembles that of cytochrome c peroxidase. In addition, degradation methods using basidiomycetous fungi or Fe^{3+} - H_2O_2 mixed reagent were developed for dioxins and polychlorinated biphenyls. The complete amino acid sequences of respective [2Fe-2S] ferredoxins were determined and compared with those of other higher plants. Finally, the toxic effects of iron on human health and the development of novel antibacterial drugs capable of inhibiting the iron transport system of *Vibrio vulnificus* are described.

Key words—mugineic acid; siderophore; ferredoxin; amino acid sequence; resonance Raman spectroscopy; manganese peroxidase

1. はじめに

筆者の研究生活を振り返ってみると、常に金属、いわゆる無機成分に関する研究に従事してきた。大阪薬科大学を昭和47年に卒業した後、物理化学教室の助手に就任し、井上正敏先生の指導の下、「グリセロリン酸カルシウムに関する研究」をさせて頂いた。徳島大学大学院では、下村 滋先生の指導の下、「原子吸光法による植物中のゲルマニウムの分析に関する研究」を行った。大学院修了後、大阪薬科大学生薬学教室の助手に就任し、太田長世先生とともに、蛍光 X 線分析装置を用いて、各種生薬に含まれる無機元素の分析を中心に研究を進めてきた。一方では、京都大学薬学部、杉浦幸雄先生との

共同研究で「植物の鉄取り込みに関する研究」を進めて行き、このテーマで薬学博士の学位を取得した。その後も、いろいろな方面で鉄に関する研究を進めてきたので、本総説では、「鉄の生物無機化学」の題目で筆者が研究してきた内容を中心にまとめてみたい。

鉄は必須金属の1つである。「なぜ、鉄が必須金属になったか？」と学生たちに尋ねると、「ヘモグロビンなどのタンパク質に含まれているから」と答える。もちろん、この答で間違っていないが、筆者は、あえて満点は与えず、「生命が地球上に誕生したときの周りの環境に鉄分が豊富にあった。特に、2価鉄のイオンとして溶けており、生命体はその鉄を利用して、進化を遂げてきたから」そして、「その鉄を重要な生命反応の一員として、利用するようになったから」と答えさせている。

鉄は、有機化合物では難しい反応を容易に行える

大阪薬科大学 (〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1)
e-mail: ymino@gaps.oups.ac.jp

本総説は、平成28年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

特技を持っている。その特技とは、酸化還元反応であり、もう1つは酸素分子に親和性を持つということである。鉄は2価と3価の状態をとるので、電子の移動を伴う酸化還元反応を得意とする（銅は1価と2価の状態をとるので鉄同様酸化還元酵素に含まれるが、2価の状態しかとらない亜鉛は縮合や加水分解反応を担う酵素に含まれる）。シトクロム類、鉄-硫黄タンパク質は、電子伝達系に関与する。また、2価鉄は酸素分子との親和性が高く、ヘモグロビン中の鉄が酸素分子と結合するのも、この性質に由来する。このように多くのタンパク質や酵素に鉄原子が利用されているが、実は、生物が鉄を利用するのは容易ではなく、多くの生物は常に鉄欠乏の状態にある。^{1,2)} これは、30億年前に起こった地球上の大気環境の変化に起因している。海洋においてラン藻類の先祖に当たる、光合成を行うシアノバクテリアが大増殖を遂げたのである。彼らは光合成の副産物として酸素を環境に放出し始めた。最初に海洋中の比較的可溶性の2価鉄を3価に酸化した。その結果3価鉄は、不溶性の水酸化鉄として、海底に沈降していった。時を経て、それは赤色の酸化鉄(III)に変化していく。これらは数億年後海底の隆起によって地上に現れ、これらを含む赤鉄鉱は近代文明の礎となった（オーストラリアの大地の色は赤鉄鉱を含むため赤褐色）。海洋中の2価鉄を酸化し終えた酸素は、大気中に放出され、大気成分を今とほとんど同じ酸素濃度（約20%）に変えていった。そして、地球上は酸素の溢れる酸化状態になっていった。このような大気に接する水中では鉄は3価として存在するので、不溶性の状態が存在し、生物がそれを利用するにはあまりにも低い濃度でしか溶けていない。そのような理由により、多くの生物（微生物）は絶滅したと考えられる。しかしながら、一部の生物は突然変異を繰り返すことで、不溶性の鉄を溶かして、体内に取り込むという素晴らしい技を手に入れた。このとき、微生物が鉄欠乏状態で鉄を溶かすために分泌される、3価鉄に親和性の高いキレーターがシデロホア（鉄イオン運搬体）である。¹⁻³⁾ 大気と接する環境に生育する微生物はこのようなシデロホアを介する独自の鉄取り込み機構を備えている。Figure 1は、微生物の鉄取り込み機構をポンチ絵的に示したものである。飛行機から何かが放たれたが、間近で見ると、Sのマークのヘル

メットをかぶり、カニの爪のような腕を持っている。「カニの爪」はギリシャ語でcheleで、多座配位子による金属イオンへの配位を意味するchelateの語源である。したがって、この者はキレーターであり、SのマークはSupermanではなくSiderophore (sidero: 鉄, phore: 運搬体)の頭文字である。すなわち、飛行機に見立てた微生物が鉄を取り込むために菌体外にシデロホアを分泌しているところを示している。このような取り込み機構は、他の必須金属の場合にはみられない。微生物の鉄取り込みはNeilandらによる精力的な研究により有用な知見が得られており、分子レベルでの考察が可能になってきた。^{4,5)} 一方、植物の鉄取り込みはほとんど分かっていなかった。筆者は、幸運にも、植物の鉄取り込みに関する研究を行う機会を得た。そこで、2.では、植物の鉄取り込み機構について説明したい。このテーマで学位を取得後、米国に留学しOregon Graduate Center (Portland, Oregon)にて、共鳴ラマン分光法による鉄含有タンパク質の研究を行う機会を得た。3.では、リグニン分解酵素の一種であるマンガネロキシダーゼと、それをヒントに帰国後に行ったダイオキシンの分解に関する研究を簡単に述べる。4.では、共鳴ラマン分光法で検討したフェレドキシンなどの鉄-硫黄タンパク質について紹介する。5.では、フェレドキシンの研究をヒントに、帰国後研究を開始したフェレドキシンの一次構造を利用する植物の分類法と同定法について述べる。6.では、生体に必須である鉄の“もろ刃の剣”の一面、すなわち毒作用について述べたい。最後に7.では、病原菌の鉄獲得系を阻害することで抗菌活性を示す化合物の探索について述べる。

地球が誕生して約45億年、生命が発生してからでも35億年の長い年月がたっている。その間、生

三野芳紀

香川県出身。1972年大阪薬科大学卒業後、同大学助手。1977年徳島大学大学院修士課程修了後、大阪薬科大学助手、講師、助教授を経て、2006年環境分析学研究室教授。この間、77年京都大学薬学部研修員（放射性薬品化学講座）、84年薬学博士（京都大学）、86-87年まで米国Oregon Graduate Center (Bioinorganic Chemistry) 留学。2010年大阪薬科大学薬品分析化学教授。2017年3月大阪薬科大学定年退職。大阪薬科大学名誉教授。

Fig. 1. Siderophore Secreted from a Microorganism (Airplane)

Modified illustration based on Vision from Oregon Graduate Center, 3, 11-12 (1987).

命は地球という無機環境にさらされてきた。したがって無機環境に存在する 100 種ほどの元素の有用性を試してみるには十分な時間があつた。生物は自らのいのちをよりよく存続させるために貪欲なものである。100 種ほどの元素の中からおよそその 3 分の 1 に当たる 30 種ほどの元素の有用性を認めて、それらを利用してきた。いったん利用しだすと、それらに依存性ができて、それらの元素は生物にとって必須となる。ここでは、ほとんどすべての生物に必須で、様々な機能を果たしている鉄を取り上げ、いのちとの係わりについて考えてみたい。生物が鉄を取り込むため、どのように巧妙な手段を発展させてきたのか、また体内に取り込まれた鉄はどのような構造の分子として存在し、いかなる機能を果たしているのか、そして、このような生体に不可欠な鉄含有分子が、逆に生体に障害作用を及ぼす可能性についても紹介できれば幸いである。

2. ムギネ酸-鉄錯体と植物の鉄取り込み機構—歪みの少ない八面体構造を形成。動物に対する生理活性にも興味—

鉄は、好気性条件下では 3 価イオンとして存在し、中性付近の pH において極めて難溶性の水酸化鉄 (III) を形成する。この不溶性の必須金属を利用するために、微生物はシデロホアと呼ばれる強力な鉄キレーター（その構造からヒドロキサム酸型とカテコール型に大別される）を分泌することが知られている (Figs. 2 and 3).^{2,3)}

植物もまた、正常な成長を維持するために、絶えず鉄の供給を必要としている。もし、鉄欠乏状態になれば、クロロフィルの生合成が抑制され、葉が黄変する鉄クロロシス（萎黄病）が起こってくる。普通、土壌それ自体が鉄欠乏になることはないが、アルカリ土壌〔水酸化物イオンのため不溶性の水酸化鉄 (III) が生成し易い〕の多くでは利用可能な鉄イオンが不足する場合がある。⁶⁾ しかし、アルカリ土壌に生育する植物すべての植物が鉄クロロシスを起こすのではなく、そのうちの多くの植物は不溶性の鉄を効率よく吸収することが可能である。鉄欠乏耐性と呼ばれるこの種の植物は鉄ストレス（鉄欠乏による圧力）に対して、①根からの水素イオンの放出、②根からの還元剤の放出、③根における鉄 (III) の還元、④根における有機酸の増加などの適応機構を持っていることが、Brown によって示されている。⁶⁾ しかし、これらの説を裏付ける物質はまだ同定されておらず、また、筆者が研究を始めるまでは、植物界のシデロホアも見い出されていなかった。

筆者の研究によって、イネ科植物の鉄取り込みがムギネ酸と呼ぶ新アミノ酸を介して、行われていることが示され、注目を集めてきた。このアミノ酸の発見は、高城が行った鉄欠乏耐性のエンバク（燕麦）と非耐性であるイネの水耕実験に始まった。彼はこの実験の過程で、中性付近の pH で鉄溶解能を持つ物質がイネの根からほとんど分泌されないのに対し、エンバクの根から多量に分泌されること、さらにその分泌量が鉄欠乏時に著しく増加することを見出した。⁷⁾ ついで、竹本らは、鉄欠乏耐性的大麦 (*Hordeum vulgare* L. var. *Minorimugi*) の根の洗液から、ムギネ酸と命名された新アミノ酸を単離し、微生物シデロホアとは全く異なる、そのユニークな

Fig. 2. Hydroxamic Acid Siderophores

Fig. 3. Catechol-Containing and Mixed Ligand Siderophores

Fig. 4. Iron Chelators of Plant Origin

Fig. 5. Stereoscopic Drawing of the Mugineic Acid-Cu(II) Complex

Fig. 6. Bond Lengths and Angles of the Cu(II) Coordination Site in the Mugineic Acid-Cu(II) Complex

Fig. 7. A Perspective Drawing of the Mugineic Acid-Co(III) Complex

構造を解明した (Fig. 4).⁸⁾ その後、大麦以外のイネ科植物からムギネ酸様活性物質が次々と単離されており,⁹⁾ これらのアミノ酸がイネ科植物の鉄の吸収と移動に重要な役割を果たしていることが推定された。

筆者は、植物界のシデロホアと考えられるムギネ酸の鉄錯体の構造と性質を明らかにする目的で種々検討を重ね、イネ科植物の鉄取り込み機構に関して有力な知見を得ることができたので、以下に紹介する。

筆者の最大の関心は、低分子 (分子量 320) で、しかも鎖状のムギネ酸分子が鉄 (III) などの金属イオンとどのような構造の錯体を形成するかにあった。そこでムギネ酸の安定な金属錯体の 1 つである銅 (II) 錯体の結晶解析を試みた結果、ムギネ酸が銅 (II) イオンに六座配位子として機能し、1 分子で歪んだ八面体構造を有することを明らかにした。そのとき、筆者は植物の分子設計の巧みさに驚かすにはいられなかった (Figs. 5 and 6).^{10,11)} なぜなら、今まで X 線結晶解析で明らかにされた多くのアミノ酸及びペプチドの銅 (II) 錯体において、六

Fig. 8. 360 MHz FT-¹H NMR Spectra of 1:1 Mugineic Acid-Fe(III) Complex (A), 1:1 Mugineic Acid-Co(III) Complex (B), 1:1 Mugineic Acid-Zn(II) Complex (C), 2:1 Mugineic Acid-Zn(II) Complex (D), and Ligand Only (E) at pD 4.5

座配位子として機能する例は皆無だったからである。銅 (II) 錯体に引き続いて、鉄 (III) 錯体と構造上類似性を有するコバルト (III) 錯体の結晶解析及び NMR による溶液中のコンフォメーション解析を行い、より歪みの少ない八面体構造をとることが明らかとなった (Figs. 7 and 8).¹²⁻¹⁵⁾ また、鉄 (III) 錯体に関しても、電位差滴定、電子スピン共鳴などの結果から、コバルト (III) 錯体に類似の構造であることが確認できた。ムギネ酸の金属錯体において、中間にあるアルコール性水酸基以外のす

Fig. 9. Effect of Some Chelators on Iron-uptake and Chlorophyll Synthesis in a Water-cultured Rice Plant

Table 1. Iron-solubilizing Abilities of Mugineic Acid and Related Compounds

Chelators	Iron concentration (ppm) of filtered solutions						
	Buffer alone	+ All nutrients	+CaCl ₂ (0.5 mM)	+MgSO ₄ (0.8 mM)	+NaH ₂ PO ₄ (0.5 mM)	Three nutrients	Other
Control	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
Mugineic acid	3.9	2.0	3.0	2.9	3.0	2.3	3.0
2'-Deoxymugineic acid	3.7	1.6	a	a	a	a	a
Nicotianamine	0.4	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
HEDTA	4.8	<0.3	0.5	1.3	3.1	<0.3	4.7
EDTA	7.5	<0.3	<0.3	0.4	3.3	<0.3	6.0
Desferrioxamine	9.3	7.9	8.1	8.2	8.4	7.9	9.3
Citric acid	0.4	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

^a Experiment not performed.

すべての官能基が金属イオンへの配位に関与していたが、事実、この水酸基 O(7)H の欠如したデオキシ型とアゼチジン環の C(3)-C(4) の欠如したグリシン型のムギネ酸様活性物質 (2'-deoxymugineic acid と distichonic acid A) が小麦とビール麦からそれぞれ単離されている (Fig. 4).

ムギネ酸の生理活性で特筆すべきことは、水耕栽培中のイネの培養液に、エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) などの合成キレート剤あるいは微生物由来のシデロホアの 1

種であるデスフェリオキサミン (Fig. 2 の ferrioxamine B から鉄を除いた構造, desferrioxamine; DF) を添加してもイネの鉄取り込みは増加しないのに対し、ムギネ酸を始めとする植物由来のキレーターは顕著に鉄取り込みを促進し、その結果として植物の鉄クロロシスを改善できる点である (Fig. 9). 当然、EDTA と DF は中性溶液中で鉄を溶解でき、その程度はそれらの鉄 (III) 錯体の安定度定数 (EDTA 25.1, DF 30.6) からムギネ酸の溶解能力を上回ると推定される。事実、緩衝液のみを含む溶

Table 2. Reduction Potentials of Some Iron Transport Compounds

Complex	E (pH 7.0) vs. NHE, mV
Mugineic acid-Fe(III)	-102
Nicotianamine-Fe(III)	-181
Ferric aerobactin	-336
Ferric rhodotorulic acid	-359
Ferrichrome A	-448
Ferrioxamine B	-468
Ferric enterobactin	~-750

Fig. 10. Proposed Mechanism for Iron Transport in Gramineous Plants

液中での鉄溶解能は、 $DF > EDTA > \mu$ グネ酸の順で大きいという結果が得られた (Table 1, buffer alone). しかし、栄養素を含む培養液中でのそれは、 $DF > \mu$ グネ酸 $\gg$ EDTA であった (Table 1, all nutrients). したがって、自然界においては、 μ グネ酸の方が鉄を選択的に溶解する能力においても EDTA より優れていると言える。一方、最も大きな鉄溶解能を有する DF に鉄取り込み促進作用がみられないのは、その鉄錯体が根の生体膜をうまく通過できないためと思われる。この点に関して、今までに単離された μ グネ酸様活性物質が6個の配位基を有し非常に類似した構造であるという事実も興味深い。

さて、このように μ グネ酸-鉄 (III) 錯体の種々の性質が明らかになったが、特に注目すべき点は、 μ グネ酸-鉄 (III) 錯体が安定 (安定度定数 18.1) であるのに対し、鉄 (II) 錯体は不安定 (8.1) であること、及び鉄 (III) 錯体の還元電位が生体内の還元剤 [例えば $NAD(P)H$] によって容易に還元され得るような高い値 (-102 mV vs. NHE) を示す点である (Table 2). これらの結果から、イネ科植物の鉄取り込み機構は、次のように考えられる；①根から μ グネ酸を分泌し錯形成によって土壤中の鉄を可溶化し、体内に取り込む、②その錯体を適当な部位に輸送した後、不安定な鉄 (II) 錯体へ還元しクロロフィル合成に必要な酵素などに引き渡

Fig. 11. Regulatory Mechanism (Hypothesis)

Fig. 12. Modified Illustration Based on Asahi Newspaper, October 1, 1986

Fig. 13. Effects of Optical Isomers of Phytosiderophores on Iron-uptake in a Water-cultured Rice Plant

Fig. 14. Effects of Light on the Amounts of Mugineic Acid Secreted from Barley Roots

○: 6000 lux, ●: 2600 lux for the period from 7 to 16 d after -Fe treatment and 6000 lux for the other periods.

す、③フリーになったムギネ酸は再利用あるいは代謝される (Figs. 10-12). 実際, ある種の微生物においても類似の機構で鉄を取り込み, 利用することが知られている.^{1,2)} また, 筆者は構造特異的な鉄取

Fig. 15. Resonance Raman Spectra of Native Manganese Peroxidase

A, 413.1-nm excitation; B, 488.0-nm excitation; C, 514.5-nm excitation.

Fig. 16. ESR Spectra of the ¹⁴NO- and ¹⁵NO-Adducts of Ferrous Manganese Peroxidase and Ferrous Horseradish Peroxidase

A, ¹⁴NO-MnP; B, ¹⁴NO-HRP; C, ¹⁵NO-MnP; D, ¹⁵NO-HRP. All spectra recorded at ~14 K.

り込み機構が植物にも存在することを, ムギネ酸様活性物質 (avenic acid A と deoxydistichonic acid A) のエナンチオマーを使った ⁵⁹Fe 取り込み実験から明らかにした (Fig. 13).¹⁶⁾ さらに, 大麦根からのムギネ酸分泌と光 (照度) の関連についても興味深い知見を得た (Fig. 14).^{2,17)} すなわち, ムギネ酸の

Fig. 17. Effects of Temperature on the Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-*p*-dioxin (DCDD)

DCDD (5 $\mu\text{g/mL}$) was incubated in Fe^{3+} (8 mM)- H_2O_2 (1%) mixed reagent for 15 min at 50°C, unless otherwise noted.

Fig. 18. Blue Copper Center of Azurin from *Alcaligenes denitrificans*

Fig. 19. Binuclear Iron-Sulfur Cluster of Ferredoxin from *Spirulina platensis*

分泌量は、大麦が前日に受けた光量（日照）に主に依存することなどが分かった。現在のところ、ムギネ酸様活性物質の検出はイネ科植物に限られるが、他の植物においても同様の機構で鉄取り込みがなされている可能性は否定できない。

世界の陸地の 25–30% はアルカリ土壌であると言われていることから、植物の鉄欠乏症は世界的に重要な問題である。イネ科植物の中でも特に食料とし

Fig. 20. Resonance Raman Spectra of *Alcaligenes denitrificans* Azurin in H_2O (—) and D_2O (---)

Fig. 21. Resonance Raman Spectra of Oxidized Spinach Ferredoxin in H_2O (—) and D_2O (---)

Fig. 22. Schematic Drawing of Cluster II of *Peptococcus aerogenes*

Iron atoms (●), sulfur atoms (○), and hydrogen bonds (---).

て重要なイネ、トウモロコシなどが鉄欠乏非耐性であることを考え合わせると、ムギネ酸が将来、鉄クロロシス改善剤として広く利用される可能性は大きい。実際、ムギネ酸合成酵素の遺伝子を組み込んだイネが開発され、実用化されつつある。¹⁸⁾ また、微生物由来のシデロホアが医薬品（鉄排泄剤）になり得たように、植物界のシデロホアであるムギネ酸に

Fig. 23. Schematic Drawing of Fe_4S_4 Cluster in Reduced *Chromatium vinosum*

Fig. 24. Resonance Raman Spectra of Oxidized Ferredoxins from *Clostridium pasteurianum* and *Clostridium aciduri* in H_2O and D_2O

ついても、ヒトあるいは哺乳動物に対してどのような生理活性を持つか、今後の研究が大いに期待される。なお、ムギネ酸の鉄排泄剤としての活性に関しては筆者の報告を参照されたい。¹⁹⁾

3. マンガンペルオキシダーゼの構造とダイオキシンの分解

生体に取り込まれた鉄は様々な構造の分子として存在し、多彩な機能を果たしている。ここでは、ヘムタンパク質の一種ペルオキシダーゼを取り上げた。

製紙工業において、木材に多量に含まれるリグニ

Fig. 25. Resonance Raman Spectra of Oxidized and Reduced *Chromatium vinosum* HiPIP in H_2O and D_2O

ンは厄介ものであり、その分解法の開発が望まれている。興味深いことに、細菌でさえ難しいこの分解をキノコの一つ（白色腐朽菌）はなし遂げることができる。Oregon Graduate Centerに留学中、私はキノコ（*Phanerochaete chrysosporium*）の分泌するリグニン分解酵素の一種、マンガンペルオキシダーゼ（manganese peroxidase; MnP）の構造解析を行う機会を得た。共鳴ラマン分光法とESRで検討した結果、その活性中心は高スピン型のFe(III)を含むヘムで、5番目の配位子としてHisが結合しており、HRP、シトクロムcペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼの活性中心と類似の構造であることを明らかにした (Figs. 15 and 16).²⁰⁾ すなわち、ヘムの配位環境を反映する共鳴ラマンスペクトルの比較から、MnPとこれらのヘムタンパク質の活性中心の類似性を明らかにし、¹⁴NOあるいは¹⁵NO付加体のESRスペクトルの比較からHisの配位を確認した。またこの研究をヒントに、身近な白色腐朽菌によるダイオキシンなど難分解性汚染物質の分解法及び $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2$ の混合試薬による環境汚染物質の分解法などを開発している。²¹⁻²⁸⁾ すな

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(1) <i>Ephedra sinica</i> I †	ATYKVKFVTPDGENEIECPDDVYVLDAAEDAGLDLPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEAIA-								
(2) <i>Ephedra sinica</i> II §	ATYKVKFVTPDGENEIECPDDVYVLDAAEDAGLDLPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEAIA-								
(3) <i>Ephedra foliata</i>	ATYKVKFVTPDGENEIECPDDVYVLDAAEDAGLDLPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEAIA-								
(4) <i>Ephedra intermedia</i> §	ATYKVKFVTPDGENEIECPDDVYVLDAAEDAGLDLPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEAIA-								
(5) <i>Ephedra americana</i>	ATYKVKFVTPDGENEIECPDDVYVLDAAEDAGLDLPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEAIA-								
(6) <i>Atropa belladonna</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(7) <i>Hyoscyamus niger</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(8) <i>Solanum nigrum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(9) <i>Solanum lyratum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(10) <i>Solanum indicum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(11) <i>Solanum abutiloides</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(12) <i>Scopolia japonica</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(13) <i>Lycium chinense</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(14) <i>Capsicum annuum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(15) <i>Nicotiana tabacum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(16) <i>Physalis alkekengi</i> *	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(17) <i>Datura stramonium</i> †	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(18) <i>Datura metel</i> ‡	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(19) <i>Datura arborea</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(20) <i>Pueraria lobata</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(21) <i>Leucaena glauca</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(22) <i>Medicago sativa</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(23) <i>Pisum sativum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(24) <i>Trifolium pratense</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(25) <i>Brassica napus</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(26) <i>Panax ginseng</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(27) <i>Petroselinum sativum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(28) <i>Phytolacca americana</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(29) <i>Phytolacca esculenta</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(30) <i>Spinacia oleracea</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(31) <i>Sambucus nigra</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(32) <i>Arctium lappa</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(33) <i>Colocasia esculenta</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(34) <i>Triticum aestivum</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(35) <i>Hordeum vulgare</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(36) <i>Oryza sativa</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(37) <i>Equisetum telmateia</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(38) <i>Equisetum arvense</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								
(39) <i>Gleichenia japonica</i>	ATYKVKLVTPDGPVEFDCPDVYVLDQAEIEGHELPYSCRAGSCSSCAGKIVAGNVDSQSDGNFLDDDDQISEG FVLTCVAYPKSDCVIOTHQEEELTG								

Fig. 26. Comparison of the Sequences of [2Fe-2S] Ferredoxins from Higher Plants

Amino acids are represented by one-letter abbreviations. † *Ephedra distachya* I, *Ephedra equisetina* I, *Ephedra viridis*, and *Ephedra intermedia*; § *Ephedra distachya* II and *Ephedra equisetina* II; ‡ minor Fd from *Ephedra intermedia*; * *Physalis alkekengi* var. *francheti*; † var. *stramonium* and var. *tatula*, and *Datura quercifolia*, ‡ *Datura metel*, *Datura innoxia*, and *Datura fastuosa*.

わち、食用キノコ菌でもダイオキシンをわずかながら分解できること、また、安価な $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2$ の混合試薬がダイオキシンの分解に有効であることなどを明らかにした (Fig. 17)。

4. 共鳴ラマン分光法による鉄硫黄タンパク質中の水素結合の検出とその重要性

代表的なブルー銅タンパク質と鉄硫黄タンパク質のラマンスペクトルにおいて同程度の重水素同位体シフトを観察したことから、ブルー銅タンパク質におけるシフトがイミダゾール窒素 (His) の水素原子ではなく、硫黄配位に水素結合している OH (Ser) やアミドの水素原子に起因することを明らかにした (Figs. 18–21).²⁹⁾ また、フェレドキシンと

高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) の Fe_4S_4 クラスター構造の違いを共鳴ラマン分光法と X 線結晶解析により明らかにした (Figs. 22–25).³⁰⁾

5. 植物フェレドキシンの一次構造を用いる植物の化学分類学

植物フェレドキシンは光合成の電子伝達系に深く関与し、すべての植物に含まれる鉄硫黄タンパク質である。このタンパク質の一次構造を解析することで植物の類縁関係を考察し、また、これを利用して重要な植物の化学的同定法の開発を目指してきた。なお、詳細な一次構造の比較から、ナス科に特徴的な配列 (例えば、33 番目のアミノ酸はヒスチジン) や各属 (species) に特徴的な配列も明らかにした

Fig. 27. Phylogenetic Tree Based on the Amino Acid Sequences of Ferredoxins from Higher Plants

The phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method of Saitou and Nei (1987) (GENETYX software). Genetic distances are represented by the proportion of amino acid differences between each *taxon* (1.0=100%).

Fig. 28. Effect of Iron-containing Biomolecules on DNA

Fig. 29. Biological Iron Transport System in *Vibrio vulnificus* (*V.v*) and the Structures of Vulnibactin (*V.v* Siderophore) and Hinokitiol (Inhibitor)

Fig. 30. The Possible Structure of Desferrioxamine-Dextran Hybrid

(Figs. 26 and 27).³¹⁻⁴⁵⁾

6. 鉄含有生体分子の DNA に及ぼす影響

鉄を含有する生体分子には多彩な機能を有するものが多い。これは、鉄原子の酸化還元作用や酸素原子との親和性に主に起因している。このような反応性を有する鉄含有分子が核酸の構造になんらかの影響を及ぼすことは十分に考えられる (Fig. 28)。そこで、代表的な鉄含有生体分子が DNA の構造に及ぼす影響について検討した。その結果、①数種の鉄含有タンパク質は、 H_2O_2 ($26 \mu\text{M}$ – 260 mM) 存在下、DNA の分解を引き起こす、②カタラーゼとペルオキシダーゼにはそのような分解活性は認められない、③鉄含有生体分子の DNA 分解活性は、強力なキレート剤の共存で抑制される、などの知見を得た。⁴⁶⁾

生体中の H_2O_2 濃度レベルで、鉄含有生体分子による DNA 分解が起これば、生体に少なからず障害をもたらすと推測される。この点に関して、DF などの鉄キレーターが DNA 分解活性を抑制する事実は、生体内で有効なキレーター (bio-chelator と呼ぶ) の医薬品としての可能性を示唆するものであり、興味深い。また、鉄含有生体分子の DNA に対する酸化ストレス作用についても、今後、検討されるべきである。

7. 微生物の鉄獲得系に作用する新規抗菌剤の開発

微生物は、鉄欠乏状態において菌体外にシデロホアを分泌し、錯形成により不溶性の鉄を溶かし、その鉄錯体を菌体膜のレセプターを介して体内に取り込むことで増殖する。このように微生物はシデロホアの関与する優れた鉄獲得系を有している。病原菌

もまた宿主の体の中で鉄を利用して増殖する。生体の中の鉄分はヘモグロビンやトランスフェリン、フェリチンの形で強固に結合しており、簡単に細菌に鉄を奪われることは少ないが、強力なシデロホアを分泌する病原菌はそれらの鉄を奪って増殖する。その結果、宿主である人は敗血症などの重篤な病気を引き起こす。この病原菌の鉄獲得系を阻害することで新規な抗菌剤の開発が可能である (Fig. 29)。例えば、病原菌のシデロホアより強力な鉄キレート剤と競合させることで、病原菌の増殖を抑制することが期待できる。そこで、筆者は人食いバクテリアの一種、*Vibrio vulnificus* の鉄獲得系を阻害することでその増殖を抑制する新たな抗菌剤の開発を検討した。この病原菌はバルニバクチンと呼ばれる強力なシデロホアを分泌して、鉄を取り込んでおり、バルニバクチンより強力な鉄キレーターにはその増殖阻害活性が期待できる。そこで、多くの市販のキレート剤を始め、種々のシデロホアなど天然のキレート剤について、*V. vulnificus* における増殖阻害活性を調べたところ、ヒノキチオールに極めて高い阻害活性があることを突き止めた。⁴⁷⁾ すなわち、ヒノキチオールは 1×10^{-5} M でほぼ完全にこの菌の増殖を抑制した。その活性の程度は、強い増殖阻害活性を有することで著名な ethylenediamine-*N,N'*-bis (2-hydroxyphenylacetic acid) (EDDHA) の活性 (同じ濃度で約 30% 抑制) より明らかに強かった。ヒノキチオール分子のトロポロン骨格が鉄との結合に関与していると推定できる。また、鉄との親和性が比較的強い DF に増殖阻害活性が認められなかったことから、*V. vulnificus* は、この鉄錯体自体を取り込み利用することが可能であると推測された。そこで、取り込まれ難くするため、DF-デキストリンのハイブリッド体を合成し、その活性を調べている。なお、ハイブリッド体は、まず、 NaIO_4 酸化でデキストランの水酸基をカルボニル基に変換後、DF 分子のアミノ基との間でシッフ塩基を形成することで比較的容易に合成することが可能である (Fig. 30)。このハイブリッド体では、多糖と結合することで DF 自体の毒性が極端に軽減させることが報告されており、大量投与できるメリットもあると考えられる。⁴⁸⁾ さらに、血液中で分解され難いイヌリンとのハイブリッド体も興味ある化合物であり、その活性についても現在調査中である。これら

の化合物は、*V. vulnificus* 感染による敗血症を抑える効果が期待できる。

おわりに

鉄は必須金属であるが、過剰の鉄は体内の臓器などに沈着し、フェントン反応を介して活性酸素種を生じさせ、これらが様々な病気の原因になることが知られている。特に、トランスフェリンと結合していない non transferrin-bound iron (生体不安定鉄) の、毒作用における重要性が最近指摘されている。⁴⁹⁾ このような観点から、鉄を効果的に排出させるキレート剤 (bio-chelator) は新しいタイプの医薬品として有用であろう。日本の男女の平均寿命は約 6 歳の差がある。いかなる理由でその差が現れるのか、現在のところ不明であるが、女性の場合は鉄欠乏気味であることを考えると、男性と比べ鉄の毒作用の影響を受け難いことも確かである。男女の平均寿命の差と鉄との関係も今後明らかになっていくと思われる。今後、鉄に関する多彩な研究が精力的に進められることを期待したい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Raymond K. N., Carrano C. J., *Acc. Chem. Res.*, **12**, 183–190 (1979).
- 2) Neilands J. B., “Bioinorganic Chemistry-II,” ed. by Raymond K. N., American Chemical Society, Washington, DC, 1977, pp. 3–32.
- 3) Snow G. A., *Bacteriol. Rev.*, **34**, 99–125 (1970).
- 4) Neilands J. B., Erickson T. J., Rastetter W. H., *J. Biol. Chem.*, **256**, 3831–3832 (1981).
- 5) Tufano T. P., Raymond K. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6617–6624 (1981).
- 6) Brown J. C., “Bioinorganic Chemistry-II,” ed. by Raymond K. N., American Chemical Society, Washington, DC, 1977, pp. 93–103.
- 7) Takagi S., *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**, 423–433 (1976).
- 8) Takemoto T., Nomoto K., Fushiya S., Ouchi R., Kusano G., Hikino H., Takagi S., Matsura Y., Kakudo M., *Proc. Japan Acad.*, **54**, 469–473 (1978).
- 9) Fushiya S., Sato Y., Nozoe S., Nomoto K., Takemoto T., Takagi S., *Tetrahedron Lett.*,

- 21, 3071–3072 (1980).
- 10) Nomoto K., Mino Y., Ishida T., Yoshioka H., Ota N., Inoue M., Takagi S., Takemoto T., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 338–339 (1981).
- 11) Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Yoshioka H., Takemoto T., Sugiura Y., Tanaka H., *Inorg. Chem.*, **20**, 3440–3444 (1981).
- 12) Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Yoshioka H., Takemoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6979–6982 (1981).
- 13) Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Takemoto T., Tanaka H., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4671–4676 (1983).
- 14) Iwashita T., Mino Y., Naoki H., Sugiura Y., Nomoto K., *Biochemistry*, **22**, 4842–4845 (1983).
- 15) Sugiura Y., Mino Y., Iwashita T., Nomoto K., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4667–4669 (1985).
- 16) Oida F., Ota N., Mino Y., Nomoto K., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3436–3437 (1989).
- 17) Mino Y., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **1**, 119–124 (2007).
- 18) Takahashi M., Nakanishi H., Kawasaki S., Nishizawa N. K., Mori S., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 466–469 (2001).
- 19) Mino Y., Inoshiri S., Uchida K., Ujita K., Yasuda M., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **1**, 113–117 (2007).
- 20) Mino Y., Wariishi H., Blackburn N. J., Loehr T. M., Gold M. H., *J. Biol. Chem.*, **263**, 7029–7036 (1989).
- 21) Mino Y., *Tokusan Joho*, **20**, 58–59 (1999).
- 22) *NIHON KEIZAI Newspaper*, March 20, 1999.
- 23) *MAINICHI Newspaper*, March 31, 1999.
- 24) *NIKKEI ECO21*, **9**, 28–29 (1999).
- 25) Mino Y., Moriyama Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1050–1051 (2001).
- 26) Mino Y., Moriyama Y., Nakatake Y., *Chemosphere*, **57**, 365–372 (2004).
- 27) Azuma T., Mino Y., *J. Health Sci.*, **57**, 442–447 (2011).
- 28) Azuma T., Mino Y., *Environment & Sanitary Engineering Research*, **25**, 14–21 (2011).
- 29) Mino Y., Loehr T. M., Wada K., Matsubara H., Sanders-Loehr J., *Biochemistry*, **26**, 8059–8065 (1987).
- 30) Backes G., Mino Y., Loehr T. M., Meyer T. E., Cusanovich M. A., Sweeney W. V., Adman E. T., Sanders-Loehr J., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2055–2064 (1991).
- 31) Mino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1585–1587 (1991).
- 32) Mino Y., Usami H., Inoue S., Ikeda K., Ota N., *Phytochemistry*, **33**, 601–605 (1993).
- 33) Mino Y., *Phytochemistry*, **35**, 385–387 (1994).
- 34) Mino Y., *Phytochemistry*, **37**, 429–431 (1994).
- 35) Mino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1186–1189 (1995).
- 36) Mino Y., Yasuda K., *Phytochemistry*, **49**, 1631–1636 (1998).
- 37) Mino Y., Iwao M., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 96–99 (1999).
- 38) Mino Y., Iwao M., *Natural Med.*, **53**, 37–41 (1999).
- 39) Mino Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1367–1369 (2002).
- 40) Mino Y., Hazama T., Machida Y., *Phytochemistry*, **62**, 657–662 (2003).
- 41) Mino Y., Shirakawa M., Harada Y., Kuroda K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 2038–2041 (2004).
- 42) Mino Y., Yukita M., Hiratsuka N., Wariishi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1535–1538 (2005).
- 43) Mino Y., Machida Y., Wariishi H., *Natural Med.*, **59**, 181–185 (2005).
- 44) Mino Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1771–1774 (2006).
- 45) Mino Y., Azuma T., Sato T., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **9**, 53–60 (2015).
- 46) Mino Y., High Tech. Research Center Research Projects (Osaka University of Pharmaceutical Sciences), 2007–2009 Research Reports, 2010, pp. 145–150.
- 47) Mino Y., High Tech. Research Center (Osaka University of Pharmaceutical Sciences), 2015 Symposium Abstract, December 5, 2015, pp. 7–8.
- 48) Hallaway P. E., Eaton J. W., Panter S. S., Hedlund B. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 10108–10112 (1989).
- 49) Brissot P., Ropert M., Le Lan C., Loréal O., *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 403–410 (2012).