

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20247008

研究課題名（和文） 転写・翻訳を担う超分子複合体RNAポリメラーゼおよびリボソームの結晶構造解析

研究課題名（英文） Crystallographic studies of macromolecular complexes in transcription and translation: RNA polymerases and the ribosome

研究代表者

横山 茂之 (YOKOYAMA SHIGEYUKI)

独立行政法人理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・領域長

研究者番号：00159229

研究成果の概要（和文）：

遺伝子発現の根幹である転写および翻訳においてそれぞれ中核的な役割を担うRNAポリメラーゼおよびリボソームについて、転写・翻訳の構造基盤を解明すべく構造生物学研究を行った。原核生物のRNAポリメラーゼやリボソームを中心に形成される巨大複合体の構造解析を行うとともに、真核生物の転写・翻訳関連因子の調製法の確立および構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

To approach the structural basis of transcription and translation, we carried out structural studies on RNA polymerase and ribosome, which play a central role in transcription and translation, respectively. These include RNA polymerase bound with regulatory proteins and nucleic acids and small ribosomal subunit bound with regulatory proteins and RNA. We also established preparation method of eukaryotic proteins responsible for transcription or translation, and performed crystallography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	33,300,000	9,990,000	43,290,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：転写、RNAポリメラーゼ、転写因子、翻訳、リボソーム、翻訳開始因子、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

転写 (RNA 合成) と翻訳 (タンパク質合成) は、すべての生物に必須の最も一般的なプロセスである。

RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、遺伝子発現の第一段階である RNA の転写をつかさどる酵素であり、分子量 400~700 kDa の巨大なタンパク質複合体である。今世紀初頭に酵母や細菌の RNAP の結晶構造が報告され、RNAP の立体構造や RNA 重合の基本的な仕組みが明らかになってきている。しかしながら、転写は単純な RNA の重合ではなく、開始、伸長、終結の一連の段階からなる複雑かつ高度に制御されたプロセスである。各段階において、RNAP は様々な転写因子等と異なる複合体を形成して固有の機能を発揮している。そのような高次複合体の構造解明は転写を理解するために必須であり、世界的にも主要な研究課題となっている。

mRNA に転写された遺伝子の配列をタンパク質のアミノ酸配列へと変換する翻訳のプロセスは、リボソームとそれを中心とした翻訳因子群によって担われている。リボソームは大小二つのサブユニット (原核生物では 30S および 50S、真核生物では 40S および 60S) からなり、全体で 70S および 80S の沈降係数をもつ巨大なタンパク質・RNA 複合体である。小サブユニットは mRNA と tRNA のコドン・アンチコドン対合をモニターして翻訳の正確性を高め、大サブユニットは A (aminoacyl) サイトにある tRNA のペプチドと P (peptidyl) サイトにある tRNA のポリペプチドを結合させるペプチド伸長反応を司っている。原核生物のリボソームについては、30S、50S、および 70S のすべてについて結晶構造が報告され、現在の研究対象は翻訳開始因子や伸長因子等まで含めた高次複合体に移っている。一方、真核生物のリボソームの結晶構造については未解明であった。

2. 研究の目的

転写および翻訳においてそれぞれ中核的な役割を担う RNA ポリメラーゼおよびリボソーム、並びに転写因子や翻訳因子に焦点を当て、転写・翻訳の構造基盤を解明すべく構造生物学研究を行うことを目的とした。主に原核生物 (高度好熱菌) の系を用いて、転写や翻訳における様々な状態を反映した複合体の立体構造解析を行うことにより、遺伝子発現機構の構造基盤を解明することを目指した。さらに、真核生物の転写・翻訳開始因子およびリボソーム小サブユニットについて、構造解析を目指し、それに適した試料の調製法の検討・確立を行った。

3. 研究の方法

RNA ポリメラーゼおよびリボソーム、転写因子や翻訳因子を調製し、転写や翻訳において鍵となる重要な複合体を再構成し、結晶化・X 線回折データ収集・構造解析を行った。得られた複合体の構造に立脚した変異体解析などの機能解析を行い、構造から得られる仮説を検証した。また、真核生物の転写・翻訳因子等について、構造解析を行うべく、結晶化に適した試料の調製を行った。

4. 研究成果

転写については、高度好熱菌由来 RNA ポリメラーゼ (RNAP) と転写因子との複合体の結晶構造解析を行った。転写伸長を阻害する因子として知られる Gfh1 と RNAP との複合体の X 線結晶構造解析に成功した (Nature, 2010)。Gfh1 は RNAP の NTP の取り込み口 (セカンダリチャネル) に結合してこれを塞ぎ、転写を阻害することが明らかになった (図 1)。さらに、この複合体では、RNAP はこれまでに見いだされていなかった新たなコンフォメーションをとっていた。これは、転写の過程で必要とされる RNAP の構造状態のひとつが Gfh1 によってトラッ

プされたものと考えられる。転写制御因子を結合した細菌の RNAP の結晶構造は世界初であり、今後の転写およびその制御機構の研究において重要な指針となる結果である。

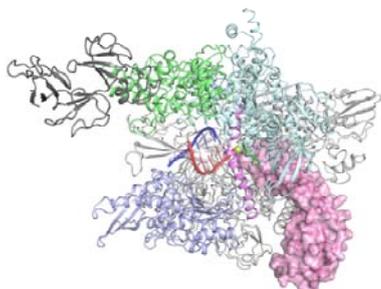


図 1. Gfh1 を結合した高度好熱菌 RNA ポリメラーゼの結晶構造

DNA の塩基配列を転写中の RNAP は、誤った塩基を取り込んだときなどに DNA 上を後退して後退複合体を形成する。細菌では、Gre 因子とよばれるタンパク質がこの後退複合体に結合して RNA の切断を促し、ヌクレオチドの校正に重要な役割を果たしている。高度好熱菌の RNAP を用いてそれらの複合体を再構成して結晶化することに成功し、構造解析を進めた。また、RNAP による転写開始を制御するタンパク質と RNAP との複合体の結晶化に成功し、現在構造解析を行っている。また、真核生物である分裂酵母の RNA ポリメラーゼ III (RNAP III) の C17/25 サブユニットの結晶化を行い、RNAP III に固有のサブユニット複合体の構造解析に成功した (図 2)。

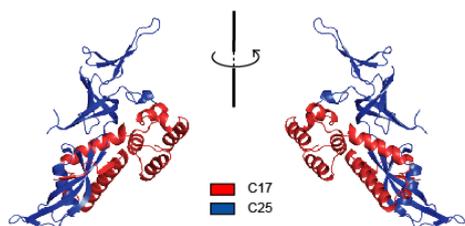


図 2. 分裂酵母 RNAP III C17/25 サブ複合体の結晶構造

翻訳については、高度好熱菌のリボソーム小サブユニット (30S) および 70S リボソームを用い、複合体の構造解析を進めている。これまでに、RelE ないし RimM を結合した 30S サブユニットの結晶構造解析に成功している。RimM は、2つのドメインとそれらをつなぐリンカーから構成されており、N 末ドメインは翻訳因子によくみられるバレル構造であり、C 末ドメインは PRC バレル構造をとっていた。RimM-S19 複合体の構造から、RimM は head 領域の 50S との会合面に結合することが示された。

真核生物については、ヒト由来翻訳開始因子の構造解析を進めている。これまでに、eIF2B α の構造解析に成功している (J. Mol. Biol. 2009) (図 3)。翻訳開始因子 eIF2B はヘテロ 5 量体タンパク質で、他の翻訳開始因子 eIF2 の GEF として働き、翻訳開始の制御に重要な役割を担っている。明らかになった eIF2B α サブユニットの構造には、リン酸化された eIF2 のリン酸化セリン残基の結合部位と思われるポケットが見いだされ、eIF2B による翻訳制御機構が示唆された。現在さらに eIF2 および eIF2B の調整法の確立およびそれを用いた結晶構造解析を目指して研究を進めている。



図 3. eIF2B α の結晶構造

並行して、翻訳に不可欠な tRNA のアミノアシル化をになう特殊な系の構造解析を行った。2 段階の反応でグルタミンを結合した tRNA を合成する高分子複合体「グルタミ

ン・トランスアミドソーム」の結晶構造解析に成功した(図4)。一つの tRNA にグルタミン tRNA 合成酵素 GluRS とアミド基転移酵素 GatCAB の二つの酵素が同時に結合している状態の立体構造を明らかにし、これらの二つの酵素間で中間産物であるグルタミン tRNA の受け渡しの機構を明らかにした(Nature, 2010)。また、翻訳の過程でセレンをタンパク質に取り込むために不可欠なリン酸化酵素と tRNA との複合体の結晶構造解析に成功した(Mol. Cell, 2010)。

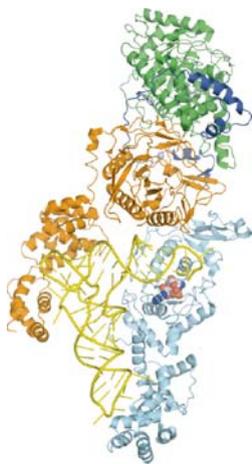


図 4. グルタミントランスアミドソームの結晶構造

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 19 件)

1. Sekine, S., Tagami, S. and Yokoyama, S. “Structural basis of transcription by bacterial and eukaryotic RNA polymerases” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 110-118 (2012). 査読有
2. Ehara, H., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Crystal structure of the C17/25 subcomplex from *Schizosaccharomyces pombe* RNA Polymerase III” *Protein Sci.* **20**, 1558-1565 (2011). 査読有

3. Tagami, S., Sekine, S. and Yokoyama, S. “A novel conformation of RNA polymerase sheds light on the mechanism of transcription”, *Transcription* **2**, 162-167 (2011). 査読有

4. Tagami, S., Sekine, S., Kumarevel, T., Hino, N., Murayama, Y., Kamegamori, S., Yamamoto, M., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. “Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein.” *Nature* **468**, 978-982 (2010). 査読有

5. Hikida, Y., Kuratani, M., Bessho, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Structure of an archaeal homologue of the bacterial Fmu/RsmB/RrmB rRNA cytosine 5-methyltransferase”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66** (12), 1301-1307 (2010). 査読有

6. Mukai, T., Hayashi, A., Iraha, F., Sato, A., Ohtake, K., Yokoyama, S. and Sakamoto, K. “Codon Reassignment in the Escherichia coli Genetic Code” *Nucleic Acids Res.* **38**, 8188-8195 (2010). 査読有

7. Kuratani, M., Hirano, M., Goto-Ito, S., Itoh, Y., Hikida, Y., Nishimoto, M., Sekine, S., Bessho, Y., Ito, T., Grosjean, H. and Yokoyama, S. “Crystal structure of *Methanocaldococcus jannaschii* Trm4 complexed with sinefungin”, *J. Mol. Biol.*, **401** (3), 323-333 (2010). 査読有

8. Chiba, S., Itoh, Y., Sekine, S. and Yokoyama, S. “Structural basis for the major role of *O*-phosphoserine-tRNA kinase in the UGA-specific encoding of selenocysteine.” *Mol. Cell* **39**, 410-420 (2010). 査読有

9. Mimasu, S., Sato, S., Umezawa, N., Higuchi, T., Umehara, T. and Yokoyama, S. “Structurally Designed Trans-2-phenylcyclopropylamine Derivatives Potently Inhibit Histone Demethylase LSD1/KDM1” *Biochemistry* **49**, 6494-6503 (2010). 査読有

10. Ito, T. and Yokoyama, S. “Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions.” *Nature* 467, 612-616 (2010). 査読有

11. Ito, T., Kiyasu, N., Matsunaga, R., Takahashi, S. and Yokoyama, S., “Structure of Nondiscriminating Glutamyl-tRNA Synthetase from *Thermotoga maritima*”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66 (7), 813-820 (2010). 査読有

12. Arakawa, A., Handa, N., Ohsawa, N., Shida, M., Kigawa, T., Hayashi, F., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. “The C-terminal BAG Domain of BAG5 Induces Conformational Changes of the Hsp70 Nucleotide-binding Domain for ADP-ATP Exchange”, *Structure* 18, 309-319 (2010). 査読有

13. Tagami, S., Sekine, S.I., Kumarevel, T., Yamamoto, M. and Yokoyama, S., “Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Thermus thermophilus* transcription elongation complex bound to Gfh1”, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 66 (1), 64-68 (2010). 査読有

14. Hiyama, T. B., Ito, T., Imataka, H. and Yokoyama, S. “Crystal structure of the α subunit of human translation initiation factor 2B”, *J. Mol. Biol.* 392, 937-951 (2009). 査読有

15. Goto-Ito, S., Ito, T., Kuratani, M., Bessho, Y. and Yokoyama, S. “Tertiary structure checkpoint at anticodon loop modification in tRNA functional maturation” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1109-1115 (2009). 査読有

16. Itoh, Y., Chiba, S., Sekine, S.I. and Yokoyama, S. “Crystal structure of human selenocysteine tRNA” *Nucleic Acids Res.* 37, 6259-6268 (2009). 査読有

17. Naganuma, M., Sekine, S.I., Fukunaga, R. and Yokoyama, S. “Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 8489-8494 (2009). 査読有

18. Itoh, Y., Sekine, S.I., Matsumoto, E., Akasaka, R., Takemoto, C., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. “Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs”, *J. Mol. Biol.* 385, 1456-1469 (2009). 査読有

19. Oki, K., Sakamoto, K., Kobayashi, T., Sasaki, H. M. and Yokoyama, S. “Transplantation of a tyrosine editing domain into a tyrosyl-tRNA synthetase variant enhances its specificity for a tyrosine analog”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13298-13303, (2008). 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. Yokoyama, S., Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein, FASEB Summer Research Conferences "Mechanism & Regulation of Prokaryotic Transcription, 2011/06/19 ~ 2011/06/24, Saxtons River, USA

2. Hiyama, T. B., Crystal Structure of the α Subunit of Human Eukaryotic Initiation Factor 2B, RNA2011, 2011/06/14 ~ 2011/06/18, Kyoto

3. 田上俊輔, RNA ポリメラーゼの新規コンフォメーションと機能の関係, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011/06/07 ~ 2011/06/09, 大阪市

4. 伊藤拓宏, グルタミンートランスアミドソームの結晶構造解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸

5. 江原晴彦, X-ray crystal structure of okadaic acid binding protein 2.1, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010), 2010/12/7-10日, 神戸
6. 田上俊輔, RNA ポリメラーゼの新規構造状態: トランスロケーションと転写制御のメカニズム解明への手掛り 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010), 2010/12/7-10, 神戸
7. 檜山卓也, 翻訳開始因子 eIF2B α によるリン酸基認識機構の研究, 第12回 RNA ミーティング, 2010/7/27-29, 東京
8. 伊藤弓弦, O-ホスホセリル tRNA キナーゼとセレノシステイン tRNA 複合体の結晶構造, 第12回 RNA ミーティング, 2010/7/27-29日, 東京
9. 永沼政広, アラニル tRNA 合成酵素による G•U 塩基対認識の構造基盤, 第12回 RNA ミーティング, 2010/7/27-29, 東京
10. 伊藤拓宏, グルタミンートランスアミドソームの結晶構造解析, 第12回 RNA ミーティング, 2010/7/27-29, 東京
11. 田上俊輔, RNA ポリメラーゼの新規コンフォメーション状態, 第12回 RNA ミーティング, 2010/7/27-29, 東京
12. 関根俊一, Structural basis of transcription regulation revealed by the crystal structure of *Thermus thermophilus* RNA polymerase elongation complex bound with a transcriptional regulator Gfh1, 第32回日本分子生物学会年会, 2009/12/9-12, 横浜
13. 田上俊輔, Crystal structure of an RNA polymerase translocation intermediate, 第32回日本分子生物学会年会, 2009/12/9-12, 横浜
14. 田上俊輔, Crystallography of bacterial RNA polymerase complexed with transcription factors, XXI Congress of the international Union of Crystallography

(IUCr2008), 2008/8/23, 大阪

15. 檜山卓也, 翻訳開始因子 eIF2B α の X線結晶構造解析, 第10回日本 RNA 学会年会, 2008/7/23, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 茂之 (YOKOYAMA SHIGEYUKI)
独立行政法人理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・領域長
研究者番号: 159229

(2) 研究分担者

関根 俊一 (SEKINE SHUNICHI)
東京大学・大学院理学系研究科・講師
研究者番号: 50321774
(平成20~21年度)

伊藤 拓宏 (ITO TAKUHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 70401164
(平成20~21年度)

藤井 佳史 (FUJII YOSHIFUMI)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号: 30392096
(平成20~21年度)

(3) 連携研究者

関根 俊一 (SEKINE SHUNICHI)
東京大学・大学院理学系研究科・講師
研究者番号: 50321774

伊藤 拓宏 (ITO TAKUHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 70401164

藤井 佳史 (FUJII YOSHIFUMI)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号: 30392096