

1. 麻疹ウイルス H タンパク質の X 線結晶構造

橋口 隆生¹⁾, 前仲 勝実²⁾, 柳 雄介¹⁾

1) 九州大学大学院医学研究院 ウイルス学, 2) 九州大学生体防御医学研究所

この10数年ほどの間に X 線結晶構造解析や核磁気共鳴などの手法を用いることにより、多くのウイルスで重要なタンパク質の立体構造が明らかにされてきた。その結果、ウイルスと宿主の間で起きている相互作用を視覚的かつ原子レベルで議論することができるようになり、ウイルス側と宿主側双方の戦略的なメカニズムについての理解が大いに深まった。本稿では、麻疹ウイルスレセプター結合タンパク質の X 線結晶構造解析から見えてきたウイルスの細胞侵入戦略やワクチンが成功を収めてきた分子基盤、さらに新たな上皮細胞レセプターに関する最新の知見について紹介する。また、今回の結晶化に用いた、均一な糖鎖を産生するヒト培養細胞株 (293SGnTI(-)細胞) のタンパク質発現系についても取り上げる。

はじめに

麻疹ウイルス measles virus は、発熱、発疹を伴う非常に感染性の強い急性ウイルス感染症である麻疹 (はしか) を引き起こす。感染時には一過性の強い免疫抑制が起こり、肺炎などの重篤な二次感染を伴う場合がある。麻疹には安全性、有効性が高い弱毒生ワクチンがあるが、未だに毎年世界中で 2000 万人を超える患者と 30 万人を超える死者を出しており、5 歳未満の小児の死因の約 4% を占める²⁾。麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属するマイナス鎖 RNA ウイルスで、エンペロープ膜上にレセプター結合タンパク質である hemagglutinin (H) タンパク質と膜融合を担う fusion (F) タンパク質という 2 つの糖タンパク質を持っている。細胞侵入時には H タンパク質が免疫系細胞に発現するレセプターである signaling lymphocyte activation molecule (SLAM, CD150) に結合し、それに伴う構造変化が F タンパク質の構造変化を誘導し、細胞との膜融合が生じると考えられている^{13, 42)}。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっておらず、仮

説にとどまっている。最近、我々は麻疹ウイルス H タンパク質 (MV-H) の X 線結晶構造解析に成功した¹⁴⁾。これまでの報告と今回明らかになった構造を組み合わせることで、麻疹ウイルスの細胞侵入戦略や麻疹ウイルスワクチンが 40 年以上にもわたり成功を収め続けている理由の一端が明らかになってきた。

ヒト培養細胞によるタンパク質の大量発現

現在、X 線結晶構造解析のためのタンパク質発現系としては大腸菌発現系や昆虫細胞発現系が主流となっているが、MV-H の構造解析は膜タンパク質の X 線結晶構造解析用に改良されたヒト培養細胞発現系を用いることにより成功した^{14, 15)}。この細胞は、293S 細胞から N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) 活性を欠損させた 293SGnTI (-) 細胞として樹立され³¹⁾、結晶構造解析を行っている少数の研究室でしか取り扱われていない特殊な変異細胞株である。通常、膜タンパク質には糖鎖が付加し、その糖鎖の修飾が不均一であるために結晶化の大きな障害となる (タンパク質を結晶化させる際には全ての分子が均一であることが望ましい)。しかし、この細胞では GnTI 活性が無いために、発現した糖タンパク質は N 結合型糖鎖が均一になる (Man₅GlcNAc₂)。MV-H の場合、293T 細胞と 293SGnTI (-) 細胞の双方で結晶化に成功したが、293T 細胞で発現させた不均一な糖鎖を持つ MV-H (分解能 3.0 Å) よりも 293SGnTI (-) 細胞で発現させた均一な糖鎖を持つ MV-H (2.6 Å) の方が高い分解能を示した。ヒト培養細胞発現系を用いる最大のメリットは既

連絡先

〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学大学院医学研究院 ウイルス学
TEL: 092-642-6138
FAX: 092-642-6140
E-mail: takaoh@virology.med.kyushu-u.ac.jp

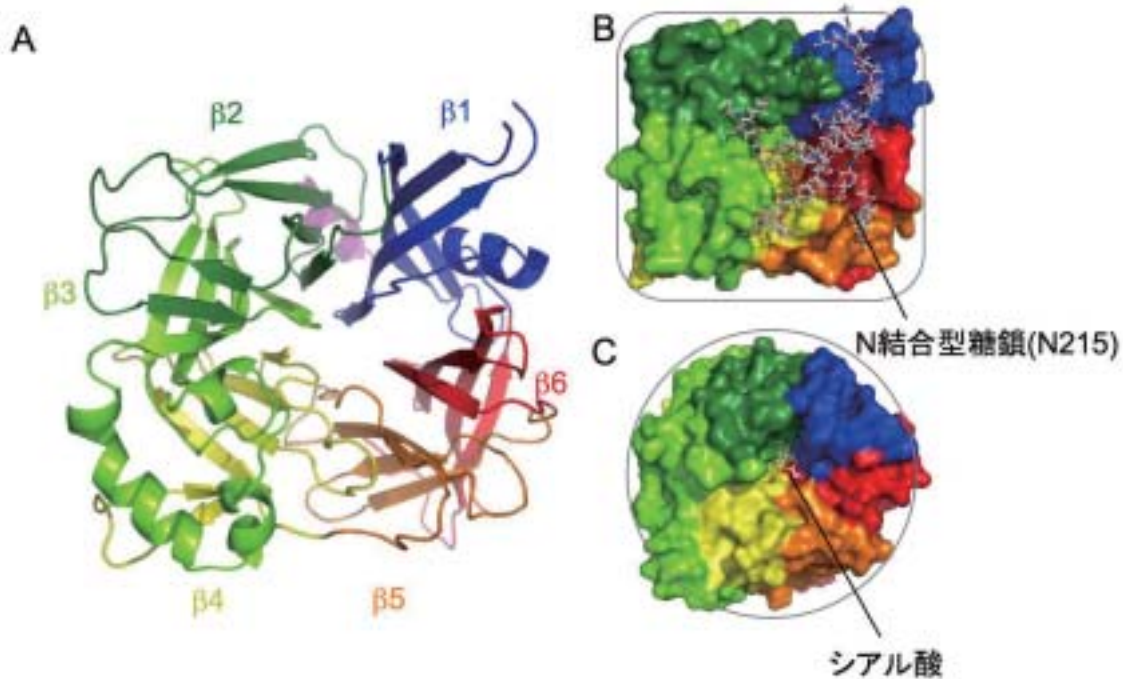


図1 麻疹ウイルスHタンパク質 (MV-H) のX線結晶構造

(A) MV-Hのリボンモデル. (B, C) MV-HとSV5-HNの表面構造. いずれも上方から見た像. 6個のベータシート構造は異なる色で示すとともに, N末端側から順に番号をつけている. MV-Hは立方体状をしている. また, SV5-HNのような他のパラミクソウイルスの多くで見られるシアル酸結合部位は自身のN結合型糖鎖で覆われている. N215は, 215番目の残基であるアスパラギン上のN結合型糖鎖を示す. (文献14を改変)

存のタンパク質発現系では得られないタンパク質を発現させることができ, かつ, ヒトの細胞を使っているため発現タンパク質が生体内と同じ適切な構造を保持していると考えられる点である. また, 位相を決めるためのセレノメチオニン誘導体の発現も可能である¹⁵⁾. 収量はタンパク質により異なるが, MV-Hの場合, 1L培養で1.2–1.5 mgほどであり, タンパク質によっては5 mg程度の収量が得られる. 今後, 結晶化に適した均一な糖鎖をもつタンパク質を得ることができるこの発現系が普及すると思われる.

麻疹ウイルスレセプター

麻疹ウイルスのレセプターとして1993年にNanicheらとDorigらによりCD46が同定された^{10, 26)}. CD46はヒトの全ての有核細胞に発現しており, 麻疹ウイルス実験室株がほとんどのヒト細胞株で増殖することを考えると理にかなった分子であった. また, サルでは赤血球にもCD46が発現しているため, 赤血球凝集反応も観察できる. 一方で, B95a細胞やヒトB細胞株で分離された麻疹ウイルス株はワクチン株や実験室馴化株とは異なるトロピズムを示し, リンパ球系の細胞でのみ増殖することが確認されていた^{21, 39)}. また, B細胞由来の麻疹ウイルスが持つHタンパク質

はCD46陽性細胞においてCD46のdownregulationや細胞融合(Fタンパク質との共発現)を起こさないことが示された^{1, 24, 34, 38)}. このような経緯から新規レセプターの存在が示唆されていたが^{1, 3, 18, 24, 38, 39)}, 2000年になってTatsuoらによりSLAMが全ての麻疹ウイルスに対するレセプターとして同定された⁴⁰⁾. SLAMは, 活性化T細胞やB細胞, マクロファージ, 成熟樹状細胞など免疫系の細胞でのみ発現しており⁶⁾, その局在は麻疹ウイルスのトロピズムや麻疹ウイルス感染によって起きる一過性の免疫抑制をうまく説明するものであった. 麻疹ウイルス野外株であるIC323株にEGFPを組み込んだ組換えウイルスによるサルやマウスを用いたin vivo感染実験が行われており, リンパ節やリンパ系臓器での感染が報告されている^{8, 28)}.

レセプター結合タンパク質

MV-Hは617アミノ酸で構成されるII型の膜タンパク質で, N末端から, 細胞内ドメイン, 膜貫通ドメイン, ストリークドメイン, そしてC末端のレセプター結合ドメインを形成している. 最近我々は前述したヒト培養細胞発現系によりMV-Hタンパク質の細胞外領域を大量に発現, 精製した後, 適切な条件下で結晶を得ることに成功した. これを放射光施設であるSPring-8やPhoton FactoryでX線回折測

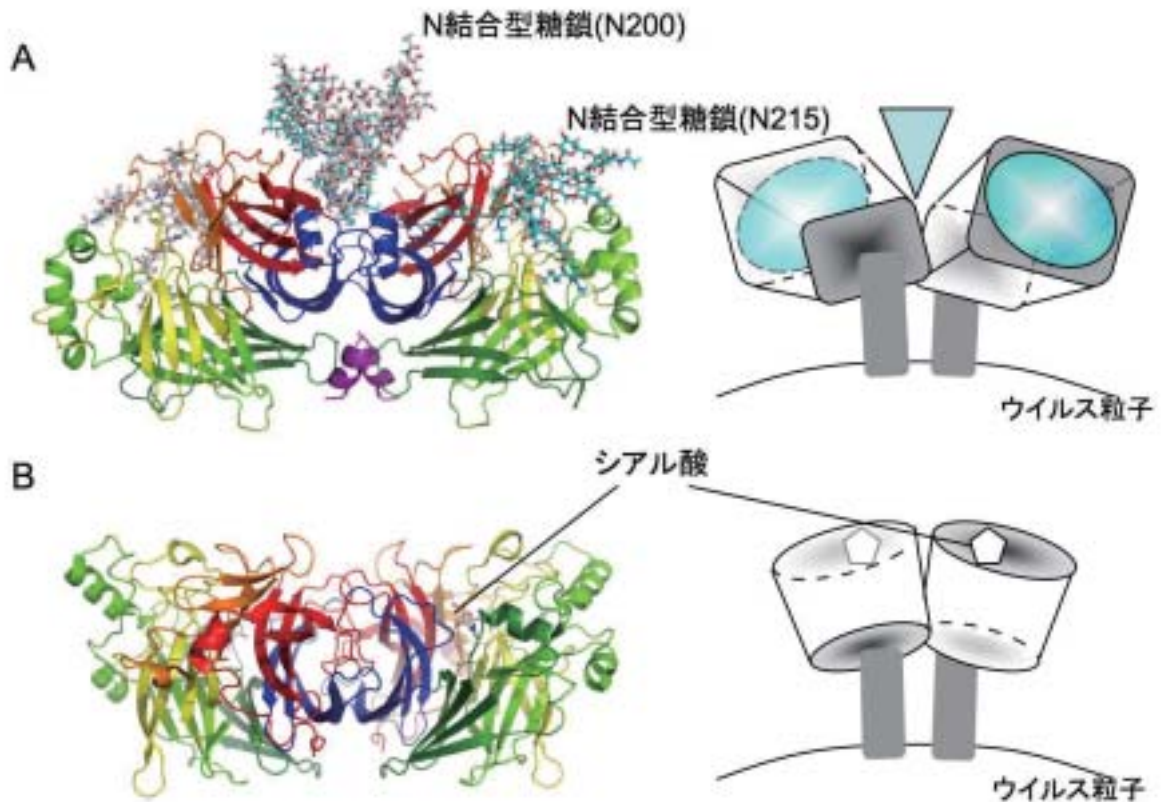


図2 二量体構造の配向

(A) MV-Hの二量体構造(側面)。(B) SV5-HNの二量体構造(側面)。それぞれウイルスタンパク質をリボンモデルで、糖鎖とシアル酸を針金モデルで表している。また、右に模式図を示す。MV-H二量体を構成する各単量体は水平面方向にほぼ180度傾いて側面が上部を向いているのに対し、シアル酸を受容体とするパラミクソウイルスは多少傾いているが、樽状の各単量体が上方を向いた配向をしている。シアンはN結合型糖鎖を示す。(文献14を改変)

定を行い、単波長異常分散法(SAD)により位相を決定し、最終的に2.6 Åの分解能で構造を決定した(図1)。多くのパラミクソウイルスのレセプター結合タンパク質(hemagglutinin-neuraminidase, HN)のレセプター結合ドメインやインフルエンザウイルスのneuraminidase(NA)はいずれもシアル酸との結合能を持つが^{7, 22, 23, 43}、MV-Hではそうしたシアル酸結合能を欠いており、レセプターとしてSLAMやCD46を使用する。このレセプター使用の違いは、MV-Hと上記のウイルスのレセプター結合タンパク質の立体構造の違いに顕著に現れている。すなわち、他のパラミクソウイルスがシアル酸と結合する活性部位に相当する部位は、麻疹ウイルスでは喇叭状に大きく広がっており、シアル酸との結合に必要なとされる保存性の高いアミノ酸は欠失している¹⁴。さらに、N結合型糖鎖(図1のN215)がその領域全体を塞いで、シアル酸や抗体、その他の分子の結合を阻害している¹⁴。また、他のパラミクソウイルスのレセプター結合ドメインがglobular headと呼ばれ、球状であるのに対し、MV-Hのレセプター結合ドメインは立方

体状(cubic head)を示す(図1)。同じパラミクソウイルス科のNewcastle Disease virus(NDV)では二量体の界面部分に第2のシアル酸結合部位が存在することが示されているが⁴⁴、MV-Hではその相同領域にはN結合型糖鎖(図2のN200)が非常に近接して存在しており、やはり、シアル酸の結合を許していない。MV-Hではその他の領域においてもシアル酸との結合を担う領域が存在しないことが、シアル酸誘導体との共結晶の実験(シアル酸誘導体とMV-Hを混合後に結晶化し、構造を決定したが、シアル酸誘導体の電子密度は確認されなかった)により示されている¹⁴。

麻疹ウイルスEdmonstonワクチン株とIC-B野生株のHタンパク質の間には、17個のアミノ酸の違いがあり、これらのうちL296(296番目のleucineを意味する。以下同様)を除く他の全てのアミノ酸が分子表面に存在している。さらに、IC-B株を含め最近の野生株は、N416上にEdmonston株が持たないN結合型糖鎖を有している。この糖鎖は後述のSLAM結合部位からはほぼ反対側の位置に

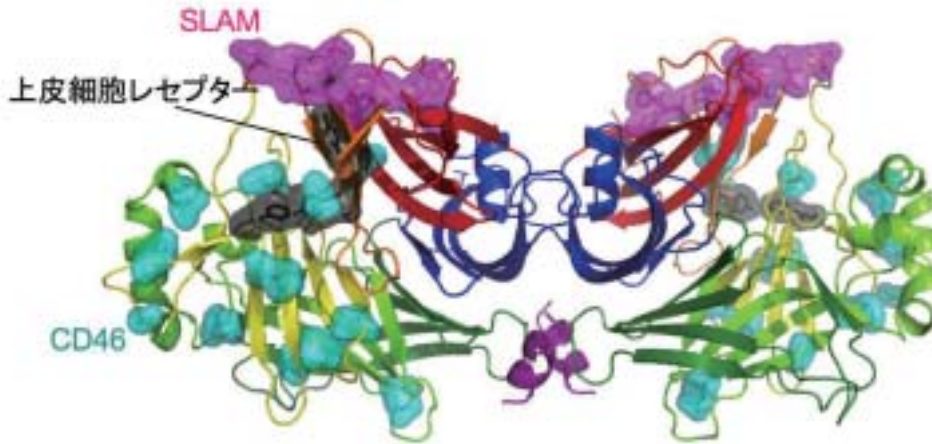


図3 MV-H 立体構造上のレセプター結合部位

MV-H 二量体を側面から見た図。SLAM 結合部位は、ウイルス粒子の最表層に位置し、レセプターとの相互作用に最も都合が良い。CD46 結合部位は、側面からストックに近い領域にある。上皮細胞レセプター結合部位は、SLAM と CD46 結合部位の間に位置している。マゼンタ：SLAM 結合部位，ブラック：上皮細胞レセプター結合部位，シアン：CD46 結合部位。（文献 14, 36 を改変）

あり、構造上、SLAM 結合への影響は無いと考えられる。しかし、CD46 と結合する際には立体障害となり得る³⁵⁾。

MV-H の独特な配向とレセプター結合部位

MV-H の結晶構造解析により、そのレセプター結合ドメインの基本骨格は、既に構造が解明されているパラミクソウイルス科の NDV、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型、パラインフルエンザウイルス 5 型 (SV5) のレセプター結合タンパク質 (HN) やインフルエンザウイルスの NA などと同じ 6 つの羽根をもつベータプロペラ構造であることが示された^{7, 14, 23, 43)}。しかし、MV-H はホモ二量体を形成しており、二量体間の配向がそれらとは大きく異なり水平面方向に大きく傾いていることが明らかとなった (図 2)。MV-H 変異体の解析から、SLAM あるいは CD46 と結合するのに重要なアミノ酸残基が同定されている。これらの SLAM や CD46 結合部位は MV-H 単量体の側面から底面に位置するように見えるが、二量体を構成する単量体同士が大きく傾くという戦略的な配向をとることで、実はウイルス粒子の表層に位置すると考えられる (図 3)。そのため、レセプターとの相互作用が容易になると予想される。このような配向には二量体の界面部分に存在する近接した N 結合型糖鎖 (N200) が影響を与えていると考えられる。麻疹ウイルス類縁のモルビリウイルスである Riderpest virus や Canine distemper virus も SLAM をレセプターとして使用するが、MV-H 上の SLAM 結合部位のアミノ酸残基はモルビリウイルスのレセプター結合タンパク質間で強く保存されており、他のモルビリウイルスも SLAM をレセプターとして使用することが強く示唆される。MV-H の推

測される SLAM 結合部位はベータシート 5 のループ領域上に局在しており、その表面電荷は強く負に帯電している。一方、Immunoglobulin superfamily に属する分子であるヒト SLAM は、V と C2 の細胞外ドメインを持っている。これまでの変異導入実験から V ドメインのみで麻疹ウイルス感染には十分であることが示されている^{29, 30)}。SLAM の構造モデルに基づいて推測される MV-H 結合部位は強く正に帯電しており、MV-H と SLAM の結合の原動力は主に静電的な相互作用であると考えられる。最近、Navaratnarajah らにより SLAM との結合に I194 が重要であることが示されているが²⁷⁾、この残基も他の SLAM 結合残基と同じ領域、ベータシート 5 と 6 の界面に局在している。4 つの short consensus repeat ドメインから構成される CD46 は、既に構造が解かれている⁴⁾。変異導入実験から麻疹ウイルス感染に重要なアミノ酸残基はドメイン 1 と 2 に集中していることが示されている^{4, 9, 16, 17, 20, 25)}。その領域との結合に重要な MV-H 上のアミノ酸残基はベータシート 3, 4, 5 に分散しており、モルビリウイルス間で全く保存されていない。

レセプターとの結合力

既に述べたように、SLAM は全ての麻疹ウイルスがレセプターとして利用できるが、CD46 は最初の麻疹ウイルス株として分離された Edmonston 株に由来するワクチン株や一部の実験室株のみがレセプターとして使用する⁴²⁾。構造解析からも、SLAM 結合部位の方が CD46 結合部位よりもレセプターに接近し易い位置にあることが明らかとなった。SLAM と CD46 の間で MV-H との結合力に差があるのか、また、Edmonston 株と野生株における CD46 利用の違

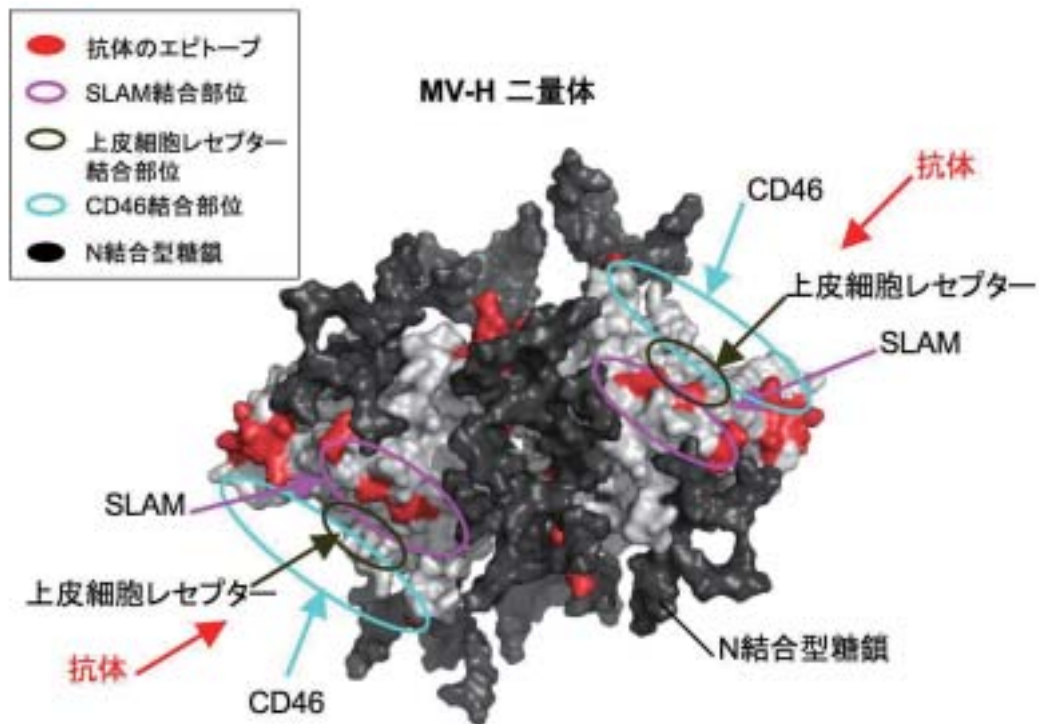


図4 N結合型糖鎖とレセプター結合部位とエピトープの関係

MV-H 二量体を上方から見た図。糖鎖で覆われていない1つの領域に3つのレセプターとの結合部位が集中している。一方、抗体も糖鎖で覆われていない同じ領域に対して集中的に作られている。従って、MV-Hでは抗体の認識部位が限られ、それがレセプター結合部位と重なっていることが構造解析により明らかとなった。マゼンタ：SLAM 結合部位，グレー：上皮細胞レセプター結合部位，シアン：CD46 結合部位，ブラック：N結合型糖鎖，レッド：抗体のエピトープ（17種類）。（文献14を改変）

この分子基盤は何かを明らかにするために、我々は表面プラズモン共鳴を用いた相互作用解析を行った。その結果、Edmonston株MV-HとSLAMの結合力（解離定数， $0.43 \mu\text{M}$ ）はCD46との結合力（ $2.2 \mu\text{M}$ ）よりも一桁強いことが示された。一方、Edmonston株MV-HとIC-B野生株MV-Hの間ではSLAMに対する結合力（それぞれ $0.43 \mu\text{M}$ ， $0.29 \mu\text{M}$ ）に差は見られなかった。しかし、IC-B株MV-HはCD46には全く結合することができなかった¹⁴）。

新たな上皮細胞レセプターの存在

麻疹ウイルスは前述したように免疫系の細胞に特異的に発現するSLAMをレセプターとして感染するが、同様に免疫系の細胞に感染するHIVとは異なり極めて強い空気感染を起こす。両者間のこの違いはどこから来るのだろうか。最近、TakedaらやTaharaらによりその原因として、新たな上皮細胞レセプターの存在が示された^{36, 37}）。肺癌細胞株であるNCI-H358細胞や様々な極性上皮細胞に対する感染実験から、麻疹ウイルスはこの上皮細胞レセプターを使用して細胞侵入を行い、出芽時には選択的にapical面から放出されることが示された。また、MV-Hの構造に基づ

いた変異導入実験により、SLAM結合部位とCD46結合部位の間のモルビリウイルス間で強く保存されている領域に、新たな上皮細胞レセプターに対する結合部位が存在することが示され、芳香族性のアミノ酸であるF483とY541、Y543が重要であることが明らかとなった（図3）。この位置はMV-H二量体上でウイルス粒子表面の先端付近にあり、上皮細胞レセプターとの結合にとって都合が良いと考えられる。また、この領域は高い保存性を示すことから、他のモルビリウイルスもこの上皮細胞レセプターを使用していることが示唆される。今後の課題としては、本レセプターの同定ならびに本レセプターを使えない組換えウイルスをサルやマウスに接種して感染病態への影響を観察することである。こうしたレセプターの使い分けが、麻疹ウイルスとHIVが同じ様なトロピズムや免疫抑制を示しながらも、一方は空気感染を起こし、他方は血液等の接触を介した感染に限られる理由であるかもしれない。

MV-Hの構造とワクチンの有効性

麻疹はワクチンが大成功を取めているウイルス感染症の代表例である。では、その分子基盤は何であろうか。その

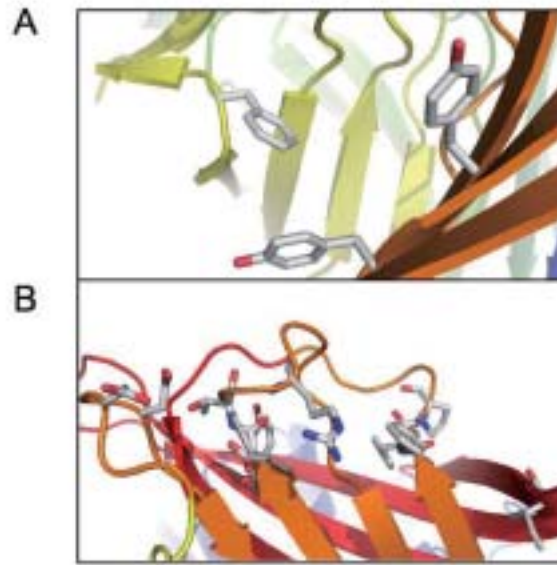


図5 レセプター結合部位のアミノ酸側鎖

(A)上皮細胞レセプターとの結合に重要なアミノ酸側鎖。(B) SLAM との結合に重要なアミノ酸側鎖。上皮細胞レセプター結合部位のアミノ酸側鎖は芳香環を持ち、SLAM 結合部位のアミノ酸側鎖はマイナスの電荷を持つものが集中している。

答えの一つが構造解析から示された¹⁴⁾。MV-H は表面の大部分がN結合型糖鎖によって覆われており(N168, N187, N200, N215), さらに二量体が水平面方向に倒れ込む配向をしているため, ウイルス粒子表面上では限られた一領域だけが大きく露出している。この領域はSLAMや前述した上皮細胞レセプター, CD46といったレセプターに対する結合部位になっている。一方, MV-Hに対する抗体17種類のエピトープマッピングから^{11, 12, 19)}, 同じ領域に抗体エピトープの大部分が存在することが示されている(図4)。また, CD46を介した侵入を阻害する抗体の多くがSLAMを介した侵入も完全ではないにしても阻害することから³²⁾, この糖鎖に覆われていない領域に抗体が結合すると立体障害により他の分子(レセプター)が接近できなくなると考えられる。

インフルエンザウイルスのHAではシアル酸の結合にかかわる重要なアミノ酸は小さなポケット内に局在し, 抗体の選択圧から逃れ, その他の領域を変異させることで迅速にエスケープすることができる^{5, 41)}。また, HIVでは糖鎖が免疫からの回避に利用されており, 抗体のしやすい“おとり”領域まで存在し, 巧みにレセプター結合部位に対する抗体の産生を抑えている³³⁾。しかし, 逆に麻疹ウイルスでは糖鎖の存在により抗体の接近可能部位が露出したレセプター結合部位周辺に制限され, そのために免疫から回避する変異体を容易に作ることができず, 40年以上にもわたり同一系統のワクチン株が世界中の麻疹ウイルスの感染

防御に効果的であり続けていると考えられる¹⁴⁾。

抗ウイルス薬・新規ワクチンの設計開発と今後の展望

麻疹にはワクチンという有効な予防法はあるが, これまでのところ特異的な治療薬は存在しない。細胞侵入の際にレセプターに結合するMV-Hの構造が解明されたことにより, 新規上皮細胞レセプター結合部位(図5A)やSLAM結合部位(図5B)をターゲットとする抗ウイルス薬の設計開発の道が開かれた。これまでの研究から, SLAM結合部位をターゲットにすれば全身への感染防御が可能になると考えられる。新規上皮細胞レセプターも麻疹ウイルスの感染に重要な役割を担っていると考えられ, 両者を組み合わせることでさらに大きな効果が期待される。また, これまで未解明だった麻疹ワクチンの有効性のメカニズムの一端が解明されたことにより, 今後, 糖鎖付加を戦略的に活用することで, HIVやHCVなどワクチン開発が困難な様々な感染症の克服への進展が期待される。

MV-Hの立体構造が明らかになったことで, これまでの知見を集約させて細胞侵入のメカニズムや麻疹ウイルスワクチンの分子基盤に光を当てることができるようになった。今後, MV-Hとレセプター(SLAM, CD46)の複合体やMV-Hと抗MV-H抗体の複合体の構造, Fタンパク質の構造が解明されることにより, 麻疹ウイルスの細胞侵入や免疫系との相互作用に関する詳細なメカニズムがさらに明らかになることが望まれる。

文 献

- 1) Bartz, R., R. Firsching, B. Rima, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol* 79 (Pt 5):1015-25, 1998.
- 2) Bryce, J., C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, and R. E. Black. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365:1147-52, 2005.
- 3) Buckland, R., and T. F. Wild. Is CD46 the receptor for measles virus? *Virus Res.* 48:1-9, 1997.
- 4) Casanovas, J. M., M. Larvie, and T. Stehle. Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *Embo J* 18:2911-22, 1999.
- 5) Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell, and W. Gerhard. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31:417-27, 1982.
- 6) Cocks, B. G., C.-C. J. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263, 1995.
- 7) Crennell, S., T. Takimoto, A. Portner, and G. Taylor. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol* 7:1068-74, 2000.
- 8) de Swart, R. L., M. Ludlow, L. de Witte, Y. Yanagi, G. van Amerongen, S. McQuaid, S. Yuksel, T. B. Geijtenbeek, W. P. Duprex, and A. D. Osterhaus. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3:e178, 2007.
- 9) Devaux, P., B. Loveland, D. Christiansen, J. Milland, and D. Gerlier. Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol* 77:1477-81, 1996.
- 10) Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75:295-305, 1993.
- 11) Ertl, O. T., D. C. Wenz, F. B. Bouche, G. A. Berbers, and C. P. Muller. Immunodominant domains of the Measles virus hemagglutinin protein eliciting a neutralizing human B cell response. *Arch Virol* 148:2195-206, 2003.
- 12) Fournier, P., N. H. Brons, G. A. Berbers, K. H. Wiesmuller, B. T. Fleckenstein, F. Schneider, G. Jung, and C. P. Muller. Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *J Gen Virol* 78:1295-302, 1997.
- 13) Griffin, D. E. Measles virus., p. p1551-1585. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
- 14) Hashiguchi, T., M. Kajikawa, N. Maita, M. Takeda, K. Kuroki, K. Sasaki, D. Kohda, Y. Yanagi, and K. Maenaka. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19535-40, 2007.
- 15) Hashiguchi, T., M. Kajikawa, N. Maita, M. Takeda, K. Kuroki, K. Sasaki, D. Kohda, Y. Yanagi, and K. Maenaka. Homogeneous sugar modification improves crystallization of measles virus hemagglutinin. *J Virol Methods* 149:171-4, 2008.
- 16) Hsu, E. C., R. E. Dorig, F. Sarangi, A. Marcil, C. Iorio, and C. D. Richardson. Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J. Virol* 71:6144-6154, 1997.
- 17) Hsu, E. C., S. Sabatinos, F. J. Hoedemaeker, D. R. Rose, and C. D. Richardson. Use of site-specific mutagenesis and monoclonal antibodies to map regions of CD46 that interact with measles virus H protein. *Virology* 258:314-26, 1999.
- 18) Hsu, E. C., F. Sarangi, C. Iorio, M. S. Sidhu, S. A. Udem, D. L. Dillehay, W. Xu, P. A. Rota, W. J. Bellini, and C. D. Richardson. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* 72:2905-2916, 1998.
- 19) Hu, A., H. Sheshberadaran, E. Norrby, and J. Kovamees. Molecular characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin protein. *Virology* 192:351-4, 1993.
- 20) Iwata, K., T. Seya, Y. Yanagi, J. M. Pesando, P. M. Johnson, M. Okabe, S. Ueda, H. Ariga, and S. Nagasawa. Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J. Biol. Chem.* 270:15148-15152, 1995.
- 21) Kobune, F., H. Sakata, and A. Sugiura. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.* 64:700-705, 1990.
- 22) Langedijk, J. P., F. J. Daus, and J. T. van Oirschot. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol* 71:6155-67, 1997.
- 23) Lawrence, M. C., N. A. Borg, V. A. Streltsov, P. A. Pilling, V. C. Epa, J. N. Varghese, J. L. McKimm-Breschkin, and P. M. Colman. Structure of the haemagglutinin-neuraminidase from human parainfluenza virus type III. *J Mol Biol* 335:1343-57, 2004.
- 24) Lecouturier, V., J. Fayolle, M. Caballero, J. Carabana, M. L. Celma, R. Fernandez-Munoz, T. F. Wild, and R. Buckland. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J. Virol.* 70:4200-4204, 1996.
- 25) Manchester, M., A. Valsamakis, R. Kaufman, M. K. Liszewski, J. Alvarez, J. K. Atkinson, D. M. Lublin, and M. B. A. Oldstone. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein(CD46).

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2303-2307, 1995.
- 26) Naniche, D., G. Variator-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67:6025-6032, 1993.
 - 27) Navaratnarajah, C. K., S. Vongpunsawad, N. Oezguen, T. Stehle, W. Braun, T. Hashiguchi, K. Maenaka, Y. Yanagi, and R. Cattaneo. Dynamic interaction of the measles virus hemagglutinin with its receptor SLAM. *J Biol Chem* 283:11763-71, 2008.
 - 28) Ohno, S., N. Ono, F. Seki, M. Takeda, S. Kura, T. Tsuzuki, and Y. Yanagi. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol* 81:1650-9, 2007.
 - 29) Ohno, S., F. Seki, N. Ono, and Y. Yanagi. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J Gen Virol* 84:2381-8, 2003.
 - 30) Ono, N., H. Tatsuo, K. Tanaka, H. Minagawa, and Y. Yanagi. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J. Virol.* 75:1594-1600, 2001.
 - 31) Reeves, P. J., N. Callewaert, R. Contreras, and H. G. Khorana. Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13419-24, 2002.
 - 32) Santibanez, S., S. Niewiesk, A. Heider, J. Schneider-Schaulies, G. A. Berbers, A. Zimmermann, A. Halenius, A. Wolbert, I. Deitemeier, A. Tischer, and H. Hengel. Probing neutralizing-antibody responses against emerging measles viruses (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? *J Gen Virol* 86:365-74, 2005.
 - 33) Scanlan, C. N., J. Offer, N. Zitzmann, and R. A. Dwek. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* 446:1038-45, 2007.
 - 34) Schneider-Schaulies, J., J.-J. Schnorr, U. Brinckmann, L. M. Dunster, K. Baczkko, U. G. Liebert, S. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3943-3947, 1995.
 - 35) Tahara, M., M. Takeda, F. Seki, T. Hashiguchi, and Y. Yanagi. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol* 81:2564-72, 2007.
 - 36) Tahara, M., M. Takeda, Y. Shirogane, T. Hashiguchi, S. Ohno, and Y. Yanagi. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol* 82:4630-7, 2008.
 - 37) Takeda, M., M. Tahara, T. Hashiguchi, T. A. Sato, F. Jinnouchi, S. Ueki, S. Ohno, and Y. Yanagi. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* 81:12091-6, 2007.
 - 38) Tanaka, K., M. Xie, and Y. Yanagi. The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Arch. Virol.* 143:213-225, 1998.
 - 39) Tatsuo, H., K. Okuma, K. Tanaka, N. Ono, H. Minagawa, A. Takade, Y. Matsuura, and Y. Yanagi. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.* 74:4139-4145, 2000.
 - 40) Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897, 2000.
 - 41) Wiley, D. C., I. A. Wilson, and J. J. Skehel. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289:373-8, 1981.
 - 42) Yanagi, Y., M. Takeda, and S. Ohno. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87:2767-79, 2006.
 - 43) Yuan, P., T. B. Thompson, B. A. Wurzburg, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure* 13:803-15, 2005.
 - 44) Zaitsev, V., M. von Itzstein, D. Groves, M. Kiefel, T. Takimoto, A. Portner, and G. Taylor. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion. *J Virol* 78:3733-41, 2004.

X-ray crystallographic analysis of measles virus hemagglutinin

Takao HASHIGUCHI¹, Katsumi MAENAKA², Yusuke YANAGI¹

¹ Department of Virology, Faculty of Medicine,

² Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

X-ray crystallographic analyses, together with nuclear magnetic resonance, have revealed three-dimensional structures of many important viral proteins, thereby allowing us to better understand the interactions between viral and host cell molecules. In this review, we summarize the recently determined crystal structure of the measles virus (MV) attachment protein hemagglutinin. Based on this structural information, we also discuss how the MV hemagglutinin interacts with various cellular receptors and why MV vaccines have been effective for many years without inducing escape mutant viruses. Other topics discussed are a putative MV receptor present on polarized epithelial cells and the protein expression system using a cultured human cell line 293SGnTI(-), which is suitable for X-ray crystallographic analyses.

