

博士論文

論文題目 Rad54B の DNA 損傷応答における役割

氏 名 安 原 崇 哲

## 目次

要旨 .....	2
第一章 序文 .....	3
第二章 方法 .....	9
第三章 結果 .....	16
Rad54B の DNA 損傷修復における役割 .....	16
Rad54B による p53 の発現および機能の抑制 .....	20
MDM2-MDMX ヘテロ二量体と Rad54B の会合 .....	26
Rad54B の DNA 損傷 G2/M チェックポイントにおける役割 .....	32
Rad54B の DNA 損傷 G1/S チェックポイントにおける役割 .....	38
Rad54B の発現増加とがん .....	42
第四章 考察 .....	52
DNA 損傷下で細胞周期を進行させる生物学的意義 .....	52
Rad54B は精巧な p53 の制御を可能にする .....	54
腫瘍形成過程における Rad54B の役割 .....	55
第五章 結論 .....	58
第六章 引用文献 .....	59
第七章 謝辞 .....	68

## 要旨

細胞が DNA 損傷を受けた場合には、細胞周期を停止し、適切な DNA 損傷応答を選択することで、がん化を防いでいると考えられている。しかしながら、その分子機構については未だ多くの部分が不明であった。本研究では、Rad54B が p53 の発現量を負に調節し、DNA 損傷下における細胞周期の進行を促進することを明らかにした。さらに、実際のがんに多く見られるように、Rad54B が過剰に発現すると、DNA 損傷後の細胞周期の進行によって、ゲノム不安定性が誘導された。以上のことから、Rad54B はがん化の過程に関与する新たな因子であり、がん治療の標的となることが示唆された。

## 第一章 序文

細胞には恒常性を維持する機構が備わっており、多くの疾患はその機構の破綻によって起こると考えられる。特に、がんにおいては、その多くの場合が遺伝子機能の異常によって起こる細胞周期の制御機構の破綻である。遺伝子をコードするゲノムは、非常に厳密な細胞内システムの下で厳重に守られており、DNAに損傷が加わるようなストレス下においては、非常に多様なシステムが協調的に働くことで、ゲノムの安定性を維持していることが知られている<sup>1</sup>。

細胞がDNA損傷を受けた際には、DNAを修復して生存を選択する場合と、細胞死を選択する場合がある。がん化の過程を考える上では、DNA損傷応答において細胞がこの運命決定をいかにしているかを解明することが重要である。DNA損傷が起こった場合、まずその損傷を感知するセンサー分子がそのシグナルをトランスデューサ分子に伝え、さらに、そのトランスデューサ分子を介して、実際に細胞の応答を引き起こすエフェクター分子を活性化するというカスケードが存在すると考えられている<sup>2</sup>。このようなDNA損傷応答カスケードのセンサーおよびトランスデューサとして機能する *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)* キナーゼは、下流の多くのエフェクター分子を活性化することで、DNA損傷応答を司っている。最も代表的ながん抑制遺伝子である *p53* は、ATMによって活性化されるエフェクター分子の代表である<sup>3,4</sup>。*p53* は非常に多岐にわたる機能を保持する転写因子であるが<sup>5</sup>、その主要な機能の一つは、DNA損傷下における細胞周期の停止である。一般に、DNA損傷をもつ細胞は細胞周

期の進行が抑制され、細胞周期が停止している間に DNA 修復などの様々な細胞応答を選択する<sup>6</sup>。ヒトのがんにおいて p53 の変異が高頻度で見つかっており<sup>7</sup>、もしそのような p53 の機能欠失によって DNA 損傷があるにも関わらず細胞周期が進行した場合には、DNA 損傷をもったまま合成期や分裂期を迎えることで、ゲノムの不安定性が引き起こされる<sup>8</sup> (図1)。

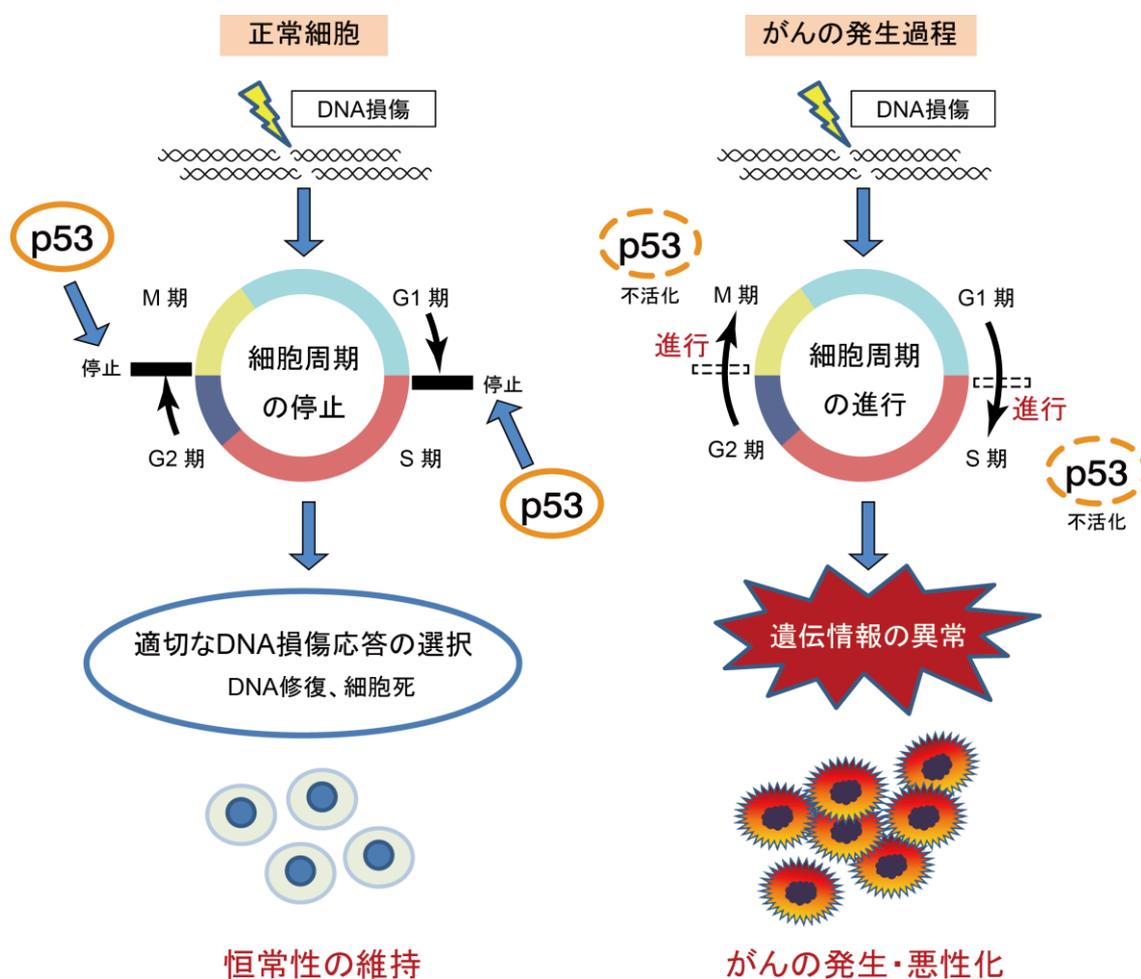


図1 : p53 の細胞周期制御によるがん抑制のメカニズム

このように、p53 はゲノムの安定性の維持に決定的な役割を果たしていることから、p53 の機能を制御する因子について、多数の研究がなされてきた。特に、p53 タンパク質の安定性を制御するユビキチン化酵素である MDM2 は、最も主要な p53 の制御因子であると考えられている<sup>9</sup>。MDM2 は p53 をユビキチンによって標識することで、細胞内のタンパク質分解システムである、プロテアソーム複合体での分解へと導く。また、MDM2 のホモログである MDMX (MDM4) は、MDM2 とヘテロ二量体を形成することで MDM2 を活性化し、ユビキチン化の促進を介して p53 タンパク質の量を負に調節することが知られている<sup>10,11</sup> (図 2)。

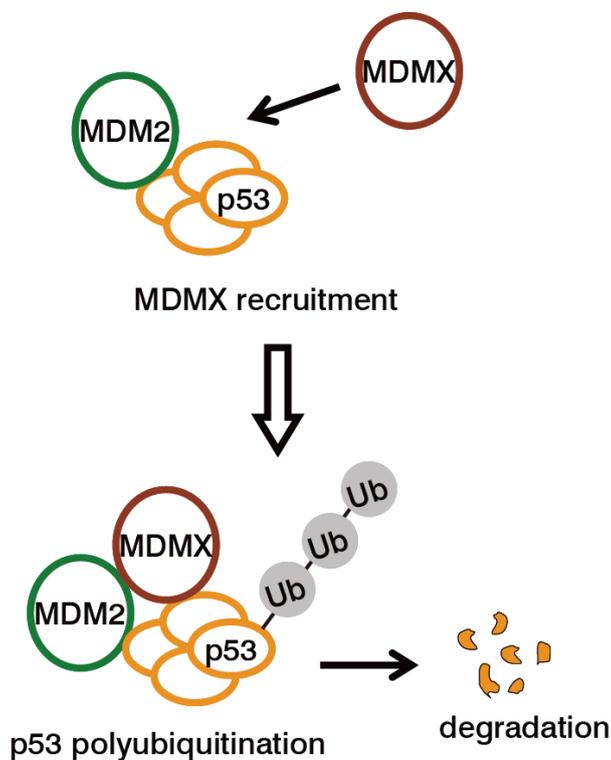


図 2 : MDM2、MDMX ヘテロ二量体による p53 のユビキチン化

MDM2、あるいは MDMX を欠損したマウスが p53 の過剰な蓄積によって胎生致死になること、およびその胎生致死が、p53 のアレルを欠失させることで回避されることから<sup>12,13,14</sup>、MDM2 および MDMX は、p53 のレベルを適切に調整し、p53 の過剰な蓄積による細胞死を防ぐことで、細胞の恒常性の維持に寄与していると考えられる<sup>15</sup>。さらに、MDM2 をコードする領域の遺伝子増幅が、がんにおいて高頻度で見つかっていることも、p53 を制御する機構の重要性を物語っている<sup>16</sup>。

DNA 損傷応答において、細胞が DNA の修復を選択した場合には、DNA 損傷の種類に応じて適切な修復機構が選択され、活性化される。損傷の中で最も致命的な DNA 二重鎖切断がおこった場合に活性化される機構は主に二つある<sup>17</sup>。一つは非相同末端結合修復と呼ばれ、切断された二重鎖の断端を適切に削りとり、断端同士を結合することで修復を行う。速やかな修復を可能とする一方で、断端の配列の欠失を伴うため、遺伝子変異を引き起こす可能性がある<sup>18,19</sup>。また、多数の二重鎖切断が同時に起こっている状況では、つなぎ合わせる断端を混同した結果、遺伝子融合などを招く可能性が示唆されている<sup>20</sup>。

もう一つの修復機構として、相同組換え修復がある<sup>21</sup>。その主な特徴は、損傷が起こった部位と相同な配列をゲノム上に検索し、その配列を参照しながら修復を行うことで、非相同末端結合修復に比べて正確に修復が可能であるということである。相同組換え修復では非常に複雑なステップを経て修復が完了するが、相同配列の検索と修復反応を容易にするために、損傷した部位周辺のゲノム構造を変換する必要がある。そのようなゲノム構造の変換は一般に、ATP を

加水分解することでエネルギーを得ながら、DNA の二本鎖をほどく DNA ヘリカーゼと呼ばれる酵素群が担っている<sup>22</sup>。相同組換え修復の場合には、Rad54 およびその相同遺伝子として発見された Rad54B の二つのタンパク質がその役割を果たしているとされている<sup>23,24</sup>。図3に示すように、Rad54 と Rad54B の構造は非常によく似ており、それぞれの中央部に位置するヘリカーゼを特徴づけるドメイン構造は、DExx-box ドメインと呼ばれる前半部分（図中 I、Ia、II、III）と HELICc ドメインと呼ばれる後半部分（図中 IV、V、VI）に分けられる。古細菌の Rad54 およびゼブラフィッシュの Rad54 の立体構造を解析した過去の文献によれば<sup>25,26</sup>、1) 立体構造中では DExx-box ドメインと HELICc ドメインは向かい合って位置すること、また、ATP 加水分解の活性中心は、DExx-box ドメイン中に含まれているが、2) DExx-box ドメインあるいは HELICc ドメインのどちらに変異を入れることでも、その ATPase 活性が失われることが示された。以上のことより、Rad54 のゲノム構造変換の活性には ATP 加水分解活性の責任部位である DExx-box ドメインと HELICc ドメインが協調的に機能することが必要であると考えられている。また、非常に興味深いことに、Rad54 および Rad54B の生化学的な特徴を調べた研究において、Rad54 に比べて Rad54B の ATP 加水分解活性が弱いということが報告されている<sup>27</sup>。従って、Rad54 と Rad54B の間の微妙なアミノ酸配列の変化が、構造上の変化、ひいては ATP 加水分解活性の強さに大きく影響している可能性がある。

Rad54 の相同組換え修復における重要性は、先行のいくつかの研究で明らかとなっており、Rad54 の機能が欠失した場合には、DNA 損傷後の細胞の生存に大

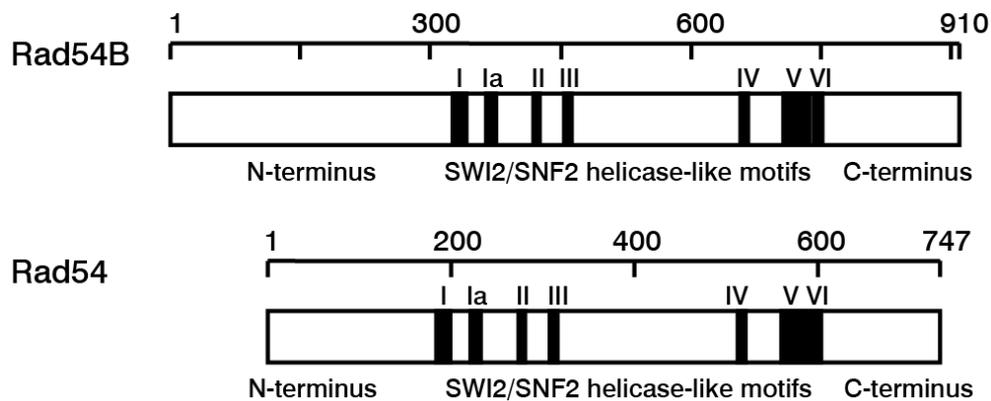


図3：Rad54B および Rad54 の配列構造

SWI2/SNF2 ファミリーに保存された配列 I~VI を黒塗り以示してある。

きな影響を与えることが知られている<sup>28,29,30</sup>。また、Rad54 と Rad54B を欠損させた細胞あるいはマウスの研究によって、Rad54B の欠損による DNA 損傷後の細胞の生存に対する影響は、Rad54 の欠損の場合と大きく異なることが報告され、DNA 損傷修復における Rad54B の役割は、Rad54 の補助的な役割とされるにとどまっていた<sup>31,32</sup>。従って、Rad54B が DNA 損傷応答において積極的に果たしている役割については未だ不明であった。

このような経緯から、本研究では Rad54B の DNA 損傷応答における役割を明確にすることを目的とした。その結果、Rad54B は相同組換え修復における役割とは別に、MDM2-MDMX ヘテロ二量体を介して p53 の発現および機能を抑制し、DNA 損傷下における細胞周期の進行を制御していた。さらに Rad54B は、がん化の過程において重要な役割を果たし、新たな治療標的として有用である可能性を示唆する結果を得た<sup>33</sup>。従って、Rad54B は、DNA 損傷下における細胞周期の制御を介してがん化の過程を制御するタンパク質であると結論づけた。

## 第二章 方法

### 抗体

抗 Rad54B ウサギ抗体の詳細については過去の文献に記載の通りである<sup>34</sup>。  
p53、MDM2 に対する抗体は Santa Cruz Biotechnology 社より、 $\beta$ -Actin、HA は Sigma Aldrich 社より、Ubiquitin は MBL 社より、Normal mouse IgG、MDMX、phospho-H2A.X Ser139 ( $\gamma$ H2AX)、phospho-Histone H3 (Ser 10)は Millipore 社より、R-phycoerythrin-conjugated anti-mouse IgG は Jackson ImmunoResearch 社よりそれぞれ購入した。

### 細胞培養

すべての培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベータにて行った。A549 細胞は理研細胞バンクより、RPE 細胞は Clontech より、HCT116 細胞は American Type Culture Collection より入手した。A549 細胞、Cos7 細胞には DMEM メディウム、HT-29 細胞および HCT116 細胞と、その派生株には McCoy's 5A メディウム、RPE 細胞には DMEM/Ham's F-12 メディウムをそれぞれ使用し、すべてのメディウムに終濃度 10% のウシ胎児血清を添加した。*RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞は過去の文献に記載の通りである<sup>31</sup>。ATM 阻害剤、Nutlin-3 は Millipore 社より、MG132、サイクロヘキシミド、ヒドロキシウレアは Sigma Aldrich 社より、オキサリプラチン、5-FU は 和光純薬より、コルセミドはナカライテスクよりそれぞれ購入した。

## プラスミド

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) を用いた実験には、MMTV プロモーター搭載のプラスミドに GFP および Rad54B cDNA 配列を挿入、あるいは pIRES-EGFP (Clontech) に Rad54B cDNA 配列を挿入することで作成した。FLAG タグ、HA タグ融合タンパク質発現用のベクターは、FLAG タグあるいは HA タグを pcDNA3.1/Zeo あるいは pEF4/Zeo (Invitrogen) にそれぞれ挿入することで作成した。ヒト MDM2、MDMX および p53 の発現用コンストラクトは、RPE 細胞の RNA から逆転写 PCR にて作成した。また、すべての PCR 産物はシーケンスの確認を行った。GST タグおよび 6×His タグ融合のタンパク質発現用のコンストラクトは、それぞれ pGEX-5X (GE Healthcare 社) または pET32a (Novagen 社) プラスミドを元に作成した。

## プラスミドの細胞への導入、免疫沈降法、ウェスタンブロット法

プラスミドの細胞への導入には、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。ウェスタンブロット、免疫沈降用の細胞の溶解には、lysis buffer (0.5% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 50 nM cantharidin, 5 nM Microcystin-LR) を用いた。免疫沈降は、細胞溶解液に抗体を加えた後、4°C にて 1–2 時間回転させながら反応させた。その後 Protein G agarose (Invitrogen) を添加し、さらに 1 時間回転させ、lysis buffer にて 3 回洗浄した後に SDS sample buffer を加えて煮沸した。変性させたタンパク質は SDS-PAGE 法にて分離し、PVDF メンブレン (Millipore 社) に転写した。タンパク

質の検出には ECL 法を用い、現像したフィルムは Image J ソフトウェアを用いて定量した。

### **mRNA 抽出および定量 PCR**

細胞内の RNA は RNAiso Plus (TaKaRa)を用いて抽出した。抽出した RNA は Moloney murine leukemia virus reverse-transcriptase、ribonuclease inhibitor および random hexamer (TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を用いて Smart Cycler (TaKaRa)にて定量 PCR を行った。本研究では以下のプライマーを使用した。

GAPDH

5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' (forward)

5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3' (reverse)

Rad54B

5'-TCCAGGTCTGAATGAAGAGATTAC-3' (forward)

5'-TCTAGTACTTTCTTCACTAGGCAG-3' (reverse)

p53

5'-AGATGTTCCGAGAGCTGAATGAG-3' (forward)

5'-GAGAATGTCAGTCTGAGTCAGGC-3' (reverse)

MDM2

5'-CCTTAGCTGACTATTGGAAATGC-3' (forward)

5'-ACATCAAAGCCCTCTTCAGCTTG-3' (reverse)

p21

5'-GACTCTCAGGGTCGAAAACGG-3' (forward)

5'-GCGGATTAGGGCTTCCTCTTG-3' (reverse)

Bax

5'-ACTCCCCCGAGAGGTCTT-3' (forward)

5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAA-3' (reverse)

### siRNA

すべての siRNA は Dharmacon より購入し、終濃度 50-75 nM で DharmaFECT4 (Dharmacon)を用いて細胞に導入した。

### リコンビナントタンパク質の作成

GST 融合タンパク質は *E. coli* BL21 (GE Healthcare 社、New England BioLabs 社)にて発現し、Immobilized Glutathione Column (Thermo Scientific 社)または Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare 社)を用いて精製した。6×His 融合タンパク質は BL21(DE3) (Invitrogen)にて発現し、TALON resin (Clontech)を用いて精製した。すべてのタンパク質は Amicon Ultra-0.5 10K (Millipore 社)を用いて binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)に溶解した。GST タグは Factor Xa (New England BioLabs 社)によって切断した。

### GST プルダウンアッセイ

GST プルダウンアッセイは以下のとおり行った。タンパク質を混合して 2 時間室温で静置した後、GST タグ融合タンパク質を Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare 社)に結合させ、洗浄した後に elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10

mM glutathione)で溶出し、ウェスタンブロットで解析した。

### インビトロユビキチン化アッセイ

インビトロユビキチン化アッセイは以下のとおり行った。Reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 2 mM DTT)中に、human UBE1 (6 nM)、human UbcH5b (100 nM) (Boston Biochem 社)、インビトロトランスレーションで得られた p53 (0.3 μl) (Promega 社)および MDM2 (100 ng)と、Ubiquitin (25 μM) (Boston Biochem 社)、GST-MDMX (200 ng)、His-SNF2-1 (200 ng)を混ぜ合わせ、37°C で2時間反応させた。産物はウェスタンブロットで解析した。

### 細胞周期解析

Trypsin-EDTA を用いて浮遊させた後に回収した細胞を CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson 社)を用いて染色し、EPICS XL (Beckman Coulter 社)にて解析した。

### 免疫染色法

カバースリップ上に培養した細胞、あるいは Trypsin-EDTA を用いて浮遊させた後に回収した細胞を、4% paraformaldehyde で10分間固定し、0.5% Triton-X- 0.1% SDS で5分間の透過処理を行った。一次抗体、二次抗体反応は37°C でそれぞれ30分ずつ行った。カバースリップ上の細胞は、最後に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、ロシュ・ダイアグノスティックス社)で核を染色し、オリンパス

社の BX51 正立顕微鏡と DP 70 デジタルカメラを使用して観察した。また、Trypsin-EDTA で回収した細胞は、FACSAria II (Becton Dickinson 社)を用いて解析を行った。

### コロニー形成法

HCT116 野生型細胞あるいは *RAD54B* ノックアウト細胞を 60 mm ディッシュに  $6.0 \times 10^3$  個ずつまき、接着後オキサリプラチンを添加した。7-10 日後に細胞を固定後染色し、コロニーの数を計測した。

### ゼノグラフトモデル

すべての実験は東京大学動物実験委員会の許可を得て行った（承認番号：医一 P12-135）。オス BALB/c Slc-nu/nu マウス（4 週齢）は日本 SLC 社より購入した。 $2.5 \times 10^6$  個の HCT116 細胞を皮下に注入し、腫瘍の体積が  $100 \text{ mm}^3$  を超えた日を第 0 日として、薬剤をオキサリプラチンは 1 週ごと、5-FU は毎日、腹腔内投与した。腫瘍サイズは毎日計測し、腫瘍の体積は、 $0.5 \times (\text{長辺}) \times (\text{短辺})^2$  の式で計算した。細胞周期の解析には、オキサリプラチン投与を開始して 2 日あるいは 3 日後の腫瘍を摘出し、上記の方法で染色を行った。

### データベース解析

National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Gene Omnibus database (GEO) で参照可能なデータセットにおいて、正常組織および腫瘍組織におけ

る Rad54B の mRNA 発現レベルの平均および標準偏差を計算し、Mann-Whitney *U*-test を用いて比較した。また、Rad54B の腫瘍組織における発現量は、正常組織の発現量で標準化した。p53 変異の有無についての予測は、過去の文献に記載の方法を参照して行った<sup>35</sup>。具体的には、各サンプルの p53 変異状況が既知である The Cancer Genome Atlas (TCGA) のサンプルを用いて、p53 が野生型のサンプル群と変異型のサンプル群において発現量に差がある 20 程度の遺伝子セットを、Welch's *t*-test で *P* 値が 0.001 以下の遺伝子の中で、ログ比の大きい順にランキングすることで抽出した。階層クラスタ解析には Cluster 3.0 ソフトウェアを用い、遺伝子の発現量を平均化した後、ピアソンの相関係数と平均連結法によってクラスタリングした。クラスタリング結果の表示には Java TreeView ソフトウェアを用いた。GEO および REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT) のサンプルは、それぞれピアソンの相関係数に基づく最近傍法によってクラスタ分類し、割り当てられたクラスタを基に、p53 変異の有無を予測した。

### 第三章 結果

#### Rad54B の DNA 損傷修復における役割

Rad54 を含む多くの DNA 損傷応答や DNA 修復に関与するタンパク質は、DNA 損傷が起こった部位に集積することで、その機能を果たすことが知られている<sup>36</sup>。そこでまず、Rad54B も Rad54 と同様に DNA 損傷後に損傷部位へ集積するかどうかについて調べた。N 末端に GFP を融合した Rad54B タンパク質を *RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡下で観察したところ、定常状態においては、核内にびまん性に分布することが分かった (図 4)。次に、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害薬であるハイドロキシウレアによって 24 時間処理し、細胞に DNA 損傷を与えた際の Rad54B の分布を観察した。しかしながら、Rad54B は DNA 損傷を与えた後も、核内にびまん性に分布するのみで、DNA 損傷部位への集積を示唆する結果は得られなかった (図 4)。

次に、Rad54B の機能を阻害した細胞において  $\gamma$ H2AX のフォーカス形成を DNA 損傷の指標にして、DNA 損傷をもつ細胞の割合の推移を調べた。驚くべきことに、*RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞および Rad54B ノックダウン A549 細胞のいずれにおいても、野生型の細胞に比べて DNA 損傷をもつ細胞の割合の有意な増加は認められなかった (図 5)。すなわち、Rad54B の阻害によって DNA 修復の効率は変化せず、DNA 修復において積極的な役割を果たしているとは結論できなかった。これは、Rad54B が DNA 損傷修復において補助的な役割を担っているという、先行研究の結論を支持する結果となった。

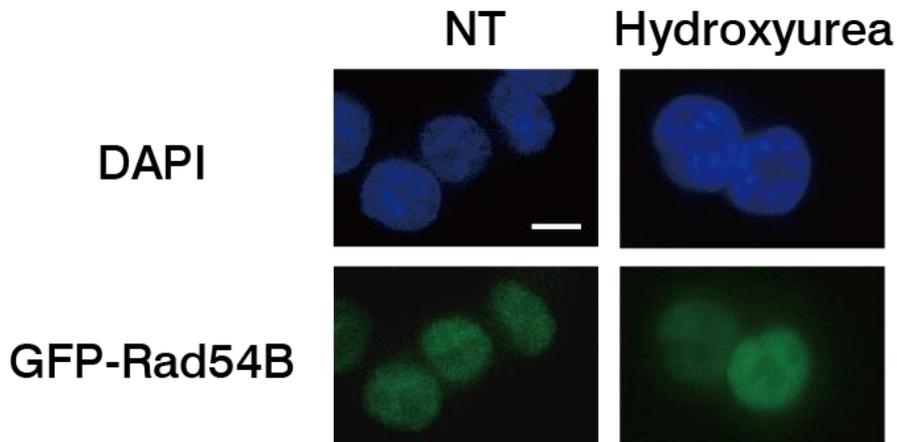


図 4 : Rad54B の細胞内局在

N 末端に GFP を融合した Rad54B タンパク質を *RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡下で観察した。(スケールバー : 10  $\mu$ m)

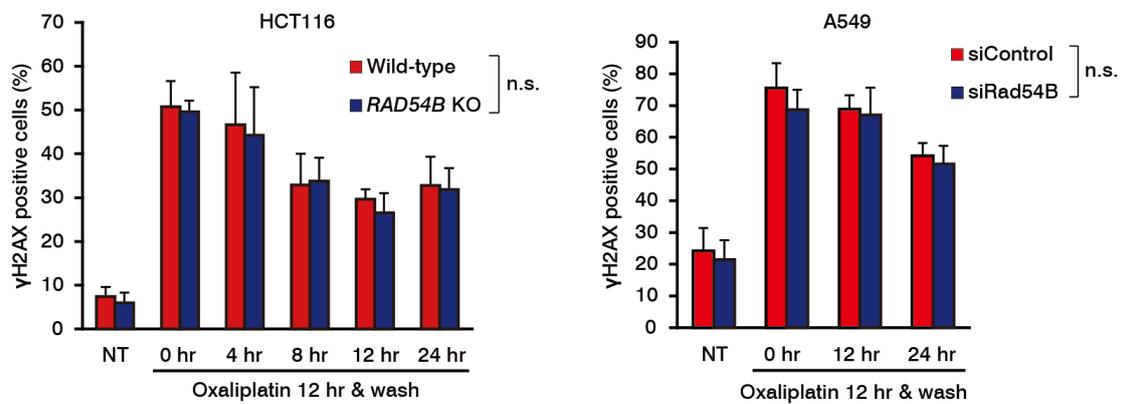


図 5 : DNA 損傷後の損傷量の推移

各細胞をオキサリプラチンで 1 2 時間処理後に洗浄し、 $\gamma$ H2AX のフォーカスが明瞭に形成されている細胞の数を経時的に計測した。左は野生型および *RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞、右はコントロールおよび Rad54B ノックダウン A549 細胞での測定結果を示す。エラーバーは 5 回の計測における標準偏差を示す。各タイムポイントにおいてウェルチの両側 *t* 検定を行い、有意な差を認めなかった (n.s. : not significant)。

しかしながら、DNA 損傷を与えた後の Rad54B の発現レベルの変化を調べたところ、Rad54B は損傷応答の初期に発現が誘導され、その後期においては発現が強く抑制されていた (図 6)。一方で、代表的な DNA 損傷応答タンパク質である p53 は、初期から後期にかけて徐々に誘導されており、Rad54B の変化と逆相関していると考えられた。以上のことから、Rad54B は DNA 損傷応答において非常に動的な制御を受けながら、DNA 修復の他に何らかの役割を果たしていると考えられた。

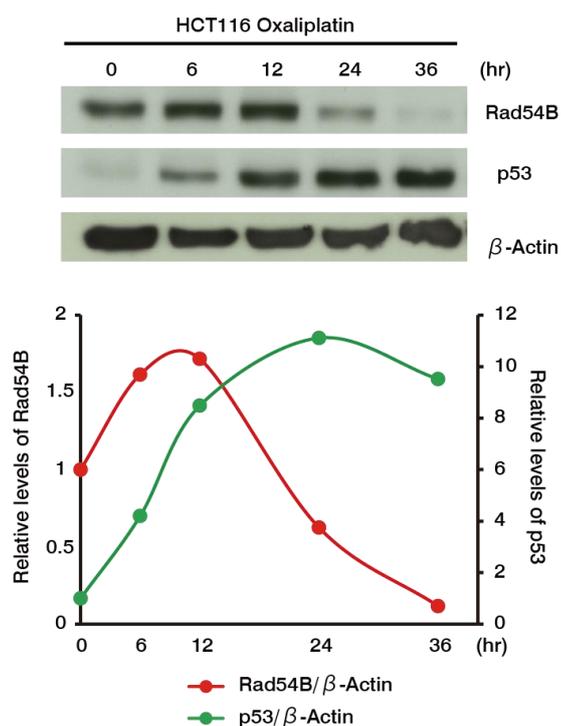


図 6 : DNA 損傷後の Rad54B 発現レベルの推移

HCT116 細胞にオキサリプラチンを添加した後の、各タイムポイントにおける Rad54B の発現レベルをウェスタンブロットによって解析した。同時に p53 の推移も解析し、ローディングコントロールとして  $\beta$ -Actin のレベルを示した。それぞれのバンドの濃さを定量し、 $\beta$ -Actin との相対量をプロットしたグラフを下に示す。

Rad54B の発現制御機構についてさらに詳しく解析したところ、p53 の量に依存して Rad54B の発現が抑制されていた (図 7)。また、DNA 損傷応答初期における Rad54B の誘導については、p53 が変異している細胞を用いることで、p53 による影響を除外して解析した。図 8 に示すように、Rad54B は DNA 損傷応答初期において p53 非依存的に誘導されており、その誘導は、代表的な DNA 損傷応答の制御因子である ATM キナーゼの活性には非依存的であった。

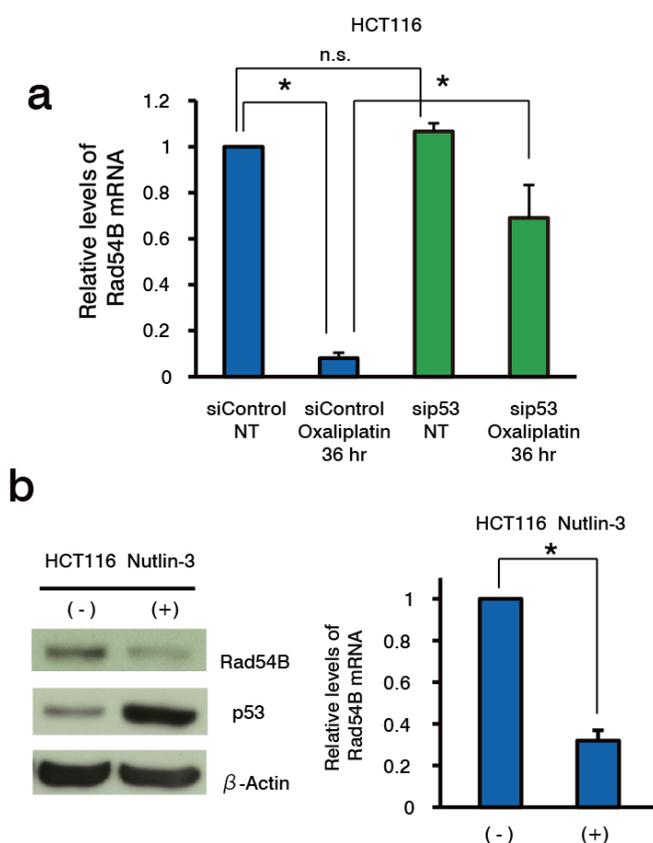


図 7 : p53 依存的 Rad54B 発現レベルの制御

- (a) p53 をノックダウンした HCT116 細胞にオキサリプラチンを添加した後の、各タイムポイントにおける Rad54B の mRNA 発現レベルを解析した。エラーバーは 3 回の測定における標準偏差を示す (両側  $t$  検定、n.s. : not significant、\* :  $P < 0.05$ )。
- (b) HCT116 細胞を 12 時間 Nutlin-3 で処理して p53 を安定化させた細胞において、Rad54B のタンパク質および mRNA の発現レベルを解析した。エラーバーは 3 回の測定における標準偏差を示す (両側  $t$  検定、\* :  $P < 0.05$ )。

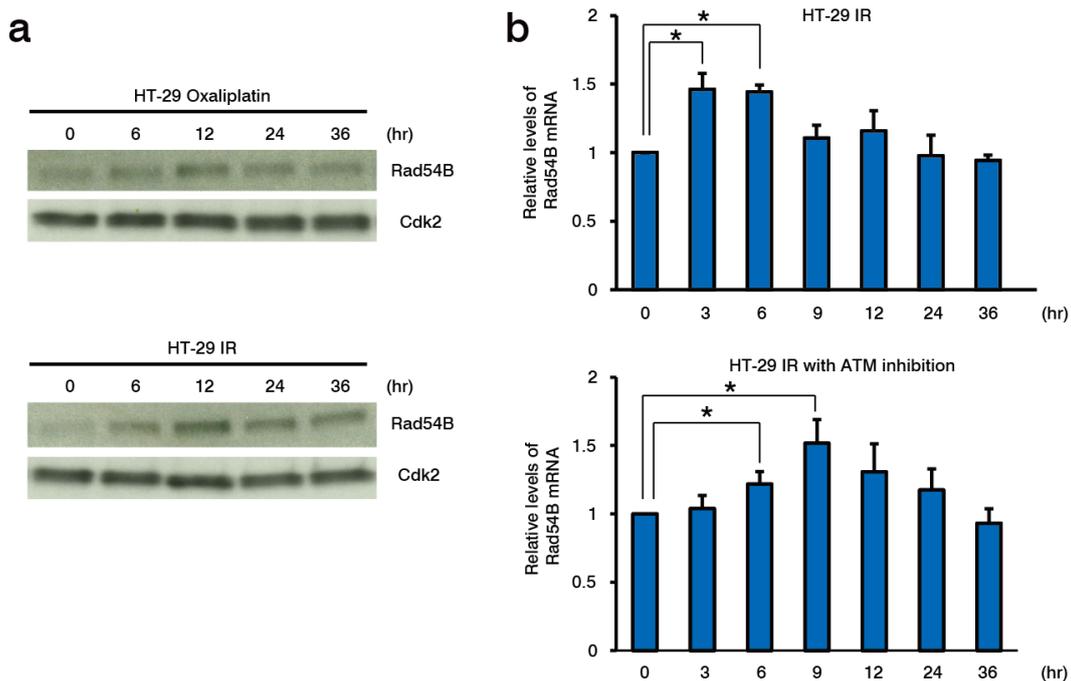


図 8 : DNA 損傷後の p53、ATM 非依存的な Rad54B 発現レベルの上昇

- (a) HT-29 細胞に DNA 損傷を与えた後の、各タイムポイントにおける Rad54B のタンパク質発現レベルを解析した。
- (b) ATM リン酸キナーゼ阻害剤で 30 分間前処理した HT-29 細胞に DNA 損傷を与えた後の、各タイムポイントにおける Rad54B の mRNA 発現レベルを解析した (両側  $t$  検定、\* :  $P < 0.05$ )。

### Rad54B による p53 の発現および機能の抑制

*RAD54B* ノックアウト細胞や、Rad54B ノックダウン細胞を解析するうちに、それらに共通する表現形を発見した。すなわち、Rad54B の発現レベルを減少させた細胞においては、定常状態、DNA 損傷後のいずれにおいても p53 の発現量が亢進していた (図 9、図 10)。さらに、先に述べた ATM は DNA 損傷後に p53 を安定化し、活性化することが知られているが、Rad54B による p53 発現量の抑制は ATM 非依存的であった (図 11)。p53 は主に転写因子として働き、タ

ターゲット遺伝子の転写レベルを制御しているが<sup>5</sup>、Rad54B の発現レベルを抑制すると、p53 ターゲット遺伝子の転写レベルが亢進していた (図 1 2、図 1 3)。つまり、Rad54B は p53 の発現レベルおよびその機能を抑制していると考えられた。

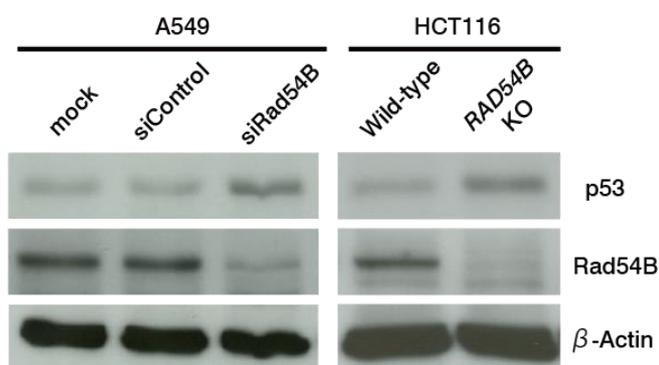


図 9 : 定常状態での、Rad54B による p53 発現レベルの制御  
定常状態での p53 タンパク質の量をウェスタンブロットで解析した。

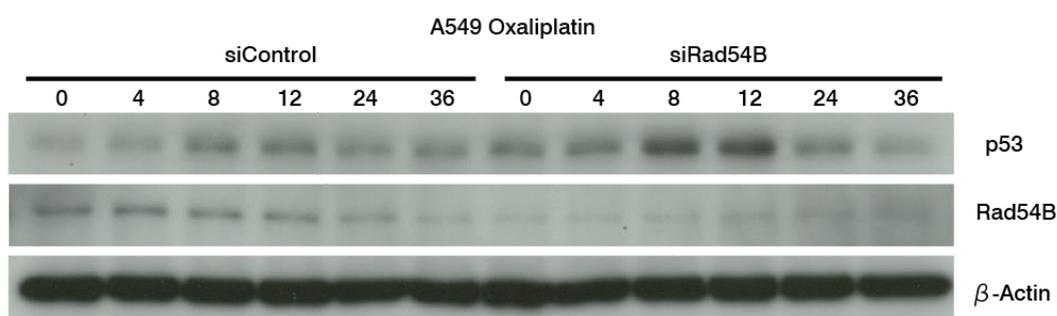


図 1 0 : DNA 損傷下での、Rad54B による p53 発現レベルの制御  
オキサリプラチン処理後の p53 タンパク質の量をウェスタンブロットで解析した。

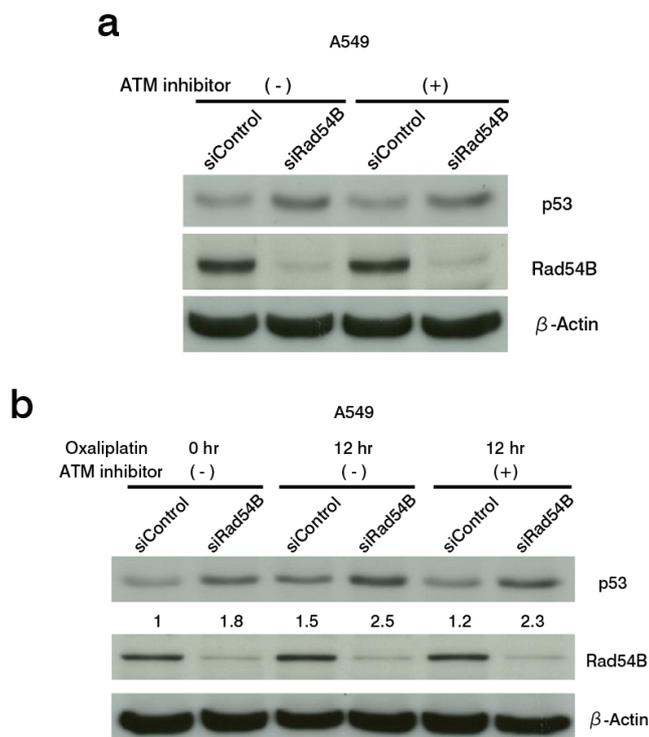


図 1 1 : ATM 非依存的な Rad54B による p53 の抑制

Rad54B をノックダウンした A549 細胞を ATM 阻害剤で処理し、(a)定常状態および(b)オキサリプラチン処理後における p53 タンパク質の量をウェスタンブロットで解析した。(b)では各バンドの濃さを定量したものを下に示した。

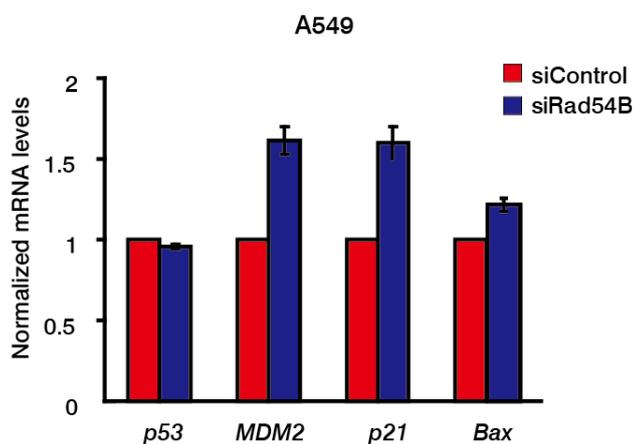


図 1 2 : 定常状態での、Rad54B による p53 の機能の抑制

定常状態での、各 p53 ターゲット遺伝子の mRNA 量を測定した。エラーバーは 3 回の実験における実験誤差を示す。

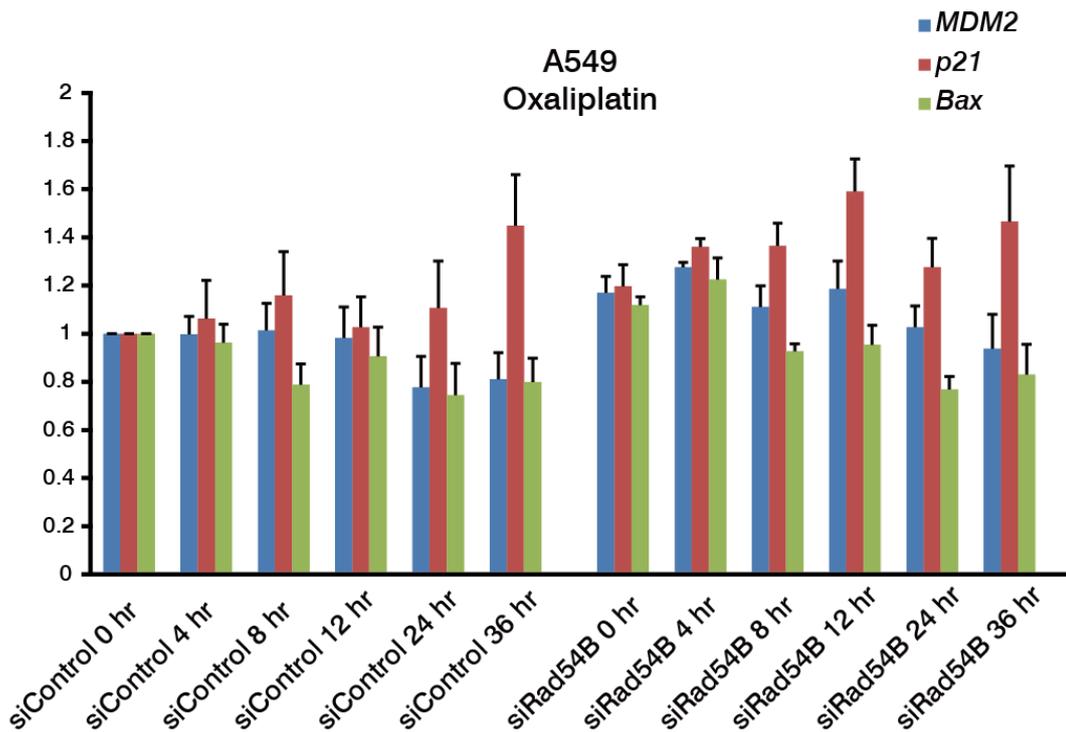


図 1 3 : DNA 損傷下での、Rad54B による p53 の機能の抑制

オキサリプラチン処理後の、各 p53 ターゲット遺伝子の mRNA 量を測定した。エラーバーは 3 回の測定における標準偏差を示す。

p53 の発現レベルの減少について、その詳しいメカニズムを調べたところ、Rad54B は p53 のユビキチン化を促進することにより、p53 タンパク質の安定性を低下させていた (図 1 4、図 1 5)。さらに解析を進めた結果、Rad54B は MDM2 と MDMX のヘテロ二量体の形成を促進していた (図 1 6)。以上のことから、Rad54B は DNA 損傷応答の初期において ATM 非依存的に誘導され、p53 の発現レベルを負に制御しており、一方、Rad54B の発現レベルは、DNA 損傷応答の後期にかけて p53 の発現が増加するにつれて抑制されるという負のフィードバックループを形成していると考えられた (図 1 7)。

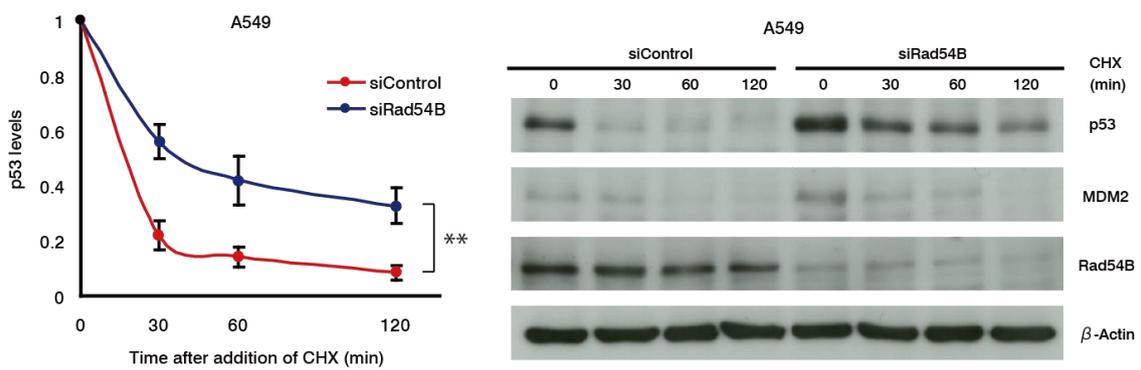


図 1 4 : Rad54B による p53 タンパク質の安定性の制御

サイクロヘキシミドによりタンパク質合成を阻害した後の p53 タンパク質の量をウェスタンブロットで解析した。エラーバーは3回の実験における実験誤差を示す。ウィルコクソンの符号順位検定を行い、両群で有意な差を認めた (\*\* :  $P < 0.01$ )。

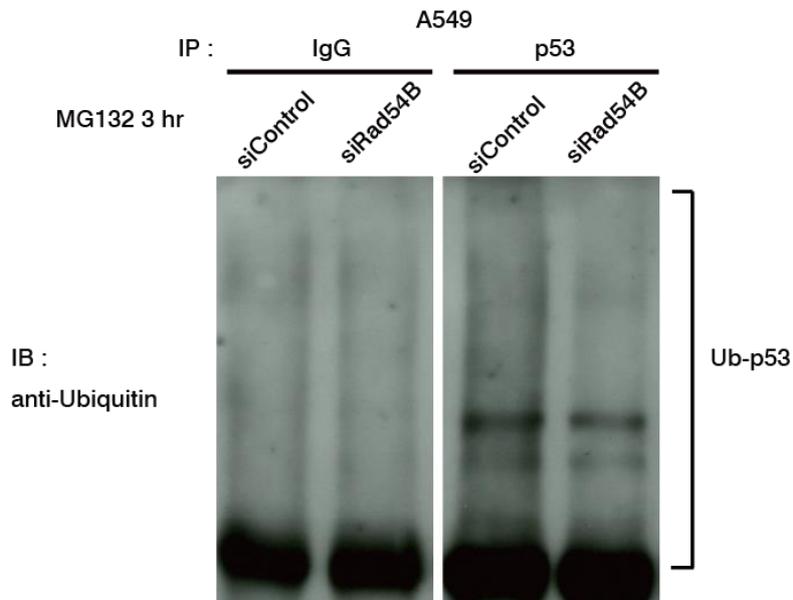


図 1 5 : Rad54B による p53 ユビキチン化の制御

MG132 によりプロテアソームを阻害した後の細胞において免疫沈降を行い、ユビキチン化された p53 タンパク質をウェスタンブロットで検出した。

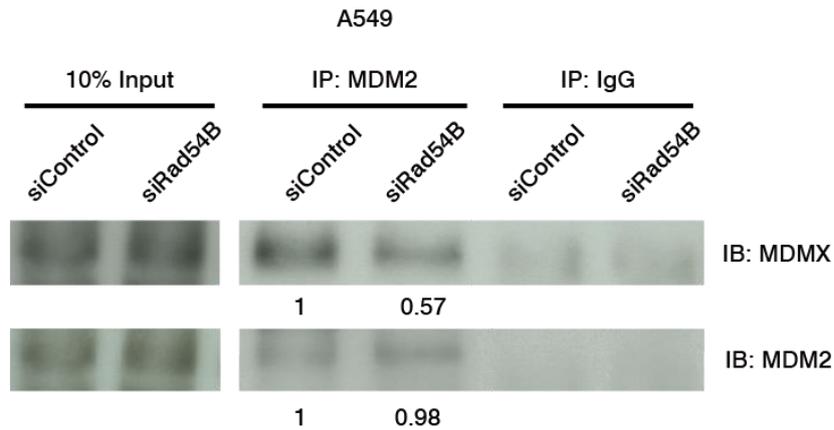


図 1 6 : Rad54B による MDM2-MDMX ヘテロ二量体形成の制御

MG132 により 6 時間プロテアソームを阻害した後の細胞において免疫沈降を行い、MDM2 に結合する MDMX の量をウェスタンブロットで解析した。各バンドの濃さを定量したものを下に示した。

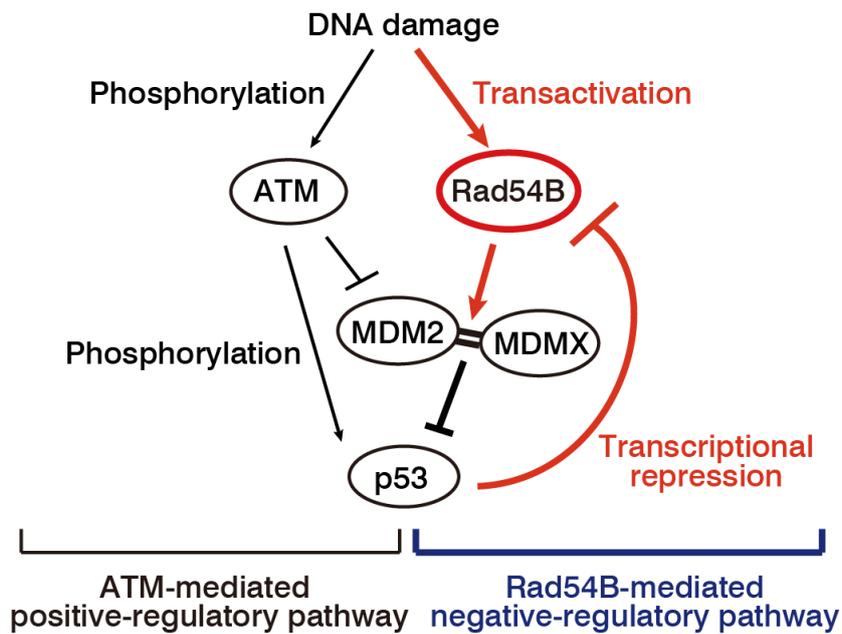


図 1 7 : Rad54B を介した、DNA 損傷応答の新たなパスウェイ

DNA 損傷後に ATM 非依存的に発現が誘導される Rad54B は、p53 と負のフィードバックループを形成することにより ATM 非依存的な p53 の抑制を行い、特に DNA 損傷応答初期において、ATM 依存的な p53 の活性化経路とバランスをとることで、適切な DNA 損傷応答の選択に寄与していると考えられる。

## MDM2-MDMX ヘテロ二量体と Rad54B の会合

ヘテロ二量体形成を促進するメカニズムとして、Rad54B が MDM2-MDMX ヘテロ二量体形成の足場として機能するという仮説を立てた。まず、これらのタンパク質間の相互作用について調べたところ、Rad54B と MDM2 および Rad54B と MDMX の内因性の相互作用が検出され (図 1 8 a, b)、これらの相互作用は直接的であった (図 1 8 c)。また、Rad54B の DNA ヘリカーゼを特徴づけているドメイン構造のうち、DExx-box ドメインに相当する部分 (ここでは SNF2-1 と名付けた) が、MDM2 および MDMX との相互作用に十分であった (図 1 9)。

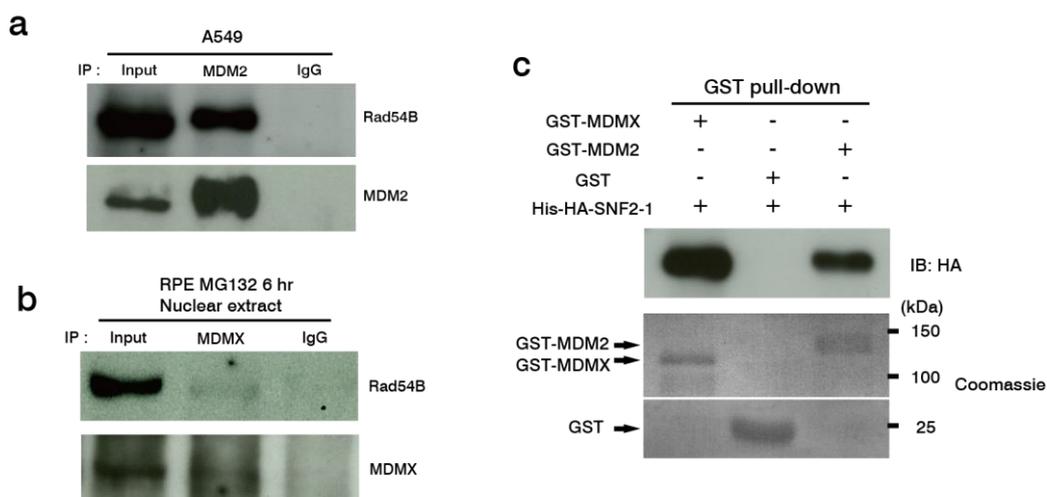


図 1 8 : Rad54B と、MDM2 および MDMX の相互作用

- MDM2 と Rad54B の内因性の相互作用を、免疫沈降によって解析した。
- MDMX と Rad54B の内因性の相互作用を、MG132 で 6 時間処理した細胞の核抽出液における免疫沈降によって解析した。
- Rad54B のフラグメント SNF2-1 と MDM2 および MDMX の直接的な結合を GST プルダウンアッセイによって解析した。

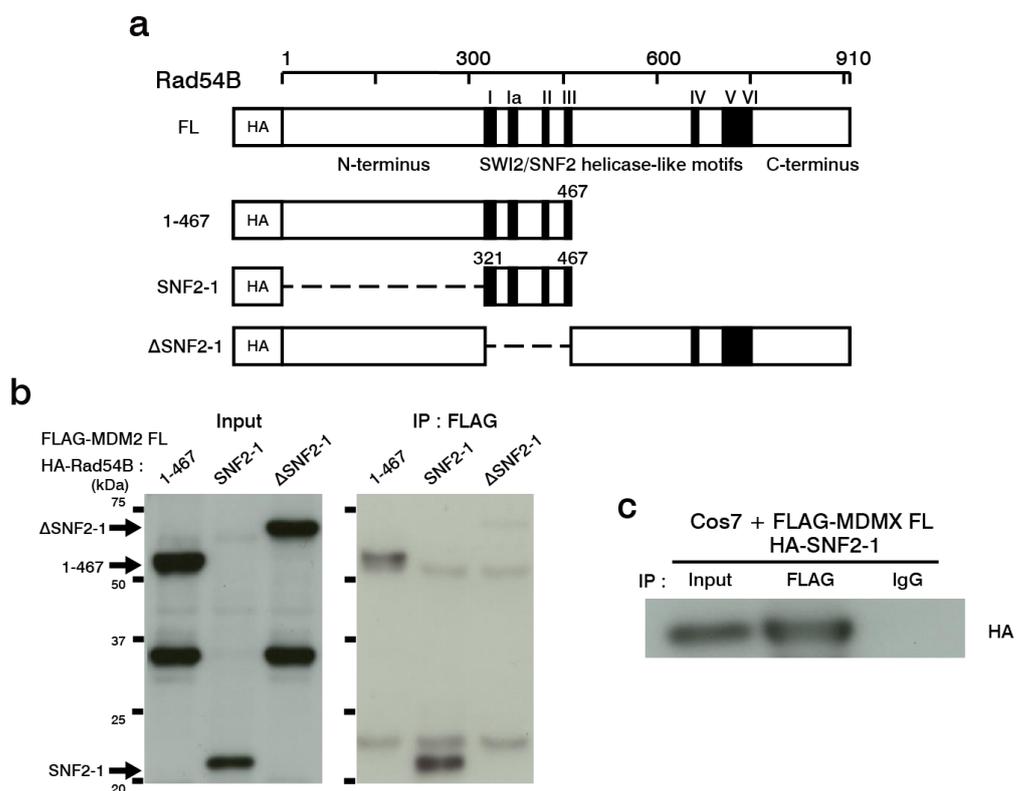


図 19 : Rad54B における、MDM2 および MDMX 結合ドメインの同定

- (a) Rad54B の一次構造。
- (b, c) SNF2-1 と MDM2 および MDMX との相互作用を、Cos7 細胞において免疫沈降によって解析した。

非常に興味深いことに、Rad54 は Rad54B とよく似たドメイン構造をもっているにも関わらず、MDM2 との相互作用は Rad54B に特異的であった (図 20)。上でも述べたように、Rad54B は DExx-box ドメインと HELICC ドメインを介して相同組換え修復において機能すると考えられてきたが、今回 Rad54B の DExx-box ドメインのみが MDM2 および MDMX との結合に十分であったことから、Rad54B のゲノム構造変換活性と、これらのタンパク質との会合は独立した機能であると推察された。

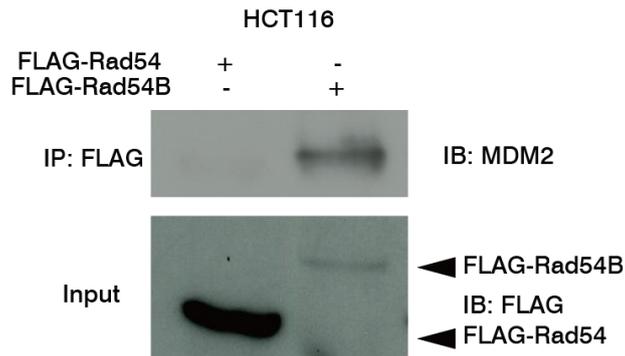


図 2 0 : MDM2 と、Rad54 および Rad54B の結合

FLAG タグを付加した Rad54 および Rad54B を HCT116 細胞において発現させ、免疫沈降によって MDM2 との相互作用を解析した。

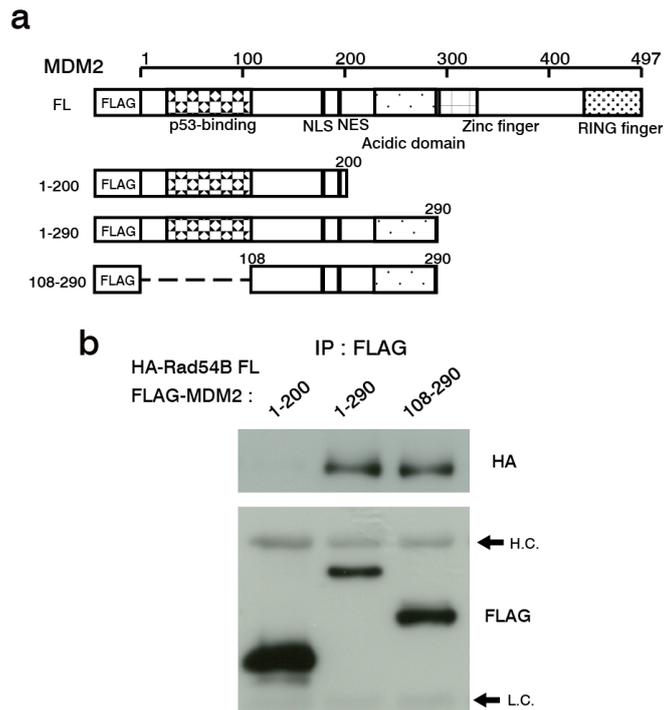


図 2 1 : MDM2 における、Rad54B 結合ドメインの同定

- (a) MDM2 の一次構造。  
 (b) MDM2 のフラグメントと Rad54B との相互作用を免疫沈降によって解析した。

一方、Rad54B が結合する MDM2 の領域は、MDM2 の中央部分に位置する acidic ドメインであった (図 2 1)。また、Rad54B が結合する MDMX の領域は、MDMX の N 末端に位置する p53 結合ドメインを含む、二つの領域であった (図 2 2)。

次に、Rad54B による p53 のユビキチン化の制御において、MDM2 および MDMX 以外の因子の関与があるかどうかを調べるため、インビトロユビキチン化アッセイを行った (図 2 3)。過去の文献で示された結果と同様に、MDM2 のみでは p53 のモノユビキチン化が促進され、MDMX を添加することによって、ポリユビキチン化が促進された (図 2 3、レーン 2、4)。さらに、MDM2 および MDMX に加えて Rad54B のフラグメントを添加すると、ポリユビキチン化がより強く促進された (図 2 3、レーン 3-5)。これらの結果から、Rad54B は MDM2 および MDMX と直接結合することで、ヘテロ二量体の形成を促進していると考えられた。

Rad54B が MDM2-MDMX ヘテロ二量体の形成を促進する機構についてより詳しく解析するため、プルダウンアッセイを用いて、MDM2-MDMX ヘテロ二量体の形成効率が Rad54B のフラグメント SNF2-1 の存在によってどのように変化するかを調べた。図 2 4 a に示すように、すべての構成因子を混ぜてからプルダウンを行うと、SNF2-1 によってヘテロ二量体の形成効率はむしろ低下した。これは、SNF2-1 が比較的豊富に存在する場合には、SNF2-1 が MDM2 および MDMX の両方に効率的に結合することで、MDM2 と MDMX の結合を阻害したと考えられた。対照的に、SNF2-1 と MDM2 の複合体を事前に形成させた後に MDMX を加えてプルダウンを行うと、ヘテロ二量体の形成効率が上昇した (図 2 4 b)。

Rad54B と MDM2 の内因性の相互作用が細胞内で定常的に検出された (図 1 8 a) のと対照的に、Rad54B と MDMX の相互作用が限定された状況において検出された (図 1 8 b) ことを踏まえると、図 2 5 に示すモデルのように、Rad54B が MDMX の MDM2 への誘導を促進する足場として機能することで、p53 のユビキチン化を促進していると考えた。

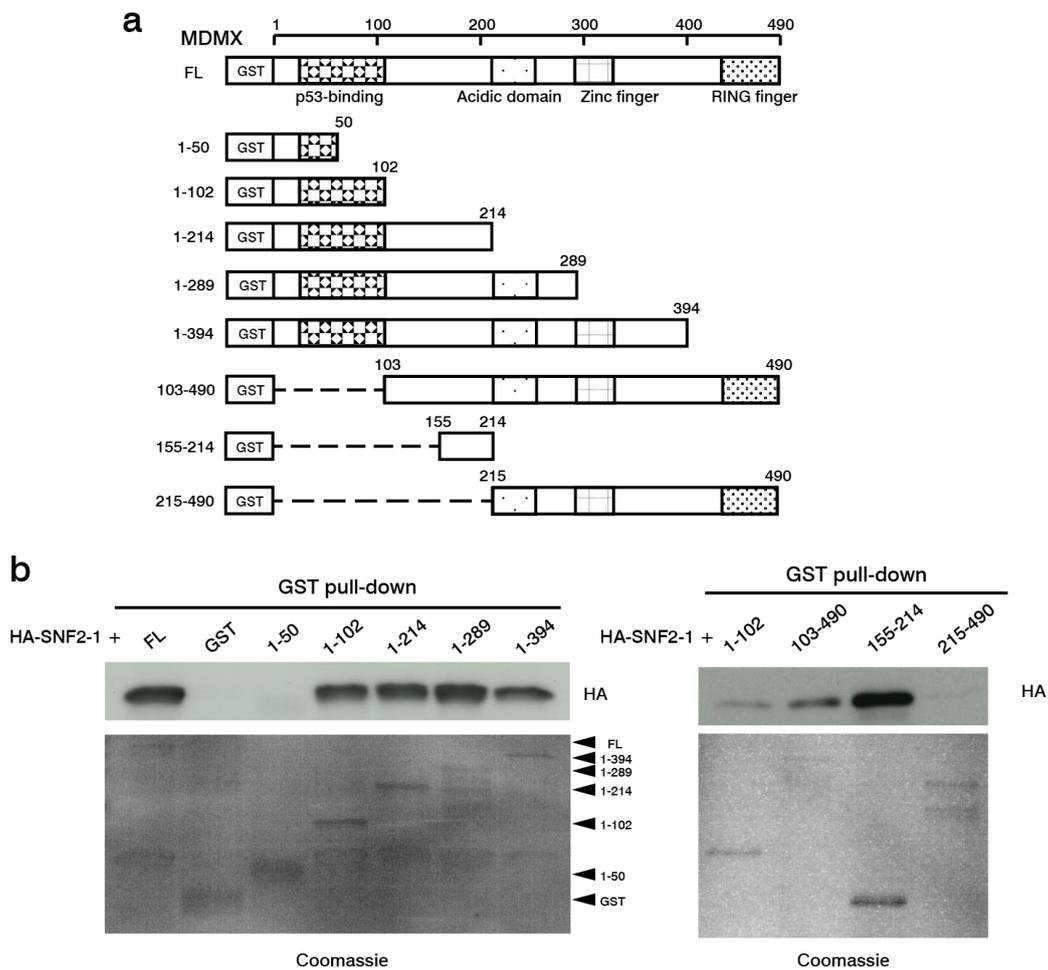


図 2 2 : MDM2 における、Rad54B 結合ドメインの同定

- (a) MDMX の一次構造。
- (b) MDMX のフラグメントと Rad54B との相互作用をプルダウンアッセイで解析した。



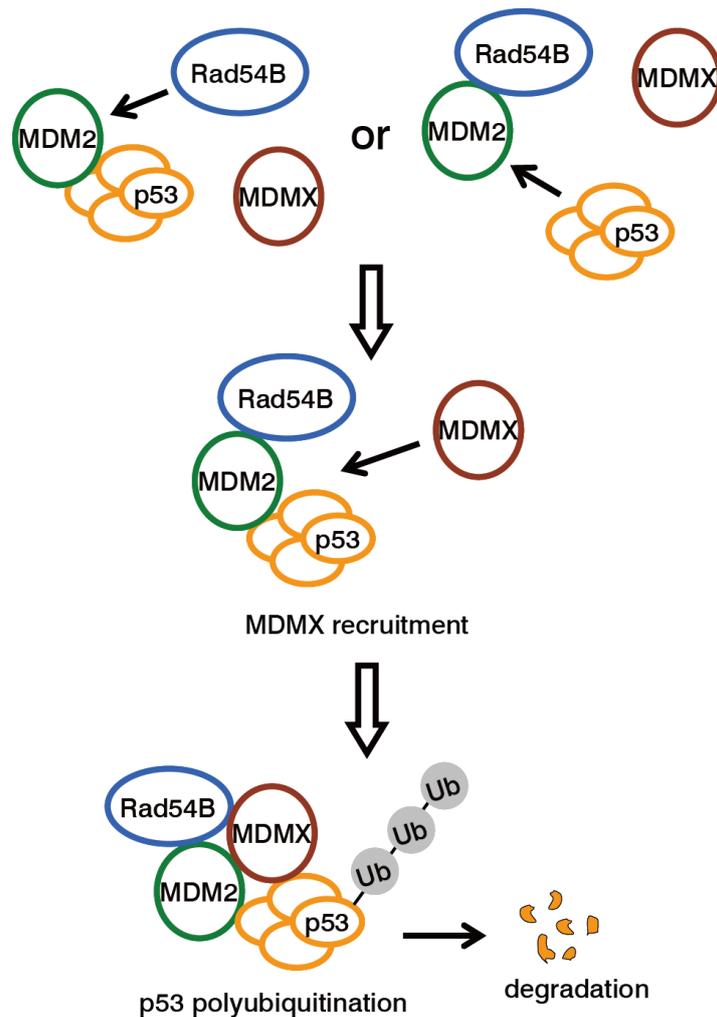


図 2 5 : Rad54B の足場機能による p53 ユビキチン化制御機構のモデル

Rad54B と MDM2 が複合体を形成した後に、Rad54B が MDMX を複合体に誘導することにより、ヘテロ二量体の形成が促進され、p53 のユビキチン化が促進される。

### Rad54B の DNA 損傷 G2/M チェックポイントにおける役割

次に、この Rad54B による p53 抑制機構が DNA 損傷応答においてどのような役割を果たしているのかについて検討した。DNA 損傷を受けた細胞では、DNA 損傷チェックポイント機構が働くことにより、G1/S 期または G2/M 期において細

胞周期が停止する。p53はそのチェックポイント機構に作用することで、細胞周期を制御していることから(図1)、Rad54Bがp53を抑制することで、チェックポイント機構に影響が出る可能性があると考えた。実際、RAD54Bノックアウト細胞では、オキサリプラチン投与後にG2/Mチェックポイントの働きが強化されていた(図26)。

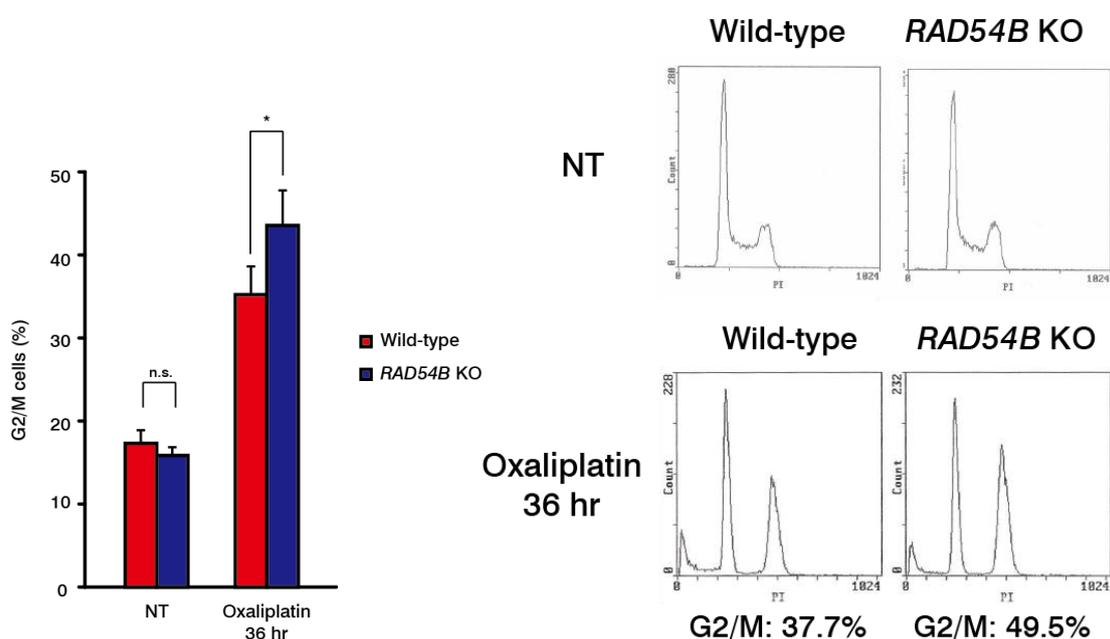


図26: Rad54BによるDNA損傷G2/Mチェックポイントの制御

オキサリプラチン投与36時間後の細胞周期を解析した。代表的なダイアグラムを右に示す。エラーバーは3回の実験における実験誤差を示す。対応のある両側t検定を行い、オキサリプラチンを添加して36時間後にG2/M期にある細胞の割合に有意な差を認めた(n.s.: not significant、\*:  $P < 0.05$ )。

さらにこのフェノタイプは、Rad54B を発現させること (図 2 7 a)、および p53 をノックダウンすること (図 2 7 b) で回復することから、p53 依存性に Rad54B が DNA 損傷後の細胞周期の制御、特に G2/M 期での停止と進行の制御を行っていることが示唆された。

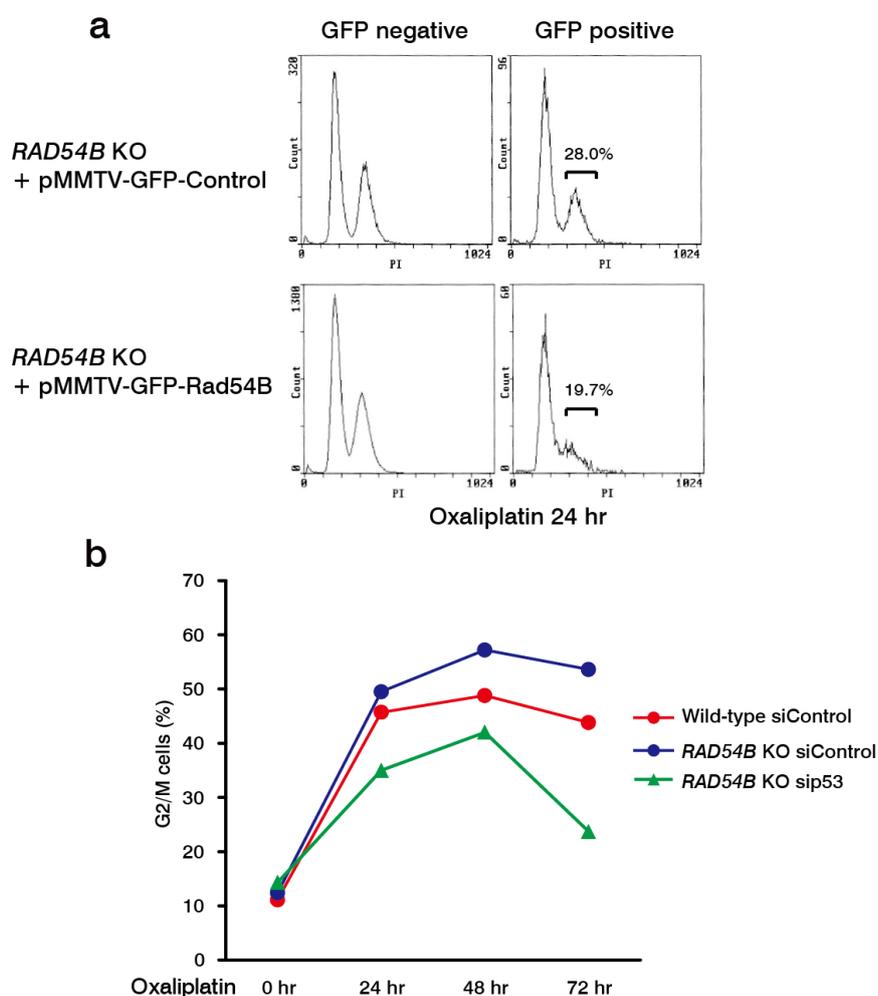


図 2 7 : Rad54B による p53 の制御と DNA 損傷 G2/M チェックポイント

- (a) *RAD54B* ノックアウト細胞に GFP 融合 Rad54B タンパク質を発現させ、GFP が発現している細胞について、オキサリプラチン投与後の細胞周期を解析した。G2/M 期にある細胞の割合をダイアグラム内に示した。
- (b) p53 をノックダウンした *RAD54B* ノックアウト細胞を用いて、オキサリプラチン投与後各時間における細胞周期を解析した。

DNA 損傷 G2/M チェックポイントに不全が起こると、DNA 損傷をもったまま分裂期を迎えることになり、クロマチンの欠失や重複のような、ゲノム不安定性を頻発すると考えられる。実際にこのような現象は酵母やカエル、さらにはヒトのがん細胞においても観察されており、アダプテーションと呼ばれている<sup>37,38,39</sup>。Rad54B による p53 の制御によって、アダプテーションが制御されるかを検証するため、オキサリプラチン投与後の細胞に、M 期の紡錘体形成の阻害剤であるコルセミドを投与することで、G2 期から M 期へと進行した細胞の検出を試みた。図 2 8 に示すように、野生型 HCT116 細胞では、オキサリプラチン投与後 1 2 時間から 2 4 時間の間に、約 6 % の細胞が M 期に進行した。一方で、

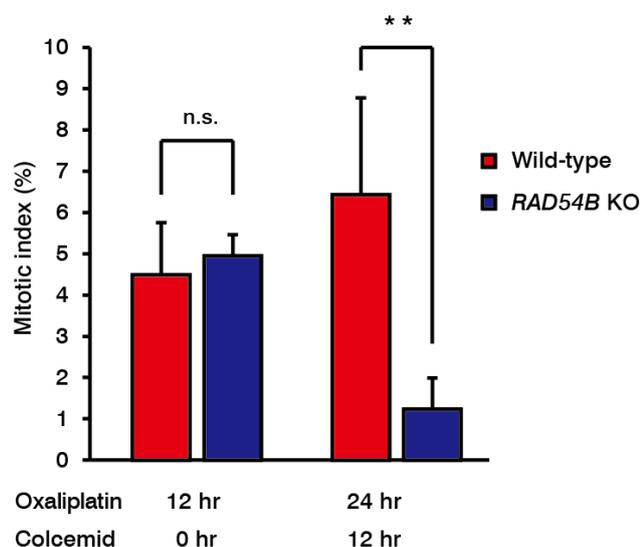


図 2 8 : Rad54B 依存的な DNA 損傷下における M 期への進行

オキサリプラチンを投与して 1 2 時間後に M 期の進行を阻害するコルセミドを添加し、その 1 2 時間後に M 期にある細胞を定量した。エラーバーは 5 回の測定における標準偏差を示す。ウェルチの両側 t 検定を行い、コルセミド添加前では差を認めず (n.s. : not significant)、添加後には有意な差を認めた (\*\* :  $P < 0.001$ )。

*RAD54B* ノックアウト細胞においては、その頻度は約 1 % に抑えられ、この抑制は、*p53* をノックダウンすることで回復した (図 2 9)。さらに、野生型 HCT116 細胞において、M 期に進行した細胞を観察したところ、これらの細胞は DNA 損傷をもっており (図 3 0)、さらにそれらの細胞は高頻度でクロマチンの断片化や欠失を伴っていた (図 3 1)。以上のことから、*Rad54B* による *p53* の抑制によって、DNA 損傷後の G2/M チェックポイント機構が無効化され、その結果として細胞周期が進行することで、ゲノム不安定性が誘導されることが示唆された。

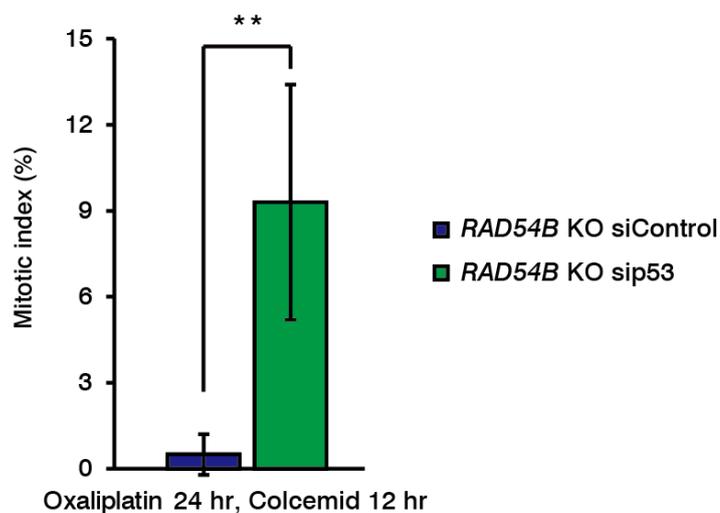


図 2 9 : *Rad54B* による *p53* の抑制と、DNA 損傷後の M 期進行との関係

図 2 8 と同様に M 期にある細胞を定量した。エラーバーは 1 0 回の測定における標準偏差を示す。ウェルチの両側 *t* 検定を行い、有意な差を認めた (\*\* :  $P < 0.001$ )。

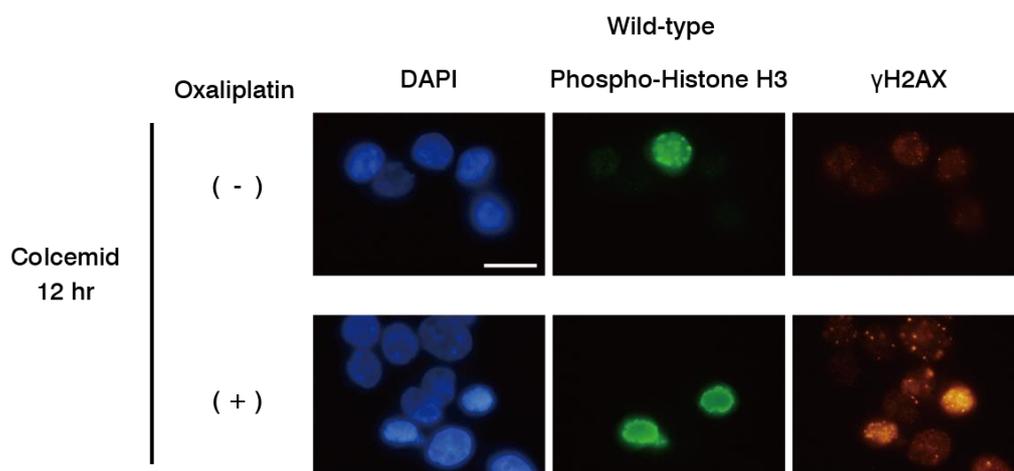


図 3 0 : 野生型 HCT116 細胞におけるアダプテーション

図 2 8 と同様に処理した野生型 HCT116 細胞の代表的な免疫染色像を示した。オキサリプラチン投与後に M 期に進行した細胞において、明らかな DNA 損傷の残存が見られる。(スケールバー : 10  $\mu$ m)

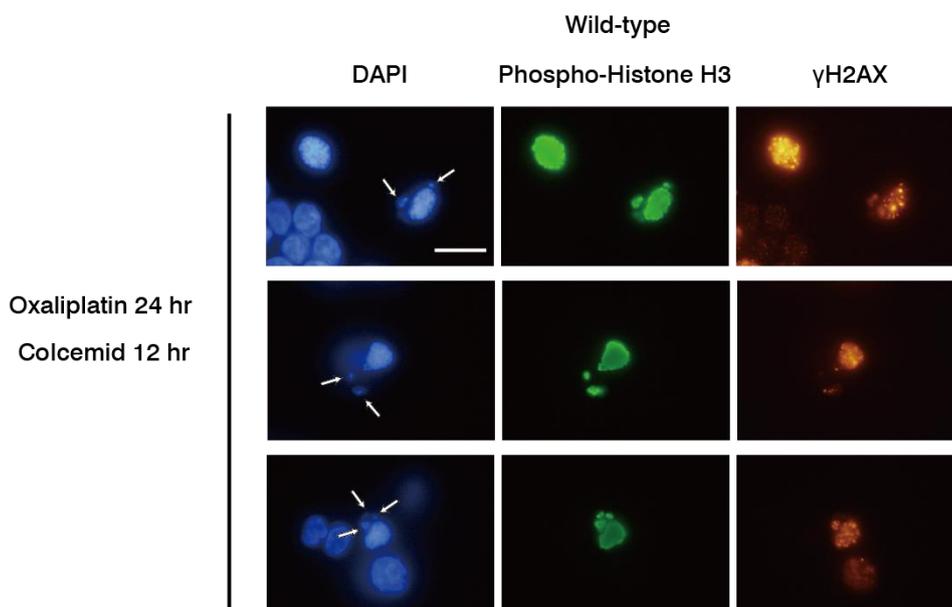


図 3 1 : アダプテーションによるゲノム不安定性の誘導

図 2 8 と同様に処理した野生型 HCT116 細胞の代表的な免疫染色像を示した。オキサリプラチン投与後に M 期に進行した細胞において、ゲノムの断片化が見られる。(スケールバー : 10  $\mu$ m)

## Rad54B の DNA 損傷 G1/S チェックポイントにおける役割

p53 のチェックポイント制御は、G2/M だけでなく G1/S でも顕著に見られることが知られている。従って、Rad54B の G1/S チェックポイントにおける役割を明らかにしたいと考えた。5-FU 処理後の G1/S チェックポイントについて解析を行ったところ、Rad54B ノックアウト細胞ではその働きが強化された (図 3 2)。このフェノタイプも、p53 をノックダウンすることで回復することから (図 3 3)、p53 依存性に Rad54B が DNA 損傷後の G1/S、G2/M 期の両方において細胞周期の停止、進行の制御を行っていることが示された。

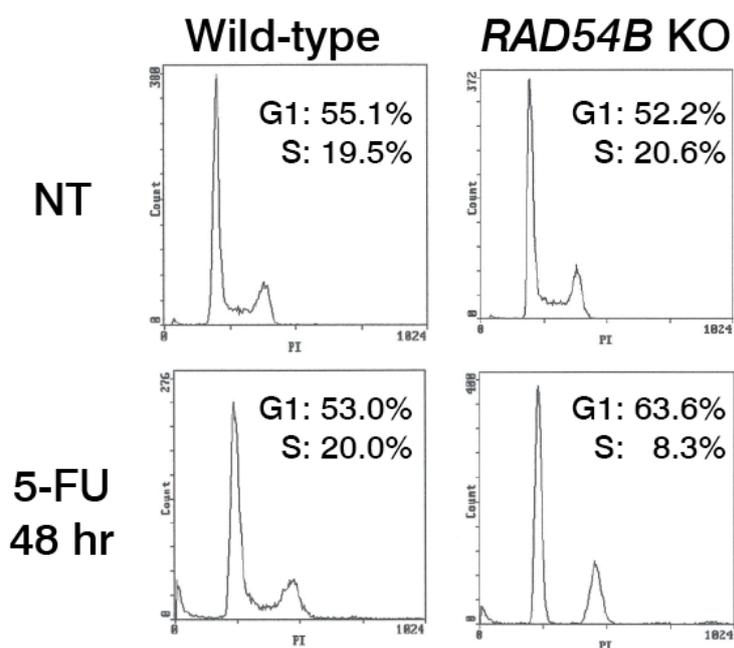


図 3 2 : Rad54B による DNA 損傷 G1/S チェックポイントの制御

5-FU 投与 4 8 時間後の細胞周期を解析した。G1 期および S 期にある細胞の割合を図中に示す。

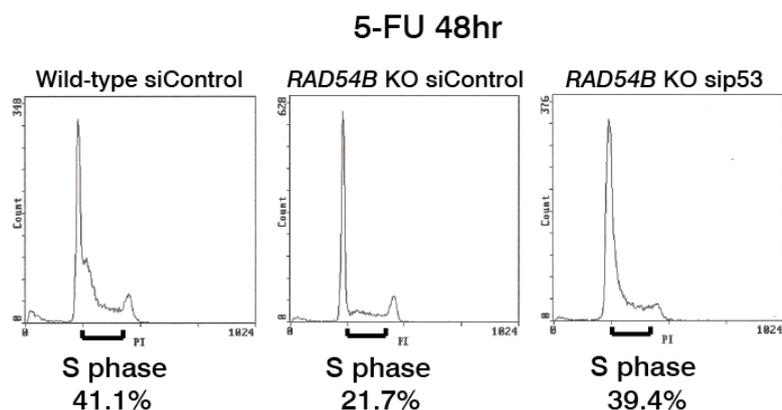


図 3 3 : Rad54B による p53 制御と DNA 損傷 G1/S チェックポイント

5-FU 投与 4 8 時間後の細胞周期を解析した。S 期にある細胞の割合を下に示す。

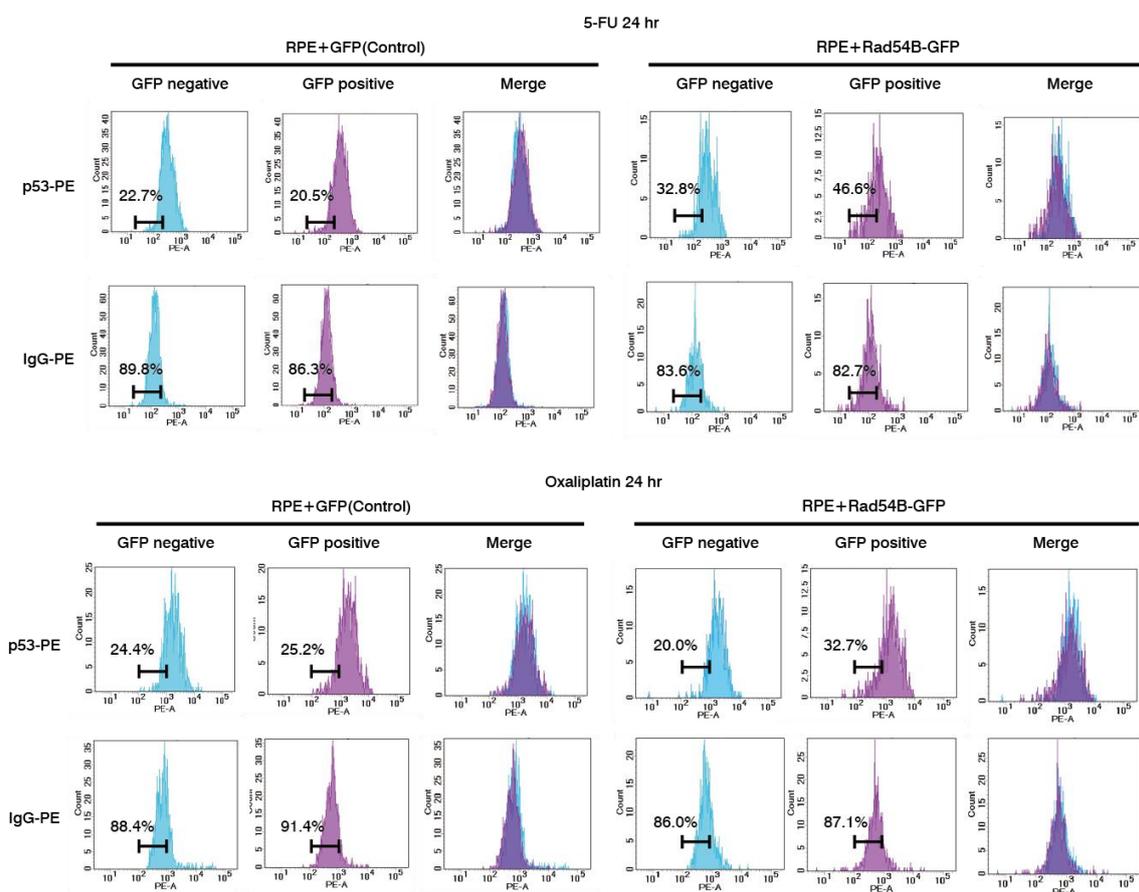


図 3 4 : Rad54B 発現量の増加による p53 の減少

5-FU またはオキサリプラチン投与 2 4 時間後の GFP 発現、非発現細胞における p53 タンパク質の量を FACS Aria II を用いて解析した。

このような G1/S 期における細胞周期の進行の促進は、正常細胞が腫瘍化する際の第一歩となることが想定される。Rad54B がこのような腫瘍化の基盤となるメカニズムに関与しているというさらなる証拠を得るため、不死化された正常網膜色素上皮 (Retina Pigment Epithelial ; RPE) 細胞を用いて、Rad54B の発現を増加させた場合に G1/S チェックポイントがどのように影響を受けるかを解析した。RPE 細胞に GFP で標識した Rad54B を導入し、5-FU あるいはオキサリプラチン処理により DNA 損傷を与えた後の p53 タンパク質の量と細胞周期の進行の解析を行った。まず、Rad54B の導入によって DNA 損傷後の p53 タンパク質の量は減少した (図 3 4)。さらに、Rad54B が導入された細胞では G1/S チェックポイントが無効化され、G1 期に留まる細胞の割合が減少した (図 3 5)。

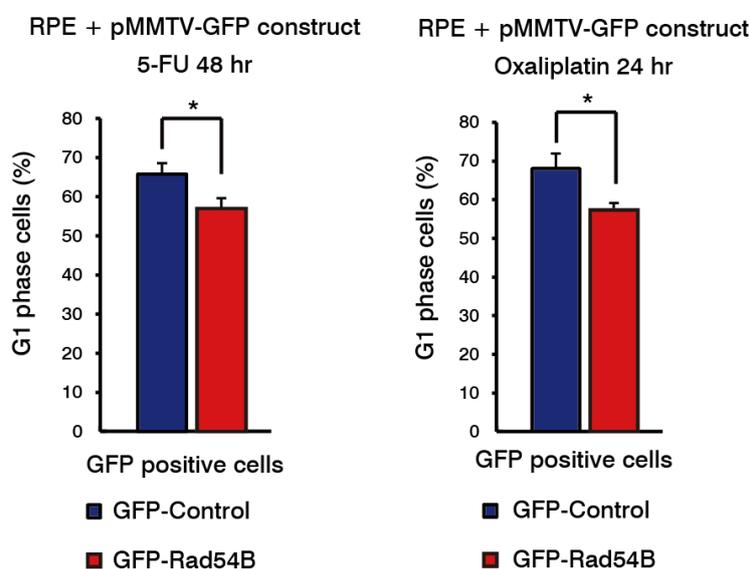


図 3 5 : Rad54B の発現増加と DNA 損傷 G1/S チェックポイント

5-FU またはオキサリプラチン投与後の GFP 発現細胞における細胞周期を解析し、G1 期にある細胞の割合を示した。エラーバーは 3 回の実験における実験誤差を示す。両側 *t* 検定を行い、有意な差を認めた (\* :  $P < 0.05$ )。

次に、G1/S チェックポイントの制御における Rad54B の役割をより明確に示すため、G1/S 期に細胞周期を同調した細胞に DNA 損傷を与えて解析を行った。

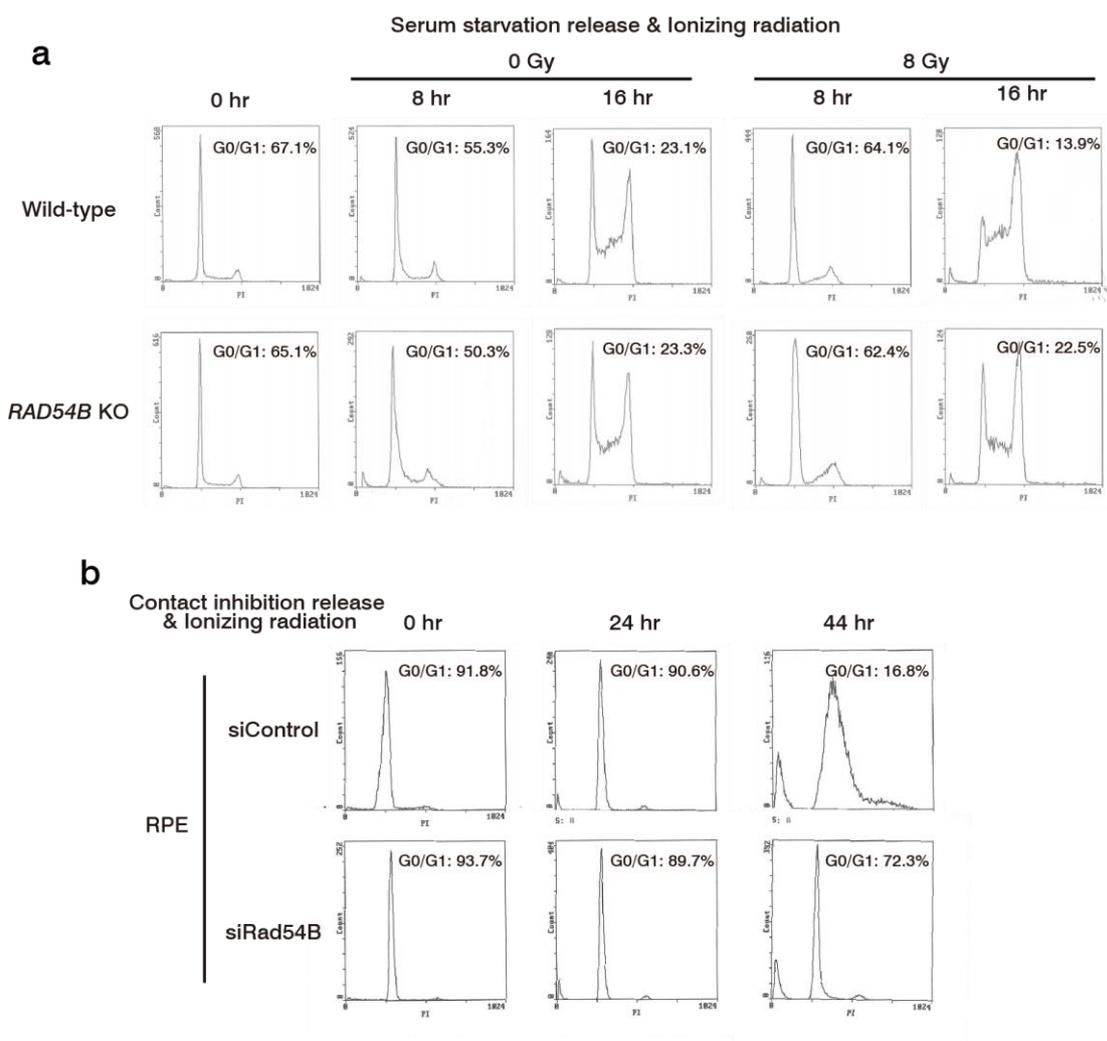


図 3 6 : Rad54B による DNA 損傷 G1/S チェックポイント強度の制御  
血清無添加、あるいは接触阻止によって G0/G1 期にそれぞれ同調した  
(a)RAD54B ノックアウト HCT116 細胞、あるいは(b)Rad54B ノックダウン RPE  
細胞に、放射線を照射し、その後の細胞周期の進行を解析した。

図 3 6 に示すように、*RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞および Rad54B ノック  
 ダウン RPE 細胞のいずれにおいても、DNA 損傷 G1/S チェックポイントが増強  
 していた。さらに、HCT116 細胞における DNA 損傷 G1/S チェックポイントの  
 強さは、p53 依存的に制御されていた (図 3 7)。以上の結果より、Rad54B は  
 p53 を抑制することで、DNA 損傷 G1/S チェックポイントの強度を弱め、細胞周  
 期の進行を促進していることが示唆された。

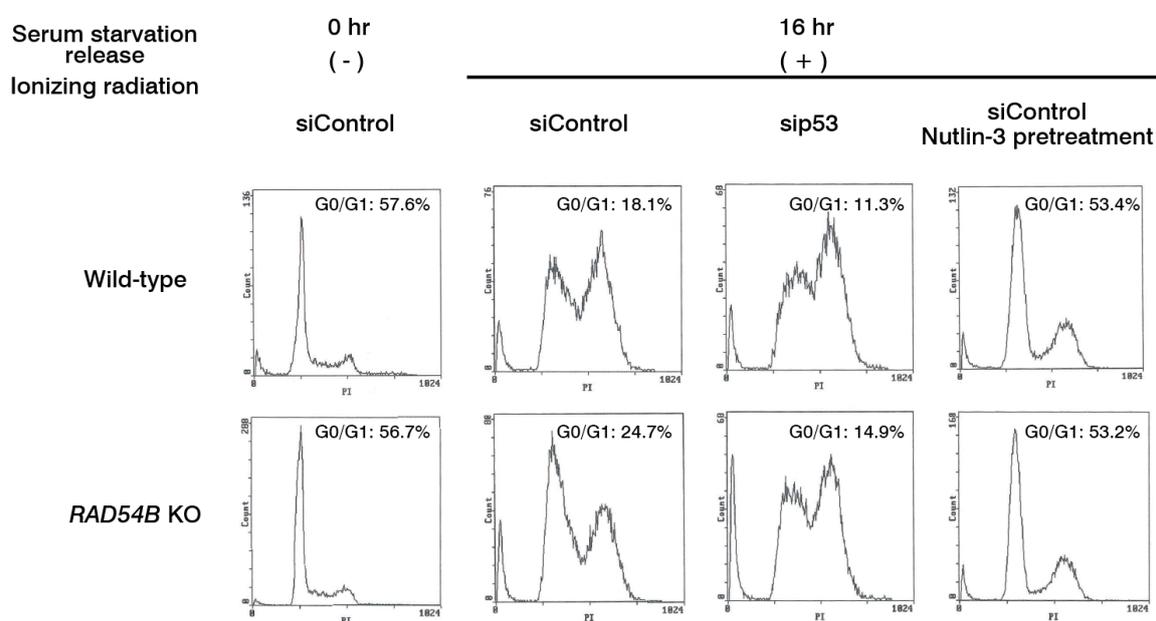


図 3 7 : Rad54B による p53 依存性 DNA 損傷 G1/S チェックポイントの制御  
 血清無添加によって G0/G1 期に同調した *RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞  
 と p53 ノックダウンあるいは Nutlin-3 処理を組み合わせると図 3 6 と同様に解  
 析した。

### Rad54B の発現増加とがん

DNA 損傷後の細胞周期の進行制御によって細胞の運命決定にどのような影響  
 があるかを明らかにするため、オキサリプラチン投与後の長期生存率をコロニ

一形成法で調べたところ、Rad54B ノックアウト細胞では生存率が低下していた (図 3 8)。すなわち、DNA 損傷後の細胞周期の進行は、ゲノム不安定性を誘導するだけでなく、そのようなゲノム異常をもった細胞の生存を促進することを示唆した。従って、Rad54B を標的にすることでこのメカニズムを抑制できれば、DNA 損傷薬剤の、がんに対する治療効果を上げることができると考えた。このことを確かめるため、ヌードマウスに野生型、または *RAD54B* ノックアウト HCT116 細胞由来のゼノグラフトを形成させ、オキサリプラチンまたは 5-FU で治療を施した。その結果、Rad54B ノックアウト細胞由来のゼノグラフトにおいて、薬物治療効果が増進された (図 3 9)。

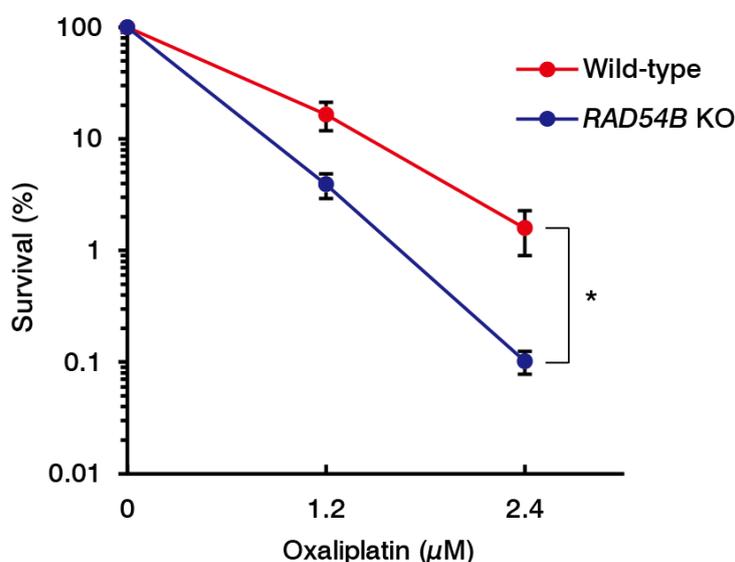


図 3 8 : オキサリプラチン投与後の長期生存率

オキサリプラチン投与後の長期生存率を、コロニー形成法を用いて解析した。エラーバーは 4 回の実験における実験誤差を示す。ログ変換した生存細胞の割合に対して反復測定 2 元配置分散分析を行い、有意な差を認めた (\* :  $P < 0.05$ )。

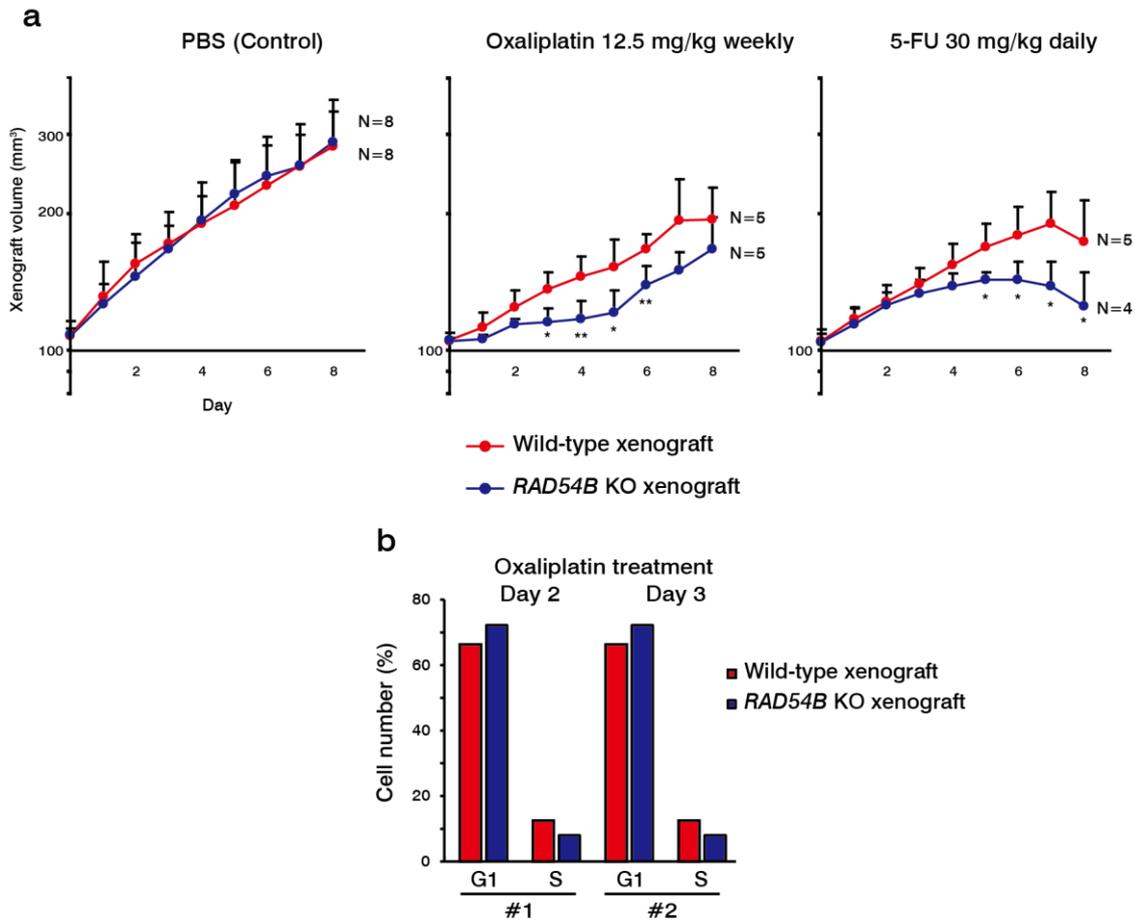
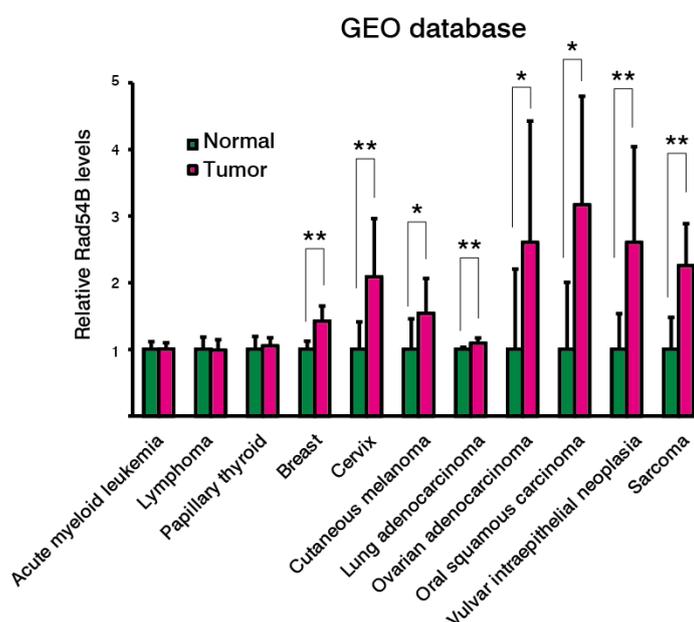


図 3 9 : ゼノグラフトモデルを用いた薬物治療効果の解析

- (a) ゼノグラフトモデルを用いて、Rad54B が薬物の治療効果に与える影響をマウスの生体内で解析した。観察した個体数はそれぞれのグラフの右に示した。エラーバーは各々の群における標準偏差を示す。各タイムポイントにおいてウェルチの両側  $t$  検定を行った (\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ )。
- (b) オキサリプラチン投与開始から 2 日目あるいは 3 日目のゼノグラフトの細胞周期の分布を解析した。

最後に、臨床検体における Rad54B の役割を明らかにするため、NCBI の GEO を参照し、正常細胞と腫瘍細胞内での Rad54B の発現量を比較できるデータセットを解析した。図 4 0 に示すように、種々の固形腫瘍において Rad54B の発現量は有意に上昇していた。また、良性腫瘍である大腸腺腫においては全てのサンプルセットにおいて、Rad54B 発現量の上昇が見られた (図 4 1)。

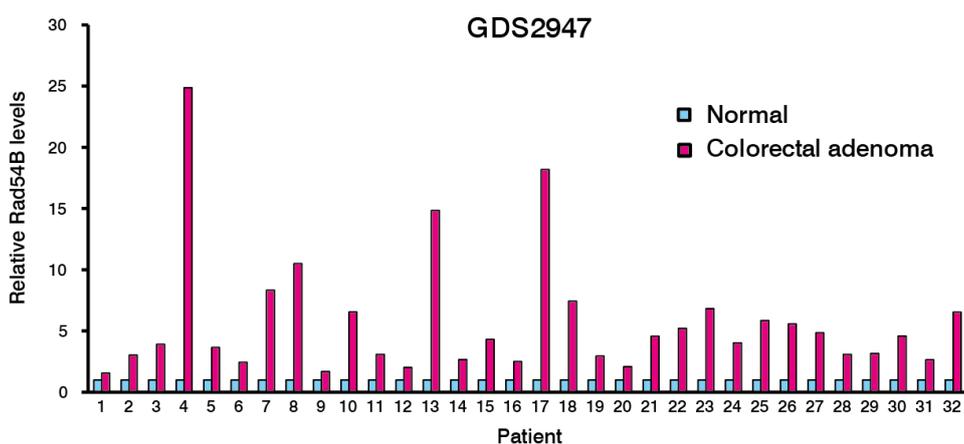
さらに、REMBRANDT を用いて、脳腫瘍、特に星細胞腫における Rad54B の発現量と、生存期間の関係について解析したところ、Rad54B の発現が多い群で明らかに予後が不良であった（図 4 2）。これらのデータベース解析により、Rad54B が腫瘍形成過程において重大な役割を果たしていることが示唆された。



Organ, type	Sample number		Relative Rad54B levels		Mann-Whitney	NCBI Accession Number
	normal	tumor	normal	tumor	<i>U</i> -test <i>P</i> value	
Acute myeloid leukemia	38	26	1±0.12	1.00±0.10	0.309	GDS3057
Lymphoma	20	42	1±0.16	0.99±0.16	0.982	GDS3516
Papillary thyroid	7	7	1±0.19	1.05±0.12	0.798	GDS1732
Breast	7	40	1±0.12	**1.43±0.23	0.0001	GDS2250
Cervix	24	28	1±0.41	**2.09±0.87	<0.0001	GDS3233
Cutaneous melanoma	7	45	1±0.46	*1.54±0.52	0.0147	GDS1375
Lung adenocarcinoma	49	58	1±0.03	**1.09±0.08	<0.0001	GDS3257
Ovarian adenocarcinoma	12	12	1±1.21	*2.60±1.82	0.0141	GDS3592
Oral squamous carcinoma	4	16	1±1.01	*3.17±1.63	0.0160	GDS1584
Sarcoma	15	39	1±0.54	**2.60±1.44	<0.0001	GDS1209
Vulvar intraepithelial neoplasia	9	9	1±0.48	**2.26±0.63	0.0011	GDS2418

mean ± s.d., \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , Mann-Whitney *U*-test.

図 4 0 : GEO データベースを用いた、正常組織と腫瘍組織における Rad54B 発現量の比較



Organ, type	Patient number	Relative Rad54B levels		Rad54B levels		Tumor displaying elevated Rad54B expression	NCBI Accession Number
		normal (N)	tumor (T)	T > N	T ≤ N		
Colorectal adenoma	32	1±0.46	3.97±0.92	32	0	100%	GDS2947

mean ± s.d.

図 4 1 : 正常組織と大腸腺腫組織における Rad54B 発現量の比較

上で示してきたような Rad54B による p53 の抑制機構が腫瘍形成機構に寄与するためには、野生型の p53 の存在が前提である。従って、ここで解析したデータベース上のサンプルの p53 の変異の有無を確かめる必要があると考えた。しかしながら、ここで示したデータベースには、p53 の変異についての情報は含まれていなかった。そこで、過去の文献において示された方法を参考にして、各サンプルの遺伝子発現パターンから p53 変異の有無の予測を試みた。図 4 3、図 4 4 に示すように、TCGA のデータを基にして図 4 0 の Breast のサンプルおよび図 4 1 のサンプルをクラスタリングしたところ、Rad54B の腫瘍における発現の上昇は、p53 の変異の有無に影響されなかった。同様に、図 4 2 のサンプルについても解析したが、Rad54B の発現が高い群と低い群の間で p53 変異をもつ

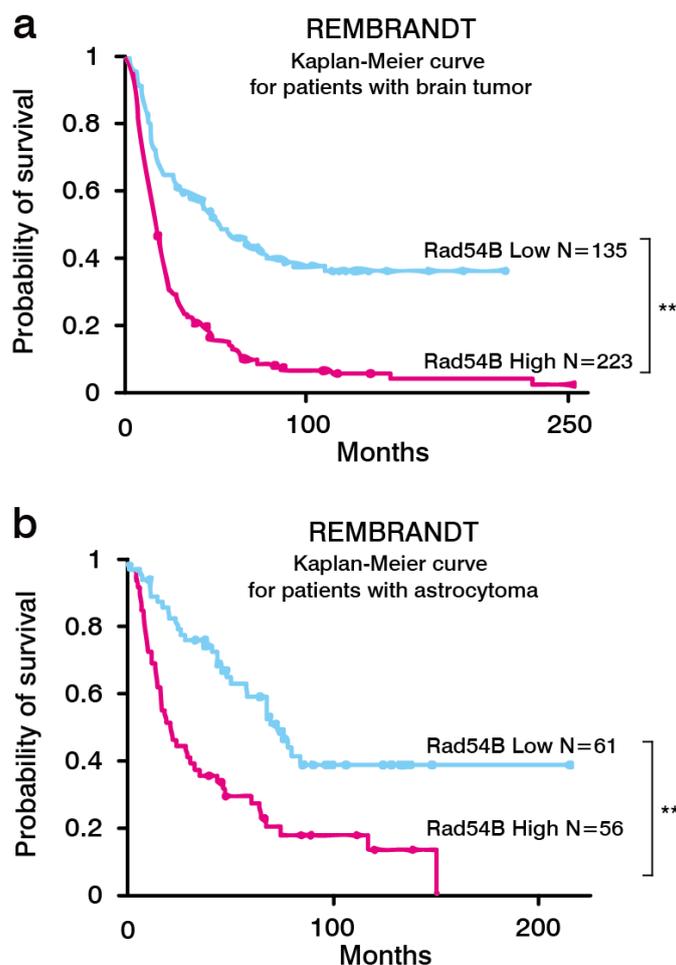
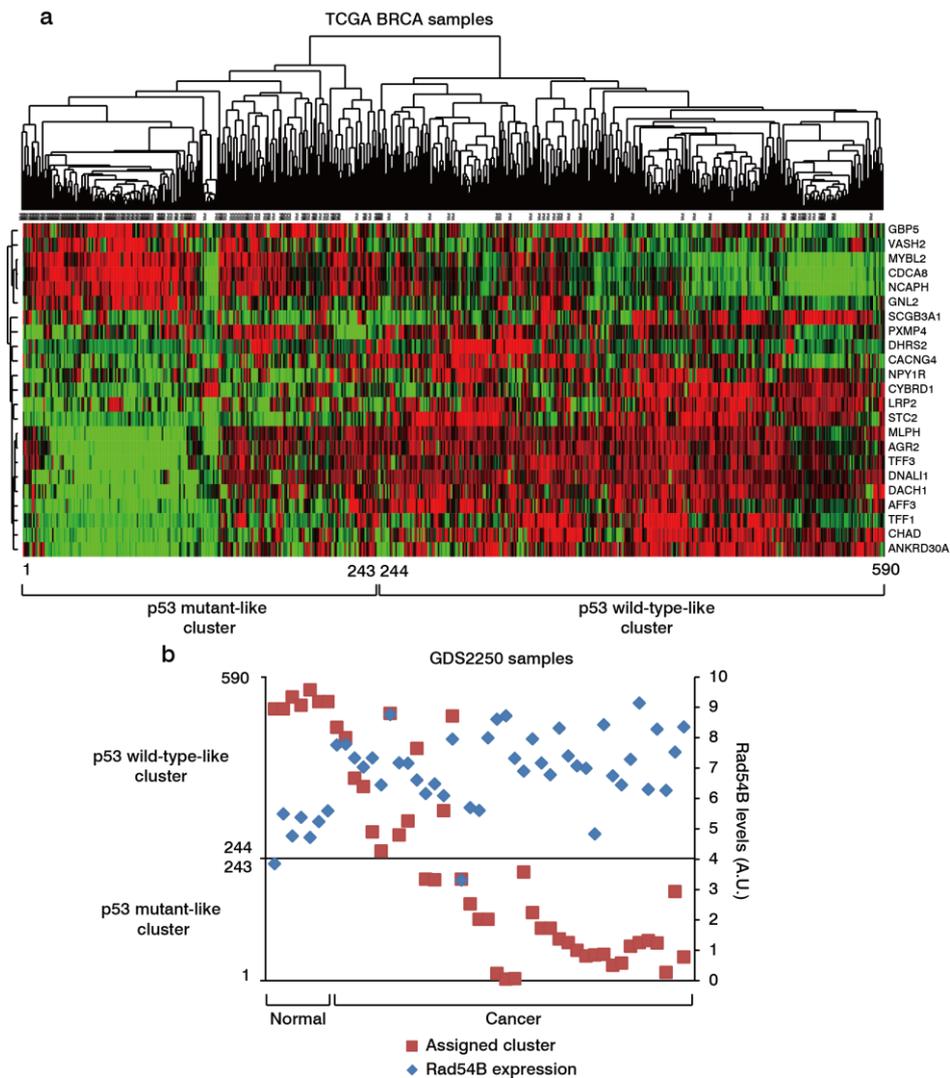


図 4 2 : Rad54B 発現量と生存期間の関係

Rad54B を正常の 2 倍以上のレベルで発現する高発現グループとそれ以外に分けて、(a)REMBRANDT に登録されているサンプル全体、(b)星細胞腫のサンプルにおける生存期間を Kaplan-Meier 法で解析した。グラフ中のドットは打ち切り例を示す。ログランク検定を行い、有意な差を認めた (\*\* :  $P < 0.001$ )。

と予測されたサンプルの割合に差はなかった (図 4 5)。以上の結果から、腫瘍において高頻度にみられる Rad54B 発現量の増加が臨床的な予後の不良と関係しており、その一つの機序として、Rad54B による p53 の抑制機構を介した細胞周期の制御が関与していると考えられた。



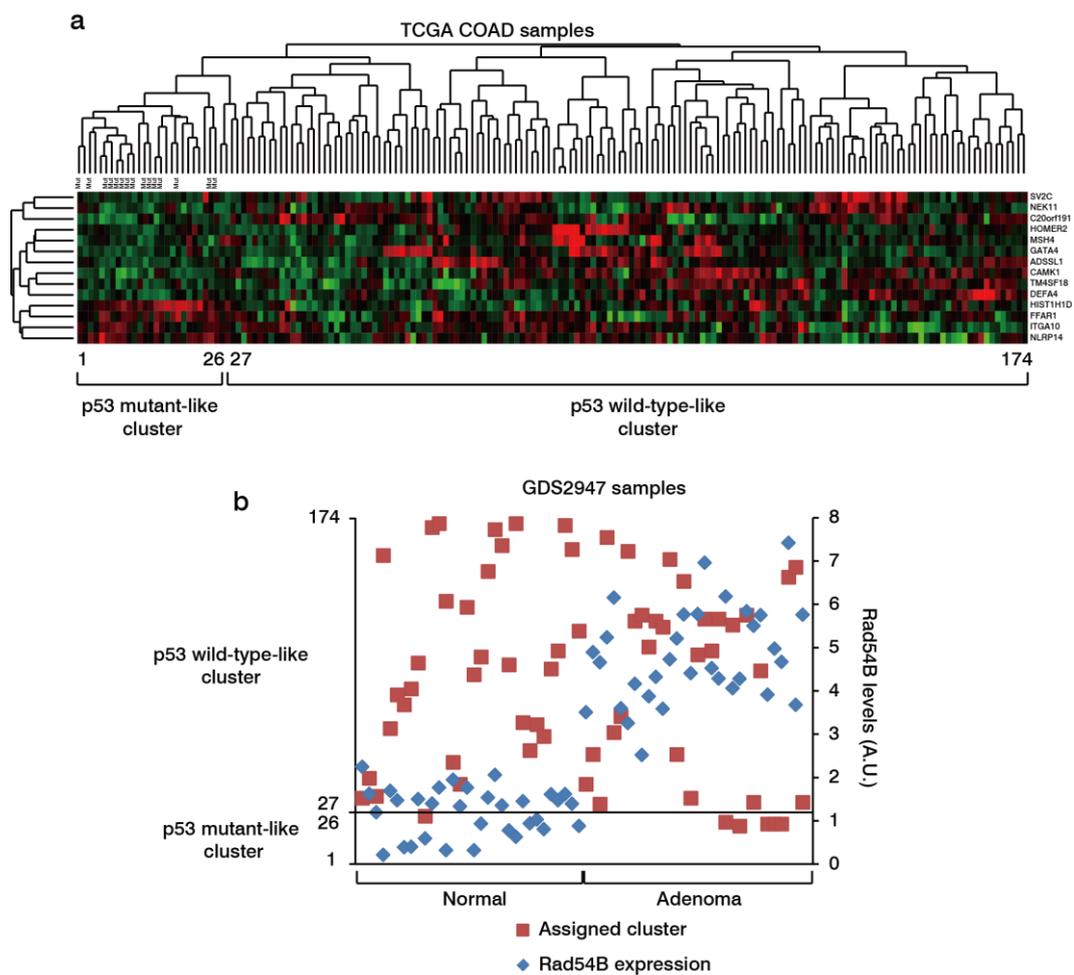
**c**

Database	Cluster	p53-mutated samples in each cluster	Risk of p53 mutation <sup>a</sup>	
TCGA BRCA (N=590)	1-243	139	57.2%	
	244-590	27	7.8%	
Database	Cluster	Number of samples in each cluster <sup>b</sup> (% total)	Predicted number of p53-mutated samples for each cluster <sup>a</sup>	Predicted number of p53-mutated samples for group (% total)
GDS2250	1-243	0 (0%)	0	0.5 (7.8%)
Normal (N=7)	244-590	7 (100%)	0.5	
GDS2250	1-243	28 (70%)	16	17.0 (42.3%)
Cancer (N=40)	244-590	12 (30%)	0.9	

\* calculated as (a) × (b).

図 4 3 : GDS2250 サンプルにおける p53 変異の予測

p53 変異の有無が既知の TCGA BRCA サンプルを用いて、23 個の遺伝子を抽出し(a)、それらの発現パターンを基にクラスタ解析を行った(b)。結果をまとめた表を(c)に示す。



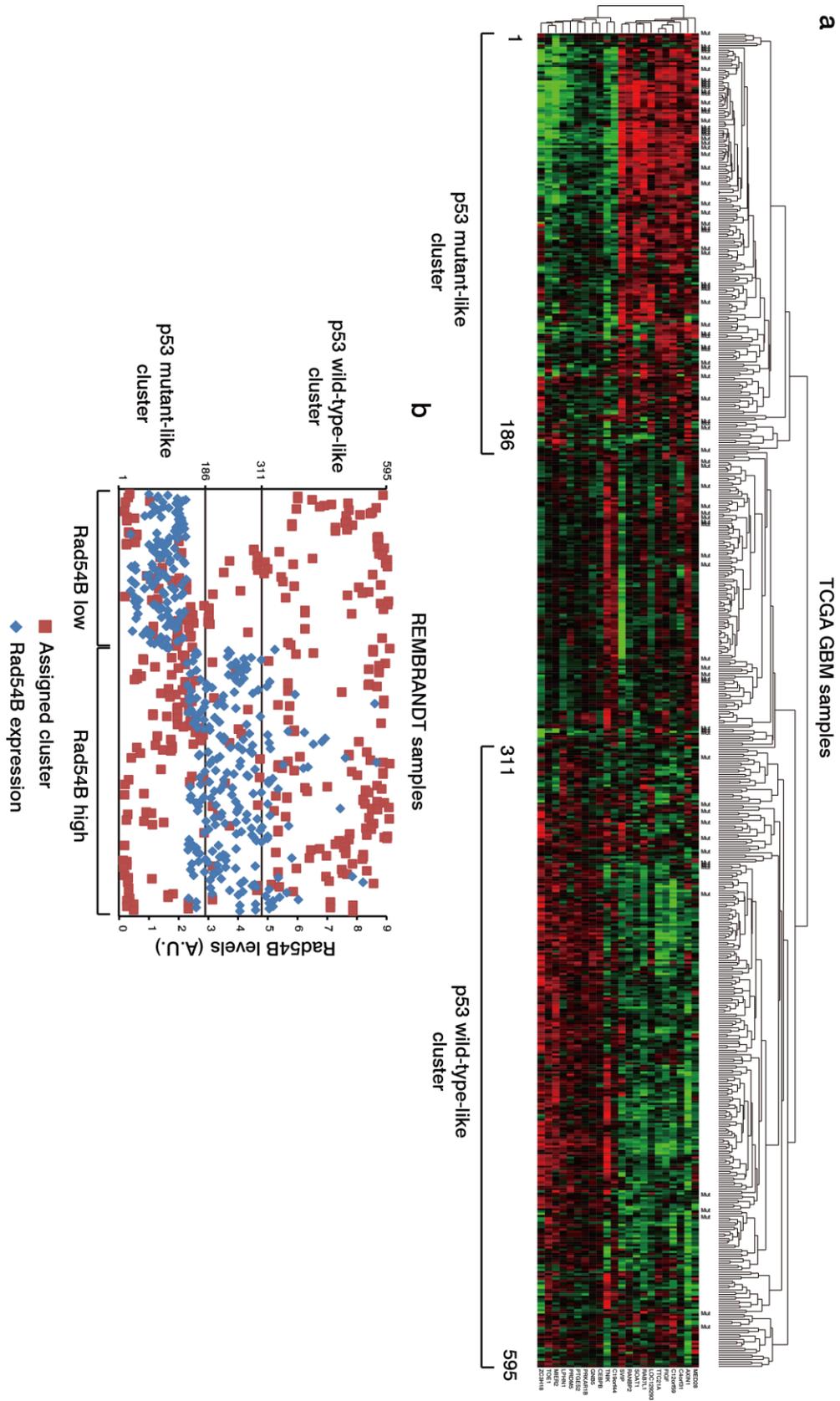
**c**

Database	Cluster	p53-mutated samples in each cluster	Risk of p53 mutation <sup>a</sup>	
TCGA COAD (N=174)	1-26	15	57.7%	
	27-174	0	0%	
Database Group	Cluster	Number of samples in each cluster <sup>b</sup> (% total)	Predicted number of p53-mutated samples for each cluster <sup>a</sup>	Predicted number of p53-mutated samples for group (% total)
GDS2947 Normal (N=32)	1-26	1 (3.1%)	0.6	0.6 (1.8%)
	27-174	31 (96.9%)	0	
GDS2947 Adenoma (N=32)	1-26	5 (16%)	2.9	2.9 (9.0%)
	27-174	27 (84%)	0	

\* calculated as (a) × (b).

図 4 4 : GDS2947 サンプルにおける p53 変異の予測

p53 変異の有無が既知の TCGA COAD サンプルを用いて、14 個の遺伝子を抽出し(a)、それらの発現パターンを基にクラスタ解析を行った(b)。結果をまとめた表を(c)に示す。



(図 4 5 次頁に続く)

**C**

Database	Cluster	p53-mutated samples in each cluster	Risk of p53 mutation <sup>a</sup>	
TCGA GBM (N=595)	1-186	49	26.3%	
	187-310	19	15.3%	
	311-595	15	5.3%	
Database Group	Cluster	Number of samples in each cluster <sup>b</sup> (% total)	Predicted number of p53-mutated samples for each cluster <sup>*</sup>	Predicted number of p53-mutated samples for group (% total)
REMBRANDT Rad54B low (N=135)	1-186	56 (41.5%)	14.8	20.4 (15.1%)
	187-310	15 (11.1%)	2.3	
	311-595	64 (47.4%)	3.4	
REMBRANDT Rad54B high (N=223)	1-186	97 (43.5%)	25.6	34.0 (15.2%)
	187-310	18 (8.1%)	2.8	
	311-595	108 (48.4%)	5.7	

\* calculated as (a) × (b).

図 4 5 : REMBRANDT サンプルにおける p53 変異の予測

p53 変異の有無が既知の TCGA GBM サンプルを用いて、2 2 個の遺伝子を抽出し(a)、それらの発現パターンを基にクラスタ解析を行った(b)。結果をまとめた表を(c)に示す。

## 第四章 考察

### DNA 損傷下で細胞周期を進行させる生物学的意義

Rad54B はこれまで DNA 修復機構に関わるタンパク質と考えられてきたが、本研究によって、Rad54B が DNA 損傷下での細胞周期の進行を促進し（図 2 6、2 8、3 2、3 5、3 6）、ゲノムの不安定性を誘導することが明らかになった（図 3 1）。さらに、細胞周期の進行によって細胞の生存が促進されたことから（図 3 8、3 9）、Rad54B はゲノムの不安定性をもった細胞が生存する機会を与え、がんの発生や悪性の過程に寄与していると考えられた。元来、細胞のがん化を防ぐために働く DNA 修復に属するタンパク質が、なぜそのような機能をもつに至ったのか、以下その生物学的意義について考察する。

今回の研究では、主にオキサリプラチン、5-FU、放射線による DNA 損傷に対して起こる細胞応答を解析したが、p53 を欠損した HCT116 細胞のオキサリプラチンおよび放射線への感受性を調べた過去の研究で、p53 の欠損によって、オキサリプラチン処理に対して明らかに抵抗性になるのに対し、放射線照射に対する感受性はあまり変化がないことが示されていた<sup>40,41</sup>。興味深いことに、図 3 8、3 9において、Rad54B がオキサリプラチンあるいは 5-FU 処理後の細胞の生存を促進することを示した。さらに、過去の文献において Rad54B は放射線照射後の細胞の生存に大きな影響を与えないことが示されていた<sup>31</sup>。つまり、ここに見られるような DNA 損傷に対する細胞の運命決定には、本研究で示した Rad54B による p53 の制御が関与している可能性が高いと考えられる。

Rad54B は p53 を制御することで、上で挙げたいずれの処理によって引き起こされた DNA 損傷に対しても、細胞周期進行の制御という一定の役割を示しているにもかかわらず、最終的な細胞の運命は大きく異なっている。従って、DNA 損傷下での細胞周期の進行には、その後の染色体異常による細胞死を誘導する効果と、ある一定の割合で生存のチャンスを与える効果の両方があるということが示唆される。つまり、オキサリプラチンや 5-FU などの損傷に対しては、細胞死を誘導する効果よりも、細胞生存のチャンスを与える効果の方が上回っており、一方、放射線によって起こる損傷に対しては、生存効果よりもむしろ細胞死を誘導する効果の方が大きい。このように、DNA 損傷後の細胞周期制御と細胞の最終的な運命の関係は一つの明快な理論では説明できず、DNA 損傷の質や量によって大きく変化していると推測される。

ではこれらの関係性が、具体的に DNA 損傷のどのような違いによって規定されるかについて考えると、放射線はどの細胞周期にある細胞に対しても一様に DNA 損傷を与える一方で、オキサリプラチンや 5-FU などの薬剤は、静止期にある細胞には明示的な DNA 損傷を与えないと想定される。すなわち、DNA クロスリンクや、核酸代謝経路阻害による DNA 損傷は、理論的には合成期に細胞周期が進行することによって初めて生じるものであり、静止期にある間には DNA 損傷と認識されることを逃れる可能性がある。従って、そのような状況において修復システムの一員である Rad54B が、潜在的な DNA 損傷を明らかにするために細胞周期を進行させ、DNA の完全な修復を可能にすることは合理的である。修復システムと細胞周期制御システムはともに、p53 などの DNA 損傷応

答因子の下流と捉えられ、それらのシステム間の相互調節機構についてはほとんど知られていなかった。本研究では、修復システムと細胞周期制御システム間の相互調節機構の存在を示し、Rad54B がその中心的な役割を担っていることが明らかとなった。このように Rad54B は、p53 抑制を介した細胞周期の制御を通じて、非常にユニークな生物学的役割を果たしていると考えられる。

### Rad54B は精巧な p53 の制御を可能にする

p53 は DNA 損傷後の細胞周期を制御することで、がん抑制遺伝子としての役割を果たしている一方で、p53 が非常に高いレベルで維持された場合には、アポトーシスを誘導することが知られており、p53 の誘導レベルが、細胞の運命を決すると考えられてきた。最近の研究では、p53 の誘導レベルと細胞応答の関係について、閾値の存在を示す結果も報告されている<sup>42</sup>。これらのことを踏まえると、がん化の過程で p53 の不活化を防ぐことは、一つのがん治療の戦略となると考えられ、実際に多くの研究でその妥当性が検討されてきた<sup>43,44,45</sup>。p53 と MDM2 の結合を阻害することで p53 の分解を抑制する Nutlin-3 のような薬剤は、生体内においても一定の効果を示すことが示されている<sup>46,47</sup>。しかしながら、この薬剤によって誘導される p53 のレベルは比較的高く、ゲノム損傷薬剤と組み合わせた場合には、細胞死誘導の効果による副作用が問題になると考えられる<sup>48</sup>。興味深いことに、p53 のアレルを数アレル添加することによって p53 の発現量を微増させた場合にも、抗腫瘍効果が得られるという報告がある<sup>49</sup>。従って、p53 を誘導する治療戦略の課題は、いかに p53 の誘導レベルを適切にコントロールす

るかということであった。本研究における、Rad54B 阻害による p53 レベルの誘導機構は、図 2 6、3 2 などで死細胞の有意な増加が見られなかったことなどから、DNA 損傷薬剤処理の後においてもアポトーシスを誘導する閾値に達していないと推定される。一方で、細胞周期の制御は、定常状態では大きな影響はなく、DNA 損傷を与えた後にのみ強く誘導されるという性質をもっていた (図 3 9)。以上のことから、図 4 6 にまとめられるように、Rad54B の阻害と DNA 損傷薬剤を組み合わせることによって、アポトーシスを誘導する閾値に達しない範囲で p53 のレベルを増加させることが可能となると考えられる。従って、Rad54B を標的とした治療戦略は、過剰なアポトーシスの誘導から生じる副作用を防ぐことで、Nutlin-3 よりも優れた治療効果を得られる可能性がある。

p53 functions	Range	Molecular state/treatment	Cellular level outcome	Clinical/in vivo outcome	
	Toxic	MDM2 KO MDMX KO	Extensive apoptosis and cell cycle arrest	Lethality	
	Effective	Nutlin-3	Increase in apoptosis	Anti-tumor effects with adverse effects	
		RAD54B KO/KD	Suppression of checkpoint escape	Suppression of drug resistance	
	Mutagenic	Normal			
		Rad54B overexpression	Increase in adaptation (checkpoint escape)	Mutagenesis/drug resistance	
Oncogenic	MDM2 overexpression Mutation in p53	Decrease in apoptosis Defects in DDR, aberrant proliferation	Malignant conversion and progression		

図 4 6 : p53 のレベルが細胞、個体に与える効果

### 腫瘍形成過程における Rad54B の役割

腫瘍形成過程はおおまかに、1) 正常細胞が、がん様の性質を獲得する過程、すなわち腫瘍発生の過程、および、2) 腫瘍の性質が徐々に変化し進展していく過程、すなわち腫瘍悪性化の過程の 2 つに分けられる。本研究で得られたデータを基に、Rad54B の発現増加が、腫瘍形成過程においてどのような役割を果

たしているかについて考察する。まず、図 3 5 で、正常細胞において Rad54B の発現が増加し、かつ DNA 損傷が加えられた場合には、本来停止すべき細胞周期が進行していることが明らかとなった。このような細胞周期の異常な進行を繰り返すことで、ゲノム異常が蓄積し、がんの形質を獲得すると想定されるため、Rad54B の発現増加は、上記 1) の腫瘍発生過程に寄与していると推定される。このことは、良性腫瘍の段階である大腸腺腫において、Rad54B の発現増加が顕著に見られたことで裏付けされる (図 4 1)。今後の研究で、Rad54B をノックイン、あるいはノックアウトしたマウスの自然発がん率、DNA 損傷薬剤による発がん率、それらのマウスを他の発がんモデルマウスと掛け合わせた際の発がん率などを解析することで、Rad54B の発がんにおける役割がより明確になると考えられる。

一方で、図 4 0 のように Rad54B の発現増加はすでに悪性化した固形腫瘍においても観察されており、図 4 2 で悪性度の比較的低い星細胞腫における Rad54B の発現増加が著明に予後不良と関係することなどから、上記 2) の腫瘍悪性化過程にも寄与していることが示唆される。しかしながら、この段階まで腫瘍の悪性化が進むと、p53 の変異をもつ割合も多いと予想されることから (図 4 3 - 4 5)、Rad54B の発現増加による腫瘍悪性化促進の機構は、本研究で示した、Rad54B による p53 の制御機構だけでは説明がつかないと考えられる。従って、今後の研究で、p53 非依存的な Rad54B の悪性化過程への寄与についても明らかにする必要がある。

以上のことから、Rad54B を標的としたがん治療戦略を考えると、図 3 9 で見

られたような、既存の DNA 損傷薬剤の治療効果を高めるのみならず、腫瘍の発生および悪性を直接的に抑制することができる可能性がある。それらを実現するためには、上で述べたように、p53 制御以外の Rad54B の新たな機能を解明すること、さらに、Rad54B 自体の発現制御についての理解は必須である。また、Rad54B タンパク質を標的とした薬剤を開発するためには、Rad54B と MDM2 および MDMX との相互作用の、より詳しい性状の解明や、相互作用を担うタンパク表面の立体構造を明らかにする必要があると考えられる。

## 第五章 結論

本研究では、Rad54B の新たな機能として、p53 タンパク質の量および機能を抑制することを発見した。そのメカニズムとして、Rad54B が MDM2 および MDMX と直接結合することでそれらのヘテロ二量体の形成を促進し、p53 のユビキチン化を介して、分解を促進していることを明らかにした。さらにこの p53 抑制機構は、DNA 損傷 G1/S および G2/M チェックポイントの強度を弱めることで細胞周期を進行させ、ゲノムの不安定性を誘導することを明らかにした。また、多くのがんにおいて Rad54B の発現増加が観察され、特に脳腫瘍においては予後不良と関係していた。以上のことから、Rad54B は、がんの発生および悪性化の過程における基盤となるメカニズムに関与していると考えられ、その機能を抑制することは、新たながん治療戦略となることが示唆された (図 4 7)。

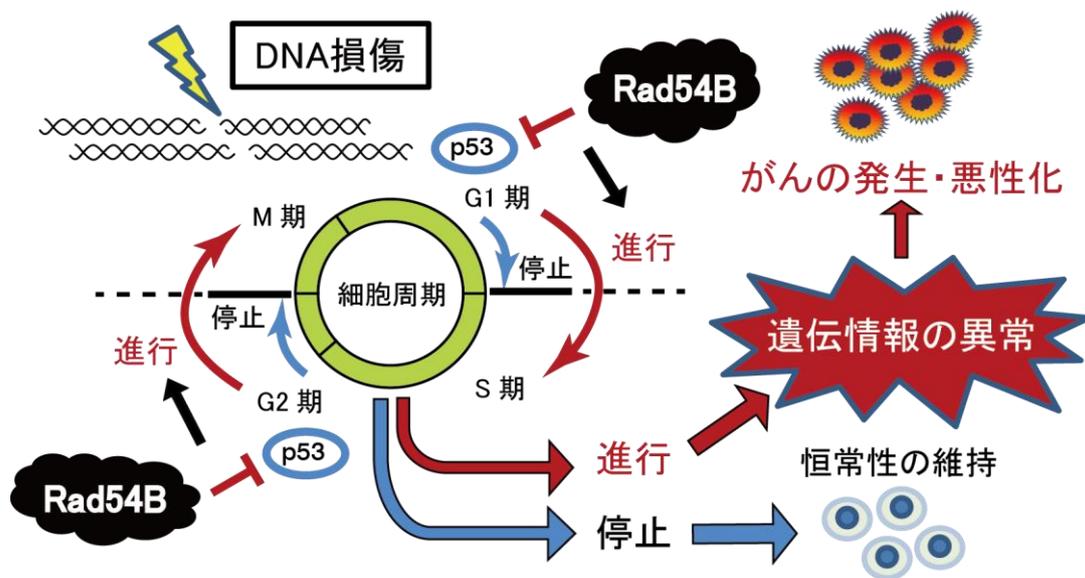


図 4 7 : Rad54B によるがん発生・悪性化過程の制御

## 第六章 引用文献

1. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078 (2009).
2. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439 (2000).
3. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-456 (1991).
4. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16 (1992).
5. Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* **13**, 951-961 (2006).
6. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672 (1996).
7. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* **77**, 81-137 (2000).

8. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**, 543-546 (1992).
9. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997).
10. Tanimura S, Ohtsuka S, Mitsui K, Shirouzu K, Yoshimura A, Ohtsubo M. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett* **447**, 5-9 (1999).
11. Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Muller S, Scheffner M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 12009-12014 (2003).
12. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-206 (1995).
13. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206-208 (1995).

14. Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, Yan W, Reinke V, Jochemsen AG, Lozano G. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* **29**, 92-95 (2001).
15. Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* **13**, 927-934 (2006).
16. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* **26**, 3453-3459 (1998).
17. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* **47**, 497-510 (2012).
18. Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 2164-2173 (1996).
19. Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR. Yeast DNA ligase IV mediates

- non-homologous DNA end joining. *Nature* **388**, 495-498 (1997).
20. Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J* **21**, 2207-2219 (2002).
  21. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1039-1056 (2009).
  22. Ryan DP, Owen-Hughes T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 649-656 (2011).
  23. Ceballos SJ, Heyer WD. Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim Biophys Acta* **1809**, 509-523 (2011).
  24. Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, *et al.* Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene* **18**, 3422-3426 (1999).

25. Durr H, Korner C, Muller M, Hickmann V, Hopfner KP. X-ray structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF2 ATPase core and its complex with DNA. *Cell* **121**, 363-373 (2005).
26. Thoma NH, Czyzewski BK, Alexeev AA, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Pavletich NP. Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 350-356 (2005).
27. Tanaka K, Kagawa W, Kinebuchi T, Kurumizaka H, Miyagawa K. Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic Acids Res* **30**, 1346-1353 (2002).
28. Kanaar R, Troelstra C, Swagemakers SM, Essers J, Smit B, Franssen JH, Pastink A, Bezzubova OY, Buerstedde JM, Clever B, *et al.* Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr Biol* **6**, 828-838 (1996).
29. Essers J, Hendriks RW, Swagemakers SM, Troelstra C, de Wit J, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **89**, 195-204 (1997).

30. Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* **9**, 325-328 (1999).
31. Miyagawa K, Tsuruga T, Kinomura A, Usui K, Katsura M, Tashiro S, Mishima H, Tanaka K. A role for RAD54B in homologous recombination in human cells. *EMBO J* **21**, 175-180 (2002).
32. Wesoly J, Agarwal S, Sigurdsson S, Bussen W, Van Komen S, Qin J, van Steeg H, van Benthem J, Wassenaar E, Baarends WM, *et al.* Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. *Mol Cell Biol* **26**, 976-989 (2006).
33. Yasuhara T, Suzuki T, Katsura M, Miyagawa K. Rad54B serves as a scaffold in the DNA damage response that limits checkpoint strength. *Nat Commun* **5**, 5426 (2014).
34. Tanaka K, Hiramoto T, Fukuda T, Miyagawa K. A novel human rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51. *J Biol Chem* **275**, 26316-26321 (2000).
35. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, Pawitan Y, Hall P,

- Klaar S, Liu ET, *et al.* An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13550-13555 (2005).
36. Agarwal S, van Cappellen WA, Guénolé A, Eppink B, Linsen SEV, Meijering E, Houtsmuller A, Kanaar R, Essers J. ATP-dependent and independent functions of Rad54 in genome maintenance. *The Journal of Cell Biology* **192**, 735-750 (2011).
37. Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**, 1097-1106 (1997).
38. Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* **117**, 575-588 (2004).
39. Syljuasen RG, Jensen S, Bartek J, Lukas J. Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res* **66**, 10253-10257 (2006).
40. Toscano F, Parmentier B, Fajoui ZE, Estornes Y, Chayvialle JA, Saurin JC,

- Abello J. p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* **74**, 392-406 (2007).
41. Moran DM, Gawlak G, Jayaprakash MS, Mayar S, Maki CG. Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells. *Oncogene* **27**, 5567-5577 (2008).
42. Kracikova M, Akiri G, George A, Sachidanandam R, Aaronson SA. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ* **20**, 576-588 (2013).
43. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* **127**, 1323-1334 (2006).
44. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660 (2007).
45. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**, 661-665 (2007).

46. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 223-241 (2009).
47. Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, Heil F, Rueger R, Graves B, Ding M, *et al.* Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol* **13**, 1133-1140 (2012).
48. Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 83-96 (2013).
49. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* **21**, 6225-6235 (2002).

## 第七章 謝辞

本研究において、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター放射線分子医学部門の宮川清教授に深く感謝いたします。また、その他多くのご協力を頂きました同教室員の方々、共同で研究を推進して下さった帝京大学の鈴木崇彦教授、アイソトープ総合センターの桂真理先生に心より感謝いたします。平成二十四年に乳がんで他界した母、安原富美子にこの論文を捧げます。