組換えモデルについて

京大・理 梁 永 弘

1960年代前半頃から、DNAに対する視点が大きく変わり、遺伝情報の担い手としてのDNAでなく、代謝的動態にあるDNAの研究に重点が移ってきている。遺伝組換えのみならず、DNAに生じたいろいろな障害の修復、DNAの修飾・制限、DNA分子構造の twist ⇌ relaxed 転移などDNAの代謝的動態のいろいろな様相が本特集でとりあつかわれている。一般的な組換え機構の説明に提出されているモデルを簡単に考察して、本特集のエビロークにかえよう。

組換えに染色分体(2本鎖DNA)の切断・再結合が関わるものであることが Meselson と Weigle のバクテリオファージでの実験¹⁾、後に Taylor による真核細胞の減数分裂の実験で明らかにされ²⁾ 確固としたものとなった。この特性のほかに、組換え機構を考察するとき必ず心に留めなければならないものに、カビなどで見出されている遺伝子変換と云われている遺伝現象がある。ある種のカビでは、減数分裂過程で複製した親染色体は4つの染色分体(tetrad: 4分子)になり、この段階で組換えが起こる。減数分裂が終ると、この4つの染色分体は順序だてて並んだ4つの細胞になる。あるものではさらに一回の体細胞分裂を経て一列に並んだ8つの細胞すなわち胞子になる(図1)。2つの親染色体に由来するものはそれぞれグループになって並んでいる(図1(i))。普通、組換えは相互交換的(reciprocal)に起こっているが、(図1(ii))、稀れには、4:4の分離比からはずれた、異常分離(abberant segregation)が起こる(図1(iii)~(ix))。この現象は遺伝子変換(gene conversion)と呼ばれており、同一遺伝子内にあるような非常に近接した遺伝マーカーでより頻繁に観察されている。異常分離を示す遺伝マーカーから離れたマーカーの間では正常な相互交換的な組換えが起こっている。この異常分離がみられる部位は組換え過程で形成される中間体、ヘテロ接合の2本鎖DNAすなわち雑種DNAになっている部位に相当し、この部位でできる非相補的塩基対の修正

(correction of mismatched base pairs)によって遺伝子変換が起こるのであると考えられている。どちらの親型の塩基対に修正されても遺伝子変換が生じるのだが、遺伝マーカーの差異による頻度の変化が観察されており、この過程に関わる要因はほとんど明らかになっていない。

今日まで提出されている組換えモデルは詳細な過程ではそれぞれ異なっているが、共通な過程がどのモデルにおいても仮定されている。DNA分子に固有な立体化学的な制約から、切断のない完全な2本鎖DNAの間では安定な塩基対合による会合体は形成されない³⁾。組換えに関与するDNA分子のうち、すくなくとも一方の親DNA分子の片鎖に切断が起こり、このようにして生じた自由端が塩基対合によって相同DNAと結合する。このヘテロ2本鎖DNAあるいは雑種DNA分子が組換えに必要な中間体と考えられている。この中間体がDNA合成を伴ったり、冗長な鎖の切除、新たに生じた切断点との結合を経て組換え分子になる。この過程にDNAの修復のみならず非相補的塩基対の修正が平行して起こる。

組換えの開始事象といえるDNA鎖上に単鎖切断が生成する機構が説明されないで残っている。遺伝的組換えに関わる遺伝子が多く知られているが、たとえば大腸菌の *rec B*, *rec C*, *rbc B*, その他多くのものも、DNAの切断に関与するとは考えられていない。ある種のカビで遺伝子変換の極性、すなわち遺伝子変換頻度の変異座位への依存性が見出されている。この現象を説明するのに、特定部位での切断生成の過程が仮定されている。組換えに影響する遺伝子の変異体の分析から、特異的なエンドヌクレアーゼが考えられたり⁴⁾ DNAの特異的塩基配列、palindrome型の配列が特別な制限酵素によって切断されるとし、大腸菌の *lac* 遺伝子系のおペレーター部位で明らかにされた塩基配列の類推から、それぞれの遺伝子(群)のおペレーター部位に組換え開始の切断点が生じるという考え⁵⁾ など

図1 +x mの交配の分離のタイプ。左側に減数分裂による8個の孢子形成の過程が模式的に示してある。

多様な説明が提出されている。また、このように特異的なエンドヌクレアーゼを考えずに、DNA複製過程での特異的な座位、たとえばレプリコンの末端にある切断点を仮定している説もある⁶⁾。一方、原核性生物で明らかになっている、リガーゼ遺伝子の変異体で組換え頻度が高まることは、長く持続する自由端があれば組換えが開始しうること示唆している。T₄ファージで、末端繰り返しのある部位で組換えが高い頻度で起こることも同じことを反映したものと考えられよう。紫外線によって組換えが高められることがわかっているが、これも紫外線照射によって生成した産物、ピリミジン2量体の除去修復過程が関与したものではなく、複製によって修復されていない2量体の相手側に生成するギャップが関わるものと考えられている。このようにDNA鎖の末端あるいは切断点が存在すれば、組換え過程が進行するのであるが、用いられる切断のタイプにより遺伝的帰結が異なるという興味ある観察がある。減数分裂過程で生じる遺伝子変換のパターンと体細胞分裂過程でのX-線照射などで高められた体細胞組換えで生じる遺伝子変換のパターンとで極性に差異が観察されているのである⁵⁾。

生理的条件の温度では、切断点のあるDNA鎖がほどこけて、自由端をもつ単鎖ができることはなく、この過程にはAlbertsタンパク質のような因子が不可欠であろう。同じような性質をもったタンパク質がカビの

一種 *Ustilago maydis* やユリの減数分裂過程にある細胞で見出されている。このような因子の関与のもとで生じた、自由端をもつ単鎖が他のDNA分子の相同部位へ転移し、水素結合することによって組換えが進行するのである。組換えに関わる2つの親分子の両方に切断点があつて、組換えが相称的な交換で始まるのか、片方の親DNAのみに単鎖の切断があつて、不相称的な交換で組換えが始まるのか、さらに前者の場合、切断は化学的極性が同じ鎖に生ずるのか、あるいは化学的極性が異なる鎖に生ずるのかによって、組換えのこの段階は3つのタイプに分けられる。

タイプIのモデル：親DNA分子の双方で、化学的極性が同じ平行な鎖に切断を仮定する。このタイプに属する典型的なものがHolliday⁷⁾のモデルである(図2)。一方のDNAに生じた単鎖切断の位置に正確に対応するところで他方のDNAにも切断が起こる。自由端の交換が起こって、それぞれ他の親分子と相補的な塩基対合を形成し、それぞれが移行したDNA鎖にある塩基対合している末端と再結合する(図2, B, C)。図2のCに示されている半染色分体が交換したキアズマ(half chromatid chiasmata)はHolliday構造とも呼ばれており、多くの組換えモデルで考えられている基本的な中間体である。この雑種DNA分子の構造上等価な部位②あるいは⑧でDNaseによる切断が起こると①と②の間にヘテロ接合の2本鎖DNA部分が生

じる。この部分に遺伝マーカーが位置していると、非相補的な塩基対の修正が起こり、遺伝子変換が生じる。2つの染色分体で修正があれば6:2(図1の(VIII)または(IX))に分離し、一つの染色分体のみに修正が起きれば5:3(図1の(IV)~(VII))に分離し、どちらの染色分体にも修正が起これないと異常4:4(図1の(III))に分離することになる。Holliday構造が②の位置で切断されると、ヘテロ接合部位を挟む遺伝マーカーは親型のままであり、③の位置で切断が起こると組換え型になる。すぐ後で述べるように、図2のCのHolliday構造は異性体化を経て図2のDの構造になりうる。この2つの構造は平衡状態にあるので、単鎖が交叉している部位すなわち③の位置での切断を考えるだけで、ヘテロ部位を挟む遺伝マーカーは親型にも組換え型にもなりうる。このモデルで仮定されているように単鎖切断が正確に対応する位置に起きない場合も、塩基配列の切除、DNA合成を組み入れた段階を考えればよいであろう。遺伝子変換の機構として考えられている非相補的な塩基対の修正はカビ類だけでなく、ショウジョウバエでも同様な機構が作用していることを示唆している実験結果があるし、バクテリアはファージでこの機構が存在していることを示している事実が蓄積してきている。

Sigal と Alberts⁸⁾は Holliday 構造の分子模型を組立て、この構造はすべての塩基が対合した立体構造をとりえて、交叉点を中心とした分子の回転で同等な分子構造の異性体になりうることを明らかにした(図3)。この異性体化の過程が多くのモデルで用いられている。

タイプⅡのモデル：単鎖切断が2つの親DNA分子の化学的極性の異なる反対平行の鎖に生じる。このタイプの古典的なものがWhitehouseのモデルであるが、図4にはWhitehouse-Hastingsの修正モデルが示されている⁹⁾。レプリコンの末端で結合しないまま残っている自由端がほどこて、そのあとに新しいDNA鎖の合成が起こる(図4, B)。新しく合成された鎖がほどこて、他方の親DNA分子の自由端をもった単鎖と対合し、その鎖を鋳型として伸長をつづける(図4, C)。

図2 Hollidayの組換えモデル(本文参照)。

図3 Holliday 構造の異性体化の過程(文献 8, 12, 15, 16を参照せよ)。

切断のなかった鎖にヌクレアーゼによる切断が生じ、冗長な鎖の分解ならびに修復合成を伴った後結合する(図4, D)。ヘテロ接合の2本鎖部位での非相補的な塩基対の修正により遺伝子変換が生じる。このモデルではヘテロ部位を挟む遺伝マーカーは組換え型になる。2重組換えは同じ事象が再度起こることによって仮定されている。

T₄ ファージ感染菌でみられる組換え中間体の構造の生成機構の説明に提出された Broker と Lehman のモデル¹⁰⁾もタイプⅡに属するものである(図5)。化学的極性が異なる鎖に起こった切断点からほどこける。自由端をもつ単鎖どうしが相補的に対合し、移動していくに伴ってギャップを作りだす(図5, B)。切断のない完全な鎖がこのようにして生じたギャップ部位で対合する(図5, C)。このCの構造は別の過程でも生成しうる。切断点から exoヌクレアーゼの分解によ

ってギャップが作られる(図5, B'), この部位で2つの親分子が対合し(図5, B''), この対合部位が塩基対合している自由端を押しつけていくに伴って、遊離してきた単鎖が相補的な対合をしてCになる。このような中間体におそらく枝分れ部位に特異的なendoスクレーゼが作用して、いろいろなタイプの完全なゲノムが整えられるのであろう。このモデルは真核細胞での組換え機構の説明を意図したものではないが、一つの組換え体分子を形成するために、片方の相互交換的な組換え体分子を犠牲にするという過程がいろいろな生物によって、ある特定の条件のもとで、用いられている可能性が考えられよう。

図4 Whitehouse-Hastingsの組換えモデル(本文参照)。

図5 Broker-Lehmanの組換えモデル(本文参照)。

タイプⅢのモデル：2つの親DNA分子のうち、片方の分子の単鎖切断でもって組換えが開始する。バクテリアの組換え、すなわち接合、形質転換で供与DNA分子の片鎖のみが組換え体に組込まれているという事実から、単鎖DNAが2本鎖DNAに侵入していった対合するという組換え過程が広く考えられており、Fox¹¹⁾の形質転換のモデルはこの一例である。いろいろな物理化学的要因によって生じたDNA分子上の障害の組換え修復過

程もこのタイプのものと考えてよいであろう。ここでは、タイプⅢのモデルとして、真核性生物での遺伝子変換の説明のために提出されたMeselsonとReddingの一般的組換えモデルを見てみよう¹²⁾。

一つの親DNA分子に生じた切断点からほどけて、自由端のある単鎖DNAができる。この単鎖DNAが2本鎖DNAに侵入していった、相同部位で対合をする。この過程はDNA分子を部分的に変性させるタンパク質や、大腸菌のたたみこまれた染色体で観察されているようなsuperhelicalな構造に生じる部分的な単鎖状の構造の存在などで促進されるであろう。MeselsonとRaddingのモデルでは、侵入していく単鎖DNAは5'の自由末端をもっているとされる。これが他の親DNAに侵入していき、相対的な対合をする(図6, B)。このような分子会合体が安定化するためには、侵入されたDNA分子のどちらかの鎖に切断が起こることが必要であると考えられている。したがって、この段階以後はタイプⅠやⅡのモデルで仮定されているものに似た過程をたどることになる。いま考えているモデルでは、侵入してきた鎖と同じ化学的極性をもった鎖で、侵入してきた鎖の末端とほぼ対する位置に切断が生じる場合が考えられている(図6, C)。片鎖が他の親

図6 Meselson-Raddingの組換えモデル(本文参照)。iは異性体化の過程を示し、Sは相称な交換の系路を示す。

DNA 分子へ移行して、空白になった部位で DNA 合成が起こる。これに伴って、侵入して枝になっている鎖が転移・同化され、冗長になった単鎖が分解される(図 6, D)。このように不相称な交換によってできた中間体(図 6, D)は異性体化を経ると、相称な交換によって生じる組換え中間体(図 6, E)と等しい構造をもとりうようになる。一方、冗長な単鎖と新たに合成された DNA 鎖とに相称な交換が起こって(図 6 の C または D の段階)、図 6 の F に示されている中間体になる過程も考えられている。この中間体は異性体化によって、不相称な交換で出来る中間体(図 6 の E)に等しい Holliday 構造になる。このモデルによって生じる組換え体の遺伝的意味が図 7 に示されている。不相称な交換によって生じたヘテロ接合の 2 本鎖部位では片方の親の遺伝情報を担った鎖が 3 つあり、もう一つの親の鎖は 1 つしかない。相称な交換が起こって出来たヘテロ接合部位では 2 つの親の遺伝情報が同等に寄与している。

タイプⅢのモデルで考えられるもう一つの系路を仮定したものとして、 $\phi \times 174$ ファージの組換え過程のモデル¹³⁾に簡単にふれておこう。一つの RFⅡ DNA 分子の自由端がほどこけて、RFⅠ DNA に侵入していく。対合後、侵入した鎖と化学的極性の異なる鎖、すなわち相補的な鎖に切断が生じる。この新しく生成した自由

端がもとの RFⅡ DNA へ移行、対合して、結局、相称な交換が起こる。Holliday 構造ができるため、この環状 DNA の組換え中間体は 8 の字型になる。遺伝組換え体は遺伝子変換によって生じると考えられている。

上に述べてきたモデルのほとんどは、Meselson と Weigle¹⁾が提出した切断・再結合の古典的モデルからはずれ、切断・再結合と DNA 複写(coping)過程などの代謝的動態が組みあわさったものである。Clark¹⁴⁾が提唱しているように、組換えに関わる酵素などいろいろな要因の存否によって、組換え過程はさまざまな系路をとりうると考えられている(前号参照)。DNA 鎖の交換によって形成された枝鎖の移動、新たな合成による DNA 鎖の置き換え、これらに伴ってできる冗長な単鎖の分解あるいは他の DNA 鎖への同化などが組換え過程で協奏して起こっているわけであるが、このような過程が経る順序、たとえば、非相補的な塩基対の修正が枝鎖の移動より先に起こるか、後に起こるかなどによって、組換えの遺伝的帰結も多様になってくる。これまで提出されているモデルから、より現実を反映したモデルを構成していくには、組換えの個々の段階に関与する酵素やタンパク質などの因子の特性、細胞内に存在する量比、その制御系などの解明が必要である。組換えのみならず多様な生物機能をもっていることがわかっている大腸菌の *rec A* 遺伝子の分子遺伝学的な研究も緒に就きかけており(前号参照)、遠くない将来に、分子レベルでの組換え機構の統合的な像を描ける時が来るかもしれない。当座は、“組換えモデルの組換え(Hotchkiss¹⁷⁾, 1974)”の試行錯誤をしながら、より現実的なモデルを探索していかなければならないであろう。本特集がこのような試みの足掛けになることを期待しながら筆をおく。

文 献

- 1) M. Meselson, J. Weigle: Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 857 (1961).
- 2) J. H. Taylor: J. Cell. Biol. 24, 57 (1965).
- 3) M. Meselson: Heritage from Mendel (ed. R. A. Brink) 81, Univ. of Wisconsin Press, Madison (1967).
- 4) T. Angel, B. Austin, D. G. Catcheside: Aust. J. Biol. Sci. 32, 1229 (1970).
- 5) H. M. Sobell: Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 279 (1975).
- 6) H. L. K. Whitehouse: Biol. Rev., 45, 265 (1970).
- 7) R. Holliday: Genet. Res., 5, 282 (1964).
- 8) N. Sigal, B. Alberts: J. Mol. Biol., 71, 789 (1972).

図7 Meselson-Radding のモデルの特性と遺伝的結果の要約¹²⁾ a は奇数回の異性体化が起こった場合でヘテロ接合部位を挟む遺伝マーカーは組換え型になる; b は偶数回の異性体化が起こった場合で類型になる。

- 9) H. L. K. Whitehouse, P. J. Hastings: *Genet. Res.*, 6, 27, (1965).
- 10) T. R. Broker, I. R. Lehman: *J. Mol. Biol.* 60, 131 (1971).
- 11) M. S. Fox: *J. Gen. Physiol.* 49, 183 (1966).
- 12) M. S. Meselson, C. M. Radding: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 358 (1975).
- 13) R. M. Benbow, A. J. Zuccareri, R. L. Sinsheimer: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 235 (1975).
- 14) A. L. Clark: *Ann. Rev. Genet.* 7, 67 (1973).
- 15) H. M. Sobell: *Molecular Mechanisms in Genetic Recombination* (ed. R. F. Grell) 1, Plenum Publishing Co. New York (1974).
- 16) S. Emerson: *Genetic Organization* (ed. E. W. Caspari, A. W. Ravin), Vol. I, 267, Academic Press, New York (1968).
- 17) Hatchkiss: *Ann. Rev. Microbiol.*, 28 445 (1974)

Brief survey of recombination models

Yeikou Ryo:

Department of Botany, Faculty of Science,
Kyoto University

ABSTRACT

Specificity and Variability of Genetic Recombination

Hideo YAMAGISHI

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

In the special issue on "Specificity and Variability of Genetic Recombination", various aspects of genetic recombination in *Escherichia coli* are tried to understand in terms of biochemistry and biophysics rather than molecular genetics. The papers are grouped into the following four sections: (1) General recombination; (2) Site specific and half site specific recombination; (3) Illegitimate recombination; and (4) *In vitro* recombination. In the first section, the major role of the *recA* gene in genetic recombination is discussed and new findings obtained from the analysis of *recA* transducing phage presented by H. Ogawa. Also multiple pathways of recombination in *E. coli* are reviewed by S. Shinoura and T. Kato. In the second section, based on their genetic analysis of integration and excision of lambda phage, the structure of the lambda attachment site was discussed by Y. Fukumaki and K. Shimada. The integration mechanism of mu phage was studied by constructing λ -mu hybrid phage and presented by T. Ogawa. A new classification of repeated DNA sequences, including the IS sequences, was introduced and different aspects of episome-host interaction discussed in relation to the interaction between the repeated sequences by H. Ohtsubo and E. Ohtsubo. In the third section, new types of DNA duplications in lambda phage were presented and discussed with respect to the replication error in the origin and termination site by H. Yamagishi and various cases of excision of the λ transducing phage carrying suppressor tRNA genes were introduced by H. Inokuchi and H. Yamagishi. In the fourth section, substrate specificity and variability of restriction enzymes were reviewed by E. Akaboshi and K. Matsubara. Finally, the dynamic aspects of DNA as the substrate for integrative recombination were stressed in the work on DNA gyrase by K. Mizuuchi in collaboration with H. Nash, M. Gellert and R. Weisberg. This issue is headed by the Preface by H. Yamagishi and K. Okamoto (Editors) and the Introduction by H. Ozeki. It is followed by the Epilogue which is a brief survey of recombination models by Y. Ryo. The epilogue introduces the concept of "Recombination of Recombination Models" which in itself becomes an appropriate prologue for future issues.