

3. エンベロープウイルスの宿主細胞への侵入過程

宮内 浩典

国立感染症研究所エイズ研究センター
エイズ予防財団

エンベロープウイルスにとってウイルス脂質二重膜と細胞膜との融合過程はウイルス感染に必須のステップである。膜融合はウイルスの融合タンパク質の構造変化によって誘導され、その構造変化はそれぞれのウイルスによって異なったきっかけで開始される。このような多様な融合タンパク質の構造変化の誘導機序は、膜融合過程の制御がウイルス感染にとって非常に重要であることを物語っている。エンベロープウイルスの中でヒト免疫不全ウイルス (HIV) を含む低 pH 非依存性のウイルスは、これまでは主に細胞表面で膜融合とウイルス侵入を行うと考えられてきた。しかし最近の研究からこれらの低 pH 非依存性のウイルスの中にもエンドサイトーシスを感染経路として利用するウイルスが存在することが明らかとなってきた。またウイルス受容体以外のいくつかの宿主因子がエンベロープウイルスの細胞侵入に関与する機構も解明されてきた。本稿では HIV の細胞侵入に関する最近の知見を含めた形で、エンベロープウイルスの膜融合機構ならびに宿主細胞への侵入機構について解説する。

1. はじめに

脂質二重層からなるウイルス膜を持つエンベロープウイルスは、宿主細胞の細胞質内に侵入しウイルスの遺伝情報を送り込むために、ウイルス膜と細胞膜との膜融合の過程を必要とする。ウイルス膜、細胞膜とも脂質二重層で形成されており、それぞれの外側の脂質膜がまず融合した後、半融合 (Hemifusion) と呼ばれる内側の膜どうしが接する過程を経て内側の膜が融合し膜融合 (fusion) が完了すると考えられている (Stalk 仮説)¹⁾ (図 1)。このような現象は一般に、触媒作用無しには容易には起こらない。これを容易にしているのが、融合タンパク質と呼ばれるウイルスタンパク質である。エンベロープウイルスのウイルス表面

に存在するウイルスタンパク質はエンベロープタンパク質 (Env) と呼ばれ、そのうち膜融合能をもつタンパク質を融合タンパク質と呼ぶ。ウイルスが宿主細胞上のウイルス受容体に結合した後、それぞれのウイルスによって異なる機構により融合タンパク質が活性化され、大きな構造変化を伴いながら膜融合を誘導する。

2. ウイルス融合タンパク質による膜融合の誘導

エンベロープウイルスの融合タンパク質はその構造的特徴によりクラス I からクラス III の三種類に分類することができる^{2,3)}。クラス I の融合タンパク質としては、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (Hemagglutinin: HA) やレトロウイルスの Env などが挙げられ、クラス II にはセムリキ森林ウイルス (Semliki Forest Virus: SFV) や Dengue 熱ウイルスなどの融合タンパク質が属する。ラブドウイルスである水泡性口炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus: VSV) の G タンパク質 (VSVG) やヘルペスウイルスの gB はクラス I とクラス II の両方の特徴を併せ持ちクラス III と呼ばれている。いずれのクラスの融合タンパク質においても、ウイルス受容体への結合や低 pH などのきっかけによって著しい構造変化が誘導され、その構造変化が膜融合を引き起こすと考えられている。

クラス I の融合タンパク質は SU と TM (レトロウイル

連絡先

〒162-8640
東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所エイズ研究センター第三室
エイズ予防財団
TEL : 03-5285-1111(2325)
FAX : 03-5285-5037
E-mail : kosuke@nih.go.jp

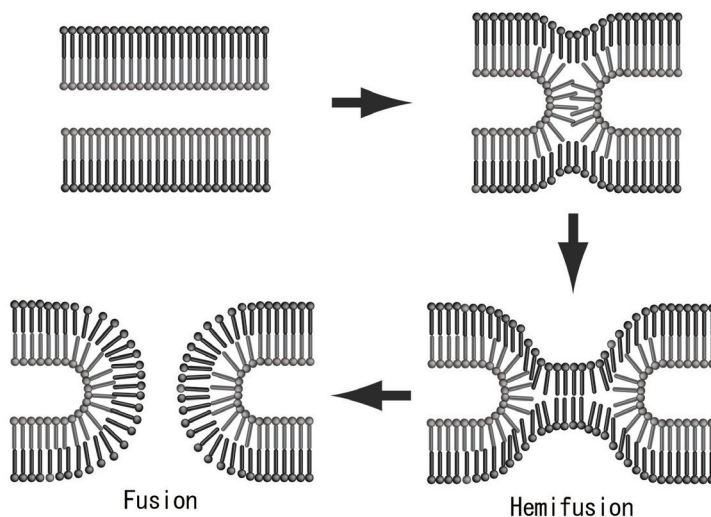


図1 脂質二重膜の膜融合

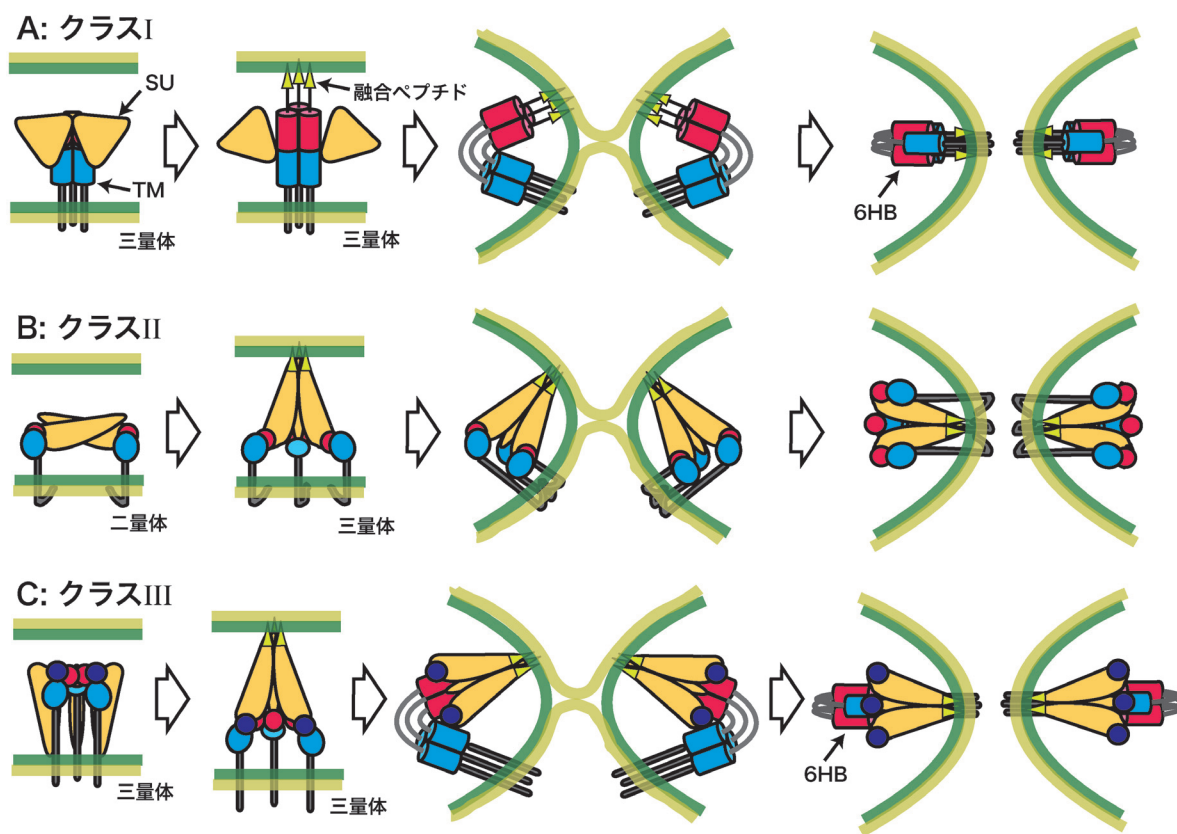


図2 ウイルス融合タンパク質による膜融合

スの場合) などと呼ばれる2つのサブユニットからなる分子の同種三量体である。SUはウイルスレセプターの認識をおもな役割としており、融合タンパク質としての活性はおもにTMに依存する。TMのウイルス膜外領域には2つ

のヘリックス (N末側のヘリックスをN-ヘリックス, C末側のヘリックスをC-ヘリックスと呼ぶ) が存在する。構造変化が起きると両ヘリックスをつなぐ部分がヘリックスとなりN-ヘリックスとC-ヘリックスが一本の長い

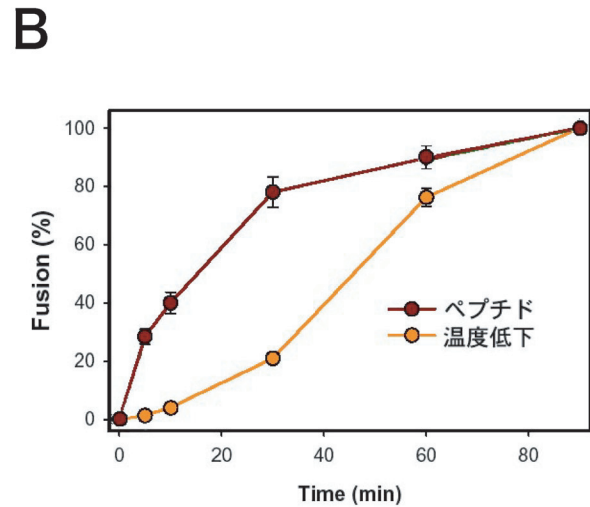
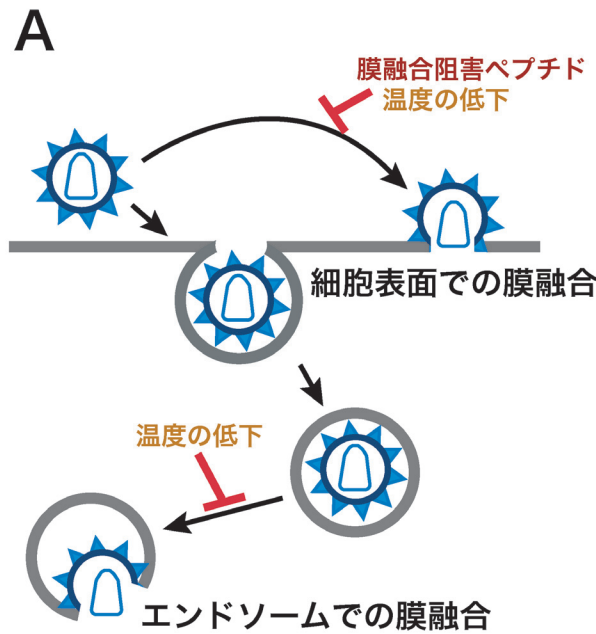


図3 膜融合阻害ペプチドおよび温度低下法による HIV 膜融合動態の解析

ヘリックスとなる。この構造変化によって TM の N 末側が細胞膜側に接近し、疎水性アミノ酸残基からなる融合ペプチド領域が細胞膜に進入することを可能にする（このときの構造をヘアピン構造と呼ぶ）。その後、ヘリックスの一部がループに構造変化することで、3つの N-ヘリックスからなる柱の溝に3本の C-ヘリックスがはまりこんだ6本柱の構造（Six-Helix Bundles: 6HB）を形成する。これによりウイルス膜と細胞膜が近接、混合し膜融合が起こると考えられている（図 2A）（このときの構造をヘアピン構造と呼ぶ）⁴⁻⁵⁾。

一方クラス II の融合タンパク質では、構造変化前に二つのサブユニットが向かい合うようにして同種二量体構造をとっている。これが3つ集まって2つの三量体に組み換わり、融合ペプチド領域を標的細胞膜側に突き出すようにして立ち上がる（この構造からボルケーノタイプなどと呼ばれる）。細胞膜に融合ペプチド領域が進入した後、立ち上がっていた部分がウイルス膜側に折れ曲がることによりウイルス膜と細胞膜が混合し膜融合が起こるとされている（図 2B）⁶⁻⁷⁾。クラス III の融合タンパク質は構造変化前から三量体であるが、標的細胞膜への結合様式はクラス II に相似していると推測されている、しかしながら細胞膜への進入後には、クラス I に特徴的な 6HB を形成することで膜融合を完了すると考えられている（図 2C）⁸⁻⁹⁾。

3. ウイルス融合タンパク質の活性化

先に述べたように、融合タンパク質はその構造変化によって膜融合を誘導するが、ほとんどの場合この構造変化は

不可逆的である（VSV G は例外的であり、一度低 pH にさらされたあとでも pH が中性に戻るとタンパク質構造も元に戻る¹⁰⁾。適切なタイミングで、適切な細胞内の場所にウイルス成分を送り込むことはウイルス増殖に重要であるため、どのきっかけで融合タンパク質の構造変化を開始させるのかは感染を成立させる上で非常に重要なポイントとなる。現在知られているすべてのクラス II 融合タンパク質やインフルエンザウイルスの HA、VSV G などは、膜融合を誘導するための構造変化を pH が中性から酸性に変わることにより開始する。特に HA、VSV G などは他のタンパク質の補助を必要とせず、低 pH のみによって膜融合を誘導することが可能である²⁾。

これに対して宿主細胞上のウイルス受容体にウイルス膜タンパク質が結合することを融合タンパク質の構造変化のきっかけとするウイルスも存在する。γレトロウイルス（Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV など）や δレトロウイルス（成人 T 細胞白血病ウイルス Human T-cell Lymphotropic Virus: HTLV など）は SU と TM からなるクラス I の融合タンパク質を持つ。これらのサブユニットはそれぞれにシステイン残基を含む CXXC, CX6CC (X は任意のアミノ酸残基) モチーフを有している¹¹⁾。ウイルス受容体との結合前にはこれらのモチーフのシステイン残基はタンパク質の内部に隠されているが、ウイルス受容体との結合に伴い、SU と TM のシステイン残基間にジスルフィド結合が形成される。その後さらなる構造変化に伴って SU と TM 間のジスルフィド結合は SU の CXXC モチーフ内のジスルフィド結合に組代わり、これによって SU が

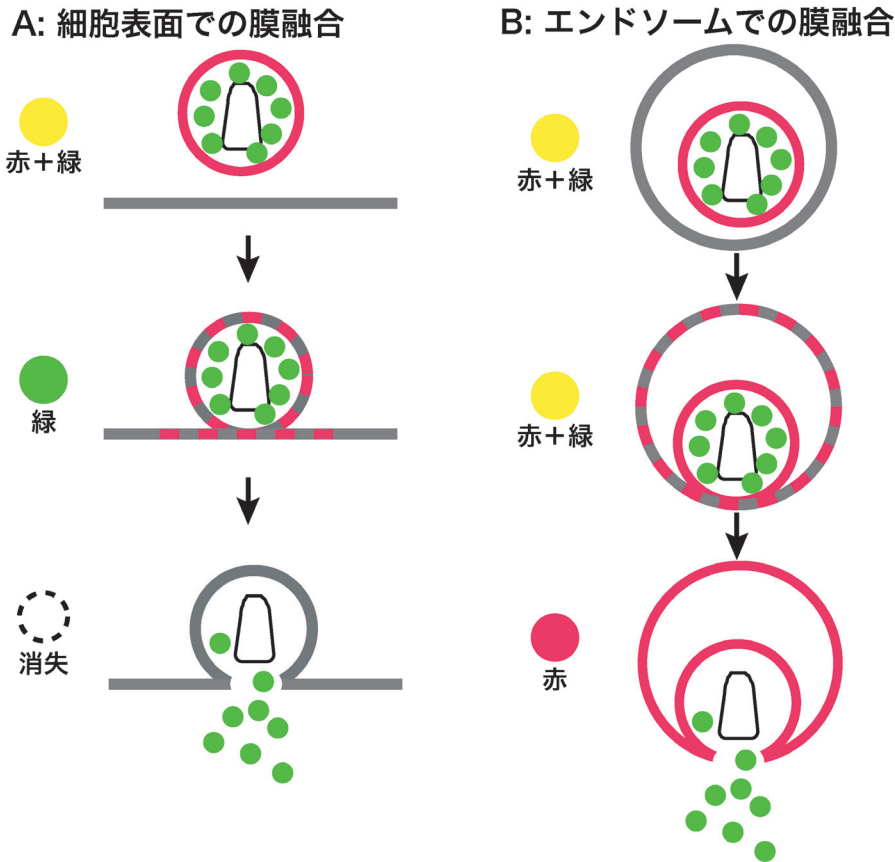


図4 細胞表面およびエンドソームでの膜融合時のウイルス標識色素の挙動

TMから遊離し、TMは膜融合に必要な6HBを含む構造へと変化する¹²⁻¹⁵。複数のウイルス受容体への連続的な結合を必要とするウイルス融合タンパク質としてはヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus: HIV）のEnvが挙げられる。HIVのEnvはgp120（SU）とgp41（TM）からなるクラスIの融合タンパク質である。HIVの感染時にはまずSUが宿主細胞上のCD4と結合する。CD4との結合はSUに共受容体であるCXCR4もしくはCCR5の結合部位を露出させる構造変化を引き起こす。SUと共受容体の結合はTMの構造変化を促し、TMの融合ペプチド領域が細胞膜へ進入し、最終的にはTMは6HBを含む構造へと変化する¹⁶⁻²⁰。

pH変化とウイルス受容体への結合の両方を必要とするウイルスも存在する。Avian Sarcoma and Leukosis Virus（ASLV）は α レトロウイルスでありSU、TMサブユニットからなるEnvをもつ。まずSUがウイルス受容体に結合することでEnvはプレヘアピン構造へと変換し、融合ペプチドが標的膜へ進入する。その後環境中のpHが低下すると、Envは6HBを含むヘアピン構造へと変換し膜融合を引き起こす²¹⁻²³。このように受容体結合とpH変化という性質の異なる2つの刺激を段階的に別の構造変化のシグナル

として利用している点でASLVのEnvは非常にユニークである。また、他のクラスI融合タンパク質と異なり、構造中間体であるプレヘアピン構造が安定して存在することも特筆すべき特徴である。これらの性質からASLVのEnvは膜融合機構を考える上で非常に有用で興味深いモデルとなっている。この節の冒頭でも述べたように、どこで膜融合過程を開始させるかはウイルスにとって死活問題であり、その意味でASLVの様に複数の刺激によってEnvの構造変化を厳密に制御することはウイルスにとっても有利であるのかもしれない。

α ヘルペスウイルスである、Herpes Simplex Virus（HSV）はさらに複雑な膜融合制御機構を有している様である。HSVの表面には12種類もの異なったEnvが存在している。そのうち5種類が膜融合に関わっており、うちgB、gD、gH、gL（gHとgLは異種二量体を形成している）の4種類が膜融合に必須である。gDがウイルス受容体を認識したのち、そのシグナルがクラスIII融合タンパク質であるgBに構造変化を引き起こし膜融合が起こると考えられている²⁴⁻²⁵。gH/gL二量体は膜融合を何らかの形で補助している様であるが、詳細な機構は未だ不明である。これらの多様なシグナルによる融合タンパク質の構造変化の制

御は、それぞれのウイルスにとって膜融合過程の制御がいかに重要であるかを物語っている。

4. ウイルスの宿主細胞への侵入とエンドサイトーシス

pH の低下を融合タンパク質の構造変化のきっかけとする低 pH 依存性のウイルスは、エンドソームの低 pH 環境を利用して膜融合を行うため、エンドサイトーシスはウイルス感染において必須である。しかし Respiratory Syncytial Virus (RSV) や HIV などの低 pH 非依存性のウイルスもエンドサイトーシス経路によって感染することが近年明らかになってきた。RSV はパラミクソウイルス科のウイルスであり G, F, SH の 3 つの Env をもつ、そのうちの F タンパク質がクラス I 融合タンパク質である。F タンパク質の構造変化には低 pH は必須ではなく、RSV は低 pH を感染の成立に必要としない。それにも関わらず、siRNA によるスクリーニングから複数のエンドサイトーシス関連タンパク質が RSV の感染に必須であることが明らかにされた²⁶⁾。このことから低 pH を必要としないことが必ずしもエンドサイトーシスを利用しないことを示す訳では無いことが分かる。

HIV も低 pH 非依存性のウイルスであり、その感染成立にエンドソームの低 pH 環境を必要としない。そのため HIV は細胞表面での細胞膜との膜融合を介して宿主細胞に感染し、エンドサイトーシスによって取り込まれた HIV ウイルスはライソソームで分解され感染には寄与しないと広く考えられてきた²⁷⁻³⁰⁾。またそれを指示する根拠として、HIV のウイルスレセプターにエンドサイトーシスが抑制されるような変異を導入したときにも HIV の感染は抑制されない³¹⁾ ことや、細胞膜直下に存在し、細胞膜を裏打ちしているアクチンネットワークを安定化させると HIV 感染が抑制される³²⁾ ことなどが挙げられる。しかしながら、エンドソームでの HIV の膜融合が電子顕微鏡で観察されている³³⁻³⁴⁾ ことや、エンドソームでのウイルスの分解を抑制すると HIV 感染が増強されること³⁵⁻³⁷⁾、クラスリン依存性のエンドサイトーシスの抑制により HIV 感染が阻害されること³⁸⁾ などは HIV がエンドサイトーシスを介して感染することを示唆している。

最近 Melikyan らは HIV の宿主細胞への侵入経路を明らかにするために、HIV の膜融合過程をリアルタイムで詳細に解析した³⁹⁾。HIV の膜融合を酵素活性で評価することができる、 β ラクタマーゼを用いたウイルス-細胞間膜融合アッセイ系において著者らは次の二つの方法によりウイルス-細胞間膜融合の動態を測定した。一つ目は、膜融合阻害ペプチドをウイルスが細胞侵入を開始してから一定時間後に加え、膜融合により細胞質内に進入した酵素を検出する方法である。膜融合阻害ペプチドは細胞膜非透過性であるため細胞表面に存在するウイルスの膜融合のみが阻害される (図 3A)。もう一つの方法は、ウイルスが細胞侵入を

開始してから一定時間後に温度を低下させる方法である。HIV の Env による膜融合は温度依存性であり、摂氏 20 度を下回ると融合能は著しく低下する。しかし β ラクタマーゼの活性はすくなくとも摂氏 10 度においては失われぬ。こちらの方法においてはウイルスが細胞のどこに存在していてもその膜融合を阻害することが可能である (図 3A)。これら 2 つの方法を用いて測定した膜融合動態を図 3B に示す。温度を低下させる方法で測定した膜融合動態は、膜融合阻害ペプチドで測定した膜融合動態と比較して著しく遅延している。この結果より HIV ウイルスはエンドサイトーシスにより細胞膜表面からエンドソームに移動したのち、エンドソームにおいて膜融合を完了することが強く推定された。

さらに Melikyan らは標的細胞でのウイルス侵入をウイルス膜とウイルス内部を別々の蛍光色素で標識した HIV ウイルスを用いてリアルタイムで観察した。もしウイルスが細胞表面で膜融合とウイルス内部成分の細胞質への放出を行った場合、まずウイルス膜標識色素 (図 4 赤色) が細胞膜への拡散によって消失し、続いてあるいはほぼ同時にウイルス内部標識色素 (図 4 緑色) が細胞質への拡散によって消失すると考えられる (図 4A)。一方、ウイルスがエンドソームで膜融合とウイルス内部成分の細胞質への放出を行う場合には、ウイルス膜標識色素はエンドソーム膜へと移行するのみで拡散しないため消失せず、ウイルス内部標識色素が膜標識色素より先に消失すると考えられる (図 4B)。HIV のウイルス受容体である CD4 と共受容体を発現した HeLa 細胞において CXCR4 指向性と CCR5 指向性ウイルス株で観察が行われた結果、ウイルス膜標識色素を先に失ったウイルスでは引き続いてのウイルス内部標識色素の消失は認められず、ウイルス内部標識色素の消失はウイルス膜標識色素の消失に先んじて起こることが観察された。これは図 4B のケースにあてはまり、観察されたほぼすべての HIV ウイルスがエンドソームで膜融合を完了していることを示唆している。さらにエンドサイトーシスに必要とされる宿主タンパク質ダイナミンの機能を抑制するなどして標的細胞のエンドサイトーシスを阻害した際には HIV ウイルスの膜融合の抑制が認められた。これらの結果を総合的に判断すると、すくなくとも HeLa 細胞においては HIV ウイルスの細胞侵入の主要経路はエンドサイトーシスを介していると考えられる。また Melikyan らは T 細胞でも同様の検討を行っており、T 細胞においても一部の HIV ウイルスはエンドサイトーシス経路を利用していることを示唆する結果を得ている。しかし先にも述べたように以前のいくつかの報告では HIV が細胞表面で膜融合することが示唆されており、宿主細胞の種類やウイルス株の違いにより膜融合を行う場所が異なる可能性は否定できない。

HIV がウイルス受容体と結合したのちエンドサイトーシスで細胞内に運ばれ、エンドソームで膜融合を完了する場

合, TMの構造変化の大部分が細胞内で進行している可能性が高い。臨床で使用されているT20誘導体に代表される膜融合阻害ペプチドや, 一部の中和抗体はTMの構造変化中間体のみに結合する。これらの分子は細胞膜不透過性であるため, エンドソームでHIVが膜融合することによりその効力が限定される可能性がある。そのため, HIVがエンドサイトーシス経路を利用する可能性を加味したHIVの細胞侵入過程の動的解析ならびにHIVの膜融合阻害剤の検討が必要とされる⁴⁰⁾。

5. ウイルスの宿主細胞への侵入と宿主因子

以前はエンベロープウイルスの侵入経路は主にウイルス受容体の細胞分布とpH環境によって規定されると考えられていたが, 近年いくつかのウイルスにおいて, その他の宿主因子がウイルス侵入経路の決定に密接に関わっていることが明らかとなってきた。

HA1とHA2で構成されるインフルエンザウイルスの融合タンパク質は, クラスI融合タンパク質で最もよく解析されている。インフルエンザウイルスは低pH依存性のウイルスであり融合タンパク質の構造変化に低pHを必要とする。すなわちウイルスは膜融合のためにエンドソームに侵入する必要がある。エンドサイトーシスはクラスリン依存性とクラスリン非依存性に大別される。クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて, エンドサイトーシスされる膜タンパク質(おもに受容体)の細胞内領域はアダプタータンパク質によって認識され, このアダプタータンパク質の働きでクラスリンタンパク質が細胞膜直下に集積することにより細胞膜の陥入が起こり, クラスリン被覆小胞が形成される。この小胞が初期エンドソームと融合することで小胞内の物質はエンドソームに取り込まれる。インフルエンザウイルスは主にクラスリン依存性エンドサイトーシスでエンドソームに侵入する⁴¹⁾。しかしインフルエンザウイルスはクラスリン依存性エンドサイトーシスの代表的なアダプタータンパク質であるAP-2をエンドサイトーシスに必要としない。最近, インフルエンザウイルスはEpsin1アダプタータンパク質によるクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を特異的に利用していることが明らかとなった⁴²⁾。細胞の生存に必要な多くの物質の取り込みはAP-2によるクラスリン依存性エンドサイトーシス経路に依存しているため, Epsin1は副作用の少ない抗インフルエンザウイルス薬の標的分子になり得るかもしれない。

エボラウイルスはクラスIの融合タンパク質を持ち, この融合タンパク質はジスルフィド結合で結ばれたGP1とGP2からなる。GP1がウイルス受容体との結合をGP2が膜融合を担うと考えられている。ウイルスがエンドソームに到達すると, エンドソームに存在する宿主プロテアーゼであるCathepsin B (CatB)とCathepsin L (CatL)によってGP1の切断を受け, これが融合タンパク質の構造変化を

誘導するきっかけのひとつになる⁴³⁾。CatBならびにCatLによる構造変化の誘導後においてもエボラウイルスの融合タンパク質は低pHを膜融合のために必要とし⁴⁴⁾, エボラウイルスはエンドソームに到達しなければならない理由を少なくとも2つ有していることになる。エボラウイルスやマールブルグウイルスなどのフィロウイルスのエンドサイトーシスにはTyro3ファミリー膜タンパク質が関与している様であるが詳細な機構については不明な点も残されている⁴⁵⁾。

ウイルスの宿主細胞への侵入に関与する宿主因子はタンパク質とは限らない。VSVはエンドソームでの膜融合だけではウイルス遺伝情報を細胞質に送り込むには十分ではなく, 膜融合後にウイルスが後期エンドソームに輸送され, 後期エンドソーム特異的に存在する脂質であるlysobisphosphatidic acidとの相互作用を経て細胞質中に侵入する⁴⁶⁾。

先にも述べたようにHIVもエンドソームで膜融合を行っているが, この膜融合にダイナミンの関与が示唆されている。ダイナミンはクラスリンおよびカベオリン依存性エンドサイトーシスにおいて, 被覆小胞の形成時に小胞と細胞膜の切り離しを行うタンパク質である。ダイナミン特異的な阻害薬はHIVの膜融合を阻害するが, ダイナミン阻害薬をHIVが細胞に結合してから一定時間後に加えていき, HIVの膜融合動態を調べたところ, 得られたHIV膜融合動態はHIVのエンドサイトーシスの速度ではなくエンドソームでの膜融合の速度と一致した。この結果からダイナミンはHIVのエンドサイトーシスのみならず膜融合にも関与することが示唆された³⁹⁾。この他にもRab6など他のいくつかのエンドサイトーシスに関与する宿主タンパク質がHIVの細胞侵入に関与することが明かとなってきており⁴⁷⁾, 今後の研究によりHIV感染侵入機構の全貌が解明されることが期待される。

6. まとめ

ウイルスの融合タンパク質による膜融合機構から, 侵入経路までを含めてエンベロープウイルスの宿主細胞侵入を概観してきたが, この分野ではまだ明らかでない部分も多い。最もよく研究されているクラスI融合タンパク質による膜融合にしても, 膜融合には何分子の融合タンパク質が必要か? 6HBを含むヘアピン構造が形成される際に三量体タンパク質の対称性はどうか?といった疑問については未だコンセンサスは得られていない。またウイルス-細胞膜間で膜融合が起こる際には, はじめに比較的小さな融合孔が開きそれが拡張していくことで膜融合が完了すると考えられている。この融合孔拡張の機構は非常に興味深く, 解明が待たれるところである。構造学的にも融合タンパク質の膜貫通領域やウイルス膜内領域などを含んだ形の構造はほとんど明らかになっておらず, これらの領域も膜

融合能に関与するということが知られているが⁴⁸⁻⁴⁹⁾, その役割については不明なままである。さらに, インフルエンザウイルスの HA と ASVL の Env はどちらもクラス I 融合タンパク質に分類されるが, 中間体構造の安定性などの点では大きく異なっており, いままでのように HA をモデルとして他のクラス I 融合タンパク質を論じることがどこまで有効かに関しては議論の余地がある。ウイルスの細胞への侵入経路に関しては, 同じ科に属するウイルスでも, さらには同じウイルスでも標的細胞によって侵入経路が異なることが知られている例⁵⁰⁻⁵¹⁾ もあり, ウイルスが宿主細胞を含む感染の状況に応じて侵入の方法を変えている可能性がある。いずれにしても, 細胞侵入はウイルス感染の最初のステップであるため, この過程を阻害することはウイルス感染症を防ぐ上で最も有効な戦略となり得る。そのためにも, 今後の研究によるさらなるウイルスの細胞侵入機能の解明が強く求められている。

7. 謝辞

本稿を執筆するにあたり, 多大なるご助言, ご指導を賜りました駒野淳博士, 村上努博士, Gregory Melikyan 博士, 宮内陽子博士に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Chernomordik LV, Melikyan GB, Chizmadzhev YA. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 906(3):309-352,1987.
- 2) White JM, Delos SE, Brecher M, Schornberg K. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 43(3):189-219,2008.
- 3) Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*. 5:111,2008.
- 4) Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. 70:777-810,2001.
- 5) Skehel JJ, Wiley DC. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*. 95(7):871-874,1998.
- 6) Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*. 344(1):38-47,2006.
- 7) Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol*. 4(1):67-76,2006.
- 8) Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*. 313(5784):187-191,2006.
- 9) Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*. 315(5813):843-848,2007.
- 10) Gaudin Y, Tuffereau C, Segretain D, Knossow M, Flamand A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. Sep 65(9):4853-4859,1991.
- 11) Pinter A, Kopelman R, Li Z, Kayman SC, Sanders DA. Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *J Virol*. 71(10):8073-8077,1997.
- 12) Wallin M, Ekstrom M, Garoff H. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J*. 23(1):54-65,2004.
- 13) Wallin M, Ekstrom M, Garoff H. The fusion-controlling disulfide bond isomerase in retrovirus Env is triggered by protein destabilization. *J Virol*. 79(3):1678-1685,2005.
- 14) Wallin M, Loving R, Ekstrom M, Li K, Garoff H. Kinetic analyses of the surface-transmembrane disulfide bond isomerization-controlled fusion activation pathway in Moloney murine leukemia virus. *J Virol*. 79(22):13856-13864,2005.
- 15) Wallin M, Ekstrom M, Garoff H. Receptor-triggered but alkylation-arrested env of murine leukemia virus reveals the transmembrane subunit in a prehairpin conformation. *J Virol*. 80(19):9921-9925,2006.
- 16) Sattentau QJ, Moore JP. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med*. 174(2):407-415,1991.
- 17) Trkola A, Dragic T, Arthos J, et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*. 384(6605):184-187,1996.
- 18) Wu L, Gerard NP, Wyatt R, et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*. 384(6605):179-183,1996.
- 19) Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393(6686):648-659,1998.
- 20) Salzwedel K, Smith ED, Dey B, Berger EA. Sequential CD4-coreceptor interactions in human immunodeficiency virus type 1 Env function: soluble CD4 activates Env for coreceptor-dependent fusion and reveals blocking activities of antibodies against cryptic conserved epitopes on gp120. *J Virol*. 74(1):326-333,2000.
- 21) Melikyan GB, Barnard RJ, Markosyan RM, Young JA, Cohen FS. Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-induced hemifusion and fusion pore formation but not for pore growth. *J Virol*. 78(7):3753-3762,2004.
- 22) Markosyan RM, Bates P, Cohen FS, Melikyan GB. A study of low pH-induced refolding of Env of avian sarcoma and leukosis virus into a six-helix bundle. *Bioophys J*. 87(5):3291-3298,2004.
- 23) Mothes W, Boerger AL, Narayan S, Cunningham JM, Young JA. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glyco-

- protein. *Cell*. 103(4):679-689,2000.
- 24) Rey FA. Molecular gymnastics at the herpesvirus surface. *EMBO Rep*. 7(10):1000-1005,2006.
 - 25) Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A, Myscofski D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*. 344(1):17-24,2006.
 - 26) Kolokoltsov AA, Deniger D, Fleming EH, Roberts NJ, Jr., Karpilow JM, Davey RA. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *J Virol*. 81(14):7786-7800,2007.
 - 27) Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*. 49(5):659-668,1987.
 - 28) Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, et al. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell*. 54(6):865-874,1988.
 - 29) McClure MO, Marsh M, Weiss RA. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J*. 7(2):513-518,1988.
 - 30) Pelchen-Matthews A, Clapham P, Marsh M. Role of CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 69(12):8164-8168,1995.
 - 31) Brandt SM, Mariani R, Holland AU, Hope TJ, Landau NR. Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization. *J Biol Chem*. 277(19):17291-17299,2002.
 - 32) Yoder A, Yu D, Dong L, et al. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell*. 134(5):782-792,2008.
 - 33) Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*. 75(22):11166-11177,2001.
 - 34) Pauza CD, Price TM. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol*. 107(3):959-968,1988.
 - 35) Fredericksen BL, Wei BL, Yao J, Luo T, Garcia JV. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 76(22):11440-11446,2002.
 - 36) Schaeffer E, Soros VB, Greene WC. Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol*. 78(3):1375-1383,2004.
 - 37) Wei BL, Denton PW, O'Neill E, Luo T, Foster JL, Garcia JV. Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 79(9):5705-5712,2005.
 - 38) Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Krausslich HG. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*. 79(3):1581-1594,2005.
 - 39) Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*. 137(3):433-444,2009.
 - 40) Miyauchi K, Kozlov MM, Melikyan GB. Early steps of HIV-1 fusion define the sensitivity to inhibitory peptides that block 6-helix bundle formation. *PLoS Pathog*. 5(9):e1000585,2009.
 - 41) Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol*. 11(6):567-573,2004.
 - 42) Chen C, Zhuang X. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(33):11790-11795,2008.
 - 43) Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*. 308(5728):1643-1645,2005.
 - 44) Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, Delos S, Bouton A, White J. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol*. 80(8):4174-4178,2006.
 - 45) Shimojima M, Takada A, Ebihara H, et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol*. 80(20):10109-10116,2006.
 - 46) Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, et al. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*. 7(7):653-664,2005.
 - 47) Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 319(5865):921-926,2008.
 - 48) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z. Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol*. 79(8):4720-4729,2005.
 - 49) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, et al. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis*. 59(2):77-84,2006.
 - 50) Delboy MG, Patterson JL, Hollander AM, Nicola AV. Nectin-2-mediated entry of a syncytial strain of herpes simplex virus via pH-independent fusion with the plasma membrane of Chinese hamster ovary cells. *Virology*. 3:105,2006.
 - 51) Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 79(11):6655-6663,2005.

The Entry Process of Enveloped Viruses to Host Cells

Kosuke MIYAUCHI

AIDS Research Center
National Institute of Infectious Diseases
1-23-1 Toyama Shinjuku Tokyo 162-8640 JAPAN
Japan Foundation of AIDS Prevention
E-mail: Kosuke@nih.go.jp

The fusion between viral and cellular membranes is the first critical step of the enveloped viral infection. This is promoted by the drastic conformational change of the viral fusion protein. The conformational change is driven by various cues that are different in each fusion protein. The divergent nature of the induction mechanism of fusion proteins tells us that the regulation of membrane fusion process is substantially important to viral infection. Historically, enveloped viruses were categorized into pH-dependent and pH-independent groups for their entry processes. It has been thought that the pH-independent viruses mainly fuse to cell membrane at the cell surface whereas pH-dependent viruses fuse to endosomal membrane. However, the recent studies suggest that some pH-independent viruses including Human Immunodeficiency Virus (HIV) also utilize the endocytosis pathway to achieve infection. In addition, it has been revealed that the host factors other than receptors play crucial roles in the entry of enveloped viruses. This review summarizes the entry process of enveloped viruses and focuses on the current topics of HIV entry.

