

## 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 (数理物質科学研究科)
教授	庄司 光男 (数理物質科学研究科)
准教授	原田 隆平 (生命環境科学研究科)
助教	堀 優太 (数理物質科学研究科)
助教	Kowit Hengphasatporn (生命環境科学研究科)
研究員	森田 陸離
研究員	宮川 晃一
研究員	下山 紘充
研究員	松井 正冬
研究員	Mrinal Kanti Si
研究員	藤木 涼
研究員	Sirin Sittivanichai
学生	大学院生 8名、学類生 3名、研究生 1名

#### 2. 概要

生命機能情報分野では、生体内で重要な働きをしている生体分子に注目し、その機能を分子構造と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5年度は、【1】銅含有アミン酸化酵素におけるセミキノンラジカル状態の理論解明、【2】複合体構造を予測する計算手法の開発、【3】SOD1 タンパク質の Cys 酸化による構造変化の理論解析、【4】Computational study for drug discovery and design research、【5】3D-RISM 理論を用いた human-ZIP8 のイオン輸送に関する理論的研究、【6】膜タンパク質に対する創薬シミュレーション手法の開発、【7】Rational design of cyclopentadiene-based super- and hyperacids based on aromaticity、【8】宇宙生命連携についての研究を大きく進展させた。これらの研究では、計算科学研究センターのスパコン (Cygnus, Pegasus)、および国内のスパコンを利用した。また、筑波大学内外の研究グループと共同研究し、新しい研究に積極的に取り組んだ。

#### 3. 研究成果

##### 【1】銅含有アミン酸化酵素におけるセミキノンラジカル状態の理論解明 (庄司)

銅含有アミン酸化酵素 (CAO) は種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒し、動植物や微生物に広く存在している。CAO は活性中心にトパキノン (TPQ) 補酵素と銅イオンを保持し、特異的活性を発現している。還元的半反応の最終過程において TPQ はセミキノン

ラジカル (TPQsq) 状態をとる。中性子構造解析を大阪医科薬科大の村川武史先生、大阪大学の岡島俊英先生らが、高分解能の中性子結晶構造解析に成功し、水素原子を含む原子位置が高分解能で決定された。本構造に対し、量子古典混合計算により、プロトン化状態の検証、セミキノラジカルのスピン密度分布、UV-vis スペクトル帰属について理論解析を実施した (図1)。

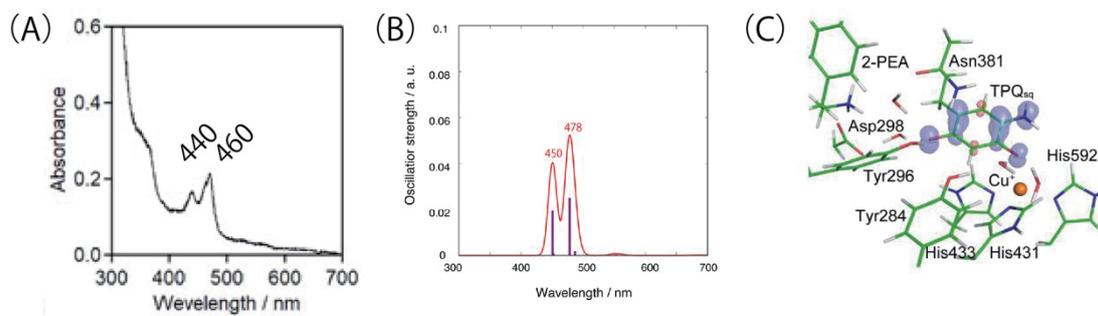


図1. CAO セミキノラジカル状態での (A)UV-vis スペクトル (実験) と TPQ-O2 位脱プロトン化状態での (B) UV-vis スペクトル (計算値)、(C) スピン密度分布。

## [2] 複合体構造を予測する計算手法の開発 (原田、Kowit、重田)

実験技術の進歩により、タンパク質と核酸 (RNA) の複合体について全体構造ではないものの、部分構造が PDB に登録されはじめている。RNA と結合するタンパク質は、複数のドメイン構造がループ領域を介して連結したマルチドメイン構造を有している場合が多い。具体的には、ドメイン構造が RNA を掴むように結合して複合体を形成する。実験的には、ループ領域の揺らぎが大きいことから、複合体の全体構造の決定が難しいという課題を抱えている。ゆえに、揺らぎが小さい部分 (ドメイン) 構造のみが PDB に蓄積されている場合がほとんどである。以上の理由から、既存の実験 (部分) 構造を参照しただけでは複合体の全体構造の解明は難しく、新規技術の開発が必要である。そこで、新規技術が確立されれば、タンパク質と RNA の分子間相互作用を詳細に解析できるようになり、機能解析が進む。本研究では、構造決定で欠けている生体分子の動的情報を補うため、揺らぎを考慮したフレキシブルドッキングを実現し、タンパク質と RNA の複合体の全体構造を予測するモデリング技術を開発した (*Bull Chem. Soc. Jpn.*, **96**, 677-68, 2023)。課題として、生体分子の揺らぎは MD を活用してあらわに考慮できるものの、通常の MD が到達可能な時間スケールが複合体形成の時間スケールに遠く及ばない。そこで、我々のグループが独自に開発を進めている長時間ダイナミクス抽出法 (*PaCS-MD, J. Chem. Phys.*, **139**, 035103, 2013) に基づき、複合体形成プロセスの抽出を試みた。PaCS-MD の適用にあたり、長時間ダイナミクス (現在の場合は複合体形成プロセス) の前 (RNA 結合前) と後 (RNA 結合後) の構造を指定しなければならない。そこで、RNA 結合前の構造を機械学習 (AlphaFold2) に基づきアミノ酸配列から予測した。RNA 結合後の構造は、タンパク質と RNA が結合した実験 (部分) 構造を利用する。これら

の条件のもと、PaCS-MD に基づき個々の部分構造が実験構造へ遷移するのに有利な初期構造を選択しながら短時間 MD を繰り返し、合理的な複合体の全体構造へ近づけていく。PaCS-MD に基づく Protein-RNA フレキシブルドッキングの概略図を図 2A に示す。

本手法の性能評価として、Protein-RNA の複合体が部分構造として実験的に決定されている「MUSASHI1-Protein (MSI1)」に適用し、複合体の全体構造を予測した。結果として、PaCS-MD に基づき複合体形成プロセスの抽出に成功し、MSI1 が有する 2 つのドメインで RNA を掴んでいる合理的な全体構造を予測できた。定量的な安定性評価として、図 2B に示すように既存の汎用的予測プログラム (Phyre2) から得られた全体構造と比較した。具体的には、両方法から生成された複合体構造に関し、タンパク質と RNA の結合自由エネルギーを MMGB/SA に基づき評価したところ、図 2B に示すように PaCS-MD で予測した複合体構造は Phyre2 と比較して安定な分子間相互作用エネルギーを示すことが分かった。以上の性能評価から、PaCS-MD はタンパク質と RNA の実験 (部分) 構造から複合体の全体構造を高精度に予測できることが分かった。

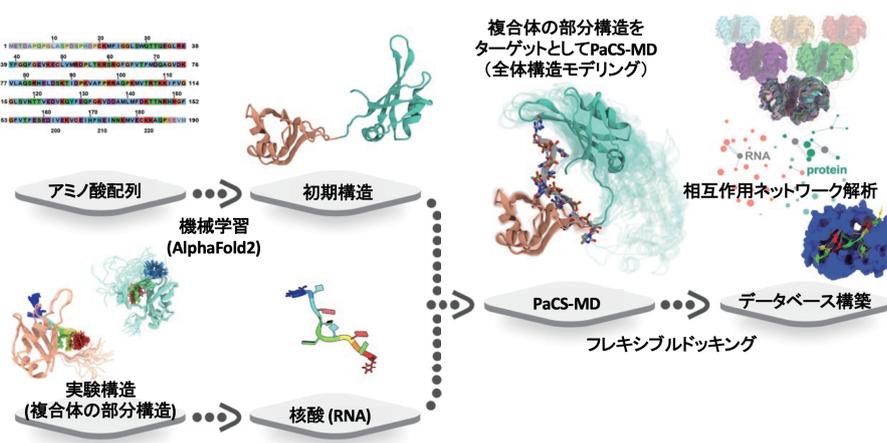


図 2A. PaCS-MD に基づく Protein-RNA フレキシブルドッキングの概念図。

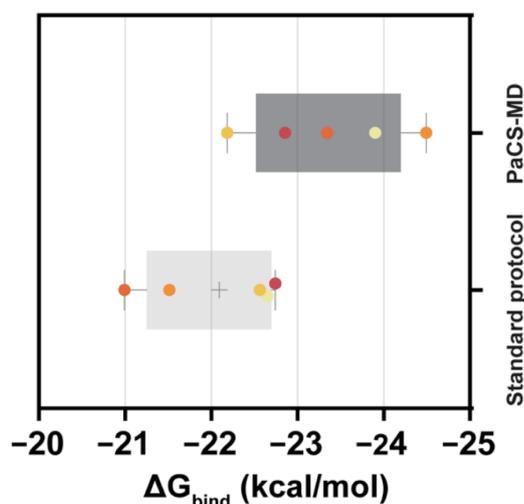


図 2B. MUSASHI1-Protein と RNA の結合自由エネルギー計算。PaCS-MD と Standard protocol (Phyre2) の性能評価。

今後の研究展開として、本手法を様々なタンパク質-RNA ペアに適用しながら分子間相互作用を蓄積していくことで、データベースを構築していく。これにより、RNA を認識するために重要な相互作用を特徴づけることができるようになり、生体機能の制御に有用な Protein-RNA の相互作用パターンを推定できる。

### [3] SOD1 タンパク質の Cys 酸化による構造変化の理論解析

スーパーオキシドディスムターゼ 1(SOD1) は、活性中心に  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  を保有するホモ二量体の金属タンパク質酵素であり (図 3)、活性酸素を酸素と過酸化水素に変換することにより、酸化ストレスから守る役目を果たしている。また、SOD1 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) として知られる神経変性疾患の原因としても知られており、特に、SOD1 のミスフォールディングや凝集化が ALS 発症の原因の一つとして考えられている。SOD1 は、酸化することにより  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  が活性中心から解離し、それによってミスフォールディングや凝集化が生じるのではないかと考えられている。よって本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて、SOD1 の酸化が  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の解離やミスフォールディングに与える影響について調べた。

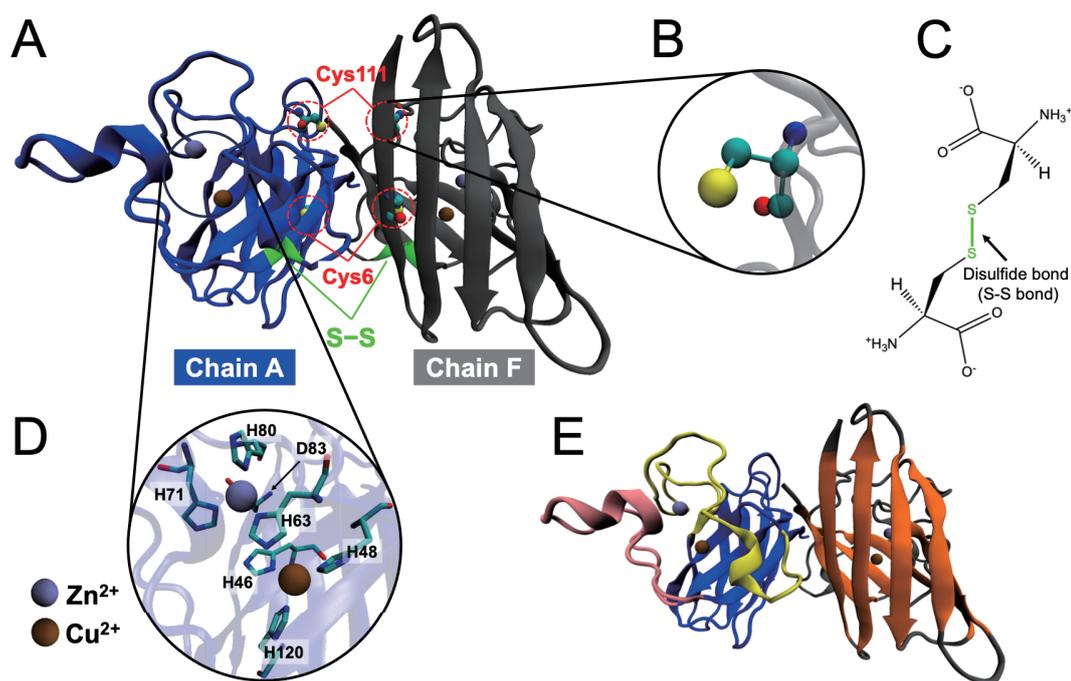


図 3 SOD1 タンパク質の構造。A: SOD1 の全体図。SOD1 は Chain A (青) と Chain F (灰) からなる。遊離している Cys は赤の破線で示し、S-S 結合をなす Cys は黄緑で示している。B: 遊離チオールの様子。チオール基 (-SH 基) の硫黄は他の残基と結合していない。C: ジスルフィド (S-S) 結合の様子。D: 金属配位の詳細。E: 主要なループ (Zn ループ: 黄、静電ループ: ピンク) と  $\beta$ -シート構造 (オレンジ)。

本研究では、SOD1 の 111 番目のシステイン残基 (Cys111) の酸化に注目し (図 3)、Cys111 のチオール基が  $\text{SO}_2^-$  と  $\text{SO}_3^-$  に酸化された計算モデルについて MD シミュレーションを行った。平均二乗偏差 (RMSD) や平均二乗揺らぎ (RMSF) などの動的構造解析から、SOD1 内の静電ループ (図 3 E) が Cys111 の酸化や  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の解離によって大きく影響を受け、構造揺らぎが大きくなることがわかった。SOD1 において、 $\text{Zn}^{2+}$  の結合は構造安定化に重要と考えられている、 $\text{Zn}^{2+}$  の解離は構造不安定化につながり、ミスフォールディングや凝集化を引き起こすと考えられている。よって、SOD1 の酸化による静電ループの不安定化が金属解離を引き起こし、SOD1 のミスフォールドを誘発し、凝集体形成に至るのではないかと考えられる。

#### **[4] Computational study for drug discovery and design research (Kowit Hengphasatpoen, Sirin Sittivanichai, R. Fujiki, Y. Shigeta)**

Our research is dedicated to drug discovery and design, employing various computational tools such as molecular docking, molecular dynamics (MD) simulation, and machine learning (Fig.4). In our investigations, we applied molecular docking and fragment molecular orbital (FMO) calculations to assess the relationship between  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and 9-O-berberrubine carboxylates. FMO calculations revealed that compound 27 outperformed compound 29, which is attributed to the presence of a methyl group enhancing binding through hydrophobic interactions. Consequently, compound 27 shows promise as an AMPK activator, warranting further exploration for diabetes and diabetic nephropathy treatment. Moreover, we focused on 8-bromobaicalein, examining its potential as a dengue and Zika replication inhibitor in a cell-based system targeting flaviviral polymerase. Beyond its inhibitory effect on the SARs-CoV-2 virus, 8-bromobaicalein demonstrated potency against dengue and Zika viruses. Additionally, our predictions identified sulfonamide chalcone derivatives as potential dengue inhibitors. Initial screening of 27 sulfonamide chalcones via cell-based antiviral and cytotoxic assays highlighted SC27 as the most potent, inhibiting the SAM-binding site of NS5 methyltransferase, a target confirmed through computational and enzyme-based assays. For HIV protease inhibitors, this study explores novel antiretroviral therapies using machine learning. Ensemble models identify key substructures for drug development. Molecular docking guides the design of 160 darunavir analogs based on these substructures. High-scoring structures undergo 1D screening, considering beyond Lipinski's rule of five and ADME predictions via the Combined Analog generator Tool (CAT). The approach aims to identify potential antiretroviral agents against HIV-1 proteases efficiently. This comprehensive approach underscores our commitment to advancing drug discovery and design through innovative computational methodologies.

Through collaboration with Prof. Shun Hirota (NAIST, Japan), we have elucidated the structural stability of antibodies in the dimeric (3D-DS) and tetrameric (#4VL) domain-swapping forms of

antibodies using hydrogen bonding analysis and 3D-RISM calculations (Fig.4). The computational results suggest that the instability of 3D-DS is in good agreement with experimental studies.

[5] 3D-RISM 理論を用いた human-ZIP8 のイオン輸送に関する理論的研究 (藤木、Kowitz、重田)

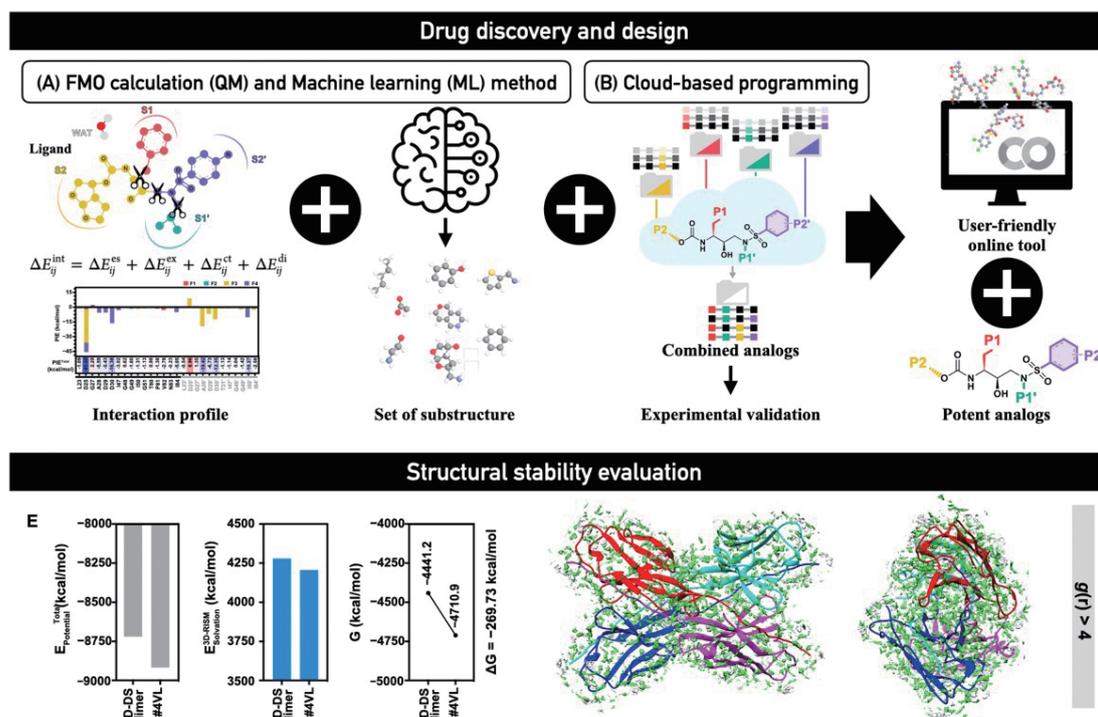


Fig.4 Our approach for the drug discovery and design using MD, ML, FMO, and docking. Structural stability of antibodies was performed by using FMO and 3D-RISM calculations.

本研究では人の体で亜鉛の輸送を行うタンパク質 human-ZIP8 に注目し、イオン輸送過程の理論的な解明を目的としている。ZIP ファミリーには 14 のメンバーが存在し、多くは主に人体での亜鉛のみの運搬に関わっているが、そのうち ZIP8 と ZIP14 は亜鉛だけでなくカドミウムやマンガンの運搬も行うことが知られている。しかし、その仕組みについては実験によって今も明らかにされていない。本研究は分子動力学 (MD) シミュレーションと、金属イオンがどのように存在するか調査するために液体の統計力学理論の一つである 3D-RISM 理論を用いることで分子論に基づいた調査を行い、その仕組みを明らかにする。本年度はイオン輸送に重要な結合サイトの特定に取り組み、MD シミュレーションを実行することでイオン分布に関する知見を得ることができた。選択性フィルタである Q58 と E221 の双方を HIS に変えた変異体と Wild Type のそれぞれに対して MD シミュレーションを実行し、得られた構造について 3D-RISM 計算を実行した。その結果、イオン輸送経路の出口に当たる部分に存在するイオン結合ドメインが変異に対して安定的であり、その周囲の残基が変異に対応した構造変化を行うことが示唆された。特に出口付近の構造変化は顕著であり、これにより亜鉛イオ

ンが透過しやすくなることが予想された。3D-RISM 計算の結果も亜鉛イオンの分布が出口付近に集中したことから、この変異による相互作用の減少が亜鉛イオン輸送能の向上に寄与していると考えられる。これは先行研究の実験結果と一致しており、亜鉛の特徴的な選択性における重要な知見を得ることができた(図5)。

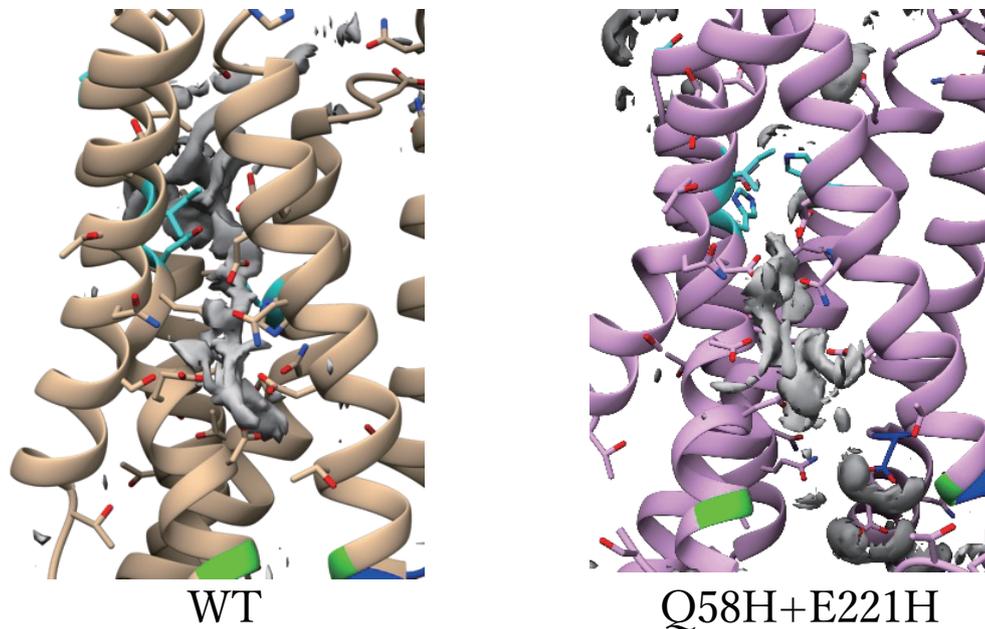


図5. 3D-RISM 計算によって得られた亜鉛イオンの分布。構造は  $1\mu\text{s}$  のシミュレーションにおける最終構造を用いた。ヘリックス間の距離が顕著に異なり、変異を加えたほうは輸送経路の出口に分布が集中している。(シアン：選択性フィルタドメイン、グリーン：輸送経路の出口に当たる残基)

## [6] タンパク質に対する創薬シミュレーション手法の開発 (森田・原田)

創薬において効率よく候補化合物を見つけるために、ドッキングシミュレーションが活用されてきた。ドッキングシミュレーションにおいては、標的とするタンパク質のポケットに化合物の形状および性質がうまくはまり込むかどうかを計算する。一方、膜タンパク質とよばれるタンパク質は細胞の内外を区切る脂質膜上に存在し、重要な機能を担う。例えば、細胞の内外での物質のやり取りや、シグナル分子を介した情報伝達を行う。その機能不全は疾患の原因となることも多く、創薬における重要なターゲットとなっている。しかし、従来のドッキングシミュレーションでは完全な水中にタンパク質が存在する状況を想定しているため、膜タンパク質に対して適切な計算を行うことができなかった。

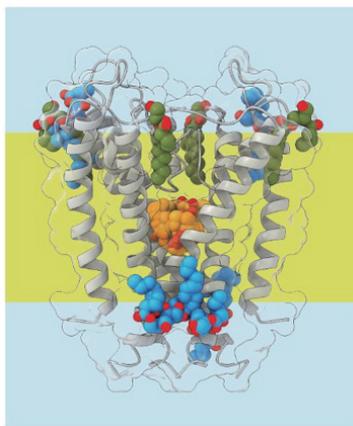


図6 LoCoMockにより得られたドッキングポーズと正解構造の比較。正解構造(緑)、従来のドッキングによる構造(オレンジ)、LoCoMockによる推定構造(水色)。

そこで、本研究では脂質の存在位置と膜の疎水性をともに評価することで、ドッキングポーズの妥当性を補正するスコア (LoCoMock) を提案した。23 種類の既知の複合体について検証したところ、16 の複合体については従来のドッキングシミュレーションより正解に近いポーズを提案することに成功した (図6)。需要の高い膜タンパク質をターゲットとした創薬が幅広く展開していくことが期待される。

## [7] Rational design of cyclopentadiene-based super- and hyperacids based on aromaticity (Mrinal Kanti Si and Yasuteru Shigeta)

The design and synthesis of neutral organic superacids are of recent interest due to their vast applications in chemistry and material sciences like olefinic polymerization, isolation of highly reactive short-lived cations, etc. Cyclopentadiene behaves as a mild organic acid, producing a stable conjugate base by gaining aromaticity and conjugation after deprotonation. To stabilize conjugate bases of organic acids to show superacidities and hyperacidities, we have considered aromatic phenyl substituents with cyclopentadiene (mono, di, and tri phenyl substituted cyclopentadiene and their cyano derivatives). The stable tri-substituted cyclopentadiene derivative shows the gas phase enthalpies of deprotonation ( $\Delta H_{\text{acid}}$ ) of 245 kcal/mol and 239 kcal/mol at DFT B3LYP and M06-2X respectively, with values in the range of hyperacidity. Some of the protonic tautomers of cyclopentadiene derivatives show hyperacidity, which shows the proton affinity values of 205 kcal/mol to 240 kcal/mol. Tri-phenyl substituted cyclopentadiene behaves as a moderate acid and becomes a superacid after replacing the phenyl with nitrobenzene, which is a stronger acid than  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\Delta H_{\text{acid}} = 298$  kcal/mol). Calculated HOMA index and nuclear independent chemical shift (NICS) reveal that the stability of conjugate bases as well as acidities increases with increasing aromaticity of cyclopentadiene rings after deprotonation in all molecules.

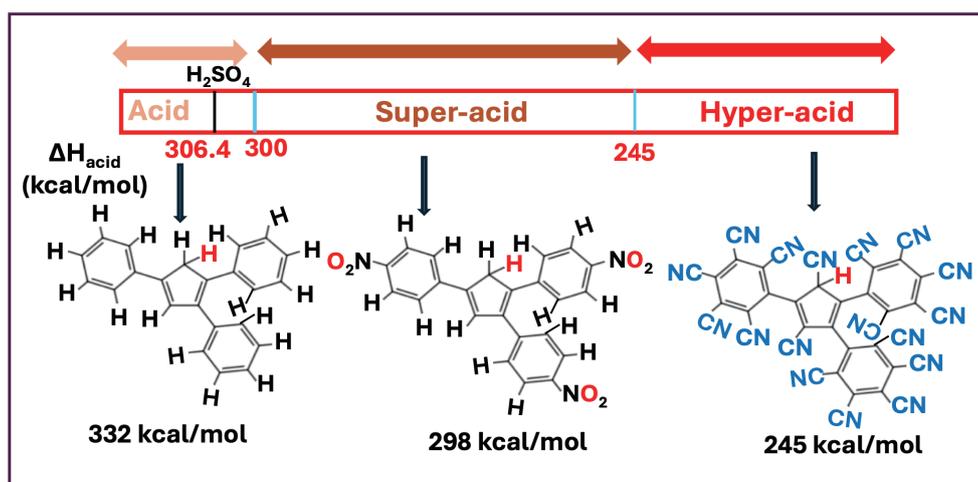


Fig.7 Structure of tri phenyl substituted cyclopentadiene derivatives and their enthalpies of deprotonation ( $\Delta H_{\text{acid}}$ )

## [8] 宇宙生命連携 (堀、庄司、重田)

生体を構成する分子であるアミノ酸はキラル分子であるが、地上生命はL型アミノ酸のみで主に構成され、L型アミノ酸を選択した理由については未だ十分に説明がなされていない。我々は、宇宙起源説で考えられる、星間空間での円偏光による不斉分解がどの程度関与しているのかについて、アミノ酸の円偏光吸収特性(円二色性吸収(CD)スペクトル)計算により、アミノ酸のホモキラル問題について取り組んだ。3種類のアミノ酸についてCDスペクトルをSAC-CI法を用いて計算したところ、10-11eV領域においてCDスペクトルが共通して大きく領域があることを見出した。銀河形成初期では10.2eVのLay- $\alpha$ 線が強く放射されることから、Lay- $\alpha$ により、アミノ酸のホモキラリティが発生した可能性について、異性体過剰率の新しい定式化により始めて理論的に示した(図8)。アミノ酸のキラル増幅で重要となる、分子間相互作用を計算し、アラニンとイソバリンの両アミノ酸で、同一キラリティ分子(homochiral dimer)の方が、異種キラリティ分子(heterochiral dimer)よりも、水中で安定化することを示した。興味深いことに、ガス中では、アミノ酸は中性イオン型を取り、カルボキシ基同士が分子間水素結合を形成するために、キラリティの差がでないが、水中では双イオン型を取ることで、カルボキシ基はアミノ基と側鎖や主鎖の水素原子と分子間相互作用を形成し、キラリティ認識がなされることが理論計算で示された。本機構は水質変性におけるアミノ酸の異性体過剰増幅に対する分子機構を示唆する結果と位置付けられる。

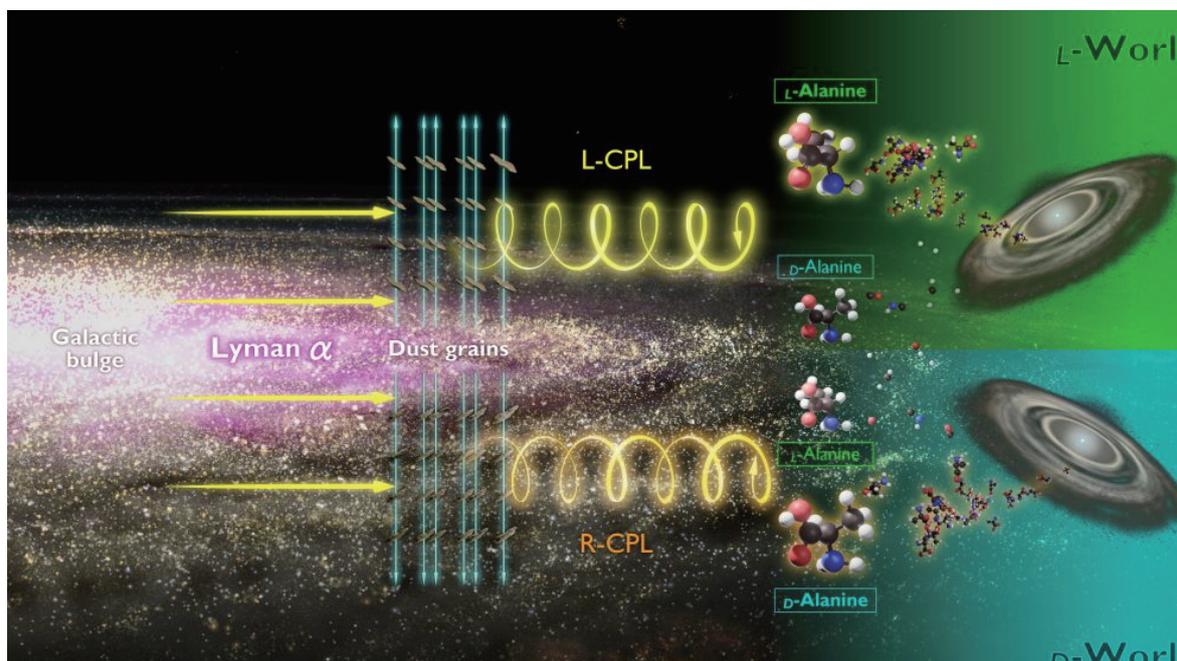


図8. 銀河形成の初期段階で放射されるライマン $\alpha$ 光がダスト散乱で円偏光化され、アミノ酸の選択的分解を引き起こし、地上生命のアミノ酸のホモキラリティ(L体世界形成)の起源となった。

## 4. 教育

### 学位論文

#### (1) 卒業研究発表

1. 小野 陸「オートポイエーシスにおける生命システムと観察者との接点」
2. 唐澤 公平「超分子複合体(ロゼット)の自己集合過程の理論的研究」

#### (2) 修士修了研究発表

1. 佐藤 綾香「SOD1 の Cys 酸化に伴う構造変化の理論的研究」
2. 俵屋 壮太郎「炭酸脱水酵素ナクレインのカルシウム結合機構の理論解析」

## 5. 受賞、外部資金、知的財産権等

### 受賞

1. 庄司光男、研究奨励賞受賞、量子化学計算を活用した複雑酵素反応および生体分子ホモキラリティ機構の解明、第5回量子生命科学大会、大阪大学、2023/5/19.
2. 重田育照、第8回分子科学会国際学術賞「溶液および固体における光アップコンバージョン機構の理論解析」、分子科学会、2023/9/12

### 外部資金

#### (1) 研究代表

1. 新学術領域研究(研究領域提案型)「生命金属科学」、重田育照、「加齢ミトコンドリア DNA 説における金属タンパク質動態に関する理論的研究」(R4-R5)
2. 日本曹達との共同研究事業「量子化学計算を用いた農薬特性の解析および各種シミュレーションを用いた材料特性の解析」、重田育照、期間 (R05.09-R06.08)、900 千円 (1 年間)
3. 公益財団法人豊田理化学研究所・豊田理研スカラー、堀優太、「理論化学による無水水素イオン伝導プロセス機構の解明および材料開発への理論提案」(R5)
4. 研究基盤支援プログラム (S タイプ)、Kowit Hengphasatporn、「リガンドタンパク質複合体構造探索のための新規計算手法の開発と創薬への応用」(R4-R6)
5. 科研費若手研究、森田陸離、「生体膜の両親媒効果を取り込んだドッキングシミュレーション手法の開発」(R5-R6)
6. 第1回 MOLISIS-CCG GRANT、森田陸離、「任意のタンパク質に蛍光能を付加する分子設計」(R4.10-R5.9)
7. 科研費研究スタートアップ支援、藤木涼、「液体の統計力学理論に基づく ZIP8 タンパク質のイオン輸送の理論的研究」(R5-R6)

## (2) 分担研究

1. CREST「自在配列」、重田育照（研究分担者）「3D ドメインスワッピングを利用したタンパク質の自在配列と機能化」 廣田俊（研究代表者）、(R02-R07)
2. 光・量子飛躍フラッグシッププログラム (Q-LEAP)、重田育照（研究分担者）「量子生命技術の創製と医学・生命科学の革新」、(研究代表者) 馬場嘉信、(R02-R12)
3. 公益財団法人豊田理化学研究所・豊田理研スカラー共同研究 Phase 1「植物空腹・指令シグナル分子の機能解明と 高機能性成長調整剤の開発」、重田育照（研究分担者）、(研究代表者) 田畑亮 (R5)
4. 学術振興会・科学研究費・基盤研究 B、重田育照（研究分担者）、(研究代表者) 守屋俊夫、(R05-R07)
5. AMED「難治性疾患実用化事業」「チトクロム C オキシダーゼを標的としたミトコンドリア病の新規治療薬開発」重田育照（研究分担者）、(研究代表者) 新谷泰範、(R03-R05)
6. 東京エレクトロンとの共同研究事業、重田育照（研究分担者）、(研究代表者) 伊藤雅英 (R02-R06)
7. 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）、「分子シミュレーションによるタンパク質化学反応ダイナミクス の 解 明 」 宮 下 治 （ 研 究 代 表 者 ） (R02-R05)
8. 特別推進研究「光合成における光誘導水分解反応機構及び光エネルギー利用機構の解明」、庄司光男（研究分担者）、沈建仁（研究代表者）(R04-R08)
9. 基盤研究（A）「XFEL-SFX による化学反応解明を目指した「反応追跡結晶」の構築」、庄司光男（研究分担者）、上野隆史（研究代表者）(R04-R07)
10. 学術変革領域研究（A）「G タンパク質の超硫黄化による新奇シグナル制御とその生理的意義の解明」、Kowit Hengphasatporn（研究分担者）、西田 基宏（研究代表者）(R04-R07)
11. 基盤研究（C）、森田陸離（研究分担者）、「アクチン細胞骨格の機能的品質と量を保障する分子機構の解明」、中野賢太郎（研究代表者）(R5-R8)
12. 基盤研究（C）、森田陸離（研究分担者）、「分子動力学計算とモデル生物で導き出す減数分裂開始機構の実態」、松田 真弥（研究代表者）(R5-R7)

## 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.Kumagai, R.Takabe, T.Nakazono, M.Shoji\*, H.Isobe, K.Yamaguchi, T.Misawa-Suzuki, H.Nagao, T.Wada\*, “Water oxidation utilizing a ruthenium complex featuring a phenolic moiety inspired by the oxygen-evolving centre (OEC) of photosystem II” , *Sustainable Energy & Fuels*, 8, 905-913 (2024/3/7). DOI:10.1039/d3se01610b
2. Q.Chen, T.Yamada, K.Miyagawa, A.Murata, M.Shoji, K.Nakatani\*, “A new small molecule DoNA binding to CAG repeat RNA” , *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 98, 117580, (2023/12/25). DOI:10.1016/j.bmc.2023.117580
3. T.Murakawa\*, K.Kurihara, M.Shoji, N.Yano, K.Kusaka, Y.Kawano, M.Suzuki, Y.Shigeta, T.Yano, M.Adachi, K.Tanizawa, T.Okajima\*, “Neutron Crystallography of a Semiquinone Radical Intermediate of Copper Amine Oxidase Reveals a Substrate-Assisted Conformational Change of the Peptidyl Quinone Cofactor” , *ACS Catalysis*, 13, 12403-12413(2023/9/7). 10.1021/acscatal.3c02629
4. A.Sato, M.Shoji\*, N.Watanabe, M.Boero, Y.Shigeta, M.Umemura\*, “Origin of Homochirality in Amino Acids Induced by Ly  $\alpha$  Irradiation in the Early Stage of the Milky Way” , *Astrobiology*, 23(10), 1019-1026(2023/10/17). DOI:10.1089/ast.2022.0140
5. Yohei Munei, Kowit Hengphasatporn, Yuta Hori, Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, “Determination of the Association between Mesotrione Sensitivity and Conformational Change of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase via Free-Energy Analyses” , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(24),9528-9537 (2023年6月). 10.1021/acs.jafc.3c01253
6. Yohei Munei, Yasuteru Shigeta, Ryuhei Harada, “A Variety of Initial Velocities in Restarting Molecular Dynamics Simulations Promotes Protein Transitions” , *Chemistry Letters*, 71(24),9528-9537 (2023年6月). 10.1246/cl.230104
7. Nitchakan Darai, Kowit Hengphasatporn, Peter Wolschann, Michael T. Wolfinger, Yasuteru Shigeta, Thanyada Rungrotmongkol, Ryuhei Harada “A Structural Refinement Technique for Protein-RNA Complexes Using Combination of AI-based Modeling and Flexible Docking: A Study of Musashi-1 Protein” ,96(7), 677-685 (2023年7月). 10.1246/bcsj.20230092
8. Nalinee Kongkaew, Kowit Hengphasatporn, Yuwanda Injongkol, Pitchayathida Meeudorn, Liyi Shi, Panupong Mahalapbutr, Phornphimon Maitarad, Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Thanyada Rungrotmongkol, Alisa S. Vangnai “Design of Electron-Donating Group Substituted 2-PAM Analogs as Antidotes for Organophosphate

- Insecticide Poisoning” , 13, 32266-32275 (2023 年 11 月 ). 10.1039/d3ra03087c
9. Takumi Nakanishi, Yuta Hori, Yasuteru Shigeta, Hiroyasu Sato, Shu-Qi Wu, Ryoji Kiyonagi, Koji Munakata, Takashi Ohhara, Osamu Sato, “Observation of proton-transfer-coupled spin transition by single-crystal neutron-diffraction measurement” , Physical Chemistry Chemical Physics, 25,12394–12400 (2023 年 4 月 ). 10.1039/D3CP00527E
  10. Natsuki Watanabe, Mitsuo Shoji, Koichi Miyagawa, Yuta Hori, Mauro Boero, Masayuki Umemura, Yasuteru Shigeta, “Enantioselective Amino Acid interactions in Solution” , Physical Chemistry Chemical Physics, 25, 15023–15029 (2023 年 5 月 ). 10.1039/D3CP00278K
  11. Natsuki Watanabe, Yuta Hori, Mitsuo Shoji, Mauro Boero, Yasuteru Shigeta, “Organocatalytic-Racemization Reaction Elucidation of Aspartic Acid by Density Functional Theory” , Chirality, 35(9), 645–651 (2023 年 4 月 ). 10.1002/chir.23573
  12. Y. Munei, K. Hengphasatporn, Y. Hori, R. Harada, Y. Shigeta, “Determination of the Association between Mesotrione Sensitivity and Conformational Change of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase via Free-Energy Analyses” , Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(24), 9528–9537 (2023 年 6 月 ). 10.1021/acs.jafc.3c01253
  13. Y. Kawabe, Y. Ito, Y. Hori, S. Kukunuri, F. Shiokawa, T. Nishiuchi, S. Jeong, K. Katagiri, Z. Xi, Z. Li, Y. Shigeta, Y. Takahashi, “1T/1H-SnS<sub>2</sub> Sheets for Electrochemical CO<sub>2</sub> Reduction to Formate” , ACS Nano, 17(12),11318–11326(2023 年 6 月 ). 10.1021/acsnano.2c12627
  14. T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Ogata, Y. Hori, K. Kusaka, Y. Hirano, K. Kurihara, Y. Shigeta, T. Tamada, Y. Higuchi, “New insights into the oxidation process from neutron and X-ray crystal structures of an O<sub>2</sub>-sensitive [NiFe]-hydrogenase” , Chemical Science, 14(35),9306-9315(2023 年 8 月 ). 10.1039/D3SC02156D
  15. T. Nakanishi, Y. Hori, Y. Shigeta, H. Sato, R. Kiyonagi, K. Munakata, T. Ohhara, A. Okazawa, R. Shimada, A. Sakamoto, O. Sato, “Development of an Iron(II) Complex Exhibiting Thermal- and Photo-induced Double Proton-transfer-coupled Spin Transition in a Short Hydrogen Bond” , Journal of the American Chemical Society, 145(35),19177–19181(2023 年 8 月 ). 10.1021/jacs.3c06323
  16. Q. Liu, T. Zhang, Y. Ikemoto, Y. Shinozaki, G. Watanabe, Y. Hori, Y. Shigeta, T. Midorikawa, K. Harano, Y. Sagara, “Grinding-Induced Water Solubility Exhibited by Mechanochromic Luminescent Supramolecular Fibers” , Small (2023 年 3 月 ). 10.1002/smll.202400063

17. Rikuri Morita\*, Yasuteru Shigeta, Ryuhei Harada\*. Efficient Screening of Protein-Ligand Complexes in Lipid Bilayers Using LoCoMock Score. (2023) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 37, 217-225
18. Raja Norazireen Raja Ahmad, Long-Teng Zhang † , Rikuri Morita † , Haruna Tani, Yong Wu, Takeshi Chujo, Akiko Ogawa, Ryuhei Harada, Yasuteru Shigeta, Kazuhito Tomizawa, Fan-Yan Wei\*. (2023) Pathological mutations promote proteolysis of mitochondrial tRNA specific 2-thiouridylase 1 (MTU1) via mitochondrial caseinolytic peptidase (CLPP). *Nucleic Acids Res.*52(3), 1341-1358
19. Rikuri Morita\*, Yasuteru Shigeta, Ryuhei Harada\*. Latrunculin resistance mechanism of non-conventional actin NAP1 uncovered by molecular dynamics simulations. (2023) *Cytoskeleton*, 81(2), 143-150
20. Vu Nguyen, D., C. Muanprasat, S. Kaewin, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, T. Rungrotmongkol and W. Chavasiri (2024). “Synthesis and biological evaluation of 2’-hydroxychalcone derivatives as AMPK activators.” *Bioorganic Chemistry*, (2024).
21. Danova, K. Pattanapanyasat, K. Hengphasatporn\*, Y. Shigeta, T. Rungrotmongkol, E. Hermawati, W. Chavasiri, “Unlocking E-arylidene Steroid Derivatives as Promising  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors” *ChemistrySelect*, (2024).
22. H. Chuntakaruk, K. Hengphasatporn\*, Y. Shigeta, C. Aonbangkhen, V. S. Lee, T. Khotavivattana, T. Rungrotmongkol, S. Hannongbua, “FMO-Guided Design of Darunavir Analogs as HIV-1Protease Inhibitors” *Scientific Reports*, (2024)
23. H. Chuntakaruk, K. Boonpalit, J. Kinchagawat, F. Nakarin, T. Khotavivattana\*, C. Aonbangkhen, Y. Shigeta, K. Hengphasatporn\*, S. Nutanong\*, T. Rungrotmongkol\*, S. Hannongbua\*, Machine Learning-Guided Design of Potent Darunavir Analogs Targeting HIV-1 Proteases: A Computational Approach for Antiretroviral Drug Discovery, *Journal of Computational Chemistry*, (2023).
24. T. Sakai, T. Mashima, N. Kobayashi, H. Ogata, L. Duan, R. Fujiki, K. Hengphasatporn, T. Uda, Y. Shigeta, E. Hifumi, S. Hirota\*, “Structural and Thermodynamic Insights into Antibody Light Chain Tetramer Formation through 3D Domain Swapping” , *Nature Communications*, (2023).
25. V. Cao, I. P. Sukanadi, N. Loeanurit, A. Suroengrit, W. Paunrat, V. Vibulakhaopan, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, W. Chavasiri, S. Boonyasuppayakorn\*, “A sulfonamide chalcone inhibited dengue virus with a potential target at the SAM-binding site of viral methyltransferase” , *Antiviral Research*, 220, 105753 (2023).
26. D.V. Nguyen, K. Hengphasatporn, A. Danova, F. Ryo, Y. Shigeta, T. Rungrotmongkol, W. Chavasiri\*, “Structure – activity relationship between 9-O-berberubine carboxylate

- derivatives and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity” , Scientific Reports, 13 (1), 18865 (2023).
27. V. Cao, N. Loeanurit, K. Hengphasatporn, R. Hairani, N. Wacharachaisurapol, N. Prompila, S. Wittayalertpanya, Y. Shigeta, T. Khotavivattana, W. Chavasiri, S. Boonyasuppayakorn\*, “The 8-bromobaicalein alleviated chikungunya-induced musculoskeletal inflammation and reduced the viral load in healthy adult mice.” , Emerging Microbes & Infections, 12 (2), 2270074 (2023).
  28. P. Pojtanadithee, K. Hengphasatporn, A. Suroengrit, S. Boonyasuppayakorn, P. Wilasluck, P. Deetanya, K. Wangkanont, P. Sukanadi, W. Chavasiri , P. Wolschann, T. Langer, Y. Shigeta, P. Maitarad, K. Sanachai\*, T. Rungrotmongkol\*, “Identification of Promising Sulfonamide Chalcones as Inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro through Structure-Based Virtual Screening and Experimental Approaches” , Journal of Chemical Information and Modeling, 63(16), 5244-5258 (2023).
  29. THT. Phan, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, W. Xie, P. Maitarad, T Rungrotmongkol, W. Chavasiri\*, “Designing Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors: A Synthesis and QSAR Modeling Approach for Biscoumarin Derivatives” , ACS Omega, 8(29), 26340-26350 (2023).
  30. K. Hengphasatporn, T. Aiebchun, P. Mahalapbutr, A. Auepattanapong, O. Khaikate, J. Meesin, C. Kuhakarn, Y. Shigeta, K. choowongkomon, T. Rungrotmongkol\*, “Sulfonylated Indeno[1,2 - c]quinoline Derivatives as Potent EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors” , ACS Omega 8 (22), 19645-19655 (2023).
  31. K. Boonthaworn, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, W. Chavasiri, T. Rungrotmongkol\*, P. Ounjai\*, “In Silico Screening of Chalcones and Flavonoids as Potential Inhibitors against Yellow Head Virus 3C-like Protease” , PeerJ 11:e15086 (2023).

## B) 査読無し論文

なし

## (2) 国際会議発表

### A) 招待講演

1. Mitsuo Shoji, QM/MM study of the reaction mechanism of sesamin biosynthesis by cytochrome P450, ICCP450-JSSS, Granship, Shizuoka, 2023/9/28.
2. Mitsuo Shoji, Origin of homochirality of amino acids, ICPAC Bali 2023, The Petra Bali Resort & Villas, Bali, Indonesia, 2023/9/15.
3. Mitsuo Shoji, The reaction mechanism of bacterial copper amine oxidase: interplay

- of theoretical QM/MM calculations and experimental methods, CJK-WTCC, Sungkyunkwan University (SKKU), Korea, 2023/6/21.
4. Ryuhei Harada, Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics for Sampling Rare Events of Proteins, The 26th International Annual Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE 26), チュラロコン大学 (タイ国), 2023/7.
  5. K. Hengphasatporn, Exploring Antiviral Drug Discovery through Computational Calculations and Fragment Molecular Orbital (FMO) Method, CCS-LBNL Collaborative Workshop 2023, CCS, U.Tsukuba, Tsukuba, Japan, 2023/4.
  6. Yasuteru Shigeta, “Computational studies on inhibition mechanism of some metalloproteins, The 5th Conference of Theory and Applications of Computational Chemistry (TACC), Sapporo, Sep. 4th-10th (2023).
  7. Yasuteru Shigeta, “Theoretical studies on structures and functions of metalloproteins: Towards understanding of inhibition mechanism of CcO and HPPD” , 26th International Annual Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE26), Jul. 20th-22nd (2023).

#### B) 一般講演

1. Mitsuo Shoji, “Overview of our research collaborations performed in the research area of molecular movies” , 高速分子動画国際シンポジウム2023、淡路夢舞台, 2023/11/30-12/1.
2. Kowit Hengphasatporn, Lian Duan, Yasuteru Shigeta, “3D structure construction of cyclic peptide using Deep learning” , the 75th annual meeting of the Society for Biotechnology, 2023/9/3-5.
3. Dang Cao Thuy Linh Linda, Kunio Kawanishi, Yukari Okita, Yukihide Watanabe, Sachie Hashimoto, Kowit Hengphasatporn, Chiaki Nagai-Okatani, Mohammed Abdel-Aziz, Rie Shiratani, Thanasis Poullikkas, Nuriza Ulul Azmi, Hiroko Bando, Yasuteru Shigeta, Atsushi Kuno, and Mitsuyasu Kato, “Cancer-Specific Sialylation Of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B Interact With Tumor-Associated Macrophage in Triple-Negative Breast Carcinoma via Siglec-9 “, the 26th International Glycoconjugate Symposium, 2023/8/27-1, Taiwan
4. K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, “Synergistic Integration of FMO and MM Calculations: A Novel Approach for Unveiling Potent Antiviral Agents” , CU-UM Bilateral Seminar and Workshop, Malaysia, 2024/2/17-19.
5. Y. Hori, A. Sato, Y. Shigeta, “Theoretical study for the active site in oxidized [NiFe]-hydrogenase” , The 5th conference of Theory and Applications of Computational

Chemistry (TACC2023), Hokkaido University, 2023/9/7.

### (3) 国内学会・研究会発表

#### A) 招待講演

1. 庄司光男, 理論化学会・レクチャーシリーズ #5 酵素反応機構と生命起源についての理論的探求, Zoom, 2023/7/27.
2. 庄司光男, 理論化学会・レクチャーシリーズ #5 酵素反応機構と生命起源についての理論的探求, Zoom, 2023/7/28.
3. 庄司光男, 招待講演、アミノ酸のホモキラリティ獲得機構から生命の起源を探る、東京理科大学、東京理科大学, 2023/7/19.
4. 庄司光男, 公開セミナー、アミノ酸のホモキラリティ獲得機構から生命の起源を探る、筑波大, 2023/6/19
5. 庄司光男, 量子化学計算を活用した複雑酵素反応および生体分子ホモキラリティ機構の解明、量子生命科学会第5回大会、大阪大学、2023/5/19.
6. 原田 隆平, 次世代インシリコ創薬を開拓する新しい分子シミュレーション手法の開発・CBI 研究機構量子構造生命科学研究所シンポジウム, オンライン, 2023年9月.
7. 堀 優太, 実験との連携による酵素触媒反応の機構解析と理論設計・化学反応経路探索のニューフロンティア, 大阪公立大学 2023・2023年9月11日.
8. 堀 優太, 無水プロトン伝導物質の設計に向けた計算化学による伝導機構の理論解析・マテリアル・計測ハイブリッド研究センター若手フォーラム, 東北大学, 2023年11月7日.
9. 堀 優太, 佐藤 綾香, 重田 育照, 理論計算による金属タンパク質の構造・電子状態・機能の解析・凝縮系の理論化学, 沖縄, 2024年3月27日.
10. 重田 育照, “分子シミュレーションに基づく生体内分子の機能解析と創薬支援技術開発”, イノベーション人材育成セミナー, 東京大学大学院薬学系研究科附属創薬機構, 東京大学, 2023.08.30
11. 重田 育照, “計算構造生物物理学に基づく生命機能メカニズム解析”, 第40回分子病理学研究会クラークシンポジウム, 北海道大学, 2023.07.14-15.

#### B) 口頭発表

1. 堀 優太, 実験との連携による計算化学の生体・物質系へのアプローチ・次世代若手研究者による応用計算・理論化学研究会 2023, 筑波大学, 口頭発表, 2023年7月.
2. 酒井隆裕, 山口将平, 真島剛史, 小林直也, 段練, 藤木涼, Kowit Hengphasatporn, 重田育照, 緒方英明, 一二三恵美, 宇田泰三, 廣田俊 ドメインスワッピングにより4量化する抗体軽鎖の会合挙動とX線結晶構造・2回抗体学会, 鹿児島市, 口頭発表

表, 2023 年 12 月 1-3 .

3. 川西邦夫, 渡邊幸秀, 康德東, 堂本裕加子, Kowit Hengphasatporn, 重田育照, 広瀬雄二郎, 徳楽清, 多分野融合によるアミロイド類縁腎臓疾患のメカニズム解析, 第 40 回分子病理学研究会クラークシンポジウム、北海道大学、口頭発表, 2023 年 7 月 14-15.
4. 堀 優太、小倉 浩樹、出倉 駿、森 初果、重田 育照, 第一原理計算を用いたプロトン伝導分子性結晶中のプロトン移動と分子運動の解析, 日本化学会 第 104 春季年会 (2024), 千葉, 口頭発表, 2024 年 3 月 19 日 .
5. 原田隆平, 森田陸離, 重田育照, 化合物の結合と膜透過プロセスを紐解くレアイベントサンプリング法の開発・本コンピューター化学会秋季年会, 香川, 口頭発表, 2023 年 11 月 25 日 .

### C) ポスター発表

1. Mitsuo Shoji, Overview of our research collaborations performed in the research area of molecular movies, 高速分子動画国際シンポジウム 2023、2023/11/30 -12/1.
2. M.Shoji, M.Takeshi, Y.Hori, Y.Shigeta, H.Hayashi, T.Okajima, QM/MM Free energy simulation for the catalytic reaction of bacterial copper amine oxidase, The 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2023/11/14.
3. Mitsuo Shoji, Quantum chemistry study of the origin of homochirality of amino acids, Poster (invited), 2023/6/21.
4. 庄司光男, アミノ酸のホモキラリティはアミノニトリル前駆体の異性体過剰に起因する、量子生命科学会第 5 回大会、2023/5/18.
5. 庄司光男, ” 高速分子動画” 領域で研究連携中の酵素反応の量子化学解析についての最近の進捗、令和 5 年度シンポジウム・領域会議、2023/5/10-11.
6. Yuta Hori, Yasuteru Shigeta, Characterization of the electronic and geometrical structures and the formation pathway in oxidized [NiFe]-hydrogenase, 17th International Congress of Quantum Chemistry, 2023/6.
7. Kowit Hengphasatporn, Nitchakan Darai, Peter Wolschann, Michael T. Wolfinger, Yasuteru Shigeta, Thanyada Rungrotmongkol, Ryuhei Harada, Combining AI-based Modeling and Flexible Docking for Efficient Refinement of Protein-RNA Complexes using PaCS-MD, The Protein Society - 37th Annual Symposium, 2023/7/12-17.
8. Kowit Hengphasatporn, Thanyada Rungrotmongkol, Supot Hannongbua, Yasuteru Shigeta, FMO-Guided Design of Darunavir Analogs as HIV-1 Protease Inhibitors, the 5th Congress of the Theory and Applications of Computational Chemistry (TACC2023), 2023/9/5-9 .

9. 佐藤綾香、堀優太、重田育照, 高電位鉄硫黄タンパク質の活性中心の電子状態及び構造と周囲のアミノ酸からの影響の理論解析, 量子生命科学会第5回大会, 2023年5月.
10. 堀優太、佐藤綾香、重田育照, 還元型高電位鉄硫黄タンパク質の鉄硫黄クラスターの電子状態と周囲のアミノ酸が与える影響, 第25回理論化学討論会, 2023年5月.
11. 堀優太、佐藤綾香、重田育照, 酸化型 [NiFe] ヒドロゲナーゼの生成過程と活性中心の構造についての理論解析, 量子生命科学会第5回大会, 2023年5月.
12. Kowit Hengphasatporn, Warinthorn Chavasiri, Siwaporn Boonyasuppayakorn, Yasuteru Shigeta, Inhibition of Dengue Virus by a Sulfonamide Chalcone Targeting the SAM-Binding Site of Viral Methyltransferase, 「硫黄生物学」第3回領域会議, 2023/09/16-18.
13. Kowit Hengphasatporn, Thanyada Rungrotmongkol, Supot Hannongbua, Yasuteru Shigeta, Finding Potent HIV-1 Protease Inhibitors through FMO-Guided Drug Design, Chem-Bio Informatics Society(CBI) Annual Meeting 2023, 2023/10/23-25.
14. Kowit Hengphasatporn, Nitchakan Darai, Peter Wolschann, Michael T. Wolfinger, Yasuteru Shigeta, Thanyada Rungrotmongkol, Ryuhei Harada, Integrated AI-based Modeling and Flexible Docking for Protein-RNA Complexes Refinement, BSJ61, 2023/11/13-16.
15. Kowit Hengphasatporn, Thanyada Rungrotmongkol, 育照重田, Combining Quantum Mechanics and Machine Learning for Accelerated Drug Design Against HIV PR Inhibitors, SCCJ2023, 2023/11/24-26.
16. K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, Insights into molecular metabolism of herbicide-resistant CYP81As through molecular docking and MM/GBSA analysis · 8th Edition of Global Congress on PLANT BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2024/3/24-27.
17. T. Sakai, T. Mashima, N. Kobayashi, H. Ogata, L. Duan, R. Fujiki, K. Hengphasatporn, T. Uda, Y. Shigeta, E. Hifumi, S. Hirota, 4 量化する抗体軽鎖の会合挙動と3Dドメインスワッピング構造の解明, 日本化学会第104春季年会, 2024年3月18-21.
18. DUAN LIAN, Convolutional Neural Network Model for Predictive Screening of Cyclic Peptides in Drug Design and Development, TACC2023, 2023/9/4-9.
19. Ayaka Sato, Yuta Hori, Yasuteru Shigeta, Theoretical analysis of the electronic and geometrical structures of the active center of a high-potential iron-sulfur protein and its influence from surrounding amino acids, TACC2023, 2023/9/4-9.
20. 渡辺七都稀, 温度サイクルによる混合エナンチオマークラスター系の脱ラセミ化の理論研究・日本化学会秋季事業 第13回CSJ化学フェスタ2023, 2023年10月17日-19日.

21. 佐藤綾香, 藤木 涼, 堀 優太, Kowit Hengphasatporn, 重田 育照, SOD1 の CYS 酸化に伴う構造変化の理論的研究・日本コンピュータ化学会 2023 秋季年会, 2023 年 11 月 23 日 -11 月 26 日 .
22. 堀 優太, 佐藤綾香, 重田育照, Theoretical investigation into the electronic and geometrical structures for the oxidation tolerance of [NiFe]-hydrogenases, 第 61 回日本生物物理学会年会, 2023/11/14.
23. 堀優太, 渡辺七都稀, 庄司光男, 重田育照, 星間空間におけるホモキラリティー発生の理論的研究, 第 17 回分子科学討論会, 2023 年 9 月 12 日 .
24. Takunori Yasuda, Rikuri Morita, Yasuteru Shigeta, Ryuhei Harada, The Computational Study on the Secondary Structure Formation of Nascent Peptides Inside the Ribosome Tunnel, BSJ61, 2023/11/13-16.
25. Rikuri Morita, Yasuteru Shigeta, Ryuhei Harada, Enhanced Conformational Sampling Based on Structural Generation by the Inverse Transformation Using Principal Component Analysis, BSJ61, 2023/11/13-16.
26. 佐藤 紘歌, 森田 陸離, 重田 育照, 原田 隆平, 分子動力学計算で解明する TGF- $\beta$  受容体の多量体形成機序・第 46 回 日本分子生物学会年会・2023 年 12 月 6 日 .
27. 保田 拓範, 森田 陸離, 重田 育照, 原田 隆平, 新生ペプチド鎖のリボソームトンネルにおける 2 次構造形成に関する計算科学的研究, 第 46 回 日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月 6 日 .
28. Ryo Fujiki, Kowit Hengphasatporn, Norio Yoshida, Yasuteru Shigeta, 3D-RISM Theory for Biological System: QM and MM, TACC2023, 2023/ 9/4-9.
29. 藤木 涼, Kowit Hengphasatporn, 重田 育照, 液体の統計力学理論に基づく ZIP8 タンパク質の理論的研究, 第 17 回分子科学討論会, 2023 年 9 月 12 日 -9 月 15 日
30. 藤木 涼, Kowit Hengphasatporn, 重田 育照, 液体の統計力学理論を用いた hZIP8 の構造変化に関する理論的研究・日本コンピュータ化学会 2023 秋季年会, 2023 年 11 月 23 日 -11 月 26 日 .

#### (4) 著書、解説記事等

1. Y. Hori, K. Nishikawa, Y. Shigeta, Y. Higuchi, “Biological Enzymes and Hydrogenases”, Hydrogenomics: The Science of Fully Utilizing Hydrogen, S. Orimo, K. Fukutani, K. Fujita, Eds., 共立出版, 2023.
2. 森田陸離、重田育照、原田隆平「脂質膜を考慮した膜タンパク質と化合物の複合体予測シミュレーション」日本生物物理学会 学会誌「生物物理」Vol. 64 No. 1(通巻 371 号)

## 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. 量子科学技術開発機構（QST）との共同研究
2. TIA かけはし

### 国際連携・国際活動

該当なし

## 8. シンポジウム、研究会、スクール等の開催実績

1. 世話人：庄司光男、原田隆平、堀 優太、Hengphasatporn Kowit、藤木涼、重田研  
10周年記念シンポジウム、筑波大学 計算科学研究センター ワークショップ室、  
2024/3/16.
2. 世話人：堀優太、藤木涼、次世代若手研究者による応用計算・理論化学研究会 2023、  
筑波大学 総合研究棟 B 110 室、2023/7/25-26

## 9. 管理・運営

重田育照

筑波大学副学長・理事（研究）

庄司光男

計算科学研究センター運営委員会委員、物理学域理論生命物理グループ長

## 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（2019-2022）
- ・大阪大学 大学院基礎工学研究科 招聘教授（2015-）
- ・日本化学会 理論化学・情報化学・計算化学ディビジョンレポート 幹事（2019-）

庄司光男

- ・理論化学会幹事（2022-2024）

原田隆平

・分子シミュレーション学会 学会誌「アンサンブル」編集委員 (2020-2024)

## 11. その他

1. 梅村雅之、庄司光男, NHK ヒューマニエンス BS101 チャンネル、(“左と右” 生命を左右するミステリー) に一瞬出演、2024 年 1 月 9 日 18:00 放送回
2. 庄司光男, 梅村雅之, プレスリリース, アミノ酸のホモキラリティは天の川銀河系形成時のライマンアルファ光で形成された、2023/9/25
3. 村川武志、庄司光男, プレスリリース, 中性子結晶構造解析によって酵素ラジカル反応中間体の詳細構造を初めて解明 - 酵素を効率的に働かせるための“手品のタネ明かし” -、2023/9/20
4. 庄司光男, 梅村雅之, 筑波大学ポッドキャスト「研究室サイドストーリー」、#036 地球上の生命はどこからやってきた? 計算で解き明かすアミノ酸と銀河形成の関係、研究紹介配信、2023/7/21
5. 堀優太、重田育照, 共同プレスリリース (立命館大学、大阪大学、筑波大学、慶應義塾大学)・荷電 $\pi$ 電子系が発現するジラジカル性をイオンペア形成によって制御～電子スピンを利用した電子・光機能材料の開発に期待～・2023 年 4 月 3 日
6. 堀優太、重田育照, 共同プレスリリース (名古屋大学、金沢大学、筑波大学)・二酸化炭素の還元触媒について、構造と電気化学特性の関係をナノスケールで解明～副反応を抑えた二酸化炭素還元のための触媒開発に貢献～・2023 年 6 月 9 日

## V-2. 分子進化分野

### 1. メンバー

教授	稲垣祐司
助教	中山卓郎
学生	大学院生 4名（後期課程1名、前期課程在学3名）、学類生 1名

### 2. 概要

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

#### 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、タンパク質の進化過程で一次配列（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 (Kamikawa et al. 2014 *Genome Biol Evol* 6:306-315; Yabuki et al. 2014 *Sci Rep* 4:4641)、③ キネトプラスト類内部の系統関係の解明 (Yazaki et al. 2016 *Genes Genet Syst* 92:35-42)、④ フォルニカータ生物群内部の系統関係の解明 (Leger et al. 2017 *Nat Ecol Evol* 1:0092)、⑤ “CRuMs クレード” の提案 (Brown et al. 2018 *Genome Biol Evol* 10:427-433)、⑥ 渦鞭毛藻内部系統関係の解明 (Sarai et al. 2020 *Proc Nat Acad Sci USA* 117:5364-5375)、⑦ 真

核微生物バルセロナ類 (PAP020 株を含む) の系統的位置の解明 (Yazaki et al. 2020 *Proc R Sci B* 287:20201538)、⑧アピコンプレクサ門グレガリン類内部系統関係の解明を行った (Yazaki et al. 2021 *Parasitol Internat* 83:102364)、⑨ *Microheliella maris* の系統的位置の解明とメガ生物群 CAM クレードの提唱を行った (Yazaki et al. 2022 *Open Biol* 12:210376)。未記載真核微生物 SRT308 株 (2016 年度年次報告書参照) および未記載真核微生物 SRT706 株については (2022 年度年次報告書参照)、矢吹彬憲博士 (海洋研究開発機構) および Dalhousie 大学 (カナダ) の Alastair G. B. Simpson 教授と Andrew J. Roger 教授との共同研究として解析が進んでおり、今後論文作成を行う予定である。また 2023 年度年次報告で報告した一次植物を構成する 3 つのサブクレード間の系統関係の検証は終了しており、磯貝龍呂氏 (生命地球科学研究群生物学学位プログラム前期課程 1 年) を中心に投稿論文を取り纏めている。本稿では、原田ら (2024 *Mol Biol Evol* 41:msae014) で推測した 340 遺伝子データに基づく真核生物大系統と、それに基づくミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼ (DNAP) の初期進化についての考察を報告する。

### 真核生物大系統に基づくミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼの初期進化に関するシナリオの検討

これまでの研究により、ミトコンドリアに局在する DNAP は 7 タイプが知られている。多くの真核生物系統はミトコンドリア局在 DNAP として POP をもっている。オピストコンタに特異的なミトコンドリア局在 DNAP は Pol  $\gamma$ 、アピコンプレクサ類とその近縁系統はミトコンドリア局在 DNAP として acPolA、ディスコバの一部であるユーグレノゾアは系統的に異なる 3 タイプのミトコンドリア局在 DNAP である PolIIA、PolIIBCD+, POP をもつ。今回我々が報告する新奇ミトコンドリア局在 DNAP である rdxPolA は、POP ほどではないが真核生物内で広い分布を示す。rdxPolA はユーグレノゾアを除くディスコバ、マラウィモナス類、アンキロモナス類から検出された。これら 3 系統はお互いに近縁でなく、色素体をもたない単細胞従属栄養系統である。ここには示さないが、rdxPolA とそれに近縁なファミリー A DNAP を用いた系統解析では rdxPolA は  $\alpha$  プロテオバクテリアの PolII と近縁性を示した。これまでの研究では、rdxPolA 以外に  $\alpha$  プロテオバクテリア PolII に明らかな起源をもつミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼは報告されていない。従って、rdxPolA はミトコンドリアの起源となった  $\alpha$  プロテオバクテリア共生体がもっていた PolII の直系の子孫 DNAP であり、現存する真核生物の直近の共通祖先 (Last Universal Common Ancestor/LECA) 以前から受け継がれてきた祖先的ミトコンドリア局在 DNAP だと解釈することが可能である。

これまで知られているミトコンドリア局在 DNA ポリメラーゼのうち、進化的に互いに近縁とは考えにくい複数の系統に分布する DNAP は POP と rdxPolA の 2 種類だけである。そこで、真核生物の初期進化段階におけるミトコンドリア局在 DNAP の進化シナリオを考える。まず、真核生物において POP と rdxPolA がどのように分布しているかを把握するためには、rdxPolA をもつ系統 (rdxPolA 系統) と POP をもつ系統 (POP 系統) の正確な系統関係

を知る必要がある。近年、300 を超える遺伝子を用いた大規模分子系統解析は、真核生物を①ディアフォレティケス、②アモルフィアと CRuMs の姉妹群、③ディスコバ、④メタモナス類、⑤マラウイモナス類、⑥アンキロモナス類の6つの大きなクレードに収斂させてきた。これまでに判明したミトコンドリア局在 DNAP の分布から、6系統のそれぞれの共通祖先がミトコンドリア局在 DNAP としてどの DNAP を用いていたか推測すると、ディスコバ、マラウイモナス類、アンキロモナス類は rdxPolA、ディアフォレティケスとアモルフィア + CRuMs は POP、メタモナス類はミトコンドリアゲノムを失っているためミトコンドリア局在 DNAP をもたないと考えられる。これらの6系統の系統関係は、使用する遺伝子や生物種が各解析で異なり議論の余地が残っている。従って、6系統の近縁関係により現在の rdxPolA と POP の分布を説明する進化シナリオは2パターン考えられる。

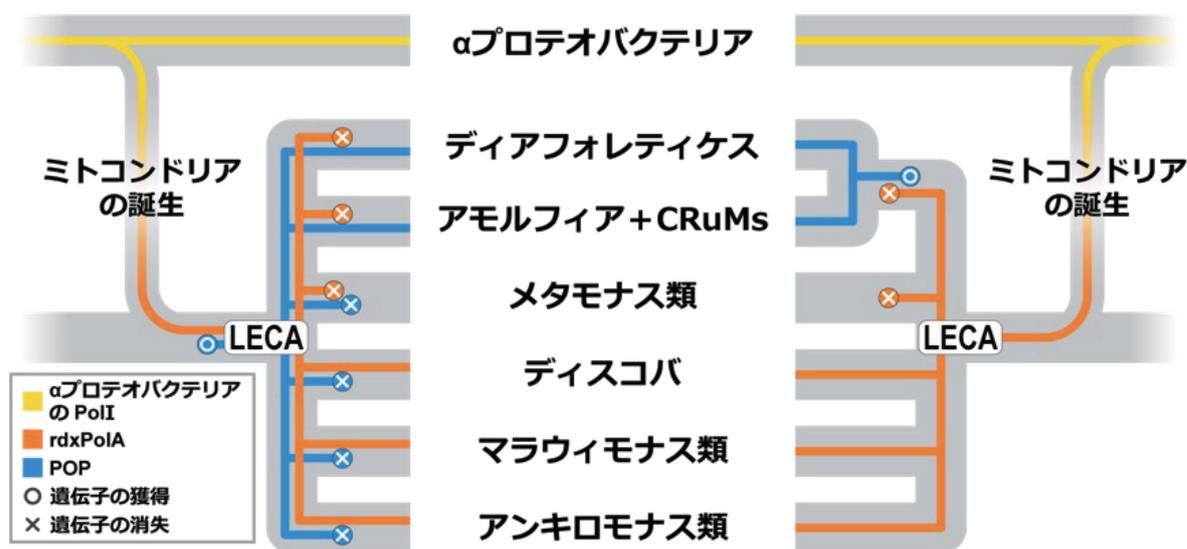


図1. 主要なミトコンドリア局在 DNAP である POP と rdxPolA が、どのようにして現在の分布になったのかを示す2つのシナリオ。オレンジ、青、黄色の線はそれぞれ、rdxPolA、POP、 $\alpha$ プロテオバクテリアの PolI の進化の軌跡を表す。(右) POP をもつ系統であるディアフォレティケスとアモルフィア + CRuMs が単系統になる場合、rdxPolA から POP への置換が一度起こったシンプルなシナリオが考えられる。(左) POP 系統と rdxPolA 系統が真核生物系統樹で混在している場合、真核生物の共通祖先である LECA の時点で rdxPolA と POP の両方が確立されており、系統ごとに消失が起こったと考えられる。

第1シナリオとして、rdxPolA 系統（ディスコバ、マラウイモナス類、アンキロモナス類）と POP 系統（ディアフォレティケスとアモルフィア + CRuMs）が真核生物系統樹上で混在せず、お互いに排他的な分布を示す場合が想定できる。この場合、rdxPolA と POP のどちらか一方が LECA に存在し、真核生物の進化の中でもう一方の DNAP への置換が一度だけ起こったと考えられる。例えば、POP 系統であるディアフォレティケスとアモルフィア + CRuMs が単系統を形成した場合のミトコンドリア局在 DNAP 進化シナリオは図1右のようになる。このシナリオではミトコンドリア共生体の PolI を起源とする rdxPolA が祖先的であると仮定

している。rdxPolA は、メタモナス類では消失し、ディアフォレティケスとアモルフィア+CRuMs の共通祖先において POP に置換されたことで現在のミトコンドリア局在 DNAP の分布が成立する。

第2のシナリオとして、真核生物系統樹上で rdxPolA 系統と POP 系統がどちらも排他的に分布しない可能性を考えよう。rdxPolA と POP が真核生物の系統樹上で混在する場合、まず LECA では POP と rdxPolA が共存を仮定する必要がある。これは rdxPolA 系統と POP 系統のそれぞれの共通祖先が LECA まで、あるいは LECA に近い真核生物系統樹の枝まで遡るためである。その後の真核生物の進化において、系統ごとに2つの DNAP のうち片方が二次的に消失したということになる (図1左)。では実際の大規模系統解析において、rdxPolA 系統と POP 系統はどのように分布しているだろうか。我々は340 遺伝子からなる真核生物系統解析用アライメントを作成し、最尤法により6つの系統間の系統関係を推測した。結果として得られた無根系統樹はメタモナス類の位置に関わらず、rdxPolA 系統もしくは POP 系統の単系統性を復元しなかった (図2A)。

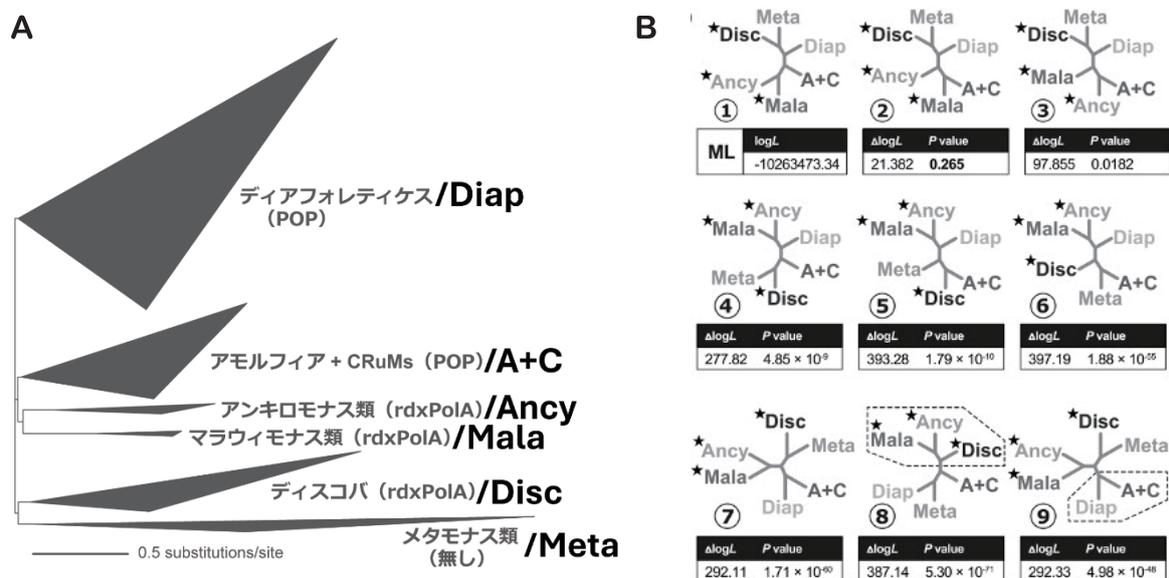


図2. 真核生物の主要6系統間の系統関係。(A) 97生物種・116,499アミノ酸残基から構成されるアライメントから復元した最尤系統樹。使用したアミノ酸置換モデルはLG+C60+F+Gモデルである。注目した6つのクレードは三角形で簡易的に表示し、内部分岐は省略した。カッコ内はミトコンドリア局在DNAPとしてrdxPolAかPOPを使うかを示した。スラッシュの右は(B)で使用する各クレードの略号を示した。(B) AU検定による6系統間の分岐関係の検討。樹形①は(A)で示した最尤系統樹。最尤系統樹では、★で示したrdxPolA系統とPOP系統は排他的に分布しなかった。樹形①からアモルフィア+CRuMsを移動させて樹形②~⑨を作成し、AU検定を行った。樹形①との対数尤度差( $\Delta \log L$ )およびAU検定のP値(P value)は図中の表に示した。樹形⑧と⑨では、rdxPolA系統とPOP系統が排他的に分布しているが、AU検定では棄却された。

さらに、rdxPolA系統またはPOP系統が単系統になる樹形が復元される可能性をAU検定

により検証した (図 2B)。樹形⑧と⑨は rdxPolA 系統と POP 系統が排他的に分布している樹形であるが、樹形①とここで注目した 2 つの樹形間に有意な対数尤度差がないという帰無仮説は棄却された。したがって、現時点では rdxPolA 系統と POP 系統はどちらも単系統を形成するとは考えにくい。この大規模系統解析結果をミトコンドリア局在 DNAP の進化へと演繹すると、LECA の時点で rdxPolA と POP の両方が存在し、真核生物の初期進化過程では rdxPolA と POP が混在していたという図 1A に示す第 2 のシナリオが支持される。

## [2] 各種トランスクリプトーム・ゲノム解析

### 原生物に共生するバクテリアのゲノム解析

自然環境において、多くの細菌が様々な真核生物と共生関係を築いている。こうした共生関係はそれら共生細菌の進化に影響しており、中でもゲノムに与える進化的影響は明確である。共生細菌の中にはゲノムサイズが 1Mbp 以下と極端に縮小したものも散見され、このように縮小した共生細菌ゲノムを調査することは、個々の共生メカニズムを理解する上で重要なだけでなく、細菌の生存に必要な不可欠な遺伝子セットの同定や生物学的プロセスの根幹を理解するためのモデルとしても有用である。

上記のような基本原理を推測するためには、ゲノム減少起こした共生細菌を幅広く調べることが重要である。これまでの研究において、系統的に多様な共生細菌のゲノムが解析されてきたが、ほとんどの研究は動物を宿主とする共生細菌に焦点を当てたものである。一方、動物を含む多細胞系は真核生物の多様性全体のごく一部であり、単細胞真核生物がその大部分を占めていることが近年広く知られるようになった。単細胞真核生物にも共生細菌が普遍的に存在することが知られているが、単細胞真核生物における共生細菌の系統のおよびゲノムの多様性については、動物に比べほとんど未解明である。

本年度において我々は、海洋渦鞭毛藻 *Citharistes regius* に共生する細菌群集から発見された 2 種類のプロテオバクテリアのゲノムを解析した。*Citharistes regius* はディオフィシス目に属する外洋性の渦鞭毛藻である。ディオフィシス目にはシアノバクテリアをはじめとする複数の細菌を共生させる種が複数知られており、*C. regius* もシアノバクテリアを主体とする共生細菌叢を持つことが示されていた。昨年度、我々は本種に共生するシアノバクテリアのゲノム解読を行い、本年度にその結果を報告した (Nakayama et al. 2024)。この研究の過程で、共生細菌叢を含む *C. regius* の細胞全体からの DNA 増幅を行い、単細胞メタゲノム配列を取得したが、その中にはシアノバクテリア以外のバクテリアゲノム配列が含まれていた。バクテリアゲノム配列は 2 種類存在し、いずれも完全な環状染色体が取得された。我々はこれらの染色体が由来するバクテリアをそれぞれ RS3、XS4 と呼称し、そのゲノム配列について詳細な解析を行った。

RS3 の染色体は 529 Kbp (GC 含有率 33%) であり、XS4 の染色体は 436 Kbp (GC 含有率 28%) であった。一般的なバクテリアの遺伝暗号を用いて予備的なアノテーションを行った

ところ、XS4 の染色体において、終止コドンによってタンパク質の読み枠が分断されるようなケースが散見された。そのため、XS4 については異なる遺伝暗号を利用している可能性が考えられた。これを踏まえ、RS3 と XS4 の染色体上のタンパク質をコードすると考えられる領域について、他のバクテリアの相同なタンパク質と比較することで、どのような遺伝暗号が用いられているかを推定した。まず、様々なバクテリアの相同タンパク質において同一のアミノ酸が使用されている座位について、RS3、XS4 上でどのコドンが利用されているのかを検出した。図 3 は RS3 および XS4 のゲノム配列中に見られるそれぞれのコドンについて、他のバクテリアのタンパク質の相同な位置に利用されているアミノ酸残基の割合をロゴプロットで表したものである。RS3 については通常バクテリアにおいて利用される遺伝暗号によって翻訳した場合と齟齬のない結果であった。一方 XS4 では、通常終止コドンとして利用される UGA (ゲノム上では TGA) が、他のバクテリアにおいて保存的にトリプトファン (W) が見られる座位に位置することが示された。この結果は XS4 では UGA がトリプトファンをコードしていることを強く示唆している。このような例はマイコプラズマや節足動物の細胞内に共生する一部のバクテリアなど、ゲノムの GC 含有率が低い生物において同様に見られる。一般的なバクテリアにおいてトリプトファンをコードするコドンは UGG のみであり、本来終止コドンである UGA がトリプトファンコードのコドンとして利用されるようになったのは、低 GC 含有率への選択圧がゲノムにかかったことに起因すると推定される。XS4 において、UGA コドン以外に通常バクテリアと異なるコドンの存在は示唆されなかった。結果として、XS4 のゲノムにおける遺伝暗号はマイコプラズマにおいて利用されるものと同様であると考えられたため、XS4 の遺伝子構造アノテーションではマイコプラズマの遺伝暗号に従って遺伝子を予測した。

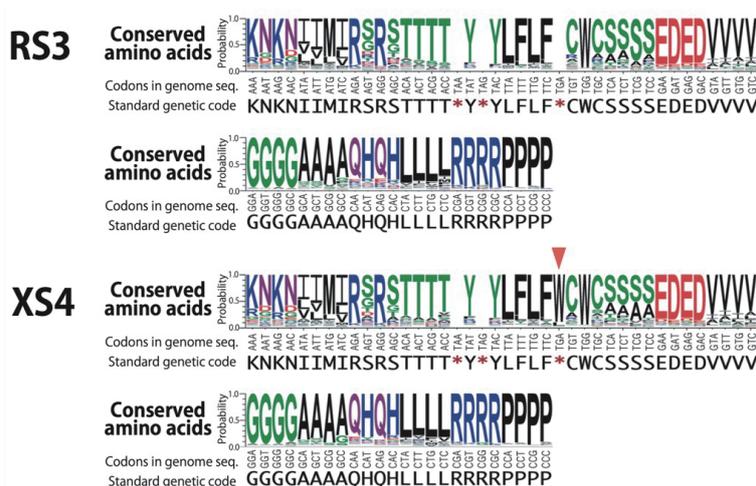


図 3. RS3, XS4 の遺伝暗号解析。RS3 (上)、XS4 (下) のゲノムに見られるコドンについて、他のバクテリアのタンパク質における相同な位置のアミノ酸の種類と割合を示す。XS4 において、通常終止コドンをコードする UGA コドン (ゲノム上では TGA) がトリプトファン (W) をコードしていることが示唆される (図中矢頭)。

遺伝子予測の結果、RS3 の染色体には 495、XS4 の染色体には 426 のタンパク質コード遺伝子が予測された (図 4)。また、rRNA 遺伝子はいずれの染色体にも 16S、23S、5S rRNA が 1 コピーずつ検出され、tRNA の数は RS3 染色体に 32、XS4 染色体に 31、さらにいずれにも 1 つの tmRNA 遺伝子が存在していた。これらの染色体以外にプラスミドなどの付加的な

ゲノム構成分子が存在している可能性は排除できないが、いずれの染色体にもリボソーム RNA 遺伝子、20 種類のアミノ酸に対応するトランスラファー RNA 遺伝子が一揃いあることが示されたことから、今回発見された環状染色体は RS3 および XS4 の完全ゲノムを表しているとは推定できる。一般的なバクテリアの環状染色体が数 Mbp であることを踏まえ、RS3 および XS4 のゲノムはいずれも非常に小さい。

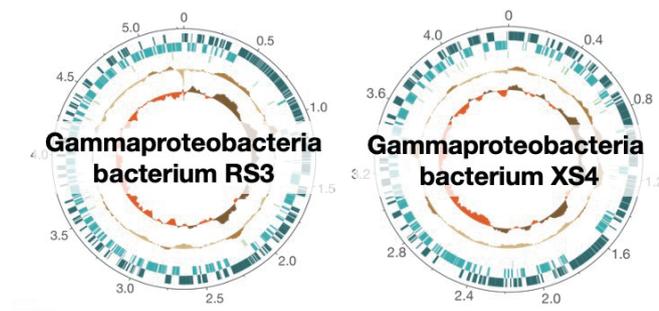


図 4. RS3, XS4 のゲノムマップ

次に、RS3 および XS4 のゲノム上にコードされるタンパク質配列のうち、多様なバクテリアの系統に保存される 105 タンパク質を用いて多遺伝子系統解析を行った。図 5 は解析によって得られた最尤系統樹を示す。この系統樹において、RS3 および XS4 はいずれも *Fastidiosibacter* 科のバクテリアと単系統群を形成することが強く示唆され、さらに RS3 および XS4 は互いに姉妹系統であることが示された。RS3 と XS4 によって構成される系統は、*Fastidiosibacter* 科に含まれる *Cysteiniphilum* 属、*Caedibacter* 属、*Fastidiosibacter* 属によって形成される単系統と姉妹系統であることが示されたが、本解析においてはそのいずれとも独立した系統であることが示唆された。

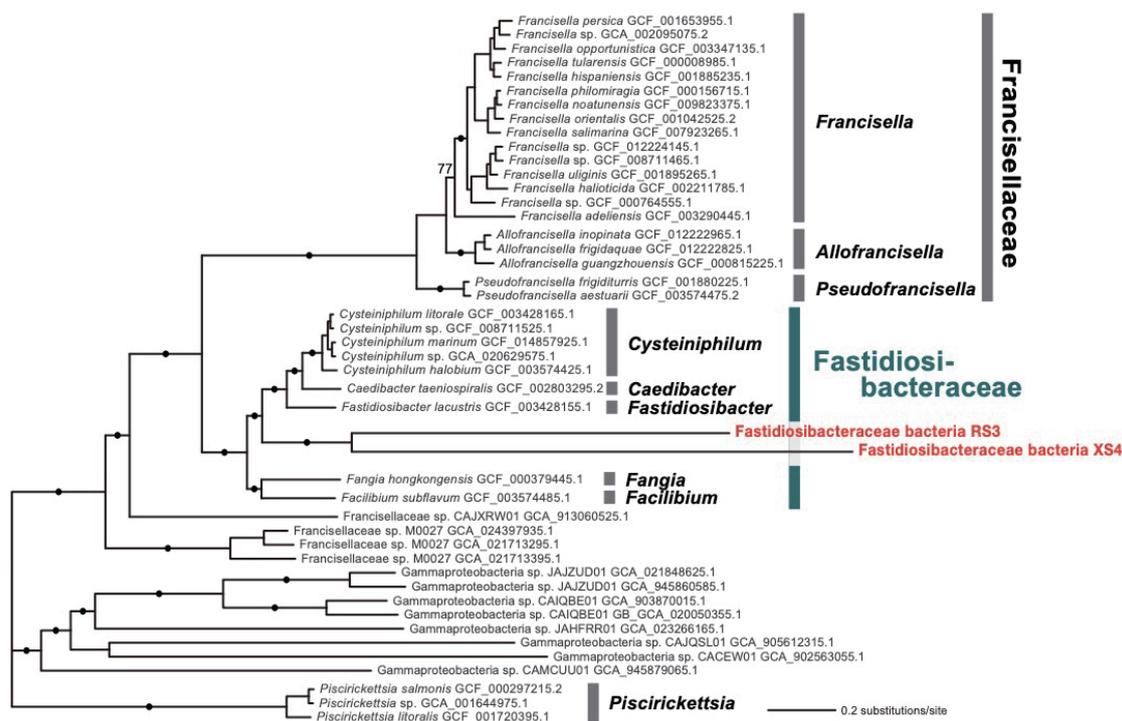


図 5. RS3 および XS4 に近縁なバクテリア系統の系統解析結果。

46 生物種・105 タンパク質で構成されるアライメントから復元した最尤系統樹。

上記の解析によって明らかとなった系統関係を踏まえ、ゲノムサイズの比較を行ったとこ

ろ RS3 および XS4 の大幅なゲノム縮小進化が明らかとなった。図 6 は系統関係とともにそれぞれのバクテリアゲノムサイズおよび GC 含有率を比較した図である。Fastidiosibacter 科の系統において、最も基部近くで分岐している *Fangia* および *Facilibium* 属のゲノムはいずれも 3 Mbp 弱であり、さらに RS3–XS4 系統の姉妹系統群内に位置する *Cysteiniphilum* 属および *Fastidiosibacter* 属のゲノムサイズが 2-3 Mbp 程度の範囲にあることから、RS3 および XS4 の祖先系統のバクテリアは、少なくとも 2 Mbp 程度のサイズのゲノム配列を有していたと考えられる。それに対して RS3 および XS4 のゲノムサイズは 500 Kbp 前後であることから、進化の中でゲノムサイズが 1/4 以下に縮小したことが示唆された。

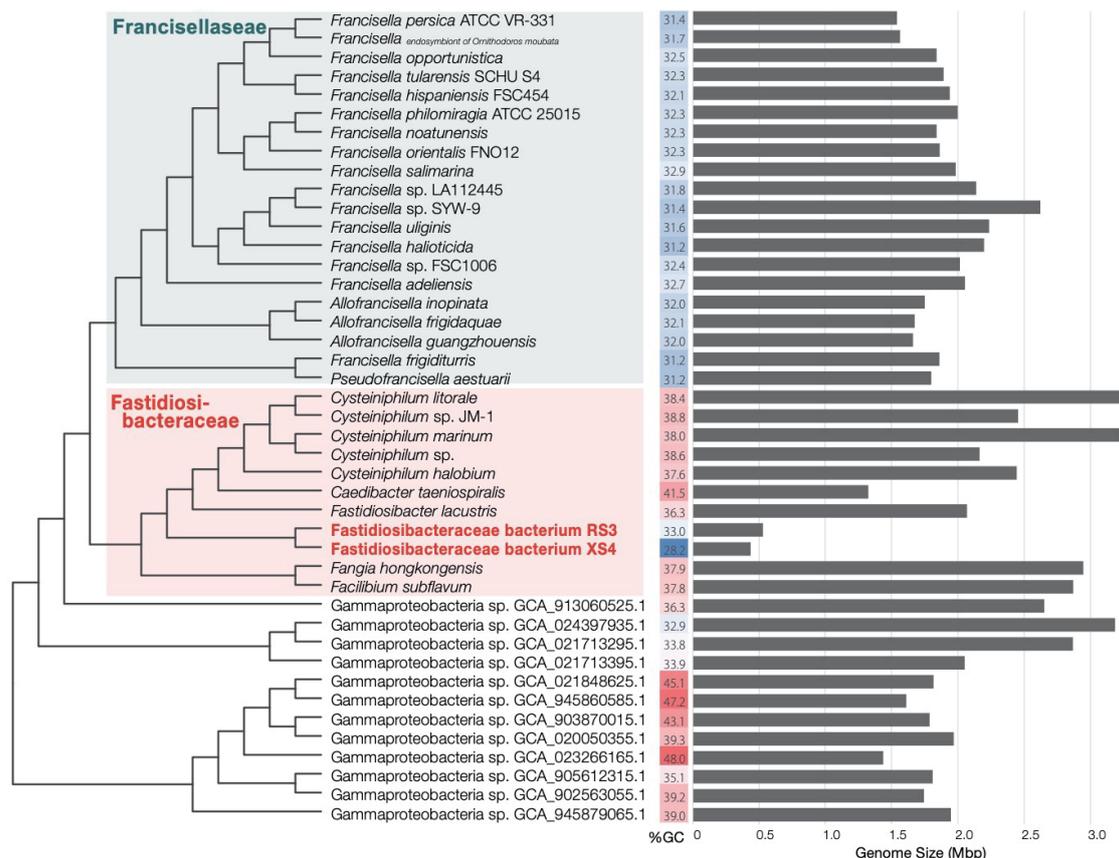


図 6. RS3 および XS4 に近縁なバクテリアとのゲノム比較。多遺伝子系統解析結果に基づく系統関係（左）とそれぞれのバクテリアに対応するゲノムの GC 含有率とゲノムサイズ（右）。RS3, XS4 のゲノムサイズは著しく小さい。

さらに RS3 および XS4 に共通する特徴として近縁な系統と比較して GC 含有率の低さが挙げられる。RS3 ゲノムの 33.04% という GC 含有率は、XS4 を除く他の Fastidiosibacter 科系統のバクテリアゲノムと比較して低い。XS4 ゲノムの GC 含有率 28.16% は、Fastidiosibacter 科系統の姉妹系統であり、低 GC 含有率をもつことが知られる *Francisella* 科のバクテリアのゲノムと比べてもさらに低い(図 6)。この RS3 と XS4 のゲノムに見られる GC 含有率の違いが、XS4 においてのみ UGA コドンがトリプトファンをコードするであろうことと強く関連していることが予想される。

さらに、RS3 および XS4 のゲノムから 2 つのバクテリアが有する代謝経路を予想し、その進化を類推した。いずれのバクテリアのゲノムにも近縁な系統のバクテリアと比べ非常に少ないタンパク質遺伝子数のみが確認され、代謝機能についてもゲノムサイズと同様に大幅な縮退が起きたものと考えられる。RS3、XS4 は単系統であり、失われたと考えられる代謝機能の大半が共通していることから、これらの代謝機能は 2 つの系統の共通祖先の段階で失われたと予想できる。2 つのバクテリアが共通して失った代謝機能は、共生性バクテリアにおいて普遍的に失われる輸送タンパク質や二成分制御系を含み、さらにアミノ酸合成経路、ピリミジン塩基合成経路、ペプチドグリカン合成経路が含まれることも明らかとなった。これらの経路によって合成される代謝産物はバクテリアの生育において不可欠なものであることから、これらの代謝産物の供給を宿主に依存していることが示唆された。SX4 においては、さらにプリン塩基合成経路やシキミ酸合成経路、リボフラビン合成経路といった RS3 において未だに保持される代謝経路も失われていることが示唆された。

本解析で明らかになった RS3 および SX4 のゲノムの特徴は、Fastidiosibacter 科におけるゲノム多様性の知見を押し広げるだけでなく、単細胞真核生物における共生細菌の系統のおよびゲノムの多様性の理解に貢献するものである。

### 色素体ゲノム解析

我々は、これまでに 3 種の緑色渦鞭毛藻、*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 ; Matsuo et al. 2022 *Front Plant Sci* 13:918543)。また、京都大学・神川龍馬博士を中心に非光合成化した珪藻、国立科学博物館・谷藤吾郎博士と共同でクリプト藻の色素体ゲノム解読を行った (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; Tanifuji et al. 2020 *Genome Biol Evol* 12:3926-3937)。2018 年度からは第 4 の緑色渦鞭毛藻 *Oxytoxum* sp. SG-436 株の色素体ゲノムおよびヌクレオモルフゲノム (共生ペディオ藻の痕跡核) の解読を開始した。また未記載渦鞭毛藻 TRD-132 株についてもヌクレオモルフゲノムの解読を目指し、シーケンス解析を開始した。2022 年度には、東京大学アジア生物資源環境研究センター・岩滝光儀博士と高橋和也博士との共同研究として、カレニア科渦鞭毛藻類 10 種の葉緑体ゲノムの解読を試み、そのうち 2 種 (*Takayama* cf. *xiamenensis* NGTk657 および *Karlodinium ballantinum*) の色素体ゲノムを完全解読した (2023 年度年次報告書参照)。これらの色素体ゲノムデータは、2023 年度から始まったチェコ共和国科学アカデミー・Elisabeth Hehenberger 博士との二国階共同事業共同研究の一環として解析している。本稿では *K. ballantinum* 葉緑体について詳細を報告したい。

光合成を行う渦鞭毛藻の大部分は、ペリディニンを含む葉緑体を持っている。興味深いことに、渦鞭毛藻の複数の系統はペリディニンを含まない葉緑体を持ち、これらの「非典型的」葉緑体が渦鞭毛藻の複数の系統に存在することが知られている。これまでの研究により、渦

鞭毛藻が多様化したのち、系統的に多様な真核藻の細胞内共生を経て非典型的葉緑体が成立したことが明らかとなっている。これまで我々の研究対象としてきた緑色渦鞭毛藻類がもつ非典型的葉緑体はペディノモナス属緑藻が起源である。またカレニア科渦鞭毛藻類は、細胞内共生したハプト藻に由来する非典型的葉緑体をもつ。今のところハプト藻由来葉緑体は大多数のカレニア科渦鞭毛藻で確認されており、カレニア科渦鞭毛藻進化のごく初期にハプト藻由来葉緑体が獲得されたと考えられる。しかし我々は、カレニア科渦鞭毛藻が多様化したのち新たなハプト藻由来葉緑体が確立したと考えざるを得ないデータを取得した。我々は、カレニア科にふくまれる複数の属のうち *Karlodinium* 属の1種 *K. ballantinum* の葉緑体ゲノムの塩基配列を完全に決定したところ、自由生活性ハプト藻 *Emiliana huxleyi* の葉緑体ゲノムと極めて相関性が高いことが判明した。図7A&Bに *K. ballantinum* と *E. huxleyi* の葉緑体ゲノムの環状マップを示したが、遺伝子の並び順（シンテニー）は同一である。また比較した2つの葉緑体ゲノム間で塩基配列レベルの一致度は99%以上であった。上記の結果は、現在 *K. ballantinum* がもつ葉緑体は *E. huxleyi* あるいは *E. huxleyi* に近縁なハプト藻から獲得したものであると解釈できる。我々は、*K. ballantinum* において新しく確立したハプト藻由来葉緑体がどのような進化的背景をもつ渦鞭毛藻核コードタンパク質で維持されているかを推測するため、*K. ballantinum* の核コード遺伝子の転写物の網羅的シーケンスデータを解析している（チェコ共和国科学アカデミー・Elisabeth Hehenberger 博士との共同研究）。

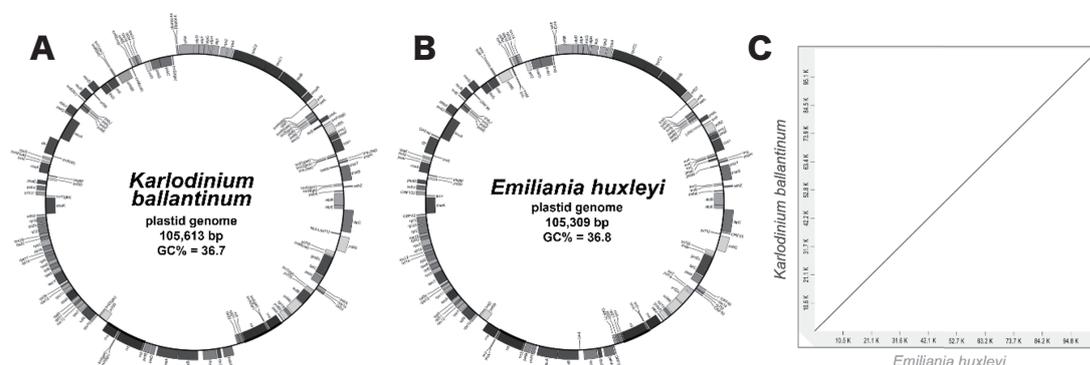


図7. 渦鞭毛藻 *K. ballantinum* とハプト藻 *E. huxleyi* の葉緑体ゲノム比較。(A) *K. ballantinum* 葉緑体ゲノムマップ。(B) *E. huxleyi* 葉緑体ゲノムマップ。比較した2ゲノムの遺伝子の並び順は同一であることが分かる。(C) *K. ballantinum* および *E. huxleyi* 葉緑体ゲノムの dot plot 解析結果。比較した2ゲノム間の塩基配列の相関性が極めて高いため、対角線が現れた。

### 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; Nishimura et al. 2020 *Front Ecol Evol* 8:140; Yazaki et al. 2022 *Front Ecol Evol* 10:1030570)。

本稿では詳細に触れないが、マラウイモナス類に近縁であることが判明した SRT706 株とアンキロモナス類 *Fabomonas* sp. SRT902 株の Mt ゲノムは解読済みである。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、② *Glissandra* sp. SRT312 株、③有孔虫 *Ammonia berccarii*、④放散虫 (*Didymocyrtis tetrathulumus* と *Acanthodesmia viniculata*)

#### 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

2020 年度報告した CysN タンパクの全原子分子動力学シミュレーション、2021 年度報告した翻訳終結因子 eRF1 C 末端ドメインの部分欠失のタンパク質立体構造への影響（ともに生命科学部生命機能情報分野との共同研究）については英文論文の作成を目指し、解析を行った。

## 4. 教育

1. 原田亮, 博士 (理学), Diversity and Evolution of Organelle-localized DNA Polymerases.
2. 藤代彩花, 学士 (理学), 光合成関連遺伝子から探る緑色渦鞭毛藻 TGD 株の共生藻痕跡核ゲノムの特徴.

## 5. 受賞、外部資金、知的財産権等

### 受賞

なし

### 外部資金

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 稲垣祐司 (代表), 2023-2026 年度, 交付額: 全年度直接経費 14,100 千円 (2023 年度直接経費 3,100 千円), 真核生物のゲノムデータに混入している原核共生体ゲノムの体系的探索 (課題番号 23H02535)
2. 日本学術振興会 学術国際交流事業 二国間交流事業 チェコとの共同研究, 稲垣祐司 (代表), 2023-2024 年度, 交付額: 全年度直接経費 5,000 千円 (2023 年度直接経費 2,500 千円), 3 次葉緑体をもつ渦鞭毛藻類における葉緑体進化 (課題番号 BPI05044)
3. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 中山卓郎 (代表), 2020-2023 年度, 交付額: 全年度直接経費 13,600 千円 (2023 年度直接経費 1,800 千円), 海洋微生物多様性の盲点 — 真核微生物に潜在する原核微生物叢の実態を探る (課題番号 20H03305)
4. 科学研究費補助金 基盤研究 (B), 中山卓郎 (分担), 2019-2023 年度, 交付額: 全年度直接経費 13,300 千円 (2023 年度直接経費 1,400 千円), 光合成補助色素フコキサンチン

ンチンの未知なる生合成系の解明とその誕生の謎を紐解く (課題番号 19H03274)

## 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. Harada R, Hirakawa Y, Yabuki A, Kim E, Yazaki E, Kamikawa R, Nakano K, Eliáš M, Inagaki Y. Encyclopaedia of family A DNA polymerases localized in organelles: Evolutionary contribution of bacteria including the proto-mitochondrion. *Molecular Biology and Evolution* 41(2):msae014 DOI 10.1093/molbev/msae014
2. Harada R, Inagaki Y. Gleaning. Euglenozoa-specific DNA polymerases in public single-cell transcriptome data. *Protist* 174(6) 125997 2023 DOI 10.1016/j.protis.2023.125997
3. Kume K, Gen T, Abe K, Komatsuzaki H, Yazaki E, Tanifuji G, Kamikawa R, Inagaki Y, Hashimoto T. Transcriptome data sets of free-living diplomonads, *Treponema* sp, and *Hexamita* sp. *Microbiology Resource Announcements* 12(11):e0050623-e0050623 2023 DOI 10.1128/MRA.00506-23
4. Harada R, Kume K, Horie K, Nakayama T, Inagaki Y, Amagasa T. AtLASS: A scheme for end-to-end prediction of splice sites using attention-based bi-LSTM. *IPSI Transactions on Bioinformatics* 16:20-27 2023 DOI 10.2197/ipsjtbio.16.20
5. Ishitani Y, Ciacci C, Ujiié Y, Tame A, Tiboni M, Tanifuji G, Inagaki Y, Frontalini F. Fascinating strategies of marine organisms to cope with coming pollutant: Titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Pollution* 330:121538-121538 2023 DOI 10.1016/j.envpol.2023.121538
6. Sakamoto F, Kanamori S, Díaz Luis M, Cádiz A, Ishii Y, Yamaguchi K, Shigenobu S, Nakayama T, Makino T, Kawata M. Detection of evolutionary conserved and accelerated genomic regions related to adaptation to thermal niches in *Anolis* lizards. *Ecology and evolution* 14(3):e11117 2024 DOI 10.1002/ece3.11117
7. Mochizuki T, Sakamoto M, Tanizawa Y, Nakayama T, Tanifuji G, Kamikawa R, Nakamura Y. A practical assembly guideline for genomes with various levels of heterozygosity. *Briefings in Bioinformatics* 24(6):1-13 2023 DOI 10.1093/bib/bbad337
8. Nomura M, Ohta K, Nishigami Y, Nakayama T, Nakamura K, Tadakuma K, Galipon J. Three-dimensional architecture and assembly mechanism of the egg-shaped shell in testate amoeba *Paulinella micropora*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11:1232685 2023 DOI 10.3389/fcell.2023.1232685

**B) 査読無し論文**

1. Nakayama T, Yabuki A, Nomura M, Shiba K, Inaba K, Inagaki Y. Convergent reductive evolution of cyanobacteria in symbiosis with Dinophysiales dinoflagellates. *bioRxiv* 2024 DOI 10.1101/2024.01.11.574452
2. 原田亮, 稲垣祐司. 遺伝子水平伝播が支配するオルガネラ局在ファミリー A DNA ポリメラーゼの進化. *月刊 細胞* 55(6):33-36 2023

**(2) 国際会議発表**

**A) 招待講演**

なし

**B) 一般講演**

1. Ryo Harada, Yoshihisa Hirakawa, Akinori Yabuki, Kim, Ensoo, Euki Yazaki, Ryoma Kamikawa, Kentaro Nakano, Marek Eliáš, Yuji Inagaki. Evolution and switching of mitochondrion-localized DNA polymerases in Euglenozoa. 3<sup>rd</sup> Annual International Congress on Euglenoids 2023. Jul.17-18, 2023, Euglena International Network. BIOCEV, Prague
2. Yuji Inagaki, Garry Benico, Kazuya Takahashi, Ryo, Harada, Inga Martinek, Kacper Maciszewski, Takuro Nakayama, Mitsunori Iwataki, Martin Kolisko, Elisabeth Hehenberger. Repeated haptophyte endosymbioses in the dinoflagellate family Kareniaceae. IX ECOP-ISOP joint meeting 2023, Jul.9-14, 2023, University of Vienna, Austria.
3. Ryu Isogai, Ryo, Harada, Takuro Nakayama, Yuji Inagaki. Impact of taxon sampling on the relationship among Rhodophyta, Glaucophyta, and Chloroplastida inferred from nuclear gene-based phylogenomic analyses. IX ECOP-ISOP joint meeting 2023. Jul.9-14,2023, University of Vienna, Austria.
4. Kazuya Takahashi, Takuro Nakayama, Yuji Inagaki, Elisabeth Hehenberger, Mitsunori Iwataki. A non-kareniacean dinoflagellate with a haptophyte-derived plastid indicates multiple tertiary endosymbioses. IX ECOP-ISOP joint meeting 2023. Jul.9-14, 2023, University of Vienna, Austria.
5. Ryo Harada, Yuji Inagaki. Has the DNA polymerase of the proto-mitochondrion been retained in Discoba, Malawimonadidae, and Ancyromonadida?: a novel mitochondrion-localized DNA polymerase with the phylogenetic affinity to the alpha-proteobacterial PolI. IX ECOP-ISOP joint meeting 2023. Jul.9-14,2023, University of Vienna, Austria.

(3) 国内学会・研究会発表

A) 招待講演

なし

B) その他の発表

1. 藤代彩花, 磯貝龍邑, 高橋和也, 岩滝光儀, 稲垣祐司, 中山卓郎. 光合成関連遺伝子に着目した緑色渦鞭毛藻 TGD 株のヌクレオモルフゲノムの解析. 日本藻類学会第 48 回大会, Mar 22-23, 2024 兵庫県神戸市 神戸大学 六甲キャンパス
2. 久米慶太郎, 若島朋幸, 巖翼, 岩本亮介, 井上貴史, 谷藤吾朗, 神川龍馬, 稲垣祐司, 橋本哲男. ディプロモナス類の寄生虫化に伴う遺伝子レパートリーの変化: 近縁自由生活種とのオルソログ比較解析. 第 93 回日本寄生虫学会大会, Mar 9-10, 2024, 東京都文京区
3. 番場浩平, 稲垣祐司. I' 型ルビスコの発見: I/I' 型ルビスコに対する祖先的タンパク質群. 日本共生生物学会第 7 回大会, Nov 18-19, 2023, 京都府 京都市 京都大学
4. 上西慧莉紗, 原田亮, 吉永真理, 稲垣祐司. クレン古細菌における PCNA 複合体の進化. 日本共生生物学会第 7 回大会, Nov 18-19, 2023, 京都府京都市 京都大学
5. 磯貝龍邑, 原田亮, 中山卓郎, 稲垣祐司. 一次植物内部系統関係におけるタクソサンプリングの影響: 紅藻類と灰色藻類のどちらが初期分岐系統なのか? 日本共生生物学会第 7 回大会, Nov 18-19, 2023, 京都府京都市 京都大学
6. 宮本知世, 矢吹彬憲, 野村真未, 柴小菊, 稲葉一男, 稲垣祐司, 中山卓郎. 細胞サイズ別環境 DNA を用いた共生性シアノバクテリアの探索. 日本共生生物学会第 7 回大会, Nov 18-19, 2023, 京都府京都市 京都大学
7. 加藤孝一郎, 南波紀昭, 稲垣祐司, 中山剛, 中山卓郎. 寄生性ユーグレナ類 *Eugleniformis parasitica* における非光合成性葉緑体の存在とその機能. 日本植物学会第 87 回大会, Sep 7-9, 2023, 北海道札幌市 北海道大学 札幌キャンパス
8. 原田亮, 久米慶太郎, 堀江和正, 中山卓郎, 稲垣祐司, 天笠俊之. AtLASS: A Scheme for end-to-end prediction of splice sites using attention-based bi-LSTM. 第 74 回バイオ情報学 (SIGBIO) 研究会, Jun 29-Jul 1, 2023, 沖縄県国頭郡恩納村 沖縄科学技術大学院大学
9. 番場浩平, 稲垣祐司, 原田亮, 中山卓郎, 磯貝龍邑. 最尤系統樹中の 2 分岐の信頼性に対する新たな評価手法. 第 74 回バイオ情報学 (SIGBIO) 研究会, Jun 29-Jul 1, 2023, 沖縄県国頭郡恩納村 沖縄科学技術大学院大学
10. 望月孝子, 坂本美佳, 谷澤靖洋, 中山卓郎, 谷藤吾朗, 神川龍馬, 中村保一. 様々なヘテロ接合性レベルを持つゲノムで検証された実用的なアセンブリガイドライン. 日本育種学会 第 145 回講演会, Mar 16-17, 2024, 東京都文京区 東京大学
11. 望月孝子, 坂本美佳, 谷澤靖洋, 中山卓郎, 谷藤吾朗, 神川龍馬, 中村保一. 様々な

ヘテロ接合性レベルを持つゲノムで検証された実用的なアセンブリガイドライン. 第  
46回日本分子生物学会年会, Dec 7, 2023, 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド

(4) 著書、解説記事等

1. 中山卓郎 原生生物学事典 朝倉書店 2023年5月 (ISBN:4254171811)

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. 筑波大学計算科学研究センター計算情報学研究部門データ基盤分野（天笠俊之教授）との共同研究：機械学習をもちいた真核生物ゲノム中のイントロン境界の予測

産学官連携

なし

国際連携・国際活動等

3. 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
4. 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
5. 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、オルガネラ DNA ポリメラーゼの多様性に関する研究
6. Elisabeth Hehenberger よび Martin Kolisko 博士（Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences・チェコ共和国）との共同研究：3次葉緑体をもつ渦鞭毛藻類における葉緑体進化

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人事委員、計算科学研究センター共同研究委員、計算科学研究センター学際計算科学連携室室長  
中山卓郎：なし

## 10. 社会貢献・国際貢献

なし

## 11. その他

なし