

Title	アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割に関する研究
Author(s)	榎本, 理世
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44648
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

アポトーシス実行過程における
ヒストン化学修飾の役割に関する研究

2003 年

榎本 理世

アポトーシス実行過程における
ヒストン化学修飾の役割に関する研究

2003年

榎本 理世

目次

緒言	1
本論	3
第一章 アポトーシスによる細胞死	3
第一節 選択的プラスミン阻害薬 YO-2 によるアポトーシス	3
実験方法	3
実験結果	4
考察	10
第二節 培養ヒト正常アストロサイト <i>in vitro</i> 細胞障害モデルでのアポトーシス	12
実験方法	12
実験結果	13
考察	15
小括	16
第二章 アポトーシスとヒストンリン酸化	17
第一節 薬物誘発アポトーシスにおけるヒストンリン酸化	17
実験方法	17
実験結果	18
考察	25
第二節 培養ヒト正常アストロサイト <i>in vitro</i> 細胞障害モデルにおけるヒストンリン酸化	26
実験方法	26
実験結果	26
考察	31
小括	32
第三章 アポトーシス誘発とクロマチンの DNA 分解酵素感受性	34
実験方法	34
実験結果	34
考察	40
小括	41
総括	42
結論	44
謝辞	46
引用文献	47

略語一覧

ACBP, acyl-CoA-binding protein
Ac-DEVD-MCA, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp- α -(4-methyl-coumaryl-7-amide)
Ac-IETD-MCA, acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-MCA
Ac-LEHD-MCA, acetyl-Leu-Glu-His-Asp-MCA
AEBSE, 4-(2'-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride
AIF, apoptosis inducing factor
AMC, 7-amino-4-methyl-coumarin
AUT, 酢酸-尿素-Triton X-100
CAD, カスパーゼ活性化 DNA 分解酵素
CBB, クーマシーブリリアントブルー
CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid
DAP, death-associated protein
DFP, diisopropyl fluorophosphate
DIABLO, direct IAP binding protein with low pI
Dlk, DAP like kinase
E-64-d, (L3 *trans*-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucine(3-methylbutyl)amide
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP, enhanced green fluoro protein
EGTA, ethyleneglycol-bis(b-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
ERK, extracellular signal-regulated kinase
HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HMG, high mobility group
HPCE, high-performance capillary electrophoresis
HPLC, 高速液体クロマトグラフィー
HtrA2, high temperature requirement protein A2
IAP, inhibitor of apoptosis protein
JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase
MAP, mitogen-activated protein
MAPK, MAP kinase
MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide
PBS, phosphate buffered saline
PI, propidium iodide
PIPES, piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)
PP, タンパク質脱リン酸化酵素
PS, ホスファチジルセリン
PTB, polypyrimidine tract-binding protein
SDS, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
Smac, second mitochondria-derived activator of caspase
TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
uH2A, ユビキチン化ヒストン H2A
YO-0, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-2-bromobenzyloxycarbonyl)tyrosine-4-acetylanilide
YO-1, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-phenylalanine-4-carboxymethylanilide
YO-2, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-picolyl)tyrosine-octylamide
YO-3, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-2-bromobenzyloxycarbonyl)tyrosine-octylamide
YO-4, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-2-bromobenzyloxycarbonyl)tyrosine-isoamylamide
YO-5, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-2-bromobenzyloxycarbonyl)tyrosine-octylester

YO-6, *trans*-4-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-2-pyrimidyl)tyrosine-3-carboxyanilide
Z-DEVD-FMK, carbobenzoxy-Asp(OCH₃)-Glu(OCH₃)-Val-Asp(OCH₃)-fluoromethylketone
ZIP, zipper interacting protein
Z-VAD-FMK, carbobenzoxy-Val-Ala-Asp(OCH₃)-FMK
WST, water soluble tetrazolium

緒言

1972年にWyllieとKerr [1] らにより見出されたアポトーシスは、様々な生命現象や病態においてきわめて重要な意義を有すると考えられている [2,3,4,5]。また、多くの薬物においてアポトーシス誘発作用 [6,7,8] や抗アポトーシス作用 [9,10,11] が報告され、それらのシグナルカスケードは薬理的にも注目されている。アポトーシスシグナルカスケードに関しては、受容体 [12,13,14]、ミトコンドリア障害 [15]、小胞体ストレス [16] の面から活発に研究されており、複雑なシグナルカスケードの存在が報告されている (Fig. 1) [15]。アポトーシスの生化学的特徴の1つであるヌクレオソーム単位のDNA断片化はアポトーシスの最終段階であり、この反応はカスパーゼ活性化DNA分解酵素 (CAD) [17,18] により触媒される。本酵素活性の調節に関しては詳細な研究がなされているが、触媒を受けるDNAの核内での挙動に関する情報は極めて少ない。

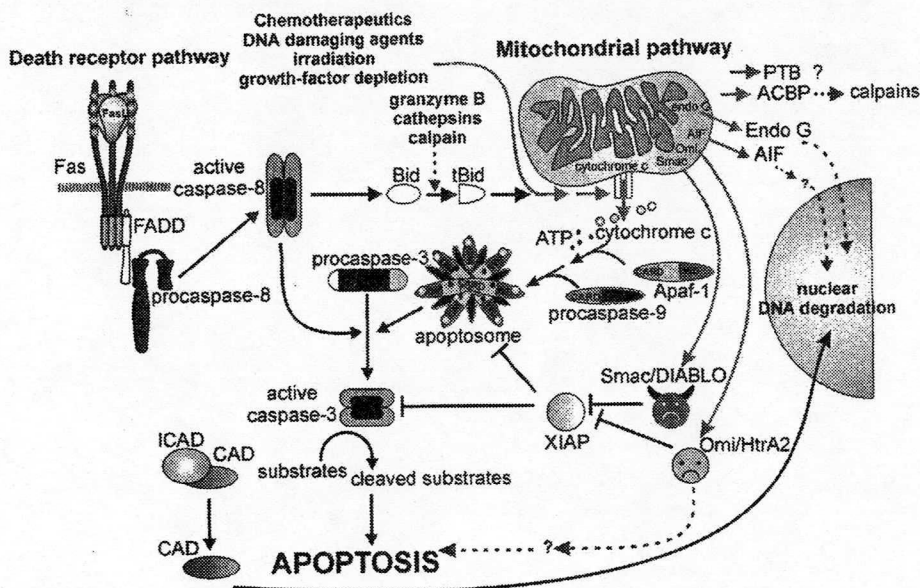


Fig. 1. Many death signals converge onto mitochondria and release multiple intermembrane space proteins. Black arrows represent caspase-dependent cell death pathways; dashed arrows represent caspase-independent cell death pathway; grey arrows represent the convergence of death signals on the mitochondria and the subsequent release of intermembrane space proteins. A variety of apoptotic stimuli (death domain receptors, chemotherapeutics, DNA-damaging agents, growth-factor withdrawal, and irradiation) trigger mitochondria, which results in the release of apoptotic proteins including cytochrome *c*, AIF, endonuclease G, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, and ACBP. Cytochrome *c* induces caspase activation by binding to Apaf-1. Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 can neutralize IAP inhibition of caspases. AIF and endonuclease G are involved in caspase-independent nuclear DNA degradation. ACBP can promote the activation of m-calpain, which belongs to a family of cysteine proteinases. The release of PTB from mitochondria is not clear, since it lacks a mitochondrial localization signal.

DNA は核タンパク質で構成されたヌクレオソームコアとともにクロマチンを形成し、密に折りたたまれて核内に収納されている [19]。従って、DNA を標的とする酵素の作用は通常は制限されていると考えられ、転写時などの必要時にクロマチン構造が弛緩し、酵素との相互作用が可能な形態をとることが示されている [20,21,22]。このクロマチン構造変化を調節する機構の一つにヒストン化学修飾が知られている [20,23,24,25,26]。ヌクレオソームの構成成分であるヒストンは進化上非常によく保存された分子量約 10-30 kDa の塩基性タンパク質で、大きく分けて H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類が存在する。これらは N 末部分にヒストンテールと呼ばれる修飾部位を含んでおり、アセチル化 [20,21]、リン酸化 [27,28,29,30]、メチル化 [25,31,32] などの様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。これらのヒストン化学修飾は転写調節 [20,21,22] や細胞周期 [27,28,29,30] など種々の細胞機能の調節に関与している。これと関連し、Lee ら [33] は、アポトーシス実行過程におけるクロマチン構造変化の可能性を報告している。

このような背景において、本研究では、アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割を追究する目的で、新規選択的プラスミン阻害薬および *in vitro* 細胞障害モデルでのアポトーシス誘発について、またアポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾について検討した。さらに、アポトーシス実行過程におけるクロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化について検討した。

本 論

第一章 アポトーシスによる細胞死

第一節 選択的プラスミン阻害薬 YO-2 によるアポトーシス

YO-2 (Fig. 2) はトラネキサム酸、picolylytyrosine および octylamine の 3 つの構成要素からなり、新規の選択的プラスミン阻害薬である [34]。本化合物は免疫抑制マウスに移植されたヒト腫瘍細胞の増殖および転移を抑制すること [35]、種々のヒト腫瘍細胞株に細胞死を誘発すること [36] が報告されている。本研究では、YO-2 による細胞死がアポトーシスによるものかどうか、またこのアポトーシス誘発作用がプラスミン阻害作用と関係しているか否か検討した。

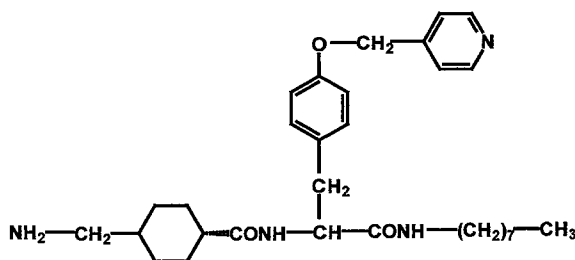


Fig. 2. The structure of YO-2.

実験方法

細胞の培養 ラット胸腺細胞は既報の方法により調製した [37]。幼若雄性ラット (4-5 週齢) の胸腺より胸腺細胞を採取し、細胞密度 10×10^6 cells/ml で 5% CO₂、37°C 条件下、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で培養した。胸腺細胞は調製後、直ちに実験に使用した。

DNA 断片化率の測定 ラット胸腺細胞を YO 関連化合物または各種タンパク質分解酵素阻害薬の存在下で培養し、アポトーシスの生化学的指標である DNA 断片化率を測定した。細胞 (10×10^6 cells) を細胞溶解用緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) 中で 4°C、15 分以上放置して溶解後、細胞溶解液を遠心分離した。上清 (断片化 DNA) および沈殿 (非断片化 DNA) の DNA 量をジフェニルアミン法 [38] によりそれぞれ定量した。DNA 断片化率は、総 DNA 量 (上清 DNA 量 + 沈殿 DNA 量) に対する断片化 DNA 量 (上清 DNA 量) の割合 (%) で表示した。

アガロースゲル電気泳動によるDNAの分析 30 μM YO-2 存在下または非存在下で培養したラット胸腺細胞 (20×10^6 cells) からDNAを抽出し、1.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。DNAは臭化エチジウム染色により検出した [33]。

Annexin V-EGFP/PI 二重染色 30 μM YO-2 存在下または非存在下で培養した胸腺細胞 (10×10^6 cells) を、Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) で染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM GB 200, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で観察した。

核の形態学的観察 胸腺細胞 (10×10^6 cells) を30 μM YO-2 または各種タンパク質分解酵素阻害薬存在下で培養後、5%ホルムアルデヒドを含むPBSで4°C、15分間以上放置し、固定した。300 \times g、10分間遠心分離して細胞を回収し、PBSに再懸濁した。核の染色は細胞懸濁液 (10×10^6 cells/ml) に12.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342を加え、室温で10分間反応させることにより行った。細胞をPBSで洗浄後、核を共焦点レーザー顕微鏡で観察した [39]。

DNA断片化に対するカスパーゼ阻害薬の影響 胸腺細胞をカスパーゼ阻害薬で1時間前処置後、30 μM YO-2 存在下または非存在下でさらに6時間培養し、ジフェニルアミン法によりDNA断片化率を測定した。

カスパーゼ活性の測定 蛍光合成基質を用いたカスパーゼ-3、カスパーゼ-8およびカスパーゼ-9様活性の測定は既報により行った。30 μM YO-2 存在下または非存在下で培養した胸腺細胞 (100×10^6 cells) を50 μl の抽出用緩衝液 (50 mM PIPES-NaOH (pH 7.4), 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 20 μM cytochalasin B, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 1 $\mu\text{g/ml}$ chymostatin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A, 2.83 $\mu\text{g/ml}$ E-64-d) に懸濁して凍結融解を繰り返したものを酵素標品とした。活性測定用緩衝液 (100 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol, 0.1 mg/ml ovalbumin) で酵素標品を希釈した後、100 μM Ac-DEVD-MCA、Ac-IETD-MCA または Ac-LEHD-MCA と37°Cで反応後、AMCの蛍光を測定し、それぞれカスパーゼ-3、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9様活性とした [40]。

実験結果

ラット胸腺細胞を種々の濃度のYO-2存在下で6時間培養すると、30 μM でもっとも顕著なDNA断片化が見られた (Fig. 3)。YO-2のDNA断片化作用は反応時間に依存して増加

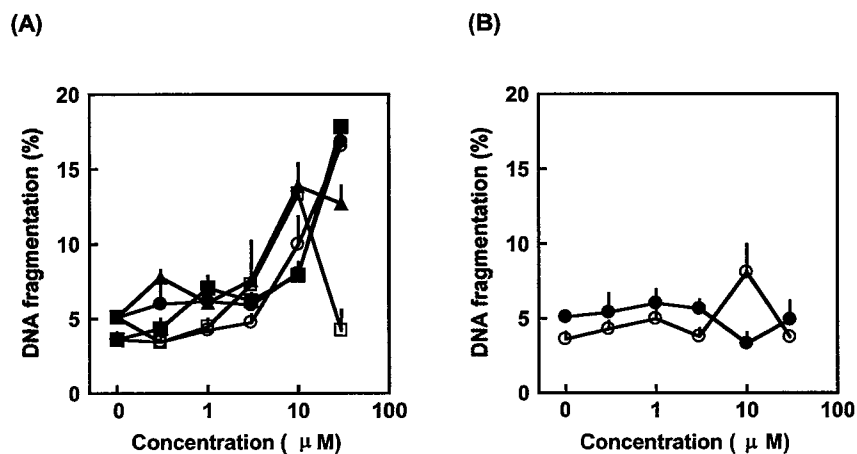


Fig. 3. The effect of various concentrations of YO compounds on DNA fragmentation in rat thymocytes. The thymocytes were incubated with different concentrations of YO compounds for 6 h. After the incubation, the cells were collected and DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. (A) \circ , YO-0; \bullet , YO-2; \square , YO-3; \blacksquare , YO-4; \blacktriangle , YO-5. (B) \circ , YO-1; \bullet , YO-6.

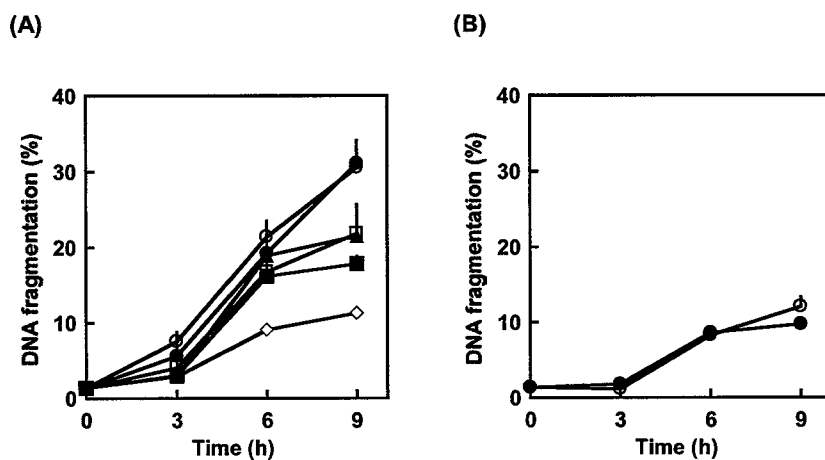


Fig. 4. The effect of incubation time on DNA fragmentation in rat thymocytes. The cells were treated with 30 μ M of various YO compounds for indicated times. After the incubation, DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. (A) \diamond , control; \circ , YO-0; \bullet , YO-2; \square , YO-3; \blacksquare , YO-4; \blacktriangle , YO-5. (B) \circ , YO-1; \bullet , YO-6.

した (Fig. 4)。その他の YO 化合物についても同様の検討を行った。プラスミン阻害作用の強い YO-0、YO-3、YO-4、YO-5 [34] は YO-2 と同様に DNA 断片化作用を示したが、プラスミン阻害作用の弱い YO-1 および YO-6 [34] はほとんど DNA 断片化を起こさなかった。YO-3 および YO-5 は 10 μ M で、YO-0 および YO-4 は 30 μ M で最も強い DNA 断片化作用を示した (Fig. 3)。YO-0、YO-3、YO-4、YO-5 の DNA 断片化作用は YO-2 と同様に反応時間に依存して増加した (Fig. 4)。アガロースゲル電気泳動により、YO-2 による DNA 断片

化はアポトーシスの生化学的特徴であるヌクレオソーム単位であることが確認された (Fig. 5)。

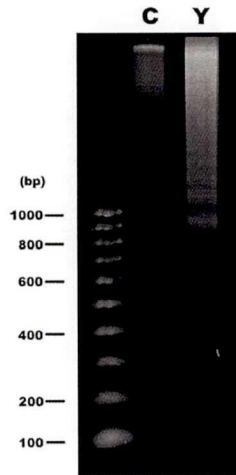


Fig. 5. Electrophoretic analysis of fragmented DNA from the thymocytes treated with YO-2. The cells were treated with 30 μ M YO-2 for 6 h. C, control; Y, YO-2.

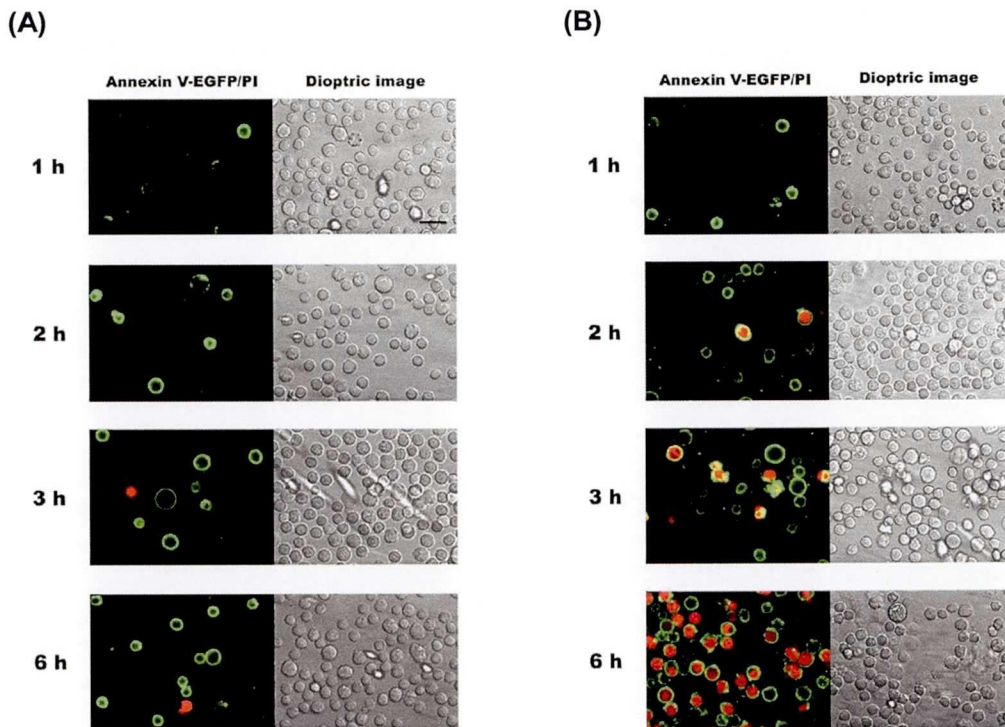


Fig. 6. Annexin V-EGFP and propidium iodide staining of untreated and YO-2 treated thymocytes. The cells were incubated with 30 μ M YO-2 for indicated time, then the cells were stained with Annexin V-EGFP (green) and propidium iodide (red) without fixation. The right panels indicated the dioptric images of the same field of vision. (A) control; (B) YO-2-treated. Bar, 10 μ m.

さらに、アポトーシス初期に観察されるフォスファチジルセリン (PS) の細胞膜内側から外側への転移 [41,42] が YO-2 により起こるかどうかについて、Annexin V-EGFP (緑色蛍光) /PI (赤色蛍光) 二重染色により調べた。1 時間の 30 μ M YO-2 処置により、PS の細胞膜外側への転移を反映する Annexin V-EGFP 染色陽性細胞の増加が見られた。Annexin V-EGFP 染色陽性細胞は YO-2 の反応時間に依存して増加した。2 時間の YO-2 処置では AnnexinV-EGFP 染色と共に死細胞を反映する PI 染色も陽性を示す細胞が認められ、6 時間の YO-2 処置においては大部分の細胞が AnnexinV-EGFP 染色、PI 染色共に陽性であった (Fig. 6)。また、YO-2 存在下で 1 時間から 9 時間培養した細胞の核を Hoechst 33342 染色の後、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、YO-2 の反応時間に依存して、アポトーシス細胞の特徴である凝縮した核の増加が見られた (Fig. 7)。

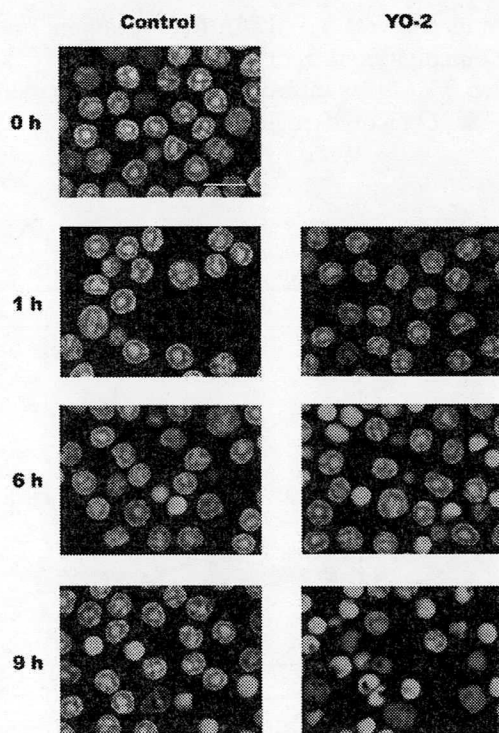


Fig. 7. Laser scanning microscopic images of thymocytes treated with YO-2. The thymocytes were treated with or without 30 μ M YO-2 for indicated times. The cells were fixed and then were stained with 12.3 μ g/ml Hoechst 33342. Bar, 10 μ m.

YO-2 のアポトーシス誘発作用において、YO-2 の 3 つの構成要素のうちのいずれが重要であるかを明らかにするために、各構成要素の DNA 断片化作用を調べた。しかしながら、トラネキサム酸、picolytyrosine および octylamine は DNA 断片化作用を示さなかった (Fig. 8)。さらに YO-2 の構造から octylamine のみを除いた化合物、またはトラネキサム酸のみ

を除いた化合物についても検討を行ったが、いずれも DNA 断片化を起こさなかった (データ非表示)。

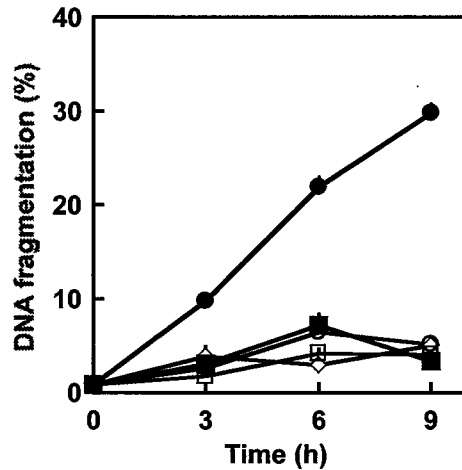


Fig. 8. Effect of elements composing YO-2 on DNA fragmentation. The thymocytes were treated with 30 μ M tranexamic acid, *O*-picolylytyrosine or *n*-octylamine for 6 h. After the incubation, DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. \diamond , control; \bullet , YO-2; \circ , tranexamic acid; \blacksquare , *O*-picolylytyrosine; \square , *n*-octylamine.

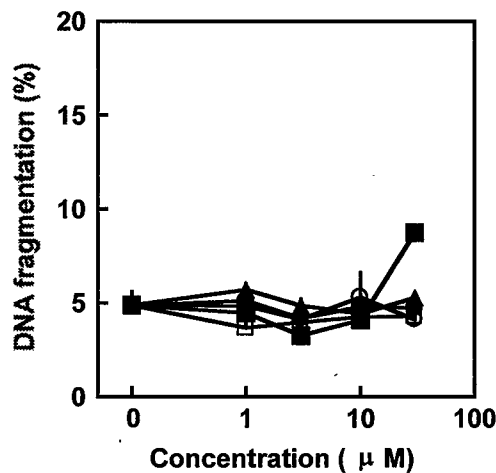


Fig. 9. Effect of other protease inhibitors on DNA fragmentation in rat thymocytes. The cells were treated with various concentrations of protease inhibitors for 6 h. After the incubation, DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. \circ , pepstatin A; \bullet , leupeptin; \square , AEBSF; \blacksquare , DFP; \blacktriangle , E-64-d.

次に、YO-2 のアポトーシス誘発作用とプラスミン阻害作用との関連を明らかにする一端として、既存のプラスミン阻害薬やその他のタンパク質分解酵素阻害薬が DNA 断片化を起こすかどうかを検討した。プラスミン阻害薬である leupeptin、AEBSF および DFP、酸性プロテアーゼ阻害薬である pepstatin A、システインプロテアーゼ阻害薬である E-64-d は

いずれも著明な DNA 断片化作用を示さず (Fig. 9)、また、これらのタンパク質分解酵素阻害薬処置によっては核の凝縮が見られなかった (データ非表示)。

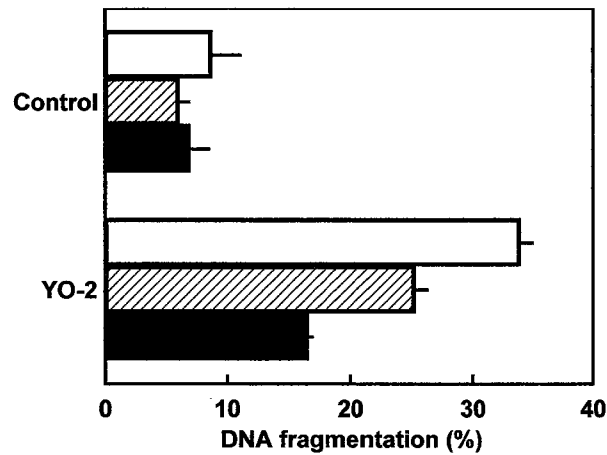


Fig. 10. The effect of caspase inhibitors on DNA fragmentation induced by YO-2. The cells were preincubated in the presence of 50 μ M Z-DEVD-FMK and 12.5 μ M Z-VAD-FMK for 1 h. Then, 30 μ M of YO-2 was added to the cells, and was incubated for 6 h. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. Open column, none; hatched column, Z-DEVD-FMK; solid column, Z-VAD-FMK.

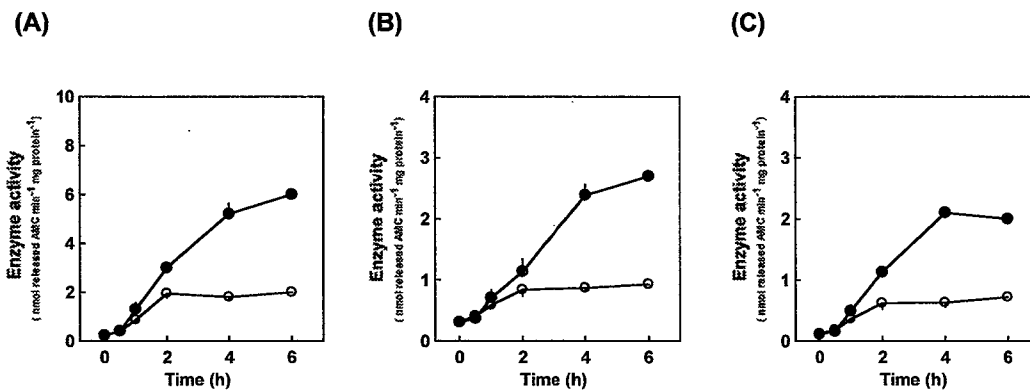


Fig. 11. Caspase activation in YO-2-treated thymocytes. Thymocytes were incubated in the absence or presence of 30 μ M YO-2 for indicated times. The activities of caspase-3 (A), -8 (B) and -9 (C) were determined using the substrates Ac-DEVD-MCA, Ac-IETD-MCA and Ac-LEHD-MCA, respectively. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. ○, control; ●, YO-2-treated.

次に、YO-2 誘発アポトーシスのシグナルカスケードについて検討を行った。カスパーゼ-3 阻害薬である Z-DEVD-FMK および非選択的カスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK はいずれも YO-2 による DNA 断片化を抑制した (Fig. 10)。さらに、蛍光合成基質を用いてカスパーゼ-3 (DEVDase)、カスパーゼ-8 (IETDase) およびカスパーゼ-9 (LEHDase) 様活性を測定した。YO-2 はこれらの活性を反応時間に依存して増加させ、4 時間から 6 時間の YO-2 処置によりすべての活性はいずれもコントロールの 2 倍以上の活性を示した (Fig. 11)。イムノブロッティング分析により、活性型カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 の存在、チトクロム *c* の細胞質への放出が確認された (データ非表示)。

考察

ラット胸腺細胞を YO-2 存在下で培養すると反応時間に依存した DNA 断片化の増加が見られた。さらに、YO-2 による DNA 断片化がヌクレオソーム単位であること、アポトーシス初期細胞の特徴の 1 つである PS の細胞膜内側から外側への転移が YO-2 により誘発されることが示された。また、形態学的観察により、YO-2 処置により核の凝縮が起こることも確認された。これらの生化学的および形態学的検討より、YO-2 がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが明らかとなった。この YO-2 のアポトーシス誘発作用において、YO-2 の 3 つの構成要素のうちのいずれが重要であるかを明らかにするために、各構成要素の DNA 断片化作用を調べた。しかしながら、トラネキサム酸、picolytyrosine および octylamine はいずれも DNA 断片化作用を示さなかった。また、YO-2 の構造から構成要素の 1 つを除いた 2 種類の化合物も同様に DNA 断片化を起こさなかったことから、YO-2 のアポトーシス誘発作用には 3 つの構成要素すべてが必要であると考えられた。

その他の YO 化合物についても DNA 断片化作用について検討を行った。プラスミン阻害作用の強い YO-0、YO-3、YO-4、YO-5 が DNA 断片化作用を示したのに対して、プラスミン阻害作用の弱い YO-1 および YO-6 は DNA 断片化作用を有していなかった。このことから、YO-2 のアポトーシス誘発作用がプラスミン阻害作用と関連している可能性が示唆された。しかしながら、プラスミン阻害作用のあるトラネキサム酸や既存のプラスミン阻害薬がほとんど DNA 断片化作用を示さなかったことから、YO-2 の両作用の関連性の詳細は不明である。

YO-2 誘発アポトーシスのシグナルカスケードについては、カスパーゼ阻害薬が YO-2 による DNA 断片化を抑制したことおよび YO-2 が反応時間に依存してカスパーゼ-3、カスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 様活性を増加させたことからカスパーゼ系を介していると考えられた。イムノブロッティング分析により、活性型カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 の存在が確認されたが、活性型カスパーゼ-8 は検出されなかったことより、IETDase 活性の増加は、カスパーゼ-8 ではなく他のタンパク質分解酵素の触媒により基質が分解された結果

と考えられた。また、YO-2 処置によりチトクロム *c* の細胞質への放出が起こったことから、本化合物による胸腺細胞アポトーシス誘発作用がミトコンドリア機能障害と関連していることが示唆された。

第二節 培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルでのアポトーシス

脳神経外科手術において人工脳透析液の代わりに生理食塩液で灌流すると、炎症反応が誘発され頭痛・高熱等の副作用が発現することが報告されている [43,44,45]。一方、Takumaら [46] は培養アストロサイトにおいて Ca^{2+} パラドックス障害によりアポトーシスが誘発されることを報告している。本研究では、培養ヒト正常アストロサイトにおいて生理食塩液の短時間暴露後の再灌流でアポトーシスが誘発されるか否か検討した。

実験方法

細胞の培養 培養ヒト正常アストロサイトおよび培地類 (AGM BulletKit) は Clonetics, BioWhittaker, Inc. (Walkersville, Maryland) より購入した。細胞は 5% CO_2 、37°C 条件下で AGM BulletKit を用い、添付のマニュアルに従って培養した。TUNEL 染色および核の形態観察用には 75 cm^2 のカルチャーフラスコで 3 回継代後、 3.4×10^4 cells/340 μl /well (1.7 cm^2) で細胞を播種し、継代した翌日とその後は 48 時間から 72 時間ごとに新しい培地に交換した。位相差顕微鏡にて細胞の増殖状態を確認し、スライド上の 70-80% まで細胞が増殖した時点 (約 8 日) で実験に用いた。また、ヒストンリン酸化の分析用には直径 100 mm または 150 mm のディッシュを用いて 2-4 回継代培養を行い、ディッシュ上の 60-80% まで増殖した時点 (17 日から 28 日) で実験に用いた。

生理食塩液および人工脳脊髄液の暴露 細胞を洗浄後、生理食塩液または人工脳脊髄液 (Table 1) で 5% CO_2 、37°C 条件下で 30 分から 1 時間暴露した。細胞は暴露後直ちに、あるいは新しい培地に交換してさらに培養を継続後に実験に供した。生理食塩液あるいは人工脳脊髄液の代わりに培地を用いて同様の操作を行ったものをコントロールとした。

Table 1. Composition of perfusates.

Component	Saline solution	Artificial cerebrospinal fluid
Na^+	154 mEq	145.4 mEq
K^+	-	2.8 mEq
Mg^{2+}	-	2.2 mEq
Ca^{2+}	-	2.3 mEq
Cl^-	154 mEq	128.5 mEq
HCO_3^-	-	23.1 mEq
Pi	-	1.1 mmol/l
Glucose	-	61.0 mg/dl

細胞生存率の測定 細胞を 5×10^3 cells/well で 96 well プレートに播種し、翌日に新しい培地に交換した。播種 2 日後に 100 μl /well で生理食塩液あるいは人工脳脊髄液に細胞を暴

露し、暴露直後 (0 時間) および新しい培地に交換して 12 時間から 48 時間培養後の細胞生存率を MTT 改良法である Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用い、添付マニュアルに従って測定した。

TUNEL 染色による DNA 断片化の検出 正常培地、生理食塩液あるいは人工脳脊髄液に 30 分間暴露後、新しい培地に交換して 24 時間培養した細胞を固定、洗浄後、*in situ* Apoptosis Detection Kit (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いて TUNEL 染色を行った。細胞を PBS で洗浄して蛍光顕微鏡により観察した。

核の形態学的観察 チャンバースライドに培養したヒト正常アストロサイトを正常培地、生理食塩液あるいは人工脳脊髄液に 1 時間暴露し、暴露直後 (0 時間) および正常培地で 24 時間から 48 時間培養した細胞を 10%中性緩衝ホルムアルデヒド液で固定後、12.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 で核を 30 分間染色した。細胞を PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡で核を観察した。

実験結果

培養ヒト正常アストロサイトの細胞生存率に対する生理食塩液あるいは人工脳脊髄液暴露の影響を調べた。細胞を正常培地に 30 分間暴露後、新しい培地に交換して 48 時間まで培養を継続したコントロールでは、細胞の増殖が観察され、48 時間では暴露直後の約 2 倍の増殖を示した。一方、生理食塩液に暴露した場合には、暴露直後の細胞生存率がコントロールの約 50%に低下した。生理食塩液暴露後、正常培地に交換して 48 時間まで培養を継続したが、細胞の増殖はほとんど見られなかった。人工脳脊髄液に暴露した場合にも暴露直後に生理食塩液暴露と同様に細胞生存率が低下していたが、正常培地に交換後 12 時間から 48 時間では細胞増殖が見られ、48 時間後には暴露直後の約 2 倍に増殖していた (Fig. 12)。生理食塩液および人工脳脊髄液暴露による DNA 断片化の有無を TUNEL 染色により検出した。生理食塩液暴露により TUNEL 染色陽性細胞が認められた。一方、生理食塩液のかわりに人工脳脊髄液に暴露した細胞ではコントロールの場合と同様に TUNEL 染色は陰性であった (Fig. 13)。Hoechst 33342 で染色した核について形態学的観察を行った。生理食塩液の 1 時間暴露により暴露直後から一部の核に凝縮が認められた。正常培地に交換後 24 時間から 48 時間培養すると凝縮した核や内部構造が消失した核が観察された。これに対して、人工脳脊髄液への暴露では暴露直後、正常培地に交換後 24 時間および 48 時間の培養により大部分の核はコントロールとほぼ同様の正常な形態を示していた (Fig. 14)。

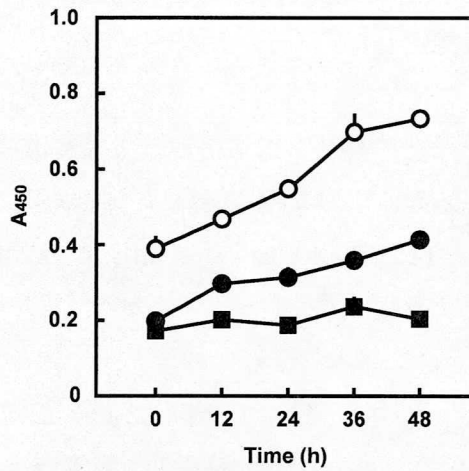


Fig. 12. Viability of human astrocytes exposed to various perfusates. Astrocytes were incubated with fresh growth medium for indicated times following exposure to growth medium (control), saline solution or artificial cerebrospinal fluid for 30 min, and the viability of the cells were tested by use of WST-8. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. ○, control; ■, saline solution; ●, artificial cerebrospinal fluid.

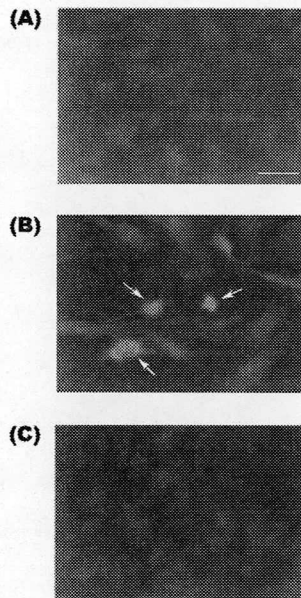


Fig. 13. TUNEL reactivity of human astrocytes exposed to various perfusates. All panels show TUNEL staining of human astrocytes exposed to normal growth medium (A), saline solution (B), or artificial cerebrospinal fluid (C) for 30 min. After exposure, these perfusates were replaced with growth medium and the cells were incubated for 24 h. Positive TUNEL staining is indicated by arrows. Bar, 100 μ m.

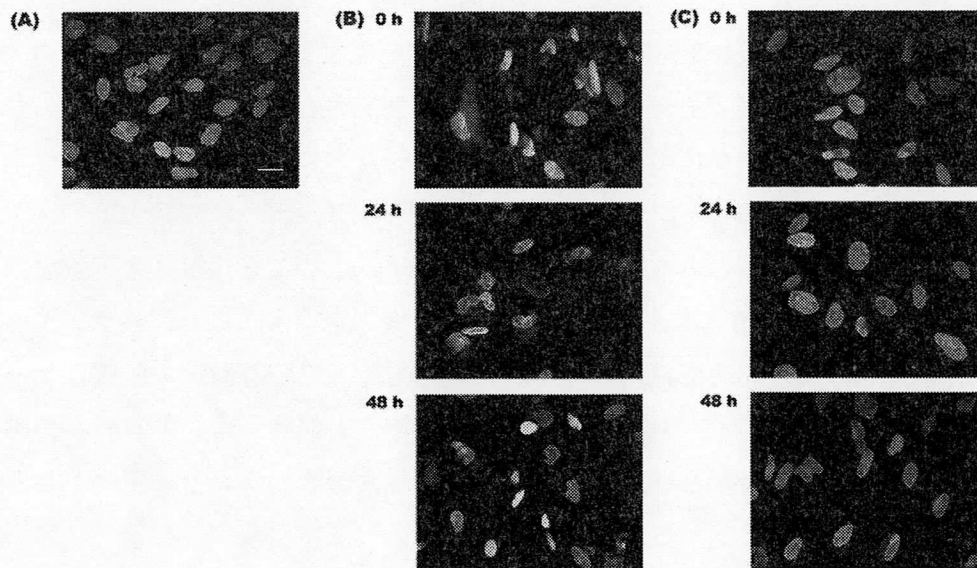


Fig. 14. Laser scanning microscopic images of human astrocytes treated with perfusates. Human astrocytes were incubated in normal growth medium for 24 h after exposure to saline solution or artificial cerebrospinal fluid for 1 h. The cells were fixed and then were stained with 12.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342. (A) control, (B) saline solution, (C) artificial cerebrospinal fluid. Bar, 20 μm .

考察

培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液に 30 分間暴露すると暴露直後に細胞生存率の著しい低下が見られた。暴露後に正常培地に交換して 48 時間まで培養を継続したが、細胞の増殖はほぼ完全に抑制されていた。人工脳脊髄液に暴露した場合にも、暴露直後に生理食塩液暴露と同様の細胞生存率低下が認められたが、正常培地に交換後 12 時間から 48 時間の培養で細胞の増殖が観察された。48 時間後には暴露直後の約 2 倍の細胞増殖を示し、コントロールとほぼ同等の増殖率であった。人工脳脊髄液暴露により生理食塩液暴露と同様の著明な細胞生存率低下が暴露直後に見られたにもかかわらず、正常培地に交換後はコントロールと同等の細胞増殖率を示していた。Cell Counting Kit-8 による細胞生存率の測定では、WST-8 がミトコンドリアの脱水素酵素で還元されて生じる WST-8 ホルマザン量を生存細胞の指標としていることから、人工脳脊髄液暴露で見られた暴露直後の細胞生存率低下は一時的なミトコンドリアの機能障害による可能性が考えられた。生理食塩液暴露による細胞障害がアポトーシスによるかどうかを明らかにするために、TUNEL 染色による DNA 断片化の検出を行ったところ、生理食塩液暴露を行った細胞で 24 時間正常培地で培養後に TUNEL 陽性細胞が認められ、アポトーシスの生化学的特徴である DNA 断片化が示された。また、形態学的検討により核の凝縮が観察された。これらの結果より、培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液暴露後、正常培地で培養を継続するとアポトーシ

ス様の細胞障害が起こることが示された。

培養ラットアストロサイトを Ca^{2+} -free 溶液に短時間暴露後、 Ca^{2+} を含む正常培地で再灌流すると Ca^{2+} パラドックス障害と呼ばれる細胞障害が誘発され [46,47,48,49]、この Ca^{2+} パラドックス障害には DNA 断片化や核凝縮等のアポトーシスの生化学的および形態学的特徴が伴うことが示されている [46]。また、培養液中からのグルコースの除去はアストロサイトに細胞障害を誘発させることも報告されている [50]。このことより、生理食塩液暴露でおこる培養ヒト正常アストロサイトのアポトーシス様細胞障害には Ca^{2+} パラドックス障害やグルコース飢餓の関与の可能性が考えられた。一方、人工脳脊髄液の暴露によっては TUNEL 染色による DNA 断片化は検出されず、核の形態も大部分がコントロール細胞と同様の正常な形態であったことから、人工脳脊髄液を生理食塩液の代わりに用いることでこの細胞障害が回避できることが示された。

小括

1. 新規プラスミン阻害薬 YO-2 はラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが明らかとなった。
2. YO-2 のアポトーシス誘発作用がプラスミン阻害作用と関連している可能性が考えられた。
3. YO-2 誘発胸腺細胞アポトーシスにはミトコンドリア機能障害の関与が示唆された。
4. 培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液に短時間暴露後、正常培地で 24 時間から 48 時間培養を継続すると、細胞生存率の低下ならびに細胞増殖の抑制が起こることが示された。
5. 生理食塩液暴露で起こる細胞障害にはアポトーシスの生化学的および形態学的特徴である DNA 断片化および核の凝縮が伴うことが明らかとなった。

第二章 アポトーシスとヒストンリン酸化

第一節 薬物誘発アポトーシスにおけるヒストンリン酸化

ラット胸腺細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害薬で処置するとアポトーシスが誘発され、この時 DNA 断片化に先立ってクロマチン構造を変化させると考えられるヒストン H4 のアセチル化亢進が起こることが報告されている [33]。本節では、もう 1 つの主要なヒストン化学修飾であるヒストンリン酸化の役割について、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬誘発アポトーシスを中心に検討を行った。

実験方法

細胞の培養 第一章第一節に記した方法で行った。

DNA 断片化率の測定 ラット胸腺細胞 (10×10^6 cells) をタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬であるカリキュリン A あるいはオカダ酸存在下で培養し、第一章第一節に記した方法で DNA 断片化率を測定した。

アガロースゲル電気泳動による DNA の分析 胸腺細胞 (10×10^6 cells) を 10 nM カリキュリン A あるいは 100 nM オカダ酸存在下で 6 時間培養後、巨大 DNA 断片 (約 50 kbp) の生成を確認した。細胞を PBS 50 μ l に懸濁し、あらかじめ暖めた PBS で溶解した 1% InCert agarose (FMC Bio Products, Rockland, Maine) を等量加えて 4°C、30 分間放置して固化させた。ゲル片を 0.5 M EDTA、1% sarcosyl および 0.5 mg/ml proteinase K を含む溶液中で 50°C、24 時間反応した後、1% FastLane agarose (FMC Bio Products, Rockland, Maine) でバイアス正弦電場ゲル電気泳動を行った [51]。また、ヌクレオソーム単位の DNA 断片化は、第一章第一節に記した方法で調べた。

核の形態学的観察 胸腺細胞 (10×10^6 cells) を 10 nM カリキュリン A あるいは 100 nM オカダ酸存在下で 8 時間培養後、第一章第一節に記した方法で核の形態を観察した。

細胞内総タンパク質リン酸化の検討 ラット胸腺細胞 (100×10^6 cells/ml) を phosphate-free RPMI 1640 中で [32 P]リン酸 (11.1 MBq/ml) で 1 時間標識後、細胞を洗浄した。標識後の細胞を各種薬物の存在下で 30 分から 4 時間培養した (10×10^6 cells/ml)。細胞 (40×10^6 cells) を細胞溶解液 (167 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% SDS, 2 mM 2-mercaptoethanol) で溶解し、細胞内総タンパク質とした。これを 12.5% SDS-PAGE で分析した (ゲルサイズ 8.5 cm \times 5.5 cm)。タンパク質の検出は CBB 染色により行った。さらに、バイオイメージング

アナライザー (BAS-1000, Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan) によるリン酸化タンパク質の検出を行った [51]。

ヒストンリン酸化の分析 前述のとおり、胸腺細胞を $[^{32}\text{P}]$ リン酸で標識後、各種薬物存在下で培養した。細胞 (40×10^6 cells) を緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 3% glycerol) で懸濁した後、等量の 0.2% Triton X-100 を含む同上緩衝液を加えて溶解した。細胞溶解液を緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1.5 mM MgCl_2 , 25% glycerol) に重層して $350 \times \text{g}$ 、10 分間遠心分離し、核分画を調製した。核から 0.4 N 硫酸でヒストン分画を抽出した。このヒストン分画を酢酸-尿素-Triton X-100 (AUT) ゲル電気泳動 [51] および SDS-PAGE と AUT ゲル電気泳動を組み合わせた二次元電気泳動で解析した (ゲルサイズはいずれも $8.5 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm}$)。SDS-PAGE の場合と同様に CBB 染色および BAS-1000 によるリン酸化タンパク質の検出を行った。

キャピラリー電気泳動による各種ヒストン含量の定量 細胞 (40×10^6 cells) からのヒストン分画の抽出は前述の方法により行い、ヒストン分画は等量の 0.4 N NaOH で中和し実験に用いた。各種ヒストン含量の定量には Quanta 4000E キャピラリー電気泳動装置 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) を用いた。試料を落差法により熔融石英キャピラリー (内径 $50 \mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$) 内に導入し、0.2 M ホウ酸ナトリウム (pH 9.3, 0.05 M SDS を含む) 中で $30 \mu\text{A}$ 定電流で泳動した。ピークは UV 検出器で 185 nm の吸収をオンキャピラリー検出した。データは Millennium 2010J Chromatography Manager (ver. 2.18) により解析した。

実験結果

ラット胸腺細胞において、カリキュリン A、オカダ酸は 6 時間処置により、それぞれ 3 nM および 100 nM でもっとも顕著な DNA 断片化作用を示した (Fig. 15A)。これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬による DNA 断片化は、カリキュリン A では 2 時間、オカダ酸では 4 時間のラグタイムの後、反応時間に依存して増加した。(Fig. 15B)。アポトーシスの生化学的特徴であるヌクレオソーム単位の DNA 断片化に先立って、DNA はまず約 200-300 kbp の DNA 断片に切断され、さらに切断されて約 50 kbp の DNA 断片が生成することが知られている [52]。DNA をバイアス正弦電場ゲル電気泳動により分析した結果、この約 50 kbp の DNA 断片の生成が見られた (Fig. 16A)。さらに、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬による DNA 断片化がヌクレオソーム単位であることが確認された (Fig. 16B)。形態学的検討により、これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬存在下で培養した細胞の大部分で核の凝縮が観察された (Fig. 17)。

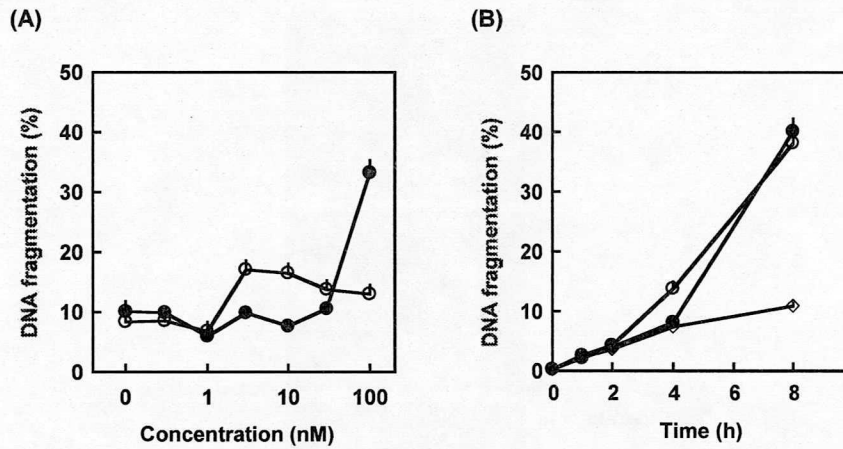


Fig. 15. The effects of calyculin A and okadaic acid on DNA fragmentation in rat thymocytes. (A) The cells were incubated with various concentrations of calyculin A or okadaic acid for 6 h. (B) The cells were treated with 10 nM calyculin A, 100 nM okadaic acid or without inhibitor for indicated times. After incubation, DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. \diamond , control; \circ , calyculin A-treated; \bullet , okadaic acid-treated.

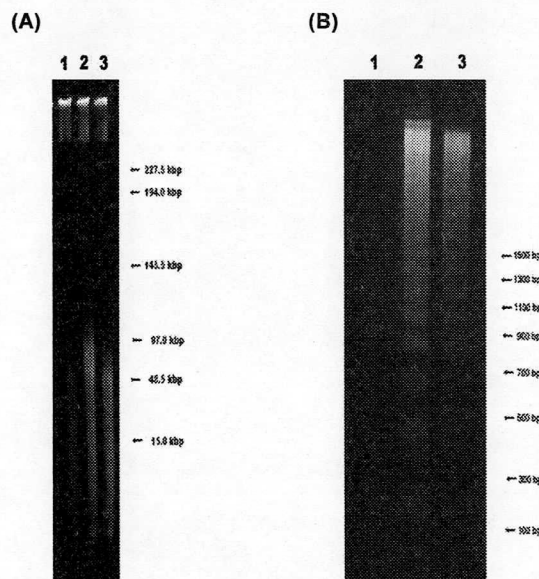


Fig. 16. Electrophoretic analyses of fragmented DNA from the thymocytes treated with protein phosphatase inhibitors. The cells were treated with 10 nM calyculin A or 100 nM okadaic acid for 6 h. (A) Biased sinusoidal field gel electrophoresis, (B) Conventional agarose gel electrophoresis. 1, control; 2, calyculin A-treated; 3, okadaic acid-treated.

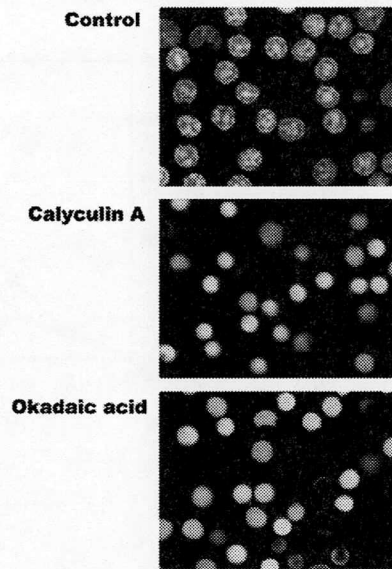


Fig. 17. Laser scanning microscopic images of thymocytes treated with protein phosphatase inhibitors. The thymocytes were treated with 10 nM calyculin A or 100 nM okadaic acid for 8 h. The cells were fixed and then were stained with 12.3 μ g/ml Hoechst 33342.

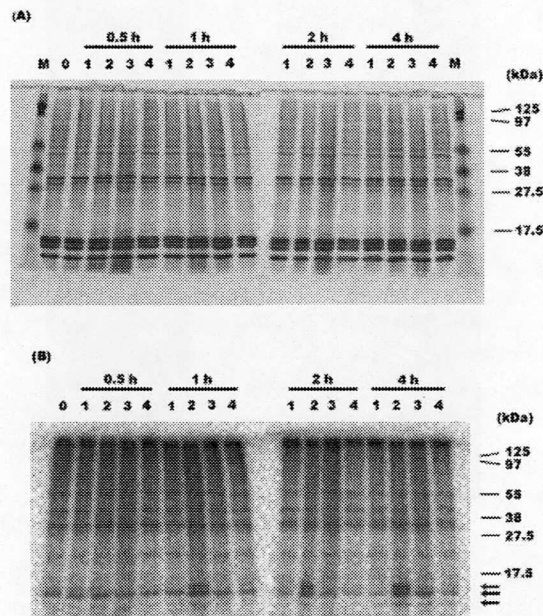


Fig. 18. Incorporation of [32 P]orthophosphate into proteins in the thymocytes treated with calyculin A, okadaic acid or dexamethasone. The cells were treated with 10 nM calyculin A, 100 nM okadaic acid or 0.1 μ M dexamethasone for indicated times. Proteins were analyzed by SDS-PAGE. (A) CBB staining, (B) BAS detected. 1, control; 2, calyculin A-treated; 3, okadaic acid-treated; 4, dexamethasone-treated. M, marker.

次に、カリキュリン A およびオカダ酸により誘発されるアポトーシスにおけるタンパク

質リン酸化について調べた。胸腺細胞を $[^{32}\text{P}]$ リン酸で1時間標識後、カリキュリン A あるいはオカダ酸存在下で30分から4時間培養した細胞から細胞内総タンパク質を抽出し、SDS-PAGEで分析した。カリキュリン A は30分間、オカダ酸は2時間処置後から約15 kDaのタンパク質(矢印)のリン酸化亢進が見られた(カリキュリン A は1時間で30%増、オカダ酸は4時間で20%増)(Fig. 18)。このタンパク質のリン酸化亢進はいずれも少なくとも4時間まで持続していた。ヒストンの SDS-PAGE では H1 を除く各ヒストン分子種がいずれも14-20 kDa の間に泳動される [53] ことから、この約15 kDa のリン酸化タンパク質はヒストンである可能性が考えられた。そこで、同様に処置した細胞の核からヒストン分画を抽出し、AUT ゲル電気泳動で解析した。

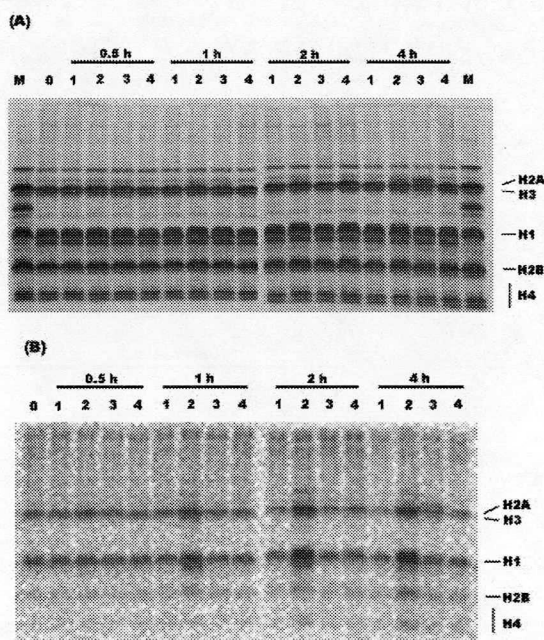


Fig. 19. Incorporation of $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate into histones in the thymocytes treated with calyculin A, okadaic acid or dexamethasone. The cells were treated with 10 nM calyculin A, 100 nM okadaic acid or 0.1 μM dexamethasone for indicated times. Histones were analyzed by AUT gel electrophoresis. (A) CBB staining, (B) BAS detected. 1, control; 2, calyculin A-treated; 3, okadaic acid-treated; 4, dexamethasone-treated. M, marker.

Table 2. The comparison of the time courses of DNA fragmentation and histone phosphorylation

Treatment	Increase of DNA fragmentation	Increase of histone phosphorylation
10 nM Calyculin A		
0.5 h	-	+
2 h	-	++
4 h	+	+++
100 nM Okadaic acid		
2 h	-	-
4 h	-	+
8 h	++	/

SDS-PAGE の分析結果と同じ時間経過でヒストン H2A/H3 および H1 のリン酸化亢進が認められた (カリキュリン A は 1 時間で 36% および 43% 増、オカダ酸は 4 時間で 56% および 11% 増) (Fig. 19B)。タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるヒストンリン酸化の亢進はアポトーシス実行過程である DNA 断片化に先立って起こることが判明した (Table 2)。また、AUT ゲル電気泳動の CBB 染色では、ヒストンに導入されたアセチル基の数に依存してバンドの移動度が小さくなる [33] が、カリキュリン A、オカダ酸あるいはデキサメタゾン (0.1 μ M) 処置はヒストン H4 群のバンドのパターンに影響を与えなかった。すなわち、これらの処置はいずれもヒストンアセチル化に影響を与えないことが示された (Fig. 19A)。AUT ゲル電気泳動の結果では H2A/H3 のどちらがリン酸化されているのか判明しなかったため、AUT ゲル電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動を行ったところ、著明なリン酸化亢進が見られたのは H2A であることが判明した (Fig. 20)。

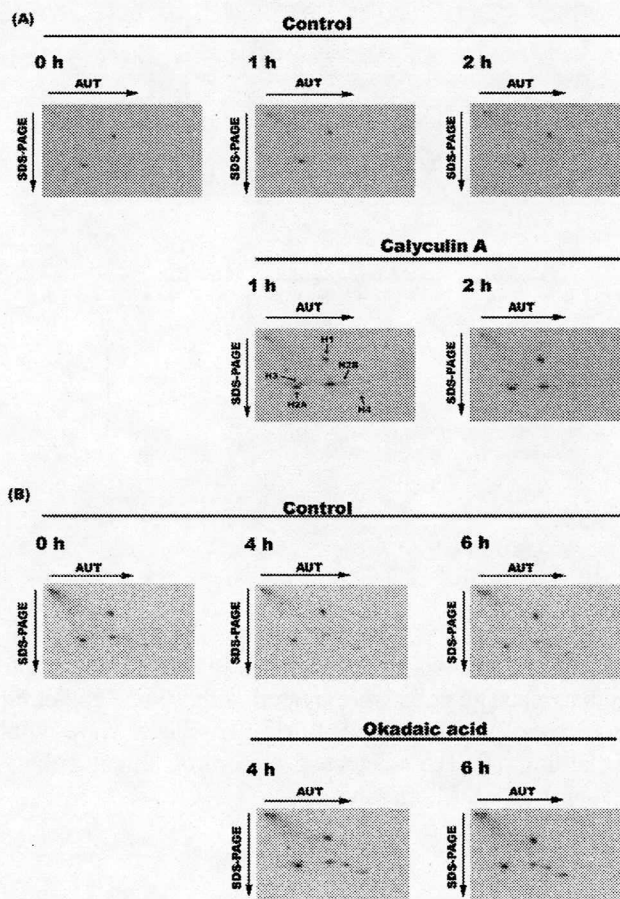


Fig. 20. Incorporation of [32 P]orthophosphate into histones in the thymocytes treated with protein phosphatase inhibitors. The cells were treated with 10 nM calyculin A or 100 nM okadaic acid for the indicated times. Histones were analyzed by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis and radioactivity was detected by BAS-1000. (A) calyculin A-treated, (B) okadaic acid-treated.

カリキュリン A 処置によるヒストン各分子種の量的変化についてキャピラリー電気泳動により検討した (Fig. 21)。しかしながら、カリキュリン A およびオカダ酸処置細胞のヒストン各分子種の含量はコントロールと比べて差が認められなかった (Fig. 22)。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるトリコスタチン A (10 nM) および酪酸 (5 mM) で処置した場合も同様にヒストン含量の変化は見られなかった (データ非表示)。

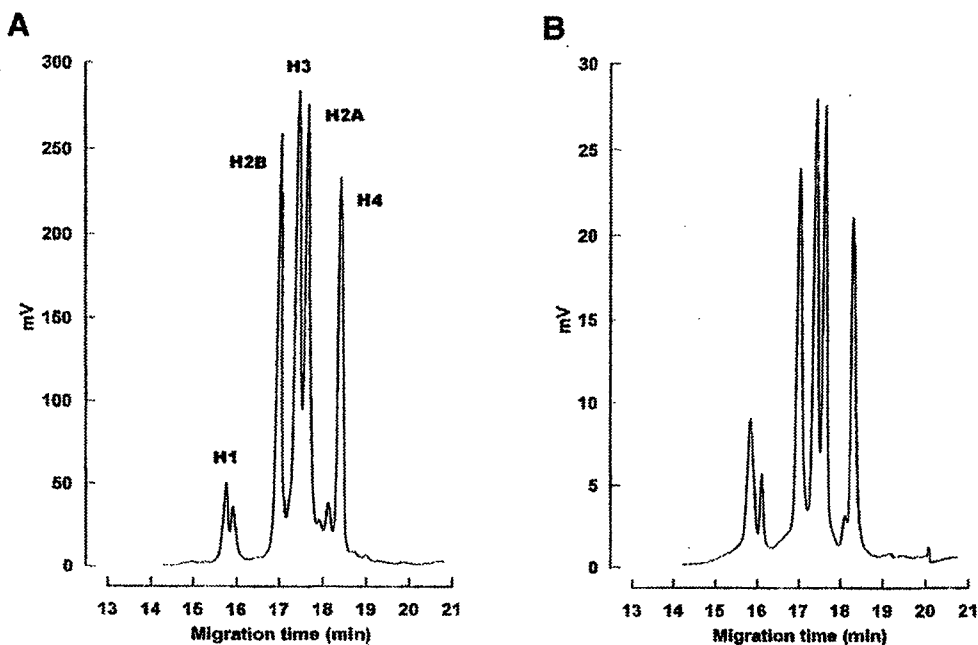


Fig. 21. Separation of molecular species of histone by HPCE. The extracts were prepared from the nuclei of rat thymocytes. The sample solutions were applied to HPCE by hydrostatic injection for 30 sec. (A) the authentic histone mixture containing H1, H2A, H2B, H3 and H4, (B) the nuclear extracts from rat thymocytes.

さらに、アポトーシスを誘発させるその他の薬物についてもヒストンリン酸化およびアセチル化に対する影響を検討した。トリコスタチン A および酪酸はヒストンアセチル化を亢進させたが (Fig. 23A)、ヒストンリン酸化には影響を与えなかった (Fig. 23B)。また、アポトーシスを誘発することが示されている抗ガン薬のエトポシド (10 μ M) (Fig. 23)、胸腺細胞に対するアポトーシス誘発作用がよく知られているデキサメタゾン (Fig. 19)、第一章第一節でアポトーシス誘発作用を示した YO-2 (30 μ M) (データ非表示) は、ヒストンリン酸化およびアセチル化のいずれに対しても影響を及ぼさなかった。

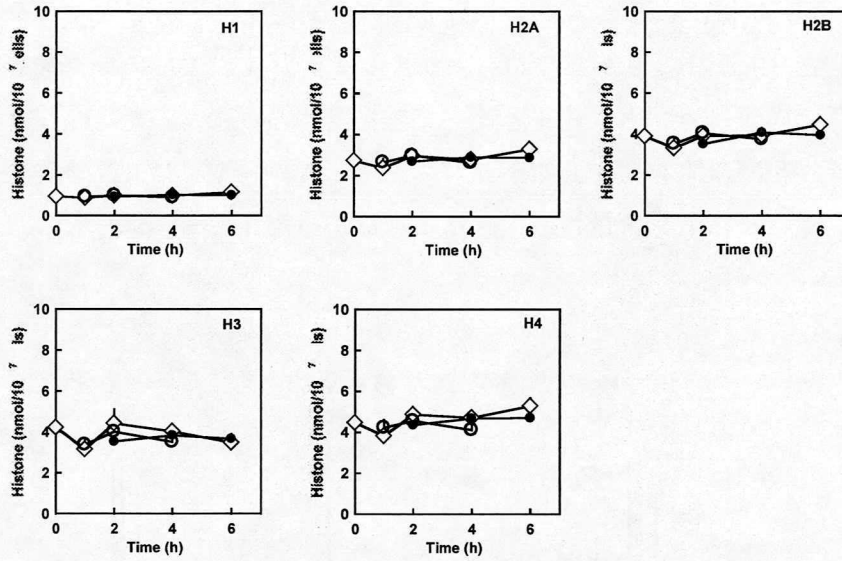


Fig. 22. The effects of calyculin A and okadaic acid on the level of histones. The nuclear extracts were prepared from the nuclei of rat thymocytes treated with 10 nM calyculin A or 100 nM okadaic acid. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. \diamond , control; \circ , calyculin A-treated; \bullet , okadaic acid-treated.

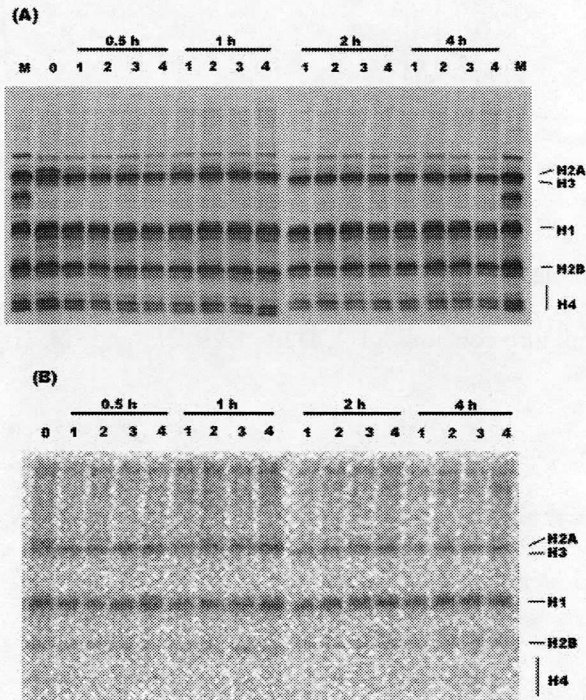


Fig. 23. Incorporation of $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate into histones in the thymocytes treated with trichostatin A, sodium butyrate or etoposide. The cells were treated with 10 nM trichostatin A, 5 mM sodium butyrate or 10 μM etoposide for indicated times. Histones were analyzed by AUT gel electrophoresis. (A) CBB staining, (B) BAS detected. 1, control; 2, trichostatin A-treated; 3, sodium butyrate-treated; 4, etoposide-treated. M, marker.

考察

ラット胸腺細胞をカリキュリン A またはオカダ酸存在下で培養すると、ラグタイムを経て反応時間に依存した DNA 断片化の増加が観察された。さらに、これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬は約 50 kbp の DNA 断片の生成およびヌクレオソーム単位の DNA 断片化を起こすことが示された。また、形態学的検討により凝縮した核が観察され、これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬はラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが明らかとなった。

このときのタンパク質リン酸化の変化について SDS-PAGE で分析を行ったところ、約 15 kDa のタンパク質の著明なリン酸化亢進が観察された。このリン酸化タンパク質がヒストンである可能性が考えられたので、ヒストン分画について AUT ゲル電気泳動および AUT ゲル電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動により分析した結果、カリキュリン A あるいはオカダ酸処置がヒストン H2A および H1 のリン酸化を亢進させることが明らかとなった。カリキュリン A およびオカダ酸処置によるヒストン H2A および H1 のリン酸化亢進はそれぞれ DNA 断片化のラグタイムである 30 分および 2 時間から起ころはじめ、少なくとも 4 時間まで持続していた。このように、トリコスタチン A や酪酸により誘発されるアポトーシスに先立ってヒストンアセチル化が亢進するのと同様に、カリキュリン A やオカダ酸によって起こるアポトーシスにヒストンリン酸化が先立って亢進することが示された。ヒストンリン酸化亢進の時間変化と DNA 断片化の時間変化は関連した挙動を示し、いずれもカリキュリン A 処置の方がオカダ酸処置に比べて先行していた。また、アポトーシスの誘発においてオカダ酸はカリキュリン A より高濃度を必要とした。カリキュリン A はタンパク質脱リン酸化酵素 (PP) 1 および PP2A を同程度に強力に阻害するのに対してオカダ酸は PP1 に対する作用が PP2A 阻害作用に比べて弱い [54] ことから、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるアポトーシスの誘発には PP1 の関与が考えられた。

ヒストンリン酸化は凝縮・弛緩といったクロマチン構造の調節に密接にかかわっていることが細胞周期 [28,29,30] や転写調節 [24,26,55] に関連した研究により明らかにされている。アポトーシスにおけるヒストンリン酸化に関しては、カビ毒の gliotoxin が胸腺細胞にアポトーシスを誘発させ、またこのアポトーシスに先立ってヒストン H3 の Ser-10 がリン酸化されることが Waring ら [56] によって報告されている。さらに、gliotoxin は cyclic AMP レベルの上昇と cyclic AMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (A キナーゼ) 活性化を誘発すること、A キナーゼの阻害薬が gliotoxin によるヒストン H3 リン酸化とアポトーシス誘発を抑制することが示されている [56]。また、Rogakou ら [57] および Talasz ら [58] は、ヒストン H2A サブファミリーの一つである H2A.X の Ser-139 リン酸化が Fas などによるアポトーシスにおいて DNA 断片化の開始に関与する可能性を示している。

以上の成績は、ヒストンリン酸化がヒストンアセチル化 [33] と同様にアポトーシス実行過程において重要な役割を担っている可能性を示唆している。

第二節 培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルにおけるヒストンリン酸化

第一章第二節において、培養ヒト正常アストロサイトに生理食塩液を短時間暴露後、正常培地に戻して培養を継続するとアポトーシス様細胞障害が起こることを示した (*in vitro* 細胞障害モデル)。また、第二章第一節において、いくつかの薬物により誘発されるアポトーシスにおいて、ヒストンリン酸化やアセチル化などのヒストン化学修飾がアポトーシスに先立って起こることを明らかにした。本節では、*in vitro* 細胞障害モデルにおけるヒストン化学修飾の変化について検討を行った。

実験方法

細胞の培養 第一章第二節に示した方法で行った。

生理食塩液および人工脳脊髄液の暴露 第一章第二節に示した方法で行った。

ヒストンリン酸化の分析 細胞を $[^{32}\text{P}]$ リン酸 (0.37 MBq/ml) で1時間標識後、生理食塩液あるいは人工脳脊髄液に30分間暴露した。暴露直後 (0時間) および暴露後1時間から6時間培養した細胞から第一章第一節に示した方法に準じて核を調製し、ヒストン分画を抽出した。得られたヒストン分画について AUT ゲル電気泳動を行い、ヒストンリン酸化の変化を解析した [51]。

N末端アミノ酸配列分析 ヒストン分画を AUT ゲル (13.5 cm×24 cm) で分離し、リン酸化の変化が認められたバンドを切り出した。ゲルを2回洗浄後、Tris-HCl (pH 8.0) 中で35°C、20時間トリプシン消化 (0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を行った。分解物は逆相 HPLC (2.0 mm×250 mm TSKgel ODS-80Ts QA, TOSOH Corporation, Tokyo, Japan) で分離した。溶出は 0-90%アセトニトリル (0.1%トリフルオロ酢酸を含む) のリニアグラジェントで行い (流速 0.2 ml/min)、ペプチドマップを作成した。HP G1005A (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, California) または ProCise 494cLC (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan) プロテインシーケンサーによりペプチドの N 末端アミノ酸配列を分析し、バンドのタンパク質を同定した。

実験結果

$[^{32}\text{P}]$ リン酸で標識した培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液に30分間暴露し、ヒストン化学修飾に対する影響について検討した。CBB 染色の結果より、生理食塩液、人工

脳脊髄液暴露はいずれもヒストンアセチル化に対して影響を与えないことが確認された (Fig. 24A)。一方、BAS-1000 によるリン酸化の検出において、生理食塩液の 30 分間暴露により暴露直後に著明なヒストン様タンパク質のリン酸化の変化が認められた。ヒストン H2A/H3 付近のバンドのうち P1 および P2 のリン酸化が亢進 (P1 リン酸化は 102%増、P2 リン酸化は 135%増) したのに対して P3 は脱リン酸化 (P3 リン酸化は 57%減) が観察された (Fig. 24B)。P1 および P2 リン酸化は生理食塩液暴露の直後にコントロールの約 2 倍に増加した。このリン酸化は培養時間とともに減少したが、いずれの培養時間においても P1 および P2 リン酸化はコントロールに比べて増加していた。人工脳脊髄液の暴露によっても同様のタンパク質リン酸化の変動が認められたが、その程度は生理食塩液の場合に比べて軽度で、正常培地に交換して 3 時間培養後にはコントロールと同程度のリン酸化を示した (Fig. 24B)。

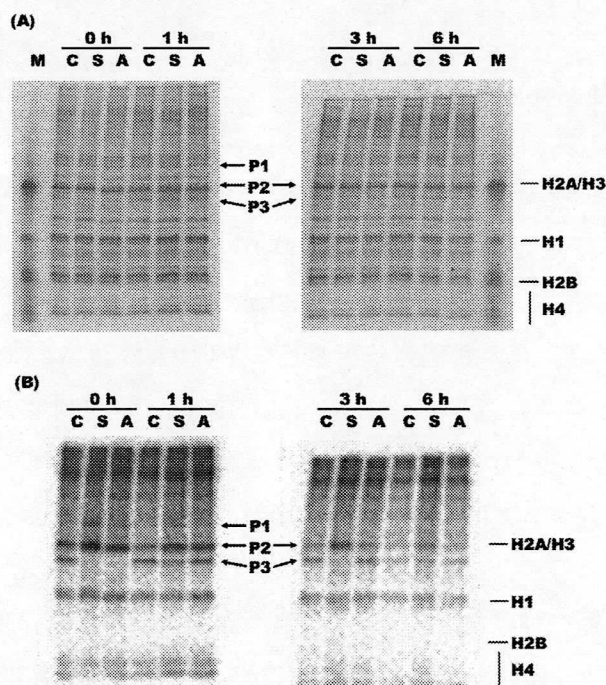


Fig. 24. Incorporation of [32 P]orthophosphate into histones in human astrocytes treated with saline solution or artificial cerebrospinal fluid. Human astrocytes were incubated in normal growth medium for the indicated times after exposure to saline or artificial cerebrospinal fluid for 0.5 h. Histones were analyzed by AUT gel electrophoresis. (A) CBB staining, (B) BAS detected. C, control; S, saline solution; A, artificial cerebrospinal fluid. M, marker.

生理食塩液暴露により P3 は暴露直後にコントロールの 1/2 以下のリン酸化レベルを示した。正常培地交換後 3 時間ではコントロールの約 2/3 のリン酸化レベルであったが、6 時間では逆にコントロールの約 1.5 倍のリン酸化レベルを示した。人工脳脊髄液の暴露によっても暴露直後には生理食塩液暴露と同様に P3 リン酸化レベルの減少がみられたが、暴露 1

時間後にはコントロールとほぼ同程度のリン酸化レベルに回復した。

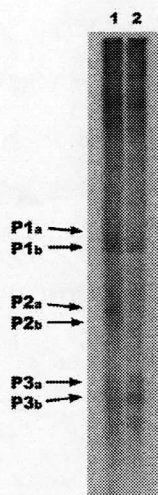
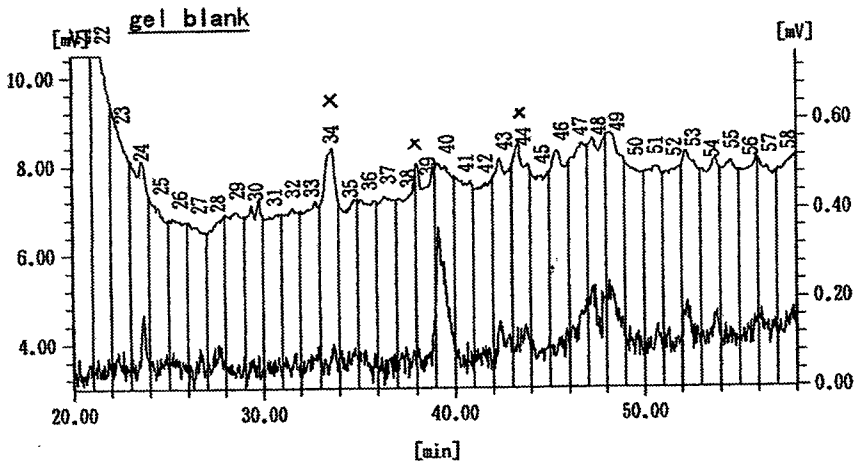
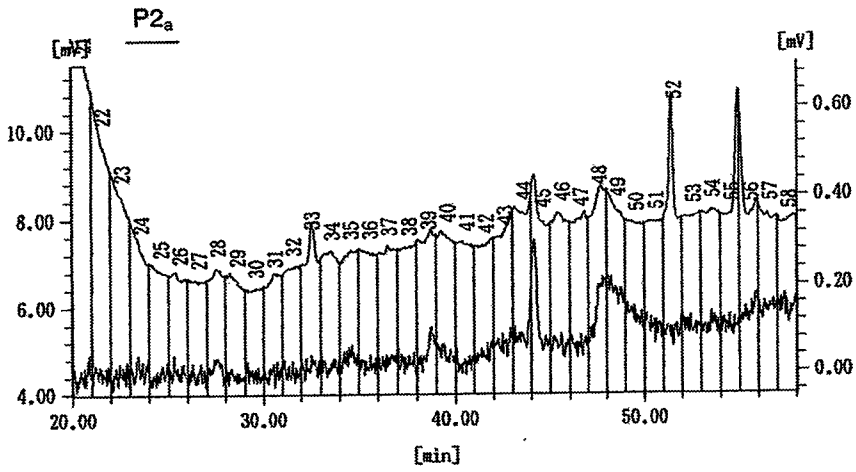
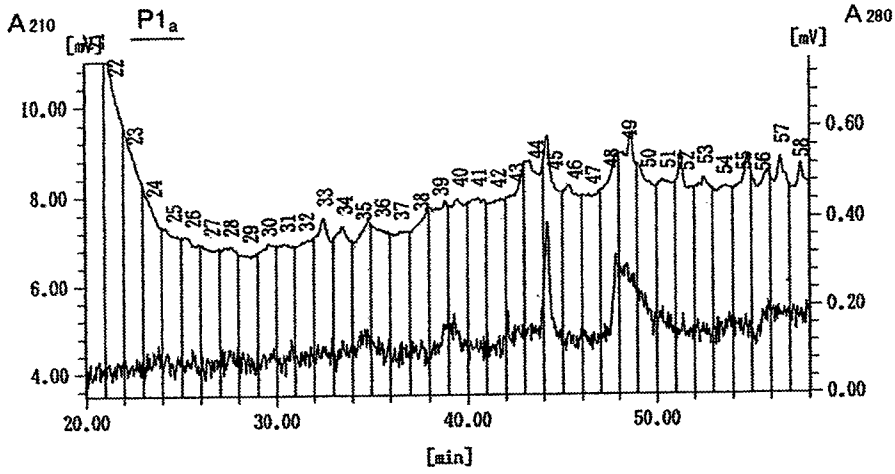


Fig. 25. Separation of phosphorylated histones prepared from nuclei of saline solution-treated cells using long AUT gels. 1, saline solution; 2, control.

これらのヒストン分画を long AUT ゲルで分離したところ P1、P2 および P3 はいずれも 2 つの成分に分離した (Fig. 25)。P1、P2 および P3 の各バンドをトリプシン消化して得られたペプチドを逆相 HPLC で分離してペプチドマップを作成した (Fig. 26)。さらに一部のペプチドについて N 末端アミノ酸配列分析を行い P1、P2 および P3 の同定を試みた。P2_a、P2_b、P3_a および P3_b より得られたペプチドの N 末端アミノ酸配列はいずれもヒストン H2A の内部配列に一致し、それぞれヒストン H2A サブタイプ的一种であることが示された (Table 3)。P1 のペプチドマップは P2 と非常に類似しており (Fig. 26)、P1_a および P1_b はヒストン H2A であることが推定された。さらに P1_a および P1_b に特徴的なペプチドについて N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、いずれもユビキチンの内部配列に一致しており、P1_a および P1_b はユビキチン化ヒストン H2A (uH2A) であることが判明した (Table 3)。

fr. 21~58



fr. 58~95

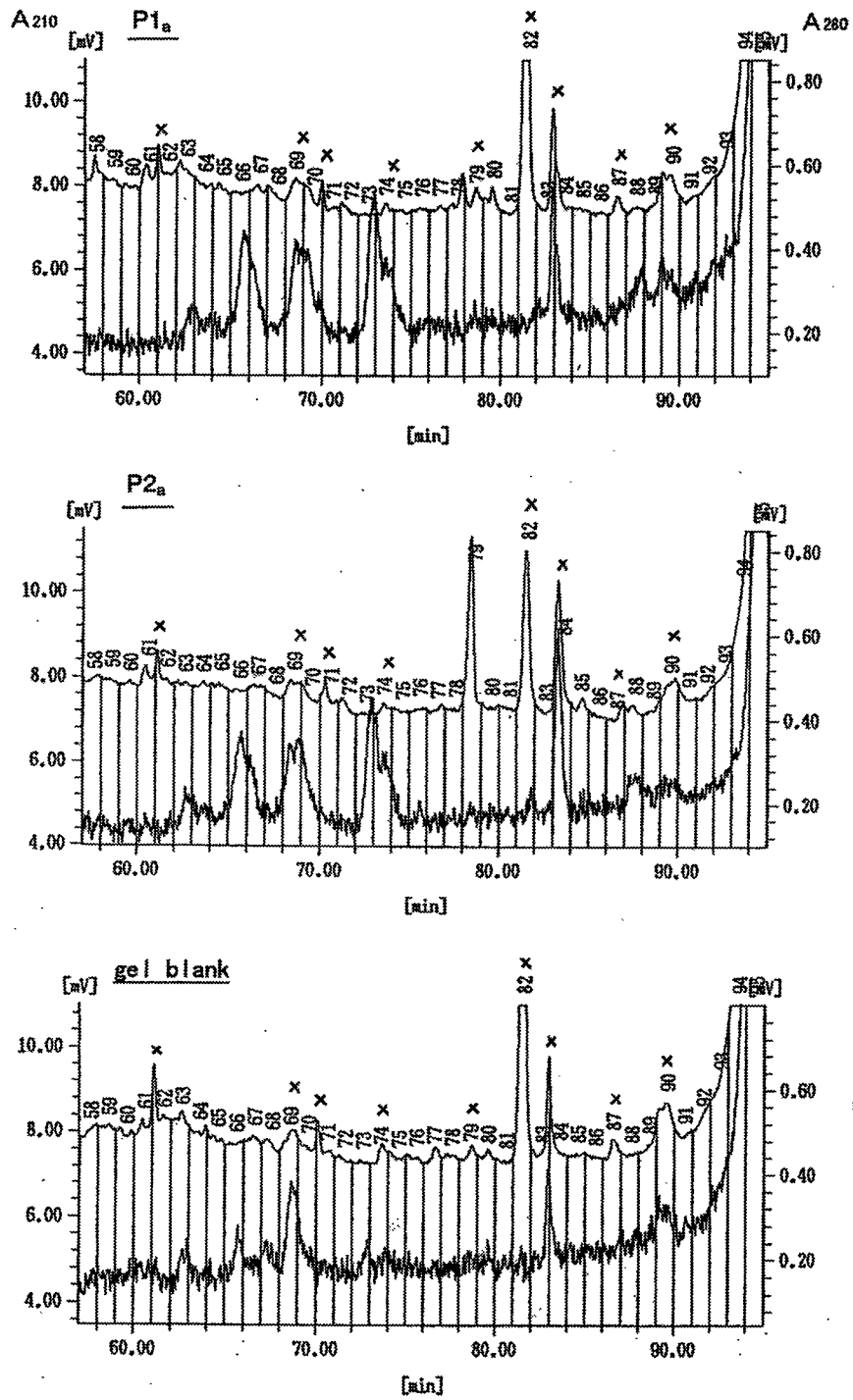


Fig. 26. HPLC profiles of polypeptide fragments of P1_a and P2_a after digestion with trypsin. Absorbance was measured at 210 and 280 nm.

Table 3. Peptide sequences derived from phosphorylated proteins.

Band	Peptide sequence	Comments
P1 _a *	iITLEVEPSDT	internal sequence of ubiquitin
P1 _b *	TITLEVEPSD	internal sequence of ubiquitin
P2 _a	VTIAQGGVLPNIQAVLL	internal sequence of histone H2A
P2 _b	VTIAQGGVLP	internal sequence of histone H2A
P3 _a	AGLQFPVGR	internal sequence of histone H2A
P3 _b	ATIAGGGVIP	internal sequence of histone H2A

* The peptide maps of P1 agreed with those of P2.

考察

培養ヒト正常アストロサイトのアポトーシス様細胞障害にヒストン化学修飾が関与しているか否かを検討した。ヒストンアセチル化は生理食塩液および人工脳脊髄液の暴露によってはほとんど変化が認められなかった。これに対して、生理食塩液暴露は暴露直後からヒストンリン酸化を著しく変動させた。N末端アミノ酸配列分析の結果、これらのヒストンがいずれも H2A であること、また、そのうちの一部は uH2A であることが明らかとなった。ヒストン H2A は進化上非常によく保存されているヒストン各分子種の中でも比較的サブタイプが多い分子種であり、ヒトでは H2A.1、H2A.2、H2A.M、H2A.X、H2A.Z の少なくとも 5 種類が確認されている [59]。また、ユビキチン化は H4 を除く各ヒストン分子種に見られる翻訳後修飾であるが、特に H2A および H2B でよく起こることが示されており、高等真核生物では 5-15% の H2A が uH2A として存在している [60]。ヒストンユビキチン化のクロマチン構造における役割は不明な点が多いが、ユビキチン化ヒストンと転写活性領域のクロマチンとの間には相関があることから、ヒストンユビキチン化がクロマチンの折りたたみに対して抑制的に機能するか、もしくはクロマチンの弛緩状態を維持するような作用を有する可能性が示唆されている [61]。生理食塩液暴露により、暴露直後に著明なリン酸化亢進が認められたヒストン (P1) は uH2A であったことから、このヒストン H2A はユビキチン化とリン酸化の 2 つの翻訳後修飾を同時に受けていることが判明した。ヒストンの翻訳後修飾にはリン酸化、アセチル化、ユビキチン化のほかにメチル化や ADP リボシル化が知られている [59]。これらの化学修飾は 1 種類のヒストン分子種に対して単独で起こるだけでなく、複数箇所または 2 種類以上の修飾が同時に起こることが報告されている [24,26,55,62]。Galasinski ら [59] は human erythroleukemia cell より酸抽出したヒストン分画の質量分析により、各ヒストン分子種が、非常に多様な修飾パターンで存在していることを示している。さらに、ヒストン H3 の Ser 10 リン酸化が転写制御に関連したヒストンアセチル化を促進する [63,64] ことなどが報告され、各種化学修飾が協同的に作用して、転写、複製、修復、細胞周期などの様々な細胞機能を調節している可能性が示されている [55,59,62]。uH2A リン酸化は生理食塩液の暴露直後でのみ著明な亢進が見られたことから、培養ヒト正常アストロサイトのアポトーシス様細胞障害の引き金の 1 つとして重

要であるのかもしれない。一方、人工脳脊髄液暴露によっても生理食塩液暴露と同様のヒストン H2A リン酸化の変動が観察されたが、その作用は軽度であった。生理食塩液暴露によるヒストン H2A (P2) のリン酸化亢進が少なくとも培養 6 時間まで持続していたのに対して、人工脳脊髄液暴露では培養 3 時間でほぼコントロールと同程度に回復していた。これらの結果より、ヒト正常アストロサイトのアポトーシス誘発にはアポトーシスに先立って起こる急激な uH2A リン酸化 (P1) の変動とその後の持続的な H2A リン酸化の亢進 (P2) が重要である可能性が考えられた。

虚血再灌流あるいは過酸化水素暴露により mitogen-activated protein (MAP) kinase (MAPK) のうち MAP/extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 kinase および stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) が活性化されることが示されている [65,66,67,68]。ERK および p38 kinase は *c-fos* や *c-jun* などの初発初期遺伝子の発現に関与してヒストン H3 をリン酸化することが報告されている [64]。また、death-associated protein (DAP) like kinase (Dlk)/Zipper interacting protein (ZIP) kinase はアポトーシスに関与することが示されている [69,70] が、本酵素はヒストン H2A、H3 および H4 を基質とし、クロマチン構造を変化させることにより転写・複製にかかわる因子群との相互作用を調節し、転写や複製を制御する可能性が示唆されている [71]。培養ヒト正常アストロサイトの生理食塩液暴露で誘発されるヒストンリン酸化の亢進にはこれらのタンパク質リン酸化酵素が関与しているのかもしれない。

タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるラット胸腺細胞のアポトーシスにおいてヒストン H2A および H1 のリン酸化亢進がアポトーシスに先立って起こることを第二章第一節で示したが、*in vitro* 細胞障害モデルと考えられるヒト正常アストロサイトのアポトーシスにおいてもヒストン H2A リン酸化の亢進が認められた。異なる細胞系や刺激によって誘発されるアポトーシスに先立ってヒストン H2A リン酸化の亢進が起こることが明らかとなり、アポトーシス実行過程においてヒストンリン酸化が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

小括

1. タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬であるカリキュリン A およびオカダ酸はラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発することが示された。
2. これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるアポトーシスに先立ってヒストン H2A および H1 のリン酸化亢進が起こることが明らかとなった。
3. これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬の処置はヒストン各分子種の含量を変化さ

せなかった。

4. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の処置はヒストンリン酸化に影響を及ぼさず、また、抗ガン薬 (エトポシド)、グルココルチコイド (デキサメタゾン) および YO-2 はヒストンリン酸化およびアセチル化をいずれも変化させなかった。
5. 培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルのアポトーシスにおいて、ヒストン H2A リン酸化の亢進が先立って起こることが明らかとなった。

第三章 アポトーシス誘発とクロマチンの DNA 分解酵素感受性

第二章において、一部のアポトーシスに先立ってヒストン H2A リン酸化が亢進することを示した。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬で誘発されるアポトーシスにおいて、DNA 断片化に先立ってヒストン H4 のアセチル化亢進が起こることが Lee ら [33] により報告されている。一方、ヒストン化学修飾の役割については転写制御や細胞周期に関連して詳細に研究されており、ヒストン化学修飾がクロマチン構造に影響を与え、これらの細胞機能を調節することが示されている [20,25,30]。そこで本章では、アポトーシスにおいて DNA 断片化や核の凝縮に先立って起こるヒストン化学修飾が、クロマチンの DNA 分解酵素感受性に影響を及ぼすか否かを検討した。

実験方法

細胞の培養 第一章第一節に示した方法で行った。

単離核における DNA 断片化 ラット胸腺細胞 (40×10^6 cells) を各種薬物存在下で培養後、核を調製した。クロマチンの内在性 DNA 分解酵素に対する感受性は、単離した核を 40 μ l の DNA 断片化用緩衝液 (15 mM Tris-HCl (pH 7.4), 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.15 mM 2-mercaptoethanol, 0.34 M sucrose, 10 mM sodium hydrogensulfite) 中で 30 分から 2 時間反応後、反応液を 10,000 \times g、20 分間遠心分離し、上清および沈殿の DNA 量をそれぞれ PicoGreen (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) を用いて測定することで検討した。核の反応による DNA 断片化は総 DNA 量 (上清 DNA 量+沈殿 DNA 量) に対する断片化 DNA 量 (上清 DNA 量) の割合 (%) で表示した。

DNA 断片化率の測定 ラット胸腺細胞をデキサメタゾン単独またはグルココルチコイドレセプターアンタゴニストであるミフェプリストン (10 μ M) 共存下で 4 時間培養し、第一章第一節に示した方法で DNA 断片化率を測定した。

カスパーゼ-3 活性の測定 ラット胸腺細胞を 0.1 μ M デキサメタゾン単独または 10 μ M ミフェプリストン共存下で 2 時間培養し、第一章第一節に示した方法でカスパーゼ-3 様活性を測定した。

実験結果

タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬で誘発される胸腺細胞アポトーシスにおいて、クロマ

チンの DNA 分解酵素感受性が変化するかどうかを調べた。5 nM カリキュリン A 存在下または非存在下で 1 時間から 4 時間培養した細胞から核を調製し、クロマチンの内在性 DNA 分解酵素に対する感受性を評価した。本化合物存在下で 2 時間培養した細胞の核を緩衝液中で 1 時間反応したとき、DNA 断片化がコントロールに比べて亢進しており、この核の DNA 断片化は細胞の培養時間に依存して増加した (Fig. 27)。この内在性 DNA 分解酵素による DNA 断片化はヌクレオソーム単位であることが確認された (Fig. 28)。

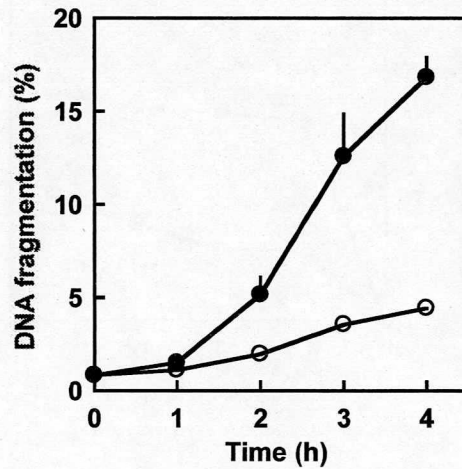


Fig. 27. The effect of histone phosphorylation on endogenous DNase sensitivity. Thymocytes were incubated in the presence or absence of 5 nM calyculin A for 1, 2, 3 and 4 h. After the treatment with calyculin A, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the DNA fragmentation buffer for 1 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. \circ , control; \bullet , calyculin A-treated.

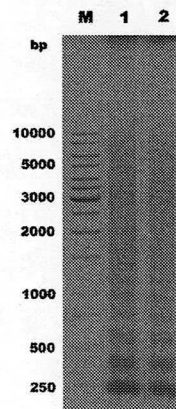


Fig. 28. Electrophoretic analysis of soluble chromatin from the thymocytes treated with calyculin A. Thymocytes were treated with or without 5 nM calyculin A for 2 h, and nuclei were prepared. The soluble chromatin was obtained from the nuclei incubated in the DNA fragmentation buffer for 1 h. Agarose gel electrophoresis of the soluble chromatin (60 ng DNA/well) prepared from control (lane 1) and calyculin A-treated (lane 2) thymocytes. M, DNA size marker.

カリキュリン A 存在下で 4 時間培養した細胞核を用いて、核の DNA 断片化に対する緩衝

液中での反応時間について検討を行った。コントロール細胞の核では緩衝液中での反応時間に依存して核の DNA 断片化が緩やかに増加し、2 時間の反応では 30 分間反応したときの約 2 倍の DNA 断片化率を示した。一方、カリキュリン A 処置細胞核では核の DNA 断片化は 30 分間の反応でほぼ平衡状態となり、2 時間までほとんど増加が見られなかった (Fig. 29)。

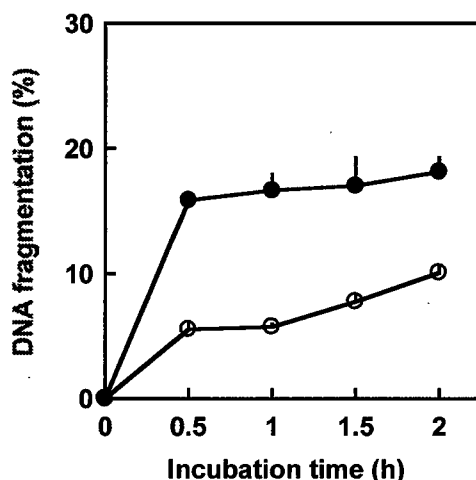


Fig. 29. The effect of incubation time on nuclear DNA fragmentation. Thymocytes were incubated in the presence or absence of 5 nM calyculin A for 4 h. After the treatment with calyculin A, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the DNA fragmentation buffer for 0.5, 1, 1.5 and 2 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 8 separate experiments. \circ , control; \bullet , calyculin A-treated.

本系での DNA 断片化に対する既知 DNA 分解酵素阻害薬の作用について検討した。0.1 mM アウリントリカルボン酸 [72] または 1 mM Zn^{2+} [73] を含む緩衝液で核を 1 時間反応し、DNA 断片化率を測定した。コントロール細胞核およびカリキュリン A 処置細胞核の DNA 断片化はいずれも Zn^{2+} によりほぼ完全に抑制されたが、アウリントリカルボン酸はいずれの DNA 断片化に対しても影響を及ぼさなかった (Fig. 30)。

他のヒストン化学修飾であるヒストンアセチル化について、クロマチンの内在性 DNA 分解酵素感受性に対する影響を調べた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるトリコスタチン A および酪酸はラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが示されている。10 nM トリコスタチン A または 5 mM 酪酸存在下で 3 時間培養した細胞から得た核を緩衝液中で 1 時間反応すると、DNA 断片化の亢進が認められた (Fig. 31)。

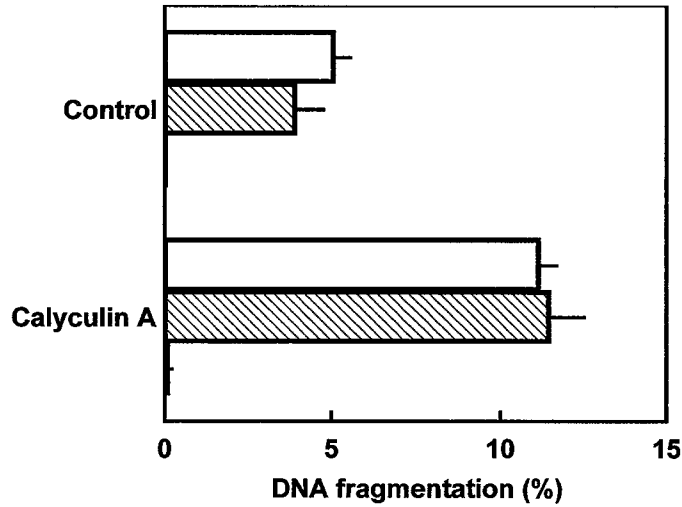


Fig. 30. The effect of DNase inhibitors on nuclear DNA fragmentation. Thymocytes were incubated in the presence or absence of 5 nM calyculin A for 4 h. After the treatment with calyculin A, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the DNA fragmentation buffer with or without DNase inhibitors for 1 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. Open columns, without DNase inhibitor; hatched columns, with 0.1 mM aurintricarboxylic acid; solid columns, with 1 mM Zn²⁺.

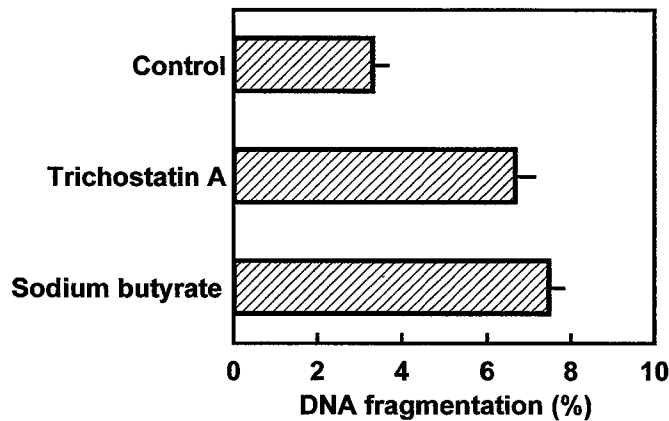


Fig. 31. The effect of histone acetylation on endogenous DNase sensitivity. Thymocytes were incubated in the presence or absence of 10 nM trichostatin A or 5 mM sodium butyrate for 3 h. After the treatment with the inhibitors, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the DNA fragmentation buffer for 1 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments.

他の薬物によるアポトーシスにおいても、内在性 DNA 分解酵素に対するクロマチンの感受性変化について検討した。30 μ M YO-2 存在下または非存在下で 1 時間から 4 時間培養した細胞から核を調製し、核の DNA 断片化率を測定した。YO-2 存在下で 2 時間培養した細胞の核を緩衝液中で 1 時間反応すると、DNA 断片化の亢進が観察された (Fig. 32)。

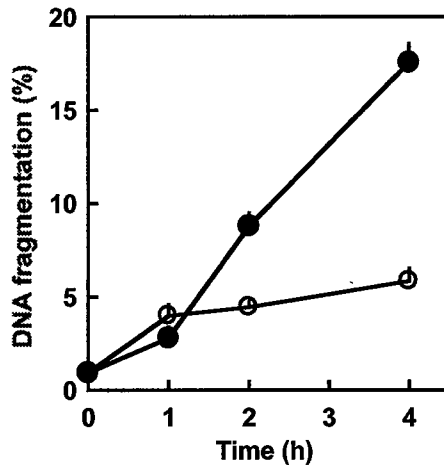


Fig. 32. The effect of YO-2 on endogenous DNase sensitivity. Thymocytes were incubated in the presence or absence of 30 μ M YO-2 for 1, 2 and 4 h. After the treatment with YO-2, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the DNA fragmentation buffer for 1 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments. ○, control; ●, YO-2-treated.

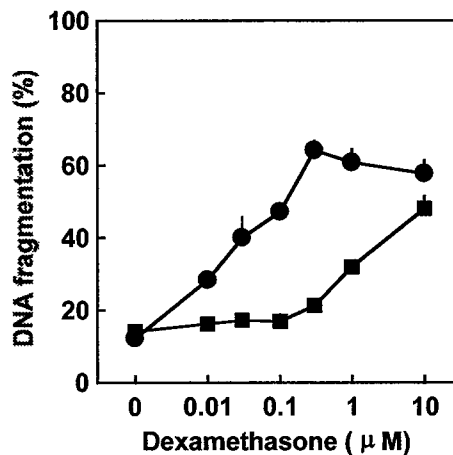


Fig. 33. The effect of the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone on dexamethasone-induced DNA fragmentation in rat thymocytes. The cells were incubated with various concentrations of dexamethasone in the presence (■) or absence (●) of 10 μ M mifepristone for 6 h. After the incubation, DNA fragmentation was determined. Values are means \pm SEM of 4 separate experiments.

さらに、デキサメタゾン誘発アポトーシスについても検討を加えた。ラット胸腺細胞を 0.1 μ M デキサメタゾン存在下で 4 時間培養すると、デキサメタゾンの濃度に依存して DNA 断片化が増加し、グルココルチコイドレセプターアンタゴニストであるミフェプリストン (10 μ M) はこの DNA 断片化を抑制した (Fig. 33)。また、ミフェプリストンはデキサメタゾンによるカスパーゼ-3 様活性の上昇を抑制することが確認された (Fig. 34)。

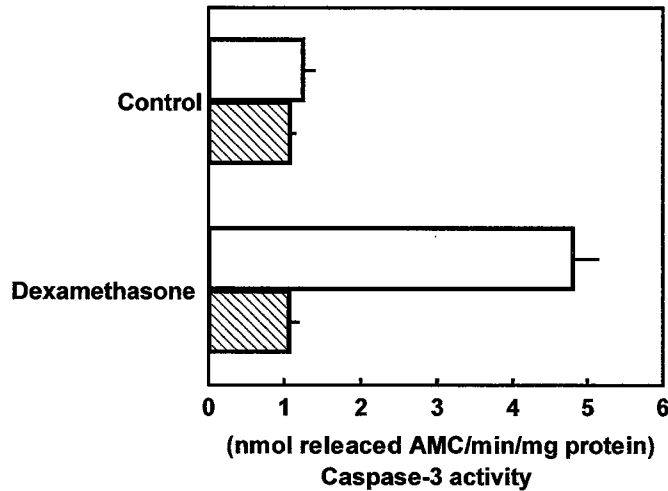


Fig. 34. The effect of mifepristone on dexamethasone-induced caspase-3 activation. The cells were treated with 0.1 μ M dexamethasone in the presence or absence of 10 μ M mifepristone for 2 h. Then, the extracts from the cells were prepared. The resulting extracts were used as the enzyme preparations. The activity of caspase-3 was determined using the substrate Ac-DEVD-MCA. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. Open columns, without mifepristone; hatched columns, with mifepristone.

クロマチンの内在性 DNA 分解酵素感受性に対するデキサメタゾンの影響についても調べた。デキサメタゾンで2時間処置した細胞の核を緩衝液中で1時間反応したとき、コントロール細胞に比べて核のDNA断片化が亢進していた (Fig. 35A)。また、ミフェプリストンはデキサメタゾンによるDNA分解酵素感受性の亢進を抑制した (Fig. 35B)。

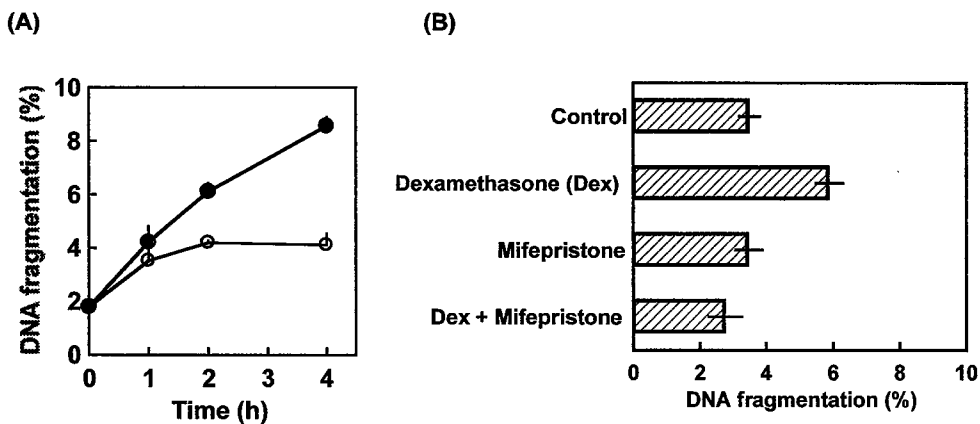


Fig. 35. DNA fragmentation in the nuclei from thymocytes treated with dexamethasone. Thymocytes were incubated in the presence (●) or absence (○) of 0.1 μ M dexamethasone for indicated times (A). Thymocytes were incubated with 0.1 mM dexamethasone in the presence or absence of 10 μ M mifepristone for 2 h (B). After the treatment with the compounds, the nuclear fractions were prepared. The resulting nuclei were incubated in the buffer solution for 1 h, and then DNA in the soluble fraction and pellet were determined using PicoGreen. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments.

考察

胸腺細胞においては核に存在する DNA 分解酵素がアポトーシスにおけるヌクレオソーム単位の DNA 断片化を触媒していることが報告されている [73,74]。本実験では、カリキュリン A 処置により内在性 DNA 分解活性が増加していることを示した。核の緩衝液との反応による DNA 断片化はコントロールおよびカリキュリン A 処置のいずれにおいても DNA 分解酵素阻害作用が知られている Zn^{2+} により抑制されたことから、核の DNA 断片化は核内に存在する DNA 分解酵素が触媒していることが示唆された。アウリントリカルボン酸は非特異的な DNA 分解酵素の阻害薬であるが、酵素の種類により感受性が異なる [75] ことから、今回実験に使用した濃度では DNA 断片化が抑制されなかった可能性が考えられた。カリキュリン A によるヒストンリン酸化は 30 分処置後からコントロールに比べて増加しはじめ、1 時間処置後には著しいリン酸化亢進が起ることを第二章第一節で示した。一方、カリキュリン A 処置細胞の核の DNA 断片化は 1 時間のラグタイムを経て、2 時間後から増加していたことからクロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性亢進にはヒストンリン酸化が関与している可能性が考えられた。Gliotoxin はヒストン H3 のリン酸化を亢進させて胸腺細胞にアポトーシスを誘発するが、本化合物はクロマチンに対する DNA 分解酵素の感受性を亢進させることが報告されている [56]。また、ヒストンアセチル化はクロマチン構造を弛緩させるが、高アセチル化されたヌクレオソームコアで再構成されたクロマチンはコントロールに比べて DNase I 感受性が増加しており、クロマチンの存在状態により DNA 分解酵素の感受性が変化することが示されている [76]。Lee ら [33] はヒストン脱アセチル化酵素阻害薬がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発し、本アポトーシスに先立ってヒストン H4 アセチル化が亢進することを報告しているが、トリコスタチン A や酪酸処置によりクロマチンの DNA 分解酵素感受性が亢進することが明らかとなった。これらのことより、アポトーシスにおけるクロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性の亢進には、ヒストンリン酸化やアセチル化に起因するクロマチン構造変化が関与している可能性が考えられた。

クロマチンの DNA 分解酵素感受性は、YO-2 およびデキサメタゾン誘発アポトーシスにおいてもカリキュリン A 誘発アポトーシスの場合と同様に亢進していた。これらのアポトーシス刺激は第二章第一節に示したように、ヒストンリン酸化やアセチル化には影響を与えないことから、DNA 分解活性はこれ以外のヒストン化学修飾や high mobility group (HMG) proteins [77] などの非ヒストンタンパク質などによって調節されている可能性が推察される。また、ミフェプリストンはデキサメタゾンによるカスパーゼ-3 様活性上昇および DNA 分解酵素に対するクロマチンの感受性亢進の両方の過程を抑制したことから、アポトーシス実行過程である DNA 断片化には、触媒する DNA 分解酵素の活性化とともに基質であるクロマチンの本酵素に対する感受性変化が関与するものと思われた。

これらの結果は、クロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化が、種々の刺激で誘発されるアポトーシス実行において、重要な過程の1つである可能性を示唆する。

小括

1. カリキュリン A 処置細胞の核を緩衝液中で反応させると、カリキュリン A の処置時間に依存して内在性 DNA 分解酵素による DNA 断片化の亢進が見られた。なお、カリキュリン A による核の DNA 断片化は DNA 分解酵素阻害作用をもつ Zn^{2+} により抑制されることが示された。
2. トリコスタチン A または酪酸で処置した細胞の核において、内在性 DNA 分解酵素による DNA 断片化が亢進することが示された。
3. YO-2 処置細胞から得た核において、内在性 DNA 分解酵素による DNA 断片化の亢進が示された。
4. グルココルチコイドレセプターアンタゴニストであるミフェプリストンがデキサメタゾンによる DNA 断片化およびカスパーゼ-3 様活性の上昇を抑制することを示した。
5. デキサメタゾン処置細胞の核において、内在性 DNA 分解酵素による DNA 断片化亢進が見られ、この DNA 断片化はミフェプリストンにより抑制されることが明らかとなった。

総 括

本研究はアポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割を解明することを目的として、種々の刺激で誘発されるアポトーシスにおけるヒストン化学修飾ならびにクロマチンの DNA 分解酵素感受性について検討したものである。

まず、新しいアポトーシス誘発剤の開発を目指し、新規プラスミン阻害薬 YO-2 がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることを生化学的および形態学的検討により明らかにした。種々の YO 化合物を用いた検討により、詳細は不明であるが、本アポトーシスにプラスミン阻害作用が少なくとも一部関連している可能性が示された。また、YO-2 による胸腺細胞アポトーシスにはミトコンドリア機能障害が関与していることが示唆された。

薬物誘発アポトーシスとは異なるモデルとして、培養ヒト正常アストロサイトの *in vitro* 細胞障害モデルについて検討を行った。培養ヒト正常アストロサイトを短時間生理食塩液に暴露した後、正常培地に戻して培養を継続するとアポトーシスの生化学的および形態学的特徴である DNA 断片化および核の凝縮が検出され、本モデルがアポトーシス様細胞障害であることを示した。また、本細胞障害に先立ってヒストン H2A リン酸化亢進が起こることを明らかにした。

アポトーシスにおけるヒストンリン酸化の役割を明らかにするために、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬を用いた検討を行った。カリキュリン A およびオカダ酸がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることを生化学的および形態学的検討により明らかにした。このときのタンパク質リン酸化の変化を SDS-PAGE および AUT ゲル電気泳動により分析し、アポトーシスに先立ってヒストン H2A および H1 のリン酸化が亢進していることを明らかにした。タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるヒストンリン酸化の変化はいずれも DNA 断片化および核の凝縮より早い段階での反応であり、カスパーゼカスケードなど既知のアポトーシスシグナルの途中や下流に位置する反応ではなく、これらのシグナルと平行して実行されることが示唆された。

ヒストンリン酸化などのヒストン化学修飾はクロマチン構造を変化させる一因であるので、アポトーシス誘発におけるクロマチン構造変化の関与について検討を行った。カリキュリン A 存在下で培養した細胞から単離した核を緩衝液中で反応すると DNA 断片化の増加が見られ、クロマチンの内在性 DNA 分解酵素に対する感受性亢進が示唆された。また、ヒストンアセチル化を亢進させるトリコスタチン A および酪酸誘発アポトーシスにおいても DNA 分解酵素感受性が増大することが示された。これらの結果はヒストンリン酸化やアセチル化などのヒストン化学修飾がアポトーシス実行において、クロマチンの DNA 分解酵素感受性を調節する可能性を示唆するものと考えられた。

また、クロマチンの内在性 DNA 分解酵素に対する感受性変化は YO-2 およびデキサメタ

ゾン誘発アポトーシスにおいても認められ、アポトーシス実行の一過程として重要である可能性が示唆された。

本研究では、種々の刺激で起こるアポトーシスにおいて、クロマチンの DNA 分解酵素感受性が亢進することを明らかにした。ヒストンリン酸化やアセチル化などのヒストン化学修飾は、アポトーシス実行過程において、クロマチンの本酵素感受性を調節する機構の 1 つとして機能する可能性を示した。すなわち、ヒストン化学修飾は DNA 分解酵素の活性とともにアポトーシス実行過程において機能的役割を有するものと考えられる。一方でヒストンリン酸化やアセチル化に影響を及ぼさないデキサメタゾンや YO-2 により誘発されるアポトーシスにおいても、同様にクロマチンの DNA 分解酵素感受性変化が見られ、クロマチンの本酵素感受性を調節する機構として、ヒストンリン酸化やアセチル化以外の別の機構が存在する可能性が推察された。

アポトーシス実行に関してはカスパーゼカスケードなどそのシグナル伝達系の詳細や制御分子の存在がすでに明らかにされている。DNA 断片化を触媒する DNA 分解酵素としては、カスパーゼカスケードの下流にある CAD がよく知られているが、クロマチンの DNA 分解酵素感受性がアポトーシス実行メカニズムに関与している可能性を示した点が本研究の特徴である。アポトーシスにおけるクロマチンの本酵素感受性を調節する機構の一つとしてヒストンリン酸化やアセチル化などのヒストン化学修飾が関与していることを示したが、ヒストンリン酸化やアセチル化を伴わないアポトーシスにおける DNA 分解酵素感受性の制御機構については詳細は不明で、今後の検討課題である。

結 論

アポトーシス実行過程の主役は DNA 分解酵素であるが、本研究では DNA 分解酵素の基質となる DNA の方に着目し、まず、新規プラスミン阻害薬 YO-2 並びにアストロサイト病態モデルのアポトーシス作用を明らかにし、これら並びにタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬のアポトーシスにおけるヒストンリン酸化について、さらにクロマチンの内在性 DNA 分解酵素感受性について検討し以下の結論を得た。

1. 新規プラスミン阻害薬 YO-2 がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることを明らかにした。またこの作用はプラスミン阻害作用と関連している可能性を示した。
2. 培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液に暴露しその後再灌流すると、アポトーシスが誘発されることを明らかにした。
3. タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬 (カリキュリン A、オカダ酸) によりラット胸腺細胞にアポトーシスが誘発されることを示した。
4. タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるアポトーシスにおいて、DNA 断片化に先立ってヒストン H2A、H1 のリン酸化の亢進が見られた。培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルでのアポトーシスにおいても、核の凝縮に先立ってヒストン H2A リン酸化の亢進が起こることを明らかにした。
5. 種々のアポトーシス誘発 (YO-2、デキサメタゾン、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬) において、クロマチンの内在性 DNA 分解酵素に対する感受性が亢進していることを示した。

以上、新規アポトーシス誘発化合物である YO-2、グルココルチコイドおよびタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬はラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させるが、これらのアポトーシス誘発にはいずれもクロマチンの DNA 分解活性の亢進が伴っていた。このことはアポトーシス刺激の種類に関わらず、アポトーシス実行においてクロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化が関与することを示唆するものと考えられた。また、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬や培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルなどの一部のアポトーシスにおいては、アポトーシス実行過程である DNA 断片化に先立ってヒストンリン酸化の亢進が認められたことから、クロマチンの DNA 分解酵素感受性の変化にはヒストンリン酸化などのヒストン化学修飾が関与している可能性が考えられた。

このように、アポトーシス実行において、カスパーゼカスケードを介した CAD などの DNA 分解酵素活性化と平行して、クロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化が関わっている可能性が示された。また、このクロマチンの本酵素感受性を調節する機構の 1 つとしてヒストン化学修飾の関与が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始ご親切なるご指導とご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科、松田敏夫教授に心より厚く御礼申し上げます。また、本研究の機会を与えられ、様々なご助言ならびにご指導を頂きました、神戸学院大学薬学部、李 英培助教授に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援ならびにご指導を賜りました、大塚製薬工場栄養研究所、内藤真策研究所長、西村益浩博士に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、貴重な YO 化合物をご提供くださいました、神戸学院大学薬学部、岡田芳男教授、津田裕子助教授に深く感謝いたします。あわせて実験にご協力をいただきました、神戸学院大学薬学部薬理学講座卒業生の立岡博之修士、駒井朋江修士、吉多由香里修士ならびに本講座修士課程の菅原稚容子様をはじめとする本講座配属生の皆様に感謝いたします。

引用文献

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- [2] Antonsson B, Martinou J-C. The bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256: 50-57.
- [3] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-254.
- [4] Thompson EB. *Annual Review of Physiology*. 1998; 60ed. California: Palo Alto.
- [5] Wyllie AH. Apoptosis. *Br J Cancer* 1993; 67: 205-208.
- [6] Bansal N, Houle A, Melnykovich G. Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB J* 1991; 5: 211-216.
- [7] Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2353-2362.
- [8] Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991; 51: 1078-1085.
- [9] Takuma K, Fujita T, Kimura Y, Tanabe M, Yamamuro A, Lee E, Mori K, Koyama Y, Baba A, Matsuda T. T-588 inhibits astrocyte apoptosis via mitogen-activated protein kinase signal pathway. *Eur J Pharmacol* 2000; 399: 1-8.
- [10] Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 249-256.
- [11] Takuma K, Phuagphong P, Lee E, Mori K, Baba A, Matsuda T. Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J Biol Chem* 2001; 276: 48093-48099.
- [12] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
- [13] Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-1430.
- [14] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- [15] van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 487-497.
- [16] Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000; 529 Pt 1: 57-68.

- [17] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
- [18] Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256: 12-18.
- [19] Wolffe A. *Chromatin: Structure and Function*. 1995; London: Academic Press.
- [20] Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352.
- [21] Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998; 12: 599-606.
- [22] Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4629-4638.
- [23] Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997; 106: 348-360.
- [24] Li J, Lin Q, Yoon HG, Huang ZQ, Strahl BD, Allis CD, Wong J. Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5688-5697.
- [25] Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000; 406: 593-599.
- [26] Thomson S, Clayton AL, Mahadevan LC. Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol Cell* 2001; 8: 1231-1241.
- [27] Hendzel MJ, Nishioka WK, Raymond Y, Allis CD, Bazett-Jones DP, Th'ng JP. Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 24470-24478.
- [28] Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 2000; 102: 279-291.
- [29] Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* 1999; 145: 225-235.
- [30] Shibata K, Inagaki M, Ajiro K. Mitosis-specific histone H3 phosphorylation in vitro in nucleosome structures. *Eur J Biochem* 1990; 192: 87-93.

- [31] Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 2001; 293: 853-857.
- [32] Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 2001; 292: 110-113.
- [33] Lee E, Furukubo T, Miyabe T, Yamauchi A, Kariya K. Involvement of histone hyperacetylation in triggering DNA fragmentation of rat thymocytes undergoing apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 395: 183-187.
- [34] Okada Y, Tsuda Y, Tada M, Wanaka K, Okamoto U, Hijikata-Okunomiya A, Okamoto S. Development of potent and selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-activity relationship. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000; 48: 1964-1972.
- [35] Szende B, Okada Y, Tsuda Y, Horvath A, Bokonyi G, Okamoto S, Wanaka K, Keri G. A novel plasmin-inhibitor inhibits the growth of human tumor xenografts and decreases metastasis number. *In Vivo* 2002; 16: 281-286.
- [36] Okada Y, Tsuda Y, Wanaka K, Tada M, Okamoto U, Okamoto S, Hijikata-Okunomiya A, Bokonyi G, Szende B, Keri G. Development of plasmin and plasma kallikrein selective inhibitors and their effect on M1 (melanoma) and HT29 cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 2217-2221.
- [37] Lee E, Miura M, Yoshinari M, Iwai H, Kariya K. Selective inhibition of dexamethasone-induced apoptosis in rat thymocytes by herbimycin A. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 128-134.
- [38] McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269: 365-370.
- [39] Lee E, Miyaguchi F, Inoue M, Kariya K, Sasaki H. A novel DNA cleaving agent, 2,2'-bis(2-aminoethyl)-4,4'-bithiazole, induces thymocyte apoptosis. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40: 151-157.
- [40] Takahashi A, Hirata H, Yonehara S, Imai Y, Lee KK, Moyer RW, Turner PC, Mesner PW, Okazaki T, Sawai H, Kishi S, Yamamoto K, Okuma M, Sasada M, et al. Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8. *Oncogene* 1997; 14: 2741-2752.
- [41] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84: 1415-1420.
- [42] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182: 1545-1556.

- [43] Griffith HB. Endoneurosurgery: endoscopic intracranial surgery. *Adv Tech Stand Neurosurg* 1986; 14: 2-24.
- [44] Griffith HB, Jamjoom AB. The treatment of childhood hydrocephalus by choroid plexus coagulation and artificial cerebrospinal fluid perfusion. *Br J Neurosurg* 1990; 4: 95-100.
- [45] Oka K, Yamamoto M, Nonaka T, Tomonaga M. The significance of artificial cerebrospinal fluid as perfusate and endoneurosurgery. *Neurosurgery* 1996; 38: 733-736.
- [46] Takuma K, Lee E, Kidawara M, Mori K, Kimura Y, Baba A, Matsuda T. Apoptosis in Ca^{2+} reperfusion injury of cultured astrocytes: roles of reactive oxygen species and NF- κ B activation. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4204-4212.
- [47] Takuma K, Matsuda T, Kishida Y, Asano S, Azuma J, Baba A. Ca^{2+} depletion facilitates taurine release in cultured rat astrocytes. *Jpn J Pharmacol* 1996; 72: 75-78.
- [48] Matsuda T, Takuma K, Kishida Y, Azuma J, Baba A. Protective effect of taurine against reperfusion injury in cultured rat astrocytes. *Adv Exp Med Biol* 1996; 403: 491-497.
- [49] Matsuda T, Takuma K, Asano S, Kishida Y, Nakamura H, Mori K, Maeda S, Baba A. Involvement of calcineurin in Ca^{2+} paradox-like injury of cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1998; 70: 2004-2011.
- [50] Xu L, Giffard RG. HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury. *Neurosci Lett* 1997; 224: 9-12.
- [51] Lee E, Nakatsuma A, Hiraoka R, Ishikawa E, Enomoto R, Yamauchi A. Involvement of histone phosphorylation in thymocyte apoptosis by protein phosphatase inhibitors. *IUBMB Life* 1999; 48: 79-83.
- [52] Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; 12: 3679-3684.
- [53] Marunouchi T, Yasuda H, Matsumoto Y, Yamada M. Disappearance of a basic chromosomal protein from cells of a mouse temperature-sensitive mutant defective in histone phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 126-131.
- [54] Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 871-877.
- [55] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-1080.
- [56] Waring P, Khan T, Sjaarda A. Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease. *J Biol Chem* 1997; 272: 17929-17936.
- [57] Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 2000; 275: 9390-9395.

- [58] Talasz H, Helliger W, Sarg B, Debbage PL, Puschendorf B, Lindner H. Hyperphosphorylation of histone H2A.X and dephosphorylation of histone H1 subtypes in the course of apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 27-39.
- [59] Galasinski SC, Louie DF, Gloor KK, Resing KA, Ahn NG. Global regulation of post-translational modifications on core histones. *J Biol Chem* 2002; 277: 2579-2588.
- [60] Jason LJ, Moore SC, Ausio J, Lindsey G. Magnesium-dependent association and folding of oligonucleosomes reconstituted with ubiquitinated H2A. *J Biol Chem* 2001; 276: 14597-14601.
- [61] Moore SC, Jason L, Ausio J. The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 311-319.
- [62] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45.
- [63] Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 2000; 5: 917-926.
- [64] Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC. Phosphoacetylation of histone H3 on *c-fos*- and *c-jun*-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J* 2000; 19: 3714-3726.
- [65] Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 4138-4142.
- [66] Hu BR, Liu CL, Park DJ. Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1089-1095.
- [67] Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E. Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20: 4506-4514.
- [68] Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998; 333 (Pt 2): 291-300.
- [69] Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S. ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1642-1651.
- [70] Kogel D, Reimertz C, Mech P, Poppe M, Fruhwald MC, Engemann H, Scheidtmann KH, Prehn JH. Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br J Cancer* 2001; 85: 1801-1808.
- [71] Kogel D, Plottner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* 1998; 17: 2645-2654.

- [72] Hallick RB, Chelm BK, Gray PW, Orozco EM, Jr. Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 1977; 4: 3055-3064.
- [73] Shiokawa D, Ohyama H, Yamada T, Tanuma S. Purification and properties of DNase gamma from apoptotic rat thymocytes. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 3): 675-681.
- [74] Gaido ML , Cidlowski JA. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem* 1991; 266: 18580-18585.
- [75] Shiokawa D, Tanuma S. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* 2001; 40: 143-152.
- [76] Krajewski WA, Becker PB. Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1540-1545.
- [77] Fedele M, Pierantoni GM, Berlingieri MT, Battista S, Baldassarre G, Munshi N, Dentice M, Thanos D, Santoro M, Viglietto G, Fusco A. Overexpression of proteins HMGA1 induces cell cycle deregulation and apoptosis in normal rat thyroid cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4583-4590.

