

酸化ストレス及び放射線障害における 細胞内ミトコンドリアの役割

馬嶋 秀行

鹿児島大学歯学部歯科放射線学講座

1. はじめに

最近、原因不明の難病等の原因が実は活性酸素の病気であるということがわかりつつある。これらの病気は急性ではなく慢性の疾患放射線の細胞に対する効果は、細胞核DNAに対する効果、のみではなく、細胞内redox status, anti-oxidative response, シグナルトランスダクション系, DNAトランスクリプション系の変化を伴う複雑な様相を示し、この結果として、細胞死がおこることが明らかにされつつある^{1,2)}。一方、細胞の致死にはネクロシスとアポトーシスの2つの形態があることが知られている^{3,4)}。放射線によって

もこの2つの致死形態があることが知られ、放射線の細胞に対する効果は核DNAに対する効果のみではなく、細胞質に対する効果もあることが知られている (Fig.1)。最近の知見では、アポトーシスにミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが唱えられ、これらは総称してミトコンドリア関連死 (mitochondria mediated cell death) と呼ばれている⁵⁻¹⁰⁾。ミトコンドリア関連死では、ミトコンドリアの膜電位の減少あるいは変化⁹⁾、細胞内カルシウムの上昇^{9, 11-13)}、通常ミトコンドリアに存在するチトクロームcの放出¹⁴⁻¹⁹⁾が報告され、我々はさらに、ミトコンドリアに存在す

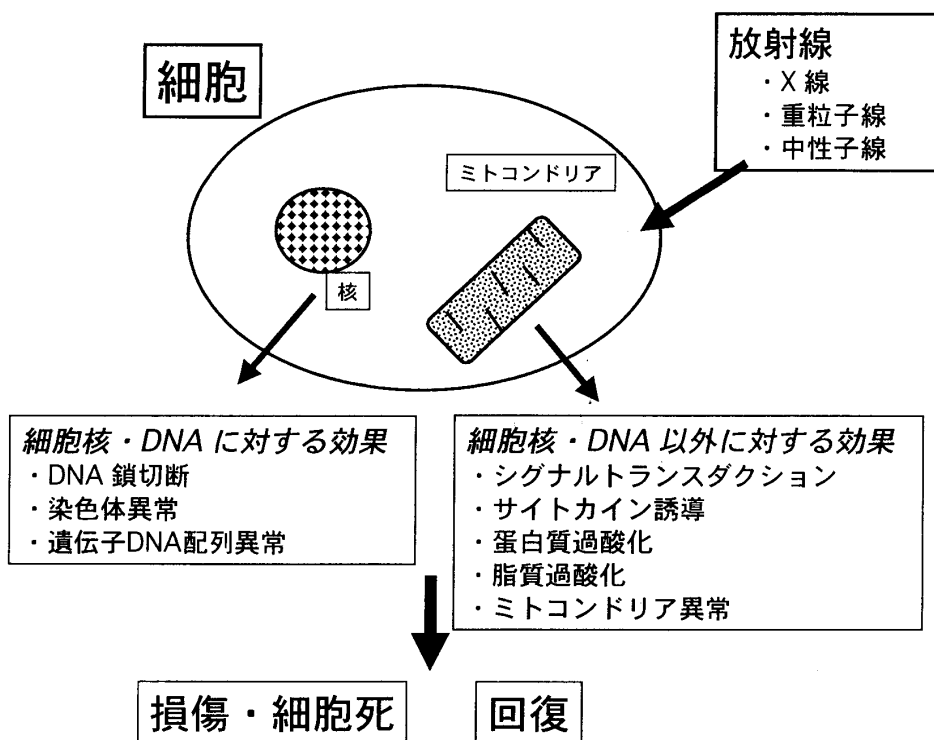


Fig. 1: 放射線の細胞に対する効果は核DNAに対する効果のみではなく、細胞質に対する効果もある。

る MnSOD over-expressed 細胞でアポトーシスが抑制されることを明らかにしている²⁰⁾。また、酸化ストレスによりミトコンドリア DNA に突然変異を多く発生し^{21, 22)}、老化²¹⁻²⁷⁾、および、アルツハイマー、パーキンソン、ALS 等、多くの神経疾患²⁷⁻²⁹⁾ でやはりミトコンドリアの障害がみつまっている。すなわち、酸化ストレスとミトコンドリア障害の関連が浮きぼりにされてきている。このほか、ミトコンドリアには、前述のアポトーシスの前駆体であるチトクローム c をはじめ、apoptosis-inducing factor (AIF)、また、caspase 前駆体が存在し、自らの細胞の致死に機能している³⁰⁻³²⁾。ミトコンドリアの本来の機能は細胞内の最大のエネルギー産生機能である。一旦、この仕組みに話しを移そう。

2. ミトコンドリア電子伝達系とスーパーオキシド産生

ミトコンドリア内膜には電子伝達系が存在し酸素下で ATP 合成が行なわれている。この電子伝達系は Complex I から IV および ATP synthase, ANP translocator から構成されている。一方、ミトコンドリアには DNA が存在し、この DNA はこれらの蛋白質のうち13の蛋白質をコードしている^{26, 33, 34)} (Fig.2)。ミトコンドリア DNA では核 DNA とコドンのシーケンスが異なることが知られている³³⁾。このミトコンドリア電子伝達系は電子の酸化還元をくり返し、その間に水素イオンを膜間隙に移し、再び水素イオンをマトリックスに移

行させ、そのエネルギーにより ATP を ADP に変換し、その産生された ATP を膜間隙に移行している。この複雑な“バイオマシン”は細胞中の最も大きなエネルギー製造器官となっているが、一方完璧なマシンではなく、電子の“もれ”を生じることが知られている。このもれは Complex I と III から最も生ずる^{35, 36)}。通常、正常な状態でも 2~3% の電子のもれが生じ、これからスーパーオキシドが発生すると考えられている³⁷⁾。則ち、このもれ電子は酸素によりトラップされ、酸素はスーパーオキシドとなる。成人で 1 日およそ 250 g の酸素を消費するが、この 2~3% の電子のもれにより細胞では最大のスーパーオキシドの発生源となっている。ミトコンドリアには、特有のマンガンスーパーオキシドが存在するが、この酵素の役割はこのスーパーオキシドを捕獲する役割上重要であることが容易に示唆されよう。

3. 電子伝達系の異常と疾患

最近、この電子伝達系の異常による病気が多数報告されつつある。パーキンソン病では、電子伝達系の Complex I にその異常が集中している³⁸⁻⁴⁰⁾。前述のようにこの部は最も大きなスーパーオキシドのもれを生ずる部であり、この部の異常により、さらにスーパーオキシドのもれを生ずることが考えられる⁴¹⁾。この結果多量のスーパーオキシドが発生し、これがパーキンソン病の病因になっていることも考えられる。パー

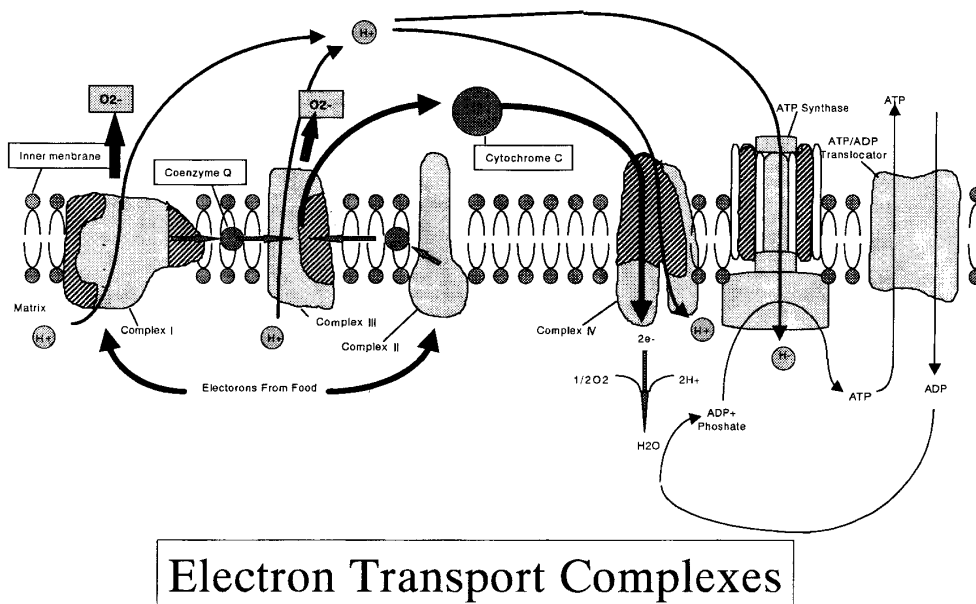


Fig. 2: 電子伝達系の scheme。斜線の部分はミトコンドリア DNA からコードされている。

キンソン病のほか、多くの神経系疾患でミトコンドリアDNAの突然変異が報告されている^{34, 39, 42)}。これらの疾患でも同様にミトコンドリアから大量のスーパーオキシドの発生が容易に予想され、これが病因となっている可能性が大きい。老化研究では、細胞の加齢に伴い、ミトコンドリアDNAの欠損がおこることが知られている。ミトコンドリアDNAは人では16569の塩基対からなるが、このうち、一定の部分が消失する、common deletionの現象が報告されている²²⁻²⁷⁾。加齢により、このようなcommon deletionが増大し²²⁻²⁷⁾、また、神経障害疾患では特に、このcommon deletionが早期におこり始めることが知られている^{27, 43)}。ミトコンドリアDNA common deletionでは、この部が特に電子伝達系の蛋白質を部分的にコードしている²⁷⁾ため前述のように、より大量のスーパーオキシドが放出されることが予想される。これが、疾病の原因になっている可能性が大きい。スーパーオキシドが細胞内酸化の源であるということはすでに30年前からスーパーオキシドセオリー (Superoxide Theory)⁴⁴⁻⁴⁶⁾として唱えられている。

4. スーパーオキシドセオリー (Superoxide Theory)

スーパーオキシドセオリー (Superoxide Theory) とは、活性酸素のうちスーパーオキシド (O_2^-) が、活性酸素群系列の最初を担う重要な物質であるという説である。これは、1969年に Fridovich 博士がスーパーオキシドを駆除するスーパーオキシドディスムターゼ (Cu Zn SOD) を発見したことにその端を発する⁴⁷⁾。同博士は、1973年にはミトコンドリアマンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) をも発見している⁴⁸⁾。ところが、およそ、その10年後には、スーパーオキシドセオリーは、あまり効果がないようなことになってしまう⁴⁹⁾。それは、スーパーオキシドはそれ自体活性は弱く、反応性に乏しいとする研究が発表されたことによる。実は、このことは数年前まで、信じられてきた。この反論説から、また、数年が経過したころには、一酸化窒素が発表され⁵⁰⁾再び注目されることになる。そのうち、スーパーオキシドと一酸化窒素は容易に反応し、peroxynitrite という反応活性の著しく高い物質に変わることがわかった⁵¹⁾。我々は、1998年には、マンガンスーパーオキシドディスムターゼの遺伝子をトランスフェクトした細胞では、活性酸素刺激により生じるアポトーシス死に対し抵抗性を示すことを明らかにした²⁰⁾。すなわち、ミトコンドリア内スーパーオキシドの量を少なくす

るようにコントロールすることこそ、一連の後に続く生体内反応を制御することが可能であるということの意味する。この結果は、スーパーオキシドセオリーの revival のように見える。

5. 放射線障害とミトコンドリア

放射線を細胞に照射すると細胞は致死にいたる。この原因は細胞核DNAの切断に由来することがわかっている。放射線によるこのDNA切断は、放射線の直接電離による直接効果と、細胞内核DNA近傍の水分子の電離、ラディカル化を引き起こし、DNAにアタックする間接効果による⁵²⁾。放射線生物学では、これらの分子機構、及びDNA切断の修復機構の研究が分子生物学手法を用い、現在解明を目指し行われてきている⁵³⁻⁵⁵⁾。新しい知見では、放射線がDNAのベースの過酸化も引き起こし、これが、原因でDNAに障害を引き起こすことも明らかにされている。最近では、これらの細胞核をターゲットとする研究の他、細胞質にも種々の変化をきたすこと研究成果が報告されつつある^{1, 2, 56)} (Fig.1)。これらには、放射線によるシグナルトランスダクションの変化、サイトカインの誘発、脂質、蛋白質の過酸化、及びミトコンドリア障害も報告されている。特にミトコンドリアDNAは核DNAと比較し酸化ストレスに対し感受性が高いことが報告されている⁵⁷⁻⁶⁰⁾。放射線による細胞の障害は、細胞核における変化と、細胞質における変化の両方がおこり、これらの最終結果として細胞障害がおこることがイメージされる。前述のスーパーオキシドが放射線致死でも関連することも考えられる。

我々はミトコンドリアに障害を有する細胞における放射線感受性を調べてみた。本研究では、ミトコンドリアDNAの存在しないミトコンドリアDNA(-)細胞を用いた (Fig.3)。この細胞は、ミトコンドリア電子伝達系障害を持つ故に老化あるいは神経障害疾患の究極のモデルになりうる。ミトコンドリアDNA欠損細

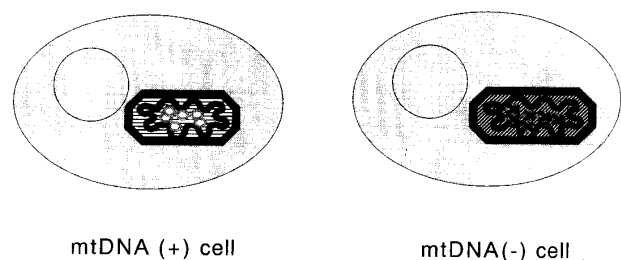
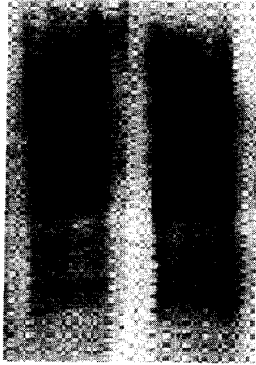


Fig.3: ミトコンドリアDNA欠損細胞 (Rho 0) scheme

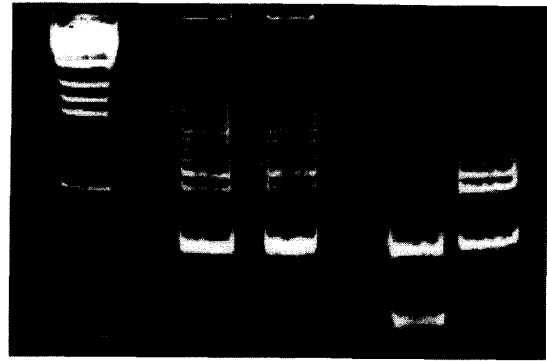
Telomere Length



143B Rho 0

Fig. 4a. : Rho 0 細胞におけるテロメア長。
(変化は認められない)。

Telomerase Activity by TRAP Assay



M 143B Rho0 NC PC

Fig. 4b. : Rho 0 細胞におけるテロメラーゼ活性。
(変化は認められない)。

胞において放射線感受性が変化すれば、ミトコンドリアが放射線感受性の変化、すなわち細胞致死機構に関連していることを示唆しよう。

ミトコンドリア DNA 欠損細胞の作成法は古く King⁶¹⁻⁶³より確立された。ミトコンドリア欠損細胞 (Rho 0)、およびその親細胞 (正常ミトコンドリア+細胞) (143B)⁶³を調べた。実験にはさらに Rho 0 細胞に正常ミトコンドリア移入した細胞 (87wt)を用いた。143B 細胞、及び Rho 0 細胞の倍加時間は各々 15.3 ± 1.1, 21.5 ± 1.7 時間と Rho 0 細胞の方が増殖が遅い。癌化、及び老化と関係が深いとされるテロメアを調べ

てみた結果、興味あることにテロメア長 (Fig.4a), テロメラーゼ活性とも両細胞 (Fig.4b)とも差異を認めなかった。

これらの細胞の放射線感受性を調べると Rho 0 細胞では、高感受性として観察され、Rho 0 細胞に正常ミトコンドリア移入した細胞 (87wt) では生存率の増大が認められた (Fig. 5)。アポトーシスでは Rho 0 細胞では少なく認められた (fig. 6)。ミトコンドリア DNA は、先に述べたように電子伝達系の一部の構成蛋白質をコードしているため、電子伝達系から発生するスーパーオキシド量を増大している可能性があるだろう。さらに、

Survival X-rays 4Gy

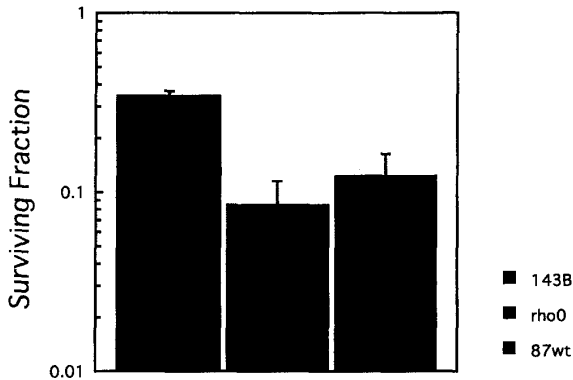


Fig. 5. : Rho 0 細胞における放射線感受性。Rho 0 細胞では高く、正常ミトコンドリア移入細胞では回復が見られる。

DNA Fragmentation X-rays 5Gy 48hr

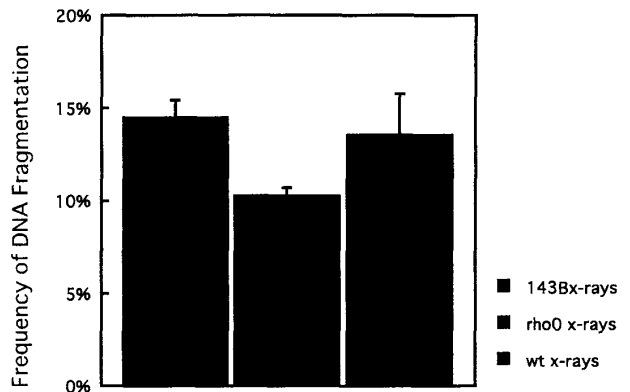


Fig. 6. : Rho 0 細胞におけるアポトーシス。Rho 0 細胞では低く、正常ミトコンドリア移入細胞では回復が見られる。



Fig. 7: マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) 遺伝子トランスフェクト細胞におけるMnSOD活性。

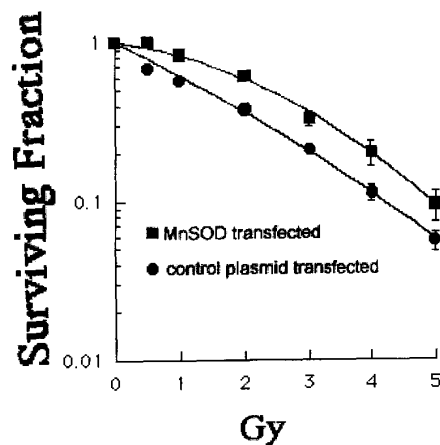


Fig. 8: MnSOD遺伝子トランスフェクト細胞における放射線感受性。低く観察される。

ミトコンドリア内スーパーオキシドを除去するマンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) と放射線感受性を調べてみよう。

6. MnSODと放射線感受性

MnSOD²⁰⁾はミトコンドリアに存在する酵素である。この酵素はSOD-2とも言われ、homotetramericの形態をとっている。ヒトでは第6番目の染色体にまたマウスでは8番目にその遺伝子が存在する。この酵素はミトコンドリアに移行する24個のアミノ酸からなるシグナルを有し、ミトコンドリアに到達後、そのシグナル部はクリーブされ、ミトコンドリア内部に移入し局在する。スーパーオキシドと一酸化窒素は容易に反応し、peroxynitriteという反応活性の著しく高い物質に

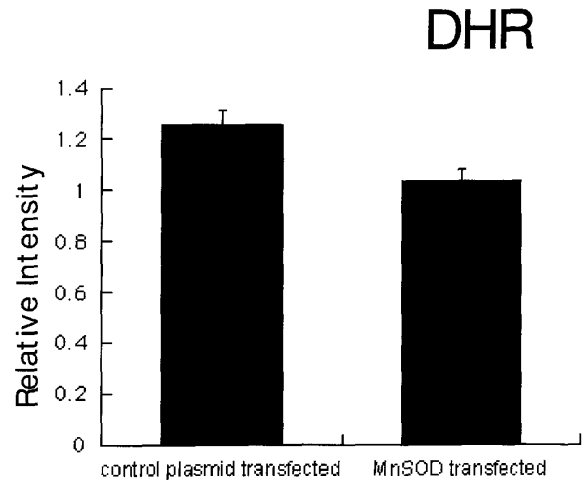


Fig. 9: MnSOD遺伝子トランスフェクト細胞におけるROS産生。低く観察される。

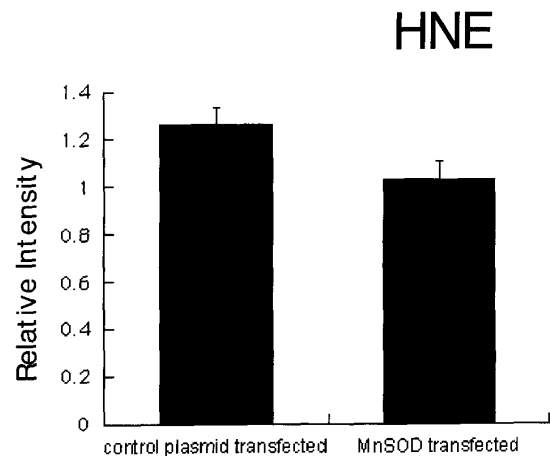


Fig. 10: MnSOD 遺伝子トランスフェクト細胞におけるHNE産生。低く観察される。

変わる。MnSODはミトコンドリア内でperoxynitrite生成を阻止している可能性が高い。MnSODと放射線感受性の関連はどうであろうか。

細胞にMnSOD遺伝子をトランスフェクトすると、MnSODの活性が増大して認められる (Fig. 7)。このMnSOD遺伝子トランスフェクト発現細胞では感受性の低下が認められた (Fig. 8)。さらに、MnSOD遺伝子トランスフェクト発現細胞では細胞内活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) (Fig. 9) 及び脂質過酸化のマーカー 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) (Fig. 10) の減少が認められた。

これらをまとめると放射線感受性にミトコンドリアが関与し、特にスーパーオキシドが関連するという

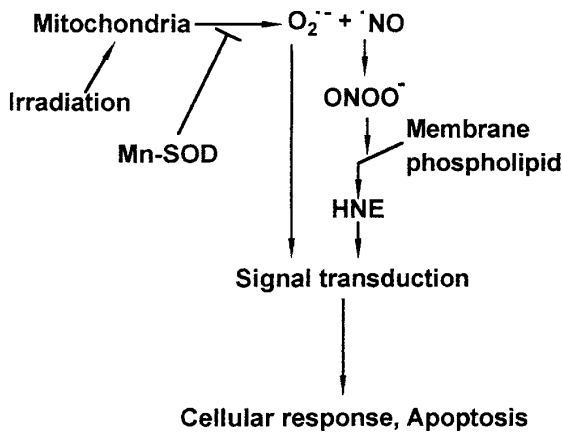


Fig. 11.: ニュースーパーオキシドセオリー (A New Superoxide Theory) scheme。

ことになる。しかも、この効果は MnSOD が阻止する。これは、前述のスーパーオキシドセオリーの再来であろう。これを筆者はニュースーパーオキシドセオリーと名付けている (Fig. 11)。

7. 終わりに

ミトコンドリア DNA の存在しないミトコンドリア DNA(-) 細胞が放射線に対し感受性が高いことを示した。ミトコンドリア DNA(-) 細胞に正常ミトコンドリアを導入した細胞では細胞の感受性の低下、すなわち回復が認められた。これらは、放射線による致死効果がミトコンドリア DNA によりも決定されることを示している。さらに、ミトコンドリア MnSOD 量は細胞放射線感受性を変化させることが観察された。これらは、放射線感受性決定の機序には、ミトコンドリア内活性酸素が深く関係している可能性を示している。ミトコンドリア DNA(-) 細胞は、神経疾患、老化の究極のモデルとなりうる。ミトコンドリア DNA(-) 細胞の生理学的意義の研究も行なわれてきている⁶⁴⁾。これらの研究により、これらの疾患の生理学的意義が明らかにされよう。

参考文献

- Schmidt-Ullrich R. K., Dent P., Grant S., Mikkelsen R. B. & Valerie K.: Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat. Res.*, 153, 245-257 2000
- Rosen E. M., Fan S., Rockwell S. & Goldberg I. D.: The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest.*, 17, 56-72, 1999
- Ross G. M.: Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr. Relat. Cancer*, 6, 41-44, 1999
- Verheij M. & Bartelink H: Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 301, 133-142, 2000
- Wallace K. B., Eells J. T., Madeira V. M., Cortopassi G. & Jones D. P.: Mitochondria-mediated cell injury: Symposium overview. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38, 23-37, 1997
- Cavalli L. R. & Liang B. C.: Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutat. Res.*, 398, 19-26, 1998
- Heales S. J., Bolanos J. P., Stewart V. C., Brookes P. S., Land J. M. & Clark J. B.: Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410, 215-228, 1999
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J. L. & Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 9, 1277-1287, 1995
- Petit P. X., Susin S. A., Zamzami N., Mignotte B. & Kroemer G.: Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.*, 396, 7-13, 1996
- Zamzami N., Hirsch T., Dallaporta B., Petit P. X. & Kroemer G.: Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29, 185-193, 1997
- Ghafourifar P., Schenk U., Klein S. D. & Richter C.: Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria: Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.*, 274, 31185-31188, 1999
- Ghafourifar P. & Richter C.: Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.*, 418, 291-296, 1997
- Richter C., Ghafourifar P., Schweizer M. & Laffranchi R.: Nitric oxide and mitochondrial Ca^{2+} . *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 914-918, 1997
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R. & Wang X.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157, 1996
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M.,

- Cai J., Peng T. I., Jones D. P. & Wang X.: Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275, 1129-1132, 1997
- 16) Cai J., Yang J. & Jones D. P.: Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366, 139-49, 1998
- 17) Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. & Newmeyer D. D.: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275, 1132-1136, 1997
- 18) Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D., Wang H. G., Reed J. C., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Green D. R. & Martin S. J.: Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.*, 144, 281-292, 1999
- 19) von Ahnen O., Renken C., Perkins G., Kluck R. M., Bossy-Wetzel E. & Newmeyer D. D.: Preservation of mitochondrial structure and function after bid- or bax-mediated cytochrome c release. *J. Cell Biol.*, 150, 1027-1036, 2000
- 20) Majima H. J., Oberley T. D., Furukawa K., Mattson M. P., Yen H. C., Szweda L. I. & St Clair D. K.: Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 273, 8217-8224, 1998
- 21) Wei Y. H., Lu C. Y., Lee H. C., Pang C. Y. & Ma Y. S.: Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 854, 155-170, 1998
- 22) Lu C. Y., Lee H. C., Fahn H. J. & Wei Y. H.: Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res.*, 423, 11-21, 1999
- 23) Linnane A. W., Marzuki S., Ozawa T. & Tanaka M.: Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, 1, 642-645, 1989
- 24) Kopsidas G., Kovalenko S. A., Heffernan D. R., Yarovaya N., Kramarova L., Stojanovski D., Borg J., Islam M. M., Caragounis A. & Linnane A. W.: Tissue mitochondrial DNA changes: A stochastic system. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 908, 226-243, 2000
- 25) Ozawa T.: Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol. Rev.*, 77, 425-464, 1997
- 26) Ozawa T.: Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 377-390, 1999
- 27) Melov S., Schneider J. A., Coskun P. E., Bennett D. A. & Wallace D. C.: Mitochondrial DNA rearrangements in aging human brain and in situ PCR of mtDNA. *Neurobiol. Aging*, 20, 565-571, 1999
- 28) Melov S., Schneider J. A., Day B. J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S. S., Crapo J. D. & Wallace D. C.: A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.*, 18, 159-163, 1998
- 29) Trounce I., Schmiedel J., Yen H. C., Hosseini S., Brown M. D., Olson J. J. & Wallace D. C.: Cloning of neuronal mtDNA variants in cultured cells by synaptosome fusion with mtDNA-less cells. *Nucleic Acids Res.*, 28, 2164-2170, 2000
- 30) Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prevost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C. & Kroemer G.: Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J. Exp. Med.*, 192, 571-580, 2000
- 31) Kroemer G. & Reed J. C.: Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 6, 513-519, 2000
- 32) Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. & Kroemer G.: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446, 1999
- 33) Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R. & Young I. G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-65, 1981
- 34) Wallace D. C.: Mitochondrial DNA in aging and

- disease. *Sci. Am.*, 277, 40-47, 1997
- 35) Beyer R. E.: An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem. Cell Biol.*, 70, 390-403, 1992
 - 36) Takeshige K. & Minakami S.: NADH⁻ and NADPH⁻ dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH⁻ ubiquinone reductase preparation. *Biochem. J.*, 180, 129-135, 1979
 - 37) Boveris A. & Chance B.: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134, 707-716, 1973
 - 38) Reichmann H. & Janetzky B.: Mitochondrial dysfunction—a pathogenetic factor in Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 247: Suppl. 2, 1163-1168, 2000
 - 39) Albers D. S. & Beal M. F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 59, 133-154, 2000
 - 40) Kirchner S. C., Hallagan S. E., Farin F. M., Dilley J., Costa-Mallen P., Smith-Weller T., Franklin G. M., Swanson P. D. & Checkoway H.: Mitochondrial ND1 sequence analysis and association of the T4216C mutation with Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 21, 441-445, 2000
 - 41) Hutchin T. & Cortopassi G.: A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6892-6895, 1995
 - 42) Hayakawa M., Hattori K., Sugiyama S. & Ozawa T.: Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 979-985, 1992
 - 43) Esposito L. A., Melov S., Panov A., Cottrell B. A. & Wallace D. C.: Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4820-4825, 1999
 - 44) McCord J. M., Keele B. B. Jr. & Fridovich I.: An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1024-1027, 1971
 - 45) Suzuki Y. J. & Ford G. D.: Mathematical model supporting the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 63-72, 1994
 - 46) Fridovich I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112, 1995
 - 47) McCord J. M. & Fridovich I.: Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055, 1969
 - 48) Weisiger R. A. & Fridovich I.: Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.*, 248, 4793-4796, 1973
 - 49) Sawyer D. T. & Valentine J. S.: Superoxide is not strong oxidant. *Acc. Chem. Res.*, 14, 393-400, 1981
 - 50) Palmer R. M., Ferrige A. G. & Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526, 1987
 - 51) Halliwell B., Zhao K. & Whiteman M.: Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic. Res.*, 31, 651-669, 1999
 - 52) Hall E. J.: *Radiobiology for the radiologist*. 4th ed. JB Lippincott Co. (Philadelphia), 1994
 - 53) Leadon S. A.: Repair of DNA Damage Produced by Ionizing Radiation: A Minireview. *Semin. Radiat. Oncol.*, 6, 295-305, 1996
 - 54) Karran P.: DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 144-150, 2000
 - 55) Pfeiffer P., Goedecke W. & Obe G.: Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15, 289-302, 2000
 - 56) Kubota N., Hayashi J-I. & Iwamura Y.: Induction of a particular deletion in mitochondrial DNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells. *Rad. Res.*, 148, 395-398, 1997
 - 57) Richter C., Park J. W. & Ames B. N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467, 1988
 - 58) Shigenaga M. K., Hagen T. M. & Ames B. N.: Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10771-10778, 1994
 - 59) Ames B. N., Shigenaga M. K. & Hagen T. M.: Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys.*

Acta, 1271, 165-70, 1995

- 60) Yakes F. M. & Van Houten B.: Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 514-519, 1997
- 61) King M. P. & Attardi G.: Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. Cell, 52, 811-819, 1988
- 62) King M. P. & Attardi G.: Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. Science, 246, 500-503, 1989
- 63) Trounce I., Neill S. & Wallace D. C.: Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T→G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 8334-8338, 1994
- 64) Chandel N. S. & Schumacker P. T.: Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. FEBS Lett., 454., 173-176, 1999