

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15082

研究課題名（和文）RNAポリメラーゼによる転写終結メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of transcription termination by RNA polymerase

研究代表者

村山 祐子（Murayama, Yuko）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：50708592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：RNAPは、DNA上の遺伝情報をRNAへと転写する巨大なタンパク質複合体である。RNAPが遺伝子の読み取りを終わらせる段階は転写終結段階と呼ばれ、遺伝子発現の的確な制御に重要であるが、そのメカニズムには多くの謎が残されていた。本研究では、Rhoと呼ばれるタンパク質が転写終結を引き起こすプロセスを理解するために、構造生物学的研究を行った。Rho依存的な転写終結を試験管内で再現する系を確立し、さらにクライオ電子顕微鏡構造解析により、Rhoタンパク質が転写中のRNAPに結合した複合体の立体構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhoは古くから知られた転写終結因子で、その機能については約50年にわたり研究されてきたが、RhoがどのようにRNAPや新生RNAと相互作用し、転写終結を引き起こすのかについては分かっていなかった。本研究は、Rhoが新生RNAを介して転写中のRNAPに結合した姿を初めて捉えたもので、転写終結という細胞の基本的なプロセスの理解に大きく貢献すると期待できる。また、Rho依存的な転写終結は翻訳や転写の制御をはじめとするさまざまな細胞内プロセスと協調して行われている。細胞はこれらのプロセスを状況に応じて調節しながら実行することでその機能を維持しており、本研究はその仕組みの理解を推し進めるものである。

研究成果の概要（英文）：RNA polymerase (RNAP) is a huge protein complex that transcribes genetic information stored on DNA into RNA. During the termination step of transcription, RNAP completes gene reading and releases the DNA and RNA. The termination step is critical for proper regulation of gene expression, however, its mechanism is largely unknown.

In this study, we performed cryo-EM structural analysis to elucidate the mechanism by which the Rho protein induces transcription termination. We first established an in vitro system that recapitulates Rho-dependent transcription termination. Cryo-EM single particle analysis revealed the structure of the complex in which the Rho protein binds to RNAP during transcription.

This study contributes to understand the mechanism of transcription termination, which is a basic cellular process.

研究分野：構造生物学

キーワード：転写終結メカニズム クライオ電子顕微鏡構造解析

1. 研究開始当初の背景

RNA ポリメラーゼ (RNAP) は遺伝情報の転写を司る巨大なタンパク質複合体である。転写の最終段階で、転写中の RNAP (転写伸長複合体) は RNA 合成を停止し、鋳型 DNA および新生 RNA を解離する (図 1)。この過程は「転写終結」と呼ばれ、遺伝子の末端を正確に決定し、遺伝子発現を適切に制御するために重要である。

転写終結因子 Rho は細菌に広く保存されたタンパク質で、多くの遺伝子において転写終結を促進し、正確な長さの RNA の合成に寄与するほか、何らかの理由で翻訳されていない mRNA の転写を中止させるなど、細胞の恒常性維持にも関わっている。

Rho はリング型の六量体 (分子量約 300 kDa) を形成する ATP 依存 RNA ヘリケースで、転写伸長複合体から送り出されてくる新生 RNA に結合する (図 1B)。その後 Rho は転写伸長複合体に相互作用し、ATP 依存的に転写終結を引き起こすことが知られていたが (図 1C)、その具体的なメカニズムは明らかになっていなかった。

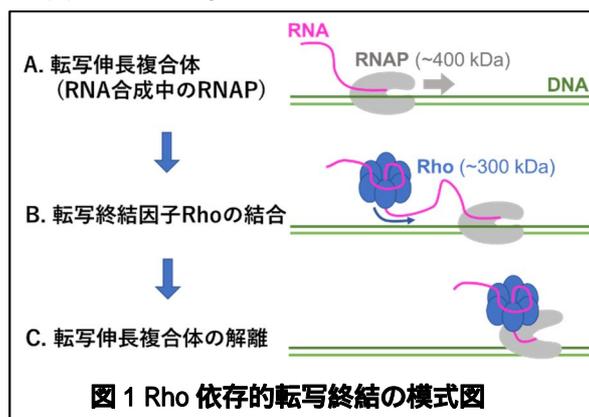


図 1 Rho 依存的転写終結の模式図

2. 研究の目的

Rho 依存転写終結のメカニズムの解明を目指して、クライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的研究を行った。

3. 研究の方法

(1) RNA 上に Rho 結合領域を持つ転写伸長複合体を調製した。Rho は新生 RNA を介して転写中の RNAP に結合するが、効率よく Rho を RNAP に結合させるためには 100 ヌクレオチド程度の長い RNA が必要となる。本研究ではまず鋳型となる DNA をデザインし、RNAP にこの鋳型 DNA を転写させることで、このような長い RNA を持つ転写伸長複合体を調製した (図 2)。まず、鋳型 DNA の上流側を制限酵素 PstI で処理することで 3'側 (鋳型鎖側) が突出した末端を作り、突出部分に RNA プライマーを結合させ、さらに RNAP を加えて転写を行わせる。鋳型 DNA には ATP・UTP・CTP のみで転写できる領域が設けられており、転写の際にこの 3 種類の NTP のみを基質として加えると、約 120 ヌクレオチドの RNA を転写したところで RNAP が停止するようにデザインされている。

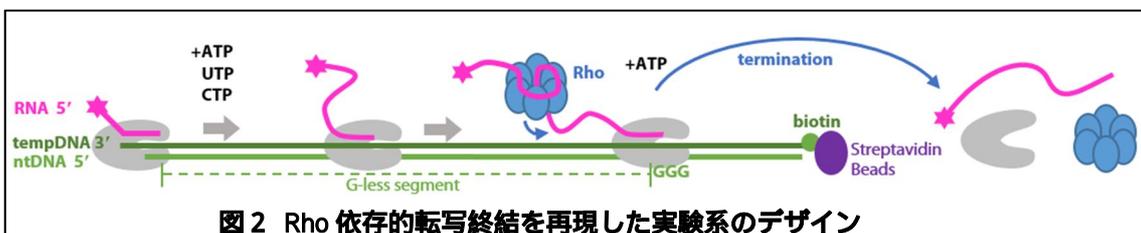


図 2 Rho 依存的転写終結を再現した実験系のデザイン

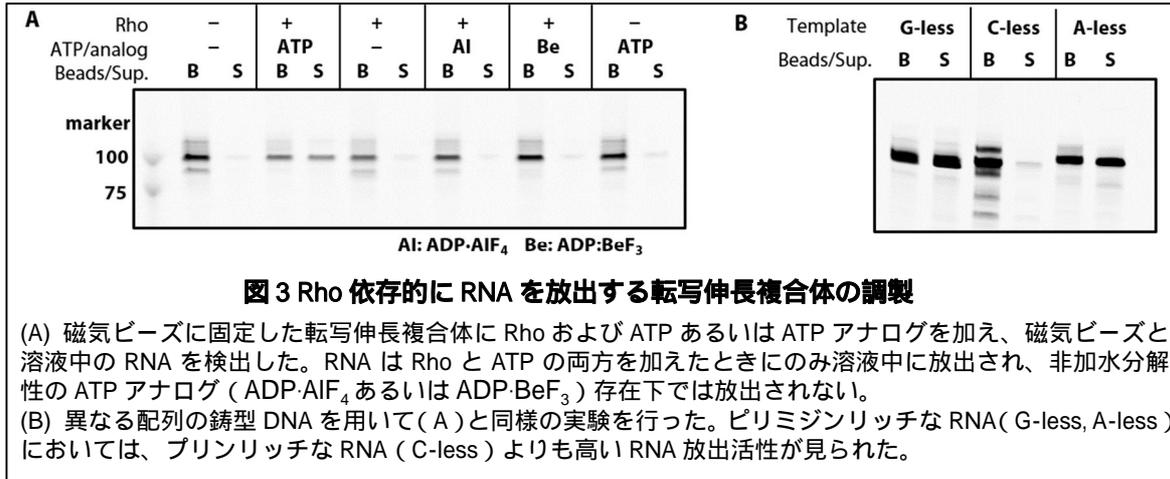
(2) 上記の転写伸長複合体に Rho を加え、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。

(3) 構造解析から得られた知見をもとに作製した RNAP および Rho の変異体を用いて RNA 放出活性を調べ、RNAP と Rho のどの部位の結合が RNA 放出活性に重要なのかを検証した。

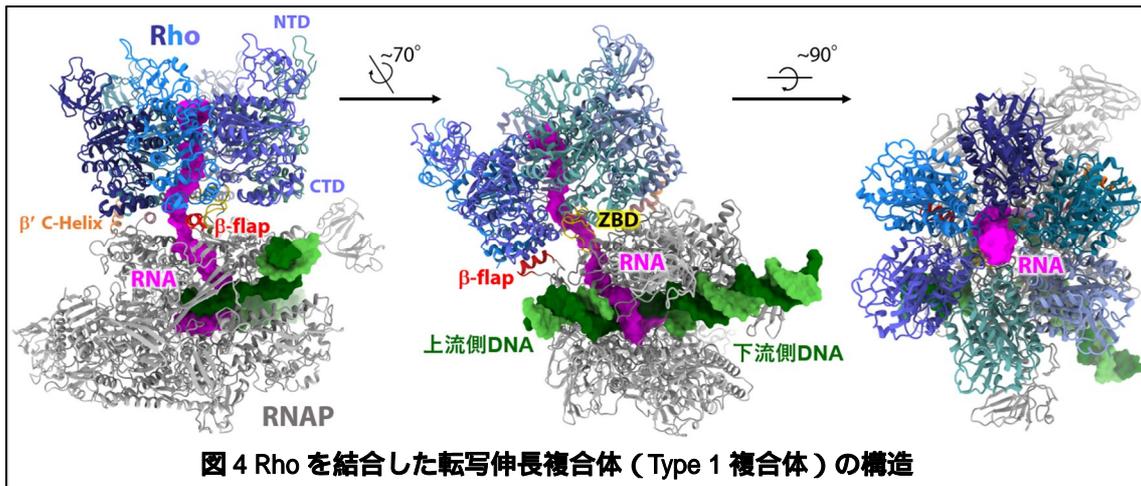
4. 研究成果

(1) Rho 依存的転写終結を試験管内で再現する実験系を確立した。上述のように、RNAP に

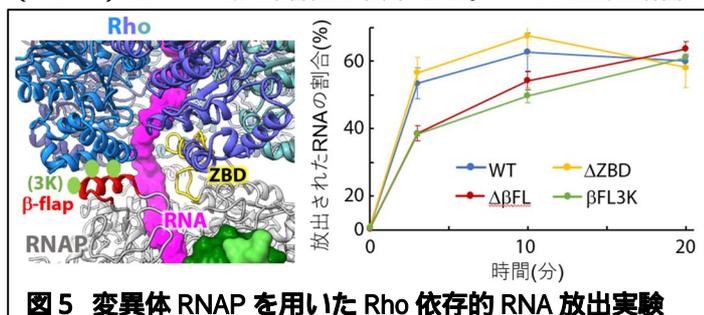
実際に転写を行わせることで、Rho を結合するための長い新生 RNA を持つ転写伸長複合体を調製した。この実験系で Rho 依存的転写終結が確かに起きているかを調べるため、磁気ビーズに固定した DNA 上で転写を行わせ、そこに Rho および ATP を加えたところ、Rho のはたらきで転写伸長複合体が解体され、RNA が磁気ビーズから溶液中へと放出されるのが確認できた（図 3A）。また、鋳型 DNA の配列を変えて同様の実験を行ったところ、Rho はピリミジンリッチな RNA に選択的に結合することが示された（図 3B）。



(2) 上記の転写伸長複合体に Rho および非加水分解性の ATP アナログ (ADP·BeF₃) を加え、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行った。構造解析の結果、2 種類の RNAP-Rho 複合体 (Type 1: 分解能 4.0 Å, Type 2: 分解能 5.8 Å) の構造が決定された。Type 1 複合体においては、Rho の六量体は、転写伸長複合体の RNA の出口の部分を取り囲むように結合していた (図 4)。その結果、転写伸長複合体の RNA 送出トンネルと Rho 六量体の中央にある RNA 結合トンネルが一続きの RNA の通り道となっていた。

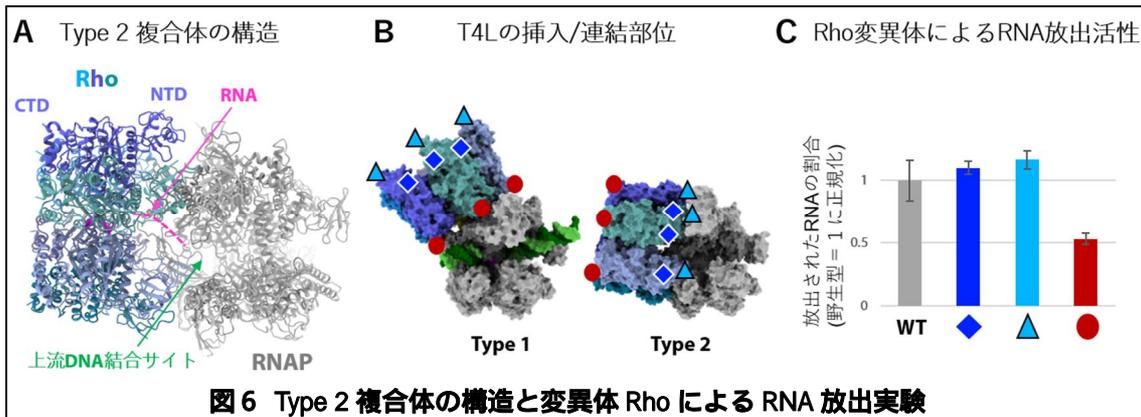


(3) Rho と RNAP のどの部位の結合が重要なのかを探るため、RNA 送出トンネル付近に変異を導入した RNAP を作製し、Rho 依存的 RNA 放出活性への影響を調べた (図 5)。ZBD を欠失させた RNAP (Δ ZBD) は野生型 RNAP (WT) と同程度の RNA 放出活性を示したが、 β -flap の先端部分を欠失させた RNAP (Δ β FL) は RNA 放出活性が低下した。Rho に直接結合すると思われる、 β -flap 先端の三つのアミノ酸残基 (Leu773, Ile777, Phe778) をリジン残基に置換した変異体 (β FL3K) は、欠失変異体 (Δ β FL) とほぼ同等の RNA 放出活性を示したことから、 β -flap 先端と Rho の相互作用が RNA 放出

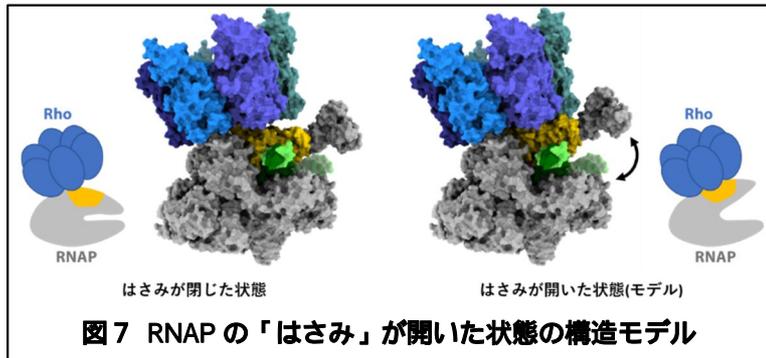


活性に重要であることが示された。

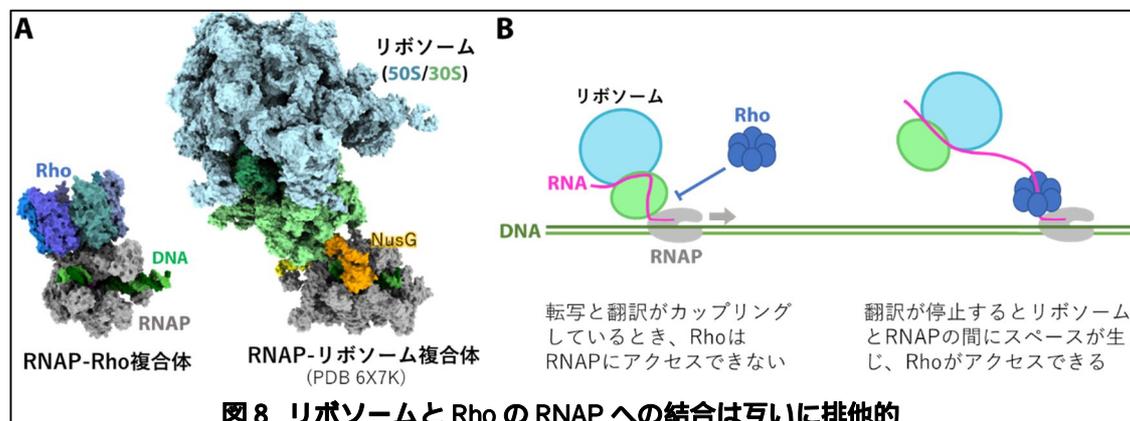
(4) Type 2 複合体においては、Rho はアポ状態の RNAP (DNA および RNA を結合していない RNAP) の上流 DNA 結合サイト付近に、Type 1 とは逆向きに結合していた (図 6 A)。どちらの向きの結合が RNA 放出活性に重要なのかを調べるため、Type 1 あるいは Type 2 の片方の複合体形成のみを阻害するように、Rho に約 100 アミノ酸のタンパク質 T4 リゾチーム (T4L) を挿入または連結した変異体を作製した (図 6 B)。変異体 Rho による RNA 放出活性を野生型と比較したところ、Type 1 を阻害する変異体では RNA 放出活性が低下したが、Type 2 を阻害する変異体の RNA 放出活性は野生型 Rho と変わらなかった (図 6 C)。このことから、RNA 放出活性には Type 1 複合体の形成が重要であることが示された。



(5) RNAP は「カニのはさみ」のような全体構造をしており、中央の溝に DNA と RNA を挟むように結合する。Type 1 複合体の構造は、転写伸長複合体に Rho が追いついた直後の状態を再現しており、RNAP の「はさみ」は閉じた状態で DNA と RNA を安定に結合している (図 7 左)。転写終了の際には、Rho は ATP 依存的な RNA ヘリケース活性により、転写伸長複合体から新生 RNA を引き抜くと考えられている。このとき、RNAP のはさみは開いた状態となり (図 7 右) DNA が外れて転写伸長複合体の解体が促されると考えられる。



(6) 細菌では、RNAP によって転写された mRNA は直ちにリボソームによって翻訳され (転写翻訳共役)、リボソームと RNAP が直接相互作用している。今回解明された構造において、Rho の RNAP への結合部位はリボソームの結合部位と重なっており、両者は同時に RNAP に結合できないことが分かる (図 8 A)。このことから、翻訳中の mRNA には Rho が結合せず、翻訳が停止すると Rho の結合部位が露出して転写終了が引き起こされる、という転写終了と翻訳の協調の仕組みをうまく説明することができる (図 8 B)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murayama Yuko, Ehara Haruhiko, Aoki Mari, Goto Mie, Yokoyama Takeshi, Sekine Shun-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural basis of the transcription termination factor Rho engagement with transcribing RNA polymerase from <i>Thermus thermophilus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade7093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ooi Wei-Yang, Murayama Yuko, Mekler Vladimir, Minakhin Leonid, Severinov Konstantin, Yokoyama Shigeyuki, Sekine Shun-ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 A Thermus phage protein inhibits host RNA polymerase by preventing template DNA strand loading during open promoter complex formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 431 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkx1162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yuko Murayama, Haruhiko Ehara, Mari Aoki, Mie Goto, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structure of RNA polymerase bound with transcription termination factor Rho
3. 学会等名 日本分子生物学会2022年年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Murayama, Haruhiko Ehara, Mari Aoki and Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of interplay between transcription and translation machineries
3. 学会等名 BDR retreat 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Murayama, Haruhiko Ehara, Mari Aoki and Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structure of RNA polymerase bound with transcription termination factor Rho
3. 学会等名 BDR Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Murayama, Mari Aoki, Takeshi Yokoyama, Mikako Shirouzu and Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structure of Thermus Thermophilus RNAP Elongation Complex Bound with Termination Factor Rho
3. 学会等名 Gordon research conference "Mechanisms of microbial transcription" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Murayama, Leonid Minakhin, Konstantin Severinov, Shigeyuki Yokoyama, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural studies of RNA polymerase elongation complex bound with a phage-encoded transcription factor gp39
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences "Mechanism and Regulation of Prokaryotic Transcription" (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース 遺伝子の読み取りを終わらせるメカニズム - 転写終結因子が結合したRNAポリメラーゼの構造を解明 - https://www.riken.jp/press/2023/20230209_1/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------