

IV. 生命科学研究部門

IV-1. 生命機能情報分野

1. メンバ

教授 館野 賢

助教 庄司 光男

2. 概要

当グループでは生命の本質を理解するために、生体内酵素反応の解明、生体高分子間に働く相互作用の解析、情報統計学に基づくバイオインフォマティクスの研究を行っている。これらは全く新しいドラッグの開発や生体進化にとって非常に重要である。また、さらなる生命現象の解明には、これまでの計算手法を活用するのみならず、新規方法論の開発や超並列計算等の様々な新技術を取り入れることで、さらなる生命科学の新展開を行っている。

3. 研究成果

【1】 RNA・タンパク質複合体系（アミノアシル tRNA 合成酵素、DNA メチル化酵素）

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は実際の生命の持つ酵素であり、タンパク質生合成の過程で重要な役割を果たす。しかしながらその完全な立体構造は未だ解かれておらず、酵素反応機構も未だ明らかにされていない。われわれは aaRS の中でもアミノ酸の一種であるイソロイシンに特異的に反応活性を持つイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) に注目し、これまで立体構造が解かれていた低分解能全体構造と反応活性を持つドメインのみの高分解能立体構造を理論的に組み合わせ、IleRS 全体の全原子立体構造を構築することを試みた。

ホモロジーモデリングを行い、全体の立体構造に対してドメイン部分の立体構造を当てはめることでタンパク質の立体構造予測を行った。次に、その構造に対して分子動力学計算を行い、より適切な構造を構築した。

それにより IleRS におけるイソロイシン基質の分子認識機構を明らかにした。とくにこの酵素はアミノ酸の中からイソロイシン基質だけを認識する過程を担っており、この過程を解明できたことはタンパク質合成過程においてきわめて重要である。また、この立体構造を理論的に構築できたことで、より高精度な計算手法 (QM/MM 法等) を適用することがはじめて可能となり、より詳細な化学反応過程を探求できるようになったことも極めて大きな進展である。

一方、DNA メチル化酵素は DNA 分子内のシトシンやアデノシンをメチル化する酵素であり、バクテリアから哺乳類まで広く存在し、細胞分化や遺伝子制御などにおいて重要な役割を果たしている。Haemophilus haemolyticus が有する M.HhaI は、塩基配列 5'-GCGC-3'を特異的に認識し、5'側のシトシンの C5 炭素原子にメチル基を付加する。Bruce らによる理論的解析によれば、Glu119 からこのシトシンの N3 原子へのプロトン移動については、エネルギー障壁 (2.2 kcal/mol) および

プロトン移動前後のエネルギー変化 (-0.7kcal/mol) が低く見積もられ、Glu119 は反応に寄与しないと報告された。ところが速度論的測定によれば、Glu119 の変異体の活性は著しく低下し、重要なアミノ酸残基であることが示唆されている。われわれは、これらの矛盾を解決するために QM/MM 分子動力学計算を用い、Glu119 の機能的な役割を解析した。その結果、前述のプロトン移動における活性化エネルギー(8.1kcal/mol) と移動前後のエネルギー変化 (-2.2kcal/mol) は Bruce らの結果と著しく異なり、実験結果とよい一致をみた。HhaI DNA メチル化酵素特有の反応機構の詳細について解明を行った。

【2】タンパク質の DNA 認識とその電子構造の制御機構

生体内においては一般に、DNA の周囲に溶媒 (水分子) が存在するが、転写因子 (タンパク 質) が DNA に結合すると、DNA の一部の塩基は、転写因子によって溶媒 (水) からマスクされる。溶媒が離れた (タンパク質が結合した) 塩基の分子軌道は、エネルギー順位が変化し、一般により不安定になることを見出した (その塩基内の分子軌道のエネルギーが上昇する)。そこでさらに、DNA の表面が溶媒に露出している面積 Solvent Accessible Surface Area (ASA) を計算し、溶媒と DNA との相互作用を定量化した結果、上記の分子軌道エネルギー順位の上昇との間に、密接な相関 (線形性) が存在することを初めて導いた。これは、DNA をリガンドとする酵素などの反応・機能のしくみを解析するなどの目的にも、新しい視点を提供するものである。

以上は、DNA-タンパク質複合体の全体を、ハイブリッド QM/MM 計算によって取り扱うことで初めて可能となった (同じ対象を、複数の異なる QM/MM スキームによって計算し、それらの電子構造を比較)。これらの解析は複合体全体の FullQM 計算や、一部分を取り出した QM 計算では不可能である。

【3】カチオン (ナトリウムイオン) と π 電子との相互作用

阪大のグループによって、2009 年タンパク質構造内部に、 π 電子と Na⁺イオンとの結合が初めて見出されたが、(Na⁺イオンではなく) 水分子の結合である可能性が否定できなかった。我々は、阪大の研究者と共同で、見出された電子密度が Na⁺イオンであることを示した。その後さらに、Na⁺イオンを水に置き換えると、タンパク質構造が不安定になることも示し、その原因についても解明した。

このようなカチオン・ π 電子相互作用は、医薬品がタンパク質に結合する際など、一般に広く見られると考えられ、きわめて重要な相互作用である。しかしながら、その立体構造や相互作用についてはこれまで明らかにされていなかった。本研究ではその存在の証明と、新しい機能単位の発見、さらにその機能的な役割と仕組みについて解明できた為、極めて重要であると考えられる。

【4】ヘモグロビンの立体構造および水和構造の変化による酸素親和調節機構

ヘモグロビンは酸素濃度が高く CO₂ 濃度が低い肺(酸素の吸着)から、逆に、酸素濃度が低く CO₂ 濃度が高い組織(酸素の放出)へと酸素を運搬するタンパク質である。酸素の吸着と放出という異なる機能を一つのタンパク質で実現するためにヘモグロビンには酸素親和調節機能が備わっている。ヘモグロビンは4つのタンパク質(サブユニット)が会合した構造をとるが、このサブユニット間のコミュニケーションが酸素親和調節に重要であることが知られている。

タンパク質の構造と機能の研究の歴史の初期の段階におけるもっとも重要な研究は M. F. ペルツによるヘモグロビンの結晶構造の解明 (1962 年ノーベル化学賞) である。さらにペルツは酸素結合型と酸素非結合型ヘモグロビンの立体構造の違いから酸素親和調節機構を説明した(ペルツの機構,1971 年)。これはタンパク質の構造と機能の関係の最も代表的な例として浸透しており、生化学の教科書で必ず触れられるテーマでもある。

しかし、近年の実験でペルツの機構だけでは説明のつかない酸素親和調節が観測されるようになった。我々の研究の最終的な目的はヘモグロビンの酸素親和調節機構の謎を解明することである。

我々は古典力場による分子動力学計算を用いてこの問題にアプローチした。近年の計算機の性能の進歩は、より規模の大きい長時間のシミュレーションを可能にしたが、その一方で計算の精度はないがしろにされてきた。実際に、ヘモグロビンに対して行われた分子動力学計算では酸素非結合型が酸素結合型の構造に遷移するという多くの実験と矛盾する結果が報告されている。一方で、我々の計算の特徴は計算精度の向上を目指した点にある。

まず我々が行ったのは計算初期の水和構造の最適化である。タンパク質の分子動力学計算では通常、一分子を直方体の溶媒ボックスの中に埋めて、これを周期的境界条件でつなぐことで、実際の溶液中に近い状態を実現している。しかし、一般的な手法で溶媒水を配置するとヘモグロビンの場合、サブユニット間の空孔に十分な溶媒が配置されず結果として直方体の溶媒ボックスが欠けてしまうという問題があることが分かった。我々は初期の水和構造を最適化することによりこれを解決した。

また、分子動力学計算に用いる力場の評価を行い、ヘモグロビンの分子動力学計算に最も適切な力場を検証した。同時に従来いくつかの力場ではタンパク質中に一般に存在するグリシンのコンフォメーションを再現することが困難であることを示した。

こうした計算の精密化は我々に非常に重要な結果をもたらした。我々はヘモグロビンの水和構造の精密な解析を行い、結果としてサブユニット間の水を含んだ相互作用ネットワークを発見し、これに基づき全く新しい酸素親和調節機構を提案した。これは酸素の結合により一つのサブユニットに起きた変化が少しの構造の変化と上記のネットワークを介して全てのサブユニットに伝搬し酸素親和性を変化させるというもので、現状報告されているモデルと実験の矛盾を説明する唯一の分子機構である。

さらに、ここまでの研究で確立したヘモグロビンの分子動力学計算のスキームを用いて酸素結合型、酸素非結合型のヘモグロビンに対して長時間の分子動力学計算を行った。剛体モデルを用いた解析によると確かに酸素非結合型のサブユニットの配置は酸素結合型に近づくが、一方で溶液中の実験的で報告されている酸素非結合型の相互作用をよく保存していることが分かった。これは、上記の変化が、初期構造として用いた結晶構造が溶液構造へと緩和する遷移である可能性を示唆している。

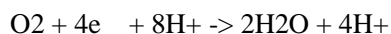
しかし、この構造が最終的な溶液構造なのか、あるいはまだ緩和の途中にあるのかは上記の計算から判断することは困難であり、さらなる大規模なサンプリングが必要である。この点を改善したうえで我々の提案する酸素親和調節機構はさらに検証されなければならない。そのためにはより精度の高い力場が必要になる。現状の生体高分子の力場はファンデルワールス相互作用、特に π スタッキングの再現に問題を抱えている。これは二重らせん DNA の塩基の積み重なり等に見られる相互作用で DNA やタンパク質の安定性に寄与している相互作用である。

上記の問題を解決した上で大規模なサンプリングを行うための基礎として、より分子量が小さくサンプリング空間が限られた蛋白質 **Trp-cage** に対して折り畳みシミュレーションを行った。タンパク質の折り畳みとは、特定の立体構造を持たない一本のペリペプチド鎖を溶液中で存在する構造へと折り畳むことであり、最も再現が困難なシミュレーションの一つである。この計算では我々が開発したスタッキング相互作用の改良力場とレプリカ交換分子動力学法とを組み合わせで用いた。

結果として我々の手法により、従来の方場よりも高い精度で溶液構造を再現することに成功した。これはヘモグロビンも含めた他のタンパク質にも応用可能な手法であり、さらなる研究の発展が可能となった。

【5】タンパク質と遷移金属の複合体の有効ポテンシャル場の開発と応用

シトクロム c 酸化酵素(COX)は生体内で呼吸(Respiration)に関連し、ミトコンドリアで酸素を水に還元する反応を担っている。この反応は



であり、電子移動とプロトン移動がカップルする反応である。反応には8プロトンが関わっており、化学反応に4プロトンが消費され、内膜への輸送に4プロトンが用いられる。生成される内膜のプロトン濃度勾配は生体内エネルギー源として用いられる ATP の合成(ATPase)に使われる。一方で、電子移動について、COX は Cytochrome c から電子(e⁻)をもらい、金属中心(CuA, heme a)を伝わって、反応中心である heme a₃-CuB に移動する。

COX における反応機構を解明するには QM/MM 分子動力学法を行うことが必要であるが、そのためにはまずその分子力場を作成することが必要である。構成アミノ酸については既に汎用力場が存在するが、金属中心についての力場は存在しない。そのため、金属中心 (CuA) に対する力

場生成を行う事から研究を始めた。

密度汎関数法(DFT)による CuA のポテンシャル曲面と一致するように以下のポテンシャル関数のパラメータを決定した。

$$U = \sum^{bonds} K_b (r - r_0)^n + \sum^{angles} K_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum^{torsion} \frac{V_n}{2} [1 + \text{Cos}(n\phi - \gamma)] \\ + \sum^{L-J} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum^{Coulomb} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

通常の MD 計算では n=2 が使われるが、n=4 の自由度も必要となることが分かった。これにより力場の精度を著しく向上させることが出来た。本研究を用いれば、高精度な QM/MM 計算が可能となる為、プロトン移動過程や、酸素還元過程が解明できる。現在研究を進展させている。

【6】細胞のシグナル情報伝達の数学的モデル (分子数理モデル)

生体内の化学反応ネットワークシステムは Stiffness が厳しく、微分方程式を数値的に解くこと自体が困難である場合も多い。ましてや、その解の安定性の解析は極めて困難である。しかし、生物学的に重要であるのは、(その時間発展よりも) 定常状態である場合が多くある。そこで、微分方程式を(定常状態の)代数方程式に変換することによって、その安定性を詳細に解析するための、新しい手法を提案した。これを応用することによって、フィードバック・ループを含むシグナル情報伝達ネットワークを解析し、ガン化などに至る、生物機能の新しい分子機構を提案した。

【7】バイオ・インフォマティクス技術の開発と応用

現在、生命科学では、個々の遺伝子ごとではなく、「ゲノム全体の遺伝子機能情報を一度に解析する」実験手法が、飛躍的に発展中である。例えば、iPS 細胞の諸々の問題は、遺伝子発現ネットワークにその根源があり、実用化に向けた課題の解決が不可欠である。同様に、生命科学上の様々な課題に、こうした実験手法が応用されつつある。このような最先端の技術の解析には、情報科学(多変量解析)が必須であり、生命科学との融合が不可欠となっている。

我々は転写因子が認識する DNA 塩基配列を、自動的かつ高精度に予測するパターン認識システム(塩基配列モチーフの同定システム)を開発することに成功した。本方法は発がん機構や iPS 細胞、再生医療技術へ応用することができるため、新たな統合的生命科学を拓けると考えている。

4. 研究業績

(1) 研究論文

1. Hagiwara Y, Kino H, Tateno M.: Modulation of electronic structures of bases through DNA recognition of protein. J Phys Condens Matter. 22(15), 152101(2010).

2. Hagiwara Y, Tateno M.: Recent advances in jointed quantum mechanics and molecular mechanics calculations of biological macromolecules: schemes and applications coupled to ab initio calculations. *J Phys Condens Matter*. 22(41), 413101(2010).

(2)学会発表

1. Masaru Tateno, A Computational Study of Catalytic Mechanisms of a Protein-RNA Hybrid Enzyme, April 22-24, 2010 Shanghai, China.
2. 舘野 賢, タンパク質機能の理論解析,蛋白質の機能-構造相関解明のための精密構造解析とその方法 ~水素原子から細胞まで, 2010/10/6-7, 大阪大学蛋白質研究所
3. Tatsunori Nishimura, Theoretical characterization of elementary reaction cycles exploiting the steepness of the stimulus/response curve, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 2010/10/22-24.
4. Masaru Tateno, Development and application of hybrid quantum mechanics (QM)/molecular mechanics (MM) molecular dynamics calculation system implemented on massively-parallel supercomputers by interfacing QM and MM engines International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 2010/10/22-24.
5. Masaru Tateno, Investigation of Functional Mechanisms of Biological Nano-machines Exploiting Computer Simulations from Dynamical Electronic Structure to Reaction Network System, Annual World Congress of Nanomedicine 2010, Oct 23-25, Beijing, China
6. MoonYoung Yang, Masaru Tateno, Computational investigation of catalytic mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日, 神戸.

<ポスター発表>

1. ○花岡 恭平、舘野 賢、ヘモグロビンの溶媒構造の同定を目指した計算科学的解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
2. ○佐藤 皓允、萩原 陽介、舘野 賢、イソロイシル tRNA 合成酵素 によるエディティング反応機構の計算科学的解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
3. ○舘野 賢、松村 浩由、○萩原 陽介, The grid-based energy representation: a novel description of the potential field involving Na⁺ - π interaction、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
4. 萩原 陽介、Martin J. Field、濡木 理、○舘野 賢、A hybrid ribozyme/protein catalyst : a computational investigation of editing mechanism of aminoacyl-tRNA synthetases、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
5. ○梁 文榮、萩原 陽介、舘野 賢、HhaI DNA メチル化酵素の反応機構の計算科学的解析、第 10 回日

本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.

6. ○カン ジョン、太田 雄大、萩原 陽介、西川 佳吾、山本 哲徳、長尾 秀実、舘野 賢、タンパク質の遷移金属結合活性サイトにおける電子構造：QM/MM 計算による解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
7. ○MoonYoung Yang and Masaru Tateno, Computational investigation of catalytic mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, HhaI DNA メチル化酵素 の反応機構の計算科学的研究, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸.
8. ○MoonYoung Yang, Yohsuke Hagiwara, Masaru Tateno, Computational analysis of reaction mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, HhaI DNA メチル化酵素 の反応機構の計算科学的解析, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 20 日-22 日, 東北大学.
9. ○A. Sato, Y. Hagiwara, M. Tateno: “Computational Investigation of Catalytic Mechanisms of Editing by isoleucyl-tRNA Synthetase”, 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日-22 日、東北大学.
10. ○Kyohei Hanaoka, Jiyoung Kang, Takashi Yonetani, and Masaru Tateno, Computational analysis of dynamical structures of Human adult hemoglobin, ヒトヘモグロビンにおける動的構造の計算科学的解析, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 20 日-22 日, 東北大学.
11. ○Ryoh Nakaki, A novel computational system for identification of transcriptional regulation motifs in genome DNA base sequences, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
12. ○Jiyoung Kang, Computational explorations of electronic and geometrical structure of heme a and heme a₃ in the bovine cytochrome c oxidase, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
13. ○Masaru Tateno, Evaluation of efficiency of a novel algorithm for accurate estimation of metal-p interaction energy International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
14. ○Kyohei Hanaoka, Jiyoung Kang, Takashi Yonetani, and Masaru Tateno, Molecular dynamics simulation of human adult hemoglobin, ヒトヘモグロビンの分子動力学計算, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸.
15. ○A. Sato, M. Tateno: “Computational Exploration of Mechanisms of Editing Reaction by isoleucyl-tRNA Synthetase”, BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会), 2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸.

IV-2. 分子進化分野

1. メンバ

准教授	稲垣祐司	(生命環境科学研究科)
教授	橋本哲男	(共同研究員・生命環境科学研究科)
準研究員	田邊晶史	(生命環境科学研究科)
学振特別研究員 PD	神川龍馬	(生命環境科学研究科)

2. 概要

分子進化分野では、真核生物の主要グループ間の系統関係解明に向け、主に3つの「柱」を設定し研究を進めている。

1. 新奇真核生物の発見 真核生物の多様性の大部分は肉眼で認識することが難しい単細胞生物であるため、これまでの研究では真核生物多様性の全体像を十分に把握しているとは言い切れない。そこで自然環境からこれまでに認識されていない新奇真核生物を単離・培養株化しすることを目指している。

2. 大規模配列データ解析 真核生物の主要グループ間の系統関係を分子系統学的に解明するには、大規模遺伝子データが必須である。そこで系統進化的に興味深い生物種を選び、培養と遺伝子データの取得をおこなっている。そのデータを基に、大規模配列データ解析を行い正確な真核生物系統の推測を目指している。

3. 分子系統解析の方法論研究 分子系統解析においては、解析する配列データの特長、使用する解析法・配列進化モデルなどにより、系統推定に偏りが生じることが知られている。これまでの方法論は、単一遺伝子データに基づいて研究されてきたが、複数遺伝子から構成される大規模配列データを解析するための方法論の検討はそれほど進んでいない。そこで、大規模配列データ解析においてより偏りの少ない推測を目指し、方法論的研究を行っている。

3. 研究成果

【1】大規模配列データ解析 (神川、稲垣、橋本)

(1) 新奇真核生物種 *Palpitomonas bilix*

パラオ共和国の海水サンプルから単離した新奇従属栄養性真核生物 *Palpitomonas bilix* の系統的位置は、顕微鏡観察および6遺伝子配列を用いた分子系統解析からは確定することができなかった (Yabuki, Inagaki, Ishida 2010)。我々は科研費基盤研究 (B)「ハプト・クリプト藻類を含む新奇巨大生物群の提唱とクロムアルベオラータ仮説の検証」(代表・稲垣; 課題番号 21370031) の支

援を受け、*P. bilix* の網羅的発現遺伝子 (expressed sequence tag/EST) 解析を行った。EST 解析には次世代シーケンサーを用い、約 100 万リード・合計配列長 3.2 メガ塩基対の配列データを取得した。この EST 解析データに基づき、159 遺伝子配列にもとづく大規模分子系統解析を行っている。予備的解析では、*P. bilix* はクリプと藻類との近縁性を示し、この系統関係はきわめて高いサポート値により支持された。

(2) 新奇真核生物種 *Tsukubamonas globosa*

筑波大学構内の兵太郎池から単離された新奇従属栄養性真核生物 TKB055 株は、電子顕微鏡観察によりエクスカバータ生物群に特徴的な細胞内微細構造をもつことが判明した。また、TKB055 株の系統的位置を核ゲノムにコードされた 5 遺伝子の配列に基づき解析したところ、エクスカバータ生物群の *Discoba* と呼ばれるグループとの近縁性が示唆された。これらの結果をまとめ TKB055 株を *Tsukubamonas globosa* として正式に記載した論文を発表した (Yabuki et al. 2011 58:319-331)。また論文執筆と平行し、カナダ・Dalhousie 大学の Andrew Roger 博士との共同研究として *T. globosa* の EST 解析を行った。今後 EST 解析から得た大量遺伝子配列データを用い、大規模系統解析の準備を行う。

一般の真核生物ミトコンドリアにくらべ、*Discoba* 生物群のサブグループの 1 つヤコバ類のミトコンドリアゲノムはより多くの遺伝子をコードしており、ミトコンドリアゲノム進化を考察する上で極めて重要である。我々の行った核コードの 5 遺伝子系統解析では *T. globosa* は *Discoba* 生物群のメンバーであることが判明し、ヤコバ類との近縁性も示唆された。そこでヤコバ類のミトコンドリアゲノムとの比較を行うために、*T. globosa* のミトコンドリアゲノムの完全解読を目指し、科研費挑戦的萌芽研究「原始真核生物を求めて：新奇真核微生物の形態・発現遺伝子・ミトコンドリアゲノム解析」(代表・稲垣；課題番号 22657025) の支援のもと実験を進めた。またこの研究は新学術領域研究「生命科学系 3 分野支援活動」の 2010 年度支援課題に選出され、ミトコンドリアの部分ゲノム配列 (合計 40 キロ塩基対) を決定した。今回配列を取得したミトコンドリアゲノム断片には、これまでヤコバ類 *Reclinomonas americana* のミトコンドリアゲノムにしか発見されていない翻訳伸長因子 EF-Tu がコードされていた。また *T. globosa* ミトコンドリアゲノム断片と考えられるコンティグの 1 つには、*R. americana* を含めこれまで解析されたいかなるミトコンドリアゲノムにも見つかっていない転写制御因子やシキミ酸合成経路にかかわる酵素をコードする遺伝子も発見された。今後、*T. globosa* ミトコンドリアゲノムを完全決定するため、さらに実験を進める予定である。

【2】新奇真核生物の発見 (稲垣・神川)

(1) 新奇自由生活性 *Parabasalia* 属メンバー NY0170 株

沖縄県石垣島のマングローブ林底泥から新規従属栄養性真核生物 NY0170 株は、顕微鏡と小サブ

ユニトリボソーム RNA 遺伝子配列の系統解析から自由生活性の *Parabasalium* 属メンバーであることが判明した。NY0170 株を *Pseudotrichomonas keilini* として正式記載した論文を発表した (Yubuki et al. 2010 ; 研究業績 2)。

(2) その他

海水、淡水、汽水サンプル、底泥サンプル等から新奇真核微生物の単離を試みているが、これまでのところ新奇な生物種の発見、単離には至っていない。

【3】分子系統解析の方法論研究 (田邊・稲垣・橋本/辻・佐藤 (高性能計算システム研究部門))

(1) 系統樹探索のための最適化アルゴリズムの構築

遺伝的アルゴリズムは工学・生物学など広範囲で利用されている最適化アルゴリズムである。この研究では、遺伝的アルゴリズムを用いて進化系統樹を最適化することを模索した。系統樹の探索は樹の尤度の最大化問題として定式化されるが、探索の効率増進をかんがみ一般的な探索では得られにくい部分解をあらかじめビルディングブロックとして与えることを考えた。この操作により通常手法の探索手法で局所解におちいる等、探索困難な場合でも最適解を得ることが期待できる。我々の開発した樹形探索アルゴリズムの性能を評価するため、10 配列をふくむアミノ酸配列データに対する網羅的探索によりえた最適解と、遺伝的アルゴリズムをふくむ各種アルゴリズムが与えた「最良解」の比較を行った。今後、テストに用いるデータの種類、サイズ等のバリエーションを増やし、開発した系統樹探索法のチューニングを行う。

(2) 最尤系統樹の信頼性評価バイアスの定量

通常ブートストラップリサンプリングデータに基づき系統樹推定を繰り返し、得られたブートストラップ系統樹群から多数決合意樹や各分岐の出現確率を算出し、系統推定の信頼性・不確実性を評価する (いわゆるブートストラップ解析)。最尤系統推定の場合、各反復の発見的探索における初期樹形が元データの最尤系統樹から遠い場合、ブートストラップ解析による信頼性は過小評価されると予想される。反対に、元データの最尤系統樹を初期樹形にした場合、信頼性は過大評価されると予想できる。この研究では、ブートストラップ解析において、初期樹形と発見的樹形探索法が、バイアスの直接的原因となると考え、様々な状況のモデルにより生成したシミュレーションデータセットをブートストラップ解析に供し、信頼性評価値に対するバイアスの定量化を試みた。解析には T2K スーパーコンピュータを使用し研究を進めた。これまでに信頼性評価値のバイアスに関し、前述の予想をほぼ確認した。今後論文作成に向け、さらに解析を進める予定である。

4. 研究業績

(1) 研究論文

1. Ishida K*, Inagaki Y*, Sakaguchi M, Oiwa A, Kai A, Suzuki M, Nakayama T, Chikuni T, Yabuki A, Yamaguchi H, Yubuki N, Yoshida M, Nakayama T, Inouye I, Hashimoto T. Comprehensive SSU rRNA phylogeny of Eukaryota. *Joint 1st authors 2010 **Journal of Endocytobiosis and Cell Research** 20:81-88.
2. Yubuki N, Ceza V, Cepicka I, Yabuki A, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I, Leander BS. Cryptic diversity of free-living parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacusteria cyprica* n. gen. et sp., as inferred from SSU rDNA sequences. 2010 **Journal of Eukaryotic Microbiology** 57:554-561.
3. Minge MA, Shalchian-Tabrizi K, Torresen OK, Takishita K, Probert I, Inagaki Y, Klaveness D, Jakobsen KS. A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. 2010 **BMC Evolutionary Biology** 10:191.
4. Kamikawa R, Sakaguchi M, Matsumoto T, Hashimoto T, Inagaki Y. Rooting for the root of elongation factor-like protein phylogeny. 2010 **Molecular Phylogenetics and Evolution** 56:1082-1088.
5. Kolisko M, Silberman JD, Cepicka I, Yubuki N, Takishita K, Yabuki A, Leander BS, Inouye I, Inagaki Y, Roger AJ, Simpson AGB. A wide diversity of previously undetected relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. 2010 **Environmental Microbiology** 12:2700-2710.
6. Yabuki A, Inagaki Y, Ishida K. *Palpitomonas bilix* gen. et sp. nov.: A novel deep-branching heterotroph possibly related to Archaeplastida or Hacrobia. 2010 **Protist** 210:523-538.
7. Mitsui H, Arisue N, Sakihama N, Inagaki Y, Horii T, Hasegawa M, Tanabe K, Hashimoto T. Phylogeny of Asian primate malaria parasites inferred from apicoplast genome-encoded genes with special emphasis on the positions of *Plasmodium vivax* and *P. fragile*. 2010 **Gene** 450:32-38.

(2) 学会発表(発表者は太字)

(A) 招待講演

1. 稲垣祐司. Residual nuclear genome of the green algal endosymbiont in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. 2010年12月9日 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会年会合同大会・ワークショップ 3W21-p 『細胞内共生オルガネラが駆動する生物進化と多様性』

(B) その他の学会発表

1. *Trans*-splicing in the intron-poor eukaryotic parasite *Giardia intestinalis*. (Poster) **Ryoma Kamikawa**, Yuji Inagaki, Masaharu Tokoro, Andrew J. Roger, Tetsuo Hashimoto. 12月7-8日 第26回国際生物学賞記念シンポジウム(茨城・つくば・つくば国際会議場)
2. Molecular evidence for the residual nuclear genome of the green algal endosymbiont in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. (Poster) **Takuya Matsumoto**, Ryoma Kamikawa, Tetsuo Hashimoto, Yuji

- Inagaki. 12 月 7-8 日 第 26 回国際生物学賞記念シンポジウム (茨城・つくば・つくば国際会議場)
3. *Giardia intestinalis* ゲノム中の「分割」イントロン群 (Oral) 神川龍馬、稲垣祐司、所正治、Andrew J Roger、橋本哲男. 第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 10 月 7-9 日 (長崎・長崎・長崎大坂本キャンパス)
 4. Molecular evidence for the residual nuclear genome of the green algal endosymbiont in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. (Oral) **Takuya Matsumoto**, Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki. 8 月 29 日 -9 月 2 日 (Universitetet i Tromso, Tromso, Norway) ISE 2010 (XIth International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis)
 5. Evolutionary characteristics of the green-colored plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. (Poster) **Yuji Inagaki**, Takuya Matsumoto, Masanobu Kawachi, Tetsuo Hashimoto. 8 月 29 日 -9 月 2 日 (Universitetet i Tromso, Tromso, Norway) ISE 2010 (XIth International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis)
 6. Spliceosome-mediated *trans*-splicing produces the complete mRNA for heat shock protein 90 in *Giardia intestinalis*. (Oral) **Ryoma Kamikawa**, Yuji Inagaki, Masaharu Tokoro, Andrew J Roger, Tetsuo Hashimoto. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII
 7. Mitochondrial genome of the katablepharid *Leucocryptos marina*. (Poster) **Yuki Nishimura**, Ryoma Kamikawa, Takuya Matsumoto, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII (18th meeting of International Society for Evolutionary Protistology)
 8. Transcriptional difference between two nucleus-encoded plastid-targeted GAPDH genes in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. (Poster) **Yuki Yazaki**, Ryoma Kamikawa, Takuya Matsumoto, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII
 9. A simulation study for assessing phylogenetic inference attracted by inclusion of sequences with compositional bias and extraordinary substitution rate. (Poster) **Sohta Ishikawa**, Yuji Inagaki, Akifumi S.Tanabe, Ryoma Kamikawa, Tetsuo Hashimoto. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII
 10. Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. (Oral) **Takuya Matsumoto**, Fumihiko Shinozaki, Tomoko Chikuni, Akinori Yabuki, Kiyotaka Takishita, Masanobu Kawachi, Takeshi Nakayama, Isao Inouye, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII
 11. *Tsukubamonas globosa* gen. et sp. nov.; a novel excavate flagellate possibly hold a key for the early evolution in "Discoba". (Poster) **Akinori Yabuki**, Takeshi Nakayama, Naoji Yubuki, Tetsuo Hashimoto, Ken-ichiro Ishida, Yuji Inagaki. 7 月 2-7 日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII
 12. Multigene phylogenies of diverse *Carpediemonas*-like organisms identify the closest relatives of 'amitochondriate' diplomonads and retortamonads. (Oral) **Kiyotaka Takishita**, Martin Kolisko, Hiroshi Komatsuzaki, Akinori Yabuki, Ivan Cepicka, P. Smejkalova, Jeffrey D. Silberman, Yuji Inagaki, Tetsuo

Hashimoto, Andrew J Roger, Alastair GB Simpson. 7月 2-7日 (石川・金沢・金沢県立美術館) ISEP XVIII

13. ストラメノパイル類における翻訳伸長因子遺伝子の進化 (Oral) **神川龍馬**、橋本哲男、稲垣祐司 3月 19-22日 (茨城・つくば・筑波大) 第34回 日本藻類学会
14. 配列組成の極端な変化によるモデル不整合が分子系統解析に与える影響について (Oral) 石川**奏太**、稲垣祐司、**神川龍馬**、**田辺晶史**、橋本哲男 3月 19-22日 (茨城・つくば・筑波大) 第34回 日本藻類学会
15. クロロフィル *a, b* を持つ緑色渦鞭毛藻類 *Lepidodinium chlorophorum* の葉緑体起源 (Oral) **松本拓也**、**瀧下清貴**、**篠崎文彦**、**千國友子**、**Marianne Aastebol Minge**、**Kamran Shalchian-Tabrizi**、**河地正伸**、**渡邊信**、**井上勲**、橋本哲男、稲垣祐司 3月 19-22日 (茨城・つくば・筑波大) 第34回 日本藻類学会