



[総説]

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染と エンドサイトーシス/エキソサイトーシス

萩原真

新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

要旨

SARS-CoV-2(通称新型コロナウイルス)は、COVID-19(コヴィッド・ナインティーン、通称新型コロナウイルス感染症)を引き起こすウイルスである。SARS-CoV-2は、呼吸器系の細胞や血管内皮細胞、神経細胞、その他の細胞にも感染し、宿主細胞内において増殖する。SARS-CoV-2の宿主細胞への感染は、細胞膜から直接細胞質へと感染するモデルと、細胞内への物質取り込み機構であるエンドサイトーシスを利用し、感染するモデルが考えられている。また、感染後、SARS-CoV-2は、宿主細胞内で増殖した後、細胞における分泌機構であるエキソサイトーシスによって細胞外へと放出されると考えられている。本稿では、エンドサイトーシスによるSARS-CoV-2の感染機構と、エキソサイトーシスによるSARS-CoV-2の細胞外への分泌機構について概説する。

キーワード: SARS-CoV-2、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、Rab、SNX27

はじめに

2019年11月に中華人民共和国で、肺炎患者が報告され、その患者より検出された新型コロナウイルスは、翌年に、国際ウイルス分類委員会(International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV)が、SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2、日本では通称新型コロナウイルス)と名付け、そのウイルスによる感染症を、世界保健機関(WHO)が、COVID-19(Coronavirus disease 2019=コヴィッド・ナインティーン)とすると発表した(日本では通称新型コロナウイルス感染症と呼ばれている)。2021年12月現在においても、世界的な流行(パンデミック)となっており、終息の目処が立っていない。

ウイルスは、生物学においては、生物ではないとしている文献のほうが多い(微生物や

ウイルス学の教科書、欧米や日本における微生物やウイルスに関連する学会ホームページなど参照)。その理由の一つは、ウイルスは自身だけでは増殖できないからである。すなわち、ウイルスは、宿主となる細胞に寄生しないと自己複製を行うことができない。そのため、ウイルスは、宿主となる細胞に侵入する必要がある。SARS-CoV-2は、COVID-19を引き起こす一本鎖プラス鎖RNAウイルスであり、宿主細胞に感染することによって増殖し、呼吸器症状、神経症状、循環器における障害など様々な症状を誘発する¹⁻⁵⁾。SARS-CoV-2の細胞内への侵入には、細胞表面から直接細胞質に侵入するモデルと、細胞における物質取り込み機構であるエンドサイトーシスを利用し、細胞内へと侵入するモデルが考えられている^{6,7)}。

これまでに、SARS-CoV-2の受容体として

萩原真
〒950-8680 新潟県新潟市東区海老ヶ瀬 471
新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

2021年12月30日受付
2022年3月9日受理

E-mail: hagimako@unii.ac.jp

ACE2(Angiotensin-converting enzyme 2)が同定されており^{2,8)}、ACE2を培養細胞で発現させるとSARS-CoV-2は、宿主となる細胞に感染しやすくなる⁹⁾。ACE2は、上気道の粘膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、腎臓の上皮細胞、腸上皮細胞、神経系細胞など様々な細胞で発現している^{10,12)}。SARS-CoV-2は、飛沫感染によって感染する割合が高く、感染者のくしゃみや咳あるいは感染者との近距離での会話などでSARS-CoV-2が放出され、非感染者がSARS-CoV-2を口や鼻などから吸い込んで感染する。口や鼻などから吸い込まれたSARS-CoV-2は、肺に到達して感染が広がると肺炎を引き起こされる。ACE2を発現している細胞であればSARS-CoV-2は、理論上は感染するわけだが、体に感染する仕組みを考えるとSARS-CoV-2は、口や鼻から吸い込まれて感染するため肺炎などの呼吸器系の症状を呈しやすい。SARS-CoV-2が呼吸器系から血中に移行するとACE2を発現している血管内皮細胞やその他の細胞にも感染する。また、ACE2は、腸上皮細胞にも発現していることより、腸においてもSARS-CoV-2が感染すると考えられている¹¹⁾。喫煙者や糖尿病患者、循環器系疾患の患者がSARS-CoV-2が重症化しやすい理由は、体内の細胞においてACE2の発現量が高まっていることが原因の一つではないかとされている¹⁰⁾。

SARS-CoV-2の宿主細胞への感染は、SARS-CoV-2表面のスパイクタンパク質と宿主細胞表面にあるACE2とが結合し、SARS-CoV-2が宿主細胞表面に付着することが最初のステップとなる^{2,8)}。他のコロナウイルスの研究では、細胞表面からコロナウイルスが、直接細胞質に侵入するには、コロナウイルスのスパイクタンパク質外側が細胞表面のII型膜貫通型セリンプロテアーゼであるTMPRSS2などのプロテアーゼによって切断され、スパイクタンパク質内側の部分を露出させることが必要であると報告されている^{13,14)}。SARS-CoV-2が、細胞表面から直接細胞質に侵入する時にもTMPRSS2が重要な役割を担っていることが報告されており、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質が切断されるとSARS-CoV-2の膜と細胞膜が融合し、SARS-

CoV-2のゲノムであるRNAが細胞質へと放出される^{8,15,16)}。一方、エンドサイトーシスによる感染では、SARS-CoV-2がACE2に結合した後、細胞膜が陥入することによって、SARS-CoV-2を包み込んだ小胞が形成され、SARS-CoV-2は細胞内部へと移行し、小胞とエンドソームが融合する⁸⁾。細胞内部に移行するにつれて、エンドソーム内のpHは低下し、酸性で酵素活性が高まるカテプシンBやカテプシンLの作用によって、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質外側が切断され、その後SARS-CoV-2の膜とエンドソーム膜が融合し、SARS-CoV-2のゲノムRNAが細胞質へと放出される^{8,16,17)}。細胞表面から直接細胞質へ放出されたSARS-CoV-2のゲノムRNAとエンドソームから細胞質へと放出されたSARS-CoV-2のゲノムRNAともに、その情報からSARS-CoV-2は複製され増殖する⁸⁾。そして、宿主細胞内部において増殖したSARS-CoV-2は、細胞における分泌機構であるエキソサイトーシスを利用し、細胞外部へと分泌され、周辺細胞へと感染が広がっていくと考えられている^{8,18)}。

本稿では、エンドサイトーシスによるSARS-CoV-2の感染機構と、宿主細胞においてSARS-CoV-2が増殖した後のエキソサイトーシスによる細胞外部への分泌機構について概説する。なお、後述のSNX27(Sorting nexin family member 27)による細胞膜へのリサイクリング経路は、広義の意味では、エンドサイトーシス経路に含めることもあるが、SARS-CoV-2の分泌経路と捉えて、本稿ではエキソサイトーシスとした。

1、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスについて

エンドサイトーシスは、細胞膜に発現している受容体にリガンドが結合し、細胞膜が窪み、ちぎりと取られて小胞が形成され、リガンドを細胞内部に取り込む機構である。エンドサイトーシスで取り込まれる代表的なものは、LDLコレステロール(Low-density lipoprotein: 低密度リポタンパク質)や血液中で鉄の輸送に関わるトランスフェリンなどが知られている。ウイルスは、この機構を巧みに利用し、細胞内部に侵入し、細胞をハイ

ジャックする。宿主細胞表面に発現している SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 に、SARS-CoV-2 表面のスパイクタンパク質が結合すると、エンドサイトーシスによって、SARS-CoV-2 が細胞内部へと取り込まれ、宿主細胞に感染すると考えられている^{2,8)}。

エキソサイトーシスは、膜によって形成された小胞が物質を包み込み、その小胞が細胞膜まで輸送され、小胞と細胞膜が融合し、細胞外部へと物質を分泌する機構である。リボソームで合成されたタンパク質のうち細胞外部へと分泌されるタンパク質は、小胞体からゴルジ体へと運ばれ、ゴルジ体から小胞が出芽し、エキソサイトーシスで細胞外部に分泌される。代表的なものを一つ挙げると、血糖値を調節するホルモンであるインスリンは、小胞体で合成された後、エキソサイトーシスによって、細胞外部へと分泌される。ウイルスは、細胞内部で増殖した後、巧妙にエキソサイトーシスを利用し、細胞外部へ放出され、周辺細胞へと感染を広げる。SARS-CoV-2 も小胞体内部で子孫ウイルスが形成された後（厳密には小胞体-ゴルジ体中間区画で形成されるとする論文もある）、小胞体からゴルジ体を経由してエキソサイトーシスによって細胞外部へと分泌されると考えられている¹⁸⁾。

2、SARS-CoV-2 の感染とエンドサイトーシス

2-1、低分子量 G タンパク質 Rab5 と Rab7 によるエンドサイトーシスについて

Rab (Ras-related protein in brain)ファミリータンパク質は、GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型が存在する低分子量 G タンパク質であり、細胞内小胞輸送を制御している。Rab タンパク質は、ヒトでは、これまでに約 60 種類のアイソフォームが同定されており、それぞれが特定のオルガネラ膜に局在し、その場所で小胞輸送を制御している。Rab タンパク質が、GDP 結合型の不活性型の時には、Rab GDI(Rab GDP dissociation inhibitor: Rab GDP 解離抑制タンパク質)が結合し、Rab の活性化を抑制している。GDP 結合型の不活性型から GTP 結合型の活性型への変換には、GEF(GDP/

GTP exchange factor: GDP/GTP 交換反応促進因子)が作用し、Rab タンパク質は活性化される。すなわち、Rab タンパク質が、GEF によって活性化される時には、Rab タンパク質に結合している GDP が解離し、GTP が結合する。Rab タンパク質は、GTP が結合した活性型になると様々なタンパク質がリクルートされ、小胞輸送を高度かつ厳密に調節している。Rab を GTP 結合型の活性型から GDP 結合型の不活性型に変換する時には、GAP(GTPase activating protein: GTP アーゼ促進タンパク質)が作用し、Rab タンパク質は不活性型となる。この機構をもう少し詳しく説明すると、GAP が Rab 自身の GTP 分解能を促進し、Rab タンパク質に結合している GTP が加水分解され、GTP の 3 つあるリン酸基のうち一つが放出され GDP とリン酸(Pi)となる。これまでに、Rab GDI は、すべての Rab タンパク質に作用すると考えられている。一方、GEF や GAP は、Rab タンパク質ごとに異なっている。図 1 に、GEF と GAP による Rab タンパク質の活性制御を図示した。

Rab5(Ras-related protein in brain 5)は、Rab ファミリータンパク質に属する低分子量 G タンパク質であり、細胞膜と初期エンドソームに局在し、エンドサイトーシスの初期において重要な因子である¹⁹⁻³¹⁾。Rab5 に対する GEF は、Rabex-5、Gapex-5、Rin1、Rin2、Rin3、Alsin が、Rab5 に対する GAP は、RN-Tre と RabGAP-5 が同定されている³²⁻³⁹⁾。活性型 Rab5 には、非常に多くのタンパク質が Rab5 と相互作用し⁴⁰⁻⁴⁴⁾、エンドサイトーシスによる物質取り込みや小胞による輸送、小胞同士の融合が起こる。細胞表面の受容体に結合したりリガンドは、Rab5 によるエンドサイトーシスによって細胞内部に取り込まれ初期エンドソームへと運ばれ、選別を受けることとなる^{19,45)}。選別された物質は、初期エンドソームから後期エンドソームが成熟し、リソソームへと物質が運ばれ、分解を受けるものや初期エンドソームから細胞表面へと物質が戻されるものなどがある。初期エンドソームから先への輸送には、別の Rab タンパク質によって制御されている⁴⁵⁾。これまでに、新型でないコロナ

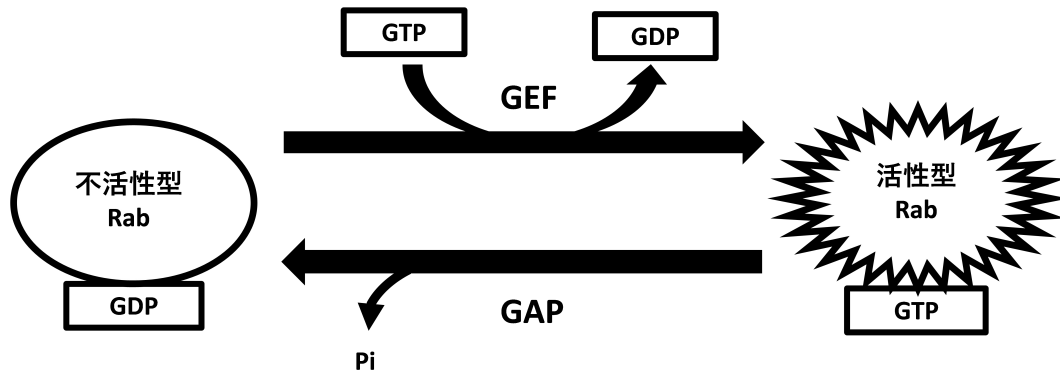


図1 Rabタンパク質の活性制御

Rabタンパク質が活性化するにはGEFの作用によって、GDPがGTPに交換されRabが活性化する。反対にRabタンパク質が不活性化するには、GAPの作用によってRab自身のGTP分解作用が促進されGTPが加水分解されGDPとなり、Rabが不活性化する。

ウイルスがRab5によるエンドサイトーシスによって、宿主細胞に感染すると報告があることから⁴⁶⁻⁴⁸⁾、SARS-CoV-2の感染にもRab5が関与する可能性は十分に考えられる。

Rab7(Ras-related protein in brain 7)は、Rab5と同様に、Rabファミリータンパク質に属する低分子量Gタンパク質であり、後期エンドソームとリソソームに局在する。Rab7に対するGEFはMon1-Ccz1(Monensin sensitivity1とCalcium caffeine zinc sensitivity1の複合体)が、Rab7に対するGAPはTBC1d15(TBC1 Domain Family Member 15)が同定されている⁴⁹⁻⁵¹⁾。活性型Rab7は、RILP(Rab Interacting Lysosomal Protein)と相互作用し、初期エンドソームから、後期エンドソーム/リソソーム経路における小胞輸送に重要な役割を担っている⁴⁵⁾。リソソームは物質を分解するオルガネラであり、初期エンドソームから後期エンドソーム/リソソーム経路で、リソソームへと運ばれた物質は、ここで分解される。

エンドサイトーシスによって、宿主細胞に侵入したウイルスの多くは、初期エンドソーム以降の後期エンドソーム/リソソーム経路において、ウイルス膜とエンドソーム/リソソーム膜が融合し、細胞質へとゲノム(SARS-CoV-2の場合はRNA)が放出される^{8,18)}。すべてのウイルスではないが、ウイルス膜とエンドソーム/リソソーム膜の融合には、pHの酸性化が関与しているものもある。pHは、細胞外液、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームの順に低くなり、エンドソーム膜やリソソーム膜にあるプロトンポンプが、酸性化を担っている。すなわち、エンドサイトーシスによって取り込まれたウイルスは、細胞内部へと運ばれるにつれて、エンドソーム内部のpHが下がっていき、酸性の環境下に曝される⁸⁾。エンドソーム/リソソーム内部には酸性環境下において活性が高まるプロテアーゼであるカテプシンBやカテプシンLが存在する⁵²⁾。エンドサイトーシスによって細胞内部へと取り込まれたSARS-CoV-2は、細胞内部へと移行し、pHが低下するとカテプシンBやカテプシンLの作用によって、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質外側が切断され、SARS-CoV-2の膜とエンドソーム/リソソーム膜とが融合し、ゲノムが細胞質に放出されると考えられている^{8,16,17)}。この、スパイクタンパク質の切断は、カテプシンBやカテプシンLの至適pHより、pHが6以下になる後期エンドソーム/リソソームで起こりやすいことが推測される(pH6付近は初期エンドソームと後期エンドソームが混在しており、厳密には初期エンドソームでも切断は起こると考えられる)。なお、リソソームは、様々な物質を分解するオルガネラであるため、SARS-CoV-2が、リソソームにおいてプロテアーゼに長時間曝されると、スパイクタンパク質だけではなくSARS-CoV-2自身が分解されてしまう。従って、SARS-CoV-2の細胞質への放出を薬剤によって阻害すれば、SARS-CoV-2の細胞内部での増殖を抑制できるであろう。

エンドソーム、リソソームの順に低くなり、エンドソーム膜やリソソーム膜にあるプロトンポンプが、酸性化を担っている。すなわち、エンドサイトーシスによって取り込まれたウイルスは、細胞内部へと運ばれるにつれて、エンドソーム内部のpHが下がっていき、酸性の環境下に曝される⁸⁾。エンドソーム/リソソーム内部には酸性環境下において活性が高まるプロテアーゼであるカテプシンBやカテプシンLが存在する⁵²⁾。エンドサイトーシスによって細胞内部へと取り込まれたSARS-CoV-2は、細胞内部へと移行し、pHが低下するとカテプシンBやカテプシンLの作用によって、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質外側が切断され、SARS-CoV-2の膜とエンドソーム/リソソーム膜とが融合し、ゲノムが細胞質に放出されると考えられている^{8,16,17)}。この、スパイクタンパク質の切断は、カテプシンBやカテプシンLの至適pHより、pHが6以下になる後期エンドソーム/リソソームで起こりやすいことが推測される(pH6付近は初期エンドソームと後期エンドソームが混在しており、厳密には初期エンドソームでも切断は起こると考えられる)。なお、リソソームは、様々な物質を分解するオルガネラであるため、SARS-CoV-2が、リソソームにおいてプロテアーゼに長時間曝されると、スパイクタンパク質だけではなくSARS-CoV-2自身が分解されてしまう。従って、SARS-CoV-2の細胞質への放出を薬剤によって阻害すれば、SARS-CoV-2の細胞内部での増殖を抑制できるであろう。

2-2、SARS-CoV-2 の感染と Rab5、Rab7

SARS-CoV-2 の感染に関する研究で、興味深い論文が発表された。その論文では、妊娠している SARS-CoV-2 陽性患者の胎盤を組織学的に解析したところ、SARS-CoV-2 非感染者と比較して、Rab5 の発現は上昇し、その一方 Rab7 の発現は低下していた⁵³⁾。すなわち、SARS-CoV-2 の感染によってエンドサイトーシスを変化させることが示唆された。SARS-CoV-2 がエンドサイトーシスによって、宿主細胞へと取り込まれるのなら、Rab5 の発現上昇は、SARS-CoV-2 の細胞内への侵入を促進することが推察される。また、Rab7 の発現低下は、初期エンドソームから後期エンドソーム/リソソームへの移行を遅延させ、エンドソーム内に SARS-CoV-2 を留めて、エンドソーム膜と SARS-CoV-2 の膜の融合を促進し、ゲノム RNA を細胞質に放出しやすくしている可能性が考えられる。

また、Rab7 は、オートファジーにも関わる⁵⁴⁾。オートファジーは、細胞質でオートファゴソームという小胞が形成され、オートファゴソームがリソソームとが融合し物質を分解する機構である。オートファジーは、栄養飢餓状態において、タンパク質をアミノ酸にまで分解するが、微生物感染時には、細菌やウイルスを分解する機構としてはたらく。特に、細菌やウイルスなどを分解するオートファジーは、ゼノファジーと呼ばれている。SARS-CoV-2 においてもオートファジーとの関連性は報告されている。SARS-CoV-2 のタンパク質である ORF3a などはオートファゴソームとリソソームの融合を阻害することが報告されており、SARS-CoV-2 のオートファゴソームでの蓄積は、SARS-CoV-2 の膜とオートファゴソーム膜の融合を促進し、その RNA が細胞質へと放出され、SARS-CoV-2 が増殖しやすくなるのではないかとしている文献がある^{55,56)}。しかし、完全に SARS-CoV-2 のタンパク質がオートファジーを阻害するわけではなく、オートファゴソーム膜と融合しなかった SARS-CoV-2 はリソソームへと運ばれ分解されるものと考えられる。また、Rab7 が Vps39 (Vacuolar protein sorting-associated protein39) と相互作用し、オートファゴソームとリソソームの融合

に関わり SARS-CoV-2 の分解に関わる可能性が報告されている⁵⁵⁾。従って、Rab7 の発現低下は、オートファジーによる細胞質に放出されたゲノム RNA や SARS-CoV-2 の材料となるタンパク質の分解ならびに SARS-CoV-2 自体の分解を阻害してしまうことが推測される。

SARS-CoV-2 は、呼吸器の細胞や血管内皮細胞、神経細胞などに感染する¹⁻⁵⁾。また、Rab5 と Rab7 は、ほぼすべての細胞に発現していると考えられている。従って、SARS-CoV-2 の感染による Rab5 の発現上昇と Rab7 の発現低下は、胎盤における細胞だけではなく、呼吸器の細胞、血管内皮細胞、神経細胞など他の細胞においても同様に起こっている可能性がある。もしそうであるのならば、Rab5 と Rab7 の発現変化は、COVID-19 の病態に深く関わっているのかもしれない。図 2 に、SARS-CoV-2 の感染は Rab5 と Rab7 の発現を変化させ感染を促進する可能性を示した。

SARS-CoV-2 感染者の胎盤における Rab5 と Rab7 の関連性を示した論文⁵³⁾では、蛍光顕微鏡で観察した画像データをコンピューターで定量的に解析したものであって、詳細な分子メカニズムについては、明らかにしていないが、以下のことが考えられる。これまでの報告で炎症性サイトカイン IL-6 (Interleukin-6) は、Rab5 の発現を上昇させることが報告されている⁵⁷⁾。また、SARS-CoV-2 の感染によっても IL-6 の発現が上昇することが報告されている^{58,59)}。これらのことより、SARS-CoV-2 の感染によって、IL-6 の発現が上昇し、IL-6 が細胞外に分泌され、オートクライン/パラクライン系によって、分泌細胞あるいは周辺の細胞に作用して、Rab5 の発現が上昇しているのかもしれない。現在、COVID-19 の治療薬として IL-6 阻害薬の有効性が検討されているが、SARS-CoV-2 感染によって、発現が上昇した Rab5 について、IL-6 阻害剤は炎症を抑制し、Rab5 の発現状態を調節することによって元に戻す可能性はありうると推測される。

また、エンドサイトーシス阻害剤を用いて、SARS-CoV-2 の感染を抑制するといったアプローチが試みられてはいるが、効果的な薬剤は見つかっていない。余談ではあるが、

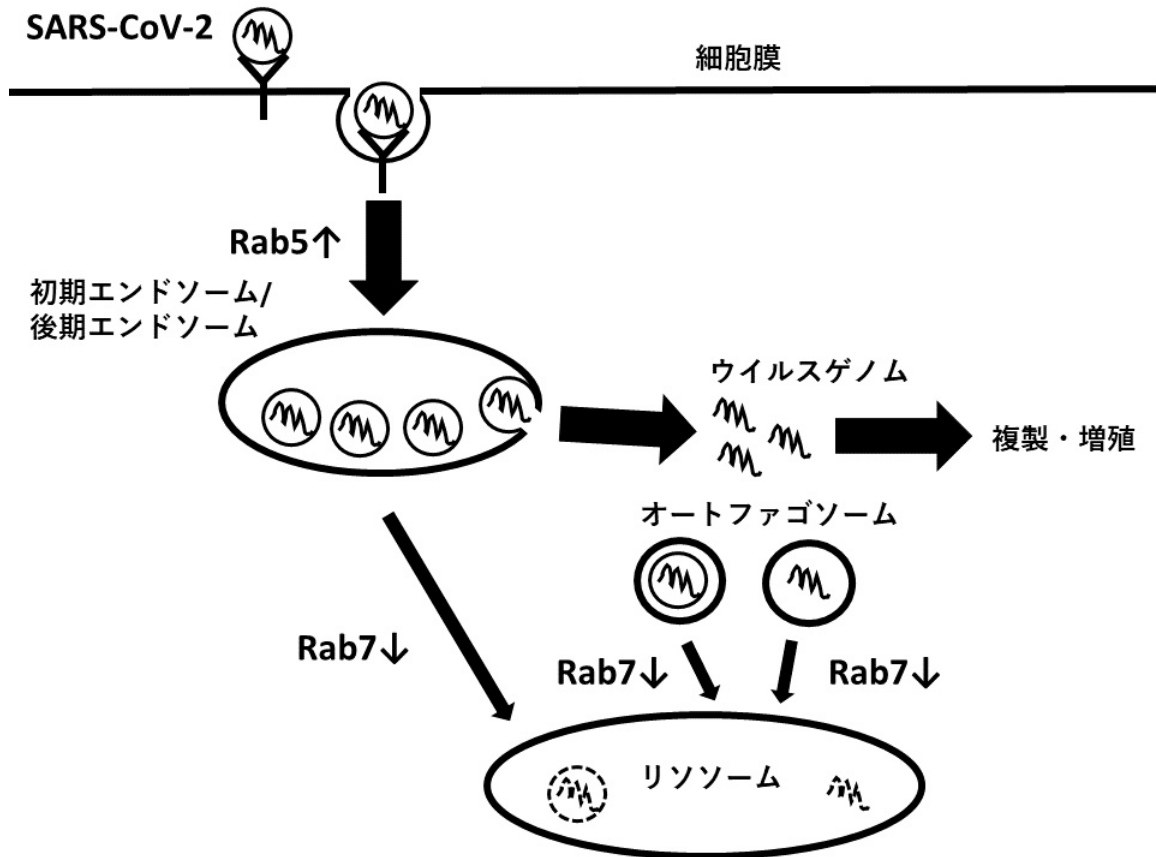


図2 SARS-CoV-2の感染促進とRabタンパク質の発現変化の関係
 SARS-CoV-2に感染した細胞は、IL-6の作用によって、Rab5の発現が上昇する。Rab5の発現が上昇した細胞は、SARS-CoV-2が、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入しやすくなる。また、Rab7の発現低下は、初期エンドソームから後期エンドソーム/リソソームへの移行を抑制し、SARS-CoV-2のゲノムRNAが細胞質に放出されやすくなる。さらに、Rab7の発現低下は、オートファジーによって、細胞質中を漂っているSARS-CoV-2のゲノムRNAや材料となるタンパク質、オルガネラファジーを含めたSARS-CoV-2自体の分解を抑制する。

アメリカ合衆国のドナルド・トランプ前大統領が服用していたされているヒドロキシクロロキンは、エンドソーム内のpHを上昇させることによってエンドサイトーシスを阻害する薬剤である。このヒドロキシクロロキンは、エンドソーム内のpHを上昇させる作用は、pHの酸性化によって活性が上昇するカテプシンBなどのプロテアーゼのはたらきを阻害するため、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質が切断されることが阻害される。従って、SARS-CoV-2の膜とエンドソーム膜との融合が抑制され、ゲノムRNAの細胞質への放出を阻止できると考えられている。培養細胞による実験では、ヒドロキシクロロキン処理によって、ウイルスの細胞への感染は抑制される^{60,61)}。同様に培養細胞を用いたSARS-CoV-2の感染実験では、詳細なメカニズムは明らかにされていないが、クロロキン(ヒドロキシクロロキンと同様の作用がある薬

剤)処理によってSARS-CoV-2の細胞への感染が抑制された⁶²⁾。しかし、培養細胞を用いた実験とは異なり、ヒトにヒドロキシクロロキンやクロロキンを投与した臨床研究では、COVID-19(新型コロナウイルス感染症)に対する効果があるという確証は得られなかった。

3. SNX27によるSARS-CoV-2のエキソサイトーシスによる細胞外分泌機構と分解

SARS-CoV-2は、細胞に感染し、ゲノムRNAの情報をもとに小胞体(もしくは小胞体-ゴルジ体中間区画)で増殖し、ゴルジ体を経由して、エキソサイトーシスによって細胞外へと分泌され、周辺の細胞に感染すると考えられている¹⁸⁾。SNX27は、Rab5陽性の初期エンドソームに局在し、初期エンドソームから細胞膜へと物質を戻す働きがあるタンパク質である⁶³⁾。なお、初期エンドソ-

ムから細胞膜へと物質を戻す経路に、Rab11 (Ras-related protein in brain 11)が制御しているリサイクリングエンドソームを経由する経路が知られているが⁴⁵⁾、SNX27がRab11と細胞内で共局在しないことより^{63,64)}、SNX27による細胞膜への輸送は、Rab11は関与しないと考えられている。一方、SNX27は、Rab4(Ras-related protein in brain 4)と共局在することより、Rab4が制御するリサイクリング経路に関わる可能性が示唆されている⁶⁵⁾。最近の研究において、SNX27がSARS-CoV-2の細胞外部への放出や分解に関与することが報告されている。

まず、Zhaoらの論文では、SNX27は、SARS-CoV-2感染を広げるのではないかとしている⁶⁶⁾。SNX27をノックアウトした細胞を用いた実験では、細胞内で増殖したSARS-CoV-2の別の細胞への感染が抑制された⁶⁶⁾。すなわち、SNX27によるエキソサイトーシスが、SARS-CoV-2の細胞外部への分泌に関わる可能性が示された。また、SNX27ノックアウト細胞において、遺伝子導入によって発現させたSARS-CoV-2のスパイクタンパク質がリソソームに局在し、分解が促進される可能性が示された。これらの結果より、SNX27ノックアウト細胞では、エキソサイトーシスを抑制することによって、SARS-CoV-2を細胞内部に閉じ込めてリソソームでの分解を促進し、別の細胞への感染を抑制するものと考えられる。

一方、Yangらは、SNX27は、感染を抑制する機能があるのではないかと記述している⁶⁵⁾。しかし、詳細は後述するが、Yangらの実験データ綿密に読解すると、Zhaoらの論文と同様にSNX27は、SARS-CoV-2感染を広げるという結論に到達できる。先に述べたようにACE2は、宿主細胞表面に発現するSARS-CoV-2の受容体であり^{2,8,9)}、SNX27とACE2のC末端側が結合することが報告され、SNX27がSARS-CoV-2の感染に関わる可能性が示唆された⁶⁷⁾。その後、Yangらによって発表された論文によると、ACE2とSARS-CoV-2が細胞表面で結合すると初期エンドソームへと運ばれ、そして、SNX27は、ACE2と結合しているSARS-CoV-2が後期エンドソーム/リソソーム経路へ運ばれ

るのを抑制し、ACE2と結合しているSARS-CoV-2を細胞表面に戻し、細胞内部での増殖を抑えて感染を抑制していると解釈している⁶⁵⁾。

Zhaoらの論文ではSNX27についてSARS-CoV-2感染を広げるとしており⁶⁶⁾、その一方、Yangらの論文ではSNX27は、感染を抑制しているとしている⁶⁵⁾。何故このようなこのような違いがあるのか考察してみた。Zhaoらの論文の主要なデータでは、遺伝子導入によって細胞内で、SARS-CoV-2あるいはSARS-CoV-2のスパイクタンパク質を発現させ、SNX27の機能低下によって細胞から細胞への感染が抑制され、リソソームで分解される可能性を示している⁶⁶⁾。その一方、Yangらの論文では、細胞外部からSARS-CoV-2を培養細胞培地中に添加し、SNX27が初期エンドソームから細胞外へとSARS-CoV-2の放出を促進し、細胞内部での増殖を抑制することが強調されている⁶⁵⁾。従って、二つの論文において、実験目的が異なるため同じSNX27を扱っているにもかかわらず結論が異なってしまったことが考えられる。

以下に結論が異なった理由について詳細を記述する。Yangらの論文では、SNX27ノックアウト細胞あるいはSNX27ノックダウン細胞では、細胞表面のACE2の発現量が低下し、その反対に、SNX27の過剰発現では、細胞表面のACE2の発現が上昇すると記述しているのにも関わらず、SARS-CoV-2の増殖を細胞表面にあるACE2の発現量で補正している⁶⁵⁾。詳細に読解するとSARS-CoV-2一つあたりが、SNX27ノックアウト細胞内で増殖しやすいことを強調するためにこのようなデータの表し方をしているものと見受けられる。確かに、SNX27ノックアウト細胞あるいはSNX27ノックダウン細胞では、細胞表面に発現しているACE2量で補正した細胞内部に侵入した一つあたりのSARS-CoV-2の増殖率は、コントロール細胞と比較して多い。しかし、SARS-CoV-2を含めたウイルスの感染においては、一つあたりの細胞で増殖するウイルス量が重要である。Yangらの論文のサプリメントインフォメーションにおけるデータでは、細胞表面に発

現している ACE2 で SARS-CoV-2 の増殖を補正する前のデータも示しており、補正前のデータでは、SNX27 ノックアウト細胞では、プレート一つあたりの SARS-CoV-2 の細胞内での増殖は抑制されている⁶⁵⁾。一方、SNX27 を過剰発現させた細胞では、プレート一つあたりの SARS-CoV-2 の細胞内での増殖は上昇している⁶⁵⁾。すなわち、一つの細胞あたりに換算した場合（細胞表面の ACE2 発現量で SARS-CoV-2 の増殖を補正していないデータ）では、SNX27 は、SARS-CoV-2 の増殖を促進する機能があるものと考えられる。さらに、Yang らの論文では、SNX27 が細胞表面における ACE2 の発現量を増やす機能があるのならば、SARS-CoV-2 が感染しやすくなる可能性があるであろうとの記述が考察にあり⁶⁵⁾、SARS-CoV-2 の増殖を細胞表面の ACE2 発現量で補正したことを考慮しているものと見受けられる。

これらのことより、Zhao らの論文と Yang らの論文とでは、データの示し方が異なっている。前者は、細胞表面の ACE2 発現量で SARS-CoV-2 の増殖を補正していないデータで解釈しており、後者は、細胞表面の ACE2 発現量で SARS-CoV-2 の増殖を補正しているデータで解釈している。両論文において、細胞表面の ACE2 発現量で SARS-CoV-2 の増殖を補正しないデータに着目すると、SNX27 の機能を低下させることによってエキソサイトーシスによる SARS-CoV-2 の細胞外への放出が抑制され、SARS-CoV-2 が細胞内部で分解を受けやすくなるという解釈ができる。すなわち、SNX27 は、エキソサイトーシスによって SARS-CoV-2 感染を広げてしまう（増殖しやすくしている）機能があるのではないかと考えられ、両論文のデータは整合性がとれる。

SNX27 ノックアウト細胞を用いた研究では、細胞から細胞への SARS-CoV-2 の感染は抑制されるものの、完全に抑制されるわけではない。バイオインフォマティクスを用いた研究では、SARS-CoV-2 の分泌に、エキソサイトーシスを制御する Rab タンパク質である Rab8(Ras-related protein in brain 8)や Rab10(Ras-related protein in brain 10)が関

与する可能性が報告されている¹⁸⁾。従って、SARS-CoV-2 の細胞外への分泌には、SNX27 が制御しているエキソサイトーシス経路だけではなく、Rab8 や Rab10 などの別のタンパク質が制御している SNX27 非依存的なエキソサイトーシス経路も関わる可能性がある。図 3 に、SNX27 による SARS-CoV-2 の細胞外への放出と分解について示した。

4. 細胞内小胞輸送をターゲットとした SARS-CoV-2 に対する薬剤

Yang らの論文では⁶⁶⁾、詳細については書かれていないが、小胞輸送経路をターゲットとした薬剤である Retro2 や ABMA が COVID-19 の治療薬として使用できる可能性を展望として示唆していることから、筆者は、小胞輸送経路に対するいくつかの阻害剤と SARS-CoV-2 の感染抑制の可能性について記述する。

Retro1 と Retro2 は、初期エンドソームとトランスゴルジネットワーク(TGN)からの小胞の融合を阻害する薬剤である⁶⁸⁾。両薬剤は、ウイルスの感染実験において、抗ウイルス作用があることが報告されている⁶⁸⁻⁷¹⁾。Retro2 と構造が似ている Retro2.1 を用いた SARS-Cov-2 の培養細胞への感染実験においても、培養細胞への感染後における SARS-CoV-2 の複製が阻害される結果が報告されている⁷²⁾。詳細なメカニズムは不明であるが、最近の研究では、Retro2 は、初期エンドソームと TGN からの小胞の融合を阻害するだけではなく、小胞体における小胞形成を阻害し、小胞体からゴルジ体への輸送を阻害することが報告されている^{73,74)}。一方、SARS-CoV-2 感染後、ウイルスタンパク質が合成されると、合成されたタンパク質のうちエンペローブタンパク質であるスパイク S タンパク質、E タンパク質、M タンパク質は小胞体膜上に集まる。そして、エンペローブタンパク質が組み込まれた小胞体膜がちぎれて、形成されたヌクレオカプシドはその膜に包み込まれ、小胞体内に子孫ウイルスが形成される。これらのことより、Retro1 と Retro2 は、エンペローブタンパク質が組み込まれた小胞体膜がちぎれるのを抑制するか、あるいは

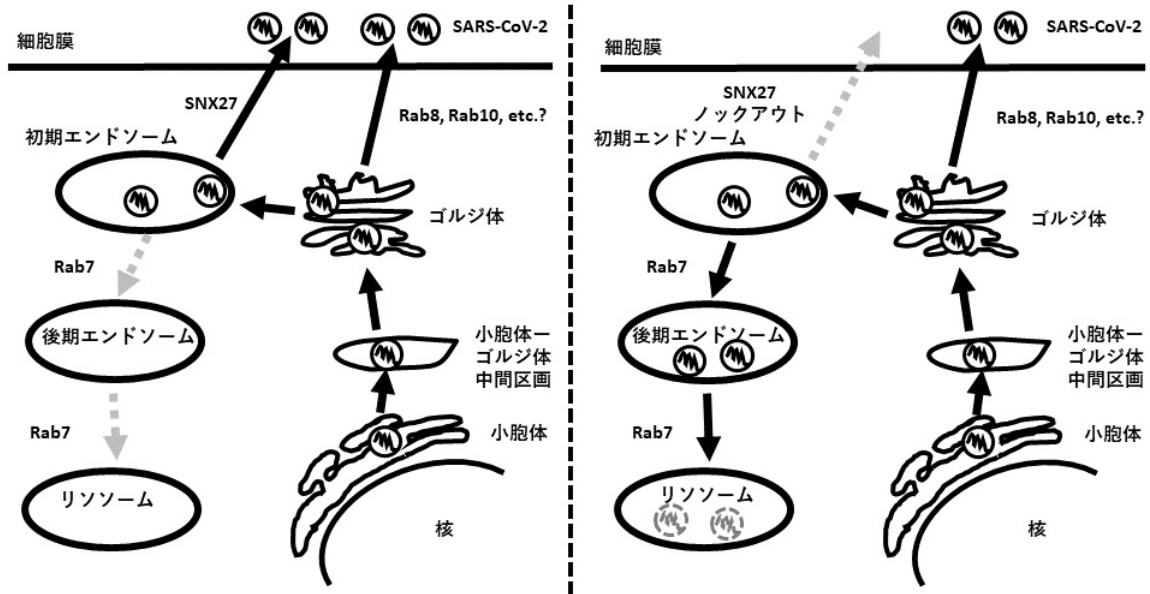


図3 SARS-CoV-2の細胞外への分泌とSNX27
 左図、小胞体もしくは小胞体-ゴルジ体中間区画においてSARS-CoV-2が産生される。産生したSARS-CoV-2は、ゴルジ体を経由して、初期エンドソームへと運ばれSNX27によるエキソサイトーシスで細胞外へと放出される。右図、SNX27ノックアウト細胞では、エキソサイトーシスによるSARS-CoV-2の細胞外への放出が抑制され、SARS-CoV-2が、リソソームへと運ばれ分解される。補足として、SNX27依存的な経路とは別な経路として、SNX27非依存的な経路においてもSARS-CoV-2が細胞外へと放出される可能性がある。

はSARS-CoV-2の子孫ウイルスが形成された後における、小胞体からゴルジ体への輸送経路を阻害している可能性が考えられる。

また、Retro1とRetro2の別のSARS-CoV-2の抗ウイルス作用のメカニズムについては、上記に記載した初期エンドソームとTGNからの輸送小胞の阻害が関わってくる可能性が考えられる。Retro1あるいはRetro2処理によって、上記に記載した小胞体の機能は完全に阻害されるわけではないため、無処理と比べて少ないものの、小胞体でのSARS-CoV-2の子孫ウイルスの形成は起こる。SARS-CoV-2の子孫ウイルスは、小胞体-ゴルジ中間区画を経てゴルジ体へと運ばれる。しかし、Retro1あるいはRetro2処理した培養細胞では、初期エンドソームとTGNからの小胞の融合が阻害されているため、SARS-CoV-2の子孫ウイルスは、TGNから初期エンドソームへの輸送が阻害される。従って、SARS-CoV-2はエキソサイトーシスによって細胞外に移行できず、TGNに留まる。TGNからは、初期エンドソームだけではなく、後期エンドソームへの輸送経路が知られている⁷⁵⁾。このTGNから後期エンドソームへの輸送はRab31によって制御されていることが

報告されている⁷⁶⁾。TGNに留まったSARS-CoV-2は、Rab31の作用によって後期エンドソームへと運ばれ、その後、Rab7によって後期エンドソームからリソソームへ運ばれ分解されることが推測される。また、別の経路としては、後期エンドソームは、オートファゴソームと融合し、アンフィソーム(Amphisome)となり、さらにアンフィソームとリソソームが融合し、オートリソソームが形成されることが知られている⁷⁷⁾。これらのことより、SARS-CoV-2は、Rab31の作用によって後期エンドソームへと運ばれた後、Rab7などの作用によって後期エンドソームとオートファゴソームが融合し、アンフィソームが形成され、さらに、アンフィソームとリソソームが融合し、オートリソソームが形成され、オートリソソーム内でSARS-CoV-2が分解されることも推測される。

これらのことをまとめると、Retro1あるいはRetro2による抗ウイルス作用は、小胞体における子孫ウイルスの形成阻害と初期エンドソームとTGN由来の小胞の融合阻害によって、リソソームあるいはオートリソソームでの分解促進作用が考えられ、SARS-CoV-2に対しても同様の抗ウイルス作用があると推

測されるが、今後の研究結果が待たれる。

ABMA は、培養細胞を用いた実験より、蛍光顕微鏡観察において、Rab7 陽性の後期エンドソームを巨大化させ、その一方、初期エンドソーム、リソソーム、ゴルジ体の形態学的な変化は観察されないことから、後期エンドソームからリソソームへの輸送を阻害する薬剤であると考えられている^{78,79)}。また、ABMA エンドソーム内の酸性化を促進し、pH を低下させることが示されている^{78,79)}。さらに、ABMA は、抗ウイルス作用があることも報告されている^{80,81)}。近年、培養細胞における高濃度 ABMA(9 μ M 以上) 処理は、細胞傷害性壊死因子(Cytotoxic necrotising factor: CNF)を用いた実験において、後期エンドソームからリソソームへの輸送を阻害するだけではなく、エンドソームから細胞質への細胞傷害性壊死因子の放出を抑制することが報告され、その一方、低濃度 AMBA (9 μ M 以下) は、細胞傷害性壊死因子を用いた実験において、エンドソームの酸性化に関わらず細胞傷害性壊死因子の細胞質への放出を促進することが示された⁸²⁾。高濃度 ABMA 処理によるエンドソームから細胞質への放出阻害の詳細なメカニズムについては、現在のところ不明であるが、高濃度 ABMA 処理によって、後期エンドソームは、オートファゴソームと融合し、アンフィソームを形成しやすくなり、さらにアンフィソームとリソソームが融合し、オートリソソームが形成されることが示唆されている⁸³⁾。高濃度 ABMA 処理と細胞傷害性壊死因子について解析した論文においては、エンドソーム内に閉じ込められた細胞傷害性壊死因子は、最終的にはオートリソソームにおいて分解を受ける可能性を推測している⁸²⁾。SARS-CoV-2 も AMBA によって、細胞質への放出が阻害され、最終的にはオートリソソームで分解を受ける可能性が推測されるが、今後、詳細に解析していく必要がある。

また、Yang らの論文では⁶⁶⁾、SNX27 の PDZ(Postsynaptic density 95、PSD-95 ; Discs large、Dlg ; Zonula occludens-1、ZO-1)ドメインが、SARS-CoV-2 の細胞から細胞への感染に重要であり、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質における PDZ ドメイン

結合モチーフが明かにされている (MTSC モチーフ:メチオニン-トレオニン-セリン-システインモチーフ)。筆者は、SNX27 の PDZ ドメインが、SARS-CoV-2 の周辺細胞への伝搬性に重要であるのならば、SNX27 をターゲットとした薬剤が COVID-19 の治療薬として有効である可能性があると考ええる。例えば、MTSC モチーフを含むペプチドを作製して、SNX27 をマスキングするといったアプローチも考えられる。すなわち、SNX27 における SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質結合部位に、MTSC モチーフを含むペプチドを結合させれば、SNX27 と SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質との結合が阻害され細胞外への放出が阻害されるとともに、SARS-CoV-2 は、初期エンドソーム内に留まると予測される。初期エンドソーム内に留まった SARS-CoV-2 は、Rab7 によって後期エンドソーム/リソソーム経路に運ばれ、リソソームで分解されやすくなることが推測できる。

おわりに

本稿では、これまでに報告されている SARS-CoV-2 の感染とエンドサイトーシス・エキソサイトーシスとの関連性についてまとめた。SARS-CoV-2 と Rab タンパク質との関連性を示す論文は、現在までにわずかではあるが、これまでに、他のウイルスでは、Rab タンパク質が感染に関わることは多数発表されている。COVID-19(新型コロナウイルス感染症)の病態に Rab タンパク質が関与していることは、間違いのないであろう。また、興味深いことに、SARS-CoV-2 の研究より、SNX27 は初期エンドソームから細胞膜へのリサイクリングを制御するだけではなく、エキソサイトーシスにも関わる因子であることが示された。SNX27 は、初期エンドソームに局在するため⁶³⁾、初期エンドソームがエンドサイトーシスとエキソサイトーシス両方の中継地点としての役割を有している可能性がある。現在、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスをターゲットした薬剤が、COVID-19 の治療に使用できるのではないかとする文献も見受けられるが、有効性と安全性については、今後の研究結果が待たれる。

文献

- 1) Engin AB, Engin ED, Engin A. Current opinion in neurological manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Curr Opin Toxicol.* 2021; 25: 49-56.
- 2) Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 2020; 131: 93-6.
- 3) Lupu L, Palmer A, Huber-Lang M. Inflammation, Thrombosis, and Destruction: The Three-Headed Cerberus of Trauma- and SARS-CoV-2-Induced ARDS. *Front Immunol.* 2020; 11: 584514.
- 4) Metkus TS, Sokoll LJ, Barth AS, et al. Myocardial Injury in Severe COVID-19 Compared With Non-COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Circulation.* 2021; 143: 553-65.
- 5) Lowenstein CJ, Solomon SD. Severe COVID-19 Is a Microvascular Disease. *Circulation.* 2020; 142: 1609-11.
- 6) Wedrowska E, Wandtke T, Senderek T, et al. Coronaviruses fusion with the membrane and entry to the host cell. *Ann Agric Environ Med.* 2020; 27: 175-83.
- 7) Emrani J, Ahmed M, Jeffers-Francis L, et al. SARS-COV-2, infection, transmission, transcription, translation, proteins, and treatment: A review. *Int J Biol Macromol.* 2021; 193: 1249-73.
- 8) Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23: 3-20.
- 9) Nascimento Conde J, Schutt WR, Gorbunova EE, et al. Recombinant ACE2 Expression Is Required for SARS-CoV-2 To Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses. *mBio.* 2020; 11.
- 10) Barbosa LC, Goncalves TL, de Araujo LP, et al. Endothelial cells and SARS-CoV-2: An intimate relationship. *Vascul Pharmacol.* 2021; 137: 106829.
- 11) Guney C, Akar F. Epithelial and Endothelial Expressions of ACE2: SARS-CoV-2 Entry Routes. *J Pharm Pharm Sci.* 2021; 24: 84-93.
- 12) Barrantes FJ. Central Nervous System Targets and Routes for SARS-CoV-2: Current Views and New Hypotheses. *ACS Chem Neurosci.* 2020; 11: 2793-803.
- 13) Glowacka I, Bertram S, Muller MA, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol.* 2011; 85: 4122-34.
- 14) Bertram S, Dijkman R, Habjan M, et al. 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.* 2013; 87: 6150-60.
- 15) Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020; 181: 271-80 e8.
- 16) Hashimoto R, Sakamoto A, Deguchi S, et al. Dual inhibition of TMPRSS2 and Cathepsin B prevents SARS-CoV-2 infection in iPS cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021; 26: 1107-14.
- 17) Takeda M. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein.

- Microbiol Immunol. 2022; 66: 15-23.
- 18) Sicari D, Chatziioannou A, Koutsandreas T, et al. Role of the early secretory pathway in SARS-CoV-2 infection. *J Cell Biol.* 2020; 219.
- 19) Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 107-17.
- 20) Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 513-25.
- 21) Hagiwara M, Kokubu E, Sugiura S, et al. Vinculin and Rab5 complex is required [correction of required] for uptake of *Staphylococcus aureus* and interleukin-6 expression. *PLoS One.* 2014; 9: e87373.
- 22) Hagiwara M, Komatsu T, Sugiura SS, et al. POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 439: 413-7.
- 23) Hagiwara M, Matsushita K. Epigallocatechin gallate suppresses LPS endocytosis and nitric oxide production by reducing Rab5-caveolin-1 interaction. *Biomed Res.* 2014; 35: 145-51.
- 24) Hagiwara M, Shinomiya H, Kashihara M, et al. Interaction of activated Rab5 with actin-bundling proteins, L- and T-plastin and its relevance to endocytic functions in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 407: 615-9.
- 25) Hagiwara M, Shirai Y, Nomura R, et al. Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378: 73-8.
- 26) 萩原 真, 小林 謙一, 田所 忠弘, et al. Rab5 結合因子同定のための迅速且つ簡便な Far-western blotting. *東京農業大学 農学集報.* 2009; 53: 322-6.
- 27) 萩原 真, 松下 健二. 低分子量 G タンパク質 Rab5 によるエンドサイトーシス制御機構. *人間生活学研究.* 2021: 39-47.
- 28) 萩原 真, 松下 健二. 細胞膜透過性 caveolin-1 スキャフォールドイングドメインペプチドによるファゴサイトーシスの活性化. *人間生活学研究.* 2021: 49-57.
- 29) Hagiwara M, Matsushita K. Synthetic cell-permeable caveolin-1 scaffolding domain peptide activates phagocytosis of *Escherichia coli* by regulating Rab5 activity. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2020; 75: 333-7.
- 30) Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, et al. TNF-alpha augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 229.
- 31) Dowler BC. Endocytosis : structural components, functions and pathways. Chapter 11 Rab5 Mediated Caveolae Endocytosis. Yuji Yamamoto, Tadahiro Tadokoro, Makoto Hagiwara.; Nova Science publishers; 2010: 211-221.
- 32) Kajihō H, Saito K, Tsujita K, et al. RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci.* 2003; 116: 4159-68.
- 33) Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, et al. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature.* 2000; 408: 374-7.
- 34) Haas AK, Fuchs E, Kopajtich R, et al. A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.* 2005; 7: 887-93.
- 35) Horiuchi H, Lippe R, McBride HM, et al. A novel Rab5 GDP/GTP

- exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*. 1997; 90: 1149-59.
- 36) Su X, Lodhi IJ, Saltiel AR, et al. Insulin-stimulated Interaction between insulin receptor substrate 1 and p85alpha and activation of protein kinase B/Akt require Rab5. *J Biol Chem*. 2006; 281: 27982-90.
- 37) Sato M, Sato K, Fonarev P, et al. Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat Cell Biol*. 2005; 7: 559-69.
- 38) Tall GG, Barbieri MA, Stahl PD, et al. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell*. 2001; 1: 73-82.
- 39) Saito K, Murai J, Kajiho H, et al. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem*. 2002; 277: 3412-8.
- 40) Hagiwara M, Kobayashi K, Tadokoro T, et al. Rab5 affinity chromatography without nonhydrolyzable GTP analogues. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2009; 64: 303-6.
- 41) Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, et al. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature*. 1999; 397: 621-5.
- 42) Christoforidis S, Zerial M. Purification of EEA1 from bovine brain cytosol using Rab5 affinity chromatography and activity assays. *Methods Enzymol*. 2001; 329: 120-32.
- 43) Pal A, Severin F, Hopfner S, et al. Regulation of endosome dynamics by Rab5 and Huntingtin-HAP40 effector complex in physiological versus pathological conditions. *Methods Enzymol*. 2008; 438: 239-57.
- 44) Christoforidis S, Zerial M. Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods*. 2000; 20: 403-10.
- 45) Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*. 2011; 91: 119-49.
- 46) Li Z, Zhao K, Lan Y, et al. Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Enters Neuro-2a Cells via Clathrin-Mediated Endocytosis in a Rab5-, Cholesterol-, and pH-Dependent Manner. *J Virol*. 2017; 91.
- 47) Li Z, Zhao K, Lv X, et al. Ulk1 Governs Nerve Growth Factor/TrkA Signaling by Mediating Rab5 GTPase Activation in Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus-Induced Neurodegenerative Disorders. *J Virol*. 2018; 92.
- 48) Wang H, Yuan X, Sun Y, et al. Infectious bronchitis virus entry mainly depends on clathrin mediated endocytosis and requires classical endosomal/lysosomal system. *Virology*. 2019; 528: 118-36.
- 49) Nordmann M, Cabrera M, Perz A, et al. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol*. 2010; 20: 1654-9.
- 50) Zhang XM, Walsh B, Mitchell CA, et al. TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 335: 154-61.
- 51) Lee MJ, Jang S, Nahm M, et al.

- Tbc1d15-17 regulates synaptic development at the Drosophila neuromuscular junction. *Mol Cells*. 2013; 36: 163-8.
- 52) Guha S, Padh H. Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J Biochem Biophys*. 2008; 45: 75-90.
- 53) Benarroch Y, Juttukonda L, Sabharwal V, et al. Differential Expression of Rab5 and Rab7 Small GTPase Proteins in Placental Tissues From Pregnancies Affected by Maternal Coronavirus Disease 2019. *Clin Ther*. 2021; 43: 308-18.
- 54) Hyttinen JM, Niittykoski M, Salminen A, et al. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833: 503-10.
- 55) Zhang Y, Sun H, Pei R, et al. The SARS-CoV-2 protein ORF3a inhibits fusion of autophagosomes with lysosomes. *Cell Discov*. 2021; 7: 31.
- 56) Koepke L, Hirschenberger M, Hayn M, et al. Manipulation of autophagy by SARS-CoV-2 proteins. *Autophagy*. 2021; 17: 2659-61.
- 57) Bhattacharya M, Ojha N, Solanki S, et al. IL-6 and IL-12 specifically regulate the expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways. *EMBO J*. 2006; 25: 2878-88.
- 58) Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: a storm is raging. *J Clin Invest*. 2020; 130: 2202-5.
- 59) Gubernatorova EO, Gorshkova EA, Polinova AI, et al. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020; 53: 13-24.
- 60) Carroll MB, Fields JH, Clerc PG. Rheumatoid arthritis in patients with HIV: management challenges. *Open Access Rheumatol*. 2016; 8: 51-9.
- 61) Biot C, Daher W, Chavain N, et al. Design and synthesis of hydroxyferroquine derivatives with antimalarial and antiviral activities. *J Med Chem*. 2006; 49: 2845-9.
- 62) Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020; 30: 269-71.
- 63) Bannert K, Berlin P, Reiner J, et al. SNX27 regulates DRA activity and mediates its direct recycling by PDZ-interaction in early endosomes at the apical pole of Caco2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020; 318: G854-G69.
- 64) Lauffer BE, Melero C, Temkin P, et al. SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2010; 190: 565-74.
- 65) Yang B, Jia Y, Meng Y, et al. SNX27 suppresses SARS-CoV-2 infection by inhibiting viral lysosome/late endosome entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022; 119.
- 66) Zhao L, Zhong K, Zhao J, et al. SARS-CoV-2 spike protein harnesses SNX27-mediated endocytic recycling pathway. *MedComm (2020)*. 2021.
- 67) Kliche J, Kuss H, Ali M, et al. Cytoplasmic short linear motifs in ACE2 and integrin beta3 link SARS-CoV-2 host cell receptors to mediators of endocytosis and autophagy. *Sci Signal*. 2021; 14.
- 68) Stechmann B, Bai SK, Gobbo E, et al. Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. *Cell*. 2010; 141: 231-42.
- 69) Priyamvada L, Alabi P, Leon A, et al. Discovery of Retro-1 Analogs Exhibiting Enhanced Anti-vaccinia Virus Activity. *Front Microbiol*.

- 2020; 11: 603.
- 70) Harrison K, Haga IR, Pechenick Jowers T, et al. Vaccinia Virus Uses Retromer-Independent Cellular Retrograde Transport Pathways To Facilitate the Wrapping of Intracellular Mature Virions during Virus Morphogenesis. *J Virol.* 2016; 90: 10120-32.
- 71) Sivan G, Weisberg AS, Americo JL, et al. Retrograde Transport from Early Endosomes to the trans-Golgi Network Enables Membrane Wrapping and Egress of Vaccinia Virus Virions. *J Virol.* 2016; 90: 8891-905.
- 72) Holwerda M, V'Kovski P, Wider M, et al. Identification of an Antiviral Compound from the Pandemic Response Box that Efficiently Inhibits SARS-CoV-2 Infection In Vitro. *Microorganisms.* 2020; 8.
- 73) Forrester A, Rathjen SJ, Daniela Garcia-Castillo M, et al. Functional dissection of the retrograde Shiga toxin trafficking inhibitor Retro-2. *Nat Chem Biol.* 2020; 16: 327-36.
- 74) Morgens DW, Chan C, Kane AJ, et al. Retro-2 protects cells from ricin toxicity by inhibiting ASNA1-mediated ER targeting and insertion of tail-anchored proteins. *Elife.* 2019; 8.
- 75) Tu Y, Zhao L, Billadeau DD, et al. Endosome-to-TGN Trafficking: Organelle-Vesicle and Organelle-Organelle Interactions. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 163.
- 76) Lei Z, Wang J, Zhang L, et al. Ubiquitination-Dependent Regulation of Small GTPases in Membrane Trafficking: From Cell Biology to Human Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 688352.
- 77) Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 70-8.
- 78) Wu Y, Pons V, Goudet A, et al. ABMA, a small molecule that inhibits intracellular toxins and pathogens by interfering with late endosomal compartments. *Sci Rep.* 2017; 7: 15567.
- 79) Wu Y, Pons V, Noel R, et al. DABMA: A Derivative of ABMA with Improved Broad-Spectrum Inhibitory Activity of Toxins and Viruses. *ACS Med Chem Lett.* 2019; 10: 1140-7.
- 80) Dai W, Wu Y, Bi J, et al. Antiviral Effects of ABMA against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vitro and In Vivo. *Viruses.* 2018; 10.
- 81) Kali S, Jallet C, Azebi S, et al. Broad spectrum compounds targeting early stages of rabies virus (RABV) infection. *Antiviral Res.* 2021; 188: 105016.
- 82) Haywood EE, Handy NB, Lopez JW, et al. Insertion-trigger residues differentially modulate endosomal escape by cytotoxic necrotizing factor toxins. *J Biol Chem.* 2021; 297: 101347.
- 83) Wu Y, Boulogne C, Carle S, et al. Regulation of endo-lysosomal pathway and autophagic flux by broad-spectrum antipathogen inhibitor ABMA. *FEBS J.* 2020; 287: 3184-99.

Infection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) and endocytosis/exocytosis

Makoto Hagiwara

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture

Summary

SARS-CoV-2 is the virus that causes COVID-19. SARS-CoV-2 infects respiratory cells, vascular endothelial cells, nerve cells, and other cells and propagates within host cells. The infection of SARS-CoV-2 to host cells is thought to be a model that directly infects the cytoplasm from the cell membrane, and a model that infects the cell using endocytosis, the mechanism of uptake of material into the cell. It is also thought that after infection, SARS-CoV-2 will proliferate in the host cell and then be released to the cell by exocytosis, the secretion mechanism of the cell. This review outlines the infection mechanism of SARS-CoV-2 by endocytosis and the extracellular secretion mechanism of SARS-CoV-2 by exocytosis.

Keywords: SARS-CoV-2, endocytosis, exocytosis, Rab, SNX27