

## 環境のストレスによって誘導される非相同的組換え —DNA の切断と再結合の分子機構—

小方 康至, 池田 日出男

東京大学医科学研究所・生物物理化学研究部 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

---

### Illegitimate recombination induced by environmental stress : Molecular mechanism of DNA break and re-joining

Yasuyuki Ogata and Hideo Ikeda

Department of Molecular Biology, Institute of Medical Science, University of Tokyo,  
Sirokanedai 4-6-1, Minato-ku, Tokyo 108-8639

#### Summary

Illegitimate recombination (Nonhomologous recombination) occurs between nonhomologous sequences or short homologous sequences at two different sites of DNA (s), and results in chromosome rearrangements including deletion, duplication, insertion, or translocation. We have developed an *in vitro* system for elucidating the molecular basis of illegitimate recombination using an *in vitro* packaging mixture for phage  $\lambda$  DNA that consists of lysates of induced lysogens of *E. coli*, and found that the recombination is catalyzed by DNA gyrase, *E. coli* DNA topoisomerase II, and does not require short homology. Subsequently, we developed an *in vivo* assay system for the quantitative analysis of illegitimate recombination during the formation of specialized transducing  $\lambda$ bio phage in *E. coli*, and found that the short-homology-independent illegitimate recombination (SHIIR) also occurs *in vivo* in oxolinic acid (an inhibitor for DNA gyrase A subunit)-treated *E. coli* cells and in temperature-sensitive *gyrA* mutants. On the basis of these results, we proposed that SHIIR is mediated by subunit exchange between DNA gyrase. On the other hand, short-homology-dependent illegitimate recombination (SHDIR) was enhanced by ultraviolet (UV) light-irradiation. With regard to the manner in which UV light-irradiation induces SHDIR, we proposed a model in which DNA double-strand breaks (DSBs) occur dependent upon UV light-related DNA damage. We searched for factors which participate in the process, and found that UV light-induced illegitimate recombination is dependent on RecJ protein and suppressed by RecQ protein. To examine the mechanism of illegitimate recombination in eukaryotes, we developed a plasmid system for quantitative analysis of deletion formation in *S. cerevisiae*, and found that Rad50, Mre11, Xrs2 proteins are involved in this process. Moreover, Hdf1 protein, a yeast homologue of Ku70, and its interacting factor, Sir4 protein are responsible for the end-joining process, thereby suggesting that Hdf1 protein and silencing factors alter broken DNA ends to create an inactivated chromatin structure, which is necessary for the re-joining of DNA ends.

**Keywords :** illegitimate recombination, short-homology-dependent and -independent, type II DNA topoisomerase,  $\lambda$ bio transducing phage, silencing factors

---

受付：1999年1月22日

受理：1999年1月26日

©日本環境変異原学会

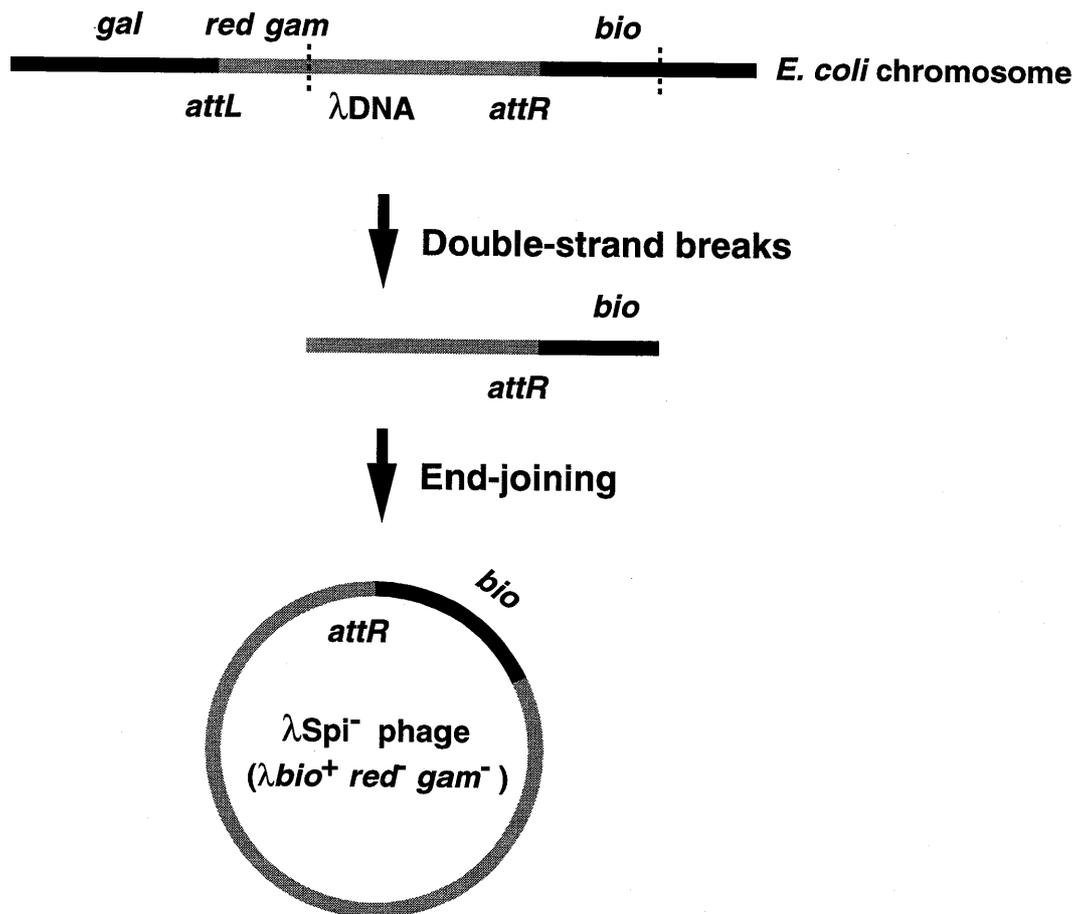


Fig. 1 Illegitimate recombination that occurs during formation of  $\lambda$ bio transducing phages. Most of  $\lambda$ bio phages have defects in the *red-gam* region of  $\lambda$  DNA, and these phages can form plaques on a lawn of *E. coli* P2 lysogen (Spi<sup>-</sup> phenotype).

## 緒 言

最近, さまざまな遺伝子疾患が, その原因遺伝子の欠失 (deletion) や重複 (duplication), 挿入 (insertion), 転座 (translocation), 逆位 (inversion) などといった染色体異常によって引き起こされることがわかってきた。例えば, 骨格筋の変性や壊死を引き起こす性染色体劣性筋ジストロフィー症の場合, その多くは, 原因遺伝子である DMD (duchne muscular dystrophy) 遺伝子の欠失や重複によるものである。また, 以前より腫瘍細胞においては染色体異常が観察されることが知られていたが, 慢性骨髄性白血病 (CML = chronic myelogenous leukemia) の原因遺伝子が, 第 9 番染色体と第 22 番染色体の相互転座により形成される *BCR-ABL* 融合遺伝子であることが見出されて以来, 主に造血器腫瘍と肉腫において, 数多くの融合遺伝子が報告され, さらに, 非腺性遺伝性大腸癌 (HNPCC = hereditary nonpolyposis colorectal cancer) の原因遺伝子が, 大腸菌において DNA 複製の際に誤って取り込まれた塩基や, 鋳型 DNA の一部が複製されずに生じた欠失を修復する「ミスマッ

チ修復」に必要な遺伝子である *mutS* 遺伝子や *mutM* 遺伝子のホモログであることが明らかにされるにいたり, 癌化もまた, 染色体異常が原因で起こることがわかってきた。

私たちは, このような染色体異常の原因となる「非相同時的組換え」が, 紫外線や活性酸素などの環境のストレスによって亢進されることを見出し (Ikeda et al., 1995; Onda et al., 1999), その分子機構の解明を試みている。本論文において私たちは, まず始めに, このような環境のストレスによって誘導される非相同時的組換えの分子機構について報告する。

## 1. 非相同時的組換えとは何か

「非相同時的組換え」とは, DNA 上の異なるふたつの部位において, 相同性のない塩基配列や, 高々数 bp の短い相同性のある塩基配列の間で起こる組換えであり, 長い相同性のある塩基配列の間で起こる「相同時的組換え (homologous recombination)」とは対照的であるという意味で非相同時的組換え (nonhomologous recombination) と呼ばれる。

非相長的組換えは、「非正統的組換え (illegitimate recombination)」とも呼ばれるが、そもそもこの言葉は、本来、バクテリアに溶原化した  $\lambda$  ファージが誘発される際にごくまれに形成される、そのゲノムの一部が  $\lambda$  ファージ由来の、もう一部がバクテリア由来の DNA からなる特殊なファージの形成過程において起こる組換えを指して用いられた言葉である (Fig. 1)<sup>a</sup>。

後に Franklin (1966) は、バクテリアの染色体における欠失や、上で述べた特殊形質導入ファージの形成のように、ごくまれで、でたらめ (haphazard) な “genetic event” を “unusual recombination” と呼び、これが “normal recombination” (すなわち相長的組換え) とは異なり、いわゆる *rec* 遺伝子の機能に依存しないことを示した。これにより、非相長的組換えと相長的組換えとは、基質となるふたつの DNA 鎖の塩基配列の相同性の必要性のみならず、その反応の分子機構もまた異なっていることが明らかになった。

## 2. 染色体異常と非相長的組換え

ヒトにおける染色体異常の研究は、染色体の観察技術の向上によってもたらされた。今世紀初頭に議論となった、ヒトの染色体数に関する論争 (48 説が正しいか 47 説が正しいかを巡る対立) は、培養細胞を材料として用いたり、いわゆる「押しつぶし法」を適用したりすることによって、従来のパラフィン切片法により観察されていた染色体像よりも明確な染色体像を顕微鏡下に観察することができるようになり、その決着をみた (Tjio and Levan, 1956)。続く 1958 年、Ford らが同様な方法で Turner 症候群の患者 (外見的には女性であるが、小児様の発育不全を示し、しばしば翼状頸や外反肘を伴う) の染色体数が 45 で、X 染色体を 1 個しか有していないことを示すにいたり、ヒトの染色体異常の研究は隆盛を迎えた。

その後、1960 年代には、ヒトの末梢血を採取して、そのなかに含まれるリンパ球を培養し、その染色体を観察する方法が開発され、このことは、種々の先天性疾患の原因となる染色体異常の発見を促し、さらには、正常人の染色体の観察による、染色体の多型や転座染色体の発見をもたらした。さらに進んで、1970 年代には、染色体を縞状の濃淡のバンドに染め分けるさまざまな分染法が広く行われるようになり、これらの分染法は、形態学的に類似している染色体の識別や同定を可能にするのみならず、染色体異常の異常部位の同定、すなわち切断部位や再結合部位の特定を可能にした。

さらに、近年の分子生物学的手法の発展は、これまで顕微鏡下に観察された染色体異常の塩基配列レベルでの

解析を可能にしたが、これによって、ヒトにおいて観察される染色体異常の構造が、バクテリアやファージにおいて観察される非相長的組換えの産物の構造と共通していることが明らかになった。したがって、バクテリアやファージにおける非相長的組換えの分子機構の解明が、ヒトの染色体異常の発生機構の解明に貢献することが考えられるようになった。

## 3. 非相長的組換えの分子機構の解明の試み —II 型の DNA トポアイソメラーゼ (大腸菌 DNA ジャイレース) によって触媒される非相長的組換えの発見—

DNA 複製や転写など、他の DNA 関連反応に比べ、非相長的組換えの分子機構の解明が立ち遅れていたのは、Franklin (1966) が述べたように、この反応が、ごく「まれ」で、「でたらめ」に起こるものであるため、検出が困難であったからである。すなわち、反応の起こる頻度が非常に低いうえに、この反応が、基質となるふたつの DNA 鎖の塩基配列に長い相同性を必要とせず、DNA 上のありとあらゆる部位で起こるため、均一な反応産物が得られなかったのである。

それに対して池田ら (1981) は、すでに確立されていた  $\lambda$  ファージの *in vitro* パッケージ系を利用し、*in vitro* において非相長的組換えを再現することに成功した。 $\lambda$  ファージの *in vitro* パッケージ系とは、 $\lambda$  ファージ粒子の *in vitro* 再構成系のことであり、大腸菌に溶原化している  $\lambda$  ファージを誘発させることによって調製した細胞粗抽出液 (溶菌液) を用い、外から加えた  $\lambda$  DNA を蛋白の殻 ( $\lambda$  プロヘッドと尾部) にパッケージさせ、感染能力のあるファージ粒子を得るというものである。池田ら (1981) は、細胞粗抽出液に、 $\lambda$  DNA とは相同性のないプラスミド pBR 322 を加えると、 $\lambda$  DNA の一部が欠失し、そこに pBR 322 が挿入されたような構造を持つ DNA、まさしく “hybrid genetic structure” (Campbell, 1962) をゲノムとするファージが形成されることに気づいたのである。

この反応を触媒する酵素が DNA ジャイレース (大腸菌 DNA トポアイソメラーゼ II) であることを明らかにしたのが、以下の実験である。池田ら (1981) は、この系において、DNA ジャイレースの阻害剤の一種であるオキシソリン酸を反応液に加えることによって、組換えが促進されることを見出した。当時はオキシソリン酸の標的は DNA ジャイレースのふたつのサブユニットのひとつである GyrA 蛋白と考えられていたので (その後、DNA ト

<sup>a</sup> このファージを用いれば、バクテリアの遺伝子を他のバクテリアに導入することができることから、このようなファージは「特殊形質導入ファージ」と呼ばれる。なお、Campbell (1962) は、このようなファージのゲノムを、いみじくも “hybrid genetic structure” と呼んだ。

ポアイソメラーズIVの発見によって、オキソリン酸がこの酵素をも標的とする薬剤であることが明らかになった (Kato et al., 1992), オキソリン酸は GyrA 蛋白に作用することによって非相同的組換え反応を促進させていることが考えられた。実際、オキソリン酸やそのプロトタ

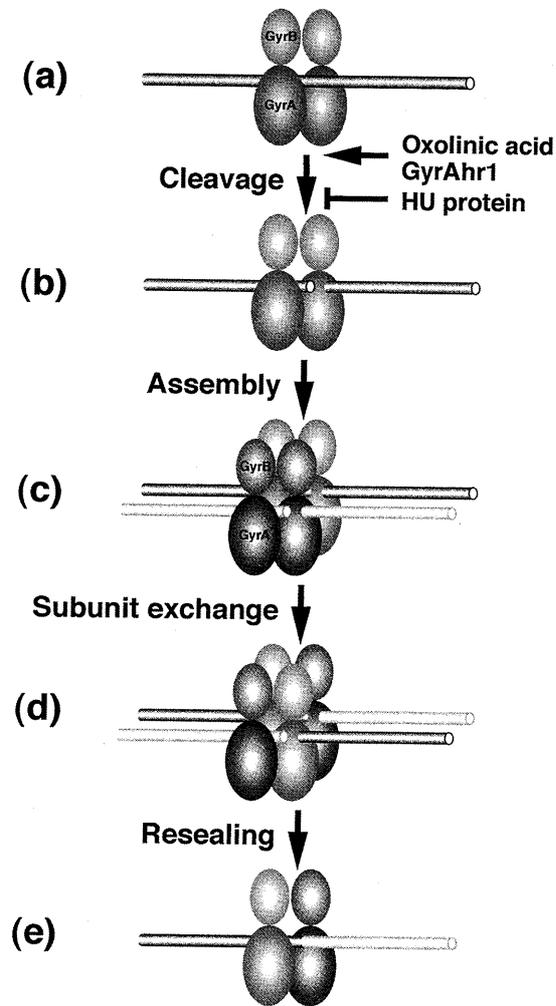


Fig. 2 DNA gyrase subunit exchange model for illegitimate recombination (Ikeda et al., 1982). A DNA gyrase cleaves DNA (b), and the gyrase-DNA complex, cleavable complex, assembles with another complex, forming the tetrameric structure (c). The dissociation of the tetrameric form results in subunit exchange that leads to the exchange of DNA strands (d).

イプであるナリジキシン酸に耐性を示す *gyrA* 遺伝子の変異株 (*nalA* 26) から細胞粗抽出液を調製した場合には、オキソリン酸によっては組換えは促進されなかった。その後、DNA ジャイレースのもうひとつのサブユニットである GyrB 蛋白の阻害剤の一種であるクマイイシンによって組換えが阻害されることが示され、この過程が DNA ジャイレースそれ自体によって触媒されることが示唆された。

実際、精製された DNA ジャイレースを反応液に加えることによって組換えが促進されること (Ikeda et al., 1984 a), およびオキソリン酸存在下での組換え産物を解析した結果、DNA ジャイレースによる DNA の切断部位とオキソリン酸によって誘導される非相同的組換えの反応産物の組換え部位がよく一致していること (Ikeda et al., 1984 b) が明らかになるにいたり、この反応が DNA ジャイレースによって触媒されることが示された。

DNA ジャイレースは、一方の DNA 鎖に二重鎖切断を導入し、その間をもう一方の DNA 鎖を通過させ、切断した DNA 末端を再び結合させることによって、DNA のリンキング数を増減させる活性を持つことから<sup>b</sup>, DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換え反応の分子機構として、池田ら (1982) は、二重鎖切断が導入された DNA 鎖と DNA ジャイレースが結合した中間産物、いわゆる「クリーバブル・コンプレックス」が独立にふたつ存在し、両者が互いに接近、結合した後、再び解離する際、サブユニットの交換が起こり、結果としてそれぞれのサブユニットに結合していた DNA 鎖の交換が起こることによって組換えが起こると考え、このモデルを「DNA ジャイレース・サブユニット交換モデル」と呼んだ (Fig. 2)。オキソリン酸は二重鎖切断が導入された DNA 鎖の再結合の過程を阻害することにより、このようなクリーバブル・コンプレックスを蓄積させることが示されているので、DNA ジャイレースによる組換え反応におけるオキソリン酸の促進的効果は、まさしくこのクリーバブル・コンプレックスの数を増加させることにあると説明することができる。

<sup>b</sup> ATP 存在下において、基質がより弛緩しているときは、リンキング数を減少させることによって負のスーパーコイルを導入し、逆に基質がより負にスーパーコイルしているときは、リンキング数を増大させることによって DNA を弛緩させる (Kataoka et al., 1996)。その際、反応の飽和点は反応温度に依存して変化し、より低温ではより負にスーパーコイルし、より高温ではより弛緩することが示されている (Kataoka et al., 1996)。この性質は、熱刺激を与えたときの大腸菌細胞の DNA のスーパーコイルリングの変化を説明するものである (Ogata et al., 1994)。

#### 4. II型のDNAトポアイソメラーズによって触媒される、相同配列を必要としない非相同的組換えが *in vivo* において起こることの証拠—非相同的組換えを定量的に検出する *in vivo* アッセイ・システムの確立と癌治療の現場からの報告—

これまで報告されてきた、バクテリアの染色体やプラスミドなど、*in vivo* において検出される非相同的組換えは、すべて、塩基配列に短い(4–10 bp)相同性のあるDNA鎖の間で起こっていたものであった(Farabaugh et al., 1978; Studier et al., 1979; Pribnow et al., 1981; Albertini et al., 1982; Jones et al., 1982; Marvo et al., 1983; Lopez et al., 1984; Yi et al., 1988; Kumagai and Ikeda, 1991). それに対し、上で述べた *in vitro* において大腸菌 DNA ジャイレースによって触媒され、オキシリン酸によって促進される非相同的組換えは、相同性のない(1–3 bp)DNA鎖の間で起こっていた(Naito et al., 1984). したがって、DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換えは、これまでに知られていないものであるか、*in vivo* においては実際には起こらない反応である可能性が考えられた。

そこで、池田ら(1995)は *in vivo* において非相同的組換えを定量的に検出するアッセイ・システム( $\lambda$ Spi<sup>-</sup>アッセイ)の確立を試みた。その原理は、溶原化している $\lambda$ ファージが誘発される際に非相同的組換えによって形成される $\lambda$ bio特殊形質導入ファージを選択し、総ファージ数に対する $\lambda$ bio特殊形質導入ファージ数の割合を求め、その値をもって非相同的組換えの頻度と定義する、というものである(Fig. 1)。 $\lambda$ bio特殊形質導入ファージ( $\lambda$ Spi<sup>-</sup>ファージ)とは、 $\lambda$ DNAの一部と大腸菌染色体DNAの一部(bio遺伝子を遺伝マーカーとして持つ)からなるハイブリッドDNAをゲノムとするファージを意味し、そのほとんどは、 $\lambda$ DNAのattL近傍にマップされるred遺伝子とgam遺伝子との両方を欠失している( $\lambda$ bio<sup>+</sup>red<sup>-</sup>gam<sup>-</sup>)。このような変異ファージは、野生型ファージが感染することのできないP2ファージ溶原菌(WL 95)にも感染することができるため、WL 95の菌液を塗った寒天培地上にプラークを形成することができる。また、ここで用いている $\lambda$ ファージ( $\lambda$ CI857)は、cIリプレッサーが温度感受性になっているため、溶原菌を熱処理すれば容易に $\lambda$ ファージを誘発させることができる(熱誘発)。かくして、熱誘発により集積したファージを用い、P2ファージが溶原化していない大腸菌(Ymel)を指示菌としてプラークを形成させ、その数を計測することによって総ファージ数を算出する一方、WL 95を指示菌としてプラークを形成させ、 $\lambda$ Spi<sup>-</sup>ファージ数を算出し、両者の比を求め、 $\lambda$ Spi<sup>-</sup>ファージ

の出現頻度とした。

このようなシステムを用いて、*in vivo* における非相同的組換えに対するオキシリン酸の効果を検討したところ、オキシリン酸によって組換えが促進されることがわかった(Shimizu et al., 1995)。しかも、このとき組換えの産物を解析すると、短い相同性(平均8 bp)のあるDNA鎖の間で起こっているものの他に、*in vitro* においてDNA ジャイレースによって触媒され、オキシリン酸によって促進される非相同的組換え同様、相同性のない(平均1 bp)DNA鎖の間で起こっているものが存在していた。さらに、オキシリン酸やナリジキシン酸に耐性を示すgyrA変異株(nalA26)では、オキシリン酸による組換えの促進は観察されなかった。したがって、DNA ジャイレースによる非相同的組換えは、*in vivo* においても実際に起こる反応であり、これまで知られていなかった新しいタイプの組換えであることが示された。

最近、ミニFプラスミドをベクターとして用いたプラスミド・シャッフリング法(Kato and Ikeda, 1996)により分離したgyrA遺伝子の温度感受性変異株のなかにオキシリン酸非存在下で $\lambda$ Spi<sup>-</sup>ファージの出現頻度が上昇するものが複数存在することが見出されたが(Shimizu et al., 1997; Ashizawa et al., unpublished), これらの変異株は高温においてDNAに二重鎖切断を導入することはできても、再結合させることのできない株であった(Ashizawa et al., unpublished)。さらに、変異gyrA遺伝子の遺伝子産物を精製し、それらの蛋白のDNAスーパーコイル活性の測定を試みたところ、変異GyrA蛋白の反応産物のなかに、野生型GyrA蛋白の反応産物には観察されない、直鎖状DNAが検出された(Ashizawa et al., unpublished)。これらの結果は、先に述べた「DNA ジャイレース・サブユニット交換モデル」を支持するものであって、変異GyrA蛋白が存在する、あるいは野生型GyrA蛋白の活性が、オキシリン酸存在下など、ある条件下で変化するなどして、DNAに二重鎖切断が導入されても再結合されないような状態が続いたとき、DNA ジャイレースによる組換えが誘導されるものと思われる(Fig. 2)。

DNA ジャイレースのDNAスーパーコイル活性を促進させる蛋白性因子としては、ヒストン様蛋白のひとつであるHU(真核HMGのファンクショナル・アナログ)(Yang and Ames, 1990)や、分子シャペロン的一种である熱ショック蛋白DnaK(真核hsp 70ホモログ)(Ogata et al., 1996)が存在するが、HU蛋白の欠失変異株ではDNA ジャイレース依存の非相同的組換えが亢進することがわかり(Shanado et al., 1998)、DNA ジャイレースによって触媒される組換えが*in vivo* において実際に起こっていることが確かめられるとともに、その分子機構が解明されつつある。

このような組換えは、T4ファージのDNAトポアイ

ソメレース (Ikeda et al., 1986) や真核の DNA トポアイソメレース II (Bae et al., 1988) でも触媒されることから、この反応はウイルスはおろか原核から真核にいたるまで高度に保存されているものであることが考えられる。実際、DNA トポアイソメレース II を標的とする抗癌剤の投与により、副作用として急性白血病 (ALs = acute leukemias) が誘発されることが知られているが、このような急性白血病の患者のリンパ球では、第 11 番染色体のある領域 (11 q 23) が切断され、他のさまざまな染色体領域と結合したような相互転座が頻りに観察される。このとき、この領域に存在する *MLL* 遺伝子 (*ALL1* 遺伝子) の構造を解析すると、その切断部位の近傍には DNA トポアイソメレース II の結合部位が存在していることがわかった (Negrini et al., 1993; Gu et al., 1994)。したがって、II 型の DNA トポアイソメレースによって触媒され、その阻害剤によって促進される非相同的組換えが、ヒトの体内でも起こっていることが認知されるようになった。これなどはいわば、大腸菌からヒトにいたるまで共通に起こる疾患の例といえるだろう。

### 5. 紫外線や変異原物質、活性酸素など、環境のストレスによって誘導される、短い相同配列を必要とする非相同的組換え

先に述べた DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換えは、その阻害剤であるオキシリン酸によって促進されることから、ある意味では環境のストレスによって誘導される非相同的組換えと考えることができる (オキシリン酸は熱ショック応答や SOS 応答などのストレス応答を誘導する薬剤であることが知られている)。私たちは、特殊形質導入ファージの形成時に起こる非相同的組換えを検出する *in vivo* アッセイ・システムの確立の過程において、紫外線など、他の環境のストレスもまた非相同的組換えを誘導することを発見した (Ikeda et al., 1995)。ただし、この場合は、DNA ジャイレースによって触媒される非相同的組換えとは異なり、短い相同配列を必要とする組換えであった (Yamaguchi et al., 1995)。したがって、非相同的組換えには、II 型の DNA トポアイソメレースによって触媒され、その阻害剤によって促進される、相同配列を必要としないタイプと、紫外線などの環境のストレスによって誘導される、分子機構が明らかではない、短い相同配列を必要とするタイプとが存在することが明らかになった。

紫外線によって誘導される非相同的組換えの発見の経緯は、以下の通りである。λ Spi<sup>-</sup> アッセイにおいては、λ ファージを増殖させるために熱誘発を採用しているが、これは、ここで用いている λ ファージ (λ *cI857*) の cI リプレッサーが温度感受性であるためである。λ ファージを誘発させる方法としては、他にも紫外線照射に

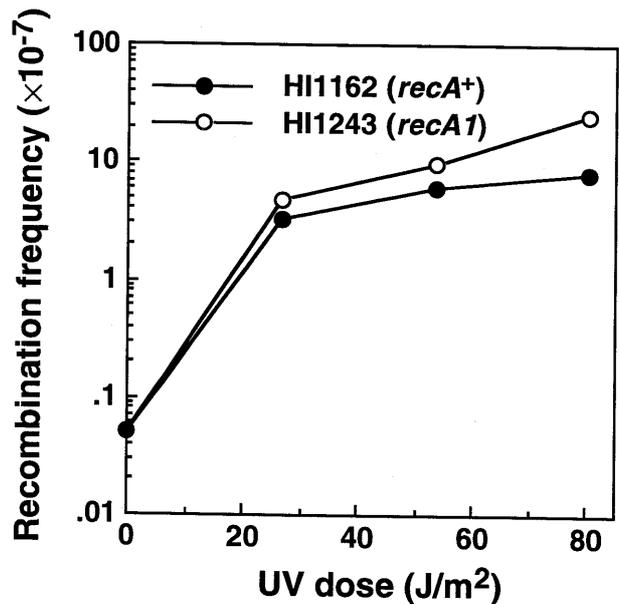


Fig. 3 Stimulation of illegitimate recombination by UV light-irradiation (Ikeda et al., 1995). *E. coli* HI1162 (as 594 except λ *cI857* ind<sup>-</sup>) or HI1243 (as HI1162 except *recA1*) was grown to  $2 \times 10^8$  cells/ml at 30°C in λ YP broth, and the culture was irradiated to UV light for various periods in a glass dish. Induction of the prophage was carried out by incubation at 42°C for 15 min, and the culture was then incubated at 37°C for 2 hr. The number of plaques on Ymel was defined as the concentration of total phages and the number of plaques on P2 lysogen WL95 was defined as the concentration of Spi<sup>-</sup> phages. The frequency of illegitimate recombination was defined as the ratio of the concentration of Spi<sup>-</sup> phage to the concentration of total phages.

よって誘発させる方法があるが、ここで用いている λ ファージの *ind* 遺伝子は変異を持つため、紫外線照射によっては λ ファージを誘発させることはできない。一方、*cI* 遺伝子と *ind* 遺伝子とが野生型である λ ファージを溶原化ファージとして採用し、紫外線照射によって λ ファージを誘発させ、特殊形質導入ファージの出現頻度を測定したところ、その頻度は、熱処理によって λ ファージを誘発させるアッセイ・システムによって測定された特殊形質導入ファージの出現頻度に比べ、非常に高い値を示すことに気づいた。

これらふたつのアッセイ・システムの違いは、λ ファージの誘発のさせ方だけなので、紫外線照射の効果は、λ ファージの誘発のみならず、組換えそのものの促進にもあるのではないかと考えた。もし、そうであるならば、熱処理によって λ ファージを誘発させるアッセイ・システムにおいても、紫外線を照射すれば組換えの頻度が高くなるはずである。実際、このアッセイ・システムにおいて、照射した紫外線の線量に依存して組換えの頻度が上昇し、その値は、紫外線照射によって λ ファージを誘発させるアッセイ・システムによって測定された値とほ

ほぼ同じ値を示すことがわかった (Fig. 3; Ikeda et al., 1995). この紫外線照射によって誘導される非相同的組換えは, *recA* 遺伝子の変異株でも同様に観察されるので, RecA 機能に依存する相同的組換えの副産物を検出しているものではないし, RecA プロテアーゼを必要とする SOS 応答の結果, 起こる反応でもない。

それでは, どうして紫外線照射によって組換えが促進されるのが問題となるが, 紫外線照射によって DNA にチミンダイマーなどの損傷が生じ, その除去修復の過程で誤った塩基が取り込まれることにより, 変異が生じることが知られているので, 紫外線が持つ, 変異を誘発するという性質が, 組換えに寄与している可能性が考えられた。もしそうであるならば, 紫外線に限らず変異を誘発するものであるならば, すべからず組換えを誘導すべきである。実際, 強力な変異誘発剤であるニトロソグアニジンやアフラトキシン B<sub>1</sub> によって非相同的組換えの頻度が上昇することがわかった (Ikeda et al., 1995). したがって, この過程には, DNA の損傷が必要であることが示唆された。

同じことは活性酸素についてもいえ, 大腸菌を過酸化水素水で処理すると,  $\lambda$ Spi<sup>-</sup> アッセイにおいて, 非相同的組換えの頻度が上昇することがわかった (Onda et al., 1999). 活性酸素によって生じる DNA 損傷としては, 8-オキソグアニンが知られているが, その修復に関与する *mutM* 遺伝子の欠失変異株では, 組換えの頻度がさらに上昇するので, 活性酸素によって誘導される非相同的組換えもまた, DNA の損傷によって引き起こされるものと思われる。

## 6. 環境のストレスによって誘導される, 短い相同性を必要とする非相同的組換えの分子機構の解明

それでは環境のストレスによって誘導される非相同的組換えはどのような分子機構で起こるのだろうか。  $\lambda$ Spi<sup>-</sup> アッセイにおいて検出される非相同的組換えは,  $\lambda$ DNA の欠失と大腸菌染色体 DNA の挿入である。欠失には, ふたつの異なる分子機構が存在し, ひとつは鑄型となる DNA の一部が複製されず, 娘 DNA 鎖からその部分が消失することによって起こるものである。欠失が起こった部位には, しばしば順方向の反復配列が認められることから, このような配列を鑄型に持つとき, DNA ポリメラーゼのスリップが起こるのであろうと考えられている。

もうひとつの欠失の分子機構は, その部位が切り出されることによって起こるものである。  $\lambda$ Spi<sup>-</sup> アッセイは, いわば  $\lambda$ DNA の異常な切り出しを検出するものであり, したがって, ここで起こる欠失は切り出しによるものである。切り出しによる欠失の最初の段階は,

$\lambda$ DNA と大腸菌染色体 DNA とにそれぞれ二重鎖切断が導入されることなので (Fig. 1), 私たちは, 紫外線照射によって組換えが亢進されるのは, 紫外線によってこのような二重鎖切断が促進されるからではないかと考えた。

しかしながら, 紫外線は  $\gamma$ 線などとは異なり, DNA に直接的に二重鎖切断を導入することはないことが, 精製された T7 ファージの DNA を用いた *in vitro* における実験によって示されている (Smith and Hanawalt, 1969). それに対して, 除去修復や組換え修復のできない大腸菌の変異株に紫外線を照射した後, さらに大腸菌をインキュベーションした場合には, 染色体の崩壊が起こり, 低分子量の DNA 断片が観察されることが報告されているので (Wang and Smith, 1986), *in vivo* においては紫外線によって DNA 二重鎖切断が誘導されることが考えられる。

すでに紫外線照射によって生じた DNA の損傷部位では複製フォークの進行が停滞することが知られているので (Rupp and Howard-Flanders, 1968), 私たちは, その際, 鑄型となった DNA 鎖が一本鎖となるため, 切断を受けやすくなるのではないかと考えた。とりわけ, 紫外線照射によって誘導される非相同的組み換えの産物を解析すると, 高頻度に組み換えが起こる部位 (ホット・スポット) の近傍には, またしても順向き反復配列が存在していたので (Yamaguchi et al., 1995), 鑄型 DNA 鎖に生じた損傷部位で複製フォークの進行にブレーキがかかり, その近傍に存在する順向き反復配列でスリップし, 鑄型 DNA 鎖が湾曲することによって生じた一本鎖 DNA のループを, そのような構造を特異的に認識し, 切断するヌクレアーゼが切断することによって二重鎖切断が形成されるのだらうと考えた (Fig. 4; Yamaguchi et al., 1995). さらに, その後の解析により, ホット・スポット領域には, 約 140 bp の逆向きの反復配列が存在していることがわかった。逆向き反復配列を持つ一本鎖 DNA は, ステム・ループやクルシフォーム構造のような特殊な二次構造を形成することが知られているので, 鑄型 DNA 鎖の損傷部位で複製フォークが停滞したとき, このような二次構造が形成され, 任意の箇所での切断を受け, 二重鎖切断が形成されることが考えられる。いずれにせよ, 私たちのモデルは, 複製フォークの進行が損傷部位で停滞することを前提としているので, 紫外線照射によって誘導される DNA 二重鎖切断に DNA 複製の伸長反応が必要か否かを検証しなければならない。間接的な証拠としては, *dnaB* 遺伝子の温度感受性変異株では紫外線照射後の非相同的組み換えの頻度が低下する (Yamashita et al., unpublished) ことが挙げられよう。この場合, *dnaB* 遺伝子の DNA 複製の開始段階の変異株 (スロー・ストップ・フェノタイプを示す) では効果はなく, 伸長段階の変異株 (クイック・ストップ・フェノタイプ

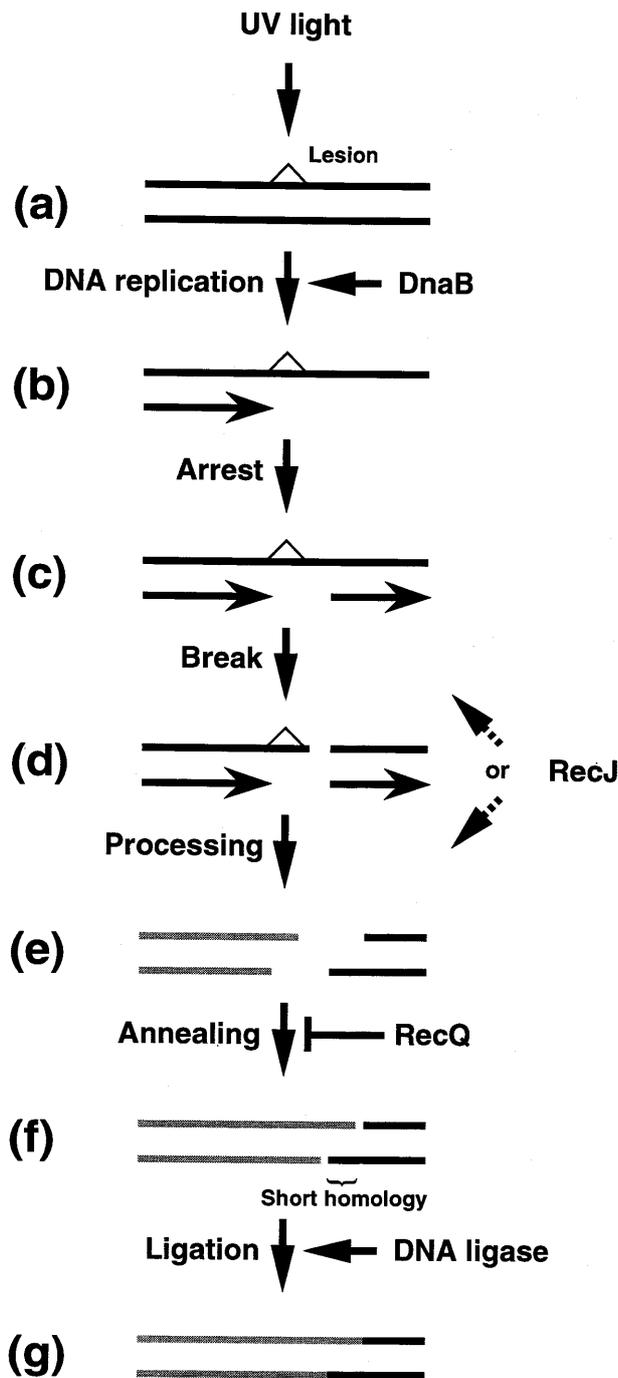


Fig. 4 A proposed mechanism of UV light-irradiation-induced illegitimate recombination. A lesion is induced by UV light-irradiation (a), and DNA replication occurs with the damaged DNA as a template (b). The progression of replication fork arrests at the lesion (c), and the template DNA is broken enzymatically (single-strand break), resulting in the formation of double-strand break (d). The ends of DNA is processed (e), annealed (f) and ligated (g). DnaB protein is involved in the step of the progression of replication forks, and RecJ protein participates in either the step of the formation of double-strand breaks (d) or the processing of DNA ends (e). Annealing is dependent on short homology (f), and this step is suppressed by RecQ protein. Ligation is carried out by DNA ligase.

イブを示す)で効果があるので、少なくとも紫外線照射によって誘導される非相対的組み換えには DNA 複製の伸長反応が必要である。DNA 複製の伸長反応は DNA 二重鎖切断の形成過程に寄与しているのかも知れない (Fig. 4)。

次に、紫外線照射によって誘導される非相対的組み換の分子機構を解明するために、この過程に関与するさまざまな因子を遺伝学的に同定することを試みた。その際、相対的組み換えに関与する遺伝子の中に、非相対的組み換えにも関与する遺伝子が存在する可能性を考え、*rec* 変異株のなかに紫外線照射後、組み換の頻度が上昇しないようなものが存在するか否かを検討した。その結果、相対的組み換の RecF 経路や RecE 経路に関与する *recJ* 遺伝子の破壊株では、紫外線を照射しても組み換が促進されることが示された (Ukita and Ikeda, 1996)。さらに、*recJ* 破壊株において低頻度ながらも起こる組み換の産物を解析したところ、この株では、野生株において観察される組み換のホット・スポットが検出されることがわかった。したがって、*recJ* 遺伝子が紫外線照射後にホット・スポットで起こる非相対的組み換えに必要であることが示された。精製された RecJ 蛋白は、一本鎖 DNA を 5' 末端から 3' 末端の方向に分解する DNA エキソヌクレアーゼ活性を持つので (Lovett and Kolodner, 1989)、非相対的組み換における RecJ 蛋白の役割として、紫外線照射によって切断を受けた DNA 鎖の末端を分解することにより、短い相同配列を持つ DNA 鎖との結合を促進させている可能性が考えられた (RecJ 蛋白が DNA 二重鎖切断の形成後に働くとする仮説) (Fig. 4; Ukita and Ikeda, 1996)。一方、RecJ 蛋白が紫外線照射後の DNA 二重鎖切断の過程に寄与する可能性も考えられるので (RecJ 蛋白が DNA 二重鎖切断の形成過程に働くとする仮説)、現在この仮説を検証している (Fig. 4)。

一方、*recJ* 遺伝子と同様に相対的組み換の RecF 経路や RecE 経路に関与する *recQ* 遺伝子の破壊株では、*recJ* 破壊株とは逆に、紫外線照射後、組み換が野生株以上に亢進することが示された (Hanada et al., 1997)。ただし、この株では、紫外線非照射時でも組み換が高頻度で起こるので、RecQ 蛋白は、紫外線照射の有無に関わらず、非相対的組み換を抑制していることがわかった。精製された RecQ 蛋白は、二本鎖 DNA を 3' 末端から 5' 末端の方向に解離する DNA ヘリケース活性を持つので、この過程における RecQ 蛋白の役割として、RecQ 蛋白が、短い相同性を持つ DNA 鎖同士の結合を抑制していることが考えられる (Fig. 4; Hanada et al., 1997)。最近、癌が多発するブルーム症候群や早老病として知られるウェルナー症候群の原因遺伝子が *recQ* 遺伝子のホモログであることが明らかにされたが、ひとつの可能性として、癌化や老化は、非相対的組み換が抑制されず、

染色体異常が多発することによって起こるのかも知れない。

この他、この過程に関与する因子として、DNAの折り曲げに働く Fis 蛋白や IHF 蛋白 (Shanado et al., 1997) などが見出されており、今後はこれら遺伝学的に同定された蛋白を精製し、紫外線照射によって誘導される非相同的組換えを *in vitro* において再構成することによって、それぞれの蛋白の役割を明らかにしていきたいと考えている。

## 7. 真核生物における非相同的組換えの分子機構の解明

大腸菌を材料として用いて明らかにしてきた非相同的組換えの分子機構が、真核生物にも共通であるか、また異なる分子機構が存在するかを明らかにすることは、染色体異常、ひいては遺伝子疾患や癌化、老化など、高次の生命現象を理解するうえで重要である。そこで、塚本ら (1996 a) は、酵母を材料として用い、プラスミドにおける非相同的組換えを定量的に検出する *in vivo* アッセイ・システムを確立した。その原理は、カナバニンとシクロヘキサミドというふたつの薬剤に耐性を示す酵母に、それぞれの薬剤に対する感受性をもたらすふたつの遺伝子 (*CAN1* 遺伝子と *CYH2* 遺伝子) を隣り合わせに持つプラスミド (YCpL2) を導入して (このプラスミドを持つ酵母はカナバニンとシクロヘキサミドを含む寒天培地にはコロニーを形成することはできない)、これらふたつの遺伝子を同時に欠失したようなプラスミドを持つ酵母 (このようなプラスミドを持つ酵母はカナバニンとシクロヘキサミドを含む寒天培地に再びコロニーを形成することができるようになる) を選択し、その出現頻度をもって非相同的組換えの頻度と定義するというものである。こうして検出された欠失は、両末端の DNA 鎖の間に短い相同性 (1–5 bp) が存在したことから、短い相同配列を必要とするタイプの非相同的組換えにより起こったものであることがわかった。

次に、この過程に関与する因子を同定することを目的として、大腸菌における紫外線照射後の非相同的組換えに対して *rec* 変異の効果を検討したように、酵母における相同的組換えや胞子形成時の減数分裂の際に起こる相同的組換えに必要な遺伝子の変異の効果を検討した。その結果、この過程に *RAD50*、*RAD52*、*MRE11*、および *XRS2* 遺伝子が関与していることが示された (Tsukamoto et al., 1996 a)。これらの遺伝子の役割を明らかにするため、組換えの検出に用いた YCpL2 プラスミドにセントロメア (動原体) をふたつ持たせたプラスミドを構築した (Tsukamoto et al., 1997 a)。このプラスミドを酵母に導入すると、細胞分裂の際にそれぞれのセントロメアが両極に引っ張られるために DNA 二重鎖切断が 2 ヶ所で起こり、組換えが誘導されるので、非相同的組

換えの最初の段階である DNA 二重鎖切断は必要ではなく、最後の段階である DNA 末端の結合 (エンド・ジョイニング) のみを検出することができる。その結果、*RAD52* 遺伝子以外はエンド・ジョイニングの過程に寄与していることが明らかになった (Tsukamoto et al., 1997 a)。Mre 11 蛋白は一本鎖 DNA を 3' 末端から 5' 末端の方向に分解する DNA エキソヌクレアーゼ活性を持ち (Paull and Gellert, 1998)、かつ Rad 50 蛋白と Xrs 2 蛋白とで三者複合体を形成すること (Johzuka and Ogawa, 1995) が知られているので、これらの蛋白は、切断を受けて生じた DNA 末端を分解し、一本鎖 DNA を露出させることによってエンド・ジョイニングを促進させていることが考えられる。一方、Rad 52 蛋白は相同的組換えに関与するので、この蛋白は、相同的組換えにより、二量体のプラスミドを形成させ、ふたつのセントロメアを持つプラスミドを生じさせることにより、間接的に非相同的組換えに寄与するのかも知れない。

この他にも、塚本ら (1996 b) は、免疫グロブリン遺伝子の再編成時に起こる V(D)J 組換えに関与する Ku 70 蛋白の酵母ホモログ (Hdf 1) が非相同的組換えに関与していること、とりわけ、ふたつのセントロメアを持つ YCpL2 の組換えに関与することから、この蛋白がエンド・ジョイニングの過程に関与することを見出した。Ku 蛋白は DNA 末端に結合する性質を持つことから、この蛋白は、DNA 末端同士を接近させることによってエンド・ジョイニングを促進させていることが考えられる。さらに、Hdf 1 蛋白と相互作用する因子として同定した Sir 4 蛋白や、Sir 4 蛋白とともに働く Sir 2 蛋白と Sir 3 蛋白もまた、エンド・ジョイニングに関与することが明らかになった (Tsukamoto et al., 1997 b)。Hdf 1 蛋白が、Sir 2、Sir 3、および Sir 4 蛋白やヒストンと複合体を形成してテロメア領域などを不活化させること (サイレンシング) を考慮すると、DNA が切断を受けたとき、Hdf 1 蛋白がこれらサイレンシング因子とともに DNA 末端を不活化し、エンド・ジョイニングを促進させている可能性が考えられる (Fig. 5; Tsukamoto and Ikeda, 1998)。しかしながら、サイレンシング因子の役割については、サイレンシング因子が接合型決定遺伝子の発現を抑制することによって間接的にエンド・ジョイニングに関与しているという説 (Åström et al., 1999; J. Harber, 私信) もあり、現在、検討中である。

また、大腸菌 RecQ 蛋白同様、その酵母ホモログである Sgs 1 蛋白もまた、非相同的組換えを抑制していることがわかった (Yamagata et al., 1998)。先に述べたように、ウェルナー症候群やブルーム症候群の原因遺伝子 (それぞれ *WRN*、および *BLM*) の産物は RecQ ホモログなので、それぞれが Sgs 1 蛋白の代わりに働き得るか否かを検証したところ、*sgs1* 遺伝子を破壊し、その代わりに野生型の *WRN*、および *BLM* 遺伝子を挿入した酵母で

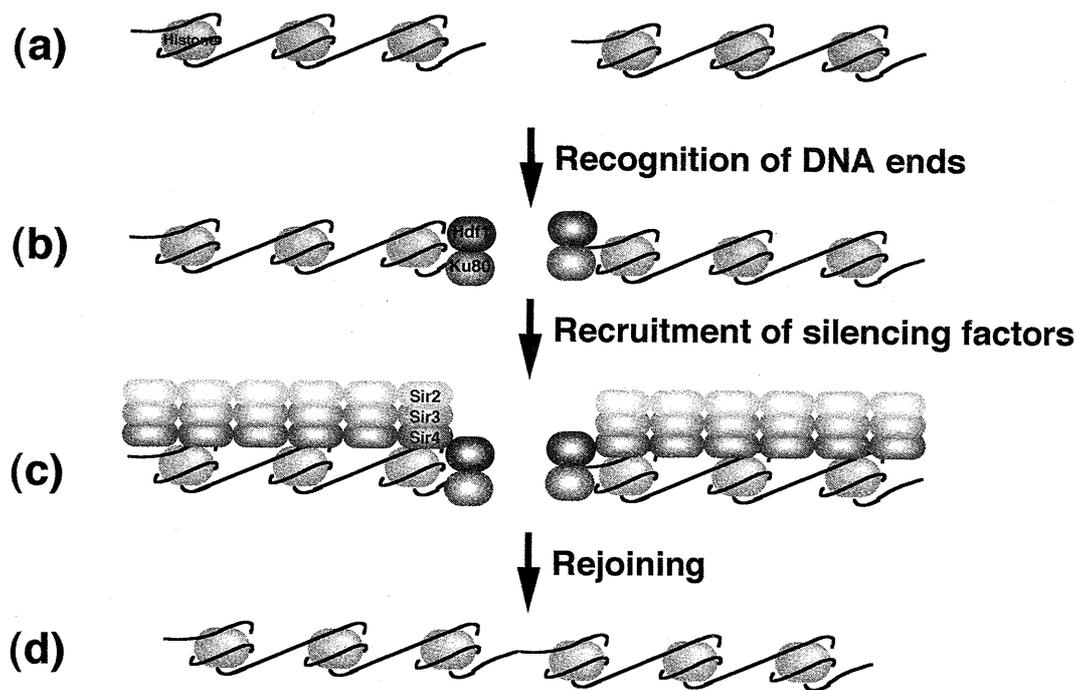


Fig. 5 A putative model for DNA end-joining (Tsukamoto et al., 1997b ; Tsukamoto and Ikeda, 1998). Hdf1 protein and Ku80 homologue bind to broken DNA ends (b) and then recruit silencing factors (c), resulting in formation of heterochromatin-like structure, which is necessary for rejoining of the DNA ends (d).

は、非相対的組換えの頻度は上昇しなかった。したがって、WRN 蛋白や BLM 蛋白が非相対的組換えを抑制していることが明らかになった。ウェルナー症候群やブルーム症候群の患者の細胞では、染色体の不安定性が観察されるが、その原因は WRN 蛋白や BLM 蛋白の組換え抑制機能の欠損にあることが考えられる。

## 結 語

大腸菌や酵母など、単細胞生物を材料として、遺伝学的、ならびに生化学的手法を用いることにより、非相対的組換えの分子機構の一端を明らかにすることができた。その結果として、ヒトにおいて観察される染色体異常の発生機構を説明することが可能となり、ひいてはヒトの遺伝子疾患や癌化、老化といった高次の生命現象までも、私たちが解明した非相対的組換えの分子機構により推察することができるようになった。

とりわけ、私たちが見出した環境のストレスにより誘導される非相対的組換えの研究は、最近、問題となっている環境汚染によるヒトの疾患を理解するうえで重要となるであろう。

## 参 考 文 献

- Albertini, A. M., M., Hofer, M. P. Calos and J. H. Miller (1982) *Cell*, 29, 319-328.
- Åström, S. H., S. M. Okamura, and J. Rine (1999) *Nature*, 397, 310.
- Bae, Y.-S., I. Kawasaki, H. Ikeda and L. F. Liu (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2076-2080.
- Campbell, A. M. (1962) *Adv. Genet.*, 11, 101-146.
- Farabaugh, R. J., U. Schmeissner, M. Hofer and J. H. Miller (1978) *J. Mol. Biol.*, 126, 847-863.
- Franklin, N. C. (1966) *Genetics*, 55, 699-707.
- Gu, Y., T. Nakamura, S. A. Schichman, R. Prasad, O. Canaai, H. Saito, C. M. Croce and E. Canaani (1994) *Cancer Res.*, 54, 2326-2330.
- Hanada, K., T. Ukita, Y. Kohno, K. Saito, J. Kato and H. Ikeda (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3860-3865.
- Ikeda, H., K. Moriya and T. Matsumoto (1981) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 399-408.
- Ikeda, H., K. Aoki and A. Naito (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3724-3728.
- Ikeda, H. and M. Shiozaki (1984a) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 49, 401-409.
- Ikeda, H., I. Kawasaki and M. Gellert (1984b) *Mol. Gen. Genet.*, 196, 546-549.
- Ikeda, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 922-926.
- Ikeda, H., H. Shimizu, T. Ukita and M. Kumagai (1995) *Adv. Biophys.*, 31, 197-208.
- Johzuka, K. and H. Ogawa (1995) *Genetics*, 139, 1521-1532.
- Kataoka, K., T. Mizushima, Y. Ogata, T. Miki and K. Sekimizu (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 24806-24810.
- Kato, J. and H. Ikeda (1996) *Gene*, 170, 141-142.
- Kato, J., H. Suzuki and H. Ikeda (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 25676-25684.
- Kumagai, M. and H. Ikeda (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 230, 60-64.
- Lopez, P., M. Espinosa, B. Greenberg and S. A. Lacks (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5189-5193.

- Lovett, S. T. and R. D. Kolodner (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2627-2631.
- Marvo, S. L., S. R. King and S. R. Jaskunas (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2452-2456.
- Naito, A., S. Naito and H. Ikeda (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 193, 238-243.
- Negrini, M., C. A. Felix, C. Martin, B. J. Lange, T. Nakamura, E. Canaani and C. M. Croce (1993) *Cancer Res.*, 53, 4489-4492.
- Ogata, Y., T. Mizushima, K. Kataoka, T. Miki and K. Sekimizu (1994) *Mol. Gen. Genet.*, 244, 451-455.
- Ogata, Y., T. Mizushima, K. Kataoka, K. Kita, T. Miki and K. Sekimizu (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 29407-29414.
- Onda, M., K. Hanada, H. Kawachi and H. Ikeda (1999) *Genetics*, 151, 439-446.
- Paull, T. T. and M. Gellert (1998) *Mol. Cell*, 1, 969-979.
- Pribnow, D., D. C. Sigurdson, L. Gold, B. S. Singer, C. Napoli, J. Brosius, T. J. Dull and H. F. Noller (1981) *J. Mol. Biol.*, 149, 337-376.
- Rupp, W. D. and P. Howard-Flanders (1968) *J. Mol. Biol.*, 31, 291-304.
- Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1997) *J. Bacteriol.*, 179, 4239-4245.
- Shanado, Y., J. Kato and H. Ikeda (1998) *Genes Cells*, 3, 511-520.
- Shimizu, H., H. Yamaguchi and H. Ikeda (1995) *Genetics*, 140, 889-896.
- Shimizu, H., H. Yamaguchi, Y. Ashizawa, Y. Kohno, M. Asami, J. Kato and H. Ikeda (1997) *J. Mol. Biol.*, 266, 297-305.
- Smith, K. C. and P. C. Hanawalt (1969) *Molecular Photobiology*, Academic Press, New York.
- Tjio, J. H. and A. Levan (1956) *Hereditas*, 42, 1-6.
- Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1996a) *Nucleic Acids Res.*, 24, 2067-2072.
- Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1996b) *Genetics*, 142, 383-391.
- Tsukamoto, Y., J. Kato, and H. Ikeda (1997a) *Mol. Gen. Genet.*, 255, 543-547.
- Tsukamoto, Y., J. Kato and H. Ikeda (1997b) *Nature*, 388, 900-903.
- Tsukamoto, Y. and H. Ikeda (1998) *Genes Cells*, 3, 135-144.
- Ukita, Y. and H. Ikeda (1996) *J. Bacteriol.*, 178, 2362-2367.
- Wang, T-C. and K. C. Smith (1986) *Mutation Res.*, 165, 39-44.
- Yamagata, K., J. Kato, A. Shimamoto, M. Goto, Y. Furuichi and H. Ikeda (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8733-8738.
- Yamaguchi, H. T., Yamashita, H. Shimizu and H. Ikeda (1995) *Mol. Gen. Genet.*, 248, 637-643.