

V. 生命科学研究部門

V-1. 生命機能情報分野

1. メンバー

教授	重田 育照
准教授	原田 隆平
助教	庄司 光男
助教	栢沼 愛
助教	西澤 宏晃
研究員	鬼頭-西岡 宏任
学生	大学院生 5 名、学類生 2 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蛋白質と核酸に注目し、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 30 年度は、光合成酸素発生中心 (PSII-OEC) の反応機構、宇宙空間におけるアミノ酸生成機構・アルコール分解機構、分子動力学シミュレーションによるナノキューブ形成機構、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の理論的研究、シングレットフィッショング過程の理論研究、ナトリウム含有遷移金属酸化物の物性解明が大きく進展した。これらの研究では、センターのスーパーコンピューター (HA-PACS、COMA) を利用している。センター内の共同研究として宇宙物理研究部門および高性能計算システム研究部門と連携し、Post K 萌芽的課題や CREST の研究課題を行なった。また、平成 27 年度より分子進化分野とも共同研究を続けている。

3. 研究成果

【1】 酵素反応機構の解明

1. 光化学系 II 酸素発生中心(PSII-OEC)における水分解反応機構の理論的解明

光化学系 II (PSII) では光エネルギーを利用して水分解反応 ($2\text{H}_2\text{O} + 4\text{hv} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$) を触媒している。本系は生体による効率的な光エネルギー変換システムとして極めて重要であり、現在、その反応機構の解明が非常に注目されている。

PSII の反応サイクルは 4 つの（準）安定な S 状態を経由すると考えられている。この S 状態遷移の中でも、 $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ 遷移は酸素-酸素結合、酸素分子放出、基質水分子の Mn クラスターへの挿入、 MnCaO_5 クラスター骨格の再構築が含まれ、非常に複雑な化学反応を伴う。高精度

電子状態計算 (QM/MM) により、 $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移に含まれる O-O 結合形成を検討し、2つの新しい機構を提唱した[1,5,7]。非断熱電子移動 (NA-CT) 機構 [1] と非ラジカルカップリング (CBS) 機構[5,7]である。酸素分子放出は水分子挿入と協奏過程であることを明らかにした[2]。また、Mn クラスターに存在する Ca イオンが水分子導入に重要な役目を果たしていることも明らかにした。複雑な化学反応を効率良く自動的に探索するアルゴリズムも新規に提案した。Mn 錯体の高酸化状態の電子状態については高精度な多参照電子状態理論 (DMRG 等) で精密に評価した。

2. ビリルビンオキシダーゼの活性中心構造変化と触媒機構についての理論解明 [5,7]

ビリルビンオキシダーゼ (BOD: Bilirubin Oxidase) は活性中心に 3 種類の Cu イオンを 4 原子 (Type 1 Copper (T1Cu) と Type 2 Copper (T2Cu)、Type 3 Copper (T3Cu)) 含有している。T1Cu 部位でビリルビンは酸化され、電子は T2Cu と 2 つの T3Cu で構成される三核銅中心 (TNC: Trinuclear Copper Center) に移動し、O₂ を H₂O に 4 電子還元する。BOD は、触媒活性が安定しているため、疾病の原因であるビリルビンに対する検査薬や酵素燃料電池の電極への応用研究がなされている。Cu イオンの配位子の違いにより、立体構造や酸化還元電位に顕著な違いが現れることについての理論解明を行った。野生型 (WT: Wild type) と変異型 M467Q (Met467Gln) の高解像度の X 線結晶構造を基に、量子力学/古典力学混合 (QM/MM) 法を用いて、酸化還元電位の変化や反応中間体の同定についての理論的解明を行った。WT と変異型 (Met467Gln: M469Q) の T1Cu 近傍の立体構造を再現できることを確認した[5]。

次に、4 電子還元過程による 4 個の Cu イオンの構造変化と電子状態の変化について理論解析した。触媒サイクル中の初期構造である RO (Resting Oxidized) 状態では $\mu^2\text{-OH}$ を持つ RO₁ 状態よりも $\mu^3\text{-oxo}$ を持つ RO₀ の方が 24.9 kcal/mol も安定であった。NI 状態における Löwdin のスピン密度を解析すると、NI 状態は完全酸化型であるが $\rho(\text{T1Cu})=0.00$ であったことから、NI 状態にプロトンを一つ加えた NI^{H+} 状態が安定な native intermediate の候補であると予測した。これらの触媒サイクルの中間体候補と、WT BOD と M467Q BOD の還元過程での分子軌道の変化を解析し、本論文で提案した新たな中間体候補を含む新しい触媒サイクルを解明した。T1Cu 周囲の構造変化自体が非常に小さいことや、TNC を構成する T2Cu と T3Cu で作る距離は各中間体の構造で変化が大きいことに注目し、T2Cu と 2 つの T3Cu 原子によって形成される三角形の面積に比例する新しい指標 I を用いることで、それぞれの BOD の構造変化を特徴づけた。指標 I は、酸化型と還元型の構造を良く分離し、TNC の酸化状態の良い指標となることを示した。

【2】 データ駆動型分子動力学シミュレーションの開発と応用

我々はこれまで、超並列カスケード選択型分子動力学シミュレーション (PaCS-MD) 法を開発し、タンパク質の折りたたみやドメイン運動などの遅い過程の構造変化の解析を行って

きた。PaCS-MD ではこれまで初期構造の選択の際に終構造などの情報を事前に与えていた。同じアルゴリズムを用いて、実験から得られる低解像度の構造データ（例えば SAXS や Cryo-MD）と MD で得られた構造に基づく理論計算データの差を小さくする構造を探索することが可能である。そこで平成 30 年度は、実験データとの類似度を用いて PaCS-MD を実行することにより、低解像度の構造データを再現する MD 構造を探索する計算手法を開発した。また、実験データとの非類似度を利用することで、構造遷移を誘起可能であることを示した。

SAXS/EM-駆動型PaCS-MDの応用例として、リジン-アルギニン-オルニチン結合 (LAO) タンパク質を選択した。LAOタンパク質はOpen状態構造とClosed状態構造のX線結晶構造が決定されており、Open-Closed構造遷移をPaCS-MDを用いて誘起した。PaCS-MD の 1 サイクルは100-psのMDシミュレーション ($T = 300 \text{ K}$, $P = 1 \text{ bar}$) を10個の独立な初期構造から実行した。

SAXS駆動型PaCS-MDのサンプリング効率を示すために、図1にSAXSのプロファイルを計算した。図1にターゲットデータ（緑）、初期構造（青）、SAXS駆動PaCS-MDデータ（赤）をそれぞれ示す。初期構造では、 $q = 0.15$ から $q = 0.4$ においてターゲットデータから著しく外れていたが、SAXS駆動PaCS-MD後に得られた理論SAXSプロファイルは、目標となる実験データのプロファイルを良好に再現し、ほぼ完全に重なっていた。SAXS駆動PaCS-MDによって得られた生成物（Closed状態構造）から測定した最小 C_α RMSDは0.8Åであり、Closed状態構造に関して高い分解能の構造が得られたことを示している。興味深いことに、SAXSデータが3次元の1次元平均回折パターンを表していたとしても、SAXS駆動型PaCS-MDはレアイベントである構造遷移を誘起し、最終構造の細密化に成功している。この結果は、LAOタンパク質のOpen状態構造とClosed状態構造の二次構造のポーズのおよびトポロジーの類似性に起因している。故に、本手法が低解像度の実験データから妥当な高分解能の原子レベルの構造を生じる可能性があることを示している。

EM 駆動型 PaCS-MD に関しても、Open-Closed 構造遷移が再現された。図 1(b)は、Closed 状態構造との C_α RMSD が最も小さいスナップショット（青）を X 線構造（赤）・EM データ（網掛け）に重ねたものである。得られた構造は、いくつかの柔軟なループ領域を除いて X 線構造とほぼ一致しており、EM 駆動型 PaCS-MD の有効性が検証できた。

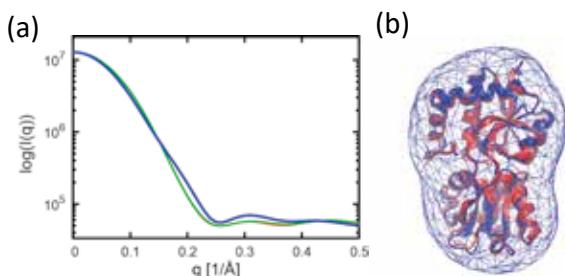


図 1 (a) SAXS のデータ（緑：実験、青：PaCS-MD の初期構造、赤：PaCS-MD の終構造、(b) Cryo-EM データ（網掛け）、青：PaCS-MD の終構造、赤：X 線結晶構造。

【3】伸長因子 EF-1 α ・EFL の分子進化過程に関する理論的研究

分子進化分野と連携して、真核生物の伸長因子 EF-1 α （図 2）及び類似の EFL というタンパク質の構造特性の解析を行った。ホモロジーモデリングにより得られた構造において表面電荷の解析を行い、EF-1 α と EFL の両方を持つ生物種において EF-1 α がどのような特徴を持つのか解析した。その結果、これらの EF-1 α では、負電荷を帯びた領域が広いことが明らかになり、伸長因子としては機能していないことが、構造特性からも示唆された。また、ホモロジーモデリングにより得られた構造に対して分子動力学計算を行って構造の安定性や妥当性を検証し、更に、ドッキングシミュレーションにより aa-tRNA 等との結合の強さを解析した。

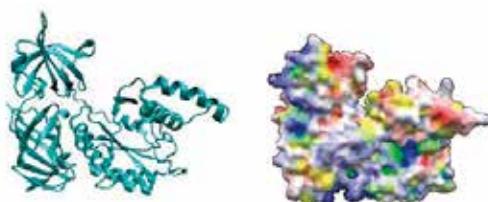


図 2 EF-1 α の構造及び表面電荷

【4】宇宙空間における有機分子の生成・分解機構の解明

星間空間に存在する複雑有機分子の生成には、星間ダスト上でラジカル反応が関わっていると考えられている。ラジカル生成に関わる有機分子の光解離反応の過程を明らかにする為、電子状態間遷移を考慮した *ab initio* 分子動力学計算 (surface hopping simulation) を行った。メタノールの光解離反応において、水素原子の解離が起こる場合、気相中では $\text{CH}_3\text{O} + \text{H}$ が、固相中では $\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}$

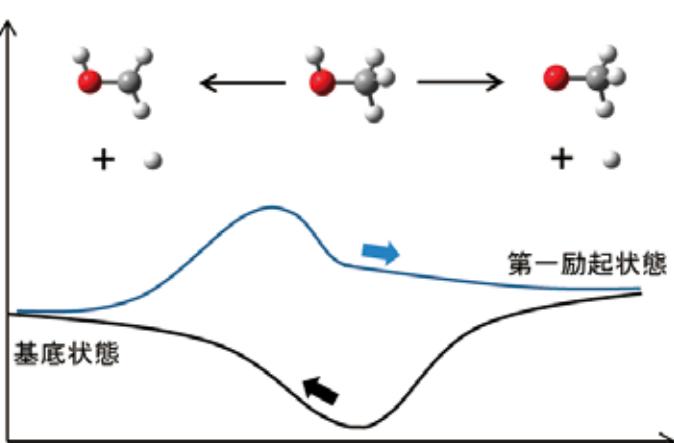


図 3 電子基底状態と電子励起状態（第一励起状態）における、 CH_3OH からの水素原子の解離

がより多く生成されると報告されているが、環境の違いによる生成物分岐比の違いの原因是明らかにされていなかった。シミュレーションの結果、電子励起状態では $\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}$ よりも $\text{CH}_3\text{O} + \text{H}$ が生成しやすいが、電子基底状態では $\text{CH}_3\text{O} + \text{H}$ よりも $\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}$ が生成しやすいことが明らかになった（図 3）。このことから、固相中では、電子基底状態に戻った後で解離が起こる割合が多い可能性があることを示し、固相中で $\text{CH}_3\text{O} + \text{H}$ よりも $\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}$ が生成しやすい理由を説明した。

また、星間ダスト表面におけるラジカル反応のメカニズムの詳細を明らかにするため、第一原理分子動力学計算を行った。ダスト表面モデル（グラフェン表面）に化学吸着している CHO と遊離 H との反応を、Car-Parrinello molecular dynamics simulation (CPMD) を用いて解析した。その結果、CHO がグラフェン表面と共有結合を形成して化学吸着している場合、主

に $\text{CO} + \text{H}_2$ が生成するが、生成した CO は垂直方向に（表面から解離する方向に）移動していく一方、生成した H_2 は表面に水平方向に移動していくものが多いという結果が得られた。

【5】 固体系の三重項-三重項消滅に基づくフォトン・アップコンバージョンの理論的研究

低エネルギーの光を高エネルギーの光に変換する技術としてフォトン・アップコンバージョン (UC) が知られている。近年、三重項-三重項消滅 (TTA) を利用した UC に注目が集まっている。現在、太陽光を利用した技術は多く開発されているがそれらの技術は太陽光に多く含まれている赤外・近赤外領域の光を利用できていない。そこで TTA-UC を用いて赤外・近赤外領域の光を可視・紫外領域の光へ変換することでこれまで以上の反応効率を実現できると期待されている。

本年度は、固体系における 9,10-ジフェニルアントラセン (DPA) およびその誘導体 (C_n -sDPAs) に対して量子化学計算を用いてその反応機構を調べた。TTA は二つの三重項状態の分子が接近した際にそれぞれの分子から電子が移動することで反応が進行する。本研究では、それぞれの分子の固体中での二量体モデルに対してフラグメント分子軌道 (FMO) 法および FMO-linear combination of molecular orbitals (FMO-LCMO) 法を用いて TTA 反応速度および三重項エネルギー移動速度を算出した（図 4）。その結果、従来用いられている DPA よりも新たに提案された C7-sDPAs のほうが、三重項エネルギー移動速度が速いことがわかった。これは、2 つの系の結晶形の違いに起因して、DPA は擬 2 次元的拡散、C7-sDPA は 1 次元的拡散となっており、同一の三重項増感剤から生じた三重項励起子の出会い確率が後者の方が高いことを理論的に明らかにした。実際、実験によって C7-sDPA が DPA よりも反応効率が高いことが報告されており、本研究は実験結果を支持することがわかった。

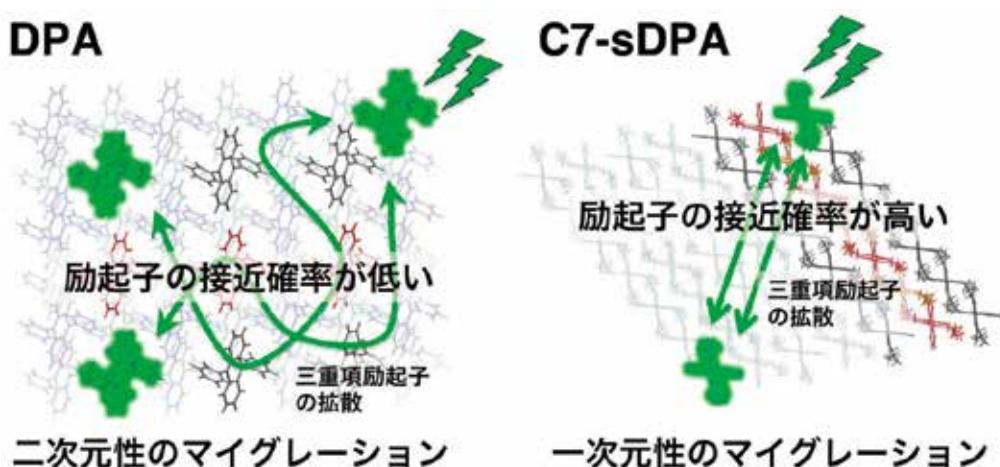


図 4 DPA および C7-sDPA でのエネルギー移動速度の違い

【6】 分子間電荷移動積分の高精度密度汎関数法計算

有機ELや有機薄膜太陽電池などの有機半導体を用いたデバイスの効率は、その有機半導体が持つキャリアの移動度に大きく依存する。この移動度を理論から見積もるには、分子間電荷移動積分やサイトエネルギーなどの主要な電荷移動パラメータを、構成有機分子のモフォロジーとその電子状態から決定する必要がある。

本研究 [H. Kitoh-Nishioka and K. Ando, *J. Phys. Chem. C* 2019, 123, 11351] では、非経験的に距離分割パラメータを最適化した長距離補正密度汎関数法 (NET-LC-DFT) を用いて、分子間電荷移動積分 (T_{DA}) が低計算コストかつ高精度に求めることが可能であることを示した。多参照摂動理論 (MRCI+Q, NEVPT2) や結合クラスター法 (SCS-CC2) などの計算負荷の非常に大きい高精度電子状態計算法によって作られた分子間移動積分のデータセット (HAB11: 11 個の正孔移動積分データ、HAB7: 7 個の電子移動積分データ) に対して NET-LC-DFT を適用し、その精度を評価した。

NET-LC-DFT 法からデータセットの有機分子のフロンティア軌道エネルギーを求め、その値がイオン化ポテンシャルエネルギーの実験値や電子親和力の高精度計算値と良く一致することを確かめた。このフロンティア軌道間の相互作用として T_{DA} を計算した結果、参照データからの誤差 (mean relative unsigned errors, MRUEs) は、HAB11 に対しては 3.2%、HAB7 に対しては 7.3% となった。これは他の手法を使った過去のベンチマーク計算と比較して、もっとも良い結果になっている。

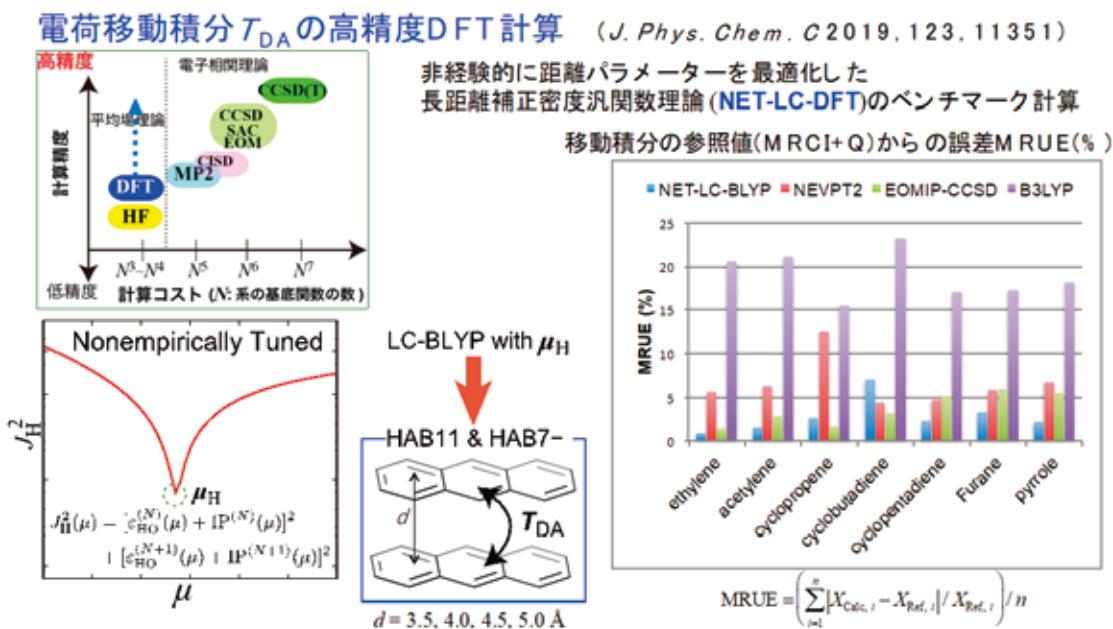


図 5 概要

【7】 ナトリウム含有遷移金属酸化物の物性解析

過去 20 年間に亘る二次イオン電池開発の進歩は、家庭用電化製品や電気自動車等の技術的な革命をもたらしてきた。最も一般的な Li イオンバッテリーは、正極材料における遷移金属イオンの複数の酸化状態変化がイオン電荷キャリアとして作用する Li イオンの挿入・抽出を可能とする上で重要となっている。しかしながら新たな材料を設計する上で、高価な Li や、Co などの希少な遷移金属の使用を避ける事が望ましい。前者に対しては、Li を Na のような、より入手しやすいアルカリ金属で置き換えることが急務である。後者に関しては、遷移金属イオンの酸化還元能の限界を超えて容量を増大させるため、他の安価な遷移金属への代替が望まれている。そのためには、Na を含む遷移金属酸化物における、酸化還元能を評価する必要がある。

本研究では、新規かつ優れた電気化学的性質を有する Na 含有 4d 遷移金属酸化物における可逆的な酸素のアニオニ性酸化還元能を密度汎関数法によって評価した。図 6 に示すように、直感的に遷移金属イオンの酸化還元が支配的であると予想された $\text{Na}_{1-x}\text{Pd}_2\text{O}_3$ や $\text{Na}_{3-x}\text{AgO}_2$ のような化合物においてさえ、電荷補償機構において酸素原子の酸化状態が大きく変化していることが明らかとなった。これらの化合物における酸素原子の酸化数の変化は、以前の研究で提案された Na イオン過剰メカニズムから生じるのではなく、遷移金属の 4d 軌道と酸素原子の 2p 軌道との間の強い混成の副産物であることを解明した。

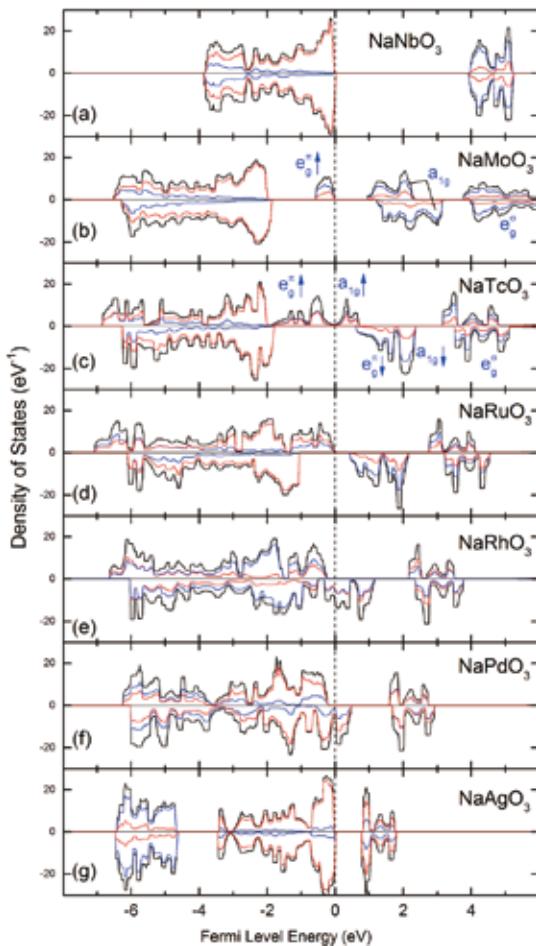


図 6 Na 含有遷移金属酸化物の状態密度（黒）全体、（赤）O の 2p 軌道、（青）遷移金属の 4d 軌道

4. 教育

【卒業研究発表】

松本悠路、「MD 計算を用いたアポ体・ホロ体シトクロム *c* の安定性解析」

柳 昂輝、「環状ジペプチドの安定構造における系統的な傾向と特徴」

【修士課程修了】

山崎笙太朗、「DNA-小分子複合体の構造安定性」

木間塚政人、「環状ペプチドの膜通過における構造変化の理論解析」

【博士課程修了】

なし

【講義】

重田育照・庄司光男、生物物理学 II、物理学類専門科目、秋 AB

重田育照・庄司光男、生物物理科学、物理学類専門科目、春 ABC

庄司光男、生物物理学実験、物理学類専門科目、秋 B

原田隆平、分子進化学 II(分担) 生命環境学群生物学類 秋 AB

原田隆平、基礎生物学実験 I(分担) 生命環境学群生物学類 秋 AB

原田隆平、生物学演習 生命環境学群生物学類 秋 C

原田隆平、計算科学リテラシー 計算科学研究センター 秋 C

原田隆平、先端生物科学セミナー(分担) 生命環境学群生物学類 秋 AB

原田隆平、専門語学 BII(分担) 生命環境学群生物学類 秋 AB

原田隆平、専門語学 BIII(分担) 生命環境学群生物学類 秋 C

5. 受賞、外部資金、知的財産権等

受賞

1. 原田隆平、日本物理学会 第 13 回 若手奨励賞(領域 12)(受賞日: 2019 年 3 月 14 日)
2. 重田育照、2018 Best Faculty Award, Feb. 18th 2019, 筑波大学 (Japan) .

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」
2. 若手研究(A) : 庄司光男(研究代表者) (平成 29 年~31 年度) 「光化学系 II 酸素

発生中心における水分解反応の全反応経路解明」

3. 若手研究（A）：原田隆平（研究代表者）（平成 28 年～30 年度）「G タンパク質共役受容体におけるシグナル伝達機構の解明」
4. さきがけ（日本学術振興機構）：鬼頭-西岡宏任（研究代表者）（2017/10 ～ 2021/3）「量子シミュレーション技術による未知の生体電子移動/機能発現の探索」

【分担研究者】

1. AMED「中分子創薬」、重田育照（代表者：前仲勝実）（平成 30～令和 2 年度）「立体構造を基盤とする中分子創薬の合理的設計」
2. ポスト「京」重点課題 7A、重田育照（代表者：押山淳 教授）（平成 28～31 年度）「構成の半導体デバイス」
3. 基盤研究(B)、庄司 光男（代表者：岡島 俊英）（平成 28～31 年度）、「酵素活性中心の構造変化とゆらぎにリンクする触媒反応遷移状態の制御機構」
4. 挑戦的萌芽研究、庄司 光男（代表者：相川 祐理）（平成 28～31 年度）「計算科学によるアストロバイオロジーへの理論的挑戦」

6. 研究業績

(1) 研究論文

A) 査読付き論文

1. V. Sladek, H. Tokiwa, Y. Shigeta, "Protein side-chain networks from energetic and geometric data – are they identical?", *Journal of Chemical Theory and Computation* **14** (12), 6623-6631 (2018). DOI:10.1021/acs.jctc.8b00733
2. M. Kayanuma, M. Shoji, K. Furuya, Y. Aikawa, M. Umemura, Y. Shigeta, "Theoretical Study of the Photodissociation Reaction of Methanol in Interstellar Clouds", *Chemical Physics Letters* **714**, 137-142 (2018). DOI:10.1016/j.cplett.2018.10.077
3. R. Sato, H. Kitoh-Nishioka, K. Kamada, Y. Shigeta, "Synergetic Effects of Triplet-Triplet Annihilation and Triplet-Triplet Energy Transfer Processes on Photon Up-conversion in Crystalline Systems", *The Journal of Physical Chemistry Letters* **9**, 6638-6643 (2018). DOI:10.1021/acs.jpcllett.8b02887
4. K. M. Bui, J. Iwata, Y. Kangawa, K. Shiraishi, Y. Shigeta, A. Oshiyama, "First principle analysis of ammonia adsorption and desorption on GaN surface", *The Journal of Physical Chemistry C* **122** (43), 24665-24671 (2018) DOI:10.1021/acs.jpcc.8b05682
5. M. H. N. Al Assadi, M. Fronzi, M. Ford, Y. Shigeta, "High-performance Na ion cathodes based on the ubiquitous and reversible O redox reaction", *Journal of Materials Chemistry A* **6**, 24120-24127 (2018). DOI: 10.1039/C8TA05961F

6. R. Harada, Y. Shigeta, "Selection Rules on Initial Structures in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Affect Conformational Sampling Efficiency", *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **85**, 153-159 (2018). DOI:10.1016/j.jmgm.2018.08.014
7. M. Akter, T. Tokiwa, M. Shoji, K. Nishikawa, Y. Shigeta, T. Sakurai, K. Kataoka, Y. Higuchi, N. Shibata, "Redox potential-dependent formation of an unusual His-Trp bond in bilirubin oxidase", *Chemistry-A European Journal* **24**, 18052-18058 (2018).
DOI:10.1002/chem.201803798
8. R. Fujiki, Y. Kasai, Y. Seno, T. Matsui, Y. Shigeta, N. Yoshida, H. Nakano, "A new scheme for computation of pK_a values based on the three-dimensional reference interaction site model self-consistent field theory coupled with the linear fitting correction scheme", *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**, 27272-27279 (2018). DOI:10.1039/C8CP04354J
9. A. Ghiami-Shomami, B. Ghalami-Chobar, Y. Shigeta, "Computational electrochemistry of a novel ferrocene derivative", *Journal of Chemical Information and Modeling*, **85**, 84-90 (2018).
DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.08.004
10. R. Harada, H. Aida, Y. Shigeta, "The Formation of Hydrophobic Core Regulates the Protein Folding of Villin Elucidated with Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics", *Chemistry Letters* **47**, 1300-1303 (2018). DOI:10.1246/cl.180596
11. M. Shoji, M. Kayanuma, Y. Shigeta, "A practical approach for searching stable molecular structures by introducing repulsive interactions among walkers", *Bulletin of Chemical Society of Japan (Selected Paper)* **91**, 1465-1473 (2018). DOI: 10.1246/bcsj.20180122
12. R. Harada, Y. Shigeta, "How Does Friction Coefficient Affect the Conformational Sampling Efficiency of Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics?", *Chemistry Letters* **47**(9), 1119-1122 (2018). DOI: 10.1246/cl.180464
13. R. Harada, Y. Shigeta, "Temperature Shuffled Structural Dissimilarity Sampling Based on a Root-Mean Square Deviation", *Journal of Chemical Information and Modeling* **58**(7), 1397-1405 (2018). DOI: 10.1021/acs.jcim.8b00095
14. R. Harada, Y. Shigeta, "How low-resolution data can predict conformational changes of a protein: a molecular dynamics study", *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**, 17790-17798 (2018). DOI: 10.1039/C8CP02246A
15. M. Shoji, H. Isobe, Y. Shigeta, T. Nakajima, K. Yamaguchi, "Concerted Mechanism of Water Insertion and O_2 Release during the S_4 to S_0 Transition of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II", *Journal of Physical Chemistry B* **122** (25), 6491-6502 (2018).
DOI:10.1021/acs.jpcb.8b03465.

16. I. Kurniawan, K. Kawaguchi, M. Shoji, T. Matsui, Y. Shigeta, H. Nagao, "A Theoretical Study on Redox Potential and pK_a of [2Fe-2S] cluster model from Iron-Sulfur Proteins", *Bulletin of Chemical Society of Japan (Selected Paper)* **91**, 1451-1456(2018).
17. R. Harada, Y. Shigeta, "On-the-Fly Specifications of Reaction Coordinates in Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Accelerate Conformational Transitions of Proteins", *Journal of Chemical Theory and Computation* **14**, 3332-3341 (2018). DOI: 10.1021/acs.jctc.8b00264
18. Y. Terai, R. Sato, T. Yumiba, R. Harada, K. Shimizu, T. Toga, T. Ishikawa-Fujiwara, T. Todo, S. Iwai, Y. Shigeta, J. Yamamoto, "Coulomb and CH-π interactions in (6-4) photolyase-DNA complex dominate DNA binding and repair abilities", *Nucleic Acid Research* **46**(13), 6761-6772 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky364
19. M. Hada, S. Saito, R. Sato, Y. Hayashi, Y. Shigeta, K. Onda, "Novel Techniques for Observing Structural Dynamics of Photoresponsive Liquid Crystals", *Journal of Visualized Experiments* (135), e57612 (2018). DOI: 10.3791/57612
20. M. H. N. Al Assadi, Y. Shigeta, "The effect of octahedral distortions on the electronic properties and magnetic interactions in O₃ NaTMO₂ compounds (TM = Ti-Ni & Zr-Pd)", *RSC Advance* **8**, 13842-13849 (2018). DOI: 10.1039/C8RA00576A
21. M. H. N. Al Assadi, Y. Shigeta, "Negative influence of orbital splitting on cathode potential of O₃ NaTMO₂ compounds", *Journal of Power Sources* **388**, 1-4 (2018). DOI: 10.1016/j.jpowsour.2018.03.056
22. R. Harada, T. Mashiko, M. Tachikawa, S. Hiraoka, Y. Shigeta, "Programmed Dynamical Ordering in Self-organization Processes of Nano-cube: A Molecular Dynamics Study", *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**, 9115-9122 (2018). DOI: 10.1039/C8CP00284C
23. Y. Yamamoto, K. Takei, S. Arulmozhiraja, V. Sladek, N. Matuo, S.-I. Han, T. Matsuzaka, M. Sekiya, T. Tokiwa, M. Shoji, Y. Shigeta, Y. Nakagawa, H. Tokiwa, H. Shimano, "Molecular association model of PPARα and its new specific and efficient ligand, pemasfibrate: Structural basis for SPPARMα", *Biochemical and Biophysical Research Communications* **499**, 239-245 (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.135
24. M. Shoji, H. Isobe, Y. Shigeta, T. Nakajima, K. Yamaguchi, "Nonadiabatic one-electron transfer mechanism for the O-O bond formation in the oxygen-evolving complex of photosystem II", *Chemical Physics Letters* **698**, 138-146 (2018). DOI: 10.1016/j.cplett.2018.02.056
25. R. Sato, H. Kitoh-Nishioka, K. Kamada, T. Mizokuro, K. Kobayashi, Y. Shigeta, "Does Inactive Alkyl Chain Enhance Triplet-triplet Annihilation of 9,10-diphenylanthracene

- Derivatives?", *The Journal of Physical Chemistry C*, **122** (10), 5334–5340 (2018). **DOI:** 10.1021/acs.jpcc.8b01328
26. A. Sato, M. Shoji, Y. Kitazawa, T. Ochi, Y. Komatsu, M. Kayanuma, Y. Aikawa, M. Umemura, Y. Shigeta, "First-principles study of the formation of glycine-producing radicals from common interstellar species", *Molecular Astrophysics* **10**, 11-19 (2018). **DOI:** 10.1016/j.molap.2018.01.002
27. R. Sato, R. Harada, Y. Shigeta, "The binding structure and affinity of photodamaged duplex DNA with members of the photolyase/cryptochrome family: A computational study", *Biophysics and Physicobiology* **15**, 18-27 (2018). **DOI:** 10.2142/biophysico.15.0_18
28. M. Shoji,* H. Isobe, K. Miyagawa, K. Yamaguchi,* Possibility of the right-opened Mn-oxo intermediate (R-oxo (4444)) among all nine intermediates in the S3 state of the oxygen-evolving complex of photosystem II revealed by large-scale QM/MM calculations, *Chem. Phys.*, 518, 81-90(2019). <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.11.003>
29. K. Yamaguchi,* M. Shoji, H. Isobe, K. Miyagawa, K. Nakatani, Theory of chemical bonds in metalloenzymes XXII: a concerted bond switching mechanism for the oxygen-oxygen bond formation coupled with one electron transfer for water oxidation in the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Mol. Phys.* 2018, 1-35.
30. C. E. Castillo, T. Stoll, M. Sandroni, R. Gueret, J. Fortage, M. Kayanuma, C. Daniel, F. Odobel, A. Deronzier, M.-N. Collomb, "Electrochemical generation and spectroscopic characterization of the key rhodium(III) hydride intermediates of rhodium poly(bipyridyl) H₂-evolving catalysts", *Inorg. Chem.*, **57**, 11225-11239, 2018
31. R. Sato, H. Kitoh-Nishioka, K. Ando, T. Yamato, "Electron Transfer Pathways of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase Revisited", *The Journal of Physical Chemistry B*, **122**(27), 6912-6921 (2018).

B) 査読無し論文

なし

(2) 国際会議等での招待講演

1. R. Harada, "Developments of Efficient Conformational Sampling Methods for Biologically Rare Events", Asia Hub for e-Drug Discovery (AHeDD) 2018 2018 年 9 月 28 日
2. R. Harada, "Simple yet Powerful Conformational Sampling Methods for Detecting Biologically Rare Events of Proteins", LBNL-CCS 合同ワークショップ 2019 年 3 月 6 日

3. Y. Shigeta, "Theoretical Studies on Triplet-Triplet Annihilation Up-conversion Processes in Solution and Solid Phases", *Theoretical Chemistry Symposium 2019*, Feb. 13th-16th 2019, Pilani, India.
4. Y. Shigeta, "Theoretical Insight into Triplet-Triplet Annihilation Up-conversion Processes in Solution and Solid Phases", *International Workshop of Photofunctional Materials Using Spin Degrees of Freedom: Interplay among synthesis, measurement, and theory*, 24th Jan. 2019, Toyonaka, Osaka, Japan.
5. Y. Shigeta, "Triplet-Triplet Annihilation Up-conversion Processes of 9,10-diphenylanthracene in solution and solid phases", *10th Asian Photochemistry Conference*, Dec. 16th-20th 2018, Taipei, Taiwan.
6. Y. Shigeta, "QM/MM analysis of metalloenzymes and beyond", *Quantum International Frontiers 2018*, Oct. 17th-21st 2018, Hunan, China.
7. Y. Shigeta, "QM/MM analysis of metalloenzymes", *The Asia Hub for e-Drug Discovery Symposium 2018*, Sep. 27th -29th 2018, Korea.
8. Y. Shigeta, "Data-driven Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics", *22nd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE22)*, Aug. 2nd-3rd, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
9. Mitsuo Shoji, "Water Insertion Reactions of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II Revealed by QM/MM", 2019/2/14, Theoretical Chemistry Symposium 2019 (TCS2019), Birla Institute of Technology and Science, Pilani, Rajasthan, India.
10. M. Shoji, H. Isobe, Y. Shigeta, T. Nakajima, K. Yamaguchi, "Water insertion reactions in the oxygen-evolving complex of photosystem II revealed by QM/MM calculations" 2018/10/31, ICPAC Langkawi 2018, Langkawi Island, Malaysia.
11. M. Shoji, H. Isobe, Y. Shigeta, T. Nakajima, K. Yamaguchi, "QM/MM study on the S state transitions of the oxygen-evolving complex in photosystem II" 2018/8/3, the 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC2018), Sendai, Miyagi.

(3) 国内学会・研究会での招待講演

1. 原田隆平, "分子混雑のシミュレーション研究とカスケード選択型分子動力学シミュレーションの開発", 日本物理学会 第 13 回若手奨励賞 (領域 12) 受賞記念講演, 日本物理学会 2019 年春季大会 2019 年 3 月 14 日
2. 原田隆平, "生物学的レイイベントを再現予測するタンパク質構造サンプリング法の開発", 第 2 回ワークショップ「レイイベントの計算科学」 2018 年 12 月 1 日

3. 原田隆平, “カスケード型超並列シミュレーションで探る FtsZ の細胞分裂ダイナミクス”, 東京大学 情報基盤センター H29 年度 インターン・後期「若手・女性利用者推薦」成果報告会 2018 年 6 月 4 日
4. 重田育照, “第一原理計算による生命機能の探求”, 第 26 回 XFEL 構造生物ミーティング, November 22nd 2018, RIKEN, 播磨.
5. 重田育照, "QM/MM studies on structure-function relationships of metalloenzymes", 第 56 回生物物理学会シンポジウム「X 線自由電子レーザーと融合分野が拓くタンパク質反応ダイナミクスの新しい計測」, September 19th-21st 2018, 岡山大学、岡山.
6. 重田育照, ポスト「京」に向けたアプリ高度化合宿, June 11th-13th 2018, 理化学研究所・計算科学研究センター、神戸.

(4) 著書、解説記事等

1. 庄司光男, 磯部寛, 重田育照, 中嶋隆人, 山口兆, 「光合成における酸素発生の反応機構」, 生物物理, 58(3), 127-133 (2018). (解説) DOI:10.2142/biophys.58.127.
2. Y. Shigeta, R. Harada, H. Matsumura, “Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*”, 物性研究所 Activity Report 2017, リサーチハイライト (invited letter) (2018). ISSN:2189-6070
3. R. Harada, Y. Shigeta, “Recent Extensions and Applications of Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Simulations”, 物性研究所スーパーコンピューターセンター Activity Report 2017 (invited review) (2018).
4. 重田育照, 「研究室だより「筑波大学計算科学研究センター 生命科学研究部門 重田研究室」」, アンサンブル 20(1), 67-71 (2018).
5. 原田隆平, 重田育照, 「カスケード選択型分子動力学法によるタンパク質機能の動的秩序解析」, *Journal of Computer Chemistry Japan* (invited review) 17(1), 46-56 (2018). DOI: 10.2477/jccj.2017-0055
6. 原田隆平, “生体機能を解明する革新的分子シミュレーション技術の開拓”, 化学工業, volume 69, pages 11-21 (2018)

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、メタノール光分解反応に関する研究を物性・宇宙分野と連携して進展させ、論文を 1 報発表した.
2. 生命情報・分子進化分野間連携

伸長因子 EF-1 α の立体構造に関する理論的研究を分子進化分野と連携して進展させ、論文を 1 報発表した。

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に hybrid DFT の GPU 版を実装し、高性能計算機部門と連携してプログラムの GPU 化対応を進展させた。

8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

- 研究会「第 2 回 レア・イベントの計算科学」、志賀基之、藤崎弘士、重田育照、森下徹也、君塚肇、Dec. 1st 2018、筑波大学計算科学研究センター.

9. 管理・運営

重田育照

物理学類学類長、教養教育機構構成員、学群教育会議構成員、研究戦略室員、数理物質科学研究科運営委員、数理物質科学研究科人事委員、計算科学研究センター運営委員会委員、人事委員会委員、生命科学研究部門長

10. 社会貢献・国際貢献

集中講義・海外の大学におけるセミナー

- 重田育照、「理論化学」（集中講義）・化学コースコロキウム、13rd-14th Dec. 2018、首都大学東京大学院理工学研究科.
- 重田育照、「物性物理フロンティア」（集中講義）、10th Nov. 2018、日本女子大物理学研究科.
- 重田育照、「生物物理学」（集中講義）、30th Aug. 2018、秋田大学大学院工学研究科.
- 重田育照、「理論セミナー」27th Jul. 2018、東京大学物性研究所.

11. その他

- 重田育照、JAXA ・ 宇宙科学研究所 客員教授 (2018-2020)
- 重田育照、ポスト K 課題 7 コデザイン WG 主査 (2018-2020)
- 重田育照、生物物理学会代議員 (2018-2020)
- 重田育照、分子科学会第 6 期運営委員会委員 (2018-2020)
- 重田育照、理論化学研究会第 5 期世話人 (2018-2019)
- 重田育照、大阪大学 大学院基礎工学研究科 招聘教授 (2015-)

V-2. 分子進化分野

1. メンバー

教授 稲垣祐司、橋本哲男（共同研究員、生命環境系）
特任助教 湯山育子（生命環境系）
研究員 石谷佳之、矢崎裕規（生命環境系）
学生 大学院生 6 名（後期課程 2 名、前期課程在学 4 名）、学類生 5 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。

新奇真核微生物の系統的位置の検討

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・培養株化し、100 以上の遺伝子データから構成される大規模分子系統解析によりその系統的位置を確定する。

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、培養とトランスクリプトームおよびゲノムデータの取得を進めている。これら大規模配列データを基に、核ゲノム解析、オルガネラゲノム解析等を行う。

系統解析における方法論研究およびタンパク質立体構造と分子進化を統合した研究

解析する配列データの特徴、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が、その偏りは複数遺伝子解析ではより顕著になる。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、系統解析プログラムの高速化をふくむ各種の methodological 研究を行う。また、タンパク質の進化中で一次配列（アミノ酸配列）の変化パターンは、機能と立体構造の両者に強く影響されると考えられる。そこで立体構造的知見を取り入れ、新たな側面からタンパク質の分子進化を研究する。

3. 研究成果

【1】 新奇真核微生物の系統的位置の検討

我々はこれまでの大規模分子系統解析により①*Tsukubamonas globosa* および②*Palpitomoans bilix* の系統的位置の解明、③キнетープラスト類内部の系統関係の解明、④フォルニカータ生

物群内部の系統関係の解明、⑤*Rigifila ramosa*、コロディクティオン類、マンタモナス類から構成される“CRuMs クレード”の提案を行った（Kamikawa et al. 2014 *Genome Biol Evol* 6:306-315; Yabuki et al. 2014 *Sci Rep* 4:4641; Yazaki et al. 2016 *Genes Genet Syst* 92:35-42; Leger et al. 2017 *Nat Ecol Evol* 1:0092; Brown et al. 2018 *Genome Biol Evol* 10:427-433）。また、大規模分子系統解析により系統的位置が確定した真核微生物 PAP020 株（H27 年度年次報告書参照）と SRT308 株（H25 年度年次報告書参照）については現在投稿論文を準備中である。

今年度の報告では、2018 年度学際共同研究の成果である有孔虫類内部の系統関係とその結果に基づく分岐年代推定に関する報告を行う。また 2017 年度に引き続き、今のところ系統的位置が確定できていない真核微生物の一種である *Microheliella maris* についての解析結果についても議論する。

有孔虫門主要 5 目間の系統関係の推測

有孔虫は石灰質（ガラス質や陶器質）あるいは膠着質等の殻をもつアーベ状原生生物の一群で、基本的に海水中に棲息する。現在広く用いられている真核生物の分類体系では、有孔虫門は 5 つの目（Rotaliida、Textulariida、Miliolida、Spirillinida、Allogromiida）から構成される。有孔虫の殻は微化石として多量に産出し、その形態の多様性と複雑性から、地質年代の推定や古気候学・古海洋学等に有用な情報を提供する生物群として研究してきた。上記研究において正確な推測をするためには、多様な有孔虫の系統がどの様な順番で出現したか、すなわち高精度の有孔虫類の内部系統関係が基盤データとして必須である。ところが、現在のところ本生物群を構成する目間の分岐についてさえ十分に解明されているとは言えない。これは有孔虫現存種の大多数は実験室内での培養ができない、あるいは培養が出来ても増殖速度が遅いため、大規模配列データの整備が極めて遅れていることが主要原因である。

我々は本研究で、有孔虫の主要 5 目を代表する生物種からのトランスクリプトームデータ獲得と、その大規模配列データを基盤とした分子系統解析により有孔虫 5 目間の系統関係を高精度で再構築することを目指した。Rotaliida に属する *Ammonia beccarii*、Miliolida に属する *Quinqueloquolina* sp.、Spirillinida に属する *Spirillina* sp.、Textulariida に属する *Textularina conica* からトランスクリプトームデータを取得した。Allogromiida に属する *Reticulomyxa filose* については、他のグループがドラフトゲノムデータを公開しているのでこれを使用した。*A. beccarii* は我々の研究室において維持されている培養株を使用したが、*Quinqueloquolina* sp.、*Spirillina* sp. および *T. conica* は海水サンプルから単離した細胞から RNA サンプルを調製し、増幅した後 Illumina 社 MiSeq を用いたシーケンス解析に供した。我々が解析した有孔虫 4 種から、それぞれ 240 万～410 万リード（合計 7 億～12 億塩基対）のトランスクリプトームデータを取得した。これら有孔虫配列データを神川らが先行研究で作製した大規模複数遺伝子アライメントに追加し、最終的に 157 遺伝子から構成されるアライメントデータ（合計 41,365 アミノ酸座位）を取得した。このデータを最尤法とベイズ法を用いて有孔虫 5 目間の系統関

係を検証した。157 遺伝子解析が復元した有孔虫内部の系統関係は最尤法およびベイズ法における最大のサポート値で支持された（図 1）。今回の我々の行った 157 遺伝子解析により、有孔虫の主要系統の関係が初めて頑健に解明されたことになる。

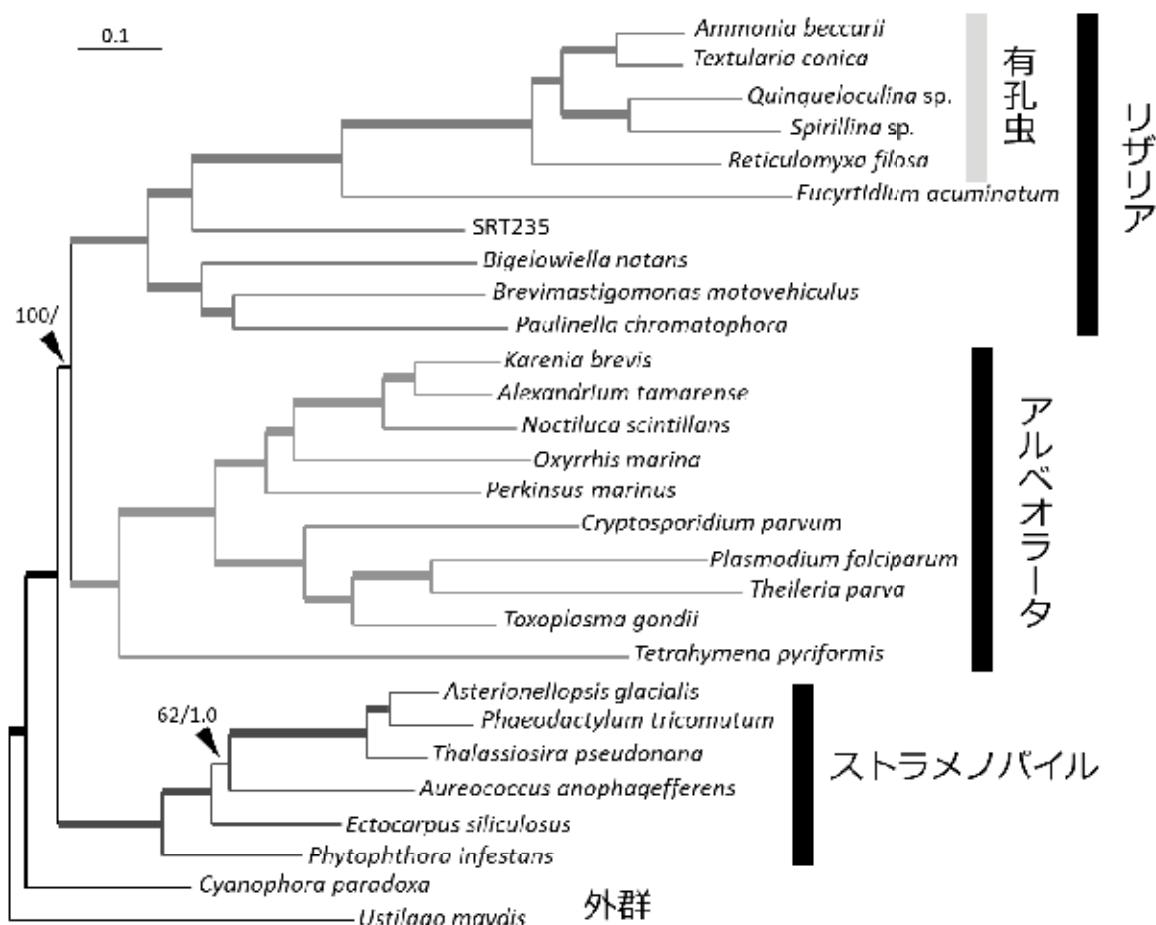


図 1. 最尤法により復元された有孔虫 5 目間の系統関係。太く表記された枝は、最尤法によるブートストラップ値 100% およびベイズ法事後確率 1.0 で支持された枝は太く表記した。矢頭でハイライトした 2 カ所の枝のみブートストラップ値を左に、事後確率を右に表記した。

157 遺伝子アライメントと頑健に復元された系統関係を用いて分岐年代推定を行った。4 遺伝子（リボソーム RNA、アクチン、 β チューブリン、RPB1）配列に基づく先行研究 (Groussin et al. 2011 *Mol Phylogenet Evol* 61:157–166) では、有孔虫の初期分岐は新原生代クリオジェニアノ紀の約 770 Mya (7 億 7 千万年前) と推測され、その 95% 信頼区間は 650–920 Mya (6 億 5 千万年–9 億 2 千万年前) と 270 Mya もの幅があった。一方 157 遺伝子解析により推測された有孔虫の初期分岐は、原生代カンブリア紀の 507 Mya (約 5 億 7 百万年前) と推測された（図 2）。また我々の解析における 95% 信頼区間は 502–523 Mya (5 億 2 百万–5 億 2 千 3 百万年前) とその幅はわずか 21 Mya となり、先行研究に比べて分岐年代推定の精度が格段に改善された。カンブリア紀は海洋環境における動物の爆発的放散が特徴であるが、動物の捕食圧の上昇が多様な殻を持つ有孔虫の多様化の背景である可能性がある。

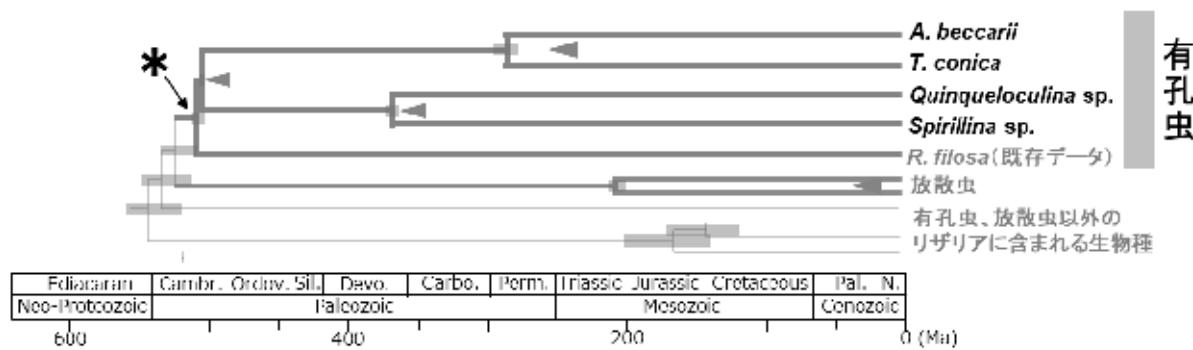


図 2. Local clock を適応したベイズ法により推測された有孔虫の分岐年代。系統樹のトポロジーは 157 遺伝子アライメントから復元したものを使い解析に使用した。有孔虫の初期分岐はアスタリスク (*) で示した。矢頭は化石データに基づく校正点を示す。系統樹の結節点に示したバーは 95% 信頼区間を示す。

338 遺伝子データに基づく *Microheliella maris* の系統的位置の検討

2017 年度では系統的位置が確定していない真核微生物種（所謂 orphan 生物種）について、157 遺伝子データでは *Microheliella maris* や未記載真核微生物 SRT605 株の系統的位置を解明できることについて報告し、使用した配列データにふくまれる進化シグナルは orphan 生物種の系統的位置を精度よく推測するのには不十分であると議論した。そこで 2018 年度にはカナダ Dalhousie 大学 Gordon Lax 博士が作成した 351 遺伝子データ (Lax et al. 2018 *Nature* 564:20-27) の分与を受け、そこに *M. maris* をふくむ orphan 生物種を追加し新たに 338 遺伝子データ（合計 98,904 アミノ酸座位）を完成させた。

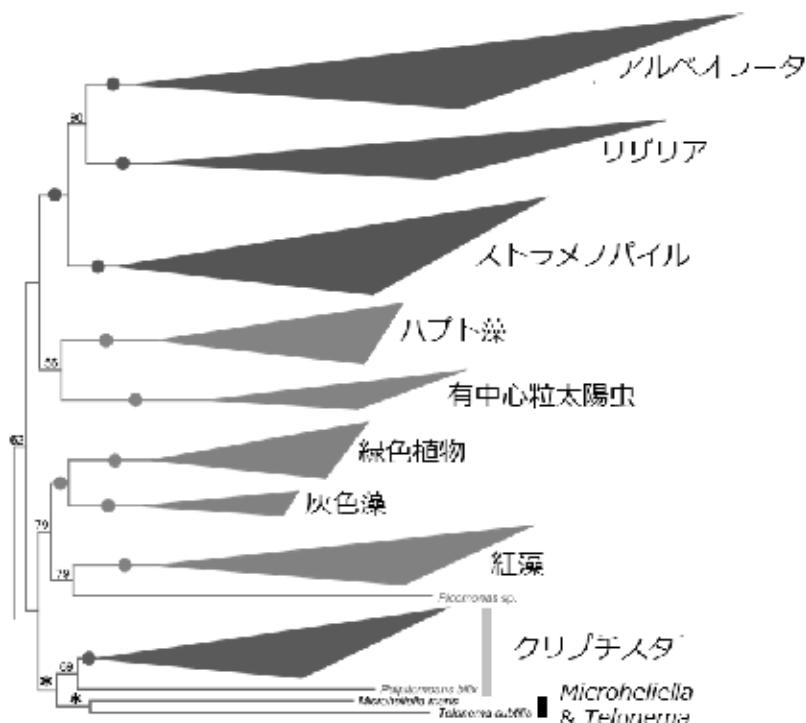


図 3. 338 遺伝子データに基づく最尤系統樹の一部。*Microheliella maris* は *Telonema subtile* と姉妹群となり、*Cryptista* (クリプチスター) の基部に位置した。ただし、図中に * で示したこれらの分岐に対する最尤法ブートストラップ解析により支持は 50% 未満であり、この系統関係について強い結論を出すことはできなかった。

M. maris をふくむ 338 遺伝子データを最尤法により解析したところ、Lax らが発表した 351 遺伝子データに基づく解析結果 (Lax et al. 2018 *Nature* 564:20-27) と矛盾しない系統樹を復元

することに成功した。*M. maris* は *Telonema subtile* と姉妹群を形成し、クリプト藻と *Palpitomonas bilix* をふくむ従属栄養性真核微生物から構成される Cryptista の基部に位置すると推定されたが、この系統的位置についてブートストラップ解析からの支持は低く、*M. maris* の系統的位置について結論を出すに至らなかった（図 3）。ただしブートストラップ解析の結果を詳細に検討したところ、*T. subtile* の系統的位置が極めて不安定であることが示唆された。338 遺伝子データにおける *T. subtile* のデータカバー率は全 98,904 アミノ酸座位の 12% と非常に低く、このため当該配列の系統的位置が安定しないのではないか推測できた。そこで *T. subtile* を除いて再度 338 遺伝子データの解析を行った結果、*M. maris* は Cryptista の基部に位置し、この関係はブートストラップ解析により頑健に支持された。今後 *T. subtile* のデータカバー率の改善した解析を行い、*M. maris* の系統的位置を再検討する必要がある。幸いなことに *T. subtile* の新しいトランスクリプトームデータが最近入手可能となった（Strassert et al. 2019 *Mol Biol Evol* 36: 757–765）。そこで 2019 年度には 338 遺伝子データをアップデートし、*M. maris* と Cryptista の近縁関係が高精度で復元されるかを確かめる。

【2】 各種トランスクリプトーム・ゲノム解析

光合成性真核微生物の色素体ゲノム解析

大多数の光合成性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、これまでの研究により 3 種の渦鞭毛藻、*Lepidodinium chlorophorum*、未記載渦鞭毛藻 2 種（MRD-151 株および TRD-132 株）では、祖先型のペリディニン色素体が緑藻（ペディノ藻）由来色素体に置換されている。我々のこれまでの研究結果は、上記緑色渦鞭毛藻 3 種は、互いに独立に細胞内共生させたペディノ藻を葉緑体化したことを示唆する。我々はこれまでに *L. chlorophorum* の色素体ゲノム（Kamikawa et al. 2015 *Genome Biol Evol* 7:1133–1140）、MRD-151 株の色素体ゲノム配列（2015 年度年次報告書）、TRD-132 株の色素体ゲノム（2016 年度年次報告書）を解読した。さらに 2017 年度年次報告書には上記 3 種の渦鞭毛藻細胞内のペディノ藻由来緑色色素体と自由生活性ペディノ藻色素体のゲノムを比較結果の概要を報告した。2018 年度には、これまで色素体ゲノム解析に供した 3 種とは異なる「第 4 の緑色渦鞭毛藻」を東京大学・岩滝光儀博士と高橋和也博士から入手し、その色素体ゲノムの解読を開始した。この研究結果については次年度以降に報告する。

真核生物系統においては、一旦獲得した光合成能力を 2 次的に失った系統が多数存在する。この光合成能力の 2 次的欠失は、光合成性真核生物の進化において独立に複数回起こっていることは確実である。ただし、2 次的に光合成能力を失った細胞の多くは縮退した非光合成性色素体を保持している。我々は光合成能力の欠失した色素体においてどのような進化が起こっているかに興味を持ち、非光合成化した珪藻の色素体ゲノム解読を中心に京都大学・神川龍馬博士と共同研究を進めてきた（Kamikawa et al. 2015 *Phycol Res* 63:19–28; Kamikawa et al.

2015 *Mol Biol Evol* 32:2598-2604; Kamikawa et al. 2017 *Mol Biol Evol* 34:2355-2366）。同様にクリプト藻において 2 次的な非光合成化が独立な複数系統で起こっていることが分かっており、非光合成化した複数のクリプト藻の色素体ゲノムの解読を行っている（国立科学博物館・谷藤吾郎博士との共同研究）。これらのデータについては来年時以降に報告する。

ミトコンドリアゲノム解析

我々は、これまで系統的に広範なミトコンドリア (Mt) ゲノムを解読し、真核生物進化における Mt ゲノムの構造、遺伝子組成、可動性イントロンの進化について研究を行ってきた (Masuda et al. 2011 *Harmful Algae* 10:130-137; Nishimura et al. 2012 *PLOS ONE* 7:e37307; Kamikawa et al. 2014 *Genome Biol Evol* 2:306-315; Nishimura et al. 2014 *Mob Genet Elements* 4:e29384; Takeuchi et al. 2015 *PLOS ONE* 10:e000132030; Nishimura et al. 2016 *Genome Biol Evol* 8:3090-3098)。さらに 2018 年度には、2016 年度に報告した有中心粒太陽虫 *Marophrys* sp. SRT127 の Mt ゲノムに関する論文を *Sci Rep* 誌に掲載した (図 4; Nishimura et al. 2019 *Sci Rep* 9:4850)。この論文では、Mt ゲノムで同定されたグループ II イントロンの大多数が、緑藻のオルガネラゲノム中のイントロンと起源を共有していることを報告した。有中心粒太陽虫は自然環境中で緑藻類を捕食し、さらに一部では捕食した緑藻の葉緑体だけを一定期間細胞内で維持する「盗葉緑体」現象が知られている。本論文では、自然環境中の有中心粒太陽虫と緑藻間の密接な関係が、イントロンの水平転移の背景だと考察した。

今年度は Cryptista に属くまれる *Hemiarma marina* の Mt ゲノムの解読を行ったので、その概要を報告する。Cryptista のメンバーのうち、我々はこれまでにカタブレファリス類 (理化学研究所・西村祐貴博士、アメリカ自然史博物館・E. Kim 博士との共同研究) と *Palpitomonas bilix* (Nishimura et al. 2016 *Genome Biol Evol* 8:3090-3098) の Mt ゲノムの解析を行ってきた。*H. marina* は、これまでメタバーコーディング解析だけで検出された Cryptista 系統の一つの実態として最近報告された生物種である。この生物種の Mt ゲノムを解読したところ、65 kb の環状 DNA であることが判明した (図 5)。詳細は省くが、*H. marina* Mt ゲノムの遺伝子レパートリーは、他の Cryptista 系統の Mt ゲノムの遺伝子レパートリーに類似していた。ただ、*H. marina* Mt ゲノムに細菌型のシトクロム c 成熟 (cytochrome c maturation/CCM) 系に関わる遺

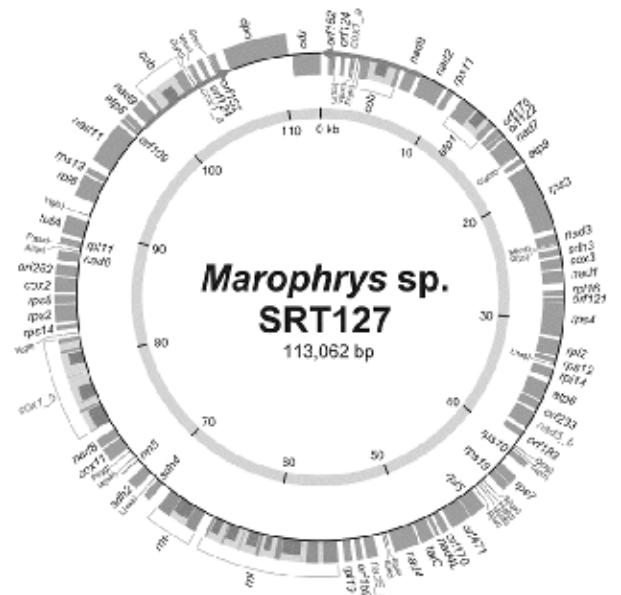


図 4. *Marophrys* sp. SRT127 のミトコンドリアゲノムマップ。タンパク質と RNA 遺伝子は濃い灰色で、イントロンは薄い灰色のボックスで示した。イントロン内の濃い灰色のボックスはホーミングエンドヌクレアーゼコード領域を示す。

伝子群がコードされていることは注目に値する(図5; *ccmA*, *ccmC* & *ccmF*は矢頭で示した)。*H. marina* Mt ゲノムデータの存在前に発表された我々の論文では、Cryptista の最原始系統である *P. bilix* は細菌型 CCM 系をもつことから、*P. bilix* が他の Cryptista 系統の祖先と分岐した後、後者で細菌型 CCM 系が失われたと推測していた(Nishimura et al. 2016 *Genome Biol Evol* 8:3090-3098)。しかし *H. marina* は *P. bilix* よりも後に分岐したにもかかわらず、その Mt ゲノムデータは細菌型 CCM 系を使用していることを示唆する。従って、この生物群における CCM 系の進化は、以前に提唱されていたよりも複雑である可能性が高い。今後 *H. marina* Mt ゲノムデータは、理化学研究所・西村祐貴博士が決定したカタブレファリス類の1種の Mt ゲノムデータと併せて投稿論文の執筆を開始する。

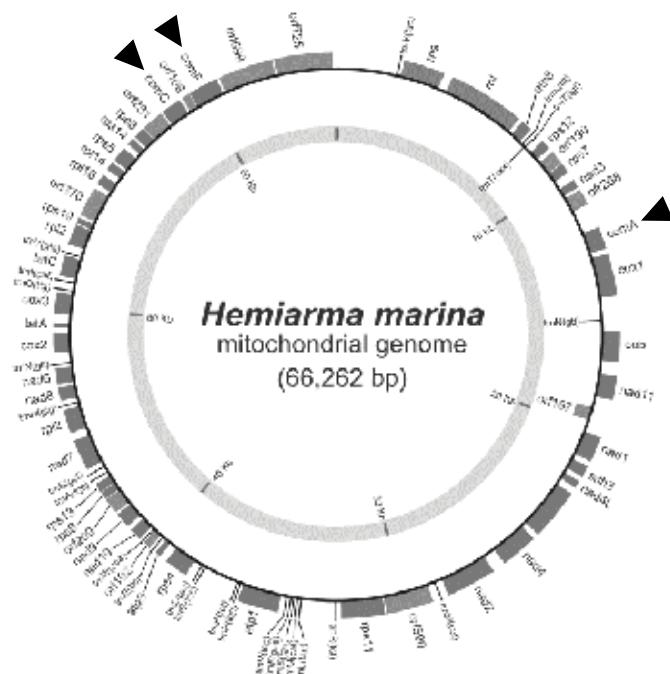


図5. *Hemiarma marina* のミトコンドリアゲノムマップ。タンパク質と RNA 遺伝子は濃い灰色で、イントロンは薄い灰色のボックスで示した。細菌型シトクロム c 成熟に関わるタンパク質遺伝子(*ccmA*, *C* & *F*)は矢頭で示した。このゲノムにはイントロンは検出されなかった。

次年度以降、以下の真核微生物の Mt ゲノム解読を予定している:①新奇真核微生物 SRT605 株、②SRT312 株 (*Glissandra* sp.)、③SRT706 株、④*Microheliella maris*、⑤有孔虫 *Ammonia berccari*、⑥放散虫 (*Didymocystis tetrathulumus* と *Acanthodesmia viniculata*)

【3】 系統解析における方法論研究およびタンパク質立体構造と分子進化を統合した研究

ミトコンドリア移行タンパク質予測プログラムの開発

これまでシステム情報工学研究科コンピュータサイエンス専攻／生命環境科学研究科生物科学専攻デュアルディグリーprogramに参加した久米慶太郎氏を中心に、アミノ酸配列とともにそのタンパク質がミトコンドリア輸送されるか否かを予測するソフトウェア NommPred を開発してきた(2016年度年次報告書参照)。これまでに利用可能なソフトウェアは、モデル生物と呼ばれるごく一部のグループから得られたデータのみを学習データとして利用していたため、このソフトウェアによる予測をモデル生物以外の系統的に広い生物種

に由来するアミノ酸配列に適用した場合、予測精度に問題が生ずることが分かっていた。そこで①非モデル生物由来のデータを広範に取り入れたデータセットを構築して学習データとし、②学習方法として勾配ブースティング（GBM）を採用した NommPred を開発した。Nommpred と既存ソフトウェアとの比較実験を行ったところ、Nommpred は非モデル生物のミトコンドリアタンパク質の予測において提案手法は既存研究と同等以上の精度を示すことが明らかとなった。このソフトウェアに関する報告は英文論文として *Evol Bioinformat* 誌に発表され (Kume et al. 2018 *Evol Bioinformat* 14:1-12) 、GitLab からダウンロード可能である (<https://gitlab.com/kkei/Nommpred>)。

立体構造情報を加味した EF-1 α —EFL 様 (EFL) タンパク質間での機能比較

翻訳伸長因子 EF-1 α と EFL はアミノアシル tRNA (aa-tRNA) に結合し、ペプチド伸長に不可欠な役割を果たす。ただし EFL の機能は生化学的に検証されたことはなく、アミノ酸配列の相同性以外に EFL が翻訳伸長因子として機能するかどうかについての生化学的・細胞生物学的実験からの知見はない。また EFL の機能を推測する上で立体構造は重要な情報であるが、EFL の三次構造はこれまでの研究で明らかとなっていない。そこで EF-1 α の情報を基に EFL 立体構造を予測し、分子動力学 (MD) シミュレーションにより EFL 三次構造モデルの妥当性を検討した (図 6)。MD シミュレーション前後の構造には大きな違いがみられず、予測された EFL 立体構造は安定であろうと考えられる。

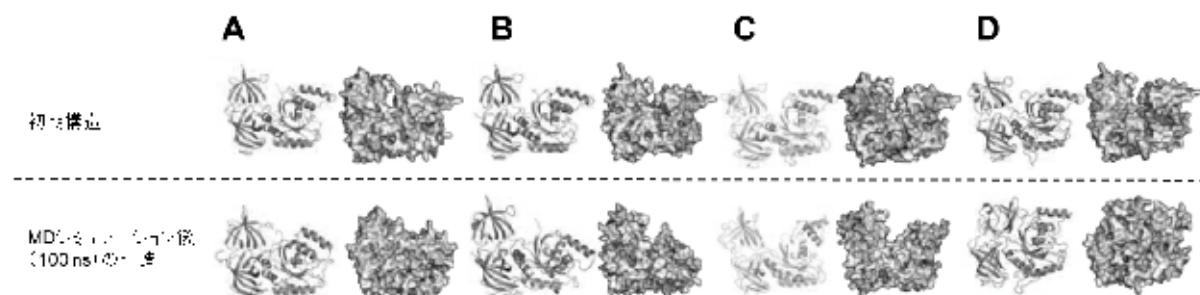


図 6. EFL タンパク質の三次構造モデル。 (A) *Subulatomonas* sp. の EFL、(B) *Pythium ultimum* の EFL、(C) *Thecamonas trahens* の EFL、(D) *Fabomonas tropica* の EFL タンパク質を示した。上段は SWISS-MODEL により作成した初期構造、下段は 100 ns の分子動力学シミュレーション後の平均的構造である。各構造の左では α ヘリックスと β シートをコイルと矢印で表示し、右図では分子表面を示した。

通常真核生物は EF-1 α あるいは EFL のどちらかをもつが、特定の種では EF-1 α と EFL の両方をもつ「dual-EF 生物種」も知られている。この dual-EF 生物種のもつ EF-1 α (divEF-1 α) の一次配列は、他の生物種の EF-1 α の 1 次配列とは大きく異なっている。そのため dual-EF 生物では、翻訳伸長因子としての機能は EFL が担い、divEF-1 α は aa-tRNA との結合能が低い (あるいは欠失している) のではないかと提唱されている。そこで本研究では dual-EF 生物種のもつ特徴的 EF-1 α は、dual-EF 生物以外の持つ典型的 EF-1 α あるいは EFL (solo-EF) ほど強く aa-tRNA に結合することができないという仮設を立て、その検証を行うために各種 EF-1 α と EFL の三次構造のホモジーモデリングを行い、分子動力学計算により三次構造モデルの

妥当性と安定性を確認した。この三次構造モデルをもちいた表面電荷計算および分子ドッキング計算では、一貫して divEF-1 α と aa-tRNA 間の結合は、solo-EF と aa-tRNA 間の結合ほど強くないと推測された。上記研究は生命科学研究部門生命機能情報分野との共同研究であり、その成果は英文論文として出版された (Sakamoto et al. 2019 *ACS Omega* in press)。

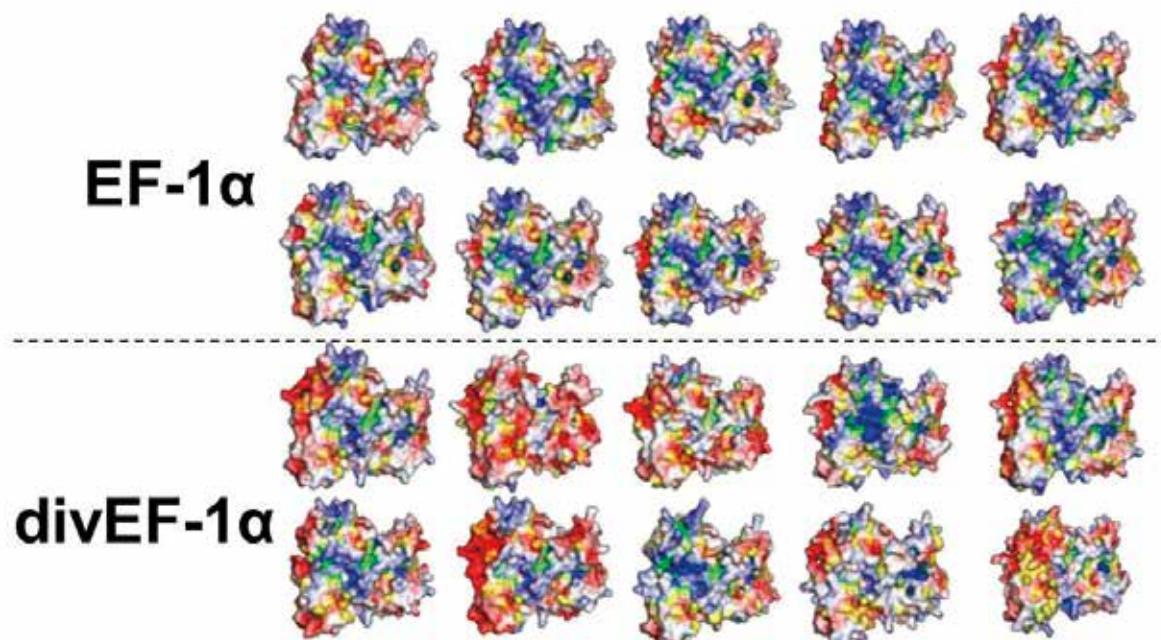


図 7. 各種 EF-1 α および EFL タンパク質の三次構造モデルで予測された分子表面の静電ポテンシャル。点線の上は EF-1 α 、下は EFL と共に存在する EF-1 α (div EF-1 α) である。EF-1 α では分子表面が正に帯電する傾向がある (青く表示された部分) 一方、div EF-1 α では同じ分子表面が負に帯電する傾向が強い (赤く表示された部分)。EF-1 α が翻訳伸長因子として機能するなら、tRNA 結合部は正に帯電する方が負に帯電した aa-tRNA と相互作用しやすいと考えられる。

この他、①真核生物と古細菌の翻訳終結因子の C 末端ドメインにおける部分的欠失の進化、②細菌類がもつ ATP 硫化酵素の進化的起源について構造的見地からの検証を行っている。これらの研究も生命科学研究部門生命機能情報分野との共同で行っている。

4. 教育

久米慶太郎, 博士 (理学), 論文名 : Evolution of Mitochondrion-related Organelles in Metamonada

松尾恵梨子, 博士 (理学), 論文名 : Evolution of Nuclear and Plastid Genomes in Dinoflagellates Experiencing Plastid Replacements

田村拓海, 修士 (理学), 論文名 : 大規模トランスクリプトームデータ解析による *Aduncisulcus paluster* のミトコンドリア関連オルガネラ機能の推測

今泉彩香, 学士 (理学), 論文名 : 単細胞真核生物 *Microheliella maris* の大規模分子系統解析

宇川尚登, 学士 (理学), 論文名 : サンゴ-褐虫藻共生系に関する褐虫藻遺伝子の網羅的
解析

川久保卓志, 学士 (理学), 論文名 : 葉緑体を置換すると光合成関連遺伝子群には何が起
こるか?

曾根原奎斗, 学士 (理学), 論文名 : クリプチスタ生物群におけるシトクロム c 成熟系の
複雑な進化 : *Hemiarma marina* ミトコンドリアゲノムに基づく一考察

原田亮, 学士 (理学), 論文名 : 真核生物におけるファミリー A タイプ DNA ポリメラーゼの多様性と分布 : 新たなタイプのミトコンドリア DNA ポリメラーゼ同定
を目指して

集中講義など
なし

5. 受賞、外部資金、知的財産権等

受賞

1. 生命環境科学研究科 専攻長表彰, 久米慶太郎, 2019 年 3 月 25 日
2. 筑波大学茗渓会賞, 宇川尚登, 2019 年 3 月 25 日

外部資金

(名称、氏名、代表・分担の別、採択年度、金額、課題名)

1. 科学研究費補助金 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (B)), 稲垣祐司 (代表), 2018-2023 年度, 交付額 : 直接経費 1,800 千円, 間接経費 540 千円, 海洋原生生物に共生する細菌多様性の実態解明 (課題番号 18KK0203)
2. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 稲垣祐司 (代表), 2016-2018 年度, 交付額 : 直接経費 3,200 千円, 間接経費 960 千円, 湧鞭毛藻細胞内に発見された新たな共生体痕跡核ゲノムの解析 (課題番号 16H04826)
3. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 稲垣祐司 (分担) (代表・濱健夫), 2016-2018 年度, 交付額 : 直接経費 2,200 千円, 間接経費 660 千円, 海洋バクテリアの長期炭素隔離機能に対する海洋酸性化の影響評価 (課題番号 16H02967)
4. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 稲垣祐司 (分担) (代表・谷藤吾朗), 2017-2020 年度, 交付額 : 直接経費 3,100 千円, 間接経費 930 千円, 非光合成生物の光適応進化の全容解明 (課題番号 17H03723)

5. 科学研究費補助金 基盤研究（C），石谷佳之（代表），2018-2020年度，交付額：直接経費1,000千円，間接経費300千円，大規模分岐年代推定—真核生物の誕生と進化を解き明かす！—（課題番号18K03820）
6. 科学研究費補助金 基盤研究（B），石谷佳之（分担）（代表・氏家由利香），2017-2019年度，交付額：直接経費3,000千円，間接経費900千円，有孔虫における殻形成機構の解明—石灰化のブラックボックスを開く—（課題番号17H02978）
7. 科学研究費補助金 基盤研究（C），石谷佳之（分担）（代表：藤木徹一），2016-2018年度，交付額：直接経費900千円，間接経費270千円，「原核藻類と原生動物の光共生に関する研究（課題番号16K00532）」
8. クリタ水・環境科学振興財団 国内研究助成，湯山育子（代表），2018年度，950千円，造礁性サンゴ体内の褐虫藻の増加に影響する物質の特定（課題番号18B083）

知的財産権

なし

6. 研究業績

(1) 研究論文

A) 査読付き論文

1. Sakamoto K, Kayanuma M, Inagaki Y, Hashimoto T, Shigeta Y. In silico structural modeling and analysis of elongation factor-1alpha and elongation factor-like protein. 2019 *ACS Omega* *in press*.
2. Nishimura Y, Shiratori T, Ishida K, Hashimoto T, Ohkuma M, Inagaki Y. Horizontally-acquired genetic elements in the mitochondrial genome of a centrohelid *Marophyris* sp. SRT127. 2019 *Scientific Reports* 9:4850. Doi: 10.1038/s41598-019-41238-6
3. Kamikawa R, Yazaki E, Tahara M, Sakura T, Matsuo E, Nagamune K, Hashimoto T, Inagaki Y. Fates of evolutionarily distinct, plastid-type glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes in kareniae dinoflagellates. 2018 *Journal of Eukaryotic Microbiology* 65(5):669-678. Doi: 10.1111/jeu.12512
4. Matsuo E, Inagaki Y. Patterns in evolutionary origins of heme, chlorophyll *a* and isopentenyl diphosphate biosynthetic pathways suggest non-photosynthetic periods prior to plastid replacements in dinoflagellates. 2018 *PeerJ* 6:e5345. Doi: 10.7717/peerj.5345
5. Matsuo M, Katahata A, Satoh S, Matsuzaki M, Nomura M, Ishida K, Inagaki Y, Obokata J. Characterization of spliced leader *trans*-splicing in a photosynthetic rhizarian amoeba,

- Paulinella micropora*, and its possible role in functional gene transfer. 2018 **PLOS One** 13(7): e0200961. Doi: 10.1371/journal.pone.0200961
6. Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Naito Y, Hishiki T, Mori M, Suematsu M, Shomi K, **Hashimoto T**, Nozaki T. Characterization and validation of *Entamoeba histolytica* pantothenate kinase as a novel antiamebic drug target. 2018 **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** 8(1):125-138. Doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.02.004
 7. Bradley A, **Hashimoto T**, Ono M. Elucidating T cell activation-dependent mechanisms for bifurcation of regulatory and effector T cell differentiation by multidimensional and single-cell analysis. 2018 **Frontier in Immunology** 9:1444. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01444
 8. Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Hishiki T, Naito Y, Suematsu M, **Hashimoto T**, Nozaki T. Biochemical, metabolomics, and genetic analyses of dephospho coenzyme A kinase involved in coenzyme A biosynthesis in the human enteric parasite *Entamoeba histolytica*. 2018 **Frontier in Microbiology** 9:2902. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02902
 9. **Kume K**, Amagasa T, **Hashimoto T**, Kitagawa H. NommPred: Prediction of mitochondrial and mitochondrion-related organelle proteins of nonmodel organisms. 2018 **Evolutionary Bioinformatics** 14:1-12. Doi: 10.1177/1176934318819835.
 10. **Yuyama I**, Ishikawa M, Nozawa M, Yoshida M, Ikeo K. Transcriptomic changes with increasing algal symbiont reveal the detailed process underlying establishment of coral-algal symbiosis. 2018 **Scientific Reports** 8:16802. Doi: 10.1038/s41598-018-34575-5

B) 査読無し論文

1. **湯山育子**. ゲノム, ランスクリプトームデータから明らかにされる刺胞動物—藻類の細胞内共生. 2018 生物科学 69(4):1087-1090.

(2) 国際会議発表

A) 招待講演

1. **Yuji Inagaki**. Heterotrophic side of the tree of the eukaryotic life. Seminor in Station Biologique de Roscoff, Jan. 18, 2019, Station Biologique de Roscoff (Roscoff, France)
2. **Yuji Inagaki**. Recent progress in understanding the early evolution of eukaryotes based on phylogenomic data-analyses. 第 10 回「学際計算科学による新たな知の発見・統合・創出」シンポジウム, Oct 15-16, 2018, 筑波大学 (つくば市, 茨城県)
3. **Yuji Inagaki**. Novel eukaryotes for elucidating the early eukaryotic evolution., ISEP18, May 27-Jun 1, 2018, Droushia Heights Hotel (Paphos, Cyprus)

B) 一般講演

1. Takashi Shiratori, Akinori Yabuki, Euki Yazaki, Yuki Nishimura, Moriya Ohkuma, Katsunori Fujikura, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki, Ken-ichiro Ishida. Orphan protistology, accelerating in Japan. Joint meeting of the Japan Society of Protistology and the Korean Society of Protozoologists, Jul 13-15, 2018, Korea Institute of Ocean Science & Technology (Jeju Island, Korea)
2. Yoshiyuki Ishitani, Yurika Ujiie, Euki Yazaki, Takashi Toyofuku, Yukiko Nagai, Yuji Inagaki. FORAMS2018, June 17-22, 2018, University of Edinburgh (Edinburgh, UK)
3. Takuro Nakayama, Yoshito Takano, Mami Nomura, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Goro Tanifuji, Yuji Inagaki, Masakado Kawata. Genome analysis of a symbiotic cyanobacterium in a dinophysialean dinoflagellate, *Orthocercus magnificus*. ISEP18, May 27-Jun 1, 2018, Droushia Heights Hotel (Paphos, Cyprus)
4. Goro Tanifuji, Ryoma Kmikawa, Chista E Moore, Tyler Mills, Naoko T Onodera, John M Archibald, Yuji Inagaki, Tetsuo Hashimoto. Comparative genomics of photosynthetic and non-photosynthetic *Cryptomonas* (Cryptophyta) species. ISEP18, May 27-Jun 1, 2018, Droushia Heights Hotel (Paphos, Cyprus)

(3) 国内学会・研究会発表

A) 招待講演

1. 稻垣祐司. ゲノム・トランスクリプトームデータを用いて推測される真核生物の初期分岐. 第 1 回ゲノム・分子進化・構造の会, Feb. 8, 2019, 筑波大学サテライトオフィス (つくば市, 茨城県)

B) その他の発表

1. 白鳥峻志, 矢崎裕規, 久米慶太郎, 稻垣祐司, 橋本哲男, 石田健一郎. 新奇原生生物 SRT308 株が明らかにするユーグレノゾアの初期進化. 日本藻類学会第 43 回大会, March 15-17, 2019, 京都大学 (京都市, 京都府)
2. 石谷佳之, 矢崎裕規, 氏家由利香, 稻垣祐司. 有孔虫の大規模分岐年代推定. 高知大学海洋コア総合研究センター共同利用成果報告会, March 7-8, 2019, 高知大学海洋コア総合研究センター (南国市, 高知県)
3. 松尾充啓, 渕端篤, 立川誠, 水口洋平, 野口英樹, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 鈴木穣, 佐藤壮一郎, 中山卓郎, 神川龍馬, 野村真未, 稻垣祐司, 石田健一郎, 小保方潤一. 有殻アメーバのゲノム解析から見えてきた一次細胞内共生進化における DNA ウィルスの役割. 日本共生学会第 2 回大会, November 24-25, 2018, 神戸大学百年記念会館六甲ホール (神戸市, 兵庫県)

4. 矢崎裕規, 上原忠晃, Guifré Torruella, 水島昇, 橋本 哲男, 稻垣祐司. オートファジーの普遍性の検証 ~オピストコンタとその近縁系統について~. 第 11 回オートファジー研究会, November 18-20, 2018, つま恋リゾート彩の郷 (掛川市, 静岡県)
5. 矢崎裕規, 上原忠晃, 坂本寛和, 水島昇, 橋本哲男, 稻垣祐司. 涡鞭毛藻細胞内共生珪藻にもオートファジーはあるのか?! 第 51 回日本原生生物学会大会, October 19-21, 2018, 島根大学 (松江市, 島根県)
6. 上原忠晃, 矢崎裕規, Guifré Torruella, 橋本哲男, 稻垣祐司. オピストコンタおよび近縁系統におけるオートファジー関連遺伝子の網羅的探索. 日本進化学会第 20 回大会, August 22-25, 2018, 東京大学駒場キャンパス (目黒区, 東京都)
7. 湯山育子. サンゴの白化現象に伴う遺伝子発現変動, 第 41 回日本分子生物学会年会. November 28-30, 2018, パシフィコ横浜 (横浜市, 神奈川県)
8. 湯山育子. 遺伝子発現から明らかにする サンゴと褐虫藻の白化時の変化. 第 21 回日本サンゴ礁学会, November 22-25, 2018, 琉球大学 (中頭郡, 沖縄県)

(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. A. J. Roger 博士および A. G. B. Simpson 博士 (ダルハウジー大・カナダ) との共同研究: メタモナス生物群の系統関係と嫌気性ミトコンドリア機能の解析
2. E. Kim 博士 (アメリカ自然史博物館・アメリカ合衆国) との共同研究: カタブレファリス類のミトコンドリアゲノム解析
3. M. Eliáš 博士 (Ostrava 大学・チェコ共和国) 等との共同研究: ヘテロロボサ類の系統関係と嫌気性ミトコンドリア機能の進化
4. V. Hampl 博士 (チャールズ大学・チェコ共和国) との共同研究: ユーフレノゾアにおけるミトコンドリア DNA ポリメラーゼの進化
5. De Vargas 博士 (CNRS/ロスコフ海洋研究所・フランス) との共同研究: 海洋原生生物に共生する細菌多様性の実態解明

8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

なし

9. 管理・運営

稻垣祐司：生命環境科学研究科教務委員、生物科学専攻カリキュラム委員、計算科学研究センター運営委員、計算科学研究センター共同研究委員

10. 社会貢献・国際貢献

なし

11. その他

1. 海洋研究調査船みらい観測航海 (MR18-04 Leg. 1) , 期間：2018年7月16日－8月17日，参加者：石谷佳之、矢崎裕規