

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06518

研究課題名(和文)クライオ電子顕微鏡による、転写翻訳複合体の構造解析

研究課題名(英文)Structural insights into the transcription-translation complex revealed by cryo-EM

研究代表者

横山 武司(yokoyama, takeshi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20719447

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)：セントラルドグマにおいて、DNAに保存された遺伝情報をRNAに写しとる「転写」、その後RNA上にコードされた核酸配列を、タンパク質を構成するアミノ酸の配列へと変換する「翻訳」は、遺伝子発現の根源を担う重要な過程である。原核生物では、これらの反応は共に細胞質で行われるため、転写、翻訳に関わるマシナリーは空間的に近接し、協調的に働いている。本研究課題では、転写を司るRNAポリメラーゼと翻訳を司るリボソームが協調して機能する様子を、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を用いることで、構造機能相関を明らかにした。RNAポリメラーゼから表出したmRNAがリボソームに取り込まれる様子を高分解能で可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は生命の根幹を担うセントラルドグマにおいて、超分子複合体がどのように機能するのかを解明するため、生物学的に非常に重要な課題に取り組んでいると言える。また原核生物特有のシステムであることから、ヒトの生命システムに影響を与えない副作用のない抗菌化合物の開発に有用な情報を取得出来るため、創薬に資する社会的意義のある研究であると言える。

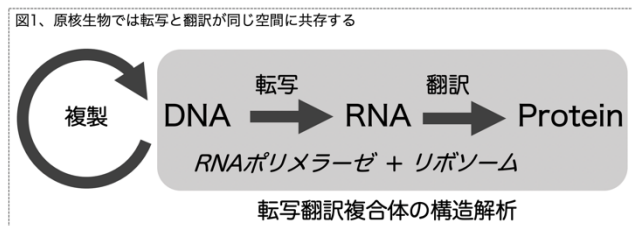
研究成果の概要(英文)：In central dogma, transcription that copies genetic information encoded on DNA to RNA having the corresponding sequence, and translation that subsequently converts the nucleic acid sequence into the amino acids sequence that forms proteins, those are important processes playing fundamental roles in gene expression. In prokaryotes, both of these processes take place in the cytoplasm, so the machineries involved in transcription and translation are spatially close to each other and work in a coordinated manner. In this research project, the structure-function relationship between RNA polymerase, which controls transcription, and ribosome, which controls translation, was investigated by using single particle cryo-EM analyses. mRNA exposed from RNA polymerase was visualized at high resolution as it was incorporated into ribosomes.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 翻訳 転写 リボソーム RNAポリメラーゼ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) セントラルドグマにおいて、DNA に保存された遺伝情報を RNA に写しとる「転写」、その後 RNA 上にコードされた核酸配列を、タンパク質を構成するアミノ酸の配列へと変換する「翻訳」は、遺伝子発現の根源を担う重要な過程である。原核生物では、これらの反応は共に細胞質で行われるため、転写、翻訳に関わるマシナリーは空間的に近接し、協調的に働いていることが明らかになった (図1)。



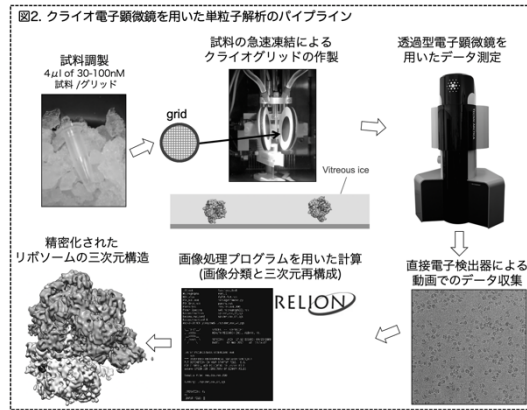
- (2) バクテリア遺伝子発現において、RNA ポリメラーゼから新生 RNA が表出し始めると、すぐにリボソームが RNA 捕まえ翻訳を開始し、RNA ポリメラーゼの進行を追いかけることが知られている (Proskin ら、*Science*, 2010)。リボソームが RNA ポリメラーゼを後ろから押し進めることで、バックトラックや停滞を抑制し、効率よく遺伝子発現が行われる。実際、1970 年代初頭に行われた、古典的な電子顕微鏡技術による大腸菌溶解産物の観察からは、RNA ポリメラーゼがリボソームの近傍に位置し、転写と翻訳が共役して行われている様子が捉えられていた (O. L. Miller ら、*Science*, 1970)。
- (3) その後、構造生物学分野においては、転写、翻訳のプラットフォームとなる、RNA ポリメラーゼ及びリボソーム複合体の詳細が、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡によって精力的に明らかにされた。そしてついに、近年のクライオ電子顕微鏡法の技術革新によって、構造多型を含んだ試料の構造解析が技術的に可能となり、RNA ポリメラーゼとリボソームが「Expressome」複合体を形成し、転写と翻訳が共役する様子が明らかにされた (Kohler ら、*Science*, 2017)。解き明かされた構造から、転写伸長反応中 RNA ポリメラーゼは、リボソームの 30S サブユニットの溶液側に結合し、リボソームに対する翻訳因子の結合と競合しないことがわかった。つまり、RNA ポリメラーゼで合成され表出した新生 mRNA を、最初に翻訳するパイオニアラウンドのリボソームは、RNA ポリメラーゼとの結合を保ちながら、翻訳の 4 つの素過程「開始」「伸長」「終結」「リサイクリング」を経験することになる。
- (4) 本研究では、新生 mRNA を介して RNA ポリメラーゼに結合した、パイオニアラウンドのリボソーム複合体を、翻訳の素過程を追いながら構造生物学的に解き明かすことを目標とし、遺伝子発現において「転写」と「翻訳」がどのように相互作用しながら効率の良い遺伝子発現を行うかを学術的「問い」と設定し研究を進めた。

## 2. 研究の目的

- (1) 転写産物である RNA は自身の配列内で相補的な塩基対を形成し、二次構造を形成し易い性質を持っており、転写、翻訳マシナリーとの立体障害を起こすことで、遺伝子発現を制御している。転写においてはその停滞やバックトラック、また、翻訳においては mRNA 上の SD 配列の露出を抑えることで翻訳開始過程を制御することが知られている。さらに、リボソームの結合、非結合により露出した RNA の二次構造の組み方の変化で、転写終結を制御する「アテニュエーション」という機構も存在する (Yanofsky ら、*Nature*, 1981)。RNA ポリメラーゼとリボソームが直接結合することで、転写された RNA は表出することなく、リボソーム内の mRNA パスに挿入されるため、二次構造形成を避けて効率的な、遺伝子発現を実現すると考えることができる。
- (2) 本研究では、表出した新生 RNA が初めにリボソームに取り込まれる、翻訳開始過程に着目し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法を用いることで、パイオニアラウンドの翻訳開始過程の作用機序の詳細を明らかにすることを目的とする。研究代表者の得意分野であるリボソームの構造解析技術と、研究協力者が得意とする RNA ポリメラーゼの構造解析技術と電子顕微鏡技術組み合わせることで、効率的に研究を推進する。さらに、本研究では新生 RNA に 2 番目以降に結合するリボソームも含めた、RNA ポリメラーゼ、リボソーム複合体の構造解析も視野にいれ研究を進める。様々な mRNA 配列を検討し、翻訳速度の変化が mRNA の配列情報のみでなく 3 次元レベルどのように影響をあたえているかの知見を得られるものと考えた。

### 3. 研究の方法

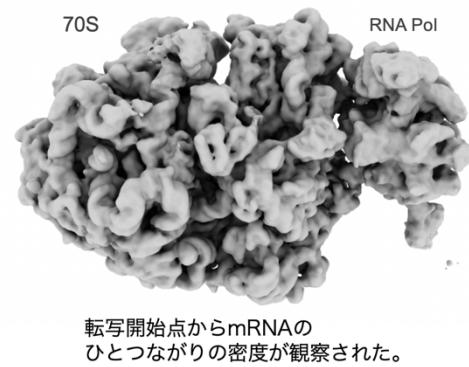
- (1) 転写伸長中 RNA ポリメラーゼを捉えた翻訳開始複合体の単粒子構造解析。前述したように、本研究課題ではまず、伸長反応中 RNA ポリメラーゼから表出した、新生 mRNA を翻訳マシナリーがどのように捉えて、翻訳開始過程が進行するかを、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を用いて明らかにする (図 2)。具体的には、伸長過程で停止した RNA ポリメラーゼ複合体を用意し、翻訳開始過程に必要な構成要素を段階的に加えることで、RNA ポリメラーゼに結合した翻訳開始反応リボソーム構造のスナップショットを明らかにする。
- (2) クライオ電子顕微鏡は、試料を急速凍結しガラス状の氷に包埋し、クライオ専用の透過型電子顕微鏡を用いて、液体窒素温度で電子線を用いて直接観察する手法である。精製した RNA ポリメラーゼ 70S リボソームを 50 nM 程度に濃度調製し、カーボン膜を貼付したグリッドの載せ、余分な水分をろ紙で取り除いたのち、液体エタンなどの寒剤を用いて急速凍結を行う。得られた凍結試料は、クライオ専用の透過型電子顕微鏡に挿入し、直接電子検出器を用いて大量の粒子像を取得する。その後、GPU を搭載した計算機を用いて、粒子像の平均化や構造分類、さらには得られた高分解能構造に対して原子モデルを構築し、構造の解釈を行い。転写と翻訳がカップルした複合体の機能を解明する。



### 4. 研究成果

- (1) RNA ポリメラーゼから表出した新生 mRNA を 70S リボソームが捉える様子の可視化 RNA ポリメラーゼに DNA とその相補鎖を取り込んだ、RNA ポリメラーゼ伸長複合体を調製し、70S リボソームを添加することにより、RNA ポリメラーゼ 70S リボソーム複合体の形成を行った。得られた複合体を、クライオ電子顕微鏡用のグリッドに載せ、急速凍結を行い、クライオ専用の透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、70S リボソームと見られる粒子像が確認された。これらの粒子像を、透過型電子顕微鏡の自動測定により大量に取得し、Relion プログラムを用いて、単粒子解析を行った。構造の違いによる粒子像の分類 (3D classification) により、70S リボソームに RNA ポリメラーゼが強く結合した粒子像のグループを得た。これらの粒子を用いて、三次元再構成を行うことで RNA ポリメラーゼがリボソームに結合する様子の可視化に成功した。RNA ポリメラーゼ及びリボソームの内部を詳細に確認すると、RNA ポリメラーゼの転写開始点から、mRNA のクライオ EM 密度が観察され、RNA ポリメラーゼの mRNA エグジットさらには、そのままりボソーム上の mRNA エントリーを経由して、リボソーム上の mRNA パス内に繋がる密度が観察され。転写により合成された mRNA が外部に露出することなく、直接リボソーム内に取り込まれる構造の特徴が観察された。
- (2) RNA ポリメラーゼから表出した新生 mRNA を 30S リボソームが捉える様子の可視化本研究課題ではさらに、mRNA の長さを段階的に変えた RNA ポリメラーゼ伸長複合体を調製し、30S リボソームと複合体を形成させることで、mRNA がどのように段階的にリボソーム内に取り込まれていくのか、その可視化を目指した。現在、その構造解析を行っているが、RNA ポリメラーゼが mRNA を伸長させながら、リボソームと相互作用していく様子の一端が明らかになりつつある。今後は、さらに一連の構造解析を進め、RNA ポリメラーゼから表出した mRNA がどのようにリボソームに取り込まれていくのかを、クライオ電子顕微鏡法を駆使して可視化していくことを目指している。

図3. 転写中RNAポリメラーゼが結合した70S複合体のクライオ電子顕微鏡構造



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 横山武司	4. 巻 53
2. 論文標題 タンパク質合成装置リボソームを題材としたクライオ電子顕微鏡単粒子解析の概説	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 914-917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 YOKOYAMA Takeshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Single Particle Cryo-EM of Ribosomal Complexes: Visualization of How Ribosome Works in Translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 28 ~ 31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.62.28	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山武司
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析の基礎と実際
3. 学会等名 日本顕微鏡学会、若手研究部会、2021年度シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究協力者	関根 俊一  (Sekine Shunichi)	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	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	村山 祐子  (Murayama Yuko)	理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員	
研究協力者	白水 美香子  (Shirouzu Mikako)	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	
研究協力者	内窪 友美  (Uchikubo Tomomi)	理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師	

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