MOLECULAR EVOLUTION OF DNA REPLICATION MACHINERY APPROACHED FROM THE VIEWPOINTS OF ARCHAEA
– EVOLUTIONAL DISCUSSION FROM THE DISTRIBUTION OF DNA POLYMERASE –

Sonoko Ishino, Katsuya Daimon, and Yoshizumi Ishino

Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, and Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan
address: 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka city, Fukuoka 812-8581 Japan
Yoshizumi Ishino e-mail: ishino@agr.kyushu-u.ac.jp
Fax: +81 92-642-3085

Abstract

DNA replication is a fundamental phenomenon to maintain and transfer of the genetic information in the living organisms. Elucidation of the molecular mechanism of DNA replication has been one of the main subjects since molecular biology started. Most of the research results in the field were obtained from *Escherichia coli* and its phages in an early stage. Then, research was expanded to the eukaryotic cells, including yeast and mammalian cells. It is now well recognized that living organisms are divided into three domains. Archaea, the third domain, different from Bacteria and Eukarya, was joined to the field of DNA replication after two other domains and the research has been active since late 1990's to present. Comparative studies in the three domains of life provide much useful information to understand the evolution of DNA replication machinery. In this mini-review article, we will discuss mainly the molecular evolution of DNA polymerase in the living organisms.

(Keywords) DNA replication, Archaea, DNA polymerase, molecular evolution

アーキア研究から見えてくる **DNA** 複製装置の分子進化 ～**DNA** ポリメラーゼの分布から進化を考察する～

石野園子、大門克哉、石野良純
九州大学大学院・農学研究院・生命機能科学部門

はじめに

DNA 複製は生命現象の基本であり、その分子機構解明のために分子生物学誕生から現在まで多くの研究者の努力が成されてきた。真正細菌（大腸菌）で始まった複製、修復研究は、1980 年代には真核生物（酵母や動物培養細胞）へ広がった。そして、1990 年代から始まった第三の生物であるアーキアの複製機構研究の発展によって、三つの生物ドメインによる比較生物学の推進が可能となった。地球上の生物は３つの独立したドメインとして、それぞれ進化をしてきたが、生命が獲得した DNA 複製装置の基本原理とその分子進化について理解するために、この比較生物学は、多くの有益な情報をもたらしてくれる。本稿では、アーキア DNA 複製関連分子の解析から、特にその中心的存在である DNA ポリメラーゼの分子進化についてまとめてみたい。

DNA ポリメラーゼの種類

DNA 鎖を合成する DNA ポリメラーゼは、鋳型 DNA に添って、その相補配列を有する DNA 鎖を合成する酵素である。従って DNA ポリメラーゼは、生物が遺伝情報の維持と伝達の機能を発達させてきたことと密接に関わっていると言える。そのため、これまでに複製、修復関連タンパク質としては最も多くの研究が行なわれて来た。 現在までに知られている DNA ポリメラーゼは、アミノ酸配列の相同性により分類することができ、A, B, C, D, E, X, Y の７つのファミリーが知られている [1-4]。

現存する生物は一つの細胞の中に複数の DNA ポリメラーゼを備えており（図１）、それぞれが細胞の中で役割分担をしている。生命の起原から現在までに、どのようにして、また何故このような多様な DNA ポリメラーゼが進化してきたのか、大変興味が持たれる。アーキアが核を持たない原核単細胞生物でありながら、その細胞増殖やヌクレオチドの鎖への取り込み活性が、真核生物の DNA ポリメラーゼα (Polα)の特異的な阻害剤であるアフィディコリンによって阻害されることが、1980 年代半ばに報告されていたが [5, 6]、90 年代に入って実際に DNA ポリメラーゼの遺伝子がクローニングされ始めると、その配列は確かに Polαに似たファミリーB に属することが分かった [7-9]。さらに、真核生物には Polα, Polδ, Polε の三種のファミリー B 酵素が DNA 複製に関わることが分かっていたところで、超好熱性アーキアの一種から、ファミリーB に属する DNA ポリメラーゼが二種見つかったことは、アーキアの DNA 複製研究をさらに興味あるものにした [10, 11]。一つのアーキア細胞の中にいったい何種類の DNA ポリメラーゼが存在するのかを調べるために、筆者は *P. furiosus* の細胞抽出液を分画して活性を追跡した。その結果、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、DNA ポリメラーゼ活性が三つに別れることが分かった [12]。さらに種々の方法を駆使して、その活性を追求した結果、Polαに似たファミリーB 酵素 (Pol I)と共に、新規の酵素 (Pol II)を発見した [13]。この酵素は、アミノ酸配列上どのファミリーにも属さないため、新しくファミリーD を提唱した [2]。

分子生物学がすっかりゲノム時代に入り、続々と全ゲノム配列が発表されると、その都度、そのゲノム中に既存のファミリーの DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子がいくつあるのかが調べられた。そうすると、アーキアの中の大きな二つのサブドメインであるクレナーキオタとユリアーキオタで、所有する DNA ポリメラーゼの種類に明白な違いがあることが分かってきた。すな

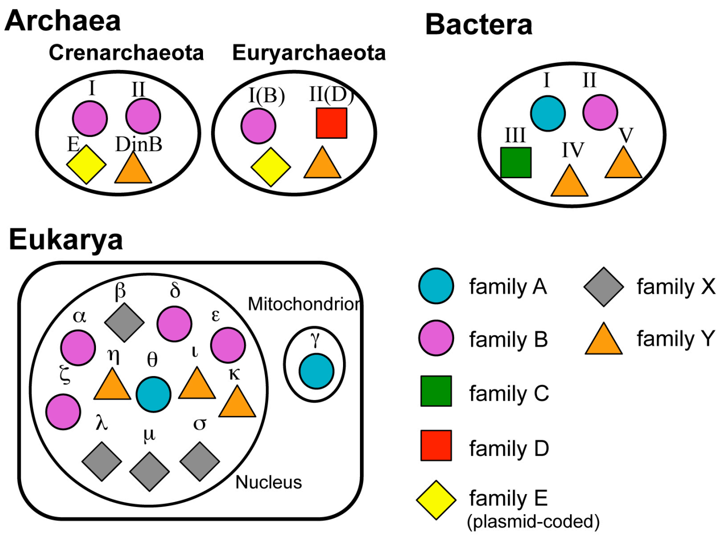

Fig. 1 Distribution of DNA polymerases from seven families in the three domains of life.
The names of DNA polymerases are various depending on the domains. Only the representative two subdomains are shown here in Archaea.

わち、PolD を有するのはユリアーキオタで、クレナーキオタには存在しない。その代わり、クレナーキオタには複数の PolB が存在するということである。また、環境要因によって、DNA 鎖の塩基に修飾が入ってしまった場合に、それが鋳型になると、複製 DNA ポリメラーゼの新生鎖合成がストップしてしまうので、入れ替わって、その部分を乗り越え合成する機能をもった DNA ポリメラーゼが存在し、その類似性からファミリー Y が提唱された [4]。この種の酵素はユリアーキオタ、クレナーキオタで区別できず、アーキアでは一部にしか存在しない。

アーキアの複製酵素はどれか？

アーキア細胞にも複数の DNA ポリメラーゼが存在することが分かると、どの酵素が DNA 複製にとって必須なものなのかということが知りたくなる。上述のように、好塩菌やメタン菌ではアフィディコリンに感受性のファミリーB 酵素が、複製酵素であろうと予想されていたし、ユリアーキオタにもクレナーキオタにもファミリーB 酵素は存在するので、それらが複製酵素であろうと考えられた。しかし、DNA ポリメラーゼとしての生化学的性質解析の結果、複製酵素に求められるプライマー伸長活性や校正活性（3′-5′エキソヌクレアーゼ活性）が高いことから PolD も複製に関わる酵素ではないかと予想された [13, 14]。他のグループからの報告とも合わせて、PolB, PolD の両方を有するユリアーキオタでは両者がそれぞれリーディング合成、ラギング合成を分担しているのではないかと言われるようになった [15, 16]。もし、リーディング合成、ラギング合成を分担する必要があるなら、クレナーキオタのほうは複数の PolB がそれぞれを受け持っているのかも知れないと想像された。

PolB は必須酵素ではなかった！

複製酵素か修復酵素かを知るには、その遺伝子が必須遺伝子かどうかを調べる方法がある。複製酵素なら、その遺伝子を破壊した変異変異株は致死となり単離できない。大腸菌の Pol III や真核生物の Pol α, Pol δ は必須である。一方修復経路は種々のバックアップがあり、また変異が入り易くなっても生きられるので、その遺伝子は必須でない。アーキアは特殊環境に生きるものが多く、培養条件の問題などで、遺伝学的実験操作が簡単ではないことが多く、大腸菌や酵母のようには解析が容易ではない。その中でも好塩菌は、培地中の塩濃度を高めておけば、普通の実験室環境でコロニー形成が可能であるので、好熱菌の *Halobacterium* sp. NRC-1 株で、複製関連遺伝子破壊株の作製が試みられた。その結果、ゲノム上に存在する PolB, PolD 共に遺伝子破壊株が単離できず、必須酵素だろうという予想が指示された [17]。

遅れを取っていた超好熱性アーキアの遺伝学的手法開発が 2000 年代半ばに進み、安定したタンパク質を供給できることから生化学的解析にとって極めて有利な超好熱性アーキア研究は、手法的に大きく前進した [18, 19]。その結果、DNA ポリメラーゼ遺伝子についても遺伝子破壊株が単離されることになった。驚いたことに、昨年 *Thermococcus* や *Methanococcus* などのユリアーキオタで、唯一の *polB* 遺伝子の破壊株が単離された [20, 21]。PolB は、少なくともこれらの菌では必須の複製酵素ではなかったのである。これらの菌では *polD* 遺伝子の破壊株は単離できないということで、PolD が複製には必須だと考えられる。このアーキアにのみ見つかっている独特の DNA ポリメラーゼは今改めて注目されている。アーキアのサブドメインは長らく知られていたクレナーキオタとユリアーキオタに加えて、コルアーキオタ、タウムアーキオタ、アイグアーキオタという新しいサブドメインが提唱されている [22-24]。これらに属する菌のゲノム中の DNA ポリメラーゼ遺伝子を調べると、クレンアーキオータの特徴である複数のファミリーB 酵素に加えて、PolD も存在する。現在、地球上に存在するアーキアの所有する DNA ポリメラーゼの分布とそれらの進化的関係に大変興味が持たれる。

DNA ポリメラーゼの進化

このように、アーキアの DNA ポリメラーゼ研究は進んできたが、これらの研究は生物全体における DNA ポリメラーゼの進化の理解に多くの有用な情報を提供した。ファミリーB の DNA ポリメラーゼは、我々ヒトを含む真核生物の細胞の中では必須複製酵素であるが、大腸菌などの真正細菌では必須ではない。アーキアの中では必須の菌もあるし、必須でない菌もありそうである。ファミリー B の酵素はどのように進化したのであろうか？

DNA ポリメラーゼがどのようにして生まれたのかは分からないが、アーキア細胞が生まれた時には複数のファミリーB 酵素とファミリーD 酵素が存在していた。そこからファミリーB 酵素が多様化して行き、現存する生物に見られるような分布になったのではないかと考えられる。より複雑化した真核細胞内でのファミリー B 酵素の由来を進化的に説明した興味深い仮説が提唱されている（図２）[25]。真核細胞に存在する三種の複製酵素 Pol α , Pol δ , Pol ε と修復酵素の Pol ζ がファミリーB に属するが、これらがどのようにして生まれて来たのかを祖先のアーキア細胞から予想している。アミノ酸配列の詳細な比較から、Pol α , Pol δ , Pol ζ はアーキアの一方の PolB と、Pol ε は他方の PolB とそれぞれ共通の祖先を有する。さらに Pol ε は真正細菌の PolB が融合した形をしている。アーキアの PolD の小サブユニットが真核細胞のファミリーB 酵素の第２サブアユニットになり、さらに大サブユニットの C 末端にある Zn フィンガー領域は Pol ε に受け継がれ、それから Pol α , Pol δ , Pol ζ へも転移したとされている。この進化説が正しいかどうかわからないが、少なくとも、アーキアの PolB, PolD はともに、現在の真核細胞が有する DNA ポリメラーゼの原型になっていると考えられる。

今後の展望

生命の起原を考える際には、PolB 酵素の原型がいつどのようにできたのかということが、最も興味深いことであろうが、それを解明するのはむずかしい。筆者にとって今最も興味深いのは、アーキア細胞の中に存在する複数のファミリー B 酵素タンパク質の構造と機能についてである。アーキアの中での DNA ポリメラーゼの分布をサブドメイン毎に見てみると、図３のようになる。ファミリーB 酵素を１つしか持たないユリアーキオタでも、菌によっては必須であるものとそうでないものがあるのであろうか？だとしたら何が違うのか？その違いはどういう進化によってもたらされたのか？アーキアのファミリーB 酵素には、その活性がアフィディコリンに対する感受性に差があることが分かっている [10, 11]。こういう性質の違いを手がかりに、アーキア細胞内におけるファミリーB 酵素の機能の違いを解析したいと考えている。また、PolD の小サブユニットは広く真核細胞のファミリー B 酵素に利用されているのに、DNA 合成触媒部位を含む大サブユニットが、なぜ受け継がれなかったのかということもミステリアスであり、DNA ポリメラーゼの進化を理解していくうえで、大変興味深い課題である。

DNA ポリメラーゼ以外にもアーキアの複製装置解析は近年急速に進展してきた [26]。複製起点認識蛋白質(Orc1/Ccd6)、複製ヘリカーゼ本体(MCM)、そのコア複合体構成タンパク質 (GINS, Cdc45)、DNA 鎖伸長促進因子(PCNA)とそのローディング因子(RFC)などがレプリソームとして形成される複合体として機能している。これらの分子についても、アーキアドメインにおける分布と機能解析の結果が蓄積されてきて、他の生物ドメインでの研究結果と比較することによって、その分子進化の理解が進んでいる。今後も三つの生物ドメインでの研究が平行して進展することに

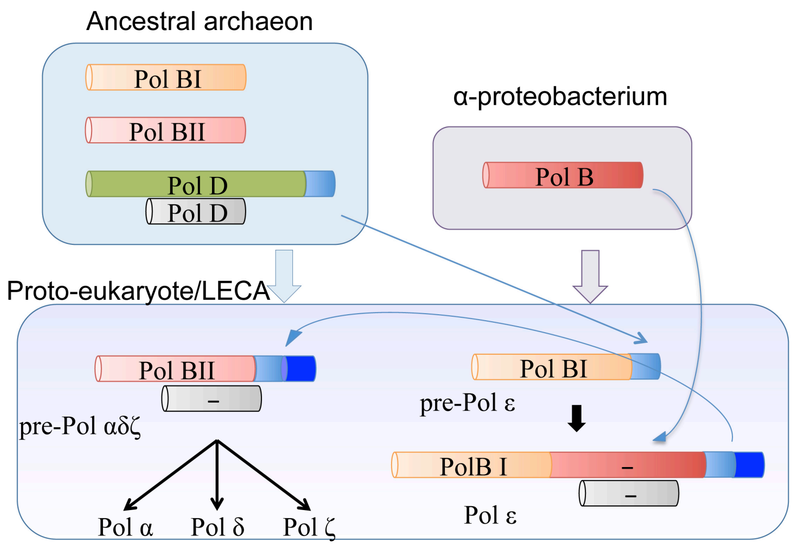

Fig. 2 Evolution of family B DNA polymerase.
Protoeukaryotic cell was derived from the symbiosis of an archaeon and α-proteobacterium. The ancestral archaeon had two PolBs and PolD. The current eukaryotic Pol α, δ, ζ come from Pol BII and the small subunit of Pol D. Pol ε was produced by insertion of the bacterial Pol B into Pol BI (PolB was inactivated). The light and dark blue boxes indicate the Zn-finger domain, which was duplicated in Pol ε and they were transferred to pre Pol αδζ. This scenario comes from the reference 25.

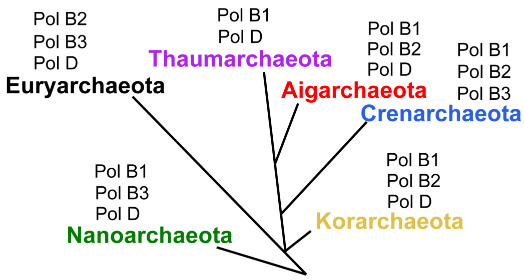

Fig. 3 DNA polymerases from family B and D in Archaea. The currently proposed six phyla in the domain Archaea are schematically shown with phylogenetical positioning, and PolBs and PolD found in each phyrum are listed.

よって、複製装置の基本的原理とその誕生についてより理解が深まることが期待される。

引用文献

1. Braithwaite, D. K. and Ito, J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 21, 787-802 (1993)
2. Cann, I. and Ishino, Y. Archaeal DNA replication: Identifying the pieces to solve a puzzle. Genetics 152, 1249-1267 (1999).
3. Lipps, G., Röther, S., Hart, C. and Krauss, G. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity.2003. EMBO J. 22: 2516-2525.
4. Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z. and Woodgate, R. The Y-family of DNA polymerases. Mol. Cell 8: 7-8 (2001)
5. Forterre P, Elie C, Kohiyama M. 1984. Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic arachaebacteria. J. Bacteriol. 159:800-802.
6. Zabel H-P, Fischer H, Holler E, Winter J. In vivo and in vitro evidence for eucaryotic α-type DNA-polymerases in Methanogens. Purification of the DNA-polymerase of Methanococcus vannielii. Syst. Appl. Microbiol. 6:111-118 (1985)
7. Pisani FM, De Martino C, Rossi M. A DNA polymerase from the archaeon Sulfolobus solfataricus shows sequence similarity to family B DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 20:2711-2718 (1992)
8. Perler FB, Comb DG, Jack WE, Moran LS, Qiang B, Kucera RB, Benner J, Slatko BE, Nwankwo DO, Hempstead SK, Carlow CKS, Jannasch H. Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 5577-5581 (1992)
9. Uemori T. Ishino Y, Toh H, Asada K, Kato I. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon Pyrococcus furiosus. Nucleic Acids Res. 21:259-265 (1993)
10. Uemori T, Ishino Y, Doi H, Kato I. The hyperthermophilic archaeon Pyrodictium occultum has two alpha-like DNA polymerases. J. Bacteriol. 177: 2164-2177 (1995)
11. Cann I, Ishino S, Nomura N, Sako Y, Ishino Y. Two family B DNA polymerases in Aeropyrum pernix, an obligate aerovic hyperthermophilic crenarchaeote. J. Bacteriol. 181:5984-5992 (1999)
12. Imamura, M., Uemori, T., Kato, I. and Ishino, Y. A non-alpha-like DNA polymerase from a hyperthemophilic archaeon Pyrococcus furiosus. Biol. Pharm. Bull. 18: 1647-1652 (1995)
13. Uemori T, Sato Y, Kato I, Doi H, Ishino Y. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus furiosus: gene cloning, expression, and characterization. Genes Cells. 2:499-512 (1997)
14. Ishino, Y. and Ishino, S. Novel DNA polymerases from Euryarchaeota. Meth. Enzymol. 334: 249-260 (2001)
15. Ishino, Y. and Ishino, S. Conprehensive search for DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus furiosus. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 25: 681-691 (2006)
16. Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J. and Raffin, J.P. The hyperthermophilic euryarchaeota Pyrococcus abyssi likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. J. Mol. Biol. 350: 53-64 (2005)
17. Berquist, B.R., DasSarma, P. and DasSarma, S. Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, Halobacterium sp. NRC-1. BMC Genet. 8: 31 (2007)
18. T. Sato, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis KOD1 J. Bacteriol., 185, 210-220 (2003)
19. T. Sato, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis Appl. Environ. Microbiol., 71:3889-3899 (2005)
20. Sarmiento F, Mrázek J, Whitman WB. Genome-scale analysis of gene function in the hydrogenotrophic methanogenic archaeon Methanococcus maripaludis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:4726-4731 (2013)
21. Cubonová L, Richardson T, Burkhart BW, Kelman Z, Connolly BA, Reeve JN, Santangelo TJ. Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in Thermococcus kodakarensis. J Bacteriol. 195:2322-2328 (2013)
22. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. Nat Rev Microbiol. 6: 245-252 (2008)
23. Brochier-Armanet C, Forterre P, Gribaldo S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. Curr Opin Microbiol. 14: 274-281 (2011)
24. Guy L, Ettema TJ. The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. Trends Microbiol. Dec;19(12):580-587 (2011)
25. Tahirov TH, Makarova KS, Rogozin IB, Pavlov YI, Koonin EV. Evolution of DNA polymerases: an inactivated polymerase-exonuclease module in Pol epsilon and a chimeric origin of eukaryotic polymerases from two classes of archaeal ancestors. Biol Direct. 4:11 (2009).
26. Ishino Y, Ishino S. Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. Sci. China, Ser-C Life Sci. 55:1-18 (2012)