

# 遺伝子の自己認識破綻による破壊 --- 遺伝子組換えと性と種の起源

Homology-driven gene inactivation in the evolution of recombination, sex and species

代表研究者 東京大学医科学研究所助教授 小林一三

Associate Professor, Institute of Medical Science, University of Tokyo

共同研究者 バリ大学ジャックモノー研究所教授 Miroslav Radman

Professor, Institute of Jacques Monod, University of Paris

Why recombination of genes has evolved is a major unsolved question in biology. We attempted to answer this question through analysis of molecular mechanisms. We (1) found that the restriction-modification systems behave as a selfish gene entity, (2) obtained evidence for homology-driven non-homologous recombination, (3) developed a stochastic model to explain the dependence of the homologous recombination on the length of the homology, (4) obtained evidence for the double-strand break repair model for homologous recombination and analyzed its role, (5) showed alteration of sequence recognition by a homologous recombinase, and (6) found roles of non-conservative recombination in rearrangements. Our results led us to hypothesize that the recombination of genes has evolved from destructive fights between sibling selfish genes.

## 研究目的

生命を遺伝子レベルで理解しようとする試みによって残された最大の謎は、遺伝子群がなぜどのようにしてこのような多様な形になったのかという問題である。遺伝子は、自己をできるだけ忠実に複製しようとするきわめて保守的な存在であることは、複製エラーを抑ええるために発達したブルーフリーディング機構一つとっても明白である。その遺伝子が、なぜ、「組み換え」という、遺伝情報をわざわざ多様化させる機構を見事に発達させ、ついには有性生殖という costly な増殖機構を作り上げたのかは、長く研究者を悩ませてきた難問である。理論家は組み換えが進化するいくつかの特殊な条件を発見した。しかし、微生物などでの組み換え分子機構の研究者には、組み換えはむしろ遺伝子の障害の「修復」機構の副産物であるという説が受け入れられやすかった。

ここでいう「組み換え」は、遺伝子間の情報の長い範囲にわたっての類似性（配列のホモロジー認識）に基づく「相同組み換え」である。実際のゲノム進化をもたらすリアレンジメントの多くは、「非正統組み換え」あるいは「非相同組み換え」という呼び名はあるものの、ほとんど実体のわかっていない細胞内遺伝子組換え機構によって引き起こされる「相同組み換え」とは、全く別の予測不可能な反応とみなされてきた。一方、組み換えにはトランスポソンの様な反復遺伝子ファミリーメンバーが遺伝子に挿入されるという形が

り、ゲノムの大きな部分は、このような「利己的な」遺伝子によって占領されている。

本研究は、このような細胞内遺伝子組み換えの機構と意味を理解しようとするものである。とりわけ、遺伝子間の相同相互作用が「自己と非自己を識別し非自己を破壊する」行為であるという可能性に注目して解析を行う。

## 研究経過

(1) 「相同相互作用によって引き起こされる非相同組み換え」を示唆する産物を、哺乳類細胞で発見した。さらに、大腸菌でこのような組み換えの選択的な検出に成功した。(2) この組み換え機構の発見に触発されて、「相同組み換えの中間体でふたつの DNA を連結している部分が、ホモロジーに沿って動き、ホモロジーの端にぶつかると破壊される」というモデルをたて、相同組み換え頻度のホモロジー長さへの依存性の説明に成功した。(3) 相同組み換えの「二重鎖切断修復モデル」のもっとも良い証明を大腸菌の系で得た。この系で、相同組み換えの起源の修復説を検討した。(4) その中で、典型的な二重鎖切断修復酵素である制限酵素が自己の維持を宿主に強制するという「利己的なふるまい」を発見した。(5) 相同組み換え酵素の DNA 塩基配列認識が変異によって変わることをはじめて示した。(6) ミスマッチ認識による自己非自己識別を研究するバリ大学の Radman 博士と、春 (フランスへ)

と秋（日本へ）、意見を交換した。秋の訪日では、博士は、遺伝学会講演、東大医科研、がんセンター、で講演をおこなった。

## 研究成果

(1) 制限修飾系の「利己的な遺伝子」としてのふるまい。

II型の制限酵素、例えばEcoRIは、特定の短い認識配列でDNAに二重鎖切断を入れる。その遺伝子(r)は、同じ認識配列をメチル化し制限酵素から保護する修飾酵素の遺伝子(m)に隣接する。これら制限修飾系は外敵のDNAを切断することによって細胞を守るために進化し維持されているというのが定説である。しかし、防御が制限修飾系の進化を説明するのに十分かは自明ではない。私たちは「ある制限修飾系の進化は「利己的な」遺伝子単位としてのふるまいによって進められた」という対照的な仮説の実験的証拠を得た。私達は、制限修飾遺伝子対(PacR7rmとEcoRIrm)を連結することによってプラスミドが著しく安定化することを発見した。「細胞から制限修飾遺伝子ペアをもつプラスミドが失われると、細胞分裂に伴って修飾酵素がうすまっていき、ついには染色体上の数多くの認識配列をメチル化しきれなくなる。残っている制限酵素がそのうち一カ所を切断し、細胞死を起こす。つまり、制限修飾酵素遺伝子ペアを追い出した細胞はこれらによって殺されるので、生きている細胞の集団中では、制限修飾酵素は高い割合で維持されることになる。」というモデルを想定し、その証拠をえた。(Naito et al. 1995)

私たちの最初の発見は、「PacR7r+m+遺伝子を連結したプラスミドは、インコンパチブル(共存不能)なプラスミドによって置き換えられにくい」というものだった。「入ってきたプラスミドが中にあるプラスミドと置き換わるのがうまくいかないのではなく、置き換えがおきた細胞が生存するところがうまくいかない」ことが示唆された。これは、「ウイルス感染細胞の利他的な自殺(アポトーシス)にも似た感染防御戦略である。侵入を受けた細胞は侵入したプラスミドもろとも死ぬが、それによってr+m+プラスミドの方が集団としてみれば侵入プラスミドとの生存競争に勝ち残る。(Naito et al. 1995)

このような「利己的な」制限修飾遺伝子が宿主内に複数ある場合、もしそれらが別の塩基配列を認識するならば、ひとつの制限修飾系は、自己の維持を宿主細胞に強制することができよう。しかし、二つの制限修飾系が同じ塩基配列を認識するならば、話は違ってくる。ひとつの制限修飾遺伝子が失われても、その制限酵素が染色体を切断することはないだろう。なぜなら、

もうひとつの制限修飾系がそれをメチル化しているから。これらの予想は実験によって確かめられた。これらの結果は、認識配列を同じくする二つの制限修飾遺伝子単位は、host-killingによる安定化において互いに排除しあうことを意味する。このようなゲノム内の特定の塩基配列をめぐる競合は、利己的な制限修飾遺伝子単位の多様な塩基配列への特殊化をもたらすであろう。制限修飾系が「利己的な遺伝子」として進化したとすれば、配列認識の個別的な特異性と全体としての多様性など、その多くの謎が説明できる。(Kusano et al. 1995)

(2) 非保存的な相同組換えの役割。

二つのDNA分子の相同組換えによって、常に二つの子DNA分子が作られるとは限らない。二つのDNA分子から一つのDNA分子だけが作られる場合も考えられる。前者を「保存的 conservative」、後者を「非保存的 non-conservative」と呼ぶ。「断端を介した相同組換えの繰り返し」による見かけ上の二重鎖切断修復が実際に起きている証拠が得られた(Yokochi et al. in prep.)。この非保存的な組換え機構によって、分子内の繰り返し配列間の組換えが配列の相対的な向きに依存することが理解できる(Yamamoto et al. submitted.)。

(3) 「二重鎖切断修復モデル」の証明とその役割の検討。

大腸菌のRecE経路とラムダのRed経路では、二重鎖切断修復モデルの予測する二重鎖ギャップ修復が、プラスミドを導入する実験系で証明された(Yokochi et al. 1995)。なお、この反応には二重鎖端から一本鎖端を作り出すエキソヌクレアーゼと、アニラーゼが関与している(Kusano et al. 1995)が、相同性対合に関与するrecA蛋白は必須ではない(Yokochi et al. 1995)。大腸菌RecE経路による二重鎖切断修復の実験系から、障害修復と交叉の密接な関係を示唆する二種類の実験結果が得られた。第一は、交叉の遺伝的な決定因子の発見である(Kusano et al. 1994)。まず、この系での二重鎖切断修復には高い頻度で両側の交叉が伴っていた。ある遺伝子(recJ)の変異によってこの交叉は著しく減少した。第二の遺伝子(recQ)の変異はこの効果をサプレースした。DNAに障害を与える紫外線、ガンマ線、過酸化水素による処理後の細胞の生存率に、この二種類の変異は上とパラレルな影響を与えた。これは、交叉とDNA障害の修復に密接な関係があることを示唆する。第二は、DNAの挿入が二重鎖切断での組換えの保存性に及ぼす影響である(Takahashi et al. in prep.)。二重鎖切断が保存的な組換えを起こしても非保存的な組換えを起こしても検出できる系で、高い頻度で保存的な組換え(二重鎖切断修復)が起きるこ

とを示した。ところが、切断点に鋳型と相同でない DNA が連結しているときには、この保存的な組換えは特異的に阻害され、非保存的な組換え（半分の交叉）が現われた。挿入 DNA の長さに応じて、保存的な組換えの割合（二つの産物を同時に回収する確率）は減少した。

これらの結果から、二重鎖切断修復機構と DNA 障害修復について次のような仮説を提案した (Kobayashi et al. 1995)。二重鎖切断は DNA 上にシークエンス特異的でなく領域特異的に作られる。挿入したばかりの外來 DNA 上あるいはその近くを二重鎖切断がヒットすると、これと相同な無傷の DNA との間に非保存的な組換えが起きて挿入変異の無い一つの DNA 分子が形成される。つまり、二重鎖切断修復は DNA 上から「異物」を排除するための破壊的なパトリールシステムではないかという考え方である。

#### (4) 相同組換え酵素の塩基配列認識の変化。

相同組換えにおいて、特定の塩基配列の相同組換え酵素による認識が重要な役割を果たす。大腸菌では、制限酵素による二重鎖切断に引き続いて、RecBCD エキソヌクレアーゼによる DNA 分解が進むが、これはカイ配列にであうとストップし、相同組換えが起きる。ある変異エキソヌクレアーゼでは、この認識配列が変化することを証明した。この組み合わせでは、エキソヌクレアーゼのストップは起きるが、組換え促進は見られない。相同組換え酵素の塩基配列認識変化のはじめの例である (Handa et al. submitted)。

#### (5) 「相同相互作用による非同組換え」の解明。

哺乳動物細胞では遺伝子ターゲティングの機構を染色体外のミニ染色体 BPV を標的として用いた系で解析する中で、この機構を示唆する産物が得られた。これらの構造は、遺伝子間の相同性による相互作用が様々の段階で中断され非同組換えを引き起こしたことを強く示唆する (Sakagami et al. 1994)。さらに、アデノウイルスベクターを用いてドナー遺伝子を導入する実験でも、この形の産物がえられた。その一つでは、非同組換え点に、フィラー DNA が挿入されており、中間体として二重鎖切断があることが強く示唆された (Fujita et al. 1995)。

「相同相互作用に依存する非同組換え」を示唆する組換え体は、二つの方法で大腸菌でも発見された。一つは、二重鎖ギャップをもつプラスミドの大腸菌多重変異株への導入である (Kusano et al. in prep.)。第二の系は、優性の薬剤感受性遺伝子を 2 コピーもつプラスミドを適当に切断してから、劣性の薬剤耐性遺伝子をもつ大腸菌に導入し、2 コピーが共に失われた組換え体を検出するという系である (Fujita et al. in prep.)。この機構によると考えられる組換え産物が、既に報告

されているゲノム再編の中に見いだされた (Kobayashi et al. 1995)。

(6) 相同組換え頻度のホモロジー長さへの依存性。従来は、「相同組換え頻度はホモロジーの長さの一次関数である。」と考えられてきた。ところが、このビクチャーは、遺伝子ターゲティングでの異常なホモロジーの長さへの依存性を説明できなかった。「相同相互作用に関連する非同組換え」の発見に触発されて、「二つの DNA がホモロジーのある部分で結合して中間体構造を作る。その連結点はホモロジーにそってランダムウォークする。分岐点の解離による相同組換え体の形成もあるが、分岐点がホモロジーの端に来ると破壊されてしまう」と見てモデル化をこころみた。その結果、「相同組換え頻度は、ホモロジー長さが短い場合はその 3 乗に比例し、長くなると 1 乗に比例する。どの長さでこのシフトが起きるかは、系によって異なる」というルールが導かれた。この理論的結果は、遺伝子ターゲティングを含む多くの系での実験結果とよく一致した (Fujitani et al. 1995)。「分岐点がホモロジーの端で跳ね返されることもある。」という、より一般的な定式化によって、変異体での結果をも説明できた (Fujitani & Kobayashi, in press.)。

#### 今後の課題と発展

「制限酵素が利己的にふるまう」という発見によって、「遺伝子がなぜ組みかえるのか」という難問をめぐっての諸問題が解かれる見通しが得られた。「利己的な遺伝子が自己と非自己を識別し、非自己に二重鎖切断をいれて破壊する」という機構がまずあり、そのひとつの表れが、「相同相互作用による二重鎖切断と非同組換え」であろう。利己的な遺伝子の間の戦いが繰り返される中で、「非保存的な組換え」と保存的な「二重鎖切断修復モデル」に従う組換えが進化してきたのであろう。

より具体的には、次のような課題の検討が、この「利己的な遺伝子の争いとしての組換え」という作業仮説をめぐって必要になるだろう。(1) 「利己的な遺伝子」としての制限修飾系のふるまいによって、どこまでその進化が説明できるか？(2) 「二重鎖切断モデルでの二重鎖切断酵素」と制限酵素の関連は？(3) 相同相互作用による二重鎖切断の導入の機構は？(4) 相同組換えのホモロジー長さ依存性が、このような破壊過程としてのモデル化で説明できるか？

#### 発表論文

1. Kobayashi, I. Selfish gene hypothesis for the restriction endonucleases and modification methyltransferases. In "Epigenetics", Russo, V., Martienssen, R. and Riggs, A. (eds.) Cold Spring

- Harbor Laboratory Press, New York, in press (1996)
2. Fujitani, Y., and Kobayashi, I. "A random walk model of the homologous recombination." **Physical Rev. E.** in press
  3. Kusano, K., Naito, T., Handa, N. and Kobayashi, I. Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for specific sequences along DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** in press
  4. Fujita, A., Sakagami, K., Kanegae, Y., Saito, Izumu and Kobayashi, I. Gene Targeting with a Replication-Defective Adenovirus Vector. **J. Virol.** 69: 6180-6190 (1995)
  5. Kobayashi, I. Homologous gene targeting for human gene therapy: Adenovirus-mediated gene transfer, homology-associated non-homologous recombination and homology-length dependence. **Proceedings of 9th symposium "Molecular Biology of Hematopoiesis"** June 24-27, 1995, in press
  6. Fujitani, Y., Yamamoto, K., and Kobayashi, I. Dependence of Frequency of Homologous Recombination on the Homology Length. **Genetics**, 140: 797-809 (1995)
  7. Kobayashi, I., Sakagami, K., Kusano, K., Fujitani, Y., and Takahashi-Kobayashi, N. Homologous interaction as a destruction process: Hypotheses for homology-driven non-homologous recombination and double-strand break repair. Modification of gene expression and non-Mendelian inheritance: **Proceedings of the US-Japanese joint meeting.** Oono, K. Takaiwa, F. (eds.) National Institute of Agrobiological Resources, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba Science City, Ibaraki, Japan (1995)
  8. Naito, T., Kusano, K., and Kobayashi, I. Selfish behavior of restriction-modification systems. **Science**, 267, 897-899 (1995)
  9. Yokochi, T., Kusano, K. and Kobayashi, I. Evidence for conservative (two-progeny) DNA double-strand break repair. **Genetics**, 139, 5-17 (1995)
  10. Sakagami, K., Tokinaga, Y., Yoshikura, H. and Kobayashi, I. Homology-associated non-homologous recombination in mammalian gene targeting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, 8527-8531 (1994)
  11. Kusano, K., Takahashi, N., Yoshikura, H. and Kobayashi, I. Involvement of *recE* exonuclease and *recT* annealing protein in double-strand break repair by homologous recombination. **Gene** 138, 17-25 (1994)
  12. Kusano, K., Takahashi, N., Yoshikura, H. and Kobayashi, I. DNA double-strand break repair: Genetic determinants of flanking crossing-over. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, 1173-1177 (1994)
  13. 小林一三. 「遺伝子にプログラムされた死--- 病原体としての制限修飾系を中心に」科学、刊行中
  14. 中山洋一、小林一三. 「制限酵素はなぜあるのか？」化学と生物、刊行中
  15. 小林一三. 「"利己的な遺伝子" 単位としての制限酵素メチル化酵素」細胞工学. 14: 1015-1023. 1995
  16. 内藤拓、小林一三. 「プログラム細胞死と「利己的な遺伝子」--- 制限酵素はなぜあるのか？」実験医学. 13, 1444-1447. 1995.
  17. 小林一三. 「遺伝子ターゲティングのメカニズムとその効率化 --- 「遺伝子の治療」をめざして」蛋白質核酸酵素. 刊行中.
  18. 小林一三. 「遺伝子ターゲティングによる「遺伝子の治療」の実現へ向けて」最新医学. 50: 1718-1730.
  19. 小林一三, 藤田亜弓. 「相同組換えによる「遺伝子の治療」をめざして」造血因子. 5, 8-16. 1994.
  20. 小林一三. 「遺伝子間相同相互作用の機構、意味、起源」蛋白質、核酸、酵素. 39, 579-588. 1994.