

令和 3 年 4 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15409

研究課題名(和文) 高速AFM/光ピンセット複合装置を用いた生体分子の機能動態の解明

研究課題名(英文) Dynamics of Biomolecules studied by High-Speed AFM with Optical Tweezers

研究代表者

梅田 健一 (Kenichi, Umeda)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：60746915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高速AFM/光ピンセット複合装置に特化した制御・解析プログラムを新規に開発し、これら二つの手法を同期して制御可能なシステムの構築を行った。更にモデル試料系として、長鎖ヘアピンコンカタマーアッセイの合成手法の開発にも成功した。こうして構築した実験系を用いて、ヘアピンDNAのアンフォールディングおよびリフォールディングするダイナミクスの可視化に成功した。更に、ヘアピンの根元にある不連続サイトを核としてssDNAがアンピーリングする様子や二次構造の形状が時々刻々と変化する様子の可視化にも成功した。これにより、生体フォールディング研究における大きな一歩を踏み出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体フォールディング機構は生体機能発現と密接に関連しており重要である。これまで光ピンセットを用いて研究がなされてきたが、分子の伸長度やフォースを計測はできても分子全体の構造変化を視覚化することができないという問題点があった。本研究において、光ピンセットに高速AFMを組み合わせた手法を確立することができ、世界で初めて外力に誘起されたフォールディング現象のダイナミクスのサブ分子レベルの可視化に成功した。この手法は今後様々な生体分子のフォールディング機構解明への応用が期待でき、今後、医薬製薬やバイオインフォマティクス分野における発展にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：I successfully developed high-speed atomic force microscopy combined with optical tweezers via the development of control and analysis software that is capable of synchronous control of these two techniques. Furthermore, I also succeeded in developing a simple method for synthesizing a long-chain hairpin concatemer assay. By means of these newly developed systems, I successfully visualized submolecular-scale unfolding and refolding dynamics of the hairpin structures induced by an external force. The obtained results also indicated that a transitional change of bistable secondary structures over time as well as an unpeeling of ssDNA that is nucleated from a discontinuity at the hairpin construct. These achievements were definitely a giant step in the biological folding research.

研究分野：生物物理

キーワード：高速AFM 光ピンセット DNA 生体機能動態 外力印加 生体フォールディング機構

1. 研究開始当初の背景

DNA は、デオキシリボ核酸の組み合わせによって構成される特異的鎖構造をもち、タンパク質合成の設計図を担うため、生物学において中心的な役目を担う。DNA は遺伝子情報を保存するために二重螺旋構造をとるが、細胞分裂に伴い、自分自身の複製を行う必要がある。このために、ヘリカーゼ、ポリメラーゼなどの様々な DNA 結合タンパク質と相互作用しながら、二重螺旋の解離および複製が行われる。更に、複製過程において、DNA はヘアピン構造や G-quadruplex、ホリデージャンクションといった高次構造をもった遷移状態を形成する。更に、DNA から翻訳されて合成されるタンパク質もまたアミノ酸配列の鎖構造をとるが、フォールディングしコンパクトに折り畳まれた高次構造をとるが、アミノ酸配列によって、特異的なコンフォメーションを形成し、極めて多様な生体反応や機能発現機構を実現している。そのため、フォールディング機構を解明することは生体機能原理の全容を理解するために必要不可欠である。

従来、生体分子のアンフォールディング過程に関する研究は光ピンセットを用いて行われてきた。この手法はマイクロ粒子に強フォーカスしたレーザー光を照射し、光の屈折により生じた輻射圧を用いて、微粒子を捕捉・操作すると同時に、フェムトニュートンオーダーで粒子に働く力を計測することが可能な手法である。従来、DNA を介して二つの微粒子間にターゲットとなる DNA/RNA やタンパク質を結合し、そのアンフォールディング過程を計測する研究が行われてきた(図 1(a))。この手法は非常にパワフルなツールではあるが、生体分子に加えられた力の大きさと分子の伸張距離のみが測定され、変形・展開された分子構造全体は視覚化できないという問題があった。

2. 研究の目的

AFM を用いれば in vitro での生体分子の構造をサブ分子分解能で可視化することができるが、従来の AFM は 1 フレーム/分程度の走査速度が限界であり、ダイナミクスの可視化は極めて困難であった。2000 年代に申請者の所属する安藤研究室がパイオニアとなって開発した高速 AFM 技術は通常の AFM と比べて桁違いに検出器系の S/N 比が高く、最大で 30 フレーム/秒の走査速度で測定可能であり、様々な生体分子のリアルタイム動態可視化に成功してきた(図 1(c))。本申請では、更にこの研究を進化させ、図 1(b)に示すように、光ピンセットと高速 AFM を組み合わせた装置の開発を行い、外力印加中にある高次 DNA 構造の機能動態の可視化を行う。

3. 研究の方法

本研究では、高速 AFM/光ピンセット複合装置を用いて、DNA の解離・複製の研究を行い、フォールディング現象をサブ分子レベルでの可視化を行う。上述したように DNA は様々な高次構造をとりうるが、本研究においては、特にヘアピン構造を中心に研究を行う。通常、DNA は相補的配列をもつ二つのヌクレオチド鎖の間で二重螺旋構造を形成するが、同じ一本の鎖の中に部分的に相補的配列をもっていた場合、ヘアピン構造を形成することが知られる。これを用いて、同一分子上で、DNA 二重螺旋の解離および再形成を引き起こす。ヘアピン構造は、将来的に、ヘリケースやポリメラーゼと結合させることで、これらのタンパク質の機能動態も評価する研究にも応用できる。ヘアピン構造は DNA の複製過程においても表れる構造であり、転写を調節するため、ヘアピン構造の研究は DNA の構造形成原理を解明するだけでなく、これらの構造によって果たされる生物学的役割も明らかにすることができる。

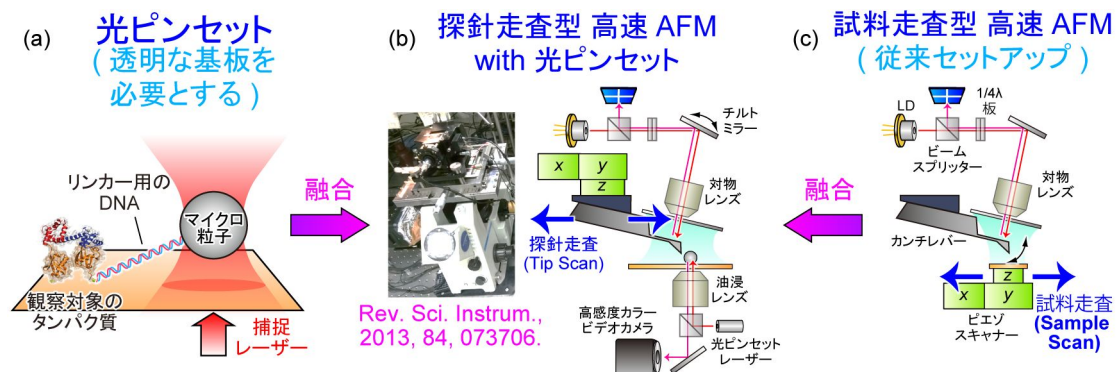


図 1: 本研究のコンセプト模式図。探針走査型高速 AFM と光ピンセットの融合。

4. 研究成果

高速 AFM と OT に同時制御を実現するために制御・解析プログラムを新たに VB.NET をベースとして開発を行った(図 2(a))。制御ソフトには、Bluetooth 接続したジョイパッドでの制御、AFM と OT の同期駆動、クリックムーブ、高ピクセルモード、探針軌跡の表示、任意アスペクト比など様々な既存のソフトにはない機能を備わっている。解析ソフトには、閾値 Flatten、任意アスペクト比、ズームモードなどの機能が備わっている。更に、OT で得られた実験データを解析するために、相互相関関数をもちいてマイクロ粒子の軌跡をトラッキングし、レーザーから変位をモニタリングすることで、AFM 測定時に生体分子に印加されたフォースを測定可能なプログラムの開発も行った。更に高速 AFM/OT 測定に最適なヘアピンをもった長鎖ヘアピン DNA アッセイの作製を行った。AFM 測定の都合上、ヘアピンが一つではなく複数箇所存在しないと実験が困難であることから、プラスミド DNA を元にしてコンカテマー技術により開発を行った。

最終的に、開発を行った計測技術を用いて、研究計画通りに高速 AFM を用いて、光ピンセットにより誘起されたヘアピン構造のアンフォールディングおよびリフォール

ディングを可視化することに成功した(図 2(b))。分子は基板に吸着しているため、その吸着力を制御することは困難であり、これら二つの現象を可視化するのは難しいと考えていたが、実験系の最適化により、本目標を達成することができた。光ピンセット粒子トラジェクトリーの解析の結果、このアンフォールディングとリフォールディングの過渡時間はいずれも 1 s 程度であることが分かった。一方で、ヘアピンの内在的なフォールディング時間は 30 μ s 程度であり、これよりも 3 万倍程度遅く観察されることが分かった。理論計算による考察により、これは分子が基板に吸着しているために、その動きが表面拡散律速になっているためであることが分かった。また、そのおかげで時間分解能が数十 ms である高速 AFM を用いて、そのダイナミクス可視化可能であることが分かった。

また、予想していなかった現象として、ヘアピンの根元にある DNA の不連続性サイトを核として、ssDNA のピーリングが生じるダイナミクスの可視化にも成功した。また、その ssDNA が再度アニーリングにより、元の dsDNA に戻る過程を可視化することにも成功した。こうした現象は宙に浮いた状態では実現可能であるが、基板に吸着した状態でも、観察できたことは予想外の結果であった。更に、ピーリングに伴い ssDNA の末端がヘアピンの二次構造を形成することも分かった。この二次構造は一つあるいは二つのボール構造をとり、時々刻々と形状を変化させることが分かった。配列から二次構造をシミュレーションしたところ、おおよそ実験結果を再現できることが分かった。このように、当初予定したよりも生体フォールディング現象に関して深い知見を得ることができた。

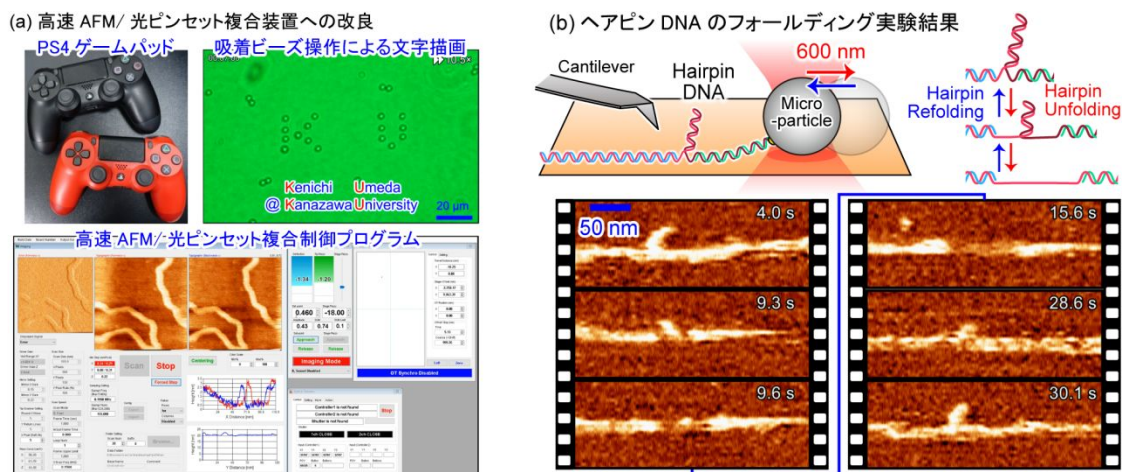


図 2: (a)高速 AFM/光ピンセット複合装置への改良。(b)ヘアピン DNA のアンフォールディング/リフォールディングの可視化の模式図および高速 AFM 実験像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Qu Mingbo, Watanabe-Nakayama Takahiro, Sun Shaopeng, Umeda Kenichi, Guo Xiaoxi, Liu Yuansheng, Ando Toshio, Yang Qing	4. 巻 10
2. 論文標題 High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Factors Affecting the Processivity of Chitinases during Interfacial Enzymatic Hydrolysis of Crystalline Chitin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 13606 ~ 13615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.0c02751	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 該当する

1. 著者名 Umeda Kenichi, Kobayashi Kei, Minato Taketoshi, Yamada Hirofumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular-Scale Solvation Structures of Ionic Liquids on a Heterogeneously Charged Surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 8094 ~ 8099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c02356	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 Umeda Kenichi, Kobayashi Kei, Minato Taketoshi, Yamada Hirofumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Atomic-Scale Three-Dimensional Local Solvation Structures of Ionic Liquids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b03874	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片山紀希、向井智哉、梅田健一、古寺哲幸
2. 発表標題 高速AFM用超微小カンチレバーの開発
3. 学会等名 日本生物物理学会令和2年度中部支部会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
中国	大連理工大学			