

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25711010

研究課題名(和文)細胞死を検出する自然免疫システムの低温電子顕微鏡法による構造生物学的基盤研究

研究課題名(英文)Structural analysis of the complex of F-actin and DNGR-1 by CryoEM.

## 研究代表者

藤井 高志 (FUJII, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・招へい研究員

研究者番号：10582611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系は細胞の健康状態をつねに監視し、傷ついた細胞を検出し除去する分子機構を進化させてきた。樹状細胞にある受容体DNGR-1は、細胞骨格を構成するアクチン繊維をリガンドとして認識することにより傷ついた細胞を検出し、そののちの一連の免疫応答をひき起こし傷ついた細胞を除去する。クライオ電顕単粒子解析法による高分解能の構造解析と変異体の解析とを組み合わせることにより、DNGR-1によるアクチン繊維の検出の機構が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：DNGR-1 is a C-type lectin receptor that binds F-actin exposed by dying cells and facilitates cross-presentation of dead cell-associated antigens by dendritic cells. We revealed the structure of DNGR-1 bound to F-actin at 7.7 angstrom resolution by CryoEM. The DNGR-1 ligand binding domain contacts three actin subunits helically arranged in the actin filament, bridging over two protofilaments. Mutation of residues predicted to mediate ligand binding led to loss of DNGR-1-dependent cross-presentation of dead cell-associated antigens, formally demonstrating that the latter depends on F-actin recognition. DNGR-1 has relatively modest affinity for F-actin but multivalent interactions allow a marked increase in binding strength. Our findings shed light on modes of actin binding by cellular proteins and reveal how extracellular detection of cytoskeletal components by dedicated receptors allows immune monitoring of loss of cellular integrity.

研究分野：生物物理

キーワード：クライオ電子顕微鏡 アクチン繊維 DNGR-1 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系は外敵を認識し排除する分子機構だけでなく、細胞の健康状態をつねに監視し傷ついた細胞を検出し除去する分子機構を進化させてきた。たとえば、けがなど組織の物理的な損傷の際に、患部にある破壊された細胞は食細胞により早急に除去され組織の修復がはじまる。このように、細胞の損傷や死はその場で“何かよからぬこと”の起っているサインであり、損傷を封じ込め組織を修復するためすばやい免疫応答はきわめて重要である。昨今、損傷をうけた組織から生じる種々の分子のパターンである損傷関連分子パターン (damage-associated molecular pattern: DAMP) を認識し応答する分子機構はホットなトピックになっている。しかしながら、この傷ついた細胞の認識、および、そののちの一連の免疫応答についてはこれまでほとんど明らかにされていない。とくに、どんな分子を認識してその細胞を傷つけていると判定しているのかについては不明であった。そんななか、樹状細胞にある受容体 DNGR-1 が細胞骨格を構成するアクチン繊維をリガンドとして認識し (単量体アクチンは認識しない)、この一連の免疫応答をひき起こしていることが明らかにされた。また、同じ時期に、DNGR-1 の細胞外ドメインの X 線結晶構造が明らかにされた。

DNGR-1 はジスルフィド結合を介したホモ二量体として存在する膜タンパク質であり、C 型レクチンファミリーに属する。細胞外ドメインに C 型レクチン様ドメインを 1 つのもち、これによりリガンドと結合すると考えられている。しかし、実際にアクチン繊維と DNGR-1 とがどのように結合し、そのシグナルが樹状細胞に伝達されているのかは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

上述したとおり、樹状細胞上にある DNGR-1 受容体は細胞骨格を構成するアクチン繊維

をリガンドとして認識し、“傷ついた”細胞を検出する。これにより、免疫システムは外敵から身を守るだけでなく、細胞の健康状態を常時監視し“傷ついた”細胞を検出し除去する。この免疫システムの原子レベルでのメカニズムを明らかにするために、クライオ電顕単粒子解析法によりアクチン繊維・DNGR-1 複合体の高分解能構造解析を行い、その原子レベルでの相互作用様式を調べた。

## 3. 研究の方法

ヒトのアクチンを重合して繊維化し、精製したマウスの DNGR-1 と混合することにより複合体を作製した。クライオ電子顕微鏡法により高分解能のデータを収集するため、これまでの経験をもとに氷の包埋の条件を幅広く検討することにより、複合体の形成率および薄い氷を作成できる条件を見出すことができた。DNGR-1 は溶液において二量体を形成しており、アクチン繊維と結合したとき、二量体のもう片方の DNGR-1 がほかのアクチン繊維と結合してバンドル化することが懸念されたが、繊維は単分散しておりバンドル状の凝集体は形成されていなかった。これは、DNGR-1 二量体はひとつの繊維に結合していることを示唆した。DNGR-1 二量体の結合ドメインのあいだの距離は概算して 5.4 nm 以上はあり、ひとつの繊維に対し DNGR-1 二量体の結合ドメインが直列に結合することは十分に可能であった。この単分散した繊維をクライオ電子顕微鏡法により観察することにより大量の画像データを取得した。らせん対称性を用いて、7.7 Å の分解能で DNGR-1 とアクチン繊維の複合体の構造を再構成することができた (PDB ID: 3J82)。アクチン繊維は 2 本の素繊維がリボンのようからみあった構造をしていたが、DNGR-1 はその 2 本の素繊維のあいだにはまり込むように結合していた。つまり、DNGR-1 はアクチン繊維を構成する複数のアクチンサブユニットと相互作用することにより安定な複合体を形成して

いた。この事実から、DNGR-1はアクチンと安定な複合体を形成する際に、アクチン繊維とのみ結合しアクチンサブユニットとは結合しないというこれまでの知見が構造生物学的に証明された。

クライオ電子顕微鏡法により得られた構造からDNGR-1のアクチン繊維に対する結合部位を予測し、実際に結合にかかわりそうなアミノ酸残基をAlaに置換することによりそれぞれのアミノ酸残基の役割を同定した。

DNGR-1は3つのアクチンサブユニットと相互作用しており、19個のアミノ酸残基がアクチン繊維に対する結合部位の候補になった。ドットプロット実験によりDNGR-1のアクチン繊維に対する結合能を調べたところ、Trp141、Glu153、Trp155、Trp250をAlaに置換するとアクチン繊維との結合能が失われた。また、HeLa細胞に紫外線を照射することにより死細胞とし、蛍光セルソーターを用いて死細胞および蛍光色素で標識したDNGR-1を検出することにより、DNGR-1に結合した死細胞を検出した。この実験の結果もドットプロット実験の結果と一致し、Trp141、Glu153、Trp155、Trp250をAlaに置換するとDNGR-1の死細胞に対する結合能が失われた。

#### 4. 研究成果

アクチン繊維は細胞形態の維持および変形を担う細胞骨格としての役割だけでなく、多種多様なタンパク質と相互作用し細胞内相互作用ネットワークのハブともいえる役割も担う。たとえば、細胞における物質輸送に使われるミオシンはその代表的なものである。これまでに、ミオシン、コフィリン、ピンキュリン、フィンプリリン、Arp2/3、SipA、コロニンについては、精度の差こそあれ、アクチンにおける結合部位が明らかにされている。その多くはアクチンのストランドに存在し、2つのストランドを架橋するようには存在していない。また、ストランドを架橋するように結合しているSipA、コロニン、

Arp2/3は、比較的広い範囲にわたり4つ以上のアクチンサブユニットと結合していることが示唆されている。しかしながら、サブナノメートルの分解能で構造が明らかにされているのはミオシン、コフィリン、コロニンのみで、アクチンとの結合の様式が高い分解能で調べられているタンパク質は少ないため、はっきりしたことは依然として不明である。

一方で、DNGR-1は、ほぼ4つのアミノ酸残基がアクチンとの結合に決定的な役割を担っていた。そのため、アクチン繊維のねじれの変化など、力学的変化に対してその結合力が大きく左右されることが予想された。また、アクチンにおけるDNGR-1との結合部位はユビキチン化、リン酸化、ニトロ化など翻訳後修飾の起こりやすい部位であることが指摘されている。細胞の代謝や細胞死の途上においてアクチン結合タンパク質や翻訳後修飾によりアクチン繊維の構造が変化し、DNGR-1との結合能が変化することは十分に起こりうる。その結果、死細胞に対する免疫応答が制御されている可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- (1) Nishimura, M.\*, Fujii, T.\*, Hiyoshi, H., Makino, F., Inoue, H., Motooka, D., Kodama, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Namba, K., Iida, T. "A repeat unit of Vibrio diarrheal T3S effector subverts cytoskeletal actin homeostasis via binding to interstrand region of actin filaments." *Sci. Reports*, 5, 10870, (2015) \*Co-first author 査読有り
- (2) Hanč, P.\*, Fujii, T.\*, Iborra, S., Yamada, Y., Huotari, J., Schulz, O., Ahrens, S., Kjær, S., Way, M., Sancho, D., Namba, K., Reis e Sousa, C. "Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens." *Immunity*, 42, 839-849, (2015) \*Co-first author 査読有り
- (3) Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y.,

- Kurusu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., Muto, E. "A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation." *J. Cell Biol.*, 208, 211-222, (2015) 査読有り
- (4) Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y.S., Kageyama, S., Hoshino, M., **Fujii, T.**, Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. "The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates." *Nature Communication*, 6, 6116, (2015) 査読有り
- (5) Gayathri, P.\*, **Fujii, T.\***, Namba, K., Löwe, J. "Structure of the ParM filament at 8.5 Å resolution" *Journal of Structural Biology* 184, 33-42. (2013) \*Co-first author 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 藤井高志 「低温電顕単粒子像解析法による筋収縮制御機構の構造生物学的基盤」第93回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2016年3月24日.
- (2) 藤井高志 「複雑な生命機能を理解するための構造解析の最先端」第87回日本生化学会大会, 京都国際会館(京都), 2014年10月15日.
- (3) 藤井高志 「低温電子顕微鏡法による繊維複合体の高分解能構造解析」第14回日本蛋白質科学会, パシフィコ横浜(横浜), 2014年6月25日.
- (4) 藤井高志 「低温電子顕微鏡法による赤痢菌ニードル繊維の高分解能構造解析」第86回日本生化学会大会, パシフィコ横浜(横浜), 2013年9月12日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 高志 (FUJII, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・招へい研究員

研究者番号: 10582611