

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 2月28日現在

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21370073
 研究課題名（和文） 分子生物学的手法によるウシと細菌のチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究
 研究課題名（英文） Studies by molecular biological methods on proton pumping mechanisms of bovine heart and bacterial cytochrome *c* oxidases
 研究代表者
 島田 秀夫（Shimada Hideo）
 研究者番号：80095611

研究成果の概要（和文）：我々が開発した HeLa 細胞を宿主とするウシ・ヒト雑種酵素発現系を利用して、ウシ心筋チトクロム酸化酵素で提案されている H⁺ 輸送経路の一つ D-pathway の変異体解析を行った。細菌酵素のこれに対応した経路の変異体解析が支持する H⁺ 能動輸送機能は否定された。振動分光法を用いた H⁺ 輸送機構の研究に必須である部位特異的同位体標識のために無細胞系によるタンパク質発現を試みた。大腸菌を利用してサブユニット数が少ない細菌酵素の機能発現系は確立した。

研究成果の概要（英文）：Function of a putative proton transfer pathway, D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase (CcO) was analyzed by site-directed mutagenesis employing HeLa cell expression system we have developed to produce bovine/human hybrid CcO. Corresponding bacterial pathway has been proposed to convey pumping and water-forming protons, which is supported by mutagenesis. Our analyses did not support the proton pumping function. Study on proton transfer mechanism of proteins by vibrational spectroscopy requires site-specific isotope labeling of proteins, which can be achieved by cell-free protein synthesis. We have successfully developed a *E. coli* cell free system to produce normal bacterial CcO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
22年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
23年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

1. 研究開始当初の背景

(1) チトクロム *c* 酸化酵素は、細胞呼吸系の末端酸化酵素であり、ミトコンドリア(mt)内膜(細菌では細胞膜)を貫通するタンパク質複合体である。膜の正電荷側に局在したチトクロム *c* (Cyt *c*) から電子を受容し、分子状酸素を還元するとともに、

膜の負電荷側から H⁺ を得て水を形成する。この反応に共役して、膜の負電荷側から正電荷側へ H⁺ を能動輸送(ポンプ)する。以上の反応によって生じる電気化学的 H⁺ 濃度勾配が ATP 合成を駆動する。ウシ心筋および細菌酵素の X 線結晶構造解析により両者の間で相同な3つの

H⁺輸送経路(D-, K-, H-pathway)が示唆されている。

D-と K-pathway は、膜負電荷側と酸素還元部位とを連結するため、両経路は水形成用 H⁺輸送経路であると示唆され、細菌酵素の変異体解析により支持されている。水形成用に4等量のH⁺が必要であるが、二つの経路により、2等量ずつ(あるいは1と3等量)輸送されることが示されている。またD-pathwayは、ポンプ用H⁺をも輸送すると提案され、変異体解析が支持している(1-3)。この経路に対応する経路がウシ酵素にもあり、構造が酷似しているのみならず、機能に重要なアミノ酸残基が保存されている。したがって、ウシ酵素のD-pathwayも同じ機能をもつと推測されている。一方、我々は、ウシ酵素のX線構造と変異体解析により、D-pathwayと異なる経路がH⁺ポンプ経路であると提案している(4, 5)。しかし、この経路のポンプ部位アミノ酸残基(Asp51)は、動物にはよく保存されているものの、細菌、植物、下等真核生物には保存されていないため、D-pathway説がこの分野で支持されている。

(2)H⁺輸送機構の研究には、変異体解析が有効である。加えて、経路を構成するアミノ酸残基側鎖に於けるH⁺の脱着を示すことは直接的証拠を与える。赤外分光法が適しているものの、タンパク質内に目的のアミノ酸と同じアミノ酸が数多く含まれる。したがって、同位体シフトにより識別する必要がある。部位特異的同位体標識は、無細胞系タンパク質合成によって可能である。膜タンパク質複合体であり、また4つの酸化還元中心をもつ本酵素の無細胞系での機能発現は極めて困難な作業と考えられるものの、これまで数年に渡って、ウシと細菌の酵素を無細胞系で機能発現させる努力を続けていた。サブユニット構成が比較的単純な細菌酵素は、大腸菌の無細胞系を用いて、機能をもつ酵素の合成に成功しているもの機能化効率が極めて低い。

2. 研究の目的

細菌酵素のD-pathwayはH⁺ポンプ経路であると提案され、構造上の類似性から対応するウシ酵素の経路も同じ機能を持つと推測され、我々の提案と対立している。しかし、ウシ酵素では、その機能はまだ検討されていない。本研究では、我々が開発したHeLa細胞を用いたウシ・ヒト雑種酵素発現系を用い、変異体解析によって、その機能を検討することを目的にした。また提案されているH⁺輸送経路の検証には、経路を構成するアミノ酸残基におけるH⁺の脱着を赤外分光法で実証することが重要である。しかし、同種のアミノ酸を数多くもつタンパク質では、特定のアミノ酸側鎖官能基由来のシグナルの帰属には、部位特異的同位体標識が必須である。この標識は無細胞系でのタンパク質合成によって可能であるため、ウシまたは細菌酵素の無細胞発

現系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ウシ心筋チトクロムc酸化酵素のD-pathwayの機能を検証するため、4種の変異体(Asn98Asp, Asn163Asp, Glu242Gln, Asp91Asn)を作成し、変異が機能に及ぼす効果を検討した。後者の二つの部位は経路の入り口と出口に対応し、細菌酵素と同様な変異が酸素還元活性を失わせることが知られている。一方、前者二カ所の部位と変異とは、対応する細菌酵素で、高い酸素還元活性を保持したまま、H⁺ポンプ活性を失わせる特異な変異である。これら部位での結果が唯一細菌酵素でのD-pathwayポンプ説を支持している。

(1)変異遺伝子の調製と発現ベクターのHeLa細胞への導入

ウシ酵素は13個のサブユニットから構成される。D-pathwayはmtDNAにコードされるサブユニットI(Sub I)が担っている。変異を導入したウシSub I遺伝子を、強力なプロモーター(CMVプロモーター)の支配下に置き、既に報告している方法によって、発現ベクターを構築し、発現ベクターを安定に保持する細胞株を樹立した(1, 2)。細胞質で合成されたSub Iは、N端に融合させたmt標的シグナル配列によりmt内膜に輸送され、そこでヒトの他のサブユニットと集合し機能化する(1, 2)。この細胞には、内在性のヒト酵素が共存するものの、雑種酵素を優勢に発現する。

(2)内在性ヒト酵素とウシ・ヒト雑種酵素

ヒトSub Iに特異的な抗体を用いたイムノブロット法を用い、ヒト酵素を定量することにより雑種酵素量を見積もった。培養細胞からmt標品を調製し、本酵素に特有の可視吸収スペクトルの吸光度によりチトクロム酸化酵素量を決定した。一定量の酵素標品をSDS-PAGEし、イムノブロット法によりヒトSub I量を定量した。高い定量性が必要な実験ではn=4の測定を行い偏差は15%以下であった。

(3)活性測定

本発現系ではウシ・ヒト雑種酵素が優勢に発現するため変異体酵素を単離しないで雑種酵素の機能を評価できる。変異体発現株を培養後、細胞からmt画分を調製した。低張液で処理によりmtの外膜が破壊されたミトプラストを調製し、反応液に添加した還元型Cyt c酸化活性とH⁺ポンプ活性を測定した。高い定量性が必要な実験ではn=7-11の測定を行い偏差は5%以下であった。

①Cyt c酸化活性

自記分光装置(パーキンエルマーLambda18)を用い、還元型Cyt cの酸化反応

を、550 nm の吸光度変化で測定した。

②H⁺ポンプ活性

還元型 Cyt *c* の酸化反応と共役した、膜内側から外側（反応液中）への H⁺ の放出によって起こる pH 変化を、pH 電極で測定した。反応液中に添加した H⁺ 当量と pH 変化の関係は、標準の HCl を利用して決定した。

(4) 変異の確認

必要があれば樹立した細胞での発現ベクター上の Sub I 遺伝子の塩基配列と全ヒトサブユニット遺伝子の塩基配列を決定した。ゲノム DNA を抽出し、目的の DNA 領域を PCR により増幅後、塩基配列を決定した。また、イントロン領域を含み、目的遺伝子領域が長鎖におよぶものについては、mRNA の抽出後、RT-PCR により cDNA を調製し、目的の領域を PCR により増幅後、塩基配列を決定した。これにより、導入した変異遺伝子の保持、および、新たな変異の有無を確認した。

(5) 大腸菌の無細胞系での細菌チトクロム酸化酵素の合成

Paracoccus denitrificans のチトクロム酸化酵素の 3 つの遺伝子発現ベクターを構築し、大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用いて合成した。合成系は市販のものを用いた。但し、ロットによって目的の遺伝子の発現効率が異なるため、発現効率の高いものを選んで使用した。詳細は報告した論文 (7) に記載されているため省くが、膜タンパク質を発現する場合、必要な膜系として、多くの系を試した結果、大腸菌の細胞が部分的に破壊されているものの、膜の内側と外側のトポロジーが生細胞と同じ方向に保持されているものが機能化に最も優れていることがわかったためこれを用いた。これは低圧で大腸菌をフレンチプレス処理して調製した。

4. 研究成果

(1) Asn98Asp, Asn163Asp 変異体解析結果

①イムノブロット解析

Asn98Asp, Asn163Asp 変異体発現ベクターを導入した株において、雑種酵素が優勢に発現しているか否かを、イムノブロット法により検討した(図 1a, b)。両変異体発現標品ともに WT に比べバンドの黒化度が低下していた。WT および変異体試料の酵素濃度を一定にして SDS-PAGE を行った。したがって、ヒト Sub I が顕著に減少し、ウシ Sub I が優勢に発現していることを示す。

②活性測定

雑種酵素が優勢に発現した株を用いてチトクロム *c* (Cyt *c*) 酸化活性および H⁺ポンプ

活性測定を行った(図 2)。両変異体は、WT と同様に速やかに還元型 Cyt *c* を酸化した(図 2a, b, c)。また H⁺ポンプ活性測定では、

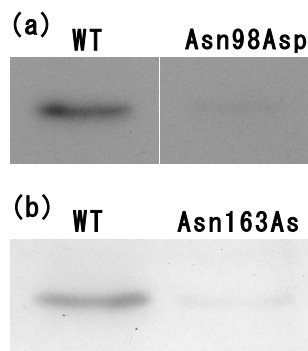


図 1. 変異体 Asn98Asp, Asn163Asp 株細胞 mt 画分のプロット解析

還元型 Cyt *c* 添加後、反応液が酸性化した(図 2d, e, f)。これは、膜内側から外側への H⁺ の放出を示す。H⁺イオノフォア FCCP を添加すると、H⁺の放出は認められなかった。これは、健全なミトコンドリア (mt) 内膜に存在する本酵素により、H⁺が放出されたことを示す。両変異体においても、H⁺が膜内側から外側へ放出された。したがって、両変異は、Cyt *c* 酸化活性にも、H⁺ポンプ活性にも影響を与えなかった。

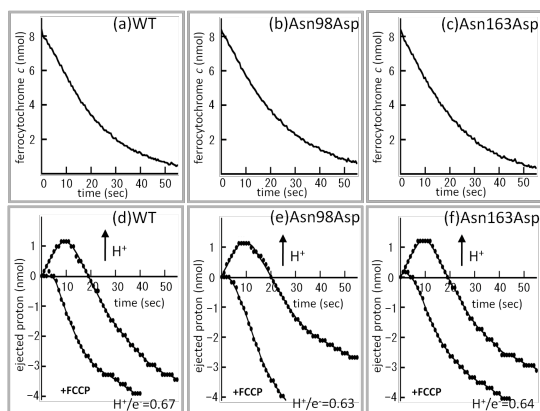


図 2. 変異体 Asn98Asp, Asn163Asp 発現標品の活性測定 (a)、(b)、(c)チトクロム *c* 酸化活性。(d)、(e)、(f)H⁺ポンプ活性。

③変異の確認

変異(Asn98Asp, Asn163Asp)は、酵素活性に影響を与えなかった。この結果は、細菌酵素の変異体解析結果とは異なる。細胞内で起こる可能性がある機能復帰突然変異を検討した。本細胞の発現ベクター内のウシ Sub I および、チトクロム酸化酵素の全サブユニット遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、Sub I に導入した変異は保持され、それ以外

の変異は認められなかった。したがって、これらの変異は酵素機能に影響を与えないことを示す。

(2) Glu242Gln 解析結果

①培養条件の検討

Glu242Gln 変異体は、通常の培養条件では細胞死が起こり、また生育が遅いため、種々測定に必要な量の細胞を得ることが困難であった。細菌酵素では、この変異は、酸素還元活性を消失させるため、mt のエネルギー産生能が低下することが予想される。そこで、mtDNA 欠損株を培養する際に用いる培地に変更した（培地組成；DMEM-high glucose, 10% fetal bovine serum, 200 μ g/mL G418, 1% penicillin-streptomycin, 1mM sodium pyruvate, 50 μ g/mL uridine)。さらに、プレートに蒔く細胞数を多くした結果、測定に必要な量の細胞を得ることができた。

②イムノブロット解析

Glu242Gln 変異体株細胞の mt 画分を調製し、雑種酵素の発現の有無をイムノブロット解析によって確認した（図 3）。その結果より、内在性のヒト酵素が 60%、雑種酵素が 40%発現していた。

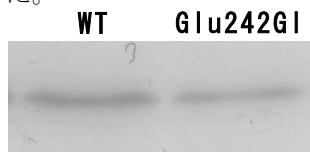


図 3. 変異体 Glu242Gln 株細胞 mt 画分のイムノブロット解析

③活性測定

得られた変異体発現株を用いて、Cyt *c* 酸化活性および H⁺ポンプ活性を測定した（図 4）。変異体を含む mt 標品は、WT を含む標品に比べ Cyt *c* 酸化活性が 40%低下した。また、H⁺ポンプ活性も WT に比べ 40%低下した。

この変異体株では、内在性のヒト酵素が

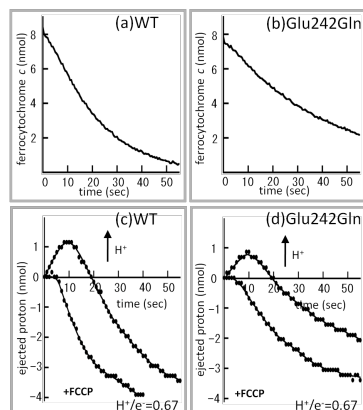


図 4. 変異体 Glu242Gln 発現細胞の活性測定 (a)、(b) チトクロム *c* 酸化活性。(c)、(d) H⁺ポンプ活性。

60%、雑種酵素が 40%発現していた。40%の活性の低下は、雑種酵素によると考えられる。したがって、変異 Glu242Gln は酵素活性を消失させた。

(3) Asp91Asn 変異体解析

①培養条件の検討

Asp91Asn 変異体発現細胞も細胞死が顕著であった。mtDNA 欠損株用培地を用いた。しかし、細胞死を抑制することはできなかった。そこで、この培地に活性酸素除去剤である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) を終濃度 1mM となるように添加した。その結果、細胞死が抑制された。また、NAC 添加培地で培養した細胞を、NAC 添加および無添加の培地へ同じ細胞数継代した。その後、3-4 日毎に新しい培地へ等体積の細胞懸濁液を継代した。その結果、NAC 無添加培地では細胞数が減少した（図 5、培養開始 26 日後に撮影）。Asp91Asn 変異体株では、チトクロム *c* 酸化酵素の酸素還元活性が低下した結果、呼吸鎖から活性酸素が発生し細胞死を誘導することが示唆された。

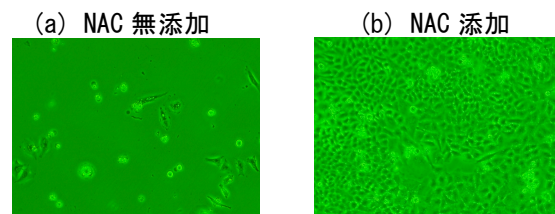


図 5. Asp91Asn 変異体株培養への NAC の効果

②イムノブロット解析

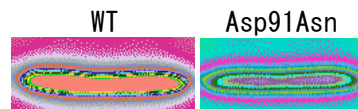


図 6. 変異体 Asp91Asn 株細胞 mt 画分のイムノブロット解析

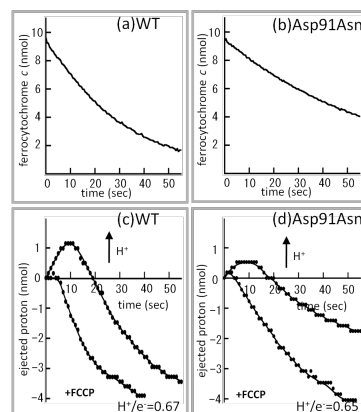


図 7. 変異体 Asp91Asn 株細胞 mt 画分の活性測定 (a)、(b) Cyt *c* 酸化活性。(c)、(d) H⁺ポンプ活性。

Asp91Asn 変異体株において、雑種酵素の発現の有無をイムノブロットで確認した (図 6)。その結果より、内在性のヒト酵素が 60%、雑種酵素が 40%発現した株であった。

③活性測定

この変異体株を用いて、Cyt *c* 酸化活性および H⁺ポンプ活性測定を行った (図 7)。その結果、両活性とも野生型発現細胞の活性から 40%低下した。この株の雑種酵素の発現量は 40%であるため、この活性の低下は雑種酵素が酵素活性を消失したことによるものである。

(4) ウシ D-pathway の変異体解析の結論

変異 Asn98Asp、Asn163Asp は、ウシ酵素の活性に影響を与えなかった。これは、D-pathway がポンプ用 H⁺を輸送しないこと示唆する。また、この結果は、細菌酵素の変異体解析結果とは異なる。一方、Asp91Asn、Glu242Gln 変異は、酸素還元活性を消失させた。これは、本経路が水形成用 H⁺を輸送することを支持する。以上の結果より、ウシ酵素 D-pathway は、水形成用 H⁺は輸送するが、ポンプ用 H⁺は輸送しないことが示唆される。ウシと細菌酵素の間で、構造が酷似し、しかも機能に重要なアミノ酸残基は保存されているにもかかわらず、機能が異なることがわかった。

(5) 無細胞系での機能発現

Paracoccus denitrificans のチトクロム酸化酵素の 3 つのサブユニット (Sub I-III) の遺伝子を市販の pUC ベクターのクローニング部位に挿入して発現ベクターを構築した。1 2 回膜貫通型の Sub I の発現量は少なかったが、細菌の P450cam 遺伝子の 5' UTR を 5' 側に挿入した結果、顕著に発現量が増加した。3 つのサブユニットの発現量がほぼ一定になるようにベクター量を調節し、大腸菌の細胞膜に機能発現させることに成功した。膜面分から可溶化し精製した結果、吸収スペクトルと Cyt *c* 酸化活性が正常な標品を得ることができた。詳細は、報告した論文 (7) を参照していただきたい。

(6) 参考文献

1. Pfizner, U et al. (2000) *Biochemistry* 39:6756-6762, 2. Pawate, AS. et al. (2002) *Biochemistry* 41:13417-13423, 3. Han et al. (2006) *Biochemistry* 45:14064-14074,
4. Tsukihara, T. et al. (2003) *PNAS* 100:15304-15309, 5. Shimokata, K. et al. (2007) *PNAS* 104:4200-4205, 6. Kamiya, K. (2007) et al. *JACS* 129, 9663-9673, 7. Katayama, Y. (2010) *JBB*, 42:235-240

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 6 件)

- ①Hideo Shimada, Mutagenesis studies on the functional roles of possible proton transfer pathways in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (Suppl 1) S12, 2009 査読無し
- ②Takashi Ogura, Structure and dynamics of cytochrome *c* oxidase as studies with resonance Raman spectroscopy, 14 (Suppl 1) S13, 2009 査読無し
- ③Yukie Katayama, Kunitoshi Shimokata, Makoto Suematsu, Takashi Ogura, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Cell-free synthesis of cytochrome *c* oxidase, a multicomponent membrane protein, *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 235-240, 2010 査読有り
- ④Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Mutagenesis studies on D-pathway function of bovine heart cytochrome *c* oxidase *Biochimica Biophysica Acta*, 1797, 93-94, 2010 査読無し
- ⑤Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Characterization by mutagenesis analysis of putative proton transfer pathway, D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *生物物理*, 151, S31, 2012 査読無し
- ⑥Ryohta Aminaka, Mai Itoh, Kunitoshi Shimokata, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Mutagenesis analyses of D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase suggest that the pathway does not transfer the pumping protons, *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 93-93, 2012 査読無し

[学会発表] (計 17 件)

- ①Hideo Shimada, Kunitoshi Shimokata, Ryohta Aminaka, Yukie Katayama, Kazumasa Muramoto, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, Mutagenesis Studies on the Functional Roles of Possible Proton Transfer Pathways in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase, 14th International Conference in Biological Inorganic Chemistry, July, Nagoya, Japan (2009) Invited
- ②下方国稔、網中良太、末松 誠、月原富武、吉川信也、島田秀夫、ウシ(サブユニット I)ノヒト雑種チトクロム *c* 酸化酵素の HeLa 細胞発現系: ミトコンドリアにおけるミトコンドリアおよび核由来タンパク質の発現誘導、第82回日本生化学会、

神戸、10月、2009

③ Hideo Shimada, Yukie Katayama, Takashi Ogura, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, Site-directed isotope labeling of cytochrome c oxidase,第47回日本生物物理学会、徳島 11月、2009 招待講演

④ Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Synthesis of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase in the *E. coli* cell-free system, 第47回日本生物物理学会、徳島、11月、2009

⑤ Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, The functional analysis of hydrogen bond network in bovine heart cytochrome c oxidase by mutagenesis, 第47回日本生物物理学会、徳島、11月、2009

⑥ 網中良太、下方国稔、伊藤真衣、片山幸江、月原富武、吉川信也、島田秀夫、ウシ心筋チトクロム c 酸化酵素の X 線構造が示唆する水形成用プロトン輸送系の機能解析、第6回「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」公開シンポジウム大阪、大阪、12月、2009

⑦ 網中良太、下方国稔、伊藤真衣、片山幸江、月原富武、吉川信也、島田秀夫、細菌チトクロム c 酸化酵素の変異体解析が支持するプロトンポンプ経路の変異に対応したウシ心筋酵素部位の変異体解析、生体エネルギー研究会第35回討論会、旭川、12月、2009

⑧ Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Mutagenesis studies on D-pathway function of bovine heart cytochrome c oxidase, 16th European Bioenergetics Conference, Warsaw Poland, July, 2010

⑨ Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Ito, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase, 第48回日本生物物理学会、仙台、9月、2010

⑩ Yukie Katayama, Miyuki Yoshiya, Keisuke Sakurai and Hideo Shimada, Characterization of histidine-tagged cytochrome P450cam and its synthesis in a cell-free system 第48回日本生物物理学会 仙台 9月 2010

⑪ Hideo Shimada, Mutagenesis studies on the functional mechanism of cytochrome c oxidase and cytochrome P450cam, 第48回日本生物物理学会 仙台 9月 2010、招待講演

⑫ Yukie Katayama, Mai Itoh, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Development of a *Paracoccus denitrificans* cell-free protein synthesis system,第49回日本生物物理学会、姫路、9月、2011

⑬ Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai

Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Mutagenesis analysis of proton transport pathway suggested by X-ray structure of bovine heart cytochrome c oxidase, 第49回日本生物物理学会、姫路、9月、2011 一般発表と招待講演

⑭ Hideo Shimada, and Shinya Yoshikawa, Diversity in proton pumping mechanisms of the terminal oxidases, in symposium “Structural Features and Molecular Evolution of Bioenergetic Enzymes.”, 第49回日本生物物理学会、姫路9月、2011 招待講演

⑮ 網中良太、下方国稔、伊藤真衣、片山幸江、月原富武、吉川信也、島田秀夫、ウシ心筋チトクロム c 酸化酵素のプロトン輸送経路の変異体解析、第37回日本生体エネルギー研究会、京都、12月、2011

⑯ Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Characterization by mutagenesis analysis of putative proton transfer pathway, D-pathway of bovine heart cytochrome c oxidase, 第50回日本生物物理学会、9月、名古屋、2012

⑰ Ryohta Aminaka, Mai Itoh, Kunitoshi Shimokata, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, Mutagenesis analyses of D-pathway of bovine heart cytochrome c oxidase suggest that the pathway does not transfer the pumping protons, 17th European Bioenergetics Conference, Freiberg, Germany, September, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田秀夫 (Shimada Hideo)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：80095611

(2) 連携研究者

片山幸江 (Katayama Yukie)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任講師

研究者番号：70464998

網中良太 (Aminaka Ryohta)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科
特任助教