

## 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  | 西澤 宏晃                                                                |
| 助教  | 堀 優太                                                                 |
| 研究員 | 三嶋 謙二                                                                |
| 研究員 | 鬼頭（西岡） 宏任（JST-PRESTO）                                                |
| 研究員 | 満田 祐樹（JSPS 特別研究員）                                                    |
| 研究員 | Kowit Hengphasatporn                                                 |
| 学生  | 大学院生 5 名（数理物質科学研究科後期課程 1 名（社会人）、前期課程 4 名）<br>学類生 2 名（物理学類）、2 名（生物学類） |

#### 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生体分子に注目し、その機能を分子構造、電子状態レベルからより詳細に解明することを目的としている。令和元年度は、【1】中分子環状ペプチドの膜透過プロセスの解明、【2】光合成酸素発生中心の反応機構の解明、【3】DFTB-MD 計算手法の開発、【4】無水プロトン伝導物質の伝導機構の解明、【5】ヘリオバクテリアの励起エネルギー移動の解明、【6】自由エネルギー反応経路探索法の開発、【7】バーチャルスクリーニング手法の開発、【8】C 型フィコシアニン色素の励起状態構造変化の解明、【9】星間空間におけるメタノール生成シミュレーションなどの研究を大きく進展させることができた。これらの研究では、計算科学研究センターのスパコン（Cygnus）の利用と国内のスパコンを利用した。筑波大学内外の研究グループと共同研究し、新しい研究にも積極的に取り組んだ。

### 3. 研究成果

#### 【1】中分子環状ペプチドの膜透過プロセスを抽出する計算手法の開発（原田、重田）

中分子環状ペプチドは、合成上のコストが安価（中分子）であることに加え、構造が環状であることから、生体内に取り込まれた際に分解されにくく、標的分子と相互作用して効率的に活性を阻害可能であるため、創薬研究において注目を浴びている。本年度は、現実的な計算コストで膜透過プロセスを抽出するために、生体分子のレアイベントサンプリング法である Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) を適用し、その抽出を試みた。PaCS-MD は、生体分子の機能発現に重要な長時間ダイナミクス（レアイベント）を効率的に抽出する計算手法である。具体的には、中分子環状ペプチドの膜透過プロセスをレアイベントとみなして PaCS-MD により抽出し、膜透過に伴う構造変化を原子レベルの分解能で解析した。PaCS-MD による膜透過プロセス抽出の概念に関しては、図 1

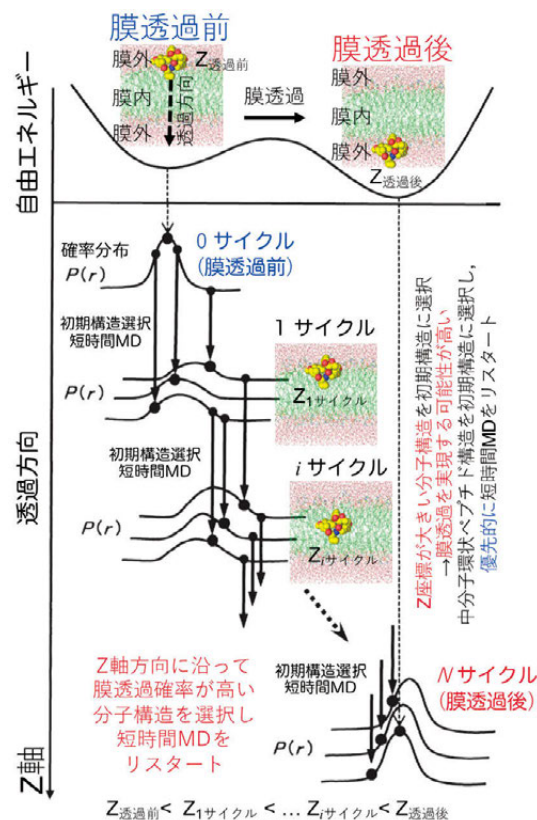


図 1. PaCS-MD に基づく膜透過プロセス

を参照にされたい。膜透過性を定量的に評価するために、抽出した膜透過プロセスの時系列データ（原子座標トラジェクトリ）からマルコフ状態モデルを構築し、膜透過に伴う自由エネルギーを計算した。自由エネルギー情報から、膜透過時の特徴的な構造変化を抽出すると共に、膜透過を実現するにはどれ程の自由エネルギー障壁が存在するのか、また、設計した環状構造（アミノ酸配列）と相関があるのかを考察した。これにより、合理的な中分子医薬を実現する設計情報を提供可能な方法論を構築することが可能となる。具体的な計算として、モデル環状ペプチドの膜透過プロセスの抽出に開発手法を適用し、膜透過に伴う自由エネルギー計算を実行した。詳細な自由エネルギープロファイル解析により、膜侵入時に環状ペプチドは大規模な構造変化を伴うことが明らかになった。物理化学的には、親水性が高い膜外領域では疎水残基を外側に配置した分子の大きさ（慣性半径）が大きな構造をとる確率が高いが、疎水性が高い膜内部では疎水基を内側に配置した慣性半径が小さい構造に遷移することが分かった。膜透過時の構造変化として各々の残基の二面角が大きくフリップすることが観測され、より合理的に疎水性残基を内外に構造変化させることで膜透過性を高めていることが分かった。通常の MD ではこの様な環状ペプチド内の二面角変化を伴うレアイベントを

抽出することが難しく、本研究で適用したレアイベントサンプリング法の重要性を示すことができた。

## 【2】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（庄司）

光化学系 II(PSII)では光エネルギーを利用して水分子を酸素分子に変換する反応( $2\text{H}_2\text{O} + 4\text{h}\nu \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$ )を触媒しており、クリーンかつ効率的なエネルギー変換システムが非常に注目されている。2018 年には時分割構造解析法(SFX)の発展により、触媒サイクル全ての反応中間体( $\text{S}_i, i=0-3$ )構造が解明され、反応過程の構造変化が直接観測できるようになった。そのため、我々は大規模 QM/MM モデル(QM Atoms=380)を作成し、各 S 状態における Mn クラスターの特徴的構造変化とプロトン化状態、周辺アミノ酸との相互作用について理論解析を進め、SFX 構造との構造比較を行った(図 2)。その結果、Mn-Mn, Ca-Mn 距離については実験結果と良い一致が得られた。Mn-O や O5-O6 距離については未だ一致が良くない結果が得られた。その理由として、電子状態の検討や状態混合、分解能の妥当性について考察を行った。

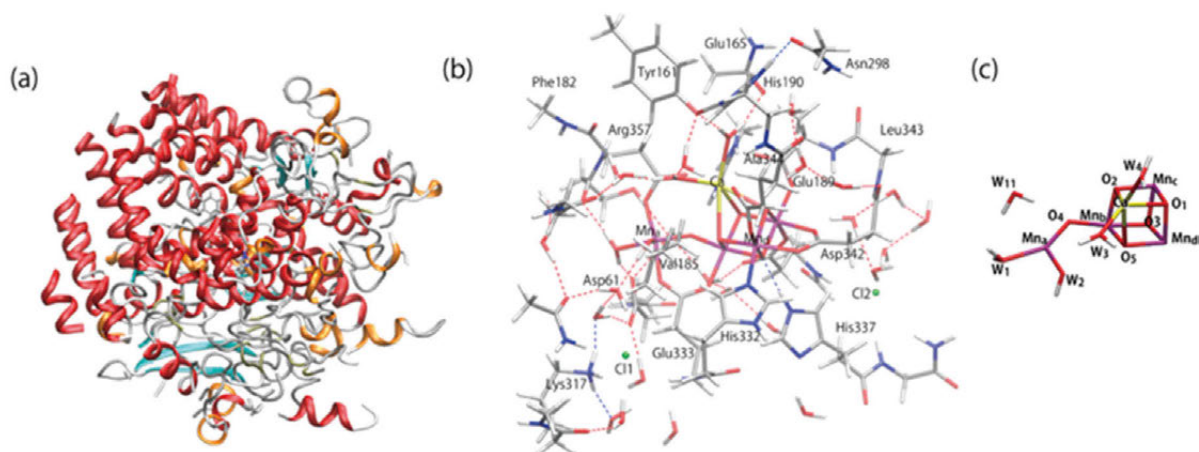


図 2. PSII-OEC の理論計算に用いた(a)QM/MM 計算全系と(b)大規模な QM 領域(Tube 表示)。Mn クラスター周辺のアミノ酸残基や  $\text{Cl}^-$ , 水分子が含まれており、水チャンネルや水素結合ネットワークを含めた。(c)反応中心の Mn クラスター部拡大図。

## 【3】DFTB-MD 計算におけるエネルギー保存と拘束手法の検証（西澤）

分子動力学 (MD) シミュレーションは生体分子の安定性などを求める際に広く用いられ、成功を収めている。しかし、原子間の相互作用を古典的なパラメーターを用いて求めるために、結合変化を伴う反応を取り扱うことができない。このような電子状態の変化を取り扱うには量子化学計算が適しているが、計算コストの大きさが問題であった。そこで近年、計算

コストが低く、比較的精度の良いという理由から半経験的手法の 1 つである密度汎関数強束縛 (DFTB) 法を用いた MD シミュレーション (DFTB-MD) が行われるようになってきた。MD シミュレーションを用いた計算結果から正しい統計平均を得るには多くのサンプリングが必要であり、その全エネルギーが保存している必要がある。しかし、DFTB-MD シミュレーションに対して、統計平均の正しさを保証するような研究結果はあまり多くない。そこで、本研究では DFTB-MD 法に関して全エネルギーが保存しているかを検証し、本手法の妥当性について検証した。その結果、量子化学計算に基づく MD 計算では、通常の古典 MD とは異なり Pulay 力と呼ばれる力の取り扱いが重要であり、この項を取り扱うことで正しく全エネルギーを保存させることができることを示した。また、拘束条件を用いた手法を組み合わせることで時間刻みを大きくしても全エネルギーを保存させることが可能となり、4 倍程度サンプリングの効率を向上させることができることが分かった。

#### 【4】無水プロトン伝導物質中の伝導機構の解明に向けた理論解析（堀）

イミダゾール(Im)を含む酸塩基複合体は、無水プロトン伝導物質として注目されている。その伝導機構は、水素結合ネットワークを介した「プロトン移動」と「水素結合ネットワークの再配向」の過程を含む Grotthuss 型機構が提案されており、再配向過程がプロトン伝導の律速だと考えられている。本研究では、MD 計算によりポリビニルホスホン酸(PVPA)と Im の複合体(PVPA- $x$ Im)中の Im の水素結合構造と分子ダイナミクスを調べることで、複合体中で起こるプロトン伝導機構について考察した (図 3)。

動径分布関数から PVPA- $x$ Im 中では、PVPA と Im 間で強い水素結合が形成されることがわかった。一方で、PVPA- $x$ Im 中では、Im 単体中と同じ局所構造を持つ Im クラスタが形成されることが予想され、その割合は、Im( $x$ )の量が大きくなるにつれて大きくなっていくことが示唆された。

Im の拡散係数および回転の相関関数より PVPA- $x$ Im 中の Im の運動性を調べた。PVPA- $x$ Im 中では、Im 単体に比べ運動性が減少することがわかった。また、 $x$  の値が増加するにつれて Im の運動性が増加するので、PVPA- $x$ Im 中では、Im の濃度( $x$ )が Im の運動をコントロールする重要な因子になり得ることが予想された。

以上より、PVPA- $x$ Im 中では、PVPA と Im 間の強い水素結合のために、Im は PVPA 周辺で凝集した状態にあることがわかった。また、Im の分子運動は、PVPA 周辺ではなく、Im 間のみの水素結合上で促進されることが考えられる。よって、プロトン伝導は、PVPA と Im 間および Im と Im 間の水素結合に関わる Grotthuss 型機構で発現することが予想される。

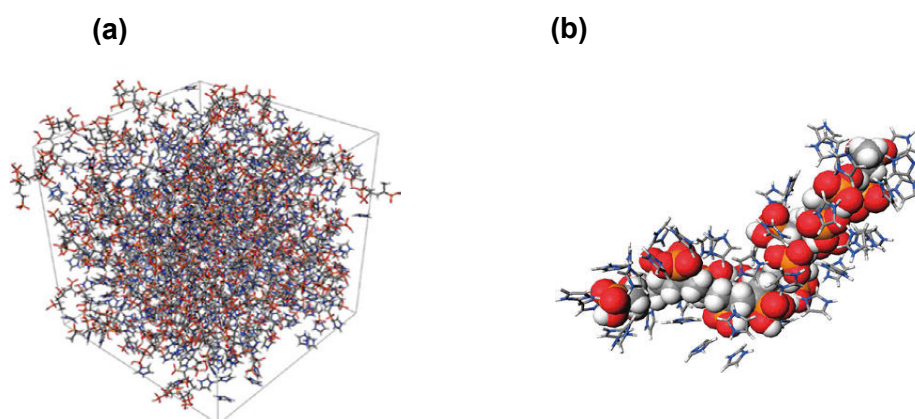


図 3. (a) PVPA-1Im の MD スナップショットと(b) PVPA 周りの局所構造

#### 【5】ヘリオバクテリア Type-I 光合成反応中心の励起子相互作用解析（鬼頭）

光合成反応初期過程を担う反応中心(RC)蛋白質は、大きく 4 種類に分類される。その中で、非酸素発生 I 型 RC のみ、その 3 次元構造が未解明であった。2017 年にヘリオバクテリア I 型 RC(hRC)の X 線結晶構造が遂に報告され、hRC 中ではアンテナ色素として、54 バクテリオクロフィル-g(BChl-g)、4Bchl-g'、2Chl-aF が、図 4 のように 2 回回転対称性を保つように配置されていることが分かった。

本研究では、hRC の持つ光捕集機構を調べる為、アンテナ色素間の励起子相互作用を計算し、シアノバクテリアが持つ酸素発生 I 型 RC(PSI)中の Chl-a 間励起子相互作用と比較した。従来の Förster 理論を用いた研究では、励起子間相互作用は、遷移双極子-双極子相互作用(d-d)で近似される。一方、hRC や PSI のように、アンテナ色素が密に会合している場合には、d-d 近似が成り立たなくなることが良く知られている。そこで、時間依存密度汎関数理論(TD-DFT)法によって各色素の遷移 ESP 電荷を求め、Poisson 方程式と組み合わせることで、蛋白質・溶媒の電子分極遮蔽効果も取り入れた、高精度な励起子相互作用計算(P-TrESP)を実行した。

P-TrESP 法の結果から、PSI では d-d 近似が成り立たないことが分かった。一方、図 4 (右)のように hRC では d-d 近似の相互作用と P-TrESP で求めた相互作用は良い相関を示した。この性質の違いの原因として、(1)BChl-g と Chl-a の遷移電荷分布の違い、(2)hRC と PSI の色素配置の違い、が考えられる。そこで、両 RC 間で仮想的な色素置換を行い、励起子相互作用変化を解析することで、上記の 2 つの要因の定量的な評価を行った。その結果、両方とも重要で、hRC の特有な色素配置に BChl-g を保有することによって、d-d 近似が適用し易い RC になっていることが明らかになった。この性質が、ヘリオバクテリア特有の光捕集効率に重要な役割を果たしていると考えられる。



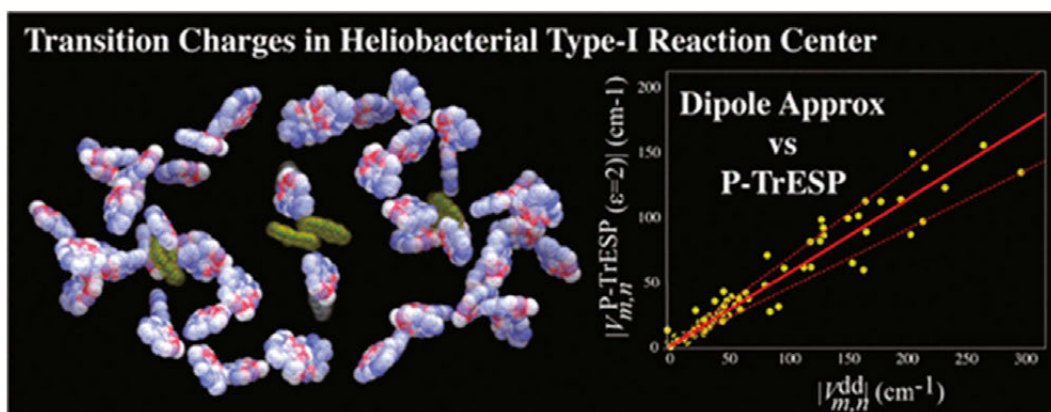


図 4. hRC 中の色素配置と励起子相互作用の計算結果

**【6】有効流量法による自由エネルギー地形での主要反応経路の探索（満田）**

より高次元の自由エネルギー地形計算が可能となるように計算手法の改善、解析手法の開発を行った。まず、解析手法として、「有効流量法」を開発した。この方法では、得られた反応経路ネットワークから反応速度を算出し、それを元に時間発展シミュレーションを行う手法である。このシミュレーションから反応の主要経路を発見することができる。実際にアラニンオクタペプチドに対してこの手法を適用し、重要な経路を割り出すことに成功した。さらに、計算手法自体の改善として、いままで自由エネルギー地形計算をアンブレラサンプリング法に限っていたところを、一般的な自由エネルギー地形計算に適用できるよう計算プログラムを改良した。これによって、メタダイナミクス法などの低コストな手法でも反応経路探索法の適用が可能となり、自由エネルギー反応経路ネットワークの算出が可能となった。さらに、メタダイナミクス法の計算結果から、各反応経路の反応速度を割り出すことができるため、それを元に反応経路ネットワークを定常状態近似で縮約し、フォールディング構造を安定点の集合として捉えることで、構造揺らぎを含めたエントロピー評価が可能となった。

**【7】 Antiviral agent discovery through computational study and calculation at atomistic level (Hengphasatporn, Shigeta)**

According to the Dr. K. Hengphasatporn's previous study, FN5Y was used as a template to search for the novel potent molecule from flavonoid databases using multiple virtual screening strategies that newly develops in this study. Besides, several computational techniques, such as all-atom MD simulations, pharmacophore-based virtual screening, molecular docking, binding free energy calculations, and FMO method, he has also developed a program to predict the possible binding sites of structural protein using a Python script and confirmed the results by the molecular docking method. In addition, the trajectory from molecular dynamics (MD) simulation was analyzed the binding affinity using the integration of quantum and molecular mechanics approaches, including pharmacophore-based

virtual screening to search for the novel potent inhibitors screening. The inhibitory effect and binding affinity of flavone derivative (F18) are greater than FN5Y about three-fold at 4 binding sites, which is confirmed by computational and experimental assay.

Another study, our team reveals the inhibitory effect of phenolic lipid; cardol triene, on dengue E protein using cell-based assay, and the binding pattern and interaction is also supported by the binding free energy calculation. However, the time of addition study showed the series of inhibition that result indicates the compound might disturb other proteins and some inhibitors cannot be specified the protein target based on an experimental study. The possible targets of this compound were predicted using a homopharma concept and network-based method as shown in his recent article.

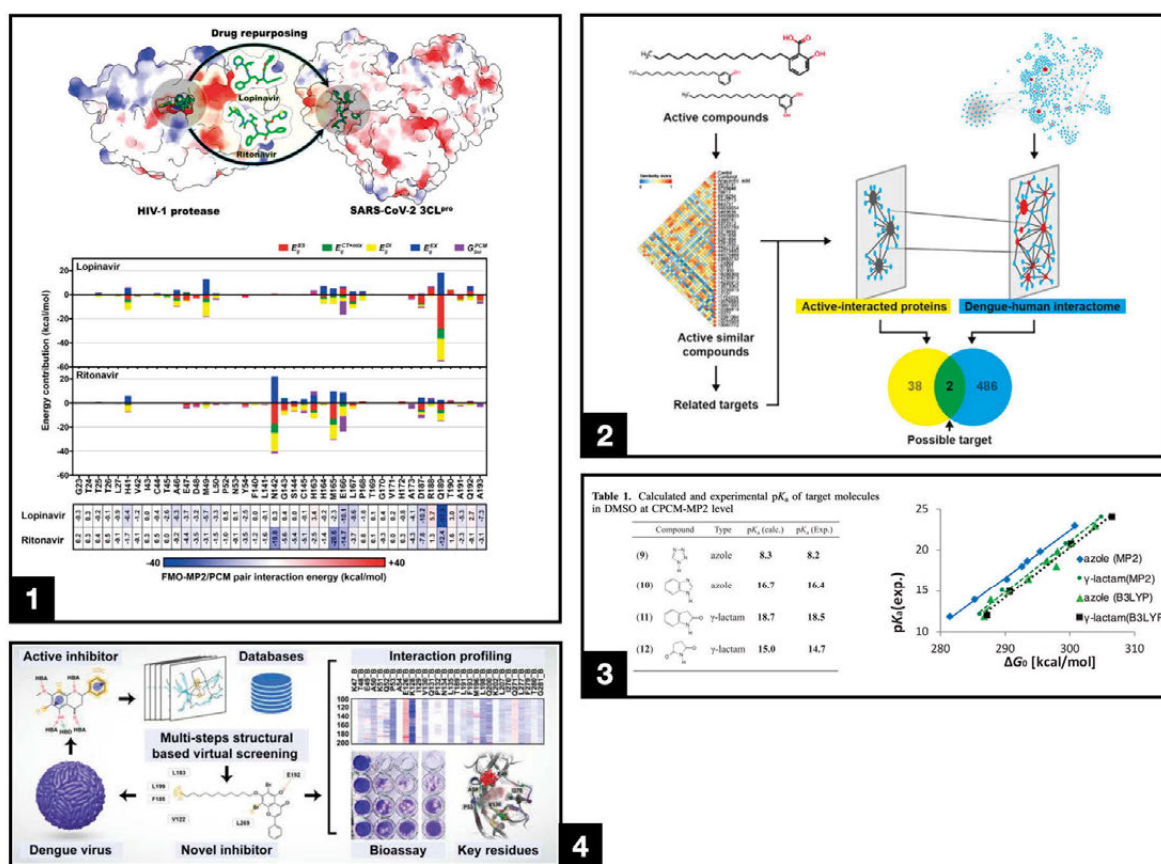


Fig.5. The overview of this study. (1) FMO study of lopinavir and ritonavir on SARS-CoV2 3CL pro, (2) Dengue viral target identification of phenolic lipids, (3) the estimation of acid dissociation ( $pK_a$ ), and (4) the study of multiple virtual screening strategies.

He theoretically estimated  $pK_a$  of N-containing heterocycles in DMSO by a quantum chemistry method with a polarizable continuum model, which was previously developed for estimating  $pK_a$  of molecules in water. Furthermore, he also calculated the permeability of middle-sized drugs through lipid

bilayer using steered MD and umbrella sampling method. Also, his research focuses on structural modeling for biological systems, for example, to evaluate the rotation of the transient receptor potential cation channels (TRP channels) and model the 3D structure of CDK-related protein. Recently, the fragment molecular orbital (FMO) method has been implemented in my latest article in order to carry out the binding pattern and energy contribution of the anti-HIV drugs on SARS-CoV2 main protease which is the cause of COVID-19.

#### 【8】C 型フィコシアニン色素励起状態構造変化の解明（三嶋、庄司）

C 型フィコシアニン色素分子は、光合成初期過程である、光捕集・光エネルギー移動・電気エネルギーへの変換において重要な役割を担っている。特に、光を吸収した際、数十 fs の短時間のうちに、分子の電子状態は、電子基底状態から、電子励起状態へと変化し、その過程の詳細は、後に続く複雑な全光合成過程に対して、大いに影響を及ぼすと考えられる。従って、光合成過程を深く理解するためには、C 型フィコシアニン色素分子の電子励起状態を詳細に研究することが重要である。C 型フィコシアニン色素分子の電子基底状態とその第一電子励起状態については、詳細な実験的・理論的研究がなされているが、第二電子励起状態以上の高電子励起状態についての研究例は非常に少ない。例えば、B. Durbeej [PCCP 2019]は、第二電子励起状態までの分子構造を量子化学計算によって求めた。その結果、電子励起状態において、テトラピロール環鎖炭素原子 C10 を中心とした、分子主鎖ねじれ回転が起こりやすいことを明らかにした。しかし、この研究においては、計算コストを下げるために、テトラピロール環鎖炭素原子 C8、C12 に結合した、二つのプロピオン酸側鎖を無視している。ところが、この二つのプロピオン酸側鎖は、非常に近い位置にあるために、水素結合やファンデルワールス力などの相互作用による影響は、無視できないと思われる。そこで、我々は、Durbeej のモデル(PΦB\*モデル)と、二つのプロピオン酸側鎖を露わに考慮に入れたモデル分子(CYC1 モデル)を構築し、密度汎関数量子化学計算によって、その第五励起状態までの分子構造を各々構造最適化し、二つのプロピオン酸側鎖が及ぼす効果について調べた。第一電子励起状態について、PΦB\*モデルと CYC1 モデルとの、分子構造や、励起エネルギーなどの、物理・化学的物性に大きな差は見られなかった。第二電子励起状態以上の高電子励起状態についての知見を得るために、電子基底状態に対する RMSD(root mean square deviation)を計算した。第二電子励起状態において、PΦB\*モデルでは、2.32 Å、CYC1 モデルでは、1.76 Å であった。PΦB\*モデルでは、この第二電子励起状態が最も大きな分子構造変化を示し、テトラピロール環鎖炭素原子 C4 における分子主鎖ねじれ回転であることがわかった。一方、同様に、CYC1 モデルでも、この第二電子励起状態の分子構造変化は、テトラピロール環鎖炭素原子 C4 における分子主鎖ねじれ回転由来であった。しかし、第三電子励起状態以上の高励起電子励起状態では、PΦB\*モデルと CYC1 モデルとは、異なる挙動を見せた。即ち、PΦB\*モデル



では、第三、四、五励起電子状態の分子構造は、電子基底状態とほぼ同様の分子構造を示した。しかし、CYC1 モデルでは、第三、四励起電子状態の RMSD は、それぞれ、1.80 Å、1.71 Å であり、二つのプロピオン酸側鎖が存在することによる影響が顕著であることがわかった。特に、CYC1 モデルの第四励起電子状態は、二つのプロピオン酸側鎖間の水素結合が顕著に見られた。

### 【9】 星間空間におけるメタノール生成シミュレーション

以前より生体を構成する分子の起源に関して、宇宙空間で生成されたとする説が唱えられている。実際、星間空間ではメタノールやホルムアルデヒド、さらにグリコールアルデヒド(最も単純な糖)などの様々な有機物が観測されている。分子雲では気相中の H、C、N、O のような比較的軽い元素がダスト表面に凍りつき、H<sub>2</sub>O の他に CO、CO<sub>2</sub> などを含む氷を形成する。低温(10–20 K)では、



などの H の付加反応により有機物が生成される。その後、星が形成され、紫外線が照射されると光化学反応により、様々な複雑有機物が生成されたのではないかと考えられている。

本研究では、CO からメタノール(CH<sub>3</sub>OH)が生成される過程を、第一原理計算を用いて求め、モンテカルロシミュレーションで用いるパラメータの精度を上げることを目的とした。反応障壁については二体反応、吸着エネルギーについては CO クラスタ上での反応を第一原理計算で解析した。モンテカルロシミュレーションにおけるダスト表面における Y 分子(= CO/CHO/CH<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>OH/CH<sub>3</sub>OH)の組成比を図 6 に示した。ダスト表面上の Y 分子の初期値は 0 個とし、ガス中の CO 分子および、H 原子の初期値はそれぞれ  $6 \times 10^5$  個、 $5 \times 10^5$  個とした 1 分子に対する H 付加反応の計算結果より、COH を経由する反応は含まずにシミュレーションを行った。CH<sub>3</sub>O は、CH<sub>2</sub>OH と比較しエネルギー的に安定であるが、反応障壁が高いため、生成されなかった。ダスト表面上で生成された CH<sub>3</sub>OH は CO に対して 18 % の結果が得られ、観測結果の範囲内で一定量の CH<sub>3</sub>OH が生成されることが確認できた。

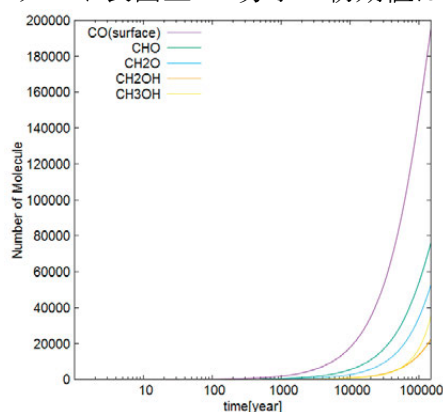


図 6. ダスト表面上での Y 分子の組成比

## 4. 教育

### <卒業研究発表>

奥原千佳、「分子動力学シミュレーションを用いた CRISPR-Cas9 の Off-target 効果に関する理論的研究」

吉岡耕作、「Docking を用いた Protein Arginin Deiminase 4 選択的阻害剤の結合様式」

#### <修士修了研究発表>

新岡侑也、「星間空間における CO 氷表面上での CH<sub>3</sub>OH 生成過程」

石川航平、「酸化型[Ni-Fe]ヒドロゲナーゼの活性中心についての理論的研究」

#### <集中講義>

1. 重田育照、「生物物理学」、4<sup>th</sup> Sep. 2019、秋田大学大学院工学研究科.
2. 原田隆平、「特別講義 9」7<sup>th</sup>Nov. 2019、14<sup>th</sup>Nov.2019、立教大学大学院理学研究科化学専攻.

### 5. 受賞、外部資金、知的財産権等

#### 受賞

2. 原田隆平、分子シミュレーション学会 2019 年度 学術賞 (受賞日: 2019 年 12 月 10 日)

#### 外部資金

##### (研究代表)

1. 新学術領域研究「ハイドロジェノミクス」、重田育照、「生体ハイドロジェノミクスの理論解析」(H31~R2 年度) 2,400 千円 (R1 年度直接経費: 1,400 千円)
2. 若手研究 (A)、庄司光男、「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」(H29~R1 年度)、全年度直接経費: 19900 千円 (R1 年度直接経費: 1600 千円)
3. 新学術領域研究「光合成分子機構の学理解明と時空間制御による革新的光-物質変換系の創製」、庄司光男、「光化学系 II 酸素発生中心における再活性化機構についての理論的解明」(H30~令和 1 年度)、全年度直接経費: 4000 千円 (R1 年度直接経費: 2000 千円)
4. さきがけ (日本学術振興機構) 庄司光男、「生体内量子多体系における特異的化学反应の機構解明」(R1 年 10 月~ R5 年 3 月)、全年度直接経費: 30,000 千円 (R1 年度直接経費: 26700 千円)
5. 若手研究、堀 優太、「理論計算に基づく酸塩基複合体中のプロトン伝導機構の解明」(R1 年 4 月~R4 年 3 月)、全年度直接経費: 3,200 千円 (R1 年度直接経費: 1,200 千円)

さがけ（日本学術振興機構）、鬼頭（西岡） 宏任、「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」（H29年10月～R3年3月）、全年度直接経費: 25,000 千円 (R1 年度直接経費: 4,300 千円)

#### (分担研究)

1. AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業・革新的中分子創薬技術の開発・中分子シミュレーション技術の開発、重田育照（研究分担者）「立体構造を基盤とする中分子創薬の合理的設計」 前仲勝実（研究代表者）、（H31～R2 年度）、全年度直接経費: 43,077 千円 (R1 年度直接経費: 13,846 千円)
2. 新学術領域研究(研究領域提案型)「高速分子動画」、庄司光男（研究分担者）、「時分割実験のための多様な反応誘起システムの開発」南後 恵理子（研究代表者）、（R1～5 年度）、全年度直接経費：4500 千円（R1 年度直接経費：4500 千円）
3. 基盤研究(B)、庄司光男（研究分担者）、「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」岡島 俊英（研究代表者）、（H28～R1 年度）、全年度直接経費：3600 千円（R1 年度直接経費：0 千円）

#### 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. Y. Hori, T. Suetake, Y. Shiota, K. Yoshizawa, Y. Shigeta, T. Ida, M. Mizuno, “Local Hydrogen Bond Structures and Dynamics of Imidazole Molecules in Poly(vinylphosphonic acid)-Imidazole Composite Material: A Molecular Dynamics Study”, *ACS Applied Polymer Materials*, *in press* (2020).
2. T. Takahashi, R. Harada, Y. Shigeta, “Distribution of Counter Ions in Negatively-charged Lipid/Water/Air Interface: Molecular Dynamics Study”, *Chemistry Letters* **49**, 361-363(2020).
3. T. Tian, T. Xu, S. Kirk, I.T. Rongde, S. Manzhos, Y. Shigeta, S. Jenkins, “Intramolecular Mode Coupling of the Isotopomers of Water: A Non-Scalar Charge Density-Derived Perspective”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **22**, 2509-2520 (2020).

4. K. Hengphasatporn, K. Plaimas, A. Suratanee, P. Wongsriphisan, J.-M. Yang, Y. Shigeta, W. Chavasiri, S. Boonyasuppayakorn, T. Rungrotmongkol, “Target Identification Using Homopharma and Network-Based Methods for Predicting Compounds Against Dengue Virus-Infected Cells”, *Molecules* **25**(8), 1883 (2020).
5. K. Hengphasatporn, T. Matsui, Y. Shigeta, “Estimation of Acid Dissociation Constants ( $pK_a$ ) of N-Containing Heterocycles in DMSO and Transferability of Gibbs Free Energy in Different Solvent Conditions”, *Chemistry Letters* **49**(3), 307-10 (2020).
6. H. Kitoh-Nishioka, Y. Shigeta, S. Itoh, A. Kimura, “Excitonic Coupling on a Heliobacterial Symmetrical Type-I Reaction Center: Comparison with Photosystem I”, *The Journal of Physical Chemistry B* **124**(2) 389-403 (2020).
7. V. Sladek, R. Harada, Y. Shigeta, “Protein Dynamics and the Folding Degree”, *Journal of Computer Chemistry, Japan*, **60**(3), 1559-1567 (2020).
8. Y. Machida, T. Murakawa, A. Sakai, M. Shoji, Y. Shigeta, H. Hayashi, “Reaction of threonine synthase with the substrate analogue 2-amino-5-phosphonopentanoate: implications into the proton transfer at the active site”, *The Journal of Biochemistry*, **167**(4), 357-364(2020).
9. R. Harada, R. Yoshino, H. Nishizawa, Y. Shigeta, “Temperature-Pressure Shuffling Outlier Flooding Method Enhances the Conformational Sampling of Proteins”, *Journal of Computational Chemistry*, **40**(15), 1530-1537 (2019).
10. R. Harada, R. Yoshino, H. Nishizawa, Y. Shigeta, “Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Simulation (PaCS-MD) Screens for Protein Complexes Generated by Rigid Docking”, *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, **92**, 94-99 (2019).
11. R. Harada, V. Sladek, Y. Shigeta, “Non-targeted Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Using Time-localised Prediction of Conformational Transitions in Protein Dynamics”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **15**(9), 5144-5153 (2019).
12. R. Harada, Y. Shigeta, “Selection Rules for Outliers in Outlier Flooding Method (OFLOOD) Regulate its Conformational Sampling Efficiency”, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **59**(9), 3919-3926 (2019).
13. R. Harada, V. Sladek, Y. Shigeta, “Non-targeted Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics Based on a Non-Redundant Selection Rule for Initial Structures Enhances Conformational Sampling of Proteins”, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **59**(12), 5198-5206 (2019).
14. R. Harada, V. Sladek, Y. Shigeta, “Developments of Rare Event Sampling Methods for Proteins”, *Journal of Computer Chemistry, Japan*, **18**(5), 99-201 (2019).

15. K. Miyagawa, H. Isobe, T. Kawakami, M. Shoji, S. Yamanaka, M. Okumura, T. Nakajima, K. Yamaguchi, “Domain-based local pair natural orbital CCSD (T) calculations of fourteen different S2 intermediates for water oxidation in the Kok cycle of OEC of PSII. Re-visit to one LS-two HS model for the S2 state”, *Chemical Physics Letters*, **734**, 136731(2019).
16. K. Miyagawa, T. Kawakami, H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, K. Nakatani, M. Okumura, T. Nakajima, K. Yamaguchi, “Domain-based local pair natural orbital CCSD (T) calculations of six different S1 structures of oxygen evolving complex of photosystem II. Proposal of multi-intermediate models for the S1 state”, *Chemical Physics Letters*, **732**, 136660 (2019).
17. K. Miyagawa, T. Kawakami, Y. Suzuki, H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, M. Okumura, T. Nakajima, K. Yamaguchi, “Domain-based local pair natural orbital CCSD (T) calculations of strongly correlated electron systems: Examination of dynamic equilibrium models based on multiple intermediates in S1 state of photosystem II”, *Molecular Physics*, 1666171 (2019).
18. 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”, *Molecular Physics*, **117**, 17, 2320-2354 (2019).
19. M. Shoji, H. Isobe, J.-R. Shen, M. Suga, F. Akita, K. Miyagawa, Y. Shigeta, K. Yamaguchi, “Elucidation of the entire Kok cycle for photosynthetic water oxidation by the large-scale quantum mechanics/molecular mechanics calculations: Comparison with the experimental results by the recent serial femtosecond crystallography”, *Chemical Physics Letters*, **730**, 416-425 (2019).
20. M. Kayanuma, M. Shoji, K. Furuya, K. Kamiya, Y. Aikawa, M. Umemura, Y. Shigeta, “First-Principles Study of the Reaction Mechanism of  $\text{CHO}^+ + \text{H}$  on Graphene Surface”, *The Journal of Physical Chemistry A*, **123**(26), 5633-5639 (2019).
21. A. Kyan, M. Kayanuma, M. Shoji, Y. Shigeta, “Reaction mechanism of non-enzymatic stereoselective formation of wine lactone”, *Chemical Physics Letters*, **725**, 114-118 (2019).
22. K. Ikeda, Y. Hori, M. H. Mahyuddin, Y. Shiota, A. Staykov, T. Matsumoto, K. Yoshizawa, S. Ogo, “Dual Catalytic Cycle of  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  Oxidations by a Half-Sandwich Iridium Complex: A Theoretical Study”, *Inorganic Chemistry*, **58**, 117274–7284 (2019).
23. Y. Hori, Y. Shiota, T. Ida, K. Yoshizawa, M. Mizuno, “Local structures and electronic properties of In atoms in In-doped ZnO”, *Thin Solid Films*, **685**, 428–433 (2019).
24. Y. Hori, T. Abe, Y. Shiota, K. Yoshizawa, “Mechanistic Insights into Methane Oxidation by Molecular Oxygen under Photoirradiation: Controlled Radical Chain Reactions”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **92**, 1840–1846 (2019).



25. N. Takumi, Y. Hori, H. Sato, S. Wu, A. Okazawa, N. Kojima, T. Yamamoto, Y. Einaga, S. Hayami, Y. Horie, H. Okajima, A. Sakamoto, Y. Shiota, K. Yoshizawa, O. Sato, “Observation of Proton Transfer Coupled Spin Transition and Trapping of Photoinduced Metastable Proton Transfer State in an Fe(II) Complex”, *Journal of the American Chemical Society*, **141**, 14384–14393 (2019).
26. M. Miyanishi, T. Abe, Y. Hori, Y. Shiota, K. Yoshizawa, “Role of Amino-Acid Residues for Dioxygen Activation in the Second Coordination Sphere of the Dicopper Site of pMMO”, *Inorganic Chemistry*, **58**, 12280–12288 (2019).
27. T. Ida, M. Nishida, Y. Hori, “Revisiting Formic Acid Decomposition by a Graph-Theoretical Approach”, *The Journal of Physical Chemistry A*, **123**, 9579–9586 (2019).
28. H. Kitoh-Nishioka, K. Ando, “Calculation of Charge-Transfer Electronic Coupling with Nonempirically Tuned Range-Separated Density Functional”, *The Journal of Physical Chemistry C*, **123**(18), 11351-11361 (2019).
29. Y. Mitsuta, Y. Sigheta, “Calculation of Free Energy Reaction Network of Alanine Polypeptide by Using Free Energy Reaction Route Mapping Method”, *Journal of Computer Chemistry, Japan*, **18**(5), 221-223 (2019)
30. K. Hengphasatporn, A. P. W. Garon, T. Langer, S. Yasuteru, T. N. Huynh, et al. “Multiple Virtual Screening Strategies for the Discovery of Novel Compounds Active Against Dengue Virus: A Hit Identification Study”, *Scientia Pharmaceutica* **88**(1), 2 (2019).
31. T. Ohto, M. Dodia, J. Xu, S. Imoto, F. Tang, F. Zysk, T. D. Kühne, Y. Shigeta, M. Bonn, X. Wu, Y. Nagata, “Accessing the Accuracy of Density Functional Theory through Structure and Dynamics of the Water–Air Interface”, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **10**(17), 4914-4919(2019).
32. Y. Imai, T. Yamamoto, A. Sekimoto, Y. Okano, R. Sato, Y. Shigeta, “Numerical investigation of the nano-scale solutal Marangoni convections”, *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers* **98**, 20-26 (2019).
33. G. Hirata, Y. Kobayashi, N. Yasuda, H. Maeda, “Pyrrole-Based  $\pi$ -System–Pt(II) Complexes: Structures, Photophysical Properties, and Excited-State Dynamics”, *Chemistry - A European Journal* **25**, 1-9(2019).
34. K. Sakamoto, M. Kayanuma, Y. Inagaki, T. Hashimoto, Y. Shigeta, “*In silico* structural analysis of Elongation factor-1  $\alpha$  and Elongation factor-like proteins”, *ACS Omega* **4**, 7308-7316 (2019).

35. T. Xu, J. Li, M. Hui, H. Roya, W.J. Huang, S. Kirk, Y. Shigeta, S. Jenkins, “Chirality-Helicity Equivalence in the S and R Stereoisomers: A Theoretical Insight”, *Journal of the American Chemical Society*, **141**, 5497-5503 (2019).

## B) 査読無し論文

なし

## (2) 国際会議発表

### A) 招待講演

1. Y. Shigeta, "Computational Studies on Octanol/water Partition Coefficient of Organic Molecules", *7th International Conference on Chemical and Biological Sciences*, National University of Singapore, March 6<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> 2020, Singapore.
2. Y. Shigeta, "Theoretical Investigation on Photofunctional  $\pi$ -electron Materials",  $\pi$ -system figuration European-Japanese workshop 2019 ( $\pi$ -EJ 2019, Nov. 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> 2019, Zabrze, Poland.
3. Y. Shigeta, “Triplet-Triplet Annihilation Up-conversion Processes of Diphenylanthracenes: Theoretical Study”, *The 30<sup>th</sup> Asian Advanced Materials Congress (AMC)*, Oct. 31<sup>st</sup>-Nov. 4<sup>th</sup> 2019, Singapore.
4. Y. Shigeta, “Theoretical Studies on Membrane Permeability of Middle-sized Molecular Drugs using Implicit Membrane Models”, *5<sup>th</sup> Japan-Thai workshop on Theoretical and Computational Chemistry 2019*, Oct. 10<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> 2019, Yokohama city University, Yokohama, Japan.
5. Y. Shigeta, “Computational studies on triplet-triplet annihilation up-conversion processes”, *The Collaborative Conference on Advanced Materials (CCAM 2019)*, Aug. 26<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2019, St. Julian, Malta.
6. Y. Shigeta, “Theoretical Studies on Membrane Permeability of Middle-sized Molecular Drugs”, *10<sup>th</sup> The Asian Consortium on Computational Materials Science (ACCMS-10)*, July 23<sup>rd</sup>-26<sup>th</sup>, Hong Kong, China.
7. Y. Shigeta, “Theoretical studies on triplet-triplet annihilation based photon up-conversion in solution and solid”, *2nd Global Forum on Advanced Materials and Technologies for Sustainable Development (GFMAT-2)*, July 21<sup>st</sup>-25<sup>th</sup>, Toronto, Canada.
8. Y. Shigeta, “Theoretical Studies on Reaction Mechanisms of Metalloenzymes: QM/MM analyses”, *23<sup>rd</sup> International Annual Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE23)*, June 27<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, Chiang Mai, Thailand.

9. Y. Shigeta, “Theoretical Studies on Photofunctional Materials: Mutual Collaboration with Experiments”, *Thai-Japan Chemistry Symposium*, June 24<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>, Chiang Mai, Thailand.
10. M. Shoji, “Water-Splitting Reactions in the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II Revealed by QM/MM calculations”, International Conference on Photocatalysis and Photoenergy 2019, Incheon, Korea, 2019/5/22.
11. M. Shoji, “Spin States and O-O bond formation mechanisms in the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II”, Awaji Island Conference on Electron Spin Science & Technology 2019, Awaji Yumebutai International Conference Center, 2019/6/17.
12. M. Shoji, “Catalytic Reaction Mechanisms Found by using the GLAS Algorithm”, ICPAC 2019, Rose Garden Hotel, Yangon, Myanmar, 2019/8/7.
13. M. Shoji, “Reaction mechanisms of water splitting in Photosystem II revealed by QM/MM calculations”, 11th CCS International Symposium, International Congress Center, Tsukuba, 2019/10/15.

#### B) 一般講演

1. M. Shoji, “Elucidation of the Entire Kok Cycle of the Photosynthetic Water Oxidation Using QM/MM Calculations”, 3rd International Solar Fuels Conference (ISF-3) and International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (ICARP2019), Hiroshima Convention Hall, 2019/11/24.
2. H. Kitoh-Nishioka, “Pathway Analysis of Protein Electron-Transfer Reactions by Using Ab Initio Electronic Structure Calculations”, QuEBS: Quantum Effects in Biological Systems 2019, Mexico, 2019/10/29 (poster).
3. H. Kitoh-Nishioka, “Pathway Analysis of Protein Electron-Transfer Reactions by Using Ab Initio Electronic Structure Calculations”, 3rd QST International Symposium, 2019/12/4 (poster).

### (3) 国内学会・研究会発表

#### A) 招待講演

1. 重田育照、“計算量子生命科学の最前線”、TIA 光・量子計測マネジメント会議、Nov. 7th 2019、産総研、筑波。
2. 重田育照、“データ同化型分子動力学計算法の開発”、膜タンパク質研究会 2019、Oct. 7th 2019、淡路夢舞台国際会議場、兵庫。

3. 重田育照, “第一原理ダイナミクスによる材料の物性・反応解析”, 第 8 回材料系ワークショップ～「富岳」時代の材料系シミュレーションの最前線～, Oct. 18th 2019, 秋葉原 UDX, 東京.
4. 重田育照, “青色受容タンパク質クリプトクロムの多様な機能と磁気感受応答に関する理論的アプローチ”, 「磁気受容タンパク」量子生命科学会第 1 回大会, May 23<sup>rd</sup> 2019, 東京大学, 東京.
5. 原田隆平, “データ駆動型分子動力学シミュレーションに立脚した効率的タンパク質構造サンプリング手法の開発”, 第 408 回 CBI 学会講演会 「分子シミュレーション技術の新たな展望～AI 活用, 高精度力場, データ駆動型シミュレーション」, 東京工業大学, 東京, 2019/7/16.
6. 原田隆平, “*in silico* タンパク質設計を実現する分子シミュレーション手法の構築”, 生物工学会シンポジウム“*in silico* タンパク質設計で加速するタンパク質工学・応用構造生物学”, 岡山大学, 岡山, 2019/9/18.
7. 原田隆平, “生体機能を解明する分子シミュレーション手法の開発と応用”, 筑波大学 プレ戦略研究会「生命から学ぶ」, 筑波大学, つくば, 2019/10/10.
8. 原田隆平, “中分子環状ペプチドの膜透過性を評価する分子シミュレーション手法の開発”, 計算メディカルサイエンス事業部発足キックオフシンポジウム, 筑波大学, つくば, 2019/12/6.
9. 原田隆平, “タンパク質の機能発現に重要なレアイベントを抽出するサンプリング手法の開発 (2019 年度 分子シミュレーション学会 学術賞 受賞講演)”, 第 33 回分子シミュレーション討論会, 名古屋公会堂, 名古屋, 2019/12/10.
10. 庄司光男, “光合成水分解反応の反応機構についての理論的探求”, ミニシンポジウム『生命科学と物質科学の融合による新規エネルギー・物質変換技術の創造をめざして』, 大阪大学基礎工, 2019/5/18.
11. 堀 優太, “水素移動が寄与する物性および反応の理論的解析: プロトン伝導とメタン水酸化反応”, 機能物性セミナー, 東大物性研, 2019/5/22.

## B) その他の発表

1. 庄司光男, 磯部寛, 重田育照, 中嶋隆人, 山口兆, “光化学系 II 酸素発生中心における水分解反応機構についての理論解析”, 第 46 回生体分子科学討論会, 筑波大学大学会館, 2019/6/22 (口頭).
2. 庄司光男, “光合成酸素発生機構の分子メカニズム”, 筑波大プレ戦略研究会「生命から学ぶ」プログラム, 筑波大学自然科学棟 B, 2019/10/10 (口頭).

3. 西澤宏晃, 重田育照, “拘束条件付き DFTB-MD 計算に対するエネルギー保存の検証”, 第 22 回理論化学討論会, 2019/5.
4. 西澤宏晃, 重田育照, “量子化学計算に基づく分子動力学シミュレーションの拘束手法とエネルギー保存の検証”, 第 46 回生体分子科学討論会, 2019/6.
5. 西澤宏晃, 重田育照, “拘束条件を用いた DFTB-MD シミュレーションの高速化とエネルギー保存の評価”, 第 57 回日本生物物理学会年会, 2019/9.
6. 西澤宏晃, 重田育照, “DFTB-MD シミュレーションの拘束条件を用いた効率化とエネルギー保存の検証”, 日本コンピューター化学会 2019 秋季年会, 2019/10.
7. 鬼頭(西岡) 宏任, 重田 育照, 伊藤 繁, 木村 明洋, “ヘリオバクテリア I 型反応中心の理論モデル II : 量子化学計算によるモデルの拡張と進化への応用”, 第 10 回日本光合成学会年会, 2019/5/26 (ポスター).
8. 鬼頭(西岡) 宏任, 重田 育照, 伊藤 繁, 木村 明洋, “ヘリオバクテリア反応中心の励起子相互作用計算”, 第 22 回理論化学討論会, 2019/5/28 (ポスター).
9. 鬼頭(西岡) 宏任, 安藤 耕司, “蛋白質中電子トンネル移動の第一原理計算”, 第 46 回生体分子科学討論会, 2019/6/22 (口頭).
10. 木村明洋, 浅井智広, 鬼頭(西岡)宏任, 重田育照, 伊藤 繁, “理論が示す構造未開明の緑色硫黄細菌 I 型反応中心の分光特性モデル : ヘリオバクテリアおよび PSI 反応中心との進化的関係”, 第 27 回「光合成セミナー2019」, 2019/7/17 (口頭) .
11. 鬼頭(西岡) 宏任, 重田 育照, 伊藤 繁, 木村 明洋, “ヘリオバクテリア I 型反応中心の量子化学計算による理論モデル : RC 進化への応用”, 第 27 回「光合成セミナー2019」, 2019/7/17 (ポスター) .
12. 鬼頭(西岡) 宏任, 大塚 教雄, 重田 育照, “フラグメント分子軌道法を用いた生体内電子移動経路解析” 第 13 回分子科学討論会 2019, 名古屋, 2019/9/20 (口頭).
13. 鬼頭(西岡) 宏任, 重田 育照, 伊藤 繁, 木村 明洋, “ヘリオバクテリア光合成反応中心の励起子結合強度計算”, 第 9 回日本生物物理学会関東支部会, 2020/3/3 (口頭).
14. 鬼頭(西岡) 宏任, 重田 育照, 伊藤 繁, 木村 明洋, “ヘリオバクテリア I 型反応中心の励起子結合と光化学系 I との比較”, 日本物理学会第 75 回年次大会(2020 年), 2020/3/19 (口頭・講演資料公表をもって発表扱い) .
15. 満田 祐樹, 重田 育照, “自由エネルギー反応経路探索法を用いたアラニンペプチドの反応経路ネットワーク解析”, 第 46 回生体分子科学討論会, 2019/6.
16. 満田 祐樹, 重田 育照, “自由エネルギー反応経路探索法を利用した水中ポリペプチドの自由エネルギーネットワーク解析”, 第 13 回分子科学討論会 2019, 名古屋, 2019/9/20.

17. 満田 祐樹, 重田 育照, “自由エネルギー反応経路探索法による水中アラニンペプチドの自由エネルギーネットワーク計算”, 日本コンピュータ化学会 2019 秋季年会.
18. 満田 祐樹, 重田 育照, “自由エネルギー反応経路探索法によるアラニンペプチドのフォールディング探索”, 第 33 回分子シミュレーション討論会, 名古屋公会堂, 名古屋, 2019/12/10.
19. 満田 祐樹, 重田 育照, “Development of the New Method to Calculate Free Energy Reaction Network of High-Dimensional Metadynamics by Using Scaled Hypersphere Search Method”, 第 100 回春季年会.
20. 三嶋謙二, 庄司光男, 重田育照, 「C 型フィコシアニン色素の吸収スペクトルに関する量子化学計算」, 第 46 回生体分子科学討論会, 2018/6/21 ~22 (ポスター) .

#### (4) 著書、解説記事等

1. R. Harada, “Rare Event Sampling of Biomolecules Based on Distributed Computing”, BUTSURI, 75, 28-33 (2020).
2. 原田隆平, “学術賞受賞寄稿「タンパク質の機能発現に重要なレアイベントを抽出するサンプリング手法の開発」”, アンサンブル, 22, 1-6 (2020).
3. 庄司光男, 電子書籍出版, “Gaussian16 で始める量子化学超入門”, Amazon Kindle direct publishing, ASIN: B0824KP51T, 2019/11.
4. 根来誠司, 武尾正弘, 柴田直樹, 樋口芳樹, 加藤太一郎, 重田育照, 「ナイロン分解酵素 NylB の構造進化, 触媒機構とアミド合成への応用」, 「食品・バイオにおける最新の酵素応用」第 13 章, 195-207, シーエムシー出版刊, 2019 年 7 月

#### 7. 異分野間連携・産学官連携・国際連携・国際活動等

##### 異分野間連携（センター内外）

1. 宇宙生命連携（CAB）
2. 生命部門内連携
3. 計算メディカルサイエンス推進部

##### 産学官連携

1. 宇宙航空研究開発機構（JAXA）宇宙科学研究所との共同研究
2. 量子科学技術開発機構（QST）との共同研究



## 国際連携・国際活動

1. Academia Sinica（台湾）化学研究所、原子分子科学研究所との MOU 締結
2. イリノイ大学化学科との MOU 締結
3. 湖南師範大化学科との MOU 締結

## 8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

1. 第 46 回生体分子科学討論会、2019 年 6 月 21 日（金）～22 日（土）
2. JAXA-CCS 研究交流会 2020 年 1 月 21 日（火）

## 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

重田育照

量子科学技術研究開発機構(QST) 客員研究員（2019-2021）  
JAXA・宇宙科学研究所(ISAS) 客員教授（2018-2020）  
ポスト K 課題 7 コデザイン WG 主査（2018-2020）  
生物物理学会代議員（2018-2020）  
分子科学会第 6 期運営委員会委員（2018-2020）  
理論化学会幹事（2019-2020）  
大阪大学 大学院基礎工学研究科 招聘教授（2015-）  
第 46 回生体分子科学討論会実行委員長

## 11. その他

## 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                                  |
| 学生   | 大学院生 5 名（後期課程 0 名、前期課程在学 5 名）、学類生 2 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方法論的研究を行う。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キネト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、真核微生物 PAP020 株 (H27 年度年次報告書参照) の系統的位置については、この生物の縮退型ミトコンドリアの代謝機能の予測とともにプレプリントとして発表した (Yazaki et al. 2019 *bioRxiv*, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/805762v1>; *Proc Roy Soc B* 誌への再投稿に向けて改訂中)。SRT308 株 (H29 年度年次報告書参照) については、新たに発見された近縁種のデータを追加し投稿論文を執筆することになった (現在追加実験データを取得中)。

今年度の報告では、*Microheliella maris* の系統的位置について最終的な報告を行う。2018 年度までは *M. maris* の系統的位置を確定できなかったが、2019 年度に 338 遺伝子データをアップデートし再解析したところ、本生物がクリプチスタ生物群の基部に位置することが、高い統計的サポートで復元された。また、細胞内共生したペディノ藻を葉緑体化した 3 種の緑色渦鞭毛藻の系統関係を 75 遺伝子データにより詳細に解明することができたので、この解析についても報告する (Sarai et al. 2020 *Proc Nat Acad Sci USA* 117:5364-5375)。

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

これまで 150 遺伝子程度から構成されるアライメントデータをもちいて真核生物の系統解析をしてきたが、このサイズのデータでは *Microheliella maris* や未記載真核微生物 SRT605 株の系統的位置を解明できないことが判明した。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、2019 年度はこのアライメントに我々の興味のある生物種からのデータを追加し、大規模系統解析を開始した (338 遺伝子データ ; 合計 98,904 アミノ酸座位)。この解析により *Microheliella maris* の系統的位置に結論を出すことができたので、その概要を報告する。

2018 年度の解析で *M. maris* の系統的位置が不安定な原因と考えられたテロネマ類の配列データをアップデートした後、解析を行った。アップデート後の 338 遺伝子データから復元された最尤系統樹 (図 1) では、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) とおおよそ矛盾しない系統関係が復元された。さらにクリプト藻、ゴニオモナス類 (*Hemiarma marina* をふくむ)、カタブレファリス類、*Palpitomonas bilix* から構成されるクリプチスタ生物群が復元され、*M. maris* はその基部から最尤法によるブートストラップ値 99%の支持を受けて分岐した (図 1)。上述の 338 遺伝子データからの解析結果から、*M. maris* について 2 通りの解釈が可能である。まず、*M. maris* はクリプチスタ生物群の初期分岐系統と解釈できる。一方、*M. maris* はクリプチスタ生物群には含まれず、クリプチスタ生物群と姉妹群となる系統であるとも考えられる。これら 2 つの解釈の妥当性について検討するためには、分子系統解析だけではなく *M. maris* と広範なクリプチスタ生物間での細胞

内微細構造の比較解析が必要である。現在、338 遺伝子データに基づく *M. maris* の系統的位  
置に関して、英文論文執筆のために準備を行っている。

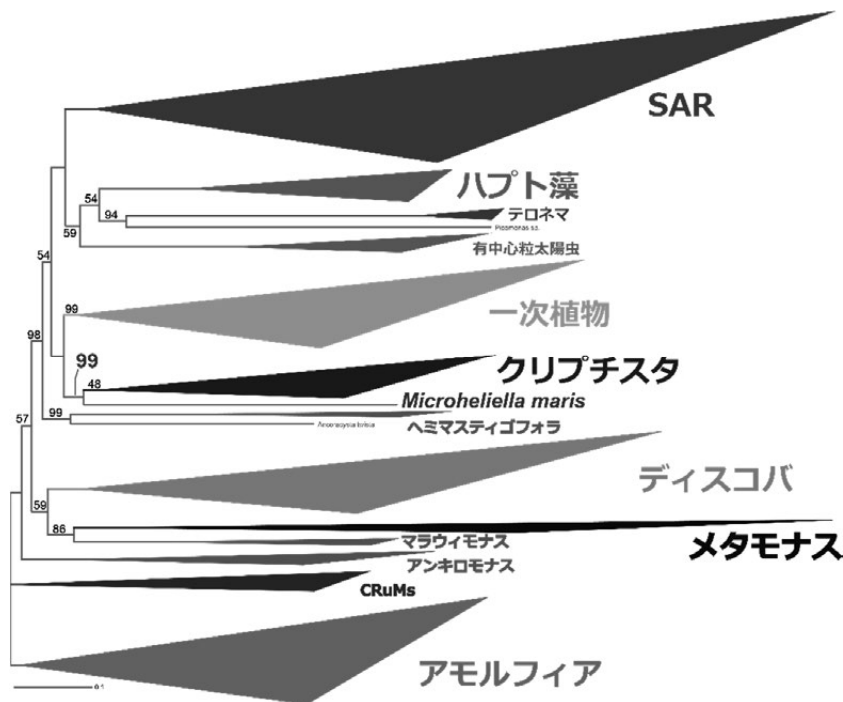


図 1. 338 遺伝子データに基づく最尤系統樹。 *Microheliella maris* はクリプチスタ生物群（クリプト藻、ゴニオモナス類、カタブレファリス類、*Palpitomonas bilix* をふくむ）の基部から分岐した。*M. maris* とクリプチスタ生物群との近縁性は最尤法ブートストラップ値 99%で支持された。

## 75 遺伝子データに基づく緑色色素体（葉緑体）を持つ渦鞭毛藻 3 種の系統関係の検討

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、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に由来するクロロフィル *a* と *b* をふくむ緑色色素体に置換されている（Sarai et al. 2020 *Proc Nat Acad Sci USA* 117:5364-5375）。我々はこれまでに上記 3 種の色素体ゲノム配列を完全に決定し、報告した（Kamikawa et al. 2015 *Genome Biol Evol* 7:1133-1140；H27 年度年次報告書；H28 年度年次報告書）。未発表ではあるが色素体コードの 51 遺伝子に基づく最尤系統解析では、上記渦鞭毛藻 3 種の緑色色素体の起源はペディノ藻、とくに *Pedinomonas* 属に極めて近縁であることが明確である（図 2 左）。しかし渦鞭毛藻 3 種の（細胞内微細構造をふくむ）細胞形態は互いに大きく異なる。もし形態情報をもとに宿主系統が互いに近縁でないと仮定するとペディノ藻の細胞内共生と色素体化が独立に起きたと考えざるを得ないが、リボソーム rRNA 遺伝子配列による系統解析では緑色渦鞭毛藻 3 種間の系統関係について結論を出すことができなかった。そこで核ゲノムコードの 75 遺伝子から構成されるアライメントデータを作成・解析した。その結果、*L. chlorophorum*、MRD-151 株および TRD-132 株の宿主系統は互いに近縁とはならないことが高い統計的サポートで支持された（図 2 右）。従って、渦鞭毛藻進化中で、細胞内共生を経たペディノ藻の色素体化は少なくとも 3 回起きていると考えられる。

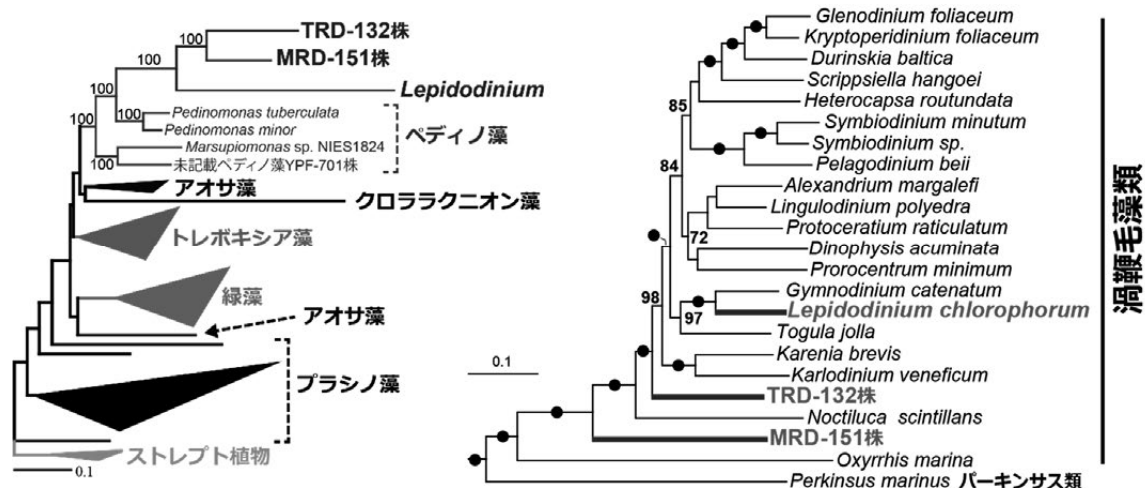


図 2. 推測された緑色渦鞭毛藻 3 種の葉緑体系統 (左) と宿主系統 (右). 左: 色素体コードの 51 遺伝子に基づく最尤系統樹. 渦鞭毛藻 *Lepidodinium chlorophorum*, MRD-132 株, TRD-151 株は単系統となり、ペディノ藻のなかでも *Pedinomonas* 属に近縁となった。この図では、渦鞭毛藻とペディノ藻クレード以外の部分のブートストラップ値は省略した。右: 核ゲノムコードの 75 遺伝子データに基づく最尤系統樹。渦鞭毛藻 3 種は単系統とならないことが、高いブートストラップ値で支持されている。枝上の黒丸はブートストラップ値 100%を示す。

## 【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

我々は、これまでに 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) の色素体 (葉緑体) ゲノム配列を決定した (Kamikawa et al. 2015 *Genome Biol Evol* 7:1133-1140 ; H27 年度年次報告書 ; H28 年度年次報告書)。現在共同研究者 (東京大学アジア生物資源環境研究センター・岩滝光儀、高橋和也博士) が主導し、MRD-151 株および TRD-132 株の正式な記載論文を執筆中である。両株の記載論文が出版された後、色素体ゲノムに関する論文の執筆に取り掛かる予定である。さらに 2018 年度からは、「第 4 の緑色渦鞭毛藻」の色素体ゲノムおよびヌクレオモルフゲノム (共生ペディノ藻の痕跡核) の解読を開始し、現在解析中である。

光合成真核生物の進化上、一旦獲得した光合成能力の 2 次的欠失が独立に複数回起こっている。この光合成能力の 2 次的欠失系統では、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に伴う色素体進化に興味を持ち、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)。また、珪藻とは系統的に離れた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、国立科学博物館・谷藤吾朗博士と共同で、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た。この研究成果は *Genome Biol Evol* 誌に掲載され、その概要を以下に報告する (Tanifuji et al. 2020 *Genome Biol Evol* 12:3926-3937)。

この研究では、非光合成性クリプト藻 2 種 *Cryptomonas* sp. CCAC1634B および SAG977-2f、光合成性の *C. curvata* CCAP979/52 の色素体ゲノムを解読し、これまでに解読された他のクリプト藻色素体ゲノムと比較解析を行った（図 3）。非光合成性色素体ゲノムからは光合成関連遺伝子の大部分は欠失していたが、非光合成種である SAG977-2f 株の色素体ゲノムには少なくとも 10 個の偽遺伝子が検出された。光合成性色素体ゲノム間では遺伝子順序は比較的保存されていたが、ゲノムが縮小した非光合成種の色素体ではゲノム再編成が頻繁に起こったことが判明した。興味深いことに CCAC1634B 株および SAG977-2f 株では、両種とも非光合成性であるにも関わらずクロロフィル *a* 合成に関わる遺伝子が保存されていた。また、先行研究で解読された非光合成種 *C. paramecium* CCAP977/2a の色素体ゲノムにはルビスコとその関連遺伝子が発見されたが、本研究で解読された非光合成性色素体ゲノムのどちらにもルビスコ遺伝子は発見されなかった。本研究により、光合成能力の 2 次的欠失に伴う色素体ゲノム中の遺伝子レパートリーの縮小過程には多様性があることを明らかとなった。

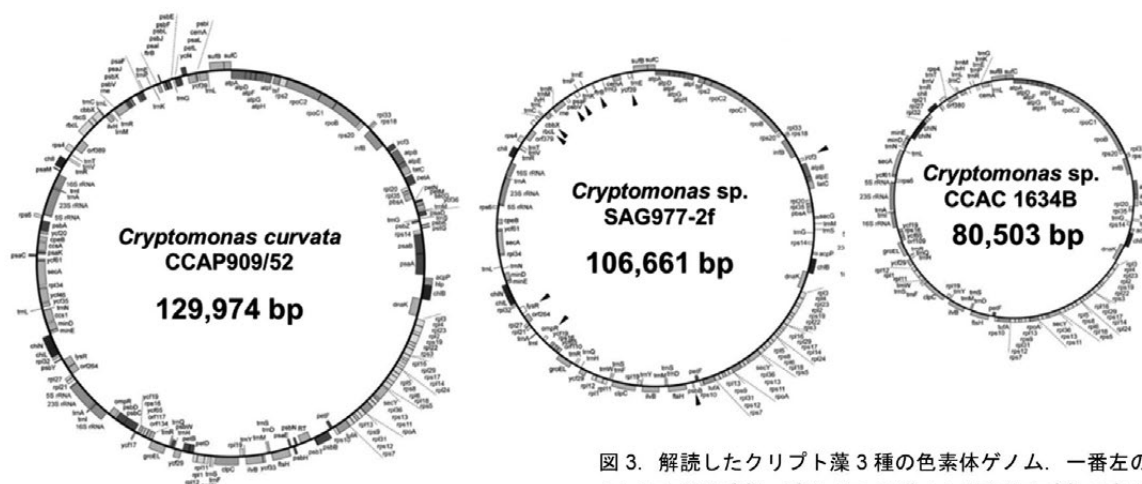


図 3. 解読したクリプト藻 3 種の色素体ゲノム。一番左のゲノムのみ光合成性、残り 2 つのゲノムは非光合成性である。

### 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; Nishimura et al. 2019 *Sci Rep* 9:4850)。H30 年度に報告した通り、我々が解読したクリプチスタ生物群にふくまれる *Hemiarma marina* の Mt ゲノムと、理化学研究所（現東京大学）・西村祐貴博士が解読した同じくクリプチスタ生物群の一系統であるカタブレファリス類に属する *Leucocryptos marina* の Mt ゲノムを合わせて英文論文として *Frontiers in Ecology and Evolution* 誌に投稿した（2020 年 3 月末時点で改訂中、2020 年 4 月 24 日受理）。投稿論文の内容は、H30 年度に報告した通りなので割愛する。

我々はクリプチスタ生物群の多様性と進化を解明する 1 つの方策として、本生物群に属する各種生物の Mt ゲノムの解読に取り組んできた (Nishimura et al. 2012 *PLOS ONE* 7:e37307 ; Nishimura et al. 2016 *Genome Biol Evol* 8:3090-3098 ; Nisihimura, Kume et al. *Front Ecol Evol* 2020 8:140) 。興味深いことに、【1】**新奇真核微生物の系統的位置の検討**で報告した通り、*Microheliella maris* はクリプチスタ生物群に極めて近縁であると考えられる。そこで 2019 年度には、海洋研究開発機構・矢吹彬憲博士と共同で *M. maris* の Mt ゲノム解読に取り掛かった (現在解析中) 。*M. maris* の Mt ゲノムについては、2020 年度中に 338 遺伝子データ解析で頑健に推測された *M. maris* の系統的位置と合わせて英文論文として投稿する予定である。

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有孔虫 *Ammonia berccari*、⑤放散虫 (*Didymocytis tetrathulumus* と *Acanthodesmia viniculata*)

### 渦鞭毛藻 *Ornithocercus magnificus* に共生するシアノバクテリアのゲノム解析

真核生物細胞中の酸化的リン酸化をおこなうミトコンドリア、酸素発生型光合成をおこなう色素体 (葉緑体) の起源は、それぞれ細胞内共生した  $\alpha$ -プロテオバクテリアとシアノバクテリアである。真核生物進化の初期段階でこれら 2 種類のオルガネラが確立したことは間違いないが、その成立過程で共生細菌と宿主真核細胞にどのような進化が起きたのか、共生細菌から宿主細胞に支配されるオルガネラへの変化で決定的な要素は何だったのかは解明されていない。現存する真核生物におけるミトコンドリア・色素体はオルガネラとして確立されて長い時間が経過しており、オルガネラ化の初期段階で起きたであろうイベントの痕跡を見つけることが難しい。一方、特定の真核生物では、宿主細胞に依存しているがミトコンドリアや色素体ほど宿主による統合・支配が確立していない細胞内共生細菌をもつ。このような細菌-真核生物共生系の細胞内共生に関する代謝的・遺伝的基盤を解明できれば、その知見を真核生物の初期進化でおきたミトコンドリアや色素体の成立を推測する一助となる。これまで我々は、ロパロディア科珪藻の細胞内に共生する窒素固定シアノバクテリア (楕円体) を細胞内に共生させたロパロディア科珪藻について研究を行ってきた (例えば Nakayama et al. 2014 *Proc Nat Acad Sci USA* 111:11407-11412; Nakayama & Inagaki 2017 *Sci Rep* 7:13075) 。また我々は、最近東北大学・中山卓郎博士と共同で外洋性渦鞭毛藻細胞に共生する細菌類について解析を行ってきた。2019 年度にはこの研究の第 1 報を *Proc Nat Acad Sci USA* 誌に発表することができたので、以下にその概要を報告する (Nakayama et al. 2019 *Proc Nat Acad Sci USA* 116:15973-15978) 。

一般にシアノバクテリアは海洋環境における一次生産者として重要な生物であり、これまで自由生活性種を中心にその生態、多様性、進化が盛んに研究されてきた。さらに近年、海洋微生物と細菌の共生の重要性、特に真核微生物と共生関係にあるシアノバクテリアについての知見が蓄積しており、海洋生態系における共生シアノバクテリアの重要性が認識されつ

つある。しかし現在のところ、海洋環境における共生シアノバクテリアの詳細についての理解は十分とは言えない。本研究では、貧栄養海域に生息する渦鞭毛藻 *Ornithocercus magnificus* の細胞外構造中に共生するシアノバクテリア (OmCya) のゲノムを決定した。ゲノム配列の基盤とした系統解析では、OmCya はこれまでの自由生活性シアノバクテリアを中心とした研究では認識されていない独自の系統であり、これまで海洋生態系に重要な役割を占めると考えられている海産シアノバクテリア系統と極めて近縁であると推測された。メタゲノム解析では、OmCya は全球的分布を示す一方、宿主渦鞭毛藻と緊密に共存することが判明した。これらの結果を総合すると、渦鞭毛藻と共生関係をもつ OmCya はこれまで行われたメタゲノム解析では見過ごされていたと考えられる。OmCya と近縁な自由生活性シアノバクテリア間で遺伝子レパートリーを比較したところ、*Prochlorococcus* 属シアノバクテリアと OmCya は同程度のゲノム縮退を示した。*Prochlorococcus* は自由生活性シアノバクテリアのうちで最も縮退したゲノムを持つが、OmCya と *Prochlorococcus* のゲノム縮退は互いに独立に起こったと考えられる。宿主渦鞭毛藻と緊密に共生する OmCya の発見は、海産シアノバクテリアの多様性、生態、進化に重要な知見をもたらした。それと同時に、本研究の結果は、真核微生物と共生関係を持つ新奇シアノバクテリア系統が海洋環境中に棲息する可能性を示唆する。

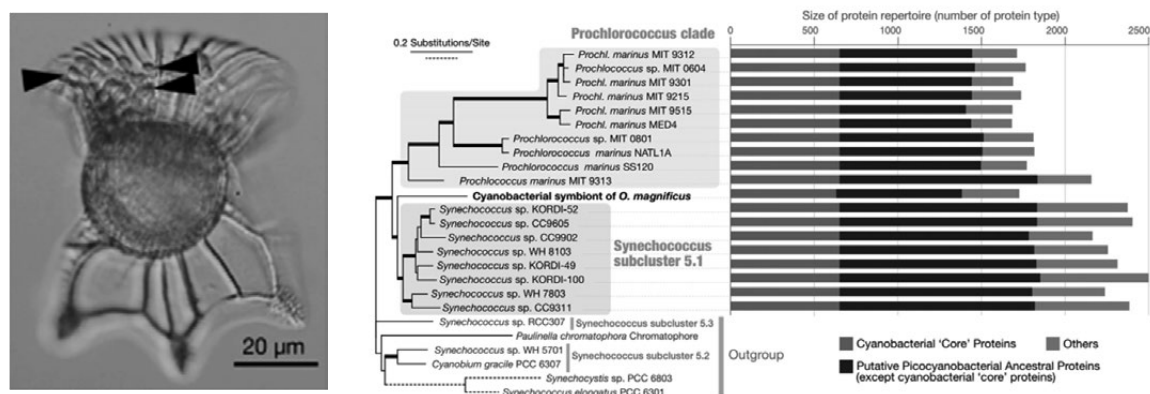


図 4. 左：渦鞭毛藻 *Ornithocercus magnificus* の光学顕微鏡写真。矢頭は共生したシアノバクテリアを示す。中央：41 遺伝子データに基づく海産ピコシアノバクテリアの最尤法系統樹。渦鞭毛藻に共生するシアノバクテリア (OmCyn) は、既知の海産シアノバクテリアと異なる新奇系統である。右：海産ピコシアノバクテリアと OmCyn 間でのタンパク質レパートリーの比較。OmCyn のもつタンパク質レパートリーは他の自由生活性近縁種よりも小さいため、渦鞭毛藻との共生生活中で OmCyn ゲノムは縮退したと考えられる。

上述した *O. magnificus* の近縁種である外洋性渦鞭毛藻 *Histioneis depressa* は、OmCyn とは異なる複数の共生細菌を保持していることが分かった (未発表データ)。現在、我々は *H. depressa* から分離した共生細菌のゲノム配列を解析している。この解析結果については来年度以降に報告する。

### 【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

#### タンパク質立体構造的見地からの CysN- EF-1α 間の近縁性の検証



翻訳伸長因子 EF-Tu と EF-1 $\alpha$  はタンパク質合成に参与する GTP 加水分解酵素であり、すべての生物にとって必須のタンパク質である。細菌類の EF-Tu と古細菌・真核生物の EF-1 $\alpha$  は互いに相同で、1 次構造から 3 次構造レベルで明らかな相同性を持つ。ただし、EF-1 $\alpha$  と EF-Tu の立体構造を詳細に比較すると、EF-1 $\alpha$  の N 末端ドメイン中の 3 番目の  $\alpha$  ヘリックスに相当する 2 次構造が、EF-Tu には存在しない。EF-Tu/EF-1 $\alpha$  はいくつかの代謝系タンパク質の起源となっており、細菌類で硝酸塩と ATP からアデノシン 5'リン酸化硝酸塩を合成する ATP スルフリレースを構成するサブユニット (CysN) はその一例である。興味深いことに CysN を EF-Tu/ EF-1 $\alpha$  とともに分子系統解析を行うと、細菌タンパクである CysN は同じく細菌タンパクである EF-Tu よりも古細菌・真核生物の EF-1 $\alpha$  に近縁となる (Inagaki et al. 2002 *Curr Biol* 12:772-776)。この CysN と EF-1 $\alpha$  間での近縁性が正しいならば、CysN の三次構造中に EF-1 $\alpha$  特異的な  $\alpha$  ヘリックスが存在する可能性が高い。しかし EF-1 $\alpha$  特異的  $\alpha$  ヘリックス相当部分が緑膿菌 CysN 結晶 (PDB 番号 1ZUN ; Mougous et al. 2006 *Mol Cell* 21:109-122) 中の disorder 領域にふくまれたため、その 2 次構造が分からなかった (図 5 左)。

我々は生命科学研究部門生命機能情報分野の原田隆平准教授と共同で、CysN 結晶中の disorder 領域が EF-1 $\alpha$  特異的  $\alpha$  ヘリックスを形成しうるかを確かめるため、水分子中の緑膿菌 CysN タンパクの全原子分子動力学シミュレーションを 2 マイクロ秒間行った。その結果、CysN タンパク結晶の disorder 領域は  $\alpha$  ヘリックスを形成しうると予測できた (図 5)。この結果は、分子系統解析で示唆された CysN と EF-1 $\alpha$  間の近縁性をタンパク質立体構造的見地から補強する結果となった。現在原田准教授を中心に、この結果を英文論文として投稿するために準備を進めている。

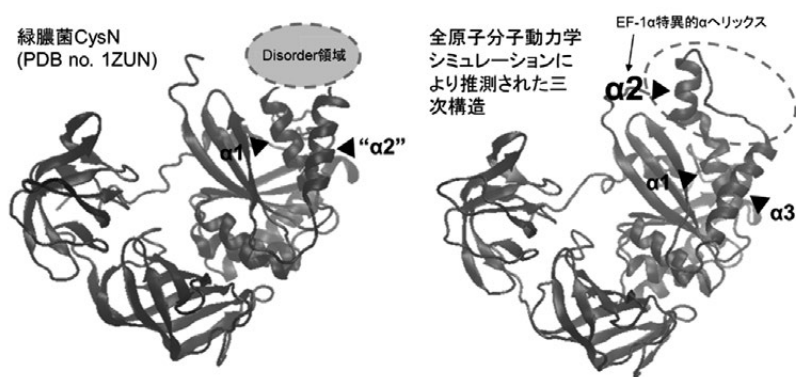


図 5. CysN タンパク質の三次構造 (左) と分子動力学シミュレーションにより推測された三次構造モデル (右)。実験的に決定された緑膿菌 CysN タンパク結晶には disorder 領域が含まれる (左)。分子動力学シミュレーションの結果、この disorder 領域は EF-1 $\alpha$  特異的な  $\alpha$  ヘリックスを持つ可能性が示唆された (右)。

この他、真核生物と古細菌の翻訳終結因子 C 末端ドメインにおける部分的欠失についての構造的・分子進化的見地からの検証を行っている。こ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

吉永真理, 学士 (理学), 論文名: 真核生物における SMC タンパクファミリーの多様化と二次的喪失

小林祐介, 学士 (理学), 論文名: 嫌気・微好気性鞭毛虫の系統メタモナスにおける解糖系関連酵素の進化

集中講義など

なし

#### 5. 受賞、外部資金、知的財産権等

##### 受賞

1. 第 52 回日本原生生物学会大会 ベストプレゼンテーションアワード, 原田亮, 2019 年 10 月 26 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 基盤研究 (B), 稲垣祐司 (代表), 2019-2023 年度, 交付額: 全年度直接経費 13,100 千円 (R1 年度直接経費 2,900 千円), ミトコンドリア DNA ポリメラーゼの多様性と進化の全容解明 (課題番号 19H03280)
2. 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: 全年度直接経費 13,700 千円 (R1 年度直接経費 2,900 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)
3. 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: 全年度直接経費 17,420 千円 (R1 年度直接経費 3,100 千円), 非光合成生物の光適応進化の全容解明 (課題番号 17H03723)
4. 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)), 橋本哲男 (代表), 2019-2022 年度, 交付額: 全年度直接経費 18,330 千円 (R1 年度直接経費 3,300 千円), フォルニカータ生物群におけるミトコンドリア関連オルガネラの機能進化の解明 (課題番号 19KK0185)
5. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 湯山育子 (代表), 2019-2021 年度, 交付額: 全年度直接経費 15,210 千円 (R1 年度直接経費 4,100 千円), サンゴ-褐虫藻共生成立・不成立に関わる遺伝子発現ネットワーク情報の構築 (課題番号 19H03026)

6. 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: 全年度直接経費 4,420 千円 (R1 年度直接経費 1,000 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)
7. 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: 全年度直接経費 17,810 千円 (R1 年度直接経費 3,000 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)

## 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. Sarai C, Tanifuji G, Nakayama T, Kamikawa R, Takahashi K, Miyashita H, Ishida K, Iwataki M, **Inagaki Y**. Dinoflagellates with relic endosymbiont nuclei as models for elucidating organellogenesis. 2020 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:5364-5375
2. Tanifuji G, Kamikawa R, Moore CE, Mills T, Onodera NT, Kashiya Y, Archibald JM, **Inagaki Y**, **Hashimoto T**. Comparative plastid genomics of *Cryptomonas* species reveals fine-scale genomic responses to loss of photosynthesis. 2020 *Genome Biology and Evolution* 12:3926-3937
3. Ciacci C, Grimmelpont MV, Corsi I, Bergami E, Curzi D, Burini D, Bouchet VMP, P. Ambrogini P, Gobbi P, Ujiié Y, **Ishitani Y**, Coccioni R, Bernhard JM, Frontalini F. Nanoparticle-biological interactions in a marine benthic foraminifer. 2019 *Scientific Reports* 19:19441
4. **Yuyama I**, Higuchi T. Differential gene expression in skeletal organic matrix proteins of scleractinian corals associated with mixed aragonite/calcite skeletons under low mMg/Ca conditions. 2019 *PeerJ* 7:e7241
5. Nakayama T, Nomura M, Takano Y, Tanifuji G, Shiba K, Inaba K, **Inagaki Y**, Kawata M. Single-cell genomics unveiled a cryptic cyanobacterial lineage with a worldwide distribution hidden by a dinoflagellate host. 2019 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:5364-5375

6. Arisue N, **Hashimoto T**, Kawai S, Honma H, Kume K, Horii T. Apicoplast phylogeny reveals the position of *Plasmodium vivax* basal to the Asian primate malaria parasite clade. 2019 *Scientific Reports* 9:7274
7. 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* 4:7308-7316

## B) 査読無し論文

1. Matsuo M, Katahara A, Tachikawa M, Minakuchi Y, Noguchi H, Toyoda A, Fujiyama A, Suzuki Y, Hata T, Satoh S, Nakayama T, Kamikawa R, Nomura M, **Inagaki Y**, Ishida K, Obokata J. Large DNA virus promoted the endosymbiotic evolution to make a photosynthetic eukaryote. 2019 *bioRxiv* (doi: 10.1101/809541)
2. Yazaki E, Kume K, Shiratori T, Eglit Y, Tanifuji G, Harada R, Simpson AGB, Ishida K, **Hashimoto T**, **Inagaki Y**. Barthelonids represent a deep-branching Matamonad clade with mitochondrion-related organelles generating no ATP. 2019 *bioRxiv* (doi: 10.1101/805762v1)

## (2) 国際会議発表

### A) 招待講演

1. **Yuji Inagaki**. Phylogenomic analyses unveiled multiple endosymbioses of pedinophycean green algae in distantly related dinoflagellates. 2019 CCS-EPCC Workshop, Dec. 2-3, 2019, University of Tsukuba (Tsukuba, Japan)
2. **Yuji Inagaki**. Dinoflagellates as the model for the evolution of eukaryotic cells and genomes. National Taiwan University-University of Tsukuba Bilateral Symposium on Life Science, Sep. 30, 2019, University of Tsukuba (Tsukuba, Japan)

### B) 一般講演

1. Yuki Nishimura, Nagisa Sato, **Yoshiyuki Ishitani**, Takashi Shiratori, Ken-ichiro Ishida, **Tetsuo Hashimoto**, **Yuji Inagaki**, Moriya Ohkuma. Re-exploration of the protein performing plant-type C-to-U RNA editing in diverse eukaryotes. The 14<sup>th</sup> International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Sep 1-5, 2018, Universite de Lille (Lille, France)
2. Takuro Nakayama, Mami Nomura, Yoshito Takano, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Goro Tanifuji, **Yuji Inagaki**, Masakado Kawata. Single-cell genomics unveiled a cryptic cyanobacterial lineage with a worldwide distribution hidden by a dinoflagellate host. CWRU-TOHOKU Joint Work Shop, Aug 5-6, 2019, Case Western Reserve University (Cleveland, USA)

3. Takuro Nakayama, Yoshito Takano, Mami Nomura, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Goro Tanifuji, **Yuji Inagaki**, Masakado Kawata. Genome analysis of a symbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium in a pelagic dinoflagellate, *Histioneis depressa*. VIII European Congress of Protistology, Jul 28-Aug 2, 2019, Crowne Plaza Hotel (Rome, Italy)
4. Euki Yazaki, Tadaaki Uehara, Hirokazu Sakamoto, **Tetsuo Hashimoto**, Noboru Mizushima, **Yuji Inagaki**. Evolutionarily distinct gene-sets for autophagosome formation in dinoflagellates harboring diatom endosymbionts. VIII European Congress of Protistology, Jul 28-Aug 2, 2019, Crowne Plaza Hotel (Rome, Italy)
5. Euki Yazaki, Ayaka Imaizumi, Keitaro Kume, Takashi Shiratori, **Tetsuo Hashimoto**, Akinori Yabuki, Ken-ichiro Ishida, **Yuji Inagaki**. Phylogenomic analysis assessing the position of “orphans” including *Microheliella maris*. VIII European Congress of Protistology, Jul 28-Aug 2, 2019, Crowne Plaza Hotel (Rome, Italy)

### (3) 国内学会・研究会発表

#### A) 招待講演

1. 矢崎裕規, **稲垣祐司**. ゼロから始める大規模分子系統解析. 第 52 回日本原生生物学会大会, Oct 26-27, 2019, 茨城大学水戸キャンパス (水戸市, 茨城県)
2. **湯山育子**. サンゴと褐虫藻の共生関係を褐虫藻の増減からとらえる. 共生起源研究会, Sep 26, 2019, 基礎生物学研究所 (岡崎市, 愛知県)
3. **稲垣祐司**. 新奇真核微生物の探索と細胞内共生に伴う宿主ゲノムの進化: 真核生物初期進化の理解に向けて. KCC セミナー, Aug 26, 2019, 高知大学海洋コア総合研究センター (南国市, 高知県)

#### B) その他の発表

1. 矢吹彬憲, 矢崎裕規, 今泉彩香, 白鳥峻志, 久米慶太郎, **橋本哲男**, **稲垣祐司**. エンドヘレア太陽虫 *Microheliella maris* の系統的位置とミトコンドリアゲノム. 日本藻類学会第 44 回大会, Mar 25-28, 2020, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島市, 鹿児島県)
2. 川久保卓志, 松尾恵梨子, 高橋和也, 谷藤吾朗, 岩滝光儀, **稲垣祐司**. 緑色渦鞭毛藻 *Oxytoxum* sp. SG-436 株の共生藻痕跡核のゲノム解析. 日本藻類学会第 44 回大会, Mar 25-28, 2020, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島市, 鹿児島県)
3. 原田亮, 中野賢太郎, 矢吹彬憲, 白鳥峻志, Ensoo Kim, **稲垣祐司**. ディスコバ生物群, マラウイモナス類, アンキロモナス類が保持する新奇ミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼ. 日本藻類学会第 44 回大会, Mar 25-28, 2020, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島市, 鹿児島県)

4. 石谷佳之, 矢崎裕規, 氏家由利香, 稲垣祐司. 有孔虫の大規模分岐年代推定. 日本古生物学会 2020 年大会, Feb 7-8, 2020, 東京大学駒場キャンパス (目黒区, 東京都)
5. 矢崎裕規, 今泉彩香, 久米慶太郎, 白鳥峻志, 橋本哲男, 矢吹彬憲, 石田健一郎, 稲垣祐司. フィロジェノミック解析により推測された *Microheliella maris* の系統的位置. 第 3 回日本共生学会大会, Nov 19-20, 2019, 理化学研究所横浜キャンパス (横浜市, 神奈川県)
6. 石谷佳之, 久米慶太郎, 稲垣祐司. 有孔虫 *Ammonia beccarii* のミトコンドリアに局在する DNA 分子群. 第 3 回日本共生学会大会, Nov 19-20, 2019, 理化学研究所横浜キャンパス (横浜市, 神奈川県)
7. 中村隆志, 樋口富彦, 宮島利宏, Sylvain Agostini, 湯山育子, 安田直子, 藤村弘行. 光阻害過程とサンゴの白化現象のモデル化. 日本サンゴ礁学会第 22 回大会, Nov 11-13, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
8. 湯山育子, 安田直子, 比嘉彩也香, Sung-Yin Yang, Sylvain Agostini, 樋口富彦, 宮島利宏, 中村隆志, 藤村弘行. サンゴの白化対応策の検討-遺伝子発現レベルでの評価-. 日本サンゴ礁学会第 22 回大会, Nov 11-13, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
9. 神保充, 湯山育子, 山下洋, 鈴木豪, 波利井佐紀, 服田昌之, 新里宙也, 天野春菜, 安元剛. RNAi による *Acropora tenuis* レクチン遺伝子の発現抑制と褐虫藻獲得. 日本サンゴ礁学会第 22 回大会, Nov 11-13, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
10. 樋口富彦, 田中健太郎, 白井厚太郎, 湯山育子, 高畑直人, 佐野有司. NanoSIMS を用いたサンゴ-褐虫藻における硫黄動態の可視化. 日本サンゴ礁学会第 22 回大会, Nov 11-13, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
11. 吉永真理, 稲垣祐司. 真核生物における SMC タンパクファミリーの多様化と二次的喪失. 第 52 回日本原生生物学会大会, Oct 26-27, 2019, 茨城大学水戸キャンパス (水戸市, 茨城県)
12. 原田亮, 平川泰久, 矢吹彬憲, 柏山祐一郎, 丸山萌, 大沼亮, Vlademir Hampl, 谷藤吾朗, 稲垣祐司. ユーグレノゾアにおけるミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼの進化. 第 52 回日本原生生物学会大会, Oct 26-27, 2019, 茨城大学水戸キャンパス (水戸市, 茨城県)
13. 上原忠晃, 栢沼愛, 重田育照, 稲垣祐司. オ翻訳終結因子 C ドメインにみられる部分的欠失の進化とタンパク質機能・構造に与える影響. 第 52 回日本原生生物学会大会, Oct 26-27, 2019, 茨城大学水戸キャンパス (水戸市, 茨城県)
14. 湯山育子, 宇川尚登, 橋本哲男. サンゴに共生する褐虫藻は、サンゴ内でどのように変化するのか. 第 52 回日本原生生物学会大会, Oct 26-27, 2019, 茨城大学水戸キャンパス (水戸市, 茨城県)

15. 矢崎裕規, 坂本寛和, 上原忠晃, 稲垣祐司, 山本林, 水島昇. ATG12-ATG5 における非共有結合非依存化の普遍性について. Sep 18-20, 2019, 第 92 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜 (横浜市, 神奈川県)
16. 湯山育子, 宇川尚登, 小林裕介, 橋本哲男. RNA-seq データが示す共生状態への移行に伴う褐虫藻の変化－光合成・アンモニア 利用効率 UP－. 日本微生物生態学会第 33 回大会, Sep 10-13, 2019, 山梨大学甲府キャンパス (甲府市, 山梨県)
17. Sung-Yin Yang, 湯山育子, 安田直子, 比嘉彩也香, 樋口富彦, 藤村弘行, 宮島利宏, 中村隆志, Sylvain, Agostini. Effects of supplementation to increase bleaching resilience on hermatypic coral microbial community. 日本微生物生態学会第 33 回大会, Sep 10-13, 2019, 山梨大学甲府キャンパス (甲府市, 山梨県)
18. 西村祐貴, 佐藤渚, 白鳥峻志, 石田健一郎, 橋本哲男, 稲垣祐司, 大熊盛也. Distribution of plant-type mitochondrial C-to-U RNA editing in diverse eukaryotes. 日本進化学会第 21 回大会, Aug 7-10, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
19. 原田亮, 中野賢太郎, 矢吹彬憲, 稲垣祐司. A novel type of mitochondrion-localized DNA polymerase unites 'orphan eukaryotes' into a new 'super-group'. 日本進化学会第 21 回大会, Aug 7-10, 2019, 北海道大学 (札幌市, 北海道)
20. 西村祐貴, 佐藤渚, 白鳥峻志, 石田健一郎, 橋本哲男, 稲垣祐司, 大熊盛也. 有中心粒太陽虫類におけるミトコンドリアゲノムの比較解析. 日本微生物資源学会第 26 回大会, Jun 27-29, 2019, 山梨大学 (甲府市, 山梨県)
21. 樋口富彦, 湯山育子. Skeletal formation of scleractinian corals in response to Mg/Ca fluctuation. 日本地球惑星科学連合 2019 年大会, May 26-30, 2019, 幕張メッセ (千葉市, 千葉県)

#### (4) 著書、解説記事等

なし

#### 7. 異分野間連携・産学官連携・国際連携・国際活動等

##### 異分野間連携

1. 筑波大学計算科学研究センター生命科学研究部門生命機能情報分野 (重田育照教授・原田隆平准教授) との共同研究: 立体構造情報と分子進化情報を統合したタンパク質機能進化に関する研究
2. 国立感染症研究所寄生動物部 (永宗喜三郎室長・案浦健主任研究官) との共同研究: ミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼ候補タンパクのアピコンプレクサ寄生虫における細胞内局在解析

## 産学官連携

なし

## 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，ユーグレノゾア基部から分岐する新奇系統に関する研究
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. C. 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

稲垣祐司：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

なし