

コロナ禍でのインターネットを活用した卒業研究遠隔指導の経験

ー受容体アミノ酸解析に基づく哺乳類での新型コロナウイルス 感染感受性リスク評価ー

水野 信哉^{1)*}・大崎 恵理子²⁾

1) 岡山理科大学理学部動物学科

2) 大阪大学大学院医学系研究科感染症免疫学講座 (ウイルス学)

要旨：2020 年度春、コロナ禍の中、秋卒業を目指すゼミ生に対して卒業研究を遠隔で指導する機会を得た。新型コロナウイルスの受容体である ACE2 の中でもスパイク蛋白の捕捉に必要な 5 カ所のアミノ酸配列に着目した。学生にはネットを活用し、NCBI データベースに登録された動物のアミノ酸情報を収集するよう指導した。その結果、感染リスクの低そうな哺乳類約 30 種を列挙するに至った。ネット活用により在宅での卒業研究を円滑に展開でき、緊急事態宣言下でも当年 9 月の学位記授与につなげることができた。

1. はじめに

2019 年末、中国湖北省武漢で発生した新型肺炎の病原体はゲノム解析の結果、2003 年に同国で発生した重症急性呼吸器症候群(SARS)の病原体と近縁の新種ウイルスであることが判明し¹⁾、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)と命名された。年明けの 2020 年、春節に伴うインバウンド需要に加え、横浜港に停泊中の旅客船からの感染拡大、空気乾燥を伴う厳冬期などの諸条件が重なり、我国でも SARS-CoV-2 感染症の急速な流行拡大に見舞われることとなった。同年 3 月 11 日に WHO が感染拡大に対して「パンデミック宣言」を行う一方、安倍内閣が 4 月上旬に「緊急事態宣言」を発出するなど、緊迫感が一気に高まった。当時の武漢株はウイルス毒性が強く、血栓・肺水腫を伴う重度の肺炎を合併し、イタリアのような先進国においても医療崩壊が伴うと致死率が 5%を超えることが判明した。我国でも著名人のコロナ死が相次ぎ、警戒・自粛モードに拍車をかけた。年度切り替えのこの時期、「3蜜回避」、「ステイホーム」などによる感染拡大予防対策が再三呼びかけられ、小中高・大学での卒業や入学に関連する様々なイベントの中止が全国的に広まった。

緊急事態宣言下において、本学でも新学期授業開始に直面して慣れないオンライン授業への対応に苦慮した。2020 年度の春学期、当研究室に所属していた過年度生に対して動物学科の必修科目である卒業研究 II を遠隔で指導する機会に遭遇した。当該ゼミ生の学業に関して単位取得を含めて履修上の問題は見受けられず、2019 年度春学期終了の時点で卒業研究 I の単位を取得していた。一方、当該学生は異国に対する関心も強く、4 年次秋学期を休学して本学提携校でもあるアジア某大学が実施している短期型留学プログラムの参加を熱望し、当年秋より現地へと旅立った。短期型プログラムは無事に修了し、当該学生は翌年 2 月に無事帰国した。その直後、我国は未曾有のコロナ禍に遭遇し、卒業研究計画の大幅な見直しを余儀なくされた。

2020年の春先、SARS-CoV-2が宿主細胞に侵入する際に必要なエントリー受容体の実体はアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2)であることが同定された²⁾。4月に入るとウイルスエンベロープ表面との間で *in silico* 解析が進み、SARS-CoV-2 スパイク蛋白との結合に必要なACE2のアミノ酸配列部分が相次いで報告されるようになった。その当時、データベースに登録されていたウイルス受容体の情報を学生がネットを介して在宅で入手し、哺乳類でのSARS-CoV-2感染のリスクを予見できる情勢となった。その結果、同年8月の学内発表会、9月の学位記授与式につなげることができた。今後も様々な理由により卒業研究や実習の遠隔指導が避けられない局面が予想されるが、その際の一助となれば幸い、との思いから当時を振り返り、その時の経験をここに記すこととした。

2. 卒業研究テーマ (ACE2 アミノ酸配列に基づく感染リスク予見)

SARS-CoV-2の受容体であるACE2は約800のアミノ酸により構成される分子量92 kDaの膜貫通型蛋白質(酵素)である²⁾。ACE2は血管収縮因子でありアミノ酸8つから構成されるアンジオテンシンII (Ang-II)を基質としてフェニルアラニンを切断し、血管収縮能を欠くAng(1-7)に変換することで過剰な血圧上昇を回避させる。ACE2がAng-IIを切断する活性中心とは別に、SARS-CoV-2のエンベロープ表面にあるスパイク蛋白を捕捉するドメインが存在する。この領域の配列の違いが感染感受性の種差を決定しうる。例えば、SARS-CoV-2に高感受性を示すヒト科の動物(チンパンジーやゴリラなど)はヒトに一致する配列を持つが、感染に抵抗性を示すマウスやラットでは5カ所の標的配列に大きな違いが認められる³⁻⁵⁾。一方、キヌゲネズミ科のハムスターでは標的配列が類似しており、肺炎症状を示す⁶⁾。

ACE2は血圧調節のキー酵素として広く研究されており、幸いなことに2020年春の時点で多くの哺乳類でアミノ酸全配列が公開されていた。それ故、ACE2アミノ酸配列の種間比較によりSARS-CoV-2感染リスクの予測が可能となる。このことを所属するすべてのゼミ生に紹介したところ、当該学生から卒業研究テーマとして進めたいとの申し出があった。そこで、Luanらの報告の中で提唱されていたSARS-CoV-2表面のスパイク蛋白捕捉に重要なACE2側の5カ所(K31, E35, D38, M82, K353)の標的配列に着目し(図1)³⁾、アミノ酸配列情報を利用できる117種の哺乳類について当年4月27日より感染リスク評価の解析を開始した。

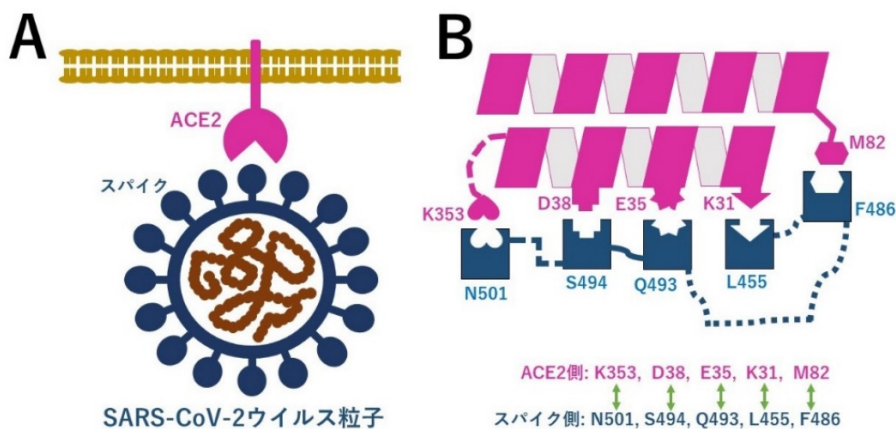


図1. (A)新型コロナウイルスの宿主細胞侵入の模式図ならびに
(B)スパイク蛋白(紺色)とACE2(ピンク色)の接着面を構成するアミノ酸情報.

3. 実際の解析手順 1 (NCBI データベースでの検索)

米国立衛生研究所の研究部門である National Center for Biotechnology Information (NCBI) が構築と運用を行うデータベースでは核酸、ゲノム、塩基多型、遺伝子発現、アミノ酸配列・構造、化合物、文献などの多様な情報が無償で提供されている。各種哺乳類 ACE2 アミノ酸配列の情報についても NCBI データベース protein のリンク ⁷⁾ から検索できる。

- (1) 調査対象の動物種の学名 (二名法) を世界哺乳類標準和名目録 ⁸⁾ より検索する。この資料は日本哺乳類学会 HP (<https://www.mammalogy.jp/list/>) より入手できる。
- (2) NCBI protein データベースのリンク ⁷⁾ に “学名と ACE2” を入れて検索する。

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

例 1) ヒトの配列を調べたい場合 → “Homo sapience ACE2”

→ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAB40370.1>

例 2) ゴリラ (ニシゴリラ) の配列を調べたい場合 → “Gorilla gorilla ACE2”

→ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_055232617.1

例 3) カモノハシの配列を調べたい場合 → “Ornithorhynchus anatinus ACE2”

→ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1626042915>

画面をスクロールして一番下の枠に表示された配列を Word.docx ファイルに貼り付ける。Luan ら(2020)の報告 ³⁾ に従い、31、35、38、82、353 番目のアミノ酸の記号に目印をつけ、アルファベット文字をエクセルファイル上に入力する。

表 1. ヒトの ACE2 アミノ酸配列

```

1 msssswllls lvavtaaqst ieeqaktfld kfnhaellf yqsslaswny ntnniteenvq
61 nmnnagdkws aflkeqstla qmyplqeiqn ltvklqlqal qqngssvlse dkskrlntil
121 ntmstiystg kvcnnpdpqe clllepplne imansldyne rlwaweswrs evgkqlrply
181 eeyvvlknem aranhyedyg dywrgdyevn gvdgydysrg qliedvehtf eeikplyehl
241 hayvraklmn aypsyispig clpahllgdm wgrfwtnlys ltvpfqgkpn idvtdamvdq
301 awdaqrifke aekffvsvgl pnmtqgfwen smldtpgnvq kavchptawd lggdfrilm
361 ctkvtmddfl tahhemghiq ydmayaapf llrnganegf heavgeimsl saatpklhks
421 igllspdfqe dneteinfl1 kqaltivgtl pftymlekwr wmvfkgeipk dqwmkkwwem
481 kreivgvvpe vphdetycdp aslfhvsndy sfiryytrtl yqfqfgealc qaakhegplh
541 kcdisnstea gqklfnmlrl gksepwtlal envvgaknmn vrpllnyfef lftwlkdqnk
601 nsfvgwstdw spyadqsikv rislksalgd rayewndnem ylfrrsvaya mrqyflkvkn
661 qmilfgeedv rvanlkpris fnffvtapkn vsdiiprtev ekairmsrsr indafrlndn
721 sleflgiqpt lgppnqppvs iwlvivgvvm gvivvgivil iftgirdrkk knkarsgenp
781 yasadiskge nnpqfntdd vqtsf
    
```

表 2. ニシゴリラの ACE2 アミノ酸配列

```

1 msgsswllls lvavtaaqst ieeqaktfld kfnhaellf yqsslaswny ntnniteenvq
61 nmnnagdkws aflkeqstla qmyplqeiqn ltiklqlqal qqngssvlse dkskrlntil
121 ntmstiystg kvcnnpnpqe clllepplne imansldyse rlwaweswrs evgkqlrply
181 eeyvvlknem aranhyedyg dywrgdyevn gvdgydysrg qliedvehtf eeikplyehl
241 hayvraklmn aypsyispig clpahllgdm wgrfwtnlys ltvpfqgkpn idvtdamvdq
301 awdaqrifke aekffvsvgl pnmtqgfwen smldtpgnvq kavchptawd lggdfrilm
361 ctkvtmddfl tahhemghiq ydmayaapf llrnganegf heavgeimsl saatpklhks
421 igllspdfqe dneteinfl1 kqaltivgtl pftymlekwr wmvfkgeipk dqwmkkwwem
481 kreivgvvpe vphdetycdp aslfhvsndy sfiryytrtl yqfqfgealc qaakhegplh
541 kcdisnstea gqklfnmlrl gksepwtlal envvgaknmn vrpllnyfef lftwlkdqnk
601 nsfvgwstdw spyadqsikv rislksalgd kayewndnem ylfrrsvaya mrqyflevkk
661 qmilfgeedv rvanlkpris fnffvtapkn vsdiiprtev ekairmsrgr indafrlndn
721 sleflgiqpt lgppnqppvs iwlvivgvvm gvivvgivil iftgirdrkk knkarseenp
781 yasadiskge nnpqfntdd vqtsf
    
```

表 3. カモノハシの ACE2 アミノ酸配列 (欠失のため 1 つずつ前にずれる)

```

1  mggslwlvfs  fvavaaaqkp  eearqfltq  fnkaelsy  qsslasweyn  tnisaenaqk
61  maeagakwsa  fyeeavrnas  fnlsqisdr  slklqlesfq  nrgssvlsee  kqkklsdaln
121  smstlystgt  vckpgkpedc  lllepgliddi  mahstdyder  lwawegwrag  vqkqmrpfye
181  tyvelkneva  rgnyyqdygd  ywradyetke  egveysrdql  iadvertfke  ikplyqhlht
241  yvrsklvqky  genrvsptgc  lpahllgdmw  grfwtlnypi  tvpypnqpn  dvt demvkqk
301  wtemrifkea  ekffssvhlp  nmtegfwnns  mltepkdgrk  vvchptawdl  gndfrikmc
361  tkvsmddflt  ahhemghiyy  dmayasqpyl  lrsganegfh  eavgeimsls  aatpkhlksl
421  gllapdfqel  qeteinflk  qaltivgtlp  ftymlkwrw  mvfkedipke  qwmkkwemk
481  reivgvvesl  phdetycdpa  alfhvssdys  firyytrtiy  qfqfgealc  laqhkqdlhk
541  cditnsiqag  ekllemlklg  ksrswtyalq  svtqtktmda  rpllkyfepl  tkw lidknkn
601  fyvgwnsacl  pltgdlgnen  aikvrslks  afgedayewn  enekylfqas  vayalrqyyl
661  qdqneivnfq  tddviinet  arisfyfkvq  nrrdsiyvpk  devenairms  rgrinsafql
721  ddntleflgi  pptlappvp  pvtiwlilfg  vvmgvvigi  aalivtgird  rrrkneegds
781  saenpyaign  gsenlgfand  esqtsf

```

ヒトの配列と一致する場合、1カ所あたり20点を加点し、5カ所のすべてが一致する場合は100点満点とした。酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸に置換している場合（例えば E→D, D→E）は10点のみ加点した。塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸に置換している場合（例えば K→D）、逆に酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸に置換している場合（例えば E→K）は減点10点とした。トータルが50点以下の場合、感染リスクが低い、と判断した。

4. 実際の解析手順 2 (Dotlet 解析による 2 種間比較)

NCBI データベースで得た情報は Dotlet 解析を加えることにより、2種間でのアミノ酸配列の異同を視覚的に捉えることが可能である。

- ・ヒト ACE2 の情報 → <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAB40370.1>
- ・ゴリラ ACE2 の情報 → https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_055232617.1
- ・カモノハシ ACE2 の情報 → <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1626042915>

この画面の情報、例えばカモノハシ ACE2 の場合、「FASTA」の文字 (図 2 左) をクリックすると、アルファベット記号としてアミノ酸配列を読み取ることができる (図 2 右)。この例では 806 個のアミノ酸記号が現れるが、各行右端には改行の目印として空白が挿入されている。したがって、いったん全アミノ酸情報を Word.docx ファイルなどに貼り付けて右端にあるすべての空白を取り除く必要がある。

The image shows a screenshot of the NCBI Protein database interface. On the left, the search results for 'Ornithorhynchus anatinus ACE2' are displayed. A red arrow points to the 'FASTA' link under the 'Identical Proteins' section. On the right, the FASTA sequence for 'angiotensin-converting enzyme 2 [Ornithorhynchus anatinus]' is shown, starting with 'MGGSLMVF...'. A red arrow points from the 'FASTA' link to the sequence.

図 2. NCBI Protein FASTA によるアミノ酸配列検索 (カモノハシ ACE2 での実例)。

次に Dotlet 解析の入力画面 (<https://dotlet.vital-it.ch/>)⁹⁾ にアクセスし、図 2 の手順で得られたアミノ酸記号を貼り付ける。例えば、Sequence-1 の枠にヒト情報、Sequence-2 の枠に知りたい動物種の情報を貼り付けることにより直線情報に変換できる。実際、アミノ酸番号 79 付近をカーソル選択すると、ヒトとゴリラの ACE2 アミノ酸配列は酷似しており、直線上に並ぶ濃いドットとして可視化することができる (図 3 A)。ヒトとゴリラの ACE2 のアミノ酸配列は 99% 以上の高いホモロジーを有しており、例えば 79 番目付近の配列も両種間でよく保存されていることが浮き彫りとなった。一方、ヒトとカモノハシの ACE2 アミノ酸配列は大きく異なっており、直線上に並ぶドットを丁寧に見てゆくと、特に 60~100 番目前後で濃いドットが激減しているのがわかる (図 3 B)。このように直線に乗ったドットの濃淡を指標として、2 種間でのアミノ酸配列異同を視覚的に捉えることができた。

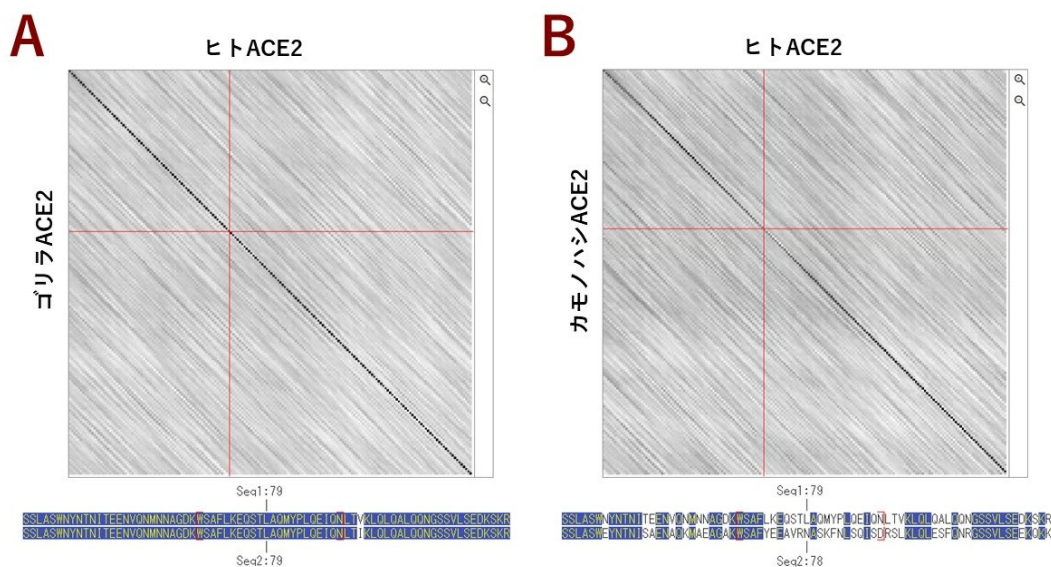


図 3. Dotlet 解析による 2 種間 ACE2 アミノ酸配列の異同性評価の実例。
(A) ギリラとヒトでの比較。(B) カモノハシとヒトでの比較。

なお、図 3 最下段パネルの青塗りで示した部分は 2 種間で一致した領域、白塗りの部分は不一致の領域を意味している。図 3 B の最下段パネルに示したヒトとカモノハシの比較において、白塗りの不一致部分が多いことを学生は視覚的に理解することができた。

5. 学習効果と考察

動物学科では卒業研究 I, II は 4 年次の春・秋学期に行い、卒業に必要な専門科目として位置づけられている。ゼミ指導教員の下で研究課題を選び、それまでに習得した専門知識および技能を生かし、卒業研究論文の完成を目指すことがシラバスにも記載されている。この学生は 4 年次秋学期に休学したため、5 年次目の春学期に卒業研究 II を行うこととなった。はじめて経験する緊急事態宣言下の緊迫した状況ではあったが、幸いなことにこの学生は動物学科の専門科目でもある微生物学や動物病理学、情報リテラシーを履修済みであった。これらの科目履修で培った専門知識と技能を土台とし、ネットで収集したアミノ酸情報を解析することで、シラバスに記載された卒業研究の到達目標を達成することができた。

図1に示したようにACE2側の31、35、38、82、353番目のアミノ酸はSARS-CoV-2スパイク蛋白との分子会合に必要とされている^{3,4)}。この位置にあるアミノ酸の異同を把握することにより、SARS-CoV-2感染性が低そうな30種程度の動物をリストすることができた。2020年春先の時点では、SARS-CoV-2に対するワクチンや抗ウイルス薬はまだ開発されておらず、不要不急の外出を控える、といった自粛ムードの中、当該学生が暮らす住居のネット環境は良好であり、図4に示した手順により順調に卒業研究を進めることが可能であった。

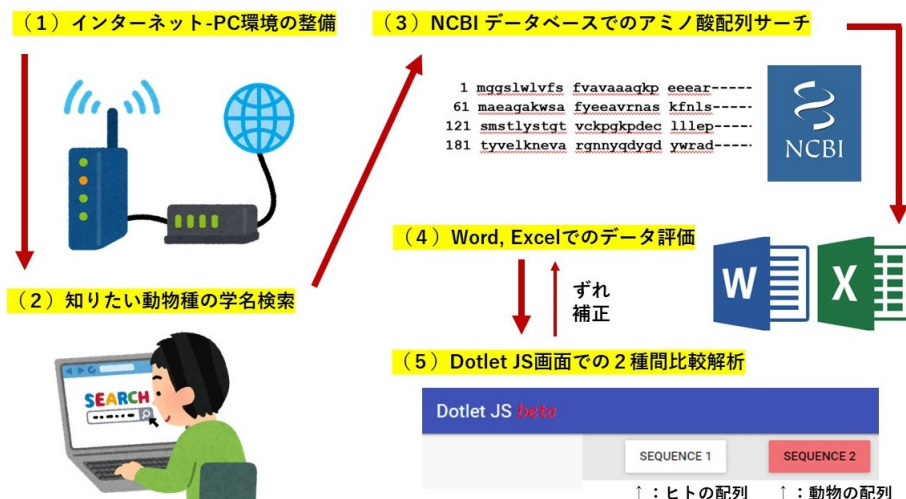


図4. インターネット検索による在宅での卒業研究の進め方 (全体像)。

研究者が動物の分子系統樹を作成する場合、MEGA-Xなどのソフトを活用するのが一般的である。これらのソフトではアミノ酸の挿入や欠失の部位を自動補正でき、分岐年代を概算できるなどの優れた点も多いが、経験のない学生が在宅かつ限られた期間内で卒業研究を完遂させるには難しい側面も有した。そこで今回はより確実な方法として、5カ所のアミノ酸にマークを付け、そのアルファベット記号をエクセルに書き出す、という方法を選んだ。学生自らの手でアミノ酸配列情報の取得やアライメント解析、種間配列比較を経験したことにより、結果的に解析法の原理や手順、動物種間におけるアミノ酸標的配列の違いなどをより具体的に体感させることができた。予想された通り、1割弱の種で欠失や挿入に基づくアミノ酸領域の前後のずれが観察されたが、Dotlet解析との組合せにより補正することも可能であった。例えばカモノハシACE2の配列中には図3Bに示した通りアミノ酸1個分の欠失を認めたが、カーソル調整の過程で欠失の位置を特定することが容易となった。

今回解析した117種のうち、25%程度が低リスク群、約15%が中リスク群に分類された。アミノ酸配列に関しては2020年春学期の当時、ヒトに近い霊長目の登録が多く、種選択の時点でバイアスが存在した。霊長目では感染リスクの低そうな種は2割以下に留まる一方、コウモリから構成される翼手目のうちリスクが低い種は7割以上にものぼった。その後の解析から、コアラやカンガルーなどの多くの有袋類でもアミノ酸配列の明らかな不一致を認めたため、SAR-CoV-2に対する有袋類の感染リスクは低いと予想された。今回の検討ではアミノ酸5カ所の解析に留まったが、この領域はウイルス粒子の捕捉といった感染成立の初期に必須とされている^{3,4)}。それ故、アミノ酸5カ所の明らかな相違は感染リスクを除外する1次スクリーニングとして有用である可能性を学生は実感することができた。

一方、今回の手法では、ACE2 アミノ酸5カ所の一致が必ずしも感染リスクの高さに直結するとは限らない、という短所を有することもゼミ生は実感したようだ。例えば、イヌでは90点の高いスコアを示したが、イヌはSARS-CoV-2接種に対して抵抗性を示すことが報告された¹⁰⁾。食肉目や翼手目の一部でも高いスコアを示す種が存在したが、拙速な判断は特定の野生種に対する風評被害や混乱につながりかねない、といった指摘を学内発表会の際に出席した野生動物を専門とする研究者から頂いた。特に感染スコアが高い種の場合、ウイルス侵入経路のみならず、ゲノム複製やカプシド形成などの経路にも種差が存在する可能性を有するため、その評価は包括的に行う必要があることを学生は肌で感じることができた。感染リスク評価の確定には生体を用いた感染実験が必須となる。実際、ウシなどの家畜ではウイルス接種により感受性が評価されている¹¹⁾。学生は自らの教材をもとに本手法の利便性のみならず限界点をも体感することができ、実りの多い卒業研究となった。

6. オンライン実習への応用と今後の展望

2021年の初頭、本学もCOVID-19の第3波に見舞われ、動物学科の2年次生を対象とした1月の生化学実習に対してもオンライン対応を余儀なくされた。毎年、生化学実習ではカタラーゼなどの酵素活性の評価を行っている。実習実施前の予習として酵素活性の発揮には適切な立体構造をとることが重要であり、そのために構成するアミノ酸の配列が重要となることも解説している。生化学実習のうちの酵素実習の回がこの年は対面で実施できなくなったため、酵素でもあるACE2のアミノ酸配列に着目して遠隔実習に変更した。

この遠隔実習において、まずはNCBI データベース利用法やDotlet解析について実例を交えて解説した。実際、Zoom共有画面からNCBI画面を開き、感染感受性が低そうなコアラなどの有袋類および感染感受性が高いヒト科の動物を例としてデモを行った。次に、学生が興味を持つ哺乳類10種を在宅で選んでもらい、図4の手順に従い感染リスクの評価をレポートとして提出するよう求めた。その結果、多くの学生が本法の長短所を理解した上でACE2のアミノ酸配列を正確に解析しており、実習後のアンケートでも好評を得ることができた。本手法はネット環境があるところなら誰でも容易に解析でき、在宅にて実習を体験できるという点でも意義深かった。特にNCBI データベースは生化学的な解析を行う上でも有益なツールであり、その使い方を体験でき実り多い実習となった。最終的に、学生は酵素活性と異なる領域でのアミノ酸相違が感染リスクを決定することを理解するに至り、酵素が持つ構造上の多彩な機能を知る機会を提供することができた。

新型コロナウイルスの発生源に関して、自然宿主はチュウゴクキクガシラコウモリなどの翼手目に起源を有するとする説が有力である¹²⁾。今回解析したコウモリ19種において、ヒトACE2との類似性は総じて低く、キクガシラコウモリ科でその傾向が強かった。本来、31番目の塩基性アミノ酸がある種のキクガシラコウモリでは酸性アミノ酸に置換する一方、35番目の酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸に置換した種がいるなど、電荷的反発を示唆する興味深い所見が得られた。コウモリは狂犬病やエボラ出血熱などの病原体起源宿主であることから少なからず偏見も存在し、無益な殺生が行われている国もあると聞く。翼手目は1,100種超の大きなグループを形成しており、種ごとに科学的根拠に基づいた冷静な対応が求められる。それ故、構造学的見地に基づくアミノ酸配列解析はコロナ禍で囁かれる様々な野生動物への偏見や風評被害に対する抑止力の提供につながると確信している。

従来、動物の分子生物学的系統分類に用いられる指標としてはアミノ酸変化速度が遅いヘモグロビンやチトクローム b などが用いられてきた。近年、哺乳類における ACE2 による分子系統樹の報告が相次いでいる³⁻⁵⁾。ACE2 との強固な結合にはスパイク蛋白の開裂(S1/S2 領域)が重要である。この過程で膜貫通型セリンプロテアーゼである TMPRSS2 による furin 配列での切断が重要となる。ACE2 のみならず TMPRSS2 にも種差が存在する¹³⁾。ACE2 以外の分子のアミノ酸配列の違いがイヌなどでの感染抵抗性を説明しうる可能性を秘めている。このような視点のもと、コウモリなどの野生動物に着目して更なる解析を進めたい。また、今回用いた手法の原理は様々な人獣共通感染症のリスク評価に活用できる可能性を有する。人間と動物の共存共栄を目指すワンヘルスの観点からも、宿主ゲノム解析に基づく新たなアプローチが合理的な感染対策の構築に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579: 265-269 (2020)
- 2) Lan J, Ge J, Yu J, *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581: 215-220 (2020)
- 3) Luan J, Lu Y, Jin X, Zhang L. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *Biochem Biophys Res Commun* 526:165-169 (2020)
- 4) Wan Y, Shang J, Graham R, *et al.* Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol* 94: e00127-20 (2020)
- 5) Damas J, Hughes GM, Keough KC, *et al.* Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 117: 22311-22322 (2020)
- 6) Sia SF, Yan LM, Chin AWH, *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* 583: 834-838 (2020)
- 7) NCBI protein database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
- 8) 川田伸一郎, 岩佐真宏, 福井大, 他. 世界哺乳類標準和名目録. 哺乳類科学 58 : 1-53 (2018)
- 9) Dotlet JS beta, <https://dotlet.vital-it.ch/>
- 10) Shi J, Wen Z, Zhong G, *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368: 1016-1020 (2020)
- 11) Das T, Sikdar S, Chowdhury MHU, *et al.* SARS-CoV-2 prevalence in domestic and wildlife animals: A genomic and docking based structural comprehensive review. *Heliyon* 9: e19345 (2023)
- 12) Zhou P, Yang XL, Wang XG, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270-273 (2020)
- 13) Huang C, Jiang Y, Yan JJ. Comparative analyses of ACE2 and TMPRSS2 gene: Implications for the risk to which vertebrate animals are susceptible to SARS-CoV-2. *Med Virol* 93: 5487-5504 (2021)