

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390119

研究課題名(和文) 病原性原虫の病原因子輸送の分子基盤に関する研究

研究課題名(英文)

Molecular Basis of Transport of Virulence Factors in the Pathogenic Protist

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

研究成果の概要(和文)：

赤痢アメーバの病原機構において中心的な役割を果たすシステインプロテアーゼの細胞内輸送機構を理解することを目指し、システインプロテアーゼの輸送体の同定とその機能解析を行った。生化学的手法により、システインプロテアーゼ結合ファミリータンパク質 1(CPBF1)が同定され、その結合特異性が確認された。また、細胞分化特異的に発現するシステインプロテアーゼを網羅的転写解析により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We identified and characterized a putative receptor/carrier for cysteine proteases, which is believed to play a pivotal role in pathogenesis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. We also identified the members of cysteine protease genes that are stage-specifically expressed during differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
21年度	5,100,000	0	5,100,000
22年度	4,400,000	0	4,400,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	1,680,000	16,780,000

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：小胞輸送、病原機構、感染症、寄生虫、システインプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 赤痢アメーバ症とその病原機構

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。赤痢アメーバがヒトに寄生すると、腸管上皮に接着し、腸管及び組織内で活発に食食を行い、システインプロテアーゼ(CP)を始めとする複数の融解性病原因子を放出して細胞・組織傷害を起こす。特にCPは赤痢アメーバの腸管上皮の潰瘍、肝膿瘍の形成、免疫からの回避において中心的な役割を果たす病原因子であることが確立されていた。赤痢アメーバはゲノムに>40ものCP遺伝子をもつが、それぞれのCPの機能的特異性はほ

ほとんど理解されていないのみならず、この病原因子の輸送と活性調節機構は未解明であった。

(2)これまでの研究成果

これまでの研究により以下の事実が既に明かにされている。(1) 小胞輸送が CP の活性制御に重要な役割を果たす。特に低分子量 GTPase Rab5 (Saito-Nakano J Biol Chem 2004), Rab7A (Nakada-Tsukui Mol Biol Cell 2005; Nozaki Parasitol Res 2006), Rab7B (Saito-Nakano Cell Microbiol 2007), Rab11B(Mitra Cell Microbiol)の研究成果により、(1-a) Rab7A 及び Rab7B がゴルジ体からリソソームへの CP の輸送過程で協調的に調節を行っていること、(1-b) Rab7A はレトロマーと呼ばれる制御分子を介して CP 輸送体のリソソームからゴルジ体への逆行輸送の制御にも関与していること、(1-c) 通常細胞膜へのリサイクリングに機能する Rab11B が CP の細胞外への分泌を制御していることなどが明らかにされていた。(2) CP 活性を制御する内因性タンパク質 Inhibitor of CP (ICP)を同定し、EhICP が結合により CP 活性を阻害し、分泌を抑制することを示した(Sato FEBS Lett 2006)。すなわち、(2-a) 局在の異なる (ICP1:細胞質、EhICP2:リソソーム内) 2種の ICP により CP 活性が抑制されること、(2-b) 2種の ICP は CP に対する基質特異性を有すること、即ち ICP2 は細胞表面に発現し、病原性に強く相関する CP5 を ICP1 よりも約 10 倍強く阻害すること、(2-c) ICP の過剰発現により細胞内 CP 量に変化はないが、活性が減少すること、それに対して分泌する CP 量が 10 倍減少し、哺乳動物細胞に対する傷害性が大きく傷害されることなどを示されていた。(3) DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、肝臓・腸管感染に伴い、一部の CP アイソタイプの発現プロファイルが選択的に変化することを明らかにした (Gilchrist Mol Biochem Parasitol 2006; Okada unpublished)。具体的には、CP4, CP6 の発現は腸管感染に伴い 6-35 倍上昇し、CP4 は肝臓感染に伴っても 3 倍上昇していた。以上、CP の輸送・活性を調節する巧緻な分子機構の一端が研究の開始時に一部明らかにされつつあった。

(3) 海外の研究の現状 CP が本原虫の病原機構において重要な役割を果たすことは、阻害剤及びアンチセンスを用いた発現制御によって培養細胞に対する傷害性が減弱すること、哺乳動物への病害性が弱まることより示されていた(Lauwaet J Biol Chem 2003; Olivos-Garcia Parasitology 2003; Ankri Infect Immun 1999; Moncada Gasterology 2006)。また CP5 の過剰発現により他の CP1, CP2 の活性が上昇することが示され、CP5 が他の CP のプロセッシングに関与する可能性が指摘された (Tillack Mol Biochem Parasitol 2006)。赤痢アメーバの逆遺伝学的手法は急速に展開しており、アンチセンス、RNA 干渉法に次いで Gene silencing(Bracha PLoS Pathogens

2006)により複数遺伝子を制御できるようになっている。赤痢アメーバの CP は 36 の C1(CP-A 12 コ, CP-B 11 コ, CP-C 13 コ)の他、数個の C2, C19, C54, C65 などに大別され、ゲノム開示 (Loftus Nature 2005; TIGR, Sanger, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>)により遺伝子の全情報は完備している。そのため生化学的手法により獲得された新規タンパク質の実態(ID)の決定は容易である。

2. 研究の目的

赤痢アメーバのシステインプロテアーゼ (CP)は、腸管上皮や肝細胞などの傷害、免疫細胞の貪食・分解による免疫回避、細菌などの貪食・分解による栄養摂取などに関与し、生存・寄生・病原性に必須な役割を果たしている。赤痢アメーバはゲノムに>40 もの CP 遺伝子をもつが、それぞれの CP の機能的相違・特異性ほとんど理解されていない。また、CP の細胞内での輸送機構、活性の調節機構などの分子基盤は十分に理解されていない。そこで本研究では赤痢アメーバの生存と寄生・病原に必須な CP の輸送ならびに活性調節機構を、生化学的・細胞化学的・逆遺伝学的手法を駆使し解明するとともに、トランスクリプトーム・プロテオームなどの"-omics"手法を応用した統合的アプローチにより多様な CP 遺伝子群の機能的特異性を解明することを目的とした。

いくつかの主要な命題は、(1) CP は N 末端にプレ領域、プロ領域をもつ未成熟な前駆体として合成され、通常分泌経路中でプロセッシングを受けて活性化型になるが、そのプロセッシングの起こる細胞内局在、並びにその分子機構は全く不明である。(2)必要に応じて、CP の「細胞内での貯蔵」と「細胞外への分泌」を決定する輸送経路の決定及びそれに繋がるシグナル伝達は全く未知である。(3) CP は>40 種もの遺伝子群として存在するが、病原性への関与の指摘されている CP1, 2, 5 以外の CP の機能的相違と特異性 (即ち、役割分担) に関しては、全く解明されていない。

3. 研究の方法

(1) CP 輸送体の同定

CP 輸送体の同定・機能解明を目的として、CP の刺激依存的分泌や、貪食に伴う CP のファゴソームへの動員などに関与する CP の特異的輸送体(CP 受容体; CPR)の実態を明らかにする。CP5-HA 発現株の抽出液中から CP5 に結合する分子をアフィニティ精製し、このタンパク質の実態を明らかにする。初年度は、組換えタンパク質・抗体およびエピトープ標識 CPR 発現形質転換体の作製により、細胞内局在の確認、結合する CP 種の特定、他の補助因子との結合を解析した。

更に、CP の輸送の制御因子 Rab11B の機能調節機構の解明を目的として、Rab11B の解

析を行う。Rab11B は過剰発現により細胞外への CP 輸送を 10 倍上昇させる。この CP 輸送活性化は CP1, CP2, CP5 いずれの CP にも起こるが CP1 が最も大きく影響を受ける。そこで、Rab11B による CP 調節機構の詳細を明らかにするために、Rab11B に結合してその機能を調節するエフェクター分子をアフィニティ精製により獲得した。

(2) CP 輸送体の機能解析

これまでの同定した CP 輸送体(CPBF1)には遺伝子族を形成する遺伝子群が存在する(CPBF1-8)。このうち、mRNA の発現量の多い CPBF6 と CPBF8 に関して細胞内局在と機能に関して解析した。また、会合するタンパク質群をアフィニティ精製し、LC-MS/MS/MS により同定を試みた。

(3) ICP による CP の活性・分泌阻害の分子機構及びその生理的役割の解明

ICP による CP 活性・分泌阻害の機構を理解することを目的として、Gene silencing 法による ICP の発現阻害株を用いて、ICP1, ICP2 それぞれの発現阻害による変化を、細胞内外の CP 活性の測定、免疫ブロットとザイモグラフィーによる CP アイソザイムの発現プロファイルで検証した。

ICP の過剰発現体と発現抑制体を用いて、哺乳動物細胞に対する傷害性、アポトーシス誘導等を比較した。

また、ICP の CP 阻害機構を理解するために、両者の共結晶の 3 次元結晶構造を解明することを目的として、ICP の精製と結晶化条件のスクリーニングを行った。

(4) CP アイソタイプ間の機能的相違の解明

Entamoeba invadens の発現解析により、栄養型の嚢子化過程における約 40 の CP 遺伝子の発現プロファイルが明らかとなった。これら *E. invadens* CP 遺伝子の annotation を完全にするとともに、ステージ特異的に発現する CP をグループ分けした後、各遺伝子の機能解析を行う。*E. invadens* で逆遺伝学を導入するために、まず、形質転換の方法論を確立した後、各 CP 遺伝子の過剰発現体を作製し、嚢子化への影響、動物細胞への傷害性などの変化を検討する。同時に、より広範な環境因子で CP の発現パターンに変化が出ることを想定し、まず様々な環境変化に伴う CP 遺伝子の発現の変動を DNA マイクロアレイを用いて経時的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) CP 輸送体の同定

CP の中でも病原性に関与することが示唆されている CP5 の輸送に関与すると示唆される分子を同定し、その機能を明らかにした。HA により標識した CP5 を発現したから免疫沈降法により、CP5 に結合する分子として CP5 輸送体(CPBF1) が同定された (図 1)。

更に、HA 標識した CPBF1 を強制発現した形質転換体から免疫沈降法により結合するタンパク質を同定したところ、CP5 並びに CP4 が特異的に同定され、CPBF1 の輸送物(cargo)の特異性が示された (図 2)。

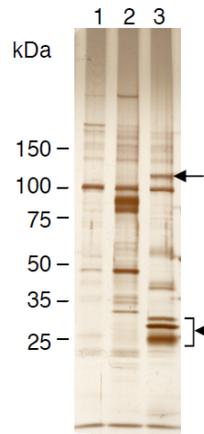


図 1 CPBF1 の単離 レーン 1, 2: コントロール; レーン 3: CP5-HA 発現形質転換体から抗 HA 抗体で免疫沈降してきたタンパク質 矢印は CPBF1 と同定された端パック室を示す

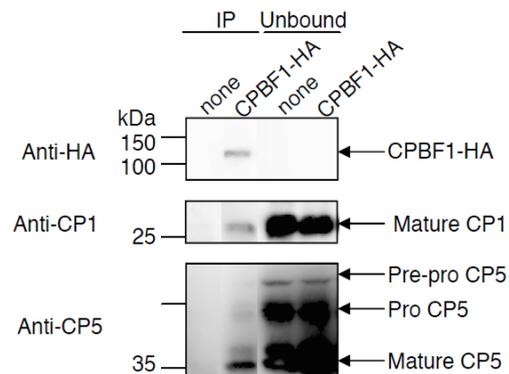


図 2 CPBF1 に結合するカーゴの確認 CP1 及び CP5 が CPBF1-HA を発現する形質転換体からのみ特異的に免疫沈降(IP)されている

(2) CP 輸送体の機能解析

次に CPBF1 遺伝子抑制株を作成し、CP の輸送の変化を調べたところ、CPBF1 発現抑制体では野生型と比較して、細胞内の CP 活性が減少し、細胞外に分泌される CP 活性が約 2 倍に上昇していた。また特異的抗体による解析でも CP5 が選択的に細胞外に放出されていることが確認された (図 3)。以上のことから CPBF1 は CP4/CP5 の輸送に、恐らくはリソソーム等への輸送に関与する特異的輸送体であることが示された。

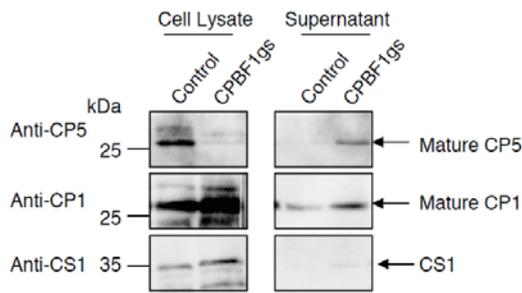


図3 コントロール株とCPBF1 gene silence株における細胞中や培養液中に存在するCP1とCP5の検出

(3) ICPによるCPの活性・分泌阻害の分子機構及びその生理的役割の解明

ICP1及びICP2に結合し、その働きを調節する可能性のある分子群をアフィニティ精製し、同定を試みたが、再現性をもって会合するタンパク質の単離は成功しなかった。また、結晶構造を得るために、結晶化条件を至適化した途中で、海外のグループからICPの結晶構造に関する論文が発表された(Casados-Vázquez LE, Lara-González S, Brieba LG. Crystal structure of the cysteine protease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*: functional convergence of a common protein fold Gene 471:45-52, 2011)。

(4) CPアイソタイプ間の機能的相違の解明

*Entamoeba invadens*を用いて嚢子過程におけるCPの発現プロファイルの変化を追跡することにより、CPのステージ特異的な発現を解析した。同時にCPの輸送調節の中心分子である>90種以上のRabの発現の変動をモニターした。まず、*E. histolytica*のゲノム上で発見された約50のCPと90のRabの相同遺伝子、並びに*E. invadens*特異的な遺伝子の注釈付け(アノテーション)を行った。その結果、ほとんどの*E. histolytica*のホモログは*E. invadens*に存在する一方で、CP-A群ではA2, A3のアイソタイプで、CP-B群では多くのアイソタイプに関して*E. invadens*特異的な遺伝子の多重化が起こっていた。一方、Rab遺伝子は他種生物と保存性の高いRab1, Rab2, Rab7, Rab11等で両者間で極めて高い相同性が見られた。一方、*E. invadens*に特異的な7種のRab遺伝子、*E. histolytica*に特異的な19種のRab遺伝子が発見された。これらの遺伝子の*E. invadens*の嚢子化過程における発現変化を調べたところ、栄養型特異的に発現する18種のCPとシスト特異的な5種のCPが同定された。また、Rab遺伝子に関しても様々なパターン

で発現する遺伝子群が特定され、約20のRabが嚢子で発現上昇した。代表的な13遺伝子の発現プロファイルを図4に示す。以上嚢子化に伴いCP並びにその輸送経路は大胆なリモデリングを受けることが明らかとなった。

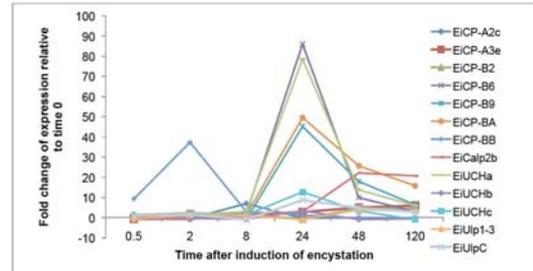


図4 嚢子過程で転写調節を受けるCPのうち代表的な13遺伝子の発現パターン

また、*Entamoeba invadens*の全遺伝子を網羅したAffymetrixカスタムDNAマイクロアレイを用いた解析により、栄養型の嚢子化過程における約40のCP遺伝子の発現プロファイルを明らかにした。更にこれらのCPの特徴を明らかにするために、*E. invadens* CP遺伝子の注釈付けを終了し、報告した。

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13件)

- ①Ebert, F., Bachmann, A., Nakada-Tsukui, K., Hennings, I., Drescher, B., Nozaki, T., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2008) An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. *Parasitol. Int.* 57, 521-524
- ②Hussain, 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.
- ③Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009) Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 11, 1471-1491.
- ④Sato, 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)
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* 126, 337-347. (Review)
- ⑪ Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 285, 26889-26899.
- ⑫ Saito-Nakano, Y., Nakahara, T., Nakano, K., Nozaki, T., and Numata, O. (2010) Marked amplification and diversification of Rab GTPases in ciliates *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 389-399.
- ⑬ 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.

[学会発表] (計 47 件)

- ① 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.
- ② Nakada-Tsukui, K. (2008) A FYVE and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. The 4th International Conference on Anaerobic Protists: The Systems Biology of Anaerobic Protozoa. 12-16 May, 2008, Taipei, Taiwan.
- ③ Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2008) A FYVE domain and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by *Entamoeba histolytica*. 第60回細胞生物学会大会 横浜 2008年6月29日~7月1日
- ④ 中野由美子、中野賢太郎、野崎智義 (2008) 原虫におけるメンブレントラフィックの多様性 第10回日本進化学会大会、2008年8月22-24日、東京
- ⑤ 見市 文香、野崎智義 (2008) 赤痢アメーバ原虫のミトコンドリア残存オルガネラ mitosome の特殊性~その機能と役割 ~第10回日本進化学会大会、2008年8月22-24日、東京
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ Nozaki, T. (2008) Regulation of cysteine protease secretion and phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Invited talk in the symposium). Jeju, Korea, Sept 29-Oct 3, 2008.
- ⑨ 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
- ⑩ 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.
- ⑪ 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
- ⑫ Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. (2008) Identification of a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- ⑬ Picazarri, K., Furukawa, A., Sato, D., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Autophagy in *E. histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009
- ⑭ 見市文香、モハンマド アブ ユースフ、津久井久美子、川合覚、野崎智義 ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能—赤痢アメーバ原虫マイトソームに存在する活性硫酸合成経路—第 78 回日本寄生虫学会大会 東京、March 27-28, 2009.
- ⑮ 古川敦、津久井久美子、山田陽子、野崎智義 赤痢アメーバシステインプロテアーゼ結合タンパク質の機能解析 第 78 回日本寄生虫学会大会 東京、March 27-28, 2009.
- ⑯ 津久井久美子、Picazarri Delgado Karina、古川敦、野崎智義 *Entamoeba* 属シスト化におけるオートファジーの関与 第 78 回日本寄生虫学会大会 東京、March 27-28, 2009.
- ⑰ 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.
- ⑱ 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.
- ⑲ Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. Functional analysis of a putative cysteine protease receptor from *Entamoeba histolytica*. The XXth Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Sept 13-17, 2009.

- ⑳ 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.
- ㉑ 津久井久美子、野崎智義 イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ貪食制御機構 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 大阪、October 9–10, 2009.
- ㉒ 見市文香、野崎智義 ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能—赤痢アメーバ原虫“sulfosome”に存在する硫酸活性化経路—第82回日本生化学会大会 神戸、October 21–24, 2009.
- ㉓ 津久井久美子、Aleyla Escueta、中野由美子、野崎智義 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様性と進化 第82回日本生化学会大会 神戸、October 21–24, 2009.
- ㉔ Nakada-Tsukui, K., Picazzari, K., Tsuboi, K., and Nozaki, T. Unique role of the autophagic pathway in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 December 9–12.
- ㉕ 野崎智義 真核生物におけるミトコンドリアの多様性:腸管寄生原虫赤痢アメーバの新規オルガネラの解析 第9回日本ミトコンドリア学会年会 東京 December 17–19, 2009.
- ㉖ 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.
- ㉗ 古川敦、津久井久美子、山田陽子、坪井久美子、野崎智義 赤痢アメーバにおける病原性因子輸送機構の分子論的解明:新規システインプロテアーゼレセプターの同定と機能解析 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20–21, 2010.
- ㉘ 見市文香、牧内貴志、モハンマド・アブ・ユースフ、野崎智義 赤痢アメーバ原虫“mitosome”に存在する硫酸活性化経路の生理機能の解明 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20–21, 2010.
- ㉙ 牧内貴志、見市文香、津久井久美子、野崎智義 *Entamoeba* マイトソームにおけるタンパク質輸送機構の解析 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20–21, 2010.
- ㉚ 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
- ㉛ Jeelani, G., Sato, D., Jusain, 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
- ㉜ Nozaki, T. Unprecedented role of the mitosome in *Entamoeba histolytica*. The 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, July 2–7, 2010, Kanazawa, Japan
- ㉝ Nozaki, T. Mitosomes from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* possess unique functions and minimal import machinery. The XIIth International Congress of Parasitology. August 15–20, 2010, Melbourne, Australia.
- ㉞ Saito-Nakano, Y., Okada, M., Penuliar, G., M., Hanadate, Y., Gilchrist, C. A., Crasta, O., Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, Ni., and Nozaki, T. Diversity and significance of vesicular trafficking in *Entamoeba histolytica*. Amebiasis Workshop 2010, “Molecular Approaches and Clinical Aspects” September 22–24, 2010, Montreal.
- ㉟ 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.
- ㊱ 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.
- ③⑦ Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: Transcriptome analysis during encystation. 21st Molecular Parasitology Meeting, WoodsHole, Massachusetts, USA. September 12–16, 2010
- ③⑧ Nozaki, T., Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K. Functional diversity of mitochondrion-related organelles in eukaryotes. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 神戸、December 7–10, 2010 (WS 進化からみたタンパク質社会)
- ③⑨ Saito-Nakano, Y., Nakano, K., and Nozaki, T. Diversity of vesicular trafficking in phagocytic protozoa and significance of traffic in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑩ Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑪ Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: transcriptome analysis during encystation. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑫ 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 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑬ Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Trafficking mechanisms of phagosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑭ Mi-ichi, F., Yousuf, A., Makiuchi, T., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Gene silencing of mitosomal proteins causes growth inhibition and suggests essentiality of mitosomes in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑮ 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 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑯ Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the *Entamoeba* mitochondrial remnant. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10–12, 2011, Tokyo
- ④⑰ 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 26th International Prize for Biology—Celebrating Dr. Nancy A. Moran. December 7–8, 2010, Tsukuba, Japan.

〔図書〕 (計2件)

- ① Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén. Dissecting the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* from a Genomic Perspective. In “Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology” Edited by C. Graham Clark, Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, 2010.
- ② Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi Nozaki. Genomic and post-genomic approaches to understand the pathogenesis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. In “Genomes of Food- and Water-borne Pathogens” Edited by Pina Fratamico, Sophia Kathariou, and Yanhong Liu. ASM Press, Washington, D.C. ISBN: 978-1-55581-457-1, 2011.

〔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

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
(H20→H21：連携研究者)