

## 2. デングウイルス複製に関与する Hsp70 サブネットワークの意義

田 鍬 修 平, ジュディスフリードマン

スタンフォード大学

細胞内寄生体であるウイルスにとって、宿主細胞の生体機能を如何に効率よく盗用し自己増殖を成し遂げるかは生存戦略の要である。細胞が備えるタンパク質品質管理機構 (Protein Quality control: QC) は、翻訳されたタンパク質を正確に折り畳み (フォールディング)、機能的構造の安定化を向上するだけでなく、本来の折り畳みの型から懸け離れ機能不全に陥った異常タンパク質を速やかに排除することで細胞内外のタンパク質恒常性維持に寄与しているが、実に多岐にわたるウイルス種がその生活環の様々なステージにおいて QC を流用している。最近、我々はデングウイルス (DENV) がその生活環において、少なくとも3つの異なるステップで QC の主要分子の一つ、Heat shock protein 70 (Hsp70) を利用すること、そしてその特異性はシャペロンを支えるコシャペロンが規定することを明らかにした。本稿では DENV 生活環における多様な QC の意義について解説する。

### はじめに

デングウイルス (DENV) はフラビウイルス科フラビウイルス属に属する。ゲノムである一本のポジティブ鎖 RNA には 3400 アミノ酸からなる一本のポリプロテインがコードされており、翻訳後宿主やウイルスのプロテアーゼにより切断を受け 10 個の独立したタンパク質として機能する<sup>30)</sup>。DENV を含むフラビウイルスは生活環を哺乳動物と昆虫動物の両方で営むことができるアルボウイルスとしての性質を持つ。系統学的にかけ離れた宿主間を交互に伝播し効率良く増殖するためにはそれぞれの環境下に最適化した変異の獲得が必要であり<sup>8, 53)</sup>、校正性の低い RNA 複製酵素が急速な変異獲得を可能にしている<sup>46)</sup>。ウイルスにとって変異獲得は宿主域への最適化のみならず宿主免疫からの回避や薬剤耐性などの恩恵に寄与する一方<sup>3, 19, 24)</sup>、

変異の蓄積はタンパク質構造の安定性を低下させ機能不全を引き起こす諸刃の剣となる<sup>31)</sup>。一般的に 1) 発現頻度が高く、2) 複合体を形成し、3) 変異を持つウイルスタンパク質はその性質上、タンパク質品質管理機構 (Protein Quality control: QC) への依存度が高くなると考えられる。

一般的に翻訳された新生ポリペプチドは概ねアンフィシンのドグマに従い自らエネルギー的に最も安定的な形へと折り畳まれ『タンパク質』として機能する<sup>43)</sup>。一方、異常な折り畳みや種々のストレスにより変性したタンパク質は露わになった疎水性領域の分子間結合により巨大な凝集体を形成し、様々な細胞障害を引き起こす<sup>6, 16)</sup>。このような致死的なアクシデントを軽減すべく、細胞は様々な QC を以ってタンパク質恒常性維持に努めている<sup>38, 41, 48)</sup>。

Heat shock protein 70 (Hsp70) は大凡すべての生物種でホモログが存在する ATP 依存的シャペロンファミリーの一つで、ヒトでは約 14 種のホモログがあり、ミトコンドリア局在型 (HSPA9: Mortalin/mtHSP70) と ER 内腔局在型 (HSPA5: BiP) 以外は細胞質及び核、一部はライソソームに局在する (図 1A)。またストレスに対して誘導される型 (e.g. HSPA1: HSP70/HSP72) や常時発現する型 (e.g. HSPA8: HSC70, BiP)、組織特異的に発現する型 (e.g. HSPA2 は精巣特異的機能を有する) と、分類のバラエティーに富んでいる<sup>15, 61)</sup>。基本的機能は分子間で共通しており、基質は新生ペプチドの折りたたみから凝集してしまつた異常タンパク質の再折り畳みの促進までと幅広く<sup>33)</sup>、

### 連絡先

James H. Clark Center  
318 Campus Drive, Room E200A  
Stanford University  
Stanford, CA 94305-5430  
TEL: 650-725-7833  
FAX: 650-724-4927  
E-mail: staguwa@stanford.edu

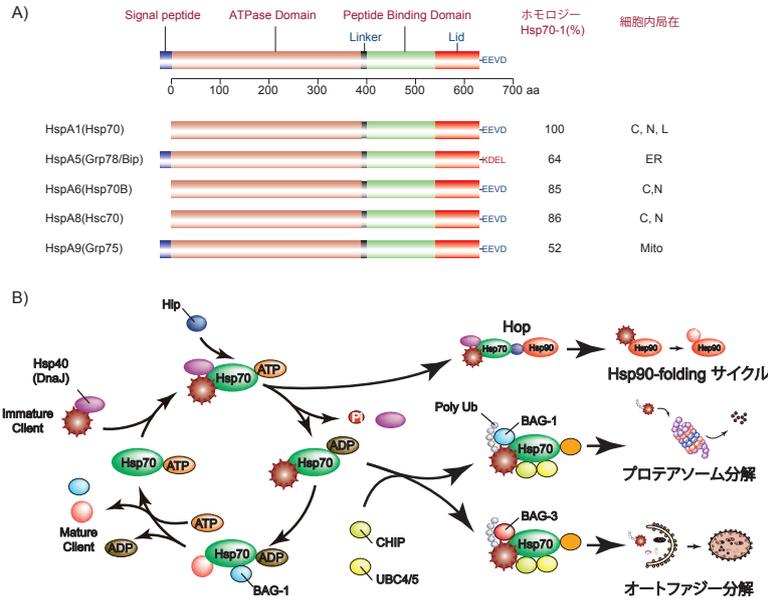


図1 ヒト Hsp70 ホモログの構造と機能

A) Hsp70 ファミリーのドメイン構造, 相同性と細胞内局在 (C: 細胞質, N: 核, L: ライソソーム)  
B) Hsp70 サイクルと他の QC との関連性

Hsp40/DnaJ により基質を受け取り, 自身の ATPase 活性を活力にタンパク質を折り畳み, Nucleotide exchange factor (NEF) によって核酸を放出することで構造変化を起こして折り畳んだタンパク質を放出するサイクルを形成する (図 1B). また他のシャペロンサイクル (Hsp90, small Hsps や TRiC/CCT) やユビキチン-プロテアソーム系やオートファジー/ライソソーム系などの分解経路と協調してタンパク質の恒常性維持に大きく貢献している<sup>13, 35</sup>. 本稿ではフラビウイルスと QC, 特に DENV と Hsp70 との関係について, 最近我々が報告した知見と合わせて解説する.

ウイルス侵入における QC の役割

フラビウイルスに共通した基本的な侵入機序は 1) ウィルス粒子 (E タンパク質) の標的細胞受容体への結合, 2) エンドサイトーシスによる細胞内取り込み, 3) Vesicle 内腔の酸性化を起点とした細胞膜融合, 4) ゲノム RNA の細胞質への放出, により完遂する (図 2)<sup>9</sup>. これまでに様々な宿主受容体が報告されているが, QC 関連では Reyes や Chavez らにより Hsp70 や Hsp90 が DENV 受容体と複合体を形成して侵入の足場になることが報告されている (U937: ヒトリンパ腫, SK-SY-5Y: ヒト神経芽細胞種や C6/36: ヒトスジシマカ由来細胞)<sup>5, 39, 42, 52</sup>. Hsp70 は Das や Zhu らにより Neuro 2a: マウス神経芽細胞腫 や Huh7: ヒト肝ガン由来細胞株における日本脳炎ウイルス

(Japanese Encephalitis Virus : JEV) の感染にも寄与することが報告されておりフラビウイルスに共通のメカニズムの存在が示唆される<sup>10, 62</sup>. 一方, Krishnan らは RNAi スクリーニングの系を用いて Ubiquitin E3ligase である CBLL1 を単離し, プロテアソーム依存的に DENV および西ナイルウイルス (WNV) の侵入段階を促進することを報告している<sup>25</sup>. しかし上記の発見にはその反証も存在し Cabrera-Hernandez らは HepG2 において Hsp70/Hsp90 は感染に必要なこと<sup>4</sup>, また Fernandez-Garcia らは CBLL1 が主に侵入後に寄与していることを主張し<sup>14</sup>, 議論は混沌としている. これらの結果の違いは用いる実験材料 (細胞種やウイルス種) や手法 (中和抗体や RNAi 技術) の違いが大きく影響していると考えられる. 我々は Hsp70 の特異的阻害剤の事前処理によりデングウイルスの宿主細胞 (Huh7 細胞) への取り込みが著しく抑制されることを確認している<sup>47</sup>. 阻害機序としては, 宿主のエンドサイトーシスを含む普遍的な膜輸送には Hsp70 が深く関与しており<sup>45</sup>, エンドサイトーシスによる取り込み阻害だけでなくウイルス受容体の細胞膜表面への輸送阻害も起因すると考えている. また Hsp70 のコファクターとして Hsp70 の ATPase 活性を促進する Hsp40/DnaJ ファミリー分子である DnaJB16, DnaJB18, DnaJC9 が侵入段階に関与することも明らかにしたが, その詳細なメカニズムは不明のままである. Walczak らは Non-envelope ウィルスである Simian Virus 40 (SV40) が DnaJB12 と DnaJB14 を利用し

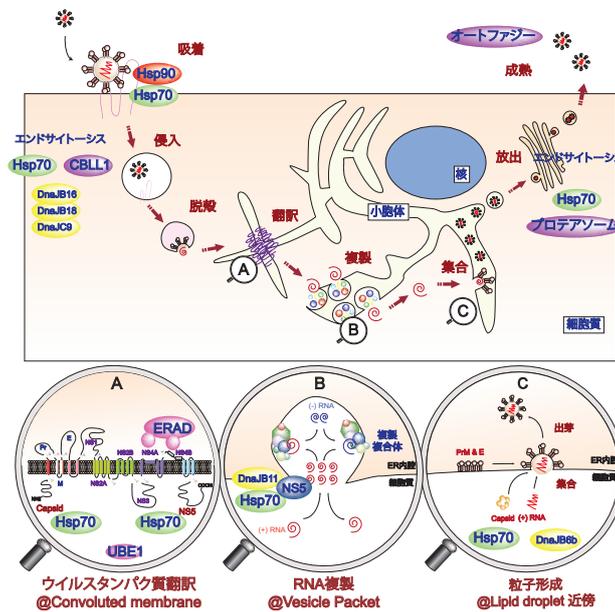


図2 デングウイルス感染に関連するQCと作用段階

- A) 翻訳とそれに関連するQC.  
 B) RNA合成に参与するHsp70とDnaJ.  
 C) ウイルス粒子形成に関連するHsp70とDnaJ.

てERから細胞質内へ侵入することを報告している<sup>54)</sup>。興味深いことに、両分子はDnaJB16, DnaJB18とパラログの関係にあり、フラビウイルスも同様なメカニズムにより細胞質内へ侵入することが想定される。

### ウイルスゲノム複製を支えるQC

フラビウイルスは宿主細胞のER膜を再構成し折り畳まれた膜構造 (Convoluted membrane/Vesicle packet) の上で増殖する (図2)<sup>21, 56)</sup>。免疫原性のあるゲノムRNAなどを細胞内免疫機構から守る隠れ家になる一方、分子の積極的な交換が行われない故に閉鎖空間内でのタンパク質品質管理は必須である<sup>59)</sup>。また感染の進行に伴い増量するウイルスタンパク質はアミノ酸の欠乏と異常タンパク質の蓄積を引き起こし、それにより惹起される種々のストレス応答は翻訳機会の減少やタンパク質の強制分解を誘導するウイルスにとって忌避すべき状況となる<sup>49)</sup>。それ故にウイルス複製に伴ったQCの窃取は想像に難くない。事実、KrishnanらはERにおける品質管理機構であるERAD (ER Associated protein Degradation) 関連分子の発現抑制がDENVやWNV複製を抑制すること<sup>25)</sup>、またKanlayaらはUbiquitin-Activating Enzyme UBE1の特異的阻害剤であるUBE1-41がDENVの複製を抑制することを報告しているが<sup>22)</sup>、ウイルス側の関連タンパク質や何故ユビキチン-プロテアソーム分解経路が必須なのか等の詳細な作用

機序の解明には至っていない (図2A)。プロテアソームと双壁をなすオートファジーに関しては、Metzらによりオートファジーが感染初期にはDENVの複製を支持するが、感染後期にはDENVに対して抑制的に働くこと、そしてその中心分子としてオートファジーの受容体でもあるSQSTM1/p62を見出し、p62がDENVに対して抑制的に働くことを明らかにしている<sup>34)</sup>。一方でHeatonらはDENV感染に伴い誘導されるオートファジーが脂質代謝を亢進し細胞内のATP総量を増加させることでウイルス複製を支持していることを報告している<sup>18)</sup>。

我々はRNAiスクリーニングを用いて、細胞質局在型のHsp70のみがDENV複製を正に制御することを確認している (図2B)<sup>47)</sup>。さらにHsp70阻害剤を加えるとウイルスRNA合成酵素であるNS5の安定性が著しく低下しプロテアソーム依存的に分解されること、それに伴いRNA複製が抑制されることも判明した。さらにHsp70阻害剤とプロテアソーム阻害薬を同時に加えることでNS5の分解は抑制できるがRNA複製の低下は阻止できないこと、また感染細胞からクルードな複製複合体を含む膜領域を単離し新たな蛋白合成を伴わない無細胞系においてもHsp70阻害によりRNA合成活性が低下したことからHsp70はNS5のフォールディングのみならず活性を持ったNS5の安定性維持に寄与することが示唆された。ちなみにHsp70単一分子種に対する遺伝子抑制の効果は分子種広範に効く

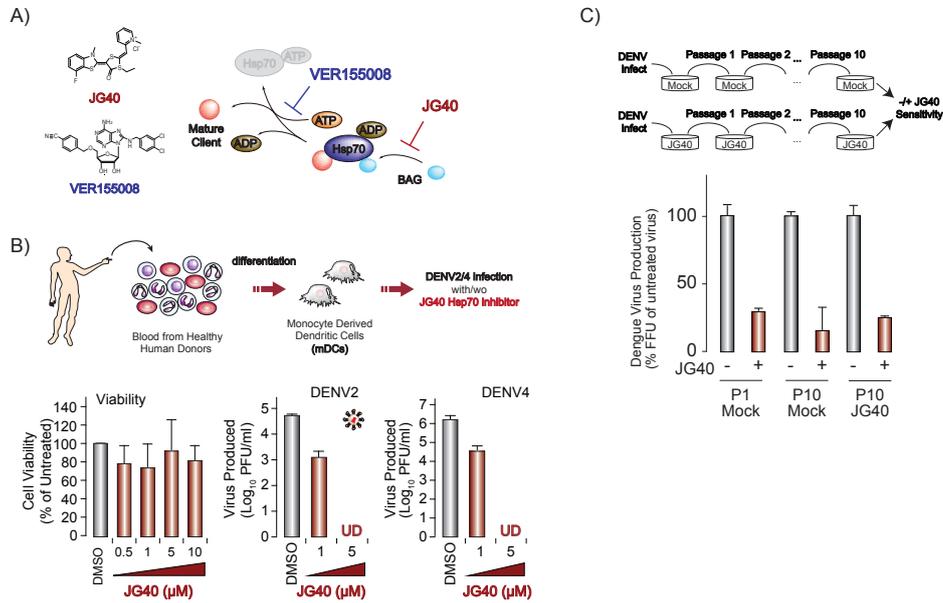


図3 Hsp70 阻害剤の作用機序と初代培養細胞における抗ウイルス効果

- A) VER155008 と JG40 の構造式と作用機序
- B) モノサイト由来樹状細胞における JG40 の細胞毒性と二種の血清型 DENV に対する抗ウイルス効果 (UD:undetected)
- C) JG40 存在/非存在下で継代したウイルスに対する JG40 感受性試験

特異的阻害剤に比して低く、これは Hsp70 分子群がストレス誘導性能やある程度のリダンダンシーを有することに起因すると考えられる。すなわち DENV 複製においては細胞質に存在する Hsp70 総体の機能は重要であるが、Hsp70 分子自体への特異性は低いことを意味している。一般的に Hsp70 のクライアント依存性はコシャペロンである DnaJ が規定していると考えられる<sup>11)</sup>。DENV の場合、ウイルス感染に伴い DnaJB11 が RNA 複製部位にリクルートされ、複製複合体や Hsp70 群と共に RNA 合成を支持することが判明した。また DnaJA2, DnaJB7, DnaJC10 なども DENV 複製に必須であることを明らかにしているが、その詳細なメカニズムは現在のところ不明である。一方、Wu らにより ER 局在型の Hsp70 が JEV 増殖を亢進すること<sup>58)</sup>、Wang らにより Hsp70 と DnaJA1 が JEV の RNA 複製を支持することが報告されており<sup>55)</sup>、ウイルス種による Hsp70 ネットワークへの依存性は異なることが示唆される。

**粒子形成と成熟における QC**

Lipid droplet 近傍に集積した Capsid は PrM, E タンパク質と共にゲノム RNA と集め、ER 内腔にウイルス粒子として放出され、エキソサイトーシスを介して細胞外へ放出される (図 2C)。我々は Hsp70 阻害により細胞培養上清中および細胞内の DENV 感染粒子が抑制されることを見出した<sup>47)</sup>。この阻害効果は Capsid の安定性が失われ

プロテアソーム及びオートファジーにより排除されるために正常な DENV 粒子形成ができないことが主な原因であるが、Hsp70 が機能上 Vesicle transport に関与する事を考えるとエキソサイトーシスの阻害による粒子放出抑制にも起因すると考えられる。さらに細胞質に局在する DnaJB6b が Capsid と相互作用し、Hsp70 と自身の持つシャペロン活性を介して DENV 粒子形成を促進することも明らかにした。同様に Choy らはプロテアソーム阻害剤がエキソサイトーシス関連分子の安定性を低下させ、結果エキソサイトーシスを抑制する事で DENV の放出を抑制することを報告しているが<sup>7)</sup>、細胞内に滞留した感染性粒子の有無については言及されていない。一方 Mateo らはオートファジー特異的阻害剤を用いて DENV 生活環への影響を検討し、阻害機序としてウイルス複製阻害に加えて、ウイルス粒子中の PrM の切断を阻害することで感染性粒子への成熟を抑制することを報告している<sup>32)</sup>。教科書的な解釈では PrM の切断イベントは粒子形成後に起こるとされており、オートファジーがどのように PrM の切断を制御するかについての直接的な説明が待たれるところである。

**免疫/病原性と QC**

DENV 感染による過剰なサイトカイン産生 (サイトカインストーム) はデング関連疾患の主徴の一つである<sup>40)</sup>。一方で免疫応答に対して DENV に限らずフラビウイルス感染が interferon receptor の下流シグナルである JAK-

STAT 経路を阻害することは広く知られている<sup>12)</sup>。近年の研究から DENV に関しては NS5 単独発現でも IFN シグナルを抑制しうること、阻害機序は NS5 が UBR4 をリクルートし、プロテアソーム依存的に STAT2 を分解することが一因であることが明らかになっている<sup>37)</sup>。ただし STAT2 の分解及びシグナル阻害も宿主細胞やウイルス株の違いにより異なることが報告されており、UBR4 以外の因子の存在が示唆される<sup>20, 50)</sup>。我々は monocyte-derived Dendritic cell (mDC) を用いて、デングウイルス感染におけるサイトカイン産生について検討し、Hsp70 阻害剤によりウイルス感染抑制による効果と相加的に TNF- $\alpha$  や RANTES の産生を抑制することを見出している<sup>47)</sup>。今後はモデル動物を使った生体での現象を検討する必要がある。

病原性に関して Ko らは Ubiquitin E3 ligase である Makorin ring finger protein 1 (MKRN1) が WNV の capsid を選択的に分解し Capsid が発揮する病原性 (細胞障害性や細胞周期停止能) を抑制すること、と同時に Capsid も Hsp70 のシャペロン活性を抑制することを報告している<sup>23)</sup>。阻害機序は WNV の Capsid が Hsp70 へ結合することによる他のクライアントへの競合阻害と示唆されているが、DENV の Capsid も Hsp70 のクライアントであり、WNV 同様に病原性に関与する可能性が考えられる。

#### フラビウイルス感染症治療薬標的としての QC

デングウイルスは世界 100 カ国以上、年間推定約 4 億人に感染し、重症化すると出血を伴うデング出血熱を発症し死に至る感染症であるが<sup>2, 44)</sup>、現在までに有効なワクチンはなく、治療法も対処療法のみであり、特異的治療薬の発見 / 開発が切望されている<sup>29)</sup>。我々は先も記述した通り、ヒト初代培養細胞を用いて Hsp70 阻害剤のフラビウイルス治療薬としての可能性を模索している (図 3)<sup>47)</sup>。VER155008 は核酸アナログで ATP の Hsp70 への結合を競合的に阻害することにより一元的に Hsp70 の機能を抑制する (図 3A)<sup>57)</sup>。一方 JG40 は Hsp70 の Nucleotide-binding domain 近傍に結合し、Hsp70 の NEF である BAG family と Hsp70 の結合を阻害する<sup>1, 26, 27)</sup>。JG40 は mDC に対して細胞毒性の出ない濃度において、2 種血清型 DENV (2 型と 4 型: 図 3B)、黄熱病ウイルス (YFV)、Kunjin ウイルス (WNV)、ランガットウイルス (LGTV) と幅広いフラビウイルス種に対して強いウイルス抑制効果を示した。Hsp70-NEF は約 12 種知られており Hsp70 同様それぞれがある程度のリダダンシーを有しながら Hsp70 シャペロンサイクルを活性化するため、特定の Hsp70 と NEF の結合を阻害する JG40-type の阻害剤は VER155008-type に比して細胞毒性が低い傾向がある (図 3B)。興味深いことに増殖が早くシャペロンへの依存度が高いガン細胞は正常細胞に比して Hsp70/Hsp90 阻害剤に対する毒性が高く<sup>28, 36)</sup>、それ故抗がん薬としても開発が進められており原理的には

抗ウイルス薬としての導入の敷居も低いと考えられる。また抗ウイルス薬治療のアキレス腱でもある耐性ウイルスの出現に関しても、細胞株を用いた実験から RNA 複製酵素である NS5 への阻害剤が 10 回の継代で薬剤耐性を示したのに対して、JG40 の場合は耐性ウイルスの出現を認められなかったことから長期的な使用にも耐えうる優秀な治療法としてのポテンシャルが垣間見える (図 3C)。現在我々は毒性の低く血中で安定な JG40-type の薬剤を用いた動物実験を行いその効果を評価している。また Hsp70/NEF の阻害剤のみならず、特異的 DnaJ に対する阻害剤はさらに毒性の低い安全な治療薬になりうる可能性があり、ウイルス粒子成熟を抑制するオートファジー阻害剤もまた別の作用機序を持った抗デングウイルス薬として有望であると考えられる。我々はこのクラスの阻害剤に新たな抗ウイルス薬としての可能性を感じている。

#### 終わりに

フラビウイルスに関する QC の報告は数多くあるが、細胞株 / ウイルス株や実験手法の違いにより研究結果は混沌としており議論は尽きない。特に DENV の場合、新しく分類されたものも含めて 5 つの血清型が存在し、それぞれ異なる病原性やタンパク質局在を有しているなどバラエティーに富んでいることも実験結果の相違に拍車をかけている<sup>17, 51, 60)</sup>。また信頼できるモデル動物も少なく、デングウイルスを増やすためだけの遺伝子組み換え動物を使った実験ではコッホの原則に寄り添って DENV 全般に普遍的な現象を検証するのは容易ではないのかもしれない。しかしながら世界的な流行、高病原性デングウイルスが出現する前に信頼できるワクチンや治療法の確立は急務である。今後の研究に期待したい。

#### 参考文献

- 1) Assimon VA, Gillies AT, Rauch JN, Gestwicki JE. 2013. Hsp70 protein complexes as drug targets. *Current pharmaceutical design* **19**:404-417.
- 2) Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**:504-507.
- 3) Borderia AV, Stapleford KA, Vignuzzi M. 2011. RNA virus population diversity: implications for inter-species transmission. *Current opinion in virology* **1**:643-648.
- 4) Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. 2007. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *Journal of medical virology* **79**:386-392.
- 5) Chavez-Salinas S, Ceballos-Olvera I, Reyes-Del Valle J, Medina F, Del Angel RM. 2008. Heat shock effect upon

- dengue virus replication into U937 cells. *Virus research* **138**:111-118.
- 6) **Chiti F, Dobson CM.** 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* **75**:333-366.
  - 7) **Choy MM, Zhang SL, Costa VV, Tan HC, Horrevorts S, Ooi EE.** 2015. Proteasome Inhibition Suppresses Dengue Virus Egress in Antibody Dependent Infection. *PLoS neglected tropical diseases* **9**:e0004058.
  - 8) **Ciota AT, Kramer LD.** 2010. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses* **2**:2594-2617.
  - 9) **Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT.** 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews* **39**:155-170.
  - 10) **Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai A.** 2009. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology* **385**:47-57.
  - 11) **Dekker SL, Kampinga HH, Bergink S.** 2015. DNAJs: more than substrate delivery to HSPA. *Frontiers in molecular biosciences* **2**:35.
  - 12) **Diamond MS.** 2009. Mechanisms of evasion of the type I interferon antiviral response by flaviviruses. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **29**:521-530.
  - 13) **Duncan EJ, Cheetham ME, Chapple JP, van der Spuy J.** 2015. The role of HSP70 and its co-chaperones in protein misfolding, aggregation and disease. *Sub-cellular biochemistry* **78**:243-273.
  - 14) **Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Bonazzi M, Cossart P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A.** 2011. Appraising the roles of CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication. *Journal of virology* **85**:2980-2989.
  - 15) **Foltz KR, Partin JS, Lennarz WJ.** 1993. Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. *Science* **259**:1421-1425.
  - 16) **Gidalevitz T, Ben-Zvi A, Ho KH, Brignull HR, Morimoto RI.** 2006. Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* **311**:1471-1474.
  - 17) **Hannemann H, Sung PY, Chiu HC, Yousuf A, Bird J, Lim SP, Davidson AD.** 2013. Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization. *The Journal of biological chemistry* **288**:22621-22635.
  - 18) **Heaton NS, Randall G.** 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe* **8**:422-432.
  - 19) **Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC.** 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of molecular evolution* **54**:156-165.
  - 20) **Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M.** 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of virology* **79**:5414-5420.
  - 21) **Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ.** 2014. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of virology* **88**:4687-4697.
  - 22) **Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V.** 2010. The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *Journal of proteome research* **9**:4960-4971.
  - 23) **Ko A, Lee EW, Yeh JY, Yang MR, Oh W, Moon JS, Song J.** 2010. MKRN1 induces degradation of West Nile virus capsid protein by functioning as an E3 ligase. *Journal of virology* **84**:426-436.
  - 24) **Korboukh VK, Lee CA, Acevedo A, Vignuzzi M, Xiao Y, Arnold JJ, Hemperly S, Graci JD, August A, Andino R, Cameron CE.** 2014. RNA virus population diversity, an optimum for maximal fitness and virulence. *The Journal of biological chemistry* **289**:29531-29544.
  - 25) **Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoyl FD, Uchil PD, Sultana H, Brass AL, Adametz R, Tsui M, Qian F, Montgomery RR, Lev S, Mason PW, Koski RA, Elledge SJ, Xavier RJ, Agaisse H, Fikrig E.** 2008. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* **455**:242-245.
  - 26) **Li X, Colvin T, Rauch JN, Acosta-Alvear D, Kampmann M, Dnyak B, Hann B, Aftab BT, Murnane M, Cho M, Walter P, Weissman JS, Sherman MY, Gestwicki JE.** 2015. Validation of the Hsp70-Bag3 Protein-Protein Interaction as a Potential Therapeutic Target in Cancer. *Molecular cancer therapeutics*.
  - 27) **Li X, Srinivasan SR, Connarn J, Ahmad A, Young ZT, Kabza AM, Zuiderweg ER, Sun D, Gestwicki JE.** 2013. Analogs of the Allosteric Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor, MKT-077, as Anti-Cancer Agents. *ACS medicinal chemistry letters* **4**.
  - 28) **Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L, Dionigi G, Roukos DH.** 2015. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* **360**:114-118.
  - 29) **Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, Yokokawa F, Nilar S, Smith P, Beer D, Lescar J, Shi PY.** 2013. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral research* **100**:500-519.
  - 30) **Lindenbach BDR, C. M.** 2007. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Fields Virology*. 5th Edition:1101-1152.
  - 31) **Maisnier-Patin S, Andersson DI.** 2004. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Research in microbiology* **155**:360-369.
  - 32) **Mateo R, Nagamine CM, Spagnolo J, Mendez E, Rahe M, Gale M, Jr., Yuan J, Kirkegaard K.** 2013. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *Journal of virology* **87**:1312-1321.
  - 33) **Mayer MP.** 2013. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences* **38**:507-514.

- 34) Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, Alvisi G, Bankhead P, Mora-Rodriguez R, Long G, Hamacher-Brady A, Brady NR, Bartenschlager R. 2015. Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *Journal of virology* **89**:8026-8041.
- 35) Miller SB, Mogk A, Bukau B. 2015. Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy. *Journal of molecular biology* **427**: 1564-1574.
- 36) Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. 2013. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current pharmaceutical design* **19**:347-365.
- 37) Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, Mulder LC, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A. 2013. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS pathogens* **9**:e1003265.
- 38) Ravikumar B, Rubinsztein DC. 2006. Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: a step towards therapy? *Molecular aspects of medicine* **27**:520-527.
- 39) Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology* **79**:4557-4567.
- 40) Rothman AL. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews. Immunology* **11**:532-543.
- 41) Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**:780-786.
- 42) Salas-Benito JS, del Angel RM. 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *Journal of virology* **71**:7246-7252.
- 43) Sela M, White FH, Jr., Anfinsen CB. 1957. Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science* **125**:691-692.
- 44) Shepard DS, Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Guzman MG, Halstead SB, Harris E, Mudin RN, Murray KO, Tapia-Conyer R, Gubler DJ. 2014. Approaches to refining estimates of global burden and economics of dengue. *PLoS neglected tropical diseases* **8**:e3306.
- 45) Sousa R, Lafer EM. 2015. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Frontiers in molecular biosciences* **2**:26.
- 46) Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**:281-288.
- 47) Taguwa S, Maringer K, Li X, Bernal-Rubio D, Rauch JN, Gestwicki JE, Andino R, Fernandez-Sesma A, Frydman J. 2015. Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell* **163**:1108-1123.
- 48) Taylor JP, Tanaka F, Robitschek J, Sandoval CM, Taye A, Markovic-Plese S, Fischbeck KH. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Human molecular genetics* **12**:749-757.
- 49) Thepparit C, Phoolcharoen W, Suksanpaisan L, Smith DR. 2004. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology* **47**:78-86.
- 50) Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology journal* **4**:91.
- 51) Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases* **181**:2-9.
- 52) Vega-Almeida TO, Salas-Benito M, De Nova-Ocampo MA, Del Angel RM, Salas-Benito JS. 2013. Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry. *Archives of virology* **158**:1189-1207.
- 53) Villordo SM, Gamarnik AV. 2013. Differential RNA sequence requirement for dengue virus replication in mosquito and mammalian cells. *Journal of virology* **87**: 9365-9372.
- 54) Walczak CP, Ravindran MS, Inoue T, Tsai B. 2014. A cytosolic chaperone complexes with dynamic membrane J-proteins and mobilizes a nonenveloped virus out of the endoplasmic reticulum. *PLoS pathogens* **10**: e1004007.
- 55) Wang RY, Huang YR, Chong KM, Hung CY, Ke ZL, Chang RY. 2011. DnaJ homolog Hdj2 facilitates Japanese encephalitis virus replication. *Virology journal* **8**:471.
- 56) Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe* **5**:365-375.
- 57) Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, Daniels Z, Dokurno P, Drysdale MJ, Follope N, Francis GL, Graham CJ, Howes R, Macias AT, Murray JB, Parsons R, Shaw T, Surgenor AE, Terry L, Wang Y, Wood M, Massey AJ. 2009. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *Journal of medicinal chemistry* **52**:1510-1513.
- 58) Wu YP, Chang CM, Hung CY, Tsai MC, Schuyler SC, Wang RY. 2011. Japanese encephalitis virus co-opts the ER-stress response protein GRP78 for viral infectivity. *Virology journal* **8**:128.
- 59) Yang G, Pevear DC, Collett MS, Chunduru S, Young DC, Benetatos C, Jordan R. 2004. Newly synthesized hepatitis C virus replicon RNA is protected from nuclease activity by a protease-sensitive factor(s). *Journal of virology* **78**:10202-10205.
- 60) Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JG, Lye DC, Ng LC, Leo YS. 2015. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *The American journal of tropical medicine*

- and hygiene **92**:999-1005.
- 61) **Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Hunt CR.** 1988. Identification and sequence analysis of a new member of the mouse HSP70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Molecular and cellular biology* **8**:2925-2932.
- 62) **Zhu YZ, Cao MM, Wang WB, Wang W, Ren H, Zhao P, Qi ZT.** 2012. Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells. *The Journal of general virology* **93**:61-71.

## The significance of Hsp70 subnetwork for Dengue virus lifecycle

**Shuhei Taguwa and Judith Frydman**

Department of Biology and Bio-X, Stanford University

Viruses hijack host machineries for replicating themselves efficiently. Host protein quality control machineries (QC) not only assist protein folding to form bona fide proteins with active functions but also get rid of un/misfolded proteins via degradation to maintain the protein homeostasis. Previous studies have reported that viruses utilize QC at various steps for their lifecycles. Recently we defined Hsp70s and their cochaperones, DnaJs functions on Dengue lifecycle. Here we summarize the significance of QC on Dengue virus.