

## Gタンパク質共役型受容体キナーゼの生理機能

大場 悠生, 仲矢 道雄

### 1. はじめに

Gタンパク質共役型受容体キナーゼ (G protein-coupled receptor kinase: GRK) は, リガンド刺激により活性化されたGタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) のC末端領域をリン酸化し, GPCRの脱感作を担うリン酸化酵素として知られてきた (図1). GRKがGPCRのC末端領域のセリン/トレオニン残基をリン酸化すると, リン酸化されたGPCRに $\beta$ -アレステンが結合する. そして, この結合によりGタンパク質とGPCRの共役が立体的に障害されるとともに, GPCRの細胞内への移行が促進され, さらなるGPCRの活性化が阻害される. ヒトゲノム中においては約800種ものGPCRが存在しているといわれており, GRKはGPCRの活性を制御することで, GPCRを介する生体の恒常性維持に大きく貢献している.

一方で近年, GRKがGPCR以外の細胞内タンパク質をリン酸化することで, 細胞内シグナル伝達を制御し, GPCRの脱感作とは無関係にさまざまな生理的応答に関与することが明らかとなってきた<sup>1)</sup>. さらに, GRKがそのキナーゼ活性に依存せずに, 細胞内タンパク質と相互作用することで, 生理的応答を制御することが判明してきた. 本稿では, 近年急速に明らかになれつつあるGRKのGPCR以外の新たな細胞内基質や結合タンパク質, およびそれらの生理機能について, 筆者らの知見も含め紹介する.

### 2. GRKによる細胞内タンパク質のリン酸化

GRKは, 哺乳類においてGRK1からGRK7までの7種類のアイソフォームが存在する. どのGRKもGPCRの脱感作に関与するという点では共通しているが, それぞれのGRKの組織分布は異なっている<sup>1)</sup>. GRK1とGRK7は網膜に, GRK4は精巣において特異的に発現している. 一

方で, GRK2, GRK3, GRK5, GRK6は全身に広く発現している. GRKはプロテインキナーゼA (protein kinase A: PKA), プロテインキナーゼG (protein kinase G: PKG), およびプロテインキナーゼC (protein kinase C: PKC) を中心とするAGCキナーゼグループに属しており, 全てのGRKは三つのドメインから構成されている. すなわち, N末端側から順に, Gタンパク質の活性を調節することが知られている「Regulator of G protein signaling (RGS) ドメイン」, 基質のリン酸化に必要な「セリン/トレオニンプロテインキナーゼドメイン」, そしてGRKの細胞内局在に影響を与えると考えられている「C末端ドメイン」から成り立っている.

7種類のGRKの中で, 最もよく研究され, 多くの機能が明らかになっているのがGRK2である. GRK2は, GPCRを脱感作することが報告された初めてのGRKであり<sup>2)</sup>, 心不全時においては $\beta$ アドレナリン受容体などの脱感作に関与することで, 病態を悪化させることが知られている<sup>3)</sup>. また, GPCRの脱感作とは無関係なGRK2の生理機能として, 細胞の遊走能の亢進作用<sup>4)</sup> やインスリン抵抗性の亢進作用<sup>5)</sup> などが報告されている. これらの機能はそれぞれ, GRK2によるヒストン脱アセチル化酵素6 (histone deacetylase 6: HDAC6) あるいはインスリン受容体基質1 (insulin receptor substrate 1: IRS1) のリン酸化を介して引き起こされる. また, GRK2に次いでよく研究されているGRK5は, GPCR以外にp53<sup>6)</sup> やヒストン脱アセチル化酵素5 (histone deacetylase 5: HDAC5)<sup>7)</sup> をリン酸化することで, DNA損傷によって引き起こされるアポトーシスを抑制したり, 心肥大関連遺伝子の発現を促進したりすることが報告されている.

その一方でGRK2, GRK5以外の他のGRKによる細胞内基質のリン酸化に関する研究は, これまでほとんど行われていない. 筆者らは最近, 全身に広く発現している4種類のGRK (GRK2, GRK3, GRK5, GRK6) の中でもGRK6のみが, そのキナーゼ活性に依存してマクロファージなどの貪食細胞によるアポトーシス細胞の貪食を促進することを見いだした<sup>8)</sup>. 興味深いことにGRK6はこれまで知られている二つの貪食細胞内のシグナル伝達経路 (DOCK180→ELMO→Rac1, GULP1→Rac1経路) とは別の新規経路によりRac1を活性化し貪食を促進していた (図2A). アポトーシス細胞の貪食にはGRK6のキナーゼ活性

九州大学大学院薬学研究薬効安全性学分野 (福岡県福岡市東区馬出3-1-1)

The physiological role of G protein-coupled receptor kinase

Yuki Ohba and Michio Nakaya (Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan)  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870612

© 2015 公益社団法人日本生化学会

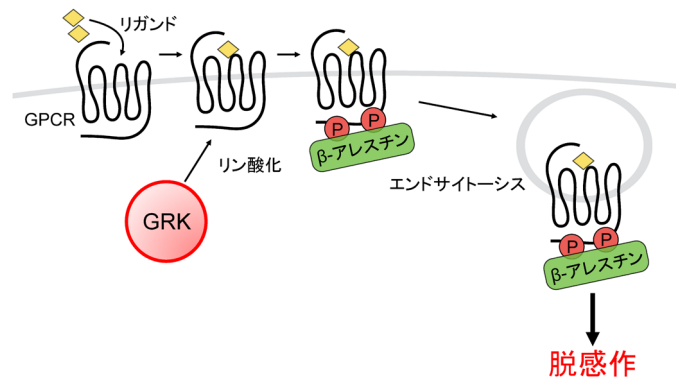


図1 GRKによるGPCRの脱感作

リガンドが結合し、活性化したGPCRは、GRKによってリン酸化される。リン酸化されたGPCRには、 $\beta$ -アレスチンが結合し、GPCRは脱感作へと導かれる。

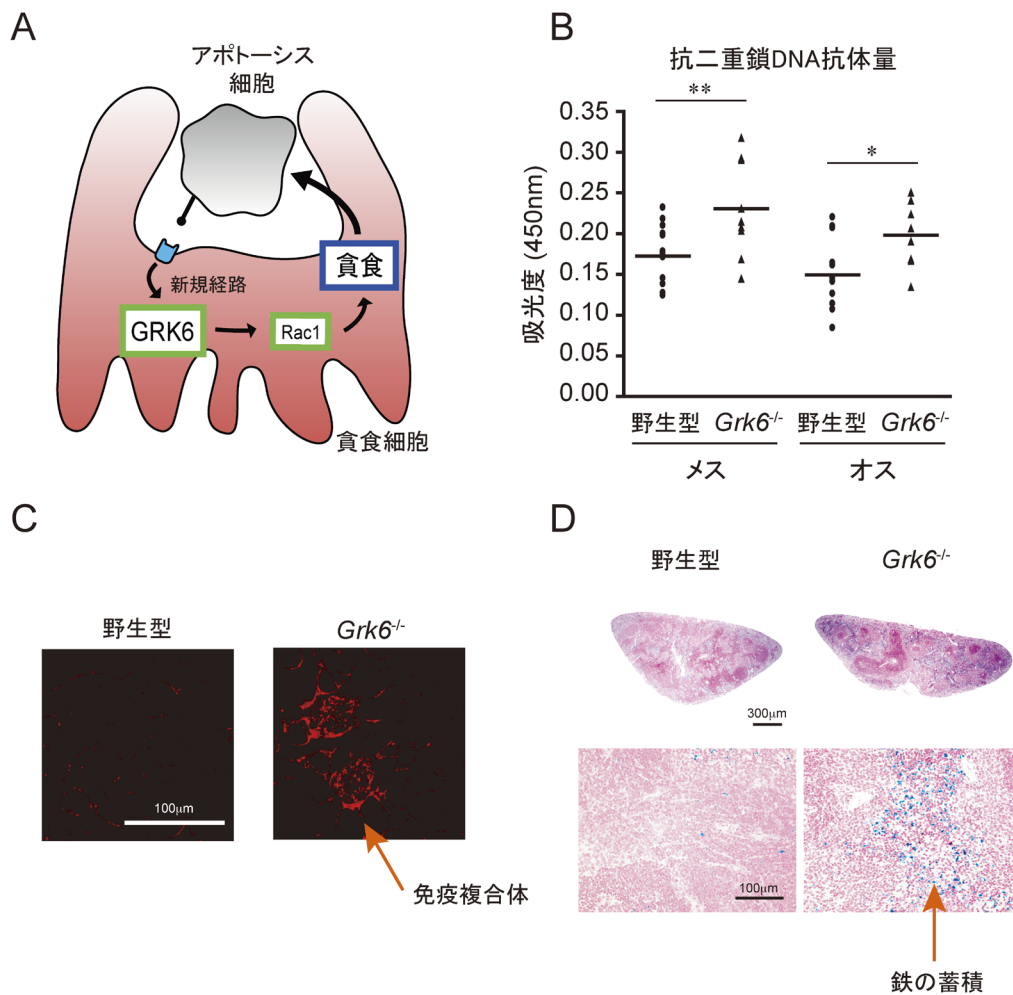


図2 アポトーシス細胞の貪食におけるGRK6の関与

(A) GRK6によるアポトーシス細胞の貪食の亢進。(B) 野生型マウスおよびGRK6ノックアウトマウスの血液中の抗二重鎖DNA抗体量。(C) 野生型マウスおよびGRK6ノックアウトマウスの腎臓における免疫複合体の検出。(D) 野生型マウスおよびGRK6ノックアウトマウスの脾臓における鉄の検出。 \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ 。(B~D)は文献8より一部を改変し、転載した。

が重要であることから、GRK6は何らかのタンパク質をリン酸化することでアポトーシス細胞の貪食を促進していると考えられた。そこで筆者らは、リン酸化プロテオミクス法を用いてこのGRK6の基質探索を行った。その結果、GRK6が同じEzrin-Radixin-Moesinファミリーに属するタンパク質である、RadixinとMoesinのリン酸化を促進することが明らかとなった。そしてGRK6ノックアウトマウス由来の骨髄マクロファージにおいては、野生型マウス由来のそれと比較してRadixinとMoesinのリン酸化レベルが低下していることを見出した。さらにGRK6を過剰発現させたNIH3T3細胞においてRadixinとMoesinをノックダウンするとその貪食能が低下した。これらの結果から、RadixinとMoesinのリン酸化は、GRK6を介した貪食促進経路に関与していると考えられた。一方で、*in vitro* キナーゼアッセイではこれらの基質がGRK6に直接リン酸化されなかったことより、GRK6は間接的にMoesinとRadixinのリン酸化に関与することがわかった。

次に筆者らは生体内でのアポトーシス細胞の貪食におけるGRK6の役割を解明するため、GRK6の発現量が特に高かった脾臓のマクロファージに着目した。脾臓は大別して赤脾髄と白脾髄と呼ばれる領域に分けられる。赤脾髄は老廃赤血球の処理の場として、白脾髄はB細胞がアポトーシスを起こし貪食される場として知られている。GRK6ノックアウトマウスの脾臓の白脾髄においては、CD68陽性マクロファージにより貪食されずに残存しているアポトーシス細胞が多く観察された。生体内のアポトーシス細胞が貪食されずに残ると、自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus : SLE）様の症状を引き起こす可能性が知られている<sup>9)</sup>。そこで筆者らは、SLEの主な症状である血中の抗二重鎖DNA抗体量の増加や腎臓の糸球体における免疫複合体の沈着が、GRK6ノックアウトマウスにおいて認められるかについて検討した。その結果、GRK6ノックアウトマウスにおいて血中の抗二重鎖DNA抗体量の増加や腎臓の糸球体における免疫複合体の沈着が観察され、GRK6ノックアウトマウスはSLE様の症状を呈することが明らかとなった（図2B, C）。

赤脾髄に存在するF4/80陽性マクロファージは、不要になった赤血球を除去する。しかしながら、不要な赤血球が適切に除去されなければ、それに含まれる鉄が脾臓に蓄積することが知られている<sup>10)</sup>。GRK6はF4/80陽性マクロファージにおいても強い発現が認められたことから、野生型マウスおよびGRK6ノックアウトマウスの脾臓から回収したF4/80陽性マクロファージによる、赤血球の取り込み能を比較した。その結果、GRK6ノックアウトマウス由来のマクロファージにおいて赤血球の取り込み能が有意に低下していた。実際、GRK6ノックアウトマウスの脾臓においては、野生型マウスに比べ、有意な鉄の蓄積が認められ

た（図2D）。すなわち、GRK6はアポトーシス細胞の貪食だけではなく、不要になった赤血球の除去にも関与することが明らかとなった。

また筆者らは最近、GRK6がNF- $\kappa$ B（nuclear factor- $\kappa$ B）シグナルの抑制タンパク質であるI $\kappa$ B $\alpha$ （inhibitor of NF- $\kappa$ B）の32番目と36番目のセリン残基をリン酸化し、I $\kappa$ B $\alpha$ の分解を促進することで、TNF- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ ）により活性化されるNF- $\kappa$ Bシグナルを亢進させることを報告した<sup>11)</sup>。これまでI $\kappa$ B $\alpha$ の32番目と36番目のセリン残基をリン酸化し、その分解を促進するリン酸化酵素としてI $\kappa$ Bキナーゼ（I $\kappa$ B kinase : IKK）が広く知られていたが、今回の研究によりGRK6もNF- $\kappa$ Bシグナルにおいて、IKKと類似の働きを持つことが明らかとなった。

### 3. キナーゼ活性に依存しないGRKの機能

GRKはGPCRや細胞内タンパク質をリン酸化するだけではなく、キナーゼ活性非依存的に生理的応答を制御することも明らかとなってきた。先に述べたように、GRK6はキナーゼ活性依存的に貪食細胞によるアポトーシス細胞の貪食を促進する<sup>8)</sup>。一方でNIH3T3細胞にGRK2を過剰発現させ、貪食能の評価を行ったところ、GRK6と同様にGRK2も貪食能を亢進させることが明らかとなった。しかしながら、キナーゼ活性を欠損させた変異型GRK2を過剰発現させた際にも、野生型GRK2の場合と同程度の貪食能の亢進が観察された。これらの結果から、GRK2はキナーゼ活性に依存せずに貪食細胞の貪食能を亢進する分子であり、キナーゼ活性依存的に作用を示すGRK6とは異なるメカニズムで貪食を制御する分子であると考えられた。

一方、GRK5については、そのキナーゼ活性に依存せず、活性化T細胞核内因子（nuclear factor of activated T-cells : NFAT）により誘導される心肥大関連因子の発現を促進することが報告された<sup>12)</sup>。この報告では、核内移行シグナル（nuclear localization signal : NLS）を持ち、核内へと移行することができるGRK5が、NFAT結合配列に直接結合することでNFATと協調して心肥大関連因子の発現を誘導すると考察されている。また、GRK5は、キナーゼ活性非依存的に細胞膜の構成成分であるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸（phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate : PIP2）とF-actinの両方に結合することで、これらをつなぐ足場タンパク質として働き、F-actinによる糸状仮足の形成や神経細胞の軸索伸長を促進することも報告されている<sup>13)</sup>。

### 4. 蛍光プローブを用いた、細胞外刺激によるGRKの構造変化の検出

前述のとおり、近年GRKの細胞内基質や結合タンパク



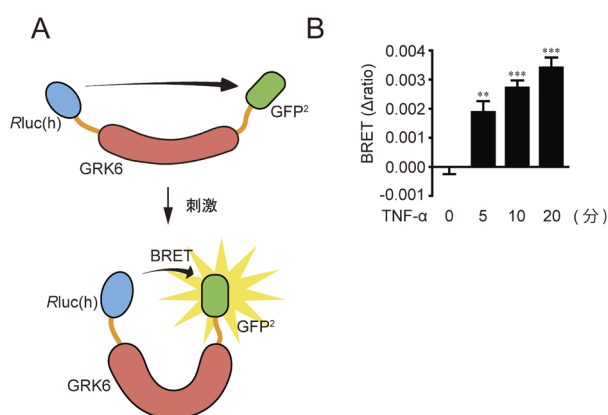


図3 分子内BRETプローブによるGRK6の構造変化の検出

(A) GRK6の分子内BRETプローブの模式図。GRK6の立体構造が変化すると、Rluc(h)とGFP<sup>2</sup>が近接し、エネルギー転移が生じるようになる。(B) TNF- $\alpha$ の刺激時間に依存したGFP<sup>2</sup>の蛍光強度の上昇。BRETプローブを発現させたHEK293細胞にTNF- $\alpha$ 刺激を行ったところ、TNF- $\alpha$ の刺激時間に依存してGFP<sup>2</sup>の蛍光強度の上昇が観察された。TNF- $\alpha$ の刺激によってGRK6の立体構造が変化したと考えられる。\*\*\* $P < 0.001$  vs. TNF- $\alpha$  0分。文献11より一部を改変し、転載した。

質が次々に報告され、GRKがさまざまな細胞内シグナル伝達を制御することが明らかとなってきた。しかしながら、それらのシグナルを調節する際の、GRK自身の活性化に関する研究はほとんど進んでいない。GRK2は、立体構造解析からその阻害剤により不活性化されると、立体構造が変化することが明らかにされており<sup>14)</sup>、GRKの活性が変化するにはその構造が変化すると考えられている。そこで筆者らは、GRK6がTNF- $\alpha$ 刺激時において構造変化するかを検討するために、GRK6のN末端側にルシフェラーゼ (Rluc) を、C末端側に蛍光タンパク質 (GFP<sup>2</sup>) を組み込んだ生物発光共鳴エネルギー転移 (bioluminescence resonance energy transfer: BRET) プローブを設計した<sup>11)</sup> (図3A)。すなわち、このBRETプローブは、GRK6の立体構造が変化すると、発光ドナーであるRlucのエネルギーが蛍光アクセプターであるGFP<sup>2</sup>に転移し、GFP<sup>2</sup>が蛍光を発するようになる。このBRETプローブをHEK293細胞に導入し、TNF- $\alpha$ 刺激を行ってNF- $\kappa$ Bシグナルの活性化を誘導したところ、TNF- $\alpha$ の刺激時間に依存してGFP<sup>2</sup>の蛍光強度が上昇した (図3B)。この結果から、TNF- $\alpha$ 刺激によってGRK6の立体構造は変化し、GRK6が活性化している可能性が示された。

## 5. おわりに

近年の研究からGRKはGPCRの脱感作に加え、細胞内タンパク質のリン酸化やキナーゼ活性非依存的な細胞内シグナルの制御など、非常に多彩な機能を持つ分子である

ことが明らかとなってきた。このようにGRKは多くの機能を持つため、これまで心不全や自己免疫疾患、パーキンソン病、アルツハイマー型認知症などのさまざまな疾患の進展に重要な分子であることが報告されている<sup>1)</sup>。近年、GRK2<sup>14)</sup>やGRK5<sup>15)</sup>の阻害剤が同定され、GRKが関与するこれらの疾患への応用が期待されている。今後は、ますます多くのGRKの新たな基質とそれに関する疾患が同定されるものと考えられ、それらをターゲットとした創薬やそれらの臨床応用が活発に研究されるのではないかと予想される。

## 文 献

- 1) Watari, K., Nakaya, M., & Kurose, H. (2014) *J. Mol. Signal.*, **9**, 1.
- 2) Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., & Lefkowitz, R.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8879–8882.
- 3) Rockman, H.A., Chien, K.R., Choi, D.J., Iaccarino, G., Hunter, J.J., Ross, J. Jr., Lefkowitz, R.J., & Koch, W.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7000–7005.
- 4) Lafarga, V., Aymerich, I., Tapia, O., Mayor, F. Jr., & Penela, P. (2012) *EMBO J.*, **31**, 856–869.
- 5) Usui, I., Imamura, T., Babendure, J.L., Satoh, H., Lu, J.C., Hupfeld, C.J., & Olefsky, J.M. (2005) *Mol. Endocrinol.*, **19**, 2760–2768.
- 6) Chen, X., Zhu, H., Yuan, M., Fu, J., Zhou, Y., & Ma, L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 12823–12830.
- 7) Martini, J.S., Raake, P., Vinge, L.E., DeGeorge, B.R. Jr., Chuprun, J.K., Harris, D.M., Gao, E., Eckhart, A.D., Pitcher, J.A., & Koch, W.J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12457–12462.
- 8) Nakaya, M., Tajima, M., Kosako, H., Nakaya, T., Hashimoto, A., Watari, K., Nishihara, H., Ohba, M., Komiya, S., Tani, N., Nishida, M., Taniguchi, H., Sato, Y., Matsumoto, M., Tsuda, M., Kuroda, M., Inoue, K., & Kurose, H. (2013) *Nat. Commun.*, **4**, 1532.
- 9) Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010) *Cell*, **140**, 619–630.
- 10) Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., & Murphy, K.M. (2009) *Nature*, **457**, 318–321.
- 11) Ohba, Y., Nakaya, M., Watari, K., Nagasaka, A., & Kurose, H. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **461**, 307–313.
- 12) Hullmann, J.E., Grisanti, L.A., Makarewich, C.A., Gao, E., Gold, J.I., Chuprun, J.K., Tilley, D.G., Houser, S.R., & Koch, W.J. (2014) *Circ. Res.*, **115**, 976–985.
- 13) Chen, Y., Wang, F., Long, H., Chen, Y., Wu, Z., & Ma, L. (2011) *J. Cell Biol.*, **194**, 905–920.
- 14) Thal, D.M., Homan, K.T., Chen, J., Wu, E.K., Hinkle, P.M., Huang, Z.M., Chuprun, J.K., Song, J., Gao, E., Cheung, J.Y., Sklar, L.A., Koch, W.J., & Tesmer, J.G. (2012) *ACS Chem. Biol.*, **7**, 1830–1839.
- 15) Homan, K.T., Wu, E., Cannavo, A., Koch, W.J., & Tesmer, J.J. (2014) *Molecules*, **19**, 16937–16949.

## 著者寸描

## ●大場 悠生（おおば ゆうき）

九州大学大学院薬学府薬効安全性学分野修士課程。

■略歴 1992年福岡県に生る。2014年九州大学薬学部卒業。  
同年より九州大学大学院薬学府修士課程在学中。

■研究テーマと抱負 GRKの新たな細胞内基質および生理機能を明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp>

■趣味 旅行。

## ●仲矢 道雄（なかや みちお）



九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野准教授。博士（医学）。

■略歴 1977年大阪府に生る。2000年東京大学理学部卒業。06年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了。07年九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野助教を経て、12年より同分野准教授。

■研究テーマと抱負 GRKの生理機能解析。

■ウェブサイト <http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp>

■趣味 子供と色々な公園で遊ぶ事。