

酸化ストレスを抑制するミトコンドリア局在マンガンスーパーオキシサイドディスムターゼの機能

犬童 寛子

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
腫瘍学講座 顎顔面放射線学分野

Beyond the function of Manganese superoxide dismutase in oxidative stress

Hiroko P. Indo

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Department of Oncology, Maxillofacial Radiology Division
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544
TEL: +81-99-275-6272 FAX: +81-99-275-6278
e-mail: hindoh@dent.kagoshima-u.ac.jp

ABSTRACT

It is well known that reactive oxygen species (ROS) causes various redox related diseases. Recent studies have shown that peroxidant molecules, such as hydrogen peroxide, work actively as signaling molecules in cancer cells. Superoxide is considered to be a major factor in oxidant toxicity, and mitochondria are the major source of superoxide. The reaction of superoxide generated from mitochondria with nitric oxide is faster than superoxide catalyzed reaction, and produces peroxynitrite. Then, peroxynitrite produces hydroxyl radicals and nitrogen dioxide, and oxidizes and nitrates DNAs, lipids and proteins, etc., and induces cell death. Thus, based on research conducted after Fridovich's seminal studies, we now propose a modified superoxide theory. Manganese superoxide dismutase (MnSOD), which scavenges superoxide anions generated from mitochondria, is an important enzyme in cellular homeostasis, cellular defense and functional dynamics. MnSOD expression and/or activity is generally lower in cancer cells than in their normal cell counterparts, while other studies demonstrate that cancer tissues possess elevated MnSOD expression compared to normal tissues. It suggests that regulation of MnSOD may confer differential outcomes in the protection of normal and cancer cells against agents that cause oxidative stress. Furthermore, expression and/or the activity of MnSOD may affect the antioxidant capacity and overall health of cells by altering mitochondrial metabolism, leading to the development and progression of cancer. It might be suggested that altered MnSOD activity on the mitochondrial metabolism in cancer cells is a key factor of cancer treatment strategy.

Key words: Reactive oxygen species (ROS), Superoxide, MnSOD

はじめに

活性酸素種 (ROS) は、生体内の酸化ストレスを増加させ、癌、糖尿病などの生活習慣病、難治性疾患と

いった様々な疾患と関連しており、我々もこれまでに多くの研究報告を行ってきた¹⁻⁴⁾。一方、生体内には低分子のグルタチオンをはじめ、ビタミンC、ビタミン

ンE, コエンザイム Q10などの抗酸化物質や抗酸化酵素群が存在しており, 酸化ストレスを防御し, 生体の恒常性 (ホメオスタシス) を維持している。

酸化還元 (Redox) は, 細胞内代謝における重要な反応であり, また細胞内シグナルとしても働いている。ROS がシグナルトランスダクションとして働き, タンパク質のシステイン残基をはじめ, 種々のアミノ酸残基の酸化的修飾を引き起こし, タンパクの構造, 機能を調節するといった翻訳後修飾は生体の酸化ストレス状態に非常に重要な役割を果たしている。近年, ゲノミクス, トランスクリプトミクス, プロテオミクス, メタボロミクスなどといった網羅的解析が飛躍的に進歩し, 様々な疾患の原因解明, 治療法の確立に大きく貢献している。この総説では, ミトコンドリアから生成される活性酸素スーパーオキシドとミトコンドリア内マトリックスに局在し, そのスーパーオキシドを除去する酵素マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) の役割について, その一部を紹介したい。

1. ミトコンドリアから産生される活性酸素

ミトコンドリアのおもな生理的役割は, エネルギー産生, つまり ATP を産生することである。ATP の合成経路には, 酸素を必要としない嫌気的な解糖系と酸素を必要とする好気的な酸化的リン酸化があり, ミトコンドリアの第一義的な機能は, この酸化的リン酸化である。すなわち酸素を利用することにより, 解糖系よりも効率よく多くの ATP を産生している。この酸化的リン酸化は, ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系で行われている。電子伝達系は, 約100種類のタンパク質が関与しており, 様々な酵素が複合体 (Complex I~IV) を形成している。ミトコンドリアでは, 驚くべきことに酸化的リン酸化のほか, イオンチャンネル, 細胞内カルシウムホメオスタシス, 脂肪酸 β 酸化, 中性脂肪サイクル, ウレアサイクル, アミノ, 脂肪, ヘム, プリン, ステロイドおよびステロイドホルモン合成など, 代謝に関与する多彩な機能が備わっている。また, 細胞内の鉄はミトコンドリアに最も多く存在しており, Fe-S クラスターの形で後述する電子伝達系の Complex I, II, III の活性中心をなし, 酸化還元を行う上で重要な役割を担っている。

通常, 電子伝達系から2~3%の電子が漏れ, この漏れ出た電子が近傍の最も反応性の高い酸素分子と反応し, スーパーオキシドを産生する。スーパーオキシドの主な発生部位としては, Complex I⁵⁾と

Complex III⁶⁾がよく知られているが, Complex II もミトコンドリアから産生される活性酸素に寄与しており, Complex II からのスーパーオキシドの発生部位は, コハク酸塩酸化部位の末端であることが示唆されている⁷⁾。電子伝達系阻害剤であるロテノン, アンチマイシン A, シアン剤により電子伝達系から産生される活性酸素が増加することが知られている⁸⁻¹²⁾。我々は, Complex I—ユビキノン (補酵素 Q—CoenzymeQ) 経路を阻害するロテノン (ROT), Complex II を阻害する3-ニトロプロピオン酸 (3-NPA), Complex II—ユビキノン経路を阻害するテノイルトリフルオロアセトン (TTFA), Complex III を阻害するアンチマイシン A (AA), Complex IV を阻害するシアン化ナトリウム (NaCN) を用い, ミトコンドリアから産生される活性酸素を測定した。その結果, すべての阻害剤によって活性酸素の上昇が見られ, このことから電子伝達系複合体のすべての部位において, 活性酸素が生成される可能性が示唆された¹³⁾。

電子伝達系と直接関与していないミトコンドリアの他の酵素もミトコンドリア由来の活性酸素産生的一端を担っており, ジヒドロオロト酸オキシダーゼがジヒドロオロト酸のオロト酸への変換の際に副産物として¹⁴⁾, また TCA サイクルの酵素である α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼも NADH/NAD⁺ 依存的に活性酸素が生じることが報告されている¹⁵⁾。

2. スーパーオキシドセオリー

酸化ストレスは, 酸化還元の連鎖反応により次々と細胞内の活性酸素を発生させ, DNA, 脂質, タンパク質などに様々なダメージを与える。スーパーオキシドの発生系としては, 細胞質では, キサンチンオキシダーゼ (Xanthine oxidase: XO), NADPH オキシダーゼ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase), また, 上述したミトコンドリアの電子伝達系がよく知られている^{16,17)}。

スーパーオキシドがイニシエーターとなり, 活性酸素発生系の中心をなすという「スーパーオキシドセオリー」はスーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase:SOD) の発見者である Irwin Fridovich 博士によって提唱された。

しかし, 約10年後, Sawyer らがスーパーオキシドの反応性は低く, 強い酸化剤ではないと報告した¹⁸⁾ことから, この「スーパーオキシドセオリー」は次第に蔭を潜めるようになった。スーパーオキシドは, SOD によって過酸化水素 (H_2O_2) と水 (H_2O) に

変換される。 H_2O_2 はスーパーオキシド同様、それほど強い活性力をもたないがROSのひとつである。さらに、この H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼによって、速やかに水と酸素に変換され、無害化される。しかし、 H_2O_2 は二価鉄の存在下では、活性の強いヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) と三価鉄に変換される。この反応は「フェントン反応」と呼ばれる。さらに、フェントン反応によってできた三価鉄は、スーパーオキシドによって、二価鉄に戻り（ハーバーワイス反応）、二価鉄が再び H_2O_2 と反応（フェントン反応）し、 $HO\cdot$ を生成する。このように、スーパーオキシドはそれ自体、活性や反応性はそれほど強くないが、連鎖反応を引き起こすことで、活性や毒性の強いROSを生み出すことから、これまで重要視されてきた。この理論に従えば、MnSODが増えれば $HO\cdot$ の生成量も当然増えることになる。しかし、我々のMnSODを過剰発現させた細胞株を用いた実験では、MnSODが増えると $HO\cdot$ は減少しており、フェントン・ハーバーワイス反応だけでは説明ができないことが明らかとなった。

一酸化窒素とスーパーオキシドによってパーオキシナイトライト ($ONOO\cdot$) が生成されるが、この $ONOO\cdot$ は反応性や毒性が強く、チロシンのニトロ化、SH基の酸化といったタンパク質の修飾を引き起こすこと、脂質過酸化を引き起こすことが知られている¹⁹⁾。

$ONOO\cdot$ のプロトン化した形である $ONOOH$ は、 $HO\cdot$ と二酸化窒素ラジカル ($NO_2\cdot$) に変換され、その後、ヒドロキシル化、ニトロ化によってそれぞれ硝酸イオン (NO_3^-) に異性化される^{3,19)}。

我々は、MnSODがスーパーオキシドのレベルを低下させるだけでなく、スーパーオキシドと $ONOO\cdot$ との結合を抑えることにより、 $ONOO\cdot$ から生成される $HO\cdot$ を抑え、それによって引き起こされる脂質過酸化、ミトコンドリア膜のカルジオリピンの酸化、放射線誘導アポトーシスを抑制することを示した。我々は、このようにミトコンドリアから出てくるスーパーオキシドが酸化ストレス連鎖反応を調節する重要なイニシエーターであると提唱し、これを新たに「ミトコンドリアルスーパーオキシドセオリー」と呼んでいる³⁾。

3. マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD)

ミトコンドリアは、エネルギーを産生する重要な細

胞内小器官であり、また酸素消費量が多く、活性酸素が多く産生されるにもかかわらず、ミトコンドリアの遺伝子DNAはヒストンに保護されていないため変異しやすい。ミトコンドリアにはスーパーオキシドを消去するMnSODをはじめ、 H_2O_2 を消去するグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、ペルオキシレドキシン (PRX) などの抗酸化酵素が存在している。

これら抗酸化酵素系と活性酸素産生系の不均衡がDNAやタンパク質に障害を及ぼし、強いてはアルツハイマーやパーキンソンなどの神経疾患、動脈硬化、発癌、老化といった様々な疾患と関与していると考えられ、抗酸化物質を用いた治療も報告されている^{20,21)}。

MnSODはヒトでは第6番目の染色体、マウスでは第8番目の染色体にその遺伝子が存在する。22kDaのモノマーからなる4量体を形成し、活性中心はMnであり、His26, His74, Asp159, His163のアミノ酸によって配位されている。MnSODはの遺伝子SOD2は核にコードされており、MnSODのcDNAは666bpで最初の72bpはミトコンドリア移行するためのリーダーシークエンス (Mitochondrial targeting sequence : MTS) であり、24のアミノ酸に翻訳される。MTSは塩基性のアミノ酸を多く含み、全体としてはプラスの電荷を持っている。ミトコンドリアの外膜はマイナスに帯電しており、電気的に引き寄せられていることが考えられていた。しかし、その後の研究で、ミトコンドリアの外膜と内膜上には「膜透過装置」があることがわかってきた。外膜の膜透過装置はTOM (Translocate of the outer mitochondrial membrane) 複合体、内膜の膜透過装置はTIM (Translocate of the inner mitochondrial membrane) 複合体とよばれる。外膜に存在するTOM複合体は、膜通過可能なミトコンドリアタンパク質を認識する受容体として働いており、タンパク質の高次構造がほどけた一次構造の状態を外膜を通過させるためのチャンネルでもある。内膜に存在するTIM複合体は、マトリックスまたは内膜のタンパク質を認識する受容体で、タンパク質を内膜に通過させる¹⁷⁻¹⁹⁾。この膜透過装置を通過してマトリックスに入ったMnSODはMTSの部分はずれ、三次元構造をした成熟したMnSODの形態になると考えられている²²⁻²⁴⁾。MTSの中のValがAlaになった変異ではMnSODのミトコンドリアへの移行やmRNAの安定性の低下が示されている²⁵⁾。我々はMTSを欠失したMnSODのcDNAを作成し、MnSODの局在の重要性について検討した。MTSを欠失したMnSODの過剰発現細胞株では正常なMnSODを過剰発現させた細胞株と比較して、

MnSOD の活性 / 発現量が低下し、ミトコンドリアから生成される活性酸素および放射線誘導アポトーシスの抑制が見られなかった²⁶⁾。これらの結果は、MnSOD が正常に機能するためにはミトコンドリア内に局在する必要があるということを示している。MnSOD のその重要性については、MnSOD 遺伝子ノックアウトマウスが生後 2 週間しか生きられないこと、このノックアウトマウスは、心筋症、脂肪肝、骨格筋アシドーシス、またミトコンドリア障害に基づく中枢神経細胞変性を示すことから証明されている^{27,28)}。

4. シグナルセンサーとしてのミトコンドリア内の活性酸素の役割

SOD2 遺伝子は、転写因子である nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B), Forkhead box O3 (FOXO3a) によってその発現は制御されている。これらの転写因子は、ミトコンドリア内の活性酸素の量によってその発現量が調節されており、ミトコンドリア内の活性酸素がシグナルセンサーとなりうることが考えられる。

Storz らは、ミトコンドリア内の活性酸素が Src を介し、NF κ B を活性化することで細胞死を抑制すること²⁹⁾、Connor らは、ミトコンドリア内の H₂O₂ が PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) を酸化することによって血管新生を調整すること、また *in vivo* においても発現が血管新生の表現系を調整している³⁰⁾。また、Kaewpila らは、MnSOD がスーパーオキシドを介し、hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF1- α) を調整していること³¹⁾ を報告している。これらの結果は、ミトコンドリア内の活性酸素が何らかのシグナルセンサーとして働いていることを示唆している。酸化ストレス応答シグナルとしてよく知られているものとして Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 (Nrf2) と Kelch like-ECH-associated protein 1 (Keap1) から成る Nrf2-Keap1 シグナリングがある。Nrf2-Keap1 の活性は、Keap1 のシステイン残基 (Cys 残基) の酸化的修飾によりおこることが知られている³²⁾。我々は、ミトコンドリアから生成される活性酸素が Nrf2-Keap1 シグナリングを調整していることを報告した。活性酸素がシグナルトランスダクションとして働き、タンパク質の Cys 残基をはじめ、種々のアミノ酸残基の酸化的修飾を引き起こし、タンパクの構造、機能を調節するといった翻訳後修飾は、生体の酸化ストレス状態に非常に重要な役割を果たしている。しかし、活性酸素による直接的

なシグナリングの活性化については、未だ不明な点も多い。

細胞内のタンパク質の Cys 残基、グルタチオン、遊離 SH 基などのチオール基 (SH: スルフヒドリル基) は酸化還元反応を受けやすく、細胞内のチオールレベルは酸化ストレスマーカーの指標とされており、分子内チオール基の酸化 / 還元状態によってタンパク質の機能や活性酸素シグナリングが調整されていることが考えられる。

我々はラット胃上皮粘膜癌様細胞株 (RGK1) に MnSOD の遺伝子を過剰発現させ、ミトコンドリア内の活性酸素を抑制した状況下での細胞内チオールレベルの変化について検討した。細胞内チオールレベルの検出には還元型のチオール基に結合する 5-IAF (5-iodoacetamidofluorescein) を用いた。MnSOD 過剰発現株ではコントロールに比べて、還元型のチオールレベルを示す蛍光強度が著明に増加していた (図 1-A)。次にこれらのタンパクを二次元泳動したところ、いくつかの異なるスポットが検出された (図 1-B)。これらの検出されたスポットのタンパク質は Cys 残基や分子内チオール基が変化し、タンパクの機能に変化をもたらしていることが考えられる。これらのことから、ミトコンドリア内の活性酸素がシグナルセンサーとして酸化ストレスを調節することで、いくつかのタンパク質の機能や活性酸素シグナリングを変化させることが示唆された。

5. MnSOD と癌

癌細胞では、酸素が十分な環境下においてもエネルギー効率の悪い解糖系が有意に働くことが知られており、Warburg 効果と呼ばれている³³⁾。癌細胞では、ROS など何らかの異常によってミトコンドリアの電子伝達系に破綻が生じ、酸化的リン酸化からのエネルギーを十分に得ることができない。そのため、代償的に解糖系が有意に働くことで不足したエネルギーを得ていると考えられ、正常の細胞に比べてグルコースの取り込みが劇的に増加していることが知られている。実際、PET (positron emission tomography) はこの現象を利用した検査法であり、「全身の小さな癌を早期に発見できる」として、癌検診にも広く活用されている³⁴⁾。

癌細胞において、好気性解糖系はアポトーシスの抵抗性を増加させることによって癌細胞の増殖を亢進している³⁵⁾。実際、酸化的リン酸化を活性化する薬として、ピルビン酸脱水素酵素 (ピルビン酸をアセチル

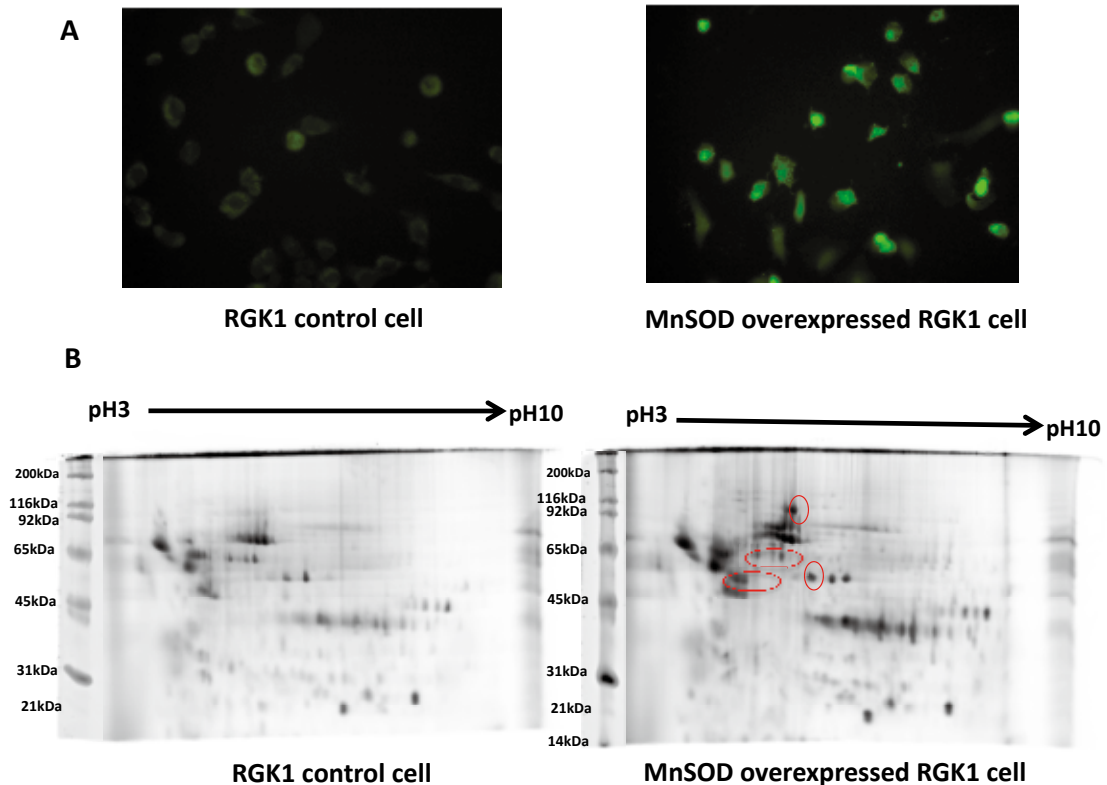


図1: MnSOD 過剰発現による細胞内チオールレベルの変化

RGK1細胞に MnSOD を過剰発現させ、ミトコンドリア内の活性酸素を抑制した状況下での細胞内チオールレベルの変化、すなわち酸化ストレスの大きさについて検討した。細胞内チオールレベルが増加すると細胞内酸化ストレスの程度は小さくなる。生細胞に還元型のチオール基に結合する5-IAF (5-iodoacetamidofluorescein) を用いてラベリングしたのち、蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。MnSOD の過剰発現株では、その蛍光強度が有意に増加していた(A)。それらのタンパクを回収し、2次元泳動を行ったところ、MnSOD 過剰発現株ではコントロールに比べていくつかの異なるスポットが認められた(B)。参考文献34) より一部改変

CoAに変換する)を活性化するジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)は転移性乳がん細胞の増殖を阻害するという報告がある³⁶⁾。また酸化リン酸化と解糖系のバランスが癌化と関連している、解糖系の亢進の結果、癌やその周囲組織が酸性化することによって、癌細胞を浸潤・転移しやすい環境にしているとの説もあるが、未だわかっていないことも多い。

正常なラット胃上皮粘膜細胞株(RGM1)とその癌様変異株RGK1細胞にMnSODを過剰発現させたときのミトコンドリア代謝機能評価をしたところ、正常細胞のMnSOD過剰発現RGM1株では酸化的リン酸化を亢進していたが、癌細胞のMnSOD過剰発現RGK1株では酸化的リン酸化が抑制されていた(図2)。これらの結果は、MnSODの発現量は正常細胞では、細胞

内の酸化ストレス状態を抑えることにより細胞保護的に働き、一方、癌細胞では酸化的リン酸化を抑制し、解糖系にスイッチすることで癌の増殖を促進している可能性を示唆している。我々は、この癌細胞において、MnSODの過剰発現は、Actin, talin, S100A4の相互作用を増強することによって癌の浸潤を増加させることを報告している³⁷⁾。

MnSODの発現量がエネルギー代謝にも関係しており、酸化的リン酸化と解糖系のスイッチの役割をしている可能性が考えられるが、MnSODの発現量は癌の種類、性質によって異なっており、またミトコンドリア内の活性酸素発生量の違いによってもシグナル伝達に変化するため、さらなる検討が必要であると思われる。

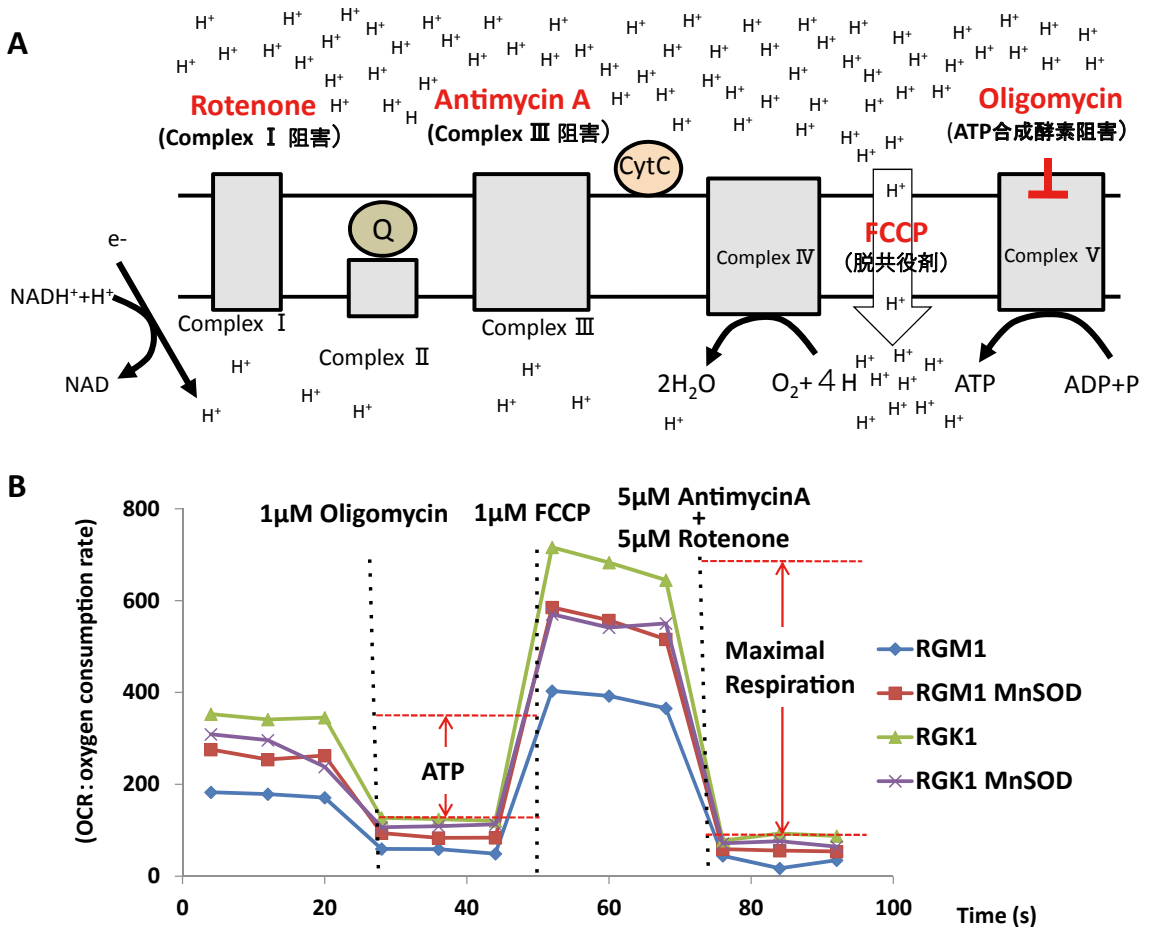


図2：正常なラット胃上皮粘膜細胞株（RGM1）とその癌様変異株 RGK1細胞に MnSOD を過剰発現させたときのミトコンドリア代謝機能評価

(A) に示す電子伝達系の阻害剤、脱共役剤を用い、細胞外フラックスアナライザー XF (Seahorse Bioscience, MA, USA) によるミトコンドリア代謝機能評価を行った。

正常細胞の MnSOD 過剰発現株では、コントロール株に比べ、電子伝達系の阻害剤、脱共役剤によって ATP 産生、最大呼吸量は増加していたが、癌細胞の MnSOD 過剰発現株では減少していた (B)。MnSOD は正常細胞では酸化的リン酸化を亢進し、癌細胞では酸化的リン酸化を抑制していることが示された。

6. 結論と今後の展望

今回の総説では、図3に示すように、我々が提唱している「ミトコンドリアルスーパーオキシドセオリー」の概要と MnSOD の機能について紹介した。MnSOD は、酸化還元酵素としての酸化ストレス応答シグナルのみならず、癌細胞の細胞周期、代謝経路、転移などの他のシグナルも調整していることが予想される。癌細胞において、MnSOD の活性/発現量は酸化的リン酸化と解糖系のスイッチをすることにより、

癌の増殖を調節している可能性があり、我々は MnSOD の高い活性/発現量が、細胞内のチオールレベルを変化させ、浸潤・転移能に関連していることを明らかにした³⁷⁾。MnSOD は腫瘍マーカーとして癌の診断、MnSOD 製剤として癌治療に用いられているが、その一方で MnSOD の過剰発現株では放射線^{26,38)}、抗がん剤³⁹⁾に抵抗性を示すことが報告されている。これまで、放射線照射による細胞死を誘導するメカニズムの解明、放射線抵抗性の獲得に関する研究、癌の浸潤転

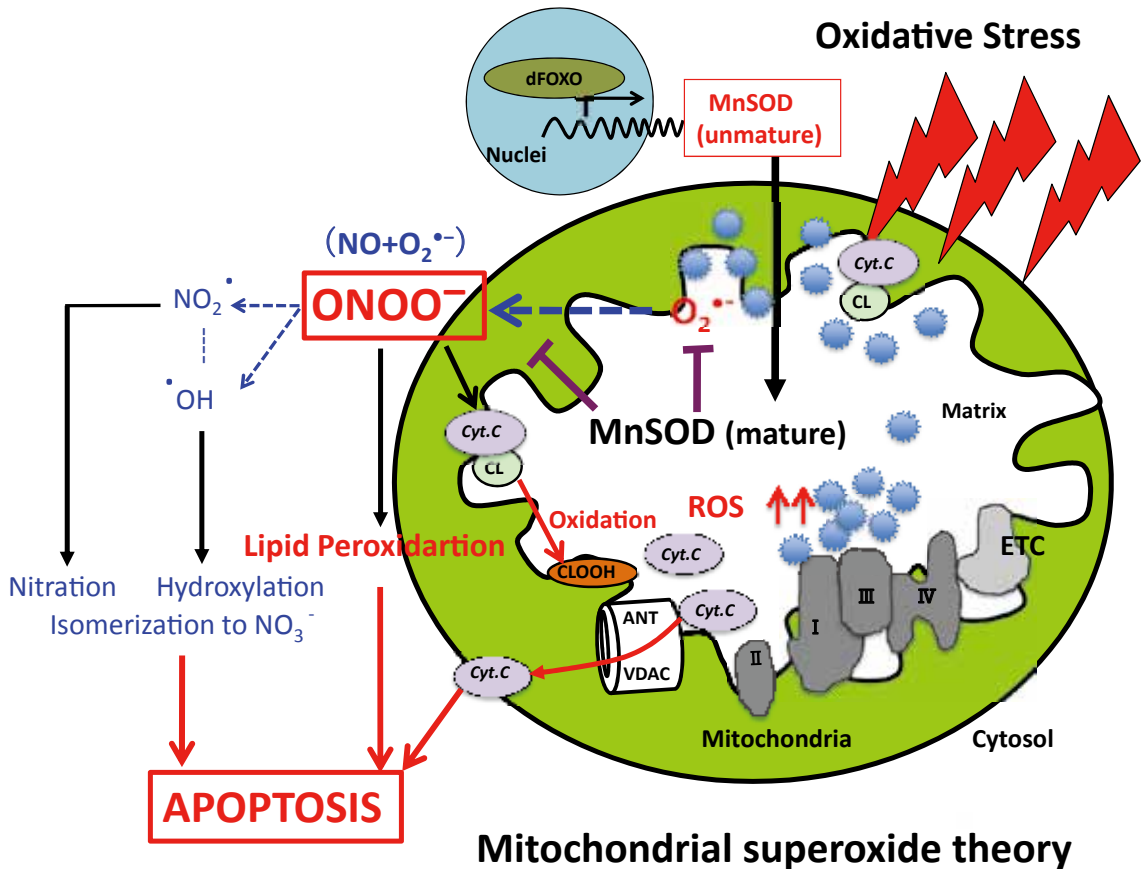


図3：ミトコンドリアスーパーオキシドセオリー³⁾

MnSOD がスーパーオキシドのレベルを低下させるだけでなく、スーパーオキシドと ONOO⁻ との結合を抑えることにより ONOO⁻ からの生成される HO[•] を抑え、それによって引き起こされる脂質の過酸化、ミトコンドリア膜のカルジオリピンの酸化、放射線誘導アポトーシスを抑制することを示している。

移に関する研究は、数多くなされているが、放射線抵抗性の獲得と癌の浸潤・転移についての関連性については、未だ詳細に解明されておらず、不明な点も多い。癌の放射線治療において、放射線抵抗性の獲得は重要な問題であり、その後の予後にも大きな影響を及ぼす。MnSOD のさらなる機能を調べることは、癌克服のための放射線抵抗性の機序解明の一助となる可能性があり、また放射線抵抗性の獲得と癌細胞の転移因子との関連性を明らかにすることによって、これらの基礎研究が臨床に反映されるように、さらなる研究を遂行していく所存である。

参考文献

- 1) Majima, H. J., Indo, H. P., Suenaga, S., Kaneko, T., Matsui, H., Yen, H-C., Ozawa, T.: Mitochondria as Source of Free Radicals, In; Free Radical Biology in Digestive Diseases, Naito, Y., Suematsu, M., Yoshikawa, T., Ed., Front Gastrointest Res., 29, 12-22, Karger, Basel, 2011.
- 2) Majima, H. J., Indo, H. P., Suenaga, S., Matsui, H., Yen, H-C., Ozawa, T.: Mitochondria as Possible Pharmaceutical Targets for the Effects of Vitamin E and its Homologues in Oxidative Stress-Related Diseases. Curr Pharm Des, 17(21), 2190-2195, 2011.
- 3) Indo, H. P., Yen, H-C., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O.,

- Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., Sato, T., Ozawa, T., St Clair, D. K., Majima, H. J.: A Mitochondrial Superoxide Theory for Oxidative Stress Diseases and Aging. *J Clin Biochem Nutr*, 56(1), 1-7, 2015.
- 4) Majima, H. J., Indo, H. P., Nakanishi, I., Suenaga, S., Matsumoto, K., Matsui, H., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Yen, H-C., Hawkins, C. L., Davies, M. J., Ozawa, T., St Clair, D. K.: Chasing Great Paths of Helmut Sies "Oxidative Stress". *Arch Biochem Biophys*, In Press, 2016.
 - 5) Takeshige, K. & Minakami, S.: NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem. J.*, 180(1), 129-135, 1979.
 - 6) Trumpower, B. L.: The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.*, 265(20), 11409-11412, 1990.
 - 7) McLennan, H. R. & Degli Esposti, M.: The contribution for mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 32(2), 153-162, 2000.
 - 8) Boveris, A. & Cadenas, E.: Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.*, 54(3), 311-314, 1975.
 - 9) Cross, A. R. & Jones, O. T.: Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta*, 1057(3), 281-298, 1991.
 - 10) Zhang, J. G., Nicholls-Grzemski, F. A., Tirmenstein, M. A., Fariss, M. W.: Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem. Biol. Interact.*, 138(3), 267-284, 2001.
 - 11) Yamagishi, S., Edelstein, D., Du, X., Kaneda, Y., Guzman, M., Brownlee, M.: Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, 276(27), 25096-25100, 2001.
 - 12) Muller, F. L., Liu, Y., Van Remmen, H.: Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 279(47), 49064-49073, 2004.
 - 13) Indo H. P., Davidson, M., Yen, H-C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., Higuchi, M., Koga, Y., Ozawa, T., Majima, H. J.: Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 7(1-2), 106-118, 2007.
 - 14) Forman, H. J. & Kennedy, J.: Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver: a function of the primary dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173(1), 219-224, 1976.
 - 15) Tretter, L. & Adam-Vizi, V.: Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by α -ketoglutarate dehydrogenase. *J. Neurosci.*, 24(36), 7771-7778, 2004.
 - 16) Matsumoto, S., Koshiishi, I., Inoguchi, T., Nawata, H., Utsumi, H.: Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic. Res.*, 37(7), 767-772, 2003.
 - 17) Turrens, J. F., Boveris, A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.*, 191(2), 421-427, 1980.
 - 18) Sawyer, D. T. & Valentine, J.S.: How Super is Superoxide. *Acc. Chem. Res.*, 14(12), 393-400, 1981.
 - 19) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87(4), 1620-1624, 1990.
 - 20) Hayashidani, S., Tsutsui, H., Shiomi, T., Suematsu, N., Kinugawa, S., Ide, T., Wen, J., Takeshita, A.: Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*, 105(7), 868-873, 2002.
 - 21) Kinugawa, S., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Ide, T., Suematsu, N., Satoh, S., Utsumi, H., Takeshita, A.: Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ. Res.*, 87(5), 392-398, 2000.
 - 22) Mihara, T. & Onuma, T.: Cytoplasmic chaperons in precursor targeting to mitochondria: The role of MSF

- and hsp70. *Trends Cell Biol.*, 6(3), 104-108, 1996.
- 23) Lithgow, T.: Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.*, 476(1-2), 22-26, 2000.
- 24) Koehler, C. M.: Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.*, 476(1-2), 27-31, 2000.
- 25) Sutton, A., Imbert, A., Igoudjil, A., Descatoire, V., Cazanave, S., Pessayre, D., Degoul, F.: The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 15(5), 311-319, 2005.
- 26) Indo, H. P., Inanami, O., Koumura, T., Suenaga, S., Yen, H-C., Kakinuma, S., Matsumoto, K., Nakanishi, I., St Clair, W., St Clair, D. K., Matsui, H., Cornette, R., Gusev, O., Okuda, T., Nakagawa, Y., Ozawa, T., Majima, H. J.: Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic. Res.*, 46(8), 1029-1043, 2012.
- 27) Li, Y., Hung, T-T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., Epstein, C. J.: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.*, 11(4), 376-381, 1995.
- 28) Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J. Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M. M.: Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(18), 9782-9787, 1996.
- 29) Storz, P. & Toker, A.: Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J.*, 22(1), 109-120, 2003.
- 30) Connor, K. M., Subbaram, S., Regan, K. J., Nelson, K. K., Mazurkiewicz, J. E., Bartholomew, P. J., Aplin, A. E., Tai, Y. T., Aguirre-Ghiso, J., Flores, S. C., Melendez, J. A.: Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *J. Biol. Chem.*, 280(17), 16916-16924, 2005.
- 31) Kaewpila, S., Venkataraman, S., Buettner, G. R., Oberley, L. W.: Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1 alpha induction via superoxide. *Cancer Res.*, 68(8), 2781-2788, 2008.
- 32) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P.: Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99(18), 11908-11913, 2002.
- 33) Warburg, O.: On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270, 1956.
- 34) Ido, T., Wan, C. N., Casella, V., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Reivich, M., Kuhl, D. E.: Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs: 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Labeled Compounds Radiopharm.*, 14(2), 175-183, 1978.
- 35) Fogg, V. C., Lanning, N. J., MacKeigan, J. P.: Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin. J. Cancer*, 30(8), 526-539, 2011.
- 36) Sun, R. C., Fadia, M., Dahlstrom, J. E., Parish, C. R., Board, P. G., Blackburn, A. C.: Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.*, 120(1), 253-260, 2010.
- 37) Indo, H. P., Matsui, H., Chen, J., Zhu, H., Hawkins, C. L., Davies, M. J., Yarana, C., St Clair, D. K., Majima, H. J.: Manganese superoxide dismutase promotes interaction of actin, S100A4 and Talin, and enhances rat gastric tumor cell invasion. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 57(1), 13-20, 2015.
- 38) Motoori, S., Majima, H. J., Ebara, M., Kato, H., Hirai, F., Kakinuma, S., Yamaguchi, C., Ozawa, T., Nagano, T., Tsujii, H., Saisho, H.: Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res.*, 61(14), 5382-5388, 2001.
- 39) Chen, P. M., Cheng, Y. W., Wu, T. C., Chen, C. Y., Lee, H.: MnSOD overexpression confers cisplatin resistance in lung adenocarcinoma via the NF- κ B/Snail/Bcl-2 pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 79, 127-137, 2015.