

論文の内容の要旨

論文題目 原核生物型 RNA ポリメラーゼの DNA 上での後退と RNA 切断の構造基盤
(Structural basis of backtracking and transcript cleavage by bacterial RNA polymerase)

氏名 村山 祐子

・研究の背景と目的

RNA ポリメラーゼ (RNAP) は細胞内における遺伝子の転写を担う、巨大なタンパク質複合体である。転写伸長中の RNAP (伸長複合体) は鋳型 DNA に沿って移動しながら RNA の 3' 端に 1 つずつヌクレオチドを付加していくことで、鋳型 DNA に相補的な RNA を合成する。RNA 合成は 5' 端から 3' 端の一方方向に行われるが、RNAP は DNA 上を転写の上流から下流、下流から上流のどちらの方向にも移動することが知られている。RNAP の逆向きの移動 (RNAP の後退, **backtracking**) は、鋳型に適合しないヌクレオチドの取り込みや鋳型 DNA の損傷、あるいは特異的なシグナル配列によって誘発される。後退状態では新生 RNA の 3' 端が鋳型 DNA から解離し、転写伸長が中断される (図 1)。このとき RNA の 3' 端は、RNAP の基質取り込みチャンネルであると考えられている 2 次チャンネルに向かって突出した状態となっている。RNAP には転写伸長反応の触媒部位において RNA を加水分解する活性があり、後退状態の RNAP はこの切断反応によって RNA 3' 端の突出部分を取り除き、転写伸長を再開することができる。RNAP 単独の活性による RNA の切断反応 (イントリンジックな RNA 切断) は比較的遅いが、細菌では **Gre factor** と呼ばれる転写伸長因子が RNAP の 2 次チャンネルに結合すると、切断活性が大幅に促進されることが知られている。真核生物の

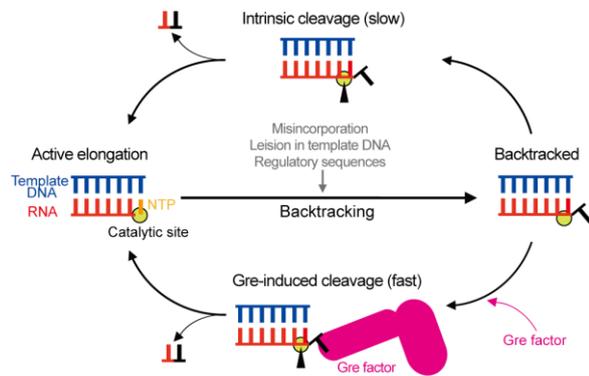


図 1 RNAP の後退と RNA 切断

RNAPでもRNA切断を促進する因子(TFIIS)が知られているが、細菌のGre factorとは配列および構造に類似性がない。後退とRNA切断はRNAPの基本的な転写制御機構のひとつであるが、その構造基盤については未解明の点が多く残されている。そこで本研究では細菌型RNAPの後退とイントリンジックなRNA切断、Gre factor存在下におけるRNA切断それぞれの構造基盤を解明することを目的として、X線結晶構造解析および生化学的解析を行った。

・後退状態のRNAPの構造

まず、後退とイントリンジックなRNA切断の構造基盤を明らかにするために、細菌型RNAPの後退状態の複合体の構造解析を行った。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のRNAPとRNA3'端の突出した核酸構造部を用いて後退状態の複合体を再構成し、分解能3.4 Åの構造を決定した。後退状態の複合体の全体構造(図2)は、通常伸長複合体とほぼ同じであったが、RNAの3'端の残基が鋳型DNAから解離し、2次チャネルに向かって突出していた(図3a)。また後退状態の複合体では、RNAPの活性を制御するトリガーループが「半開き」の状態であった。トリガーループは活性部位の近傍に位置する柔軟性に富んだモチーフで、基質NTPの結合時に閉じた状態となり、基質の適切な配向に寄与する(図3b)。後退状態の複合体におけるRNAの3'端の残基と閉じた状態のトリガーループの位置が重なることから(図3c)、後退状態ではトリガーループは閉じたコンフォメーションをとることができずに半開き状態に固定されると考えられる。

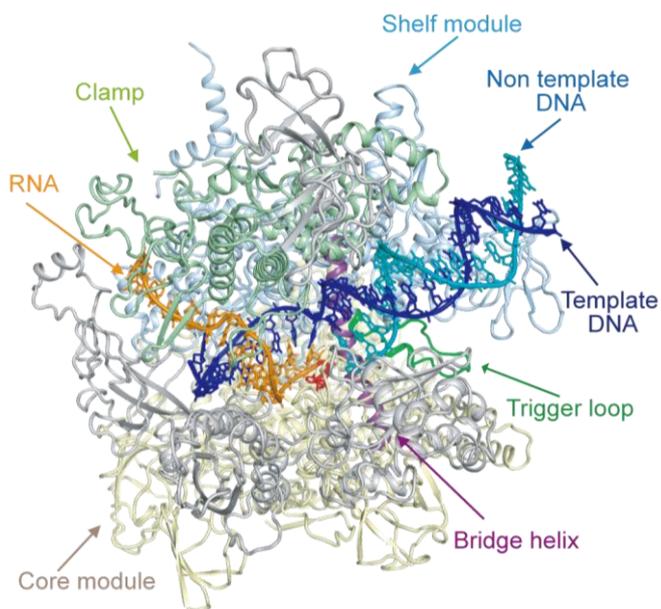


図2 後退状態のRNAPの全体構造

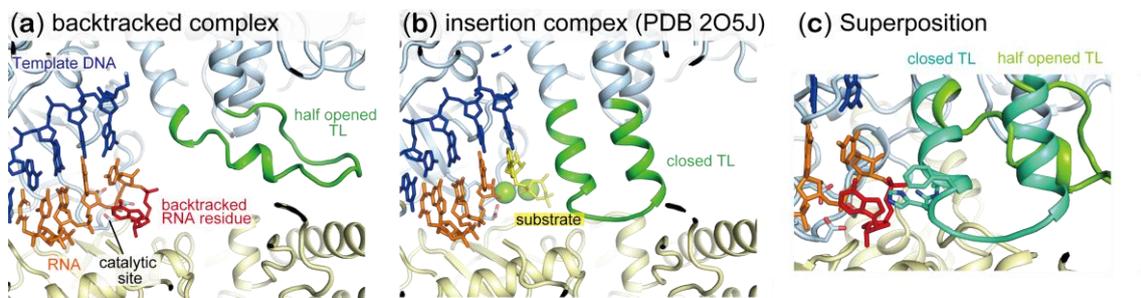


図3 活性部位付近の構造 (a)後退状態 (b) 基質結合状態(PDB 2O5J) (c)重ね合わせ

・ Gre factor を結合した後退状態の複合体の構造

続いて、Gre factor 存在下における RNA 切断の構造基盤を明らかにするために、Gre factor を結合した後退状態の複合体の構造解析を行った。本研究では、*T. thermophilus* の切断促進因子である GreA と切断促進活性を持たない Gre factor ホモログである Gfh1 のハイブリッドタンパク質 (Gre-hybrid) を結晶化に用いた。Gre-hybrid (図 4a) は、Gfh1 の N 端側のコイルドコイルドメインの先端約半分を GreA の対応するドメインに置換したもので、GreA と同様の切断促進活性を持つことが先行研究において示されている。後退状態の RNAP と Gre-hybrid の複合体 (BC・Gre-hybrid) について、分解能 4.3 Å の X 線結晶構造を決定することに成功した。BC・Gre-hybrid では RNAP が「ラチェット状態」と呼ばれるコンフォメーションにあり、通常の伸長複合体や後退状態 (図 2) における「タイト状態」と比べて Gre factor の結合部位である 2 次チャネルや DNA/RNA の結合チャネル (1 次チャネル) が広がり、ブリッジヘリックスが折れ曲がるなど大きく変化していた (図 4b)。この全体構造は切断促進活性を持たない Gfh1 を結合した伸長複合体とほぼ同様であった。切断促進活性に必須な保存残基を含む Gre-hybrid のコイルドコイル先端部は RNAP の触媒部位の近くに配置されており (図 4c)、切断活性の促進に寄与していることが示唆された。BC・Gre-hybrid 複合体では、トリガーループは完全に開いた状態となっていた。

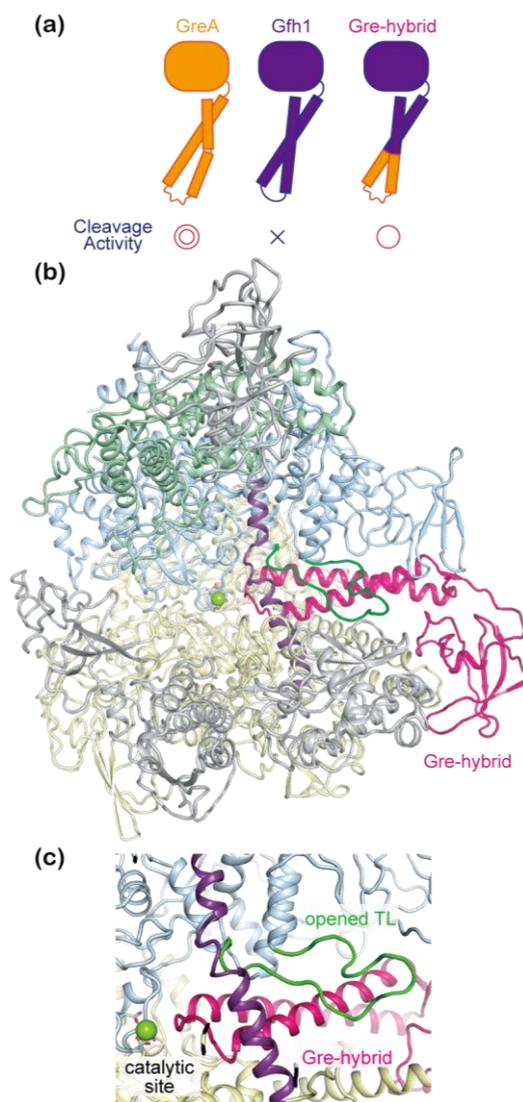
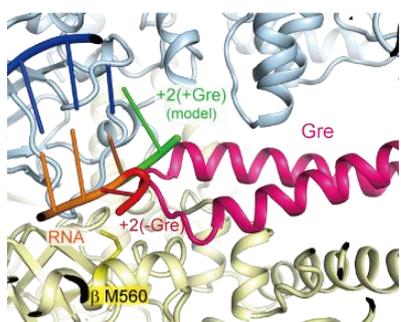


図 4 (a) Gre-hybrid のドメイン構成
(b) BC-Gre-hybrid の全体構造
(c) 活性部位付近の拡大図

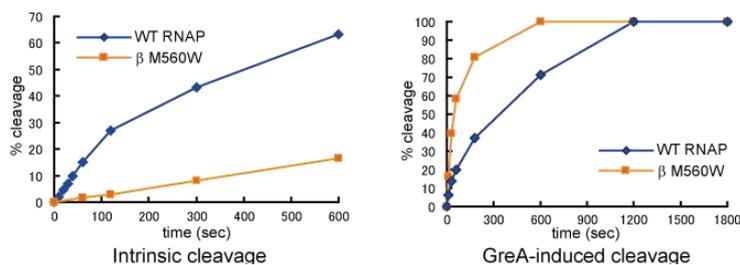
・ イントリンジックな切断と GreA factor 存在下での切断における RNA の経路の変化

BC・Gre-hybrid の構造では核酸構造部に相当する電子密度が観察できなかったが、後退状態の RNA の構造を重ね合わせると、Gre-hybrid の先端部分と RNA の 3' 端部分が衝突する (図 5)。このことから、後退状態の RNAP に GreA が結合すると RNA の 3' 端部分の構造が変化することが推測された。後退状態の複合体では、RNA の 3' 端の残基は RNAP の β サブユニットの Met560 残基の近くにある。この残基をトリプトファンに置換した RNAP 変異体では、イントリンジックな RNA 切断が大幅に阻害されたが、GreA 存在下での RNA 切断は阻害されなかった (図 6)。このことから、RNA の 3' 端はイントリンジックな切断の

際には Met β 560 残基の近くに位置しているが、GreA が結合した状態での切断の際には別のコンフォメーションをとっていることが示唆された。



← 図 5 Gre factor の結合による RNA のコンフォメーション変化



↑ 図 6 RNAP β -M560W 変異体における RNA 切断活性の変化

・考察

基質結合状態の複合体 (PDB 2O5J) と今回決定された後退状態の複合体および BC・Gre hybrid 複合体におけるトリガーループの構造比較を図 7 に示す。基質結合状態の閉じたトリガーループは、隣接するブリッジヘリックスとほぼ平行な 2 本の α ヘリックスを形成している。転写伸長中は基質が次々と取り込まれるため、トリガーループは頻りに閉じた状態となり、ブリッジヘリックスを伸びた状態に保つ役割を果たしていると考えられる。後退状態では、トリガーループが半開き状態となる。このとき、2 次チャネルはやや広がっているが、Gre factor の結合には不十分である。一方で、トリガーループが閉じた状態にならないため、ブリッジヘリックスが曲がりやすくなり、ラチェット状態への移行が容易になっている可能性がある。Gre factor を結合した RNAP はラチェット状態にあり、ブリッジヘリックスが折れ曲がっている。このとき 2 次チャネルは Gre factor のコイルドコイルドメインに占められ、トリガーループは完全に開いた構造に固定される。

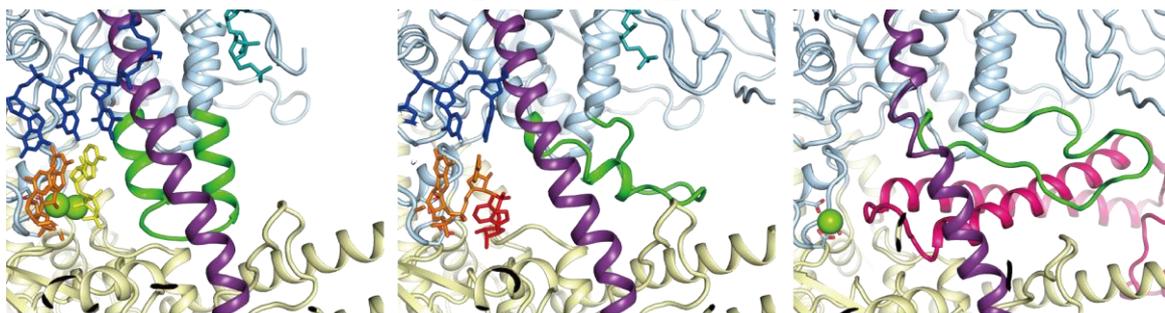


図 7 基質結合状態、後退状態、BC・Gre hybrid 複合体におけるトリガーループの構造比較

本研究では、細菌型 RNAP の後退状態の複合体、Gre factor を結合した後退状態の複合体を再構成し、それぞれの X 線結晶構造を決定した。これらの構造と生化学的解析から、後退状態および Gre factor を結合した後退状態の複合体ではトリガーループがそれぞれ半開きの状態と開いた状態に固定されること、またイントリンジックな RNA 切断と Gre factor 存在下における RNA 切断では、RNAP の全体構造と切断を受ける RNA の経路が異なることが明らかになった。