

## 論文の内容の要旨

### RNA ポリメラーゼと核酸および転写因子の複合体の構造解析 (Structural analysis of RNA polymerase complexed with nucleic acids and a transcription factor)

田上 俊輔

DNA から RNA への遺伝子配列の転写は RNA ポリメラーゼ (RNAP) によって行われている。転写中の RNAP (elongation complex, EC) は RNA の 3'末端に 1 塩基ずつヌクレオチドを付加することで RNA を伸長する(図 1)。EC はヌクレオチドを付加すると、鋳型 DNA の次の塩基が触媒部位に入ってくるように、DNA に沿って 1 塩基分トランスロケーションする。同時に NTP の結合部位も空になり、次の基質が入ってくるようになる。このような RNA 合成の一連の流れをヌクレオチド付加サイクルと呼ぶ。さまざまな転写因子が EC による RNA 合成を制御しており、正確な遺伝子発現を実現するために重要な役割を果たしている。これらの転写因子はヌクレオチド付加サイクルのどこかの段階で EC に結合することで転写制御を行うと考えられる。しかしながら、転写因子がヌクレオチド付加サイクルのどの段階で EC に結合するのか、その際に

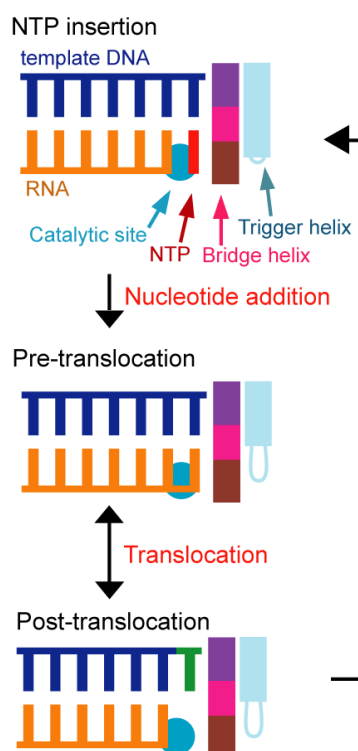


図 1. RNAP によるヌクレオチド付加サイクル

EC はいかなる構造・コンフォメーションをとっているのか、転写因子が結合した結果どのようなメカニズムで RNAP の活性を制御するのか、といった点については多くの転写因子で未解明のままである。このような疑問点は、EC と転写因子の複合体の構造解析を行うことで解明できると考えられる。本研究では、真正細菌の Gfh1 と呼ばれる転写因子と EC の複合体の X 線結晶構造解析を行った。

Gfh1 は Gre-factor と呼ばれる真正細菌の転写因子ファミリーに属するタンパク質で、RNAP による RNA への NTP 付加反応とその逆反応である pyrophosphorolysis を阻害することが報告されている。Gre-factor は配列、構造がよく保存されており、N 端側のコイルドコイルドメイン (NTD) と C 端側の球状ドメイン (CTD) からなる。CTD は RNAP との結合、NTD は Gre-factor の転写制御活性を担うことが生化学的な解析から示されている。本研究では、RNAP と Gfh1 の結合様式、さらに Gfh1 による転写阻害メカニズムを明らかにするために、EC・Gfh1 複合体の X 線結晶構造解析を行った。また、Gfh1 は RNA 伸長反応を阻害するので、EC・Gfh1 複合体の X 線結晶構造から RNA 合成のメカニズムについて重要な示唆を得られる可能性もあると考えた。X 線結晶構造解析には高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のタンパク質を用いた。

EC・Gfh1 複合体の結晶化では、クリスタルパッキングに影響を与える目的でさまざまな長さ・配列の DNA・RNA を EC の再構成に用いて、結晶化条件のスクリーニングを行った。この結果、EC・Gfh1 複合体の結晶化に成功し、放射光施設で X 線回折データを収集した。その後、過去に報告されていた EC 単独の原子座標 (PDB 2O5I) をモデルに用いて、分子置換法によって初期位相を

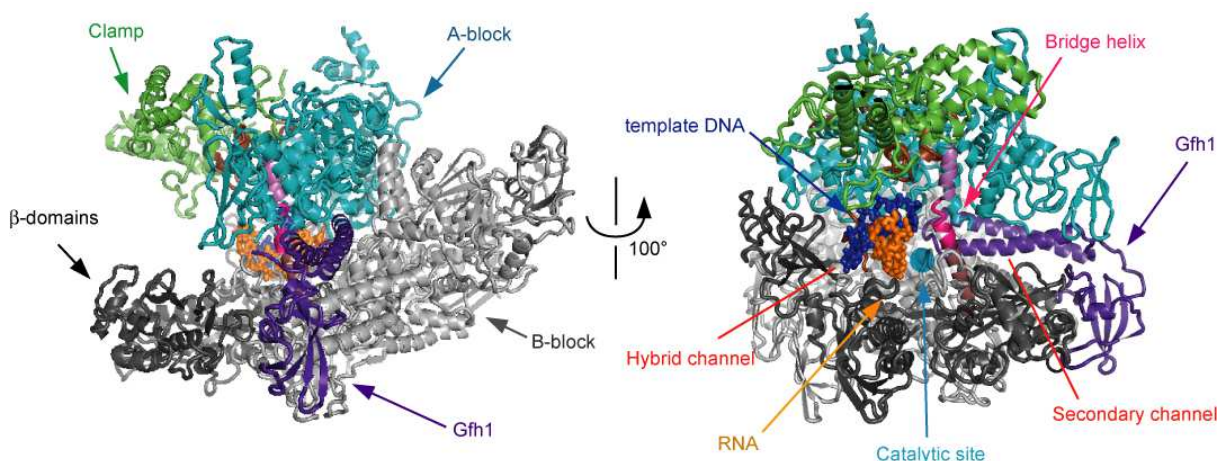


図 2. EC・Gfh1 複合体の全体構造

計算した。分子置換後の電子密度マップには Gfh1 の電子密度が明確に観察され、Gfh1 単体の構造(PDB 2F23)をその電子密度に当てはめることができた。最終的な EC・Gfh1 の構造を図 2 に示す。今回の EC・Gfh1 の結晶構造は、真正細菌の EC と転写因子の複合体としてははじめて報告された結晶構造である。

EC・Gfh1 複合体中で、Gfh1 は RNAP の核酸結合部位の裏にあるセカンダリーチャンネルに結合していた。Gfh1 の CTD はセカンダリーチャンネルの外側の構造と疎水性相互作用で結合しており、RNAP と Gfh1 の結合に重要な役割を果たすことが構造から裏付けられた。Gfh1 の NTD はセカンダリーチャンネルを貫通しており、NTD の先端は RNAP の活性部位付近に達していた(図 3)。NTD の先端は NTP の  $\beta$ - $\gamma$  phosphate の結合部位を占有しており、直接的に NTP の結合を阻害していた。この観察は、Gfh1 が NTP の結合に対して競合阻害的にはたらくという生化学的解析の結果を十分に説明する。

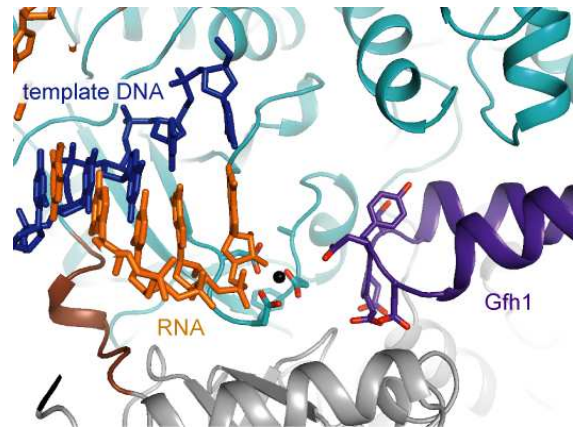


図 3. EC・Gfh1 複合体の活性部位付近の構造

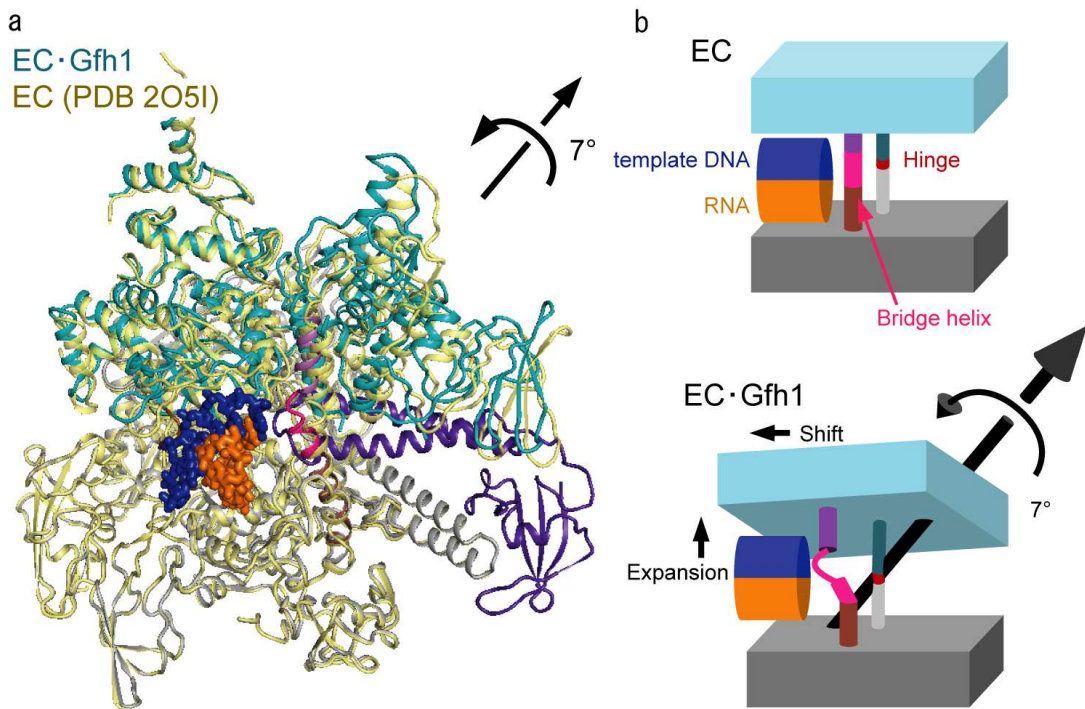


図 4. EC・Gfh1 複合体の“ねじれた”構造

- (a) EC と EC・Gfh1 複合体の構造の重ね合わせ
- (b) EC と EC・Gfh1 の中心部の構造の模式図

また、EC・Gfh1 複合体の構造を過去に報告されていた EC の構造 (PDB 2O5I) と比較したところ、EC・Gfh1 複合体中の RNAP は構造が大きく変化していた。EC・Gfh1 複合体中の RNAP では、RNAP の DNA・RNA 結合チャンネルを形成する 2 つの構成モジュールが相互に約 7° 回転しており、“ねじれた”構造をとっていた(図 4)。この“ねじれた”構造は、Gfh1 の NTD が RNAP のセカンダリーチャンネルに収まることでトラップされていた。“ねじれた”構造では DNA・RNA 結合チャンネルが広がっており、その結果 RNAP と DNA・RNA との結合が弱められていると考えられた。また、構成モジュール間の回転により、2 つの構成モジュールをつないでいる長い  $\alpha$  ヘリックス(ブリッジヘリックス)が中央で折れ曲がって、DNA・RNA 結合チャンネルにちょうど 1 塩基分突き出していた。その結果、DNA・RNA はトランスロケーション後の位置に結合していた。しかしながら、鋳型 DNA の次の塩基が活性部位に入ってくることを、突き出したブリッジヘリックスが妨げており、EC はトランスロケーション前後のどちらとも異なる状態にあった。

ここで、EC・Gfh1 複合体中で観察された“ねじれた”構造を経由して RNAP のトランスロケーションが行われるというモデルを考案した。EC が DNA に沿って移動するトランスロケーションの段階では、一方的にトランスロケーション前の状態からトランスロケーション後の状態に進むのではなく、トランスロケーション前後の状態の平衡状態にあることが知られている。このことから、トランスロケーションは分子の熱運動によって引き起こされていると考えられるが、このようなランダムな動力を用いてどのように正確なトランスロケーションが行われているかは解明されていなかった。熱運動によって EC が今回観察された“ねじれた”構造をとり、一時的に DNA・RNA との結合を弱めつつ、同時にブリッジヘリックス折り曲げて DNA・RNA を 1 塩基分押し込むというメカニズムを用いれば、熱運動を動力に正確なトランスロケーションを達成することができると考えられる。