

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770125

研究課題名（和文） 転写開始複合体によるプロモーター依存的転写レベル調節機構の構造学的研究

研究課題名（英文） Structural study of promoter-dependent transcription level control by the transcription initiator complex

研究代表者

伊藤 啓 (ITOU HIROSHI)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号：10390626

研究成果の概要（和文）： プロモーターの配列によって転写の強弱に違いが生じる分子機構の構造生物学的理解を目的として、RNA ポリメラーゼの転写開始複合体ならびに関連するドメイン（CBID）の結晶構造の解明を試みた。得られた CBID 結晶は低分解の反射しか与えない上に完全双晶であり立体構造解析は困難であった。大腸菌由来転写開始複合体の結晶を得ることを試みたが目的とする結晶は得られなかった。他グループから酵母由来酵素による転写開始複合体の立体構造解析が報告され、本課題で想定したモデルもその一部が説明可能となった。

研究成果の概要（英文）： Structural study was conducted to establish structural basis necessary to understand molecular mechanism of promoter-dependent transcription level control by RNA polymerase. This process is physiologically important, but less understood due to lack of structural information. Firstly, CBID domain, an insertion domain specifically found in the β' subunit of the RNA polymerase of cyanobacteria and supposed to affect conformation changes of transcription initiating complex, was crystallized. The CBID crystal had cell parameters of $a=185.9$, $b=185.9$, $c=276.5$ (angstroms), $\alpha=\beta=90$, $\gamma=120$ (degrees), and belonging to space group $P3_1$ (or $P3_2$). The crystals diffracted poorly and were perfectly twinning. The crystals contain more than 10 CBID molecules (molecular weight of the molecule is 70 kDa), and structure determination using the crystals was unsuccessful. Despite of our efforts for improving the crystals, all the obtained crystals exhibited the same crystallographic characters, and we could not determine the tertiary structure. Secondly, to determine the structure of transcription initiation complex, an intermediate between an open complex composed of RNA polymerase and promoter and an elongation complex successfully synthesizes long transcript, we prepared RNA polymerase from *E.coli* and tried crystallization. The target crystal could not be obtained, but the crystal structures of the initiation complex of yeast RNA polymerase were reported from two research groups respectively. These related structures showed that elongation of RNA chain stabilizes DNA-RNA hybrid and this affects spatial arrangement of the hybrid in active center of the enzyme. Our hypothesis supposing disorder of DNA-RNA hybrid in active center switches the initiating complex to active or inactive complex, is partly explained by these crystal structures.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

プロモーターに結合した RNA ポリメラーゼ (RNAP) はその全てが転写伸長段階へと進むと考えられてきたが、転写開始複合体はその後転写伸長反応へと進むもの (productive 複合体) とプロモーターから離れず短い RNA 断片 (abortive transcript) を繰り返し合成した後に不活性型になるもの (moribund 複合体) の2通りへと枝分かれする事が国立遺伝学研究所・嶋本伸雄博士らにより示され、その生理的機能が明らかとなってきた (Branched pathway) (文献 1-5)。転写開始複合体がどちら側に進みやすいかは、結合したプロモーターの配列に依存する。Productive 複合体を作りやすいプロモーターでは転写伸長反応に進む複合体の割合が多く転写レベルが高くなり、逆に moribund を作りやすいプロモーターでは不活性化する複合体の割合が増えて転写レベルが低くなる。Branched pathway は、プロモーターによって転写のレベルに強弱が生まれる仕組みを説明する生理学的に重要な意味を持つ優れたモデルであるが、その枝分かれがどのような分子機構に基づいているのかは、理解に必要となる構造学的基盤が欠如しており未解決であった。

シアノバクテリア由来 RNAP は転写開始段階で moribund 複合体をほとんど形成しない。他種 RNAP との比較研究から、moribund 形成の主因が RNAP のコア酵素側に存在する事、シアノバクテリア RNAP に特異的に見られる β' サブユニット中の挿入ドメイン (CBID) がその役割に寄与することが示唆されていた (文献 6)。CBID は分子量約 70kDa と、大腸菌など他のバクテリア由来 RNAP のものと比べても3倍以上も大きい。これまでに明らかとされてきた RNAP の構造学的基盤を基に、正しい NTP の取り込みと RNAP に DNA 上の伸長方向へのトランスロケーションとの連携が、新しく取り込まれた NTP が RNAP の活性中心に種を越えて保存されて保存された2つの構造モチーフ (trigger-loop と bridge-helix) のブラウン運動に一定の制動

機構を働かせる為に起こるという Brownian ratchet model が提唱されている (文献 7, 8)。本モデルと、これまでに得られている moribund 複合体に関する知見 (文献 2, 6) とを合わせ、branched pathway の分子機構について、我々は以下の仮説を想定した。

- (1) CBID は trigger-loop に挿入されていることから、この分への大きな構造体の挿入による物理的制限によって loop の運動量が低下し、trigger-loop と bridge-helix とで構成されるラチェットの運動と RNA 鎖伸長反応の速度差が小さくなることが予想される。両者の間での力学的カップリングが改善されることで、シアノバクテリア転写開始複合体では moribund 化が防がれているのではない。
- (2) すなわち、moribund 複合体では構造の何らかの変化によって DNA-RNA ハイブリッドと RNAP の活性中心の運動部分との位置関係が狂ってラチェットとの連携が崩れる結果、RNA 鎖の正常伸長を起こせずに abortive transcript を合成し不活性化へと至るのではない。

これら仮説の確認を行う為には、CBID と moribund 複合体の立体構造の解析をそれぞれ行い、その構造と機能の相関を解明することが必要であり、現在 missing link となっている転写開始複合体から転写伸長複合体へと至る分子機構を理解する事を通じて、Brownian ratchet model の構造生物学的検証を行う事が出来る。

(参考文献)

1. Kubori T & Shimamoto N. *J. Mol. Biol.* 256, 449- (1996)
2. Sen R *et al.* *J. Biol. Chem.* 275, 10899- (2000)
3. Susa M *et al.* *J. Biol. Chem.* 277, 15407 (2002)
4. Sen R *et al.* *Genes Cells.* 6, 389- (2001)
5. Susa M *et al.* *Mol. Microbiol.* 59, 1807 (2006)
6. Imashimizu M. PhD thesis, The University Tokyo (2006)
7. Kornberg RD *PNAS* 104, 12955 (2007)
8. Bar-Nahum *et al.* *Cell* 120, 183 (2005)

2. 研究の目的

プロモーターと RNAP とから構成される転写開始複合体による転写開始段階での転写レベルの調節は、転写の調節において最もダイナミックレンジが大きく生理的に重要である。しかしその調節の分子機構の理解は、立体構造情報の欠如により停滞している。そこで、本研究ではその解決を試みる。立体構造がいまだ未知である転写開始複合体ならびに関連するドメイン (CBID) の構造解析をそれぞれ行い、現在 missing link となっている転写開始複合体から転写伸長複合体へと至る分子機構を理解するための構造学的基盤を構築する事を目的とする。

3. 研究の方法

研究目的の達成に必要とされる構造学的基盤を構築するため、シアノバクテリア RNA ポリメラーゼに特徴的に見られる β' サブユニット中の挿入ドメイン (CBID) ならびに RNAP moribund 複合体の立体構造を、それぞれ蛋白質 X 線結晶構造解析法を用いて明らかにすることを試みた。

- (1) それぞれのタンパク質の調製は大腸菌を用いて行い、遺伝子改変により導入した His-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィー、その他イオン交換クロマト、ゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせて精製を行った。
- (2) 結晶化実験は、初期スクリーニング実験を、市販スクリーニングキットを用いた sitting-drop 蒸気拡散法を、初期結晶が得られた後の最適化実験を hanging-drop 蒸気拡散法を用いて行った。
- (3) X 線回折実験は、データ収集に向けた予備検討実験を実験室系の X 線回折装置を用いて行い、構造解析に向けたデータ収集を放射光施設 (高エネルギー加速器研究機構放射光施設 PF) ビームラインを用いて行った。

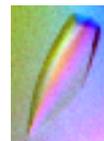
4. 研究成果

(1) CBID の結晶構造解析

まず、CBID とポリメラーゼ活性中心との構造学的関係を明らかにするために、シアノバクテリア RNAP β' サブユニットならびに CBID 周辺の活性中心を様々に含む部分の組み換えタンパク質を調製した。それぞれについて結晶化条件の探索を行ったが、目的とするタンパク質の結晶は得られなかった。次に、結晶を既に得ていたが、分解能が低くその構造解析に成功していなかった CBID 単体 (残基番号 435-984) の結晶について、その性質の向上を試みた。複数の結晶からこれまでに得

た回折データを解析したところ、これまで空間群 $P3_12_1$ に属すると思われていた CBID の結晶が、実際には空間群 $P3_1$ の結晶系 2 つが一つの結晶中に b 軸を共有して存在する完全双晶である事が示唆された (twining factor 0.41)。分解能が低い ($>4\text{\AA}$) ことと併せて、この結晶を用いての構造解析は期待できないと判断し、結晶の性質を変えることを試みた。まず、結晶が得られる条件において、種々の有機溶媒や界面活性剤をはじめとする添加剤を加える事を試みたが、改善が見られた結晶を得る事は出来なかった。

(図 1)



CBID 結晶



CBID(C 末 5 残基削除)

種々に変えることにより結晶中での分子のパッキングに影響を与える事を試みた。C 末端側の長さを変えることで、見た目の形状が異なる結晶を異なる結晶化条件下で得る事に成功した (図 1)。

しかし X 線回折実験を行い得られたデータを解析した結果、結晶が得られる条件や見た目の形状が異なっても、格子定数に小さな差は見られたが CBID で得られる結晶は全て共通の結晶学的性質を持つ類似結晶であり、それ以外の結晶が得る事は出来ない事が明らかとなった。表 1 に CBID 結晶から得られたデータの一例を示す。

(表 1)

| | |
|-----------------------------|---|
| Cell | $a=185.9, b=185.9,$ $c=276.5 (\text{\AA}),$ $\alpha=90, \beta=90, \gamma=120(^{\circ})$ |
| Lambda (\AA) | 1.0000 |
| Resolution (\AA) | 40.0-4.0 (4.22-4.0) |
| No. of observation | 347,356 (50,990) |
| No. of unique reflection | 89,767 (13,136) |
| I/ σ (I) | 15.4 (5.7) |
| Completeness (%) | 99.7 (100) |
| Redundancy | 3.9 (3.9) |
| Rmeas (%) | 7.0 (32.1) |

$R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_j \langle |I_h - I_{h,j}| \rangle / \sum_h \sum_j I_{h,j}$ where $\langle |I_h - I_{h,j}| \rangle$ is the mean intensity of symmetry-equivalent reflections.

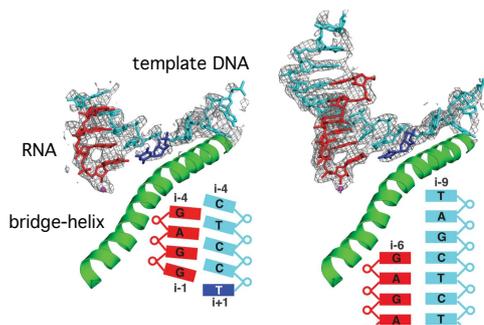
その他結晶中での分子配向に影響を与えるべく、結晶の脱水処理や結晶の化学的架橋なども試みたが改善は見られず、非対称単位中に存在するタンパク質分子の数が多 (>10 分子) 上に、分解能の大きな向上が見られない結晶の性質により、本タンパク質の立体構造の決定を行う事は出来なかった。

(2) 大腸菌 RNAP moribund 複合体

次に RNAP による moribund 複合体の結晶化に

向けた検討を行った。mRNA 伸長反応を行う productive 複合体の立体構造は好熱菌由来 RNAP のものがこれまでに報告されており(転写伸長複合体)、それら立体構造と構想活性中心における DNA-RNA ハイブリッドの位置関係を比較することによって作業仮説の確認を行う事を試みた。結晶化実験には大腸菌由来 RNAP を調製し用いた。これまで moribund 研究を含めて、RNAP 機能研究の多くは大腸菌由来酵素を用いて行われてきている。その一方で、結晶構造が明らかとされているバクテリア由来 RNAP は好熱菌由来酵素である。活性中心付近のアミノ酸配列は良く保存されており、ゆえに両者共に類似の立体構造を有するものと考えられ、その前提に基づいて構造・機能相関が論じられているが、RID などの挿入ドメインの位置や大きさには種毎に違いが見られるなどの違いがある。1 塩基のレベルで高分解能かつ動的な機能解析研究が進められている RNAP 研究においては、そうした違いが機能調節に及ぼす影響も考慮されるべきであり、ゆえに大腸菌由来 RNAP の立体構造そのものが明らかになること自体に意味がある。酵素の調製は、 β' サブユニットの C 末端側に His-tag を持つ様に遺伝子を改変した大腸菌から行い、アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。複合体の結晶化は、これまでに報告されている好熱菌 RNAP の結晶構造と、嶋本博士らにより報告されている機能解析結果(「1. 研究開始当初の背景」の項末尾の「参考文献」)を基にデザインした任意の長さを持つ合成核酸からなる DNA-RNA 複合体との共結晶を試みたが、研究期間内に結晶を得る事は出来なかった。なお、本研究期間の最終年度において、RD. Kornberg 博士、P. Cramer 博士らの研究グループよりそれぞれ酵母由来 RNAP の複製開始複合体の立体構造の報告が為された(Liu, X *et al.* *Science* 333, 633 (2011), Cheung, ACM *et al.* *EMBO J.* 30, 4755 (2011))。2 塩基から 7 塩基まで、異なる長さの RNA とのハイブ

(図 2) RNA 4 塩基の時には不安定な DNA-RNA ハイブリッド(左)が、6 塩基まで伸長する事により(右)安定な伸長複合体と同じ位置関係を形成する。(Liu *et al.*より改変)



リッドを含むそれら構造からは、abortive transcript として生成が確認される短い RNA (<4nt) では、鋳型 DNA とのハイブリッド形成が安定していないこと、またその状態においては、次の RNA の鋳型となる DNA の塩基対の電子密度が不明瞭である(=位置が定まっていない)など、活性中心における DNA-RNA ハイブリッドの位置関係が反応の進行に適切な状態に保たれにくい事が示された(図 2)。Liu *et al.*においては、更に鋳型と対になる基質 NTP を加えることでその不安定な状態から伸長反応が進み、ハイブリッドが転写伸長複合体で観察されたコンフォメーションと同じ状態に変化することも示されており、不安定な開始複合体が安定して反応を進める伸長複合体へと変わる事が観察されている。ここから更に、moribund を形成しやすいプロモーターと、そうではないプロモーターとの複合体など、プロモーター配列の違いによって、その後の構造変化に違いが生じる事が明らかとなれば、プロモーター配列依存的に転写開始複合体が伸長複合体となるか、あるいは不活性化するのか、その調節機構についての分子機構の詳細が明らかとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

(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 1 件)

- ① Hironori Aramaki, Hiroyuki Kabata, Shuso Takeda, Hiroshi Itou, Hideki Nakayama, and Nobuo Shimamoto, Formation of repressor-inducer-operator ternary complex: Negative cooperativity of D-camphor binding to CamR, *Genes to Cells*, 査読有, 16, 2011, 1200-1207 DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01563.x

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 啓 (ITOU HIROSHI)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号: 10390626

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし