

3. HCV ワクチン開発のための CD81の構造生物学的研究

北 所 健 悟

京都大学低温物質科学研究センター・学際低温応用研究部門

CD81は、テトラスパニンファミリーに属する細胞表面の抗原の一つであり、C型肝炎ウイルスとの結合が強いことから、C型肝炎ウイルスの感染に関与すると考えられている。CD81分子は、236個のアミノ酸からなる膜4回貫通型の膜蛋白質であり、2つの細胞外領域と3つの細胞内ドメインおよび4つの膜貫通疎水性領域から形成されている。このうちCD81の細胞外領域の1つであるLELドメインは、91個のアミノ酸からなり、他のテトラスパニンと同様に2つのS-S結合を有する。我々は、ヒトのCD81のウイルス結合ドメインであるLEL (CD81-LEL)のX線構造解析を行い、この立体構造が全く新規なモチーフであることを見出した。またCD81-LELとHCVウイルスとが相互作用すると思われる部位を同定した。CD81-LELは結晶中でダイマーを形成し、各々のサブユニットは5本の α -ヘリックスとそれをつなぐループ部分で構成され、stalkとheadサブドメインからなる“mushroom-like”の立体構造をとっていた。しかしながら、この各々のサブユニットは立体構造的には少し違った構造を取っており、活性型と2つの内の1つのS-S結合が還元された不活性型のコンフォメーションを取っていた。HCVの結合に関与するアミノ酸残基は、headサブドメインにある疎水性クラスターに集中しており、これらの側鎖は外側に突出した形で存在し、結晶内では他の分子とパッキングしていた。従って、この特徴のある疎水性クラスターが、HCVのエンベロープ糖蛋白質E2の認識部位である可能性が示唆された。

はじめに

生体内において、ウイルスが宿主に感染する際、宿主側のレセプターやコレセプターなどの受容体タンパク質と、ウイルス表面のタンパク質との結合が必須である。この宿主とウイルスとの相互作用を、原子レベルで観察するには、タンパク質X線構造解析が、最も有効な手法である。タンパク質結晶学は、強力な放射光X線源の利用と、解析理論並びに構造解析ソフトウェアの開発により、急速に発展しつつある。ヒト並びに種々のウイルスのゲノム解析が進んだ現状において、タンパク質X線構造解析の手法を使い、ウイルスタンパク質とそのレセプタータンパク質、およびそれらの複合体の相互作用機構を、立体構造に基づいて検討することは、ウイルス感染のメカニズムを理解する上で、極めて重要である。また、新規な抗ウイルス

薬を開発する際にも、タンパク質と薬物の結合部位での詳しい相互作用を、ダイレクトに観察できることから、非常に効力を発揮する。実際、抗インフルエンザ薬やHIV薬などの感染症に対する新しい薬が、タンパク質の立体構造に基づく薬物デザイン (Structure-based drug design)により、次々と開発されている。最近、様々なウイルスの全ゲノムが解明されつつあり、それとともに、ウイルスが産出するタンパク質の機能が明らかになりつつある。これに伴い、ウイルスと宿主の関連が明らかとなり、その相互作用がどうなっているのか、構造生物学的なアプローチで解明される場合が、今後ますます、多くなって来ると考えられる。とりわけ製薬会社などで、抗ウイルス薬を目的としたドラッグデザインが、盛んになっており、ポストゲノム時代をむかえて、ウイルス学の分野においても、今後その重要性が増すと考えられる。

C型肝炎ウイルスとCD81

C型肝炎は、世界人口の3%にあたる1億8千人が、感染しているとされるウイルス性の病気で、米国では400万人以上のキャリアが存在し、日本においても、そのキャリ

連絡先

〒606-8501 京都市左京区北白川追分町
TEL & FAX: 075-753-4061
E-mail: kengo@nice.kumac.kyoto-u.ac.jp

アは200万人以上と言われている。このウイルス感染は、血液を介して起こり、その半数は、急性肝炎を発症するが、残り半数は無症状のまま経過し、数十年の沈黙の後、肝臓に劇的なダメージを与える肝硬変を引き起こす。このことがC型肝炎を“沈黙の感染症”と呼ぶ所以である。このウイルスによる肝炎の約8割が慢性化し、肝硬変、肝臓などの肝臓における主たる病気の要因となっている。現段階で使用されているインターフェロンによる治療も患者の3割に対してのみ効果を発揮するため、他の新薬並びにワクチンの開発が待たれている。HCVは、ウイルス学的分類から、黄熱病ウイルスに代表されるフラビウイルスの一種で、約9600塩基からなる(+)鎖の一本鎖RNAをゲノムに持つ。HCVは1989年に発見されたウイルスで、米国カイロン社のChooらによって、そのゲノムのクローン化がなされている¹⁾。翌年、日本の2カ所の研究所からHCVゲノムの全容が明らかとされている。現在では、HCVウイルスに関する分子生物学研究や種々の生化学的実験により、その予想されるウイルス遺伝子蛋白質の機能が明らかとなっているが、依然としてその感染や発症のメカニズムについてはよく理解されていない。その理由としては、信頼性の高い *in vitro* でのウイルスの増殖系が確立されていないことと、チンパンジー以外にHCVに感染して肝炎を起こす実験動物が無いことがあげられる。ただし、最近になり、いくつかのHCVゲノム自己複製細胞(HCVレプリコン細胞)が開発され、HCV研究が進みつつある²⁾。C型肝炎ウイルスの詳しい総説については、本誌でも度々取り上げられているので、そちらの文献を参照していただきたい³⁻⁶⁾。

1998年に、イタリアカイロン社のPileriらは、HCVの表面にあるスパイク状のエンベロープ糖蛋白質(E2)が、ヒトの細胞表面上の膜蛋白質であるCD81分子の細胞外ドメイン(LEL; Large Extracellular Loop)に結合することを見出した⁷⁾。CD81は膜4回貫通型蛋白質であるテトラスパニンに属する細胞表面の抗原性レセプターで、がん細胞の成長や増殖に関与する抗原として発見され、生体内で種々の免疫応答に関与する重要な役割を担っている⁸⁾。CD81は、236個のアミノ酸からなる膜4回貫通型の膜蛋白質で、2つの細胞外領域(SEL並びにLEL)と、3つの細胞内ドメイン(CY1-3)、および4つの膜貫通疎水性領域(TM1-TM4)から形成されている。このうちHCVとの結合に必須な領域は、主要な細胞外領域であるLELドメインで、91残基のアミノ酸からなり、他のテトラスパニンと同様に2つのジスルフィド結合を有する。他方、HCVウイルスのエンベロープ蛋白質E2は、分子量55kDaからなる糖蛋白質で、ウイルスの表面にあるスパイク部分を構成しており、これがCD81のLELドメインと結合することによる感染が示唆されている⁷⁾。C型肝炎ウイルス(HCV)が感染する際のKeyとなるレセプターについて

は、現段階で依然はっきりとしない。最近、CD81のトランスジェニックマウスを用いた実験から、HCVウイルスの感染におけるCD81以外のタンパク質レセプターの存在が示唆された⁹⁾。しかしながら、CD81とHCVのE2が強い結合を示すことから、CD81がHCV感染時に何らかの関与をしている可能性が示唆される。

このCD81並びに他のテトラスパニンの立体構造は、未知であった。またHCVエンベロープ蛋白質であるE2分子についても、未だ結晶構造が得られていない。筆者らは、CD81蛋白質の分子機構ならびにHCVウイルスの感染メカニズムに、構造生物学的視点から、直接的な知見を得るために、HCVのターゲットとなるCD81の細胞外ドメインの結晶化を行い¹⁰⁾、X線解析の手法を用いて、その立体構造を決定した¹¹⁾。また、この立体構造に基づき、HCVの結合部位を推測した。ここでは、CD81の細胞外ドメインの立体構造決定における事例を通じて、より身近になったタンパク質X線構造解析を紹介し、ウイルス研究者の方々の、構造生物学への参画のプロモーションとしたい。

X線構造解析法による立体構造決定

蛋白質はアミノ酸が結合してできる高分子ポリマーであり、そのアミノ酸の並び方と組み合わせにより、ある特定の立体構造を形成する。その構造の基本モチーフとしては、 α -ヘリックスと β -ストランドが知られている。アミノ酸の配列から立体構造を知ることは、現段階では困難であり、蛋白質の立体構造を観察する方法としては、X線構造解析、NMR、電子顕微鏡などが上げられる。蛋白質の立体構造を知ることにより、その機能が初めて明らかとなることがあり、このような構造生物学的アプローチは、蛋白質研究を行う上で、不可欠となっている。また、その明らかとされたゲノムからターゲットタンパク質を発見、精製し、構造生物学の手法を用いて立体構造を決定し、ドラッグデザインなどの創薬につなげていく、ゲノム創薬プロジェクトについても、その重要性が増している。X線構造解析では、ターゲットとなるタンパク質を結晶化し、得られる回折データを用いて、その立体構造を決定する。最近のこの分野の、著しい進歩の背景には、SPRING-8などの強力なX線源の開発と、X線構造解析用プログラムの発展がある。以前では不可能であった微小結晶のデータ測定が可能となり、より精度の高い三次元構造を決定できるようになっている。

CD81-LELの結晶化

タンパク質の結晶を得るための、一番重要なファクターは、タンパク質の純度であるといっても過言ではない。具体的にはSDS-PAGEで単一なバンドを示す純度が必要である。結晶学に関わっているものほど、純度に対して厳しい連中は無いと思う。Unfolding, Refoldingといった手法

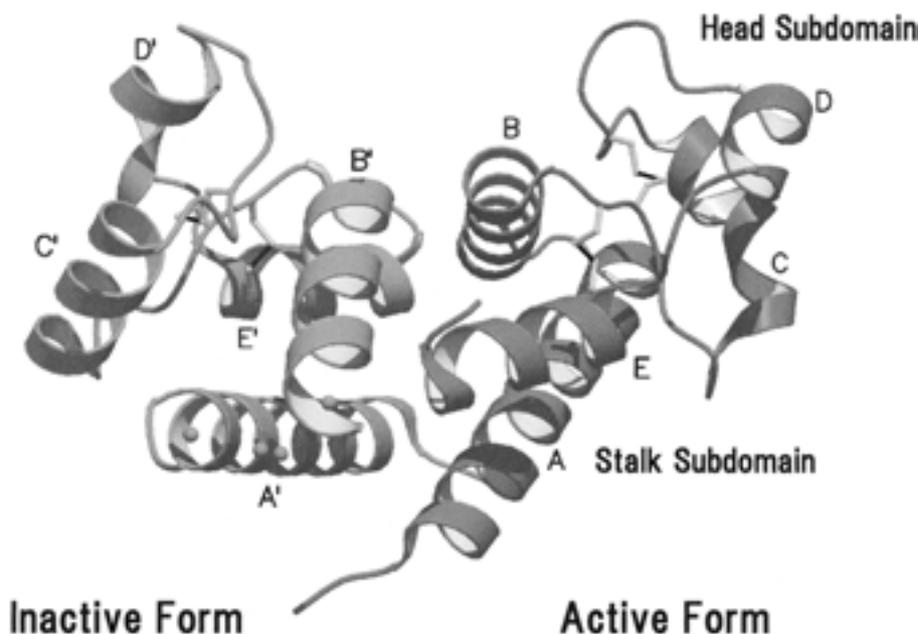


図1 CD81-LELの立体構造
 活性型コンフォメーションは右に、不活性型は左に示してある。
 AからEは α -ヘリックスを示している。

で精製を行い、結晶解析に成功した例も少なくない¹²⁾。

結晶化ロボットなども開発段階であるが、いずれにしてもスクリーニングが必要である。約10年前にハンプトンリサーチ社が開発したCrystal Screenキットは、結晶解析を早めたプレークスルーであったと思われる¹³⁾。このキットは、Sparse Matrix法という統計的手法を用いて作成されており、既に知られている結晶化条件を絞り込み50種類の組成を決定した¹⁴⁾。これにより、従来の沈殿剤テストが要らなくなり、ダイレクトに結晶化スクリーニングが行えるようになった。その後、様々な会社がよく似た結晶化用スクリーニングキットを出している¹⁵⁾。結晶化の手法に関しては、主に蒸気拡散法がよく行われており、密閉系で、徐々に塩濃度を上げていくことでタンパク質を過飽和の状態にし、結晶を作成するという手法である。量的には、数mgあれば、スクリーニングを開始することが出来る。

CD81のLELドメインの発現精製については、大腸菌においてGST融合蛋白質など、結晶化を行う純度の高いサンプルを得るために、種々の方法で、発現系の改良が試みられた。最終的には、ProteinAとその抗体であるIgGセファロースカラムを用いたシステムが構築された¹⁶⁾。IgG結合性蛋白質であるProteinAのC末端側にThrombin認識サイトを挿入し、目的蛋白質であるCD81-LELを組み込み、更にC末側に、His-tagを付け加えて、純度の高い目的蛋白質を、効率良く得ることができた¹⁰⁾。この系の短所は、IPTGなどで誘導が掛けられないことにあるが、培養液1Lから数mgの蛋白質を得ることは可能であった。一

方、長所はIgGカラム抽出液をプロテアーゼ処理した後に、再度、IgGセファロースに通すことにより、目的の蛋白質のみを得る事ができ、これをNiカラムにかけることで、純度の高いサンプルが得られた。最終的にはもう一度、ゲルろ過処理して凝集蛋白質を取り除いた。この結果、数日でクリスタルスクリーンなどのキットを用いて、容易に結晶を得た。結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法で行い、スクリーニングの条件を検討することで、三角板状の結晶を、再現良く得ることができた¹⁰⁾。

CD81-LELのX線構造解析

この結晶は、空間群がP2₁, a=31.5Å, b=77.2Å, c=38.5Å, $\beta=107.4^\circ$ であり、液体窒素を用いた極低温下で、データ測定を行い、フランスGrenobleにある放射光施設ESRFの強力なX線源を用いて、1.6Å分解能の高分解能データ収集を行った。構造決定は、数種類の重原子誘導体結晶を基にした、多重重原子同型置換法で行った。当初、有効な重原子誘導体として酢酸ウラニルを得たが、その後、2つめの有効な重原子誘導体を見出すことは困難であった。最終的には、50数種類のデータ測定を実験室系で行い、その結果、有効なルテチウム誘導体データと水銀誘導体、白金誘導体、サマリウム誘導体データなどを用いて、プログラムSHARPで位相決定を行い、分子モデリング可能な電子密度を得る事ができた。得られた電子密度をスケルトナイズし、プログラムOを用いて、得られた様々な電子密度をチェックした。その結果、ダイマー分子の80%



図2 テトラスパニンファミリーの細胞外LELドメインの一次構造の比較

Hは α ヘリックス, Gは 3_{10} ヘリックスである. 色の濃い部分は相互作用に関わる残基, 及びCys残基. ヒトのCD81とアフリカミドリザル (green monkey) 並びにタマリン (tamarin) では, 5残基が各々異なる.

程度をトレースすることができた. その後, 位相改良を行い, プログラムCNSならびにREFMACを使って精密化を行った. 最終的には190残基と194個の水分子を含み, 20–1.6Å分解能の全反射を用いて, $R=18.7\%$, $R\text{-free}=23.8\%$ の, 精度の高い原子座標を得た.

CD81-LELの立体構造

CD81-LELは, 結晶内で非対称単位中に, ヘテロなダイマーとして存在し, 各々のサブユニットは5本の α -helix (A–E並びにA'–E')と, それを繋ぐループ部分で構成され, “stalk”領域と“head”領域から成る, いわゆる“mushroom-like”の構造を有していた(図1)¹¹.

1.6Å分解能という高分解能な電子密度には, CD81のダイマーが持つ4本のS–S結合の内, 1本が揺らいだ構造をとっていることが観察できた. このモノマー同士は, それぞれ, 2つの異なるコンフォメーションを取っていた. 生化学的データより, 2つのS–S結合がHCVのE2蛋白質との結合に必須であることが示されており¹⁷, ダイマーの内の一方が, HCVと結合する“活性型フォーム”を, もう他方の1つのS–S結合が還元された側が, 結合しない“不活性型フォーム”のコンフォメーションを取ると考えられる(図1). またS–S結合が崩れたことにより, A', B'-helixを結ぶループ部分の4残基に対応する電子密度は観測できなかった(図1). この隣り合った2つS–S結合は, stalk領域(A, B, E-helix)とhead領域(C, D-helix)をつなぐ部分に位置しており, head領域のコンフォメーションを制御していた. 2つのモノマー同士を比較すると, 特にhead領域の立体構造が異なっていた.

CD81のHCVウイルス認識部位

CD81-LELドメインは, 疎水性領域が多いのが特徴で, 分子内には2つの大きな疎水性クラスターが存在し, この蛋白質の機能を考える上で重要な役割を果たしていた. 1つめはstalk領域間に存在して, ダイマー形成に必要な疎

水性クラスターで, ダイマー間のローカルな2回軸で関係付けられる位置に存在していた. これは主としてAとA'-helixの間, 並びにC末端helixの疎水性残基同士の相互作用からなる. N末端とC末端の α -helixは, 互いに空間的に近い位置にあり, 膜貫通ドメインであるTM3とTM4ドメインに, それぞれ繋がっていると考えられる. 一次構造で示している様に(図2), これらの膜貫通ドメインと繋がる部分の疎水性残基は, CD81のみならず他のテトラスパニンにおいてもよく保存されており, このことは他のテトラスパニンもダイマーとして存在している可能性を示唆するものである.

もう1つの疎水性クラスターは, head領域を形成するC, D-helixの部分で, 溶媒領域に対して突き出た形で存在し, 結晶内では他の対称な分子と疎水性相互作用によってパッキングすることで安定な構造をとっていた(図3). このクラスターは非常に特異的で, 溶媒領域に, この様な疎水性残基が存在することは, エネルギー的に好ましくない為, アミノ酸置換等が進化の過程で起こる傾向にあると考えられる. しかしながら, クラスターを形成する疎水性残基(Ile181, Ile182, Leu185)は種の違うCD81においても非常に良く保持されている(図2). この特異な立体構造上の特徴を考慮すると, head領域の疎水性クラスターが他の分子との相互作用に関わる領域である可能性が示唆された.

従って, この溶媒側に突き出たheadサブドメインの疎水性クラスターがHCVウイルスのE2エンベロープ糖蛋白質の結合に関与する領域であると仮定できる. CD81-LELの遺伝子工学による部位特異的変異体の実験から, E2エンベロープ糖蛋白質との結合に関わる重要なアミノ酸残基が同定されている¹⁸. ヒトとチンパンジーのCD81-LELは, E2に対して, IC_{50} が数nM程度の強い結合で, HCVに感染する⁷. しかしながら, アフリカミドリザル (AGM)のCD81-LELはE2に結合せず, HCVにも感染しない¹⁹. 一方, Tamarinというサル (TAM)由来の

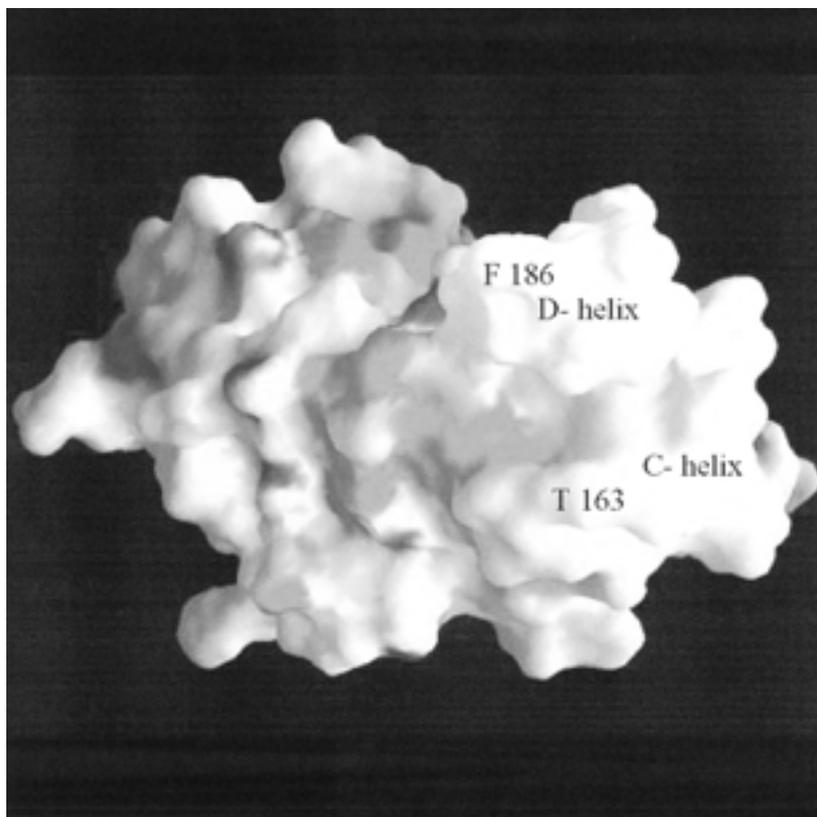


図3 CD81-LELの静電ポテンシャルの表示
疎水性クラスターを形成しているC-およびD-ヘリックスと、溶媒に突出しているPhe186並びにThr163の残基を示している。白い部分が疎水性領域である。

CD81-LELはE2に結合するが、感染しないことが明らかとなった¹⁹⁾。図2に示した様に、ヒトとチンパンジーのCD81-LELは、全く同一のアミノ酸配列であるが、AGMならびにTAMでは、それぞれ5個のアミノ酸残基が違っている。興味深いことにこれらの残基は、headサブドメインに集中している(図2)。この5個のアミノ酸残基の内、3残基に対してsingle-site mutationによる実験で、E2蛋白質との結合に対する効果が調べられており、その結果、Phe186残基がHCV-E2タンパク質の結合に非常に重要であることがわかっている¹⁸⁾。つまり、ヒトのCD81-LELのPhe186をAlaに変換すると、E2への結合能が全く無くなり、またAGMのCD81-LELで、Leu186をPheに置換するとE2への結合が回復し、更にTAMにおいて、Phe186は保持されている。これらのことから、Phe186の重要性が示唆される。それに対して、ヒトにおいてThr163をAlaに変換したものとAsp196をGluに変換したミュータントはE2への結合に対して全く影響がなかった。以上の変異体実験の結果から、CD81とE2との結合において、Phe186残基の重要性が示唆される。また、得られた立体構造から、このPhe186に注目すると、図3、図4でも明らかな様に、その側鎖は、外側の溶媒領域に突出した形で存在していた。従って、このhead領域のPhe186

残基周辺が、HCVのE2蛋白質の認識部位である可能性が示唆された。更に構造的には、Ile181, Ile182, Leu185などの疎水クラスターを形成するアミノ酸残基も溶媒側に突き出るような形で存在していることから、これらの疎水性残基も何らかの形でウイルスとの結合に関与していると考えられる。

次に我々は、抗ウイルス薬を念頭に入れて、阻害剤との共結晶によるX線構造解析を目指した。5種類の阻害剤存在下で結晶化を行ったところ、元の三角板状とは異なる形状の六角柱状結晶を得た。この結晶を用いて、SPring-8でデータ測定を行い、分子置換法によって構造解析を行ったが、阻害剤部分の電子密度を観察することが出来なかった。これは、阻害剤の結合が弱いことと、溶解度が極端に低いことなどが影響したと考えられる。この結晶系での二つのモノマーはいずれもS-S結合が保持されており、従って、どちらも活性型フォームを取っていたと思われる²⁰⁾。これにより、4つのCD81-LELのコンフォメーションを得ることが出来た。図4に示してあるのは、4つのコンフォメーションを重ねたものである。A, B, E-ヘリックス部分については、ほとんど立体構造が保持されており、stalk領域のrigidさを示している。一方、head領域については、非常にフレキシブルな構造をとっていること

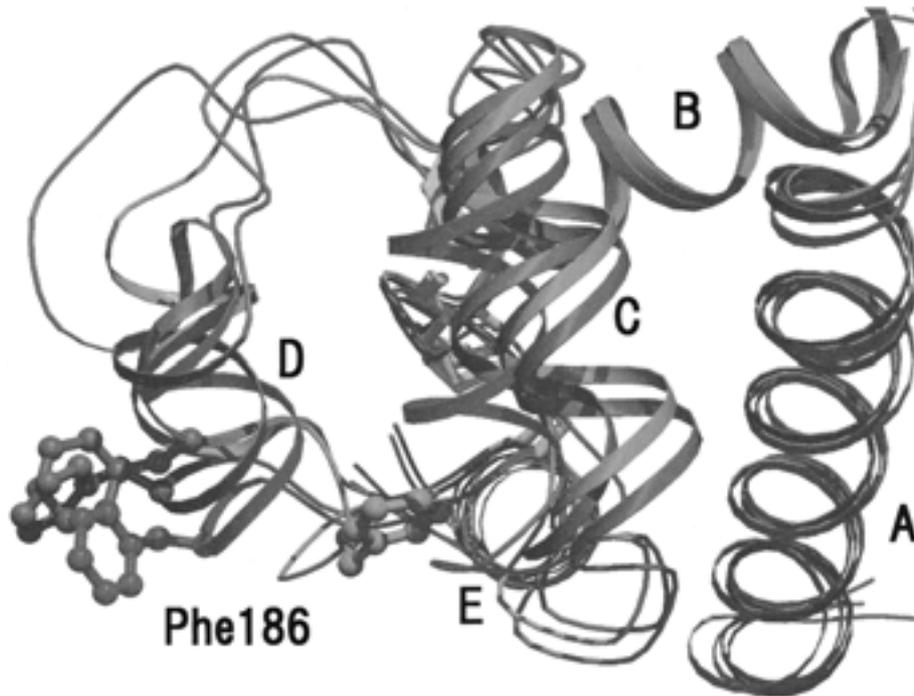


図4 ヒト CD81-LEL の4つのコンフォメーションを重ね合わせた図
ball-and-stick で示しているのは Phe186. 4つのうち HCV と結合する3つのフォームのものは、外側を向いている.

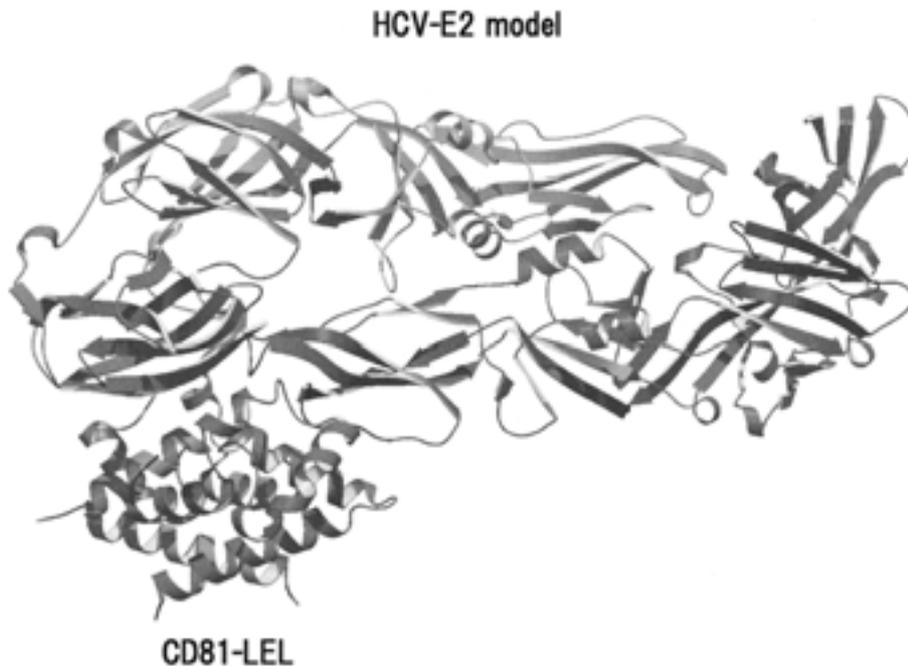


図5 HCV-E2 分子モデルと CD81-LEL を並べた構造予測図

がわかる。興味深いことに、先の Phe186 残基は、活性型フォームの3つについては、分子の外側に対して突き出しているが、不活性型では、分子内で疎水結合をしていた(図4)。このことから、HCV と結合する際には、Phe186 が分子の外側に突き出したコンフォメーションを取って

いると考えられる。

次に、C型肝炎ウイルスのE2タンパク質については、現段階ではその立体構造は決定されていない。しかしながら Yagnik らは、Tick Borne Encephalitis virus の E protein の結晶構造を用いて、HCV-E2 の立体構造を予測し

ている²¹⁾。E2はE1とヘテロダイマーを形成すると考えられており、E2もダイマーとして存在すると考えられている²²⁾。図5のように、HCV-E2分子は、N末端側のHead部分とC末側のTail部分からなり、Head-to-Tail型の立体構造をとっている。この構造予測の結果は、CD81-LELとの結合データとよく一致する。すなわち、E2分子の頭の部分と、尻尾の部分の両方にCD81-LELの結合サイトがあり、図5のようにダイマーを形成することで、E2のN末側とC末側の両方が同時にCD81と相互作用していると考えられる。いずれにしても、現段階ではCD81とHCV-E2のコンプレックスの構造が決定されていないので、両者の詳細な結合様式は不明である。図5に示す様に、両者の大きさを比較すると、CD81に比べてE2分子が、非常に大きい。CD81分子のみで、HCVのレセプターとして結合することは考えにくく、他のレセプターが存在すると考えられる。しかしながら、HCV-E2との結合の強さから、CD81は、HCVの感染に何らかに関与するコレセプターとしての働きがあると仮定される。すなわち、CD81は、他のメインなHCVのレセプターに付随、あるいは関与して、両者を融合させる際に、重要な役割を果たすタンパク質でないかと考えられる。このことは、CD81と類縁のテトラスパニンであるCD9分子が、精子と卵子を融合させるに重要な役割を担っていることと一致している^{23,24)}。最近になって、CD81についても、受精での役割が示唆されており²⁵⁾、テトラスパニンの膜状での融合における重要な働きを示すものであると考えられる。

おわりに

C型肝炎ウイルスの結合に関与し、生体内において、重要な役割を担っている膜4回貫通型蛋白質である、CD81の細胞外ドメインの立体構造を明らかにした。この結果は、C型肝炎ウイルスの結合のメカニズムや感染に至る経路の解明など、未知の部分が多いHCVの研究に役立つものであると期待される。この立体構造決定により、HCVのワクチン開発や立体構造を基にしたドラッグデザインへの応用が広がると思われる。

日本においても、タンパク3000などの構造ゲノムプロジェクトが始まっているが、構造生物学の分野がウイルス学や感染症研究に対する寄与は、まだまだ少ないのではないと思われる。SPring-8に代表されるように日本の構造生物学のポテンシャルは、欧米と比較しても引けをとらないはずである。今後、より多くのコントリビューションをウイルス学の研究に果たすにはどうすればいいのか、どうすればもっと日本の構造生物学とウイルス学との融合が果たせるのか、弱輩者の私個人では答えは見出せないでいる。もともとこのタンパク質結晶学の最近の飛躍的な進歩は、HIVプロテアーゼのドラッグデザインなど、とりわけHIV研究とともに広がったという感じがある。抗感染

症という研究において、ターゲットタンパク質の立体構造を基にしたドラッグデザインの重要性が、考慮されることによってタンパク質結晶学は広がり、発展したという一面がある。今度は、ウイルス研究に対してそのお返しをする番であると思う。私としては、少しでもお役に立てるようウイルス学と関わって行きたいと思う。例えば、ある種のウイルスをターゲットとして、そのすべてのタンパク質並びに、関連する宿主側のタンパク質も含めて、立体構造決定を行うような、ウイルス蛋白質丸ごとプロジェクトなどがあってもいいのではないかと考える。これによってウイルスとその感染メカニズムに対する理解が深まり、同時に、抗ウイルス薬の開発も可能ではないかと思う。これには産学の垣根を越えた取り組みも必要ではないかと思う。実際に企業においては、このようなアプローチも行われているのではないと思われる。今後とも日本において構造生物学とウイルス学の融合が出来るように微力ながら、尽力していきたいと思います。

謝 辞

最後にCD81-LELの立体構造決定は、筆者がイタリアジェノバ大学のMartino Bolognesi教授の下で文部科学省在外研究員として留学中に、イタリアカイロン社のGuido Grandi博士のグループとの共同研究で行ったものである。公私共にご援助頂いたラボのメンバーに感謝します。データ測定の際お世話になった、ゲルノーブルのESRF、ハンブルグのHASYLAB、つくばのPF、播磨のSPring-8の皆様に感謝します。

末文であるが、この研究の後半部分については、特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」のサポートによるものである。改めて関係者の先生方に謝意を表したいです。

文 献

- 1) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**: 359-362
- 2) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**: 110-113
- 3) 加藤宣之 (2002) 肝炎ウイルス (2) —ウイルスの増殖機構の解明とその制御法の開発を目指して。ウイルス, **52**: 157-162.
- 4) 松浦善治 (2002) C型肝炎ウイルスの感染機構。ウイルス, **52**: 185-190.
- 5) 下遠野邦忠 (2003) C型肝炎ウイルスの克服に向けて。ウイルス, **53**: 87-91.
- 6) 加藤宣之 編著 (2000) C型肝炎ウイルス。IPC (Tokyo).
- 7) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi

- G, Abrignani S.(1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282** : 938-941.
- 8) Levy, S., Todd, S. C. and Maecker, H. T.(1998) CD81 (TAPA-1) : a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **16** : 89-109.
- 9) Masciopinto F, Freer G, Burgio VL, Levy S, Galli-Stampino L, Bendinelli M, Houghton M, Abrignani S, Uematsu Y.(2002) Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* **304** : 187-196.
- 10) Kitadokoro K, Galli G, Petracca R, Falugi F, Grandi G, Bolognesi M.(2001) Crystallization and preliminary crystallographic studies on the large extracellular domain of human CD81, a tetraspanin receptor for Hepatitis C Virus. *Acta Crystallogr.* **D57** : 156-158.
- 11) Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, Grandi G, Bolognesi M.(2001) CD81 extracellular domain 3 D structure : insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.*, **20** : 12-18.
- 12) Ponassi M, Cantoni C, Biassoni R, Conte R, Spallarossa A, Moretta A, Moretta L, Bolognesi M, Bordo D. (2003) Expression and crystallographic characterization of the extracellular domain of human natural killer cell triggering receptor NKp46. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* **59** : 2259-2261.
- 13) ハンプトンリサーチ社 <http://www.hamptonresearch.com/>
- 14) Jancarik, J., and Kim, S. H.(1991) Sparse matrix sampling : a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24** : 409-411.
- 15) decode genetics 社 <http://www.decode.com/emeraldstructures/>
- 16) Nilsson, B., et al.(1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng.*, **1** : 107-113
- 17) Petracca R, Falugi F, Galli G, Norais N, Rosa D, Campagnoli S, Burgio V, Di Stasio E, Giardina B, Houghton M, Abrignani S, Grandi G.(2000) Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J. Virol.*, **74** : 4824-4830.
- 18) Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S.(2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E 2. *J. Virol.*, **74** : 3642-3649.
- 19) Meola A, Sbardellati A, Bruni Ercole B, Cerretani M, Pezzanera M, Ceccacci A, Vitelli A, Levy S, Nicosia A, Traboni C, McKeating J, Scarselli E.(2000) Binding of hepatitis C virus E 2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J. Virol.*, **74** : 5933-5938.
- 20) Kitadokoro K, Ponassi M, Galli G, Petracca R, Falugi F, Grandi G, Bolognesi M.(2002) Subunit association and conformational flexibility in the head subdomain of human CD81 large extracellular loop. *Biol Chem.* **383** : 1447-1452.
- 21) Yagnik, A. T., A. Lahm, A. Meola, R. M. Roccasecca, B. B. Ercole, A. Nicosia, and A. Tramontano.(2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E 2. *Proteins* **40** : 355-366.
- 22) Cocquerel L, Kuo CC, Dubuisson J, Levy S.(2003) CD 81-dependent binding of hepatitis C virus E 1 E 2 heterodimers. *J. Virol.* **77** : 10677-10683.
- 23) Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. (2000) Severely reduced female fertility in CD 9-deficient mice. *Science*, **287**, 319-321.
- 24) Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E.(2000) Requirement of CD 9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321-324.
- 25) Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, Kawase I, Mekada E.(2003) Tetraspanins CD 9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J. Cell Biol.* **161** : 945-956.

Structural biology of the human CD81, a receptor for Hepatitis C Virus.

Kengo Kitadokoro

Research Center for Low temperature and Materials Sciences, Kyoto University
Kitashirakawaoiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan (Kyoto 606-8501)
E-mail : kengo@nice.kumac.kyoto-u.ac.jp

Human CD81, which is belonged to tetraspanin family, has been previously identified as a receptor for the hepatitis C virus envelope E 2 glycoprotein. The crystal structure of the human CD81 long extracellular domain, binding site for E 2 glycoprotein, is presented here at 1.6 Å resolution. The tertiary structure of CD81-LEL, which is composed of five alpha-helices, is resemble for a mushroom-shaped molecules (stalk and head subdomains) and forms a dimer in the crystallographic asymmetric unit. The two disulfide bridges, which are conserved all the tetraspanin and are necessary for CD 81-HCV interaction, are stabilizing the conformation of the head domain. This head domain is solvent exposed surface region and is locating the amino acid residues which are essential for the E 2 binding. The hydrophobic cluster in this head domain may suggest that the presence of a docking site for a low complementary surface cavity in the partner E 2 glycoprotein. We proposed that the dimer structure may be important in the interactions of HCV E 2 glycoprotein and also the viral protein may occur in dimeric aggregation on the HCV envelope. This common structural motif of the tetraspanin provides the first insight onto the mechanism of HCV binding to human cell and may be targets for structure-based antiviral drug.