

# 活性酸素と酸化ストレス応答

## —分子メカニズムの新たな展開—

野澤義則<sup>1</sup>・鈴木紀子<sup>2</sup>

(1: 東海学院大学健康福祉学部管理栄養学科, 2: 岐阜大学大学院医学研究科産科婦人科学)

### 要 約

生体における活性酸素種 (ROS) の生成・消去システムの制御異常によって生じる酸化ストレスは、脂質、たんぱく質あるいは核酸に障害をもたらす、動脈硬化、がん、糖尿病など生活習慣病を含め多くの疾病の病因と密接に関連していることは、これまでも広く知られている。ところが、その一方で活性酸素の生理的作用が最近注目されるようになり、そのなかでも細胞シグナル伝達分子としてさまざまな細胞応答の発現調節に関与していることが明らかされ、国内外において ROS 研究の大きな潮流となりつつあり、従来の“悪しきオキシダント・良きアンチオキシダント”という古典的なセントラルドグマのパラダイムシフトを迎えようとしている。本稿ではこのような背景をもとに、ROS の生理的機能に焦点を当て最近の展開を概説する。

**キーワード:** 活性酸素種 (ROS)、酸化ストレス、レドックス・シグナリング、ホルミシス効果、抗酸化物質 (アンチオキシダント)

### 1. はじめに

ヘルムット・シエス (Helmut Sies, 1985 年)<sup>1)</sup> が“Oxidative Stress”という概念を提唱してからほぼ 30 年になるが、邦語では“酸化ストレス”として広く知られている。その基本は活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の産生系と消去 (軽減) 系のバランスが乱れ、ROS 過剰となり、細胞成分の脂質、たんぱく質、DNA などと反応し細胞機能異常をもたらすことにある。したがって、今や活性酸素病 (Redox disease) と呼ばれ、心筋梗塞、高血圧、糖尿病などさまざまな疾患が ROS と関連していることが示されている。したがって、ROS は悪く、抗酸化物質は良いもの (Bad oxidants and good antioxidants)<sup>2)</sup> とする考えが一般的であった。ところが一方では、このような概念にも時の変遷とともに変化がみられ、ROS にも従来の病理的なものに加え生理的なものの存在が指摘されるようになり、ROS の生体における意義にも新たな展開がみられる。ROS の生理的機能のなかでも最も古くからよく知られているのは、白血球による殺菌作用である。なお、1970 年代後半には過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による細胞増殖作用や細胞増殖因子、サイトカイン刺激による  $H_2O_2$  産生が観察され、ROS の生理的意

義が指摘されていた。1998 年にトーレン・フィンケル (Tören Finkel)<sup>3)</sup> は、ROS を介するチロシンリン酸化が細胞機能制御に必要であることを示し、ROS のシグナル分子としての新たな機能を提示した。そして今日では、レドックス・シグナリング (Redox signaling) として広く知られている。したがって、活性酸素病もレドックス・シグナリングの障害として考えられている。このような背景を反映して、ROS に関しても、光と影、明暗、功罪、善悪、ポジティブ・ネガティブ、レドックス・パラドックス (Redox paradox) などさまざまな表現されている。換言すれば、酸化ストレスにも悪いもの (Distress) と良いもの (Eustress) とが存在し、生体機能反応に深く関連している。80 年代のハンス・セリエ (Hans Selye, 1983 年) によるストレス学説<sup>4)</sup> によれば、ストレスをもたらす外部刺激 (ストレッサー; Stressor) に対する生体の適応反応であり、彼の名言“ストレスは「生活のスパイス」と考えなさい”は実に巧みな表現である。この適応反応 (Adaptive response) は、生物一般にみられるホルミシス (Hormesis) 現象<sup>5)</sup> であり、軽度のストレスは良い効果をもたらす、過度のストレスは障害をもたらす。

このように ROS の二役作用 (Dual function) は、今

日では一般的な概念として広く受け入れられているが、本稿では ROS の「光」の側面、すなわち生理的作用とその周辺について述べる。

## 2. 酸素は両刃の剣 — エネルギーと ROS の産生

地球に生物が誕生したのは約 40 億年前と考えられており、その当時は酸素はなく、嫌気性生物が存在していた。その後、光合成を行うラン藻類の出現により酸素が放出されるようになり、その増加に伴い嫌気性生物は滅亡し好気性生物が現れるが、地球誕生から現在の大気組成になるまでには実に 12 億年の長き年月を経たとされている。やがて哺乳類のような酸素を必要とする高等生物が誕生することになる。細胞のミトコンドリアは酸素を利用してエネルギーを産生し、生命活動を営んでいる。一方、酸素から酸化力の強い活性酸素が生じるために細胞障害、ひいては疾患の原因ともなる。このような二面性から「酸素は両刃の剣」と称される所以である。その酸素の発見については紆余曲折があったがジョセフ・ブリーストリー (Joseph Priestly) が発見者とされている。フランスの高名な化学者アントワヌ・ラボアジェ (Antoine Lavoisier, 1974 年) によって名付けられた oxygene に由来して英語では oxygen、日本語では「酸素」と訳されたが、この邦語は化学・植物学者 (江戸時代後期) の宇田川榕菴によるものである。

## 3. 活性酸素種 (ROS) の生成メカニズム

主な活性酸素種にはスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ )、ペルオキシラジカル ( $ROO\cdot$ ) などさまざまなものがあり、フリーラジカルは反応性が強い。 $H_2O_2$  と  $^1O_2$  はフリーラジカルではない。一説によれば、1 日に細胞 1 個あたり 10 億個の ROS が発生し、DNA 損傷は細胞 1 個につき 1 日に数万から数十万個で起こると言われている。

ところで、ROS 生成メカニズムについては、ミトコンドリア由来のものとミトコンドリア以外のものとに大別される。

### 3-1 ミトコンドリアによる ROS 生成

ミトコンドリアは、体重の 10% ほどを占め、ヒトの細胞 1 個あたり数百から数千個ほど存在するが、心筋や骨格筋、神経細胞などに多い。独立した DNA 系を有し分裂、融合したりダイナミックに動いている。ミトコンドリアは、酸素を使いエネルギー (ATP) 生産を行う効率的なシステムであるが、また同時に生体に不都合な ROS を生成する。呼吸鎖、電子伝達系と酸化的リン酸化とから ATP を合成するが、その過程の複合体 I と複合体 III は一度に 1 つの電子しか受け渡せないために処理できず漏出し、酸素に吸収されてスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) が発生する (図 1)。我々が呼吸で取り込む

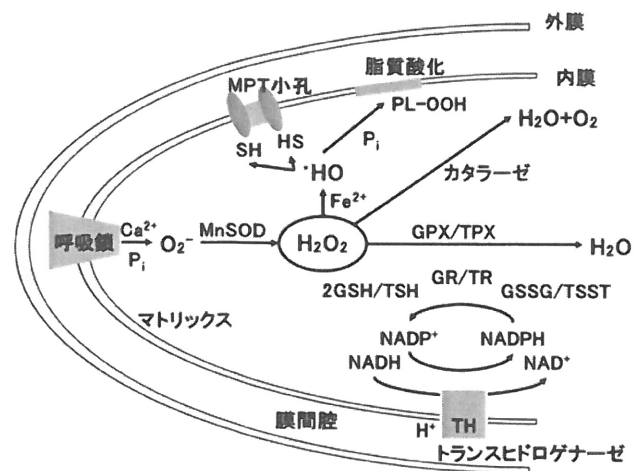


図1 ミトコンドリアにおける活性酸素の生成・消去システム

PL; リン脂質、SOD; スーパーオキシドディスムターゼ、GPX; グルタチオンペルオキシダーゼ、TRX; チオレドキシン、GR; グルタチオンレダクターゼ、TR; チオレドキシンレダクターゼ、GSH; 還元型グルタチオン、GSSG; 酸化型グルタチオン、TSH; 還元型チオレドキシン、TSST; 酸化型チオレドキシン

酸素の約 2% は体内で副産物 (byproduct) の ROS となり、ROS の最大生成はミトコンドリア由来である。なお、反応性が強く DNA、脂質、たんぱく質などに損傷を与えるため、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) によってラジカルでない  $H_2O_2$  に変換される。このようにミトコンドリアからの ROS は悪玉として扱われてきた。

ミトコンドリアの外膜に存在するモノアミンオキシダーゼ (MAO) は、生体アミン類 (セロトニン、ノルアド

表 1 Nox ファミリーオキシダーゼの組織分布、生成 ROS、活性化因子および生理的機能

酵素	組織・細胞分布	生成 ROS	活性化因子	生理的機能
Nox1	大腸、動脈	$O_2^-$	Noxo1, Noxa1	腸管免疫
Nox2	食細胞・血管内皮	$O_2^-$	p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> , P40 <sup>phox</sup> , Rac	食細胞・殺菌
Nox3	内耳	$H_2O_2$ , $O_2^-$	Noxo1, Noxa1	耳石形成
Nox4	腎臓はじめ多くの組織	$H_2O_2$	—	血管新生
Nox5	脾臓・睪丸・血管内皮	$O_2^-$	$Ca^{2+}$	精子運動
Duox1/2	甲状腺・内臓・上皮	$H_2O_2$	$Ca^{2+}$	甲状腺ホルモン生成

レナリン、ドーパミンなど)の酸化的脱アミノ反応を触媒し、アルデヒド、アンモニア、 $H_2O_2$ を産生する。

### 3-2 ミトコンドリア以外での ROS 生成

その主なものに NADPH オキシダーゼ (Nox; NADPH oxidase) ファミリーがあり、Nox1~Nox5 の 5 つの酵素に加え、Duox1 (Dual oxidase1) と Duox2 の 7 つのメンバーからなる。Nox は N 末端側の膜貫通領域と C 末端側の細胞質 (サイトゾル) 領域とに分かれ、前者には 6 回の膜貫通セグメントが、後者には NADPH・FAD 結合ドメインが存在する。Nox は細胞内の電子供与体である NADPH から電子を受け取り、FAD と 2 つのヘムを介して細胞外の酸素に電子を与え  $O_2^-$  を生成する。すなわち  $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP + H^+$  の反応による。なお、Nox の活性にはさまざまな細胞質因子が働くが、たとえば Nox2 では p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、P40<sup>phox</sup>、Rac (低分子 G たんぱく質) などである。

ところで、このオキシダーゼファミリーにも食細胞(ファゴサイト)系と非食細胞系とがあり、前者の代表は好中球やマクロファージによる病原体の殺菌作用をもたらす ROS を産生するのが Nox2 であり、 $O_2^-$  は  $H_2O_2$  や次亜塩素酸 (HOCl) などに変換され、それらは強力な殺菌作用をもたらす。したがって、善玉 ROS の代表として古くからよく知られていた。一方、非食細胞系の Nox1、Nox3 の活性には Nox2 と同様に細胞質因子を必要とするが、Nox4 はこれらの活性化たんぱく質の関与がなく、恒常的に ROS (主に  $H_2O_2$ ) を生成する。Nox5 と Duox1/2 は EF ハンドを介して  $Ca^{2+}$  によって活性化され、それぞれ  $O_2^-$  と  $H_2O_2$  を生成する。Duox には、その名 (dual; 2 つのオキシダーゼ) が示すようにペルオキシダーゼ類似領域が N 末端に存在する。

なお、Nox ファミリーの他にも ROS 生成酵素がある。キサントキシダーゼ (XO) は、ヒポキサチン→キサンチン→尿酸の反応を触媒し  $O_2^-$  が生じるが (キサンチン +  $H_2O_2 + 2O_2 \rightarrow$  尿酸 +  $O_2^- + 2H^+$ )、酸素濃度が低いと  $H_2O_2$  ができる (キサンチン +  $H_2O + O_2 \rightarrow$  尿酸 +  $H_2O_2$ )。虚血・再灌流の際に生じる多量の  $O_2^-$  産生はこの XO 活性化による。

### 4. 活性酸素種の消去システム

生体の過剰な ROS 生成によるレドックスバランスの乱れを正常化するために、さまざまな ROS 消去システムが作動するが、それには抗酸化酵素系と非酵素系とがある。前者の主要な酵素にはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) がある (図 1)。

SOD は、 $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  の反応を触媒し、3 種のタイプがある: SOD1 (Cu/Zn-SOD、細胞質)、SOD2 (Mn-SOD、ミトコンドリア)、SOD3 (Cu/Zn-SOD、細胞膜外表面)。このように好気性生物はスーパーオキシドの障害から保護されている。CAT は、 $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  の反応を触媒し、細胞小器官のペルオキシソーム (Peroxisome) に存在する。GPX は  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSH + 2H_2O$  の反応を触媒し、補酵素としてセレンを有する。還元型グルタチオン (GSH) を酸化型グルタチオン (GSSG) にして  $H_2O_2$  を分解する。この酵素は脂質過酸化物も基質とすることができる。

なお、その他にはチオレドキシン依存性の  $H_2O_2$  消去酵素ペルオキシドキシン (Peroxiredoxin, PRX) は、チオレドキシンペルオキシダーゼ (TRXPX) とも呼ばれ 6 種のアイソフォームがあり、それぞれ細胞内分布が異なる。すなわち、PRX1/2 は細胞質、PRX3 はミトコン

ドリア、PRX4 は小胞体、リソソーム、PRX5 はペルオキシソーム、ミトコンドリア、PRX6 は細胞質、ミトコンドリアに存在する。

また、酵素ではないが低分子量（105 アミノ酸）の酸化還元たんぱく質のチオレドキシン（Thioredoxin, TRX）は、それ自身の単独作用として一重項酸素（ $^1O_2$ ）やヒドロキシラジカル（ $\cdot OH$ ）を消去できるとともに、ペルオキシレドキシンとの共同作用で ROS を消去する。酸化型 TRX は還元酵素の作用によって再び還元型 TRX に変換される。TRX1 はサイトゾルに、TRX2 はミトコンドリアに分布する。TRX が酸化ストレスマーカーとして用いられている。

一方、これらの酵素・たんぱく質系による ROS 消去システムに加え、さまざまな低分子抗酸化物質が存在する。

グルタチオンは、グルタミン酸・システイン・グリシンからなるトリペプチドで、還元型（GSH）と酸化型（GSSG：2 分子の GSH がジスフィルド結合したもの）とがあり、細胞内はほとんど GSH として存在する。GSH は電子供与体として作用し、ROS との直接反応により還元し消去する。また、GSH はチオレドキシン（TRX）と同じようにペルオキシダーゼと共同作用で上述のグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）として働く。いずれの反応においても GSH は相手を還元し自らは酸化されるが、グルタチオン還元酵素（GR）によって再還元される。

ミトコンドリアの呼吸鎖成分であるユビキノンの還元体ユビキノールは、内因性の抗酸化分子として作用している。

また、抗酸化ビタミンとしては、ビタミン C（アスコルビン酸）とビタミン E（ $\alpha$ -トコフェロール）がよく知られており、前者はアスコルビン酸 +  $O_2^- \rightarrow H_2O_2 + \text{モノデヒドロアスコルビン酸}$ 、ついでカタラーゼにより  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  の反応が起こる。また、ヒドロキシラジカルは、アスコルビン酸 +  $\cdot OH \rightarrow H_2O + \text{モノデヒドロアスコルビン酸}$  の反応で消去される。後者の  $\alpha$ -トコフェロールは、細胞膜やリポタンパク質のフリーラジカル連鎖反応を抑え抗酸化作用をもたらす。

尿酸はビタミン C よりはるかに強い抗酸化物質であり、ヒト血漿中にかなり高濃度で存在するが、キサンチン、ヒポキサンチンのようなオキソプリンからキサンチンオキシダーゼによって生成される。ビタミン C の合成ができ

ないヒトでは、尿酸がビタミン C の代用として抗酸化作用を発揮しているとも考えられている。

## 5. 酸化ストレス応答における転写因子 Nrf2 の役割

Nrf2 (Nuclear factor - erythroid - 2 - related - factor2) は、塩基性ロイシンジッパー構造を持つ転写因子であり、ROS や親電子性物質を含めさまざまな環境ストレスに適応し細胞ホメオスタシスを維持するための中心的な役割を果たし、多様なストレス応答あるいは生体防御を司る酵素の発現を調節している<sup>6)</sup>。なお、この他に炭水化物や脂質の中間代謝の調節にも関与している<sup>7)</sup>。

ストレスの無い状態では、Nrf2 は Keap1 たんぱく質と結合しており、ユビキチン化されプロテアソームによって分解されるが、ROS や親電子性物質などに曝されると、Keap1 が Nrf2 から解離し Nrf2 は核内に移行し、Maf2 とヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の ARE（抗酸化物質応答配列）/XRE（異物応答配列）に結合して酸化ストレス防御関連の遺伝子発現が誘導される（図 2）。

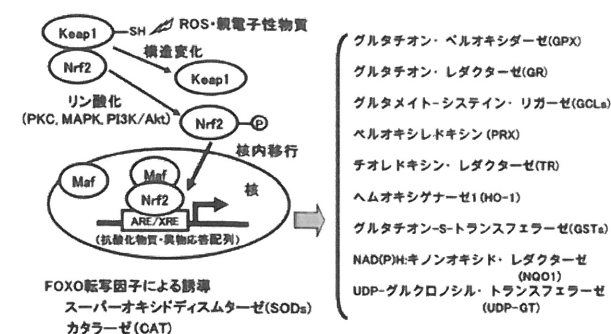


図 2 Nrf2/Keap1 転写制御系を介する抗酸化・第二相酵素の発現機構

Keap1 は、多くのシステイン残基（27 個）を有し高感度のストレスセンサーとして作用する。ROS などの刺激を受けると、これらの中にいくつかのシステイン残基（Cys 151、Cys 273、Cys288）が反応し Keap1 の構造変化が生じ Nrf2 から解離する。Keap1 の分解には従来のプロテアソーム系に加え、オートファジーも関与することが最近示されている。

このような Keap1 依存性の Nrf2 調節の他に Keap1 によらないさまざまなレベル（転写、転写後、翻訳後）での機構がある<sup>8)</sup>。たとえば、Nrf2 は多くのセリン、スレオニン、チロシン残基をもっており、種々のプロテ

ンキナーゼ（プロテインキナーゼ C/PKC、MAP キナーゼ、PI3/Akt など）によってリン酸化を受けると、Keap1 との結合から解離され核内移行が促進される。ところが、興味深いことに、MAP キナーゼの 1 つである p38 キナーゼによって Nrf2 がリン酸化されると Keap1 結合が促進され核内移行が阻害される。

## 6. 活性酸素の生理的作用

従来の酸化ストレスの概念は、ROS 生成系と消去系の不均衡による過剰 ROS がもたらす DNA、脂質、たんぱく質など生体分子への障害に焦点が当てられてきた。したがって、呼吸によって生じる量的にも多い ROS は、好まざる副産物であるために、上述のような ROS 消去システムで対応している。つまり、酸化ストレスは、疾病とも関連し悪いものとして扱われてきた。ところが、その一方でミトコンドリア以外の ROS 生成系がさまざまな細胞機能調節に関連することが、多くの研究によって示され、今や従来の bad ROS のみならず good ROS の存在が広く知られている（図 3）。換言すれば、前者は量的に多い副産物 ROS であり、後者は必要に応じ生成される低濃度の ROS である。この低濃度の ROS 刺激の生理的有用性は、ホルミシス（Hormesis）効果<sup>5)</sup>で説明されている。ある物質が高濃度では有害をもたらす、低濃度ではむしろ有益となる現象である。

最近では、良い ROS の条件としての低濃度に加え、短時間（一過性）の作用（刺激）時間が注目されており、典型的な例としてレドックス・シグナリングがある。

ここでは、ROS の多様な生理的作用の中で主なものについて述べるが、これまで悪しきものとして扱われてきたミトコンドリア ROS にも新たな生理的意義が見いだされ注目を集めている<sup>9-10)</sup>。

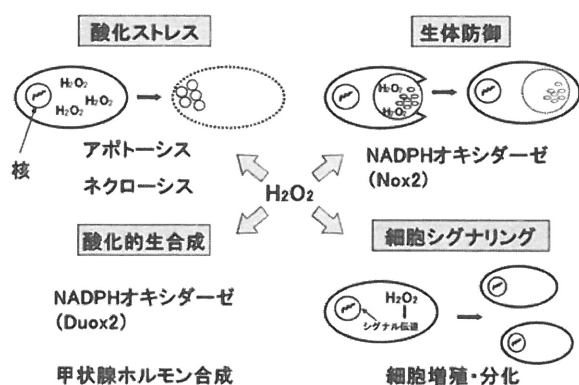


図3 過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）による細胞応答

## 6-1 食細胞の殺菌作用

ROS の“光と影”、“明暗”、“ポジティブ・ネガティブ”など対比して議論されてきたなかで、食細胞による ROS 生成は“光”の代表として古くから知られていた。好中球など食細胞が細菌を取り込むと急激に酸素消費が増える呼吸バースト（Respiratory burst）が起こり、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HOCl、<sup>•</sup>OH などが生成され、殺菌作用をもたらす（図4）。Nox2 オキシダーゼによって生じる O<sub>2</sub><sup>-</sup>は、細胞内・外に放出されるが、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）反応（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Cl<sup>-</sup>+H<sup>+</sup>→HOCl+H<sub>2</sub>O）でより強力な殺菌物質（次亜塩素酸；HOCl）となる。また、この次亜塩素酸は O<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応して<sup>•</sup>OH ができ殺菌、異物排除に役立っている。

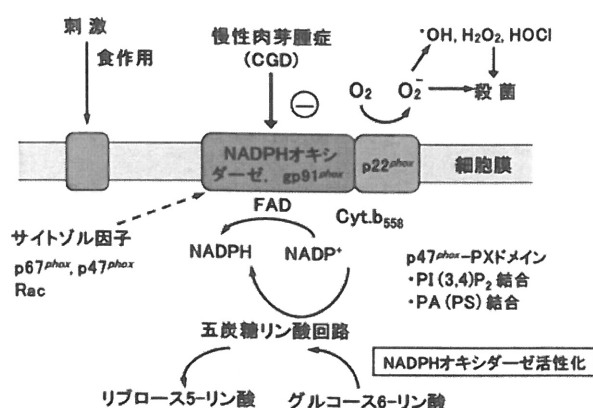


図4 食作用（ファゴサイトーシス）・殺菌作用の分子メカニズム-Nox2の活性化

## 6-2 シグナル分子としてのROS-レドックスシグナリング

多彩な細胞応答において、ROS がシグナル分子として重要な機能を発揮していることが、多くの活発な研究によって明らかにされ、ROS の生理的意義が広く認識されるようになり新たな展開が注目されている<sup>11-15)</sup>。端的に言えば、ROS はセカンドメッセンジャーとして作用していることになるが、そのことは 20 年も前に示唆されていた。たとえば、増殖因子やサイトカインの受容体刺激による細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による増殖因子様作用などが観察されていた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は細胞膜の水チャネル（アクアポリン）を介して効果よく通過でき、細胞内の間のシグナル分子として作用する<sup>16)</sup>。

ここでは ROS によるシグナル伝達系の調節について述べるが、特徴的なことは ROS に対して高い反応性を

示し、可逆的な酸化修飾を受ける、いわゆる ROS センサーたんぱく質の存在である。シグナル伝達系は、たんぱく質のプロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸化で調節されているが、主なものとして MAP キナーゼ系、PI3 キナーゼ/PTEN 系、ASK1/TRX 系、プロテインキナーゼ A/C/G 系、チロシンキナーゼ・チロシンホスファターゼ (PTP) 系などがある。たとえば、神経細胞 PC12 を  $H_2O_2$  処理すると、 $Ca^{2+}$  依存性チロシンキナーゼ Pyk2 によるリン酸化でホスホリパーゼ D2 (PLD2) が活性化され、さらに Src キナーゼによる Pyk2 活性上昇が生じ、PI3K/Akt/p70S6K の生存シグナリング系が活性化される<sup>17-19)</sup> (図 5)。

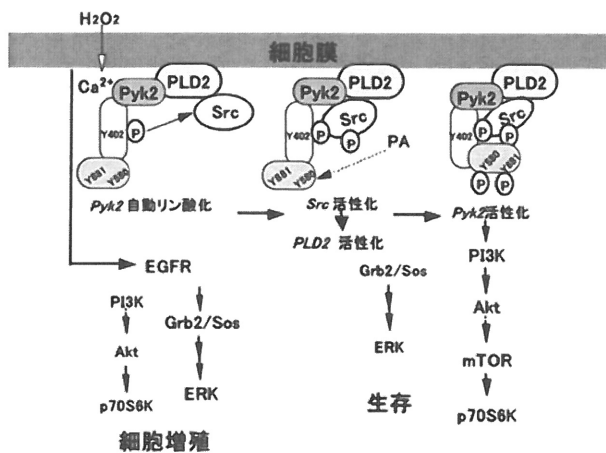


図 5 神経細胞 PC12 の  $H_2O_2$  刺激における生存シグナリングの活性化

PLD; ホスホリパーゼ D、PA; ホスファチジン酸、Pyk2;  $Ca^{2+}$  依存性チロシンキナーゼ、PI3K; PI3 キナーゼ

ストレス応答 MAP キナーゼの JNK、p38 は上流の ASK1 によるリン酸化で活性化され、アポトーシスを起こすが、細胞の状況によっては分化や生存を誘導する<sup>12)</sup>。前述のように、正常状態では ASK1 は還元型 TRX (チオレドキシン) と結合しているが、ROS によって TRX が酸化型に変換されると ASK1 が解離し活性化される。また、この活性化 ASK1 は、PP5 (プロテインホスファターゼ 5) によって脱リン酸化を受け不活性化される。活性化された JNK、p38 はチロシンホスファターゼで脱リン酸化・活性阻害されるが、そのホスファターゼが ROS で不活化されると、結果としてそれらの MAP キナーゼの持続的活性化が起こる。PKA、PKC、PKG など

のプロテインキナーゼは、 $H_2O_2$  によって分子内ジスフィルド結合が形成され活性化される。このように ROS は、MAP キナーゼ系においてプロテインキナーゼ (たんぱく質リン酸化) の活性化とプロテインホスファターゼ (たんぱく質脱リン酸化) の不活性化の調節分子として作用する。

PI3K/PTEN 系は、上記の MAP キナーゼ系とは異なり、ROS による可逆的な酸化修飾を受けるチロシンホスファターゼの 1 つとして知られている PTEN は、たんぱく質の脱リン酸化を行う一方、PI3K によって  $PI(3,4,5)P_3$  を脱リン酸化して  $PI(4,5)P_2$  に変換する。この酵素は、ASK1 と同じように、 $H_2O_2$  によるジスフィルド結合形成により不活性化されるが、TRX などで還元されると再度活性化される。 $PIP_3$  は増殖・分化に重要な ASK キナーゼの活性化因子であり、PI3K と PTEN による On・Off 調節を行っている。

なお、遺伝子発現に関与する ROS シグナリング、すなわち Nrf2/Keap1 系に関しては上述してあり、ここでは触れない。

### 6-3 概日リズム

動物、植物、菌類など広く多細胞系、単細胞系のほとんどの生物は、光・温度などの外環境変化に同調して約 24 時間周期で代謝、遺伝子発現、摂食行動あるいは睡眠などの生命現象が変動し、これを概日リズム (Circadian rhythm, サーカディアンリズム) と呼んでいる。また、日周変動あるいは日内リズムとも言われる。そして、この概日リズムを作り出すのは生物時計 (体内時計、概日時計) の働きによる。哺乳動物では、マスターペースメーカーの中核時計は視床下部の直径 1 ミリほどの視交叉上核にあり、光に応答しスイッチオンとなりホルモンやニューロペプチドを放出する。これに続いて各組織・臓器に存在する抹消時計が作動し、それぞれの固有の機能を発揮する。時計遺伝子発現の日周変動機構は、転写・翻訳フィードバックループ (Transcription・translation feedback loops, TTFLs) によって制御されている。すなわち、転写活性化因子の CLOCK と BMAL1 は、二量体を形成し E ボックスに結合すると転写制御の CRY と PER 遺伝子の転写を活性化する。その一方では、CRY と PER は CLOCK・BMAL1 二量体に直接結合し、その転写活性を抑える。このように、体内時計の転写の活性化と抑制の周期が 24 時間になるように制御されており、

各種代謝や睡眠などを含む多彩な生理機能の日周期的制御がなされている。

ところで、このような転写を基盤とする従来の古典的な機構に加え、プロテアソーム分解、エピジェネティック調節や翻訳後修飾などの関与が示されている。さらに最近、ROS 変動が体内時計の制御に密接に関与していることが明らかにされ、ROS 消去酵素の1つである PRX (ペルオキシドキシシン) の酸化・還元が日周変動することが示された。実際に酸化型の PRX-SO<sub>2</sub>/3H レベルが 24 時間周期で変化する。興味深いことに、この現象が DNA をもたない赤血球でも見られることから、転写を必要としない日周リズムの存在を示している<sup>20)</sup>。

このように、PRX の発現・活性が ROS レベルの変化によって時計遺伝子の発現が制御されるが、一方では、時計遺伝子が PRX 発現を調節するという新たなフィードバックループが形成されている。つまり、細胞のレドックス状態の変動が体内時計の制御因子として重要な役割を果たしている。

#### 6-4 甲状腺ホルモンの生合成 — ヨウ素イオンの酸化

甲状腺ホルモンは、アミノ酸のチロシンが 2 つ結合し、側鎖に 3 個あるいは 4 個のヨウ素が結合したもので、前者はトリヨードチロシン (T<sub>3</sub>)、後者はチロキシシン (T<sub>4</sub>) である。生理活性は T<sub>3</sub> の方がはるかに強いが、血中ではほとんどが T<sub>4</sub> である。T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> の生合成は、濾胞細胞内の巨大なヨウ素化された糖たんぱく質のチログロビンで行われるが、チログロビン中のヨウ素の約 70% は不活性な前駆体であるモノヨードチロシン (MIT) とヨードチロキシシン (DIT) に存在し、残りの 30% が T<sub>3</sub> および T<sub>4</sub> に含まれる。まず最初に血中のヨウ素イオン (I<sup>-</sup>) が、輸送体を介して濾胞細胞内に入り、ペルオキシダーゼ (Duox2) によって生成される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により酸化され遊離ヨウ素 (I<sup>+</sup>) となる (図 3)。ついでチログロビン内のチロキシシン残基のヨード化が起こり、MIT や DIT となり、2 分子の DIT が結合すると T<sub>4</sub> が、また MIT と DIT が結合すると T<sub>3</sub> が生成される。その後、リソソームによる加水分解によって甲状腺ホルモンがチログロビンから遊離し濾胞細胞から血中へ放出される。ヨウ素イオンの酸化を阻害する化合物は抗甲状腺剤として使用されている。

#### 6-5 ミトホルミシス—ミトコンドリア ROS による細胞適応機構

以上述べた生理時機能は主に NADPH オキシダーゼによる ROS 生成を介するものであるが、その一方で呼吸に伴うミトコンドリア由来の悪しき副産物としての ROS に対して、新たな側面、つまり良き ROS として細胞応答に関与していることが明らかにされつつある<sup>9, 21-23)</sup>。したがって、ミトコンドリア ROS は、ネガティブ・ポジティブの二役効果をもたらすことになるが、ここでは主な例について述べる。

a) オートファジー (Autophagy) : 自食作用と訳される細胞内浄化機構の一つであり、病的な細胞内容物や不要な細胞内成分を分解・消化し、生存のために再利用する機構である。すなわち、それらの細胞成分を取り込んだオートファゴソーム (Autophagosomes) は、リソソームと融合してオートリソソームとなり、内容物がリソソーム酵素によって分解される。細胞が栄養飢餓の状態になると、ミトコンドリア ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) のレベル上昇が起こり、オートファジーが促進される<sup>10)</sup>。薬剤によってこの ROS 上昇を阻害するとオートファジーが抑えられることから、ミトコンドリア由来の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、オートファジー作用にとって必要である<sup>24)</sup>。システインプロテアーゼ (Atg4) が酸化・不活化され、ついで酸化 Atg4 が別の因子 Atg8 を活性化すると、オートファゴソームの形成が促進されオートファジーが活発となる。ところで、オートファジーは生存に寄与する一方で、細胞死をもたらす。これもホルミシス効果で、ROS の低レベルでは生存、高レベルでは死をもたらす。

b) 低酸素適応 — HIF-1 $\alpha$  (低酸素誘導因子) による転写制御 : 酸素存在下のエネルギー産生は、ミトコンドリアの電子伝達系で効率よく行われるが、低酸素環境では解糖系で ATP が産生される。細胞が低酸素 (0.3~3%) 状態になると、ミトコンドリア (複合体 III) 由来の ROS が遊離するが、その詳細な分子機構は明らかでない。

ところで、この ROS 遊離が低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ , Hypoxia-inducible factor) の転写調節に重要な働きをしている<sup>10)</sup>。通常の酸素存在下では、HIF-1 $\alpha$  たんぱく質は、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解されるが、低酸素下では分解されず安定化され、核内に移行し

DNA の低酸素応答領域 (HIF-response elements, HRE) に結合し関連遺伝子の転写が起こる。低酸素、ミトコンドリア ROS および HIF-1 $\alpha$  活性化の関連性を示す興味深い実験知見がある。ミトコンドリア DNA の複製を阻害するエチディウムブロマイドの存在下で培養した細胞では、低酸素による ROS 遊離は起こらず、HIF-1 $\alpha$  は安定化・活性化されない。HIF-1 $\alpha$  を介してほとんどの解糖系酵素の転写が活性化しグルコースの利用が促進される。さらに、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (PDK) の転写を促進し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PD) 活性を抑制してミトコンドリアの TCA サイクルへのピルビン酸輸送を阻害する。そのために酸化的リン酸化による ATP 合成は低下し、解糖系優位のエネルギー獲得となる。

**c) 寿命延長 — Harman 説を越えて：** ドナルド・ハーマン (D. Harman) 博士が提示した老化のフリーラジカル説 (1956 年)<sup>25)</sup>によれば、呼吸に伴って電子伝達系の複合体 III から副産物として生じる ROS は、脂質、たんぱく質、核酸などの細胞成分を酸化し機能障害をきたし、結果として寿命短縮・死をもたらす。いわゆる悪しき ROS のルーツとして長年にわたり広く知られてきた。

また一方では、貝原益軒の“腹八分目が良い”とか、ベンジャミン・フランクリンの“長生きしたければ、食べるものを少なくせよ”など古くから少食が健康によいとされてきた。80 年ほど前に CM. McKay らによりカロリー制限がラットの寿命延長をもたらすことが初めて示された。最近になって、酵母、線虫、ハエ、マウス、サルなどでカロリー制限による寿命の延長が観察され、その分子メカニズムに関する研究の急速な展開がみられる。その 1 つに酸化的障害軽減説があり、カロリー制限によりミトコンドリアのエネルギー代謝が低下すると酸素消費が減り、ひいては ROS 生成が減少するために細胞成分の損傷が軽減され、抗酸化・寿命延長がもたらされることになる<sup>26)</sup>。

ところが一方では、この説と異なるメカニズムが最近提唱され注目されている。カロリー制限によるエネルギー低下が AMPK (AMP-依存性キナーゼ) の活性化をきたし、GPC-1 $\alpha$  のリン酸化を介しミトコンドリアの増加やエネルギー代謝が促進され低レベルの ROS が生成され、これがシグナル分子として作用し酸化ストレス耐性・第二相酵素など抗酸化・寿命延長の関連遺伝子が発

現される<sup>23)</sup>。いわゆるホルミシス効果である。このプロセスは、適度の運動によるエネルギー消費の場合にも見られ、抗酸化・寿命延長作用の一因となっている。

さらに、カロリー制限の長寿効果に新たな展開が見られ、NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) であるサーチュイン (Sirtuin) の活性化により p53、NF $\kappa$ B、FOXO、PGC-1 $\alpha$  などの転写因子が脱アセチル化され、細胞の寿命が延長される<sup>27)</sup>。サーチュイン遺伝子が長寿遺伝子と言われる所以である。

## 7. 抗酸化物質 (アンチオキシダント) の有用性と課題

### 7-1 抗酸化物質の直接的・間接的作用

さまざまな低分子抗酸化物質があり、その作用が直接的か間接的によって分けられる<sup>28)</sup>。前者の代表的な例としては、抗酸化ビタミンと呼ばれるビタミン C、E の他にグルタチオン (GSH)、N-アセチルシステイン (NAC)、ビリルビンがあり、ROS と直接反応し消去するスカベンジャー作用である。また、ROS 生成酵素 (NOXs, MAOs, ミトコンドリア電子伝達系など) のそれぞれに直接作用して活性を阻害し ROS 生成を抑える多くの物質が開発されている。また、ミトコンドリアに直接働き ROS 生成を抑えるミトキノンが注目されている。一方、間接的抗酸化物質は、それ自体には抗酸化活性はないが、SOD、NQO-1、HO-1 などの抗酸化酵素の誘導発現をもたらす Nrf2-Keap 系に作用する。たとえば、ポリフェノール、フラボノイド、スルフォラファン、レスベラトロールなどの親電子性物質のファイトケミカル (Phytochemicals) がよく知られている<sup>29-30)</sup>。この抗酸化制御システムを活性化するより効果的な Nrf2 アゴニストの開発が期待されている。

### 7-2 抗酸化物質のパラドックス

30 年前に H. Sies によって提唱された“oxidative stress” (酸化ストレス) の概念も時を経るにつれ変化がみられる。かつては、“Bad ROS and good antioxidants”とする考えが一般的に広く知られており、その根底には ROS は生体成分 (脂質、たんぱく質、核酸など) に反応して障害をもたらす、ひいては酸化ストレス病などと呼ばれるように、さまざまな疾患と密接に関与していることが示され、この悪しき ROS を軽減・消去する低分子

抗酸化物質が日常生活でも健康増進・疾病予防のために広く使用されている。

しかし、その一方で最近、シグナル分子を中心に良い ROS の存在が多くの研究によって明らかにされ、本稿の趣旨でもある ROS の二役、すなわち生理的作用 (Physiological role) と病態生理的 (Pathophysiological role) がレドックス・ホメオスタシスの視点から議論されている<sup>28, 31-32)</sup>。この良さあるいは悪しき ROS の区別は容易ではないが、低濃度で一過性の生成・作用は良く、反対に高濃度、持続的な生成・作用は悪い ROS と考えられている。つまり、濃度と時空間的要因が考慮されるべきである。

抗酸化物質は、この良き ROS も減弱・消去するために生理的機能が抑制され、かえって逆効果となるというパラドックスが生じる。たとえば、線虫のカロリー制限による寿命延長効果は、ビタミン C、E ( $\alpha$ -トロフェロール) の投与で減弱ないしは消失する<sup>21)</sup>。また、ヒトにおいても、適度の運動は上述のようにカロリー制限と同じ効果がある。ミトコンドリアの増加・活性化が起こり、一過性の ROS 生成によって、ROS 防御遺伝子の発現をきたし疾病リスクの軽減となる、いわゆるミトホルミシス効果である<sup>22, 26)</sup>。ところが、抗酸化物質の摂取によって運動によるホルミシス効果が抑制され、インスリン感受性の増大や酸化ストレス防御機能が減弱する。ここに、より詳細な興味深いヒトの筋肉トレーニング(ランニング)効果に対するビタミン C、E の影響を示す報告がある<sup>33)</sup>。11 週間にわたって一定のプログラムに従ったランニングを継続し、両ビタミン摂取群とプラセボ群について足の外側広角筋のミトコンドリアのチトクローム C オキシダーゼ・サブユニット IV (COX4) とサイトゾルの PGC-1 $\alpha$  の発現を比較すると、プラセボ群では両マーカーの発現が増加するが、ビタミン摂取群では変化が見られず、高用量の抗酸化ビタミンの使用は注意すべきとされている。つまり、筋肉トレーニングに対するミトコンドリアの適応能が抗酸化ビタミンで減弱する (図 6)。

### 7-3 抗酸化物質の作用標的化 (ターゲティング)

レドックス恒常性の乱れによる酸化ストレスがさまざまな疾患と深く関わっており、多種類の低分子抗酸化物質が治療・予防のために広く使われている。その一方

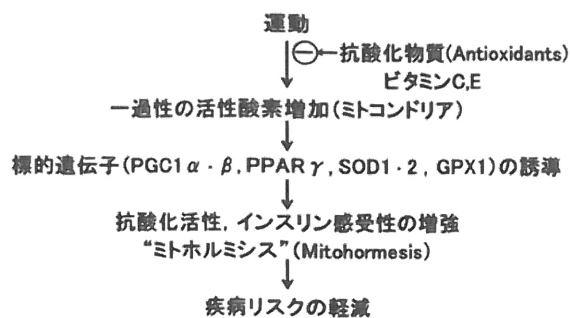


図6 運動によるミトホルミシス効果に対する抗酸化物質の影響

で、それらの有効性に関しては必ずしも満足すべき結果がみられないとの指摘も多い。その主な原因として複雑な ROS 生成・消去系システムがあり、実に多種多様な酵素や化合物が関与している上に、生体機能に必要な ROS を考慮すると抗酸化物質の選択は容易ではない。悪い ROS を消去し、良い ROS は保持するという困難な選択となる。そこで、抗酸化物質の作用標的化 (Targeting) が注目されている<sup>34-35)</sup>。たとえば、ミトコンドリアを標的とした MitoQ がある<sup>36)</sup>。これは抗酸化成分ユビキノール (Ubiquinol) に脂溶性カチオンを結合させたもので、MitoQ 投与ラットで虚血・再灌流による心臓障害が著しく抑えられることが示されている。その物質はミトコンドリア内で還元され抗酸化活性の強いユビキノールとなり脂質過酸化、ミトコンドリア障害を抑制する。

また、代表的な ROS 生成酵素の NADPH オキシダーゼ (Noxs) を標的とする阻害剤が注目されている<sup>34, 37)</sup>。長年にわたり、Nox2 と Duox2 の生理的機能が広く知られており、それら両酵素の異常により慢性肉芽腫症 (CGD) や甲状腺機能低下症が起こる。その他のアイソフォームの生理的あるいは病態生理的な意義は、疾患に伴う過剰発現あるいはノックアウトマウスの解析によって明らかにされつつあり、各アイソフォームを標的とした特異性の高い活性阻害剤を目指した研究開発が進められており、多くの候補化合物が実験動物で検討されている。例えば、Nox1 阻害剤は動脈硬化、高血圧、肝臓線維症など、Nox4 阻害剤は虚血性心疾患、骨粗鬆症、腎障害などに対する改善効果が報告されている。いずれにしても、各 Nox アイソフォームに特異的な低分子阻害物質の開発・臨床応用のためには、それぞれのアイソフォームと疾患との関連性について詳細な分子レベルの解明が必要である。このような直接的な ROS 消去・生成

阻害物質とは別に間接的なアプローチとして転写因子 Nrf2 を標的とした活性化物質の開発も有望視されている。すでにスルフォラファンなど様々な植物由来のものがサプリメントとしても使われているが、より有効性・特異性のより高い化合物が望まれる。

また一方では、作用標的化を考慮した細胞内活性酸素、なかでもシグナル分子として重要な  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  の検出、局在および経時的定量に関する高感度の分析法が必要であり、実際に化学発光プローブやレドックス感受性 GFP による測定が試みられている<sup>38-40)</sup>。

## 8. 今後の展望と課題

1970 年代より酸化ストレスは、活性酸素 (ROS) の過剰生成あるいは消去不足というレドックス恒常性の不均衡によって生じ、脂質やたんぱく質、核酸などの生体成分の障害をもたらす、生活習慣病はじめ諸種の疾患の要因として考えられてきた。したがって、生体内では酵素系 (SOD、カタラーゼなど) や非酵素系 (ビタミン C・E、グルタチオンなど) の ROS の軽減・消去システムが存在し、疾患の予防・改善にとって重要な役割を果たしている。さらには、この作用の補充・強化の目的でさまざまな抗酸化物質 (アンチオキシダント) が広く使用されている。つまり、悪しきオキシダント (ROS)・良きアンチオキシダントの概念が長年一般化され、しかも ROS の大部分は呼吸によるミトコンドリア由来であり、避けられない悪魔 (inevitable devil) などと揶揄されてきた。

ところが、その一方で ROS の中でもフリーラジカルでない  $H_2O_2$  に関して興味深い実験結果が得られ注目された。それは培養細胞を増殖因子で刺激すると低濃度の  $H_2O_2$  が生じ、また低濃度の  $H_2O_2$  処理によって細胞増殖がおこり、高濃度では増殖停止・細胞死が起こるという現象であった。つまり、低濃度の  $H_2O_2$  は増殖  $H_2O_2$  シグナル分子として作用するという重要な新知見が提示され、ホルミシス効果を反映するものである (図 7)。ミトコンドリアについてもミトホルミシス (Mitohormesis) と呼ばれているように、適度な運動やカロリー制限による低濃度の一過性の ROS 生成は、遺伝子発現を介して疾病リスクの軽減をもたらす。なお、この例の他にも ROS が新たなシグナル分子として位置付けられたことによって ROS の多様な生理的機能が明らかにされつつあり、本稿でもその数例を示したが、今後の更なる展開が期待

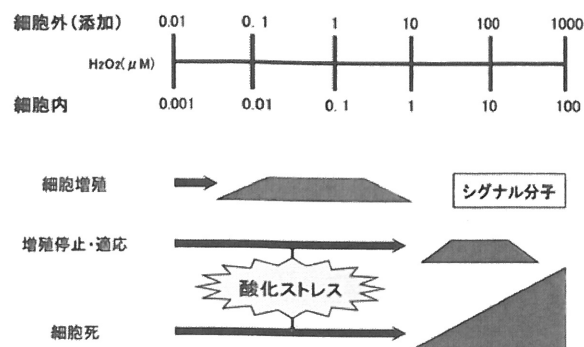


図 7 細胞応答の  $H_2O_2$  濃度依存性—ホルミシス作用

される。

このように、ROS に関する従来の古典的概念から二役作用 (生理的・病態生理的) という新たなパラダイムシフトを迎えた今日では、アンチオキシダントの適用性についても再考が求められている。すなわち、病態的 ROS を除き、生理的 ROS を残すという困難な課題であり、現時点では適確な手法は得られていないが、標的化 (ターゲッティング) を含めた研究開発は医学応用にとってもきわめて重要であり、それだけに期待も大きい。そのためにも、レドックス・シグナリングの生化学的および分子生物学的な基礎研究のさらなる進展が求められる。

## 参考文献

- [1] H. Sies, (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol*, 4, 180-183.
- [2] D. Lichtenberg, I. Pinchuk, (2015) Oxidative stress, the term and the concept, *Biochem Biophys Res Commun*, 461, 441-444.
- [3] T. Finkel, Oxygen radicals and signaling, (1998) *Curr Opin Cell Biol*, 10, 248-253.
- [4] O. Rom, A.Z. Reznichk, (2016) The stress reaction: a historical perspective, *Adv Exp Med Biol*, 905, 1-4.
- [5] K. Davis, (2016) Adaptive homeostasis, *Mol Aspects Med*, 49, 1-7.
- [6] Y.J. Surh, J.K. Kundu, H.K. Na, (2008) Nrf2 as a

master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals, *Planta Med*, 74, 1526-1539.

[7] J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem Sci*, 39, 199-218.

[8] H.K. Bryan, A. Olayanju, C.E. Goldring, B.K. Park, (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation, *Biochem Pharmacol*, 85, 705-717.

[9] L.A. Sena, N.S. Chandel, (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species, *Mol Cell*, 48, 158-167.

[10] T. Finkel, (2012) Signal transduction by mitochondrial oxidants, *J Biol Chem*, 287, 4434-4440.

[11] P. Chiarugi, (2009) Survival or death: the redox paradox, *Antioxid Redox Signal*, 11, 2651-2654.

[12] P.D. Ray, B.W. Huang, Y. Tsuji, (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell Signal*, 24, 981-990.

[13] H. Sies, (2014) Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress, *J Biol Chem*, 289, 8735-8741.

[14] H.J. Forman, M. Maiorino, F. Ursini, (2010) Signaling functions of reactive oxygen species, *Biochemistry*, 49, 835-842.

[15] D.I. Brown, K.K. Griendling, (2015) Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system, *Circ Res*, 116, 531-549.

[16] G.P. Bienert, A.L. Møller, K.A. Kristiansen, A. Schulz,

I.M. Møller, J.K. Schjoerring, T.P. Jahn, (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes, *J Biol Chem*, 282, 1183-1192.

[17] Y. Ito, S. Nakashima, Y. Nozawa, (1997) Hydrogen peroxide-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells: possible involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein tyrosine kinase, *J Neurochem*, 69, 729-736.

[18] Y. Ito, S. Nakashima, Y. Nozawa, (1998) Possible involvement of mitogen-activated protein kinase in phospholipase D activation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not by carbachol, in rat pheochromocytoma PC12 cells, *J Neurochem*, 71, 2278-2285.

[19] Y. Banno, K. Ohguchi, N. Matsumoto, M. Koda, M. Ueda, A. Hara, I. Dikic, Y. Nozawa, (2005) Implication of phospholipase D2 in oxidant-induced phosphoinositide 3-kinase signaling via Pyk2 activation in PC12 cells, *J Biol Chem*, 280, 16319-16324.

[20] A. Stangherlin, A.B. Reddy, (2013) Regulation of circadian clocks by redox homeostasis, *J Biol Chem*, 288, 26505-26511.

[21] T.J. Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, M. Ristow, (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress, *Cell Metab*, 6, 280-293.

[22] M. Ristow, K. Zarse, A. Oberbach, N. Klötting, M. Birringer, M. Kiehntopf, M. Stumvoll, C.R. Kahn, M. Blüher, (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 8665-8670.

[23] M. Ristow, S. Schmeisser, (2011) Extending life span by increasing oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 51, 327-336.

- [24] R. Scherz-Shouval, E. Shverts, E. Fasa, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar, (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4, *EMBO J*, 26, 1749-1760.
- [25] D. Harman, (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol*, 11, 298-300.
- [26] E.J. Masoro, (2007) The role of hormesis in life extension by dietary restriction, *Interdiscip Top Gerontol*, 35, 1-17.
- [27] Saunders LR, Verdin E., (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging, *Oncogene*, 26, 5489-5504.
- [28] H.H. Schmidt, R. Stocker, C. Vollbracht, G. Paulsen, D. Riley, A. Daiber, A. Cuadrado, (2015) Antioxidants in translational medicine, *Antioxid Redox Signal*, 23, 1130-1143.
- [29] S.M. Tortorella, S.G. Royce, P.V. Licciardi, T.C. Karagiannis, (2015) Dietary sulforaphane in cancer chemoprevention: The role of epigenetic regulation and HDAC inhibition, *Antioxid Redox Signal*, 22, 1382-1424.
- [30] L. Li, H. Dong, E. Song, X. Xu, L. Liu, Y. Song, (2014) Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling, *Chem Biol Interact*, 209, 56-67.
- [31] S.Y. Tang, B. Halliwell, (2010) Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?, *Biochem Biophys Res Commun*, 394, 1-5.
- [32] J.M. Gutteridge, B. Halliwell, (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths, *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 561-564.
- [33] G. Paulsen, K.T. Cumming, G. Holden, J. Hallén, B.R. Rønnestad, O. Sveen, A. Skaug, I. Paur, N.E. Bastani, H.N. Ulseth, I. Garthe, R. Blomhoff, H.B. Benestad, T. Raastad, (2014) Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial, *J Physiol*, 592, 1887-1901.
- [34] V.T. Dao, A.I. Casas, G.J. Maghzal, T. Seredenina, N. Kaludercic, N. Robledinos-Anton, F. Di Lisa, R. Stocker, P. Ghezzi, V. Jaquet, A. Cuadrado, H.H. Schmidt, (2015) pharmacology and clinical drug candidates in redox medicine, *Antioxid Redox Signal*, 23, 1113-1129.
- [35] J. Castro-Marrero, M.D. Cordero, M.J. Segundo, N. Fernández de Sevilla, J. Alegre, (2015) Does oral coenzyme Q10 plus NADH supplementation improve fatigue and biochemical parameters in chronic fatigue syndrome?, *Antioxid Redox Signal*, 22, 679-685.
- [36] V.J. Adlam, J.C. Harrison, C.M. Porteous, A.M. James, R.A. Smith, M.P. Murphy, I.A. Sammut, (2005) Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury, *FASEB J*, 19, 1088-1095.
- [37] S. Altenhöfer, K.A. Radermacher, P.W. Kleikers, K. Wingler, H.H. Schmidt, (2015) Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement, *Antioxid Redox Signal*, 23, 406-427.
- [38] W.M. Nauseef, (2014) Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases, *Biochim Biophys Acta*, 1840, 757-767.
- [39] B. Enyedi, M. Zana, Á. Donkó, M. Geiszt, (2013) Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins, *Antioxid Redox Signal*, 19, 523-534.
- [40] S. Dey, A. Sidor, B. O'Rourke, (2016) Compartment-specific control of reactive oxygen species scavenging by antioxidant pathway enzymes, *J.Biol.Chem.*, 291, 11185-11197.