

TSUBAME 共同利用 令和4年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 アレスチン分子の活性化機構の分子動力学シミュレーション  
英文: Molecular dynamics simulations of the arrestin activation mechanism井上 飛鳥  
Asuka Inoue東北大学大学院薬学研究科  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University  
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp>

細胞質シグナル制御タンパク質である  $\beta$  アレスチンは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) により活性化を受ける。この活性化にはリン酸化された GPCR の C 末端との結合が重要だと考えられてきたが、最近の研究によって GPCR の膜貫通ヘリックスから成る疎水性コアや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>) も寄与していることが分かってきた。そこで、リン酸化 C 末端、疎水性コア及び PIP<sub>2</sub> の  $\beta$  アレスチンへの活性化の寄与を分子動力学シミュレーションによって検証し、 $\beta$  アレスチンの活性化機構を調べた。その結果、それぞれの結合構造では  $\beta$  アレスチンの活性化の程度が異なり、リン酸化 C 末端は細胞質側コアよりも活性化への寄与が大きいことが分かった。また、PIP<sub>2</sub> によって  $\beta$  アレスチンは活性化構造に近づくことが分かった。

Activation of  $\beta$ -arrestins is triggered by binding to G protein-coupled receptors (GPCRs) on the plasma membrane. Although binding to the phosphorylated C-terminal of GPCRs has been considered important for this activation, recent studies have revealed that  $\beta$ -arrestin activation is also influenced by the intracellular hydrophobic core of the GPCR and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in the plasma membrane. Here, by using molecular dynamics simulation, we examined the contribution of the phosphorylated C-terminus, the intracellular core, and PIP<sub>2</sub> to  $\beta$ -arrestin activation. Our results show that the degree of  $\beta$ -arrestin activation differs for each binding mode, with the phosphorylated C-terminus contributing more to activation than the intracellular core. In addition, we find that PIP<sub>2</sub> molecules shift  $\beta$ -arrestin to the active conformation.

**Keywords:**  $\beta$  アレスチン、PIP<sub>2</sub>、GPCR、MD シミュレーション

#### 背景と目的

$\beta$  アレスチンは細胞膜上の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に結合することで活性化する。活性化した  $\beta$  アレスチンは GPCR の内在化を引き起こすことで G タンパク質シグナルを終結させるほか、多様なシグナル分子の活性化の足場となることが知られている。そのため、 $\beta$  アレスチンによる GPCR シグナル制御機構は GPCR を標的とした創薬において注目されている。これまでの研究において、 $\beta$  アレスチンの活性化にはリン酸化された GPCR の C 末端との結合が重要だと考えられてきたが、最近の研究によって GPCR の細胞質側のコアや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>) によっても活性化が制御されることが分かってきた。

本研究では、リン酸化 C 末端、細胞質側の疎水性コア及び PIP<sub>2</sub> による  $\beta$  アレスチンの構造変化を分子動力学 (MD) シミュレーションによってとらえ、それぞれの活

性化に対する寄与を調べることを目的とした。

#### 概要

始めに、バソプレシン V2 受容体 (V2R) と  $\beta$  アレスチンの複合体モデルをホモロジーモデリングによって構築した (図 1)。この複合体立体構造は GPCR のリン酸化 C 末端と細胞質側コアの両方に結合している。モデリングの鋳型構造には V2R の C 末端を融合させたキメラ M2 ムスカリン受容体 (M2R) と  $\beta$  アレスチンの複合体構造 (PDBID: 6U1N) ならびに V2R と G タンパク質の複合体構造 (PDBID: 7KH0) を用いた。リン酸化 C 末端と細胞質側コアによる活性化の寄与を調べるために、①リン酸化 C 末端と細胞質側コアの両方に結合した GPCR- $\beta$  アレスチン複合体モデル、②リン酸化 C 末端のみと結合したモデル、③細胞質側コアのみと結合したモデルの 3 種を構築した。これらのモデルを 1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC) 膜に埋め込んだ (図 2)。また、PIP<sub>2</sub> による  $\beta$  アレスチンの活性

化の寄与を検証するために、PIP<sub>2</sub>を含んだ POPC 膜に③のモデルを埋め込み、100 ns の MD シミュレーションを行った。

MDシミュレーション中におけるβアレスチンの活性化の評価にはβアレスチンの2つのドメイン間のねじれの角度を用いた(図3)。N末端側のNドメインとC末端側のCドメイン間のねじれの角度が大きいほど活性化構造に近く、ねじれの角度が小さいと不活性化構造に近いことを示している。

結果および考察

POPC 膜におけるシミュレーションの結果、活性化を示すドメイン間のねじれの角度は① > ② > ③ の順になっていた(図4a)。この結果からリン酸化C末端と細胞質側コアが活性化に与える程度は異なり、リン酸化C末端のほうが細胞質側コアよりも活性化に対する寄与が大きいと考えられる。

また、PIP<sub>2</sub>を含有したPOPC膜におけるシミュレーションでは、PIP<sub>2</sub>含有POPC膜のβアレスチンはPOPCのみの膜よりもドメイン間のねじれの角度が大きくなっていた(図4b)。この結果から、細胞質側コアとの結合ではほとんど活性化を示さないβアレスチンについて、PIP<sub>2</sub>が存在する脂質二重膜環境では活性化構造に近づくことが示唆された。

まとめ、今後の課題

今回のMDシミュレーションの結果からGPCRのリン酸化C末端、細胞質側コア、PIP<sub>2</sub>によるβアレスチンの活性化構造変化への寄与が分かった。今後はこれらの活性化の程度の違いがβアレスチンのシグナル伝達分子との相互作用に及ぼす影響の解析を進める。

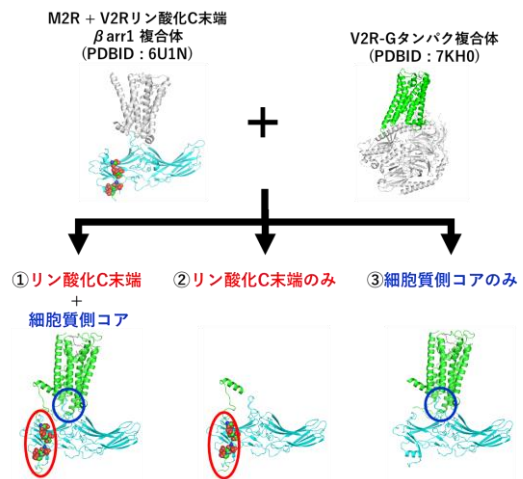


図1 βアレスチンのモデル構築

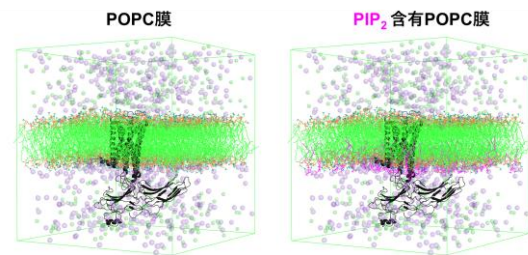


図2 脂質膜への埋め込み

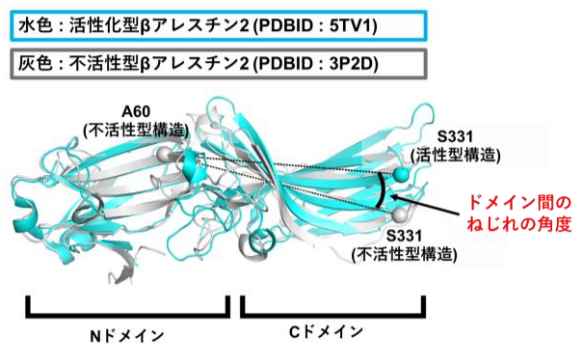


図3 βアレスチンのドメイン間のねじれ

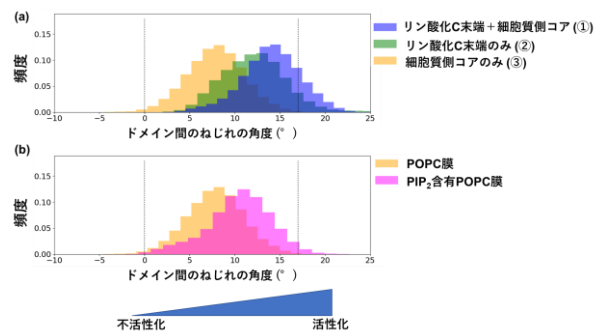


図4 βアレスチンの活性化  
(a) POPC 膜における3つのモデルの比較  
(b) POPC 膜とPIP<sub>2</sub>含有POPC膜の比較