

## P-011

**Oxidatively generated DNA damage induced by AMT, a metabolite of carcinogenic amitrole**

Ayako Furukawa<sup>1</sup>, Shinji Oikawa<sup>2</sup>, Kanako Harada<sup>2</sup>, Hirokazu Sugiyama<sup>2</sup>, Yusuke Hiraku<sup>2</sup>, Mariko Murata<sup>2</sup>, Atsuyoshi Shimada<sup>1</sup>, Shosuke Kawanishi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inst. for Developmental Res., Aichi Human Service Center.

<sup>2</sup>Dept Environ. Mol. Med., Mie Univ. <sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka Univ. of Medical Science.

Amitrole, which is a widely used herbicide, induces thyroid and liver tumors in rodents. However, the mechanism of carcinogenesis by amitrole remains to be clarified. In this study, we investigated DNA damage by an amitrole metabolite, 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AMT), in the presence of Cu(II). The amount of 8-oxodG was increased by AMT in the presence of Cu(II). AMT-induced 8-oxodG formation was enhanced in deuterium oxide (D<sub>2</sub>O). Sodium azide and DABCO, potent and relatively specific scavengers of <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, and bathocuproine, a Cu(I) chelator, inhibited AMT-mediated 8-oxodG formation, suggesting that <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and Cu(I) play an important role in DNA damage induced by AMT. AMT plus Cu(II) also induced piperidine-labile DNA lesions frequently at every guanine residue. It is concluded that oxidatively generated DNA damage induced by AMT via the generation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> may contribute to carcinogenicity of amitrole.

**発がん性アミトロール代謝物AMTによる酸化的DNA損傷**

古川 絢子<sup>1</sup>、及川 伸二<sup>2</sup>、原田 夏菜子<sup>2</sup>、杉山 浩一<sup>2</sup>、平工 雄介<sup>2</sup>、村田 真理子<sup>2</sup>、島田 厚良<sup>1</sup>、川西 正祐<sup>3</sup>

<sup>1</sup>愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理、<sup>2</sup>三重大院・医・環境分子医学、<sup>3</sup>鈴鹿医療科学大・薬学

アミトロールを含む除草剤を扱う労働者において、がんによる死亡が増加したことが報告されている。また、アミトロールはラットやマウスに甲状腺濾胞腺癌や肝癌などを引き起こす。アミトロールによる変異原性は認められておらず、その発がん機構は不明である。本研究では、アミトロール代謝物、3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AMT) によるDNA損傷性を検討し、その発がん機構の解明を行った。2価の銅イオンの存在下においてAMTは濃度依存的に8-oxodGの生成を増加させた。一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)の寿命を延長させるD<sub>2</sub>O(重水)中では、8-oxodGの生成量がより増加した。<sup>1</sup>O<sub>2</sub>のスカベンジャーであるsodium azideとDABCOおよび1価の銅イオンキレート剤、バソキュプロインにより8-oxodGの生成は抑制された。また、AMTは全てのグアニンを損傷した。以上の結果からAMTによる酸化的DNA損傷には<sup>1</sup>O<sub>2</sub>と1価の銅イオンが関与することが明らかになった。アミトロールによる発がん機構には、その代謝物による<sup>1</sup>O<sub>2</sub>生成を介した酸化的DNA損傷が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(Mutat Res/Fund Mol M, in press)

## P-012

**Effects of p53- and Rb-knockdowns on mutations induced by 8-hydroxyguanine**

Hiroyuki Kamiya<sup>1</sup>, Tetsuya Suzuki<sup>1,2</sup>, Hideyoshi Harashima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Natl. Inst. Hlth. Sci.

Tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma protein (Rb), arrest cell cycle to repair the damage when living cells are exposed to reactive oxygen species (ROS). p53 also enhances base excision repair pathway which repairs oxidized guanine, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua). However, it is unclear whether the mutations induced by 8-OH-Gua are actually suppressed by p53 and Rb. We examined effects of p53- and Rb-knockdowns on the 8-OH-Gua-induced-mutations.

To examine whether p53 and Rb suppress the mutations induced by the oxidized guanine, replicable shuttle vector plasmid which contains 8-OH-Gua:C pair on the *supF* gene was introduced into p53- or Rb-knocked-down human cells and mutations in the *supF* gene were analyzed. The mutation frequencies induced by 8-OH-Gua were not significantly different in the p53- and Rb-knocked-down cells compared with control cells. These results suggest that p53 and Rb do not suppress the mutations induced by 8-OH-Gua.

**p53とRbのノックダウンは8-ヒドロキシグアニン誘発変異に影響しない**

紙谷 浩之<sup>1</sup>、鈴木 哲矢<sup>1,2</sup>、原島 秀吉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院、<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所

【目的】腫瘍抑制遺伝子産物であるp53とRbは、活性酸素を暴露させた場合に細胞周期を停止させる。また、p53は8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)の修復経路である塩基除去修復を活性化する。しかし、p53やRbが実際に8-OH-Guaが誘発する変異の抑制に寄与しているか否かは明らかにされていない。そこで、本研究では、8-OH-Gua誘発変異へのp53やRbのノックダウンの影響を調べた。

【方法】ヒトU2OS細胞にsiRNAを導入してp53やRbをノックダウンした。ノックダウン細胞に8-OH-Gua:C塩基対を*supF*遺伝子中に含む複製型プラスミドDNAを導入した。複製された*supF*プラスミドDNAを回収し、指示大腸菌に導入し*supF*変異体率を算出した。

【結果】p53やRbのノックダウンは8-OH-Gua誘発変異頻度に影響しないことが明らかとなった。

【結論】U2OS細胞においては、p53やRbが8-OH-Gua誘発変異に大きく寄与はしていないことが示唆された。