

### 3. カベオラエンドサイトーシスとウイルス侵入

野村 隆士

藤田保健衛生大学・医学部・解剖学第一講座

カベオラがエンドサイトーシスを行う膜ドメインであるかどうかは、未だに議論されている問題である。しかし、Simian virus 40 (SV40) の細胞内侵入のリアルタイムイメージング解析により、ウイルス侵入に利用されるカベオラエンドサイトーシスの詳細が明らかになってきた。SV40 を内包したカベオラは、ダイナミン依存的に細胞膜から budding する。その後、SV40 はカベオソームへ移動し、やがて ER へと運ばれる。これに加えて、ヒトコロナウイルス-229E も細胞内侵入にカベオラを利用することがわかってきた。本稿では、現在明らかにつつあるカベオラエンドサイトーシスを紹介し、ウイルス侵入との関わり合いを論じたいと思う。

#### はじめに

細胞膜は、比較的均一な脂質の二重層から形成されており、膜タンパク質はその中に埋め込まれた状態で、膜内を二次元方向に動くという流動モザイクモデル<sup>40)</sup>がこれまで広く受け入れられてきた。このモデルは、細胞膜の基本構造を非常にうまく表現している。これに加えて、近年、ラフトやカベオラといった膜マイクロドメインと言う概念が広く受け入れられ、細胞膜の脂質組成は均一ではなく、組成の異なる膜マイクロドメインを多数含んでいるというイメージが加わりつつある。

ウイルスの細胞内侵入に関して、大まかに言えば、非エンベロープウイルスは細胞のエンドサイトーシスにより、エンベロープウイルスは細胞膜との膜癒合により、侵入は成立すると従来考えられてきた。近年、ウイルス種によっては、侵入部位として膜マイクロドメイン嗜好性があるとする報告が挙がってきている<sup>4, 18, 24, 29, 30, 32)</sup>。本稿では、ウイルス侵入に利用される膜マイクロドメインのうち、筆者の研究対象であるカベオラに焦点を当て、そのエンドサイトーシスを紹介する。はじめにカベオラとカベオラエンドサ

イトーシスについて触れ、細胞内侵入にカベオラを利用するウイルスのうち、最も解析の進んでいる Simian virus 40 (SV40) の侵入機構を紹介する。次に、ヒトコロナウイルス-229E (HCoV-229E) の侵入機構について触れ、最後にリアルタイムイメージング解析手法の有用性について論じてみたいと思う。

#### 1. カベオラとカベオリン

カベオラは、約 50 年前に同定された細胞膜の陥凹構造であり、典型的なものは、細い開口部と 50-80 nm の内腔をもつ (図 1)<sup>44)</sup>。その脂質組成は、ラフトと同様にスフィンゴ脂質とコレステロールに富んでいる。カベオラは大半の細胞に存在するが、その存在密度は細胞種によってまちま

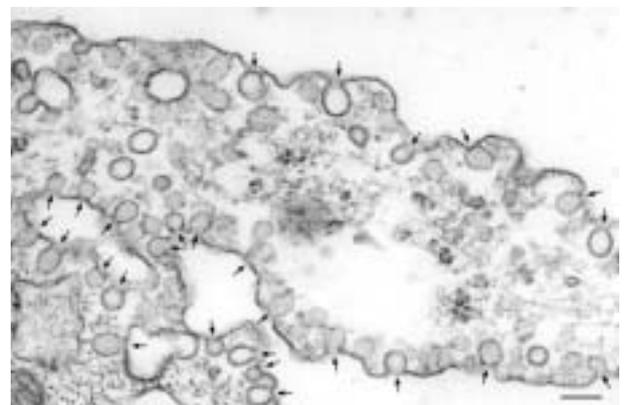


図 1 培養線維芽細胞の電子顕微鏡像。丸フラスコ状のカベオラ (矢印) が多数認められる。Bar = 100 nm.

#### 連絡先

〒 470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1 - 98

TEL : 0562-93-2648

FAX : 0562-93-5904

E-mail : rnomura@fujita-hu.ac.jp

表1 エンドサイトーシスにおけるカベオラとクラスリン被覆ピットの比較表

	カベオラ	クラスリン被覆ピット
大きさ	50-80 nm	100-150 nm
コートタンパク質	カベオリン-1	クラスリン
budding時に作用するタンパク質	ダイナミン	ダイナミン
buddingを抑制する分子	DynK44A DGV-cav	DynK44A Eps15 EΔ95/295
行き先	カベオソーム 初期エンドソーム	初期エンドソーム
コントロールリガンド	CTB (cholera toxin binding subunit)	Tf (transferrin)
コントロールウイルス	SV40 (Simian virus 40)	SFV (Semliki forest virus)

ちである。脂肪細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞には多くのカベオラが存在するのに対し、神経細胞、リンパ球などにはカベオラは存在しない、もしくはあってもごくわずかである。1992年にカベオラの主要構成タンパク質としてカベオリン-1が同定されたことで<sup>16, 34)</sup>、カベオラの形成、機能に関する報告は飛躍的に増加した。カベオリン-1には、全長178アミノ酸からなる $\alpha$ と、N末の31アミノ酸が欠失している $\beta$ の2つのアイソフォームが存在する。これらは転写開始点の異なる2つのmRNAから翻訳されることが示されている<sup>15)</sup>。カベオリン-1は、膜タンパク質であり、中央よりややC末側の33アミノ酸からなる疎水性領域が細胞膜内でヘアピンループを作って、N末、C末共に細胞質側に存在している<sup>7)</sup>。カベオリン-1はscaffolding domainを介してオリゴマーを形成する<sup>20)</sup>と同時に、そのC末はパルミトイル化を受け細胞膜にアンカーしている<sup>5)</sup>。カベオリン-1を発現していないリンパ球にカベオリン-1を強制発現させると、カベオラが形成されたことから、カベオリン-1はカベオラ形成能を持つことがわかった<sup>9)</sup>。また、カベオリン-1の $\alpha$ 、 $\beta$ の存在比や、カベオリン-1のチロシンリン酸化修飾によって、カベオラの形態が異なることも報告されている<sup>11, 23)</sup>。現在までに3つの独立した遺伝子でコードされるカベオリン-1、-2、-3が同定されている。カベオリン-2はカベオリン-1と同じ細胞、組織で共発現している<sup>36, 37)</sup>のに対し、カベオリン-3は主に骨格筋、心筋細胞に発現している<sup>42)</sup>。

カベオリン-1はカベオラ形成能の機能以外にも様々な機能を持つ。カベオラはラフトと同様に膜コレステロールに依存する膜ドメインである<sup>34)</sup>が、これはカベオリン-1がコレステロールと直接結合する性質を持つことに由来する<sup>22)</sup>。また、カベオリン-1は様々なシグナル伝達分子と結合し、主にその活性を抑制する方向で調節している<sup>1, 17, 28)</sup>。カベオリン-1のノックアウトマウスは一見正常に発育するも

の、各種細胞のカベオラは消失し、血管の異常や未分化内皮細胞の異常増殖などが認められている<sup>6)</sup>。

## 2. カベオラエンドサイトーシス

カベオラが発見されて50年近く経過した現在でも、カベオラがエンドサイトーシスを行うかどうかに関しては、議論がなされている。しかし、ガングリオシドGM1をレセプターとするcholera toxin binding subunit (CTB)を細胞に結合させると、CTBは細胞膜上においてカベオラに検出され、さらに培養を続けるとエンドソームで検出されることが報告されている<sup>21, 27)</sup>。シリカコートされた内皮細胞の細胞膜からGTP-依存的にカベオラがbuddingすること<sup>38)</sup>、ダイナミンがカベオラのネック部分に局在し、カベオラbuddingを制御していることが報告されている<sup>12, 25)</sup>。カベオリン-1ノックアウトマウスの内皮細胞に対して、細胞を横断するトランスサイトーシスの有無をBSAを用いて検討した結果、BSAの輸送は抑制されることがわかった<sup>33, 39)</sup>。以上のことから、カベオラは、エンドサイトーシスを行う膜ドメインであると考えて良いだろう。

エンドサイトーシス経路として、最も研究の進んでいるのは、クラスリン被覆ピットによるエンドサイトーシスである。これに対し、カベオラエンドサイトーシスの詳細は、その姿がやっと見え始めたところである。CTBのエンドサイトーシス等、まだまだ混沌としている<sup>14)</sup>ことも多いが、現在までにわかっているカベオラエンドサイトーシスの特徴を、クラスリン被覆ピットと対比しながら挙げてみたい。ちなみに、カベオラエンドサイトーシスの詳細が明らかになってきたのは、後述するSV40の細胞内侵入機構の解析<sup>29-31)</sup>によるところが大きい。

カベオラエンドサイトーシスとクラスリン被覆ピットエンドサイトーシスの特徴を簡単に比較したものを表1に示す。クラスリン被覆ピットはクラスリンから形成されるサ

サッカーボール状の網目構造を細胞質側に持つのに対し、カベオラ膜の細胞質側は、カベオリン-1によって形成されるひも状構造体 (caveolae filamentous coat) により、まるでコマにひもを巻くように巻かれている形態をとる<sup>8,34)</sup>。ピットの大きさはクラスリン被覆ピットが約 100-200 nm に対し、カベオラは 50-80 nm と小さい<sup>34)</sup>。クラスリン被覆ピットと同様に、カベオラも、細胞膜から budding するには GTP アーゼであるダイナミンが neck 部分にリクルートされる必要がある<sup>12, 25)</sup>。このダイナミンの作用は抗ダイナミン抗体をマイクロインジェクションすることにより、抑制される<sup>12)</sup>。また、ダイナミン-1 のドミナントネガティブフォームである DynK44A は、内在性のダイナミン-1、2 の機能をともに抑制し、クラスリン被覆ピットとカベオラのエンドサイトーシスを両方とも抑制する<sup>3, 25)</sup>。また、クラスリン被覆ピットエンドサイトーシスは Eps15 のドミナントネガティブ分子 Eps15 (E $\Delta$ 95/295) により<sup>2)</sup>、カベオラエンドサイトーシスはカベオリン-1 のドミナントネガティブ分子 DGV-cav により抑制される<sup>35)</sup>。細胞膜から budding したクラスリン被覆ピットは初期エンドソームへ移動するのに対し、カベオラは初期エンドソーム、もしくはカベオソームへ移動する<sup>29, 30)</sup>。これまでに両エンドサイトーシスを示すためのポジティブコントロール実験として用いられてきたリガンドは、クラスリン被覆ピットエンドサイトーシスにはトランスフェリン、カベオラエンドサイトーシスには CTB が挙げられる。しかし、CTB に関しては、カベ

オラ以外の膜ドメインから細胞内に取り込まれる報告も存在し<sup>14, 26, 43)</sup>、その扱いには注意を要する。

### 3. SV40 の細胞内侵入

SV40 は小型の非エンベロープウイルスで、その大きさはちょうどカベオラ内腔にスッポリ入り込む大きさである。SV40 が細胞膜上の非コート陥凹構造から細胞内へ侵入することが報告され<sup>13)</sup>、後にその構造がカベオラであることが免疫電顕法により証明された<sup>41)</sup>。SV40 は細胞膜上を移動し、カベオラに捕捉され、カベオラエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた後、小胞体へ移動することが明らかにされた<sup>41)</sup>。しかし、当時の研究手法は、ウイルス吸着細胞を経時的に固定し、電顕解析を行うという解析方法であったため、個々のウイルス粒子の動態を連続して追跡することが出来なかった。その後、蛍光リアルタイムイメージング手法の発展と共に、この手法を用いて SV40 の侵入がリアルタイムイメージング解析され、カベオラから小胞体への SV40 侵入経路の詳細が明らかになった<sup>29, 30)</sup> (図 2)。

SV40 は細胞膜上のレセプター分子に結合後、細胞膜上を移動し、やがてカベオラに捕捉される。この過程において、SV40 が既存のカベオラまで移動するのか、SV40 結合部位へカベオラ小胞 (正確にはカベオリン-1 を含む小胞と言うべき) がリクルートされ、結果としてカベオラに捕捉されるのかという問題が存在する。SV40 の取り込みに関

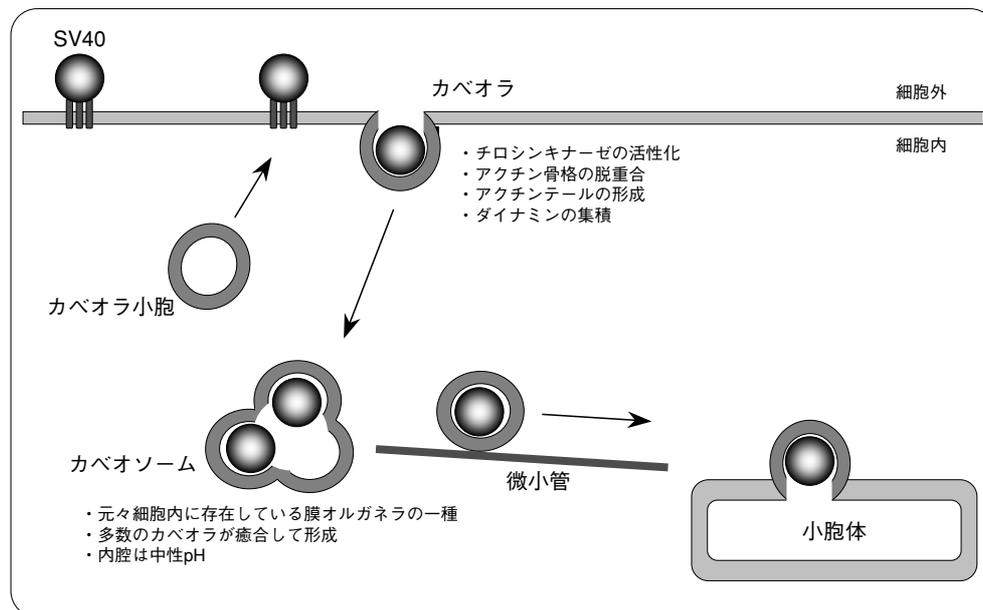


図 2 SV40 の細胞内侵入過程の模式図.

SV40 結合部位へカベオラ小胞、またはカベオリン-1 がリクルートされ、SV40 はカベオラ内腔へ取り込まれる。SV40 を取り込んだカベオラ周辺では、チロシンキナーゼの活性化、アクチン骨格の脱重合、アクチンテールの形成、ダイナミンの集積が起これ、カベオラは細胞膜から budding する。次に SV40 -カベオラ小胞はカベオソームと癒合する。カベオソーム内の SV40 は、膜小胞に取り込まれて budding し、微小管に沿って小胞体へと移動する。

しては、後者であると考えられている<sup>31)</sup>。SV40がカベオラ内腔へ入ると、ある種のシグナル伝達系が惹起され、カベオラ周辺におけるチロシンキナーゼの活性化が起こり、膜直下のアクチンフィラメントの脱重合が誘導される<sup>30)</sup>。単量体となったアクチンは、SV40の入ったカベオラヘリクルートされ‘アクチンテール’を形成する<sup>30)</sup>。同時に、カベオラ開口部へのダイナミンの集積が起こり、カベオラは細胞膜から budding しカベオラ小胞となる<sup>29,30)</sup>。アクチンテールとは、カベオラに短いアクチンフィラメントが附着し、あたかも尻尾のように見える構造体のことである。

次に、SV40を内包したカベオラ小胞は、これまでのエンドソームとは異なるコンパートメント(カベオソームと命名)へ輸送される<sup>29)</sup>。カベオソームとは、初期エンドソームマーカーであるEEA1や、トランスフェリンが存在しない膜オルガネラであり、その内腔は中性pHを示す<sup>29)</sup>。このオルガネラは、多数のカベオラ小胞が癒合して形成されたもので、SV40感染とは関係なく元々細胞内に存在しているオルガネラであることが判明した<sup>29)</sup>。そして、カベオソームからSV40を抱えた膜小胞が budding し、微小管に沿って小胞体へ輸送され、やがてウイルスゲノムは核内へ移行すると考えられている<sup>29,30)</sup>。

#### 4. HCoV-229E の細胞内侵入

コロナウイルスは直径約100-120 nmのエンベロープ

イルスである。ヒトコロナウイルス(HCoV)には、重症急性呼吸器症候群を引き起こすSARSウイルスをはじめ、風邪の原因ウイルスであるHCoV-229EやHCoV-OC43などが知られている。そもそも筆者は、細胞膜ドメインとしてのラフト、カベオラの構造・機能を研究対象としていた。その一環として、ヒト線維芽細胞の界面活性剤不溶性浮遊画分を採材し、構成分子をスクリーニングしたところ、アミノペプチダーゼN(CD13)がラフトの主要構成成分であることを見出した<sup>24)</sup>。これまでに、生細胞においてGPI結合型タンパク質等、ラフト分子といわれる分子を、抗体またはリガンドで架橋するとカベオラへ移動することが報告されていた<sup>10,19)</sup>。そこで、架橋操作によるCD13のカベオラへの移動能を検討した結果、抗体にて架橋されたCD13はカベオラへ集まることが判明した<sup>24)</sup>。このCD13のカベオラへの移動現象に対する生理的・病理的意味を考察するに際し、筆者らは、CD13はHCoV-229Eのレセプター分子である<sup>45)</sup>ことに注目した。つまり、HCoV-229Eは抗CD13抗体と同様に、CD13を架橋することで、結果的に細胞膜上をカベオラへ運ばれるのではないかとの作業仮説を立てた。

これを検証するため、氷上にて細胞にウイルスを結合させ、37℃で3時間インキュベーションしたところ、ウイルスはカベオリン-1と一致する局在を示した(図3)。この局在変化を電子顕微鏡観察により検証したところ、37℃、3時間インキュベーション後の細胞では、カベオラ開口部の

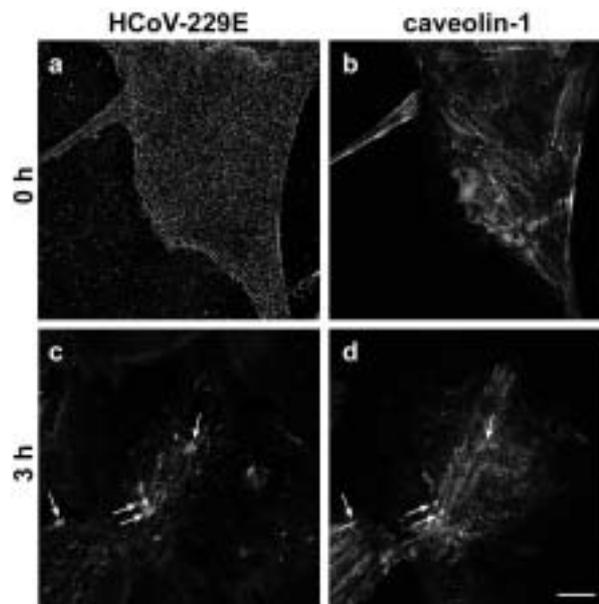


図3 HCoV-229Eの局在変化を捉えた蛍光顕微鏡像。

氷上にて培養線維芽細胞にHCoV-229Eを結合させ、37℃で0(a,b)、3(c,d)時間インキュベーション。固定後、抗HCoV-229E抗体(a,c)と抗カベオリン-1抗体(b,d)で二重染色を行った。37℃、3時間インキュベーションすると、ウイルスはカベオリン-1と一致する局在を示した(矢印)。Bar=20 μm。

真上に局在するウイルスが多数認められ、その割合は全体のウイルスの約3割を占めるに至った。つまり、HCoV-229Eは細胞表面に結合後、細胞膜上をカベオラまで移動することが明らかとなった<sup>24)</sup>。また、このカベオラへの移動は膜コレステロール量に依存することも判明した<sup>24)</sup>。次に、(1) 膜コレステロール枯渇処理細胞におけるウイルスの細胞内侵入量、(2) カベオリン-1をノックダウンして、カベオラ形成を抑制した細胞におけるウイルス感染効率を定量した結果、どちらにおいても、ウイルス侵入量は抑制されることが判明した。以上の結果から、エンベロープウイルスであるHCoV-229Eも、カベオラから細胞内へ侵入することが明らかとなった<sup>24)</sup>。

### 5. 固定標本による解析とリアルタイムイメージング解析

筆者らが捉えたHCoV-229Eのカベオラからの細胞内侵入は、大まかに言えば、ウイルスを吸着させた細胞を37℃でインキュベーションし、経時的に固定した感染細胞に対して光学顕微鏡的、電子顕微鏡的解析を行った結果得られたものである。このような固定標本を用いた解析方法は、特に電子顕微鏡に代表されるように、超微細局在、微細構造を解析するには非常に威力を発揮する解析方法である。

しかし、この方法は、ウイルスが細胞膜上を移動し、細胞内へ入る過程を、個々のウイルス粒子に対して連続して追跡することができない側面を持っている。例えば、図3のような蛍光像は、特定の局在を示す既存のカベオラクラスターに、散在していたウイルスがあたかも移動したかのような印象を与える。しかし、散在していたウイルスがクラスターを形成し、その部位にカベオラ小胞が集まる可能性も否定できない(図4A)。また、カベオラ以外の侵入経路の有無と、その割合はどのくらいか?と言った疑問に答えることも難しい(図4B)。これらの疑問に答えるためには、個々のウイルス動態を連続的に追跡することが必要になる。リアルタイムイメージングにより、ウイルスは既存のカベオラへ移動するのか、それともカベオラがウイルスを「迎えに」来るのか、と言った問題を解決することが可能になると考えられる。また、カベオラとそれ以外の侵入経路の比率も形態学的に定量することが可能になると言える。

ウイルス侵入機構を解析するにあたり、リアルタイムイメージング解析手法、固定標本による電子顕微鏡解析手法を組み合わせることで解析することにより、HCoV-229Eの細胞内侵入時における超微細構造(図4C)の詳細を明らかにできると考えている。

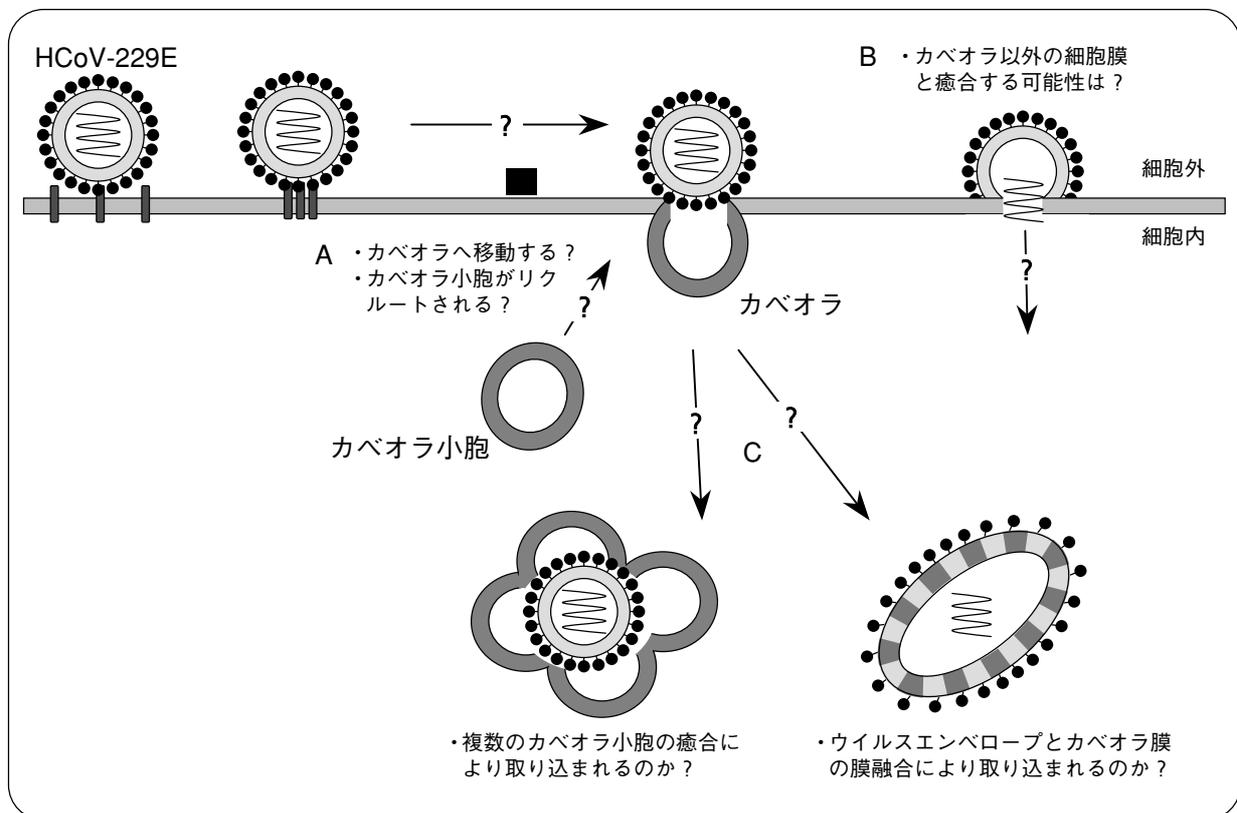


図4 カベオラから細胞内に侵入することが明らかとなったHCoV-229Eの侵入経路における今後の課題。

- (A) ウイルスが既存のカベオラまで移動するのか、カベオラ小胞がウイルス結合部位にリクルートされるのかといった課題。  
 (B) ウイルスはカベオラ以外の膜経路で細胞内へ侵入する可能性についての検討。  
 (C) ウイルスがカベオラから取り込まれる際のカベオラ膜(小胞)の詳細な形態とウイルスエンベロープの膜癒合部位の同定。

## 6. おわりに

最近, SV40 の侵入にカベオラ, カベオソームが利用されることを報告したグループから, SV40 はカベオラ経路以外に, ラフト介在経路のエンドサイトーシスで細胞内に侵入することが報告された<sup>4)</sup>. いろいろな可能性を考え合わせると, ウイルスの侵入経路は1つだけではなく, 細胞の状況によって侵入経路は変化するのかもしれない. リアルタイムイメージング手法を用いた個々のウイルス粒子の動態解析と, 固定標本を用いた電顕解析を行うことで, より本来のウイルス侵入機構を明らかにできるのではないだろうか.

## 文 献

- 1) Anderson RGW.: The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* 67: 199-225, 1998.
- 2) Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A.: Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci*, 112 (Pt 9) : 1303-1311, 1999.
- 3) Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL.: Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*, 127: 915-934, 1994.
- 4) Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A.: Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*, 168: 477-488, 2005.
- 5) Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM.: Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem*, 270: 6838-6842, 1995.
- 6) Drab M, Verkade P, Elger M, Kasperx M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft F C, Schedl A, Haller H, Kurzchalia T V.: Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293: 2449-2452, 2001.
- 7) Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K.: Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J*, 12: 1597-1605, 1993.
- 8) Fernandez I, Ying Y, Albanesi J, Anderson RGW.: Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11193-11198, 2002.
- 9) Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG.: De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21- caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8655-8659, 1995.
- 10) Fujimoto T.: GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking. *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 929-941, 1996.
- 11) Fujimoto T, Kogo, H, Nomura R, Une T.: Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci*, 113 Pt 19: 3509-3517., 2000.
- 12) Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA.: Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol*, 141: 85-99, 1998.
- 13) Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A.: Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 109: 2721-2729., 1989.
- 14) Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia T V, Sharma DK, Pagano RE, Hancock JF, Mayor S, Parton RG.: Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol*, 168: 465-476, 2005.
- 15) Kogo H, Fujimoto T.: Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett*, 465: 119-123, 2000.
- 16) Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons, K.: VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi- network-derived transport vesicles. *J Cell Biol*, 118: 1003-1014, 1992.
- 17) Kurzchalia TV, Parton RG.: Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 424-431, 1999.
- 18) Marjomaki V, Pietiainen V, Matilainen H, Upla P, Ivaska J, Nissinen L, Reunanen H, Huttunen P, Hyypia T, Heino J.: Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J Virol*, 76: 1856-1865, 2002.
- 19) Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR.: Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science*, 264: 1948-1951, 1994.
- 20) Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV.: VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*, 6: 911-927, 1995.
- 21) Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L.: Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature*, 296: 651-653, 1982.
- 22) Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K.: VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92: 10339-10343., 1995.
- 23) Nomura R, Fujimoto T.: Tyrosine-phosphorylated caveolin-1: immunolocalization and molecular characterization. *Mol Biol Cell*, 10: 975-986, 1999.
- 24) Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T.: Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol*, 78: 8701-8708, 2004.
- 25) Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE.: Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol*, 141: 101-114, 1998.
- 26) Orlandi PA, Fishman PH.: Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*, 141: 905-915, 1998.
- 27) Parton RG.: Ultrastructural localization of ganglio-

- sides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem*, 42: 155-166, 1994.
- 28) Parton RG.: Cell biology. Life without caveolae. *Science*, 293: 2404-2405, 2001.
  - 29) Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A.: Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.*, 3: 473-483., 2001.
  - 30) Pelkmans L, Puntener D, Helenius A.: Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 296: 535-539, 2002.
  - 31) Pelkmans L, Helenius A.: Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 414-422, 2003.
  - 32) Pietiainen V, Marjomaki V, Upla P, Pelkmans L, Helenius A, Hyypia T.: Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell*, 15: 4911-4925, 2004.
  - 33) Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li, M, Pestell RG, Di Vizio, D, Hou H, Jr, Kneitz B, Lagaud, G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti, M. P.: Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 276: 38121-38138, 2001.
  - 34) Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW.: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68: 673-682., 1992.
  - 35) Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG.: Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol*, 1: 98-105, 1999
  - 36) Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP.: Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 131-135, 1996.
  - 37) Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP.: Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*, 272: 29337-29346, 1997.
  - 38) Schnitzer JE, Oh P, McIntosh DP.: Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science*, 274: 239-242, 1996.
  - 39) Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP.: Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem*, 276: 48619-48622, 2001.
  - 40) Singer SJ, Nicolson GL.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731, 1972.
  - 41) Stang E, Kartenbeck J, Parton RG.: Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell*, 8: 47-57, 1997.
  - 42) Way M, Parton RG.: M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.*, 376: 108-112, 1995.
  - 43) Wolf AA, Jobling MG, Wimer-Mackin S, Ferguson-Maltzman M, Madara JL, Holmes RK, Lencer WI.: Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J Cell Biol*, 141: 917-927, 1998.
  - 44) Yamada E.: The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 445-458, 1955.
  - 45) Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV.: Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 357: 420-422., 1992.

## **Caveolar endocytosis and virus entry**

**Ryuji Nomura**

Department of Anatomy I, Fujita Health University School of Medicine

Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

E-mail : rnomura@fujita-hu.ac.jp

The endocytic function of caveolae has been controversial for a long time. However, a real-time-imaging analysis of Simian virus 40 (SV40) 's entry in cells has indicated the existence of caveolar endocytosis during virus entry. The caveolae engulfed SV40 virions begin budding from plasma membrane depending on dynamin. SV40 enclosed in caveolae vesicles move to the caveosome, then to the endoplasmic reticulum. In addition, it was demonstrated that human coronavirus-229E enters the cell through caveolae. This review examines the involvement of caveolae in endocytosis used by the viral entry system.