



2022年11月11日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科

### 細胞の情報伝達のオンオフを切り替える脂質分子 —細胞内取り込み因子アレスチンが受容体に結合する第二の機構の発見—

#### 【発表のポイント】

- ・細胞の情報伝達において、入力が入オンになった後に一過的にオフになり再びオンになる過程に必要な脂質分子(PIP<sub>2</sub>)<sup>(注1)</sup>を同定
- ・PIP<sub>2</sub>は情報制御因子のアレスチン<sup>(注2)</sup>に結合し、アレスチンが細胞表面の受容体(GPCR)<sup>(注3)</sup>を細胞内に取り込む過程を促進
- ・効果の持続時間が長い薬の開発や、副作用を低減した薬の開発に貢献

#### 【概要】

細胞は外来との情報(シグナル)のやりとりの大半を G タンパク質共役型受容体(GPCR)<sup>(注3)</sup>と呼ばれる膜表面のセンサーを介して行っています。GPCR に細胞外からシグナル伝達分子(リガンド)<sup>(注4)</sup>が結合すると、GPCR は細胞内に取り込まれて内在化<sup>(注5)</sup>し、しばらくの間応答性が低下した状態(脱感作)を保ち、その後細胞表面へと戻ってきます(図1)。細胞は内在化機構を備えることで、リガンドの到来をオフ→オン→オフというパルス情報としてデジタル処理することができます。そのための適切な情報処理には、リガンドと結合した GPCR が一時的に細胞内に取り込まれて不応答となる必要があります。しかし、この過程で働くアレスチンが GPCR に結合する分子機構については不明な点が多く残されていました。

東北大学大学院薬学研究科の井上飛鳥教授、スタンフォード大学の Brian Kobilka 教授らの国際共同研究グループは、機能性膜脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)<sup>(注1)</sup>に着目し、この脂質分子がアレスチンと GPCR の結合を促進し、アレスチンを構造変化させて活性型へと誘導することで、GPCR を細胞内に取り込むことができることを見出しました。薬の多くは GPCR に作用して薬効を発揮することから、本研究の知見は持続的な効果を示す薬や副作用を低減した薬の開発に貢献するものです。

本研究成果は、2022年11月10日(現地時間)に「Cell」誌電子版、11月23日に同冊子版に掲載されました。

**【問い合わせ先】**

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥(いのうえ あすか)

電話 022-795-6861

E-mail [iaska@tohoku.ac.jp](mailto:iaska@tohoku.ac.jp)

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

電話 022-795-6801

E-mail [ph-som@grp.tohoku.ac.jp](mailto:ph-som@grp.tohoku.ac.jp)

## 【詳細な説明】

### 研究背景

細胞は外来との情報(シグナル)のやりとりの大半を G タンパク質共役型受容体(GPCR<sup>(注3)</sup>)と呼ばれる膜表面のセンサーを介して行います。GPCR に細胞外からシグナル伝達分子(リガンド<sup>(注4)</sup>)が結合すると、GPCR は細胞内に取り込まれて(内在化<sup>(注5)</sup>)、しばらくの間応答性が低下した状態(脱感作)を保ち、その後細胞表面へと戻ってきます(図1)。細胞は内在化機構を備えることで、リガンドの到来をパルス情報(オフ→オン→オフ)としてデジタル処理することができます。また、生体内ではシグナル伝達分子は”濃度”自体よりも”変化率”として知覚され、脱感作のような負のフィードバック機構を備えることで、幅広い濃度域の変化を感知できると言えます。

GPCR の内在化にはアレスチン<sup>(注2)</sup>と呼ばれる細胞内タンパク質が必要であることが知られています。GPCR はリガンドと結合して活性型へと構造変化をすると、リン酸化酵素により GPCR の細胞質側のセリンやスレオニンのアミノ酸側鎖がリン酸化修飾を受けます(図1)。このリン酸化された GPCR にアレスチンは強く結合します。この結合が引き金となり、アレスチンに構造変化が生じ、内在化因子を呼び寄せることで GPCR とアレスチンの複合体が細胞内に取り込まれます。一方で、細胞内領域にセリンやスレオニンをほとんど含まない GPCR もアレスチンを介して内在化することが知られていましたが、リン酸化レベルの低い GPCR にアレスチンが結合できる機構は不明でした。また、このような GPCR は内在化してから直ちに細胞表面へとリサイクルされる挙動(クラス A タイプ<sup>(注6)</sup>)、長時間の内在化はクラス B タイプ、(図1)を示すことが知られていましたが、細胞表面ではアレスチンと結合する一方、細胞内部ではアレスチンと乖離しやすくなる分子基盤はわかっていませんでした。

### 研究内容

東北大学大学院薬学研究科の井上飛鳥教授、スタンフォード大学の Brian Kobilka 教授らの国際共同研究グループは、膜脂質の 1 種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub><sup>(注1)</sup>)、(図2)がクラス A タイプの GPCR がアレスチンと結合する「糊」の役割を果たしていることを見出しました。PIP<sub>2</sub> は細胞表面の生体膜<sup>(注7)</sup>に豊富に含まれる一方、細胞内部の膜ではその含量が低下することから、内在化した部位では「糊」が消失することで GPCR からアレスチンから離れ、細胞表面へとリサイクルされることが説明できることがわかりました。

研究グループは、以前のアレスチンとニューロテンシン受容体の構造研究において PIP<sub>2</sub> 分子がアレスチンとの結合面に存在することに着目しました(図2)。この構造ではニューロテンシン受容体のリン酸化の促進剤として添加した PIP<sub>2</sub> が構造決定したサンプルに残っていました。PIP<sub>2</sub> には負に帯電したリン酸基を 2 つ有し、これはアレスチンの表面に存在する正に帯電した 3 つのアミノ酸側鎖(アルギニン・リジン)によって認識されていました。そこで東北大学の研究グループは、この 3 カ所を

中性のアミノ酸(グルタミン)に置換し PIP<sub>2</sub>と結合できない 3Q 変異型アレスチン<sup>(注8)</sup>を作製し、クラス A タイプを含む多数の GPCR に対して、3Q 変異型アレスチンが結合できるかどうか調べました。アレスチンがリガンド刺激に応じて GPCR に結合する挙動を高速に測定するために、分割ルシフェラーゼシステム(NanoBiT 法<sup>(注9)</sup>)を用いました。この手法では、アレスチンと GPCR にルシフェラーゼの断片をそれぞれ融合させたタンパク質を培養細胞に発現させます。改変型のルシフェラーゼ断片は、アレスチンと GPCR が近接した時にのみ立体的に組み合わさり酵素活性を出現します。あらかじめ、ルシフェラーゼの基質を培養細胞に取り込ませておくことで、リガンド刺激前後のアレスチンと GPCR の結合をマイクロプレートリーダーを用いてリアルタイムに検出できます。また、ルシフェラーゼ断片を GPCR の代わりに特定の膜に局在するタンパク質モチーフに融合することで、アレスチンが細胞表面の膜(形質膜)に局在変化したか、細胞内部の膜(エンドソーム膜<sup>(注10)</sup>)に移動したかを同様に計測することができます。

研究グループは 23 種類の GPCR について、リガンド刺激によるアレスチンとの結合にどの程度 PIP<sub>2</sub>に依存性があるか NanoBiT 法を用いて調べました(図3A)。その結果、PIP<sub>2</sub>依存性は2つの集団に分類されることが数学的に示されました。興味深いことに、PIP<sub>2</sub>感受性による GPCR の分類は、過去に GPCR の内在化と表面へのリサイクル速度の GPCR の分類と一致していました。すなわち、クラス A タイプの GPCR はアレスチンと安定な結合を行うのに PIP<sub>2</sub>が必要という共通した機構があることがわかりました(図4)。また、GPCR のリン酸化修飾のパターンとの関連を調べるべく、クラス B タイプであるニューロテンシン受容体の 10 カ所のセリン・スレオニンを様々な組み合わせでアラニンに置換した変異型ニューロテンシン受容体を用いて、アレスチン結合の PIP<sub>2</sub>依存性を計測しました。その結果、C 末端ループに 2 カ所のセリン・スレオニンが存在すればクラス B タイプとして振る舞い、1 カ所だとクラス A タイプとなることがわかりました。すなわち、クラス B タイプの GPCR でもアレスチンと結合する際は PIP<sub>2</sub>が補助因子として使われ、GPCR のリン酸化修飾の数・パターンに応じてアレスチン-GPCR 結合への PIP<sub>2</sub>の寄与率が変化するを示しています。

次にスタンフォード大学の研究グループは PIP<sub>2</sub>がどのような作用をアレスチンや GPCR に及ぼすかについて、精製タンパク質を用いた実験を行いました。精製したニューロテンシン受容体に PIP<sub>2</sub>存在下リン酸化修飾を行い、アレスチンと混合すると複合体を形成しますが、3Q 変異型アレスチンとはほとんど複合体を形成しませんでした。この時にアレスチンがどのような GPCR との結合様式(C 末ループへのぶら下がり=テールハング結合、膜貫通コア領域への結合=コア結合)を、フィンガーグループにビマン蛍光標識(周囲の環境に応じて蛍光強度・波長が変化)したアレスチンを用いて調べたところ、3Q 変異型アレスチンは GPCR とのコア結合を取れないことがわかりました(図3B)。また、単体のアレスチンに対する影響を調べるため、アレスチンの活性型構造を認識する抗体との結合を調べたところ、PIP<sub>2</sub>はアレスチ

ンを緩く活性型に構造変化させることがわかりました。PIP<sub>2</sub> 以外の脂質の特異性を調べたところ、リン酸基が1つのPI(3)Pではこの構造変化は全く生じませんでした。リン酸化修飾 GPCR を模倣した合成ペプチドと比較すると、PIP<sub>2</sub> によるアレスチンの構造変化に与える影響、特にアレスチンの自己阻害 C 末端ループを乖離させる活性は弱いことがわかりました。以上から、アレスチンは PIP<sub>2</sub> と結合することで活性化型に傾き、GPCR の膜貫通コア領域との結合が促進される機構が示されました(図4)。

これまでのアレスチンやイノシトールリン脂質の知見を踏まえたモデルは以下のようになります(図4、図5)。クラス A・B タイプ GPCR の双方に対し、PIP<sub>2</sub> はアレスチンが GPCR に結合し、内在化することに促進的に機能します。内在化された膜で PIP<sub>2</sub> レベルが低下すると、クラス A タイプ GPCR からはアレスチンが離れて GPCR が表面にリサイクルされるのに対して、クラス B タイプ GPCR ではアレスチンは結合し続け、内在化が持続します。クラス B タイプ GPCR では、アレスチンがテールハング結合を取ることで膜貫通コア領域部分が G タンパク質と結合して、新たなシグナルの起点として機能することが可能となります。

### **研究の意義**

持続的に薬を服用する際の問題点として、耐性や副作用が挙げられます。耐性の機序の1つとして、GPCR の内在化により薬効が低減することがあります。また、副作用には標的 GPCR のシグナル伝達のバランスが変わることで生じる現象が知られています。本研究で明らかとなった、PIP<sub>2</sub> によるアレスチンの時空間的な制御機構から、GPCR 作用薬の内在化・脱感作や副作用のシグナル伝達の分子基盤の解明につながります。このような知見はさらに、薬効・安全性の高い薬(持続的な薬効を發揮し、服用量や服用回数を減らせ、副作用リスクの少ない薬)の合理的な開発に資すると期待されます。

### **【謝辞】**

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業(17K08264, 21H04791, 21H05113, JPJSBP120213501, JPJSBP120218801)、科学技術振興機構創発的研究支援事業(JPMJFR215T)、日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業 PRIME(19gm5910013)、第一三共生命科学研究振興財団、武田科学振興財団、小野医学研究財団、上原記念生命科学財団を始め多数の研究費支援を受けて実施されました。

## 説明図

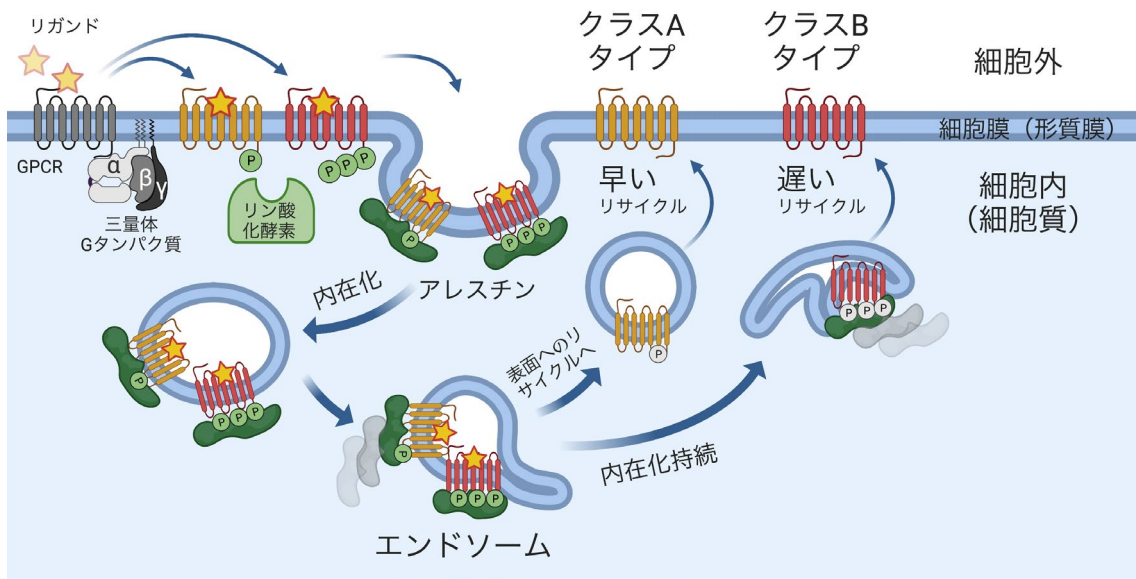


図1 アレスチンによる GPCR の内在化とリサイクルの速度による分類

GPCR にリガンドが結合すると三量体タンパク質を介したシグナル伝達が生じる。続いて、GPCRリン酸化酵素によって細胞内部分がリン酸化(P)を受け、アレスチンと結合する。GPCR とアレスチンは内在化し、エンドソームに到達する。その後、GPCR は膜表面へとリサイクルされるが、この速度が早い種類(クラス A タイプ)と遅い種類(クラス B タイプ)に分類される。クラス A タイプはリン酸化レベルが低く、エンドソームで直ちにアレスチンが解離することが知られる。

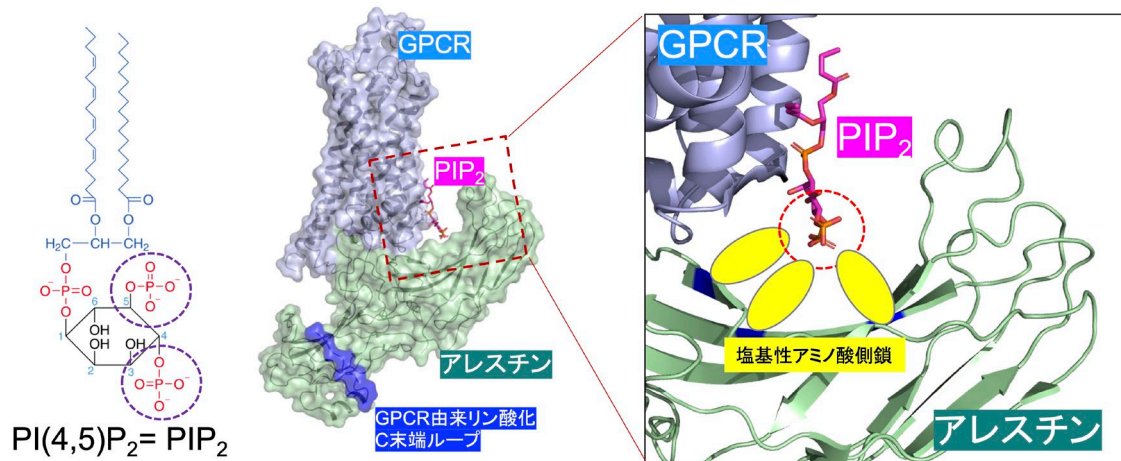


図2 アレスチンと PIP<sub>2</sub> の結合

以前の構造研究 (PDB ID: 6UP7) から、GPCR (ニューロテンシン受容体) とアレスチンの間に結合した PIP<sub>2</sub> 分子が観察された。PIP<sub>2</sub> の 2 つのリン酸基 (イノシトールの 4 位と 5 位) は、アレスチンの表面に存在する 3 つの塩基性アミノ酸の側鎖 (黄色) によって認識されていた。この 3 つのアミノ酸を置換して PIP<sub>2</sub> と結合できなくしたアレスチンを 3Q 変異型として今回の研究で使用した。

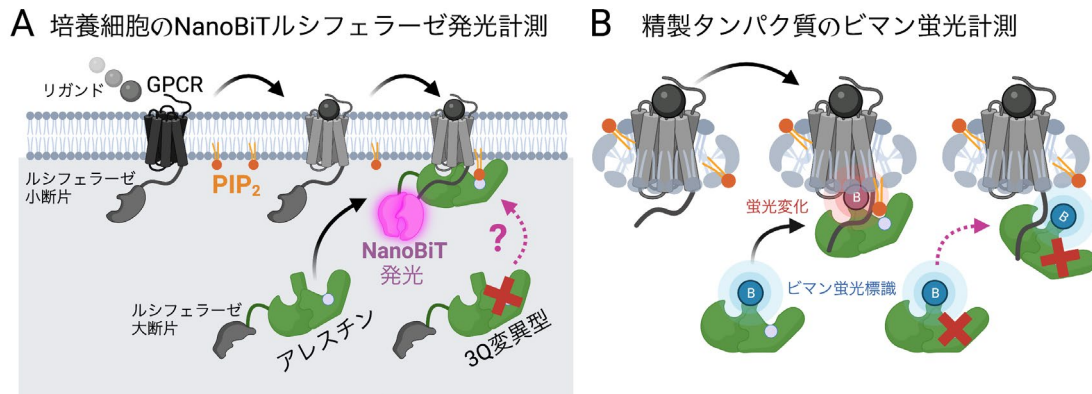


図3 アレスチンと GPCR の相互作用の測定方法

(A) 培養細胞における NanoBiT 分割ルシフェラーゼを用いた発光計測。分割ルシフェラーゼの小断片と大断片をそれぞれ GPCR とアレスチンに融合させたタンパク質を遺伝子工学により培養細胞に発現させる。リガンドにより刺激された GPCR がアレスチンと結合する様子を発光シグナルとして計測できる。通常型アレスチンと 3Q 変異型アレスチンの発光シグナルを比較することで、PIP<sub>2</sub> の依存性を評価した。(B) ビマン蛍光標識アレスチンを用いた精製タンパク質レベルでの相互作用計測。精製したアレスチンに蛍光色素のビマンを結合させ、別途精製した GPCR と混合させる。アレスチンが GPCR とコア結合をすると、蛍光変化が観測される。3Q 変異型アレスチンは GPCR とは結合できるものの、コア結合はとれずにテールハング結合であることがわかった。

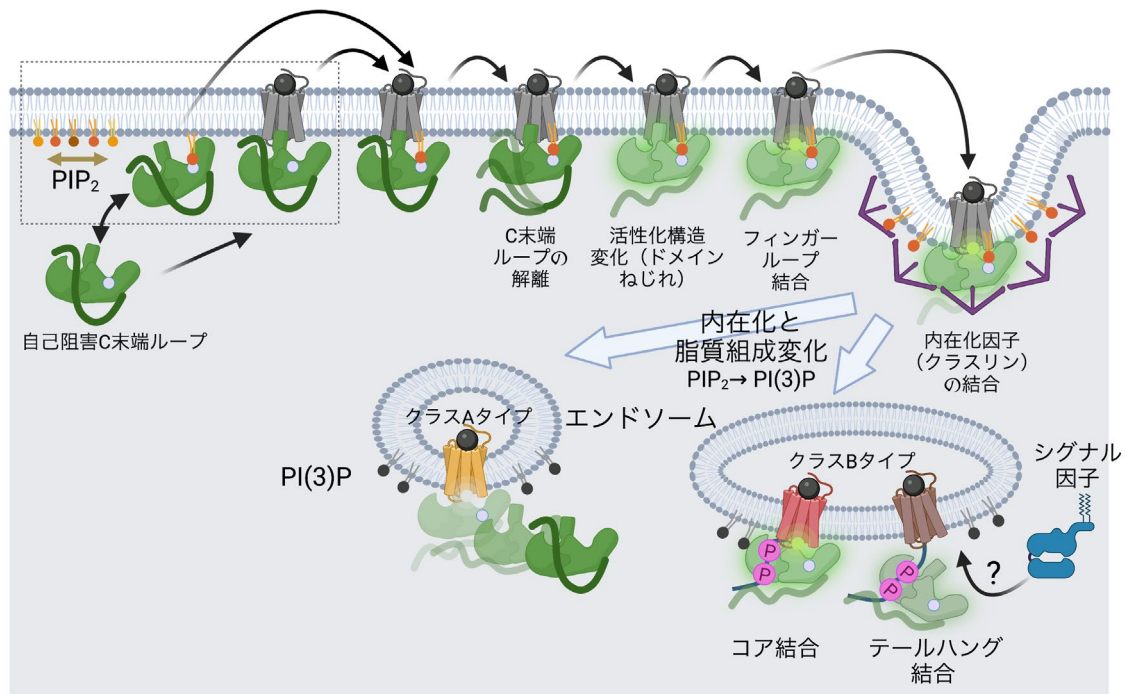


図4 アレスチンの活性化と GPCR への結合に対する PIP<sub>2</sub> の役割

アレスチンは自己阻害 C 末端ループを有しており、不活性型を維持に寄与する。

PIP<sub>2</sub>と結合することで、アレスチンの一連の活性化の構造変化(C末端ループの解離、アレスチンのN末ドメインとC末ドメインのねじれ、フィンガーグループ(アレスチンの中央上の突起)のGPCRへの結合)を促進する。GPCRと安定的に結合したアレスチンは内在化因子を呼び寄せ、内在化を誘導する。エンドソーム膜ではPIP<sub>2</sub>が少なく、リン酸基が異なる脂質のPI(3)Pが蓄積するため、クラスAタイプGPCRではアレスチンとの結合ができなくなる。一方、クラスBタイプGPCRではアレスチンとはGPCRのリン酸化ループを介して結合し続けられる。この時、フィンガーグループを介したコア結合に加えて、テールハング結合を取る。テールハング結合では、GPCRの膜貫通コア領域が別のタンパク質がアクセスできるようになり、新たなシグナル伝達を開始される。



図5 本研究成果のイメージ図

細胞表面の膜に存在する GPCR(青)とアレスチン(黄色)の結合を PIP<sub>2</sub>(赤)が促進する様子をパズルピースとして描いた。膜の左下と右上が、それぞれ細胞外側と細胞内側であることを注意(他の図と上下逆)。

Image Art Credit: Miyuki SAKURA, Asuka INOUE, John JANETZKO



## 【用語説明】

(注1) ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>、ピーアイピーツー)

生体膜を構成するリン脂質の 1 種。極性基の末端にリン酸基を 2 つ結合し、大きな負電荷を有する。細胞表面の生体膜(形質膜)に多く存在することが知られる。構造の類似した脂質を含めてホスホイノシタイド(ホスホイノシチド)と総称される。

(注2) アレスチン(β アレスチン、ベータアレスチン)

細胞質に存在する GPCR のシグナル伝達の機能の調節因子。リン酸化を受けた GPCR と強く結合し、クラスリンなどの内在化因子と結合することで、GPCR を細胞内に取り込む。また、シグナル伝達因子の足場タンパク質としてシグナルの起点としても機能する。アレスチンには全身性に発現する 2 つのサブタイプ(β-arrestin1, β-arrestin2)が存在する。

(注3) G タンパク質共役型受容体(GPCR)

細胞外のリガンドに応答して三量体 G タンパク質を介して細胞内へとシグナル伝達を行うセンサータンパク質。構造的に 7 回細胞膜を貫通する特徴を持つ。ヒトには約 800 種類の GPCR が存在し、それぞれが特定のホルモン分子や代謝物を認識する。薬の標的としても重要であり、既存薬約 3 割が GPCR を介して薬効を発揮することが知られる。

(注4) リガンド

タンパク質の結合分子。今回の研究では GPCR を活性化する分子を指す。

(注5) 内在化

細胞表面に存在するタンパク質(GPCR など)が細胞内に取り込まれる現象。

(注6) クラス A タイプ GPCR

リガンド刺激により内在化した後に、直ちに(30 分以内)細胞表面にリサイクルされる GPCR。逆に、長時間内在化が持続する GPCR はクラス B タイプと呼ばれる。クラス A は GPCR のリン酸化部位(セリン・スレオニン)が少ないことが知られる。GPCR の系統樹(アミノ酸相同性)から分けられるクラス A、B、C(ファミリーA、B、Cとも呼ばれる)とは異なる分類法ことに注意。

(注7) 生体膜

細胞の表面や内部の区画を区切る薄い(約 5 ナノメートル)膜。生体膜はリン脂質(1 つの分子にリン酸基と 2 本の脂肪酸を有する)の二重の平面層から形成される。

(注8) 3Q 変異型アレスチン

PIP<sub>2</sub> 結合部位を構成する 3 つの塩基性(正に帯電)のアミノ酸をグルタミン(1 文字表記 Q)に置換した変異型アレスチン。3Q 変異型アレスチンは PIP<sub>2</sub> と結合することができないものの、リン酸化 GPCR とは結合できる。通常型(野生型)アレスチンと比較することで、PIP<sub>2</sub> 依存的な GPCR との結合などを調べることができる。

(注9) NanoBiT(ナノビット)法

ルシフェラーゼを 2 分割して、調べたいタンパク質のペアにそれぞれ融合させることで、タンパク質の相互作用を計測する手法。目的のタンパク質同士が結合すると、

分割したルシフェラーゼが近接し、酵素活性のあるルシフェラーゼを構成する。発光基質をあらかじめ細胞培養液に添加しておくことで、タンパク質の結合を発光変化として測定することができる。

(注10) エンドソーム膜

細胞表面から取り込まれた空胞を覆う膜。内在化された GPCR はエンドソームで一時的に貯留する。

【関連する以前の研究のプレスリリース・成果発表】

・多発性硬化症治療薬が作用する受容体の構造基盤を解明 ～副作用の少ない安全性の高い薬剤の開発に貢献～(2021年12月24日)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/12/press20211224-03-s1p.html>

・シグナル伝達の「偏り」を生み出すリン酸化機構の解明 ～副作用を切り分けた GPCR 作動薬の開発に貢献～(2022年2月10日)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2022/02/press20220210-03-signal.html>

【発表論文】

雑誌名: Cell

論文タイトル: Membrane phosphoinositides stabilize GPCR-β-arrestin complexes and provide temporal control of complex assembly and dynamics

(日本語訳: 膜脂質のホスホイノシタイドは GPCR とアレスチンの複合体を安定化し、複合体の形成と細胞内動態の時間制御を可能とする)

著者: John Janetzko, Ryoji Kise, Benjamin Barsi-Rhyne, Dirk H. Siepe, Franziska M. Heydenreich, Kouki Kawakami, Matthieu Masureel, Shoji Maeda, K. Christopher Garcia, Mark von Zastrow, Asuka Inoue\*, Brian K. Kobilka\* (\*共同責任著者)

DOI: doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.018

URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.018>