

2. コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連

田口 文広

国立感染症研究所ウイルス第3部第5室

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) はマウスに急性致死性肝炎、脱髄性脳脊髄炎などを引き起こし、ヒトの疾患モデルとして研究が進んでいる。一方、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) は重症急性呼吸器症候群 (SARS) の病原体であり、2003年に発見された新しいウイルスだが、医学的インパクトの強さから発見以来精力的に研究が進められ、現在最も解析が進んでいるコロナウイルスの一つである。両ウイルスの受容体は同定され、ウイルスの受容体結合や細胞侵入機構について研究が進められている。最近の研究から、これらのウイルスは異なる経路で細胞内に侵入することが分かってきた。本稿では、両ウイルス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。

はじめに：

コロナウイルスはエンベロープを持つウイルスである。その細胞侵入は、粒子の受容体結合からエンベロープと標的細胞の膜融合までの過程を意味する。コロナウイルスは3グループからなり、MHV, SARS-CoV はいずれもグループ2に属している。両ウイルスとも受容体が同定され、受容体結合、細胞侵入機構については、研究が進んでいる。一方、グループ1コロナウイルスに属するヒトコロナウイルス 229E (229E)、豚の伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、ネコの伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) の受容体は、各々の固有宿主の aminopeptidase N であることは明らかにされてから長い間、細胞侵入機構に関する知見はあまり多くない。最近、SARS-CoV は MHV などの他のエンベロープウイルスとは異なり、全く新しい細胞侵入機構を持つことが報告されている。本稿では、MHV 及び SARS-CoV の細胞侵入機構を紹介し、その病原性への関与についても言及したい。

コロナウイルススパイク (S) 蛋白：

コロナウイルス粒子は形態学的に特徴のある“王冠 (コロナ) 様”突起 (スパイク) を持つ¹⁾。スパイクは最外部が球状で、その下の棒状部位でエンベロープに埋め込まれている。スパイクはウイルスの受容体結合及び細胞内侵入を司り、一本のスパイクは3分子のS蛋白から構成されている。S蛋白は分子量約180kDaのクラスIのfusion蛋白である。MHV S蛋白は、分子中程の塩基性アミノ酸部位が細胞の蛋白分解酵素により解裂され、N末端S1とC末端S2の2サブユニットになる。S1とS2は共有結合で結ばれている訳ではなく、その結合は弱い。スパイク最外部の球状部分はS1が、その下の棒状部分は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)} (図1)。S1N330の下流には超可変部位 (hypervariable region, HVR) があり、MHV株間で最も大きな相違が見られる⁴⁾。MHVの膜貫通性サブユニットS2は、HIVのgp41やインフルエンザHA2など他のエンベロープ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hepatad repeat (HR) 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HA2のN末端の疎水性アミノ酸領域はFPとして機能するが、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に固

連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1
 国立感染症研究所ウイルス第3部第5室
 TEL : 042-561-0771 (内線 533, 755)
 E-mail : ftaguchi@nih.go.jp

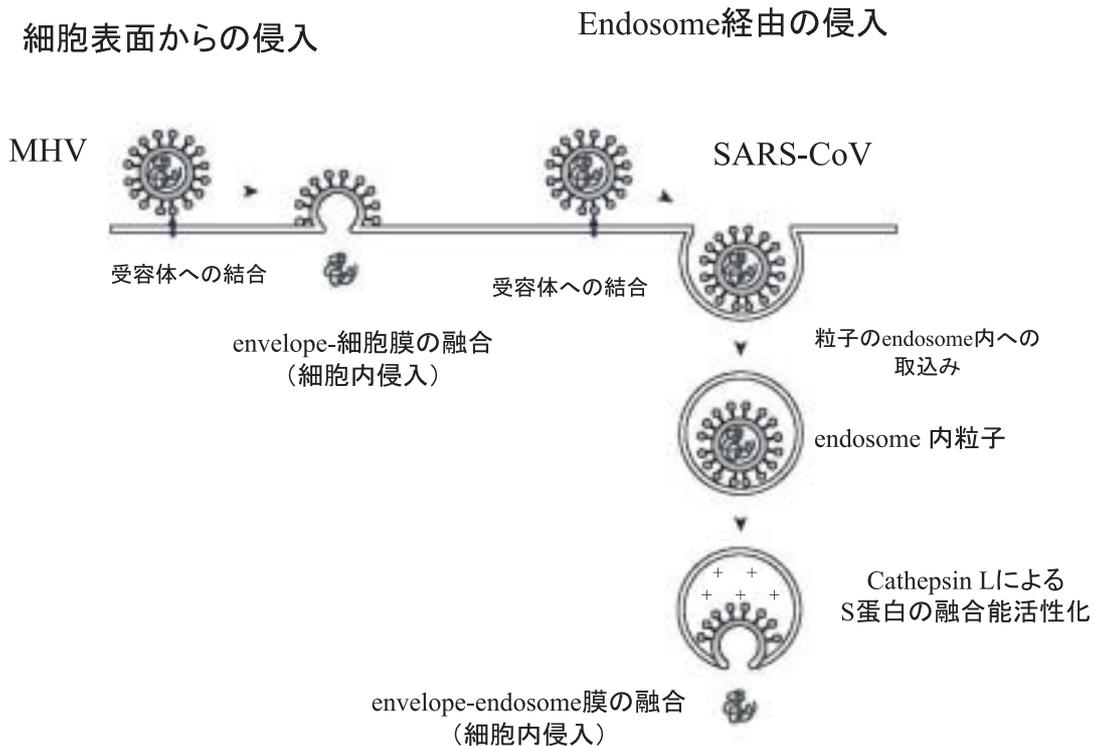


図2 MHVとSARS-CoVの細胞侵入経路：

MHVは受容体CEACAM1に結合後、細胞表面から細胞内へと侵入する（詳細は図3を参照）。一方、SARS-CoVはACE2に結合し、endosomeに輸送され、酸性環境下で活性のあるプロテアーゼ、cathepsinLによりS蛋白の解裂及び細胞融合活性が誘導され、endosomeから細胞質内へ侵入する。

性を持つタイプIの膜内在性蛋白であり、分子量約110 kDaの糖蛋白で気管支、肺、心臓、腎臓、消化器等の多くの種類の組織で発現されている¹⁶⁾。その主な機能は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、血管拡張機能を得る。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、酵素活性部位を取り囲む凸状部位に存在すると報告されたが、最近、より詳細な解析がなされている¹⁷⁾。

MHV及びSARS-CoVの細胞侵入経路：

MHV感染細胞は通常の培養条件下で合胞性巨細胞を形成し、bafilomycinやNH₄Clのようなlysosome指向性試薬の影響を受けない。このことは、MHVの細胞への侵入はendosomeを経由することなく直接細胞膜から侵入することを示唆している¹⁸⁾（図2）。MHV-JHM株の持続感染細胞から分離された変異株は、通常の培養条件では巨細胞を形成することはないが、感染細胞をpH 6の酸性溶液で処理することにより、巨細胞が形成される。また、細胞での感染はlysosome指向性試薬処理により著しく阻害される¹⁸⁾。この感染様式は、インフルエンザや水泡性口内炎ウイルスと酷似していて、endosome内の酸性環境がウイルス融合

活性を誘導するというendosome経路による細胞侵入機構が考えられる。

一方、SARS-CoVの細胞侵入機構は別の新たな機構が提唱されている。Batesらは、SARS-CoV感染はlysosome指向性試薬の影響を受けること、更に、SARS-CoV 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報告した¹⁹⁾。これらの実験結果から、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¹⁹⁾（図2）という細胞侵入機構が提唱された。更に、彼等はSARS-CoVのS蛋白活性化には細胞内のシステインプロテアーゼが関与することを突き止め、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を明らかにした²⁰⁾。最近、Weiss等は培養細胞での感染で合胞性巨細胞を誘導しない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を報告しているが、この場合cathepsin Lとcathepsin BがS蛋白の活性化に必要である²¹⁾。また、ヒトコロナウイルス229Eはカベオラ経由で細胞内に侵入することが報告されていて、細胞内侵入機構

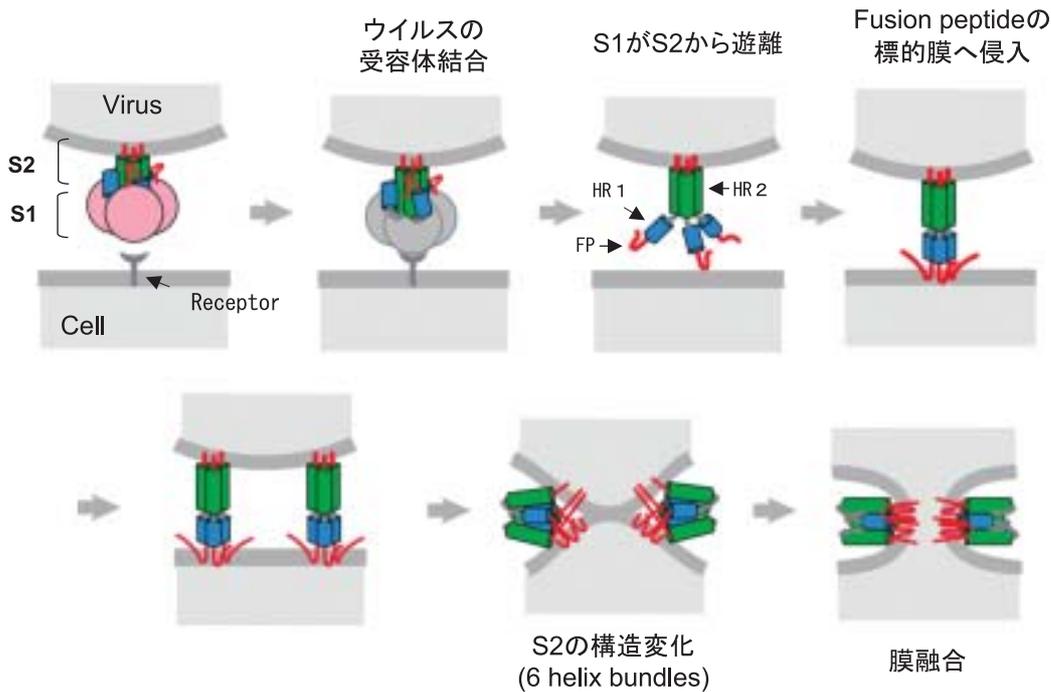


図3 コロナウイルス細胞侵入の分子機構：

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（6 helix bundles の形成）が起こり、隣接したウイルスエンベロー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、エンベロープと endosome 膜の融合が起こり、細胞侵入すると考えられている。

としては SARS-CoV との類似性があるのかもしれない²²⁾。我々は、トリプシンの他にも thermolysin, elastase などのプロテアーゼが SARS-CoV 感染細胞の融合を促進し、同時に S 蛋白の解裂も誘導することを観察している。Bates らの仮説によると、細胞表面に吸着させたウイルス S 蛋白はプロテアーゼ処理により活性化され、細胞膜と融合後 SARS-CoV ゲノムは細胞内侵入することが推測される。そこで、我々は氷温下で SARS-CoV を bafilomycin 処理 VeroE6 細胞に吸着させ、その後トリプシンなどのプロテアーゼ処理により感染が起こるか否かについて検討し、SARS-CoV が細胞内侵入することを観察した。この系では、endosome 経路が遮断されていて、氷温では接種ウイルスは ACE2 に結合した状態で留まっているので、プロテアーゼ処理により直接細胞表面から SARS-CoV が侵入することが示唆された。即ち、SARS-CoV は 2 つの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の有無が経路決定に大きく働いていることが想像された。この実験での注目されたのは、細胞表面からの感染の方が endosome 経路での感染より効率が良いという点であり、プロテアーゼ存在下では SARS-CoV が迅速に増殖することが明

らかとなった²³⁾。プロテアーゼ存在下での SARS-CoV 増殖の亢進は、肺、腸管が SARS 感染での主要標的組織であり、組織障害が大きいことを説明することができるかもしれない。実際、肺炎時に産生される主要プロテアーゼの elastase が SARS-CoV 増殖亢進作用を示すことも観察されている²³⁾。これらの結果から、SARS-CoV 感染時にその環境下に S 蛋白活性化プロテアーゼが存在すれば、感染増強が推測されたので、マウスに弱病原性呼吸器細菌を感染させ肺でのエラスターゼ産生を誘導した条件下で SARS-CoV を感染させると、その感染は著しく増強され、その結果肺炎の重症化が観察された(未発表)。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示唆していると思われる。

細胞侵入の分子機構

上述のように MHV と SARS-CoV では細胞内侵入経路及び S 蛋白の融合能活性化機構は異なるが、細胞膜とエンベロー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。これはコロナウイルス特有の細胞内侵入機構というよ

りクラス1のエンベロープ蛋白を持つウイルスに共通している。MHVの細胞侵入機構もHIVやインフルエンザウイルスの侵入機構をモデルとして組み立てられたものである²⁴⁾。MHV 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。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。この変化はS2分子がヘアピン構造を取ることであり、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)になることである。6 helix bundles形成により、エンベロー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²⁴⁾ (図3)。この過程の中で6 helix bundles形成が極めて重要である。MHV及びSARS-CoVでもHR1, HR2に相当するペプチドを用いて、両者がanti-pararell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^{8, 25)}。

MHVの受容体CEACAM1非依存性感染

MHVはCEACAM1を認識して標的細胞へ感染し、感染細胞からはCEACAM1を持たない細胞へと細胞融合が起こり、感染拡大することがGallagherらによって報告された(受容体非依存性細胞融合/感染)²⁶⁾。この活性を示すのはMHV-JHM株で神経病原性が極めて高いウイルスである。JHM変異株srr7はこの活性を示すことはなく、S2に点変異(1114: Leu → Phe)を持っている²⁷⁾。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、受容体非依存性細胞融合活性はS蛋白によることは明白である²⁷⁾。JHM S1は受容体結合がなくてもS2から遊離し²⁸⁾、その結果S2の構造変化が誘導されること²⁹⁾が、受容体非依存性感染のメカニズムであると考えられている。この過程では、S2が構造変化を起こす瞬間には、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。最近、我々はJHM株のspinoculation(ウイルス感染細胞を接種ウイルスと共に3000rpmで2時間遠心する)により、受容体非発現細胞へ感染することを示し、既に提唱された受容体非依存性感染の仮説と矛盾しないことを報告した³⁰⁾。S2の構造変化は非可逆的反応で、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。JHMのS蛋白は、自然条件下で受容体結合なく活性化し、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。

JHMV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日以上生存する。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。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¹⁴⁾。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^{14, 31)}。

おわりに：

本稿ではコロナウイルスの細胞侵入経路、侵入機構について、MHVとSARS-CoVについて述べた。MHVの細胞侵入機構は、解析が進んでいるHIVなどと同様と思われるが、SARS-CoVの細胞侵入機構はこれまでは報告のない新しい様式であろう。また、MHVの受容体非依存性感染も非常に稀な感染様式であるが、受容体を持たない細胞への感染も報告されている麻疹ウイルスやHIVなどでは、このような機構で感染する可能性もあるのではないだろうか。本稿では、両コロナウイルスとも細胞侵入機構がウイルスの病原性発現に深く関与している可能性を示唆した。今後これらのことを検証するためには、動物を用いた詳細な研究が必要である。

文 献

- 1) Tyrell DA, Almeida JD, Berry DM. et al. (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) 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
- 8) Bosch BJ, Martina BE, Van Der Zee R, Lepault J, Haijema BJ, Versluis C, Heck AJ, De Groot R, Osterhaus AD, Rottier PJ. (2004) Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8455-8460.
 - 9) 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.
 - 10) Dveksler GS, Pensiero MN, Cardellicchio CB, Williams RK, Jiang G, Holmes KV, and Diffenbach CW. (1991) Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* 65: 6881-6891.
 - 11) 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
 - 12) Ohtsuka N, and Taguchi F. (1997) Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype. *J. Virol.* 71: 8860-8863
 - 13) Miura SH, Nakagaki K, and Taguchi F. (2004) N terminal domain of murine coronavirus receptor CEA-CAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein. *J. Virol.* 78: 216-223
 - 14) 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
 - 15) Li W, Moore MJ, Vasilleva N et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-454
 - 16) 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 Let.* 532: 107-110
 - 17) Li W, Zhang C, Sui J et al. (2005) receptors and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24: 1634-1643.
 - 18) 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
 - 19) Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, 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.
 - 20) 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.
 - 21) Qiq 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
 - 22) 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
 - 23) 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
 - 24) Chen D and Kim PS. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-684
 - 25) Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM et al. (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
 - 26) Gallagher T, Buchmeier MJ, and Perlman S. (1992) Cell-receptor independent infection by a neurotropic murine coronavirus. *Virology* 191: 517-522
 - 27) Taguchi F, and Matsuyama S. (2002) Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus. *J. Virol.* 76: 950-958
 - 28) Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN, Ruffolo R, Gallagher TM. (2001) Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *J Virol.* 75:2792-2802.
 - 29) Matsuyama S, and Taguchi F. (2002) Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 76: 11819-11826
 - 30) Watanabe R, Matsuyama S and Taguchi F (2006) Receptor-independent infection of murine coronavirus: analysis by spinoculation. *J. Virol.* 80: 4901-4908
 - 31) Gallagher T, and Buchmeier MJ. (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279: 371-374

Cell entry mechanism of coronaviruses: Implication in their pathogenesis.

Fumihiko TAGUCHI

Division of Viral Respiratory Diseases and SARS
National Institute of Infectious Diseases

Coronaviruses infect many species of animals, including humans. Among them, murine coronavirus, mouse hepatitis virus (MHV) has been well studied as a model of human diseases, such as hepatitis and demyelinating disease. An agent causing severe acute respiratory disease (SARS), SARS coronavirus (SARS-CoV), is a newcomer in this genus, however, it is now one of the most studied coronaviruses due to its medical impact. The receptors of those two viruses have been identified and their cell entry mechanism has been actively investigated. Recently, SARS-CoV cell entry mechanism is shown to be different from that of other enveloped viruses, including MHV. In this review, cell entry mechanism of those two viruses is described, stressing on the difference and similarity found between those two viruses.

