

DNA 傷害におけるシグナル伝達機構とアポトーシス誘導制御

吉田 清 嗣

生きとし生けるものは全て、その生を授かった瞬間から死という不可避な運命に向かって歩を進めていると言える。そのような観点で死という運命のからくりを知ることにより、生への真の理解が深まるのではないかと考えられる。細胞レベルでは、この生と死の決定が間断なく下されており、結果としてあるバランスで恒常性を維持していることが知られている。さらにこれまでの研究から、死ぬか生きるかを決めている仕組みが分子レベルにおいてかなり解明されてきている。中でも、遺伝情報の担い手であってその正確な複製と子孫への伝達が種を超えて生物的特性と位置づけられている最も重要な分子群である DNA に、何らかの理由で傷害が生じた場合の細胞の応答機構が、少しずつではあるが明らかになってきた。DNA の傷害が直せる場合には、細胞はいったん増殖を止めてその傷害を修復するが、DNA の傷害が直せないと判断した場合には細胞は自ら死を選択する。本稿ではこの細胞の運命決定のメカニズムを中心に、筆者らの研究も含め DNA 傷害におけるシグナル伝達機構とアポトーシス誘導制御について、概説したい。

1. はじめに

我々の個体の細胞は、通常その殆どが静止期 (G_0 期) にあって細胞分裂しないことが知られている。神経細胞や筋肉細胞のように、全く分裂しない細胞もある。ところが、ひとたび外界からの刺激などにより細胞が増殖する指令が下されると、一部の例外を除いて細胞分裂を繰り返すことになる。これは、 G_0 期から細胞周期の G_1 期に進入し、細胞周期を $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow G_1$ と秩序正しく進行させることであり、必要な細胞分裂が終了すれば、細胞周期から脱出して速やかに G_0 期に戻る。細胞分裂で最も重要なことは、遺伝情報を正確に子孫に伝えること、すなわち DNA 複製とその分配 (有糸分裂) である。この DNA 複製とその分配の推進は、細胞周期のエンジンであるサイクリンとサイクリン依存性キナーゼにより引き起こされる。一方、

DNA 複製と分配という作業中にはさまざまな事故が起こりうるため、各作業ステップを監視して細胞周期の進行にブレーキをかけているのがチェックポイントコントロールである¹⁾。このチェックポイントコントロールのなかで、DNA 損傷が存在するときに細胞周期の進行を停止させる経路を総称して損傷チェックポイント経路と呼ぶ。DNA 損傷はさまざまな要因で生じることが知られており、いつ、どこで、どのくらい傷害を受けたかを判断し、損傷チェックポイント経路を起動させ多種多様な応答システムを可能にしているのである (図 1)。この経路は①DNA 損傷の存在を検出 (sensors)、②検出された場合にその情報を増幅しながら伝達 (transducers)、③エフェクター (effectors)、の 3 ステップからなる (図 2)。電離放射線で誘導された二本鎖 DNA 切断の場合、ステップ①により照射後数分間以内に全ての二本鎖切断部位近傍にあるヒストンがリン酸化される²⁾。ステップ②にはキナーゼカスケードが重要な働きを担っており、Ataxia telangiectasia mutated (ATM) がその中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。ステップ③には、細胞周期の進行を一時停止する、DNA 修復経路を活性化し、アポトーシスを誘導する、といった多彩な機能が含まれており、がん抑制遺伝子産物である p53 を中心とした制御機構が働いている。

東京医科歯科大学難治疾患研究所 (〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45)

Mechanisms for induction of apoptosis in response to DNA damage

Kiyotsugu Yoshida (Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

本総説は 2007 年度奨励賞を受賞した。

DNA傷害とは

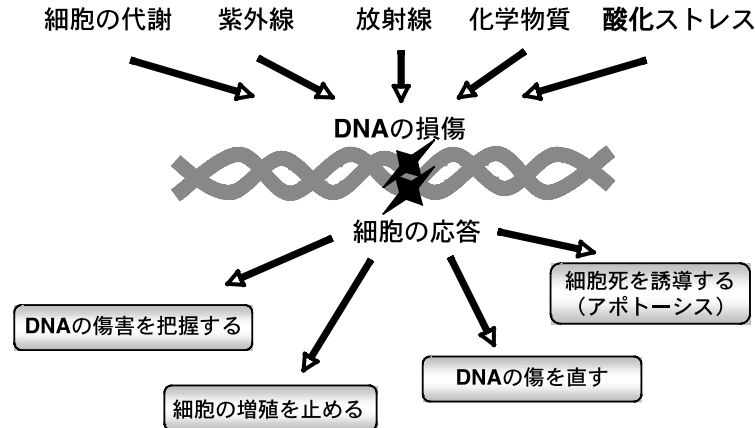


図1 さまざまなDNA傷害と細胞の応答

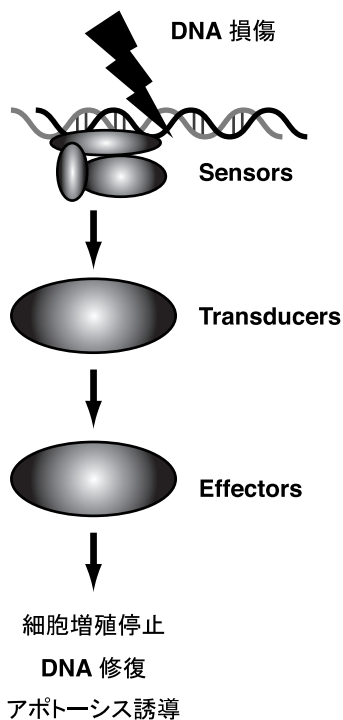


図2 DNA損傷チェックポイント経路

2. ATM遺伝子とその機能

ATM遺伝子は毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT) と呼ばれる, 進行性の失調症と眼球結膜の毛細管拡張を呈する疾患の原因遺伝子である. 1995年にShilohらのグループによりポジショナルクローニング法で第11染色体長腕23に位置するATM遺伝子の一部が同定され³⁾, 1997年にLavinらのグループにより全長cDNAがクローニングされた⁴⁾. 13kbのmRNA, 3,056個のアミノ酸からなる推定350kDaの巨大なタンパク質をコードす

る. ATMのC末端領域にはホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI-3K) に高い相同性を有する領域がある. 構造的に, チェックポイント遺伝子産物である出芽酵母のMEC1やTEL1, 分裂酵母のRAD3, ドロソフィラのMEI41と同じPI-3K関連ファミリーであることが示されている. これまでの研究から, DNA損傷時に起こる生体の反応において, ATMの下流で様々なタンパク質が制御を受け働いていることがわかってきた. 特に細胞周期チェックポイント機能について考えてみたい (図3).

1) G₁/S期チェックポイント

G₁/S期チェックポイントでは, 電離放射線によるDNA損傷に際し, ATMはp53のセリン15をリン酸化し, またChk2をリン酸化することで活性化したChk2がp53のセリン20をリン酸化する. これにより, p53をユビキチン化することで分解へと導くMDM2との結合が解除され, 直接並びに間接的にp53の安定化が促進し, 活性化される. さらにMDM2はATMによって直接リン酸化されることによりp53のさらなる蓄積に貢献しているらしい⁵⁾. このようなp53の蓄積と転写機能の活性化は, p21の発現誘導を介してサイクリンE/Cdk2, サイクリンA/Cdk2の活性を抑制することにより, G₁/S期チェックポイントを制御していることが明らかになってきた.

2) S期チェックポイント

S期チェックポイントにおいては, 正常な細胞では放射線照射などによりDNA合成は抑制されるが, AT患者細胞ではこのような抑制が起こらず, 放射線抵抗性DNA合成 (RDS) とよばれる状態を示すことが知られている. 近年, ATMによるChk2のリン酸化と活性化がG₁/S期チェックポイントだけでなく, S期チェックポイントにも

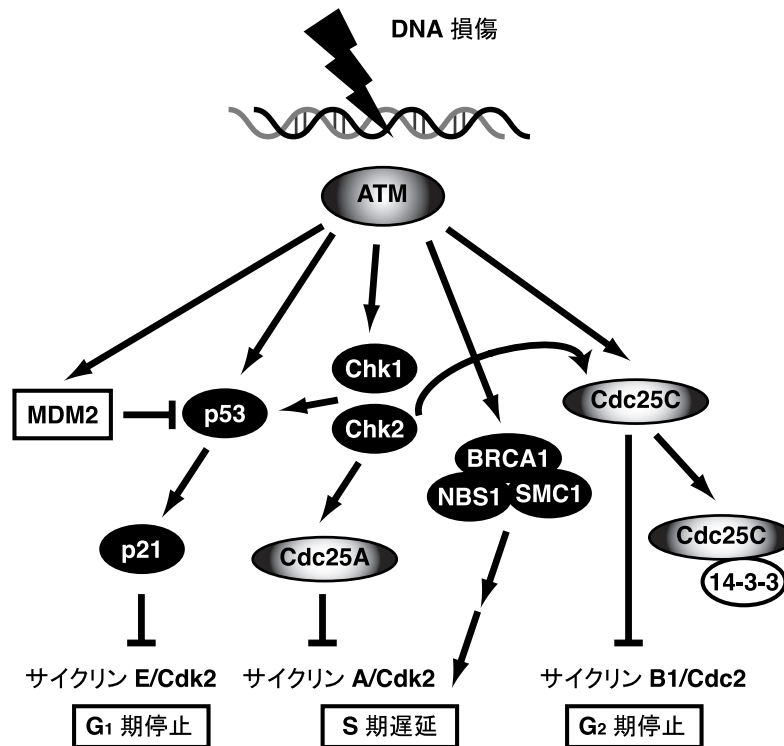


図3 ATMによる細胞周期チェックポイント制御

重要な働きを担っていることが明らかにされた。Chk2はCdc25Aのセリン123をリン酸化し、ユビキチン依存性経路を介してCdc25Aの分解を促進する。Cdc25Aはチロシン脱リン酸化酵素であり、サイクリンA/Cdk2を活性化することから、Cdc25Aの分解によりサイクリンA/Cdk2の機能が抑制される。一方、AT細胞ではこの抑制が働かないため、S期への進行を止めることができないと考えられる^{6,7)}。またNijmegen症候群の責任遺伝子産物であるNBS1もATMによりリン酸化され、このリン酸化がRDSの抑制に必要であるという報告がなされた^{8,9)}。家族性乳がんの原因遺伝子産物BRCA1もATMによってリン酸化を受けることが知られており¹⁰⁻¹²⁾、このリン酸化によりDNA損傷におけるS期チェックポイントのみならず、G₂期チェックポイントにも関わっていることが示唆されている¹³⁾。出芽酵母の染色体凝集・分配に必要な遺伝子産物として同定されたSMC1のヒトホモログもATMによってリン酸化され、S期チェックポイントに関与しているらしい^{14,15)}。また近年同定されたファンconi貧血の原因遺伝子産物であるFANCD2もATMによってリン酸化を受け、放射線照射によるRDSの抑制に関わっていることが示されている¹⁶⁾。このように、ATMは様々な経路を介してDNA損傷におけるS期チェックポイント制御の要として機能していることが明らかになっている。

3) G₂/M期チェックポイント

G₂/M期チェックポイントにおいてもATMは重要な働きをしているらしい。通常G₂期にいる細胞が放射線照射を受けるとG₂/M期チェックポイントが働きM期への進入が停止されるが、AT細胞ではG₂期にとどまることなくM期に突入してしまう。このATM依存的なG₂/M期チェックポイントは、前述したようにATMによるBRCA1のリン酸化が必要らしい。また、Cdc25CはサイクリンB/Cdc2複合体をチロシン15の脱リン酸化によって活性化しM期への進行を促すが、Cdc25Cが核外に放出されることによってサイクリンB/Cdc2複合体の脱リン酸化が起こらず、M期への進入が阻害されることが知られている。ATMはChk2の活性化を介してCdc25Cのリン酸化と14-3-3σとの結合を促し、Cdc25Cの核外排出によりG₂/M期チェックポイントに貢献していることも示されている¹⁷⁾。さらに、Rad17もATMによってリン酸化され、このリン酸化はRad9-Rad1-Hus1複合体形成に必須であり、このリン酸化が起こらないとG₂/M期チェックポイントが働かないという報告もある^{18,19)}。

4) ATMによるc-Ablチロシンキナーゼの制御

チロシンキナーゼは様々な刺激によって活性化され、標的因子のチロシン残基リン酸化によってシグナル伝達を制御する酵素である。その機能は多岐に渡り、細胞の分化、増殖などに必須の役割を担っている。c-Ablチロシンキ

ナーゼは、Src ファミリーチロシンキナーゼとほぼ相同的構造とそれに続く長いC末端領域から成っており、そこにはDNA結合領域、三つの核移行シグナル、アクチン結合領域、一つの核外移行シグナルなどが存在する(図4A)。

その構造的特徴から幅広い機能を有するキナーゼとして解析が進められていたが、95年に電離放射線によるDNA損傷によって活性化されるという全く新しい知見が示された²⁰⁾。続いてc-Ablが電離放射線によるG₁期での細胞周期

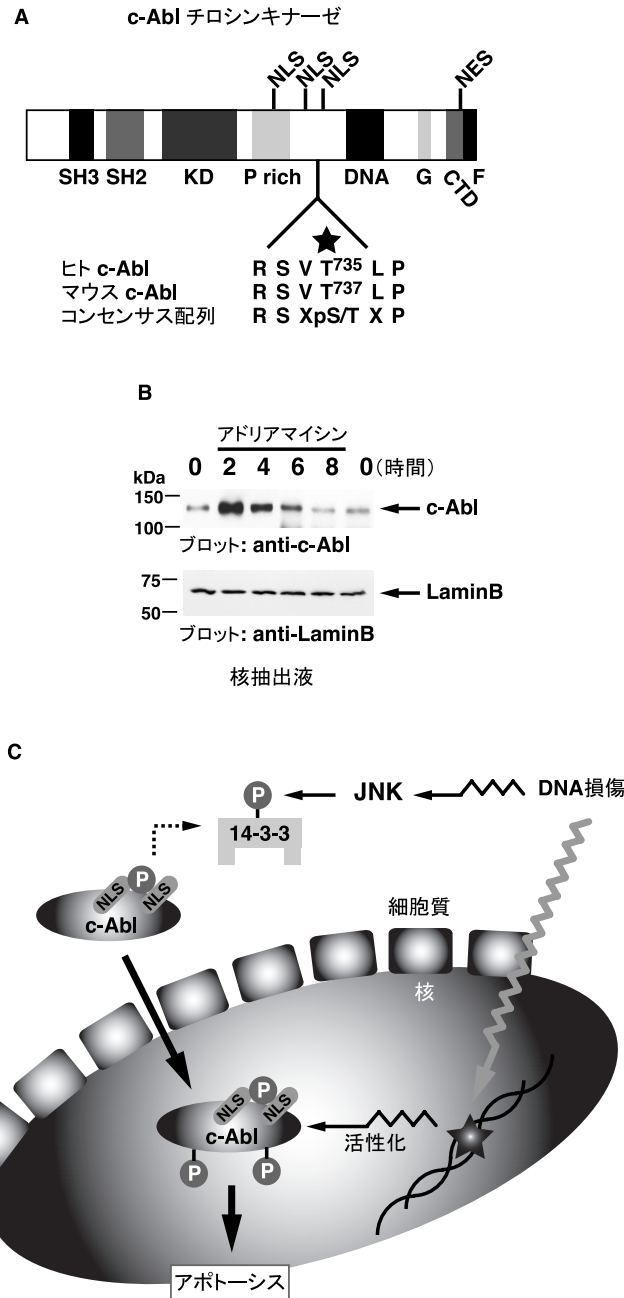


図4 c-Abl チロシンキナーゼはDNA損傷に応答して細胞核に移行しアポトーシスを誘導する

A: c-Abl チロシンキナーゼの構造と14-3-3結合部位。KD, チロシンキナーゼドメイン; P rich, プロリンリッチドメイン; DNA, DNA結合ドメイン; G, G-アクチン結合ドメイン; CTD, RNAポリメラーゼII C末端ドメイン結合領域; F, F-アクチン結合ドメイン; NLS, 核移行シグナル; NES, 核外移行シグナル。2番目と3番目の核移行シグナル間に14-3-3結合配列が存在し、この配列はマウスでも保存されている。★; リン酸化部位。B: HeLa細胞にアドリアマイシンを添加し、核分画におけるc-Ablの発現を計時的に観察したところ、処理後2時間で核移行はピークに達し、その後漸減していった。C: 未刺激の細胞では、c-Ablは細胞質と核を行き来しており、その一部は14-3-3と結合し細胞質に留まっている。一方、抗がん剤などによってDNA損傷が誘発された細胞は、活性化されたJNKによって14-3-3がリン酸化され、14-3-3からc-Ablが解離する。核移行シグナルが露出したc-Ablは核に移行し、活性化されp73, Rad9などを介してアポトーシスを誘導すると考えられる。(文献29より引用, 改変)

停止に必須であるという報告がなされたが²¹⁾、異論もあり未決着のままである^{22, 23)}。さらに、Wang らのグループは、AT 患者からの細胞や ATM ノックアウトマウスの線維芽細胞ではこの電離放射線による c-Abl の活性化が起こらないことを見出した。さらに彼らは、ATM ノックアウトマウス線維芽細胞に ATM キナーゼドメインのみを導入、発現させるとこの欠陥が補正されること、逆にキナーゼドメイン内にアミノ酸点変異を導入した変異 ATM を導入、発現させてもこの欠陥が補正されないことを示し、電離放射線による細胞応答において c-Abl が ATM によりリン酸化・活性化を受ける標的分子であることを明らかにした²⁴⁾。また Lavin らのグループは、ATM が c-Abl とその SH3 ドメインを介して直接結合していることを明らかにした。ATM と c-Abl との結合は恒常的なもので、電離放射線の照射によっても変化はなかったが、DNA 損傷があるときのみ ATM は c-Abl を活性化することが示された²⁵⁾。先の、DNA 損傷がなくても ATM キナーゼドメインのみで c-Abl が活性化されるという Wang らの知見と考え合わせると、DNA 損傷に応答して ATM に c-Abl リン酸化のゴーサインを出す“DNA 損傷センサー”のような未知の分子の存在が予想される。

3. DNA 損傷における c-Abl の活性化と アポトーシス誘導

c-Abl チロシンキナーゼは DNA 損傷を始めとする様々なストレスに応答して活性化し、細胞死（アポトーシス）を誘導する。DNA 損傷における c-Abl のアポトーシス誘導能は 1996 年に報告され²⁶⁾、その後、細胞死誘導のターゲットとして p73 が同定された²⁷⁾。しかし、c-Abl は p73 を含む p53 ファミリーが欠損した細胞でも同様にアポトーシスを誘導することから、p73 以外のターゲット分子の存在が予見され、我々は新たな基質としてチェックポイントに関わる Rad9 を同定した²⁸⁾。そもそも c-Abl は核、細胞質にユビキタスに発現しており、核内の c-Abl が DNA 損傷で活性化されてアポトーシスを誘導することが知られている。我々は c-Abl の核内ターゲット分子 Rad9 を同定する過程で、c-Abl が DNA 損傷に伴って細胞質から核に移行することを見出し、その分子メカニズムを明らかにした。さらにこの核移行がアポトーシス誘導を制御していることを見出した²⁹⁾。

1) DNA 損傷に応答した c-Abl の核移行

種々のがん細胞株を抗がん剤で処理し c-Abl の細胞内局在を調べたところ、核への集積が確認された（図 4B）。この核移行は DNA 損傷後約 2 時間をピークとした一過性の現象であり、またこの移行は c-Abl のキナーゼ活性とは無関係であった。後述するように DNA 損傷によって活性化

され強力にアポトーシスを誘導するキナーゼ、C キナーゼ δ (PKC δ) も同様に核に集積することが知られているが、このケースではキナーゼ活性に依存していることから^{30, 31)}、そのメカニズムは異なることが予測される。そこで、DNA 損傷による c-Abl の核移行には何らかの制御分子が関わっていることが示唆され、c-Abl に会合するタンパク質を質量分析計によって解析したところ、その一つとして 14-3-3 というアダプター分子を同定した。

2) 14-3-3 と JNK による c-Abl の細胞内局在制御

14-3-3 は真核生物中に幅広く存在するタンパク質ファミリーであり、特定のアミノ酸配列のリン酸化セリン/スレオニンに結合して、タンパク質間の結合を制御し多彩な細胞内シグナル伝達を調節している。その生理的役割の一つとして、結合分子の細胞内局在の調節が挙げられ、細胞質中に留めておくという働きが多数報告されている。実際に c-Abl と 14-3-3 の会合を検討したところ細胞質にのみ検出され、さらにこの会合は DNA 損傷によって著しく減弱した。このことから、14-3-3 との会合によって細胞質に局在していた c-Abl が、DNA 損傷によって何らかの機構により 14-3-3 から解離し核に移行することが示唆された。次に c-Abl の 14-3-3 結合部位を検討した。14-3-3 は RSXpS/TXP (X は任意のアミノ酸) という配列に結合することが知られており、c-Abl にはこのコンセンサス配列が一箇所存在する (RSVT⁷³⁵LP)。興味深いことに、この配列は c-Abl の 2 番目と 3 番目の核移行シグナル領域間のほぼ中央かつきわめて近傍に位置しており、もし 14-3-3 が結合するとこの領域がマスクされる可能性が高い（図 4A）。そこでこの配列が 14-3-3 結合部位かについて変異体を用いた実験で検証したところ、実際に結合ドメインであることを確認した。さらにスレオニン 735 がリン酸化されているかを検討したところ、恒常的にリン酸化を受けていた。また DNA 損傷によりそのリン酸化レベルは変化しないという予想外の結果を得た。なぜなら、14-3-3 はその標的因子における結合部位のリン酸化・脱リン酸化によって結合のオン・オフが規定されている例が多いからである。DNA 損傷前後での 14-3-3 の発現量には変化が見られないことから、c-Abl の 14-3-3 からの解離には何らかの 14-3-3 の修飾が関わっている可能性が推察された。いくつかの可能性を検討し、結論として MAP キナーゼファミリーの一つで広範なストレスに応じて活性化される JNK による 14-3-3 のリン酸化が主たる役割を担っていることを突き止めた。すでにアポトーシス誘導分子である Bax のミトコンドリア移行に JNK による 14-3-3 のリン酸化が関わっていることが報告されている³²⁾。類似のメカニズムが c-Abl の 14-3-3 からの解離にも関与しているかを調べるために JNK 活性を阻害したところ、DNA 損傷による c-Abl の解離が有意

に抑制されることが明らかとなった。さらに14-3-3のJNKリン酸化部位であるセリンをアラニンに置換した変異体でも、c-Ablの14-3-3からの解離が減弱していたことから、このメカニズムの妥当性が示された。

3) スレオニン 735 をリン酸化するキナーゼの同定

c-Ablの14-3-3との結合に最も重要なスレオニン735をリン酸化するキナーゼが不明なままであった。そこでこのキナーゼを同定するためにスレオニン735リン酸化特異的抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGEにて展開後、複合体構成群を逐次質量分析計にて解析しキナーゼの同定を試みたが、残念ながらキナーゼの同定には至らなかった。そこでゲノムワイドな網羅的解析として、ラムダファージによるスレオニン735リン酸化特異的抗体を用いた発現クローニングも並行して進め、候補となるキナーゼの同定を試みた。その結果、5種類のタンパク質がスレオニン735をリン酸化するキナーゼの候補として挙げた。これらのキナーゼがインビトロでスレオニン735をリン酸化するか確認するため、インビトロキナーゼアッセイを行ったところ、5種類のキナーゼでスレオニン735のリン酸化反応が検出された。次に、COS-7細胞にGFPベクター、5種類のGFP-キナーゼ(野生型または不活性型)をそれぞれFlag-c-Ablと共にトランスフェクションした。細胞抽出液を抗Flag抗体で免疫沈降し、抗スレオニン735リン酸化抗体でプロットした。その結果、不活性型キナーゼではリン酸化反応が検出できなかったのに対して、野生型のキナーゼではスレオニン735のリン酸化亢進が見られた。よって、過剰発現系において5種類のキナーゼ活性依存的にスレオニン735をリン酸化することが明らかとなった。さらにスレオニン735のリン酸化をより詳しく解析するため、キナーゼ不活性型であるFlag-c-Abl(K-R)を安定的に発現するHeLa/dn-c-Abl細胞を作製した。この細胞をH₂O₂で刺激すると、スレオニン735のリン酸化は20分をピークに亢進し、4時間で元に戻った。HeLa/dn-c-Abl細胞で5種類のキナーゼがスレオニン735のリン酸化に関与するかどうかを調べるため、siRNAを用いてキナーゼをノックダウンし、細胞をH₂O₂で刺激した。4種類のキナーゼをノックダウンしてもH₂O₂の刺激によるスレオニン735のリン酸化亢進に影響は見られなかったが、残りの一つのキナーゼをノックダウンしH₂O₂で刺激すると、このリン酸化の亢進は抑制された。次にc-Ablとこのスレオニン735キナーゼの細胞内局在を見るため、免疫染色を行った。c-Ablは主に細胞質にあり、キナーゼは細胞質と核に存在した。次に、c-Ablの核内移行にこのスレオニン735キナーゼが関与するかを検討したところ、コントロールでは酸化ストレスによって細胞質にあるc-Ablが核内へと移行した。一方、このスレオニン735キナーゼをノックダウンした細胞

では、H₂O₂刺激に関係なくc-Ablの核内集積が起こった。これらの結果からこのスレオニン735キナーゼはc-Ablを細胞質にとどめておく機能をもつことがわかった。

スレオニン735キナーゼがc-Ablを細胞質にとどめておくことが、アポトーシスとどのような関係にあるか調べるため、HeLa/dn-c-Abl細胞にsiRNAをトランスフェクションしてスレオニン735キナーゼをノックダウンし、DMSOまたはc-Ablの阻害剤であるSTI571で前処理した後にH₂O₂で刺激しTUNELアッセイによってアポトーシスを評価した。この結果、スレオニン735キナーゼをノックダウンすると酸化ストレスによるアポトーシスを起こしやすくなった。また、このアポトーシスはSTI571による前処理で抑制された。従ってスレオニン735キナーゼはc-Abl依存的なアポトーシスに抵抗性を示すと考えられる。

4) c-Abl 依存性アポトーシス誘導における核移行の意義

14-3-3とJNKによるc-Ablの細胞内局在調節機構が、DNA損傷によるアポトーシス誘導にどのように関わっているかについて検討を行った。c-Ablを細胞に導入するとアポトーシスが誘導され、それは抗がん剤処理により増強するが、14-3-3を共発現させると、有意にアポトーシス誘導を抑制した。さらに、JNKによるリン酸化を受けない変異体14-3-3の導入により、その抑制効果が強まること明らかとなった。次にc-Ablノックアウトマウスの線維芽細胞に14-3-3結合部位のスレオニンをアラニンに置換したc-Abl変異体を導入すると、野生型c-Ablに比較してアポトーシス誘導能が高まっていたが、抗がん剤で惹起したアポトーシスには両者間で有意な差は観察されなかった。このことから、c-Ablによるアポトーシス誘導にはその核移行が必要であり、JNKは14-3-3のリン酸化を介してc-Abl-14-3-3複合体形成を巧妙に制御しながらアポトーシス誘導に寄与していると考えられる(図4C)。

5) Abl キナーゼの制御と臨床応用への可能性

Bcr-Ablは相互転座によるc-Bcrとc-Ablの融合タンパク質であり、慢性骨髄性白血病(CML)の原因遺伝子産物である。近年、CMLの分子標的治療としてSTI571(商品名:グリベック)という薬剤が臨床応用され効果を上げている一方、早くも薬剤耐性が大きな問題となっている。Bcr-Ablは恒常的に活性化されており、アポトーシスを抑制する。その局在は細胞質のみであると考えられてきたが、最近になって抗がん剤エトポシド処理によってBcr-Ablは速やかに核に移行するという報告がなされた³³⁾。またBcr-Ablを人工的に細胞核に移行すると強力なアポトーシス誘導因子として働くというユニークな知見も示されており³⁴⁾、c-AblのみならずAblキナーゼの核内での活性化とアポトーシス誘導が示唆されている。そもそもBcr-Abl

には c-Abl 同様三つの核移行シグナルが存在するにもかかわらず、細胞質にのみ局在している点は謎であった。もし Bcr-Abl の核移行が我々の見出した c-Abl と同じメカニズムで制御されているならば、この核移行を促すことにより CML に有効な治療法の開発が可能になるかもしれない。例えば、Bcr-Abl と 14-3-3 の結合を特異的に阻害したり、14-3-3 結合部位のスレオニンのリン酸化をブロックすることなどが考えられる。Bcr-Abl が発現しているがん細胞にのみ効果があり、正常細胞には影響を及ぼさない創薬開発の可能性に大いなる期待を抱きながら、Bcr-Abl の核移行メカニズムの検討を進めている。

DNA 損傷における c-Abl の核移行メカニズムの解明を通じて、アポトーシス誘導にはその核移行が必要であることを示した。昨今 Abl キナーゼの機能解析を進める上で、活性化の場が細胞内のどこであるかに起因する機能の相違が注目されている。それは多くの場合、局在における基質の違いとして説明が可能になってくると思われる。特にアポトーシス誘導では Bcr-Abl の例でも明らかのように、その局在が細胞質か核かによって正反対の機能を示すことは興味深い。Abl キナーゼの、細胞質と核との間の行き来の調節機構をさらに解明し、細胞内局在をふまえた新たな基質を探索していくことで、今までにない全く新しいコンセプトのがん治療開発への端緒となれどと考えている。

4. DYRK2 によるがん抑制遺伝子産物 p53 の制御とアポトーシス誘導

DNA は遺伝情報の担い手であり、その正確な複製と子孫への伝達は生物の本質的特性である。一方 DNA は放射線、紫外線などの外的要因だけでなく、細胞の代謝過程で生ずる活性酸素などの内的要因によっても絶えず損傷を受けている。このような DNA 損傷に対し、生物は多様なシグナル伝達機構により細胞周期を停止して損傷を修復し、修復不能な場合には細胞死（アポトーシス）を誘導し、損傷によって生ずる突然変異の蓄積を回避する。この DNA 損傷応答で中心的な働きを担っているのががん抑制遺伝子産物 p53 である。p53 の重要な機能として G₁ 期停止とアポトーシス誘導が挙げられるが、これらの機能の使い分けが p53 のリン酸化によって制御されているという、エポックメイキングな仕事が今から約 8 年前に日本の研究グループから発信された³⁵⁾。重篤な DNA 損傷に曝露されると、p53 の 46 番目のセリン残基がリン酸化され、p53AIP1 の発現を誘導してアポトーシスを引き起こすというモデルである。現在までに我々を含む多くのグループがこのモデルを基本的に支持する結論に至っており、p53 は DNA 損傷細胞の運命の分岐点で、生死の判断を下すチェックポイント分子であるという認識が浸透した。当然であるが、細胞の運命を決定するセリン 46 のリン酸化に関わるキナーゼ

の探索が次の標的となり、翌年の暮れには欧州の二つのグループから、HIPK2 というキナーゼが紫外線照射に応答してセリン 46 をリン酸化することが報告された^{36,37)}。しかし、放射線刺激によるセリン 46 リン酸化には HIPK2 は関与していないことから、DNA 二本鎖切断でのセリン 46 キナーゼは爾来闇のままであった。

1) DYRK2 による p53 セリン 46 のリン酸化

我々は、DNA 損傷におけるアポトーシス誘導に関わるいくつかのキナーゼに注目して研究を進めていた。その一つに PKC δ があり、DNA 損傷に応答して活性化され、カスパーゼ 3 による切断でキナーゼ領域が核に移行しアポトーシスを強力に誘導することを明らかにしていた³⁸⁾。その過程で PKC δ の切断、核移行とセリン 46 のリン酸化に時空間的な類似性を見出すに至り、PKC δ とセリン 46 リン酸化との関係について研究を開始した³⁹⁾。結論としては、PKC δ はセリン 46 のリン酸化には関わっているものの、直接のキナーゼであるとする確たる証拠は得られなかった。そこでセリン 46 を直接リン酸化するキナーゼを単離すべく、リン酸化抗体を用いたキナーゼの発現クロニング法を立ち上げた（図 5A）⁴⁰⁾。その結果、セリン 46 をリン酸化するキナーゼとして全く予想もしていなかった DYRK2（dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2）というキナーゼを同定した。実際のところ、DYRK2 の細胞内での生理的な機能はほとんど明らかにされていなかったため、本当に DNA 損傷に関わるキナーゼなのか大いなる期待と不安を抱きながら、慎重かつ丁寧に検証を行った。まずインビトロでのリン酸化を検討したところ、p53 のセリン 46 は DYRK2 によって高効率にリン酸化されることを確認した（図 5B）。次に細胞に DYRK2 を導入すると、セリン 46 のリン酸化が観察され、DNA 損傷によりそのリン酸化レベルが増大した。一方、キナーゼ活性を持たない DYRK2 変異体を細胞に導入しておくと、DNA 損傷によって惹起されるセリン 46 のリン酸化が有意に抑えられることを見出した。さらに内在性 DYRK2 の発現を RNA 干渉によって抑制したところ、抗がん剤処理によって引き起こされるセリン 46 のリン酸化が見られなくなった（図 5C）。以上の結果から、DYRK2 が DNA 損傷におけるセリン 46 キナーゼであることが強く示唆された⁴⁰⁾。また、DNA 二重鎖切断によるセリン 46 のリン酸化は ATM 依存性である可能性を示唆する報告がなされていた⁴¹⁾。そこで DYRK2 との関連について調べたところ、ATM をノックダウンした細胞では、DYRK2 を導入しても DNA 損傷によって誘発されるセリン 46 のリン酸化の亢進が見られなかったことから、DYRK2 によるセリン 46 のリン酸化には ATM が必須であることが判明した。そのメカニズムは現在のところ不明だが、ATM による DYRK2

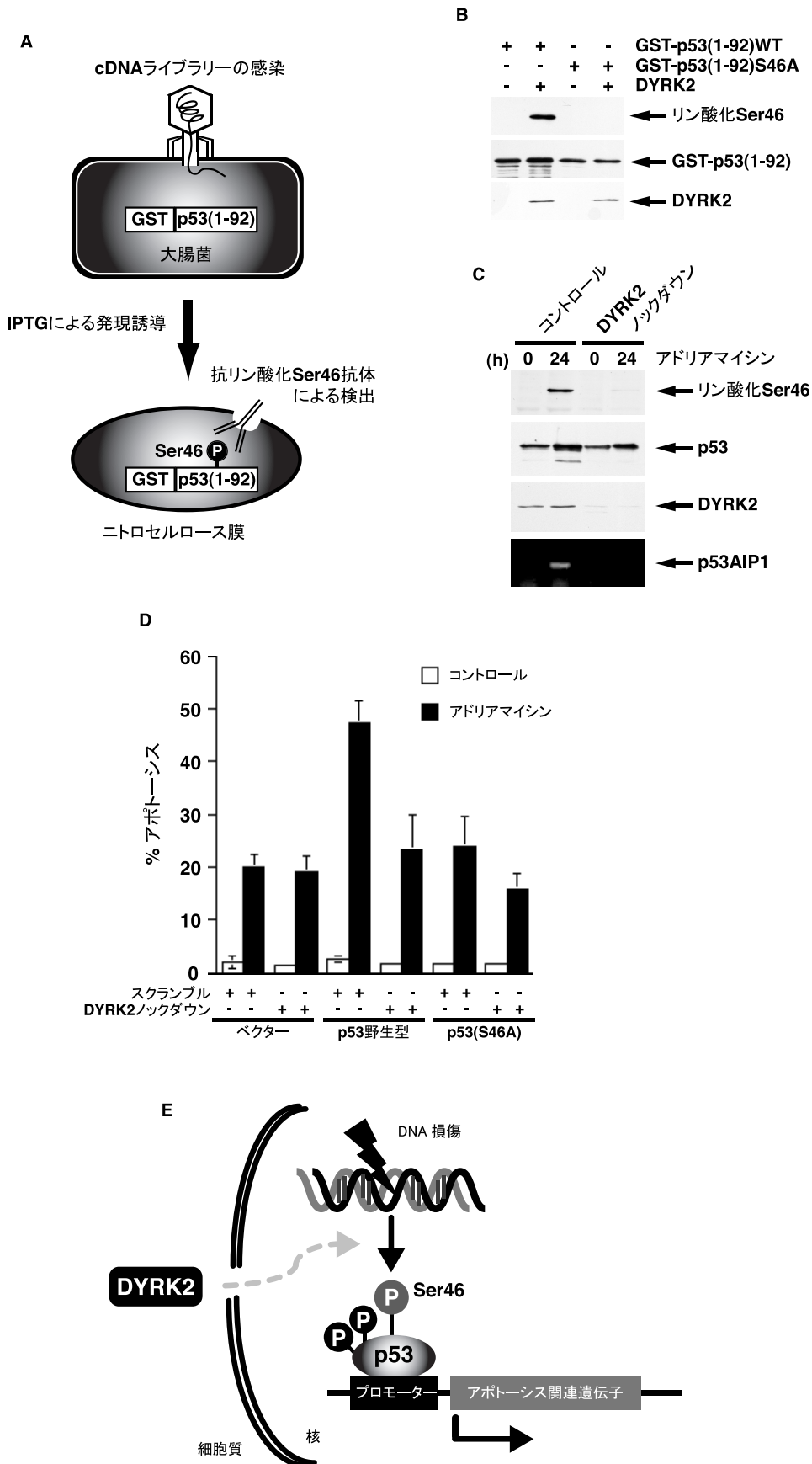


図5 DYRK2はDNA損傷に反応してp53依存性にアポトーシスを誘導する

A: p53Ser46 キナーゼ同定のための発現クローニング法の概略. GST-p53(1-92)を発現する大腸菌にヒトcDNAライブラリーファージを感染させ、IPTGにて誘導後、プラークをフィルターに転写し、抗リン酸化Ser46抗体で検出した. B: 精製DYRK2をGST-p53と反応させてキナーゼアッセイを行ったところ、効率よくSer46をリン酸化した. C: DYRK2をsiRNAによってノックダウンしたところ、アドリアマイシンによるSer46のリン酸化とp53AIP1の発現が著しく抑えられた. D: p53が発現していないSaOS-2細胞にp53を導入して抗がん剤で処理すると、アポトーシスが誘導され、この誘導はDYRK2ノックダウンによって顕著に抑制される. 一方SerをAlaに置換したp53(S46A)の導入ではアポトーシス誘導は野生型と比べて低下しており、DYRK2の発現はほとんど影響を及ぼさない. E: DNA損傷によって惹起されるDYRK2の核移行とSer46リン酸化、そしてp53依存性アポトーシス誘導のモデル. (文献40より引用、改変)

のリン酸化・活性化の可能性を示唆する予備的な結果を得ている。

ではいったいどこでセリン 46 のリン酸化が起きるのだろうか？ p53 は転写因子であり核に局在しているが、DYRK2 はそのほとんどが細胞質で発現している。そこで DNA 損傷における細胞内局在を検討したところ、DYRK2 はその一部が核に移行することが明らかになった。しかもこの核移行は他のプロアポトーティックキナーゼ c-Abl⁽²⁹⁾ や PKC δ ⁽³⁰⁾ のそれと比較して明らかに遷延しており、かつセリン 46 のリン酸化と時空間的に合致していることから、DYRK2 が DNA 損傷におけるセリン 46 キナーゼであることを支持する結果となった⁽⁴⁰⁾。

2) DNA 損傷における DYRK2 による p53 を介したアポトーシス誘導

次に、DYRK2 によるセリン 46 のリン酸化が、DNA 損傷によって惹起されるアポトーシス誘導に関わっているかについて検討した。p53 のない細胞に正常型 p53 を発現させて抗がん剤で処理するとアポトーシスが誘導されたが、あらかじめ DYRK2 の発現を抑制しておくと、このアポトーシス誘導が有意に低下した (図 5D)。さらに、セリン 46 のリン酸化が起きない変異型 p53 の発現ではアポトーシス誘導能が下がり、DYRK2 の発現とは無関係であった (図 5D)。これらの結果から、DYRK2 は DNA 損傷に应答してアポトーシスを誘導する機能的なセリン 46 キナーゼであるという結論が示された (図 5E)⁽⁴⁰⁾。

我々の発見は、DNA 損傷におけるセリン 46 キナーゼの同定を通じて、アポトーシス誘導の新たな情報伝達機構を呈示したことのみならず、DYRK2 というがんにおける新たな分子標的の可能性を示唆できたという点において重要だと考えている。すなわち DYRK2 を必要な時に必要な場所で働かせることができれば、がん細胞を効率よくアポトーシスに導くことが可能になるかもしれない。解決すべき課題は山積しているが、がん治療への応用を目指してさらなる研究を進めていかねばならない。

5. PKC δ による DNA 損傷依存的なアポトーシス誘導制御

PKC δ は DNA 損傷などのストレス刺激に応じてカスパーゼ 3 により分解され、遊離したキナーゼドメインの活性が高まりアポトーシスを強く惹起することが知られている^(38,42~44)。しかし、どのような機序でアポトーシスを誘導するかについては、最近まで明らかにされていなかった。我々はこのメカニズムに迫るため、PKC δ の新たな基質を探索し、同定した。

1) c-Abl と PKC δ による Rad9 制御とアポトーシス誘導

c-Abl と PKC δ 両方のキナーゼのアポトーシス誘導の核内エフェクター因子として、チェックポイントタンパク質である Rad9 を同定した^(28,30)。 *Schizosaccharomyces pombe* Rad9 のヒトホモログである hRad9 は N 末端領域に BH-3 様ドメインを有し、Bcl-2/xL と結合し、アポトーシスを誘導する。c-Abl はその SH-3 ドメインを介して Rad9 のプロリンに富んだ C 末端領域と結合し、28 番目のチロシンをリン酸化することを見出した。興味深いことに、このチロシン残基は BH-3 様ドメインの C 末に位置し、c-Abl によるリン酸化によって Bcl-2/xL との結合が促進され、アポトーシス誘導を増強することが観察された。一方、c-Abl ノックアウトマウス線維芽細胞の解析から、DNA 損傷における Rad9 のチロシンリン酸化は c-Abl 依存であること、またチロシンリン酸化を受けない Rad9 では Bcl-2/xL との結合が著しく減少していることが明らかとなった。なお、Rad9 は Rad1, Hus1 と複合体を形成 (9-1-1 複合体) し、特に G₂ 期のチェックポイントに関与していると考えられているが、c-Abl による Rad9 のチロシンリン酸化はこれらの複合体形成に影響を及ぼさない。一方で Rad9 の強制的脱リン酸化によりこの複合体形成が観察されなくなることから、他のキナーゼによるセリン/スレオニンのリン酸化が示唆され、Rad9 の恒常的かつ DNA 損傷で誘導されるリン酸化を担う主要なキナーゼとして PKC δ を同定した。PKC δ によるリン酸化は 9-1-1 複合体形成に必要であり、また PKC δ の活性阻害による脱リン酸化状態の Rad9 ではもはや Bcl-2 と会合できないことを示し、PKC δ によるアポトーシス誘導のメカニズムの一端が明らかとなった。さらに種々の手法を用いてこれらのキナーゼの細胞内局在を調べたところ、DNA 損傷に伴って核に移行することを見出した。核への移行はキナーゼの活性化依存のかつアポトーシス誘導に必須であり、あるがん細胞ではこの核移行が阻害されていることを明らかにした。またこの核移行機能不全が薬剤耐性獲得に関わっているという可能性を示唆する結果を得ており、この詳細なメカニズムの解明が期待される。

2) DNA 損傷における JNK/SAPK カスケードの上流に位置する Lyn チロシンキナーゼと PKC δ の機能解析

放射線や抗がん剤などによって惹起される DNA 損傷において、ストレス応答シグナルである JNK/SAPK カスケードが活性化されるが、このカスケードの上流因子とその役割については諸説あり、多くは不明である。我々はこれまでに、Lyn チロシンキナーゼが DNA 損傷によって活性化され、JNK/SAPK カスケードを特異的に活性化することを明らかにした^(45,46)。Lyn による JNK の活性化はその上流キナーゼである MKK7, MEKK1 依存性であるが、そ

の上流は不明であった。我々は、DNA 損傷において PKC δ が JNK/SAPK カスケードを活性化することを見出した⁴⁷⁾。興味深いことに、PKC δ による JNK の活性化も Lyn と同様に MKK7 依存的、SEK1 非依存的であり、JNK/SAPK カスケードにおける役割の類似性が示唆された。そこで種々の変異株を用いた実験から、Lyn における JNK の活性化が PKC δ 依存的であることが判明し、PKC δ は JNK/SAPK カスケードにおいて Lyn の下流に位置することを明らかにした。実際に Lyn はチロシンリン酸化により PKC δ を活性化するが、PKC δ はセリン/スレオニンのリン酸化により Lyn を活性化できない。さらに免疫沈降法などを用いた実験から、Lyn と PKC δ は恒常的に複合体を形成しており、また PKC δ と MEKK1 は DNA 損傷依存的に複合体を形成することを見出した。以上の解析から、DNA 損傷における Lyn を介した JNK/SAPK カスケードは、Lyn $\rightarrow$ PKC δ $\rightarrow$ MEKK1 $\rightarrow$ MKK7 $\rightarrow$ JNK/SAPK であることが示唆された。

3) PKC δ によるトポイソメラーゼ II α の制御機構

PKC δ の複合体構成因子の探索を目的として、PKC δ をベイトとした免疫沈降法による一次元電気泳動と質量分析計を用いたプロテオミクス解析を行っており、現在までに複数の会合分子を同定している。その一つとして細胞分裂に必須なタンパク質であるトポイソメラーゼ II α を単離した⁴⁸⁾。PKC δ とトポイソメラーゼ II α の会合は細胞周期特異的であり、主に S 期で観察された。また PKC δ によってトポイソメラーゼ II α の発現が上昇し、それに伴い酵素活性も強まることがインビトロ及び各種細胞を用いた実験から明らかとなった。また S 期をターゲットとするような抗がん剤による PKC δ の活性化がトポイソメラーゼ II α の過剰な活性化を引き起こし、この過剰な活性化が引き金となってアポトーシス誘導を惹起しているという、全く予想外の知見を得た。

4) PKC δ による *p53* 発現制御

がん抑制遺伝子 *p53* は発がん抑制において中心的な役割を果たしていることが明らかになってきたが、その生理機能と調節機構の全貌は解明されていない。これまでの研究から、*p53* は DNA 損傷に応じた翻訳後修飾により安定化されると言われている。さらに最近の報告では、*p53* の発現は ribosomal protein L26 と nucleolin によって翻訳レベルでも制御されることが明らかにされ⁴⁹⁾、従って *p53* の発現は複数の段階で様々な調節機構が関与すると予想されるが、驚くべきことに *p53* 転写活性の調節についての情報は極めて少ないのが実状である。

前述したように、PKC δ が *p53* の制御にどのように関わっているかを調べていく過程で、PKC δ が DNA 損傷に

おける *p53* の発現をコントロールしている可能性を見出した⁵⁰⁾。抗がん剤で *p53*mRNA と *p53* タンパク質の発現変化を比較したところ、*p53*mRNA もタンパク質と同じように、DNA 損傷によって発現が誘導されることが分かった。さらに PKC δ の阻害剤を用いると、*p53*mRNA もタンパク質も発現量が激減した。PKC δ のドミナントネガティブ変異体や siRNA を用いても同様の結果が得られたことから、PKC δ が転写レベルでも *p53* を制御していることが示唆された。次に、様々な *p53* プロモーター領域欠失変異体を用いてレポーターアッセイを行い、それぞれのレポーター遺伝子発現の変化から PKC δ の制御に応答する *p53* プロモーター領域の同定を試みた。その結果、*p53* 遺伝子の上流 -70~-46 の領域を欠失すると PKC δ の活性を抑えてもレポーター遺伝子の発現に抑制がかからないことが明らかとなった。この結果は *p53* 遺伝子の PKC δ 応答配列が上流 -70~-46 の領域に存在することを示している。この領域は *p53* 中心プロモーター領域 (CPE) だと考えられているが、結合する転写因子はいまだ同定されていない。そこで、CPE の配列をプローブとして質量分析法によりこの配列に結合する核タンパク質について検討したところ、アポトーシス促進因子 Btf が CPE 結合タンパク質の一つとして同定された。さらにクロマチン免疫沈降法を用いて、PKC δ と Btf が細胞内でも *p53* プロモーターと結合することを確認し、そしてこの結合は DNA 損傷により促進されることも明らかにした。また抗 PKC δ 抗体でクロマチン免疫沈降した後、抗 Btf 抗体で再度免疫沈降すると、CPE 領域が特異的に検出されたことから、同じ CPE クロマチン断片上に PKC δ と Btf が会合していることが示唆された。さらに、PKC δ の阻害剤により Btf と CPE の結合が顕著に抑制されたことから、Btf の CPE への結合能は PKC δ キナーゼ活性依存的であることが明らかとなった。

次に、Btf の機能による *p53* の転写活性の変化を、レポーターアッセイや RT-PCR などで解析した。Btf を過剰発現させると、*p53* のプロモーター活性や *p53*mRNA とタンパク質レベルの発現も明らかに誘導された。また、Btf を siRNA によりノックダウンした結果、*p53* のプロモーター活性と mRNA やタンパク質レベルの発現が低下していることが確認された。これらのことから、Btf は *p53* の転写活性を制御する転写因子であるという仮説が強く支持された。さらに、PKC δ の阻害剤を用いると Btf によって誘導された *p53* の発現が明らかに抑制されたことから、Btf による *p53* の転写活性は PKC δ によって制御されることが判明した。

最後に、PKC δ -Btf-*p53* 転写制御経路の細胞内での役割を、アポトーシスを評価する TUNEL アッセイにより検討した。Btf をノックダウンすると、*p53* 野生型の細胞での

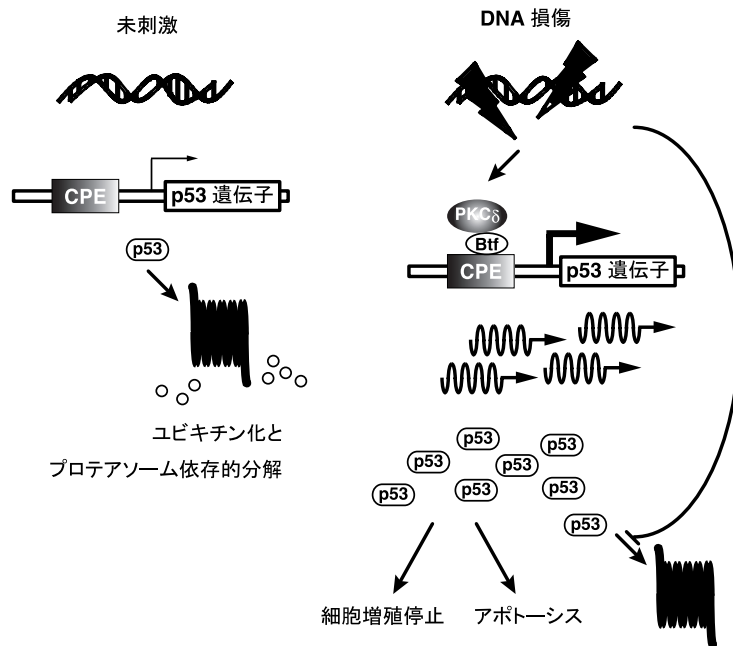


図6 PKC δ は*p53*の発現を転写レベルで制御している

未刺激な細胞では、*p53*は転写・発現されるが、その遺伝子産物は主にMdm2が介したユビキチン-プロテアソーム系により速やかに分解されるため、発現レベルは低く抑えられている。DNA傷害により*p53*の転写レベルでの発現も亢進し、*p53*のプロモーター領域のうち、CPEと呼ばれる配列を介して、PKC δ とそのターゲット転写因子であるBtfによって制御されていることが明らかとなった。(文献50より引用、改変)

みDNA傷害によるアポトーシス誘導が抑えられた。このことから、Btfは*p53*の転写制御を介して、*p53*依存性アポトーシスを誘導することが推測される。さらに、Btfによって起こされたアポトーシス誘導はPKC δ の阻害剤で明らかに抑制されたことから、PKC δ -Btf-*p53*の転写制御は*p53*依存性アポトーシス誘導に関与しているとの結論に至った(図6)。

6. おわりに～ DNA傷害におけるプロアポトーティックキナーゼの核移行とアポトーシス誘導

放射線、抗がん剤などによるDNA傷害をはじめとする様々なストレスに対する適応形態の一つであるアポトーシスと呼ばれる細胞死は、生体の恒常性維持において不可欠な生命現象として獲得され保存されてきた基本機能である。この制御の破綻は、がんをはじめさまざまな疾患の病因に結びつくことが知られている。そもそも生物が外的環境変化やストレスに適応して生存していくためには、その変化を正確に認識し、情報として迅速かつ効率的に、核や小胞体などの細胞内小器官に伝えなければならない。特にアポトーシスが核のない細胞では生じないことから、アポトーシス誘導においては細胞質から核あるいは核から細胞質への何らかの情報交換が必須である。この細胞内情報伝

達網としてキナーゼによるタンパク質リン酸化システムが用いられており、多彩な細胞応答を可能にしている。ストレス応答におけるアポトーシス制御機構もこのシステムによって厳格にコントロールされていると考えられているが、その分子メカニズムは多くが未だ明らかにされていない。また、リン酸化による情報伝達機構が、如何にしてアポトーシス実行因子である種々のタンパク質・DNA分解酵素へとシグナルを伝えているのかについても、国内外で広く研究が行われているにも関わらずその多くが不明である。とりわけリン酸化によるストレス誘導性アポトーシスの分子制御機構は、多くの場合細胞種に特異的であったり、惹起するストレスによって全く逆の事象が観察され、混沌としているのが現状である。我々はこれまで述べてきたように、c-Abl、PKC δ 、DYRK2といったキナーゼのストレス誘導性アポトーシスシグナルにおける役割を、主にそのリン酸化によって制御される分子の同定を通じて明らかにしてきた。そして焦点をあてて機能を解明してきたこれらプロアポトーティックなキナーゼ群が、図らずもDNA傷害に応じて例外なく細胞質から細胞核に移行してアポトーシスを誘導することが判明し、キナーゼ群の核移行がアポトーシス誘導の本質であるという今までにない全く新しいモデルの提唱に至っている(図7)。今後、この

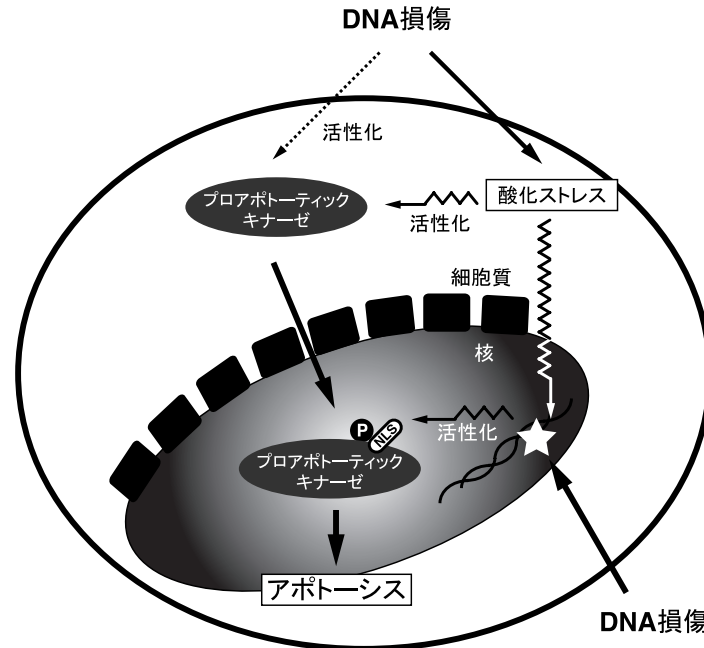


図7 DNA 傷害におけるプロアポトーティックキナーゼの核移行とアポトーシス誘導のモデル

モデルの妥当性を詳細なメカニズムを解明することで明らかにしていきたい。そしてこれらキナーゼ群の核移行とがんをはじめとする疾患とその異常に着目し、診断や治療への応用に繋がる分子ターゲットを明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、ダナ・ファーマーがん研究所において Donald Kufe 教授のもと着手し、東京医科歯科大学に異動後も継続しているものである。本研究を支えてくれた共同研究者の皆様に深謝致します。

文 献

- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A. (1989) *Science*, 246, 629-634.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. (2002) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 162-169.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vnagaita, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G., Taylor, A.M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S., & Shiloh, Y. (1995) *Science*, 268, 1749-1753.
- Zhang, N., Chen, P., Khanna, K.K., Scott, S., Gatei, M., Kozlov, S., Watters, D., Spring, K., Yen, T., & Lavin, M.F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8021-8026.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., & Shkedy, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14973-14977.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001) *Nature*, 410, 842-847.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., & Bartek, J. (2002) *Nat. Genet.*, 30, 290-294.
- Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H., & Kastan, M.B. (2000) *Nature*, 404, 613-617.
- Zhao, S., Weng, Y.C., Yuan, S.S., Lin, Y.T., Hsu, H.C., Lin, S.C., Gerbino, E., Song, M.H., Zdzienicka, M.Z., Gatti, R.A., Shay, J.W., Ziv, Y., Shiloh, Y., & Lee, E.Y. (2000) *Nature*, 405, 473-477.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S.J. (1999) *Science*, 286, 1162-1166.
- Gatei, M., Scott, S.P., Filippovitch, I., Soronika, N., Lavin, M. F., Weber, B., & Khanna, K.K. (2000) *Cancer Res.*, 60, 3299-3304.
- Li, S., Ting, N.S., Zheng, L., Chen, P.L., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lee, E.Y., & Lee, W.H. (2000) *Nature*, 406, 210-215.
- Xu, B., Kim, S., & Kastan, M.B. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, 21, 3445-3450.
- Kim, S.T., Xu, B., & Kastan, M.B. (2002) *Genes Dev.*, 16, 560-570.
- Yazdi, P.T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E.Y., & Qin, J. (2002) *Genes Dev.*, 16, 571-582.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B., & D'Andrea, A.D. (2002) *Cell*, 109, 459-472.
- Matsuoka, S., Huang, M., & Elledge, S.J. (1998) *Science*, 282, 1893-1897.
- Bao, S., Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Fang, Y., Richardson, D.A., Ali, A., Chen, S.M., Abraham, R.T., & Wang, X.F. (2001) *Nature*, 411, 969-974.
- Post, S., Weng, Y.C., Cimprich, K., Chen, L.B., Xu, Y., & Lee, E.Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13102-13107.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.

- M., Weichselbaum, R.R., & Kufe, D.W. (1995) *Nature*, **376**, 785-788.
- 21) Yuan, Z.M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., & Kufe, D. (1996) *Nature*, **382**, 272-274.
 - 22) Liu, Z.G., Baskaran, R., Lea-Chou, E.T., Wood, L.D., Chen, Y., Karin, M., & Wang, J.Y. (1996) *Nature*, **384**, 273-276.
 - 23) Koleske, A.J., Gifford, A.M., Scott, M.L., Nee, M., Bronson, R.T., Miczek, K.A., & Baltimore, D. (1998) *Neuron*, **21**, 1259-1272.
 - 24) Baskaran, R., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.E., Morgan, S.E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M.B., & Wang, J.Y. (1997) *Nature*, **387**, 516-519.
 - 25) Shafman, T., Khanna, K.K., Kedar, P., Spring, K., Kozlov, S., Yen, T., Hobson, K., Gatei, M., Zhang, N., Watters, D., Egerton, M., Shiloh, Y., Kharbanda, S., Kufe, D., & Lavin, M.F. (1997) *Nature*, **387**, 520-523.
 - 26) Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., & Kufe, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1437-1440.
 - 27) Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., & Kufe, D. (1999) *Nature*, **399**, 814-817.
 - 28) Yoshida, K., Komatsu, K., Wang, H.G., & Kufe, D. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3292-3300.
 - 29) Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D., & Miki, Y. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 278-285.
 - 30) Yoshida, K., Wang, H.G., Miki, Y., & Kufe, D. (2003) *EMBO J.*, **22**, 1431-1441.
 - 31) DeVries, T.A., Neville, M.C., & Reyland, M.E. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6050-6060.
 - 32) Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1889-1899.
 - 33) Dierov, J., Dierova, R., & Carroll, M. (2004) *Cancer Cell*, **5**, 275-285.
 - 34) Vigneri, P. & Wang, J.Y. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 228-234.
 - 35) Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., & Taya, Y. (2000) *Cell*, **102**, 849-862.
 - 36) D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., & Soddu, S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 11-19.
 - 37) Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 1-10.
 - 38) Yoshida, K. (2007) *Cell. Signal.*, **19**, 892-901.
 - 39) Yoshida, K., Liu, H., & Miki, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 5734-5740.
 - 40) Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y., & Yoshida, K. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 725-738.
 - 41) Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E., & Anderson, C.W. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12491-12494.
 - 42) Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., Weichselbaum, R., & Kufe, D. (1995) *EMBO J.*, **14**, 6148-6156.
 - 43) Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., & Kufe, D. (1996) *J. Exp. Med.*, **184**, 2399-2404.
 - 44) Yoshida, K. & Kufe, D. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1431-1438.
 - 45) Yoshida, K., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5370-5380.
 - 46) Yoshida, K., Kharbanda, S., & Kufe, D. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 34663-34668.
 - 47) Yoshida, K., Miki, Y., & Kufe, D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48372-48378.
 - 48) Yoshida, K., Yamaguchi, T., Shinagawa, H., Taira, N., Nakayama, K.I., & Miki, Y. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3414-3431.
 - 49) Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., & Kastan, M.B. (2005) *Cell*, **123**, 49-63.
 - 50) Liu, H., Lu, Z.G., Miki, Y., & Yoshida, K. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 8480-8491.
-