

201123034A-B

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23年度 総括研究報告書

平成22年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成24（2012）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～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 西村 順裕

平成24（2012）年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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	---- 38
西村 順裕	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 46
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

# I . 総合研究報告

総合研究報告書

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）およびエンテロウイルス71（EV71）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のひとつである。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る。

本研究では、PSGL-1以外の、CVA16受容体の同定を行い、硫酸化を受ける分子であることを突き止めた。さらに、各種細胞でのCVA16増殖を解析した。さらに、CVA16の受容体特異性は、キャプシド蛋白質のアミノ酸2つで規定されていることを明らかにした。本研究成果は、CVA16感染症とEV71感染症の病原性の相違に関する分子生物学的解明に役立つと期待される。

A. 研究目的

コクサッキーA16型ウイルス（CVA16）とエンテロウイルス71（EV71）はいずれも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属している。いずれも手足口病の主要な病原ウイルスである。CVA16感染による手足口病の症状は一般に軽く経過し、通常数日で回復する。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。

近年国内では、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。また、2011年にはCVA6による手足口病も流行している。幸いにも我が国では、EV71による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。

ウイルスは細胞に感染する際に、まず細胞表面の受容体に結合する。ウイルスに特異的受容体を同定できれば、

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大きく役立つ。例えば、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受容体は1989年に同定された。以降、ポリオ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てきた。最も有用な成果のひとつは、ヒトポリオウイルスレセプター発現マウス L929 細胞の樹立である。この細胞には、ポリオウイルスのみが感染し、細胞死を起こす。この細胞を使ったポリオウイルス同定法は、簡便かつ特異的な方法として、WHO によるポリオ根絶計画にも大きく貢献している。さらに、ヒトポリオウイルス受容体発現トランスジェニックマウスモデルも開発されている。このマウスは、ポリオウイルス毒性を反映した症状を呈す。したがって、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なモデルである。

CVA16やEV71を含むA群ヒトエンテロウイルスの受容体は、2009年に相次いで同定された。我々が Jurkat 細胞から同定した P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、山吉らが RD 細胞から同定した Scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) である。

我々の同定した PSGL-1 はシアロム

チンファミリーに属す、I 型膜蛋白質である PSGL-1 は主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現している。PSGL-1 のアミノ末端は細胞外に位置し、セレクトインやケモカインと相互作用する。このような相互作用により、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。リガンドとの相互作用は、PSGL-1 アミノ末端領域の複雑な翻訳後修飾により制御されている。例えば、PSGL-1 と P セレクトインの相互作用には、PSGL-1 のチロシン (Y46、Y48、Y51) の硫酸化のみならず、トレオニン T57 への O 型糖鎖付加が必要である。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り、O 型糖鎖付加は不要である。このように、PSGL-1 が細胞外からのシグナルを受信し、生理機能を発現するためには、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なのである。

CVA16 の各種細胞への感染実験から、PSGL-1 陽性の Jurkat 細胞においては、PSGL-1 以外の分子が主要な CVA16 受容体として機能していると考えられた。つまり、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示唆する研究結果を得てきた。

本研究では CVA16R の同定を目指した。さらに、CVA16 の研究成果を EV71 研究にフィードバックし、の病原性の違いを考察することを目的とした。

平成 22 年度は CVA16R の分子生物学的性状の解析を行い、CVA16R は硫酸化を受ける分子であることを突き止めた。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。

平成 23 年度は、CVA16 の受容体特異性を決定するキャプシドアミノ酸の同定を行った。さらにその研究成果を EV71 研究にフィードバックすることに成功した。つまり、CVA16 の受容体特異性に関与するアミノ酸に相当する EV71 のアミノ酸は、EV71 の受容体特異性を規定することを解明した。

## 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. キャプシド領域塩基配列の決定

RT-PCR により、キャプシドをコードする領域を増幅した。塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。

### 7. 感染性クローンの作製

EV71-1095 および EV71-02363 を基に作製した。ゲノム全長を RT-PCR により増幅し、pBR322 由来プラスミドにクローニングした。アミノ酸変異は PCR による site-directed mutagenesis により導入した。In vitro transcription により RNA を合成し、RD 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に組換えウイルスを含む培養液を回収した。

高タイターウイルスを得るために、もう一度 RD 細胞に感染させた。強い細胞変性効果が出現した時点でウイルス液を回収し、実験に用いた。

#### 8. 免疫沈降法による EV71-PSGL-1 結合の検出

Protein G ビーズと PSGL-1-Fc を反応後、洗浄し、EV71 を加えた、1 時間後洗浄し、共沈した EV71 をウエスタンブロットティングで検出した。

#### 9. ウイルス感染実験

細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を 1 CCID<sub>50</sub>/cell のウイルスで 1 h 感染させ、洗浄後、34°C で培養した。Sodium chlorate による硫酸化阻害実験においては、10~30 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。

#### 5. 異なる細胞指向性を示す CVA16 のキャプシド領域の解析

CVA16 の Jurkat 細胞での増殖は、硫酸化阻害剤の影響を受けない。つまり、PSGL-1 以外の受容体を介してのウイルス感染が主要であると考えられる。そこで、RD 細胞で増殖させた CVA16 を Jurkat 細胞で一度増殖させ、Jurkat 細胞での増殖前後におけるキャプシドアミノ酸変異を解析した。その結果、Jurkat 細胞で一度増殖した CVA16 では、VP1-97 と VP1-145 に変異を起していることが明らかとなった。つまり、これら二つのアミノ酸で、CVA16 の受容体特異性が規定されていることが示唆された。

#### 6. VP1-97 と VP1-145 に相当する、EV71 アミノ酸の機能予測

EV71 分離株間において、VP1-97 は高く保存されているが、近接する VP1-98 に高い多様性がある。また、

EV71 の VP1-145 も高い多様性がある。EV71 における VP1-98 および VP1-145 はポジティブセレクションを受けることが報告されていることから、この二つのアミノ酸は EV71 感染および増殖に重要な役割をなすことが推測された。そこで、EV71 の VP1-98 および-145 が、受容体特異性に関与するものと推測した。

EV71-PB 株と non-PB 株とで VP1-98 および-145 のアミノ酸を比較した。EV71-PB 株では VP1-98E/145G、non-PB 株では VP1-98K/145E をもつ頻度が高いことから、これら 2 つのアミノ酸の組合せが PSGL-1 結合性に関与するものと推測した。

#### 7. VP1-98 および VP1-145 と EV71 受容体特異性の解析

cDNA 由来ウイルスの PSGL-1 結合性を、PSGL-1-Fc との共沈により検討した。PB 型アミノ酸 (VP1-98E/145G) をもつ、EV71-1095 分離株、cDNA 由来 EV71-1095 株および EV71-02363EG 株は、PSGL-1-Fc と共沈した。つまり、VP1-98E/145G が PSGL-1 結合に重要であることが明らかとなった。

Non-PB 型アミノ酸 (VP1-98K/145E) をもつ、EV71-02363 分離株、cDNA 由来 EV71-02363 株および EV71-1095KE 株は、PSGL-1-Fc と共沈しなかった。つまり、VP1-98K/145E をもつ EV71 は PSGL-1 に結合しないことが示され

た。

以上のように、VP1-98 および-145 は、EV71 における受容体特異性を規定することを明らかにした。

#### D. 考察

本研究により、CVA16 の未知受容体が硫酸化を受ける分子であることを明らかにした。また、CVA16 の受容体特異性は VP1 のアミノ酸わずか二つで規定されていることを明らかにした。さらに、この CVA16 における成果を EV71 研究にフィードバックすることができた。つまり、CVA16 の受容体特異性に関与するアミノ酸に相当する EV71 キャプシドアミノ酸は、EV71 の受容体特異性にも関与していることを突き止めた。

平成 22 年度は、CVA16R の同定を行い、硫酸化を受ける分子であることを突き止めた。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チ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 セレクチ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 セレクチンとの結合には、Y46 と Y48 の硫酸化チロシンとシアリルルイス x をもつトレオニン 57 の O 型糖鎖が重要である。E セレクチ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 x 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 セレクチンは、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。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。しかし、いずれも異なる第二の受容体を使用することが明らかとなった。また、その受容体特異性を規定するのは、ウイルスキャプシドVP1にあるアミノ酸二つであることを明らかにした。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。一方、CVA16とEV71による病原性が関与していることも考えられる。CVA16の受容体特異性の解明をきっかけとして、今後両ウイルスの病原性の違いの解明への展開が期待される。推測される。

## E. 結論

CVA16がJurkat細胞へ感染する際の受容体は、硫酸化を受ける分子である

ことを明らかにした。さらに、CVA16の受容体特異性を決定する、ウイルスキャプシドアミノ酸を同定した。さらに、この研究成果をEV71研究にフィードバックすることにも成功した。硫酸化に依存するCAV16感染機構の解析は、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
- 3) Nishimura Y, Shimizu H: Cellular receptors for human enterovirus species A. *Frontiers in Virology*, in press.

### 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

3) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Analysis of amino acid determinants of enterovirus 71 responsible for the PSGL-1-binding phenotype. IUMS 2011 Sapporo. 札幌市、2011年9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, Shimizu H	Cellular receptors for human enterovirus species A.	Frontiers in Virology			In press
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

1 **Mini review**

2

3 **Cellular receptors for human enterovirus species A**

4

5 Yorihiro Nishimura\* and Hiroyuki Shimizu

6

7 Department of Virology II

8 National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

9

10 **\*Correspondance:**

11 Dr. Yorihiro Nishimura

12 Department of Virology II

13 National Institute of Infectious Diseases

14 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi,

15 Tokyo 208-0011, Japan

16 ynishi@nih.go.jp

17

18 **Running title:**

19 HEV-A receptors

20

21 **Headings and sub-headings:**

22 **1. Introduction**

23 **2. PSGL-1**

24 **3. SCARB2**

25 **4. Annexin II**

26 **5. Sialic acid**

27 **6. DC-SIGN**



28 **7. Conclusion**

29 **8. Acknowledgements**

30

31 **Conflict of interest statement**

32 The authors declared that no competing interests exist.

33 **Abstract**

34 Human enterovirus species A (HEV-A) is one of the four species of HEV in the genus  
35 *Enterovirus* in the family *Picornaviridae*. Among HEV-A, coxsackievirus A16 (CVA16)  
36 and enterovirus 71 (EV71) are the major causative agents of hand, foot, and mouth  
37 disease (HFMD). Some other types of HEV-A are commonly associated with  
38 herpangina. Although HFMD and herpangina due to HEV-A are common febrile  
39 diseases among infants and children, EV71 can cause various neurological diseases,  
40 such as aseptic meningitis and fatal encephalitis.

41

42 Recently, two human transmembrane proteins, P-selectin glycoprotein ligand-1  
43 (PSGL-1) and scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2), were identified as  
44 functional receptors for EV71 and CVA16. In *in vitro* infection experiments using the  
45 prototype HEV-A strains, PSGL-1 and SCARB2 could be responsible for the specific  
46 receptors for EV71 and CVA16. However, the involvement of both receptors in the *in*  
47 *vitro* and *in vivo* infections of clinical isolates of HEV-A has not been clarified yet. To  
48 elucidate a diverse array of the clinical outcome of HEV-A-associated diseases, the  
49 identification and characterization of HEV-A receptors may provide useful information  
50 in understanding the HEV-A pathogenesis at a molecular level.

51

52 **Keywords:**

53 Human enterovirus species A, enterovirus 71, receptor, PSGL-1, SCARB2

54

55 **1. Introduction**

56 The genus *Enterovirus* within family *Picornaviridae*, nonenveloped viruses with a  
57 single-stranded RNA genome of positive polarity, is comprised of more than 100  
58 serotypes (Pallansch and Roos, 2007). Human enteroviruses (HEVs) are presently  
59 classified into four species, HEV species A, B, C, and D (HEV-A, B, C, and D). At  
60 present, coxsackievirus A2 (CVA2), CVA3, CVA4, CVA5, CVA6, CVA7, CVA8,  
61 CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, enterovirus 71 (EV71), EV76, EV89, EV90, EV91,  
62 and EV92 have been classified as HEV-A (Oberste et al., 2004, 2005, 2008). In addition,  
63 four types of simian enteroviruses are classified as HEV-A (Oberste et al., 2007).  
64 Although most enterovirus infections are asymptomatic, particular clinical  
65 manifestations are associated with specific types of enteroviruses (Pallansch and Roos,  
66 2007). CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, and CVA10 are commonly associated with  
67 herpangina. EV71 and CVA16 are major causative agents of hand, foot, and mouth  
68 disease (HFMD), a common febrile disease occurring mainly in young children,  
69 characterized by skin rash involving palms and soles, and ulcers on oral mucosa.  
70 Recently, HFMD outbreaks mainly due to CVA6 have been reported (Fujimoto et al., in  
71 press). Clinical manifestations of HFMD caused by EV71, CVA6, and CVA16 are  
72 usually mild and self-limited. However, EV71 infection causes a diverse range of  
73 neurological diseases, such as aseptic meningitis, acute flaccid paralysis, brainstem  
74 encephalitis, neurogenic pulmonary edema, and may result in long-term neurological  
75 sequelae, mainly in infants and young children (Alexander et al., 1994;McMinn,  
76 2002;Modlin, 2007).

77

78 Recently, two human transmembrane proteins, P-selectin glycoprotein ligand-1  
79 (PSGL-1) (Nishimura et al., 2009) and scavenger receptor class B, member 2  
80 (SCARB2) (Yamayoshi et al., 2009), were identified as functional receptors for EV71  
81 and CVA16 (Patel and Bergelson, 2009). In addition, annexin II (Yang et al., 2011),

82 sialic acid (Yang et al., 2009), and dendritic cell(DC)-specific ICAM3-grabbing  
83 nonintegrin (DC-SIGN) (Lin et al., 2009b) were found to be cellular factors involved in  
84 the early stages of EV71 infection. This review summarizes our current understanding  
85 of the EV71/CVA16 receptors and their role in HEV-A infection.

86

## 87 **2. PSGL-1**

88 Patients with severe EV71-associated encephalitis and neurological pulmonary edema  
89 showed a significant depletion of T cells and high levels of proinflammatory cytokines  
90 (Lin et al., 2003; Wang et al., 2003), suggesting the possible involvement of  
91 lymphocytes in EV71 infection and the immunopathogenesis. Therefore, we generated a  
92 cDNA library from Jurkat T cells and used it for expression cloning to identify a  
93 receptor on lymphocytes that specifically binds to EV71. Finally we identified PSGL-1  
94 as a functional EV71 receptor on Jurkat T cells (Nishimura et al., 2009).

95

96 PSGL-1 is a sialomucin leukocyte membrane protein expressed as a homodimer of  
97 disulfide-linked subunits and it can bind to three different selectins (P, E, and L) (Sako  
98 et al., 1993; Laszik et al., 1996; Somers et al., 2000). The tissue distribution of PSGL-1 is  
99 restricted to myeloid, lymphoid, and dendritic lineages, and platelets. PSGL-1 is also  
100 expressed on DCs of lymph nodes and macrophages in the intestinal mucosa (Laszik et  
101 al., 1996), which could be the primary sites of EV71 replication. PSGL-1 plays critical  
102 roles in the tethering and rolling of leukocytes for the recruitment of cells from blood  
103 vessels to the sites of acute inflammation upon stimulation by infection.

104

105 We found that some representative EV71 strains bind to PSGL-1 but other strains did  
106 not (Nishimura et al., 2009). According to their PSGL-1 binding capability, we  
107 classified the EV71 isolates as PSGL-1-binding strains (EV71-PB) and  
108 PSGL-1-non-binding strains (EV71-non-PB). The replication of EV71-PB in Jurkat T