

2. プロテアーゼ依存的なコロナウイルス細胞侵入

松 山 州 徳

国立感染症研究所 ウイルス第三部

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) のエンベロープ糖蛋白 (S 蛋白) は、宿主プロテアーゼ (トリプシン, エラスターゼ, カテプシン, TMPRSS2) に切られて活性化される。インフルエンザウイルス等多くのエンベロープウイルスもプロテアーゼを利用するが、プロテアーゼの作用する様式が SARS-CoV とは異なる。インフルエンザウイルスの場合は細胞でウイルスが作られるときエンベロープ糖蛋白 (HA) がプロテアーゼに切れ「膜融合誘導可能な形」になるが、SARS-CoV の場合は「細胞侵入の瞬間」に S 蛋白が切られて膜融合開始の引き金が引かれる。我々は SARS-CoV によく似た S 蛋白を持つマウス肝炎ウイルス (MHV-2) を用いて、S 蛋白は二段階の構造変化をすることを検出した。まず S 蛋白はレセプターに結合すると安定した三量体を形成し、Fusion Peptide を露出させ、細胞膜に突き刺さる。続いてプロテアーゼにより開裂を受け、内部のヘリックス構造を引きつけることによりウイルスと細胞の膜を引き寄せ、融合させると考えられる。このメカニズムはウイルスにとって標的細胞で確実に膜融合を誘導できる効率の良い仕組みである。

1. はじめに

コロナウイルスは、エンベロープをもつ直径 60~220nm の楕円形あるいは多形成のウイルスである。ウイルスゲノムはポジティブ本鎖 RNA で、27~32kb のサイズであり、RNA ウイルスの中では最大サイズである。ヒトに感染するコロナウイルス Human coronavirus (HCoV) としては、1960年代に HCoV-229E と HCoV-OC43 が風邪の原因ウイルスとして分離された。また 2003 年に HCoV-NL63, 2005 年には HCoV-NH が呼吸器症状を示す患者から分離された。さらに 2003 年に分離された重症急性呼吸器症候群の原因病原体 (SARS-CoV) はキクガシラコウモリを自然宿主とするコロナウイルスであったが、ハクビシンを経由してヒトに感染することで、肺炎を引き起こすウイルスに変化したと考えられている。一方、同科のウイルスには、ニワト

リ伝染性気管支炎ウイルス (IBV), マウス肝炎ウイルス (MHV), ブタ伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV), ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) など、異なる宿主動物に様々な病気を引き起こすウイルスが知られている。

本稿ではコロナウイルスの細胞侵入とその時に起こるエンベロープ糖蛋白の構造変化について概説したい。しかしながら、本誌「ウイルス」にはこれまでに、何度もこの分野に関連する総説が掲載されており、改めて解説すべき知見は僅かである。コロナウイルスの細胞侵入については田口文広が^{1,6)}、コロナウイルスの RNA 複製機構については水谷哲也、塚本健司が詳しく解説している^{7,8,9)}。また、宮内浩典の総説には HIV を中心としたエンベロープウイルス全般の細胞侵入機構について詳しく述べられており、典型的なクラス I 膜融合蛋白をもつコロナウイルスもこの範疇に入る¹⁰⁾。さらにエンベロープ糖蛋白の構造変化については、鶴留雅人による十分に考察された総説があるので、参考にしていただきたい^{11,12)}。一方、SARS-CoV の病原性発現に関する研究は、久場敬司による総説が他誌に掲載されているので引用しておく¹³⁾。本稿では特にこれまで詳しく解説されたことの無い、最近 SARS-CoV と MHV-2 株で解明された新しいウイルス細胞侵入様式「プロテアーゼ依存的細胞侵入」について、我々の研究から得られたメカニズムを解説する。

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4室

TEL: 042-848-7065

FAX: 042-567-5631

E-mail: matuyama@nih.go.jp

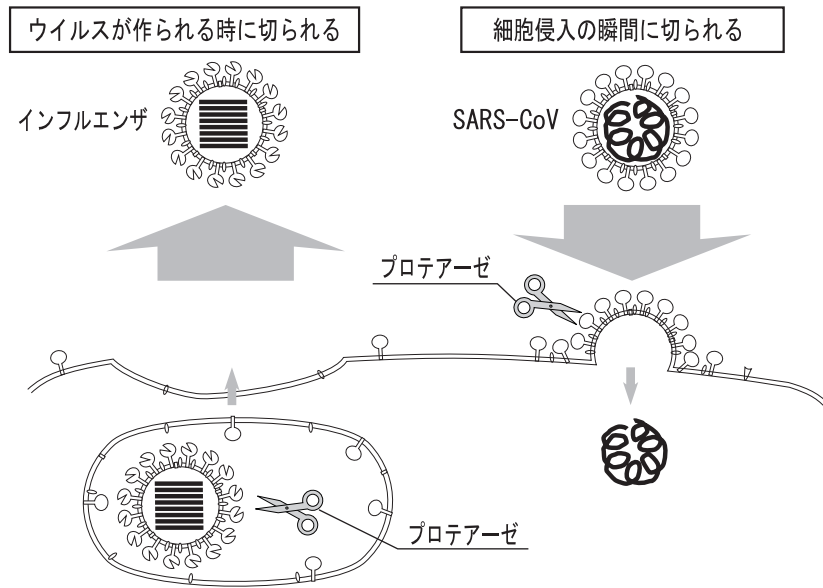


図1 エンベロープウイルスのプロテアーゼ依存性

インフルエンザ, HIV 等の多くのエンベロープウイルスは細胞内でウイルスが作られる時, エンベロープ糖蛋白がプロテアーゼによる開裂を受け, 「膜融合誘導可能」な形に活性化される。一方, SARS-CoV のエンベロープ糖蛋白(S) は細胞侵入の瞬間に宿主プロテアーゼによる開裂を受け, 膜融合活性が発揮される。

2. プロテアーゼ依存的エンベロープ糖蛋白

エンベロープウイルスが細胞に侵入する時, エンベロープの脂質二重膜と細胞の脂質二重膜が融合する必要がある。ウイルス表面のエンベロープ糖蛋白がこの膜融合反応を仲介するが, 多くのウイルスのエンベロープ糖蛋白は宿主のプロテアーゼに切られて「膜融合誘導可能な形」になる。プロテアーゼがウイルスに作用する様式は大きく二つに分けられる。(図1)

2-1. ウイルスが作られる時に切られるもの

まず, HIV やインフルエンザ等の多くのウイルスは, エンベロープ糖蛋白が「ウイルスが作られるとき」あるいは「ウイルスが標的組織に到達したとき」にプロテアーゼに切られて開裂し, 「膜融合誘導可能な形」になると考えられている。HIV は細胞内で作られる時, エンベロープ糖蛋白(GP160)がFurin によって切れ GP120 と GP41 の2つのサブユニットに分かれる。また, ニパウイルスはカテプシンにより, エンベロープ糖蛋白(F)が切られることが知られている。インフルエンザウイルスのエンベロープ糖蛋白(HA)は, トリプシン, トリプターゼクララ, ミニプラスミン, HAT によって切られることが報告されているが, 最近, 肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)が, 効率良くHAを活性化することが報告されている^{14,15)}。またメタニューモウイルスでもTMPRSS2による同様の結果が報告されており, 肺炎

ウイルスの指向性を決める主役因子である可能性が示唆されている¹⁶⁾。

2-2. 細胞侵入の瞬間に切られるもの

現在までに報告されたSARS-CoVのS蛋白を活性化する宿主プロテアーゼは, トリプシン, エラスターゼ, カテプシン, TMPRSS2である¹⁷⁻²⁰⁾。しかし上記のように「ウイルスが作られるとき」に働くのではなく, 「細胞侵入の瞬間」に働くことが報告されている^{18,19)}。同様にプロテアーゼを利用するウイルスとして, マウス肝炎ウイルスMHV-2株, ヒトコロナウイルス229Eがある²¹⁻²³⁾。またはエボラウイルスもカテプシンを利用して細胞侵入すると考えられている²⁴⁾。

これまでによく研究されているコロナウイルス, MHV-JHM株, MHV-A59株はHIVと同様の「ウイルスが作られるとき」に切られるS蛋白をもっている。約180kDaのS蛋白は一本の蛋白として合成され, 細胞内のFurinにより約90kDaのS1及びS2サブユニットに開裂される。一方, SARS-CoV, 229E及びMHV-2株のS蛋白はFurin切断サイトが欠損しているため, 180kDaの一本の蛋白として合成された後, 開裂を受けず180kDaのままウイルス粒子上に乗っている。この未開裂S蛋白は「膜融合誘導可能な形」になっておらず, 感染時, レセプター結合の後に上記の宿主プロテアーゼによる開裂を受けて活性化すると考えられている。

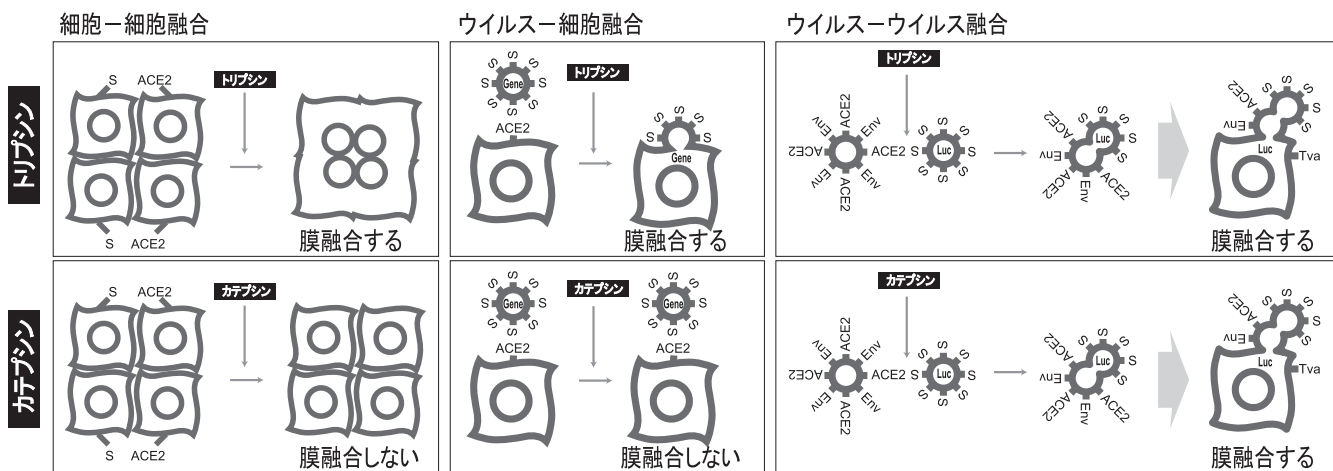


図2 SARS-CoVの膜融合活性の検出

トリプシンは3つの方法(細胞-細胞融合, 細胞-ウイルス融合, ウイルス-ウイルス膜融合)で膜融合を誘導することができる。しかし、カテプシンについては、特殊な方法(ウイルス-ウイルス膜融合)で膜融合が検出されるのみであり、カテプシンがトリプシンと同じようにS蛋白を活性化する最終的な引き金となるとは考え難い。

3. S蛋白の膜融合活性検出

我々はプロテアーゼによるS蛋白活性化を検出するために、「細胞-細胞融合」または「ウイルス-細胞融合」を調べている。「細胞-細胞融合」は、ウイルス感染細胞あるいはS蛋白発現細胞にプロテアーゼを37℃で5分間作用させ、3~5時間後に誘導される融合細胞の核を数えて定量する方法である(図2)。また「ウイルス-細胞融合」は氷上でウイルスを細胞に吸着させた後、プロテアーゼを37℃で5分間作用させて感染を成立させ、5時間後にRNAを回収し、複製を開始したウイルスのmRNAをリアルタイムPCRで定量する方法である(図2, 図4)。

一方、Simmonsらは、特殊な方法「ウイルス-ウイルス膜融合法」を用いてS蛋白の膜融合活性を検出している(図2)。この方法には、2種類のHIVシュードタイプウイルスを用いる。1つ目は表面にSARS-CoVのレセプター(ACE2)とAvian Sarcoma and Leukosis Virus (ASLV)のエンベロープ糖蛋白(Env)を持たせてある。2つ目はウイルス内にルシフェラーゼの遺伝子を、表面にはSARS-CoVのS蛋白を持たせてある。これら2種類を試験管内で混ぜ合わせ、様々なタイミングと濃度でプロテアーゼを作用させた後、ASLVのレセプター(Tva)発現細胞へ感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。試験管内で2種類のシュードタイプウイルスが融合した場合のみ、ルシフェラーゼ遺伝子が細胞内に入ると考えられる。この方法の利点は、試験管内で温度と環境を完全にコントロールした条件下で膜融合を定量できることである。彼らはこの方法で、ウイルスとレセプターの結合後にトリプシンを作用させると膜融合を誘導できることを示した¹⁷⁾。

この結果は、SARS-CoVのS蛋白はレセプター結合後とプロテアーゼ作用後に「二段階の構造変化」をすることを予想している。またプロテアーゼはS蛋白に対して膜融合活性の引き金を引く「トリガー」として働くことを示している。我々はSARS-CoVに非常によく似たS蛋白と細胞侵入様式をもつMHV-2を用いてこの二段階の構造変化を直接検出し、彼らのSARS-CoVでの予想をサポートする結果を報告している(後述)。

しかし、このウイルス-ウイルス膜融合法には問題点もある。ASLVもSARS-CoVと同様にエンドソームを通るウイルスであるため、もし試験管内でのウイルス-ウイルス膜融合が不十分であっても、細胞に感染させた時にエンドソーム内の何らかの因子が補うことで、結果として試験管内で膜融合が成立しているかのように見えてしまう可能性があり、我々は彼らの結果解釈の問題点を指摘している²¹⁾。

3-1. トリプシン, エラスターゼ

トリプシンは、SARS-CoVとMHV-2のS蛋白に対して、上記の細胞-細胞融合、ウイルス-細胞融合のどちらの方法でも、強く膜融合を誘導するので、正にS蛋白の活性化因子であるといえる。またエラスターゼもトリプシンと同様に膜融合を誘導できることが確認されている¹⁹⁾。エラスターゼは炎症組織で好中球が大量に放出するプロテアーゼであり、肺炎が重症化する時のウイルス増殖に関与する可能性が予想される(図5)。

3-2. カテプシン

SARS-CoV, MHV-2は、トリプシンやエラスターゼが細胞の周りに無い場合は、レセプター結合後にエンドソームを通り、ライソゾーム内のカテプシンによりS蛋白が開裂をうけ活性化されると考えられている。この説は、バ

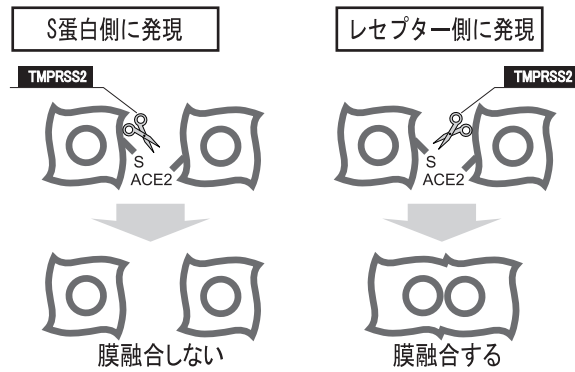


図3 TMPRSS2の空間的な方向とSARS-CoV膜融合誘導

TMPRSS2はS蛋白と向かい合った反対側の膜上、つまりレセプター(ACE2)と同じ側の膜上にある時のみ、S蛋白を活性化することができる。

フィロマイシンやアンモニウムクロライドのようなエンドソーム内のpH低下を抑える薬によりウイルスの細胞侵入が阻止されること、またはカテプシンのインヒビターやsiRNAで細胞侵入を阻止されることが根拠となっている^{17,25)}。しかし、我々の実験では、市販のカテプシンをS蛋白発現細胞に作用させても細胞-細胞融合を誘導できないし、ウイルス-細胞融合も誘導できない。一方でBoschらはS蛋白発現細胞をカテプシン処理することにより細胞融合の誘導に成功しているが、融合細胞は極めて小さく、極めて低頻度である²⁵⁾。また、Simmonsらがウイルス-ウイルス膜融合により、カテプシンによる膜融合を検出しているが¹⁷⁾、上述のように、この方法には結果の解釈に疑問が残る。このような結果から我々は、カテプシンによる膜融合誘導能は、トリプシンと比べて著しく弱く、膜融合に必要な因子が何か不足していると考えている。MHV-2を用いた実験では、後述するように、S蛋白はトリプシンに切られた場合は66kDa、カテプシンに切られた場合は71kDaに開裂するので、この5kDaの違いにより膜をひきつける力に差が生じている可能性がある。

我々は、カテプシンが膜融合を誘導できない現象について、MelikyanのグループのインフルエンザHAのある変異にヒントを得て解析を行った。HAのエンベロープ内のアミノ酸変異は、膜融合過程がヘミフュージョン(脂質二重膜の外側の膜だけ融合した状態)で止まり、そこへ膜をかく乱する試薬、クロロプロマジン(CPZ)を作用させることにより、ヘミフュージョンから完全な膜融合を誘導することが報告されている²⁶⁾。我々はMHV-2の膜融合過程が、カテプシンに誘導される場合は、インフルエンザの変異体と同じようにヘミフュージョンで止まっていると仮定し、CPZを作用させることにより、完全な膜融合を誘導できるかどうかを調べた。細胞表面にウイルスを吸着させた後、まず細胞をカテプシンで5分間処理し、その後

CPZを3分間作用させた。細胞侵入したウイルスをリアルタイムPCRで検出した結果、僅かではあるが、ウイルスRNAの細胞侵入を検出することができた²¹⁾。この結果からカテプシンが存在するエンドソームでは、CPZに変わる因子がS蛋白の働きを助けている可能性が考えられる。エンドソーム膜のコレステロール濃度は細胞表面より低いといわれており²⁷⁾、我々はエンドソーム膜の構成が、膜融合を引き起こしやすい環境を作っていると予想している。

3-3. TMPRSS2

現在までに報告されている膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)を利用するウイルスは、インフルエンザ、メタニューモ、SARS、ヒトコロナウイルスNL63である^{14,15,16,20,28)}。SARS-CoVをTMPRSS2発現細胞に感染させると、細胞膜融合が起こる。さらに、この細胞ではバフィロマイシンやカテプシンインヒビターでエンドソーム経路からの侵入を止めても、SARS-CoVはよく細胞侵入できる(図4)。よって、SARS-CoVのS蛋白はTMPRSS2によって切断されて活性化すると考えられる。しかし、TMPRSS2発現細胞で作られたウイルスのS蛋白や、細胞に発現しているS蛋白に開裂はみられなかった。Shullaらのごく僅かなS蛋白の開裂を検出しているが、TMPRSS2による強い膜融合活性とは明らかに相関しないほど僅かである²⁸⁾。インフルエンザウイルスのHAはTMPRSS2発現細胞ではよく切断されるのに比べると、SARS-CoVのS蛋白の開裂は極めて少ない²⁰⁾。

この現象のメカニズムとしては、SARSのS蛋白はレセプター結合で構造変化を誘導された時のみプロテアーゼに活性化されると考えられるので、レセプターに接したS蛋白のみをTMPRSS2が切断するのであれば、ごく僅かなS蛋白の開裂でも、膜融合が起こると予想できる。我々は細胞で作られたウイルスが全く切られず、細胞に入るウイルスのS蛋白のみが切られると予想し、S蛋白と

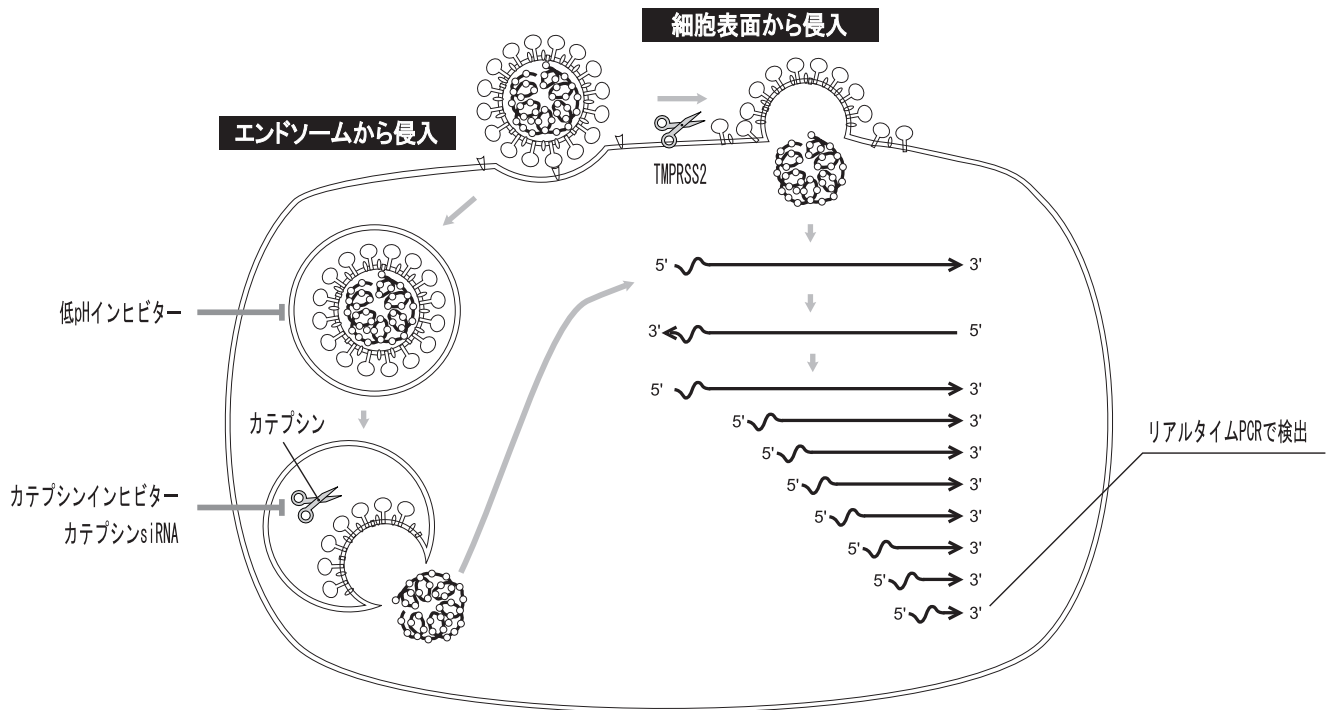


図4 二通りの経路から細胞に侵入する SARS-CoV

SARS-CoV はエンドソームで膜融合する経路と、細胞表面で膜融合する経路の、二通りの経路から細胞侵入することができる。

TMPRSS2 の空間的な方向がそれを決めるメカニズムであると考え、方向性を確かめる実験をおこなった (図3)。S 蛋白もしくはレセプターを発現した細胞をそれぞれ準備し、S 蛋白側だけに TMPRSS2 を発現させた場合と、レセプター側だけに TMPRSS2 を発現させた場合で細胞膜融合を調べると、S 蛋白と相対する細胞に TMPRSS2 が発現した時のみ、膜融合が誘導されることがわかった²⁰⁾。つまりウイルスが細胞に入る時のみ S 蛋白は TMPRSS2 に切れられ、出て行く時には切れられないと想像できる。TMPRSS2 はウイルスにとっては、確実に標的細胞に侵入でき、しかも細胞でつくられたウイルスには作用しない、使い勝手のよいプロテアーゼであるといえる。

3-4. プロテアーゼ依存的なウイルスの組織指向性

上記のように、SARS-CoV はトリプシン、エラスターゼ、TMPRSS2 を利用する場合は細胞の表面から侵入でき、カテプシンを利用する場合はエンドソーム経路を通る (図4)。片方のルートはプロテアーゼインヒビターで止めても、他方から侵入可能であり、ウイルスは感染する細胞によって経路を選ぶ可能性がある。実際の SARS 肺炎で主にどちらのルートを通して感染するのかは解らないし知る術もないが、我々のカニクイザルを用いた感染実験の結果は、TMPRSS2 を発現している I 型肺胞上皮細胞に SARS-CoV はよく感染していた²⁰⁾。

またエラスターゼにより SARS-CoV の細胞侵入が誘導

されることは、肺炎が重症化する時のウイルス増殖に関わる可能性が考えられる。我々は図5に示すように、SARS-CoV が感染初期に肺胞上皮細胞に感染するときは TMPRSS2 を利用し、重症肺炎下ではエラスターゼを利用して細胞侵入するという、「SARS 肺炎のプロテアーゼ利用モデル」を提案している²⁰⁾。一連のプロテアーゼによるウイルスの活性化機構は、永井美之の提唱する「ウイルス病原性発現におけるプロテアーゼ依存性トロピズム説」²⁹⁾ を支持するものであり、肺炎ウイルスの指向性を決める因子の主役が TMPRSS2 である可能性を示唆している。

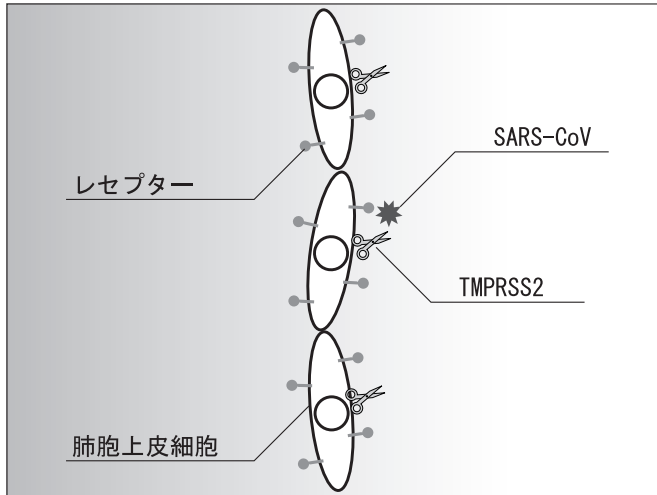
4. S 蛋白の二段階構造変化

上記の Simmons らの報告により、SARS-CoV の S 蛋白はレセプター結合とプロテアーゼ切断により、二段階の構造変化を経て膜融合を誘導することが予想されていたので¹⁷⁾、我々は、構造変化検出の為の材料が十分に揃っており、SARS-CoV とよく似た S 蛋白をもち、さらに同じような細胞侵入経路をとる MHV-2 株を用いて、二段階構造変化の検出を試みた²¹⁾。

4-1. レセプターが誘導する構造変化 (一段階目)

可溶性 MHV レセプター (soCEACAM1a) と MHV-2 を混ぜあわせ、誘導される構造変化を Native-PAGE の後、ウエスタンブロッティングで検出した。S 蛋白はレセプターがなければ、180kD 泳動されるが、レセプターで構造

感染初期



重症肺炎期

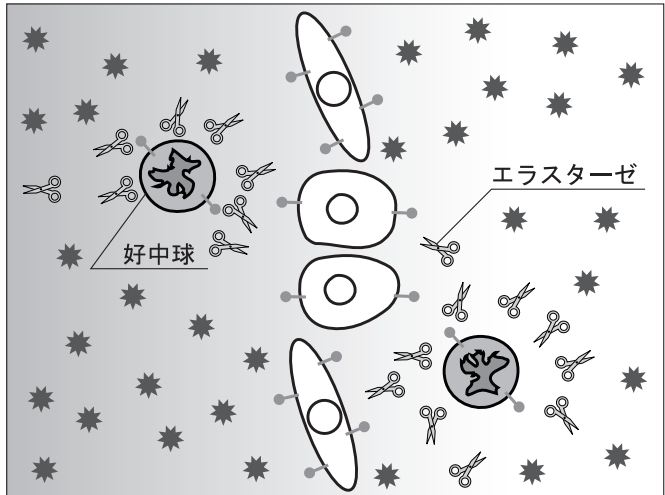


図5 SARS肺炎におけるプロテアーゼ利用モデル

SARS-CoVは感染初期に肺胞上皮表面のTMPRSS2を利用して、また重症肺炎時には免疫細胞が作るエラスターゼを利用して細胞に侵入する可能性がある。

変化を誘導すると、三量体の位置、約500kDaにシフトする。他のウイルスでは構造変化中間体はHR-Nの部分で強く結合することが報告されていることから考えて、MHV-2のS蛋白も構造変化前には弱い結合で三量体を作っているが、レセプターが誘導する構造変化でHR-Nが強い結合を作ると考えられる。またFusionPeptideの近くを認識する抗体を使うと、一量体の180kDaは殆ど検出されず、三量体の500kDaのみが検出されることから、レセプター結合によりFusion Peptideが露出されたと考えられる。リポソーム浮遊法を行ったところ、ウイルスはレセプター依存的に脂質二重膜に結合することを確認できた。つまりMHV-2のS蛋白はレセプターに結合すると、図6に示すように強固な三量体をつくり、Fusion Peptideを露出し、脂質二重膜に結合した状態で、プロテアーゼがやって来るのを待っていると考えられる。

4.2. プロテアーゼが誘導する構造変化 (二段階目)

一段階目の構造変化を可溶性レセプターで誘導した後、トリプシンを20分間作用させて開裂させ、通常のSDS-PAGEとウエスタンブロッティングで確認した。さらにプロテイナーゼK感受性を確認することにより構造変化産物を解析した。レセプターが無いとS蛋白はトリプシンにより90kDaに切られるが、レセプターにより一段階目の構造変化を誘導しておくことで66kDaに切られる。この66kDaが活性化したS蛋白であると考えられたので高濃度のプロテイナーゼKを作用させたところ、53kDaのバンドが検出された。この53kDaはHR-Cと同じアミノ酸配列を持つHRペプチドにより、形成を阻害されることから、プロテイナーゼK耐性の構造変化最終産物、6-ヘリッ

クスバンドル(6HB)であると考えられる。

同様にカテプシンを作用させた場合、71kDaに切り出されたが、HRペプチドやプロテイナーゼKに対する感受性はトリプシンの場合と同じであった。つまり、カテプシンに誘導される構造変化はトリプシンと同じであるにも関わらず、膜融合活性は発揮されないということになる。上記の「3-2」に示した実験のように、カテプシン処理後にCPZを作用させるとウイルスの細胞侵入を誘導できることから、細胞でカテプシンが作用するエンドソーム内環境では、膜融合が成立するために、CPZに代わる他の因子が必要であることが予想される。

5. 未解明の問題

エンベロープウイルスの細胞侵入はよく研究されており、エンベロープ糖蛋白の構造や、構造変化の過程はモデル図が描かれ、わかりやすく説明されているが、全ては推定であり、意外にも解っていないことは多い。例えばウイルスの細胞侵入経路は複数あり、明確にどこからどう入っているのかを判断するのは簡単ではない³⁰⁾。HIVは本当に細胞表面から侵入するのか？という疑問は宮内浩典が投げかけた大きな疑問である¹⁰⁾。細胞膜内側の電顕写真や細胞表面のコレステロール存在比を考慮すると、細胞表面はエンベロープウイルスが直接侵入できる環境にあるとは思えない。他にもS蛋白の構造について、レセプターに結合したS1からどうやってS2に信号を伝達するのか？Fusion Peptideはどうやって膜と結合するのか？S蛋白はどのように折れ曲がって構造変化するのか？という問題もあまり解っていない。比較的よく解っているのは、変化前の構造

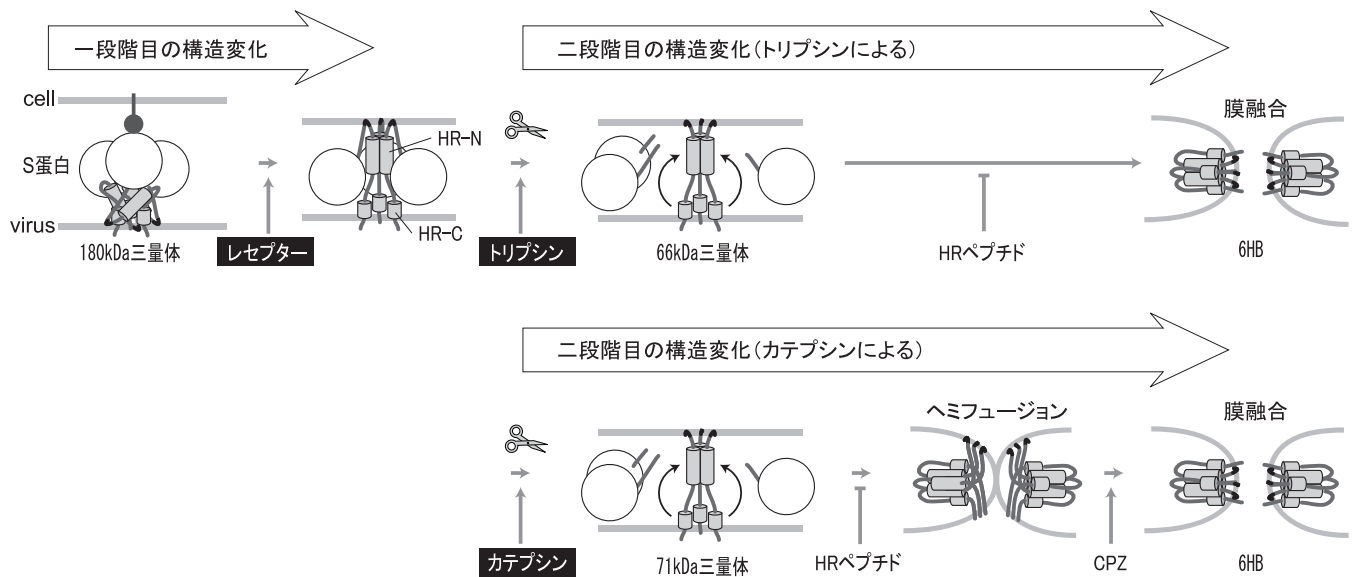


図6 MHV-2のS蛋白の二段階構造変化

S蛋白はレセプターとプロテアーゼにより、二段階の構造変化を誘導される。トリプシンに切られたS蛋白は膜融合に十分な構造変化を発揮できるが、カテプシンに切られたS蛋白では不十分であると考えられ、クロロプロマジン (CPZ) のような膜に作用する薬剤の助けを借りて、膜融合が可能となる。

と変化後の構造であり、変化の過程はほとんど解っていない。さらに、融合過程の膜の構造はどうなっているのか？という問題も、昨年新しい見解が報告されたばかりである³¹⁾。また本稿の課題でもあるが、エンドソーム内でウイルスの膜融合を誘導する最終的な引き金は何か？という問題もよく解っていない。

これら未解明の問題を SARS-CoV や MHV-2 を用いて解析することには意義がある。なぜならばプロテアーゼ依存的なエンベロープ糖蛋白をもつウイルスは、レセプター結合後にプロテアーゼが存在しない環境下では、構造変化が中間段階で止まっていると考えられ、プロテアーゼによる分解産物を解析することは、活性化された中間段階そのものを解析することになるからである。しかも、プロテアーゼの反応条件やプロテアーゼインヒビターにより構造変化をコントロールできるため、構造変化の過程を詳しく解析できる可能性があり、この分野の新展開が期待できる研究材料であるといえる。

謝 辞

杉浦奨励賞に推挙してくださいました、国立感染症研究所の竹田誠部長、山田章雄部長、日本獣医生命科学大学の田口文広教授に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Taguchi F. et. al.. [Cell entry mechanisms of coronaviruses], *Uirusu* 59, 215-222 (2009).
- 2) Taguchi F. [Cell entry mechanism of coronaviruses: implication in their pathogenesis], *Uirusu* 56, 165-171 (2006).
- 3) Taguchi F. [SARS coronavirus], *Uirusu* 53, 201-209 (2003).
- 4) Taguchi F. [Mouse hepatitis virus (MHV) receptor and its interaction with MHV spike protein], *Uirusu* 51, 177-183 (2001).
- 5) Taguchi F. [Structure and biological functions of the spike protein of mouse hepatitis virus], *Uirusu* 46, 109-117 (1996).
- 6) Taguchi F. [Molecular biology of coronaviruses], *Uirusu* 40, 81-90 (1990).
- 7) Mizutani T. [The mechanism of MHV transcription], *Uirusu* 51, 225-236 (2001).
- 8) Mizutani T. [Current topics on SARS coronavirus], *Uirusu* 54, 97-105 (2004).
- 9) Tsukamoto K. [Unique mechanism of coronavirus mRNA transcription], *Uirusu* 46, 99-10 (1996).
- 10) Miyauchi K. [Entry process of enveloped viruses to host cells] *Uirusu*. 59 :205-13. (2009)
- 11) Tsurudome M. [Analyses of paramyxovirus glycoproteins involved in the induction of cell fusion], *Uirusu* 49, 61-70 (1999).
- 12) Tsurudome M. [Viral fusion mechanisms], *Uirusu. J Virol* 55, 207-219 (2005).
- 13) 久場敬司. 新興ウイルス感染症における ARDS 発症, 重症化の分子機構, *実験医学* 28, 2934-2939 (2010)
- 14) Böttcher E. et. al.. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80, 9896-9898 (2006).
- 15) Chaipan C. et. al.. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 83, 3200-3211

- (2009).
- 16) Shirogane Y. et. al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82, 8942-8946 (2008).
 - 17) Simmons G. et. al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *PNAS*. 102, 11876-11881 (2005).
 - 18) Simmons G. et. al. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *PNAS*. 101, 4240-4245 (2004).
 - 19) Matsuyama S. et. al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *PNAS*. 102, 12543-12547 (2005).
 - 20) Matsuyama S. et. al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84, 12658-12664 (2010).
 - 21) Matsuyama S. et. al. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J Virol* 83, 11133-11141 (2009).
 - 22) Qiu Z. et. al. Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J Virol*. 80, 5768-5776 (2006).
 - 23) Kawase M. et. al. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J Virol* 83, 712-721 (2008).
 - 24) Chandran K. et. al. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308:1643-5 (2005).
 - 25) Bosch BJ et.al. 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 (2008)
 - 26) Melikyan G.B. et. al. Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Molecular biology of the cell* 10, 1821-1836 (1999).
 - 27) Schulze H. et. al. Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 674-683 (2008).
 - 28) Shulla A. et. al. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol* 85, 873-882
 - 29) Nagai Y. et. al. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72, 494-508 (1976).
 - 30) Marcer J. et. Al. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* 79: 803-833 (2010)
 - 31) Lee K. Architecture of a nascent viral fusion pore. *EMBO* 29, 1299-1311 (2010).

Protease dependent cell entry mechanism of Coronaviruses

Shutoku MATSUYAMA

Dept. Virology III, National Institute of Infectious Diseases

Previous studies have demonstrated that the SARS-CoV S protein requires proteolytic cleavage by elastase, cathepsin or TMPRSS2 for S-mediated cell-cell or virus-cell membrane fusion. Activation of viral glycoprotein (GP) by protease also has been reported for influenza virus. The most distinctive difference between influenza virus and SARS-CoV is the stage during virus replication in which viral glycoproteins are cleaved by proteases. In influenza virus, the protease makes a simple cut in the GP during maturation. In contrast, SARS-CoV S protein is cleaved by the protease following receptor-induced conformational changes. The protease cleavage site in S protein is thought to be exposed only after receptor binding. In support of this model, we reported that the S protein of mouse hepatitis virus type 2 (MHV-2), which is highly similar to the S protein of SARS-CoV, requires two-step conformational changes mediated by sequential receptor binding and proteolysis to be activated for membrane fusion. Such a mechanism allows for tight temporal control over fusion by protecting the activating cleavage site from premature proteolysis yet allowing efficient cleavage upon binding to the receptor on target cells.