

C型肝炎ウイルスレセプターCD81の構造生物学

Structural Biology of the Human CD81, a Receptor for Hepatitis C Virus.

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 北所 健悟

Kengo Kitadokoro

Research Center for Low temperature and Materials Sciences, Kyoto University

1. はじめに

“沈黙の感染症” – その病因が全くわからないことから、「原因不明の肝硬変」と呼ばれた末期肝臓病に、多くの人々が苦しめられてきた。肝炎はそのウイルスのタイプからA型やB型に分類されていたが、この肝炎は、そのいずれにも属さず、輸血歴のある人に多く見られる輸血後肝炎として診断されていた。この謎の肝硬変の病因は、非A非B型ウイルスすなわちC型肝炎ウイルスによるものであることが、現在では明らかとなっている。C型肝炎は世界の人口の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、最近、血液製剤の使用による感染が問題となっている日本においても、そのキャリアは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”と呼ぶ由来である。このウイルスによる肝炎の70–80%が慢性化し、肝硬変、肝癌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。C型肝炎ウイルス(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ウイルスは1989年に米国で発見された比較的歴史の浅いウイルスであり、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。

最近になり、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^[2]。CD81は4回膜貫通型蛋白質であるテトラスパニンファミリーに属する細胞表面の抗原性レセプターのひとつで、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。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 (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 (図1). このうち HCV の結合に必須な領域は、主要な細胞外ドメインである LEL (Large Extracellular Loop) ドメインで、91個のアミノ酸からなり、他の160種類のテトラスパニンファミリーと同様に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 55 kDa 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[2].

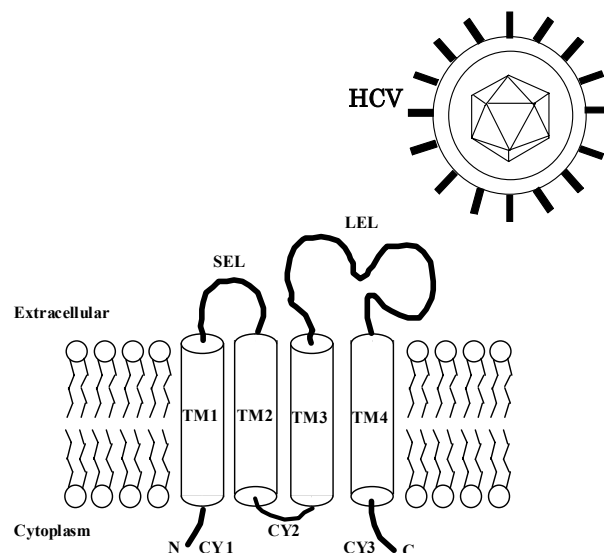


図1. 膜4回貫通型蛋白質テトラスパニンと HCV ウイルスの模式図.

この CD81 並びに他のテトラスパニンの三次元構造については全く未知のものであった. また HCV エンベロープ蛋白質である E2 分子についても全くその立体構造については知見が得られていない. 最近筆者らは、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の直接的な知見を得るために、HCV が感染する際に標的となる CD81 分子の LEL ドメインの X 線構造解析を行い、この結果、CD81 分子の HCV 蛋白質結合部位を明らかとすることができた[3].

2. 低温 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 -ストランドがよく知られている. アミノ酸の配列から立体構造を知ることが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、現在の蛋白質研究の上で必須のものとなっている. また、その明らかとされたゲノムから蛋白質を発現、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もその重要性が示唆されている. X 線構造解析では、蛋白質を結晶化し、得られる回折データにより、その立体構造を決定するのであるが、最近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、それに呼応した X 線損傷によるダメージを軽減するための低温化での結晶データ測定法の開発が挙げられる. 低温 X 線構造解析法の発展により、以前では不可能であったデータ測定が可能となり、より精度の高い三次元構造を得ることができるようになっている.

3. CD81-LEL の立体構造

ヒト由来 CD81 の細胞外領域である LEL ドメインを大腸菌にクローニングして発現精製し、CD81-LEL ドメインの結晶化を行った^[4]。この結晶は空間群が $P2_1$, $a=31.5\text{\AA}$, $b=77.2\text{\AA}$, $c=38.5\text{\AA}$, $\beta=107.4^\circ$ 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 線源を用いることで、 1.6\AA 分解能の高分解能データ収集を可能にした^[3]。構造決定は重原子同型置換法で行った。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、精密化の結果、最終的には 190 残基と 194 個の水分子を含み、 $20-1.6\text{\AA}$ 分解能の全反射で、 $R=18.7\%$ ($R\text{-free}=23.8\%$) の原子座標を得ることができた。この蛋白質はループ構造をとっていると予測されていたが、得られたモデルは新規な α -ドメイン構造であった。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 2) ^[3]。

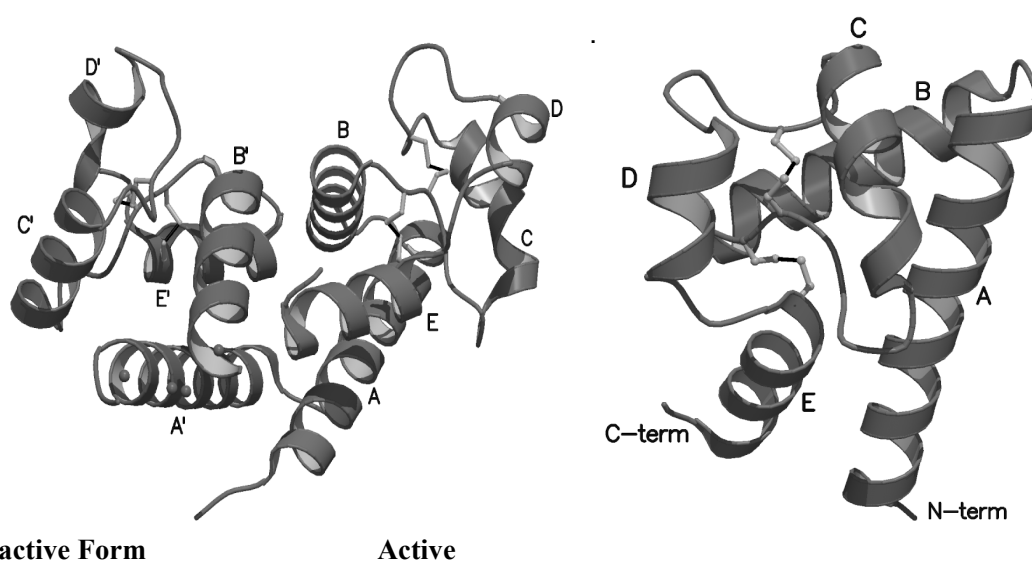


図 2. CD81-LEL の立体構造.

(a) ダイマー構造. 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。

(b) 別角度からのモノマー図. 構造は N 端と C 端を含む stalk サブドメインと head サブドメインからなる。

1.6\AA 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。従って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とされており、ダイマーの内的一方が、“活性型”を、もう他方の 1 つの S-S 結合が還元された側が、“不活性型”のコンフォメーションを取ると考えられる (図 2 a, b)。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 2a, b)。この隣り合った 2 つ S-S 結合は、stalk 領域 (A, B, E - helix) と head 領域をつなぐ部分に位置しており (図 2b), head 領域 (C, D - helix) 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。

4. 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、2量体の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 は空間的に近い位置にあり、膜貫通ドメインである TM3 と TM4 にそれぞれ繋がっていると考えられる (図 2 a)。一次構造で示している様に、これらの TM 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 (図 3)、このことは他のテトラスパニンも二量体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。このクラスターは非常に特異的で、溶媒領域にこのよう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 3)。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^[3]。

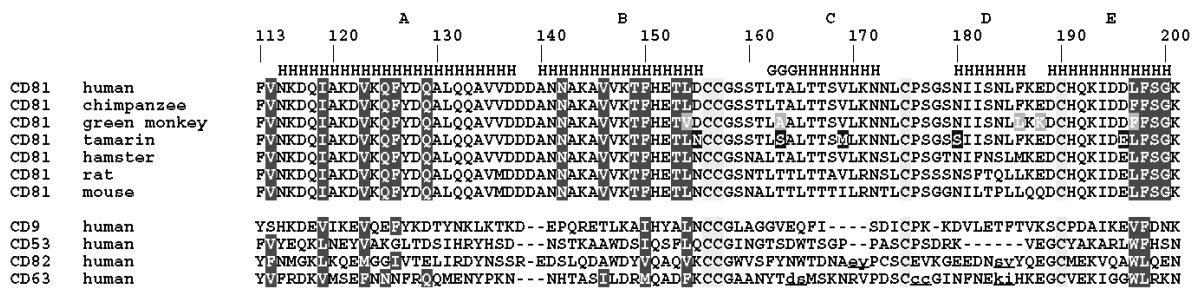


図 3. テトラスパニンファミリーの細胞外 LEL ドメインの一次構造の比較。

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、および 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残基が各々違っている。

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 エンベローブ糖蛋白質の結合に関与する領域であると仮定できる。最近、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 エンベローブ糖蛋

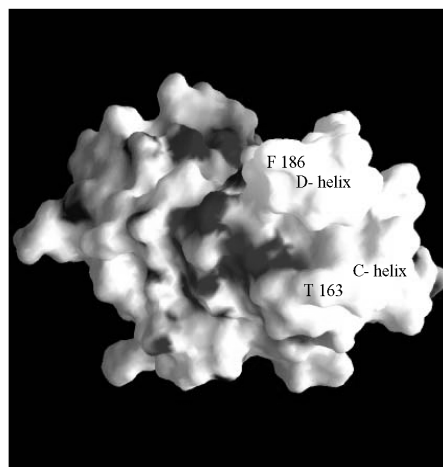


図 4. CD81-LEL の静電ポテンシャルの表示。疎水性クラスターを形成している C-および D-ヘリックスと、溶媒に突出している Phe186 並びに Thr163 の残基を示している。白い部分が疎水性領域である。

白質との結合に関わる重要なアミノ酸残基が同定された^[5]. ヒトとチンパンジーの CD81-LEL は E2 に対して, IC₅₀ が数 nM 程度の強い結合で, HCV に感染する^[2]. 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^[6]. 一方, Tamarin というサル (TAM) 由来の 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^[6]. 図 3 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 3, 図 5). この 5 個のアミノ酸残基の内, 3 残基が 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 蛋白質の結合に非常に重要であることがわかっている^[6]. すなわち, 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. 以上の実験データから CD81 の E2 糖蛋白質との結合において, 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 5 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 サブドメインの 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. このことは CD81-LEL と E2 蛋白質との複合体の構造により, 明らかになると思われる.

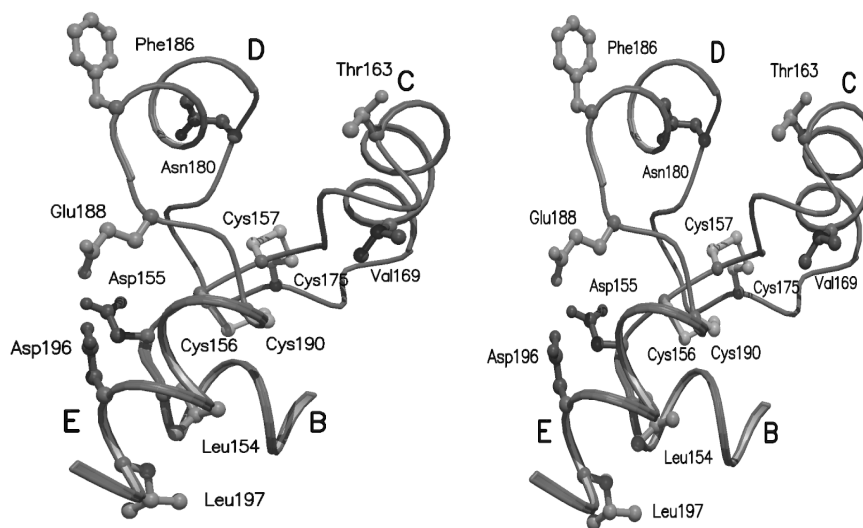


図 5. ヒト CD81-LEL においてアフリカミドリザル並びにタマリンが変異しているアミノ酸残基.

5. 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, 今後, C 型肝炎ウイルスの結合の詳しいメカニズムや感染に至る経路の解明, またどの様にして肝炎が発症し, 肝癌に至るのかなど, まだまだ未知の部分が多い HCV の研究に役立つものであ. この蛋白質の立体構造決定により, C 型肝炎ウイルス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などへの応用が広がるとともに,

この構造が他の重要なテトラスパニンファミリーの研究に対してもその構造予測など、構造上の基盤となるモチーフとして活用できる。

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 教授の下で留学中にイタリアカIRON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。

参考文献

1. Choo, Q. L. , *et al.* , *Science*. **244**, 359 (1989).
2. Pileri, P. , *et al.*, *Science*. **282**, 938 (1998).
3. Kitadokoro K., *et al.*, *EMBO J.*, **20**, 12 (2001).
4. Kitadokoro, K., *et al.*, *Acta Crystallogr.* **D57**, 156 (2001).
5. Higginbottom, A., *et al.* *J. Virol.* , **74**, 3642 (2000).
6. Meola, A., *et al.*, *J. Virol.* , **74**, 5933 (2000).