



古細菌の転写装置

はじめに

すべての生命は、遺伝子発現のプロセスにおいて、遺伝情報をDNAからRNAに写し取るのに普遍的で巨大な転写装置であるRNAポリメラーゼ (RNAP) を用いている。RNAPはマルチサブユニットタンパク質複合体で構成されており、そのサブユニット組成は生命ドメイン(真正細菌、古細菌、真核生物)によって異なるが、古細菌RNAPと真核生物RNAポリメラーゼII (Pol II) のサブユニット組成は類似しているだけでなく、そのアミノ酸配列も相同性をもっている。古細菌のRNAPは、二つの基本転写因子と共に、真核生物のPolIIIに類似性のある転写開始前複合体 (transcription pre-initiation complex) をプロモーター上に形成する(図1)。そして、開始、伸長、終結の順に多段階的に転写が進む。これらのことは、三つの生命ドメインの進化系統樹に示されているように¹⁾、古細菌と真核生物が、同じ共通祖先から分子進化してきたことと一致している。

本稿では、古細菌の転写機構を真核生物と比較しながら概説し、筆者らが決定した古細菌RNAPのX線結晶構造を紹介する²⁾。また、最近行った古細菌RNAPのサブユニットの欠損株について簡略に記述する³⁾。

1. 古細菌の転写機構

古細菌は1種類のRNAPのみで転写を行っており、古細菌のRNAPは構造・機能的に真核生物のPolIIIと非常によく似ていることが知られている^{4,5)}。生体外において、古細菌のRNAPはTBP (TATA box binding protein) およびTFB (transcription factor B) の二つの基本転写因子のみで転写開始前複合体を形成する(図1)⁶⁾。まずTBPがプロ

モーター上のTATAボックスに結合し、次にTFBのN末端側のドメインがBRE (TFIIB recognition element) とTBPに結合する。TFBのC末端側にあるB-フィンガードメインが古細菌RNAPの内部と直接結合し、RNAPをプロモーター領域にリクルートして、転写開始前複合体が形成される。これに対して真核生物PolIIIは、多種類の基本転写因子群 (TFIIA, TFIIB, TFIID (TBPを含む), TFIIE, TFIIF, TFIIH) によって数メガダルトン以上もの巨大な転写開始前複合体をプロモーター上に形成し⁷⁾、さらに生体内においてはクロマチンの再構成や転写の制御を行うのに重要なメディエーター複合体を伴っている⁸⁾。古細菌のRNAP, TBPおよびTFBは真核生物のPolIII, TBPおよびTFIIBと相同性があり、古細菌の転写開始前複合体は、真核生物の転写開始前複合体をシンプルにしたものと捉えることができる。

すべての古細菌のゲノムは、真核生物のTFIIEの α サブユニットおよびTFIISに相同性があるTFE (transcription factor E) およびTFS (transcription factor S) の遺伝子をコードしている。TFEは、生体外において、いくつかのプロモーターと準最適条件下で転写開始を促進することが知られており、最近になってプロモーターDNAのメルティングと初期の転写伸長にも関わっていることが報告されている⁹⁾。TFSは、TFIISの校正機能と同様に、転写伸長が途中で止まったRNAPの転写伸長を再開するために、転写途中産物の切除を促進している¹⁰⁾。このように、転写伸長因子に関しても、古細菌と真核生物は類似性を示している。一方で、古細菌は、真核生物と異なり、真正細菌に類似した転写活性・抑制因子から成る転写制御機構を採用している¹¹⁾。一見、真核生物に構造と転写反応の振舞いが似ているにもかかわらず、真正細菌の転写制御機構に類似した一面も擁していることが古細菌の特徴である。

2. 古細菌由来RNAPのX線結晶構造

転写装置であるRNAポリメラーゼの構造生物学的研究は、以前から活発に行われており、真正細菌では好熱菌由来RNAP、真核生物では出芽酵母由来PolIIIの高分解能のX線結晶構造が発表されている^{12,13)}。しかし、最後の生命ドメインである古細菌由来RNAPの立体構造の全貌は、依然として明らかにされていなかった。最近、筆者らは、古細菌である*Sulfolobus solfataricus* (Sso) 由来RNAPのX線結晶構造を決定することに成功した²⁾。Sso RNAPの全体構造は、11個のサブユニットで構成されており、9個のサブユニット (A'A''BDLPNKH) のコア部分とそのコア

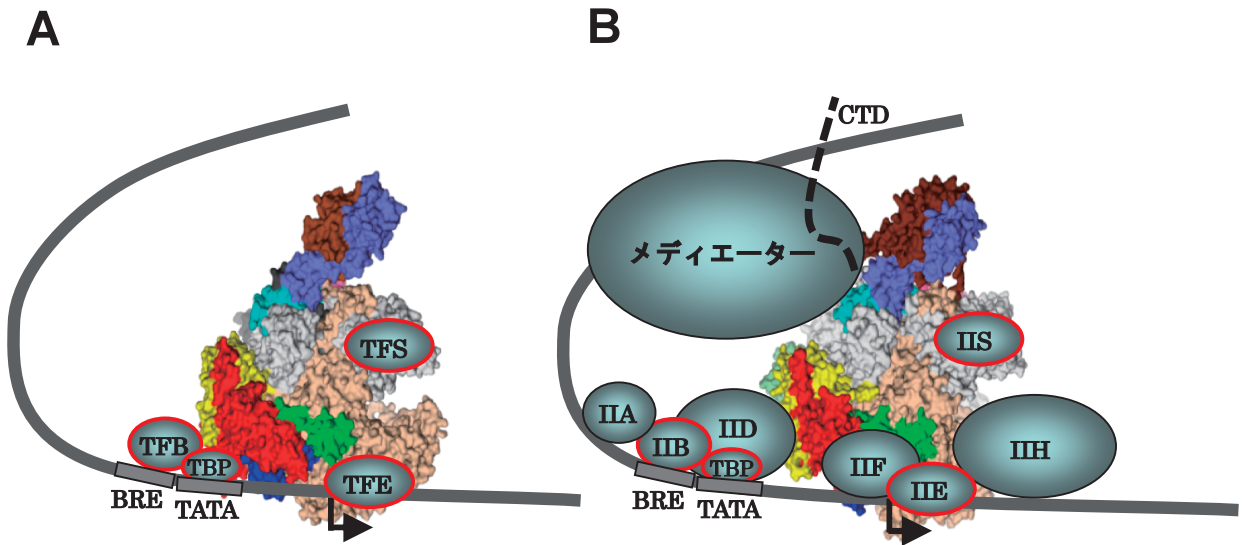


図1 プロモーター DNA 上における転写開始前複合体 (transcription pre-initiation complex) のモデル (A) 古細菌 RNAP, (B) 真核生物 PolIII. 両酵素の個々のサブユニットの色は、図2で色分けしたサブユニットの組成と一致している。(矢印) 転写開始点。(赤色) で囲った転写因子は、古細菌および真核生物で保存されていることを示している。

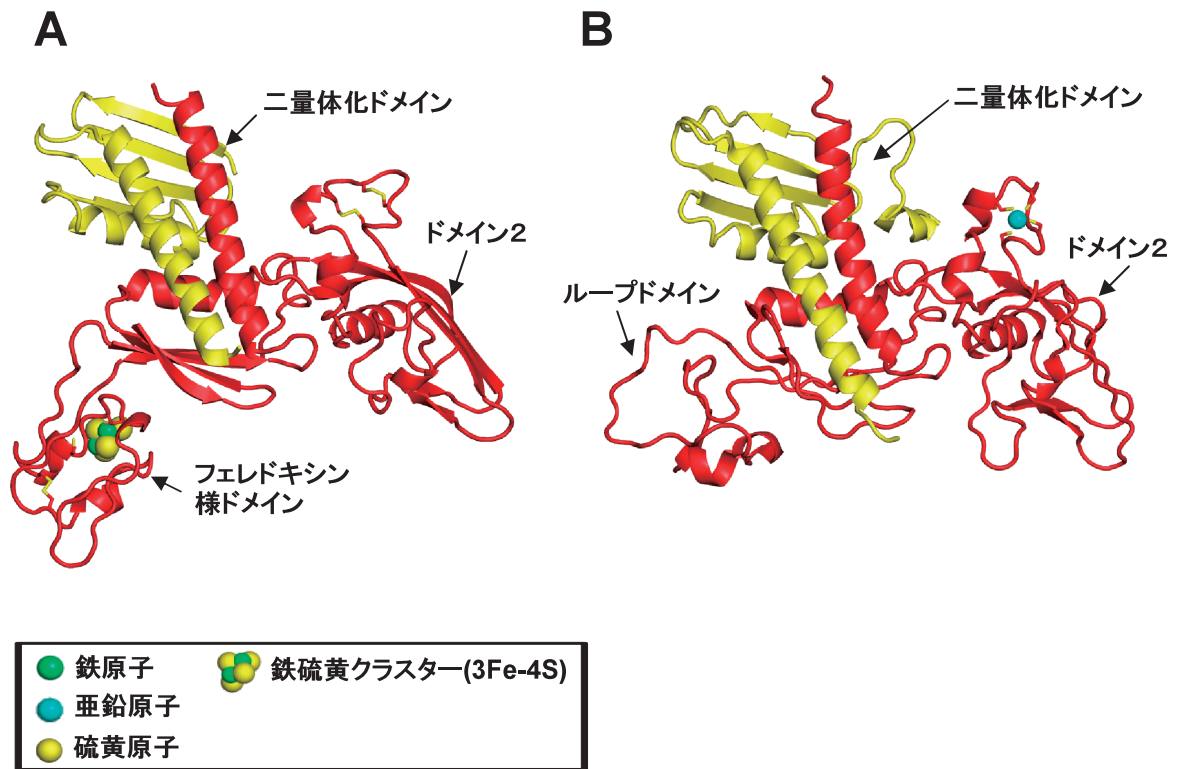
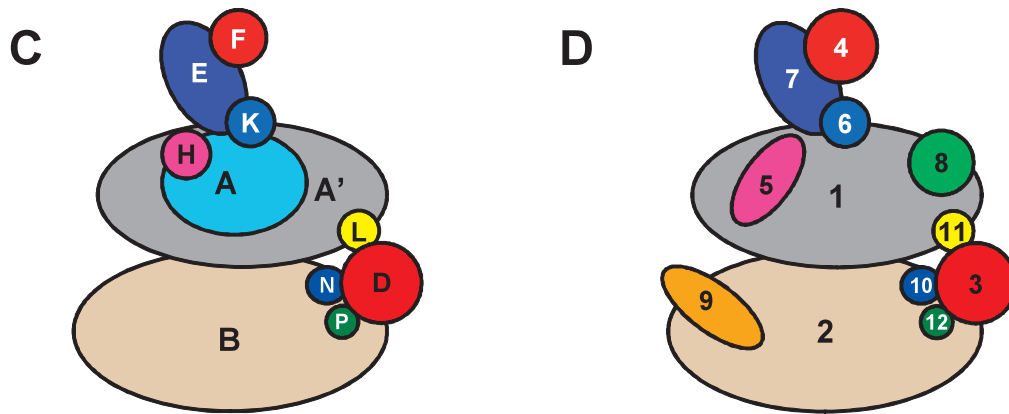
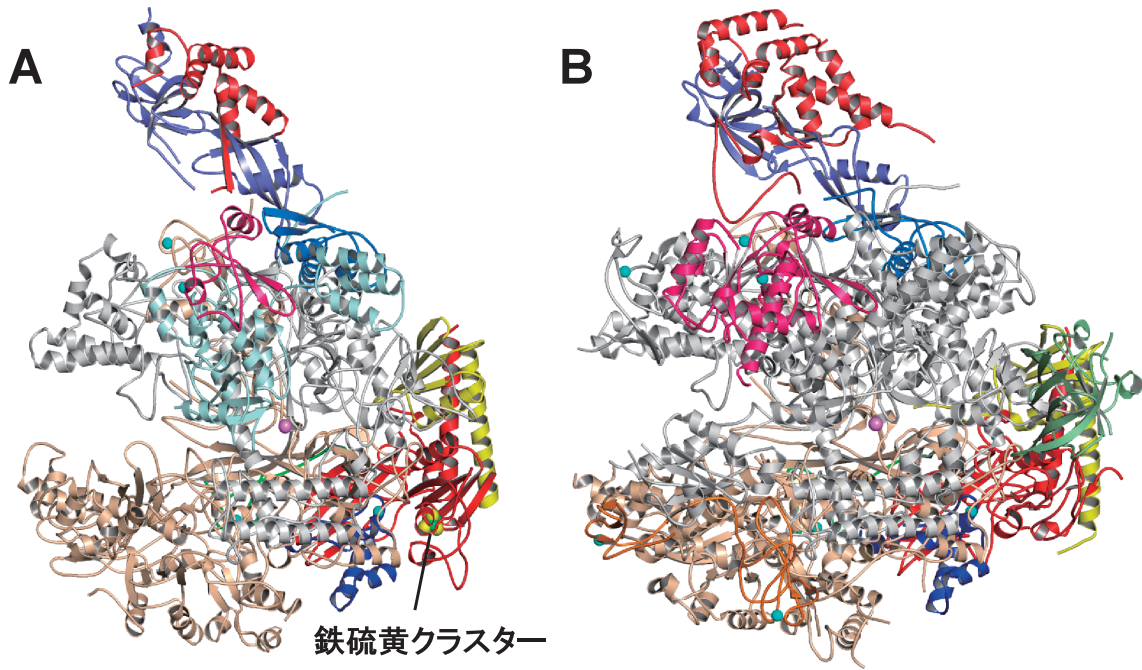


図3 (A) D/L ヘテロ二量体の X 線結晶構造, (B) RPB3/11 ヘテロ二量体の X 線結晶構造.



● マグネシウム原子	● 鉄原子
● 亜鉛原子	● 鉄硫黄クラスター(3Fe-4S)
● 硫黄原子	

図2 (A) *Sulfolobus solfataricus* (Sso) RNAP の X 線結晶構造, (B) *Saccharomyces cerevisiae* (Sce) PolIII の X 線結晶構造, (C) Sso RNAP のサブユニット組成の模式図, (D) Sce PolIII のサブユニット組成の模式図.

部分から突き出た2個のサブユニット(EF)の部分で構築されている。*Sso* RNAPは、DNAを内部に取り込むという特徴をもつための三つの大きいサブユニットA'A''(クランプ構造)およびB(ローベ構造)から成る蟹の爪のような構造を有している。この特徴的な構造は、マルチサブユニットタイプのRNAPに典型的で、真正細菌RNAPおよび真核生物PolIIIにも保存されている。*Sso* RNAPの全体構造は、12個のRPB(RNA polymerase B)サブユニットで構成された出芽酵母のPolIIIと非常に似ている(図2)。出芽酵母のPolIIIでは大きいサブユニットであるRPB1とRPB2がクランプとローベ構造を形成している。両酵素は、蟹の爪の内部に活性部位があり、触媒残基など転写活性に重要な部分も保存されている。これらのことは、両酵素が同じ共通祖先から分子進化してきたことを示唆している。しかし、*Sso* RNAPには出芽酵母PolIIIの二つのサブユニット(RPB8, RPB9)が存在せず、また、転写活性を制御するのに重要なCTD(carboxy terminal domain)およびRPB1とRPB5のJawドメインを有していない。さらに、*Sso* RNAPでは、出芽酵母PolIIIのRPB1に相当するサブユニットが、二つのサブユニット(A'A'')に分断されている。そのため、*Sso* RNAPは、出芽酵母PolIIIに比べて、コンパクトな構造でできている。このことは、古細菌と真核生物で類似した他のタンパク質でも、一般的によく知られていることである。

一方驚くべきことに、*Sso* RNAPは、Dサブユニットのフェレドキシン様ドメインに鉄硫黄クラスター(3Fe-4S)を保持し、一つのジスルフィド結合を形成していた(図3)。DサブユニットはLサブユニットと非常に安定なヘテロ二量体を形成し、そのヘテロ二量体は三つのドメイン(ドメイン2、二量体化ドメイン、フェレドキシン様ドメイン)で構成されている。D/Lヘテロ二量体は、真核生物のRPB3/11のヘテロ二量体および真正細菌の $\alpha_1\alpha_2$ のホモ二量体と同様にRNAPを集積し、とりわけ、大きいサブユニット(A'A''B)を集積するための受け皿のような役割を担っている。図3に示すように、D/Lヘテロ二量体およびRPB3/11の全体構造は、ヘテロ二量体を形成するための二量体化ドメインおよびドメイン2が両者で類似している。しかしながら、Dサブユニットのフェレドキシン様ドメインとRPB3サブユニットのループドメインは、まったく異なっている。RPB3サブユニットのドメイン2において、四つのシステイン残基でキレートされた亜鉛原子はDサブユニットに存在せず、それに相当するシステイン残基が二つのジスルフィド結合を形成している。鉄硫

黄クラスターの三つの鉄原子は一部の古細菌に保存された三つのシステイン残基と結合し、その鉄硫黄クラスターの立体配置がフェレドキシンタンパク質の鉄硫黄クラスターとほぼ同じであった。このことから、おそらくフェレドキシンが進化上、ドメインシャッフリングによってドメイン2と二量体化ドメインに挿入されたのかもしれない。フェレドキシン様ドメインにおいて、もう一つのフリーなシステイン残基が、4Fe-4S型の鉄硫黄クラスターを形成するためにFe原子の近傍に立体配置されており、生体内では3Fe-4S型ではなく、4Fe-4S型の鉄硫黄クラスターを形成していることが推定される。一部の真核生物のRPB3にも四つのシステイン残基が保存されており、筆者らは高等植物であるシロイヌナズナのAC40(RNAポリメラーゼIおよびIIIのDサブユニットに相同性があるサブユニット)にも、一つの鉄硫黄クラスターがあることを見出している。

鉄硫黄クラスターは、RNAPの活性部位から45Åほど離れているため、転写活性には影響していないことが考えられる。そこで、鉄硫黄クラスターの機能を調べるために、クラスターの鉄原子をキレートしているシステイン残基の変異体解析を行った。その結果、変異体のDサブユニットは鉄硫黄クラスターを保持せず、またLサブユニットとヘテロ二量体を形成することができなかった。このことから、鉄硫黄クラスターはDサブユニットの構造安定化に寄与しており、したがって、鉄硫黄クラスターはRNAPを集積するための構造的役割を担っている可能性が示唆される。

3. 古細菌由来RNAPのサブユニットの遺伝子破壊

古細菌のE/Fヘテロ二量体は、真核生物のRPB7/4ヘテロ二量体によく似ており、DNAを取り込むためにクランプ構造を閉じた状態にしていることが明らかにされている。出芽酵母において、RPB7は、生育に必須遺伝子で、一方、RPB4遺伝子の欠損株($\Delta RPB4$)は温度感受性を示し、生育条件の違いにより、RPB4が全体的あるいは局所的な遺伝子の転写レベルを制御している^{14,15}。しかしながら、古細菌では、EおよびFサブユニットの生体内の機能について明らかにされていなかった。そこで、最近、筆者らは遺伝子破壊法が確立された古細菌である*Thermococcus kodakarensis*を用いて¹⁶、Fサブユニット遺伝子の破壊を行った³。その結果、Fサブユニット欠損株(ΔF)は、 $\Delta RPB4$ と同様に温度感受性を示した。共同で確立した遺伝子相補法などを用いて ΔF を解析したところ、 ΔF が温度感受性を示したのは、生育の最適温度条件下で誘導

されるシャペロンタンパク質 (CpkB) の発現量が減少したことに起因していることが示唆された。Eサブユニット遺伝子は、様々な方法で破壊を試みたが、欠損させることができなかった。

おわりに

古細菌由来 RNAP は、大腸菌発現系を利用して発現・精製したそれぞれのサブユニットを組み合わせることで、生体外において再構成され得る。しかし、真核生物の PolIII はそのように再構成することができない。すなわち、古細菌では、古細菌由来 RNAP の構造情報を基に、変異体構築による RNAP の機能解析が可能である。したがって、古細菌の RNAP は、そのような変異体解析を真核生物で行うのに優れた代替モデルといっても過言ではない。古細菌は、真核生物の TFIIF に相同性がある遺伝子をゲノムにコードせず、上述したように TBP および TFB のみでプロモーター依存型の転写を開始する。おそらく、古細菌の RNAP は自らがヘリカーゼ様の活性をもち、DNA の二重鎖をほどくことで転写を開始していることが考えられる。近い将来、DNA がほどかれた状態の転写開始複合体 (transcription initiation complex) の X 線結晶構造解析が古細菌の RNAP を用いて行われれば、我々ヒトを含む真核生物の転写研究の発展に多大に貢献するだろうと期待される。

謝辞

今回、紹介した筆者の研究成果は、米国ペンシルバニア州立大学の村上勝彦博士の研究室で得られたものであり、助言・指導して下さった村上博士に感謝致します。また、Fサブユニットの遺伝子欠損株の作成にご助力を頂いた京都大学の旧今中研究室の金井保博士に感謝いたします。

- 1) Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579.
- 2) Hirata, A., Klein, B.J., & Murakami, K.S. (2008) *Nature*, **451**, 851–854.
- 3) Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T.J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J.N., Imanaka, T., & Murakami, K.S. (2008) *Mol. Microbiol.*, **70**, 623–633.
- 4) Werner, F. (2007) *Mol. Microbiol.*, **65**, 1395–1404.
- 5) Kwapisz, M., Beckouet, F., & Thuriaux, P. (2008) *Trends Genet.*, **24**, 211–215.
- 6) Bell, S.D. & Jackson, S.P. (1998) *Trends Microbiol.*, **6**, 222–228.
- 7) Orphanides, G., Lagrange, T., & Reinberg, D. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2657–2683.

- 8) Takagi, Y. & Kornberg, R.D. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 80–89.
- 9) Grunberg, S., Bartlett, M.S., Naji, S., & Thomm, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 35482–35490.
- 10) Lange, U. & Hausner, W. (2004) *Mol. Microbiol.*, **52**, 1133–1143.
- 11) Geiduschek, E.P. & Ouhammouch, M. (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**, 1397–1407.
- 12) Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., & Darst, S.A. (1999) *Cell*, **98**, 811–824.
- 13) Cramer, P., Bushnell, D.A., & Kornberg, R.D. (2001) *Science*, **292**, 1863–1876.
- 14) Miyao, T., Barnett, J.D., & Woychik, N.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46408–46413.
- 15) Pillai, B., Verma, J., Abraham, A., Francis, P., Kumar, Y., Tatu, U., Brahmachari, S.K., & Sadhale, P.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3339–3346.
- 16) Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 210–220.

平田 章

(愛媛大学大学院理工学研究科物質生命工学専攻)

Archaeal transcriptional machinery

Akira Hirata (Department of Material Science and Biotechnology, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University, Bunkyo 3, Matsuyama 790–8577, Japan)

細胞運動関連遺伝子群のゲノムワイドスクリーニング法の開発

1. はじめに

細胞観察技術の向上によってライブセルイメージングは容易な手段となり、モニター上で細胞がいつも簡単に動き回るのを目のあたりにすると、誰もがそのダイナミックな運動に驚かされる。しかし細胞が運動し前進する過程は非常に複雑であり、運動中の細胞内で起きている様々な素過程がどのように制御・統括されているのかは未だよく分かっていない。現在一般的に受け入れられている細胞運動のプロセスは次のとおりである。i) 細胞の前後 (極性) の決定, ii) 前端部における仮足の形成・伸長と新たな接着斑の構築, iii) 後端部での接着斑の解除, iv) 後端部における細胞の収縮。このように細胞の運動には、時系列に沿ったこれらのステップが継続的に繰り返されることが必要である (図 1)。そして各ステップでは様々な素過程 (細胞膜のリン脂質代謝, 細胞骨格の再構成, 細胞内小胞輸