

## 平成30年杉浦賞論文

## 1. 単純ヘルペスウイルスの細胞侵入および粒子形成過程の解明

有井 潤

東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、ヒトの大多数に感染し、脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスといった多彩な疾患の原因となる、医学上極めて重要なウイルスである。HSV 感染症には効果的な抗ウイルス剤が開発されているものの、未だにこの疾患はコントロールされていない。このため、HSV の増殖機構や病態発現機構を明らかにすることは、HSV の感染制御のために重要であると考えられる。

HSV は 10 を超える膜タンパク質を保持しており、これらは細胞侵入や粒子形成過程において主体的な役割を果たしている。本稿では、これらの HSV 膜タンパク質と宿主細胞由来膜がどのように相互作用し、HSV の増殖が引き起こされるのかについて、我々の研究成果を中心に概説する。

## はじめに

宿主細胞の中でしか増えることができないウイルスにとって、細胞膜をはじめとした宿主細胞の膜構造は克服しなければならない障壁といえる。多くのウイルスは、感染細胞の膜をダイナミックに構造変化することで自らの増殖を達成している。このためウイルスと宿主細胞膜との相互作用は、ウイルスの指向性や病原性に密接に関わり、抗ウイルス戦略上も有力な標的となりうると考えられる。

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、我々人類にとって、もっとも身近に存在を認識できるウイルスといえるかもしれない。HSV は口唇ヘルペスの原因となるだけでなく、脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスといった多様な疾患をヒトに引き起こす<sup>1)</sup>。また、一度感染した HSV は神経細胞で終生続く潜伏感染を成立させることができ、ストレスなどをきっかけとして再活性化され、病態を繰り返すようになる<sup>1)</sup>。

このため、ヘルペスウイルスのヒトにおける感染率は、90%を超えると考えられている<sup>2)</sup>。HSV 感染症には、ノーベル賞の受賞対象である抗ウイルス剤アシクロビルなどの効果的な抗ウイルス剤が開発されている。それにもかかわらず多くの HSV 感染症患者在、長期にわたって治療を続けなければならない現実には、未だこの疾患が抗ウイルス剤によってコントロールされていないことを示している。すなわち、HSV の増殖機構や病態発現機構を明らかにし、抗ウイルス戦略の標的を同定することは、HSV 感染症の制御のために重要であると考えられる。

## HSV の感染環

HSV 粒子は、脂質 2 重膜から形成されるエンベロープ、ゲノム DNA を格納した正二十面体のカプシド、そしてエンベロープとカプシドの間に充填されたテグメントという 3 層から形成される<sup>3)</sup>。エンベロープには約 10 種のウイルス糖タンパク質が取り込まれており、これらは細胞侵入や粒子形成過程において重要な役割を果たしている。

HSV 粒子のエンベロープ膜は、細胞表面またはエンドゾーム膜において膜融合を引き起こし、細胞内に侵入する<sup>4)</sup>。その後カプシドは核膜孔まで輸送され、核膜孔を通してウイルスゲノムのみを核内に注入する<sup>1)</sup>。核内においてウイルス遺伝子の発現、ウイルスゲノムの複製が引き起こされ、ゲノムを格納したカプシドが形成される。このカプシドは、細胞生物学上極めて特殊な“小胞媒介性核外輸送”を介して細胞質へと輸送される (Nuclear Egress)<sup>5)</sup>。細胞質においてカプシドは、大半のテグメントタンパク質を獲得し、

## 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・免疫部門 ウイルス病態制御分野

TEL: 03-6409-2071

FAX: 03-6409-2072

E-mail: jun-arii@ims.u-tokyo.ac.jp

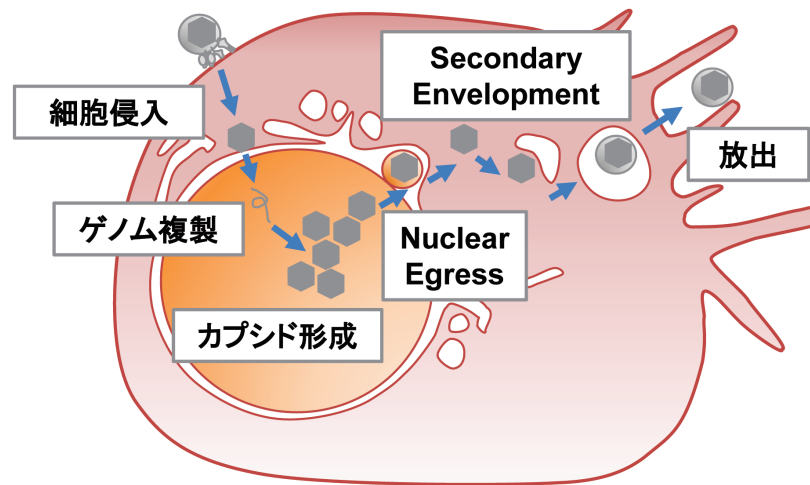


図1 HSVの感染環

さらにトランスゴルジネットワーク (TGN) 由来とされる小胞に対して出芽を行い (Secondary Envelopment), 感染性のウイルス粒子が形成される<sup>5)</sup>. その後, HSV 粒子はエクソサイトーシスによって細胞外へと放出されると考えられている (図1). 我々は, HSV 粒子が細胞侵入し, 細胞内でウイルス粒子形成を行う過程について, 主に HSV のコードする膜タンパク質と宿主因子との相互作用に注目して研究を進めてきた.

#### HSV の細胞侵入は, 四種の糖タンパク質によって引き起こされる

宿主細胞表面にある分子で, ウイルスによる細胞侵入を仲介するものを, 一般的に感染受容体と呼んでいる. ウイルス粒子と感染受容体との会合は, ウイルスが増殖を開始する第一歩であり, 感染受容体の有無は, ウイルス標的細胞を規定する. そのため, 感染受容体の解明は, それぞれのウイルスの病態を理解するための重要な鍵となる.

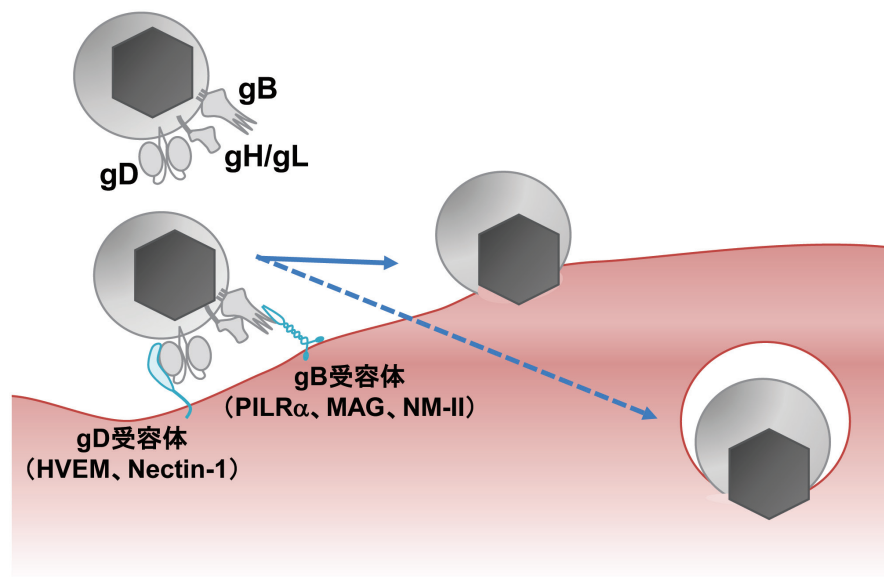
HSV による細胞侵入は, ウイルス糖タンパク質 glycoprotein B (gB) および gC と宿主細胞膜上のヘパラン硫酸との間の吸着によって開始される<sup>6)</sup>. この過程は必須ではないとされているが, HSV の細胞侵入効率を上げるために大きな貢献をしている. HSV の細胞侵入には, 四つのエンベロープ糖タンパク質 (gB, gD, gH および gL) が必須である (図2)<sup>7)</sup>. これらのうち gD は, 感染受容体 (HVEM や Nectin-1 など) を認識していることが古くから知られていた<sup>8-10)</sup>. これらはもともと, HSV への感受性が低い CHO 細胞に対して, HSV 感受性を与える因子として同定されたもので, 神経や上皮を始めとして, さまざまな培養細胞において発現している. また, ノックアウトマウスを用いた解析から, HVEM や Nectin-1 が HSV の指向性や病態発現に大きな影響を与えることが明らかとなっている<sup>11-13)</sup>.

一方, gB は HSV がコードする唯一の膜融合タンパク質であり<sup>14)</sup>, gH/gL ヘテロダイマーは gB と相互作用する<sup>15,16)</sup>. このため, 受容体に結合することで活性化した gD は, gH/gL 複合体を介して gB の膜融合活性を解放することで, ウイルスエンベロープと宿主細胞膜との膜融合が引き起こされると考えられている (図2). また, HSV は標的細胞の種類によって, 細胞表面での直接の膜融合, およびエンドゾームでの膜融合という二種類の侵入経路を使い分けていることが知られている<sup>17-19)</sup>. つまり, gB の膜融合活性は, エンドゾーム内の低 pH を必ずしも必要としない.

#### 初めての gB 受容体 PILR $\alpha$

2008 年, 大阪大学微生物病研究所の荒瀬教授のグループによって, gB 自身にも受容体が存在し, HSV の細胞侵入には gD 受容体と gB 受容体がともに必要であることが報告された<sup>20)</sup>. 当初同定された gB 受容体は, 免疫系細胞に特異的に発現している paired immunoglobulin-like type 2 receptor (PILR) $\alpha$  である<sup>20)</sup>. この発見に驚いた我々は, まず PILR $\alpha$  依存的な細胞侵入経路を詳細に解析した. その結果, gB 受容体 PILR $\alpha$  の発現が, HSV の細胞侵入経路を, エンドゾームを介したのから細胞表面での膜融合にスイッチさせることが明らかとなった<sup>21)</sup>.

さて, HSV の生体内での主要な標的細胞は, 上皮細胞および神経細胞である. しかし, 初めて同定された gB 受容体 PILR $\alpha$  は, 免疫系細胞に特異的に発現する分子であり, 実際に生体内で利用されているのか疑問の余地があった. gB による PILR $\alpha$  の認識には, 二つの O 型糖鎖が必須であったため<sup>22)</sup>, 我々はこの部位に変異を導入した HSV を作製し, その性状を解析した. この組換えウイルスは, PILR $\alpha$  を受容体として利用できないものの, 多くの培養細胞に感染可能であり, 神経病原性を維持していた.



**図2** HSVによる細胞侵入機構は、四種のウイルス糖タンパク質(gB, gD, gH, gL)によって引き起こされる。この過程には、これまで知られてきたgDに対する受容体だけでなく、gBに対する受容体も必要とされる。HSVエンベロープと標的細胞との膜融合は、細胞表面またはエンドゾーム膜において引き起こされる。

しかしマウス角膜感染モデルに供したところ、この組換えウイルスは、角膜における増殖能や、病態発現能が有意に低下していた<sup>23)</sup>。すなわち、PILR $\alpha$ を介したHSVの細胞侵入は、中枢神経系では機能していないものの、末梢組織における病態発現に貢献していることが示唆された。

#### 上皮および神経組織で機能するgB受容体NM-IIの発見

その後、PILR $\alpha$ と同性を持つ myelin associated glycoprotein (MAG) が第二のgB受容体として同定されたが<sup>24)</sup>、その発現はグリア細胞に局限しており、HSVの指向性を説明することはできなかった。我々は、HSVを感染させたマウス繊維芽細胞からgBを精製し、相互作用するタンパク質を質量解析した結果、HSVの広い感染域を説明する主要な感染受容体として non-muscle myosin II (NM-II) AおよびBを同定した<sup>25,26)</sup>。NM-IIAはほとんどの培養細胞において発現し、特に上皮細胞に多く発現している。一方でNM-IIBは神経細胞において高発現していることが知られている。つまり、NM-IIAおよびBの存在によって、HSVがさまざまな細胞へ感染可能であることを説明することができる。NM-IIはgBと相互作用するものの、一般的には細胞内に存在するタンパク質と考えられていた。興味深いことに、HSV感染開始数分以内にNM-IIは細胞表面に局在変化していた<sup>25)</sup>。またこの変化は、宿主の myosin light chain kinase (MLCK) によって制御されていた。MLCKに対する阻害剤ML-7や、MLCKの活性化に必須のカルシウムイオンをキレート剤BAPTM-AMで除去する

と、HSVの細胞侵入や膜融合を阻害することができた<sup>25)</sup>。さらにマウス角膜感染モデルにおいて、MLCK阻害剤ML-7を事前投与すると、HSV感染による致死率を著しく減弱させることができた<sup>25)</sup>。これらの結果は、NM-IIが生体内におけるHSVの感染受容体として機能しており、NM-IIやその制御機構がHSV予防薬のターゲットとなりうることを示している。

また我々の発表の後、ヘルペスウイルス科に属する腫瘍ウイルス、エプスタイン・バーウイルスが、上皮細胞に感染するときNM-IIAを感染受容体として用いることが報告されている<sup>27)</sup>。すなわち、NM-IIの利用はヘルペスウイルス科全体に共通した現象である可能性がある。さらに驚くべきことに、プニヤウイルス科の重症熱性血小板減少症ウイルスやアルテリウイルス科の豚繁殖・呼吸器症候群ウイルスの細胞侵入にもNM-IIAが用いられていることが報告されている<sup>28,29)</sup>。HSVの感染受容体としてのNM-IIの発見から、多くのウイルスに効果がある抗ウイルス剤開発の可能性が提示されたと考えている。

#### HSVカプシドのNuclear Egressは、小胞媒介性に引き起こされる

HSVは、ゲノム複製およびカプシドへのゲノムパッケージングを核内で行う。そのため、核内で形成されたヌクレオカプシドは、細胞質において感染性のウイルス粒子として成熟するために、核内から核外に輸送される必要がある。この過程は、ヌクレオカプシドのNuclear Egressと呼ば

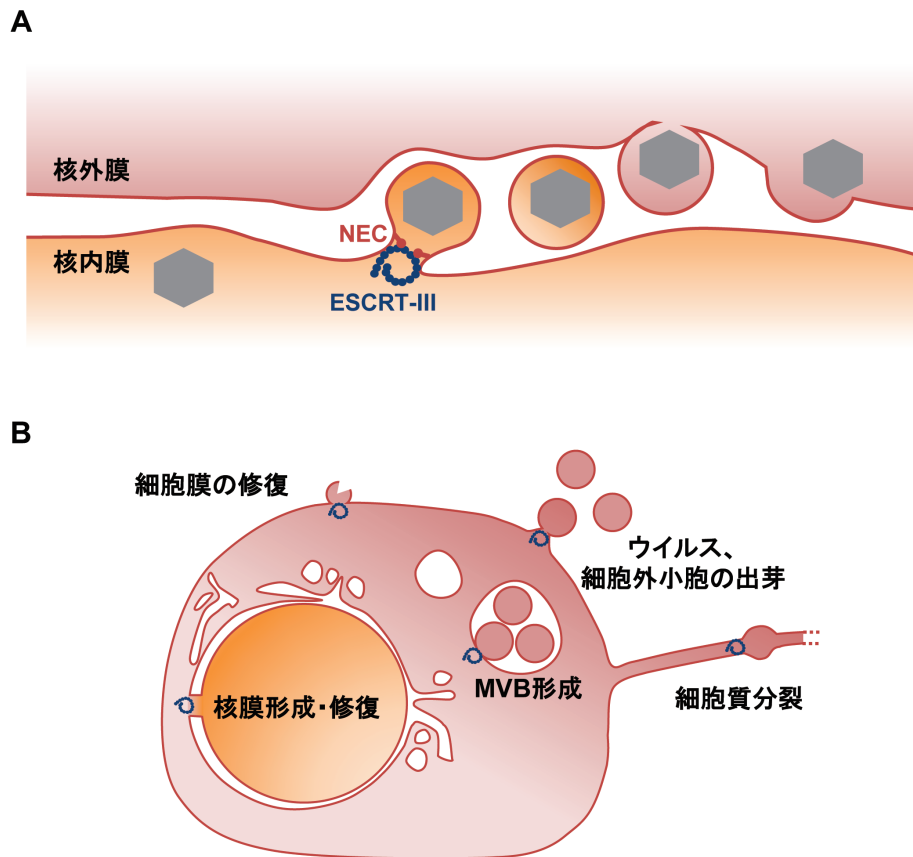


図3 (A) HSV カプシドの Nuclear Egress は、核内膜からのカプシドの出芽と、核膜間粒子と核外膜との融合という二段階に分けられる小胞媒介性核外輸送によって引き起こされる。核膜間粒子の形成を引き起こす HSV 因子 NEC は、宿主の ESCRT-III システムを利用することで核内膜の切断を引き起こす。(B) ESCRT-III は、細胞質において膜を切断するシステムである。近年核膜の形成や修復も ESCRT-III が担うことが明らかになっている。

れている。ヌクレオカプシドは、核膜孔よりも大きな構造体であるため、小胞媒介性に核外輸送される<sup>5)</sup>。すなわち、核内で形成された HSV カプシドは、核内膜から一旦出芽し、核膜間にエンベロープに包まれたウイルス粒子を形成する。その後、核膜間のウイルス粒子のエンベロープは、核外膜と融合することで、カプシドを核内から細胞質へと輸送する(図3A)。これらの過程の中で、特に核膜間に小胞を形成する過程は、HSV がコードする Nuclear Egress Complex (NEC) が主体的な役割を担っていると考えられている<sup>5)</sup>。NEC 構成タンパク質をコードする UL31 または UL34 遺伝子の欠損ウイルスは、核膜間粒子を全く形成できなくなることが知られている<sup>30,31)</sup>。また、培養細胞に NEC を発現させた場合、核膜間に小胞構造が観察される<sup>32,33)</sup>。さらに、大腸菌内で発現し精製した NEC は、*in vitro* において人工脂質膜を変形させ、小胞を形成する能力がある<sup>34)</sup>。クライオ電子顕微鏡による解析では、これらの小胞の内側に、六量体 NEC が形成する格子構造が観察されている<sup>32,35)</sup>。NEC 六量体内の連結部位や六量体

間の連結部位に変異を導入した場合、人工脂質膜における膜変性が低下する<sup>34,35)</sup>。さらに、これらの変異をウイルスゲノムに導入した場合、核内膜における出芽およびウイルス増殖が著しく阻害される<sup>36,37)</sup>。これらの報告から、NEC は、核内膜に格子構造を形成することで、核膜間の小胞形成を自ら行っていると考えられている。

ただし、実際は感染細胞においては、核内膜の裏打ちである核ラミナの部分的な分解や、ヌクレオカプシドの核内膜へのリクルートなどの現象と、核膜間小胞形成がタイミングよく引き起こされる必要がある<sup>38)</sup>。また、欠損によって核膜間粒子の形成効率が低下するウイルス遺伝子は、UL31/UL34 以外にも存在する<sup>39,40)</sup>。すなわち、HSV カプシドの Nuclear Egress は、NEC 以外にも多くのウイルス因子や宿主因子が寄与する複雑な過程であると考えられる。

#### ESCRT-III は、Nuclear Egress における核内膜の切断を担う

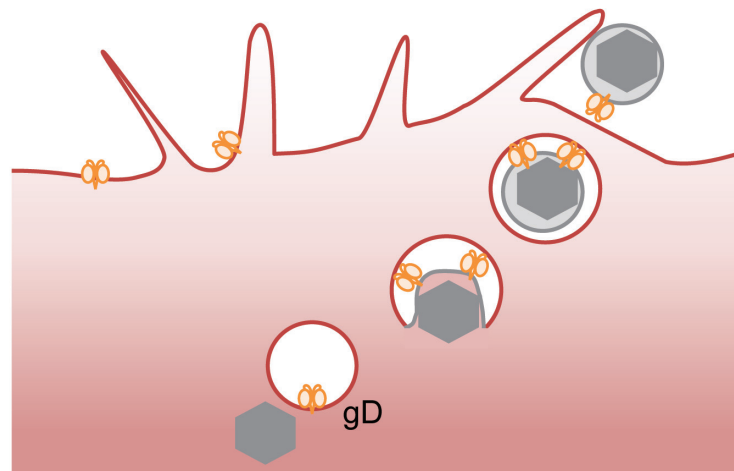


図4 Secondary Envelopment には膜変性が必要とされる。細胞侵入に必須の糖タンパク質 gD は、膜変性を誘導することでこの過程に貢献する。

最近我々は、Nuclear Egress における核内膜の切断と、宿主の Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)-III システムとの関係について報告を行った。ESCRT-III は、もともと多胞体 (MVB: Multivesicular body) の形成およびそれに伴う膜タンパク質の分解に必須の分子群として定義されたものである<sup>41)</sup>。ESCRT-III 構成タンパク質は、らせん状に集合することで膜の切断を直接引き起こすと考えられており、細胞質分裂、細胞膜の修復、細胞外小胞の形成など、細胞質における膜切断を担うことが明らかとなっている<sup>41)</sup>。また、HIV を始めとしたさまざまなエンベロープウイルスは、出芽の最終段階における膜切断において ESCRT-III を利用していることが知られている<sup>41)</sup>。これらは、いずれも細胞質から小胞や娘細胞を“切り離す”方向性に膜を切断しているといえる。また近年、細胞分裂後期の核膜形成や、核膜の修復も、ESCRT-III が同様のトポロジーで引き起こしていることが報告され、その機能は細胞質に限定されないことが徐々に明らかとなってきている (図 3B)<sup>42-46)</sup>。

通常 ESCRT-III タンパク質は、単量体として細胞質や核内に広く存在し、膜上において多量体を形成して切断を行うと考えられている。つまり、通常 ESCRT-III の集積が観察されるのは、多胞体を形成しているエンドゾームや、細胞質分裂における娘細胞のつなぎ目などに限られる。驚いたことに、HSV 感染細胞では、ESCRT-III は核内膜に集積していた<sup>47)</sup>。核膜への ESCRT-III の集積は NEC に依存しており、NEC の単独発現によっても観察することができた。さらに ESCRT-III の抑制は、核内膜における膜切断を阻害し、核膜間に不完全にエンベロープを獲得したウイルス粒子を蓄積させ、ウイルス増殖を著しく抑制した<sup>47)</sup>。また、多くのウイルス出芽において ESCRT-III をリクルートするアダプターとして使われている ALIX が、

やはり HSV の Nuclear Egress にも用いられていた<sup>47)</sup>。我々の結果は、ESCRT-III が核内膜の切断を担う、初めての例を提示したものと見える。同時に、HSV は宿主機構をハイジャックすることで、カプシドの Nuclear Egress を達成していることを示唆している。

HSV がハイジャックしている宿主機構とは、何なのだろうか？小胞媒介性核外輸送は、ウイルス感染細胞だけではなく、ハエ細胞における巨大リボ核タンパク質複合体 (RNP: ribonucleoprotein) の核外輸送にも用いられていることが知られている<sup>48,49)</sup>。ESCRT-III は、ハエ細胞における RNP の核外輸送にも寄与していた<sup>47)</sup>。さらに、非感染 HeLa 細胞において ESCRT-III を阻害すると、核内膜の過形成が観察された。つまり ESCRT-III は、非感染細胞においても核内膜の恒常性の維持に貢献していると考えられる<sup>47)</sup>。核内膜タンパク質や、核内膜の裏打ちを担う Lamin A/C などをコードする遺伝子への変異は、重篤な遺伝性疾患の原因として知られている<sup>50)</sup>。このような遺伝性疾患の患者由来の細胞では、核内膜タンパク質の蓄積や、核内膜の過形成が観察されている<sup>50)</sup>。つまり、核内膜の恒常性の維持は、真核細胞にとって極めて重要であることが想像される。ESCRT-III は、核内膜を切断することで、核内膜および核内膜タンパク質の過剰な蓄積を防いでいるのではないかと我々は考えている。

#### Secondary envelopment を駆動するウイルス糖タンパク質

細胞質において HSV カプシドは、TGN 由来と考えられている小胞に出芽することで成熟ウイルス粒子となる。この過程は、核内膜における出芽と区分するため、Secondary Envelopment と呼ばれている<sup>5)</sup>。Secondary Envelopment が引き起こされるためには、細胞質小胞膜をウイルス因子が積極的に変性させる必要があると考えら

れるが、その責任因子は不明であった。我々は、いくつかのウイルス因子を検討した結果、ウイルスによる細胞侵入に必須の糖タンパク質 gD に注目した<sup>51)</sup>。HEK293T 細胞に gD を単独発現させると、細胞表面および細胞質内小胞に膜変性を誘導した。またこの機能は、gD の細胞内領域のアルギニンクラスターに変異を導入することで失われた。gD の細胞内領域は、HSV の細胞侵入には必須ではなく、その意義はこれまで不明であった。細胞内領域のアルギニンクラスターに変異を導入した組換え HSV は、増殖能が低下しており、電子顕微鏡下で感染細胞を観察したところ、成熟ウイルス粒子の数が減少し、エンベロープを獲得していないカプシドが細胞質に蓄積していた。すなわち、gD の細胞内領域が引き起こす膜変性は、Secondary Envelopment に貢献していると考えられる<sup>51)</sup>。ただし、これまで報告があるように、gD 欠損株は細胞侵入することができないものの、Secondary Envelopment 自体は完全に停止しない<sup>52)</sup>。HSV は、10 種を超えるウイルス糖タンパク質を、その粒子に取り込むことが知られている<sup>1)</sup>。このため、複数の糖タンパク質が協調的に膜変性を誘導し、ウイルス粒子を形作っているのではないかと考えられる。実際に、gD と、非必須のウイルス糖タンパク質である gE や、膜融合に必須な gB との二重欠損体は、Secondary Envelopment をほとんど行うことができないことが知られている<sup>53,54)</sup>。

### おわりに

核内でゲノム複製をするエンベロープウイルスである HSV は、少なくとも 4 回宿主細胞の膜を通過する必要がある (図 1)。すなわち、(i) 細胞表面あるいはエンドゾーム膜での膜融合による侵入、(ii) 核内膜からの出芽と (iii) 核外膜との融合に分けられる Nuclear Egress、(iv) そして細胞質における Secondary Envelopment である。これらは、いずれも複数のウイルス膜タンパク質が、さまざまな宿主因子を利用しながら引き起こす複雑な過程であり、その分子機構はまだ不明な点も多い。これらの過程は、HSV の感染環の中では必要不可欠といえ、抗ウイルス剤の標的となりうると考えられる。また我々の研究は、HSV が感染細胞の膜構造をダイナミックに変換させることで、膜通過を達成し、細胞を破壊することなく増殖することを示してきた。これらの変化が引き起こされる分子機構の解明は、真核細胞の膜構造がどのように維持されるのか、という点において、細胞生物学へ貢献できると考えられる。

### 謝辞

本研究は全て川口寧教授 (東京大学・医科学研究所) の御指導の下、実施いたしました。この場を借りて心より感謝申し上げます。また、多くの共同研究者に御協力いただいたことに、改めて感謝いたします。常に大きな視野で研

究を推進することの大切さを説いてくださった河岡義裕教授 (東京大学・医科学研究所) および、受容体研究の立ち上げから御指導いただいた荒瀬尚教授 (大阪大学・微生物病研究所) には、特に御礼申し上げます。

また、私が研究活動を始めた東京大学・獣医微生物学教室では、明石博臣教授、遠矢幸伸教授 (現・日本大学) および加藤健太郎教授 (現・東北大学) に、ポストドク時代には W. I. Sundquist 教授 (ユタ大学) に御指導いただきましたことを、この場を借りて感謝いたします。

最後になりましたが、名誉ある杉浦奨励賞に御推挙下さいました河岡義裕教授、荒瀬尚教授、川口寧教授に改めて深謝いたします。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

### 参考文献

- 1) Roizman, B., Knipe, D. M. & Whitley, R. J. in *Fields virology* (eds D.M. Knipe *et al.*) 1823-1897 (Lippincott-Williams & Wilkins, 2013).
- 2) Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Redefining chronic viral infection. *Cell* **138**, 30-50, doi:10.1016/j.cell.2009.06.036 (2009).
- 3) Pellet, P. E. & Roizman, B. in *Fields virology* (eds D.M. Knipe *et al.*) 1802-1822 (Lippincott-Williams & Wilkins, 2013).
- 4) Sathiyamoorthy, K., Chen, J., Longnecker, R. & Jar-detzky, T. S. The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Current opinion in virology* **24**, 97-104, doi:10.1016/j.coviro.2017.04.006 (2017).
- 5) Johnson, D. C. & Baines, J. D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 382-394, doi:10.1038/nrmicro2559 (2011).
- 6) Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N. & Spear, P. G. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of virology* **65**, 1090-1098 (1991).
- 7) Turner, A., Bruun, B., Minson, T. & Browne, H. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *Journal of virology* **72**, 873-875 (1998).
- 8) Warner, M. S. *et al.* A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246**, 179-189, doi:10.1006/viro.1998.9218 (1998).
- 9) Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J. & Spear, P. G. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436 (1996).
- 10) Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. & Spear, P. G. Entry of alphaherpesvi-

- ruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-1620 (1998).
- 11) Taylor, J. M. *et al.* Alternative entry receptors for herpes simplex virus and their roles in disease. *Cell host & microbe* **2**, 19-28, doi:10.1016/j.chom.2007.06.005 (2007).
  - 12) Karaba, A. H., Kopp, S. J. & Longnecker, R. Herpesvirus entry mediator and nectin-1 mediate herpes simplex virus 1 infection of the murine cornea. *Journal of virology* **85**, 10041-10047, doi:10.1128/JVI.05445-11 (2011).
  - 13) Karaba, A. H., Kopp, S. J. & Longnecker, R. Herpesvirus entry mediator is a serotype specific determinant of pathogenesis in ocular herpes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 20649-20654, doi:10.1073/pnas.1216967109 (2012).
  - 14) Heldwein, E. E. *et al.* Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* **313**, 217-220, doi:10.1126/science.1126548 (2006).
  - 15) Atanasiu, D., Saw, W. T., Cohen, G. H. & Eisenberg, R. J. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *Journal of virology* **84**, 12292-12299, doi:10.1128/JVI.01700-10 (2010).
  - 16) Atanasiu, D. *et al.* Bimolecular complementation defines functional regions of Herpes simplex virus gB that are involved with gH/gL as a necessary step leading to cell fusion. *Journal of virology* **84**, 3825-3834, doi:10.1128/JVI.02687-09 (2010).
  - 17) Nicola, A. V., Hou, J., Major, E. O. & Straus, S. E. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *Journal of virology* **79**, 7609-7616, doi:10.1128/JVI.79.12.7609-7616.2005 (2005).
  - 18) Nicola, A. V., McEvoy, A. M. & Straus, S. E. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Journal of virology* **77**, 5324-5332 (2003).
  - 19) Nicola, A. V. & Straus, S. E. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *Journal of virology* **78**, 7508-7517, doi:10.1128/JVI.78.14.7508-7517.2004 (2004).
  - 20) Satoh, T. *et al.* PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* **132**, 935-944, doi:10.1016/j.cell.2008.01.043 (2008).
  - 21) Arii, J. *et al.* Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha. *Journal of virology* **83**, 4520-4527, doi:10.1128/JVI.02601-08 (2009).
  - 22) Wang, J. *et al.* Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *Journal of virology* **83**, 13042-13045, doi:10.1128/JVI.00792-09 (2009).
  - 23) Arii, J. *et al.* A single-amino-acid substitution in herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B at a site required for binding to the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha (PILRalpha) abrogates PILRalpha-dependent viral entry and reduces pathogenesis. *Journal of virology* **84**, 10773-10783, doi:10.1128/JVI.01166-10 (2010).
  - 24) Suenaga, T. *et al.* Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 866-871, doi:10.1073/pnas.0913351107 (2010).
  - 25) Arii, J. *et al.* Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **467**, 859-862, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7317/abs/nature09420.html#supplementary-information (2010).
  - 26) Arii, J., Hirohata, Y., Kato, A. & Kawaguchi, Y. Non-muscle myosin heavy chain IIb mediates herpes simplex virus 1 entry. *Journal of virology* **89**, 1879-1888, doi:10.1128/JVI.03079-14 (2015).
  - 27) Xiong, D. *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 11036-11041, doi:10.1073/pnas.1513359112 (2015).
  - 28) Gao, J. *et al.* MYH9 is an Essential Factor for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection. *Scientific reports* **6**, 25120, doi:10.1038/srep25120 (2016).
  - 29) Sun, Y. *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA is a critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Journal of virology* **88**, 237-248, doi:10.1128/JVI.02141-13 (2014).
  - 30) Roller, R. J., Zhou, Y., Schnetzer, R., Ferguson, J. & DeSalvo, D. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *Journal of virology* **74**, 117-129 (2000).
  - 31) Reynolds, A. E. *et al.* U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of virology* **75**, 8803-8817 (2001).
  - 32) Hagen, C. *et al.* Structural Basis of Vesicle Formation at the Inner Nuclear Membrane. *Cell* **163**, 1692-1701, doi:10.1016/j.cell.2015.11.029 (2015).
  - 33) Klupp, B. G. *et al.* Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7241-7246, doi:10.1073/pnas.0701757104 (2007).
  - 34) Bigalke, J. M., Heuser, T., Nicastrò, D. & Heldwein, E. E. Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nature communications* **5**, 4131, doi:10.1038/ncomms5131 (2014).
  - 35) Bigalke, J. M. & Heldwein, E. E. Structural basis of membrane budding by the nuclear egress complex of herpesviruses. *The EMBO journal* **34**, 2921-2936, doi:10.15252/embj.201592359 (2015).
  - 36) Roller, R. J., Bjerke, S. L., Haugo, A. C. & Hanson, S. Analysis of a charge cluster mutation of herpes simplex virus type 1 UL34 and its extragenic suppressor

- suggests a novel interaction between pUL34 and pUL31 that is necessary for membrane curvature around capsids. *Journal of virology* **84**, 3921-3934, doi:10.1128/JVI.01638-09 (2010).
- 37) Ariei, J. *et al.* Roles of the Inter-Hexamer Contact Site for Hexagonal Lattice Formation of Herpes Simplex Virus 1 Nuclear Egress Complex in Viral Primary Envelopment and Replication. *Journal of virology*, doi:10.1128/JVI.00498-19 (2019).
- 38) Hellberg, T., Passvogel, L., Schulz, K. S., Klupp, B. G. & Mettenleiter, T. C. Nuclear Egress of Herpesviruses: The Prototypic Vesicular Nucleocytoplasmic Transport. *Advances in virus research* **94**, 81-140, doi:10.1016/bs.aivir.2015.10.002 (2016).
- 39) Maruzuru, Y. *et al.* Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress. *Journal of virology* **88**, 7445-7454, doi:10.1128/JVI.01057-14 (2014).
- 40) Liu, Z. *et al.* Herpes simplex virus 1 UL47 interacts with viral nuclear egress factors UL31, UL34, and Us3 and regulates viral nuclear egress. *Journal of virology* **88**, 4657-4667, doi:10.1128/JVI.00137-14 (2014).
- 41) Hurley, J. H. ESCRTs are everywhere. *The EMBO journal* **34**, 2398-2407, doi:10.15252/embj.201592484 (2015).
- 42) Raab, M. *et al.* ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* **352**, 359-362, doi:10.1126/science.aad7611 (2016).
- 43) Vietri, M. *et al.* Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* **522**, 231-235, doi:10.1038/nature14408 (2015).
- 44) Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P. & Carlton, J. G. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* **522**, 236-239, doi:10.1038/nature14503 (2015).
- 45) Webster, B. M., Colombi, P., Jager, J. & Lusk, C. P. Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell* **159**, 388-401, doi:10.1016/j.cell.2014.09.012 (2014).
- 46) Denais, C. M. *et al.* Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* **352**, 353-358, doi:10.1126/science.aad7297 (2016).
- 47) Ariei, J. *et al.* ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity. *Nature communications* **9**, 3379, doi:10.1038/s41467-018-05889-9 (2018).
- 48) Jokhi, V. *et al.* Torsin mediates primary envelopment of large ribonucleoprotein granules at the nuclear envelope. *Cell reports* **3**, 988-995, doi:10.1016/j.celrep.2013.03.015 (2013).
- 49) Speese, S. D. *et al.* Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell* **149**, 832-846, doi:10.1016/j.cell.2012.03.032 (2012).
- 50) Schreiber, K. H. & Kennedy, B. K. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell* **152**, 1365-1375, doi:10.1016/j.cell.2013.02.015 (2013).
- 51) Ariei, J., Shindo, K., Koyanagi, N., Kato, A. & Kawaguchi, Y. Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. *Journal of virology* **90**, 10170-10181, doi:10.1128/JVI.01396-16 (2016).
- 52) Ligas, M. W. & Johnson, D. C. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *Journal of virology* **62**, 1486-1494 (1988).
- 53) Farnsworth, A., Goldsmith, K. & Johnson, D. C. Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *Journal of virology* **77**, 8481-8494 (2003).
- 54) Johnson, D. C., Wisner, T. W. & Wright, C. C. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *Journal of virology* **85**, 4910-4926, doi:10.1128/JVI.00011-11 (2011).



# Molecular mechanisms of entry and egress of herpes simplex virus 1

**Jun ARII**

Division of Molecular Virology, Department of Microbiology and Immunology,  
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Herpes simplex virus (HSV) is a common pathogenic agent causing a variety of diseases in humans such as mucocutaneous and skin diseases, keratitis, and encephalitis. Although antivirals have been developed against HSV, they cannot eradicate the diseases caused by this virus. Thus, to control HSV infection, it is important to elucidate the underlying mechanism of its replication and pathogenesis. HSV encodes more than ten membrane proteins which play important roles in viral entry and egress. This review summarizes the interactions of HSV membrane proteins with the cellular membranes during viral replication.

