

2重鎖切断修復機構としての相同組換え

花田 克浩

はじめに

相同組換えは、相同な配列を持つ二つの領域で生じる核酸の再編成と定義される生命現象であるが、その生物学的な役割はかなり幅広い。相同組換えは、DNAの二つの鎖が両方とも切断してしまった2重鎖切断を修復するほか、DNAダメージなどで中断したDNA複製の再開始、1本鎖DNA領域の修復、原核生物では接合による遺伝子交換、真核生物の場合は減数分裂期組換えなど、「DNA修復」や「DNA配列の多様性獲得」に関連する生命現象に幅広く関わっている^{1,2)}。このように多種多様な生命現象に関わっているため、各現象の分子メカニズムも異なり、研究の歴史が長い割には解明されていない部分が多い。本稿では比較的分子メカニズムが解明されている2重鎖切断修復に関して、大腸菌（原核生物モデル）の知見と、出芽酵母（真核生物モデル）や哺乳類細胞の知見を紹介したい。

相同組換えとゲノム解析の歴史

相同組換え研究の歴史は、分子生物学領域で研究されている生命現象の中でも長い方であり、1920年代にはすでに、メンデルの法則に該当しない遺伝現象を説明するメカニズムとして、「遺伝子組換え」が議論されている。当時は、「遺伝子の正体って何？」というテーマがもっとも関心を集めていた研究領域だったらしく、タンパク質と核酸のどちらが「遺伝」を担当しているのか、盛んに研究されていた時代だったそうである。そのような時代背景においても、自らの研究を基に『遺伝子組換え』という当時としては奇抜な概念を提唱していた当時の生物学者に、私個人は畏敬の念を抱いている。とはいえ、遺伝子の正体さえ分かっていない時代であるから、遺伝学的解析は「顕微鏡で見える範囲の遺伝子座位」と「表現型」が唯一の手がかりがあった。原核生物（大腸菌）では、接合で伝達される遺伝因子で相同組換えにより染色体と置換されるHfr (high frequency recombination) というF-因子が、接合後の何分で染色体の遺伝子と置換されるかという指標で染色体マッピングが行われた。大腸菌では全ゲノムを100分とし、相同組換えの頻度を

指標したマッピング (linkage mapping) が行われた³⁾。同様に、真核生物でも同一染色体上の二つの遺伝子に関して相同組換えの頻度を指標にマッピングが行われた。同一染色体上の二つの遺伝子が揃って遺伝する確率が0となる場合（平均1回の交叉が起こる距離）を1モルガンと定義し、その1/100の確率となる遺伝子距離（1センチモルガン：cM）を評価の基軸とした。このような染色体マッピング法は、ワトソンらによりDNAの構造が解明された後もしばらく継続され、分子遺伝学の発展に寄与してきた。

その後、DNA配列読取技術とコンピューターでのゲノム解析手法の飛躍的進歩により、このような古典的染色体マッピング法はあまり利用されなくなった。現在ではゲノム配列を基にした染色体マッピングが主流である。相同組換えは分子遺伝学の発展に多く貢献してきた経歴があり、そのメカニズムに関しても多くの研究者に注目されている。

2重鎖切断修復機構としての相同組換え

相同組換えは、相同鎖検索の鋳型となる1本鎖DNA領域の出現が必須条件である。しかし、単純な1本鎖DNA領域を修復するだけならDNAポリメラーゼとDNAリガーゼのみで十分であるため、相同組換えの関

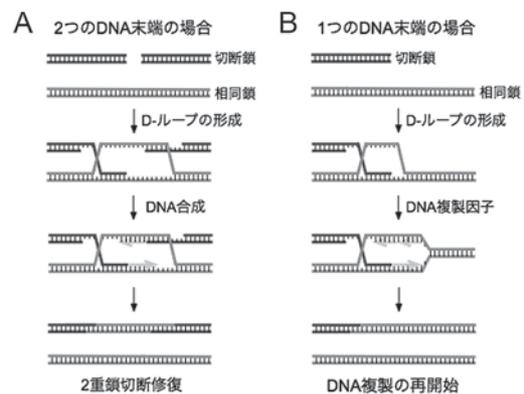


図1. 相同組換えによる2重鎖切断修復。(A) 二つのDNA末端を生じた場合、相同組換えは末端の再結合を実行する。(B) 一つのDNA末端が存在する場合、相同組換えの中間体からDNA複製再開始が起きる。

与は非常に限定的である。一方、DNAに2重鎖切断が起きてしまった場合は、相同組換えの機能が非常に重要となる。染色体が切断されたままの状態では細胞分裂に突入すると、切断された染色体断片は均等に娘細胞へ染色体分配されるとは限らないので、細胞分裂により遺伝情報を失ってしまう危険性が高くなる。それを回避するために、相同組換えはその2重鎖切断を修復する。相同組換えによる修復は、2重鎖切断の種類によってその機構が異なる(図1)。DNA切断により二つのDNA末端が形成された場合、相同組換えの役割は二つのDNA末端を相同な遺伝子領域を利用して再結合させることである(図1A)⁴⁾。まず、DNA末端が処理され、組換え酵素の機能により切断鎖が相同鎖の相補鎖に会合する。これにより、相補鎖を鋳型としたDNAの再合成が可能となり、2重鎖切断により失われた遺伝子情報を再構成することができる(図1A)。

一方、DNA切断の結果として、一つのDNA末端のみを生じた場合、相同組換えは組換え中間体構造からDNA複製開始させるという役割を担う(図1B)⁴⁾。一つのDNA末端しか存在しないので、D-ループ構造を介した末端同士の再結合は不可能である。しかし、原核生物

ではD-ループにRNAプライマーゼを呼び込む機構が存在するために、D-ループに完全なDNA複製フォークの再構成することが可能となる。一方、真核生物ではこの機構に関する詳細なメカニズムは明らかになっていない。したがって、本稿では原核生物の知見のみを紹介する。

大腸菌における相同組換えを介した2重鎖切断修復

二つのDNA末端の2重鎖切断修復 原核生物は基本的には単細胞生物なので、染色体が切断されたままの状態では細胞分裂を実行することは「死」を意味する。一方、DNAファージ感染など侵略者から自身のゲノム情報を守るゲノム防御システムも備えておかなければならない。その感染防御のために制限酵素でDNAを切断するが、その際に重要なことは侵入者のゲノムと自分のゲノムを区別して2重鎖切断を修復することである。自己ゲノム保護とファージ感染防御を両立させるために、原核生物は種固有の*Chi* (crossover hotspot instigator) 配列を持っており、*Chi*配列に依存した相同組換えを行うシステムを備えている¹⁾。DNA末端が存在すると、強力なヌクレアーゼ活性を持つRecBCDがDNAの分解を始める(図2A, RecBCD経路)。DNA末端の99%以

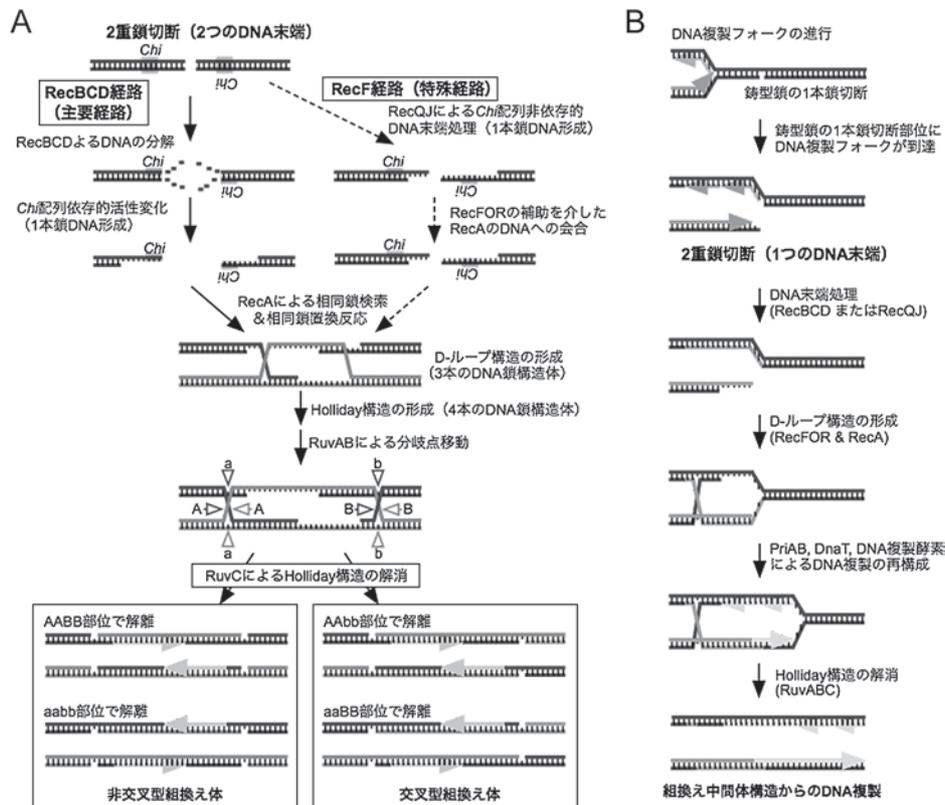


図2. 大腸菌における相同組換えのメカニズム。(A) 二つのDNA末端が存在する場合の2重鎖切断修復。(B) 一つのDNA末端が存在する場合の2重鎖切断修復。一つの末端のみで構成される2重鎖切断修復は通常、DNA複製領域で起きる。この場合、組換え中間体からDNA複製を開始させることを誘導する。

上はRecBCD経路で処理されることが知られており、RecBCDは不要なDNAを分解する酵素であると考えられている。この機能は、バクテリオファージやその他の外来遺伝因子からの感染防御に役立っている。RecBCDによるDNA分解は、自己ゲノム・外来ゲノムという区別はなく、すべての直鎖状DNAを標的にして作用する。しかし、自己ゲノムに関しては種固有の*Chi*配列を認識することで、分解を中断することができる(図2A, RecBCD経路)。RecBCDが種固有の*Chi*配列を認識すると、2重鎖の両方を分解するヌクレアーゼ活性(3'-5'ヌクレアーゼ活性と5'-3'ヌクレアーゼ活性)から、5'-3'ヌクレアーゼ活性のみへと変化する(図2A, RecBCD経路)。その活性変化の結果、自己ゲノムのみで3'末端を持つ1本鎖DNAが形成される(図2A, RecBCD経路)。

一方、RecBCDとは別にRecQJも2重鎖切断の末端処理を行うことができる(図2A, RecF経路)⁴⁾。RecQJはDNAの2本の鎖を両方とも分解するという活性はなく、RecQのDNA鎖巻き戻し反応とRecJの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性により、切断部位を末端とする1本鎖DNAを形成する(図2A, RecF経路)。RecQJは、通常、DNA複製の再開に関与する組換え経路で機能している。DNA複製の停止は、*Chi*配列に依存せず、染色体上のどこでも起きるので、再開機構も*Chi*配列に依存しない方が効率的である。RecQJが*Chi*配列に依存しないのも、この点に関連していると考えられている。実際、RecQJが2重鎖切断修復へ関与することは非常に稀であり(1%以下と推定)、RecQJによる2重鎖切断修復は、RecBCDが不活性化されている特殊な状況のみで活躍する。また、RecQJの活性はRecFと連動する性質を示すのでRecF経路の構成因子と認識されている。

このような末端処理機構で形成された1本鎖DNAは相同鎖検索の鋳型として利用される。1本鎖DNA領域にRecAが重合し、1本鎖DNA-RecA複合体が形成される^{1,4)}。この複合体が鋳型鎖(切断末端)となり、相同な配列を検索する。相同配列を発見できた場合、DNA鎖の交換反応を触媒する。この作用により、3本のDNA鎖で構成された分岐構造(D-ループ構造)を形成する。RecBCD経路ではRecBCDがRecAを1本鎖DNAへと誘導するため、RecAは効率よく1本鎖DNA上に会合することができる。一方、RecF経路では、RecQJにはRecAのDNA結合を補助する活性がないため、1本鎖DNAに対する結合能がRecAよりも強いSsb(1本鎖DNA結合タンパク質)がRecAより先にDNAに結合する。これを解消するためにRecFORが必要となってくる。RecFORは1本鎖DNAに結合しているSsbをRecAに置

換する働きを持っている(図2A, RecF経路)。

原核生物の場合、D-ループ構造は4本のDNA鎖で構成される分岐構造(Holliday構造)へ効率的に変換される(図2A)。Holliday構造は相同な配列間で分岐点を移動することができ、RuvABはこの分岐点移動を触媒する酵素である。Holliday構造が分岐点移動を行っている間、DNA末端領域ではDNA鎖の合成が起き、切断によって失われたゲノム情報は再構成される。最後に、Holliday構造はHolliday構造を特異的に解離させる酵素RuvCにより解離され、反応は終了する(図2A)。この解離に関して、AA-BBまたはaa-bb部位で解離が起きた場合、切断鎖と相同鎖が置換されることがない。この組換えを「非交叉型組換え」と呼ぶ(図2A)。一方、AA-bbまたはaa-BB部位での解離が起きた場合、切断鎖と相同鎖の外側領域が置換されてしまう。これを交叉型組換えと呼ぶ(図2A)。原核生物では、組換えに関して交叉型と非交叉型の割合比に関して偏りがないと考えられている。

一つのDNA末端の2重鎖切断修復 DNA切断が、DNA複製フォークの鋳型鎖で起きた場合、一つのDNA末端のみをもつ2重鎖切断が形成される。一つの末端のみで構成される2重鎖切断は、多くの場合、DNAの鋳型鎖に1本鎖切断が存在する領域にDNA複製フォークが到達した時に起きる(図2B)。当然ながらこの場合、再結合する相手は存在しない。したがって、一つの末端のみで構成される2重鎖切断に対する相同組換えのDNA修復機構としての役割は、末端の再結合ではなく、D-ループからDNA複製の再開を誘導することである(図2B)。DNA複製フォークの構成要素のうち、リーディング鎖のDNAポリメラーゼについては、D-ループに侵入した切断鎖をプライマーとすることで、DNA合成反応を再開することが可能である。しかし、ラギング鎖はDNA合成のためにRNAプライマー利用しているので、RNAプライマーゼを呼び込まない限りDNA複製を再開することは不可能である。この問題を解決する手段として、大腸菌では、PriA, PriB, DnaT(その他の因子としてPriC, DnaB, DnaC)がD-ループ領域に強く結合し、かつ、RNAプライマーゼを呼び込む活性を持っていることで、D-ループ領域にRNAプライマーゼを含んだラギング鎖の再構成を可能とする機構が存在することが明らかになっている(図2B)⁴⁾。この機能により、D-ループ領域にリーディング鎖とラギング鎖を持つ完全なDNA複製フォークの再構成が可能となり、DNA複製が再開される。

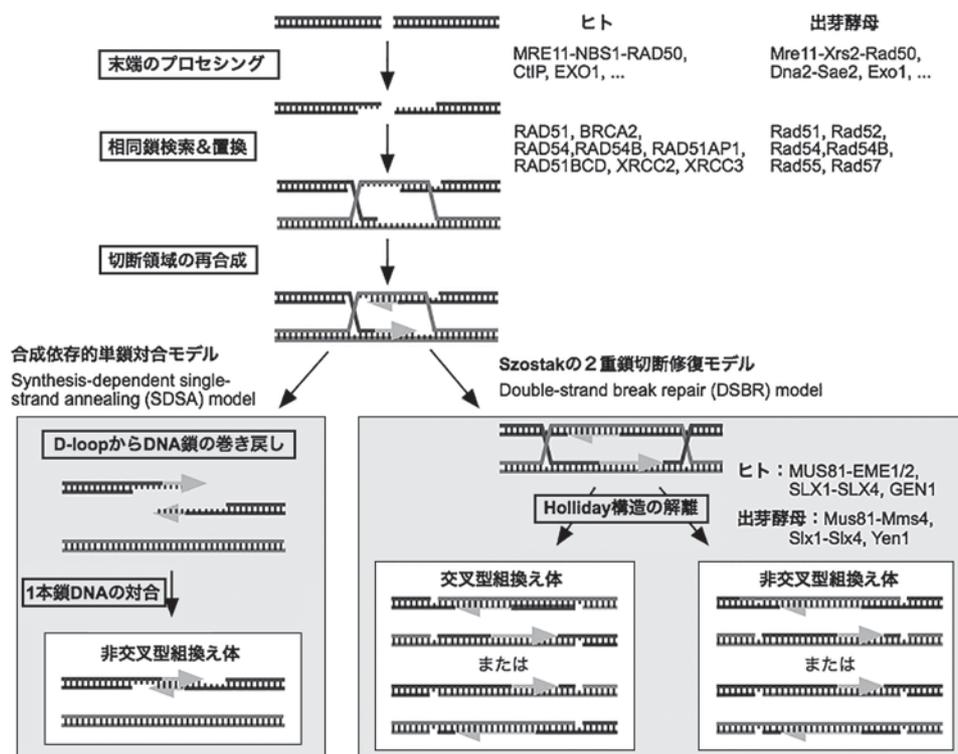


図3. 真核生物における相同組換えのメカニズム. 合成依存的単鎖対合モデルと2重鎖切断修復モデルの二つが存在し, 交叉型・非交叉型の制御を行っている.

真核生物の相同組換えのメカニズム

交叉型, 非交叉型組換え体 原核生物に比べ, 真核生物の相同組換えはかなり複雑である. 真核生物では, 二つの末端を持つ場合の修復機構は, 「相同組換え」と「非相同的末端連結 (non-homologous end-joining: NHEJ)」という二つの独立の経路が存在する⁴⁾. これらの経路選択が最初のステップとなるが, その経路選択のメカニズムに関しては本稿の趣旨と少し異なるので別の機会で紹介したい. 真核生物の相同組換えについて, 原核生物と異なる特徴は, 真核生物の体細胞期では交叉型の組換えがほとんど起きないことである⁵⁾. 体細胞の交叉型の組換えが関与する生命現象の一つである姉妹染色体交叉 (sister chromatid exchange: SCE) は, 「相同組換えを過剰に誘発するDNAダメージを大量に受けた場合」や「交叉型組換えを抑制する因子が機能不全になった場合」など, 限定的な状況でしか高頻度で検出されない⁶⁾. 一方, 減数分裂期組換えでは, 必ず相同染色体間で1か所 (稀に2か所) の交叉が起きる⁵⁾. この交叉は生殖細胞の発生・分化にとって非常に重要な反応であり, 交叉が起きないと有効な配偶子を形成することができないことも知られている. このような現象から, 真核生物の相同組換えのメカニズムは原核生物とはかなり異なるだろうと

推定されてきた. この点を解く鍵として, 真核生物の組換え中間体の解離機能には少なくとも二つの異なる経路があることが実証された. 真核生物の相同組換えに関しては未だ不明な点が多く, 全容解明とはいかないが, これまでに明らかになっていることを簡単に紹介したい.

相同組換えのメカニズム 2重鎖切断により形成されたDNA末端は, MRE11-RAD50-NBS1 (出芽酵母では Mre11-Rad50-Xrs2) や CtIP (出芽酵母では Sae2), Exo1などで1本鎖化が行われる (図3). この点に関しては, まだ上記の因子以外の役者が存在する可能性が高いと考えられており, 今後の研究が注目される. このような機構で形成された1本鎖DNAにRecAと同様な活性を持つRAD51が結合し, D-ループ形成を触媒する. この点に関しては, 出芽酵母とその他の生物では少々メカニズムが異なる. 出芽酵母の場合, Rad52が相同組換えに必須であることに対し, 他の生物ではRAD52の存在はさほど重要ではない. その代わりに, 家族性乳がんの原因遺伝子の一つであるBRCA2が重要な役割を担っている. BRCA2はRAD51のDNAへの結合を触媒する機能を持っており, BRCA2がないと相同組換えはほとんど起きない. このステップに関する他の因子として, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 (出芽酵母では Rad55, Rad57) が同定されているが, その

機能はまだよく分からない。真核生物のRAD51は、原核生物のRecAと比べてHolliday構造への変換能力が弱い。そのため、組換え中間体はD-ループの状態では保持される。その間に、DNA合成が起き、切断により失ったDNA配列の再合成が行われる。真核生物の体細胞や減数分裂期組換えの非交叉部位の場合、このDNA合成が終了した後、速やかにD-ループが解消される。それにより、二つの1本鎖DNA末端が再び露出することになるが、その末端にはD-ループ内でのDNA合成により獲得した合成DNA領域が存在する。その合成領域には相補配列が存在するので、その相補配列を利用して再会合が可能となる。その結果、非交叉型の組換え体が形成される(図3: 合成依存的単鎖対合モデル)。D-ループを解消する因子として、哺乳類ではBLM, PARI, FBH1(出芽酵母の場合ではSgs1, Srs2)などが議論されているが、まだこの点のメカニズムの詳細は明らかになっていない。一方、交叉型の組換えは、原核生物と同様にHolliday構造を介したメカニズムで実行される(図3: 2重鎖切断修復モデル)。この場合もHolliday構造解離酵素であるGEN1(出芽酵母の場合Yen1)やSLX1-SLX4, MUS81-EME1またはEME2(出芽酵母ではMus81-Mms4, Slx1-Slx4)などが組換え中間体を解離する。GEN1(出芽酵母の場合Yen1)とその他の因子は独立に作用することが明らかになっているが、その経路選択についてはまだ解明されていない。真核生物の相同組換えのメカニズムについては不明な点が多々あるが、交叉型・非交叉型の形成メカニズムの解明など、確実な進歩を続けている。

おわりに

この稿の主な読者である生物工学会会員の方にとって、相同組換えは、遺伝子工学の手法や遺伝育種法といっ

た研究ツールと認識されている方が多いのではないだろうか。相同組換えは、今後もゲノム編集のツールとして活用されていくと考えられ、分子遺伝学、分子育種などの研究技術として、さらに発展していくと推定される。技術として活用する場合、もっとも重要な点は、「いかに交叉型組換えを高頻度に引き出すか」ということになる。しかし、真核生物の体細胞では交叉型の組換えは非常に低頻度に保たれていることが問題でこの点を解決できた者が新しい手法の開発者となり得る。これまでの解決例として、BLM遺伝子が機能しないことで生じる遺伝子疾患であるブルーム症候群では、交叉型組換えが非常に高頻度に起きることが知られている⁶⁾。この現象により、ブルーム症候群患者の染色体は非常に不安定でがんを高頻度で発症するのだが、その特性を利用してゲノム編集に活用した研究も存在する⁶⁾。我々は、今後も真核生物の相同組換えのメカニズムの全容解明を目標として研究を続けていくが、このような基礎研究で得られた知見を、新たな遺伝子工学技術として利用していただけるよう、生物工学会会員の皆様に関心を持っていただければ幸いである。

文 献

- 1) Kowalczykowski, S. C.: *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 156 (2000).
- 2) Keeney, S. *et al.*: *Annu. Rev. Genet.*, **48**, 187 (2014).
- 3) Berlyn, M. K. B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 814 (1998).
- 4) Hanada, K. and Yamaoka, Y.: *Microbes Infect.*, **16**, 833 (2014).
- 5) Andersen, S. L. and Sekelsky, S.: *Bioessays*, **32**, 1058 (2010).
- 6) Hanada, K. and Hickson, I. D.: *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 2306 (2007).