

74	GPCRリン酸化バーコードによるアレスチン機能の理解	井上 飛鳥
----	----------------------------	-------

**【目的】** Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor : GPCR) は既存薬の約30%もの作用標的を占めることが知られ、創薬開発の最重要のタンパク質群に位置付けられる。GPCRのシグナル伝達分子は主に三量体Gタンパク質 (以下、Gタンパク質) によって担われるが、近年、βアレスチン (以下、アレスチン) による多様な作用に着目されている。アレスチンの活性化機構として、リン酸化されたGPCRに結合し構造変化が生じるとされるが、GPCRリン酸化のパターンやアレスチンのフィンガーグループの役割、その他の活性化因子の機構など不明な点が多く残されている。本研究ではアンジオテンシン受容体 (AT1R)、スフィンゴシン1リン酸受容体 (S1PR1)、ケモカイン受容体 (CCR2とD6R) およびニューロテンシン受容体 (NTSR1) をモデルとしてアレスチンの活性化機構の解析を行った。

**【方法】** GPCRリガンド刺激依存的なアレスチンとの結合を評価するため、NanoBiT補酵素断片法を用いた。Direct法ではGPCRのC末端にSmBiTを融合したコンストラクトとアレスチンのN末端にLgBiTを融合したコンストラクトを用いた。Bystander法ではアレスチンのN末端にSmBiTを融合したコンストラクトとLgBiTにCAAXモチーフに融合した膜局在コンストラクトを用い、C末インタクトのGPCRを共発現させた。これらのNanoBiTコンストラクトをHEK293A細胞またはGPCRキナーゼ (GRK) を欠損させたHEK293A細胞 (GRK2/3二重欠損、GRK5/6二重欠損、GRK2/3/5/6四重欠損) にリポフェクション法を用いて導入し、発光基質を取り込ませた後にGPCRリガンドを添加し、発光シグナル変化を発光プレートリーダーにより計測した。

**【結果】** AT1Rにおいては内因性リガンドであるAng IIがGRK2/3/5/6を介してアレスチンをリクルートする一方、バイアスリガンドのTRV027はGRK5/6を選択的に活性化することでアレスチンをリクルートし、S326のリン酸化が重要であった。S1PR1の構造研究からバイアスリガンドのフィンゴリモドリン酸はトグルスイッチの構造変化が中間状態であり、これがS1P結合型とは異なる受容体内のコンタクトネットワーク変化を誘導し、細胞内側の構造がアレスチンを好む形状につながるということがわかった。リガンドを共通とするバランス型受容体CCR2とアレスチンバイアス型受容体D6Rとの比較から、D6RのアレスチンリクルートにはGRK2/3/5/6が不要であり、アレスチンの活性化構造がD6R誘導型とCCR2誘導型で異なることがわかった。NTSR1の研究から、機能性膜脂質であるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸 (PIP<sub>2</sub>) がアレスチンのGPCRへの結合とアレスチン活性化を促進しており、PIP<sub>2</sub>結合がGPCR内在化の分類を説明できることを見出した。

GPCRのリン酸化形成とアレスチンによるバーコード依存的な機能

