

4. エボラウイルスの宿主細胞侵入機構

櫻井 康晃

Texas Biomedical Research Institute

エボラウイルスは紐状の粒子構造を持つエンベロープウイルスであり、ヒトやその他の霊長類に感染することで重篤な出血熱を引き起こす。宿主細胞への侵入は、増殖サイクルの中で最初の必須過程であり、治療標的の一つとして盛んに研究されてきた。細胞侵入に不可欠なウイルスタンパク質である表面糖タンパク質 GP に加えて、特徴的な粒子構造がウイルス因子となり、様々な宿主因子がウイルスと相互作用することで宿主細胞への侵入が成立する。エボラウイルスは、まず GP を介して細胞表面タンパク質と結合し、細胞内へと移行後、エンドソーム小胞に包まれながら酸性 pH を伴う細胞内分画へと移動していく。その後、宿主プロテアーゼにより GP のプロセッシングが起こり、細胞内受容体との相互作用が可能となる。そして、適当な条件が揃った環境下で、GP の大規模な構造変換を介してウイルス膜とエンドソーム膜の融合が起こり、細胞侵入が完了する。それら感染ステップに関わる宿主因子の同定、及び GP の構造解析を中心として、エボラウイルスの基礎研究は近年目覚ましい進展を見せている。本稿では、エボラウイルスの細胞侵入機構を最新の知見も踏まえて紹介していく。

1. はじめに

エボラウイルスは、マールブルグウイルスと共にフィロウイルス科に属し、人やその他の霊長類に感染することで非常に致死率の高い出血熱を引き起こす (図 1A)¹⁶⁾。2013 年 12 月にギニアにおいて始まった西アフリカでのアウトブレイクは前例の無い規模で拡大し、現在までに 10000 人以上の死者を出し、欧米にも波及した。その高い病原性と感染効率にも関わらず、正式に認可されている治療薬及びワクチンは現在無い^{73, 98)}。そのため、複製可能なウイルスを扱うためには特殊な高度安全実験施設 (BSL4 施設) が必要である。しかし、それにも関わらず細胞侵入過程の研究は近年急激に進んだと思われる。世界中で BSL4 施設の新設・稼働が進められてきたことに加えて、BSL4 施設

を必要としない代替法 (シュードタイプウイルスやウイルス様粒子) の開発、ウイルス糖タンパク質の結晶構造の解明、さらに他のウイルスの細胞侵入 (特に膜融合) に関する知識の還元が大きく寄与してきた^{12, 44, 92, 99)}。

細胞侵入は、ウイルスが宿主細胞に感染する中で最初の必須な過程である。過去の報告から、エボラウイルスの細胞侵入は他の多くのウイルスに比べて長い時間を必要とすることが分かっている^{63, 83, 102)}。このことからその細胞侵入は、数多くの因子が関与する複雑な過程と考えられる。その一方で、より多くの薬剤の標的になる可能性を持った感染過程であるとも言える。実際、現在抗ウイルス薬として候補に挙げられている薬剤の多くが、細胞侵入を標的としたものである¹¹⁾。以下では、エボラウイルスの細胞侵入を、それに関与するウイルス因子及び宿主因子に焦点を当ててみていきたいと思う。

2. ウイルス糖タンパク質 GP

エボラウイルスは合計 7 つの遺伝子を持っており、そのうちの 1 つである GP 遺伝子がコードしているのが糖タンパク質である。GP 遺伝子からは RNA エディッティングにより複数のタンパク質が発現し、それらは膜貫通型糖タンパク質 GP、分泌型糖タンパク質 sGP (secreted GP) 及び ssGP (small secreted GP) である^{58, 85)}。転写産物の大半

連絡先

Texas Biomedical Research Institute
7620 NW Loop 410
San Antonio, TX, 78227-5301
TEL: +1-210-258-9682
FAX: +1-210-670-3329
E-mail: ysakurai@txbiomed.org

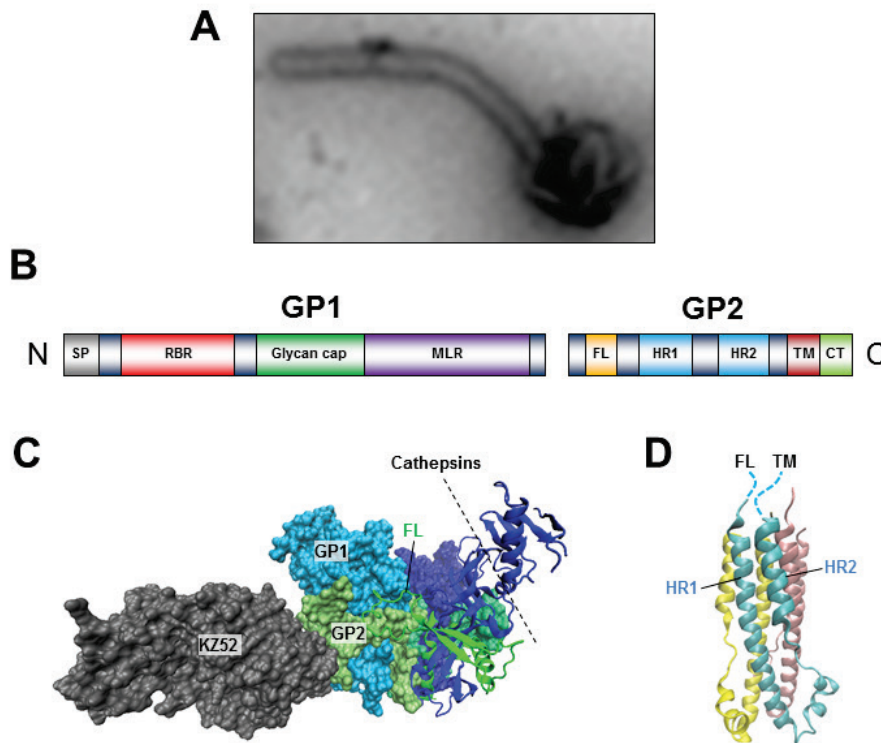


図1 エボラウイルスと表面糖タンパク質 GP

(A) エボラウイルス粒子の電子顕微鏡写真. 本研究室により撮影. (B) 表面糖タンパク質 GP のドメイン構造. エボラウイルス GP は GP1 と GP2 の 2 つのサブユニットから構成されている. GP1 は N 末端側よりシグナルペプチド (SP), 受容体結合領域 (RBR), グリカンキャップ (Glycan cap), ムチン様領域 (MLR) を持つ. GP2 は融合ループ (FL), N 末ヘプタッドリピート配列 (HR1), C 末ヘプタッドリピート配列 (HR2), 膜貫通領域 (TM), そして細胞質領域 (CT) から構成される. (C) GP 三量体とそれに結合する KZ52 の立体構造 (PDB id: 3CSY⁴⁴). ただし GP1 (青色) のムチン様領域, 及び GP2 (緑色) の膜貫通領域より C 末端側は除く. GP1/GP2 ヘテロ二量体の二つは空間充填モデル, 残り一つはリボンモデルで示されている. ヘテロ二量体の一つに結合しているのは中和抗体である KZ52 (灰色). Cathepsins によるプロセッシング部位のおおよその位置は点線で示されている. (D) GP2 三量体による 6 ヘリックス束構造 (PDB id: 2EBO⁵²). 各単量体はそれぞれ青色, 黄色, ピンク色のリボンモデルで示されている.

(70%) から生成される sGP は, ウイルス糖タンパク質を標的とした抗体へ結合することで, 免疫機能を阻害すると考えられているが, より詳細な解析が必要である^{13, 33}. ssGP のウイルス感染における役割は未だ分かっていない. そして転写産物のおよそ 25% から生成されるのが, ウイルス粒子表面に存在する膜貫通型糖タンパク質 GP であり, これがウイルスの細胞侵入にとって唯一必要不可欠なウイルスタンパク質である.

エボラウイルスの GP は, ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の外被タンパク質 (Env) やインフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) 等と同様, クラス I 膜融合タンパク質に属する⁹⁶. ウイルス産生細胞内において, ポリプロテイン前駆体 GP0 が合成され, 細胞膜への輸送途中においてゴルジ体プロテアーゼ Furin によるプロセッシングが起こり, GP1 と GP2 が生成される (図 1B)⁹⁴. しかし, このプロセッシング部位に変異を導入した GP を持つウイ

ルスは *in vitro* 及び *in vivo* において感染性を維持していることから, GP の成熟過程において Furin は必須因子ではなく, 別のメカニズムが代替可能と考えられる^{72, 100}. 表面タンパク質 GP1 は受容体との結合, 膜タンパク質 GP2 は膜融合を担っている. S-S 結合により連結した GP1 と GP2 のヘテロ二量体がさらに三量体を形成することで, 膜融合能を持った複合体となり, ウイルス表面に存在している (図 1C)⁸⁶.

GP1 は N 末端より, 受容体結合領域 (Receptor binding region: RBR), グリカンキャップ, ムチン様領域 (Mucin-like region: MLR) から構成される (図 1B)⁴⁴. 受容体結合領域は, 宿主の受容体との結合を介する領域であり, 全てのエボラウイルスにおいて高度に保存されており, マールブルグウイルスとの相同性も高い⁴². このことはフィロウイルス全てが共通の受容体を使って宿主細胞に感染している可能性を示唆している. グリカンキャップは多くの

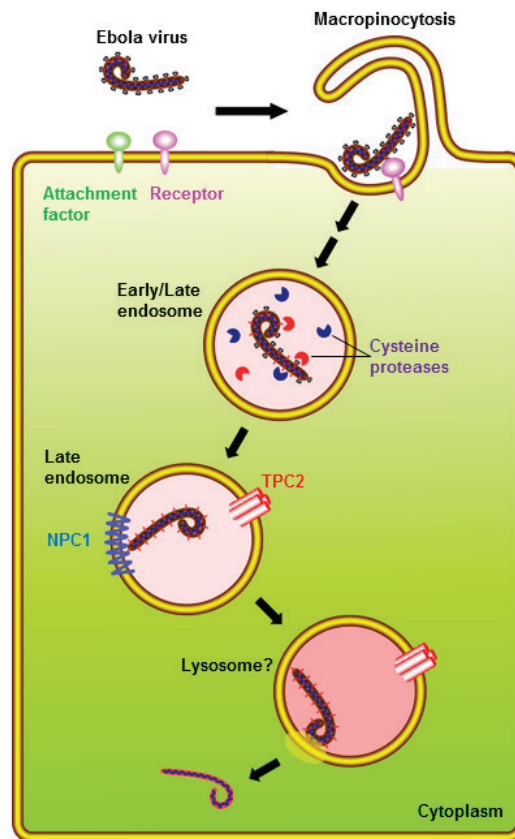


図2 エボラウイルスの細胞侵入モデル

エボラウイルスは様々な宿主因子と相互作用しながら宿主細胞へ侵入する。まず吸着因子との非特異的結合により細胞表面上にウイルスが濃縮され、さらに受容体との特異的結合により細胞侵入が始まる。その後、マクロピノサイトーシスにより細胞内へと移行し、エンドソーム小胞に包まれながら初期エンドソーム、そして後期エンドソームへと移動する。その間、エンドソーム内が適当な酸性 pH へと達すると、システインプロテアーゼにより GP のプロセッシングが起こる。その結果、後期エンドソームに発現している膜タンパク質 NPC1 と GP が結合する。カルシウムチャンネル TPC の働きを介して、ウイルス粒子が適当な分画 (リソソーム?) へと移行すると、膜融合が誘導され、ウイルス粒子のコアが細胞質へと放出される。

N 型糖鎖により修飾されており、受容体結合領域をウイルス表面から覆い隠し、中和抗体による認識から保護している^{45, 46)}。ムチン様領域はフィロウイルス間で相同性が低い領域であるが、全てのウイルスにおいて非常に多くの N 型糖鎖及び O 型糖鎖による修飾を受けている⁴⁵⁾。ムチン様領域を欠損させたエボラウイルス GP を持つシュードタイプウイルスは、多くの培養細胞において野生型 GP を持つウイルスと同程度かより高い感染性を持つことから、*in vitro* においては必ずしも必要ではない^{34, 37)}。しかしマクロファージ等の一部の標的細胞においては、細胞表面タンパク質との結合を介することで感染を促進する他、グリカンキャップ同様、受容体結合領域を覆い隠す役目も持っていると考えられている^{17, 78, 91)}。GP の持つ細胞障害作用もムチン様領域が介していることが報告されており、*in vivo* における病原性において重要な役割を担っていると考えられる¹⁰¹⁾。

GP2 は他のクラス I 融合タンパク質と似た特徴を持っており、N 末端より、融合ループ (Fusion loop: FL) と呼ばれる疎水性領域、N 末ヘプタッドリピート配列 (HR1)、C 末ヘプタッドリピート配列 (HR2)、膜貫通領域 (Transmembrane region: TM)、短い細胞質領域 (Cytoplasmic region: CT) から構成される (図 1B)^{44, 52, 95)}。融合ループ及び HR1 / HR2 の配列はフィロウイルス間で高度に保存されており、エボラウイルスザイール株の HR2 配列に相当する合成ペプチドは、マールブルグウイルスの感染も阻害することが報告されている⁶⁰⁾。

エボラウイルスに感染し生存した患者より分離された中和抗体である KZ52 は、*in vitro* 及び小動物モデルにおいてウイルス感染を強く抑制することが証明されている^{54, 74)}。結晶構造解析により、KZ52 は GP1 と GP2 が隣接する部位を標的としていることが示され、膜融合に必要な GP の構造変換を阻害することで、エンドソーム内での膜融合を

たは直前の感染過程を阻害すると考えられている (図 1C)⁴⁴⁾。さらに、治療薬として有望視されている「Zmapp」を構成する3種類の抗体のうち、*in vitro*においても強力な中和活性を持つ c4G4 と c4G7 も、KZ52 と同様に GP1 と GP2 の境界領域に結合する⁷⁰⁾。この領域は糖鎖による修飾をほとんど受けておらず、ウイルス間において配列が保存されており、言わば GP のアキレス腱として中和抗体の格好の標的となっているのかもしれない。

3. 細胞表面タンパク質の役割

エンベロープウイルスは細胞侵入時、通常まず細胞表面上に存在するタンパク質との親和性の低い非特異的結合により細胞表面に吸着し、受容体である別の膜タンパク質との特異的であり強い結合を介して細胞内へと移行する (図 2)。エボラウイルスは細胞接着に依存して細胞表面に発現するタンパク質と結合することが示唆されており、T細胞やB細胞等の浮遊細胞の極めて低い感染感受性がそれを裏付けている^{15, 99)}。一方、*in vivo* 及び *in vitro* において非常に多岐にわたる組織と細胞に感染することが知られており、それら全てに発現している単一の細胞表面受容体は未だ同定されていない^{92, 99)}。現在では、細胞表面受容体が組織や細胞によって異なり、複数存在するというモデルが有力である。以下に、エボラウイルスの細胞侵入に関わる主な細胞表面タンパク質を挙げる。

1) C型レクチン

C型レクチンはカルシウムイオン依存的に糖鎖に結合する一群のタンパク質であり、エボラウイルス感染に感受性のある様々な細胞に発現しており、その細胞侵入を促進する。組織により発現しているレクチンの種類は異なり、肝臓に発現する ASGPR-1、マクロファージや樹状細胞に発現する hMGL や DC-SIGN、血管内皮細胞に発現する L-SIGN 等がエボラウイルスやマールブルグウイルス感染に関わると報告されている^{1, 3, 22, 23, 49, 55, 56, 91)}。これら C型レクチンは、GP1 のグリカンキャップやムチン様領域に多く存在する糖鎖に結合し、ウイルスの細胞表面への吸着を促進する^{76, 91)}。しかし、糖鎖結合部位の大半が欠損した GP を持つシュードタイプウイルスが多く、培養細胞に対し感染性を保っていることから、C型レクチンの感染促進効果には組織・細胞特異性があると考えられる^{34, 37)}。一方で最近の報告により、バクテリア由来のレクチンがムチン様領域に結合することでエボラウイルス感染を阻害し、マウスにおいて治療効果が認められたことから、C型レクチンが *in vivo* における病原性に重要な役割を果たしていることが示唆される¹⁹⁾。

2) TIM-1

様々な組織由来の細胞における表面タンパク質の発現と

ウイルス感染への感受性との相関を解析した結果、T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) が受容体候補として同定された³⁹⁾。TIM-1 は細胞外 IgV 領域及び O 型糖鎖により高度に修飾されたムチン様領域を持ち、IgV 領域を介してアポトーシス細胞表面に存在する脂質 phosphatidylserine (PtdSer) を特異的に認識する¹⁸⁾。エボラウイルスの細胞侵入は TIM-1 抗体により阻害され、感受性の低い細胞に TIM-1 を強制発現させると感染促進が認められた³⁹⁾。GP との直接結合も認められたが、その後の報告により、TIM-1 はウイルス膜に存在する PtdSer とも結合し、この相互作用がウイルスの細胞内移行を促進していることが示唆された^{65, 66)}。このメカニズムはその他多くのエンベロープウイルスの細胞侵入にも関与していることが証明されている^{35, 66, 67)}。このことは、エボラウイルスを含む多くのウイルスがアポトーシス細胞に擬態することで細胞に侵入していることを示唆している。また、TIM-1 はエンドソーム内でエボラウイルスの細胞侵入を制御する NPC1 とも結合し、この相互作用がウイルス感染にとって重要であることが最近報告されており、その役割は細胞内にまで及ぶと思われる⁴³⁾。一方、TIM-1 は様々な組織や細胞で発現しているが、主な感染標的でもあるマクロファージ等には発現しておらず、個体レベルでの重要性を検討する必要がある³²⁾。

3) TAM family チロシンキナーゼ受容体

TAM family に属する一群のタンパク質は、受容体型チロシンキナーゼとして細胞分裂や接着等に関与しており、多くの組織において発現している⁵⁰⁾。Expression cloning 法により、そのメンバーである Axl がエボラウイルスの細胞侵入因子として同定された⁸⁹⁾。しかし、直接 GP とは結合せず、間接的にウイルス粒子の細胞内移行に関与することが示唆されている^{6, 31)}。また、Axl の感染促進効果も細胞種に依存する⁶⁾。興味深いことに、TIM-1 同様、Axl はリガンドである Gas6 を介して PtdSer に結合し、多くのウイルスが細胞侵入時にそのメカニズムを利用していることが報告されている⁶⁸⁾。

4) β 1 インテグリン

インテグリンは広範囲の細胞種で発現しており、細胞接着等に関わる膜タンパク質である²⁰⁾。下流シグナルの活性化が細胞骨格の再構築、そしてエンドサイトーシスを誘導することから、ヘルペスウイルスやアデノウイルスを初めとして多くのウイルスの吸着因子、又は細胞表面受容体になっている⁹⁰⁾。エボラウイルスの場合、分泌型 β 1 インテグリンや特異抗体によってシュードタイプウイルスの感染が抑制されたことから、細胞侵入に関わることを示唆される⁹³⁾。その後の報告により、GP のプロセッシングに関わる細胞内プロテアーゼの成熟を促進することで、細胞

侵入に間接的に関与しており、吸着や細胞内移行には必要ないことが分かった⁸⁸⁾。

4. マクロピノサイトーシスによる細胞内移行

多くのウイルスは細胞表面タンパク質との相互作用後、エンドサイトーシスにより細胞内へと移行する。それらメカニズムで既知のものは主に、クラスリン介在型エンドサイトーシス、カベオラ介在型エンドサイトーシス、及びマクロピノサイトーシスに大別される⁵⁹⁾。エボラウイルスに関しては複数のメカニズムに関する報告があるが、野生型エボラウイルスやそれと粒子構造が同一と考えられるウイルス様粒子 (Virus-like particle: VLP) を用いた報告により、マクロピノサイトーシスが主なメカニズムであることが示された (図 2)^{71, 82)}。マクロピノサイトーシスは、細胞外液や大きめの細胞外物質を取り込むプロセスで、一時的なアクチンの再構成によりラッフル膜が形成されることが特徴であり、最終的にマクロピノソームと呼ばれる細胞内小胞が形成される⁴⁷⁾。マクロピノサイトーシスの制御分子である Pak1 や CtBP 等の発現を siRNA で抑制、又は Na⁺/H⁺ exchanger の阻害剤 EIPA で処理するとウイルスの細胞内移行が阻害された。さらに、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれるデキストラン分子とウイルス粒子が、感染の非常に早い段階から共局在することが認められている^{69, 71, 82)}。マクロピノサイトーシスを制御する分子でもある PI3K (Phosphoinositide-3 kinase) やアクチン重合を制御する Rho GTPase がエボラウイルスの細胞侵入に必要であり、マクロピノサイトーシスの誘導に関わるエキソサイトーシスが感染に関与することが認められたことも、ウイルス感染におけるマクロピノサイトーシスの重要性を示している^{62, 77, 83)}。エボラウイルス粒子の直径は 80 nm 程度であるが、長さが 1 μm 以上にも達し、通常のクラスリン小胞 (直径 120 nm 程度) やカベオラ小胞 (直径 70 nm 程度) の大きさを超えており、マクロピノソーム (直径 200 - 10,000 nm) への取り込みは適当なメカニズムと言える。野生型エボラウイルスと同様、長さが 1 μm 程度に達する細長い構造を持つ Respiratory syncytial virus (RSV) や紐状構造を呈したインフルエンザウイルスもまたマクロピノサイトーシスを主なメカニズムとして細胞内に移行していることも興味深い^{41, 80)}。一方で、マクロピノサイトーシスによる細胞内移行は、エボラウイルス GP に強く依存した現象であり、粒子の大きさや構造にのみ影響されている訳ではない^{31, 69, 71)}。そのため、GP と細胞表面タンパク質との相互作用がマクロピノサイトーシスを誘導している可能性が考えられるが、エボラウイルス感染においてどのようにマクロピノサイトーシスが誘導・制御されているかの詳しいメカニズムは未解明である。

5. エンドソームによるウイルス粒子の輸送

前述したようにエボラウイルスの細胞侵入には比較的長い時間を要するのだが、最近の報告によると、その大部分がエンドソームによるウイルス粒子の輸送にかかる時間であることが分かった⁶³⁾。エンドソームは細胞外の物質を取り込んだり、細胞表面や細胞内膜上のタンパク質の輸送を行う小胞である。エボラウイルスはマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、このエンドソームに包まれながら膜融合に適した細胞内分画へと移動する (図 2)。EEA1 をマーカーとする初期エンドソーム (pH6 - 7) を経て、LAMP1 をマーカーとする後期エンドソーム (pH5 - 6) へ移動する^{71, 82)}。LAMP1 はリソソーム (pH<5) にも発現しているのだが、ウイルス粒子がこの分画まで到達するか否かはまだ議論されている。小胞輸送に重要な役割を果たしている GTPase である Rab family の中で、初期エンドソームと後期エンドソームの輸送をそれぞれ制御している Rab5 と Rab7 がエボラウイルスの細胞侵入に必要なことも示されている⁸²⁾。さらに、宿主因子のスクリーニングにより、エンドソームの融合に関わる HOPS complex の構成因子や、エンドソーム膜の生合成に関わる PIKfyve が同定されており、エボラウイルスの細胞侵入におけるエンドソームの重要性が分かる⁸⁾。我々の最近の研究によれば、カルシウムシグナル経路もこの感染ステップを制御していることが示唆されたのだが、これについては後程詳しく紹介したい。

6. 宿主プロテアーゼによる GP のプロセッシング

エボラウイルスの GP が膜融合を誘導するためには、エンドソーム内の pH の低下が必要なことは長い間知られていた⁹²⁾。しかしそれだけでは不十分であり、プロテアーゼによる GP のプロセッシングが必須である (図 2)。主に後期エンドソームに存在し、酸性条件下で活性化するシステインプロテアーゼである cathepsin B と cathepsin L がその実行因子であることが報告された^{9, 87)}。それらによる GP1 のプロセッシングにより、グリカンキャップとムチン様領域が除かれ、その結果、受容体結合領域がウイルス表面に現れることで、細胞内受容体との結合が可能となる (図 1C)^{14, 30, 37, 44)}。Cathepsin B / L によるプロセッシングの結果として生成する GP1 の大きさは報告により異なり、17-19 kDa であるが、この小さな GP1 を持つウイルス粒子はなお cathepsin 阻害剤に感受性があることから、さらに未知のプロセッシングが感染には必要であることが示唆されている⁹⁷⁾。Cathepsin L 依存性は細胞種により異なり、あくまで cathepsin B の補助的な役割にとどまると考えられる^{9, 53)}。一方、複製可能なウイルスを用いた比較的長時間の感染実験では、cathepsin B / L は必要ないことが報告されており、さらにそれぞれの cathepsin を欠損

したマウスにおけるウイルスの増殖効率及び病原性は野生型マウスにおけるものと全く差が無かった⁵⁷⁾。以上のことから、エボラウイルスの細胞侵入において宿主のシステインプロテアーゼによるプロセッシングは間違いなく必須な過程であるが、感染個体内での cathepsin の役割に関しては更なる研究が必要である。また、これら報告の多くはエボラウイルスのザイル株を用いた結果であるが、エボラウイルスの他の株及びマールブルグウイルスの細胞侵入は cathepsin B / L に依存せず、異なる未知のプロテアーゼが関与することが示唆されている^{21, 64)}。

7. 細胞内膜タンパク質 NPC1 との相互作用

プロテアーゼによる GP1 のプロセッシング後に必須な宿主因子として、Niemann-Pick C1 (NPC1) が異なる2つのグループにより同時に報告された^{8, 10)}。NPC1 は非常に広範囲の組織に発現しており、細胞内の後期エンドソームやリソソームに発現し、コレステロールの輸送に関わる膜タンパク質である。その欠損によりリソソーム内にコレステロールが蓄積することで、エンドソームを介する輸送やシグナル伝達経路に異常が起き、その結果、遺伝的変異を持つヒトは進行性神経疾患である Niemann-Pick disease type C という病気を発症する⁷⁹⁾。この患者由来の細胞、及び人工的に NPC1 を欠損させた細胞ではエボラウイルスの感染が強く阻害され、NPC1+/- マウスは野生型マウスと比べてウイルス感染に抵抗性を示したことから、NPC1 が *in vitro* 及び *in vivo* において重要な役割を果たしていることが分かる^{8, 27)}。NPC1 欠損細胞においては、ウイルスは LAMP1 を発現する後期エンドソームにまで到達出来るが、膜融合は阻害されていたことから、細胞侵入の非常に後期の過程に NPC1 が関与していると考えられる⁸⁾。さらに、プロテアーゼによるプロセッシング後の GP と NPC1 が直接結合することが認められ、その相互作用を阻害することでシュードタイプウイルスと複製可能なウイルスの両方の感染が強く抑制されたことから、GP と NPC1 との結合がウイルス感染にとって重要であることが分かる⁶¹⁾。一方、細胞内で NPC1 とペアで働く NPC2 は感染に必要なでないこと、NPC1 のエンドソーム内部に面したごく一部の領域のみがウイルス感染に必要な十分であることから、NPC1 の宿主因子としての役割はコレステロール輸送分子としての機能とは独立していることが示唆される^{8, 40, 61)}。以上のことから、NPC1 はエンドソーム内におけるエボラウイルス GP との結合相手であり、膜融合に必要な細胞内受容体であると考えられている (図2)。NPC1 は、個体レベルでもその重要性が証明されており、薬剤の標的としても有望であると考えられる。

8. 細胞内カルシウム経路による感染制御

カルシウムイオンは細胞が正常に働くためには必須であ

り、多様な細胞機能を制御している。エボラウイルスの細胞侵入の宿主因子の一つである C 型レクチンはカルシウムイオン依存的に標的分子と結合すること、またエンドソームの動態にもカルシウムが重要な役割を果たしていることから、エボラウイルス感染もまたカルシウムに大きく依存することが示唆される²⁹⁾。このことを裏付けるように、siRNA screening を用いた過去の報告により、calmodulin や Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 等のカルシウムシグナル経路の因子がエボラウイルスの細胞侵入に必要であることが認められた³⁸⁾。また我々は最近、エンドソームに局在するカルシウムチャンネルである two-pore channels (TPCs) が細胞侵入に必要であることを発見した⁸⁴⁾。TPCs は、強力な細胞内カルシウムシグナル伝達物質であるニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸 (NAADP) によって活性化される実行因子として近年報告された⁷⁾。様々な組織で発現しており、その活性は酸性 pH によって制御されている^{4, 75, 104)}。ヒトやマウスを含めた一部の動物では TPC1 と TPC2 が発現しているが、それぞれの発現を抑制又は欠損させたヒト及びマウスの細胞が野生型エボラウイルスの感染に抵抗性を示した¹⁰³⁾。これらのチャンネル活性を直接阻害する薬剤もまたウイルスの細胞侵入を抑制した。阻害剤存在下では、TPC2 と NPC1 の両方を発現するエンドソームに VLP が蓄積し、一方で TPC2 のみ発現しているエンドソームに存在する VLP の割合が低下していた。このことは、TPC2 のみ発現しているエンドソームがウイルス感染にとって何らかの形で必要であり、その分画にウイルス粒子が移行する過程で TPCs が働いていると考えられる (図2)。TPCs はエンドソームの動態に関わることが示唆されており、エボラウイルスもまたその機能を利用していると思われるが、今後より詳細な解析が必要である^{26, 48, 81)}。一方、TPCs を阻害する薬剤の一つであるテトランドリンはマウスでのウイルス増殖を強く抑制したことから、TPCs がウイルスの病原性に重要な役割を果たしており、抗ウイルス薬の標的になり得ることを示唆している。

9. 膜融合

エボラウイルス GP2 を介した膜融合のメカニズムに関する知見は、他のクラス I 融合タンパク質に関する過去の研究に寄るところが大きい。一方で、GP の詳細な結晶構造解析が報告されており、それらもまた大きく貢献してきた。

GP2 の N 末端にある融合ループは、未熟な融合反応を防ぐために通常 GP1 の受容体結合領域によって覆われている^{12, 44)}。システインプロテアーゼによるグリカンキャップとムチン様領域の除去後、露出された受容体結合領域が NPC1 と結合することで、もしくは更に何らかの外的因子の働きにより融合ループが受容体結合領域の傘から露出す

る^{2,5)}。その後、酸性 pH 下では融合ループの構造変化が促進されると考えられ、その疎水性領域がエンドソームの脂質膜に突き刺さり、膜融合が始まる^{24,25)}。結果、引き伸ばされた三量体 GP2 は更に大きく構造変化を起こし、融合ループの C 末端側にある HR1 (α ヘリックス) に HR2 (α ヘリックス) が反転して逆向きに結合したヘアピン様構造である“6 ヘリックス束”を形成する (図 1D)^{52,95)}。酸性 pH 下ではこの構造が極めて安定化されると考えられている²⁸⁾。HR2 配列由来でエンドソームにアクセス出来るように組み換えられたペプチドが、エボラウイルスの細胞侵入を阻害したことから、他のクラス I 融合タンパク質と同様、GP2 の場合もこの 6 ヘリックス束の形成が必須なイベントであることが分かる⁶⁰⁾。三量体 HR1 と HR2 が 6 ヘリックス束を形成することで、膜貫通領域と融合ループがそれぞれ貫通しているウイルス膜とエンドソーム膜が十分接近し、最終的に膜融合が起こる⁹⁶⁾。このようにして細胞侵入が完了した結果、ゲノム RNA を含むウイルス粒子のコアが細胞質へと放出され、ウイルスの複製が開始される。

10. おわりに

エボラウイルスの細胞侵入は他の多くのウイルスのそれに比べて、より多くの因子が絡み合う複雑な過程であり、未解明な点もなお数多くある。細胞侵入を標的とした薬剤は数多く同定されており、モデル動物で治療効果が認められたものも複数報告されている^{36,51,84)}。しかしその多くは阻害機構が分かっておらず、未解明の侵入過程がそれら薬剤の標的となっている可能性が考えられる。そのため、エボラウイルスの細胞侵入に関する基礎研究は、薬剤開発という観点からもより一層行う必要がある領域である。しかし、その特殊な粒子構造が故に、野生型ウイルス以外を使用して結論を出す場合には十分注意する必要がある。また、感染標的となる組織や細胞が非常に広範囲に及ぶこともあり、細胞種によって感染メカニズムが異なる可能性が考えられており、特に宿主因子を対象とした病原性の解析及び治療薬の開発には気を付けたい。一方、複製可能なウイルスを使用し、個体レベルでの解析または薬剤の開発を行うには BSL4 施設が必要となる。残念ながら現在日本では BSL4 施設が稼働しておらず、最終的には他国に依存せざるを得ない。現在米国の施設を使用している著者もまた、複製可能なウイルスを用いた実験の重要性を痛感しており、可能ならば日本独自の BSL4 施設が稼働し、日本もまたエボラウイルス研究に大きく貢献出来ることを願っている。

11. 参考文献

- Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *Journal of virology* 76:6841-6844.
- Bale, S., T. Liu, S. Li, Y. Wang, D. Abelson, M. Fusco, V. L. Woods, Jr., and E. O. Saphire. 2011. Ebola virus glycoprotein needs an additional trigger, beyond proteolytic priming for membrane fusion. *PLoS neglected tropical diseases* 5:e1395.
- Becker, S., M. Spiess, and H. D. Klenk. 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *The Journal of general virology* 76 (Pt 2):393-399.
- Brailoiu, E., D. Churamani, X. Cai, M. G. Schrlau, G. C. Brailoiu, X. Gao, R. Hooper, M. J. Boulware, N. J. Dun, J. S. Marchant, and S. Patel. 2009. Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *The Journal of cell biology* 186:201-209.
- Brecher, M., K. L. Schornberg, S. E. Delos, M. L. Fusco, E. O. Saphire, and J. M. White. 2012. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change. *Journal of virology* 86:364-372.
- Brindley, M. A., C. L. Hunt, A. S. Kondratowicz, J. Bowman, P. L. Sinn, P. B. McCray, Jr., K. Quinn, M. L. Weller, J. A. Chiorini, and W. Maury. 2011. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology* 415:83-94.
- Calcraft, P. J., M. Ruas, Z. Pan, X. Cheng, A. Arredouani, X. Hao, J. Tang, K. Rietdorf, L. Teboul, K. T. Chuang, P. Lin, R. Xiao, C. Wang, Y. Zhu, Y. Lin, C. N. Wyatt, J. Parrington, J. Ma, A. M. Evans, A. Galione, and M. X. Zhu. 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459:596-600.
- Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, and T. R. Brummelkamp. 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477:340-343.
- Chandran, K., N. J. Sullivan, U. Felbor, S. P. Whelan, and J. M. Cunningham. 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308:1643-1645.
- Cote, M., J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C. M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, and J. Cunningham. 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477:344-348.
- De Clercq, E. 2015. Ebola virus (EBOV) infection: Therapeutic strategies. *Biochemical pharmacology* 93:1-10.
- Dias, J. M., A. I. Kuehne, D. M. Abelson, S. Bale, A. C. Wong, P. Halfmann, M. A. Muhammad, M. L. Fusco, S. E. Zak, E. Kang, Y. Kawaoka, K. Chandran, J. M. Dye, and E. O. Saphire. 2011. A shared structural solution for neutralizing ebolaviruses. *Nature structural & molecular biology* 18:1424-1427.

- 13) Dolnik, O., V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, U. Stroher, H. D. Klenk, and V. Volchkov. 2004. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *The EMBO journal* 23:2175-2184.
- 14) Dube, D., M. B. Brecher, S. E. Delos, S. C. Rose, E. W. Park, K. L. Schornberg, J. H. Kuhn, and J. M. White. 2009. The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *Journal of virology* 83:2883-2891.
- 15) Dube, D., K. L. Schornberg, C. J. Shoemaker, S. E. Delos, T. S. Stantchev, K. A. Clouse, C. C. Broder, and J. M. White. 2010. Cell adhesion-dependent membrane trafficking of a binding partner for the ebolavirus glycoprotein is a determinant of viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:16637-16642.
- 16) Feldmann, H., and T. W. Geisbert. 2011. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* 377:849-862.
- 17) Francica, J. R., A. Varela-Rohena, A. Medvec, G. Plesa, J. L. Riley, and P. Bates. 2010. Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS pathogens* 6:e1001098.
- 18) Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* 235:172-189.
- 19) Garrison, A. R., B. G. Giomarelli, C. M. Lear-Rooney, C. J. Saucedo, S. Yellayi, L. R. Krumpe, M. Rose, J. Paragas, M. Bray, G. G. Olinger, Jr., J. B. McMahon, J. Huggins, and B. R. O'Keefe. 2014. The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. *Antiviral research* 112:1-7.
- 20) Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
- 21) Gnirss, K., A. Kuhl, C. Karsten, I. Glowacka, S. Bertram, F. Kaup, H. Hofmann, and S. Pohlmann. 2012. Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression. *Virology* 424:3-10.
- 22) Gramberg, T., H. Hofmann, P. Moller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch, and S. Pohlmann. 2005. LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* 340:224-236.
- 23) Gramberg, T., E. Soilleux, T. Fisch, P. F. Lalor, H. Hofmann, S. Wheeldon, A. Cotterill, A. Wegele, T. Winkler, D. H. Adams, and S. Pohlmann. 2008. Interactions of LSECTin and DC-SIGN/DC-SIGNR with viral ligands: Differential pH dependence, internalization and virion binding. *Virology* 373:189-201.
- 24) Gregory, S. M., E. Harada, B. Liang, S. E. Delos, J. M. White, and L. K. Tamm. 2011. Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11211-11216.
- 25) Gregory, S. M., P. Larsson, E. A. Nelson, P. M. Kasson, J. M. White, and L. K. Tamm. 2014. Ebolavirus entry requires a compact hydrophobic fist at the tip of the fusion loop. *Journal of virology* 88:6636-6649.
- 26) Grimm, C., L. M. Holdt, C. C. Chen, S. Hassan, C. Muller, S. Jors, H. Cuny, S. Kissing, B. Schroder, E. Butz, B. Northoff, J. Castonguay, C. A. Luber, M. Moser, S. Spahn, R. Lullmann-Rauch, C. Fendel, N. Klugbauer, O. Griesbeck, A. Haas, M. Mann, F. Bracher, D. Teupser, P. Saftig, M. Biel, and C. Wahl-Schott. 2014. High susceptibility to fatty liver disease in two-pore channel 2-deficient mice. *Nature communications* 5:4699.
- 27) Haines, K. M., N. H. Vande Burgt, J. R. Francica, R. L. Kaletsky, and P. Bates. 2012. Chinese hamster ovary cell lines selected for resistance to ebolavirus glycoprotein mediated infection are defective for NPC1 expression. *Virology* 432:20-28.
- 28) Harrison, J. S., C. D. Higgins, K. Chandran, and J. R. Lai. 2011. Designed protein mimics of the Ebola virus glycoprotein GP2 alpha-helical bundle: stability and pH effects. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20:1587-1596.
- 29) Hay, J. C. 2007. Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO reports* 8:236-240.
- 30) Hood, C. L., J. Abraham, J. C. Boyington, K. Leung, P. D. Kwong, and G. J. Nabel. 2010. Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity. *Journal of virology* 84:2972-2982.
- 31) Hunt, C. L., A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey, and W. Maury. 2011. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *Journal of virology* 85:334-347.
- 32) Ichimura, T., E. J. Asseldonk, B. D. Humphreys, L. Gunaratnam, J. S. Duffield, and J. V. Bonventre. 2008. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* 118:1657-1668.
- 33) Ito, H., S. Watanabe, A. Takada, and Y. Kawaoka. 2001. Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of virology* 75:1576-1580.
- 34) Jeffers, S. A., D. A. Sanders, and A. Sanchez. 2002. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *Journal of virology* 76:12463-12472.
- 35) Jemielity, S., J. J. Wang, Y. K. Chan, A. A. Ahmed, W. Li, S. Monahan, X. Bu, M. Farzan, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff, and H. Choe. 2013. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS pathogens* 9:e1003232.
- 36) Johansen, L. M., J. M. Brannan, S. E. Delos, C. J. Shoemaker, A. Stossel, C. Lear, B. G. Hoffstrom, L. E. Dewald, K. L. Schornberg, C. Scully, J. Lehar, L. E.

- Hensley, J. M. White, and G. G. Olinger. 2013. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection. *Science translational medicine* 5:190ra179.
- 37) Kaletsky, R. L., G. Simmons, and P. Bates. 2007. Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *Journal of virology* 81:13378-13384.
- 38) Kolokoltsov, A. A., M. F. Saeed, A. N. Freiberg, M. R. Holbrook, and R. A. Davey. 2009. Identification of novel cellular targets for therapeutic intervention against Ebola virus infection by siRNA screening. *Drug development research* 70:255-265.
- 39) Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray, Jr., J. Chiorini, and W. Maury. 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8426-8431.
- 40) Krishnan, A., E. H. Miller, A. S. Herbert, M. Ng, E. Ndungo, S. P. Whelan, J. M. Dye, and K. Chandran. 2012. Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a flavivirus entry receptor. *Viruses* 4:2471-2484.
- 41) Krzyzaniak, M. A., M. T. Zumstein, J. A. Gerez, P. Picotti, and A. Helenius. 2013. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens* 9:e1003309.
- 42) Kuhn, J. H., S. R. Radoshitzky, A. C. Guth, K. L. Warfield, W. Li, M. J. Vincent, J. S. Towner, S. T. Nichol, S. Bavari, H. Choe, M. J. Aman, and M. Farzan. 2006. Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *The Journal of biological chemistry* 281:15951-15958.
- 43) Kuroda, M., D. Fujikura, A. Nanbo, A. Marzi, O. Noyori, M. Kajihara, J. Maruyama, K. Matsuno, H. Miyamoto, R. Yoshida, H. Feldmann, and A. Takada. 2015. The Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for the Cellular Entry of Ebola Virus. *Journal of virology*.
- 44) Lee, J. E., M. L. Fusco, A. J. Hessel, W. B. Oswald, D. R. Burton, and E. O. Saphire. 2008. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 454:177-182.
- 45) Lee, J. E., and E. O. Saphire. 2009. Neutralizing ebolavirus: structural insights into the envelope glycoprotein and antibodies targeted against it. *Current opinion in structural biology* 19:408-417.
- 46) Lennemann, N. J., B. A. Rhein, E. Ndungo, K. Chandran, X. Qiu, and W. Maury. 2014. Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1. *mBio* 5:e00862-00813.
- 47) Lim, J. P., and P. A. Gleeson. 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* 89:836-843.
- 48) Lin-Moshier, Y., M. V. Keebler, R. Hooper, M. J. Boulware, X. Liu, D. Churamani, M. E. Abood, T. F. Walseth, E. Brailoiu, S. Patel, and J. S. Marchant. 2014. The Two-pore channel (TPC) interactome unmask isoform-specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:13087-13092.
- 49) Lin, G., G. Simmons, S. Pohlmann, F. Baribaud, H. Ni, G. J. Leslie, B. S. Haggarty, P. Bates, D. Weissman, J. A. Hoxie, and R. W. Doms. 2003. Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology* 77:1337-1346.
- 50) Linger, R. M., A. K. Keating, H. S. Earp, and D. K. Graham. 2008. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Advances in cancer research* 100:35-83.
- 51) Madrid, P. B., S. Chopra, I. D. Manger, L. Gilfillan, T. R. Keepers, A. C. Shurtleff, C. E. Green, L. V. Iyer, H. H. Dilks, R. A. Davey, A. A. Kolokoltsov, R. Carrion, Jr., J. L. Patterson, S. Bavari, R. G. Panchal, T. K. Warren, J. B. Wells, W. H. Moos, R. L. Burke, and M. J. Tanga. 2013. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *PLoS one* 8:e60579.
- 52) Malashkevich, V. N., B. J. Schneider, M. L. McNally, M. A. Milhollen, J. X. Pang, and P. S. Kim. 1999. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-A resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2662-2667.
- 53) Martinez, O., J. Johnson, B. Manicassamy, L. Rong, G. G. Olinger, L. E. Hensley, and C. F. Basler. 2010. Zaire Ebola virus entry into human dendritic cells is insensitive to cathepsin L inhibition. *Cellular microbiology* 12:148-157.
- 54) Maruyama, T., L. L. Rodriguez, P. B. Jahrling, A. Sanchez, A. S. Khan, S. T. Nichol, C. J. Peters, P. W. Parren, and D. R. Burton. 1999. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *Journal of virology* 73:6024-6030.
- 55) Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann. 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* 78:12090-12095.
- 56) Marzi, A., P. Moller, S. L. Hanna, T. Harrer, J. Eisemann, A. Steinkasserer, S. Becker, F. Baribaud, and S. Pohlmann. 2007. Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR. *The Journal of*

- infectious diseases 196 Suppl 2:S237-246.
- 57) Marzi, A., T. Reinheckel, and H. Feldmann. 2012. Cathepsin B & L are not required for ebola virus replication. *PLoS neglected tropical diseases* 6:e1923.
 - 58) Mehedi, M., D. Falzarano, J. Seebach, X. Hu, M. S. Carpenter, H. J. Schnittler, and H. Feldmann. 2011. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *Journal of virology* 85:5406-5414.
 - 59) Mercer, J., M. Schelhaas, and A. Helenius. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry* 79:803-833.
 - 60) Miller, E. H., J. S. Harrison, S. R. Radoshitzky, C. D. Higgins, X. Chi, L. Dong, J. H. Kuhn, S. Bavari, J. R. Lai, and K. Chandran. 2011. Inhibition of Ebola virus entry by a C-peptide targeted to endosomes. *The Journal of biological chemistry* 286:15854-15861.
 - 61) Miller, E. H., G. Obernosterer, M. Raaben, A. S. Herbert, M. S. Deffieu, A. Krishnan, E. Ndungo, R. G. Sandesara, J. E. Carette, A. I. Kuehne, G. Ruthel, S. R. Pfeffer, J. M. Dye, S. P. Whelan, T. R. Brummelkamp, and K. Chandran. 2012. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *The EMBO journal* 31:1947-1960.
 - 62) Miller, M. E., S. Adhikary, A. A. Kolokoltsov, and R. A. Davey. 2012. Ebolavirus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection. *Journal of virology* 86:7473-7483.
 - 63) Mingo, R. M., J. A. Simmons, C. J. Shoemaker, E. A. Nelson, K. L. Schornberg, R. S. D'Souza, J. E. Casanova, and J. M. White. 2015. Ebola virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1+ endolysosomes is a rate-defining step. *Journal of virology* 89:2931-2943.
 - 64) Misasi, J., K. Chandran, J. Y. Yang, B. Considine, C. M. Filone, M. Cote, N. Sullivan, G. Fabozzi, L. Hensley, and J. Cunningham. 2012. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *Journal of virology* 86:3284-3292.
 - 65) Moller-Tank, S., L. M. Albritton, P. D. Rennert, and W. Maury. 2014. Characterizing functional domains for TIM-mediated enveloped virus entry. *Journal of virology* 88:6702-6713.
 - 66) Moller-Tank, S., A. S. Kondratowicz, R. A. Davey, P. D. Rennert, and W. Maury. 2013. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *Journal of virology* 87:8327-8341.
 - 67) Morizono, K., and I. S. Chen. 2014. Role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *Journal of virology* 88:4275-4290.
 - 68) Morizono, K., Y. Xie, T. Olafsen, B. Lee, A. Dasgupta, A. M. Wu, and I. S. Chen. 2011. The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry. *Cell host & microbe* 9:286-298.
 - 69) Mulherkar, N., M. Raaben, J. C. de la Torre, S. P. Whelan, and K. Chandran. 2011. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology* 419:72-83.
 - 70) Murin, C. D., M. L. Fusco, Z. A. Bornholdt, X. Qiu, G. G. Olinger, L. Zeitlin, G. P. Kobinger, A. B. Ward, and E. O. Saphire. 2014. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:17182-17187.
 - 71) Nanbo, A., M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, G. Neumann, P. Halfmann, and Y. Kawaoka. 2010. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS pathogens* 6:e1001121.
 - 72) Neumann, G., T. W. Geisbert, H. Ebihara, J. B. Geisbert, K. M. Daddario-DiCaprio, H. Feldmann, and Y. Kawaoka. 2007. Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates. *Journal of virology* 81:2995-2998.
 - 73) Osterholm, M. T., K. A. Moore, N. S. Kelley, L. M. Brosseau, G. Wong, F. A. Murphy, C. J. Peters, J. W. LeDuc, P. K. Russell, M. Van Herp, J. Kapetshi, J. J. Muyembe, B. K. Ilunga, J. E. Strong, A. Grolla, A. Wolz, B. Kargbo, D. K. Kargbo, P. Formenty, D. A. Sanders, and G. P. Kobinger. 2015. Transmission of Ebola viruses: what we know and what we do not know. *mBio* 6:e00137.
 - 74) Parren, P. W., T. W. Geisbert, T. Maruyama, P. B. Jahrling, and D. R. Burton. 2002. Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *Journal of virology* 76:6408-6412.
 - 75) Pitt, S. J., T. M. Funnell, M. Sitsapesan, E. Venturi, K. Rietdorf, M. Ruas, A. Ganesan, R. Gosain, G. C. Churchill, M. X. Zhu, J. Parrington, A. Galione, and R. Sitsapesan. 2010. TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca²⁺ release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca²⁺. *The Journal of biological chemistry* 285:35039-35046.
 - 76) Powlesland, A. S., T. Fisch, M. E. Taylor, D. F. Smith, B. Tissot, A. Dell, S. Pohlmann, and K. Drickamer. 2008. A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans. *The Journal of biological chemistry* 283:593-602.
 - 77) Quinn, K., M. A. Brindley, M. L. Weller, N. Kaludov, A. Kondratowicz, C. L. Hunt, P. L. Sinn, P. B. McCray, Jr., C. S. Stein, B. L. Davidson, R. Flick, R. Mandell, W. Staplin, W. Maury, and J. A. Chiorini. 2009. Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors. *Journal of virology* 83:10176-10186.
 - 78) Reynard, O., M. Borowiak, V. A. Volchkova, S. Delpeut, M. Mateo, and V. E. Volchkov. 2009. Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. *Journal of virology* 83:9596-9601.
 - 79) Rosenbaum, A. I., and F. R. Maxfield. 2011. Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and

- potential therapeutic approaches. *Journal of neurochemistry* 116:789-795.
- 80) Rossman, J. S., G. P. Leser, and R. A. Lamb. 2012. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *Journal of virology* 86:10950-10960.
 - 81) Ruas, M., K. Rietdorf, A. Arredouani, L. C. Davis, E. Lloyd-Evans, H. Koegel, T. M. Funnell, A. J. Morgan, J. A. Ward, K. Watanabe, X. Cheng, G. C. Churchill, M. X. Zhu, F. M. Platt, G. M. Wessel, J. Parrington, and A. Galione. 2010. Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca(2+) signaling and endolysosomal trafficking. *Current biology : CB* 20:703-709.
 - 82) Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, T. Albrecht, and R. A. Davey. 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS pathogens* 6:e1001110.
 - 83) Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, A. N. Freiberg, M. R. Holbrook, and R. A. Davey. 2008. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS pathogens* 4:e1000141.
 - 84) Sakurai, Y., A. A. Kolokoltsov, C. C. Chen, M. W. Tidwell, W. E. Bauta, N. Klugbauer, C. Grimm, C. Wahl-Schott, M. Biel, and R. A. Davey. 2015. Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* 347:995-998.
 - 85) Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3602-3607.
 - 86) Sanchez, A., Z. Y. Yang, L. Xu, G. J. Nabel, T. Crews, and C. J. Peters. 1998. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *Journal of virology* 72:6442-6447.
 - 87) Schornberg, K., S. Matsuyama, K. Kabsch, S. Delos, A. Bouton, and J. White. 2006. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *Journal of virology* 80:4174-4178.
 - 88) Schornberg, K. L., C. J. Shoemaker, D. Dube, M. Y. Abshire, S. E. Delos, A. H. Bouton, and J. M. White. 2009. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8003-8008.
 - 89) Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann, and Y. Kawaoka. 2006. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of virology* 80:10109-10116.
 - 90) Stewart, P. L., and G. R. Nemerow. 2007. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends in microbiology* 15:500-507.
 - 91) Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka. 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of virology* 78:2943-2947.
 - 92) Takada, A., C. Robison, H. Goto, A. Sanchez, K. G. Murti, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka. 1997. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14764-14769.
 - 93) Takada, A., S. Watanabe, H. Ito, K. Okazaki, H. Kida, and Y. Kawaoka. 2000. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 278:20-26.
 - 94) Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk. 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5762-5767.
 - 95) Weissenhorn, W., A. Carfi, K. H. Lee, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1998. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Molecular cell* 2:605-616.
 - 96) White, J. M., S. E. Delos, M. Brecher, and K. Schornberg. 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 43:189-219.
 - 97) Wong, A. C., R. G. Sandesara, N. Mulherkar, S. P. Whelan, and K. Chandran. 2010. A forward genetic strategy reveals destabilizing mutations in the Ebola-virus glycoprotein that alter its protease dependence during cell entry. *Journal of virology* 84:163-175.
 - 98) Wong, G., X. Qiu, G. G. Olinger, and G. P. Kobinger. 2014. Post-exposure therapy of filovirus infections. *Trends in microbiology* 22:456-463.
 - 99) Wool-Lewis, R. J., and P. Bates. 1998. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *Journal of virology* 72:3155-3160.
 - 100) Wool-Lewis, R. J., and P. Bates. 1999. Endoproteolytic processing of the ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *Journal of virology* 73:1419-1426.
 - 101) Yang, Z. Y., H. J. Duckers, N. J. Sullivan, A. Sanchez, E. G. Nabel, and G. J. Nabel. 2000. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nature medicine* 6:886-889.
 - 102) Yonezawa, A., M. Cavrois, and W. C. Greene. 2005. Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha. *Journal of virology* 79:918-926.
 - 103) Zhu, M. X., J. Ma, J. Parrington, P. J. Calcraft, A. Galione, and A. M. Evans. 2010. Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *American journal of physiology. Cell physiology* 298:C430-441.
 - 104) Zong, X., M. Schieder, H. Cuny, S. Fenske, C. Gruner,

K. Rotzer, O. Griesbeck, H. Harz, M. Biel, and C. Wahl-Schott. 2009. The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from lysosomal

stores. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458:891-899.

Ebola virus host cell entry

Yasuteru SAKURAI

Texas Biomedical Research Institute

Ebola virus is an enveloped virus with filamentous structure and causes a severe hemorrhagic fever in human and nonhuman primates. Host cell entry is the first essential step in the viral life cycle, which has been extensively studied as one of the therapeutic targets. A virus factor of cell entry is a surface glycoprotein (GP), which is an only essential viral protein in the step, as well as the unique particle structure. The virus also interacts with a lot of host factors to successfully enter host cells. Ebola virus at first binds to cell surface proteins and internalizes into cells, followed by trafficking through endosomal vesicles to intracellular acidic compartments. There, host proteases process GPs, which can interact with an intracellular receptor. Then, under an appropriate circumstance, viral and endosomal membranes are fused, which is enhanced by major structural changes of GPs, to complete host cell entry. Recently the basic research of Ebola virus infection mechanism has markedly progressed, largely contributed by identification of host factors and detailed structural analyses of GPs. This article highlights the mechanism of Ebola virus host cell entry, including recent findings.