

熱帯熱マラリア原虫の培養系における増殖阻害アッセイ

岩永達也 加藤健太郎

東京大学 農学部 獣医微生物学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

[抄録] マラリアは、特に熱帯や亜熱帯地域で見られる感染症であり、アピコンプレクサ門に属するマラリア原虫の感染によって引き起こされる。既存の薬剤に対する耐性原虫の増加に伴い、原虫の感染・増殖を抑制する新規の薬剤・治療法の開発が急務となっている。本稿ではその研究開発の手法の一つとして、フラスコ内で培養した熱帯熱マラリア原虫に対する薬剤の増殖阻害効果を、血液塗抹の観察に依り定量的に検証する実験法について述べる。

キーワード；熱帯熱マラリア原虫、増殖阻害剤

Growth inhibition assay with *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum*.

Tatsuya Iwanaga, Kentaro Kato

Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Abstract: Malaria, which is caused by an Apicomplexan parasite, *Plasmodium* spp., is an infectious disease, especially seen in tropical and subtropical regions. Because of increasing resistant parasites to current medications, development of new drug or treatment which inhibits parasite infection and growth is needed. For this development activity, in this article, we described a method in which the effects of drugs on the culture of *Plasmodium falciparum* in flasks are measured quantitatively by microscopy of the blood smear.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, growth inhibitor

[はじめに]

マラリアは、熱帯や亜熱帯地域で多く見られる人の感染症であり、ハマダラカの媒介によるアピコンプレクサ門に属するマラリア原虫の感染によって引き起こされる。アフリカでは特に感染者が多く、近年でも100万人近くの死者を出す未だ重大な疾病である。病原体となる原虫は中間宿主である人の血液に入ると、一旦肝細胞内で増殖するが、その後放出されるメロゾイトは赤血球内で増殖を繰り返す。治療は現在クロロキンやメフロキンの投与により行われるが、耐性原虫や副作用の問題のため、新しい薬剤・治療法の開発が求められている (Katoら、2012)。本稿では、特に強い症状を引き起こすとされる熱帯熱マラリア原虫をフラスコ内で培養し、そこへ薬剤を投与することによって現れる増殖阻害効果を、血液塗抹を顕微鏡観察することにより評価する方法について述べる。

[方法]

1. 使用する原虫株と宿主細胞、試薬類

マラリア原虫として、熱帯熱マラリア原虫 HB3 株を使用した。宿主として、AB 型人血液 (採血から 2 週間以内) を用いた。血液塗抹の染色にはライト・ギムザ染色を用いた。また、原虫のライフサイクルの同調にヘパリンナトリウム水溶液、5%D-ソルビトール水溶液を使

用した。

2. 薬剤添加による増殖阻害アッセイ

熱帯熱マラリア原虫の赤血球内増殖期は、赤血球侵入後 20 時間までに見られるリング期、その後見られるトロホゾイト期 (侵入後 20 時間~36 時間)、核の分裂が観察できるシズント期 (侵入後 36 時間~44 時間) の 3 期に分けられる。

原虫の培養におけるライフサイクルを同調させるため、ヘパリンによる侵入阻害効果を利用する。原虫の培養液中に最終濃度 30 単位/ml となるようにヘパリンナトリウム水溶液を加え、44 時間培養する。44 時間後、培養液中の赤血球を新しい液体培地で洗浄し、4 時間インキュベートすることにより、この間原虫は新しい赤血球に侵入することができる。培養液を遠心分離して上清を捨てた後、赤血球体積の 9~10 倍量の 5%D-ソルビトール水溶液を加えて激しく振盪して後期トロホゾイト・シズント期の原虫を死滅させる。再び赤血球を液体培地で洗浄すると、培養液中にはヘパリンを洗浄してから 4 時間の間に新たに赤血球に侵入したリング期の原虫だけが残る。この方法により、理論上 4 時間の幅で原虫のライフサイクルを同調させることができる。

原虫の培養液を新しい液体培地とともに 96 ウェルプレート (U 底) に分注する。ヘマトクリット (培養液に対する赤血球の体積比率) は

1%、パラシテミア（全赤血球数に対する感染赤血球数比率）は 0.5%程度が望ましい。今回は原虫がトロホゾイト期にあるときに薬剤とともに分注し、48 時間の培養を開始した。あらかじめプレートに2倍濃度の薬剤の入った液体培地を入れておき、そこへヘマトクリット2%の培養液同量を一齐に加えると、実験の開始がスムーズに行える。対照実験には、薬剤の溶媒を同じ濃度となるように加えたものを用いる。

48 時間の培養により、マラリア原虫のライフサイクルが一周する。各ウェルから上清を取り除き、各々の培養液で血液塗抹を作製する。ライト・ギムザ染色により血液塗抹を染色し、顕微鏡で観察する。全赤血球 10000 個に対する感染赤血球の個数を数え、その割合を算出する。薬剤の入っていない対照実験の培養液では、2.5~3%となることを見込まれる。対照実験に対する各薬剤・各濃度で得られた感染率の割合を評価することにより、それらの薬剤の増殖阻害効果を見ることができる。

【結果】

薬剤の入っていない対照実験に対するパラシテミアの減少の度合いから、その薬剤の原虫に対する増殖阻害効果を検証することができる（図）。また、薬剤濃度を段階的に設定することにより、薬剤効果の濃度依存性を調査することもでき、対照の 50%のパラシテミアを示した薬剤濃度をその薬剤の IC₅₀ 濃度とすることができる。

マラリア原虫はシズント期を経た後、宿主細胞を破って培養液中に出、新たな赤血球に侵入する。したがって、シズント期~リング期間は原虫数が増加する移行期となる。リング期から実験を開始し、次のリング期でサンプル回収とすると、薬剤の効果等によりまだ一部の原虫が移行期にある場合に感染率が安定せず正確に評価することができない。トロホゾイト期に実験を開始し次のトロホゾイト期で回収することにより、感染率が不安定になるのを抑え、なおかつ薬剤がどこかの段階で増殖に影響を与えていればその影響を感染率の変化として検出できる。

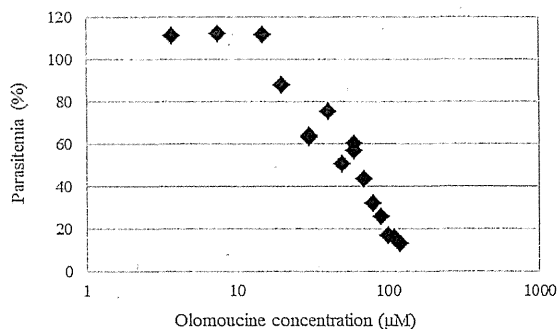
【考察】

96 ウェルプレートを用いて、それぞれの条件下において熱帯熱マラリア原虫を培養することにより、原虫の増殖具合から薬剤の原虫増殖に対する影響を評価することができる。マラリア原虫の培養には本来細かな頻度での液体培地の交換が必要となるが、ヘマトクリット値・パラシテミアをともに低値に設定することによりそれを必要とせず、加える薬剤の濃度以外の条件をそろえて実験を行うことができる。

ここで述べた実験方法を用いることで、投与した薬剤により原虫のリング期からトロホゾイト期への遷移やシズント期の核分裂、新しい宿主細胞への侵入など、赤血球内サイクルのどこかが抑制されていれば、それらを原虫の増殖阻害効果として検出することができる。この実験方法だけでは、どの部分を薬剤が抑制してい

るかまでは判断できないが、原虫のライフサイクルの同調がうまくいってれば、薬剤の投与とサンプル回収のタイミングを変えることによりそれらを推測することができる。

また、一つのウェルに入れる原虫培養液の量を増やしたり、ウェルの数を増やしたりすることにより、薬剤を投与してからの原虫発育の経時的变化を観察することもできる。しかしその場合、原虫を培養するインキュベーターからプレートを外へ出す回数が増えることにより原虫の発育が遅れてしまい、実験結果に影響を及ぼす可能性があるため注意が必要である。



図：薬剤として Olomoucine(Calbiochem)を使用した例。x 軸に薬剤の濃度、y 軸に対照実験に対するパラシテミアの比率をとった。

【謝辞】

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、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により行われた。

【文献】

- 1) Kato K, Sugi T, Iwanaga T.: Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. *Parasitol Int.* 61:224-234, 2012

トキソプラズマ原虫の培養と精製

杉 達紀 加藤健太郎

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] ここではトキソプラズマ原虫を使用した実験系に必須となるトキソプラズマ原虫の培養増殖及び、単離方法について手順をおって紹介する。

キーワード；トキソプラズマ原虫、哺乳類培養細胞、精製法

In vitro culture of *Toxoplasma gondii* with mammalian cells as hosts

Tatsuki Sugi, Kentaro Kato

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: Here the authors report the step-by-step way to culture, propagate and purify *Toxoplasma gondii* parasite. Purification of parasites is the first step of all experiments using *Toxoplasma gondii*.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, *in vitro* culture, purification

[はじめに]

トキソプラズマ原虫は再興感染症の病原体であることから、マラリア原虫と同じ門に属し、かつ遺伝子操作などが容易であることから、原虫の実験材料としては非常に適している。ここでは、宿主細胞として哺乳類の細胞を用いてフラスコ内でトキソプラズマ原虫を大量に培養する方法及び、生きたトキソプラズマ原虫を精製する方法を、成書 (Striepen ら、2007) に本研究室で加えた変更点を踏まえ、MOI、培地、取り扱い操作などの詳細を紹介したい。

[方法]

我々は、トキソプラズマ原虫の宿主細胞としてウイルス等の宿主細胞を必要とする病原体の増殖によく用いられている Vero 細胞を利用している。以下は Vero 細胞を宿主細胞とした場合の培地組成などを紹介する。

[A] 材料、道具

【細胞】

Vero 細胞

(Riken Bio Resource Center: RCB0001)

Toxoplasma gondii

(ATCC から各種系統が入手可能)

ToxoDB (<http://www.toxodb.org/>) には入手可能なトキソプラズマ原虫のゲノムプロジェクトのデータがまとまっており、ゲノム情報が利用可能な株を確認することができる。

【培地】

DMEM (Dulbecco Modified Eagles' medium) (Nissui #05919)

5% FCS 添加 DMEM (Vero 細胞培養用)

1% FCS 添加 DMEM (感染細胞培地用)

10% DMSO 添加 FCS (凍結保存液)

[B] 培養の実際

(1) 哺乳類宿主細胞の用意

トキソプラズマ原虫は偏性細胞内寄生生物であるため、宿主細胞が培養には必須である。フラスコを最大限利用するためには、宿主細胞はフラスコの底面全面に confluent で培養されている状態が好ましい。トキソプラズマ原虫接種日の前夜に confluent の Vero 細胞を 3:1 で希釈して播種したフラスコを用意することで、安定して confluent の Vero 細胞を用意することができる。

(2) 凍結トキソプラズマ原虫の接種

ATCC などより入手したトキソプラズマ原虫は凍結状態であるので、培地で洗浄後フラスコ内の宿主細胞に接種する。

i) 凍結バイアルを 37°C で速やかに融解する。

ii) 10 倍量 (10ml 程度) の感染培地で希釈し 2000rpm, 5 分, 4°C での遠心を行う。

iii) 上清を除き、感染細胞用培地 5ml にピペッティングで優しく懸濁する。

iv) 接種先の Vero 細胞フラスコから増殖培地を除く。

v) 原虫懸濁液を Vero 細胞フラスコに接種する。この時フラスコの蓋は密栓しない。

vi) 37°C, 5% CO₂ の通常の哺乳類細胞培養条件で 30 分ほど静置する (フラスコ内の CO₂ 濃度を平衡化するため)。

vii) 一度インキュベータから取り出し、蓋を密栓する。万が一の場合にトキソプラズマ原虫の

汚染が広がらないようにするためと、外からのコンタミを防ぐためである。Vero 細胞が confluent であるため、はじめに CO₂ 濃度の平衡化をすれば密栓した状態でも原虫は元気に増殖する。

viii) 原虫の増殖が顕微鏡下で確認できるまで、2 日毎に感染細胞用培地を交換し、培養を続ける。

(3) トキソプラズマ原虫の精製、継代

原虫の姿が顕微鏡下で確認できたら (図 1、コロニーの様子)、原虫の精製および継代を行う。継代先の Vero 細胞は (1) の項と同様に用意しておく。

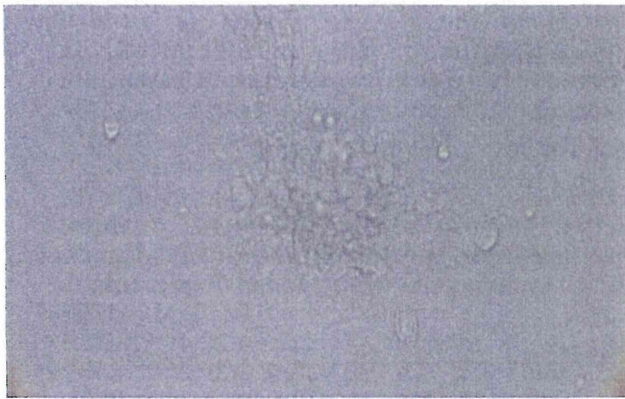


図 1. 20×10 倍で観察した原虫増殖箇所

準備する器具

5ml シリンジ (培養スケールによって変更する)

25G 針

径 5um フィルター

(我々は、シリンジに直接付けられる

Millipore 社の Millex SV 5.00um を利用している。)

スクレーパー

i) スクレーパーで感染細胞を剥がす (図 2)。



図 2. スクレーパーを用いた感染細胞の回収

ii) 5ml シリンジと 25G 針を用いて宿主細胞を破壊する (図 3)。2~3 回出し入れし、最後にシリンジに吸い込んでおく。針の先を折るとプラスチックの端にアクセスしやすい。

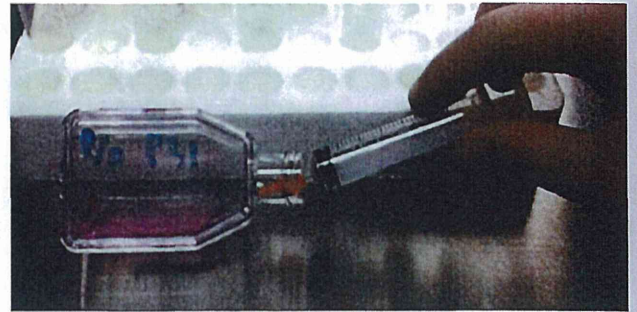


図 3. シリンジと中折れ針による感染細胞の破壊操作

iii) シリンジから針を外し、5um フィルターを取り付け、感染細胞懸濁液をフィルターでろ過し遠心管に回収する (図 4)。この時、5um より小さい原虫細胞と破壊された宿主細胞塊はフィルターを通るが、5um より大きい Vero 細胞は通らないので原虫のみを回収することができる。



図 4. シリンジに取り付けたフィルターでの原虫濾過

iv) 濾過した原虫懸濁液を、2000rpm, 10分、室温で遠心し、原虫を回収する。

注) トキソプラズマ原虫を低温、37°C などで繰り返し温度変化させると、原虫の生存率が下がる報告がある (Carruthers ら、1999) ことから (原虫の侵入に関わる分泌機能が失われる) 我々は精製の操作中は常に室温で扱うことにしている。

v) 上清を除き感染培地もしくは PBS などのバッファーを 5ml 加え原虫を懸濁する。

vi) iv)~v) をさらに 2 回繰り返し原虫を洗浄する。

vii) 原虫を 5ml の感染培地もしくは目的とするバッファーに再懸濁し、顕微鏡下で計数する。我々は一般的な血球計算盤を用いて対物 20 倍、対眼 10 倍の倍率を用いている。(図 5)。

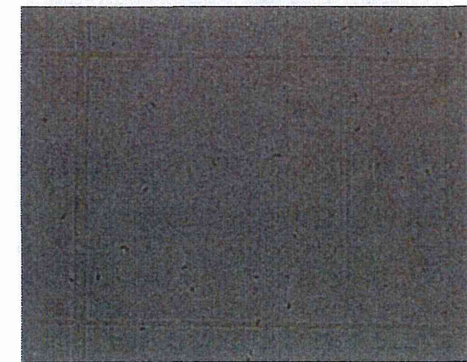


図 5. 血球計算盤での原虫計数。図中の四角の一片の長さは 0.025mm。

トキソプラズマ原虫は三日月型をした細胞として観察される。

viii) multiple of infection (MOI)が 0.1 から 1 になるように感染培地 5ml に原虫を希釈し、増殖培地を除いた Vero 細胞フラスコに接種する。

ix) MOI が 1 の場合は 24 時間程、MOI が 0.1 の場合は 48 時間ほどで宿主細胞が全て原虫に破壊され (図 6)、次回原虫の継代や原虫の精製回収に使用できるようになる。時間についてはトキソプラズマ原虫の系統株によるものもあるので、事前に MOI を振り条件検討しておくとうい。

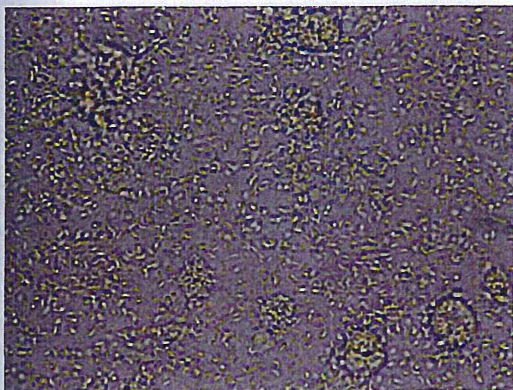


図 6. MOI=0.1 で接種し、48 時間後の様子

注 1) 材料として原虫を用いる場合には、i)-vii) までの手順に従うが、MOI を管理して接種した感染細胞から回収した原虫の方が、原虫数や生存率などが揃ったいきの良い原虫を得られる。

注 2) MOI を管理したい場合には継代時に原虫の精製をする必要があるが、継代後に原虫サンプルを回収する必要などなく、単純に継代をしたい場合には、手順 i) のスクレーパーによる剥離後にピペッティングで懸濁し、10 分の 1 量を次の Vero 細胞に接種すれば良い。

(4) 凍結保存方法

培養を一時中止したい時や、原虫材料を送付するときなどに凍結保存が有効である。培養細胞全般と同じ方法で凍結サンプルを作成することができる。我々は感染細胞ごと凍結する方法で問題なく保存できている。

i) (3) の方法に従って原虫を継代後、感染細胞が破壊される 24 時間程前に (例えば、MOI を 0.1 で接種した場合は 24 時間の培養時間で) 回収を行う。

ii) 感染細胞をスクレーパーでフラスコから剥がし、ピペットで遠心管に回収する。

iii) 1000rpm, 4°C, 5 分間の遠心を行い、上清を除く。

iv) 凍結保存液に再懸濁し (T25 の感染細胞を 2ml に懸濁し、2 本のバイアルという計算で凍結している)、凍結用バイアルにいれ、プログラムフリーザーや BICELL などの器具を用いて -80°C にて冷凍する。

v) 凍結した細胞は液体窒素に保管し、半永久的に保存が可能である。

(5) クローニング

遺伝子組み換えや、突然変異、自然変異などで新たな性質を持った原虫を作出した場合、クローニングをすることで原虫株の樹立が行える。我々は、96well プレートを用いた限界希釈法でクローン化を行なっている。

準備する器具

□ 96well プレートに (1) と同様に 3 : 1 (およそ 1.0×10^4 細胞/well) の希釈度で Vero 細胞を播種し一晚培養したもの。

□ クローニングしたい原虫を含む原虫群

i) 2 倍階段希釈をするために、96well プレートに培養した Vero 細胞から培地を取り除き、感染培地 100ul を全 well へ加える。

ii) (3) の手順に従い、クローニングをしたい原虫群感染細胞から原虫の精製を行い、原虫数が 2.0×10^3 /ml となるように感染細胞用培地で希釈する。

iii) 96well プレートの 1A から 1H までの 8well に原虫希釈液を 100ul ずつ加え、8 連のマルチピペッターなどを用いて、5 回混合し 100ul をとり 2A-2H の well に加える。

iv) 同様に混合した後に 100ul ずつ隣の Well へ加えて、11A-11H の列まで 2 倍階段希釈を続ける。

v) 11A-11H で混合した 100ul の原虫希釈液は廃棄し、接種されたプレートを用意する。

vi) 一週間程 37°C, 5%, CO₂ で培養し、顕微鏡下で 1 つのコロニー/well で観察される well を選択する。(5 日目ほどから観察できるようになるが、培養中にプレートに振動を与えるとコロニーが分散して一つの原虫由来のコロニーかどうかの判別が難しくなるので注意を要する)

vii) 各列でコロニー陽性 Well 率が 50% 以下となっている希釈列から数個の well を選択し継代に用いる。(接種後 7 日目~8 日目)

viii) 継代日の前日に Vero 細胞を 24well プレートに用意する。

ix) 継代する well をマイクロピペットで勢いよくピペッティングし、(10 回ほど)、顕微鏡下で感染細胞と宿主細胞が well の底から離れていることを確認する。

x) 感染細胞懸濁液を 24well プレートの well に接種する

xi) その後感染細胞が破壊されるタイミングで、順に 6well プレート、T25 フラスコへと継代する。

[結果]

MOI 0.1 で摂取し、48 時間後に感染細胞の破壊を確認した (図 6)。

T75 フラスコから、 1.0×10^9 のタキゾイトを得ることができた。

[考察]

一般的な成書では HFF 細胞を宿主細胞とし

て使っており、その入手面や維持のしやすさを考えると Vero 細胞でのトキソプラズマ培養は研究室に導入しやすい。また、室温での操作を徹底することで、37°C に繰り返し暴露されることによって活性を失う (Carruthers ら、1999) ことのない元気なトキソプラズマ原虫を得られ、後のアッセイにとって再現性のある良い材料をえることができる。

また、MOI を管理することにより宿主細胞の破壊産物が少ない状態でトキソプラズマ原虫培養液を得ることができる。これにより、原虫精製後の純度と収量を上げることが可能となる。

限界希釈法において、やや高めの希釈度から希釈列を作ることにより、効率的にクローンを得ることができる (Sugi ら、2010)。

[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、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により行われた。

[文献]

- 1) Striepen B, Soldati D.: Genetic Manipulation of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, Elsevier, UK, 2007, p392-418.
- 2) Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD.: Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol*, 1:225-35, 1999.
- 3) Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al.: Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. *Eukaryotic Cell*, 9:667-70, 2010.

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 ($\text{Gal}\beta\text{1-3GlcNAc}\beta$) and type 2 ($\text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta$). H antigen ($\text{Fuc-}\alpha\text{1-2Gal}$), i.e., O-type antigen, is generated by fucose transfer to a galactose residue with an $\alpha\text{1-2}$ linkage of type 1 or type 2. The A antigen ($\text{GalNAc } \alpha\text{1-3(Fuc-}\alpha\text{1-2)Gal}$) and B antigen ($\text{Gal } \alpha\text{1-3(Fuc-}\alpha\text{1-2)Gal}$) 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 $\alpha\text{1,2FUTs}$ 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

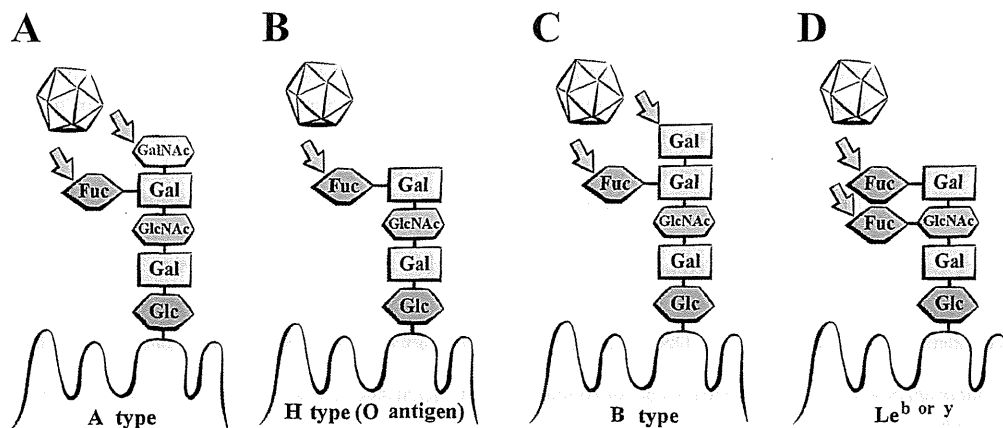


Fig. 1. Schematic image of virus (in this case norovirus) recognition of carbohydrates on HBGAs at the host cell entry step. (A) Fucose (Fuc) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) on A antigen are recognized by norovirus. (B) Fucose (Fuc) on O antigen is recognized by norovirus. (C) Fucose (Fuc) and galactose (Gal) on B antigen are recognized by norovirus. (D) Fucoses (Fuc) on Le^b or y is recognized by norovirus.

have been classified according to the interaction of the virus with the H, A, B, and Le epitopes (Fig. 1) [6, 7]. HBGAs are important factors for determining host specificity, although it is still unclear whether HBGAs act as the primary receptor or enhance norovirus infectivity. Researchers including ourselves have demonstrated that feline calicivirus (FCV), a member of the genus *Vesivirus*, infects the upper respiratory tract by attaching to α 2-6-linked sialic acids and using junctional adhesion molecule-1 for internalization [8, 9]. It is comparatively easy to study the life cycle of FCV because the virus replicates efficiently in cell culture without specific supplementation, whereas noroviruses are not cultivable in cell culture.

INTERACTION BETWEEN ENTERIC BACTERIA AND CARBOHYDRATES

Carbohydrates also function as receptors for bacterial attachment at the initial step of infection. Here, we describe the role of carbohydrates in bacterial infections, focusing on *Salmonella enterica* and several assortative bacterial species that produce a variety of fimbrial adhesions (Fig. 2).

Salmonella strains cause disease in diverse mammalian hosts. Some *Salmonella* strains have a narrow host range, such as *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) and serovar Paratyphi (*S. paratyphi*), which cause disease only in humans, whereas strains such as *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) and serovar Enteritidis (*S. enteritidis*) cause infection in numerous species including mice, poultry, pigs, sheep, cattle, horses and humans [2].

Infected orally, *Salmonella* reach the intestinal tract and then mainly attach to the M cells of the intestinal epithelium to initiate invasion [10]. After colonization of the intestinal epithelium, Typhoid *Salmonella*, *S. typhi* and *S. paratyphi*, invade M cells. However, *S. typhi* and *S. paratyphi* can also survive being engulfed by macrophages, which then spread throughout the body via the lymphatic and blood systems. Non-typhoidal *Salmonella*, *S. typhimurium* and *S. enteritidis* cannot survive within macrophages (Fig. 3). They cause gastroenteritis in humans and animals by colonizing the intestinal epithelium and then invading and destroying the M cells and enterocytes [2].

Bacterial adherence requires both specific and non-specific interactions. In the case of *Salmonella*, the negative charge produced by sialic acid on the surface of the host cell is required as a non-specific adherence factor [11]. For their specific interactions, *Salmonella* and assortative

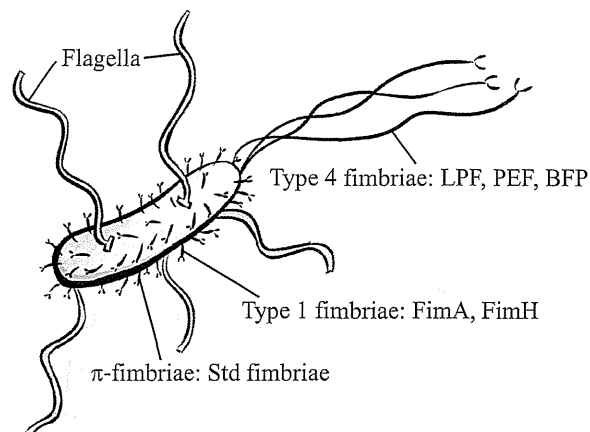


Fig. 2. General structure and localization of bacterial fimbriae and flagella.

Gram-negative bacteria have many kinds of fimbriae (pili) and flagella. Bacterial lectin-like adhesive molecules (adhesins) included in bacterial fimbriae recognize and bind to sugar-containing molecules on the host cell surface. Bacterial fimbriae and adhesins contribute to bacterial attachment, the initial step of bacterial infection. Each bacterial adhesin recognizes a specific structure of its target sugar molecule, and bacterial fimbriae also help to determine the specificity (species, tissue, or cell) of bacterial infection. Two types of representative fimbriae of *Salmonella* and assortative bacteria (Type 1 fimbriae and Type 4 fimbriae) are shown. Type 1 fimbriae are short and highly expressed entirely on the surface of bacteria. Type 4 fimbriae are thin and flexible, expressed at low levels, and are generally located at the polar part of bacteria. FimA and FimH are categorized as Type 1 fimbriae. Long-polar fimbriae (LPF), Plasmid-code fimbriae (PEF) and bundle-forming pili (BFP) are categorized as Type 4 fimbriae. Std fimbriae are categorized as π -fimbriae. Bacterial flagella are the moving apparatus of bacteria, but their components can also contribute to the binding to sugar-containing molecules.

tative bacteria possess various adhesion molecules such as a variety of bacterial fimbriae. At the initial infection step, bacterial attachment is mainly controlled by these bacterial fimbriae. Individual fimbria recognize and bind to specific receptors to promote adhesion to the host cell surface [2, 12].

Long polar fimbriae (LPF) and plasmid-code fimbriae (PEF) are categorized as type 4 fimbriae (Fig. 2). Std fimbriae are categorized as π -fimbriae [2, 13–15]. A previous report showed that when one of the fimbriae carried by *Salmonella typhimurium* was deleted, only virulence for mouse was moderately altered, and that multiple fimbrial adhesins were required for full virulence [16]. For *Salmonella* and assortative bacteria, type 1 fimbria is the

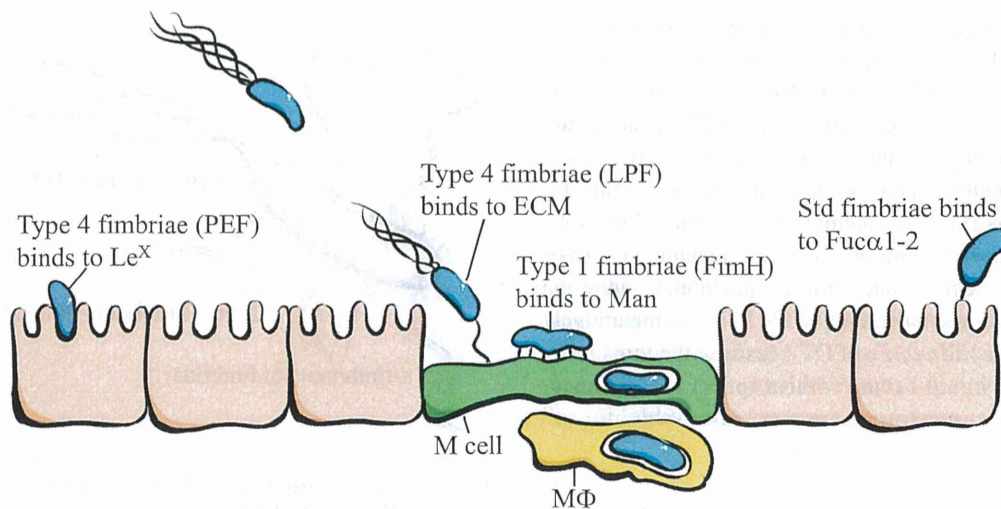


Fig. 3. Various fimbriae of *Salmonella* and assortative bacteria and their sugar-containing receptor molecules. *Salmonella* and assortative bacteria express a variety of fimbriae. The minor component of Type 1 fimbriae, FimH, is present at the tip of type 1 fimbriae, mediates binding to D-mannose-containing structures and enables bacteria to colonize various host tissues [18]. Type 1 fimbria is highly expressed on the bacterial surface, allowing large amounts of bacteria to adhere via the FimH-mannose interaction. The various kinds of type 4 fimbriae play an important role in bacterial infection. Plasmid-encoded fimbria (PEF) is required for bacterial attachment to intestinal epithelial cells. PEF specifically binds to trisaccharide Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, also known as the Lewis X (Le^x) blood group antigen [13]. Long polar fimbria (LPF) mediates the adhesion of *S. typhimurium* to murine Peyer's patches [21]. Extracellular matrix proteins (ECMs) may act as receptors for LPF. ECMs are modified with various carbohydrate moieties, and the presence of Mannose inhibits the LPF-ECM interaction. Mannose-containing carbohydrates may participate in bacterial adhesion via LPF [23]. Std fimbriae are categorized as π -fimbriae and are well conserved among *S. enterica* serotypes but absent from other related bacterial species. Std fimbriae recognize and bind the H type 2 histo-blood group oligosaccharide, the terminal Fuc α 1-2Gal β 1 moiety. *S. typhi* and *S. paratyphi* can survive within the macrophages after they are engulfed by phagocytosis. Non-typhoidal *Salmonella*, *S. typhimurium* and *S. enteritidis*, however, are unable to survive within macrophages.

best characterized [17]. Type 1 fimbriae consist of a major component (FimA) and a minor component (FimH) (Fig. 2). FimH lies at the tip of type 1 fimbriae, where it mediates binding to D-mannose-containing structures and enables the bacteria to colonize various host tissues [18]. Type 1 fimbriae are also produced by other gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [19]. The FimH protein of enterobacterial species including *Salmonella* recognizes mannose-containing oligosaccharides [18]. In the case of *E. coli*, previous reports have shown that FimH protein has a considerably high affinity for oligosaccharides containing Man α 1-3, such as Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc and Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-4)Man, which are constituents of cell surface glycoproteins [19]. The process of bacterial adhesion to the epithelial cell surface mediated by Type 1 fimbriae (FimH) is conservative among enterobacteria. Type 1 fimbriae are highly expressed on the bacterial surface, allowing large quantities of bacteria to adhere via the FimH-

Mannose interaction (Fig. 3).

Type 4 fimbriae are thin and flexible, and generally expressed at a lower level than type 1 fimbriae. Some type 4 fimbriae are only present at low levels on the surface of bacteria, and are localized at the bacterial pole. Although their expression level is low, type 4 fimbriae frequently play an important role in bacterial infection. Like type 1 fimbriae, type 4 fimbriae are thought to recognize carbohydrates as specific receptors, but the receptor molecules and precise functions of some type 4 fimbriae have yet to be determined. For example, the function of the type 4 fimbria bundle-forming pili (BFP), an important virulence factor for pathogenic *E. coli* strains, is not yet known (Fig. 2). BFP may not be involved in initial adhesion; rather, it may participate in the formation of the bacterial colony by forming bundles that link one bacterium to another [20]. Although the function of and receptors for type 4 fimbriae remain unclear, bacterial virulence has been shown to decrease when type 4 fimbriae are deleted [16]. LPF medi-