総説

遺伝子分析による
脂質合成系進化の解析

山岸 明彦・横堀 伸一

東京薬科大学生命科学部分子生命科学科
(〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

Phylogenetic Analysis of Genes of Lipid Biosynthesis

Akihiko YAMAGISHI and Shin-ichi YOKOBORI

*Department of Molecular Biology, University of Pharmacy and Life Science
(1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392)*

Abstract : All of the pathways including biosynthesis of lipid is established during the evolution of life. Phylogenetic analysis of genes of lipid biosynthesis can reveal the evolution of the biosynthetic pathway. Results obtained for archaeobacterial lipid biosynthesis were interpreted based on the knowledge of the phylogeny of biological organisms. It is possible to have some information on the early evolution of the lipid biosynthetic systems.

General ways of phylogenetic analysis of enzymes are also explained. Based on the knowledge of a particular enzyme, the gene of the enzyme can be cloned. The sequence of the gene can be obtained by the general techniques in molecular biology. Sequence of the gene can be analyzed by comparing with other homologous genes using appropriate computer programs. Principle and characteristics of each phylogenetic analysis program are discussed. The programs can be easily obtained from public area through internet.

Key words : Lipid biosynthesis, phylogenetic analysis of genes, evolution of life.

1 はじめに

どんな生物も進化の産物であり、そのどの様な代謝経路も進化の過程で確立されてきたものである。こうした考えにたてば、現存する生物種の脂質も祖先型生物から受け継がれ進化してきた結果と考える事が出来る。著者らは、これまで古細菌を研究対象として、その分子進化の研究を行ってきた。古細菌の脂質合成系の研究を行い、それを真核生物、真正細菌と比較することにより、脂質合成系の進化の歴史を明らかにすることが出来るのではないかと考えている。本稿では、脂質合成酵素を対象としてその進化の歴史を解析しようという視点からの研究方法に関して概説する。

2 系統樹とそれを用いた脂質合成系進化の解析

Fig. 1 に現在広く受け入れられている全生物の進化系統を示した。全生物は大きく、真正細菌、古細菌、真核生物：山岸明彦

核生物の三つに分類される。古細菌は、大きさ $1\mu\text{m}$ 程度の大きさの原核生物でありながら、真核生物と類似の分子生物学的特徴も示す生物群である。古細菌には、温泉にすむ超好熱菌などの好熱性古細菌、塩田に見られる高度好塩菌、絶対嫌気性のメタン菌が含まれる¹⁵⁾。

Fig. 1 の系統樹は 16S あるいは 18S のリボソーム RNA の塩基配列組成に基づいて作成されたものである。リボソーム RNA は全ての生物に存在してタンパク質合成という重要な反応に関与しているなど、いくつかの理由から、生物の系統樹を作成する上で最も適切な遺伝子の一つであると考えられている¹⁵⁾。

古細菌の膜脂質は真正細菌、真核生物とはまったく異なる脂質から構成されている。すなわち、古細菌の極性脂質は Fig. 2 で示されるように、グリセロールに炭化水素鎖が結合しているという点は通常の生物とかわり無いが、グリセロールに結合しているのは、脂肪酸では無くアルコールである。従って、グリセロールとの結合もエステル結合でなくエーテル結合である。疎水性基のグ

Fig. 1 16S/18S rRNA に基づく全生物界の系統樹 (Woese らによる¹⁴⁾)。全生物界は真正細菌 (Eubacteria), 古細菌 (Archaeobacteria), 真核生物 (Eukaryotes) の3つのドメインに分けられている。

リセロールへの結合も、通常の生物の脂質が *sn*-1,2 であるのにたいし *sn*-2,3 位となっている。また炭化水素鎖も側鎖のあるイソプレノイドである。このイソプレノイドの炭化水素鎖の構造には二種類ある。それらは、Fig. 2 の a で示したジエーテル型の脂質と、b で示したテトラエーテル型の脂質である。テトラエーテル型の脂質はジエーテル型の脂質がさらに二分子結合した形をし

ている。こうした特徴は古細菌の多くの種で一般的に広く保持されている¹⁶⁾。

イソプレノイド鎖合成はおそらく真正細菌や真核生物とほぼ同様の過程で進行するものと推定されている。しかし合成過程に関する実証的な研究はまだ余り多くはない。イソプレノイド合成及び、グリセロールとの結合などエーテル脂質合成過程に関する酵素の精製及び酵素遺伝子のクローニングがごく最近いくつか報告されている^{1), 2)}。

Fig. 1 に示した系統樹を前提として、この系統樹に脂質合成系路を重ね合わせて検討することにより、脂質合成系路の進化の過程を推定することが出来る。

Koga らは、ごく最近古細菌の膜脂質のグリセロール骨格の鏡像異性を決定する *sn*-グリセロール-1-リン酸脱水素酵素遺伝子を *Methanobacterium thermoautotrophicum* からクローニングした³⁾。その遺伝子を解析したところ、その酵素は大腸菌の *sn*-グリセロール

-3-リン酸脱水素酵素遺伝子とはまったく異なる遺伝子であることが分かった。グリセロール骨格の鏡像異性体が一旦区別されると、極性脂質合成系路のそれ以降の酵素の鏡像異性体に対する特異性が全て決まってしまうことになるので、これらの酵素の鏡像異性体に対する特異性が片側から反対に一斉に変わることは考えにくい。古細菌の膜脂質のグリセロール骨格が、真正細菌と反対であることについては既に述べた。Koga らは、この鏡像異性体の違いは、真正細菌と古細菌が進化のごく初期に分化するとき、鏡像特異性の異なる 2 種のホスホグリセロール脱水素酵素がそれぞれの生物に取り込まれたためだと言う説を提案している³⁾。

我々は、古細菌の一種 *Thermoplasma* の脂質合成系がテルビナフィンによって阻害されることを見出した¹⁷⁾。テルビナフィンは真核生物のステロイド合成系の酵素スクワレンエポキシダーゼの特異的阻害剤である。この阻害剤によって、*Thermoplasma* のジエテルからテトラエテル合成の反応が阻害されることが明らかになった。まだ、阻害される酵素も反応基質となるジエテルの詳細な構造も反応機構も不明のままである。しかし、同じテルビナフィンによって阻害されるということは、古細菌のテトラエテル合成に関与しているこの酵素の反応部位は少なくとも構造的に真核生物のスクワレンエポキシダーゼに類似していることを示している。真核生物のステロイド合成系は勿論イソプレノイド合成系の関与によって進行する。古細菌の祖先が持っていたイソプレノイド合成系が、真核生物に受け継がれてステロイド合成系となったのでは無いかと我々は考えている^{4), 17)}。

以上二つの例で用いている方法は、他の遺伝子の塩基配列に基づいて作成された生物種の進化系統樹に脂質合成系を重ね合わせて比較して、その進化を議論するという方法である。この議論のための系統樹としては、前述のようにもっぱら 16S あるいは 18S リボソーム RNA 遺伝子に基づく系統樹が用いられる。このような方法で検討された議論を検証するため、或いはさらに詳細な議論をするためには、脂質合成に関与する酵素そのものの系統樹を作ることが今後必要になってくるであろう。現在、我々の研究室では脂質合成系の酵素に関してはそこまで到達した研究例は出ていないが、他の代謝系の酵素に関してこうした研究を行っている。遺伝子のクローニングと塩基配列決定、系統樹作成に関しては、どの様な酵素であっても本質的に同じであるので、一般論の形でそれらの実験の手順について以下に概説する。

3 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

遺伝子をクローニングするためには、その酵素に関する何らかの情報が必要である。すなわち、

- 1) 酵素に対する抗体がある。
- 2) 酵素の活性を大腸菌の変異株の相補、或いは発色反応などで容易に検出することが出来る。
- 3) 酵素の部分的アミノ酸配列が決定されている。
- 4) 既に、他の生物で同じ或いは類似の酵素の遺伝子の塩基配列が知られている。

の内の少なくとも一つの条件が満たされている必要がある。

まず、対象とする生物の cDNA (原核生物の場合はゲノム DNA) のライブラリーを作成する。ライブラリーは実験に良く用いられる代表的な生物種に関しては他の研究者あるいは分子生物学試薬を取り扱っているメーカーから入手可能である。適当なライブラリーが得られないときには、生物材料から mRNA あるいは DNA を出発材料として、出来る限り多くの遺伝子を含む様なライブラリーを自分で作製する。

次いで、そのライブラリーの中からその酵素の情報を利用して、目的とする遺伝子の DNA を含むクローンを単離する。抗体がある場合は、ライブラリーのコロニー或いはファージのプラークに発現している酵素タンパク質を抗体で検出することによって目的とするクローンを検出する。酵素活性が何らかの形で検出可能なときは、大腸菌内で発現させたタンパク質の酵素活性に基づき目的とするクローンを検出する。アミノ酸配列が決定されている場合には、その配列から推定される塩基配列を持つ核酸のプロンプを合成し、このプロンプを用いてコロニー或いはプラークハイブリダイゼーションによって目的とするクローンを検出する。他の生物種で同じ或いは類似の酵素の遺伝子が得られている場合は、その情報に基づいてプロンプを作製して、同様にハイブリダイゼーションによって目的とするクローンを検出する。以上の様に目的のクローンの候補が得られると、次いでその塩基配列を決定する。塩基配列の決定は RI を用いる方法もあるが、現在では多くの場合蛍光検出器を用いた自動塩基配列決定装置を用いて行われている。あるいは、得られた遺伝子のクローンの塩基配列決定を業者に委託することも可能である。

こうしたクローニングの作業或いは塩基配列決定は、現在多くの分子生物学研究室で可能であるが、まったく経験の無い研究者が自力でこの一連の操作を行うことは事実上不可能である。その場合にはこうした実験方法に関する経験豊かな研究室との共同研究が不可欠である。

4 塩基配列の系統解析法の原理の概略

分子系統解析とは、核酸やタンパク質の情報を用いて、それぞれの遺伝子やタンパク質の系統関係、さらには生物の系統関係を解析することである。方法としては、これらの情報高分子の一次配列をそのまま使う場合

と、これらの高分子の一次配列に関係するが一次配列そのものではない情報、たとえば核酸のハイブリダイゼーションやタンパク質の免疫沈降を利用するような場合がある。ここでは、前者の塩基配列またはアミノ酸配列そのものを用いた幾つかの系統解析法についてのみ紹介する。また紙面も限られているので、本稿では各解析法の原理の概略と長所短所について紹介するにとどめ、原理の詳細については日本語で解説している成書^{18)~20)}が幾つか出版されているので、そちらに譲りたい。得られた塩基配列に基づく系統解析の進み方の概略を Fig. 3 にフローチャートとして示す。

タンパク質遺伝子を解析する場合には二つの選択肢がある。それは、解析を塩基配列レベルで行う場合とアミノ酸配列レベルで行う場合の二つである。後者のためには適当な遺伝暗号表を用いて塩基配列をアミノ酸配列に翻訳する。塩基配列データの場合、コドンの 3 塩基の何文字目を解析に用いるべきかと言う点が、どの程度進化距離の離れた生物（遺伝子）間で比較するのにかによって異なり、その選択は重要である。一般にコドン 3 文字目の塩基置換速度はコドン 1 文字目及び 2 文字目に比べて極めて早いので、その情報は種内変異や極めて近縁な生物間での系統解析に主に用いられる。また用いる遺伝子またはタンパク質によって大きく異なるが、コドン 1 文字目及び 2 文字目の塩基置換速度またはアミノ酸置換速度はコドン 3 文字目に比べると遅く、より広い範囲、時

には生物全体をカバーするような系統解析に用いられる。ただし遺伝子の進化速度は遺伝子（タンパク質）間で大きく異なるので、解析前にその遺伝子（タンパク質）が確かに自分の目的に適うものであるか検討しておく必要がある。また、解析に用いる遺伝子（タンパク質）の長さ（座位数）も重要な検討すべき因子である。解析に用いるデータの長さがあまりに短いと、たとえその結果が統計学的に有意であっても、誤った系統樹を与える可能性がある。

5 配列の alignment

分子系統解析を行うためには、まず得られた塩基（アミノ酸）配列を比較対象とする他の相同な配列と並べて解析用のデータを作らなければならない。すなわち、配列にギャップ等を導入して、進化経路をさかのぼると同じ座位の塩基（アミノ酸）に由来すると考えられる座位同士が同じ座位に来るようにする（alignment）^{18)~20)}。そのアルゴリズムについては、多くの報告がある。多くの場合この時点で、必ずしも得られた alignment の妥当性がはっきりしない領域がでてくる。alignment の仕方、alignment された配列のどの部分を用いるかによって以後の結果に大きな影響があるので、慎重に系統解析に使う部分を決め、使わない部分を除く。次いで、系統樹の推定を行う。

6 系統樹推定法

系統樹作成の方法は数多く報告されているが、ここでは特に広く使われている三つの方法を紹介する。

1) 最大節約法²¹⁾：最大節約法は、系統樹の「枝の長さ」を最小化するという最大節約原理に基づく系統樹推定法である。この方法は、もともと生物の形態などの形質を利用した系統解析の方法として開発されてきたものであるが、現在は分子データにも適用されており、最も良く使われている手法の一つである。

2) 最尤法^{5),20)}：この方法は、塩基置換やアミノ酸置換があるモデルに従っておきと仮定し、考えられる系統樹の樹型が実現する確率、またはその最大対数尤度を計算する。これを各樹型間で比較して最大の対数尤度を示す樹型を最尤系統樹として採用する。この方法の最大の問題は、他の方法に比べて計算量が膨大となるため、あまり多くの taxa を含んだような系統解析には不向き、あるいは事実上不可能という点にある。ただし、最近のコンピュータの進歩の結果、パーソナルコンピュータ程度でも最尤法での分子系統解析が可能になってきたことも事実である。また、この方法は様々な塩基置換（またはアミノ酸置換）モデルを利用することが可能である。

3) 近隣接合法⁶⁾：これは、距離行列法の一つであ

Fig. 3 分子系統解析のストラテジー。

り, taxon 間の進化距離を計算した後, その進化距離を元に系統樹を作成する方法である。近隣接合法では, まず星形の樹型の系統樹を仮定する。その後, その進化距離の総和を指標として, それをもっと小さくするように, ある taxon に通じる枝と別の taxon に通じる枝とを“近隣”とみなして“結合”する。これを一つのグループと考え, この操作を繰り返して, すべての分岐が 2 つに分岐するようになるまで行う。この方法の問題点としては, 最大節約法でのステップ数の比較や, 最尤法での対数尤度の比較のような評価方法がないことである。それらの方法では, その方法で得られた最も可能性のある系統樹と他の無視することはできない系統樹の樹型とを比較していくことが可能であるが, 近隣接合法では一つのデータからは一つの樹型しか得られないので, そのような評価を行うことができない。ただし近隣接合法には, 様々な方法で得られた進化距離を利用できること, 計算量が最尤法などに比べれば非常に少ないので, 最尤法などでは解析不可能な 100 程度の taxa を含むようなデータでも解析を試みることができる, と言った利点がある。

なお, 進化距離すなわち 2 つの配列の間の塩基置換数やアミノ酸置換数を推定する際, 非常に長い時間の間に起こる塩基置換数 (アミノ酸置換数) が問題になるので, 多重置換についての補正が必要である^{18)~20)}。塩基置換数の推定には, 塩基置換のパターンを幾つかクラス分けすることにより, パラメーター数の異なる種々の推定法が用いられる。アミノ酸置換数の推定の場合には, 塩基置換に比べてより置換パターンが多いので並行置換の問題が少ないが, より置換パターンが複雑であり, 幾つかの経験的な置換推定法が使われている。

7 系統樹の信頼度の検定

得られた系統樹がどのぐらい確からしいかを検討するために幾つかの方法が開発されてきたが, 最も広く使われている検定法はブートストラップ (bootstrap) 法⁷⁾であろう。ブートストラップ法では, すべての形質 (これは塩基配列やアミノ酸配列の各座位) が独立しているという仮定の下, 重複を許してランダムに各形質 (座位) を選びとり, 最初のデータと同じ数の形質を含むデータセットを作る。これを用いて, オリジナルのデータで行った系統解析を行う。もしもオリジナルのデータから得られる系統樹の樹型を支持する座位が偏り無くデータ中に分布しているのなら, 上記のようなランダムなサンプリングによって得られたデータに基づいて, 改めて得られる系統樹の樹型は, オリジナルのものと同じか非常によく似ているはずである。しかしオリジナルのデータから得られる系統樹の樹型が非常に限られた数の座位のデータによって支持されているだけなら, ランダ

ムサンプリングの過程でそのような座位に関するデータは失われる可能性が高く, 改めて得られる系統樹の樹型はオリジナルデータに由来するものと大きく変わっている可能性が高い。このような解析を繰り返し, オリジナルのデータから得られた系統樹の樹型がどの程度の確率で再現されるかを計算する。この確率が高くなるほど, その樹型が正しい可能性が高くなる。ブートストラップ法で得られた結果の信頼度は, データの座位数や何回ブートストラップを繰り返したかによって変わってくる。

いずれにせよ, 系統樹の構築は一つの方法のみで行うのではなく複数の方法で行うことが必要である。もしも, 異なる方法で系統樹を書き, その結果に大きな矛盾があるようならば, そのデータは系統樹の構築に用いるにはなにかしらの点で適していない可能性が高い。また, 各系統樹推定法には, それぞれ長所と共に欠点もあり, そのデータに対して適切な解析法を用いる必要性がある。

8 系統樹解釈上の留意点^{18)~20)}

まず, 遺伝子系統樹と種系統樹を区別して考えなければならない。分子系統樹は個々の遺伝子 (タンパク質) について得られることが多い。すなわち系統樹はその遺伝子についての系統樹であり, それが種分化をそのまま反映している保証はない。実際, 違う遺伝子について調べると系統樹の樹形も異なることが多く, 一つの遺伝子に基づいた分子系統樹を元に系統関係を論じるには注意が必要である。

また, 比較している相同遺伝子がゲノム中に一つのコピーしか存在しなければ, それを用いて解析することは問題は少ない。しかし, 比較している相同遺伝子が機能が同一であっても違っていても, ゲノム中に複数コピー存在するのなら, その解析には十分な注意が必要である。機能の異なった相同遺伝子を含めて解析する場合には, 酵素の分類などさらに注意が必要となる。

もちろん, どの遺伝子を用いるかという点は重要である。たとえば, 16S または 18S リボソーム RNA (rRNA) を用いた分子系統樹の構築は, いろいろな問題点は抱えているにしても, 現在では多くの生物の系統関係を明らかにする上で最も有力な手段とみなされている。そのため非常に大きなデータベースが構築されており, 16S または 18S rRNA の塩基配列を決定して既存のデータと比較することにより, 容易に系統関係を論ずることができるようになっている。

また, どのぐらいの長さ (座位) の配列を用いるのか, どのぐらいの分子進化速度を示す遺伝子 (タンパク質) を用いるのかも重要である。16S/18S rRNA の解析は, 真核生物, 真正細菌, 古細菌を区別したり, その

中の「界」や「門」などの相互の関係を解析するには有効と思われる。反対にこの遺伝子は、たとえば哺乳類（哺乳綱）の中の系統関係を明らかにするためには不向きである。そのような解析を行うためにはこの遺伝子は進化速度が遅すぎるためで、その場合には他の分子、たとえばミトコンドリア DNA にコードされているような遺伝子（進化速度が早いことが知られている）の解析の方が適している。

最近、系統解析に含める taxa の組み合わせの違いや、outgroup とする taxon の選択の違いにより得られる系統関係が異なることがあることが報告されている。また特に、系統解析に含める taxa が明らかに特定の分類群に偏っている場合には注意が必要である。系統樹上で示される long branch の長さは過小に評価されている可能性が高い。また、明らかに分子進化速度が他の taxa と異なっている taxon を含む場合も、その系統解析の結果の解釈には注意が必要である。もし、生物間で遺伝子の塩基組成 (GC% で表されることが多い) が大きく異なる場合、それは塩基配列の変異パターンが系統間で異なっていることを意味しており、系統解析の結果に悪影響を与えることが知られている。

9 プログラムの入手法

系統解析プログラムとそれに関連するプログラムは、市販の塩基配列/アミノ酸配列の解析用ソフトにも含まれている場合があるが、そのようなものを購入しなくても WWW などを通じて目的にあったフリーウェアを入手して用いることができる。系統解析を行っている論文のうちのかなりのものはそのようなフリーウェアを用いて解析し報告されている。Table 1 に、我々が現在使っている系統解析用のフリーウェアの入手先を掲げてある。ただし、我々は系統解析に現在のところ Macintosh コンピュータと Unix ベースのコンピュータで

行っているため、それらで利用できるものに偏していることをお断りしておく。また、これらのプログラムは頻繁に version up や bag fixation が行われているので、時々チェックする方がよい。

Phylip のホームページ (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) は、そこから各コンピュータのオペレーティングシステムに適した Phylip のプログラムをダウンロードできるだけでなく、分子系統解析に関連するフリーウェア、シェアウェア、市販のプログラムの解説付きのリストなども掲載している。また、多くの場合はそれらのソフトウェアに関するホームページや入手先にもリンクが張られているので、それらのプログラムの入手先や入手法を知るためにも便利である。

最近ではコンピュータの高性能化が著しく、必ずしもワークステーションなどを使わなくてもパーソナルコンピュータを用いてかなりの解析をすることができる。そこで著者らは、上で述べたように主として Macintosh コンピュータを系統解析に使い、場合により Unix マシンを用いている。アミノ酸や塩基配列の alignment は Clustal W⁸⁾ (最近その後継の Clustal X⁹⁾ が発表された)で行っている。しかし、その alignment をそのまま以後の解析に使えることはあまり多くなく、さらに SeqPup¹⁰⁾ の様な alignment editor を使って修正している。SeqPup は alignment した配列を様々なフォーマットに変換する機能があるので、種々のプログラムのデータ様式にすぐに変換でき便利である。また Phylip⁵⁾ は、最大節約法、最尤法、近隣接合法のいずれもが実行でき、配列データ以外の分子データや形態データなども取り扱うことができる。Unix や Macintosh, Windows, DOS のいずれでも利用できるものが用意されている。また、そのマニュアルは系統樹作成法の概説書として読むこともできる。ただし、Phylip は

Table 1 URL of the Programs.

Program (Package)	Operation System		References
Phylip (phylogenetic analysis)	Unix, DOS, Win., Mac.	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html	5)
Molphy (phylogenetic analysis)	Unix.	ftp://ftp.sunmhm.ism.ac.jp/pub	11)
Puzzle (phylogenetic analysis)	Unix, Win., Mac.	http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/~strimmer/puzzle.html	13)
Clustal W (alignment)	Unix, Win., Mac.	ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software	8)
Clustal X (alignment)	Unix, Win., Mac.	ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software	9)
SeqPup (alignment editor)	Unix, Win., Mac.	http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/seqpup	10)
TreeView (visualization)	Win., Mac.	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html	12)

インターネットを通じて入手可能なフリーウェアをリストアップした。

現在のところアミノ酸配列を用いた最尤法による解析をサポートしていないこともあり、アミノ酸配列ベースの最尤法を行う場合には Molphy¹¹⁾ を用いている。これらのプログラムパッケージは、ブートストラップ解析を行うためのプログラムも含んでいる。解析結果は、Tree View¹²⁾ などを用いて論文にそのまま Figure として用いることができる系統樹に変換できる。また Puzzle¹³⁾ というプログラムは、得られた樹型を元に最尤法により枝の長さとお数尤度の推定を行う。ここで例に挙げたものはすべてフリーウェアである。

(受付: 1998年5月6日, 受理: 1998年5月21日)

文 献

[1] 雑誌、コンピュータプログラム

- 1) A. Chen, C. D. Poulter, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11002 (1993).
- 2) S. Ohnuma, M. Suzuki, T. Nishino, *J. Biol. Chem.* **269**, 14792 (1994).
- 3) Y. Koga, T. Kyuragi, M. Nishihara, N. Sone, *J. Mol. Evol.* **46**, 54 (1998).
- 4) 山岸明彦, 科学, **66**, 464 (1996).
- 5) J. Felsenstein, "PHYLP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c" University of Washington, Seattle, WA (1995).
- 6) N. Saitou, M. Nei, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406 (1987).
- 7) J. Felsenstein, *Evolution*, **39**, 783 (1985).
- 8) J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson,

Nucleic Acids Res., **22**: 4673 (1994).

- 9) J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins, *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876 (1997).
 - 10) D. Gilbert, "SeqPup ver. 0.5" Indiana University, Bloomington, IN (1996).
 - 11) J. Adachi, M. Hasegawa, "MOLPHY: programs for molecular phylogenetics, ver. 2.3" Institute of Statistical Mathematics, Tokyo (1995).
 - 12) R. D. M. Page, "TreeView" University of Glasgow, Scotland, UK (1996).
 - 13) K. Strimmer, A. von Haeseler, *Mol. Biol. Evol.*, **13**, 964 (1996).
 - 14) C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 4576 (1990).
- [2] 単行本
- 15) 山岸明彦 "古細菌の生物学" 古賀洋介, 亀倉正博編 東京大学出版会, (1998) p. 17.
 - 16) 古賀洋介, 西原正照, "古細菌の生物学" 古賀洋介, 亀倉正博編 東京大学出版会, (1998) "細胞表層" 印刷中.
 - 17) A. Yamagishi, T. Kon, G. Takahashi, T. Oshima, "*Thermophile: the key to molecular evolution and the origin of life*", Taylor & Francis, London (1998) p. 287.
 - 18) 日本生化学会 (編) "新生化学実験講座第16巻分子進化学実験法" 東京化学同人, (1993).
 - 19) 根井正利 "分子進化遺伝学" 根井正利監訳, 五条堀孝, 齊藤成也訳, 培風館, (1990).
 - 20) 長谷川政美, 岸野洋久 "分子系統学" 岩波書店, (1996).
 - 21) 三中信宏, "生物系統学" 東京大学出版会, (1997).

[総説]

遺伝子分析による脂質合成系進化の解析

山岸 明彦・横堀 伸一

東京薬科大学生命科学部分子生命科学科 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

生物のどのような生合成経路も進化の過程でできたものであり、脂質の合成系も同様である。脂質合成系遺伝子の系統学的解析によって脂質合成系の進化を明らかにすることができる。古細菌の脂質合成酵素の研究結果が生物の進化系統の知識と重ねて解釈され、そのことから生命進化初期における脂質合成系の進化に関する情報を得ることができた。

また、酵素の系統学的解析法の方法論について概説する。ある酵素に関する適切な知識があればその遺伝子をクローニングすることができる。一般的な分子生物学的技術を用いてその塩基配列を決定することもできる。その塩基配列を相同な配列をもつ酵素遺伝子と共にコンピュータを用いて解析することができる。系統解析に用いられるプログラムの原理とそれぞれの性質を議論する。これらのプログラムはインターネットを通じて入手可能である。

(連絡者：山岸明彦) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)

[総説]

過酸化脂質の FIA による分析

赤坂 和昭・大類 洋

東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

過酸化脂質のフローインジェクション法について述べた。導入された試料はオンラインで連続的に試薬との混合、反応、検出が行われる。これらの方法により過酸化脂質を簡便かつ迅速に分析することが可能となる。検出法には早い応答、高い選択性と感度、及び共存物質の影響を受けないことが要求される。diphenyl-1-pyrenyl-phosphine を用いた蛍光検出法はこの目的に適した方法の一つであり、この試薬を用いた FIA により共存する抗酸化剤の影響もなく 10^{-13} mol レベルの過酸化脂質を 2 分間隔以内で分析することが可能で、食用油や食品へ適用し好結果が得られた。この他の方法として I_3 -吸光度を測定する方法や化学発光法についても紹介した。

(連絡者：赤坂和昭) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)