

201028057A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成23(2011)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成23(2011)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析 ---- 1  
西村 順裕

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 9

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

コクサッキーA16型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

研究代表者 西村 順裕 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

コクサッキーA16型ウイルス（CVA16）は、小児の発熱性疾患である手足口病の主要な原因ウイルスである。一般に手足口病の症状は軽く、予後も良好である。一方、エンテロウイルス 71（EV71）感染による手足口病では、時として重篤な中枢神経疾患を起こす。CVA16 および EV71 感染の分子機構には不明な部分が多く、ウイルスが細胞に感染する際に使用する受容体も長年にわたり未知であった。近年我々は CVA16 および EV71 に共通の受容体として、P-selectin glycoprotein ligand-1（PSGL-1）を同定した。PSGL-1 は白血球表面に発現するシアロムチンファミリー蛋白質であり、初期炎症反応に重要な分子である。

本研究では、PSGL-1 陽性の Jurkat 細胞における CVA16 と EV71 の増殖様式を解析した。EV71 の増殖は、抗 PSGL-1 抗体および硫酸化阻害剤の両方で阻害され、EV71 は PSGL-1 の硫酸化チロシンを認識して感染することが示された。一方、CVA16 の増殖は、抗 PSGL-1 抗体で阻害されなかったが、硫酸化阻害剤で阻害された。したがって、Jurkat 細胞における CVA16 受容体は、PSGL-1 以外の硫酸化を受ける分子であることが示唆された。受容体の硫酸化に依存する CVA16 感染機構の解析は、手足口病をはじめとする CVA16 感染症の病原性発現の分子的基盤の解明に役立つことが期待される。

A. 研究目的

コクサッキーA16型ウイルス（CVA16）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。遺伝学的に近縁なエンテロウイルス 71（EV71）とも

に、手足口病の主要な病原ウイルスである。手足口病の症状は一般に軽く、通常数日で回復する。CVA16 感染では手足口病が主な症状で、重症化することはない。しかし、EV71 感染では時として無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺などの様々な神経疾患を伴う。EV71 による手足口病の大規模な流行は、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾以降、アジア太平洋地域で多発しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。特に 2008 年には、安徽省を中心とした中国各地で大規模な手足口病流行が発生し、120 名以上の死亡例が報告された。その後中国では毎年 EV71 が大流行し、数百人の死亡例が報告されている。国内においては、毎年 CVA16 あるいは EV71 のどちらかが主流の手足口病が発生している。近年 CVA16 の流行が続いていたが、2010 年には EV71 による手足口病が流行した。幸いにも我が国では重症例の大規模な発生は認められていないが、散発的には報告されている。

ウイルス感染による病原性発現機構の分子的基盤の解明や予防治療法の開発研究には、ウイルスが細胞に感染する際に使用する特異的受容体の同定が重要である。CVA16 と同じピコルナウイルス科、エンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスの場合、受容体同定が大きな布石となり、ウイ

ルスの分子生物学的研究および病理学的研究が飛躍的に進展した。ポリオウイルス受容体の同定後、ヒトポリオウイルスレセプター発現マウス L929 細胞が樹立された。この細胞は、ポリオウイルスのみが感染し、細胞死を起こす。ポリオウイルスの分離同定に非常に有用な細胞であり、WHO によるポリオ根絶計画にも大きく寄与してきた。さらにヒトポリオウイルスレセプター発現トランスジェニックマウスモデルも樹立された。このマウスは、ポリオウイルスによる神経病原性発現機序やワクチン株の病原性解析等の研究に非常に有用である。

CVA16 や EV71 を含む A 群ヒトエンテロウイルスの受容体は長年未知であり、同定が切望されていた。2009 年、2 種類の全く異なる受容体が報告された。一つは我々が Jurkat 細胞から同定した P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) である。もう一つは小池らが RD 細胞から同定した Scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) である。これらの分子はそれぞれ全く異なるファミリーに属すにもかかわらず、ともに CVA16 と EV71 に共通な受容体として機能する。

我々の同定した PSGL-1 はシアロムチンファミリー膜蛋白質である。主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現する膜蛋白質で、細胞外に位置

するアミノ末端領域はセレクチンやケモカインと相互作用する。この相互作用により、PSGL-1は炎症初期過程における白血球の遊走・接着・浸潤に重要な機能を果たす。PSGL-1のアミノ末端領域には様々な翻訳後修飾が起り、詳細に解析されている。たとえば、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のO型糖鎖付加が重要である。一方、PSGL-1とケモカインCCL27の相互作用には、チロシンの硫酸化のみが必須である。このように、PSGL-1が機能するためには、細胞表面での発現のみならず、アミノ末端領域の翻訳後修飾が重要である。

CVA16はPSGL-1を受容体とし、PSGL-1特異的にヒトPSGL-1発現マウスL929細胞へ感染する。一方、PSGL-1陽性のJurkat細胞においては、PSGL-1以外かつSCARB2以外の受容体(この受容体をCVA16Rと本研究では呼ぶ)を使用して感染することを明らかにしてきた。本研究ではCVA16Rの同定を目指し、受容体の違いからCVA16とEV71の病原性の違いを考察することを目的とする。本年度はCVA16Rの分子生物学的性状の解析を行った。その結果、CVA16Rは硫酸化を受ける分子であることを明らかにした。また、CVA16と同様にPSGL-1

を受容体とするEV71を用い、EV71との結合に重要なPSGL-1の翻訳後修飾も解明した。さらに、様々な白血球系細胞株を用いた感染実験を行い、CVA16の細胞指向性を解明した。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

ヒト腎由来293T細胞(PSGL-1陰性)、PSGL-1陽性白血球細胞株としてJurkat、U937、MOLT-4細胞を用いた。またウイルスの力価測定にはヒト横紋筋種由来RD細胞を用いた。

### 2. ウイルス

CVA16のプロトタイプ株であるG-10株を用いた。PSGL-1に結合するEV71株(EV71-PB)であるSK-EV006、C7/Osaka, KED005, 1095, 75-Yamagata株を用いた。PSGL-1に結合しないEV71株(EV71-nonPB)としてNagoya, 02363株を用いた。

### 3. 抗体

抗PSGL-1抗体KPL1およびPL2、抗硫酸化チロシン抗体Sulfo-1C-A2を用いた。

### 4. 発現プラスミド

ヒトPSGL-1発現プラスミドを基に、アミノ末端領域にアミノ酸変異を導入した発現プラスミドを作製した。

### 5. フローサイトメトリーによるウイルスとPSGL-1との結合検出

293T細胞に一過性にPSGL-1分子を

発現させた。この細胞とウイルスを氷上で 30 分反応させ、細胞に結合したウイルスを蛍光標識抗体で染色した。

#### 6. ウイルス感染実験

細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を  $1 \text{ CCID}_{50}/\text{cell}$  のウイルスで 1 h 感染させ、洗浄後、 $34^\circ\text{C}$  で培養した。Sodium chlorate による硫酸化阻害実験においては、 $10\sim 30 \text{ mM}$  の sodium chlorate 存在下で培養した Jurkat 細胞を用いた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は不要である。

### C. 研究結果

#### 1. 硫酸化阻害剤によるウイルス増殖阻害

PSGL-1 を含め、受容体の硫酸化が CVA16 や EV71 の増殖に関与するかどうかを検討した。Jurkat 細胞を sodium chlorate 存在下で培養し、硫酸化を阻害した。Sodium chlorate は細胞表面の PSGL-1 発現量に影響しないことを確認後、この細胞にウイルスを感染させ、ウイルスの増殖前後のウイルス力価を比較解析した。Jurkat 細胞における CVA16 の増殖は sodium chlorate 依存的に阻害された。また、EV71-PB の増殖も阻害された。一方、EV71-nonPB の増殖は阻害されなかった。以上の結果

より、Jurkat 細胞における EV71-PB と CVA16 の増殖には、硫酸化を受ける分子が関与することを明らかにした。

#### 2. 硫酸化阻害剤による、PSGL-1 へのウイルス結合阻害

Sodium chlorate 存在下で培養した 293T/PSGL-1 細胞に対する EV71-PB 結合を、フローサイトメトリーで解析した。Sodium chlorate は細胞表面での PSGL-1 発現には影響しなかった。しかし、Sodium chlorate は細胞表面での硫酸化チロシン発現を低下させ、さらに EV71-PB 結合も阻害した。したがって、硫酸化チロシンが EV71-PB 結合に重要であることが明らかとなった。

#### 3. PSGL-1 アミノ末端領域のチロシンがウイルス結合に重要

PSGL-1 のチロシン (Y46, Y48, Y51) をフェニルアラニンに置換した変異体を 293T 細胞に発現させ、EV71-PB との結合を検討した。これらの PSGL-1 変異体ではチロシンの硫酸化が阻害されるとともに、EV71-PB 結合も低下した。したがって、これらのチロシンの硫酸化が EV71-PB 結合に必須であることが示唆された。

#### 4. 白血球系細胞株における CVA16 増殖

CVA16 は Jurkat 細胞で増殖したが、PSGL-1 陽性にもかかわらず U937 および MOLT-4 細胞ではほとんど増殖し



なかった。つまり U937 および MOLT-4 細胞では PSGL-1 以外の因子がウイルス増殖に必要であることが示唆された。

#### D. 考察

本研究では、CVA16 および EV71 が硫酸化を受ける分子を受容体として、Jurkat 細胞に感染することを明らかにした。EV71 が認識する硫酸化を受ける分子は PSGL-1 のみと考えられた。一方、CVA16 は PSGL-1 のみならず、他の硫酸化を受ける分子を受容体として Jurkat 細胞に感染することを明らかにした。

硫酸化を受ける細胞表面分子には様々な種類がある。膜型プロテオグリカンは、コア蛋白質とよばれる細胞膜蛋白質に様々なグリコサミノグリカンが共有結合した分子である。グリコサミノグリカンには硫酸化を受ける分子がある。その種類により、コンドロイチン硫酸グリカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど様々なプロテオグリカンが存在し、特異的機能を果たしている。一方、PSGL-1 はコアとなる蛋白質のチロシンに硫酸化を受ける分子である。PSGL-1 の硫酸化チロシンとセレクトインの相互作用については結晶構造解析を含め詳細に解析されている。たとえば、Pセレクトインとの相互作用には Y48 と Y51 の硫

酸化チロシンが鍵である。Lセレクトインとの結合には、Y46 と Y48 の硫酸化チロシンとシアリルルイス<sub>x</sub>をもつトレオニン57のO型糖鎖が重要である。Eセレクトインとの結合には硫酸化チロシンは関与せず、シアリルルイス<sub>x</sub>をもつトレオニン57のO型糖鎖のみが相互作用する。

本研究では、PSGL-1 とウイルスとの結合には特に Y48 と Y51 の硫酸化チロシンが重要であることを明らかにした。つまり EV71 と Pセレクトインは、PSGL-1 結合において異なる様式をとることを解明した。また、PSGL-1 のアミノ末端チロシンの硫酸化レベルにより、CVA16 や EV71 の感染性が制御されている可能性も かんがえられた。

CVA16 と EV71 は遺伝学的に非常に近縁なウイルスであり、ともに PSGL-1 を受容体として使用できる。つまり、CVA16 感染と EV71 感染に共通してみられる手足口病の症状は、PSGL-1 により説明できる可能性がある。たとえば、PSGL-1 のリガンドの一つに、皮膚に関連したケモカインである CCL27 が知られている。PSGL-1 は、Pセレクトインを介し炎症を起こした皮膚への白血球の移動に関与するのみならず、CCL27 と相互作用し、皮膚にホーミングする T 細胞を制御する。一方、CVA16 や EV71 による手足

口病では、手足の皮膚・口の粘膜に特徴的な発疹が生じる。この発疹発症のメカニズムは明らかになっていないが、CVA16やEV71とPSGL-1陽性細胞（皮膚にホーミングするT細胞や、皮膚ランゲルハンス細胞）との相互作用が関与しているのかもしれない。

本研究で明らかにした、硫酸化チロシンがウイルス受容体において重要な役割をなす例は、現在までにヒト免疫不全ウイルスとケモカインレセプターCCR5においてのみ報告されている。硫酸化を受けるチロシンはCCR5のアミノ末端領域にも存在し、この硫酸化がヒト免疫不全ウイルス感染に重要であることが報告されている。今回明らかとなった硫酸化チロシンを介するPSGL-1とCVA16/EV71の相互作用は、ウイルスと受容体の相互作用として第二番目の報告である。

以上のように、CVA16Rの硫酸化がCVA16の増殖に必須であることを明らかにした。本研究成果は、硫酸化を制御することで、CVA16とPSGL-1、CVA16とCVA16R、両方の相互作用を阻害できる可能性を示した。つまり、2種類の受容体を標的とする、硫酸化に着目した新しいCVA16感染阻害剤の開発に役立つと期待される。

## E. 結論

CVA16のJurkat細胞への感染には、

PSGL-1に加え、硫酸化を受ける分子が関与することを明らかにした。硫酸化に依存するCVA16感染機構の解析は、手足口病やEV71の起こす中枢神経疾患等、エンテロウイルスによる病原性発現の分子的基盤の解明に役立つことが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* 6: e1001174, 2010

2. Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, 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: 287-91, 2011

### 2. 学会発表

1) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. St. Andrews, UK, 2010

年 9 月

2) 西村順裕、脇田隆字、清水博之: コクサッキーA16 型ウイルスの白血球系細胞株における増殖の解析 . 第 58 回日本ウイルス学会 . 徳島市、2010 年 11 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H	Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection.	PLoS Pathog	6	e1001174	2010
Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, 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(Pt2)	287-91	2011

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

# Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 Is Critical for Enterovirus 71 Infection

Yorihiko Nishimura, Takaji Wakita, Hiroyuki Shimizu\*

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama-shi, Tokyo, Japan

## Abstract

Enterovirus 71 (EV71) is one of the major causative agents of hand, foot, and mouth disease, a common febrile disease in children; however, EV71 has been also associated with various neurological diseases including fatal cases in large EV71 outbreaks particularly in the Asia Pacific region. Recently we identified human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) as a cellular receptor for entry and replication of EV71 in leukocytes. PSGL-1 is a sialomucin expressed on the surface of leukocytes, serves as a high affinity counterreceptor for selectins, and mediates leukocyte rolling on the endothelium. The PSGL-1–P-selectin interaction requires sulfation of at least one of three clustered tyrosines and an adjacent *O*-glycan expressing sialyl Lewis x in an N-terminal region of PSGL-1. To elucidate the molecular basis of the PSGL-1–EV71 interaction, we generated a series of PSGL-1 mutants and identified the post-translational modifications that are critical for binding of PSGL-1 to EV71. We expressed the PSGL-1 mutants in 293T cells and the transfected cells were assayed for their abilities to bind to EV71 by flow cytometry. We found that *O*-glycosylation on T57, which is critical for PSGL-1–selectin interaction, is not necessary for PSGL-1 binding to EV71. On the other hand, site-directed mutagenesis at one or more potential tyrosine sulfation sites in the N-terminal region of PSGL-1 significantly impaired PSGL-1 binding to EV71. Furthermore, an inhibitor of sulfation, sodium chlorate, blocked the PSGL-1–EV71 interaction and inhibited PSGL-1-mediated viral replication of EV71 in Jurkat T cells in a dose-dependent manner. Thus, the results presented in this study reveal that tyrosine sulfation, but not *O*-glycosylation, in the N-terminal region of PSGL-1 may facilitate virus entry and replication of EV71 in leukocytes.

**Citation:** Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H (2010) Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 Is Critical for Enterovirus 71 Infection. *PLoS Pathog* 6(11): e1001174. doi:10.1371/journal.ppat.1001174

**Editor:** Michael Farzan, Harvard Medical School, United States of America

**Received:** April 1, 2010; **Accepted:** September 30, 2010; **Published:** November 4, 2010

**Copyright:** © 2010 Nishimura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by KAKENHI (Grant-in-Aid for Young Scientists (B), 21790452) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (<http://www.mext.go.jp/english/>). Y.N. and H.S. were supported in part by a Grant-in-Aid for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases and a Grant-in-Aid for the Promotion of Polio Eradication, from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (<http://www.mhlw.go.jp/english/index.html>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: hshimizu@nih.go.jp

## Introduction

Enterovirus 71 (EV71) is a small, nonenveloped, positive-stranded RNA virus that belongs to human enterovirus species A of the genus *Enterovirus* in the family *Picornaviridae*. EV71 is a major causative agent of hand, foot, and mouth disease (HFMD), a common febrile disease affecting mainly young children. HFMD is characterized by a skin rash on the palms and soles, and ulcers on the oral mucosa. HFMD due to EV71 and other enteroviruses is usually mild and self-limited; however, EV71 infection may also cause severe neurological diseases including polio-like paralysis and fatal brainstem encephalitis in young children and infants (reviewed in [1,2]). Over the last decade, many EV71 outbreaks involving a number of fatal encephalitis cases have been reported throughout the world, especially in the Asia-Pacific region, including in Malaysia, Taiwan, Vietnam, and mainland China [2,3,4].

Using an expression cloning method by panning with a cDNA library from human Jurkat T cells, we recently identified human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) as a functional cellular receptor for EV71 [5]. In addition, Yamayoshi et al. [6] identified scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) as another cellular receptor for EV71 by screening EV71-susceptible transformants after transfecting mouse L929 cells with genomic

DNA from human RD rhabdomyosarcoma cells. SCARB2 is ubiquitously expressed on a variety of tissues and cells [7], whereas the tissue distribution of PSGL-1 is mainly limited to immune cells such as leukocytes and dendritic cells [8]. We have also demonstrated that some EV71 strains (PSGL-1-binding strain; EV71-PB) use PSGL-1 as the primary and functional receptor for infection of Jurkat T cells, but other EV71 strains (PSGL-1-non-binding strain; EV71-non-PB) do not, suggesting phenotypic differences in PSGL-1 usage among EV71 strains. Thus, the identification of two distinct cellular receptors for EV71, PSGL-1 and SCARB2, has provided important clues in the elucidation of the molecular basis of early virus-host interactions and pathogenesis of EV71. However, little is known about the biological significance of the two EV71 receptors.

PSGL-1 is a sialomucin membrane protein that is expressed as a homodimer comprised of two disulfide-linked subunits. Interaction of PSGL-1 with selectins and chemokines is a key event during early inflammation of immune cells [8,9,10,11]. The N-terminal region of PSGL-1 is critical for PSGL-1 binding to P-, E- and L-selectins, and post-translational modifications such as *O*-glycosylation and tyrosine sulfation in the N-terminal region of PSGL-1 contribute the efficient binding to selectins [12,13,14,15]. We have previously shown that the N-terminal region of human PSGL-1 (amino acids 42–61) containing a potential *O*-glycosylation residue (T57) and three

## Author Summary

Enterovirus 71 (EV71) is a major causative agent of hand, foot, and mouth disease and a diverse array of neurological diseases, including fatal encephalitis, in children. EV71 has increasingly caused large outbreaks of hand, foot, and mouth disease particularly in the Asia-Pacific region. Recently, we identified human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) as a functional receptor for EV71. PSGL-1 on immune cells is a key molecule involved in early inflammatory events and the PSGL-1–selectin interaction is regulated by post-translational modifications of PSGL-1. Here, we found that a post-translational modification, tyrosine sulfation, at the N-terminal region of PSGL-1 is critical for its binding to EV71 and subsequent viral replication in lymphocytes. Important roles for tyrosine sulfation in protein-protein interactions have been widely accepted; however, involvement of tyrosine sulfation of the receptor in the virus-receptor interaction has been reported only for HIV-1. Therefore, this is the second and unique example of the involvement of tyrosine sulfation in specific virus-receptor interactions. Our results shed new light on biological roles for tyrosine-sulfated proteins in cell tropism and the pathogenesis of EV71.

potential tyrosine sulfation sites (Y46, Y48, and Y51) is directly responsible for PSGL-1 binding to EV71-PB [5]. Therefore, in the present study, we investigated the involvement of post-translational modifications of PSGL-1 in the binding to EV71-PB using a series of PSGL-1 mutants and an inhibitor of sulfation.

Tyrosine sulfation is an important late post-translational modification of secreted and membrane-bound proteins expressed in various mammalian cells and tissues and occurs in the trans-Golgi network [16,17]. Tyrosine sulfated proteins have been described in many mammalian species, and important roles for tyrosine sulfation in protein-protein interactions have been widely accepted, particularly for various chemokine receptors and their ligands that mediate leukocyte migration during inflammation. Furthermore, it has been well established that tyrosine sulfation of the N-terminal region of the chemokine receptor, C-C chemokine receptor 5 (CCR5), plays critical roles in the function of CCR5 as a coreceptor for virus entry and replication of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants [18].

Here we demonstrate that tyrosine sulfation of the N-terminal region of PSGL-1 facilitates PSGL-1–EV71 interaction and viral replication of EV71-PB in Jurkat T cells. To our knowledge, this is the second direct example of the involvement of tyrosine sulfation in specific virus-receptor interactions, a modification that mediates viral entry and replication in target cells.

## Results

### O-glycosylation at T57 of PSGL-1 is not necessary for EV71-1095 binding

For binding to selectins, PSGL-1 requires post-translational modifications with sialyl Lewis x-containing O-glycans at T57.  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase (FUT7) is involved in the biosynthesis of sialyl Lewis x determinants (Fig. 1A) [19,20]. Prevention of O-glycosylation by alanine substitution at T57 (T57A) eliminates binding of PSGL-1 to P-selectin without affecting tyrosine sulfation [12]. First, we generated and expressed a PSGL-1-T57A mutant (Fig. 1A) in 293T cells (293T/T57A) to examine the role of O-glycosylation on T57 for PSGL-1 binding to EV71-1095, a representative strain of EV71-PB [5]. As a positive binding control, we used a soluble form

of recombinant P-selectin (P-selectin-Fc). P-selectin-Fc did not bind to any PSGL-1 transfectants in the presence of 2 mM EDTA (Fig. 1B). P-selectin-Fc bound weakly to 293T cells transiently expressing PSGL-1 (293T/PSGL-1) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  but not to 293T/T57A cells (Fig. 1B). Double expression of PSGL-1 and FUT7 in 293T cells resulted in the efficient binding of P-selectin-Fc to PSGL-1 in a calcium-dependent manner (Fig. 1B). Even in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and FUT7, P-selectin-Fc did not bind to 293T/T57A cells (Fig. 1B). These observations are consistent with previous findings that interaction of PSGL-1 with P-selectin is calcium-dependent and requires appropriate O-glycosylation of PSGL-1 at T57 [10,12]. In contrast, EV71-1095 showed marked binding to 293T/PSGL-1 cells in a calcium-independent manner, even in the absence of FUT7 (Fig. 1B). EV71-1095 also bound to 293T/T57A cells (Fig. 1B). These results indicate that, unlike the interaction between PSGL-1 and P-selectin, the interaction between PSGL-1 and EV71-1095 does not require  $\text{Ca}^{2+}$  and the O-glycans at T57 of PSGL-1.

### Sialic acids are not necessary for EV71-1095 binding

To examine the role of sialic acids on the cell surface, including sialyl Lewis x moieties in the potential O-glycans at T44 and T57 of PSGL-1, on EV71 binding to 293T/PSGL-1 cells, we tested EV71 binding to the cells pretreated with sialidase. Sialidase treatment removed cell-surface sialyl Lewis x (Fig. 2A) and reduced P-selectin-Fc binding to 293T/PSGL-1 cells (Fig. 2B). On the other hand, EV71-1095 binding to the sialidase-treated cells was not reduced regardless of the removal of sialyl Lewis x (Fig. 2C). Although treatment with sialidase decreased EV71 infection to DLD-1 cells [21], sialic acids on the cell surface of 293T/PSGL-1 cells are not necessary for the binding of PSGL-1 to EV71-1095.

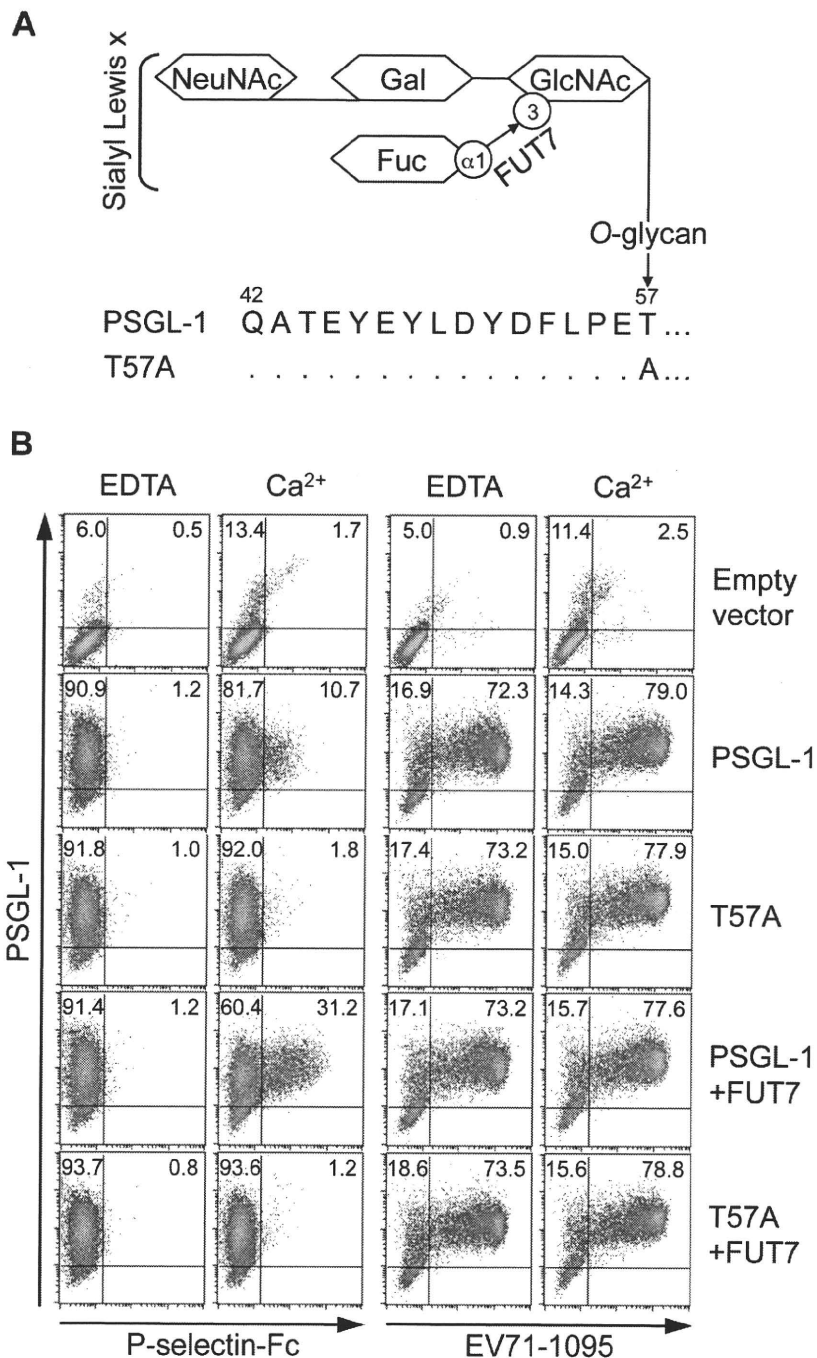
### An inhibitor of sulfation reduces PSGL-1 binding to EV71-PB

In addition to O-glycosylation of PSGL-1, sulfation of the three tyrosines (Y46, Y48, and Y51) in the N-terminal region of PSGL-1 is required for high affinity binding to P- and L-selectins [13,14,15,22,23]. To assess the role of tyrosine sulfation of PSGL-1 in the PSGL-1–EV71 interaction, we treated 293T/PSGL-1 cells with sodium chlorate, an inhibitor of sulfation that blocks PSGL-1 binding to P-selectin [13]. As described previously, sodium chlorate had no apparent effect on PSGL-1 expression on the cell surface (Fig. 3A). On the other hand, sodium chlorate reduced sulfated tyrosines on the cell surface (Fig. 3B) and inhibited EV71-1095 binding to 293T/PSGL-1 cells in a dose-dependent manner (Fig. 3C). These observations indicated that sulfation of PSGL-1, in addition to its expression on the cell surface, is important for EV71 binding.

### One or more tyrosines in the N-terminal region of PSGL-1 are important for EV71-PB binding

We then determined the requirement for the putative sulfated tyrosines (Y46, Y48, or Y51) in the N-terminal region of PSGL-1 for its binding to EV71-1095. We generated PSGL-1 mutants with phenylalanine substitutions at one or more tyrosines and a mutant with a deletion of this region (Fig. 4A). We transfected 293T cells with expression plasmids containing the PSGL-1 mutants and used them for the EV71 binding assay using flow cytometry. 293T cells transfected with an empty vector expressed little or no detectable tyrosine sulfated proteins on the cell surface (Fig. 4B). Similar to the binding of PSGL-1 to P-selectin [13,14], substitution of the tyrosines with phenylalanine prevented tyrosine sulfation and

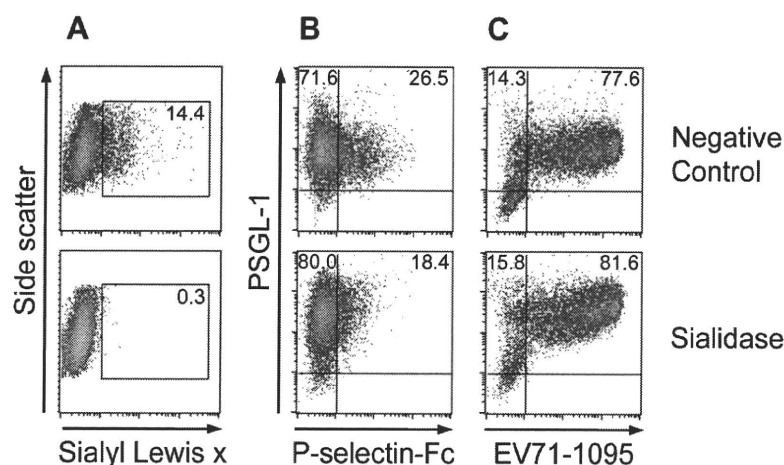




**Figure 1. PSGL-1 O-glycosylation at T57 is not necessary for binding to EV71-1095.** (A) Schematic structure of the O-glycosylation of PSGL-1 and the T57A mutant. FUT7 is involved in the synthesis of sialyl Lewis x. (B) 293T cells were transfected with the indicated expression plasmids. Transfectants were incubated with P-selectin-Fc or EV71-1095 in the presence (Ca<sup>2+</sup>) or absence (EDTA) of 2 mM CaCl<sub>2</sub> followed by the P-selectin-Fc or EV71 binding assay using flow cytometry. The percentage of cells bound to P-selectin-Fc or EV71-1095 is indicated in the upper right quadrant. The data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g001

PSGL-1 binding to EV71-1095 (Fig. 4B). Substitution of one or two tyrosines slightly reduced (Y46F) or impaired (Y48F, Y51F, Y4648F, or Y4651F) the binding of PSGL-1 to EV71-1095 regardless of the apparent expression of tyrosine sulfated proteins on the cell surface (Fig. 4B). Substitution of two or three tyrosines (Y4851F or FFF) or deletion of the region (d46–51) reduced tyrosine sulfated proteins on the cell surface and completely disrupted the PSGL-1–EV71 interaction (Fig. 4B). We also

examined the role of tyrosine sulfation in PSGL-1 binding to other EV71-PB strains. Binding of SK-EV006, C7/Osaka, KED005, and 75-Yamagata strains to 293T/PSGL-1 cells was also inhibited by sodium chlorate (Fig. S1). These strains bound to 293T/T57A cells but not to 293T cells expressing the PSGL-1-FFF mutant. Taken together, these findings demonstrate that, in contrast to O-glycosylation at T57, tyrosine sulfation of PSGL-1 is essential for the efficient binding to EV71-PB strains.

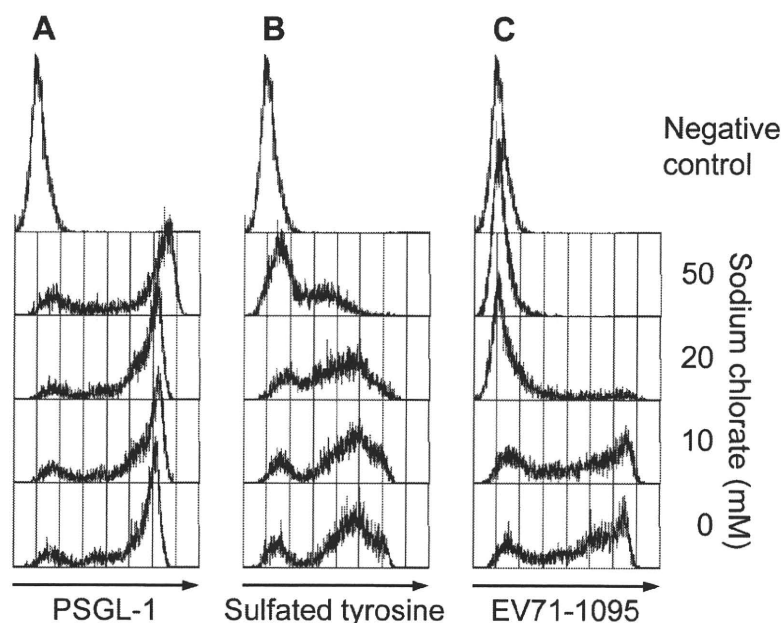


**Figure 2. Effect of sialidase treatment on PSGL-1 binding to EV71-1095.** (A) Sialyl Lewis x expression on the cell surface, as measured with flow cytometry. The percentage of cells expressing sialyl Lewis x is indicated. (B) The cells were examined with the P-selectin-Fc binding assay using flow cytometry. The percentage of cells bound to P-selectin-Fc is indicated in the upper right quadrant. (C) The cells were examined with the EV71 binding assay using flow cytometry. The percentage of cells bound to EV71-1095 is indicated in the upper right quadrant. As a negative control, 293T/PSGL-1 cells were incubated in the medium without sialidase. The data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g002

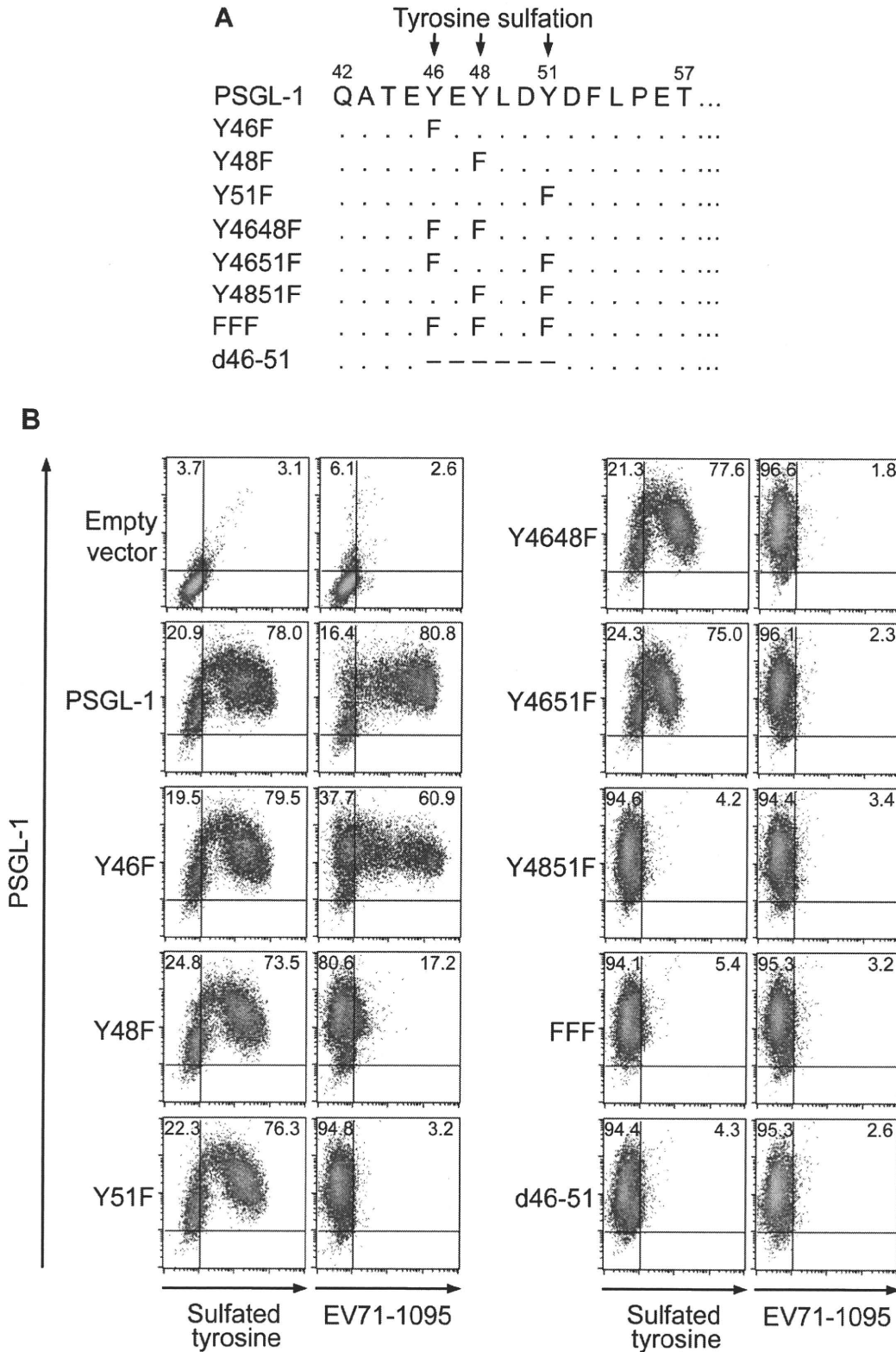
### Sodium chlorate inhibits EV71-PB replication in Jurkat T cells

We next examined whether sulfation of PSGL-1 is required for PSGL-1-dependent replication of EV71-PB in Jurkat T cells. Jurkat T cells were infected with EV71 and cultured in the presence of sodium chlorate to inhibit the sulfation of PSGL-1. Sodium chlorate treatment did not affect PSGL-1 expression on Jurkat T cells (Fig. 5A). On the other hand, sodium chlorate significantly inhibited the replication of EV71-1095 in a dose-

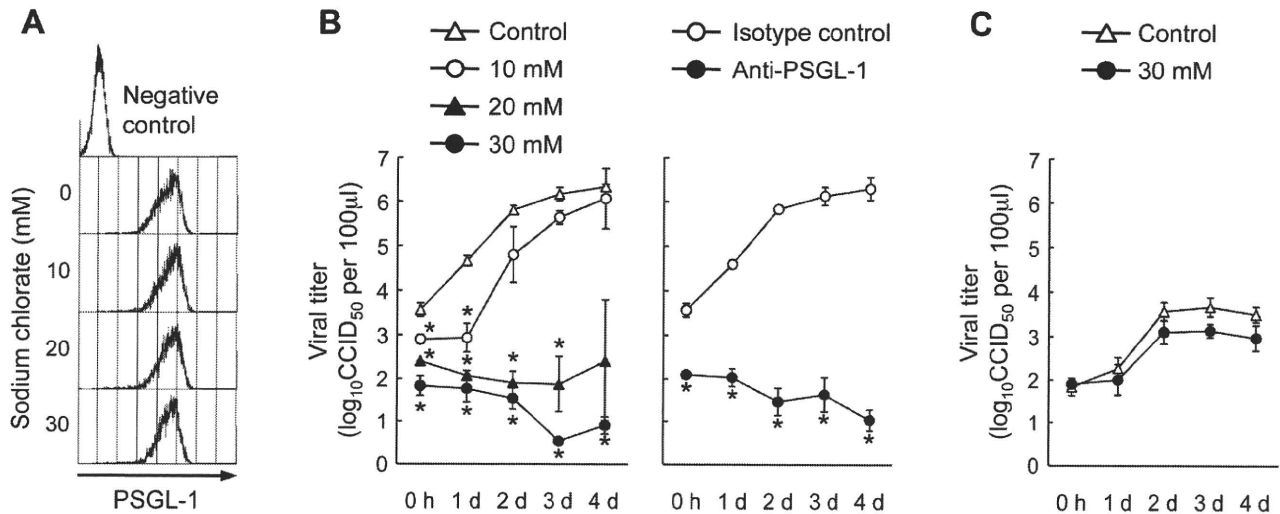
dependent manner (Fig. 5B). The replication of other EV71-PB strains was also inhibited in the presence of sodium chlorate (Fig. 6). In contrast, replication of EV71-non-PB strains (EV71-02362 and EV71-Nagoya), which can replicate in Jurkat T cells in a PSGL-1-independent manner [5], was not affected by sodium chlorate (Figs. 5C and 6). This observation supports that sodium chlorate inhibited replication by blocking EV71-PB entry into the cells. To confirm that sodium chlorate is acting at the receptor level, we transfected Jurkat T cells with genomic RNA of EV71-



**Figure 3. Effect of sodium chlorate on PSGL-1 binding to EV71-1095.** Pretreatment of 293T/PSGL-1 cells with sodium chlorate reduces EV71-1095 binding in a dose-dependent manner. (A) PSGL-1 expression on the cell surface, as measured with flow cytometry. As a negative control, 293T/PSGL-1 cells cultured in the absence of sodium chlorate were stained with an isotype control antibody. (B) Sulfated tyrosines on the cell surface, as measured with flow cytometry. As a negative control, 293T/PSGL-1 cells cultured in the absence of sodium chlorate were stained with an isotype control antibody. (C) The cells were examined with the EV71 binding assay using flow cytometry. As a binding control, 293T/PSGL-1 cells were treated with mock-infected culture supernatant. The data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g003



**Figure 4. Sulfated tyrosines in the N-terminal region of PSGL-1 are important for binding to EV71-1095.** (A) Putative sites of tyrosine sulfation (Y46, Y48, and Y51) in the N-terminus (aa 42–57) of PSGL-1 and the series of PSGL-1 mutants constructed. Identical and deleted amino acids are indicated by dots (.) and dashes (-), respectively. (B) EV71-1095 binding to PSGL-1 mutants. The percentage of cells expressing tyrosine sulfated proteins or bound to EV71-1095 is indicated in the upper right quadrant. The data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g004



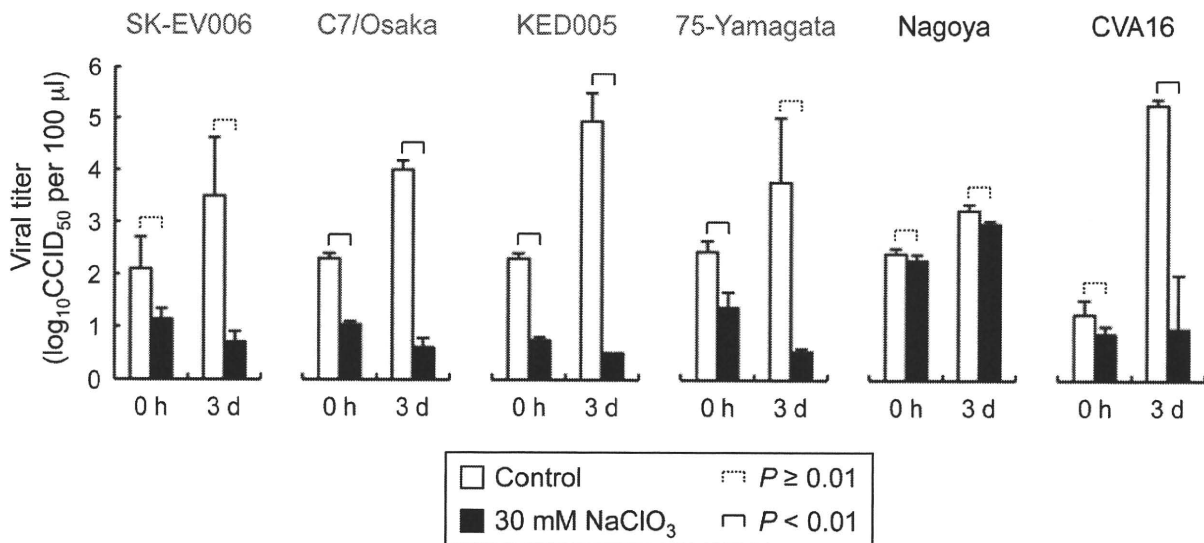
**Figure 5. Effect of sodium chloride on EV71-1095 replication in Jurkat T cells.** (A) PSGL-1 expression on the Jurkat T cell surface, as measured by flow cytometry. As a negative control, Jurkat T cells maintained in the absence of sodium chloride were stained with an isotype control antibody. (B) EV71-1095 growth kinetics in Jurkat T cells in the presence of sodium chloride. Viral titers were determined at 0 h, 1 day, 2 days, 3 days, and 4 days after EV71-1095 inoculation in Jurkat T cells. As a control for inhibition of EV71 replication, EV71-1095 growth kinetics in Jurkat T cells in the presence of anti-PSGL-1 (KPL1) and control antibodies are shown. (C) EV71-02363 (EV71-non-PB) growth kinetics in Jurkat T cells in the presence of sodium chloride. Viral titers are indicated as the mean  $\pm$  S.D. of triplicate analyses. Asterisks indicate  $P < 0.01$  compared to those of the controls. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g005

1095 and examined viral titers at 24 h posttransfection in the presence or absence of 30 mM sodium chloride. Although infectious viruses were recovered in the presence of sodium chloride, the mean viral titer in the presence of sodium chloride was over 10 times lower than that of the control experiments (data not shown). Although sodium chloride inhibited EV71-PB-binding to PSGL-1 expressing cells (Figs. 3C and 5B (0 h postinfection)), we could not rule out the possible involvement of the sodium chloride treatment during the later stages of viral replication. Further studies are needed to elucidate the inhibitory mechanism of action of sodium chloride in a receptor dependent or independent manner during different stages of viral replication of EV71.

Replication of the G-10 strain of coxsackievirus A16, which may use another unidentified receptor(s) to infect Jurkat T cells [5,24], was significantly inhibited by sodium chloride (Fig. 6). This result suggests that some sulfated molecules other than PSGL-1 might be involved in the replication of coxsackievirus A16 in Jurkat T cells in a PSGL-1-independent manner.

**Discussion**

We have shown that tyrosine sulfation, but not *O*-glycosylation, of the N-terminal region of PSGL-1 is critical for EV71-PB binding to PSGL-1 and for virus entry and subsequent replication



**Figure 6. Replication of five EV71 strains and coxsackievirus A16 (CVA16) in Jurkat T cells in the presence of sodium chloride.** Viral replication was determined in Jurkat T cells incubated with 30 mM sodium chloride. EV71-PB strains are indicated in red. Titers are expressed as the mean, and error bars indicate the S.D. of triplicate or quintuplicate (CVA16) analyses. doi:10.1371/journal.ppat.1001174.g006