

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370048

研究課題名(和文) 転写においてRNAポリメラーゼが形成する過渡的な複合体の構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional studies of multiple complexes of RNA polymerase

研究代表者

関根 俊一 (Sekine, Shun-ichi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・チームリーダー

研究者番号：50321774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：巨大なタンパク質複合体であるRNAポリメラーゼは、そのコンフォメーションを多様に変化させながら転写を遂行する。その実体を明らかにするために、CPX法を開発してRNAポリメラーゼの構造状態の解析を行うことにより、主な転写機能とRNAPの構造状態との相関関係を確立した。また、転写開始・伸長中にRNAPが形成するいくつかの複合体の結晶構造解析を行い、転写エラーの校正や外来因子による転写制御のメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RNA polymerase accomplishes transcription by temporally changing its conformation. We developed the CPX method to analyze the RNAP conformation in solution, and first established relationships between major transcription functions and RNAP's tight-ratcheted structural forms. We also performed crystallographic analyses of RNAP complexes relevant to transcription initiation and elongation, and revealed the structural basis for proofreading, as well as the regulation mechanism by an external factor.

研究分野：生物学

キーワード：転写 RNAポリメラーゼ 転写因子 校正 X線結晶構造解析 バクテリオファージ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の DNA 配列を読み取って RNA を合成する転写のプロセスは、セントラルドグマの第一段階であり、すべての生命活動の根幹である。転写は、分子量 400 kDa にも達する巨大なタンパク質複合体である DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNAP) によって担われている。近年酵母や細菌、古細菌の RNAP の結晶構造が報告され、RNA 合成機構についてはしだいに明らかになってきている。一方、転写は開始・伸長・終結の各段階を経て行われる複雑な過程であるが、RNAP はその時々必要に応じてその機能を切り替えることで転写を遂行する。このような RNAP の多機能性は、転写の各段階における RNAP の構造変化に基づくと考えられるが、具体的にどのような構造変化が起こっているかはよく分かっていなかった。また、転写の各段階で、様々な転写因子等が RNAP のはたらきを助けたり、機能を調節したりするが、それら転写調節の構造基盤についてもほとんど研究が進んでいなかった。

我々はこれまでに、細菌の一種高度好熱菌 (*Thermus thermophilus*) 由来の RNAP を用いて、世界に先駆けて転写因子や核酸を含む転写複合体の構造解析に取り組んできた。これまでに、転写開始因子シグマ(σ)を結合した RNAP ホロ酵素 (RNAP- σ) や転写伸長を阻害する因子である Gfh1 を結合した転写複合体 (Gfh1 複合体) の構造などを明らかにしている。特に、Gfh1 を結合した複合体では、RNAP はこれまで知られていなかった「ラチェット型」コンフォメーションを取っていることを見いだした。

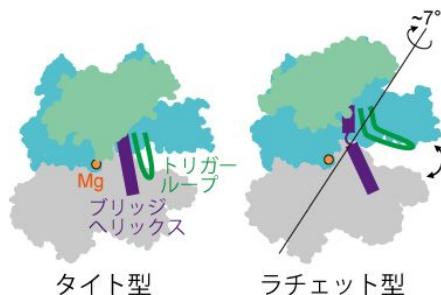


図1 RNAP の「タイト型」と「ラチェット型」コンフォメーション

RNAP の中心部で DNA/RNA を結合するチャネルを構成する 2 つのモジュールが互いに大きくずれ、従来から知られていた「タイト型」と比較してチャネルが大きく広がっていた。活性部位の再編成が行われていたことから、ラチェット型は、単に Gfh1 によって阻害された状態というだけでなく、より普遍的に、転写の諸機能と密接に関連した重要なコンフォメーションである可能性が示唆された。たとえば、転写伸長中における RNAP の一時的な転写休止状態や、転写開始・終結において核酸を結合・解離するのに必要な過渡的な中間構造に対応する可能性がある。本研究では、RNAP のラチェット型コンフォメーションの転写における役割・意義を解明し、転写開始・伸長段階における制御のメカニズムを明らかにするために、以下の機能・構造解析を行った。

2. 研究の目的

(1) CPX 法の開発とそれを用いた RNAP の構造変化と機能の相関の解明

転写中の様々な状態において、RNAP が「タイト型」と「ラチェット型」のどちらのコンフォメーションをとっているかを調べるために、分子内クロスリンク (S-S 架橋) を用いた検出系を確立する。これを用いて、代表的な転写複合体における RNAP の構造状態を解析し、機能との相関を明らかにする。

(2) 転写エラーによる RNAP の後退と転写校正機構の解明

転写伸長中の RNAP (伸長複合体) は、転写エラーを起こしてミスマッチ塩基を取り込んだときなどに、一時的に DNA 上を後退して転写を休止する (後退複合体)。このとき、RNA の 3'末端は鋳型 DNA からはがれた状態にあるが、RNAP にはこの 3'末端を切断 (校正) して転写を再開する機能が備わっている。さらに、GreA 等の転写因子は、後退複合体に結合して RNA 切断活性を大幅に促進し、転写の校正に重要な役割を果たしている (Gre 因子複合体)。転写校正 (RNA 切断) の構造基盤を解明するために、これらの複合体の結晶構造解析を行う。

(3) 外来因子による転写開始複合体形成の阻害機構の解明

転写開始の際には、RNAP は転写開始サブユニットであるシグマ因子を結合してホロ酵素となり、プロモーター配列特異的に DNA に結合し、二重らせんをほどいて転写バブルを含む開始複合体を形成する。細菌に感染するバクテリオファージの多くは、自らの転写因子を用いて宿主の転写を支配することが知られている。転写開始複合体の形成を阻害する因子も知られているが、それらとホロ酵素との複合体の結晶構造解析を行うことで、外来因子が宿主の転写系を制御する仕組みを解明するとともに、転写開始のメカニズムに関する知見を得る。

3. 研究の方法

高度好熱菌 RNAP に変異を導入し、分子内架橋によって構造変化を検出するための変異体 (CPX 変異体) を作成した。反応条件等を最適化し、構造変化を検出する系を確立した。高度好熱菌 RNAP を用いて、後退複合体や転写因子を結合した状態の複合体を再構成し、結晶化・構造解析を行った。並行して、関連する変異体解析等を行った。

4. 研究成果

(1) CPX 法の開発とそれを用いた RNAP の構造変化と機能の相関の解明

転写中の様々な状態における RNAP のコンフォメーションを簡便に調べるために、CPX (システインペア架橋) 法を開発した。

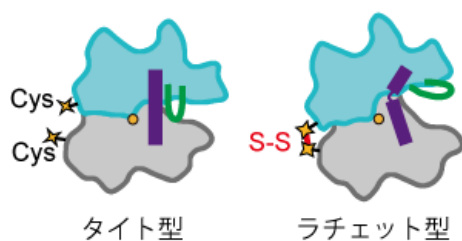


図2 CPX 法の概要

高度好熱菌の RNAP を用い、二カ所にシステイン残基を導入した変異体 (CPX 変異体) を作製した。この変異体では、RNAP が「ラチェット型」コンフォメーションをとったときに高効率でサブユニット間に S-S 結合が形成

されるため、コンフォメーション変化を検出できる。これを用いて、代表的な転写複合体における RNAP のコンフォメーションを調べた。

ミスマッチ塩基を取り込んで DNA 上を後退した状態にある RNA ポリメラーゼのコンフォメーションを調べたところ、DNA 上を 1ヌクレオチド分後退して停止した状態では「タイト型」を、大幅に後退した状態では「ラチェット型」をとっていることが示唆された。また、前者の 1ヌクレオチド分後退した状態の RNAP に作用し、RNA の切断 (校正) を促進する転写因子 GreA は、RNAP をラチェット型に切り替えて高い活性を引き出すことが明らかになった。さらに、GreA によるラチェット型への変化は、主に RNAP が後退や停止状態にあるときに引き起こされ、通常の転写伸長複合体は抵抗性を示すことが分かった。

RNAP が合成した新生 RNA 鎖がヘアピン構造をとれるような場合、RNAP は安定な転写休止状態に入ったり、RNA および DNA を解離して転写を終結したりする。RNAP のコンフォメーションは、このような RNA ヘアピンによってもラチェット型に切り替わることが明らかになった。

このように、RNAP のラチェット型コンフォメーションは多くの重要な転写機能に深く関与していることが初めて明らかになった。新生 RNA や転写因子がタイト型とラチェット型の 2つのコンフォメーションの切り替えに深く関与しており、転写の諸機能が 2つのコンフォメーションの切り替えによって制御されているという普遍的原理の存在が示唆された (Mol. Cell 2015)。

(2) 転写エラーによる RNAP の後退と転写校正機構の解明

ミスマッチ塩基を取り込み、DNA 上を 1ヌクレオチド分後退して停止した状態の RNAP (後退複合体) および Gre 因子を結合した状態の RNAP (Gre 因子複合体) を再構成して結晶構造解析を行った。この 2種類の複合体において、RNAP は、前者ではタイト型を、後者ではラチェット型をとっているこ

とが示され、CPX 法による実験結果とよく一致する。後退複合体の構造は、伸長複合体の構造とよく似ているが、活性部位のトリガーループと呼ばれるループが、後退にともなう RNA の 3'末端突出に伴って折れ曲がった状態になっているのが特徴である。CPX を用いた実験で、後退複合体は伸長複合体よりもラチェット型に移行しやすい性質を持っていることが示されていたが、折れ曲がったトリガーループがその要因と考えられる。一方、Gre 因子複合体では、ラチェット型 RNAP と Gre 因子の一部が共同で新たな RNA 結合部位を形成しており、突出した RNA の 3'末端をそこに結合してより高い切断活性を実現していると考えられる (Mol. Cell 2015)。

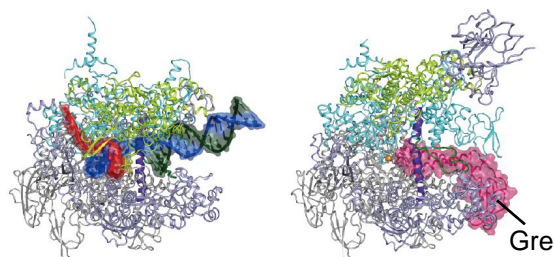


図3 後退複合体 (左) および Gre 因子複合体 (右) の構造

(3) 外来転写因子による転写開始阻害機構の解明

バクテリオファージの多くは、宿主の転写をハイジャックし、経時的に転写をコントロールすることにより、自らの複製・増殖を達成する。高度好熱菌ファージにコードされたタンパク質 gp39 は、感染中後期に宿主である高度好熱菌の転写をコントロールする転写因子として機能することが知られている。高度好熱菌の RNAP に直接結合し、宿主遺伝子の転写を阻害する一方で、ファージ遺伝子の転写は阻害しない。

このメカニズムを明らかにするために、gp39 を結合した状態の高度好熱菌 RNAP ホロ酵素の結晶構造解析を行い、これに成功した。gp39 は、RNAP の RNA 排出口を構成するβフラップとよばれるドメインを足場に結合し、シグマサブユニットの C 末端ドメイン (σ_4) を大きく再配置していることが明らかに

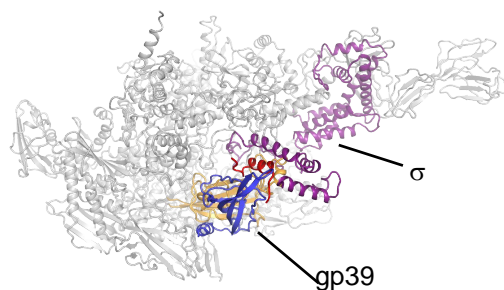


図4 ウイルス因子 gp39 を結合した状態の RNAP ホロ酵素複合体の構造

なった。 σ_4 はプロモーターの-35 領域を認識する役割を担っているが、このドメインの位置を大きくずらすことによって、転写開始に必要な過渡的複合体の形成を妨げていると考えられる。これにより、多くの宿主遺伝子の転写が阻害される一方で、ファージの遺伝子のプロモーターは-35 領域に依存しないものが多いため、この影響をあまり受けないと考えられる。このように、ファージが自らの転写因子を用いて宿主のプロモーター認識を時間とともに巧みに制御する仕組みを解明した (Genes Dev. 2014)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Sekine, S., Murayama, Y., Svetlov, V., Nudler, E. and Yokoyama, S. (2015) The ratcheted and ratchetable structural States of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions. **Mol. Cell** 57, 408-421. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.014. (査読有り)
2. Antonopoulos, I.H., Murayama, Y., Warner, B.A., Sekine, S., Yokoyama, S., Carey, P.R. (2015) Time-resolved Raman and polyacrylamide gel electrophoresis observations of nucleotide incorporation and misincorporation in RNA within a bacterial RNA polymerase crystal. **Biochemistry** 54, 652-665. doi:10.1021/bi501166r. (査読有り)
3. Higo, T., Suka, N., Ehara, H., Wakamori, M., Sato, S., Maeda, H., Sekine, S., Umehara, T. and Yokoyama, S. (2014) Development of a hexahistidine-3×FLAG

- tandem affinity purification method for endogenous protein complexes in *Pichia pastoris*. **J. Struct. Funct. Genomics**. 15, 191-199. doi:10.1007/s10969-014-9190-1. (査読有り)
4. Severinov, K., Minakhin, L., Sekine, S., Lopatina, A. and Yokoyama, S. (2014) Molecular basis of RNA polymerase promoter specificity switch revealed through studies of *Thermus* bacteriophage transcription regulator. **Bacteriophage** 4, e29399. doi:10.4161/bact.29399. (査読有り)
5. Tagami, S., Sekine, S., Minakhin, L., Esyunina, D., Akasaka, R., Shirouzu, M., Kulbachinskiy, A., Severinov, K. and Yokoyama, S. (2014) Structural basis for promoter specificity switching of RNA polymerase by a phage factor. **Genes Dev**. 28, 521-531. doi:10.1101/gad.233916.113. (査読有り)
6. Murayama, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. (2013) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analyses of *Thermus thermophilus* backtracked RNA polymerase. **Acta Cryst. F69**, 174-177. doi:10.1107/S1744309113000055. (査読有り)
7. Sekine, S., Tagami, S. and Yokoyama, S. (2012) Structural basis of transcription by bacterial and eukaryotic RNA polymerases. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 22, 110-118. doi:10.1016/j.sbi.2011.11.006. (査読有り)
8. Ehara, H., Sekine, S. and Yokoyama, S., (2011) Crystal structure of the C17/25 subcomplex from *Schizosaccharomyces pombe* RNA Polymerase III. **Protein Sci.** 20, 1558-1565. doi:10.1002/pro.682. (査読有り)
9. Tagami, S., Sekine, S. and Yokoyama, S. (2011) A novel conformation of RNA polymerase sheds light on the mechanism of transcription. **Transcription** 2, 162-167. doi:10.4161/trns.2.4.16148. (査読有り)

[学会発表](計 7件)

1. 関根俊一 “新生 RNA による RNA ポリメラーゼの構造変化と機能との相関” 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 ~27 日, パシフィコ横浜.
2. Sekine, S. “SMART : an S-S based method to detect RNA polymerase conformational change” The 65th Fujihara Seminar International Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids, 2013 年 10 月 1~4 日, 苫小牧グランドホテルニュー王子.
3. Sekine, S. “Structural basis for promoter switching of RNA polymerase by a phage-encoded protein” ICSG2013-SLS 2013 年 7 月 29 日~8 月 1 日, 京王プラザホテル札幌.
4. Sekine, S. “R/T conformational switching of RNA polymerase for the multiple transcription functions” FASEB Science Research Conference Mechanism & Regulation of Prokaryotic Transcription 2013 年 6 月 23~28 日, Saxtons River, USA.
5. Sekine, S. “Structural basis for promoter switching of RNA polymerase by a phage-encoded factor” FASEB Science Research Conference Mechanism & Regulation of Prokaryotic Transcription 2013 年 6 月 23~28 日, Saxtons River, USA.
6. 関根 俊一 “転写校正において RNA ポリメラーゼの構造と活性を切りかえるメカニズム” 第 12 回日本蛋白質科学会年会 2012 年 6 月 20~22 日, 名古屋国際会議場
7. 関根 俊一 “転写の校正反応において RNA ポリメラーゼの構造と活性を切りかえるメカニズム” 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11~14 日, 福岡国際会議場

{その他}

ホームページ等

・研究室ホームページ

http://www.clst.riken.jp/activity/structural_biology_group1_team2.html

・プレスリリース「RNA ポリメラーゼの働

きを切り替えるメカニズムを解明」

<http://www.riken.jp/pr/press/2015/2015020>

6_3/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関根 俊一 (SEKINE, Shun-ichi)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研

究センター・チームリーダー

研究者番号：50321774