

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18731

研究課題名(和文)生物分子マシンの作動原理を理解する：共振現象による計測と制御

研究課題名(英文) Detection and control of functional vibrations of biomolecular machines by resonance phenomena

研究代表者

今清水 正彦 (Masahiko, Imashimizu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90465930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：酵素反応が熱揺らぎと同程度の低いエネルギーで極めて正確に行われる原理は、明らかにされていない。本研究では、物理化学的解析が進んだポリメラーゼ反応をモデルとし、室温の熱エネルギー以下のエネルギーを持つテラヘルツ(THz)波を、酵素反応への摂動として利用した新手法を開発した。そして、特定波長のTHz波照射が温度上昇とは質的に反対の作用をポリメラーゼ反応に及ぼし、その反応を正確にするという新しい現象を見出した。また、水溶液中のタンパク質運動へのTHz波照射作用を溶液NMR法により原子レベルで観測する方法を開発し、熱とは質的に異なるプロトン交換へのTHz励起作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の分子機能を考える上で、多くの場合、水分子の熱運動は均質なものとして捉えられてきた。しかし、生体高分子表面の水分子集団の熱運動は、均質ではない。生体高分子の特性を反映した形で不均質になる。その不均質性は、熱運動を利用しながら正確な分子機能を生み出す酵素反応機構と深く関わっている。不均質性の微視的詳細を明らかにし、それを生物学的理解に結びつける新しいアプローチが必要になる。本研究は、生体試料にTHz波を照射し、その応答を構造ダイナミクス・化学反応など複数の指標で調べるアプローチを構築した。水運動の不均質性を加味した形で正確な酵素反応機構の記述を深め、今後のTHz波制御の可能性を明確にした。

研究成果の概要(英文)：Highly accurate chemical reactions that are achieved by utilizing thermal fluctuations are the interesting biomolecular mechanism remains to be elucidated. To address this question, a new approach is needed to perturb biomolecular reaction systems with the energy as low as or lower than thermal fluctuations at physiological temperatures. Here, we employ terahertz (THz) wave as such a perturbation. Not only in terms of the energy range, but also collective biomolecule-water-coupled motions are predicted to exist in the THz frequency region. We developed THz-pump-seq that can statistically assess the effects of (sub)-THz irradiation on transcription by RNA polymerase. This method allowed us to find that (sub)-THz irradiation had the opposite effect of increasing temperature on transcription, making the reaction smooth and accurate. We also discuss the molecular mechanisms behind this phenomenon, based on NMR measurement of aqueous DNA and protein solutions under (sub)-THz irradiation.

研究分野：テラバイオロジー

キーワード：テラヘルツ波 酵素反応正確性 RNAポリメラーゼ 生物ナノマシン 熱ゆらぎ 水和 不均質性

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA の塩基情報を RNA に転写するタンパク質酵素を RNA ポリメラーゼと呼ぶ。地球上の生物の遺伝子発現は、この「転写」と呼ばれる分子過程から始まる。RNA ポリメラーゼが DNA と RNA に結合している複合体を、転写複合体と呼ぶ。転写複合体は、最も分子機構の解明が進んだ生物分子マシンの 1 つとして知られている。転写は、生物の必須分子過程の一つであり、様々な調節機能が備えられている。特に興味深い調節機能は、間違った塩基情報を読む頻度を 10 万に 1 回以下に抑える高い正確性である。この時に転写複合体が利用できるエネルギーは室温の熱揺らぎ程度であるから、転写複合体は熱揺らぎを正確な反応の調節に利用していると考えられる。

2. 研究の目的

タンパク質や核酸等の複合体から成るナノサイズの生物分子マシンは、水溶液中で、熱運動を利用して正確に作動する。この仕組みは面白い生命の本質であるが未解明である。本研究の目的は、この仕組みを、生物から化学、物理の研究者まで広く理解可能であり、生物分子機能を制御する新技術につながる一般的なレベルで解明することである。この問題の難しさは、どの程度問題を掘り下げれば一般的な解明と言えるのか？ どう実験的に検証するのか？ という点である。本研究では、転写複合体をモデルとし、この問題を熱揺らぎよりも十分に大きな活性化エネルギーを前提とする化学反応機構では説明できない未解明の機構として捉える。また、室温の熱揺らぎと同等以下のエネルギーを持つ電磁波である THz 波を揺らぎ運動への摂動として利用する (図 1)。周波数が約 10^{11} Hz - 10^{13} Hz の帯域の電磁波を THz 波と呼ぶ (特に 10^{12} ヘルツ以下の帯域の電磁波を sub-THz 波と呼ぶことがある)。THz 波が転写反応へ波長依存的に及ぼす効果を計測し、統計的に評価する新技術を開発し、実験的な検証を試みる。また、転写反応への直接的な THz 励起作用を裏付ける構造ダイナミクス変化を分光的に検出する。

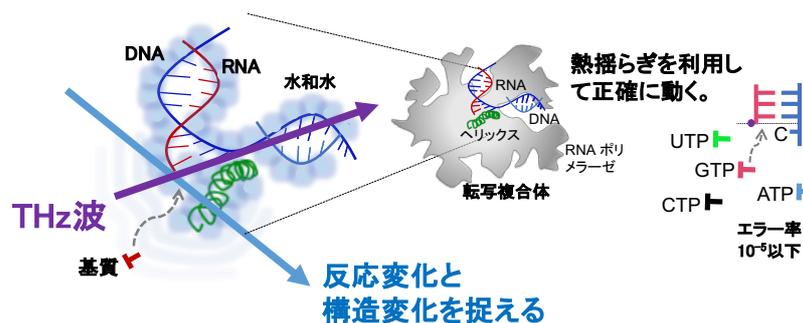


図 1. 本研究アプローチの概要

3. 研究の方法

THz 波を用いて、生体高分子・水溶媒系 (不均質な誘電体であり、中身はブラックボックス) に摂動を与え、その応答を熱的作用と分離して測定する新しい実験的アプローチを構築した。そのような摂動手段として、0.1~4 THz 周波数域の高強度 THz パルスを用いた。エネルギーの観点だけでなく、生体高分子と水の熱運動に特有の不均質な挙動が、THz 周波数域に存在するからである。生体高分子・水溶媒系への THz 照射作用の測定は、莫大な分子数を用いて統計解析が

可能なハイスループット DNA シークエンシング (HT-seq) と分光法を組み合わせで行なった。具体的には、THz 光源の強度・周波数などの条件決定と試料セル周りの光学系を構築し、その傍ら、転写の主な分子過程を一度に統計評価できる HT-seq 測定系を構築した。また、HT-seq 実験データの情報解析パイプラインを構築した。この一連の方法を THz-pump-seq と呼ぶことにした。THz 照射に加え、試料温度だけを同様の光学系を用いて (THz 非照射で) 上昇させる実験系を構築し、THz 照射と水温上昇による転写への影響の違いを精密に調べた。一般的な懸念として、水の THz 吸収による水温上昇が考えられるため、THz 照射と温度の影響を明確化する必要がある。光源は、水の吸収係数が比較的小さい sub-THz 帯 (0.1 THz) を用いる予定を追加した。クライストロン型 sub-THz 光源の利用に伴い、本研究の THz 研究協力者として田中真人氏 (産業技術総合研究所) に参画頂いた。研究方法のデザインの大枠は、連携研究者として参画頂いた高橋聡氏 (東北大学) との議論に基づいて行い、物理化学的問題等を明確にした。

印加した外場 (THz 周波数域の交流電場) への直接的な応答として生じる生体高分子・水と水の微視的な変化を溶液 NMR 法で解析した。申請当初の計画では、1 分子蛍光測定を行う予定であったが、申請後に優れた溶液 NMR 連携が可能な研究環境が得られたため、より直接的かつ原子レベルで構造ダイナミクス変化を捉えられる NMR 観測に予定を変更した。これに伴い、本研究の NMR 研究協力者として徳永裕二氏 (産業技術総合研究所) に参画頂き、所属グループ長の竹内恒氏の協力を得た。測定試料は、転写複合体に先立って、同位体ラベルしたユビキチンを用いた。このタンパク質は熱安定性に優れたコンパクトな構造を持ち、一般性の高いタンパク質構造の物理化学的解析が可能である。プロトン交換反応を指標として、THz 励起と熱励起のユビキチン・水和ダイナミクスへの影響の違いを調べた。

4. 研究成果

(1) 転写反応への THz 波照射作用の解析。

4 THz パルスを発生する THz 自由電子レーザー (THz-FEL、大阪大学産業科学研究所) 及び 0.1 THz パルスを発生するクライストロン型 sub-THz 光源 (産業技術総合研究所) を用いて、0.39 m 光路長内の微量水溶液試料に THz 照射する実験系を構築した。転写複合体試料に、基質添加と同時に高強度 THz パルスを 90 秒照射し、転写反応の主要過程への THz 照射の影響を HT-seq 法で調べた。試料作製において、転写開始、転写ポージング、終結、読み誤り (エラー率) を同時に HT-seq 検出・統計評価できる実験的手法を構築した (図 2)。さらに、同光源を用いて THz

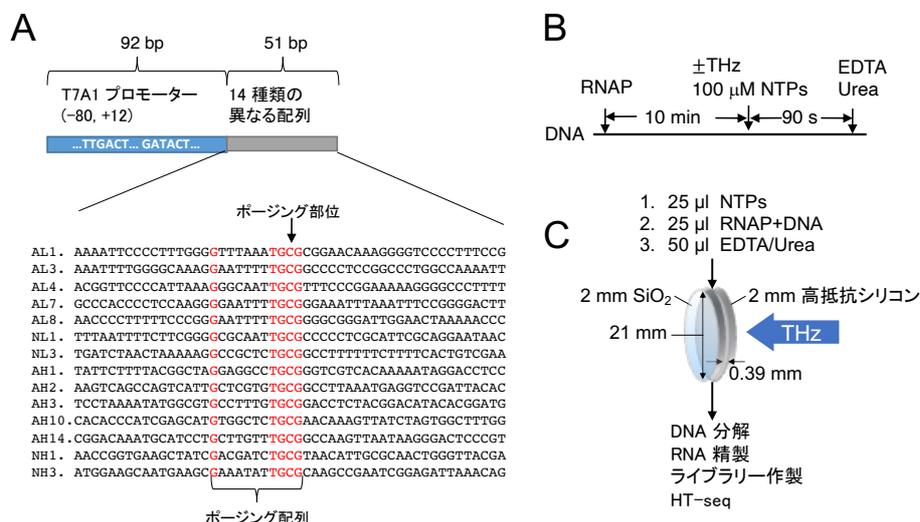


図2. RNAポリメラーゼ (RNAP) による転写への THz 照射作用を評価するための実験。(A) *in vitro* 転写に使用した DNA 配列。T7A1 プロモーター (-80~+12, +1 は転写開始点) の下流にポーリング配列を含む 14 種類の異なる 51 塩基配列を接続した。(B) *in vitro* 転写 (±THz 照射) 反応スキーム。(C) THz 照射用試料セルの概略図および試料注入から HT-seq までの手順。

波を透過させずに試料の水温を厳密な管理下で上昇させるコントロール実験系を構築した。THz-FEL を用いた実験設定・結果の解釈において、連携研究者として参画頂いた保科宏道氏 (理化学研究所) の協力を得た。

THz 波は強く水に吸収される性質を持つ。このため、水溶液生物試料への高強度 THz パルス照射影響は様々な角度から調べていく必要がある。FEL で発生させた 4 THz 波はパルスエネルギーが大きく、照射表面の水への急速な吸収に伴う試料表面温度の上昇と、衝撃波の発生が起こる。このような間接的な 4 THz 波照射効果は、ネガティブな側面だけでなく、生理的に起こりえる局所的で微小な温度・圧力ゆらぎとして、ポジティブに利用することもできる。特に本研究では、高強度 4 THz パルスの水への吸収から、生理的に起こり得る温度・圧力 ゆらぎ条件を人工的に作り出し、このような物理パラメーターの揺らぎがある条件下で転写反応の恒常性を維持する仕組みの一端を明らかにした。具体的には、THz-pump-seq 法を用いて、温度・圧力変動ストレスによって転写効率が大きく低下することを明らかにした。また、そのストレスを軽減する Gre タンパク質 (転写伸長因子) の新しい機能を発見した。Genes to Cells 誌において本研究成果を発表した (Imashimizu et al., 2021., doi: 10.1111/gtc.12822)。

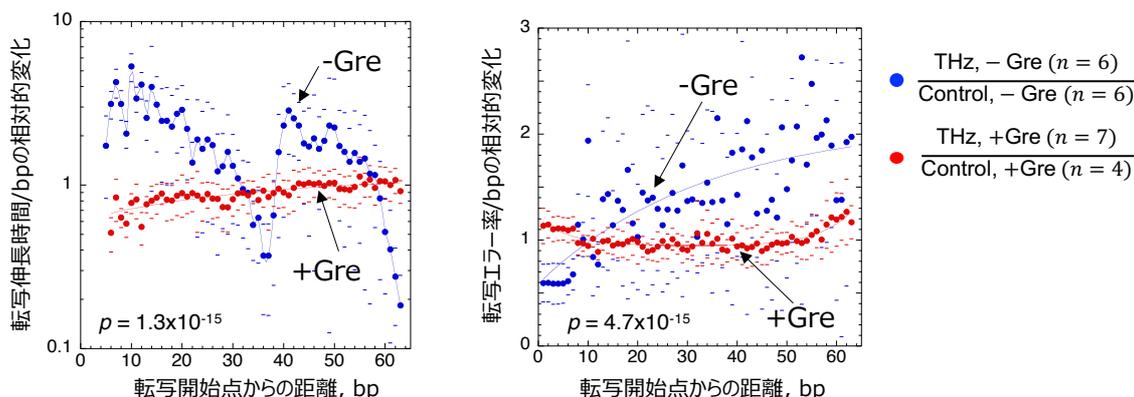


図3. 4 THz パルス (THz-FEL で発生) を用いて誘発した転写反応への温度・圧力ストレスが、Gre タンパク質によって抑制されることを発見した。塩基対当たりの (左) 転写伸長時間および (右) 転写エラー率に対する 4 THz パルスの影響。複数の実験にわたって行なった測定を平均化し (実験数 $n \geq 4$)、さらに 14 種類の DNA 配列を用いた結果の平均値±標準偏差を THz 照射/非照射 (Control) の比としてプロットした。

温度上昇作用とは異なる転写反応への影響が、0.1 THz パルス照射 ($\sim 20 \text{ mW/cm}^2$, $\sim 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度上昇) において観測された。0.1 THz 照射は、マクロには温度上昇を伴うにも関わらず、熱伝導による通常加熱とは質的に反対の作用を複数の転写反応過程に与えていたのである。論文出版前のため、詳細な記述は省略するが、適切な強度における 0.1 THz 照射により、転写反応の正確性が高まるという新しい現象が見出された。さらに複数の sub-THz 周波数の光源を用い、転写反応を正確にする照射効果に周波数依存性があることを示唆する結果が得られた (ジャイロトロン光源の使用において、福井大学遠赤外領域開発研究センター・山口裕資氏の協力を得た)。今後、誘電緩和測定等により、水和層を含めた水の緩和時間変化を直接調べ、直接的な分

子変化を捉える予定である。

(2) タンパク質ダイナミクスへの THz 照射作用の解析。

クライストロン型光源を用い、0.1 THz 電磁波照射時のユビキチンの遅いダイナミクスの変化を、水素-重水素交換 NMR 分光法を用いて調べた (図 4)。その結果、0.1 THz 波照射によって、タンパク質の内部や疎水性表面に位置するアミドの水素-重水素交換が加速される一方で、表面の柔軟な構造領域に位置するアミドの交換は減速されることが明らかとなった (図 5)。0.1 THz 波照射は、同時にユビキチン試料温度を 0.3 °C 上昇させた。そこで、0.1 THz 波照射効果と温度上昇効果を分離するため、非照射で温度を 5 °C 上昇させた試料を同様に解析した。その結果、0.1 THz 波の照射作用は、温度上昇による熱的作用と質的に反対になることが明らかとなった (図 5)。この結果は、タンパク質と水の界面においてカップルしている両者の運動を、sub-THz 波によって非熱的に励起できること、またその運動がタンパク質の機能に関わる遅いダイナミクスに影響を与えていることを示唆している。またこの成果は、sub-THz 波の照射により、水との相互作用を介して、タンパク質の機能を制御できる可能性を示している。Biophysical Journal 誌において本研究成果を発表した (Tokunaga et al., 2021, doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.013)。

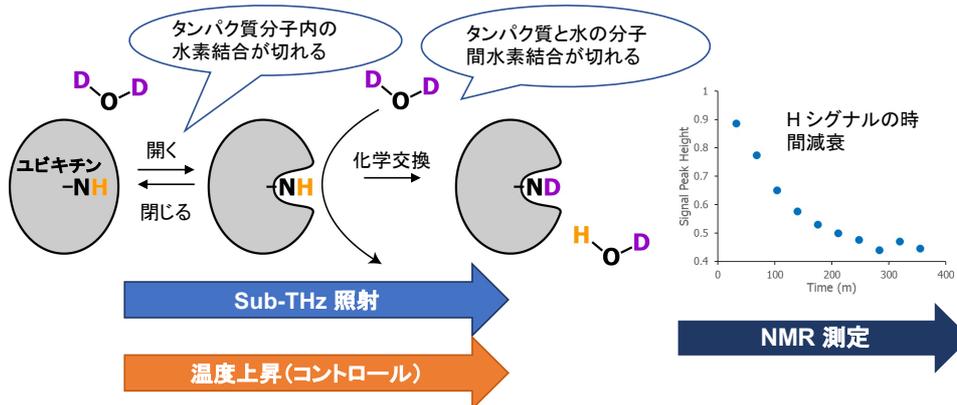


図 4 : Sub-THz 照射システムと水素-重水素交換 NMR を組み合わせた新手法。解析対象としてユビキチンタンパク質を用いた。溶媒が D₂O の場合、熱運動でユビキチン構造が開いた時に主鎖のアミドプロトンが重水素に置換され、H NMR 信号が消失する。この過程を測定する。タンパク質の開裂と化学交換のいずれの過程でも水素結合の切断が起こるため、この方法は sub-THz 励起によって引き起こされる水素結合ネットワークの変化を高感度で捉えられる。コントロール実験として、sub-THz 波を照射せずに熱伝導によって温度を上昇させた。

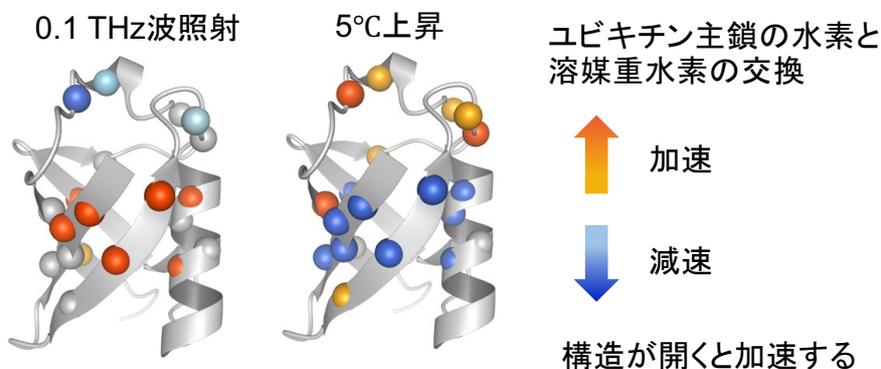


図 5 : 0.1 THz 波照射と 5 °C の温度上昇が、水溶液中のユビキチンタンパク質に異なるダイナミクス変化を起こすことを溶液 NMR 観測により明らかにした。ユビキチン構造において、重水素交換の加速 (オレンジ色) と減速 (青色) が観測されたアミノ酸残基を丸で表示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imashimizu Masahiko, Tanaka Masahito, Hoshina Hiromichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Gre factors prevent thermal and mechanical stresses induced by terahertz irradiation during transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 56 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokunaga Yuji, Tanaka Masahito, Iida Hitoshi, Kinoshita Moto, Tojima Yuya, Takeuchi Koh, Imashimizu Masahiko	4. 巻 120
2. 論文標題 Nonthermal excitation effects mediated by subterahertz radiation on hydrogen exchange in ubiquitin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2021.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 今清水 正彦、田中 真人、杉山 順一、保科宏道、竹内 恒
2. 発表標題 テラバイオロジーとテラバイオテクノロジーの創出
3. 学会等名 超異分野学会 関西フォーラム 2020
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 今清水 正彦、徳永 裕二、竹内 恒、田中 真人、保科宏道、山口裕資
2. 発表標題 Effects of Nonthermal Excitation Mediated by Terahertz Radiation on Biomolecular Dynamics and Reactions
3. 学会等名 The 8th International Workshop on Far-Infrared Technologies (IW-FIRT2021) (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 今清水 正彦、徳永 裕二、田中 真人、竹内 恒、保科宏道
2. 発表標題 テラバイオロジー:テラヘルツ領域の分子運動から生物機能を理解する
3. 学会等名 第10回 超異分野 学会 本大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 今清水正彦, 田中真人, 杉山順一、保科宏道, 竹内恒
2. 発表標題 Terahertz radiation and temperature increase: Opposite effect on transcription by RNA polymerase
3. 学会等名 9th ILANIT/FISEB Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 今清水正彦, 高橋弘喜, David B. Lukatsky
2. 発表標題 反復DNA配列にコードされた生物の熱揺らぎ利用戦略: 転写調節の統計的解釈によって見えてきたこと。
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 今清水正彦, 田中真人, 保科宏道, 竹内恒
2. 発表標題 Terahertz wave irradiation and temperature increase differently affect transcription by RNA polymerase.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 今清水正彦, 田中真人, 田上 俊輔, 保科宏道, 竹内恒
2. 発表標題 テラヘルツ光照射が生化学反応に及ぼす影響: 転写をモデルとした研究
3. 学会等名 第13回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 今清水 正彦
2. 発表標題 Understanding of biomolecular functions that utilize thermal fluctuations.
3. 学会等名 Mini-Symposium "Biophysics of Genome", Ben-Gurion University of the Negev (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 今清水 正彦, 田中 真人, 保科宏道, 竹内 恒
2. 発表標題 Terabiology: Understanding of biomolecular functions that utilize thermal fluctuations in the terahertz region.
3. 学会等名 The 84th Annual Meeting of the Israel Chemical Society (国際学会)
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 今清水 正彦, 田中 真人, 保科宏道, 竹内 恒
2. 発表標題 遺伝子発現のテラバイオロジー: テラヘルツ領域のゆらぎ運動から遺伝子発現の分子機能を理解する。
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 今清水 正彦、田中 真人、保科宏道、竹内 恒
2. 発表標題 テラバイオロジー:テラヘルツ領域のゆらぎ運動から生物機能を理解する。
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	徳永 裕二 (Tokunaga Yuji) (80713354)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員	
研究協力者	田中 真人 (Tanaka Masahito) (30386643)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・研究グループ長	
研究協力者	保科 宏道 (Hoshina Hiromichi) (10419004)	国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・上級研究員 (82401)	
研究協力者	高橋 聡 (Takahashi Satoshi) (30283641)	東北大学・多元物質科学研究所・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------