

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01771

研究課題名（和文）1分子イメージングによるゲノム編集ツールの分子作動機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of molecular insight into genome editing tools by single-molecule imaging

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、さまざまなゲノム編集ツールCRISPR/Cas9に高速原子間力顕微鏡を適用し、RNAとの結合や標的DNAへの結合と切断を実時空間で可視化することで、Cas9タンパク質がもつDNA切断作動機構の統一的理解を目標とした。SaCas9とFnCas9の核酸非結合状態におけるフレキシブルな構造、RNA結合状態における安定で固い2つのローブ構造、RNA-DNA結合状態におけるヌクレアーゼドメインの動きを可視化することに成功した。また、Cas9タンパク質がもつ共通の構造と異なる分子作動機構を見出し、本研究成果は、ゲノム編集ツールのさらなる高度化へ向けた基盤研究となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、ほとんどのCas9タンパク質におけるRNAの役割は、標的DNAへのガイド役だけでなく、Cas9の立体構造の安定化に重要であることを明らかにした。さらに、DNA切断時のエンドヌクレアーゼの動きは、標的DNAの方向へプレスするような動きや、ななめにスライドする動きがあり、個々のCas9タンパク質は異なる切断作動機構をもつことを明らかにした。社会的意義として、ゲノム編集ツールは現代のバイオテクノロジーの中心ともいえる存在であり、その統一的理解は、ゲノム編集技術のさらなる高度化を可能にし、人類の生命科学の発展に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we employed high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) to examine various CRISPR/Cas genome editing tools, visualizing their interactions with RNA and their binding and cleavage of target DNA in real space and time. Our aim was to achieve a comprehensive understanding of the DNA cleavage mechanism of Cas proteins in action. We successfully visualized the flexible structure of SaCas9 and FnCas9 in their nucleic acid-free states, the stable and rigid two-lobe structure in their RNA-bound states, the fluctuations of the REC domain, and the displacements of the nuclease domain in the RNA-DNA bound states. Additionally, by comparing these results with previous data of SpCas9, we proposed a common structural framework and a distinct molecular mechanism for the operation of Cas9 proteins. We believe that this research is expected to serve as a fundamental basis for the further advancement of genome editing tools.

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

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas) は細菌や古細菌がもつ獲得免疫機構の一種であり、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]。具体的には、以下の3段階で構成される。

・第1段階：適応

細菌内に侵入した外来核酸は 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取り込まれる。

・第2段階：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。

・第3段階：干渉

crRNA は特定の Cas タンパク質と複合体 (エフェクター複合体) を形成し、crRNA のもつガイド配列と相補的な配列をもつ外来核酸を認識し、結合・切断・分解を行う。crRNA のもつガイド配列は、過去に感染した外来核酸に由来するため、外来核酸の再感染を防ぐことができる。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、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1つである。

2013年に 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で、さまざまな生物のゲノム編集が可能であることが報告された [Cong *et al.* Science 2013]。同時に、ゲノム編集技術のさらなる高効率化・高選択性・多機能化を目標に、Cas タンパク質の分子作動機構の解明が精力的に進められ始めた。特に、X 線結晶構造解析や低温電子顕微鏡法による静的な構造情報が、その作動機構の解明に大きく貢献し、構造と機能との相関を基盤にし、アミノ酸残基の変異により、異なる機能を有する Cas 変異体が次々と開発された。しかしながら、多くの Cas タンパク質の機能発現には、タンパク質の大規模な動きが必要であると予想される。つまり、機能中の Cas タンパク質の構造変化にこそ作動機構の本質が隠されており、分子作動機構の完全理解の達成には、動的な構造情報も必要であると考えられる。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。

我々はこれまでに、Cas9 タンパク質の中で最もよく研究されている化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の SpCas9 に高速 AFM を適用し、RNA 結合による安定な立体構造の形成や、標的 DNA 結合状態におけるヌクレアーゼドメインの揺らいだ構造、Mg 存在化での DNA 切断時の構造変化を可視化することに成功してきた [Shibata *et al.* Nat. Commun. 2017]。一方で、さまざまな細菌から多種多様な 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 %)、それらの 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。

2. 研究の目的

本研究は、高速 AFM を多種多様な Cas タンパク質に網羅的に適用し、そのはたらく現場を実時空間で動画撮影することで、CRISPR-Cas 酵素群の DNA 切断作動メカニズムの全貌解明を目的とする。

3. 研究の方法

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来の Cas9 およびガイド RNA は大腸菌を用いて発現した。具体的には、SaCas9 は大腸菌 Rosetta2 (DE3) (Novagen) で発現し、その後、Ni-NTA Superflow (QIAGEN) および HiTrap SPHP (GE Healthcare) のクロマトグラフィーを用いて精製した。98 ヌクレオチドをもつガイド RNA は、T7 RNA ポリメラーゼを用いてインビトロで転写し、その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した。600 塩基対のターゲット DNA は、21 ヌクレオチドのターゲット配列および CAGAAT PAM を含む pUC19 プラスミドをテンプレートとして PCR 増幅し、その後、Wizard DNA Clean-Up System (Promega) を使用して精製した。

apo-SaCas9、SaCas9-sgRNA、および SaCas9-sgRNA-dsDNA の AP-mica 上での HS-AFM 観察のために、マイカ表面を 0.01% (3-アミノプロピル) トリエトキシシラン (APTES) (信越化学工業) で 3 分間処理した。Cas9 試料は、約 10 nM の濃度で 3 分間のインキュベーションにより AP-mica 表面に弱く吸着させた。SaCas9-RNA 複合体。および、SaCas9-RNA-DNA 複合体は、試験管内で

あらかじめ結合させた (SaCas9:sgRNA:dsDNA = 1:1:1 のモル比)。apo-SaCas9 および SaCas9-sgRNA の高速 AFM 観察は、20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 10% グリセロール、および 0.1 mM EDTA のバッファー中で行った。SaCas9-RNA-DNA 複合体の高速 AFM 観察は、20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 30 mM KCl, 10% グリセロール、および 0.1 mM EDTA のバッファー中で行った。また、すべての高速 AFM 実験は室温で行われた。

4. 研究成果

最初に、SaCas9 単体 (RNA も DNA も結合していない状態) での高速 AFM 観察を行った。Cas9 タンパク質はいくつかのドメインが正しく折り畳まれることで立体構造を形成する (図 1)。ところが、SaCas9 単体では、安定な立体構造をとらず、非常に柔軟な構造をとることが高速 AFM 観察により明らかとなった (図 2)。その一方で、SaCas9 を標的 DNA 配列まで運ぶ役割を担う sgRNA が結合した状態 (SaCas9-RNA 複合体) では、2 つの球状ローブ (複数のドメインの集合体) が互いに向き合った構造が観察された (図 3)。また、これら 2 つのローブは、閉じたり開いたりする動きを持つことが分かった (図 3 中の 4.0 秒と 4.6 秒の画像)。この sgRNA による SaCas9 の立体構造の安定化は、SpCas9 でも観察されており、sgRNA が Cas タンパク質の立体構造の安定化に重要な役割を担うことを強くサポートしている。また、SaCas9 と SpCas9 に限らず、本研究期間を通して試みた他の種の Cas タンパク質 (FnCas9, AsCas12, LbCas12a) においても、同様の結果が認められ、sgRNA が Cas タンパク質全般における安定な立体構造の形成に重要であることを強く示唆している (論文投稿準備中)。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、強固に標的配列に結合したままであることも分かった。このような分子動態は、Cas タンパク質を含めたエンドヌクレアーゼの共通の分子作動機構と考えられる。

次に、標的 DNA に結合した SaCas9-RNA-DNA 結合状態では、三つ葉のクローバーのような構造が観察され、全てのドメインが安定な動態を示すことが分かった (図 4)。過去に報告した SpCas9 の場合では、DNA 切断機能をもつ HNH ドメインがフラフラとよく動き、揺らぎの大きなドメインであることが分かっていた。ところが、SaCas9 ではそのような様子は観察されず、どのドメインも固く安定した立体構造を形成することが分かった。さらに、Mg を高速 AFM 観察バッファー内に添加し、DNA 切断反応を開始させると、HNH ドメインが切断部位までわずかに移動し (0.5 nm 程度)、上側に位置するドメインと HNH ドメインの両方で、標的 DNA を挟むような構造変化を生じること明らかとなった (図 5)。加えて、SaCas9 は、DNA 切断後すぐに DNA から離れる様子も捉えることに成功した (図 5)。これまでの細胞を用いた研究により、SaCas9 は一分子において何度も DNA を切断できる特徴 (ターンオーバー) を持つことが報告されており、高速 AFM で可視化した、DNA 切断後にすぐ離れる現象は、SaCas9 のターンオーバー機能をサポートする結果であると考えられる。さらに、試験管内であらかじめ 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 切断後においても DNA と強く結合しているが、SaCas9 の場合は、DNA から解離する分子が多いことが分かった。この結果は、SaCas9 は SpCas9 より小型であり、タンパク質内部に 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り、すぐに DNA と解離するというメカニズムが考えられる。この DNA 切断後に DNA から解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) に有利であると考えられる。

次に、高速 AFM 基板上で SaCas9-RNA 複合体が標的配列 DNA へ結合する瞬間の画像も捉えることに成功した。このとき、SaCas9 は構造を大きく変え、2 つのローブに分かれ、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 の近傍約 10 nm 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、今後さらなる高速 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わかめる必要がある。

このように、SaCas9 単体、SaCas9-RNA 複合体、および、SaCas9-RNA-DNA 複合体による DNA の切断といった一連の過程を撮影した高速 AFM 動画と、これまでに報告した SpCas9 との高速 AFM 動画の比較から、CRISPR/Cas9 による DNA 切断ダイナミクスの統一的理解を得ることができた [Puppulin *et al.* *Acs Nano* 2023]。また、本研究で仮定した標的 DNA 探索の分子メカニズムを検証するため、他の種に由来する Cas9 や、その変異体を含めたさらなる実験結果の積み上げが必要である。本研究により得られた動的な構造情報は、より安全なゲノム編集ツール開発の基盤となることが期待される。

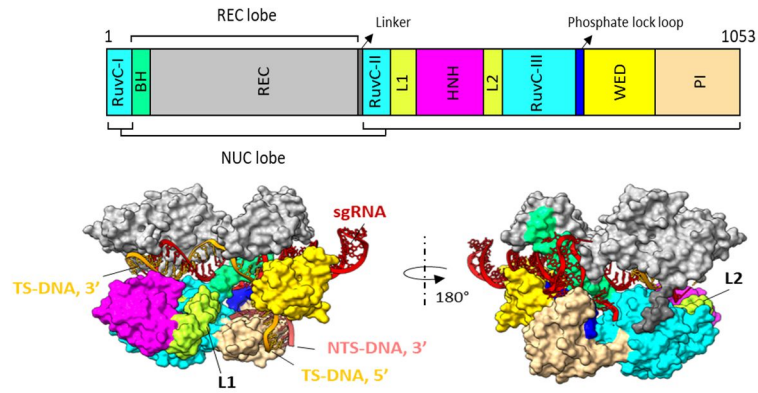


図 1. SaCas9 のドメイン構造（上）と結晶構造（下）
SaCas9 はいくつかの部分（ドメイン）から構成される。HNH および RuvC と呼ばれるドメインが「ハサミ」としてはたらき、二本鎖 DNA を切断する。

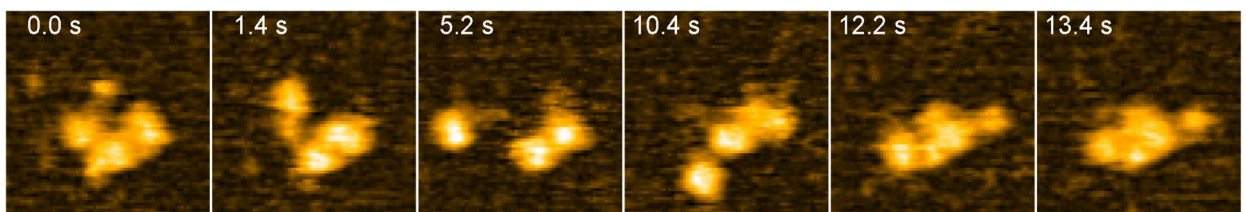


図 2. SaCas9 単体の高速 AFM 動画

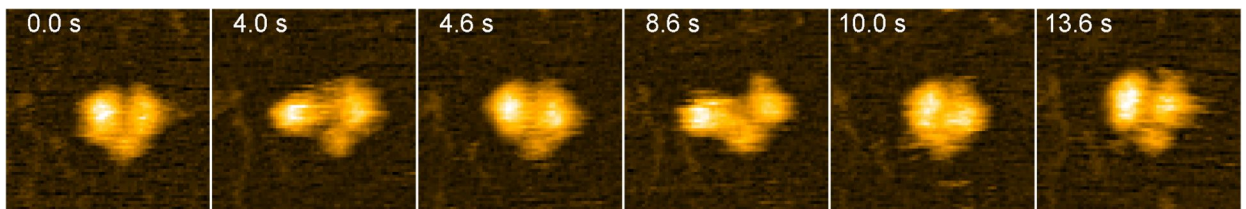


図 3. SaCas9-RNA 複合体の高速 AFM 動画

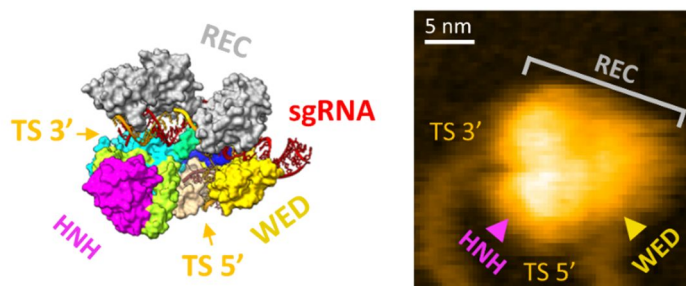


図 4. SaCas9-RNA-DNA 複合体の結晶構造（左）と高速 AFM 画像（右）の比較

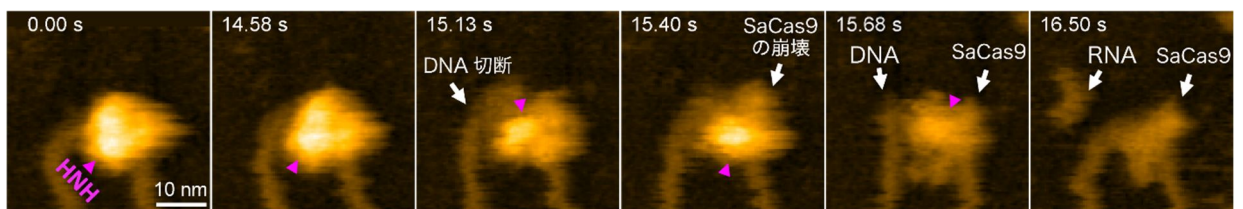


図 5. SaCas9-RNA-DNA 複合体の DNA 切断時の高速 AFM 画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sumino Ayumi, Zhao Yimeng, Mukai Daichi, Sumikama Takashi, Puppulin Leonardo, Hattori Motoyuki, Shibata Mikihiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Antithetic effects of agonists and antagonists on the structural fluctuations of TRPV1 channel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2301013120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2301013120	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 Tsujioka Shotaro, Sumino Ayumi, Nagasawa Yutaro, Sumikama Takashi, Flechsig Holger, Puppulin Leonardo, Tomita Takuya, Baba Yudai, Kakuta Takahiro, Ogoshi Tomoki, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Murakoshi Hideji, Shibata Mikihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Imaging single CaMKII holoenzymes at work by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadh1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adh1069	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 Sumino Ayumi, Sumikama Takashi, Shibata Mikihiro, Irie Katsumasa	4. 巻 14
2. 論文標題 Voltage sensors of a Na ⁺ channel dissociate from the pore domain and form inter-channel dimers in the resting state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43347-3	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 Sumino Ayumi, Sumikama Takashi, Zhao Yimeng, Flechsig Holger, Umeda Kenichi, Kodera Noriyuki, Hattori Motoyuki, Shibata Mikihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 High-speed AFM reveals fluctuations and dimer splitting of the N-terminal domain of GluA2- 2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.12.19.572481	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Katsuya Sakai*, Nozomi Sugano-Nakamura, Emiko Mihara, Nichole Marcela Rojas-Chaverra, Sayako Watanabe, Hiroki Sato, Ryu Imamura, Dominic Chih-Cheng Voon, Itsuki Sakai, Chihiro Yamasaki, Chise Tateno, Mikihiro Shibata, Hiroaki Suga, Junichi Takagi* & Kunio Matsumoto*	4. 巻 7
2. 論文標題 Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocyclic peptides into fragment crystallizable regions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat. Biomed. Eng	6. 最初と最後の頁 164-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-022-00955-6	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 -

1. 著者名 Shin Morioka, Shoko Sato, Naoki Horikoshi, Tomoya Kujirai, Takuya Tomita, Yudai Baba, Takahiro Kakuta, Tomoki Ogoshi, Leonardo Puppulin, Ayumi Sumino, Kenichi Umeda, Noriyuki Kodera, Hitoshi Kurumizaka, & Mikihiro Shibata*	4. 巻 23
2. 論文標題 High-speed atomic force microscopy reveals spontaneous nucleosome sliding of H2A.Z at the subsecond timescale.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nano Lett.	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 Leonardo Puppulin*, Junichiro Ishikawa, Ayumi Sumino, Arin Marchesi, Holger Flechsig, Kenichi Umeda, Noriyuki Kodera, Hiroshi Nishimasu, & Mikihiro Shibata*	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 Leonardo Puppulin*, Daiki Kanayama, Naohiro Terasaka, Katsuya Sakai, Noriyuki Kodera, Kenichi Umeda, Ayumi Sumino, Arin Marchesi, Wei Weilin, Hideo Tanaka, Takeshi Fukuma, Hiroaki Suga, Kunio Matsumoto, & Mikihiro Shibata*	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/acсами.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 Koichiro E. Kishi et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 672-689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.01.007	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

〔学会発表〕 計40件 (うち招待講演 23件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMで切り拓くナノ生命科学
3. 学会等名 バイオテクノロジー研究センターシンポジウム「光といのち」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 タンパク質の1分子イメージングで切り拓くナノ生命科学
3. 学会等名 埼玉大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Single-molecule visualization of Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase II by HS-AFM.
3. 学会等名 NanoBioCom2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy reveals the activity-dependent structural dynamics of CaMKII.
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMによるタンパク質の1分子イメージング
3. 学会等名 第73回構造生物応用研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Activity-dependent structural dynamics of CaMKII visualized by High-speed atomic force microscopy.
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of the Australian Society of Biophysics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Application of high-speed atomic force microscopy to neuroscience.
3. 学会等名 The 19th NanoLSI colloquium (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMによるCaMKIIの1分子イメージング
3. 学会等名 第2回日本神経化学会若手KYOUEN (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柴田幹大、角野歩、炭竈享司
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜タンパク質のナノスケールイメージング
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Taisei Suzuki, Hideji Murakoshi, and Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy revealed alternative interactions between CaMKII holoenzymes depend on their phosphorylation.
3. 学会等名 the 7th NanoLSI symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森岡 新、佐藤 祥子、大石匠美、畠澤 卓、堀越 直樹、鯨井 智也、滝沢由政、胡桃坂 仁志、柴田 幹大
2. 発表標題 Direct visualization of nucleosome sliding in histone variants and tailless nucleosomes by HS-AFM.
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松島啓介, 村越秀治, 柴田幹大
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy revealed structural dynamics of CaMKII at single-molecule level.
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚田秀明, 柴田幹大
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy reveals functional dynamics of Francisella novicida Cas9.
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木大晴, 村越秀治, 柴田幹大
2. 発表標題 Interaction between Intra CaMKII holoenzymes revealed by high-speed AFM.
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 大晴, 炭電 享司, 村越 秀治, 柴田 幹大
2. 発表標題 高速AFMによるスパイン構造的可塑性におけるCaMKII の構造的役割の解明
3. 学会等名 R5年度生物物理学中部支部討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松島 啓介, 村越 秀治, 柴田 幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いたCaMKII の活性依存的なキナーゼドメイン複合体の解析
3. 学会等名 R5年度生物物理学中部支部討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今田涼太, 柴田幹大
2. 発表標題 ヌクレオソーム動態の安定な高速AFM観察条件の検討
3. 学会等名 R5年度生物物理学中部支部討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 篠宮 永人, 柴田 幹大
2. 発表標題 高速AFMによる神経ペントラクシンNP1の多量体構造解析
3. 学会等名 R5年度生物物理学中部支部討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 クロマチンリモデリングの実時空間イメージング
3. 学会等名 新学術領域研究「クロマチン潜在能」第5回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2022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ヌクレオソームの1分子ナノ動態撮影
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022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ヒストンバリエントのナノ動態観察
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いた1分子ナノ生命科学
3. 学会等名 第39回分子病理学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 タンパク質の構造変化をリアルタイムかつナノスケールで可視化する
3. 学会等名 物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線：理論と実験との密な協働」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 原子間力顕微鏡が切り拓くナノ生命科学
3. 学会等名 がん研究早期体験プログラム がん研EEP 授業編 『生命科学・医学研究の最先端と未来』（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMによるタンパク質複合体のナノ動態・機能相関の解明
3. 学会等名 名工大セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Application of high-speed atomic force microscopy to Nano life science
3. 学会等名 ナノ精密医学・理工学卓越大学院プログラム プレプログラム, (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) for cancer research
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata and Takayuki Uchihashi
2. 発表標題 Oligomeric states of microbial rhodopsins in lipid bilayer determined by high-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 19th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Correlation between function and mobility of protein complex revealed by HS-AFM
3. 学会等名 NanoLSI第6回国際シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森岡 新, 佐藤祥子, 堀越直樹, 鯨井智也, 胡桃坂仁志, 柴田幹大
2. 発表標題 Direct imaging of spontaneous sliding along DNA of H2A.Z.1 nucleosome by high-speed atomic force microscopy.
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 Leonardo Puppulin, Junichiro Ishikawa, Hiroshi Nishimasu, Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Target DNA binding dynamics of Staphylococcus aureus Cas9 as revealed by high-speed atomic force microscopy.
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 塚田秀明, 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるFnCas9の機能動態解析
3. 学会等名 R4年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松島啓介, 村越秀治, 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いたCaMKII の動態解析
3. 学会等名 R4年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichiro E. Kishi, et al.
2. 発表標題 Cryo-EM structural analysis of pump-like channelrhodopsin ChRmine and structure guided engineering.
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 柴田幹大
2. 発表標題 クロマチンリモデリングの実時空間イメージング
3. 学会等名 新学術領域研究「クロマチン潜在能」第4回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Visualizing single-molecule dynamics of protein complexes by high-speed AFM.
3. 学会等名 「全原子・粗視化分子動力学による細胞内分子動態の解明」ウェブセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田幹大, 服部素之, 角野 歩
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜中TRPV1 チャネルの動態観察
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 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田幹大, 服部素之, 角野 歩
2. 発表標題 Structural dynamics of the cytoplasmic domain of transient receptor potential vanilloid1(TRPV1) in lipid bilayer observed by high speed atomic force microscopy (HS-AFM).
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤津綜隆, 平野里奈, 柴田幹大, 鯨井智也, 滝沢由政, 江原晴彦, 関根俊一, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 ヒストンバリエントH2A.Bによるヌクレオソーム構造変化が転写に与える影響の解明
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMによる記憶分子CaMKIIの構造ダイナミクス観察
3. 学会等名 ブルカージャパン表面計測事業部主催【第2回】高速AFMオンラインシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

柴田幹大研究室 https://bioafminfi.w3.kanazawa-u.ac.jp/ 小型CRISPR-Cas9がDNAを切断する瞬間を撮影！ https://nanolisi.kanazawa-u.ac.jp/highlights/24978/ 柴田幹大研究室 https://bioafminfi.w3.kanazawa-u.ac.jp/

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