

特集：ストレス応答分子：分子メカニズムの解明と病態の理解

DNA 損傷チェックポイントとがん —Chk1 阻害剤の展望と問題点—

後藤英仁^{1,2}, 稲垣昌樹^{1,2}

DNA 障害チェックポイントは、ATM-Chk2-p53 経路と ATR-Chk1-Cdc25A 経路の大きく二つのシグナル伝達経路によって制御されている。多くのがんにおいては、ATM-Chk2-p53 経路が障害されている。そのため、抗がん剤や放射線治療等で DNA 障害を引き起こした後、ATR-Chk1-Cdc25A 経路を阻害する薬剤（特に、Chk1 阻害剤）を併用することで細胞死をがん特異的に引き起こすことが期待され、多くの薬剤が現在臨床治験に入っている。最近の研究成果によって、Chk1 は、ATR 以外のキナーゼからもリン酸化修飾を受けて機能変化していることが明らかになってきた。本稿では、新規の Chk1 リン酸化修飾とその機能変化に焦点を当てながら、Chk1 阻害剤の抗がん剤としての可能性について言及する。

はじめに

細胞の遺伝情報 (DNA) は、外来性 (放射線, 紫外線, DNA 障害性薬物など) および内因性 (フリーラジカル, 細胞内代謝産物など) の要因によって、常に障害を受けている。障害を受けた細胞は、DNA 障害チェックポイントを活性化させることで、細胞周期を G1/S 移行期, S 期, G2/M 移行期で停止させる。この細胞周期停止によって、細胞は障害 DNA を修復することが可能になり、間違った遺伝情報が子孫に伝えられるのを防いでいる。仮に、修復が困難である状態 (広範な DNA 損傷や欠損等が認められ

る場合) では、細胞は、細胞周期の進行を半永久的に停止したり (細胞老化), 細胞死を導いたり (アポトーシス) して、障害細胞を増殖細胞集団から排除する。しかし、DNA 障害チェックポイントに異常が生じると、結果として、遺伝子の変異が蓄積され、最終的には、細胞ががん化したり、がんが悪性化したりする要因となる。DNA 損傷は、最終的には、CDK (cyclin-dependent kinase; サイクリン依存性キナーゼ) を阻害する二つの DNA 障害チェックポイント経路を活性化することが知られている¹⁻⁴⁾。

一つは、ATM (ataxia-telangiectasia mutated; 毛細血管拡張性運動失調症変異遺伝子産物)-Chk2 (checkpoint kinase 2; チェックポイントキナーゼ 2)-p53 と至る経路で、主に、(電離放射線等で引き起こされる) DNA の二重鎖切断の際に活性化される。ATM および Chk2 は、p53 をリン酸化することで p53 を安定化させる。転写因子である p53 は、p21 (CDK 阻害タンパク質の一つ) などの転写を制御することで、細胞周期停止を引き起こす。このシグナル伝達経路は、主に、G1/S チェックポイントで機能しており、多くのがん細胞で (遺伝子変異などによって) 不活化されている¹⁻⁹⁾ (図 1)。

他方、もう一つの重要な経路である ATR (ATM- and Rad3-related; ATM および Rad3 近縁遺伝子産物)-Chk1

¹ 愛知県がんセンター研究所発がん制御研究部 (〒464-8681 愛知県名古屋市中種区鹿子殿 1-1)

² 名古屋大学大学院医学系研究科細胞腫瘍講座 (〒466-8550 愛知県名古屋市中区鶴舞町 65)

DNA damage checkpoint and cancer—pros and cons of Chk1 inhibitors—

Hidemasa Goto^{1,2} and Masaki Inagaki^{1,2} (¹Division of Biochemistry, Aichi Cancer Center Research Institute, 1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8681, Japan, ²Department of Cellular Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan)

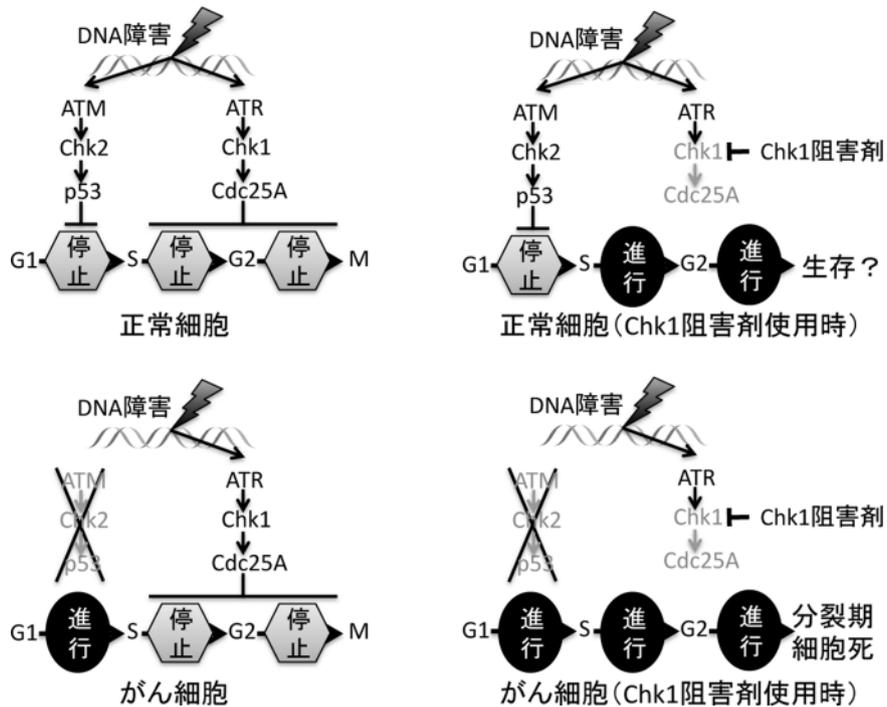


図1 正常細胞とがん細胞のDNA障害チェックポイントの違い
本文参照。

(checkpoint kinase 1; チェックポイントキナーゼ1)-Cdc25A経路は、主に、S期のDNA複製チェックポイント、G2/Mチェックポイントで機能しているが、がん細胞でこのシグナル伝達経路はむしろ亢進している。言い換えると、がん細胞では、正常細胞に比べ、ATR-Chk1-Cdc25A経路の重要性が増している。そのため、抗がん剤や放射線治療等でDNA障害を引き起こした後、Chk1阻害剤を併用することで、すべてのDNA障害チェックポイントを不活性化し、最終的に（致死的な染色体不安定性を引き起こすことによって）“mitotic catastrophe”と呼ばれる分裂期細胞死をがん特異的に引き起こすことが期待されている。現在、多くのChk1阻害剤が開発され、一部は第I相または第II相の臨床治験に入っている^{1~5,10~19)}(図1)。

我々を含めた最新の研究によって、Chk1は、ATR以外のキナーゼからもリン酸化修飾を受けて機能変化し、これらのリン酸化修飾を通じて（外来性のDNA障害がない状態でも）細胞周期の進行を巧みに制御していることが明らかになってきた¹³⁾。本稿では、新規のChk1リン酸化修飾とその機能変化に焦点を当てながら、Chk1阻害剤の抗がん剤としての可能性について言及する。なお、一般的なDNA障害チェックポイントに関しては、優れた総説^{1~5)}がすでに発表されているので、それらをあわせてご参照いただければ、幸いである。

1. DNA障害チェックポイントにおけるChk1の機能—セリン296の自己リン酸化修飾の重要性—

DNA損傷や複製障害で一本鎖DNAが生じると、ATRは以下のように活性化すると考えられている(図2参照)。ATRは、ATR結合タンパク質ATRIP(ATR-interacting protein)の働きにより、RPA(replication protein A)でコートされた一本鎖DNAに集積し、弱く活性化する²⁰⁾。それと同時に、クランプローダー(環状タンパク質複合体を一度開いてDNAを取り囲むように装着したのち、再び、環状タンパク質複合体を閉じることでDNAに装着するもの)であるRAD17の働きにより、RAD9-HUS1-RAD1からなる三量体(9-1-1)複合体がRPAでコートされた一本鎖DNAに挿入される^{21,22)}。その際に、RAD9は(弱く活性化された)ATRによってリン酸化される。RAD9は、このリン酸化修飾依存性にTOPBP1(DNA topoisomerase II binding protein 1)と結合し、ATRの近傍にTOPBP1をリクルートする^{23~25)}。効率的なATRの活性化は、ATRとTOPBP1の相互作用によってはじめて引き起こされる²⁵⁾。TOPBP1の相互作用によって高い活性を有したATRは、DNA傷害部位近傍でChk1を含めた種々の基質をリン酸化する。ATRによるChk1のリン酸化修飾・活性化には、Chk1とClaspinの結合が重要な役割を担っている^{26~28)}。Claspin自身は、TIM(Timeless)、TIPIN(TIM-interacting protein)と三者複合体を形成しており、この複合体もTIPINとRPA

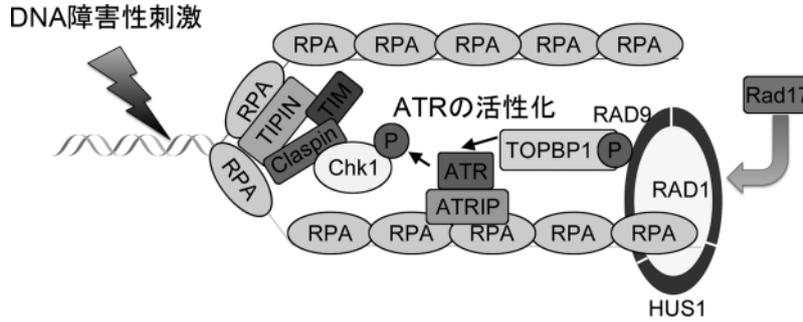
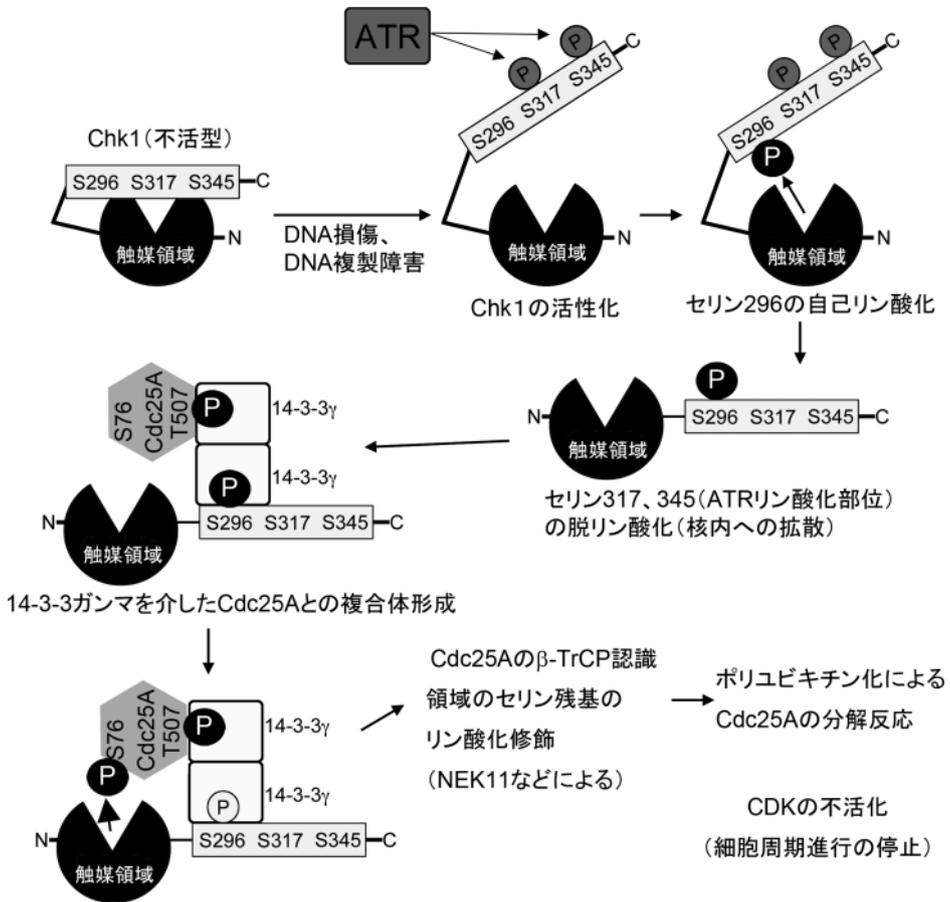


図2 DNA 障害部位での ATR-Chk1 経路の活性化モデル
本文参照. P はリン酸化修飾.

の結合を介して一本鎖 DNA 上にリクルートされている^{29,30)}. つまり, ATR による Chk1 のセリン 317 およびセリン 345 のリン酸化修飾は, DNA 損傷部位近傍で引き起こされている³¹⁾.

しかし, Chk1 が ATR によってリン酸化/活性化された後, Chk1 が Cdc25A を不活化するまでの経路には, Chk1 の機能制御の観点から, 大きく二つの問題が未解決のまま残されていた. 一つ目の未解決な点は, DNA 障害部位で

引き起こされたシグナルが Chk1 を介してどのように核全体に存在している Cdc25A に伝えられていくのかである. 二つ目は, Chk1 から Cdc25 へのシグナル伝達機構に 14-3-3 タンパク質 (哺乳類細胞では, アルファ, ベータ, ガンマなど計七種類のアイソマーが存在している) が重要な役割を担っていることが遺伝学的に証明されているが, 哺乳類細胞での 14-3-3 の関与について明解な解答が得られていないことである.



Chk1によるCdc25Aのセリン76のリン酸化
図3 DNA 障害チェックポイントにおける Chk1-Cdc25A 経路の概略
本文参照.

我々は、Chk1の自己リン酸化修飾の解析を通じて、この二つの未解決の問題についての解明を試み、以下のモデルを示すことができた³¹⁾(図3)。ATRによって、Chk1のセリン317およびセリン345のリン酸化修飾が引き起こされると、Chk1が活性化し、自身のセリン296をリン酸化する。この自己リン酸化修飾が引き起こされると、Chk1のセリン317およびセリン345は速やかに脱リン酸化される。ATRによるChk1のリン酸化修飾はDNA障害部位と一致して検出されるのに対して、Chk1の自己リン酸化反応は核全体で検出される。つまり、このリン酸化部位の移行が活性化Chk1をDNA損傷部位から核全体に分布させるうえで重要であったのである。

次に、Chk1がセリン296の自己リン酸化反応依存性に14-3-3ガンマと結合することを見だし、この点に注目し解析を進めた(図3)³¹⁾。14-3-3タンパク質はCdc25Aともリン酸化修飾依存性に結合すること、14-3-3タンパク質は二量体を形成することにより、Chk1とCdc25Aは14-3-3ガンマを介して複合体を形成する。この三者複合体の形成により、Chk1は、Cdc25Aのセリン76をはじめリン酸化できるようになる。Cdc25Aのセリン76のリン酸化修飾は、この部位の近傍(C末端側)に存在する β -TrCP phosphodegron配列(セリン残基が二つリン酸化されるとF-boxタンパク質の β -TrCPが結合できる配列)の二つのセリン残基のリン酸化修飾を誘導する[このリン酸化反応は、Chk1によって活性化されたNEK1³²⁾(アスペルギルスNIMAの近縁キナーゼの1種)などによって遂行される]。リン酸化Cdc25Aは、SCF ^{β -TrCP}複合体(Skp-Cullin-F-boxタンパク質からなるユビキチン化酵素複合体でF-boxタンパク質が β -TrCPであるもの)に認識されユビキチン依存的に分解される。この分解により、CDKが活性化できず、細胞周期は停止する。つまり、我々の研究成果は、Chk1-Cdc25A経路にChk1-セリン296の自己リン酸化修飾および14-3-3ガンマが必須の役割を担っていることを明らかにした。上記のように、Chk1-セリン296の自己リン酸化修飾は、DNA障害チェックポイントにおいて機能的に重要であるが、このリン酸化修飾の有無によって細胞や個体レベルでChk1の活性化/不活性化状態を検知できることから、Chk1阻害剤の新規開発や既存薬の阻害効果の検証にもとても有用である。

2. 細胞周期依存的なChk1のリン酸化修飾

Chk1は、(外来性のDNA障害のない)通常の細胞周期進行においても重要な役割を担っていると考えられている。その根拠の一つとなっているのは、*CHEK1*ノックアウトマウスが胎生早期に致死であることである^{33,34)}。Chk1は、特に、S期において後期の複製開始点におけるDNA複製を抑制するのに必須であり、この機構に破綻をきたす

と(おそらく、DNA複製に必要な因子が枯渇することによって)、DNA損傷が引き起こされる^{34~36)}。また、*CHEK1*のハプロ不全マウス(一般に二つの遺伝子のうち片方が機能しなくなった状態のことを指すが、この場合は、一つの遺伝子座がノックアウトされた状態の*CHEK1*^{+/-}マウスのこと)では、不適切なS期への移行(G1/Sチェックポイントの破綻)、S期でのDNA障害の蓄積(DNA複製チェックポイントの破綻)、未熟な状態での分裂期移行(G2/Mチェックポイントの破綻)が観察されており³⁷⁾、Chk1は、S期に限らず、通常の細胞周期の進行に重要な役割を担っている。Chk1は、増殖サイクル(つまり、G1→S→G2期)を通じて外来性のDNA障害のない状態でも一定レベルの活性を保持している^{38~42)}。つまり、外来性のDNA障害のない状態でも、Chk1は、Cdc25の活性化を負に制御することなどで、(分裂期開始に必須な)CDK1などのCDKが適切な時期まで活性化しないようにしている。このChk1によるCDK1の制御(抑制)機構がG2/M移行期に適切に解除されないと、細胞は分裂期に進めない。そのため、その解除機構は存在するはずであるが、長い間未解決な問題として残されていた。

我々は、G2/M移行期から分裂期にかけて、CDK1がChk1のセリン286およびセリン301を直接リン酸化することを報告した⁴³⁾(図4)。このリン酸化修飾により、Chk1はCrm-1(chromosome region maintenance protein 1;タンパク質を核外に輸送する機能をもつ)依存性に核から細胞質に移行する⁴¹⁾。このChk1の核外排出により、CDK1は核内で強く活性化することがはじめて可能になるのである^{41,42)}。一方、このリン酸化修飾が起らない(つまり、セリンをアラニンに置換した)S286A/S301A変異体を発現させると、変異Chk1は核内に留まるため、CDK1の活性化のタイミングが著しく遅れ、分裂期への進行が遅延する^{41,42)}。このことは、G2/M移行期にCdk1とChk1の間の直接的なポジティブフィードバック機構が存在すること、細胞がいったん分裂期への進行を決定したら(つまり、CDK1がある程度活性化したら)、Chk1を核外に排出することを通じて円滑に分裂期に進行していくことを示唆している。また、G2期にChk1阻害剤などでChk1活性を抑制してしまうと、細胞の準備が不完全なまま分裂期に進行してしまい、染色体(ゲノム)の不安定性を引き起こす要因の一つとなりうる。

Chk1は、常に、核と細胞質をシャトルしている分子で、チェックポイント応答時には、核に集積し機能する⁴⁴⁾。しかし、Chk1は、増殖サイクル時(G1→S→G2期)においても、チェックポイント応答時よりは程度は弱い、主に核に局在している^{41,45)}。しかし、Chk1が増殖サイクル時にどのような制御を受けて核に多く存在するのかについては、明確な知見がなかった。我々は、血清飢餓の際(G0

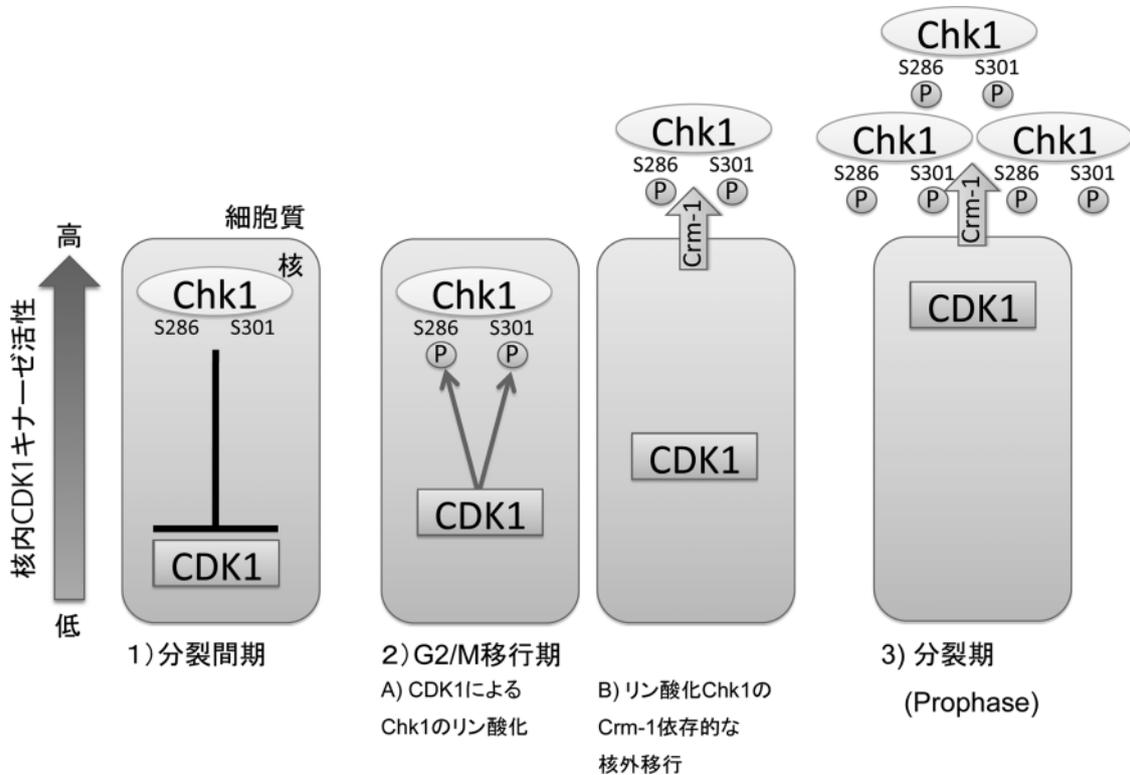


図4 CDK1とChk1の直接的ポジティブフィードバック機構

分裂間期には、Chk1はCdc25を抑制することを介して、間接的にCDK1を抑制している。G2/M移行期になると、なんらかのきっかけでCDK1は弱く活性化する。この活性化されたCDK1によって、Chk1はリン酸化される。リン酸化Chk1は（タンパク質を核外に輸送する機能をもつ）Crm-1に結合して、核から細胞質に移行する。この核外移行により、核内のChk1含量が低下するため、結果として、Chk1の核内活性が低下する。この核内活性の低下により、CDK1に対する抑制が解除され、さらに、CDK1の活性化を導く。このようなポジティブフィードバック機構によって、CDK1はいったん活性化するとChk1による抑制が効かなくなる。

期)には、Chk1は核というよりむしろ細胞質にびまん性に局在しているのに対し、血清（増殖因子）刺激時（G1期）には、核に集積することを見いだした⁴⁵⁾。このChk1の核内移行と同期してChk1のセリン280がリン酸化されること、このリン酸化修飾はMAPK（mitogen-activated protein kinase）カスケードの下流に位置するp90 RSK（90 kDa ribosomal S6 kinase）によって遂行されていることも明らかにした（図5）。このリン酸化部位をリン酸化されないアラニンに置換するとChk1の核内集積が阻害されること、逆に、リン酸化修飾を模倣するグルタミン酸に置換すると核内集積が促進されることから、セリン280のリン酸化修飾はChk1の核内集積に重要な役割を担っているといえる。増殖因子依存的な核内移行が阻害されると、紫外線照射後のATRからのリン酸化修飾やChk1の自己リン酸化修飾が遅延する⁴⁵⁾。したがって、このリン酸化修飾によって、増殖細胞はDNA障害に対して素早く対応できる状態になる。つまり、この知見は、p90 RSKからChk1に至るシグナル伝達経路が増殖サイクル時のDNA変異を起こさないための障壁として働いている可能性があることを示唆している。したがって、Chk1阻害剤を抗がん剤とし

て使用するうえで慎重な対応をすべきChk1機能の一つであろう。

3. Chk1阻害剤の抗がん剤としての可能性と問題点

外科的切除以外のがん治療の多く（放射線治療、化学療法など）は、DNA障害を引き起こすことで、がん細胞に細胞老化やアポトーシスを誘導し、がん細胞の無秩序な増殖を抑えてきた。しかし、これらの治療は、同時に、分裂能の高い消化管上皮、毛根や骨髄細胞などにも大きな影響にも与え、この副作用が治療効果を左右する一因にもなっている。したがって、正常細胞とがん細胞のDNA障害チェックポイント経路の違いを知っておくことは極めて重要といえる¹³⁾。

「はじめに」で述べたように、正常細胞には、ATM-Chk2-p53経路とATR-Chk1-Cdc25A経路の大きく二つのDNA障害チェックポイント経路が存在する（図1）。一方、多くのがん細胞では、ATM-Chk2-p53経路がこのシグナル伝達経路分子の点変異や欠損などで機能不全をきたしている。実際、遺伝的に高発がん性を呈する疾患の原因遺伝子としてATM、CHEK2、TP53が同定されており、また、

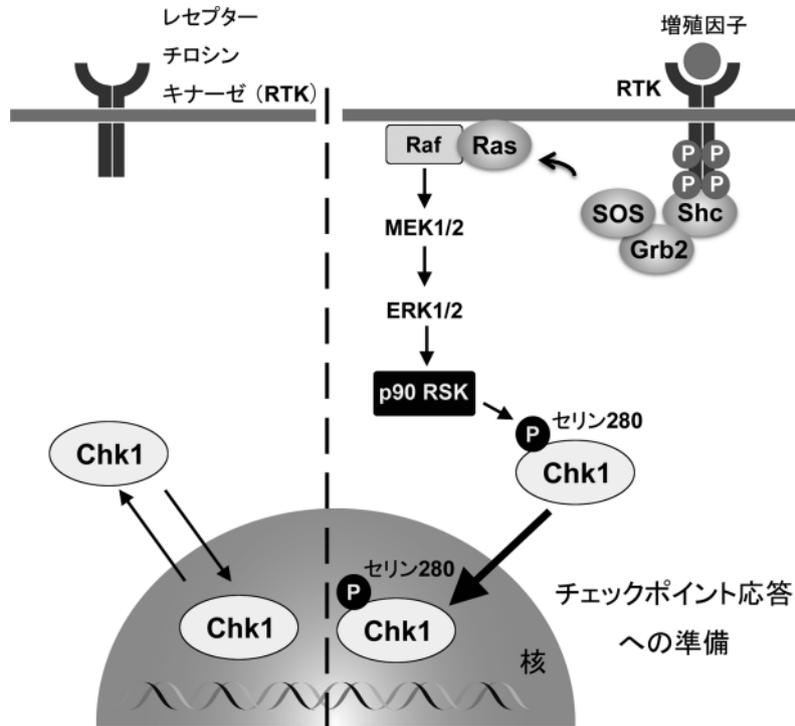


図5 増殖因子依存的な Chk1-セリン 280 のリン酸化修飾と Chk1 の核内移行
本文参照。

多くの散発性のがんでも上記遺伝子の変異や欠損などは報告されている。ATM-Chk2-p53 経路が損傷されることによって、主に、G1/S チェックポイントが機能しなくなり、染色体（ゲノム）の不安定性が増強されるという分子モデルが想定されている。これに対して、がん細胞では、ATR-Chk1-Cdc25A 経路のシグナル伝達分子の点変異や欠損などは稀である。がん細胞といえどもハウスキーピング遺伝子などの生存に必須な遺伝子群を欠落するわけにはいかない。それゆえ、染色体（ゲノム）の不安定性も一定の範囲内でコントロールされる必要があり、その維持機構の中核に ATR-Chk1-Cdc25A 経路が存在する。そのため、放射線や抗がん剤で DNA 障害を引き起こした後、ATM-Chk2-p53 経路に機能不全をきたしているがん細胞／組織に Chk1 阻害剤を作用させることで、がん細胞に生存不可能な染色体不安定性を引き起こし、細胞死を誘導できるのではと考えられ、多くの Chk1 阻害剤が抗がん剤の併用薬として開発されている^{13,18)} (図 1)。

この治療法が最も効果的になる前提は、Chk1 阻害剤で ATR-Chk1-Cdc25A 経路を阻害した場合に、正常細胞では ATM-Chk2-p53 経路が ATR-Chk1-Cdc25A 経路の機能欠損を完全に相補することで細胞死が誘導されないというものであるが、本稿で詳しく述べたように、Chk1 は DNA 障害チェックポイントの機能制御以外にも、いくつかの細胞増殖に必須の役割を果たしている。そのため、Chk1 阻害剤は少なからず正常細胞に影響を与えてしまう。

このことは、必ずしも Chk1 阻害剤がもつ放射線治療や抗がん治療の併用薬としての可能性を全否定するものではない。上記で述べたように、Chk1 阻害剤は、放射線治療や抗がん剤の併用によってがん細胞に強く影響を与える可能性が高いことなど、特異性とその用量に留意すれば、有望な分子標的薬の一つであることに疑いの余地はない。そのためには、Chk1 を介したシグナル伝達経路の全貌を解明していく努力が必要とされる。

おわりに

最近の研究で、明らかな外的な DNA 損傷がない状態でも、Chk1 は細胞周期制御の一翼を担っていることが明らかになりつつある。また、Chk1 の機能制御は、ATR 以外のキナーゼのリン酸化修飾によっても担われていることが判明した。Chk2 を介したシグナル伝達経路に比べて、Chk1 経路の解明が遅れてきたことは事実である。特に、外的な DNA 損傷刺激がある場合に比較して、正常な細胞周期進行における Chk1 を介したシグナル伝達経路についての一層の理解を深める必要がある。Chk1 阻害剤を分子標的薬としてがん治療に役立てていくためには、Chk1 の細胞機能の解明への持続的な努力とともに、阻害剤の特異性の向上や使用量を減らすための腫瘍への選択的ドラッグデリバリーシステムの構築など、多方面での進展が望まれる。

文 献

- 1) Jackson, S.P. & Bartek, J. (2009) *Nature*, **461**, 1071–1078.
- 2) Ciccia, A. & Elledge, S.J. (2010) *Mol. Cell*, **40**, 179–204.
- 3) Bartek, J. & Lukas, J. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 238–245.
- 4) Medema, R.H. & Macurek, L. (2012) *Oncogene*, **31**, 2601–2613.
- 5) Polo, S.E. & Jackson, S.P. (2011) *Genes Dev.*, **25**, 409–433.
- 6) Langerak, P. & Russell, P. (2011) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **366**, 3562–3571.
- 7) McGowan, C.H. & Russell, P. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 629–633.
- 8) Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 402–412.
- 9) Appella, E. & Anderson, C.W. (2001) *Eur. J. Biochem./FEBS*, **268**, 2764–2772.
- 10) Flynn, R.L. & Zou, L. (2011) *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 133–140.
- 11) Nam, E.A. & Cortez, D. (2011) *Biochem. J.*, **436**, 527–536.
- 12) Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., & Nakanishi, M. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 2572–2581.
- 13) Goto, H., Izawa, I., Li, P., & Inagaki, M. (2012) *Cancer Sci.*, **103**, 1195–1200.
- 14) Neely, K.E. & Piwnica-Worms, H. (2003) *Cell Cycle*, **2**, 455–457.
- 15) Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007) *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 495–507.
- 16) Cimprich, K.A. & Cortez, D. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 616–627.
- 17) Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (2007) *Oncogene*, **26**, 7773–7779.
- 18) Ma, C.X., Janetka, J.W., & Piwnica-Worms, H. (2011) *Trends Mol. Med.*, **17**, 88–96.
- 19) Ma, C.X., Cai, S., Li, S., Ryan, C.E., Guo, Z., Schaiff, W.T., Lin, L., Hoog, J., Goiffon, R.J., Prat, A., Aft, R.L., Ellis, M.J., & Piwnica-Worms, H. (2012) *J. Clin. Invest.*, **122**, 1541–1552.
- 20) Zou, L. & Elledge, S.J. (2003) *Science*, **300**, 1542–1548.
- 21) Zou, L., Liu, D., & Elledge, S.J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13827–13832.
- 22) Ellison, V. & Stillman, B. (2003) *PLoS Biol.*, **1**, E33.
- 23) Lee, J., Kumagai, A., & Dunphy, W.G. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 28036–28044.
- 24) Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., & Karnitz, L.M. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 1472–1477.
- 25) Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., & Dunphy, W.G. (2006) *Cell*, **124**, 943–955.
- 26) Kumagai, A. & Dunphy, W.G. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 839–849.
- 27) Chini, C.C. & Chen, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 30057–30062.
- 28) Kumagai, A., Kim, S.M., & Dunphy, W.G. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 49599–49608.
- 29) Kemp, M.G., Akan, Z., Yilmaz, S., Grillo, M., Smith-Roe, S. L., Kang, T.H., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W.K., Abraham, R.T., Sancar, A., & Unsal-Kacmaz, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 16562–16571.
- 30) Errico, A. & Costanzo, V. (2010) *EMBO Rep.*, **11**, 270–278.
- 31) Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., & Inagaki, M. (2010) *EMBO J.*, **29**, 2802–2812.
- 32) Melixetian, M., Klein, D.K., Sorensen, C.S., & Helin, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1247–1253.
- 33) Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., & Elledge, S.J. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1448–1459.
- 34) Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., & Nakayama, K. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1439–1447.
- 35) Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., & Bartek, J. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 3553–3562.
- 36) Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., & Jackson, D.A. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2719–2731.
- 37) Lam, M.H., Liu, Q., Elledge, S.J., & Rosen, J.M. (2004) *Cancer Cell*, **6**, 45–59.
- 38) Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., & Lukas, J. (2003) *Cancer Cell*, **3**, 247–258.
- 39) Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., & Nakanishi, M. (2008) *Cell*, **132**, 221–232.
- 40) Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., & Lukas, J. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 884–891.
- 41) Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T., & Inagaki, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34223–34230.
- 42) Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N., & Inagaki, M. (2011) *J. Cell Sci.*, **124**, 2113–2119.
- 43) Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F., & Inagaki, M. (2006) *Genes Cells*, **11**, 477–485.
- 44) Jiang, K., Pereira, E., Maxfield, M., Russell, B., Goudelock, D. M., & Sanchez, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 25207–25217.
- 45) Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Matsuyama, M., Wang, Z., Yatabe, Y., Kiyono, T., & Inagaki, M. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1582–1592.