

## 論文の内容の要旨

論文題目                    真核生物型 RNA ポリメラーゼの X 線結晶構造解析  
(Crystallographic studies on the eukaryotic RNA polymerases)

江原 晴彦

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。RNAP には、大きく分けて単一のサブユニットから構成されるものと、複数のサブユニットから構成されるものが存在する。前者はファージやミトコンドリア等、限られた所での転写を司っている。一方、後者のマルチサブユニット型 RNAP は、真正細菌、古細菌、真核生物を含む生物界全体に広く分布し、転写の大半を担っている。マルチサブユニット型 RNAP は、いずれも配列的、構造的な相同性を持ち、共通の祖先から進化してきたものと考えられている。真正細菌および古細菌においては 1 種類の RNAP がすべての転写を行っている。それに対し、真核生物の核内には少なくとも 3 種類の RNAP が存在し、それぞれ RNA ポリメラーゼ I, II, III (Pol I, II, III) と呼ばれている。これらのうち、Pol I は 35S rRNA 前駆体の転写を専門に行う。また、Pol II は mRNA 前駆体や多くの snRNA の転写を、Pol III は 5S rRNA, tRNA 及び様々な small RNA の転写を担うことが知られている。

構造的な観点からは、500 kDa 程度の大きなタンパク質複合体であり、Pol I は 14、Pol II は 12、Pol III は 17 のサブユニットから構成されている。これら 3 種類の RNAP は高い進化的関連性を持つが、特にコアを形成する 10 個のサブユニットは共通性が高く、主に RNA 伸長といった RNAP の根幹的な触媒反応に関わっている。一方、他の周辺部に位置するサブユニットは独自性が高く、転写の開始や終結に関わるほか、固有の転写因子との相互作用の場を提供すること等が知られている。

RNAP はセントラルドグマの中核を担う極めて重要な酵素であり、これまでも数々の生化学、構

造生物学的研究が行われてきた。真正細菌や古細菌の RNAP に加え、真核生物の Pol II やそれらと核酸との複合体等の結晶構造が解明されており、RNA 伸長の基本的な触媒メカニズムは徐々に明らかにされつつある。しかし、特に真核生物の RNAP についてはその調製や結晶化に関して難易度が高いこともあり、限られた生物種、限られた結晶系での解析が主であった。それ故に、複雑で可動性に富んだ分子であることが予想されながら、RNAP 内で生じ得る大きな構造変化についての知見は現在でも十分ではない。よって本研究では、真核生物の転写の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、真核生物の RNAP やその部分複合体の調製方法の確立と、それらの X 線結晶構造解析を行った。

### ピキア酵母由来 RNAP の調製法の確立

導入した遺伝子を大量発現させる場合と比べて、内在性のタンパク質複合体を精製するためには、多量の菌体とより高い精製度が要求される。本研究においては、増殖速度が速く、高密度培養が可能なことで知られるピキア酵母を用いることで前者の問題を解決した。また、ゲノム上に存在する RNAP のサブユニットをコードする遺伝子に改変を加え、3xFLAG タグと His タグを導入することにより、精製の効率化を行った。これらのタグを利用したアフィニティー精製を含む、多段階のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることで Pol I, Pol II, Pol III それぞれの精製を行った。特に Pol I, Pol II に関しては結晶構造解析を行うのに十分な量と純度を実現した (Fig.A-1)。

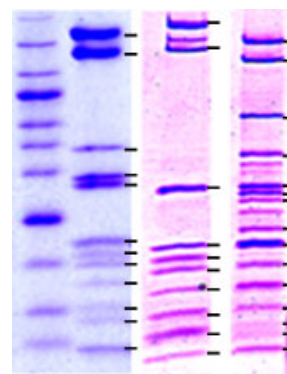


Fig.A-1 精製した RNAP の SDS-PAGE

左より、分子量マーカー、Pol I, Pol II, Pol III

### ピキア酵母由来 Pol II の X 線結晶構造解析

精製した Pol II の結晶化スクリーニングを行い、微小な結晶を与える条件を多数発見した。これらの条件をもとに、塩や沈殿剤等の検討を行い、ある程度の大きさを持った単結晶を与える条件を複数得ることができた。

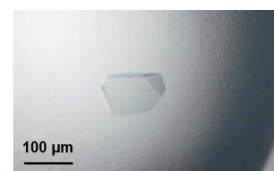


Fig.A-2 Pol II の結晶

得られた結晶に関して予備的な X 線回折実験を行ったところ、結晶の外見により、異なった結晶格子を持つことが判明した。それらのうち三方晶系の格子を持つ結晶に関して更なる結晶化条件の最適化を行い、回折実験に適した大きさの結

晶を得ることができた (Fig. A-2). 得られた結晶を用いて X 線回折データの収集を行った。

以前に報告されていた出芽酵母の Pol II の構造を用い、分子置換法による位相決定を行った。その結果、結晶中には 12 個すべてのサブユニットから成る完全な Pol II が含まれていることが判明した。多くの箇所では初期モデルと電子密度との大きなずれが観測されたため、これらに関して構造モデルの修正を行った。最終的な構造を Fig.A-3 に示す。ピキア酵母の Pol II は全体としてカニのはさみのような形をしており、中央部には核酸の通り道となる大きな溝が存在する (primary channel)。また、primary channel に対して上からフタをするような形で、clamp と呼ばれる領域が存在する。さらに、裏側には転写因子との結合部位や、NTP の通り道となりうる小さな穴が存在する (secondary channel)。さらに、中央部から外側に突き出すような形で、Rpb4/7 という二つのサブユニットから成る細長いストーク構造が存在する。

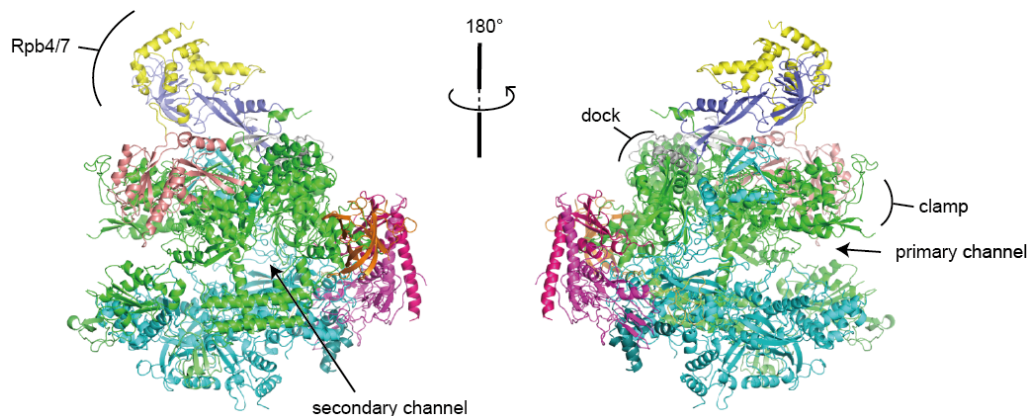
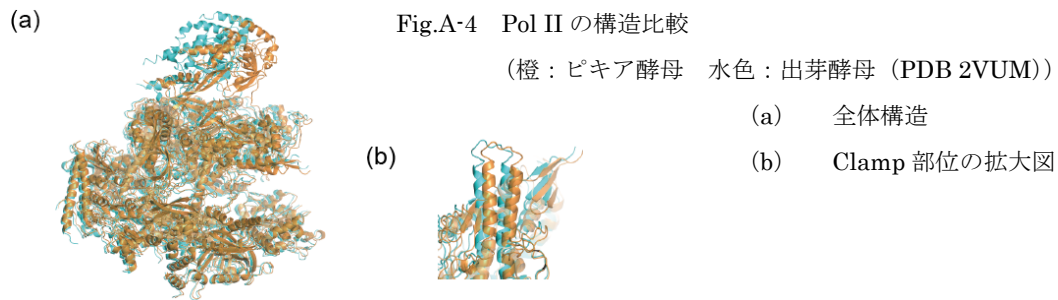
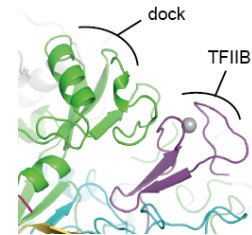


Fig.A-3 ピキア酵母 Pol II の全体構造

詳細な構造比較を行ったところ、これまでに報告されてきた Pol II の構造とは大きく異なる点が明らかとなった (Fig.A-4)。特に Rpb4/7 に関しては出芽酵母の Pol II 等と比べて傾いた角度で結合しており、先端付近においては 15 Å を超える大きなずれが観察された。Rpb4/7 がこのような大きな動きをし得るとするのは新しい発見である。さらに、clamp 領域に関しても大きな動きが観測された。この部分は以前より可動性を持つことが知られていたが、今回の構造では、これまでで最も内側に閉じた形をとっていた。Pol II の高い保存性を考えると、今回観察された構造変化は種間の違いに由来するものではなく、Pol II の取りうる別の構造状態であると考えられ、転写の分子メカニズムにおいて新たな知見を与えるものである。



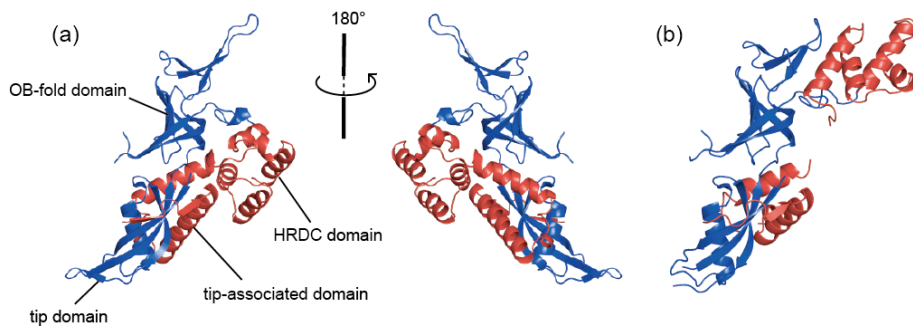
本研究ではさらに、Pol II と、基本転写因子の一つである TFIIB との複合体の X 線結晶構造解析を行い、Pol II の dock ドメイン付近に TFIIB の zinc ribbon ドメインが結合している様子を明らかにした (Fig.A-5)。



### Pol III 部分複合体の調製と X 線結晶構造解析

Fig.A-5 Pol II と TFIIB の複合体

Pol III は真核生物中で最も複雑な RNAP であり、17 のサブユニットから成る。本研究では、Pol III に特異的なサブユニットに着目し、複数の生物種由来の配列を用いて C82/34/31, C53/37, C17/25 という3種類の部分複合体の再構成を行った。それらのうち、分裂酵母由来の C17/25 複合体に関して X 線結晶構造解析に成功した。その結果、以前に解かれていた出芽酵母の C17/25 の構造と比較して C17 HRDC ドメインの位置が大きく異なっていることが判明した (Fig.A-6)。配列解析の結果、種によってドメイン間の動きやすさに違いがあること、また本研究の分裂酵母 C17/25 に見られる HRDC ドメインの配置が転写に重要であることが示唆された。



本研究では、Pol II 全体及び Pol III の部分構造において、予期せぬ大きな動きが起き得ることを発見した。これらの結果は RNAP による転写の分子メカニズムに重要な知見を与えると共に、異なる結晶系で構造解析を行うことの重要性を指し示すものと考えられる。