

研究終了報告書

「高速 AFM を用いた SMC 複合体の力学機構の解明」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 梅田 健一

1. 研究のねらい

遺伝情報を保持する DNA は、細胞核内において、トポロジカルドメインと呼ばれる高次構造を形成して染色体を形作るが、細胞分裂時や遺伝子複製時に、必要な遺伝子領域をオープンにする機構が必要となる。この働きの中核を担っているのがコヒーシンやコンデンシン、Smc5/6 に代表される染色体構造維持 (Structural Maintenance of Chromosomes, SMC) 複合体である。SMC は ATPase 活性をもつ環状のモータータンパク質であり、巨大なリング状の構造の内側を通すかたちで DNA とトポロジカルに結合し、クロマチン構造が絡まらないようにする働きや、細胞分裂において、2 本の DNA を繋ぎ止めて、姉妹染色分体間の接着を司る働きをもつ。これまで、SMC のこうした現象における分子論的な描像は手付かずの状態だったが、2018 年頃から一分子蛍光イメージングや光ピンセット、クライオ EM などにより徐々に明らかになりつつある。しかしながら、一分子蛍光イメージングではダイナミクスに関する情報は得られるが原子レベルでの構造に関する情報が得られず、クライオ EM では、その逆に構造に関する情報は得られるダイナミクスに関する情報が得られない。そのため、サブ分子スケールでどのような動きをするかについて、これまで研究がなされていない。本研究グループにより開発された高速原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) を用いれば、サブ分子スケールでのダイナミクスを 100 ms 程度の時間分解能で計測可能であり、これまで未解明だった分子機能に関して知見が得られることが期待される。SMC に関する AFM 研究は既に報告されているが、SMC は非常に壊れやすい性質をもっており、基板や探針相互作用により容易にその多量体構造が分解してしまうため、DNA にトポロジカル結合した生きた状態の SMC のダイナミクスを可視化した成功例が存在しない。そのため、これまでの研究で培ってきた脂質膜を使った技術を活かして、基板相互作用を限りなく小さくすることで生きた状態にある SMC にサブ分子スケールでのダイナミクスを可視化し、サブ分子レベルでの知見を得ることを狙いとして研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

SMC は、染色体の形成過程において重要な役目を担うが、その分子レベルの原理に関して不明な点が多い。そのため、高速 AFM を用いて、サブ分子レベルでの現象を可視化し、原理解明を行うことを目的として研究を行った。SMC にはいくつか種類が存在するが、その中でももっとも機能性が未解明な Smc5/6 を用いて研究を行うことにした。まず、AFM 観察で一般的に用いられるマイカ上において観察を行い、明瞭な分子像を得ることに成功した。近年、アポ状態である I 形の分子構造に関してはクライオ EM で報告されているが、O 形の構造はまだ明らかではない。そのため、クライオ EM により得られた I 形の分子構造の PDB データを開始構造として用いた粗視化分子動力学計算を行い、外力により分子構造変化を誘起することで O 形分子構造を人為的に生成した。また、高速 AFM データからデータ同化を行うことで、O 形分子構造を特定することに成功した。ただし、マイカ上の計測では、基板相互作用により徐々に分子が壊れてしまうため、DNA と結合した SMC ダイナミクスを観察することは困難であることが分かった。そのため、表面電荷密度および基板相互作用を調節することが可能な弱正帯電脂質膜上で観察を行うことにした。脂質膜の組成と観察用のバッファー条件、分子のローディング条件などを最適化することで、DNA に SMC が結合した状態であっても安定してサブ分子分解能イメージング可能な条件を見つけることに成功した。更に、ATPase 加水分解反応において表れるヘッド結合モードとヒンジ結合モードに関して、明瞭な分子構造を可視化することに成功した。また、分子の結合角度を解析することで、上記のシミュレーションで得られた構造データと対応づけることにも成功した。SMC が DNA をトポロジカル結合するメカニズムを明らかにするために、ワイルドタイプ(WT)と、加水分解を抑制した ATPase 変異体の実験結果を比較した実験を行い、DNA は Smc5/6 のヘッド側からアクセスし、ヘッドドメインに結合した後に、ATP 加水分解に応じて、ヒンジ側に移行することを明らかにした。これにより、これまで生化学実験によって蓄積してきた Smc5/6 の反応機構をサブ分子スケールで原理検証を行うことに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「Smc5/6 の分子構造の同定」

Saccharomyces cerevisiae Smc5/6 試料は遺伝学研究所の村山グループから提供いただき用いた。まず、標準的な分子保持基板であるマイカ上において Smc5/6 の観察を行った。その結果、明瞭な O リング構造が観察された。既に報告されているコヒーシンやコンデンシンの AFM 像と非常に似ているが、SUMO E3 Ligase である Nse2 が Smc5 のコイルドドメインに結合しており、分子が非対称構造をとることが分かった。他の SMC にはないこの特徴的なサブドメインにより、二本あるアームの種類を識別することが可能となることが明らかとなった。クライオ EM によって、アポ状態である I 構造に関してはクライオ EM により全体像が明らかになっているが、O 構造に関してはヘッドドメインしか明らかではない。次に示すように、AFM 実験データより得られた情報をもとに、free jointed chain model に基づいたシミュレーションを行った。二つのアームに外力を印加し、人工的に O 形構造(ATP 結合状態)を形成し、探針コンボリューションも考慮に入れて、疑似 AFM 像を生成したところ、AFM データに非常に酷似した分子像を得ることができた。この構造を見るとアームが開いた状態において、Nse2 はコイルドコイルの直上に存

在するため、AFM イメージにおいて輝点として観察されることが分かった。更に、ヒンジドメインにおいては、上に凸になった吸着配向構造をとるために、これが輝点として観察されることが分かった。AFM イメージにおいても見られたように、Nse1/3ドメインがヘッドドメインの上に存在することで、ヒンジと比べてヘッドドメインが大きく観察されることが分かった。

更に、他の SMC はコイルドコイルの中央にエルボーをもっており、B 形構造も安定して存在するが、Smc5/6 に関してもエルボーが存在するのかどうかは明らかではない。AFM 実験結果の解析の結果、4 カ所のコイルドコイル連結部位においてエルボーが存在し、探針相互作用により分子がダイナミクスした際に Smc5 と Smc6 で大きくダイナミクスが異なることが分かった。エルボーに相当する位置での曲率角度をプロットしたデータを比較したところ、Smc5 においては単一のピークが見られ、平均値 50° のシングルガウシアン分布によりフィッティングすることができた。一方で、Smc6 に関しては、 6° と 40° に二つのピークが見られた。Smc5 のエルボーはある一定の角度をもったまま大きく変化することがないのに対し、Smc6 のエルボーはフレキシブルに大きく変化可能であることが分かった。ただし、マイカ上のイメージング中に Nse2 が解離することがあり、その状態では Smc5 は鋭く屈曲することが可能であるため、過渡的に B-form をとることが可能であることが分かった。また、マイカ上のイメージングだと基板相互作用が強すぎるため、容易にヘッドやヒンジ部位が解離し分子が壊れてしまうため、intrinsic な構造変化を可視化できないことも分かった。

研究テーマ B「DNA に結合した Smc5/6 の機能動態解明」

脂質膜は anti-fouling 表面として分子の非特異吸着を抑えることができることが知られており、基板相互作用を抑えるために同様の計測を脂質二重膜上において行った。まず、Smc5/6 を DNA 上にトポロジカルロードした試料を脂質膜上に滴下して観察を試みた。長さ 1895 bp (~ 644 nm) の DNA を用いることで、DNA に結合した状態の分子を明瞭に可視化することができた。マイカ上の実験とは異なり、長時間安定して分子を壊さずにイメージングすることに成功した。それぞれの DNA に結合した分子の数の統計データの取得を行った。まず、ATP の有無を比較すると、ATP 無しでは、分子は DNA にロードされないことが分かった。多くのケースにおいて、一つの DNA に一つの分子が結合していたが、複数の分子が結合している例も見られた。マイカ上の実験において、分子は非常に凝集しやすい性質をもつが、二分子が同じ DNA 結合しているケースであっても、分子同士は相互作用し合い、引きつけ合うが、不可逆的に結合することなく、ダイナミクスする現象が見られた。分子同士は疎水性相互作用により引きつけ合うが DNA は拡散により広がろうとするため、分子が付いたり離れたりする様子を可視化することができた。

また、これに関連して、研究成果 1,2 で述べるように、高速 AFM の高速化に関する研究も同時並行で行っており、従来型と比べて理論的に帯域が二倍程度大きな振幅計測器の開発に成功し、本計測において用いている。

研究テーマ C「Smc5/6 の ATPase 加水分解反応機構の解明」

DNA ローダーの作用により、まず DNA は Smc5/6 のヘッドドメインに結合する。高速 AFM

を用いて明瞭なヘッド結合モードを可視化することに成功した。更に ATP 加水分解に伴い、DNA はヘッドからヒンジドメイン側へ移行し、ヒンジ結合モードを形成する。この結合モードに関しても明瞭な分子像を得ることに成功している。分子は DNA に沿って、非常に高速に拡散運動しているにも拘わらず、イメージング中にヘッドとヒンジ結合が入れ替わる頻度は非常に小さかった。このことから、ヘッドおよびヒンジ結合はそれぞれサブおよびメインコンパートメントに DNA が embrace された構造であることが示唆された。更に分子の結合モードの比較を行った。WT においては、ヘッド結合とヒンジ結合がおよそ 50% ずつ観察された。一方で、ATPase 活性を阻害した変異体を用いた実験では、ほとんどがヘッド結合モードであった。そのため、WT に関しては ATPase サイクルが進行するのに対し、変異体では ATPase 反応が阻害されるというスキームを裏付ける結果を得ることができた。

更に、分子の DNA への結合角に関しても調べてみたところ、ヘッド O は 104° に単一ピークをもつのに対し、ヒンジ O は 55° 、 90° 、 130° に広がる分布をもつことが分かった。このことは、DNA の曲率角と同様にサブよりもメインコンパートメントの方が、DNA の格納面積が大きいため、DNA の取り得る自由度が大きく様々な角度をとりうるからであると考えられる。先行研究より、DNA はクレイシンのリングを通る形でヘッドドメインに結合することが分かっている。クレイシンおよびヘッドドメインは Smc5 よりも Smc6 の方がヒンジ部位に近い位置に存在し、斜めに傾いた構造をとる。そのため、DNA がクレイシンおよびヘッドドメインにフィットするように配置すると、DNA もヘッドの非対称性を反映させる形で斜めになることが分かった。

3. 今後の展開

SMC は ABC 型 ATPase モーターとしての働きをもち、ATP 加水分解によるエネルギーにより、染色体の構造形成を維持する働きをもつ。しかし、その ATPase 活性はミオシンなどの運動性タンパク質の ATPase 活性と比べて桁違いに小さく、なぜこのような小さなエネルギー消費量で染色体構造を維持してできるかが、これまで明らかではなかった。本研究において、高速 AFM を用いて、生きた状態にある SMC を観察することに成功した。しかし、過去の研究において、ミオシンが ATPase 活性的に動く様子を可視化できているにも拘わらず、SMC の ATPase 活性的に動く様子を可視化するには至らなかった。このことは、SMC の ATPase 活性は、結合モードのスイッチの役割を担っており、染色体維持機構に関して補助的な役割しか持っていないという説を裏付けている。ただし、この説を更に強固にするためには、更に基板相互作用の小さな条件下で計測する必要がある。しかし、こうした系では、分子の拡散速度が速いため、サブ分子スケールでの観察が難しくなってしまう。こうした問題を解決するために、現在、超高速 AFM の開発を進めており、更に詳細な SMC の機能動態解明を行っていきたい。

また、本研究において、様々な条件の脂質やバッファー条件に関して計測を行い、比較検討を行うことが多かった。その過程で、高速 AFM の自動化の重要性に気付くことができた。近年、AI やインフォマティクス技術が急速に進化してきているが、まだ高速 AFM の計測・解析技術に取り入れた研究はほとんど行われていない。そのため、こうした新しい技術を高速 AFM に取り入れることで、高速イメージングや自動イメージングに応用できると期待される。

4. 自己評価

研究目的の達成状況: SMC は分子構造が非常に壊れやすいとともに、凝集しやすい性質をもつため、研究開始前の予備検討の段階では、DNA にトポロジカル結合した状態で長時間観察することが難しかった。そのため、サブ分子スケールでの観察は断念して、LLPS 形成機構の解明に関してのみ研究を行うことも考えていた。しかし、研究が開始して、脂質膜を用いた実験を行ったところ、予想外なことに、分子を壊さずに、明瞭な分子像とダイナミクスを同時に計測可能であることが明らかになった。そのため、当初の研究目的を達成できたと考えている。

研究の進め方: 観察に必要な高速 AFM 機器を購入したり、その他消耗品などを購入したりすることで効率的に研究を進めることができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果: まだ、研究成果が出てから年数が経っていないため、目に見える程度までは波及効果は得られていないが、今後、以下のような波及効果が期待できる。まず、これまで高速 AFM 観察において、マイカ基板が広く用いられており、SMC など生きた状態にある生体分子を計測できないケースが多かった。本研究において、脂質膜を用いた高速 AFM イメージングの確立に成功し、これまで生体機能動態の可視化が難しかった他の生体分子にも応用可能であることを示すことができた。また、高速 AFM の更なる高速化に関する研究に関しても順調に進んでおり、二倍高速化した振幅計測器に関しては、市販装置への導入も行われている。今後、Z ピエゾやカンチレバーなどに関しても実用化を行い、市販化を行っていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 18件

Kenichi Umeda, Chihiro Okamoto, Masahiro Shimizu, Shinji Watanabe, Toshio Ando, and Noriyuki Kodera: “Architecture of zero-latency ultrafast amplitude detector for high-speed atomic force microscopy”, *Applied Physics Letters*, 119, 181602-1-5 (2021). 査読有り

高速 AFM は有用な手法だが、更に広範な生命現象を明らかにするためには、更なる高速化が必須となる。高速 AFM において帯域を律速するデバイスにはいくつかあるが、振幅計測器は、最大の計測帯域律速デバイスとなっていた。本研究では、これまで提唱されてこなかった微分型のスキームを用いることで、原理的な遅延が完全にゼロの振幅計測器が実現可能なことを理論的に見出し、実験的に実証を行うことに成功した。

Kenichi Umeda, Steven J McArthur, and Noriyuki Kodera: “Spatiotemporal resolution in high-speed atomic force microscopy for studying biological macromolecules in action”, *Microscopy*, 72, 151–161 (2023). 査読有り

近年、我々のグループでは、現行の高速 AFM より 10 倍以上高速スキャンが可能な次世代型超高速 AFM の開発を行っている。高速 AFM において帯域を律速するデバイスには、カンチレバー、Z ピエゾ、振幅計測器がある。カンチレバーや Z ピエゾの帯域はそれらの共振周波数で制限されるため、物理的なサイズを小さくすることで高速化することができ、振幅計測器に関しては微分型のスキームを用いることで高速化可能であることを示した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件 (特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	岡田孝夫、安藤敏夫、梅田健一、岡本千優、古寺哲幸
	発 明 の 名 称	振幅計測装置及び振幅計測方法
	出 願 人	株式会社 生体分子計測研究所
	出 願 日	2021 年 7 月 26 日出願
	出 願 番 号	特願 2021-121704
	概 要	研究成果 1 で Applied Physics Letters に投稿した内容に関して特許出願を行った。

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- 1) ○K. Umeda, Y. Kurokawa, Y. Murayama, and N. Kodera,
“Sub-molecular-scale observation of Structural Maintenance of Chromosomes complexes by high-speed AFM”, 講演番号 1SEA-6,
第 61 回日本生物物理学会年会, シンポジウム, 名古屋国際会議場, 2023 年 11 月 14 日.
- 2) ○梅田健一、黒川裕美子、村山泰斗、古寺哲幸,
「高速 AFM による SMC 型染色体構造維持複合体の動的構造解析」,
第 23 回日本蛋白質科学会年会, 講演番号 WS16-03, ワークショップ, 名古屋国際会議場,
2023 年 7 月 7 日

受賞

- 1) AFM BioMed Conference 2022, Aichi, Japan, “High-Speed AFM Study of Structural Maintenance of Chromosomes”, Sep. 2nd, 2022, Young Investigator Award.

プレスリリース

- 1) Applied Physics Letters (“Architecture of zero-latency ultrafast amplitude detector for high-speed atomic force microscopy”) で得られた研究成果のプレスリリースを行った(「時間遅れゼロの超高速振幅計測法の開発に成功～高速 AFM のさらなる高速化・低侵襲化に期待～」
<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2021/11/Architecture-of-zero-latency-ultrafast-amplitude-detector-for-high-speed-atomic-force-microscopy.pdf>
その後、国内の複数メディアに紹介された。2021 年 11 月。