

機関番号：82609

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790454

研究課題名 (和文) エンテロウイルス71の第2の感染受容体の同定と解析

研究課題名 (英文) Identification and Characterization of the second receptor of Enterovirus 71

研究代表者

山吉 誠也 (YAMAYOSHI SEIYA)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：50529534

研究成果の概要 (和文) : Enterovirus 71 (EV71) 感受性であるヒト RD 細胞のゲノム DNA を低感受性であるマウス L929 細胞に導入し EV71 感受性を獲得したマウス細胞 (Ltr246 細胞) を樹立した。この Ltr246 細胞に存在する EV71 の第2の感染受容体を同定することを目的とし、Ltr246 細胞に発現しているメッセンジャー RNA を網羅的に解析した。TSN、CCL2 および MEPCP の3つのヒト遺伝子が Ltr246 細胞に存在していることが明らかとなったが、それらは Ltr246 細胞 EV の EV71 感受性とは関係なかった。

研究成果の概要 (英文) : We established Enterovirus 71 (EV71)-sensitive mouse L929 cells (Ltr246 cells), which carried a portion of human genomic DNA. To identify the second receptor of EV71, we analyzed the expression of mRNA in Ltr246 cells, comprehensively. Although three human genes (TSN, CCL2 and MEPCP) were integrated into Ltr246 cell genome, these were not related to EV71 sensitivity of Ltr246 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス71、レセプター、手足口病

1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス71 (EV71) はヒトの乳幼児にみられる手足口病の原因ウイルスの一つである。EV71 感受性細胞であるヒト由来 RD 細胞のゲノム DNA を低感受性であるマウス由来 L929 細胞へ導入することで、EV71 感受性を獲得した L929 細胞を2株 (Ltr051 細胞および Ltr246 細胞) 樹立した。どのヒト遺伝子がこれらの細胞に導入されたために EV71 感受性となったかを調べるために、Ltr051 細胞

の mRNA の発現と、親株である L929 細胞の発現をアジレント社製のマイクロアレイ Whole Human Genome, 4x44K を用いて比較した。その結果、Ltr051 細胞に EV71 感受性を与えている遺伝子として SCARB2 を同定し、その役割が感染受容体であることを突き止めた。同様な解析を行えば、Ltr246 細胞に EV71 感受性を与えたヒトの遺伝子を同定することが可能であると考えられていた。

2. 研究の目的

今回、アジレント社、TAKARA 社および TORAY 社のマイクロアレイを用いて、Ltr246 細胞に導入され EV71 感受性を与えているヒト由来の遺伝子の同定を試みた。また、mRNA の発現の全体像を把握するために、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。一方で、Ltr246 細胞ではマウスのゲノムにヒトのゲノム DNA の一部が導入されているので、どの領域のヒト DNA が含まれているのかを、ヒトのゲノムをターゲットとしたアレイ化 CGH を用いて調べた。

3. 研究の方法

実験材料：

RNA：下記の細胞由来の RNA

Ltr246 細胞：マウス L929 細胞のヒトゲノム組換え細胞 Ltr246。EV71 感染感受性。

L929 細胞：マウス由来の細胞。Ltr246 細胞の親株。

DNA：下記の細胞由来のゲノム DNA

Ltr246 細胞および L929 細胞

RD 細胞：ヒト由来の培養細胞。

cDNA：下記の細胞由来の cDNA

RD 細胞、L929 細胞、Ltr246 細胞

マイクロアレイ：

- ・Agilent 社製の Whole Human Genome, 4x44K
- ・TAKARA 社製の X121A IntelliGene HS Human Expression CHIP
- ・TORAY 社製 TRT-XR023 3D-Gene Human Oligo chip 25k

アレイ化 CGH：

- ・Agilent Whole Human Genome CGH Microarray Kit 244A

実験方法：

1. マイクロアレイ

マイクロアレイのハイブリダイゼーションとスキャン：各細胞由来 RNA を DNase I 処理から行った。DNase I 処理した RNA 1 μ g から Ambion Amino Alkyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit により aRNA を合成したところ約 66~74 μ g 得た。2 種類の aRNA サンプルのうち Ltr246 は Cy5(蛍光 635nm)で、L929 は Cy3(蛍光 532nm)で標識し、それぞれ 6 μ g ずつをハイブリダイゼーション用バッファーに溶解した(二色法)。アジレント社 Whole Human Genome, 4x44K、タカラバイオ社 X121A IntelliGene HS Human Expression CHIP スライド 2 枚組または TORAY 社 TRT-XR023 3D-Gene Human Oligo chip 25k に調製したハイブリダ

イゼーション溶液をロードし、ハイブリダイズした。マイクロアレイを洗浄後、スキャナー GenePix 4000B によりスキャンした。

解析方法：スキャンしたマイクロアレイのイメージを GenePix 付属ソフトで読み込んでスポットの検出し、各スポットのフォアグラウンド値は含まれるピクセルの中央値、バックグラウンド値は含まれるピクセルの中央値として求めた。各スポットのフォアグラウンド値からバックグラウンド値を差し引いた値をシグナル値とした。バックグラウンド値の標準偏差をノイズ値とした。Cy5 側と Cy3 側それぞれでシグナル値がノイズ値の 3 倍以上 (S/N 比 \geq 3) あるスポットのみ解析に用いた。一方で、コントロールとなる L929 側ではプローブにハイブリしない可能性があるため L929 側で S/N 比 \leq 3 であっても Ltr246 側で S/N 比が十分に良い (S/N 比 \geq 5) スポットを別途ピックアップした。ゲインを 3 段階にわけてスキャンしたデータをグローバルノーマライゼーション後、マージした(ただしスライド A と B のうち A については 2 段階のスキャンで済んだので 2 つのみをマージ)。Cy5 と Cy3 で蛍光強度と強度比の関係に歪みが見られたため最後に Locally Weighted Scatter plot Smoother (LOWESS) 補正を行った。強度比は \log_2 (Cy5/Cy3) で表した。膜タンパクの推定には SOSUI (Batch) / SOSUIsignal プログラムを用いた (URL: <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)。また、Ltr246 より L929 で強く発現する遺伝子についても検討した。

2. アレイ化 CGH 法

アレイ化 CGH 法とハイブリダイゼーション：Agilent アレイ CGH 法プロトコール ver. 6.0 に従って、ゲノム DNA 各 2.5 μ g を Alu I と Rsa I で消化後、ランダムプライマーと Exo-Klenow を用いた反応で Cy3-dUTP あるいは Cy5-dUTP を取り込ませて修飾した。Agilent Whole Human Genome CGH Microarray Kit 244A (G4411B) を使用した。このマイクロアレイスライドは 60mer の長さの DNA オリゴマープローブが 912 行 267 列のハニカム構造状に配列してスポットされている。コントロールプローブなどを除いた有効なゲノムプローブ数は 238, 385 個。蛍光修飾したゲノム DNA を混合し、65 $^{\circ}$ C で 40 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄の温度条件には、37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C または 65 $^{\circ}$ C のいずれかを用いた。

CGH アレイのスキャン：マイクロアレイスキ

ャナーAxon GenePix 4000B を用いて 5 μ m 間隔、レーザー強度 100%でスキャンした。ただし、プローブスポット間で蛍光強度に大きな差異があるため表 2 のようにゲイン値を変更して計 3 回ずつスキャンした。

データ処理: スキャナーGenePix 4000B の付属ソフト GenePixPro 6.1 でスキャンイメージ上のスポットの認識とフォアグランドとバックグランドの数値化を行った。自作のプログラムにて GenePix Pro が認識したスポットのシグナル強度（フォアグランドーバックグランド）および Cy5 と Cy3 の強度比、その強度比の 2 を底とする log 値を求めた。また、この段階でコントロール類のプローブスポットや、フォアグランドの蛍光強度が装置上限 (65535) に達しているものや、シグナル/ノイズ比が 3 に満たないものを除外した。

3. mRNA sequence 解析

シーケンス: total RNAを前処理の後、大規模シーケンサーであるイルミナ社Genome Analyzer GAIIXを用いてシーケンシングを行った。シーケンシング前の前処理工程は、提供された試験試料にイルミナ社のmRNA プロトコールに準じたシーケンス解析用前処理を実施した。すなわち、mRNA 抽出の作業、断片化、シーケンス用アダプターの連結、逆転写、精製を行い、ライブラリを作成した。得られたライブラリに対し、GAIIX を用いたシーケンス解析作業を2 レーン分を行った。その結果、78塩基長のDNA 塩基配列および各塩基の同定信頼度を示すデータを55, 387, 868配列取得した。

BLAST プログラム: NCBI BLAST+ version 2.2.24 のソースをダウンロードし、プログラムをコンパイルした。BLAST プログラムは核酸配列用のプログラム blastn を使用し、megablast アルゴリズムを実行させた。megablast アルゴリズムは大量検索に適しているが、旧来の blastn アルゴリズムに比べるとギャップの入ったアライメントなどの検出率が下がる。

検索用核酸配列データベース: NCBI Reference Sequence (RefSeq) release 43 を使用した。RNA の RefSeq 全 2, 415, 195 配列 (1.4GB) のうちヒト 46, 468 配列 (38MB) とマウス 42, 779 配列 (32MB) を検索用核酸配列としてデータベース化したものである。

実行コンピュータ: 主に NIMS のスパコン SGI

Altix ICE3200EX (総理論演算性能 45.87 TFLOPS、総主記憶 12.28TB、総ノード数 512) を使用し、データの集計など補助的に DELL の PC サーバを使用した。

4. Ltr246 細胞での確認実験

Genomic PCR

プライマー: ヒトゲノムの対象遺伝子の特異的に増幅する PCR 用プライマー
テンプレート: RD 細胞、L929 細胞および Ltr246 細胞由来のそれぞれのゲノム DNA
上記のプライマーおよびテンプレートを用いて、Ltr246 細胞に候補遺伝子が存在するかを調べた。

RT-PCR

プライマー: ヒト遺伝子の cDNA を特異的に増幅するプライマー
テンプレート: RD 細胞、L929 細胞および Ltr246 細胞由来のそれぞれの cDNA
上記のプライマーおよびテンプレートを用いて、Ltr246 細胞に候補遺伝子の mRNA が発現しているかを調べた。

EV71-GFP の感染

EV71 低感受性の L929 細胞に、ヒト遺伝子を発現するプラスミドを導入後、EV71-GFP を感染させる。24 時間後に蛍光顕微鏡を用いて感染の成立を確認する。EV71-GFP は感染が成立し、ウイルスの複製が起こると GFP を発現するため、感染の成立を GFP の蛍光で確認できる。

4. 研究成果

アジレント社製の Whole Human Genome, 4x44K を用いたマイクロアレイの結果から、Ltr246 細胞に導入されていると推定されるヒト遺伝子(膜貫通型蛋白質のみでなく、分泌蛋白質等も含む)を 30 個選び出し(表 1)、それらが本当に Ltr246 細胞に導入されているかを Genomic PCR を用いて確認したところ、3 つのヒト由来の遺伝子 (TSN、CCL2 および MEPCP) が Ltr246 細胞に導入されていることが明らかとなった。そこで、L929 細胞に 3 つの遺伝子がコードする蛋白質をそれぞれ発現させ、EV71 が感染するかを確認した。しかし、TSN、CCL2 および MEPCP のどれかを発現させた場合、またはこれらを組み合わせで発現させた場合でも EV71 の感染効率は上昇しなかった。

TAKARA 社製の X121A IntelliGene HS Human Expression CHIP を用いたマイクロアレイの結果から、Ltr246 細胞に導入されていると推

定されるヒト遺伝子を 38 個選び出し(表 2)、それらが Ltr246 細胞に導入されているかを Genomic PCR で確認した。38 個の候補遺伝子の中に Ltr246 細胞に導入されている遺伝子は無かった。

TORAY 社製の TRT-XR023 3D-Gene Human Oligo chip 25k を用いたマイクロアレイの結果から、Ltr246 細胞に導入されていると推定されるヒト遺伝子を 25 個選び出し(表 3)、それらが Ltr246 細胞に導入されているかを Genomic PCR で確認した。25 個の候補遺伝子の中に Ltr246 細胞に導入されている遺伝子は無かった。

Agilent 社製の Whole Human Genome CGH Microarray Kit 244A を用いたアレイ化 CGH 法を添付のプロトコールに従って行ったが、ノイズ・シグナル比が悪く、候補遺伝子を選択することが出来なかった。そこで、アレイの洗浄温度条件を 37 度から 45 度または 60 度に変更して再実験した。しかしながら、どちらの条件でもノイズ・シグナル比の改善は見られなかったため、これ以降の解析は行えなかった。

Ltr246 細胞のトランスクリプトームを次世代シーケンサー Genome Analyzer GAIIx で解析し、得られたそれぞれの配列を NCBI のヒトおよびマウスの RefSeq のデータベースに対して Blast をかけた。ヒト由来 mRNA にマッチした配列を遺伝子ごとに分類し、その上位の 29 個の膜貫通型蛋白質をコードする遺伝子をリストした。これらの中から、検出された配列がヒトの mRNA をカバーしていた程度を基にさらに選抜し、7つの遺伝子 (AMMECR1、DAG1、NPTN、PCDH1、PPAPDC2、SEC63 および TMC01) について、Ltr246 細胞に当該遺伝子の mRNA が発現しているかを確認した。7つの遺伝子の mRNA は Ltr246 細胞で発現していなかった。

Ltr246 細胞のトランスクリプトームを各種方法で解析した結果、mRNA sequence の大規模解析と以前解析したアジレント社製マイクロアレイ Whole Human Genome, 4x44K の結果には多数の一致をみることができた。一方、TORAY 社製や TAKARA 社製のマイクロアレイとは明確な一致を見出せなかった。実際、アジレント社製のマイクロアレイの解析の際には、EV71 感受性に関係は無かったものの導入されているヒト遺伝子が見つまっている。つまり今回のような解析をする場合、最も適したマイクロアレイはアジレント社の Whole Human

Genome, 4x44K であると結論できる。

表 1 アジレント社製のマイクロアレイから選ばれた 30 個の候補遺伝子

TSN	CCNG2	ACBD7	PDE4D
AMY1C	VHL	KLC3	SLC27A1
MLF1IP	ZNF713	CP	SRGAP3
CCL2	FUT6	ALPK1	GRIK3
MALL	EGR1	PDGFRA	FOXP4
MEPCP	ABCG4	BRAF	DBP
FAM39B	FAM39DP	G3BP2	BARHL1
UBL4A	KIAA1370		

表 2 TAKARA 社製のマイクロアレイから選ばれた 38 個の候補遺伝子

ALOX5AP	ATP6V0B	C13orf16	C19orf6
CDC91L1	CNIH	DPM3	FXDY1
IFITM2	INTS5	KCP2	LRP1
PUSL1	RBAF600	RHEBL1	RNASEK
TMEM97	TMEM203	TRPM5	TSP0
C19orf18	C20orf24	CAV1	CD81
GPR30	GPX6	HIAT1	HTR1A
LRRN1	NCR1	NCR3	PGM5
SLC5A10	SLC6A11	STX4A	TM4SF7
VAMP4	WDR1		

表 3 TOYOBO 社製のマイクロアレイから選ばれた 25 個の候補遺伝子

ATP1A3	BAMBI	C4orf3	C7orf34
DSG4	FAM134A	GRPR	HAVCR2
MEGF10	MSLNL	PASK	SEZ6L2
CCR5	CST9	CYP1A2	DSEL
INSIG1	KIAA2013	LILRA5	MAN2A1
ST6GLNC5	SLC1A7	SLC7A9	SIK3
TMEM53			

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3件)

1. Yamayoshi, S., S. Koike
“Identification of the Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection”
Journal of Virology. In press (2011) (査読有)
2. Yamayoshi, S., G. Neumann, Y. Kawaoka
“Role of the GTPase Rab1b in *Ebolavirus* Particle Formation”
Journal of Virology. 84:4816-4820. (2010) (査読有)
3. Yamayoshi, S., Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, T. Minowa, T. Takemura, and S. Koike
“Scavenger Receptor B2 Is a Cellular Receptor for Enterovirus 71”
Nature Medicine 15:798-801. (2009) (査読有)

[学会発表] (計8件)

1. 山吉誠也, 小池智
“EV71の感染受容体 SCARB2 の結合領域の同定”
<第9回感染症沖縄フォーラム> 2011年2月10日
2. 山吉誠也
“エンテロウイルス71感染受容体とその機能”
<第58回日本ウイルス学会学術集会> 2010年11月9日
3. S. Yamayoshi, S. Koike
“Identification of Important Region of Human SCARB2 for an Enterovirus 71 infection”
<Europic 2010> 2010年9月12日
4. S. Yamayoshi, S. Koike
“Important Region of Human SCARB2 for an Efficient Enterovirus 71 Infection”
<The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity> 2010年9月8日
5. 山吉誠也, 小池智
“ヒトの SCARB2 にある EV71 感染に重要な領域の決定”
<第7回ウイルス学キャンプ in 湯河原> 2010年8月9日
6. 山吉誠也, 小池智
“マウス SCARB2 のエンテロウイルス71感染受容体としての機能”
<第57回日本ウイルス学会学術集会> 2009年10月26日
7. S. Yamayoshi, S. Koike
“Species specificity of enterovirus 71 is determined by quality and quantity of viral receptor.”

< The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity > 2009年9月9日

8. 山吉誠也, 山下康子, Jifen Li, 花方信孝, 箕輪貴司, 竹村太郎, 小池智
“SCARB2 はエンテロウイルス71の感染受容体である”
<第6回ウイルス学キャンプ in 湯河原> 2009年6月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山吉 誠也 (YAMAYOSHI SEIYA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号: 50529534

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし