

# Chromosomal DNA fragmentation-mediated cell death induced by various stresses

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/17253">http://hdl.handle.net/2297/17253</a>

【総説】

外的ストレスによる染色体DNA断片化と細胞死

Chromosomal DNA fragmentation-mediated cell death induced by various stresses

金沢大学大学院医学系研究科  
分子情報薬理学

樋口 善博

はじめに

動物細胞の染色体DNAは、放射線、紫外線、活性酸素、DNAに結合する薬物、さらにはtopoisomerase酵素阻害活性をもつ制癌剤などの物理的または化学的な外部ストレスによって種々の様式で損傷を受け、それが引き金となって細胞死に至る。動物細胞において種々の条件下でDNA損傷を受け細胞死に至るまでの過程では、細胞内でネクロシスまたはアポトーシスによる多くのいろいろな現象変化を伴うが、とくに染色体DNAでは巨大 (Giant) DNA断片、高分子量 (high molecular weight, HMW) のDNA断片またアポトーシスではラダー (ladder-like)、ネクロシスではスメア (smear) の低分子量 (low molecular weight, LMW) のDNA断片化が起こり、それらのDNA断片はアガロース電気泳動上で確認できる。これらの染色体DNA断片化の機序を考える上で、現在アポトーシスに認められるラダーDNA断片化、所謂internucleosomal DNA断片化に関与すると考えられるendonucleasesについて言及する必要があるが、これまで数多く報告されており (Table 1)<sup>1)</sup>、最近ではcaspase activated DNase (CAD) やDNA fragmentation factor (DFF-40) と称するDNA分解酵素がクローニングされかなり正確にその実態が捕えられている (Table 1)。これらに付随してそれらのDNA断片群より大きな、1Mb以上の巨大DNA断片や50-300kbの高分子量のDNA断片化についてアポトーシス細胞での細胞死でここ15年位の間に観察されるようになって来た<sup>2)</sup>。染色体DNAの断片化を考える上で、chromatin構造やそのコンフォメーションとの関連性についてはまだよく分かっていない点が多いが、本総説では染色体DNA損傷についてこれまでに報告されている事

例を整理しながら紹介しつつ、結果的にアポトーシスまたはネクロシスによる細胞死でその染色体DNAがどのようにDNA損傷、とくにDNA断片化を受けて細胞死に至るのかを、これまでの筆者らの研究報告を加味しながら考察してみたい。

真核細胞の染色体構造

原核細胞のDNAはほとんど裸状であるのに対し、真核細胞のDNAは核内で複合体を形成しchromosome (染色体) と呼ばれる形態をとっている。動物細胞の核内には全体で約50億個のヌクレオチドからなる約50cmのDNAが50,000倍の密度までchromatinの形態を保ちながら縮在しており、DNAはhistoneとnon-histoneタンパク質と結合し、リンカーと繰り返し構造をもちながらnucleosome構造を作っている。21番目の一番小さいchromosomeのものでも~50Mb DNAをもつ。chromosome (chromatin) の三次元的構造についての詳細はPientaらの総説<sup>3)</sup>を参照されたい。ここでは簡単に述べる (Figure 1)。

Interphase DNAはDNAの特異的なサイトで核マトリックスシステムとの相互作用を伴う。DNA loop domain構造はCookらによって1976年に最初に提唱され<sup>4)</sup>、そのloop構造は真核細胞のDNAをsuperhelical organization (超らせん構造状態化) にすることに参与している。DNA loop領域はその塩基部分で核マトリックスと接しており、その接触物によってloopsはトポロ

Table I. Nucleases and nuclease-like factors involved in chromosomal DNA fragmentation (文献1より改変)

Mediator (Nucleases)	Type of DNA fragmentation	3' and 5' termini
Topoisomerase II <sub>a</sub>	HMW	3'OH and 5'P
AIF (apoptosis inducing factor)	HMW	Undetermined
DFF-40	HMW and LMW	3'OH and 5'P
CAD (caspase activated DNase)	HMW and LMW	3'OH and 5'P
DNASIL3	HMW and LMW	3'OH and 5'P
P25	HMW and LMW	3'OH and 5'P
97 kDa endonuclease	HMW and LMW	Undetermined
DNase I	LMW	3'OH and 5'P
DNase $\gamma$	LMW	3'OH and 5'P
Endonuclease G	LMW	3'OH and 5'P
NUC18	LMW	3'OH and 5'P
DNase II	LMW	3'P and 5'OH
L-DNase II	LMW	3'P and 5'OH
Cathepsin B	LMW	Undetermined
Acinus	Chromatin condensation	Undetermined

HMW and LMW indicate high molecular weight DNA fragments and low molecular weight DNA fragments, respectively.

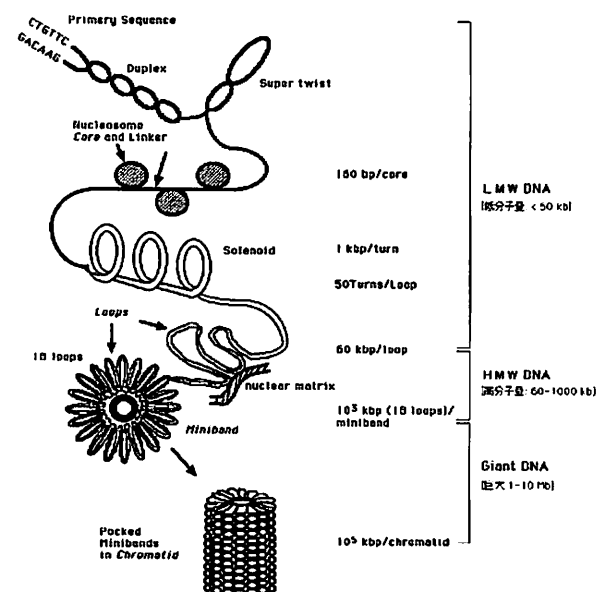


Figure 1. The structure model of chromosome (文献21より転載)

ジカルに束縛されている。核マトリックスは DNA loopsの複製のため固定された部位を持っており、loopsは10kbpと180kbpの間にあり平均すると $63 \pm 14$ kbpである。一つのchromosomeは約80個のminibandsを持ち、一個のminibandは18個のloopsを持つ。Chromatideの中心軸の廻りは約1MbのDNA (18 x 60kb) のminibandsを形成する。Chromosomeの末端にあるtelomere領域は周囲(外面)のlaminaにattachしている。FilipskらはDNA loopsはradical loopモデルと高次DNA構造が用いた時のみpackされることが出来ることを提唱しているが<sup>5)</sup>、DNA loopsはどのように核マトリックスと会合しているかはまだよくわかっていない。

#### 染色体DNA損傷を引き起こす外的要因

このような三次元的な緻密で複雑な構造をもつ染色体DNAに対し、損傷を引き起こす原因の外的なもの、X線、 $\gamma$ 線などの電離放射線照射、紫外線(UV)照射、etoposideのようなtopoisomerase酵素阻害剤、DNAアルキル化剤、活性酸素発生剤、mitomycinやbleomycinなどの抗生物質性の制癌剤など数多く知られている。中でも電離放射線照射、bleomycin、活性酸素発生剤は、直接もしくはDNAに結合後に細胞内活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)または酸素フリーラジカルを発生しDNA損傷を引き起こすと考えられている。また一方で、種々のDNA塩基部分の化学修飾を引き起こすアルキル化剤がある。

#### DNA損傷の形態

DNA損傷の形は大きく分けて二つ考えられる。一つはDNAの切断で、(1) single strand breaks (SSB, 一重鎖切断)、(2) double strand breaks (DSB, 二重鎖切断)、(3) DNA分解酵素を介した切断がある。もう一つは、DNAの修飾で、(1) DNA中のcross link、(2) O-メチル化などのDNA塩基の修飾、(3) DNA中のguanine塩基などの酸化的反応による水酸化などがある。DNAの塩基や糖

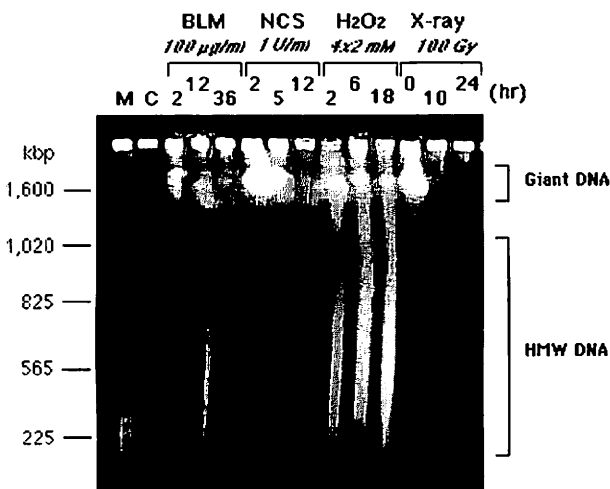


Figure 2. Giant DNA fragmentation in T24 human bladder carcinoma cells. (文献1より改変)

T-24 human bladder cells were treated with BLM (bleomycin), NCS (neocarzinostatin),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide) and X-ray. For  $H_2O_2$ , cells were treated four times every 30 min with 2mM  $H_2O_2$ . For X-ray, cells were irradiated with X-ray and direct after (at zero time) irradiation cells were prepared for PFGE. M and C indicate DNA size marker (*S. cerevisiae*) and non-treated cells, respectively.

部分の化学修飾については別の総説を参照していただきたい。そこで本誌ではDNAの切断についてのみ言及したい (Figure 3)。

1) SSBによるDNA損傷：電離放射線照射によって誘起されるDNA損傷(鎖分解)により、生物活性を有するssDNAが致死的なダメージを被る。酸素存在下でのOHラジカルによるDNA鎖の破壊は核酸塩基の損失を伴い、かつ塩基の酸化的修飾(8-oxo-deoxyguanosine形成)をも伴う。

2) DSBによるDNA断片の蓄積：DNA断片は通常アガロース電気泳動で分離が可能でかつ大まかなDNAサイズを測ることができたが、染色体レベルの大きさのDNAを分離することはこれまで困難であった。ところが、1984年SchwartzとCantor<sup>6)</sup>によってパルスフィールド電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)が開発され、 $10^6 \sim 10^7$  (1M~10M) bpのサイズの巨大DNA断片(実際は1%アガロースで50kb-10Mbの範囲で可能)を泳動分離できるようになった<sup>7)</sup>。そのことでDSBによる巨大DNA断片を量的に、サイズの、両面に渡って観察されるようになった。DNAサイズは、>1Mb: Giant DNA; 10kb~1Mb: HMW DNA; <10kb: LMW DNA (internucleosomal, ladder-like DNA)断片に便宜上構造的な大ききで分類できる (Figure 1, 2)。

3) 酵素系を介したDNAの切断：アポトーシスやネクロトーシスなどの細胞死における核内や細胞小胞体に局在する幾つかのendonucleasesが報告され、それぞれ二価陽イオン( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ )の要求性の可否、エンドの切断様式が分類されている (Table I)。

#### 染色体DNAの断片化 (Table II)

##### Thymidyl酸合成酵素阻害剤による巨大DNA断片化

1988年に鮎沢らは、thymidyl酸合成酵素阻害剤である5-fluoro-2'-deoxyuridineによってFM3Aマウス乳癌細胞の核内に50~200 kbの大きさのDNA断片の出現を報告した<sup>8)</sup>。その後、この阻害剤についてはHT29ヒト大腸癌細胞でさらに大きくて、 $\gamma$ 線照射で観察されるものと同等の5~10Mb及び2Mbサイズの巨大DNA断片を観察した。200~500kbの大きさのDNA断片はFM3A細胞系では一個のrepliconに相当する。それ故に、複製forkに参与している酵素活性がDSBに対応している可能性があるかと彼等は報告している。しかしながら、作用機構の異なると考えられている $\gamma$ 線による場合とthymidine lessによる場合のDNA断片化の様

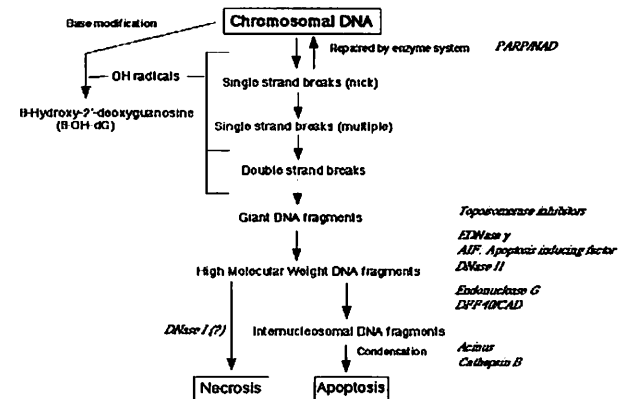


Figure 3. Oxidative stress-induced DNA fragmentation (文献22より改変)

Table II. DNA fragmentation induced by oxidative stress and various agents in various cell types (文献2より改変)

Treatment	Cell type	Giant DNA (bp)	HMW DNA (bp)	Ladder DNA*
Ionizing radiation	L-1210 (mouse leukemia)	0.1~10 M		ND
		3 M		ND
		1~2 M	200~800 k	+
X-ray ~50 Gy	EMT-6 (methotrexate-resistant)	1~2 M, 2 M		ND
1.5~12 Gy	T-24 (human bladder carcinoma)	1~2 M	100~800 k	+
20~100 Gy	HT-29 (colon adenocarcinoma)	1~2 M		ND
$\gamma$ -ray	T-24	1~2 M		+
Ultra violet-C				
Hydrogen peroxide	T-24	1~2 M	200~800 k	-
		1~2 M	200~800 k	+
		1~2 M	50~500k	+
>5 mM	U-937 (human myeloid leukemia)			
1~5 mM				
GSH-depletion				
Glutamate/BSO	C-6 (rat glioma)	1~2 M	200~800 k, <50 k	+
Anticancer drugs	Du-145 (prostatic carcinoma)	>1 M	450~600 k, 30~50 k	+
		1~2 M	200~800 k	+
BLM	T-24	1~2 M		+
Neocarzinostatin	T-24	1~2 M		+
5-FdUrd	HT-29	~10 M, 2 M	200~800 k	-
Duocarmycins	Hela (human uterine cervix carcinoma)	1~2 M	200~800 k	ND
Topoisomerase inhibitors	Thymocytes	800 k~1 M,	200~600 k, <100 k	+
		U-937	50~100 k	+
VM-26	Thymocytes	700k~1 M	30~80 k	+
mAMSA	Hela	1~2 M	900 k	ND
V-16 (etoposide)	Du-145	>1 M	450~600 k, 30~50 k	+
	MCF-7 (breast adenocarcinoma)		50 k	+
Cytokines	Jurkat T-lymphocytes		>700 k, 200~250 k, <50k	+
			30~500 k	+
Fas/anti-Fas				
TNF- $\alpha$				
TGF- $\beta$ 1	CC-164 (mink lung)		300 k, 50 k, <50 k	+
Serum depletion	K-562 (human leukemia)		50~300 k	+
			~50 k	ND
			50 k, <50 k	+
	H-11ras-R3 (mesenchymal cell)			
	HT-29 (colon adenocarcinoma)			

ND: not determined

\* indicates internucleosomal DNA fragment and + is positive.

式で、chromosomeに対する作用で働く共通となるものは何かはまだよくわかっていない。ただ、thymidine lessによる場合は、uracil excision/misrepair cycleが巨大DNA断片化で重要な役割を果たしていると考えられるがこれらははっきりとしない。

#### 電離放射線照射 (X線, $\gamma$ 線) 及び紫外線によるDNAの断片化

1990年にStamatoとDenko<sup>10)</sup>は動物細胞でのDSBによるDNA断片を測定する際にPFGE法を改良し、その改良したPFGE法を用いてDNA fragmentsを定量化することで $\gamma$ 線照射下による線量と遊離DNA fragmentsとの関係を示した。さらに、致死量の電離放射線照射誘導細胞死の過程で染色体DNAから0.1-12.6Mbサイズの巨大DNA断片が出現し、その量は照射線量に比例していたことが報告された。がその当時はまだX線による特異的な現象なのかどうかは明らかでなかった。L1210マウス白血病細胞に~50GyのX線照射により0.1M~10Mbの範囲にわたる巨大DNA断片が、中でも1~2MbのDNA断片が量的に多く認められた。筆者らもヒト膀胱癌T24細胞で100GyのX線照射により1~2Mbの巨大DNA断片化を同様に観察したが<sup>10)</sup>(Figure 3)、このことは照射後時間経過とともに1~2Mbの巨大DNA断片の一部は修復されサイズ的に元の大きさに復帰し、残りの巨大DNA断片はさらに断片化が進み200~800kbの断片に続いてラダーDNA断片化に至った。このよう現象はHT29細胞を用いたDusenburyらの場合でも見られた<sup>10)</sup>。Methotrexate抵抗性のEMT6マウス乳癌細胞では、1.5から12Gyの線量の範囲のX線照射で3MbサイズのDSBの誘導が認められたが、しかし7.5Gyの場合では、この3Mbは30分で修復され約75%がもとのchromosomeサイズになっていた。これらの実験結果は、X線照射によるDNA損傷の際にはいわゆるDNA修復機構の活性化をも誘導し、かなりの二重鎖切断DNAは照射後修復されることを示しており、DNAの切断とその修復の全体的バランスがくずれることによって最終的に細胞死にいた

ることを示唆している。X線と葉酸代謝阻害の場合はおのおの非依存的な機構で巨大DNA断片が形成するものと考えられる。

一方、紫外線 (UV) 照射では、Cタイプ (波長200-290nm) で致死線量 (50J/m<sup>2</sup>) のUV照射で1~2Mbの巨大DNA断片、100-800kb高分子量DNA断片、さらにラダーDNA断片を伴う一連の断片化を引き起こしアポトーシスに至った。そのUV照射後初期段階では細胞内NADの減少、及びPoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 酵素の活性化が認められ、UV照射の場合でも一部DNA損傷後の修復機構が働いているものと考えられる<sup>10)</sup>。このUV照射の系では細胞内にROSが発生していないか、もしくは発生していても巨大DNA断片化には関与していないことが明らかになった<sup>10)</sup>。このことから巨大DNA断片化は必ずしもROSによって起こるものとは限らないと考えられる<sup>10)</sup>。

#### 裸核を用いたDNAの断片化

細胞から核だけ取り出したいわゆる裸核を用いた場合でもwhole cellと同様にラダーDNA断片化を伴うアポトーシス様変化が起こる。SunとCohenは、ラットthymocyte裸核を用いたアポトーシスで、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>イオンの効果を調べた。>460kb、200-250kbおよび30-50kbの高分子量のDNA断片が認められ、これらはMg<sup>2+</sup>イオンに依存していた。さらに、この高分子量のDNA断片化に続いて起こるラダーDNA断片化は、Ca<sup>2+</sup>またはMg<sup>2+</sup>イオンの単独存在下では起こらず両イオンを必要としていた<sup>10)</sup>。このことは、アポトーシスの過程で高分子量DNA断片化とラダーDNA断片化は異なったステップにあることを示唆している。また一方で、methylprednisolone (ステロイドホルモン) によるthymocytesのアポトーシス誘導の際には、Ca<sup>2+</sup>依存性の50~300kbの高分子量DNA断片の出現が報告されており、同じthymocytesでもアポトーシス誘導物質、誘導方法の違いによって働く因子が異なっているのかもしれないことを示唆している。

### アポトーシスでは染色体DNAはどのように切断されるのか Topoisomerase 阻害剤によるアポトーシス

Topoisomeraseの阻害剤、たとえばVM26 (epipodophyllotoxin), mAMSA (amsacrine) などは抗癌剤として広く使用されているが、それらによる癌細胞死はラダーDNA断片化を伴うアポトーシスであることが知られている。これらの阻害剤で処理したthymocyteでは800kb~1Mb, 200~600kb, さらに100kb以下の大きな3つのグループに分けられるような巨大DNAおよび高分子量のDNA断片群が認められる。しかし他の作用系では、例えばVP16 (etoposide) によるDU145ヒト前立腺癌細胞、およびMCF7乳癌細胞では、50kbの高分子量のDNA断片およびラダーDNA断片のみが認められ、800kb~1Mbおよび200~600kbのサイズのものも観察されていない (Table II)。これらの巨大および高分子量のDNA断片化はいずれもアポトーシスの際に認められるラダーDNA断片化よりも時間的に前に起きている。これらのDNA断片の出現は統一的な決められたパターンではなく、個々のアポトーシスの場合でサイズ的には若干異なるが、いずれにしても高分子量のDNA断片が生ずることはあり得ることと考えられる。サイトカインとそのレセプターを介したアポトーシス

Fas抗体, TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) などによるリガンドと、そのレセプターを介するいわゆる細胞内シグナル伝達による細胞死誘導の場合でもアポトーシスが起る。その際にもラダーDNA断片化の前段階に高分子量のDNA断片が生ずることが報告されている<sup>21</sup>(Table II)。Fas/anti-FasによるJurkat Tリンパ球細胞の場合には、700kb以上、200-250kb, 50kb, さらに50kb以下およびラダーDNA断片が、TGF- $\beta$ 1によるH29大腸癌細胞の場合には、300kbと50kbおよび<50kb, ラダーDNA断片が、TNF- $\alpha$ による場合には30~500kbラダーDNA断片が観察され、ほぼどの場合でも50~500kbの高分子量のDNA断片化が生じている。これらのリガンドとレセプターとの結合後、ROSの蓄積もしくは介在がシグナル伝達系で関与することも報告されている<sup>22</sup>。そのDNA切断機構はROS (酸素フリーラジカル) によるDNAに対する直接作用によるのか、またはendonucleasesのような酵素系を介したDNAの断片化なのかは現在明らかでない。一方でCa<sup>2+</sup>依存性のDNasesが関与しているとの報告もあり現在まだ混沌としている<sup>23</sup>。いずれ高分子量DNA断片化に関与していると思われる酵素やタンパク因子が同定されると思われる。ところでアポトーシスで見られるラダーDNA断片化は細胞死の終末期であって、これが細胞死の引き金とはなっているとは考えにくい。それ故、ラダーDNA断片化を議論してもあまり意味がないが、外的因子による細胞死がネクローシスかアポトーシスかの判定に必要となる一つの現象であるかも知れない。

### 栄養枯渇によるアポトーシス

幾つかの培養型細胞では、血清を除いたいわゆる栄養、成長因子を枯渇した場合でもアポトーシスが誘導される。例えば、HT29ヒト大腸癌細胞やK562ヒト白血病細胞さらにある種の繊維芽細胞の場合では、300kb, および50kbさらに50kb以下のDNA断片が観察された。また水でネクローシスを起こした系では、700kb以上の巨大DNA断片および200~300kbが観察された。しかし、低分子量DNA断片はアガロース電気泳動上ではスミア状であり、ネクローシス様形態変化を示した<sup>24</sup>。このようにアポトーシスで見られるような巨大DNAおよび高分子量のDNA断片がネクローシスの場合でも同様に起きると考えられる。

### その他のアポトーシス誘導系

1) 細胞内グルタチオン枯渇による場合：神経細胞やグリア細胞、さらにはXc<sup>-</sup> antitransport系を持つ細胞は、細胞外の高濃度(1mM以上)のグルタミン酸でcystineの取り込みが抑えられ、cystineもしくはcysteineの減少、さらにはグルタチオン(glutathione, GSH)の枯渇を来し、その結果GSHの細胞内濃度低下を原因とする細胞死に至る<sup>19</sup>。この系でGSHの減少と共に細胞内のROSが蓄積し、脂質過酸化、さらには染色体DNAの断片化を伴う<sup>19</sup>。筆者らはC6ラットglioma細胞を10mMのグルタミン酸で処理し、細胞内GSHの減少・枯渇誘導後、脂質過酸化そして染色体DNAの~2Mb, 200~800kbの巨大DNA断片化を認め、さらにラダーDNA断片化をもたらす。そしてアポトーシスに至ることを報告してきた<sup>19</sup>。この系では、cycloheximide (CHX)<sup>19</sup>やH-7と言ったタンパク合成阻害剤、protein kinase C (PKC) 阻害剤でこれらの高分子量DNAおよびラダーDNA断片化が抑制されることを発見した<sup>19</sup>。GSH枯渇誘導による細胞死はROSによる直接的なDNA損傷ではなく、何か未知の細胞内因子を介する間接的ないわゆるROSを介したシグナルによるDNA断片化のように考えられるが、現在まだこの系に関与する因子は明らかにされていない。しかし、一方で、筆者らの最近の研究では外からアラキドン酸などの高級不飽和脂肪酸を加えると脂質過酸化が促進し、~2Mbおよび200~800kbの巨大DNA断片が増大するが、ラダーDNA断片化は逆に抑制されネクローシス様の細胞死に至った。この様に不飽和脂肪酸によるネクローシス様作用の促進と共に巨大DNA断片が生ずることが明らかであり、脂質過酸化と巨大DNA断片化には少なからず何らかの関連性があると考えられる<sup>19</sup>。

Buthionine sulfoximine (BSO) はGSHの前駆物質である glutamic acid-cysteineを合成する酵素 ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase) を阻害し、結果的に細胞内GSH濃度を低下させ、C6 glioma細胞ではグルタミン酸によるGSH濃度低下と同様に細胞内ROSの蓄積をもたらすことで細胞死 (アポトーシス) を引き起こす。この系ではC6細胞での巨大DNA断片、高分子量のDNA断片およびラダーDNA断片の出現においては時間差 (遅れて出現) があるが、DNA断片化パターンは上述したグルタミン酸による場合とほぼ同じであった<sup>20</sup>。このことから、グルタミン酸によるC6細胞の細胞死はグルタミン酸レセプターを介したいわゆるexcitotoxicityによるものではないことが推察される。このBSOによる系では細胞内ROSが直接DNAを攻撃するのか、またはシグナルを介したendonucleaseの活性化によるものなのか明らかでないが、これもCHXやH-7によってアポトーシスが抑制されることからグルタミン酸の場合と同様PKC及び新たなタンパク因子の発現を介した機構が考えられる。

2) タンパク合成阻害剤による影響：C6 gliomaのグルタミン酸によるアポトーシスはタンパク合成阻害剤であるCHX, actinomycin DによってラダーDNA断片化が抑制される。さらにこれまでに述べてきたアポトーシス系の中で、dexamethasoneによるthymocytesの場合、V16 etoposide, bleomycinによるDU145の場合、さらにMg/Caイオンによる>1Mb, 450~600kb, 30~50kbの高分子量DNA断片およびラダーDNA断片化が生じる場合で共にCHXにより細胞死 (アポトーシス) が抑制されることが確認されている。このことからこれらのDNA断片は、etoposide/DU145の場合ではtopoisomerase/DNAの相互関係でなく新たに発現したendonucleaseによるproductsである可能性が考えられる。

## おわりに

ここで紹介したように、DNA断片化のサイズパターンはある程度明らかになって来たが、しかし外的ストレスによる細胞死の過程で、切断されたDNA断片の末端構造はどのような構造になっているのか、また活性酸素によって又は酵素的に切断されやすい構造上のhot spotがchromosomeに存在するのか、については今後の研究が待たれる。アポトーシスにおけるDNA損傷で、そして巨大DNA断片化のもつ意義は何なのか、巨大DNA断片化が本当にアポトーシス(ラダーDNA断片化)の引き金になっているのか、また必然的なものか、については今後の大きな課題でありもっと詳細に検討を加えていかなければならない。更には、巨大DNA断片化は単なるコンフォメーションを崩してcytolysisの最終段階のDNasesによる切断を受け易くしているだけなのか、またそのサイトには特異的な遺伝子の関連性があるのか、early eventとlate eventの区別、それらには必然的な関連性があるのかどうか、についてはひじょうに興味のあることであるが残念ながらこれらについても今後の更なる研究を待たねばならない。

## 文 献

- 1) Higuchi Y. The role of endonucleases in chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. In AJ Corvin (ed), *New Dev Cell Apoptosis Res*, p179-192, Nova Science Publishers, New York, 2007
- 2) Higuchi Y, Yoshimoto T. Chromosomal DNA fragmentation in oxidative stress-induced mammalian cell death. *Recent Res Develop Biophys Biochem*. 1: 161-171, 2001
- 3) Pieta KJ, Partin AW, Coffey DS. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res*. 49: 2525-2532, 1989
- 4) Cook PR, Brazell, IA, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 22: 303-324, 1976
- 5) Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, Walker PR. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J* 9: 1319-1327, 1990
- 6) Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNA s by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75, 1984
- 7) Higuchi Y. Measurement of DNA double-strand breaks with giant DNA and high molecular weight DNA fragments by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods in Molecular Biology* 186: 161-170, 2002
- 8) Ayusawa D, Arai h, Wataya Y, Seno T. A specialized form of chromosomal DNA degradation induced by thymidylate stress in mouse FM3A cells. *Mutation Res* 200: 221-230, 1988
- 9) Stamato TD, Denko N. Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation Res* 121: 196-205, 1990
- 10) Higuchi Y, Matsukawa S. Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances which cause oxidation stress.

*Free Radic Biol Med* 23: 90-99, 1997

- 11) Dusenbury CE, Davis MA, Lawrence TS, Maybaum J. Induction of megabase DNA fragments by 5-fluorodeoxyuridine in human colorectal tumor (HT29) cells. *Mol Pharmacol* 39: 285-289, 1990
- 12) Higuchi Y, Mizukami Y, Yoshimoto T. Ultraviolet ray induces chromosomal giant DNA fragmentation followed by internucleosomal DNA fragmentation associated with apoptosis in rat glioma cells. *Ann NY Acad Sci*, 1010: 326-330, 2003
- 13) Higuchi Y, Tanii H, Koriyama Y, Hashii M, Higashida H, Mizukami Y. Reactive oxygen species-independent chromosomal giant DNA fragmentation is associated with caspase-mediated apoptosis in ultraviolet-irradiated Cells. *J Cell Mol Med*, in submission
- 14) Sun X, Cohen GM. Mg-dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *J Biol Chem* 269: 14857-1486, 1994
- 15) Higuchi Y. Glutathione depletion induces giant DNA fragmentation associated with apoptosis or necrosis. In K Nesaretnam, L Packer (eds), *Mcronutrients and Health: Molecular Biological Mechanisms*, p202-216, AOCs Press, Champain, 2001
- 16) Higuchi Y, Matsukawa S. Active oxygen-mediated chromosomal 1-2 Mbp giant DNA fragmentation into internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis of glioma cells induced by glutamate. *Free Radic Biol Med* 24: 418-426, 1998
- 17) Higuchi Y, Kato S, Matsukawa S. Involvement of protein kinase C in apoptosis induced by glutamate in C6 rat glioma cells. In RS Rao, MG Deo, LD Sanghvi (eds), *Proceeding of the XVI International Cancer Congress*, eds, p857-861, Monduzzi Editore, Bologna, 1994
- 18) Higuchi Y, Matsukawa S. Glutathione depletion induces chromosomal giant DNA and high molecular weight DNA fragmentation associated with apoptosis through lipid peroxidation and protein kinase C activation in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 363: 33-42, 1999
- 19) Higuchi Y, Tanii H, Koriyama Y, Mizukami Y, Yoshimoto T. Arachidonic acid promotes glutamate-induced cell death associated with necrosis by 12-lipoxygenase activation in glioma cells. *Life Science* 80: 1856-1864, 2007
- 20) Higuchi Y, Yoshimoto T. Promoting effect of polyunsaturated fatty acids on chromosomal giant DNA fragmentation associated with cell death induced by glutathione depletion. *Free Radical Res* 38: 649-658, 2004
- 21) Higuchi Y, Tanii H, Mizukami Y, Yoshimoto T. The role of lipid peroxidation in chromosomal DNA fragmentation associated with cell death induced by glutathione depletion. In M Hiramatsu, L Packer, T Yoshikawa (eds), *Molecular Interventions and Protection in Lifestyle Related Diseases*. p287-302, Taylor & Francis, New York, 2006
- 22) Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 66: 1527-1535, 2003.