

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590557

研究課題名(和文) エンテロウイルス71の細胞侵入過程の解明

研究課題名(英文) Analysis of the early steps of enterovirus 71 infection

研究代表者

山吉 誠也 (Yamayoshi, Seiya)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50529534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：エンテロウイルス71の感染受容体として報告された2つの分子Scavenger receptor Class B member 2(SCARB2)と P-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)の機能的な比較・解析を行った。SCARB2を介した感染は、非常に効率良く起こり、ウイルスの細胞への侵入も効率良く起こった。また、SCARB2はウイルス粒子の構造変化を誘導出来た。一方、PSGL-1を介した感染は効率が悪く、PSGL-1はウイルス粒子の構造変化を誘導できないものの、ウイルス粒子と強く結合した。

研究成果の概要(英文)：Human scavenger receptor class B member 2 (SCARB2) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) have been reported to be receptors for enterovirus 71. I functionally compared these receptors. Enterovirus 71 infects more efficiently via SCARB2 than PSGL-1. The binding affinity of PSGL-1 to viral particles is stronger than that of SCARB2. The conformational alteration of enterovirus 71 is triggered by incubation with SCARB2 under acidic conditions but not by incubation with PSGL-1 under any condition which we tested. These data suggest that SCARB2 is an authentic receptor for enterovirus 71 and PSGL-1 may act as an attachment molecule for enterovirus 71 on the cell surface.

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 SCARB2 PSGL-1 機能比較

1. 研究開始当初の背景

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に分類され、一本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。EV71 は、コクサッキーウイルス A16 (CVA16) とともに、手足口病の主要な原因ウイルスとして知られる。一般に、手足口病は、ありふれた小児の熱性発疹性疾患であり、予後は良好である。しかし、EV71 による手足口病流行時には、死亡例を含む重篤な脳炎や急性弛緩性麻痺など中枢神経合併症の頻度が高くなることが知られている。2008 年以降、中国において、手足口病の流行が継続しており、毎年約 100 万人の手足口病患者が発生し、100 名以上の死亡例が報告されている。

EV71 感染に高感受性を示すヒト由来 RD 細胞のゲノム DNA を、低感受性であるマウス由来 L929 細胞に導入し、ヒト遺伝子が導入されたために EV71 高感受性となった L929 細胞を 2 株 (Ltr051 細胞および Ltr246 細胞) 樹立された。Ltr051 細胞から Scavenger Receptor B2 (SCARB2) が EV71 の感染受容体であることが報告された (Yamayoshi et al, Nature Medicine, 2009)。Ltr246 細胞に感受性をもたらしたヒト由来遺伝子は、同定されていない。一方、ウイルス粒子との結合を指標として EV71 の感染受容体の検索をヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞の cDNA ライブラリーを用いて行い、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) が EV71 の感染受容体であるという報告もされた (Nishimura et al, Nature Medicine 2009)。

2. 研究の目的

EV71 の細胞内への侵入には、異なった複数の経路が存在することが示唆されていた。各感染経路が EV71 の細胞や個体への感染に重要である可能性があるものの、それらの比較解析は行われていない。そこで、まず SCARB2 および PSGL-1 の感染経路の特徴を細胞レベルで解析し、それぞれの感染受容体の EV71 の感染初期過程における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) L-SCARB2 細胞および L-PSGL-1 細胞の樹立

SCARB2 と PSGL-1 の比較を行うために、EV71 に低感受性である L929 細胞にそれぞれの分子を恒常的に発現させた細胞株、L-SCARB2 細胞および L-PSGL-1 細胞を樹立する。

(2) 2 つの感染受容体を介したウイルス感染効率の比較

1 段階感染での比較

L-SCARB2 細胞または L-PSGL-1 細胞に、EV71-GFP (感染が成立すると GFP を発現する EV71) を感染させる。感染 24 時間後、GFP 陽性細胞の数を FACS Calibur を用いて計測する。GFP 陽性細胞数を比較することで、2 つの感染受容体を介した EV71-GFP の感染効率を評価する。

多段階感染での比較

L-SCARB2 細胞または L-PSGL-1 細胞に EV71 を moi=0.01 で感染させ、時間経過を辿ってウイルス力価を測定する。

(3) 2 つの感染受容体とウイルス粒子の結合効率の比較

可溶性感染受容体への結合

SCARB2 または PSGL-1 の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域を融合させた可溶性タンパク質とウイルス粒子を反応させ、可溶性感染受容体に結合したウイルス量をウエスタンブロットにより定量する。

感染受容体発現細胞への結合

35S で RI 標識したウイルス粒子を L-SCARB2 細胞または L-PSGL-1 細胞に結合させる。非結合ウイルス粒子を除去後、結合しているウイルスを細胞と共に回収し、シンチレーションカウンターで結合ウイルス量を定量する。

(4) 2 つの感染受容体を介したウイルス粒子の細胞内取り込み効率の比較

EV71 が SCARB2 または PSGL-1 を介して細胞に感染する際、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスの内、どのエンドサイトーシスを利用しているのかをそれぞれに特異的な阻害剤を用いて同定する。また、感染にエンドソームの酸性化が必要かも調べる。

(5) 2 つの感染受容体によるウイルス粒子の構造変化誘導の比較

可溶性感染受容体によるウイルス粒子構造の変化

ウイルス粒子とそれぞれの可溶性感染受容体を 37 で反応させた後、ショ糖密度勾配超遠心で構造変化が起こったウイルスや RNA を放出した中空ウイルス粒子を分画する。

VP4 の放出の確認

構造変化が起こったウイルス粒子からは、本来ウイルス粒子に存在するはずの構造蛋白質 VP4 が粒子内から放出され、消失することが推測される。そこで、この VP4 の放出をショ糖密度勾配超遠心で分画した中空ウイルスで確認する。

(6) Ltr246 細胞に発現する感染受容体の解析

Ltr246 細胞に EV71 感受性を付与したヒト遺伝子は未だ同定されていない。そこで、Ltr246 細胞に様々なウイルス株を MOI=0.01 で感染させ、ウイルスの増殖効率を検討し、Ltr246 細胞に発現する感染受容体の性状を解析する。

4. 研究成果

EV71の感染受容体として報告された2つの分子SCARB2とPSGL-1のEV71感染受容体としての機能を比較した。

(1) L-SCARB2細胞およびL-PSGL-1細胞の樹立

マウス由来L929細胞に、ピューロマイシン耐性遺伝子およびSCARB2またはPSGL-1を発現するプラスミドを導入した。その後、ピューロマイシン存在下で細胞を継代・クローニングを行った。SCARB2またはPSGL-1の発現が高いクローンを選択し、L-SCARB2細胞およびL-PSGL-1細胞とした。それぞれの細胞表面において、それぞれの分子が発現していることはFlow cytometryにより確認した。

(2) 2つの感染受容体を介したウイルス感染効率の比較

1 段階感染での比較

L-SCARB2 細胞および L-PSGL-1 細胞に EV71-GFP を感染させ、24 時間後に GFP 陽性細胞数を計測した。その結果、L-SCARB2 細胞における GFP 陽性細胞数は、L-PSGL-1 細胞よりも有意に多かった。よって、SCARB2 を介した感染の方が効率が良く結論した。

多段階感染での比較

L-SCARB2細胞およびL-PSGL-1細胞に、EV71をMOI=0.01で感染させ、多段階増殖を検討したところ、やはりEV71はSCARB2を介して感染する時の方が効率良く増殖した。

(3) 2つの感染受容体とウイルス粒子の結合効率の比較

可溶性感染受容体への結合

SCARB2またはPSGL-1の細胞外領域とヒトIgGのFc領域を融合させた可溶性タンパク質(SCARB2-FcまたはPSGL1-Fc)とEV71を混和し、抗Fc抗体で免疫沈降後、共沈してきたウイルスをウエスタンブロットで検出した。ウイルスは、PSGL1-FcおよびSCARB2-Fcのどちらとも結合していたが、PSGL1-Fcの方がより多く結合することがわかった。

感染受容体発現細胞への結合

L-SCARB2細胞およびL-PSGL-1細胞に35SでRI標識したウイルス粒子を結合させたところ、L-PSGL-1細胞へのウイルス結合量は、L-SCARB2細胞よりも多かった。

(4) 2つの感染受容体を介したウイルス粒子の細胞内取り込み効率の比較

EV71の細胞への感染にクラスリン依存性エンドサイトーシスが必要であることがHussainらによって報告された(JBC, 2011)。また、EV71の感染にはエンドソームの酸性条件が必須であることも同時に報告された。そこで、ウイルス粒子の細胞への侵入時にSCARB2またはPSGL-1を介して、EEA1陽性の初期エンドソーム内へと到達する効率を共焦点蛍光顕微鏡で比較した。SCARB2を介して細胞内へ侵入した方が、PSGL-1を介した侵入よりも、効率良くウイルス粒子が初期エンドソームに運ばれていた。

(5) 2つの感染受容体によるウイルス粒子の構造変化誘導の比較

可溶性感染受容体によるウイルス粒子構造の変化

35SでRIラベルした精製ウイルス粒子と可溶性感染受容体SCARB2-FcとPSGL1-FcをそれぞれpH=7.4、6.0および4.5の条件下で、37度で1時間反応させた。その後、ウイルスの構造変化を調べたところ、SCARB2-Fcとウイルス粒子をpH=7.4の条件下で反応させてもウイルス粒子の構造変化は確認されなかったが、pH=6.0および4.5ではウイルス粒子の一部が軽いフラクションへとシフトしていた。一方、PSGL1-Fcとウイルス粒子を反応させた場合では、どのpH条件でもウイルス粒子の構造変化は確認できなかった。

VP4の放出の確認

上記実験において、SCARB2-Fcとの反応により、軽いフラクションへとシフトしていたウイルス粒子内のウイルスRNA量を測定したところ、ウイルスRNA量は元のウイルスよりも減少していた。さらに、同じフラクションに構造蛋白質VP4があるかをSDS-PAGEにより確認したところ、VP4蛋白質は消失していた。

(6) Ltr246 細胞に発現する感染受容体の解析

Ltr246 細胞に、EV71、8 株を MOI=0.01 で感染させ、増殖を比較した。1 株は Ltr246 細胞において、RD 細胞と同程度の増殖を示した。3 株は、RD 細胞よりもかなり効率が悪いものの、Ltr246 細胞において増殖した。残りの 4 株は、Ltr246 細胞でほとんど増殖しなかった。以上より、Ltr246 細胞に発現する感染受容体は、EV71 の感染初期過程において、中心的な役割を果たせないことが分かった。

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5件)

1. Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S. 2013. Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. **J Virol** 87:3335-3347. (査読有)
10.1128/JVI.02070-12
2. Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. 2013. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 110:14753-14758. (査読有)
10.1073/pnas.1217563110
3. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S. 2012. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. **J Virol** 86:5686-5696. (査読有)
10.1128/JVI.00020-12
4. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. 2012. Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases. **Front Microbiol** 3:32. (査読有)
10.3389/fmicb.2012.00032
5. Yamayoshi S, Koike S. 2011. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. **J Virol** 85:4937-4946. (査読有)
10.1128/JVI.02358-10

〔学会発表〕(計8件)

1. 山吉誠也、大岡静衣、藤井健、小池智
“2つのエンテロウイルス71感染受容体 SCARB2 と PSGL1 の機能比較”
第60回日本ウイルス学会学術集会、
2012年11月14日、大阪府
2. 藤井健、永田典代、山吉誠也、島貫碧、
設楽浩志、多屋長治、小池智
“EV71感受性マウスモデルの作出と
解析”
第60回日本ウイルス学会学術集会、
2012年11月14日、大阪府
3. 山吉誠也、大岡静衣、藤井健、小池智
“エンテロウイルス71感染受容体の機能比較”
第9回ウイルス学キャンプ in 湯河原、
2012年7月11日、静岡県

4. 山吉誠也
“手足口病の原因ウイルスの感染受容体”
第153回日本獣医学会学術集会、2012年
3月28日、埼玉県
5. 山吉誠也、藤井健、小池智
“エンテロウイルス71感染受容体の機能比較”
感染症若手フォーラム、2012年2月4日、
長崎県
6. 山吉誠也、藤井健、小池智
“CVA7、CVA14、CVA16 および EV71 は
SCARB2 依存的に細胞に感染する”
第8回ウイルス学キャンプ in 湯河原、
2011年11月7日、静岡県
7. S. Yamayoshi, S Iizuka, T. Yamashita, H. Minagawa, K. Sanjoh, N. Katsushima, T. Itagaki, K. Mizuta, Y. Nagai, M. Okamoto, H. Nishimura, K. Fujii, S. Koike
“Human SCARB2-dependent infection of clinical isolates of Coxsackievirus A14, A16 and Enterovirus 71”
15th International Congress of Virology、
2011年9月15日、北海道
8. 山吉誠也、藤井健、小池智
“エンテロウイルス71感染受容体の機能解析”
第15回神経ウイルス研究会、2011年5
月19日、石川県

〔図書〕(計0件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)
なし
○取得状況(計0件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
山吉 誠也 (YAMAYOSHI, Seiya)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号: 50529534
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし