

クリプトスポリジウム原虫における培養細胞を用いた感染・増殖阻害アッセイ

村越ふみ^{1), 2)}, 加藤健太郎^{1), 2)}

- 1) 帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野
〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地
- 2) 東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医微生物学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

[抄録] 添加薬剤によるクリプトスポリジウム原虫の感染・増殖阻害効果を *in vitro* で検証する実験系について説明する。

キーワード ; クリプトスポリジウム原虫, 感染阻害, 増殖阻害

Infection/growth inhibition analyses of *Cryptosporidium parvum* by various additives using *in vitro* culture system

Fumi Murakoshi^{1), 2)}, Kentaro Kato^{1), 2)}

- 1) Research Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
- 2) Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Abstract: We described methods to examine the effects of inhibition / growth inhibitors using *in vitro* culture system of *Cryptosporidium parvum*.

Key Words: *Cryptosporidium parvum*, infection inhibition, growth inhibition

[はじめに]

クリプトスポリジウム症はヒトにおいて免疫不全患者で重篤となり、仔牛において生産性の低下や斃死を引き起こすことで問題となるが、有効な薬剤が存在しない。本稿では、薬剤探索法の一つとして培養細胞株を用いたクリプトスポリジウム原虫の増殖・侵入阻害実験について説明する。本方法では 96well プレートと蛍光抗体を用いたカウント法を用いるため、少ない原虫数と視野数で比較的省力的に精度の高い薬剤探索を行うことが可能である。

[方法]

本稿では、上記実験系の例として、クリプトスポリジウム原虫に対して一定の効果を持つニタゾキサニド(Rossignol *et al.*, 2001)をポジティブコントロールとして用いた増殖阻害効果の検討法を示す。

[A]材料、道具

原虫株: *Cryptosporidium parvum* (HNJ-1 株)

宿主細胞: HCT-8 (ATCC No. CCL-244™)

[培地]

HCT-8 を用いた本原虫用培地の組成は Upton ら(1995)の方法を参照している。

HCT-8 維持培地: RPMI-1640 with 10mM

HEPES, 1mM sodium pyruvate, 1.5/L sodium bicarbonate and 10% FCS. ペニシリン、ストレプトマイシン。

クリプトスポリジウム原虫維持培地: 細胞の維持培地に 50 mM glucose, 35 mg of ascorbic acid, 1.0 mg of folic acid, 4.0 mg of 4-aminobenzoic acid, 2.0 mg of calcium pantothenate を加える。抗生物質はペニシリン、ストレプトマイシンの他に 0.25 mg/ml の amphotericin B (Fungizone) を加える。

[脱殻用試薬、道具]

本原虫のオーシストからスポロゾイトへの脱殻は Rochelle ら(2002)の方法を部分的に変更して行っている。

6%次亜塩素酸ナトリウム、AHBSS (pH2.0 に調整した HBSS)、1%タウロコール酸ナトリウム (sigma T0875) in PBS、1%トリプシン (GIBCO®) in PBS

精製フィルター: Millex SV 5.00um (Millipore)

[観察用試薬、機器]

Sporo-glo™ (Waterborne, Inc.): クリプトスポリジウム特異的な標識付ポリクローナル抗体
オールインワン蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス BZ-9000)

[B]脱殻

- ①塩化セシウム精製により高度に精製されたクリプトスポリジウムオーシストを用いる。1mlのPBSに懸濁した原虫オーシストにピュールラックスを1 μ l加え、氷上で10min静置する(ここから無菌操作を行う)。その後、PBSで3回遠心洗浄する。
- ②オーシストのペレットにAHBSSを1ml加え、37°Cで30分インキュベートする。
- ③遠心上清を除き、タウロコール酸を750 μ l、トリプシンを250 μ l加えて37°Cで60分インキュベートする。
- ④顕微鏡下にて脱殻率を確認する(図1)。十分に脱殻していた場合はPBSで2回洗浄する。
- ⑤スポロゾイトの懸濁液をMillex SVフィルターに通し、脱殻後のオーシストウォールを取り除く。得たスポロゾイト懸濁液を遠心して1mlのPBS懸濁液にまとめる。血球計算盤などを用いて顕微鏡下でスポロゾイト数をカウントする。

[C] [接種]

- ①接種時にコンフルエントになるよう、96wellに播種したHCT-8細胞を用意する。スポロゾイトが 2×10^5 個/mlとなるよう調整し、1wellに200 μ lずつ播種する(1wellに 4×10^4 接種)。
- ②侵入しなかった原虫を除くため、3h後に培地を交換する。増殖阻害実験を行う際は、交換する培地に薬剤を加えておく。接種後48時間培養する。(今回はニタゾキサニドを10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ Mの濃度になるよう調整した培地と、コントロールとしてDMSOを加えた培地を用意し、培地交換を行った。)

[観察]

- ①細胞をPBS(-)で素早く3回洗浄
- ②ice coldメタノールで5分固定し、PBS(-)で3回洗浄する
- ③1%BSA in PBS(-)で15分ブロッキングする
- ④sporo-glo(1 \times)を1%BSA in PBS(-)で3倍希釈し、96wellに加え1時間室温で遮光静置
- ⑤PBS(-)で3回洗浄し、50 μ lPBS(-)を加える
- ⑥オールインワン顕微鏡、対物レンズ $\times 10$ 倍にて、wellの蛍光をカウントする(図2)。

[結果・考察]

増殖阻害曲線を書くことにより(図3)、ニタゾキサニドのIC₅₀は1.36 μ Mとなった。変動係数(CV)は2.5%であり、増殖阻害評価系として、本実験系が使用可能であることがわかった。

[謝辞]

本研究は、文部科学省特別研究奨励費及び科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニユアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、農林水産省・農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業により行われた。

[文献]

- 1) Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. J Infect Dis. 184:103-106, 2001.
- 2) Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. J Clin Microbiol. 33:371-375, 1995.
- 3) Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, De Leon R. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Appl Environ Microbiol. 68:3809-3817, 2002.

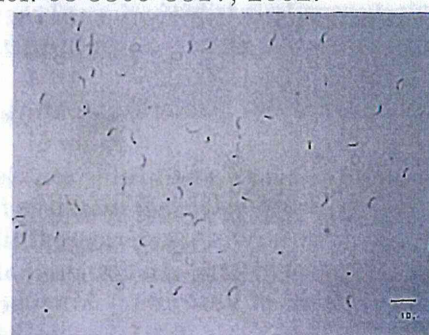


図1 脱殻したスポロゾイト



図2 蛍光顕微鏡像

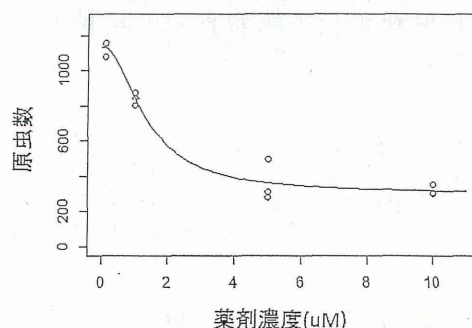


図3 生存曲線

熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球貪食時におけるマクロファージ内遺伝子発現解析

高野量^{1),2)}, Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, 加藤健太郎¹⁾

1) 帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野
〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線13番地

2) 東京大学 医科学研究所
〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

[抄録] ヒト末梢血由来マクロファージは、非感染赤血球に比べ、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球に対し、高い貪食・破壊活性を示す。ここでは、マクロファージによる原虫寄生赤血球の選択的な貪食・破壊指向性の分子基盤を明らかにするために、原虫寄生赤血球とマクロファージの共培養系を利用した、マクロファージ内における遺伝子発現応答の解析手法について紹介する。

キーワード ; 熱帯熱マラリア原虫、マクロファージ、遺伝子発現、バイオインフォマティクス

Gene expression analysis of human peripheral blood-derived macrophages exposed to *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes.

Ryo Takano^{1,2)}, Terkawi Mohamad Alaa¹⁾, Kentaro Kato¹⁾

1) Research Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
2) Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Abstract: Human peripheral blood-derived macrophages show highly specific phagocytic activity to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as compared to those co-cultured with uninfected erythrocytes. Here, to gain better insights into the possible mechanism by which macrophages preferentially phagocytize and kill the parasitized erythrocytes, we introduce the method for analyzing the gene expression of human peripheral blood-derived macrophages exposed to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, Macrophage, Gene expression, Bioinformatics

[はじめに]

マラリアは世界三大感染症の一つとして、感染者は年間約2億人、死亡者は60~70万人に上ると推測され、その対策が急務とされている原虫感染症である。赤血球内に寄生するマラリア原虫は、その増殖に伴い赤血球を破壊し、これが貧血、発熱、脾腫等といった臨床症状を引き起こす。血中内のマラリア原虫寄生赤血球の排除には、単球とマクロファージの動員と活性化が必須であるが、マクロファージがどのようにマラリア原虫寄生赤血球を破壊するか、その詳しいメカニズムは不明な点が多い。

本書のTerkawiらの稿で述べたように、ヒト末梢血由来マクロファージと熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養系を用いると、原虫寄生赤血球がマクロファージに効率良く貪食される様子が観察される。本稿では、その分子基盤を明らかにする一助として、原虫寄生赤血球、

及び非感染赤血球と共培養後のマクロファージにおける細胞内遺伝子発現の網羅的解析手法について紹介する。

遺伝子発現解析は、現在、マイクロアレイチップと次世代シーケンサーを用いた手法が主流だが、ここではAgilent社製DNAマイクロアレイチップを用いた解析手法を紹介する。

[方法]

(1) 細胞の準備

熱帯熱マラリア原虫の培養、マラリア原虫寄生赤血球の精製、単核球分離、マクロファージ分化誘導、及び共培養は、本書のTerkawiらの稿を参照されたい。

(2) マクロファージからのRNA抽出

原虫寄生赤血球、及び非感染赤血球との共培養後のマクロファージからTotal RNAを抽出

する。ここでは、前述した 5.0×10^6 cells のマクロファージに、 1.0×10^8 cells の原虫寄生赤血球、及び非感染赤血球を添加し、共培養開始から 37°C にて 2 時間経過後のサンプルから RNA を抽出する。

共培養したマクロファージを、あらかじめ 4°C に氷冷した PBS を用いて 3 回洗浄し、培養液上清中の貪食されていない赤血球を除去する。続いて、細胞に 1.0 mL の TRIzol Reagents (Ambion) を加え、ピペッティングにより、よく懸濁する。溶液が均一になったら、500 μL ずつ 1.5 mL のエッペンチューブに移す。これらのチューブは、直ちに -80°C に保存するか、片方のチューブから直ちに RNA を抽出する。

☆注意：RNA は凍結融解により品質劣化するため、出来る限り凍結融解を繰り返さないこと。

☆使用キット：RNA 抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) の使用を推奨する。しかし、SV Total RNA Isolation System (Promega) や、同等の品質で RNA を抽出できるキットであれば、いずれも使用可能である。

500 μL の TRIzol Reagents により回収した細胞溶解液に、100 μL のクロロホルムを加え、蓋を閉めた後、15 秒間勢いよく上下に振る。その後、室温にて 10 分間静置後、12000 g、15 分間、 4°C にて遠心する。遠心分離後、一番上の透明な層（水層）を 350 μL 回収し、新しい 1.5 mL のエッペンチューブに移す。一番下のピンク色の有機層、及び白い中間層には、タンパク質及び脂質、DNA が含まれているので、これらの液層がコンタミしないよう注意する（下図）。



回収した水層に 350 μL の RLT Buffer を加え、よく懸濁した後、さらに 700 μL の 70% エタノールを加え、ピペッティングにより懸濁す

る。この懸濁液を、キットに付属しているカラムにアプライし、11000 rpm の条件下で 15 秒間、室温で遠心する。カラムに吸着した RNA は、キット付属の洗浄 Buffer RW1 で 1 回、洗浄 Buffer RPE で 2 回洗浄し、30~50 μL の Nuclease-free water (D.W.でもよい) を用いて溶出する。

溶出した RNA 3.0 μL を、1.5 mL の新しいエッペンチューブに取り、 -80°C で保存する。分注した 3.0 μL の RNA は、RNA の収量、及び品質チェックに用いる。

(3) RNA の収量、及び品質チェック

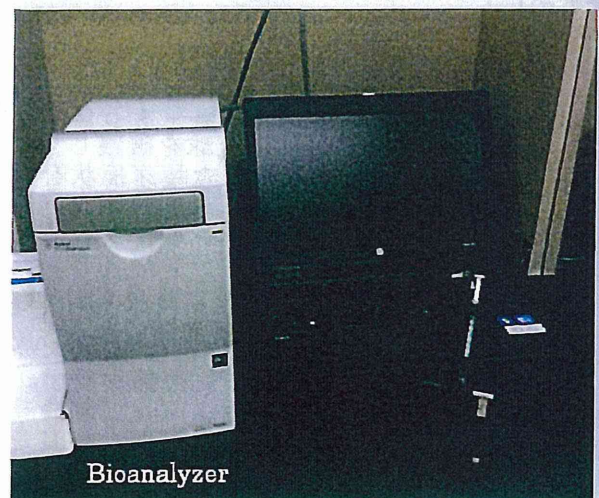
分注した 3.0 μL の RNA を融解し、RNA の収量、及び品質チェックを行う。RNA の収量は、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) を用いて、RNA の品質チェックは、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて評価する。

RNA が分解されていると、その後のマイクロアレイや次世代シーケンサー解析で得られるデータの信頼性が著しく低下する。NanoDrop では、溶出した RNA へのタンパク質等のコンタミは判断できるが、RNA が分解されているか判断することはできない。トランスクリプトーム解析を行う場合、これを防ぐため、RNA の品質を、必ず Bioanalyzer 等を用いて評価する必要がある。

RNA の品質は、28S、18S rRNA のバンドが、きちんと確認できるかにより判断する。Bioanalyzer では、これらのバンドピークを用いて、RNA の品質を独自の RNA Integrity Number (RIN) によって数値化することにより、定量的に判断することが可能である。RNA 抽出が正確に行われ、RNA の分解が進んでいないと、培養細胞で $\text{RIN} > 9.0$ 、組織では $\text{RIN} > 7.0$ を一般的に示す。凍結融解を繰り返すと、この RIN が著しく低下する。実際のマイクロアレイには、RIN が 6.5 を下回った場合は、再度実験が可能であれば、RNA の取り直しを推奨する。

☆使用キット：

Agilent RNA 6000. Nano Kit. Catalog#: 5067-1511、または Agilent RNA 6000 Pico Kit. Catalog#: 5067-1513



(4) マイクロアレイ実験

抽出した RNA を用いて、トランスクリプトーム解析を行う。Agilent 社製のマイクロアレイの詳細なプロトコルは、以下のウェブサイト参照するとよい。

https://www.chem-agilent.com/lsc-a-booth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm

ウェブサイトアクセス時に、ID とパスワードを求められるが、これは Agilent 社製品の日本代理店である、トミーデジタルバイオロジー株式会社に問い合わせると教えてもらえる。

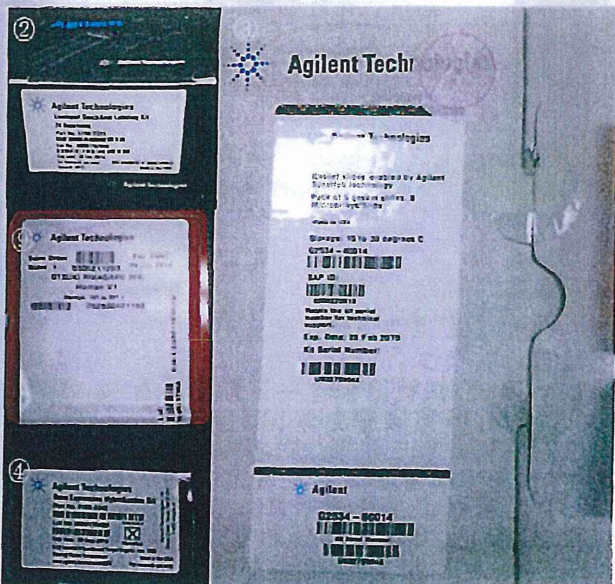
手順は簡便であるが、本実験は一度経験しているかどうかのものをいう。Agilent 社製のマイクロアレイスライドを購入すると、特典として実技の講習会に無料で参加できるため、これに参加することをお勧めする。

☆使用キット：

- ① Agilent RNA Spike In Kit (for one-color), Catalog#: 5188-5282
- ② Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color, Catalog#: 5190-2305, 24 反応分
- ③ Hybridization Gasket Slide Kit (5) - 8 microarrays per slide, Catalog#: G2534-60014, 5 枚
- ④ Agilent Gene Expression Hybridization Kit, Catalog#: 5188-5242, 8×60K 100 アレイ分
- ⑤ Agilent 2×Hi-RPM Hybridization Buffer (25 mL), Catalog#: 5190-0403
- ⑥ Agilent 25×Fragmentation Buffer, Catalog#: 5185-5974
- ⑦ Agilent 10×Blocking Agents, Catalog#: 5188-5281
- ⑧ Agilent Gene Expression Wash Pack, Catalog#: 5188-5327

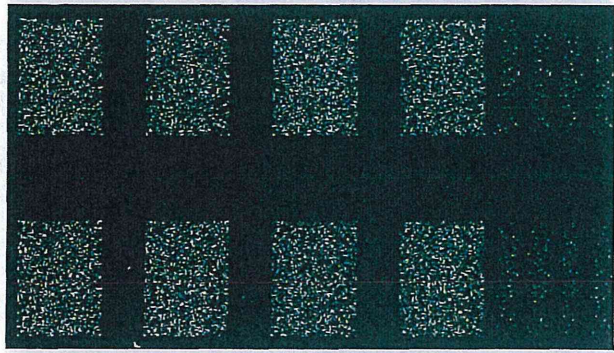
ヒト遺伝子発現解析には、一枚で 8 検体の解析が可能以下のアレイを使用する。

- ⑨ SurePrint G3 Human GE Microarray 8×60K ver. 2.0 (受注生産)

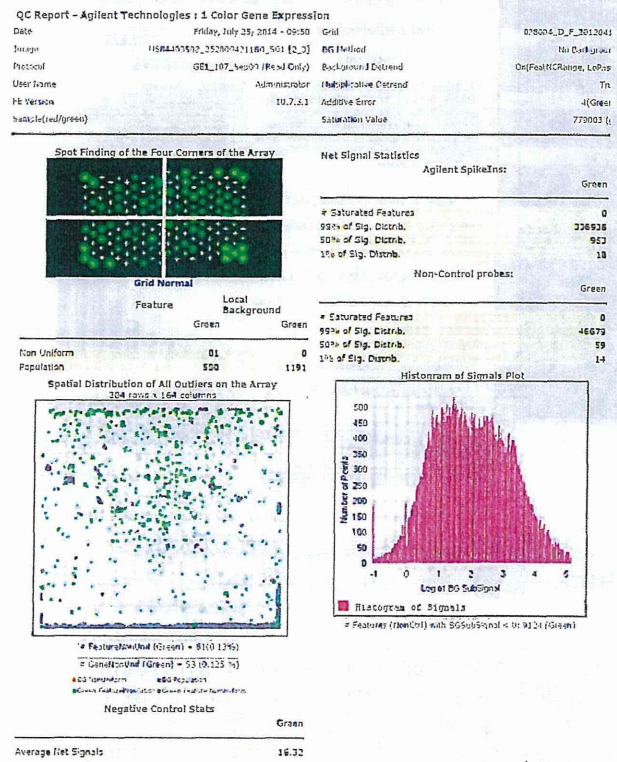


(5) 画像撮影及び数値化、データ解析

アレイスライドは、高感度マイクロアレイスキャナー (Agilent Technologies) を用いて撮影する。生データは、以下のような画像となる。



これを Feature Extraction Software (Agilent) に読み込ませることで、全自動でスポットの数値化、及びアレイスライドの品質チェックを行うことができる。以下に、アレイの品質チェックシートである QC Report の例を添付する。この結果を精査することで、アレイの結果が信頼性があるかが判断できる。QC Report についても、前述のウェブサイトには細かく記載されているので参照されたい。



Feature Extraction では、QC Report とともに、全スポットを数値化したテキストファイルが作製される。このテキストファイルを、Gene Spring (Agilent) に読み込ませることで、データの標準化、及び統計解析を簡便に行うことができる。コンピュータに自信がないのであれば、商用のソフトウェアである Gene Spring や Rosetta Resolver (Rosetta) 等の使用をお勧めする。Linux 等を使用できる程度のリテラ

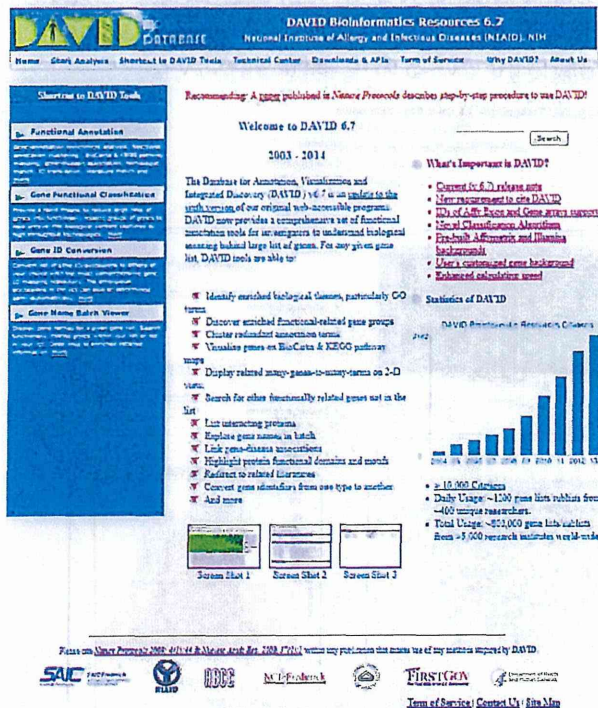
シーがあれば、現在では様々な解析パッケージが入手可能なため、ライトユーザーでも自前で解析を行うことができる。

(6) バイオインフォマティクス

比較対照群との間で、発現に統計的な有意差が見られた遺伝子群について、以下に示す様々な解析手法が用いられる。

① 機能分類 (Functional annotation)

発現変動を示した遺伝子群の中に、どのような機能に関連した遺伝子が多く含まれているか調べる解析手法。遺伝子は、細胞内局在、分子機能、及び生物学的意味合いといった、様々なカテゴリで分類される。トランスクリプトーム解析の結果に対し最も頻繁に使用され、代表的なものとして Gene Ontology が挙げられる。現在では、DAVID Bioinformatics Database (下図: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いれば、ウェブ上で簡便に行うことができる。



② ネットワーク解析 (Network analysis)

発現変動を示した遺伝子群に対し、遺伝子-遺伝子間の制御関係を表した遺伝子ネットワークの構築を行うことにより、どのような因子が発現制御に関連しているのかを調べる解析手法。トランスクリプトーム解析の結果に対し、機能分類とともに使用される。本解析には、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity) や、GeneGo (GeneGo Inc.) 等の Software が頻用される。これらのソフトウェアは商用であるが、KEGG 等と比較して、クオリティの高い図の作製が行え、基となるデータベースの更新が早く信頼性が高いのが特徴である。

③ 細胞種解析 (Cell-type enrichment analysis)

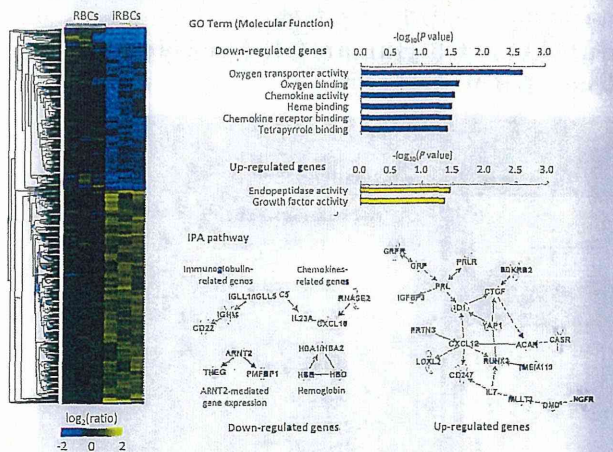
病原微生物の感染実験において、ある特定の組織へどのような免疫細胞が遊走、流入してきたかを、トランスクリプトームの結果から推定する解析手法。本解析は、CTen (<http://www.influenza-x.org/~jshoemaker/cten/>) を用いれば、ウェブ上で簡便に行うことができる。現在では、感染組織のみならず、そこに遊走された免疫細胞を、FACS 等によりソーティングし、これらについてトランスクリプトーム解析をすることが可能になったため、当該解析法はあまり使用されない。

[結果と考察]

熱帯熱マラリア原虫感染赤血球、または非感染赤血球と末梢血由来マクロファージを 37°C で 2 時間共培養し、これらの細胞から total RNA を抽出した。抽出された RNA が、RIN > 7.0 であることを Bioanalyzer を用いて確認した後、Agilent 社製ヒト用マイクロアレイスライドを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

非感染赤血球と共培養したマクロファージと比較して、原虫感染赤血球と共培養したマクロファージにおいて、168、及び 216 遺伝子の発現低下、及び上昇が見られた (下図: ヒートマップを参照)。

これらの発現が変動した遺伝子群に対し、Gene Ontology 解析による機能分類、及び Ingenuity Pathways Analysis を用いてネットワーク解析を行った。発現低下が見られた遺伝子群には、ヘモグロビン合成や炎症反応に関与する遺伝子群が有意に多く含まれていた。一方、発現上昇が見られた遺伝子群には、陽イオン性ペプチドや、タンパク質分解酵素、及び (サイトカインを含む) 増殖因子等が有意に多く含まれていた (下図: 右パネルを参照)。



上図 トランスクリプトーム解析の結果
ヒト末梢血由来単球から分化させたマクロファージと非感染赤血球、及び熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を共培養し、2 時間後のマクロファージ内の遺伝子発現を両群間において比較した。左図は、群間において統計的に優位に発現が変動していた遺伝子の発現を、ヒートマップによって示したもの (Unpaired T-test, P

< 0.05)。右図は、これらの遺伝子に対して、Gene Ontology 解析、及び Ingenuity Pathways Analysis によるネットワーク解析を施し、機能分類、及び遺伝子間ネットワークを構築した結果を示した。

このことから、熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球を貪食したマクロファージ内では、病原体を効率良く分解・破壊するため、様々なタンパク質分解酵素の遺伝子発現が誘起されていることが示唆された。これらの分解酵素が、実際に原虫寄生赤血球に対して破壊効果を持つのか等について、今後検証していく必要がある。

[あとがき]

マイクロアレイチップを用いたトランスクリプトーム解析は、コストがかかると思っっている研究者が多いが、業者に外注するのと比較して、自身で実験・解析を行うことができ、設備さえ整っていれば、3分の1のコストで結果を得ることができる。次世代シーケンサーによる解析と比較しても安価であり、RNA抽出から最短2日で結果を得ることができる。現在販売されているAgilent社製マイクロアレイチップには、遺伝子に対するプローブだけでなく、近年同定された long intergenic non-coding RNA の発現を検出するためのプローブも搭載されており、ヒト培養細胞に対する、次世代シーケンサーを用いた解析は、エピジェネティクスや Chip-Seq 等に主流が移っているように思われる。

寄生虫学研究において、感染後の宿主応答を網羅的に解析したい場合、特に、ヒト培養細胞、またはマウスを用いた感染実験における宿主応答を解析したい場合、次世代シーケンサーを用いるよりも、マイクロアレイチップの方が安価で効率的であり、データ解析も容易である。次世代シーケンサーは、アノテーションされていない遺伝子が存在する、寄生虫等のゲノムに対して用いるのが本来の用途と言える。

ここで紹介した解析手法に質問・疑問等、詳細なプロトコルが知りたい等ご要望がございましたら、ryot@obihiro.ac.jp までご連絡ください。

[謝辞]

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニユアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、農林水産省・農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業により行われた。また、本実験は帯広畜産大学人体及びヒト試料研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

本研究を行うにあたり、マイクロアレイ実験に関わる技術、及びデータ解析についてご指導頂きました。米国ワシントン大学医学部 Michael G. Katze 教授に深謝いたします。

また、Bioanalyzer、及びマイクロアレイ機器等は、帯広畜産大学動物・食品検査診断センター、及び東京大学医科学研究所共通機器を使用して行われた。機器使用等にご指導頂きまし

た、帯広畜産大学食品有害微生物学分野の川本恵子教授、食品リスク分野の豊留孝仁講師、及び東京大学医科学研究所宿主寄生体学分野の伊庭英夫教授、小林郷介助教に深謝いたします。

[参考文献]

- 1) Terkawi Mohamad Alaa, 高野量、加藤健太郎：ヒト末梢血由来マクロファージと熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球の共培養法、寄生虫研究 材料と方法 2014年版、三恵社、愛知、2014
- 2) Bradel-Tretheway BG, Mattiaccio JL, Krasnoselsky A, Stevenson C, Purdy D, Dewhurst S, Katze MG. Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase accessory factors. *J Virol.* 85: 8569-81. 2011.
- 3) Chang ST, Sova P, Peng X, Weiss J, Law GL, Palermo RE, Katze MG. Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. *MBio.* 2:e00134-11.
- 4) Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* 4:P3. 2003.
- 5) Go JT, Belisle SE, Tchitchek N, Tumpey TM, Ma W, Richit JA, Safronetz D, Feldmann H, Katze MG. 2009 pandemic H1N1 influenza virus elicits similar clinical course but differential host transcriptional response in mouse, macaque, and swine infection models. *BMC Genomics.* 13:627. 2012.
- 6) Kiso M, Takano R, Sakabe S, Katsura H, Shinya K, Uraki R, Watanabe S, Saito H, Toba M, Kohda N, Kawaoka Y. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Sci Rep.* 3:1563. 2013.
- 7) Kupfer DM, White VL, Strayer DL, Crouch DJ, Burian D. Microarray characterization of gene expression changes in blood during acute ethanol exposure. *BMC Med Genomics.* 6:26. 2013.
- 8) Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 9:559. 2008.
- 9) Nalpas NC, Park SD, Magee DA, Taraktsoglou M, Browne JA, Conlon KM, Rue-Albrecht K, Killick KE, Hokamp K, Lohan AJ, Loftus BJ, Gormley E, Gordon SV, MacHugh DE. Whole-transcriptome, high-throughput RNA sequence analysis of the bovine macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection in vitro. *BMC Genomics.* 14:230. 2013.

- 10) Pasieka TJ, Cilloniz C, Carter VS, Rosato P, Katze MG, Leib DA. Functional genomics reveals an essential and specific role for Stat1 in protection of the central nervous system following herpes simplex virus corneal infection. *J Virol.* 85:12972-81. 2011.
- 11) Rahrman EP, Watson AL, Keng VW, Choi K, Moriarity BS, Beckmann DA, Wolf NK, Sarver A, Collins MH, Moertel CL, Wallace MR, Gel B, Serra E, Ratner N, Largaespada DA. Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis. *Nat Genet.* 45:756-66. 2013.
- 12) Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Cuyinh Le Mt, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis.* 207: 262-71. 2013.
- 13) Shoemaker JE, Lopes TJ, Ghosh S, Matsuoka Y, Kawaoka Y, Kitano H. CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC Genomics.* 13:460. 2012.
- 14) Tisoncik JR, Billharz R, Burmakina S, Belisle SE, Prohl SC, Korth MJ, Garcia-Sastre A, Katze MG. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways. *J Virol.* 92: 2093-104. 2011.
- 15) Werner T. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 50-4. 2008.

Reviews and Opinions

The Role of Carbohydrates in Infection Strategies of Enteric Pathogens

Kentaro Kato^{1,2*} and Akiko Ishiwa^{1,2}

Received 20 September, 2014 Accepted 4 November, 2014 Published online 15 November, 2014

Abstract: Enteric pathogens cause considerable public health concerns worldwide including tropical regions. Here, we review the roles of carbohydrates in the infection strategies of various enteric pathogens including viruses, bacteria and protozoa, which infect the epithelial lining of the human and animal intestine. At host cell entry, enteric viruses, including norovirus, recognize mainly histo-blood group antigens. At the initial step of bacterial infections, carbohydrates also function as receptors for attachment. Here, we describe the function of carbohydrates in infection by *Salmonella enterica* and several bacterial species that produce a variety of fimbrial adhesions. During invasion by enteropathogenic protozoa, apicomplexan parasites utilize sialic acids or sulfated glycans. Carbohydrates serve as receptors for infection by these microbes; however, their usage of carbohydrates varies depending on the microbe. On the surface of the mucosal tissues of the gastrointestinal tract, various carbohydrate moieties are present and play a crucial role in infection, representing the site of infection or route of access for most microbes. During the infection and/or invasion process of the microbes, carbohydrates function as receptors for various microbes, but they can also function as a barrier to infection. One approach to develop effective prophylactic and therapeutic antimicrobial agents is to modify the drug structure. Another approach is to modify the mode of inhibition of infection depending on the individual pathogen by using and mimicking the interactions with carbohydrates. In addition, similarities in mode of infection may also be utilized. Our findings will be useful in the development of new drugs for the treatment of enteric pathogens.

Key words: bacteria, carbohydrate, enteric pathogen, infection, protozoa, virus

INTRODUCTION

Enteric pathogens, many of which are zoonotic, exert a major impact on public health worldwide including tropical regions. In humans and animals, the enteric pathogens, which include viruses, bacteria and protozoa, infect the intestine epithelial lining, resulting in food poisoning or diarrheal disease. When enteric pathogens enter humans or animals via the oral route, they must withstand the proteolytic conditions in the stomach before penetrating the mucus layer and accessing the underlying gut epithelium for attachment or cell invasion. Adhesion of the enteric pathogens to the intestine epithelial tissue is a prerequisite for the initiation of infection. In many systems it is mediated by lectins present on the surface of the pathogen that bind to complementary carbohydrates on the surface of the host

cells. Carbohydrates such as heparan sulfate have been reported to play a crucial role in the entry or budding of viruses [1], and bacterial lectins typically act in the form of elongated submicroscopic multisubunit protein appendages, known as pili [2]. Recently, the surface proteins of apicomplexan parasites have also been reported to bind to carbohydrates on host cells [3]. Thus the initial steps of host cell recognition by enteric pathogens may incorporate common strategies.

Once pathogens invade the host cells, they initiate their survival mechanisms to avoid extermination by host immunity. Ultimately, if infection of host cells could be inhibited, proliferation of the pathogens could be prevented and pathogenesis could be controlled. Insights obtained from studies designed to address this concept will be invaluable to develop novel therapies using innovative drug

¹ National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

² Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

*Corresponding author:

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Tel: +81-3-5841-5398

Fax: +81-3-5841-8184

E-mail: kkato@obihiro.ac.jp

design and engineered vaccine candidates to limit the infectivity of widespread enteric pathogens. Here, we review the recent major advances in research on the role of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogenic viruses, bacteria and protozoa. We further discuss how our knowledge regarding these carbohydrates may influence prophylactic and therapeutic drug development for the treatment of diseases caused by enteric pathogens.

INTERACTION BETWEEN ENTERIC VIRUSES AND CARBOHYDRATES

Carbohydrates function as receptors for virus entry. Negatively charged carbohydrates, which are expressed on many types of cells and tissues such as sialic acid and heparan sulfate, are common viral receptors. Orthomyxovirus, polyomavirus, reovirus, coronavirus, paramyxovirus and parvovirus recognize sialic acid as a receptor. Adeno-associated virus, herpesvirus and flavivirus recognize heparan sulfate. On the other hand, the enteric virus norovirus recognizes histo-blood group antigens (HBGAs), which are not charged.

Here, we focus on the association of carbohydrates with norovirus as the virus enters the host cell. Norovirus, a member of the family *Caliciviridae*, is a major cause of acute water- and food-borne gastroenteritis [4]. Norovirus infection is associated with up to 90% of epidemic non-bacterial acute gastroenteritis cases worldwide [5]. Noroviruses are divided into at least five genotypes, three of which (genogroups I, II, and IV) infect humans. Except for a few genotypes, all noroviruses bind to HBGAs including

ABH antigens and Lewis antigens [5, 6]. In HBGAs, carbohydrate core structures constitute antigenically distinct phenotypes, namely type 1 ($\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}\beta$) and type 2 ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$). H antigen ($\text{Fuc}\alpha 1\text{-2Gal}$), i.e., O-type antigen, is generated by fucose transfer to a galactose residue with an $\alpha 1\text{-2}$ linkage of type 1 or type 2. The A antigen ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3(Fuc}\alpha 1\text{-2)Gal}$) and B antigen ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3(Fuc}\alpha 1\text{-2)Gal}$) of HBGAs are generated by transfer of GalNAc and Gal, respectively, to an H structure irrespective of the carbohydrate core structure. FUT1 and FUT2 are $\alpha 1,2\text{FUTs}$ that catalyze the transfer of Fuc to the Gal residue of type 1 and 2 chains, thereby resulting in the synthesis of H type 1 and H type 2, respectively. HBGAs are found in saliva and mucosal secretions from the intestinal epithelial cells of secretors (i.e., individuals who have the *FUT2* gene that encodes a fucosyltransferase).

Non-secretors, who do not express FUT2 fucosyltransferase and consequently do not express H type 1 or Le^b in the gut, are not infected after challenge with the prototype strain of norovirus, NV/68 [5, 6]. Moreover, the association data between blood type and NV/68 infection showed that, among secretor volunteers, blood groups O and A were associated with an increased risk of infection, while blood group B was associated with a decreased risk. On the other hand, epidemiological studies have shown that some norovirus strains with ABH phenotypes that differ from that of NV/68 can infect individuals. GII/4, which is known as a global epidemic strain, binds more HBGAs than other strains, suggesting that the strength of transmission of GII/4 strains is related to the broad recognition of HBGAs [6]. The recognition sites on HBGAs by norovirus

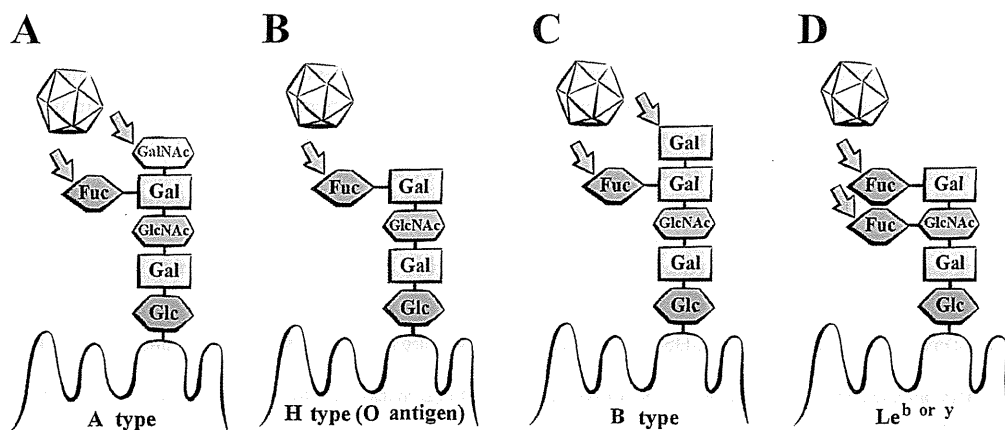


Fig. 1. Schematic image of virus (in this case norovirus) recognition of carbohydrates on HBGAs at the host cell entry step.

(A) Fucose (Fuc) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) on A antigen are recognized by norovirus. (B) Fucose (Fuc) on O antigen is recognized by norovirus. (C) Fucose (Fuc) and galactose (Gal) on B antigen are recognized by norovirus. (D) Fucoses (Fuc) on Le^b or y is recognized by norovirus.