

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15140

研究課題名（和文）高速AFMと蛍光顕微鏡の複合機を用いた転写開始素過程の解明

研究課題名（英文）Investigation of elementary steps of transcription initiation by HS-AFM combined with single-molecule fluorescence microscopy

研究代表者

福田 真悟（Fukuda, Shingo）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：90829186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：「転写」は分子生物学のセントラルドグマにおける最初のステップである。そのため、転写がどのようなメカニズムで開始されるのかを明らかにすることは、生命現象の根本の理解につながると考えられる。本研究では、この転写開始過程を高速原子間力顕微鏡（AFM）で観察するための要素技術の開発を行い、一分子レベルでの転写開始メカニズムを明らかにすることに成功した。また、開発した手法は他の生体試料へも適用可能であるため、本研究によって高速AFMの適用範囲は拡張され、今後、高速AFMは生体分子を解析するさらなる主要な装置になるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの転写開始過程の観察では、X線結晶構造解析や電子顕微鏡、光学顕微鏡、光ピンセットなどの手法が用いられてきた。しかしながら、これらの手法ではRNAP-DNA複合体のダイナミックな構造変化をリアルタイムに観察することはできなかった。一方で本研究では、高速AFMを使った観察によってRNAPとDNAが相互作用して働く様子を直接、可視化することに成功し、これまで解像することの出来なかった転写開始メカニズムを明らかにすることが出来た。これらの一分子レベルでの基礎研究の成果が、医薬創薬開発等の応用研究へ向けた知識基盤へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Transcription is the first step in the central dogma of molecular biology. To understand the basics of biological phenomena, therefore it is important to reveal mechanisms how RNA polymerase initiates the transcription. This research developed techniques to allow HS-AFM to visualize the transcription initiation and uncovered the mechanism at single-molecule level. Since the developed methods are applicable for various biological samples, HS-AFM would be a more practical tool for analyzing biological phenomena.

研究分野：生物物理学

キーワード：一分子計測 転写 走査型プローブ顕微鏡 高速AFM

1. 研究開始当初の背景

「転写」は分子生物学のセントラルドグマにおける最初のステップである。そのため、転写がどのようなメカニズムで開始されるのかを明らかにすることは、生命現象の根本の理解につながると考えられる。これまでに転写の開始過程は、電子顕微鏡やX線結晶構造解析、光学顕微鏡、光ピンセットなどの手法を用いて行われてきた。しかしながら、それらの手法では高解像のスナップショットの撮影か輝点やビーズの挙動からの分子の動きの推定しかすることが出来ず、転写開始過程におけるダイナミックなRNAポリメラーゼ(RNAP)やDNAの構造変化を可視化することが出来なかった。本研究では、生体分子の構造と動態を同時に可視化することができる高速原子間力顕微鏡(AFM)を転写開始過程に適用することで、転写を開始するためのRNAP-DNA複合体の一分子レベルでの構造動態変化を明らかにする。さらに、高速AFM/蛍光顕微鏡複合機を用いることで、両顕微鏡からの多角的な情報から、より精緻な転写開始メカニズムを議論することを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、高速AFMでRNAPによる転写開始過程を可視化するための要素技術開発を行う。具体的には、弱い相互作用で会合するRNAP-DNA複合体を可視化することが出来る低侵襲走査手法の開発や高速AFM/蛍光顕微鏡複合機の改良、RNAP-DNA複合体をゆるやかに固定できる基板の開発を行う。これらの開発を通して、転写開始過程におけるRNAP-DNA複合体の構造動態変化を可視化することが出来る実験システムを確立する。そして開発した実験手法を用いて、転写開始過程を明らかにし、その仕組みの理解につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

研究に使用した高速AFMや蛍光顕微鏡は自作のものを用いて、転写開始過程を観察するために最適化した。オンリートレースイメージング法の開発では、Igor ProとC言語でソフトウェアを開発した。試料ステージを引き上げるための変調信号は自作の電子回路を使いフィードバック信号と足し合わせた。ソフトウェア上から変調信号の振幅や速度を変更することで試料に適したパラメータを調整することが出来るようになった。ダイナミックPID制御法の開発では、下側の閾値を高速AFM観察中にモニターできるように回路やソフトウェアを改良した。

4. 研究成果

(4-1) 高速AFMのための高速・低侵襲走査手法の開発

RNAPは微弱な静電相互作用によってプロモーター配列へ結合して開始前複合体を形成するため、高速AFM観察中に探針走査によって、容易にRNAPがDNAから解離することが分かった。この問題を解決するために、高速AFMの低侵襲化のための技術開発を行った。

① オンリートレースイメージング(OTI)法の開発

一般的な高速AFMでは、試料ステージをラスタ走査して試料の高さ情報をカンチレバーで検出して画像化する。このときX軸(速軸)の走査は三角波を用いて、Y軸(遅軸)の走査はのこぎり波を用いて行う。このためX方向の走査は同じラインを2回走査することになり、1度の走査でトレース画像とリトレース画像の2枚の画像を取得する。従来のAFM計測ではトレース走査とリトレース走査は同一のものと考えられており、どちらか一方の画像のみを使用していた。我々は高速観察において、トレース走査とリトレース走査におけるカンチレバーの動きの違いを明らかにして、リトレース走査の時にトレース走査と比べて大きな力が探針から試料に加えられることを明らかにした。この発見をもとに、リトレース走査を省略するオンリートレースイメージング(OTI)法を開発した。この手法を用いることによって、探針-試料間に加わる力を大幅に低減することができ、制御帯域を~2.5倍向上させることに成功した。OTI法を用いることによって、弱い相互作用($K_d = 0.1 \sim \mu\text{M}$)で結合するアクチンフィラメントの重合過程を観察することに成功し、本手法の有効性を実証することが出来た(図1)。

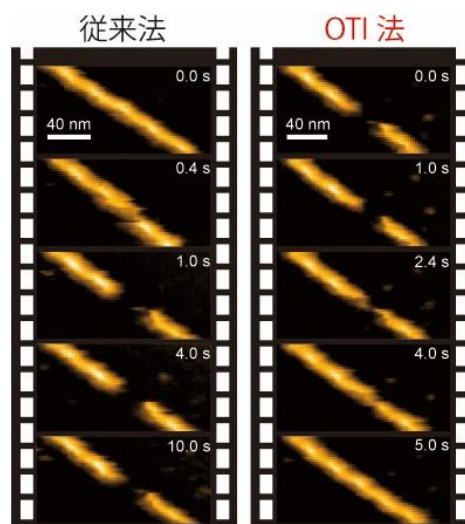


図1. OTI法の効果。観察中(左, 0.4 s)に探針を用いて、アクチンフィラメントを切断した。従来法(左)では大きな探針-試料間の力により、アクチンモノマーが結合することが出来なかったが、OTI法(右)ではアクチンの重合過程を観察することが出来た。フレームレートは5 fpsであった。

② ダイナミック PID 制御法の開発

カンチレバーの振幅値がセットポイントを上回った時に PID 制御のゲインを変調するダイナミック PID 制御法が開発されている。この手法を用いることで、高速 AFM の制御帯域を大幅に向上させることが出来ることが明らかになっている。しかしながら、振幅値がセットポイントを下回った時にゲインを変化させる手法は確立されておらず、その効果は明らかになっていない。下側の閾値を観察中にモニターできるダイナミック PID 制御回路とソフトウェアを開発して、Y 軸方向に平行な微小管の観察をすると、下側の閾値をセットポイントから -0.2~-0.3 に設定したときに大幅に探針-試料間の力を低減できることが分かった。低侵襲化は時間分解能の向上を意味するため、この下側の閾値を設定したダイナミック PID 制御法と OTI 法を合わせることで、アクチンフィラメントを 62.5 (フレーム/秒) fps で観察することに成功した(図 2)。

本研究で開発した OTI 法とダイナミック PID 制御法によって高速 AFM の低侵襲化と高速化に成功した。これによって、弱い相互作用で結合する RNAP-DNA 複合体の高速 AFM 観察が可能になった。さらに本手法は、転写開始過程以外の様々な生命現象に適用可能であるため、高速 AFM の適用範囲を飛躍的に拡張させることが出来た。ここで開発した手法が様々な生命現象に適用され、それらの機能発現メカニズムの解明に貢献することが期待される。

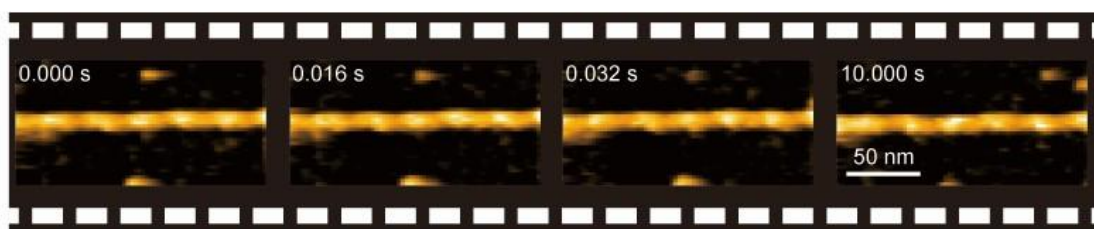


図 2. アクチンフィラメントの高速 AFM 観察画像。

開発したダイナミック PID 制御法と OTI 法を使うことで、62.5 fps での高速 AFM 観察に成功した。10 秒間以上、観察してもアクチンフィラメントは探針によって破壊されることはなかった。

(4-2) 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の改良

高速 AFM / 光学顕微鏡複合機にイメージスプリッティング光学系を導入して、複数の蛍光色素を高速 AFM と同時に観察できる実験システムを構築した。DNA のプロモーター部位を 2 つの蛍光色素でラベルして、開始前複合体の形成を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) を用いて検出することを試みた。しかしながら、FRET の検出効率の低さや高速 AFM と光学顕微鏡の視野の大きさの違いから、開始前複合体の形成過程を高速 AFM と光学顕微鏡で同時に計測することはできなかった。

(4-3) DNA をゆるやかに固定できる脂質基板の開発

DNA のリン酸基は負に帯電しているので、転写開始過程の高速 AFM 観察において、正に帯電している脂質二重膜(DPTAP)を観察基板として用いることを検討した。バッファー条件や脂質濃度を調整することで再現性良く、1 マイクロメートル四方の領域を平坦な脂質二重膜でカバーすることが出来る実験条件を確立した。基板に固定した DNA の高速 AFM 観察の結果から、脂質膜上に固定された DNA はネイティブな構造を維持していることがわかった。また、DNA は脂質膜上を緩やかに拡散し、この動きは観察バッファーの塩濃度によってコントロールできることがわかった。

(4-4) 転写開始過程における RNAP-DNA 複合体の観察

① RNAP によるプロモーター探索過程の観察

開発した脂質基板を用いて RNAP-DNA 複合体の観察を行った。生理条件下では、RNAP は DNA に結合と解離を繰り返した(図 3 左)。この結果は、RNAP がプロモーター領域を探索するときにプロモーター配列へ直接結合する'3D 拡散モデル'を支持している。一方で低塩濃度条件では、RNAP は DNA 上をスライディング運動した(図 3 右)。

② 開始前複合体の観察

開始前複合体をチューブ内で形成させて基板に固定して観察を行った。この観察では基板にアミノシラン(0.1%)を使用した。観察中にインタラクティブモードを用いて探針を RNAP に強く接触させて RNAP を複合体から解離させると DNA が RNAP に巻き付くようにして複合体を

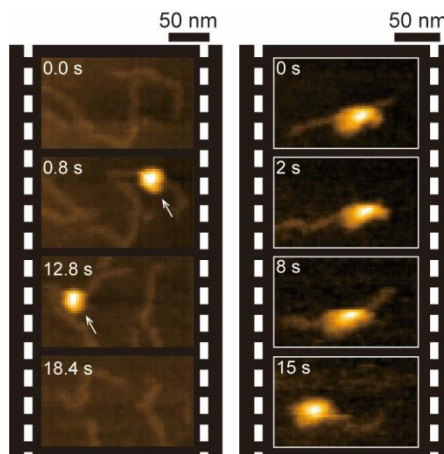


図 3. RNAP によるプロモーター探索過程の高速 AFM 観察。(左) 生理条件下(100 mM KCl)では RNAP は DNA と結合と解離を繰り返した。矢印で RNAP を示す。(右) 低塩濃度条件(25 mM KCl)では、RNAP は DNA 上をスライディング運動した。フレームレートはそれぞれ、1.3 fps (左)と 1 fps (右)であった。

形成していることがわかった。さらに、ヌクレオチドオミッション法を用いて、伸長複合体を形成させて同様の観察を行うと DNA は RNAP に巻き付いた状態で RNA の合成が行われることが明らかになった。

③ 開始前複合体の形成過程のリアルタイム観察

開始前複合体の形成過程のリアルタイム観察を行った。初めに DNA を脂質基板に固定してイメージング中に RNAP を観察溶液に加えると、RNAP と DNA が相互作用して DNA が RNAP に巻き付く様子が観察された。複数のプロモーターや変異プロモーター配列を用いて観察した結果、DNA が巻き付いている時間はプロモーターによって変化することが分かった。また、DNA が巻き付くときに RNAP の β' サブユニットが大きく開く様子が観察された。この結果は、プロモーターが RNAP に取り込まれるときに β' サブユニットが大きく開く 'クランプオープンモデル' を支持している。さらに、プロモーター部位を蛍光色素でラベルして開始前複合体の形成過程の一分子蛍光顕微鏡観察を行った。この計測では、粘性抵抗の変化によって、シアニン色素の蛍光シグナルが変化することを利用して開始前複合体の形成過程を観察した。開始前複合体の形成は、DNA が 1 本鎖へほどかれることによっておこる蛍光シグナルの増強として検出された。様々なプロモーターを用いて、開始前複合体を形成するまでの時間を計測すると高速 AFM を用いて計測した DNA が RNAP に巻き付いている時間と正の相関があることがわかった。

研究期間全体を通して、高速 AFM の低侵襲化を実現するための要素技術開発を行い、転写開始過程の高速 AFM 観察に成功した。高速 AFM による直接観察から、一分子レベルでの RNAP が転写を開始するメカニズムを明らかにして、遺伝子発現機構に関する重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Fukuda Shingo, Ando Toshio | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 Faster high-speed atomic force microscopy for imaging of biomolecular processes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Review of Scientific Instruments | 6. 最初と最後の頁 033705 ~ 033705 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0032948 | 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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shingo Fukuda |
| 2. 発表標題 Control systems for high-speed AFM and its advances toward ultra-high-speed AFM |
| 3. 学会等名 Computational Biophysics of Atomic Force Microscopy A Lecture-based Workshop（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shingo Fukuda Toshio Ando |
| 2. 発表標題 Probing processes in transcription initiation by Escherichia coli RNA polymerase |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 福田真悟 |
| 2. 発表標題 高速AFMの操作手順と測定のコツ |
| 3. 学会等名 ブルカージャパン主催第3回高速AFMオンラインシンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

| | | |
|-----------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 原子間力顕微鏡、制御方法、及び、プログラム | 発明者 安藤敏夫、福田真悟 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2020-199938 | 取得年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔その他〕

| |
|--|
| 高速AFMのさらなる高速化・低侵襲化に成功 https://nano1si.kanazawa-u.ac.jp/achievements/achievements-16204/ |
|--|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|