

P-009

Effects of methyl DNA lesions on human RNA polymerase II-transcription.

Isao Kuraoka¹, Kiyoji Tanaka²

¹Division of Chemistry, Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ; ²Laboratories of Organismal Biosystems, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka Univ.

DNA lesion interferes with DNA replication and transcription, leading to mutations and cell death, which may also cause cancer, inborn diseases, and aging. The majority of the DNA repair and mutagenesis studies are based on the actions of DNA polymerases. However, DNA lesion interferes transcription. Therefore, to estimate an accurate risk of damaged DNA in living cells, it will be an important to understand the behavior of RNA polymerase on the transcribed strand containing DNA lesions, which are induced by mutagens and carcinogens in the environment.

Here, we examined whether elongating RNA polymerase II (RNAPII) is stalled at sites of O6-methylguanine (O6-meG) or O4-methylthymine (O4-meT) on the transcribed strand. In case of O6-meG, RNAPII stalled at the lesion, but in case of O4-meT, it bypassed it. In addition, we found that O6-meG and O4-meT generated a G:C to A:T and a T:A to C:G transcriptional transition in the transcription products, respectively. These findings indicate that O6-meG lesions caused a blockage of transcription elongation and/or O6-meG and O4-meT led the misincorporation of a ribonucleotide, implying the initiation of transcription-coupled repair of O6-meG and/or transcriptional mutagenesis of O6-meG and O4-meT.

P-010

Oxidative and nitrative DNA damage in mice with oncogenic ras

Shiho Ohnishi¹, Hiromitsu Saito², Noboru Suzuki², Yusuke Hiraku³, Mariko Murata³, Shosuke Kawanishi¹

¹Suzuka University of Medical Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences; ²Department of Animal Genomics, Mie University, Life Science Research Center; ³Department of Environmental and Molecular Medicine, Mie University Graduate School of Medicine

K-ras mutations are frequently observed in human lung cancer. K-ras mutations seemed to be important for lung carcinogenesis because it is reported that the activation of the K-ras oncogene leads to lung adenocarcinomas in mouse model. In this study, we analyzed the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-nitroguanine in mice with pulmonary adenocarcinomas caused by K-ras mutation.

Knock-in mice with oncogenic K-ras, conditionally expressed by Cre/LoxP system, were prepared. The mutated K-ras has a point mutation in codon 12. We performed immunohistochemical analysis of oxidative and nitrative DNA damage in lung tissues of mice after induction of mutated K-ras.

8-OxodG and 8-nitroguanine were apparently formed in lung adenocarcinomas, associated with increased expression level of oncogenic K-ras. These DNA damage may play a role in carcinogenesis induced by oncogene, because 8-oxodG and 8-nitroguanine can induce mutations. The mechanism for 8-nitroguanine formation is under investigation.

ヒト RNA ポリメラーゼ II 転写反応におけるメチル化 DNA 損傷の影響

倉岡 功¹、田中 亀代次²

¹大阪大学大学院基礎工学研究科、²大阪大学大学院生命機能研究科

DNA 損傷は、複製および転写を阻害し、変異や細胞死を導き、最終的に発がん、遺伝病および老化を引き起こすことが考えられている。これまでのその損傷を修復する機構およびその損傷による突然変異機構の研究では多くの場合、DNA ポリメラーゼを基とした実験が行なわれて来た。しかしながら、DNA 損傷は転写を阻害する。それ故、細胞における正確な損傷の危険性を評価するためには、環境中の変異原および発がん剤などによって生じる DNA 損傷をもった転写鎖における RNA ポリメラーゼの挙動を理解する事は重要なことだと思われる。

今回、我々は転写伸長中の RNA ポリメラーゼ II が O6 メチルグアニンおよび O4 メチルチミンにおいて停止するかどうか調べた。O6 メチルグアニンの場合、RNA ポリメラーゼ II は停止したが、O4 メチルチミンでは、ポリメラーゼは損傷を乗り越えた。またそれぞれの損傷は GC to AT および TA to CG トランジション転写変異を起こしていた。O6 メチルグアニンは転写と共役した DNA 修復によって修復される可能性を、またそれぞれの損傷は、転写変異を引き起こす可能性を示唆していた。

ras 遺伝子変異マウスにおける酸化およびニトロ化 DNA 損傷

大西 志保¹、齋藤 浩充²、鈴木 昇²、平工 雄介³、村田 真理子³、川西 正祐¹

¹鈴鹿医療科学大学・薬学部、²三重大学・生命科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス、³三重大学・医学部・環境分子医学

ヒト肺がんでは K-ras 遺伝子の変異が多い。動物実験でも K-ras 変異により肺腫瘍を引き起こすことから肺がんの発生には K-ras 変異が重要と考えられる。本研究では、K-ras 変異により肺腫瘍を発生させたマウスにおける、8-オキシグアニンおよび 8-ニトログアニンの生成を解析した。

まず活性変異型 K-ras を、Cre-LoxP 系を用いてコンディショナルに発現させることができるよう、遺伝子改変したマウスを作成した。変異型 K-ras は、肺がんでは報告の多いコドン 12 のアミノ酸置換型変異を導入した。変異型 K-ras を発現させた後、マウスを解剖して肺の組織標本を得て、酸化およびニトロ化 DNA 損傷の解析を免疫組織化学的に行った。

その結果、腫瘍形成部位では変異型 K-ras の発現上昇とともに、8-オキシグアニンおよび 8-ニトログアニンの生成が見られた。8-オキシグアニンおよび 8-ニトログアニンは変異誘発能を持つことから、これら DNA 損傷塩基の蓄積が、がん遺伝子による発がんにおいても関与している可能性がある。また 8-ニトログアニンの生成には酸化窒素種の関与が考えられるが、その産生機構については現在検討中である。