

1. 宿主酸化装置とビロポリンを介した プラス鎖 RNA ウイルスゲノム複製複体の活性化機構

錦 織 雅 樹

John and Jeanne Rowe Center for Research in Virology, Morgridge Institute for Research
Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin-Madison

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスは、一部の例外を除いて、細胞小器官の膜上でゲノム複製を行う。膜結合性ゲノム複製複体のこれまでの研究から、その構造と機能にはウイルスの分類を超えた多くの共通性が見えてきた。著者らは、プラス鎖 RNA ウイルスの主要なグループのひとつであるアルファウイルススーパーグループに属するウイルスがコードする、ゲノム複製に必須な非構造タンパク質（複製タンパク質）が、「ビロポリン (viroporin)」として機能し、複製複体が形成された膜の透過性を亢進することを見いだした。これにより、真核プラス鎖 RNA ウイルスの三大スーパーグループ（ピコルナ、フラビ、アルファ）の代表的なウイルスが、共通してビロポリンを複製タンパク質としてコードすることが明らかとなった。真核生物は、主に生体膜を用いて様々な細胞内化学環境の並存を可能としている。一例として、細胞質基質における還元的な環境と小胞体内腔における酸化的な環境の並存が挙げられる。アルファウイルススーパーグループの一部では、ビロポリンは小胞体内腔の酸化力を細胞質へ放出し、複製タンパク質の酸化依存的な酵素活性化を促進した。この知見は、分類を超えて認められつつも、断片的であった3つの事象—ビロポリン・酸化依存性・ゲノム複製—を1つの線で結ぶものであった。ビロポリンが関与する分子経路はウイルス特異的であると想定されることから、プラス鎖 RNA ウイルスの生活環の中核を標的としつつも、人体への副作用が少ない、チャンネル遮断剤および抗酸化剤等を含む、非ヌクレオチド系新規抗ウイルス剤の開発への可能性が広がった。

はじめに

プラス鎖 RNA ウイルスは、宿主細胞に侵入すると、ゲノム RNA の翻訳により複製に関わるタンパク質（本稿では「複製タンパク質」と総称する）を合成する。複製タンパク質は、複製鋳型である自身の RNA を認識して、ゲノム複製複体を形成し、相補的なマイナス鎖 RNA の合成を経て、子孫プラス鎖 RNA を複製する。本稿では、ゲノム複製複体の3次元構造と機能活性化の分子機構について

での最新の知見を紹介したい。なお、紙面の都合上、関連研究を網羅出来ないことを予めお許し頂きたい。

プラス鎖 RNA ウイルスの分類とゲノム複製複体の形態との相関

プラス鎖 RNA ウイルスは、現在3つのブランチ（ICTV 分類上では Phylum : 門）に分類されている^{1,2)} (図1)。ブランチ1は、主に原核生物を宿主とするウイルスと、真核生物を宿主とする近縁のウイルスより構成される。ブランチ2は、ピコルナウイルススーパーグループに属するウイルスより構成され、SARS コロナウイルスも当区分に含まれる。ブランチ3は、フラビウイルススーパーグループおよびアルファウイルススーパーグループに属するウイルスより主に構成される。これら三大スーパーグループの中で、複製に関する知見の充実した3つのウイルスについて、ゲノム構造とコードするタンパク質を図1下部に示す。上記の分類はポリメラーゼの配列比較に由来するものである

連絡先

〒 53706
1525 Linden Drive, Madison, Wisconsin, United States
TEL: +1-608-265-9741
FAX: +1-608-265-9214
E-mail: nishikiori@wisc.edu

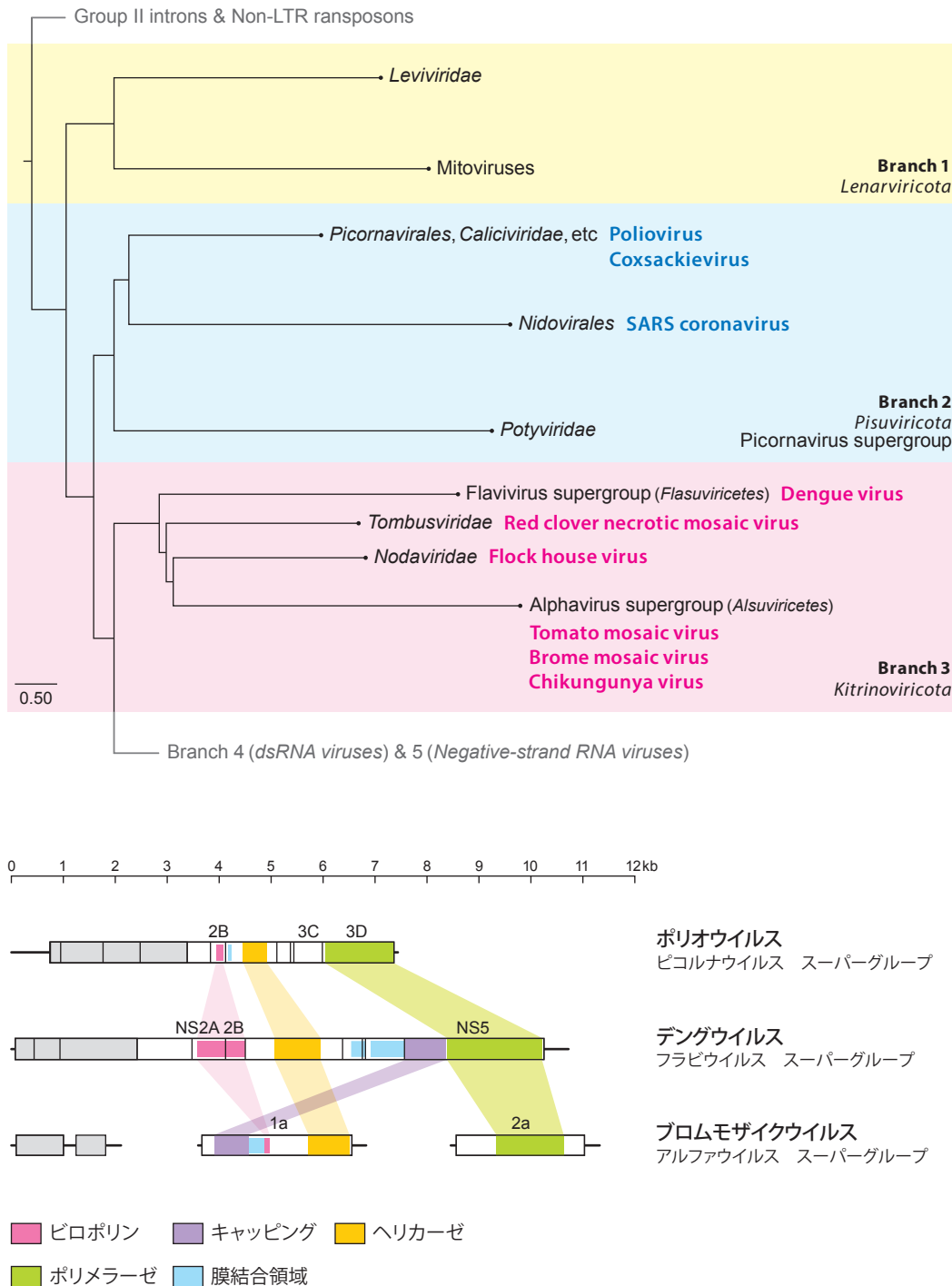


図1 RNA ウイルスのポリメラーゼ配列に基づく系統樹とモデルプラス鎖 RNA ウイルス。(A) 代表的なウイルス目と関連モデルウイルス (文献2の系統樹を一部抜粋)。(B) モデルウイルスのゲノム構造とコードするタンパク質。複製タンパク質のコード領域を白色で示す。

が、ポリメラーゼおよび他の複製タンパク質から構成されるゲノム複製複合体の形態とも相関が認められる³⁾。一般に、ブランチ1に属するウイルスは可溶性のゲノム複製複合体を形成する^{4,5)}。ブランチ2に属するウイルスは2重膜の小胞 (Double membrane vesicle: DMV) からなるゲ

ノム複製複合体を形成する。ブランチ3に属するウイルスのゲノム複製複合体は、細胞小器官の膜が内腔側に陥入して形成される、1重膜の釣鐘状の小胞 (spherule) である (図3)。ブランチ2と3のゲノム複製複合体が膜に覆われている理由のひとつとして、複製中間体である2本鎖

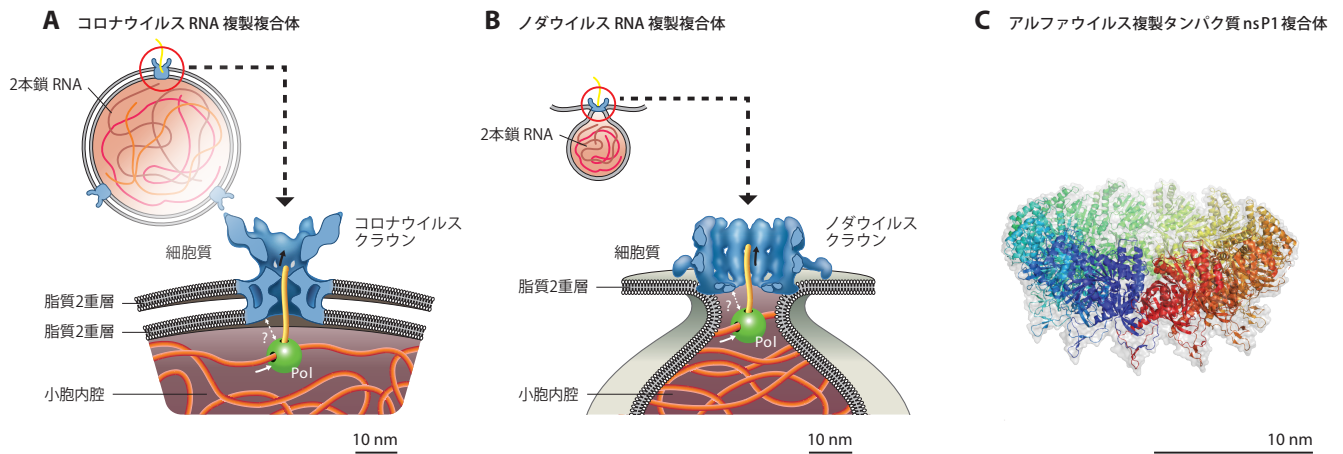


図2 プラス鎖RNA ウイルスの複製タンパク質多量体とゲノム複製複合体の模式図。(A) コロナウイルス (MHV) のゲノム複製複合体 (B) ノダウイルス (FHV) のゲノム複製複合体 (C) アルファウイルス (Chikungunya virus) 複製タンパク質 nsP1 の立体構造. 複製タンパク質多量体は、小胞内腔においてポリメラーゼ (Pol) と近接し、RNA 重合反応に伴った伸長エネルギーを用いて新生鎖1本鎖 (黄色線) を細胞質に放出すると予想される。

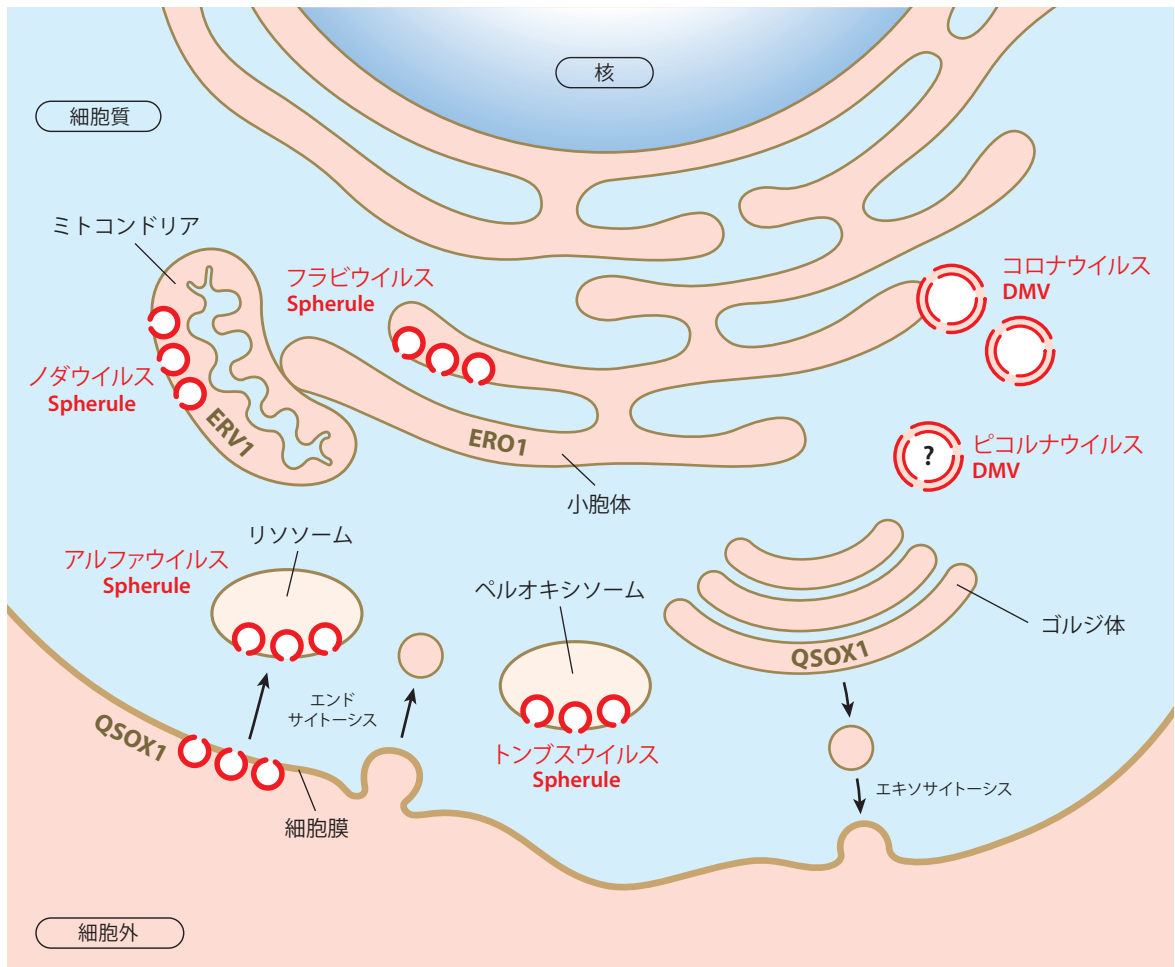


図3 宿主細胞内コンパートメントの酸化還元状態およびゲノム複製複合体の細胞内局在. 青色は還元的な環境を、黄土色は酸化的な環境を示す. ジスルフィド結合形成に関わる宿主タンパク質 (ERO1, ERV1, QSOX1) の局在も図中に示した. 複製複合体の局在については文献^{8,9)}を参照頂きたい.

RNA や、適切な末端修飾が施されていない新生1本鎖RNAを、宿主細胞に存在する非自己RNA認識機構^{6,7)}から隔離・保護する可能性が提唱され^{8,9)}、実験的にも一部支持されている¹⁰⁾。

プラス鎖RNAウイルスのゲノム複製複合体の類似性

近年、ブランチ2に属するコロナウイルス (Mouse Hepatitis virus: MHV および SARS-CoV-2)、並びにブランチ3に属するノダウイルス (Flock house virus: FHV) のゲノム複製複合体の3次元構造が、クライオ電子顕微鏡技術により、生体に近い状態で観察された¹¹⁻¹⁵⁾。その結果、特定の複製タンパク質 (MHV nsp3 もしくは FHV protein A) より構成される6もしくは12量体からなるリング状構造体が新規に同定された (図2AとB)。当該新規構造体はコロナウイルスの場合は2重膜を横断し、FHVの場合は複製複合体と細胞質との境界に位置していた。これらはいずれも子孫RNAとみられる繊維状構造の起点となっていたことから、新生RNAの細胞質への放出孔として機能すると考えられた。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いた精製タンパク質の単粒子解析が、ブランチ3に属するアルファウイルス (Chikungunya virus) の複製タンパク質 nsp1 について行われ、近縁のFHV複製タンパク質¹⁶⁾と同様の12量体リング状構造が確認され (図2C)、多量体会合様式、膜結合様式、さらにはRNA 5' キャッピング酵素の触媒機構の一端までが原子レベルで明らかになった^{17,18)}。個々の複製複合体の形成モデルについては原著^{13,14,17)}に譲るが、複製複合体の形成、構造、機能において、分類の垣根を超えた類似性が議論され始めている^{12,19)}。

ゲノム複製複合体の酸化依存的活性化

細胞質基質は高濃度 (1-10 mM) の還元型グルタチオンを含むとともに、酸化型グルタチオンを即座に除去する複数の仕組みをもち、高度に還元的な環境を維持している²⁰⁾ (図3)。別の抗酸化物質であるアスコルビン酸も0.1-10 mMの濃度で細胞質基質中に存在する²¹⁾。プラス鎖RNAウイルスのゲノム複製は、上述のように宿主細胞質と繋がりのある構造体で行われるため (図2と3)、いずれの複製複合体構成因子も上記還元剤に晒されると推測されるが、少なくともブランチ3に属する数種のウイルスのゲノム複製に、酸化的な環境が必要であることが、以下の研究により示された。

アルファウイルススーパーグループに属する Tomato mosaic virus は、宿主細胞の膜タンパク質 TOM1 と ARL8 との相互作用を経て、自身の複製タンパク質のRNA 5' キャッピング酵素活性を活性化する^{22,23)}。著者らは、この活性化機構を解析する過程で、複製タンパク質の一部が酸化修飾 (ジスルフィド修飾) を受けること、さらに酸化修飾を受けた複製タンパク質のみが、RNA 5'

キャップ付加に必須な、グアニリル化中間体を形成することを見出した²⁴⁾。複製タンパク質にあるシステイン残基への変異導入実験から、アルファウイルススーパーグループ内で高度に保存された2つのシステイン残基が、ゲノム複製の様々な過程 (ゲノムRNAおよび膜結合、ジスルフィド修飾、グアニリル化反応) において重要な役割を果たすことが判明した。複製タンパク質の酸化修飾およびグアニリル化は、近縁の Brome mosaic virus (BMV 図1) および Cucumber mosaic virus においても観察された²⁴⁾。

フラビウイルスが感染した細胞では、酸化ストレスが誘導される。Geiss らは、抗酸化剤処理により、フラビウイルス (Kunjin virus) のゲノム複製が阻害されることを報告した²⁵⁾。分子レベルでの解析により、抗酸化剤処理によりマイナス鎖と比較してプラス鎖RNAの合成が抑制されること、5'末端にキャップ構造をもたない子孫RNAがより蓄積することが明らかとなり、宿主のRNA品質管理機構により適切な末端修飾の施されていない子孫RNAが分解を受けていると推測された。この知見に一致するように、酸化剤を処理すると、フラビウイルス (Dengue virus) NS5 キャッピング酵素のグアニリル化活性が亢進した。同様のキャッピング活性の亢進は、アルファウイルス (Venezuelan Equine Encephalitis virus) の複製タンパク質 nsP1 でも観察された。さらに、NS5は分子間ジスルフィド結合を形成すること、NS5において保存されたメチオニン残基が酸化修飾され、酸化依存的なキャッピング酵素活性亢進に関与することも明らかになった²⁵⁾。

Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) は、ブランチ3の中でアルファウイルスおよびフラビウイルスの中間に分類される (図1)。RCNMVのゲノム複製には、宿主の活性酸素種産生酵素 (NbRBOHB) に加え、活性調節因子であるカルシウム依存性タンパク質キナーゼ (NbCDPKiso2)²⁶⁾ と植物免疫複合体の足場タンパク質 (NbRACK1)²⁷⁾ が必要であることが報告された。RCNMVの複製タンパク質 p27 は、ゲノム複製の場である小胞体膜上に、これら宿主タンパク質をリクルートして複合体を形成し、活性酸素種の産生を誘導した^{26,27)}。特異的な抗酸化剤を用いた薬理学実験から、活性酸素種の中でも、NbRBOHBの生成物であるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) がRCNMVのゲノム複製に必要であることが示された²⁸⁾。さらに、NbRBOHBの酵素活性は、スーパーオキシドとその代謝産物である過酸化水素を介してBMVのゲノム複製にも必要であることが示された^{26,28)}。従って、ブランチ3のプラス鎖ウイルスは、ゲノム複製に活性酸素種を積極的に利用している可能性が浮かび上がった。

細胞小器官膜の透過性亢進と酸化力流出を介したゲノム複製複合体活性化機構

BMVはアルファウイルススーパーグループの中で、ゲ

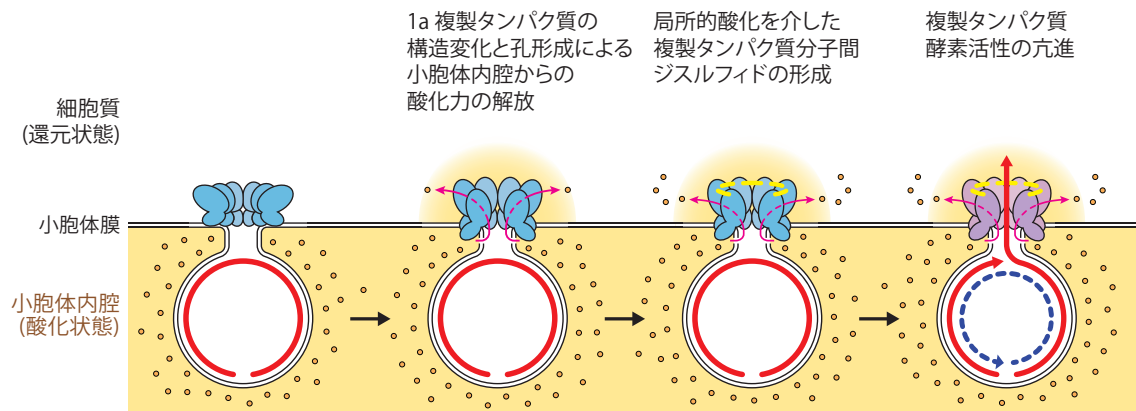


図4 BMV ゲノム複製複合体の活性化モデル. 近縁のアルファウイルス複製タンパク質 nsP1 の立体構造 (図2) を基本としたモデルを提示する.

ノム複製複合体の構築から機能活性化に至る素過程の解析が進み、複製に関する知見が最も多く蓄積しているウイルスのひとつである (総説として^{8, 9, 29}). 著者らは、前述の複製タンパク質のジスルフィド結合と酵素活性の活性化の分子機構をさらに理解するため、BMV の RNA 複製が可能で³⁰、かつ酸化経路に関する知見が充実した出芽酵母を用いて遺伝生化学的解析を進めた。出芽酵母および高等真核生物において、小胞体内腔の酸化的環境は主にフラビン酵素 Erol1 により作り出される^{31, 32}。Erol1 はタンパク質もしくは還元グルタチオンのシステイン残基の電子を分子状酸素へ受け渡し、基質のジスルフィド結合の形成を触媒するとともに、副産物として過酸化水素を産生する。Erol1 は生存に必須な因子であるが、出芽酵母においては温度感受性変異体 *erol1-1* が単離され^{31, 32}、関連経路の理解に役立っている。当該変異体および *ERO1* 過剰発現体を用いた解析から、小胞体内腔に存在する Erol1 タンパク質が、小胞体の細胞質側表面で行われる BMV ゲノム複製の律速因子であることが判明した³³。

細胞小器官内腔に由来する酸化力を、主に細胞質側に存在する複製タンパク質が、膜を越えて、どのように利用しているのだろうか？ 1990 年代から、ピコルナおよびフラビウイルスのいくつかで、膜の透過性を上げる複製タンパク質群^{34, 35} が知られていた。例として、ブランチ2のポリオウイルス 2B タンパク質³⁵ もしくはブランチ3のデングウイルス NS2 タンパク質^{36, 37} が挙げられ (図1)、このような機能をもつタンパク質は、おそらく孔を形成することから、ピロポリン (viroporin) と呼ばれる³⁸。これまでに同定されたピロポリンは、ゲノム複製のみならずウイルスの粒子形成や、さらには宿主の小胞輸送阻害やウイルスの細胞毒性にも関与する多機能タンパク質である³⁸。BMV を含めアルファ様ウイルスの複製タンパク質にはこのような機能は知られていなかったが、古典的なハイグロマイシン感受性検定試験³⁸ を含む、4 系統の独立なピロ

ポリン検定試験において、BMV 1a 複製タンパク質 (図1) はポリオウイルス 2B と同様の表現型を示したことから、1a には膜透過性亢進機能があると考えられた³³。

さらに、1a に存在する両親媒性 α ヘリックスの1つがピロポリン機能に関与すること、ならびにピロポリン機能を欠く 1a 変異体は、1a の初期機能である複製複合体の形成と複製鋳型取り込みの機能を維持する一方で、1a の後期機能であるジスルフィド結合形成とキャッピング活性に欠損がみられた³³。以上から、1a 複製タンパク質は小胞体膜の透過性を亢進し、Erol1 が産出した酸化性物質を小胞体内腔から放出して、自己の分子間ジスルフィド結合を誘導するとともに、おそらくは立体構造の再編成を経て、キャッピング酵素機能を活性化すると考えられた (図4)。これらの結果は、上述したブランチ3の複製タンパク質に関する知見²⁴⁻²⁶ と矛盾しないものであり、フラビウイルスにおいて推測されていたピロポリンを介した複製タンパク質の酸化と活性化の作業仮説²⁵ を全く別の系で実証するものであった。従って、ブランチ3のウイルス (フラビ、トンプス、アルファ) は共通して、複製タンパク質による膜透過性亢進と酸化誘導を介した、複製複合体活性化機構を有している可能性がある。

今後の課題と展望

ブランチ2に属するウイルスの大多数は、ゲノム RNA 5' 末端にキャップ構造をもたず、ゲノム結合タンパク質 (VPg/3B) が付加されている。従って、ブランチ3のモデルをそのまま適用出来ない。上記 BMV 研究を進めるにつれ、1a の膜透過性機能は 2a ポリメラーゼが担う RNA 合成にも必要であるという事実が見えてきた³³。ピコルナウイルス 2B の膜透過性機能も、3D ポリメラーゼが担う RNA 合成に必要である^{39, 40}。従って、プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製におけるピロポリンの機能を一般化するならば、複製複合体の構築から機能化への遷移促進 (具

体的には、ポリメラーゼおよびRNA修飾酵素を含むゲノム複製関連酵素の活性亢進)と言えるかもしれない。

ピコルナ様ウイルスの2Bピロポリンは、小胞体もしくはゴルジ体から、カルシウムや他のイオンを放出する^{38, 41, 42)}。カルシウムや亜鉛等の金属イオンは、ポリオウイルス3(C)Dポリメラーゼの多量体化と活性化に関わる^{43, 44)}。ウイルス側の因子に加え、宿主側の因子も酸化修飾もしくは金属イオン等の補因子の供給により活性化される可能性がある。関連経路に関わる下流因子の探索と機能解析が今後必要である。

ウイルス生活環の中核を担い、かつ共通項の多いゲノム複製機構は、薬剤標的として高い潜在性をもつ。いわゆるチャネルブロッカーは幅広く利用されていることから⁴⁵⁾、プラス鎖RNAウイルス間で少なくとも機能が保存されているピロポリンは、基礎および応用研究の両側面において興味深い研究対象である。

おわりに

本稿では、プラス鎖RNAウイルスのゲノム複製複合体の分子構造と、宿主の酸化装置を介したゲノム複製複合体の活性化にまつわる新奇分子機構について紹介した。様々な幸運に恵まれて、著者はプラス鎖RNAウイルスの複製タンパク質に膜透過性の機能が広く保存されていること、さらにピロポリンの分子機能の一端を明らかにすることが出来た。植物アルファ様ウイルスの複製に関与する宿主因子の同定と機能解析というニッチからスタートした本研究が、20年近くの時を経て、稚拙ながらもプラス鎖RNAウイルス全般について議論出来るところまで来た現状を嬉しく思う。

謝辞

本研究を進めるにあたりご指導を賜ったPaul Ahlquist先生、石川雅之先生、飯哲夫先生、加藤悦子先生、内藤哲先生に深く感謝の意を表します。また、一緒に研究に取り組んでくださった全ての方々ならびに本稿の執筆の機会を与えてくださった荻和宏明編集委員長に厚く御礼申し上げます。石川雅之先生には、本総説についても貴重な御意見をいただきました。重ねてお礼申し上げます。図の作成につきましては、H. Adam Steinberg様ならびに小林佑生様にご協力いただきました。

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) Wolf YI, Kazlauskas D, Iranzo J, Lucia-Sanz A, Kuhn JH, Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV. 2018. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *mBio* 9:e02329.
- 2) Wolf YI, Silas S, Wang Y, Wu S, Bocek M, Kazlauskas D, Krupovic M, Fire A, Dolja VV, Koonin EV. 2020. Doubling of the known set of RNA viruses by metagenomic analysis of an aquatic virome. *Nat Microbiol* 5:1262-70.
- 3) Ahola T. 2019. New Phylogenetic Grouping of Positive-Sense RNA Viruses Is Concordant with Replication Complex Morphology. *mBio* 10:e01402.
- 4) Vega L, Sevillano L, Esteban R, Fujimura T. 2014. Resting complexes of the persistent yeast 20S RNA Narnavirus consist solely of the 20S RNA viral genome and its RNA polymerase p91. *Mol Microbiol* 93:1119-29.
- 5) Haruna I, Spiegelman S. 1965. Autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science* 150:884-6.
- 6) Schlee M, Hartmann G. 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol* 16:566-80.
- 7) Guo Z, Li Y, Ding SW. 2019. Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nat Rev Immunol* 19:31-44.
- 8) den Boon JA, Ahlquist P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* 64:241-56.
- 9) den Boon JA, Diaz A, Ahlquist P. 2010. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* 8:77-85.
- 10) Kovalev N, Inaba JI, Li Z, Nagy PD. 2017. The role of co-opted ESCRT proteins and lipid factors in protection of tombusviral double-stranded RNA replication intermediate against reconstituted RNAi in yeast. *PLoS Pathog* 13:e1006520.
- 11) Wolff G, Limpens R, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, Koning RI, Agard DA, Grunewald K, Koster AJ, Snijder EJ, Barcena M. 2020. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* 369:1395-8.
- 12) Unchwaniwala N, Ahlquist P. 2020. Coronavirus dons a new crown. *Science* 369:1306-7.
- 13) Ertel KJ, Benefield D, Castano-Diez D, Pennington JG, Horswill M, den Boon JA, Otegui MS, Ahlquist P. 2017. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. *Elife* 6:e25940.
- 14) Unchwaniwala N, Zhan H, Pennington J, Horswill M, den Boon JA, Ahlquist P. 2020. Subdomain cryo-EM structure of nodaviral replication protein A crown complex provides mechanistic insights into RNA genome replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:18680-91.
- 15) Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, Stanifer ML, Boulant S, Bartenschlager R, Chlanda P. 2020. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* 11:5885.
- 16) Ahola T, Karlin DG. 2015. Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the

- alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biol Direct* 10:16.
- 17) Jones R, Bragagnolo G, Arranz R, Reguera J. 2021. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature* 589:615-9.
 - 18) Zhang K, Law YS, Law MCY, Tan YB, Wirawan M, Luo D. 2021. Structural insights into viral RNA capping and plasma membrane targeting by Chikungunya virus nonstructural protein 1. *Cell Host Microbe* 29:757-64.
 - 19) Wolff G, Barcena M. 2021. Multiscale Electron Microscopy for the Study of Viral Replication Organelles. *Viruses* 13:197.
 - 20) Morgan B, Ezerina D, Amoako TN, Riemer J, Seedorf M, Dick TP. 2013. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 9:119-25.
 - 21) Smirnoff N. 2018. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med* 122:116-29.
 - 22) Nishikiori M, Mori M, Dohi K, Okamura H, Katoh E, Naito S, Meshi T, Ishikawa M. 2011. A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 7:e1002409.
 - 23) Nishikiori M, Sugiyama S, Xiang H, Niiyama M, Ishibashi K, Inoue T, Ishikawa M, Matsumura H, Katoh E. 2012. Crystal structure of the superfamily 1 helix case from Tomato mosaic virus. *J Virol* 86:7565-76.
 - 24) Nishikiori M, Meshi T, Ishikawa M. 2012. Guanylation-competent replication proteins of Tomato mosaic virus are disulfide-linked. *Virology* 434:118-28.
 - 25) Gullberg RC, Jordan Steel J, Moon SL, Soltani E, Geiss BJ. 2015. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology* 475:219-29.
 - 26) Hyodo K, Hashimoto K, Kuchitsu K, Suzuki N, Okuno T. 2017. Harnessing host ROS-generating machinery for the robust genome replication of a plant RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1282-90.
 - 27) Hyodo K, Suzuki N, Okuno T. 2019. Hijacking a host scaffold protein, RACK1, for replication of a plant RNA virus. *New Phytol* 221:935-45.
 - 28) Hyodo K, Suzuki N, Mise K, Okuno T. 2017. Roles of superoxide anion and hydrogen peroxide during replication of two unrelated plant RNA viruses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signal Behav* 12:e1338223.
 - 29) Ahlquist P. 2006. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 4:371-82.
 - 30) Janda M, Ahlquist P. 1993. RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 72:961-70.
 - 31) Frand AR, Kaiser CA. 1998. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1:161-70.
 - 32) Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS. 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1:171-82.
 - 33) Nishikiori M, Ahlquist P. 2018. Organelle luminal dependence of (+)strand RNA virus replication reveals a hidden druggable target. *Sci Adv* 4:eaap8258.
 - 34) Chang YS, Liao CL, Tsao CH, Chen MC, Liu CI, Chen LK, Lin YL. 1999. Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 73:6257-64.
 - 35) Doedens JR, Kirkegaard K. 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J* 14:894-907.
 - 36) Leon-Juarez M, Martinez-Castillo M, Shrivastava G, Garcia-Cordero J, Villegas-Sepulveda N, Mondragon-Castelan M, Mondragon-Flores R, Cedillo-Barron L. 2016. Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Viol J* 13:1.
 - 37) Shrivastava G, Garcia-Cordero J, Leon-Juarez M, Oza G, Tapia-Ramirez J, Villegas-Sepulveda N, Cedillo-Barron L. 2017. NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence* 8:1450-6.
 - 38) Nieva JL, Madan V, Carrasco L. 2012. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol* 10:563-74.
 - 39) van Kuppeveld FJ, Galama JM, Zoll J, van den Hurk PJ, Melchers WJ. 1996. Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J Virol* 70:3876-86.
 - 40) de Jong AS, Melchers WJ, Glaudemans DH, Willems PH, van Kuppeveld FJ. 2004. Mutational analysis of different regions in the coxsackievirus 2B protein: requirements for homo-multimerization, membrane permeabilization, subcellular localization, and virus replication. *J Biol Chem* 279:19924-35.
 - 41) de Jong AS, de Mattia F, Van Dommelen MM, Lanke K, Melchers WJ, Willems PH, van Kuppeveld FJ. 2008. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol* 82:3782-90.
 - 42) van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, Willems PH, Dijkman HB, Galama JM, Melchers WJ. 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* 16:3519-32.
 - 43) Marcotte LL, Wass AB, Gohara DW, Pathak HB, Arnold JJ, Filman DJ, Cameron CE, Hogle JM. 2007. Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 81:3583-96.
 - 44) Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC. 2001. Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J* 20:1153-63.
 - 45) Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, Overington JP. 2017. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16:19-34.

