

図 20 次世代シーケンサー (NGS) を使ったウイルス検出法

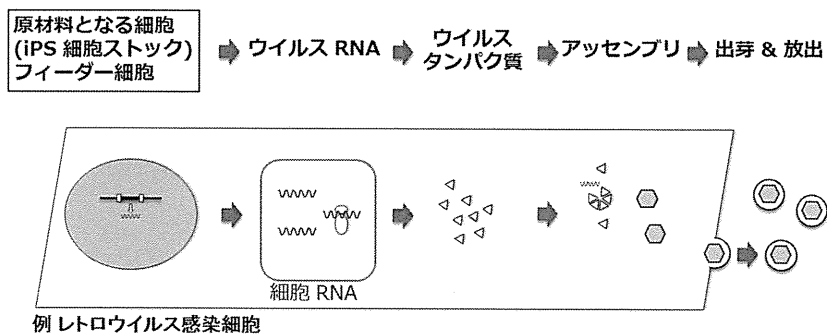


図 21 次世代シーケンサー (NGS) を使ったウイルス検出法

Samples	No. of reads	length/read (nt)	Bases (%>=30)
HEK293	23M	194	2.310G (88.47)
HEK293 + FCV 12 h	33M	195	3.316G (88.72)
HEK293 + FCV 24 h	31M	194	30.96G (88.35)

表 2 HEK293 細胞, FCV 感染 HEK293 細胞 RNA-seq データ (Illumina HiSeq 2500 使用)

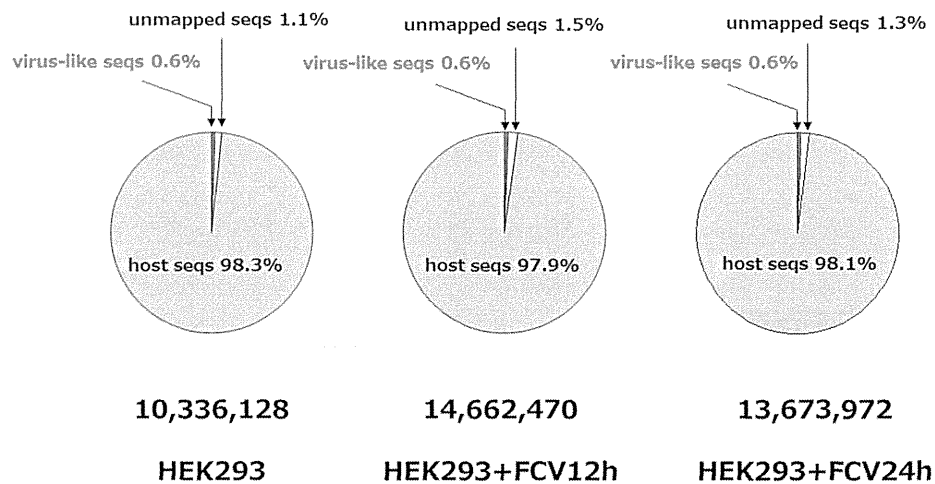


図 22 HEK293 細胞, FCV 感染 HEK293 細胞の RNA-seq データに含まれるウイルス様 シークエンス

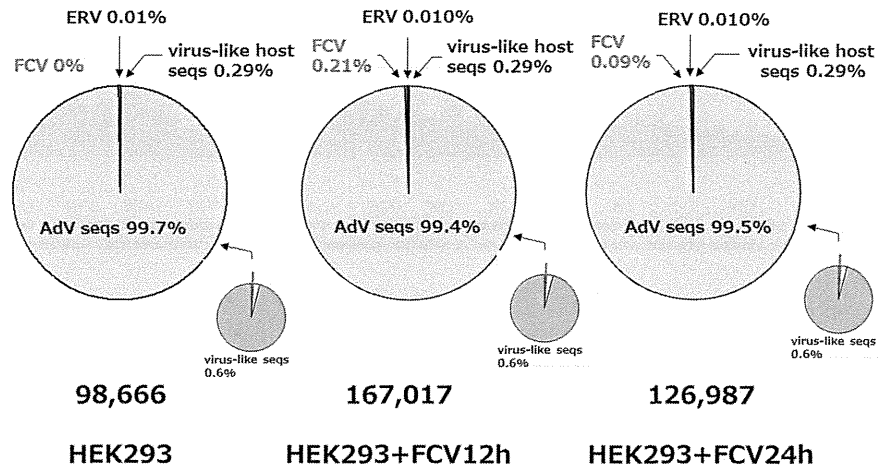


図 23 HEK293 細胞, FCV 感染 HEK293 細胞に含まれるウイルス様シーケンスの内訳 (1)

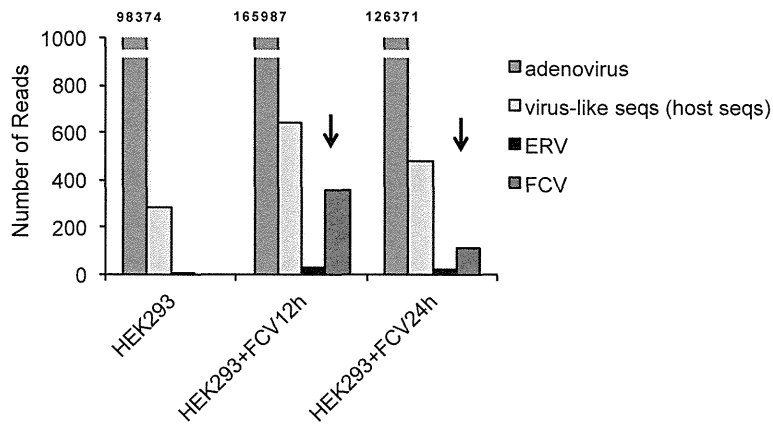


図 24 HEK293 細胞, FCV 感染 HEK293 細胞に含まれるウイルス様シーケンスの内訳 (2)

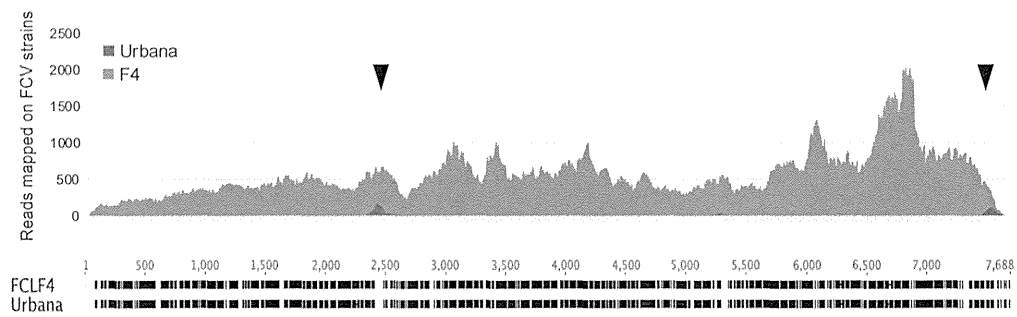


図 25 RNA ウイルスは多様なシーケンスバリエーションから構成されているので検出に使うウイルスデータベースによって検出感度が変わる

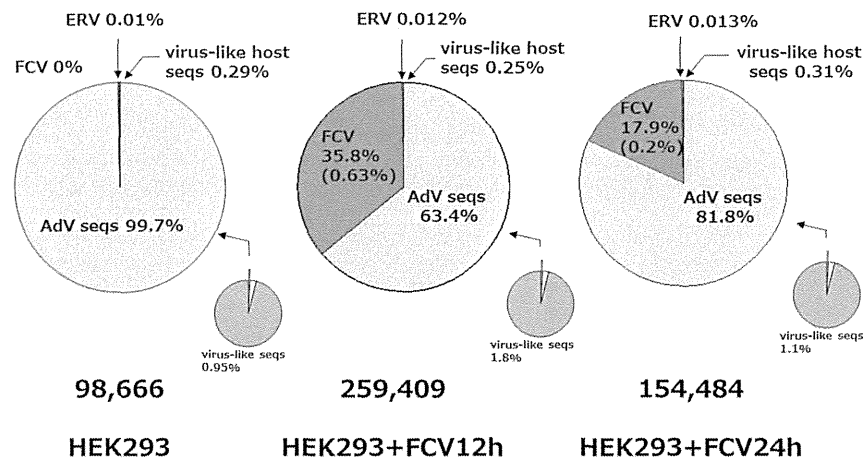


図 26 拡張ウイルスデータベースを使ったウイルス様シーケンスの内訳 (2)

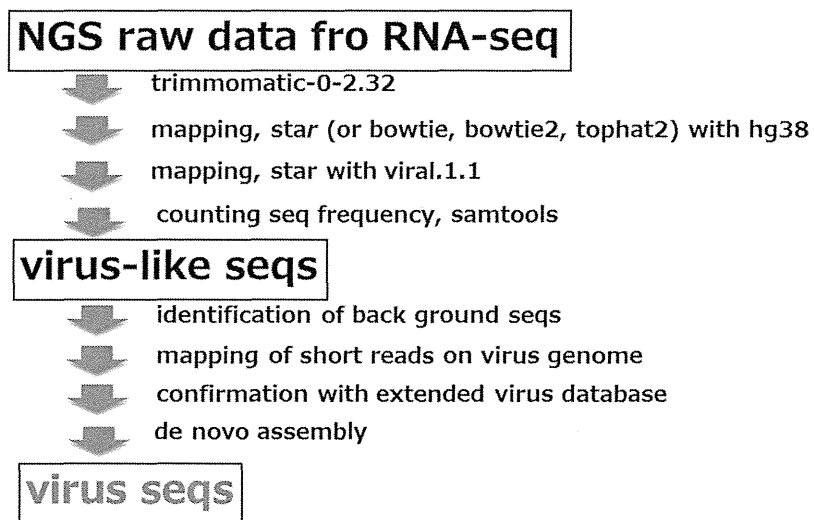


図 27 NGS を用いた細胞のウイルス感染を検出するためのパイプライン

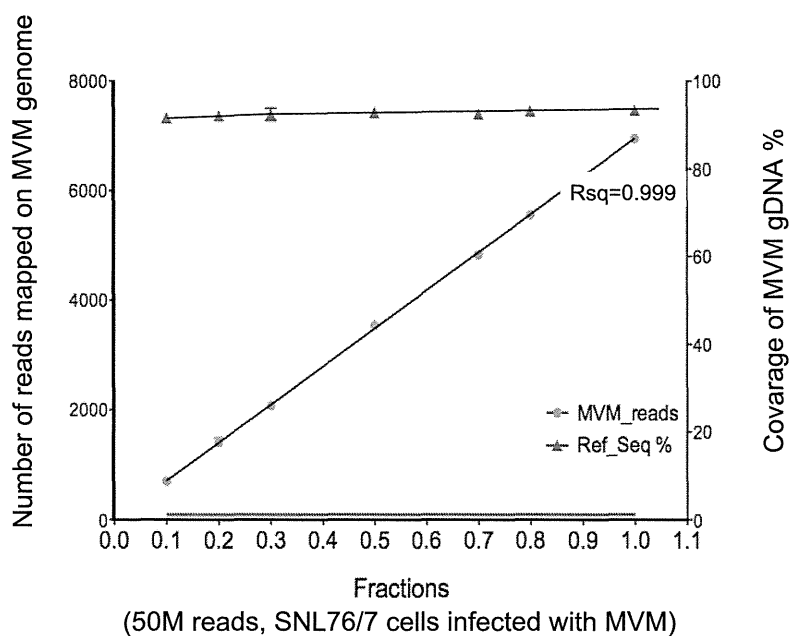


図 28 感染ウイルス検出に必要なサイズの RNA-seq データ

	Number of MVM reads	Time for analysis
bowtie1	472	8 min
bowtie2	6819	10 min
Bwa	6928	15 min
tophat2	6636	66 h
star	6952	3 min

表3 異なる解析プログラムによる RNA-seq データの解析にかかる時間と検出されるウイルス様シーケンスの数

試薬・解析	価格	1 サンプル	時間
RNA 精製 (RNeasy plus universal mini kit)	44500円 (50 sample用)	890円	2 時間
鋳型調製用キット (TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 - Set A)	628000円 (48 sample用)	13083円 (=628000/48)	2日 (サンプル調製)
フローセル (TruSeq SR Cluster Kit v3 - cBot - HS)	666000円/ラン (RNA-seq, 20Mリード; 約9サンプル/1レーン, 8レーン9×8=72サンプル/ラン)	9250円 (=666000/72)	3日 (シーケエンシング)
反応試薬 (TruSeq SBS Kit v3 - HS, 50 Cycle)	391000円/ラン	5430円 (=391000/72)	
RNA-seq ウイルス検出データ解析		? 円	2日
合計		(28653+a)円	~1週間

表4 NGS を使ったウイルス検出法のコストと検出時間について
(例: HiSeq 2500, Illumina)

	Number of reads	length/read (nt)	Bases (%>=30)
SNL76/7	54M	125	6.791G (93.6/90.2)
SNL76/7 Irradiated	58M	125	7.246G (93.6/90.5)
SNL76/7 + MVM	50M	125	6.271G (93.7/90.9)

表5 SNL76/7細胞のRNA-seq data (Illumina HiSeq 2500)

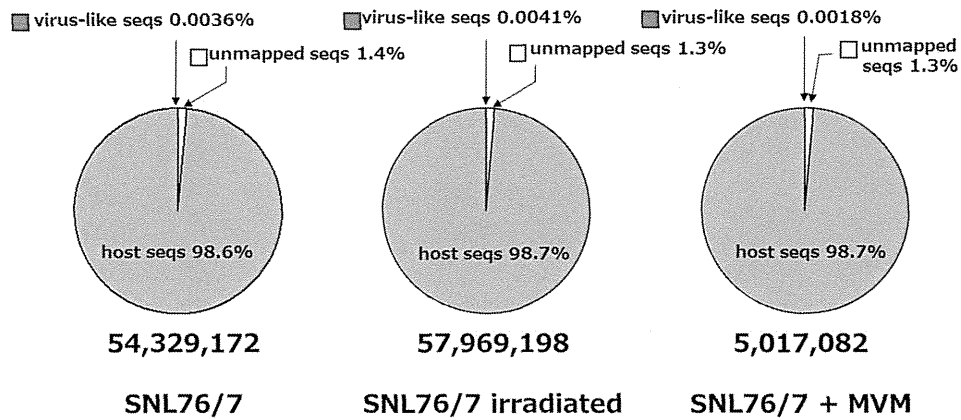


図29 SNL76/7細胞, 放射線照射済76/7細胞, MVM感染SNL76/7細胞RNA-seqに含まれるウイルス様シーケンス

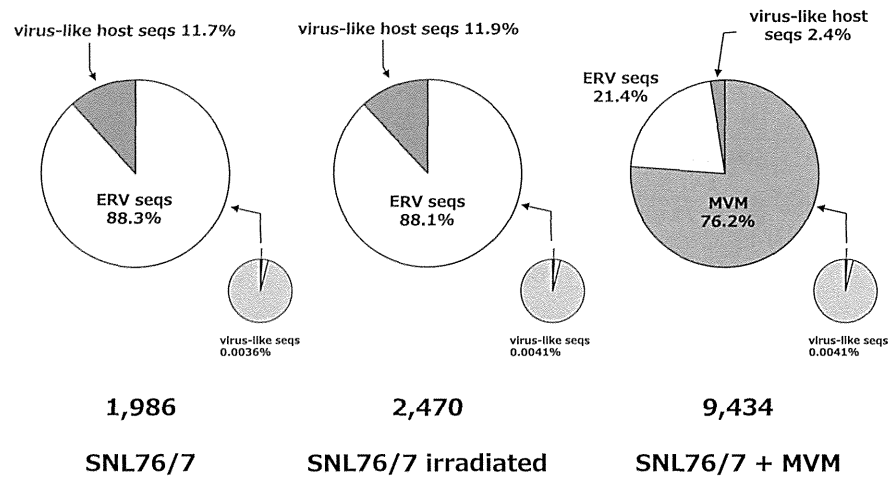


図 30 SNL76/7 細胞，放射線照射済 76/7 細胞，MVM 感染 SNL76/7 細胞 RNA-seq のウイルス様シーケンス内訳

細胞組織加工医薬品におけるウイルス検出法に関する研究

研究分担者：橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第一室長

研究要旨 細胞表面に発現したウイルス受容体を指標とした細胞組織加工製品のウイルス感受性評価手法を開発することを目的として、液体クロマトグラフィー/質量分析を用いたウイルス受容体解析技術の開発を行った。細胞表面のタンパク質をビオチン標識することで、ウイルス受容体関連タンパク質を効率良く回収できることが明らかとなった。本解析技術をヒト iPS 細胞に応用した結果、複数のウイルス受容体関連分子の同定に成功した。本解析技術は、細胞組織加工製品のウイルスレセプトーム解析手法として有用であることが実証された。

A. 研究目的

細胞組織加工製品のウイルス安全性確保においては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒト(自己・同種)由来細胞組織加工製品等の品質及びのウイルス安全性の確保に関する指針」、「ヒト(自己・同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」、「ヒト(自己・同種) iPS(様)細胞加工医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」、及び、「ヒト ES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」に記載されたウイルス安全性に関する規定を順守して、原材料、製造工程、及び最終製品の各段階で、適切なウイルス検査・試験を行う必要がある。適切なウイルス試験を設定するためには、その細胞の内在性ウイルスに加えて、どのような外来性ウイルスの迷入があるか、あるいは感染リスクが高いのかを把握することが重要である。

ICHQ5A「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオ医薬品のウイルス評価」に

関するガイドラインには、内在性及び外来性ウイルス検出及び確認のために推奨される試験として、感染性試験及び電子顕微鏡観察(レトロウイルス試験)、*In vitro* 試験、*In vivo* 試験、並びに抗体産生試験等のさまざまな試験法が例示されている。既知ウイルスのスクリーニング法としては、PCR法、抗ウイルス抗体を用いた免疫学的方法、及び核酸増幅法等が知られている。これらの手法は確立された手法であり、特異的且つ高感度に標的ウイルスの有無を確認することができる。一方、ウイルス感染は、ウイルスが細胞表面の受容体(表1)に結合することが引き金となり起こることから、受容体の発現は、細胞のウイルス感受性を評価するための指標として利用できる可能性がある。特に、iPS細胞のように、細胞の特性解析が不十分な細胞については、適切なウイルス感染性試験を設定するための一つの根拠として有益な情報となりうる可能性がある。

本研究ではまず、細胞表面に発現したウ

ウイルス受容体を指標とした細胞組織加工製品のウイルス感受性評価手法を開発することを目的として、モデル細胞を用いて、ウイルス受容体解析技術（ウイルスレセプトーム解析技術）の開発を検討した。次に、開発したレセプトーム解析技術を用いて、ヒトiPS細胞表面に発現したウイルス受容体の解析を行うとともに、本解析手法の有用性を検証した。

B. 研究方法

B.1. 材料等

B.1.1. CHO-DG44 細胞

0.1% Pluronic F-68 を添加した DG44 培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mL となるように CHO-DG44 細胞を播種し、7日間、旋回培養 (125 rpm, 37°C, 5% CO₂ 気流下) した。

B.1.2. ヒト iPS 細胞

ヒト iPS 細胞として、253G1 株を用いた。凍結ストックを解凍後、hES 培地 (bFGF (R&D Systems) を含む Primate ES 培地 (ReproCELL)) を用いて細胞懸濁液を調製した後、feeder 細胞 (マイトマイシン C 処理 SNL 細胞) を播種した dish に播き、hES 培地で培養した。Feeder 細胞上で 4~6 日毎に継代を行い、コロニーが十分に成長し、且つ dish 面積に対して十分な細胞密度となった時に、matrigel (BD Biosciences) でコーティングした dish に継代した。Matrigel 上での培養には mTeSR1 培地 (STEMCELL) を使用した。Matrigel コーティング dish を用いた培養の継代は feederless single cell passage 法に従って行った。Accumax (Innovative Cell Technologies) を添加して細胞を分離して、継代の際の培地は Y-27632

(Wako) を含む mTeSR1 培地で細胞懸濁液を調製し、 0.25×10^5 cells/60mm dish となるように播種し、7日間培養した。

B.2. 細胞表面タンパク質のビオチン化

回収した CHO-DG44 細胞 (1.4×10^7 個) あるいはヒト iPS 細胞 (3.0×10^6 個) を PBS で 3 回洗浄し、5 mL の PBS で再懸濁したのち、1 mL の 10 mM sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Fisher Scientific) 水溶液を加え、4°C で 2 時間の転倒混和によりビオチン化反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、100 mM glycine/PBS でビオチン化を停止させ、300 μ L の RIPA buffer (0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 使用前に 1 μ L の Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加) を加え、4°C で約 1 時間転倒混和し、15,000 rpm で 10 分間遠心した遠心上清を RIPA lysate として回収した。

B.3. ビオチン化タンパク質の精製と消化

Streptavidin agarose resin 50% slurry (Thermo Fisher Scientific) 10 μ L (レジン 5 μ L に相当) を PBS で洗浄したのち、液相を 30 μ L の RIPA lysate に置換し、室温で 1 時間混和した。レジンを 100 μ L の RIPA buffer で 1 回、純水で 3 回洗浄し、液相を 100 μ L の guanidine buffer (8 M guanidine-0.5 M EDTA (pH 8.6)) または Tris buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5)) に置換し、2 μ L の 1 M DTT を加え 65°C で 20 分間、続けて 4.8 μ L の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加え遮光しながら室温で 40 分間反応させ、還元カルボキシメチル化を行った。反応後、0.5 mL の純水でレジンを 3 回洗浄し、液相を 100 μ L の 50

mM Tris-HCl (pH 8.5)で置換し、終濃度 5 ng/ μ L の修飾トリプシンを加え 37°C で 16 時間消化した。消化物をフィルター(Empty Micro Bio-Spin, Bio-Rad)で濾過しレジンを取り除いた。また, whole cell lysate として, RIPA lysate 30 μ L に 70 μ L の guanidine buffer を加え, 同様の条件で還元カルボキシメチル化を行い, PD minitrap G-25 (GE Healthcare)で脱塩, 凍結乾燥の後, 100 μ L の Tris buffer で溶解し, 終濃度 5 ng/ μ L の修飾トリプシンを加え 37°C で 16 時間消化した。いずれも消化物は Speed vac で乾燥させ 25 μ L の 0.1%ギ酸に溶解し, LC/MS 分析に供した。

B.4. 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS)

分析条件は以下の通りである。

(1) LC

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

分析カラム: L- column2 C18 column (0.075 mm \times 150 mm, ϕ 3 μ m, CERI)

バッファーA 及び B として, 2%及び 90%のアセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液を使用し, 流速 0.3 μ L/min, B 溶媒 5-65%のリニアグラディエントで分離を行った。

(2) MS

装置: LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific), 及び Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific)

分析条件は以下のとおりであった。

キャピラリー電圧: 2.0 kV

マススペクトルの範囲: m/z 450-2000

タンデム MS (MS/MS) コリジョンエネルギー: 30%

(3) タンパク質同定

Proteome Discoverer ソフトウェア (1.4., Thermo Fisher Scientific) の Sequest HT 検索エンジンを用いてタンパク質同定を行った。CHO-DG44 細胞由来タンパク質の同定では UniProtKB 中の *Cricetulus griseus* を種とするデータベースを, またヒト iPS 細胞由来タンパク質の同定ではヒトを種とするデータベースを用いた。修飾としてシステイン残基のカルボキシメチル化(+ 58.005 Da, static), およびメチオニン残基の酸化(+ 15.995 Da, dynamic)を指定した。ビオチン化ペプチドは, 固相化ストレプトアビジンに残留し, 測定試料中にはほぼ無いと推測されるので, LC-ビオチン化 (+ 339.162) は考慮しなかった。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料 iPS 細胞を用いたので, 所内倫理委員会に諮り承認を得た。

C. 研究結果及び考察

C.1. 細胞表面のウイルス受容体解析技術 (ウイルスレセプトーム解析技術) の開発

C.1.1. CHO-DG44 細胞由来 Whole cell lysate からのウイルス受容体の探索

CHO-DG44 細胞の RIPA lysate を, そのまま還元カルボキシメチル化, 及びトリプシン消化した後, LC/MS 分析を行った(図 1A, whole cell lysate). 取得した MS/MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果(図 2A), 同定された総タンパク質数 (532 個) に対する膜タンパク質, 及び細胞内タンパク質の割合は, それぞれ 27%及び 19%であ

った。膜タンパク質が最も多く同定されたものの、細胞内タンパク質が量的に多く、ウイルス受容体はほとんど検出されなかった(表 2.whole).

C.1.2. ビオチン化膜タンパク質の濃縮条件の検討

膜タンパク質の回収方法として、超遠心分離法があるが、微量タンパク質の回収には適さない場合がある。また近年、さまざまな界面活性剤を用いた膜タンパク質抽出キットが販売されているが、脱界面活性剤・脱塩操作後に、回収率が低下することが懸念されている。そこで RIPA lysate から、細胞表面に存在するタンパク質のみを効率的に回収するために、細胞膜透過性を持たない分子で標識する過程を追加した。可溶化前の細胞を Sulfo-NHS-LC-biotin 溶液中で振盪することで細胞表面タンパク質のビオチン化を行い、可溶化後に固定化ストレプトアビジンでビオチン化タンパク質を精製したのち、溶出を省き固定化ストレプトアビジンに結合させたままの状態還元カルボキシメチル化と消化を行ってペプチドにすることで、凝集・沈殿による膜タンパク質の逸失の抑制を図った。また、通常の還元カルボキシメチル化には、タンパク質を変性させ反応効率を高めるために、グアニジンなどの変性剤を含む溶媒が用いられるが、グアニジンが固定化ストレプトアビジンを変性させビオチン化タンパク質の流失を起こす危険が想定されたため、還元カルボキシメチル化時の溶媒として、8 M のグアニジンを含む guanidine buffer を用いた試料に加え、より穏やかな条件として緩衝剤のみを含む Tris buffer を用いた試料を別に用

意した。

ビオチン化とストレプトアビジンでの細胞表面タンパク質の濃縮を行ったことで、同定された全タンパク質数は減少したものの(Tris buffer 358 個, guanidine buffer 305 個)、膜タンパク質数の割合は、27%から 32% (Tris buffer)または 43% (guanidine buffer)に上昇した(図 2)。また、ウイルス受容体関連タンパク質として、intercellular adhesion molecule 1 (Coxsackievirus A13, A18, A21, 及び rhinovirus), low-density lipoprotein receptor (Rhinovirus), MHC class I antigen Hm1-C4, MHC class I antigen Hm1-C5 (以上, Simian virus 40), neural cell adhesion molecule 1 (Rabies virus), nucleolin (respiratory syncytial virus), dystroglycan (Old World arenaviruses), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (Vaccinia virus, Circovirus, 及び HSV1 and 3), 及び sulfated glycoprotein 1 (17 種, 表 1 参照)が同定され、同定数は 1 個から 9 個に改善された(表 2)。還元カルボキシメチル化に用いる緩衝液については、guanidine buffer で還元カルボキシメチル化を行ったもので特にウイルス受容体由来ペプチドの検出数が多く(表 2)、Tris buffer 系では細胞内タンパク質の検出数が多かった(図 2 B, C)。このことから、ストレプトアビジン-ビオチン間の結合は guanidine buffer 中で還元カルボキシメチル化を行ってもなお十分に維持されており、むしろ或る程度の変性条件を適用して非特異吸着物や凝集物を除去する方が、効率良く細胞表面のウイルス受容体を回収できるものと推定される。

C.1.3. 同定されたウイルス受容体の質量スペクトル

表 2 に挙げたウイルス受容体関連タンパク質由来ペプチドの MS スペクトルおよびそれらの代表的な MS/MS スペクトルを図 3 に示す. 本分析で同定されたウイルス受容体関連タンパク質由来ペプチドを指標とすることで, 各ウイルス受容体関連タンパク質の相対定量が可能になると思われる.

C.2. ヒト iPS 細胞のウイルスレセプトーム解析

C.2.1. ヒト iPS 細胞由来 whole cell lysate からのウイルス受容体関連タンパク質の探索

ヒト iPS 細胞由来の whole cell lysate を還元カルボキシメチル化, トリプシン消化した後, 細胞数に換算して 1×10^5 個相当のタンパク質を LC/MS で分析した (グラジュエント条件: 5-65%B 溶媒, 720 分間). 約 50 分~600 分にかけて, 多数のピークが検出された (図 4A). 取得された MS/MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果, 同定された総タンパク質数は 740 であった. 細胞内タンパク質, 核タンパク質, 及び膜タンパク質の割合は, 総タンパク質数に対して, それぞれ 20.0%, 19.4%, 及び 16.4% であり, 細胞内タンパク質の存在比率が最も高率であった (図 5A). タンパク質の機能に基づいて同定されたタンパク質を分類した結果, protein binding, RNA binding 及び catalytic activity に関連したタンパク質の順で, 存在比率が高かった (図 6A). 次に, 表 1 に示したリストを用いて, 同定されたタンパク質中のウイルス受容体関連タンパク質を探索した結果, claudin-6 (HCV), heat shock 70 kDa protein 1A/1B, 4 (Japanese encephalitis virus), nucleolin (Respiratory syncytial virus), 及び

coxsackievirus-adenovirus receptor (Adenovirus 2, Adenovirus subgroups A, C, D, E, F, 及び Coxsackievirus B1-B6) の存在が明らかとなった. Whole cell lysate の分析により多数のタンパク質が同定されたが, ウイルス受容体関連タンパク質は僅かであり, 膜タンパク質を分画する必要があることが示唆された.

C.2.2. ヒト iPS 細胞由来膜面からのウイルス受容体関連タンパク質の探索

C1.2. で検討したビオチン標識法を利用した手法により, ヒト iPS 細胞由来膜タンパク質の濃縮・精製を行った. 図 4(B) は, 濃縮・精製したヒト iPS 細胞由来膜タンパク質の LC/MS 分析 (グラジュエント条件: 5-65%B 溶媒, 360 分間) により得られたベースピーククロマトグラムである. MS/MS データを用いたデータベース検索により, 631 種類のタンパク質が同定された. Whole cell lysate と比較して同定数は減少したが, 細胞内タンパク質, 核タンパク質, 及び膜タンパク質の割合は, 総タンパク質数に対して, それぞれ 19.1%, 16.3%, 及び 19.2% であり, 膜タンパク質の存在比率が最も高率となった (図 5B). タンパク質の機能に基づくタンパク質の分類では, protein binding, catalytic activity, 及び RNA binding に関連したタンパク質の順で存在比率が高く, whole cell lysate とは異なっていた (図 6B). また, ウイルス受容体関連タンパク質として, 40S ribosomal protein SA (Sindbis virus), CD81 antigen (HCV), Claudin-6 (HCV), Coxsackievirus and adenovirus receptor (Adenovirus 2, Adenovirus subgroups A, C, D, E, F, 及び Coxsackievirus B1-B6), heat shock

70 kDa protein 1A/1B, 4 (Japanese encephalitis virus), integrin beta-1 (Echovirus 1 及び 8, Human rotavirus, Human herpesvirus 8), junctional adhesion molecule A (Reovirus, 及び Orthorheovirus), lysosome membrane protein 2 (Enterovirus 71), nucleolin (Respiratory syncytial virus), 及び solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (Human T cell leukemia virus 1) (11 種類)が同定された(表 3).

タンパク質とは異なるが、表 1 のリストには、ウイルス受容体関連分子の一つとしてシアル酸が挙げられている。そこで、以前に報告された手法 (Takakura, D, Kawasaki, N. et al., *J Proteomics*, 2014, 101, 17-30.) により糖ペプチドを濃縮した後、LC/MS 分析によりシアロ糖鎖付加糖ペプチドの有無を確認した。図 7(A) は濃縮した糖ペプチドのベースピーククロマトグラムである。図 7(B)及び 7(C)は、それぞれ、糖鎖関連フラグメントイオンである m/z 366 及び m/z 657 の抽出イオンクロマトグラムである。両クロマトグラムで同一時間にフラグメントイオンが検出された時間に、シアロ糖鎖結合糖ペプチドが溶出されている可能性が高い。図 7(D) にはピーク A の位置で取得された MS/MS スペクトルを示した。フラグメントイオン m/z 292, 及び 657 は、いずれもシアル酸関連糖鎖フラグメントイオンであり、iPS 細胞の細胞表面には、シアロ糖鎖付加糖タンパク質が存在することが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、まず、モデル細胞として、遺伝子組換え医薬品の産生細胞として汎用

される培養細胞の一つである CHO 細胞 DG44 を用いて、LC/MS を用いたレセプトーム解析技術を開発した。ビオチン化とストレプトアビジンを利用して細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収し、ウイルス受容体の検出効率を高めることができることを示した。また、CHO 細胞 DG44 に Icam-1, LDL 受容体などのウイルス受容体が発現していることを見出した。つぎに、本解析技術を用いて、ヒト iPS 細胞のレセプトーム解析を行い、12 種類のウイルス受容体関連分子の同定に成功した。本研究で使用した iPS 細胞は、これらの分子を標的とするウイルスに対する感受性が高いことが示唆された。今後、複数ロットの iPS 細胞のレセプトーム解析を行うことにより、感染性リスクの高いウイルスの予測にも繋がるものと思われる。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30:28(8), 921-932 (2014)

2. 学会発表 該当事項なし

G-1. 実用新案登録 該当事項なし

G-2. その他 該当事項なし

表1. ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス1

Receptor	Virus	Ref
Neuropilin-1 (Vascular endothelial cell growth factor 165 receptor, CD antigen CD304)	Human T cell leukemia virus 1	10
NPC1 (Niemann-Pick C1 protein)	Ebola virus	10
claudin-1 (Senescence-associated epithelial membrane protein), claudin-6	HCV	10,11
LDLR (Low-density lipoprotein receptor)	Rhinovirus (minor group)	10
CD4 (T-cell surface glycoprotein CD4)	Human immunodeficiency virus type 1	1
	Human immunodeficiency virus type 2	1
	Simian immunodeficiency virus	1
	Human herpesvirus 7	1
Transferrin receptor 1 (CD71)	New World arenaviruses	10
	Mouse mammary tumor virus	1
Icam-1 (CD54, Intercellular adhesion molecule 1)	Coxsackievirus A13, A18, A21	1
	Major group rhinovirus (91 serotypes)	1, 10
MHCI	Simian virus 40	1
MHCII	Adenovirus type 5 (subgroup C)	1
	Epstein-Barr virus	10
Hsp70	Japanese encephalitis virus	10
Low-affinity nerve growth factor receptor (CD271, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16)	Rabies virus	1
	Coxsackievirus A21	1
DAF (Decay-accelerating factor, CD55)	Coxsackievirus B1, B3, B5	1
	Coxsackievirus B	10
	Echovirus 3, 6, 7, 11 to 13, 20, 21, 24, 29, 33	1
	Echovirus 70	1
GLUT-1 (Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1, Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain, HepG2 glucose transporter)	Human T cell leukemia virus 1	10
N-CAM-1 (CD56, Neural cell adhesion molecule)	Rabies virus	1
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, (CD66a, Bgp, biliary glycoprotein)	Mouse hepatitis virus	1
Aminopeptidase N (CD13)	Human coronavirus, 229E	1
	Transmissible gastroenteritis virus	1
Poliovirus receptor (Pvr, NECL-5, CD155)	Poliovirus types 1-3	1
	Poliovirus	10
CD46 (membrane cofactor protein, trophoblast leukocyte common antigen, TLX)	Adenovirus (B1, B2, D)	3
	Measles virus	1
VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1, INCAM-100, CD106)	Encephalomyocarditis virus	1
	Adenovirus (C)	3
nucleolin (protein C23)	RSV (respiratory syncytial virus)	4
CD21 (Complement receptor type 2, Cr2, Complement C3d receptor, Epstein-Barr virus receptor, EBV receptor)	Epstein-Barr virus	1, 10
	Gibbon ape leukemia virus	1
Pit1 (Pituitary-specific positive transcription factor 1)	Feline leukemia virus T	1
	Feline leukemia virus B	1
	Adenovirus (B1, B2)	3
CD80 (activation B7-1 antigen, BB1, CTLA-4 counter-receptor B7.1, B7)	Adenovirus (B1, B2)	3
	Sindbis virus	1, 10
Laminin receptor (40S ribosomal protein SA, 37 kDa laminin receptor precursor, 37LRP, 37/67 kDa laminin receptor, LRP/LR, 67 kDa laminin receptor, 67LR, Laminin receptor 1, LamR, Laminin-binding protein precursor p40, LBP/p40)	Sindbis virus	1, 10
CD86 (activation B7-2 antigen, B70, BU63, CTLA-4 counter-receptor B7.2, FUN-1)	Adenovirus (B1, B2)	3
CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, C-C CKR-5, CC-CKR-5, CCR-5, CHEMR13, HIV-1 fusion coreceptor, CD antigen CD195)	HIV	5, 10
Ephrin-B2 (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 5, LERK-5, HTK ligand, HTK-L)	Henipavirus	8, 10
Asialoglycoprotein receptor GP-2	Sendai virus	1
CD81 (26 kDa cell surface protein TAPA-1, Target of the antiproliferative antibody 1, Tetraspanin-28, Tspan-28)	HCV	10

表1. ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス2

Receptor	Virus	Ref
CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)	HIV	5, 10
	Human immunodeficiency virus type 2	1
	Feline immunodeficiency virus	1
Car (coxsackievirus-adenovirus receptor)	Adenovirus 2	10
	Adenovirus subgroups A, C, D, E, F	1
	Coxsackievirus B1 to B6	1
Par-1 (proteinase-activated receptor 1)	Porcine endogenous retrovirus A	1
Par-2 (proteinase-activated receptor 2)	Porcine endogenous retrovirus A	1
Pit2	Feline leukemia virus B	1
	Amphotropic murine leukemia virus	1
SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule, CD150)	Measles virus	1, 10
Lysosome membrane protein 2 (85 kDa lysosomal membrane sialoglycoprotein, LGP85, CD36 antigen-like 2, Lysosome membrane protein II, LIMP II, Scavenger receptor class B member 2, CD antigen CD36)	Enterovirus 71	10
α -Dystroglycan (Dystrophin-associated glycoprotein 1 [Cleaved into: Alpha-dystroglycan (Alpha-DG); Beta-dystroglycan (Beta-DG)])	Old World arenaviruses	10
desmoglein-2 (DSG2, cadherin family member 5, HDGC)	Adenovirus (B1, B2)	3
PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1)	Enterovirus 71	10
Nectin-1 (Poliovirus receptor-related protein 1, Herpes virus entry mediator C, Herpesvirus entry mediator C, HveC, Herpesvirus Ig-like receptor, HlgR, Nectin-1, CD antigen CD111)	Herpes simplex virus 1/2	10
RDr	RD114	1
Ephrin-B3 (EPH-related receptor transmembrane ligand ELK-L3, EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 8, LERK-8)	henipavirus	8
occludin	Coxsackievirus B	10
	(HCV)	10
EGFR (epidermal growth factor receptor)	Vaccinia virus	1
Scavenger receptor class B member 1 (SR-B1, CD36, CD36 and LIMPII analogous 1, Collagen type I receptor, thrombospondin receptor-like 1)	HCV	2, 10
Nectin-2 (Poliovirus receptor-related protein 2, Herpes virus entry mediator B, Herpesvirus entry mediator B, HveB, Nectin-2, CD antigen CD112)	Herpes simplex virus 1/2	10
HVEM (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14, Herpes virus entry mediator A, Herpesvirus entry mediator A, HveA, Tumor necrosis factor receptor-like 2, TR2, CD270)	Herpes simplex virus 1/2	10
Hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVcr-1, kidney injury molecule 1, KIM-1, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 1, TIMD-1, T-cell immunoglobulin mucin receptor 1, TIM-1, T-cell membrane protein 1)	Hepatitis A virus	1
	Ebolavirus (EBOV)	7
	Marburgvirus (MARV)	7
	Hepatitis A virus	10
	Ebola virus	10
Nectin-4 (Poliovirus receptor-related protein 4, Ig superfamily receptor LNIR, Nectin-4 [Cleaved into: Processed poliovirus receptor-related protein 4])	Measles virus	6, 10
ACE2 (angiotensin converting enzyme 2)	SARS coronavirus	9, 10
L-SIGN (C-type lectin domain family 4 member M, CD209 antigen-like protein 1, DC-SIGN-related protein, DC-SIGNR, Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 2, DC-SIGN2, Liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing non-integrin, CD antigen CD299)	SARS coronavirus	10
DC-SIGN (CD209, C-type lectin domain family 4 member L, Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1, DC-SIGN1)	Dengue virus	2
	HCV	2
	CMV	2
	KSV (HHV8)	2
	HIV	2
	HTLV	2
	Bunyavirus	10
	Ebola virus	2

表1. ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス3

Receptor	Virus	Ref
CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)	HIV	5, 10
XPr1	Xenotropic and polytropic murine leukemia virus	1
scavenger receptor class A member 2, macrophage receptor MARCO, macrophage receptor with collagenous structure)	Adenovirus (C)	3
Langerin (CD207, C-type lectin domain family 4 member K)	HIV	2
JAM (Junction adhesion molecule)	Reovirus	10
	Orthorheovirus	1
Fcγr	Feline leukemia virus C	1
α2β1 (Vla-2, CD49b)	Echovirus 1 and 8	1
α2β1, α4β1	Human rotavirus	1
α2β1, αVβ3	Echovirus	2
α3β1, α2β1	Human herpesvirus 8	1
αMβ2	Adenovirus type 2 (subgroup C)	1
αV integrins	Adenovirus type 9 (subgroup C)	1
	Adenovirus 2	10
	Foot and mouth disease virus (FMDV)	2
αVβ3 (vitronectin receptor)	Coxsackievirus A9	1
	Echovirus 22	1
β3 integrins	Hantavirus	1
integrins	Rotavirus	10
	Vaccinia virus	2
Chondroitin sulfate proteoglycans	Circovirus	2
	HSV1 and 3	2
GM1	SV40 polyomavirus	10
Histo-blood group antigens	Norovirus	10
Heparan sulfate proteoglycans	Vaccinia virus, Adenovirus, Norovirus, Circovirus, Dengue virus, HCV, CMV, HSV1 and 2, KSV (HHV9), RSV, Rhinovirus89, Foot and mouth disease virus (FMDV), HIV, HTLV	2
Lactoseries tetrasaccharide c	John Cunningham polyomavirus	10
sialic acid	Adenovirus	2
	Rhinovirus87	2
	Rotavirus	10
	Influenza A	10
α2,3 sialic acid	Sendai virus	2
	Influenza A virus (avian)	2
α2,6 or α2,3 sialic acid	Rotavirus	2
α2,6 sialic acid	Influenza A virus (human)	2

References

1. "Principles of virology" Flint SJ *et al.* (2nd ed. chapter 5, Table 5.1)
2. "Viral Entry into Host Cells" *Advances in Experimental Medicine and Biology* 790, Stefan Pohlmann and Graham Simmons Eds.
3. "Adenovirus receptors" Niklas Arnberg, *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2012 33(8):442-8.
4. "RSV fusion: time for a new model." Mastrangelo P and Hegele RG, *Viruses* 2013 5(3):873-85.
5. "Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection" Weiss RA, *BMC Biology* 2013, 11:57.
6. "Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus." Noyce RS and Richardson CD, *Trends in Microbiology* 2012 20(9):429-39.
7. "Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world." Hunt CL *et al.*, *Viruses* 2012 4(2):258-75.
8. "Ephrin-B2 and ephrin-B3 as functional henipavirus receptors." Xu K *et al.*, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2012 23(1):116-23.
9. "SARS-CoV and Emergent Coronaviruses: Viral Determinants of Interspecies Transmission" Bolles M *et al.*, *Current Opinion in Virology* 2011 1(6): 624–634.
10. "The cell biology of receptor-mediated virus entry" Grove J and Marsh M, *The Journal of Cell Biology* 2011 195(7):1071–1082.
11. "The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus", *J Virol* 2008 82(7): 3555-60.

表2. 同定されたウイルス受容体タンパク質と代表的なペプチド

Entry	Accession	position	Sequence	MH+ [Da]	z	m/z	RT [min]	detection		
								whole	Tris	guanidine
intercellular adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	350539683	290-300	cVLELADQILK	1302.70	2	651.86	124.26	n	y	y
		210-222	QLWTFDLPVTEPK	1573.83	2	787.42	123.14	n	y	y
low-density lipoprotein receptor [Cricetulus griseus]	350540068	335-352	IGYEeLcPNGFQLVDQHR	2207.99	3	736.67	106.59	n	n	y
		429-441	NVVALDTEVANNR	1414.73	2	707.87	64.95	n	y	y
Shared peptide among MHC1 Hm1-C2, Hm1-C4, and Hm1-C5		244-280	EEEEQTQDMELVETRPSPGDGTFQK	2783.23	3	928.42	74.64	n	y	y
MHC class I antigen Hm1-C4 [Cricetulus griseus]	345842479	156-169	TWTAADTAAQIQQR	1533.77	2	767.39	77.79	n	y	y
		79-89	EGPEYWEEETR	1424.60	2	712.80	68.21	n	y	y
MHC class I antigen Hm1-C5 [Cricetulus griseus]	345842477	268-280	WAAVAVPSGEECK	1399.73	2	700.37	71.39	n	n	y
		79-89	EGPEYWEGQTR	1351.60	2	676.30	61.68	n	y	y
PREDICTED: neural cell adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	354472688	60-70	FFLcQVAGEAK	1270.62	2	635.81	97.56	n	y	y
PREDICTED: nucleolin [Cricetulus griseus]	354502803	449-470	NLSFNTEDELKEVFEALEIR	2624.32	3	875.44	177.63	n	y	y
40S ribosomal protein SA [Cricetulus griseus]	345842370	129-155	ADHQPLTEASYVNLPTIALcNTDSPL R	2997.49	3	999.83	109.89	y	y	n
		64-80	ANVAIENPADVSVSSR	1740.96	2	870.99	82.50	y	y	y
PREDICTED: dystroglycan [Cricetulus griseus]	354476371	785-823	GVPIIFADELDDSKPPPSMPLILQ EEK	3152.62	3	1051.54	128.69	n	n	y
		518-533	IPSDTFYDNEDTTTQK	1861.80	2	931.40	64.72	n	n	y
		234-247	SQQAPLAFQAGDQR	1516.75	2	758.88	62.02	n	y	y
PREDICTED: chondroitin sulfate proteoglycan 4 [Cricetulus griseus]	354471469	715-734	QGAGGVEGTEWETLAFHOR	2259.07	3	753.69	120.02	n	y	y
		1759-1771	GQLLVSEEPHAR	1448.79	2	724.90	69.25	n	y	y
PREDICTED: sulfated glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	354484438	171-185	EAVDSYLPVILMIK	1705.92	2	853.46	161.51	n	y	y

各条件でMS/MSによる同定が可能な程度に検出されたものをyで、検出されなかったかまたは量が不十分だったものをnで示す。

表3 同定されたウイルス受容体関連タンパク質1

Accession	Description	Score	Coverage	# AAs	MW [kDa]	関連ウイルス			
P08865	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4 - [RSSA_HUMAN]	29.43	21.36	295	32.8	Sindbis virus			
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	FLAAGTHLGGTNLDFQMEQYIK	3		0.0000	5.36	3	2617.27732	0.64	
	ADHQPLTEASYVNLPTIALcNTDSPLR	2	C20(Carboxymethyl)	0.0000	4.66	3	2997.45536	-2.33	
	FAAATGATPIAGR	2		0.0000	3.44	2	1203.64653	-1.32	
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	QQMENYPK	1		0.0000	1.48	2	1037.47173	-0.35	
P60033	CD81 antigen OS=Homo sapiens GN=CD81 PE=1 SV=1 - [CD81_HUMAN]	3.30	8.47	236	25.8	HCV			
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	QFYDQALQQAVVDDDDANNAK	1		0.0000	3.30	3	2253.04374	0.81	
P56747	Claudin-6 OS=Homo sapiens GN=CLDN6 PE=1 SV=2 - [CLDN6_HUMAN]	11.02	9.09	220	23.3	HCV			
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	DFYNPLVAEAGK	2		0.0000	3.40	2	1394.69206	-2.18	
	GPSEYPTK	2		0.0000	2.42	2	878.42461	-0.96	
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor OS=Homo sapiens GN=CXADR PE=1 SV=1 - [CXAR_HUMAN]	15.49	12.60	365	40.0	Adenovirus 2 Adenovirus subgroups A, C, D, E, F Coxsackievirus B1 to B6			
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	FTLSPEDQGPLDIEWLSPADNQK	2		0.0000	5.01	3	2713.33994	1.57	
	TQYNQVPSDEFER	1		0.0000	3.39	2	1612.72576	1.19	
	VGSDQcLLR	1	C6(Carboxymethyl)	0.0000	2.55	2	1048.50798	-1.18	
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 - [HSP71_HUMAN]	157.19	36.51	641	70.0	Japanese encephalitis virus			
	Sequence	# PSMs	Modifications	Δ Cn	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	
	TLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITR	3		0.0000	5.70	3	2981.45304	-3.24	
	ELEQVcNPHISGLYQAGGPGPGFGAQGPk	2	C6(Carboxymethyl)	0.0000	5.46	3	3056.47574	-0.86	
	SINPDEAVAYGAAVQAAIIMGDK	1		0.0000	5.25	3	2304.15891	2.06	
	IINFPAAAIAYGI DR	1		0.0000	4.01	2	1687.89690	-2.89	
	NQVALNPQNTYFDAK	2		0.0000	3.58	2	1658.84636	-2.03	
	TTPSYVAFTDTER	4		0.0000	3.58	2	1487.70391	1.74	
	VEIANDQGNR	4		0.0000	3.41	2	1228.62663	-1.19	
	ATAGDTHLGGEDFDNR	2		0.0000	3.37	3	1675.72959	-0.69	
	NALESYAFNMK	1		0.0000	2.92	2	1287.60393	0.06	
	YKAEDVQR	2		0.0000	2.50	2	1137.55229	-1.08	
	cQEVISWLDANTLAEKDEIEHK	2	C1(Carboxymethyl)	0.0000	2.46	4	2663.22988	0.15	
	AAAIGIDLGITTYcVGVFQHGK	1	C14(Carboxymethyl)	0.0000	2.41	3	2266.13047	5.79	
	MVQEAEK	31		0.0000	2.02	2	834.40227	-0.43	
	FGDPVVOsDMK	1		0.0000	2.59	2	1222.57488	-2.00	