

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生
命科学と先端的基盤技術」
研究課題「ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学－構
造がもたらす正確さ」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：月原 富武
(兵庫県立大学大学院生命理学研究科、
特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

ミトコンドリアの呼吸鎖酵素の構造に基づいて、それらが内膜において精巧に働く仕組みを解き明かすことを目指して研究を行った。研究実施にあたっては兵庫県立大学と理化学研究所の研究者が緊密に連携をとって行った。多くの研究は両者が共同して実施したが、X線自由電子レーザー(XFEL)及び放射光によるX線回折実験法の開発は理化学研究所、電子顕微鏡構造解析法の開発は兵庫県立大学が分担した。以下に、その主要な研究成果を要約する。

チトクロム c 酸化酵素 (CcO) の研究では、プロトンポンプ機構については 1998 に H-パス説を提案して以来、激しい議論が続いている。各種中間体の高分解能構造解析や XFEL による時分割結晶構造解析などによって、プロトンポンプの合理的な仕組みが明らかになってきた。

CcO の精密結晶構造解析では、酸化型 1.5Å、還元型 1.6Å の構造解析、酸化型の XFEL 無損傷構造解析、CO 結合還元型の光励起時分割構造解析、中間体類似体や pH などが異なる結晶化条件での高分解能構造解析を行った。CcO は反応サイクル中で構造変化を起こす領域は2つのヘムを含む分子内部の極めて限られていて、変化の大きさも微小である。また、その変化は酸性側 pH5.7 から塩基性側 pH8.0 まで同じであり、正確な構造変化によって機能する蛋白質と言える。

プロトンが能動輸送される H-パスはマトリックス側 (N 側) から膜間腔側 (P 側) まで内膜を貫いていて、N 側は水が動くことができる水チャネル、P 側は水素結合のリレーがある水素結合ネットワークで構成されている。水チャネルが水素結合ネットワークに連結する手前にゲートがあり、そのゲートは酸素還元中心を構成するヘム a_3 がシフトすることでヘリックス X が構造変化をさせることによって開閉される。酸素還元中心に酸素分子が結合する以前ではゲートは開いている。酸素分子が酸素還元中心の Cu_B に結合した段階でヘム a_3 のシフトが起こり、ゲートが閉じる。その後、酸素分子は Fe_{a_3} 側に移行して酸素還元反応サイクルが始動する。

水チャネルのゲートの水素結合ネットワーク側にはプロトンが蓄積されるプールがあり、そのプールは20数箇所の水部位とプロトンを受容できる多くの官能基及び Mg イオンで構成されていて、分子内部で外部と隔離されている。ここに水チャネルのゲートが開いている時に4プロトンが蓄積される。反応サイクル中でチトクロム c (Cyt.c) から Cu_A 、ヘム a を経てヘム a_3 に電子が4回輸送される。その度に1プロトンずつプロトンプールから水素結合ネットワークに供給される。 Cu_A 、ヘム a から電子がヘム a_3 に移行するたびにプロトンプールの構造変化が起こり、プロトンが水素結合ネットワークに供給する。続いて Fe^{2+} から Fe^{3+} になったヘム a の電荷との反発によってプロトンは水素結合ネットワークの P 側に押し上げられる (反対側は閉じている)。その際に Cu_A 還元型から酸化型に変化して水素結合ネットワークのゲートが開き、プロトンが P 側に能動輸送される。一連の研究によって少なくともミトコンドリアの CcO については H-パス説に従ったプロトンポンプが受け入れられる所までは来た。

呼吸鎖超複合体では活性の高い試料を調製し、結晶化条件を検討している。結晶化中の超複合体の劣化が深刻な課題であり、新たに脂質メソフェーズ法による系統的な結晶化条件検索を開始した。Cyt.c-CcO 複合体の構造決定は、2次元結晶作成から始め、新しい界面活性剤を使用して、高い pH 領域で複合体形成が起こることを確認した。そのことを拠り所に3次元結晶化を行い、2.0Å 分解能で構造決定した。その結果、1970 年代に Cyt.c の化学修飾に基づいた CcO との結合部位と矛盾しない部位が CcO と相互作用していた。Cyt.c のヘムから CcO の Cu_A への合理的な電子伝達経路も同定することができた。興味深いことに、Cyt.c と CcO の相互作用は長い親水性側鎖が関わっているが疎水性アミノ酸の関与は皆無である。蛋白質間は大きく離れ、両者の接触表面積も極端に少ない。両者の会合の際には表面の水を保持したままで会合する。この相互作用様式はこれまでにない蛋白質間相互作用であり、“Soft and Specific Interaction”と呼ぶことにした。この相互作用によって迅速な解離会合と効率の良い電子伝達が行われていると考えられる。

構造解析技術開発では、兵庫県立大学で膜蛋白質の電子顕微鏡像のコントラストを向上させる方法 (GraDeR 法) を開発して、膜蛋白質の単粒子構造解析の可能性を向上させる画期的な技術として注目されている。理化学研究所では XFEL による大きな結晶を使った SF-ROX 法を開発し、さらにこの方法を適用した光励起による時分割 XFEL 結晶構造解析法も開発した。これらの方法

を用いて兵庫県立大学と共同で酸化型 CcO の活性中心の X 線無損傷構造解析を行い長年の議論に終止符を打つとともに、CO 結合 CcO の CO 光解離のナノ秒時分割構造解析に成功して酸素結合に連動した水チャネルの開閉機構を明らかにした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:チトクロム c 酸化酵素(CcO)の静的精密構造解析によるプロトンポンプ機構の解明(兵庫県立大学、理化学研究所)。**XFEL 高分解能無損傷構造解析を行い酸素還元中心の構造を決定した。さらに酸化型 1.5Å、還元型 1.6Å と高い分解能の構造解析を行った。**その結果、予てより提唱しているプロトンポンプ経路である H-パスがヘリックス X の構造変化によって開閉されることが分った。更に、H-パスに隣接して一時的にプロトンを蓄積する部位も見つかり、H-パスの実態がより鮮明になった。(Hirata et al., Nature Methods (2014) 11, 734-736; Yano et al., J. Biol. Chem. (2016) 291, 23882-23894.)

2.

概要:CcO の動的精密構造解析によるプロトンポンプ機構の解明(兵庫県立大学、理化学研究所)。**X 線自由電子レーザーを用いた SF-ROX 法によって、チトクロム酸化酵素の CO 結合還元型の光解離時分割結晶構造解析を行った。**光照射前、照射後 20ns、100μs での構造を決定した。その結果、CO と同様な効果をもたらす O2 分子が活性中心の銅に結合した時点でヘリックス X の構造が変化して、H-パスが閉じることが分かった。(Shimada et al., Science Advance (2017))

3.

概要:チトクロム c(Cyt.c)-CcO 複合体の高分解能結晶構造解析(兵庫県立大学)。**電子伝達経路の決定に加えて、新しい蛋白質間相互作用様式を見出した。**構造に基づいて計算によって電子伝達経路を決定した。両者の結合は互いの長い親水性残基間の相互作用によってできており、疎水性残基間での直接の相互作用はない。これは今までにない蛋白質間相互作用であり、“Soft and Specific Interaction”と呼ぶことにした。この相互作用によって効果的な電子伝達が可能になっている。(Shimada et al. EMBO J. (2017) 36, 291-300.)

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:

X 線自由電子レーザー(XFEL)による高分解能 X 線無損傷回折実験法(SD-ROX 法)を開発した(理化学研究所)。XFEL による高分解能の回折像を得るためには、大きな結晶による回折実験が必要であった。一方、強力な XFEL を結晶に照射すると、瞬時に結晶全体にその影響が広がると考えられていた。しかし、1-2μm の大きさの X 線で、50μm 間隔で結晶に X 線を照射することによって損傷を避けることができた。この方法は SF-ROX 法と命名されて XFEL における巨大なタンパク質の高分解能 X 線無損傷回折実験法を確立した。(Hirata et al., Nature Methods (2014) 11, 734-736.)

2.

概要:

電子顕微鏡構造解析のための膜蛋白質試料調製法を開発した(兵庫県立大学)。膜蛋白質では試料調製の際に生じる界面活性剤のミセルやフリーの界面活性剤がイメージのコントラストを著しく低下させる。このたび lauryl maltose-neopentyl glycol (LMNG)中で可溶化した膜蛋白質溶液を調製し、コントラストを向上させる方法(GraDeR法)を開発した。膜蛋白質の単粒子構造解析の可能性を向上させる画期的な技術として注目されている。(Hauer F., Gerle C. et al., Structure, 2015)

3.

概要:

第3世代放射光光源を利用した X 線損傷を軽減する回折実験法を開発した(理化学研究所)。 高エネルギーの X 線ほど原子による X 線の吸収は少なく蛋白質の損傷も軽減できる。しかし、高エネルギーの X 線に対して感度高い検出器がなかった。30 keV(波長 0.4133 Å)の X 線で、CdTe センサを備えた光子カウント型ピクセル検出器 Pilatus3 X CdTe (DECTRIS, Ltd.)を設置して、X 線損傷を受けやすいチトクロム酸化酵素の回折実験を行った。その結果、X 線還元の影響を大幅に抑えた構造が得られた。今後、SPring-8 で X 線損傷が深刻な場合の回折実験法を確立することができた。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「県立大」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
月原 富武	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任教授	H24.10～
伊藤－新澤 恭子	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	准教授	H24.10～
小倉 尚志	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	教授	H24.10～H29.7
吉川 信也	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任教授	H24.10～
舘野 賢	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	教授	H24.10～
宮澤 淳夫	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	教授	H24.10～
杉村 高志	兵庫県立大学大学院物質理学研究科	教授	H24.10～
柳澤 幸子	兵庫県立大学大学院物質理学研究科	准教授	H29.8～
御前 智則	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	助教	H24.10～
西野 有里	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任講師	H24.10～
姜 志姪	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任助教	H24.10～
山下 栄樹	大阪大学蛋白質研究所	准教授	H25.4～
島田 敦広	岐阜大学 応用生物科学部 生物化学研究室	テニユアトラック助教	H27.4～
森本 幸生	京都大学原子炉実験所 粒子線基礎物性研究部門	教授	H29.4～
石野 恭子	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	研究補助員	H29.4～
宋 魁峰	兵庫県立大学大学院物質理学研究科	D3	H26.4～
宮本 朱梨	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H28.4～
ルオ・ファンジャ	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	D3	H28.12～
ゲーレ・クリストフ	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任准教授	H25.4～H29.3
島田 悟	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任助教	H24.10～H28.9

馬場 淳平	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H26.4～H28.3
前田 晋太郎	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任助教	H24.10～H27.5
江藤 勇樹	兵庫県立大学大学院生命理学研究科		H27.4～
波多野 啓太	兵庫県立大学大学院生命理学研究科		H27.4～
上根 滋史	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H24.10～H27.3
武村 秀平	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H24.10～H27.3
岩本 新	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H25.4～H27.3
三角 裕子	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	技術補助員	H26.4～H26.9
三枝 馨	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	研究員	H25.4～H26.3
引田 理英	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	PD 研究員	H25.4～H26.3
衿丘 徹	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H24.10～H26.3
加藤 公児	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	特任講師	H24.10～H25.3
木山 知美	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	技術補助員	H24.11～H25.3
矢野 直峰	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	D3	H24.10～H25.3
李 昌雨	兵庫県立大学大学院物質理学研究科	D2	H24.10～H26.3
押田 幸歩	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H24.10～H25.3
畑中 美紀	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	M2	H24.10～H25.3

研究項目

- ・チトクロム酸化酵素(複合体 IV)の水素原子を同定できる X 線結晶構造解析とナノ秒時分割結晶構造解析によって、酸素還元とプロトンポンプ機構を原子の挙動として解明する。
- ・NADH-ユビキノン還元酵素(複合体I)の2次元及び3次元構造解析
- ・ミトコンドリア呼吸系構成蛋白質間の相互作用の解析

②「理研」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
上野 剛	理化学研究所・放射光科学総合研究センター 利用システム開発研究部門 ビームライン基盤研究部 生命系放射光利用システ	専任技師	H26.10～

	ム開発ユニット		
平田 邦生	理化学研究所・放射光科学総合研究センター 利用システム開発研究部門 ビームライン基盤研究部 生命系放射光利用システム開発ユニット	専任技師	H24.10～H26.9

研究項目

・X線自由電子レーザーを用いて、チトクロム酸化酵素のナノ秒時分割構造解析を行うための技術開発及び回折実験を行う。

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について
(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

CREST内では高島プロジェクトに対して、CcOの試料調製・結晶化・結晶構造解析及び得られた構造の解釈について随時協力してきた。高島プロジェクトの結果は応用研究にとどまらず基礎研究にとっても極めて興味深い結果を提供しており、今後も緊密に連携して行きたい。

当該プロジェクトのRAのちに博士研究員であった引田理英(現在高エネルギー物理学研究所助教)は米国アルバート・アインシュタイン医科大学Rousseau教授の博士研究員として留学し、ウシ心筋からCcOを精製・結晶化する方法を広め、我々以外で始めて高分解能のウシ心筋のCcOの高分解能での結晶化を行えるようにした。この度、アルバート・アインシュタイン医科大学は、その結晶を使ってCO結合還元型の構造をPNAS誌(Ishigami et al., 2017)に報告した。これは哺乳類のCcO研究が広がることであり、細菌に偏っているCcO研究にとって心強い。Rousseau教授らは構造解析結果を、構造の混ざり(CO結合還元型とCO非結合還元型)を気づかずに解釈して誤った結論を導いている。Rousseau教授は毎年、我々の所に来ており本年度も来る予定である。丁寧な検証によって互いに矛盾のない構造情報に基づいた議論を進めたい。

JPARKの玉田太郎博士とは、中性子回折法によってカルボン酸等のプロトン化状態を決定することを目指して共同研究を進めてきた。CcOのプロトンポンプ機構の理解にとってプロトン化状態を確定することは極めて重要であり、現状での中性子回折における分子量限界を超えた課題であるが、研究の継続を計りたい。この問題の克服は中性子回折の適用限界を飛躍的に拡大し、産業界からの期待も飛躍的に拡大する。

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学(兵庫県立大学)

(1) 研究実施内容及び成果(理化学研究所との共同研究を含む)

I. チトクロム酸化酵素の精密結晶構造解析によるプロトンポンプ機構の解明

(a) 酸化型 1.5Å、還元型 1.6Å の構造解析(論文16;兵庫県立大、理研)

要旨:酸化型 1.5Å、還元型 1.6Å の構造解析によって、能動輸送されるプロトンが蓄積されるプールを同定し、そこへプロトンが蓄積される仕組みを明らかにした。

CcOは酸素を水に還元することによってエネルギーを獲得する呼吸酵素である。酸素還元反応サイクルでH-パスと呼ばれる経路を介して4プロトンが能動輸送される。このH-パスのマトリ

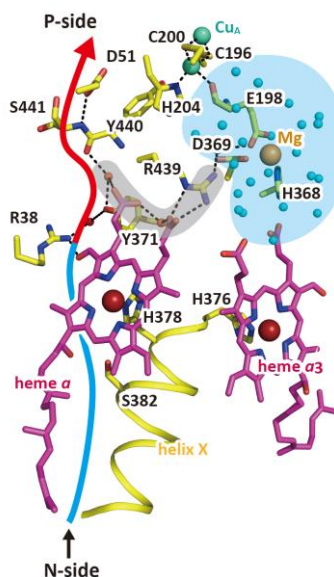


図1. H-パスとプロトンをプールする Mg-水クラスター

ックス側(N側)は複数の水を含むことのできる幾つかの空洞などで構成されていて、水チャネル(図1の矢印の青色部分)と呼ぶ。一方膜間腔側(P側)は水素結合ネットワーク(図1の矢印の赤色部分)と呼ぶ。

これまでの種々の反応中間体類似物の構造から、水チャネルはヘム a3 が還元状態でかつ酸素などリガンドがない R 状態の時のみ開いていることが分かっている。すなわち R 状態でのみ N 側からプロトンを通すことができる。一方、酸素分子がヘム a3 のところで順次還元される際に、1電子ずつ4回 CuA からヘム a を介してヘム a3 に移動する。それに同期してプロトンが P 側に能動輸送される。その間、水チャネルは閉じた構造のままになっていてプロトンの逆流を止めている。従って、R 状態で4プロトンを蓄積するプールが必要になる。

酸化型 1.5Å、還元型 1.6Å の高分解能構造解析を行ったところ、プロトンプールの存在と水チャネルの開閉機構を明らかにすることができた。図1の水色で塗られた部分を Mg 含有水クラスターと呼び、Mg とその周辺に20カ所以上ある水及び親水性アミノ酸残基で構成されている。ここに4プロトンを蓄積すると考えている。水チャネルの開閉は、ヘム a3 へ配位子が結合することによってヘム a3 がスライドして、そのビニル基がヘリックス X と近接して、その構造変化を誘起することによって制御される。

(b) XFEL による完全酸化型の高分解能無損傷 X 線結晶構造解析(論文2;兵庫県立大、理研)

要旨:大きな結晶を用いる SF-ROX 法によって 1.95Å 分解能で構造決定を行い、過酸化物が活性中心の Fe と Cu の両方に配位していることを明らかにし、長年の議論に終止符を打った。

X 線自由電子レーザー(XFEL)施設である SACLA では強力な X 線を 10 fs という極めて短いパルスの X 線を発生することができる。この新しい XFEL は反応過程を直接観測する高速時分割構造解析に道を拓く X 線である。複合体 IV でその反応過程を観測するために準備実験を進めた。高分解能の回折像が得られるのかどうか、回折強度を見積もることができるか否かなど幾つかの克服すべき問題がある。それらの問題点を克服する手始めに、チトクロム酸化酵素(複合体 IV)の X 線無損傷構造解析を行った。

チトクロム酸化酵素をはじめとするヘム蛋白質は、X 線照射によってヘム鉄が還元されることは避けられない。そのために X 線結晶構造解析によって得られた構造は X 線損傷を受けた構造の可能性がある。X 線照射後 10 fs では原子核の移動は起らない。従って 10 fs のパルス X 線によって回折強度を観測すれば X 線無損傷のデータが得られる。一方、強力な XFEL を結晶に照射すると、瞬時に結晶全体にその影響が広がると考えられていた。実際にそうした損傷が 100K でも起るか否かを酸化型チトクロム酸化酵素の結晶を用いて確認実験を SACLA で行った。その結果、1~2μm の大きさの X 線では、影響が回折強度の減衰として表れるのは半径 10μm の範囲であった。そこで 50m 間隔で結晶に X 線を照射する方法を採用した。

通常の X 線回折強度は回折が生じる角度領域を連続して走査し、その積分値を求めることによって計測される。10 fs のパルス光を照射する間に走査することは出来ない。そこで、0.10°間隔で測定して、擬似的な連続走査と見なして強度を見積ることによって、1.9Å 回折強度データ収集を行った。

構造解析の結果、活性中心には X 線損傷の影響を受けていない過酸化物(O-O)が Fe と Cu を橋渡している構造を確認した。このことによって長年懸案であった、完全酸化型の構造についての論争に終止符を打つことができた(図2)。また、極低温での大きな結晶を用いた X 線自由電子レーザーによる X 線無損傷高分解能結晶構造解析法を確立することが出来た。

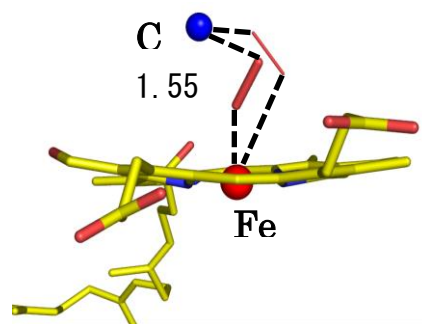


図2. 酸素還元中心で Fe と Cu に配位している過酸化物

(c) チトクロム酸化酵素のナノ秒時分割結晶構造解析(論文18;兵庫県立大、理研)

要旨:酸素還元中心の CuB に外から O₂ が結合した段階でヘム a3 がスライドしてヘリックス X の

構造変化を誘起して水チャンネルが閉じることが明らかになった。

CO結合還元型は、反応サイクル中の酸素結合還元型の類似体である。還元型酵素の酸素還元中心に酸素が結合すると水チャンネルが閉じることが、既述の研究で明らかになった。この研究では、COが酸素還元中心から離れる過程を時系列で追跡して、COが酸素還元中心を構成するFea3, CuBに対してどの位置にある段階で水チャンネルが開閉されるかを明らかにすることとした。

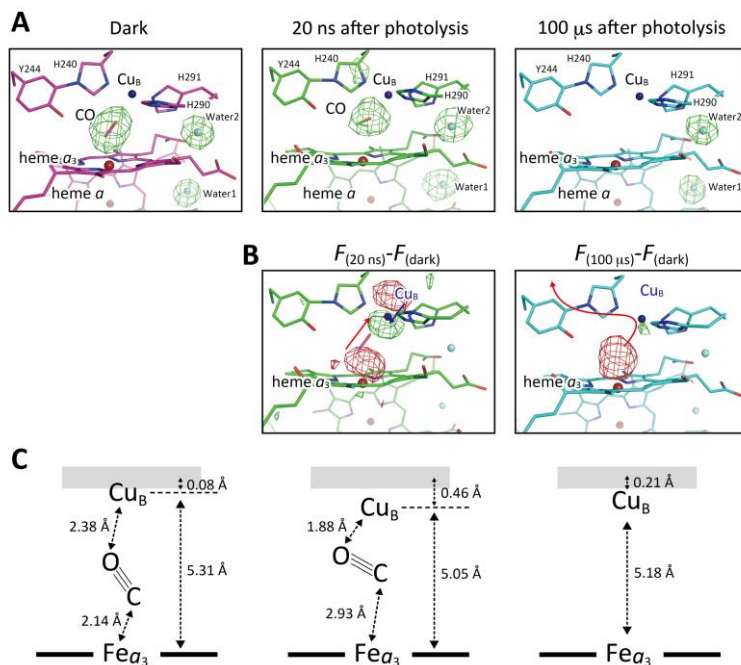


図3. CO 結合還元型の CO 光解離と活性中心の構造変化

図3A,BはCO結合還元型結晶に励起光を照射した際のCOの消長を(Fo-Fc)電子密度図で示している。照射前はCOはFea3に配位している。その時の酸素還元中心の構造は常温での2.2Å分解能の静的構造解析結果と一致している。光照射後20nsにはCOはFea3から離れてCuBに配位する。その結果、CuBは3配位から4配位に変化しFea3側に0.26Å移動し、CuBは配位して

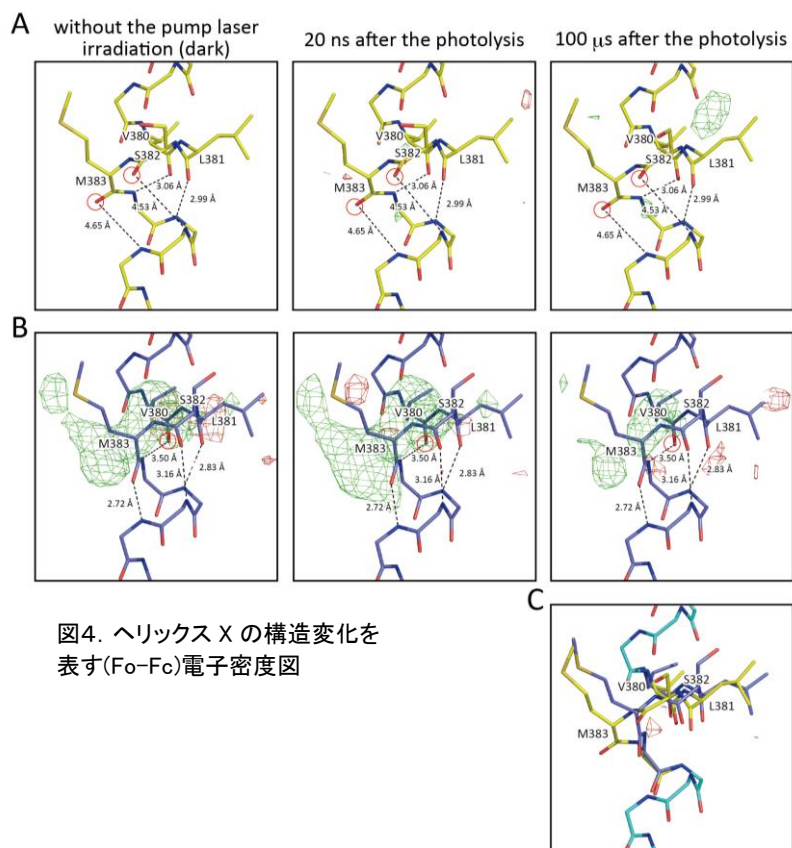


図4. ヘリックス X の構造変化を表す(Fo-Fc)電子密度図

いる3つのイミダゾールのN原子の平面から大きくずれる。この時の構造は100Kでの1.8Å分解能の構造と一致している。こうした構造変化が起こるために、一度CuB側に移行するとFea3側に直ちには戻らないで、100μs後にはCOがCuBから離れる。この活性中心での構造変化に対して、チャネルの開閉を制御するヘリックスの構造変化は(Fo-Fc)電子密度図から明らかになった(図4)。図4AはFcを閉じた構造で求めたもので、Bは開いた構造で求めたものである。これらは励起光照射後20nsまでは照射前と同じ閉じた構造のままであることを示している。一方、100μs後では閉じた構造、開いた構造の両方に対して有意な残余電子密度が残っている。そこでFc計算を両者が混ざっている構造で求めると、残余電子が消失した(図4C)。100μs後ではCOが酸素還元中心から出て行くと、ヘリックスXは開いた構造に変化しつつある。

COがFea3からCuB側に移行した段階ではヘリックスXは閉じたままであり、COがCuBから酸素還元中心の外に出るとヘリックスXは開いた構造に変化し始める。しかし、その構造変化は時間を要するために、COの動きよりも遅れて変化する。この一連の過程の逆の過程である酸素結合過程での構造変化を演繹することができる。

酸素分子が酸素還元中心に入ってきていない状態では、ヘリックスXは開いた構造である。分子の外から入って来る際に、最初にCuBに結合した時点でヘリックスXは閉じた構造に変化する。続いて酸素分子はFea3側に移行して酸素還元反応サイクルが回り始める。この際に水チャネルが開いていると、反応効率が低下する。CuBに結合した時点即ち反応サイクルが始動する前に水チャネルが閉じることは、プロトン能動輸送の効率を上げる優れた仕組みである。酸素還元中心の構造変化によって誘起されるヘリックスXの構造変化は遅れるので、CuBに酸素分子が到達した時点でヘリックスXが閉じた構造に変化することは、Fea3側に移行した時点で閉じた構造に変化することをより確実にする。

酸素還元中心の構造変化がヘリックスXの構造変化の構造変化を起こすヘムa₃の経時的变化も明らかにすることができた。図5にはヘリックスXが開いた構造である100Kでの還元型の構造に、dark, 20 ns, 100μsのヘムa₃とその周辺の構造を重ねて描いている。還元型は青色、dark, 20 ns, 100μsはそれぞれ、ピンク、緑、淡青色で示している。ヘムa₃は100μsでは還元型とほぼ同じ位置にあり、20 ns, darkの順に還元型からのシフトが大きくなる。その結果、還元型ヘリックスXとそれぞれの状態のヘムa₃の最近接距離(図5B)が、還元型では3.37Åであるのに対して20 nsでは3.13Åになり、もはやヘリックスXは開いた構造を維持できなくなり、閉じた構造(図5C)に変化する。

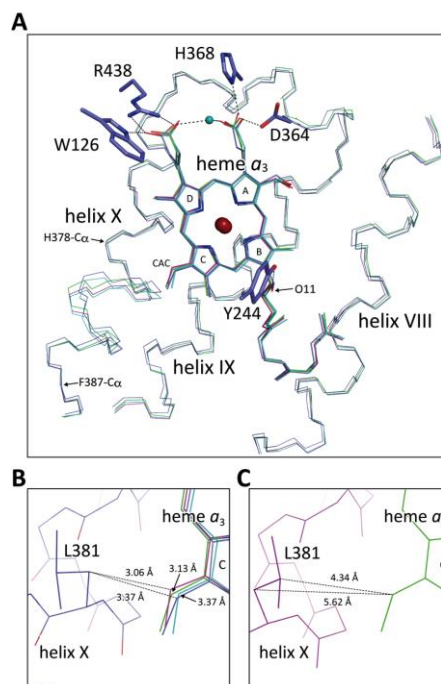


図5. ヘム a₃ とヘリックス X の相互作用

(d) アジド結合酸化型の構造(投稿論文作成中;兵庫県立大)

要旨:N₃⁻結合酸化型の結晶をN₃⁻濃度 2mM 及び 20mM で調製し、それぞれ 1.65, 1.85Å 分解能で構造を決定し、N₃⁻結合によるヘム a の酸化還元電位が低下する理由を明らかにした。

N₃⁻濃度が 2mM ではN₃⁻の大部分はFea₃とCuBの両方に配位する。20mM ではFea₃とCuB別々に配位するN₃⁻が共存している。N₃⁻がFea₃とCuBの両者を橋渡しする構造ではヘム a₃は酸化型とほぼ同じ構造をしている。

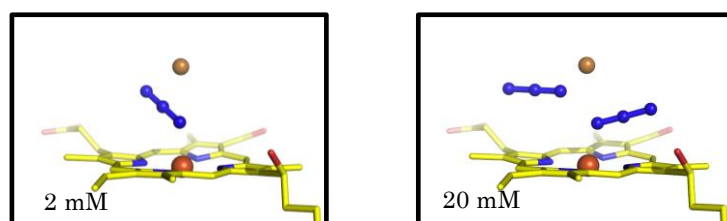
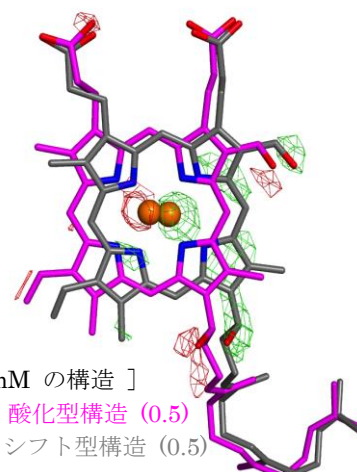


図6. 酸素還元中心の N_3^- 、(左) N_3^- 濃度 2mM、(右) N_3^- 濃度 20mM

一方、2種類の N_3^- が共存する構造ではヘム a_3 は酸化型の構造と大きくシフトした構造がほぼ同じ割合で共存する。そのシフトする方向は還元型と同じ方向であるが、それよりも大きくシフトしている。さらにヘム a_3 のシフトに連動して起こるヘリックス X の構造変化のうち主鎖の構造は還元型とほぼ同じであるが、Met383 の側鎖の構造が大きく異なっている。そのため還元型では水チャンネルが開構造を取るのに対して、20mM N_3^- 結合型ではヘリックス X は酸化型と同じ閉構造と Met383 の側鎖が大きく構造を変えた構造が共存する。M383 の構造変化によって還元型で水チャンネルを開かせていた水を許容できる空洞が消失するが、別の箇所空洞が広がって水チャンネルが繋がりやすくなっている。

高濃度の N_3^- 溶液中ではヘム a の酸化還元電位が酸化型に比べて低下することが知られている。水チャンネルが酸化型に比べてより開いた構造になっていて、ヘム a の周辺に外部の水がより容易に到達できるようになっている。従って N_3^- 化されることによってヘム a の周辺プロトン濃度の低い環境になるため、酸化還元電位の低下をもたらすと考えられる。



[20mM の構造]

桃色 : 酸化型構造 (0.5)

灰色 : シフト型構造 (0.5)

表1. N_3^- 濃度 2mM, 20mM での構造多型

N_3^- 濃度	2mM		20 mM	
Heme a_3	酸化型 0.7	シフト型 0.3	酸化型 0.5	シフト型 0.5
Helix X	閉構造 0.8	S383 閉構造 0.2	閉構造 0.5	S383 閉構造 0.5

図7. N_3^- 濃度 20mM でのヘム a_3 の多型構造

(d) CO 結合部分還元型の高分解能 X 線結晶構造解析 (論文作成中; 兵庫県立大)

要旨: 1.68Å 分解で構造決定を行い Asp51, 含 Mg 水クラスター及びヘム a の構造は Cu_A , Fe_a の電子状態、ヘム a、ヘリックス X の構造は Fe_{a3} , Cu_B の電子状態の変化に連動して変化することが明らかになった。

これまで高分解能で構造決定できた反応中間体、および反応中間体類似物とそれらの金属中心の電子状態を第8図に示している。

CO 結合部分還元型では Cu_A , Fe_a は酸化状態、 Fe_{a3} , Cu_B は還元状態にある。反応サイクルにおける各活性中心金属の電子状態の変化とそれに連動するタンパク質の構造変化の関係を明らかにするために構造解析を行った。反応サイクル中に構造が変化する部位を図9に示している、このうち Cu_A , Fe_a を電子が通過する前後で Asp51, Mg 付近、ヘム a の構造が変化する、一方、電子が Fe_{a3} に入った瞬間にヘム a_3 の構造が変化し、Asp51, Mg 付近、ヘム a の構造は元に戻る。

酸化型	[CuA(3+), Fea(3+), CuB(2+), Fea3(3+)]
CN 結合酸化型	[CuA(3+), Fea(3+), CuB(2+), Fea3(3+)]
CO 結合部分還元型	[CuA(3+), Fea(3+), CuB(1+), Fea3(2+)]
CN 結合部分還元型	[CuA(2+), Fea(2+), CuB(1+), Fea3(3+)]
還元型	[CuA(2+), Fea(2+), CuB(1+), Fea3(2+)]
CO 結合還元型	[CuA(2+), Fea(2+), CuB(1+), Fea3(2+)]
NO 結合還元型	[CuA(2+), Fea(2+), CuB(1+), Fea3(2+)]
CN 結合還元型	[CuA(2+), Fea(2+), CuB(1+), Fea3(2+)]

図8. 高分解能構造解析できた構造の金属中心の電子状態

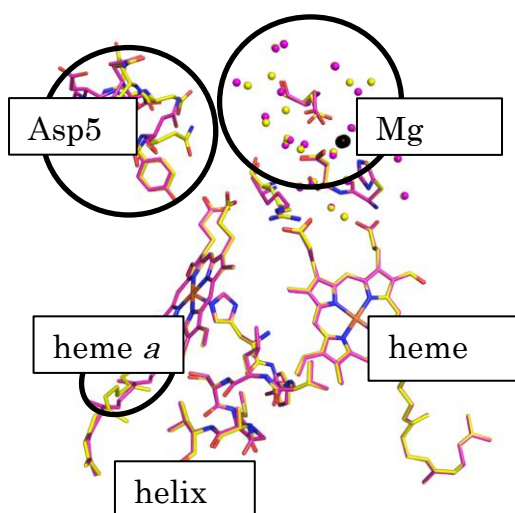


図9. 反応サイクル中で構造変化が起こる部位

(e) CN 結合部分還元型の高分解能 X 線結晶構造解析 (論文作成中; 兵庫県立大)

要旨: 1.65Å 分解で構造決定を行いヘム a 、ヘリックス X の構造は Fe_{a3} の電子状態の変化に連動して変化的こと、 Cu_B の電子状態の変化はヘリックス X の構造変化には無関係であることが明らかになった。

CN 結合部分還元型は活性中心金属 Cu_A 、 Fe_a 、 Fe_{a3} 、 Cu_B のうち Fe_{a3} のみが酸化状態で他は全て還元状態である。1.65Å 分解で X 線結晶構造解析を行ったところ、ヘム a_3 とヘリックス X は酸化型タイプの構造であり、Asp51, Mg 周辺、ヘム a の構造は全て還元型タイプであった。この構造解析によって初めて Fe_{a3} と Cu_B の電子状態を分離することができ、ヘム a_3 とヘリックス X の構造は Cu_B の電子状態には影響されず、 Fe_{a3} の電子状態のみによって制御されていることが明らかになった。

II. ミトコンドリア呼吸系構成蛋白質間の相互作用の解析

(a) Cyt.c-CcO 複合体の高分解能 X 線結晶構造解析 (論文18; 兵庫県立大)

要旨: チトクロムcとチトクロム酸化酵素酸素は「特異的で柔らかな相互作用」によって会合・解離して、効率良い電子伝達を行う。

チトクロム酸化酵素とチトクロムcの複合体の結晶構造解析を2.0Å分解能で行った。チトクロムc(図10の赤色)はチトクロム酸化酵素(緑色)の膜外領域にある負に帯電した窪んだ表面に結合している。両者の結合はチトクロムc側の3つのLysと1つのGlnがチトクロム酸化酵素の側鎖と水素結合あるいは塩橋を作っている(図11)。互いに相互作用している領域の近くには、チトクロムcでは電子を供与するヘムc、チトクロム酸化酵素側では電子を受け取るCuAがある。構造に基づいた計算によって電子伝達経路を決定することができた(図12)。

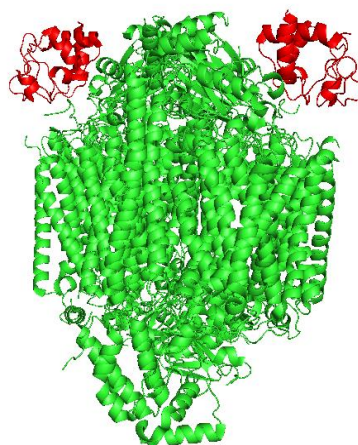


図10. チトクロム c-チトクロム c 酸化酵素複合体の構造

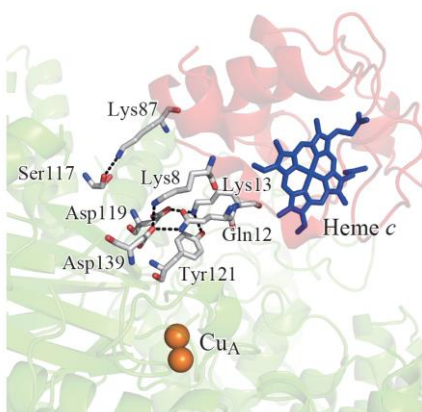


図11. チトクロム c とチトクロム c 酸化酵素の相互作用

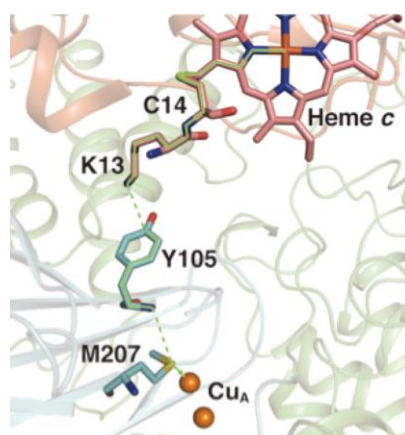


図12. チトクロム c からチトクロム c 酸化酵素への電子伝達経路

両者の相互作用様式を他の電子伝達複合体と比べてみると興味深い特徴が明らかになった。チトクロムc-チトクロムbc1複合体に比べて、両者の最近接Cα間距離は3Å以上長く互いに遠く離れている(図13)、チトクロムc、チトクロムc酸化酵素の接触表面積はチトクロムc、チトクロムbc1の場合4分の1以下であり、両者の間には水分子がより多くある。両者の間には、どちらにも相互作用する水、どちらか一方に相互作用する水の他に、どちらの蛋白質にも直接相互作用しない水がある。表面の水を排除しないで会合して(図14)、第3の水が多くあるのがチトクロム酸化酵素とチトクロムcの複合体の特徴である。

チトクロムcは4カ所でしっかりチトクロムc酸化酵素に固定されているが、固定部分から離れるにつれて大きく揺らいでいる。この大きな揺らぎは、両者の間に多くの水を取り込むことによるエントロピーの減少を補うであろう。

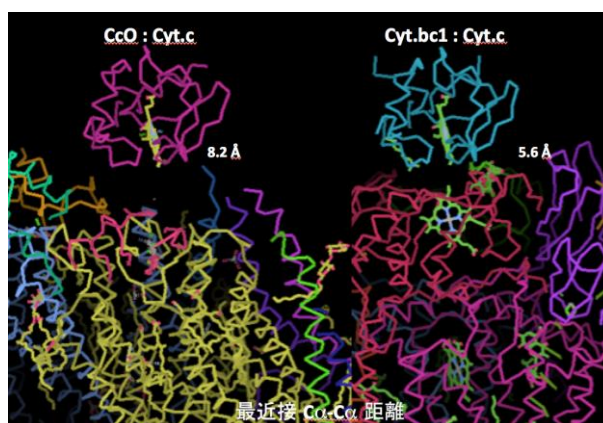


図13. CcO-Cyt.c 複合体と Cyt.bc1-Cyt.c 複合体の構造

両者の相互作用様式はこれまでに見つかった相互作用様式であり、「特異的かつ柔らかい相互作用」と呼ぶことにした。この相互作用様式は電子伝達において効率の良い会合・電子伝達・解離を可能にするものである。

(b) Cyt.c の CcO への結合における第2の結合部位の同定(論文作成中;兵庫県立大学)

要旨: Cyt.c-CcO 複合体の共結晶化の際に Cyt.c のモル数を CcO の2倍以上にすることによって第2の部位に結合した結晶を調製し、その部位を 2.9Å 分解能で決定した。

1970 年代の反応速度論的解析から、チトクロム酸化酵素には、チトクロム c が結合する部位は 2 か所あってそれぞれ異なった K_m を有し、電子伝達を調節している可能性が示唆されている。そこで、実際にチトクロム c の結合部位が 2 箇所あるのかを調べるために、Cyt.c 濃度を变化させ結晶化条件を検討した。Cyt.c と CcO の比が 2 を越えるところで、既に構造決定している比が 1:1 の結晶とは異なる結晶を得た。構造解析した結果、CcO 2 量体に対して Cyt.c が 1 分子結合した構造が得られた。その位置は 1:1 で結合している Cyt.c の近傍であった。擬似の 2 回対称で関係付けられるもう一つの部位は Cyt.c を許容する空間が無くなっており、結晶化の過程で離脱したと考えられる。ここでは、1:1 で結合している Cyt.c の位置を A、1.5:1 で結合している Cyt.c の位置を B とする。A 部位の Cyt.c は CcO へ電子伝達を行うが、B 部位の Cyt.c は構造を見る限り直接 CcO へ電子伝達を行うのは困難である。B 部位は A 部位の極近傍にあり A が離脱すれば直ちに A に移行して電子伝達に関わるのであろう。

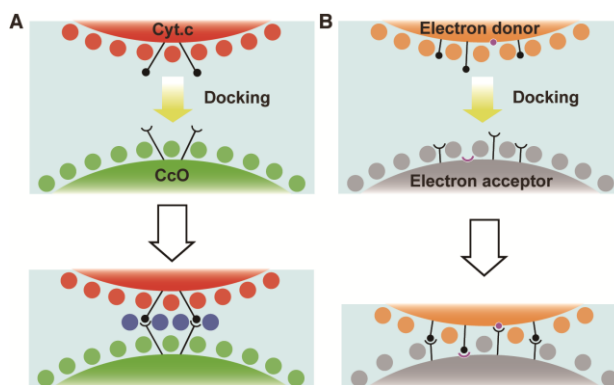


図14. CcO-Cyt.c 複合体形成機構と通常の複合体形成の温度因子

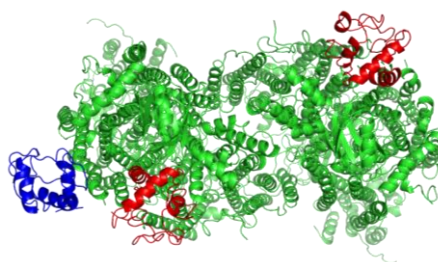


図15. Cyt.c が第2の部位(青色)にも結合した構造

(b) 複合体 I, III, IV 超複合体の調製(論文14;兵庫県立大)

要旨: ウシ心筋から呼吸鎖超複合体の調製法を構築し、その活性を確認した。

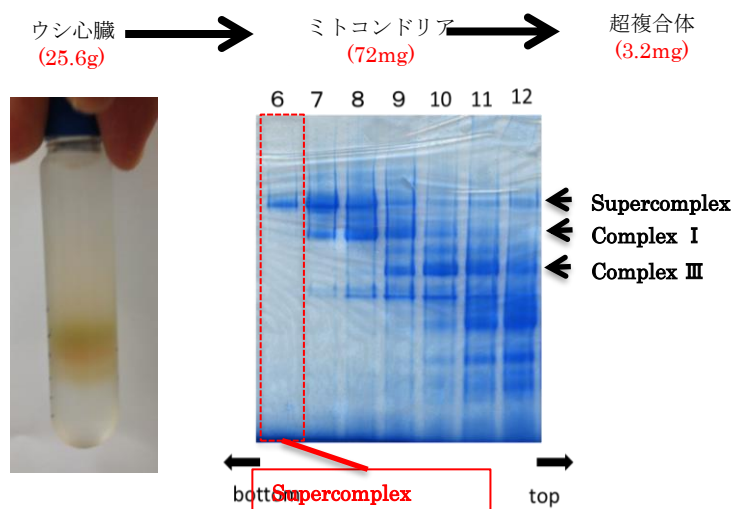


図16. 安定な超複合体の迅速大量精製

呼吸鎖複合体 I, III, IV はミトコンドリア内膜において互いに集合して機能していると言われている。ウシ心筋からこれらの超複合体をジギトニンで可溶化した後、アンフィフォルに置き換えて安定化することによって、大量に精製する方法を構築することができた。ウシ心筋 25.6g から精製標品 3.2 mg を2日間で得ることができるようになった(図16)。

図17は I, III, IV 超複合体とそれらの混合物の活性をしている。超複合体内では I, III, IV が連携して機能していることを示している。

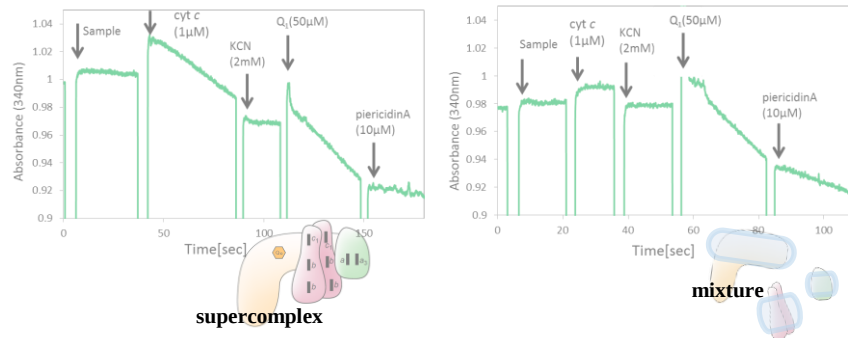


図17. 超複合体と各成分の混合物との活性の比較

III. 構造解析技術開発

(a) 電子顕微鏡技術開発 (論文8 ; 兵庫県立大)

要旨：膜蛋白質のEM像のコントラストを改善する資料調製法を開発した。

膜蛋白質では試料調製の際に生じる界面活性剤のミセルやフリーの界面活性剤がイメージのコントラストを著しく低下させる。このたび GraDeR という、lauryl maltose-neopentyl glycol (LMNG)中で可溶化した膜蛋白質溶液を調製し、コントラストを向上させる方法を開発した。膜蛋白質の単粒子構造解析の可能性を飛躍的に広げる画期的な技術として注目されている。

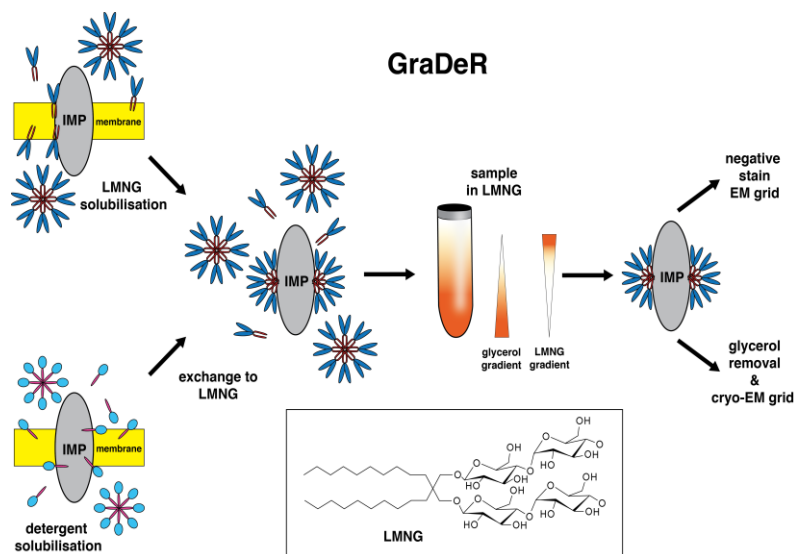


図18. EMで膜蛋白質のイメージのコントラストを改善する GraDeR 法

3. 2 チトクロム酸化酵素の時分割結晶構造解析法の開発(理化学研究所)

(1) 研究実施内容及び成果

(a) XFEL による無損傷時分割結晶構造解析法の確立(論文2、6、18;Z理研)

要旨: XFEL による高分解能 X 線無損傷回折実験法(SD-ROX 法)を開発した。さらに光をトリガーにしたナノ秒時分割構造解析法を確立した。

XFEL による高分解能の回折像を得るためには、大きな結晶による回折実験が必要であった。一方、強力な XFEL を結晶に照射すると、瞬時に結晶全体にその影響が広がると考えられていた。しかし、1-2 μm の大きさの X 線で、50 μm 間隔で結晶に X 線を照射することによって損傷を避けることができた(図20)。この方法は SF-ROX 法と命名されて XFEL における巨大なタンパク質の高分解能 X 線無損傷回折実験法を確立した。

結晶中で起こる反応を観測するために、光励起によって反応を開始させて一定時間後に回折像を収集する時分割回折実験システム(図21)を構築して、CcO の CO 解離過程を観測することができた。

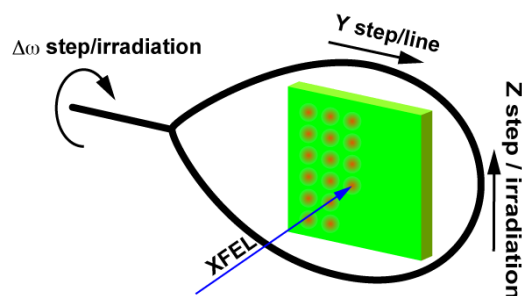


図 19. SF-ROX 法による X 線照射法

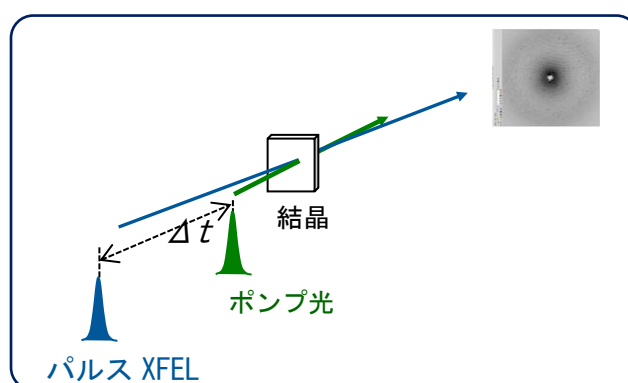


図 20. 光励起による時分割回折実験法

(b) 高エネルギー X 線による低損傷構造解析(未発表;理研)

要旨: タンパク質の放射光 X 線回折実験において X 線損傷を軽減する方法を開発した。

SPring-8 等蓄積リング型放射光光源を利用した蛋白質の X 線結晶解析においては、試料結晶への吸収線量に応じた放射線損傷の問題が、回折強度の減衰や局所的な分子構造の変化として現れる。結晶による X 線吸収は高エネルギー X 線の利用により低減されるが、同時に回折強度の減少や検出器感度の低下を伴う。しかしながら、高エネルギー X 線に対して十分な感度を持つ検出器の利用が可能であれば、より吸収線量を抑えた条件での回折データ収集が可能であると期待される[1]。

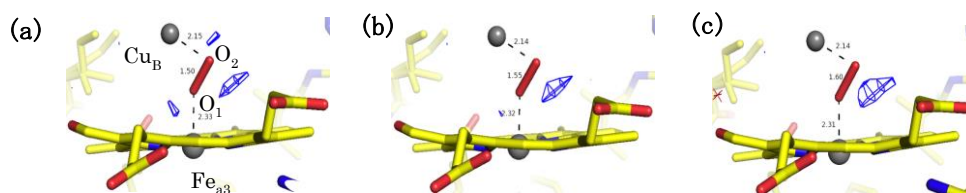


図 21. 酸素還元中心付近の差フーリエ電子密度分布の比較

本プロジェクトにおいて X 線自由電子レーザーを利用した無損傷構造解析により、還元中心の配位子が過酸化水素イオン(Peroxide)であることが明らかとなった[2]。休止酸化型チトクロム酸化酵素は、蓄積リングでは X 線照射で酵素が活性化されて Peroxide が水へと還元され、得られる結晶構造は吸収線量に応じて酸素原子間の距離が伸びた物となる事が分かっている[3]。この局所的な構造変化は、X 線感受性の高い蛋白質試料に対する高エネルギー X 線利用の効果を検証する目的に適した指標と言える。

そこで SPring-8 構造生物学 I ビームライン (BL41XU) において、休止酸化型結晶に対し 30 keV (波長 0.4133 Å) の X 線を利用した低吸収線量のデータ収集を行った。高エネルギー X 線に対して高い検出効率を持つ CdTe センサを備えたフォトンカウント型ピクセル検出器 Pilatus3 X CdTe (DECTRIS, Ltd.) を利用することにより、平均吸収線量を 55 kGy に抑えて分解能 1.9 Å のデータセットを取得した。得られた構造は差フーリエマップの残余電子密度の比較から、配位子の酸素原子間距離が上記無損傷構造解析と同じ 1.55 Å 程度と見積もられ、X 線還元の影響を大幅に抑えた構造が得られた (図 21)。

さらに現在、可視吸収分光法等を活用した放射線損傷のエネルギー依存性の有無を検証している。

参考:

- [1] Arndt et al., J. Appl. Cryst. (1984). 17, 118-119
- [2] Hirata et al., Nature Methods (2014). 11, 734-736
- [3] Aoyama et al., PNAS (2009). 106, 2165-2169

§ 4 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 1 件、国際 (欧文) 誌 18 件)

1. 著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年

1. Hirata K, Shinzawa-Itoh K, Yano N, Takemura S, Kato K, Hatanaka M, Muramoto K, Kawahara T, Tsukihara T, Yamashita E, Tono K, Ueno G, Hikima T, Murakami H, Inubushi Y, Yabashi M, Ishikawa T, Yamamoto M, Ogura T, Sugimoto H, Shen JR, Yoshikawa S, Ago H., Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL, Nature Methods, 11, 734-736, 2014 (DOI:10.1038/nmeth.2962)

2. Shimada S., Shinzawa-Itoh K., Amano S., Akira Y., Miyazawa A., Tsukihara T., Tani K., Gerle C. & Yoshikawa S., Three-dimensional structure of bovine heart NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) by electron microscopy of a single negatively stained two-dimensional crystal. Microscopy (Oxf), 63, 167-174, 2014 (DOI: 10.1093/jmicro/dft082)

3. Shinya Yoshikawa, Naomine Yano, Kyoko Shinzawa-Itoh, Kazumasa Muramoto, Eiki Yamashita, Tomitake Tsukihara, Improved X-ray structures of bovine heart cytochrome c oxidase reveal redox-driven proton active transports by Mg²⁺-containing water cluster, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1837,e103-e104, 2014 (DOI:10.1016/j.bbabi.2014.05.186)

4. Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S, Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 1553-1558, 2015 (DOI: 10.1073/pnas.1419767112)

5. Michihiro Suga, Fusamichi Akita, Kunio Hirata, Go Ueno, Hironori Murakami, Yoshiaki Nakajima, Tetsuya Shimizu, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Hideo Ago & Jian-Ren Shen, Native structure of photosystem II at 1.95Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses, Nature, Vol. 7532, pp.99-103, 2015 (DOI:10.1038/nature13991)

6. Jiko C., Davies K.M., Shinzawa-Itoh K., Tani K., Maeda S., Mills D.J., Tsukihara T., Fujiyoshi Y., Kühlbrandt W. & Gerle C., Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid

bilayer in 2D membrane crystals. *Elife*. Mar 27;4, 2015 (DOI: 10.7554/eLife.06119)

7. Hauer F., Gerle C., Fischer N., Oshima A., Shinzawa-Itoh K., Shimada S., Yokoyama K., Fujiyoshi Y. & Stark H. GraDeR: membrane protein complex preparation for single particle cryo-EM. *Structure*, 23.9:1769-1775, 2015 (DOI: 10.1016/j.str.2015.06.029.)

8. Masahide Hikita, Akima Yamamoto, Kyoko Shinnzawa-Itoh, Takashi Ogura, Shinya Yoshikawa, Stepwise binding of two azide ions to the O₂-reduction site of bovine heart cytochrome c oxidase shown by resonance Raman analysis, *Chemistry Letters*, vol. 44, No.8, 1142-1144. 2015 (DOI:10.1246/cl.150384)

9. Yano N, Muramoto K, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T. X-ray structure of cyanide-bound bovine heart cytochrome c oxidase in the fully oxidized state at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 1;71, 726-30, 2015, (DOI:10.1107/S2053230X15007025)

10. 光岡薫、ゲーレ・クリストフ. "低温電子顕微鏡法を用いた単粒子解析の最近の進展と膜タンパク質への応用." *生化学* 88.4、532-536、2016

11. Christoph Gerle, On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF₁ ATP synthase. *BBA - Bioenergetics* 1857: 1191-1196, 2016 (10.1016/j.bbabo.2016.03.008)

12. Shinzawa-Itoh K, Shimomura H, Yanagisawa S, Shimada S, Takahashi R, Oosaki M, Ogura T, Tsukihara T. Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies., *J Biol Chem.* 291, 4178-4184, 2016 (10.1074/jbc.M115.680553)

13. Osuda Y, Shinzawa-Itoh K, Tani K, Maeda S, Yoshikawa S, Tsukihara T, Gerle C., Two-dimensional crystallization of monomeric bovine cytochrome c oxidase with bound cytochrome c in reconstituted lipid membranes., *Microscopy* 65, 263-267, 2016 (10.1093/jmicro/dfv381)

14. Yano N, Muramoto K, Shimada A, Takemura S, Baba J, Fujisawa H, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S., The Mg²⁺-containing Water Cluster of Mammalian Cytochrome c Oxidase Collects Four Pumping Proton Equivalents in Each Catalytic Cycle., *The Journal of Biological Chemistry* 291, 23882-23894, 2016 (10.1074/jbc.M115.711770)

15. Shimada S, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Aoe S, Shimada A, Yamashita E, Kang J, Tateno M, Yoshikawa S, Tsukihara T, Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode., *The EMBO Journal*, 36, 291-300, 2017 (10.15252/embj.201695021)

16. Shimada A, Kubo M, Baba S, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, Nomura T, Kimura T, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Hatano K, Eto Y, Miyamoto A, Murakami H, Kumasaka T, Owada S, Tono K, Yabashi M, Yamaguchi Y, Yanagisawa S, Sakaguchi M, Ogura T, Komiya R, Yan J, Yamashita E, Yamamoto M, Ago H, Yoshikawa S, Tsukihara T., A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase., *Sci Adv.* 2017 Jul 14;3(7):e1603042. doi: 10.1126/sciadv.1603042.

17. Luo F, Shinzawa-Itoh K, Hagimoto K, Shimada A, Shimada S, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T., Structure of bovine cytochrome c oxidase crystallized at a neutral pH using a fluorinated detergent., *Acta Cryst.*, 2017, F73, 416-422. doi: 10.1107/S2053230X17008834.

18. Luo F, Shinzawa-Itoh K, Hagimoto K, Shimada A, Shimada S, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T., Structure of bovine cytochrome c oxidase in the ligand-free reduced state at neutral pH., *Acta Cryst.*, 2018, F74, 92-98. doi: 10.1107/S2053230X17018532.

19. Shimada S, Oosaki M, Takahashi R, Uene S, Yanagisawa S, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K., A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta.* (2018);**1859**: 154-163.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 吉川信也 "膜タンパク質機能解析のための結晶構造解析戦略" *ドージンニュース*, 2014,

152, 7-15.

2. Yoshikawa S, Shimada A, Shinzawa-Itoh K. Respiratory conservation of energy with dioxygen: cytochrome C oxidase. *Met Ions Life Sci.*, 15:89-130, 2015 (DOI: 10.1007/978-3-319-12415-5_4.)

3. Yoshikawa, S., Shimada, A. "Reaction mechanism of cytochrome c oxidase." *Chem Rev.*, 115:1936-89, 2015 (DOI: 10.1021/cr500266a.)

4. Yoshikawa, S. "XFEL studies on bovine heart cytochrome c oxidase" *ADVANCES IN PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION Including Bioenergy and Related Processes* (Springer, Dordrecht) Series Editors: Govindjee and Thomas D. Sharkey, volume 41, 357-373, 2015

5. 吉川信也“フェムト秒 X 線レ T ザー結晶構造解析法を用いた無損傷休止型チトクロム酸化酵素の構造解析”、放射光学会誌 2015、3月号、Vol.28 No.2, p. 56-65

6. 平田邦生、「SACLA 自由電子レーザーを用いた無損傷タンパク質結晶構造解析手法の開発」、生物物理 Vol. 55 (2015) No.2 通巻 318 号 p. 084-086

7. 平田邦生、伊藤(新澤)恭子、上野剛、山本雅貴、吾郷日出夫、「X線自由電子レーザーを利用したタンパク質高分解能無損傷構造解析」、日本結晶学会誌 57, 122-128 (2015)

8. 小倉尚志、呼吸系、”フロンティア生物無機化学”、第4章、pp. 238 - 260、伊東・青野・林編著、三共出版

9. Hauer, Florian; Gerle, Christoph (2017): www.grader-protocol.com.figshare.https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4635850.v2

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 16 件、国際会議 24 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. 月原 富武(兵庫県大院生命理)、「複雑さと精緻さを追求する構造生命科学/Structural life science」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市尚徳町 101-5)、2013 年 6 月 12 日

2. 吉川信也、(兵庫県大院生命理)、「水素原子観測によるウシ心筋チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構解明を目指して」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市尚徳町 101-5)、2013 年 6 月 13 日

3. 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクロム c 酸化酵素の高効率プロトンポンプを可能にするタンパク質構造ダイナミクス: 振動分光法」、とりぎん文化会館(鳥取市尚徳町 101-5)、2013 年 6 月 14 日

4. T. Ogura (兵庫県立大学), "Identification of functionally important conformational changes in cytochrome c oxidase", The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, May 21-25, 2013

5. Shinya Yoshikawa (兵庫県大院生命理), "Molecular structure and functional mechanisms of cytochrome c oxidase", Main symposia "Mitochondriology": New Approaches in Bioenergetics, 38th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013, St. Petersburg, Russia, July 7, 2013

6. Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理)、Structure of bovine cytochrome c oxidase at high resolution、NSRRC's Annual Users' Meeting and 20th Anniversary of Operation、National Synchrotron Radiation Research Center, 101 Hsin-Ann Road, Hsinchu Science Park Hsinchu 30076, Taiwan, R.O.C., Sep. 5, 2013

7. Gerle C. (兵庫県大院生命理) Structure of the bovine heart F1Fo-ATP synthase determined by sub-tomogram averaging of 2D crystals. 70th annual meeting of the Japanese Society of Microscopy, Makihari, Chiba, 2014.05.11

8. 月原富武(兵庫県立大学)、我が国の蛋白質結晶学 / Protein crystallography in Japan、第 14 回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム、ワークビア横浜/横浜産貿ホール マリネリア、2014 年 6 月 27 日

9. 吉川信也(兵庫県立大学)、「高度に組織化された鉄イオンの機能により駆動されるチトク

ロム酸化酵素反応機構”鉄バイオサイエンス学会第38回学術集会、仙台、2014年9月7日

10. T. Ogura (兵庫県立大学), "Vibrational Spectroscopic Investigation of Molecular Mechanisms of Aerobic Respiration", *Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation*, 沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス(OIST)(沖縄県), 2014年11月12日

11. Gerle, C. (兵庫県立大学) Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. 日本生体エネルギー研究会第40回討論会、愛媛大学、松山、2014年12月11日

12. Gerle, C. Technical advances in cryo EM of rotary ATPases. 2014年度べん毛研究交流会、合歓の郷、志摩市、2015年3月1日

13. 吉川信也(兵庫県立大学)、Proton pump mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase、日本生物物理学会北海道支部講演会、北大理学部、札幌、2015年3月4日

14. Hideo Ago, Kunio Hirata, Kyoko Shinzawa-Itoh, Naomine Yano, Tomitake Tsukihara, Eiki Yamashita, Go Ueno, Hironori Murakami, Shinya Yoshikawa, and Masaki Yamamoto (理研・放射光科学総合研究センター、阪大蛋白研・兵庫県立大院生命理学)、"Determination of damage-free crystal structure of an X-ray sensitive protein using SACLA", 8th International Workshop on X-ray Radiation Damage to Biological Crystalline Samples, Hamburg Germany, April 11th, 2014

15. T. Ogura, S. Nakashima, M. Kubo, S. Yamaguchi, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa (兵庫県大院生命理), "Cooperative Structural Dynamics of Proton Pumping Elements in Cytochrome c Oxidase as Studied by Innovative Infrared Spectroscopy", 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8), Istanbul, Turkey, June 24, 2014

16. Hideo Ago, Kunio Hirata, Kyoko Shinzawa-Itoh, Naomine Yano, Tomitake Tsukihara, Eiki Yamashita, Go Ueno, Hironori Murakami, Shinya Yoshikawa, Masaki Yamamoto (理研・放射光科学総合研究センター、阪大蛋白研・兵庫県立大院生命理学)、"Intact structure determination of a highly radiation sensitive protein at SACLA", 23rd IUCr Congress, Montreal, Canada, August 8th, 2014

17. Gerle, C. (兵庫県大院生命理) Structure of the bovine heart F1Fo-ATP synthase determined by sub-tomogram averaging of 2D crystals. 18th Congress of the International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), Brisbane, Australia, 2014.08.14

18. 月原富武(兵庫県大院生命理)、チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構、分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」、岡崎コンファレンスセンター、2015年4月21日

19. 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、プロトンポンプ機能に必要な部品の働き、分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」、分子科学研究所 岡崎コンファレンスセンター(愛知県)、2015.4.20-21

20. T. Ogura, T. Nomura, S. Yanagisawa, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa (兵庫県大院生命理), Effects of Proton Motive Force on the Structure and Dynamics of Cytochrome c Oxidase: Resonance Raman Spectroscopy, 5th Georgian Bay International Conferences Bioinorganic Chemistry (CanBIC5), Parry Sound, Canada, 2015.5.19-23

21. 月原富武(兵庫県立大学)、高分解能 X 線結晶構造解析によるチトクロム酸化酵素の酸素還元・プロトンポンプ機構の解明、第15回日本蛋白質科学会年会 徳島、あわぎんホール、2015年6月24日

22. T. Ogura, S. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa (兵庫県大院生命理), Molecular Mechanisms of Cytochrome c Oxidase as Studied by Vibrational Spectroscopy, 11th Australian Conference on Vibrational Spectroscopy / 5th Asian Spectroscopy Conference, University of Sydney, Australia, 2015.9.29-10.2

23. Christoph Gerle (兵庫県大院生命理), CryoEM of the mammalian F-ATP synthase: possible implications for the mitochondrial permeability transition pore. Departmental seminar, University of Padua, Padua, Italy, 2016.05.09

24. Tomitake Tsukihara (兵庫県大院生命理), Recent structural studies of bovine cytochrome oxidase by multiple methods, IPR International Symposium 2016 Taiwan-Japan Joint Symposium of Crystallography Frontier of Protein Crystallography, Centennial Hall, Hokkaido

University, 2016/6/24

25. *Christoph Gerle(兵庫県大院生命理), Membrane bending and more: cryoEM of the mammalian F-ATP synthase., Mitochondrial bASiCs: ATP, Signaling and Calcium symposium, University of Padua, Padua, Italy, 2016/7/1

26. Masaru Tateno (兵庫県大院生命理), Functional Mechanisms of Biological Macromolecular Systems Revealed by Hybrid ab Initio Quantum Mechanics/molecular Dynamics Simulation. BIT's 7th Annual Global Congress of Catalysis-2016, KINTEX, Goyang, Korea, 2016/7/1

27. Jiyoung Kang(兵庫県大院生命理), Theoretical Analysis of Dynamical Mechanisms of Ligand-recognition by Cytochrome c Oxidase Employing Hybrid ab initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Molecular Dynamics Simulation, BIT's 7th Annual Global Congress of Catalysis-2016, KINTEX, Goyang, Korea, 2016/7/1

28. Christoph Gerle(兵庫県大院生命理), On the structural possibility of pore forming mitochondrial FoF1 ATP synthase., EBEC 2016, 19th European Bioenergetics Conference,, Riva del Garda, Italy, 2016/7/2-7

29. *Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理), The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome c oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle, EBEC 2016, 19th European Bioenergetics Conference, Riva del Garda. Italy, 2016/7/2-7

30. S. Nakashima(兵庫県大院生命理), C. Li, T. Nishiguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Ogura, The Coupling Mechanism Between Proton Pumping and Oxygen Reduction Reaction in Cytochrome c Oxidase, 9th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Nanjing, P. R. China, 2016/7/3-8

31. 月原 富武(兵庫県大院生命理), 島田 敦広, 矢野 直峰, 村本 和優, 新澤- 伊藤 恭子, 山下 栄樹, 吉川 信也, 精密 X 線結晶構造解析によるチトクロム酸化酵素の酸素還元・プロトンポンプ機構, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/27

32. Christoph Gerle(兵庫県大院生命理), In & out of the membrane: cryoEM of bovine FoF1 ATP synthase, Minisymposium on Structure-Based Bioenergetics, Spring-8, Harima, 2016.12.1

33. *Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理), Structural studies of cytochrome c oxidase functioning in the mitochondrial inner membrane, THE 42nd NAITO CONFERENCE ON In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan, 2016/10/6

34. *Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理), Structural studies of cytochrome c oxidase, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Auckland, Australia, 2016/12/6

35. Kang, J., and Tateno, M.(兵庫県大院生命理), Dynamical mechanisms of biological macromolecular systems investigated by ab initio electronic structure calculations coupled to molecular dynamics, EMN Meeting on Quantum 2017, Vienna, Austria. 2017/7/18-2017/7/22

36. Jiyoung Kang(兵庫県立大院生命理), Energy landscape analyses of biological systems: quantum molecular dynamics Mini Symposium on Computational Neurobiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2017/8/16

37. Masaru Tateno(兵庫県立大院生命理), Toward understanding what life is, by unification of physical and information sciences Mini Symposium on Computational Neurobiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, 2017/8/16

38. 島田 敦広(岐阜大応生), 久保 稔(理研 SPring-8), 馬場 清喜(高輝度研), 吾郷 日出夫(理研 SPring-8), 月原 富武(兵庫県立大院生命理), 吉川 信也(兵庫県立大院生命理), A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome co oxidase, 日本生物物理学会第55回年会, 熊本大学黒髪北地区, 2017/9/19

39. *Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理), Structural studies of cytochrome c oxidase, The Rossmann Symposium, Laffayette, Indiana, USA 2017/11/29

40. Shinya Yoshikawa(兵庫県立大院生命理), Reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase, Symposium on Material Science and Technology toward Energy-Saving Society, 東京大学工学部武田ホール, 2018/3/12-13

② 口頭発表 (国内会議 15 件、国際会議 6 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. 吾郷日出夫・平田邦生・上野 剛・村上博則・山本雅貴・山下栄樹・伊藤(新澤)恭子・加藤公児・畑中美樹・武村修平・矢野直峰・吉川信也・月原富武(理研・放射光科学総合研究センター、阪大蛋白研・兵庫県立大院生命理学)、SACLA によるウシ心筋チトクローム酸化酵素の無損傷高分解能結晶構造解析、平成 25 年度日本結晶学会年会及び総会、熊本大学 黒髪南地区(熊本県熊本市)、2013 年 10 月 12 日

2. H. Ago, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, T. Tosha, T. Hisano, M. Kubo, H. Sugimoto, Y. Shiro, M. Yamamoto, E. Yamashita, J. R. Shen, K. Shinzawa-Ito, K. Kato, M. Hatanaka, S. Takemura, N. Yano, T. Ogura, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, (理研・放射光科学総合研究センター、阪大蛋白研、岡大・院自然科学、兵庫県大院生命理) "High-resolution femtosecond crystallography at SACLA, a challenge of reducing the X-ray radiation damage on super molecular assemblies", 11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR), Grand Elysée Hotel Hamburg, Germany, Sep. 8-11, 2013

3. 西口達人, 引田理英, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 中島 聡, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクローム c 酸化酵素の酸化還元反応の時間分解赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発」、日本化学会第 94 春季年会、名古屋大学 東山キャンパス(愛知県)、2014 年 3 月 30 日

4. 中島 聡, 久保 稔, 石上 泉, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「時間分解振動分光法によるチトクローム酸化酵素の反応初期過程」、日本化学会第 94 春季年会、名古屋大学 東山キャンパス(愛知県)、2014 年 3 月 28 日

5. 中島 聡, 久保 稔, 石上 泉, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクローム酸化酵素の反応初期過程での共役機構」、第 6 回日本生物物理学会 中国四国支部大会、とりぎん文化会館、2014 年 5 月 17 日

6. Masaki Yamamoto, Kunio Hirata, Kyoko Shinzawa-Itoh, Naomine Yano, Shuhei Takemura, Koji Kato, Tomitake Tsukihara, Eiki Yamashita, Go Ueno, Hironori Murakami, Takshi Ogura, Hiroshi Sugimoto, Jian-Ren Shen, Shinya Yoshikawa, Hideo Ago(理研・放射光科学総合研究センター、阪大蛋白研、岡大・院自然科学、兵庫県大院生命理)、「Determination of Damage-free Crystal Structure of X-ray Sensitive Proteins using SACLA」、American Crystallographic Association Annual Meeting, Albuquerque, NM, USA, May 28th, 2014

7. 中島 聡, 久保 稔, 石上 泉, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理、理研・放射光科学総合研究センター、Albert Einstein College)、「時間分解振動分光法でみたチトクローム酸化酵素の反応初期過程での共役機構」、第 41 回生体分子科学討論会、九州大学 西新プラザ、2014 年 6 月 6 日

8. 西口達人, 李 辰, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也, 中島 聡, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクローム c 酸化酵素の反応初期過程の研究」、日本化学会第 95 回春季年会、日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部、2015 年 3 月 28 日

9. 中島 聡, 西口達人, Chen Li, 中川善之, 青柳裕大, 新澤-伊藤 恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクローム c 酸化酵素の酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構」、第 42 回生体分子科学討論会、高崎シティーギャラリーコアホール(群馬県)、2015.6.12-13

10. 中島 聡, 西口達人, 李 辰, 伊藤-新澤 恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理)、「チトクローム c 酸化酵素における酸素還元反応とプロトンポンプ共役機構」、第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館(石川県)、2015.9.13-15

11. 島田 敦広、矢野 直峰、岸田 佳織、馬場 淳平、江藤 勇樹、波多野 啓太、山下 栄樹、伊藤-新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理)、「チトクローム酸化酵素の高分解能 X 線結晶構造解析から明らかとなった、酸素還元反応と共役したプロトン輸送機序」、第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学 角間キャンパス 自然科学本会、2015 年 9 月 14 日

12. 吾郷 日出夫、平田 邦生、上野 剛、山本 雅貴、新澤-伊藤 恭子、月原 富武、吉川

信也、菅 倫寛、秋田 総理、沈 建仁(理研・放射光科学総合研究センター, 兵庫県大院生命理学, 阪大・蛋白研, 岡大・院自然科学)、巨大タンパク質の高分解能・無損傷結晶構造解析が可能なフェムト秒X線結晶構造解析法の開発、第 53 回 日本生物物理学会年会、金沢大学 角間キャンパス 自然科学本部、2015 年 9 月 13 日

13.伊藤(新澤)恭子(兵庫県大院生命理), ウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製法, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/7

14.中島 聡、中川善之、Li Chen、新澤-伊藤 恭子、吉川信也、小倉尚志(兵庫県大院生命理)時間分解振動分光法によるチトクローム c 酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の研究, 第 43 回生体分子科学討論会, 名古屋大学, 2016/6/24-25

15.上野剛(理研・放射光科学総合研究センター)、島田敦広(兵庫県大院生命理)、山下栄樹(阪大蛋白研)、長谷川和也、熊坂崇(JASRI)、伊藤-新澤恭子、吉川信也、月原富武(兵庫県大院生命理)、山本雅貴(理研 RSC)、高エネルギー X 線を利用した休止酸化型チトクローム酸化酵素の低損傷構造解析, 平成 28 年度 日本結晶学会 年会及び会員総会, 茨城県立県民文化センター, 2016/11/17

16.上野剛(理研・放射光科学総合研究センター)、高エネルギー X 線を利用した休止酸化型チトクローム酸化酵素の低損傷構造解析, 平成 28 年度 日本結晶学会 年会及び会員総会, 茨城県立県民文化センター, 2016/11/17

17.島田 悟, 上根 滋史, 大崎 麻里加, 高橋 涼子, 下村 陽信, 三枝 馨, 前田 晋太郎, 引田 理英, 伊藤(新澤) 恭子(兵庫県大院生命理), 本来の構造と機能を保持したウシミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/27

18.Satoru Shimada, Kyoko Shinzawa-Itoh, Junpei Baba, Shimpei Aoe, Atsuhiko Shimada (兵庫県大院生命理), Eiki Yamashita (阪大蛋白研), Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara (兵庫県大院生命理), X-ray structural analysis of mammalian cytochrome c-cytochrome c oxidase complex at 2.0 Å resolution, 14th Conference of the Asian Crystallographic Association AsCA 2016, Hanoi University of Science and Technology Hanoi, Vietnam, 2016/12/4-7

19.Kyoko Shinzawa-Itoh, Satoru Shimada, Junpei Baba, Shimpei Aoe, Atsuhiko Shimada (兵庫県大院生命理), Eiki Yamashita (阪大蛋白研), Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara (兵庫県大院生命理), Complex Structure of Mammalian Cytochrome c-Cytochrome c Oxidase Complex Reveals a Novel Protein-Protein Interaction Mode, 5th Annual Conference of AnalytiX-2017, Hilton Fukuoka Sea Hawk, 2017/3/22-24

20.Go Ueno (RIKEN SPring-8 Center), Low-dose X-ray structure analysis of cytochrome oxidase utilizing high-energy X-rays, 24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2017), Hyderabad, India, 2017/8/26 予定

21.伊藤(新澤)恭子(兵庫県立大学), Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel interprotein interaction mode, 第 9 回国際構造生物学会(9th International Conference on Structural Biology), チューリッヒ スイス, 2017/9/18-20

③ ポスター発表 (国内会議 70 件、国際会議 11 件)

2. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. 引田理英、伊藤新澤恭子、森山昌和、小倉尚志、木平清人、吉川信也(兵庫県大院生命理)、「ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系複合体 I に含まれる FMN の共鳴ラマンスペクトル」、日本化学会、立命館大学 琵琶湖くさつキャンパス、2013 年 3 月 22-25 日

2. 武村秀平、加藤公児、矢野直峰、山下栄樹、村本和優、伊藤-新澤恭子、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)、「ウシ心筋チトクローム酸化酵素の酸性アミノ酸残基のイオン化状態の X 線結晶構造解析」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市)、2013 年 6 月 13, 14 日

3. 矢野直峰、加藤公児、山下栄樹、村本和優、伊藤-新澤恭子、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)、「ウシ心筋チトクローム酸化酵素の Mg を含む水クラスター機能の高分解能 X 線結晶構造解析による研究」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市)、2013

年 6 月 13, 14 日

4. 前田晋太郎、山本麻未、伊藤(新澤)恭子、Christoph Gerle、宮澤淳夫、藤吉好則、吉川信也(兵庫県大院生命理)、「ウシ心筋 FoF₁ ATP 合成酵素の 2 次元結晶化」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市)、2013 年 6 月 13, 14 日

5. 上根滋史、島田悟、伊藤(新澤)恭子、吉川信也(兵庫県大院生命理)、「ウシ心筋 NADH-ユビキノン酸化還元酵素の精製法の検討」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取市)、2013 年 6 月 13, 14 日

6. M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato, S. Yoshikawa(兵庫県大院生命理), Real time observation of water-channel closure controlled by CuB in bovine cytochrome c oxidase using a novel high-sensitivity infrared system, International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC-16, Grenoble, France, July 22-26, 2013

7. 玉田太郎・栗原和男・黒木良太・大原高志・伊藤(新澤)恭子・吉川信也・月原富武(原子力機構量子ビーム・原子力機構 J-PARC センター・兵庫県立大院生命理学)、「チトクロム c 酸化酵素の中性子回折データ収集に向けた取り組み」、平成 25 年度日本結晶学会年会及び総会、熊本大学 黒髪南地区(熊本県熊本市)、2014 年 10 月 12 日(土)~13 日(日)

8. Gerle Christoph、慈幸千真理、前田晋太郎、Davies Karen、Kuhlbrandt Werner、藤吉好則、伊藤(伊藤)恭子、吉川信也(兵庫県大院生命理学、阪大蛋白質研、Max Planck Biophys., 名大細胞生理学研)、「Highly stable tubes of bovine mitochondrial F-ATP synthase suitable for electron cryo tomography」、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

9. 坂口美幸、伊藤(新澤)恭子、吉川信也、小倉尚志(兵庫県大院生命理学)、「Interaction Between Heme and Heme-Cu Binuclear Center in Cytochrome c Oxidase」、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

10. 村本和優、望月正雄、谷口槇、矢野直峰、前田友子、伊藤(新澤)恭子、山下栄樹、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理、阪大蛋白質研)、一酸化炭素・シアン化物結合混合原子価型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の構造解析)、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

11. 西口達人、引田理英、伊藤(新沢)恭子、吉川信也、中島聡、小倉尚志(兵庫県大院生命理)、チトクロム c 酸化酵素の酸素還元反応における赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

12. 引田理英、山本旭麻、前田 友子、伊藤(新澤)恭子、小倉尚志、吉川信也(兵庫県大院生命理)、完全酸化型チトクロム c 酸化酵素の酸化還元活性金属中心とアザイドの相互作用の分光学的研究、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

13. 村本和優、望月正雄、矢野直峰、前田友子、伊藤(新澤)恭子、山下栄樹、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理、阪大蛋白質研)、シアン化物・アジ化物結合完全酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の構造解析)、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

14. 網中良太、伊藤真衣、下方国稔、片山幸江、月原富武、吉川信也、島田秀夫(兵庫県大院生命理学、ワールドインテック)、Sequencing bovine/human hybrid cytochrome c oxidase genes in “HeLa cells to verify mutagenesis results disapproving D-path proton pumping”、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

15. 佐藤航、今井瑞依、内田毅、伊藤恭子、吉川信也、石森浩一郎(北大院総化、北大院理、兵庫県大院生命理)、浸透圧効果を利用したシトクロム c- シトクロム c 酸化酵素電子伝達複合体における相互作用の解析、第 51 回日本生物物理学会、国立京都国際会館(京都市)、2013 年 10 月 28-30 日

16. M. Hikita, A. Yamamoto, T. Maeda, K. Shinzawa-Itoh, T. Ogura, S. Yoshikawa(兵庫

県大院生命理), "完全酸化型チトクロム c 酸化酵素の酸化還元活性金属中心とアザイドの相互作用の分光学的研究", 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府), 2013 年 10 月 28 日~30 日

17. T. Nishiguchi, M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, S. Nakashima, T. Ogura (兵庫県大院生命理), "チトクロム c 酸化酵素の酸素還元反応における赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発", 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府), 2013 年 10 月 28 日~30 日

18. M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura (兵庫県大院生命理), Interaction Between Heme and Heme-Cu Binuclear Center in Cytochrome c Oxidase, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府), 2013 年 10 月 28 日~30 日

19. T. Nomura, S. Yanagisawa, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura (兵庫県大院生命理), Resonance Raman Study on Cytochrome c Oxidase Reconstituted in the Phospholipids Vesicles, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, May 21-25, 2013

20. M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura (兵庫県大院生命理), Interaction Between Heme and Heme-Cu Binuclear center in Cytochrome c oxidase, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, May 21-25, 2013

21. 平田邦生、吾郷日出男、上野剛、山下栄樹、新澤恭子、加藤公児、畑中美紀、竹村周平、矢野直峰、村上博則、沈建仁、小倉尚志、久保稔、杉本宏、当舎武彦、久野玉雄、城宜嗣、山本雅貴、吉川信也、月原富武(理研・放射光科学総合研究センター, 兵庫県大院生命理、阪大・蛋白研、岡大・院自然科学), A new approach towards damage-free and high-resolution protein crystallography at SACLA, American Crystallographic Association, Honolulu, July 23, 2013

22. 中島 聡, 久保 稔, 石上 泉, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 小倉尚志(兵庫県大院生命理), チトクロム酸化酵素の反応初期過程での共役機構, 第 6 回日本生物物理学会 中国四国支部大会, とりぎん文化会館, 2014 5.17-18

23. Gerle Christoph, Chimari Jiko, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shintaro Maeda, Karen Davies, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理、阪大蛋白質研, Max Planck Biophys) Highly stable tubes of bovine mitochondrial F-ATP synthase suitable for electron cryo tomography 第14回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年6月26日

24. 矢野直峰、武村秀平、前田友子、村本和優、山下栄樹、伊藤—新澤恭子、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)“高分解能X線結晶構造解析によって明らかになったチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ反応過程における Mg を含む水クラスターの機能”、第14回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年6月26日

25. 馬場淳平、島田敦広、矢野直峰、山下栄樹、武村秀平、前田友子、村本和優、伊藤—新澤恭子、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)、CO 結合型ウシ心筋チトクロム c 酸化酵素に対する高分解能X線結晶構造解析法を用いた金属酸化還元中心によるプロトンポンプ制御機構の解明、第14回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年6月26日

26. 川原貴子、長尾修平、島田敦広、矢野直峰、武村秀平、前田友子、村本和優、伊藤—新澤恭子、山下栄樹、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)、CN-結合型および CN-結合部分還元型チトクロム c 酸化酵素の高分解能X線結晶構造解析、第14回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014 年6月26日

27. Shinya Yoshikawa, Naomine Yano, Kyoko Shinzawa-Itoh, Kazumasa Muramoto, Eiki Yamashita, Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理、阪大蛋白研) Improved X-ray structures of bovine heart cytochrome c oxidase reveal redox-driven proton active transports by Mg²⁺-containing water cluster, European Bioenergetics Conference (EBEC)2014, Lisbon Portugal, 2014 年 7 月 12-17 日

28. N. Yano, K. Shinzawa-Itoh, A. Shimada, S. Takemura, T. Kawahara, H. Tadehara, S. Nagao, J. Baba, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, K. Muramoto, E. Yamasahita(兵庫県大院生命理、阪

大蛋白研), Structures of bovine cytochrome oxidase reveal proton active transports, IUCr 2014, 23rd Congress and General Assembly of The International Union Of Crystallography, The Palais des congrès de Montréal, Montréal, Québec, Canada, 5-12 August 2014

29. 西口達人, 引田理英, 新澤-伊藤恭子, 吉川信也, 中島 聡, 小倉尚志(兵庫県大院生命理), チトクロム c 酸化酵素の酸素還元反応の時間分解赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 9.25-27

30. S. Nakashima, M. Kubo, I. Ishigami, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura(兵庫県大院生命理), チトクローム酸化酵素の反応初期過程における共役機構の解明, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 9.25-27

31. Satoru Shimada, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shimpei Aoe, Atsuhiko Shimada, Jumpei Baba, Syuhei Takemura, Eiki Yamashita, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理、阪大蛋白研), X-ray structural analysis of the cytochrome c and cytochrome oxidase, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25 日-27 日

32. Shintaro Maeda, Kyoko Shinzawa-Itoh, Atsuo Miyazawa, Christoph Gerle, Yoshinori Fujiyoshi, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理, 名古屋大・CeSPI), The improvement of 2D crystal quality by crystallization temperature correlated with fluidity of lipids mixture, 第 52 回 日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25 日~27 日

33. Atsuhiko Shimada, Masahide Hikita, Hitomi Tadehara, Akima Yamamoto, Eiki Yamashita, Kyoko Shinzawa-Itoh, Tomoko Maeda, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理、阪大蛋白研), High-resolution crystal structural analysis reveals that the two azide ions bind to Cytochrome c oxidase in different manner 第 52 回 日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25 日-27 日

34. Shigefumi Uene, Satoru Shimada, Kyoko Shinzawa-Itoh, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa(兵庫県大院生命理), Quantification of the active center of bovine heart NADH-ubiquinone reductase with Piericidin A 第 52 回 日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25 日~27 日

35. Kyoko Shinzawa-Itoh, Satoru Shimada, Ryoko Takahashi, Shigefumi Uene, Harunobu Shimomura, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理), Purification of the respiratory super complex from mammalian mitochondria, 第 52 回 日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 25 日~27 日

36. Mizue Imai, Wataru Sato, Kaoru Inoue, Koichi Sakamoto, Kyoko Shinzawa, Takeshi Uchida, Shinya Yoshikawa, Koichiro Ishimori(北大.院総化, 兵庫県大院生命理, 北大院理) “ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム c-シトクロム c 酸化酵素複合体における 電子伝達反応の構造制御機構”第52回日本生物物理学会、札幌、2014 年 9 月 26 日

37. Satoru Nakashima, Minoru Kubo, Izumi Ishigami, Kyoko Itoh-Shinzawa, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura(兵庫県大院生命理) “チトクローム酸化酵素の反応初期過程における共役機構の解明”第52回日本生物物理学会、札幌、2014 年 9 月 26 日

38. Tatsuhito Nishiguchi, Masahide Hikita, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima, Takashi Ogura(兵庫県大院生命理) “チトクロム c 酸化酵素の酸素還元反応の時間分解赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発”第52回日本生物物理学会、札幌、2014 年 9 月 26 日

39. 矢野直峰・武村秀平・島田敦広・村本和優・伊藤-新澤恭子・山下栄樹・月原富武・吉川信也(兵庫県大院生命理)、高分解能 X 線結晶構造解析によるチトクロム酸化酵素の Mg を含む水クラスターの機能、平成 26 年度 日本結晶学会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1 日~3 日

40. 吉村政人、Chen Nai-chi、Guan Hong-hsiang、月原富武、Chen Chun-jung(NSRRC, 兵庫県大院生命理)、電子密度平均化法の位相決定への応用、平成 26 年度 日本結晶学会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1 日~3 日

41. 馬場淳平、長尾修平、川原貴子、矢野直峰、島田敦広、山下栄樹、村本和優、伊藤-新澤恭子、月原富武、吉川信也(兵庫県大院生命理)、チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ逆流防止機構の解析、平成 26 年度 日本結晶学会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1 日～3 日

42. 島田敦広、平田邦夫、山下恵太郎、吾郷日出夫、山本雅貴、上野剛、伊藤-新澤恭子、吉川信也、月原富武(兵庫県大院生命理、理研 Spring-8、阪大蛋白研)、X 線自由電子レーザーを用いて得られた回折イメージ処理法の検討、平成 26 年度 日本結晶学会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1 日～3 日

43. 坂口美幸、木村哲就、上野 剛、城 宜嗣、小倉尚志、久保 稔(兵庫県大院生命理、理研 Spring-8)、X 線回折計と共存した同軸・同時可視吸収分光装置の開発、平成 26 年度日本結晶学会年会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1-3 日

44. Gerle, C.(兵庫県大院生命理) Novel sample preparation methods for cryo EM of large membrane complexes. 国際ワークショップ「WINTech 2015」、神戸市、神戸大学 統合研究拠点コンベンションホール、2015 年 3 月 12 日

45. Gerle, C. (兵庫県大院生命理) Novel sample preparation methods for cryo EM of large membrane complexes. Annual Evaluation Symposium of the Leading Graduate Program, 上郡町、CAST、2015 年 3 月 16 日

46. 中川善之、伊藤-新澤恭子、吉川信也、中島 聡、小倉尚志(兵庫県大院生命理)、時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム c 酸化酵素の反応ダイナミクスの研究、日本化学会第 95 回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部、2015 年 3 月 26-29 日

47. Gerle C., Hauer F., Fischer N., Oshima A., Shinzawa-Itoh K., Shimada S., Yokoyama K., Fujiyoshi Y. & Stark H(兵庫県大院生命理、Max Planck Biophys.,京産大総合生命 名大細胞生理学研). GraDeR: membrane protein complex preparation for single particle cryo-EM. 3DEM Gordon Research Conference, Colby-Sawyer College, New London. NH, U.S.A. 2015.6.21

48. C. Li, T. Nishiguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, S. Nakashima, T. Ogura(兵庫県大院生命理), Newly Developed systems of time-resolved IR spectroscopy for elucidating the proton pumping reaction of cytochrome c oxidase, 第 15 回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール(徳島県)、2015.6.24-26

49. 伊藤-新澤恭子、下村陽信、柳澤幸子、島田 悟、小倉尚志、月原富武(兵庫県大院生命理)、機能を保持したウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の調製、第 15 回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール(徳島県)、2015.6.24-26

50. 島田 悟、青江 新平、伊藤- 新澤 恭子、島田 敦広、馬場 淳平、武村 秀平、山下栄樹、吉川 信也、月原 富武(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、チトクロム c とチトクロム酸化酵素共結晶の高分解能 X 線結晶構造に基づく相互作用解明、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 24 日

51. 馬場 淳平、島田 敦広、山下 栄樹、村本 和優、伊藤- 新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、シアン結合完全還元型チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析から明らかになった、活性中心を構成する heme a₃ の高い可動性、第 15 回日本蛋白質科学会年会 徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 25 日

52. 波多野 啓太、島田 敦広、引田 理英、蓼原 瞳、山本 旭麻、山下 栄樹、前田 友子、伊藤- 新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、チトクロム酸化酵素の真のアジ化物イオン結合型構造により明らかになった、酸素還元中心の構造変化とプロトンポンプ経路の関係性、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 25 日

53. 青江 新平、島田 悟、伊藤- 新澤 恭子、島田 敦広、馬場 淳平、武村 秀平、山下栄樹、吉川 信也、月原 富武(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、第 2 のチトクロム c 結合部位を持つチトクロム c - チトクロム酸化酵素共結晶の X 線結晶構造解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 25 日

54. 伊藤- 新澤 恭子、下村 陽信、柳澤 幸子、島田 悟、小倉 尚志、月原 富武(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、機能を保持したウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の調製、

第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 26 日

55. 萩本 楓、伊藤-新澤 恭子、島田 敦広、島田 悟、Luo Fangjia、山下 栄樹、月原 富武(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、中性領域(pH7.3)でのウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶化及び構造解明、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 26 日

56. 島田 敦広、矢野 直峰、武村 秀平、村本 和優、山下 栄樹、伊藤-新澤 恭子、前田 友子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、チトクロム酸化酵素内の Mg を含む水クラスターが酸素取り込み前に 4 等量のプロトン蓄積することで、高効率プロトンポンプ反応を可能にする、第 15 回日本蛋白質科学会年、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 26 日

57. 江藤 勇樹、島田 敦広、前田 友子、山下 栄樹、村本 和優、伊藤-新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、チトクロム酸化酵素 F 型中間体の高分解能 X 線結晶構造解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島・あわぎんホール、2015 年 6 月 26 日

58. 伊藤-新澤恭子、下村陽信、柳澤幸子、島田 悟、高橋涼子、上根滋史、小倉尚志、吉川信也、月原富武(兵庫県大院生命理)、Active supercomplex purified from bovine heart reveals the functional unit of the mitochondrial respiratory chain, 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館(石川県)、2015.9.13-15

59. 波多野 啓太、宮本 朱梨、島田 敦広、馬場 清喜、熊坂 崇、伊藤-新澤 恭子、月原 富武(兵庫県大院生命理)、吉川 信也、チトクロム酸化酵素を用いた常温高分解能 X 線回折実験法の確立、第 53 回 日本生物物理学会年会 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本、2015 年 9 月 13 日

60. 島田 悟、青江 新平、伊藤-新澤 恭子、馬場 淳平、島田 敦広、山下 栄樹、吉川 信也、月原 富武(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、チトクロム酸化酵素に対するチトクロム c の 2 つの結合部位の X 線構造解析、第 53 回 日本生物物理学会年会金沢大学 角間キャンパス 自然科学本会 2015 年 9 月 14 日

61. 江藤 勇樹、島田 敦広、原 史剛、山下 栄樹、伊藤-新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理・阪大蛋白研)、ウシ心筋チトクロム酸化酵素 O 型中間体の X 線結晶構造解析、第 53 回 日本生物物理学会年会、)金沢大学 角間キャンパス 自然科学本会 2015 年 9 月 14 日

62. 上野剛、平田邦生、吾郷日出夫、村上博則、馬場清喜、島田敦広、熊坂崇、伊藤-新澤恭子、吉川信也、月原富武、山本雅貴(理研・放射光科学総合研究センター、兵庫県大院生命理学)、「常温嫌気結晶試料の動的構造解析へ向けた自動サンプルチェンジャーSPACE の高度化」、平成 27 年度日本結晶学会年会、大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス、2015 年 10 月 18 日

63. 島田 悟、青江 新平、伊藤-新澤 恭子、馬場 淳平、島田 敦広、舘野 賢、山下 栄樹、吉川 信也、月原 富武(兵庫県大院生命理)、チトクロム c とチトクロム酸化酵素の複合体での結晶構造が示す新しい蛋白質間相互作用様式、第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2016/6/7-9

64. Ryuichiro Terada, Jiyoung Kang, and Masaru Tateno(兵庫県大院生命理)、Hybrid ab initio quantum mechanics analysis of O₂-binding to the CuB-Fea3 binuclear center of cytochrome c oxidase, 第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2016/6/9

65. 波多野 啓太、島田 敦広、宮本 朱梨、馬場 清喜(兵庫県大院生命理)、山下 恵太郎、久保 稔、吾郷 日出夫、平田 邦生、上野 剛、村上 博則、山本 雅貴(理研・放射光科学総合研究センター)、熊坂 崇(JASRI)、山下 栄樹(阪大蛋白研)、小倉 尚志、伊藤-新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理)、X 線自由電子レーザーを用いた、ポンプ・プローブ法によるチトクロム酸化酵素の時分割結晶構造解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2016/6/7-9

66. 宮本 朱梨、島田 敦広、波多野 啓太、馬場 清喜、熊坂 崇、伊藤-新澤 恭子(兵

庫県大院生命理), 常温での高分解能データ収集に必要なチトクロム酸化酵素結晶の凍結解凍法の確立, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/7-9

67. 江藤 勇樹、島田 敦広、山下 栄樹、伊藤- 新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理), チトクロム酸化酵素 F 型中間体の 1.6Å 分解能 X 線結晶構造解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/7-9

68. 島田 敦広、馬場 淳平、山下 栄樹、村本 和優、伊藤- 新澤 恭子、月原 富武、吉川 信也(兵庫県大院生命理), チトクロム酸化酵素の様々な反応中間体及び反応中間体類似物の構造から提唱されるプロトンポンプ機構, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/7-9

69. Atsuhiko Shimada (兵庫県大院生命理), The damage-free crystal structure of cytochrome c oxidase at the resting oxidized state determined using X-ray free electron laser, EMBO Conference “The biochemistry and chemistry of biocatalysis: From understanding to design, Oulu university, Finland, 2016/6/13

70. Kazutoshi Tani, Karen Davies (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main, Germany), Chimari Jiko, Shintaro Maeda(阪大蛋白研), Kyoko Shinzawa-Itoh(兵庫県大院生命理), Deryck Mills (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main, Germany), Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理), Yoshinori Fujiyoshi(名大・CeSPI), Werner Kühlbrandt(Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main, Germany) & Christoph Gerle(兵庫県大院生命理), Electron crystallography of tomographic volumes., 3DEM Gordon Research Conference, Hong Kong University, Hong Kong, 2016/6/21

71. 島田敦広(兵庫県大院生命理), X 線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の時分割構造解析から明らかとなった、銅イオンへの配位子結合によって制御されるプロトンポンプ経路の閉鎖メカニズム, 第 89 回日本生化学会大会, 仙台国際センター 東北大学川内北キャンパス, 2016/9/27

72. 島田 悟, 上根 滋史, 大崎 麻里加, 高橋 涼子, 下村 陽信, 三枝 馨, 前田 晋太郎, 引田 理英, 伊藤(新澤) 恭子(兵庫県大院生命理), 本来の構造と機能を保持したウシミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25-27

73. 島田 悟, 伊藤-新澤 恭子, 馬場 淳平, 青江 新平, 島田 敦広(兵庫県大院生命理), 山下 栄樹(阪大蛋白研), 姜 志姪, 館野 賢, 吉川 信也, 月原 富武(兵庫県大院生命理), チトクロム c とチトクロム酸化酵素の複合体構造が示す新しいタンパク質間相互作用様式, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25-27

74. 青柳 裕大、西口 達人、新澤-伊藤 恭子、吉川 信也、中島 聡、小倉 尚志(兵庫県大院生命理), チトクロム c 酸化酵素の水素結合状態変化の酸素還元反応への影響, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場. 2016/11/25-27

75. 中島 聡、中川善之、伊藤-新澤 恭子、吉川信也、小倉尚志(兵庫県大院生命理), 時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム酸化酵素の共役機構, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25-27

76. Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Shun Yamauchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima, T. Ogura(兵庫県大院生命理), Elucidating the mechanisms of proton pumping in cytochrome c oxidase by time resolved IR spectroscopy, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25-27

77. Ryuichiro Terada, Jiyoung Kang, and Masaru Tateno(兵庫県大院生命理), Hybrid ab initio molecular dynamical simulation of cytochrome c oxidase: Mechanisms of structural changes by dynamical ligand recognition, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25

78. 島田敦広(兵庫県大院生命理), High-resolution crystal structure of cytochrome c oxidase reveals the mechanism of high efficient proton pumping, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016/11/25

79. Ryuichiro Terada, Jiyoung Kang, and Masaru Tateno (兵庫県大院生命理),

Dynamical mechanisms of structural transitions acting as functional switch induced by the ligand binding in cytochrome c oxidase, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016/12/2

80. 伊藤(新澤)恭子(兵庫県立大学), Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel interprotein interaction mode, 第19回国際生物物理学(International Union for Pure and Applied Biophysics:IUPAB)大会, エジンバラ イギリス, 2017/7/16-20

81. Tomitake Tsukihara(兵庫県大院生命理) A novel protein-protein interaction detected in Cyt.c-Cytochrome oxidase complex, 24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2017), Hyderabad, India, 2017/8/23 予定

(4)知財出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

③その他の知的財産権
特になし

(5)受賞・報道等

《受賞や新聞報道等について、具体的に記入してください。》

①受賞

1. 日本顕微鏡学会 論文賞 第30回(2015年度) 応用研究(生物)

“Visualization of two distinct states of disassembly in the bacterial V-ATPase from *Thermus thermophilus*”(Microscopy (2013) 62(4): 467-474): Kazutoshi Tani, Christopher P. Arthur, Masatada Tamakoshi, Ken Yokoyama, Kaoru Mitsuoka, Yoshinori Fujiyoshi, Christoph Gerle

2. Atsuhiko Shimada, EMBO Conference “The biochemistry and chemistry of biocatalysis: From understanding to design” ポスター賞, EMBO Conference, Oulu, Finland, 2016/6/12-15

① マスコミ(新聞・TV等)報道

1. Cell Press Cross Talk Interview with Senior Editor Milka Kostic, MasterClass—Using GraDeR with Florian Hauer, Niels Fischer, and Christoph Gerle :Biology in 3D, <http://www.cell.com/crosstalk/masterclass-using-grader-with-florian-hauer-niels-fischer-and-christoph-gerle>

2. 神戸新聞7月14日朝刊 Shimada A. et al., A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase., Sci Adv. 2017 Jul 14;3(7):e1603042.で報告した CcO のナノ秒時分割結晶構造解析によって、プロトン能動輸送過程で弁が開閉されるタイミングを決定できたことを紹介した。

③その他

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

② 社会還元的な展開活動

・本研究成果をインターネットで公開し、一般に情報提供している。

(URL;http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/GCOE/japanese/pico_intro/yoshikawa/index.htm)

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
24 年 10 月 1 日	チーム内キックオフミーティング(非公開)	兵庫県立先端科学技術支援センター、セミナー室	12 人	本研究の課題概略を研究代表者・月原が説明した後、個別課題について主たる担当者が研究計画を発表し研究の進め方について議論した。
26 年 3 月 13 日	CREST 研究「ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学」研究会	兵庫県立大学播磨理学キャンパス研究棟 7 階 739 号	35 人	時分割構造解析によるチトクロム酸化酵素の酸素還元・プロトンポンプ機構および呼吸鎖複合体 I、呼吸鎖超複合体の構造解析を中心に研究成果の発表と討論を行った。
26 年 7 月 29 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	19 人	研究進捗報告のためのミーティング
26 年 12 月 22 日、 23 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	20 人	研究進捗報告のためのミーティング
27 年 1 月 31 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	13 人	2 月の SACLA での時分割実験の打ち合わせ
27 年 3 月 16 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	9 人	高分解能 X 線回折実験法に関する検討会
27 年 4 月 23 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	20 人	2 月に実施した SACLA での時分割実験の報告
27 年 5 月 21 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	15 人	6 月の SACLA での時分割実験の打ち合わせ
28 年 5 月 9 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	10 人	研究進捗報告のためのミーティング
28 年 6 月 20 日	CREST 高島グループとのミーティング(非公開)	大阪大学蛋白質研究所	7 人	研究打ち合わせ
28 年 11 月 22 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	9 人	研究進捗報告のためのミーティング
28 年 11 月 29 日	チーム内ミーティング(非公開)	兵庫県立大学	10 人	研究進捗報告のためのミーティング
29 年 1 月 26 日	梅名泰史博士セミナー「光化学系 II に結合した金属の異常分散効果に	CAST 南棟 1 階 セミナー室	23 人	巨大な膜タンパク質である PSII 中の Mn イオンと Fe イオンの価数を波長を変えた

	よる価数決定」			X 線を使った回折データに基づいた構造解析によって決定することに初めて成功した研究を紹介した。
29 年 3 月 3 日	CREST 研究「ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学」研究会(非公開)	CAST 支援棟 1 階 セミナー室	20 人	研究進捗報告のためのミーティング
29 年 3 月 6 日	野崎大二郎 博士セミナー「電子伝達機構の理論研究に関する講演会」	CAST 支援棟 1 階 セミナー室	20 人	チトクロム酸化酵素における電子伝達経路を量子力学計算によって求める研究を紹介した。
29 年 8 月 4 日	CREST 高島グループとのミーティング(非公開)	大阪大学蛋白質研究所	4 人	研究打ち合わせ
29 年 10 月 5 日	将来の蛋白質構造解析法についての検討会	兵庫県立大学	3 人	研究打ち合わせ
29 年 12 月 28 日	CREST 高島グループとのミーティング(非公開)	大阪大学蛋白質研究所	5 人	CcO の結晶構造解析について研究打ち合わせ
30 年 1 月 12 日	SLS(スイス) 富崎孝志博士による講演会	兵庫県立大学	25 人	時分割構造解析に関する講演会
30 年 1 月 16 日	SFX 実験前打ち合わせ	兵庫県立大学	11 人	研究打ち合わせ
30 年 2 月 16 日	CREST 高島グループとのミーティング(非公開)	大阪大学蛋白質研究所	4 人	CcO の結晶構造解析について研究打ち合わせ
30 年 2 月 21 日	SFX 実験打ち合わせ	兵庫県立大学	5 人	研究打ち合わせ
30 年 3 月 19 日	SFX 実験打ち合わせ	兵庫県立大学	10 人	研究打ち合わせ

§ 6 最後に

CcO の高分解能構造解析では、結晶構造に複数の状態の混ざりがあることを避けられないことが明らかになり、このことを考慮した構造決定が必須であった。このことの要因には

- (1) CcO は他に類を見ない微細な構造の変化によって働いている
- (2) 解析の分解能が向上することによって、これまで見過ごされていた微細な構造変化が識別できるようになった

ことが挙げられる。構造の混ざりのある箇所の同定と構造決定法を確立することができたことは、CcO の構造研究のみならずタンパク質の精密な反応機構の研究にとって有用である。

CcO のプロトンポンプ機構については我々が 1998 に H-パス説を提案して以来、激しい議論が続いている。実験事実等の積み上げによって少なくともミトコンドリアの CcO については H-パス説に従ったプロトンポンプが受け入れられる所までは来た。その仕組みをよりリアルに、結果としてわかりやすくすることが課題になっている。我々は、その構造から判断して細菌の CcO でも H-パスによってプロトンが能動輸送されていると考えているが、今後に残された問題である。

ミトコンドリアの CcO は細菌の CcO にはない 10 サブユニットがコアのサブユニットを取り囲んでいる。これまでの研究は余分なサブユニットが、より微細で正確な構造変化を可能にしていることを強く示唆している。ミトコンドリアに存在する種々のイフェクターの効果も微細な構造変化によって、機能に影響を与えているものと思われる。従って、今後も本酵素の構造研究は高分解能構造解析が

必須である。

我が国の XFEL 施設である SACLA は米国に続いて完成した設備である。その光の強さは米国の施設に劣るが、安定性など高い質を備えている。CcO では精密な構造決定が求められるために、光の強度の不足を補うために大きな結晶を使用する SF-ROX 法を考案した。当初、通論では不可能とされていたことを、目的のために無駄を覚悟して取り組むことによって道を開くことができた。利用者と開発者が十分な議論ができたことによって道を開くことができた。

超複合体の構造決定には Cryo-EM もあるが、最終的に精度の高い構造を得るためには3次元構造上の純度の高い票品が必要になる。そこまで来れば3次元結晶化も可能であり、高分解能構



研究に参画した兵庫県立大学のスタッフと学生

造を目指して回り道することなく、結晶化を目指しているが、まだ結晶を得ていない。29 年度にはより体系的に脂質メソフェーズ法で結晶化するために新たに設備を備えて取り組んでいる。何としても結晶を得たい。

研究実施に当たっては、兵庫県立大学と理化学研究所は地の利を生かして随時、臨機応変に連絡を取って進めることができた。SACLA や SPring-8 の技術開発においても随時 CcO 結晶を提供して技術の高度化に貢献できた。困難を承知の研究であるが、熟練した研究者だけでなく多くの学生も参画し、貢献するとともに最先端の研究に取り組む楽しさを実感してもらえたのではないかと思います。