

## 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

萩原真<sup>1\*</sup>、松下健二<sup>2</sup>

Rab タンパク質は、現在までに約 60 個同定されており、それぞれが特異的にオルガネラに局在し、細胞内での小胞輸送を制御している。Rab タンパク質は、他の低分子量 G タンパク質と同様に、GTP が結合した活性型と GDP が結合した不活性型が存在し、分子スイッチとして機能を果たしている。Rab5 は、細胞膜と初期エンドソームに局在する Rab タンパク質であり、エンドサイトーシスにおける細胞膜からの物質取り込みや小胞輸送、小胞と初期エンドソームの融合を制御している。Rab5 の活性は GEF (GDP/GTP 交換因子)、GAP (GTPase 促進タンパク質)、Rab GDI (Rab GDP 解離抑制タンパク質)、Rab GDF (Rab GDI 解離因子) によって厳密に制御されている。また、活性型 Rab5 には様々な因子が相互作用し、エンドサイトーシスが進行していくと考えられている。本稿では、最初に Rab5 の活性を制御する因子について触れ、次に Rab5 によるクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御機構について概説する。

**キーワード：** エンドサイトーシス、Rab5、GEF、GAP、Rab GDI、Rab GDF

### はじめに

Rab は、Ras-related protein in brain を省略したものであり、脳より Ras と相同性が高い遺伝子としてクローニングされた低分子量 G タンパク質である。Rab タンパク質は、これまでに約 60 種類同定されている。それぞれの Rab タンパク質における C 末端側のアミノ酸配列が異なるため、この違いによって局在できるオルガネラが異なると考えられている<sup>1)</sup>。Rab5 は、Rab ファミリーに属する分子量約 25 kDa の低分子量 G タンパク質であり、エンドサイトーシスにおいて重要な役割を担っている<sup>2,3)</sup>。Rab5 は、細胞膜と初期エンドソームに局在し、細胞外からの物質取り込みや小胞輸送、小胞と初期エンドソーム融合を制御している<sup>2,3)</sup>。Rab5 は、クラスリン依存性エンドサ

イトーシスにおいて最も研究が進んでいるが<sup>2,3)</sup>、カベオラ依存性エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスによる細胞内への取り込みにも関与する<sup>4,12)</sup>。本稿では、最初に Rab5 の活性を制御する因子について触れ、次に Rab5 によるクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御機構について概説する。

### Rab5 の活性制御タンパク質

Rab5 は、GDP が結合した不活性型と、GTP が結合した活性型が存在し、この活性変化によって高度にエンドサイトーシスが制御されている。Rab5 が不活性型から活性型へと変化する時には GDP/GTP 交換反応を促進する GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factor: GEF) が Rab5 と相互作用し、Rab5 が活性化される<sup>2,3)</sup>。その反対に、

<sup>1</sup> 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科 <sup>2</sup> 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部

\* 責任著者 連絡先 : hagimako@unii.ac.jp

利益相反 : なし

Rab5 が活性型から不活性型に変化する時には、Rab5 自身が持つ GTPase 活性を促進する GTPase 促進タンパク質 (GTPase-activating protein: GAP) が Rab5 と相互作用し、Rab5 に結合している GTP が加水分解反応によって GDP となり、Rab5 は不活性型となる<sup>2,3)</sup>。不活性型 Rab5 には、Rab GDP 解離抑制タンパク質 (Rab GDP dissociation inhibitor: Rab GDI) が相互作用し、Rab5 から GDP が解離するのを抑制して Rab5 が活性化するのを抑えている<sup>2,3)</sup>。Rab GDI は、Rab5 とだけ相互作用するのではなく、Rab ファミリータンパク質全てに作用すると考えられている<sup>1)</sup>。さらに、Rab に対する GEF は Rab GDI の存在下では Rab を活性化できないことから、Rab GDI 解離因子 (Rab GDI displacement protein: Rab GDP、別名 Rab GDI displacement factor: Rab GDF) が知られており<sup>1,13)</sup>、Rab5 においても Rab GDF の作用によって Rab GDI が解離するとされている<sup>14)</sup>。近年、Rab5 に対する Rab GDF の研究に進展があり、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する CD147 (別名 Basigin) と相互作用する YIPF2 が Rab5 と Rab22 の Rab GDF として新たに同定された<sup>15)</sup>。また、Rab タンパク質では、活性制御タンパク質が作用するには、C 末端側におけるシステインの脂質修飾が必要であるとされている<sup>1)</sup>。Rab5 では、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの作用によってゲラニルゲラニル基が C 末端側の 2 個のシステイン残基に 1 個ずつ結合し、合計 2 か所のゲラニルゲラニル修飾を受けると考えられている<sup>16,17)</sup>。

Rab5 に対する GEF としては、Rabex-5<sup>18)</sup>、Rin (Ras and Rab interactor) タンパク質 (Rin1、Rin2、Rin3)<sup>19-21)</sup>、ALS2/Alsin<sup>22,23)</sup>、Gapex-5 (別名 Rab5-activating protein 6: RAP6) (線虫の Gapex-5 ホモログは RME-6) が報告されている<sup>24-26)</sup>。これらはいずれも高度に保存された Vps9 ドメイン (Vacuolar protein sorting-associated protein 9 ドメイン) (酵母ホモログに由来する名前) を有しており<sup>27)</sup>、このドメインが Rab5 の活性化に必須と

考えられている。Rabex-5 は Rabaptin-5 と複合体を形成するが、Rabaptin-5 は活性化した Rab5 と結合することから、Rabaptin-5-Rabex-5 複合体は協調して Rab5 を活性化させると考えられている<sup>18)</sup>。Rin タンパク質は、Rab5 だけではなく、その名のとおりがん原遺伝子 Ras にコードされている低分子量 G タンパク質 Ras とも相互作用することが知られている。Rin タンパク質は、Ras を介したシグナル伝達によって Rab5 を活性化させエンドサイトーシスを促進し、細胞増殖や細胞移動などにも関わる<sup>28-30)</sup>。ALS2/Alsin は、筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子 Als2 にコードされているタンパク質であり、Rab5 だけではなく、低分子量 G タンパク質 Rac1 に対しても GEF として作用し、Rac1 を活性化させることによってマクロピノサイトーシスによる取り込みを促進する<sup>31,32)</sup>。Gapex-5 は、細胞膜近傍でインスリンシグナル伝達において Rab5 を活性化させることやファゴサイトーシスにおける Rab5 の活性を調節していることが報告されている<sup>5,24)</sup>。余談ではあるが、Gapex-5 は Rab31 に対しても GEF として作用し、トランスゴルジネットワークからエンドソームへの小胞輸送にも関与するとされているが<sup>33)</sup>、詳細については不明な点も多い。また、脂質ラフトの一種であるカベオラの主要なタンパク質である caveolin-1、アクチン重合因子である L-plastin や T-plastin なども Rab5 を活性化する<sup>12,34)</sup>。これらのタンパク質は Vps9 ドメインを持たないため、GEF を刺激することによって Rab5 を活性化するのではないかと推測される。

活性型 Rab5 を不活型にする GTPase 促進タンパク質 (GAP) は共通の配列である TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) ドメインを有するものと<sup>35)</sup>、TBC ドメインを持たないものがある。Rab5 の GAP としては TBC ドメインを有する RN-Tre が知られているが<sup>36)</sup>、同様に TBC ドメインを有する RabGAP-5 も Rab5 の GAP として機能することが報告されている<sup>37)</sup>。Rab5GAP-5 と Rab5 の関連性を報告した論文では、RabGAP-5 の Rab5 に対

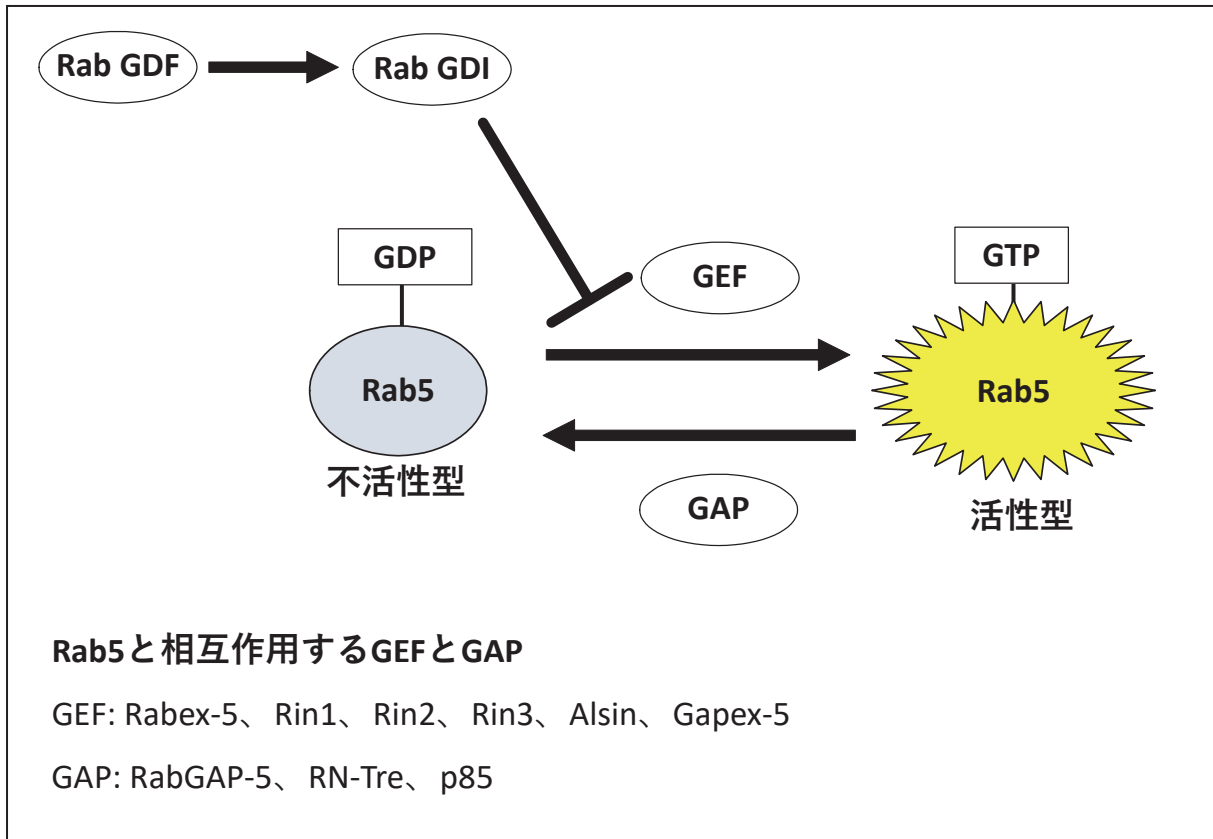


図 1 Rab5 の活性調節メカニズム

GDP が結合している Rab5 は不活性型であり、Rab GDI によって、不活性状態が維持される。Rab5 GDF によって、Rab5 から Rab GDI が解離すると、GEF の作用によって Rab5 に結合している GDP が GTP に交換され活性型 Rab5 となる。活性型 Rab5 は、細胞膜における物質取り込みから初期エンドソームまでの小胞輸送を制御する。初期エンドソームに到達し、役目を終えた Rab5 は GAP の作用によって、Rab5 自身のもつ GTPase 作用が促進される。Rab5 は GTP のリン酸基を加水分解することによって、リン酸を一つ放出し、GDP が結合した不活性型となる。

する GAP 作用は RN-Tre よりも強く、RN-Tre は Rab5 に対する GAP 作用よりも Rab41 に対する GAP 作用の方が強いことが明かにされている<sup>37)</sup>。TBC ドメインを持たない Rab5 に対する GAP は、ホスファチジルイノシトールのイノシトール環の 3 位をリン酸化する酵素であるホスファチジル-3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K) の p85 サブユニットが知られている<sup>38,39)</sup>。p85 サブユニットは p110 サブユニットと複合体を形成するが、p110 は Rab5 に対する GAP 作用はない。p85 は活性型 Rab5 と不活性型 Rab5 両方と相互作用し、p110 は活性型 Rab5 のみと相互作用する。このことより、p85-p110 複合体は活性型 Rab5 と

相互作用し、p85 が不活性型 Rab5 と相互作用する時は、p85 と p110 は解離している<sup>40)</sup>。また、がん抑制タンパク質の一つである TSC2 (tuberin) は、TBC ドメインを有していないが、Rabaptin-5 と相互作用し、Rab5 に対する GAP 作用があるとの報告がある<sup>41)</sup>。しかし、その報告の後に、同様の結果を得られたという文献がない。図 1 に、Rab5 の活性を調節する因子についてまとめた。

### Rab5によるクラスリン依存性エンドサイトーシス制御機構

Rab5 には様々なタンパク質が結合することが

Rab5 アフィニティークロマトグラフィー法によって生化学的に明らかにされており<sup>42-45)</sup>、Rab5 と様々な因子が相互的に作用し、時空間的にエンドサイトーシスが制御されている。クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいては、細胞膜上にある受容体にリガンドが結合するとクラスリンタンパク質が集積することによって、クラスリン被覆ピットが形成される<sup>46)</sup>。この時、クラスリン被覆ピット上で、Rab5 の GEF である Gapex-5 の作用によって Rab5 が活性化される<sup>24-26)</sup>。次に、細胞膜が陥入し、Dynamin-2 によって小胞が細胞膜からちぎりとられる<sup>46)</sup>。この時に、細胞骨格タンパク質であるアクチンの重合が細胞膜から遊離するための駆動力となると考えられている<sup>46)</sup>。細胞膜から遊離した小胞ではクラスリンが外されるとともに重合しているアクチンが解離する<sup>46)</sup>。これ以後、小胞は細胞骨格タンパク質である微小管(チューブリン)の線路上を移動していくとされている<sup>47)</sup>。細胞内部へ小胞が移行すると、活性型 Rab5 の相互作用因子である Rabaptin-5 が活性型 Rab5 と結合する<sup>23)</sup>。Rabaptin-5 は、GEF である Rabex-5 (Gapex-5 による Rab5 の活性化は細胞膜上で起こるが Rabex-5 は細胞内部にある小胞膜上で Rab5 を活性化させる)と複合体を形成し、小胞膜上の Rab5 の活性が増幅する。Rab5 の活性が増幅することによって、さらに Rabaptin-5-Rabex-5 複合体が小胞膜上に引きよせられる(ポジティブフィードバック)。そして、小胞膜上の活性型 Rab5 には、PI3K である Vps34 が結合し、ホスファチジルイノシトールのイノシトール環の 3 位をリン酸化することによって、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) が産生される<sup>2)</sup>。PI3P は、初期エンドソーム膜の主要なリン脂質である。EEA1 (Early endosome antigen 1) は、活性型 Rab5 の相互作用因子であり、初期エンドソームマーカーとして知られている。EEA1 には FYVE ドメインという PI3P 結合モチーフがある。活性型 Rab5 と EEA1 の Rab5 結合ドメインが結合し、さらに、

EEA1 の FYVE ドメインと PI3P が結合すると、初期エンドソーム膜上へ EEA1 が局在する。EEA1 は二量体を形成し、初期エンドソームどうしをつなぎとめることによって、初期エンドソームどうしを融合させる。融合に関わる因子はそれだけではなく、初期エンドソーム膜上で活性型 Rab5 と PI3P は Rabenosyn-5-Vps45 複合体を引きよせ、それらが小胞の融合を制御する SNARE (soluble NSF attachment protein receptor complex) の集積を調節することによって、初期エンドソームどうしが融合する<sup>2)</sup>。SNARE は、小胞膜にある v-SNARE (v は vesicular の v を意味する)と標的膜にある t-SNARE (t は target-membrane の t を意味する)とがあり、分子内にある SNARE モチーフを介して結合し SNARE 複合体を形成することで小胞どうしの膜融合を引き起こす。初期エンドソームどうしの融合が繰り返されるにつれて、初期エンドソームの大きさは徐々に巨大化していく。Rab5 の不活性化の前段階としては、初期エンドソームから別のエンドソームへの輸送に関わる Rab タンパク質のエフェクターによって Rab5 活性化のポジティブフィードバックが阻害される (Rab カスケード)<sup>48)</sup>。Rab5 の不活性化は、GAP によって促進され、Rab5 は不活性化されると初期エンドソーム膜上から細胞質に放出される。初期エンドソームへと運ばれたリガンドや受容体のうち、受容体はリサイクリングエンドソームを経て細胞膜に戻されるものや、後期エンドソームを経てリソソームへと輸送され分解されるものがある。また、リガンドは、初期エンドソーム-後期エンドソーム-リソソームの輸送過程におけるどこかの段階で、トランスポーターなどの作用によって取り出されるものもある。LDL (低密度リポタンパク質) では、リソソームへと運ばれて分解を受け、遊離したコレステロールが、コレステロールトランスポーターであるニーマン・ピック C1 (NPC1) とニーマン・ピック C2 (NPC2) によって細胞質へと放出され、細胞膜や様々なオルガネラ膜へと運ばれる<sup>49)</sup>。図 2

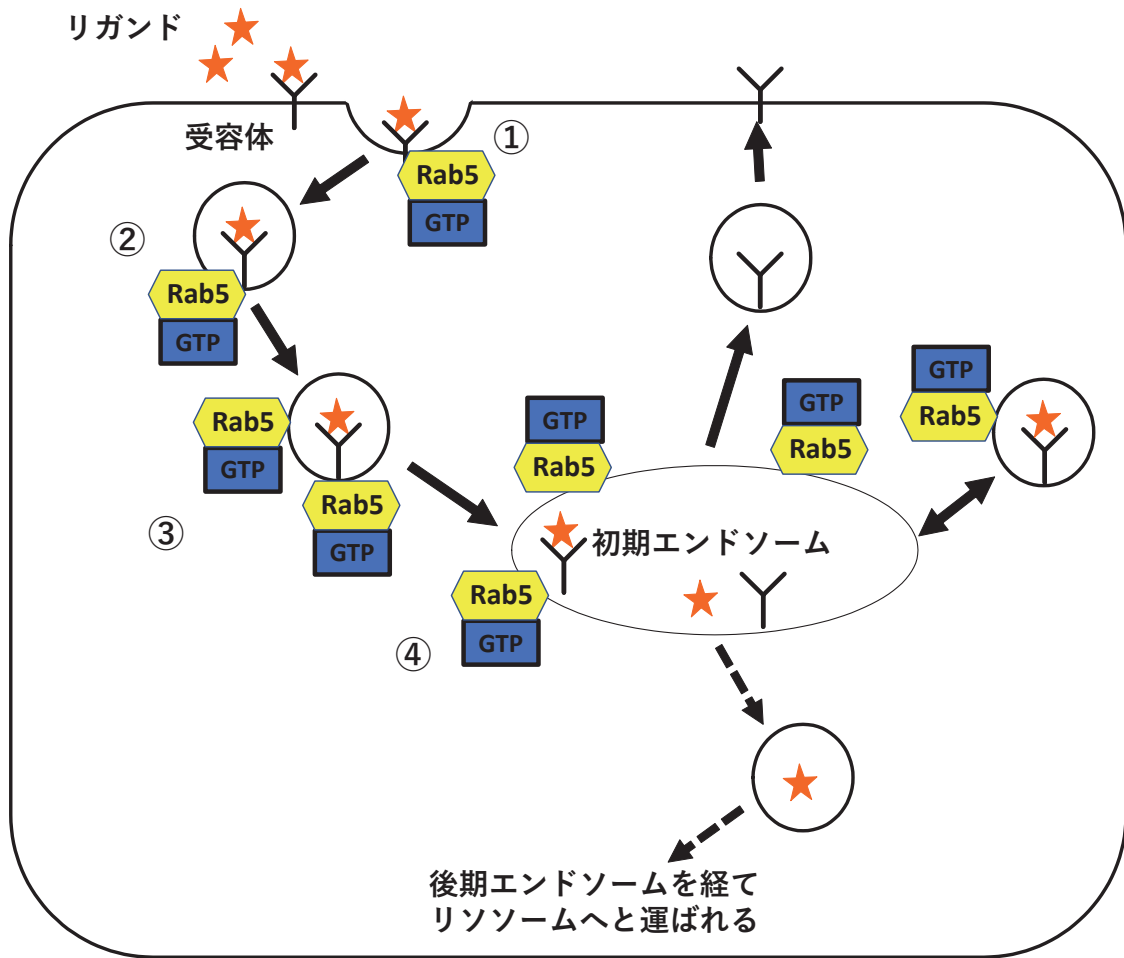


図 2 活性型 Rab5 によるエンドサイトーシス制御機構

Rab5 によるエンドサイトーシスが進行していく段階ごとに起こっていることを①～④に記す(詳細は本文参照)。①クラスリン被覆ピット上で Gapex-5 が Rab5 を活性化させる。②小胞膜上では Rabaptin-5-Rabex-5 複合体が引きよせられ、Rabex-5 が Rab5 を活性化させる。③PI3K である Vps34 によって PI3P が産生される。④EEA1 が PI3P と Rab5 に結合する。EEA1 どうしで二量体が形成され、初期エンドソームどうしが融合し徐々に巨大化する。

に Rab5 によるエンドサイトーシスの概略を示した。

クラスリン依存性エンドサイトーシス以外のエンドサイトーシスであるカベオラ依存性エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスも Rab5 によって調節されていると報告されているが<sup>4,12)</sup>、それらのエンドサイトーシスにおいては、クラスリン依存性エンドサイトーシスと共通の因子もあればそうでないものあ

る。詳細については、今後の研究によって明らかになるであろう。

## 結語

エンドサイトーシスは、細胞に必要な栄養成分の取り込みやシグナル伝達に参与するだけでなく、細胞にとって有害な細菌、毒素、ウイルスの侵入経路にもなる。2021 年 1 月現在、新型コロナウイルスが世界的に流行しており、新型コロ

ナウイルスに関する研究が盛んに行われている。新型コロナウイルスも他のウイルスと同様にエンドサイトーシスを利用し、宿主細胞に侵入するとされていることから<sup>50-53)</sup>、エンドサイトーシスの分子メカニズム解明は、新型コロナウイルスの感染機構の解明にも繋がっていくものと考えられる。また、Rab5は、最も良く研究されているRabタンパク質の一つではあるが、エンドサイトーシスの分子メカニズムは不明な点も多くあり、Rab5の相互作用因子を同定することによって新たな分子メカニズムの解明が期待される。生化学的にRab5相互作用因子を同定する方法においては、個々の臓器や細胞におけるタンパク質の発現量に依存する。従って、これまでにRab5相互作用因子の同定に用いられていない組織や細胞から新規なRab5相互作用因子が発見される可能性は十分にあるものと考えられる。

### 倫理的配慮

本論文は、様々な学術的文献をまとめたものであり、倫理委員会等の審査は不要である。

### 文献

- 1) Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* 2011; 91: 119-49.
- 2) Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 107-17.
- 3) Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 513-25.
- 4) Stein MP, Muller MP, Wandinger-Ness A. Bacterial pathogens commandeering Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic.* 2012; 13: 1565-88.
- 5) Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, et al. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature.* 2008; 453: 241-5.
- 6) Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, et al. The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol.* 2004; 2: E261.
- 7) Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, et al. Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 627-32.
- 8) Duclos S, Diez R, Garin J, et al. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 19: 3531-41.
- 9) 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.
- 10) Wen MH, Wang JY, Chiu YT, et al. N-Cadherin Regulates Cell Migration Through a Rab5-Dependent Temporal Control of Macropinocytosis. *Traffic.* 2016; 17: 769-85.
- 11) Maganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C, et al. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for Trypanosoma cruzi internalization and replication in macrophages. *Traffic.* 2008; 9: 1299-315.
- 12) 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.
- 13) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001; 81: 153-208.
- 14) Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR. Identification of a GDI displacement factor that

- releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* 1997; 16: 465-72.
- 15) Qi S, Su L, Li J, et al. YIPF2 is a novel Rab-GDF that enhances HCC malignant phenotypes by facilitating CD147 endocytic recycle. *Cell Death Dis.* 2019; 10: 462.
  - 16) Farnsworth CC, Seabra MC, Ericsson LH, et al. Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 11963-7.
  - 17) Edler E, Stein M. Recognition and stabilization of geranylgeranylated human Rab5 by the GDP Dissociation Inhibitor (GDI). *Small GTPases.* 2019; 10: 227-42.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) Saito K, Murai J, Kajihio 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.
  - 21) Kajihio 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.
  - 22) Topp JD, Gray NW, Gerard RD, et al. Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 2004; 279: 24612-23.
  - 23) Otomo A, Hadano S, Okada T, et al. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 1671-87.
  - 24) 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.
  - 25) Hunker CM, Galvis A, Kruk I, et al. Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340: 967-75.
  - 26) 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.
  - 27) Carney DS, Davies BA, Horazdovsky BF. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 27-35.
  - 28) Sandri C, Caccavari F, Valdembrì D, et al. The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling. *Cell Res.* 2012; 22: 1479-501.
  - 29) Tomshine JC, Severson SR, Wigle DA, et al. Cell proliferation and epidermal growth factor signaling in non-small cell lung adenocarcinoma cell lines are dependent on Rin1. *J Biol Chem.* 2009; 284: 26331-9.
  - 30) Balaji K, Colicelli J. RIN1 regulates cell migration through RAB5 GTPases and ABL tyrosine kinases. *Commun Integr Biol.* 2013; 6: e25421.
  - 31) Sato K, Otomo A, Ueda MT, et al. Altered oligomeric states in pathogenic ALS2 variants associated with juvenile motor neuron diseases cause loss of ALS2-mediated endosomal function. *J Biol Chem.* 2018; 293: 17135-53.
  - 32) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, et al. Defective relocalization of ALS2/alsin

- missense mutants to Rac1-induced macropinosomes accounts for loss of their cellular function and leads to disturbed amphisome formation. *FEBS Lett.* 2011; 585: 730-6.
- 33) Lodhi IJ, Chiang SH, Chang L, et al. Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab.* 2007; 5: 59-72.
- 34) 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.
- 35) Itoh T, Satoh M, Kanno E, et al. Screening for target Rabs of TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain-containing proteins based on their Rab-binding activity. *Genes Cells.* 2006; 11: 1023-37.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) Chamberlain MD, Berry TR, Pastor MC, et al. The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J Biol Chem.* 2004; 279: 48607-14.
- 39) Chamberlain MD, Oberg JC, Furber LA, et al. Deregulation of Rab5 and Rab4 proteins in p85R274A-expressing cells alters PDGFR trafficking. *Cell Signal.* 2010; 22: 1562-75.
- 40) Whitecross DE, Anderson DH. Identification of the Binding Sites on Rab5 and p110beta Phosphatidylinositol 3-kinase. *Sci Rep.* 2017; 7: 16194.
- 41) Xiao GH, Shoarinejad F, Jin F, et al. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem.* 1997; 272: 6097-100.
- 42) Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, et al. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature.* 1999; 397: 621-5.
- 43) Hagiwara M, Kobayashi K, Tadokoro T, et al. Rab5 affinity chromatography without nonhydrolyzable GTP analogues. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2009; 64: 303-6.
- 44) Christoforidis S, Zerial M. Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods.* 2000; 20: 403-10.
- 45) Christoforidis S, Zerial M. Purification of EEA1 from bovine brain cytosol using Rab5 affinity chromatography and activity assays. *Methods Enzymol.* 2001; 329: 120-32.
- 46) Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 857-902.
- 47) Nielsen E, Severin F, Backer JM, et al. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol.* 1999; 1: 376-82.
- 48) Barr FA. Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *J Cell Biol.* 2013; 202: 191-9.
- 49) Meng Y, Heybrock S, Neculai D, et al. Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond. *Trends Cell Biol.* 2020; 30: 452-66.
- 50) Filippini A, D'Alessio A. Caveolae and Lipid Rafts in Endothelium: Valuable Organelles for Multiple Functions. *Biomolecules.* 2020; 10.
- 51) Baig AM. Can Neurotropic Free-Living



- Amoeba Serve as a Model to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis? ACS Chem Neurosci. 2020; 11: 3697-700.
- 52) Galimberti S, Petrini M, Barate C, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors Play an Antiviral Action in Patients Affected by Chronic Myeloid Leukemia: A Possible Model Supporting Their Use in the Fight Against SARS-CoV-2. Front Oncol. 2020; 10: 1428.
- 53) 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.

