

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01836

研究課題名(和文) 高速AFMによるゲノム編集ツールCRISPR-Casの分子作動機構の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive studies of working mechanism of Cas proteins using HS-AFM

研究代表者

柴田 幹大 (Shibata, Mikihiro)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：80631027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゲノム編集ツールCasタンパク質群に高速AFMを適用し、様々なCasタンパク質がDNAに結合し切断する瞬間を実時間可視化することで、DNA切断分子作動機構を統一的に理解することを目的とした。研究期間において、SaCas9、AsCas12a、LbCas12aに対して高速AFM観察を行い、核酸非結合状態ではフレキシブルな構造をとるが、RNA結合状態では安定で固い構造をとり、RNA-DNA結合状態では、標的DNA配列に強く結合したままであることを明らかにした。この分子動態は、全てのCasタンパク質において観察され、エンドヌクレアーゼにおける共通の分子作動機構といえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における学術的意義として、Casタンパク質におけるRNAの役割が、標的DNA配列へのガイド役だけでなく、立体構造の安定化に寄与することを明らかにした点や、RNA-Casタンパク質がDNA配列へひとたび結合すると、DNA上をスライドすることなく強固に結合したままであることを明らかにした点が挙げられる。また、現代のバイオテクノロジーの中心であるゲノム編集を担うCasタンパク質群のDNA切断分子機構の統一的な理解は、人類にとって重要であり、ゲノム編集技術のさらなる高度化を促す研究成果と位置付けられ、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to understand the mechanism of DNA cleavage reaction of Cas proteins, which are used as genome editing tools. Using high-speed atomic force microscopy (HS-AFM), we tried to visualize the dynamics of Cas proteins during the binding to and cleaving a target site of DNA in real-time with nano-meter resolution. During the three years research period, HS-AFM observations were performed on SaCas9, AsCas12a, and LbCas12a. HS-AFM videos of three Cas proteins showed that structures of Cas proteins without nucleic acids were flexible, while structures of RNA-binding Cas proteins were stable and rigid. Furthermore, when RNA-Cas complex bound to the target site of DNA, a complex remained tightly bound to the target site of DNA and did not slide on the DNA. Since this molecular dynamics was observed in all Cas proteins, we concluded that it could be a common molecular binding mechanism to the target site of DNA of Cas proteins.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子イメージング・ナノ計測 ゲノム工学 タンパク質・酵素化学 1分子計測・操作 バイオイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated) 系は細菌や古細菌がもつ獲得免疫機構であり、ウイルス等による外来核酸の侵入に対する防御機構である [Wright *et al.* Cell 2016]。CRISPR-Cas 系は、以下の3つの段階で構成される。

(1) 適応…細菌内に侵入した外来核酸が Cas1-Cas2 インテグラーゼ複合体により切り出され、CRISPR アレイに新たなスペーサー配列として組み込まれる。

(2) 発現…CRISPR アレイから CRISPR RNA (crRNA) 前駆体が転写され、別の Cas ヌクレアーゼにより成熟型の crRNA へとプロセッシングされる。

(3) 干渉…crRNA は特定の Cas タンパク質とエフェクター複合体を形成し、Cas-crRNA エフェクター複合体は crRNA のもつガイド配列と相補的な外来核酸を認識し切断、分解する。このように、crRNA のもつガイド配列 (スペーサー配列) は過去に感染した外来核酸に由来するので、crRNA は細胞内で分子記憶としてはたらく、CRISPR-Cas 系は外来核酸の再感染を防ぐ。また、CRISPR-Cas 系はエフェクター複合体の構造により、複数の Cas からなるマルチサブユニット複合体のクラス1と、単一の Cas からなるクラス2に分類される。これら CRISPR-Cas 酵素は、原核生物の獲得免疫機構といった生物学的な興味に加え、ゲノム編集技術 (ゲノム DNA の塩基配列を意図した配列へ書き換える技術) への応用という観点から、現代のバイオテクノロジーの分野で最も注目されている酵素群の一つである。2013年、Cas9-RNA 複合体を用いてゲノム DNA の狙った部位を切断することにより、様々な生物のゲノム編集が可能であることが報告されて以来 [Cong *et al.* Science 2013]、これまで困難だった複数の遺伝子の同時ノックアウトや、霊長類におけるノックアウト動物の効率的な作製が可能となり、生命科学・医学研究に革命がもたらされた。実際に2020年ノーベル化学賞に CRISPR/Cas9 の発見と応用が選ばれ、人類の未来に大きな影響を与えうる技術として認識されている。同時に、ゲノム編集技術のさらなる高効率化・高選択性・多機能化を目指し、Cas タンパク質の詳細な分子作動機構の解明が精力的に研究され始めた。特に、結晶構造解析による構造情報がその作動機構の解明に大きく貢献し、構造-機能相関研究を基盤とした変位導入により、異なる機能を有する Cas 変異体が開発され、ゲノム編集ツールとして実際に利用され始めている。しかしながら、多くの Cas タンパク質は、DNA 配列を探索・選択的に結合・切断といったタンパク質の大規模なダイナミックな動きによって機能を発現する。つまり、機能中の Cas タンパク質のダイナミクスにこそ作動機構の本質が隠されており、動的な構造情報なくして分子作動機構の完全理解は果たせない。また、Cas-crRNA エフェクター複合体の中には、多くのタンパク質や核酸と巨大複合体を形成するものもあり、それらが協奏的にはたらくため、その分子機構は複雑となり、依然として不明な点が多い。

これまでに、様々な Cas タンパク質の結晶構造が解かれてきたが、DNA 切断前の立体構造は Cas によって大きく異なることが報告されている [Nishimasu *et al.* Curr. Opin. Struct. Biol. 2016]。しかしながら、DNA 切断前の立体構造は異なるが、DNA 切断機能は同じであるという事実は、DNA 切断における Cas タンパク質のダイナミクスに共通の作動機構があることを示唆しており、機能中のタンパク質のダイナミクスを捉えることこそが、その作動機構の解明に必須といえる。我々の研究グループは、溶液中にある生体分子をナノメートルの空間分解能、かつ、数十ミリ秒の時間分解能で動画撮影できる高速原子間力顕微鏡 (以下、高速 AFM) の研究開発を進めており、これまでに、様々なタンパク質の作動する姿を動画撮影し、その仕組みの解明を果たしてきた [Shibata *et al.* Nat. Nanotech. 2010; Shibata *et al.* Sci. Rep. 2018 等]。また、Cas9 が DNA を探索・結合・切断する一連の過程を捉え、DNA 切断における、Cas9 分子の構造変化を動画撮影することにも成功している [Shibata *et al.* Nat. Commun. 2017]。

## 2. 研究の目的

本研究は、高速 AFM を多種多様な Cas タンパク質に対し網羅的に適用することで、そのはたらく姿を動画撮影し、CRISPR-Cas 酵素群の DNA 切断作動機構の全貌解明を試みる。

## 3. 研究の方法

我々がこれまでに可視化した Cas9 のダイナミクスは、最もよく研究されている化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の SpCas9 である [Shibata *et al.* Nat. Commun. 2017]。これまでに、様々な細菌から多様な Cas9 が発見されてきたが、異なる細菌に由来する Cas9 タンパク質間のアミノ酸配列同一性は低く (約 20%)、多様な立体構造を持つことが報告されてきた。本研究では、様々な細菌に由来する Cas9 に対して高速 AFM を適用し、Cas9 が実際に機能する現場を撮影し、詳細にその分子動態を比較することで、Cas9 における共通の分子作動機構を明らかにする。具体的には、SpCas9 と比べてサイズが小さい *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9)、ター

ゲット DNA 配列に 5'突起末端を作る *Acidaminococcus sp.* Cas12a (AsCas12a)、と *Lachnospiraceae bacterium* Cas12a (LbCas12a)に対して高速 AFM 観察を適用する。これまでは、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES-基板) を用いてマイカ基板表面を正電荷に修飾し、DNA を AFM 基板へ固定していたが、マイカ表面が原子レベルでフラットであることや、各 Cas9 の DNA 切断ドメインが AFM 基板側へ強く吸着してしまい、DNA を切断する瞬間が観察できない可能性を考慮して、様々な手法で AFM 基板表面の修飾を試みる。これまでに、脂質二重膜を高速 AFM 基板に適用した実績があり、正電荷を含む脂質二重膜上に、DNA が吸着することは分かっている。そこで、AFM 基板表面を正電荷を含む脂質二重膜でカバーすることで Cas タンパク質の DNA 切断ドメインが AFM 基板側へ吸着するのを防ぎ、かつ、負電荷をもつ DNA を脂質二重膜上に吸着させる方法を試す。さらに、脂質二重膜の組成をシステマティックに検討することで、最適な実験条件を探し出す。また、高分子化合物を AFM 基板に用いることで、DNA は AFM 基板と結合するが、Cas タンパク質は吸着しない AFM 基板条件を探る。具体的には、所属研究所内の高分子を専門とする化学系の研究者と共同研究を開始し、Cas タンパク質が機能できる AFM 基板条件を探し出す。また、AFM 基板表面にナノメートルサイズの凹凸を作成し Cas タンパク質の DNA 切断ドメインがナノサイズの空間内で自由に動ける基板条件の設計も行う。具体的には、ピラーアレーンや人工ラセン高分子、ポリエチレングリコール(PEG)とポリ-L-リシン(PLL)の混合高分子(METHOXY-POLY(ETHYLENE GLYCOL)-BLOCK-POLY)を AFM 基板へ適用する。

#### 4. 研究成果

SaCas9, AsCas12a, LbCas12a に対する高速 AFM 観察より、Cas タンパク質単体では安定な立体構造を形成せず、フレキシブルな動態をとることが分かった。さらに、Cas タンパク質内部に RNA が結合すると、全ての Cas タンパク質において、安定な立体構造を形成することが分かった。この結果は、RNA を介する Cas タンパク質の立体構造には RNA が重要であることを意味する。また、全ての Cas9 は、一旦標的配列の DNA 上に結合すると、DNA 上をスライドすることなく、強固に DNA 上に結合したままであることが分かった。これらの分子動態は、全ての Cas タンパク質において同様に観察され、エンドヌクレアーゼの RNA, DNA 結合における共通の分子作動機構と考えられる。

次に、各 Cas9 の DNA 切断過程における高速 AFM 観察において、APTES-基板上的 SaCas9 の RNA-DNA 三者複合体では、DNA 切断ドメインが AFM 基板側へ強く結合してしまい、DNA を切断する瞬間を捉えることはできなかった。しかし、チューブ内で DNA 切断反応を開始させ、DNA 切断後もなお、DNA に結合したままかどうかを調べたところ、SpCas9 は DNA 切断後も DNA と強く結合するが、SaCas9 の場合は、DNA から解離することが分かった。この結果は、SaCas9 は SpCas9 より小型であり、Cas9 内部に DNA と結合するサイトが少ないため、切断後の DNA と相互作用が弱くなったためだと考えられる。この DNA 切断後に DNA を離しやすいという事実は、ゲノム編集において、新たな遺伝子の挿入技術 (ノックイン) において有利であると考えられる。また、APTES-基板上において、RNA 結合状態の SaCas9 が標的配列の DNA に結合する様子を捉えた。このとき、SaCas9 は構造を大きく変え、2つのドメインに分かれ、DNA を巻き込むように結合することが分かった。さらに興味深いことに、標的 DNA の近傍に SaCas9 が接近した時のみ、構造変化が起こることが分かった。これらの分子動態は、今後さらなる AFM 基板の条件検討を行い、SaCas9 の DNA 結合における構造変化に由来するのかを確かめる必要がある。次に、AsCas12a における RNA-DNA 三者複合体では、SaCas9 同様に、APTES-基板上では DNA 切断ドメインが AFM 基板側を向き、その動きが制限されることが分かった。また、DNA 切断反応後には DNA へ結合したままの分子が多くみられ、タンパク質内部の DNA 結合サイトの数が DNA との結合を反映することが分かった。また、ピラーアレーンを高速 AFM 基板に適用した場合、観察例は少ないが、AsCas12a が DNA を切断する瞬間を捉えることができた (図3)。しかしながら、高速 AFM 画像の空間分解能が十分ではなく、どのドメインがどのような構造変化により DNA の切断が起きたかを議論するには至っていない。今後、さらに高速 AFM 観察の試行回数を増やし、再現性をとると共に、空間分解能の高い高速 AFM 画像が必要である。また、LbCas12a に対する高速 AFM 観察では、他の Cas9 タンパク質とは異なり、RNA を結合したタンパク質を数多く観察することができなかった。これは、たとえ同じ Cas12a だとしても RNA 結合能が異なることを意味している。

最終年度では、PEG と PLL の混合高分子を高速 AFM 基板に用いることで、DNA は強固に AFM 基板へ固定されるが、Cas タンパク質の機能性ドメインの動きは制限されない AFM 基板条件を作成することに成功し、AsCas12a において、観察例は少ないながら、DNA を切断する瞬間を可視化することができた。本研究は引き続き、様々な AFM 基板条件を検討することで、再現性良く Cas タンパク質が DNA を切断する瞬間を可視化できる実験条件を検討する。また、Cas タンパク質の DNA 切断ドメインとは反対側にビオチンを付加し、AFM 基板をアビジン様タンパク質でカバーすることで、Cas タンパク質の機能を損なわない工夫が必要である。これらの実験条件を引き続き検討することにより、本研究目的である Cas タンパク質の統一的な分子作動機構の解明を目指す予定である。

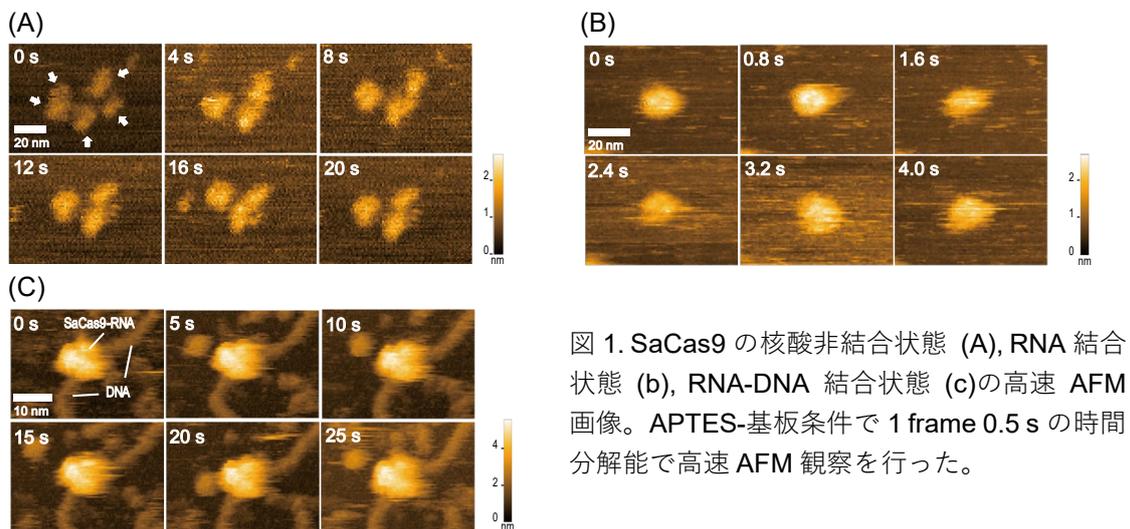


図 1. SaCas9 の核酸非結合状態 (A), RNA 結合状態 (b), RNA-DNA 結合状態 (c) の高速 AFM 画像。APTES-基板条件で 1 frame 0.5 s の時間分解能で高速 AFM 観察を行った。

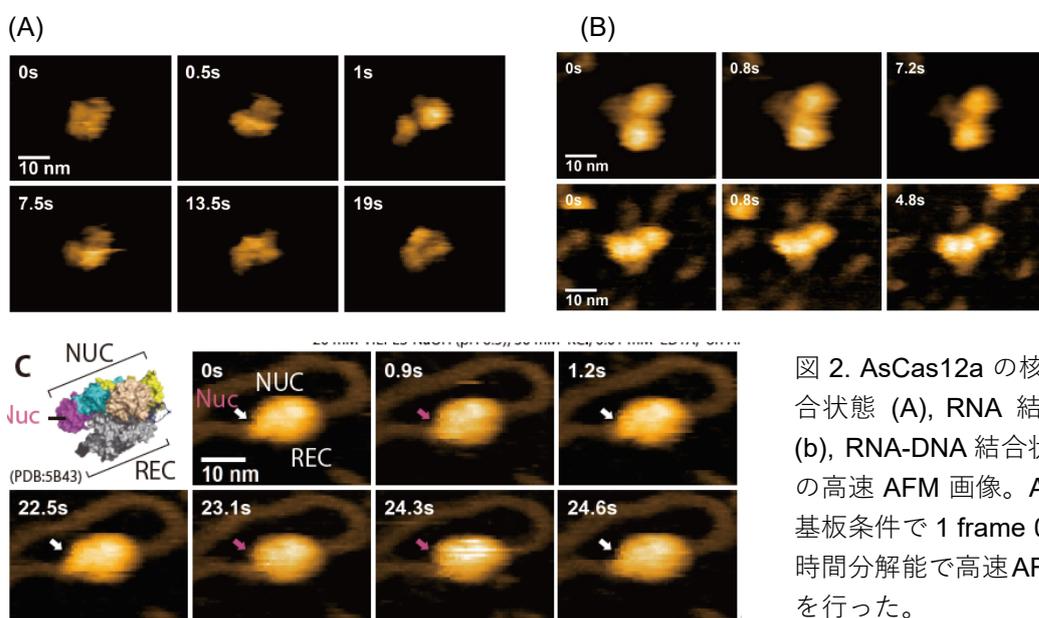


図 2. AsCas12a の核酸非結合状態 (A), RNA 結合状態 (b), RNA-DNA 結合状態 (c) の高速 AFM 画像。APTES-基板条件で 1 frame 0.5 s の時間分解能で高速 AFM 観察を行った。

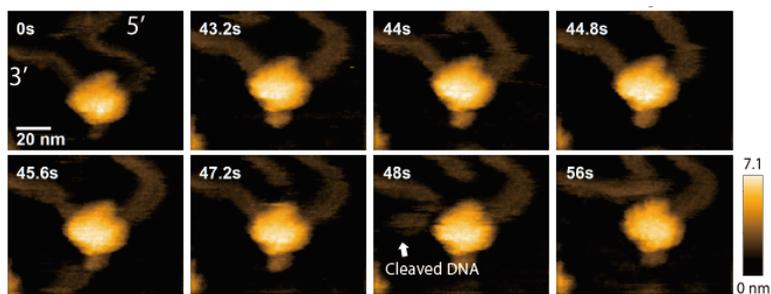


図 3. AsCas12a の RNA-DNA 結合状態の高速 AFM 画像。ピラーアレーン AFM 基板条件で 1 frame 0.5 s で高速 AFM 観察を行った。48 s において切断された DNA が観察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Tetsuya Ueta, Keiichi Kojima, Tomoya Hino, Mikihiro Shibata, Shingo Nagano, Yuki Sudo*	4. 巻 119
2. 論文標題 Applicability of Styrene-Maleic Acid Copolymer for Two Microbial Rhodopsins, RxR and HsSRI.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical journal	6. 最初と最後の頁 1760-1770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.09.026	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 Rina Hirano, Yasuhiro Arimura, Tomoya Kujirai, Mikihiro Shibata, Aya Okuda, Ken Morishima, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama, Hitoshi Kurumizaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Histone variant H2A.B-H2B dimers are spontaneously exchanged with canonical H2A-H2B in the nucleosome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01707-z	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 Katsuya Sakai, Toby Passioura, Hiroki Sato, Kenichiro Ito, Hiroki Furuhashi, Masataka Umitsu, Junichi Takagi, Yukinari Kato, Hidefumi Mukai, Shota Warashina, Maki Zouda, Yasuyoshi Watanabe, Seiji Yano, Mikihiro Shibata, Hiroaki Suga*, and Kunio Matsumoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-019-0285-7	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 W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, S. Okazaki, T. Izume, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Beja, T. Uchihashi, H. Kandori and O. Nureki	4. 巻 574
2. 論文標題 Crystal structure of Heliorhodopsin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 132-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-019-1604-6	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 Mikihiro Shibata, Keiichi Inoue, Kento Ikeda, Masae Konno, Manish Singh, Chihiro Kataoka, Rei Abe-Yoshizumi, Hideki Kandori, and Takayuki Uchihashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Oligomeric states of microbial rhodopsins determined by high-speed atomic force microscopy and circular dichroic spectroscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26606-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 Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Kento Ikeda, Hayato Seki, Keiichi Kojima, Mikihiro Shibata, Izuru Kawamura, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 122
2. 論文標題 High thermal stability of oligomeric assemblies of Thermophilic rhodopsin in a lipid environment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 6945-6953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b04894	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 Katsuya Sakai, Toby Passioura, Hiroki Sato, Kenichiro Ito, Hiroki Furuhashi, Masataka Umitsu, Junichi Takagi, Yukinari Kato, Hidefumi Mukai, Shota Warashina, Maki Zouda, Yasuyoshi Watanabe, Seiji Yano, Mikihiro Shibata, Hiroaki Suga, and Kunio Matsumoto	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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21件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 柴田幹大, 村越秀治
2. 発表標題 高速AFMを用いたCaMKII多量体のCa <sup>2+</sup> 信号積算メカニズムの解明
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による柔軟なタンパク質動態のナノスケール撮影
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷孫斗, 柴田幹大, 上田直子, 角野歩
2. 発表標題 高速 AFM によるハブ毒液由来脂質分解酵素 PLA2の膜認識機構の解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Nano-scale imaging of biological samples using High-speed Atomic Force Microscopy.
3. 学会等名 LIIF2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるクロマチン動態のナノスケール観察
3. 学会等名 第2回クロマチン潜在能領域会議（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Visualizing flexibility in protein structures by high-speed atomic force microscopy.
3. 学会等名 57th日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy visualization of protein flexibility in action.
3. 学会等名 Joint UBI-NanoLSI workshop TRENDS IN MOLECULAR BIOPHYSICS OF LIVING CELLS (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata and Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Signal integration mechanism of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II revealed by High-speed AFM.
3. 学会等名 BPS2020 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuya Ueta, Keiichi Kojima, Tomoya Hino, Mikihiro Shibata, Shingo Nagano & Yuki Sudo
2. 発表標題 Physicochemical properties of the microbial rhodopsin RxR in the membrane-mimicking molecule styrene maleic acid (SMA) copolymer.
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名	W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, S. Okazaki, T. Izume, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P.Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Beja, T. Uchihashi, H. Kandori and O. Nureki
2 . 発表標題	Structure and biophysical characterization of the heliorhodopsin.
3 . 学会等名	57th日本生物物理学会年会
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Shotaro Tsujioka, Hideji Murakoshi, and Mikihiro Shibata
2 . 発表標題	Application of drift elimination method for high-speed AFM images.
3 . 学会等名	57th日本生物物理学会年会
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Satoko Kitazawa, Linhao Sun, Ayako Housaka, Takahiro Watanabe-Nakayama, Hiroki Konno, Mikihiro Shibata, and Shinji Watanabe
2 . 発表標題	Mapping of mechanical property on live cell surface by scanning ion conductance microscope.
3 . 学会等名	57th日本生物物理学会年会
4 . 発表年	2019年

1 . 発表者名	Mikihiro Shibata
2 . 発表標題	Nanoscale imaging of biomolecules by high-speed atomic force microscopy.
3 . 学会等名	International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年	2018年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Watching single proteins in action using high-speed AFM.
3. 学会等名 56th生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Filming single proteins at work using high-speed atomic force microscopy.
3. 学会等名 Irago Conference 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy for nano-scale imaging of biological samples.
3. 学会等名 The 2nd NanoLSI Symposium in London -Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science-（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノスケールイメージング
3. 学会等名 2018日本表面真空学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による揺らいだタンパク質構造のナノスケール撮影
3. 学会等名 非共有結合系の分子科学：計測技術から探る生体分子科学の新展開（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Nanoscale visualization of biomolecules using high-speed atomic force microscopy.
3. 学会等名 6th AIST International Imaging Workshop（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 計測系から見た分子集合体の機能計測-高速AFM計測
3. 学会等名 日本化学会第99秋季年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata and Hideji Murakoshi
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy shows conformational dynamics of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II
3. 学会等名 BPS19 63th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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