

4. コロナウイルスの細胞侵入機構

田口 文広^{1,2)}, 松山 州徳²⁾

1) 日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医感染症学教室

2) 国立感染症研究所ウイルス第3部第4室

エンベロープウイルスは、エンベロープと細胞膜の融合により細胞内に侵入する。コロナウイルス (CoV) ではスパイク(S)蛋白がその機能を担う。本稿では、2種類のCoV, マウスCoV (マウス肝炎ウイルス, MHV) と重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV) の細胞侵入機構について概説する。感染細胞に細胞融合を誘導するMHV株は受容体結合によりS蛋白が構造変化し、エンベロープと原形質膜の融合により細胞表面から侵入するが、感染細胞融合能のないSARS-CoV及びMHV-2株はエンドゾームに輸送され、その酸性環境下でプロテアーゼによりS蛋白融合能が活性化されエンドゾーム膜との融合により侵入することが明らかとなった。また、細胞表面の受容体に結合したこれらのウイルスは、幾つかのプロテアーゼにより活性化され、直接細胞表面から侵入することが示唆され、SARS-CoVではエンドゾーム経由侵入より効率が高く、感染動物の肺での高いウイルス増殖の原因となる可能性が示唆された。また、MHV-JHM株は受容体非発現細胞にも感染することが明らかになり、その機構はJHMVの高神経病原性と関連すると思われた。

はじめに：

コロナウイルスにはヒト、家畜、実験動物など様々な動物に感染する多くのウイルスが知られている。その中で、マウス肝炎ウイルス (MHV) と重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルス (SARS-CoV) については受容体が同定され、ウイルス-受容体の相互作用やウイルスの細胞内侵入機構について詳細な解析がなされている。これまでの研究から、これらのコロナウイルスは幾つかの異なる様式で細胞内に侵入することが分かってきた。本稿では、その細胞侵入機構について概説し、細胞侵入機構のウイルスの病原性発現への関与について紹介する。

コロナウイルススパイク (S) 蛋白：

コロナウイルスは粒子表面に他のウイルスとは異なる“王冠 (コロナ) 様”突起 (スパイク) を持つウイルス群として命名された¹⁾。スパイクは最外部が大きく膨らんでいる形状をなし、下部の棒状部位で粒子のエンベロープに埋め込まれている。スパイクは3分子のS蛋白から成り、S蛋白は標的細胞表面にある受容体結合及びそれに引き続く細胞侵入に中心的な役割を果たしている。S蛋白は分子量約180kDaのクラスIのfusion蛋白 (糖蛋白) である。多くのMHV株のS蛋白は、分子中程の塩基性アミノ酸部位が細胞由来の蛋白分解酵素フリニンに認識、解裂され、N末端S1とC末端側のエンベロープに結合するS2サブユニットになる。スパイク最外部の膨らんだ部分はS1が、棒状部分はS2が構成すると考えられている。S1のN末端330個からなる領域 (S1N330) は受容体結合部位であり、特にMHV株間で保存されている2か所が受容体結合に重要である^{2,3)}。S1N330の下流にはMHV株間で最も大きく相違する領域があり、超可変部位と呼ばれている⁴⁾。MHVの膜貫通性サブユニットS2は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やインフルエンザウイルス (IFV) など他のウイルスの膜貫通性サブユニットと構造的に類似性が高く、分子内には α -ヘリックス構造の2種類のheptad repeat (HR)

連絡先

田口文広
〒180-8602
東京都武蔵野市境南町1-7-1
日本獣医生命科学大学
TEL : 0422-31-4151 (328内)
FAX : 0422-33-2094
E-mail : ftaguchi@nvl.u.ac.jp

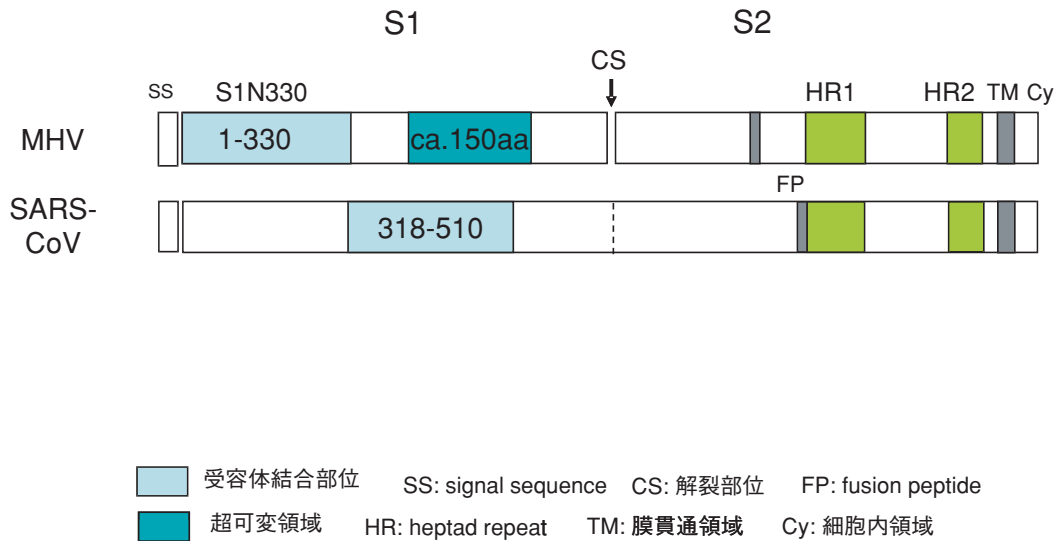


図1 コロナウイルス S 蛋白の比較

MHV の S 蛋白は細胞由来蛋白分解酵素により N 末端側 S1 と C 末端側膜結合性の S2 に解裂されるが、SARS-CoV 粒子に存在する S 蛋白は解裂していない。また、S1 領域の受容体結合部位は MHV では S1 N 末端 330 個アミノ酸領域に存在し、SARS-CoV では S1 相当部位の中程に位置している。S2 にはいずれのウイルスにも HR1、HR2 と FP が存在し、構造的、機能的類似性は高い。

及び疎水性アミノ酸領域からなる fusion peptide (FP) が存在する (図 1)。HIV gp41 や IFV HA2 では、N 末端の疎水性アミノ酸領域が FP として同定されているが、MHV の FP は S2 分子内部に存在し、その部位は明らかではない。S2 は膜貫通領域でエンベロープと結合し、その下流 C 末端の 20-30 個からなる細胞内領域は他のウイルス構造蛋白である膜蛋白 M との相互作用に関与する⁵⁾。

一方、SARS-CoV の S 蛋白も MHV 同様の大きな糖蛋白であるが、細胞内でもウイルス粒子上でも解裂型 S 蛋白は検出されていない^{5,6)} (図 1)。この非解裂性はヒトコロナウイルス HCoV-229E や猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 等と同じ性状であり、また、MHV の中でも、MHV-2 株は SARS-CoV と同様非解裂性の S 蛋白を持つ。これらのウイルスは、一般的な MHV と同様の塩基性アミノ酸からなる領域も存在するが、領域内の塩基性残基数が少なく、非解裂性となると考えられる。塩基性アミノ酸に富む領域を持つ組み換え変異 SARS-S 蛋白は、細胞内で解裂を受け、細胞融合活性を示すことが報告されている⁷⁾。SARS-CoV S 蛋白上の受容体結合部位は、MHV と異なり S 蛋白 N 末端ではなく、S1 に相当する部位の中程 (S 蛋白 N 末端から 318 から 510 番目のアミノ酸) にあり、その中で 424-494 番アミノ酸が受容体との結合に直接関与する^{8,9)}。229E や FIPV も S 蛋白 N 末端部位ではなく、むしろ SARS-CoV S 蛋白と同様、S1 内部に受容体結合部位を持っている。S2 相当部位の基本的な構造は MHV S2 や他のクラス I fusion 蛋白と同様で、2 個の HR と FP が存在し、FP は HR1 の上

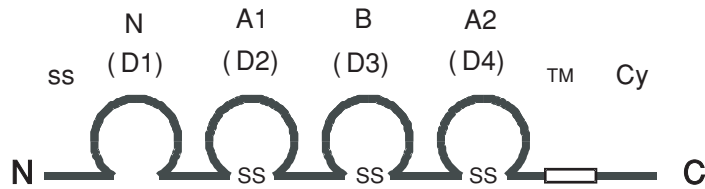
流に位置していて、膜融合に関与すると考えられる (図 1)。

コロナウイルス受容体：

コロナウイルスの受容体として最初に報告されたのは MHV 受容体である。MHV 受容体の CEACAM1 (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する蛋白である¹⁰⁾。4 個 (N 末端から N, A1, B, A2) 又は 2 個 (N 及び A2) の細胞外ドメイン、その下流の膜貫通領域 (TM) と長さの異なる 2 種類の細胞内領域 (Cy) を持ち、細胞外ドメイン数、Cy の長さの組み合わせで、4 種類の splice variants が報告されている¹¹⁾ (図 2)。また最近、TM を欠損する可溶性 CEACAM1 も存在することが報告された¹²⁾。CEACAM1 には 2 種類の allelic form があり、MHV 感受性マウスは CEACAM1a、MHV 抵抗性 (感受性の低い) SJL マウスは CEACAM1b を持っている。1b は 1a に比べて受容体活性が 10-100 倍低く、そのため感受性が低いのではないかと推測されている^{13,14)}。CEACAM1 の受容体活性は N ドメインに存在し、N 単独でウイルス結合活性、ウイルス中和活性、S 蛋白の構造変化誘導活性を持つが、N ドメイン単独で細胞表面に発現された N + TM + Cy 蛋白は受容体活性を示さない¹⁵⁾。

SARS-CoV の受容体は、angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) である¹⁶⁾。ACE2 はカルボキシペプチダーゼ活性を持つタイプ I の膜内在性蛋白であり、分子量約 110 kDa の糖蛋白で様々な組織で発現されている¹⁷⁾。その主な機能

MHVR :CEACAM1



MHVR1:CEACAN1

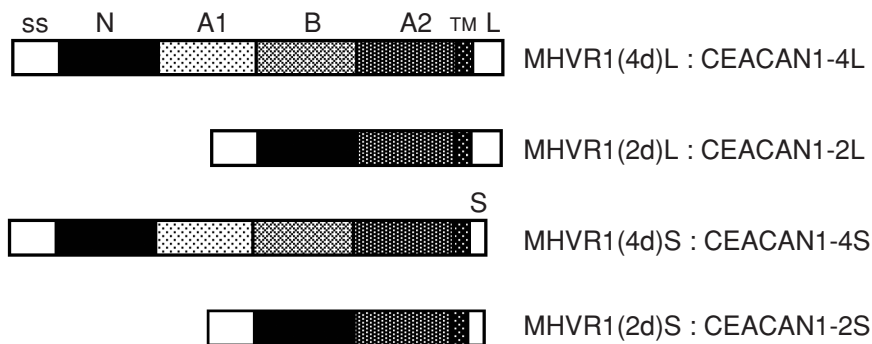


図 2 MHV 受容体の 4 種類の splice variants

MHV の受容体 CEACAM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する蛋白であり、4 個 (N 末端から N, A1, B, A2) 又は 2 個 (N 及び A2) の細胞外ドメイン、その下流の膜貫通領域 (TM) と長さの異なる 2 種類の細胞内領域 (Cy) を持ち、細胞外ドメイン数, Cy の長さの組み合わせで、4 種類の splice variants が存在する. ss=signal sequence.

は angiotensin (AT) I の AT1-9 への変換である. AT1-9 は更に ACE により AT1-7 に変換され、血管拡張機能を獲得する. ACE2 の酵素活性は SARS-CoV の受容体活性には必要ない. ACE2 の S 蛋白結合部位は、細胞膜から最外部に位置し、酵素活性部位に隣接するところに存在すると報告されている^{9,18)}.

コロナウイルスの細胞侵入経路:

一般的に、ウイルス侵入経路に関しては、次のように考えられている. 培養細胞に感染し融合を引き起こすエンベロープウイルスは、細胞膜-細胞膜融合活性を示すことから、エンベロープ-細胞膜融合も誘導し、細胞表面から侵入する. 一方、感染細胞に融合を引き起こさないウイルス (例えば IFV 等) は、感染細胞を酸性溶液で処理することにより細胞融合が誘導されることから、感染後細胞内エンドゾームに輸送されエンドゾーム内の酸性環境下で膜融合が起こり、細胞内へと侵入すると考えられている¹⁹⁾. 神経親和性株 MHV - JHM 株感染細胞では細胞融合が観察されるが、非解裂性 S 蛋白を持つ MHV-2 感染細胞には細胞融合が見られない. JHM の感染は、bafilomycin や NH₄Cl の

ような endosome/lysosome 内環境の酸化阻害剤の影響を受けないことから、JHM の細胞への侵入は endosome を經由することなく直接細胞膜から侵入することが示唆されている²⁰⁾. MHV-JHM 株の持続感染細胞から分離された変異株 OBLV60 は細胞融合活性を欠くが、感染細胞を酸性溶液で処理することにより細胞融合が誘導され、また、感染は lysosome 酸化阻害剤により著しく抑えられることから、この感染様式は、IFV と酷似していて、endosome 内の酸性環境がウイルス融合活性を惹起するという endosome 経路による細胞侵入機構が考えられる²⁰⁾.

一方、SARS-CoV 感染は lysosome 酸化阻害剤の影響を受けること、更に、SARS-S 発現細胞の酸性溶液処理では細胞融合は誘導されないが、トリプシン処理することにより誘導でき、同時に S 蛋白の解裂も引き起こすという実験結果から、SARS-CoV は細胞表面の受容体 ACE2 に結合し、endosome へと輸送され、endosome 内の酸性環境下で活性を示すプロテアーゼにより S 蛋白の膜融合能が活性化され、エンベロープと endosome 膜融合が起き、ゲノムが細胞内に侵入する²¹⁾ (図 3) という細胞侵入機構が提唱された. 更に、SARS-S 蛋白の活性化には細胞内のシステインプロ

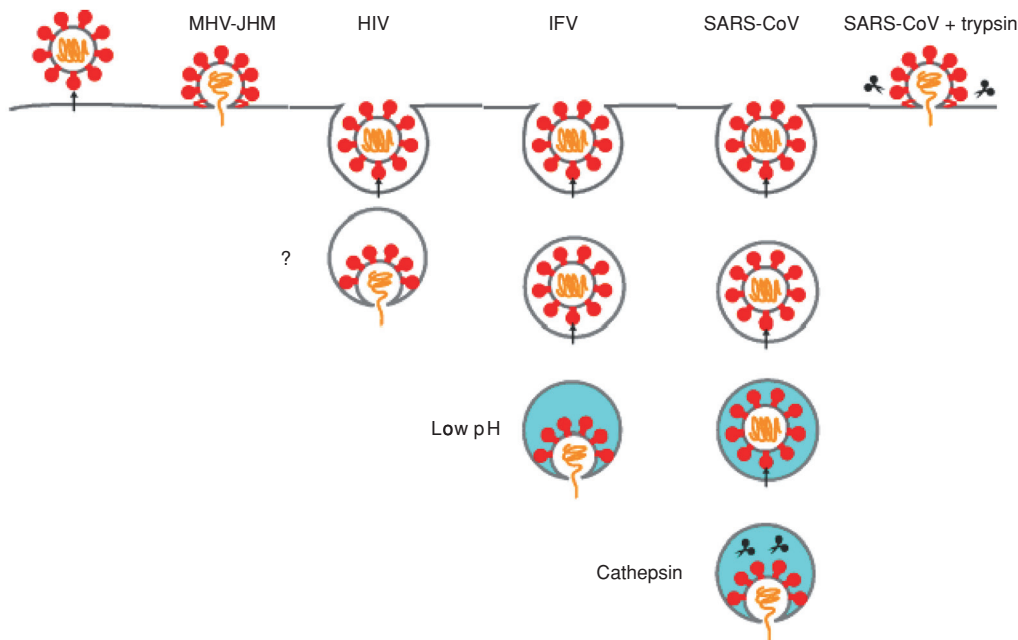


図3 様々なウイルスの細胞侵入経路

エンベロープウイルスの細胞侵入は、細胞の表面から侵入するウイルス(MHV-JHM)、初期 endosome を経由するもの(HIV)、endosome 内が酸性環境下になると侵入が成立するもの(IFV)、lysosome でさらに cathepsin により S 蛋白が活性化されて侵入が成立するウイルス(SARS-CoV)がある。SARS-CoV は細胞外のプロテアーゼにより S 蛋白が細胞表面で活性化され、細胞膜から侵入する場合もある。

テアーゼが関与することが示唆され、cathepsin L が受容体結合後の S 蛋白の膜融合能を活性化することが明らかにされた²²⁾。その後、cathepsin L が実際に SARS-CoV S 蛋白の解裂を誘導することが、精製した SARS-S 蛋白を用いて報告されている²³⁾。これらの一連の実験から、SARS-CoV では endosome 経由、cathepsin 依存性の細胞侵入機構が考えられる。一方、培養細胞での感染で細胞融合を誘導しない MHV-2 株も SARS-CoV と同様の機構により細胞内侵入を果たすことが明らかにされたが、この場合 cathepsin L と cathepsin B が S 蛋白の活性化に必要である²⁴⁾。また、HCoV-229E はカベオリン経由で細胞内に侵入することが報告されているが²⁵⁾、我々は、229E も SARS-CoV や MHV-2 と同様に、endosome に輸送され、その環境下で cathepsin L 等により S 蛋白の活性化を受け、細胞質内に侵入することを報告した²⁶⁾。このように、非解裂性 S 蛋白を持つ MHV-2、HCoV-229E の細胞内侵入機構は SARS-CoV と極めて類似していることが明らかにされた。

我々は、トリプシン以外にもエラスターゼなどのプロテアーゼが SARS-CoV 感染細胞の融合を惹起し、同時に S 蛋白の解裂も誘導することを報告した²⁷⁾。プロテアーゼによる感染細胞融合の誘導は、細胞表面の ACE2 に結合したウイルス粒子 S 蛋白がプロテアーゼ処理により活性化され、細胞膜と融合後ゲノムが直接細胞表面から細胞内侵入する

可能性を暗示している。我々は bafilomycin 処理により endosome 経路感染を遮断した細胞に SARS-CoV を吸着させ、その後トリプシンなどのプロテアーゼ処理により、ウイルスが細胞内侵入することを明らかにした。即ち、受容体結合した粒子はプロテアーゼ処理により直接細胞表面から侵入することを示唆した。これらの結果から、SARS-CoV はプロテアーゼの有無により異なる経路から細胞に侵入でき、S 蛋白の解裂誘導能のあるプロテアーゼが侵入経路決定に大きく働いていることが推測された。更に、興味ある点は、細胞表面からの感染の方が endosome 経路での感染より効率が極めて高く、プロテアーゼ存在下では SARS-CoV が迅速により高く増殖することである²⁷⁾。これらの実験結果から、プロテアーゼ存在下での SARS-CoV 増殖の亢進は、肺や腸管などの標的組織での高い増殖と強い組織障害の原因ではなかと考えられた。そこで、マウスに弱病原性呼吸器細菌を感染させエラスターゼ産生を惹起し SARS-CoV を感染させると、その感染は著しく増強され、その結果、致死的な肺炎の重症化が観察された²⁸⁾。このことは、SARS の重症化肺炎の病態発生に SARS-CoV S 蛋白の融合活性を促進するプロテアーゼが関与している可能性を強く示唆していると思われる。

上述のように MHV-JHM と他のコロナウイルス (SARS-CoV, MHV-2, HCoV229E) の間では細胞内侵入経路及び

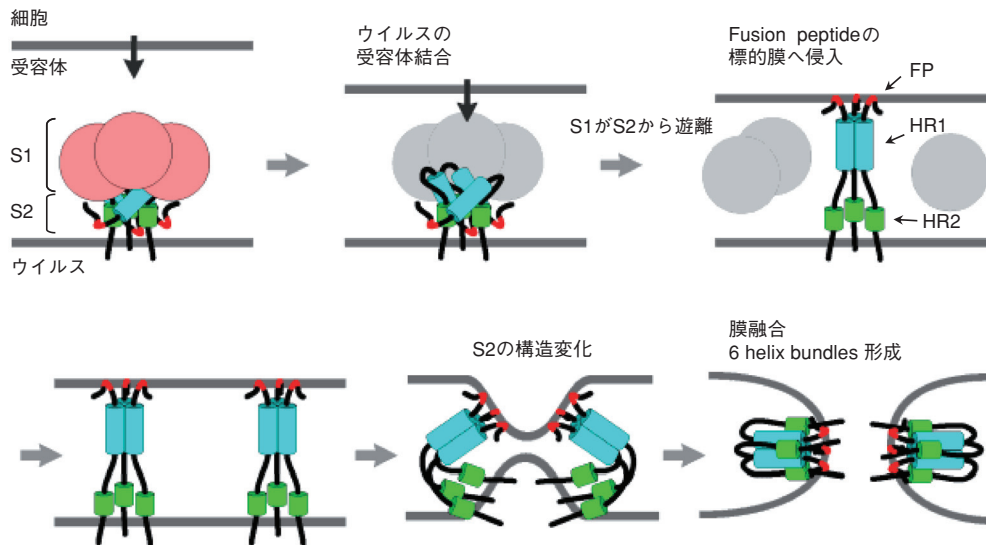


図4 コロナウイルス細胞侵入の分子機構

MHVとSARS-CoVは細胞侵入経路及びS蛋白の融合活性化機構は異なるが、活性化された膜貫通性S2による膜融合は同じメカニズムで起こると推測されている。MHVではS1が受容体に結合するとS2から遊離し、それに伴いS2に存在するFPが露出し、標的細胞膜に挿入される。その後S2の構造変化(6HBの形成)が起こり、隣接したウイルスエンベロップと細胞膜の融合に至る。SARS-CoV-S蛋白はendosome内で解裂を受け、FPがendosome膜に挿入され、エンベロップとendosome膜の融合が起こり、細胞侵入すると考えられている。

S蛋白の融合能活性化機構は異なるが、細胞膜とエンベロップの融合は同様のメカニズムによって起こると思われる(図4)。これはコロナウイルスS蛋白による特有の細胞内侵入機構というよりクラスI fusion蛋白を持つウイルスに共通していると考えられる。S1とS2の解裂したS蛋白を持つJHMの細胞侵入機構もHIVやIFVの侵入機構をモデルとして組み立てられたものである²⁹⁾(図4)。最近、HIVのエントリーに関して細胞表面から直接侵入するのではなく、endosome経路であることが報告されたが、どのような因子が必要なのかは明らかでない(30, 図3)。JHMではS1N330が細胞表面のCEACAM1-Nドメインに結合すると、S1がS2から離脱する³¹⁾。露出したS2のFPが標的細胞の細胞膜に挿入され、S2蛋白の構造変化が誘導される³²⁾。この変化は、3量体のHR1の外側に3本のHR2が覆い被さるように位置する構造(6 helix bundles, 6HB)、即ちS2分子がヘアピン構造を取ることである。6HB形成により、エンベロップと標的細胞膜が隣接し、2種類の膜間で融合が起こり、最終的にウイルスゲノムが細胞質内へと侵入する。この過程の中で6HB形成が極めて重要である。S1とS2が解裂したMHV-A59株では、HR1, HR2に相当するペプチドを用いて、両者がanti-parallel様式で結合し電子顕微鏡下では棒状構造として観察され、また、HIV感染で報告されているように、HR2ペプチドでウイルスの細胞内侵入が押さえられることなどが明らかにされて

いる³³⁾。我々は非解裂性親株SARS-S蛋白を持つpseudotypeウイルスの感染はSARS-S HR2ペプチドで阻害されないが、解裂性S蛋白を持つウイルスの細胞表面からの感染は強く阻害されることを報告した³⁴⁾。このことは、HR2ペプチドによる細胞侵入阻害はendosome経路で感染する場合には働かないことを示唆している。

これまでの報告は、S1とS2が非解裂性のSを持つSARS-CoV及びMHV-2では、侵入最終過程でのS蛋白の解裂の必要性を示している。即ち、endosome内におけるcathepsinsによるS蛋白解裂である。最近我々はMHV-2を用いて、ウイルスのレセプター結合から細胞膜との融合に至る過程で、S蛋白が膜融合活性を発揮するための一連の構造変化を解析した。MHV-2粒子上のS蛋白は可溶性受容体の結合により構造変化を開始し、fusionペプチドを標的膜に差し込む。続いて、膜融合能を活性化させるトリプシン処理により、S蛋白の解裂が起こり、解裂されたS2により6HBが形成され、ウイルスエンベロップと細胞の融合が引き起こされることが示された³⁵⁾。つまり、MHV-2のS蛋白は、受容体とプロテアーゼによって誘導される二段階の構造変化を必要とすることが明らかとなった。この現象はSARS-CoVでは証明されていないが、S蛋白の性状を考慮するとMHV-2と同様の機構でS蛋白の構造変化が起こり細胞内侵入することが予測される。

MHVの受容体 CEACAM1 非依存性感染

通常 MHV は受容体 CEACAM1 発現細胞に感染し、感染は CEACAM1 発現細胞へと広がっていくが、MHV-JHM 株は CEACAM1 発現細胞に感染した後、CEACAM1 を持たない細胞へと感染拡大することが、Gallagher らによって報告された（受容体非依存性感染）³⁶⁾。JHM 由来の変異株（soluble-receptor resistant）srr7 はこの活性を欠き、S2 に点変異（1114: Leu → Phe）を持っている³¹⁾。JHM-S 蛋白を CEACAM1 非発現 BHK 細胞で発現すると細胞融合が観察され、srr7S 蛋白は融合活性を示さないことから、この活性は S 蛋白によること、1114 番のアミノ酸が関与することが明らかにされた³⁷⁾。JHM S1 は受容体結合がなくても S2 から遊離し、また受容体に結合することなく S2 の構造変化が誘導されること、また srr7 はこの様な性状を欠くこと^{31, 32)} から、受容体非依存性のメカニズムについて、次の様に推測される。JHM 株 S1 は受容体結合がなくても S2 から遊離し、その結果 S2 の構造変化が誘導され膜融合が起きるといふ機構である。この仮説では、S2 が構造変化を起こしている瞬間には、S2 は標的細胞膜の近傍に存在することが重要である。近傍に存在すれば、S2 の FP が標的細胞膜に挿入され、その後引き起こされる構造変化により、エンベロープと細胞膜の融合が起こるが、標的細胞と接していない場合は、S2 の構造変化は起こるもののエンベロープ-細胞膜の融合は起こらない。このことを検証するために、JHM 株を受容体非発現細胞へ spinoculation（培養細胞と接種ウイルスを共に 3000rpm で 2 時間遠心する）したところ、受容体非発現細胞への高い感染が認められ、提唱された仮説と矛盾しないことが明らかとなった³⁸⁾。S2 の構造変化は非可逆的反應で、FP が細胞膜に結合していない場合にも進行し、一旦構造変化した S2 は融合活性を示すことはないと考えられる³²⁾。JHM の S 蛋白は、受容体に結合しなくても自然に活性化され、近くに存在する受容体非発現細胞への侵入の機会を狙っているような性質を持っている。

JHM は極めて神経病原性が高く 10 PFU 以下の脳内接種でマウスは感染後 2-3 日で死亡するが、srr7 は 1000 PFU 以上が必要で、マウスは 8 日以上生残する。また、JHM 感染マウス脳内では、neuron, astrocyte, microglia など多種類の細胞に感染するが、受容体となる CEACAM1 を発現している細胞は microglia のみである³⁹⁾。マウス脳由来細胞の混合培養で JHM は microglia に感染し、その後 neuron, astrocytes, oligodendrocytes 等に感染が拡大するが、srr7 の感染は microglia に留まっている。即ち、脳由来混合細胞培養でも受容体非依存性感染が観察されている³⁹⁾。JHM の脳内での多種類の細胞での増殖と高い神経病原性は、この受容体非依存性感染の可能性が示唆されている^{39, 40)}。JHM 株は、MHV 感受性培養細胞が発見されるまではマウス脳から脳へと継代が繰り返されてきた。受容体発現細胞

が限局されているような脳は、MHV 感受性が低いと考えられるが、JHM はその様な組織で生き延びるための手段を得たような変異株ではないだろうか。

おわりに：

本稿ではコロナウイルスの幾つかの異なる細胞侵入経路/侵入機構について、MHV と SARS-CoV により得られた知見を紹介した。非解裂性 S 蛋白を持つ MHV-2 やヒトコロナウイルス 229E も SARS-CoV と同様の細胞侵入機構、即ちエンドゾーム経路でプロテアーゼ依存性を示すことが明らかになってきたが、SARS-CoV と MHV-2 の間では、活性化されるプロテアーゼや活性化過程に違いがあることも示唆されている。プロテアーゼ依存性でエンドゾーム経路の感染機構は、エボラウイルス感染で最初報告されたが、コロナウイルスでは、受容体に関する研究が進んでいるため、可溶性受容体などを用いた詳細な細胞侵入の分子機構の解析が可能である。また、プロテアーゼは本来の感染経路ではなく、別の経路からの感染を可能にすることができ、感染増強作用があることも、ウイルスの病原性発現を考える上で貴重な知見となっている。今後、ウイルスと受容体の相互作用、細胞侵入機構の更に詳細な分子機構の解析が期待される。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なコメントを下さいました池田秀利博士（日本獣医生命科学大学）に深謝致します。

文献

- 1) Tyrell DA, Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mulluci L and McIntosh K. (1968) Coronaviruses. *Nature (Lond.)* 220: 650
- 2) Kubo H, Yamada YK, and Taguchi F. (1994) Localization of neutralizing epitopes and receptor-binding site within the amino terminal 330 amino acids of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 68: 5403-5410
- 3) Suzuki H, and Taguchi F. (1996) Analysis of receptor-binding site of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 70: 2632-2636.
- 4) Parker S, Gallagher TM, and Buchmeier MJ. 1989. Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* 173: 664-673
- 5) Weiss SR and Navas-Martin S. (2005) Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 635-664
- 6) 田口文広 (2003) SARS コロナウイルス, *ウイルス*, 53: 201-209, 2003
- 7) Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S and Taguchi F. (2008) Entry from cell surface of SARS coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing

- cleaved S protein. *J. Virol.* 82: 11985-11991
- 8) Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Garzan M (2003) A 193-amino-acid fragment of the SARS coronavirus s protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 279: 3197-3201
 - 9) Li W, Wong SK, Li F, Kuhn JH, Hunag IC, Choe H and Franzen M. (2006) Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronaviruses: Insight from ACE2-S-protein interaction. *J. Virol.* 80: 4211-19
 - 10) Williams RK, Jiang GA and Holmes KV. (1991) Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5533-5536.
 - 11) Taguchi F. (2005) Coronavirus receptors. Pp 821-831 in "Experimental models of multiple sclerosis" Ed: E. Lavi and C S Constantinescu. Springer
 - 12) Terahara K, Yoshida M, Taguchi F, Igarashi O, Nochi T, Gotoh Y, Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Beauchemin N, and Kiyono H. (2009) Expression of newly identified secretory CEACAM1a isoforms in the intestinal epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 340-346,
 - 13) Ohtsuka N, Yamada YK, and Taguchi F. (1996) Difference in virus-binding activity of two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. *J. Gen. Virol.* 77: 1683-1692
 - 14) Ohtsuka N, and Taguchi F. (1997) Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype. *J. Virol.* 71: 8860-8863
 - 15) Miura SH, Nakagaki K, and Taguchi F. (2004) N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein. *J. Virol.* 78: 216-223
 - 16) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TG, Choe H, and Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450-454.
 - 17) Harmer D, Gilbert M, Borman R, and Clark KL (2002) Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 532: 107-110
 - 18) Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong SK, Huang IC, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, and Farzan M (2005) receptors and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24: 1634-1643.
 - 19) White JM, Delos SE, Brecher M, and Schornberg K. (2008) Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 43(3):189-219.
 - 20) Gallagher TM, Escarmis C, and Buchmeier MJ. (1991) Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: Effect of mutations in the spike glycoprotein. *J. Virol.* 65: 1916-1928
 - 21) Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, and Bates P. (2004) Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4240-4245.
 - 22) Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp A, Reeves JD, Diamond SL and Bates P. (2005) Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11876-11881.
 - 23) Bosch JB, Bartelink W and Rottier PJM. (2008) Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J. Virol.* 82: 8887-8890
 - 24) Qiu Z, Hingley ST, Simmons G, Yu C, Sarma JD, Bates P and Weiss S. (2006) Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J. Virol.* 80: 5768-5776
 - 25) Nomura R, Kiyota A, Suzaki A, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T (2004) Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78: 8701-8708
 - 26) Kawase M, Shirato K, Matsuyama S and Taguchi F. (2009) Protease-mediated entry via endosome of human coronavirus 229E. *J. Virol.* 83: 712-721.
 - 27) Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F. (2005) Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 102: 12543-12547
 - 28) Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S and Taguchi F (2008) Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol. Immunol.* 52: 118-127
 - 29) Chen D and Kim PS. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-684
 - 30) Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. (2009) HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137:433-444.
 - 31) Saeki K, Ohtsuka N, and Taguchi F. (1997) Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. *J. Virol.* 71, 9024-9031
 - 32) Matsuyama S, and Taguchi F. (2002) Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 76: 11819-11826
 - 33) Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, and Rottier PJ. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* 77:8801-8811.
 - 34) Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F (2008) Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *J. Virol.* 82: 588-592
 - 35) Matsuyama S, and Taguchi F. (2009) Two step conformational changes mediated by receptor binding and

- proteolysis of a coronavirus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 83(21):11133-11141.
- 36) Gallagher TM, Buchmeier MJ and Perlman S. (1992) Cell receptor-independent infection by a neurotropic murine coronavirus. *Virology.* 191: 517-522
- 37) Taguchi F, and Matsuyama S. (2002) Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus. *J Virol.* 76:950-958.
- 38) Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus: analysis by spinoculation. *J. Virol.* 80: 4901-4908
- 39) Nakagaki K, Nakagaki K, and Taguchi F (2005) Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV from initially infected microglial cells in mixed neural culture. *J. Virol.* 79: 6102-6110
- 40) Miura TA, Travanty EA, Oko L, Bielefeldt-Ohmann H, Weiss SR, Beauchemin N, and Holmes KV. (2008) The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of Ceacam1a^{-/-} Mice. *J Virol.* 82:755-763.

Cell entry mechanisms of coronaviruses

Fumihiko TAGUCHI^{1,2} and Shutoku MATSUYAMA²

Laboratory of Virology and Viral Diseases,
Faculty of Veterinary Medicine,
Nippon Veterinary and Life Science University¹ and
Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases².

Enveloped viruses enter into cells via fusion of their envelope and cellular membrane. Spike (S) protein of coronavirus (CoV) is responsible for entry events. We studied the cell entry mechanisms of two different CoVs, murine coronavirus mouse hepatitis virus (MHV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). MHV-JHM that induces syncytia in infected cells entered directly from cell surface, i.e., fusion of envelope and plasma membrane, whereas SARS-CoV and MHV-2 that fail to induce syncytia entered via endosome in a protease-dependent fashion, i.e., fusion of envelope and endosomal membrane. The latter viruses entered directly from cell surface, when receptor-bound viruses were treated with proteases that activate fusion activity of their S proteins. The entry pathway of SARS-CoV could influence the severity of the disease. It was also revealed that a highly neurovirulent JHM spread in a receptor-independent fashion, which could result in a high neuropathogenicity of the virus.