

神経系内分泌小胞膜に特異的に存在する電子伝達 系の構造と機能

姫路工業大学理学部助教授

鰐木基成

神経系内分泌小胞膜に特異的に存在する電子伝達系の構造と機能

1. 研究の背景と目的

高等動物の生体内情報伝達を行う中枢・末梢における神経内分泌組織中には神経伝達物質の貯蔵と放出に携わる特殊な小胞が存在する。生体アミン、神経ペプチドを含有するこれらの小胞膜中には膜貫通型電子伝達体・チトクロム b_{561} が存在し、電子等量を細胞質中のアスコルビン酸(AsH)から受け取り、小胞内のセミデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルへ渡すという、膜を横断する電子伝達反応を行っている(図1)。全く同一のチトクロム b_{561} がこれらの小胞と類縁の副腎髄質クロマフィン小胞膜にも存在している。

還元型アスコルビン酸(AsH)はこれらの小胞膜を通過できないため、このチトクロム b_{561} による電子伝達反応は、小胞内におけるドーパミン β -水酸化酵素(DBH)あるいはペプチジルグリシン α -アミド化酵素(PAM)による生体アミン・神経ペプチド合成に必須であり(図2)、神経伝達物質の貯蔵・放出・リサイクルにおいて非常に重要な役割を担っていることになる。このチトクロム b_{561} は分子量約28,000であり、今まで知られているどのチトクロムとも異なる一次構造を有している。生体内情報伝達の中で重要な位置を占める生体アミン及び神経ペプチド分泌小胞膜に普遍的に存在している重要なタンパク質であるにもかかわらず、小胞膜中でのトポロジー、電子伝達に関与するアミノ酸残基、また電子伝達に必須であるヘムBの結合個数、またその配位子、といったような基本的なことは何ひとつ解明されていなかった。

副腎髄質クロマフィン小胞膜中にチトクロム b_{561} が存在していることは、かなり、以前から知られていたが、AsH/MDAラジカルと小胞膜を縦断した電子伝達を行っていることがわかってきたのは比較的最近のことである。またこのチトクロムは完全な膜貫通型タンパク質であり、その分離精製には非常な困難が伴い、そのためcDNAクローニングなども非常に遅れていた。最初にウシ・チトクロム b_{561} のcDNA配列が報告されたのは1988年であり、ヒト・チトクロム b_{561} cDNAの配列の報告は1994年行われた。

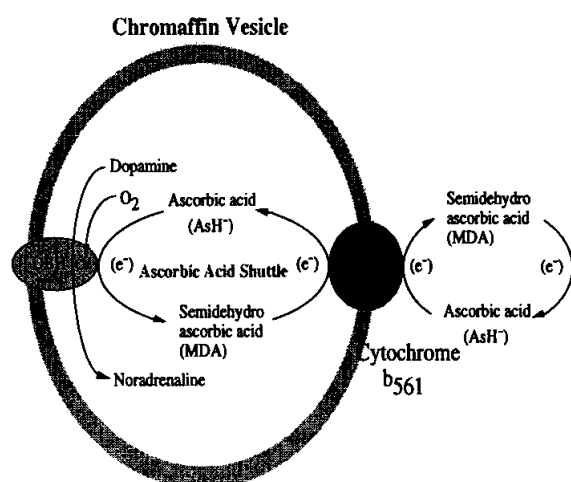


図1 クロマフィン小胞におけるチトクロム b_{561} の関与する電子伝達反応

生体アミン含有小胞、神経ペプチド含有小胞等の小胞膜中には膜貫通型電子伝達素チトクロム b_{561} が存在し、細胞質中のアスコルビン酸(AsH)から電子等量を受け取り、その電子等量を小胞内セミデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルへ渡すという膜を横断する電子伝達反応を行っている。その電子伝達反応のおかげで、小胞内のアスコルビン酸(AsH)の濃度はほぼ20 mM程度に維持され、小胞内で行われるドーパミン β -水酸化酵素(DBH)あるいはペプチジルグリシン α -アミド化酵素(PAM)による一原子酸素添加反応(水酸化反応)のための電子等量を供給する。

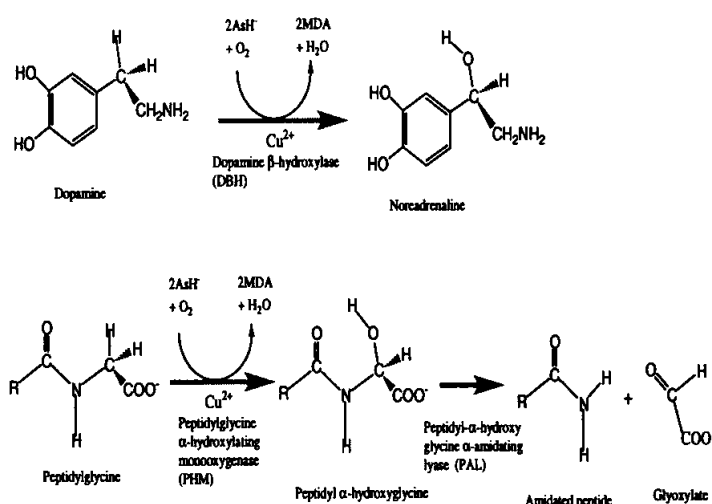


図2 神経内分泌小胞におけるドーパミン β -水酸化酵素(DBH)あるいはペプチジルグリシン α -アミド化酵素(PAM)による生体アミン・神経ペプチド合成反応

いずれの酵素も、酸素分子に由来する酸素原子を基質に添加し、基質を水酸化するモノオキシゲナーゼ反応を触媒する。酸素分子の活性化反応のために、酸素1分子につき2電子の供給を必要とするが、生理的には還元型アスコルビン酸(AsH)が電子供与体として働いていると思われる。

我々は神経内分泌小胞膜における膜貫通電子伝達体・チトクロム b_{561} の構造と機能を明らかにする目的で、1995年より研究を開始し、まずヒツジ・チトクロム b_{561} のcDNAクローンを得て、その塩基配列を明らかにすることに成功した。ついで、ブタ副腎髄質由来のチトクロム b_{561} のcDNAクローンを得、その塩基配列を明らかにすることに成功した。さらに、ウシクロマフィン小胞膜よりチトクロム b_{561} を高純度に分離・精製することに成功した。

2. 研究方法・研究内容

(a) β -オクチルグルコシドを可溶化剤・界面活性剤として使用し、ウシクロマフィン小胞膜よりチトクロム b_{561} を疎水アフィニティークロマトグラフィー法(ω -amniooctyl Sepharose 4B 樹脂を合成・使用した)により、迅速・大量に分離精製する方法を確立した。さらに電子伝達に必須であるヘムBの結合個数、またその配位子を生化学的手法、およびEPR法(大阪大学大学院基礎工学研究科・助手・堀洋博士との共同研究)、共鳴ラマン散乱法(岡崎国立共同研究機構分子科学研究所・教授・北川禎三博士との共同研究)により確定した。

(b) 精製したチトクロム b_{561} を用いて、パルスラジオリシス法によりセミデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルへの電子伝達及び分子内電子伝達反応の素過程を詳細に解析した。さらにHis残基の特異的修飾剤・DEPによる電子伝達反応への影響を解析した(大阪大学産業科学研究所・助手・小林一雄博士との共同研究)。

(c) その他の下等な生物種、特に無脊椎動物、あるいは植物におけるチトクロム b_{561} cDNAのクローニング及びその塩基配列の解析を行い、保存性アミノ酸残基の役割を解析した(プラナリア(planaria)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) b_{561} cDNAについてのクローニングを行った)(姫路工業大学理学部・助手・織井秀文博士との共同研究)。

(d) 高分解能X線結晶解析をめざし、精製したウシチトクロム b_{561} の結晶化条件のスクリーニングを行った(理化学研究所播磨研究所・研究員・朴三用博士との共同研究)。

3. 研究成果

(1) チトクロム b_{561} の精製法の確立

ウシ副腎髄質からしよ糖密度不連続勾配遠心法などによりクロマフィン小胞を高純度に精製し、さらにそのゴースト膜を得た。DTT 及び AsH⁻ 存在下、膜を 1.0%β-オクチルグルコシドにより可溶化した後、ω-aminooctyl Sepharose 4B、Con A-Sepahrose によるアフィニティークロマトグラフィーによりチトクロム b_{561} を SDS-PAGE 上単一バンドになるまでに精製した(文献 (1))。

(2) 精製チトクロム b_{561} のヘム含量

精製したチトクロム b_{561} 標品を用いてピリジンヘモクローム法によりそのヘム含量を測定した。ヘム B 含量は 61.4 nmoles / mg protein 程度であることがわかった。分子量を 27,700 とすると 1 分子あたり 1.70 個のヘム B が結合していることになる。保存性 His 残基の分布を考慮すると、チトクロム b_{561} には、細胞質側、小胞膜内側それぞれに 1 個ずつ、計 2 個の独立したヘム B が結合していると考えられる(文献 (1))。

(3) EPR 法による精製チトクロム b_{561} 活性部位の解析

精製した還元型チトクロム b_{561} をフェリシアン化カリにより酸化し、部分酸化型、及び完全酸化型の標品を得、5K, 15K において EPR スペクトルを測定した。pH 8.0 の緩衝液中ではヘムの酸化還元に伴って変動する 3 つの low-spin 分子種 ($g_z=3.70$, $g_z=3.16$, $g_z=2.84$) が観測された。 $g_z=2.84$ シグナルに対応する $g_x=2.24$, $g_y=1.66$ シグナルも観測された。 $g_z=3.70$ の分子種は 5K において強い EPR シグナルを示すのに対し、 $g_z=3.16$, $g_z=2.84$ の分子種は 15K においてその強度が強かった。 $g_z=3.70$ 分子種は膜貫通型 b 型チトクロムに見られるタイプ (HALS) (His/His 配位) であり、 $g_z=3.16$ 分子種はチトクロム b_5 などに見られるタイプ (His/His or Met/His 配位) に近い。これらのうち $g_z=3.70$, $g_z=3.16$ の 2 つの分子種はクロマフィン小胞膜においても観測されており、チトクロム b_{561} 分子における 2 つの独立なヘム結合部位の存在を示唆している。一方 pH 6.8 の緩衝液中では $g_z=2.84$ の EPR シグナルは観測されなかったことから、 $g_z=2.84$ 分子種は周囲の環境変化に伴い、内部配位子の性質が変化し、 $g_z=3.70$ か $g_z=3.16$ どちらかの分子種と相互変換していると思われる(文献 (1))。

(4) 弱アルカリ処理・DEP 処理による選択的不活性化

精製チトクロム b_{561} を酸化型の状態で弱アルカリ処理(pH 8.0)すると、2 つのヘムの内の一方が AsH⁻ では還元できなくなることがわかった。このヘムは小胞膜内側に位置するヘムと思われる。弱アルカリ処理したチトクロム b_{561} を AsH⁻ 存在下におくと、665nm 付近に新たな吸収バンドが現れてくることから、このヘムは徐々にピリベルジンへと開環されているものと思われる(文献 (2))。また、酸化型チトクロム b_{561} を His 残基に対する特異的修飾剤・DEP(diethylpyrocarbonate)によって処理することによっても AsH⁻ による還元反応が著しく阻害されることがわかった(未発表)。

(5) パルスラジオリシス法による電子伝達機構の解明

パルスラジオリシス法により、MDA と還元型チトクロム b_{561} との電子伝達反応の解析を行った。MDA は非常に不安定であり、2 分子の MDA 分子が不均化反応により速やかに AsH⁻ とデヒドロアスコルビン酸 (完全酸化型) となってしまう。しかしパルスラジオリシス法では、AsH⁻ 水溶液に電子ビームを照射する事により、過渡的に MDA が得られる。

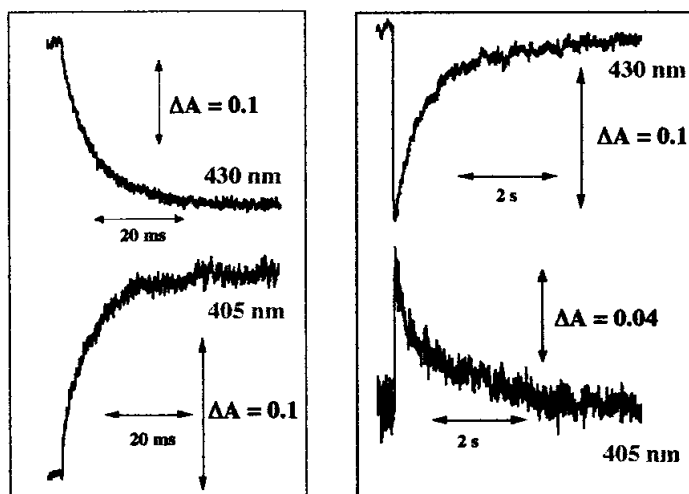


図3 パルスラジオリシス法による還元型チトクロム b_{561} とアスコルビン酸(AsH)、セミデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルとの反応
(左)パルス照射後、ミリ秒領域におけるMDAラジカルによる還元型ヘムの酸化反応と、(右)それに引き続く、秒領域における酸化されたヘムの溶媒中のAsHによる再還元反応。

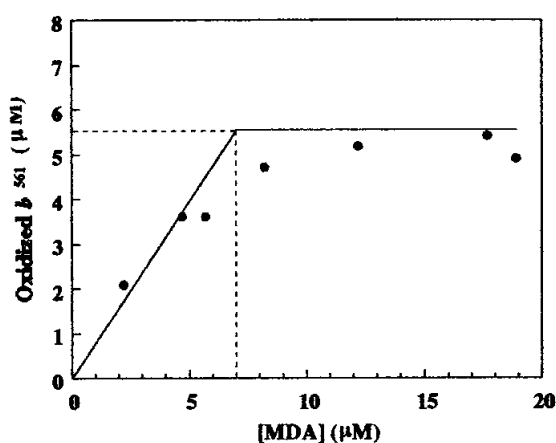


図4 パルスラジオリシス法による還元型チトクロム b_{561} の酸化反応におけるMDAラジカル濃度依存性
5 mM アスコルビン酸(AsH)存在下でパルスビーム強度を変化させることにより、生成するMDAラジカル濃度を変化させたときの酸化された還元型チトクロム b_{561} の濃度。
還元型チトクロム b_{561} 濃度 12.0 μM

AsH-溶液中ではチトクロム b_{561} は完全還元型となっているため、還元型チトクロム b_{561} より、MDAラジカルへの電子伝達反応が観測されることになる。この過程を高速可視吸収スペクトルにより追跡した。その結果、実際にミリ秒領域においてMDAは還元型チトクロム b_{561} を酸化していることがわかった。それに続いて、秒領域で、チトクロム b_{561} のヘムの吸収の回復過程が見られた(図3)。これは、酸化されたヘム鉄がAsHにより再還元されている過程を示している。これら2つの過程の速度定数のpH変化を調べた結果、MDAによる酸化過程はpH5.5で最大の値($4.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)を示し、pHが上昇すると、その速度は減少する事がわかった。一方、AsHによる還元反応は中性付近(pH6.8)で速度が最大($8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)となった。このことは、2つの電子伝達反応が全く違う部位において行われていることを示している。照射する電子ビームの強さを適当に調節する事により、生成するMDAの濃度を変化させて酸化過程を調べたところ、チトクロム b_{561} の半分以下の濃度のMDA存在下では、MDA濃度の増加に応じたチトクロム b_{561} の酸化の増大が見られるが、半分程度のところで頭打ちとなり、過剰量のMDA存在下でもチトクロム b_{561} の半分のヘムしか酸化されることがわかった(図4)。即ち、チトクロム b_{561} の半分のヘムのみがMDAとの反応性を持つことが明らかとなった。また、弱アルカリ処理したチトクロム b_{561} とMDAとの反応はほとんど見られなかった。これらの結果は、チトクロム b_{561} では、MDAによる酸化過程とAsHによる還元過程はそれぞれ別のヘムで起こっていることを示している(文献(3))。

(6) チトクロム b_{561} cDNA 遺伝子のクローニングとそのアミノ酸一次構造の決定

ヒツジ及びブタの副腎髄質から RT-PCR 法によってチトクロム b_{561} 遺伝子を cDNA クローニングし、そのアミノ酸一次構造を検討した。推定される分子量は 27,700、疎水・親水性領域の解析より 6 つの膜貫通領域があることが分かった。現在までに報告されているその他の生物種のチトクロム b_{561} のアミノ酸配列と比較したところ、ヒトから *C. elegans* まで完全に保存されている 6 つの His と 1 つの Met 残基も保存されていることがわかった。さらに細胞質側と小胞膜内側に相当する領域にそれぞれ 1箇所ずつ完全に保存されている配列(⁶⁹ALLVYRVFRN⁷⁸、¹²⁰SLHSW¹²⁴)があることを見出した (図 5)(文献(2))。

最近、最も原始的な中枢神経系を保持している、扁形動物門に属するプラナリア (線虫 *C. elegans* よりも下等な生物である) のチトクロム b_{561} 遺伝子の cDNA クローニングに成功した。アミノ酸一次構造配列、保存性 His 残基、について調べたところ、6 個の保存性 His 残基のうちの 1 個が Asn 残基に置き換わっていることが明らかとなった。しかし細胞質側と小胞膜内側にそれぞれ存在する保存性配列はよく保存されていた(未発表)。これらの結果は 2 つの保存性部位がアスコルビン酸(AsH)・セミデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルとの電子伝達に関与しているとの我々の提唱(文献(2))と合致するものであった。

ごく最近、植物にもチトクロム b_{561} に非常に似たタンパク質が存在していることが、expression tag 法により明らかとなった。我々はシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)より 2 種の b_{561} 様遺伝子の全長 cDNA クローニングに成功し、そのアミノ酸一次構造配列、保存性 His 残基、について調べた。その結果、一方の b_{561} ではプラナリアで Asn 残基に置き換わっていた保存性 His 残基が Gln 残基に置換されていることがわかった。このことは真の保存性 His 残基は 5 個であり、その内の 4 個がヘム配位子として働いていることを示すと思われる。さらに驚くべきことに、小胞内側の保存性配列 SLHSW は植物の b_{561} でも保存されていたのに対して、細胞質側の保存性配列 ALLVYRVFRN は全く保存されていなかった。このことは、植物ではチトクロム b_{561} は動物とは全く異なる生理的役割を担う電子伝達体として進化していったということを示唆している。

(7) チトクロム b_{561} 膜貫通モデル

以上の研究成果をもとに、図 6 のようなウシチトクロム b_{561} の 6 回膜貫通モデルを提唱した。このモデル上で、2 つのヘムの内の 1 つは小胞内側の His54-His122 のペアにより保持され、もう 1 つのヘムは細胞質側に位置し His88-His161 のペアで保持されていると考えられる。チトクロム b_{561} の酸化型の可視吸収スペクトルでは 700 nm 付近に特徴的な吸収バンドが無いことから、Met 残基のヘムへの配位は否定されている。また、2 つの保存されている配列(⁶⁹ALLVYRVFRN⁷⁸、¹²⁰SLHSW¹²⁴)はそれぞれ予想される 2 つのヘムのすぐ近傍に位置することになり、それぞれ、細胞質側での AsH 結合部位、ベシクル内での MDA 結合部位を形成していると考えられる。これらの配置は効率的な膜貫通電子伝達機構を考える上で非常に興味深い。植物細胞中でのチトクロム b_{561} の役割は全くわかっていないが、基本的な高次立体構造は動物小胞膜中のチトクロム b_{561} と同じであると考えられる。植物チトクロム b_{561} において、保存性の SLHSW 配列がどのような生理的役割を持つか非常に興味をもたれる。

図5 動物、植物のチトクロム b_{561} のアミノ酸配列アラインメント

	1		60
561bovine	~~~~~MEG PASPARAPGA LPYYVAFSQL LGLIVVAMTG AWLGMYSR.GG IAWESA...L		
561sheep	~~~~~MEG PASPARAPGA LPYYVAFSQL LGLTVVAMTG AWLGMYSR.GG IAWESA...L		
561pig	~~~~~MES PAGRTPAPGA LPYYVAFSQL LGLTVVAVTG AWLGAYR.GG IAWESA...L		
561human	~~~~~MEG GAA.AATPTA LPYYVAFSQL LGLTLVAMTG AWLGLYSR.GG IAWESD...L		
561planaria	~~~~~VDGIS RLSVVQNLNG FLPLIFICEV CGLAIVIMTA VHMGGVLQDGG FGWTKE...L		
561elegans	MSLLFDPGFV ILREDQSVKL FNIIIVMSQV FGGLAVLLVT IWMSSKFES.G FAW.NEDPDK		
561thal1	~~~~~MAVPVLG GPPIFMVVRV LGFIIAALVL TWTVHYR.GG LALSSDNKDH		
561thal2	~~~~~MAVRI.N AMAVTFVAHA LAVIAAIMVL VWSISYSR.GG LAWEATNKNL		
		*	
	61		120
561bovine	QFNVHPLCMI IGLVFLQGDA LLVYRVFRNE AKRTTKVLHG LLHVFAFVIA LVGLVAVFEH		
561sheep	QFNVHPLCMV IGLVFLQGDA LLVYRVFRNE AKRTTKVLHG LLHVFAFVIA LVGLVAVFEH		
561pig	QFNVHPLCMI IGLVFLQGDA LLVYRVFRNE AKRTTKILHG LLHVLAFAVIA LVGLVAVFDY		
561human	QFNAHPLCMV IGLIFLQGNA LLVYRVFRNE AKRTTKVLHG LLHIFALVIA LVGLVAVFDY		
561planaria	VFRYHPMFMI LGMIFIYQNA IMVYRVFRNT KKIRAKWLHA VLNLLALILG SVGLKAVFDS		
561elegans	EFNYHPTFMI MGVFLFGEA LLVYRVFRNE RKKFSKTLHV ILHSCVLVFM LMALKAVFDY		
561thal1	IFNVHPVMMV IGLILFNGEA MLAYKSVQGT..KNLKKLVHL TLQLTAFILS LIGVMAALKF		
561thal2	IFNLHPVLMV IGFILGGEA IISYKSLPLE..KPVKKLIHL ILHAIALALG IFGICAAFKN		
	* * * * *	* * * *	*
	121		180
561bovine	H.....R KKGADLYSL HSWCGILVFA LFFAQWLVG FFFLPGASF SLRSRYRPQH		
561sheep	H.....R KKGADLYSL HSWCGILVFA LFFAQWLVG FFFLPGASF SLRSRYRPQH		
561pig	H.....R KKGADLYSL HSWCGILVFA LFFAQWLVG FFFLPGASF SLRSRYRPQH		
561human	H.....R KKGADLYSL HSWCGILVFA LYFVQWLVG FFFLPGASF SLRSRYRPQH		
561planaria	H.....N MKGTANMYSL HSWVGLGCVI LFGCQWVLG ISFLPKLPE TLRSAIMPLH		
561elegans	HNLHKDPSGN PAPIVNLVSL HSWIGLSVVI LYFAQYIVGF ITYFFPGMPI PIRQLVMPFH		
561thal1	H.....I DKGIENFYSL HSWGLGLCLF LFAFQWAAGF VTYWYPGGSR NSRASLMPWH		
561thal2	H.....N ESHIPNLVSL HSWIGIGVIS LYGFQWVYSF IVFFFPGGST NLKSGLLPWH		
	*	** * * *	* * *
	181		240
561bovine	VFFGAAIFLL SVATALLGLK EALLF.EL.G TKYSMFEPEG VLANVLGLLL ATFATVILYI		
561sheep	VFFGAAIFLL SVATALLGLK EALLF.EL.G TKYSTFEPEG VLANVLGLLL AAFATVVLVI		
561pig	VFFGAAIFLL SVGTALLGLK EALLF.QL.G TKYSAFESEG VLANVLGLLL VAFGAVVLYI		
561human	IFFGATIFLL PVGTALLGLK EALLF.NL.G GKYSAFEPEG VLANVLGLLL ACFGGAVLYI		
561planaria	RSLGMIILGL AVAAAVMGIT E.....Y.N NNDKSKSPST MLGNFIGIIS LIFVSIVLFL		
561elegans	QMFGVLIFIF VSITVAMGIS ERAAWKHTCW TKEGQMCQQ ATSSFGVFT FLYTVCVLLL		
561thal1	VFLGISIYAL ALVTATTGIL EKVTFLOV.N QVITRYSTEA MLVNTMGVLI LILGGFVILG		
561thal2	AMLGLFVYIL AVGNAALGFL EKLTFLE..N GGLDKYGSEA FLINFTAITT ILFGAFVVLV		
	*	* *	
	241		275
561bovine	LTRADWKR.. PLQAEQALS MDFKLTLEGD SPSSQ		
561sheep	LTRADWKR.. PLQAEQALS MDFKLTLEGD SPSSQ		
561pig	LTRADWKR.. PLQAEQALS MDFKLTLEGD SPSSQ		
561human	LTRADWKR.. PSQAEQALS MDFKTLRQGD SPGSQ		
561planaria	VIWSEYRRIE PGTEERIIIL ND~~~~~		
561elegans	VLNPRWKRQS LPEEEGLHHL TSSHSMSD~~~~~		
561thal1	VVTPVSGKDQ VLTQ~~~~~		
561thal2	ASAESPSPSP SVSNDSDVDF SYSAT~~~~~		

全ての生物種で保存されているアミノ酸残基を*印で示した。thal1, thal2 はシロイヌナズナ b_{561} を示している。

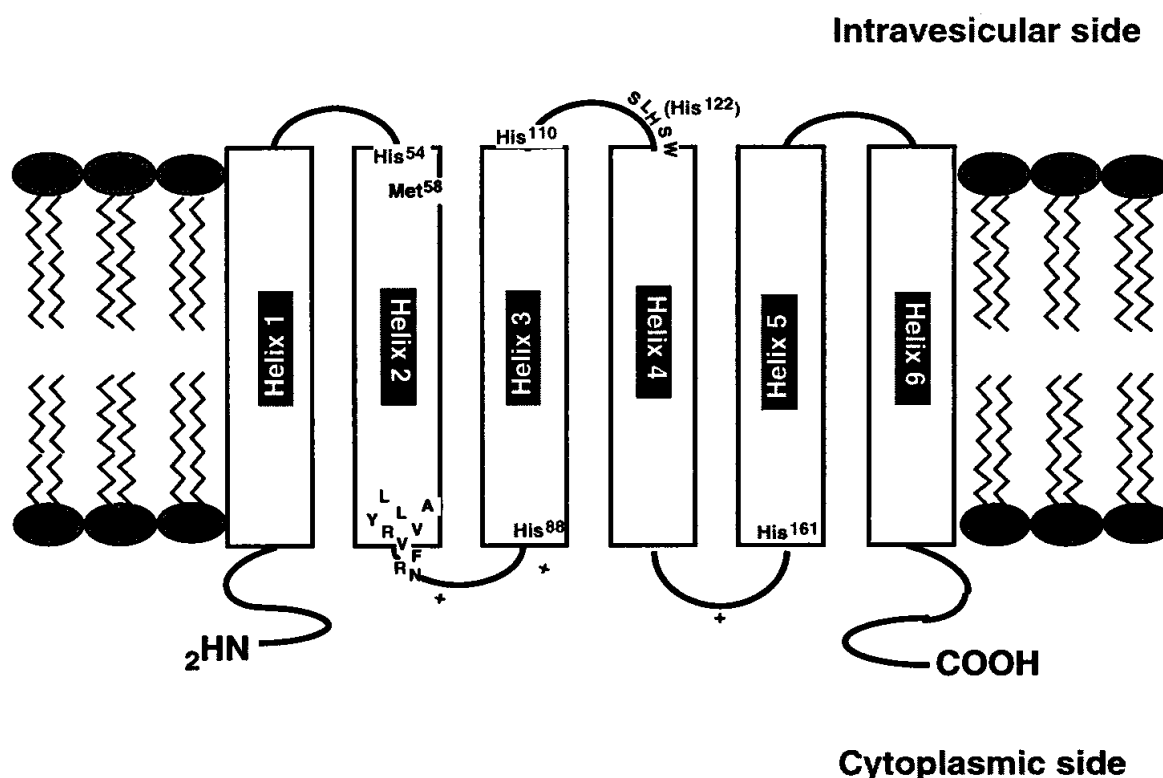


図6 ウシチトクロム b_{561} のクロマフィン小胞膜貫通モデル

膜を貫通している α ヘリックス部分は NH_2 末端側より順番にヘリックス 1、2、..... と名づけた。また、全ての動物種で良く保存されている 2 つの配列 (本文参照)、及び、5 個の完全保存性 His 残基、1 個の Met 残基をアミノ酸一文字表示で表した。また、保存性の良い塩基性アミノ酸残基を + 印で表した

4. 生活や産業への貢献および波及効果

アスコルビン酸(AsH)、すなわちビタミンCは非常に古くから知られており、その名称はビタミンの代表として人々の生活の中に(清涼飲料水、或いは化粧品等への添加物としても)とけ込んでいる。しかし、実際の体内における生理的役割となると、壊血病に関連したコラーゲンの生成と保持(具体的にはプロリン及びリジンの水酸化反応)ということ以外にはあまりよくわかっていない。本研究はこのビタミンCの別の重要な生理作用として、チロシン代謝と関連したカテコールアミンの生成、神経ペプチドの生成に際して、チトクロム b_{561} という電子伝達体の働きにより密接に関与していることを明らかにした。

我々は、これらの実験成果をさらに発展させるべく、チトクロム b_{561} の活性中心の構造と機能、或いは電子伝達反応における役割等を調べるため、詳細な生物物理学的解析を開始している。本研究で用いているような生物物理学的解析と分子生物学的手法とを統括的に用いることにより、(1) 放出された生体アミン、アスコルビン酸(AsH)やドーパミン β -水酸化酵素(DBH)の小胞中への再取込機構とチトクロム b_{561} との関連性(2) 電子伝達を駆動する生体エネルギー論的側面からの解析、といったような未知の脳科学研究領域への突破口となることが期待される。

参考文献

- (1) Tsubaki, M., M. Nakayama, E. Okuyama, Y. Ichikawa, and H. Hori (1997) Existence of two heme B centers in cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by a new purification procedure and EPR spectroscopy. J. Biol. Chem. 272, 23206-23210.
- (2) Okuyama, E., Yamamoto, R., Ichikawa, Y., and Tsubaki, M. (1998) Structural basis for the electron transfer across the chromaffin vesicle membranes catalyzed by cytochrome b_{561} : analyses of cDNA nucleotide sequences and visible absorption spectra. Biochim. Biophys. Acta, 1383, 269-278.
- (3) Kobayashi, K., Tsubaki, M. and Tagawa, S. (1998) Distinct roles of two heme centers for transmembrane electron transfer in cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin vesicles as revealed by pulse radiolysis. J. Biol. Chem. 273, 16038-16042.

口頭発表

- (1) 鏑木基成、山本隆治、堀 洋、奥山英策、市川佳幸、北川禎三 (1996) クロマフィン小胞膜に存在するシトクロム b_{561} の活性部位の解析、第 69 回日本生化学会大会・第 19 回日本分子生物学会合同年会 (平成 8 年 8 月 26～30 日、札幌)
- (2) 奥山英策、山本隆治、市川佳幸、鏑木基成 (1996) クロマフィン小胞体中存在するシトクロム b_{561} の cDNA クローニングと機能部位の解析、第 69 回日本生化学会大会・第 19 回日本分子生物学会合同年会 (平成 8 年 8 月 26～30 日、札幌)
- (3) 鏑木基成、山本隆治、中山雅登、奥山英策、市川佳幸、堀 洋、北川禎三 (1996) クロマフィン小胞体中存在するシトクロム b_{561} の cDNA クローニングと機能活性部位の解析、公開シンポジウム「生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学」第 1 回ワークショップ (平成 8 年 12 月 4～5 日、京都)
- (4) 鏑木基成、中山雅登、奥山英策、市川佳幸、堀 洋、(1997) クロマフィン小胞膜に存在するシトクロム b_{561} の cDNA クローニングと機能活性部位の解析、第 24 回生体分子科学討論会 (平成 9 年 7 月 15～16 日、岡崎)
- (5) 小林一雄、田川精一、鏑木基成 (1997) 副腎髄質クロマフィン小胞膜に存在するシトクロム b_{561} とアスコルビン酸ラジカルの反応、公開シンポジウム「生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学」第 2 回ワークショップ (平成 9 年 12 月 1～2 日、東京)
- (6) 鏑木基成、草川貴史、一瀬智子、奥山英策、市川佳幸、(1997) 副腎髄質クロマフィン小胞膜に存在するシトクロム b_{561} の cDNA クローニングと機能活性部位の解析、公開シンポジウム「生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学」第 2 回ワークショップ (平成 9 年 12 月 1～2 日、東京)
- (7) 鏑木基成、一瀬智子、武内総子、堀 洋、小林一雄、田川誠一、(1998) 副腎髄質クロマフィン小胞膜に存在するシトクロム b_{561} とアスコルビン酸との電子伝達反応、第 25 回生体分子科学討論会 (平成 10 年 8 月 4～5 日、西宮)

- (8) 鏑木基成、一瀬智子、堀 洋、(1998) His 残基修飾によるクロマフィン小胞膜由来 cytochrome b_{561} の電子伝達反応の阻害、第71回日本生化学会大会(平成10年10月14日～17日、名古屋)
- (9) M. Tsubaki, K. Kobayashi, T. Ichise, F. Takeuchi, S. Tagawa (1998) Distinct roles of two heme centers in cytochrome b_{561} for electron transfer across the chromaffin vesicle membranes, 公開シンポジウム「生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学」第3回ワークショップ (平成10年11月30～12月1日、広島)