

環境因子による酸化 DNA 損傷とがん, 老化

及川 伸二, 村田 真理子, 平工 雄介, 川西 正祐*

三重大学医学部衛生学教室 〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174

Mechanism of oxidative DNA damage by environmental chemicals and its role in carcinogenesis and aging

Shinji Oikawa, Mariko Murata, Yusuke Hiraku and Shosuke Kawanishi

Department of Hygiene, Mie University School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie, 514-8507, Japan

Summary

Reactive oxygen species are capable of causing damage to various cellular constituents, such as DNA, proteins and lipids, leading to carcinogenesis, aging and a number of diseases. We have investigated the sequence specificity of oxidative stress-mediated DNA damage by using ^{32}P -labeled DNA fragments obtained from the human *c-Ha-ras-1*, *p53* and *p16* genes. The sequence specificity of DNA damage plays the key role in the mutagenic process, and affects the mutation frequency. Therefore, investigation on sequence specificity of DNA damage would provide clues on the biological significance of DNA damage which in turn may be beneficial for cancer prevention strategy. Here we discuss the mechanisms and sequence specificity of DNA damage caused by various environmental chemicals and UVA-activated photosensitizers in relation to carcinogenesis and aging.

Keywords : DNA damage, carcinogenesis, aging, environmental chemicals, reactive oxygen species

緒言

環境因子や食餌性因子により生体内で生成される活性酸素は, さまざまな生体分子を攻撃し, 細胞傷害をもたらす。なかでも活性酸素による遺伝子の損傷は, 細胞死, 老化, 突然変異, 発がんなどに密接に関連している。化学発がん過程の第一段階 (イニシエーション) における DNA 損傷機構は付加体形成と酸化損傷に大別される。DNA 付加体は環境化学物質が生体内の薬物代謝酵素で代謝活性化され, DNA に直接作用することにより形成される。一方, 活性酸素は, イニシエーションに加えて, 発がん過程の第二段階であるプロモーションやプログレッションに寄与すると考えられる。我々は, 発がん性金属やベンゼンなどの単環芳香族化合物が酸化的に DNA 損傷を介して発がんに至ることを報告してきた。さらに,

従来, DNA 付加体形成によりその発がん機構が説明されてきた多環芳香族化合物が酸化 DNA 損傷性も有することを発見している。すなわち, 多くの環境化学物質の発がん過程において酸化 DNA 損傷が非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

活性酸素が DNA を損傷し, 老化の進行に関与するという仮説が提唱されている。また, 最近染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列の短縮が老化のプログラムに関与しているとの報告がなされている。我々は, 老化促進機構の一つとして, 活性酸素によるテロメア短縮促進の研究を行い, 酸化ストレスと老化の関係を解明している。

本総説では, 最新の研究をもとに, 発がんや老化における酸化 DNA 損傷の意義を概説する。

1. 実験方法の原理

実験にはヒトがん原遺伝子 *c-Ha-ras-1* およびがん抑制遺伝子 *p53* や *p16* のホットスポットを含む約 100 ~ 400

* kawanishi@doc.medic.mie-u.ac.jp

受付: 2001年11月12日 受理: 2001年11月12日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

Table 1 Mechanisms of oxidative DNA damage and/or adduct formation induced by various carcinogens

	Ames test	DNA adduct formation	Oxidative DNA damage	References
Aromatic nitro and amino compounds				
4-Aminobiphenyl (polynuclear)	+	+++	+	Murata et al. (2001)
MeIQx and IQ (polynuclear)	+	+++	+	Murata et al. (1999a, 1999b)
<i>o</i> -Toluidine (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma et al. (1999)
Nitrobenzene (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma and Kawanishi (1999)
<i>o</i> -Anisidine (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma and Kawanishi (2001)
Aromatic hydrocarbons				
Benzo[<i>a</i>]pyrene (polynuclear)	+	+++	+	Flowers et al. (1997)
Benzene (mononuclear)	-	+	+++	Kawanishi et al. (1989a) Hiraku and Kawanishi (1996) Oikawa et al. (2001a)
Pentachlorophenol (mononuclear)	-	+	+++	Naito et al. (1994)
<i>p</i> -Dichlorobenzene (mononuclear)	-	-	+++	Oikawa and Kawanishi (1996)
Caffeic acid (mononuclear)	-	-	+++	Inoue et al. (1992)
Others				
2-Nitropropane (aliphatic amino compound)	±	+	+++	Sakano et al. (2001)
Benzoyl peroxide	-	-	+++	Kawanishi et al. (1999)

塩基対のDNA断片をサブクローニングにより多量に得た。これらのDNA断片の5'末端を³²Pで標識し、制限酵素で切断して一端のみが標識された単離DNA断片を調製した。また、テロメア配列を含むDNA断片(5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄3')は合成し、同様に³²Pで標識して実験に用いた。Maxam-Gilbert法を応用し、オートラジオグラムからDNA損傷性とその塩基特異性を決定した。また、培養細胞を用いた実験においては、ヒト白血病細胞HL-60とそのカタラーゼ過発現株のHP100を用い、細胞内DNA損傷における過酸化水素の関与を検討した。

2. 酸化的DNA損傷と発がん

発がん物質のスクリーニングとして、変異原性試験の一つであるAmes試験が実施されている。1976年にAmesが300種の化学物質を試験した時には、発がん物質の90%が変異原性を示し、非発がん物質の90%は変異原性を示さないことから、変異原性の検出により発がん性が予測できると期待された。しかし、その後の研究からAmes試験陽性物質と発がん物質との一致率は、現在では約60%程度といわれている。新規化合物はAmes試験陰性を確認後、使用が許可される。それゆえ、Ames試験陰性物質の安全性の評価方法に関する研究が必要である。我々は、“Ames test negative”な発がん物質についてDNA損傷性を検討した。その結果、Ames試験陰性の発がん物質は多くの場合、活性酸素生成を介してDNA損傷を起こし発がんに関与することを見出した。これまでの研究においてAmes試験陰性の発がん物質と酸化的DNA損傷性との間に定性的な相関関係を認めている。すなわち、Ames試験がDNA付加体を形成する発がん物質を効率よく検出するのに対して、我々

のシステムは酸化的DNA損傷をもたらす発がん物質を検出するのに優れていると考えられる。種々の発がん物質によるDNA損傷形態とAmes試験による判定との関係をTable 1に示した。本セクションでは、発がん物質の化学構造とDNA損傷形態との関係に注目し、酸化的DNA損傷とその機構について述べる。また、発がん性金属における活性酸素の生成と塩基配列特異的DNA損傷の発がんへの関与についても概説する。

1) 芳香族アミノ化合物

(1) 多環芳香族アミノ化合物

芳香族アミノ化合物である2-ナフチルアミン(2-naphthylamine)、4-アミノビフェニル(4-aminobiphenyl, ABP)やベンジジン(benzidine)は、染料や酸化防止剤の合成中間体として広く使用されていたが、ヒトに膀胱癌を発生させることが明らかとなり、現在、労働安全衛生法で製造が禁止されている。しかし、これらの発がん物質はタバコの主流煙中に含まれていることが明らかになっており、喫煙者の膀胱癌への関与が示唆される。一般にこれらの化合物は、生体内でシトクロムP-450によりN-水酸化されて、ヒドロキサム酸が形成される。ヒドロキサム酸は、アセチルトランスフェラーゼあるいはスルホトランスフェラーゼによりエステル化される。このヒドロキサム酸エステルは、硫酸エステルの脱離性のため非酵素的に解離し、ナイトレニウムイオンを生じ、核酸やタンパク質と結合する。発がん性化学物質のうち、ベンゼン環の数が多き場合、一般に、DNA付加体形成による発がんの第1段階(イニシエーション)に関与すると考えられている。

我々は、ABPの発がん機構には、以上のようなDNA付加体の形成のみならず、酸化的DNA損傷も関与する

ことを明らかにした (Murata et al., 2001). ABPの代謝物である *N*-ヒドロキシ-4-アミノピフェニルは、自動酸化し、ニトロソ体となる過程で活性酸素が生じ、生体内重金属存在下でDNAを損傷する。さらに生体内還元物質NADHによりニトロソ体が還元され、酸化還元サイクルが形成されると活性酸素の生成が増強し、著しいDNA損傷が認められる。さらに、食品加熱生成物ヘテロサイクリックアミンやアゾ染料などの多環式アミノ化合物についてもDNA付加体の形成のみならず、その *N*-ヒドロキシ代謝物が酸化的にDNAを損傷することを明らかにし (Murata et al., 1999a; Ohnishi et al., 2000, 2001), 活性酸素を介して発がん過程に関与する可能性を示した。

(2) 単環芳香族アミノ化合物

ベンゼン環が一つのアミノ化合物であるオルトトルイジン (*o*-toluidine) は、染料や化学薬品の精製、除草剤などに使用され、膀胱癌の多発が認められている [IARC 評価: 2B (ヒトに対して発がん性を示す可能性がある)]. オルトトルイジンがDNAに付加体を形成するという報告はなく、その発がん機構は解明されていない。我々は、オルトトルイジンの代謝物である 4-amino-3-methylphenol および *o*-nitrosotoluene が、Cu(II) および NADH との共存下で濃度依存的にDNAを強く損傷することを認めた (Ohkuma et al., 1999). DNA損傷の塩基特異性は、4-amino-3-methylphenol, *o*-nitrosotoluene + NADH とともにチミンおよびシトシンが、強く損傷された。酸化的DNA損傷の指標である 8-oxodG の生成量を検討した結果、Cu(II) 存在下で 4-amino-3-methylphenol, *o*-nitrosotoluene + NADH とともに 8-oxodG 量が濃度依存的に著しく増加した。従って、オルトトルイジンの代謝物が、生体内物質存在下で酸化還元サイクル (redox cycle) を形成し、酸化的にDNAを損傷することが発がんにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。我々は、さらにニトロベンゼンなどの代謝物が酸化的DNA損傷を起こすことを認めており (Ohkuma and Kawanishi, 1999, 2001), ベンゼン環が一つのアミノ化合物は主に酸化によりDNAを損傷することを明らかにした。

2) 芳香族炭化水素

(1) 多環芳香族炭化水素

ベンゾ [*a*] ピレン (benzo [*a*] pyrene) は数多くの強力な発がん性芳香族炭化水素中で最も良く知られたものの一つである。ベンゾ [*a*] ピレンは、シトクロム P-450 により 7, 8-ジオール-9, 10-エポキシド (7, 8-diol-9, 10-epoxide) まで代謝され、湾領域エポキシドが形成されグアニンの 2 位のアミノ基に結合しDNAに付加体を形成する。多環芳香族炭化水素の発がん性において、この湾領域エポキシドは非常に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、最近、ベンゾ [*a*] ピレ

ンの代謝物が活性酸素を生成し酸化的DNA損傷も引き起こすことが報告され (Flowers et al., 1997), 現在、我々はその機構解明を行っている。

(2) 単環芳香族炭化水素

ベンゼンは、Ames 試験では変異原性を検出できない発がん性環境化学物質である。ベンゼンは、造血系障害および悪性腫瘍 (白血病) を引き起こす。我々は、ベンゼンの代謝物であるカテコール (Oikawa et al., 2001a), ハイドロキノン (Hiraku and Kawanishi, 1996) および 1, 2, 4-ベンゼントリオール (Kawanishi et al., 1989a) が生体内物質存在下において、酸化的にDNAを損傷することを証明した。特に、生体内還元物質NADH共存下において、カテコールは非常に強くDNAを損傷した。この損傷機構 (Fig. 1) として、カテコールの酸化生成物である 1, 2-ベンゾキノンがNADHにより速やかにカテコールまで2電子還元され、酸化還元サイクルを形成し、活性酸素が持続的かつ多量に生成されることを明らかにした。また、ヒト白血病由来のHL-60とHP100細胞を用いた結果から、カテコールはH₂O₂の生成を介して細胞内DNAを損傷することが認められた。これらのベンゼン代謝物、とくにカテコールは活性酸素生成を介してDNA損傷を引き起こし、ベンゼンの発がん性に深く関与することが示唆された。その他のAmes試験陰性の発がん物質であるオルトフェニルフェノール (OPP) (Inoue et al., 1990), ペンタクロロフェノール (PCP) (Naito et al., 1994), パラジクロロベンゼン (*p*-DCB) (Oikawa and Kawanishi, 1996) の各代謝物のハイドロキノン誘導体およびベンゾキノン誘導体が生体内物質の存在下で同様に活性酸素生成を介してDNA損傷を起こすことも解明している。

3) 発がん性金属

金属は生体にとって必須なものもあると同時に、その量や種類により毒性を示すものがある。6価クロム、ニッケル、砒素、ベリリウム、カドミウムの発がん性は、職業がんに関する疫学調査や動物実験の研究などから疑う余地はない。また、鉄錯体、鉛、コバルトなどについても、ヒトに対して発がん性を示す可能性が報告されている。我々は *in vitro* の実験に基づき、発がん性金属によるDNA損傷をもたらす活性種は活性酸素であることを明らかにし、1986年に世界に先駆けて金属発がんの活性酸素説を提唱した (Fig. 2)。6価クロム (Kawanishi et al., 1986), 2価のニッケル (Kawanishi et al., 1989b, 2001a; Inoue and Kawanishi, 1989), Fe(III) ニトリロ三酢酸錯体 (Inoue and Kawanishi, 1987) 及び2価のコバルト (Kawanishi et al., 1989c) などの発がん性金属化合物が、H₂O₂ からヒドロキシルラジカル (\bullet OH), 一重項酸素 (1 O₂; ラジカルでないが反応性に富む励起状態分子酸素), 金属-酸素錯体など種々のタイプの活性酸素

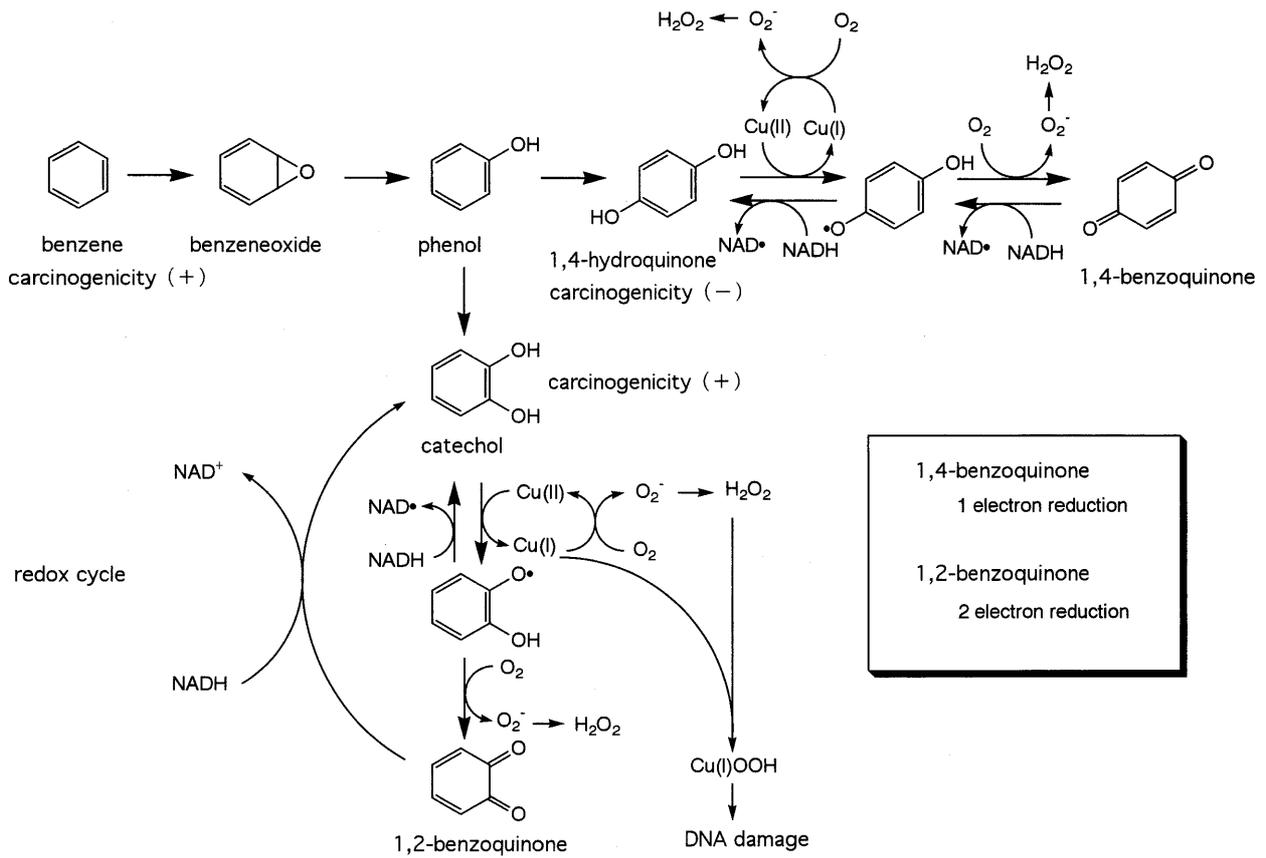


Fig. 1 Mechanisms of oxidative DNA damage by benzene metabolites

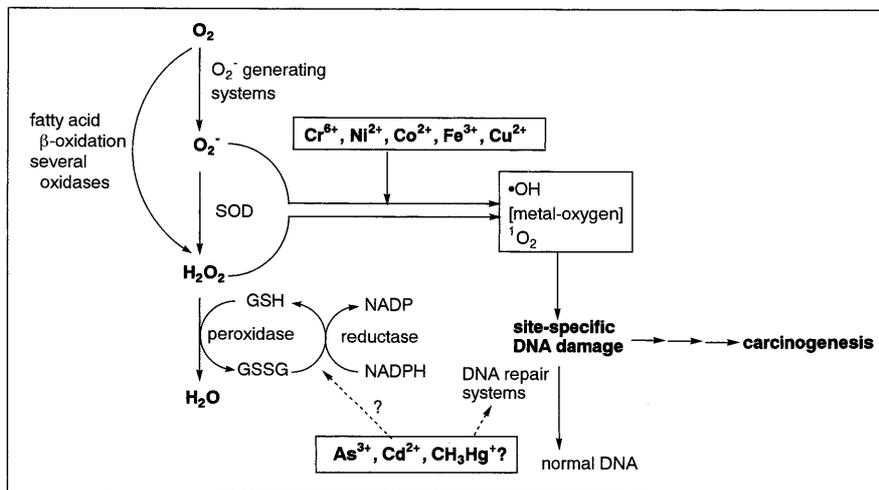


Fig. 2 Scheme of metal carcinogenesis mediated by reactive oxygen species

種を生成する。これらの活性酸素種は、塩基配列に特異的な DNA 損傷を起こし、発がんに関与する (Kawanishi et al., 2001b)。

以上のように、酸化 DNA 損傷は環境化学物質の発がん過程において非常に重要な役割を果たしている。現在、我々は、酸化 DNA 損傷に加え DNA 付加体形成をも簡便に検出できるシステムを構築中であり、酸化損傷と付加体形成の比率が発がん感受性に与える影響の解

明を行っている。

3. 酸化 DNA 損傷と老化

加齢とともに活性酸素、放射線や太陽紫外線などによる酸化ストレスが蓄積し、その結果、DNA や蛋白質が損傷され、老化が進行するとの仮説が提唱されている。染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n の短縮が老化のプログラムに関与すると

の報告がなされている。テロメアは、真核生物の染色体の末端に存在し、ヒトでは約10 kbも続き、染色体の安定性や構造維持に重要な役割を果たしている。細胞分裂のDNA複製時に新生鎖5'末端部分のテロメアDNAは一定の割合で短縮する。このテロメア繰り返し配列の短縮が酸化ストレスにより通常の4~5倍促進されることが報告された。(von Zglinicki et al., 1995, 2000)。さらに、炎症組織ではテロメアの短縮促進が認められることから、炎症が老化促進に関与することも考えられる。従って、我々は、環境因子や炎症による酸化ストレスに注目し、テロメア短縮促進を介した老化促進機構の解明を行っている。

1) 太陽紫外線

太陽紫外線が、発がんのみならず、皮膚の老化を進行させることが知られている。太陽紫外線によるDNA損傷はDNAに吸収領域を持つUVBが主要な役割を果たしていると考えられてきたが、光増感物質を介したUVAによる損傷も近年注目されている(Hiraku and Kawanishi, 2000; Ito and Kawanishi, 1997; Tada-Oikawa et al., 1997)。我々は生体内光増感物質(リボフラビンなど)の存在下、ヒト繊維芽細胞WI-38にUVAを照射し、テロメア繰り返し配列領域の短縮促進を検討した。その結果、UVA照射量に依存してテロメア長の指標の一つであるTRF (terminal restriction fragment)の短縮が認められ、また、同条件下においてヒト培養細胞(WI-38や前骨髄性白血病細胞HL-60)にUVAを照射すると照射量に依存して有意に8-oxodGが増加した(Table 2)(Oikawa et al., 2001b)。この酸化DNA損傷によるTRFの短縮促進機構を解明するため、テロメア繰り返し配列を含む合成DNA(5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄-3')を用いてDNA損傷とその塩基配列特異性をピペリジン処理と8-oxodG修復酵素Fpg protein処理を行って検討した。生体内光増感物質存在下、UVA照射により、テロメア配列中の5'-GGG-3'の中央のGに特異的に8-oxodGが生成することを認めた。8-oxodGを電気化学検出器付HPLC(HPLC-ECD)で定量した結果、Gの連続配列を含まない合成DNAに比べ、テロメア繰り返し配列を含む合成DNAにおいて8-oxodG生成量の著しい増加を認めた。この塩基配列特異的DNA損傷は、UVAにより励起された光増感物質が5'-GGG-3'配列の5'側Gから電子を引き抜き、その後中央のGへhole(+

電荷)の移動が起こることにより、その部位に8-oxodGが生成するためと考えられ、電子受容性の光増感分子に共通した機構である。

2) 過酸化水素

酸化ストレスとして過酸化水素(H₂O₂)を用いたとき、Cu(II)存在下においてテロメア繰り返し配列中の5'-GGG-3'配列の5'側Gが顕著に損傷される(Fig. 3A)(Oikawa and Kawanishi, 1999)。4つの塩基(A, G, C, T)中ではGの酸化電位が最も低く、特にGGやGGG等のポリG配列は容易に酸化される。二本鎖DNAでは、GGやGGG配列の5'側のGが最も酸化されやすいことが最高被占軌道(HOMO: highest occupied molecular orbital)の理論計算からも示されている(Yoshioka et al., 1999; Kawanishi et al., 1999)。テロメア配列中の5'-GGG-3'配列の5'側Gの損傷は、最高被占軌道による理論計算とよく一致する。さらにテロメア繰り返し配列を含むDNAでは、グアニンの酸化生成物である8-oxodGが、テロメア配列を含まないDNAよりも約5倍増加した。このDNA損傷はカタラーゼとCu(I)キレート剤であるパソキプロインにより抑制されたことから、損傷の活性種はH₂O₂とCu(I)から生成された金属-酸素錯体であると考えられる。

3) 炎症

慢性的な感染や炎症組織ではマクロファージや好中球から一酸化窒素(NO)及びスーパーオキシド(O₂⁻)が過剰に生成される。NOとO₂⁻同時発生試薬(SIN-1)においても5'-GGG-3'配列中の5'側Gの著しい損傷が認められた(Fig. 3B)(Oikawa and Kawanishi, 1999)。このGGG配列特異的な損傷には、NOとO₂⁻の反応生成物ペルオキシナイトライト(ONOO⁻)が重要な役割を果たしていると考えられる。この反応は条件により8-oxodGが生成される場合と8-nitroGが生成される場合があり、Gのニトロ化も塩基配列特異的損傷に関与すると推定される。

以上の結果から酸化ストレスによりテロメア繰り返し配列(5'-TTAGGG-3')_n中の5'-GGG-3'配列に特異的に損傷が起こることが解明された。従って、環境化学物質やUVAによるGGG配列特異的な損傷を介したテロメア繰り返し配列の短縮促進が、老化促進に関与していると考えられる。遺伝的早老症のウェルナー症候群などでは、その原因遺伝子であるDNAヘリカーゼの変異により、DNAの複製や修復、転写などに異常をきたすことが知られているが、テロメアの短縮速度も速いことが報告されている。テロメア短縮促進については、正常なヘリカーゼなどが、DNA修復過程において、テロメア繰り返し配列中の5'-GGG-3'配列特異的な損傷部位の切断に関与する可能性が考えられるため、現在検討を行っている。

Table 2 8-oxodG formation and TRF length in WI-38 fibroblasts

UVA (J/cm ²)	8-oxodG/10 ⁵ dG ± S.E.	TRF (kb)
0	0.44 ± 0.07	9.48
2	0.72 ± 0.03	8.53
5	0.98 ± 0.16	7.98
10	1.09 ± 0.26	8.25

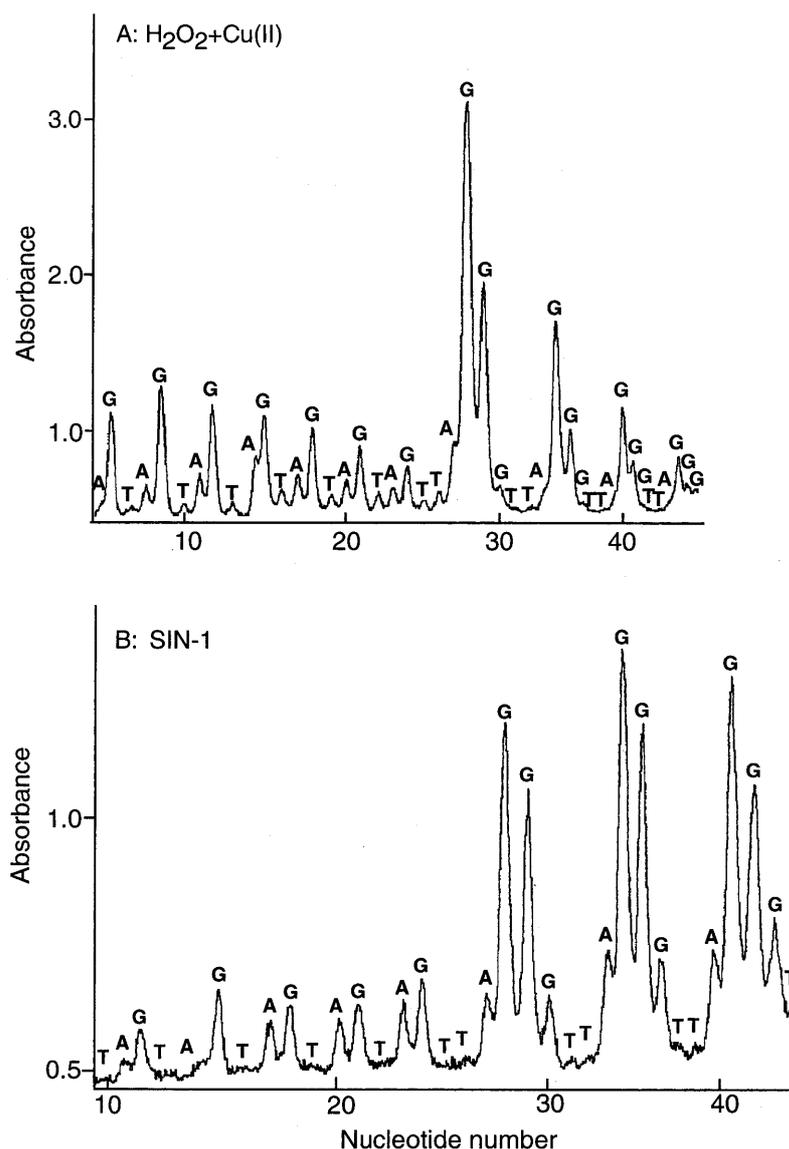


Fig. 3 Guanine-specific DNA cleavage by oxidative stress. The ³²P 5' end-labeled 48-base pair fragment (5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄-3') in 200 μ l of 10 mM sodium bicarbonate buffer at pH 7 containing 5 μ M DTPA and 20 μ M per base of sonicated calf thymus DNA was incubated with 250 μ M H₂O₂ in the presence of 20 μ M Cu (II) (A) or 1 mM SIN-1 (B) at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. After piperidine treatment, DNA fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel using a DNA-sequencing system and the autoradiogram was obtained by exposing X-ray film to the gel. The relative amounts of oligonucleotides produced were measured using a laser densitometer (LKB 2222 UltroScan XL). The piperidine-labile sites of the treated DNA were determined by direct comparison with the same DNA fragment after undergoing DNA sequencing reactions according to the Maxam-Gilbert procedure. The horizontal axis shows the nucleotide number.

参考文献

- Flowers, L., S.T. Ohnishi and T.M. Penning (1997) DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones : role of reactive oxygen species, Cu (II) /Cu (I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals, *Biochemistry*, 36, 8640-8648.
- Hiraku, Y. and S. Kawanishi (1996) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites, *Cancer Res.*, 56, 5172-5178.
- Hiraku, Y. and S. Kawanishi (2000) Distinct mechanisms of guanine-specific DNA photodamage induced by nalidixic acid and fluoroquinolone antibacterials, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 211-218.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide, *Cancer Res.*, 47, 6522-6527.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1989) ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel (II) complex of glycylglycyl-L-histidine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 445-451.
- Inoue, S., K. Yamamoto and S. Kawanishi (1990) DNA damage induced by metabolites of *o*-phenylphenol in the presence of copper (II) ion, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 144-149.
- Inoue, S., K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1992) Caffeic acid

- causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H₂O₂ formation, *Carcinogenesis*, 13, 1497-1502.
- Ito, K. and S. Kawanishi (1997) Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer, *Biol. Chem.*, 378, 1307-1312.
- Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958.
- Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989a) Human DNA damage induced by 1,2,4-benzenetriol, a benzene metabolite, *Cancer Res.*, 49, 164-168.
- Kawanishi S., S. Inoue and K. Yamamoto (1989b) Site-specific DNA damage induced by nickel (II) ion in the presence of hydrogen peroxide, *Carcinogenesis*, 10, 2231-2235.
- Kawanishi, S., K. Yamamoto and S. Inoue (1989c) Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobalt (II) ion, role of sulfate radical, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3491-3496.
- Kawanishi, S., S. Oikawa, M. Murata, H. Tsukitome and I. Saito (1999) Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter, *Biochemistry*, 38, 16733-16739.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Oikawa, N. Yamashita, S. Toyokuni, M. Kawanishi and K. Nishino (2001a) Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 108-116.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku and S. Oikawa (2001b) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, *Mutat. Res.*, 488, 65-76.
- Murata, M., M. Kobayashi and S. Kawanishi (1999a) Mechanism of oxidative DNA damage induced by a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoxaline, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 268-275.
- Murata, M., M. Kobayashi and S. Kawanishi (1999b) Non-enzymatic reduction of nitro-derivative of a heterocyclic amine IQ by NADH and Cu (II) leads to oxidative DNA damage, *Biochemistry*, 38, 7624-7629.
- Murata, M., A. Tamura, M. Tada and S. Kawanishi (2001) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic 4-aminobiphenyl, *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 765-773.
- Naito, S., Y. Ono, I. Somiya, S. Inoue, K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1994) Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites, *Mutat. Res.*, 310, 79-88.
- Ohkuma, Y., Y. Hiraku, S. Oikawa, N. Yamashita, M. Murata and S. Kawanishi (1999) Distinct mechanisms of oxidative DNA damage by two metabolites of carcinogenic *o*-toluidine, *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, 97-106.
- Ohkuma, Y. and S. Kawanishi (1999) Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic and reproductive toxic nitrobenzene in the presence of NADH and Cu (II), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257, 555-560.
- Ohkuma, Y. and S. Kawanishi (2001) Oxidative DNA damage induced by a metabolite of carcinogenic *o*-anisidine : enhancement of DNA damage and alteration in its sequence-specificity by superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 389, 49-56.
- Ohnishi, S., M. Murata, S. Oikawa, Y. Hiraku and S. Kawanishi (2000) Copper-dependent DNA damage induced by hydrazobenzene, an azobenzene metabolite, *Free Radic. Res.*, 32, 469-478.
- Ohnishi, S., M. Murata, M. Degawa and S. Kawanishi (2001) Oxidative DNA damage induced by an *N*-hydroxy metabolite of carcinogenic 4-dimethylaminoazobenzene, *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 23-29.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1996) Copper-mediated DNA damage by metabolites of *p*-dichlorobenzene, *Carcinogenesis*, 17, 2733-2739.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1999) Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening, *FEBS Lett.*, 453, 365-368.
- Oikawa, S., I. Hirokawa, K. Hirakawa and S. Kawanishi (2001a) Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol, *Carcinogenesis*, 22, 1239-1245.
- Oikawa, S., S. Tada-Oikawa and S. Kawanishi (2001b) Site-specific DNA damage at GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening, *Biochemistry*, 40, 4763-4768.
- Sakano, K., S. Oikawa, M. Murata, Y. Hiraku, N. Kojima and S. Kawanishi (2001) Mechanism of metal-mediated DNA damage induced by metabolites of carcinogenic 2-nitropropane, *Mutat. Res.*, 479, 101-111.
- Tada-Oikawa, S., S. Oikawa and S. Kawanishi (1997) Cellular DNA damage and apoptosis induced by UV-A radiation, *Photomed. Photobiol.*, 19, 29-32.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, W. Docke and C. Lotze (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence? *Exp. Cell Res.*, 220, 186-193.
- von Zglinicki, T., R. Pilger, and N. Sitté (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 64-74.
- Yoshioka, Y., Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, and I. Saito (1999) Experimental and theoretical studies on the selectivity of GGG triplets toward one-electron oxidation in B-form DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 8712-8719.