

2. コロナウイルス感染の基礎と SARS-CoV-2

白 戸 憲 也

国立感染症研究所ウイルス第3部

1. はじめに

2019年12月末に中国武漢で発生した新型肺炎は、コロナウイルスによるものであることが明らかになり^{1,2)}、原因ウイルスは重症呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)、疾患名は Coronavirus Diseases 2019 (COVID-19) と名付けられた³⁾。当初は重症呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) や中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) のように、他宿主のコロナウイルスがヒトに感染するようになったもので、感染は現局的であると思われていた。しかしその予想は完璧に誤りで、SARS-CoV-2 は SARS-CoV や MERS-CoV とは異って新たな5番目のヒトコロナウイルスとも考えられるものであった。全世界に瞬く間に拡散し、2020年10月20日現在、4000万人をこえる患者数、111万人を超える死者数が報告されている⁴⁾。SARS-CoV-2 はその社会的なインパクトが強烈であり、世界中で他分野の研究者も数多く参加し、信じられない勢いで研究が進められている。SARS-CoV-2 発生以前は、3年に1度開催される国際学会であるニドウイルスシンポジウムもホテルの会議場1つで済んでしまうように、コロナウイルス研究を行っているラボは全世界でも数えるほどであった。特に我が国では SARS-CoV の研究ブームが去った後はかなり衰退し、日本ウイルス学会学術集会で口頭セッションも開催できないほど、数えられるレベルの研究によってかろうじて研究が継続されていたにすぎない。

コロナウイルスの感染機構については本誌にたびたび掲載されており⁵⁻⁷⁾、改めて解説すべきことでもない。しかし本稿ではコロナウイルスに対してなじみのない方に対し

て、SARS-CoV-2 感染の理解の補助となるように、改めてコロナウイルス感染の基礎について解説する。

2. コロナウイルスについて

1) コロナウイルスの宿主について

コロナウイルスはヒトを含め、様々な動物において固有のウイルスを持つ。すなわち、ヒトにはヒトの、ウシにはウシの、イヌにはイヌの、キリンにはキリン⁸⁾の、アルパカにはアルパカ⁹⁾の、シロイルカにはシロイルカ¹⁰⁾の、インコにはインコ^{11,12)}の、というようにそれぞれの宿主におけるウイルスが存在することが知られている。それぞれの宿主においては軽症であり、まれに種を超えて感染した場合に重症化するものが現れると言われる。ヒトにおいては、2003年に中国で確認された SARS-CoV はキクガシラコウモリが宿主であり¹³⁾、2012年にサウジアラビアで確認され、以後散発的に発生している MERS-CoV はヒトコブラクダが宿主である^{14,15)}。また、1970年代からその存在は知られていたが、2013年に北アメリカ大陸に初めて侵入して以降、各国に拡散して養豚産業に打撃を与えた豚流行性下痢ウイルス (PEDV) もコウモリ由来であることが示唆されている^{16,17)}。

2) ヒトのコロナウイルスについて

ヒトに感染するコロナウイルスはこれまでに6種類が知られていた。SARS-CoV-2の発生で7種類となった。ヒトが宿主のヒトコロナウイルス (HCoV) はこれまでに 229E, OC43, NL63, HKU1 の4種が知られている。229E と NL63 は α コロナウイルス、OC43 と HKU1 は β コロナウイルスに属している。これらは鼻風邪の原因と言われ、風邪の10~12%の原因と言われる。多くは軽症だが小児においては高熱を引き起こすこともある¹⁸⁾。229E, OC43 が最初に分離されたのは1960年代であり、NL63 と HKU1 は2000年代に入り、SARS-CoV の流行中に発見された。ヒトコロナウイルスの疫学はよく知られていないが、70%前後の子供は3歳前後までに229E または NL63 に対して抗体陽性となり、ほとんどの子供は6歳までに感染を経験すると報告されている¹⁹⁾。またヒトコロナウイルスの流行はインフルエンザと同様に冬季にピークが見られるが、229E は春、

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

TEL: 042-561-0771

FAX: 042-567-5631

E-mail: shirato@nih.go.jp

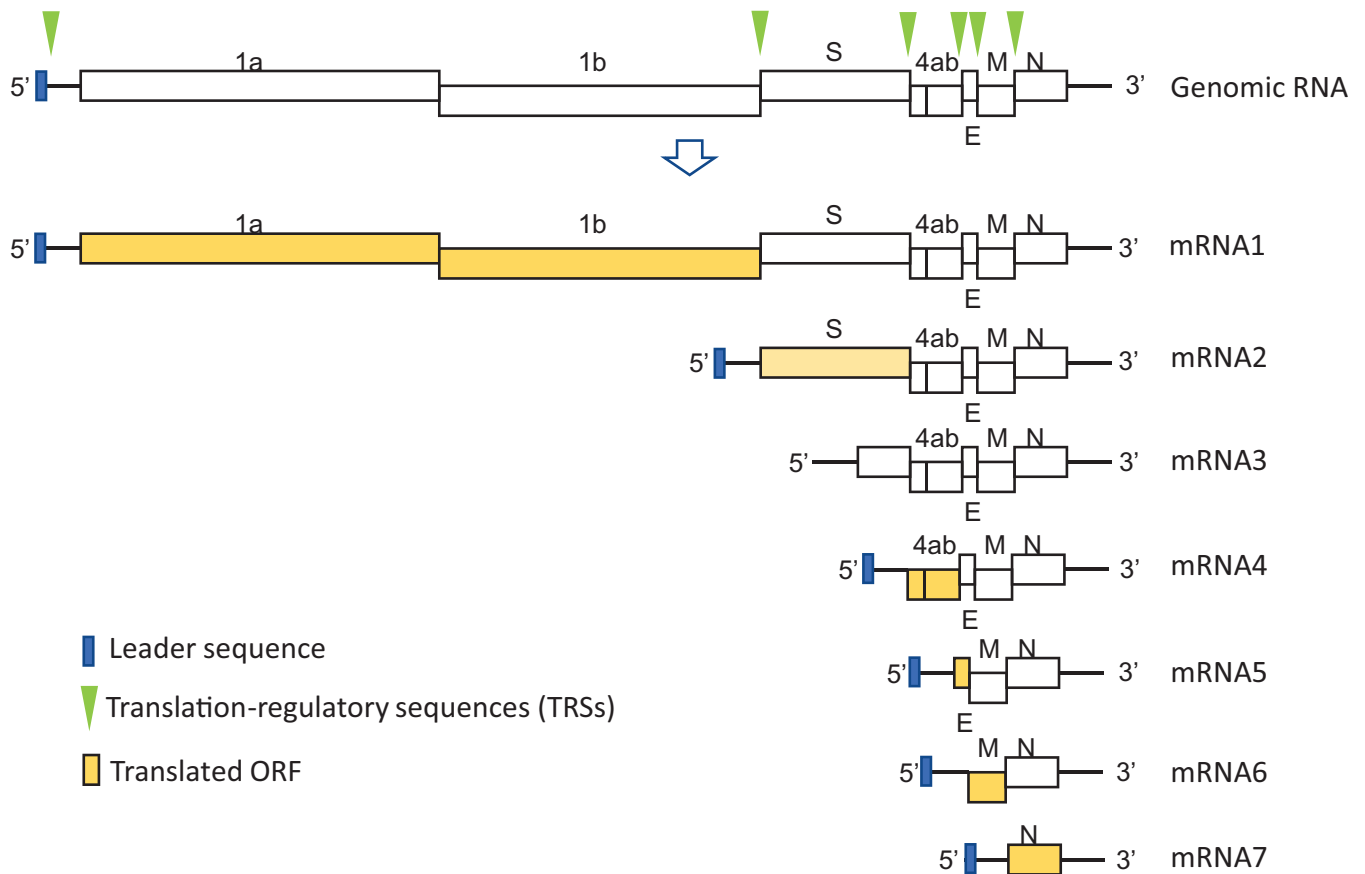
秋にも検出されることがあると報告している²⁰⁾。SARS-CoV-2以外の残り2種は上記のSARS-CoVとMERS-CoVであり、MERS-CoVであり、HCoVと異なり、重症肺炎を引き起こす。SARS-CoVは感染した場合にほとんどが症状を示して8割近くが重症となり、無症状は数%に過ぎないと言われる²¹⁾。また、無症状者から他へ感染が広がったという報告はなかった²²⁾。MERS-CoVの場合、糖尿病などの持病のある場合に重症化する場合が多く、無症状の感染者は積極的疫学調査の結果ようやく判明するものであった。MERSでは特に院内感染が重要であり、無症状の医療従事者からの感染が疑われるケースもあるが、イスラム教の巡礼であるハッジなどの大規模なヒトの移動を伴うイベントでアウトブレイクが起こった報告は1つもない。従って院内感染のケアを重視すれば問題はないと考えられていた^{23, 24)}。HCoVではガーナでの調査²⁵⁾により、ヒトコロナウイルス遺伝子は上気道感染の臨床症状を示すグループ(n=593)と、無症状のグループ(n=620)からリアルタイムRT-PCRによりどちらからも同程度(13.7% vs 10.5%)に検出されることが報告された。症状有では無症状グループと比較して100コピー以上のコピー数を示す検体が増加する傾向にあるが(11.5% vs 4.8%)、コピー数の平均をとるとNL63のみ症状有のほうで高くなるが、229EやOC43では違いがみられないという事である。無症状でもコピー数の多いものでは 10^6 、 10^7 ほどのコピー数を示すものもいた。これらのことから、HCoVは冬季に流行すると言われるが、宿主の免疫状態などからコピー数の高いケースが冬に多くなって存在が見えるようになるだけで、HCoV自体はヒトの間で通年で特に症状も見られず流行している可能性が示唆されている。さらに、11~29年ほど継続して健康人から採取された血清の調査により、ヒトは12か月ほどの間隔で何かしらのHCoVに繰り返し感染することが報告されている²⁶⁾。これはELISAによる調査であるので、HCoVそれぞれの種特異的な抗体を正確に検出しているわけではないが、少ないケースでは28.6年に5回、多いケースでは11.5年間に12回も何らかのHCoVへの感染を繰り返している。各HCoVの血清型に関する報告はほとんどないため、中和抗体が維持できず再感染するのか、または別の血清型に繰り返し感染するのかが明らかではないが、HCoV229Eについては少なくとも2つの中和性の異なる血清型が存在することが明らかになっている²⁷⁾。研究が困難である原因はウイルス分離の困難さにあると思われる。229E、OC43、NL63はそれぞれ株化培養細胞で複製可能な実験室株が存在するが、HKU1は株化細胞で複製するものは報告されておらず、唯一ヒトのプライマリ気管支上皮細胞(HBTEC)を気相(ALI, Air-liquid interface)培養したもので分離できる²⁸⁾。229Eはいくつかの株化培養細胞により分離することができるが知られているが、他のHCoVはHBTECのALI培養以外で培養は極め

て難しい。我々もOC43、NL63、HKU1の分離に成功しているが^{29, 30)}、株化培養細胞での臨床分離株の安定した複製は困難であるため、分離株を用いた中和試験等による抗原性の比較は簡単ではない。

3) コロナウイルスのゲノム、複製、受容体について

コロナウイルスはプラス鎖の1本鎖RNAをゲノムとしてもつエンベロープウイルスで、ゲノムは5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA配列を持ち、大きさが約30kbとRNAウイルスとしては極めて長い。図1にHCoV229Eゲノムを参考として示す³¹⁾。ゲノムの2/3程を16の非構造タンパク質群(nsp1-16)をコードするORF1a、1bが占め、残りに構造タンパク質(S, spike; E, envelope; M, membrane; N, nucleocapsid; HE, hemagglutinin esterase)や他の非構造タンパク質がコードされている(229EはHE蛋白質を持たない)。複製は2通りの考え方があり、1つはプラス鎖ゲノムからマイナス鎖ゲノムが合成され、そこから5'末端にゲノムRNAの5'末端と同一のリーダー配列を持つ様々な長さのSubgenomic mRNAが合成される(不連続性(+) mRNA合成)³²⁾。もう1つは各々のsubgenomic mRNAに対する相補的なマイナス鎖が合成され、次にプラス鎖のsubgenomic mRNAが合成されるというものである(不連続性(-) RNA合成)³³⁾。いずれにせよ、リーダー配列から各々のORFの直前に存在するtranslation regulatory sequence (TRS)からそれ以降の配列を含むsubgenomic mRNAが合成され、それぞれのsubgenomic mRNAからは5'末端側にコードされているタンパク質のみが翻訳される。すべてのsubgenomic mRNAは一番3'側にコードされているNタンパク質の配列を含むことになるため、遺伝子検査系を構築する場合は感染の痕跡を見つけられるようにNタンパク質が標的に選ばれることが多い。ゲノム複製は細胞内に形成されるDouble-membrane vesicles (DMVs)で行われる³⁴⁾。DMVの形成にはnsp3、4、6が関与すると言われる³⁵⁾。nsp1は感染した宿主細胞の遺伝子発現が抑制され、ウイルス遺伝子発現が効率的に進められることも報告されている³⁶⁻³⁸⁾。nsp5はpolyproteinとして合成されるnspを解裂させるプロテアーゼである³⁹⁾。nsp7、8、12は複合体を形成してRNA依存性RNAポリメラーゼとなることが報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。Nsp9はRNAとの結合に関与すると言われる⁴³⁾、nsp13はhelicase⁴⁴⁾、nsp15はendonuclease⁴⁵⁾と言われる。またコロナウイルスはnsp14が3'-to-5'exoribonuclease (EXoN)活性を持ち、複製においてnsp10らと校正に関与していることが特徴と言える^{40, 46, 47)}。このようにnspは多様な機能でウイルス複製に関与している。

構造タンパク質のうち、Eタンパク質、Mタンパク質はvirionの集合に関与している⁴⁸⁻⁵⁰⁾。粒子の形成はこの2つだけで可能であるが⁵¹⁾、RNAを粒子中に組み込むにはNタンパク質が必要である⁵²⁾。コロナウイルスの粒子形



J Gen Virol . 1990 May;71 (Pt 5):1065-73. 参照

図1 一般的なコロナウイルスのゲノム構造 (HCoV-229E)

成については日本獣医生命科学大学の氏家誠先生によるレビューで詳細にまとめられているので参照されたい⁵³⁾。HE タンパク質はウイルスによっては存在しないが、HE タンパク質を持つものはこれのシアル酸-O-アセチルエステラーゼ活性により、ウイルスのリリースが促進される^{54,55)}。受容体との結合、すなわち細胞侵入や中和に関連するものがSタンパク質である。ヒトに感染するコロナウイルスのうち、HCoV-229EはAPN (CD26)⁵⁶⁾、SARS-CoV、HCoV-NL63はACE2^{57,58)}、MERS-CoVはDPP4⁵⁹⁾の分子が受容体であることがわかっているが、HCoV-OC43とHCoV-HKU1はシアル酸に結合するといわれる^{60,61)}。また他動物の α コロナウイルスのうち、豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、II型猫腸炎コロナウイルス (type II FCoV)、IIa型イヌコロナウイルス (type IIa CCoV)はHCoV-229Eと同様にそれぞれの宿主のAPN分子を受容体とするが、これらは共通して猫APN(fAPN)を受容体として利用できることも知られる⁶²⁾。

FCoVはそれぞれ2つの血清型に分かれ、I型が全体の70～95%を占めるがI型は受容体がわかっていない^{63,64)}。APNを受容体とするII型は培養細胞で容易に複製でき、

II型を用いて研究が行われてきた。一方ゲノム解析により、II型FCoVはCCoVとの間の組換えによりSタンパク質挟んで前後がCCoVと入れ替わったことで生じたと言われている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。さらにI型CCoVは同様にIIa型CCoVとI型FCoVの間でSタンパク質に組換えが起こって生じたと考えられている⁶⁸⁾。また、IIb型のCCoVはSタンパク質N末端側でTGEVとの間で組換えが生じてきたと言われる⁶⁹⁾。SARS-CoVにおいても、発生当初宿主と言われたハクビシンに感染するようになったSARS-related CoV (SARSr-CoV)は2種のコウモリコロナウイルスの組換えで生じたと言われる⁷⁰⁾。このように、コロナウイルスではウイルスが共感染した際に、頻繁に組換えウイルスが生じることが知られている⁷¹⁾。これはRNAポリメラーゼがTRSにおいて共存する他のテンプレートへの乗り換えと元のテンプレートへの復帰を容易に起こすためと考えられている⁷²⁾。この現象を利用して、意図的にTRSから後ろの遺伝子配列を入れ替えるTargeted RNA recombination法という技術が、組換えウイルス作製に利用されている(図2参照)^{73,74)}。

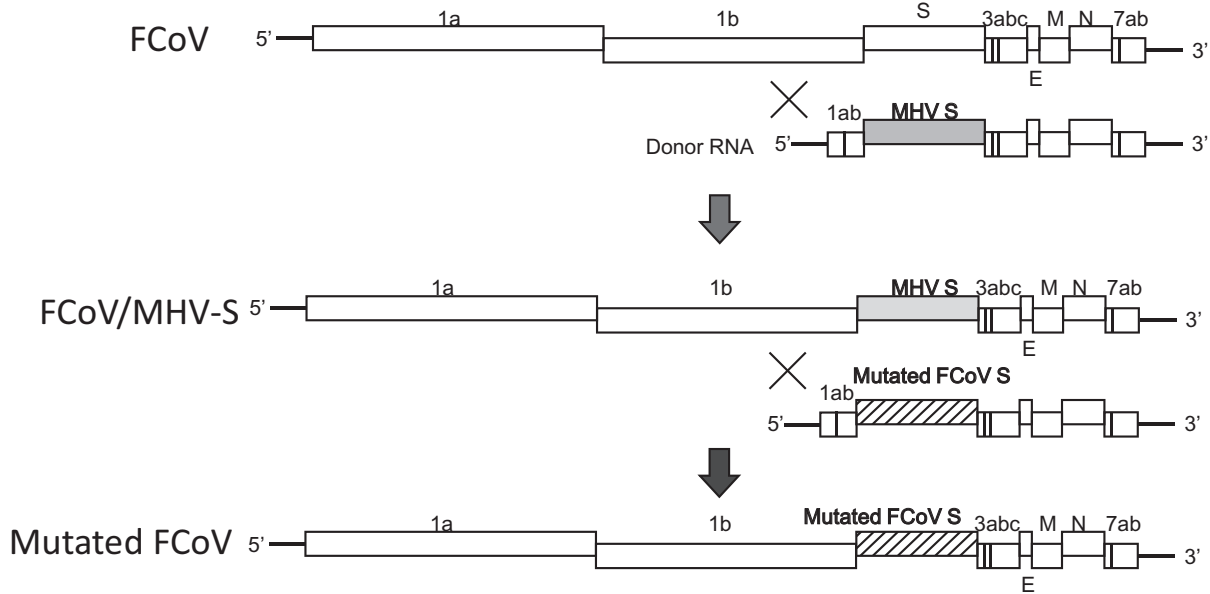


図2 Targeted RNA recombination の例

プラスミド上でSタンパク質のみをMHVに入れ替え、in vitro transcriptionでmRNAを合成し、FCoV感染細胞にtransfectionする。培養上清中の組換えウイルスをDBT細胞等マウスの細胞で複製させることで、FCoV/MHV-Sウイルスを得ることが出来る。

同様にプラスミド上でFCoVのSタンパク質に変異を導入し、in vitro transcriptionでmRNAを合成し、FCoV/MHV-S感染細胞にtransfectionする。培養上清中の組換えウイルスをfcwf細胞等ネコの細胞で複製させることで組換えFCoVを得ることが出来る。(J Virol. 2003 Apr; 77(8): 4528-4538. 参照)

4) コロナウイルスの細胞侵入機構について

コロナウイルスはエンベロープウイルスであり、細胞侵入のためには細胞膜とウイルス膜との膜融合が必要である。ウイルスのSタンパク質と細胞側の受容体との結合とプロテアーゼにより、2段階の構造変化を経て膜融合が誘導される^{75,76}。Sタンパク質は受容体との結合に関与するS1と、膜融合に関連し、heptad repeat配列を含むS2に分かれる(図3参照)。ヒトに感染するコロナウイルスのうち、 α コロナウイルスウイルス(229E, NL63)はS1/S2ジャンクションにfurin認識部位(RXXR)がないため、S1/S2の境界は曖昧であるが、 β コロナウイルスはSARS-CoVを含むSARS-related coronavirus (SARSr-CoV)を除き、すべてfurin認識部位を持っている。Sタンパク質と受容体が結合したのち、おそらくS1/S2部分でプロテアーゼによる解裂を受けて1段階目の構造変化が行われ、fusion peptide(FP)の近傍が露出すると考えられる。現在putative FPと考えられているのがS2領域に存在するvery highly conserved region (VHCR)であり、ほぼすべてのコロナウイルスで類似のアミノ酸配列を持っている⁷⁷。このputative FP直前のS2'サイトでプロテアーゼによって切られることが、最終的な膜融合のステップである6-helix bundleの形成イベントのトリガーであると考えられている^{76,78,79}。

これまでの研究により、コロナウイルスは2つの異なる経路で細胞侵入することがわかっている(図4参照)。1つはカテプシン群の酵素によって後期エンドソーム経路で侵入する経路である。コロナウイルスは他のエンベロープウイルスと同様にエンドゾーム経路で細胞侵入すると考えられていたが、bafilomycinなどでpH低下を阻害することでブロックできるが、E64D等のシステインプロテアーゼインヒビターでブロックできること、さらにカテプシンインヒビターやカテプシンに対するsiRNAを用いてブロックできることから、インフルエンザウイルスのようにpH依存的にSタンパク質の構造変化を誘導しているのではなく、カテプシン群のプロテアーゼに依存していることが明らかになった^{75,80-83}。一方、このエンドソーム経路をブロックしている状態でも、トリプシン処理など、外部からプロテアーゼで処理することで細胞侵入を誘導できることが明らかになり^{84,85}、後期エンドソームだけではなく、細胞表面あるいは初期エンドソーム(以後便宜上細胞表面と表記)からも侵入できることが考えられた。さらにin vivoでは共感染したバクテリアや浸潤した好中球などが分泌するエラスターゼなどのプロテアーゼによって感染が増強される可能性も考えられた⁸⁵⁻⁸⁷。ここで、当研究室前室長の田口文広先生は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)蛋白質やメタニューモウイルスの

ルスは本来 TMPRSS2 経路を使用しているが、培養細胞に純化する過程でカテプシン感受性が高まり、セリンプロテアーゼ非存在下で複製できるようになっていることが示されている^{29, 98}。特に OC43 の臨床株は HBTEC の ALI 培養において、camostat のみで感染をブロックできることから、この経路にほぼ依存していることが示された一方、株化培養細胞純化株である VR1558 はカテプシン経路にほぼ依存しており、HBTEC の ALI 培養で複製できないことが示されている²⁹。229E の臨床株は TMPRSS2 を好み、純化株である VR-740 はカテプシン経路を好むことは同様であるが、これらの感受性は S2 領域の FP を挟んだ 2 点のアミノ酸を入れ替えることで逆転することから、臨床株はカテプシン認識サイトも元々持っているが、認識のしやすさが異なることが示されている⁹⁸。また、コロナウイルス感染においては、TMPRSS2 は一見感染を増強するように見えるが、臨床株も培養細胞純化株も TMPRSS2 発現 HeLa 細胞での力価はほぼ変わらず、TMPRSS2 発現のない環境で力価に差が出ることから、TMPRSS2 の発現でウイルス感染が増強するのではなく、培養細胞への純化によるカテプシンへの感受性の差が力価の差になることが示されている⁹⁸。つまり、TMPRSS2 存在下でのデータを 100% とするか、TMPRSS2 非存在下でのデータを 100% とするかの違いであるが、コロナウイルスの場合は前者を用いるのが正しいと思われる。インターフェロン等への感受性ももちろんあるが、それぞれのウイルスが持つ基本的なカテプシン感受性などの後期エンドソーム経路の利用性の違いが TMPRSS2 非存在下での培養に関連していると思われ、SARS-CoV が VeroE6⁹⁹、MERS-CoV が Vero¹⁰⁰、229E が WI-38 など¹⁰¹、NL63 が LLC-MK-2 と、TMPRSS2 非存在下で標準株の分離・培養ができていたのは、これらのウイルスの基本的な後期エンドソーム経路利用性の高さによると想定される。OC43 の培養細胞純化株が得られているのは奇跡に近いと思われる。これらのことから、コロナウイルスの本来の性状を解析するには実験室株ではなく、本来の性質を残した臨床株に近いウイルスを利用する重要であることが示されている。

また、MERS-CoV は S1/S2 ジャンクションに furin サイトがあるが、これを欠損させると後期エンドソーム経路で感染するようになり、SARS-CoV は S1/S2 ジャンクションに furin サイトがないが、furin サイトを導入すると、細胞表面から細胞侵入しやすくなることが報告されている^{102, 103}。さらに TMPRSS2 は PEDV 感染においては細胞表面からのウイルスの放出に関与していることもわかっており¹⁰⁴、TMPRSS2 は多様な機能でコロナウイルス感染に関与している。

上記のように、TMPRSS2 発現細胞を用いることで、コロナウイルス本来の性質を研究することが出来るようになった。九州大学の白銀勇太先生によってクローンされた

Vero/TMPRSS2 細胞⁹⁰ はコロナウイルス研究の大きな助けになっている。当部でも HeLa-ACE2/TMPRSS2⁹³ や HeLa/TMPRSS2⁹⁵、VeroE6/TMPRSS2 (田原舞乃先生による)¹⁰⁵ をクローンして利用している。これらの細胞はコロナウイルス研究に非常に有用であるため、JCRB 細胞バンクを通して分譲できるように準備を進めている。すでに Vero/TMPRSS2 は JCRB1818、VeroE6/TMPRSS2 は JCRB1819 として利用可能である。TMPRSS2 発現細胞の維持に関する注意点としては、G418 を添加して培養していても TMPRSS2 発現が抜けてしまうことがあるということである。おおむね 20 代程度であれば抜けることは少ないため、当室では 20 代をめぐりに細胞を入れ替えている。センダイウイルスの多段階増殖などを指標にすると TMPRSS2 発現を確認しやすい。

4. SARS-CoV-2 の感染について

これまでコロナウイルスの感染についての基礎について述べてきたが、これまで判明している限り、SARS-CoV-2 はこれらのコロナウイルスとしての特徴を持つことが報告されている。SARS-CoV-2 の受容体は SARS-CoV と同様の ACE2 であることが早々に報告されている¹⁰⁶。同時に TMPRSS2 を使って細胞侵入すること、カテプシン経路のインヒビターである E64D、TMPRSS2 経路のインヒビターである camostat をともに使用することで細胞侵入を防ぐことが出来ることがわかった¹⁰⁶。また当部においても 1 月 29 日には VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いてウイルス分離に成功しており¹⁰⁷、電顕写真と合わせて 1 月 31 日にプレスリリースしている。以上のようにコロナウイルスに対するこれまでの知見が通用するものであるとわかっている。

SARS-CoV-2 は当初、武漢の海鮮市場由来であると言われており、ここでは野生動物も食用として売られていた¹⁰⁸。海鮮市場と流行の関係を否定する報告もあり、真偽のほどは定かでないが、このような野生動物市場は新たなコロナウイルスが誕生するのに非常に都合のよい環境である。近縁のウイルスを持つ動物が一堂に集められた環境では容易に共感染を起こし、polymerase の乗り換えによる組み換えウイルスの誕生も容易に起こり、組み換えウイルスが目に見える形で表に出てくる確率も高まると考えられる。SARS-CoV-2 はナカキクガシラコウモリのコウモリコロナウイルスである RaTG13^{109, 110} をベースに、S タンパク質領域がセンザンコウコロナウイルスと組み変わったものと言われる¹¹¹⁻¹¹³。上記のように SARSr-CoV には furin サイトがないことから、人為的に作製されたという説まで出たが、前述のように TRS を介してきれいに入れ替わったコロナウイルスがいくつも存在している。さらに S1/S2 ジャンクションに挿入をもつコウモリコロナウイルスである RmYN02¹¹⁴ の存在が自然界での発生の可能性を一層高

めている。

クロロキン/ヒドロキシクロロキンが抗 SARS-CoV-2 薬として選択されたが^{115, 116)}、これらの作用がエンドソームの pH 上昇によるプロテアーゼ阻害により、後期エンドソーム経路が阻害される、という事を考えれば、クロロキン/ヒドロキシクロロキン単体の内服投与では、細胞表面からの経路を止めることが出来ないという事は想定できることである。

また、SARS や MERS との大きな差として、無症状でも高力価のウイルスを排出し、これらの陽性者がウイルスの拡散に関係していることが知られている¹¹⁷⁾。しかしこれも前述のように、ヒトコロナウイルスで既に示唆されているものであり、SARS-CoV-2 という名がつけられているが、ヒトコロナウイルスであると思えばこれまでの知見が通用している。

5. 最後に

これまでに報告されている SARS-CoV-2 の知見の中で、過去のコロナウイルスの知見と大きく外れているものはないと思われるが、謎は多く残っており、特に東アジア以外では流行の勢いが異なるという点は何かしらの特徴があるに違いない。以前までとはコロナウイルス研究の勢いが全く異なり、スーパーコンピューターの富岳が利用されるようなケースは1年前では全く想像できなかった事態である。今後は SARS-CoV-2 を用いて、コロナウイルスとしての新たな知見が続々と報告されるに違いない。

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) Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ.2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579:265-269.
- 2) Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL.2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270-273.
- 3) WHO.2020. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Accessed Oct. 21.
- 4) WHO.2020. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Accessed Oct.
- 5) Taguchi F.2006. Cell entry mechanism of coronaviruses: implication in their pathogenesis. *Uirusu* 56:165-171.
- 6) Matsuyama S.2011. Protease dependent cell entry mechanism of Coronaviruses. *Uirusu* 61:109-116.
- 7) Taguchi F, Matsuyama S.2009. Cell entry mechanisms of coronaviruses. *Uirusu* 59:215-22.
- 8) Hasoksuz M, Alekseev K, Vlasova A, Zhang X, Spiro D, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Saif LJ.2007. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J Virol* 81:4981-90.
- 9) Jin L, Cebra CK, Baker RJ, Mattson DE, Cohen SA, Alvarado DE, Rohrmann GF.2007. Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. *Virology* 365:198-203.
- 10) Mihindikulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D.2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol* 82:5084-8.
- 11) Gough RE, Drury SE, Culver F, Britton P, Cavanagh D.2006. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Casin). *Avian Pathol* 35:122-6.
- 12) Suryaman GK, Soejoedono RD, Setiyono A, Poetri ON, Handharyani E.2019. Isolation and characterization of avian coronavirus from healthy *Eclectus* parrots (*Eclectus roratus*) from Indonesia. *Vet World* 12:1797-1805.
- 13) Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF.2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-9.
- 14) Hemida MG, Perera RA, Wang P, Alhammadi MA, Siu LY, Li M, Poon LL, Saif L, Alnaeem A, Peiris M.2013. Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. *Euro Surveill* 18:20659.
- 15) Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA.2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 370:2499-505.
- 16) Tang XC, Zhang JX, Zhang SY, Wang P, Fan XH, Li LF, Li G, Dong BQ, Liu W, Cheung CL, Xu KM, Song WJ, Vijaykrishna D, Poon LL, Peiris JS, Smith GJ, Chen H, Guan Y.2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol* 80:7481-90.
- 17) Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ.2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4:e00737-13.
- 18) Hirokawa C, Watanabe K, Kon M, Tamura T, Nishikawa M.2008. Isolation of a virus closely related to human coronavirus 229E from a case of pharyngitis, March 2008-Niigata. *Infectious Agents Surveillance Report (written in Japanese)* 29:283.

- 19) Dijkman R, Jebbink MF, El Idrissi NB, Pyrc K, Muller MA, Kuijpers TW, Zaaijer HL, van der Hoek L.2008. Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J Clin Microbiol* 46:2368-73.
- 20) Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE.2010. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 48:2940-7.
- 21) Wilder-Smith A, Telesman MD, Heng BH, Earnest A, Ling AE, Leo YS.2005. Asymptomatic SARS coronavirus infection among healthcare workers, Singapore. *Emerg Infect Dis* 11:1142-5.
- 22) WHO.2003. Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (?SARS). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70863>. Accessed Oct. 26.
- 23) Al-Tawfiq JA, Gautret P.2019. Asymptomatic Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection: Extent and implications for infection control: A systematic review. *Travel Med Infect Dis* 27:27-32.
- 24) WHO.2018. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) <https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/mers-cov/en/index.html>. Accessed Oct. 26.
- 25) Owusu M, Annan A, Corman VM, Larbi R, Anti P, Drexler JF, Agbenyega O, Adu-Sarkodie Y, Drosten C.2014. Human coronaviruses associated with upper respiratory tract infections in three rural areas of Ghana. *PLoS One* 9:e99782.
- 26) Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, Jebbink MF, Matser A, Kinsella CM, Rueda P, Ieven M, Goossens H, Prins M, Sastre P, Deijs M, van der Hoek L.2020. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* doi:10.1038/s41591-020-1083-1.
- 27) Shirato K, Kawase M, Watanabe O, Hirokawa C, Matsuyama S, Nishimura H, Taguchi F.2012. Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004-2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein. *J Gen Virol* 93:1908-17.
- 28) Pyrc K, Sims AC, Dijkman R, Jebbink M, Long C, Deming D, Donaldson E, Vabret A, Baric R, van der Hoek L, Pickles R.2010. Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J Virol* 84:11255-63.
- 29) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S.2018. Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry. *Virology* 517:9-15.
- 30) Shirato K, Nao N, Matsuyama S, Kageyama T.2020. Ultra-Rapid Real-Time RT-PCR Method for Detecting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Using a Mobile PCR Device, PCR1100. *Jpn J Infect Dis* 73:181-186.
- 31) Raabe T, Schelle-Prinz B, Siddell SG.1990. Nucleotide sequence of the gene encoding the spike glycoprotein of human coronavirus HCV 229E. *J Gen Virol* 71 (Pt 5):1065-73.
- 32) Mizutani T, Repass JF, Makino S.2000. Nascent synthesis of leader sequence-containing subgenomic mRNAs in coronavirus genome-length replicative intermediate RNA. *Virology* 275:238-43.
- 33) Sethna PB, Hung SL, Brian DA.1989. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5626-30.
- 34) Snijder EJ, Limpens R, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, Faas F, Koster AJ, Barcena M.2020. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol* 18:e3000715.
- 35) Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ.2013. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* 4.
- 36) Kamitani W, Narayanan K, Huang C, Lokugamage K, Ikegami T, Ito N, Kubo H, Makino S.2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12885-90.
- 37) Narayanan K, Ramirez SI, Lokugamage KG, Makino S.2015. Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res* 202:89-100.
- 38) Nakagawa K, Narayanan K, Wada M, Popov VL, Cajimat M, Baric RS, Makino S.2018. The Endonucleolytic RNA Cleavage Function of nsp1 of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Promotes the Production of Infectious Virus Particles in Specific Human Cell Lines. *J Virol* 92.
- 39) Stobart CC, Sexton NR, Munjal H, Lu X, Molland KL, Tomar S, Mesecar AD, Denison MR.2013. Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common and divergent regulatory determinants of protease activity. *J Virol* 87:12611-8.
- 40) Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, Snijder EJ, Canard B, Imbert I.2014. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3900-9.
- 41) te Velthuis AJ, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SH, Snijder EJ.2010. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res* 38:203-14.
- 42) te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ.2012. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res* 40:1737-47.
- 43) Egloff MP, Ferron F, Campanacci V, Longhi S, Rancurel C, Dutartre H, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Cambillau C, Canard B.2004. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a

- single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3792-6.
- 44) Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J.2004. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* 78:5619-32.
 - 45) Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J.2004. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12694-9.
 - 46) Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS.2011. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 8:270-9.
 - 47) Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, Zevenhoven JC, Bernard S, Betzi S, Imbert I, Canard B, Guillemot JC, Lecine P, Pfefferle S, Drosten C, Snijder EJ, Decroly E, Morelli X.2014. Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem* 289:25783-96.
 - 48) Opstelten DJ, Raamsman MJ, Wolfs K, Horzinek MC, Rottier PJ.1995. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol* 131:339-49.
 - 49) Nguyen VP, Hogue BG.1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol* 71:9278-84.
 - 50) Narayanan K, Maeda A, Maeda J, Makino S.2000. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol* 74:8127-34.
 - 51) Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ.1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* 15:2020-8.
 - 52) Hsieh PK, Chang SC, Huang CC, Lee TT, Hsiao CW, Kou YH, Chen IY, Chang CK, Huang TH, Chang MF.2005. Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent. *J Virol* 79:13848-55.
 - 53) Ujike M, Taguchi F.2015. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* 7:1700-25.
 - 54) Zeng Q, Langereis MA, van Vliet AL, Huizinga EG, de Groot RJ.2008. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9065-9.
 - 55) Desforgues M, Desjardins J, Zhang C, Talbot PJ.2013. The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. *J Virol* 87:3097-107.
 - 56) Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV.1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357:420-2.
 - 57) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Gre-enough TC, Choe H, Farzan M.2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450-4.
 - 58) Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pohlmann S.2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7988-93.
 - 59) Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL.2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495:251-4.
 - 60) Huang X, Dong W, Milewska A, Golda A, Qi Y, Zhu QK, Marasco WA, Baric RS, Sims AC, Pyrc K, Li W, Sui J.2015. Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *J Virol* 89:7202-13.
 - 61) Hulswit RJG, Lang Y, Bakkers MJG, Li W, Li Z, Schouten A, Ophorst B, van Kuppeveld FJM, Boons GJ, Bosch BJ, Huizinga EG, de Groot RJ.2019. Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:2681-2690.
 - 62) Tusell SM, Schittone SA, Holmes KV.2007. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J Virol* 81:1261-73.
 - 63) Hohdatsu T, Okada S, Ishizuka Y, Yamada H, Koyama H.1992. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci* 54:557-62.
 - 64) Benetka V, Kubber-Heiss A, Kolodziejek J, Nowotny N, Hofmann-Parisot M, Mostl K.2004. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 99:31-42.
 - 65) Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ.1998. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 72:4508-14.
 - 66) Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H.1996. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol* 40:425-33.
 - 67) Motokawa K, Hohdatsu T, Aizawa C, Koyama H, Hashimoto H.1995. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. *Arch Virol* 140:469-80.
 - 68) Pratelli A.2006. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Vet Res* 37:191-200.
 - 69) Lorusso A, Decaro N, Schellen P, Rottier PJ, Buon-

- avoglia C, Haijema BJ, de Groot RJ.2008. Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol* 82:10312-7.
- 70) Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, Choi GK, Xu H, Lam CS, Guo R, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY.2010. Ecopidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *J Virol* 84:2808-19.
- 71) Fu K, Baric RS.1992. Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology* 189:88-102.
- 72) Sola I, Moreno JL, Zuniga S, Alonso S, Enjuanes L.2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* 79:2506-16.
- 73) Masters PS, Rottier PJ.2005. Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 287:133-59.
- 74) Haijema BJ, Volders H, Rottier PJ.2003. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol* 77:4528-38.
- 75) Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P.2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11876-81.
- 76) Matsuyama S, Taguchi F.2009. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J Virol* 83:11133-41.
- 77) Madu IG, Roth SL, Belouzard S, Whittaker GR.2009. Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *J Virol* 83:7411-21.
- 78) Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR.2009. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5871-6.
- 79) Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJ, Bosch BJ, de Haan CA.2014. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog* 10:e1004502.
- 80) 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* 101:4240-5.
- 81) Bosch BJ, Bartelink W, Rottier PJ.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* 82:8887-90.
- 82) Huang IC, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, Ghiran S, Vasilieva N, Dermody TS, Harrison SC, Dormitzer PR, Farzan M, Rottier PJ, Choe H.2006. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J Biol Chem* 281:3198-203.
- 83) Qiu Z, Hingley ST, Simmons G, Yu C, Das Sarma J, Bates P, Weiss SR.2006. Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J Virol* 80:5768-76.
- 84) Kawase M, Shirato K, Matsuyama S, Taguchi F.2009. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J Virol* 83:712-21.
- 85) Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F.2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12543-7.
- 86) Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F.2008. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol* 52:118-27.
- 87) Belouzard S, Madu I, Whittaker GR.2010. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *J Biol Chem* 285:22758-63.
- 88) Bottcher E, Freuer C, Steinmetzer T, Klenk HD, Garten W.2009. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. *Vaccine* 27:6324-9.
- 89) Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M.2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80:9896-8.
- 90) Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y.2008. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82:8942-6.
- 91) Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F.2010. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84:12658-64.
- 92) Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V, Pohlmann S.2013. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J Virol* 87:6150-60.
- 93) Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S.2012. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol* 86:6537-45.
- 94) Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Kramer-Kuhl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Dro-

- sten C, Dittmer U, von Hahn T, Simmons G, Hofmann H, Pohlmann S.2013. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol* 87:5502-11.
- 95) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S.2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 87:12552-61.
- 96) Shirato K, Kanou K, Kawase M, Matsuyama S.2017. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *J Virol* 91:pii: e01387-16.
- 97) Yamamoto M, Matsuyama S, Li X, Takeda M, Kawaguchi Y, Inoue JI, Matsuda Z.2016. Identification of Nafamostat as a Potent Inhibitor of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein-Mediated Membrane Fusion Using the Split-Protein-Based Cell-Cell Fusion Assay. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6532-6539.
- 98) Shirato K, Kanou K, Kawase M, Matsuyama S.2017. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *J Virol* 91.
- 99) Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drobot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, et al.2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300:1399-404.
- 100) Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA.2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367:1814-20.
- 101) Hamre D, Procknow JJ.1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:190-3.
- 102) Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F.2008. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol* 82:11985-91.
- 103) Park JE, Li K, Barlan A, Fehr AR, Perlman S, McCray PB, Jr., Gallagher T.2016. Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:12262-12267.
- 104) Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, Taguchi F.2011. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol* 85:7872-80.
- 105) Nao N, Sato K, Yamagishi J, Tahara M, Nakatsu Y, Seki F, Katoh H, Ohnuma A, Shirogane Y, Hayashi M, Suzuki T, Kikuta H, Nishimura H, Takeda M.2019. Consensus and variations in cell line specificity among human metapneumovirus strains. *PLoS One* 14:e0215822.
- 106) Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Muller MA, Drosten C, Pohlmann S.2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271-280 e8.
- 107) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M.2020. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:7001-7003.
- 108) Zhang X, Chen X, Zhang Z, Roy A, Shen Y.2020. Strategies to trace back the origin of COVID-19. *J Infect* 80:e39-e40.
- 109) Li C, Yang Y, Ren L.2020. Genetic evolution analysis of 2019 novel coronavirus and coronavirus from other species. *Infect Genet Evol* 82:104285.
- 110) Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S.2020. Full-genome evolutionary analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect Genet Evol* 79:104212.
- 111) Lam TT, Jia N, Zhang YW, Shum MH, Jiang JF, Zhu HC, Tong YG, Shi YX, Ni XB, Liao YS, Li WJ, Jiang BG, Wei W, Yuan TT, Zheng K, Cui XM, Li J, Pei GQ, Qiang X, Cheung WY, Li LF, Sun FF, Qin S, Huang JC, Leung GM, Holmes EC, Hu YL, Guan Y, Cao WC.2020. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 583:282-285.
- 112) Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, Li N, Guo Y, Li X, Shen X, Zhang Z, Shu F, Huang W, Li Y, Zhang Z, Chen RA, Wu YJ, Peng SM, Huang M, Xie WJ, Cai QH, Hou FH, Chen W, Xiao L, Shen Y.2020. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 583:286-289.
- 113) Zhang T, Wu Q, Zhang Z.2020. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol* 30:1346-1351 e2.
- 114) Zhou H, Chen X, Hu T, Li J, Song H, Liu Y, Wang P, Liu D, Yang J, Holmes EC, Hughes AC, Bi Y, Shi W.2020. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol* 30:2196-2203 e3.
- 115) Adeoye AO, Oso BJ, Olaoye IF, Tijjani H, Adebayo AI.2020. Repurposing of chloroquine and some clinically approved antiviral drugs as effective therapeutics to prevent cellular entry and replication of coronavirus. *J Biomol Struct Dyn* doi:10.1080/07391102.2020.1765876:1-11.
- 116) Beura S, Chetti P.2020. In-silico strategies for probing chloroquine based inhibitors against SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn* doi:10.1080/07391102.2020.1772111 : 1-13.

- 117) Oran DP, Topol EJ. 2020. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review. *Ann Intern Med* 173:362-367.

Basis of coronavirus infection, and SARS-CoV-2

Kazuya SHIRATO

Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases

At the end of December 2019, novel pneumonia emerged in Wuhan city, China, and it caused by novel coronavirus. Causative virus designated as Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and the diseases name was Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). At first, SARS-CoV-2 was regarded as kind of SARS-CoV and Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV). However, it was misunderstanding and SARS-CoV-2 was similar to human coronavirus-es. Here, to help better understanding for SARS-CoV-2, the basis of coronavirus infection was described.