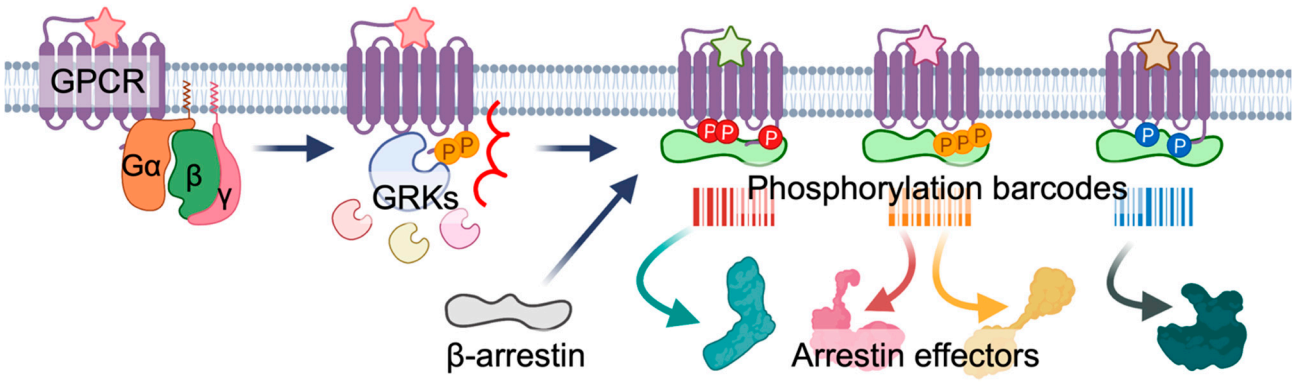
| 74　GPCRリン酸化バーコードによるアレスチン機能の理解 | 井上　飛鳥 |
|---|---|

【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 AngⅡ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（$PIP_2$）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、$PIP_2$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



# 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

東北大学 大学院薬学研究科 分子細胞生化学分野

Key words：GPCR，アレスチン，GRK，バイアス

## 緒　言

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）によるシグナル伝達も G タンパク質と並んで重要であることが認識されつつある。アレスチンはその語源である Arrest（停止）作用として、G タンパク質との立体的な競合作用やGPCR の内在化作用により、G タンパク質シグナルを収束する機能が当初示されたが、その後、アレスチン自身がエフェクター（ERK、Src など）をリクルートして、シグナル伝達を誘導する機能に着目が集まっている。

アレスチンはリン酸化された GPCR に結合するが、その多面的な機能は GPCR のリン酸化パターン（リン酸化バーコード）により規定されるもの考えられている。これまで、アレスチンの好むリン酸化バーコード（例えば PxxPxxP：P はリン酸化セリン・スレオニン残基、x は任意のアミノ酸残基）は提唱されてきたものの、バーコードとアレスチンの構造変化や機能の関係は解析が進んでおらず、さらにはこのリン酸化を担う酵素（GPCR キナーゼ（GRK）が想定されている）やその制御機構は不明な点が多い。過去の研究において、本研究者らはブラジキニン B2 受容体のリン酸化部位をモデルとして、連続したスレオニン残基が構造認識一本鎖抗体 IB30 の好む活性型アレスチン構造を誘導し、ERK シグナルを制御することを明らかとした［1］。本研究において、アレスチン機能発揮に関与する GPCR リン酸化バーコードとこれを付与する酵素の同定とその制御機構を目的として、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機能の解析を行った。研究過程から GPCR リン酸化に非依存的なアレスチンと GPCR の結合の重要性が示唆されたことから、この新規のアレスチン活性化機構についても解析を進めた。関連する GPCR 研究成果と合わせて、構造レベルから細胞レベルのシグナル制御の知見まで多様な GPCR シグナル制御機構が明らかとなった［2〜9］。

## 方　法

### 1. NanoBiT アレスチンアッセイ

リガンド刺激依存的な GPCR とアレスチンの結合評価として NanoBiT 補酵素断片法を用いた［5, 6］。Direct 法では GPCR の C 末端に SmBiT を融合したコンストラクト（15 アミノ酸フレキシブルリンカーを挟む、以下同）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。エンドソーム移行測定に際しては、LgBiT と Endofin FYVE ドメインを融合したコンストラクトを用いた Bystander 法により実施した。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）［6］にリポフェクション法を用いて導入した。翌日、細胞を回収し、アッセイバッファー（ハンクス緩衝液、5 mM HEPES (pH 7.4)、

0.01%ウシ血清アルブミン）に懸濁した後、96 ウェルホワイトプレートに播種し、発光基質セレンテラジンを添加した。室温に 2 時間静置後、発光プレートリーダー（SpectraMax L、Molecular Devices）によりベースラインの発光カウントを測定した。続いて GPCR リガンドを添加し、発光変化を測定した。AT1R の一部実験においては、プロテインキナーゼ C による AT1R リン酸化の影響を排除するため、阻害剤 Go6983 処理下でアレスチンリクルート計測を行なった。

**2. フローサイトメトリー**

N 末端に FLAG タグを有する GPCR コンストラクトを発現させた細胞に対して、一次抗体（anti-DYKDDDDK, Clone 1E6、FujiFilm Wako）と二次抗体（anti-mouse IgG、Alexa 488 conjugated、Thermo Fisher Scientific）を用いて蛍光染色し、フローサイトメーター（EC800、Sony）により蛍光量を測定した。

## 結果および考察

**1. AT1R バイアスリガンドと GRK 選択性**

AT1R はバイアスリガンド研究のモデル受容体として汎用されており、これまでに TRV027 を始めとするアレスチンバイアスリガンドが開発されている。本研究者は、AT1R の内因性リガンドである AngⅡとアレスチンバイアスリガンドの間にアレスチンの質的な差異が存在するかどうか、アレスチンリクルートに寄与する GRK に着目した解析を行った［6］。各種 *GRK* 欠損細胞と親細胞において、リガンド依存的なアレスチンリクルートを測定したところ、AngⅡにおいては *GRK2/3* 二重欠損細胞および *GRK5/6* 二重欠損細胞においてアレスチンリクルートが残存し、*GRK2/3/5/6* 四重欠損細胞では完全にアレスチン応答が消失した（図 1a）。一方、TRV027 では *GRK2/3* 二重欠損細胞では親細胞とアレスチンリクルートが同程度であるものの、*GRK5/6* 二重欠損細胞においてアレスチン応答が消失した。このことから、AngⅡと TRV027 では AT1R のリン酸化部位やアレスチン機能が異なることが示唆された。次に、AT1R の C 末端のリン酸化候補部位を個々にアラニン置換した変異体コンストラクトを作製してアレスチンリクルートを測定したところ、S326A 変異体においてのみ TRV027 刺激によるアレスチン応答が顕著に減少した（図 1b～d）。このことから、TRV027 結合型 AT1R は GRK5/6 を選択的に活性化すること、その受容体リン酸化機構として GRK5/6 による AT1R の細胞内コアの開口を感知して近傍の C 末端ループの Ser/Thr 残基をリン酸化することが想定された。一分子顕微鏡観察や NanoBiT-BRET による 3 分子の相互作用解析から、リガンド結合により AT1R と Gq および GRK5/6 がマイクロドメインに集合し、その後に Gq 活性に依存して GRK5/6 がマイクロドメインから追い出される機構が判明した［6］。

**2. S1PR1 バイアスリガンドと構造基盤**

フィンゴリモドは S1PR1 モジュレーターと呼ばれるクラスの多発性硬化症治療薬であり、その活性代謝体（フィンゴリモドリン酸）は S1PR1 とアレスチンの強固な結合を誘導し、S1PR1 の持続的な内在化と分解を導く。本研究者は共同研究により S1P 結合型とフィンゴリモドリン酸結合型の S1PR1 の構造研究を実施した［5］。意外にも、両者の S1PR1 のクライオ電顕構造は、全体として極めて似通った構造をとっておりバイアス性がどのように生じるか不明であった。そこで、本研究者は生体膜環境を模した計算シミュレーションとして分子動力学解析を行い、受容体のコンタクトネットワークを詳しく調べたところ、S1P とフィンゴリモドリン酸で異なるアミノ酸残相互作用変化を見出した。次にこれら残基間相互作用を低下させた変異体の G タンパク質活性やアレスチン活性を調べたところ、F265A 変異体や N307A 変異体において、G タンパク質とアレスチンのバランスが変化し、これらの相互作用のスイッチが S1PR1 機能のバイアス性の起因であることを明らかにした（図 2）。また、この相互作用を誘導するリガンドポケット内部の変化として、トグルスイッチと呼ばれるトリプトファン残基（W269）の構造変化がフィンゴリモドリン酸においては活性型と不活性型の中間状態であることが重要であることが示唆された。以上から、S1PR1 におけるアレスチンバイアスリガンドの受容体活性化の構造基盤を明らかにした［5］。

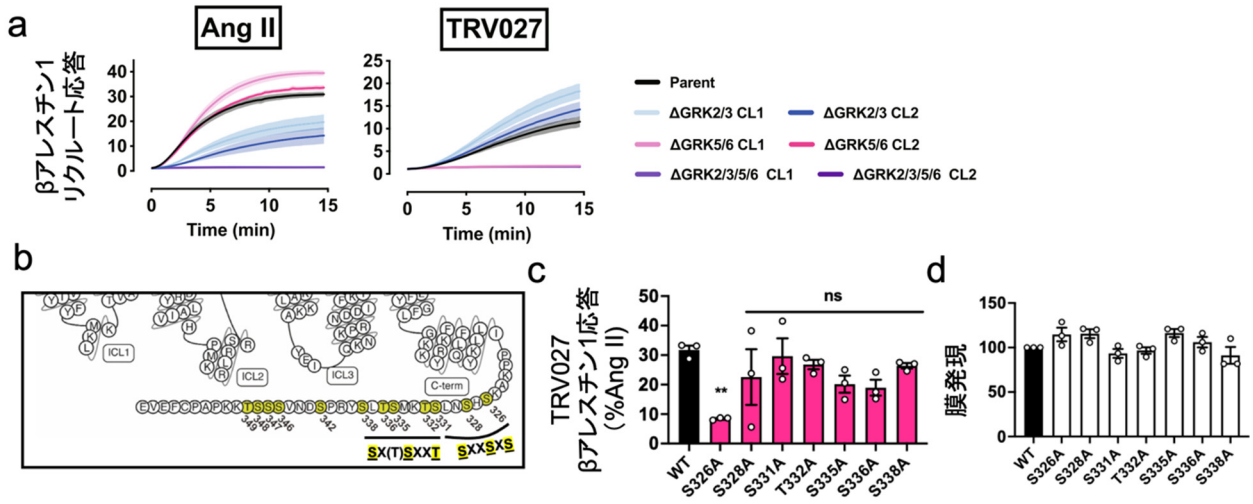



図 1. AT1R のバイアスリガンドと GRK5/6 依存的なリン酸化

a) GRK 欠損細胞を用いたアレスチンリクルートのカイネティクス応答。

b) AT1R の C 末端のリン酸化配列。

c) C 末端の Ser/Thr の点変異の TRV027 刺激によるアレスチン応答。** $P<0.01$; ns, $P>0.05$; One-way ANOVA followed by the Dunnett's analysis。

d) C 末端の Ser/Thr の点変異の膜発現。

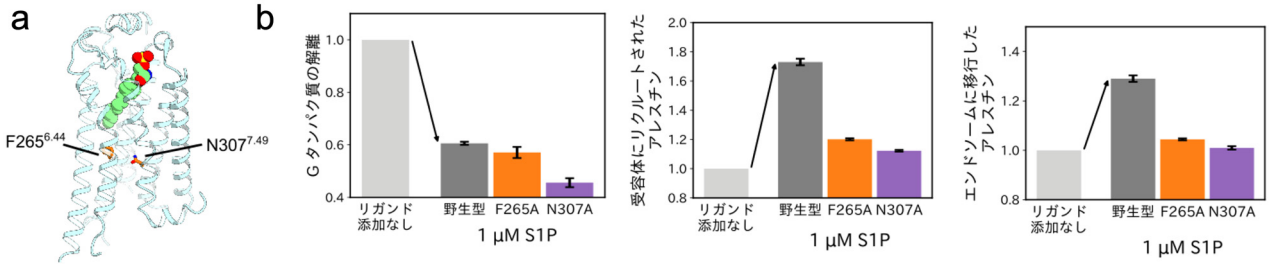



図 2. アレスチン経路を担う S1PR1 のアミノ酸残基相互作用

a) 分子動力学シミュレーションによって特定したアレスチンバイアスリガンドに特有の相互作用に関わるアミノ酸残基（F265 と N307）。これらのアミノ酸残基はリガンド（空間充填モデル）からやや離れた位置に存在していた。

b) 変異体実験による検証。アラニン置換変異体の G タンパク質活性は野生型と同等であったが、アレスチン活性（受容体へのリクルート応答、エンドソーム移行）は顕著に減弱した。

### 3. CCR2 と D6R と GRK 選択性

CCR2 と D6R は内因性リガンドとしてケモカイン CCL7 を共通とする受容体である。CCR2 は典型的 GPCR として G タンパク質とアレスチンと結合するが、D6R はアレスチンのみを活性化する非典型的受容体と位置付けられている。本研究者は共同研究により、CCR2 と D6R のアレスチン機能を含め、網羅的なシグナル比較を実施した［4］。NanoBiT G タンパク質乖離アッセイを行ったところ、D6R は既報の Gi を含めいずれの G タンパク質クラスにおいても CCL7 刺激による G タンパク質応答は認められなかった。一方、アレスチンリクルート応答は CCR2 と比べて D6R の方がより低濃度の CCL7 で生じた。GRK 欠損細胞を用いてところ、アレスチンリクルートの GRK 依存性を調べたところ、CCR2 においては GRK2/3/5/6 四重欠損細胞でアレスチン応答が消失した一方、D6R では同等であった。ま

た、D6R の C 末端欠損コンストラクトにおいてはアレスチン結合が消失したことから、GRK 非依存的な D6R リン酸化によりアレスチンリクルートが生じることが示唆された。また、IB30 センサーによるアレスチン構造変化を測定したところ、CCR2 と比べて D6R において顕著な IB30 認識構造が誘導された一方、リン酸化 ERK 応答は D6R の方が少なかった。共同研究者が実施したホスホプロテオミクスによる網羅的シグナル解析から、コフィリンを始めとする D6R 依存的な種々のシグナル変化が検出された。以上から、アレスチンバイアス型受容体のシグナル特性を詳細に記述された［4］。

**4. NTSR1 のリン酸化パターンとアレスチンの $PIP_2$依存性**

NTSR1 とアレスチンの構造研究において、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸（$PIP_2$）が両タンパク質の界面に存在し、アレスチンリクルートに寄与することが示唆されていた。$PIP_2$との結合を低下すること意図したアレスチンの 3Q 変異体（3 つの塩基性アミノ酸残基をグルタミンに置換した変異体）においては、野生型アレスチンと比較してわずかなリクルート応答の低下に留まった［10］。そこで、NTSR1 のリン酸化コードと $PIP_2$依存性の関連を調べるため、NTSR1 の 10 個のリン酸化 Ser/Thr 候補を様々な組み合わせでアラニン置換したコンストラクトを作製し、野生型と 3Q 変異体のアレスチンとのリガンド依存的なリクルート応答を評価した（図 3a）。その結果、アラニン変異により $PIP_2$の感受性が顕著に増加するパターンを見出した（図 3b）。例えば、5A 変異体や ALAA 変異体においては野生型アレスチンのリクルート応答を基準とした際に 3Q 変異体アレスチンのリクルートが低下した。アレスチンのエンドソーム移行を評価したところ、3Q と逆相関していた（図 3c）。さらに、3Q 変異体アレスチンを用いた $PIP_2$感受性を 20 種類の GPCR に対して網羅的に評価したところ、過去に GPCR の内在化を基準に分類されていたクラス A（短時間の内在化と早いリサイクル）とクラス B（持続的な内在化と遅いリサイクル）と非常によい相関を示した。クラス A タイプからクラス B タイプに変換するバソプレシン V2 受容体の C 末端配列のスワップコンストラクトが知られているが、これを 2 種類の GPCR について試したところ、実際に $PIP_2$感受性が非感受性にシフトすることがわかった。共同研究者が実施した精製アレスチンを用いた動態解析から、$PIP_2$は GPCR 非存在下においてもアレスチンに結合して、自己阻害 C 末端の遊離を除く各種構造変化を誘導することがわかった。以上から、$PIP_2$の局在に合わせてアレスチンは形質膜で活性化されやすく、リン酸化レベルの低い GPCR においては内在化後に $PIP_2$濃度が低下することによりアレスチンが乖離し膜表面へリサイクルされる一方、リン酸化レベルの高い GPCR では $PIP_2$が低下後もアレスチンと持続的な結合を行うことが示唆され、リン酸化パターンと $PIP_2$による協調的なアレスチン制御機構が明らかとなった（図 3d）。

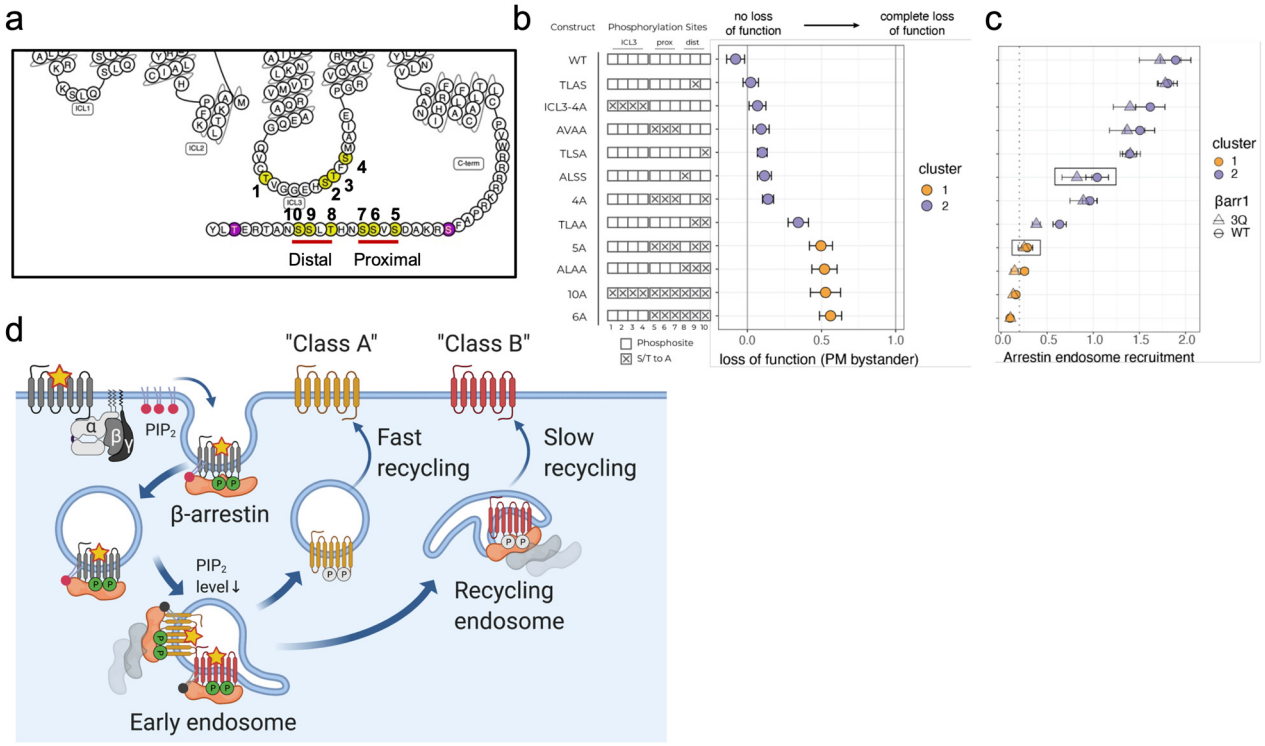



図 3. NTSR1 のリン酸化変異とアレスチンの $PIP_2$ 依存性の変化

a) NTSR1 の細胞内ループと C 末端のリン酸化配列。

b) Ser/Thr 変異体のアレスチンの膜移行における $PIP_2$ 依存性。Cluster1 は $PIP_2$ 依存性が高い群、Cluster2 は $PIP_2$ 依存性が低い群を示す。

c) Ser/Thr 変異体のアレスチンのエンドソーム移行。

d) アレスチンリクルートと活性化における GPCR のリン酸化と $PIP_2$ の協調的な役割および内在化クラス A と B の制御機構。

## 共同研究者・謝辞

本研究とこの関連研究は数多くの共同研究者を通じて実施された。本研究助成金を謝辞に記載した末尾の文献[2〜9]および文献数の都合上ここには含められなかった文献（PMIDs: 34271220、34853152、35255436、35302494、35316095、35489202、35592437、35594393）を列挙することにより略する。

## 文　献

1) Baidya M, Kumari P, Dwivedi-Agnihotri H, Pandey S, Chaturvedi M, Stepniewski TM, Kawakami K, Cao Y, Laporte SA, Selent J, Inoue A, Shukla AK. Key phosphorylation sites in GPCRs orchestrate the contribution of β-Arrestin 1 in ERK1/2 activation. **EMBO Rep.** 2020 Sep 3;21(9):e49886. doi: 10.15252/embr.201949886. PMID: 32715625.

2) Okamoto HH, Miyauchi H, Inoue A*, Raimondi F, Tsujimoto H, Kusakizako T, Shihoya W, Yamashita K, Suno R, Nomura N, Kobayashi T, Iwata S, Nishizawa T*, Nureki O*. Cryo-EM structure of the human MT1-Gi signaling complex. **Nat Struct Mol Biol**. 2021 Aug;28(8):694-701. doi: 10.1038/s41594-021-00634-1. PMID: 34354246.

3) Nagiri C, Kobayashi K, Tomita A, Kato M, Kobayashi K, Yamashita K, Nishizawa T, Inoue A*, Shihoya W*, Nureki O*. Cryo-EM structure of the β3-adrenergic receptor reveals the molecular basis of subtype selectivity. **Mol Cell**. 2021 Aug 5;81(15):3205-3215.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.06.024. PMID: 34314699.

4) Pandey S, Kumari P, Baidya M, Kise R, Cao Y, Dwivedi-Agnihotri H, Banerjee R, Li XX, Cui CS, Lee JD, Kawakami K, Maharana J, Ranjan A, Chaturvedi M, Jhingan GD, Laporte SA, Woodruff TM, Inoue A, Shukla AK. Intrinsic bias at non-canonical, β-arrestin-coupled seven transmembrane receptors. **Mol Cell**. 2021 Nov 18;81(22):4605-4621.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2021.09.007. PMID: 34582793.

5) Xu Z, Ikuta T, Kawakami K, Kise R, Qian Y, Xia R, Sun MX, Zhang A, Guo C, Cai XH, Huang Z, Inoue A*, He Y*. Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. **Nat Chem Biol**. 2022 Mar;18(3):281-288. doi: 10.1038/s41589-021-00930-3. PMID: 34937912.

6) Kawakami K, Yanagawa M, Hiratsuka S, Yoshida M, Ono Y, Hiroshima M, Ueda M, Aoki J, Sako Y*, Inoue A*. Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying β-arrestin transducer bias. **Nat Commun**. 2022 Jan 25;13(1):487. doi: 10.1038/s41467-022-28056-7. PMID: 35078997.

7) Chen G#, Xu J#, Inoue A#*, Schmidt MF#, Bai C, Lu Q, Gmeiner P*, Liu Z*, Du Y*. Activation and allosteric regulation of the orphan GPR88-Gi1 signaling complex. **Nat Commun**. 2022 May 2;13(1):2375. doi: 10.1038/s41467-022-30081-5. PMID: 35501348.

8) Dixon AD, Inoue A, Robson SA, Culhane KJ, Trinidad JC, Sivaramakrishnan S, Bumbak F, Ziarek JJ. Effect of Ligands and Transducers on the Neurotensin Receptor 1 Conformational Ensemble. **J Am Chem Soc**. 2022 Jun 15;144(23):10241-10250. doi: 10.1021/jacs.2c00828. PMID: 35647863.

9) Matic M, Singh G, Carli F, Oliveira Rosa N, Miglionico P, Magni L, Gutkind JS, Russell RB, Inoue A, Raimondi F. PRECOGx: exploring GPCR signaling mechanisms with deep protein representations. **Nucleic Acids Res**. 2022 May 26:gkac426. doi: 10.1093/nar/gkac426. Epub ahead of print. PMID: 35639758.

10) Huang W, Masureel M, Qu Q, Janetzko J, Inoue A, Kato HE, Robertson MJ, Nguyen KC, Glenn JS, Skiniotis G, Kobilka BK. Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with β-arrestin 1. **Nature**. 2020 Mar;579(7798):303-308. doi: 10.1038/s41586-020-1953-1. PMID: 31945771.