

3. エンテロウイルス 71 の感染機構に関する研究

西村 順裕

国立感染症研究所 ウイルス第二部

ウイルス感染機構の解明において、特異的ウイルス受容体の同定は重要である。私は、手足口病の主要な原因ウイルスであるエンテロウイルス 71 (EV71) の受容体として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を同定した。PSGL-1 はシアロムチンファミリーの膜蛋白質で、主に白血球に発現する。EV71 との結合には、PSGL-1 の N 末端領域のチロシン硫酸化が必須であった。EV71 受容体の同定は、ウイルス侵入の初期過程のみならず、ウイルス感染による病原性発現機構の解明や予防治療法の開発研究に役立つものと期待される。

エンテロウイルス 71 (EV71) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属、A 群ヒトエンテロウイルスに分類される¹⁷⁾。ウイルスゲノムは一本鎖 RNA で、エンベロープはなく、20 面体の小型ウイルスである^{19,29)}。EV71 は、同じく HEV-A に分類されるコクサッキーウイルス A16 (CVA16) とともに、手足口病の主要な病原ウイルスである。手足口病は乳幼児を中心に流行し、主に手・足・口に発疹を呈する感染症である。症状は一般に軽く、通常数日で回復する。しかし、EV71 感染では稀に無菌性髄膜炎・急性脳炎・神経原性肺水腫などの神経疾患を呈することが知られている。EV71 による手足口病の大流行は、1990 年代後半よりアジア太平洋地域で多発しており、小児の急性死症例をとまなうことから大きな問題となっている^{1, 2, 5, 12, 28, 30, 36, 38)}。

EV71 感染病態には未だ不明な点が多い。たとえば、なぜ EV71 感染では重症化する場合があるのか未解明である。EV71 や CVA16 を含む A 群ヒトエンテロウイルス全体においても、感染・病原性発現を規定する宿主因子の研究は遅れていた。しかし、2009 年に EV71 受容体として P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)¹⁵⁾ と scavenger

receptor class B, member 2 (SCARB2)³⁴⁾ が相次いで同定され、大きく前進したと思われる (図 1)^{14, 18, 32, 33)}。私は、PSGL-1 との結合性により EV71 分離株が 2 種類に分けられることも明らかにし、PSGL-1-binding (EV71-PB) 株および PSGL-1-non-binding (EV71-non-PB) 株と名付けた¹⁵⁾。EV71 受容体としての PSGL-1 の同定・機能解析については、最近本誌に総説を掲載させていただいた⁴⁰⁾。本稿は EV71-PB 株が中心であり、最初に PSGL-1 同定方法および機能解析を簡単にまとめる。次に、PSGL-1 同定にいたるまで、私がいかに「幸運」であったかを執筆させていただく。

1. PSGL-1 の同定と機能解析

1-1. EV71 受容体の発現クローニング

パンニング法による発現クローニング^{7, 11, 23-26)}を EV71 受容体の同定に応用した¹⁵⁾。EV71 受容体を発現しておらず、EV71 固相化プレートに結合しない浮遊系マウスミエローマ細胞 (P3U1 細胞) を用いた。P3U1 細胞に Jurkat 細胞 (ヒト T リンパ球細胞株) cDNA ライブラリーを導入し、EV71 固相化プレートに載せ、プレートに結合するようになった細胞を選択した (パンニング)。EV71 固相化プレートに結合するようになった P3U1 細胞には、Jurkat 細胞の EV71 受容体 cDNA が導入され発現しているものと考えられる。およそ 1000 万個の細胞を EV71 固相化プレートでパンニングし、非結合細胞を洗い流し、一週間培養したところ、プレート上にわずか 4 つのコロニーが形成された。これらの細胞を増やし、ゲノムを抽出し、cDNA ライブラリー由来遺伝子を PCR で増幅した。シーケンシングしたところ、いずれのコロニーからの増幅産物も、

連絡先

〒 208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 ウイルス第二部

TEL: 042-561-0771 (代表)

FAX: 042-561-4729

E-mail: ynishi@nih.go.jp

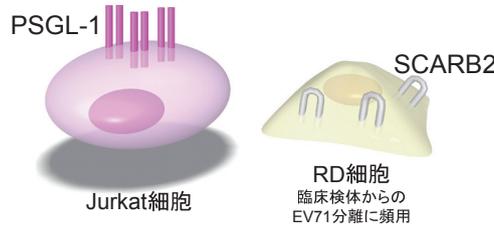


図1 EV71 受容体

PSGL-1はJurkat細胞（ヒトTリンパ球細胞株）における受容体である。SCARB2はRD細胞（ヒト横紋筋腫細胞株）における受容体である。SCARB2はN末およびC末領域に細胞膜貫通領域があり、逆U字型である。

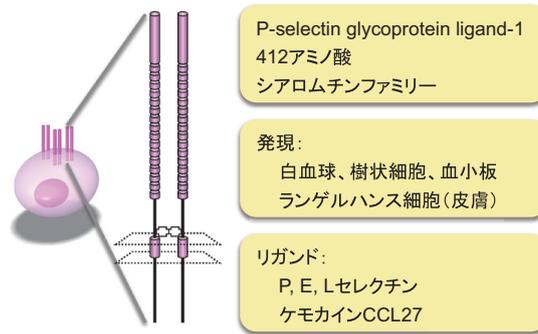


図2 PSGL-1の性状

PSGL-1は二量体をなし、N末端を外側として細胞表面に発現している。
(文献15を改変)

ヒトPSGL-1をコードしていた。

1-2. PSGL-1の機能

PSGL-1は412アミノ酸からなるシアロムチンファミリー膜蛋白質で、ホモダイマーを形成し、主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現している(図2)^{8, 21, 27}。PSGL-1のN末端領域は細胞外に位置し、リガンドであるセレクチンやケモカインと相互作用する。PSGL-1とセレクチンの相互作用は、初期炎症過程における局所への白血球の遊走・接着・浸潤に重要である。PSGL-1は白血球表面に恒常的に発現しているのに対し、セレクチンは炎症等により血管内皮細胞表面への発現が誘導される。PSGL-1とセレクチンの相互作用は、立体構造解析も含め詳細に研究されている^{8, 21, 27}。

1-3. PSGL-1のN末端領域にEV71が結合

PSGL-1とEV71との細胞表面での結合を、フローサイトメトリーで解析した(図3)。PSGL-1をほとんど発現していない293T細胞表面に(図3, 上段)、PSGL-1を一過性に発現させたところ、細胞表面にEV71が結合するようになった(図3, 下段)。また、EV71とPSGL-1との結合は、PSGL-1のN末端領域を認識する抗PSGL-1モノクローナ

ル抗体により濃度依存的に阻害された¹⁵。さらに、ヒトPSGL-1のN末端領域以外をマウスPSGL-1に置き換えたキメラPSGL-1を発現させた場合にも、EV71は結合した¹⁵。つまり、EV71はヒトPSGL-1のN末端領域に特異的に結合した。

1-4. PSGL-1のN末端領域のチロシン硫酸化がEV71結合に必須

EV71とPSGL-1との相互作用における、PSGL-1翻訳後修飾の役割を詳細に解析した(図4, 5)¹⁶。PSGL-1とPセレクチンの相互作用には、PSGL-1のチロシン(Y46, Y48, Y51)の硫酸化に加え、トレオニン(T57)へのO型糖鎖付加が重要である(図6)^{10, 20, 22, 27, 31}。Eセレクチンとの結合にチロシンの硫酸化は不要であるが²⁷、ケモカインCCL27との相互作用にはチロシンの硫酸化のみが必須である(図6)⁴。

まず、O型糖鎖付加について検討した(図4)。293T細胞に一過性にPSGL-1を発現させ、可溶性Pセレクチン-FcあるいはEV71との結合をフローサイトメトリーで解析した。T57をアラニンに置換し、O型糖鎖付加を阻害した変異体(T57A)を発現させた場合、Pセレクチン-Fcは結合しなかったが、EV71は結合した(図4, 下段)。ま

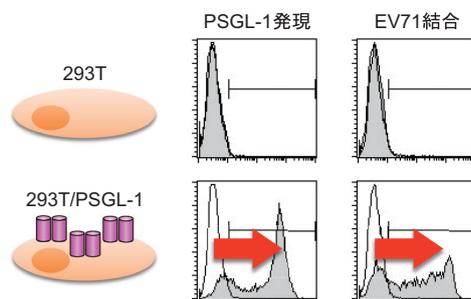


図3 EV71はPSGL-1に結合する

フローサイトメトリーで解析した。293T細胞はPSGL-1を発現しておらず、EV71は結合しない（上段）。293T細胞表面にPSGL-1を発現させると、EV71が結合するようになった（下段）。

（文献15を改変）

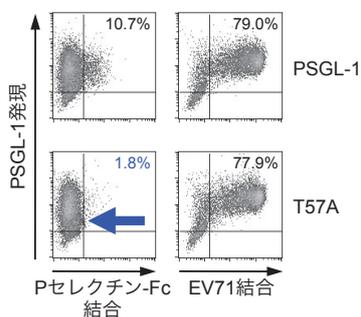


図4 PSGL-1 T57へのO型糖鎖付加は、EV71結合に不要

PSGL-1（上段）あるいはT57をアラニンに置換した変異体T57A（下段）を発現させた293T細胞を用いた。可溶性Pセレクトイン-FcあるいはEV71との結合を、フローサイトメトリーで解析した。T57A変異により、Pセレクトイン-Fcとの結合は低下したが、EV71との結合は不変だった。

（文献16を改変）

た、PSGL-1発現293T細胞をシアリダーゼで処理した場合、Pセレクトイン-Fc結合は低下したが、EV71結合は不変であった¹⁶⁾。したがって、PSGL-1のT57のO型糖鎖付加は、EV71結合に不要と考えられた。

次にPSGL-1のチロシン硫酸化（図5A）とEV71結合について解析した。硫酸化阻害剤であるsodium chlorate存在下で培養したPSGL-1発現293T細胞は、細胞表面の硫酸化チロシン発現が低下し、EV71結合も低下した¹⁶⁾。次に、PSGL-1のチロシン（Y46, Y48, Y51）を全てフェニルアラニンに置換し、チロシン硫酸化を阻害した変異体（FFF変異体；図5B）を293T細胞に発現させ、EV71との結合を検討した（図5C）。FFF変異体ではチロシンの硫酸化が阻害されるとともに、EV71結合も低下した。したがって、チロシンの硫酸化がEV71結合に必要なことが示唆された（図6）。

1-5. PSGL-1依存性／非依存性EV71増殖

Jurkat細胞とRD細胞（ヒト横紋筋腫細胞株）における、PSGL-1発現（図7A）とEV71増殖（図7B）を解析した。

細胞表面におけるPSGL-1発現をフローサイトメトリーで解析したところ、Jurkat細胞には高い発現がみられた（図7A）。一方、臨床検体からのEV71分離に頻用されるRD細胞（多くのEV71株が効率よく増殖し、細胞変性効果が顕著）の表面には、ほとんど発現していなかった。次に、PSGL-1依存性EV71増殖を解析した（図7B）。細胞を抗PSGL-1抗体で前処理し、EV71を感染させた。Jurkat細胞では、抗PSGL-1抗体処理によりEV71増殖が阻害された。一方、RD細胞におけるEV71増殖は、抗PSGL-1抗体処理の影響を受けなかった。つまり、RD細胞においてEV71はPSGL-1非依存的に、SCARB2などを受容体として増殖することが明らかとなった。

1-6. まとめ

EV71と受容体の「結合性」を指標としたクローニング法により、PSGL-1を同定することができた。PSGL-1、SCARB2以外にもEV71受容体が存在することも考えられ^{9, 35, 37)}、EV71受容体全容の解明が望まれる。

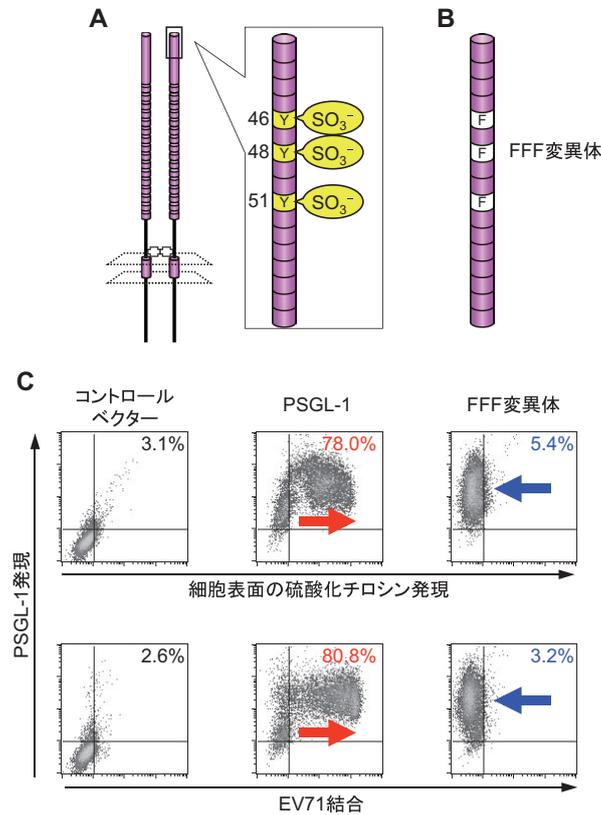


図5 EV71 との結合には、PSGL-1 の N 末端領域のチロシン硫酸化が必須

A. PSGL-1 の N 末端領域のチロシン。これら三つのチロシンが硫酸化を受ける。

B. FFF 変異体。チロシンの硫酸化を阻害するため、フェニルアラニンに置換した変異体を作製した。

C. FFF 変異体は EV71 と結合しない。293T 細胞に、コントロールベクター、PSGL-1 あるいは FFF 変異体発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後、細胞表面の硫酸化チロシン発現（上段）と、EV71 結合（下段）を、フローサイトメトリーで解析した。

FFF 変異体を発現させた場合、細胞表面の硫酸化チロシンが検出されず、EV71 が結合しなかった。

（文献 16 を改変）

2. 幸運 (serendipity) に恵まれた PSGL-1 同定

2-1. EV71-PB 株の使用

私は、当研究室にある数々の EV71 分離株から、運良く EV71-PB 株である 1095 株を用いて、EV71 固相化プレートを作製していた。1095 株を選んだ理由は、以前当室に在籍した田野良夫博士が、1095 株を免疫原として抗 EV71 モノクローナル抗体を作製したからであった。もし田野良夫博士が、EV71-non-PB 株を使って抗体を作製していた場合、私は EV71-non-PB 株を使って EV71 固相化プレートを作製したであろう。この場合、PSGL-1 を同定することはできなかったと思われる。

PSGL-1 同定後、EV71-non-PB 株を固相化して何度かパンニングを行ったが、EV71 受容体候補分子は何も獲れなかった。

2-2. Jurkat 細胞への着目

臨床検体からの EV71 分離には、RD 細胞や Vero 細胞が頻用される (図 1)。リンパ球である Jurkat 細胞を使うことは、まずない。Jurkat 細胞で EV71 が増殖するという報告があったが³⁾、正直なところ私は重要視しておらず、RD 細胞や Vero 細胞からの受容体同定を試みていた。

Jurkat 細胞に着目するには、以下の経緯があった。下島昌幸先生 (当時・東京大学 医科学研究所、現・山口大学 共同獣医学部) より、「パンニングに使う細胞は、P3U1 細胞よりも、Jurkat 細胞の方がいい。なぜなら、PCR で cDNA 由来遺伝子を増幅する時に、非特異増幅がないから。」というアドバイスを頂いた。私は是非 Jurkat 細胞をパンニングに使いたいと思い、まず、Jurkat 細胞が EV71 固相化プレートに結合しないことを確認する実験を行った。ところが期待は裏切られ、Jurkat 細胞は EV71 固相化プレートに結合した。つまり、Jurkat 細胞は EV71 受容体



図6 リガンドとの結合に重要な、PSGL-1のN末端領域の翻訳後修飾

EV71との結合には、PSGL-1のチロシン硫酸化が必要であり、T57へのO型糖鎖付加は不要であった。

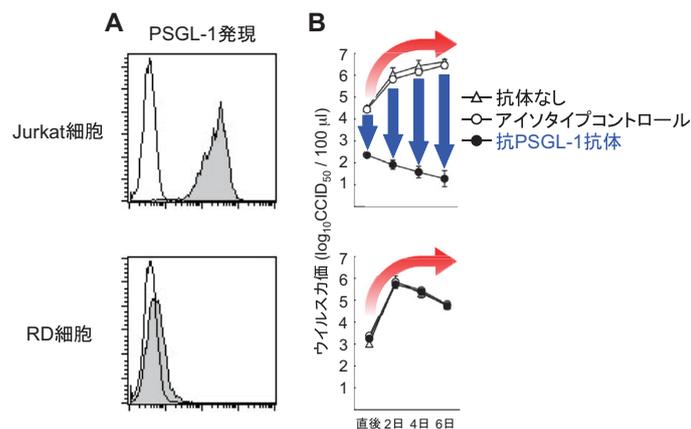


図7 細胞株におけるPSGL-1発現とEV71増殖

A. 細胞表面のPSGL-1発現をフローサイトメトリーで検出した。PSGL-1はJurkat細胞に高発現していた。

B. EV71 (1095株)の複製。細胞を抗PSGL-1抗体で処理後、EV71を感染させた。抗PSGL-1抗体処理により、Jurkat細胞でのEV71増殖は阻害された(青矢印)。RD細胞でのEV71増殖は阻害されなかった。

(文献15を改変)

を発現しているため、EV71受容体同定のためにP3U1細胞の代わりに使うことはできないことがわかったのだ。残念に思いながらも、ここで私は運良く「Jurkat細胞もEV71受容体を発現しているようなので、RD細胞のcDNAライブラリーを作製するついでに、Jurkat細胞のライブラリーも作ってみよう」と思いつき、ごく軽い気持ちで(あまり期待せずに)実験を進めた。当時、私はJurkat細胞にもRD細胞と同じ受容体が発現しているものと考えていた(私を含めおそらく世界中のEV71研究者は、EV71受容体は1種類と考えていたのではないだろうか)。

また、EV71固相化プレートにJurkat細胞を載せた場合、ほとんどの細胞はプレートに結合しなかったが、ごくわずかの細胞が結合し、一週間培養するとコロニーを形成した。当時、私は、Jurkat細胞のごくわずかの集団がEV71受容体を発現しているものと考え、プレート上のコロニーを回

収して増やし、cDNAライブラリーを作製した。PSGL-1同定後にわかったことであるが、Jurkat細胞のほぼ100%がPSGL-1を発現している(図7A)。PSGL-1のチロシン硫酸化とEV71結合に関する研究成果から(図5)¹⁶⁾、EV71固相化プレートに結合したJurkat細胞は、PSGL-1発現に加え、PSGL-1のN末端領域のチロシン硫酸化が十分におこっていた細胞と考えられた。

RD細胞のPSGL-1発現はごくわずかである(図7A)。Jurkat細胞cDNAライブラリーと並行して、RD細胞cDNAライブラリーを用いて、EV71固相化プレートでパンニングを行っていたが、PSGL-1、SCARB2を含め、EV71受容体候補分子は獲れなかった。

下島昌幸先生がJurkat細胞でのパンニングを試されていなければ、私がJurkat細胞に着目することはなかったであろう。

2.3. チロシン硫酸化を十分におこす浮遊系マウス細胞の使用

EV71 と PSGL-1 の結合には、PSGL-1 のチロシン硫酸化が必須である (図 5)。パンニングに使う浮遊系マウス細胞にヒト PSGL-1 遺伝子が導入されたとしても、チロシン硫酸化が十分に起きなければ、細胞は EV71 固相化プレートに結合しない (上記 2.2. のとおり、Jurkat 細胞ですら、EV71 固相化プレートにほとんど結合しないのである)。私がパンニングに用いた P3U1 細胞 (東京大学 獣医微生物学教室 明石博臣先生より分与。ネコ免疫不全ウイルス²⁴⁾、ネコカリシウイルス¹¹⁾ 等の受容体同定に使われた細胞と同じ。) は、運良くチロシン硫酸化能力の高い細胞であったため、PSGL-1 を同定できた。

2.4. 「結合性」を指標としたパンニング法の使用

受容体同定には、私は運良く、EV71 と受容体の「結合性」を指標としたパンニング法を用いていた。私は幸運にも、このパンニング法を開発された下島昌幸先生と同じ研究室 (東京大学 獣医微生物学教室) に在籍したことがあり、10 年以上にわたり懇意にいただいている。私が国立感染症研究所に着任した 2003 年頃、下島昌幸先生はパンニング法でネコ免疫不全ウイルスの受容体を同定された²⁴⁾。この成果を聞き、私もパンニング法を EV71 受容体同定に応用しようと考えた。なお、下島昌幸先生は平成 18 年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞を受賞されている³⁹⁾。

パンニング法は非常に単純で簡単な方法である。しかし私の場合、特に cDNA ライブラリーの作製が上手くいかなかった。他のトラブルもあり、一度はパンニング法をあきらめ、他の同定法もいろいろ試したが EV71 受容体は獲れなかった。

以下述べるように、山吉誠也先生らが SCARB2 を同定された方法 (EV71 が感染しないマウス L929 細胞に、EV71 受容体を発現させると、EV71 が感染するようになるという、「感染性」を指標としたクローニング法)³⁴⁾ では、PSGL-1 を同定することは困難であると推測される。ヒト PSGL-1 を発現させたマウス L929 細胞において、EV71 が効率よく感染・増殖するためには、EV71 キャプシドアミノ酸 VP2-149 へのアダプト変異が重要である¹³⁾。山吉誠也先生らによる「感染性」を指標とした受容体同定方法では、EGFP をコードした cDNA 由来 EV71 (EV71-GFP) を用いる³⁴⁾。山吉誠也先生らが使用された SK-EV006 株をはじめ、ほとんどの EV71 分離株は、VP2-149 にアダプト型アミノ酸をもっていない⁶⁾。したがって、EV71-GFP は、ヒト PSGL-1 を発現させたマウス L929 細胞ではほとんど増殖しないものと考えられる。また、運良く、私がメインに使っていた EV71 分離株、1095 株には、VP2-149 にアダプト型アミノ酸をもつウイルスが quasispecies としてか

なり含まれていたものと思われる。このため、1095 株をヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞に感染させたところ、細胞変性効果を伴うウイルス増殖が顕著にみられたものと考えている^{13,15)}。

2.5. まとめ

PSGL-1 の同定は、serendipity ともいえる様々な「幸運」に恵まれた。割愛したが、学術集会時の懇親会 (いわゆる飲み会) などで偶然小耳に挟んだ話がきっかけとなり、劇的に研究が進展したこともあった。私は「塞翁が馬」という言葉を好んでおり、何が研究や人生を左右するかわからないところを面白く思う。今、本研究を振り返ると、私は「EV71 受容体としての PSGL-1 の同定」という細く長い綱渡りを、見えない「幸運」に支えられながら、知らないうちに運良く渡りきっていたように思う。もう一度渡れと言われても、非常に困難であろう。

3. おわりに

EV71 の感染機構には、複数の受容体が関与することが明らかとなった。受容体の発見は大きな一歩であるが、解明すべき疑問は山積である。

なぜ、EV71 は複数の受容体を使うのか？

受容体特異性と病原性に関連はあるのか？

・・・私は微力ながら、研究により一つでも多くの答えを知りたい。研究成果が何かの役に立てば、この上なく嬉しく思う。

謝辞

本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第二部にて私が行いました。私は 2003 年秋に着任し、ウイルス第二部第二室 清水博之室長のもとで EV71 受容体同定を開始しました。PSGL-1 同定には 3 年かかりました。特に cDNA ライブラリーの作製は私にとって最難関でした。最終的に高品質なライブラリーができ、パンニングを行ったところ、半月ほどで PSGL-1 を同定できました。PSGL-1 同定に至るまでの、データの出なかった 3 年の間、全くプレッシャーをかけることなく、私の好きなように実験をさせ、本当に温かく気長に待ってくださった清水博之室長、ウイルス第二部 脇田隆字部長、宮村達男前部長・前所長には心より深謝しております。また、清水博之室長、脇田隆字部長には日本ウイルス学会杉浦奨励賞に私をご推薦くださったことを、日本ウイルス学会には本研究を評価してくださったことを、深謝しております。

本研究には、山口大学 共同獣医学部 獣医微生物学教室 下島昌幸准教授、ウイルス第二部の同僚をはじめとする、私が今までに出会った恩師・研究仲間からのご指導、ご助言が不可欠でした。深く感謝申し上げます。最大の「幸運」は、妻・希 (のぞみ) との出会いであり、感謝しています。

参考文献

- 1) Bible, J.M., Pantelidis, P., Chan, P.K.S. and Tong, C.Y.W.: Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev Med Virol* 17: 371-379, 2007.
- 2) Chan, L.G., Parashar, U.D., Lye, M.S., Ong, F.G.L., Zaki, S.R., Alexander, J.P., Ho, K.K., Han, L.L., Pallansch, M.A., Suleiman, A.B., Jegathesan, M. and Anderson, L.J.: Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin Infect Dis* 31: 678-683, 2000.
- 3) Chen, L.C., Shyu, H.W., Chen, S.H., Lei, H.Y., Yu, C.K. and Yeh, T.M.: Enterovirus 71 infection induces Fas ligand expression and apoptosis of Jurkat cells. *J Med Virol* 78: 780-786, 2006.
- 4) Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B.G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O. and Miyasaka, M.: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J Biol Chem* 279: 51775-51782, 2004.
- 5) Ho, M., Chen, E.R., Hsu, K.H., Twu, S.J., Chen, K.T., Tsai, S.F., Wang, J.R. and Shih, S.R.: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 341: 929-935, 1999.
- 6) Huang, S.W., Wang, Y.F., Yu, C.K., Su, I.J. and Wang, J.R.: Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology* 422: 132-143, 2012.
- 7) Kobayashi, K., Kato, K., Sugi, T., Takemae, H., Pandey, K., Gong, H., Tohya, Y. and Akashi, H.: Plasmodium falciparum BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem* 285: 1716-1725, 2010.
- 8) Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P. and Moore, K.L.: P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88: 3010-3021, 1996.
- 9) Lin, Y.W., Wang, S.W., Tung, Y.Y. and Chen, S.H.: Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1166-1173, 2009.
- 10) Liu, W.J., Ramachandran, V., Kang, J., Kishimoto, T.K., Cummings, R.D. and McEver, R.P.: Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem* 273: 7078-7087, 1998.
- 11) Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H.: Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol* 80: 4482-4490, 2006.
- 12) McMinn, P.C.: An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 26: 91-107, 2002.
- 13) Miyamura, K., Nishimura, Y., Abo, M., Wakita, T. and Shimizu, H.: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011.
- 14) Nishimura, Y. and Shimizu, H.: Cellular receptors for human enterovirus species A. *Front Microbiol* 3: 105, 2012.
- 15) Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T. and Shimizu, H.: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 794-797, 2009.
- 16) Nishimura, Y., Wakita, T. and Shimizu, H.: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* 6: e1001174, 2010.
- 17) Oberste, M.S., Peñaranda, S., Maher, K. and Pallansch, M.A.: Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 85: 1597-1607, 2004.
- 18) Patel, K.P. and Bergelson, J.M.: Receptors identified for hand, foot and mouth virus. *Nat Med* 15: 728-729, 2009.
- 19) Plevka, P., Perera, R., Cardosa, J., Kuhn, R.J. and Rossmann, M.G.: Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Science* 1 March 2012 (10.1126/science.1218713).
- 20) Pouyani, T. and Seed, B.: PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83: 333-343, 1995.
- 21) Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D.A. and Larsen, G.R.: Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75: 1179-1186, 1993.
- 22) Sako, D., Comess, K.M., Barone, K.M., Camphausen, R.T., Cumming, D.A. and Shaw, G.D.: A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 83: 323-331, 1995.
- 23) Sakurai, Y., Shimojima, M., Miyazawa, T., Masuoka, K., Tohya, Y. and Akashi, H.: Identification of the feline CD63 homologue using retrovirus-mediated expression cloning. *Vet Immunol Immunopathol* 98: 185-191, 2004.
- 24) Shimojima, M., Miyazawa, T., Ikeda, Y., McMonagle, E.L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M.J. and Willett, B.J.: Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303: 1192-1195, 2004.
- 25) Shimojima, M., Miyazawa, T., Sakurai, Y., Nishimura, Y., Tohya, Y., Matsuura, Y. and Akashi, H.: Usage of myeloma and panning in retrovirus-mediated expression cloning. *Anal Biochem* 315: 138-140, 2003.
- 26) Shimojima, M., Takada, A., Ebihara, H., Neumann, G., Fujioka, K., Irimura, T., Jones, S., Feldmann, H. and Kawaoka, Y.: Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* 80: 10109-10116, 2006.
- 27) Somers, W.S., Tang, J., Shaw, G.D. and Camphausen, R.T.: Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and

- E-selectin bound to SLe^X and PSGL-1. *Cell* 103: 467-479, 2000.
- 28) Suzuki, Y., Taya, K., Nakashima, K., Ohyama, T., Kobayashi, J.M., Ohkusa, Y. and Okabe, N.: Study on risk factors for severe hand-foot-and-mouth disease. *Pediatr Int* 52: 203-207, 2009.
- 29) Wang, X., Peng, W., Ren, J., Hu, Z., Xu, J., Lou, Z., Li, X., Yin, W., Shen, X., Porta, C., Walter, T.S., Evans, G., Axford, D., Owen, R., Rowlands, D.J., Wang, J., Stuart, D.I., Fry, E.E. and Rao, Z.: A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol* 19: 424-429, 2012.
- 30) WHO: Outbreak news. Enterovirus, China. *Wkly Epidemiol Rec* 83: 169-170, 2008.
- 31) Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P. and Cummings, R.D.: Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J Biol Chem* 270: 22677-22680, 1995.
- 32) Yamayoshi, S., Fujii, K. and Koike, S.: Scavenger receptor B2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases. *Front Microbiol* 3: 32, 2012.
- 33) Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T., Nagai, Y., Fujii, K. and Koike, S.: Human SCARB2-dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, A16 and Enterovirus 71. *J Virol* 86: 5686-5696, 2012.
- 34) Yamayoshi, S., Yamashita, Y., Li, J., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T. and Koike, S.: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 798-801, 2009.
- 35) Yang, B., Chuang, H. and Yang, K.D.: Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virol J* 6: 141, 2009.
- 36) Yang, F., Ren, L., Xiong, Z., Li, J., Xiao, Y., Zhao, R., He, Y., Bu, G., Zhou, S., Wang, J. and Qi, J.: Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol* 47: 2351-2352, 2009.
- 37) Yang, S.L., Chou, Y.T., Wu, C.N. and Ho, M.S.: Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol* 85: 11809-11820, 2011.
- 38) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行. *病原微生物検出情報* 30: 9-10, 2009.
- 39) 下島昌幸: ネコ免疫不全ウイルスの感染指向性に関する研究. *ウイルス* 57: 75-82, 2007.
- 40) 西村順裕, 清水博之: エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. *ウイルス* 59: 195-203, 2009.

The infection mechanism of enterovirus 71

Yorihiro NISHIMURA

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan
E-mail: ynishi@nih.go.jp

Identification of a specific viral receptor is important for understanding the virus infection mechanism. I identified P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) as one of the functional receptors for enterovirus 71 (EV71), a pathogen that causes hand, foot, and mouth disease. PSGL-1, which belongs to the sialomucin family, is a transmembrane protein mainly expressed on leukocytes. Tyrosine sulfation in the N-terminal region of PSGL-1 is critical for PSGL-1's capacity to bind EV71. The identification of EV71 receptors provides important mechanistic information about viral entry into cells and helps us understand viral pathogenesis and develop new anti-viral strategies.