

エンベロープウイルスの粒子形成・出芽機構の解析

入江 崇

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・ウイルス学研究室

多くのエンベロープウイルスのマトリクス蛋白質やレトロウイルスの Gag 蛋白質は、粒子形成・出芽において重要な役割を果たしており、単独でウイルス様粒子 (VLPs: Virus-like particles) を形成し、出芽する事が出来る。これらの蛋白質中に主に3種類のL-ドメインモチーフ配列 (PPxY, P(T/S)AP, YP(x)_nL) が同定され、出芽効率を上昇させるために、これを介して宿主の ESCRT 経路を利用するという、多くのエンベロープウイルスに共通の機構が明らかにされてきた。しかし、これらのL-ドメイン配列を持たず、上記の経路の関与が不明であり、出芽機構が明らかにされていないウイルスも数多く存在する。この様なウイルスのうち、主にセンダイウイルス (SeV) の出芽について、我々は以下のことを明らかにした。1) SeV M 蛋白質による VLP の出芽は、ESCRT 経路に非依存的であるにも関わらず、そのN末端のYLDL配列を介してこの機構の構成分子であるAlix/AIP1と機能的に相互作用する。2) SeVのアクセサリ蛋白質の1つであるC蛋白質もAlix/AIP1と相互作用し、これを原形質膜にリクルートする事で出芽にESCRT経路を利用できるようにしている。3) さらにC蛋白質は、(-)鎖ゲノム及び(+)鎖アンチゲノムRNA合成のバランスを制御することにより、感染性ウイルス粒子の産生を最適化している。これらの結果は、SeVのユニークな出芽機構を明らかにしただけでなく、感染性ウイルス粒子産生効率を高めるための新しいウイルスゲノム合成制御機構を示すものである。

1. はじめに

ウイルスは宿主細胞内に侵入すると、細胞の機能を借りてウイルス蛋白質やウイルスゲノムなどを合成し、最終的にこれらのウイルス粒子構成物から子孫ウイルス粒子が組み立てられ、細胞外に放出される。このウイルスの複製過程は、受動的、偶発的に起こるイベントの総和として起こるものではなく、感染性の子孫ウイルス粒子を効率良く産生するために、宿主及びウイルス側の様々な因子が協調し高度にシステム化されたものである。本総説では、エンベロープウイルスの粒子形成・出芽段階における感染性子孫

ウイルス粒子産生の効率化に寄与する分子メカニズムについて、パラミクソウイルス科のプロトタイプであるセンダイウイルス (SeV) をモデルとした我々の最近の知見について紹介する。

2. エンベロープウイルスの出芽

エンベロープウイルスは、宿主の細胞膜を自らのウイルスエンベロープとして利用し、ウイルスゲノムを含むカプシドを包み込んだ状態で細胞膜表面より出芽する。多くのエンベロープウイルスでは、そのマトリクス蛋白質やGag蛋白質を細胞内で単独で発現させると、これらを内包したウイルス様粒子 (VLPs: virus-like particles) が形成され、細胞表面より放出されることから、これらの蛋白質がウイルスの粒子形成及び出芽の主要な原動力となっていることがわかる⁴⁾。この機能に重要な数種類のアミノ酸モチーフ配列 (L-ドメインモチーフ) が、レトロウイルスを中心に様々なウイルスで同定されており、初期に同定されたPPxY, P(T/S)AP, YP(x)_nLの各モチーフ配列は、Nedd4-like E3 ubiquitin ligases, Tsg101, Alix/AIP1等の宿主因子とそれぞれ相互作用する事が明らかにされた⁴⁾。これらはいず

連絡先

〒734-8551

広島県広島市南区霞1-2-3

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・ウイルス学研究室

TEL: 082-257-5157

FAX: 082-257-5159

E-mail: tirie@hiroshima-u.ac.jp

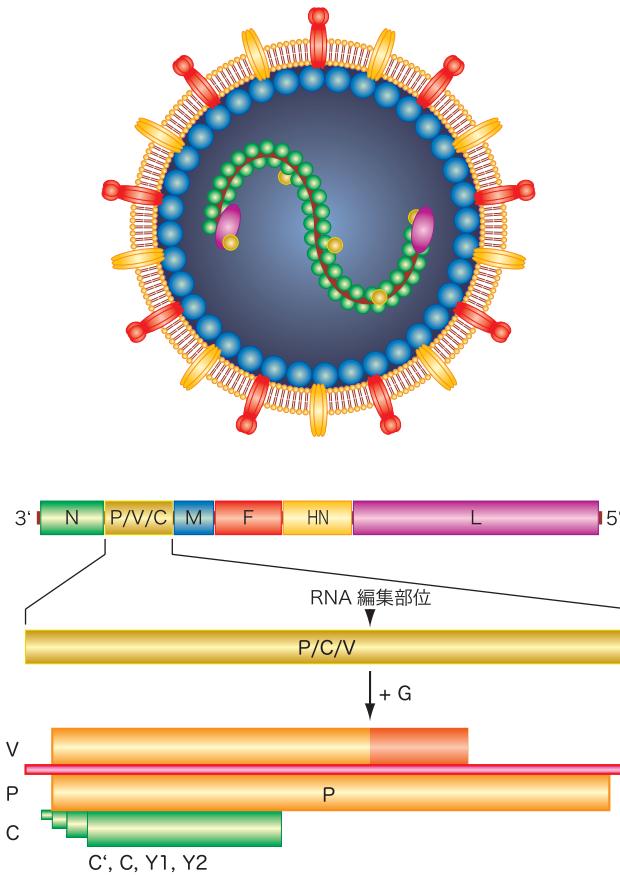


図1 センダイウイルスのゲノム及び粒子構造とアクセサリ-蛋白質の発現様式

れも、ウイルスの出芽とトポロジー的に相関したエンドサイトーシスや多小胞体 (MVB: multivesicular body) のソーティング, 細胞質分裂などに関与する ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体の関連分子である。いずれのモチーフを持つウイルスの出芽も, ほとんどの場合 ESCRT 経路の最終段階で働く AAA-ATPase である VPS4 の活性に依存的事であることや, 各モチーフは機能的に相互交換が可能であること, さらに上記の様な L-ドメインモチーフを持たないウイルスでも, その出芽が VPS4 依存的事である場合があることなどから, 宿主の ESCRT 経路がウイルス間で共通して出芽に利用されていると考えられている⁴⁾。

しかし一方で, 既知の L-ドメイン配列を持たず, それに相当するドメインも未同定であったり, ESCRT 経路の関与が不明または否定的であり, 出芽機構がほとんど明らかにされていないウイルスも数多く残されている。この様なウイルスのうち, パラミクソウイルスは既知の L-ドメイン配列を持たず, ESCRT 経路依存的または非依存的な多様な出芽機構を持つことが明らかになってきた。本総説ではセンダイウイルスでの我々の成果を中心に, その粒子形成・出芽における特徴的な分子メカニズムについて解説する。

3. センダイウイルスの粒子形成・出芽機構

(1) センダイウイルス (SeV)

SeV は, モネガウイルス目パラミクソウイルス科レスピロウイルス属に分類されるエンベロープウイルスである。ヒトに対してはほとんど病原性を示さず, マウスやラットなどの齧歯類を自然宿主として呼吸器疾患を引き起こすことから, 麻疹ウイルス (MeV), 流行性耳下腺炎ウイルス (MuV), ニパウイルス (NiV), ニューカッスル病ウイルス (NDV) などのヒトや動物の重要な感染症の原因ウイルスを含むパラミクソウイルスのプロトタイプとして *in vitro* および *in vivo* の両面から幅広く研究されており, また, 有望な遺伝子治療用ウイルスベクターとしての応用が進められている¹⁶⁾。その一本鎖 (-) 鎖 RNA ゲノム上には, N, P, M, F, HN, L の 6 種類のウイルス蛋白質がモノシストロニックにコードされており, さらに P 遺伝子からは, C 及び V 等のウイルスの複製に必須ではないアクセサリ-蛋白質が, それぞれ P とは異なる ORF および P mRNA 転写時に RNA 編集を受けてできた V mRNA から合成される (図 1)¹⁶⁾。ヌクレオプロテイン (N) は (-) および (+) 鎖ゲノム RNA と強固に結合し, ヌクレオカプシ

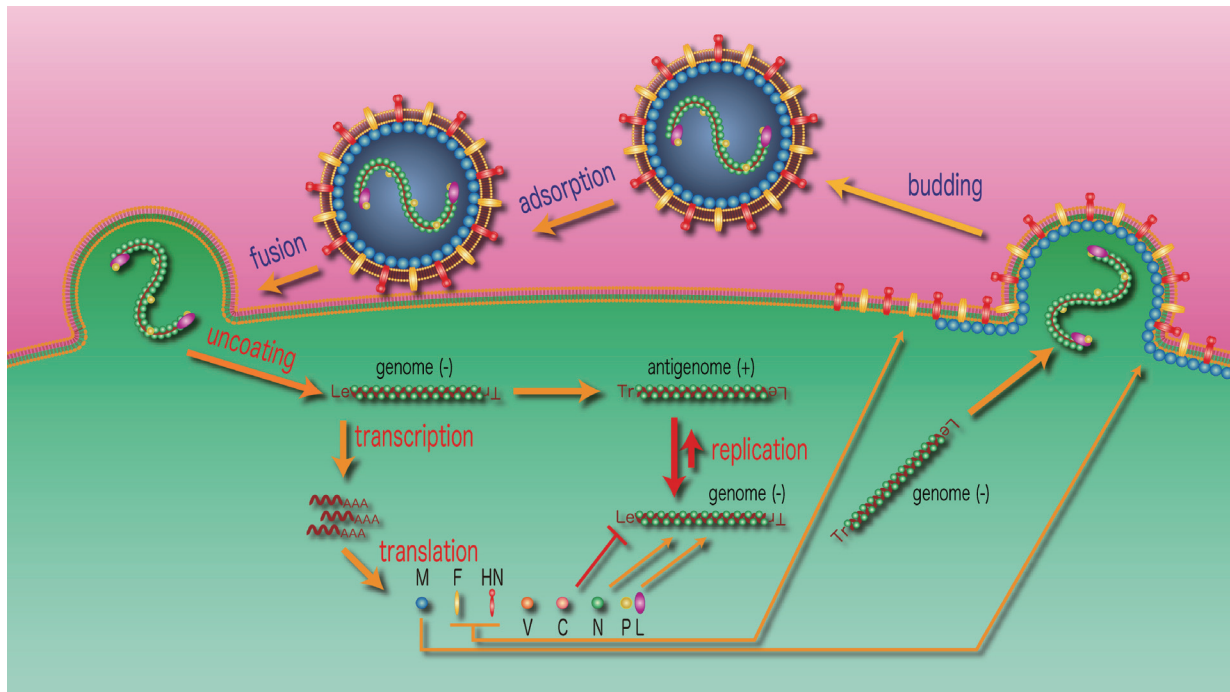


図2 センダイウイルスの複製サイクル

ドを形成する。これにラーズプロテイン(L)とリン酸化蛋白質(P)からなるRNA依存性RNAポリメラーゼ複合体が結合してRNP複合体を形成し、ウイルスRNAの転写・複製の機能的単位となる。ウイルス粒子表面からはタイプI及びII糖蛋白質であるエンベロープ蛋白質(F及びHN)が突出している。F蛋白質はウイルス感染時の膜融合を司る。HN蛋白質はレセプターとの結合に重要であり、糖鎖のシアル酸に結合してヘマグルチニン(HA)活性を示すだけでなく、ノイラミニダーゼ(NA)活性を有し、感染細胞からのウイルスの遊離に必要である。マトリクス蛋白質(M)はウイルスエンベロープ直下に存在し、ウイルス粒子構造の形成に重要な役割を果たしている。また多くの場合、M蛋白質単独でVLPの形成・出芽を誘導できることから、ウイルスの出芽において最も重要な蛋白質であると考えられている¹⁶⁾。

SeVの複製サイクルの概要を図2に示した。多くのパラミクソウイルスと同様にウイルス粒子が宿主細胞表面に吸着した後、F蛋白質の働きによりウイルスエンベロープと原形質膜が融合し、細胞質内にヌクレオカプシドが放出される。他のほとんどのモノネガウイルスと共通して、ウイルス蛋白質及びウイルスRNAの合成は細胞質で行われ、ウイルス感染初期にはウイルスポリメラーゼによりウイルスゲノムを鋳型としてウイルスmRNAが転写され、ウイルス蛋白質が合成される。その後N蛋白質が蓄積すると、同じウイルスポリメラーゼにより(+)鎖アンチゲノムRNAが合成され、さらにこれを鋳型として(-)鎖ゲノムRNAが

合成される。(+)及び(-)鎖ゲノムRNAは、合成されると直ちにN蛋白質が結合してヌクレオカプシドを形成し、原形質膜上の特定の部位に他のウイルス粒子構成蛋白質と共に集合し、ウイルス粒子が形成され、原形質膜表面より出芽する¹⁶⁾。

(2) SeV M蛋白質による粒子形成・出芽と宿主因子の関与

他の多くのエンベロープウイルスと同様に、パラミクソウイルスのM蛋白質は、ウイルス粒子形成・出芽において最も重要なウイルス蛋白質である。M蛋白質は、原形質膜の内表面に集合し、SeVや同じレスピロウイルス属のヒトパラインフルエンザウイルス1型(hPIV1)、アブラウイルス属のNDV、ヘニパウイルス属のNiV、モルビリウイルス属のMeV等では、単独で効率良くVLPを形成・出芽する^{6, 7, 20, 21, 31, 32)}。一方、ルブラウイルス属のパラインフルエンザ5型(PIV5)やMuVなどは、M蛋白質単独ではVLPを形成しないか非常に効率が低い³⁾が、F蛋白質やHN蛋白質などの他のウイルス蛋白質の存在により効率良くVLPを形成・出芽できるようになる^{17, 26)}。いずれの場合においてもM蛋白質はVLPの形成に必須のウイルス蛋白質である。また、M遺伝子欠損組換えSeVやMeVでは、ウイルス粒子の産生効率が著しく低下するだけでなく、その形態も親株と比べて大きく異なり、RNPを内包しない空の粒子の割合が著しく増加する^{3, 9)}。

前述の3種類のL-ドメインモチーフは、レトロウイルス以外の様々なウイルスでも見いだされ、出芽におけるESCRT経路の関与が明らかにされた⁴⁾。しかし、パラミク

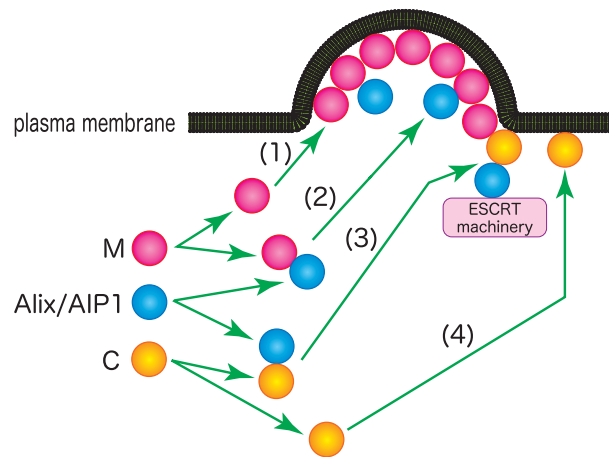


図3 C蛋白質によるSeV M-VLPの出芽促進モデル

ソウウイルスのM蛋白質にはこれらの配列がみられず、出芽・粒子形成のメカニズムについての理解が遅れていた。我々は、様々なパラミクソウイルスのM蛋白質のアミノ酸配列を比較し、SeV (レスピロウイルス属) やNiV (ヘニパウイルス属)、MeV (モルビリウイルス属) のN末端側にYPxL配列に類似のYxxL配列が保存されていることを見いだした¹³⁾。この配列は、M蛋白質単独でのVLP形成効率が低いPIV5やMuVでは見られなかった。そこで我々は、SeV M蛋白質に見られるYLDL配列の、VLP形成における重要性について最初に検討した¹³⁾。

SeV M蛋白質のYLDL配列をALDA (M-A2) またはAAAA (M-A4) に置換すると、M-VLPの形成・出芽効率が著しく低下した¹³⁾。また、既知のL-ドメイン配列との機能的相互作用が明らかにされたESCRT関連分子Nedd4、Tsg101およびAlix/AIP1のM-VLPの出芽における関与を、それぞれのドミナントネガティブ (DN) 変異体の過剰発現により検討したところ、DN-Alix/AIP1の過剰発現によりM-VLPの出芽が抑制された¹³⁾。この結果から、M蛋白質とAlix/AIP1の相互作用を調べたところ、M蛋白質はYLDL配列を介してAlix/AIP1のN末端211アミノ酸領域と相互作用し、これがM-VLPの効率良い出芽に重要であることを明らかにした¹³⁾。また、最近我々は、M-A2およびM-A4変異を持つ組換えウイルスとそのリバータントを用いた解析から、M蛋白質YLDL配列とAlix/AIP1の重要性をウイルスレベルでも確認した (投稿中)。

YPDL型L-ドメイン配列を介してAlix/AIP1相互作用するGag蛋白質をもつウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV) の出芽は、他のPPxYやP (T/S)AP型L-ドメイン配列を持つラウス肉腫ウイルス (RSV) やヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) と同様にESCRT経路に依存的であり、DN-VPS4の過剰発現により抑制される³⁰⁾。これとは異なり、SeV M-VLPの出芽はDN-VPS4の過剰発現による抑制を

受けず、ESCRT経路に非依存的である事が示唆された¹²⁾。これを反映して、既知のL-ドメイン配列を持つ多くのウイルスの場合とは異なり、SeV M蛋白質のYLDL配列は3種類のL-ドメイン配列のいずれとも機能的に相互置換できなかった¹³⁾。

我々の報告に先だって、相互作用する宿主側因子は同定されていないものの、SeV以外のパラミクソウイルスであるPIV5やNiVでもM蛋白質中に出芽に重要なモチーフ配列、FPIVおよびYMYLが同定された^{6, 25)}。これらのうち、PIV5のFPIV配列は既知のL-ドメイン配列と相互置換が可能であり、VLPの出芽はESCRT依存的であったが、NiV M-VLPの出芽はESCRT非依存的であった^{6, 25)}。ESCRT非依存的な出芽は、前述のSeVやNiV M-VLP以外にもヒトRSウイルス (HRSV)、ラブドウイルス科の水疱性口内炎ウイルス (VSV) やオルソミクソウイルス科のインフルエンザウイルスなどでも報告されているが、ESCRT経路に代わる機構は不明であった^{5, 10, 21, 34)}。しかし最近、HRSVやインフルエンザウイルスのVLPの出芽に、ESCRT経路ではなく、Rab11依存的なARE (apical recycling endosome) 経路の関与が明らかにされた^{1, 5)}。

(3) SeV C蛋白質による粒子形成・出芽促進作用と宿主因子の関与

我々は以前に、様々なウイルス蛋白質の共発現がM-VLPの形成・出芽に与える影響を検討し、ウイルス粒子の構成蛋白質ではないアクセサリ蛋白質の一つであるC蛋白質がM-VLPの出芽を促進する事を見いだした^{24, 31)}。Yeast two-hybrid screeningにより、C蛋白質の相互作用因子としてM蛋白質と同じAlix/AIP1を同定した²⁴⁾。M蛋白質の場合とは異なり、C蛋白質中にはAlix/AIP1との相互作用モチーフ配列は見いだされていないが、C末端の10アミノ酸程度の欠損で相互作用が失われた^{12, 24)}。またC蛋白質は、Alix/AIP1とM蛋白質とは異なる部位 (211 ~ 423

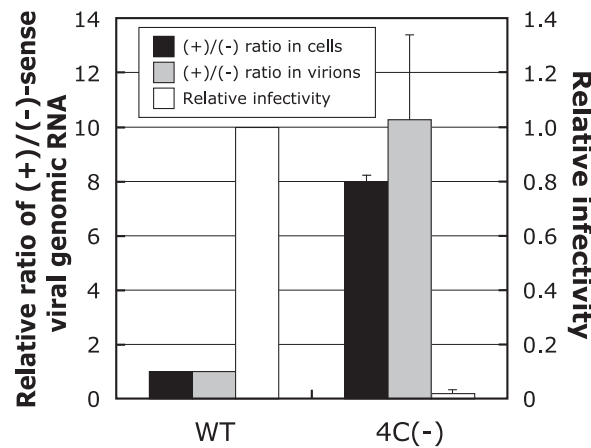


図4 C欠損組換え SeV の感染価の低下とゲノム長 RNA の極性変化

アミノ酸領域)で相互作用する¹³⁾。

SeV C 蛋白質は同一のフレーム上の異なる開始コドンから翻訳され、C 末端を同一とする 4 種類の蛋白質 (C', C, Y1, Y2) の総称であり、感染細胞内では通常 C 蛋白質がメジャーに発現する (図 1)¹⁶⁾。これらのうち Y1 及び Y2 蛋白質を細胞内で単独発現させると細胞質及び核に分布するのに対し、C' 及び C 蛋白質では主に原形質膜に局在が見られ、C 蛋白質の N 末端 23 アミノ酸領域が膜ターゲティングシグナル及び膜アンカーとして機能する^{12, 19)}。我々は、C 蛋白質の原形質膜局在に着目し、その M-VLP の出芽促進作用との関係を調べた¹²⁾。その結果、Alix/AIP1 との相互作用能を失った C 末端欠損 C 蛋白質変異体及び原形質膜局在を失った N 末端欠損 C 蛋白質 (Y1 蛋白質) では出芽促進作用が失われた。一方、Y1 蛋白質の C 末端に K-Ras 由来の膜ターゲティングシグナル配列を付加することにより、原形質膜局在が回復し、出芽促進能も回復した。また、通常細胞質に局在する Alix/AIP1 が、原形質膜局在能と Alix/AIP1 結合能の両方を持つ C 蛋白質との共発現では原形質膜で共局在するようになることから、C 蛋白質による M-VLP の出芽促進作用には、Alix/AIP1 が C 蛋白質によって原形質膜にリクルートされることが必要であると考えられる¹²⁾。

また上述のように、SeV M 蛋白質単独発現により形成される VLP の出芽は、ESCRT 経路に非依存的であり、DN-VPS4 の過剰発現の影響を受けないが、出芽促進能を持つ C 蛋白質との共発現では、M-VLP の出芽は DN-VPS4 の過剰発現によって抑制され、ESCRT 依存的になることを見いだした¹²⁾。

最近、PIV5 M 蛋白質が宿主の AmotL1 (angiomin-like 1) と相互作用することが yeast two-hybrid screening により明らかにされた²²⁾。AmotL1 は 2 つの PPxY モチーフを持ち、PPxY 型 L-ドメイン配列を持つウイルスと同様

に、これに結合する WW モチーフを持つ宿主蛋白質と相互作用すると考えられ、この相互作用と M-AmotL1 相互作用により、出芽に ESCRT 経路が利用できるようになると予想される²²⁾。AmotL1 は PIV5 M-VLP の出芽において、SeV M-VLP の出芽における C 蛋白質と類似の役割を果たしているのかもしれない。

以上の結果から推察される SeV の出芽モデルを図 3 に示した¹²⁾。SeV M 蛋白質は単独で原形質膜内表面に結合し、出芽部位で M-M 相互作用により凝集する (図 3, 経路 1)。C 蛋白質も自らの機能により原形質膜に結合する (図 3, 経路 4)。一部の C 蛋白質は Alix/AIP1 と相互作用し、これを原形質膜にリクルートする (図 3, 経路 3)。Alix/AIP1 は ESCRT 複合体の構成要素であるので、これも原形質膜へリクルートされ、出芽に利用されるようになり、出芽が促進される。M 蛋白質も一部が Alix/AIP1 と相互作用し、これを出芽部位にリクルートし、利用していると予想されるが (図 3, 経路 2)、M-Alix/AIP1 相互作用の機能的意義については、さらに今後の研究が必要である。

(4) C 蛋白質によるウイルス RNA 合成の極性制御とウイルス粒子産生の最適化

C 蛋白質が上記の機序により M-VLP の出芽を促進する事が明らかとなったが、4 種類の C 蛋白質のうち、C' 及び C の 2 種類または 4 種類全てを欠損した組換えウイルス (rSeV-C' / C (-) 及び 4C (-)) では、培養細胞への感染実験において、親ウイルス (rSeV-WT) と比べて感染性ウイルス粒子産生量は 1/100 以下に低下するものの、培養上清中に検出された粒子由来のウイルス蛋白質量は C' / C (-) では 1/10 程度の低下にとどまり、また 4C (-) ではむしろ若干増加する^{11, 15)}。この見た目のウイルス粒子産生量と実際の感染価の乖離について調べたところ、ウイルスゲノム RNA を内包するヌクレオカプシドの粒子内への取り込みの異常はみられず、産生されたウイルス粒子中に内包された

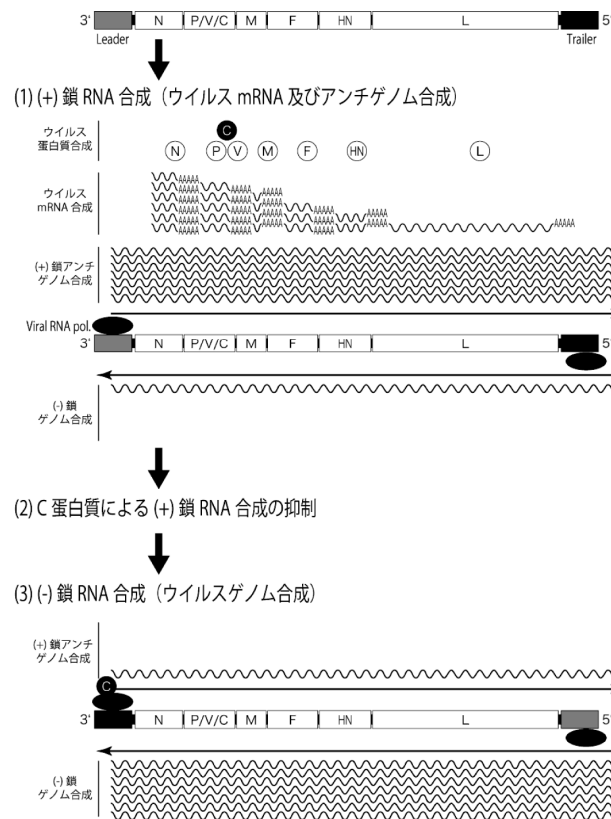


図5. 予想されるC蛋白質によるウイルスRNA合成の極性制御モデル

ゲノムRNAの極性の変化が原因であることが明らかとなった(図4)¹¹⁾。感染細胞内ではウイルスゲノムRNA複製の際に(-)鎖ゲノムRNA以外に、この鋳型となる(+)鎖アンチゲノムRNAが合成されるが、それぞれがほぼ等しい効率でウイルス粒子内に取り込まれ、(-)鎖ゲノムRNAを内包した感染性ウイルス粒子の他に(+)鎖アンチゲノムRNAを内包した非感染性ウイルス粒子も産生されることが知られている¹⁴⁾。ところが、WTウイルス感染細胞では(+)鎖及び(-)鎖のゲノム長RNAがおおよそ1:3~1:5の割合で検出され、おおよその割合を反映した(-)鎖及び(+)鎖ゲノム長RNAを内包したウイルス粒子が培養上清中に検出されるが、C'/C(-)及び4C(-)ウイルス感染では、WTに対して(+)/(-)ゲノム長RNA比が10倍程度増加しており、感染価の低下の原因となっていることが明らかとなった¹¹⁾。C蛋白質が(+)鎖アンチゲノムRNA及びウイルスmRNAの合成に関与するゲノムプロモーター依存的に抑制作用を示すことが1990年代前半にミニゲノムを用いて明らかにされているが³³⁾、このウイルスの複製サイクルにおける意義については長い間不明なままであった。しかし上記の結果から、C蛋白質が、(-)鎖ウイルスゲノムRNAを持った感染性ウイルス粒子の産生効率

を最大にするために、ウイルスRNA合成の極性を制御していることが明らかとなった¹¹⁾。

これまでの結果から推察されるC蛋白質によるウイルスゲノムRNA合成の極性制御モデルを図5に示した。感染初期のC蛋白質が十分に合成されていない段階では、アンチゲノムプロモーターに対してゲノムプロモーターの活性が相対的に強いため、(+)鎖アンチゲノムRNA合成及びウイルスmRNA合成が進み、ウイルス蛋白質が蓄積する。しかしC蛋白質が増加すると、これがゲノムプロモーターからのRNA合成を抑制し、相対的にアンチプロモーターの活性が強くなることで(-)鎖ゲノムRNA合成が進み、最終的に(+)鎖アンチゲノムRNA量を上回ると考えられる。

全ての(-)鎖RNAウイルスの複製において、(-)及び(+)鎖RNA合成の極性制御の必要性は明らかであるが、その機構については、ゲノムプロモーター及びアンチゲノムプロモーターの活性の違いを原因とする以外の可能性はほとんど報告されていなかった。上記の結果は、ウイルスRNA合成の極性制御機構について新しい可能性を提示するものであり、今後そのメカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

4. おわりに

SeVの粒子形成・出芽に焦点を当てたこれまでの研究から、その仕組みについて幾つかの答えを得ることができた。しかし、粒子形成・出芽の段階だけを見ても、未だに多くの問題が未解決のまま残されている。例えば、ウイルスの出芽においてM蛋白質やC蛋白質だけでなく、様々なウイルス蛋白質の関与が報告されているが^{5, 18, 23, 26, 27)}、これらが相互にどのように機能しているのかはほとんど明らかにされていない。また、粒子形成・出芽におけるアクチンなどの細胞骨格の関与が古くから示唆されており²⁸⁾、出芽がアクチンの重合・脱重合阻害剤などの処理によって抑制されること^{2, 29)}、M蛋白質などのウイルス蛋白質がアクチンと相互作用すること⁸⁾、M蛋白質のアクチン相互作用部位に変異を導入すると出芽効率が減少すること³²⁾などが報告されている。また、多くのウイルスでアクチンが粒子中に取り込まれることが知られている。しかし、これらは現象論にとどまり、細胞骨格系の関与するメカニズムを具体的に示すには至っていない。さらに、様々なウイルス蛋白質がどの様にして効率良く出芽部位に集合し、ウイルス粒子が構築されるのかについても多くの事が未解明のままである。これらの問題を含め、効率良く子孫ウイルスを増やすためのウイルスの戦略について明らかにしていきたい。

謝 辞

エンベロープウイルスの出芽に関する研究は、2003年から米国ペンシルバニア大学にてDr. Ronald N. Harty研究室在籍中に開始し、広島大学大学院医歯薬学総合研究科で継続して行ってきたものであり、国内外を問わず多くの方々の御支援、御指導頂きましたことに深く感謝申し上げます。特に本稿で紹介したセンダイウイルスに関する研究は、2005年より広島大学大学院医歯薬学総合研究科において行ったものであり、ご指導頂いた吉田哲也教授、ご指導ならびに杉浦奨励賞にご推挙頂きました坂口剛正教授に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Bruce E. A., Digard P. and Stuart A. D.: The Rab11 pathway is required for influenza A viral budding and filament formation. *J Virol*: 2010.
- 2) Burke E., Dupuy L., Wall C. and Barik S.: Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* 252: 137-148, 1998.
- 3) Cathomen T., Mrkic B., Spehner D., Drillien R., Naef R., Pavlovic J., Aguzzi A., Billeter M. A. and Cattaneo R.: A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* 17: 3899-3908, 1998.
- 4) Chen B. J. and Lamb R. A.: Mechanisms for enveloped

virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372: 221-232, 2008.

- 5) Chen B. J., Leser G. P., Morita E. and Lamb R. A.: Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 81: 7111-7123, 2007.
- 6) Ciancanelli M. J. and Basler C. F.: Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol* 80: 12070-12078, 2006.
- 7) Coronel E. C., Murti K. G., Takimoto T. and Portner A.: Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. *J Virol* 73: 7035-7038, 1999.
- 8) Giuffre R. M., Tovell D. R., Kay C. M. and Tyrrell D. L.: Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *J Virol* 42: 963-968, 1982.
- 9) Inoue M., Tokusumi Y., Ban H., Kanaya T., Shirakura M., Tokusumi T., Hirata T., Nagai Y., Iida A. and Hasegawa M.: A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *J Virol* 77: 6419-6429, 2003.
- 10) Irie T., Licata J. M., McGettigan J. P., Schnell M. J. and Harty R. N.: Budding of PPxY-containing rhabdoviruses is not dependent on host proteins TGS101 and VPS4A. *J Virol* 78: 2657-2665, 2004.
- 11) Irie T., Nagata N., Yoshida T. and Sakaguchi T.: Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. *Virology* 374: 495-505, 2008.
- 12) Irie T., Nagata N., Yoshida T. and Sakaguchi T.: Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. *Virology* 371: 108-120, 2008.
- 13) Irie T., Shimazu Y., Yoshida T. and Sakaguchi T.: The YLDL sequence within Sendai virus M protein is critical for budding of virus-like particles and interacts with Alix/AIP1 independently of C protein. *J Virol* 81: 2263-2273, 2007.
- 14) Kolakofsky D. and Bruschi A.: Antigenomes in Sendai virions and Sendai virus-infected cells. *Virology* 66: 185-191, 1975.
- 15) Kurotani A., Kiyotani K., Kato A., Shioda T., Sakai Y., Mizumoto K., Yoshida T. and Nagai Y.: Sendai virus C proteins are categorically nonessential gene products but silencing their expression severely impairs viral replication and pathogenesis. *Genes Cells* 3: 111-124, 1998.
- 16) Lamb R. A. and Parks G. D.: *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins. Number of 2006.
- 17) Li M., Schmitt P. T., Li Z., McCrory T. S., He B. and Schmitt A. P.: Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of

- virus-like particles. *J Virol* 83: 7261-7272, 2009.
- 18) Licata J. M., Johnson R. F., Han Z. and Harty R. N.: Contribution of Ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J Virol* 78: 7344-7351, 2004.
 - 19) Marq J. B., Brini A., Kolakofsky D. and Garcin D.: Targeting of the Sendai virus C protein to the plasma membrane via a peptide-only membrane anchor. *J Virol* 81: 3187-3197, 2007.
 - 20) Pantua H. D., McGinnes L. W., Peeples M. E. and Morrison T. G.: Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *J Virol* 80: 11062-11073, 2006.
 - 21) Patch J. R., Crameri G., Wang L. F., Eaton B. T. and Broder C. C.: Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virol J* 4: 1, 2007.
 - 22) Pei Z., Bai Y. and Schmitt A. P.: PIV5 M protein interaction with host protein angiogenin-like 1. *Virology* 397: 155-166, 2010.
 - 23) Robison C. S. and Whitt M. A.: The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol* 74: 2239-2246, 2000.
 - 24) Sakaguchi T., Kato A., Sugahara F., Shimazu Y., Inoue M., Kiyotani K., Nagai Y. and Yoshida T.: AIP1/Alix is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. *J Virol* 79: 8933-8941, 2005.
 - 25) Schmitt A. P., Leser G. P., Morita E., Sundquist W. I. and Lamb R. A.: Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol* 79: 2988-2997, 2005.
 - 26) Schmitt A. P., Leser G. P., Waning D. L. and Lamb R. A.: Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles. *J Virol* 76: 3952-3964, 2002.
 - 27) Schnell M. J., Buonocore L., Boritz E., Ghosh H. P., Chernish R. and Rose J. K.: Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *EMBO J* 17: 1289-1296, 1998.
 - 28) Simons K. and Garoff H.: The budding mechanisms of enveloped animal viruses. *J Gen Virol* 50: 1-21, 1980.
 - 29) Stallcup K. C., Raine C. S. and Fields B. N.: Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology* 124: 59-74, 1983.
 - 30) Strack B., Calistri A., Craig S., Popova E. and Gattlinger H. G.: AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114: 689-699, 2003.
 - 31) Sugahara F., Uchiyama T., Watanabe H., Shimazu Y., Kuwayama M., Fujii Y., Kiyotani K., Adachi A., Kohno N., Yoshida T. and Sakaguchi T.: Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology* 325: 1-10, 2004.
 - 32) Takimoto T., Murti K. G., Bousse T., Scroggs R. A. and Portner A.: Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *J Virol* 75: 11384-11391, 2001.
 - 33) Tapparel C., Hausmann S., Pelet T., Curran J., Kolakofsky D. and Roux L.: Inhibition of Sendai virus genome replication due to promoter-increased selectivity: a possible role for the accessory C proteins. *J Virol* 71: 9588-9599, 1997.
 - 34) Utley T. J., Ducharme N. A., Varthakavi V., Shepherd B. E., Santangelo P. J., Lindquist M. E., Goldenring J. R. and Crowe J. E., Jr.: Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10209-10214, 2008.

Envelope virus assembly and budding

Takashi IRIE

Department of Virology, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, Japan
E-mail: tirie@hiroshima-u.ac.jp

For many enveloped viruses, viral matrix and retroviral Gag proteins are able to bud from the cell surface by themselves in the form of lipid-enveloped, virus-like particles (VLPs), suggesting that these proteins play important roles in viral assembly and budding. The major three-types of L-domain motifs, PPxY, P(T/S)AT, and YP(x)_nL have been identified within these proteins. Many viruses have been shown to commonly utilize cellular ESCRT pathway via direct interaction between the L-domains and the components of the pathway for efficient viral budding. However, for many enveloped viruses, L-domain motifs have not yet been identified, and the involvement of the ESCRT pathway in virus budding is still unknown. Among such viruses, we have been focusing on Sendai virus (SeV) and shown that (i) SeV M functionally and physically interact with a component of the ESCRT complex, Alix/AIP1, although budding of M-VLPs does not seem to be dependent on the pathway; (ii) one of the accessory proteins of SeV, C, also interact with Alix/AIP1, and recruit it to the plasma membrane for efficient budding of M-VLPs; (iii) the C protein regulate balance of viral genome and antigenome RNA synthesis for optimized production of infectious virus particles. These results demonstrate a unique mechanism for budding of SeV as well as a novel mechanism of regulated synthesis of viral genome RNAs for efficient production of infectious particles.

