

V. 生命科学研究部門

生命科学研究部門は生命機能情報分野、および、分子進化分野の 2 つの研究分野からなり、それぞれ、第一原理計算や分子動力学計算に基づく原子レベルでの生体内分子の機能解析、真核生物系統間の遺伝情報系統解析を独立に行ってきた。H27 年度は定期的会合を行い、共同研究をスタートした。

以下では、それぞれの部門の業績を個別に示す。

V-1. 生命機能情報分野

1. メンバー

教授	重田 育照
助教	庄司 光男
助教	栢沼 愛
研究員	原田 隆平（学術振興会特別研究員）
研究員	佐藤 竜馬（7 月 1 日より）
学生	大学院生 2 名 （後期課程在学 1 名、前期課程在学 1 名（途中退学））、学類生 1 名

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タンパク質と核酸に注目し、その原子レベルで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。平成 27 年度には、光合成酸素発生中心(PSII-OEC)およびニトリルヒドラターゼにおける反応機構の解明を、高精度計算手法である量子/古典混合(QM/MM)法により行った。また、全原子分子動力学(MD)法により、タンパク質の折り畳み経路解析を行った。これらの研究には膨大な計算を高速に実行するため、スーパーコンピューター(HA-PACS, COMA)の効率的利用に取り組んだ。センター内の共同研究として宇宙物理研究部門、ならびに、高性能計算システム研究部門と連携し、それぞれアミノ酸生成過程、フラグメント分子軌道法の GPU 化に関する研究を推進した。

3. 研究成果

【1】タンパク質フォールディングを再現するシミュレーション手法の開発

[発表論文 1-8]

タンパク質フォールディングは「レアイベント」であり、通常の分子動力学(Molecular Dynamics: MD)シミュレーションが到達可能な時間スケールと比較して、長時間の確率過程において観測される。従って、従来の MD シミュレーションに基づきレアイベントを再現す

ることは、時間スケールの制約から困難な場合が多い。時間スケールの制約を打破するために、“ANTON”に代表される生体分子の分子動力学シミュレーション専用の汎用計算機の開発が急速に進んでおり、マイクロ秒からミリ秒に至るタンパク質フォールディングシミュレーションも実現可能になってきている。しかしながら、これらの高速計算機は誰もが利用出来る訳ではない。現状として、研究室レベルの計算機を用いてタンパク質フォールディングに至る時間スケールまで MD シミュレーションを実行することは、依然として困難である。故に、高速計算機に代わる戦略として、タンパク質のレアイベントを再現するためのシミュレーション手法の開発が必要である。

本研究では、汎用計算機を用いた長時間 MD シミュレーションを実行する代わりに、初期構造の異なる超並列な短時間 MD シミュレーションをカスケード的に実行する「カスケード型超並列シミュレーション」の概念に基づくシミュレーション手法(タンパク質構造探索法)を提案した[1-8]。本計算手法では、タンパク質の長時間ダイナミクスを直接追跡することは困難であるが、時間的制約によるタンパク質構造探索を打開することが可能である。何故ならば、複数の初期構造の異なる短時間 MD シミュレーションをリスタートさせることで、遷移確率を上昇させることが出来るからである。本研究では、カスケード型超並列シミュレーションを駆使し、タンパク質機能に重要なレアイベントを効率的に再現する計算手法を開発した。

カスケード型超並列シミュレーションに属するシミュレーション手法の例として、OFLOOD 法[8]の研究成果を記述する。OFLOOD 法では、タンパク質の状態分布に注目し、確率密度が疎な状態分布に着目する。一般的に、タンパク質の状態分布は反応座標により射影された構造空間における高次元構造分布として記述される。この高次元構造分布において、密な分布は出現確率が高いクラスタとして認識され、タンパク質の安定状態に対応する。これに対して、クラスタに属さない密度が疎な分布は、はずれ値(Outlier)と呼ばれ、遷移状態近傍に存在している可能性が高い。OFLOOD 法では、これら出現確率が低い Outlier に対応するタンパク質構造を構造リサンプリングの初期構造として選択し、短時間 MD シミュレーションに構造探索していくことで、構造遷移を促進する。Outlier を検出するために、タンパク質の高次元構造分布を階層的クラスタリング手法である「FlexDice」によりクラスタリングし、クラスタに属さない構造分布を求め、Outlier とした。Outlier は元々準安定状態間の遷移状態近傍に位置しているので、初期速度の再分配により運動エネルギーを与え直すことにより、容易に隣接する準安定状態に構造変化させることが出来る。計算手順としては、Outlier の構造リサンプリングにより得られたトラジェクトリを用いてタンパク質構造分布をアップデートし、Outlier を逐次検出していく。最終的に、考えている高次元構造空間におけるタンパク質状態分布が収束するまで Outlier の検出とその構造リサンプリングを繰り返す。

OFLOOD 法を用いた構造サンプリング効率の検証として、小タンパク質のフォールディング経路の再現を試みた。選択した小タンパク質は、汎用計算機 ANTON で用いられた中から選択した。その 1 例として、35 残基の Villin の計算結果について記述する。フォールディングシミュレーションの初期構造としては、完全に伸びきった変性構造をアミノ酸配列からモデリングし、タンパク質周りの溶媒効果は一般化ボルンモデルにより取り込んだ。反応座標として、天然構造の 2 次構造を参照構造とした部分的平均自乗距離(Root Mean Square Deviation: RMSD)を採用し、構造空間を定義した。この構造空間に構造サンプリングにより得られるトラジェクトリを射影し、構造分布を作成した後、FlexDice により Outlier を検出した。1 サイクルあたり 100 個の Outlier を検出し、初期構造あたり 100 ps の短時間 MD シミュレーションをリスタートさせた(サイクル当たりの計算コストは、10 ns: 100 初期構造 X100 ps)。計算結果として、50 サイクル(500 ns)以内で、Villin のフォールディング経路を再現することが出来た。特に、主フォールディング経路に加えて、先行研究では報告されていない副フォールディング経路の再現に成功した。計算コストとしては、ANTON を用いた長時間 MD シミュレーションではフォールディング経路の再現にマイクロ秒オーダーを要していたが、OFLOOD 法はナノ秒のオーダーでタンパク質フォールディングを再現することが出来た。

【2】三重項-三重項消滅に基づくフォトン・アップコンバージョン機構の理論的研究

太陽光エネルギーを利用した技術が多数開発されており、光触媒、光有機合成、太陽電池などである。しかし、既存の技術では幅広いスペクトル領域を有している太陽光のほんの一部しか利用できておらず、個々の技術においては決まった波長領域だけしか利用できていない。そこで、近年太陽光においてほとんど利用されていない、赤外・近赤外の光を利用しようとする試みが成されている。なかでも注目されているのがフォトン・アップコンバージョン(UC)である。UC とは、低エネルギー(長波長)の光を高エネルギー(短波長)の光に変換する方法である。この方法には複数あり二光子吸収、二段階励起、三重項-三重項消滅がある。二光子吸収、二段階励起は桁違いに強い励起光を必要とするため、今回の目的に即した方法ではない。一方、三重項-三重項消滅に基づくフォトン・アップコンバージョン(TTA-UC)は太陽光レベルの低い励起光を利用することができることから注目されている。TTA-UC はドナーである増感剤が光を吸収し励起一重項状態となり、その後項間交差により励起三重項状態となる。励起三重項状態のドナーからアクセプターである発光体へ三重項エネルギー移動が起こり、発光体が励起三重項状態となる。これと同じプロセスで別の発光体が励起三重項状態となり、それらが拡散・衝突することで、一方が励起一重項状態、もう一方が基底状態となる。これにより吸収光よりも高いエネルギーレベルのアップコンバージョン発光が起こる仕組みである。この方法を用いた技術の開発が進められているが空気中での反応効率など

に問題があり実用化に至っていない。そのため、反応機構を詳細に調べ実用化に向けた反応効率の向上が必要である。

本研究では現在最も研究の進んでいる溶液中における TTA-UC について研究を進めた。ドナーとしてオクタエチルポルフィリン (PtOEP)、アクセプターとして 9,10-ジフェニルアントラセン (DPA) および DPA の改良型 (二つのフェニル基をエーテル結合を介して炭素鎖 n のアルキル基で架橋: C n -DPA)、溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。この系に対する実験が行われ、反応効率が C7-sDPA > DPA > C8-sDPA > C6-sDPA の順であることが示された。しかし、C6-, C7-, C8-sDPA はそれぞれ同じようなアルキル鎖であるにもかかわらず反応効率に差が生じている原因については明らかとされていない。本研究では、それぞれの分子の特性および溶媒中におけるダイナミクスを分子シミュレーションを用いて解析した。

TTA-UC を引き起こすためには発光体の励起三重項状態のエネルギー (E_{T1}) の二倍が励起一重項状態のエネルギー (E_{S1}) よりも大きくなるエネルギー整合条件 ($\Delta E = 2 E_{T1} - E_{S1} > 0$) を満たす必要がある。そこで、第一原理電子状態計算を実行し、それぞれの分子で見積もった。その結果、すべての分子でエネルギー整合条件を満たすことが確認できた。しかし、分子同士に明確な差が確認できなかったことから、個々の分子の特性には明確な差がないと考えられる。そこで、溶媒中でのダイナミクスに差があることが反応効率に効いていると考え、溶媒中での分子動力学 (MD) シミュレーションを実行した。MD シミュレーションの結果から拡散係数を見積もった。その結果、拡散係数の大きさは DPA > C7-sDPA > C8-sDPA > C6-sDPA の順に大きいことがわかった。さらに TTA が起こる際に二つの分子間で電子交換機構が働く。そこで、電子交換の際の電子の移動速度を見積もった。電子移動速度定数を決定する物理量として電子カップリング (T_{DA}) があり、本研究では T_{DA} に着目して調べた。その結果、最も T_{DA} が大きくなる分子が C7-sDPA であることを明らかにした。このことから同じアルキル鎖を有する分子において反応効率が違う理由が、拡散係数および電子カップリングから説明することができた。

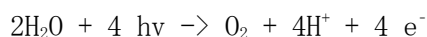
【3】ニトリルヒドラーゼ (NHase) の反応機構についての理論的研究 [発表論文 9]

NHase はニトリルを水和してアミドを生成 ($R-CN + H_2O \rightarrow R-CONH_2$) する酵素であるが、化学工業においてアクリルアミド等の合成に広く用いられている重要な生体触媒の一つである。NHase の反応機構の詳細に関しては、最近、K. H. Hopmann による先行理論研究、更に Y. Yamanaka らによる変異体 (β R56K) の時間分解 X 線結晶構造解析から、環状中間体が形成されることが示唆された。しかし、環状中間体形成後の反応機構に関しては、これまで 3 つの異なる経路が提唱されており、明らかになっていなかった。我々は、QM/MM 法により、環状中間体生成以降の想定される複数の反応機構の解析を行い、以下の機構であることを明らかにした。(1) β Tyr72 から基質に α Ser113 を経由してプロトン移動が起こり、 α Cys114-SO $^-$ の

S-O 結合が開裂すると同時に α Cys109 と α Cys114 の間に S-S 結合が生成、(2) 水分子が α Cys114 の硫黄原子と反応することでイミド酸生成と α Cys114 のシステインスルフェン酸の再生が起こり、(3) 活性中心あるいはタンパク質の外でイミド酸がアミドに異性化する。また、反応機構に深く関わる周辺アミノ酸残基 (β Arg56) の役割についても分子レベルで明らかにし、S-S 中間体の形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした [9]。

【4】光化学系 II 酸素発生中心(OEC)の反応機構についての理論的研究 [発表論文 12-16]

光合成は光エネルギーを化学エネルギーに効率的に変換するシステムであり、生命が作り上げた洗練された化学反応系とも言える。光合成反応は巨大な蛋白質複合体内で行われ、一連の化学反応：光捕集、電子伝達、ATP 生成と糖生成が行われる。電子伝達を担う光化学系 II では水を分解し、酸素分子を発生する以下の反応を触媒している。



この反応では化学的に安定な水から電子を引き抜いて(酸化して)いる事から分かるように、極めて難しいため、多くの反応制御がなされていると考えられる。そのため、これらの反応機構を明らかにする事は、生化学的重要性のみならず人工光合成の有益な設計指針を与えるものと期待される。

我々は最も初めの化学反応過程である S₂→S₃ 遷移を量子古典混合(QM/MM)法を用いて理論解析した[2, 6]。活性中心の Mn クラスターでの化学反応のみならず、Y161(Yz)に関連するプロトン共役電子移動も取り扱うため、Y161 も含む大きな QM 領域を用いて、反応経路探索を行った。その結果、Ca に配位する水(W3)が Mn(III)サイトに移動する 2 つの経路(L, R 反応)が存在する事を見いだした。中でも L 構造(L-opened structure)を経由する経路(L 経路)が R 反応経路よりもエネルギー障壁が低く、より好ましい事も明らかにした。

2015 年に PSII-OEC の Mn クラスター骨格を良く再現した (4 つの Mn 原子を持つ) モデル錯体が C. Zhang らにより合成がなされた。天然系(native OEC)とより詳しい比較を行うため、取りうる酸化状態での構造変化、電荷、スピン状態について詳しく理論解析を行った[3, 5]。モデル錯体は多くの物性が native OEC と極めて良く似ている事を明らかにしたが、少し違いも有る事も明らかになった。Native OEC とモデル錯体の構造を比較するとモデル錯体は Mn₃ と Mn₄をつなぐ酸素原子(O₄)が無い。理論モデルに O₄を導入すると native OEC により構造が近づくことから、O₄の導入がより正確なモデル錯体に重要である事を示した[13]。

【5】アミノ酸生成経路についての理論的検討 (宇宙生命分野)

宇宙分野での目覚ましい観測技術の向上により、宇宙(星間空間)でのアミノ酸検出が近年注目されている。隕石中での数種類にわたるアミノ酸の検出、電波観測による分子雲中のグリシン前駆体の発見、探査機 Stardust のサンプルリターンによる彗星中のグリシンの発見

等により、星間アミノ酸の存在が強く示唆されるようになった。一方で、その生成機構は不明な点が多く、観測されている星間分子からどのようにしてアミノ酸が作られるかは未だ謎が多い。我々は、これまでに提案されている生成経路を基に、反応物と生成物の安定性、および反応における遷移状態に関するエネルギー評価を行うことで、最も妥当なアミノ酸生成経路を理論的に推定した。特にアミノニトリルやヒダントインといった安定性の高い中間体を経由した加水分解反応によるアミノ酸生成と、反応活性の高いラジカル分子を用いた経路について、第一原理計算（密度汎関数法）による解析を行った。

その結果、前駆体の加水分解によるアミノ酸生成では、その反応エネルギー障壁は、60 kcal/mol 以上となり、触媒として水分子を加えたものでも 50 kcal/mol 程度となった。星間雲中のような極低温下ではこの程度のエネルギー障壁を熱揺らぎによって越えることは難しく、光輻射のような外部エネルギー供給による反応促進が必要となる。一方で、ラジカルを用いたグリシン生成機構ではその生成経路中における反応のエネルギー障壁が最大で 7.99 kcal/mol、最も低い経路では全体で 1.85 kcal/mol しかなく、星間ダスト上でも比較的起こりやすい生成経路である。このことから、星間分子としてのアミノ酸生成にはラジカルが強く関わることを計算科学的に解明した。本研究により星間アミノ酸の生成機構に対する詳細な反応エネルギープロファイルの構築に成功した。

【6】フラグメント分子軌道 (FMO) 法の GPGPU 化[研究論文 18]

GPU 等の演算加速装置を用いた高性能科学技術計算システムへの対応は、量子化学計算においても重要なトピックとなっている。これまでに我々は、大規模分子軌道計算の実現に向けてフラグメント分子軌道 (FMO) 計算プログラム実装の一つである OpenFMO の GPGPU 化に向けた開発を行ってきた。本年度の成果としては、フラグメント間の静電相互作用 (ESP) 計算の GPU 化である。ESP 計算のうち特に二つの近接フラグメント間の静電相互作用を計算する 4 中心フラグメント間クーロン相互作用計算 (4C-IFC) のアルゴリズム構成はこれまで GPU 化してきた Fock 行列計算と類似しており、その知見を大いに活用できる。平成 27 年度は、実装した GPGPU 化 OpenFMO の性能評価は筑波大学の HA-PACS ベースクラスタを用いて行った。8 ノードを利用してクランビン (642 原子、20 フラグメント) の FMO-HF/6-31G(d) 計算を実行した。比較のため CPU による直接計算の他、SCF (self consistent field) 中に積分を保存しておく in-core 手法も行っている。GPU 化により全ての計算過程で 3~4 倍の高速化となっており、計算全体としては 3.3 倍の高速化を実現している。

4. 教育

【卒業研究】

坂本航太郎、「伸長因子 EF-1 の立体構造に関する理論的研究」

【講義】

重田育照、計算物理学 2、物理学類専門科目、春 ABC

重田育照、計算物理学 3、物理学類専門科目、秋 ABC

庄司光男、生物物理学、物理学類専門科目、春 ABC

【集中講義】

重田育照、「量子化学に基づく化学反応理論」“大学院講義反応量子化学”、14th-15th Jan. 2016、名古屋大学大学院理学研究科。（8 コマ）

重田育照、“大学院講義”、June 22nd 2015、徳島大学大学院薬学研究科。（1 コマ）

5. 受賞、外部資金、知的財産権等

(1) 受賞

1. 栢沼愛、第一回黒田チカ賞、2016 年 1 月.
2. 佐藤皓允（博士後期課程 2 年）、ポスター賞（物理化学部門優秀賞）、CSJ 化学フェスタ 2015、2015 年 11 月.
3. 庄司光男、新学術領域 3D 活性サイト科学第二回成果報告会 講演賞（大門賞）、2015 年 9 月.

(2) 外部資金

【研究代表者】

1. 新学術領域研究「複合光応答」計画研究、重田育照（代表者）（平成 26～30 年度）
「実験と理論の協奏的アプローチによる多重スピン励起子変換制御」 金額（H27 年度）：（直）11,600,000 円（間）3,480,000 円
2. 基盤研究 C：庄司光男（代表者）（平成 26 年～28 年度）「トレオニン合成酵素の全反応機構の理論的解明」 金額（H27 年度）：（直）600,000 円 （間）180,000 円
3. 若手研究（B）：原田隆平（研究代表者）（平成 26 年～27 年度）「タンパク質構造揺らぎに基づく構造変化予測法の構築」 金額（H27 年度）：（直）900,000 円 （間）270,000 円

【分担研究者】

1. 挑戦的萌芽研究：重田育照（分担者）（代表者：岡野泰則 大阪大学教授）（平成 27～28 年度）「メゾスケール空間内移動速度論創成のための挑戦的研究」 金額（H27 年度）：（直）400,000 円（間）120,000 円
2. 特別推進研究：庄司光男（分担者）（代表者：沈建仁 岡山大学教授）（平成 24～28

年度)「光合成系 II における水分解反応の学理解明」金額(H27 年度):(直)2,500,000 円 (間) 750,000 円

6. 研究業績

(1) 研究論文

A) 査読付き論文

1. R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, “TaBoo SeArch (TBSA) algorithm with a modified inverse histogram for reproducing biologically relevant rare-events of proteins”, *Journal of Chemical Theory and Computation* **12**, 2436–2445 (2016), DOI:10.1021/acs.jctc.6b00082.
2. R. Harada, T. Nakamura, Y. Shigeta, “Sparsity-weighted Outlier FLOODing method” *Journal of Computational Chemistry* **37**, 724-738 (2016), DOI:10.1002/jcc.24255.
3. R. Harada, A. Kitao, “Non-targeted Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics for Enhancing the Conformational Sampling of Proteins” *Journal of Chemical Theory and Computation* **11**, 5493-5502 (2015), DOI:10.1021/acs.jctc.5b00723.
4. R. Harada, T. Nakamura, Y. Shigeta, “Automatic Detection of Hidden Dimension in OFLOOD Method” *Chemical Physics Letters* **639**, 269-274 (2015), DOI: 10.1016/j.cplett.2015.09.031.
5. R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, “Efficient Conformational Sampling of Proteins based on a Multi-Dimensional Inverse Histogram: an Application to Folding of Chignolin in Explicit Solvent” *Chemical Physics Letters* **630**, 68-75 (2015), DOI:10.1016/j.cplett.2015.04.039.
6. R. Harada, Y. Takano, T. Baba, Y. Shigeta, “Simple, yet Powerful for Conformational Sampling of Proteins” *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 6155-6173 (2015), *invited as a feature article*, DOI: 10.1039/C4CP05262E.
7. R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, “Enhanced Conformational Sampling Method for Proteins on the TaBoo SeArch algorithm: Application to the Folding of a Mini-Protein Chignolin” *Journal of Computational Chemistry* **36**, 763-772 (2015), DOI: 10.102/jcc.23854.
8. R. Harada, T. Nakamura, Y. Takano, Y. Shigeta, “Protein Folding Pathways Extracted by OFLOOD Method” *Journal of Computational Chemistry* **36**, 97-102 (2015), DOI: 10.1002/jcc.23773.

9. M. Kayanuma, M. Shoji, M. Yohda, M. Odaka, Y. Shigeta, “Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase Subsequent to Cyclic Intermediate Formation: A QM/MM Study”, *The Journal of Physical Chemistry B* **123**(13), 3259-3266 (2016), DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11363.
10. M. Kayanuma, T. Stoll, C. Daniel, F. Odobel, J. Fortage, A. Deronzier, M.-N. Collomb, “A computational mechanistic investigation of hydrogen production in water with the $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]^+ / [\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /ascorbic acid photocatalytic system”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 10497-10509 (2015), DOI: 10.1039/C4CP04949G.
11. T. Stoll, C. E. Castillo, M. Kayanuma, M. Sandroni, C. Daniel, F. Odobel, J. Fortage, M.-N. Collomb, “Photo-induced redox catalysis for proton reduction to hydrogen with homogeneous molecular systems using rhodium-based catalysts”, *Coordination Chemistry Reviews* **304**, 20-37, (2015), DOI:10.1016/j.ccr.2015.02.002.
12. M. Shoji, H. Isobe, K. Yamaguchi, “QM/MM Study of the S2 to S3 Transition Reaction in the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II”, *Chemical Physics Letters* **636**, 172-179 (2015), DOI:10.1016/j.cplett.2015.07.039.
13. M. Shoji, H. Isobe, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, “Geometric and electronic structures of the synthetic Mn_4CaO_4 model compound mimicking the photosynthetic oxygen-evolving complex”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 11330-11340 (2016), DOI: 10.1039/C5CP07226C.
14. M. Shoji, M. Kayanuma, H. Umeda, Y. Shigeta, “Performance of the divide-and-conquer approach used as an initial guess”, *Chemical Physics Letters* **634**, 181-187 (2015), DOI:10.1016/j.cplett.2015.06.011.
15. M. Shoji, H. Isobe, T. Nakajima, K. Yamaguchi, “Full Geometry Optimizations of the CaMn_4O_4 Model Cluster for the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II”, *Chemical Physics Letters* **640**, 23-30 (2015), DOI:10.1016/j.cplett.2015.10.006.
16. H. Isobe, M. Shoji, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, “Chemical Equilibrium Models for the S3 State of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II”, *Inorganic Chemistry* **55**(2), 502-511(2015), DOI:10.1021/acs.inorgchem.5b02471.
17. K. Hanaoka, W. Tanaka, M. Kayanuma, M. Shoji, “A QM/MM study of the 5'-AMP DNA hydrolysis of aprataxin”, *Chemical Physics Letters* **631-632**, 16-20 (2015), DOI:10.1016/j.cplett.2015.04.053.

18. 梅田宏明、塙敏博、庄司光男、朴泰祐、重田育照、“OpenFM0 における 4 中心クーロン相互作用項計算の GPGPU 化の試み”、*Journal of Computer Chemistry Japan (invited letter)* **14**, 69-70(2015). DOI: 10.2477/jccj.2015-0041.
19. S. Maekawa, R. Sato, K. Hirao, Y. Shigeta, “Solvent effects on excited-state electron-transfer rate of pyrene-labeled deoxyuridine: a theoretical study”, *Chemical Physics Letters* **644**, 25-30 (2016). DOI:10.1016/j.cplett.2015.11.037.
20. S. Maekawa, T. Matsui, K. Hirao, Y. Shigeta, “A Theoretical Study on Reaction Mechanisms of Nitrite Reduction in Copper Nitrite Complexes as Models for the Copper Nitrite Reductase”, *Journal of Physical Chemistry B* **119**, 5392-5403 (2015). DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01356.

B) 査読無し論文

なし

(2) 国際会議発表

A) 招待講演

1. Y. Shigeta, “Theoretical design of photochemical properties of diarylethenes”, *International Mini-Symposium on Fundamentals and Applications of Photosynergetic Excitations*, AIST Osaka center Mar. 15th 2016, Osaka, Japan.
2. Y. Shigeta, “Inverse Histogram-based Sampling Algorithm for Protein-folding Problems”, *The Seventh Asia-Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC 7)*, Jan. 25th-28th 2016, Kaohsiung, Taiwan.
3. R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, “Simple, yet powerful conformational sampling methodologies for proteins”, Symposium #98 ‘Conformational Dynamics of Biomolecules and the Biomolecule-Solvent Interface’ *Pacificchem 2015*, Dec. 15th-20th 2015, Hawaii, USA.
4. Y. Shigeta, “Theoretical studies on triplet-triplet annihilation processes of diphenylanthracene derivatives in solution”, *Symposium #44 Modeling and Analyzing Exciton and Charge Dynamics in Molecules and Clusters’ Pacificchem 2015*, Dec. 15th-20th 2015, Hawaii, USA.
5. Y. Shigeta, “Molecular Design for Optical Properties of Diarylethenes”, *Energy, Materials, Nanotechnology (EMN) Bangkok meeting*, Nov. 10th-13th 2015, Bangkok, Thailand.
6. Y. Shigeta, “Simple Conformational Search Algorithms For Protein Folding”, 6th

Czech-Slovakia-Japan Theoretical Chemistry meeting, Oct. 11th-14th 2015, Bratislava, Slovakia.

7. 庄司光男、“光化学系 II の酸素発生中心の電子状態”、総会シンポジウム、第 53 回生物物理学会、2015/9/14.
8. M. Shoji, “QM/MM study on the possible reactions of Photosystem II oxygen evolving complex in the S2 to S3 transition”, *AWEST2016*, Awaji island Conference, Hyogo, 2015/6/14-15.
9. M. Shoji, “Possibilities of Glycine formation in interstellar medium”, *Symposium on Hierarchy and Holism in Natural Sciences*, National Astronomical Observatory of Japan, 2016/2/5.

B) 一般講演

1. Y. Shigeta, K. Kamiya, T. Baba, M. Boero, “An Integrated Approach for Analyzing Mutational Effects on Enzymatic Reactions of Nylon Oligomer Hydrolase (NylB)”, *20th Quantum Systems Chemistry, Physics, and Biology*, September 14th-20th, Varna, Bulgaria.
2. M. Kayanuma, M. Shoji, Y. Shigeta, “A QM/MM study of catalytic mechanism of nitrile hydratase”, *The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan*, Kanazawa University, oral, 2015/9/13.
3. M. Kayanuma, M. Shoji, Y. Shigeta, “Theoretical study on the reaction mechanism of nitrile hydratase”, *Kyoto University*, Kyoto, 2016/3/17.
4. M. Shoji, Y. Ujiie, M. Kayanuma, Y. Shigeta, T. Murakawa, H. Hayashi, “Theoretical elucidation on the molecular mechanism of product assisted catalysis of threonine synthase”, *The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan*, Kanazawa University, 2015/9/14.
5. M. Shoji, Y. Ujiie, R. Harada, M. Kayanuma, Y. Shigeta, T. Murakawa, H. Hayashi, “Molecular dynamics study on the key catalytic intermediates of threonine synthase”, *29th Annual Symposium of the Protein Society*, Barcelona, Spain, poster, 2015/7/22-25.
6. M. Shoji, “QM/MM Study on the Reaction Mechanism of Assimilatory Nitrite Reductase (aNiR)”, *Metals in Biology in Wako*, (poster+2 min's talk), 2015/6/16-17.

(3) 国内学会・研究会発表

A) 招待講演

1. 重田育照、“ナノバイオ系のシミュレーションとダイナミクス：その後の展開”、
「量子化学の最近の進展- 大規模・複雑系の量子化学シミュレーション -」、Mar.
23rd 2016、AICS、兵庫.
2. 重田育照、“分子動力学法と情報科学の融合によるタンパク質の構造探索”、「分子
技術と理論計算・データ科学」大阪大学未来研究分子技術イニシアティブセミナー、
Mar. 14th-15th 2016、大阪大学豊中キャンパス、大阪
3. 重田育照、“第一原理計算に基づく物質の起源と生命痕跡の探求”、シンポジウム
「宇宙惑星居住の実現に向けて - 生命維持, 食糧生産, エネルギー・資源開発 等
-」、化学工学会第 81 年会、Mar. 13th-15th 2016、関西大学千里山キャンパス、大
阪.
4. 重田育照、“化学における動力学と統計について”、研究交流会「理論分子科学・
分子非線形科学のこれまでとこれから」、東京大学駒場リサーチキャンパス、Mar.
5th-6th 2016、東京.
5. 重田育照、“レアイベントとしてのタンパク質の構造変化と機能”、タンパク研セ
ミナー「構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題」、東京大学 先端科学
技術研究センターENEOS ホール、Mar. 1st-2nd 2016、東京.
6. 重田育照、神谷克政、“理論研究によるチトクロム *c* 酸化酵素の酸化還元と共役し
たプロトン輸送機構：入り口と出口”、生物物理学会シンポジウム「膜を介したプ
ロトン透過機構」、Sep. 13th-15th 2015、金沢、石川.
7. 重田育照、“理論計算に基づくタンパク質の反応性と物性の解析”、「2015 年度第
1 回水和ナノ構造研究会」、Sep. 1st-2nd 2015、那須、栃木.
8. 重田育照、“第一原理計算に基づく酵素機能解析：チトクロム *c* 酸化酵素のプロト
ンポンプを例として”、東京大学物性研究所 「機能物性融合科学シリーズ(3)「反
応と輸送」」、Jun. 24th-26th、柏、千葉.
9. 重田育照、神谷克政、“チトクロム *c* 酸化酵素におけるプロトン輸送の構造的仕掛
け”、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」、Apr. 20th-21st
2015、分子研、愛知.
10. 庄司光男、“NTChem による光合成酸素発生中心の電子状態解析”、第五回 NTChem ワ
ークショップ、秋葉原 UDX6 階カンファレンス、2016/3/9.
11. 原田隆平、“Simple yet Powerful Conformational Sampling Methods for Reproducing
Biologically Rare Events”、生物物理学会シンポジウム「生体分子に関するレ
アイベントの探究」、第 53 回生物物理学会年会、金沢大学、石川、2015/9/15.

12. 原田隆平、 “カスケード型超並列シミュレーションを用いた生物学的レアイベント探索手法の開発”、 第 2 回凝縮系の理論化学、琉球大学、沖縄、2016/3/10.

B) その他の発表

1. 栢沼愛、庄司光男、重田育照、“ニトリル水和酵素の触媒機構に関する理論的研究”、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学、京都、口頭、2016/3/27.
2. 栢沼愛、庄司光男、重田育照、“QM/MM 法によるニトリル水和酵素の触媒機構の解析”、生体分子科学討論会 2015、高崎シティーギャラリー、群馬、口頭、2015/6/13.
3. 庄司光男、“宇宙空間におけるアミノ酸生成反応についての理論的研究”、第 3 回キラル研究会、京都大学、京都、口頭発表、2015/11/28.
4. 庄司光男、磯部寛、山口兆、重田育照、鷹野優、“光化学系 II 酸素発生中心の S2→S3 状態変化についての理論的解明”、3D active site、第 2 回成果報告会、筑波山京成ホテル、茨城、口頭+Poster、2015/9/4-5.
5. 庄司光男、栢沼愛、重田教育照、長友重紀、長井雅子、“ヘム蛋白の特異的円二色性(Soret 帯 CD)についての理論的解明”、蛋白質科学会、あわぎんホール、徳島、ポスター、2015/6/24-26.
6. 張致遠、原田隆平、栢沼愛、庄司光男、○重田育照、“主成分解析に基づくエントロピー計算に関する一考察”、第 18 回理論化学討論会 2015、大阪大学、大阪、口頭、2015/5/20-22.
7. 庄司光男、栢沼愛、梅田宏明、重田育照、“分割統治法を用いた初期電子密度行列の構築、第 18 回理論化学討論会 2015、大阪大学、大阪、ポスター、2015/5/20-22.
8. 栢沼愛、庄司光男、重田育照、“ニトリル水和酵素の触媒機構に関する理論的研究”、第 18 回理論化学討論会 2015、大阪大学、大阪、ポスター、2015/5/20-22.
9. M. Shoji, H. Isobe, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, “Electronic structure analysis on the synthetic model (Mn4CaO4) of the photosynthetic oxygen evolving complex”、日本化学会春季年会、同志社大学、京都、口頭、2016/3/27.
10. 庄司光男ら、“宇宙空間でのアミノ酸生成反応機構についての理論的研究”、日本天文学会 2016 年春季年会、首都大学東京、東京、口頭、2016/3/15.
11. 庄司光男、佐藤皓允、佐藤竜馬、原田隆平、栢沼愛、重田育照、“分割統治法を用いた初期電子密度行列の効率的作成”、蛋白質研セミナー、東京大学先端科学研究センター、東京、ショートトーク+ポスター、2016/3/1-2.
12. 佐藤竜馬、鎌田賢司、岸亮平、中野雅由、重田育照、“三重項-三重項消滅光アップコンバージョンの反応機構の理論的研究”、第 29 回分子シミュレーション討論会、朱鷺メッセ、新潟、口頭、2015/11/30-12/2.

13. 佐藤竜馬、鬼頭（西岡）宏任、安藤耕司、重田育照、倭剛久、“光回復酵素における電子移動経路解析”、蛋白研セミナー、東京大学先端科学研究センター、東京、ポスター、2016/3/1-2.
14. 佐藤皓允、庄司光男、重田育照、白石賢二、矢花一浩、梅村雅之、“星間空間での光反応によるL型アミノ酸過剰生成の計算科学的検証”、第3回キラル研究会、京都大学、口頭、2015/11.
15. 佐藤皓允、庄司光男、重田育照、“アミノ酸過剰生成の起源についての理論解析”、大阪大学蛋白質研究所セミナー、東京大学 先端科学技術研究センター、ポスター、2016/3.
16. 佐藤皓允、庄司光男、重田育照、“L型アミノ酸過剰生成の起源についての計算化学的解析”、第5回CSJ化学フェスタ2015、タワーホール船堀、ポスター、2015/10.
17. 原田隆平、鷹野優、重田育照、“逆状態分布に基づく効率的タンパク質構造サンプリング手法の開発”、第29回分子シミュレーション討論会、朱鷺メッセ、新潟、ポスター、2015/11/30-12/2.
18. 原田隆平、鷹野優、重田育照、“レアイベント探索手法”OFL00D”で解明するタンパク質フォールディング機構”、第15回日本蛋白質科学会年会、あわぎんホール、徳島県、ポスター、2015/6/24-6/26.

(4) 著書、解説記事等

1. R. Harada, Y. Inagaki, Y. Shigeta, “Protein Folding and Evolution”, Materials Science and Engineering, Article ID: Protein Folding and Evolution/00999 Elsevier.

7. 異分野間連携・国際連携・国際活動等

1. 宇宙・生命・物性分野間連携（宇宙生命）
宇宙空間でのL-アミノ酸生成に関する研究を物性・宇宙分野と連携して進展させた.
2. 生命情報・分子進化学分野間連携
伸長因子 EF-1 の立体構造に関する理論的研究を分子進化学分野と連携して進展させた.
3. 生命-高性能計算システム研究部門連携
フラグメント分子軌道法の GPU 化を高性能計算システム研究部門と連携して進展させた.

8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

1. 重田育照、研究交流会「理論分子科学・分子非線形科学のこれまでとこれから」、

2016. 3. 5-3. 6.

2. 重田育照、「構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題」大阪大学蛋白研セミナー、2016. 3. 1-3. 2.

9. 管理・運営

1. 重田育照、分子科学会 速報配信担当、2015/09/01-2016/08/31
2. 重田育照、水和ナノ構造研究会委員(平成 27 年度-)、ATI-公益財団法人新世代研究所.

10. 社会貢献・国際貢献

11. その他

【産学連携：3 件】

1. 重田育照、原田隆平、庄司光男、谷口岳志氏(株式会社MCHCR&Dシナジーセンター)との共同研究(受託 30万 受け入れ)
2. 重田育照、原田隆平、中村朋健(富士通株式会社)との共同研究.
3. 庄司光男、阿部幸浩氏(東洋紡)への学術指導.

【特許出願：3 件】

1. 名称：情報処理、シミュレーションプログラムおよびシミュレーション方法
発明者：中村朋健、重田育照、原田隆平
出願人：富士通、筑波大学
出願番号：2015-032321
出願年月日：2015/02/20
2. 名称：情報処理装置、シミュレーション方法、およびシミュレーションプログラム
発明者：中村朋健、重田育照、原田隆平
出願人：富士通、筑波大学
出願番号：2015-156702
出願年月日：2015/08/07
3. 名称：情報処理装置、指標次元抽出方法、および指標次元抽出プログラム
発明者：中村朋健、重田育照、原田隆平
出願人：富士通、筑波大学
出願番号：2015-156703
出願年月日：2015/08/07

V-2 分子進化分野

1. メンバー

准教授	稲垣 祐司（センター勤務・生命環境系）
研究員	中山 卓郎
教授	橋本 哲男（共同研究員・生命環境系）
特任助教	谷藤 吾朗（生命環境系）
研究員	石川 奏太（生命環境系）
学生	大学院生 8 名（後期課程在学 4 名、前期課程在学 4 名）、学類生 1 名

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】新奇真核微生物の発見 …… 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微生物を単離・培養株化する。

【2】各種トランスクリプトーム・ゲノム解析 …… 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進めている。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す。

【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。また、現状では超並列計算機上で効率よく作動する解析プログラムも十分に普及しているとは言えない。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、方法論的研究と系統解析プログラムの並列化を行っている。

3. 研究成果

【1】大規模配列データに基づく真核生物大系統の推測

H25 年度末には、我々の研究グループが単離・同定し、正式に記載した *Tsukubamonas globosa* の大規模分子系統解析とミトコンドリアゲノムの完全解読結果を *Genome Biol Evol* 誌に (Kamikawa et al. 2014 *Genome Biol Evol* 6:306-315)、H26 年度初めには *Palpitomoans bilix* の大規模分子系統解析の結果を *Sci Rep* 誌に発表した (Yabuki et al. 2014 *Sci Rep* 4:4641)。これまでのところ未発表ではあるが、系統的帰属が未解明な真核微生物 (*Microheliella*

maris および *Rigifila ramosa*) をはじめホヤ病原性寄生原虫 *Azumiobodo hoyamushi* など解析し、現在論文執筆あるいは執筆準備中である。今回は、H25 年度から継続して解析を進めている新奇真核微生物 PAP020 株の系統的位置に関する大規模分子系統解析と、H26 年度から解析準備を開始した SRT308 株の系統的位置に関する大規模分子系統解析の進捗を報告する。

(1) 新奇真核微生物 PAP020 株の系統的位置の推測

新奇真核微生物 PAP020 株は、筑波大・白鳥峻志氏によりパラオ共和国のマングローブ林の底泥から単離された嫌気／微好気性真核微生物である。顕微鏡観察と小サブユニットリボソーム RNA 配列に基づく系統解析では、PAP020 株と既知の真核生物との間に明らかな近縁性は示唆されなかった。そこで H25-26 年度では、PAP020 株から Illumina Hi-seq2000 によるトランスクリプトームデータを取得し、そのデータを基盤とした予備的な大規模分子系統解析を行った。H27 年度には、前年度実施した予備解析には含まれなかったが、PAP020 株の系統的位置解明のカギを握るカルペディエモナス様生物群 (CLOs) をふくむ 148 遺伝子から構成されるアライメントデータを作成した。この解析では、予備解析では不明だった PAP020 株、既知の CLOs、ディプロモナス類との間の系統関係を厳密に検討した。この大規模分子系統解析の結果、先行研究でのディプロモナス類と CLOs との近縁性が復元され、PAP020 株はディプロモナス類と CLOs が形成する「フォルニカータ」クレードの基部から分岐し、この系統関係はブートストラップ値 100% で支持された (図 1)。この解析は H27 年度の筑波大学計算科学研究センター学際共同利用プログラム REALPHYL (15a18 ; 代表・稲垣祐司) によりサポートされた。

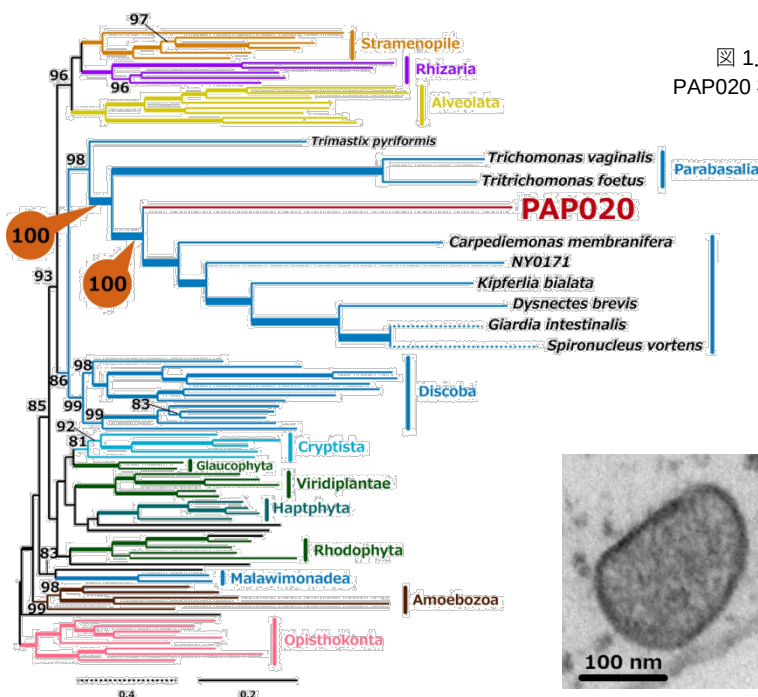


図 1. 148 遺伝子データに基づく PAP020 株の系統的位置。

フォルニカータ
クレード

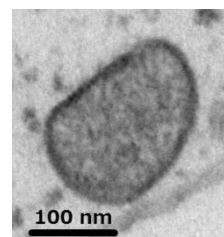


図 2. PAP020 株の縮退ミトコンドリアと考えられる構造。
写真提供：白鳥峻志 (筑波大)

本解析結果から、①PAP020 株がこれまで認識されていなかった祖先的フォルニカータ生物である、あるいは②フォルニカータ生物群と近縁だがこれまで認識されていなかった系統群が存在し、PAP020 株はその新奇系統群に含まれるという 2 つの可能性が示唆された。フォルニカータクレードにふくまれる生物は、いずれも嫌気性あるいは微好気性であり、構造・機能ともに縮退したミトコンドリアをもつ。電子顕微鏡観察では PAP020 株細胞内に縮退ミトコンドリアと思しき構造が観察された (図 2)。そこで、PAP020 株の縮退ミトコンドリアの代謝機能を予測するためトランスクリプトーム解析をやり直す。最終的に、148 遺伝子データから推測された系統的位置と縮退ミトコンドリア機能を合わせて、論文作成に取り掛かる。

(2) 新奇真核微生物 SRT308 株の系統的位置の推測

新奇真核微生物 SRT308 株は、筑波大・白鳥峻志氏によりパラオ共和国で採取された海水サンプルから単離された好気性真核微生物である。予備的な顕微鏡観察で把握された形態的特徴、リボソーム RNA 遺伝子配列に基づく系統解析では、この生物の系統的位置を確定することはできなかった。我々は H26 年度に SRT308 株のトランスクリプトームデータを取得し、系統的位置を確定するための大規模分子系統解析の準備を進め、H27 年度は 116 遺伝子データを予備的に解析した。この系統解析で SRT308 株は、キネトプラスチダ類、ディプロネマ類、ユーグレナ類から構成されるユーグレノゾア生物群の基部から分岐した。H28 年度の筑波大学計算科学研究センター学際共同利用プログラム REALPHY (16a25 ; 代表・稲垣祐司) により、SRT308 株の系統的位置をさらに検証してゆく。

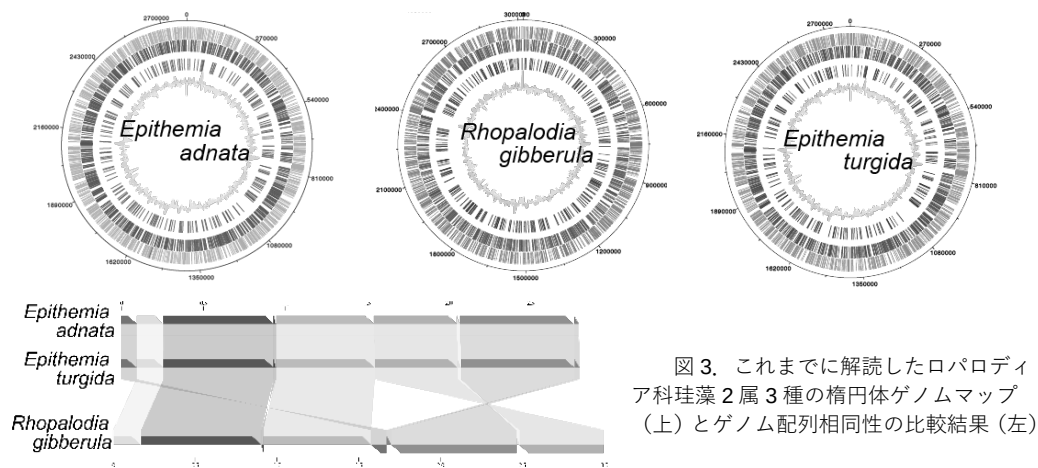
【2】各種トランスクリプトーム・ゲノム解析

(1) ロパロディア科珪藻細胞内のシアノバクテリア共生体 (橢円体) のゲノム解読

ロパロディア科珪藻は、ミトコンドリアや色素体に加え、独自のシアノバクテリア共生体を保持する (橢円体, spheroid body)。橢円体は窒素固定能力を持ち、窒素化合物を宿主細胞に供給していると考えられてきた。また橢円体は珪藻細胞外では生育できず、珪藻細胞の分裂とともに娘細胞に受け継がれる。しかし、橢円体が珪藻細胞にどの程度統合されているのか詳細は不明であり、我々はゲノム情報を軸に、珪藻と橢円体の共生関係機構の解明を目指している。これまでに我々はロパロディア科珪藻 *Epithemia turgida* (Nakayama et al. 2014 *Proc Nat Acad Sci USA* 111:11407-11412) および *Rhopalodia gibberula* の橢円体ゲノム全塩基配列を決定することに成功している。予備的な比較解析により 2 つの橢円体ゲノム間には明らかな違いがみられ、ロパロディア科珪藻の種間で橢円体ゲノム配列に進化的多様性があることが示唆された (中山・稲垣 ; 未発表データ)。

H27 年度においては、さらに別のロパロディア科珪藻種 *Epithemia adnata* の橢円体ゲ

ノム配列 (2.79M 塩基対) の解読・アノテーションを完了させ、計 3 種における楕円体間の詳細なゲノム比較解析を行なった (図 3)。比較した 3 種 (*E. adnata*、*E. turgida* および *R. gibberula*) 全ての楕円体ゲノムにおいて、光化学系複合体タンパク質遺伝子がほとんど確認できなかったことから、光合成能の欠失は *Rhopalodia* 属、*Epithemia* 属の分岐以前に起こったことが示唆された。一方、*R. gibberula* 楕円体ゲノムには *Epithemia* 属の楕円体ゲノムからは既に失われたビタミン B₁₂ 生合成経路やクロロフィル生合成経路の酵素遺伝子が複数同定され、*Epithemia* 属の楕円体ゲノムは、より縮退的であることが示された。さらに、*Epithemia* 属楕円体ゲノムの遺伝子は *R. gibberula* 楕円体遺伝子に対して比較的高い非同義置換率をもっていたことから、楕円体ゲノムは宿主珪藻の系統間において遺伝子進化速度に違いが見られることが示された。



H27 年度では、珪藻細胞がどのように細胞内共生体である楕円体を制御しているかの分子的知見を得るため、*Epithemia adnata* の核ゲノムにコードされているタンパク質遺伝子の解析を行い、楕円体の制御に関わるとみられる遺伝子の探索を行なった。次世代 DNA シーケンサー Illumina MiSeq を用いて、比較的小規模 (合計約 800 M 塩基対) のトランスクリプトームデータを取得し、そこから 48,538 タンパク質配列を推定した。これらのタンパク質について、配列相同性検索および分子系統解析を用いて進化的起源の推定を行なったところ、5 種類のタンパク質遺伝子がシアノバクテリアから遺伝子の水平転移によって獲得されたことが示唆された。系統解析の結果に基づけば、これらのタンパク質は楕円体の祖先とは異なる系統のシアノバクテリアから獲得されたと考えられるが、そのうち 2 つの遺伝子は珪藻細胞内において楕円体特異的に局在するペプチドグリカン壁の代謝に関わるものであり、これらの遺伝子が楕円体の制御に関わっている可能性がある。今後は、*Epithemia turgida* の核ゲノム解析を行い、より網羅的な楕円体制御遺伝子の探索を行う予定である。

(2) 光合成性真核微生物の色素体ゲノム解析

我々は渦鞭毛藻における葉緑体置換、二次的な光合成能の欠失に伴う色素体ゲノム進化に興味を持ち、各種の真核藻類の色素体ゲノム解読を行っている。

H26 年度に解読した非光合成性珪藻 *Nitzschia* sp. NIES-3581 株の色素体ゲノムは 70 Kbp 程度であり、光合成能喪失に伴いゲノム縮退が進行したと考えられる (図 4)。この色素体ゲノム上には光化学系 I および II、シトクロム *b6/f* 複合体に関連する遺伝子は存在しないため、ATP 合成酵素の駆動力となるプロトン勾配を造り出せず、従って ATP を産生できない。しかし奇妙なことに、NIES-3581



図 4. *Nitzschia* sp. NIES-3581 株の非光合成性色素体ゲノム (Kamikawa et al. 2015 *Mol Biol Evol*)

株をはじめ非光合成性色素体で ATP 合成酵素遺伝子が色素体ゲノム上に保存されていることから、①これらの色素体中の ATP 合成酵素では ATP 分解してプロトン勾配を形成し (通常とは逆反応)、②プロトン勾配はストロマからチラコイドルーメンへのタンパク質を輸送に利用されているという仮説を提案した。本論文は分子進化学分野のインパクトファクター第一位 (IF = 9.105 ; 2014 年) のジャーナルに掲載された (Kamikawa et al. *Mol Biol Evol* 2015 32:2598-2604)。

多くの渦鞭毛藻は紅藻の二次共生によって獲得された色素体 (ペリディニン色素体)

をもつが、未記載渦鞭毛藻 MRD-151 株では、祖先型のペリディニン色素体が、緑藻であるペディノ藻の三次共生に由来する緑藻型の色素体に置換されていることが判明している。我々は MRD-151 株の色素体の全ゲノムの配列決定を目指し、同株のトータル DNA サンプルを次世代シーケンス解析した結果、約 102 Kbp の環状葉緑体ゲノム配列を取得し、タンパク質コード遺伝子と構造 RNA 遺伝子合計 131 を同定した (図 5)。ゲノム比較解析の結果、MRD-151 株色素体ゲノムコードタンパク質のレパートリーは、自由生活性ペディノ

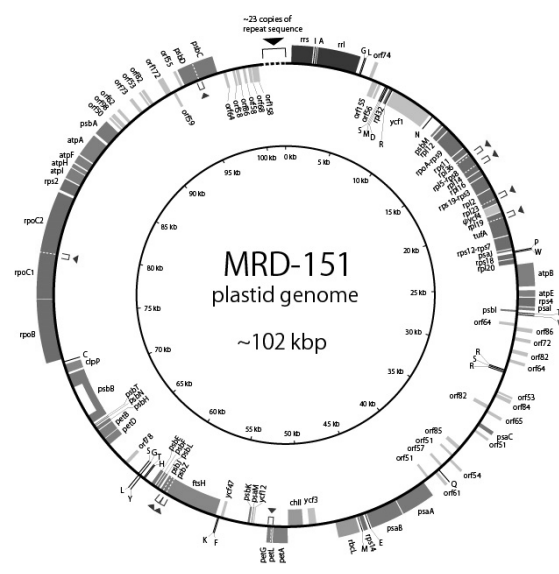


図 5. 未記載渦鞭毛藻 MRD-151 株の色素体ゲノム

ミトコンドリアは細胞内共生した α プロテオバクテリアが退化したオルガネラである。ミトコンドリアの成立は原始真核生物細胞に深く関連し、真核生物の細胞体制とゲノム構造に大きな影響を与えたと考えられている。また真核生物の進化過程で、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の種類や数、ゲノム構造などが大きく多様化してきた。我々は各種の真核微生物のミトコンドリアゲノムを解読し、その多様性と進化を解明しようとしている。

は、チトクローム *c* 成熟に関わるバクテリア型タンパク質サブユニット (*ccmA*, *ccmB*, *ccmC*, *ccmF*) を複数コードする点でユニークである。*P. bilix*

図 6. *Palpitomonas bilix* ミトコンドリアゲノム。左に大まかなゲノム構造を、右には詳細な遺伝子配置を示した。

熟機構をもつことから、①*P. bilix* を含むクリプチスタ生物群の共通祖先ではバクテリア型チトクローム *c* 成熟機構を使用していたこと、②*P. bilix* とその他のクリプチスタ生物の共通祖先が分岐した後、チトクローム *c* 成熟機構の置換が起こったと推測された。

H27 年度には、新たに有中心粒太陽虫の未記載種 SRT127 株のミトコンドリアゲノムの解読も行った。次世代シーケンス解析により復元されたミトコンドリアゲノムは環状で約 113 K 塩基対の環状ゲノムであり、41 種類の典型的なミトコンドリアタンパク質が確認された。

(4) 嫌気性従属栄養性ストラメノパイル生物 *Cantina marsupialis* のトランスクリプトーム解析に基づくミトコンドリア代謝機能の推測

ストラメノパイル生物群には PCR 法により海水サンプルから増幅された 18S リボソーム RNA 配列だけから存在が推測されている MAST 系統群が多数知られている。我々は、ストラメノパイル生物群に含まれる嫌気性従属栄養性真核微生物 *Cantina marsupialis* の単離培養に成功し、その詳細な形態データを *J Eukaryot Microbiol* 誌に報告した (Yubuki et al. 2015 *J Eukaryot Microbiol* 62:532-542)。H25 年度にこの培養株のトランスクリプトームデータを取得し、H26 年度にはそのデータを独立行政法人海洋研究開発機構・瀧下清貴博士の研究グループと共同で解析することで、この生物がもつ退化型ミトコンドリアの代謝機能を推測した。通常の酸素呼吸型ミトコンドリアには電子伝達に必要な複合体 I、II、III、IV および F_1F_0 ATPase をもつが (図 7 上)、*C. marsupialis* ミトコンドリアには複合体 II だけが検出された (図 7 下)。また *C. marsupialis* は、嫌気環境に適応した生物に見られる退化型ミトコンドリア (例えばヒドロゲノソーム) に特有の pyruvate:ferredoxin oxidoreductase、iron-hydrogenase および嫌氣的 ATP 合成にかかわる酵素を保持する。一方、不完全ながら TCA 回路やアミノ酸合成系を含むことから、ヒドロゲノソームなどの退化型ミトコンドリアよりは酸素呼吸型ミトコンドリアに近い特徴をもつ。従って、*C. marsupialis* ミトコンドリアは、これまでに研究されてきたミトコンドリアとは異なる、独自の代謝系を保持していると考えられる。この研究結果は *Protist* 誌に掲載された (Noguchi et al. 2015 *Protist* 166:534-550)。

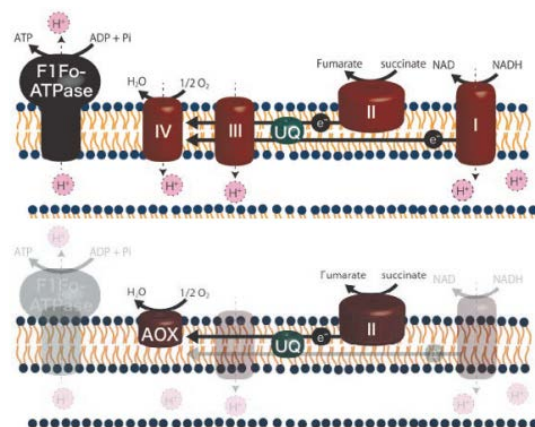


図 7. 酸素呼吸型ミトコンドリアと *Cantina marsupialis* ミトコンドリアとの比較。(上) ミトコンドリア内膜には ATP 合成のために電子伝達に関わるタンパク質複合体が存在している。(下) 一方、*C. marsupialis* ミトコンドリアでは、複合体 II 以外が欠失している。左図は海洋研究開発機構発行 Blue Earth 142 号 (9 頁) に掲載されたものを使用した。

【3】分子系統解析の方法論研究

分子系統解析で広く用いられる“homogeneous”塩基置換モデルでは、遺伝子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。遺伝子配列間の塩基組成が大きく異なる場合、homogeneous 置換モデルを前提と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、遺伝子配列間の塩基組成の違いを独立したパラメータとして評価できる“non-homogeneous (NH)”置換モデルによる系統解析プログラムを適応することで解消可能である。一方、この解析法では推定すべきパラメータ数と計算時間が飛躍的に増大するという問題が生じるため、系統解析プログラムの並列化が必須である。そこで本研究では、NH モデルを実装した NHML プログラム (Galtier and Gouy, *Mol. Biol. Evol.*, 15(7), 871-879, 1998) に対し、大規模遺伝子配列データに基づく分子系統解析に想定したコード並列化を施し、スーパーコンピュータ (COMA PACS-IX) 上で良好な並列性能を得るためのチューニングを行った。

H26 年度までの成果では、NHML を用いた分子系統解析のうち、①分子系統樹 1 本ごとの尤度計算 (=モデルパラメータおよび枝長の最適化) と、②分枝交換法による最尤系統樹の発見的探索という粒度の異なる 2 つのアルゴリズムに着目し、それぞれに OpenMP および MPI に

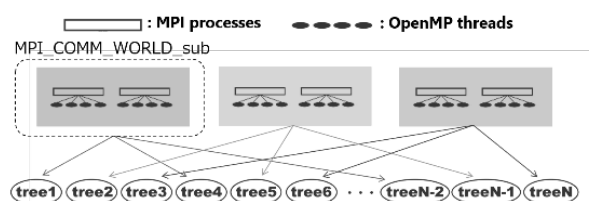


図 8. MPI プロセスのグループ分割

よる並列計算技術を導入した。これにより、共有メモリ型並列と分散メモリ型並列を効率よく組み合わせたハイブリッドな並列スキームを提案した (石川ら 情報処理学会論文誌コンピューティングシステム, 7(3), 2014)。H27 年度ではこのスキームをさらに拡張し、より多くの計算ノード (コア) を利用して上記の multi-grained なデータ解析を効率的に並列処理できるよう改良を行った。具体的には、① 1 本の系統樹の尤度計算において、遺伝子配列アライメントの座位ごとの尤度計算を独立に行えること、またモデルパラメータおよび枝長も解析的な手法を用いることでそれぞれ独立に最適化できることに着目し、前者を OpenMP によるスレッド並列化 (共有メモリ型並列)、後者を MPI によるプロセス並列化 (分散メモリ型並列) した。その上で、②分枝交換により提案された複数の樹形もまた並列に尤度計算できることを踏まえ、MPI_COMM_WORLD の分割により複数の MPI プロセスからなるサブグループを作成し、異なる提案樹形の尤度計算をこれらのサブグループ単位で管理し、サブグループ内でも①のハイブリッドな並列計算を行う、という階層的な並列スキームを実装した (図 8)。

上記の並列化による性能向上を確認するため、COMA システムにて最大 32 ノード (512 コア) までを利用し、17 種 10,000 座位からなるシミュレーションデータを用い、評価試験を行った。結果、32 ノード使用時において、128 の MPI プロセスを 1 グループ 4 プロセス (16 スレッド) の計 32 グループに分割し、それぞれのグループで異なる提案樹形の尤度計算を並列に処理することで、1 コアでの逐次処理に比

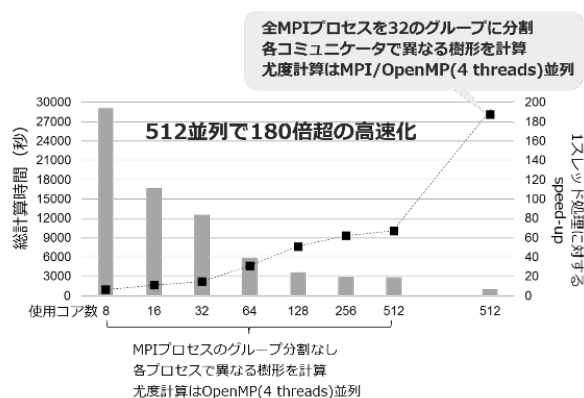


図 9. COMA システムにおける性能評価

べ 187.3 倍の高速化を達成した (図 9)。また、上記スキームによる並列化を、MPI プロセスをグループ分割しない H26 年度までの並列スキームと比較したところ、512 コア使用時に 2.79 倍の高速化を達成できたことから、より多くの計算資源を必要とする大規模分子系統解析に適したものであると評価できる。本成果は H27 年度学際共同利用プログラム (15a-24, 代表: 石川) によるものである。H28 年度ではこれらの成果を論文として国際学会に投稿するとともに、更なる高速化のために①のアルゴリズムに GPU 並列計算技術を導入する予定である (H28 年度学際共同利用プロジェクト 16a-46)。

4. 教育

(1) 博士論文

- A) 西村祐貴 “Diversity and Evolution of Protist Mitochondria: Introns, Gene Content and Genome Architecture”

(2) 修士論文

- A) 沈茹菁 「ヒト腸管寄生虫 *Giardia intestinalis* における新規スプライソソーム構成因子の探索」
 B) 森田幸之介 「新奇緑色渦鞭毛藻 MRD-151 株の葉緑体ゲノム比較解析」
 C) 高林舜 「*Kipferlia bialata* の大規模配列データから推測するフォルニカータ生物ミトコンドリアの縮退進化」

(3) 卒業論文

- A) 宮田凌佑 「セスジアカムカデ中のアピコンプレクサ寄生虫のリボソーム RNA 系統解析」

(4) 集中講義

橋本哲男: 「核酸・タンパク質配列データにもとづく生物進化の推測」

計算科学リテラシー (日・英)

5. 受賞、外部資金、知的財産権等

(1) 受賞

- A) 矢崎裕規（博士後期課程 2 年）Holtz-Conner Travel Award, VII ECOP-ISOP Joint meeting 2015.
- B) 西村祐貴（博士後期課程 3 年）筑波大学大学院生命環境科学研究科 研究科長表彰
- C) 森田幸之介（博士前期課程 2 年）筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻 専攻長表彰
- D) 高林舜（博士前期課程 2 年）筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻 専攻長表彰

(2) 外部資金（名称、氏名、代表・分担の別、採択年度、金額、課題名）

- A) 新学術領域研究（研究領域提案型）「ミトコンドリア・色素体以外の共生オルガネラ成立過程の解明（課題番号 23117006）」，稲垣祐司（代表），研究期間：2011-2015 年度，交付額：直接経費 17,300 千円，間接経費 5,190 千円.
- B) 基盤研究（B）「新型分割イントロンのスプライシング機構と進化多様性の解明（課題番号 15H04406）」，橋本哲男（分担；稲垣祐司），研究期間：2015-2017 年，交付額：直接経費 4,600 千円，間接経費 1,380 千円.
- C) 基盤研究（B）海外学術「嫌気環境に生育する真核微生物の多様性の解明（課題番号 15H05231）」，橋本哲男（分担；稲垣祐司），研究期間：2015-2017 年，交付額：直接経費 5,300 千円，間接経費 1,590 千円.
- D) 若手研究（B）「ケルコゾア生物における“ミトコンドリア型解糖系”の理解に向けた基礎的研究（課題番号 23247038）」，中山卓郎，研究期間：2014-2016 年，交付額：直接経費 1,100 千円.
- E) 若手研究（B）「非光合成葉緑体の進化と機能多様性探索～比較ゲノムとプロテオームから」，谷藤吾朗，研究期間：2014-2016 年，交付額：直接経費 500 千円.

(3) 知的財産権（種別、氏名、課題名、年月日）

なし

6. 研究業績

(1) 研究論文

A) 査読付き論文

- ① Nishimura Y, Amagasa T, Inagaki Y, Hashimoto T, Kitagawa H. A system for supporting phylogenetic analyses over alignments of next generation sequence data. *Proceedings for the 10th International Conference on Complex, Intelligent, and Software Intensive Systems (CISIS-2016)* Accepted to be

published.

- ② Templeton T, Asada M, Jiratanh M, Ishikawa SA, Tiawsirisup S, Sivakumar T, Namangala B, Takeda M, Mohkaew K, Ngamjituea S, Inoue N, Sugimoto C, Inagaki Y, Suzuki Y, Yokoyama N, Kaewthamasorn M, Kaneko O. Ungulate malaria parasites. 2016 *Scientific Reports* 6:23230.
- ③ Harada R, Inagaki Y, Shigeta Y. Protein folding and evolution. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Article ID: Protein Folding and Evolution/00999.
- ④ Noguchi F, Shimamura S, Nakayama T, Yazaki Y, Yabuki A, Hashimoto T, Inagaki Y, Fujikura K, Takishita K. Metabolic capacity of mitochondrion-related organelles in the free-living anaerobic stramenopile *Cantina marsupialis*. 2015 *Protist* 166:534-550.
- ⑤ Kamikawa R, Tanifuji G, Ishikawa SA, Onodera NT, Ishida K, Hashimoto T, Miyashita H, Mayama S, Inagaki Y. Proposal of a Twin-arginine translocator system-mediated constraint against loss of ATP synthase genes from nonphotosynthetic plastid genomes. 2015 *Molecular Biology and Evolution* 32:2598-2604.
- ⑥ Ishikawa SA, Kamikawa R, Inagaki Y. Multiple conversion between the genes encoding bacterial class-I release factors. 2015 *Scientific Reports* 5:12406.
- ⑦ Takeuchi F, Sekizuka T, Ogasawara Y, Yokoyama H, Kamikawa R, Inagaki Y, Nozaki T, Sugita-Konish Y, Ohnishi T, Kuroda M. The mitochondria genomes of *Kudoa* species are extremely diverged among Metazoa. 2015 *PLOS ONE* 10(7):e30132030.

B) 査読無し論文

- ① 中山卓郎, 稲垣祐司. シアノバクテリアと真核藻類の細胞統合—「窒素固定オルガネラ」へ続く道? 2016 *生物の科学 遺伝* 70:176-180.
- ② 稲垣祐司. 共生体由来オルガネラにまつわるエトセトラ. 2016 *生物の科学 遺伝* 70:156-160.

(2) 国際会議発表 (発表者には*を付けた)

A) 招待講演

*Yuji Inagaki. Green alga-derived nucleomorphs in dinoflagellate cells. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

B) 一般講演

- ① Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Yumiko Ogasawara, Hiroshi Yokoyama, Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Tomoyoshi Nozaki, Yoshiko Sugita-Konishi, Takahiro Ohnishi, *Makoto Kuroda. Phylogenetic analysis of a myxozoan genus *Kudoa* mitochondrial genomes, and the modulation of host innate immunity by *Kudoa* infection. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- ② *Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki. Convergent evolution of carbon metabolisms after loss of photosynthesis. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- ③ *Kounosuke Morita, Goro Tanifuji, Takuro Nakayama, Ryoma Kamikawa, Chihiro Sarai, Kazuya Takahashi, Mitsunori Iwataki, Yuji Inagaki. Plastid genome reduction in two separate dinoflagellate lineages bearing pedinophyte-derived plastids. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- ④ *Keitaro Kume, Shun Takabayashi, Ryoma Kamikawa, Goro Tanifuji, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto. Prediction and comparison of the metabolism of mitochondrion-related organelles in free-living fornicate organisms. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- ⑤ *Eriko Matsuo, Yuki Nishimura, Yuji Inagaki. Impact of endosymbiotic gene transfer on plastid metabolic pathways in dinoflagellates with haptophyte-derived plastids. 2015 年 9 月 30 日-10 月 2 日 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- ⑥ *Euki Yazaki, Takashi Shiratori, Keitaro Kume, Tetsuo Hashimoto, Ken-Ichiro Ishida, Yuji Inagaki. Strain PAP020, a novel anaerobic microeukaryote branching at the base of Fornicata. 2015 年 9 月 5-10 日 VII ECOP-ISOP Joint meeting 2015. Hotel-Conference Center Sylken Al-Andalus Palace & the "Reina Mercedes" Scientific Campus of the University of Seville, Seville, Spain.

- ⑦ *Kounosuke Morita, Goro Tanifuji, Takuro Nakayama, Ryoma Kamikawa, Chihiro Sarai, Kazuya Takahashi, Mitsunori Iwataki, Yuji Inagaki. Comparative genome analysis of pedinophyte plastids and the pedinophyte-derived plastids in two dinoflagellates *Lepidodinium chlorophorum* and strain MRD-151. 2015 年 9 月 5-10 日 VII ECOP-ISOP Joint meeting 2015. Hotel-Conterence Center Sylken Al-Andalus Palace & the "Reina Mercedes" Scientific Campus of the University of Seville, Seville, Spain.
- ⑧ Euki Yazaki, Takashi Shiratori, Keitaro Kume, Sohta Ishikawa, Ken-Ichiro Ishida, Tetsuo Hashimoto, *Yuji Inagaki. Is a microaerophilic flagellate strain PAP020 is the most basal member of the Fornicata? 2015 年 5 月 27-29 日 Integrated Microbial Biodiversity Program meeting, Canadian Institute for Advanced Research. Westin Mountain Bear Resort, Victoria, Canada.
- ⑨ *Fumiya Noguchi, Shigeru Shimamura, Takuro Nakayama, Yuki Yazaki, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Katsunori Fujikura, Kiyotaka Takishita. 2015 年 3 月 30-4 月 2 日 Society of General Microbiology, Annual Conference 2015. The International Convention Centre, Birmingham, UK.

(3) 国内学会・研究会発表（発表者には*を付けた）

A) 招待講演

- ① 皿井千裕, 谷藤吾朗, 中山卓郎, 神川龍馬, 高橋和也, 石田健一郎, 岩滝光儀, *稲垣祐司. ヌクレオモルフをもつ 2 種の未記載渦鞭毛藻: 「真核-真核型」細胞内共生を介した葉緑体成立過程を解き明かす新たなモデルとして. 2015 年 8 月 20-23 日 第 37 回日本進化学会第 17 回大会. 中央大学後楽園キャンパス, 文京区, 東京.

B) その他の発表

- ① *矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. フォルニカタ生物群の基部から分岐する新奇嫌気性生物 PAP020 株のミトコンドリア様オルガネラの代謝機能の推測. 2016 年 3 月 19-20 日 第 85 回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ, 宮崎, 宮崎.
- ② *神川龍馬, Stefan Zauner, Uwe Maier, Daniel Moog, John M Archibald, Andrew J Roger, 真山茂樹, 石田健一郎, 宮下英明, 稲垣祐司. 非光合成性珪藻類葉緑体における機能. 2016 年 3 月 19-20 日 日本藻類学会第 40 回大会 日本歯科大学生命歯科部, 千代田区, 東京.
- ③ *中山卓郎, 稲垣祐司. Rhopalodia 科珪藻細胞内共生体の比較ゲノム解析. 2016

年 3 月 19-20 日 日本藻類学会第 40 回大会 日本歯科大学生命歯科部, 千代田区, 東京.

- ④ *松尾恵梨子, 稲垣祐司. 葉緑体を置換した渦鞭毛藻の葉緑体関連代謝系における EGT の傾向. 22016 年 3 月 19-20 日 日本藻類学会第 40 回大会 日本歯科大学生命歯科部, 千代田区, 東京.
- ⑤ *高林舜, 久米慶太郎, 神川龍馬, 谷藤吾朗, 稲垣祐司, 橋本哲男. フォルニカータ+パラバサリア生物群内でのミトコンドリア縮退進化. 2015 年 9 月 26 日 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会 順天堂大学, 文京区, 東京.
- ⑥ *中山卓郎, 神川龍馬, 谷藤吾朗, 稲垣祐司. Rhopalodia 科珪藻における細胞内共生シアノバクテリアのゲノム縮小進化. 2015 年 9 月 6-8 日 日本植物学会第 79 回大会 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター, 新潟, 新潟.
- ⑦ *矢崎裕規, 白鳥峻志, 久米慶太郎, 橋本哲男, 石田健一郎, 稲垣祐司. トランスクリプトームデータを基盤とした大規模分子系統解析による新奇嫌気性真核微生物 PAP020 株の系統的位置の解明. 2015 年 8 月 20-23 日 第 37 回日本進化学会第 17 回大会. 中央大学後樂園キャンパス, 文京区, 東京.

(4) 著書、解説記事等

なし

7. 異分野間連携・国際連携・国際活動等

(1) 異分野連携

高性能計算システム研究部門との連携による分子系統解析プログラムの並列化

(2) 国際連携

- A) A. J. Roger 博士 (Dalhousie 大・カナダ) および A. G. B. Simpson 博士 (Dalhousie 大・カナダ) との共同研究：フォルニカータ生物群における嫌気性ミトコンドリア機能の解析
- B) A. J. Roger 博士 (Dalhousie 大・カナダ)、A. G. B. Simpson 博士 (Dalhousie 大・カナダ)、M. W. Brown 博士 (アメリカ・ミシシッピ州立大) との共同研究：大規模遺伝子配列データに基づく真核生物大系統の推測

(3) 国際活動

なし

8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

- (1) 2nd International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells 開催場所:筑波大学大学会館国際会議場(茨城県つくば市), 2014 年 9 月 30 日-10 月 2 日,

オーガナイザー：稲垣祐司、橋本哲男、石田健一郎。

- (2) 研究会「微生物進化 2015」開催場所：筑波大学計算科学研究センター（茨城県つくば市），
日時：2015 年 2 月 27 日，オーガナイザー：案浦健、千葉洋子、橋本哲男、稲垣祐司。

9. 管理・運営

なし

10. 社会貢献・国際貢献

なし

11. その他

なし