

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04849

研究課題名(和文) 高速AFM/光ピンセット複合機を用いたSMCの液-液相分離の形成・破壊機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the formation and destruction mechanism of liquid-liquid phase separation in SMC using a high-speed AFM/optical tweezers combination device

研究代表者

梅田 健一 (Umeda, Kenichi)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SMCの染色体の形成機構を解明するために、高速AFMを用いて、サブ分子レベルでのSMCの機能動態の可視化を行った。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。粗視化シミュレーションを行うことで、0形分子構造を特定することに成功した。更に、脂質膜の実験系を最適化することで、DNAに結合したSMCをサブ分子分解能でイメージングすることに成功した。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、これまで生化学実験で得られた描像に直接的な証拠を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMCのサブ分子分解能での機能動態の可視化に成功したことで、これまで生化学実験結果に基づいて描いていたイラストをダイレクトに実証することができた。更に、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。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of chromosome formation in SMC, I used high-speed AFM to visualize the functional dynamics of SMC at the submolecular scale. First, I performed observation on mica, which is commonly used for AFM observation, and succeeded in obtaining clear molecular images. By performing coarse-grained simulations, I succeeded in identifying the 0-form molecular structure. Furthermore, by optimizing the lipid membrane experimental system, I succeeded in imaging SMC bound to DNA at submolecular resolution. I also succeeded in visualizing the clear molecular structure of the head and hinge binding mode that appear in the ATPase hydrolysis reaction, and succeeded in obtaining direct evidence for the pictures that has been conventionally obtained in biochemical experiments.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速AFM 染色体維持構造タンパク質 DNA 生体機能動態

1. 研究開始当初の背景

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。

2. 研究の目的

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。特に、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。

3. 研究の方法

SMC にはいくつかの種類が存在するが、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。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、分子構造を高分解能で観察すること目的として、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。その後、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いる、脂

質二重膜上において同様の計測を行った。

4 . 研究成果

「Smc5/6 の分子構造の同定」

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 の観察を行ったところ、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、探針コンポ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することが分かった。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。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。

「DNA に結合した Smc5/6 の機能動態解明」

次に、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計測を行った。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。DNA には長さ 1895 bp (~ 644 nm) のものを用いた。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 に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。

「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 はヘッドドメインに結合する。これによりヘッド結合モードを形成する。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 への結合角に関するところ、ヘッド θ は 104° に単一ピークをもつものに対し、ヒンジ θ 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14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 Yoshimi Kazuto, Takeshita Kohei, Kodera Noriyuki, Shibumura Satomi, Yamauchi Yuko, Omatsu Mine, Umeda Kenichi, Kunihiro Yayoi, Yamamoto Masaki, Mashimo Tomoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Dynamic mechanisms of CRISPR interference by Escherichia coli CRISPR-Cas3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4917-4917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32618-0	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 Hayakawa Yuuki, Takaine Masak, Ngo Kien Xuan, Imai Taiga, Yamada Masafumi D, Behjat Arash Badami, Umeda Kenichi, Hirose Keiko, Yurtsever Ayhan, Kodera Noriyuki, Tokuraku Kiyotaka, Numata Osamu, Fukuma Takeshi, Ando Toshio, Nakano Kentaro, Uyeda Taro QP	4. 巻 6
2. 論文標題 Actin-binding domain of Rng2 sparsely bound on F-actin strongly inhibits actin movement on myosin II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202201469	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 Radhakrishnan Renjith M., Kizhakkeduth Safwa T., Nair Vishnu M., Ayyappan Shine, Lakshmi R. Bhagya, Babu Neethu, Prasannajith Anjaly, Umeda Kenichi, Vijayan Vinesh, Kodera Noriyuki, Manna Tapas K.	4. 巻 299
2. 論文標題 Kinetochore-microtubule attachment in human cells is regulated by the interaction of a conserved motif of Ska1 with EB1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102853 ~ 102853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102853	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 Kubo Shintaroh, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Takada Shoji	4. 巻 20
2. 論文標題 Removing the parachuting artifact using two-way scanning data in high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0006	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 Jin Xiaocen, Tanaka Hikari, Jin Meihua, Fujita Kyota, Homma Hidenori, Inotsume Maiko, Yong Huang, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Ando Toshio, Okazawa Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 PQBP5/NOL10 maintains and anchors the nucleolus under physiological and osmotic stress conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35602-w	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, McArthur Steven J, Kodera Noriyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Spatiotemporal resolution in high-speed atomic force microscopy for studying biological macromolecules in action	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 151 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfad011	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 Morioka Shin, Sato Shoko, Horikoshi Naoki, Kujirai Tomoya, Tomita Takuya, Baba Yudai, Kakuta Takahiro, Ogoshi Tomoki, Puppulin Leonardo, Sumino Ayumi, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Kurumizaka Hitoshi, Shibata Mikihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Spontaneous Nucleosome Sliding of H2A.Z at the Subsecond Time Scale	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 1696 ~ 1704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.2c04346	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 Puppulin Leonardo, Ishikawa Junichiro, Sumino Ayumi, Marchesi Arin, Flechsig Holger, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Nishimasu Hiroshi, Shibata Mikihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Dynamics of Target DNA Binding and Cleavage by Staphylococcus aureus Cas9 as Revealed by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 4629 ~ 4641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.2c10709	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, Yamada Hirofumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Nanomechanics of self-assembled surfactants revealed by frequency-modulation atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 4626 ~ 4634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2nr00369d	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 Shimizu Masahiro, Okamoto Chihiro, Umeda Kenichi, Watanabe Shinji, Ando Toshio, Kodera Noriyuki	4. 巻 93
2. 論文標題 An ultrafast piezoelectric Z-scanner with a resonance frequency above 1.1 MHz for high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Review of Scientific Instruments	6. 最初と最後の頁 013701 ~ 013701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0072722	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 Puppulin Leonardo, Kanayama Daiki, Terasaka Naohiro, Sakai Katsuya, Kodera Noriyuki, Umeda Kenichi, Sumino Ayumi, Marchesi Arin, Weilin Wei, Tanaka Hideo, Fukuma Takeshi, Suga Hiroaki, Matsumoto Kunio, Shibata Mikihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 54817 ~ 54829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsaami.1c17708	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, Okamoto Chihiro, Shimizu Masahiro, Watanabe Shinji, Ando Toshio, Kodera Noriyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Architecture of zero-latency ultrafast amplitude detector for high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 181602 ~ 181602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0067224	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 -

1. 著者名 Marchesi Arin, Umeda Kenichi, Komekawa Takumi, Matsubara Takeru, Flechsig Holger, Ando Toshio, Watanabe Shinji, Kodera Noriyuki, Franz Clemens M.	4. 巻 11
2. 論文標題 An ultra-wide scanner for large-area high-speed atomic force microscopy with megapixel resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13003 ~ 13003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92365-y	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 -

1. 著者名 Minato Taketoshi, Umeda Kenichi, Kobayashi Kei, Araki Yuki, Konishi Hiroaki, Ogumi Zempachi, Abe Takeshi, Onishi Hiroshi, Yamada Hirofumi	4. 巻 60
2. 論文標題 Atomic-level nature of solid/liquid interface for energy conversion revealed by frequency modulation atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SE0806 ~ SE0806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abffa2	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 K. Umeda and N. Kodera,
2. 発表標題 High-Speed AFM Study of Structural Maintenance of Chromosomes
3. 学会等名 AFM BioMed Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Kodera and K. Umeda
2. 発表標題 Recent progress in high speed atomic force microscopy technologies
3. 学会等名 AFM BioMed Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 巽和真、梅田健一、安藤敏夫、古寺哲幸
2. 発表標題 高速AFMの更なる高速化に向けたZ-スキャナの共振制御装置
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山紀希、梅田健一、安藤敏夫、古寺哲幸
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡のさらなる高速化を目指した超微小カンチレバーの開発
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenichi Umeda
2. 発表標題 Controlling and Data Acquisition Methods for High-Speed AFM
3. 学会等名 Computational Biophysics of Atomic Force Microscopy, A Lecture-based Workshop
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原 猛, 渡辺 信嗣, 梅田 健一, 角野 歩, 安藤 敏夫, 古寺 哲幸
2. 発表標題 パッチクランプ機能付き高速AFMの開発
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保進太郎, 梅田健一, 古寺哲幸, 高田彰二
2. 発表標題 原子間力顕微鏡の固有ノイズ: パラシューティングの除去手法開発
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 振幅計測装置及び振幅計測方法	発明者 岡田孝夫, 安藤敏夫, 梅田健一, 岡本千優, 古寺哲幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-121704	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Speeding up atomic force microscopy https://nanolisi.kanazawa-u.ac.jp/en/achievements/achievements-18299/
--

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
---------	---------