

様 式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23117005

研究課題名（和文）ミトコンドリアの進化の多様性

研究課題名（英文）Multidirectional evolution of mitochondria

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 164,900,000 円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの進化の多様性を理解することを目的として、主に嫌気的原生生物等を用いたミトコンドリア関連オルガネラのタンパク質構成因子、生理機能、タンパク質・代謝物輸送装置、分裂装置等の分子レベルでの同定と機能解析並びに関連した全ゲノム解析等を実施し、多方向性のミトコンドリア進化の様態を解明し、進化の方向を決定する因子に関する様々な知見を獲得した。

研究成果の概要（英文）：We aimed at demonstration and elucidation of multidirectional evolution of mitochondria in eukaryotes, particularly in anaerobic protists. We mainly elucidated physiological functions, protein/metabolite transport mechanisms, quality control mechanisms, genomic and transcriptomic regulation of highly divergent mitochondrion-related organelles such as mitosomes and hydrogenosomes in protists. Our studies demonstrated the unique mechanisms that evolved under anaerobic and free living / parasitic conditions in detail, and gave insights into evolutionary constraints leading to such diversities.

研究分野：生化学・細胞生物学・感染症・寄生虫学・原生生物学・代謝・小胞輸送・病原機構・創薬

キーワード：進化 共生 オルガネラ ミトコンドリア 嫌気 寄生

1. 研究開始当初の背景

本研究は、マトリョーシカ型進化原理の内部共生に伴うオルガネラと真核生物の進化を理解する取り組みの一つとして、ミトコンドリアの進化の多様性を理解するために実施された。ミトコンドリアは α プロテオバクテリアの内部共生を由来とするが、宿主による隷属化、嫌気適応に従い、縮退進化を遂げる。その変化の方向性と様態は多様である。しかし、ミトコンドリアの進化多様性に関する知見はオビストコントやアーケプラスチダなどの大グループのごく一部の生物群について報告されているのみであり、真核生物の他の大グループのミトコンドリア進化に関する知見はほとんど存在していなかった。とくに典型的なミトコンドリアが嫌気・微好気環境に適応した結果生ずると考えられていたミトコンドリア関連オルガネラ (MRO) に関する知見は、真核生物系統樹の中に散在するごく一部の寄生虫に関して報告があるのみで、その進化プロセスに関する研究はまだ行われていなかった。そこで、以下の大きく 4 点の研究を行った。

嫌気適応を果たしたヒトの大腸に寄生する赤痢アメーバや *Entamoeba* 属原虫の高度に縮退したミトコンドリア (マイトソーム) の生理機能、タンパク質・代謝物輸送機構、分裂・品質保証等オルガネラ維持機能の解析を行った。更に、典型的なミトコンドリアをもたない嫌気性の生物群フォルニカータに属す生物種を対象に、ゲノム・EST 解析及び MRO のプロテオーム解析を行い、比較解析を目指す。

また、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に病原性突然変異を有するミトコンドリア病モデルマウスを複数系統は、ヒトミトコンドリア病の症状の一部をよく模倣するが、ヒトでみられる症状の全てが再現される訳ではない。その理由として、ヒトでは mtDNA 突然変異の種類が数多く知られており、変異ごとに病態も異なることに加え、核 DNA の多様性も病態の発症メカニズムに関わっていることが考えられた。この仮説を証明するためには、既存の病態モデルマウスにおいて核 DNA にも変化を加えること、さらにこれまで樹立されたものとは異なる mtDNA 突然変異を有する新規病態モデルマウスの作出という 2 つのアプローチが必要であった。

更に、進化的位置の不明確な *Kudoo aseptumpunctata* のミトコンドリアの解析を行うこととした。*Kudoo aseptumpunctata* は養殖ヒラメ喫食後の平均 6 時間を潜伏期とする嘔吐・下痢の原因病原体であり、次世代シーケンサーによるメタゲノム解読法で発見された。*Kudoo septempunctata* は、ミクソゾア門に属する後生動物で、数個の細胞からなる簡単な個体構造を持つ。ミクソゾアは、魚と環形動物への交互寄生という独特の生活環を持つが、ゲノムは未解読で進化も不明である。*Kudoo septempunctata* の生活環から寄生による個体構造の退化が特徴的であり、予備的なゲノム情報からもマトリョーシカ的な退化を伴うゲノム縮退が生じている貴重なモデル生物であることが示唆されていた。

2. 研究の目的

赤痢アメーバのマイトソームの生理機能を明らかにする。特に硫酸活性化によって合成された活性硫酸 PAPS の役割と PAPS によって合成される硫酸化脂質の性状と機能を明らかにすることを目指した。同時に、赤痢アメーバのマイトソームへのタンパク質輸送機構をインシリコ解析による同定するとともに、生化学的・遺伝学的・細胞化学的方法でその特徴を明らかにすることを目指した。同時に、赤痢アメーバのマイトソームの分裂・融合の分子機構を明らかにすること、赤痢アメーバマイトソームの新規膜タンパク質を同定し、その維持機構を統合的に解明することを目指した。

更に、嫌気環境下におけるミトコンドリア進化の多様性を明らかにするために、典型的なミトコンドリアをもたない嫌気性の生物群フォルニカータに属す生物種を対象に、ゲノム・EST 解析及びミトコンドリア関連オルガネラ (MRO) のプロテオーム解析を行い、得られたデータを他のフォルニカータ生物種および姉妹群であるパラバサリアに属す生物種と比較解析することにより、退化型ミトコンドリアの機能および関連する代謝

や情報発現機構の分子進化を解明しようとした。また、これまでにミトコンドリア全ゲノム配列データの報告のない多様な新奇真核非モデル微生物におけるデータの取得とそれらに基づく比較解析から、真核生物におけるミトコンドリアゲノム進化の概要を明らかにしようとした。

更に、核 DNA と mtDNA それぞれを改変したマウスの解析を通じて、核 DNA と mtDNA がミトコンドリア病の病態発症メカニズムにどのように関わっているかを解明する。また、*Kudoo septempunctata* の特徴的な生活環境ゆえにゲノム情報等の遺伝情報は乏しいが、総合的なゲノミクスおよびトランスクリプトーム解析を用いてマトリョーシカ的な交互寄生に依存する生命の特徴を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

赤痢アメーバの培養は HM-1:IMSS cl6 株を用いて常法によって行った。栄養型の形質転換、マイトソーム分画・精製、組換えタンパク質作製、35S 硫酸ラベル化、蛍光顕微鏡観察、等は論文に詳細に記載された方法により行った。フォルニカータ生物群に属する 4 つの典型的な mt をもたない生物種、*CLO-NY0171* 株、*Kipferlia bialata*、*Dysnectes brevis*、*Trepomonas* sp. について NGS 解析によりトランスクリプトームデータを得、フォルニカータ生物群の系統樹の推測を行った。次に、それぞれの生物種に関して、培地中に存在する餌バクテリアの種類を 1 種のみにすることを目標に二者培養系の確立を目指した。二者培養系が確立できた *K. bialata* と、ほぼ二者培養系に近い状態が確立できた *D. brevis* の 2 生物種について NGS による全ゲノム解析を実施した。得られたデータおよび既存のデータをもとに比較ゲノム・トランスクリプトーム解析を行い、MRO の機能進化に関する推測を行った。一方、さまざまな新奇真核微生物に関して、mt ゲノム解析を実施した。

mtDNA に病原性突然変異を有するミトコンドリア病モデルマウスの病態発症メカニズムにおける核 DNA の関与を検討するために、核 DNA にコードされたミトコンドリア分裂因子 Drp1 を組織特異的に欠損したマウスを樹立し、野生型 Drp1 を有するモデルマウスとの病態比較を行った。また、mtDNA に病原性突然変異を有するモデルマウスを新たに樹立するために、マウス培養細胞のスクリーニングを実施し、新規の病原性突然変異型 mtDNA の探索を行った。

Kudoo のゲノム情報解析は以下のように実施した。*Kudoo septempunctata* に感染している養殖ヒラメの冷凍切身を PBS で懸濁し、浮遊してきた直径約 10 μ m の細胞を 100 μ m フィルターにてゴミを除いて純度をあげ回収した。DNA 精製は常法のプロテアーゼ処理後、QIAGEN カラムにて精製した。精製ゲノム DNA を用いて イルミナ GAIIx /MiSeq もしくは PacBio 1 分子シーケンサーにて配列解読した。SSPACE および HGAP2 にて de novo assembly を行った。トランスクリプトーム解析は以下のように行った。ヒト直腸ガン細胞 Caco2 に生 *Kudoo septempunctata* を接種して、経時的に Caco2 の total RNA を調製して mRNA を精製後、ScriptSeq v2 kit にて RNA-seq ライブラリーを作成した。配列解読は MiSeq v3 kit 150 cycle にて行った。情報解析は CLC Genome workbench v7.5 で行った。

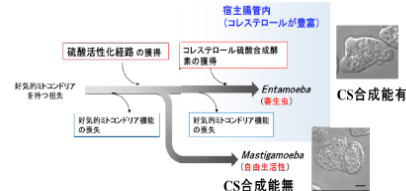
4. 研究成果

a. 赤痢アメーバのマイトソームで合成された活性化硫酸の最終産物の同定と機能解析

赤痢アメーバの栄養型を 35S 硫酸でラベルし、脂質を抽出、OASIS カラムで精製し、2 次元薄層クロマトグラフィーで展開し、8 種類の SL1-8 と分離された脂質を得た。SL1 の構造を NMR により分析し、コレステロール硫酸 (CS) であることを決定した。更に、赤痢アメーバゲノムから硫酸転移酵素 SULT11-10 の遺伝子を探したところ、10 種のアイソエンザイムが発見された。それぞれの遺伝子の発現抑制体を small antisense RNA 触媒遺伝子サイレンシング (gs) 法で作製した。硫酸転移酵素 SULT6 を gs したときのみ SL1=CS の合成が阻害され、SULT6 が責任遺伝子であることが示された。更に、SULT6 の遺伝子発現プロファイルを解析すると、その mRNA の発現量が嚢子化 (encystation) で顕著に増加することが示された。CS の嚢子化における関与を示すために、硫酸活性化の初段酵素 ATP スルフィラーゼ (AS) の阻害剤 chlorate を培養アメーバ細胞に添加した

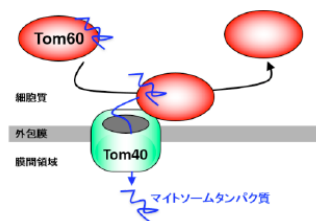
ことろ、CSの合成と嚢子化の効率が比例して抑制された。以上のことから、赤痢アメーバの特殊進化したミトコンドリア=マイトソームが区画化された硫酸活性化経路を利用してCSの合成と嚢子化の制御の機能するという新しいミトコンドリア進化の様態を示した。アメボゾア Amoebozoa におけるミトコンドリアの進化過程は以下のように予想された。

➢ CS合成能の獲得が寄生適応に繋がった可能性



b. 赤痢アメーバマイトソームのタンパク質輸送機構の解明

赤痢アメーバゲノム中には外膜・内膜の輸送体で他種生物で保存したタンパク質は外膜の TOM40 と呼ばれる中心孔のみであった。TOM40 の複合体を免疫沈降法で分離し、構成因子を同定したところ、TOM60 とその後名付けた 60kDa の TPR ドメインを有するタンパク質が同定された。TOM60 はマイトソームマトリクスタンパク質である ATP スルフィラーゼと膜タンパク質のシャペロンである Hsp20, Hsp70 と結合し、マイトソームへのタンパク質の受容体・輸送体であることが明らかとなった。TOM40, TOM60 の gs 株は増殖阻害を示し、マイトソームタンパク質輸送機構が栄養型の増殖に必須であることが示された。



c. 赤痢アメーバの新規ベータバレル型タンパク質の同定

In silico 予測により、30kDa の新規ベータバレル型タンパク質 MBOMP30 を同定した。MBOMP30 はマイトソームの外膜に存在することが免疫電子顕微鏡、細胞分画法、生化学的手法により確認された。また円二色光法によりベータストランドリッチな三次元構造が確認された。

d. 赤痢アメーバの新規マイトソームタンパク質の同定

赤痢アメーバのマイトソームプロテオームの中から 25 種の膜貫通領域 TM をもつタンパク質を選択し、局在解析を行い、そのうち 3 種類のタンパク質がマイトソーム局在であることを確認した。

e. ミトコンドリアの嫌氣的進化の多様性

4 種のフォルニカータ生物、*K. bialata*, *D. brevis*, *CLO-NY0171*, *Trepomonas* sp. の NGS データに基づく比較解析から、フォルニカータ生物群に関する高解像度の系統樹を推測することができた。また、MRO における嫌氣的エネルギー産生経路の進化において、関連酵素の獲得や別の酵素への転換に遺伝子水平転移が大きく貢献していることが明らかとなった

(Kolisko, Kamikawa, Leger et al. 投稿中)。さらに、MRO のプロテオーム解析、タンパク質局在解析を進めるための予備的解析を行った。Mt ゲノム解析に関してはハプト藻類 *Chrysochromulina* sp.、カタブレファリス類 *Leucocryptos marina*、クリプティスタ生物群の原始系統 *Palpitomonas bilix*、クロララクニオン藻 *Lotharella oceanica*、ディスコバ生物群に属することが判明した鞭毛虫 *Tsukubamonas globosa*、および有中心粒太陽虫の未記載株に関して、mt ゲノム配列データを得ることができ、mt ゲノムの多様性に

関する新知見を明らかにした。とくに、*Chrysochromulina* sp., *L. marina* の解析からイントロン転移に関する複雑な進化史が明らかとなり、*T. globosa* の解析からはこれまでに例のない新規のミトコンドリア DNA コード遺伝子が発見された。

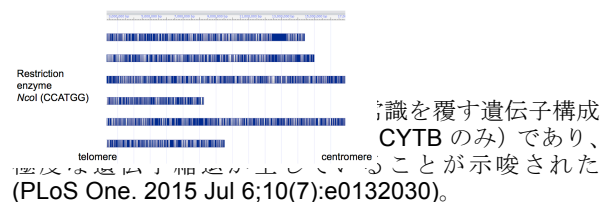
f. 哺乳動物細胞におけるミトコンドリア病の分子基盤の解明

Drp1 を欠損したマウスでは、野生型 Drp1 を有するマウスと比較して病態が重篤化することを確認した。この結果は、ミトコンドリア病の病態形成に、mtDNA だけでなく核 DNA にコードされた遺伝子の機能も大きく関与することを示しており、核-ミトコンドリア間クロストークが病態形成に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

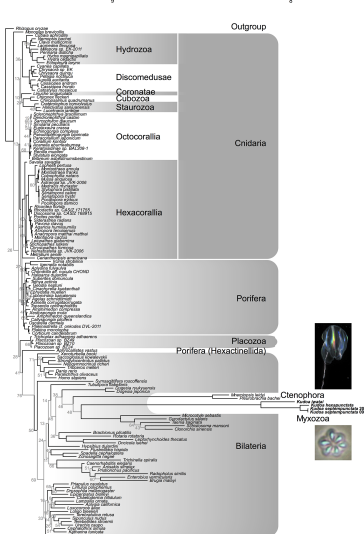
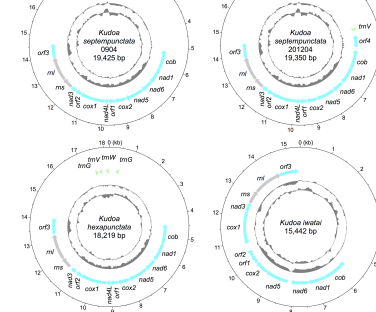
また、マウス培養細胞のスクリーニングから、ヒトミトコンドリア病患者において症例報告がある点突然変異と相同な点突然変異を有するクローンを見出し、この変異を濃縮することに成功した。現在、当該変異をマウス ES 細胞に導入し、キメラマウスの作出を通じて新規病態モデルマウスの樹立を試みている。

g. *Kudoa septempunctata* のゲノムおよびミトコンドリアゲノム解析

Kudoa septempunctata の全ゲノム解読とミトコンドリア DNA 配列を解読した。配列情報と合わせて光学マッピング法(Argus system)により全ゲノム制限酵素地図を作成した。ゲノムサイズ 83 Mb で二倍体の 3 本の染色体からなることを明らかにした。



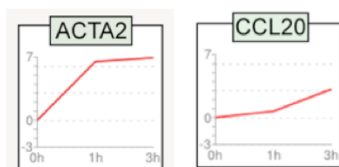
認識を覆す遺伝子構成 (CYTB のみ) であり、ことが示唆された (PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0132030)。



h. *Kudoa septempunctata* のトランスクリプトーム解析
環形動物と魚類を交互寄生して生存する *Kudoa septempunctata* のゲノム情報を活用し、トランスクリプ

もしくは左右相称動物の生物であり、今後、ゲノム解析が有効だと

トーム解析を行った。ヒト腸管培養細胞 Caco2 との接触により、培養細胞の遺伝子発現がどう変化するか検討した。炎症性ケモカイン Ccl20 およびアクチン Acta2 の転写増強が顕著であり、*Kudoa septempunctata* との接触により炎症応答と細胞内骨格のリアレンジメントが生じていると推察された。



i. *Kudoa septempunctata* の Multi-locus Sequencing Typing (MLST) 法の開発

解読したミトコンドリア遺伝子を標的にしたナナホシクダの高感度かつ高精度の検出系開発のための基盤情報を得ることができた。ミトコンドリアゲノムは細胞中に大量に存在するため、18S-rRNAなどの核ゲノムを対象とした検査系よりも高感度なPCR検出が可能である。また、ミトコンドリア・ゲノムの変異導入率が高いことから、18S-rRNAよりも明確な *Kudoa* 属の分類法を確立することが可能と思われる。他種のミトコンドリア遺伝子を同定して比較することにより、食中毒に起因する種のみを検出系も開発できると考えている (J Fish Dis. 2016 Jun;39(6):667-72.)。一方で、クダアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの違いを利用して産地の区別ができれば、疫学解析にも応用できると示唆された。

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 54 件)

- Pineda E, Vazquez C, Encalada R, Nozaki T, Sato E, Hanadate Y, Nequiz M, Olivos-Garcia A, Moreno-Sanchez R, Saavedra E. Roles of acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) and acetate kinase (PPI-forming) in ATP and PPI supply in *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 1163-1172 (2016).
- Hanadate Y, Saito-Nakano Y, Nakada-Tsukui K, *Nozaki T. Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* (2016).
- Jeelani G, *Nozaki T. *Entamoeba* thiol-based redox metabolism: A potential target for drug development. *Mol Biochem Parasitol* (2016).
- Santos HJ, Imai K, Hanadate Y, Fukasawa Y, Oda T, Mi-ichi F, *Nozaki T. Screening and discovery of lineage-specific mitochondrial membrane proteins in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* (2016).
- Srivastava VK, Chandra M, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. Crystal Structure Analysis of Wild Type and Fast Hydrolyzing Mutant of EhRabX3, a Tandem Ras Superfamily GTPase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* **428**, 41-51 (2016).
- Mi-ichi F, Nozawa A, Yoshida H, Tozawa Y, *Nozaki T. Evidence that *Entamoeba histolytica* mitochondrial carrier family links mitochondrial and cytosolic pathways through exchange of PAPS and ATP. *Eukaryot Cell* (2015).
- Chiba Y, Kamikawa R, Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Nozaki T. Discovery of PPI-type Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Genes in Eukaryotes and Bacteria. *J Biol Chem* **290**, 23960-23970 (2015).
- Verma K, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. Insights into endosomal maturation of human holo-transferrin in the enteric parasite *Entamoeba histolytica*: essential roles of Rab7A and Rab5 in biogenesis of giant early endocytic vacuoles. *Cell Microbiol* (2015).
- Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Tsuboi K, Miyamoto E, Watanabe N, Kawakami E, *Nozaki T. Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **17**, 1510-1522 (2015).
- Mi-ichi F, Miyamoto T, Takao S, Jeelani G, Hashimoto T, Hara H, *Nozaki T, Yoshida H. *Entamoeba* mitochondria play an important role in encystation by association with cholesterol sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2884-E2890 (2015).
- Emmanuel M, Nakano YS, Nozaki T, Datta S. Small GTPase Rab21 mediates fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: implications in pathogen invasion. *PLoS Pathog* **11**, e1004666 (2015).
- Santos HJ, Imai K, Makiuchi T, Tomii K, Horton P, Nozawa A, Ibrahim M, Tozawa Y, *Nozaki T. A novel Mitosomal beta-barrel Outer Membrane Protein in *Entamoeba*. *Sci Rep* **5**, 8545 (2015).
- Jeelani G, Sato D, Soga T, Watanabe H, *Nozaki T. Mass spectrometric analysis of L-cysteine metabolism: physiological role and fate of L-cysteine in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *MBio* **5**, e01995 (2014).

- Anwar S, Dikhit MR, Singh KP, Kar RK, Zaidi A, Sahoo GC, Roy AK, Nozaki T, Das P, Ali V. Interaction between Nbp35 and Cfd1 proteins of cytosolic Fe-S cluster assembly reveals a stable complex formation in *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* **9**, e108971 (2014).
- Valdes J, Nozaki T, Sato E, Chiba Y, Nakada-Tsukui K, Villegas-Sepulveda N, Winkler R, Azuara-Liceaga E, Mendoza-Figueroa MS, Watanabe N, Santos HJ, Saito-Nakano Y, Galindo-Rosales JM. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics* **111**, 30-45 (2014).
- Jeelani G, *Nozaki T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: applications and implications. *Curr Opin Microbiol* **20**, 118-124 (2014).
- Marumo K, Nakada-Tsukui K, Tomii K, *Nozaki T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* **44**, 625-635 (2014).
- Hertz R, Tovy A, Kirschenbaum M, Geffen M, Nozaki T, Adir N, Ankri S. The *Entamoeba histolytica* Dnmt2 homolog (Ehnmeth) confers resistance to nitrosative stress. *Eukaryot Cell* **13**, 494-503 (2014).
- Chandra M, Mukherjee M, Srivastava VK, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. Insights into the GTP/GDP cycle of RabX3, a novel GTPase from *Entamoeba histolytica* with tandem G-domains. *Biochemistry* **53**, 1191-1205 (2014).
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* **100**, 3-17 (2014).
- Ali V, Nozaki T. Iron-sulphur clusters, their biosynthesis, and biological functions in protozoan parasites. *Adv Parasitol* **83**, 1-92 (2013).
- De Cadiz AE, Jeelani G, Nakada-Tsukui K, Caler E, Nozaki T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* **8**, e74840 (2013).
- Furukawa A, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **81**, 1820-1829 (2013).
- Makiuchi T, Mi-ichi F, Nakada-Tsukui K, *Nozaki T. Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for *Entamoeba* mitochondrial transport. *Sci Rep* **3**, 1129 (2013).
- Jeelani G, Husain A, Sato D, Soga T, Suematsu M, *Nozaki T. Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* **95**, 309-319 (2013).
- Husain A, Sato D, Jeelani G, Soga T, *Nozaki T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1831 (2012).
- Jeelani G, Sato D, Husain A, Escueta-de Cadiz A, Sugimoto M, Soga T, Suematsu M, *Nozaki T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS One* **7**, e37740 (2012).
- Nakada-Tsukui K, Tsuboi K, Furukawa A, Yamada Y, *Nozaki T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cell Microbiol* **14**, 1299-1317 (2012).
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghisso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012).
- Mishra V, Kumar A, Ali V, Nozaki T, Zhang KY, Bhakuni V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica*-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie* **94**, 1676-1686 (2012).
- Furukawa A, Nakada-Tsukui K, *Nozaki T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and beta-hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **8**, e1002539 (2012).
- Penuliar GM, Furukawa A, Nakada-Tsukui K, Husain A, Sato D, *Nozaki T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother* **67**, 375-386 (2012).
- Mishra V, Kumar A, Ali V, Nozaki T, Zhang KY, Bhakuni V. Role of conserved active site tryptophan-101 in functional activity and stability of phosphoserine aminotransferase from an enteric human parasite. *Amino Acids* **43**, 483-491 (2012).
- Mishra V, Kumar A, Ali V, Nozaki T, Zhang KY, Bhakuni V. Glu-108 is essential for subunit assembly and dimer stability of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **181**, 117-124 (2012).
- Mi-ichi F, Makiuchi T, Furukawa A, Sato D, *Nozaki T. Sulfate activation in mitochondria plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1263 (2011).
- Penuliar GM, Furukawa A, Sato D, *Nozaki T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2045-2052 (2011).
- Husain A, Jeelani G, Sato D, *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).
- Mishra V, Ali V, Nozaki T, Bhakuni V. Biophysical characterization of

- Entamoeba histolytica phosphoserine aminotransferase (EhPSAT): role of cofactor and domains in stability and subunit assembly. *Eur Biophys J* 40, 599-610 (2011).
- 39 Hashimoto T, Kitagawa H. A system for supporting phylogenetic analyses over alignments of next generation sequence data. Proceedings for the 10th International Conference on Complex, Intelligent, and Software Intensive Systems (CISIS-2016) (2016).
 - 40 Tanifuji G, Archibald JM, Hashimoto T. Comparative genomics of mitochondria in chlorarachniophyte algae: endosymbiotic gene transfer and organellar genome dynamics. *Sci Rep* 6, 21016 (2016).
 - 41 Noguchi F, Shimamura S, Nakayama T, Yazaki E, Yabuki A, Hashimoto T, Inagaki Y, Fujikura K, Takishita K. Metabolic Capacity of Mitochondrion-related Organelles in the Free-living Anaerobic Stramenopile *Cantina marsupialis*. *Protist* 166, 534-550 (2015).
 - 42 Arisue N, Hashimoto T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int* 64, 254-259 (2015).
 - 43 Nishimura Y, Kamikawa R, Hashimoto T, Inagaki Y. An intronic open reading frame was released from one of group II introns in the mitochondrial genome of the haptophyte sp. NIES-1333. *Mob Genet Elements* 4, e29384 (2014).
 - 44 Kamikawa R, Kolisko M, Nishimura Y, Yabuki A, Brown MW, Ishikawa SA, Ishida K, Roger AJ, Hashimoto T, Inagaki Y. Gene content evolution in Discobid mitochondria deduced from the phylogenetic position and complete mitochondrial genome of *Tsukubamonas globosa*. *Genome Biol Evol* 6, 306-315 (2014).
 - 45 Kamikawa R, Brown MW, Nishimura Y, Sako Y, Heiss AA, Yubuki N, Gawryluk R, Simpson AG, Roger AJ, Hashimoto T, Inagaki Y. Parallel re-modeling of EF-1alpha function: divergent EF-1alpha genes co-occur with EFL genes in diverse distantly related eukaryotes. *BMC Evol Biol* 13, 131 (2013).
 - 46 Ishikawa SA, Inagaki Y, Hashimoto T. RY-Coding and Non-Homogeneous Models Can Ameliorate the Maximum-Likelihood Inferences From Nucleotide Sequence Data with Parallel Compositional Heterogeneity. *Evol Bioinform Online* 8, 357-371 (2012).
 - 47 Nishimura Y, Kamikawa R, Hashimoto T, Inagaki Y. Separate origins of group I introns in two mitochondrial genes of the katablepharid *Leucocryptos marina*. *PLoS One* 7, e37307 (2012).
 - 48 Arisue N, Hashimoto T, Mitsui H, Palacpac NM, Kaneko A, Kawai S, Hasegawa M, Tanabe K, Horii T. The Plasmodium apicoplast genome: conserved structure and close relationship of P. ovale to rodent malaria parasites. *Mol Biol Evol* 29, 2095-2099 (2012). doi: 10.1093/molbev/mss082
 - 49 Takishita K, Kolisko M, Komatsuzaki H, Yabuki A, Inagaki Y, Cepicka I, Smejkalova P, Silberman JD, Hashimoto T, Roger AJ, Simpson AG. Multigene phylogenies of diverse Carpediemonas-like organisms identify the closest relatives of 'amitochondriate' diplomonads and retortamonads. *Protist* 163, 344-355 (2012).
 - 50 Shimizu A, Enoki S, Ishikawa K, Mito T, Obata K, Nagashima R, Yonekawa H, Nakada K, Hayashi J. Mouse somatic mutation orthologous to MELAS A3302G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene confers respiration defects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 467(4): 1097-1102.
 - 51 Hayashi C, Takibuchi G, Shimizu A, Mito T, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J. A somatic T15091C mutation in the Cytb gene of mouse mitochondrial DNA dominantly induces respiration defects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 463(4): 1021-1027.
 - 52 Hashizume O, Ohnishi S, Mito T, Shimizu A, Ishikawa K, Nakada K, Soda M, Mano H, Togayachi S, Miyoshi H, Okita K, Hayashi J. Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci Rep*. 2015; 5: 10434. doi: 10.1038/srep10434.
 - 53 Shimizu A, Mito T, Hashizume O, Yonekawa H, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J. G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA^{Lys} regulates late-onset disorders in transmittochondrial mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 459(1): 66-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.070.
 - 54 Mito T, Ishizaki H, Suzuki M, Morishima H, Ota A, Ishikawa K, Nakada K, Maeno A, Shiroyoshi T, Hayashi J. Transmittochondrial mito-miceΔ and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 456(4): 933-937. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.009.
 - 55 Takeuchi F, Sekizuka T, Ogasawara Y, Yokoyama H, Kamikawa R, Inagaki Y, Nozaki T, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Kuroda M. The Mitochondrial Genomes of a Myxozoan Genus Kudoa Are Extremely Divergent in Metazoa. *PLoS One*. 2015 Jul 6;10(7):e0132030. doi: 10.1371/journal.pone.0132030. eCollection 2015. PubMed PMID: 26148004; PubMed Central PMCID: PMC4492933.
 - 56 Takeuchi F, Ogasawara Y, Kato K, Sekizuka T, Nozaki T, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Kuroda M. Genetic variants of Kudoa septempunctata (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. *J Fish Dis*. 2016 Jun;39(6):667-72. doi: 10.1111/jfd.12395. Epub 2015 Jun 11. PubMed PMID: 26096292.
 - 57 Sugita-Konishi Y, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A, Ohnishi T. New validated rapid screening methods for identifying Kudoa septempunctata in olive flounder (Paralichthys olivaceus). *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(2):145-7. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.133. Epub 2014 Dec 24. PubMed PMID: 25672358.
 - 58 Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. Identification of Kudoa septempunctata as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of Paralichthys olivaceus in raw fish. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(8):1046-52. doi: 10.1093/cid/cir1040. Epub 2012 Jan 26. PubMed PMID: 22281845.
- 〔学会発表〕 (計 43 件)
1. 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)
 2. Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., and Furukawa, A. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Prosistology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Workshop).
 3. Nozaki, T. Protozoan metabolism and drug development: discovery and targeting a novel pathway in the enteric parasite. Singapore-Japan Joint Forum on Emerging Concepts in Microbiology. November 15-16, 2011, Singapore.
 4. Nozaki, T. Divergent evolution of mitochondrion-related organelles under anaerobic conditions: Function and transport of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. The 33rd Japanese Society of Molecular Biology, December 13-16, 2011, Yokohama.
 5. Nozaki, T. Evolutionary divergence of function and import of the mitochondria. JST Vinnova Japan-Sweden Joint Workshop, Multidisciplinary BIO, January 25, 2012, Tokyo.
 6. Nozaki, T. Metabolism and metabolomics in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebiasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 2-3, 2012, Delhi, India. (Invited lecture)
 7. Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Escueta-de Cadiz, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomics of parasite differentiation: metabolomic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unprecedented pathways during encystation. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebiasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India.
 8. Anwar, S., Patel, P., Roushan, R., Das, P., Nozaki, T., and Roy, A. K., and Ali, V. Purification, characterization, and homology modeling of EhNbp and EhCfd proteins involved in Fe-S clusters assembly in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebiasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India.
 9. Murakami, Y., Makiuchi, T., and Nozaki, T. Analysis of the targeting mechanism of mitochondrial protein in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebiasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India.
 10. Nozaki, T. Evolution of function and import machinery of the mitochondria under anaerobic conditions: Highly divergent mitochondrion-related organelles in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. Mito 2012, Heraklion, Greece, May 9-13, 2012.
 11. Nozaki, T. Mitosomal transport system in *Entamoeba histolytica*. Protist 2012, International Society of Evolutionary Protistology Meeting, Oslo, Norway, July 29-Aug 3, 2012.
 12. Jeelani, G., Dan, S., Husain, A., Escueta-de Cadiz, Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolome of encystation in *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
 13. Chiba, Y., Dan, S., Makiuchi, T., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Organelle metabolomics of *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
 14. Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 11-14, 2012.
 15. Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting. Bangkok, Thailand, Dec 12-14, 2012.
 16. Nozaki, T. A novel beta barrel transporter in the mitosome of *Entamoeba histolytica*. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
 17. Santos, H, Makiuchi, T., Imai, K, Tomii, K., Horton, P, and Nozaki, T. A novel mitosomal beta barrel protein in *Entamoeba histolytica*. International Congress of Protistology XIV, Jul 28-Aug 2, 2013, Vancouver.
 18. Nozaki, T. Evolution of mitochondrion-related organelles in parasitic protists under anaerobic conditions. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa.
 19. Santos, H, Makiuchi, T., Imai, K, Tomii, K., Horton, P, and Nozaki, T. A novel mitosomal beta barrel protein in *Entamoeba histolytica*. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa.
 20. Nozaki, T. Unique evolution of mitochondrion-related organelles in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: a potential target for drug development. 16th International Conference on Emerging Infectious

- Diseases in the Pacific Rim-US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Parasitic Diseases Panel Meeting, Feb 9-12, 2014, Dhaka.
21. Nozaki, T. Evolution of mitochondrion-related organelles in parasitic protists under anaerobic conditions. 33rd Yonsei Tropical Medicine Symposium "Recent Progress on Cell Biology of Protozoan Parasites", Institute of Tropical Medicine, Yonsei University College of Medicine, Feb 20, 2014, Seoul.
 22. Nozaki, T. Divergent evolution of protein and metabolite transport in the anaerobic protozoan *Entamoeba histolytica*. CIFAR meeting, Prague, Czech Republic, June 25-28, 2014.
 23. Nozaki, T. Metabolomics analysis of differentiation and anti-oxidative stress mechanisms of the enteric protozoan *Entamoeba* (workshop; invited) International Conference of Parasitology XIII, Mexico City, Mexico, Aug 10-15, 2014.
 24. Herbert J. Santos, Kenichiro Imai, Takashi Makiuchi, Kentaro Tomii, Paul Horton, Akira Nozawa, Mohamed Ibrahim, Yuzuru Tozawa, and Tomoyoshi Nozaki. A novel mitochondrial β -barrel outer membrane protein in *Entamoeba*. Seminar on Amebiasis, Campeche, Oct 13-16, 2015.
 25. Somlata, Kumiko Nakada-Tsukui, Kentaro Tomii and Tomoyoshi Nozaki. Analyzing role of BAR domain proteins in *Entamoeba histolytica*. Seminar on Amebiasis, Campeche, Oct 13-16, 2015.
 26. Takashi Makiuchi, Herbert J. Santos, Tomoyoshi Nozaki, Hiroshi Tachibana. Analysis of the fission mechanism of mitosomes in *Entamoeba histolytica*. Seminar on Amebiasis, Campeche, Oct 13-16, 2015.
 27. Ghulam Jeelani, Yoko Chiba, Tomoyoshi Nozaki. Exploring the polyamine pathway in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Seminar on Amebiasis, Campeche, Oct 13-16, 2015.
 28. Herbert J. Santos, Ghulam Jeelani, Mihoko Mori, Kazuro Shiomi, and Tomoyoshi Nozaki. Screening of microbial metabolites for inhibitors of cysteine biosynthesis pathway in *Entamoeba histolytica*. Seminar on Amebiasis, Campeche, Oct 13-16, 2015.
 29. Tomoyoshi Nozaki. Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases, The U.S. – Japan Cooperative Medical Sciences Program, Bethesda, U.S.A., January 13-14, 2016.
 30. Nishimura Y, Amagasa T, Inagaki Y, Hashimoto T, Kitagawa H. A system for supporting phylogenetic analyses over alignments of next generation sequence data. 10th International Conference on Complex, Intelligent, and Software Intensive Systems (CISIS-2016), Jul 6-8, Fukuoka, Japan (2016).
 31. Tanifuji G, Archibald JM, Hashimoto T. Comparative analysis of chlorarachniophyte mitochondrial genomes; evolutionary insights from genome architecture and endosymbiotic gene transfer. VII ECOP-ISOP Joint Meeting, Sep 5-10, Sevilla, Spain (2015).
 32. 高林 舜, 久米 慶太郎, 神川 龍馬, 谷藤 吾朗, 稲垣 祐司, 橋本 哲男. フォルニカータ+パラバサリア生物群内でのミトコンドリア縮退進化. 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会, 9 月 26 日, 東京 (2015).
 33. Nishimura Y, Kamikawa R, Tanifuji G, Hashimoto T, Inagaki Y. Mitochondrial genome of *Palpitomonas bilix*: unique genome structure and ancestral characteristics in gene content. Protist2014, Aug 3-8, Banff, Canada (2014).
 34. Kolisko M, Kamikawa R, Andersson JO, Hashimoto T, Inagaki Y, Aimpson AGB, Roger AJ. The origin of the *Giardia* mitosome demystified: comparative analyses of predicted organellar proteomes across free-living and parasitic metamonads. International Congress of Protistology (ICOP) XIV, Jul 28-Aug 3, Vancouver, Canada (2013).
 35. 久米 慶太郎, 高林 舜, 森田 幸之介, 神川 龍馬, 稲垣 祐司, 橋本 哲男. Fomicata 生物のミトコンドリア関連オルガネラタンパク質における matrix targeting signal. 第 15 回日本進化学会大会, 8 月 28-30 日, つくば (2013).
 36. Nishimura Y, Kamikawa R, Hirasawa T, Yubuki N, Hashimoto T, Inagaki Y. An intron-rich mitochondrial cox1 gene of the katablepharid *Roombia* sp. NY0200. International Congress of Protistology (ICOP) XIV, Jul 28-Aug 3, Vancouver, Canada (2013).
 37. 石川香, 橋爪脩, 清水章文, 三藤崇行, 中田和人, 林純一. マウスミトコンドリア DNA の突然変異がコントロールする表現型~核外ゲノムの変異によるインパクト~. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市.
 38. Kaori Ishikawa, Shun Katada, Takayuki Mito, Kazuto Nakada. Mitochondrial fission is important to prevent disease phenotypes induced by a pathogenic mtDNA mutation. Molecular Mitochondria – Joint Seminar of Young Finnish-Japanese Mitoscientists. 2015/10/05, Helsinki, Finland.
 39. 石川香, 小笠原絵美, 堅田俊, 三藤崇行, 石原孝也, 林純一, 三原勝芳, 石原直忠, 中田和人. 病原性 mtDNA 突然変異の病態発症抑制機構におけるミトコンドリア分裂の役割. YoungMito2015, 2015 年 7 月 9 日, ホテル一宮シーサイドオーツカ, 千葉県一宮市.
 40. 石川香, 堅田俊, 石原孝也, 櫻澤遼太, 小笠原絵美, 林純一, 三原勝芳, 石原直忠, 中田和人. ミトコンドリア・ダイナミクスの破綻が突然変異型 mtDNA の組織内含有率に及ぼす影響. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 2014 年 12 月 3 日, 九州大学, 福岡県福岡市.
 41. 陳内理生, 原田哲也, 河合高生, 黒田誠, 竹内史比古, 久米田裕子. ミトコンドリア DNA を標的としたナナホシクダア検出法の開発. 第 34 回日本食品微生物学会総会. (江戸川区 2013 年 10 月)
 42. 竹内史比古, 関塚剛史, 野崎智義, 大西真, 小西良子, 大西貴弘, 黒田誠. ナナホシクダの退化したミトコンドリアゲノムが明らかにす
- る、ミクソゾアの左右相称動物起源. 日本進化学会第 14 回大会 (八王子市 2012 年 8 月)
43. 黒田誠. 新下痢原性寄生虫クダアの発見. 第 81 回日本寄生虫学会 (西宮市 2012 年 3 月 23-24 日)
- 【その他】
若手教育セミナーとしてバイオインフォマティクス講習会を開催した (2012 年 7 月 22 日). 20 名の参加者を迎え, “基本的な unix コマンドの習得”と Open source (無償) を最大限に活用した“次世代シーケンサー解読リードの情報解析”を中心に講習を実施した [図書] (計 1 件)
石川香・林純一・中田和人. 「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理」医学のあゆみ 254 巻 5 号 452-458 頁 2015 年 8 月 1 日.
- ## 6. 研究組織
- ### (1) 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
- ### (2) 研究分担者
- 石川 香 (ISHIKAWA, Kaori)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 40734827
- 橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 50208451
- 黒田 誠 (KURODA, Makoto)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析
研究センター・センター長
研究者番号: 80317411