

メタロチオネインを介した酸化ストレス応答

関 庚 善

The Physiological Significance of Metallothionein in Oxidative Stress

Kyong-Son MIN

Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, 3-11-1 Nishiki-ori-kita, Tondabayashi City 584-8540, Japan

(Received July 20, 2006)

Metallothionein (MT), a ubiquitous family of low-molecular weight metal-binding proteins, comprises 30% cysteine residues. Although all of the thiol residues in MT are bound to metals, it still remains active to reactive oxygen species. Each cysteine residue in MT is more effective at protecting DNA from hydroxyl radical attack than the glutathione cysteine *in vitro*. Prooxidative agents such as paraquat and carbon tetrachloride induce MT synthesis mediated by some responsive elements. MT demonstrates strong antioxidant properties, yet the physiological relevance of its antioxidant action is not clear. An injection of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), which produces reactive oxygen species, caused transcriptional induction of MT synthesis in the liver and kidney. Pretreatment of mice with Zn attenuated nephrotoxicity induced by Fe-NTA. After a Fe-NTA injection, a loss of Cd-binding properties of preinduced MT was observed only in kidneys of Zn-pretreated mice but not in liver. MT-enriched hepatocytes are resistant to Fe-NTA toxicity, oxidative DNA, and cell damage during conditions of glutathione depletion. In glutathione-depleted cells, but not in non-treated cells, Cd-binding properties of cellular MT decreased with increasing concentration of Fe-NTA. Moreover, Cd released from MT after an injection of Fe-NTA induced new MT protein again. Thus MT may act as a secondary antioxidant in cellular protection system against oxidative stress.

Key words—metallothionein; oxidative stress; radical scavenger

1. はじめに

われわれ好気性生物は酸素の代謝産物である活性酸素あるいは酸素ラジカル種 (ROS) に常にさらされ、生体は細胞内酸化還元状態を一定に維持するため、酸化-抗酸化のバランスを調節している。多くの生命現象を支配する酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、生体が酸化傾向に傾く現象を酸化ストレスと言い、種々の疾患の原因あるいは誘因になる。酸化ストレス時には、反応性の高い ROS が核酸、タンパク質あるいは脂質などのあらゆる種類の生体成分に対して酸化的損傷を与えるため、予防、阻止及び修復とあらゆる段階で、生体防御システムが存在している。このような防御システムにはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、

グルタチオンパーオキシダーゼ (GPx) やその他ヘムタンパク質パーオキシダーゼなどの酵素群やビタミン C や E、カロチノイド、尿酸、ビリルビンやアルブミンなどの非酵素的抗酸化剤によるもの等が知られている。また、生体内に豊富に存在するグルタチオン (GSH) やチオレドキシン、ペプチドやタンパク質のチオール基のようなバイオチオールもレドックス制御に大きく関与するだけでなく、シグナル伝達機構としても重要であると考えられる。

メタロチオネイン (MT) はその構成アミノ酸の 1/3 がシステインからなる金属結合低タンパク質であり、すべてのシステイン残基は金属に対して配位する金属-硫黄結合をなし、MT は金属クラスター構造を形成して、 α -domain と β -domain を持つ強固な構造をしている。¹⁾メタロチオネインのシステイン残基は金属と結合していても、ヒドロキシラジカルに対する反応性は GSH の約 300 倍も高いことが報告され、MT がラジカル特にヒドロキシラジカルのスカベンジャーになり得ることが示唆された

大阪大谷大学薬学部 (〒584-8540 富田林市錦織北 3-11-1)

e-mail: minkyon@osaka-ohtani.ac.jp

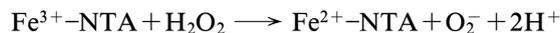
本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

が、生体内で抗酸化作用を示すかについては明確にされていない。²⁾ 一方、種々の化学的あるいは物理的な要因による酸化ストレス状態で MT が誘導されることから、MT が酸化ストレスタンパク質として機能している可能性が考えられている。³⁾ そこで、本総説では MT の酸化ストレス応答タンパク質や生体内抗酸化剤としての役割について、生体内でヒドロキシラジカルを産生し、酸化ストレスを引き起こす鉄ニトリロトリアセテート (Fe-NTA) を用いた筆者の研究を中心に概説する。

2. 酸化ストレスによる MT 誘導とそのメカニズム

酸化ストレスによって MT が転写レベルで誘導されることが報告されているが、ラジカル産生物質であるメナジオンや四塩化炭素を投与した場合は、肝臓の過酸化脂質濃度と MT 誘導量には相関がみられず、これらのラジカル生成物質投与時では ROS による直接的な MT 誘導だけでなく、炎症メディエーターによる間接的な誘導も起こっていると考えられる。^{4,5)}

そこで、過酸化水素からのヒドロキシラジカル産生を触媒し、生体内に取り込まれると肝臓や腎臓で酸化ストレスを引き起こし、腎障害や腎癌を発症する Fe-NTA を用いて、ヒドロキシラジカル産生による MT 誘導について検討した。



無機鉄及び Fe-NTA を投与すると、肝臓及び腎臓の MT 濃度、さらには MTmRNA レベルも顕著に増加した (Fig. 1).⁶⁾ また、無機鉄と Fe-NTA は同じ鉄用量であるにも係わらず、無機鉄に比べ、ラジカル産生量の多い Fe-NTA 投与で肝臓及び腎臓 MT 濃度が数倍高い値を示した。ところで、鉄イオンはヒドロキシラジカルの産生を同様に触媒する銅イオンとは異なり、MT を直接誘導せず、生体条件では通常 MT と結合しない。したがって、このような鉄化合物による MT 誘導には生体内で生じたラジカル、特にヒドロキシラジカルが関与していると考えられる。さらに、無機鉄及び Fe-NTA を皮

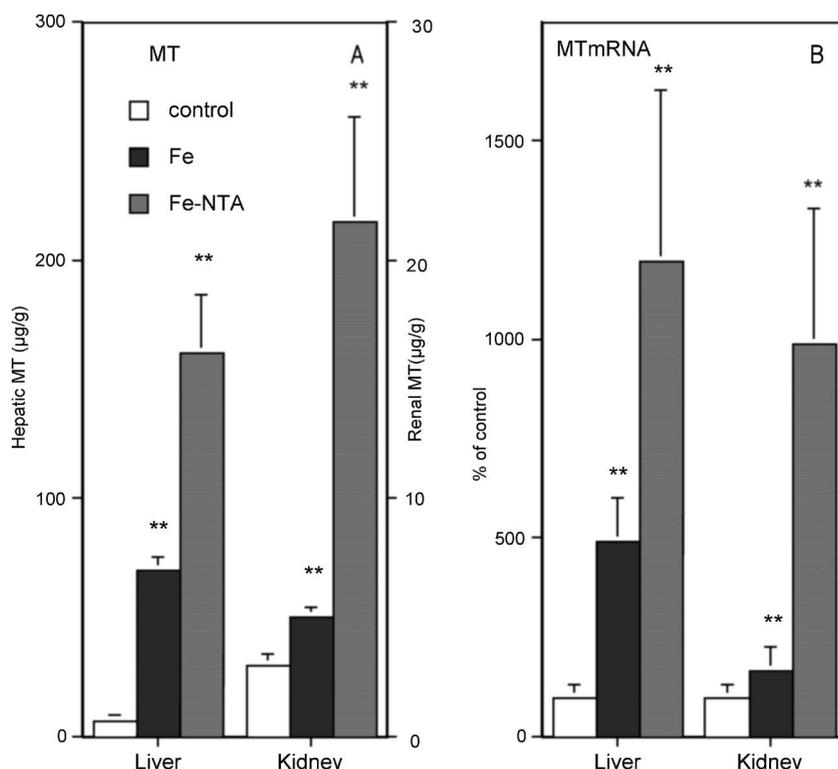


Fig. 1. Induction of Hepatic and Renal MT Synthesis after an Injection of FeCl₃ and Fe-NTA

A: Hepatic and renal MT concentrations after an injection of Fe compounds. Mice received s.c. a single dose of Fe compounds (7.5 mg Fe/kg) as FeCl₃ or Fe-NTA. After 24 h, the liver and kidneys were obtained and hepatic and renal MT concentrations were determined by the modified Cd-hem method. B: Hepatic and renal MT mRNA levels 4 h after injection of Fe compounds at a dose of 7.5 mg Fe/kg. Total RNA was extracted and analyzed by Northern blot hybridization using [α -³²P] dCTP-labeled probes of mouse MT-I and 18 S rRNA. Data points represent mean + S.D. of 4–10 mice. ***p* < 0.01: significantly different from control mice.

下投与すると皮下での炎症反応により、投与後すぐに血漿 IL-6 濃度の顕著な増加がみられ、特に Fe-NTA 投与時では無機鉄の約 30 倍の値を示した。IL-6 によって MT が誘導される肝臓では、血漿 IL-6 濃度の上昇後に肝臓で MT 濃度及び過酸化脂質濃度の有意な増加がみられた。一方、IL-6 で MT が誘導されない腎臓では過酸化脂質濃度が有意に増加したのちに、MT 濃度が顕著に増加した。また、Fe-NTA だけでなく、ラジカル性の腎障害を引き起こすことの知られている臭素酸カリウムを投与した場合でも肝臓だけでなく腎臓の MT 濃度も投与量に応じて増加した。したがって、Fe-NTA 投与による酸化ストレス時には、IL-6 を介した間接的な MT 誘導とともに、腎臓でみられるようなラジカルによる直接誘導も起こっていると考えられる。

ところで、MT のプロモーター部分には metal responsive element (MRE), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate responsive element (TRE) を含む antioxidant responsive element (ARE), Glucocorticoid responsive element (GRE), IL-6 responsive element type II (IL-6RE type II) が存在する。Fe-NTA 投与による酸化ストレス時には炎症時の場合と同様に IL-6 による IL-6RE type II に対する刺激により MT が発現し、グルココルチコイドとそのレセプターが補助的な機能を果たすと考えられる。⁷⁾ 一方、Dalton et al. は Hepa 細胞において MT が過酸化水素によって直接誘導され、それには ARE や MRE が関与することを明らかにした。⁸⁾ しかし、ARE を介して酸化ストレス防御遺伝子である quinone reductase などを誘導する抗酸化剤、*tert*-butylhydroquinone (BHQ) は MT を転写レベルで誘導するが、MT プロモーターの ARE 部分欠除では MT の転写活性は消失せず、むしろ MRE 部分欠除の方が転写活性の低下が認められた。⁹⁾ さらに BHQ 処理によって MRE に対する転写因子 metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) の結合が活性化された。最近、Keap1 が酸化ストレスを感知するセンサーとして見出され、酸化ストレス時には Keap1 の 2 つのシステイン残基がジスルフィド形成等の酸化を受けることによって、Keap1 に結合していた転写因子 Nrf2 が核に移行し、ARE を介して酸化ストレス防御遺伝子の発現を活性化すること

が明らかにされた。¹⁰⁾ しかし、Bi et al. は ARE に結合する転写因子 Nrf2 あるいは MRE に結合する MTF-1 のノックアウト細胞を用いて検討したところ、BHQ による MT 誘導は Nrf2 ノックアウト細胞で変化がなかったのに対して MTF-1 ノックアウト細胞では消失した。¹¹⁾ このことから、BHQ による MT 誘導には Nrf2 を介した ARE ではなく、MTF-1 を介した MRE が関与することが示唆された。さらに酸化ストレス時では MT を含めた生体タンパク質に結合している亜鉛の遊離に伴って MTF-1 が活性化され、逆に metal-free の MT は MTF-1 の活性化を抑制したことから、酸化ストレス時での MT 誘導には亜鉛を介した MTF-1 の活性調節が行われていると考えられる。¹²⁾ このように、MT は直接的あるいは間接的に酸化ストレスにตอบสนองして誘導されることが明らかとなり、酸化ストレス応答タンパク質の 1 つと考えられ、他の抗酸化遺伝子や生体抗酸化剤との関連について今後解明されていくであろう。

3. 酸化ストレス防御因子としての MT の作用

3-1. 酸化ストレスによる DNA 損傷に対する防御作用 ROS のうち、ヒドロキシラジカルは DNA との反応性が高く、DNA 鎖の切断や 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の形成などの塩基損傷といった酸化的 DNA 損傷を起こすことが知られている。MT はヒドロキシラジカルとの反応性が高いことから、これらの酸化的 DNA 損傷を防御する可能性がある。Cai et al. は銅イオンを触媒とする過酸化水素からのヒドロキシラジカル産生系での DNA 鎖切断を MT が防御することを報告しているが、この場合は MT によるラジカル消去作用ではなく、銅イオンを MT が保持することによってラジカル産生を抑制していると考えられる。¹³⁾ われわれは MT に結合しない鉄イオンを用い、かつヒドロキシラジカルの産生速度の速い Fe-NTA/H₂O₂ 系及びヒドロキシラジカルのホットスポットが多く存在する ras DNA を用いて酸化的 DNA 損傷に対する MT の防御作用を検討した。Fe-NTA/H₂O₂ 系で生成したヒドロキシラジカルはその濃度に伴って ras DNA 鎖断片の切断活性が顕著に上昇したが、反応系に MT を添加すると Fe-NTA による DNA 鎖切断活性が有意に抑制された (Fig. 2)。¹⁴⁾ このような抑制作用は MT I 及び II によって

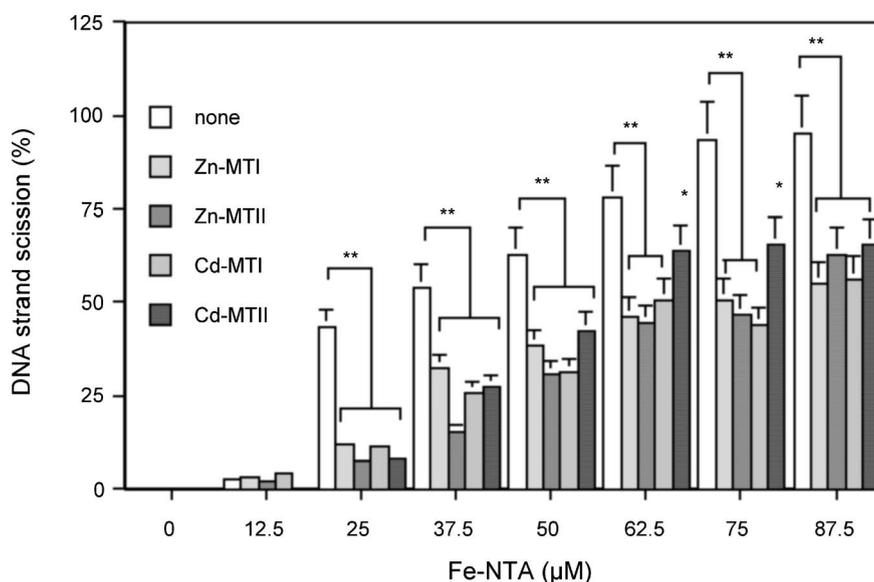


Fig. 2. Protective Effect of Zn-MTs and Cd-MTs on DNA Strand Scission by Fe^{3+} -NTA/ H_2O_2

25 μM of MTs were incubated with [^{32}P]-labeled DNA fragments in the presence of Fe^{3+} -NTA/ H_2O_2 at varying concentrations and then the remaining fragments were separated by 8% polyacrylamide 8 M urea gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.5). After gels were dried, the remaining fragments were quantified by densitometric scanning of autoradiographs. The percentage of DNA strand scission was calculated from the loss in density. Each point represents the mean and S.D. of three experiments. *Significantly different from the none group at $p < 0.05$. **Significantly different from the none group at $p < 0.01$.

も、また亜鉛やカドミウムが結合している場合でも同様に認められた。このような MT 添加による Fe-NTA の DNA 切断活性の抑制は EDTA 処理によって結合金属を除いても同様にみられたが、さらに NEM でチオール基をアルキル化すると消失し、MT のチオール基がヒドロキシラジカルの消去に関与していると考えられる。また、Fe-NTA の濃度に従って DNA 鎖の切断だけでなく、酸化ストレスのバイオマーカーである 8-OHdG の生成が増加したが、MT を添加すると有意に抑制され、同じバイオチオールである GSH ではそのような作用は認められなかった。¹⁵⁾ 初代肝細胞を用いた系でも Fe-NTA によって 8-OHdG 生成が有意に増加したが、MT を高濃度蓄積した細胞では 8-OHdG 生成が抑制され、細胞レベルでも MT による防御作用がみられた。¹⁶⁾ さらに、MT は Fe-NTA の添加濃度に伴って、MT の結合金属とチオール基の減少が認められ、MT のチオール基がジスルフィドを形成することによってヒドロキシラジカルを消去することが示唆された。MT は細胞質だけでなく核内にも存在することから、核内でもヒドロキシラジカルのスカベンジャーになり得ると考えられる。

3-2. 酸化ストレスによる毒性に対する MT の防御作用 亜鉛やカドミウムの前処理や MT 遺伝

子の導入などにより MT が過剰発現している細胞やマウスでは種々の酸化ストレスによる毒性を防御することが報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ しかし、その一方では MT ノックアウト細胞やマウスを用いた場合では MT の防御作用については意見が分かれています。他の抗酸化系特に GSH などのバイオチオールとの関係については明確にされていない。^{20,21)} そこで、MT 蓄積量の異なる初代肝細胞系を用いて、GSH 低下時における酸化ストレス毒性に対する MT の防御作用について検討した。Figure 3 が示すように MT 濃度の高い肝細胞では Fe-NTA による細胞生存率の低下が抑制され、さらに細胞からの LDH の逸脱がそれぞれ有意に抑制された。¹⁶⁾ このような MT 蓄積細胞における Fe-NTA 細胞毒性に対する防御作用はカドミウムでも、亜鉛 MT 蓄積細胞でも認められた。一方、MT 蓄積細胞では Fe-NTA 濃度に従って細胞内 GSH 濃度が減少したが、細胞内 MT 濃度は全く影響を受けず、通常は GSH がヒドロキシラジカルの消去に関与すると考えられる。しかし、GSH 合成阻害剤である DL-buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO) で前処理し、MT 蓄積細胞の GSH 濃度を 1/20 にまで減少させた MT 蓄積細胞では Fe-NTA によって細胞 MT の金属結合濃度が有意に減少し、MT のチオール基の

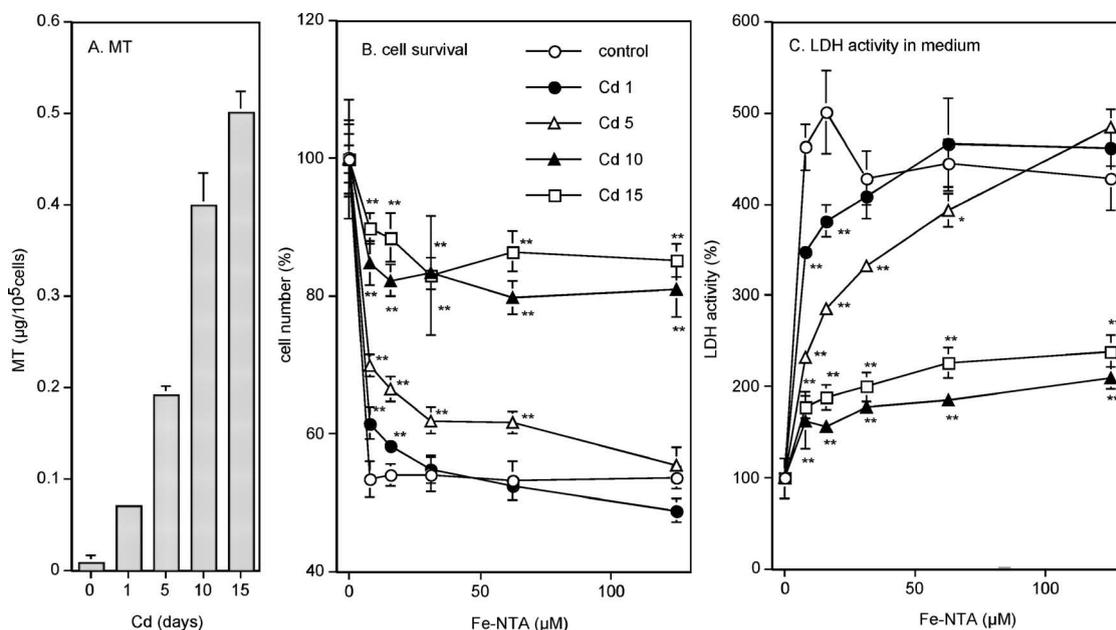


Fig. 3. Cytotoxicity of Fe-NTA during Depletion of GSH in Primary Hepatocytes from Control and Cd-treated Rats

A: The concentration of MT in cultured cells prepared from control and Cd-treated rats (1 mg/kg/day, 1–15 days). Cell survival (B) and LDH activity in medium 6 h after the treatment with Fe-NTA (0–125 μM) and BSO (500 μM). Data points represent mean \pm S.D. ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significantly different from control cells.

酸化が起こっていた。したがって、GSH 低下時には Fe-NTA による酸化ストレスを MT が消去することによって防御作用を示すと考えられ、細胞レベルで MT は GSH の補足的な抗酸化剤として作用していることが示唆された。

また、Fe-NTA は細胞毒性だけでなく、酸化ストレスによる腎毒性を発症する。しかし、亜鉛やビスマスの前投与によって腎臓 MT 濃度を増加させておくと、Fe-NTA によって上昇した血漿尿素窒素濃度が有意に抑制され、腎臓 MT の金属結合濃度が有意に減少した (Fig. 4).⁶⁾ このように Fe-NTA によって MT の結合金属濃度が減少したが、抗体で測定した MT 濃度にはほとんど変化がなく、さらに還元剤処理すると MT の結合金属濃度が再び回復した。したがって、Fe-NTA 投与によって腎臓で生成したヒドロキシラジカルは MT のチオール基の酸化によって消去され、腎毒性を防御すると考えられる。MT のジスルフィド形成については、Zangger et al. は *in vitro* で酸化させた MT ダイマーでは α -domain でジスルフィドを形成することを報告している。^{22,23)} さらに最近 Feng et al. は酸化ストレス状態にすると、心臓に過剰発現させた MT がジスルフィドを形成すること、その場合 α -domain だけでなく、 β -domain でもジスルフィドを

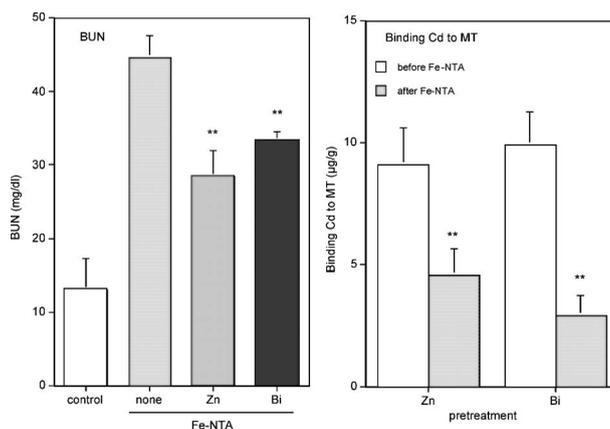


Fig. 4. Effect of Pretreatment with Zn and Bi on Nephrotoxicity Induced by Fe-NTA

ZnSO₄ (20 mg Zn/kg/day), Bi(NO₃)₃ (50 $\mu\text{mole/kg/day}$), saline were treated *s.c.* for 2 days. Fe-NTA was injected to these pretreated mice at a dose of 7.5 mg/kg. At 4 h after the Fe-NTA injection, blood was obtained and the concentration of blood urea nitrogen (BUN) was determined. Binding Cd to renal MT was determined by Cd-hem binding assay. Data points represent mean \pm S.D. of 4–6 mice. * $p<0.05$, ** $p<0.01$: significantly different from Fe-NTA 0 mg/kg mice in each pretreatment group.

形成することを明らかにし、われわれと同様に酸化ストレス時に生体内で MT がジスルフィドを形成することを証明している。²⁴⁾

さらに Fe-NTA 投与による MT の酸化は BSO 前投与により増強され、反対に GSH 投与により軽減されたことから、Fe-NTA 投与後の腎臓において

も MT は GSH の補足的な抗酸化剤として作用することが示唆された。

4. 生体内抗酸化系としての MT

Fe-NTA 投与時には GSH の補足的な抗酸化剤として MT が作用していることを明らかにしてきたが、MT が生体内抗酸化系として機能しているかどうかははまだ明確にされていない。われわれは MT 蓄積マウスに Fe-NTA を投与すると、投与後短時間から腎臓 MT 濃度の低下がみられ、その後経時的に回復することを見出した。その腎臓細胞質を還元剤処理すると、Fe-NTA 投与後短時間では MT 濃度の回復がみられたものの、8—16 時間後では MT 濃度は低下したままであった。つまり、Fe-NTA 投与により、前もって腎臓に蓄積していた MT が酸化され、その後酸化された MT は腎臓内で分解を受けること、さらに、その後再び腎臓 MT 濃度が増加したことから MT が再誘導されることが示唆された。実際、³⁵S でラベルしたシステインを用いたパルス実験で、Fe-NTA 投与により蓄積していた MT の分解が促進され、反対に MT の生合成が促進することを確認している(投稿準備中)。さらに、*in vitro* 実験で EDTA によって結合金属を除いた MT は lysosomal protease による分解が早まることを既に報告していて、酸化ストレス時に MT から結合金属が遊離することから、結合金属が遊離した、つまり酸化された MT は早期に分解されると考えられる。²⁵⁾ さらに、酸化ストレス時に MT から遊離した金属は MT を誘導し、再び MT を合成している可能性が示唆された。

以上の結果をまとめると MT は Fig. 5 のようなサイクルで GSH の補足的な抗酸化系として作用していると考えられる。まず、細胞内で生成した過酸化水素は Fe-NTA によってヒドロキシラジカルを生成し、細胞毒性や DNA 損傷を引き起こす。通常は GSH がその消去系として作用するが、多量のヒドロキシラジカルの生成や GSH 濃度の低下時では、細胞質あるいは核内で MT がジスルフィド結合を形成することによってヒドロキシラジカルを消去する。MT は分子内あるいは分子間でジスルフィド結合を形成するのに伴って、MT の結合金属が遊離し、さらに遊離した亜鉛などの金属は MTF-1-MRE を介して MT を誘導し、再合成された MT は再びヒドロキシラジカルの消去系として作用すると

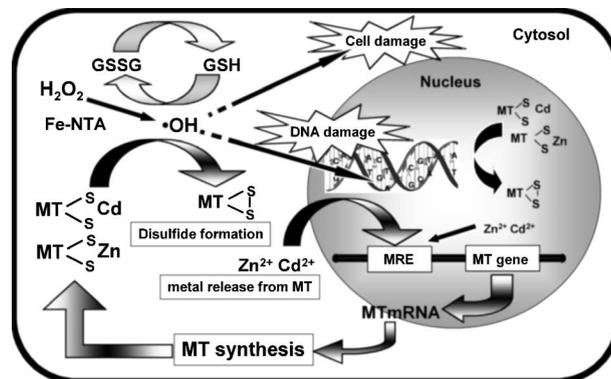


Fig. 5. MT Regenerating System by Release of Metals from MT under Oxidative Stress Induced by Fe-NTA

考えられる。

5. 今後の展望と薬物治療への応用

生体は酸化-抗酸化のバランスを保っているが、酸化が進み酸化ストレスが引き起こされると、それに応答して酸化ストレス防御遺伝子が誘導される。MT も酸化ストレスに応答して誘導され、本総説で述べたように直接抗酸化作用を示すだけでなく、NF- κ B や MTF-1 等のレドックス感受性転写因子を介したシグナル伝達によっても細胞の恒常性を維持していると考えられる。^{26—28)} また、酸化ストレス応答では Keap1-Nrf2 システムが新たに見い出され、細胞質に存在する MT の係わりについてもこれから解明されることで、生体抗酸化システムでの MT の位置付けが行われていくであろう。ここでは MT-I 及び II を中心に述べてきたが、脳に局在する MT-III についても抗酸化作用が認められ、神経系での役割も解明されつつある。^{29—31)} さらに、MT の生理的な作用としてではなく、強いヒドロキシラジカルの消去剤であることから、癌の放射線治療時における癌細胞以外の細胞や遺伝子障害の防御や、prooxidant となる制癌剤や種々の薬物の毒性や副作用の軽減などの臨床応用が考えられる。既に、MT を高発現させた動物や細胞の実験では放射線照射による酸化的 DNA 損傷の軽減、アントラキノン系制癌剤であるアドリアマイシンによる致死毒性や心臓での脂質過酸化、血清クレアチンホスホキナーゼ活性の上昇、心筋収縮力の低下などの抑制、心臓の虚血・再灌流による心筋梗塞部位サイズの縮小など、生体内での MT の抗酸化作用が報告され、今後の展開が期待されている。^{32—34)}

謝辞 本研究は神戸学院大学栄養学部で行ったものであり、研究の遂行に当たりご協力頂きました、小野坂敏見教授を始め、鉄地川原さん及び公衆衛生研究室所属学生たちに心より感謝いたします。また、本総説をまとめるに当たり、ご助言を頂きました大阪大谷大学薬学部田中慶一教授に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Kagi JHR., "Metallothionein. III" eds. by Suzuki K. T., Imura N., Kimura M., Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, 1993, pp. 29-55.
- 2) Thornalley P. J., Vasak M., *Biochim. Biophys. Acta*, **827**, 36-44 (1985).
- 3) Sato M., Bremner I., *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 325-337 (1993).
- 4) Min K. S., Terano Y., Onosaka S., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 152-162 (1991).
- 5) Min K. S., Terano Y., Onosaka S., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 74-79 (1992).
- 6) Min K. S., Morishita F., Tetsuchikawahara N., Onosaka S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**, 9-17 (2005).
- 7) Kasutani K., Ito N., Kanekiyo M., Muto N., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **151**, 143-151 (1998).
- 8) Dalton T., Palmiter R. D., Andrews G. K., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5016-5023 (1994).
- 9) Dalto T. P., Li Q., Bittel D., Liang L., Andrews G. K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 26233-26241 (1996).
- 10) Kang M. I., Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S. G., Yamamoto M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 2046-2051 (2004).
- 11) Bi Y., Palmiter R. D., Wood K. M., Ma Q., *Biochem. J.*, **380**, 695-703 (2004).
- 12) Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W., *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8471-8485 (2003).
- 13) Cai L., Koropatnick J., Cherian M. G., *Chem. Biol. Interact.*, **96**, 143-155 (1995).
- 14) Min K. S., Nishida K., Onosaka S., *Chem. Biol. Interact.*, **122**, 137-152 (1999).
- 15) Min K. S., Horie T., Tetsuchikawahara N., Onosaka S., *J. Health Sci.*, **51**, 497-503 (2005).
- 16) Min K. S., Tanaka N., Horie T., Kawano H., Tetsuchikawahara N., Onosaka S., *Toxicol. Lett.*, **158**, 108-115 (2005).
- 17) Pitt B. R., Schwarz M., Woo E. S., Yee E., Wasserloos K., Tran S., Weng W., Mannix R. J., Watkins S. A., Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Kagan V. E., Lazo J. S., *Am. J. Physiol.*, **273**, L856-865 (1997).
- 18) Hurnanen D., Chan H. M., Kubow S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1520-1528 (1997).
- 19) Reinecke F., Levanets O., Olivier Y., Louw R., Semete B., Grobler A., Hidalgo J., Smeitink J., Olckers A., Van der Westhuizen F. H., *Biochem. J.*, **395**, 405-415 (2006).
- 20) Lazo J. S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A. E., Choo K. H., Pitt B. R., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5506-5510 (1995).
- 21) Zheng H., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D., *Toxicol. Lett.*, **87**, 139-145 (1996).
- 22) Zangger K., Shen G., Oz G., Otvos J. D., Armitage I. M., *Biochem. J.*, **359**, 353-360 (2001).
- 23) Zangger K., Armitage I. M., *J. Inorg. Biochem.*, **88**, 135-143 (2002).
- 24) Feng W., Benz F. W., Cai J., Pierce W. M., Kang Y. J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 681-687 (2006).
- 25) Min K. S., Nakatsubo T., Fujita Y., Onosaka S., Tanaka K., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 299-305 (1992).
- 26) Zhou Z., Wang L., Song Z., Saari J. T., McClain C. J., Kang Y. J., *Am. J. Pathol.*, **164**, 1547-1556 (2004).
- 27) Giedroc D. P., Chen X., Apuy J. L., *Antioxid. Redox Signal*, **3**, 577-596 (2001).
- 28) Lichtlen P., Schaffner W., *Swiss Med. Wkly.*, **131**, 647-652 (2001).
- 29) Uchida Y., Gomi F., Masumizu T., Miura Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 32353-32359 (2002).
- 30) Ebadi M., Sharma S. K., Ghafourifar P., Brown-Borg H., El Refaey H., *Methods Enzymol.*, **396**, 276-298 (2005).
- 31) Hozumi I., Uchida Y., Watabe K., Sakamoto T., Inuzuka T., *Neurosci. Lett.*, **395**, 220-223 (2006).
- 32) Jeong H. G., Youn C. K., Cho H. J., Kim S.

- H., Kim M. H., Kim H. B., Chang I. Y., Lee Y. S., Chung M. H., You H. J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 34138–34149 (2004).
- 33) Kang Y. J., Chen Y., Yu A., Voss-McCowan M., Epstein P. N., *J. Clin. Invest.*, **100**, 1501–1506 (1997).
- 34) Kang Y. J., Li G., Saari J. T., *Am. J. Physiol.*, **276**, H993–997 (1999).