

# 1. ピコルナウイルスの感染初期過程

小池 智

東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト

ピコルナウイルス科はヒトや動物に種々の感染症を引き起こすウイルスの大きな科であり、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus: FMDV) など重要なウイルスを含んでいる。感染の初期過程はそれぞれのウイルスに固有の宿主域や標的組織を決定するために重要な役割を果たしている。本稿においてはこれまでのピコルナウイルスの受容体、細胞内への侵入過程、脱殻過程などについて明らかになってきていることをまとめて解説する。

## はじめに

ピコルナウイルスは直径約 30nm の大きさで envelope を持たない。現在ピコルナウイルス科はエンテロウイルス属、ヘパトウイルス属、パレコウイルス属、コブウイルス属、カルディオウイルス属、アフトウイルス属、エルボウイルス属、テシオウイルス属、アビヘパトウイルス属、サペロウイルス属、セネカウイルス属、トレモウイルス属の 12 属に分類されている。基本的構造として VP1-4 のカプシドタンパクが各々 60 個ずつ集合し、その中に 7-8.8Kb の 1 本のプラス鎖 RNA ゲノムが入りウイルス粒子を形成している<sup>66)</sup>。ウイルスはそれぞれ固有の宿主域や標的組織を持っているが、これらの特異性をまず第一に左右するのは細胞への感染初期過程である。ウイルスの感染成立には、細胞内にウイルスゲノム RNA を到達させる必要がある。したがって標的細胞へ結合すること、細胞内へ侵入すること、ウイルス粒子と宿主の膜を越えてゲノム RNA を細胞質内への放出すること (脱殻) などの過程を経なければならない。これらの過程はウイルスごとに多種多様な様式をとっていて、同じピコルナウイルスとしてひとくくり

にすることができない<sup>3, 39, 75)</sup>。初めに図 1 に示した基本的な解決すべき点の概略を述べ、次に個々のウイルスについて各論を述べる。

## 概論

ウイルスと受容体との結合にはウイルスの粒子構造が大きく影響している。ピコルナウイルスの粒子は外側に VP1, VP2, VP3 が位置していて、カプシドタンパク 1 コピーずつが結合した最小ユニットはプロトマーと呼ばれている。プロトマーが 5 つ集合したものがペンタマー、ペンタマーが 12 個集合すると正二十面体構造ができる。X 線結晶構造解析によればエンテロウイルス属 (ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、ライノウイルスなど) においては粒子表面の凹凸が深く 5 回対称軸の周りにキャニオンと呼ばれる深くぼみが存在していて、受容体との結合部位になっている<sup>29, 67)</sup>。カルディオウイルス属ではこれに相当するくぼみは浅くピットと呼ばれている<sup>43-45)</sup>。一方 FMDV ではウイルス粒子の表面は比較的平坦になっているが<sup>1, 42)</sup>、ウイルス表面に飛び出したループ部分で受容体との結合を行っている。すなわちこれらの形状はそれぞれ受容体との結合に適応した形状に進化してきたと考えられる。

多くのピコルナウイルスの宿主域は狭く感染は種特異的である。これは受容体タンパクとの特異的な結合が必要であるために宿主域が狭くなっている場合が多い。ただし FMDV は例外的に宿主域が広い。1990 年頃から次々とピコルナウイルスの受容体が同定されているが、これまでに同定されているものを表 1 にまとめた。多数の受容体が同定された結果、受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するもの、インテグリンファミリーに属するもの、

## 連絡先

〒 156-8506

東京都世田谷区上北沢 2 丁目 1 番 6 号

(財) 東京都医学総合研究所ゲノム医科学研究分野ウイルス感染プロジェクト

TEL: 03-5316-3312

FAX: 03-5316-3224

E-mail: koike-st@igakuken.or.jp

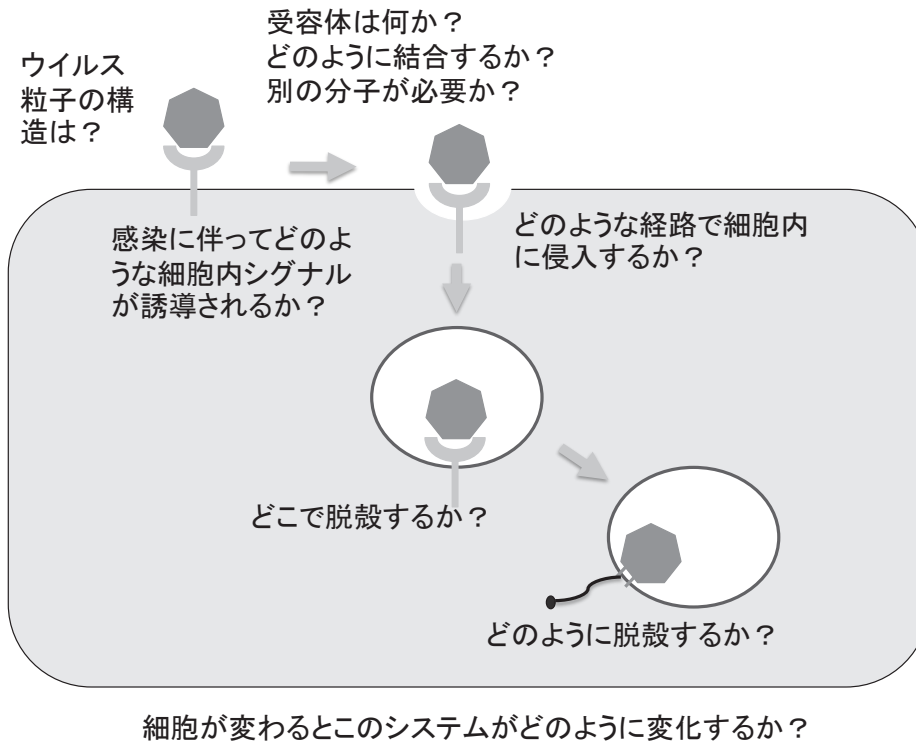


図1 ピコルナウイルス感染初期過程の問題点

表1

ウイルス属	ウイルス	ウイルスレセプター
アフトウイルス	FMDV	heparan sulfate $\alpha v \beta 1, \alpha v \beta 3, \alpha v \beta 6, \alpha v \beta 8, \alpha 5 \beta 1$ integrin
カルジオウイルス	EMCV	VCAM-1
エンテロウイルス	PV1-3	CD155/PVR
	CVA9	$\alpha v \beta 3$ integrin
	CVA13, 17, 18, 20, 21, 24	intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
	CVB1-6	Coxsackie-adenovirus receptor (CAR)
	ECHO1	$\alpha 2 \beta 1$ integrin
	EV70	Decay-acceralating facgtor (DAF)
	EV71	Scavenger receptor B2 (SCARB2), P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)
	HRV major group	intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
HRV minor group	Low density lipoprotein receptor (LDLR) family	
ヘパトウイルス	HAV	HAV cellular receptor -1 (HAVcr-1)
パレコウイルス	HPeV 1	$\alpha v \beta 3$ integrin

Low density lipoprotein (LDL) 受容体ファミリーに属するもの、Decay accelerating factor (DAF), その他などに大別することができる。まだ未同定のウイルス受容体も存在している。また感染には複数の分子を同時に使って感染しているウイルスや、複数の別の受容体経路から感染しうるウイルスも存在する。したがって受容体の同定は相変わらず重

要な課題である。

また利用する受容体によって細胞内への侵入経路が決定される。clathrin や caveolin 依存的あるいは非依存的に侵入が起こる。エンドサイトーシスの経路の探索は主として共焦点レーザー顕微鏡などを用いてウイルス（あるいは受容体）と特定の分子の共局在の観察, dominant negative

表 2

ウイルス属	ウイルス	ウイルス粒子上の受容体結合部位	受容体	細胞種	エンドサイトーシス経路	構造変化開始の原動力	脱殻過程
エンテロ	ポリオウイルス	キャニオン	PVR (CD155)	非極性細胞	clathrin, caveolin 非依存的	PVR	A-particle→empty capsid
				極性細胞	caveolin 依存的	PVR	
	CVB	キャニオン	CAR	非極性細胞	clathrin, caveolin 非依存的	CAR	A-particle→empty capsid
				極性細胞	caveolin 依存的	CAR	
	HRV major group	キャニオン	ICAM-1		clathrin, caveolin 非依存的	ICAM-1 (+ low pH)	A-particle→empty capsid
	HRV minor group	キャニオン以外	LDLR		clathrin 依存的	low pH	empty capsid
	EV71	?	SCARB2		clathrin 依存的	?	?
		?	PSGL-1		?	?	?
アフト	FMDV	RGD配列	integrin		clathrin 依存的	low pH	12S pentamer
		RGD配列以外	heparn sulfate		caveolin 依存的	low pH	

mutant による阻害効果, si RNA による阻害効果, 薬剤による阻害効果などを調べて総合的に判断されるようになってきた。また受容体分子は本来の生理的役割も持っていることから、本来のリガンドの結合のようにウイルスの結合によっても細胞内での様々なシグナル伝達が起こる。受容体の侵入過程は生体のシステムを借用するので、このような生理的シグナルの解明も重要であることが示されてきている。

ウイルスの感染成立にはゲノム RNA のウイルス粒子からの放出が必須であるが、これはウイルス粒子の分解過程でもあるため、ウイルス粒子の物理化学的安定性と感染成立過程は密接な関連がある。エンテロウイルスは受容体との結合がウイルスゲノム放出に繋がる構造変化の引き金となるが、酸性条件に弱いライノウイルスや FMDV では pH の低下が引き金となっている。どの程度の pH によって構造変化が起こるかによって脱殻が起こる場所も決まってくる。

ウイルス粒子そのものの構造は 1980 年代中盤から行われてきたが、近年はウイルスと受容体の複合体をクライオ電顕などの技術により詳細に解析することが可能となってきた。さらに脱殻過程の中間産物の構造解析も行われ始め、素過程が分子レベルで明確になりつつある。ピコルナウイルスは PFU : particle の比率が 1:100 から 1:1,000 程度であるため、感染に結びつく過程と感染に至らない過程を見極めることが難しかったが、徐々にその実態が明らかにされてきた。上記の着目点に絞り、研究の進んでいる個々のウイルスについて代表的なものをウイルス別に解説する。

## ポリオウイルス

ポリオウイルスはポリオウイルスレセプター (PVR)・CD155 を介して感染する<sup>36, 51)</sup>。PVR は細胞外に 3 つの免疫グロブリン様ドメインを持つ膜タンパクである。ウイルスとの相互作用に必要なドメインは N 末端に位置するドメインである<sup>37, 68)</sup>。さらにウイルスと受容体の相互作用はクライオ電顕や X 線結晶構造解析により詳細に解析されている<sup>2, 13, 25, 80)</sup>。PVR の N 末端側の免疫グロブリン様ドメインはウイルスのキャニオンの中に結合し、複数の部分でコンタクトしていることが判明している。キャニオンの大きさと免疫グロブリン様ドメインの大きさがほぼ一致していることから、ウイルスの進化の過程でキャニオンの形状の変化と共に同一の遺伝子ファミリーに属する一連の受容体に適合しながら進化してきたことを伺わせる。

かつては培養細胞においてポリオウイルスは clathrin 依存的にエンドサイトーシスされ、エンドソーム内の pH 低下によって脱殻が起こるとされてきたが<sup>46, 47, 79)</sup>、PVR の発見により脱殻は中性 pH 領域で PVR によって開始されることが判明した<sup>20, 34)</sup>。試験管内で細胞の膜分画もしくは精製した可溶性 PVR とウイルス粒子を混合することによりウイルス粒子からゲノム RNA の放出が起こる<sup>22)</sup>。この過程はショ糖密度勾配遠心による沈降定数の変化やカプシドタンパクの構成などにより検出することができる。native virion (沈降定数 160S, (VP1+VP2+VP3+VP4)x60 + ゲノム RNA) は構造変化を引き起こし、VP4 を欠いた altered particle (A-particle) (沈降定数 135S, (VP1+VP2+

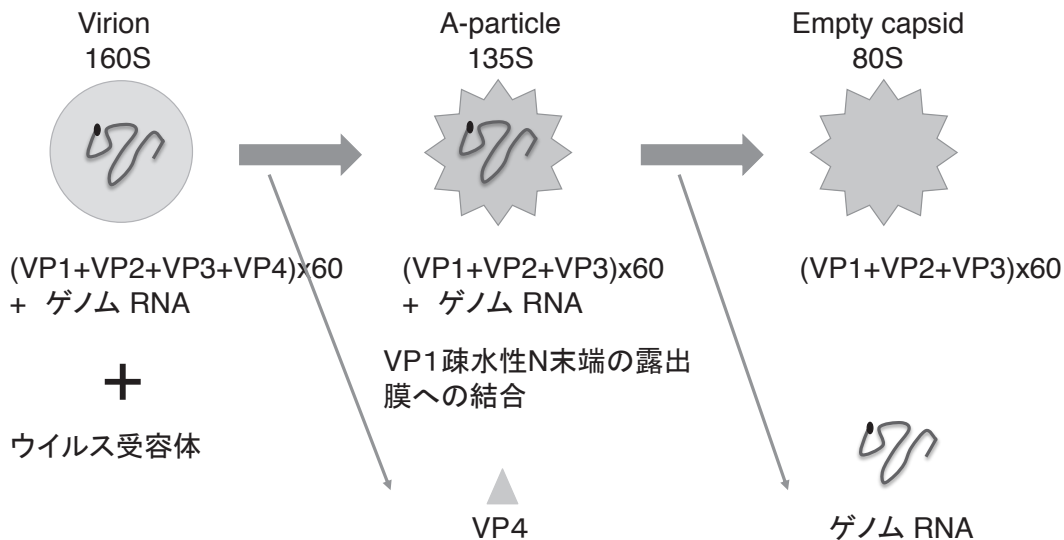


図2 エンテロウイルス粒子の脱殻過程

VP3)  $\times 60$  + ゲノム RNA) となる。VP4 は通常ウイルス粒子の内側に存在している分子であるため、大規模な構造変化である。A-particle ではその他のカプシドタンパクの構造も変化しており、特に VP1 の N 末端にある疎水性の高い領域が粒子表面へと露出する点が重要である<sup>22)</sup>。試験管内では次に empty capsid (沈降定数 80S,  $(VP1+VP2+VP3) \times 60$ ) ができ、ウイルスゲノムが放出される。膜の存在下で構造変化が起こる場合では、A-particle の 5 回対称軸の一つが膜方向に垂直な方向を向き、周囲にある VP1 の N 末端の疎水性ドメインが細胞膜に刺さる。カプシドタンパクは中から出てきた VP4 と共に RNA を放出する穴を形成し RNA が細胞質側へ抜け脱殻が完了する<sup>12, 13, 19)</sup> (図 2)。Hogle らグループはクライオ電顕で 135S ならびに 80S 粒子の構造を解析し、2 回対称軸付近にゲノム RNA が通過する穴が形成されるというモデルを提出している<sup>7, 40, 41)</sup>。

この脱殻反応は中性 pH 領域で起こるのでエンドサイトーシスを必要とせず細胞膜上で起こると考えられていたが、最近の研究によりエンドサイトーシス後に起こり、どこで起こるかは細胞の種類によって異なっていることが明らかにされた。Brandenburg らはウイルスのカプシドタンパクとゲノム RNA を異なった蛍光色素で標識し、両者の標識が分離することなどを指標にしてどのような経路で侵入しいつどこで脱殻反応が起こるかを HeLa (S3), HEK 293, SH-SY5Y 細胞を用いて調べた<sup>10)</sup>。その結果、脱殻は侵入開始後 20 分以内に細胞膜から 100–200 nm の距離において起こっていることが示された。さらに sodium azide と 2-deoxyglucose を用いて ATP を欠乏させると RNA 放出は起こらないこと、cytochalasin D によって actin の脱重合を起こすと侵入は起こらないこと、clathrin

heavy chain, AP2 complex  $\mu 1$  subunit, filipin のノックダウンにより感染は影響を受けないこと、microtubule 依存性の輸送を阻害する nocodazole 処理では RNA 放出は影響を受けないことなどを示し、この過程は ATP と actin に依存するが、clathrin, caveolin, flotillin, microtubule のいずれにも依存しない経路であることを明らかにした。

一方 Coyne らは極性細胞である human brain microvascular cells (HBMEC) を用いてポリオウイルスの感染を調べた。それによればポリオウイルスは dynamin 依存性の caveolin 経路でエンドサイトーシスされる。ウイルスとの相互作用により PVR の細胞質ドメインのリン酸化が起こり、チロシン脱リン酸化酵素である SHP-2 の活性化が起こる。そこからの過程はまだ不明であるが結果的に actin, dynamin, caveolin 依存的なエンドサイトーシスが引き起こされる。HBMEC へのポリオウイルス感染場合は脱殻反応までに要する時間が 2.5 時間と HeLa 細胞の感染などに比較して長いことが特徴である<sup>17)</sup>。

Ohka らによる *in vivo* の解析では、ポリオウイルスは神経・筋接合部において PVR を含むシナプス小胞に取り込まれ、小胞のまま神経細胞の細胞体まで軸索を輸送される<sup>60–62)</sup>。この間ウイルス粒子は PVR と結合したまま逆行輸送されるが、輸送中は脱殻反応を起こすことなく 160S 粒子のまま細胞体まで輸送され、そこで脱殻が起こっている。これらの実験結果は、ウイルス感染はウイルス受容体との結合の後にも受容体から生じるシグナル等に依存して次のステップへと進み最終的な脱殻反応にまで至ることを示しているが、細胞の種類等が異なると感染の様式も異なることを示している。ポリオウイルスの脱殻開始のタイミングを決定する機構は不明である。

### コクサッキーウイルス B 群 (CVB)

CVB の受容体としては Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) が同定されている<sup>4, 15, 74</sup>。CAR は免疫グロブリン様ドメインを 2 つ持つ膜タンパクである。ウイルスの結合に関わるのは N 末端側のドメインである<sup>26</sup>。CAR は CVB と結合してポリオウイルス同様ウイルスの脱殻反応を開始することができる<sup>52</sup>。CAR は細胞間接着に関与しており、極性をもった上皮細胞ではタイトジャンクションに存在している。また CVB 受容体として DAF も同定されている<sup>5, 69</sup>。DAF は補体系の制御に関わっており、short consensus repeat (SCR) の 4 回繰り返しが存在し、GPI-anchor で膜上に発現している。主に SCR2, SCR3, SCR4 が CVB の 2 回対称軸付近に結合する。DAF はすべての CVB 株と結合できる訳ではなく、結合する株としない株が存在する。DAF と結合する株においても CAR が存在しないとウイルスの感染は成立しない<sup>70</sup>。

極性のない HeLa 細胞においては DAF に結合する株も結合しない株も CVB は CAR と共にエンドサイトーシスされた。感染は dynamin 依存的であり、clathrin, caveolin やエンドソームの酸性化は必要とされなかった<sup>64</sup>。

しかし、極性細胞 Caco-2 への CVB 感染では DAF が重要な働きをしている事が示されている。CAR は極性細胞においてはタイトジャンクション内に存在しているので、細胞表面でウイルスと接触することができない。一方 DAF は apical 面にいるのでウイルスを捕捉することができる<sup>71</sup>。CVB の結合により DAF のクロスリンクが起こり c-Abl の活性化、続いて Rac の活性化が起こる。これにより細胞骨格の再編成が起こってウイルスは apical 面からタイトジャンクションへと輸送される。同時に c-Fyn の活性化、続いて caveolin-1 のリン酸化が起こる。その結果ウイルスは caveolin 依存的にエンドサイトーシスされる<sup>16</sup>。また CVB 感染によりタイトジャンクションに存在している occludin のリン酸化が起こりエンドサイトーシスされる。occludin を欠損させると CVB のエンドサイトーシスも阻害される<sup>18</sup>。詳細なメカニズムはさらなる解析が必要であるが、これらの感染には様々な分子が関わりウイルスの取り込みが起こっていることが考えられる。

### ヒトライノウイルス (Human Rhinovirus HRV)

100 以上の血清型を持つ HRV は現在 A, B, C の 3 つの species に分類されている。species C の受容体は不明であるが、A と B に属するものの約 90 の serotype は Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) を受容体として利用しており<sup>24, 72, 73</sup>、残りが LDL 受容体や VLDL 受容体を利用している<sup>27, 28, 48</sup>。一部 heparan sulfate を受容体とできるものもある。

Major group の受容体である ICAM-1 は 5 つの免疫グロ

ブリン様ドメインを持ち N 末端側のドメインがウイルスのアニオンと結合する<sup>38, 63</sup>。ICAM-1 は他に CVA21 など受容体として利用している<sup>54, 76</sup>。HVR14 は ICAM-1 との相互作用により中性 pH で A-particle ができるが、HRV16 は ICAM-1 との結合だけでは A-particle 形成には至らない<sup>30</sup>。しかし ICAM-1 の存在下で弱酸性 (pH 5.5-6.0) にすると脱殻が起こることが示された<sup>57</sup>。したがって major group HRV は ICAM-1 単独もしくはそれに加えて酸性条件で脱殻反応を起こす。RD 細胞において HRV14 が ICAM-1 と共に clathrin, caveolin, flotillin 非依存的に侵入することが示されている<sup>35</sup>。

一方 minor group HRV は LDL 受容体ファミリー分子とアニオンではなく 5 回対称軸の上にある突起において結合する。LDL 受容体、VLDL 受容体は結合してもウイルスの構造変化を引き起こすことはできず、ウイルス粒子は clathrin 依存的に感染開始後 10 分程度でエンドサイトーシスされ、後期エンドソームの酸性条件化 (pH<5.6) で 80S empty capsid ができて脱殻が起こる<sup>8, 9, 65</sup>。

### FMDV

FMDV は主に integrin を受容体とする。インテグリンは  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロダイマーで構成され、細胞や細胞外基質と相互作用する受容体として機能している。現在 19 種の  $\alpha$  鎖と 8 種の  $\beta$  鎖が同定されており、その組み合わせで多種のインテグリンファミリーを形成する。FMDV のウイルス粒子表面は比較的平坦でエンテロウイルスのようなアニオンは存在しない。しかしインテグリンは VP1 内に存在する Arg-Gly-Asn というアミノ酸配列 (RGD 配列) を認識する<sup>49, 50</sup>。FMDV の VP1 上でウイルス粒子の外側に露出している GH ループで広くこの配列が保存されている<sup>14</sup>。 $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$  インテグリンを発現させた培養細胞で serotype O, A のウイルスの感受性が確認されている<sup>21</sup>。ウシ個体においては  $\alpha v \beta 6$  インテグリンが病変を生じる上皮細胞で常に発現が見られ、病変の生じない部位には発現がないことが確かめられ、個体感染では重要な役割を果たしているのではないかと考えられている<sup>53</sup>。

また heparan sulfate はインテグリンとは別の受容体として報告されている<sup>32</sup>。heparan sulfate 結合部位はインテグリン結合部位とは異なっている<sup>23</sup>。RGD 配列に変異がある変異株もインテグリン経路非依存的に感染することができる。しかし heparan sulfate に結合するように馴化した株はウシにおいて病原性が高くはないとされている。

FMDV は受容体との結合では脱殻を開始せず、侵入後速やかに pH6.5 において A-particle や empty capsid を経ずに 12S ペンタマーへと分解する<sup>11</sup>。インテグリンと結合したウイルスは clathrin 依存的にエンドサイトーシスされ<sup>6, 33, 59</sup>、heparan sulfate と結合したウイルスは caveolae

に入りエンドサイトーシスすることが知られている<sup>58)</sup>。

### EV71

EV71は手足口病を引き起こす代表的なウイルスであるが、近年アジアにおいて稀に重篤な中枢神経系合併症を引き起こし、乳幼児の死亡例が報告されている。ヒトRD細胞はEV71に関する感受性が高いが、マウスL細胞は殆ど感受性がないことを利用し、Scavenger receptor B2 (SCARB2)がL細胞にウイルス感受性を与える分子であることを同定した<sup>78)</sup>。SCARB2はIII型膜タンパク質であり、CD36ファミリーに属する。通常lysosomeに多く局在しているが、形質膜との間を行き来しているため、細胞表面でウイルスと結合していると考えられる。これまでのピコルナウイルス受容体としてこのファミリーに属する分子は同定されていない。SCARB2は全てのEV71株ならびにCVA7, CVA14, CVA16の受容体としても機能している。受容体タンパクでウイルスとの結合に重要な領域は第4エクソンにコードされる63アミノ酸の領域であることが明らかにされている<sup>77)</sup>。RD細胞を用いてsiRNAライブラリーにより感染を阻害する分子のスクリーニングが行われた。その結果clathrin-mediated endocytosisに関与する分子群AP2A1, ARRB1, CLTC, CLTCL1, SYNJ1, ARPC5, PAK1, ROCK1, WASF1のノックダウンにより感染が阻害されることが明らかになった<sup>31)</sup>。

Nishimuraらはパニング法によりEV71ウイルス粒子と強く結合するタンパクとしてP-selectin ligand glycoprotein-1 (PSGL-1)を同定した<sup>55)</sup>。PSGL-1はムチン様タンパクで、白血球で発現しており、P-selectinのリガンドである。PSGL-1は全てのEV71とは結合できず一部の株とのみ結合可能である。また感染効率はSCARB2を介する感染と比較すると低い。N末端付近のチロシン残基の硫酸化がウイルスとの結合に重要であることが示されている<sup>56)</sup>。

### 終わりに

近年の分子同定の技術によりウイルス受容体がここ20年間で次々と同定された。以前は単純な電子顕微鏡での観察などから感染初期過程が論じられていたが、ウイルスのPFU/particleの比率が大きいため、正しい現象の把握に至らなかった。現在では共焦点レーザー顕微鏡技術やX線結晶構造解析、クライオ電顕技術が向上したため、だんだん物として見えるようになってきている。また侵入に関わる宿主分子もノックダウン技術が確立し、ゲノム全体に対してスクリーニングすることができるようになったため、副作用の大きい薬剤による評価だけに頼らず結論を下せるようになってきた。これらの技術的進歩で感染初期過程の解明は大きく進歩し、いくつかの疑問点は解決した。しかし、細胞の種類などが変わると結果も大きく変わることも明らかになってきているので、これが一般論であると

結論できない。これまで理解できたことは多くは培養細胞系を基本とした「箱庭」の理解であるかも知れない。さらに生体内で起こる感染現象を対象として詳細なメカニズムを解明するには至っていない。しかし、今後も次々と技術革新がなされ困難な*in vivo*条件での種々の測定が可能となり、感染現象が深く理解されることを期待している。

### 参考文献

- 1) Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, and F. Brown. 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337:709-16.
- 2) Belnap, D. M., B. M. McDermott, Jr., D. J. Filman, N. Cheng, B. L. Trus, H. J. Zuccola, V. R. Racaniello, J. M. Hogle, and A. C. Steven. 2000. Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:73-8.
- 3) Bergelson, J. M. 2010. Receptors, p. 73-86. *In* E. Ehrenfeld, E. Domingo, and R. P. Roos (ed.), *The Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC.
- 4) Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-3.
- 5) Bergelson, J. M., J. G. Mohanty, R. L. Crowell, N. F. St John, D. M. Lublin, and R. W. Finberg. 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 69:1903-6.
- 6) Berryman, S., S. Clark, P. Monaghan, and T. Jackson. 2005. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79:8519-34.
- 7) Bostina, M., H. Levy, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 2011. Poliovirus RNA is released from the capsid near a twofold symmetry axis. *J Virol* 85:776-83.
- 8) Brabec, M., G. Baravalle, D. Blaas, and R. Fuchs. 2003. Conformational changes, plasma membrane penetration, and infection by human rhinovirus type 2: role of receptors and low pH. *J Virol* 77:5370-7.
- 9) Brabec-Zaruba, M., B. Pfanzagl, D. Blaas, and R. Fuchs. 2009. Site of human rhinovirus RNA uncoating revealed by fluorescent *in situ* hybridization. *J Virol* 83:3770-7.
- 10) Brandenburg, B., L. Y. Lee, M. Lakadamyali, M. J. Rust, X. Zhuang, and J. M. Hogle. 2007. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol* 5:e183.
- 11) Brown, F., and B. Cartwright. 1961. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. *Nature* 192:1163-4.
- 12) Bubeck, D., D. J. Filman, N. Cheng, A. C. Steven, J. M. Hogle, and D. M. Belnap. 2005. The structure of the poliovirus 135S cell entry intermediate at 10-angstrom resolution reveals the location of an externalized polypeptide that binds to membranes. *J Virol* 79:7745-55.
- 13) Bubeck, D., D. J. Filman, and J. M. Hogle. 2005. Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus-re-

- ceptor-membrane complex. *Nat Struct Mol Biol* 12:615-8.
- 14) Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish, and D. L. Rock. 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79:6487-504.
  - 15) Carson, S. D., N. N. Chapman, and S. M. Tracy. 1997. Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 233:325-8.
  - 16) Coyne, C. B., and J. M. Bergelson. 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124:119-31.
  - 17) Coyne, C. B., K. S. Kim, and J. M. Bergelson. 2007. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *Embo J* 26:4016-28.
  - 18) Coyne, C. B., L. Shen, J. R. Turner, and J. M. Bergelson. 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* 2:181-92.
  - 19) Danthi, P., M. Tosteson, Q. H. Li, and M. Chow. 2003. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol* 77:5266-74.
  - 20) De Sena, J., and B. Mandel. 1977. Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology* 78:554-66.
  - 21) Duque, H., and B. Baxt. 2003. Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine alpha(V) integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol* 77:2500-11.
  - 22) Fricks, C. E., and J. M. Hogle. 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 64:1934-45.
  - 23) Fry, E. E., J. W. Newman, S. Curry, S. Najjam, T. Jackson, W. Blakemore, S. M. Lea, L. Miller, A. Burman, A. M. King, and D. I. Stuart. 2005. Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A10 61 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *J Gen Virol* 86:1909-20.
  - 24) Greve, J. M., G. Davis, A. M. Meyer, C. P. Forte, S. C. Yost, C. W. Marlor, M. E. Kamarck, and A. McClelland. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56:839-47.
  - 25) He, Y., V. D. Bowman, S. Mueller, C. M. Bator, J. Bella, X. Peng, T. S. Baker, E. Wimmer, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann. 2000. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:79-84.
  - 26) He, Y., P. R. Chipman, J. Howitt, C. M. Bator, M. A. Whitt, T. S. Baker, R. J. Kuhn, C. W. Anderson, P. Freimuth, and M. G. Rossmann. 2001. Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat Struct Biol* 8:874-8.
  - 27) Hewat, E. A., E. Neumann, J. F. Conway, R. Moser, B. Ronacher, T. C. Marlovits, and D. Blaas. 2000. The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view. *Embo J* 19:6317-25.
  - 28) Hofer, F., M. Gruenberger, H. Kowalski, H. Machat, M. Huettinger, E. Kuechler, and D. Blaas. 1994. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1839-42.
  - 29) Hogle, J. M., M. Chow, and D. J. Filman. 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229:1358-65.
  - 30) Hoover-Litty, H., and J. M. Greve. 1993. Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J Virol* 67:390-7.
  - 31) Hussain, K. M., K. L. Leong, M. M. Ng, and J. J. Chu. 2011. The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *J Biol Chem* 286:309-21.
  - 32) Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. Newman, and A. M. King. 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 70:5282-7.
  - 33) Johns, H. L., S. Berryman, P. Monaghan, G. J. Belsham, and T. Jackson. 2009. A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol* 83:6247-56.
  - 34) Kaplan, G., M. S. Freistadt, and V. R. Racaniello. 1990. Neutralization of poliovirus by cell receptors expressed in insect cells. *J Virol* 64:4697-702.
  - 35) Khan, A. G., A. Pickl-Herk, L. Gajdzik, T. C. Marlovits, R. Fuchs, and D. Blaas. 2010. Human rhinovirus 14 enters rhabdomyosarcoma cells expressing icam-1 by a clathrin-, caveolin-, and flotillin-independent pathway. *J Virol* 84:3984-92.
  - 36) Koike, S., H. Horie, I. Ise, A. Okitsu, M. Yoshida, N. Iizuka, K. Takeuchi, T. Takegami, and A. Nomoto. 1990. The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *Embo J* 9:3217-24.
  - 37) Koike, S., I. Ise, and A. Nomoto. 1991. Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4104-8.
  - 38) Kolatkar, P. R., J. Bella, N. H. Olson, C. M. Bator, T. S. Baker, and M. G. Rossmann. 1999. Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *Embo J* 18:6249-59.
  - 39) Levy, H., M. Bostina, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 2010. Cell Entry, a Biochemical and Structural Perspective, p. 87-104. *In* E. Ehrenfeld, E. Domingo, and R. P. Roos (ed.), *The Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC.
  - 40) Levy, H. C., M. Bostina, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 2010. Catching a virus in the act of RNA release: a novel poliovirus uncoating intermediate characterized by cryo-electron microscopy. *J Virol* 84:4426-41.
  - 41) Lin, J., N. Cheng, M. Chow, D. J. Filman, A. C. Steven, J. M. Hogle, and D. M. Belnap. 2011. An externalized polypeptide partitions between two distinct sites on

- genome-released poliovirus particles. *J Virol* 85:9974-83.
- 42) Logan, D., R. Abu-Ghazaleh, W. Blakemore, S. Curry, T. Jackson, A. King, S. Lea, R. Lewis, J. Newman, N. Parry, and et al. 1993. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 362:566-8.
  - 43) Luo, M., C. He, K. S. Toth, C. X. Zhang, and H. L. Lipton. 1992. Three-dimensional structure of Theiler murine encephalomyelitis virus (BeAn strain). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2409-13.
  - 44) Luo, M., K. S. Toth, L. Zhou, A. Pritchard, and H. L. Lipton. 1996. The structure of a highly virulent Theiler's murine encephalomyelitis virus (GDVII) and implications for determinants of viral persistence. *Virology* 220:246-50.
  - 45) Luo, M., G. Vriend, G. Kamer, I. Minor, E. Arnold, M. G. Rossmann, U. Boege, D. G. Scraba, G. M. Duke, and A. C. Palmenberg. 1987. The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science* 235:182-91.
  - 46) Madshus, I. H., S. Olsnes, and K. Sandvig. 1984. Mechanism of entry into the cytosol of poliovirus type 1: requirement for low pH. *J Cell Biol* 98:1194-200.
  - 47) Madshus, I. H., S. Olsnes, and K. Sandvig. 1984. Requirements for entry of poliovirus RNA into cells at low pH. *Embo J* 3:1945-50.
  - 48) Marlovits, T. C., C. Abrahamsberg, and D. Blaas. 1998. Very-low-density lipoprotein receptor fragment shed from HeLa cells inhibits human rhinovirus infection. *J Virol* 72:10246-50.
  - 49) Mason, P. W., E. Rieder, and B. Baxt. 1994. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1932-6.
  - 50) McKenna, T. S., J. Lubroth, E. Rieder, B. Baxt, and P. W. Mason. 1995. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* 69:5787-90.
  - 51) Mendelsohn, C. L., E. Wimmer, and V. R. Racaniello. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56:855-65.
  - 52) Milstone, A. M., J. Petrella, M. D. Sanchez, M. Mahmud, J. C. Whitbeck, and J. M. Bergelson. 2005. Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J Virol* 79:655-60.
  - 53) Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P. H. Weinreb, S. M. Violette, S. Alexandersen, and T. Jackson. 2005. The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol* 86:2769-80.
  - 54) Newcombe, N. G., P. Andersson, E. S. Johansson, G. G. Au, A. M. Lindberg, R. D. Barry, and D. R. Shafren. 2003. Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J Gen Virol* 84:3041-50.
  - 55) Nishimura, Y., M. Shimojima, Y. Tano, T. Miyamura, T. Wakita, and H. Shimizu. 2009. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-7.
  - 56) Nishimura, Y., T. Wakita, and H. Shimizu. 2011. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* 6:e1001174.
  - 57) Nurani, G., B. Lindqvist, and J. M. Casasnovas. 2003. Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments. *J Virol* 77:11985-91.
  - 58) O'Donnell, V., M. Larocco, and B. Baxt. 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* 82:9075-85.
  - 59) O'Donnell, V., M. LaRocco, H. Duque, and B. Baxt. 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* 79:8506-18.
  - 60) Ohka, S., N. Matsuda, K. Tohyama, T. Oda, M. Morikawa, S. Kuge, and A. Nomoto. 2004. Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol* 78:7186-98.
  - 61) Ohka, S., M. Sakai, S. Bohnert, H. Igarashi, K. Deinhardt, G. Schiavo, and A. Nomoto. 2009. Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *J Virol* 83:4995-5004.
  - 62) Ohka, S., W. X. Yang, E. Terada, K. Iwasaki, and A. Nomoto. 1998. Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology* 250:67-75.
  - 63) Olson, N. H., P. R. Kolatkar, M. A. Oliveira, R. H. Cheng, J. M. Greve, A. McClelland, T. S. Baker, and M. G. Rossmann. 1993. Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:507-11.
  - 64) Patel, K. P., C. B. Coyne, and J. M. Bergelson. 2009. Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells. *J Virol* 83:11064-77.
  - 65) Prchla, E., E. Kuechler, D. Blaas, and R. Fuchs. 1994. Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. *J Virol* 68:3713-23.
  - 66) Racaniello, V. R. 2007. Picornaviridae: The viruses and their replication, p. 795-838. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5 ed. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
  - 67) Rossmann, M. G., E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenberger, J. P. Griffith, H. J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, and et al. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317:145-53.
  - 68) Selinka, H. C., A. Zibert, and E. Wimmer. 1991. Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3598-602.



- 69) Shafren, D. R., R. C. Bates, M. V. Agrez, R. L. Herd, G. F. Burns, and R. D. Barry. 1995. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* 69:3873-7.
- 70) Shafren, D. R., D. T. Williams, and R. D. Barry. 1997. A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein to mediate lytic infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol* 71:9844-8.
- 71) Shieh, J. T., and J. M. Bergelson. 2002. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J Virol* 76:9474-80.
- 72) Staunton, D. E., V. J. Merluzzi, R. Rothlein, R. Barton, S. D. Marlin, and T. A. Springer. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 56:849-53.
- 73) Tomassini, J. E., D. Graham, C. M. DeWitt, D. W. Lineberger, J. A. Rodkey, and R. J. Colonno. 1989. cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4907-11.
- 74) Tomko, R. P., R. Xu, and L. Philipson. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3352-6.
- 75) Tuthill, T. J., E. Groppelli, J. M. Hogle, and D. J. Rowlands. 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 343:43-89.
- 76) Xiao, C., C. M. Bator-Kelly, E. Rieder, P. R. Chipman, A. Craig, R. J. Kuhn, E. Wimmer, and M. G. Rossmann. 2005. The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure* 13:1019-33.
- 77) Yamayoshi, S., and S. Koike. 2011. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. *J Virol* 85:4937-46.
- 78) Yamayoshi, S., Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, T. Minowa, T. Takemura, and S. Koike. 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:798-801.
- 79) Zeichhardt, H., K. Wetz, P. Willingmann, and K. O. Habermehl. 1985. Entry of poliovirus type 1 and Mouse Elberfeld (ME) virus into HEp-2 cells: receptor-mediated endocytosis and endosomal or lysosomal uncoating. *J Gen Virol* 66 ( Pt 3):483-92.
- 80) Zhang, P., S. Mueller, M. C. Morais, C. M. Bator, V. D. Bowman, S. Hafenstein, E. Wimmer, and M. G. Rossmann. 2008. Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18284-9.

## Early Steps of Picornavirus Infection

**Satoshi KOIKE**

Neurovirology Project,  
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Picornaviridae is a large family of viruses that cause a variety of infectious diseases in humans and animals. It includes important viruses such as poliovirus, hepatitis A virus and foot and mouth disease virus. Early steps of infection play important roles in determining the host range and the target organs for each virus. Here, I review the recent advances in the studies of cellular receptors for picornaviruses, mechanisms of cell entry and viral uncoating.

