

岡崎国立共同研究機構 教授

木下 一彦

「一方向性反応のプログラミング基盤」

1. 研究実施の概要

「一方向性反応のプログラミング基盤」という研究課題名は、「生命活動のプログラム」という領域に応募するために苦し紛れに付けたものである。応募時の説明（「構想」）は以下のようなものであった。

生命活動は、一方で精緻なプログラミング、他方「気まぐれ」、の2つの要素が相俟って織りなすのだとすると、その根元は分子レベルにまで遡ることができそうである。転写、蛋白合成をはじめポンプ、モーター作用など、「一方向に進む分子反応」がプログラムの最小ユニットで、そのオン・オフが上位プログラムを構成する。多くの場合エネルギー的に不利な反応を、一方向に進ませてくれる分子メカニズムこそが、プログラミング基盤といってよかろう。分子レベルでの気まぐれは熱運動・熱揺らぎであり、一方向性反応はこの揺らぎに抗して、というより揺らぎをうまく利用して、正しく進行する。この仕掛けを、蛋白質分子の構造とその変化に基づいて、解明したい。

こう書いておきながら、正直な所、5年間で、蛋白質分子が反応を一方向に進める仕掛け（駆動源となるもう一つの反応との共役の仕掛け）が「分かった」と言えるようになるとは、全く思っていなかった。しかし今、研究代表者の頭の中では、もしかしたら分かりかけてきたのかもしれない、という期待が育ち始めている。少なくとも、5年前の自分と比べて格段に理解が深まった。蛋白質分子1個の働きを光学顕微鏡の下で観察する「一分子生理学」のおかげである。もちろん、研究代表者の独りよがり成果というわけにはいかない。この報告書では、得られた実験事実とその直接的解釈に重点を置く。研究は今も続いており、研究代表者は「わくわく」していることを付け加える。

我々のチームはこれまで蛋白質分子の立体構造解析を直接手がけてこなかったもので、蛋白質分子機械の仕掛けを考察するための基礎となる構造情報は、文献に頼っている。本チームの大きな特徴の一つは、構造を眺めただけではまず分かりそうもない、力（蛋白質分子機械の出す力、蛋白質に働く力）やタイミング（いつ、何がきっかけで力を出すか、構造変化するか）などの情報を得てきたことにある。分子機械は、上述のように熱揺らぎのおかげで気まぐれに働くので、複数の分子機械を同期させることが原理的にできない。複数の分子機械の出す力は足し算にならないし、働くタイミングもバラバラである。どうしても、1個1個を直接測定する必要がある。このために、目的の分子に大・中・あるいは小さな目印を結合させ、光学顕微鏡の下で個々の分子機械の振る舞いを観察する手法を開発してきた。大きな目印は、光ピンセットや磁気ピンセットにより操ることもでき、それに対する分子機械の応答を測ることもできる。手法および結果の両面で、分子1個に摂動を加えてその応答を観察する、「一分子生理学」の発展に寄与できたと思う。

具体的な成果の筆頭にあげるべきは、回転分子モーターである F_1 -ATPase の一方向への回転（駆動源は ATP の加水分解により得られるエネルギー）を詳細に解析したことである。このモーターは 90 度と 30 度のステップを交互に繰り返しながら回ることがわかり、しかも、90 度ステップは ATP の結合により、30 度ステップは分解産物の解離により駆動され

ることが分かった。蛋白質上での ATP の分解反応そのものは、ほとんど仕事（エネルギーの放出）にかかわらない。ATP 分解の役目の第一は、分子機械を初期状態にリセットして反応を繰り返させることにある。大部分の仕事は ATP の結合に伴って行われる、というこの結果は、他の蛋白質分子機械の仕掛けを考える上でも重要であろう。F₁ の場合、さらに、結合したヌクレオチドの状態に応じて、どのような回転ポテンシャル（回転力の基となるポテンシャルエネルギー）が F₁ 内に誘起されるかを推定することもできた。分子機械の化学状態と力（構造変化の駆動力）の対応がついたのは初めてであろう。これにより、F₁ を逆回しにすれば ATP が合成されることを説明することもできた。ATP の加水分解を利用して一方向に回る仕組み、外力による逆回転を利用して反応を合成方向に進める仕組み、の両方につき、重要な知見が得られたことになる。これらを説明できる F₁ モデルを作ることでもできた。リニアーマーターであるキネシンに関しても、化学状態と力の関係が分かりつつある。

(1) 計測センターグループ

一分子観察のための手法開発を行った。蛋白質分子よりはるかに大きな棒やビーズを結合させると、1 個の分子機械に起きる構造変化を詳細に観察できる。小さな蛍光色素分子 1 個を任意の場所に結合させると、その特定部分の構造変化（向きの変化）を観察できる。色素を 2 個付けるとその間の距離とその変化を測れる。また、蛋白質分子の数倍程度の大きさの目印を使うと、超高速イメージングが可能となる。ビーズを結合させた分子機械は、光ピンセットにより位置を制御でき、また力を加えられる。磁気ピンセットを使うと、多くの分子機械を一斉に引っ張ったり回転させたりできる。

以上を用いて、回転分子モーター F₁-ATPase の回転特性の詳細を明らかにした。エネルギー変換効率が 100% 近くに達し得ること（熱揺らぎをうまく利用）、回転角によらず一定のトルクを出すこと、などを見いだすとともに、上述のように回転機構に迫ることができた。RNA 合成酵素およびミオシンがともに螺旋モーターであることを示し、とくに RNA 合成酵素は DNA の右巻きらせんに忠実に沿って進むことを明らかにした。光ピンセットを用いて DNA および蛋白質分子の紐を結ぶことができた。曲率を制御する手段として、またミクロの手術糸として、利用可能である。巨大リボソームの作成法を開発し、内部に閉じこめたアクチンの重合により突起を形成させた。細胞変形のモデルとなる。

(2) 分子モーターグループ

本グループは、1 分子系から分子集合体を経て筋線維に至るまで、「生体分子モーターシステム」の全ての階層を研究し、しかも、蛋白質のもつ自己集合能や生理機能を利用して「A 帯滑り運動系」など独自の生体分子モーター運動系を構築、そして温度パルス顕微鏡法や単一筋原線維操作・解析法などの新手法を開発・応用して独自の視点で分子モーターシステムの研究を行ってきた。

主な研究成果として、1) 光ピンセットによりアクチン・ミオシン分子モーターの硬直結合の破断力分布を1分子顕微計測し、単頭・双頭結合それぞれの結合寿命と負荷の関係を明らかにした。2) 微小管・キネシン分子モーターの結合破断力測定から、各ヌクレオチド状態が単頭結合か双頭結合かを決定し、キネシンの歩行メカニズムについて新しい証拠を提出した。3) 温度パルス顕微鏡法を開発し、ミオシン、キネシン分子モーターの運動速度が50℃(変性温度以上)に至るまで同じ活性化エネルギーで上昇することや、発生力は温度に依存しないことを見出した。4) 開発した「細いフィラメント再構築筋収縮系」を用いて、筋収縮系が示す「自発的振動収縮(SPOC)現象」の発現に制御蛋白質系は必要ないこと、収縮力のpH依存性はトロポミオシンによることなどを見出した。5) 各種動物の心筋のSPOC振動周期が心拍周期と相関することを発見し、心拍機能にSPOC特性が重要な役割を演じているという新説を提出した。6) 温度パルス顕微鏡法の原理を応用してDNAチップの開発を行った。

(3) ATP 合成酵素グループ

F₁-ATPase が回転分子モーターであることを、好熱菌の $\alpha_3\beta_3\gamma$ の系で一分子観察により実証したのに引き続き、葉緑体由来および大腸菌由来のF₁-ATPaseでも回転を示し、一般性を確立した。固定子および回転子サブユニットの同定のため、 ϵ サブユニットの回転も観察した。以上より、 $\alpha_3\beta_3\epsilon$ よりなるF₁-ATPaseは、 $\alpha_3\beta_3$ に対して $\gamma\epsilon$ が回転することが分かった。

F₀部分の回転に関しては、界面活性剤存在下での一分子観察の問題を指摘するとともに、架橋反応を利用してF₀のcサブユニットからなるリングが回転することを実証した。そしてF₀F₁-ATP合成酵素の発現系作成に成功し、bサブユニットが、F₀とF₁を結合するsecond stalkとして機能することを明らかにした。

◎の回転は β の構造変化に駆動されると考えられるので、クロスリンク形成や変異導入などにより β の構造変化を調べた。そして、本酵素に特徴的なADPMgによる特異的阻害と、非触媒ヌクレオチド結合部位との関係を、ATPの加水分解・合成の両面から追求し、一分子観察によってこの特異的阻害の実体を明らかにし、さらにこの阻害をきわめて受けにくい変異体の作成に成功した。

一方、 ϵ が大きな構造変化をして本酵素のATPase活性を調節することが分かった。ATP合成条件では働かないラチェット的な調節である。また、葉緑体由来の γ と好熱菌由来の $\alpha\cdot\beta$ を組合わせて、葉緑体F₁-ATPaseに特徴的な酸化還元による調節を、一分子レベルで再現することに成功した。

2. 研究構想

以下に、研究開始時の構想を再掲する。

生命活動は、一方で精緻なプログラミング、他方「気まぐれ」、の2つの要素が相俟って織りなすのだとすると、その根元は分子レベルにまで遡ることができそうである。転写、蛋白合成をはじめポンプ、モーター作用など、「一方向に進む分子反応」がプログラムの最小ユニットで、そのオン・オフが上位プログラムを構成する。多くの場合エネルギー的に不利な反応を、一方向に進ませてくれる分子メカニズムこそが、プログラミング基盤といってよかろう。分子レベルでの気まぐれは熱運動・熱揺らぎであり、一方向性反応はこの揺らぎに抗して、というより揺らぎをうまく利して、正しく進行する。この仕掛けを、蛋白質分子の構造とその変化に基づいて、解明したい。

後述するように、いま、蛋白質分子1個の構造変化を、その分子がまさに働いている現場で、リアルタイムで捉えることが可能になりつつある。一方向にはあるが本質的に気まぐれに働く、したがって互いに同期させられない、蛋白質分子機械のメカニズムは、一分子観察により初めて解明される。X線結晶構造解析で静的構造の分かった蛋白質を対象に、いつどのような構造変化が起きて反応を進めるのかを明らかにする。

蛋白質分子機械に内蔵された一方向性反応のプログラムが具体的に解明された例はまだない。本研究により、手法も含めて、新しく一分子生理学・一分子工学が切り開かれるものと期待する。

具体的目標の第1として、メカニズムを推定する基礎となる原子構造が解かれており、なおかつ典型的な方向性反応（1方向への移動）を示す系として、ミオシンおよびキネシン分子モーターの動作機構の解明を目指す。近年の研究の進展により、機構解明まであと1歩の所まで来ている系である。第2に、プロトン ATPase による ATP 合成反応機構の解明を目指す。こちらも原子構造が解かれており、現時点ではまだ確証がないが分子内回転が重要な役割を果たすと予想されているので、分子間の直線的移動が仕事であるモーターとの対比を念頭に置く。

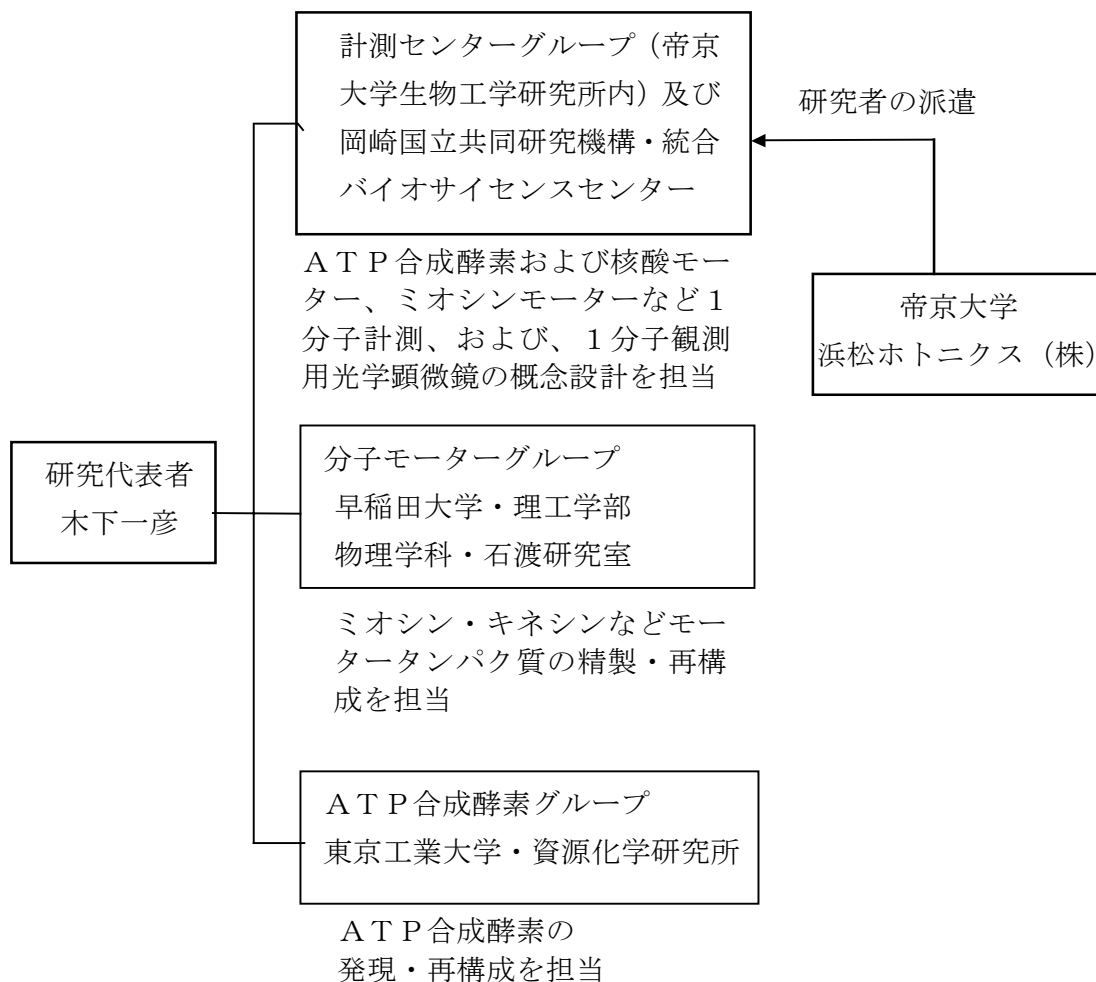
以上を実現するため、慶應義塾大学木下研究室を中心とした計測センターグループ（浜松ホトニクス㈱の協力も得て光学顕微鏡の新技术を開発するとともに、分子モーターとATP合成酵素のメカニズム研究への応用を担当；研究開始当初はATP合成酵素が分子モーターの仲間入りするという明確な意識がなかった）、早稲田大学石渡研究室を中心とした分子モーターグループ（リニア分子モーターの精製・再構成・メカニズム解析を担当）、東京工業大学吉田研究室を中心としたATP合成酵素グループ（同酵素の再構成とメカニズム解析を担当）の3グループからなる組織を立ち上げた。

といっても、明確な分担意識があったわけではない。また、5年間分のはっきりした研究計画があったわけでもない。とにかく、若い人たちに存分に研究に打ち込む場を提供したいというのが、根本であった。自由にのびのびとやってもらったつもりであるが、実際

にそうであったかどうかは、参加した研究者の本音を聞いてみないと分からない。始める前からある程度分かっていたことではあるが、一分子相手の仕事は、努力だけでは不十分で運命の神様に好かれないと結果がでない。うまくいかなければ論文の書きようがないという、若い人には過酷な分野である（年寄りには手の出しようもない）。5年間で、このことはさらに思い知らされた。失敗する自由まで押しつけられてしまいながら努力を重ねてくれた仲間感謝したい。

すでに述べたように、研究代表者は、当初の予想をはるかに超える成果が得られたと考えている。実質3年半で研究チームが解散せざるを得ないのは残念であるが、今後も共同研究を続けて、分子機械の働く仕組みは分かってしまったぞ、と言ってみたいものである。

3. 研究実施体制



4. ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成9年 3月15日	第1回 SKY セミナー	慶應義塾大学矢上キャンパス	38名	研究発表及び討論会
平成9年 7月26日	第2回 SKY セミナー	東京工業大学資源化学研究所	43名	研究発表及び討論会
平成9年 10月25日	第3回 SKY セミナー	早稲田大学大久保キャンパス	37名	研究発表及び討論会
平成10年 1月10日	第4回 SKY セミナー	帝京大学生物工学研究センター	35名	研究発表及び討論会
平成10年 7月17日	第5回 SKY セミナー	東京工業大学長津田キャンパス	45名	研究発表及び討論会
平成10年 11月7日	第6回 SKY セミナー	早稲田大学大久保キャンパス	40名	研究発表及び討論会
平成11年 1月11日	第7回 SKY セミナー	慶應義塾大学矢上キャンパス	43名	研究発表及び討論会
平成11年 7月23日	第8回 SKY セミナー	東京工業大学長津田キャンパス	41名	研究発表及び討論会
平成11年 12月11日	第9回 SKY セミナー	早稲田大学大久保キャンパス	38名	研究発表及び討論会
平成12年 1月15日	第10回 SKY セミナー	慶應義塾大学矢上キャンパス	40名	研究発表及び討論会
平成12年 10月6日	第11回 SKY セミナー	東京工業大学長津田キャンパス	45名	研究発表及び討論会
平成13年 1月13日	第12回 SKY セミナー	早稲田大学大久保キャンパス	39名	研究発表及び討論会
平成13年 10月13日	第13回 SKY セミナー	慶應義塾大学矢上キャンパス	42名	研究発表及び討論会

5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 11 件、海外 66 件)

1. Suzuki, Y., Ohkura, R., Sugiura, S., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr., Tanokura, M., and Sutoh, K. Modulation of actin filament sliding by mutations of the SH2 cysteine in dictyostelium myosin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 701-706 (1997).
2. Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S., and Kinoshita, K., Jr. Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5646-5650 (1997).
3. Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K., Jr., Motojima, F., and Yoshida, M. Rotation of the gamma-subunit in F₁-ATPase-Evidence that ATP synthase is a rotary motor enzyme. *J. Bioenerg. Biomemb.* 29: 207-209 (1997).
4. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K., Jr. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* 386: 299-302 (1997).
5. Miyata, H., Kinoshita, K., Jr., and Marriott, G. Cooperative association of actin protomers and crosslinked actin oligomers in filaments at low ionic strength. *J. Biochem.* 121: 527-533 (1997).
6. Sasaki, Y.C., Yasuda, K., Suzuki, Y., Ishibashi, T., Satoh, I., Fujiki, Y. and Ishiwata, S. Two-dimensional arrangement of a functional protein by cysteine-gold substrate interaction: Enzyme activity and characterization of a protein monolayer on a gold substrate. *Biophys. J.* 72: 1842-1848 (1997).
7. Ishiwata, S., Miki, M., Shin, I., Funatsu, T., Yasuda, K. and dos Remedios, C.G. Inter-head distances in myosin attached to F-actin estimated by fluorescence energy transfer spectroscopy. *Biophys. J.* 73: 895-904 (1997).
8. Kato, Y., Matsui, T., Tanaka, N., Muneyuki, E., Hisabori, T., and Yoshida, M. Thermophilic F₁-ATPase is activated without dissociation of an endogenous inhibitor, ϵ subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 24906-24912 (1997).
9. 巨大な目印を付けて、分子の回転をみる、安田涼平、木下一彦細胞のミクロ探検—見えないものを見る— (財団法人日本学術協力財団、東京)、45-56 (1997)。
10. 回転するATP合成酵素、安田涼平、木下一彦、生体分子モーターの仕組み (日本生物物理学会シリーズ・ニューバイオフィジックス、No. 4、石渡信一編集) (共立出版、東京)、61-70 (1997)。
11. 分子モーター研究の新展開、石渡信一、「生体分子モーターの仕組み—シリーズ・ニューバイオフィジックス4—」共立出版 1-23 (1997)。
12. ミオシン分子モーターの特殊な機能、石渡信一、「生体分子モーターの仕組み—シリーズ・ニューバイオフィジックス4—」共立出版 158-173 (1997)。
13. Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Jr., and Yoshida, M. Direct observation of the rotation of ϵ subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 19375-19377 (1998).
14. Kinoshita, K. Jr. Linear and rotary molecular motors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 453 "Mechanisms of Work Production and Work Absorption in Muscle" Sugi, H., and Pollack, G.H., Eds., Plenum Press (New York), pp.5-14 (1998).
15. Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. Jr. Formation of giant liposomes promoted by divalent alkali cations: Critical role of electrostatic repulsion. *Biophys. J.* 74: 2973-2982 (1998).

16. Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr., and Yoshida, M. F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* 93: 1117-1124 (1998).
17. Kinosita, K., Jr., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S., and Yoshida, M. F₁-ATPase: A rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93: 21-24 (1998).
18. Ishiwata, S. Use of fluorescent probes. In Current Methods in Muscle Physiology-Advantages, Problems and Limitations-, Oxford Univ. Press. pp.199-222 (1998).
19. Fujita, H. and Ishiwata, S. Spontaneous oscillatory contraction without regulatory proteins in actin filament-reconstituted fibers. *Biophys. J.* 75: 1439-1445 (1998).
20. Ishiwata, S., Funatsu, T. and Fujita, H. Contractile properties of thin (actin) filament-reconstituted muscle fibers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 453: 319-329 (1998).
21. Fukuda, N., Fujita, H., Fujita, T. and Ishiwata, S. Regulatory roles of MgADP and calcium in tension development of skinned cardiac muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19: 909-921 (1998).
22. Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., Kruip, J., Hisabori, T., Yoshida, M. and Shibata, M. ATP synthesis by F₀F₁-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *J. Biol. Chem.* 273: 865-870 (1998).
23. Taguchi, H. and Yoshida, M. Chaperonin from thermophile *Thermus thermophilus*. *Methods. Enzymol.* 290: 169-180 (1998).
24. Muneyuki, E., Okuno, D., Yoshida, M., Ikai, A., Arakawa, H. A new system for the measurement of electrogenicity produced by ion pumps using a thin polymer film: examination of wild type bacteriorhodopsin and the D96N mutant over a wide pH range. *FEBS Lett.* 427: 109-114 (1998).
25. Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. and Ohkuma, S. V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* 273: 20504-20510 (1998).
26. Maruyama, C., Tanaka, Y., Takeyasu, K., Yoshida, M. and Sato, M. H. Structural studies of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: sequence analysis and identification of the residues modified by fluorescent cyclohexylcarbodiimide and maleimide. *Plant Cell Physio.* 39: 1045-1053 (1998).
27. 光ピンセットー 1 分子を見て操作するー、木下一彦、宮田英威、石渡信一、バイオイメージング (日本生物物理学会シリーズ・ニューバイオフィジックス、No. 7、曾我部正博、臼倉次郎編集)、(共立出版、東京)、93-104 (1998)。
28. 心筋の収縮と超分子の自己組織化ー化学振動から生物リズムへ 2、石渡信一、科学 68: 110-113 (1998)。
29. Adachi, K., Kinosita, K. Jr., and Ando, T. Single-fluorophore imaging with an unmodified epifluorescence microscope and conventional video camera. *J. Microscop.* 195: 125-132 (1999).
30. Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K. and Kinosita, K. Jr. Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2048-2053 (1999).
31. Arai, Y., Yasuda, R., Akashi, K., Harada, Y., Miyata, H., Kinosita, K. Jr. and Itoh, H. Tying a molecular knot with optical tweezers. *Nature* 399: 446-448 (1999).
32. Kato, H., Nishizaka, T., Iga, T., Kinosita, K. Jr. and Ishiwata, S. Imaging of thermal activation of actomyosin motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9602-9606 (1999).

33. Noji, H., Häsler, K., Junge, W., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M., and Engelbrecht, S. Rotation of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 597-599 (1999) .
34. Kinosita, K. Jr. Real time imaging of rotating molecular machines. *FASEB J.* 13: S201-S208 (1999).
35. Fukuda, N., and Ishiwata, S. Effects of pH on spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflügers Arch.* 438: 125-132 (1999).
36. Fujita, H. and Ishiwata, S. Tropomyosin modulates pH dependence of isometric tension. *Biophys. J.* 77: 1540-1546 (1999).
37. Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M., Noji, H. Cross-linking of two β subunits in the closed conformation in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274: 5701- 5706 (1999).
38. Bald, D., Muneyuki, E., Amano, T., Kruip, J., Hisabori, T. and Yoshida, M. The noncatalytic site-deficient $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex and F₀F₁-ATP synthase can continuously catalyse ATP hydrolysis when Pi is present. *Eur. J. Biochem.* 262: 563-568 (1999).
39. Hisabori, T., Kondoh, A., Yoshida, M. The γ subunit in chloroplast F₁-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* 463: 35-38 (1999).
40. Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Noji, H., Hara, K., Yoshida, M. and Hisabori, T. The $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of F₁-ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 can maintain steady state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites. *Biochem. J.* 343: 135-138 (1999).
41. Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T., Yoshida, M. ϵ subunit, an endogeneous inhibitor of bacterial F₁-ATPase, also inhibits F₀F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274: 33991- 33994 (1999).
42. F₁-ATPase : 1 分子でできた回転モーター、安田涼平、野地博行、生物物理、226 号 361-366 (1999)。
43. Miyata, H., Marriott, G. Akashi, K., Nishiyama, S., Ohki, K. and Kinosita, K. Jr. Cell deformation mechanism studied with actin-containing giant vesicle, a cell mimicking system. *In Giant Vesicles*, P. L. Luisi and P. Walde, Eds, John-Wiley & Sons, pp.320-333 (2000).
44. Akashi, K., Miyata, H. and Kinosita, K. Jr. Observation of a Variety of Giant Vesicles under an Optical Microscope. *In Giant Vesicles*, P.L. Luisi and P. Walde, Eds, John-Wiley & Sons, pp.46-48 (2000).
45. Kinosita, K. Jr., Yasuda, R. and Noji, H. F₁-ATPase: a highly efficient rotary ATP machine. *Essays Biochem.* 35: 3-18 (2000).
46. Kinosita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H. and Adachi, K. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency. *Philos. Trans. R. Sci. Lond. B* 355: 473-490 (2000).
47. Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. and Kinosita, K. Jr. Stepping rotation of F₁-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7243-7247 (2000).
48. Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinosita, K. Jr., and Ishiwata, S. Characterization of single actomyosin rigor bonds: Load-dependence of lifetime and mechanical properties. *Biophys. J.* 79: 962-974 (2000).
49. Hara, K. Y., Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Kinosita, K. Jr., and Yoshida, M. The role of the DELSEED motif of the subunit in rotation of F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 14260-14263 (2000).

50. Fukuda, N., Kajiwar, H., Ishiwata S. and Kurihara, S. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circ. Res.* 86: e1-e6 (2000).
51. Kawai, M., Kawaguchi, K., Saito, M. and Ishiwata, S. Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles. *Biophys. J.* 78: 3112-3119 (2000).
52. Yasuda, K., Okano, K. and Ishiwata, S. Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation. *Biotechniques* 28: 1006-1011 (2000).
53. Kawaguchi, K., and Ishiwata, S. Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 272, 895-899 (2000).
54. Okano, K., Yasuda, K. and Ishiwata, S. Position-specific release of DNA from a chip by using photothermal denaturation. *Sensors & Actuators B* 64: 88-94 (2000).
55. Masaike, T., Mitome, N., Noji, H., Muneyuki, E., Yasuda, R., Kinosita, K. Jr. and Yoshida, M. Rotation of F₁-ATPase and the hinge residues of the β subunit. *J. Exp. Biol.* 203: 1-8 (2000).
56. Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M. and Capaldi, A.C. Observations of rotation within the F₀F₁-ATP synthase: deciding between rotation of F₀c subunit ring and artifact. *FEBS Lett.* 470: 244-248 (2000).
57. Bald, D., Noji, H., Stumpp, M. T., Yoshida, M. and Hisabori, T. ATPase activity of a highly stable $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of thermophilic F₁ can be regulated by the introduced regulatory region of gamma subunit of chloroplast F₁. *J. Biol. Chem.* 275: 12757-12762 (2000).
58. Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, K., Wakabayashi, T., Yoshida, M. V-Type H⁺-ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*; Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* 275: 13955-13961 (2000).
59. Muneyuki, E., Noji, H., Amano, T., Masaike, T. and Yoshida, M. F₀F₁-ATP synthase: general structural features of 'ATP-engine' and a problem on free energy transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1458: 467-81 (2000).
60. 石渡信一 “筋収縮滑り運動機構とトライボロジー” トライボロジスト 45 : 119-125 (2000)。
61. 藤田英明、佐々木大輔、石渡信一 “生体分子モーター系における分子シンクロナイゼーションの研究” バイオサイエンスとインダストリー58 : 30-33 (2000)。
62. 藤田英明、佐々木大輔、石渡信一 “生体分子モーター系における分子シンクロナイゼーションの研究” バイオサイエンスとインダストリー58 : 256-259 (2000)。
63. Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N., and Kinosita, K. Jr. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* 409: 113-115 (2001).
64. Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr., and Itoh, H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase. *Nature* 410: 898-904 (2001).
65. Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Itoh, H., Yoshida, M. and Kinosita, K. Jr. Purine but not pyrimidine nucleotides support rotation of F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 276: 25480-25486 (2001)
66. Hirono-Hara, Y., Noji, H., Nishiura, M., Muneyuki, E., Hara, K.Y., Yasuda, R., Kinosita, K. Jr., and Yoshida, M. Pause and rotation of F₁-ATPase during catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13649-13654 (2001).

67. Ishiwata, S., Tadashige, J., Masui, I., Nishizaka, T. and Kinoshita, K. Jr. Microscopic analysis of polymerization and fragmentation of individual actin filaments. *Molecular Interactions of Actin* 32: 79-94 (2001).
68. Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science* 291: 667-669 (2001).
69. Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy. *Cell Motil. Cytoskel.* 49: 41-47 (2001).
70. 岡野和宣、陳鋼、小原賢信、梶山知晴、安田賢二、石渡信一 “DNA プローブアレイを用いた DNA 断片回収” 電気学会論文誌 E 121-E, 181-186 (2001)。
71. Fukuda, N., Ouchi, J., Kajiwara, H., Sasaki, D., Ishiwata, S. and Kurihara, S. Acidosis and inorganic phosphate enhance length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *J. Physiol.* 536: 153-160 (2001).
72. Fukuda, N., Sasaki, D., Ishiwata, S. and Kurihara, S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle. Role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation.* 104: 1639-1645 (2001).
73. Noji, H. and Yoshida, M. The rotary machine in the cell: ATP synthase. *J. Biol Chem.* 276: 1665-1668 (2001).
74. Motohashi, K., Kondou, A., Stumpp, M. T. and Hisabori, T. Comprehensive survey of the proteins targeted for chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11224-11229 (2001).
75. Tsunoda, S.P., Aggeler, R., Yoshida, M. and Capaldi, R.A. Rotation of the subunit oligomer in fully functional F_1F_0 ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 898-902 (2001).
76. Bald, D., Noji, H., Yoshida, M., Hirono-Hara, Y. and Hisabori, T. Redox regulation of the rotation of F_1 -ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 276: 39505-39507 (2001).
77. Fujita, H., Sasaki, D., Ishiwata, S. and Kawai, M. Elementary steps of the cross-bridge cycle in bovine myocardium with and without regulatory proteins. *Biophys. J.* 82: in press (2002).

(2) 特許出願（国内 3 件、海外 0 件）

① 国内

1. 発明者 : 木下一彦、塩 育
 発明の名称 : 顕微鏡安定性強化機構
 出願番号 : 2001-225306
 出 願 日 : 2001 年 7 月 26 日
2. 発明者 : 木下一彦、塩 育
 発明の名称 : 安定性の高い上下動機構
 出願番号 : 2001-225307
 出 願 日 : 2001 年 7 月 26 日
3. 発明者 : 木下一彦、塩 育
 発明の名称 : 光ピンセット捕捉力強化光学系
 出願番号 : 2001-379490

出 願 日 : 2001 年 12 月 13 日

(3) 受賞、新聞報道等

新聞報道

1. 見えた最小分子モーター 北海道新聞 3月20日(1997)
2. 地上最小の分子モーター発見 東京新聞 3月20日(1997)
3. 生物のエネルギーを生む細胞内極微モーター 読賣新聞 3月20日(1997)
4. あなたの体の中で世界最小モーター回転 朝日新聞 3月20日(1997)
5. 世界最小の「モーター」 日本経済新聞 3月22日(1997)
6. DNA 動かし結び目 ミクロ操作に応用も 日本経済新聞 6月3日(1999)
7. DNA の糸結ぶ 光ピンセット使う 日経産業新聞 6月3日(1999)
8. DNA 結んだ! 読賣新聞 6月3日(1999)
9. DNA に“結び目”作る 日刊工業新聞 6月3日(1999)
10. 「世界最小のひも」DNA 結んだ! 毎日新聞 6月3日(1999)
11. 「分子モーター」仕組み解明に道 日本工業新聞 6月3日(1999)
12. 世界初 DNA 使い「結び目」産経新聞 6月3日(1999)
13. 21世紀 DNA 糸でミクロ手術? 東京新聞 6月3日(1999)
14. 世界初 結べた DNA 神奈川新聞 6月3日(1999)
15. DNA 操りひもの結び目 赤旗新聞 6月3日(1999)
16. DNA チップで遺伝子回収 日本経済新聞 1月10日(2000)
17. タンパク移動の機構解明 日経産業新聞 1月30日(2001)
18. 遺伝子情報読みとる酵素 DNA をくるくる回転 日刊工業新聞 1月11日(2001)
19. 分子モーターの回転撮影 日本工業新聞 4月19日(2001)
20. 瞬間速度毎分10万回転超える 日刊工業新聞 4月19日(2001)
21. レース車並み高速回転 日経産業新聞 4月19日(2001)
22. レーシングカー並み細胞内モーター 赤旗新聞 4月19日(2001)
23. タンパク質1分子の世界最小回転モーター 科学新聞 4月27日(2001)