

IV. 生命科学研究部門

IV-1 生命機能情報分野

1. メンバ

助教 庄司 光男

2. 概要

生命機能情報分野では生体内で重要な働きをしている蛋白質、核酸等に注目し、その特異的機能を理論的に解明することを目的としている。今年度は、一酸化窒素還元酵素とDNAトポイソメラーゼに注目し、高精度計算手法(QM/MM)を用いてこれらの特異的かつ効率的な化学反応を初めて明らかにした。また、L型アミノ酸生成過剰や異常型プリオン蛋白質の立体構造予測研究においても幾つか重要な結果を得た。これらの理論解明には膨大な計算が必要であり、これまで用いていた並列性能の低い計算プログラムでは取り扱う事が困難であった。そこで、高並列環境に適した計算プログラムを整備し、スーパーコンピュータ(T2K-Tsukuba 等)を活用することで結果を出した。さらなる計算速度の向上には、計算プログラム(分子動力学法、第一原理計算法)のGPU対応が必須となる。そのため、HPC 分野と連携し、プロファイリングを行い、プログラム開発のための調査を行った。

3. 研究成果

【1】一酸化窒素還元酵素(NOR)の反応機構の理論的研究

一酸化窒素還元酵素(NOR)は一酸化窒素(NO)を亜酸化窒素(N_2O)に変換する反応 ($2NO + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2O + H_2O$)を触媒し、微生物の嫌気呼吸経路を担っている。生成物の N_2O は大気中に拡散することで、強力な地球温暖化ガス(CO_2 の 300 倍)として働くため、NOR は多くの分野で注目されている。NOR は膜蛋白質であり結晶化が困難で、立体構造が不明であった。2010 年に初めて X 線結晶構造解析が成功し、鉄2核(Fe_B , Fe_{b3})で構成される活性中心構造を持つことが判明した(Fig.1)。しかしながら求められた構造は休止状態(酸化状態)にあり、活性中心には基質 NO が入る空間は無く、反応機構は推定できなかった。そこで我々はX線構造を基に NOR の反応機構についての理論的解明を行った。QM/MM 法を適用し、反応中心は高精度第一原理計算法(Broken-symmetry DFT: QM)を、周りの蛋白質は分子動力学法(MM)で取り扱った。NO から N_2O が生成するまでの各反応ステップについて順に中間状態と遷移状態探索を行った。

(1) 休止状態(NO が結合していない状態)

(2) 基質結合状態(NO が 1 分子結合した状態) Fe_B , Fe_{b3} の2つのサイトに NO は N と O それぞれで配位が可能であるため、合計4状態を求めた。N 配位のほうがO配位よりも安定であり、 Fe_B よりも Fe_{b3} に配位した方が安定であることが分かった。

(3) 基質結合状態(NO が2分子結合した状態)

NO_2 分子が結合した状態は3つの結合様式が考えられるが、cis- Fe_{b3} 形式が最も安定であった。また、初

めの NO が部分的に還元されていることで、2つめの NO は低い反応障壁で N-N 結合形成が行えることが分かった。

(4) NO 結合乖離過程

最も高いエネルギー障壁を持つ段階である。鉄中心は $\text{Fe}_B(\text{IV})=\text{O}$, $\text{Fe}_{B3}(\text{II})$ のフェリル中間体となり、Glu211 が Fe_B に二座配位することで hyponitrite 中間体の過剰な安定化を防いでいることが分かった。この Glu211 は保存アミノ酸であり、反応機構にとって極めて重要な役目を持っていることが分かった。

(5) N_2O 脱離過程

N_2O は脱離 Fe_{B3} のスピン状態が low-spin から high-spin 状態へ変化する過程で N_2O が乖離させている事が分かった。

これらの反応では電子状態が反応途中で変化しており、正確な電子状態を求めることが、正確な反応機構解明に必須である。また、各中間状態や遷移状態探索は多くの計算が必要となるため、T2K-Tsukuba や HECToR 等のスーパーコンピュータ利用が欠かせなかった。NOR における N_2O 生成メカニズムの解明は(1)環境学的重要性、(2)生物学的重要性、(3)化学的重要性、(4)医療への応用 に対して極めて重要である。そのため、大きなインパクトと波及効果を与える事が期待できる。現在論文にまとめ、投稿準備中である。

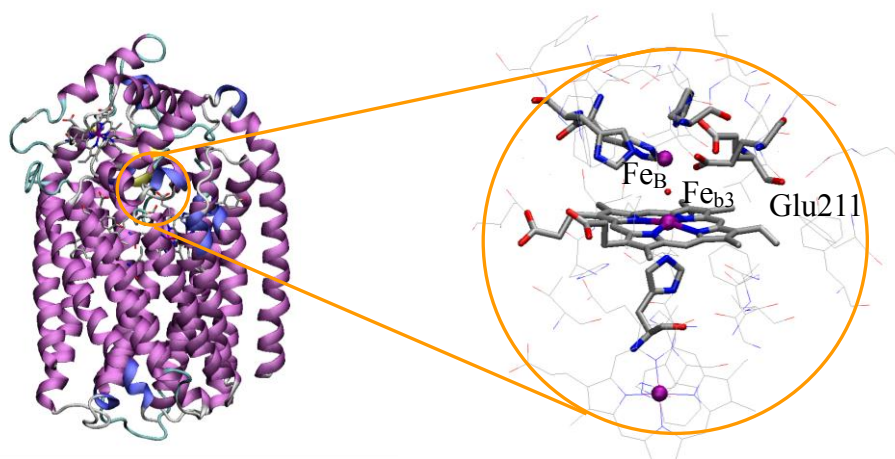


Fig. 1. NOR の全体構造と活性中心構造

【2】DNA トポイソメラーゼ II における DNA 再結合反応の理論的解明

DNA は細胞核内で高度に折りたたまれて収納されている。そのため、DNA の転写や複製の際には、DNA 鎖のねじれ(トポロジ)が問題となるが、これは DNA トポイソメラーゼによって解消されている。DNA トポイソメラーゼは生命にとって不可欠な酵素であるだけでなく、抗生物質や抗がん剤に対する有力な標的であり、現在盛んに創薬研究がなされている。トポイソメラーゼの触媒サイクルは DNA の切断と再結合の二つがあるが、分子レベルでの触媒機構については未だ解明されていない。本研究では反応阻害に最も重要とされている再結合過程に注目し、DNA トポイソメラーゼ II (DNA-topo II) の DNA 再結合反応を QM/MM 法によって理論的に解明した(Fig.2)。

我々は (1)金属イオンの役割、(2)水と保存アミノ酸残基を介した求核剤活性化のメカニズムを明らかにした。

これらは DNA-topo における保存アミノ酸残基の役目を説明する初めての知見である。これらの結果は、今後新たな阻害剤を開発していくための、非常に有益な指針となりうる。本研究は花岡恭平君が主に研究を進めた。現在論文にまとめ、投稿準備中である。

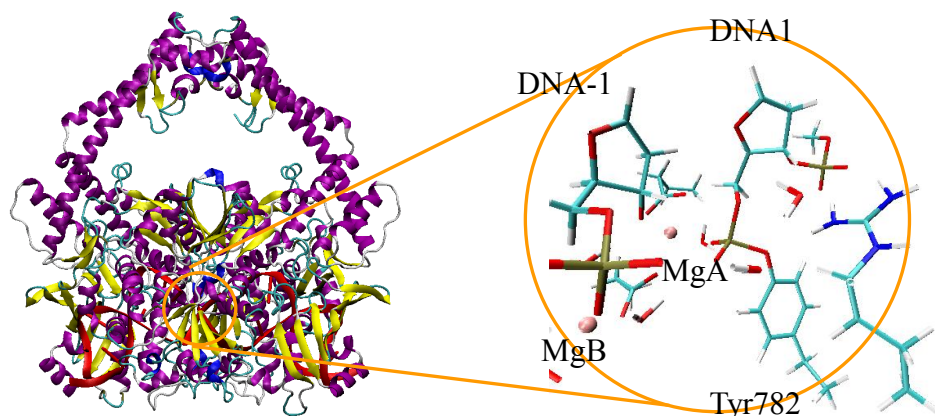


Fig. 2. DNA-topoII の全体構造と活性中心構造

【3】 原始太陽系におけるL型アミノ酸過剰についての理論的研究

地球上の生命を構成しているアミノ酸は、鏡像異性体であり、L 型と D 型という鏡合わせにした二つの立体構造を持つ。実験室中における化学合成では、L 型と D 型はそれぞれ等量生成されるにも拘らず、生命はほぼ 100%が L 型により形成されている。この矛盾を説明する仮説として、アミノ酸の起源が地球外から来たという説がある。このシナリオでは、宇宙空間中で円偏光が生成し、L 型と D 型のうち一方のアミノ酸：例えばD型アミノ酸が選択的に破壊され、L 型アミノ酸の存在比が多くなり、現在の L 型アミノ酸世界が形成されたという説である(Fig.3)。我々は、この説を理論的に検証するため、(1)どのような円偏光によってアミノ酸が崩壊するのか (2) どのような崩壊経路が存在するのか、について研究を行った。その結果、紫外領域において強い吸収を持つこと、CA-AB 結合を切る経路が存在すること、隕石中に存在が確認されているアラニン、バリンに共通した性質であることが分かった。本研究は佐藤皓允くんが主に研究を進め、梅村雅之先生、矢花一浩先生、白石賢二先生、神谷克政先生、庄司の協同研究体制でなされた。

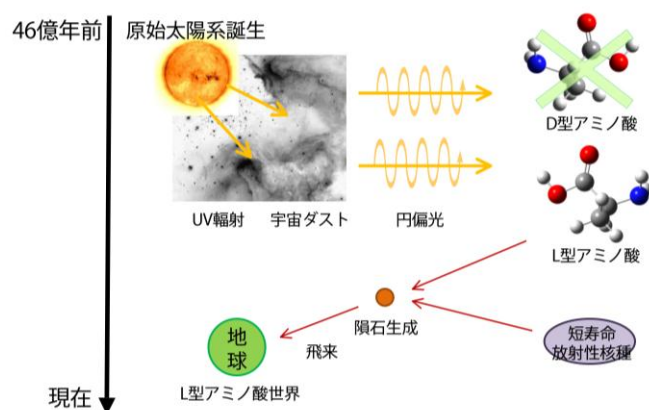
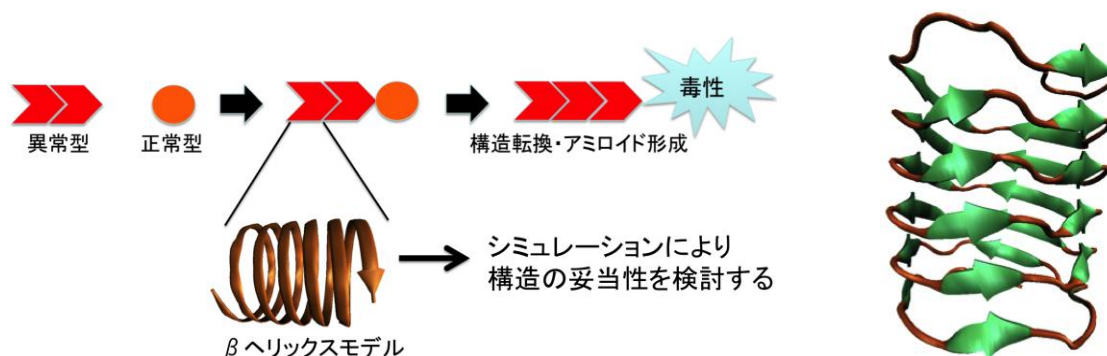


Fig.3 L型アミノ酸生成シナリオ

【4】異常型プリオン蛋白質の立体構造予測

プリオンとは哺乳類で発見されたタンパク質性の感染因子のことである。正常な立体構造とは異なる立体構造のタンパク質(プリオン)が、正常型タンパク質を次々と異常型に転換、凝集していくことで、アミロイド線維と呼ばれる線維構造を形成する(Fig.4)。この線維が生体内に蓄積すると細胞死を引き起こし、様々な神経性疾患の引き金となる。日本では 2001 年に牛での狂牛病感染が確認され、人にも伝染する可能性が指摘されたため、社会的にも大きな衝撃をもたらした。しかしながら、感染機構や異常型タンパク質の立体構造など、分子レベルでは明らかにできていないため、生物、化学、物理から医学にまたがる大きなフロンティア領域として科学的解明が期待されている。本研究では生物学的研究が最も進んでいる酵母プリオン Sup35 に注目し、この未知の立体構造を計算機シミュレーションによって再現することで、立体構造変化や感染機構を理論的に明らかにする事を試みた。その第一歩として、実験的に提唱されているモデルの1つである β ヘリックスモデルの熱力学的安定性の検討を行った。室温で $1\mu s$ の分子動力学シミュレーションを行った。特徴的な β シート構造が所々で壊れ、 β シートとループ構造の繰り返しパターンが現れた。この部位がヘリックス構造を安定に保つために必須であると考えられる。 β シートとループ構造の繰り返しパターンは、HET-s と呼ばれる他のプリオンでもみられている。HET-s でみられるモチーフと本研究で得られたパターンは非常に類似性が高いことが分かった。本研究は近藤大生君が主に研究を進め、東工大の田口英樹先生、野間繁子先生、神谷克政先生、庄司の協同研究体制でなされた。

Fig. 4 プリオン蛋白質のアミロイド形成と $1\mu s$ の MD シミュレーション結果

【5】スーパーコンピュータ利用について

我々はこれまで QM/MM 計算に 2006 年版 GAMESS を基に開発したプログラムを用いていたが、(1) DFT 計算が遅い、(2) 対応する汎関数が限られている、(3) 並列化効率が悪い (<64 core) という問題があった。そこで、高並列化への大幅な改良を行うことを考えたが、調査の結果、NWChem プログラムパッケージを用いることで効率よく大規模並列環境(スーパーコンピュータ)に対応できる事が分かった。研究に必要なユーティリティプログラムを作成し、研究環境を整備した。T2K-Tsukuba において 512core でも効率よく動作する事を確認した(Fig.5)。また、一万軌道の SCF 計算も行えるため、60残基の蛋白質ならまるごと第一原理計算できる事がベン

チマーク測定により判明した。昨年度末東日本大震災によりT2K-Tsukubaが停止し、研究が中断されたが、エジンバラ大学 EPCC により、HECToR を利用させて頂くことができた。我々は NOR と DNA-TopoII の理論解析に大いに活用させて頂き、研究を行う事ができた。ここに心から感謝の意を表します。

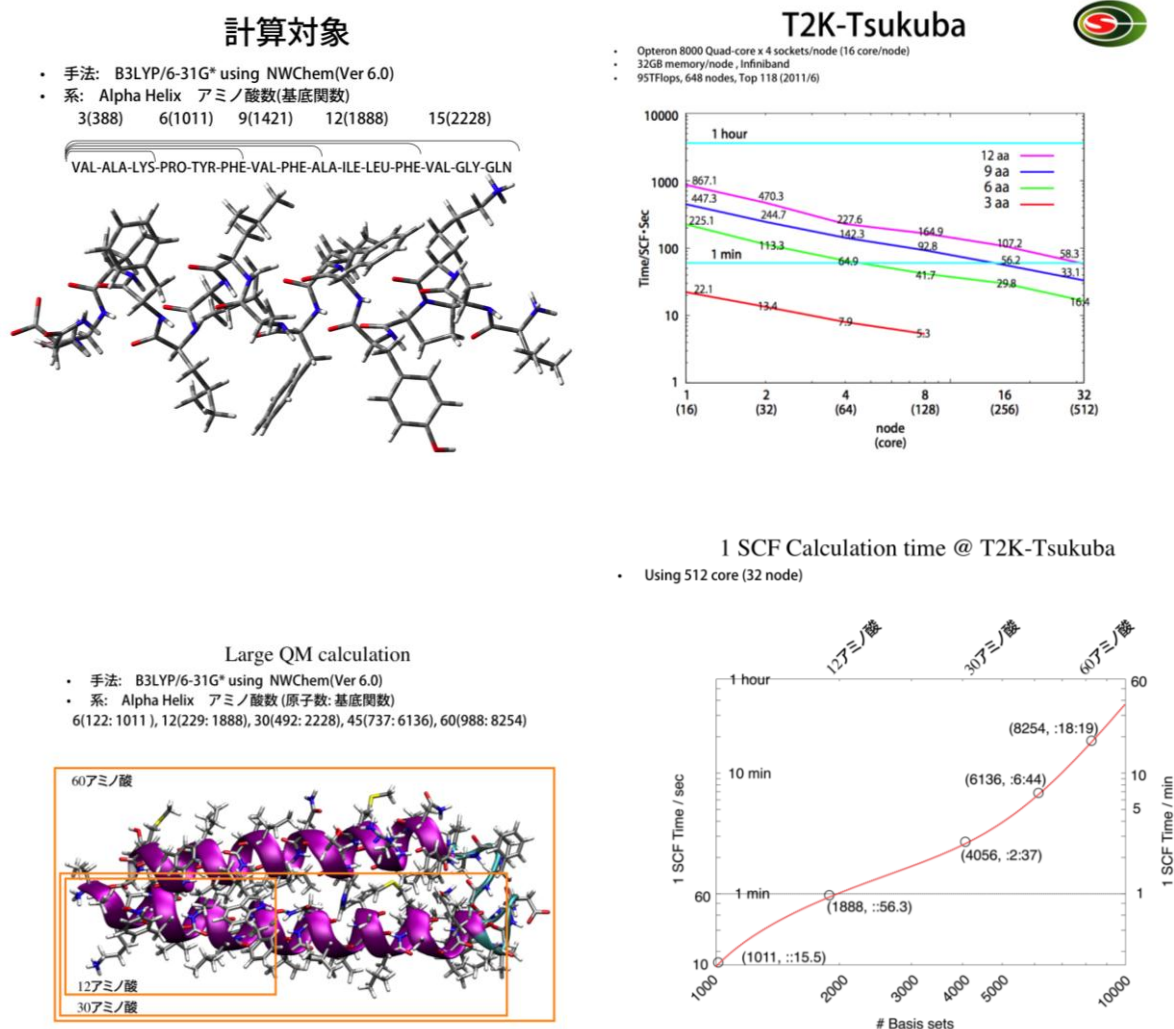


Fig5. T2K-Tsukuba における DFT ベンチマーク計算

【6】 GPGPU による計算加速

生命科学研究分野では、より短期間での問題解明やよりリアルステックなシミュレーションのために、計算のさらなる高速化と大規模化対応が欠かせない。一方、近年の計算機環境は目覚ましく発展している。CPU 単体の演算性能向上は見込めない段階に達し、現在は超並列やヘテロ並列計算によって計算の高速化を行う段階に入っている。中でも、GPU を用いるヘテロ計算機は消費電力や計算機コストの点でメリットが非常に大きい。そのため我々は QM/MM 計算を GPU 環境で行う事で、新たな生命科学研究領域を開拓することを試みている。

QM/MM 計算においてボトルネックはQM(量子力学) 計算である。QM 計算のプロファイリングを詳細に行い、二電子積分ルーチンが最も重いことが分かった。しかしながらパッケージに組み込まれている CPU 二電子積分コードは非常に煩雑であり、GPU 対応させることは非常に難しい。そこで、改良が行いやすいシンプルな二電子積分ルーチンを GPU 対応させることを試みている。本研究は藤田典久さんが主に研究を進め、朴泰介先生、埴敏博先生、梅田宏明先生、庄司の協同研究体制でなされた。

4. 研究業績

(1)研究論文

1. M. Shoji, K. Hanaoka, A. Sato, D. Kondo, M. Yang, K. Kamiya, K. Shiraishi, Calculation of the Electron Transfer Coupling Matrix Element in Diabatic Reactions, Int. J. Quantum Chem., accepted(2012). DOI: 10.1002/qua.24074
2. K. Yamaguchi, H. Isobe, S. Yamanaka, T. Saito, K. Kanda, M. Shoji, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya and M. Okumura, Full geometry optimizations of the mixed-valence CaMn4O4X(H2O)4 (X=OH or O) cluster in OEC of PS II: Degree of symmetry breaking of the labile Mn-X-Mn bond revealed by several hybrid DFT calculations, Int. J. Quantum Chem., 13 APR 2012, DOI: 10.1002/qua.24117
3. T. Saito, M. Shoji, K. Kanda, H. Isobe, S. Yamanaka, Y. Kitagawa, S. Yamada, T. Kawakami, M. Okumura, K. Yamaguchi, Theory of chemical bonds in metalloenzymes. XVII. Symmetry breaking in manganese cluster structures and chameleonic mechanisms for the O-O bond formation of water splitting reaction, Int. J. Quantum Chem., 112, 121-135 (2012).
4. T. Saito, S. Yamanaka, K. Kanda, H. Isobe, Y. Takano, Y. Shigeta, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, M. Shoji, Y. Yoshioka and K. Yamaguchi, Possible mechanisms of water splitting reaction based on proton and electron release pathways revealed for CaMn4O5 cluster of PSII refined to 1.9 Å X-ray resolution, Int. J. Quantum Chem., 112, 253-276 (2012).

(2)学会発表

<口頭発表>

1. 佐藤皓允、庄司光男、神谷克政、梅村雅之、矢花一浩、白石賢二、星間空間における L 型アミノ酸過剰の理論的研究, 天文学会春季年会、2012/03/22.
2. Mitsuo Shoji, Computational Bioscience Utilizing Supercomputers: Performance and Applications, LBNL and CCS-Tsukuba Joint Workshop, CCS, University of Tsukuba, 2012/3/19.

3. Mitsuo Shoji, QM/MM Studies on the reaction mechanisms in metalloenzymes, Exascale Symposium, The University of Edinburgh, 2012/2/23.
4. 佐藤 皓允, 庄司光男、神谷克政、梅村雅之、矢花一浩、白石賢二、星間空間におけるアミノ酸キラリティ生成機構の理論的研究, ALMA ワークショップ, 2012/01/21.
5. K. Hanaoka, D. Kondo, M. Yang, K. Kamiya, M. Shoji, K. Shiraishi, Theoretical investigation for mechanism of DNA religation by E.coli topoisomerase IA, 第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館, 2011/09/23.
6. D. Kondo, K. Hanaoka, M. Yang, K. Kamiya, M. Shoji, S. Kawai-Noma, H. Taguchi, K. Shiraishi, Theoretical Investigation of Structural Stability of beta;-Helix Model for Amyloid Fibrils from Yeast Prion Sup35, The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Hyogo, 2011/09/06.
7. M. Shoji, D. Kondo, K. Hanaoka, M. Yang, H. Umeda, K. Kamiya, K. Shiraishi, Theoretical investigation on the substrate binding states of nitric oxide reductase, The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Hyogo, 2011/9/18.

<ポスター発表>

1. K. Hanaoka, D. Kondo, M. Yang, K. Kamiya, M. Shoji, K. Shiraishi, Theoretical investigation for mechanism of DNA religation by E.coli topoisomerase IA, 第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館, 2011/09/23.
2. 庄司光男、近藤大生、花岡恭平、梁 文榮、梅田宏明、神谷克政、白石賢二、一酸化窒素還元酵素における基質結合状態についての理論的研究, 第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館, 2011/09/23.
3. K. Hanaoka, D. Kondo, M. Yang, K. Kamiya, M. Shoji, K. Shiraishi, Computational analysis for DNA religating reaction by E.coli topoisomerase IA, ISTCP-VII, Waseda, 2011/08/23.
4. M. Shoji, K. Hanaoka, M. Yang, D. Kondo, K. Kamiya, K. Shiraishi, A new procedure for the calculation of electron transfer coupling matrix element, ISTCP-VII, Waseda, 2011/08/23.

4. 連携・国際活動・社会貢献、その他

1. 庄司光男、花岡恭平、佐藤皓允、第 1 回つくば科学研究コンテスト、筑波大学大学会館、2012/3/17.
2. 庄司光男、Poster 展示、SC11, 2011/11/15.
3. 花岡恭平、Gromacs での分子動力学法 (MD) の入門 (基礎編)、公開講習会 (生命科学 WG)、CCS, 2011/10/27.
4. 庄司光男、生命科学研究分野研究紹介、物理チャレンジ (宮城県聖ウルスラ学院英智高等学校)、CCS 2011/9/1

5. 佐藤皓允、花岡恭平、庄司光男、大学説明会（物理学類）, 2011/8/27.
6. 朴泰祐, 佐藤三久, 塙敏博, 児玉祐悦, 高橋大介, 建部修見, 多田野寛人, 藏増嘉伸, 吉川耕司, 庄司光男, 「演算加速装置に基づく超並列クラスター HA-PACS による大規模計算科学」, 情報処理学会研究報告, 2011-HPC-130 (21), pp. 1-7, 2011 年 7 月.

III-2. 分子進化分野

1. メンバー

准教授 稲垣祐司 (生命環境系)

教授 橋本哲男 (共同研究員・生命環境系)

特任助教 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) クリプト藻類に近縁な真核微生物種の解析

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微生物 *Palpitomonas bilix* の網羅的発現遺伝子 (expressed sequence tag/EST) データを約 100 万リード・合計配列長 320 万塩基対を取得した。H22 年度に行った 159 遺伝子配列にもとづく分子系統解析では *P. bilix* はクリプト藻類との近縁性を示した。また *Palpitomonas* とは別の従属栄養性真核微生物であるカタブレファリス類もクリプト藻類に近縁であることが明確となったため、*Palpitomonas* の系統的位置を正しく推測するためにはカタブレファリス類を解析に含める必要が生じた。そこで H23 年度にはカタブレファリス類の一種

である *Roombia* sp. の大規模 EST 解析を行った。イルミナシークエンシングを用いたこの EST 解析により約 2 億塩基対の配列データを取得し、*Palpitomonas*・*Roombia* の両配列を含むデータセットの作成を開始した。H24 年度には大規模系統解析により、カタブレファリス類を含め *Palpitomonas* の系統的位置に関する最終的解析を行い、その結果を投稿論文に纏めることを開始する。

Palpitomonas・*Roombia* 等クリプト藻類に近縁な従属栄養性真核微生物に関する研究は、科学研究費補助金基盤研究 (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) の支援をうけた。

(2) 新奇真核生物種 *Tsukubamonas globosa* の解析

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微生物 *Tsukubamonas globosa* は、エクスカバータ生物群の Discoba と呼ばれるグループに含まれる。我々は、H23 年度までにカナダ・Dalhousie 大学の Andrew Roger 博士との共同研究として *Tsukubamonas* の EST 解析を行った。H23 年度には EST データを元に 159 遺伝子データを作成し大規模系統解析を行った。Discoba クレードはヤコバ類と盤状クリステ類 (ディスクリスタータ) の 2 つのサブクレードに分けることが、159 遺伝子解析では *Tsukubamonas* はそのどちらのグループにも含まれないことが分かった。従って Discoba クレード中の *Tsukubamonas* の位置は、①ヤコバ類の根元から分岐する、②盤状クリステ類の根元から分岐する、③Discoba クレードのもっとも祖先的な位置から分岐する、のいずれかであるはずである。しかし上記 3 つの分岐位置のうちどれが尤もらしいかは、159 遺伝子解析では明確にならなかった。単一遺伝子データを個別にチェックしたところ、多数のデータに遺伝子の水平移動、他生物の遺伝子配列の混入が見られた。H24 年度には、*Tsukubamonas* の系統的位置を確定するため使用する単一遺伝子データから系統解析の「ノイズ」をもたらす配列を削除し、再度 159 遺伝子データを解析する。

Discoba 生物群のサブグループ・ヤコバ類のミトコンドリア (mt) ゲノムは、一般の真核生物 mt にくらべより多くの遺伝子をコードしている。従って Discoba 生物群の mt ゲノムはもっとも原始的であるとも考えられ、mt ゲノムと真核生物の初期進化を考察する上で極めて重要である。H22 年度から、Discoba 生物群のメンバーである *Tsukubamonas* の mt ゲノムの完全解読を目指し実験を進め、部分ゲノム配列 (合計 4 万塩基対) を決定した。H23 年度はさらにゲノム解析を続け、mt ゲノムの完全解読に成功した。*Tsukubamonas* は 5 万 3 キロ塩基対の環状 mt ゲノムをもち、ユニークな遺伝子構成をしていた。例えばこれまでヤコバ類を含むごく一部の mt しかコードしていない翻訳伸長因子 Tu (*tufA*) や ATP 合成酵素サブユニット 3 (*atp3*) が *Tsukubamonas* mt ゲノムにコードされていた。またこれまで他の mt ゲノム上には確認されていないリボソームタンパク 36 (*rps36*) が *Tsukubamonas* mt ゲノム上に発見された。H24 年度には、*Tsukubamonas* mt ゲノムデータと大規模系統解析からの結果を合わせて投稿論文を作成する。

Tsukubamonas に関する研究は、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) の支援をうけた。

(3) フォルニカータ生物群に属する嫌気性真核微生物種の解析

「フォルニカータ生物群」とは、病原性真核微生物 *Giardia intestinalis* に代表されるディプロモナス類と「カルペディエモナス様生物 (*Carpediemonas*-like organisms or CLOs)」と総称される自由生活性真核微生物種とで構成される。*Giardia* は嫌気環境へ適応する過程で、好気性 mt を機能不明の mt 由来オルガネラ・ミトソームへと改変したが、その進化の詳細は未解明である。従って、通常の mt から *Giardia* ミトソームへの機能変化を高精度の推測するためには、ディプロモナス類と各種 CLOs との系統関係を明確にすることと共に、CLO の mt 由来オルガネラがどのような機能を持つかを解明する必要がある。そこでカナダ・Dalhousie 大学の Alastair Simpson 博士、Andrew Roger 博士と共同で、各種 CLO の EST データの取得とその解析を計画した。この計画では、EST データを基にした大規模系統解析によりフォルニカータ生物群内部系統を高精度に推測し、トランスクリプトームにより CLO の mt 由来オルガネラ機能の推定が可能となる。

H23 年度には、2 種の CLO 株・*Dysnectes brevis* と未同定 NY0171 株から mRNA サンプルを調製し、イルミナシーケンスに供した。H24 年度以降、カナダ側の EST データと統合することにより CLO の mt 由来オルガネラの機能を解明する。さらにフォルニカータ生物群内での mt 機能の進化を解明するため、大規模系統解析により推定した系統樹を基盤に *Giardia* ミトソームとの機能比較を実施する。

【2】新奇真核生物の発見 (稲垣・神川)

(1) 新奇アメーバ状真核微生物 “トヤマアメーバ”

H23 年度 7 月に富山県魚津市ミラージュランド付近の海岸で砂サンプルを採集した。この砂サンプルを粗培養し、新奇アメーバ状真核微生物 “トヤマアメーバ” を単離した。“トヤマアメーバ” から小サブユニットリボソーム RNA 遺伝子と熱ショックタンパク質 90kDa (Hsp90) 遺伝子を決定し系統解析したが、この生物種が真核生物のどの系統群に所属するかははっきりしなかった。H24 年度以降も光学・電子顕微鏡をもちいた形態観察と分子系統解析を継続し、“トヤマアメーバ” の系統的位置を探る。

(2) 光合成をしない珪藻 *Nitzschia* sp.

珪藻類の大多数は葉緑体を持ち光合成を行う。しかし *Nitzschia* 属珪藻類の一部は二次的に光合成能を失った従属栄養性種が知られている。H23 年度に沖縄県石垣島のマングローブ林で採集した落ち葉上から光合成をしない「無色」珪藻 *Nitzschia* sp. を単離し、培養株化することに成功した。H24 年度以降、電子顕微鏡観察により光合成能を失った葉緑体（白色体）の様態の観察、大規模配列解析による葉緑体ゲノム構造の解析や宿主（珪藻）細胞の EST 解析などを順次行ってゆく。

【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。H23 年度には、遺伝的アルゴリズムを用いて進化系統樹を最適化するプログラムを一通り完成させ、性能

評価として種々の配列データを用いたベンチマークテストを行った。またベンチマークの過程で明らかとなった改善点についてはプログラムの改良を行った。

(2) 最尤系統樹の信頼性評価バイアスの定量

通常分子系統解析では、ブートストラップ法により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。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と元データの最尤系統樹との間のトポロジカルな距離に依存し、系統樹の信頼性が過大あるいは過小評価されると予想できる。H22-23 年度にかけて、初期樹形と発見的樹形探索法がブートストラップ解析による出現確率に与えるバイアスの定量化を行った。

(3) 塩基組成の偏りがもたらすアーティファクト

一般に分子系統解析で用いられる“homogeneous”塩基置換モデルでは、配列間で塩基組成は大きく異なることを前提としている。しかし現実には生物種間、あるいは同一ゲノムの異なる領域間でも塩基組成が異なることがある。配列間の塩基組成が大きく異なる場合、homogeneous 置換モデルを適応した解析では、著しいモデル不整合が生じ、その結果誤った系統樹（アーティファクト）に導かれることが分かっている。この塩基組成の偏りに起因するアーティファクトを防ぐためには、これまでに大きく 2 種類の方法が提唱され、現存配列の解析に用いられてきた。すなわち、①配列データの 4 種類の塩基をピリミジン、プリンに書換えた後 homogeneous モデルで解析する RY コーディング解析と、②配列間の塩基組成の偏りを取り入れたより複雑な“non-homogeneous”モデル解析である。しかし、これまで RY コーディング解析や non-homogeneous モデル解析がどの程度の塩基組成の偏りに頑健であるか、シミュレーションデータを用いた検証は行われていなかった。

H23 年度には、塩基組成の偏りの程度を変えたシミュレーションデータを作成し、RY コーディング解析と non-homogeneous モデル解析の頑健性を詳細に検証した。その結果、両解析とも塩基組成の偏りに起因するアーティファクトを抑制することができるが、RY コーディング解析は配列の生成プロセスに依存してその頑健性が大きく変わることが明らかとなった。

3. 研究業績

(1) 研究論文

1. Matsumoto T, Shinozaki F, Chikuni T, Yabuki A, Takishita K, Kawachi M, Nakayama T, Inouye I, Hashimoto T, Inagaki Y. Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. 2011 **Protist** 162:286-276.
2. Yabuki A, Nakayama T, Yubuki N, Hashimoto T, Ishida K, Inagaki Y. *Tsukubamonas globosa* n. g., n. sp., a novel excavate flagellate possibly holding a key for the early evolution in “Discoba.” 2010 **Journal of Eukaryotic Microbiology** 58:319-331.
3. Matsumoto T, Ishikawa SA, Hashimoto T, Inagaki Y. A deviant genetic code in the green alga-derived plastid in the dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. 2011 **Molecular**

Phylogenetics and Evolution 60:68-72.

4. Ishitani Y, Ishikawa SA, Inagaki Y, Tsuchiya M, Takahashi K, Takishita K. Multigene phylogenetic analyses including diverse radiolarian species support the "Retaria" hypothesis-the sister relationship of Radiolaria and Foraminifera. 2011 **Marine Micropaleontology** 162:268-276.
5. Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. A novel spliceosome-mediated trans-splicing can change our view on the genome complexity of the divergent eukaryote *Giardia intestinalis*. 2011 **Biophysical Reviews** 3:193-197.
6. Kamikawa R, Inagaki Y, Roger AJ, Hashimoto T. Splintrons in *Giardia intestinalis*: Spliceosomal introns in a split form. 2011 **Communicative & Integrative Biology** 4:1-3.

(2) 学会発表 (発表者は太字)

(A) 招待講演 (すべて口頭発表)

1. Inagaki Y. Recent progress in placing newly-discovered lineages of protists in the deep tree of eukaryotes. 2011 年 8 月 6 日, CGAB (Center for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics) meeting, Dalhousie University, Halifax, Canada.
2. Yabuki A, Kamikawa R, Kolisko M, Ishikawa SA, Ishida K, Simpson AGB, Roger AJ, Inagaki Y. *Tsukubamonas globosa* is a deep-branching member in the Discoba clade: Morphology, phylogenomics, and mitochondrial genome. 2011 年 9 月 6-11 日, IUMS2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), 札幌コンベンションセンター, 札幌, 北海道.
3. **Kamikawa R**, Inagaki Y, Roger AJ, Hashimoto T. *Trans*-splicing of split introns is required for the expressions of indispensable genes in *Giardia intestinalis*. 2011 年 9 月 6-11 日, IUMS2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), 札幌コンベンションセンター, 札幌, 北海道.
4. 稲垣祐司、矢吹彬憲、神川龍馬. 新奇真核微生物からの大規模配列データで変貌し続ける、我々の真核生物大系統像. 2011 年 11 月 25 日, 第 31 回微生物系統分類研究会, 理化学研究所, 和光, 埼玉.
5. 稲垣祐司、中山卓郎、笠井文絵、大河内直彦. 珪藻細胞中の窒素固定に特化したオルガネラ「楕円体」: オルガネラ獲得過程理解にむけた新たなモデル. 2011 年 12 月 13-16 日, 第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.

(B) その他の学会発表

1. 稲垣祐司. 真核生物ゲノムの可塑性: 渦鞭毛藻類葉緑体関連遺伝子の起源を例に. (Oral) 2011 年 5 月 22-27 日, 日本地球惑星科学連合 2011 年大会 千葉・幕張メッセ国際会議場.

2. 中山卓郎、池上裕子、中山剛、井上勲、**稲垣祐司**、笠井文絵. Rhopalodia 科珪藻に見られる細胞内共生シアノバクテリアの起源と分子進化. (Poster) 2011 年 5 月 22-27 日, 日本地球惑星科学連合 2011 年大会 千葉・幕張メッセ国際会議場.
3. 矢崎裕規、神川龍馬、松本拓也、**橋本哲男**、**稲垣祐司**. 渦鞭毛藻 *Lepidodinium* 「葉緑体型」 GAPDH 遺伝子の転写活性比較. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
4. 西村祐貴、神川龍馬、**稲垣祐司**、**橋本哲男**. ミトコンドリア 7 遺伝子に基づくカタブレファリス類 *Leucocryptos marina* の系統的位置. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
5. 矢吹彬憲、神川龍馬、Martin Kolisko、石田健一郎、田辺晶史、**橋本哲男**、**稲垣祐司**. 159 遺伝子データに基づく従属栄養性真核微生物 *Palpitomonas bilix* の系統的位置. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
6. 神川龍馬、矢吹彬憲、Martin Kolisko、西村祐貴、石川奏太、石田健一郎、**橋本哲男**、Andrew J Roger、Alastair GB Simpson、**稲垣祐司**. *Tsukubamonas globosa* の Phylogenomic 解析と部分的ミトコンドリアゲノム配列. (Poster) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
7. 石谷佳之、石川奏太、**稲垣祐司**、土屋正史、瀧下清貴. 複数遺伝子解析により得られた放散虫と有孔虫の姉妹関係. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
8. 神川龍馬、**稲垣祐司**、Andrew J Roger、**橋本哲男**. 寄生性真核微生物 *Giardia* の縮退ゲノムにおける複雑な遺伝子発現. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
9. 神川龍馬、**稲垣祐司**. 真核生物における翻訳伸長因子 EF-1alpha および翻訳伸長因子様タンパク質 EFL の進化. (Poster) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
10. 松本拓也、神川龍馬、**橋本哲男**、**稲垣祐司**. 緑色渦鞭毛藻類 *Lepidodinium chlorophorum* が持つ共生体退化核遺伝子について. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
11. 小松崎洋志、瀧下清貴、Martin Kolisko、矢吹彬憲、雪吹直史、**稲垣祐司**、**橋本哲男**、Andrew J Roger、Alastair GB Simpson. ミトコンドリアをもたないプロティスト分類群 'Fornicata' の分子系統: 複数遺伝子に基づく解析. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会富山・富山・富山大.
12. 石川奏太、**稲垣祐司**、**橋本哲男**. Red vs. Green: Apicomplexa 類における退化型葉緑体 apicoplast の起源に関する分子系統学的研究. (Oral) 2011 年 7 月 11 日, 第 5 回日本進化原生生物学研究会

会富山・富山・富山大.

13. Kamikawa R, **Inagaki Y**, Roger AJ, **Hashimoto T**. Spliceosomal introns in a split form: Another aspect of intron evolution in eukaryotes. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
14. Nishimura Y, Kamikawa R, **Inagaki Y**, **Hashimoto T**. The phylogenetic position of the katablepharid *Leucocryptos marina* based on seven mitochondrial gene sequences. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
15. Yazaki Y, Kamikawa R, Matsumoto T, **Hashimoto T**, **Inagaki Y**. Difference in transcriptional regulation between two genes encoding plastid-targeted GAPDH in the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
16. Ishikawa S, Kamikawa R, **Inagaki Y**. Intragenomic gene conversion in the evolution of bacterial peptide-chain release factors. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
17. Tanabe AS, **Inagaki Y**, **Hashimoto T**, Tsuji M, Sato M. Effective bootstrapping: A new method for estimating accurate credibilities of splits on a phylogenetic tree. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
18. Komatsuzaki H, Takishita K, Kolisko M, Yabuki A, Roger AJ, Simpson AGB, **Inagaki Y**, **Hashimoto T**. Molecular phylogeny of the amitochondriate lineage, Fornicata, based on multi-gene analysis. (Poster) 2011 年 7 月 26-30 日, SMBE2011 京都・京都・京都大学.
19. 石谷佳之、石川奏太、**稲垣祐司**、土屋正史、瀧下清貴. (Oral) 複数遺伝子解析により明らかとなった放散虫と有孔虫の姉妹関係. 2011 年 10 月 29-30 日, 第 11 回放散虫研究集会 愛媛・松山・愛媛大学.
20. 長安英治、石川奏太、竹谷茂、**稲垣祐司**、吉田彩子、丸山治彦. 糞線虫の持つ細菌様フェロケラターゼ遺伝子の同定. (Oral) 2012 年 3 月 23-24 日, 第 81 回日本寄生虫学会大会 兵庫・西宮・兵庫県立大学.

4. シンポジウムの開催

なし