

## 2. RNA ウイルスの増殖過程に寄与する宿主蛋白質の機能解析

山吉 誠也

東京大学医科学研究所ウイルス感染分野

RNA ウイルスのゲノムには限られた数のウイルス蛋白質のみがコードされているため、RNA ウイルスは増殖過程の多くを宿主細胞の機能に依存している。RNA ウイルスの増殖に寄与する宿主蛋白質を解明することは、基礎的なウイルス学研究のみならず、抗ウイルス薬の開発などの応用的研究にも貢献し得る。

筆者らは、マイナス鎖 RNA ウイルスであるエボラウイルスの膜蛋白質 VP40 の細胞質内輸送に宿主の COPII 輸送が関与すること、プラス鎖 RNA ウイルスのエンテロウイルス A71 の感染受容体が SCARB2 であること、分節型 RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスのゲノム RNA の核内での輸送に宿主蛋白質 CLUH が寄与することを明らかにした。本稿では、それらの知見について紹介したい。

### 1. エボラウイルスの膜蛋白質 VP40 の細胞質内輸送

フィロウイルス科 (Family *Filoviridae*) には、エボラウイルス属 (Genus *Ebolavirus*)、マールブルグウイルス属 (Genus *Marburgvirus*) およびキュエヴァウイルス属 (Genus *Cuevavirus*) の3つの属が分類される<sup>1)</sup>。エボラウイルス属には *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Bundibugyo ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* および *Reston ebolavirus* の5種がある。*Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus* および *Bundibugyo ebolavirus* は、ヒトにウイルス性出血熱を含む特徴的な症状を呈すエボラウイルス病 (Ebola Virus Disease) を引き起こす。1976年に初めて同定されてから、アフリカを中心に約25回の流行を引き起こしている<sup>2)</sup>。これまでで最も大きな流行は、2013年から2016年にリベリア、ギニアおよびシエラレオネを中心とした西アフリカで起こった。最終的な感染者は28,616名、死者は11,310名に上り、致死率は約40%であった<sup>3)</sup>。ギニアの小さな

村から始まった今回の流行では、現地での医療支援に従事していた欧米の医師・看護師らがエボラウイルスに感染し、帰国後に発症したこともあり世界的に大きな問題となった。

エボラウイルスは1本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、ゲノムには少なくとも7種類のウイルス蛋白質がコードされる。主要な構造蛋白質の1つである VP40 蛋白質は、ウイルスエンベロープの直下に位置する膜蛋白質である (図1)。エボラウイルスの粒子が紐状構造となるのは、この VP40 蛋白質の性状が深くかかわっている<sup>4)</sup>。培養細胞に VP40 蛋白質を発現させると、ウイルス様粒子 (Virus-like Particle; VLP) が培養上清中へと放出されること<sup>5,6)</sup>から、VP40 蛋白質はエボラウイルスの子孫ウイルス粒子が形質膜から放出される過程において中心的な役割を果たすと考えられる<sup>7)</sup> (図2)。VP40 蛋白質による VLP の形成には、VP40 蛋白質の N 末端にある Late-domain (PTAP および PPXY モチーフ) と呼ばれる領域を介した Tsg101 および Nedd4 と相互作用が重要であることが知られていた<sup>8-10)</sup>。Tsg101 および Nedd4 は、Multi vesicular body (MVB) sorting に関わる宿主蛋白質である。MVB sorting は、ユビキチン化されたある種の宿主蛋白質を '積み荷' として認識し、エンドソーム膜に輸送した後に、エンドソームの内腔側へエンドソーム膜が陥入することで形成される小胞に '積み荷' を載せる働きをする。Nedd4 は MVB sorting の識別シグナルであるユビキチン化を触媒する酵素であり、Tsg101 は MVB sorting の初期過程で働く Endosomal sorting

#### 連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台4-6-1

東京大学医科学研究所ウイルス感染分野

TEL: 03-5549-5502

FAX: 03-5449-5408

E-mail: yamayo@ims.u-tokyo.ac.jp

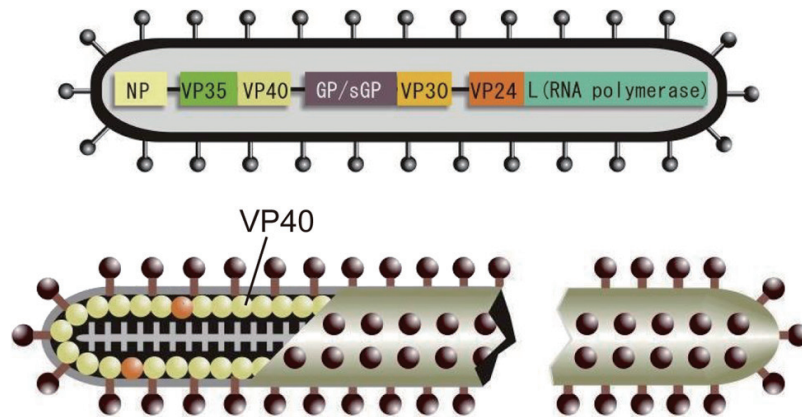


図1 エボラウイルスの模式図

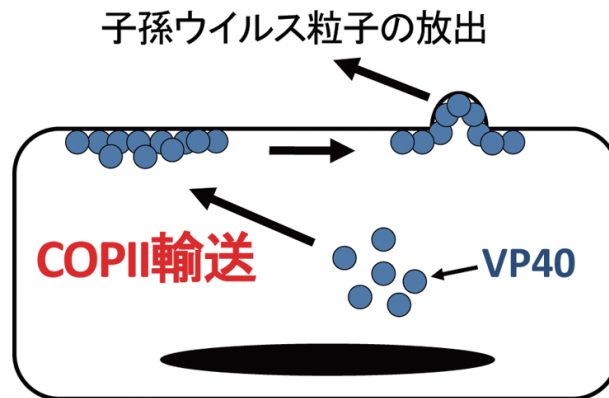


図2 VP40 蛋白質の細胞質内輸送の模式図

complex required for transport-I (ESCRT-I) 複合体の構成蛋白質の1つとして、ユビキチン化された蛋白質と直接相互作用する。ユビキチン化された蛋白質を含む ESCRT-I は、ESCRT-II、-III と連続的に相互作用して複合体を形成する。形成された複合体が VPS4 により解体されると同期してエンドソーム内にユビキチン化された蛋白質を含む小胞が形成される。VP40 蛋白質の Late-domain を介した MVB sorting との相互作用は VLP 形成に関わるが、N 末端の Late-domain を完全に失った欠損変異体 VP40 蛋白質が効率は低いながらも VLP を形成できること<sup>11)</sup> や、VP40 蛋白質の Late-domain にアミノ酸変異を持った変異型エボラウイルスの培養細胞での増殖は、野生型に比べ若干低下すること<sup>12)</sup> が報告されている。つまり、VP40 蛋白質の Late-domain を介した Tsg101 や Nedd4 との結合は、ウイルスの出芽の効率を上昇させているものの、ウイルスの出芽には必須ではない。

このように VP40 蛋白質が形質膜下に集簇した後に働く宿主蛋白質は知られていたものの、VP40 蛋白質の形質膜

下への輸送機構は明らかでなかった。我々は、共免疫沈降法および質量分析法により VP40 蛋白質と結合する宿主蛋白質を解析した結果、VP40 蛋白質が小胞体からゴルジ体への小胞輸送を担う COPII 輸送の構成蛋白質である SEC24C と特異的に相互作用することを明らかにした<sup>13)</sup>。VP40 蛋白質の形質膜下への輸送は、shRNA による SEC24C の発現抑制やドミナントネガティブ変異体による COPII 輸送の阻害により阻害され、その結果として VLP の形成効率も低下していた<sup>13)</sup>。VP40 蛋白質の欠損変異体やアミノ酸変異導入実験により、VP40 蛋白質は自身の C 末端領域を介して SEC24C と相互作用していることが分かった<sup>13)</sup>。この相互作用領域のアミノ酸をそれぞれアラニンへ置換した変異型 VP40 蛋白質は、形質膜下への細胞内輸送が正常に行われず、細胞質に留まっていた。また、同じフィロウイルス科のマルブルグウイルス属の VP40 蛋白質も COPII 輸送を細胞質内輸送に用いていることも示した<sup>13)</sup>。その後の研究から、エボラウイルス VP40 蛋白質によるウイルス粒子形成過程に関与する宿主蛋白質が多数報告され<sup>16-23)</sup>、

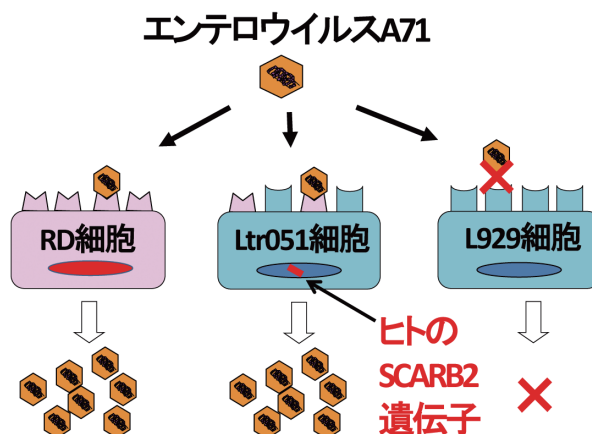


図3 エンテロウイルス A71 の感染受容体の同定法

ウイルス粒子の形成過程が宿主蛋白質により複雑かつ精巧に制御されていることが明らかとなっている。一方で、インフルエンザウイルスや麻疹ウイルスなどでも宿主細胞の小胞輸送を介したウイルス蛋白質の細胞質内輸送が報告され<sup>24, 25</sup>、宿主の小胞輸送がウイルス蛋白質の細胞内輸送に幅広く利用されていることが示唆される。

## 2. エンテロウイルス A71 の感染受容体

エンテロウイルス A71 は、ピコルナウイルス科 (Family *Picornaviridae*) エンテロウイルス属 (Genus *Enterovirus*) エンテロウイルス A (Enterovirus A) に分類される<sup>15</sup>。エンテロウイルス A71 は、同じくエンテロウイルス A に分類されるコクサッキーウイルス A16 と共にヒトの乳幼児に手足口病を引き起こす代表的な病原体である。手足口病は、軽度な発熱および手足・口腔内の水泡性発疹を特徴とする予後良好な感染症である。発疹は手のひら、手の甲、足底、足の甲、膝伸側部、臀部などに 4 mm 程度の丘疹性紅斑に、2~3 mm の水泡を伴い現れる。エンテロウイルス A71 による手足口病の流行時には、急性脳脊髄炎、神経原性肺水腫などの重篤な中枢神経症状を引き起こす症例が、稀に報告されることがある。このような重篤な症状を引き起こすことがあるエンテロウイルス A71 による手足口病の大規模な流行がアジア各国で起こり、多数の死亡例が報告され公衆衛生上の懸念となっている<sup>14</sup>。中枢神経症状を呈したヒトの死亡例において、ウイルス抗原が大脳皮質、視床下部、中脳、小脳核、橋、延髄および脊髄などの広範な神経細胞に検出される<sup>26</sup>。つまり、エンテロウイルス A71 感染による中枢神経症状は、ウイルスが神経細胞に感染することが原因である。しかし、エンテロウイルス A71 をはじめとしたピコルナウイルス科に分類されるウイルスの宿主域は狭いため、マウスなどの齧歯類には生後数日間を除き感染しないので、生体内でのウイルス動態の解析や病原性解析は困難であった。

エンテロウイルス属に分類されるウイルスは、感染受容体を介して細胞に吸着・侵入した後、ウイルス粒子の構造変化が起き、ゲノム RNA を細胞質に放出する。プラス鎖 1 本鎖のゲノム RNA は mRNA として働き、1 つの巨大なポリ蛋白質が翻訳される。翻訳されたポリ蛋白質は、ウイルスのプロテアーゼによって構造蛋白質や非構造蛋白質などの機能を持った 11 種類のウイルス蛋白質へとプロセシングされる。主要な構造蛋白質である VP1, VP2, VP3 および VP4 蛋白質が 60 セット組み合わせられることで、エンベロープを持たない正 20 面体のウイルス粒子が形成される<sup>27</sup>。

我々は、エンテロウイルス A71 の神経病原性の分子基盤を明らかにすることを目標に、その端緒として感染受容体の同定を試みた。エンテロウイルス A71 が効率良く増殖できるヒトの横紋筋肉腫由来 RD 細胞のゲノム DNA を、エンテロウイルス A71 低感受性であるマウス繊維芽細胞由来 L929 細胞に導入することで、エンテロウイルス A71 高感受性のマウス細胞 (Ltr051 細胞) を樹立した<sup>28</sup>。Ltr051 細胞には、エンテロウイルス A71 の感受性に関わるヒト遺伝子が導入されていると考え、ヒトの mRNA 発現解析用マイクロアレイを用いて Ltr051 細胞で発現する mRNA をプロファイリングした。その結果、Ltr051 細胞にはヒト SCARB2 遺伝子が導入され、その mRNA が発現していることが分かった<sup>28</sup>。そこで、ヒト SCARB2 を発現するプラスミドを作製し、L929 細胞に導入後、エンテロウイルス A71 を感染させ、感染受容体として機能するかを確認した。エンテロウイルス A71 の感染効率は、SCARB2 発現により著しく上昇していた (図 4)。ヒトの SCARB2 は、ウイルス粒子と直接結合し、エンテロウイルス A71 の感染は抗 SCARB2 抗体および可溶性 SCARB2 蛋白質により阻害された。これら結果から、SCARB2 がエンテロウイルス A71 の感染受容体であることを示した<sup>28</sup>。さらに、エンテロウイルス A71 とヒトの SCARB2 の結合

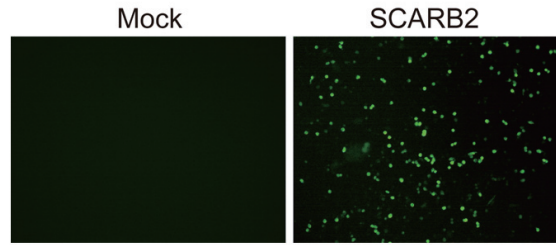


図4 SCARB2 発現細胞へのエンテロウイルス A71 の感染

領域を同定するため、ヒトの SCARB2 とマウスの Scarb2 のキメラを多種類作成した。キメラ型 SCARB2 とウイルス粒子との結合実験およびキメラ型 SCARB2 を介した感染効率の測定により、ヒトの SCARB2 遺伝子の Exon 4 にコードされるアミノ酸配列が、ウイルス粒子への結合および感染受容体としての機能に必要であることを明らかにした<sup>29)</sup>。また、世界中で様々な遺伝子型のエンテロウイルス A71 が流行しているが、どの遺伝子型に分類されるウイルスも SCARB2 依存的に細胞に感染することも示した<sup>30)</sup>。

次にエンテロウイルス A71 の感染受容体として同定した SCARB2 が、エンテロウイルス A71 と同じエンテロウイルス A に分類される他種のウイルスでも感染受容体として機能するかを確かめた<sup>30)</sup>。ヒトの SCARB2 を恒常発現させた L929 細胞 (L-SCARB2 細胞) に、コクサッキーウイルス A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, A12, A14 および A16 をそれぞれ感染させ、細胞変性効果 (CPE) の出現およびウイルス感染効率を比較した。コクサッキーウイルス A7, A14 および A16 を感染させた L-SCARB2 細胞では CPE が観察され、ウイルスの感染効率も上昇していた<sup>30)</sup>。さらに、ヒトの SCARB2 がコクサッキーウイルス A7, A14 および A16 のウイルス粒子と直接結合すること、これらのウイルスの感染効率が SCARB2 発現抑制により低下することから、コクサッキーウイルス A7, A14 および A16 の感染受容体もヒト SCARB2 であることを示した<sup>30)</sup>。エンテロウイルス A に分類されるウイルスの中で、SCARB2 を感染受容体として用いる 4 種のウイルスは主に手足口病を引き起こし、SCARB2 を利用しない残りのウイルスは主にヘルパンギーナを引き起こす。これは、手足口病の病態と感染受容体の関連を示唆している。

我々とは別の研究グループから、PSGL-1<sup>31)</sup>, Annexin II<sup>32)</sup>, Nucleolin<sup>33)</sup>, Vimentin<sup>34)</sup>, Heparan sulfate glycosaminoglycan<sup>35)</sup> および Sialylated glycan<sup>36)</sup> が、エンテロウイルス A71 の感染を促進する分子として報告された。エンテロウイルス属に分類されるウイルスの感染受容体は、ウイルス粒子の細胞への吸着、ウイルス粒子の細胞への取り込みおよびウイルス粒子の構造変化によるゲノム RNA の放出を引き起こし、感染効率を上昇させる分子と定義される。この定義

にヒトの SCARB2 が該当するかを検討した。既に、SCARB2 がウイルス粒子と結合することおよびウイルスの感染効率を上昇させる事は示していたので、SCARB2 がウイルス粒子の細胞への取り込みおよびウイルス粒子の構造変化誘導を担うのかを確かめた<sup>37)</sup>。感染 15 分後に細胞を固定し、ウイルス粒子の細胞内局在を蛍光顕微鏡により確認したところ、ウイルス粒子は効率よく細胞内に取り込まれ、その多くが Early Endosome に到達していた。この結果は、SCARB2 を介した細胞への侵入は、クラスリン依存性エンドサイトーシスによって引き起こされるとい報告と一致する<sup>38)</sup>。次に、精製したウイルス粒子とヒトの SCARB2 を混ぜ、中性 pH 下またはエンドソーム内を模した酸性 pH 下に移し、ウイルス粒子の構造変化とゲノム RNA の放出を評価した。酸性 pH 下で SCARB2 と反応させた場合でのみ、ウイルス粒子の構造変化およびゲノム RNA の放出が起こった<sup>37,39,40)</sup>。以上より、ヒト SCARB2 が、細胞表面上でウイルス粒子と結合し、クラスリン依存性エンドサイトーシスによりウイルス粒子を細胞へと取り込み、酸性条件下でウイルス粒子の構造変化を惹起し、ウイルスゲノムを細胞質へ放出させ、ウイルス感染効率を上昇させることを確認した。つまり、SCARB2 がエンテロウイルス A71 の感染受容体であることが証明された。

この知見を元にして、我々はウイルスの病原性解析用のモデルマウスを作成するため、ヒトの SCARB2 遺伝子およびそのプロモーターを含む Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンを導入したトランスジェニックマウス系統を樹立した<sup>41)</sup>。この SCARB2 トランスジェニックマウスでは、ヒトとほぼ同様の臓器・組織・細胞でヒト SCARB2 の発現がみられた。エンテロウイルス A71 の静脈内、腹腔内または脳内接種による感染では、エンテロウイルス A71 は中枢神経系で良く増殖し、マウスに致死性であった<sup>41)</sup>。感染マウスの大脳皮質、中脳、小脳核、橋、延髄および脊髄の神経細胞においてウイルス抗原が検出された。SCARB2 トランスジェニックマウスは、成獣となったのちもエンテロウイルス A71 に対する感受性を失わなかったが、経口感染での感染効率が著しく低い点はヒトとは異なる。我々は、エンテロウイルス A71 の病原性発現

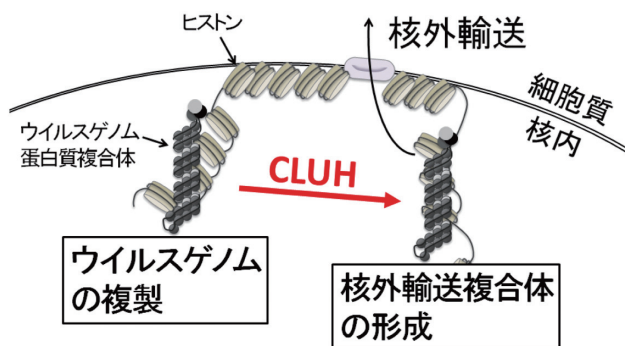


図5 インフルエンザウイルスゲノムの核内輸送の概念図

機序の解明に資するのみならず、ワクチンや治療薬の生体レベルでの評価にも有用な小動物感染モデルである SCARB2 トランスジェニックマウスを樹立することに成功した。

### 3. インフルエンザウイルスのゲノム RNA の核内での輸送

A 型インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科 (Family *Orthomyxoviridae*) アルファインフルエンザウイルス属 (Genus *Alphainfluenzavirus*) に分類される。A 型および B 型インフルエンザウイルスは、発熱、咳、喉の痛み、鼻水、筋肉または身体の痛み、頭痛または胃腸症状 (嘔吐および下痢) などの症状を呈する呼吸器疾患インフルエンザを引き起こす。インフルエンザの流行により、数百万の重症例、数十万人の死者およびそれに関連する経済的損失が毎年引き起こされる<sup>42)</sup>。A 型インフルエンザウイルスは、ヒト以外にも鳥類、豚、犬、馬などの様々な動物に自然感染するが、B 型インフルエンザウイルスの感染はヒトやアザラシに限られる<sup>43)</sup>。C 型インフルエンザウイルスは、ヒトに対してのみ軽度の呼吸器疾患を引き起こし、大規模な流行を引き起こすとは考えられていない<sup>44)</sup>。近年見つかった D 型インフルエンザウイルスが、ヒトに病気を引き起こすかは不明である<sup>45)</sup>。

インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写・複製の場である宿主細胞の核は、厳密に区画化された動的なオルガネラである。染色体間の空間である核質には、核スペクトル、promyelocytic leukaemia (PML) 体およびカハル体がある。それらを構成する因子は局所的に高濃度になることで反応を促進しているが、その領域を分離する膜がないため、核の構成因子の局在は時空間的に厳密に制御されなければならない<sup>46, 47)</sup>。インフルエンザウイルスの“ゲノム複製”とウイルスゲノムの“核外輸送複合体の形成”は、それぞれ核内のクロマチン領域で起こる<sup>48, 49)</sup>。しかし、“ゲノム複製”が起こるクロマチン領域と“核外輸送複合体形成”が起こるクロマチン領域が同じかどうかは不明であっ

た。我々は、非感染細胞では細胞質に存在する宿主蛋白質 CLUH が、ウイルス感染細胞ではウイルス蛋白質 PB2 および M1 とそれぞれ相互作用し、PB2-CLUH 複合体は核質へ、M1-CLUH 複合体は核マトリックスへ輸送されることを明らかにした<sup>50)</sup>。細胞質から核質へ移動した CLUH と細胞質から核マトリックスへ移動した CLUH が協調的に働くことにより、新規に合成されたウイルスゲノムは“ゲノム複製”の場所から“核外輸送複合体形成”が起こる場所へ輸送されることを明らかにした<sup>50)</sup>。この知見は、ウイルスがゲノム複製から粒子形成にモードを切り替える際に、ウイルスゲノムが核内を移動するという新しい概念をもたらした。さらに、通常は細胞質のみに存在する CLUH がウイルスの感染により核内へと移行し、ウイルスゲノムの核内での輸送に関わることも明らかとなり、CLUH の新たな生理的機能の解明につながることも期待される。

### 4. おわりに

これまでの研究生活では、本稿で紹介したエボラウイルス、エンテロウイルス A71、インフルエンザウイルスの他にも、ロタウイルス、イヌジステンパーウイルスを研究対象としてきた。私の性格が原因なのか、1つのウイルスの研究を長く続けることが出来ていない。“これ”という研究テーマを見つけ、そのスペシャリストになりたい一方で、どのウイルスにもそれなりに詳しいというジェネラリストにも憧れる。惑わされる日々にも早々に別れを告げるためにも、“四十にして惑わず”を目標に日々精進していきたい。“五十にして天命を知る”ことが出来れば、その後の研究者人生を謳歌できるのではないかという希望を持っている。

## 謝 辞

本稿で紹介した研究は、東京大学医科学研究所ウイルス感染分野河岡義裕先生および東京都医学総合研究所ウイルス感染プロジェクト小池智先生のご指導の下で進めたものです。河岡先生には通算10年に渡り、論文の書き方からプロジェクトの進め方まで微に入り細に入りご指導賜り、心より御礼申し上げます。小池先生には博士号取得後の4年間、本質を追求することの重要性を御教授いただきました。また、研究生活をスタートしたばかりの学部学生時代に、実験の基礎・基本をご指導いただきました岐阜大学農学部獣医学科人獣共通感染症学講座源宣之先生ならびに杉山誠先生に深く感謝いたします。研究を進めるにあたり、多くの共同研究者の方々にご協力いただきましたこと、心よりお礼申し上げます。また、日々の研究生活を同じ研究室で過ごした全ての皆様のご支援に感謝いたします。最後に、日本ウイルス学会杉浦奨励賞に御推荐くださいました河岡先生、小池先生、杉山先生に深謝いたします。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

## 引 用

- 1) Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Muhlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Saphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. 2014. Discussions and decisions of the 2012-2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012-June 2013. *Arch Virol* 159:821-830.
- 2) Boisen ML, Hartnett JN, Goba A, Vandi MA, Grant DS, Schieffelin JS, Garry RF, Branco LM. 2016. Epidemiology and Management of the 2013-16 West African Ebola Outbreak. *Annu Rev Virol* 3:147-171.
- 3) Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, Soropogui B, Sow MS, Keita S, De Clerck H, Tiffany A, Dominguez G, Loua M, Traore A, Kolie H, Malano ER, Heleze E, Bocquin A, Mely S, Raoul H, Caro V, Cadar D, Gabriel M, Pahlmann M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Impouma B, Diallo AK, Formenty P, Van Herp M, Gunther S. 2014. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med* 371:1418-1425.
- 4) Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. 2002. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* 76:4855-4865.
- 5) Timmins J, Scianimanico S, Schoehn G, Weissenhorn W. 2001. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 283:1-6.
- 6) Jasenosky LD, Neumann G, Lukashovich I, Kawaoka Y. 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 75:5205-5214.
- 7) Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y. 2006. Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* 2:e99.
- 8) Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7:1313-1319.
- 9) Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J. 2007. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* 81:4895-4899.
- 10) Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H. 2003. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol* 77:9987-9992.
- 11) Yamayoshi S, Kawaoka Y. 2007. Mapping of a region of Ebola virus VP40 that is important in the production of virus-like particles. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S291-295.
- 12) Neumann G, Ebihara H, Takada A, Noda T, Kobasa D, Jasenosky LD, Watanabe S, Kim JH, Feldmann H, Kawaoka Y. 2005. Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 79:10300-10307.
- 13) Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashovich IS, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. 2008. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 3:168-177.
- 14) Qiu J. 2008. Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health? *Lancet Neurol* 7:868-869.
- 15) Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Ictv Report C. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* 98:2421-2422.
- 16) Silva LP, Vanzile M, Bavari S, Aman JM, Schriemer DC. 2012. Assembly of Ebola virus matrix protein VP40 is regulated by latch-like properties of N and C terminal tails. *PLoS One* 7:e39978.
- 17) Adu-Gyamfi E, Digman MA, Gratton E, Stahelin RV. 2012. Single-particle tracking demonstrates that actin coordinates the movement of the Ebola virus matrix protein. *Biophys J* 103:L41-43.
- 18) Lu J, Qu Y, Liu Y, Jambusaria R, Han Z, Ruthel G, Freedman BD, Harty RN. 2013. Host IQGAP1 and Ebola virus VP40 interactions facilitate virus-like particle egress. *J Virol* 87:7777-7780.
- 19) Okumura A, Rasmussen AL, Halfmann P, Feldmann F, Yoshimura A, Feldmann H, Kawaoka Y, Harty RN, Katze MG. 2015. Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is an Inducible Host Factor That Regulates Virus Egress during Ebola Virus Infection. *J Virol* 89:10399-10406.
- 20) Han Z, Sagum CA, Bedford MT, Sidhu SS, Sudol M, Harty RN. 2016. ITC E3 Ubiquitin Ligase Interacts

- with Ebola Virus VP40 To Regulate Budding. *J Virol* 90:9163-9171.
- 21) Baz-Martinez M, El Motiam A, Ruibal P, Condezo GN, de la Cruz-Herrera CF, Lang V, Collado M, San Martin C, Rodriguez MS, Munoz-Fontela C, Rivas C. 2016. Regulation of Ebola virus VP40 matrix protein by SUMO. *Sci Rep* 6:37258.
  - 22) Han Z, Sagum CA, Takizawa F, Ruthel G, Berry CT, Kong J, Sunyer JO, Freedman BD, Bedford MT, Sidhu SS, Sudol M, Harty RN. 2017. Ubiquitin Ligase WWP1 Interacts with Ebola Virus VP40 To Regulate Egress. *J Virol* 91.
  - 23) Yamayoshi S, Neumann G, Kawaoka Y. 2010. Role of the GTPase Rab1b in ebolavirus particle formation. *J Virol* 84:4816-4820.
  - 24) Kawaguchi A, Hirohama M, Harada Y, Osari S, Nagata K. 2015. Influenza Virus Induces Cholesterol-Enriched Endocytic Recycling Compartments for Budozone Formation via Cell Cycle-Independent Centrosome Maturation. *PLoS Pathog* 11:e1005284.
  - 25) Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. 2013. Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol* 87:4683-4693.
  - 26) Ong KC, Wong KT. 2015. Understanding Enterovirus 71 Neuropathogenesis and Its Impact on Other Neurotropic Enteroviruses. *Brain Pathol* 25:614-624.
  - 27) Plevka P, Perera R, Cardosa J, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2012. Crystal structure of human enterovirus 71. *Science* 336:1274.
  - 28) Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:798-801.
  - 29) Yamayoshi S, Koike S. 2011. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. *J Virol* 85:4937-4946.
  - 30) Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S. 2012. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol* 86:5686-5696.
  - 31) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. 2009. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-797.
  - 32) Yang SL, Chou YT, Wu CN, Ho MS. 2011. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol* 85:11809-11820.
  - 33) Su PY, Wang YF, Huang SW, Lo YC, Wang YH, Wu SR, Shieh DB, Chen SH, Wang JR, Lai MD, Chang CF. 2015. Cell surface nucleolin facilitates enterovirus 71 binding and infection. *J Virol* 89:4527-4538.
  - 34) Du N, Cong H, Tian H, Zhang H, Zhang W, Song L, Tien P. 2014. Cell surface vimentin is an attachment receptor for enterovirus 71. *J Virol* 88:5816-5833.
  - 35) Tan CW, Poh CL, Sam IC, Chan YF. 2013. Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor. *J Virol* 87:611-620.
  - 36) Yang B, Chuang H, Yang KD. 2009. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Viol J* 6:141.
  - 37) Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S. 2013. Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. *J Virol* 87:3335-3347.
  - 38) Lin YW, Lin HY, Tsou YL, Chitra E, Hsiao KN, Shao HY, Liu CC, Sia C, Chong P, Chow YH. 2012. Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71. *PLoS One* 7:e30507.
  - 39) Dang M, Wang X, Wang Q, Wang Y, Lin J, Sun Y, Li X, Zhang L, Lou Z, Wang J, Rao Z. 2014. Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. *Protein Cell* 5:692-703.
  - 40) Chen P, Song Z, Qi Y, Feng X, Xu N, Sun Y, Wu X, Yao X, Mao Q, Li X, Dong W, Wan X, Huang N, Shen X, Liang Z, Li W. 2012. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenger receptor B 2. *J Biol Chem* 287:6406-6420.
  - 41) Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. 2013. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:14753-14758.
  - 42) Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, Cohen C, Gran JM, Schanzer D, Cowling BJ, Wu P, Kyncl J, Ang LW, Park M, Redlberger-Fritz M, Yu H, Espenhain L, Krishnan A, Emukule G, van Asten L, Pereira da Silva S, Aungkulanon S, Buchholz U, Widdowson MA, Bresee JS, Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator N. 2018. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet* 391:1285-1300.
  - 43) Bodewes R, Morick D, de Mutsert G, Osinga N, Bestebroer T, van der Vliet S, Smits SL, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. 2013. Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerg Infect Dis* 19:511-512.
  - 44) Matsuzaki Y, Nakamura K. 1997. [The virological, epidemiological and clinical features of influenza A, B and C viruses]. *Nihon Rinsho* 55:2515-2520.
  - 45) White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. 2016. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *J Clin Virol* 81:31-33.
  - 46) Lamond AI, Sleeman JE. 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol* 13:R825-828.
  - 47) Mao YS, Zhang B, Spector DL. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet* 27:295-306.
  - 48) Takizawa N, Watanabe K, Nouno K, Kobayashi N, Nagata K. 2006. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect* 8:823-833.
  - 49) Ma K, Roy AM, Whittaker GR. 2001. Nuclear export of

influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* 282:215-220.

- 50) Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. 2016. The host protein CLUH par-

ticipates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. *Nature Microbiology* 1:16062.

## Functional analysis of Host proteins involved in RNA virus replication

**Seiya YAMAYOSHI**

Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo  
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Since RNA virus genome encodes only a limited number of viral proteins, replication of RNA virus mostly relies on host cells. Elucidation of host proteins that play important roles in the virus replication cycles contributes not only to fundamental virology research but also to applied research such as development of antiviral drugs.

We revealed that Ebola virus matrix protein VP40 utilized host COPII transport machinery for its intracellular transport to the plasma membrane. Second, we demonstrated that enterovirus A71 used Scavenger receptor class B member 2 (SCARB2) as a cellular receptor. Finally, we found that host protein CLUH played an important role in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein (vRNP) complexes. Here, I would like to briefly introduce these findings.