

2. インフルエンザウイルスゲノムの細胞内動態を 制御する宿主因子の研究

川口 敦史

筑波大学医学医療系感染生物学分野

インフルエンザウイルスゲノムは ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成し、その細胞内動態の制御には、ウイルスタンパク質だけでなく、宿主由来の因子（宿主因子）が必須である。我々は、試験管内再構成系を用いた生化学的手法とプロテオミクス解析により、ウイルス RNP 複合体の複製とその細胞内輸送を制御する宿主因子の同定を進めてきた。DNA 複製のライセンシング因子である MCM 複合体によってウイルスゲノム複製は活性化され、複製されたウイルスゲノムはスプライシング因子である UAP56 が NP シャペロンとして機能することで子孫 RNP 複合体を形成する。複製されたウイルス RNP 複合体は、宿主の RNA 結合タンパク質である YB-1 と結合し、共に中心体へと集積する。YB-1 による細胞周期非依存的な中心体の成熟化によって小胞輸送経路が活性化され、ウイルス RNP 複合体はコレステロールが豊富なりサイクリングエンドソームを介して細胞膜まで輸送される。エンドソーム膜内のコレステロールは、細胞膜上で脂質ラフトのクラスタリングを誘導するのに関与し、ウイルス RNP 複合体の細胞膜への輸送と協調したウイルス粒子形成場のトリガーとして機能すると推測される。

はじめに

インフルエンザウイルスのゲノムは八本に分節化されたマイナス極性の一本鎖 RNA であり、各ウイルスゲノム分節には1ないし2つのウイルスタンパク質がコードされている。インフルエンザウイルスの最大の特徴は、分節化されたウイルスゲノムを持つことであり、DNA シーケンサーが普及していない 1970 年代でも、マウスでの連鎖解析と同様に、変異株と野生株を共感染させて交雑株を単離することで、変異が導入されたウイルス遺伝子を同定することが可能であった。この利点を生かし、本奨励賞に名前を冠する杉浦先生を筆頭に、温度感受性変異株を用いたインフルエンザウイルスのフォワードジェネティクスが盛んに進

められ^{1,2)}、リバーズジェネティクスによる分子遺伝学が導入される以前から、各ウイルスタンパク質のおおまかな機能が明らかにされていた。しかし、インフルエンザウイルスは 12 種類しかウイルスタンパク質を持たないため、ウイルスタンパク質の機能のみで、ウイルスゲノムの細胞内動態を説明することは難しく、宿主因子の同定とその機能を明らかにすることは、ウイルスの増殖機構だけでなく、種特異性や病原性を理解するためにも重要である。本稿では、我々が進めてきた A 型インフルエンザウイルスゲノムの複製機構とその細胞内輸送機構について、各過程を制御する宿主因子の機能を中心に概説する。

ウイルスゲノム複製と vRNP 複合体形成

ウイルスポリメラーゼ複合体は、PB1 サブユニットに PB2 サブユニットと PA サブユニットがそれぞれ結合した 3 者複合体であり、インフルエンザウイルスゲノム (vRNA) の 3' 末端側の 12 塩基と 5' 末端側の 13 塩基が半相補鎖を形成したプロモーター配列に結合する。vRNA は、RNA 結合タンパク質である NP が数珠状に結合することで、viral ribonucleoprotein (vRNP) 複合体を形成し、vRNP が転写およびゲノム複製の基本ユニットとして機能する。

連絡先

〒 305-8575

茨城県つくば市天王台 1-1-1

筑波大学医学医療系感染生物学分野

TEL & FAX: 029-853-3233

E-mail: ats-kawaguchi@md.tsukuba.ac.jp

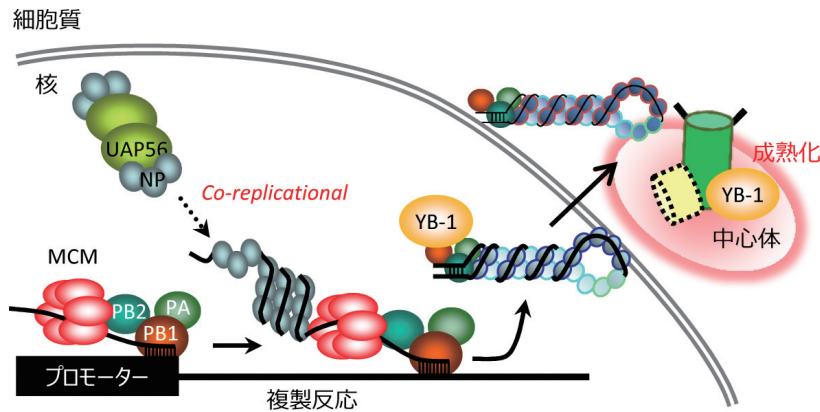


図1 ウイルスゲノム複製と子孫 RNP 複合体形成のモデル図

MCM 複合体は伸長反応複合体を安定化する。UAP56 によって、NP が新規合成鎖にリクルートされ、RNP 複合体が形成される。子孫 vRNP には、核内で YB-1 が結合し、核外輸送後、vRNP と共に中心体へと集積する。

NP の vRNA への結合は、機能的な RNA 合成の鋳型形成に必須である^{3,4)}。インフルエンザウイルスの転写反応は、宿主 pre-mRNA のキャップ構造に PB2 が結合し、キャップ構造から 12 ~ 14 塩基下流で PA が mRNA を切断することで開始する。これにより生成された十数塩基の短鎖 RNA をプライマーとして、vRNA を鋳型としたウイルス mRNA の伸長反応が開始する。転写反応が鋳型 vRNA の 5' 末端近傍まで到達すると、連続した 5 ~ 7 塩基の U 残基をウイルスポリメラーゼが繰り返して転写することで約 20 塩基の poly (A) 鎖を付加し、ウイルス mRNA 合成が終結する。一方、ゲノム複製の開始反応は、プライマー非依存的である。ゲノム複製では、vRNA を鋳型として複製中間体である cRNA を合成し、cRNA を鋳型として vRNA の増幅を行う。複製反応では転写反応の場合とは異なり、連続した U 残基領域においてウイルスポリメラーゼはスリップせず、忠実に鋳型鎖を複製する。

細胞核内には RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の転写部位が約 8,000 カ所あり、それぞれの転写部位では複数の Pol II 分子が mRNA を転写している。これらの転写部位では、転写ファクターとよばれる様々な転写関連因子が含まれる巨大な転写複合体が形成されている⁵⁾。その周囲には、スプライシング因子が濃縮された核内ドメインであるスプライゾームなどの構造体が局在し、転写反応と協調した mRNA 成熟が行われている。ウイルスポリメラーゼは PA サブユニットを介して、Pol II の最大サブユニットの C-terminal domain (CTD) と相互作用し^{6,7)}、ウイルスポリメラーゼは転写ファクターの宿主因子を利用してウイルスゲノムの転写・複製を制御していることが推測される。これまで我々の研究グループでは、機能的にウイルスゲノム複製に関わる宿主因子を同定するため、試験管内ウイルスゲノム複製系を構築し、その解体と再構成を進め

てきた⁸⁻¹²⁾。ウイルス粒子から精製した vRNP は、転写反応を行うことはできるが、完全鎖長のウイルスゲノムをプライマー非依存的に複製できない (vRNA → cRNA 合成、及び cRNA → vRNA 合成)。一方、vRNP に非感染細胞の核抽出液を加えることで、ウイルスゲノム複製反応を再構成することができる。そこで、非感染細胞の核抽出液から上記の反応を支える宿主因子を生化学的に単離し、vRNA → cRNA 合成に関与する宿主因子として、宿主 DNA 複製のライセンス因子である MCM 複合体¹¹⁾、cRNA → vRNA 合成に関与する宿主因子として転写関連因子である pp32/APRIL を同定してきた¹²⁾ (図 1)。

MCM 複合体は、minichromosome maintenance (MCM) 2, 3, 4, 5, 6, 7 の 6 種類のタンパク質からなるリング様のヘテロ 6 量体であり、G1 期に宿主 DNA の複製起点上にリクルートされ、S 期への進行に伴って DNA 複製ヘリカーゼとして開始反応を制御する分子である。RNA 合成反応は、(1) RNA ポリメラーゼとプロモーターの結合 (開始反応)、(2) RNA ポリメラーゼのプロモーターからの離脱および伸長反応複合体の形成、(3) 伸長反応、(4) 反応の終結および RNA ポリメラーゼの鋳型からの離脱、の 4 つの素過程に大別することができる。MCM 非存在下では、開始反応は観察されるが、プロモーターから離脱した伸長反応複合体が不安定であり、新規合成鎖を伸長しにくい¹¹⁾。一方、MCM が新規合成鎖と PA サブユニットに結合することによって、伸長反応複合体が安定化され、長鎖ウイルスゲノムでも複製できることが示唆されている。pp32/APRIL は鋳型極性を認識する宿主因子だと推測されているが詳細な機能は不明である¹²⁾。鳥の pp32 遺伝子で同定されている挿入変異の有無によって、鳥インフルエンザウイルスの種特異的なウイルスポリメラーゼ活性が規定されているとの報告もあり¹³⁾、今後の展開が期待される宿主

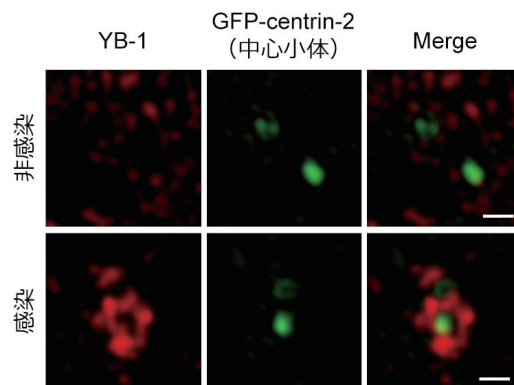


図2 中心体に局在した YB-1 の超解像顕微鏡観察

3D-SIM 超解像顕微鏡を用いて、YB-1 (赤色) 及び中心小体のマーカーとして GFP-centrin-2 (緑色) を観察した。Scale bar; 500 nm. 文献 27 より改変。

因子である。

ウイルスポリメラーゼ活性を促進する因子として、多くのスプライシング関連因子が同定されている^{9,14-16)}。北里大学 百瀬博士によって同定された RAF-2p48 は、スプライシング因子 U2AF⁶⁵ のリンカー領域近傍に結合する UAP56 (U2AF⁶⁵-Associated Protein, 56 kDa) と同一分子である。RAF-2p48 は NP の三量体化を促進し、二量体の RAF-2p48 に三量体の NP がそれぞれ結合することで 400 kDa を超える八量体を形成する。RAF-2p48 は複製反応と協調して、三量体の NP を新規合成鎖にリクルートすることで、子孫 vRNP の形成を促進する (図 1)。また、酵母レプリコン系を用いた遺伝学的解析から、Tat-SF1 (Tat stimulatory factor 1) と Prp18 を同定しており^{14,15)}、いずれの宿主因子も vRNA-NP 複合体形成を促進する分子シャペロンとして機能する。NP は一本鎖 RNA に結合して、鋳型鎖の不要な二次構造形成を抑え、機能的な鋳型構造を形成するのに必要である¹⁵⁾。また、NP が新規合成鎖に結合することで、新規合成鎖と鋳型鎖の二本鎖 RNA 形成を抑制し、新規合成鎖の鋳型鎖からのリリースが促進される¹⁷⁾。今後は、各 NP シャペロンの機能的な使い分けを明らかにすることが課題である。

Rab11 陽性小胞輸送経路を介したウイルスゲノムの細胞内輸送

複製された vRNP は M1 及び NS2 を介して核外輸送因子である CRM1 と結合し、細胞質へと移行する¹⁸⁻²¹⁾。ウイルス粒子の裏打ちタンパク質であり、脂質膜に結合する性質をもつ M1 を介して、vRNP は細胞膜直下に集積するモデルが考えられているが²²⁾、詳細は不明である。そこで、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により、ウイルスゲノムの細胞内局在を観察したところ、ウイルスゲノムは中心体の周囲に集積して輸送小胞様の局在を示すことを見出した²³⁾。Arf 依存的なエンドソーム形成阻害剤で

あるプレフェルデン A 処理により、ウイルスゲノムは繊維状の局在パターンを示して微小管と共局在すること、および微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理によって、ウイルスゲノムが細胞質全体に分散することが明らかになった²³⁾。よって、ウイルスゲノムはエンドソーム依存的に微小管を介して細胞質を輸送されていると推測される。

エンドソームによる細胞内の時空間的な物質輸送は、低分子量 GTPase である Rab ファミリーを分子スイッチとして制御される。そこで、ウイルスゲノムと共局在する Rab ファミリー分子を探索したところ、Rab11a との共局在が観察された²⁴⁻²⁶⁾。Rab11a はリサイクリングエンドソームの輸送を制御する因子であり、細胞膜からの逆行性輸送、及び核近傍で形成される Endocytic recycling compartment (ERC) からの順行性輸送を制御する。Rab11a は GTP と結合することで活性型となり、C 末端のガラニルガラニル基修飾を介してエンドソーム膜に挿入され、キネシンなどモータータンパク質によって輸送される。我々は、インフルエンザウイルス感染によって、GTP 型 Rab11a が増加し、リサイクリングエンドソームが ERC へと集積することを明らかにした²⁷⁾。また、vRNP は GTP 型 Rab11a に特異的に結合することも明らかになっている (北里大・百瀬博士との共同研究)²⁴⁾。現在、Rab11a のGuanine nucleotide exchange factor は明らかにされておらず、感染に応答した Rab11a の活性化機構を明らかにすることが今後の課題である。

ウイルス感染による微小管ダイナミクスの変動

vRNP の主要構成因子はウイルスポリメラーゼと NP であり、これらのウイルスタンパク質のみでは、時空間的な vRNP の細胞内輸送を規定するのは難しく、宿主因子が子孫 vRNP に結合して、その動態を制御する必要があると考えられる。そこで、抗 NP 抗体を用いて vRNP を精製し、

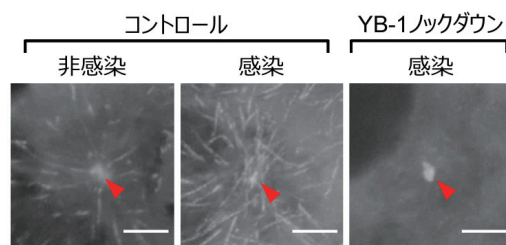


図3 中心体から出芽する微小管の Time-lapse 観察

微小管の重合末端に局在する GFP-EB1 タンパク質を発現する細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、感染8時間後に中心体(矢頭)から出芽する微小管を1分間、1.56秒ごとに Time-lapse 観察を行った。各時間の画像を重ね合わせた結果を示す。Scale bar; 5 μ m. 文献27より改変。

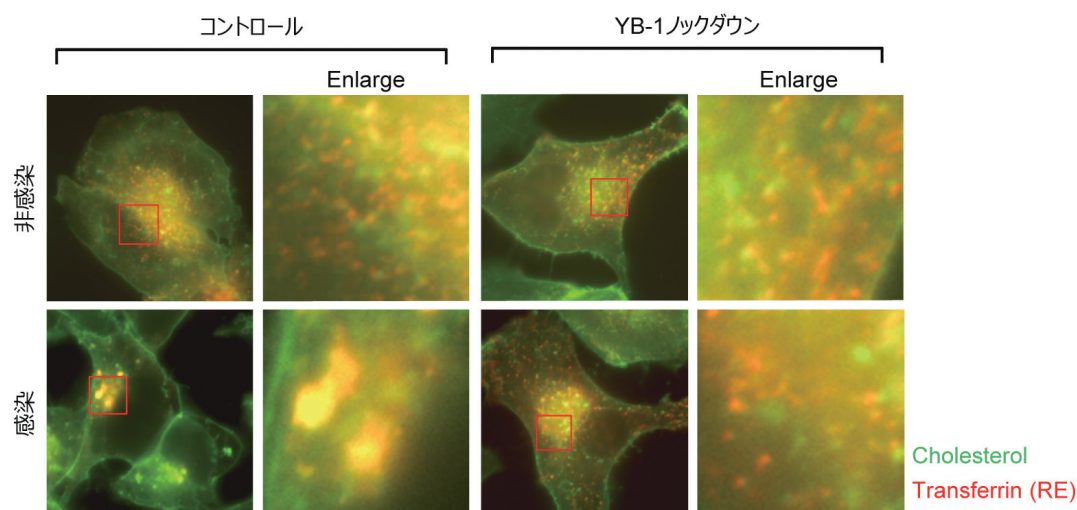


図4 インフルエンザウイルス感染によってコレステロールはリサイクリングエンドソームに蓄積する

感染8時間後に、蛍光標識したトランスフェリン(赤色)を取りこませ、リサイクリングエンドソームを検出した。細胞固定後、コレステロール特異的な染色試薬である Filipin(緑色)でコレステロールを検出した。赤枠部分の拡大像を各パネルの右部に示す。文献27より改変。

結合する宿主因子を LC-MS 解析で網羅的に同定したところ、Y-box binding protein-1 (YB-1) を同定した²⁸⁾。YB-1 は DNA/RNA 結合タンパク質であり、Y-box 配列に結合する転写因子として機能するだけでなく、転写された宿主 mRNA と共に細胞質へと輸送され、mRNP 複合体の主要構成因子として翻訳制御に関与する²⁹⁾。非感染細胞では、YB-1 は宿主 mRNA と結合するため、細胞質に局在する。一方、インフルエンザウイルス感染により、YB-1 は核移行し、核内ドメインの一つである PML ボディに集積してスペckルを形成することを見出した²⁸⁾。核内で複製された vRNA は、すぐに核外輸送されるため、vRNA の核内局在を観察するのは困難である。そこで、レプトマイシン B で核外輸送因子 CRM1 を阻害し、FISH 法により vRNA を検出したところ、vRNA と YB-1 が PML ボディ

で共局在した²⁸⁾。CRM1 と結合するためのアダプターとして機能する NS2 や M1 も PML ボディに集積することが報告されており³⁰⁾、YB-1 は核外輸送複合体を形成した vRNP と結合すると推測される。

中心体は、微小管重合中心として機能するオルガネラであり、9本のトリプレット微小管がドーナツ状に束ねられた中心小体と、それを取り囲む中心体マトリックスから形成されている³¹⁻³⁴⁾。中心体は、細胞周期間期で娘中心体を複製後、分裂期で成熟化し、紡錘体を形成して染色体の娘細胞への分配を担う。“成熟化”の分子実体は、中心体マトリックスに微小管重合を促進する因子が集積することである^{35,36)}。感染後期で、YB-1 は vRNP と共に核外輸送され、中心体に集積する。超解像顕微鏡を用いて詳細な観察をしたところ、YB-1 は中心体マトリックスに局在し、

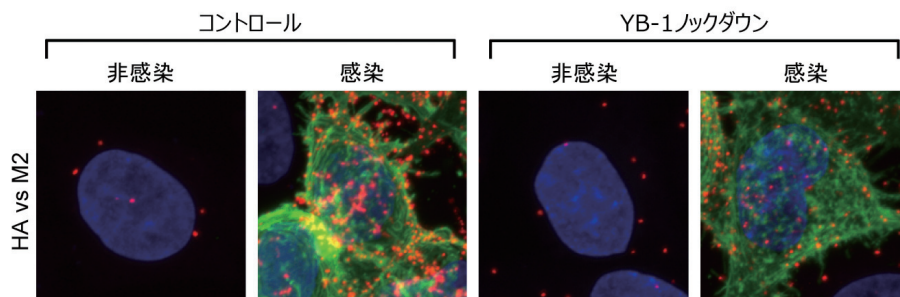


図5 PLA法によるウイルス粒子形成場の検出

抗HA抗体および抗M2抗体を用いてPLA法を行い、HAとM2間の近接シグナル(赤色)を検出した。通常の間接蛍光抗体法で検出したHA(緑色)およびDAPIで染色した細胞核(青色)も示す。文献27より改変。

中心小体の周囲でプロペラ様の局在パターンを示すことを明らかにした²⁷⁾(図2)。一方、非感染細胞では、YB-1は分裂期にのみ中心体へと集積し、中心体からの紡錘糸形成を促進することを見出した³⁷⁾。また、Time-lapseイメージングで微小管のダイナミクスを観察したところ、インフルエンザウイルス感染によって、YB-1依存的に中心体からの微小管重合活性が促進されていた²⁷⁾(図3)。以上の結果より、インフルエンザウイルスは、YB-1を中心体にリクルートすることで、間期でも分裂期様に中心体の成熟化を促進している可能性が考えられる。

微小管は重合と脱重合を繰り返して、細胞内輸送を制御する。よって、中心体の活性化は、細胞内輸送の促進へと繋がる。蛍光標識されたトランスフェリンをリサイクリングエンドソームの積み荷として感染細胞に取り込ませ、アクティブなリサイクリングエンドソームをパルス標識したところ、YB-1依存的にリサイクリングエンドソームが融合した不定形のオルガネラであるERCが増加することを見出した²⁷⁾。ERCはリサイクリングエンドソームの中継点として機能し、ERCへ運ばれた小胞は、ERCから再び出芽して、中心体近傍から細胞膜へ順方向性輸送される。

脂質ラフトでのウイルス粒子形成場の構築

細胞膜から取りこまれた膜タンパク質や脂質の多くは、初期エンドソームを介して、数分以内に細胞膜へリサイクルされる。一方、一部はERCへと蓄積後、十数分かけてゆっくりと細胞膜へ再輸送される。ERCでは、一部の膜タンパク質のbasolateral/apicalソーティングが行われること^{38,39)}、リソソームからリサイクルされるコレステロールが集積することなどが報告されているが⁴⁰⁾、ERCの機能はほとんど明らかにされていない。そこで、コレステロール特異的な染色試薬であるFilipinを用いてコレステロールの細胞内局在を観察したところ、感染によって形成促進されたERCには、vRNPと共にコレステロールが多く集積することを見出した²⁷⁾(図4)。従って、YB-1によって中心体

が成熟化することで、コレステロールに富んだERC形成が誘導されることが示唆された。

脂質ラフトとは、スフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜上の膜ドメインの一種である⁴¹⁾。脂質ラフトの大きさやその動態は、いまだに正確な定義が成立していないが、スフィンゴ脂質間の空隙にコレステロールがパッキングされることで秩序だった膜構造を形成している。脂質ラフトには膜受容体をはじめとする様々なシグナル伝達分子が同定されており、細胞内外の情報伝達を担うプラットフォームとして機能する。最近の仮説では⁴²⁾、細胞膜上には数十nm程度の小さな脂質ラフトしか存在せず、刺激に応答して大きな脂質ラフトが形成されることでシグナル伝達の基盤になると提唱されている。大きな脂質ラフトを形成するトリガーとして、タンパク質間や脂質間の相互作用が推測されているが、その詳細は不明である。

インフルエンザウイルス粒子表面には、HAとNAがスパイクタンパク質として発現し、M2がイオンチャネルとしてウイルス粒子膜に挿入されている。M1はウイルス粒子の裏打ちタンパク質として、HAとNAの細胞内ドメインと相互作用する⁴³⁾。ウイルス粒子は脂質ラフトから出芽すると考えられており⁴⁴⁾、産生されたウイルス粒子膜の総脂質の50%以上がコレステロールである。HA(おそらくNAも)は、コレステロールに結合して小さな脂質ラフトに集積し、細胞膜上に点在する^{45,46)}。M2はコレステロール結合モチーフを持つが^{47,48)}、膜貫通ドメインが短いため、スフィンゴ脂質間にコレステロールが入り込むことで厚くなった脂質ラフト内には局在できず、脂質ラフトのエッジ部分に結合すると考えられている。よって、ウイルス粒子の形成場“budozone”は、HAやM2が集積した小さな脂質ラフトが、大きな脂質ラフトへとリモデリングされることで形成されると推測される。

Proximity Ligation Assay (PLA)法は40nm以内に近接した分子間の相互作用を蛍光シグナルとして検出できるアッセイ系であり、HAとM2間のPLAシグナルは各々

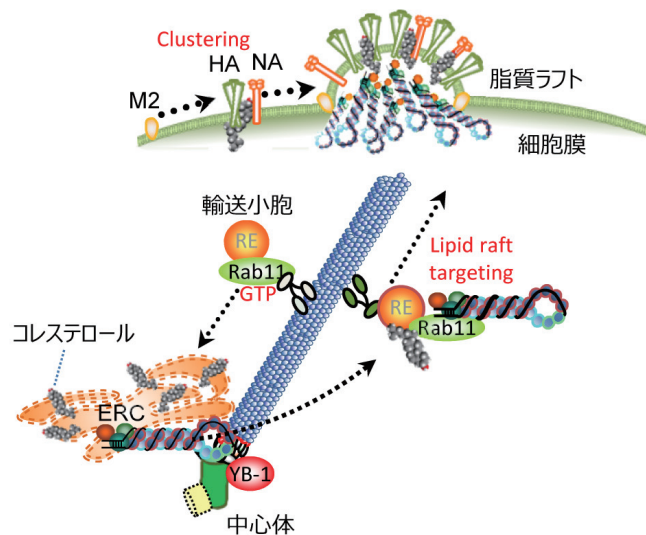


図6 リサイクリングエンドソームを介したvRNP輸送と粒子形成のモデル図

ウイルス感染により、リサイクリングエンドソーム (RE) がERCへと取りこまれ、コレステロールもERCに蓄積する。ERCから出芽したコレステロールに富んだリサイクリングエンドソームを介して、vRNPは細胞膜へ輸送される。リサイクリングエンドソーム膜内のコレステロールは脂質ラフトのクラスタリングを活性化するトリガーとして機能すると推測している。文献27より改変。

ンパク質のコレステロール結合ドメインに依存的である。すなわち、HAとM2がクラスタリングして検出されるPLAシグナルはbudozoneの形成量ととらえることが可能である。そこで、YB-1ノックダウンにより、コレステロールのERCへの蓄積を抑制した条件下で、HAとM2間のクラスタリングをPLA法で検討した。その結果、YB-1ノックダウンにより、HAとM2間のPLAシグナルは低下し、budozone形成が低下することが示唆された²⁷⁾(図5)。ちなみに、HAとM2は、トランスゴルジネットワークを介して細胞膜へ輸送されるため、YB-1ノックダウンによる細胞膜上での発現量に影響はない。従って、ERCから出芽したリサイクリングエンドソーム膜内のコレステロールはbudozone形成に必要であり、vRNPの細胞膜への輸送と協調した脂質ラフトのクラスタリングを活性化するトリガーとして機能する可能性が考えられる(図6)。

おわりに

vRNPは、ウイルスゲノムとウイルスポリメラーゼ及びNPからなるシンプルな複合体だが、本稿で概説したように、感染細胞内で時空間的に様々な機能制御を必要とする。近年のプロテオミクス解析やハイコンテントスクリーニング技術の発展を背景に、宿主因子もさらに同定されていくはずである。しかし、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への適応変異として知られるPB2のE627K変異のように、ウイルス学として重要であることが明確であるものの、分子機能が明らかになっていないものも多い。生化学的な

解析や構造生物学的観点も含めて、vRNPの細胞内動態をより理解していくことで、詳細な分子機構を明らかにし、宿主域の決定機構や病態の発現などウイルス学の重要課題に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究は、筑波大学永田恭介学長のご指導のもと、北里大学百瀬文隆博士、理化学研究所松本健博士をはじめとして、研究室内外の多くの方々のご支援のうえで進めることができました。ここに深く感謝申し上げます。また、名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞にご推薦くださいました永田恭介先生、小池智先生、俣野哲朗先生に厚く御礼申し上げます。

本稿に関し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Sugiura A, Tobita K, Kilbourne ED: Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of influenza virus. *J Virol* 10:639-647, 1972.
- 2) Sugiura A, Ueda M, Tobita K, Enomoto C: Further isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of influenza virus. *Virology* 65:363-373, 1975.
- 3) Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A: RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* 104:1021-1026, 1988.

- 4) Portela A, Digard P: The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83:723-734, 2002.
- 5) Chikashige Y, Ding DQ, Imai Y, Yamamoto M, Haraguchi T, Hiraoka Y: Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 16:193-202, 1997.
- 6) Engelhardt OG, Smith M, Fodor E: Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* 79:5812-5818, 2005.
- 7) Lukarska M, Fournier G, Pflug A, Resa-Infante P, Reich S, Naffakh N, Cusack S: Structural basis of an essential interaction between influenza polymerase and Pol II CTD. *Nature* 541:117-121, 2017.
- 8) Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K: Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277:45306-45314, 2002.
- 9) Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K: Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75:1899-1908, 2001.
- 10) Momose F, Handa H, Nagata K: Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* 78:1103-1108, 1996.
- 11) Kawaguchi A, Nagata K: De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J* 26:4566-4575, 2007.
- 12) Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K: pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA. *Elife* 4, 2015.
- 13) Long JS, Giotis ES, Moncorge O, Frise R, Mistry B, James J, Morisson M, Iqbal M, Vignal A, Skinner MA, Barclay WS: Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction. *Nature* 529:101-104, 2016.
- 14) Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K: An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18235-18240, 2007.
- 15) Minakuchi M, Sugiyama K, Kato Y, Naito T, Okuwaki M, Kawaguchi A, Nagata K: Pre-mRNA Processing Factor Prp18 Is a Stimulatory Factor of Influenza Virus RNA Synthesis and Possesses Nucleoprotein Chaperone Activity. *J Virol* 91, 2017.
- 16) Landeras-Bueno S, Jorba N, Perez-Cidoncha M, Ortin J: The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription. *PLoS Pathog* 7:e1002397, 2011.
- 17) Kawaguchi A, Momose F, Nagata K: Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol* 85:6197-6204, 2011.
- 18) Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P: Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75:408-419, 2001.
- 19) Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y: Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* 19:6751-6758, 2000.
- 20) O'Neill RE, Talon J, Palese P: The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 17:288-296, 1998.
- 21) Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, Hoshida K, Kobayashi N, Nagata K: Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res* 77:31-42, 2001.
- 22) Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP: Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 74:8709-8719, 2000.
- 23) Jo S, Kawaguchi A, Takizawa N, Morikawa Y, Momose F, Nagata K: Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes Infect* 12:1079-1084, 2010.
- 24) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y: Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome. *PLoS One* 6:e21123, 2011.
- 25) Eisfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y: RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J Virol* 85:6117-6126, 2011.
- 26) Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, Digard P: A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol* 85:4143-4156, 2011.
- 27) Kawaguchi A, Hirohama M, Harada Y, Osari S, Nagata K: Influenza Virus Induces Cholesterol-Enriched Endocytic Recycling Compartments for Budozone Maturation. *PLoS Pathog* 11:e1005284, 2015.
- 28) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K: YB-1 functions as a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. *J Virol* 86:11086-11095, 2012.
- 29) Matsumoto K, Wolffe AP: Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* 8:318-323, 1998.
- 30) Shibata T, Tanaka T, Shimizu K, Hayakawa S, Kuroda K: Immunofluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. *J Virol Methods* 156:162-165, 2009.
- 31) Fu J, Glover DM: Structured illumination of the interface between centriole and peri-centriolar material. *Open Biol* 2:120104, 2012.
- 32) Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L: Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol* 14:1148-1158, 2012.

- 33) Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, Huang B, Agard DA: Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nat Cell Biol* 14:1159-1168, 2012.
- 34) Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA: 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol Open* 1:965-976, 2012.
- 35) Piehl M, Tulu US, Wadsworth P, Cassimeris L: Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1584-1588, 2004.
- 36) Lane HA, Nigg EA: Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 135:1701-1713, 1996.
- 37) Kawaguchi A, Asaka MN, Matsumoto K, Nagata K: Centrosome maturation requires YB-1 to regulate dynamic instability of microtubules for nucleus reassembly. *Sci Rep* 5:8768, 2015.
- 38) Apodaca G, Katz LA, Mostov KE: Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol* 125:67-86, 1994.
- 39) Knight A, Hughson E, Hopkins CR, Cutler DF: Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol Biol Cell* 6:597-610, 1995.
- 40) Holtta-Vuori M, Tanhuanpaa K, Mobius W, Somerharju P, Ikonen E: Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 13:3107-3122, 2002.
- 41) Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572, 1997.
- 42) Pike LJ: Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597-1598, 2006.
- 43) Jin H, Leser GP, Zhang J, Lamb RA: Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J* 16:1236-1247, 1997.
- 44) Suomalainen M: Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic* 3:705-709, 2002.
- 45) Leser GP, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology* 342:215-227, 2005.
- 46) Hess ST, Kumar M, Verma A, Farrington J, Kenworthy A, Zimmerberg J: Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. *J Cell Biol* 169:965-976, 2005.
- 47) Veit M, Klenk HD, Kendal A, Rott R: The M2 protein of influenza A virus is acylated. *J Gen Virol* 72 (Pt 6):1461-1465, 1991.
- 48) Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, Lin TI: The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* 34:52-66, 2005.

Dynamics of the influenza virus genome regulated by cellular host factors

Atsushi KAWAGUCHI

Department of Infection Biology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba
1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8575, Japan
Phone & Fax: 81-29-853-3233
Email: ats-kawaguchi@md.tsukuba.ac.jp

For efficient replication of the influenza virus genome and its post-replicative processes, not only viral factors but also host-derived cellular factors (host factors) are required. The influenza virus genome exists as viral ribonucleoprotein (vRNP) complexes with viral RNA-dependent RNA polymerases and nucleoprotein (NP). Using biochemical and proteomics approaches, we have identified host factors which are required for the vRNP replication and the progeny vRNP transport. We found that MCM complex, a cellular DNA replication licensing factor, is required for successful viral genome replication. In concert with the replication reaction, the nascent RNA chains are encapsidated with NP by cellular splicing factor UAP56. Further, after nuclear export of vRNP, we revealed that vRNP is transported to the plasma membrane using cholesterol-enriched recycling endosomes through cell cycle-independent activation of the centrosome by YB-1, which is a mitotic centrosomal protein. Depletion of YB-1 shows that the cholesterol-enriched endosomes are important for clustering of viral structural proteins at lipid rafts to assemble the virus particles concomitantly with the arrival of vRNP beneath the plasma membrane.

