

Rb がん抑制遺伝子と *ras* プロトがん遺伝子の 遺伝学的・生化学的關係

高橋 智聡, 竹上 雄治郎, シャムマ アワド

Rb がん抑制遺伝子産物と Ras プロトがん遺伝子産物の間には、相互抑制的な関係が存在する。線虫の陰門形成において、*lin-35* (*Rb*) は *let-60* (*ras*) に機能的に拮抗する。この経路の遺伝学的解析は、*lin-35* が *let-60* の上流でも下流でもあり得るという一見混乱した結果を示した。一方、ほ乳類において、Ras は D 型サイクリンの転写活性化を介して Rb のリン酸化を促進、その活性を抑制する。逆に、Rb は Ras タンパク質の成熟を促す種々のイソプレニル化関連酵素・転写因子群の転写を E2F 依存的に抑制することによって、Ras の膜輸送と活性化を遅延させる。このため、*Rb* 欠損によってマウス生体に誘導される表現型のいくつかは、*ras* の同時欠損によってレスキューされる。

はじめに

Rb (retinoblastoma gene) は、ポジショナルクローニング法により同定された最初のヒトがん抑制遺伝子である。E2F ファミリーをはじめとする多様なパートナーと複合体を形成し、多彩な生物学的現象に関わる。一方、*ras* は多くのヒトがんにおいて活性化型突然変異が見いだされ、発がんレトロウイルスのゲノム中にも含まれるプロトがん遺伝子である。GTP の加水分解に依存して駆動する分子スイッチとして、様々なシグナル伝達経路で作用する。それぞれの遺伝子機能に関して、すでに幾多の優れた総説がものされている。しかし、一見かけ離れた位置にある両者の間に、双方向的な遺伝学的・生化学的關係が存在することは、あまり知られていない。Ras シグナルによる細胞周期制御の重要なエントリーポイントが Rb である^{1,2)}。Ras は、主に D 型サイクリンの転写調節を介して、Rb タンパク質のリン酸化を制御する。この場合、Rb は Ras の下流であ

る。逆に Rb が Ras 活性を上流から制御するという概念の形成は、内在性の Ras 活性が、細胞周期に依存して変化するという発見に端を発した³⁾。Rb が失活すると、この細胞周期依存性が消え、Ras 活性が亢進する^{4,5)}。同じ頃、線虫の陰門形成に関わる遺伝子群の解析から、Rb・E2F 複合体が Ras の上流で作用する可能性が示された⁶⁻⁹⁾。この後、*Rb*・*ras* ダブルノックアウトマウス胚や腫瘍が解析され、ほ乳類における *Rb* と *ras* の遺伝学的關係の理解が進んだ¹⁰⁻¹⁵⁾。

本稿は、特に、ほ乳類における Rb による Ras 活性制御の生物学的意義とその機構を詳しく論じる。また、これまで活性化型変異体 Ras の生物活性に基づいて推測されてきたが、実は活性化型のそれとは大きく異なることが判明しつつある野生型 Ras の働きにも光を当てる。

1. Rb タンパク質

(1) Rb の機能

Rb 変異は、網膜芽細胞腫、肺小細胞がん、骨肉腫など、限られた種類のヒト腫瘍に見いだされる。しかし、サイクリン D 遺伝子増幅、*Cdk4* 突然変異や *Ink4a* 欠失など、Rb 活性を制御するパスウェイに含まれる分子の異常や、Rb 活性の消失がヒトがんの大半で観察されることから、Knudson による存在予測に基づいて遺伝子クローニングされ 20 余年を経た今も、Rb はがん・生物学研究の中心的課

京都大学大学院医学研究科分子腫瘍学教室 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町)

The genetic and biochemical interactions of *Rb* and *ras*
Chiaki Takahashi, Yujiro Takegami and Awad Shamma
(Department of Molecular Oncology, Kyoto University
Graduate School of Medicine, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-
ku, Kyoto 606-8501, Japan)

題のひとつである¹⁶⁾。

よく知られる Rb の機能を簡単にまとめる。Rb はまず G₁/S 移行期を制御する中心的分子として理解された。その活性を制御するリン酸化が細胞周期と連動するのは¹⁷⁻¹⁹⁾、サイクリン・サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体によるリン酸化の基質になるため^{20,21)}、故に、Rb は多くのがん抑制遺伝子産物を含む CDK インヒビター群と密接な関係を持つ。さらに、ヒトパピローマウイルスや C 型肝炎ウイルスをはじめいくつもの DNA ウイルス由来発がん性タンパク質の標的となるため²²⁻²⁵⁾、多くのがん研究者の興味を G₁/S 移行期へと向かわせた。Rb はまた APC-Skp2 とユビキチン結合複合体を形成し p27 の分解を制御する^{26,27)}。

Rb の機能は、G₁/S 移行期制御にとどまらない。分化を促進する MyoD, C/EBPβ, NF-IL6, CBFA-1, グルココルチコイド受容体²⁸⁻³²⁾、あるいは、分化を阻害する Id2 や RBP2, EID1 等の転写因子³³⁻³⁶⁾と相互作用することにより細胞最終分化を制御する。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC), Suv39H1, HP1α 等のヒストン修飾因子あるいは DNA メチル基転移酵素 (DNMT) を E2F 依存的プロモーターにリクルートするためのアダプターとしても作用し³⁷⁻⁴¹⁾、セネセンス (細胞老化) 維持に寄与する染色体機構とされる SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) の成立にも関わる⁴²⁾。また、テロメア長の調整⁴³⁾、Mad2 あるいは BRCA1/TopII 依存的な DNA 損傷応答の発現^{44,45)}、Apaf-1, プロカスペーゼ⁴⁶⁾の転写制御、あるいは、p53 の分解を促進する Mdm2 の働きを阻害する Arf の転写制御により^{47,48)}細胞死の決定にも関与する。RNA 干涉⁴⁹⁾や、オートファジー^{50,51)}などにも関与することが報告される。Rb の失活は、腫瘍の進展の過程でも頻繁に観察され¹⁶⁾、血管内皮増殖因子 (VEGF) あるいは HIF-1α に依存した血管新生との関わり⁵²⁻⁵⁴⁾、浸潤転移におけるシクロオキシゲナーゼ-2 との関わり⁵⁵⁾にも注目が集まっている。更に、植物における幹細胞プール規模の維持に関わること^{56,57)}、マウスの造血幹細胞ニッチ形成において重要な役割を果たすことが示唆されたのに加え⁵⁸⁾、最近、Rb 欠損マウス線維芽細胞が、ある培養条件下で、がん幹細胞あるいは ES (embryonic stem) 細胞のように振る舞うという衝撃的な報告が成された⁵⁹⁾。

(2) E2F ファミリー

上掲のパートナーを含め、膨大な数の結合タンパク質 (2001 年までに 110 種類以上との報告⁶⁰⁾) が同定されている。しかし、Rb は細胞内に大量に存在するタンパク質とは言えず、どのような条件下でどのようなパートナーと結合するのか、その選択性の制御機構はなにかなど、未解明の問題は多い。しかし、非常に明白なのは、E2F ファミ

リーが Rb の最も重要なパートナーであることである⁶¹⁾。G₁ 期における Rb のリン酸化は、E2F との結合を解離する。解離した E2F は、細胞増殖等に関わる様々な遺伝子の転写促進を行う。一方、Rb・E2F 複合体は、HDAC 等を利用してクロマチン構造を改変し、標的遺伝子の転写不活性化を誘導する。しかし、G₀ 期に大半の標的遺伝子上で E2F と複合体を形成するのは p130 とされる⁶²⁾。Rb は p107, p130 というファミリーを有し、部分的に機能を補完し合っている⁶³⁻⁶⁶⁾。ファミリー遺伝子を全て欠く細胞は、セネセンスを逸脱しがん化する^{67,68,59)}。

Rb 機能のどのくらいが E2F に依存するかに注目が集まった。浸透度の低い網膜芽細胞腫あるいは良性の網膜腫瘍から発見された種々の Rb 変異体から、E2F-1 との結合能を喪失するが細胞分化促進能を喪失しないものが見いだされたために、Rb による分化制御は E2F 非依存的機能のひとつと考えられたが⁶⁹⁾、その後、Rb と E2F ファミリーを同時に欠くマウスの解析などから、E2F 依存的な分化制御機構も存在することが示された^{63,70)}。

2. Ras から Rb へ

Rb は Ras シグナルによって誘導されるトランスフォーメーション⁷¹⁾やセネセンス⁷²⁻⁷⁴⁾において重要な標的分子として作用する。Ras シグナルは、PI3K, Raf, Ral, PKC, Nore1, AF6 等のエフェクター分子⁷⁵⁾を介し、細胞外からの多様な刺激を細胞周期や細胞分化を制御するパスウェイに伝達する。Ras 中和抗体の注入は、静止期細胞が血清刺激によって再び細胞周期に入るのを阻害する⁷⁶⁾。一方、活性化型 Ras は G₁ 期を短くする。この時、サイクリン D は発現上昇するが、サイクリン E, Cdk4 の発現量は変化しない⁸¹⁾。Ras は血清刺激による細胞の S 期への進行に必要なだが、がんウイルス産物 E1A を導入し Rb を不活性化しておくと、Ras は必要では無くなる⁷⁷⁾。Peeper らは、Rb が正常に機能する細胞において、ドミナントネガティブ Ras あるいは Ras 中和抗体の注入が、サイクリン D を減少させ、低リン酸化 Rb を蓄積し、細胞を G₁ 期静止させること、そして、Rb が機能していない細胞では、Ras 活性の抑制は、細胞周期に影響を与えないことを示した¹⁾。サイクリン D1 プロモーターには、AP-1, Ets-2, Myc, CREB/ATF という Ras 下流の immediate early genes と呼ばれる転写因子群への結合サイトがある。また、Ras により活性制御を受ける p42/44 MAP キナーゼ、p38 HOG/MAP キナーゼ、AP-1 もこのプロモーターの制御に関与するとされる⁷⁷⁾。Ras から Rb への流れは、既に確立された話になっている。

3. Rb から Ras へ

(1) Ras 活性の細胞周期依存的変動

Taylor と Shalloway は、Raf の Ras 結合ドメインを GST

に融合させたタンパク質を用い、細胞のライセートからGTP結合型Rasを選択的に沈降することにより、リアルタイムでRas活性を測定する技法を開発した³⁾。血清飢餓によるG₀ブロック、mitotic blockによるM期チェックポイントからの脱出のいずれにおいてもRasは急激に活性化される。また、G₁初期に一度活性が低下した後、G₁中期でRasは再度活性化する(図1)。このG₁中期のRasの活性化には、MAPキナーゼ(MAPK)の活性化が伴わない。恒常的活性化型の解析のみから知り得た我々のよく知っているRasシグナルとは異質のものらしい。

Raptisらは、SV40 large T抗原がおそらくRbの不活性化によってRas活性化を亢進させること⁴⁾、更に、Leeらは、Rb欠損線維芽細胞ではRas活性の細胞周期依存的制御が破綻し、比較的高いRas活性が持続されることを発見した⁵⁾(図1)。Leeらはまた、Rb欠損線維芽細胞の分化能異常がドミナントネガティブRasの導入によってレス

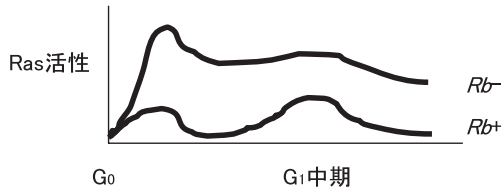


図1 細胞周期依存的なRas活性の変動とRbとの関係

キューされること、すなわち、Rb欠損によって亢進するRas活性が細胞の最終分化を阻害する可能性を示した。

(2) 線虫 *lin-35* と *let-60* の遺伝学的関係

Horvitzらは、失活性の変異によって線虫の陰門形成に異常(multivulva)をもたらす二つの遺伝子群 *SynMuv* genes を同定した。クラスAとクラスBとに分類され、異なる群に属する2遺伝子の複合変異により陰門形成に携わる細胞数が異常に増える。この異常は、線虫の陰門形成細胞におけるRasシグナルの亢進に依存することが判っていた⁷⁹⁾。その後、クラスBに属する *lin-35* が、ほ乳類のRbに相当する遺伝子であることが判明した⁶⁾。

当時、ほ乳類細胞では、RbはRasの下流と位置づけられていた。しかし、Horvitzらのエピスタシス解析の結果は、一見混乱したものとなった。実験系によって、RbはRasの下流か並列という結果と、RbはRasと並列かその下流という2種類の結果が得られたのである⁶⁾(図2)。さらには、E2Fオーソログである *efl-1* とDPオーソログである *dpl-1* が、*lin-35* と複合体を形成し、HDAC依存的な転写抑制機構を介してRasシグナルに拮抗する可能性が示された⁷⁾。他のグループからも、E2Fオーソログである *efl-1*、DPオーソログである *dpl-1* の失活性変異により、Ras/MAPK活性が亢進、線虫胚の極性に異常を生じるこ

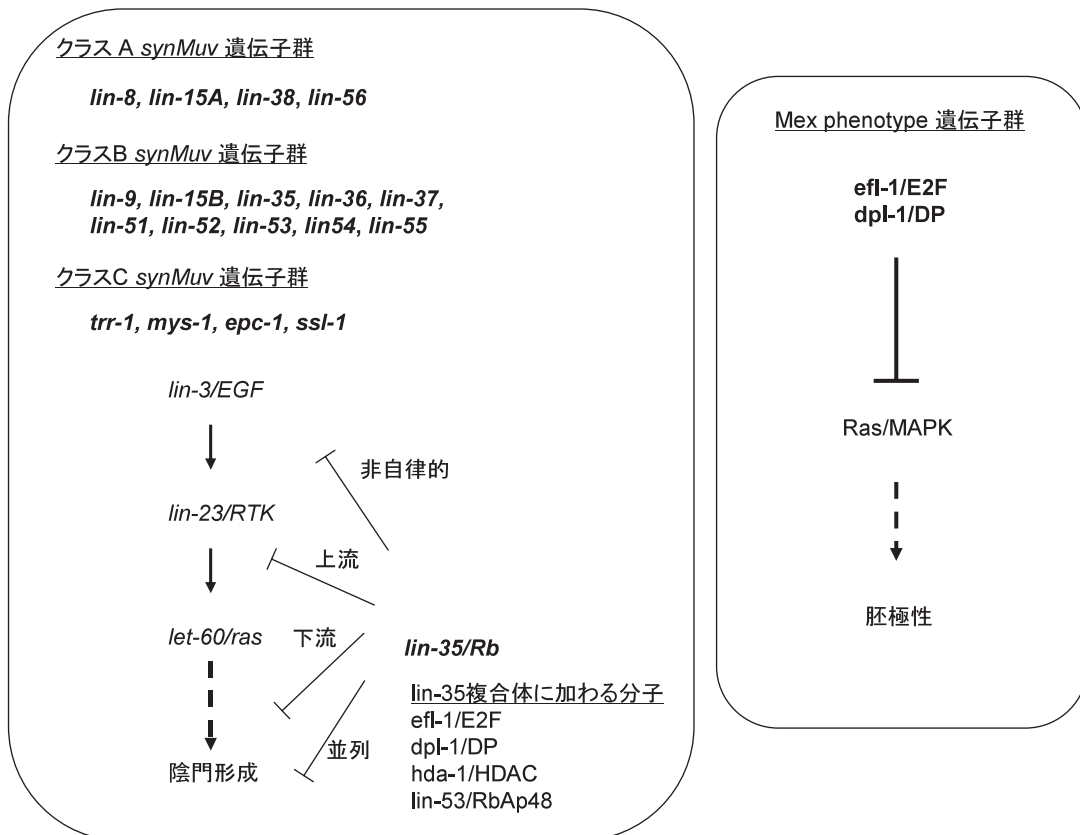


図2 線虫におけるRbとrasの遺伝学的関係

とが報告された⁸⁾ (図2)。最近, クラス C *synMuv* 遺伝子群も発見され⁹⁾, 線虫の Rb 機能の理解はさらに深まった。しかし, Rb が陰門形成において細胞自律的に働いているかに関しては異論があり, Rb はむしろ隣接する hypodermal syncytium で作用し, 細胞・細胞間の関係 (*lin-3* の発現制御) によって陰門形成に関わるという報告もなされた^{80,81)} (図2)。

筆者は 1999 年に Ewen 研究室に移動し, Lee らが得た知見と Horvitz らの報告を考え合わせる機会を得た。Rb は Ras の上流でもあるかもしれないと考え, Ewen, Lee 博士らとディスカッションを重ねた後, マウスを用いてエピスタシス解析を試みることにした。当時, *Rb* 欠損マウスの表現型は詳細に解析され, *Rb* と *E2F* ファミリーの複合変異マウスの解析も進みつつあった。これらの情報を利用して, *Rb*・*ras* ダブルノックアウトマウスの表現型を解釈しようとした。

(3) 様々な *Rb* ホモ型欠損複合変異マウス

Rb ホモ型欠損マウスは, 胎生 13.5~15.5 日で死ぬ。肝性貧血がその主因と思われる。他に, 骨格筋最終分化の異常, 肺・心臓の発生異常, 骨格筋・中枢・末梢神経系の細胞周期異常とアポトーシス亢進等様々な異常を呈する^{63,82)} (表1)。*Rb* 欠損貧血が肝性といわれる理由は, 赤芽球までの発生は正常に行われるが, 造血の場が肝に移り, 脱核をふくむ赤芽球成熟が行われる段階で破綻が起こるためである。この原因については諸説あるが⁸³⁾, その貪食能に

よって赤芽球の脱核を助ける肝マクロファージ⁸⁴⁾の最終分化に必要な PU. 1 の活性が *Rb* 欠損によって障害されるとする説が広く支持されている⁸⁵⁾。骨格筋最終分化の異常は, MyoD, MEF2C 等の組織特異的転写因子と Rb の直接あるいは間接的な関係に依存すると考えられている^{86,28,87)}。

ほ乳類の E2F ファミリーとして E2F-1~8 が発見されている⁸⁸⁾。Rb はそのうち E2F-1~4 と選択的に結合する⁸⁹⁾。E2F-4 は E2F-1~3 と異なり, 転写抑制的に働くと考えられる。*Rb* と *E2F1~3* のいずれかを同時に欠くマウスは, 後述する *Rb*・*ras* 両欠損マウスとは対照的に, 細胞周期異常とアポトーシスのレスキューが著明であるのに対し, 骨格筋分化や心肺発生はほとんどレスキューされない (表1)。*Rb*・*ras* 同時欠損マウスと共通したのは, 肝性造血が部分的にレスキューされることであった。

Id2 は, bHLH 転写因子の阻害因子であり, Rb に結合するとされる分子のひとつである⁹⁰⁾。*Id2* の追加欠損は, 骨格筋分化を除いてほとんど全ての *Rb* 表現型をレスキューした³³⁾。*Rb* 欠損によって *Id2* の活性が亢進し, 肝マクロファージの最終分化に必須の転写因子 PU. 1 の活性を阻害する。最終分化に失敗した肝マクロファージは赤芽球と結合できず, 脱核を含む成熟が阻害され, 貧血を起こすものと考えられた⁸⁵⁾。

衝撃的だったのは, 胎盤のみ野生型で, 胚は *Rb* をホモ型欠損するマウスの表現型であった。このマウスでも, レンズと骨格筋を除いて, ほとんどの *Rb* 欠損胚表現型がレスキューされた⁹¹⁾。従来記載された *Rb* 欠損胚表現型のほ

表1 これまでに報告された *Rb* ホモ型複合変異マウス表現型の概略 (63, 72, 10, 11, 14, 82, 94, 98, 59)

遺伝的背景	表現型と <i>Rb</i> ホモ型マウスとの比較
<i>Rb</i> ^{-/-}	胎生致死, 細胞周期異常, アポトーシス亢進, 肝性貧血, 胎盤形成不全, 骨格筋分化異常, 心肺発生異常
追加変異	
<i>p107</i> ^{-/-}	アポトーシス亢進, キメラマウスに網膜芽細胞腫発症
<i>p130</i> ^{-/-}	アポトーシス亢進, キメラマウスに網膜芽細胞腫と褐色細胞腫発症
<i>p107</i> ^{-/-} ; <i>p130</i> ^{-/-}	MEF はセネセンスを逸脱, がん幹細胞様の挙動
<i>E2F1</i> ^{-/-}	寿命延長, 細胞周期異常・アポトーシスを完全あるいは部分的にレスキュー, 貧血部分的レスキュー, 骨格筋分化異常と心肺発生異常はレスキューしない
<i>E2F2</i> ^{-/-}	細胞周期異常部分的レスキュー, 肝性貧血部分的レスキュー
<i>E2F3</i> ^{-/-}	寿命延長, 細胞周期異常・アポトーシスを完全あるいは部分的にレスキュー, 貧血部分的レスキュー, 骨格筋分化異常と心肺発生異常はレスキューしない
<i>p53</i> ^{-/-}	細胞周期異常さらに亢進, アポトーシス部分的レスキュー
カスパーゼ 3 ^{-/-}	アポトーシス部分的レスキュー
<i>Apaf-1</i> ^{-/-}	アポトーシス部分的レスキュー
<i>Arf</i> ^{-/-}	細胞周期異常部分的に亢進, アポトーシス部分的に亢進あるいはレスキュー
<i>Id2</i> ^{-/-}	産まれるが呼吸不全, 肝マクロファージの分化異常と肝性貧血レスキュー, 骨格筋分化異常はレスキューしない
<i>N-ras</i> ^{-/-}	寿命延長, 骨格筋分化と心肺発生レスキュー, マクロファージ分化と肝性貧血部分的レスキュー, 骨格筋を含め細胞周期異常・アポトーシスはレスキューしない, MEF はセネセンスを逸脱
<i>K-ras</i> ^{+/-}	寿命延長, 骨格筋分化と心肺発生レスキュー, 肝性貧血部分的レスキュー, 骨格筋を含め細胞周期異常・アポトーシスはレスキューしない
<i>Ink4a</i> ^{-/-}	MEF はセネセンスを逸脱
+<i>Rb</i> 再構成	
低発現 <i>Rb</i>	寿命延長, 骨格筋分化異常顕在化
<i>Rb</i> ^{R654W}	寿命延長, 肝マクロファージ分化と肝性貧血レスキュー, 細胞周期異常はレスキューしない
胎盤	産まれるが呼吸不全, 骨格筋分化以外の大抵の異常をレスキュー

とんどが、胎盤の機能不全に起因する非細胞自律的なものだというのである。この知見の噂は、この論文がNature誌に掲載される1年も前から世界中のRb研究者の間で飛び交い、その後のRb研究や報告の論調に甚大な影響を与えた。しかし、例えば、ストレス下の赤芽球分化など、Rbの細胞自律的役割を否定できない発生系は多く⁹²⁾、この報告の解釈には慎重であらねばならない。一方で、Rbホモ型欠損細胞と野生型細胞のキメラマウスでは、肝性造血を含め、かなりの部分のRb欠損表現型がレスキューされるので^{93,94)}、Rbには細胞自律的・非細胞自律的両方の機能があると考えべきである。実際に、肝マクロファージと赤芽球、造血幹細胞と骨髄表面の微少環境との相互作用など、Rbの非細胞自律的な作用を示す報告は多い。また一方で、骨格筋の表現型が正常の胎盤によってレスキューされなかったことは、後述する骨格筋におけるRb-Ras経路が細胞自律的であることを支持する。

以上のように、Rb・rasダブルノックアウトマウスの観察以前に、多くの複合変異マウスが作製されており、表現型を詳細に比較することにより、より深い解釈が可能になった。

(4) Rb・rasダブルノックアウトマウス胚

Rbホモ型欠損マウスが胎生13.5~15.5日で致死である一方(上述)、N-ras⁹⁵⁾、H-ras⁹⁶⁾をホモ型で欠くマウスはそれぞれ正常に発生する。驚くことにN-rasとH-rasを両方欠くマウスも正常に発生する⁹⁷⁾。K-rasホモ型欠損は、貧血による胎生致死を誘導する⁹⁸⁾。N-rasホモ型欠損に加えK-rasをヘテロ型で欠く遺伝学的背景を導入すると致死性が生じるので⁹⁹⁾、N-RasとK-Rasの間には、一部重複する機能が存在すると考えられる。

RbとN-rasを同時に欠損すると、最長18.5日まで寿命が延長した¹⁰⁾。肝性貧血は顕著にレスキューされ、肝性造

血期間中ヘマトクリット値は上がり続け、脱核した赤血球が末梢に出現するが、この期間を過ぎると再び致命的な貧血が出現する。また、最終分化マーカーを正常に発現する肝マクロファージも有意に増加していた(投稿準備中)。骨格筋細胞最終分化の異常もレスキューされ、MyoD、MEF2Cの転写促進能が回復されていた。Rb欠損骨格筋におけるこれらの転写因子の不活性化は、亢進したRas活性によって説明できる。一方、骨格筋・中枢・末梢神経系の細胞周期異常とアポトーシスは、レスキューされない。ことに、骨格筋では、正常なmyotubeの発達が観察されながら、まさに同じ細胞で、アポトーシスや巨大核の出現が持続した¹⁰⁾。すなわち、N-ras欠損はRb欠損骨格筋の分化異常を特異的にレスキューし、細胞周期・アポトーシスに影響しない。このことはまた、細胞周期を制御する機構と細胞分化を制御する機構が、Rbの複合的機能において分離可能であることを示す¹⁰⁰⁾。この考えを支持したのは、前述した遺伝的浸透率の低い網膜芽細胞腫や良性の網膜腫瘍に見いだされるRb変異の解析結果であった。これらの変異体は、E2F-1との結合能を失うため、細胞周期に大きな影響を与えないが、Rb欠損細胞の分化能をレスキューすることができる^{69,101)}。しかも、このような変異体のいくつもの、Ras活性化を抑制する機能を喪失していない⁵⁾。一方、Rbホモ型マウスにおけるK-rasのヘテロ型追加欠損も、16.5日まで寿命を延長し、レスキューの様式もN-ras欠損時と同様の傾向であった¹¹⁾。

(5) Rb・rasダブルノックアウトマウス下垂体腫瘍

Rbヘテロ型マウスは、正常アレルの体性欠失にともない、脳下垂体中葉由来の腺がんを生じる。12ヶ月齢にもなれば、この表現型の浸透率はほぼ100%になる¹¹⁾。Rb^{+/-}; N-ras^{-/-}、Rb^{+/-}; K-ras^{+/-}マウスともに、下垂体腫瘍の頻度は変わらないが、浸潤性が抑制されたため、神

表2 これまでに報告されたRbヘテロ型複合変異マウス表現型の概略(63, 11, 12, 14, 109)

遺伝背景	表現型とRbヘテロ型マウスとの比較
Rb ^{+/-}	脳下垂体腺がん, 低悪性度甲状腺C細胞腫瘍(線腫), 褐色細胞腫
十追加変異	
p107 ^{-/-}	網膜異形成, キメラマウスに多種の腫瘍
p53 ^{-/-}	腫瘍の種類増加, 寿命短縮
p53 ^{+/-}	retがん遺伝子の突然変異に依存した甲状腺C細胞腫瘍悪性化
E2F1 ^{-/-}	腫瘍頻度低下, 寿命延長
E2F3 ^{-/-}	下垂体腺がん頻度低下, 寿命延長, 甲状腺C細胞腫瘍悪性化と転移性獲得
E2F4 ^{-/-}	腫瘍頻度低下, 寿命延長
Id2 ^{-/-}	脳下垂体腺がん分化度亢進, 増殖低下, 血管新生低下, 寿命延長
N-ras ^{-/-}	脳下垂体腺がん分化度亢進と浸潤性低下, 甲状腺C細胞腫瘍悪性化と転移性獲得
N-ras ^{+/-}	N-ras正常アレルの体性欠失にともなう甲状腺C細胞腫瘍悪性化と転移性獲得
K-ras ^{+/-}	脳下垂体腺がん分化度亢進, 浸潤性低下, 寿命延長
Ink4a ^{-/-}	甲状腺C細胞腫瘍悪性化
Arf ^{-/-}	甲状腺C細胞腫瘍悪性化, 脳下垂体腺がん増悪
Ink4a ^{-/-} ; Arf ^{-/-}	甲状腺C細胞腫瘍悪性化, 脳下垂体腺がん増悪
Suv39h1 ^{-/-}	甲状腺C細胞腫瘍悪性化

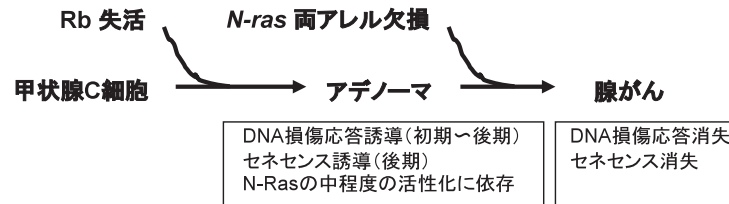


図3 $Rb^{+/-}; N-ras^{+/-}$ マウスにおいて観察される2段階発がんとその機構

経症状の発現時期が遅延した。特に *K-ras* ヘテロ型は著明に寿命が延びた¹¹⁾ (表2)。ACTH分泌の測定や組織学的解析から、浸潤性の低下は、*ras* の追加欠損によって腫瘍の分化度が亢進したためと考えられた^{11,12)}。この知見は、上述の胚発生における *Rb* と *ras* の関係と合致する。また、この場合、*Ras* は *Rb* 欠損下垂体腫瘍のプロGRESSIONに対して正の貢献を行うといえる。一方、*E2F1*, 2, 4のいずれかを欠いても、下垂体腫瘍の頻度が低下し、寿命は延びる^{102~104)} (表2)。*Ras* とは対照的に、*E2F* は *Rb* 欠損下垂体腫瘍のイニシエーションにおいて働くと思える。また、*Id2* の追加欠損は、分化度、大きさ、頻度ともに減少させた⁵⁶⁾。一方、*p21*, *p27*, *p53*, *Arf* 追加欠損は、いずれも下垂体腫瘍の出現を促進した^{105~109,14)} (表2)。

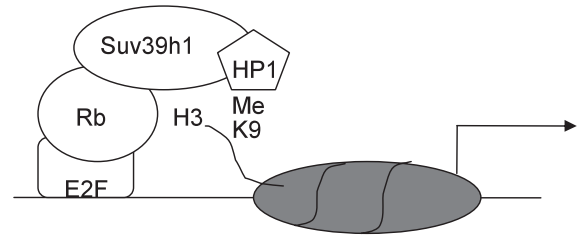
(6) *Rb*・*N-ras* ダブルノックアウトマウス甲状腺腫瘍

Rb ヘテロ型マウスからはまた、下垂体と同様の機序で、甲状腺カルシトニン産生細胞(以下C細胞)由来の腺腫(以下C細胞アデノーマ)が生じる。病理診断学的に明確に腺腫として受け入れられた訳ではないが(R. Bronson 博士私信)、遺伝学的背景の違いによってさらに悪性化する余地があるという見地と最近の生化学的な知見(後述)に基づき、本稿ではアデノーマと呼ぶ。*E2F1* あるいは *E2F4* の追加欠損は、C細胞アデノーマの発生頻度を減少させる^{102,104)}。*K-ras* のヘテロ型欠損は、C細胞アデノーマの組織型には影響を与えない¹¹⁾。しかし、*E2F3* そして *N-ras* の追加ホモ型欠損は、いずれもC細胞アデノーマを高度に悪性転換する^{103,12)}。さらに、 $Rb^{+/-}; N-ras^{+/-}$ マウスC細胞は、*Rb* の体性欠失に続き *N-ras* 正常アレルの体性欠失を起こし悪性化する。つまり、C細胞において、*Rb* が欠損した遺伝学的背景では、*N-ras* はがん抑制遺伝子の如く振る舞うのだ¹²⁾ (図3)。

(7) *Rb* 欠損によって誘導されるDNA損傷とセネセンス

Rb 欠損C細胞アデノーマは、その発生の初期(4~6ヶ月齢)から種々のDNA損傷応答マーカー¹¹⁰⁾を発現する。このころ、PCNAやKi-67は高率に陽性で、アデノーマは生育を続ける¹⁴⁾。つまり、DNA損傷応答だけでは、腫瘍の増殖は止まらない。約11ヶ月齢では、DNA損傷応答マーカーに加え、種々のセネセンスマーカー¹¹¹⁾が高頻度に

Rb存在下のヒストンメチル基転移酵素複合体



Rb欠損時のヒストンメチル基転移酵素複合体

- 野生型N-Rasは複合体形成を促進
- 活性化型N-Rasは複合体形成を阻害

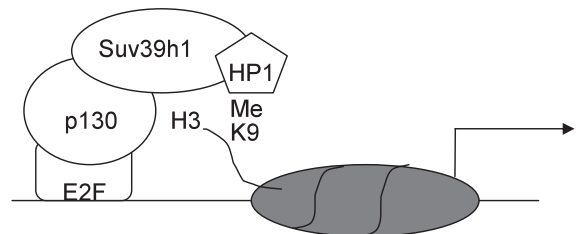


図4 *Rb* 欠損時の p130 の役割

発現する。このころには、PCNA・Ki-67陽性細胞は非常に少ない。一方、*N-ras* ホモ型マウスに生じた *Rb* 欠損C細胞腫瘍は、どのような時期でも、DNA損傷応答・セネセンスマーカーをほとんど発現せず、PCNA・Ki-67陽性細胞は高率である¹⁴⁾。

Rb ヘテロ型マウスにおいて、セネセンス誘導に必要なと思われる遺伝子である *Ink4a*, *Arf*, *Suv39h1* のいずれを追加欠損しても、C細胞アデノーマは高度に悪性化した¹⁴⁾。*N-ras* を欠く *Rb* 欠損C細胞腫瘍株は、比較的容易に樹立することができる。この細胞において野生型N-Rasを再構成すると、まずDNA損傷応答が、続いて、種々のセネセンスマーカーが発現した。ところが、同細胞において活性化型のN-Rasを再構成すると、DNA損傷応答もセネセンスマーカーも出現しない。更に、*Rb* も再構成すると、野生型と活性化型のN-Rasの作用は逆転する。つまり、*Rb* 欠損は野生型N-Rasに*Rb* なしでセネセンスを誘導する機能を付加し、活性化型N-Rasは*Rb* に依存してセ

ネセセンスを誘導する¹⁴⁾。

ある培養条件において、野生型 N-Ras は *Rb* 欠損下で、*Rb* 存在下の約 10 倍活性化する。同条件下で、活性化型 N-Ras は *Rb* 存在下の野生型 N-Ras の約 50 倍活性化し、しかも、野生型と違い *Rb* 再構成の影響をほとんど受けない。*Rb* 欠損によって約 10 倍活性化した N-Ras は p130 を誘導し、これが *Rb* に代わって Suv39h1 や HP-1 γ と複合体を形成し、ヒストンメチル化に依存したセネセンスを誘導する。これに対して、約 50 倍活性化した活性化型 N-Ras は p130 を誘導しないために、*Rb* が存在しなければ、機能的な Suv39h1 複合体が形成されない (図 4)。N-Ras の中庸的な活性化、あるいはその活性化型変異に伴って喪失するかもしれない未知の機能に依存してセネセンスを誘導し、*Rb* 欠損 C 細胞は完全ながん化から免れると考えられる。C 細胞と同様に、*Rb*^{-/-}; *N-ras*^{-/-} および *Rb*^{-/-}; *Ink4a*^{-/-} 初期培養線維芽細胞は容易にセネセンスを逸脱する¹⁴⁾。

(8) Oncogene-induced senescence と Tumor suppressor loss-induced senescence

Ras の活性化に依存したセネセンス誘導という概念の生成は、Serrano らがヒトの二倍体線維芽細胞に活性化型の Ras を導入するとセネセンスを誘導することを見つけた時に始まる¹¹²⁾。更に、様々ながん遺伝子にその活性があることが判り¹¹³⁾、oncogene-induced senescence という呼称が授けられた。Ras の活性化は、reactive oxygen species (ROS) の誘導¹¹⁴⁾、p38 や PRAK の活性化^{115,116)}、p16^{Ink4a} の転写促進¹¹⁷⁾等を介してセネセンスを誘導することが示されている。Ras によって誘導される hyper-replication が DNA 損傷を亢進、セネセンスを誘導することも提唱された^{118,119)}。また、Ras GAP (GTPase activating protein) のひとつである NF-1 ががん抑制遺伝子を失活させることにより内在性の Ras を活性化した系において誘導されるセネセンスでは、一時的に活性化した Ras が PI3K/AKT/FOXO あるいは ERK を活性化することによって GAP, Sprouty, Spredなどを発現誘導し、逆に Ras パスウェイを抑制するので、セネセンスが誘導されるという feedback モデルが提示されている¹²⁰⁾。Ras 下流の B-Raf の活性化型変異は、やはりセネセンスを引き起こす。これはメラノーマの前がん病変とされる色素性母斑が増殖停止を維持する機構とされる¹²¹⁾。B-Raf の活性化は、IGFBP1 やインターロイキン-6、-8 の発現を亢進することによってセネセンスを誘導すると考えられている^{122,123)}。

がん抑制遺伝子の失活がセネセンスを誘導し、これががん化を阻止する前例は *PTEN* と *VHL* である。前者の欠損は p53 に、後者は *Rb* と p400 に依存したセネセンスを誘導する^{124,125)}。これに *Rb* が加わった¹⁴⁾。そろそろ tumor

suppressor loss-induced senescence という言葉を口にしてもよいのではないだろうか。

Rb 突然変異だけががん化する組織の種類は限られている。*Rb* 変異を有する家系を長期追跡しても、それほど多種の腫瘍が発生するわけではない¹²⁶⁾。その理由のひとつが、*Rb* 欠損によるがん化が、我々の観察したような Ras あるいは p53¹²⁷⁾ に依存した生体防御機構によって厳密に拮抗されるからであると考えられる。

(9) *Rb* を欠損すると何故 Ras 活性は亢進するか

では、*Rb* を欠損すると何故 Ras の活性が亢進するのか？ Lee らは、血清飢餓状態においた *Rb* 欠損線維芽細胞に血清刺激を与えた時に観察される急峻な Ras の活性化が、*Rb* の転写抑制能に依存する可能性を示していた⁵⁾。また、Horvitz らによる線虫の *SynMuv* 遺伝子群解析も、*Rb* が転写抑制依存的 (HDAC 依存的) に Ras 経路に拮抗する可能性を示唆した⁷⁾。我々は、C 細胞において *Rb* による転写抑制を受ける遺伝子として、ファルネシル 2 リン酸合成酵素、ファルネシル基転移酵素群、ゲラニルゲラニル基転移酵素群の大半とこれらの上流転写因子である *SREBP* ファミリーを同定した¹⁴⁾。これらの遺伝子の上流には、E2F 結合コンセンサス配列か *SREBP* 転写因子の結合配列である sterol responsive element (SRE) あるいはその両方が見いだされる (図 5)。これらの知見から、*Rb* が E2F 直接依存的に、あるいは、E2F に依存した *SREBP* ファミリーの転写抑制によって、イソプレニル化関連酵素の大半を転写抑制することが考えられた。そして、*Rb* の機能を増強させる条件下で、実際に *Rb* が N-Ras のイソプレニル化を遅延させることが示された¹⁴⁾。

イソプレニル化は、カルボキシル末端に CAAX モチーフ (C: cysteine; A: aliphatic) を有するタンパク質の翻訳後修飾の最初のステップであり、システインに転移される脂質としてファルネシル基がつく場合とゲラニルゲラニル基がつく場合を包含した言い方である¹²⁸⁾。この反応によって

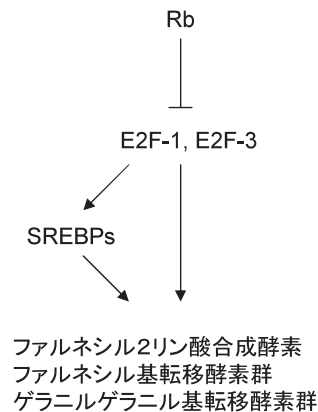


図5 *Rb* によるタンパク質イソプレニル化の制御機構

Rasは小胞体の膜にアンカーされ、カルボキシル末端側の加水分解、パルミトイル化を経てゴルジ装置や形質膜に輸送される。K-, N-, H-のRasアイソフォームは、ほぼ同一のエフェクタードメインを有し、一様にイソプレニル化を受けるが、パルミトイル化の様態が異なるために、それぞれ異なる深さとアフィニティーをもって脂質二重膜の細胞質面に結合し、細胞内小器官への分布も異なる。このことが、上流のレセプター複合体や下流のエフェクターに対する異なるアクセス性を付与し、それぞれのアイソフォームが特異的な機能を発揮する。Rasは形質膜においてだけでなく、途中のゴルジ装置においても活性化される。これは、Srcを介したホスホリパーゼC γ の活性化に依存すると考えられている。また、ゴルジから発せられるRasシグナルは、JNK, ERK, AKTやRalを活性化する様式が、レセプター型チロシンキナーゼを経て発せられる形質膜からのRasシグナルのそれとは異なっている^{129,130}。Rbが不活性化した時に獲得されるRasの機能が、活性化型変異Rasのそれと質的に異なることの一因かもしれない。

4. がん抑制遺伝子としての野生型 *ras*

本稿では、*Rb*を欠損した遺伝学的背景において、野生型Rasとがん原性（活性化型）Rasの機能に明確な差違があることを紹介した。ひとつの教訓は、Chris Marshall博士が記述したように¹³¹、Rasシグナル伝達の量的・時間的パターンによって、下流のイベントがまったく異なることである。もうひとつ重要なのは、Rasの活性化型変異はgain of functionであるとともにloss of functionでもあるという考え方である。*Rb*を欠損しない場合に、すべてのアイソフォームの野生型*ras*が、それぞれの活性化型アレルに対して、部分的にドミナントな機能を有すると考えさせる報告がある。例えば、*ras*突然変異を有する多くのがんにおいて、野生型アレルの発現量が変異アレルのそれを越えることは稀であることや、変異アレルの方が相対的に過多になるようなアレル数変動が観察されることが挙げられる¹³²。化学発がんの過程で*H-ras*あるいは*N-ras*に活性化型の突然変異が生じて、それだけでは細胞はがん化せず、正常のアレルが欠失することが必要であった^{133~135}。同様の現象は、よりコントロールされた実験系を用い、

*K-ras*でも観察された¹³⁶。これらの知見は、活性化型*ras*存在下の野生型*ras*によるがん抑制機能獲得を示唆している。野生型Rasの発現とある種の臨床がんの予後が正相関することも知られる¹³²。

おわりに

RbとRasの機能的関連について報告されていることを記述した。様々な複合遺伝子変異マウスが(表1, 2)、Rb機能の理解に貢献したこと、とくにRbとRasのように直接結合しない分子間の関連を調べるのに威力を発揮したことを感じて頂けると幸いである。

本稿で強調したのは、RbとRasの間に相互抑制的な関係があることである。この関係がひとつの細胞の中で同時進行し、サーキット(閉鎖回路)を形成するかもしれない(図6)。そうであれば、この機構は細胞周期の「周期性」の創造に貢献するかもしれない。Ras活性の細胞周期的変化が、イソプレニル化関連酵素の発現と協調するかどうかは、まだ解明されていない。また、イソプレニル化関連酵素の発現変化がどのくらいのダイナミクスでRas活性の変化に反映されるかもまだわからない。

更には、イソプレニル化を受けると考えられるタンパク質は300を数える。これらは、Ras2, RhoA, RhoB, RhoC, RhoE, Rac1, Rac2, Cdc42, Rheb, TC10, TC21, RalA, Rap1A, Rap1B, Rap2, Rab8, Rab11, Rab13等の低分子GTPaseタンパク質や、動物体で作用するCENP-E, CENP-Fを含む¹³⁷。Rb機能のうち、N-Rasのイソプレニル化制御だけが特異的に重要なのだろうか？ これまでに、RhoA, Cdc42, Racの活性がRb欠損細胞において亢進していることが観察された¹²。Rbはがんのプログレッションの過程でも不活性化することが多く¹⁶、そのようながんにおいて、これらの被イソプレニル化タンパク質の活性が亢進しているのか、そうであれば、がん細胞の挙動にどのように関わるか興味深い。Rbと脂質合成経路の関連も未解明である。Rbヘテロ型マウスには脂肪肝が生じる¹³⁸。イソプレニル化制御も含め、Rbのメタボリックな機能からがん細胞の挙動を見直すと、臨床的にも意義深いかも知れない。

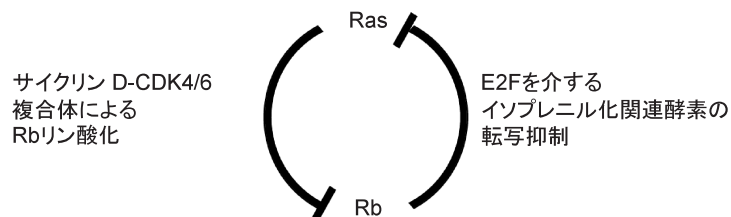


図6 RasとRbの間の相互抑制的関係

謝辞

綴編にあたり、スペースの都合上残念ながら引用できなかった沢山の重要な論文の著者にお詫びする。Mark Ewen, Kwang-Youl Lee, Roderick Bronson, Daniel Peeper 博士らとの出会いとディスカッションは本稿執筆に不可欠であった。また、茶野徳宏博士、三木貴雄博士、北嶋俊輔氏に原稿の御批評を頂いた。各位に心より感謝申し上げる。

文 献

- 1) Peeper, D.S., Upton, T.M., Ladha, M.H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernardis, R., DeCaprio, J.A., & Ewen, M.E. (1997) *Nature*, **386**, 177-181.
- 2) Mittnacht, S., Paterson, H., Olson, M.F., & Marshall, C.J. (1997) *Curr. Biol.*, **7**, 219-221.
- 3) Taylor, S.J. & Shalloway, D. (1996) *Curr. Biol.*, **6**, 1621-1627.
- 4) Raptis, L., Brownell, H.L., Corbley, M.J., Wood, K.W., Wang, D., & Haliotis, T. (1997) *Cell Growth Differ.*, **8**, 891-901.
- 5) Lee, K.Y., Ladha, M.H., McMahon, C., & Ewen, M.E. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7724-7732.
- 6) Lu, X. & Horvitz, H.R. (1998) *Cell*, **95**, 981-991.
- 7) Ceol, C.J. & Horvitz, H.R. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 461-473.
- 8) Page, B.D., Guedes, S., Waring, D., & Priess, J.R. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 451-460.
- 9) Ceol, C.J. & Horvitz, H. R. (2004) *Dev. Cell*, **6**, 563-576.
- 10) Takahashi, C., Bronson, R.T., Socolovsky, M., Contreras, B., Lee, K.Y., Jacks, T., Noda, M., Kucherlapati, R., & Ewen, M. E. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 5256-5268.
- 11) Takahashi, C., Contreras, B., Bronson, R.T., Loda, M., & Ewen, M.E. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10406-10415.
- 12) Takahashi, C., Contreras, B., Iwanaga, T., Takegami, Y., Bakker, A., Bronson, R.T., Noda, M., Loda, M., Hunt, J.L., & Ewen, M.E. (2006) *Nat. Genet.*, **38**, 118-123.
- 13) Takahashi, C. & Ewen, M.E. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 9345-9348.
- 14) Shamma, A., Takegami, Y., Miki, T., Kitajima, S., Noda, M., Obara, T., Okamoto, T., & Takahashi, C. (2009) *Cancer Cell*, **15**, 255-269.
- 15) Peeper, D.S. (2009) *Cancer Cell*, **15**, 243-245.
- 16) Burkhardt, D.L. & Sage, J. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 671-682.
- 17) Buchkovich, K., Duffy, L.A., & Harlow, E. (1989) *Cell*, **58**, 1097-1105.
- 18) Chen, P.L., Scully, P., Shew, J., Wang, J.Y., & Lee, W.H. (1989) *Cell*, **58**, 1193-1198.
- 19) DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C.M., & Livingston, D.M. (1989) *Cell*, **58**, 1085-1095.
- 20) Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J., & Livingston, D.M. (1993) *Cell*, **73**, 487-497.
- 21) Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A., & Weinberg, R.A. (1993) *Cell*, **73**, 499-511.
- 22) Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., & Howley, P.M. (1989) *EMBO J.*, **8**, 4099-4105.
- 23) Munakata, T., Liang, Y., Kim, S., McGivern, D.R., Huibregtse, J., Nomoto, A., & Lemon, S.M. (2007) *PLoS Pathog.*, **3**, 1335-1347.
- 24) DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C. M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., & Livingston, D.M. (1988) *Cell*, **54**, 275-283.
- 25) Whyte, P., Williamson, N.M., & Harlow, E. (1989) *Cell*, **56**, 67-75.
- 26) Ji, P., Jiang, H., Rekhman, K., Bloom, J., Ichetovkin, M., Pagano, M., & Zhu, L. (2004) *Cell*, **16**, 47-58.
- 27) Binne, U.K., Classon, M.K., Dick, F.A., Wei, W., Rape, M., Kaelin, W.G., Jr., Naar, A.M., & Dyson, N.J. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 225-232.
- 28) Novitch, B.G., Mulligan, G.J., Jacks, T., & Lassar, A.B. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 441-456.
- 29) Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y., & Lee, W.H. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2794-2804.
- 30) Chen, P.L., Riley, D.J., Chen-Kiang, S., & Lee, W.H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 465-469.
- 31) Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C., & Hinds, P.W. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 303-316.
- 32) Singh, P., Coe, J., & Hong, W. (1995) *Nature*, **374**, 562-565.
- 33) Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y., & Iavarone, A. (2000) *Nature*, **407**, 592-598.
- 34) Benevolenskaya, E.V., Murray, H.L., Branton, P., Young, R.A., & Kaelin, W.G., Jr. (2005) *Mol. Cell*, **18**, 623-635.
- 35) Miyake, S., Sellers, W.R., Safran, M., Li, X., Zhao, W., Grossman, S.R., Gan, J., DeCaprio, J.A., Adams, P.D., & Kaelin, W. G., Jr. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8889-8902.
- 36) MacLellan, W.R., Xiao, G., Abdellatif, M., & Schneider, M.D. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8903-8915.
- 37) Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., & Kouzarides, T. (1998) *Nature*, **391**, 597-601.
- 38) Luo, R.X., Postigo, A.A., & Dean, D.C. (1998) *Cell*, **92**, 463-473.
- 39) Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., & Harel-Bellan, A. (1998) *Nature*, **391**, 601-605.
- 40) Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., & Kouzarides, T. (2001) *Nature*, **412**, 561-565.
- 41) Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., & Wolffe, A.P. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 338-342.
- 42) Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., & Lowe, S.W. (2003) *Cell*, **113**, 703-716.
- 43) Garcia-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D., & Blasco, M.A. (2002) *Genetics*, **32**, 415-419.
- 44) Hernandez, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benzra, R., Lowe, S.W., & Condon-Cardo, C. (2004) *Nature*, **430**, 797-802.
- 45) Xiao, H. & Goodrich, D.W. (2005) *Oncogene*, **24**, 8105-8113.
- 46) Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., & Helin, K. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 267-285.
- 47) Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 22-30.
- 48) Sherr, C.J. & Weber, J.D. (2000) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 94-99.
- 49) Wang, D., Kennedy, S., Conte, D., Jr., Kim, J.K., Gabel, H.W., Kamath, R.S., Mello, C.C., & Ruvkun, G. (2005) *Nature*, **436**, 593-597.
- 50) Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B. T., Knabb, J.R., Schumacker, P., & Macleod, K.F. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**,

- 6229-6242.
- 51) Polager, S., Ofir, M., & Ginsberg, D. (2008) *Oncogene*, **27**, 4860-4864.
 - 52) Lasorella, A., Rothschild, G., Yokota, Y., Russell, R.G., & Iavarone, A. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 3563-3574.
 - 53) Gabellini, C., Del Bufalo, D., & Zupi, G. (2006) *Oncogene*, **25**, 5326-5332.
 - 54) Dasgupta, P., Sun, J., Wang, S., Fusaro, G., Betts, V., Padmanabhan, J., Sebti, S.M., & Chellappan, S.P. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9527-9541.
 - 55) Gauthier, M.L., Berman, H.K., Miller, C., Kozakeiwicz, K., Chew, K., Moore, D., Rabban, J., Chen, Y.Y., Kerlikowske, K., & Tlsty, T.D. (2007) *Cancer Cell*, **12**, 479-491.
 - 56) Ebel, C., Mariconti, L., & Gruissem, W. (2004) *Nature*, **429**, 776-780.
 - 57) Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Gruissem, W., & Scheres, B. (2005) *Cell*, **123**, 1337-1349.
 - 58) Walkley, C.R., Shea, J.M., Sims, N.A., Purton, L.E., & Orkin, S.H. (2007) *Cell*, **129**, 1081-1095.
 - 59) Liu, Y., Clem, B., Zuba-Surma, E.K., El-Naggar, S., Telang, S., Jenson, A.B., Wang, Y., Shao, H., Ratajczak, M.Z., Chesney, J., & Dean, D.C. (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 336-347.
 - 60) Morris, E.J. & Dyson, N.J. (2001) *Adv. Cancer Res.*, **82**, 1-54.
 - 61) Dimova, D.K. & Dyson, N.J. (2005) *Oncogene*, **24**, 2810-2826.
 - 62) Takahashi, Y., Rayman, J.B., & Dynlacht, B.D. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 804-816.
 - 63) Wikenheiser-Brokamp, K.A. (2006) *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 767-780.
 - 64) Classon, M. & Dyson, N. (2001) *Exp. Cell Res.*, **264**, 135-147.
 - 65) Dannenberg, J.H. & te Riele, H.P. (2006) *Results Probl. Cell Differ.*, **42**, 183-225.
 - 66) Macaluso, M., Montanari, M., & Giordano, A. (2006) *Oncogene*, **25**, 5263-5267.
 - 67) Dannenberg, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L., & te Riele, H. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 3051-3064.
 - 68) Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., & Jacks, T. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 3037-3050.
 - 69) Sellers, W.R. & Kaelin, W.G., Jr. (1997) *Clin. Oncol.*, **15**, 3301-3312.
 - 70) Dirlam, A., Spike, B.T., & Macleod, K.F. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8713-8728.
 - 71) Williams, J.P., Stewart, T., Li, B., Mulloy, R., Dimova, D., & Classon, M. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1170-1182.
 - 72) Zhang, X., Kim, J., Ruthazer, R., McDevitt, M.A., Wazer, D. E., Paulson, K.E., & Yee, A.S. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8252-8266.
 - 73) Deng, Q., Li, Y., Tedesco, D., Liao, R., Fuhrmann, G., & Sun, P. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 8298-8307.
 - 74) Sebastian, T., Malik, R., Thomas, S., Sage, J., & Johnson, P.F. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3301-3312.
 - 75) Rebollo, A. & Martinez, A.C. (1999) *Blood*, **94**, 2971-2980.
 - 76) Mulcahy, L.S., Smith, M.R., & Stacey, D.W. (1985) *Nature*, **313**, 241-243.
 - 77) Peeper, D.S. & Bernards, R. (1997) *FEBS Lett.*, **410**, 11-16.
 - 78) Stacey, D.W., Dobrowolski, S.F., Piotrkowski, A., & Harter, M.L. (1994) *EMBO J.*, **13**, 6107-6114.
 - 79) Ferguson, E.L. & Horvitz, H.R. (1989) *Genetics*, **123**, 109-121.
 - 80) Myers, T.R. & Greenwald, I. (2005) *Dev. Cell*, **8**, 117-123.
 - 81) Cui, M., Chen, J., Myers, T.R., Hwang, B.J., Sternberg, P.W., Greenwald, I., & Han, M. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 667-672.
 - 82) Zacksenhaus, E., Jiang, Z., Chung, D., Marth, J.D., Phillips, R. A., & Gallie, B.L. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 3051-3064.
 - 83) Walkley, C.R., Sankaran, V.G., & Orkin, S.H. (2008) *Cell Div.*, **3**, 13.
 - 84) Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2001) *Science*, **292**, 1546-1549.
 - 85) Iavarone, A., King, E.R., Dai, X.M., Leone, G., Stanley, E.R., & Lasorella, A. (2004) *Nature*, **432**, 1040-1045.
 - 86) Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., & Nadal-Ginard, B. (1993) *Cell*, **72**, 309-324.
 - 87) Skapek, S.X., Pan, Y.R., & Lee, E.Y. (2006) *Oncogene*, **25**, 5268-5276.
 - 88) Du, W. & Pogoriler, J. (2006) *Oncogene*, **25**, 5190-5200.
 - 89) Clanton, M. & Harlow, E. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 910-917.
 - 90) Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., & Israel, M.A. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 1270-1284.
 - 91) Wu, L., de Bruin, A., Saavedra, H.I., Starovic, M., Trimboli, A., Yang, Y., Opavska, J., Wilson, P., Thompson, J.C., Ostrowski, M.C., Rosol, T.J., Woollett, L.A., Weinstein, M., Cross, J.C., Robinson, M.L., & Leone, G. (2003) *Nature*, **421**, 942-947.
 - 92) Spike, B.T., Dirlam, A., Dibling, B.C., Marvin, J., Williams, B. O., Jacks, T., & Macleod, K.F. (2004) *EMBO J.*, **23**, 4319-4329.
 - 93) Williams, B.O., Schmitt, E.M., Remington, L., Bronson, R.T., Albert, D.M., Weinberg, R.A., & Jacks, T. (1994) *EMBO J.*, **13**, 4251-4259.
 - 94) Maandag, E.C., van der Valk, M., Vlaar, M., Feltkamp, C., O'Brien, J., van Roon, M., van der Lugt, N., Berns, A., & te Riele, H. (1994) *EMBO J.*, **13**, 4260-4268.
 - 95) Umanoff, H., Edelman, W., Pellicer, A., & Kucherlapati, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1709-1713.
 - 96) Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A., & Katsuki, M. (2000) *Oncogene*, **19**, 2951-2956.
 - 97) Esteban, L.M., Vicario-Abegon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., Pellicer, A., & Snaos, E. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 1444-1452.
 - 98) Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hattori, T., Otani, H., Aiba, A., & Katsuki, M. (1997) *Oncogene*, **15**, 1151-1159.
 - 99) Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., & Jacks, T. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2468-2481.
 - 100) Goodrich, D.W. (2006) *Oncogene*, **25**, 5233-5243.
 - 101) Sun, H., Chang, Y., Schweers, B., Dyer, M.A., Zhang, X., Hayward, S.W., & Goodrich, D.W. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1527-1537.
 - 102) Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B.O., Dyson, N.J., Harlow, E., & Jacks, T. (1998) *Nat. Genet.*, **18**, 360-364.
 - 103) Ziebold, U., Lee, E.Y., Bronson, R.T., & Lees, J.A. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 6542-6552.
 - 104) Lee, E.Y., Cam, H., Ziebold, U., Rayman, J.B., Lees, J.A., & Dynlacht, B.D. (2002) *Cancer Cell*, **2**, 463-472.

- 105) Brugarolas, J., Bronson, R.T., & Jacks, T. (1998) *J. Cell Biol.*, **141**, 503–514.
- 106) Park, M.S., Rosai, J., Nguyen, H.T., Capodiecchi, P., Cordon-Cardo, C., & Koff, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6382–6387.
- 107) Williams, B.O., Remington, L., Albert, D.M., Mukai, S., Bronson, R.T., & Jacks, T. (1994) *Nat. Genet.*, **7**, 480–484.
- 108) Harvey, M., Vogel, H., Lee, E.Y., Bradley, A., & Donehower, L.A. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 1146–1151.
- 109) Tsai, K.Y., MacPherson, D., Rubinson, D.A., Nikitin, A.Y., Bronson, R., Mercer, K.L., Crowley, D., & Jacks, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16865–16870.
- 110) Shiloh, Y. (2003) *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 155–168.
- 111) Dimri, G.P. (2005) *Cancer Cell*, **7**, 505–512.
- 112) Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., & Lowe, S.W. (1997) *Cell*, **88**, 593–602.
- 113) Di Micco, R., Fumagalli, M., & d'Adda di Fagagna, F. (2007) *Cell Biol.*, **17**, 529–536.
- 114) Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., & Finkel, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 7936–7940.
- 115) Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., & Sun, P. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3389–3403.
- 116) Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., Dong, M.Q., Frangou, C.G., Yates, J.R., & Han, J. (2007) *Cell*, **128**, 295–308.
- 117) Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., & Hara, E. (2001) *Nature*, **409**, 1067–1070.
- 118) Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Anderson, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J., & Grogoulis, V.G. (2006) *Nature*, **444**, 633–637.
- 119) Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pilicci, P.G., & d'Adda di Fagagna, F. (2006) *Nature*, **444**, 638–642.
- 120) Courtois-Cox, S., Genter Williams, S.M., Reczek, E.E., Johnson, B.W., McGillicuddy, L.T., Johannessen, C.M., Hollstein, P.E., MacCollin, M., & Cichowski, K. (2006) *Cancer Cell*, **10**, 459–472.
- 121) Mooi, W.J. & Peeper, D.S. (2006) *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1037–1046.
- 122) Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., & Green, M.R. (2008) *Cell*, **132**, 363–374.
- 123) Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., & Peeper, D.S. (2008) *Cell*, **133**, 1019–1031.
- 124) Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P.P. (2005) *Nature*, **436**, 725–730.
- 125) Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., & Kaelin, W.G., Jr. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 361–369.
- 126) Kleinerman, R.A., Tucker, M.A., Tarone, R.E., Abramson, D. H., Seddon, J.M., Stovall, M., Li, F.P., & Fraumeni, J.F., Jr. (2005) *J. Clin. Oncol.*, **23**, 2272–2279.
- 127) Laurie, N.A., Donovan, S.L., Shih, C.S., Zhang, J., Mills, N., Fuller, C., Teunisse, A., Lam, S., Ramos, Y., Mohan, A., Johnson, D., Wolson, M., Rodrigues-Galindo, C., Quatro, M., Francoz, S., Mendrysa, S.M., Guy, R.K., Marine, J.C., Jochemsen, A.G., & Dyer, M.A. (2006) *Nature*, **444**, 61–66.
- 128) Nadolski, M.J. & Linder, M.E. (2007) *FEBS J.*, **274**, 5202–5210.
- 129) Hancock, J.F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 373–384.
- 130) Quatela, S.E. & Philips, M.R. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 162–167.
- 131) Marshall, C.J. (1995) *Cell*, **80**, 179–185.
- 132) Spandidos, D.A., Sourvinos, G., Tsatsanis, C., & Zafiroopoulos, A. (2002) *J. Oncol.*, **21**, 237–241.
- 133) Finney, R.E. & Bishop, J.M. (1993) *Science*, **260**, 1524–1527.
- 134) Bremner, R. & Balmain, A. (1990) *Cell*, **61**, 407–417.
- 135) Diaz, R., Ahn, D., Lopez-Barcons, L., Malumbres, M., Perez de Castro, I., Lue, J., Ferrer-Miralles, N., Mangués, R., Tsong, J., Garcia, R., Perez-Soler, R., & Pellicer, A. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 4514–4518.
- 136) Zhang, Z., Wang, Y., Vikis, H.G., Johnson, L., Liu, G., Li, J., Anderson, M.W., Sills, R.C., Hong, H.L., Devereux, T.R., Jacks, T., Guan, K.L., & You, M. (2001) *Nat. Genet.*, **29**, 25–33.
- 137) Maurer-Stroh, S., Washietl, S., & Eisenhaber, F. (2003) *Genome Biol.*, **4**, 212.
- 138) Harrison, D.J., Hooper, M.L., Armstrong, J.F., & Clarke, A.R. (1995) *Oncogene*, **10**, 1615–1620.