

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2009

課題番号：16087208

研究課題名(和文)ミトコンドリアエネルギー変換を駆動する蛋白質複合体の機能の原子機構

研究課題名(英文) The atomic mechanism of the functions of protein complexes which drive mitochondrial energy transduction.

研究代表者

吉川 信也 (YOSHIKAWA SHINYA)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号 40068119

研究成果の概要(和文): チトクロム酸化酵素の全脂質の構造が決定され、His503がプロトンポンプと酸素還元の共役部位であること、休止型酵素の酸素還元部位には過酸化物が結合していること、 $\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$ に結合している $\text{O}_2$ が1段階3電子還元されること、水経路がプロトンポンプの逆流を効率よく防ぐこと等が明らかになった。NADH-ユビキノン還元酵素とF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP合成酵素が二次元結晶化された。水溶液中の蛋白質に適用できる超高感度赤外分光装置が開発された。

研究成果の概要(英文): Complete structures of the intrinsic lipids in bovine cytochrome c oxidase were determined. His503 couples the proton-pumping process with  $\text{O}_2$  reduction process. Resting oxidized enzyme has a peroxide bridged in the  $\text{O}_2$  reduction site. The bound  $\text{O}_2$  at  $\text{Fe}_{\text{a}3}^{2+}$  is completely reduced by a non-consecutive three electron donation. The water-channel of the H-channel blocks the reverse proton leak to provide the highly effective energy coupling. Two dimensional crystals of NADH-ubiquinone reductase and F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase were obtained. Highly sensitive infrared apparatus applicable for any protein system in aqueous solution was constructed.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費       | 間接経費 | 合計         |
|--------|------------|------|------------|
| 2004年度 | 8,700,000  | 0    | 8,700,000  |
| 2005年度 | 17,400,000 | 0    | 17,400,000 |
| 2006年度 | 16,500,000 | 0    | 16,500,000 |
| 2007年度 | 26,489,000 | 0    | 26,489,000 |
| 2008年度 | 13,000,000 | 0    | 13,000,000 |
| 2009年度 | 13,000,000 | 0    | 13,000,000 |
| 総計     | 95,089,000 | 0    | 95,089,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：酸素反応機構、膜蛋白質、ミトコンドリア、エネルギー変換、X線結晶構造解析、チトクロム酸化酵素、NADH-ユビキノン還元酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) チトクロム酸化酵素(CcO): それまで、8年にわたる CcO 結晶化に最適の界面活性剤の、有機合成による探索の結果、再現性に問題はあったが、1.6 分解能での構造解析が可能な X

線回折像を与える結晶が得られた。したがって、水素原子レベルの X 線構造解析は困難ではあるが現実的な課題と考えられる状況であった。また、プロトンポンプ経路と考えられる構造が発見され、酵素反応中間体である P 型と F 型の 2.0

~2.1 分解能での構造解析が本格的に開始されていた。最大の問題はP, F, O 等の中間体を結晶中で単離することであった。

(2) NADH-ユビキノン還元酵素(Complex I): 当研究計画開始より約 10 年前に微結晶を得ているが明瞭な X 線回折斑点を示さなかった。微結晶が析出するような標品でも酵素活性を持つ酵素は 10~20%程度しか含まれていないことが阻害剤による酵素活性の滴定により明らかになった。その後、精製条件を検討した結果、活性酵素を 2/3 以上含む、安定な標品が得られていた。

(3)  $F_1F_0$ ATP 合成酵素( $F_1F_0$ ATPase): 精製条件を精密に検討し、これまでに知られている本酵素の全てのサブユニットを含み不純タンパク質がほとんど認められない標品の精製法が確立された。抗体結合型酵素の結晶化のため、数種のモノクローナル抗体の調製が進められていた。

(4) 赤外分光学的解析: 可視分光測定に用いる程度の濃度の酵素溶液のタンパク質部分の時分割赤外分光のための装置が小倉尚志博士により設計され、当研究計画発足以前より5年間にわたって試作がくり返されていた。しかし、その後、この装置の改善の余地がさらに発見された。一方、市販の FTIR 装置による静的赤外分光法により測定された CcO の酸化還元差スペクトルの強度は非常に低く、酸化還元反応に共役して立体構造が変化するアミノ酸残基は極めて少数であることが示されていた。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアエネルギー変換の全容を解明するためにはそれを駆動する最も重要な構成成分であるチトクロム酸化酵素(CcO)と NADH ユビキノン還元酵素(Complex I)と ATP 合成酵素( $F_1F_0$ ATPase)との3複合体の反応機構を明らかにしなければならない。そこで、本研究では、CcO については、種々の酵素反応中間体を結晶中で低温固定しX線結晶構造を 1.2 Å 分解能で水素原子の位置をも含めて決定するとともに、プロトン輸送に伴うアミノ酸残基の立体構造変化を含めた化学構造変化を、時分割高感度赤外分光法により動的に追跡する。このとき、同位体標識により、検討したいアミノ酸残基の赤外吸収変化を他の変化と区別する。X線構造解析は、他の方法では得られない立体構造情報をもたらすが、本研究ではさらに反応に関与する官能基や原子の化学反応性に関する、より精密な情報と、反応に伴う実時間変化に関する情報とを獲得するために時分割高感度赤外分光法により反応経過を解析する。Complex I および  $F_1F_0$ ATPase については、結晶化条件を確立し、2.8 Å 分解能より高分解能で種々の酵素反応中間体を低温固定しX線構造を決定する。一方、酵素反応に伴う時分割赤外分光学的解析を行う。このようにして、上述の CcO の研究のように水素原子レベルのX線構造解析と同位体標識酵素を用いた時分割赤外分光による高精度の

反応機構解析の足がかりとする。

## 3. 研究の方法

### (1) CcO (チトクロム酸化酵素)

#### 結晶化と X 線結晶構造解析

ウシ心筋 CcO の結晶化に適した界面活性剤を有機合成によって探索することにより結晶の品位の向上をはかる。結晶化条件は本研究期間を通じて検討し、できる限り分解能の向上を目指した。我々の研究対象であるウシ心筋 CcO 結晶の充填様式は、水素原子の位置を決定するためには 1.4 分解能以上の高分解能が必要であることを示している。そこで 1.4 分解能の構造解析が可能な X 線回折強度データの収集、さらにはその精度の向上をはかる。また種々の近似解析法を開発し水素原子の位置決定を試みる。このようにして、プロトンの輸送に伴う輸送経路のアミノ酸側鎖の立体構造変化やプロトン化状態の変化を直接 X 線構造中に検出することを目指した。

この酵素の酵素反応中間体である P 型と F 型は結晶中で安定化することが容易でないことが明らかになり、それら結晶の調製法の再検討と分解能の向上をはかった。これら中間体の X 線構造解析により、 $O_2$  還元反応とプロトン輸送のための立体構造変化との共役の機構を解明することを目指す。さらに、完全酸化型や完全還元型だけではなく、阻害剤存在下で調製した、酸化状態の異なる酸化還元中心を持つ酵素の構造解析により、どの酸化還元中心がどの立体構造変化を制御しているかを明らかにする。上記全ての中間体および阻害剤結合型の 1.2 分解能の構造解析を目標とした。

なお、ウシ心筋 CcO の構造決定の一環として脂質の構造解析や休止酸化型の酸素還元中心の精密構造解析を異常分散効果の解析も利用しつつ推進した。

#### 赤外分光学的機能解析

高感度時分割赤外分光装置により、ウシ心筋 CcO の  $O_2$  還元反応に伴う赤外吸収スペクトルの時間変化を精密に解析し、どの酸化還元中心がどの赤外吸収帯の変化を制御しているかを明らかにすることを計画していた。しかし、高感度時分割赤外分光装置の性能向上に集中する必要があると、計画変更をせざるを得なかった。

### (2) Complex (NADH-ユビキノン還元酵素)

有機合成による界面活性剤の探索により、結晶化のために最も重要な、精製法の改良に重点を置いた。さらに、活性酵素分子が現在 1/3 程度しか含まれていない標品が得られているので、微結晶化による純化も試みた。(ウシ心筋チトクロム  $bc_1$  複合体では変性酵素が 50%以上含まれているような標品から微結晶化により変性酵素を除去することができる。) 純度、活性、安定性ともに、種々の機能研究に十分

な標品が得られているので、フラビンと鉄イオウ中心の共鳴ラマンスペクトルを解析した。平行して2次元結晶化も試みた。

#### (3) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase(ATP合成酵素)

Complex と同様に界面活性剤の探索により精製法の改良に努力する。さらに、平成16-17年度はモノクロナール抗体結合型酵素の結晶化に重点を置いた。また、有色の不純物のほとんど含まれていない高純度標品が得られているので非共鳴ラマン分光法による構造解析も推進した。さらに2次元結晶化条件の探索も行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) CcO

##### 結晶化とX線結晶構造解析

3オキサトリデシルマンノシドで安定化したウシ心筋チトクロム酸化酵素の、1.65 分解能でのX線構造では酵素は単量体で存在していることが認められた。しかしデシルマルトシドで安定化した標品では2量体で存在していたので、ミトコンドリア膜内では単量体と2量体の相互変換が示唆される。

CcOのO<sub>2</sub>還元とプロトンポンプ機構解明のために呼吸阻害剤結合のX線構造に及ぼす効果を検討した。その結果、COは低温のときはCu<sub>B</sub><sup>1+</sup>にside-on型で、常温ではend-on型でFe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>に結合し、NOはbent end-on型にFe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>に結合していること、Fe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>に結合したCOもNOもCu<sub>B</sub><sup>1+</sup>から2.5 以上離れており、相互作用は非常に弱いと考えられること、さらに、Cu<sub>B</sub><sup>1+</sup>は3残基のHisと平面3配位構造をとっていた。したがって、Fe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>の配位子はCu<sub>B</sub><sup>1+</sup>とほとんど相互作用がないことを強く示唆している。これがFe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>-O<sub>2</sub>結合型の安定性の構造的要因と考えられる。完全還元型CN<sup>-</sup>結合型では、CN<sup>-</sup>は水分子を導入しCu<sub>B</sub>の配位子の一つであるHis290がCu<sub>B</sub>から脱離し、CN<sup>-</sup>と残りの2個のHisが新たな平面3配位構造を形成した。一方O<sub>2</sub>はFe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>に結合したときスーパーオキシドに近い電子状態になっていることが赤外分光解析により明らかにされている。したがって、O<sub>2</sub>結合型もCN<sup>-</sup>と同様に水分子を取り込んで上述の構造を形成すると考えられる。これらの結果はO<sub>2</sub>がFe<sub>a3</sub><sup>2+</sup>に結合して1電子を收容して形成されたスーパーオキシドにより水分子が導入され1段階3電子還元を引き金になっていることを示唆している。さらに、COやNO結合によりH-pathwayの下部にある水経路の上部の容積が大幅に減少した。さらに、F型やP型やO型でも同様であり、還元型以外のときは大幅に減少し水の通過が実質的に遮断されていた。この変化によりプロトンポンプの逆流を効率よく防ぐことにより、エネルギー変換効率を高めることに寄与していると考えられる。これらの成果はCcOの反応機構の理解を飛躍的に高める歴史的成果といえる。

ヘムAのビドロキシフェルニルエチル基の

水酸基の結合している炭素(ヘムAの持つ唯一の不斉炭素)の絶対配置がチトクロム酸化酵素のX線構造解析結果から決定された。

Zn<sup>2+</sup>とCd<sup>2+</sup>のX線構造での結合様式と酵素活性阻害様式を組織的に解析し、酸素還元のためのH<sup>+</sup>の輸送経路の一つであるD経路のHis503が酵素の酸化還元に共役したH<sup>+</sup>の能動的な取り込みを、プロトンポンプに共役して、促進していることを明らかにした。膜間腔側にZn<sup>2+</sup>が結合しプロトンポンプを阻害することが報告されているが、そのような効果を示唆するZn<sup>2+</sup>結合は認められなかった。

休止状態酸化型酵素の酸素還元中心には過酸化物が架橋していることをX線構造解析法により非経験的に決定した。この過程でSPring-8の強力X線による水和電子が金属中心を還元すること、しかし、100Kでは蛋白質の動きがほとんど抑えられるため、金属中心の還元に伴う立体構造変化はほとんど起こらないことが明らかになった。なお、休止状態酸化型酵素の酸素還元中心には過酸化物が架橋していることは、塩素イオンの異常分散効果が観測できなかったこと、共鳴ラマン分光法によりO-O伸縮振動が観測されたことによっても確かめられた。

過酸化水素によって調製された酸素還元反応中間体のP型とF型の混合物のX線構造が解明され、酸素原子間距離は休止期のそれより明らかに長くO-O結合は切断されていた。

ウシ心筋CcOの結晶化およびX線回折実験条件の検討を当研究期間中継続しSPring-8で0.93 分解能の回折斑点を検出した。さらに、酸化型および還元型酵素について、1.4 分解能での構造解析が可能なX線回折強度データの収集に成功した。水素原子位置決定を、方法の開発を進めながら推進する一方、酸化還元に伴う、非水素原子の位置変化を解析した。その結果、Mg<sup>2+</sup>中心付近の水分子の位置に明らかな変化が認められた。

##### 脂質の構造決定

CcO固有のリン脂質の構造と組成は、結晶化条件(精製条件)が確立していなかったため、未解決であった。反応機構の解明のためには、全ての構成成分の化学構造を決定する必要がある。我々は、結晶化標品から脂質を単離し、質量分析法等によって、含まれている全ての脂質(7種のリン脂質と7種のトリグリセリド)の構造を決定した。次に、酸化型1.8 分解能のCcOの電子密度に基づいて脂質の構造を同定し、10分子のリン脂質と3分子のトリグリセリドが含まれていることを明らかにした。サブユニットIIIに強く結合している3分子のリン脂質の脂肪酸の不飽和結合のcis/trans構造の区別が1.8 分解能のX線構造で可能であった。それら3分子のリン脂質は酸素輸送経路に配置されて、酸素輸送を制御していることがDCCD結合型酵素のX線構造から明らかにされた。さらに、単量体/2量体変換に伴う脂質結合位置の変化が検出された。

## (2) Complex

ペリシジン感受性酵素分子(変性していない酵素分子)70%以上を含む標品の精製法を確立した。この標品によりComplex IはFMN,  $Q_{10}$ ,  $Zn^{2+}$ を各1当量、無機イオウと鉄イオンを各30当量含むことを明らかにした。また、Optical diffractionを示す2次元結晶が得られた。2次元結晶は、負染色像の再考分解能(20Å)に到達し、現在氷抱埋2次元結晶の電子顕微鏡観察によって結晶化条件の最適化を推進している。また、2次元結晶化条件の再現性がコール酸添加により大きく向上した。

FMNと鉄イオン中心の共鳴ラマンスペクトルの検出に成功した。蛋白質の分子量が高いほどFMNの共鳴ラマンスペクトルの測定は困難である。したがって、Complex IはFMNのラマンスペクトルの測定できた最大の蛋白質である。

## (3) F1FoATPase

F1FoATPaseの全てのサブユニットを含み、可視吸収を持つ不純物をほとんど含まない安定な標品の精製法を確立した。そこで、非共鳴ラマンスペクトルの測定を推進しATP結合による芳香族アミノ酸の環境変化を検出した。またOptical diffractionを示す2次元結晶が得られた。この2次元結晶の電子顕微鏡像は欠損のない酵素分子が結晶化されたことを示している。これまでサブユニットの欠損のない結晶は得られておらず、この結果は極めて意義深い。

## (4) 超高感度時間分解赤外分光装置の開発

フロー法による赤外分光学的解析を目指して、フェムト秒レーザーの白色性を利用した赤外光源とMCTマルチチャンネル検出器で構成される赤外分光装置の開発に努力した。その結果フローセルに必要な最短光路長(50  $\mu$ m)で高精度の赤外分光測定が可能となった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計24件)

1. K. Muramoto, K. Ohta, K. Shinzawa-Itoh, K. Kanda, M. Taniguchi, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable  $O_2$  reduction with minimization of active oxygen species and provide a proton pumping gate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010 in press.(査読有)
2. M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, A Resonance Raman Band Assignable to the O-O Stretching Mode in the Resting Oxidized State of Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase, *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, in press. (査読有)
3. Y. Katayama, K. Shimokata, M. Suematsu, T. Ogura, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, Cell-free synthesis of cytochrome *c* oxidase, a multicomponent membrane protein, *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, in press. (査読有)

4. Ohta K, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T (2010) X-ray structure of the NO-bound Cu(B) in bovine cytochrome *c* oxidase. *Acta Cryst. F*, **66**, 251-253(査読有)
5. K. Shinzawa-Itoh, J. Seiyama, H. Terada, R. Nakatsubo, K. Naoki, Y. Nakashima, S. Yoshikawa (2010) Bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase contains one molecule of ubiquinone with ten isoprenoide units as one of the cofactors. *Biochemistry* 49, 487-492(査読有)
6. Nakamura-Ogiso, E., Matsuno-Yagi, A., Yoshikawa, S., Yagi, T., and Ohnishi, T. (2008) Iron-sulfur cluster N5 is coordinated by a HXXXCXXCXXXXXC motif in the NuoG subunit of *E. coli* NADH:quinine oxidoreductase (Complex I), *J. Biol. Chem.* **283**, 25979-25987. (査読有)
7. Ohnishi, To., Ohnishi, Ts., Shinzawa-Itoh, K. and Yoshikawa, S. (2008) Functional role of Coenzyme Q in the energy coupling of NADH-CoQ oxidoreductase (Complex I): Stabilization of the semiquinone state with application of inside-positive membrane potential to proteoliposomes, *Biofactor* **32**, 13-22. (査読有)
8. Ikemura, K., Mukai, M., Shimada, H., Tsukihara, T., Yamaguchi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Ogura, T., Red-Excitation Resonance Raman Analysis of the  $\nu_{Fe=O}$  Mode of Ferryl-Oxo Hemoproteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14384-14385 (2008). (査読有)
9. H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura, S. Yoshikawa (2009) A Peroxide Bridge between Fe and Cu Ions in the  $O_2$  Reduction Site of Fully Oxidized Cytochrome *c* Oxidase could suppress the Proton Pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2165-2169 (2009). (査読有)
10. Sugiyama, H., Nakatsubo, R., Yamaguchi, S., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K. Yoshikawa, S.: Resonance Raman spectra of the FMN of the bovine heart NADH: coenzyme Q oxidoreductase, the largest membrane protein in the mitochondrial respiratory system, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 145-148. (査読有)
11. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., Aoyama, H., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 7881-7886. (査読有)

12. S. Yoshikawa, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, T. Tsukihara, T. Ogura, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimnada, Reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 395-400. (査読有)
13. S. Yoshikawa, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimnada, Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1110-1116. (査読有)
14. K. Shimokata, Y. Katayama, H. Murayama, M. Suematsu, T. Tsukihara, K. Muramoto, H. Aoyama, S. Yoshikawa, H. Shimada, The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 4200-4205. (査読有)
15. K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, K. Muramoto, H. Terada, T. Kurauchi, Y. Tadehara, A. Yamasaki, T. Sugimura, S. Kurono, K. Tsujimoto, T. Mizushima, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoshikawa: Structures and physiological roles of thirteen integral lipids of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *EMBO J.* 26 (2007) 1713-1725. (査読有)
16. K. Muramoto, K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoko-o, E. Yamashita, H. Aoyama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa: A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (2007) 7881-7886. (査読有)
17. E. Yamashita ( 阪大 ), H. Aoyama ( 理研 ), M. Yao ( 理研 ), K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Tsukihara ( 阪大 ): Absolute configuration of the hydroxyfarnesylethyl group of haem A, determined by X-ray structural analysis of bovine heart cytochrome *c* oxidase using methods applicable at 2.8 Å resolution, *Acta Cryst.* D61(2005) 1373-1377. (査読有)
18. S. Yoshikawa: Reaction mechanism and phospholipids structures of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Biochem. Soc. Trans.* (2005) 934-937. (査読有)
19. T. Takahashi, S. Kuroiwa, T. Ogura, S. Yoshikawa: Probing the oxygen activation reaction in intact whole mitochondria through analysis of molecular vibrations, *J. Am. Chem. Soc.* 127(2005) 9970-9971(査読有)
20. K. Oda, T. Ogura, E. H. Appelman, S. Yoshikawa, The intrinsic stability of the second intermediate following the dioxygen-bound form in the O<sub>2</sub> reduction by cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.* 570(2004) 161-165. (査読有)

[学会発表](計133件)  
国際学会

- S. Yoshikawa, Structures of bovine cytochrome *c* oxidase facilitating the four-electron reduction of O<sub>2</sub> in one-step and the effective proton pump. 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, 2009, Nagoya Japan, Plenary Lecture 2 (July 26, 2009).
- H. Shimada, Mutagenesis studies on the functional roles of possible proton transfer pathways in bovine heart cytochrome *c* oxidase, 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, 2009, Nagoya Japan, Invited Lecture A-08 (July 26, 2009).
- T. Ogura, Structure and dynamics of cytochrome *c* oxidase as studied with resonance Raman spectroscopy. 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, 2009, Nagoya Japan, Invited Lecture A-10 (July 26, 2009).
- S. Yoshikawa, X-ray structures of CO, NO and Cyanide derivatives of bovine heart cytochrome *c* oxidase. 54<sup>th</sup> National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Citta Universitaria, Catania Italy, September 23-27, 2009, Invited Lecture in Symposium G (September 25, 2009).
- S. Yoshikawa, Bovine heart cytochrome *c* oxidase structures facilitating the four-electron reduction of O<sub>2</sub> in one-step and the effective proton pump. Invited Seminar in Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, January 7, 2010, New York, NY, USA.
- Yoshikawa, S.: Reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 53<sup>rd</sup> National Meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (plenary lecture) (Riccione, Italy, 2008, September 23-26)
- Yoshikawa, S.: Evidence for H channel proton pump in bovine cytochrome *c* oxidase, 15<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference (invited presentation) (Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)
- Suga M, High resolution X-ray diffraction experiment of bovine cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)
- Mochizuki M, X-ray crystal structural analysis of cyanide binding cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)
- Aoyama H, A peroxide bridge between the two metals in the dinuclear center of the fully oxidized cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)

11. Muramoto K, X-ray structure of carbon monoxide at copper site of the dinuclear site of cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)

12. Shinzawa-Itoh K, Aoyama H, Muramoto K, Terada H, Kurauchi T, Tadehara Y, Yamasaki A, Sugimura T, Kurono S, Tsujimoto K, Mizushima T, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S. Structural analyses for lipid/protein interactions in bovine heart cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)

13. Muramoto K, X-ray structural analysis of zinc/cadmium inhibitory site in bovine heart cytochrome *c* oxidase (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)

14. Y. Katayama, Synthesis of functional *Paracoccus Denitrificans* cytochrome *c* oxidase by *Escherichia coli* cell-free coupled transcription/translation system (The 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Ireland, 2008, July 19-24)

15. K. Shimokata, Mutations of possible proton-transfer pathways of bovine heart cytochrome *c* oxidase

16. Yoshikawa, S. : Lipid-Protein Interactions in Cytochrome *c* Oxidase, Keystone Symposia, "Molecular Basis for Biological Membrane Organization"(invited presentation) (Big Sky, Montana USA, 2008, January 12-18 )

17. Yoshikawa, S. : Proton Pumping Mechanism of Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase, Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th International Biophysics Congress (invited presentation) (Long Beach, California, USA, 2008, February 2-6)

18. S. Yoshikawa: Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Symposium "Bioenergetics Electron transport systems in biomembranes organized by S. Yoshikawa and W. A. Cramer (invited presentation) (Kyoto, Japan 2006, June 18-23).

19. Y. Yukutake, Mutational analyses of a hydrogen bond network in a bacterial cytochrome *c* oxidase which is homologous to that of the bovine heart enzyme, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (Kyoto, Japan 2006, June 18-23).

20. S. Yoshikawa, Reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase, The 14<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference (plenary lecture) (Moscow Russia, 2006 July 22-27).

21. S. Yoshikawa, Mass spectral and X-ray structural analyses of lipids in bovine heart cytochrome *c* oxidase, BioScience 2005—from Gene to Systems (invited presentation) (SECC, Glasgow, UK, 2005 July 17-21).

22. S. Yoshikawa, Experimental results indicating that heme *a* of bovine heart cytochrome *c* oxidase is the driving element of the proton-pumping, International Conference on Mitochondria, from Molecular Insight to Physiology and Pathology 40 Years of Bari Meetings (invited presentation) (University of Bari, Bari Italy 2005 December 17-22).

23. S. Yoshikawa, The low spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton pumping process, 13<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference, Colloquium ID, "Heme-Copper Oxygen Reductase" (invited presentation) (Pisa, Italy, 2004 August 21-26).

〔図書〕(計2件)

1. S. Yoshikawa, Structural chemical studies on the reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, in "Biophysical and Structural Aspects of Bioenergetics" Marten Wikström ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 2005 pp. 55-71.

2. S. Yoshikawa, Mitochondrial cytochrome *c* oxidase in "Structures" B. Lewin ed., *Virtual Text*, Ergito Cambridge MA USA, 2005. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 信也 (YOSHIKAWA SHINYA)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・  
教授

研究者番号：40068119

(2) 研究分担者

村本 和優 (MURAMOTO KAZUMASA)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・  
准教授

研究者番号：50305679

(H20-H21: 連携研究者)

伊藤 恭子 (ITOH KYOKO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・  
助教

研究者番号：70206316

(H20-H21: 連携研究者)