

3. 生きた細胞におけるウイルスの可視化

川口 寧

東京大学医科学研究所・感染症国際研究センター
感染制御部門・ウイルス学分野

ウイルスの定義の1つとして、「ウイルス粒子は極めて微小である。よって、光学顕微鏡で観察することができない。」という記述がウイルス学の教科書にはあった。しかし、近年の光学顕微鏡の技術的進歩、また、様々な蛍光蛋白質および蛍光物質の開発は、生きた細胞内のウイルス粒子を光学顕微鏡で観察することを可能とした。これらの新しいテクノロジーを利用して、ウイルス粒子成熟過程の時間空間的な解析が可能となり、ダイナミックなウイルス増殖過程の実体が次第に明らかにされつつある。本稿では、単純ヘルペスウイルス1型のウイルス粒子可視化技術およびそれを利用したウイルス粒子成熟過程の解明について、我々の研究で得られた知見を含め解説する。

はじめに

ウイルス感染症の制御法で、最も効果的であるのはワクチンであることは論を待たない。しかし、新型インフルエンザ、エイズ、一部を除くヘルペスウイルス感染症等、効果的なワクチン開発が困難である（または、間に合わない）ウイルス感染症の制御は、抗ウイルス剤に頼らなければならないのが現状である。細菌に対する抗生物質を鑑みれば明らかのように、抗微生物剤の標的は、微生物に特異的なものでなければならない。さもないと、副作用が問題となる。一方、ウイルスは宿主細胞なしでは生存できない。ウイルス遺伝子の転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、ウイルス蛋白質やウイルス粒子の輸送等、ウイルス生活環の大部分は宿主細胞機構に依存している。つまり、ウイルス特異的な現象は極めて限られており、このことが抗ウイルス剤の開発を困難にしていると言える。既存の抗エイズ薬

や抗ヘルペスウイルス剤を鑑みれば明らかのように、これまでに開発された抗ウイルス薬の多くは、ウイルス特異酵素を標的としている場合が多い。しかし、全てのウイルスが、エイズウイルスやヘルペスウイルスの様に、抗ウイルス薬の標的となりうる特異酵素を持つわけではない。また、特異酵素を標的とする既存の抗ウイルス剤に関しても、抗ウイルス剤の宿命である薬剤耐性ウイルスの出現が報告されており、ウイルス特異酵素以外の現象を標的とした新規抗ウイルス薬の開発が求められている。それでは、ウイルス特異酵素以外のウイルス特異的な現象とは何であろうか？ウイルス特異的なものの最たるものは、ウイルス粒子そのものおよびその成熟過程であると言える。実際、ウイルス粒子の成熟過程を標的とする抗エイズ剤が報告されている⁹⁾。この様に、「ウイルスがどのようにできるか？」といったウイルス学の根幹を成す基本原理を解明するだけでなく、新しい抗ウイルス剤開発の基礎となるウイルス粒子成熟過程の研究は、ウイルス学分野において精力的に行われている。

従来、ウイルス粒子を観察するためには、電子顕微鏡が必要であった。周知のように、電子顕微鏡の解析では感染細胞を固定する必要がある。しかし、ウイルス粒子成熟過程は極めてダイナミックであることより、固定した細胞から得られる情報は限られていた。実際、ウイルス粒子成熟過程には不明な点が多い。近年の光学顕微鏡の技術的進歩、また、様々な蛍光蛋白質および蛍光物質の開発は、ウイル

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・感染症国際研究センター
感染制御部門・ウイルス学分野
TEL: 03-6409-2070
FAX: 03-6409-2072
E-mail: ykawagu@ims.u-tokyo.ac.jp

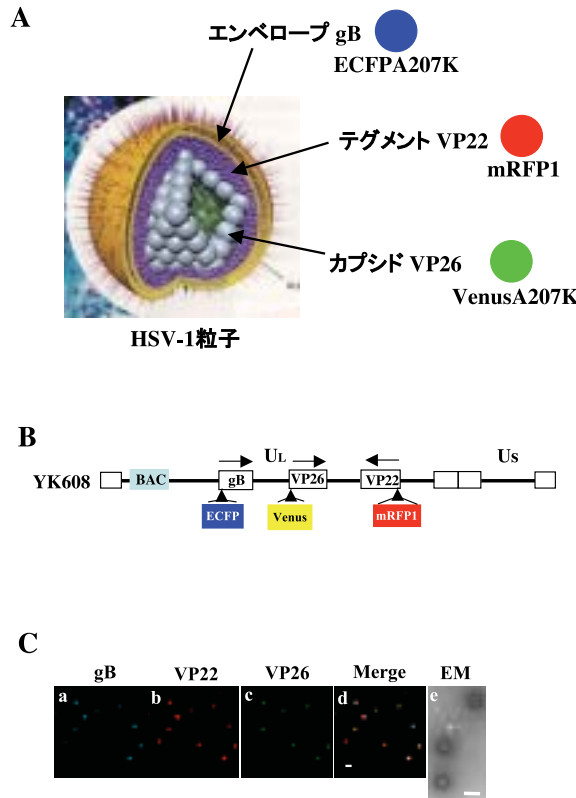


図 1 (A) YK608 ウイルス粒子の模式図. カプシド蛋白質 VP26 を蛍光蛋白質 Venus (緑色), テグメント蛋白質 VP22 を蛍光蛋白質 mRFP1 (赤色), エンベロープ蛋白質 gB を蛍光蛋白質 ECFP (青色) で標識した. (B) YK608 のウイルスゲノムの模式図. (C) 精製 YK608 ウイルス粒子の共焦点顕微鏡によるイメージング画像 (a-d) および電子顕微鏡像 (e). 電子顕微鏡像より, YK608 は完全なウイルス粒子を形成していると考えられ, さらに, 3 色の異なる蛍光を発色する.

ス粒子構成蛋白質をこれら蛍光プローブで標識することにより, 生きた細胞内におけるウイルス粒子の様々な動態を光学顕微鏡で観察することが可能となってきた. 光学顕微鏡を用いた生きた感染細胞のリアルタイムイメージングでは, 同一細胞内でのウイルス粒子またはウイルス蛋白質の動態を, 経時的に観察することが可能である. つまり, 従来の固定された細胞から得られる情報は時系列的に極めて断片的なものであったのに対し, 生細胞のリアルタイムイメージングでは, 時系列的に連続した情報を得ることができる. さらに, Z 軸に対して網羅的な感染細胞のイメージ切片を取得後, それらに基づく 3 次元立体構築イメージをコンピューター上で再現し, 標的としているウイルス感染現象の空間的な位置を解析することも可能である. これら感染細胞の時空間的な解析技術は, ウイルス粒子成熟過程の研究に大きなインパクトを与え, 従来では得ることのできない新発見が報告され始めている.

ウイルス粒子およびその成熟過程の可視化

ウイルス粒子の可視化には, 大きく分けて 2 つの方法がある. 1 つは, ウイルス粒子そのものを蛍光色素で標識す

る方法である⁶⁾. この方法を用いれば, ほとんど全ての種類のウイルス粒子を可視化することが可能である. しかし, ウイルス粒子の表面のみを蛍光物質で標識しているため, ウイルス粒子が宿主細胞に感染し, 粒子が崩壊すると可視化は不能となる. ウイルスの細胞侵入過程や侵入後から粒子崩壊までのウイルス粒子の輸送といった限られた現象のみが解析可能であり, 新生ウイルス粒子の成熟過程を観察することはできない. 2 つめは, ウイルス粒子構成蛋白質を蛍光蛋白質と融合させるかたちで発現する組み換えウイルスを利用する方法である⁵⁾. 通常, ウイルス粒子構成蛋白質は, 1 つのウイルス粒子の中にかかなりのコピー数が存在している. 組み換えウイルスにおいては, 1 つのウイルス粒子に複数コピーの蛍光蛋白質がウイルス粒子構成因子と融合したかたちで発現することとなり, それ故に, ナノメートル単位のウイルス粒子でも光学顕微鏡において可視化が可能となる. この方法を用いれば, ウイルス粒子そのものの観察だけでなく, 生きた感染細胞中での新生ウイルス粒子構成蛋白質の動態や粒子形成過程も可視化することができる. しかし, ウイルス粒子構成蛋白質に蛍光蛋白質を標識することによってウイルス粒子形成が阻害される場

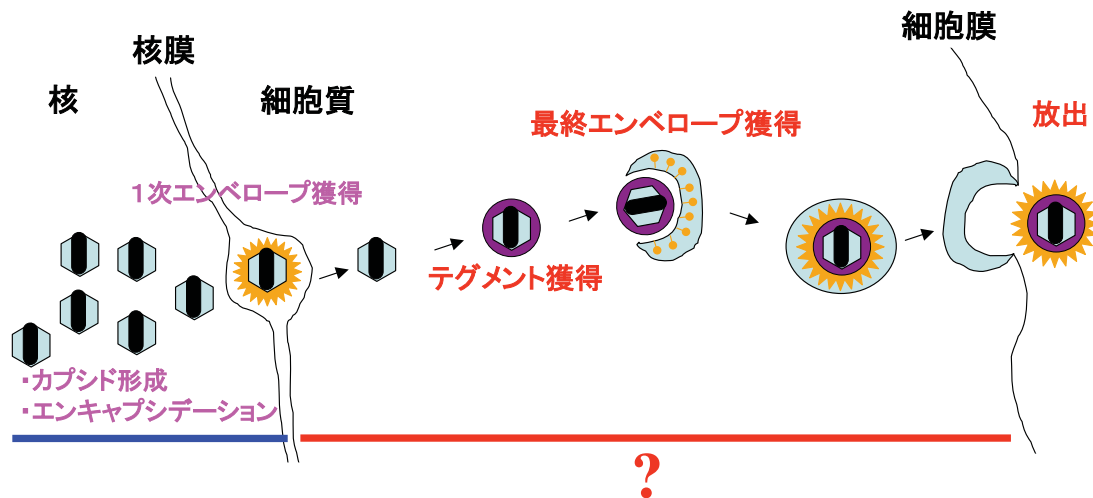


図2 HSV ウイルス粒子成熟過程. HSV は核内でカプシドを形成し, ウイルスゲノムをパッケージングする. その後, カプシドが核内膜でエンベロープを被り (primary envelopment), 核内外膜間 (perinuclear space) に出芽後, 核外膜とエンベロープが融合することによってカプシドが細胞質に放出される. その後, カプシドはテグメントを獲得し, 細胞質の膜オルガネラに出芽することによって最終エンベロープを獲得する (secondary or final envelopment). その後, エクソサイトーシスによって細胞外に放出される.

合や, 組み換えウイルス作製系がない, または, 蛍光蛋白質遺伝子のウイルスゲノムへの挿入ができない場合は, この方法を適応することができず, 今のところ, 全種類のウイルスにおいてこの方法が利用可能というわけではない. ウイルス粒子およびその成熟過程の可視化は, 大型の DNA ウイルスであるヘルペスウイルス, アデノウイルス, ポックスウイルスで先行している. その理由として, (i) 組み換えウイルス作製技術が確立されている, (ii) 多くのウイルス粒子構成蛋白質が存在するので, 蛍光タンパク質を融合させてもウイルスの粒子形成に影響のない (少ない) 候補ウイルス蛋白質が存在する可能性が高い, (iii) ウイルスゲノムが大きいので, 外来遺伝子挿入許容量が大きく複数の蛍光タンパク質の遺伝子を挿入可能であることが挙げられる. ウイルス粒子は複数の異なるウイルス因子から構成されている場合が多いので, それらが集合し, ウイルス粒子が構築されるといった一連のウイルス粒子成熟過程の解析においては, 異なる複数の蛍光蛋白質を複数のウイルス因子に標識する必要がある. このような多色の蛍光蛋白質を用いた一連のウイルス粒子成熟過程の解析は, 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1: herpes simplex virus 1) および近縁のプタヘルペスウイルスであるオーエスキー病ウイルス (PRV: pseudorabies virus) において精力的に行われている (後述).

HSV-1 の可視化

HSV には, 2 つの血清型 (HSV-1 および HSV-2) があり, ヒトに口唇ヘルペス, 性器ヘルペス, 角膜炎, 脳炎,

新生児ヘルペスなどの多様な疾患を引き起こす¹³⁾. 現在, アシクロビルをはじめとする抗ヘルペスウイルス剤が開発されたことにより, HSV 感染症の効率的な治療が可能となったといえる. しかし, 米国で年間 1,000 万人以上が性器ヘルペスに罹るという事実は, HSV 感染症のコントロールが未だに困難であることを物語っている. HSV を含めたヘルペスウイルスの特徴として, 潜伏感染を引き起こすことが挙げられる. HSV は局所で病態を引き起こした後, 神経節に輸送され潜伏感染する. そして, ある種の刺激や宿主の免疫状態によって再活性化される. その際は, 神経節から局所にウイルスが輸送され, 回帰感染を引き起こす. この潜伏感染をするというヘルペスウイルスの性状がこれらのウイルス群の感染制御を困難にしている大きな原因である.

HSV 粒子は, ほぼ球状で, 外側よりエンベロープ, テグメント, ヌクレオカプシドの主要基本構造から成る (図 1A). 4 つのウイルス因子から構成されるヌクレオカプシドは直径が 100 ~ 110nm の正 20 面体で内部に直鎖状 2 本鎖の DNA ゲノムを格納している. ウイルスゲノムは約 150kbp と大型であり, 約 20 ~ 30kbp 外来遺伝子の挿入が可能である. 最外層のエンベロープは, 宿主細胞由来の脂質 2 重層を基本とする膜構造であり, 約 10 種のウイルス特異的糖蛋白質が埋め込まれている. テグメントとは, エンベロープとカプシドとの間に介在する蛋白質層であり, 20 種類以上のウイルス因子が存在している. HSV では, ウイルス DNA の転写を活性化する転写制御因子や, 宿主の転写物を分解する RNA 分解酵素がテグメント層に含まれる.

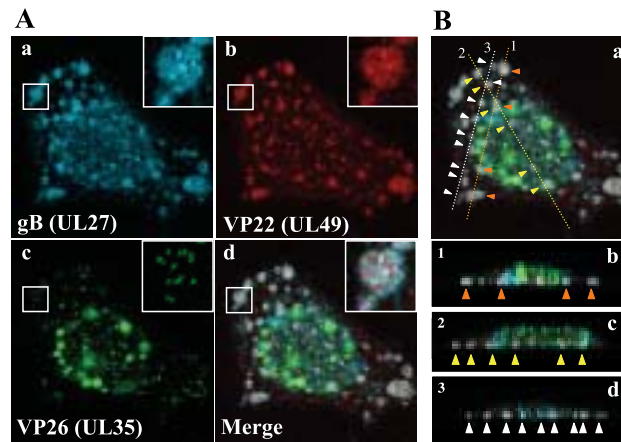


図 3 細胞の基底面に形成される ‘assembly sites’. (A) YK608 を Vero 細胞に感染させ、12 時間後の細胞基底面のリアルタイムイメージング画像. エンベロープ蛋白質 gB (a), テグメント蛋白質 VP22 (b), カプシド蛋白質 VP26 (c) が細胞の基底面に形成される複数のコンパートメント (assembly sites) で蓄積している (d). 拡大図: それぞれのコンパートメントには、エンベロープ蛋白質、テグメント蛋白質およびカプシド蛋白質が蓄積している. カプシドはウイルス粒子とほぼ同サイズのドット状に検出されることから、成熟したカプシド構造体が細胞基底面の assembly sites に蓄積していることが示唆される. (B) Z 軸に対して細胞の頭頂部から基底面までの網羅的な感染細胞 (A) の Z 切片画像を取得し、コンピューターで 3 次元立体構築を行った. 各 line における (a) Z-stack イメージング画像を示す (b, c, d). assembly sites (矢印) が細胞の基底面に形成されていることがわかる.

生きた細胞における HSV-1 粒子の可視化は、1999 年に Elliott らのグループによって初めて報告された⁵⁾. 彼女らは、テグメント構成ウイルス因子の 1 つである VP22 が蛍光蛋白質 GFP と融合したかたちで発現する組み換えウイルスを作製し、生きた細胞においてリアルタイムイメージングを行った. その結果、VP22 の感染細胞における連続的な挙動だけでなく、ウイルス粒子をも可視化することが可能であることが明らかになった. また、カプシド構成ウイルス因子やエンベロープ構成ウイルス因子を蛍光蛋白質で標識した組み換えウイルスも作製され、ウイルス粒子レベルでのリアルタイムイメージングが可能であることが報告された^{1, 4, 12, 14)}. テグメント構成因子やエンベロープ構成因子に関しては、複数の各構成因子に蛍光蛋白質を標識可能であることが報告されているが、カプシド構成因子に関しては、VP26 に蛍光蛋白質を標識した組み換えウイルスのみが報告されている. これは、他のカプシド構成因子に蛍光蛋白質を標識すると正常なカプシド形成を阻害してしまい、組み換えウイルスの作製が不可能であることが原因であると考えられている. 実際、HSV-1 や PRV とは異なる亜科に属するヘルペスウイルス、例えば、ヒトサイトメガロウイルス、Epstein-Barr ウイルスにおいてもカプシドの可視化が試みられているが、未だに報告がない. HSV-1 や PRV において、VP26 を蛍光蛋白質で標識した組み換えウイルスの作製^{4, 14)} やカプシドの可視化¹⁴⁾ が比較的早く報告されたことは幸運であり、その後の HSV-1 や PRV のリアルタイムイメージングの進展に大きく貢献した.

HSV-1 および PRV の神経軸索輸送

HSV の潜伏感染および再活性化後の回帰感染の際は、ウイルスはそれぞれ神経軸索を逆方向に移動する (逆行性輸送および順行性輸送). Elliott らのグループによる生きた細胞における HSV-1 粒子の可視化成功後、幾つかのグループが HSV-1 または PRV の神経軸索輸送の可視化に成功し、実際にウイルス粒子が双方向に移動すること、その際の移動速度などを報告している^{2, 14)}.

HSV-1 や PRV の回帰感染では、ウイルスは神経軸索を順行性輸送され局所に運ばれる. その際のウイルス粒子成熟過程には不明な点が多い. 電子顕微鏡を用いた解析では、2 つのモデルが提唱されていた. 1 つは、神経細胞の細胞体でウイルスが最終エンベロープを獲得し、完成されたウイルス粒子が神経軸索を順行輸送される ‘Marriage Model’ であり、もう 1 つは、細胞体で構築されたカプシドとエンベロープが別々に神経軸索を輸送され、神経終末でカプシドが最終エンベロープを獲得する ‘Separate Model’ である^{7, 8, 10, 11)}. 最近、カプシドを蛍光蛋白質で標識した組み換え HSV-1 を用い、エンベロープを特異抗体で検出すると、神経軸索においてカプシドとエンベロープの局在が全く一致しないという ‘Separate Model’ を支持する報告がなされた¹⁶⁾. また、エンベロープを蛍光蛋白質で標識し、カプシドを特異抗体で検出しても同様な結果が得られることも報告されている¹⁵⁾. 一方、カプシドとエンベロープを異なる蛍光蛋白質で標識した組み換え PRV のリアルタイム

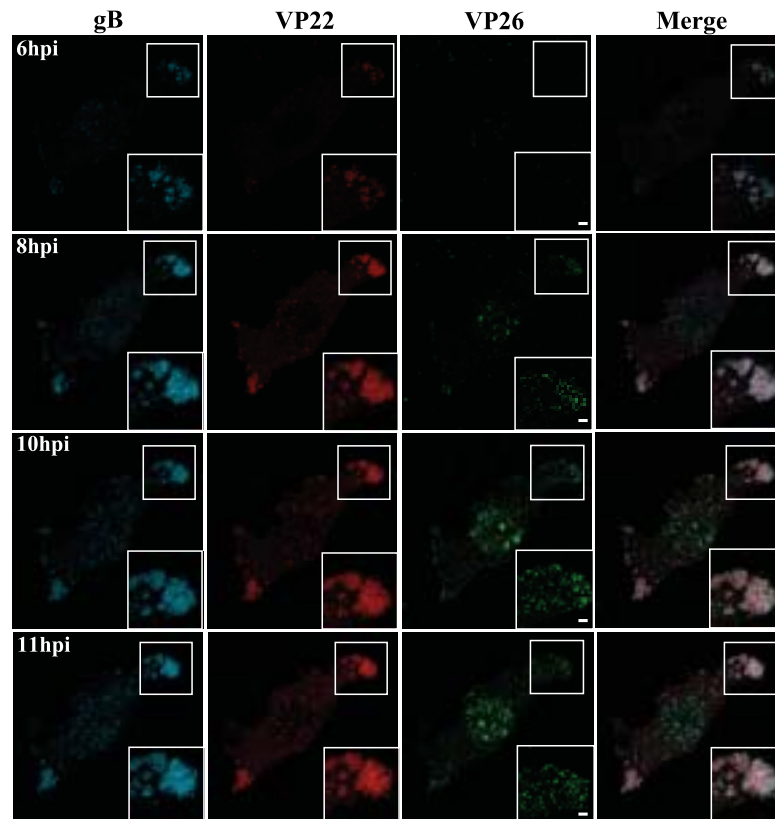


図4 ‘assembly sites’ 形成過程のタイムラプス解析. テグメント (VP22) とエンベロープ (gB) 蛋白質が同時に蓄積を始め (6h), その後, カプシド (VP26) が遅れて集積する (8h). 時間とともにエンベロープとテグメント蛋白質で規定されるコンパートメントのサイズは大きくなる一方, カプシドのドットの大きさはほぼ変化せず数が増えるのみである. テグメントとエンベロープ蛋白質の動態は完全に一致する.

イメージング解析から, エンベロープとカプシドの両方が存在するウイルス粒子が神経軸索を順行性輸送される像が得られるという ‘Marriage Model’ を支持する報告が別のグループからなされた¹⁾. これら2つのグループの相反する結果が, HSV-1 と PRV というウイルスの種類によるものなのか, 解析系の違いによるものなのかは不明である.

HSV-1 粒子の異なる3つのコンポーネントを異なる蛍光蛋白質で標識した組み換えウイルスの作製とそれを用いたウイルス粒子成熟過程の解析

HSV のウイルス粒子成熟過程を図2に示す. HSV は核内でカプシドを形成し, ウイルスゲノムをパッケージングする. その後, カプシドは核外へと移動する. カプシドの核外への輸送に関しては3つのモデルが提唱されてきた¹³⁾. 現在では, カプシドが核内膜でエンベロープを被り (primary envelopment), 核内外膜間 (perinuclear space) に出芽後, 核外膜とエンベロープが融合することによってカプシドが細胞質に放出されるというモデルが最も支持されている. その後, カプシドはテグメントを獲得し, 細胞

質の膜オルガネラに出芽することによって最終エンベロープを獲得する (secondary or final envelopment). その後, エクソサイトーシスによって細胞外に放出される. HSV のウイルス粒子成熟過程は精力的に行われており, カプシドの核内で構築→ゲノムのパッケージング→核内膜での primary envelopment → perinuclear space への出芽過程までは明らかになっているが, その後のウイルス粒子成熟過程は不明な点が多い. 例えば, カプシドがテグメントを獲得する場や最終エンベロープ獲得の場に関してさえ断片的な証拠しかなく, 未だ確定的ではない.

前述のように, HSV 粒子はカプシド, テグメント, エンベロープの3つのコンポーネントから構成されている. 我々は一連の HSV ウイルス粒子成熟過程を解析するために, HSV-1 粒子の3つのコンポーネントを異なる蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルス YK608 を作製した (図1A)¹⁷⁾. 親株は, 我々が独自に開発した HSV-1 改変系が利用可能であり, かつ, 野生体の性状を保持する YK304¹⁸⁾ を用いた. YK608 は4つの外来遺伝子がウイルスゲノムに挿入されているのにも関わらず (図1B), Vero 細胞における増殖能は親株 YK304 や野生体と比して, 若干低下している

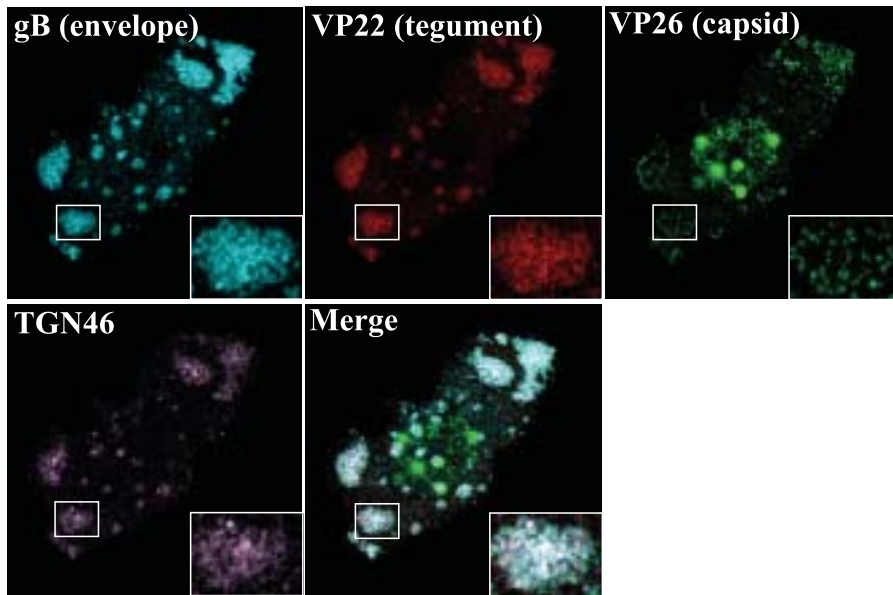


図5 HSV感染細胞基底面に誘導される‘assembly sites’にはTGNマーカーがリクルートされる。YK608をVero細胞に感染させ、12時間後の感染細胞を固定し、抗TGN46抗体で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Assembly sitesに、TGNのマーカーであるTGN46が蓄積している。

だけであった¹⁷⁾。精製YK608ウイルス粒子を電子顕微鏡で観察したところ、野生体と同様な形態のウイルス粒子が観察された(図1C)。また、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、3色の蛍光を発するウイルス粒子が検出可能であった(図1C)。さらに、生きたYK608感染細胞の網羅的な3次元立体構築イメージを解析した結果、感染細胞の基底面(正確には、細胞と培養シャーレの接着面)に、カプシド、テグメントおよびエンベロープ蛋白質が蓄積するコンパートメントが複数誘導されることが明らかになった(図3)。各コンパートメントを詳細に観察すると、カプシド蛋白質はドット状に観察され、その大きさが成熟したカプシドと同様であった(図3)。また、タイムラプス解析より、同定されたコンパートメントには、テグメントとエンベロープ蛋白質が同時に蓄積を始め、その後、カプシドが遅れて集積し、時間とともにエンベロープとテグメント蛋白質で規定されるコンパートメントのサイズは大きくなる一方、カプシドのドットの大きさはほぼ変化せず、数が増えるのみであった(図4)。以上のリアルタイムイメージング解析より、我々が見出した細胞基底面に誘導される複数のコンパートメントはウイルス粒子成熟の場、特に、3つのコンポーネントが集積していることから、HSV-1の最終エンベロープ獲得の場であることが強く示唆され、‘assembly sites’と命名した。

次に、我々の同定した‘assembly sites’に宿主細胞のどの膜オルガネラが集積するかを解析した。通常、核近傍の

1カ所に検出されるゴルジ体やTGN(*trans*-Golgi Network)は、HSV-1が細胞に感染すると細胞質全体に拡散することが報告されている^{3, 19)}。拡散したTGN、ゴルジ体、または、通常より細胞質全体に拡散している他の膜オルガネラが‘assembly sites’に特異的にリクルートされれば、HSV-1最終エンベロープの場同定のより確かな根拠となると考えた。解析の結果、TGNのマーカーが特異的に‘assembly sites’にリクルートされるが、他のマーカー(ゴルジ体、初期エンドソーム、後期エンドソーム)はリクルートされないことが明らかになった(図5)。以上のことから、HSV-1の最終エンベロープ獲得がTGNで行われていることが強く示唆された。本知見は¹⁷⁾、HSV-1最終エンベロープの場に関して、現在までの最良の証拠を呈示するものとして、*Journal of Virology*のSpotLightで紹介された(*J. Virol.* 82: 5117, 2008)。

おわりに

生きた細胞におけるウイルス生活環の可視化技術は、ウイルス粒子成熟過程の解明に有用だけでなく、新しい抗ウイルス薬の開発に利用するといった様々な可能性を秘めている。図6は、HSVの増殖を抑制する薬剤を添加した際の各ウイルス粒子コンポーネントの発現を示している。薬剤を添加すると、各ウイルスコンポーネントの発現パターンまたは発現量が薬剤非添加と比して明らかに異なる。つまり、本技術はウイルス粒子成熟過程を標的とした抗ウイ

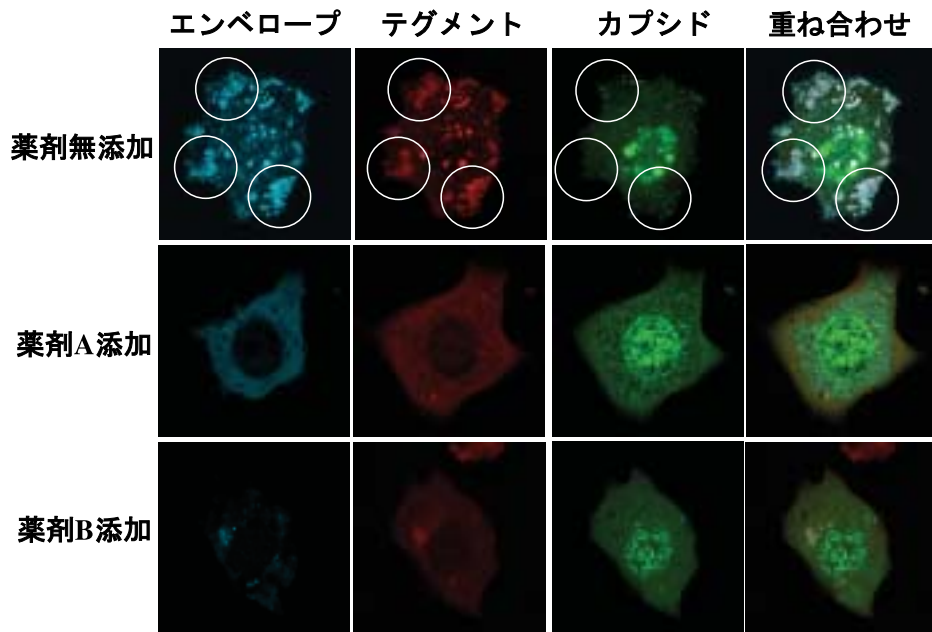


図6 リアルタイムイメージングの抗ウイルス薬開発への応用. YK608 感染 Vero 細胞に HSV の増殖を阻害することが知られている Brefeldin A (薬剤 A) または monensin (薬剤 B) を添加した. その結果, それぞれの薬剤を添加すると各ウイルス粒子構成蛋白質の発現量または発現パターンが薬剤非添加と比して異なることが明らかになった. この差異を指標にして, ウイルス粒子成熟過程を標的とした新しい抗 HSV 剤のスクリーニングが可能であることが示唆される.

ルス剤の開発に応用可能であることが示唆される. 我々が開発した組み換えウイルスとハイコンテントリアルタイムイメージングシステム (マルチウエルプレート等を利用し, 多サンプルのイメージ画像を短時間で解析するシステム) を組み合わせれば, high-throughput なスクリーニング系も構築可能であると考えられる.

一方, ウイルス粒子成熟過程のリアルタイムイメージングの歴史は約 10 年と浅く, 解決・改良しなければならない問題が多くあることも事実である. 今後, より一層の顕微鏡の光学系, イメージング解析ソフトおよび蛍光蛋白質の改良が望まれると共に, 実際のウイルス感染細胞のイメージング技術に関する情報の蓄積や研究者間での共有が重要である. なお, 'Marriage Model' と 'Separate Model' の論争を鑑みれば明らかなように, リアルタイムイメージングも万能ではない. 従来の電子顕微鏡による解析, 蛍光抗体法による解析, 生化学・分子生物学的解析等を組み合わせ, より多面的な解析がウイルス粒子成熟過程の解明には必須であると考えられる.

文 献

- 1) Antinone, S. E., and G. A. Smith. Two modes of herpesvirus trafficking in neurons: membrane acquisition directs motion. *J Virol* 80:11235-40, 2006.
- 2) Bearer, E. L., X. O. Breakefield, D. Schuback, T. S. Reese, and J. H. LaVail. Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8146-50, 2000.
- 3) Campadelli, G., R. Brandimarti, C. Di Lazzaro, P. L. Ward, B. Roizman, and M. R. Torrisi. Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2798-802, 1993.
- 4) Desai, P., and S. Person. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* 72:7563-8, 1998.
- 5) Elliott, G., and P. O'Hare. Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J Virol* 73:4110-9, 1999.
- 6) Georgi, A., C. Mottola-Hartshorn, A. Warner, B. Fields, and L. B. Chen. Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6579-83, 1990.
- 7) LaVail, J. H., A. N. Tauscher, J. W. Hicks, O. Harrabi, G. T. Melroe, and D. M. Knipe. Genetic and molecular in vivo analysis of herpes simplex virus assembly in murine visual system neurons. *J Virol* 79:11142-50, 2005.
- 8) LaVail, J. H., K. S. Topp, P. A. Giblin, and J. A. Garner. Factors that contribute to the transneuronal spread of herpes simplex virus. *J Neurosci Res* 49:485-96, 1997.
- 9) Li, F., R. Goila-Gaur, K. Salzwedel, N. R. Kilgore, M. Reddick, C. Matallana, A. Castillo, D. Zoumplis, D. E. Martin, J. M. Orenstein, G. P. Allaway, E. O. Freed,

- and C. T. Wild. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13555-60, 2003.
- 10) Lycke, E., K. Kristensson, B. Svennerholm, A. Vahlne, and R. Ziegler. Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol* 65 (Pt 1):55-64, 1984.
 - 11) Penfold, M. E., P. J. Armati, Z. Mikloska, and A. L. Cunningham. The interaction of human fetal neurons and epidermal cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32:420-6, 1996.
 - 12) Potel, C., K. Kaelin, I. Gautier, P. Lebon, J. Coppey, and F. Rozenberg. Incorporation of green fluorescent protein into the essential envelope glycoprotein B of herpes simplex virus type 1. *J Virol Methods* 105:13-23, 2002.
 - 13) Roizman, B., D. M. Knipe, and R. J. Whitley. Herpes simplex viruses, p. 2501-2602. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A., 2007.
 - 14) Smith, G. A., S. P. Gross, and L. W. Enquist. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3466-70, 2001.
 - 15) Snyder, A., B. Bruun, H. M. Browne, and D. C. Johnson. A herpes simplex virus gD-YFP fusion glycoprotein is transported separately from viral capsids in neuronal axons. *J Virol* 81:8337-40, 2007.
 - 16) Snyder, A., T. W. Wisner, and D. C. Johnson. Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J Virol* 80:11165-77, 2006.
 - 17) Sugimoto, K., M. Uema, H. Sagara, M. Tanaka, T. Sata, Y. Hashimoto, and Y. Kawaguchi. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol* 82:5198-211, 2008.
 - 18) Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata, and Y. Kawaguchi. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* 77:1382-91, 2003.
 - 19) Wisner, T. W., and D. C. Johnson. Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol* 78:11519-35, 2004.

Visualization of viruses in living cells

Yasushi KAWAGUCHI

Division of Viral Infection, Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo.

4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

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

Live-cell imaging of cells infected with recombinant viruses expressing fluorescently tagged structural viral proteins enables to visualize virion maturation pathways at a virion particle level in the same cells as infection progresses. This technology have gradually unveiled previously unreported aspects of the pathways. This article focuses on live-cell imaging technology of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and reviews the up-to-date topics of HSV-1 maturation pathway including our recent progress.