

ほ乳類細胞における DNA 二本鎖切断修復と、 p53 によるゲノム安定化機構

本間 正充*

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Double strand breaks DNA repair in mammalian cells and maintenance of genomic integrity mediated by p53

Masamitsu Honma

National Institute of Health Sciences, Division of Genetics and Mutagenesis
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Chromosomal double strand breaks (DSBs) occurring in mammalian cells can initiate genomic instability. They are usually repaired through either of two pathways : end-joining (EJ) or homologous recombination (HR), and their misrepairs result in deletion, amplification, and translocation, which are common in human tumors. The tumor suppressor protein p53 is involved in maintaining genomic stability. We demonstrate here that the deficiency of wild-type p53 protein may allow unrepaired DSB to initiate chromosomal instability, and mutant-type p53 protein promotes illegitimate recombination leading to translocation. These results support a model in which p53 protein contributes to the maintenance of genomic integrity through recombinational repair. We also developed a system to trace the fate of DSBs occurring in a single copy gene of human genome using restriction endonuclease *I-SceI*. DSBs at the *I-SceI* site were repaired 100 times more frequently by EJ than HR. This system should be useful for understanding of mechanisms of DSB repair as well as serving as a model for DNA damage induced by low-dose irradiation.

Keywords : genomic instability, p53, double-strand break (DSB), end-joining (EJ), homologous recombination (HR)

結 言

生物はあらゆる種類の DNA 損傷に対抗するため、さまざまな修復経路を進化させてきた。ヒトにおけるそれら修復経路の異常は、遺伝子突然変異を起因とする遺伝病やがんなどを引き起こすことが知られており、その修復経路の恒常性の維持はゲノム安定化の中心的役割をも

つものと考えられる。多くの DNA 損傷の中で DNA の二本鎖切断 (double strand break ; DSB) は、もっとも危険性が高いように思われる (Khanna and Jackson, 2001)。電離放射線等によってはほ乳類細胞の染色体上に誘発された DSB は、主として End-Joining (EJ)、または相同組換え (Homologous Recombination ; HR) によって修復される (Harber, 2000 ; van Gent et al., 2001)。HR はエラーフリー型の修復機構で、基本的に染色体の構造変化や、遺伝情報の消失を伴わない。一方、EJ は必ず染色体の部分欠失や転座をもたらすエラー発生型の修復機構

* E-mail : honma@nihs.go.jp

受付 : 2002 年 10 月 3 日 受理 : 2002 年 10 月 3 日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第 13 回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」で発表された。
This paper was presented at the 13th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 25th, 2002. The symposium entitled "Environmental Mutagens and Genomic Instability", was organized by Minako Nagao and Hitoshi Nakagama and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

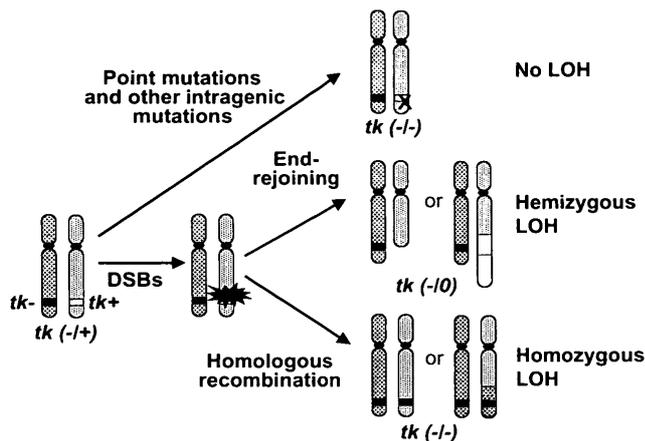


Fig. 1 A general model of recessive mutations in the *tk* locus. The human *tk* gene is located on chromosome 17q and is heterozygous (*tk*^{-/+}) in TK6 cells. DSBs occurring within or near the functional *tk* locus are usually repaired by either of two pathways: end-rejoining (EJ) or homologous recombination (HR). EJ brings about hemizygous LOH, accompanied by interstitial deletions or translocations, while HR brings about homozygous LOH, but no apparent changes in chromosome structure.

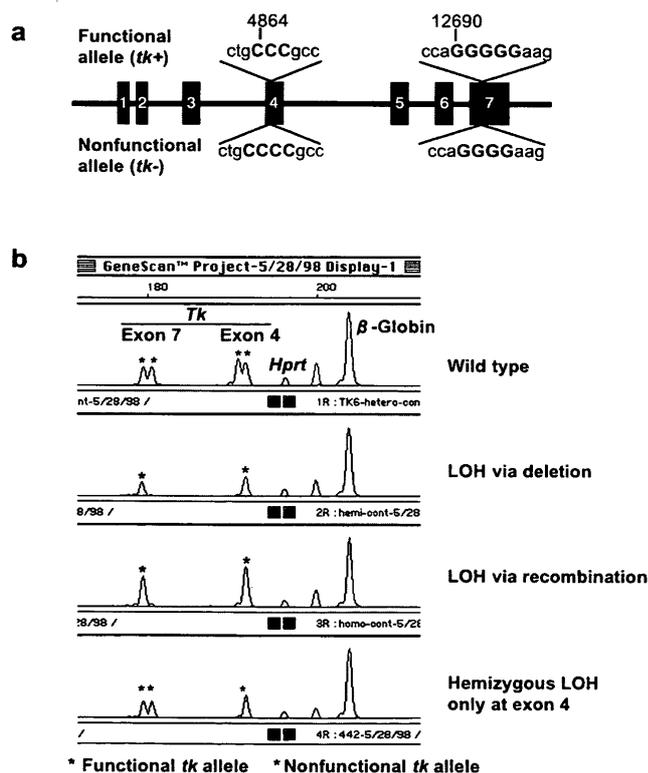


Fig. 2 Mutations at the heterozygous *tk* locus. (a) Schematic diagram of the *tk* locus and location of frame-shift dimorphism in TK6 cells. (b) Representative examples of LOH in TK-deficient mutants analyzed with an ABI 310 genetic analyzer. The mutants lacking peaks corresponding to functional alleles should have LOH, becoming either hemizygous or homozygous for the nonfunctional allele; these can be distinguished by comparing the ratio of the peak area of the nonfunctional *tk* allele.

である。一般的にHRはバクテリアや酵母などの下等生物での主たる修復機構であり、ほ乳類細胞においては、DSBの大部分はEJによって修復されると考えられている (Lin et al., 1999; Tremblay et al., 2000)。しかしながら、その正確な寄与率に関しては明らかではない。このような基本的なDSB修復経路に関する研究については、本稿の最後に述べる。

近年、DSB修復に関する理解が高まり、修復のメカニズムやそれに関与するタンパクの役割などが解明されつつある。詳しくは他の総説に譲るが (Jeggo, 1998; Pierce et al., 2001; Jackson, 2002), ATM, H2AX, p53などの分子はDNA損傷を認識し、その後、切断部位においてRad50-NBS1-MRE11複合体が形成される。EJによって修復される場合はKu70, Ku80, DNA-PK, Xrcc4, DNAリガーゼなどが働き、HRによって修復される場合はRad51を中心とするそのパラログの複合体がその役割を担っていると考えられている。このように非常に多くの分子がDSB修復に関与し、ゲノムの安定化に寄与していると考えられているが、その破綻と発がんとの関係は明らかではない。そもそも、DNA修復の破綻による遺伝的不安定には2つのタイプがあり、1つは修復機能の欠損により細胞が致死性、もしくはDNA損傷に対して感受性となるタイプ、もう一方は修復機能の不完全性のため突然変異を誘発する、いわゆる mutator phenotypeを示すタイプである。DSBに関与する上記タンパクを欠損する細胞の多くは前者のタイプを示すため、発がんには直接繋がらないものと考えられる。一方、後者の例としてはp53の異常があげられ (Livingstone et al., 1992; Lu and Lane, 1993)、また、DSB修復以外にはミスマッチ修復系の破綻などが知られている (Reitmair et al., 1997)。これら遺伝子の異常は実際に大腸がんを始めとする多くのヒトがん組織で観察されることから発がん性との関係は強い。本稿では遺伝的不安定を後者のタイプに定義し、主にp53変異、もしくは欠損細胞がもたらす mutator phenotypeの特徴と発がんとの関係について、我々の研究結果をもとに述べる。

1. DSB二本鎖切断モデルとしてのTK遺伝子突然変異

染色体ゲノムにおけるDSB修復機構を解析するためのモデル系としては、常染色体上の劣性型遺伝子突然変異を利用した系が有用である (Liber et al., 1989)。ヒトリンパ芽球細胞株TK6は17番染色体長腕上に存在するthymidine kinase 遺伝子 (*tk*) をヘテロにもつため (*tk*^{+/-})、この*tk*⁺アレルをターゲットとした遺伝子突然変異の検出が可能である (Fig.1)。TK欠損の変異細胞はトリフルオロチミジン (TFT) 抵抗性細胞として回収できるが、*tk*⁺アレルにDSBが生じ、それがEJ、もしくは相同染色体間のHRによって修復されると、活性型*tk*

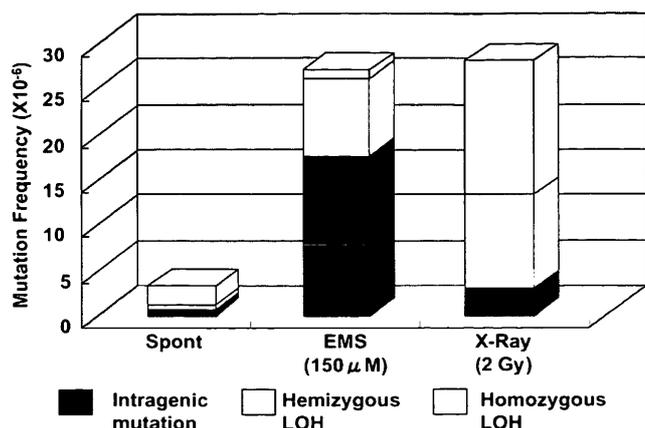


Fig. 3 Mutation frequencies and spectra of the mutations spontaneously occurring and induced by EMS (150 μ M) and X-ray (2 Gy) at the *tk* locus in TK6 cells. The mutations are classified into 3 types; intragenic mutations, hemizygous LOH, and homozygous LOH.

アレルが消失した変異体、いわゆる LOH (loss of heterozygosity) 型の突然変異体をもたらす (Yandell et al., 1986). この場合、EJ によって活性アレルの欠失が生じた場合はヘミ型 LOH、HR によって不活化アレルがホモになった場合はホモ型 LOH となる。これら LOH 解析は *tk* 遺伝子内に存在する多型性部位を利用することで可能である。TK6 細胞の *tk* 遺伝子の exon4 と 7 にはフレームシフト型の突然変異が存在する (exon4 のフレームシフトが *tk* 不活化の原因) (Giver et al., 1995) (Fig. 2a). この領域を PCR で増幅し、DNA シークエンサーによりフラグメント解析することにより、両アレルを区別でき LOH を容易に判定できる (Fig. 2b). また、PCR を定量化することにより、ヘミ型とホモ型を区別することもできる。

Fig. 3 に TK6 細胞の自然および、EMS (150 μ M)、X 線 (2Gy) 誘発 *tk* 遺伝子突然変異のスペクトルを示す。自然誘発に関しては、全体の突然変異の 20% が点突然変異で、残り 80% が LOH であり、その大部分が HR に起因していた (Honma et al., 1997a). 一方、EMS はアルキル化剤であるため、変異のほとんどは LOH を伴わない点突然変異が主であり、X 線では誘発される変異の大部分は DSB に由来するため LOH 型の変異が多い。興味深いことに X 線による損傷でもその多くはホモ型の LOH をもたらす。このことは、ほ乳類細胞においても DSB の修復に、HR が重要な役割をはたしていることを示すものである。ただし、この結果から単純にヒト細胞での突然変異は DSB に由来する損傷が主であり、その多くは HR によって修復されるといえることはできない。突然変異スペクトルと突然変異メカニズムとの関係については後述するが、常染色体性劣性型突然変異検出系では HR によって LOH を引き起こす DSB は必ずしも *tk* 遺伝子内に生じる必要がなく、組換え型 LOH が検出

しやすい系であることを理解しておく必要がある。しかしながら、癌抑制遺伝子である Rb や p53 のヒトがん組織での LOH 頻度や、その機構はここで観察されたものと一致しており、本検出系は DSB 修復のモデル系であると同時に、細胞のがん化過程における遺伝子変化のモデルであることは確かである (Li et al., 1992). LOH は EJ もしくは HR 以外に、遺伝子変換、非相同型組換え、染色体不分離等のメカニズムによっても起こりうる。これらメカニズムは染色体や、*tk* 近傍の遺伝マーカー等を解析することにより分類することができる (Honma et al., 2001). LOH 発生のメカニズムを解明することは、ヒト細胞における DSB 修復機構だけでなく、細胞癌化を制御する因子の解明にもつながるものと考えられる。

2. p53 による遺伝的安定化機構

がん抑制遺伝子である p53 はヒトがん組織において最も高頻度に変異が観察される遺伝子であり (Hollstein et al., 1991), その役割として、損傷した DNA を認識し、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導を行うことにより損傷を受け細胞を排除し、ゲノムの安定化に寄与していると考えられている (Kastan et al., 1991; Ko et al., 1996). しかしながら、これら機構の破綻だけでは p53 変異細胞のもつ遺伝的不安定性やがん細胞としての特性を完全に説明することはできないため、DNA 修復機構への関与も指摘されている。

我々は、p53 が関与する DNA 修復機構と、p53 の異常によってもたらされる遺伝的不安定性の特徴を明らかにするため、p53 欠損細胞、もしくは変異細胞を用い、そこで生じる遺伝子突然変異頻度や特徴を p53 正常細胞と比較した。TK6 細胞は p53 正常細胞であるが、TK6 と同一起源をもつ isogenic 細胞である WTK-1 細胞は p53 遺伝子のコドン 237 にホモに突然変異をもつ p53 変異細胞である。また、TK6 細胞にヒトパピローマウイルスの E6 タンパクを発現させた TK6-E6 細胞、およびベクターのみを導入した TK6-20C 細胞が樹立されている。E6 タンパクは野生型 p53 タンパクと結合しすみやかに分解するため、TK6-E6 細胞は機能的に p53 を欠損している (Yu et al., 1997). したがって、WTK-1、TK6-E6 細胞は TK6 と遺伝的バックグラウンドを共通とする p53 変異、欠損細胞と見なすことができる。Table1 に各細胞の *hprt*, *tk* 遺伝子座における自然突然変異頻度を示す。Tk 遺伝子座における WTK-1、TK6-E6 細胞での突然変異頻度は p53 正常細胞である TK6 細胞に比べて、それぞれ 30 倍、10 倍高く、p53 変異、欠損細胞とも遺伝的に不安定であり、mutator phenotype を示すことが示唆された。

p53 を欠損する TK6-E6 細胞で生じる突然変異の特徴を明らかにするため *tk* 変異体の LOH 解析を行ったところ、p53 正常細胞である TK6 では生じる変異の大部分がホモ型の LOH だったのに対して、TK6-E6 ではそのほと

Table 1 Spontaneous mutation frequencies of TK6 and related cell lines

Cell lines	p53 status	Mutation frequency ($\times 10^6$; mean \pm SD)	
		HPRT	TK
TK6	Wild-type	2.1 \pm 2.0	3.3 \pm 1.1
WTK-1	Mutant	17.4 \pm 5.9	101.1 \pm 6.8
TK6-E6	Deficient	2.3 \pm 1.8	33.5 \pm 9.8
TK6-20C	Wild-type	3.8 \pm 4.0	3.8 \pm 1.0

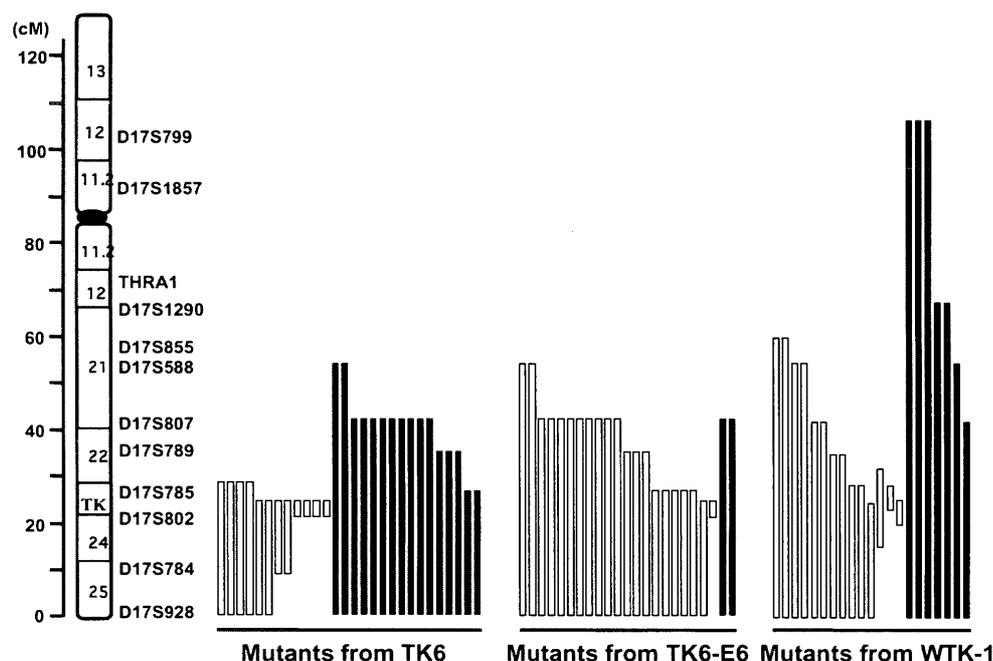


Fig. 4 Extent of loss of heterozygosity (LOH) in the TK-deficient mutants from TK6, TK6-E6 and WTK-1 cells. Twelve microsatellite loci on chromosome 17 that are heteromorphic in these cell lines were examined. The approximate position of each locus is mapped on the right of the schematic chromosome 17. The human *tk* locus is mapped on 17q23.2. Open and closed bars represent hemizygous LOH and homozygous LOH mutants, respectively. Length of bars indicates the extent of LOH.

んどがヘミ型 LOH を示した。このことは TK6-E6 細胞では HR が起こらないため DSB の大部分は EJ によって修復されることを示している。この LOH の範囲をマイクロサテライトマーカーを用いて 17 番染色体上にマッピングした (Fig. 4)。p53 正常細胞 (TK6) 由来の欠失型 LOH のほとんどは *tk* 遺伝子に局限する interstitial deletion か、*tk* より末端までの terminal deletion であり、染色体の変化が最小限となっているのに対して、p53 欠損細胞 (TK6-E6) のほとんどの変異体には、染色体広範にわたる terminal deletion が起きていた。また、このような広範な LOH は p53 正常細胞ではすべて組換え型 LOH として観察されることから、本来 HR によって修復されるべき DSB が、p53 欠損細胞では EJ によって修復され、その結果、大きな染色体異常をもたらしているものと考えられた。実際、TK6-E6 由来の LOH 変異体をクロモゾームペイント法により解析すると、17 番染色体

の部分欠失、転座、増幅等の構造異常が同一クローン中にモザイクとして観察された。このような染色体異常は、G2 期において切断された染色分体間の自己融合 (chromatid fusion) が原因と考えられる。chromatid fusion は、一時的には安定であるが、細胞分裂を迎えると引きちぎられ、再び 2 本鎖切断が生じる。そしてこれが DNA 複製を経て、再び chromatid fusion が繰り返される、いわゆる Breakage-Fusion-Bridge (BFB) cycle を引き起こす (Coquelle et al., 1997; Pipiras et al., 1998)。このように、p53 欠損細胞が遺伝的に不安定である、その要因は、すみやかに修復されない DSB であり、これが BFB サイクルの引き金となって、種々の染色体異常を引き起こすものと考えられる (Honma et al., 2000)。

一方、p53 変異細胞である WTK-1 に由来する *tk* 変異体を解析すると、ヘミ型だけでなく、ホモ型の LOH の頻度も増加していた。このことから WTK-1 細胞では

Table 2 Yield of spontaneous mutation frequencies at *tk* locus in TK6 cells

Type of mutation	Target size (kb)	Mutat. Freq. ($\times 10^{-6}$)	Mutat. Freq./kb ($\times 10^{-8}$)
Intragenic mutation (including small interstitial deletion)	11	1.17	10.65 (1805)
Recombinational LOH	35,000	2.01	0.0059 (1)
Gene Conversion	11	0.06	0.51 (86)

TK6-E6細胞と異なり、組換え修復能は保持されているものと考えられた (Honma et al., 1997a). LOH 変異体の染色体を解析すると (Fig. 4), 組換え型と思われた変異体の染色体には転座を伴うものが多く、その転座は変異体にクローナルに観察されたことから WTK-1 細胞では組換え修復は起こるが、その fidelity が低いために非相同 (illegitimate) 性の組換えにより、他の染色体部位との転座を誘発するものと考えられた (Honma et al., 1997b). また、WTK-1 細胞では染色体不分離による aneuploid も高頻度に観察され、変異型 p53 は組換え修復の異常に伴う染色体の構造的変異をもたらすだけでなく、細胞分裂や染色体分離機構にも影響を与え、染色体の数的異常も導くものと考えられた (Cross et al., 1995; Fukasawa et al., 1996; Honma et al., 2001).

以上のことから p53 による遺伝的安定化機構として、ゲノム中に生じた DSB の相同組換え修復への関与を提唱する。p53 欠損細胞ではこの相同組換えがすみやかに働かないため、修復を免れた DSB は BFB サイクルを介して転座、欠失、増幅等のさまざまな染色体異常をもたらす (Livingstone et al., 1992; Agapova et al., 1996). また、p53 変異細胞では組換え修復能は保持されているものの、その正確さが低いため逆に染色体転座を誘発する。このように p53 の欠損、もしくは異常による遺伝的不安定性は点突然変異のような小さな遺伝子変異よりも染色体レベルの大きなゲノム変化に関与している。多段階発癌過程におけるゲノム変化を考えると、p53 の異常は、相同、非相同性の組換えを介して、ゲノム中に LOH 型の突然変異や染色体異常の蓄積を促しているものと考えられる。

3. I-SceI 発現系を利用したほ乳類細胞における DSB 修復機構

Tk 遺伝子における突然変異スペクトルの結果からヒト細胞で起こる突然変異の大部分は DSB に由来し、その多くは HR により LOH をもたらすことが示唆された。しかしながらこの結果は、これまでの遺伝子突然変異研究で常識とされてきた突然変異の大部分は外来性の変異原や、DNA の複製、修復のエラーによって生じる点が突然変異が主であるということと矛盾するものである。また、冒頭でも述べたが、DSB の修復においても、ほ乳類細胞において EJ と HR のどちらが優先的に働くのか

という問題に関してもこれまでの多くの研究結果と相反するものである。この問題を理解するためには突然変異スペクトルと、突然変異のメカニズムの関係を正しく認識する必要がある。突然変異スペクトルは必ずしもゲノム中で起こるすべての突然変異のイベントを正確に反映するものではなく、その突然変異検出系に強く依存する。たとえば、*hprt* や、トランスジェニックマウスの *LacZ* 遺伝子などをターゲットとした突然変異検出系では HR や、大きな遺伝子の欠失を伴う EJ を検出することはできず、その変異はもっぱら点突然変異が対象となるため、当然バイアスが生じる (Ikehata and Ono, 2001). 同様に、*tk* 遺伝子突然変異検出系でもそのスペクトルにはバイアスが存在する。この系は点突然変異だけでなく、EJ や HR による LOH 型突然変異を検出できることが最大の特徴であるが、点突然変異は *tk* 遺伝子内の損傷を対象とするのに対して、LOH は 17 番染色体上のかかなりの部分で生じる DNA 損傷から由来することが Fig.4 から理解される。また、LOH でも EJ 型と HR 型ではその範囲はかなり異なる。このことは、Fig.3 で示したスペクトルにおける各イベントの突然変異のターゲットサイズが違うことを示しており、これを大まかにターゲットサイズ当たりで補正すると、点突然変異の方が圧倒的に頻度が高くなり、これまでの常識と矛盾がない (Table 2). このように突然変異スペクトルから、突然変異のメカニズムを論じるにはきわめて注意が必要である。

DSB の修復メカニズムを細胞レベルで理解するために、放射線のような外来性の変異原によりゲノム中にランダムに DSB を発生させて、特定の遺伝マーカーの変異スペクトルをレトロスペクティブに解析しても上記の理由からあまり意味はない。一つの DSB のたどる運命を完全にトレースすることができてこそ、この目的は達成される。我々は、DSB の発生モデルとして制限酵素 I-SceI に注目している。I-SceI は出芽酵母のミトコンドリア DNA にコードされている酵素で、その認識部位は 18bp の非パリンδροーム構造をもつ (Jasin, 1996). ヒトゲノム中にはこの配列は 1 つも存在しないため、この DNA 配列を特定のゲノム部位に挿入し、I-SceI 酵素を発現させることにより、その部位に確実に DSB を発生させることができる (Taghian and Nickoloff, 1997). 我々はこの I-SceI 部位を、TK6 細胞の *tk* 遺伝子内にジーンターゲット法により挿入することに成功し、この部

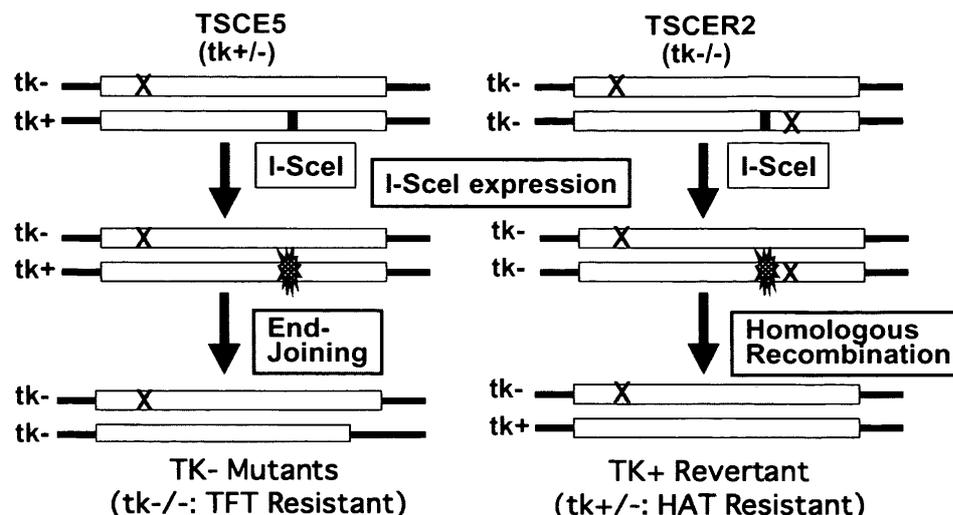


Fig. 5 Schematic representation of the experimental system to detect EJ and HR. Open and closed rectangles represent the wild and mutant type of the *tk* gene, respectively. When a DSB occurring at the I-SceI site is repaired by EJ and causes a deletion, TK-deficient mutants are isolated from TSCE5 cells in TFT medium. When HR repairs it, on the other hand, TK-proficient revertants are generated from TSCER2 cells under HAT selection.

位に生じたDSBの運命を定性、定量的に解析できる系を確立した。*Tk*ヘテロのTSCE5細胞ではI-SceI部位で生じたDSBがEJによって修復されると*tk*遺伝子の一部が欠失し、細胞は*tk* (-/-)の変異体として回収される。一方、コンパウンドヘテロに変異をもつ*tk* (-/-)のTSCER2細胞では、生じたDSBが染色体間のHRによって修復されると*tk* (-/+)のリバートンとなる (Fig. 5)。これら細胞にI-SceIの発現ベクターをトランスフェクションすると、変異体、リバートンの出現頻度はそれぞれ40倍、100倍増加した。このことはDSBが直接EJおよびHRを誘発することを示している。しかしながら、両者の絶対頻度はEJの方がHRの約100倍高く、このことはDSBの99%以上はEJによって修復されることを示している。本系はヒトゲノム中で生じたDSBの運命を公正にトレースすることができるため、DSB修復のメカニズムや、その関与するさまざまな生体内因子の研究に利用されることが期待できる (Honma et al., 投稿中)。

おわりに

ここ最近、DSBの修復に関する研究分野は大きく進歩し、ほ乳類細胞におけるDSBの認識から修復に至る一連のカスケードと、それに関与するタンパク因子の役割についてはほぼ解明されつつある。しかしながら、DSB修復の基本的な生物学的役割については不明な点が多い。どのような場合DSBは修復され、また、修復されずその細胞はアポトーシスによって排除されるのか？ 修復される場合、なぜ、エラー発生型のEJが優先的に働くのであろうか？ これはゲノム安定性を考慮

すると生体にとって不利ではないのか？ また、EJとHRの修復経路はどのように使い分けられているのか？ それらは競合したり、互いに相補するのか？ EJやHR以外の修復機構 (たとえばsingle strand annealing) は、どの程度関与しているのか？ これら問題の解決には、従来の分子生物学的、生化学的手法だけでは困難のように思われる。今後、これらの問題を解明のために新しい細胞遺伝学的手法を用いたBreakthroughを目指したい。

参考文献

- Agapova, L., G. V. Ilyinskaya, N. A. Turovets, A. V. Ivanov, P. M. Chumakov, and B. P. Koptin (1996) Chromosome changes caused by alteration of p53 expression, *Mutat. Res.*, 354, 129-138.
- Coquelle, A., E. Pipiras, F. Toledo, G. Buttin, and M. Debatisse (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplifications, *Cell*, 89, 215-225.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzerda, W. H. Raskind, and B. J. Reid (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science*, 267, 1353-1356.
- Fukasawa, K., T. Choi, R. Kuriyama, S. Rulong, and G. F. V. Woude (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53, *Science*, 271, 1744-1747.
- Giver, C. R., S. L. Nelson Jr., M. Y. Cha, P. Pongsaenook, and A. J. Grosovsky (1995) Mutational spectrum of X-ray induced TK-human cell mutants, *Carcinogenesis*, 16, 267-275.
- Haber, J. E. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.*, 16, 259-264.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancer, *Science*, 253, 49-53.
- Honma, M., M. Hayashi, and T. Sofuni (1997a) Cytotoxic and mutagenic responses to X-ray and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, 374, 89-98.
- Honma, M., L.-S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N.

- Tanaka, and T. Sofuni (1997b) Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4774-4781.
- Honma, M., M. Momose, H. Tanabe, H. Sakamoto, Y. Yu, J. B. Little, T. Sofuni, and M. Hayashi (2000) Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosome integrity, *Mol. Carcinog.*, 28, 203-214.
- Honma, M., M. Momose, T. Sofuni, and M. Hayashi (2001) Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction, *Mutat. Res.*, 493, 101-104.
- Ikehata, H. and T. Ono (2001) In vivo mutation analysis with transgenic mouse (Japanese), *Prot. Nuc. Acid & Enz.*, 46, 1171-1180.
- Jackson, S. P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis*, 23, 687-696.
- Jasin, M (1996) Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases, *Trend Genet.*, 12, 224-228.
- Jeggo, P. A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.*, 150 (Suppl.), S80-S91.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, 51, 6304-6311.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001) DNA double-strand breaks : signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.*, 27, 247-254.
- Ko, L.J. and C. Prives (1996) p53 : puzzle and paradigm, *Gene & Devel.*, 10, 1054-1072.
- Li, C.-Y., D. W. Yandell, and J. B. Little (1992) Molecular mechanism of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18, 77-87.
- Liber, H. L., D. W. Yandell, and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells ; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus, *Mutat. Res.*, 216, 9-17.
- Lin, Y., T. Lukacsovich, and A. S. Waldman (1999) Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes, *Mol. Cell Biol.*, 19, 8353-8360.
- Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks, and T. D. Tlsty (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53, *Cell*, 70, 923-935.
- Lu, X., and P. Lane (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation : Defects in chromosome instability syndrome?, *Cell*, 93, 765-778.
- Pierce, A. J., J. M. Stark, F. D. Araujo, M. M. Moynahan, M. Berwick, and M. Jasin (2001) Double strand breaks and timorogenesis, *Trends in Cell Biol.*, 11, S52-S59.
- Pipiras, E., A. Coquelle, A. Bieth, and M. Debatisse (1998) Interstitial deletions and interchromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome, *The EMBO J.*, 17, 325-333.
- Reitmair, A. H., R. Risley, R. G. Bristow, T. Wilson, A. Ganesh, A. Jang, J. Peacock, S. Benchimol, R. P. Hill, T. W. Mak, R. Fishel, and M. Meuth (1997) Mutator phenotype in Msh2-deficient murine embryonic fibroblasts, *Cancer Res.*, 57, 3765-3771.
- Taghian, D. G. and J. A. Nickoloff (1997) Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells, *Mol. Cell Biol.*, 17, 6386-6393.
- Tremblay, A., M. Jasin, and P. Chartrand (2000) A double strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells, *Mol. Cell Bio.*, 20, 54-60.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat. Rev. Genet.*, 2, 196-206.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja, and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12, 255-263.
- Yu, Y., C.-Y. Li, and J. B. Little (1997) Abrogation of p53 function by HPV 16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells, *Oncogene*, 14, 1661-1667.