

機関番号：82401  
研究種目：基盤研究（A）  
研究期間：2008～2011  
課題番号：20247008  
研究課題名（和文）転写・翻訳を担う超分子複合体 RNA ポリメラーゼおよびリボソームの結晶構造解析  
研究課題名（英文）Crystallographic studies of macromolecular complexes in transcription and translation: RNA polymerases and the ribosome  
研究代表者  
横山 茂之（YOKOYAMA SHIGEYUKI）  
独立行政法人理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・領域長  
研究者番号：00159229

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：転写、RNA ポリメラーゼ、転写因子、翻訳、リボソーム、翻訳開始因子、X線結晶構造解析

## 1. 研究計画の概要

遺伝子発現の根幹である転写・翻訳においてそれぞれ中核的な役割を担う 2 つの超分子複合体、RNA ポリメラーゼおよびリボソームに焦点を当て、転写・翻訳の構造基盤を解明すべく構造生物学研究を行う。主に原核生物（高度好熱菌）の系を用いて、転写や翻訳における様々な状態に相当する複合体の立体構造解析を行い、遺伝子発現の分子メカニズムを解明する。並行して、原核生物とは大きく異なり、かつ複雑な真核生物の翻訳開始に着目し、結晶構造解析に適した試料の調製法を確立して解析を行う。

## 2. 研究の進捗状況

転写については、高度好熱菌由来 RNA ポリメラーゼ（RNAP）と転写因子との複合体の結晶構造解析を進めている。これまでに、転写伸長を阻害する因子として知られる Gfh1 と RNAP との複合体の X 線結晶構造解析に成功している（Nature, 2010）。Gfh1 は RNAP の NTP の取り込み口（セカンダリチャネル）に結合してこれを塞ぎ、転写を阻害することがはじめて明らかになった。さらに、この複合体では、RNAP はこれまでに見いだされていなかった新たなコンフォメーションをとっていた。これは、転写の過程で必要とされる RNAP の構造状態のひとつが Gfh1 によってトラップされたものと考えられる。転写制御因子を結合した細菌の RNAP の結

晶構造は世界初であり、今後の転写およびその制御機構の研究において重要な指針となる結果である。現在この知見をもとに、RNAP の変異体解析を進めている。また、RNAP と他の転写因子等との複合体の構造解析も進行中である。

翻訳については、高度好熱菌のリボソーム小サブユニット（30S）および 70S リボソームを用い、複合体の構造解析を進めている。これまでに、RelE ないし RimM を結合した 30S サブユニットの結晶構造解析に成功している。RimM は、2 つのドメインとそれらをつなぐリンカーから構成されており、N 末ドメインは翻訳因子によくみられるバレル構造であり、C 末ドメインは PRC バレル構造をとっていた。RimM-S19 複合体の構造から、RimM は head 領域の 50S との会合面に結合することが示された。今後は、転写開始因子 IF1 と mRNA を結合した 30S 複合体の構造解析を進めていく。また、真核生物のリボソーム小サブユニット（40S）の構造解析を行うために、His-tag を付加するなどした 40S の調製法の開発を行っている。

真核生物については、ヒト由来翻訳開始因子の構造解析を進めている。これまでに、eIF2B $\alpha$  の構造解析に成功している（J. Mol. Biol. 2009）。eIF2B はヘテロ 5 量体タンパク質で、翻訳開始因子 eIF2 の GEF として働き、翻訳開始の制御に重要な役割を担っている。明らかになった eIF2B $\alpha$  サブユニットの構造

には、リン酸化された eIF2 のリン酸化セリン残基の結合部位と思われるポケットが見いだされ、eIF2B による翻訳制御機構が示唆された。現在さらに eIF2 および eIF2B の調整法の確立およびそれを用いた結晶構造解析を目指して研究を進めている。

並行して、翻訳に不可欠な tRNA のアミノアシル化をになう特殊な系の構造解析を行った。2 段階の反応でグルタミンを結合した tRNA を合成する高分子複合体「グルタミン・トランスアミドソーム」の結晶構造解析に成功し、タンパク質間での tRNA の受け渡しの機構を明らかにした (Nature, 2010)。また、翻訳の過程でセレンをタンパク質に取り込むために不可欠なリン酸化酵素と tRNA との複合体の結晶構造解析に成功した (Mol. Cell, 2010)。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

転写については、これまでに転写因子を結合した RNAP 複合体の結晶構造解析に成功し、さらに他の因子や DNA・RNA を結合した複合体の解析を進めている。翻訳についても、リボソーム 30S サブユニットと翻訳因子との複合体の結晶構造解析に成功している。さらに、真核生物の翻訳開始因子の研究も順調に進めており、当初の研究目的を十分に達成している。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後も引き続き、転写・翻訳の中心をになう高分子複合体の構造生物学研究を推進する。特に、RNAP と転写因子等との複合体および eIF2B-eIF2 の系に重点を置き、研究を行っていく。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Tagami, S., Sekine, S., Kumarevel, T., Hino, N., Murayama, Y., Kamegamori, S., Yamamoto, M., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. “Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a

transcription inhibitor protein.” *Nature* 468, 978-982 (2010) 査読有り

② Ito, T. and Yokoyama, S. “Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions.” *Nature* 467, 612-616 (2010) 査読有り

③ Chiba, S., Itoh, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Structural basis for the major role of *O*-phosphoserine-tRNA kinase in the UGA-specific encoding of selenocysteine.” *Mol. Cell* 39, 410-420 (2010) 査読有り

④ Hiyama, T.B., Ito, T., Imataka, H. and Yokoyama, S. “Crystal structure of the  $\alpha$  subunit of human translation initiation factor 2B.” *J. Mol. Biol.* 392, 937-951 (2009) 査読有り

⑤ Naganuma, M., Sekine, S., Fukunaga, R. and Yokoyama, S. “Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8489-8494 (2009) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① Yokoyama, S., “Structural biology and engineering of the transcription and translation systems”, International Symposium “Membranes and Modules” 10<sup>th</sup> Dec. 2009, Berlin, Germany

② Itoh, Y., Chiba, S., Naganuma, M., Goto-ito, S., Fukunaga, R., Kuratani, M., Bessho, Y., Ito, T., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Crystallographic Studies of Aminoacyl-tRNA Synthesis and tRNA Modification”, 23rd tRNA Workshop, 29<sup>th</sup>, Jan. 2010, Aveiro, Portugal