

2002年6月10日
独立行政法人 理化学研究所

遺伝子の転写を開始するメカニズムを世界で初めて解明

- 原子レベル (2.6Å) での X 線結晶構造解析によって明らかに -

理化学研究所（小林俊一理事長）は、遺伝子の転写開始にかかわるタンパク質の立体構造を原子レベルで決定し、そのメカニズムを解明することに世界で初めて成功しました。理研播磨研究所細胞情報伝達研究室の横山茂之主任研究員、Dmitry G. Vassylyev 副主任研究員、関根俊一研究員らの研究グループによる成果です。

DNA 上の遺伝情報（塩基配列）を RNA に転写するプロセスは、遺伝子発現の根幹をなすものであり、この転写をつかさどる酵素が「RNA ポリメラーゼ」です。原核生物の場合、RNA ポリメラーゼの中心となる酵素に転写開始因子 (σ [シグマ]因子) が結合することによって転写が開始されます。研究グループでは、 σ 因子が結合した RNA ポリメラーゼの結晶構造を、大型放射光施設 SPring-8 の理研構造生物学ビームラインなどを用いて 2.6 Å（オングストローム*1）の分解能で決定することに成功。解析の結果、RNA ポリメラーゼ全体が“カニのはさみ”のような構造をとっており、 σ 因子が DNA のある特異的な部位（プロモーター*2）を認識し結合するのに都合の良い仕組みになっていることが明らかになりました。また、DNA 結合部位の溝が、1 本鎖 DNA のみ結合できるような構造になっていることなども分かりました。

転写を開始するメカニズムが解明されたことは、遺伝子発現制御の分子機構を解明する上で重要な知見を与えるだけでなく、抗生物質や活性制御物質が転写部分で作用する機構を明らかにし、効果の高い新薬の開発も可能になると期待されます。

本研究成果の詳細は、英国の科学雑誌『nature』6月13日号に掲載されます。

1. 背景

DNA に塩基配列として刻まれた遺伝情報は、タンパク質のアミノ酸配列に変換されることによって初めておのおのの機能を発揮することができます。このタンパク質を合成するために細胞は、DNA を鋳型（いがた）にして同じ塩基配列を持った RNA を合成し、RNA の情報をもとにタンパク質を作ります。この DNA、RNA、タンパク質という情報の流れはすべての生物において共通の遺伝メカニズムであり、生命活動の根幹をなすものです。

RNA を合成するステップは「転写」と呼ばれ、遺伝子が働き出すための最初の段階として重要です。転写をつかさどる酵素「RNA ポリメラーゼ」は、中心となる「コア酵素」と、転写の各ステップによって異なるさまざまな転写因子とによって構成される巨大な複合体酵素です。その構造と機能は、バクテリアなどの原核生物から、ヒトを含めた高等真核生物にいたるまで普遍的に保存されています。近年、バクテリア（原核生物）や酵母（真核生物）由来の RNA ポリメラーゼの結晶構造が報告され、転写メカニズムの構造レベルでの解明の可能性が示されました。しかしながら、いずれも中程度の分解能で解かれたものであり、かつ転写開始に不可欠な転写開始因子を含んでいないコア酵素のみの解析であったため、転写開始の詳細

なメカニズムについては、ほとんど明らかになっていませんでした。

2. 研究の手法

原核生物の RNA ポリメラーゼのコア酵素は、 $\alpha_2\beta\beta'\omega$ の 5 つのサブユニットからなるタンパク質の複合体です。これが転写開始因子である「 σ 因子」と結合し、「ホロ酵素 ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$)」となることによってはじめて、遺伝子のプロモーター配列を認識して結合し、転写を開始します。今回、研究グループでは、RNA ポリメラーゼの機能的構造を原子分解能レベルで解明するために、原核生物である高度好熱菌^{*3} の RNA ポリメラーゼホロ酵素の立体構造解析に取り組みました。

X 線によって立体構造を決定するためには、ホロ酵素 (タンパク質) の結晶を作成しなければなりません。そこで高度好熱菌からホロ酵素のみを取り出して精製し、優れた結晶を再現性よく得ることに成功しました。構造決定にあたっては、大型放射光施設 SPring-8 の理研構造生物学ビームライン・(BL45XU) などを用い、結晶の X 線回折データを収集しました。BL45XU には最近、タンパク質の立体構造を解くための多波長異常分散 (MAD) 法に最適化しているばかりでなく、最近開発された受像面積の大きい検出器 (40cm×40cm) を装備しているため、RNA ポリメラーゼの結晶のように格子長の大きい結晶の回折データ収集に適しています。

3. 立体構造の解析結果から明らかになったこと

SPring-8 の高輝度なシンクロトロン放射光を用いて、2.6Å という高分解能の X 線回折データを得ることができました。精密に決定された σ 因子を含む RNA ポリメラーゼの立体構造は、全体として「カニのはさみ」のような構造をとっていることが分かりました。さらに、得られた立体構造の解析結果から、ホロ酵素が DNA のプロモーター配列に結合して転写を開始する以下のような一連のメカニズムが明らかになりました。

- 1) 遺伝子のプロモーター配列を認識・結合する σ 因子の 2 つのドメインは、プロモーター配列 2 ヶ所を認識して結合するのに都合が良いように酵素の表面に配置されていることが分かりました。 σ 因子には両末端にある「N 末端側ドメイン」と「C 末端側ドメイン」、およびそれらを結ぶ「リンカードメイン」から構成されています。N 末端側ドメインと C 末端側ドメインはそれぞれ、DNA のプロモーター配列 2 ヶ所を認識します。決定された構造結果においても、RNA ポリメラーゼの表面に存在する両ドメインの間隔がプロモーター配列の間隔とほぼ一致していました。
- 2) DNA に結合して転写を開始する際、RNA ポリメラーゼは DNA の一本鎖だけに結合することが分かりました。今まで、転写が開始する時には、RNA ポリメラーゼが結合している DNA の一定領域 (転写開始点から、12 塩基上流までの間) で DNA の二重鎖が解離して一本鎖になる「転写バブル」と呼ばれる構造を形成すると考えられてきました。今回解析した RNA ポリメラーゼホロ酵素は σ 因子を結合しているため、DNA 結合部位の溝が二重鎖 DNA を結合するには狭く、解離した一本鎖 DNA のみを結合できる構造になっており、従来の説を裏付ける結果となりました。
- 3) σ 因子のリンカードメインは、合成された RNA と鋳型 DNA の二重鎖を不安定化

させ、RNAの鎖を排出溝に向かわせる役割を果たしていると推測されます。明らかになった立体構造から、鋳型DNAと合成されたRNAの二重鎖は、 σ 因子のリンカードメインとコア酵素の間にある狭いチャンネルを通ると考えられます。そして、この狭いチャンネル内における σ 因子のリンカードメインとRNAとの相互作用によって、RNAとDNAの二重鎖は不安定化され、RNAは一本鎖となって排出溝に向かうものと考えられます。

- 4) さらに、合成されるRNA鎖は σ 因子の解離を促すことが推測されました。 σ 因子は遺伝子の転写を開始させる役割がありますが、RNAポリメラーゼがDNAに沿って進みながらRNAを合成する「伸長ステップ」に移行するには σ 因子を解離する必要があります。興味深いのは、 σ 因子のC末端側ドメインがRNAの排出溝の出口をふさいでいるという点です。合成されていくRNA鎖の末端が排出溝の出口に到達すると、RNA鎖に押されて σ 因子はRNAポリメラーゼからもプロモーターからも解離を余儀なくされ、転写は伸長ステップへと移行するものと考えられます。

4. 今後の展開

転写のプロセスは、遺伝子が発現して機能するための最初のステップとなるものです。従って、転写因子(σ 因子)を結合したRNAポリメラーゼ、つまり転写に不可欠な最小単位の構造を原子レベルで解明したことは、今までヴェールに包まれていた転写開始のメカニズムを本当の意味で理解する道を開いたものといえます。今後研究グループでは、さらに、転写終結因子など種類の異なる転写因子や、DNA、RNAを結合したRNAポリメラーゼの立体構造解析を行い、転写のメカニズムの全ぼうを明らかにしていく予定です。

また、RNAポリメラーゼはすべての生物の生命活動に必須なタンパク質であるため、抗生物質のターゲットになります。本研究で明らかになった立体構造から得られる知見を生かして、真核生物と原核生物のRNAポリメラーゼ構造の微妙な差異に着目し、病原性細菌を含む原核生物のポリメラーゼにだけ特異的に結合する化合物を作ることによって抗生物質として利用できる可能性があります。このような新たな抗生物質や活性制御物質の創製といった医療への応用を目指した研究も飛躍的に進展するものと期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 播磨研究所

細胞情報伝達研究室 主任研究員 横山 茂之

Tel : 0791-58-2838 / Fax : 0791-58-2835

Tel : 045-507-2515 / Fax : 045-507-2509 (横浜研究所)

副主任研究員 Dmitry G. Vassilyev

Tel : 0791-58-2838 / Fax : 0791-58-2835

播磨研究所 研究推進部 西村 勇人

Tel : 0791-58-0900 / Fax : 0791-58-0800

(報道担当)

<補足説明>

※1 Å (オングストローム)

長さの単位。1 オングストロームは 1×10^{-10} メートル (= 0.1 ナノメートル)。

※2 プロモーター

遺伝子の上流に存在する特別な DNA 塩基配列。転写開始因子が結合すると RNA 合成の開始を指令する。原核生物では、合成開始点 (+1) から、35 残基 (-35) と 10 残基 (-10) 上流にあるプロモーター領域 2 ヶ所に、RNA ポリメラーゼの σ 因子の 2 つのドメインが認識・結合する。

※3 高度好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB8)

大島泰郎博士によって日本の温泉から単離された細菌の一種。80°C の高温でも生育するため、高度好熱菌を構成するタンパク質は非常に熱安定である。高度好熱菌由来の熱安定な酵素は、PCR 法や DNA 塩基配列決定などに利用され、分子生物学の発展に大きく寄与した。また、高度好熱菌由来のタンパク質はその熱安定性のため結晶化しやすく、結晶化のターゲットとして利用されることも多い。

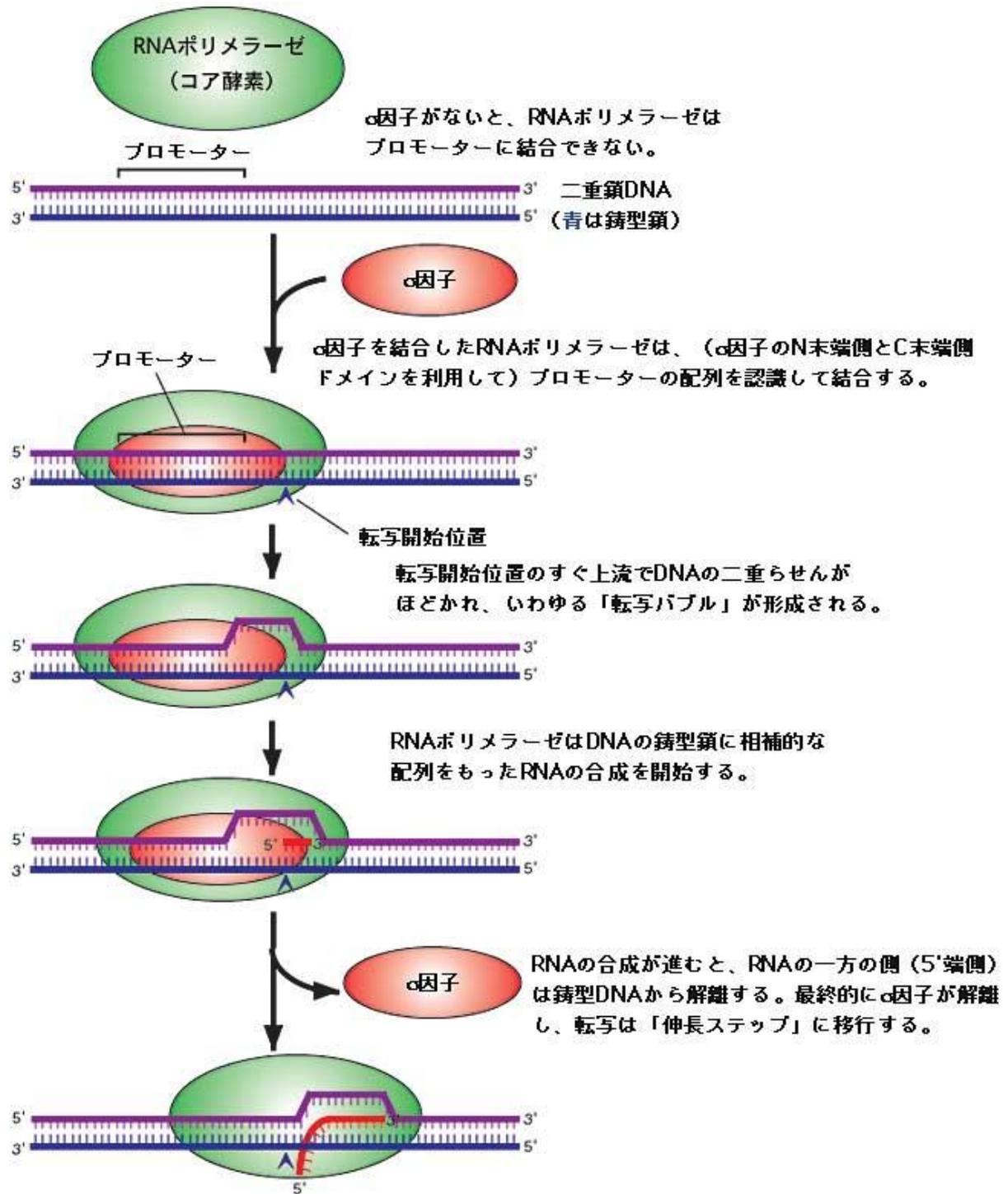


図1 RNAポリメラーゼによる転写の開始

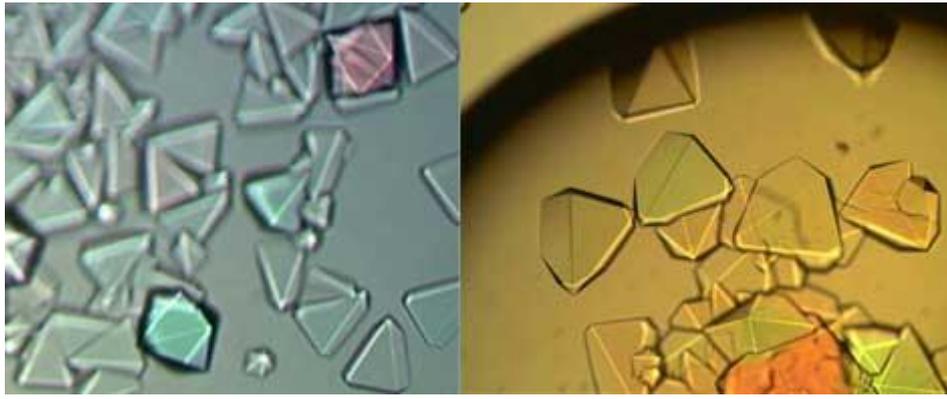


図2 RNAポリメラーゼホロ酵素の結晶

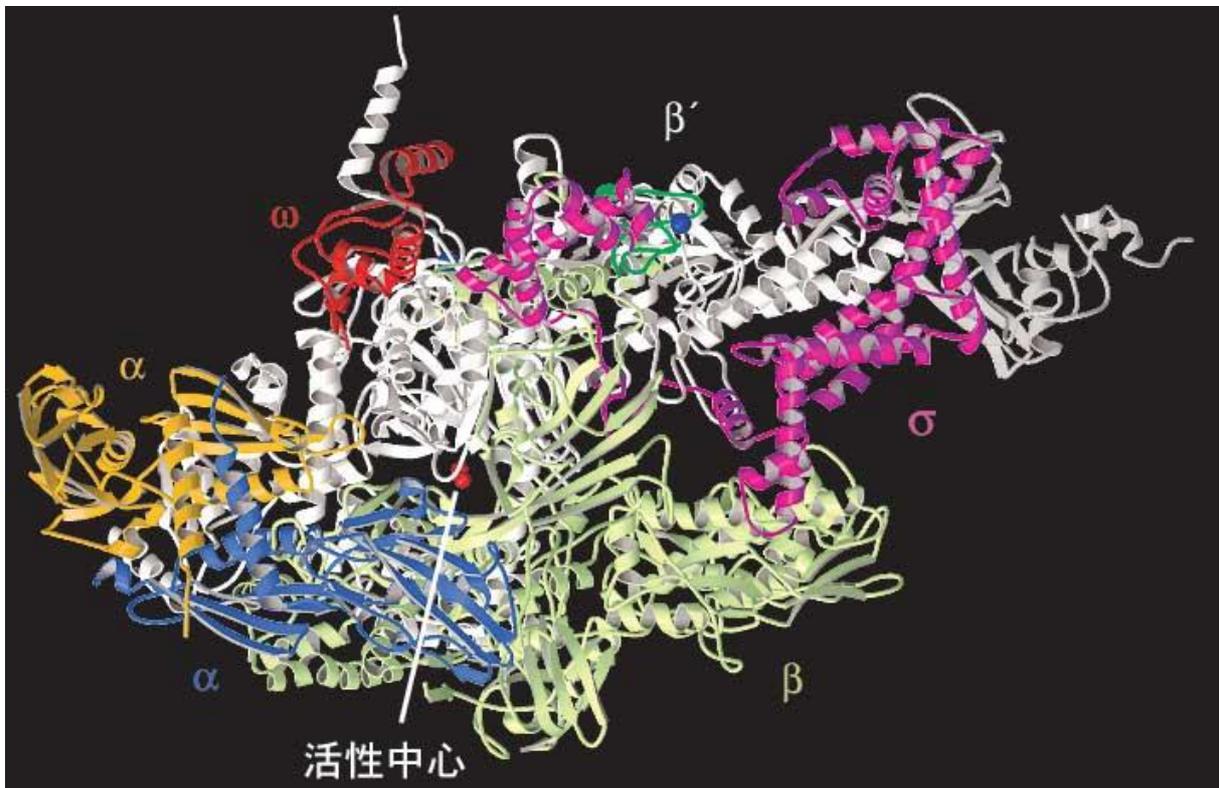


図3 RNAポリメラーゼ結晶構造の模式図

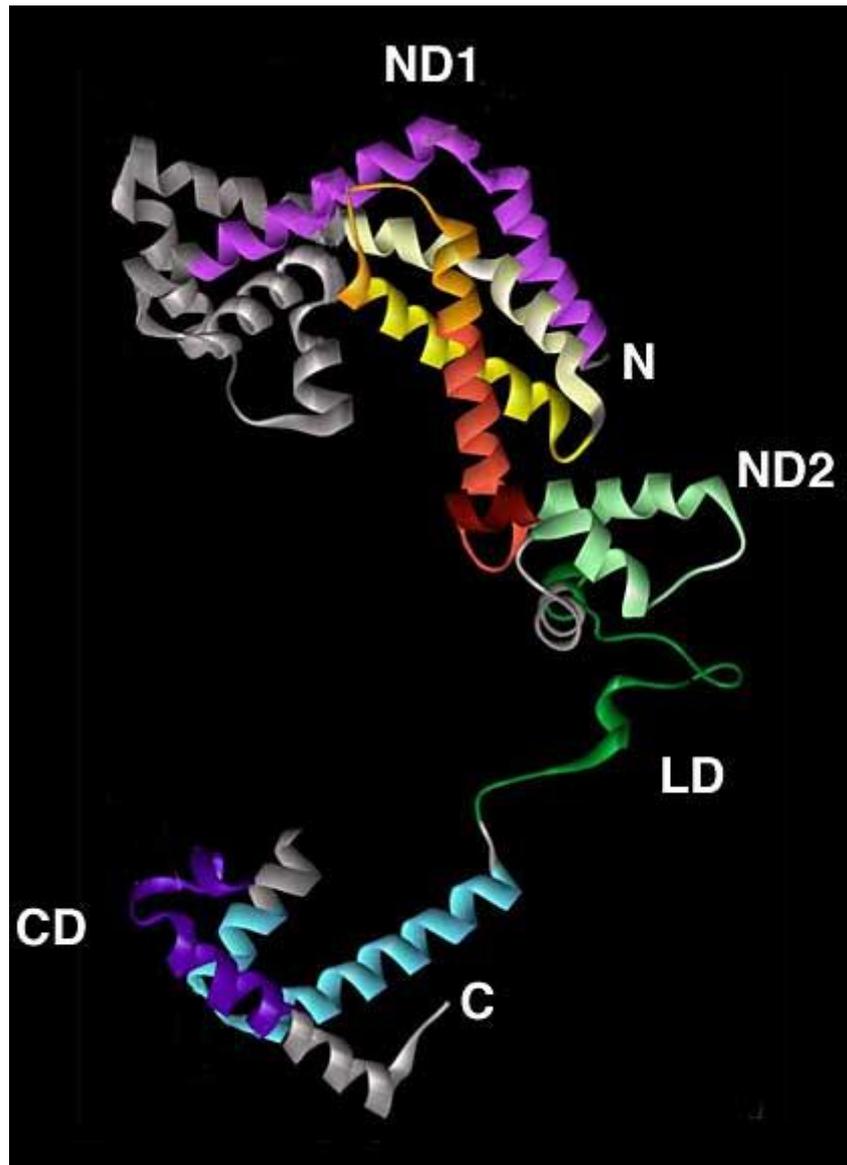


図4 σ 因子の立体構造

ND1,ND2 : N 末端側ドメイン LD : リンカードメイン CD : C 末端側ドメイン