

相分离形成机制及其在病毒感染中的作用

赵文慧, 程明扬, 鲁逸远, 石春卫, 王春风, 曹欣*, 曾艳*

(吉林农业大学动物医学院, 吉林省动物微生态与健康养殖重点实验室, 吉林吉林省动物微生态制剂工程研究中心, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 长春 130118)

摘要: 液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)是胞内分子因理化性质自发形成聚集或分离而形成的无膜细胞器, 在细胞生命活动中扮演重要角色。近年来, 相分离参与病毒感染过程的研究逐渐增多, 揭示了相分离在病毒生命周期中的重要作用, 该领域已成为一个新的研究热点。尽管如此, 我们对相分离的认识仍然处于起步阶段, 与病毒感染相关的研究还不够完善。因此, 本文将从相分离形成机制和相分离在病毒感染过程中的作用两方面进行阐述, 目的在于通过了解相分离形成机制结合现有相分离在病毒学中的研究, 重新审视病毒如何增强自身复制和逃避宿主免疫等相关问题, 为抗病毒策略的研发提供一条新思路。

关键词: 相分离; 生物分子凝析物; 多价作用; 病毒感染

Mechanism of phase separation formation and its role in viral infection

ZHAO Wenhui, CHENG Mingyang, LU Yiyuan, SHI Chunwei, WANG Chunfeng,

CAO Xin*, ZENG Yan*

(College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Microecology and Healthy Breeding, Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal Microecological Preparations, Key Laboratory of Animal Production and Product Quality and Safety of Ministry of Education, Changchun 130118, China)

Abstract: Liquid-liquid phase separation (LLPS) is a membrane-free organelle formed by spontaneous aggregation or separation of intracellular molecules due to physicochemical properties, which plays an important role in cell life activities. In recent years, the research on phase separation involved in the process of virus infection has gradually increased, which has become a new research hotspot to reveal the important role of phase separation in the virus life cycle. However, our understanding of phase separation is still in its infancy, and the research on viral infections is incompletely illustrated. Therefore, this paper will elaborate from two aspects: the formation mechanism of phase separation and the role of phase separation in the process of viral infection. The purpose is to re-examine how the virus can enhance its own replication and evade host immunity by understanding the formation mechanism of phase separation and combining with the existing research of phase separation in virology, to provide a new idea for the development of antiviral strategies.

Key Words: phase separation; biomacromolecule condensate; multivalent interactions; viral infection

收稿日期: 2022-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31941018, U21A20261, 32072888); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-35); 吉林省科技发展计划项目(YDZJ202102CXJD029, 20200402041NC); 长春市科技计划项目(21ZY42)

第一作者: E-mail: zhaowenhui233@163.com

*通信作者: 曹欣, E-mail: xinc@jlau.edu.cn; 曾艳, E-mail: zengyan@jlau.edu.cn

细胞中生化反应的发生需要严格控制反应的时间和空间。调节反应组分的定位是实现这种时空控制的方式之一。将反应组分集中于一处可以增加反应动力学, 而将它们分离可以减缓或抑制反应。经典细胞器是由生物膜包裹形成的隔室, 将酶与相关成分集中在细胞器里进行生化反应, 因此, 膜的通透性决定了膜内的成分。但是, 近年来发现的无膜细胞器可以在具有实现经典细胞器的生物学功能的同时, 还具有更加机动灵活的特性, 如在细胞中可因物理化学性质的改变随时形成无膜细胞器^[1]。这种无膜细胞器形成过程叫做液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS), 简称相分离, 该过程形成的液体状腔室称为生物分子凝析物^[2]。

病毒是一种专性细胞内寄生微生物, 进入细胞后迅速利用细胞内环境做出适应性反应, 逃避宿主免疫监视来促进病毒复制和传播。随着当代生物学对细胞中相分离作用研究的深入, 一些研究着眼于探索病毒与相分离之间的作用联系。已经证明一些病毒的生命周期有生物分子凝析物参与, 也有研究指出病毒入侵引起的相分离可以干扰细胞成分执行正常的生理功能。尽管如此, 相分离与病毒学的联系还属于崭新的研究领域, 病毒感染过程中的相分离相关研究还不完善。因此, 本文旨在阐明病毒如何利用相分离作用参与病毒的生命周期。这对于探索发现新的抗病毒靶点从而实现防治病毒感染有重要意义。下文将重点介绍生物分子凝析物的形成原理, 并综述病毒生命周期中利用该方式逃避宿主免疫增强病毒复制的研究进展。

1 相分离概述

第一个生物分子凝析物在神经元细胞核内被观察到, 被称为核仁^[3]。后来, 在细胞核、细胞质和基本上所有真核细胞的细胞膜上都发现了这样的结构, 如P颗粒(胚芽体)、应激颗粒以及核结构(如Balbiany小体、核斑点和核旁斑点)。随后, 有研究发现了秀丽隐杆线虫生殖细胞中P颗粒的液体性质并对此展开研究, 从此打开了生物分子凝析物形成机制研究的大门^[4]。在过去的十年中, 近3 000篇文章强调了相分离与细胞生理和病理状态

的关系。这种相分离现象在细胞生物学影响深远。

在物理学中, 由于溶质和溶剂分子之间的相互作用, 可溶解的组分既能存在于均相溶液中, 也能发生相分离形成两相体系。后来, 此概念延伸到细胞生物学中, 生物大分子的均相溶液分离成两相即为相分离。其中, 大分子与其他相关组分相互作用发生相分离浓缩形成生物分子凝析物液滴构成一相, 周围大分子含量较少的溶液构成另一相。

相分离发生过程具有快速、动态的特点, 所形成的生物分子凝析物可以对某些组分浓度变化或环境刺激(如温度、压力、pH、细胞外信号等)迅速作出响应, 所以这种物理变化过程是可逆的, 凝析物可以快速完成形成或消散。研究表明, 这种物理现象的发生依赖凝析物成分之间微弱、瞬态的相互作用^[5]。由此形成的亚稳态结构允许液滴内部成分与周围环境快速进行交换, 同型或相似分子就可以实现选择性渗透。有报道称, 这种渗透作用可以使分子在两相之间的浓度差达到一个数量级^[6]。重点是维持该浓度差不需要能量, 因为相分离本身就是一个体系能量趋于最低的热力学自发过程, 相界面处的化学势差为零^[7]。这种特性可以使液滴快速聚集反应所需的底物, 并达到较高反应物浓度, 在一定程度上加快反应速度。此外, 选择性渗透还可以实现对凝析物内部分子的精细选择, 使一些生化反应具有特异性。Nott等^[8]在体外实验中发现, DEAD-Box解旋酶4(DEAD-Box helicase 4, Ddx4)凝析物可以通过相分离只招募单链或发夹RNA而不招募双链RNA。

2 相分离发生的物理机制

在热力学中, 当分子浓度在溶液达到溶解度极限时, 体系就可以发生相分离^[9]。前文提到分子间的相互作用可以驱动相分离的发生, 所以通常能发生相分离的物质富含多价分子, 其中“多价”指分子中存在多个重复的相互作用位点, 这种多价性可以控制分子内或分子间的相互作用^[10]。聚合物学中的概念表明, 多价分子在混合时会由于熵驱动效应自发地组装成大的寡聚体或聚合物, 这种组装将在本质上降低分子的溶解

度,促进相分离发生。

在细胞中,这种多价分子包括数百种不同的蛋白质和核酸。其中蛋白质通常含有多个模块相互作用结构域或序列富含固有无序区域(intrinsically disordered regions, IDRs); RNA和DNA序列中含有多个可以结合其他核酸分子和蛋白质的区域。由于长度、灵活性和多价性, RNA已被证明是一些富含RNA识别基序(RRM)的蛋白质控制相分离发生和调节的关键分子^[11]。

2.1 含有模块结构域蛋白质的相分离

许多蛋白质含有同种类型结构域或不同类型的模块相互作用域的多次重复,如一些蛋白质中富含SRC同源性3(SRC Homology 3, SH3)结构域和富含脯氨酸的基序(prolinerich motifs, PRMs)重复模块,这两种结构序列被证明可以互相结合并且被认为在信号传导中具有重要作用。之后对由SH3/PRM重复序列组成的人工合成系统的研究发现,具有多个SH3结构域重复的(SH3)_n蛋白与具有PRM结构域重复的(PRM)_n蛋白进行混合可以形成凝析物,揭示了这些重复域在相分离驱动中的重要作用^[12]。肌动蛋白调控信号通路中的多价蛋白Nephrin、Nck和神经Wiskott-Aldrich综合征蛋白(neural Wiskott-Aldrich syndrome protein, N-WASP)就存在这样的基序。N-WASP通过Nephrin的磷酸酪氨酸残基(phosphotyrosine, pTyr)和Nck的SRC同源性2 (SRC homology 2, SH2)结构域之间的相互作用,以及Nck的SH3结构域和N-WASP的PRMs之间的相互作用,组装成多价分子凝析物^[1]。此外, mRNA脱帽蛋白3增强子(enhancer of mRNA decapping protein 3, EDC3)中的氨基酸序列与mRNA脱帽酶亚基2(mRNA-decapping enzyme subunit 2, DCP2)中富含亮氨酸的基序发生的结合也被证明可以促进相分离^[13]。

2.2 含有IDRs蛋白质的相分离

IDR是指缺乏明确的三维结构的一段氨基酸序列。IDR一般富含特定的极性和带电氨基酸而缺少疏水非极性氨基酸,通常多样性低且多含重复序列,这为多价分子间的弱相互作用驱动相分离提供了基础^[1]。分子内的电荷分布情况被证明通过影响分子空间构象来影响相分离的发生,如相同净电荷的分子当电荷均匀分布时不利于相分离,反

之则促进相分离^[14,15]。此外,一些芳香族氨基酸也可能存在于IDR中,通过芳香环的 π 键和带正电荷氨基酸的阳离子相互作用等方式以增强分子间的相互作用来促进相分离,如具有IDRs的Ddx4发生的相分离就在一定程度上依赖这种作用方式^[16]。

由于富含IDRs而具有相分离能力的蛋白质有很多,这些蛋白质大多数有结合RNA的能力,如P小体、应激颗粒等。其中IDRs序列多样性的缺乏使Gly/Ser-Phe/Tyr-Gly/Ser和/或poly-Gln和poly-Asn重复序列广泛存在,这对于招募RNA分子与有丝分裂纺锤体发生相分离十分关键^[17]。此外,还有研究证明,多肽主链的相互作用可能在含IDRs蛋白的相分离中也发挥重要作用^[18]。

3 相分离作用参与病毒感染过程

许多病毒已被证明在感染过程中可以组装生物分子凝析物来促进感染,如A型禽流感病毒(influenza A viruses, IAV)、狂犬病病毒(rabies virus, RABV)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)等。这种促进感染的方式一方面是通过参与病毒的生命周期,用相分离发挥其所具有的物理化学属性来达到加速反应进程的目的;另一方面是通过病毒蛋白与宿主免疫相关蛋白相分离干扰正常免疫反应来进行免疫逃避。

3.1 相分离在病毒侵入和脱衣壳过程中的作用

IAV是一种有囊膜的单股负链RNA(ssRNA)病毒,其基因组包含8个不同的片段。基质蛋白M1外壳包裹由基因组RNA、核蛋白(nucleo protein, NP)和RNA聚合酶构成的病毒核糖核蛋白(viral ribonucleoprotein, vRNP)复合体,一个病毒颗粒含有8种vRNPs。IAVs感染细胞时通过受体介导的内吞作用形成囊泡进入细胞,随着囊泡的成熟及其内部离子环境的变化(H^+ 、 K^+ 增加),M1-M1寡聚体相互作用被破坏,vRNP复合物的溶解度增加^[19]。在低pH(<5.5)时,触发病毒囊膜和内体膜的膜融合^[20]。融合后,病毒核心在宿主组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)和转运蛋白1(transportin 1, TNPO1)等的作用下在胞质中脱衣

壳^[21]。在正常细胞条件下, HDAC6是一种微管蛋白去乙酰化酶。在蛋白酶体应激下, 可以结合错误折叠的蛋白聚集物进行自噬降解。IAV包含非锚定的泛素链, 可以模拟错误折叠的蛋白质聚集, 反过来激活HDAC6进行聚集体加工, 促进病毒脱衣壳^[22]。有研究发现, HDAC6可以使应激颗粒(stress granules, SGs)中的重要成分RNA解旋酶DDX3X去乙酰化来促进相分离发生, 这种促进作用被证明直接参与了SGs的成熟^[23]。TNPO1是一种核导入受体, 通过与细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS)结合, 将RNA结合蛋白转运到细胞核中。研究表明, TNPO1可以通过增加RNA结合蛋白的溶解度来抑制相分离发生^[24]。病毒侵入宿主细胞进行脱衣壳的过程是通过劫持这两种重要的相分离调节因子, 从而直接干扰细胞正常相分离的相关生理功能, 可以在一定程度上帮助病毒建立稳定感染。

3.2 相分离在基因组复制和包装过程中的作用

单股负链RNA病毒都是由不分节段ssRNA组成的囊膜病毒^[25], 包括VSV、RABV、麻疹病毒(measles virus, MeV)、埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)等。它们编码共同的3'-N-P-M-G-L-5'结构元素。M和G基因分别编码N(核蛋白)、基质蛋白和糖蛋白, P(磷蛋白)和L(大蛋白)编码RNA酶。这些病毒进入细胞释放RNP到细胞质中, 大多数病毒在细胞质中形成特殊的病毒复制位点, 称为病毒包涵体, 是病毒基因组转录和复制的中心。已有研究证明, 这些病毒形成的包涵体是相分离形成的无膜生物分子凝析物^[26,27], 通过相分离的方式集中病毒蛋白、细胞因子和核酸, 为病毒复制提供平台。包涵体中的RNA、N、P和L蛋白都是构成凝析物的重要组成, 但不同病毒各成分蛋白对相分离所起的作用有所差异。N蛋白是一种RNA结合蛋白, 包含30%的IDRs; P蛋白包含了占其序列75%的IDRs和一个寡聚结构域, 这两种蛋白质都具备进行相分离的条件。研究证明, N蛋白和P蛋白在相分离形成RABV病毒包涵体过程中起重要作用^[26]。类似的结论在VSV的相关研究中也有报道, 而与RABV不同的是, VSV只有在N、P、L三种蛋白质同时存在的时候才能形成具有液体性质的包涵体^[27], 意味着这三种蛋白质之间的相互作

用对该过程起到一定作用。最近, 有新的关于人偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)的研究在体外纯化了HMPV的P蛋白, 证明P蛋白可能单独作为病毒包涵体的一种支架蛋白, 可以借助与单体N蛋白、寡聚N蛋白以及RNA的多价相互作用来促进包涵体的相分离^[28]。目前, 还没有治疗HMPV感染的疫苗或抗病毒药物, 病毒包涵体作为一个新型抗病毒药物开发的靶点, 对其相分离多价相互作用的研究将具有重要价值。

SARS-CoV-2是正股ssRNA病毒, 基因组全长30 Kb。SARS-CoV-2的病毒基因组被核衣壳(N)蛋白包裹, N蛋白在感染的细胞里大量产生, 被证明可以通过提高基因组RNA转录效率来加快病毒复制进程。而这种功能的实现依赖于N蛋白与病毒RNA发生相分离作用形成的高密度N蛋白-RNA生物分子凝析物, 大量招募SARS-CoV-2依赖RNA的RNA聚合酶复合物从而增强反应动力学, 为病毒RNA的高效转录奠定基础^[29]。另外, 有研究还提出, N蛋白诱导的相分离可能促进基因组包装^[30]。实现这两种功能的切换开关被证明是N蛋白的磷酸化: 当N蛋白被磷酸化时, 液滴具有液体性质, 可以促进转录和复制; 当N蛋白未被磷酸化时, N与RNA强烈结合增加了液滴中成分相互作用的强度, 导致液态到凝胶态的转变, 从而推动液滴的成熟, 之后RNA致密化的核脂质形成, 促进基因组包装^[31]。除此之外, N蛋白与SGs的核心成分Ras GTP酶激活蛋白SH3功能区结合蛋白(ras GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein, G3BP)上的IDRs相互作用发生相分离, 占据G3BP与SGs相关蛋白的相互作用位置, 破坏细胞中的SGs生物分子凝析物结构^[32]。病毒的这种策略将直接导致宿主细胞的防御机制遭到破坏, 从而更有利于在宿主细胞中增殖。轮状病毒(rotaviruses, RVs)是一种双链RNA病毒。有研究表明, RVs的病毒复制工厂是非结构蛋白NSP5和NSP2相互作用发生相分离形成的, 其中NSP2为RNA的伴侣蛋白, 可以招募富集病毒RNA来实现病毒快速复制转录的功能^[33]。人腺病毒(human adenovirus, HAdV)是双链DNA病毒, 其单链DNA结合蛋白也被证明介导相分离形成病毒复制工厂^[34]。这再一次强调了具有RNA结合能力的病毒蛋白在相分离构建复制

工厂过程中可能发挥的作用,可能为未来病毒诱导的相分离相关研究提供一些参考线索。

3.3 相分离在病毒组装过程中的作用

IAV基因组复制发生在宿主细胞核中,随后vRNPs被输出到细胞质。有研究发现,当到达病毒粒子组装位点(质膜)时,8个RNA片段相互连接的vRNPs复合物就已经形成并可以直接观察到^[35]。这意味着期间的某个时间点,8个vRNPs会组装成高阶基因组复合物。研究发现,在vRNPs被运输到质膜的过程中,共定位的不同类型vRNP片段数量增加^[36],同时聚集成不断增大的灶点^[37]。随后的研究表明,这些灶点具有液体性质,是一种vRNPs和GTP酶Rab11相互作用发生相分离形成的生物分子凝析物,可以招募不同类型的vRNP,从而增强病毒RNA-RNA的随机相互作用来促进病毒粒子的组装过程^[38]。此外,由于相分离促进的RNA-RNA相互作用也与导致毒株产生变异的IAV基因组重组有关,而且这种重组经常发生在体温较高的鸟类体内,所以有学者怀疑这与温度较高导致相分离作用增强有关,因为温度是影响相分离发生的因素之一。

3.4 相分离在病毒免疫逃逸中的作用

环GMP-AMP合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)是一种胞质DNA感受器,DNA可

以诱导其发生相分离触发一个有效的反应来检测病原感染和转导天然免疫信号。有研究发现,双链DNA疱疹病毒科的病毒蛋白ORF52、VP22与cGAS竞争结合DNA,可以在病毒感染的早期就干扰cGAS感受DNA信号刺激,从而阻断cGAS下游的天然免疫信号通路^[39]。相分离现象为发现新的病毒免疫逃避机制提供了可能。

4 展望

相分离形成的生物分子凝析物最初在细胞中被发现时就引起了轰动,相分离导致相变增加了细胞结构的复杂性,为理解生物体如何工作、控制反应和适应刺激提供了新的可能。这种由含模块结构域、IDR的蛋白质和核酸之间的弱相互作用驱动形成的相分离在病毒学领域中的应用接连被发现,证明了病毒可以通过这种作用影响宿主的正常生理功能、促进病毒的免疫逃逸和自身的复制增殖(图1)。随着近年来对病毒与相分离关系研究的逐渐深入,一些靶向病毒相分离作用的药物不断被发现,这对开发新的药物抵抗病毒感染有重要意义^[40-42]。然而,现有的相关研究还十分有限,很多问题尚待解决,因此,相分离在病毒学中应深入展开基础性研究以达到广泛的应用前景。

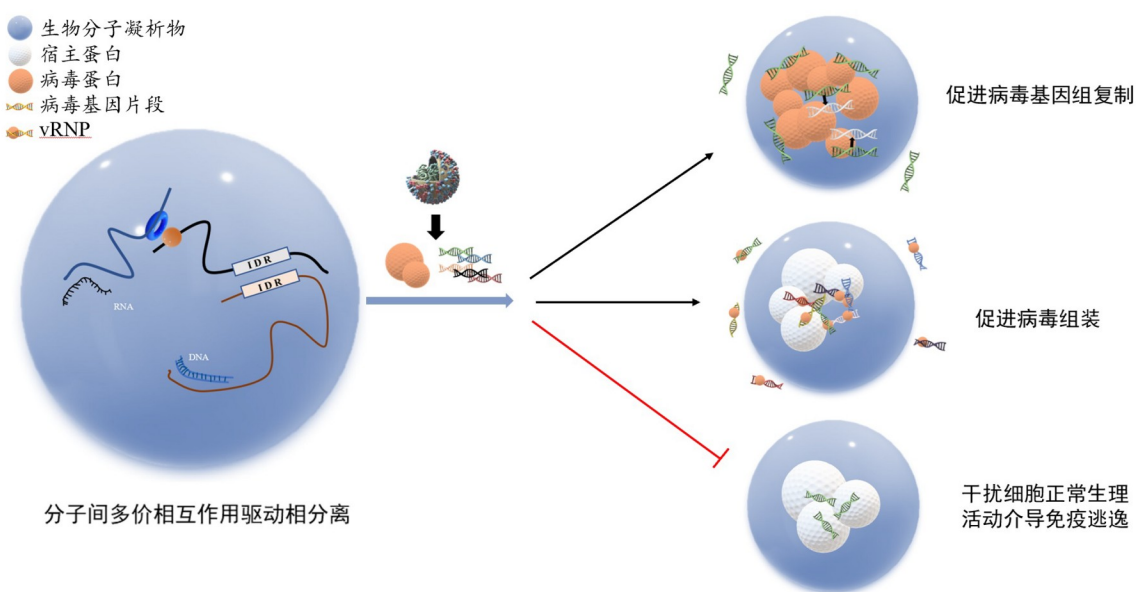


图1 相分离作用参与病毒感染过程示意图

参考文献

- [1] Banani SF, Rice AM, Peeples WB, et al. Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell*, 2016, 166(3): 651-663
- [2] Banani SF, Lee HO, Hyman AA, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-298
- [3] Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, 2009, 324(5935): 1729-1732
- [4] Brangwynne CP, Mitchison TJ, Hyman AA. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(11): 4334-4339
- [5] Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, et al. Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 420-435
- [6] Sehgal PB, Westley J, Lerea KM, et al. Biomolecular condensates in cell biology and virology: phase-separated membraneless organelles (MLOs). *Anal Biochem*, 2020, 597: 113691
- [7] Hyman AA, Weber CA, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30(1): 39-58
- [8] Nott TJ, Craggs TD, Baldwin AJ. Membraneless organelles can melt nucleic acid duplexes and act as biomolecular filters. *Nat Chem*, 2016, 8(6): 569-575
- [9] Palit S, Kreplak L, Frampton JP. Formation of core-sheath polymer fibers by free surface spinning of aqueous two-phase systems. *Langmuir*, 2022, 38(15): 4617-4624
- [10] Berry J, Brangwynne CP, Haataja M. Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions. *Rep Prog Phys*, 2018, 81(4): 046601
- [11] Maharana S, Wang J, Papadopoulos DK, et al. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science*, 2018, 360(6391): 918-921
- [12] Li P, Banjade S, Cheng HC, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483(7389): 336-340
- [13] Fromm SA, Kamenz J, Nöldeke ER, et al. *In vitro* reconstitution of a cellular phase-transition process that involves the mRNA decapping machinery. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(28): 7354-7359
- [14] Kato M, Han TW, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, 2012, 149(4): 753-767
- [15] Pak CW, Kosno M, Holehouse AS, et al. Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein. *Mol Cell*, 2016, 63(1): 72-85
- [16] Nott TJ, Petsalaki E, Farber P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol Cell*, 2015, 57(5): 936-947
- [17] Jiang H, Wang S, Huang Y, et al. Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly. *Cell*, 2015, 163(1): 108-122
- [18] Conicella AE, Zerze GH, Mittal J, et al. ALS Mutations disrupt phase separation mediated by α -helical structure in the TDP-43 low-complexity C-terminal domain. *Structure*, 2016, 24(9): 1537-1549
- [19] Stauffer S, Feng Y, Nebioglu F, et al. Stepwise priming by acidic pH and a high K^+ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *J Virol*, 2014, 88(22): 13029-13046
- [20] Yoshimura A, Kuroda K, Kawasaki K, et al. Infectious cell entry mechanism of influenza virus. *J Virol*, 1982, 43(1): 284-293
- [21] Yamauchi Y. Influenza A virus uncoating. *Adv Virus Res*, 2020, 106: 1-38
- [22] Miyake Y, Keusch JJ, Decamps L, et al. Influenza virus uses transportin 1 for vRNP debundling during cell entry. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 578-586
- [23] Saito M, Hess D, Eglinger J, et al. Acetylation of intrinsically disordered regions regulates phase separation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 51-61
- [24] Sengupta P, Seo AY, Pasolli HA, et al. A lipid-based partitioning mechanism for selective incorporation of proteins into membranes of HIV particles. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(4): 452-461
- [25] Maes P, Amarasinghe GK, Ayllón MA, et al. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: second update 2018. *Arch Virol*, 2019, 164(4): 1233-1244
- [26] Nikolic J, Le Bars R, Lama Z, et al. Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 58
- [27] Heinrich BS, Maliga Z, Stein DA, et al. Phase transitions drive the formation of vesicular stomatitis virus replication compartments. *mBio*, 2018, 9(5): e02290-17
- [28] Boggs KB, Edmonds K, Cifuentes-Munoz N, et al. Human metapneumovirus phosphoprotein independently drives phase separation and recruits nucleoprotein to liquid-like bodies. *mBio*, 2022, 13(3): e0109922
- [29] Savastano A, Ibáñez de Opakua A, Rankovic M, et al. Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6041

- [30] Chen H, Cui Y, Han X, et al. Liquid-liquid phase separation by SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and RNA. *Cell Res*, 2020, 30(12): 1143-1145
- [31] Carlson CR, Asfaha JB, Ghent CM, et al. Phosphoregulation of phase separation by the SARS-CoV-2 N protein suggests a biophysical basis for its dual functions. *Mol Cell*, 2020, 80(6): 1092-1103
- [32] Luo L, Li Z, Zhao T, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase separates with G3BPs to disassemble stress granules and facilitate viral production. *Sci Bull*, 2021, 66(12): 1194-1204
- [33] Geiger F, Acker J, Papa G, et al. Liquid-liquid phase separation underpins the formation of replication factories in rotaviruses. *EMBO J*, 2021, 40(21): e107711
- [34] Hidalgo P, Pimentel A, Mojica-Santamaría D, et al. Evidence that the adenovirus single-stranded DNA binding protein mediates the assembly of biomolecular condensates to form viral replication compartments. *Viruses*, 2021, 13(9): 1778
- [35] Fournier E, Moules V, Essere B, et al. A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(5): 2197-2209
- [36] Chou Y, Heaton NS, Gao Q, et al. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5): e1003358
- [37] Ramos-Nascimento A, Kellen B, Ferreira F, et al. KIF13A mediates trafficking of influenza A virus ribonucleoproteins. *J Cell Sci*, 2017, 130(23): 4038
- [38] Alenquer M, Vale-Costa S, Etibor TA, et al. Influenza A virus ribonucleoproteins form liquid organelles at endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1629
- [39] Xu G, Liu C, Zhou S, et al. Viral tegument proteins restrict cGAS-DNA phase separation to mediate immune evasion. *Mol Cell*, 2021, 81(13): 2823-2837.e9
- [40] Wang S, Dai T, Qin Z, et al. Targeting liquid-liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes innate antiviral immunity by elevating MAVS activity. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(7): 718-732
- [41] Risso-Ballester J, Galloux M, Cao J, et al. A condensate-hardening drug blocks RSV replication *in vivo*. *Nature*, 2021, 595(7868): 596-599
- [42] Zhao M, Yu Y, Sun LM, et al. GCG inhibits SARS-CoV-2 replication by disrupting the liquid phase condensation of its nucleocapsid protein. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2114