

TSUBAME 共同利用 令和5年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 GPCR とシグナル分子の相互作用機構の分子動力学シミュレーション

英文: Molecular dynamics simulations for the interaction mechanisms between GPCRs and signaling molecules

井上飛鳥  
Auska 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>

## 邦文抄録(300 字程度)

G タンパク質共役受容体(GPCR)は細胞膜上に発現し、細胞外から細胞内へのシグナル伝達を担う。β アレスチンは GPCR によって活性化される細胞内シグナル分子のひとつであり、細胞膜に含まれ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>) と相互作用し、アロステリックに活性制御されることが報告されている。本課題研究において、PIP<sub>2</sub> が β アレスチンに与える影響を GPCR-β アレスチン複合体の分子動力学シミュレーションによって調べたところ、PIP<sub>2</sub> 分子が β アレスチンの既知 PIP<sub>2</sub> 結合部位と結合することが観察された。さらに、既知の結合部位とは別の部位に PIP<sub>2</sub> が結合する様子が観察され、この部位と PIP<sub>2</sub> の相互作用の滞留時間は既知 PIP<sub>2</sub> 結合部位よりも長いことがわかった。

## 英文抄録(100 words 程度)

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are expressed in the plasma membrane and transmit signals from the extracellular side to the intracellular side. GPCRs activate many intracellular signaling molecules including β-arrestins, which interact with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) molecules contained in the plasma membrane. Here, we used molecular dynamics simulations to study the effects of PIP<sub>2</sub> on β-arrestin in a model GPCR-β-arrestin complex system. PIP<sub>2</sub> molecules were immediately bound to the known PIP<sub>2</sub>-binding site of β-arrestin, and another PIP<sub>2</sub>-binding site was observed with longer retention time than the known PIP<sub>2</sub>-binding site.

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

## 背景と目的

G タンパク質共役受容体(GPCR)は細胞膜上に発現する膜タンパク質であり、ヒトゲノム上に約 800 種類存在する最大のタンパク質ファミリーである。GPCR は光・匂い・ホルモンなどといった細胞外からの刺激を細胞内へ伝える役割をもっており、細胞内の様々なシグナル分子を活性化する。そのうちのひとつとして β アレスチンが知られており、G タンパク質シグナルの終結に関わるとともに β アレスチン依存的なシグナルの起点となる。GPCR-β アレスチンのシグナル経路は創薬上重要であり、GPCR を標的とした薬剤の効果が多大な影響を及ぼす。

リガンド結合により活性型となった GPCR は、細胞質に存在する β アレスチンを細胞膜へとリクルートする。β アレスチンの活性化にはリン酸化 GPCR との相互作用が重要であるが、近年、脂質二重膜と相互作用も β

アレスチンの活性化の制御因子であることが報告されている。ホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸(PIP<sub>2</sub>) はこのような膜脂質のひとつであり、細胞膜に近づいた β アレスチンと結合することで GPCR と結合していない β アレスチンを弱く活性化できることが本研究者の先行研究で明らかとなっている。

酸性脂質である PIP<sub>2</sub> による β アレスチンの活性化には β アレスチン表面上に存在する3つの塩基性アミノ酸から構成される結合部位が関わっている(図1)。一方で、この部位のアミノ酸残基を中性アミノ酸に置換して PIP<sub>2</sub> との結合能を失わせた β アレスチン変異体でも PIP<sub>2</sub> との結合は残存しており、β アレスチンには他の部位でも PIP<sub>2</sub> と結合しうることが示唆されていた。

本研究課題においては、β アレスチンと PIP<sub>2</sub> の相互作用様式を理解することを目的として分子動力学(MD)シミュレーションを行い、新規 PIP<sub>2</sub> 結合部位の同定を

試みた。

## 概要

本研究では  $\beta$  アレスチンと結合する GPCR としてバンプレシン V2 受容体 (V2R) をモデルとした。脂質二重膜の内葉に  $\text{PIP}_2$  を 10%mol の割合で含む 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) 二重膜を用意し、V2R- $\beta$  アレスチン複合体を埋め込んだ (図2)。 $\beta$  アレスチンが V2R と結合し、活性型構造を取る初期状態から分子動力学シミュレーションを開始し、その動態を観察した。その際、 $\text{PIP}_2$  の初期配置が及ぼす影響を取り除くため、 $\text{PIP}_2$  の初期配置をランダムにした脂質二重膜を作製し、計 3 回のシミュレーション結果を解析した。

## 結果および考察

シミュレーション中では  $\text{PIP}_2$  と既知  $\text{PIP}_2$  結合部位との結合が見られた (図3)。これは界面活性剤ミセル中の実験構造 (図1) で見られたのと同様の部位であり、シミュレーション中における二重膜中でも同様に結合することがわかった。さらに、 $\beta$  アレスチンは別の箇所でも  $\text{PIP}_2$  と結合していることを見出した (図3)。この新規  $\text{PIP}_2$  結合箇所と既知  $\text{PIP}_2$  結合部位を構成する各残基が  $\text{PIP}_2$  と相互作用距離にある時間の割合を調べたところ、この新規結合部位は既知結合部位よりも長い時間  $\text{PIP}_2$  と相互作用していることがわかった (図4)。4 残基からなる当該部位を新規の  $\text{PIP}_2$  結合部位と位置付けた。

## まとめ、今後の課題

本課題研究では  $\beta$  アレスチンの新規  $\text{PIP}_2$  結合部位を MD シミュレーションによって同定した。今後、不活性化状態の  $\beta$  アレスチンと  $\text{PIP}_2$  の結合・解離過程をシミュレーションすることで、 $\text{PIP}_2$  によって  $\beta$  アレスチンが活性化状態へと至る全過程を捉えることができる可能性がある。また、本研究により見出した新規の  $\text{PIP}_2$  結合部位について、変異体を用いた機能解析を計画しており、 $\beta$  アレスチンの GPCR シグナル制御における  $\text{PIP}_2$  の重要性の実験的実証が望まれる。

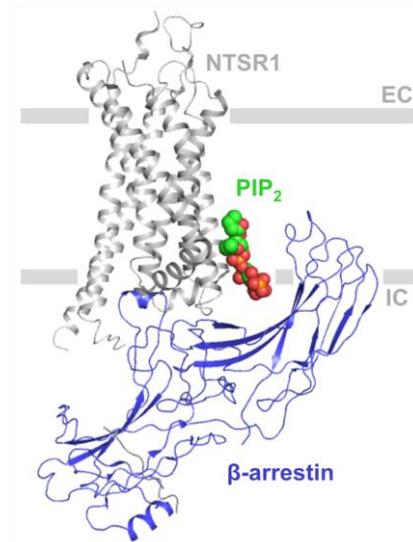


図1 活性型  $\beta$  アレスチンと  $\text{PIP}_2$  の結合

ニューロテンシン受容体1 (NTSR1)- $\beta$  アレスチン 1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造 (PDBID: 6UP7)。一分子の  $\text{PIP}_2$  が  $\beta$  アレスチンと結合している。

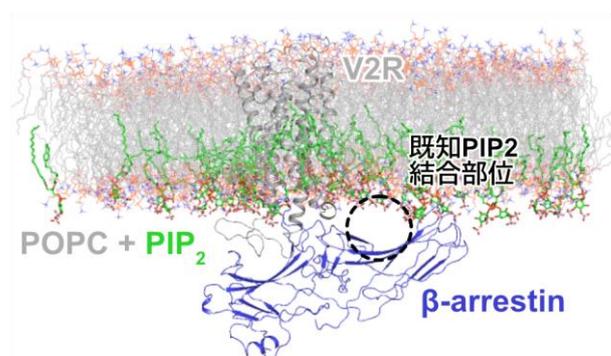


図2  $\text{PIP}_2$  と活性化  $\beta$  アレスチンのシミュレーション系

MD シミュレーションにおける初期配置の一例。初期状態では既知  $\text{PIP}_2$  結合部位 (図1) と  $\beta$  アレスチンの相互作用は存在しない。

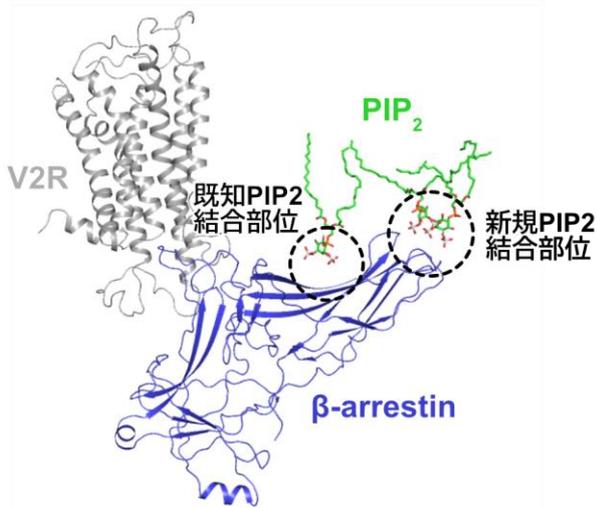


図3 シミュレーション中で $\beta$ アレスチンに結合した $PIP_2$  既知 $PIP_2$ 結合部位と比べてGPCR(V2R)からより離れた位置で $PIP_2$ と結合している。

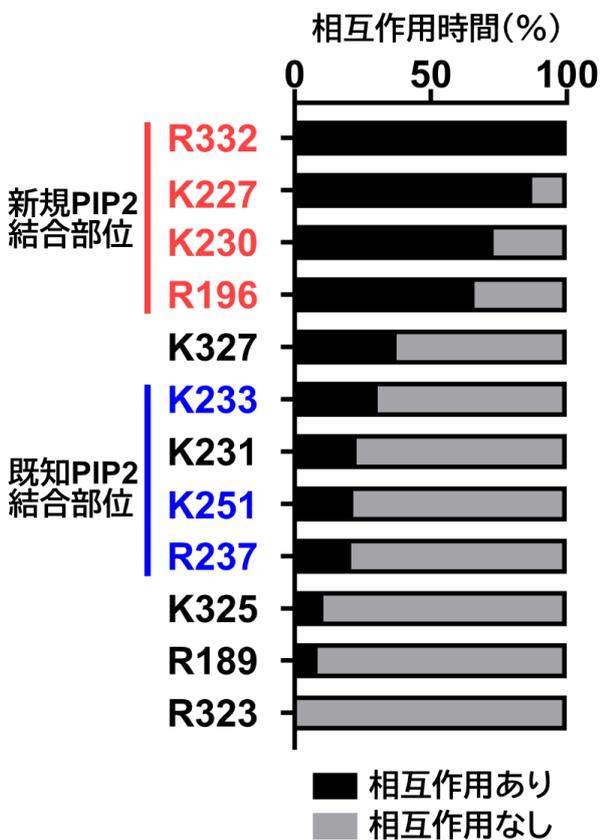


図4  $\beta$ アレスチンの残基と $PIP_2$ と相互作用時間  
 $\beta$ アレスチン表面に存在する塩基性アミノ酸と $PIP_2$ の相互作用時間は新規  $PIP_2$  結合部位が既知部位よりも長い。