

分子系統学の基礎

法政大学 生命科学部

大島 研郎

本日の講義資料

kiso3

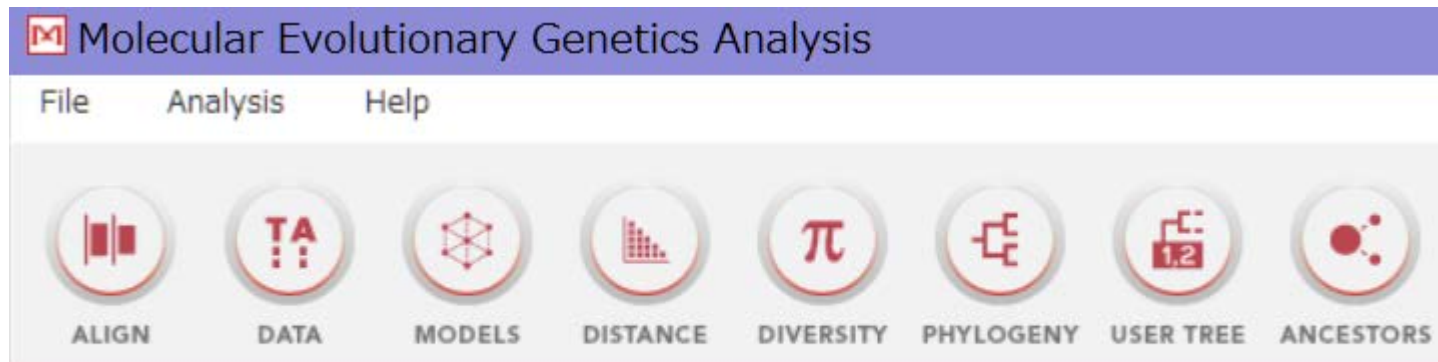
← 本日の講義で使用するWebページへのリンクが載せてあります。

bacteria_16S.fas

bacteria_alaS.fas

bacteria_pgk.fas

本日の講義では, MEGAを使います。



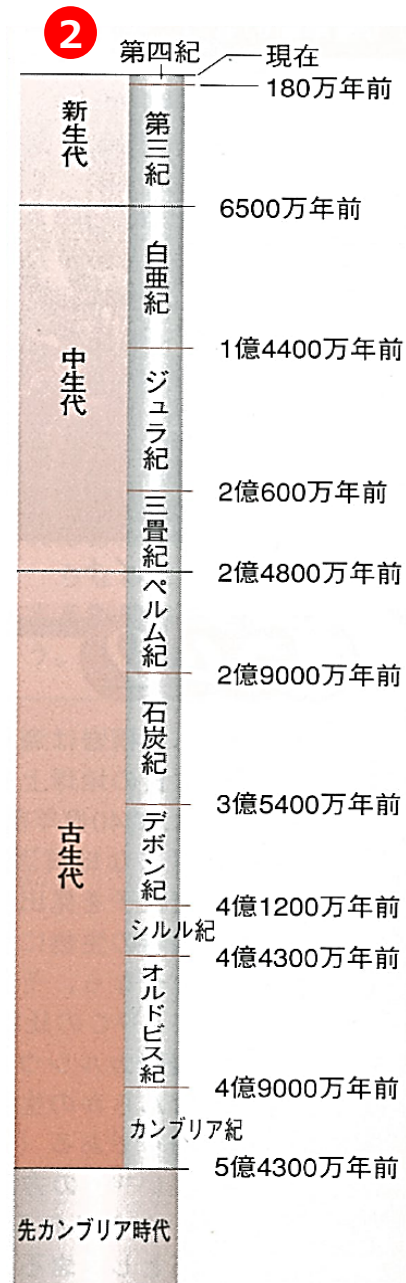
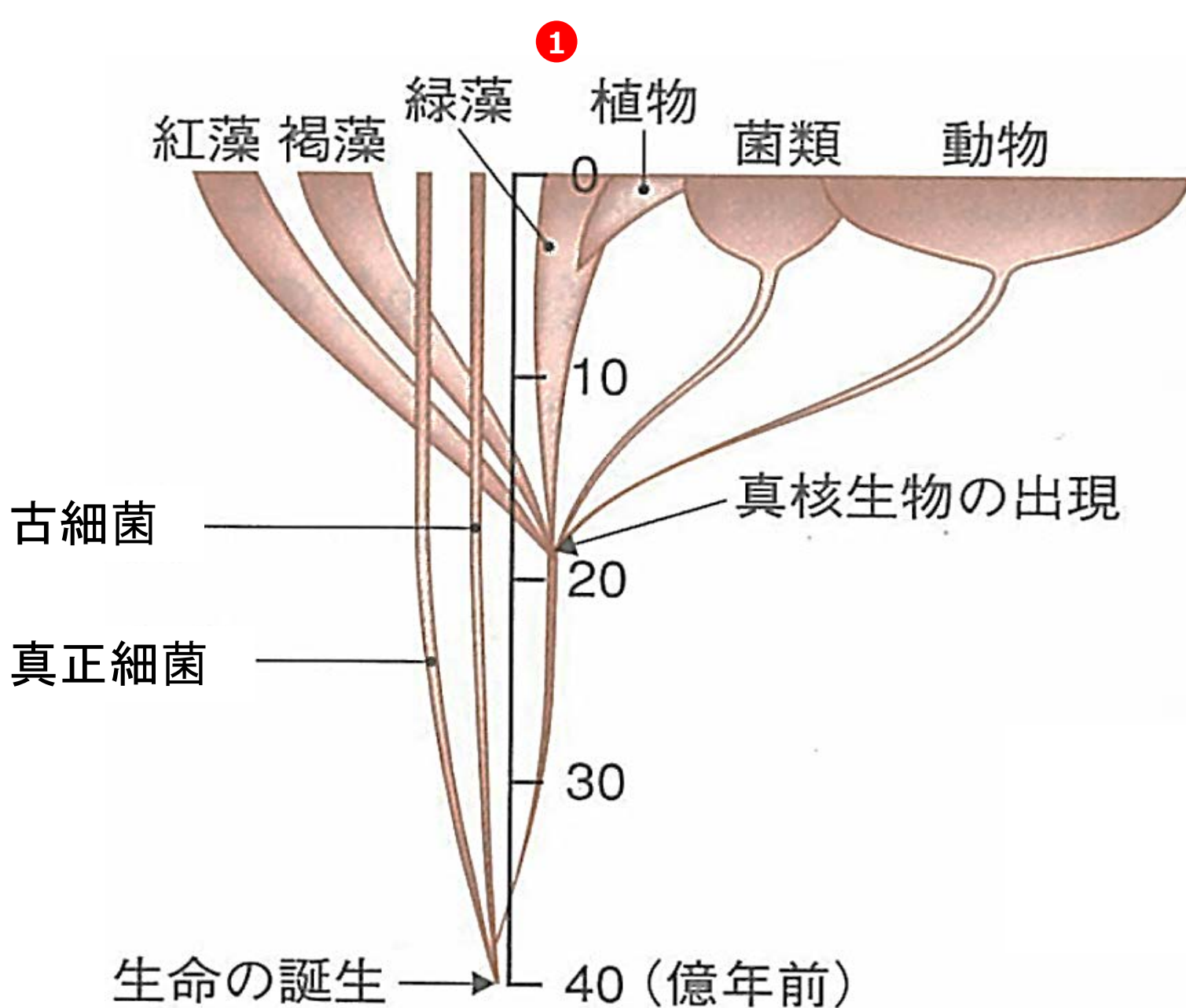
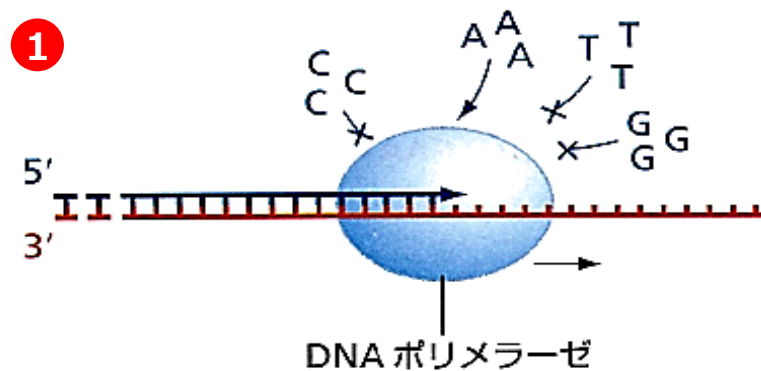


図2 地質年代

DNA修復

DNA分子の損傷は1日1細胞あたり最大50万回程度発生することが知られており、その原因は、正常な代謝活動に伴うもの（DNAポリメラーゼによるDNA複製ミス）と環境要因によるもの（紫外線など）がある

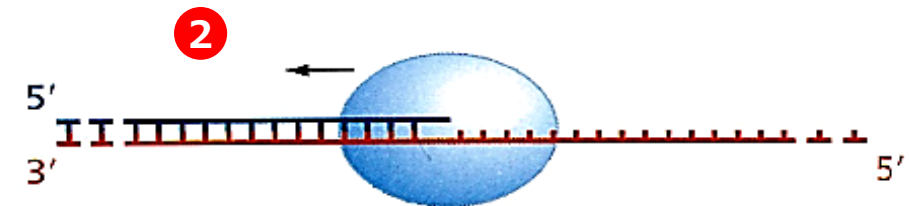
(A) ヌクレオチドの選別



(B) 校正



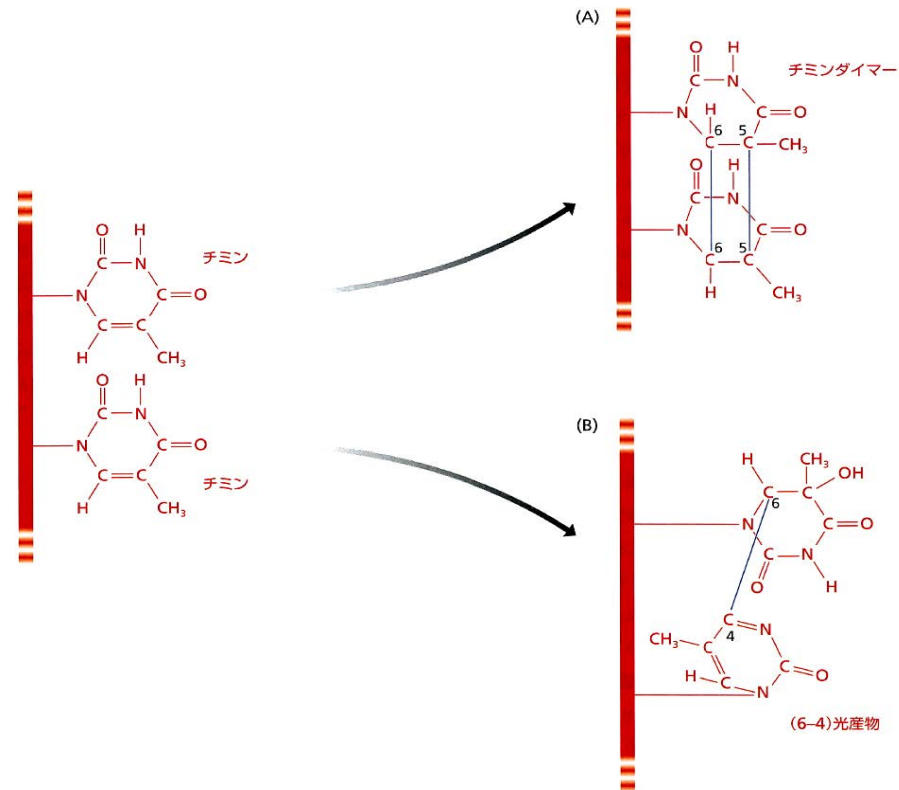
最後のヌクレオチドが塩基対を形成していると、この酵素のポリメラーゼ活性が勝る



最後のヌクレオチドが塩基対を形成していないと、この酵素のエキソヌクレアーゼ活性が勝る

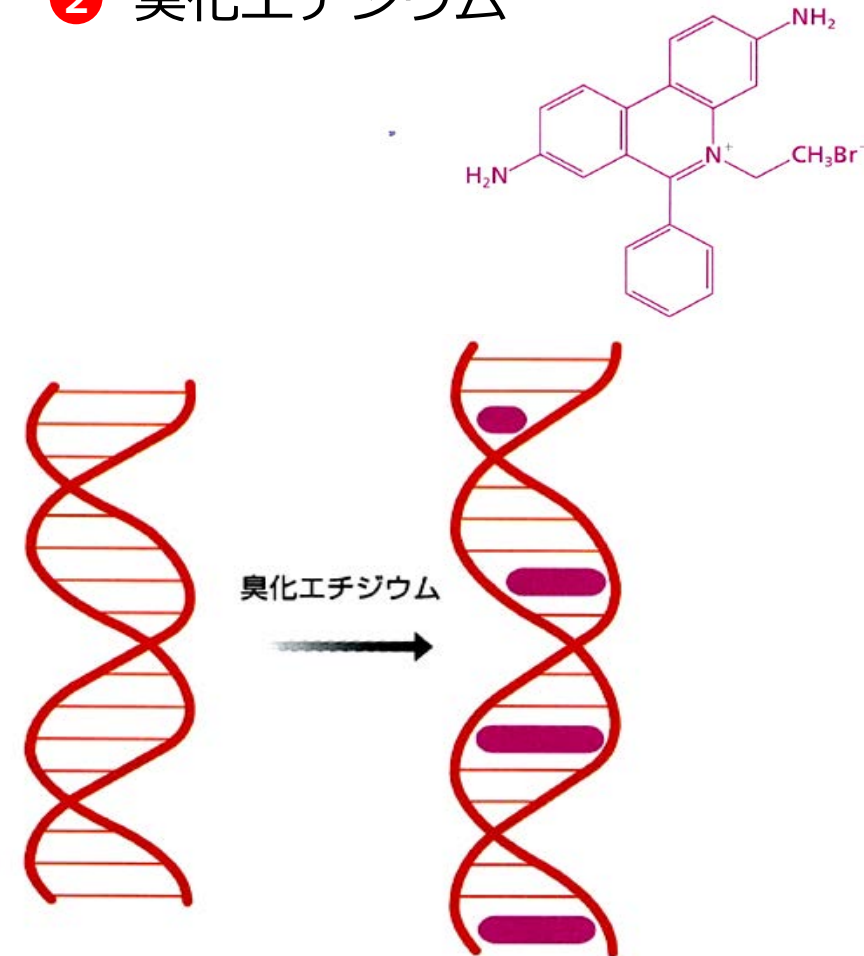
- DNAポリメラーゼにはエラー訂正機能が備わっている場合がある
- 正しくない塩基対が認識されると、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって1塩基が除去され、その後DNA合成が再開される

① チミン二量体



チミン二量体は、通常生成することはない、DNA配列の混乱、複製の中断、ギャップの生成、複製のミスが発生させる

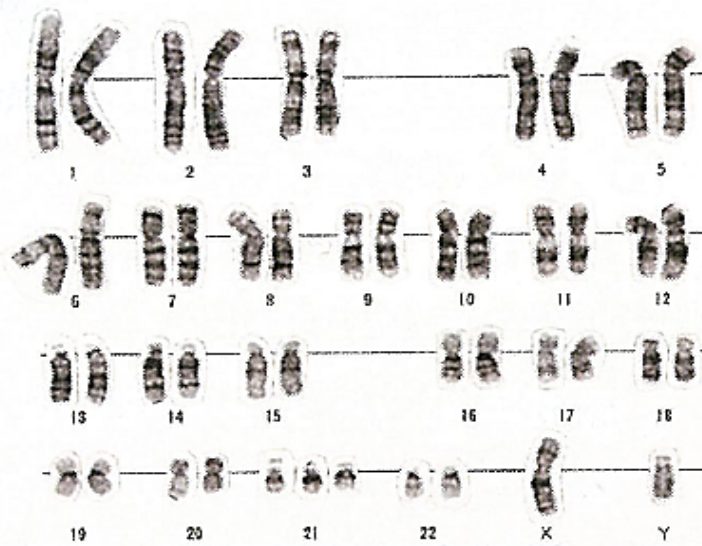
② 臭化エチジウム



二本鎖DNAにインターカレートして、DNAの複製や転写を阻害することにより変異原性を示すと考えられている

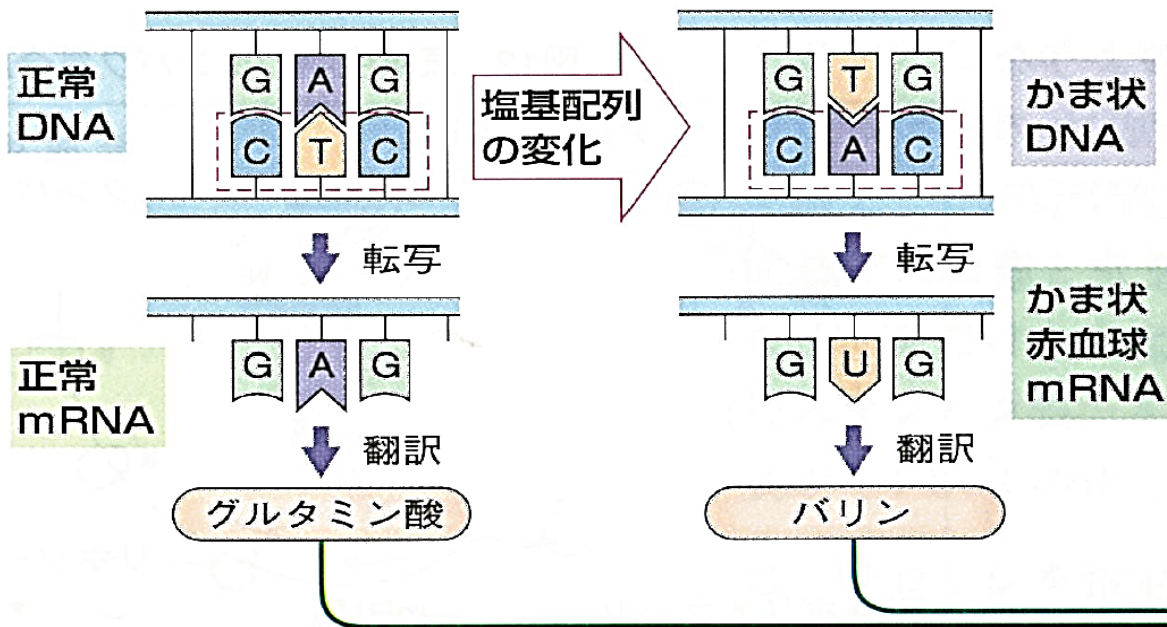
突然変異

突然変異 { 遺伝子突然変異
染色体突然変異 { 欠失・逆位・転座・重複
異数性・倍数性



① ダウン症の男子の染色体

② DNAに生じた突然変異によって鎌状赤血球貧血症になる

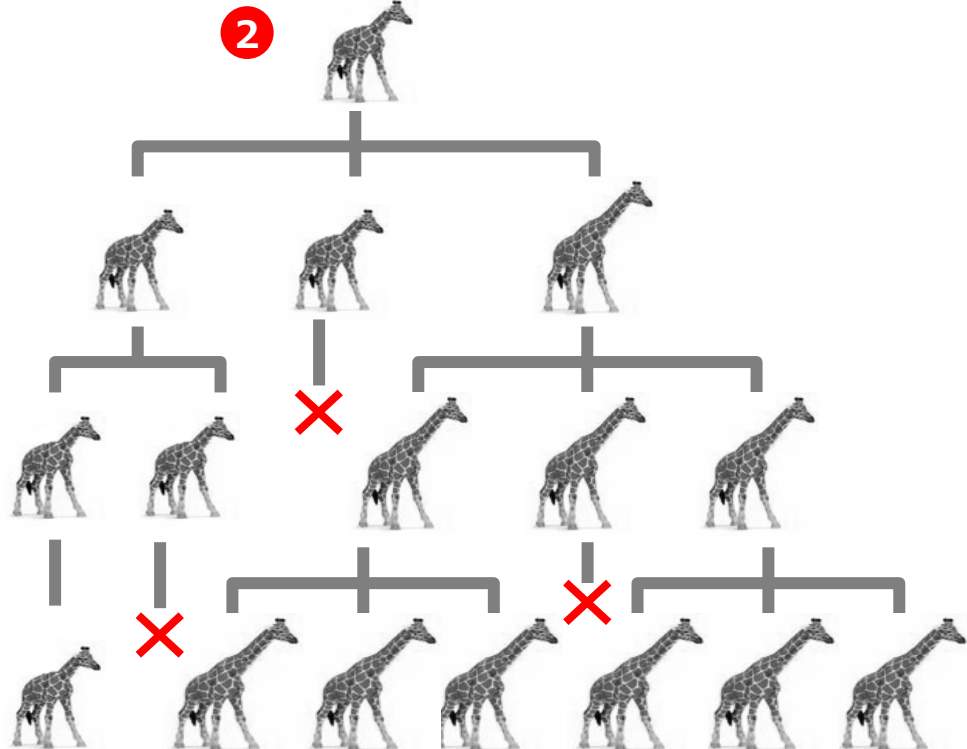
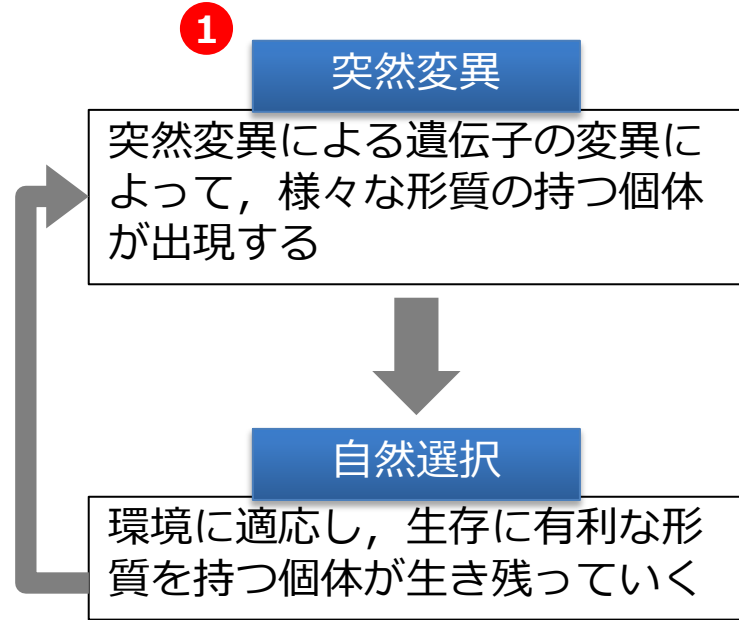


正常赤血球のヘモグロビン	かま状赤血球のヘモグロビン
バリン	1 バリン
ヒスチジン	2 ヒスチジン
ロイシン	3 ロイシン
トレオニン	4 トレオニン
プロリン	5 プロリン
グルタミン酸	6 バリン
グルタミン酸	7 グルタミン酸

総合進化説

現在、進化を説明する理論として最も支持されているのは総合進化説と呼ばれるもので、自然選択説や突然変異説、隔離説、メンデルの遺伝子の理論、集団遺伝学の理論や中立進化説などを統合したものである。

説の名称	提唱者	おもな内容
用不用説	ラマルク	よく使う器官は発達し，使わない器官は退化する。
自然選択説	ダーウィン	自然選択…環境に適した形質が子孫に受け継がれる。
隔離説	ワグナーら	地理的隔離・生殖的隔離により種が分化する。
突然変異説	ド・フリース	突然変異が進化の要因。
中立説	木村資生	有利でも不利でもない偶然で決まる。



1 ヘモグロビンのアミノ酸配列（一部）のアラインメント

		*	20	*	40	*	60	*	80																																																																															
human	:	M	V	L	S	P	A	D	K	T	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	A	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	L	S	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	L	S	H	G	S	A	Q	V	K	G	H	G	K	K	V	A	D	A	L	T	N	A	V	A	H	V	D	D	M	P	N	A	L	S	A	L	:	84	
monkey	:	M	V	L	S	P	A	D	K	S	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	G	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	L	S	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	L	S	H	G	S	A	Q	V	K	G	H	G	K	K	V	A	D	A	L	T	L	A	V	G	H	V	D	D	M	P	Q	A	L	S	A	L	:	84	
mouse	:	M	V	L	S	G	E	D	K	S	N	I	K	A	A	W	G	K	I	G	G	H	A	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	A	S	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	V	S	H	G	S	A	Q	V	K	G	H	G	K	K	V	A	D	A	L	A	N	A	A	G	H	L	D	D	L	P	G	A	L	S	A	L	:	84		
cat	:	M	V	L	S	A	A	D	K	S	N	V	K	A	C	W	G	K	I	G	S	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	T	F	C	S	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	L	S	H	G	S	A	Q	V	K	A	H	G	Q	K	V	A	D	A	L	T	Q	A	V	A	H	M	D	D	L	P	T	A	M	S	A	L	:	84	
dog	:	M	V	L	S	P	A	D	K	T	N	I	K	S	T	W	D	K	I	G	G	H	A	G	D	Y	G	G	E	A	L	D	R	T	F	Q	S	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	L	S	P	G	S	A	Q	V	K	A	H	G	K	K	V	A	D	A	L	T	T	A	V	A	H	L	D	D	L	P	G	A	L	S	A	L	:	84	
pig	:	M	V	L	S	A	A	D	K	A	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	G	Q	A	G	A	H	G	A	E	A	L	E	R	M	F	L	G	F	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	N	L	S	H	G	S	D	Q	V	K	A	H	G	Q	K	V	A	D	A	L	T	K	A	V	G	H	L	D	D	L	P	G	A	L	S	A	L	:	84	
chicken	:	M	V	L	S	A	A	D	K	N	N	V	K	G	I	F	T	K	I	A	G	H	A	E	E	Y	G	A	E	T	L	E	R	M	F	T	T	Y	P	P	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	D	L	S	H	G	S	A	Q	I	K	G	H	G	K	K	V	V	A	A	L	I	E	A	A	N	H	I	D	D	I	A	G	T	L	S	K	L	:	84
alligator	:	M	V	L	S	M	E	D	K	S	N	V	K	A	I	W	G	K	A	S	G	H	L	E	E	Y	G	A	E	A	L	E	R	M	F	C	A	Y	P	Q	T	K	I	Y	F	P	H	F	D	S	H	N	S	A	Q	I	R	A	H	G	K	K	V	F	S	A	L	H	E	A	V	N	H	I	D	D	L	P	G	A	L	C	R	L	:	84		
frog	:	M	H	L	T	A	D	D	K	K	H	I	K	A	I	W	P	S	V	A	A	H	G	D	K	Y	G	G	E	A	L	H	R	M	F	M	C	A	P	K	T	K	T	Y	F	P	D	F	D	F	S	E	H	S	K	H	I	L	A	H	G	K	K	V	S	D	A	L	N	E	A	C	N	H	L	D	N	I	A	G	C	L	S	K	L	:	84	

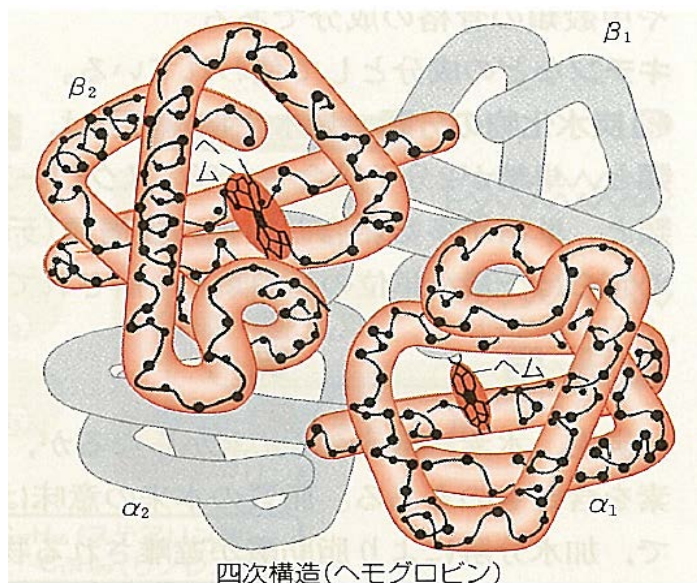
2 ヘモグロビンのアミノ酸配列の類似度（相同性）

	ヒト	サル	マウス	ネコ	イヌ	ブタ	ニワトリ	ワニ	カエル
ヒト	100%	97%	92%	93%	90%	90%	79%	79%	71%
サル		100%	92%	92%	90%	92%	80%	80%	70%
マウス			100%	89%	88%	90%	81%	81%	69%
ネコ				100%	92%	90%	80%	81%	71%
イヌ					100%	88%	78%	79%	69%
ブタ						100%	78%	79%	71%
ニワトリ							100%	82%	70%
ワニ								100%	72%
カエル									100%

- 近縁な生物同士はDNAやアミノ酸配列が似ている
- 遠縁になるほどDNAやアミノ酸配列の相同性は低くなる

中立変異

ヘモグロビン遺伝子の比較



ゴリラ	CCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAAGGAAGCACCCCTCCAGCAGTTCCACACACTC
チンパンジー	CCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAAGGAAGCACCCCTCCAGCAGTTCCACACACTC
ヒト	CCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAAGGAAGCACCCCTCCAGCAGTTCCACACACTC

ゴリラ	GCTTCTGGAACGTCTGAGGTTATCAATAAGCTCCTAGTCCAGACGCCATGGGTCATTTCA
チンパンジー	GCTTCTGGAACGTCTGAGGTTATCAATAAGCTCCTAGTCCAGACGCCATGGGTCATTTCA
ヒト	GCTTCTGGAACGTCTGAGGTTATCAATAAGCTCCTAGTCCAGACGCCATGGGTCATTTCA

ゴリラ	CAGAGGAGGACAAGGCTACTATCAC AAGCCTGTGGGGCAAGGTGAATGTGGAAGATGCTG
チンパンジー	CAGAGGAGGACAAGGCTACTATCAC AAGCCTGTGGGGCAAGGTGAATGTGGAAGATGCTG
ヒト	CAGAGGAGGACAAGGCTACTATCAC AAGCCTGTGGGGCAAGGTGAATGTGGAAGATGCTG

ゴリラ	GAGGAGAAAACCTGGGAAGGTAGGCTCTGGTGACCAGGAC AAGGGAGGGAAGGAAGGACC
チンパンジー	GAGGAGAAAACCTGGGAAGGTAGGCTCTGGTGACCAGGAC AAGGGAGGGAAGGAAGGACC
ヒト	GAGGAGAAAACCTGGGAAGGTAGGCTCTGGTGACCAGGAC AAGGGAGGGAAGGAAGGACC

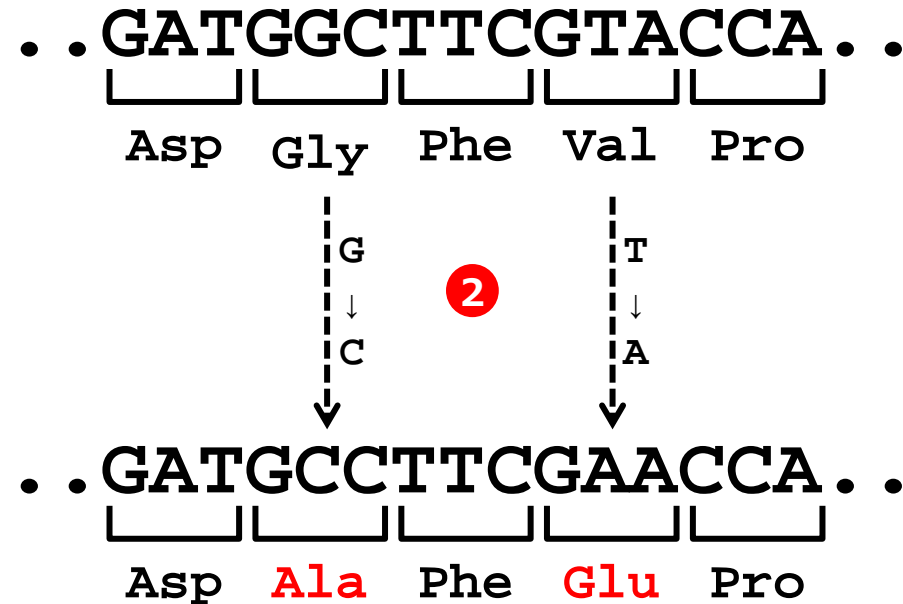
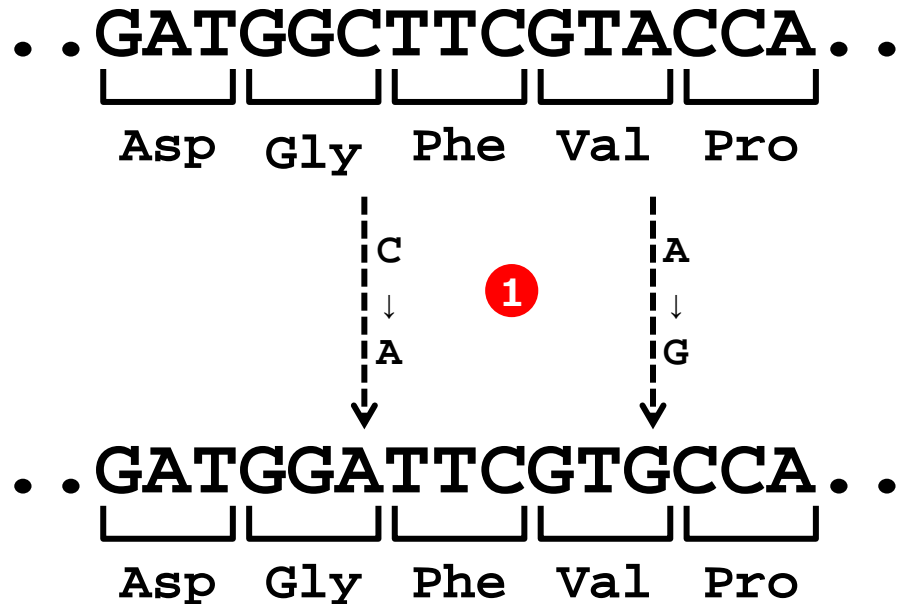
ゴリラ	CTGTGCC TGGC AAAAGTCC AGGTCCGCTTCTCAGGATTTGTGGCACCTTCT
チンパンジー	CTGTGCC TGGC AAAAGTCC AGGTCCGCTTCTCAGGATTTGTGGCACCTTCT
ヒト	CTGTGCC TGGC AAAAGTCC AGGTCCGCTTCTCAGGATTTGTGGCACCTTCT

生物に対する影響の度合いで突然変異を分類するのなら、それは、

- ① 生物に有利な変異
- ② 生物にとって不利な変異
- ③ 生物にとって有利でも不利でもない変異

の三つに分けられる。突然変異がある塩基で起こるのは、偶然によるものであるから、その突然変異が生物にとって有利である可能性は、非常に少ない。そして、生物に対して有利でも不利でもない変異は、
 ちゅうりつへんい
中立変異と呼ばれる。

分子進化の中立説

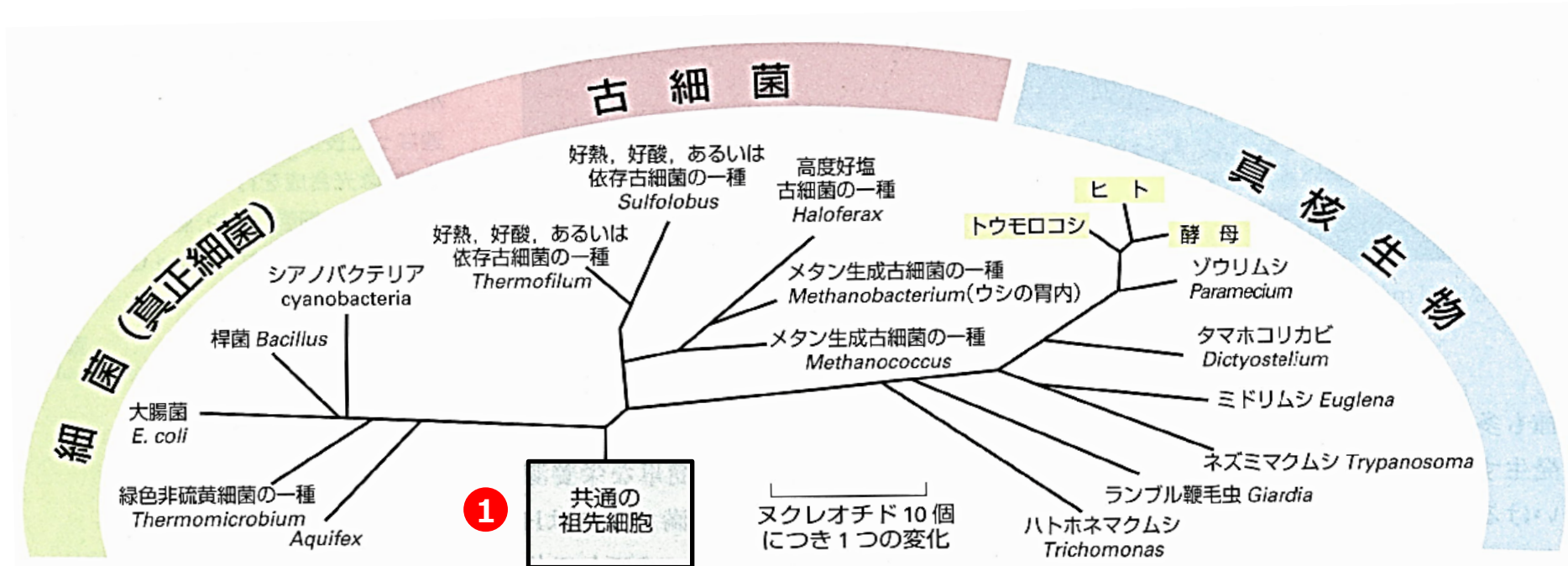


- 2カ所の突然変異が生じたが、アミノ酸配列は変わらない → 中立変異
- このような変異は害がないので、次世代に伝わりやすい

- 上の例では、突然変異によってアミノ酸配列が変化している
- このような変異は、多くの場合、有害であるので、次世代に伝わりにくい

分子系統樹

- DNAには変異が一定の割合で起こっており、そのほとんどが自然選択とは無関係な中立の変異である
- DNAの配列がどのくらい似ているかを調べることによって、進化的にどの程度近縁であるかを知ることができる



② 分子時計 アミノ酸の変化した数と、化石から知られる2つの系統の生物が分かれた時期とから、アミノ酸が1個変わるのにどれだけ時間がかかるかを計算できる。

系統樹の作成法

- DNA 配列のアラインメント (並行配列) から, 系統樹の推定に必要な比較データを得る。
- 比較データを変換して, 系統樹を推定する。
- 系統樹の信頼度を検定する。

1 多重アラインメント

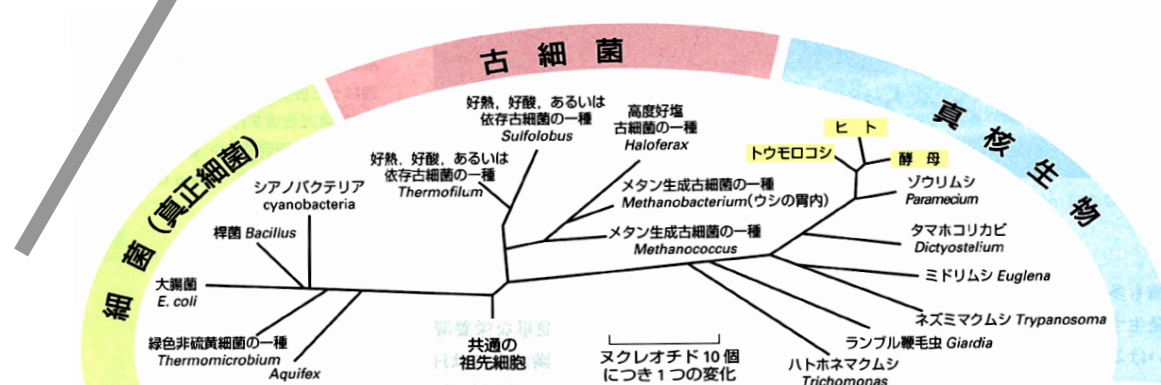
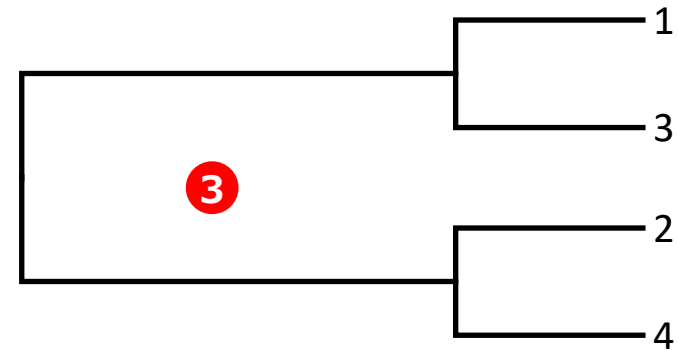
```

1  AGGCCAAGCCATAGCTGTCC
2  AGGCAAAGACATACCTGACC
3  AGGCCAAGACATAGCTGTCC
4  AGGCAAAGACATACCTGTCC
    
```



2 距離行列

	1	2	3	4
1	-	0.20	0.05	0.15
2		-	0.15	0.05
3			-	0.10
4				-



オーソログ遺伝子とは？

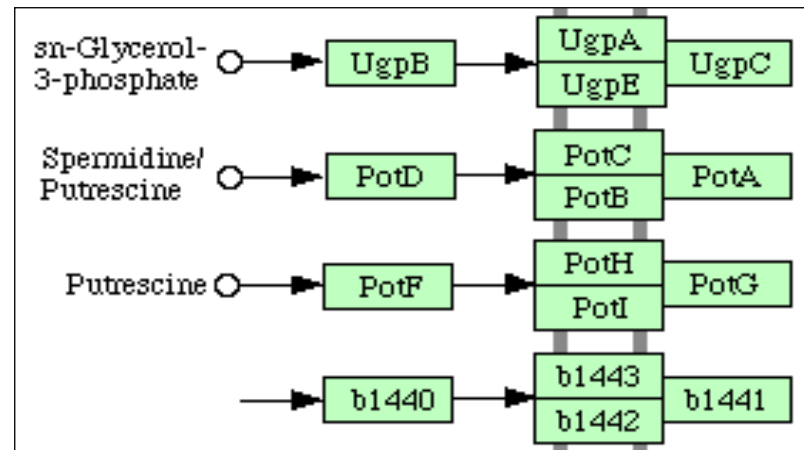
1 オーソログ (Ortholog)

種分岐の際に同じ遺伝子だったもの。通常同じ機能を持つ
(ヒトとチンパンジーのアミラーゼ遺伝子など)

2 パラログ (Paralog)

遺伝子重複によってできた類似遺伝子

(例えば一つの生物種が持っている様々なトランスポーター遺伝子など)



http://www.genome.jp/tools/blast/



BLAST Search

「tmk_eco」
あるいは
「znuC_eco」
をコピー&ペースト

「Favorite」
を選択

「eco bsu hpy sau pae」
と入力

BLAST FASTA KEGG2

Compute Clear

Enter query sequence: (in one of the three forms)

Sequence ID (Example) mja:MJ_1041

Local file name 参照...

Sequence data

Select program and database:

BLASTP (prot query vs prot db) KEGG GENES

BLASTX (nucl query vs prot db) Favorite organism code or category

KEGG MGENES

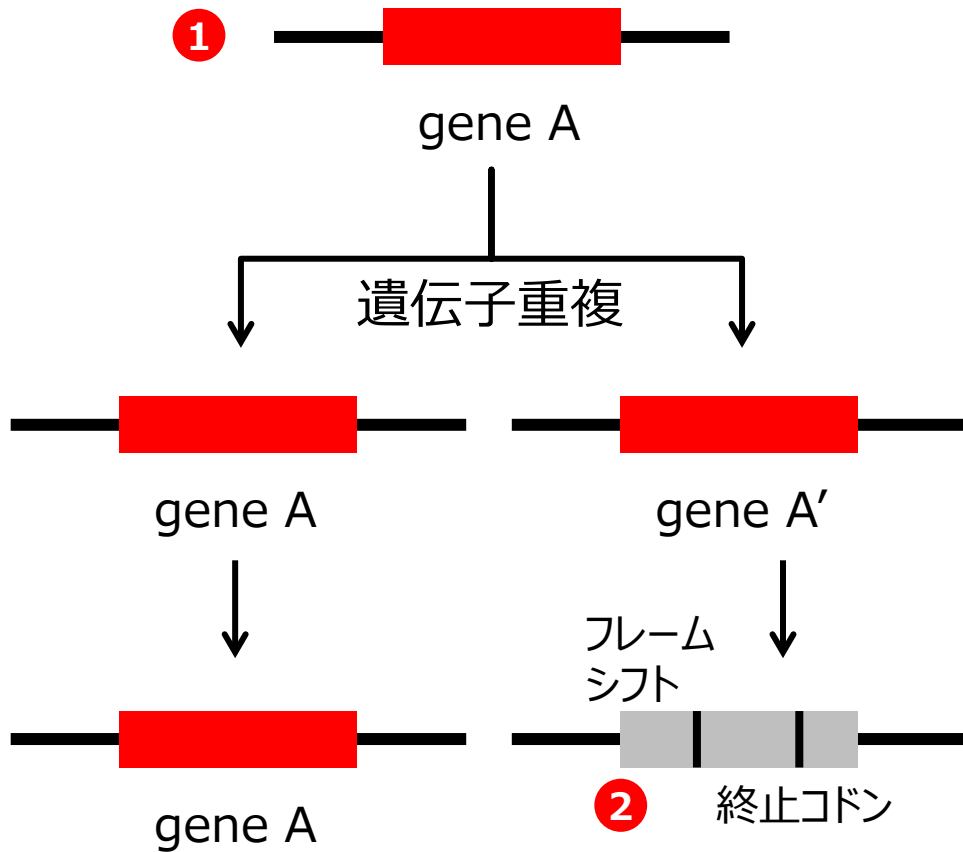
KEGG VGENES

nr-aa (GenBank, UniProt, RefSeq, PRF and PDBSTR)

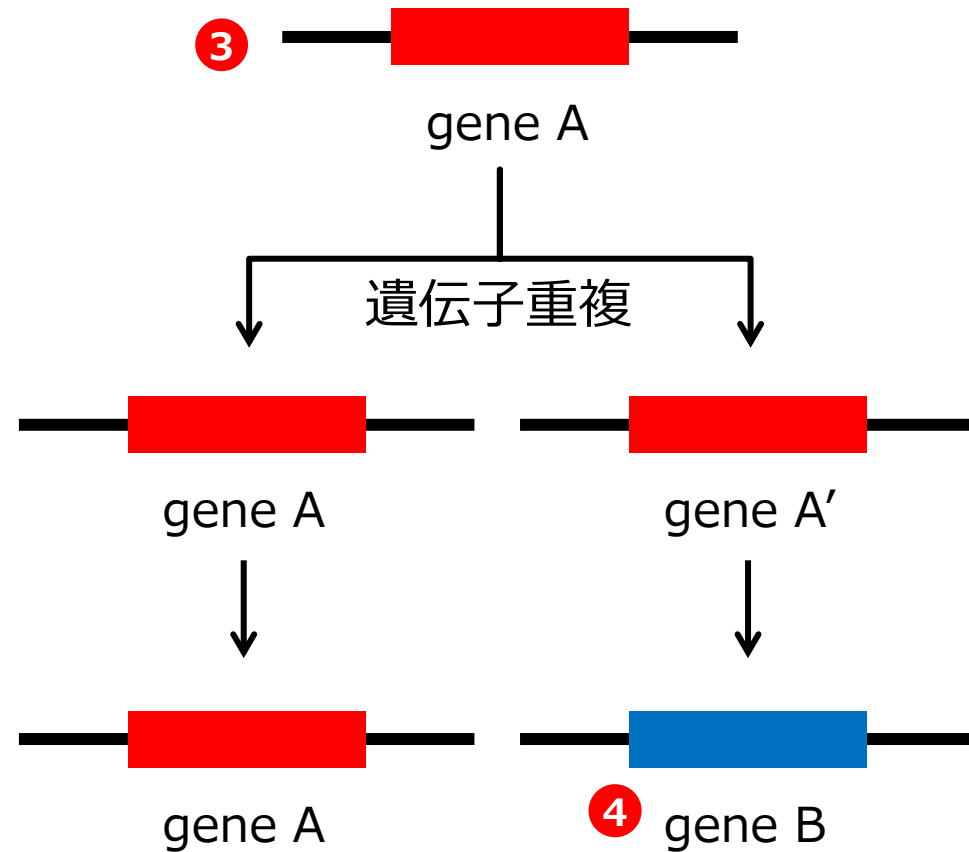
Swiss-Prot UniProt RefSeq PRF

PDBSTR

遺伝子重複

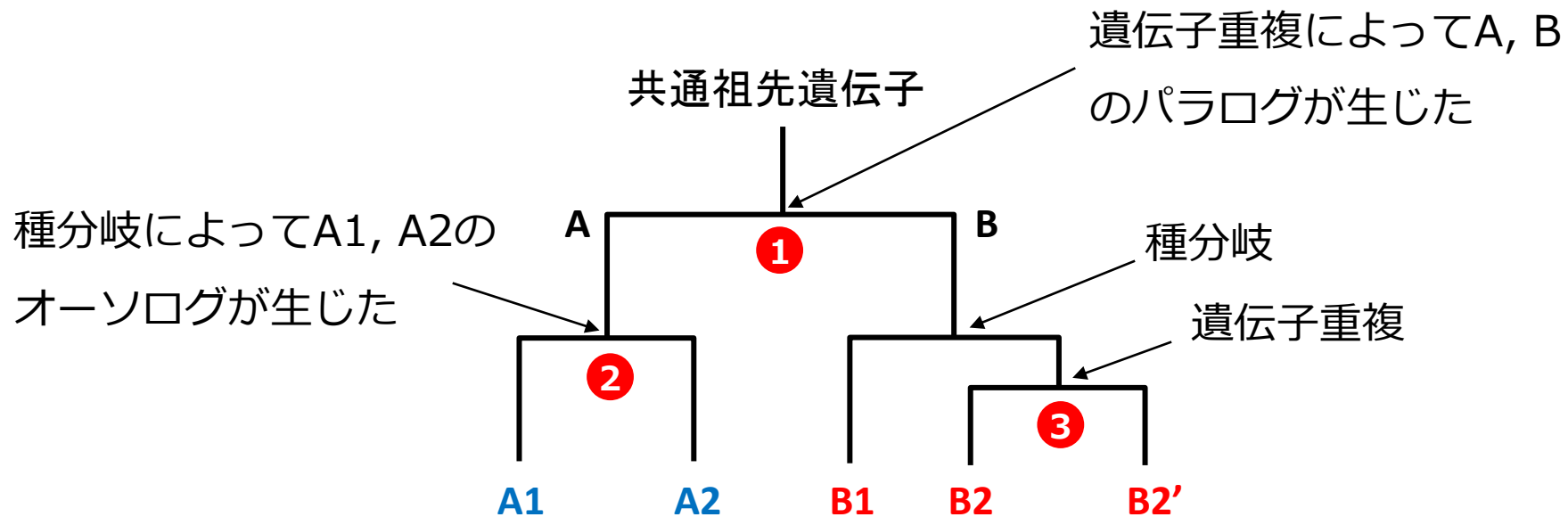


片方の遺伝子が機能を失っても生存には影響しないので、通常は一方が偽遺伝子になっていく

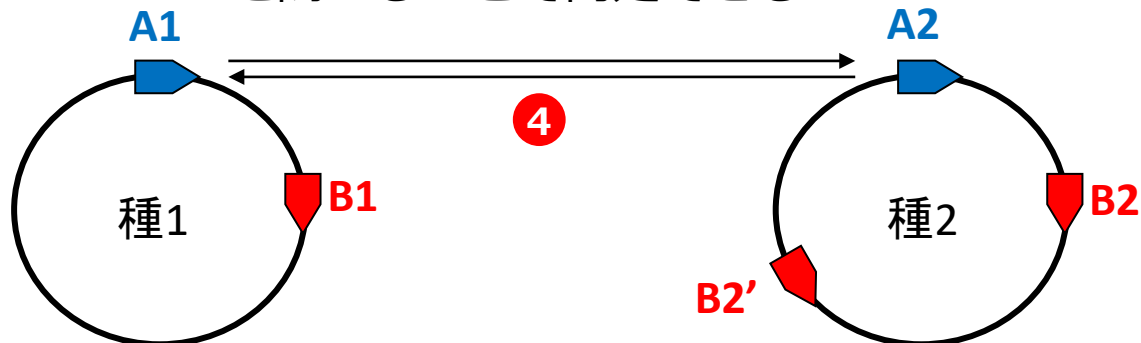


ごく稀に、一方の遺伝子が新たな機能を獲得し、元とは異なる遺伝子へと進化する

オーソログ遺伝子とは？



2つのゲノム間のオーソログは、双方向ベストヒットを調べることで同定できる。



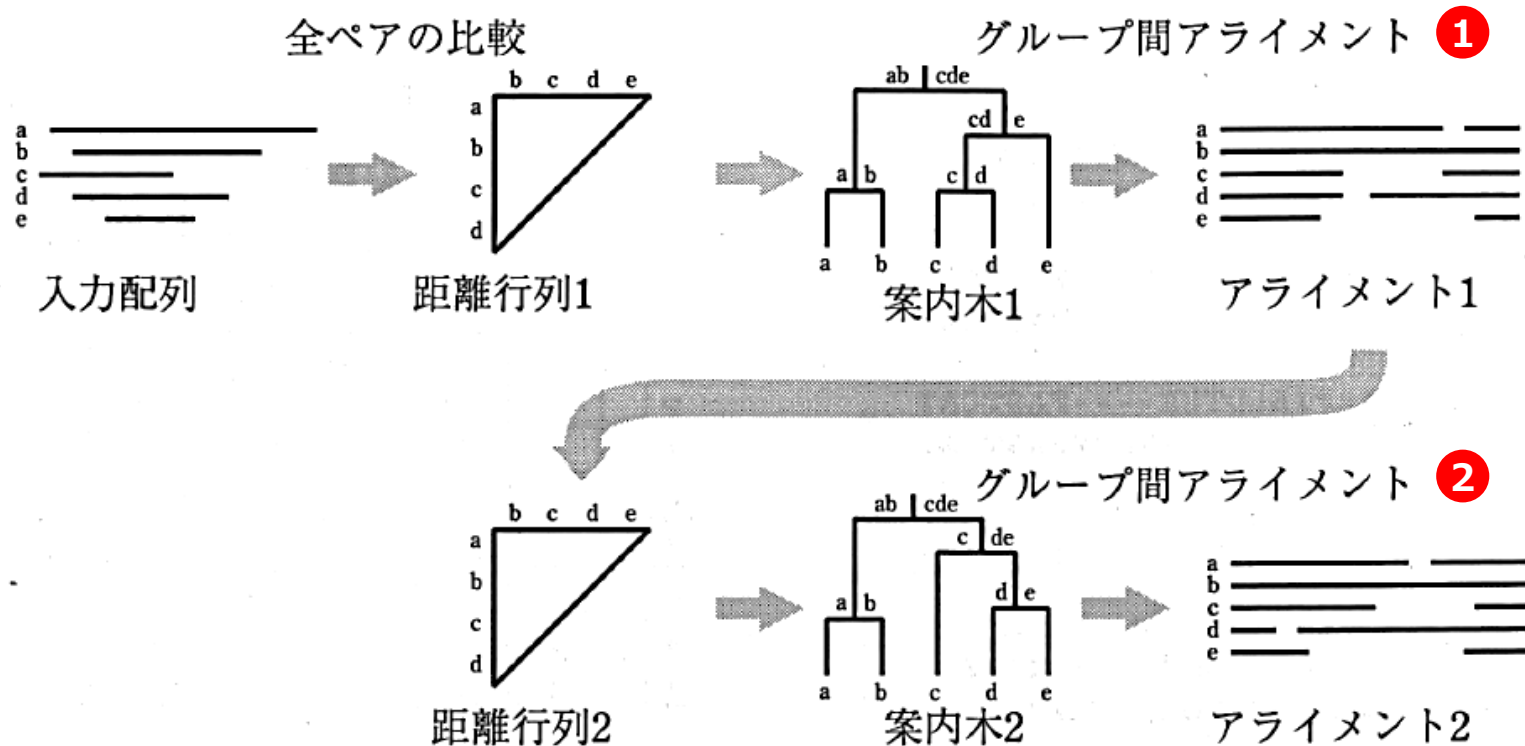
多重アラインメント

- 配列中の残基同士を対応づけたものがアラインメント
- 挿入や欠失により対応させることのできない残基には空白文字（**ギャップ**）を入れる
- 2配列間でのアラインメントを**ペアワイズアラインメント**、3配列以上でのアラインメントを**マルチプルアラインメント**という
- 主要なマルチプルアラインメントアルゴリズムとして、「**累進法**」と「**反復改善法**」がある

1. Aquifex_aeolicus	C	C	G	G	C	C	G	G	A	A	G	T	C	C	C	C	-	G	A	G	C	T	A	A	C	C	G	G	C	T	C	C	T	T	C	G	G	G	A	G	C	C	G	G	A	-	-	-	-	-	G	G	C	A	G	G	C	C																											
2. Sulfurihydrogenibium_sp	T	T	C	A	T	C	G	G	A	A	G	T	C	C	C	-	G	G	G	C	T	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	C	A	G	G	C	C																								
3. Sulfurihydrogenibium_azorense	T	T	C	A	T	C	G	G	A	A	G	T	C	C	C	-	G	A	G	C	T	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	C	A	G	G	C	C																						
4. Hydrogenobacter_thermophilus	C	T	T	C	C	C	G	G	A	A	G	C	C	T	C	-	G	G	G	C	T	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	T	A	G	A	G	C																						
5. Hydrogenobaculum_sp	G	T	T	T	C	G	G	A	A	G	T	C	C	T	C	-	A	A	G	C	T	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	C	A	G	A	G	C																					
6. Thermotoga_maritima	G	G	C	T	C	C	C	G	A	A	G	A	C	A	C	C	T	A	C	C	C	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	T	C	C																				
7. Thermotoga_petrophila	G	G	C	T	C	C	C	G	A	A	G	A	C	A	C	C	T	G	C	C	C	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	T	C	C																			
8. Bacillus_subtilis	A	A	C	A	C	C	C	G	A	A	G	T	C	G	G	T	-	G	A	G	G	T	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	C	A	G	C	C	C																	
9. Chlamydophila_pneumoniae	T	T	T	A	C	C	T	T	A	A	G	T	C	G	T	T	-	G	A	C	T	C	A	A	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	A	G	C	C	C													
10. Thermus_thermophilus	T	C	T	A	C	C	C	G	A	A	G	T	C	G	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	A	G	C	C	T	A	C	G	G	G	C	A	G	C	C

累進法

- ペアワイズアラインメントからはじめて、徐々にアラインメントを組み上げて最終的なマルチプルアラインメントを得る方法
- 高速に計算可能であるものの、途中段階のアラインメントに生じたエラーを取り除くことが出来ないため、最終的な精度は反復改善法に比べて低下することが多い
- 累進法の代表的なアルゴリズム：ClustalW、T-Coffee など



ClustalW

http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja

HOME 塩基配列の登録 利用の手引き **検索・解析** FTP・WebAPI レポート・統計 お問い合わせ

HOME > 検索・解析 > ClustalW

ClustalW ヘルプ

Version

2.1 (Latest version)
 1.83 (Modified by Dr. Kirill Kryukov)

Sequences

DNA sequences
 File Upload:
 or COPY & PASTE:

Submit

「bacteria_16S.fas」の中身を
コピー＆ペースト

設定確認してクリック

Pairwise Alignment Parameters

Alignment Type: Slow Fast

Slow Pairwise Alignment Options

DNA Weight Matrix	GAP OPEN	GAP EXTENSION
IUB	10	0.1

Multiple Sequence Alignment Parameters

DNA Weight Matrix	GAP OPEN	GAP EXTENSION	GAP DISTANCES	NO END GAPS
IUB	10	0.20	5	no

ITERATION	NUMITER	CLUSTERING
no	1	NJ

OUTPUT Options

FORMAT	ORDER
Aln w/numbers	aligned

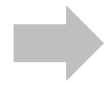
マルチプルアラインメントの結果が表示される

Thermotoga_maritima	CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAA-----ACTCCCTTCGGGGA	88
Thermotoga_petrophila	CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAA-----ACTCCCTTCGGGGA	89
Aquifex_aeolicus	CCTAACACATGCAAGTCGTGCGCAGGGTCGG-----CCCCTTTTGGGGC	92
Hydrogenobacter_thermophilus	CCTAACACATGCAAGTCGTGCG--GGGT-GG-----CTCT-----	80
Hydrogenobaculum_sp	CCTAACACATGCAAGTCGTACGGAGAGTGGGGCA--ACTCA-----	78
Sulfurihydrogenibium_sp	CCTAACACATGCAAGTCGTG-GGGCAGCAGGCTACTACCTTCGGGTAGTA	88
Sulfurihydrogenibium_azorense	CCTAACACATGCAAGTCGTG-GGGCAGCAGGCTATTACCTTCGGGTAATA	97
Escherichia_coli	CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAG-AAGCTTGCTTCTTT--	93
Salmonella_enterica	CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAG-CAGCTTGCTGCTTC--	83
Burkholderia_mallei	CCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGG-----GCTT-CGGCCT---	62
Helicobacter_pylori	CCTAATACATGCAAGTCGAACG--ATGAAGCTTCTAGCTTGCTAGAGT--	92
Campylobacter_jejuni	CCTAATACATGCAAGTCGAACG--ATGAAGCTTTTAGCTTGCTAGAA---	93
Chlamydomphila_pneumoniae	GATGAGGCATGCAAGTCGAACGGTAATGACTTTCGG-TTGTTAT-----	86
Bacillus_subtilis	CCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGGTGGG---AGCTTGCTCCCT---	92
Deinococcus_radiodurans	CTTAAGACATGCAAGTCGAACG-----CGGTCTTCGGAC----	80
Thermus_thermophilus	CCTAAGACATGCAAGTCGTGCGGGCCGCGGGGT----TTTACTCCGT---	90
Pyrococcus_horikoshii	ACTAAGCCATGCGAGTCAAGGGGGCGTC-----CCTTCTGGGAC--	81

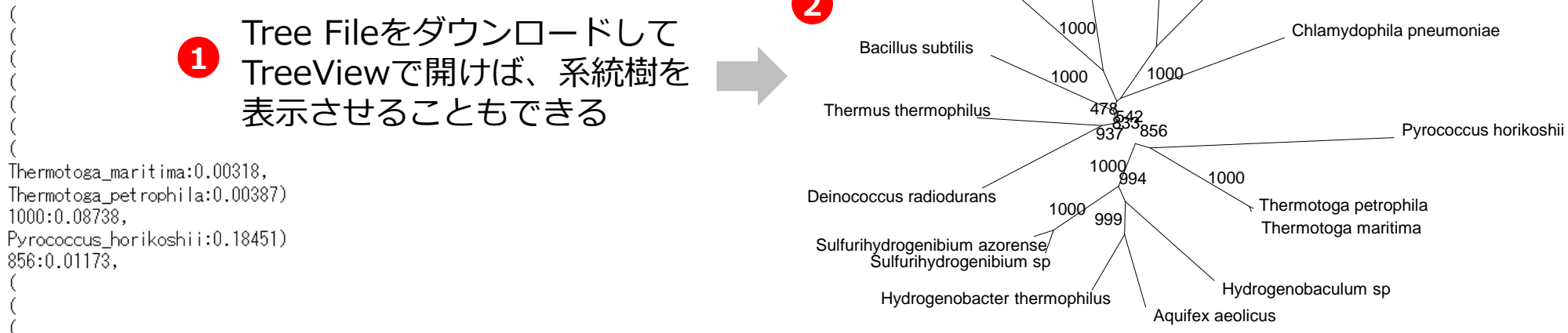
Download Bootstrapped Tree File

1

Tree Fileをダウンロードして
TreeViewで開けば、系統樹を
表示させることもできる



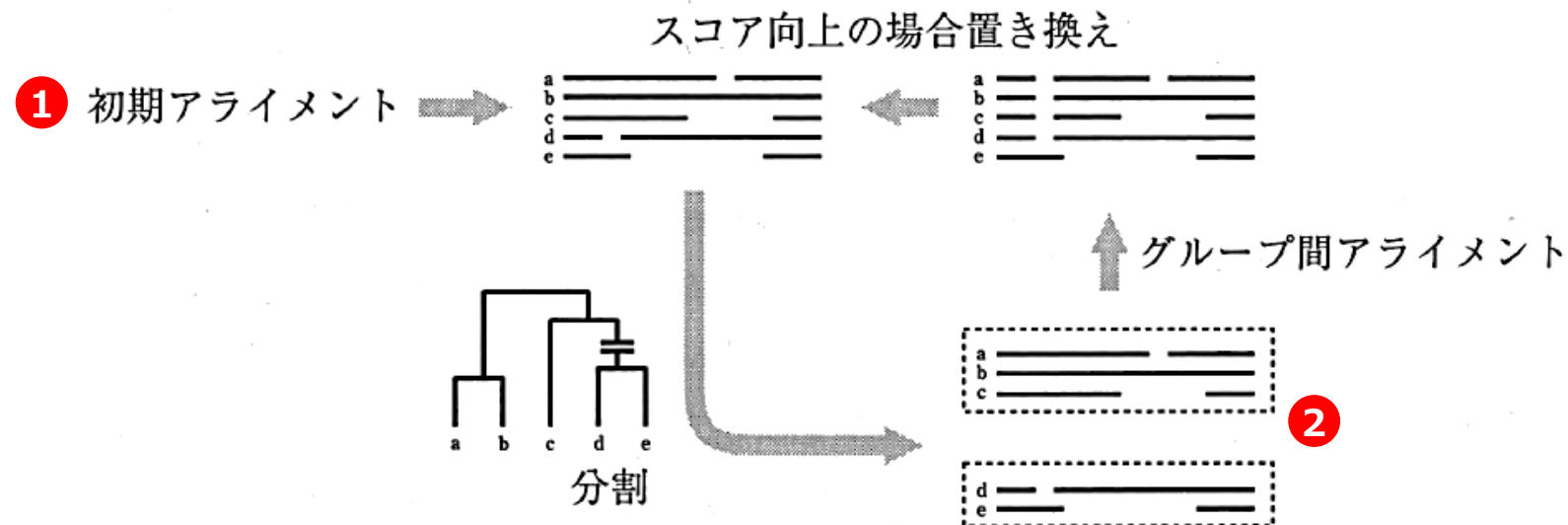
2



```
(
(
(
(
(
(
Thermotoga_maritima:0.00318,
Thermotoga_petrophila:0.00387)
1000:0.08738,
Pyrococcus_horikoshii:0.18451)
856:0.01173,
(
(
(
```

反復改善法

- 累進法などで得られたアラインメントを2つに分割し、それらのアラインメントから再び1つのアラインメントを計算する、ということを繰り返す方法
- アラインメント中のエラーを取り除くことが可能
- 系統樹の枝を切断する形でアラインメントを2つに分割する
- 累進法に比べて計算量が多いものの、高精度なアラインメントを得ることができる
- 代表的なアルゴリズム： Prn、MAFFT、MUSCLE など

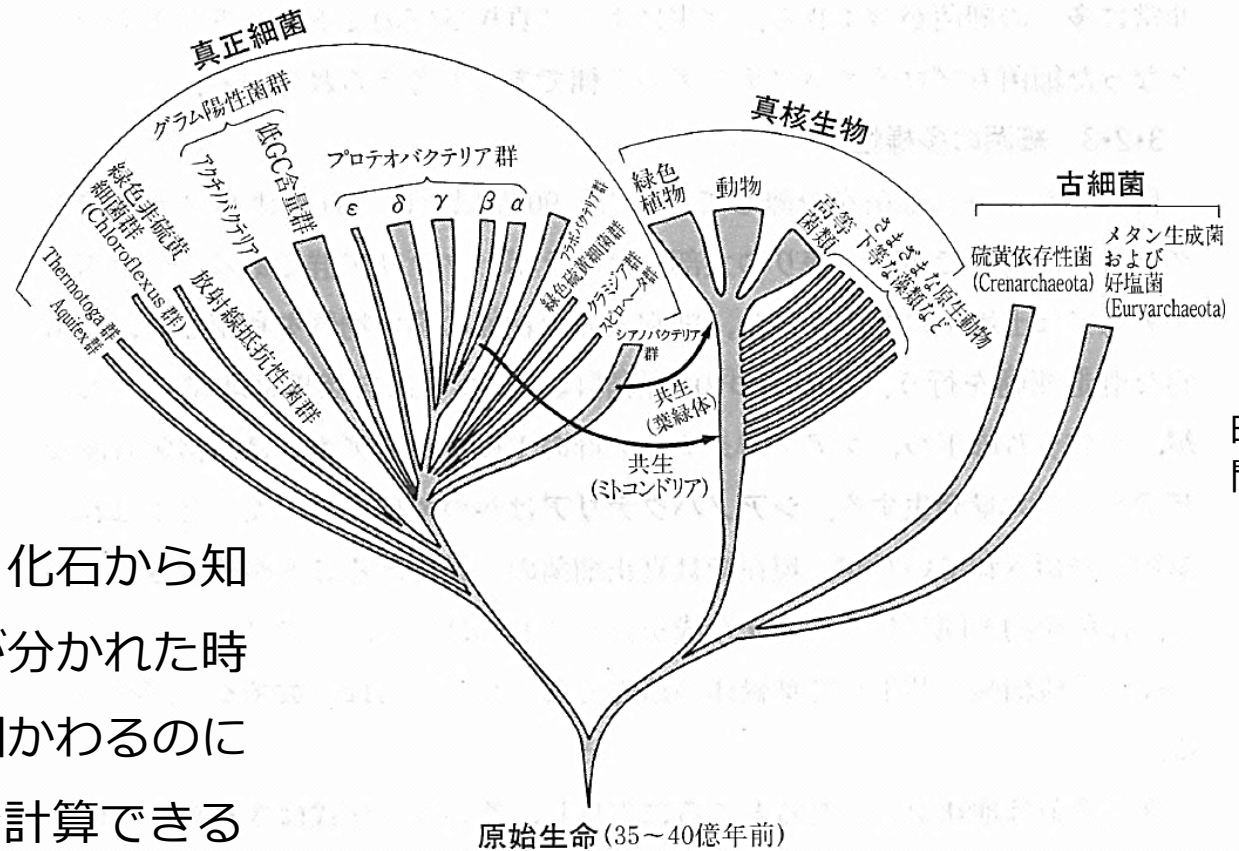


16S rRNAの塩基配列による進化系統解析

DNAに蓄積する変異は**一定の割合**で起こっており、そのほとんどが自然選択とは無関係な**中立の変異**である



DNAの配列がどのくらい似ているかを調べることによって、進化的にどの程度近縁であるかを知ることができる



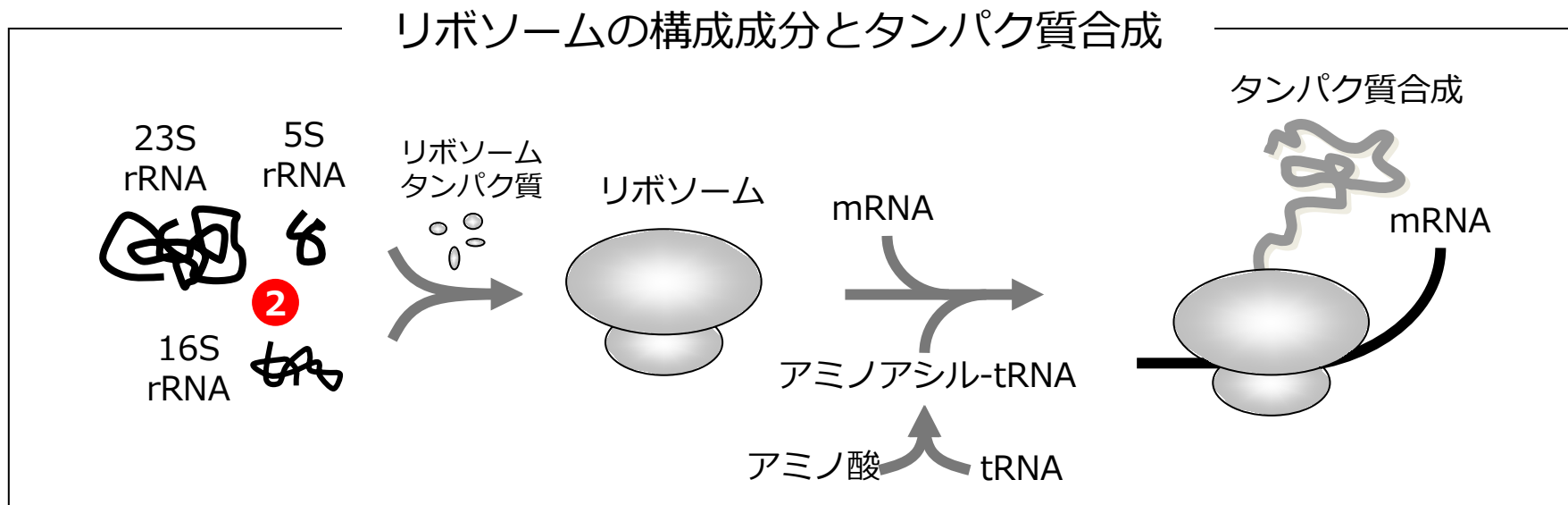
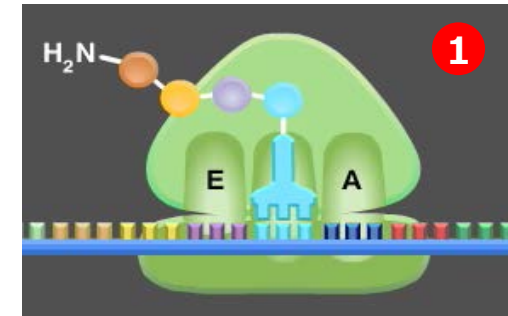
分子時計

アミノ酸の変化した数と、化石から知られる2つの系統の生物が分かれた時期とから、アミノ酸が1個かわるのにどれだけ時間がかかるかを計算できる

図3・5 リボソーム RNA の構造に基づいて推定された生物の進化

なぜリボソームRNAが系統解析によく使われるのか？

- タンパク質合成は生物にとって**必須の機能**
 - どの生物でもリボソームRNA遺伝子をもっている
- **RNAのままに機能する**（翻訳されない）ので、進化の過程で変異が生じにくい（同義置換のような変異が起こらない）
 - **配列が保存されている**ので遠縁の生物とでも比較できる
 - DNA増幅のための**プライマー**を設計しやすい



リボソームは、**3種類のrRNA**と数十個の**リボソームタンパク質**から構成される

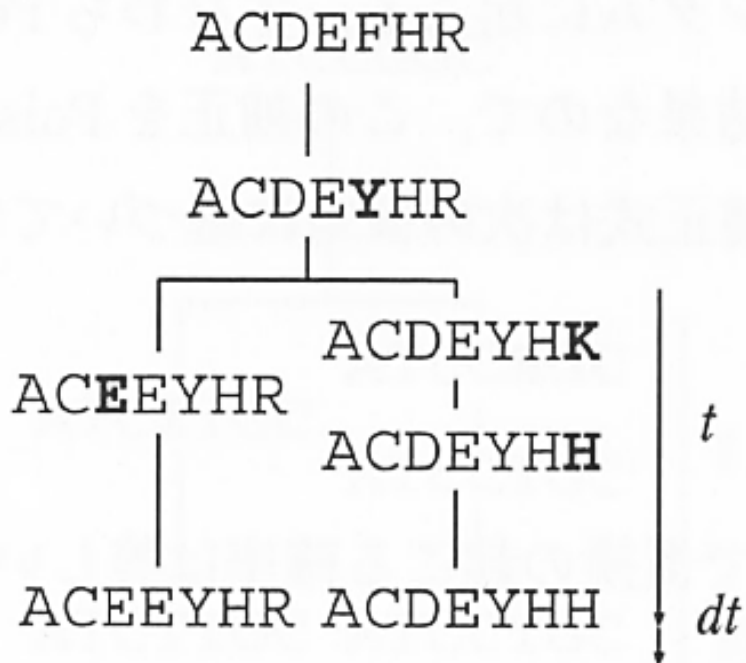
進化距離の計算

- 共通の祖先に由来する2つの配列において、それらが分岐してから現在までに蓄積した置換の数を置換数といい、置換数を座位数で割ったものを**進化距離**という
- 進化距離の推定値は、距離行列法による系統樹の計算などに用いられる
- 進化距離は、基本的に2つの配列の類似性に基づいて推定されるが、そのためのいろいろな方法が存在する

- 類似性の指標としてもっとも単純なものは**相違度**である
- 相違度Dは、2本の配列の間で一致しない座位の数を、比較した座位の数で割ったものである

$$D = \frac{\text{一致しない座位数}}{\text{比較する座位数}}$$

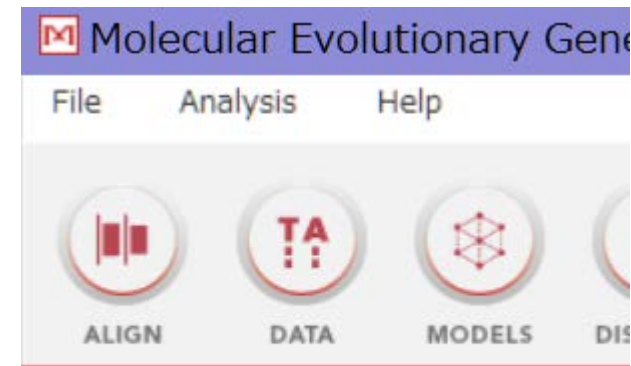
- 実際には、「相違度」と「進化距離」とは比例関係にはない
- 相違度を見ただけでは、
 - ・ **多重置換**：同一の座位に複数回の置換が起こること
 - ・ **復帰置換**：祖先型に戻るような置換
 を無視してしまうからである



ACEEYHR
 :: ::
 ACDEYHH

$D = 2 / 7$

MEGAなどの系統樹作成ソフトを使用して計算する



ファイルを開く

- メニュー File → Open A File
- 「bacteria_16S.fas」を選ぶ
- How would you like to open this fasta file? と聞かれるので
- Align を選択

アラインメントを作成

- Alignment Explorerが開く
- メニュー Alignment
- Align by Muscle
- Select all? と聞かれるので
- OK を押す
- Muscleの設定ウィンドウが開く
- Compute
- アラインメントの結果が表示される

MX: Alignment Explorer (bacteria_alaS.fas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

Protein Sequences

Species/Abbrv	*
1. Hydrogenobacter_therm	M F S T D E I R E L F L S F F E K K G H V R V R S A P L V P E S D P T L L F V N A G M V
2. Aquifex_zeolicus	M S L S A H E I R E L F L S F F E K K G H T R Y K S A P L V P E N D P T L L F V N A G M
3. Hydrogenobaculum_sp	M K T D E I R E K F L S F F E N K G H T V Y K S S S I V P K S D P T L L F V N A G M V P
4. Sulfurihydrogenibium_az	M E F M A A D E I R E S F L K Y F E S K G H T I V K S A S I I P E N D P T L L F V N A G
5. Sulfurihydrogenibium_sp	M K Y M T A D E I R Q S F L K Y F E S K G H T I V K S A S I I P E N D P T L L F V N A G
6. Persephonella_marina	M K F L T A N G I R E S F L R Y F E E R G H T R Y K S A S I I P E T D P T L L F V N A G
7. Thermotoga_pectrophila	M R Y M T S E E I R E A F L K F F E K K G H K I L P S A S L I P D D P Q L L F T V A G M
8. Thermotoga_maritima	M R Y M T S E E I R E A F L K F F E K K G H K I L P S A S L I P D D P Q L L F T V A G M
9. Escherichia_coli	M S K S T A E I R Q A F L D F F H S K G H Q V V A S S S L V P H N D P T L L F T N A G M
10. Salmonella_enterica	M S K S T A E I R Q A F L D F F H S K G H Q V V A S S S L V P N N D P T L L F T N A G M
11. Campylobacter_jejuni	M D I R K A Y L D F F A S K G H E I T P S S P L V P D D A T L L F T N A G M V P F K S I
12. Helicobacter_pylori	M D I R N E F L G F F G N K G H A Y Y P S M P L V P N D A T L L F T N A G M V G F K D I
13. Thermus_thermophilus	M R T A E I R E K F L S F F E G K G H L R L P S F S L I P E D D P S L L F T S A G M A P
14. Deinococcus_radiodur	M T A P L T T A E I R E R Y L Y F F E T K G H L R L P S H S T I A P D P T L L F T V A G

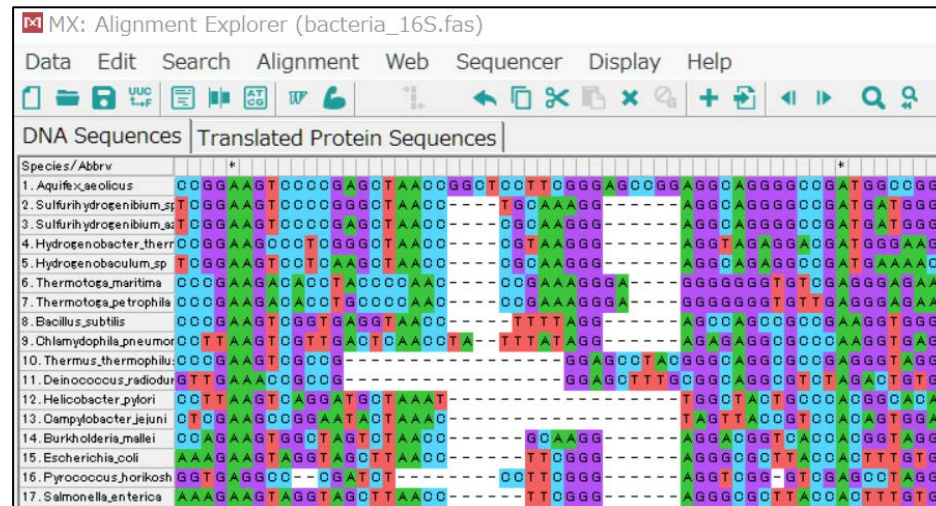
MUSCLE Alignment Options

Option	Setting
GAP PENALTIES	
Gap Open	-2.90
Gap Extend	0.00
Hydrophobicity Multiplier	1.20
MEMORY/ITERATIONS	
Max Memory in MB	2048
Max Iterations	16
ADVANCED OPTIONS	
Cluster Method (Iterations 1,2)	UPGMA
Cluster Method (Other Iterations)	UPGMA
Min Diag Length (Lambda)	24

? Help Reset Cancel OK

MEGA形式で保存する

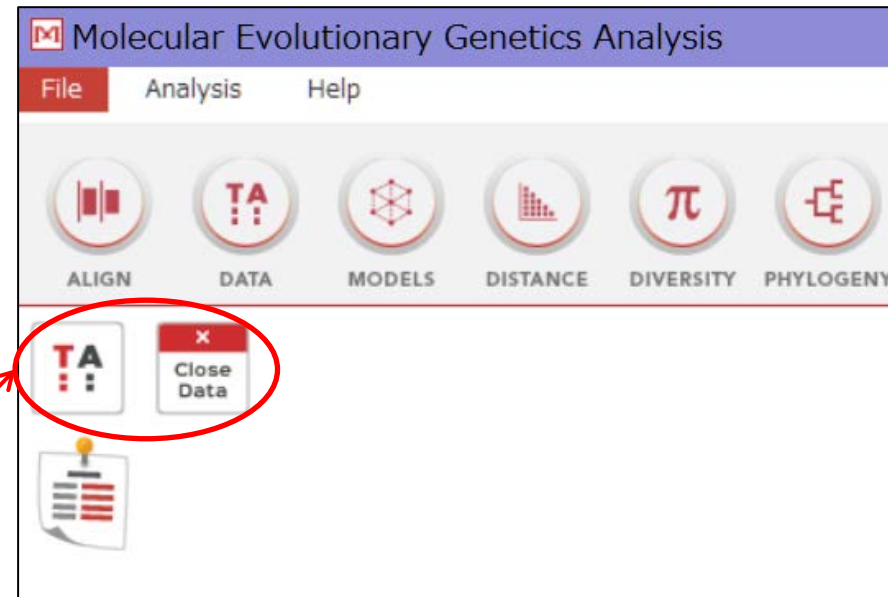
- メニュー Data
- Export Alignment
- MEGA format
- 保存
- Title : 入力しなくても大丈夫
- Protein-coding nucleotide data? と聞かれるので No を選択



メインウィンドウに移行する

- メニュー Data
- Phylogenetic analysis
- Protein-coding nucleotide data? と聞かれるので No を選択
- メインウィンドウに戻る

これが表示されるようになる



系統樹を作成

- Phylogeny
- Construct UPGMA Tree
- 設定画面が表示される

- Test of Phylogeny : None
- Model/Method : Jukes-Cantor
- Rates among Sites : Uniform rates
- Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion

- Compute

MX: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction

Option	Setting
ANALYSIS	
Scope	→ All Selected Taxa
Statistical Method	→ UPGMA
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ None
No. of Bootstrap Replications	→ Not Applicable
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ Nucleotide
Model/Method	→ Kimura 2-parameter model
Substitutions to Include	→ d: Transitions + Transversions
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	→ Gamma Distributed (G)
Gamma Parameter	→ 1.00
Pattern among Lineages	→ Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ Complete deletion
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ Not Applicable

? Help X Cancel ✓ OK


- Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion

MX: Alignment Explorer (bacteria_16S.fas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

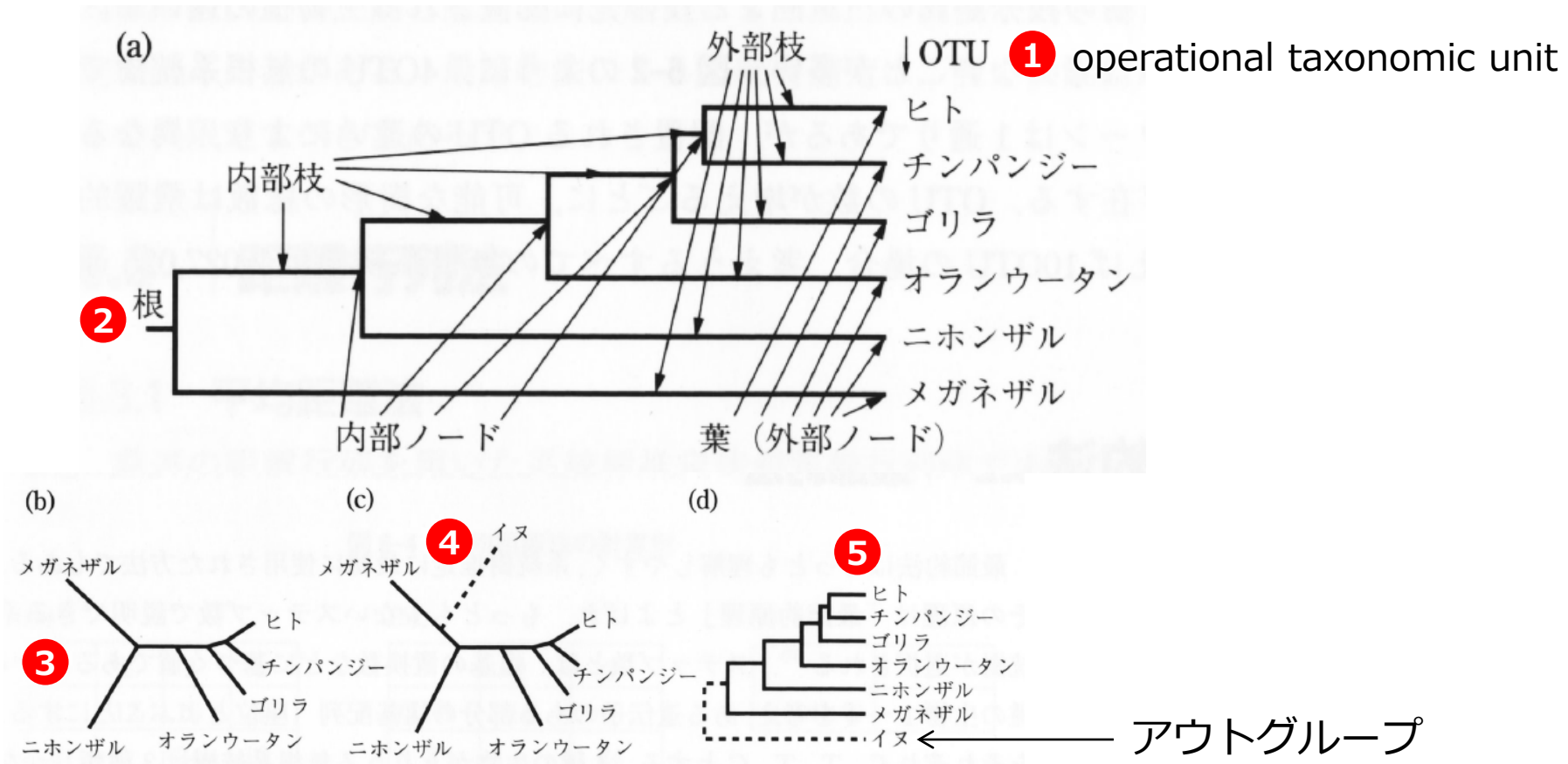
Species/Abbrv		*																						*	
1. Aquifex_aeolicus	C	O	G	G	A	A	G	T	C	O	C	C	G	A	G	C	T	A	A	O	C	C	G	G	C
2. Sulfurihydrogenibium_sp	T	C	G	G	A	A	G	T	C	O	C	C	G	G	G	C	T	A	A	O	C	C	G	G	C
3. Sulfurihydrogenibium_sp	T	C	G	G	A	A	G	T	C	O	C	C	G	A	G	C	T	A	A	O	C	C	G	G	C
4. Hydrogenobacter_ther	C	O	G	G	A	A	G	C	O	C	T	C	G	G	G	C	T	A	A	O	C	C	G	G	C
5. Hydrogenobaculum_sp	T	C	G	G	A	A	G	T	C	O	C	C	A	A	G	C	T	A	A	O	C	C	G	G	C
6. Thermotoga_maritima	C	O	G	A	A	G	A	C	A	C	O	T	A	C	C	C	A	A	C	C	C	C	A	A	C
7. Thermotoga_petrophila	C	O	G	A	A	G	A	C	A	C	O	T	G	C	C	C	A	A	C	C	C	C	A	A	C
8. Bacillus_subtilis	C	O	G	A	A	G	T	C	G	G	T	G	A	G	G	T	A	A	O	C	C	C	G	G	C
9. Chlamydomonas_pneumoniae	C	O	T	A	A	G	T	C	G	T	T	G	A	C	T	C	A	A	O	C	T	A	A	C	
10. Thermus_thermophilus	C	O	G	A	A	G	T	C	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
11. Deinococcus_radiodurans	G	T	G	A	A	A	C	C	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
12. Helicobacter_pylori	C	O	T	A	A	G	T	C	A	G	G	A	T	G	O	T	A	A	A	T	C	C	C	C	C
13. Campylobacter_jejuni	C	O	T	C	G	A	A	G	C	O	G	G	A	A	T	A	C	T	A	A	A	C	C	C	C
14. Burkholderia_mallei	C	O	A	G	A	A	G	T	G	G	C	T	A	G	T	C	T	A	A	O	C	C	C	C	C
15. Escherichia_coli	A	A	A	G	A	A	G	T	A	G	G	T	A	G	C	T	T	A	A	O	C	C	C	C	C
16. Pyrococcus_horikoshii	G	G	T	G	A	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
17. Salmonella_enterica	A	A	A	G	A	A	G	T	A	G	G	T	A	G	C	T	T	A	A	O	C	C	C	C	C



◆ 通常は、ギャップを含むサイトを無視して系統樹を作成する

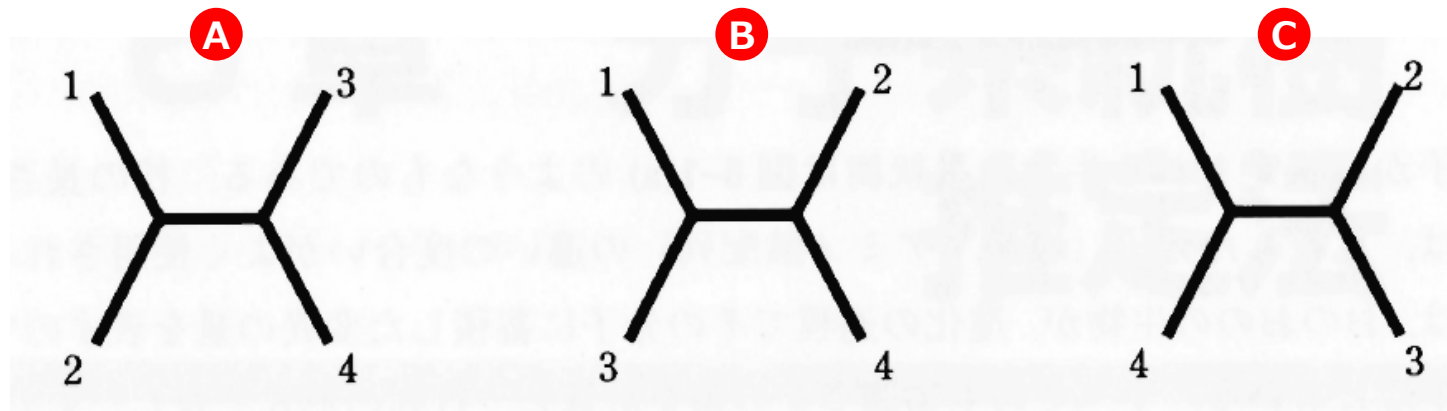
クラスター分析 cluster analysis

2つ以上の対象を、それらの間の類似度あるいは非類似度を手がかりにして似たものを集め、いくつかのグループ（クラスター）に分類する方法



- 霊長類だけの系統樹だと、系統関係はわかるが、どのように進化してきたのかはわからない
- アウトグループとしてイヌを加えると、根は点線のどこかにあることは確実なので、有根化することができる

4 OTU の場合にとりうる3つの無根系統樹

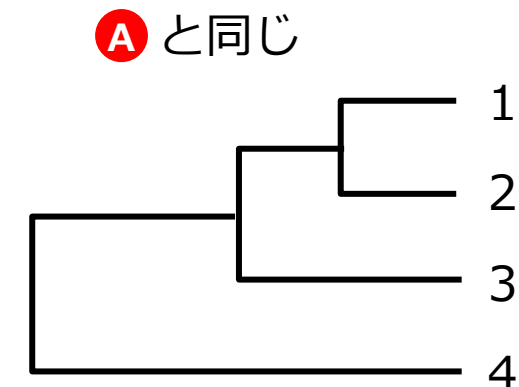


10 OTUの場合は、考えるすべての無根系統樹は 2,027,025通り存在する

系統樹を作成するためのクラスタリング法には

- UPGMA
- 近隣結合法
- 最尤法
- ベイズ法

など、様々な方法がある



UPGMA (平均距離法、非加重結合法)

Sokal & Michener (1985)

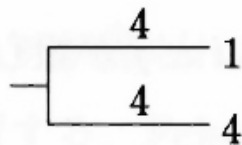
Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

- **距離の算術平均**の小さなものから結合することにより得られる樹形を選ぶ、段階的探索法の一つ
- **進化速度の一定性**が仮定されるため、**有根系統樹**が得られる
- 一番簡単な方法で計算も容易であるが、進化速度一定の仮定が必要であるため、進化速度が系統間で異なるときは誤った推定を行いやすい。

平均距離法の計算例

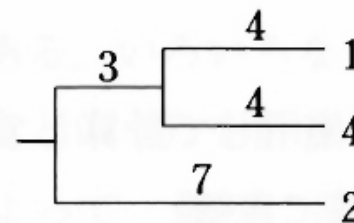
1

	2	3	4
1	12	16	8
2		24	16
3			16



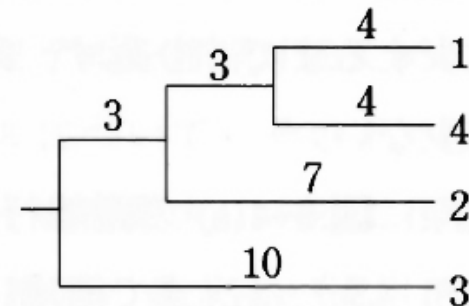
2

	2	3
(1, 4)	14	16
2		24



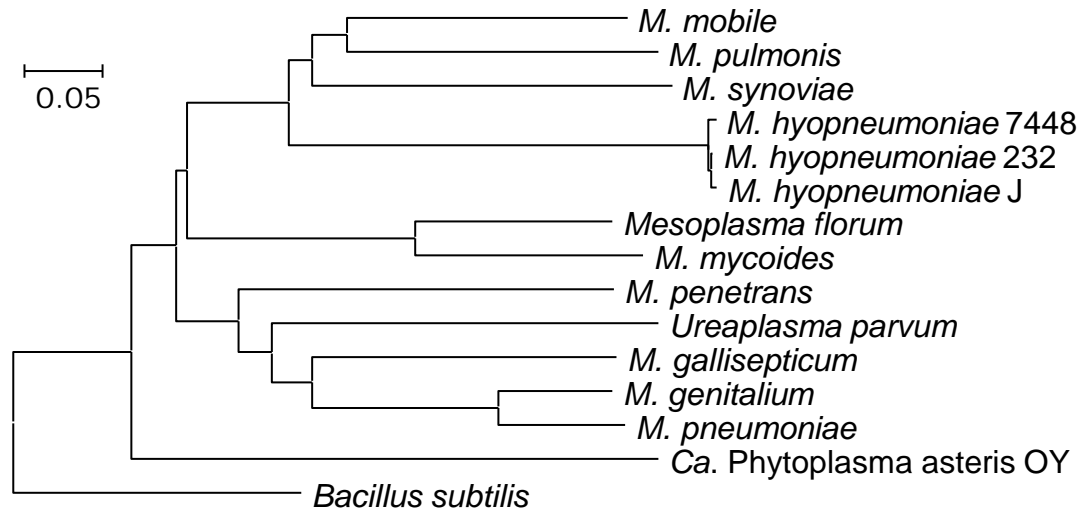
3

	3
((1, 4), 2)	20

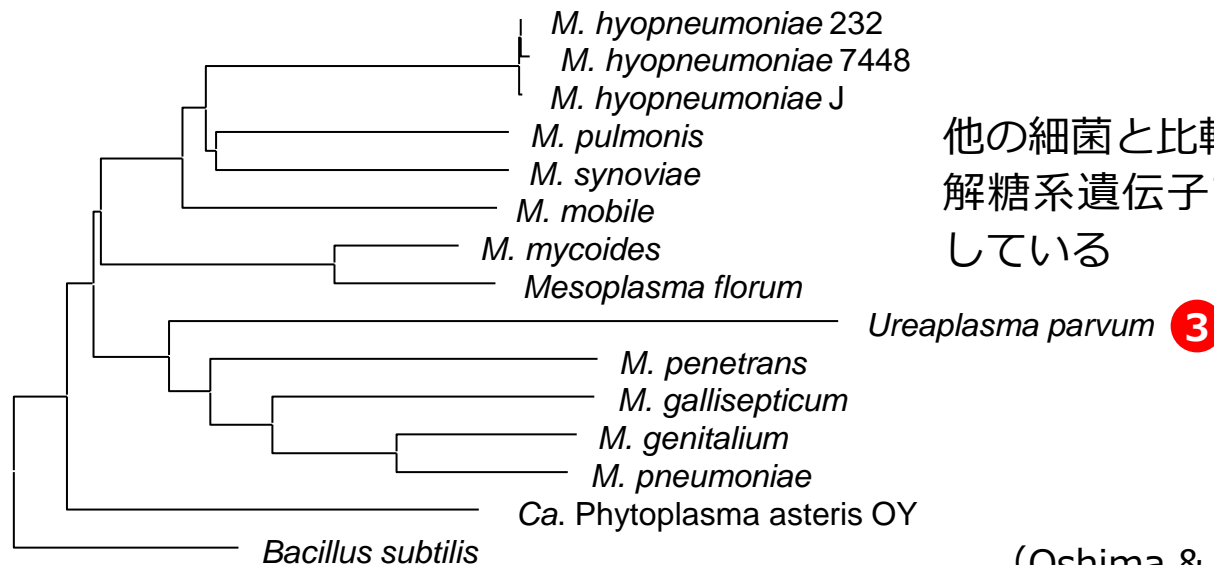


進化速度が系統間で異なる例

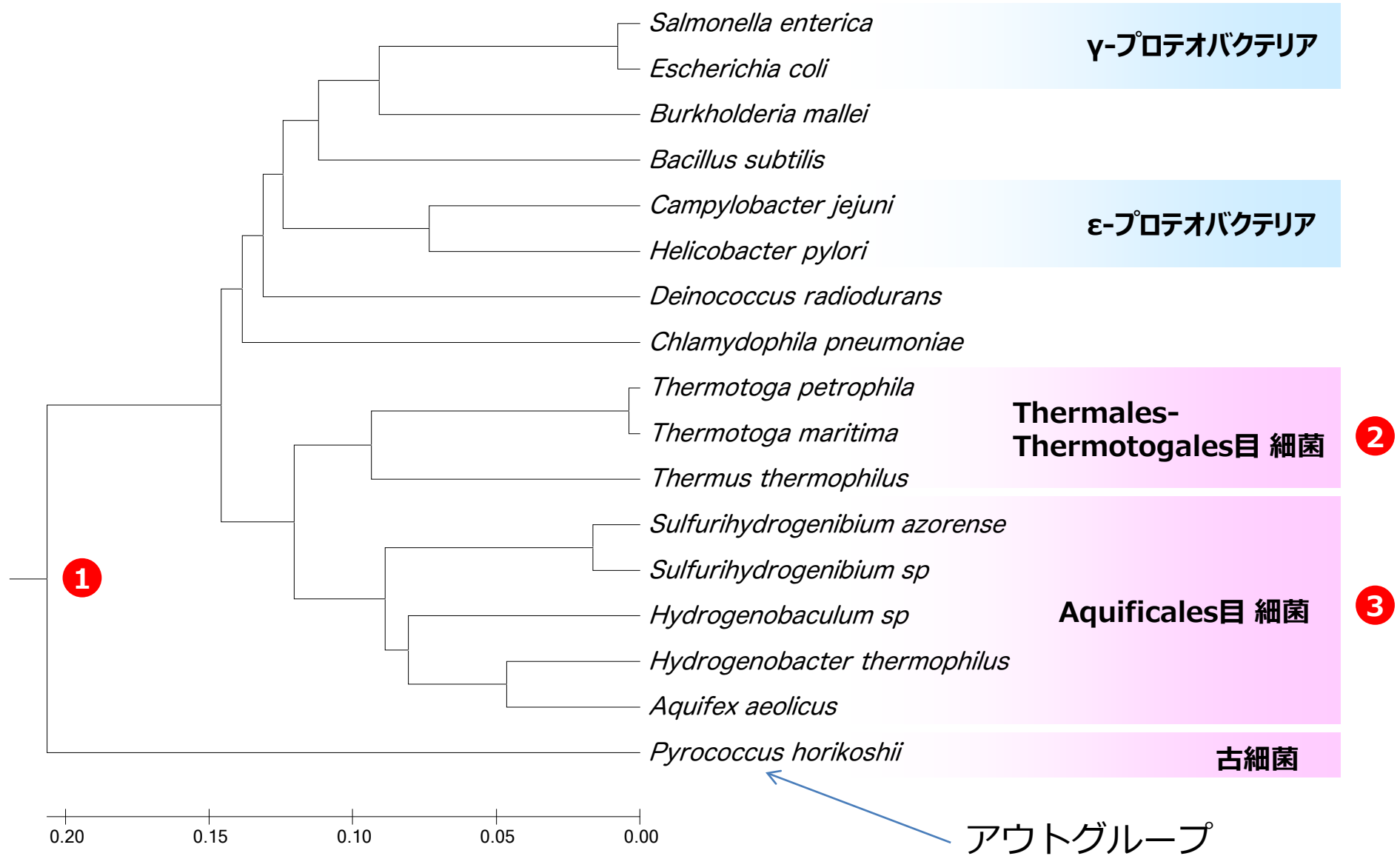
① UvrAのアミノ酸配列を用いた系統樹



② Enolaseのアミノ酸配列を用いた系統樹



他の細菌と比較して *Ureaplasma parvum* の解糖系遺伝子では高い置換頻度で変異が蓄積している

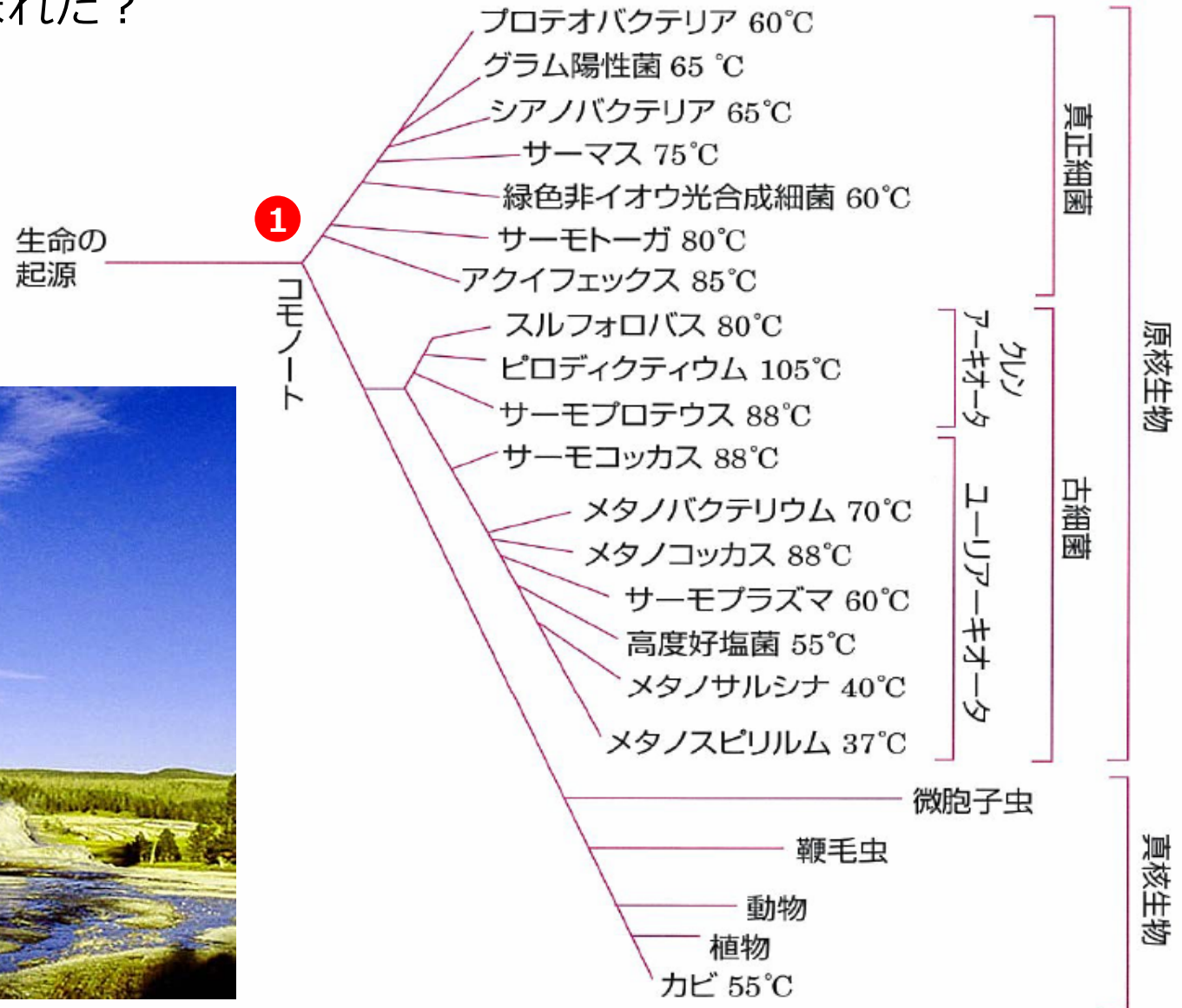


■ 生命の起源にもっとも近いのは、どのバクテリアのグループなのか？

原始生命は熱水中で生まれた？



イエローストーン国立公園の間欠泉



● 図 9.1 全生物界の分子系統樹 ●

最節約法による系統樹を作成

- Phylogeny
- Construct Maximum parsimony
- 設定画面が表示される

MX: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction

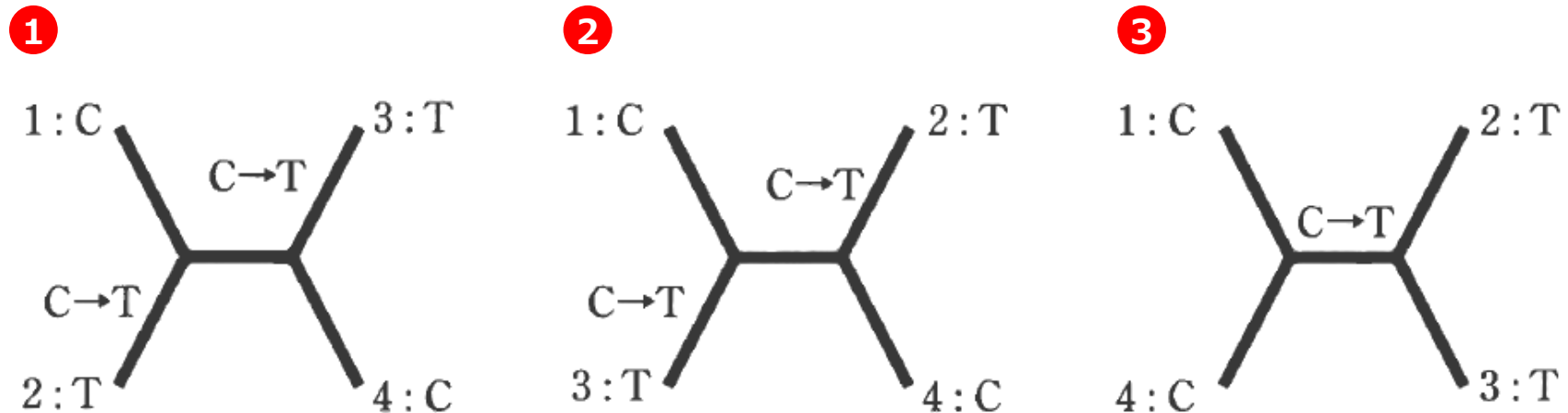
Option	Setting
ANALYSIS	
Statistical Method	→ <i>Maximum Parsimony</i>
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ <i>None</i>
No. of Bootstrap Replications	→ Not Applicable
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ <i>Nucleotide</i>
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ <i>Use all sites</i>
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable
TREE INFERENCE OPTIONS	
MP Search Method	→ <i>Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)</i>
No. of Initial Trees (random addition)	→ <i>10</i>
MP Search level	→ <i>1</i>
Max No. of Trees to Retain	→ <i>100</i>
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ Not Applicable

? Help X Cancel ✓ OK

- Test of Phylogeny : None
- Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
- Compute

最節約法（最大節約法、Maximum parsimony）

- 考えられるすべての系統樹の中から、**形質の変化の数が最も少ないもの**を選択する方法
- 配列の座位毎に必要な変異の数を数え、**総変異数が最小の系統樹**を採用する



- 最節約法では、同じ配列の同じ部位に2回以上の置換が起きると（**多重置換**）、推定を誤ることがある
- 最節約法による系統樹推定は、互いの配列が比較的類似したもの限定すべき

近隣結合法による系統樹を作成

- Phylogeny
- Construct Neighbor-Joining Tree
- 設定画面が表示される
 - Test of Phylogeny : None
 - Model/Method : Jukes-Cantor
 - Rates among Sites : Gamma Distributed
 - Gamma Parameter : 1
 - Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
- Compute

MX: Analysis Preferences	
Phylogeny Reconstruction	
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope	→ All Selected Taxa
Statistical Method	→ Neighbor-joining
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	→ 500
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ Nucleotide
Model/Method	→ Kimura 2-parameter model
Substitutions to Include	→ d: Transitions + Transversions
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	→ Gamma Distributed (G)
Gamma Parameter	→ 1.00
Pattern among Lineages	→ Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ Complete deletion
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ 3

? Help X Cancel ✓ OK

近隣結合法

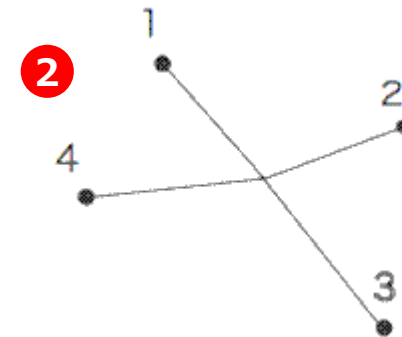
(neighbor-joining method、略してNJ法)

Saitou N. and Nei M. (1987)

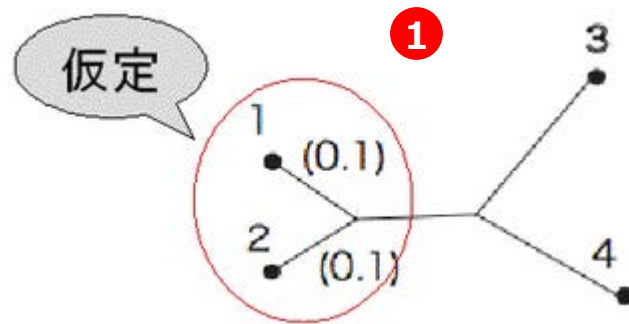
- 系統樹を段階的に構成するアルゴリズムのクラスタ解析法
- アルゴリズムの各段階で「**全ての枝の長さの合計が最小**」となるようなトポロジーが望ましいという基準に基づいている
- 最終的に全枝長を最小にするトポロジーが得られるとは限らない（が、多くの場合、最適なものに非常に近い系統樹が得られることが分かっている）

①

配列	1	2	3	4
1				
2	0.2			
3	0.1	0.3		
4	0.4	0.4	0.5	

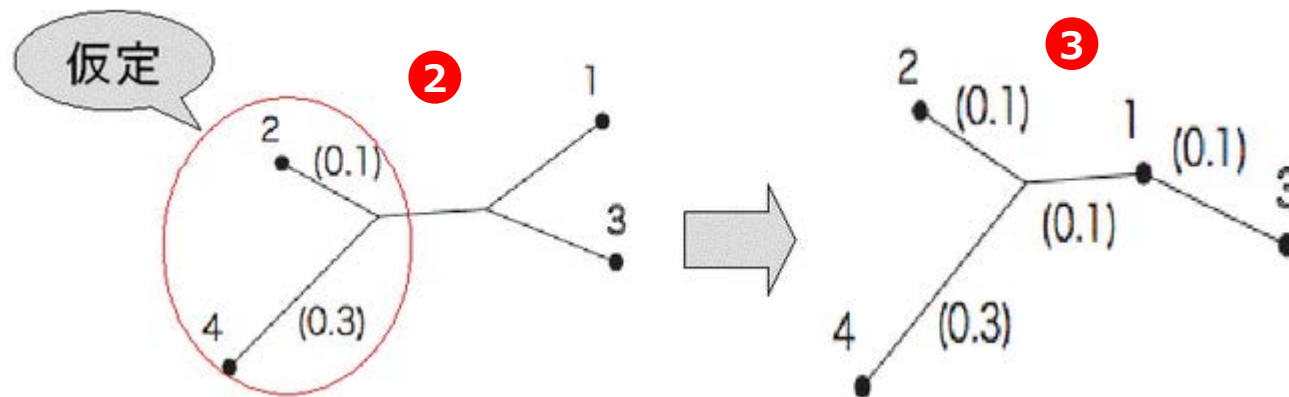


- ✓ まず、放射状の系統樹を仮定します
- ✓ 次に特定の配列が、二本の枝でつながる近隣関係にあると仮定して、系統樹全体に必要な枝の長さを計算します



配列 1 と 2 が近隣関係にあると仮定していますが、
これでは配列 1 と 3、配列 2 と 3 の距離関係をうまく表すことができません

- ✓ そこで今度は配列 2 と 4 が近隣関係にあると仮定してみると、全ての距離関係をうまく表すことができます



- 計算効率が高く、ほかの系統解析法（最大節約法、最尤法、ベイズ法など）では計算能力的に不可能なほどの大量のデータセットでも扱うことが可能である
- UPGMAと異なり、近隣結合法はすべての系統が同じ速度で進化する（分子時計の仮説）ことを仮定せずに無根系統樹を作ることができる

Jukes-Cantor model

JukesとCantorが1969年に提案したモデル。どの塩基サイト(A,G,C,T)でも同じの変化率 α で互いに变化すると仮定している。

	A	G	C	T
A	-	α	α	α
G	α	-	α	α
C	α	α	-	α
T	α	α	α	-

Kimura 2-parameter model

Kimura が1980年に提案したモデル。サイト当たりの変化率を次のように仮定している。

	A	G	C	T
A	-	α	β	β
G	α	-	β	β
C	β	β	-	α
T	β	β	α	-

トランジションと
トランスバージョン

塩基置換には、プリン間 ($A \Leftrightarrow G$) やピリミジン間 ($C \Leftrightarrow T$) の置換である転位 (トランジション) と、それ以外の置換である転換 (トランスバージョン) とがある。一般に、トランジションの方が起こりやすい。

Tamura 3-parameter model

Tamuraが1992年にK80モデルを一般化したモデル。塩基頻度(GとCの頻度) $\theta = \pi_G + \pi_C$ を用いる。

	A	G	C	T
A	-	$\alpha\theta$	$\beta\theta$	$\beta(1-\theta)$
G	$\alpha(1-\theta)$	-	$\beta\theta$	$\beta(1-\theta)$
C	$\beta(1-\theta)$	$\beta\theta$	-	$\alpha(1-\theta)$
T	$\beta(1-\theta)$	$\beta\theta$	$\alpha\theta$	-

Tamura-Nei model

Tamura と Neiが1993年に提案したモデル。A⇌C,C⇌Tが異なる比率 α_R, α_Y で置換すると仮定している。

	A	G	C	T
A	-	$\pi_G \omega$	$\beta \pi_C$	$\beta \pi_T$
G	$\pi_A \omega$	-	$\beta \pi_C$	$\beta \pi_T$
C	$\beta \pi_A$	$\beta \pi_G$	-	$\pi_T \psi$
T	$\beta \pi_A$	$\beta \pi_G$	$\pi_C \psi$	-

$$\omega = \alpha_R / \pi_R + \beta$$

$$\psi = \alpha_Y / \pi_Y + \beta$$

$\alpha_R / \alpha_Y = \pi_R / \pi_Y$ であるとHasegawa, Kisino and Yanogaが1985年に提案したモデル (HKY) に等しい。

一般時間反転可能モデル(general time-reversible : **GTR**)

From \ To	A	C	G	T
A	-	$Rate_{AC} Freq_C$	$Rate_{AG} Freq_G$	$Rate_{AT} Freq_T$
C	$Rate_{AC} Freq_A$	-	$Rate_{CG} Freq_G$	$Rate_{CT} Freq_T$
G	$Rate_{AG} Freq_A$	$Rate_{CG} Freq_C$	-	$Rate_{GT} Freq_T$
T	$Rate_{AT} Freq_A$	$Rate_{CT} Freq_C$	$Rate_{GT} Freq_G$	-

$Rate_{XY}$ は塩基Y から塩基X への移行速度、 $Freq_X$ は塩基X の頻度
 ただし、 $Rate_{XY} = Rate_{YX}$ とする (これを「時間反転可能」[time-reversible] という)
 (Tavar'e, 1986, Posada and Crandall, 1998)

Bootstrap

- 作成した系統樹の**信頼性**を評価する方法
- 系統樹の作成に用いたアミノ酸配列を大量に**複製(リサンプリング)**し、それぞれのリサンプルデータから推定される系統樹が元データの系統樹を支持する確率を求める

1 元のデータ

```
data1: MNDRQAALDQALKQIEKQFG  
data2: MACGGEKKTEANPETYPDKP  
data3: MSENNO SNQNNQILKIIKST  
data4: MTAEKSKALAAALAQIEKQF
```

2 リサンプルデータ

```
data1: MDAIMKAGDADGKRQFQQAA  
data2: MTETMPKPSKCPPGEKEDAK  
data3: MQQKMISTESETINLSNKNS  
data4: MLSQMEKFAKAFLEAQAKAK
```

- 元の配列データの長さと同じになるまで、データの各列を**ランダムに抜き出して生成**
- 同じ列を何回使っても良い

課題 1

近隣結合法による系統樹を作成 2

- Phylogeny
- Construct Neighbor-Joining Tree
- 設定画面が表示される
 - Test of Phylogeny : Bootstrap
 - No of Bootstrap Replications : 1000
 - Model/Method : Kimura 2-parameter model
 - Substitutions to Include : Transitions + Transversions
 - Rates among Sites : Gamma Distributed
 - Gamma Parameter : 1
 - Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
- Compute
- File → Save Current Session → 「kadai1」というファイル名で保存

The screenshot shows the 'MX: Analysis Preferences' dialog box, specifically the 'Phylogeny Reconstruction' tab. The dialog is organized into several sections with a table-like structure of options and settings.

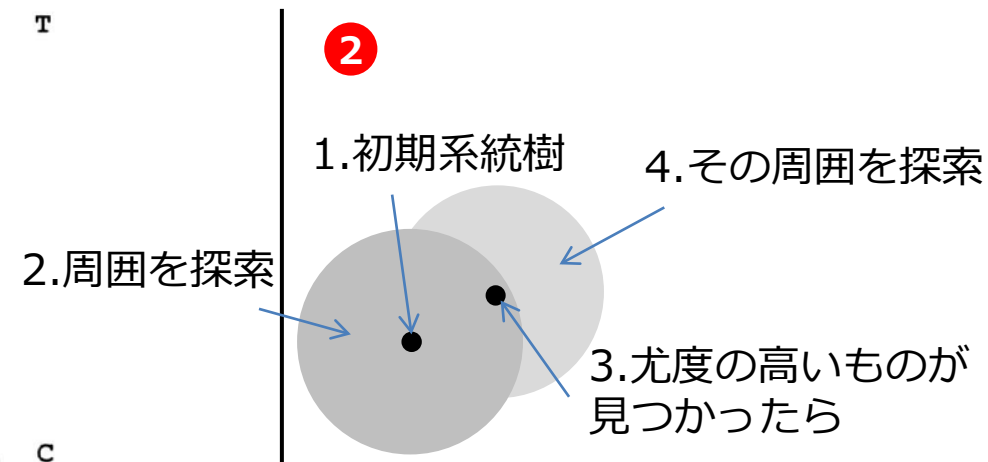
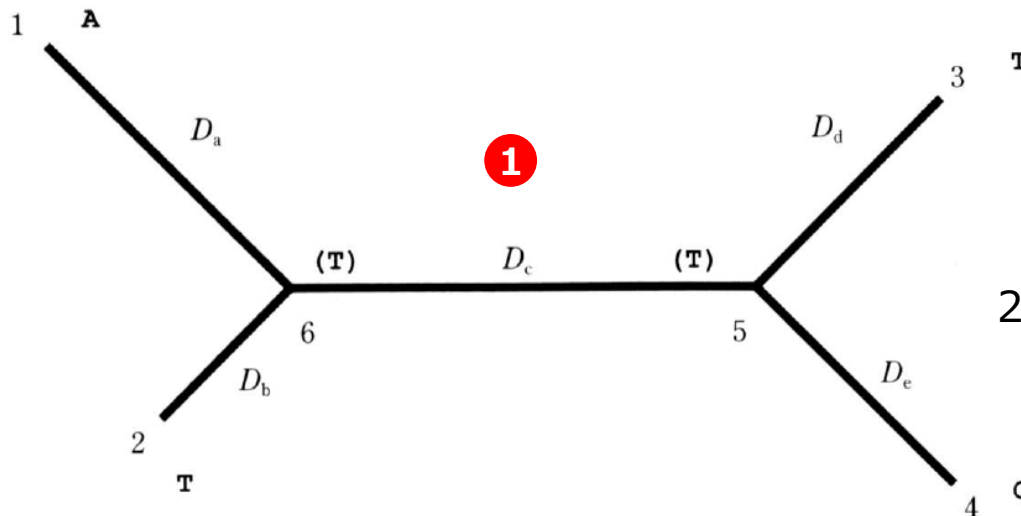
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope	All Selected Taxa
Statistical Method	Neighbor-joining
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	500
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	Nucleotide
Model/Method	Kimura 2-parameter model
Substitutions to Include	d: Transitions + Transversions
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	Gamma Distributed (G)
Gamma Parameter	1.00
Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	Complete deletion
Site Coverage Cutoff (%)	Not Applicable
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	3

At the bottom of the dialog, there are three buttons: a Help button (with a question mark icon), a Cancel button (with an 'X' icon), and an OK button (with a checkmark icon).

最尤法 (Maximum likelihood estimation)

(Felsenstein, J. Mol. Evol., 1981))

- 想定される樹形ごとに手持ちの配列が得られる「尤度」を求め、**最も尤度の高い樹形**を採用する方法
- 塩基やアミノ酸配列の置換に関する確率モデルを仮定した上で、尤度を計算する
- 難点は計算量が多いこと → NJ法などで生成した初期系統樹と、それを枝交換して改変した系統樹の尤度を計算し、比較することを繰り返す
→ 発見的探索 (heuristic search)



$$l_D(i) = \sum_{s_5, s_6} f(s_5) P_{s_5 T}(D_d) P_{s_5 C}(D_e) P_{s_5 s_6}(D_c) P_{s_6 A}(D_a) P_{s_6 T}(D_b)$$

尤度とは？

- あるモデルが正しいと仮定した状況で手元のデータが得られる確率
- データに対するモデルの当てはまりの良さを表す

10 回のコイントスを行って表が1 回、裏が9 回出たとき

1 モデル1

「このコインを使ったコイントスでは表と裏が 1 : 9 の比率で出る」

$$\text{尤度}L_1 = (1/10) \times (9/10)^9 = 0.0387$$

2 モデル2

「このコインを使ったコイントスでは表と裏が等確率で出る」

$$\text{尤度}L_2 = (1/2)^{10} = 0.000977$$

$L_1 > L_2$ であることから、前者の方が当てはまりが良い（尤もらしいモデル）ということになります

最適なモデル選択

- Models
- Find Best DNA/Protein Models
- 設定画面が表示される
 - Tree to Use : Automatic
 - Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
- Compute

MX: Analysis Preferences

Model Selection (ML)

Option	Setting
ANALYSIS	
Tree to Use →	Automatic (Neighbor-joining tree)
User Tree File →	Not Applicable
Statistical Method →	Maximum Likelihood
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type →	Nucleotide
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment →	Use all sites
Site Coverage Cutoff (%) →	Not Applicable
Branch Swap Filter →	None
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads →	3

? Help X Cancel OK

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	$\ln L$	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)
TN93+G	37	22022.299	21726.161	-10826.017	n/a	0.42	1.33	0.242	0.181
GTR+G	40	22023.441	21703.303	-10811.577	n/a	0.42	1.33	0.242	0.181
TN93+G+I	38	22030.159	21726.020	-10824.943	0.12	0.54	1.33	0.242	0.181
1 GTR+G+I	41	22031.038	21702.900	-10810.372	0.12	0.55	1.33	0.242	0.181
T92+G	34	22031.146	21759.009	-10845.451	n/a	0.41	1.31	0.211	0.211

L : 最大尤度

- 3** AIC (赤池情報量規準) = $-2 \ln L + 2k$ (k : 自由パラメータ数)
 BIC (ベイズ情報量規準) = $-2 \ln L + k \ln(n)$ (n : 標本数)
 統計モデルの良さを評価するための指標

2 $\ln L$: 対数尤度

最尤法による系統樹を作成

- Phylogeny
- Construct Maximum Likelihood Tree
- 設定画面が表示される

- Test of Phylogeny : None
- ① • Model/Method : General Time Reversible model
- ② • Rates among Sites : Gamma Distributed with Invariant sites (G+I)
 - No of Discrete Gamma Parameter : 5
 - Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
 - ML Heuristic Method : Nearest-Neighbor-interchange (NNI)
 - Initial Tree for ML : Make initial tree automatically
 - Branch Swap Filter : Very Strong

- Compute

The screenshot shows the 'MX: Analysis Preferences' dialog box, specifically the 'Phylogeny Reconstruction' tab. The dialog is organized into several sections with a table-like structure of options and settings.

Option	Setting
ANALYSIS	
Statistical Method	Maximum Likelihood
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	None
No. of Bootstrap Replications	Not Applicable
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	Nucleotide
Model/Method	Tamura-Nei model
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	Uniform Rates
No of Discrete Gamma Categories	Not Applicable
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	Complete deletion
Site Coverage Cutoff (%)	Not Applicable
TREE INFERENCE OPTIONS	
ML Heuristic Method	Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
Initial Tree for ML	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Initial Tree File	Not Applicable
Branch Swap Filter	None
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	3

At the bottom of the dialog, there are three buttons: a Help button (with a question mark icon), a Cancel button (with an 'X' icon), and an OK button (with a checkmark icon).

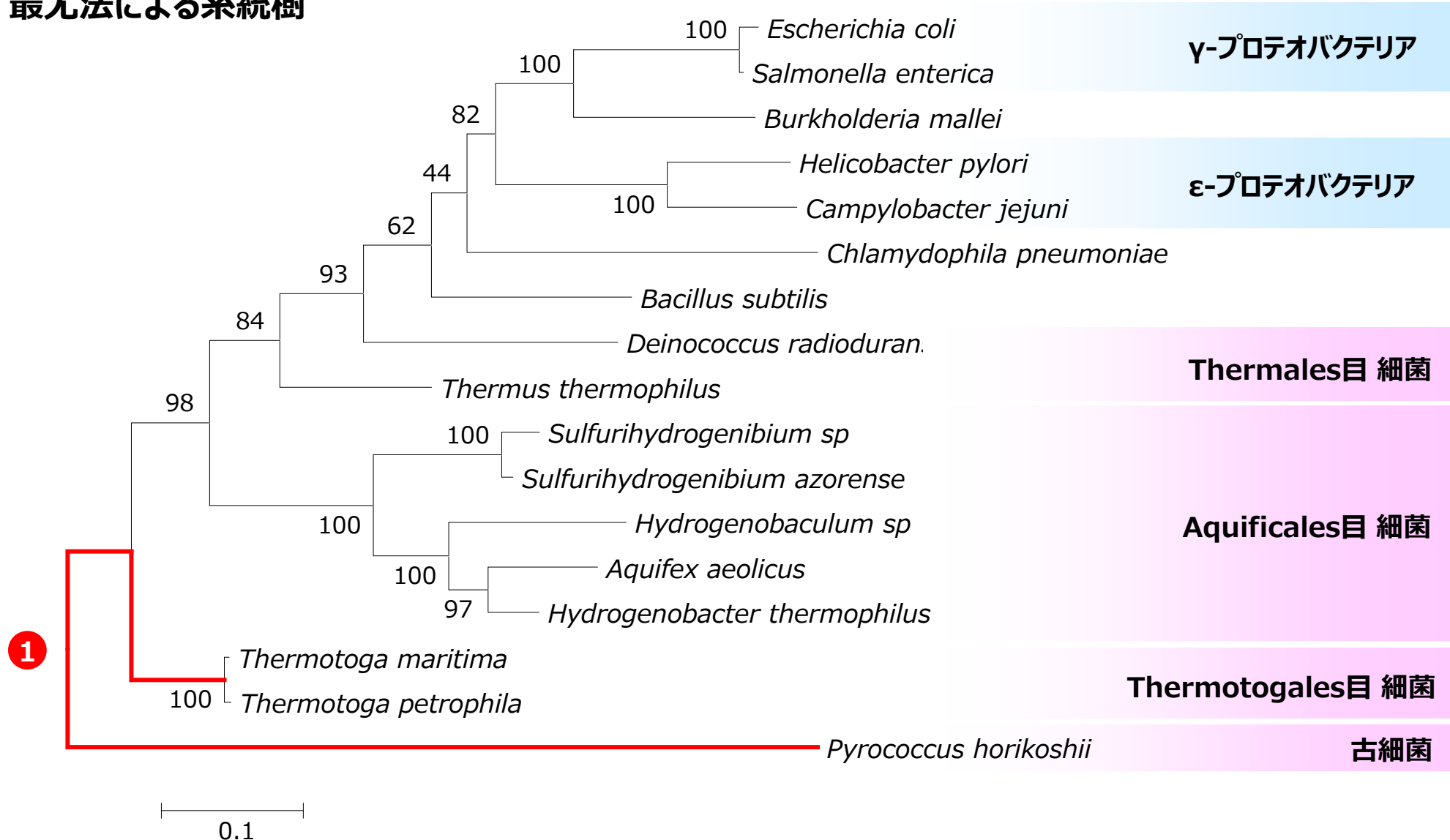
Rates among Sites : Gamma Distributed with Invariant sites

- 塩基配列、アミノ酸配列の中では、置換が滅多に起こらない座位がほとんどであり、置換が頻発する座位は限られている
- そこで、各座位を「ガンマ分布に基づいたカテゴリ」に分類するモデル(Yang, 1994) がよく利用される
- このようなモデルを使用する場合、+ G と表記される
- カテゴリ数としては、任意の数が設定できる（通常は5つくらいに設定しておくが良い）

Rates among Sites : Gamma Distributed with Invariant sites

- 置換の起きない座位(invariable site) と置換が起きる座位(variable site) の2つにカテゴリ分けするモデル(+ I と表記)

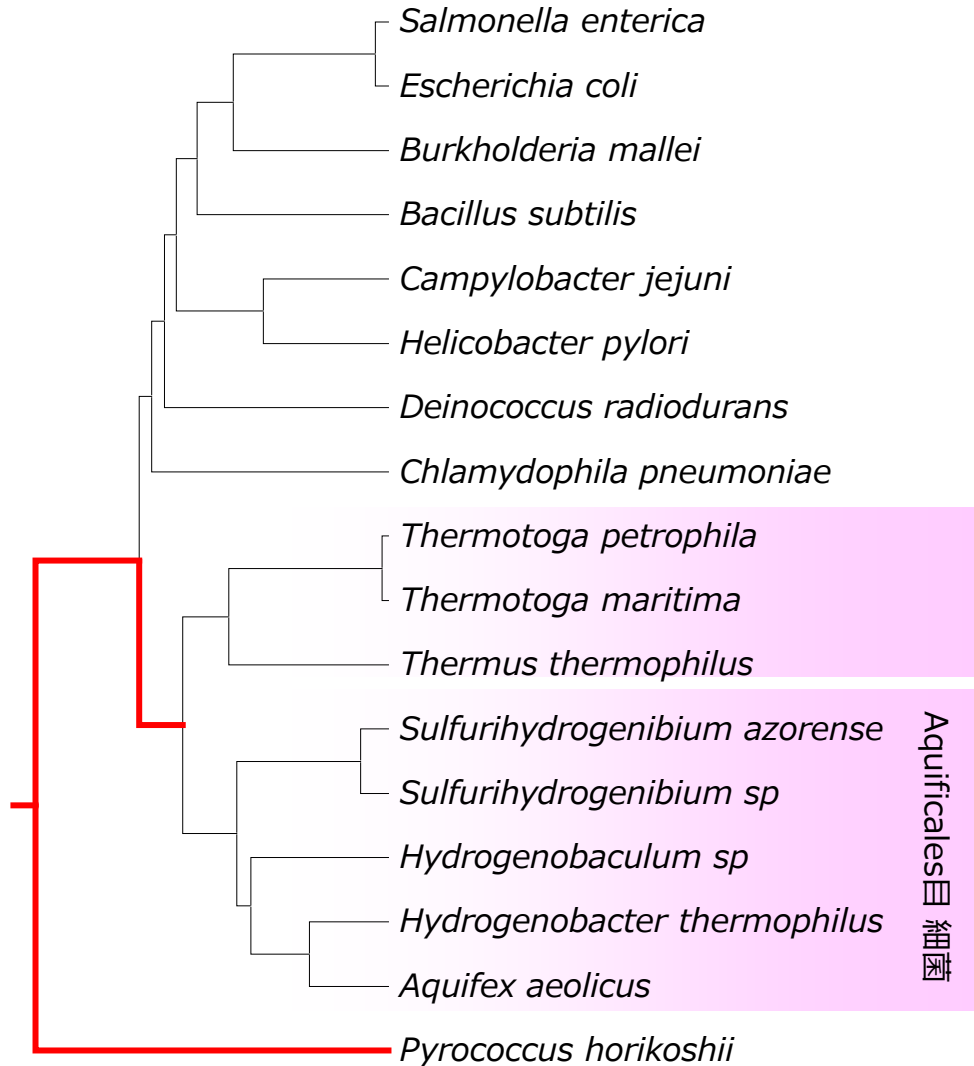
最尤法による系統樹



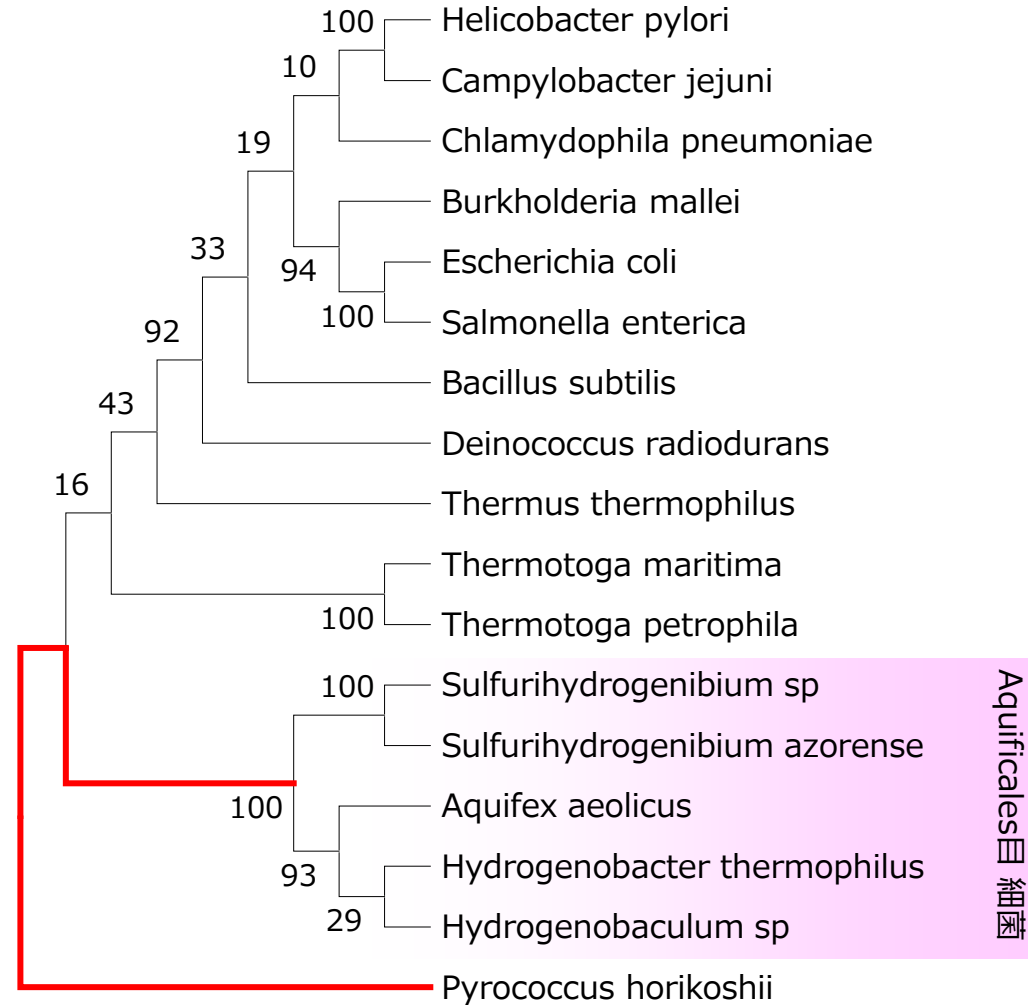
生命の起源に最も近い細菌はどれか？

他の方法で作成した系統樹と比べてみよう

UPGMA



最節約法

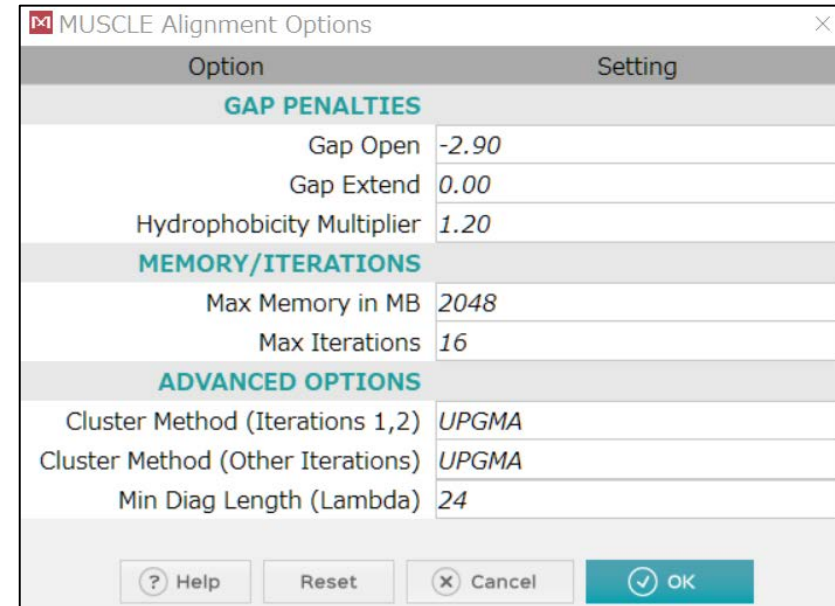


alanyl-tRNA synthetaseのアミノ酸配列を用いた系統樹を作成する

- メニュー File → Open A File
- 「bacteria_alaS.fas」を選ぶ
- How would you like to open this fasta file? と聞かれるので
- Align を選択

アラインメントを作成

- Alignment Explorerが開く
- メニュー Alignment
- Align by Muscle
- Select all? と聞かれるので
- OK を押す
- Muscleの設定ウィンドウが開く
- Compute
- アラインメントの結果が表示される



メインウィンドウに移行する

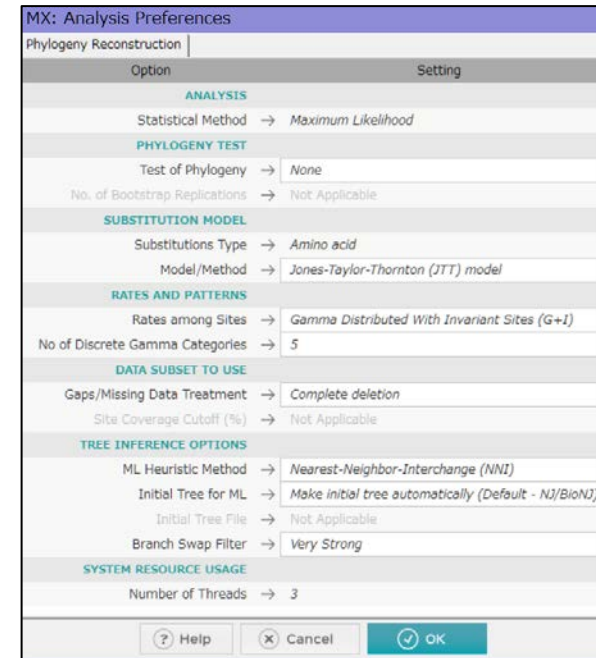
- メニュー Data
- Phylogenetic analysis
- Protein-coding nucleotide data? と聞かれるので No を選択
- メインウィンドウに戻る

最尤法（アミノ酸配列）による系統樹

- Phylogeny
- Construct Maximum Likelihood Tree
- 設定画面が表示される

- Test of Phylogeny : None
- ① • Model/Method : WAG model
- Rates among Sites : Gamma Distributed with Invariant sites (G+I)
- No of Discrete Gamma Categories : 5
- Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
- ML Heuristic Method : Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
- Initial Tree for ML : Make initial tree automatically
- Branch Swap Filter : Very Strong

- Compute



進化モデルの選択

- 塩基置換速度行列は4x4 の行列でしたが、アミノ酸置換速度行列は20x20 の行列となるため、 $Rate_{XY}$ と $Freq_X$ の数は時間反転可能モデルでも $190 + 20 = 210$ となり膨大です
- そこで、既に系統関係の分かっている分類群間の系統樹において、大量のデータを用いてあらかじめ推定された $Rate_{XY}Freq_X$ の値を用いた行列を**アミノ酸置換モデル**として用います
- これらは、実際のデータから観測された「経験的な」ものなので、**empirical model** と呼ばれます

From \ To	A	C	G	T
A	-	$Rate_{AC}Freq_C$	$Rate_{AG}Freq_G$	$Rate_{AT}Freq_T$
C	$Rate_{AC}Freq_A$	-	$Rate_{CG}Freq_G$	$Rate_{CT}Freq_T$
G	$Rate_{AG}Freq_A$	$Rate_{CG}Freq_C$	-	$Rate_{GT}Freq_T$
T	$Rate_{AT}Freq_A$	$Rate_{CT}Freq_C$	$Rate_{GT}Freq_G$	-

進化モデルの選択

- 様々なモデルが提案されています
- RateXY は既存のempirical model の値を用い、アミノ酸頻度FreqX はデータから推定するモデルも+ F モデルと呼ばれて広く用いられています
 - Dayhoff : 核 (Dayhoff et al., 1978)
 - JTT : 核 (Jones et al., 1992)
 - WAG : 核 (Whelan and Goldman, 2001)
 - mtREV24 : ミトコンドリア (Adachi and Hasegawa, 1996)
 - rtREV : レトロウィルス (Dimmic et al., 2002)
 - cpREV : 葉緑体 (Adachi et al., 2000)

Table. Maximum Likelihood fits of 48 different amino acid substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	<i>lnL</i>	(+J)	(+G)	<i>f(A)</i>	<i>f(R)</i>	<i>f(N)</i>	<i>f(D)</i>	<i>f(C)</i>	<i>f(Q)</i>	<i>f(E)</i>	<i>f(G)</i>	<i>f(H)</i>	<i>f(I)</i>	<i>f(L)</i>	<i>f(K)</i>	<i>f(M)</i>	<i>f(F)</i>	<i>f(P)</i>	<i>f(S)</i>
WAG+G+I	27	29915.356	29718.300	-14832.081	0.14	1.98	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070
rtREV+G+I+F	46	29920.010	29584.446	-14746.025	0.13	1.47	0.072	0.063	0.033	0.056	0.007	0.029	0.100	0.081	0.023	0.058	0.093	0.072	0.021	0.052	0.030	0.050
WAG+G+I+F	46	29931.832	29596.268	-14751.936	0.14	1.82	0.072	0.063	0.033	0.056	0.007	0.029	0.100	0.081	0.023	0.058	0.093	0.072	0.021	0.052	0.030	0.050
rtREV+G+F	45	29937.535	29609.258	-14759.440	n/a	0.84	0.072	0.063	0.033	0.056	0.007	0.029	0.100	0.081	0.023	0.058	0.093	0.072	0.021	0.052	0.030	0.050
WAG+G	26	29946.621	29756.859	-14852.365	n/a	1.01	0.087	0.044	0.039	0.057	0.019	0.037	0.058	0.083	0.024	0.048	0.086	0.062	0.020	0.038	0.046	0.070
WAG+G+F	45	29957.705	29629.428	-14769.524	n/a	0.96	0.072	0.063	0.033	0.056	0.007	0.029	0.100	0.081	0.023	0.058	0.093	0.072	0.021	0.052	0.030	0.050
rtREV+G+I	27	30066.203	29869.148	-14907.505	0.13	1.55	0.065	0.045	0.038	0.042	0.011	0.061	0.061	0.064	0.027	0.068	0.102	0.075	0.015	0.029	0.068	0.049
cpREV+G+I	27	30082.145	29885.089	-14915.475	0.14	1.84	0.076	0.062	0.041	0.037	0.009	0.038	0.050	0.084	0.025	0.081	0.101	0.050	0.022	0.051	0.043	0.062

課題 2

- 「bacteria_pgk.fas」には、14種のバクテリア由来のphosphoglycerate kinaseのアミノ酸配列が入っている
- alanyl-tRNA synthetaseのアミノ酸配列を用いたのと同様に、以下の設定を用いて最尤法の系統樹を作成し、ファイル名「kadai2」として保存
 - Test of Phylogeny : None
 - Model/Method : WAG model
 - Rates among Sites : Gamma Distributed with Invariant sites (G+I)
 - No of Discrete Gamma Categories : 5
 - Gaps/Missing Data Treatment : Complete deletion
 - ML Heuristic Method : Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
 - Initial Tree for ML : Make initial tree automatically
 - Branch Swap Filter : Very Strong
- AlaS、Pgkの2つの系統樹を比較して、トポロジーの違いについて考察しなさい
Please describe the topological difference between phylogenetic trees of AlaS and Pgk.

- 作成した系統樹のファイル（**kadai1.mtsx** と **kadai2.mtsx**）を、メールに添付して提出してください
- 送付先は kenro[at]hosei.ac.jp です（[at] を@に変換）
- メールのはじめの件名は「**系統樹課題**」にしてください
- メール本文に、以下のように「氏名」「所属」「学生証番号」「本日の講義の感想」を記載してください

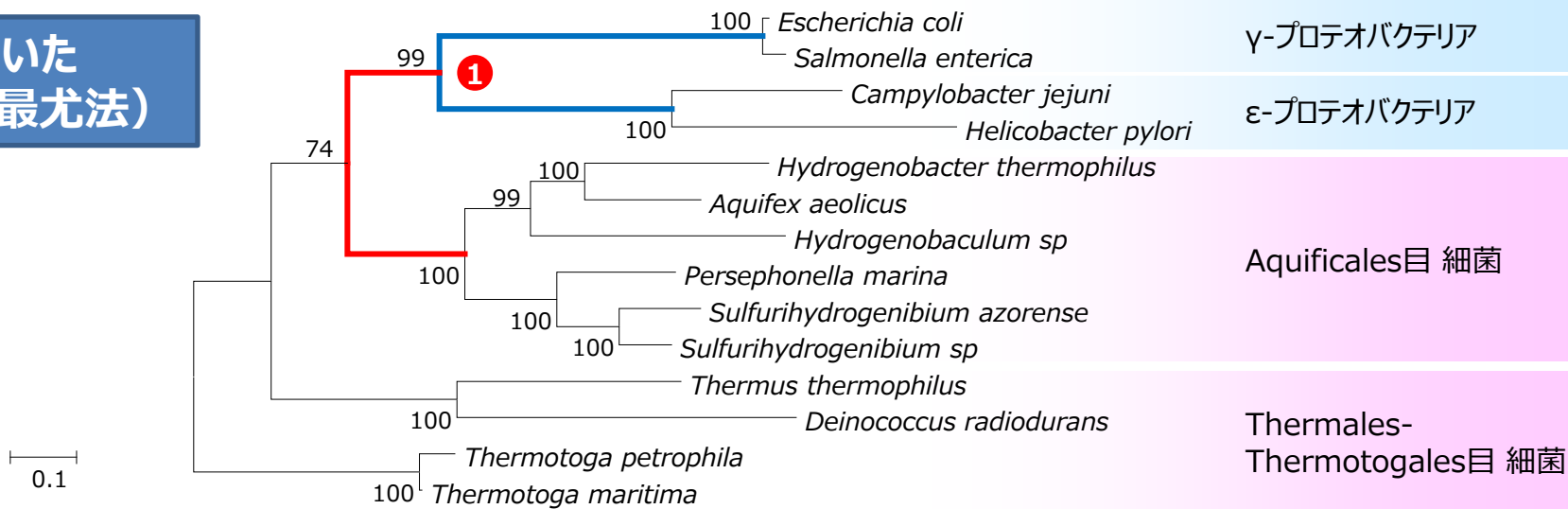
氏名：○○ ○○

所属：××××専攻 △△△△研究室

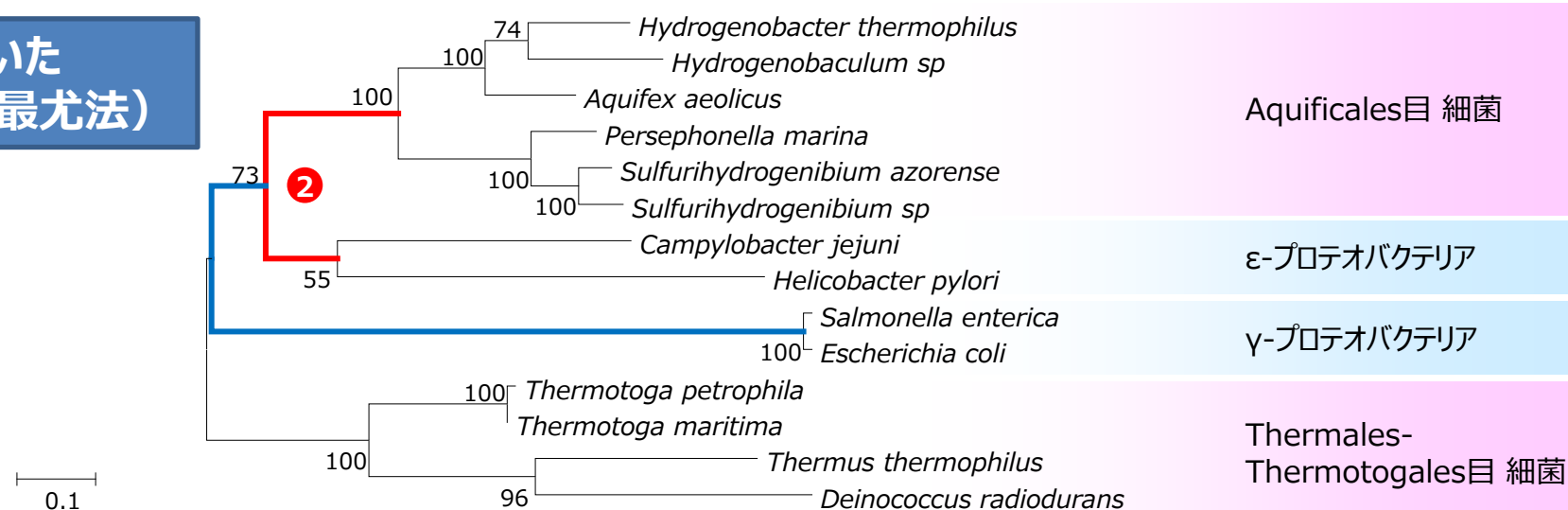
学生証番号：□□□□□

講義の感想：

AlaSを用いた
系統樹 (最尤法)

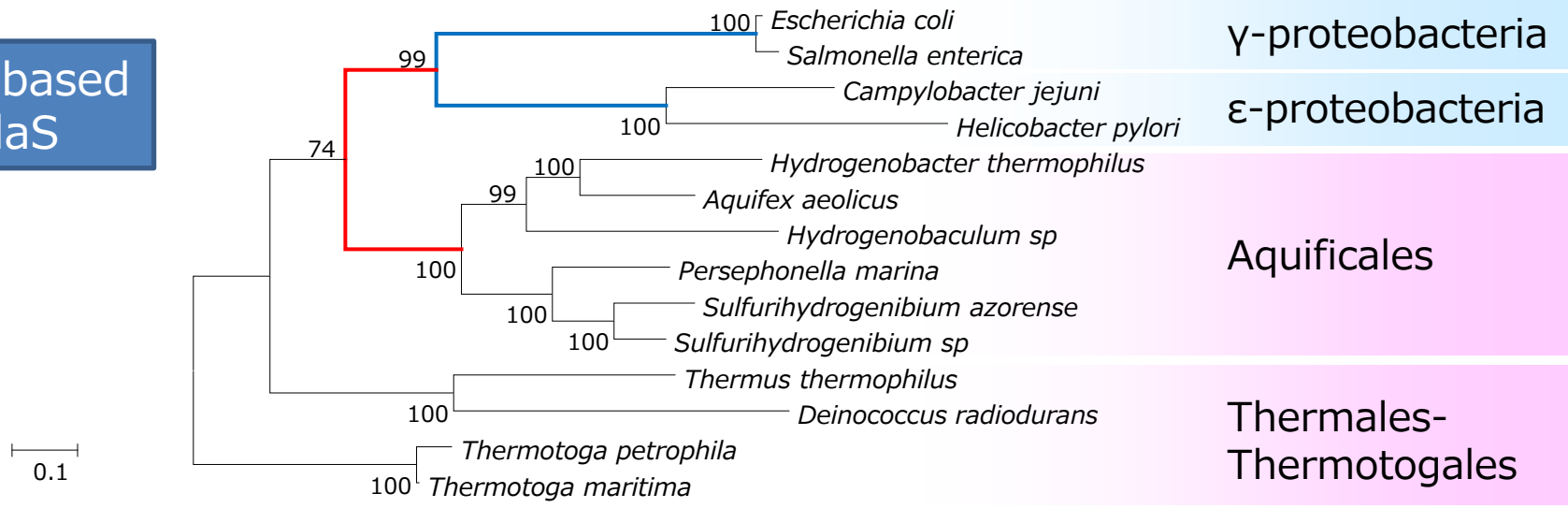


Pgkを用いた
系統樹 (最尤法)

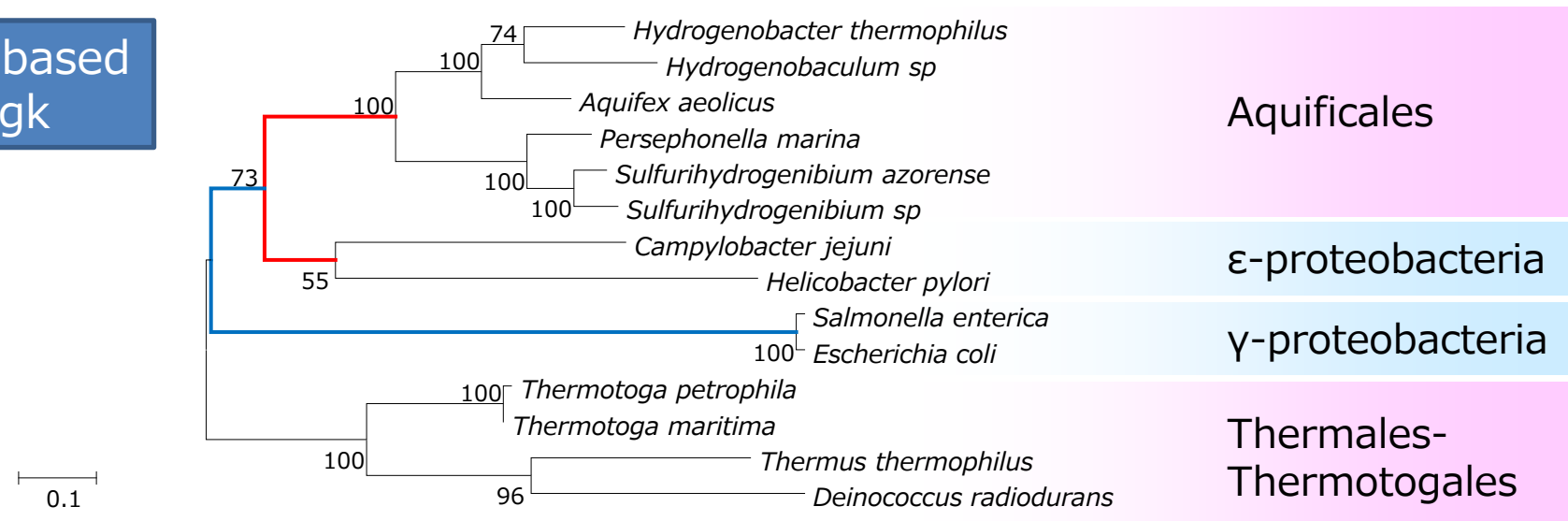


過去に、Aquificales目 細菌とε-プロテオバクテリアとの間で、大規模な遺伝子の水平移動が生じた可能性が考えられている

ML tree based on AlaS



ML tree based on Pgk

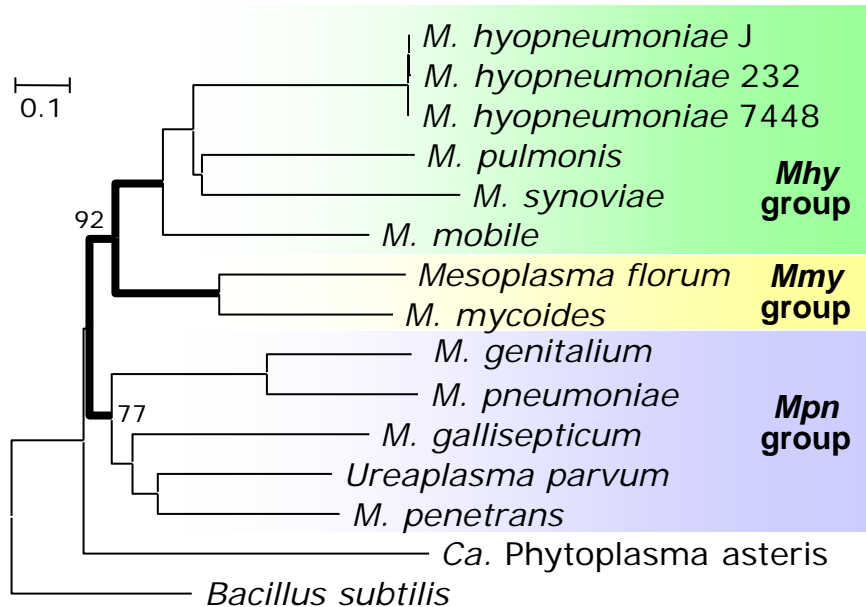


- Several proteins phylogenetically close to the ε-proteobacteria are encoded in the genomes of the Aquificales.
- These results raised the possibility that a large horizontal gene transfer had been occurred between the Aquificales and ε-proteobacteria.

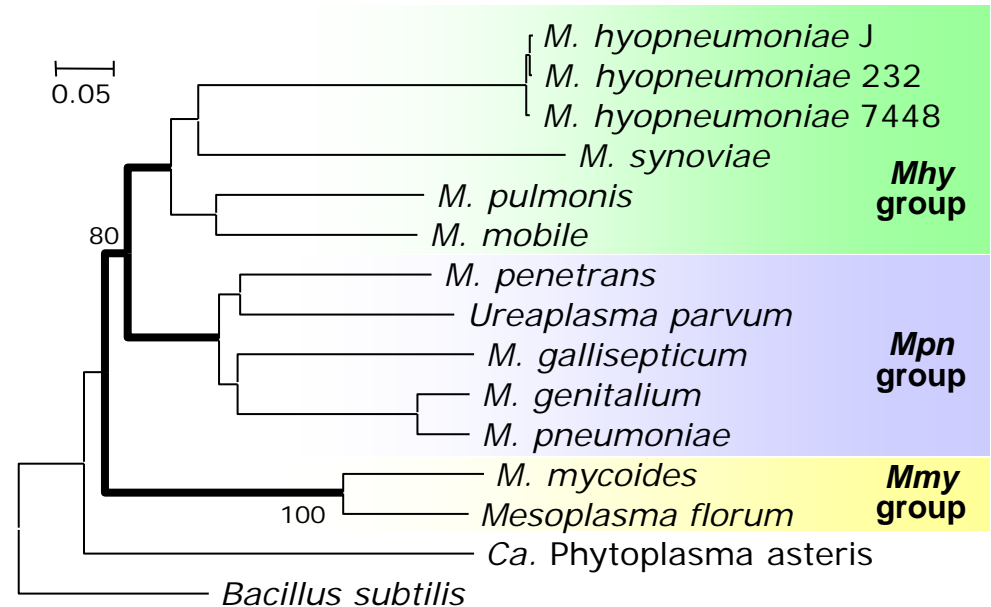
1つの遺伝子の系統解析だけでは進化の歴史を調べるのに不十分な場合がある

- 異なる遺伝子を用いて系統樹を作成した場合に、トポロジーが一致しないことがある
- これには、遺伝子の水平移動、分岐年代の近さ、塩基・アミノ酸置換の飽和、個々の遺伝子にかかる選択圧の違いなど、様々な原因が考えられる
- 従って、生物の進化を解析するためには、全ゲノム配列を用いるなど、なるべく多くの情報量を用いるのが望ましいと考えられている

DnaE (DNA polymerase III)



GyrB (DNA gyrase)

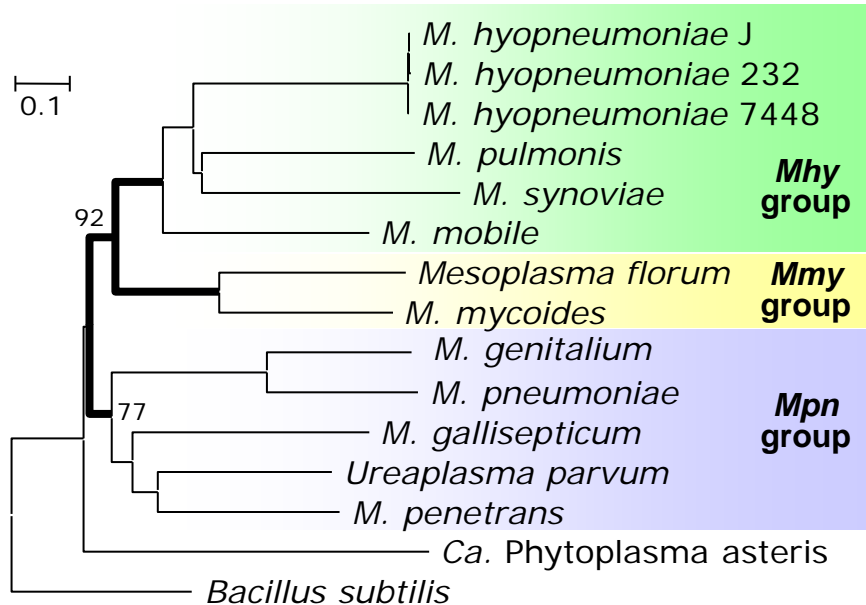


(Oshima & Nishida, *J. Mol. Evol.*, 2007)

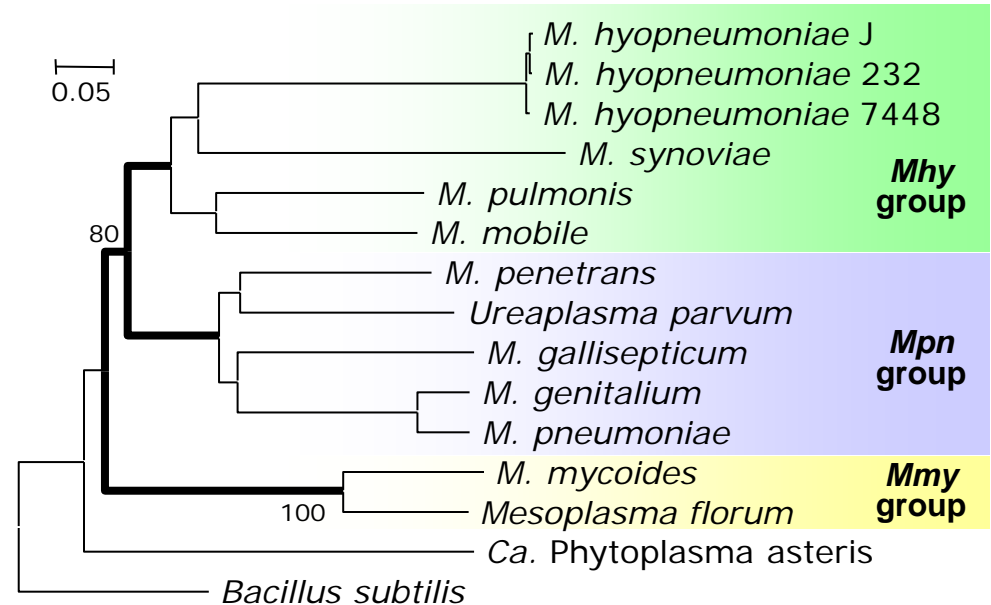
Phylogenetic analysis of a single gene provides only a limited understanding of an evolutionary history

- Phylogenetic trees derived from comparisons of different genes do not always concur each other.
- This is probably due to lateral gene transfer, saturation for amino acid substitutions, or highly variable rates of evolution of individual genes.
- Therefore, it is believed that comparative studies based on the complete sequences of bacterial genomes would contribute to the basis for phylogeny and, ultimately, taxonomy.

DnaE (DNA polymerase III)



GyrB (DNA gyrase)



(Oshima & Nishida, *J. Mol. Evol.*, 2007)