

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14643

研究課題名(和文)クライオ電子顕微鏡を用いた転写伸長超複合体の構造解析

研究課題名(英文)Cryo-EM structure analysis of transcription elongation complexes

研究代表者

江原 晴彦 (Ehara, Haruhiko)

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：80634766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトをはじめとする真核生物のゲノムDNAは、クロマチンと呼ばれる高度に折りたたまれた構造をとる。DNAが遺伝子として機能する際には、RNAポリメラーゼ2(Pol2)と呼ばれる酵素が、ゲノムDNAに書かれた情報を読み取ることが知られているが、真核生物の折りたたまれたDNAを、どのように読み取ることができるのかは、分かっていなかった。本研究では、クロマチンDNAをPol2が読み取る化学反応を試験管の中で再現し、その最中の分子構造を凍結し、クライオ電顕単粒子解析という手法を用いることで、まさにクロマチンをPol2が読み込んでいく状態の分子構造を、高解像度で観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトなどの細胞において、クロマチンの高次構造の影響が遺伝子のON/OFFに与える影響は極めて大きく、細胞の分化、多能性や、がん化などにも深くかかわっている。本研究は、それらの生物学的な背景を考えるにあたって、新たな知見を与えるものである。また、このように複雑で不均一なタンパク質核酸複合体の構造解析は、従来は非現実的と考えられていたものであり、世界に先駆けて構造解析に成功したことは、技術的な面も大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNAs in eukaryotes are tightly packaged in chromatin structures. For DNAs to work, they must be transcribed by an enzyme called RNA polymerase. However, it was not clear how RNA polymerase can read tightly-packed chromatin DNAs. In this study, we have done in-vitro transcription reactions using RNA polymerase and a chromatin template, flash-froze the reaction mixture, and then solved molecular structures of RNA polymerase transcribing a chromatin DNA.

研究分野：構造生物学

キーワード：転写 クロマチン Cryo-EM

1. 研究開始当初の背景

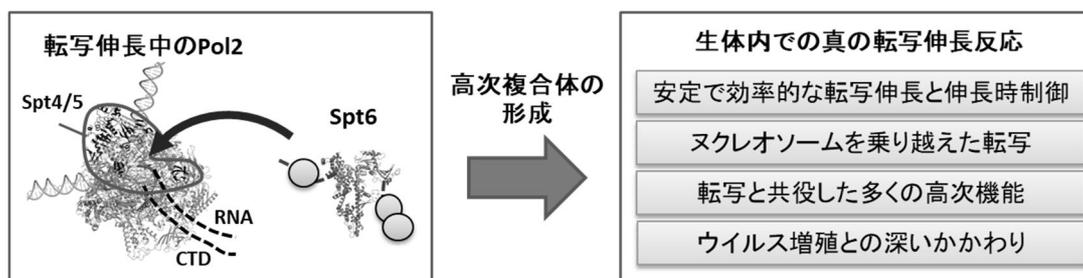
真核生物による mRNA の転写と、それを担う RNA ポリメラーゼ 2(Pol2)は、基礎的な生命の理解に加えて、転写制御や疾患との関連といった応用的な観点からも極めて重要であり、多くの研究がされてきた。その結果、生体内における Pol2 は、多種多様な転写関連複合体が集合したものである、超複合体の一員として機能していること、更には転写の開始や伸長、終結といった転写の各段階に応じて、結合するパートナーを切り替えることで、同じ Pol2 分子が異なった仕事に適応していること、などが明らかになってきていた。Cryo-EM 関連技術の進歩等により、転写開始に関わる複合体に関しては、多くの構造が明らかにされつつあった。その一方、転写伸長に関連した超複合体は、長い mRNA の効率的な転写や、転写伸長時における制御に必要である他、ヌクレオソームの乗り越えや、転写と共役したクロマチン修飾など、真核生物固有の興味深い現象に深く関与しているにも関わらず、研究が進んでいなかった。

転写伸長に関わる複合体の構造解明が遅れていた理由として、巨大複合体の再構成や構造解析に関する一般的な難しさに加えて、あまりに多くの転写伸長関連タンパク質が知られており、どれが直接 Pol2 に結合する因子か定かではないことが挙げられた。また、転写伸長因子と Pol2 との結合は、1 : 1 では比較的弱いことが多く、さらに Pol2 の CTD と呼ばれる領域のリン酸化が結合に必要とされるため、安定な複合体の再構成が困難であった。その上、Pol2 の CTD は、構造を取らないリピート配列であり、仮に転写因子が結合したとしても、ふらふらとつなぎ留められているだけで、構造解析に適さないとみなされていた。

しかし、複数の転写因子が協調的に結合することで複合体の安定性が増す例や、長い新生 RNA の存在が転写伸長因子の結合を強化する例などが明らかにされてきた。また、リン酸化 CTD との結合が重要とされる転写因子においても、例えば CTD を欠損した Pol2 に弱いながらも結合を示すなど、CTD に加えて Pol2 の本体部位とも直接結合することが知られつつあり、比較的安定な構造をとった転写伸長超複合体の再構成と構造解析を行うことが、重要な課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、Spt4/5 や Spt6 等の、様々な転写伸長因子が共に結合した状態の、Pol2 転写伸長複合体の再構成を行い、その原子分解能での分子構造を明らかとすることを当初の目的としていた。そして、構造解明等を通じて、転写伸長因子の存在が、どのようにして、Pol2 単体では不可能な効率的な転写伸長や、様々な高次制御、さらにはヌクレオソームを乗り越える転写、といったものを可能にしていけることができるのか、といった、数々の謎について、その背景にある分子メカニズムを解明することを目指した。さらには、転写伸長複合体に代表されるような、大きくて複雑なタンパク質複合体の再構成と構造解析は、それ自体が技術的な最先端にあり、本研究を通じて新たな技術的知見を得ることも目的とした。



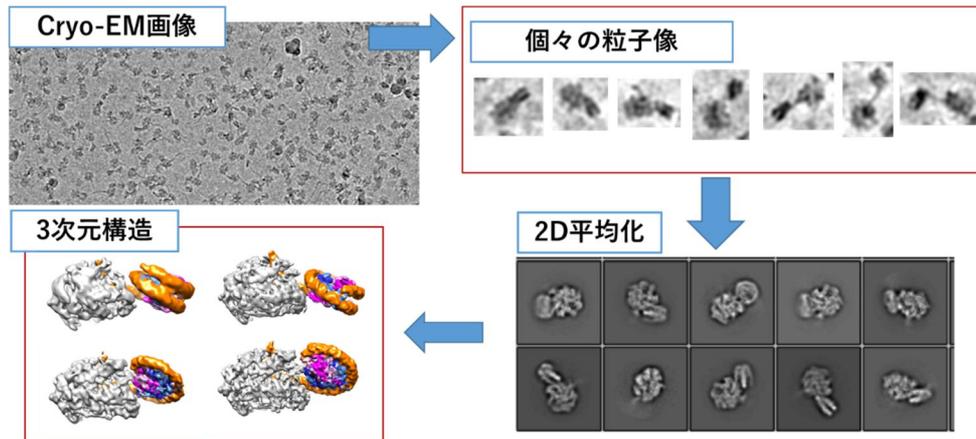
3. 研究の方法

まずは、転写伸長複合体を試験管内で再構成する必要があるが、そのために必要な複合体の構成要素について、様々な発現系や、酵母を用いた内在性複合体の調製など、様々な手段を用いた精製系の確立を行った。その後、それらの構成要素や、核酸などを混合し、実際に試験管内で転写伸長反応を行わせるなどの手段を用い、転写伸長複合体の再構成を行った。再構成を行った複合体について、クライオ電顕を用いた単粒子解析により、立体構造の解明を行った。

4. 研究成果

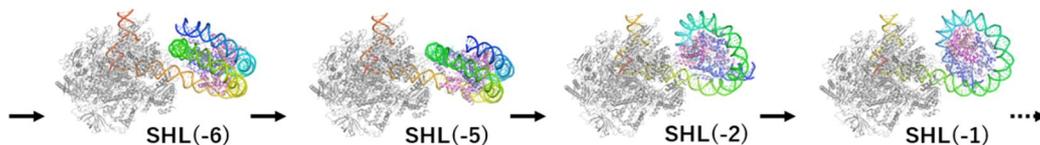
本研究は、当初においては Pol2 に転写伸長因子が結合した状態の複合体の構造解明を計画していたが、様々な技術革新等を経て、Pol2 と転写伸長因子に加え、ヌクレオソームと呼ばれる円盤状の DNA を加えた、より困難でインパクトのある研究を目指すこととなった。

まずは、Pol2 単体がヌクレオソームを転写する系について、試験管内での再構成と、Cryo-EM 単粒子解析による立体構造解明を行った。本試料は、極めて不均一性が高く、様々な異なる状態の複合体を含んでいたが、計算機的な解析により、複数の状態の構造を同時に解明することができた（下図）

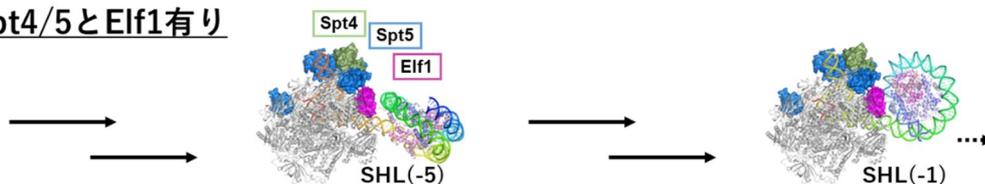


次に、ヌクレオソーム転写に対して、転写伸長因子が与える影響について、研究を行った。様々な転写伸長因子を加え、転写実験を行ったところ、Spt4/5 と Elf1 と呼ばれる転写伸長因子を共に加えた際、ヌクレオソーム転写が大きく活性化されることを発見した。また、これらの転写因子の存在下で、再び Cryo-EM 単粒子解析を行うことで、Spt4/5 と Elf1 を含む状態での、ヌクレオソーム転写に関する、分子構造を解明することができた。その結果、主として、Elf1 と呼ばれる因子が、ヌクレオソームと Pol2 の間に物理的に割り込むことで、転写の休止を防ぐこと等をはじめとした、今まで知られていなかった転写活性化の分子メカニズムを明らかにすることができた（下図）。

転写因子無し



Spt4/5とElf1有り



ヌクレオソーム転写は、ヒトを含めた真核生物の遺伝子発現の根幹に位置するものであり、多くの研究者の興味をひいてきた。しかし、本研究で行ったような複雑で不均一な複合体の再構成と構造解析は、非常に難易度が高く、長らく実現されてこなかったものである。我々が世界に先駆けてヌクレオソーム転写系の構造解析に成功したことは、国内外に対して大きなインパクトを与えたものであり、生物学的な意味でも、技術的な点からも、今後の研究の流れを変えていくものだと考えている。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

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, 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Haruhiko Ehara, Tomoya Kujirai, Yuka Fujino, Mikako Shirouzu, Hitoshi Kurumizaka, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of nucleosomal transcription by RNA polymerase II
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruhiko Ehara, Tomoya Kujirai, Yuka Fujino, Mikako Shirouzu, Hitoshi Kurumizaka, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Structural basis of chromatin transcription by RNA polymerase II and elongation factors
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruhiko Ehara, Tomoya Kujirai, Yuka Fujino, Mikako Shirouzu, Hitoshi Kurumizaka, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 Cryo-EM analysis of nucleosomal transcription with elongation factors Elf1 and Spt4/5
3. 学会等名 Mechanisms of Eukaryotic Transcription (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruhiko Ehara, Tomoya Kujirai, Yuka Fujino, Mikako Shirouzu, Hitoshi Kurumizaka, Shun-ichi Sekine
2. 発表標題 クロマチン上で起こる転写伸長の構造生物学
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江原 晴彦
2. 発表標題 クライオEMで見えてきた、ヌクレオソーム転写の分子メカニズム
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ehara Haruhiko, Kujirai Tomoya, Fujino Yuka, Shirouzu Mikako, Kurumizaka Hitoshi, Sekine Shun-ichi
2. 発表標題 Cryo-EM analysis of RNA polymerase II transcribing a nucleosomal DNA
3. 学会等名 2018 Kuo Symposium on 3D-EM of Macromolecules and Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ehara Haruhiko, Kujirai Tomoya, Fujino Yuka, Shirouzu Mikako, Kurumizaka Hitoshi, Sekine Shun-ichi
2. 発表標題 転写伸長因子Elf1とSpt4/5のクロマチン上での転写伸長における役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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