

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301  
 研究種目：基盤研究(A)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24241048  
 研究課題名(和文) 高速AFM/一分子蛍光複合機で明らかにするリング状ATPaseの協同的構造変化  
  
 研究課題名(英文) Cooperative Conformational Dynamics of Ring-Shaped ATPase studied by High-Speed AFM/Fluorescence Microscopy  
  
 研究代表者  
 内橋 貴之(UCHIHASHI, TAKAYUKI)  
  
 金沢大学・数物科学系・教授  
  
 研究者番号：30326300  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：高速原子間力顕微鏡(AFM)によってタンパク質の凝集を解く分子シャペロンClpBの構造ダイナミクスを観察した。ClpB 6量体リングの形状がATP濃度依存的に大きく揺らぐことを見出した。このリング構造の揺らぎがClpBの脱凝集活性に寄与していることを示唆する結果が得られた。高速AFM/蛍光顕微鏡複合機の性能を向上し、高速AFMと蛍光顕微鏡で一分子の同視野かつ同時観察が可能となった。回転モータータンパク質であるV1-ATPaseにおいて回転軸であるDFサブユニットがなくても、回転子リング内でATP加水分解によるサブユニットの構造変化が協同的に一方方向へ伝搬していくことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We observed conformational dynamics of a molecular chaperone ClpB which disaggregates denatured proteins. We found that the hexameric ring of the TC1pB dynamically changes between symmetric, asymmetric and broken ring. Also it was indicated that the dynamic fluctuation of the ring structure is essential for the chaperon activity of ClpB.  
 We also improved combined system high-speed AFM and fluorescent microscopy. The combined system enabled simultaneous single-molecule imaging with high-speed AFM and fluorescence microscopy. We succeeded in observing processive movement of enzymatic chitinase with fluorophores along a chitin fibril and further conformational change of F1-ATPase and binding/dissociation of fluorescent-ATP analogue. We have applied high-speed AFM to investigate cooperative conformational change of V1-ATPase without the shaft (DF subunit). We found that conformational change of the A subunit propagates unidirectionally in the hexameric ring even without the shaft.

研究分野：生物物理

キーワード：一分子イメージング 走査型プローブ顕微鏡 高速原子間力顕微鏡 タンパク質 分子シャペロン 構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

リング状オリゴマーを形成する ATPase は原核細胞からヒトに至るまで普遍的に存在する。特に、AAA+ファミリー ATPase に属するタンパク質は、特徴的なヌクレオチド結合モチーフを持つ一群のタンパク質で、その機能はタンパク質のアンフォールディング・脱凝集、膜融合、DNA の複製・転写など多岐にわたっている。これらの機能は、ATP 加水分解により駆動されるサブユニットの構造変化を通じて発揮されると考えられている。これまで、結晶構造解析や電子顕微鏡、生化学的手法により、各サブユニットの ATP 加水分解はサブユニット間で協調して行われていることが示唆されてきたが、一分子のサブユニットレベルでリアルタイムに可視化された例はない。協同的な加水分解には、同調型、回転型、連続型などいくつかの様式が提案されているが (Ogura ら, *Genes Cells* 2001)、実際にどの様式でサブユニット間の協調を取っているか明確な回答は得られていない。さらには、その構造変化が具体的にどのように機能と結びついているのかも明らかでない。

AAA+タンパク質に高速 AFM を適用することで、リング内サブユニットの協同的構造変化がどのように起こっているか、また、その構造変化と基質の認識・結合との相関を直接示すことが可能であると期待される。さらに、現在開発中の高速 AFM/蛍光顕微鏡の高性能化により ATP の結合・加水分解が構造変化に変換される過程に関して重要な知見が得られるものと期待される。

## 2. 研究の目的

**I. ClpB の構造ダイナミクスの観察:** AAA+シャペロン ClpB は、他の分子シャペロンである DnaK と協力して、凝集したタンパク質を再び活性のある状態にまで再生する脱凝集活性を持つ。ClpB の作用機構として、ATP のエネルギーを用いて凝集タンパク質を 6 量体リング中央の孔に糸通しのように引き込んでほぐすことが想定されている。電子顕微鏡像の単粒子解析 (Lee ら, *Mol. Cell*, 2007) や生化学的解析 (Watanabe ら, *J. Biol. Chem.* 2005) により、M ドメインのプロペラ状の構造やリング中央の孔の大きさが、ヌクレオチドの結合状態に応じて大きく変化することが明らかにされている。こうした構造変化が凝集タンパク質の認識と結合、リング中央の孔への引き込みに関与すると考えられるが、実際にどのような構造変化が生じ、構造変化が基質の脱凝集をどのように起こしているのか、その詳細は明らかでない。高速 AFM で M ドメインやリング中央孔を観察し、これらの構造変化がどのような協同性を持って起こるのか、さらにはこれらの構造変化が DnaK との協同や凝集タンパク質の認識・結合をどのように制御しているかを明らかにする。

**II. F<sub>1</sub>-ATPase の構造動態と ATP 結合の同時観察:** 我々は高速 AFM と蛍光顕微鏡の同時観察可能な装置を開発しており、光学顕微鏡ステージ上で高速 AFM を動作させることに成功している。この装置の高性能化を図り、一分子からの蛍光と構造動態を同時に観察し、蛍光性ヌクレオチドの結合数や結合・解離とサブユニットの構造変化のタイミングを解析する。これにより ATP の化学反応が力学的変化に変換される過程を明らかにする。

**III. リング状 ATPase の協同的構造変化の共通性:** V<sub>1</sub>-ATPase と F<sub>1</sub>-ATPase は構造、機能ともに高い類似性を持つが、V<sub>1</sub>-ATPase でも F<sub>1</sub>-ATPase と同じように、回転子がない六量体リング内でサブユニットのヌクレオチド状態とそれに共役した構造変化が協同的に回転伝搬するかどうかは自明ではない。高速 AFM で ATP 加水分解による回転子がない V-ATPase を観察し、構造変化のリング内協同性の有無を検証する。

## 3. 研究の方法

**I. ClpB の構造ダイナミクスの観察:** 本研究課題のメインターゲットとして好熱菌由来の ClpB を用いる。基板への固定のために AAA1 あるいは AAA2 ドメイン側にビオチンタグを導入した 2 種類の試料を調製し、ストレプトアビジンコートしたマイカ基板に分子を固定する。高分解能観察可能な試料条件の探索後、ATP 濃度を変えて構造変化の観察を行う。さらに、AAA-1 および AAA-2 に ATP 結合もしくは加水分解活性を阻害した変異を導入し、構造変化のリング内協同性とヌクレオチド状態の相関を明らかにする。

**II. 高速 AFM/蛍光顕微鏡複合機の高性能化:** 高速 AFM と全反射型蛍光顕微鏡による一分子同時観察を可能にする。これにより、蛍光性 ATP アナログを用いて、F<sub>1</sub>-ATPase へのヌクレオチドの結合の様子を観察する。

**III. リング状 ATPase の協同的構造変化の共通性:** F<sub>1</sub>-ATPase と同様の回転モータータンパク質である V<sub>1</sub>-ATPase についてサブユニットの構造変化が回転伝搬するかについて高速 AFM による検証を行う。

## 4. 研究成果

**I. ClpB の構造ダイナミクスの観察:** ビオチン化 ClpB を 2mM 濃度の ATP 存在下、55°C で 2 分間インキュベーションして 6 量体化したのち、ストレプトアビジン基板に配向制御吸着させて高速 AFM 観察を行った。その結果、基板に ClpB6 量体を固定した場合、ほとんど全ての分子でリングが切断されていることが判明した。基板や観察溶液の塩濃度など様々な条件を検討したところ、ClpB6 量体リングは非常に不安定で、基板への強い吸着によりリング構造を維持できずに壊れることがわかった。その後、マイカ基板に分子を弱

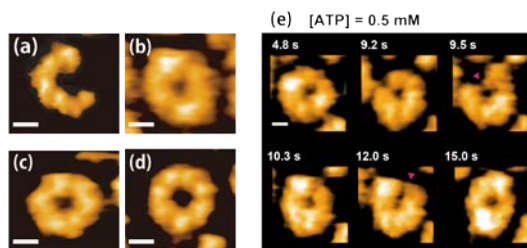


図1 好熱菌 ClpB の高速 AFM 観察。(a) – (d) は 0.5mM-ATP 濃度で観察された ClpB 多量体の構造。(a), (b), (c), (d)は、それぞれ切れたリング、非対称 6 量体リング、円対称 6 量体リング、円対称 7 量体リングを示している。スケールバーは 5 nm。(e) 0.5mM で観察された ClpB 6 量体のダイナミクス (0.1 s/frame)。矢印はリングが切れていること位置を示している。

く吸着させ、観察溶液の塩濃度を最適化することでリング構造が観察できる条件を見出した。高速 AFM 観察の結果、ClpB 6 量体は切れたリング (図 1a) やリング内の 2 個のサブユニット位置が高くなった楕円形の非対称リング構造 (図 1b) が多く観察された。電子顕微鏡観察により報告されているような円対称 6 量体リング (図 1c) は非常に少なく、また、円対称なリングの多くは七量体であった (図 1d)。ATP 濃度を変えて測定したところ、比較的低い ATP 濃度 (100  $\mu$ M) では切れたリングが 70% 近くを占め、ATP 濃度を高くすると切れたリング構造の割合が減り、非対称なリング構造の割合が増加した。一方、対称なリングの割合は ATP 濃度によらず 5% 程度であった。このことから、ClpB の 6 量体リングのメジャーな構造は非対称なリング構造であることがわかった。

ATP $\gamma$ S の存在下では対称リングの割合が 20% 近くまで増加した。また、AAA-1 と AAA-2 ドメインの両方で ATPase を欠損した変異体 (E279Q/E678Q) では、60% 近くの割合で対称な 6 量体リングが観察された。一方、ADP や AMPPNP 存在下で野生型 ClpB を観察したところ、60% 以上の分子が切れたリング構造であった。これらのことから、ATP の結合により 6 量体リングは円対称なリングを形成するが、ATP の加水分解によりリング内に歪が生じてリングが非対称化もしくは切断が起こるのではないかと考えられる。非対称リングでは円内の対向した位置 2 ヶ所のサブユニットの高さが高く観察されることから、ATP 加水分解にリング内協同性が示唆された。ATP 存在下で ClpB6 量体のダイナミクスを観察したところ、非対称なリング構造が切れたり、リング構造が復元したりして大きく揺らいでいる様子が観察された (図 1e)。ATP 濃度を高くすると、構造揺らぎの頻度も高くなったことから、リングの構造揺らぎは ATP 依存的に生じているものと考えられる。

AAA-1 もしくは AAA-2 のどちらか一方の ATPase 活性を欠損した変異体を観察したところ、リング構造の揺らぎは AAA-2 ドメイン

への ATP の結合と加水分解によるものであることがわかった。また、脱凝集活性が低下した変異体 (E423A) では対称リングが多く観察され、脱凝集活性を向上した変異体 (Y494D) ではほとんどの 6 量体は切れたリング構造であった。このことから、6 量体内部の歪によるリングの非対称化、切断と復元のダイナミックな動きが脱凝集活性に寄与していることが示唆された。

II. 高速 AFM/蛍光顕微鏡複合機の高性能化: 全反射型蛍光顕微鏡と高速 AFM の同視野かつ同時観察を 1 分子スケールで行えるように装置の改良を行った。F<sub>1</sub>-ATPase の固定子リングにおいてトルクを発生する  $\beta$  サブユニットの構造変化とその回転伝搬と同時に蛍光性 ATP の結合を同時観察することにも成功した。

III. V<sub>1</sub>-ATPase の協同的構造変化の観察: A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 複合体の N 末端側を His-Tag で標識した試料を調製し、マイカ基板を Ni で処理してから基板に固定した。ヌクレオチドが無い場合、3 つの輝点からなる三角形の構造が観察され、その像はシミュレーション像によく一致し、ヌクレオチド非結合型でも非対称な構造をとっていることが確認でき、シミュレーションと AFM 像に良い一致が見られた。

次に、10  $\mu$ M の ATP $\gamma$ S 濃度で観察を行ったところ、open 構造にある A サブユニットの位置が反時計回りに順番に伝搬する様子が観察できた。この結果から、F<sub>1</sub>-ATPase の  $\alpha_3\beta_3$  複合体と同様に、回転子がなくてもリング内での協同的構造変化が生じることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. T. Yamasaki, Y. Oohata, T. Nakamura and YH. Watanabe, "Analysis of the cooperative ATPase cycle of the AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus* by using ordered heterohexamers with an alternating Subunit Arrangement", *J. Biol. Chem.* **290**(15), 9789-9800 (2015) (査読有), DOI: 10.1074/jbc.M114.617696.
2. R. Iino, H. Ueno, Y. Minagawa, K. Suzuki, T. Murata, "Rotational mechanism of *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase by crystal-structure and single-molecule analyses", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31**, 49-56 (2015) (査読有), DOI: 10.1016/j.sbi.2015.02.013.
3. K. Takeda, T. Uchihashi, H. Watanabe, T. Ishida, K. Igarashi, N. Nakamura, H. Ohno, "Real-time dynamic adsorption processes of cytochrome c on an electrode observed through electrochemical high-speed atomic

- force microscopy", *PLoS ONE* **10**(2), e0116685 (2015) (査読有), DOI:10.1371/journal.pone.0116685.
4. M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando, R. Yasuda, "Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells", *Sci. Rep.* **5**, 8724 (2015) (査読有), DOI: 10.1038/srep08724.
  5. S. Enoki, R. Iino, Y. Niitani, Y. Minagawa, M. Tomishige and H. Noji, "High-speed angle-resolved imaging of single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision", *Anal. Chem.* **87**, 2079-2086 (2015) (査読有), DOI: 10.1021/ac502408c.
  6. A. Yukawa, R. Iino, R. Watanabe, S. Hayashi and H. Noji, "Key chemical factors of arginine finger catalysis of F<sub>1</sub>-ATPase clarified by an unnatural amino acid mutation", *Biochemistry* **54**, 472-480 (2015) (査読有), DOI: 10.1021/bi501138b.
  7. M. Imamura, T. Uchihashi, T. Ando, A. Leifert, U. Simon, A. D. Malay and J. G. Heddl, "Probing structural dynamics of an artificial protein cage using high-speed atomic force microscopy", *Nano Lett.* **15**, 1331-1335 (2015) (査読有), DOI: 10.1021/nl5045617.
  8. Y. Shibafuji, A. Nakamura, T. Uchihashi, N. Sugimoto, S. Fukuda, H. Watanabe, M. Samejima, T. Ando, H. Noji, A. Koivula, K. Igarashi, and R. Iino, Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma Reesei* cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cell. *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065 (2014) (査読有), DOI: 10.1074/jbc.M113.546085.
  9. Y. Nakazaki and YH Watanabe, "ClpB chaperone passively threads soluble denatured proteins through its central pore", *Genes Cells* **19**(12), 891-900 (2014) (査読有), DOI: 10.1111/gtc.12188.
  10. H. Ueno, Y. Minagawa, M. Hara M, S. Rahman, I. Yamato, E. Muneyuki, H. Noji, T. Murata and R. Iino, "Torque generation of *Enterococcus hirae* V-ATPase", *J. Biol. Chem.* **289**, 31212-31223 (2014) (査読有), DOI: 10.1074/jbc.M114.598177.
  11. T. Ando, T. Uchihashi, and S. Scheuring, "Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy", *Chem. Rev.* **114**(6), 3120-3188 (2014) (査読有), DOI: 10.1021/cr4003837.
  12. A. Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, T. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, and M. Samejima, "Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose", *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4584-4592 (2014) (査読有), DOI: 10.1021/ja4119994.
  13. K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, "Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nat. Commun.* **5**, 3975 (2014) (査読有), DOI: 10.1038/ncomms4975.
  14. N. Yilmaz, T. Yamada, P. Greimel, T. Uchihashi, T. Ando, and T. Kobayashi, "Real-time visualization of assembling of a sphingomyelin-specific toxin", *Biophys. J.* **105**, 1397-1405 (2013) (査読有), DOI: 10.1016/j.bpj.2013.07.052.
  15. R. Iino and H. Noji, "Intersubunit coordination and cooperativity in ring-shaped NTPases", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 229-234 (2013) (査読有), DOI: 10.1016/j.sbi.2013.01.004.
  16. S. Fukuda, T. Uchihashi, R. Iino, Y. Okazaki, M. Yoshida, K. Igarashi, and T. Ando, "High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope", *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 073706 (2013) (査読有), DOI: 10.1063/1.4813280.
  17. Y. Minagawa, H. Ueno, M. Hara, Y. Ishizuka-Katsura, N. Ohsawa, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, I. Yamato, E. Muneyuki, H. Noji, T. Murata and R. Iino "Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V<sub>1</sub>-ATPase", *J. Biol. Chem.* **288**, 32700-32707 (2013) (査読有), DOI: 10.1074/jbc.M113.506329.
  18. H. Watanabe, T. Uchihashi, T. Kobashi, M. Shibata, J. Nishiyama, R. Yasuda, and T. Ando, "Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy", *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 053702 (2013) (査読有), DOI: 10.1063/1.4803449, DOI: 10.1063/1.4813280.
  19. H. Yamashita, K. Inoue, M. Shibata, T. Uchihashi, J. Sasaki, H. Kandori, and T. Ando, "Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by high-speed atomic force microscopy", *J. Struct. Biol.* **184**, 2-11 (2013) (査読有), DOI: 10.1016/j.jsb.2013.02.011.
  20. T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, "High-speed AFM and applications to biomolecular systems", *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 393-414 (2013) (査読有), DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130324.
  21. T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, "Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy", *Nat. Protoc.* **7**(6), 1193-1206 (2012) (査読有), DOI: 10.1038/nprot.2012.047.

22. R. Suno, M. Shimoyama, A. Abe, T. Shimamura, N. Shimodate, Y.H. Watanabe, Y. Akiyama and M. Yoshida, "Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH", *FEBS Lett.* **586**(19), 3117-3121 (2012) (査読有), DOI: 10.1016/j.febslet.2012.07.069
23. S. Mizuno, Y. Nakazaki, M. Yoshida and Y.H. Watanabe, "Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein", *FEBS J.* **279**, 1474-1484 (2012) (査読有), DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08540.x.
24. S. Hayashi, H. Ueno, A. R. Shaikh, M. Umemura, M. Kamiya, Y. Ito, M. Ikeguchi, Y. Komoriya, R. Iino and H. Noji, Molecular mechanism of ATP hydrolysis in "F<sub>1</sub>-ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations", *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8447-8454 (2012) (査読有), DOI: 10.1021/ja211027m.

[学会発表] (計 25 件)

(国際会議 招待講演)

1. T. Uchihashi, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Observation of Single-Molecule Dynamics", The 6th RSC-CSJ Symposium (held in conjunction with the 95th CSJ Annual Meeting (Chiba, Japan, March 27, 2015).
2. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscope for imaging of biomolecular dynamics at solid surface" 10th Annual International Electromaterials Science Symposium (Wollongong, Australia, February 11-13, 2015).
3. T. Uchihashi, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy", The 7th Biennial Australian Colloid & Interface Symposium (Hobart, Australia, February 1-5, 2015). (Keynote Lecture)
4. R. Iino, "Watching dynamic motions of individual molecular motors with gold nanopores", PACCON2015. (Bangkok, Thailand, January 22, 2015).
5. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscope for studying dynamic interactions in biomolecular system", The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (Mie, Japan, January, 10-11, 2015).
6. T. Uchihashi, "Single-molecule imaging of proteins at work with high-speed atomic force microscopy", 16<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins (Shiga,

Japan, October 5-10, 2014).

7. T. Uchihashi, "Cooperative Conformational Change in Ring-Shaped ATPase Observed by High-Speed AFM", 第 52 回日本生物物理学会年会 Japan-China-Taiwan Joint Symposium on Cooperativity in Supramolecular Machine (Hokkaido, Japan, September 26, 2014).
8. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscopy for imaging of protein dynamics", Agilent Nanomeasure 2014 (Beijing, China, September 16-17, 2014).
9. T. Uchihashi, "Visualization of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy", Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses (Okinawa, Japan, April 21-25, 2014).
10. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Application of high-speed atomic force microscopy -from proteins to Cells", 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (Auckland, New Zealand, December 8-13, 2013).
11. T. Uchihashi and T. Ando, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Imaging of Protein Dynamics", 2013 MRS Fall Meeting, Symposium LL: Advances in Scanning Probe Microscopy (Boston, USA, December 13, 2013).
12. T. Uchihashi, "High-speed AFM for observing cell dynamics", 4th Asia-Pacific Symposium on Nanobionics (Melbourne, Australia, November 14-15, 2013).
13. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Single-Molecule Imaging of Proteins at Work with High-Speed Atomic Force Microscopy", IMS Workshop on "Hierarchical Molecular Dynamics: From Ultrafast Spectroscopy to Single Molecule Measurements" (Okazaki, May 25-26, 2013).

(国内会議 招待講演)

14. 飯野亮太 「生体回転超分子モーターの作動メカニズム」日本化学会 第95春季年会 特別企画 シンポジウム (日本大学船橋, 2015年3月26日)
15. 内橋貴之 「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質のダイナミクスと物性計測」第9回NIBBバイオイメージングフォーラム「物理特性のイメージング」(基礎生物学研究所, 2015年1月27日)
16. 内橋貴之 「高速原子間力顕微鏡の開発とバイオ応用」新世代研究所水和ナノ構造・界面ナノ科学合同研究会「固液界面の水和ナノ構造と生体高分子ダイナミクス」(伊豆, 2015年1月25日)

17. 飯野亮太「金ナノ粒子、金ナノロッドを用いた生体分子モーターのマイクロ秒1分子計測」新学術領域「柔らかな分子系」第7回ワークショップ(岡崎コンファレンスセンター, 2014年12月12日)
18. 内橋貴之「高速AFMによる生体試料のダイナミクス観察」, 日本膜学会第36回年会 境界領域シンポジウム「膜解析の最前線~生体膜・膜タンパク質から模擬膜, ソフトマターまで~(早稲田大学, 2014年5月13日)
19. 内橋貴之, 飯野亮太, 渡辺洋平, 野地博行, 安藤敏夫, "HS-AFM observations of conformational dynamics of ring-shaped ATPases: F1 and TClpB", 231st IMEG seminars & Minisymposium: ATP/GTP駆動分子マシナリーの高速AFMイメージングと分子機構解明の進展(熊本大学発生医学研究所, 2014年2月20日)
20. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡による生体試料の動的構造解析 ~一分子から細胞まで~」第1回新学術領域「植物環境感覚」「少数性生物学」ジョイントシンポジウム(大阪大学中之島センター, 2013年12月17日)
21. 内橋貴之「研究者になるということ」2013年北大情報系若手連携シンポジウム(北海道大学, 2013年11月29日)
22. 内橋貴之「高速原子間力顕微鏡 ~分子の動きを直視して理解する~」, 生物物理若手の会 第53回夏の学校(伊豆長岡温泉えふでの宿, 2013年9月7日)
23. 飯野亮太「生体分子モーターの揺らぎと機能」国際高等研究所「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第2回研究会(京都, 2013年8月9日)
24. 渡辺洋平「AAA+シャペロンClpBのリング構造ダイナミクスと機能」第3回分子モーター討論会(東京大学農学部中島董一郎記念ホール, 2013年7月19日)
25. 内橋貴之「高速AFMによるタンパク質機能動態の直接観察」, 日本生化学会九州支部例会シンポジウム「タンパク質構造の動きと機能発現」(佐賀大学, 2013年5月18日)

[図書] (計7件)

1. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Development of high-speed AFM and its biological applications", Chapter 8, pp.143-176 in Atomic Force Microscopy in Nanobiology (K. Takeyasu Ed.) Pan Stanford Publishing, Singapore (2014).
2. 内橋貴之「1分子ナノバイオ計測における最新トピックス 6:高速原子間力顕微鏡(AFM)」(pp.209-211), 化学フロンティア 23 1分子ナノバイオ計測:分子から生命システムを探る革新的技術(野地博行編集, 化学同人)(2014年6月)

3. T. Ando and T. Uchihashi, "High-speed AFM and imaging of biomolecular processes", Chapter 19, pp.713-742 in Nanoscale Liquid Interfaces: Wetting, Patterning, and Force Microscopy at the Molecular Scale (T. Ondarcuhu, J.-P. Aimé Eds.), Pan Stanford Publishing (2013).
4. 飯野亮太「Part III 機能とダイナミクス 第15章1節 モータータンパク質」(pp. 233-242), DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「揺らぎ・ダイナミクスと生体機能ー物理化学的視点からみた生体分子ー」(化学同人)(2013)
5. 内橋貴之, 安藤敏夫「23章 原子間力顕微鏡による膜タンパク質のダイナミクス研究」(pp.196-203) in 膜タンパク質構造研究(岩田想編集, 化学同人)(2013年8月)
6. T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, "Nanovisualization of proteins in action using high-speed AFM", Chapter 5, pp.119-147 in Single-molecule Studies of Proteins. Biophysics for the Life Sciences Vol.2, (A. Oberhauser, Ed.), Springer (2013).
7. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, M. Shibata, D. Yamamoto and H. Yamashita, "High-speed AFM for observing dynamic processes in liquid", Chapter 7, pp.189-209 in Atomic force microscopy in liquid (A. N. Baró and R. G. Reifensberger Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH (2012)

[その他]

ホームページ等

[http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index\\_J.htm](http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index_J.htm)

[http://groups.ims.ac.jp/organization/iino\\_g/index.html](http://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html)

<http://www.konan-u.ac.jp/hp/bio-watanabe/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

内橋 貴之 (UCHIHASHI TAKAYUKI)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号: 30326300

(2)研究分担者

飯野 亮太 (IINO RYOTA)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号: 70403003

渡辺 洋平 (WATANABE YO-HEI)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号: 40411839