

細胞の動的高次構造体
2020 年度採択研究代表者

2022 年度
年次報告書

梅田 健一

金沢大学 ナノ生命科学研究所
特任助教

高速 AFM を用いた SMC 複合体の力学機構の解明

研究成果の概要

染色体維持構造タンパク質(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ている。SMC には数種類あるが、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。蛍光顕微鏡とは異なり、高速 AFM では分子を基板に吸着させる必要があり、分子が拘束条件下にあるために、うまくダイナミクスを可視化できない問題があった。この問題を克服するために、前年度の研究において、脂質膜基板を用いることで吸着力を抑制し、分子のダイナミクスを可視化することに成功した。しかし、吸着力を弱くした状態ではダイナミクスは見えるものの分子の構造が観察できないため、吸着力を強くすると分子が壊れてしまうという問題があった。2022 年度において、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。そのため、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、ワイルドタイプと、加水分解を抑制した ATPase ミュータント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。更に、近年 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 により得られた分子構造の PDB データを元にし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し、AFM で観察される O 形分子構造の生成を行うことにも成功した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Dynamics of Target DNA Binding and Cleavage by *Staphylococcus aureus* Cas9 as Revealed by High-Speed Atomic Force Microscopy”, ACS Nano, vol. 17, pp.4629–4641, 2023
- 2) “High-speed atomic force microscopy reveals spontaneous nucleosome sliding of H2A.Z at the subsecond timescale”, Nano Letters, vol. 23, pp.1696–1704, 2023
- 3) “Spatiotemporal resolution in high-speed atomic force microscopy for studying biological macromolecules in action”, Microscopy, vol. 72, pp.151–161, 2023
- 4) “PQB5/NOL10 maintains and anchors the nucleolus under physiological and osmotic stress conditions”, Nature Communications, vol. 14, pp.1–20, 2023
- 5) “Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3”, Nature Communications, vol. 13, pp.1–14, 2022