

# C 型肝炎ウイルスに結合する 4 回膜貫通型レセプター CD81 の細胞外ドメインの結晶構造

京都大学大学院理学研究科附属機器分析センター

北所 健悟

## Crystal structure of the human CD81 extracellular domain, a four transmembrane receptor for Hepatitis C Virus.

**Kengo Kitadokoro<sup>1,2</sup>, Domenico Bordo<sup>1,3</sup>, Giuliano Galli<sup>4</sup>, Roberto Petracca<sup>4</sup>,  
Fabiana Falugi<sup>4</sup>, Sergio Abrignani<sup>4</sup>, Guido Grandi<sup>4</sup> and Martino Bolognesi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Physics - INFN and Advanced Biotechnology Center,  
University of Genoa, Via Dodecaneso, 33. I-16146 Genova (Italy).

<sup>2</sup> Research Center for Instrumental Analysis, Graduate School of Science,  
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 (Japan).

<sup>3</sup>National Institute for Cancer Research c/o Advanced Biotechnology  
Center, Largo Rosanna Benzi, 10. I-16132 Genova (Italy)

<sup>4</sup> Chiron Vaccines Research Center, Via Fiorentina, 1 53100 Siena (Italy)

Human CD81, which is belonged to tetraspanin family, has been previously identified as a receptor for the hepatitis C virus envelope E2 glycoprotein. The crystal structure of the human CD81 long extracellular domain, binding site for E2 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 CD81-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 is essential for the E2 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 E2 glycoprotein.

We proposed that the dimer structure may be important in the interactions of HCV E2 glycoprotein

and also the viral protein may occur in dimeric aggregation on the HCV envelope. This common structural motifs 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.

## はじめに

C 型肝炎は世界の人口の約 3%にあたる 1 億 7 千人もの人々に感染するウイルス性の病気  
で(1)、日本においてもそのキャリアは 200 万人とも 300 万人とも言われている。このウイルスによる肝炎の 7 割から 8 割は慢性化し、肝硬変、肝臓などの肝臓における主たる病気となっている(2)。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およそ 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)は黄熱病ウイルスに代表されるフラビウイルスの一種に分類され、約 9600 塩基からなる(+)鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つ(3)。その存在は以前より知られており、塩基配列は 1989 年に Choo らによって決定されている(4)。種々の生化学的実験や分子生物学により、その予想されるウイルス遺伝子産物の性質が明らかとなっているが、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* でのウイルスの培養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。

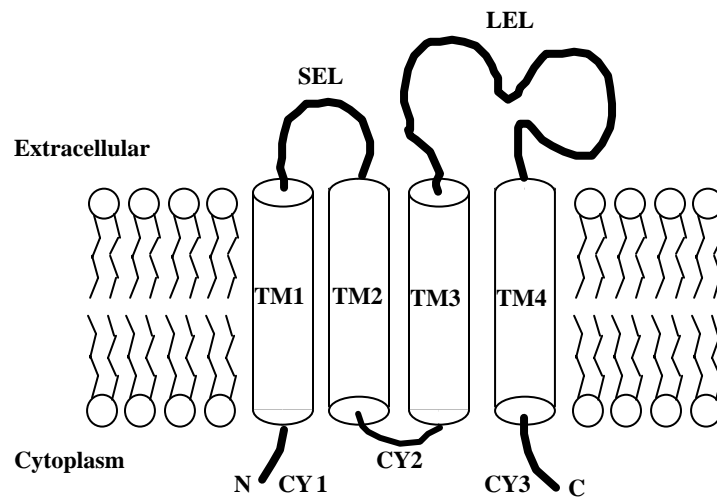


図 1. 4 回膜蛋白質レセプター Tetraspanin ファミリーの模式図。

しかしながら最近、イタリア Chiron 社の Pileri らは HCV のエンベロープ糖蛋白質 (E2) がヒトの細胞表面抗原レセプターである 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 (5)。CD81 は Tetraspanin family に属する細胞表面の抗原性レセプターの一つであり、がん細胞の成長や増殖に関する抗原として発見され、種々の免疫応答に関する重要な役割を担っている (6)。CD81 分子は 236 個のアミノ酸からなる 4 回膜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)。このうち本研究で対象とする CD81 分子の細胞外ドメインのひとつである LEL (Large Extracellular Loop) ドメインは 91 個のアミノ酸からなり、他の 160 種類の Tetraspanin レセプターと同様に 2 つのジスルフィド結合を有する (図 2)。他方、HCV ウイルスのエンベロープ糖蛋白質 E2 は、分子量 55 k Da からなる糖蛋白質であり、この糖蛋白質が CD81 の LEL ドメインと結合して C 型肝炎を引き起こすことが示唆されている (5)。

この CD81 並びに他の Tetraspanin family 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 エンベロープ糖蛋白質である 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。最近我々は、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、この結果ウイルス感染に直接関与する CD81 分子のウイルス蛋白質結合部位を詳細に検討することができた (7) のでここで報告する。

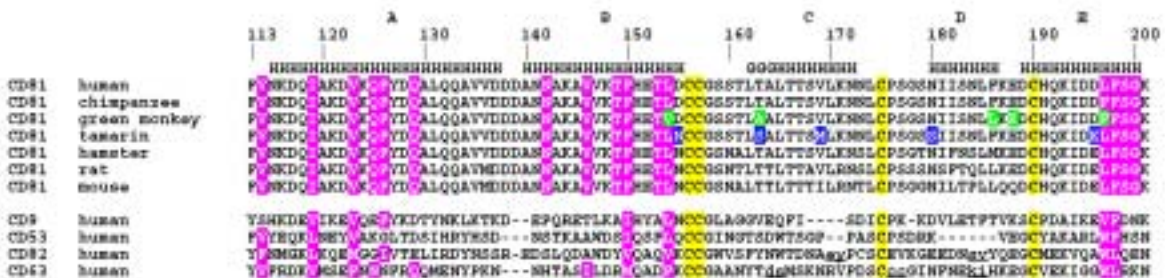


図 2. Tetraspanin ファミリーの LEL ドメインのアミノ酸配列の比較。  
2 次構造は PROCHECK より算出した。H は  $\alpha$ ヘリックス、G は 310ヘリックスである。赤は相互作用に関わる残基で、黄色は保持されている Cys 残基。ヒトの CD81-LEL とアフリカミドリザル (green monkey) 並びにタマリン (tamarin) と異なる残基はそれぞれ緑と青で示しているが、163 番のアミノ酸はどちらも違っている。また省略した insertion は次の通りである。CD82, gLSVKEGFCAPFKTKTQSGNHFHWFY; CD83, gNEKIP; gINWVG; 及び hAI。

## 実験と方法

CD81 の LEL ドメイン部分については、大腸菌において GST 融合蛋白質などで当初発現していたが、最終的に蛋白質結晶化を行うための純度の高い系として ProteinA とその抗体である IgG セファロースカラム (8) を用いたシステムが構築された (9)。IgG 結合性蛋白質である ProteinA の C 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 His-tag を付け加えることで精製能を上げ、非常に純度の高い目的蛋白質を効率良く得ることができた。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、1 L 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もう一度、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 カラムに通す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、ゲルろ過処理することで凝集蛋白質を取り除くことができた。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、容易に結晶を得ることができた。

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。この結晶は空間群が  $P2_1$ 、 $a = 31.5$  ,  $b = 77.2$  ,  $c = 38.5$  ,  $\beta = 107.4^\circ$  であり、Grenoble にある放射光施設 ESRF において 1.6 分解能のデータ測定を可能にした (9)。この蛋白質はメチオニンを有していなかったため、構造解析は重原子多重同型置換法で行った。当初有効な重原子誘導體として酢酸ウラニルを得たが、その後 2 つめの有効なデリバティブ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、その過程でウラニルと同一のサイトで、より有効なものとしてルテチウム誘導體を見出した。ルテチウム誘導體の MAD 法による解析も試みたが、結果的にはこれらルテチウム誘導體データと水銀誘導體、白金誘導體、サマリウム誘導體などを用いて、SHARP/SOLOMON で位相の精密化を行い、モデリング可能な電子密度を得る事ができた。この際、種々の誘導體データの組み合わせと溶媒含量の組み合わせを考慮して位相を計算し、得られた電子密度を MAPMAN などでスケルトナイズし、O を用いて得られた様々な電子密度と Bones をチェックした。DM での Averaging も行ったが、結果的には SHARP/SOLOMON の電子密度の方がより解釈しやすいものであり、それぞれの 2 量体分子の 80% 程度をトレースすることができた。その後、位相改良などを行い、CNS ならびに REFMAC を使って精密化を行った結果、20 - 1.6 分解能の全反射を用いて、 $R = 18.7\%$ 、 $R\text{-free} = 23.8\%$  のモデルを得ることができた。

### CD81-LEL の立体構造

CD81-LEL は結晶内において非対称単位中に 2 量体として存在し、立体構造的にヘテロなダイマー構造を形成していた(図 3)。この蛋白質は以前より Large Extracellular loop と呼ばれ、その二次構造はループ構造をとっていると予測されていた。しかしながら、各々のサブユニットは 5 本の  $\alpha$ -ヘリックス (A E および A' E') とそれをつなぐループ部分で構成され、"stalk" サブドメインと "head" サブドメインからなるいわゆる "mushroom-like" の立体構造をとっていた (図 3, 4)(7)。

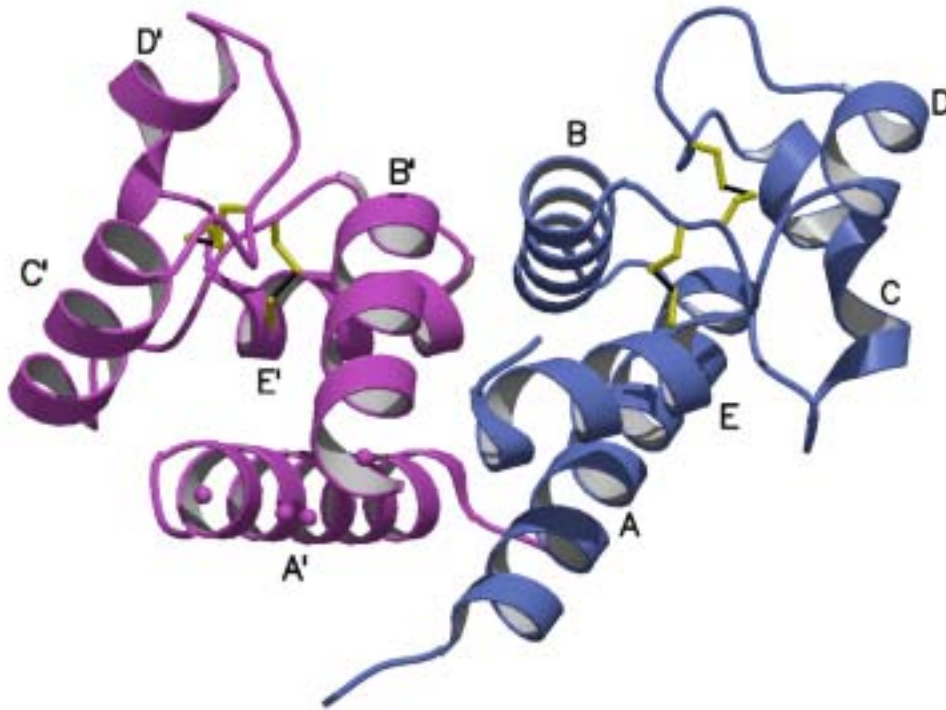


図 3 . CD81-LEL のダイマー構造。活性型コンフォメーションは青色、不活性型はピンクで示してある。黄色は S-S 結合を示している。Disorder している 3 残基は推定される位置をドットで示してある。図は Molscrip を Raster3D で Render している。

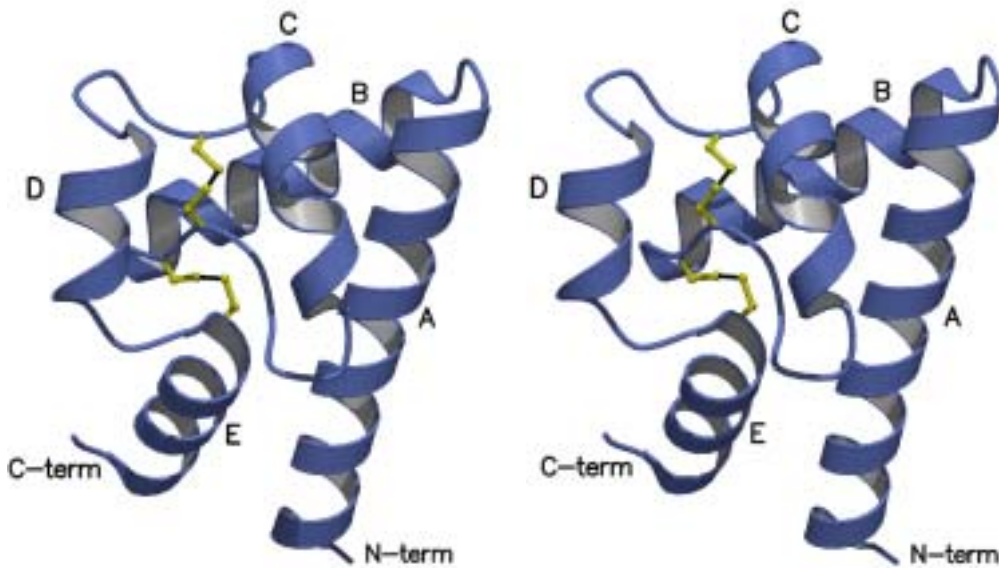


図 4・CD81-LEL モノマーのステレオ図。

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。

この立体構造は全く新規なものであり、DARI などのデータベースでその類似性を調べたが良く似た構造を持つものは特に検出されなかった。結晶内においてヘテロな立体構造をとった理由としては、ESRF などの強いビームを用いた結果、100K であってもラジカルが発生し、S-S 結合が切断された可能性がある (10)。1.6 分解能での電子密度には、ダイマー中の 4 つの S-S 結合の内、ひとつの S-S 結合がゆらぎ、二つの可能なコンフォメーションを取っていることが観察できた。生化学的データでは S-S 結合が HCV の E2 蛋白質と結合するのに必須であることが分かっており (11)、今回の解析により、2 量体の内の一方が活性型コンフォメーションをとり、もう他方が不活性型なコンフォメーションをとっていると考えられる。この隣り合った 2 つ S-S 結合は、stalk サブドメインと head サブドメインをつなぐ部分に位置しており (図 4) とりわけダイマー間では head サブドメイン (C ヘリックスと D ヘリックスの領域) の立体構造が異なっていた。また A' - ヘリックスと B' ヘリックスを結ぶループ部分の 3 残基の電子密度は disorder していた (図 3)。

## HCV の結合に關与する疎水性クラスター

Stalk サブドメインはダイマー間で主として A と E のヘリックスの疎水性の相互作用でその構造が保持されており、また Lys124 Asp195、並びに Asp128 - His191 という 2 つのイオン架橋により構造が安定化されていた。この 2 つのイオン結合に関わるアミノ酸残基は様々な種の CD81-LEL で保持されており ( 図 2 )、CD81-LEL の立体構造を形成する上で重要な残基であると考えられる。図 4 で示している様に、N 末端と C 末端のヘリックス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 にそれぞれつながっていると考えられる。一方 head サブドメインは、B、C、および D のヘリックスとそれらを結ぶループ部分からなり、生体内においてこの領域は細胞の表面に露出した形で存在していると仮定される。

全体的に、CD81-LEL 分子は非常に疎水性領域が多く ( 図 5 )、これが重原子の結合サイトを見つけ出しにくかった理由のひとつでもあると考えられる。おおまかに分けると分子内には 2 つの大きな疎水性クラスターが存在し、この蛋白質を考える上で機能的に重要な役割を果たしていた。1 つめは stalk サブドメイン間に存在して、ダイマー構造を形成するために必要で、ローカルな 2 回軸で関係付けられる疎水性クラスターである。これは主として A ヘリックスと A' ヘリックスの間、並びに C 末端側の疎水性残基同士 ( Val114, Ile119, Val123, Phe126, Leu197, Phe198 ) の相互作用からなる。一次構造で示している様に ( 図 2 )、これらの疎水性残基は、CD81-LEL のみならず他の Tetraspanin ファミリーにおいてもよく保持されており、このことは他の Tetraspanin ファミリーも分子が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溶媒領域側に突き出た形で存在する C および D ヘリックスの領域で構成されており ( 図 5 )、結晶内では他の対称な分子との疎水性相互作用によってパッキングしていた。この疎水性クラスターは非常に特異的で、溶媒部分にこのような疎水性領域が存在することはエネルギー的に好ましくなく、自然界ではミューテーション等の淘汰が起こる傾向にある。しかしながら、この疎水性クラスターを形成する残基 ( Ile181, Ile182, Leu185, Phe186 ) 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 )。この極めて特異な立体構造上の特徴を考慮すると、この疎水性クラスターが他の分子と相互作用する領域である可能性を示唆している。



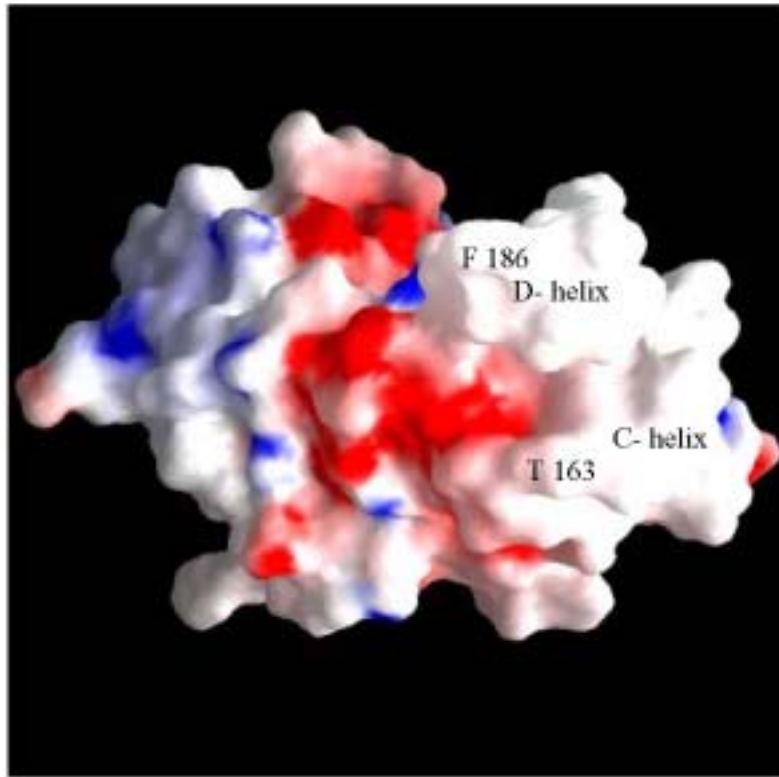


図5. GraspによるCD81-LELの分子表面。疎水性クラスターを形成しているC-およびD-ヘリックスと、溶媒に突出しているPhe186並びにThr163の残基を示している。

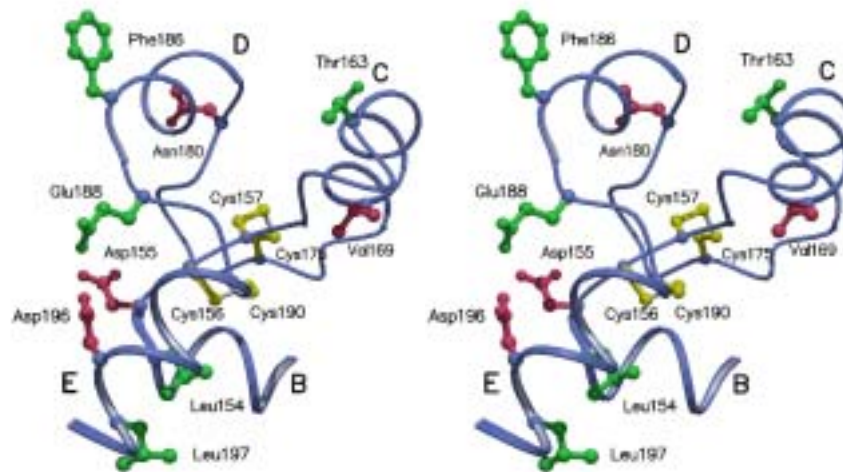


図6. ヒトCD81-LELにおいてアフリカミドリザル並びにタマリンが変異しているアミノ酸残基。緑はAGM、赤はTAMが変異している残基で、黄色はS-S結合を示す。



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關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 エンベロープ糖蛋白質との結合に關わる重要なアミノ酸残基が同定された(12)。ヒトとチンパンジーの CD81-LEL は E2 に結合し、HCV に感染する(5)。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(13)。一方、Tamarin というサル (TAM) 由来の CD81-LEL は E2 に結合し、しかしながら HCV には感染しないことが明らかとなった(13)。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(12)。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 においては 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 6 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 エンベロープ糖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(図 7)、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關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。

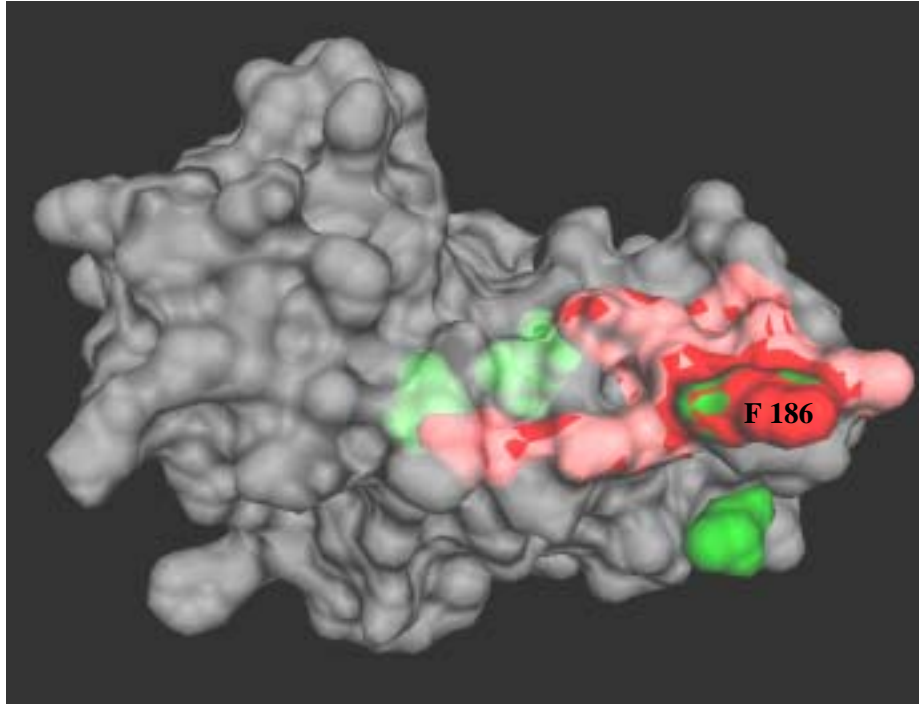


図7. プログラム Dino による CD81-LEL の分子表面。緑で示したのはヒト CD81-LEL においてアフリカミドリザルで変異しているアミノ酸残基。赤は溶媒領域に突出して存在する疎水性クラスターを示している。Phe186 が突き出しているのがよくわかる。

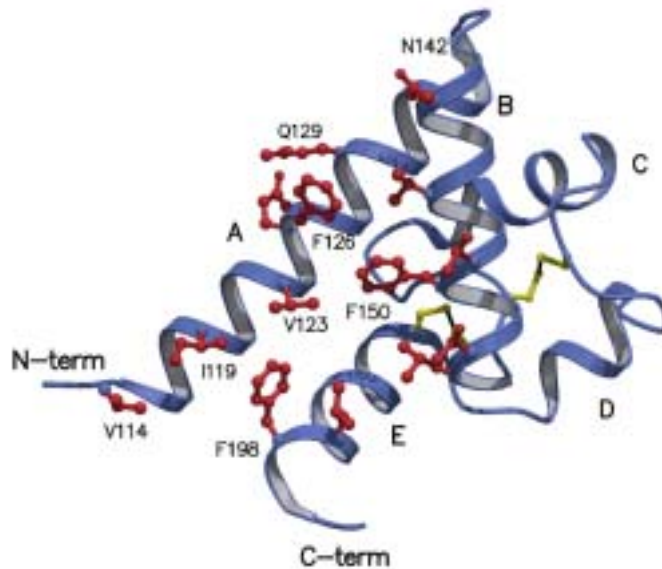


図8. ダイマー形成に関わる疎水性インターフェース。  
疎水性クラスターに重要と考えられるアミノ酸を赤色でハイライトしている。

#### 4 回膜貫通型蛋白質 Tetraspanin ファミリーの共通の構造モチーフ

Tetraspanin は当初、がん細胞の成長増殖に関わる抗原として見出されたが(14)、その後の研究により、生体内において細胞の接着、増殖、活性化、遊走などをコントロールする重要な蛋白質群であることがわかってきている(6, 15)。特にこの Tetraspanin ファミリーのうち CD81 と非常に構造的に近い蛋白質である CD9 は、受精に関わる重要な蛋白質であることが見出された。CD9 は最初、ジフテリア毒素レセプターの関連蛋白質として見いだされた蛋白質であるが(16)、昨年 CD9 のノックアウトマウスを使った実験で、CD9 を持たない雌が不妊になることが発表された(17, 18)。このことにより、CD9 が生体内において、受精における重要な役割を果たして、精子の認識に関わるレセプターであることが示唆されている。また他方、CD82 は CD81 とは進化的には一番離れた位置にあると推定されるが、最近、白血病の原因となるヒト T リンパ球向性ウイルス 1 (human T lymphotropic virus 1, ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 human T cell leukemia virus type 1, HTLV-1) のエンベローブ糖蛋白質が、この CD82 に結合することが見出され、その感染との関わりが示唆されている(19)。

この様に Tetraspanin ファミリー蛋白質群の生体内における役割や重要性が次々と明らかになりつつある。今回我々の構造決定により、はじめてこのファミリーの三次元構造が明らかになったが、この CD81 の LEL ドメインの構造的モチーフについては、他の Tetraspanin ファミリーにおいても共通となるモチーフである可能性が示唆される。図 2 のアミノ酸配列でも明らかな様に、stalk サブドメインと C 末端ヘリックスにおいて、ダイマー構造の形成に関わる疎水性アミノ酸残基は、Tetraspanin ファミリー間で非常によく保持されており、しかも立体構造においては、これらの疎水性残基の側鎖も溶媒側に突出して存在し、ダイマーが形成されることにより構造が安定化されている(図 8)。このことは他の Tetraspanin ファミリーにおいても、その立体構造が二量体を形成している可能性を示唆している。更に、生体内において Tetraspanin ファミリーが、ホモなダイマーだけでなく、互いに異なる種類の Tetraspanin 同士のヘテロなダイマーを形成している可能性を示唆している(7)。最近の新しい研究により、CD81 が CD9 と互いに相互作用し、またこの両者に関わる Molecular Partner の存在が発見されている(20)。また、CD81 がインテグリンの  $\alpha 4 \beta 1$  とコンプレックスを形成していることなどが発見されている(21, 22)。この際、これらの分子を認識する領域は、前述の head サブドメインの溶媒側に突き出た疎水性クラスターであると考えられる。この様な Tetraspanin ファミリーとそれに関わる蛋白質分子の集合体は、細胞表面上において Tetraspan-Web と呼ばれる多数の蛋白質間のネットワークを構築していると考えられている(7, 23)。HCV や HTLV-1

などのウイルスが感染する際や受精などの様々な現象も、この蛋白質集合体の Web サイトを通じて、細胞外ドメイン (LEL) で認識され、細胞質側に何らかのシグナルが伝達されるものであると考えられる (7)。

## おわりに

今回、C 型肝炎ウイルスの結合レセプターと考えられる CD81 の LEL ドメインの立体構造を明らかにしたことにより、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と考えられる。この結晶構造によって、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可能性が広がるとともに、この構造が他の重要な Tetraspanin 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であると考えられる。

最後に本研究は筆者がイタリアジェノバ大学で留学中に行ったものであり、公私共にご援助頂いたラボのメンバーに感謝します。またデータ測定の際にお世話になりました Grenoble の放射光施設 ESRF の ID14 の方々並びに Hamburg の EMBL/DESY の方々に感謝します。

## 参考文献

1. World Health Organization, (1997) *Weekly Epidemiol. Rec.* **72**, 65
2. Hoofnagle, J. H. (1997) *Hepatology* **26** (suppl. 1), 15S.
3. Houghton, M. (1996) in *Virology*, Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA), 1035-1058.
4. Choo, Q. L., *et al.*, (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-62
5. Pileri, P., *et al.* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938-941.
6. 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.
7. Kitadokoro K., *et al.* (2001) CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.*, **20**,12-8.
8. Nilsson, B., *et al.* (1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng.*, **1**, 107-113
9. Kitadokoro, K., *et al.* (2001) **Crystallization and preliminary crystallographic**

**studies on the large extracellular domain of human CD81, a tetraspanin receptor for Hepatitis C Virus. *Acta Crystallogr. D* **57**, 156-8.**

10. Ravelli, R. B., McSweeney, S. M. (2000) The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures. *Structure Fold Des*, **8**, 315-28.
11. Petracca, R., *et al.* (2000) Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J. Virol.*, **74**, 4824-4830.
12. Higginbottom, A., *et al.* (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J. Virol.*, **74**, 3642-3649.
13. Meola, A., *et al.* (2000) Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J. Virol.*, **74**, 5933-5938.
14. Hotta, H., *et al.* (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* **48**, 2955-62
15. Maecker, H. T., Todd, S. C. and Levy, S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.*, **11**, 428-442.
16. Iwamoto R., *et al.* (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.*, **13**, 2322-30.
17. Miyado K., *et al.* (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321-4.
18. Le Naour F, *et al.* (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, **287**, 319-21.
19. Pique C, *et al.* (2000) Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology*, **276**, 455-65
20. Charrin S, *et al.* (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14329-37
21. Hemler, M. E. (1998) Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**, 578-585.
22. Serru, V., *et al.* (1999) Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem. J.*, **340**, 103-111.
23. Rubinstein E., *et al.* (1996) CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 2657-2665.