

平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価用〕

◆記入に当たっては、「平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成26年 4月24日現在

研究代表者 氏名	木下 一彦	所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)	早稲田大学・理工学術院・教授
研究課題名	一分子生理学による生体分子機械の動作機構の解明		
課題番号	16002013		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 木下 一彦（早稲田大学・理工学術院・教授）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成16年度	89,600 千円
平成17年度	123,200 千円
平成18年度	86,500 千円
平成19年度	95,267 千円
平成20年度	84,900 千円
総計	479,467 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

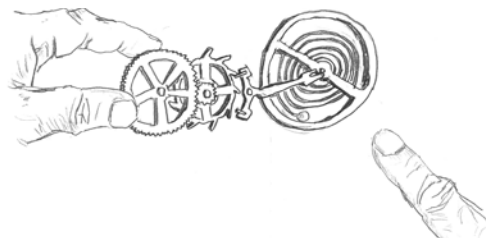
特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

本特別推進研究の発展として、2009年度より新たな特別推進研究「一分子生理学を超えて：生体分子機械を力で優しく働かせる」を開始した。それまでは、本特別推進研究も含めて、光学顕微鏡下で個々のたんぱく質分子機械の自然な、あるがままの振る舞いを観察することにより、動作原理の解明を目指してきた。単に観察するだけでなく、光ピンセットや磁気ピンセットを用いた一分子操作も援用してきたが、操作の目的のほとんどは、観察のための系のお膳立て（たとえば2種のたんぱく質分子を近づけて相互作用させる）、あるいは分子機械の働きに抵抗（本来動く方向の逆向きに力を加えるなど）した上でどれだけしっかり働けるかを問うものであった。1990年代に始まった一分子生理学のこの流れの中で、我々を含め多くの研究者が、一分子を「観る」ことにより初めて分かったといえる成果を次々と上げてきた。ではこの、「分かった」というのは、根源的理解だったのか。「なるほどそうかもしれない（が・・・）」という、*nice-story telling* に留まっていると言われれば、頷かざるを得ない。

複雑な機械の動きを、観るだけで理解するのは難しい。働いているところをただ観るのではなく、外から力を加えて働かせて「やる」ことができれば、因と果の関係もはっきりし、本当の理解に至れるのではないか。たとえば右図のテンプ（古典的な時計が時を刻む仕掛け）、初めて見たとして、動くところを詳細に観察したら仕掛けが分かるか。まずは各 부품の構造と仕掛けを知らねばならない。その上で、どこをどう押したらどんな動きが現れるか、本来の動力源（ゼンマイ）を止めて、研究者が主体となって自分の指で「動かして」みるのが肝要である。これを、分子機械に対して行う。たとえば電場駆動の分子機械を、電場無しで働かせることができないか。あるいは、ある重要部品を欠損させた上で、動かなくなるかどうかでなく、動かす道がないものを問う。いいかえると、本来の機能発現の仕組みを、部分的に外力操作で代替する試みである。このとき大切なのは、強い力で強引に動かすのではなく、優しくそっと触ることである。そっと押しても動くのが正しい方向、間違っていれば指先で感じられる。



言うは易く行うは難し。やっと結果が出始めたところである。現時点での具体的な目標の一つは、電位依存性イオンチャネルを電位でなく外力で（文字通り手動で）開閉すること。成功の兆しが見えつつある。

もう一つは、 F_1 -ATPase。単独ではATP分解を駆動力源とした回転モーターだが、生体内ではプロトン駆動の F_0 モーターと一体となっており、 F_0 が F_1 を逆回しすることによりATPを合成している。この F_0 の役目を、外力（磁気ピンセット）に代替させる。外力による逆回転は以前から試みてきたが、これまでは、強い力で強引に回してきたので、なかなか仕組みに迫れなかった。優しい力で回してみるにより、どこでつかえるか（ F_1 が逆らう力を出すか）勝手に回るか（ F_1 が助けるか）を調べる。3ヶ所の活性部位のどこにADPないしATPが結合しているかにより振る舞いが替わるであろうから、それも測定する。まだ予備的ではあるが、いくつかの結合ヌクレオチド結合状態につき、回転力の角度依存性が測れている。力が測れば、それを積分すれば F_1 の内部エネルギーが求まる。たんぱく質分子の内部エネルギーを、構造（回転角で代表）と結合ヌクレオチドの関数として求めるのは初めての試みであり、たんぱく質科学に根源的な寄与をするものと期待している。 F_1 に関しては、いったんエネルギーが求まれば、任意のヌクレオチド濃度、任意の負荷（ATP合成のための逆回転力）の下での F_1 の振る舞いを、予想できることになる。予想ができてこそ自然科学である

さらに、DNAの二重らせんをさらにきつく巻く分子機械、reverse gyraseに関しても、基本特性が明らかになってきており、さらに外力で助けてやることにより、仕掛けに迫ろうとしている。この場合は、助けすぎるとかえって邪魔になるような気配もある。

発表した成果の主なものについては、2-3ページに記述した。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

原著論文

1. "None of the rotor residues of F_1 -ATPase are essential for torque generation" R. Chiwata, A. Kohori, T. Kawakami, K. Shiroguchi, S. Furuike, K. Adachi, K. Sutoh, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr., *Biophys. J.* in press.
2. "Accurate polarity control and parallel alignment of actin filaments for myosin-powered transport systems" M. Miyazaki, K. Kinosita Jr, and K. Shiroguchi, *RSC Advances* 3 (2013) 8728-8733.
3. "Controlled rotation of the F_1 -ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis" K. Adachi, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, and K. Kinosita Jr., *Nat. Commun.* 3 (2012) 1022.
4. "Direct observation of strand passage by DNA-topoisomerase and its limited processivity" K. Yogo, T. Ogawa, M. Hayashi, Y. Harada, T. Nishizaka, and K. Kinosita Jr., *PLoS ONE* 7 (2012) e34920.
5. "Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis" N. Soga, K. Kinosita, Jr., M. Yoshida and T. Suzuki, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 9633-9639.
6. "Torque generation and utilization in the motor enzyme F_0F_1 -ATP synthase: half-torque F_1 with short-sized pushrod helix and reduced ATP synthesis by half-torque F_0F_1 " E. Usukura, T. Suzuki, S. Furuike, N. Soga, E. Saita, T. Hisabori, K. Kinosita Jr., and M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 1884-1891.
7. "Efficient ATP synthesis by thermophilic *Bacillus F_0F_1-ATP synthase" N. Soga, K. Kinosita Jr., M. Yoshida, and T. Suzuki, *FEBS J.* 278 (2011) 2647-2654.*
8. "Torque generation in F_1 -ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice" A. Kohori, R. Chiwata, M. D. Hossain, S. Furuike, K. Shiroguchi, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinosita Jr., *Biophys. J.* 101 (2011) 188-195.
9. "Direct observation of the myosin Va recovery stroke that contributes to unidirectional stepping along actin" K. Shiroguchi, H. F. Chin, D. E. Hannemann, E. Muneyuki, E. M. De La Cruz, and K. Kinosita Jr., *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001031.
10. "Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe" S. Furuike, M. Nakano, K. Adachi, H. Noji, K. Kinosita Jr., and K. Yokoyama, *Nat. Commun.* 2 (2011) 233.
11. "Activation and stiffness of the inhibited states of F_1 -ATPase probed by single-molecule manipulation" E. Saita, R. Iino, T. Suzuki, B. A. Feniouk, K. Kinosita, Jr., and M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 11411-11417.
12. "Chemo-mechanical coupling in F_1 -ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis" R. Shimo-Kon, E. Muneyuki, H. Sakai, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinosita Jr., *Biophys. J.* 98 (2010) 1227-1236.
13. "Stimulation of F_1 -ATPase activity by sodium dodecyl sulfate" M. D. Hossain, S. Furuike, Y. Onoue, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinosita Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 435-442.
14. "Torque-induced slip of the rotary motor F_1 -ATPase" A. Palanisami, and T. Okamoto, *Nano Lett.* 10 (2010) 4146-4149/
15. "A giant liposome for single-molecule observation of conformational changes in membrane proteins" Y. Onoue, T. Suzuki, M. Davidson, M. Karlsson, O. Orwar, M. Yoshida, and K. Kinosita Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1332-1340.
16. "Effect of ϵ subunit on the rotation of thermophilic *Bacillus F_1-ATPase" M. Tsumuraya, S. Furuike, K. Adachi, K. Kinosita Jr., and M. Yoshida, *FEBS Lett.* 583 (2009) 1121-1126.*

総説

1. "Rotational catalysis by F_1 -ATPase" K. Adachi, T. Nishizaka, and K. Kinosita, Jr., in *Comprehensive Biophysics*, Vol. 8. "Bioenergetics" S. Ferguson, Ed, Academic Press (Elsevier), Oxford (2012) pp. 35-49.
2. " F_1 -ATPase: A prototypical rotary molecular motor" K. Kinosita, Jr., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 726 (2012) 5-16.
3. "Chemo-mechanical coupling in the rotary molecular motor F_1 -ATPase" K. Adachi, S. Furuike, M. D. Hossain, H. Itoh, K. Kinosita, Jr., Y. Onoue, and R. Shimo-Kon, in "Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology — Nobel Symposium" A. Gräslund, R. Rigler, and J. Widengren, Eds, Springer, Heidelberg (2010) pp. 271-285.

国際会議招待講演

1. "Letting molecular machines work by soft assisting force" Gordon Research Conference on Single Molecule Approaches to Biology, 2014.07.13-18, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort, Lucca, Italy.
2. "Single-molecule physiology and beyond" Active Soft and Biological Matter Workshop, 2012.09.30-10.05, Les Houches, France.
3. "Single-molecule physiology and beyond" (Plenary) 17th Int. Biophysics Congress, 2011.10.30-11.03, Beijing, China.
4. "Some recent topics in single-molecule physiology" Emerging Paradigms in Physical Biology, 2011.08.27-28, Bangalore, India.
5. "Progress and regress in single-molecule physiology" IX European Symposium of the Protein Society, 2011.05.22-26, Stockholm, Sweden.
6. "A rotary molecular motor with amazing performance" IMAGINENANO, 2011.04.11-14, Bilbao, Spain.
7. "Single-molecule studies of the mechanics of molecular motors" (Plenary) 6th World Congress on Biomechanics, 2010.08.01-06, Singapore, Singapore.
8. "Rotating protein machines" International Soft Matter Conference 2010, 2010.07.05-08, Granada, Spain.
9. "Rotations in molecular machines" 1st Symposium on Frontiers of Biophysics, 2010.05.17-19, Seoul, Korea.
10. "Rotary motions in molecular machines" 2nd Bangalore Microscopy Course, 2010.02.21-28, National Centre for Biological Sciences, TIFR, Bangalore, India.
11. "Playing with microscopes: Some technical hints" 2nd Bangalore Microscopy Course, 2010.02.21-28, Bangalore, India.
12. "Beyond single-molecule physiology" Frontiers in Biophysics, 2009.11.07-09, Bilbao, Spain.
13. "Rotary motions in molecular machines" Nano SWEC 2009, 2009.11.02-04, Bordeaux, France.
14. "Rotations in molecular machines" Subcellular Microscopy and Probing, 2009.10.23-25, Heidelberg, Germany.
15. "Rotations in molecular machines" 355th Xiangshan Science Conference, 2009.07.08-10, Beijing, China.

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか (続き)

(3) 研究費の取得状況 (研究代表者として取得したもののみ)

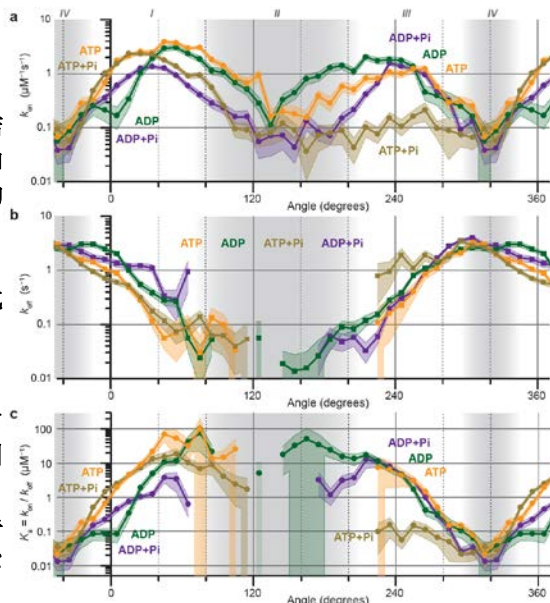
特別推進研究 2009-2013 年度 「一分子生理学を超えて：生体分子機械を力で優しく働かせる」 研究代表者
 直接経費総額 474,900,000 円

基盤研究 (A) 2014-2017 年度 「優しく動かしてみる一分子生理学」 研究代表者
 直接経費総額 30,800,000 円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

4-1 F_1 -ATPase における化学-力学エネルギー変換機構

回転に伴い ADP および ATP の結合速度定数、解離速度定数、結合定数がどのように変化するかが明らかになった (右図)。高親和性・低親和性の 2 状態ではなく、何桁にもわたる結合特性の連続的な変化が見えたのは、たんぱく質分子機械として初めてである。Induced fit の実態を初めて捉えたもので、fit は連続的に起こることがわかった。 F_1 による ATP 合成も説明でき、Boyer の結合変化説 (ノーベル賞受賞) の具体的内容を示せたことになる。



4-2 F_1 -ATPase は何でも回せる回転モーターではないか

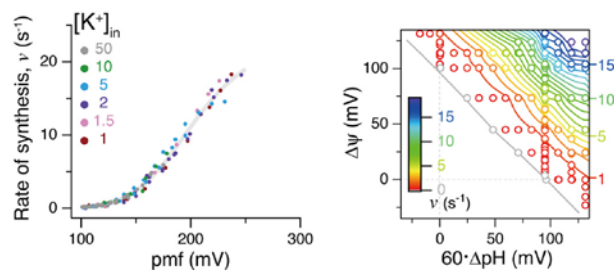
回転軸を半身に削いでしまった変異体でも、高速回転するだけでなく、野生体の半分の回転力を発生できる。また回転子頭部 (固定子から外にはみ出した部分) を完全に削除しても高速回転および半分の回転力発生が可能である。以前の結果と合わせると、(半分程度の) 回転力発生に必須な回転子残基は一つもないことになる。おそらく F_1 は、多少非効率ながらも何でも回せるモーターとしてまず出現し、進化により回転力が十分大きくなったときに ATP 合成能力を獲得したのではないかと考えられる。

4-3 ATP 合成酵素の働き

従来活性の低かった好熱菌由来の ATP 合成酵素を、高活性で脂質膜に再構成することに成功した。この標品を用いて、ATP 合成速度に膜電位とプロトン濃度差が同等の寄与をすることを示した (右図)。それぞれ単独ないし他

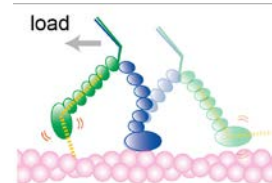


方が負のときも、両者の代数和としてのプロトン駆動力 (pmf) に応じた合成速度を出すことを示したのは、種々の合成酵素を通じて初めてである。また、 V_0V_1 -ATP 合成酵素の ATP 駆動の回転で、ほぼ 30 度のステップ回転が見えた (左図)。この酵素のプロトンモーター部分 V_0 は回転子が 12 回対称であり、 V_1 部分の ATP 駆動回転に伴う V_0 での回転子-固定子相互作用が見えたものと考えられる。



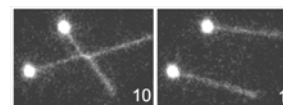
4-4 ミオシンの歩行機構

ミオシン V の歩行時に後足がアクチンから持ち上がると、直後に爪先が下がる (右図の後足) ことにより、負荷により腰を後に引かれていても前方着地が保証される (前方で足裏がアクチンに平行) ことを示した。爪先下がり状態のほうが熱エネルギーの 5 倍くらい安定である。二足歩行機構に関する最後の大きな疑問に答えられた。



4-5 DNA 上で働く分子機械

II 型トポイソメラーゼによる DNA どうしのすり抜けを初めて一分子観察できた (右図)。多重絡まりを解くときは、DNA 上の一分子のトポイソメラーゼが約 10 秒間活性状態を保ち、その間にブラウン運動でやってくるもう一本の DNA を次々と通過させる。



また、高温で DNA の二重螺旋をさらにきつく巻きあげる reverse gyrase の働きを可視化し、一分子が数分間以上 processive に、従来の生化学知見より 2 桁速く働くこと、DNA がある程度捻られれば停止すること、などを示した。この酵素を持つ好熱菌内では、DNA が少しきつく巻かれた状態に保たれ、緩んだらすぐに捻られる。DNA の熱変性を防ぐ仕組みとして有効と思われる。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

本特別推進研究の実施期間およびその後に発表した論文の引用総数は現時点で814（各発表論文の引用数の和）で、Cellの6報（重複含まず、以下同）、Nature4報、Science4報、Nature 姉妹紙22報、PNAS38報などを含む。ATP駆動のたんぱく質分子機械としてもっとも理解が進んでいるものの一つ、 F_1 -ATPaseに関しては、結晶構造を除いて、我々（京産大吉田賢右教授グループと共同）および関連研究室（中央大宗行研、京産大横山研、東大野地研、学習院大西坂研等々）の一分子研究の寄与が圧倒的で、引用も多い。単に回転分子モーターの仕組みの理解にとどまらず、多くのたんぱく質分子機械の代表として、他の系の理解にも大きく寄与していると考えている。二本足で歩くりニア分子モーターミオシンの歩行機構に関しては、実施期間中に歩行原理の基礎（着地した足の足首の曲げと持ち上がった脚の回転ブラウン運動により進む）を明らかにし、その後、後ろに引っ張られてもなおかつ前進する仕組みとして爪先上下機構を提唱、実証した。一分子生理学の手法においても、巨大プローブを用いた目で分かる実験結果の追求、蛍光色素一分子イメージング（とくに分子の向きの測定）、構造変化とヌクレオチド結合解離の同時測定、超高速撮像によるサブミリ秒キネティクス、磁気ピンセットによるたんぱく質分子機械の操作（他の多くの例はDNAの操作）など、先端技術を提供してきている。

国際会議においても、一分子関連で分子モーター代表として招かれることが多く、とくに回転分子モーターに関しては唯一の代表であることが多い（2-2ページ参照）。一方、リニア分子モーター関連では、筋収縮研究からの長い伝統の中で、傍流扱いをされていると感じなくもない。伝統的な、二つ頭を交互に使って前進するという言い方を、二本足で歩くと言い換えたりするのも反発を買うようである（分野外の研究者には好評）。インドにおける顕微鏡講習会で講師を務めたときは、そう簡単に学べない原理や技術を若い研究者の卵に伝えた。

米国に行くのをやめてしまったので、招待される機会はこのところ減少傾向にある。これには、一分子生理学が一時の勢いを失いつつあることも関連しているように思える。成熟期に入って、目新しさで他研究者を引きつけるのが難しくなってきたのではなからうか。ここ数年、ポピュラージャーナルに載る一分子論文は目立って減ってきた。科学が流行に左右されるというのもどうかと思う一方、若い研究者たちには新しい道を切り開いて分野外からも注目されるようになってほしい、という気持ちもある。この意味で、「働かせてやる」一分子生理学の提唱には、褒められない動機もある。外力で働かせてやるのは非常に難しいことはやる前から分かっており、これを若い人たちに勧めてよいものかどうか・・・もちろん、決して積極的に勧めはしないのだが。米国などでは、実験は「簡単に」再現できないといけない、という風潮もあるようで、難しい実験に手を出す人は多くないと思われる。その中で我々が、働かせてやる一分子生理学をちょうど始めようとした頃、Ron ValeがATPなしで外力によりキネシンを前後に歩かせる試みを発表した。さすがValeと感心するとともに、無言の励ましを感じた。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	"Coupling of rotation and catalysis in F_1 -ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation" K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Cell</i> 130 (2007) 309-321.	一分子イメージングと磁気ピンセットを組み合わせて、回転分子モーター F_1 -ATPaseの回転においてどの角度でどのようなヌクレオチド反応が起きるのかを明らかにした。	164
2	"Rotation of F_1 -ATPase: How an ATP-driven molecular machine may work" K. Kinoshita, Jr., K. Adachi, and H. Itoh <i>Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.</i> , 33 (2004), 245-268.	回転分子モーター F_1 -ATPaseに関する総説。回転力の元となるポテンシャルエネルギーとATP加水分解の自由エネルギーの関係を論じると共に、回転モデルを提出。	113
3	"ATP-driven stepwise rotation of F_0F_1 -ATP synthase" H. Ueno, T. Suzuki, K. Kinoshita, Jr., and M. Yoshida <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 102 (2005) 1333-1338.	F_0F_1 -ATP合成酵素全体(F_1 -ATPaseはその一部)のATP駆動の回転を高速撮影で捉え、最高速度が37°Cにおいて毎秒350回転に達することを示した。 F_0F_1 の場合、 F_0 部分の存在は回転をほとんど妨げない。	81
4	"Myosin V walks by lever action and Brownian motion" K. Shiroguchi, and K. Kinoshita, Jr. <i>Science</i> , 316 (2007) 1208-1212.	二足歩行するリニア分子モーターミオシンVが、ATP依存の足首の前屈と、持ち上げた脚の回転ブラウン運動を利用して前進することを示した。脚の回転は空間のあらゆる方向を経巡り、腰の部分は完全に自由な自在継ぎ手であることが分かった。	71
5	"Activation of pausing F_1 motor by external force" Y. Hirono-Hara, K. Ishizuka, K. Kinoshita, Jr., M. Yoshida, and H. Noji <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 102 (2005) 4288-4293.	回転分子モーター F_1 -ATPaseは、回転中にADP阻害と呼ばれる状態に陥りしばらくの間回転を止めるが、この状態から磁気ピンセットを用いて無理矢理前方に40度程度回してやると、阻害が解けて回転が再開することを示した。	58
6	"Axle-less F_1 -ATPase rotates in the correct direction" S. Furuike, M. D. Hossain, Y. Maki, K. Adachi, T. Suzuki, A. Kohori, H. Itoh, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Science</i> , 319 (2008) 955-958.	回転分子モーター F_1 -ATPaseは、筒状に並んだ固定子サブユニットの中央の孔に回転子サブユニット γ が突き刺さる構造となっている。この γ の突き刺さる部分を、遺伝子的にほとんど削ってしまっても、遅いながら正しい方向に回転を続けることが分かった。	53
7	"One rotary mechanism for F_1 -ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar" N. Sakaki, R. Shimo-Kon, K. Adachi, H. Itoh, S. Furuike, E. Muneyuki, M. Yoshida, and K. Kinoshita, Jr. <i>Biophys. J.</i> , 88 (2005) 2047-2056.	回転分子モーター F_1 -ATPaseの回転をnM以下からmMまでの広いATP濃度範囲にわたって観察し、回転機構がATP濃度によらないことを示した。これだけの広い濃度範囲にわたり、3ヶ所の活性部位へのヌクレオチド結合数が変わらないことを示唆する。	43
8	"Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors" M. Y. Ali, K. Homma, A. H. Iwane, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinoshita Jr., T. Yanagida, and M. Ikebe <i>Biophys. J.</i> , 86 (2004) 3804-3810.	二本足のリニアモーターミオシンVIがレールであるアクチン線維上をわずかに右巻きの螺旋状に運動することを示した。従来予想されていたミオシンVIの脚の長さに比べて歩幅が断然長いことを意味し、 α ヘリクスの脚がほどけて伸びることを示唆した。	38
9	"The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F_1 -ATPase is dispensable for torque generation" M. D. Hossain, S. Furuike, Y. Maki, K. Adachi, M. Y. Ali, M. Huq, H. Itoh, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Biophys. J.</i> , 90 (2006) 4195-4203.	回転分子モーター F_1 -ATPaseの回転子サブユニットの固定子に突き刺さったいわば回転軸というべき部分のうち、先端から21残基削っても、回転速度は7割、回転力は5割までしか落ちなかった。この後の回転子の大規模削除の研究に展開。	19
10	"Temperature dependence of the rotation and hydrolysis activities of F_1 -ATPase" S. Furuike, K. Adachi, N. Sakaki, R. Shimo-Kon, H. Itoh, E. Muneyuki, M. Yoshida, and K. Kinoshita, Jr. <i>Biophys. J.</i> , 95 (2008) 761-770.	好熱菌由来の F_1 -ATPaseの回転を、4-50°Cの温度範囲で観察した。50°Cでの無負荷回転は毎秒700回転以上に達する一方、4°Cでは毎秒10回転程度と極端に遅くなり、低温域で新たな律速過程が現れることが示唆された。	18

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	"Chemo-mechanical coupling in F_1 -ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis" R. Shimo-Kon, E. Muneyuki, H. Sakai, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Biophys. J.</i> 98 (2010) 1227-1236.	F_1 -ATPase の活性 (ATP 加水分解および回転) は bi-site (3ヶ所の活性部位のヌクレオチド結合数が 1-2-1-2・・と変化) か tri-site (2-3-2-3・・) なのかが長く問題だった。Tri-site だが3の時間はごく短い(従って区別が難しかった)、と決着をつけた。	23
2	"Resolving stepping rotation in <i>Thermus thermophilus</i> H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe" S. Furuike, M. Nakano, K. Adachi, H. Noji, K. Kinoshita Jr., and K. Yokoyama <i>Nat. Commun.</i> 2 (2011) 233.	F_0F_1 -ATP 合成酵素の類縁の V_0V_1 -ATP 合成酵素の ATP 駆動の回転に、30度ステップが見つかった。12回対称の V_0 の回転子と固定子の相互作用が見えたと思われる。一方、 V_1 単独の回転は 120度ステップの連続で、80-40度のサブステップに分かれる F_1 と異なる。	13
3	"Activation and stiffness of the inhibited states of F_1 -ATPase probed by single-molecule manipulation" E. Saita, R. Iino, T. Suzuki, B. A. Feniouk, K. Kinoshita, Jr., and M. Yoshida <i>J. Biol. Chem.</i> 285 (2010) 11411-11417.	F_1 の最小サブユニット構成は $\alpha_3\beta_3\gamma$ だが、ここに ϵ が加わると活性が阻害される。阻害は ϵ が伸びた構造をとるときに起きることを示した。ADP 阻害の場合は外力で回転させると阻害が解除されるが、 ϵ 阻害では回転しにくく、解除には大きな外力を必要とする。	11
4	"Effect of ϵ subunit on the rotation of thermophilic <i>Bacillus</i> F_1 -ATPase" M. Tsumuraya, S. Furuike, K. Adachi, K. Kinoshita Jr., and M. Yoshida <i>FEBS Lett.</i> 583 (2009) 1121-1126.	上記3に述べたように ϵ は F_1 の活性を阻害するが、この阻害効果は ATP 濃度が低いときに限られることが分かった。ATP 濃度が高いと、 ϵ はヘアピン構造をとって回転を邪魔しない。	10
5	"Torque generation and utilization in the motor enzyme F_0F_1 -ATP synthase: half-torque F_1 with short-sized pushrod helix and reduced ATP synthesis by half-torque F_0F_1 " E. Usukura, T. Suzuki, S. Furuike, N. Soga, E. Saita, T. Hisabori, K. Kinoshita Jr., and M. Yoshida <i>J. Biol. Chem.</i> 287 (2012) 1884-1891.	F_1 の駆動子サブユニット β (ATP 加水分解部位を持つ) には、種を超えて保存されている負電荷を持つヘリクスがあり、あたかも回転子を押すかのような位置にある。このヘリクスを半分削ったところ、回転力も半分になった。	10
6	"Torque generation in F_1 -ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice" A. Kohori, R. Chiwata, M. D. Hossain, S. Furuike, K. Shiroguchi, K. Adachi, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Biophys. J.</i> 101 (2011) 188-195.	F_1 の回転子サブユニットの、固定子部分に突き刺さった回転軸部分を、縦に半身にそいでも (α ヘリクスのコイルドコイルの片方を全削除)、回転力は半分には落ちないことを示した。	9
7	"Direct observation of the myosin Va recovery stroke that contributes to unidirectional stepping along actin" K. Shiroguchi, H. F. Chin, D. E. Hannemann, E. Muneyuki, E. M. De La Cruz, and K. Kinoshita Jr. <i>PLoS Biol.</i> 9 (2011) e1001031.	二本足のリニア-分子モーターミオシン V は、後ろ向きに引っ張られても前進できる。持ち上がった足(これは回転ブラウン運動する)の爪先が下がるため、前方に振れたときのみ足裏がレールに平行となり、前方着地が保証されるからだを示した。	7
8	"Efficient ATP synthesis by thermophilic <i>Bacillus</i> F_0F_1 -ATP synthase" N. Soga, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, and T. Suzuki <i>FEBS J.</i> 278 (2011) 2647-2654.	一分子観察のおかげでもっとも理解が進んでいる好熱菌由来の ATP 合成酵素は、これまでなぜか合成活性が低かった。酵素精製法・膜への再構成法を工夫し、従来より二桁近く活性の高い標品を得た。	6
9	"Controlled rotation of the F_1 -ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis" K. Adachi, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, and K. Kinoshita Jr. <i>Nat. Commun.</i> 3 (2012) 1022.	外力(磁気ピンセット)により F_1 を正逆両方向にゆっくり回し、ATP ないし ADP の結合・解離の速度常数および結合状態が回転角とともに連続的に数桁にわたり変化することを示した。Induced fit の実態を初めて捉えたもので、ATP 合成の仕組みも説明できる。	5
10	"A giant liposome for single-molecule observation of conformational changes in membrane proteins" Y. Onoue, T. Suzuki, M. Davidson, M. Karlsson, O. Orwar, M. Yoshida, and K. Kinoshita Jr. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1788 (2009) 1332-1340.	直径数十ミクロンの巨大リポソームに ATP 合成酵素を再構成し、酵素分子をガラス面に特異的に結合させることにより、膜内での回転を観察できる系を作成した。プロトン駆動の回転観察が目的であったが、ATP 駆動の回転までしか観察できなかった。	5

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

我々は基礎研究に従事しているので、研究の実用化という形での社会への還元は、その才のある方々にお任せしたいと考えている。後述のように、研究手段に関しては、実用化という貢献もほんのわずか行ったつもりではある。

当面の社会への還元に関しては、若い人たちに我々の成果を説明し、できたらそれを通じて科学一般に興味を持ってもらいたい。我々の研究結果は、ほとんど動画の形で得られるので、動画とともに説明をしたい。そこで、高校での出張授業を、積極的に引き受けてきた。九州から東北まで、いろいろな高校で一生懸命聞いてもらえたのはうれしい。その縁で高校からの研究室見学もあり、この夏にも九州の高校から数十名の高校1・2年生を迎えて顕微鏡を覗いてもらう予定である。早稲田大学のオープンキャンパスに際しても、模擬講義を何度か行った。ふだんの講義も、専門課程だけでなく、物理・応物学科の1年生向けの一般授業、さらに文系学生を交えた全学向け授業も行っている。海外においても、すでに述べたようにインドでの顕微鏡講習会（大学生からポストドクレベルが対象）において、顕微鏡技術の講義およびどんな成果が得られたかに関する講演を行った。

研究室のホームページには、毎日平均100前後の訪問があり（ラボ内接続を除く）、載せている動画を教育目的で使いたいので許可がほしいという連絡も海外から多い。最近では、キネシンで有名な Ron Vale から、小学生から高校生向けに顕微鏡を紹介するサイトを立ち上げるので、いくつかの動画を説明付きでほしいと言ってきた。

顕微鏡関連でいくつかの特許を内外で取得しているが（本特別推進研究以前）、そのうちの「顕微鏡のフォーカス安定機構」および「顕微鏡の上下微動機構」を利用した高安定性顕微鏡ステージが市販され、他の研究者の役に立っている。最近の改良により、安定性が大幅に向上した。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）

- KA 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 早稲田大学 主任研究員
- SF 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 大阪医科大学 医学部 助教
- MDH 早稲田大学 客員助教授（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 Shahjalal University of Science and Technology, Associate Professor
- TO 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 金沢大学 博士研究員
- AP 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 Harvard Medical School, Research Scientist
- RS 早稲田大学 客員助手（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 法政大学 生命科学部 技術補佐員
- KY 早稲田大学 客員助手（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 北里大学 医学研究科 助教
- YO 早稲田大学 客員助手（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 名古屋大学 理学部 博士研究員
- KS 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 理化学研究所 Young Chief Investigator
- DP 早稲田大学 客員講師（専任扱い）： 本特別推進研究で雇用
現 American University of Beirut, Assistant Professor