

姫路工業大学大学院理学研究科 教授

吉川 信也

「水素イオン能動輸送機構の構造生物学的解析」

1. 研究実施の概要

ミトコンドリアでは、三種類の酸化還元反応に共役した水素イオン能動輸送機能を持つ膜タンパク質複合体酵素によって作られた水素イオン濃度勾配と膜電位を利用して加水分解反応に共役する水素イオン能動輸送複合体酵素によって、ATP が合成されている。このエネルギー変換機構の全容を解明するために、X 線構造解析法、赤外分光法、分子生物学的方法により、これら四種類すべての複合体酵素の構造と機能を解明することが本研究課題の目標である。ここでは、これら四種類の複合体酵素のうち反応機構の研究に著しい進歩があった、チトクロム酸化酵素に関する成果を中心として研究の概要を述べる。

1) O₂還元機構

チトクロム酸化酵素の O₂還元中心はヘム a₃ と Cu_B とから構成される複核中心であることは X 線構造が決定されるより以前から知られていた。本研究により決定された、完全還元型の X 線構造（このとき O₂ が結合できる。）は Cu_B¹⁺ にヒスチジンイミダゾール基が 3 個平面 3 角形に配位しているを示している。このような 1 価銅錯体は極めて安定で、電子供与能も配位子受容能も非常に弱いことが知られている。したがって、この配位構造が酸素化型(Fe²⁺-O₂)の安定性の主要因であることが明らかになった。この結果は本酵素による酸素活性化機構の解明のための最も重要な結果の一つであるといえる。さらに、Cu_B に配位しているヒスチジンの一つ(His240)とチロシン(Tyr244)が共有結合で連結され、その結果 Tyr244 の OH 基がヘム a₃ に結合した O₂ と水素結合を形成することのできる位置に固定されていた。この Tyr244 は水素結合のネットワークでマトリクス側分子表面と連結されていた。この構造はヘム a₃ に結合した O₂ は Cu_B と架橋するのではなく Tyr244 と水素結合を作り、Cu_B¹⁺からの電子を Tyr244 を経由して O₂ に伝達することを示唆している。さらに Tyr244 は水素イオンをマトリクス側から汲み上げて結合した O₂ に供与することができる。この酸性水素イオンによって Fe_{a3}³⁺-OOH を不安定化し、実質的に O₂ の 4 電子還元を実現すると考えられる。このようにして、酸素活性化機構をほぼ解明することができた。

2) 水分子生成のための水素イオンと O₂ と H₂O の通路。

O₂還元中心とマトリクス側とをつなぐ 2 つの水素結合のネットワークが X 線構造に発見された。1 つはマトリクス側分子表面にある Asp91 からメチオニンやグルタミン酸残基とそれらをつなぐ水分子で作られていた。もう一つはマトリクス側表面のグルタミン酸 (Glu62) からメチオニン、リシン、スレオニンを経由し、Cu_B に配位したイミダゾールに共有結合しているチロシンにつながっていた。また酸化還元中心からは膜面に平行に膜貫通領域の分子表面への O₂ (あるいは H₂O) の三つの通路が明確に認められた。カルボキシル基修飾試薬である DCCD が上述の (O₂/H₂O) 経路の一つに結合して、通路を完全に閉じることにより酵素活性を完全に阻害することが示された。従って、三つの通路のうち二つは水の通路、一つが O₂ の通路であることが明らかになった。さらに O₂還元部位の膜間腔側にはっきりとした芳香族アミノ酸のクラスターが認められた。この構造は酸素還元中心から膜間腔側へは水素イオンも水分子も輸送されることはないことを示している。さらに、

この結果はマトリクス側表面から O₂ 還元中心への水素イオン輸送経路のどちらもが水素イオン能動輸送（プロトンポンプ）のための水素イオンの輸送経路ではないことを示している。

3) 水素イオン能動輸送機構

水素イオン能動輸送機構について、X線構造解析により、以下のような知見が本研究期間内に得られた。膜間腔側分子表面近くに存在するアスパラギン酸 (Asp51) の水素結合構造は酸化状態によって大きく変化し、還元によってカルボキシル基の pKa 値が 5 以上低下することを示唆している。(酸化型ではアスパラギン酸はエタノール溶液中での水素結合構造を持っているが、還元型では水溶液中とほとんど同じ水素結合構造を持っている。この構造は pKa 値が 10.2 から 4.8 に還元に伴って低下することを示唆している。) このカルボキシル基はヘム a (酸素還元中心に電子を供与するヘム) 側鎖のホルミル基に水素結合しているアルギニン (Arg38) に水素結合のネットワークで連結されていた。このヘム a のホルミル基とマトリクス側分子表面とは水が通過できる通路 (水通路) でつながれていた。ホルミル基はポルフィリンのπ電子系と共役しているので、中心の鉄イオンの電子状態の影響を鋭敏に受けて、酸化されると正電荷のかたよりが増加する。したがって、酸化に伴って Arg38 のグアニジノ基は解離すると考えられる。さらにヘム a 側鎖のヒドロキシフェネシルエチル基が還元によって回転し、水通路の容積が増加することが X線構造解析によって明らかになった。これらの結果は次のような水素イオン能動輸送機構を示唆している。ヘム a が酸化されることによって Arg38 の pKa が大きく低下し、水素イオンが解離する。それが水素結合のネットワークを経由して Asp51 の COO⁻ に輸送され、COOH を形成する。次にヘム a が還元されると水通路が大きくなるのでマトリクス側から水分子が吸い込まれる。またヘム a 側鎖のホルミル基の正電荷のかたよりは消失するのでグアニジノ基の pKa は大きく増加する。そのため、マトリクス側から取り込まれた水分子から水素イオンを引き抜く。一方、ヘム a の還元により Asp51 の COOH 基は分子表面に露出し水素イオンを膜間腔側に放出する。再び酸化されたとき水通路が収縮するので、OH⁻ はマトリクス側に押し出され Asp51 の COO⁻ が分子内部に移動する。

上述の X線構造の分解能 (酸化型 1.8Å、還元型 1.9Å) では水素原子を検出できないので、赤外分光法により、アミノ酸側鎖の酸化還元に伴う水素イオン化状態の変化を検討した。その結果 Asp51 のカルボキシル基の水素イオン化はヘム a の酸化状態に制御されていること、Arg38 のヘム a の酸化に伴う解離と帰属できる赤外スペクトル変化を検出した。

Asp51 が水素イオン能動輸送部位であることを機能的に証明するために、部位特異的変異体 (Asp51Asn) をウシ/ヒトハイブリッド酵素として調製し、その機能を解析したところ酸素還元能は野生型と同一であるが、水素イオン能動輸送能は完全に消失していた。

これらの結果は Asp51 を含む水素結合ネットワークとそれにつながっている、水通路が水素イオン能動輸送部位であることを示している。

4) NADH—ユビキノ還元酵素（複合体 I）の構造と機能

Hatefi の精製方法を改良し、ほとんど、ヘムタンパク質の混入の認められない標品の調製法を確立した。この標品は安定であるので、反応機構研究の第 1 歩として初期定常状態を解析した。その結果、ユビキノ-NADH-NAD⁺-ユビキノールの順序で基質と反応生成物が結合、遊離することを明らかにすることが出来た。また、いくつかの条件で微結晶も得られている。さらに、粉末 X 線回折像を示す微結晶も得られた。

各研究グループの成果

1. 生化学グループ (吉川)、結晶学グループ (月原) (重複が多いのでまとめて記述する。)

1) X 線回折実験。SPring-8 に超分子複合体専用ビームラインを建設した。ビームタイムが飛躍的に増加した結果、最近 1.54Å 分解能の X 線回折斑点の測定に成功した。

2) 酸化型 2.3Å 分解能、還元型 2.35Å 分解能の X 線構造。専用ビームラインが稼動するまでは高エネルギー物理学研究所放射光施設で常温 (8°C) で X 線回折実験を行い酸化型と還元型の構造決定を行った。その結果、His240 と Tyr244 とが共有結合で架橋されていることと Asp51 の立体構造変化とがとらえられた。(これらの結果は Science 誌に発表した。)

3) 酸化型 1.8Å 分解能、還元型 1.9Å 分解能の X 線構造。SPring-8 で収集されたデータによって得られた結果。概要に記述されたこと以外に、脂質の構造決定がなされている。カルジオリピン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルコリンがそれぞれ数個ずつ X 線構造に認められた。質量分析により、構造を検討したところ脂肪酸側鎖の構造がフォスファチジルコリン以外のリン脂質で均一であることが確認された。これはタンパク質部分がリン脂質の炭素側鎖も二重結合の位置も決定できることを示している。さらに、反応中間体 (P 型、F 型) および配位子結合型の配位子の構造精密化を進めている。

4) 静的赤外分光。市販の FTIR 装置 (Perkin-Elmer2000) の機能を最大限に発揮させるため、低湿度条件でセルの光路長の変化をできるだけ防ぐことにより、1739cm⁻¹ に COOH の 1585cm⁻¹ に COO⁻に由来する吸収帯が認められた。これらは Asp51 を含まない細菌の酵素には認められないため、Asp51 に帰属することができる。また D₂O/H₂O 変換効果を検討した結果、1670cm⁻¹ 付近に Arg のグアニジノ基と推定できる吸収帯も検出することができた。

5) 複合体 I の構造と機能。これは (水素イオン能動輸送能を持つ) 他の二つの電子伝達複合体に比べて、機能と構造の研究がはるかに遅れている。その最大の原因は精製法が確立していないことにあると言える。そこで、Hatefi の方法を出発点として詳細に検討した結果、吸収スペクトルにヘムタンパク質の混在が認められずに、酵素活性もデシルユビキノと NADH を基質としたときペリサイジンにより 99%阻害されるような標品を得ることができる条件を確立することができた。この標品は再現性に問題はあ

の微結晶を析出し、粉末 X 線回折像を与えた。

2. 分子生物学グループ (島田)

上述の赤外分光学的解析のためには吸収帯の帰属が不可欠である。そのためには同位体標識が不可欠である。そこで本酵素の無細胞遺伝子発現系を構築した。現在、収量以外の問題点はほぼ解明され、吸収スペクトル、活性ともに完全な酵素が発現される系が完成している。一方、概要に記述したように、原核生物に保存されていないウシ酵素の部位特異的変異の効果を検討するため、ウシとヒトのチトクロム酸化酵素のハイブリッドをヒト細胞のミトコンドリア中に発現させることに成功した。

3. 振動分光学グループ (小倉)

1) 超高感度時間分解赤外分光装置の設計試作。アミノ酸残基の水素イオン化状態の酵素反応に伴う動的変化を追跡するため、共鳴ラマン分光測定に必要な程度の酵素濃度 (~ 25 μ M) でもタンパク質領域の赤外吸収の測定を可能にするような装置を開発した。フェムト秒パルスレーザーの不確定性による白色光化を利用して約 100 cm^{-1} 程度の波数範囲の白色赤外光を作ることになり、現在最終的な調整段階である。

2) 再構成膜小胞の調製。リン脂質二重層によって作られた小膜に呼吸鎖電子伝達複合体を組み込み、水素イオン能動輸送能を定量的に測定することに利用されている。しかし、これまでに報告されている膜小胞は水素イオンの漏れが大きく、精密な測定には不十分であった。そこで、報告されている調製法を詳細に検討し、水素イオンの漏れをほとんど完全に無視できる小胞体の調製法を確立した。その結果、呼吸調節比 (Respiratory control ratio) が 2.0 程度のチトクロム酸化酵素標品でも H^+/e^- 比は 1.0 を示し、水素イオンの漏れは無視できるほど低かった。これらの結果はこれまでの水素イオン能動輸送機構に大きな変革を必要とする可能性を示している。

2. 研究構想

ミトコンドリアのエネルギー変換は NADH-ユビキノ還元酵素 (複合体 I)、ユビキノール-チトクロム c 還元酵素 (複合体 III)、チトクロム酸化酵素 (複合体 IV) および ATP 合成酵素 (複合体 V) によって駆動される高度に組織化された生理過程である。上述の 4 種の複合体のうち複合体 I、複合体 III、複合体 IV は電子伝達反応 (酸化還元反応) に伴って水素イオンを能動輸送する機能をもっている。さらに複合体 V は ATP の加水分解反応に伴う水素イオン能動輸送を持つ膜タンパク質複合体であり、これを水素イオン濃度勾配 (水素イオン駆動力) により逆方向に動かして ATP を合成する。このようにして酸化還元反応と加水分解反応が水素イオン濃度勾配によって共役されていることは Mitchel の歴史的な業績により確立されている。これら 4 種の呼吸鎖複合体は水素イオン能動輸送を共通に持っていて、それを駆動する反応だけが異なっていると見ることができる。しかし、駆動する反応に適合させるため、それらを触媒する機構だけではなく水素イオン能動輸送の機構にも複合体の種類による大きな相違が推定される。したがってミトコンドリアのエネルギー

一変換の全容を解明するためにはこれら全ての複合体の構造と機能を明らかにしなければならない。

一般に、酵素の触媒反応の場合は種々のアミノ酸残基が空間的に配置されて形成されているために、溶液中では実現できない異方性を持つことができる。例えば結合した基質部分だけを親水性環境に置きその他を疎水性環境に置くことができる。またその環境が酵素反応の進行に伴って精密に制御されつつ変化することによって反応の進行を促進していると考えられる。活性中心に結合した基質の活性中心の立体構造も含めて、反応の進行に伴う構造変化をそれらを構成する原子の位置の変化としてとらえられて、はじめてその酵素の反応機構が解明されたと言える。このとき、生物学と化学の区別がなくなり、両方が飛躍的に活性化されることが期待される。このためには、第一に、目的の酵素の X 線構造を高分解能で決定することが不可欠である。さらに X 線構造は酵素が基質と反応して生ずる種々の反応中間体についても決定されることが必要である。このために第三世代の放射光に専用の、呼吸鎖複合体に代表されるような巨大なタンパク質の高分解能の構造解析のためのビームラインを設置し、十分なビームタイムを確保する。X 線回折実験の分解能の向上のためには、結晶化条件の精密化に加えて、X 線回折実験条件、特に結晶の凍結条件の検討を十分に行うことが不可欠である。そのために、最も必要なことはビームタイムである。(実験室の X 線回折実験装置ではこのように巨大な分子の X 線回折強度データを高精度で収集することは不可能である。)ミトコンドリア呼吸系の各複合体のように巨大な膜タンパク質複合体の立体構造の決定には現在のところ、X 線結晶構造解析法に優る方法は開発されていない。しかし、X 線結晶構造解析法にくらべて空間的(幾何学的)情報を得ることはほとんど不可能であるが、特定の部位の化学構造を精密に決定するためには振動分光学(赤外、ラマン)的方法が不可欠である。さらにその化学構造の酵素反応に伴う変化を精密に追跡するためにも極めて有効であると考えられる。しかし、この分光法は低分子化合物の構造解析のために開発されてきた方法であるため、呼吸系複合体のように巨大な分子に適用するためには、活性中心以外の部分からのシグナルを除去するための方法と、酵素反応は本質的にミリ秒の時間軸での時象であるために、測定法の感度と応答速度の向上が必要である。

そこで本研究課題ではこれら複合体の X 線結晶構造解析のために、精製条件を根本的に改良し、原子レベルでの X 線構造を出来るだけ多数の酵素反応中間体を結晶中で固定し高分解能で決定する。この X 線構造にもとづいて、特に水素イオン能動輸送系を同定し(水素イオン能動輸送のためにはその系のどこかが必ず駆動反応に共役して立体構造を変化させる必要がある。したがって水素イオン能動輸送駆動反応に共役した立体構造変化を手がかりにして、水素イオン能動輸送系を同定することができる。)それに含まれるアミノ酸残基を同位体標識することのできる系(無細胞遺伝子発現系)を確立する。一方、酵素反応に伴う水素イオン輸送を動的にとらえるための赤外分光装置を開発する。前述の通り、ミトコンドリア呼吸系の各複合体の触媒する反応はミリ秒の時間軸にある。従ってこの反応

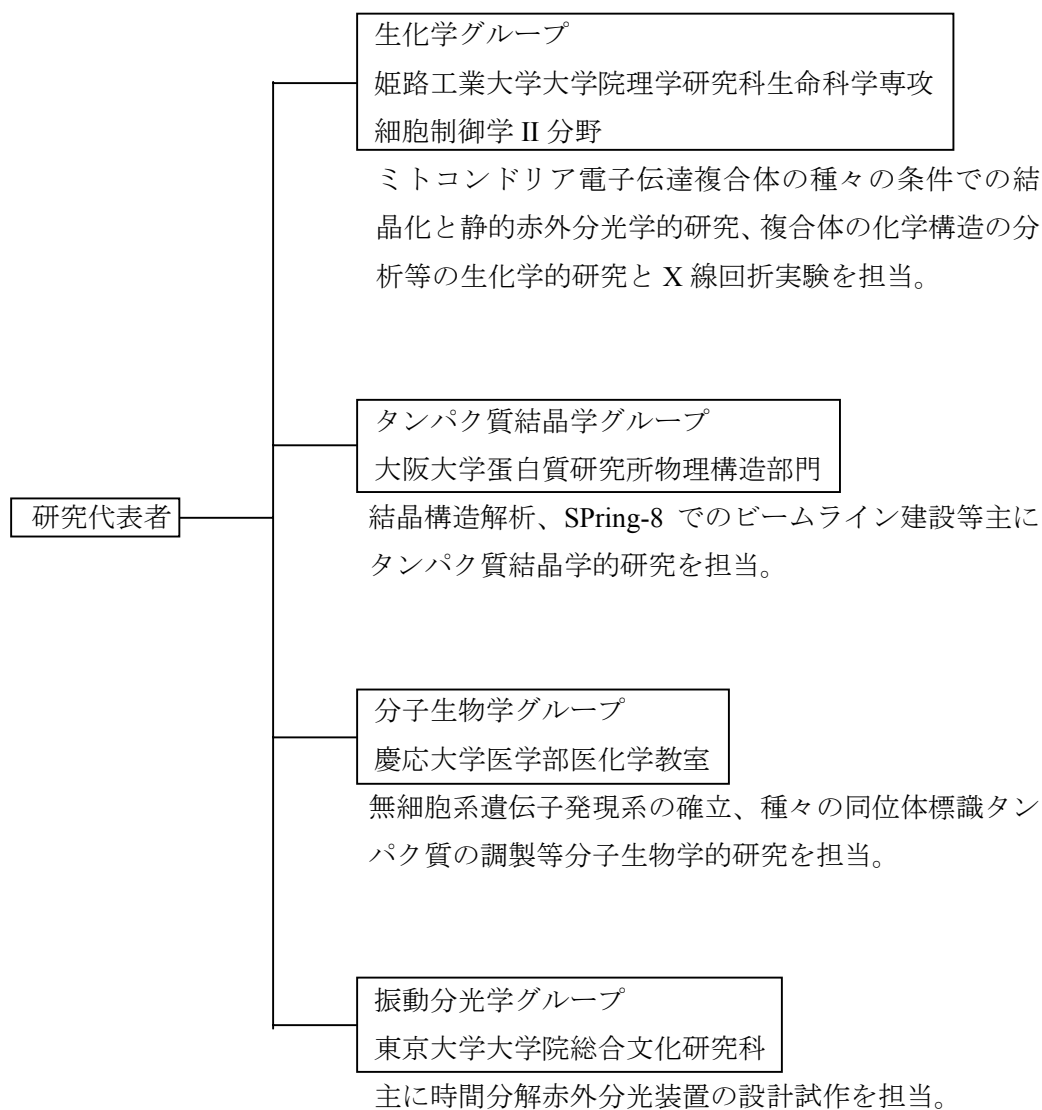
を追跡するためにはフロー法は不可欠である。これまでの水溶液中のタンパク質の赤外分光測定の場合のように高いタンパク質濃度では精密なフロー法は不可能である。そのために、赤外分光装置の感度と時間分解能を飛躍的に高める必要がある。

以上のような方法と装置により、ミトコンドリア呼吸鎖の各複合体を結晶化し、X線構造を決定する。決定されたX線構造にもとづいて、水素イオン能動輸送系の重要と考えられるアミノ酸残基を同位体標識した酵素標品を大量に調整する系を確立する。このようにして調整された同位体標識標品を用いて、フロー法により、赤外吸収スペクトルの変化を独自に開発した超高感度赤外分光装置によって追跡する。このようにして、水素イオン能動輸送機構を反応に関与する官能基（それを構成する原子）の立体構造も含めた構造変化を実時間で解析することにより、解明することを目指す。これまでは主に原核生物（細菌）のチトクロム酸化酵素のアミノ酸残基の機能が部位特異的に他のアミノ酸に変換することによって経験的にはあるが、解析されてきた。特に酸素還元反応に関与するアミノ酸残基のほとんどは真核生物にも保存されているので、哺乳動物の酵素の反応機構の研究にもこの方法は多大の貢献をしてきた。しかし、ミトコンドリア酵素にしか保存されていないアミノ酸残基の部位特異的変異にはこの方法は適用できない。そのため、細菌に保存されていないアミノ酸残基は酵素反応に関与していないとの不思議な暗黙の了解が一部の研究者の間にはあった。本研究により細菌に保存されていないアミノ酸残基がチトクロム酸化酵素の水素イオン能動輸送部位であることがX線結晶構造解析により明らかとなった。そこで、同位体標識酵素の調製法の開発のための努力に加えて、このミトコンドリア遺伝子にコードされたアミノ酸残基の部位特異的変異の可能な遺伝子発現系を確立するための努力が開始された。水素イオン能動輸送部位と推定されるアミノ酸残基が生物種によって保存されていないことは、本研究計画申請時には全く予想されていなかった。各サブグループの役割分担は以下の通りである。

- 1) 生化学グループ：呼吸鎖複合体の精製法の改良と結晶化。X線回折実験とX線構造解析。（構造解析グループと協力して行われた。）静的赤外分光学的研究。その他呼吸鎖複合体の生化学的研究。
- 2) 構造解析グループ：SPring-8専用ビームラインの建設。X線回折実験。X線結晶構造解析。
- 3) 分子生物学グループ：無細胞遺伝子発現系の構築。哺乳動物ミトコンドリア固有のアミノ酸残基の部位特異的変異。
- 4) 振動分光グループ：超高感度赤外分光光度計および、赤外フローセルの設計試作。呼吸鎖複合体の水素イオン能動輸送の精密測定法の開発。結晶の呼吸スペクトル測定法の開発。チトクロム酸化酵素のO₂化型結晶の調製法の確立。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|------------------|---------|-----|--------|-----------------|
| 平成 12 年 4 月 28 日 | チーム内研究会 | 姫工大 | 約 30 名 | グループ間の情報交換と研究討論 |
| 平成 13 年 6 月 4 日 | チーム内研究会 | 阪大 | 約 30 名 | グループ間の情報交換と研究討論 |
| 平成 14 年 6 月 7 日 | チーム内研究会 | 姫工大 | 約 30 名 | 研究成果とりまとめに関する協議 |

5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 5 件、海外 26 件)

1. Beef heart cytochrome *c* oxidase. (S. Yoshikawa) *Current Opinion in Structural Biology* 7, 574-579 (1997).
2. ATP and ADP bind to cytochrome *c* oxidase and regulate its activity. (J. Napiwotzki, K., Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and B. Kadenbach) *Biol. Chem.* 378, 1013-1021 (1997).
3. Crystal structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. (S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara) in *Oxygen Homeostasis and Its Dynamics*, Y. Ishimura, H. Shimada and M. Suematsu (eds.), Springer-Verlag Tokyo (1998) pp.13-23.
4. Crystals of bovine heart ubiquinol-cytochrome *c* reductase diffracting X-rays up to 2.8 Å resolution at 276 K. (S. Murakami, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa) *Acta Cryst. D54*, 146-147 (1998).
5. Crystal structure of bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å resolution. (S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara) *J. Bioener. Biomemb.* 30, 1-14 (1998).
6. Mechanism of dioxygen reduction catalyzed by cytochrome *c* oxidase as studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy. (T. Ogura, D. A. Proshlyakov, J. Matysik, E. H. Appelman, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa) in *Oxygen Homeostasis and Its Dynamics*, Y. Ishimura, H. Shimada and M. Suematsu (eds.), Springer-Verlag Tokyo (1998) pp.102-105.
7. Time-resolved resonance Raman study of dioxygen reduction by cytochrome *c* oxidase. (T. Kitagawa, T. Ogura, S. Hirota, D. A. Proshlyakov, J. Matysik, E. H. Appelman, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa) in *Oxygen Homeostasis and Its Dynamics*, Y. Ishimura, H. Shimada and M. Suematsu (eds.), Springer-Verlag Tokyo (1998) pp. 57-71.
8. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. (Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Peters Libeu C., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., and Tsukihara, T.) *Science*, 280, 1723-1729 (1998).
9. Crystal structural studies of a membrane protein complex, cytochrome *c* oxidase from bovine heart. (T. Tsukihara and S. Yoshikawa) *Acta Cryst. A54*, 895-904 (1998).
10. The structure of crystalline bovine heart cytochrome *c* oxidase (S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara) in *Frontiers of Cellular Bioenergetics*, S. Papa (ed.), Kluger Academic/Plenum Publishers, New York (1999) pp.131-156.
11. Structural analysis of bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å resolution. (T. Tomizaki, E. Yamashita, H. Yamaguchi, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa) *Acta Cryst. D55*, 31-45 (1999).
12. Infrared evidence for Cu^{II} ligation of photodissociated CO of cytochrome *c* oxidase at ambient temperatures and accompanied deprotonation of a carboxyl side chain of protein. (T. Iwase, C. Varotsis, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1415-1416 (1999).
13. X-ray structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. (S. Yoshikawa) *Biochem. Soc. Trans.* 27, 351-362 (1999).
14. Quantitative reevaluation of the redox active sites of crystalline bovine heart cytochrome *c* oxidase. (M. Mochizuki, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, T. Usui, T. Tsukihara and S.

- Yoshikawa) J. Biol. Chem. 274, 33403-33411 (1999).
15. シトクロム酸化酵素 吉川信也 蛋白質核酸酵素 増刊「構造生物学のフロンティア」第44巻 530-537 (1999)
 16. X-ray structure of azide bound fully oxidized cytochrome *c* oxidase from bovine heart at 2.9 Å resolution. (M. J. Fei, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, H. Yamaguchi, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima and S. Yoshikawa) Acta Cryst. D56 (2000) 529-535.
 17. A new measurement system for UV resonance Raman spectra of large proteins and its application to cytochrome *c* oxidase. (M. Aki, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa) J. Phys. Chem. B104 (2000) 10765-10774.
 18. X-ray structure and the reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. (S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara) J. Inorg. Biochem. 82 (2000) 1-7.
 19. Bovine heart cytochrome *c* oxidase. (S. Yoshikawa) in Subcellular Biochemistry, Vol. 35: Enzyme-catalyzed Electron and radical Transfer (A. Holzenburg and N. S. Scrutton eds) pp.581-619, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
 20. 光合成と呼吸に共通する仕組み—電子伝達とプロトン輸送 吉川信也 シリーズ・光が拓く生命科学、第3巻生命を支える光、115- 131 (2000) 共立出版
 21. シトクロム酸化酵素における電子とプロトン移動の共役 吉川信也 シリーズ・ニューバイオフィジックス II-1、電子と生命—新しいバイオエナジエティックスの展開、125- 142 (2000) 共立出版
 22. シトクロム酸化酵素のはたらき 吉川信也 生体とエネルギーの物理、日本物理学会編、172- 197 (2000) 裳華房
 23. Presence of the heme-oxo intermediate in oxygenation of carbon monoxide by cytochrome *c* oxidase revealed by resonance Raman spectroscopy. (Y. Kim, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa) J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 757-758.
 24. Optimization of the energy constant of the methionine S^δ-C^ε bond for X-PLOR refinement of protein structure. (M. Odoko, M. Yao, E. Yamashita, R. Nakashima, K. Hirata, H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa) J. Appl. Cryst. 34 (2001) 80-81.
 25. Intermolecular interactions in dimer of bovine heart cytochrome *c* oxidase. (S.J. Lee, E. Yamashita, T. Abe, Y. Fukumoto, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, H. Ueda and S. Yoshikawa) Acta Cryst. D57 (2001) 941-947.
 26. Mitochondrial cytochrome oxidase. (S. Yoshikawa) in Handbook of Metalloproteins (A. Messerschmidt, R. Huber, and T. Poulos, eds.) John Wiley Sons, Ltd, (2001) vol.1, pp.348-362.
 27. 基礎生化学実験法、第3巻 タンパク質 I 検出・構造決定法 第12章 塩析、結晶化、第13章膜蛋白質取扱い法、第1節膜タンパク質の可溶化 吉川信也 日本生化学会編、107- 114(2001)東京化学同人
 28. Steady-state kinetics of NADH: coenzyme Q oxidoreductase isolated from bovine heart mitochondria. (Y. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, K. Watanabe, K. Naoki, N. Hano and S. Yoshikawa) J. Bioenerg. Biomembr. (2002), 34, 11-19.
 29. The second coenzyme Q₁ binding site of bovine heart NADH: coenzyme Q oxidoreductase. (Y. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, K. Watanabe, K. Naoki, N. Hano and S. Yoshikawa) J. Bioenerg. Biomembr. (2002), 34, 89-94.
 30. Cytochrome-*c* oxidase (S. Yoshikawa) in Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology (E. J. Massaro ed.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2002) pp.131-152.

31. Cytochrome *c* oxidase (S. Yoshikawa) *Advances in Protein Chemistry* (2002), 60, 341-395.

(2) 特許出願（国内 4 件）

出願番号：特願 2002-202279（整理番号 A021P47）

発明者：吉川信也、島田秀夫、下方国稔

発明の名称：タンパク質をミトコンドリアへ輸送する方法

出願人：科学技術振興事業団

出願日：平成 14 年 7 月 11 日

出願番号：特願 2002-211028（整理番号 A021P51）

発明者：小倉尚志、吉川信也

発明の名称：酵素含有リン脂質小胞の製法

出願人：科学技術振興事業団

出願日：平成 14 年 7 月 19 日

出願番号：特願 2002-231042（整理番号 A021P53）

発明者：吉川信也、島田秀夫、下方国稔

発明の名称：改変されたチトクロム *c* 酸化酵素及びミトコンドリア

出願人：科学技術振興事業団

出願日：平成 14 年 8 月 8 日

出願番号：特願 2002-248909（整理番号 A021P52）

発明者：小倉尚志、黒岩繁樹、吉川信也

発明の名称：酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法

出願人：科学技術振興事業団

出願日：平成 14 年 8 月 28 日

(3) 新聞報道等

受賞（吉川信也）

1. Erald Antonini Medal: Societa Italiana di Biochimica (September 1998)

2. Keilin Memorial Medal: Biochemical Society (英国) (April, 1999)

3. 慶応医学賞：慶応大学医学振興財団（1999 年 12 月）

4. Woodward Visiting Professor: Deaprtment of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University (March, 1999) (Deaprtment of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University が化学分野の最も重要な業績をあげた研究者を Woodward Visiting Professor として、招待している。賞に準ずるものである。)

- (4) その他特記事項
なし。