

機関番号：82603

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073001

研究課題名（和文） 原虫感染における含硫アミノ酸代謝の役割

研究課題名（英文）Role of sulfur-containing amino acid metabolism in protozoan infections

研究代表者

野崎 智義 (NOZAKI TOMOYOSHI)

国立感染症研究所 寄生動物部 部長

研究者番号：60198588

研究成果の概要（和文）：

原虫感染症における代謝の役割を明らかにすることを目的に、赤痢アメーバをモデルとして、その代謝機構を、メタボローム・トランスクリプトーム等のオミクス手法を用いて、俯瞰的に解析した。システイン負荷・飢餓ストレスに応答する代謝変化、並びに、細胞分化に伴う代謝変化、更にそれらの変化に伴う遺伝子発現変化などを統合的に解明した。その結果、これまで全く知られていない新しい酸化ストレス応答代謝経路や代謝産物が同定された。また、嚢子化に伴う代謝フラックス、及び遺伝子発現の調節が明らかにされた。以上、原虫におけるオミクス解析による統合的代謝解析系は十分に構築された。

研究成果の概要（英文）：

To better understand the role played by metabolism in protozoan infections, we investigated metabolic responses of the enteric protozoan *Entamoeba histolytica* toward oxidative stress and stage conversion by “omics” approaches such as transcriptomics and metabolomics. We have discovered novel pathways and networks associated with cysteine-supplementation/deprivation stress and encystation. We have established comprehensive analytical methods to examine the metabolic networks using transcriptomics and metabolomics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	18,000,000	0	18,000,000
19年度	18,000,000	0	18,000,000
20年度	18,000,000	0	18,000,000
21年度	18,000,000	0	18,000,000
22年度	18,000,000	0	18,000,000
総計	90,000,000	0	90,000,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：寄生虫学（衛生動物学を含む）

キーワード：含硫アミノ酸、代謝、感染症、メタボローム、トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

**(1) 赤痢アメーバ症**

赤痢アメーバ症は世界人口の約1%に感染し、年間10万の死亡を起こす、マラリアに

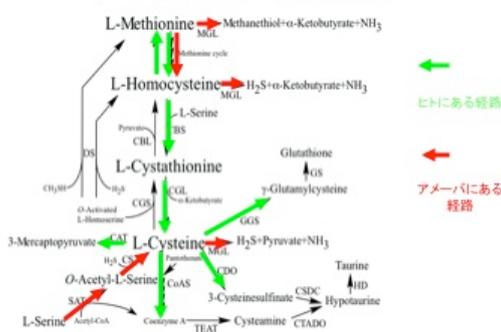
次いで死亡者数の多い原虫性感染症である。発展途上国だけでなく、わが国でも知的障害者などに濃厚な感染を起こしている。その医学的・保健衛生学的重要性に加えて、嫌氣的

代謝・ミトコンドリアの二次的喪失など生物進化上興味深い生物学的特徴が多く備わっている。

## (2)赤痢アメーバの代謝：これまでの研究成果

赤痢アメーバの代謝は進化の過程で大きく変化しており、含硫アミノ酸代謝を始めとして様々な、宿主と異なる代謝経路をもつ。特殊な代謝経路を含硫アミノ酸代謝経路を例に以下に示す。

### アミノ酸代謝(一部を抜粋)



我々のグループはこれまで、赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝の特殊性を示してきた。例えば、1. メチオニンとシステインをつなぐトランスサルフレーション経路が不完結であること、2. 含硫アミノ酸がメチオニンガンマリナーゼにより分解されること、3. システインが硫化水素とセリンからデノボ合成されること、などを明らかにした。更に、メチオニンガンマリナーゼを標的とした創薬研究を展開して来た。しかしながら、これまでの既存の代謝研究は、解糖経路と含硫アミノ酸代謝に限定的であり、統合的な代謝ネットワークは全く理解されていなかった。そこで本研究では、赤痢アメーバの代謝全体をオミクス手法を用いて俯瞰することを目的とした。

## (3) 海外の研究の現状

原虫の代謝はその生物学的理解と創薬標的の探索の両面から、解析が進んでいる。一方で俯瞰的な研究はほとんど展開されていなかった。この数年間で、原虫のオミクス代謝研究は、本研究が展開するのと同時に、マラリア原虫、トリパノソーマなどの複数の原虫種で行われるようになった。

## 2. 研究の目的

本研究は、腸管寄生虫赤痢アメーバをモデル原虫として、感染における含硫アミノ酸等の代謝の変化を明らかにすることを目的として、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどのオミクス技術を融合させた統合的アプローチを用いた解析を行う。長期的ゴールは、感染・寄生及び病原機構における含硫アミノ酸代謝の役割を理解することであり、感染の代謝学という新たな代謝学の一分野を創造することである。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスクリプトーム解析手法の開発

赤痢アメーバ 9327 の全遺伝子とヘビアメーバ *Entamoeba invadens* の 12384 の全遺伝子を網羅したアリメトリクスプラットフォームのマイクロアレイを作成した。作製はアリメトリクスに委託した。使用した試薬、条件等はアリメトリクスのプロトコル、マニュアルに従った。詳細は Husain, A. *BMC Genomics* 12, 275, 2011 に譲る。

### (2) メタボローム解析手法の開発

キャピラリー電気泳動-飛行時間計測型質量分析計によるメタボローム解析は、アジレント社製機材を用いて、カチオン・アニオン・核酸解析モードを行った。データ解析はマスターハンドで行った。詳細は既述による (Soga, T, *Anal Chem* 81:6165-6174, 2009)。

### (3) システイン負荷・飢餓による代謝中間体と酵素遺伝子発現に対する影響の解析

通常のBI-S-33培地のシステインを除去したものと、10mM追加したものを用いた。嚢子化は常法によった (Picazarri, K. *Inf. Immun.* 76, 278-288, 2008)。

## 4. 研究成果

### (1) システイン飢餓によるトランスクリプトームの変化

メチオニン、セリン、システインの負荷により生じる遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いて明らかにした。特にシステイン負荷により多くの遺伝子が増減した。以下に顕著に 3-48 時間のいずれかの時点で 3 倍以上の増加 (表 1) または減少 (表 2) の見られた遺伝子と減少のリストを示す。

以下のリストでシステイン飢餓により、発現抑制の見られた NADPH 依存的酸化還元酵素 (EhN02) に関しては、詳細な機能解析を行った (下参照)。更に、システイン飢餓により発現上昇の見られた Iron-sulfur flavoproteins の 2 遺伝子に関しては、gene silence 法による発現抑制株の作製を行った。発現抑制株では、システインの枯渇下で、増殖が抑制された。また、発現抑制によって過酸化水素への感受性が上昇することが確認された (図 3)。

また、システイン飢餓時に起こる含硫アミノ酸関連酵素遺伝子の発現プロファイルの変化を図 4 に示す。また、システイン飢餓暴露後短時間で、メチオニンガンマリナーゼ 1 (MGL1)、フォスフォセリンアミノ転移酵素 (PSAT)、セリンアセチル転移酵素 2 (SAT2) などが顕著に抑制された。

Accession numbers	Common Names	Basal Expression (log <sub>2</sub> )	3 h	6 h	12 h
XM_647419	Major facilitator superfamily (MFS) transporter	6.11	+4.1	+14.6	+10.0
XM_650038	Iron-sulfur flavoprotein, putative	8.40	+3.6	+6.8	+9.8
XM_644279	Iron-sulfur flavoprotein, putative	7.17	+3.6	+5.4	+8.7
XM_651312	Hypothetical protein	2.73	-1.0	+2.4	+7.8
XM_644746	Hypothetical protein	3.53	+4.8	+8.8	+6.0
XM_643338	Hypothetical protein	7.42	+1.7	+1.9	+5.8
XM_645468	Zinc finger protein, putative (IBR superfamily)	5.39	+2.9	+9.1	+5.7
XM_644430	Gluc6-phosphate N-acetyltransferase, putative	3.79	+8.6	+6.2	+5.5
XM_645799	Iron sulfur flavoprotein like, putative	7.47	+1.5	+3.5	+5.4
XM_642792	Hypothetical protein	2.54	+3.4	+6.4	+5.0
XM_650580	Acetyltransferase, putative	7.01	+1.9	+3.4	+4.8
XM_647486	Hypothetical protein	2.97	+3.7	+4.4	+4.8
XM_648920	Hypothetical protein	3.08	+1.2	+3.3	+4.7
XM_645096	Hypothetical protein	4.10	+1.7	+1.9	+4.7
XM_644075	Hypothetical protein	2.48	+2.9	+5.2	+4.5
XM_001913345	Hypothetical protein	8.19	+1.9	+2.7	+4.4
XM_648476	Hypothetical protein	2.90	+2.0	+3.1	+4.4
XM_644225	Hypothetical protein	3.25	+1.7	+4.8	+4.4
XM_642957	Hypothetical protein	2.53	-1.0	+2.1	+4.4
XM_647890	Hypothetical protein	6.82	+1.5	+2.7	+4.4
XM_643428	Longevity assurance family protein	5.38	-2.3	+1.2	+4.4
XM_647567	Hypothetical protein	6.18	+9.7	+13.6	+4.2
XM_646949	Heat shock protein, Hsp20 family, putative	5.63	+2.0	+4.6	+4.2
XM_646060	Short chain dehydrogenase	4.86	+6.1	+8.1	+4.2
XM_652477	Regulator of nonsense transcripts, putative	9.86	+5.9	-1.0	-4.1
XM_643429	Hypothetical protein	5.95	+1.6	+1.9	+4.1
XM_646319	Hypothetical protein	3.36	+2.4	+4.8	+4.0
XM_649191	Regulator of nonsense transcripts, putative	9.73	+6.5	+1.0	-4.0
XM_646412	Hypothetical protein	5.09	+2.0	+3.2	+4.0
XM_651955	Hypothetical protein	4.52	-1.3	+1.3	+3.9
XM_649317	Regulator of nonsense transcripts, putative	4.76	+7.4	-1.1	-3.9
XM_647768	Ankyrin, putative	6.30	+2.0	+4.3	+3.8
XM_650547	Hypothetical protein	9.16	+6.5	+1.4	-3.6
XM_647757	Hypothetical protein	2.94	+2.9	+4.5	+3.4
XM_647571	Hypothetical protein	8.44	+6.1	+6.5	+3.4
XM_645809	Riboflavin kinase/FAD synthetase, putative	6.61	+1.4	+4.6	+3.4
XM_643175	Hypothetical protein	8.73	+3.9	+5.2	+3.3
XM_651173	Hypothetical protein	7.03	+3.4	+4.2	+3.3
XM_651901	Hypothetical protein	4.51	+2.3	+4.2	+3.3
XM_645555	Hypothetical protein	2.32	+2.1	+5.9	+3.2
XM_650171	Hypothetical protein	4.08	+7.5	+7.8	+3.2
XM_643804	Hypothetical protein	6.53	+4.1	+2.0	+3.1
XM_649510	DNA methyltransferase, putative	5.97	+2.4	+1.7	+2.3
XM_647939	Regulator of nonsense transcripts, putative	6.30	+6.2	-1.4	-2.1
XM_648119	Hypothetical protein	8.27	+3.7	+4.1	+2.0
XM_649988	Hypothetical protein	6.45	+2.7	+5.2	+1.9
XM_648922	Hypothetical protein	5.03	-1.5	-1.2	+1.7
XM_649257	Protein kinase domain containing protein	2.61	+6.8	-1.0	+1.5

表 1 システイン飢餓により誘導される遺伝子群 定常状態での発現レベル、飢餓誘導後、3, 6, 12 時間後の mRNA の増 (+) 減 (-) を示す (倍) 3-48 時間後のいずれかの時点で 3 倍以上の増加があったもののみ示す。

Accession numbers	Common Names	Basal Expression (log <sub>2</sub> )	3h	6h	12h
XM_648717	Hypothetical protein	8.8	+1.1	+1.4	-2.8
XM_648481	NADPH-dependent oxidoreductase (EhNO2)	10.6	-1.9	-1.9	-3.0
XM_650547	Hypothetical protein	9.2	+6.5	+1.4	-3.6
XM_652477	Regulator of nonsense transcripts, putative	9.9	+5.9	-1.0	-4.1
XM_649191	Regulator of nonsense transcripts, putative	9.7	+6.5	+1.0	-4.0
XM_649317	Regulator of nonsense transcripts, putative	4.8	+7.4	-1.1	-3.9
XM_651359	Hypothetical protein	7.8	+2.4	-1.6	-5.1
XM_001914319	Cysteine protease, putative	7.8	-1.7	-3.2	-2.5
XM_645369	Hypothetical protein	9.0	-1.1	-6.3	-11.1
XM_649853	Leucine rich repeat protein, BspA family	8.4	-5.4	-6.7	-2.2
XM_651153	Hypothetical protein	4.7	-1.7	-5.1	-1.6
XM_001913553	Actin binding protein, putative	9.2	+1.3	-3.5	-5.0
XM_643815	Leucine rich repeat protein	8.3	-4.3	-3.2	-2.4
XM_650791	RhoGAP domain containing protein	6.9	+2.1	-2.3	-5.0
XM_644068	Myb-like DNA-binding protein	6.3	+1.3	-1.9	-4.4
XM_646593	Hypothetical protein	10.6	+1.5	-2.7	-4.1
XM_644126	Hypothetical protein	6.9	+1.1	+1.0	-3.3
XM_652381	Leucine rich repeat/phosphatase domain containing protein	7.2	-2.4	-4.5	-2.9
XM_651502	Hypothetical protein	7.3	+1.7	-3.7	-4.4
XM_652115	Helicase, putative	5.6	-1.0	-4.3	-2.3
XM_649517	Fatty acid elongase, putative	4.8	+1.3	-5.6	-5.4
XM_001914195	Pescadillo homolog, putative	5.7	+1.4	-2.9	-4.0
XM_64821	Phospholipase D like protein	4.4	+1.7	-3.6	-4.2
XM_649099	Hypothetical protein	4.9	+1.4	-2.3	-4.5
XM_650629	Hypothetical protein	4.9	+1.1	-3.2	-5.8
XM_645444	Rho family GTPase	6.0	-1.1	-4.4	-4.4
XM_651384	Hypothetical protein	6.9	-1.3	-4.4	-2.4
XM_642804	Leucine rich repeat protein	7.9	-5.1	-3.5	-2.1
XM_652013	Hypothetical protein	11.1	-4.3	-1.2	+1.4
XM_648669	Hypothetical protein	9.3	+1.1	-4.3	-2.9
XM_647555	Hypothetical protein	7.1	+1.6	+1.0	-1.3
XM_644980	Hypothetical protein	6.9	+1.7	-1.0	-1.4
XM_645403	Hypothetical protein	6.0	-2.3	-4.1	-3.9
XM_001914173	Leucine rich repeat protein	8.2	-3.4	-4.6	-2.1
XM_001914026	Hypothetical protein	7.1	+1.2	-1.2	-1.4
XM_644692	Hypothetical conserved, protein	9.1	-5.7	-2.0	+1.1
XM_645533	Actinin-like protein, putative	5.4	+1.7	-5.4	-2.4
XM_651612	Hypothetical protein	6.3	+1.0	-3.2	-4.1
XM_651999	Hypothetical protein	6.6	-9.5	-5.3	-1.3
XM_001914259	Hypothetical protein	7.1	+1.4	+1.0	-1.1
XM_001913952	Hypothetical protein	9.4	+1.4	-1.3	-1.2
XM_645752	Hypothetical protein	7.1	+1.4	-1.0	-1.2
XM_643708	Hypothetical protein	9.4	+1.5	-1.3	-1.2
XM_643865	Hypothetical protein	7.1	+1.4	-1.1	-1.3
XM_645163	Hypothetical protein	5.0	+1.5	-4.1	-2.4
XM_643106	Hypothetical protein	7.1	+1.5	-1.1	-1.3
XM_643788	Hypothetical protein	7.1	+1.5	-1.1	-1.3
XM_645779	Hypothetical protein	7.2	+1.4	-1.1	-1.4
XM_643812	Protein kinase domain containing protein	6.0	+1.1	-4.0	-4.0

表 2 システイン飢餓により抑制される遺伝子群 定常状態での発現レベル、飢餓誘導後、3, 6, 12 時間後の mRNA の増 (+) 減 (-) を示す (倍) 3-48 時間後のいずれかの時点で 3 倍以上の減少があったもののみ示す。

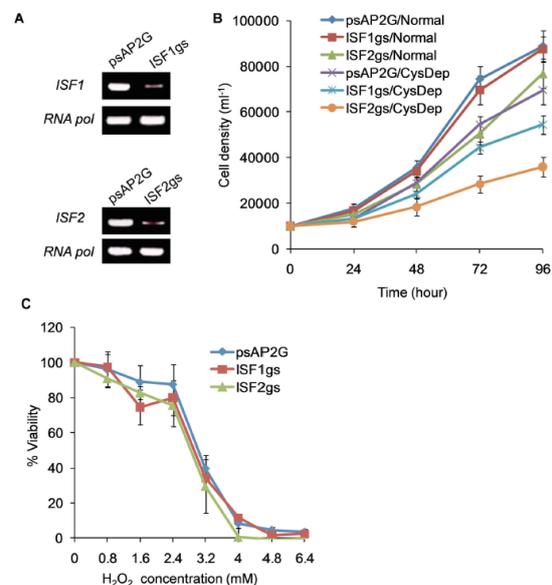


図 3 Iron-sulfur flavoprotein1, 2 (ISF1,

2)の発現抑制株の作製と表現型解析 A. ISF1, 2 発現抑制株 (gene silenced, gs)の発現抑制の qRT-PCR による確認 B. 発現抑制株の cysteine 存在下 (normal)と非存在下 (CysDep)での増殖動態 C. ISF1, 2の過酸化水素の対する感受性

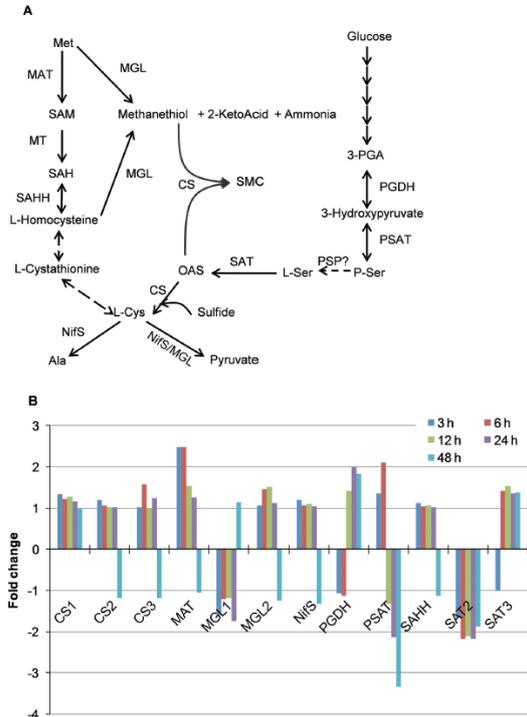


図 4 含硫アミノ酸代謝に関する経路に  
関与する遺伝子のシステイン飢餓にともなう  
発現変化 A. 含硫アミノ酸代謝経路の  
概要 代謝中間体及び酵素を示す B. 核  
遺伝子の time 0 に対する発現量の変化  
(log2)

(2) システイン飢餓によるメタボロームの変化

原虫の抽出液から約 150 の代謝中間体を  
キャピラリー電気泳動法と質量分析計により、  
網羅的に、各含硫アミノ酸ならびに含  
硫アミノ酸の代謝に関する中間代謝物を  
再現性よく定量する系を確立した。

これまで信じられていた教科書的な赤痢  
アメーバの解糖経路の流れが謝りである  
ことが示された。具体的には、グルコースの  
大部分がグリセロール 3 リン酸に蓄積する  
こと、フォスフォエノールピルビン酸から  
のピルビン酸への直接の変換が起こらない  
ことなどの新規な知見が得られた。更にグリ  
セロール 3 リン酸、ピルビン酸、フマル  
酸などの代謝中間体はシステイン飢餓によ  
り上昇し、システインによる解糖経路調節  
への関与が示された (図 5)。

一つは S-メチル-L-システインの合成経路  
であった。S-メチル-L-システインの合成は、  
赤痢アメーバに選択的に存在するメチオン  
ン分解酵素によるメチオンやホモシステ  
インの分解代謝物であるメタンチオールと、  
セリンのアセチル化物である O-アセチル  
セリンから合成されることが証明された。  
これにより、これまでシステインのデノボ  
合成に機能すると考えられてきた経路が  
S-メチル-L-システインの合成に機能する  
可能性が示された。今後、その生理機能の  
解明が必要である (図 6)。また、システ  
イン枯渇により誘導される 2 つ目の経路と  
して、イソプロパノールアミンやそのリン  
酸化物、及びフォスファチジル付加物を合  
成するケネディー経路が同定された。本経  
路のシステイン枯渇応答における生理的  
役割が示唆された (図 7)。

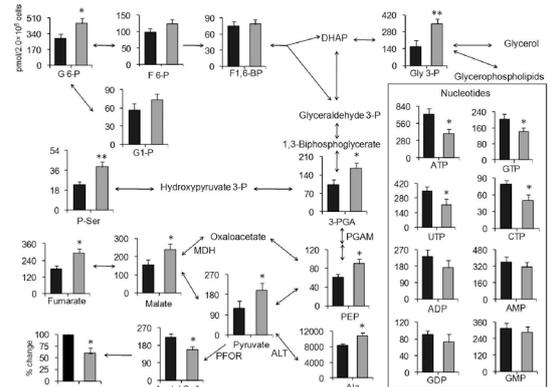


図 5 システイン飢餓時の解糖経路の中間代  
謝産物の濃度 黒棒：コントロール、灰棒：  
システイン飢餓

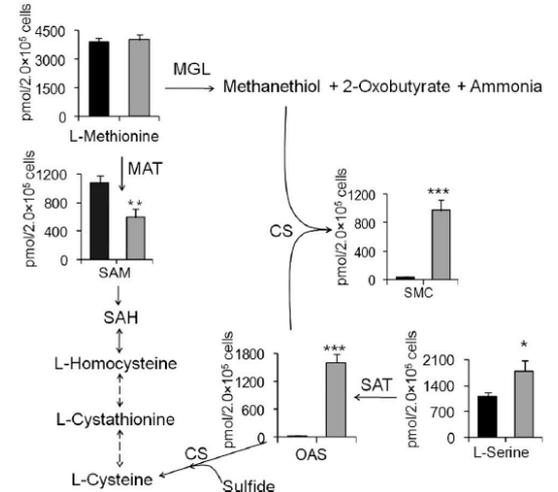


図 6 システイン飢餓時の含硫アミノ酸代謝  
経路の中間代謝産物の濃度 黒棒：コント  
ロール、灰棒：システイン飢餓

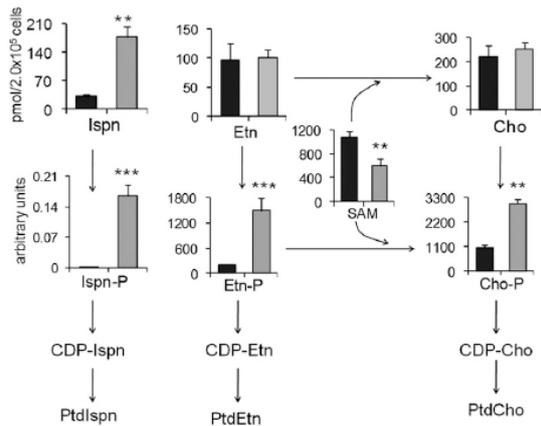
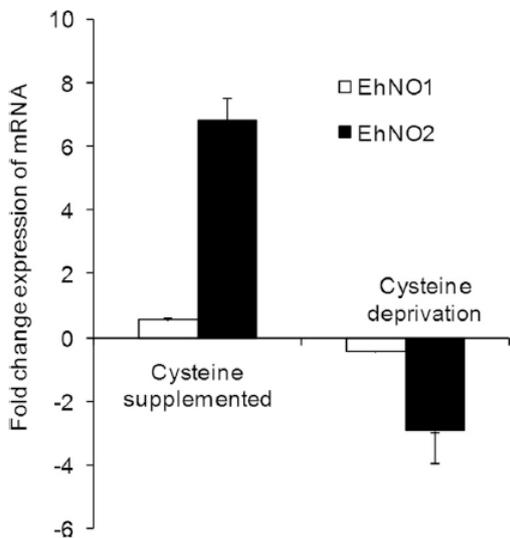


図7 シスチン飢餓時のアミノアルコール代謝経路の中間代謝産物の濃度 黒棒：コントロール、灰棒：シスチン飢餓

(3) シスチン応答性の新規NADPH-依存性酸化還元酵素(EhNO2)の解析

EhNO2遺伝子のシスチン負荷・除去により発現変化を確認した(図8)。



更に、詳細に酵素学的検討を行い、EhNO2がフェレドキシン:NAPD還元活性、並びに、シスチン・2価鉄還元活性を有することが明らかとなった。同時にメトロニダゾールを還元し、インビボでの薬剤感受性に関与することが明らかとなった。従って本酵素は細胞のレドックス状態により厳密な調節を受け、シスチンや鉄の代謝に関与する酵素であることが明らかとなった(図9)。

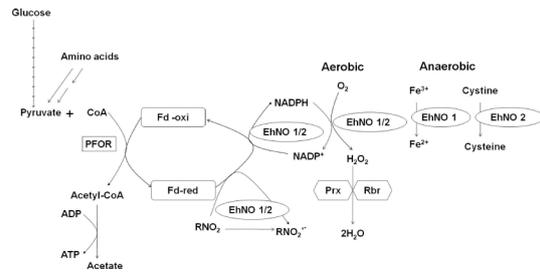


図9 予想されるEhNO2のインビボ機能

(5) 嚢子化過程のメタボローム・トランスクリプトーム解析

*Entamoeba invadens*を用いて嚢子過程における発現と代謝の変化を解析した。メタボローム解析により、解糖経路の代謝物が嚢子壁の主要構成成分であるキチンの生合成に振り向けられることが明らかとなった(図10, 11)

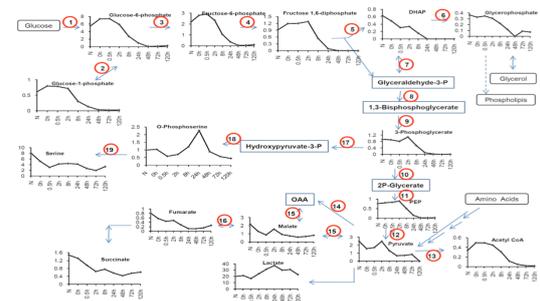


図10 解糖経路を中心としたエネルギー生産経路の中間代謝産物と酵素遺伝子、その転写量

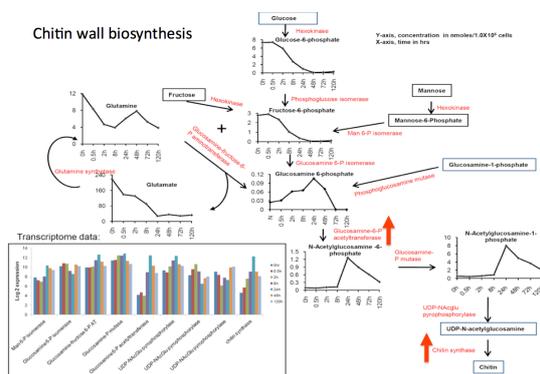


図11 キチン生合成経路の中間代謝産物と酵素遺伝子、その転写量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

① Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Biochemical and functional

- characterization of phosphoserine aminotransferase from *Entamoeba histolytica*, which possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 71-83.
- ② Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauser, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., Petri, Jr., W. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 163-176.
- ③ Sato, D., Yamagata, W., Kamei, K., Nozaki, T. and Harada, S. (2006) Expression, purification, and crystallization of L-methionine  $\gamma$ -lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 1034-1036.
- ④ Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 164-187.
- ⑤ Clark, C.G., Cecilia, U., Alsmark, M., Hofer, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noel, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers, J. P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., and Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* 65, 51-190.
- ⑥ Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis. *FEBS J.* 275, 548-560.
- ⑦ Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine  $\gamma$ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 697-699, 2008.
- ⑧ Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- ⑨ Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028. (Review)
- ⑩ Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736.
- ⑪ Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61.
- ⑫ Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.* 12, 331-342.
- ⑬ Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104.
- ⑭ Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 9, 926-933.
- ⑮ Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation

in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 285, 39160-39170.

- ⑯ Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. BMC Genomics 12, 275, 2011.
- ⑰ Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2045-2052, 2011.
- ⑱ Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., Nozaki, T. Sulfate activation in mitosomes plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. PLoS Neglect. Trop. Dis. 5, e1263, 2011.

〔学会発表〕（国際会議又は国内招待講演のみ計 40 件）

- Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Iron sulfur (Fe-S) cluster assembly in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*: localization, oxygen sensitivity, and physiological significance. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Jun 18-23, 2006, Kyoto.
- Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Cysteine biosynthesis pathway in *Entamoeba histolytica* is a rational target to develop new chemotherapeutics against amebiasis. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity., Sept 4-7, 2006, Awaji, Hyogo, Japan.
- Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Regulation and physiological importance of sulfur-containing amino acid metabolism in *Entamoeba histolytica*. 41st Joint Conference on Parasitic Diseases of The Japa-United States Cooperative Medical Science Program, Feb 1-3, 2007, Tokyo.
- Nozaki, T. (2007) Regulation of secretion of cysteine proteases by Rab11B small GTPase and proteinous inhibitors in *Entamoeba histolytica*. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health,

Amsterdam, the Netherlands, May 24-28, 2007.

- Ali, V., Husain, A., and Nozaki, T. (2007) Characterization of cysteine biosynthetic pathway: a potential drug target in *Entamoeba histolytica*. The 7th International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, Sept 1-5, 2007.
- Hussain, S., Ali, V., and Nozaki, T. (2007) Characterization and evaluating the role of serine O-acetyltransferase isoforms in cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba histolytica*. The 7th International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, Sept 1-5, 2007.
- Husain, A., Hishiki, T., Gilchrist, C. A., Ali, V., Suematsu, M., Petri, Jr., W. A., and Nozaki, T. (2007) Metabolic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 7th International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, Sept 1-5, 2007.
- Nozaki, T. (2007) Autophagy in *Entamoeba*. 13<sup>th</sup> Forum Cheju Korea-Japan Parasitology Seminar, Oct 23-25, 2007, Chuncheon, Korea.
- Nozaki, T. (2007) Proteomic analysis of the virulence of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 2<sup>nd</sup> Mexican Symposium of Cellular and Molecular Proteomics of Mass Spectrometry, Guanajuato, Mexico, Nov. 4-9, 2007.
- Yousuf, M.A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2007) Unique characteristics of pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Membrane Traffic, Nov 27-29, 2007, Awaji, Hyogo, Japan.
- Miichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. The mitosome in *Entamoeba histolytica*. US-Japan Cooperative Science Program. Jan 15-17, 2008, Davis, USA.
- Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine.

- The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.
- Husein, A., Jeelani, G., Bilal, A. S., Sato, D., Mi-ichi, F., Hishiki, T., Gilchrist, C. A., Suematsu, M., Petri, Jr., W. A., and Nozaki, T. (2008) Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Shimizu, A., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Characterization of methionine gamma-lyases from enteric protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, as a potential drug target against amoebiasis". The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- Nozaki, T. (2008) Regulation of cysteine protease secretion and phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. XVIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Invited talk in the symposium). Jeju, Korea, Sept 29-Oct 3, 2008.
- Mi-ichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. (2008) The mitochondria-related organelle in the anaerobic parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Protistology: Evolution and Diversity. Tsukuba, Japan, Nov 8-9, 2008
- Mi-ichi, F., Abu, Y. M., Nakada-Tsukui, K., Kawai, S., and Nozaki, T. (2008) The mitochondria-related organelle in the anaerobic protist *Entamoeba histolytica*. International Symposium: Bacteria made organelles made eukaryotic cells. Tokyo, Japan, Nov 29-30, 2008.
- Nozaki, T., Furukawa, A., Jeelani, G., Sato, D., Karaki, T., and Harada, S. (2009) Role of sulfur-containing amino acid metabolism: characterization of two isotypes of methionine gamma-lyase in *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Nozaki, T. Rab small GTPases and phosphatidylinositides regulate phagocytosis and membrane trafficking of virulence factors: their roles in the pathogenesis of amebiasis. XVIIIth Congress of Parasitology, Aguascalientes, Mexico, September 21-26, 2009.
- Nozaki, T. Mitosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Adaptive and Innate Immune Response to Neglected Tropical Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. San Diego, January 10-11, 2010.
- Sato, D., Husain, A., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolic analysis of the human enteric parasite *Entamoeba histolytica*: Discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapeutics. Metabolomics 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands
- Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomics of parasite differentiation: metabolomic profiling of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* revealed activation of unpredicted pathways during differentiation of the proliferative into dormant stage. Metabolomics

- 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands
- Nozaki, T. Unprecedented role of the mitosome in *Entamoeba histolytica*. The 18<sup>th</sup> Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, July 2-7, 2010, Kanazawa, Japan
- Nozaki, T. Mitosomes from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* possess unique functions and minimal import machinery. The XIII<sup>th</sup> International Congress of Parasitology. August 15-20, 2010, Melbourne, Australia.
- Nozaki, T., Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Suematsu, M., and Soga, T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapy. Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects" September 22-24, 2010, Montreal.
- Penuliar, G. and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects" September 22-24, 2010, Montreal.
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: Transcriptome analysis during encystation. 21<sup>st</sup> Molecular Parasitology Meeting, WoodsHole, Massachusetts, USA. September 12-16, 2010
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: transcriptome analysis during encystation. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Jeelani, G., Sato, D., Husein, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis during differentiation of enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* into the infectious cyst stage. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Mi-ichi, F., Yousuf, A., Makiuchi, T., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Gene silencing of mitochondrial proteins causes growth inhibition and suggests essentiality of mitosomes in *Entamoeba histolytica*. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Mi-ichi, F., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis of sulfur containing amino acid metabolism in *E. histolytica*. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the *Entamoeba* mitochondrial remnant. The 45<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the *Entamoeba* mitochondrial remnant. Biology of Symbiosis: Memorial Symposium for the 26<sup>th</sup> International Prize for Biology-Celebrating Dr. Nancy A. Moran. December 7-8, 2010, Tsukuba, Japan.
- Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The Second Cross-Straits and Asia Pacific International Conference on Parasites, August 31-September 2, 2011, Tainan, Taiwan. (Invited lecture)
- Nozaki, T. A novel import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan. (Symposist and Convenor)
- Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. Novel receptor family proteins mediate transport of lysosomal enzymes in the enteric protozoan parasite

*Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan. (Symposist)

Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Trafficking mechanisms of phagosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan.

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/para/parasite.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 智義 (Tomoyoshi Nozaki)

国立感染症研究所寄生動物部・部長

研究者番号：60198588

### (2) 研究分担者

Vahab Ali

群馬大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20400757

(H18～H20)

津久井 久美子 (Kumiko Tsukui)

国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官

研究者番号：00420092

(H18～H20)

佐藤 暖 (Dan Sato)

慶応義塾大学先端生命科学研究所・特別研究助教

研究者番号：50468477

(H21～H22)