

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H04344

研究課題名(和文) 転写因子によるRNAポリメラーゼの構造変化と転写制御のメカニズム

研究課題名(英文) Structural basis of RNA polymerase regulation by transcription factors

研究代表者

関根 俊一 (Sekine, Shun-ichi)

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・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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAポリメラーゼ(RNAP)による遺伝子の転写は、転写開始・伸長・終結からなる多段階の複雑なプロセスである。RNAPは、それ単独では遺伝子の転写を遂行することはできず、各段階において多くの転写因子がRNAPと複合体を形成してその機能を補助することで転写は達成されている。本研究では、原核生物の転写を左右するファージ由来の転写因子やリボソームを結合したRNAPとの複合体の構造解析を行い、その構造基盤に迫った。また、真核生物の核内で形成される巨大な転写伸長複合体の構造決定に成功するとともに、それがヌクレオソームDNAを転写するメカニズムを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の研究成果は、すべての生命現象の根幹である転写とその制御の分子メカニズムを解明した最先端のものであり、今後の国内外の転写・クロマチンの分野の研究に重要な基礎を与えるものである。今後、転写制御やエピジェネティクス制御の研究分野の大きな発展につながるとともに、制御の破綻によるがん等の疾患メカニズムの理解や創薬研究等の基礎となることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Gene transcription is a complex, multi-step process consisting of transcriptional initiation, elongation, and termination. RNA polymerase (RNAP) alone cannot accomplish transcription, and, in each step, a number of transcription factors bind RNAP to support its function. In this study, we analyzed the structures of RNAP bound with bacteriophage transcription factors and ribosome, which is involved in the prokaryotic transcription regulation. We also succeeded in structure determination of a huge transcription elongation complex formed in the eukaryotic nucleus, and first elucidated the mechanism by which the elongation complex transcribes nucleosomal DNA.

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 X線結晶構造解析 クライオ電顕 バクテリオファージ ヌクレオソーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

DNA の塩基配列を読み取って RNA を合成する転写のプロセスは、あらゆる生命現象の根幹をなすものである。RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、分子量 400~700 kDa に達する巨大なタンパク質複合体であり、種々の転写因子を結合してさらに巨大な複合体を形成し、遺伝子の転写を担う。転写は単なる RNA の重合反応ではなく、プロモーター依存的な転写開始から転写伸長、終結へと至る、高度に制御された多段階の複雑なプロセスである。その過程で、RNAP は結合するパートナー (転写因子等) を随時交換し、その構造と機能をダイナミックに切り替えながら転写を遂行すると考えられるが、そのしくみはよくわかっていない。

申請者らは、これまでに、細菌由来の RNAP を用い、転写関連因子や DNA/RNA が結合した転写複合体の構造解析を行ってきた。転写開始因子シグマを結合した RNAP ホロ酵素の結晶構造解析により、プロモーター認識に必須の複合体の構造を明らかにした。また、バクテリオファージの転写阻害因子 gp39 を結合した複合体、転写伸長を阻害するタンパク質 Gfh1 を結合した複合体、および転写中に誤った塩基を取り込み、DNA 上を後退した状態の複合体等の構造解析に成功し、転写の基本メカニズムの理解に大きく貢献してきている。さらに、ジスルフィド (S-S) 結合を用いて RNAP のコンフォメーション変化を捉える系を開発し、転写因子や核酸が RNAP の構造を大きく左右し、その機能を制御していることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、さらに高難度の転写因子や RNA を結合した RNAP の構造解析を行うことにより、転写制御のしくみを原子レベルで明らかにすることを目指す。研究対象をこれまでの原核生物から真核生物にまで広げ、クロマチン内での転写やより複雑な制御のメカニズムの解明に挑んだ。

3. 研究の方法

原核生物に関しては、高度好熱菌の RNAP を用い、その活性を制御する因子との複合体の解析を行った。バクテリオファージ由来の 2 種類の制御因子 gp39 と gp76 の存在下で RNAP ホロ酵素を結晶化し、複合体の構造を X 線結晶構造解析によって解析した。また、RNAP から伸びる RNA にリボソームを結合させて転写翻訳共役複合体を形成させ、クライオ電子顕微鏡解析を行った。

真核生物に関しては、ピキア酵母の RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) に転写伸長因子が結合して形成される転写伸長複合体を中心に研究を行った。普遍的な転写伸長因子 Elf1, Spt4/5, TFIIS を選び、それらを含む複合体を X 線結晶構造解析ないしクライオ電子顕微鏡解析によって解析した。また、東京大学のグループとの共同研究により、RNAP II にヌクレオソーム DNA を転写させ、形成される複合体をクライオ電子顕微鏡解析によって解析・分類することで、RNAP II・ヌクレオソーム複合体のスナップショットを獲得した。

4. 研究成果

(1) 原核生物における転写伸長制御

細菌に感染するバクテリオファージの中には、自らがコードするタンパク質因子を用いて宿主の転写系を乗っ取り、ファージの複製・増殖に適した環境を作り出すものがある。高度好熱菌ファージ P23-45 は、2 種類のタンパク質 gp39 と gp76 を使い、宿主である高度好熱菌の RNA ポリメラーゼ (RNAP) を調節し、宿主遺伝子の転写を阻害することが知られている。最近我々は、高度好熱菌 RNAP ホロ酵素と gp39 との複合体の X 線結晶構造解析により、gp39 が RNAP の RNA 排出口付近に結合し、プロモーター認識を担うシグマサブユニットの位置をずらすことで転写を阻害することを明らかにした。

本研究では、もう一方の因子である gp76 の作用機序を明らかにするために、gp76 を結合した状態の RNAP ホロ酵素の結晶構造解析を行った。gp76 は RNAP のクレフト内に結合し、転写に重要な構造要素と相互作用していることが明らかになった (Fig. 1)。gp76 の結合位置は、転写開始複合体における一本鎖 DNA および RNA の位置と重複することから、gp76 による転写阻害は開複合体の形成の阻害に基づいていると考えられる。以上の結果から、gp76 と gp39 は、宿主 RNAP の異なる部位に結合し、互いに異なるメカニズムで転写を阻害していることが示唆され、2 つの因子が協調的に宿主 RNAP による転写を制御する仕組みが明らかになった。

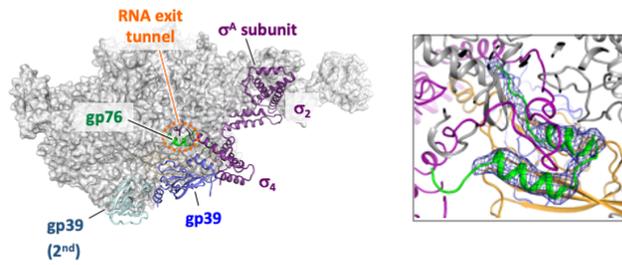


Fig. 1. ファージ因子を結合した RNAP の構造

以上を踏まえ、真核生物における転写伸長制御とヌクレオソーム転写について説明する。

(2) 真核生物における転写伸長制御とヌクレオソーム転写

転写の開始段階では、RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) は基本転写因子 (転写開始因子) と一体となって転写開始複合体を形成し、プロモーターから転写を開始する。転写を開始して約十数残基の長さの RNA を合成すると、転写開始因子は転写伸長因子で置換され、RNAP II は転写伸長複合体へと移行する。転写伸長複合体は以降 数万~数百万塩基対の長さに渡る DNA 領域を転写するために必須であるが、その構造は未解明だった。X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析を組み合わせ、保存性の高い 3 種類の転写伸長因子 E1f1, Spt4/5, TFIIS を結合した RNAP II の転写伸長複合体の構造を世界で初めて明らかにした (Science 2017) (Fig. 2)。E1f1 と Spt4/5 は、RNAP II 表面の広い範囲を覆い、DNA および RNA の通り道を補強・再構築することで、転写伸長に特化した複合体を確立していた。転写伸長複合体の構造は、転写開始複合体のそれとは大きく異なっており、転写の開始段階から伸長段階への移行にともなって、劇的な複合体の転換が起こることが明らかになった。E1f1 と Spt4/5 は転写伸長複合体を安定化し、中途での転写終結や休止を防ぐことで、長距離に渡る転写を可能にしていることが示唆された。

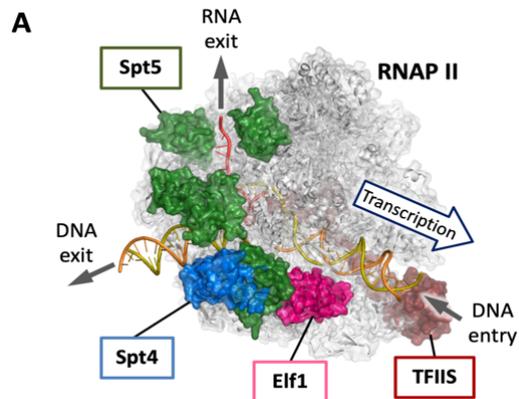


Fig. 2. RNAP II 転写伸長複合体

真核生物では、ゲノム DNA はヌクレオソームと呼ばれる基本単位が数珠繋ぎに連なって折りたたまれたクロマチン構造をとって細胞核内に収納されている。ヌクレオソームは DNA がヒストタンパク質の周囲に約 1.7 回巻きついた円盤状の構造体であり、DNA を核に収納するために必須である一方で、DNA が転写される際には大きな障壁となる。遺伝子発現時に RNA ポリメラーゼがヌクレオソーム構造をとった DNA をどのように転写するのかは、長らく生物学における未解明の謎だった。RNAP II とヌクレオソームの複合体の立体構造を世界で初めて解析することに成功し、その謎を解明した (Fig. 3)。酵母の RNAP II にヌクレオソーム DNA を

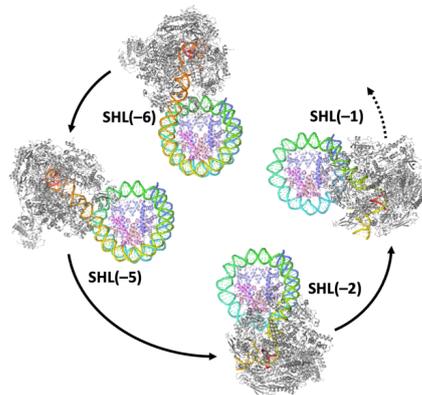


Fig. 3. RNAP II によるヌクレオソーム転写

転写させ、得られた反応産物の混合物をクライオ電子顕微鏡によって解析して分類することで、ヌクレオソームを通過中の RNAP II の複合体構造を複数得ることに成功した(Science 2018)。これら一連の構造は、RNAP II がヌクレオソーム上を前進していくスナップショットを表しており、RNAP II はヒストンの表面から DNA を段階的に引き剥がしながら、ヌクレオソーム上の異なる 4 箇所で一時的に停止しつつ転写することが初めて示された。

一方、実際の細胞核内には RNAP II の転写を補助するさまざまなタンパク質（転写伸長因子等）が存在し、よりスムーズなヌクレオソーム DNA の転写を実現している。上述の転写伸長因子 Eif1 と Spt4/5 のヌクレオソーム転写における役割を調べたところ、これらの因子は RNAP II のヌクレオソーム上での停止頻度を低下させ、RNAP II がヌクレオソームを通過する効率を大幅に上昇させることが明らかになった。Eif1 と Spt4/5 の存在下で反応させた転写産物のクライオ電子顕微鏡解析を行ない、両因子を伴った RNAP II の転写伸長複合体とヌクレオソームの複合体の構造を解析した(Fig. 4)。両因子は RNAP II に結合してその表面の構造を作り変え、RNAP II とヌクレオソームが安定的に相互作用して転写が休止するのを防止していることが明らかになった(Science 2019)。さらに、それらはヌクレオソームから DNA を引き剥がすセパレーターとして機能していることも示唆された。このように、転写伸長因子がヌクレオソーム上での RNAP II の進行を促進するメカニズムが明らかとなり、精巧な転写の仕組みの一端が明らかになった。

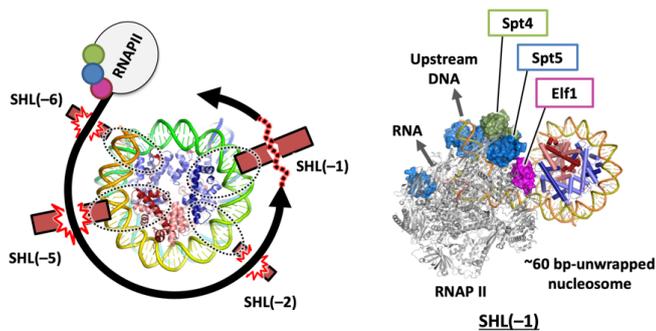


Fig. 4. 転写伸長因子を伴ったヌクレオソームの転写

以上の一連の研究成果は、今後の国内外の転写・クロマチンの分野の研究の基礎となるような画期的な成果である。今後、細胞核内で働く他の因子との関連も含めて、転写制御やエピジェネティクス制御の研究分野の大きな発展につながるとともに、制御の破綻によるがん等の疾患メカニズムの理解や創薬研究等へもつながることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Takaharu, Sekine Shun-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Overview of the "1SBA: integrative approaches towards understanding of gene expression" session at the 57th BSJ meeting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 253 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00644-1	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Ehara Haruhiko, Kujirai Tomoya, Fujino Yuka, Shirouzu Mikako, Kurumizaka Hitoshi, Sekine Shun-ichi	4. 巻 363
2. 論文標題 Structural insight into nucleosome transcription by RNA polymerase II with elongation factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 744 ~ 747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aav8912	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 -
1. 著者名 Kujirai Tomoya, Ehara Haruhiko, Fujino Yuka, Shirouzu Mikako, Sekine Shun-ichi, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 362
2. 論文標題 Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 595 ~ 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aau9904	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 -
1. 著者名 Ehara Haruhiko, Sekine Shun-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Architecture of the RNA polymerase II elongation complex: new insights into Spt4/5 and Elf1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transcription	6. 最初と最後の頁 286 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21541264.2018.1454817	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 Ehara Haruhiko, Yokoyama Takeshi, Shigematsu Hideki, Yokoyama Shigeyuki, Shirouzu Mikako, Sekine Shun-ichi	4. 巻 357
2. 論文標題 Structure of the complete elongation complex of RNA polymerase II with basal factors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 921 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/science.aan8552	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 -

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) doi: 10.1093/nar/gkx1162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ehara Haruhiko, Umehara Takashi, Sekine Shun-ichi, Yokoyama Shigeyuki	4. 巻 487
2. 論文標題 Crystal structure of RNA polymerase II from Komagataella pastoris	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 230 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.039	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 -

1. 著者名 Sekine, S., Murayama, Y., Svetlov, V., Nudler, E. and Yokoyama, S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Ratcheting of RNA polymerase toward structural principles of RNA polymerase operations.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Transcription	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/21541264.2015.1059922.	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of nucleosome transcription by RNA polymerase II
3. 学会等名 日本生物物理学会 第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of the RNA polymerase II elongation complex with basal factors
3. 学会等名 CSHL meeting Mechanisms of eukaryotic transcription (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根俊一
2. 発表標題 RNA ポリメラーゼ II によるクロマチン転写の構造基盤
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of cellular transcription by RNA polymerase II
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会年会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of chromatin transcription by RNA polymerase II
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 関根 俊一
2. 発表標題 RNAポリメラーゼIIによるクロマチン転写のメカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根 俊一
2. 発表標題 RNAポリメラーゼIIによるクロマチン転写のメカニズム
3. 学会等名 蛋白質研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Architecture of the RNA polymerase II elongation complex with basal elongation factors
3. 学会等名 IAS Focused Program on Mechanisms of Gene Transcription and its Regulations (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of host RNA polymerase inhibition by a Thermus phage protein gp76
3. 学会等名 FASEB SRC "Mechanisms and Regulation of Prokaryotic Transcription" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Haruhiko Ehara
2. 発表標題 Structural elucidation of eukaryotic RNA polymerase II "holo"-elongation complex
3. 学会等名 FASEB SRC "Mechanisms and Regulation of Prokaryotic Transcription" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Murayama
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 SRC "Mechanisms and Regulation of Prokaryotic Transcription" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江原晴彦
2. 発表標題 基礎的な転写伸長因子が結合したRNAポリメラーゼII転写伸長複合体の構造
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関根 俊一
2. 発表標題 バクテリオファージによる宿主RNAポリメラーゼ調節の構造基盤
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 関根 俊一
2. 発表標題 Ratcheting of RNA polymerase for the multiple transcription functions
3. 学会等名 FASEB SRC Mechanism and Regulation of Prokaryotic Transcription (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 生命機能科学研究センター https://www.bdr.riken.jp/jp/index.html 転写制御構造生物学研究チーム https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/sekine-s/index.html コンパクトなDNAをスムーズに転写する仕組み http://www.riken.jp/pr/press/2019/20190208_1/ 真核生物での遺伝子読み取りの仕組みを解明 http://www.riken.jp/pr/press/2018/20181005_1/ 転写中のRNAポリメラーゼIIの構造を解明 http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170804_1/ 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/2015/20150206_3/

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