

氏 名 Liu, Chang

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2428 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Structural determinants of the inhibition of M2R by Sigma-1R
and the direct inhibition of GIRK channels by Sigma-1R
antagonist

論文審査委員 主 査 西田 基宏
生理科学専攻 教授
久保 義弘
生理科学専攻 教授
古瀬 幹夫
生理科学専攻 教授
岡村 康司
大阪大学 大学院医学系研究科 教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Liu, Chang

Title Structural determinants of the inhibition of M2R by Sigma-1R and
the direct inhibition of GIRK channels by Sigma-1R antagonist

Sigma-1 receptor (S1R) is a multimodal chaperone protein located chiefly at the mitochondrion-associated endoplasmic reticulum (ER) membrane (MAM) at rest. S1R can translocate to various regions of the cell such as plasma membrane (PM) or ER-PM junction, under cellular stress or the application of its ligands. It has been implicated in a diverse array of pathophysiological conditions including drug addiction, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). One of the well-known disease associated mutants of S1R, called ALS-linked E102Q mutation, is reported to cause ER stress-mediated defects in protein homeostasis and dysregulation of RNA-binding proteins, eventually leading to the occurrence of ALS. The crystal structure analysis of human S1R revealed that S1R has only one transmembrane domain (TM) with a short N-terminal (N-ter) on the luminal side and a bulky C-terminal (C-ter) including a β -barrel structure on the cytosolic side. The site of the E102Q mutation locates on the C-ter of S1R. It has been reported that S1R directly interacts with various proteins such as NMDAR, STIM1, BiP, IP₃R, voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels. It was also reported that S1R colocalizes with muscarinic acetylcholine receptor M2 (M2R) on the soma of motoneurons. M2R is one of the G_{i/o} coupled receptors expressed on PM of such as cardiac muscle cells and neurons, and it plays key roles in wide-ranged physiological responses. Despite of the knowledge of the colocalization of M2R and S1R, there is no information about the functional regulation of M2R by S1R so far.

The aim of the first part of this study is to clarify whether and how S1R could interact with M2R, and I obtained the results as follows: (1) By patch-clamp recordings of HEK293T cells coexpressing G-protein coupled inward rectifier potassium channel (GIRK) as an effector, it was observed that S1R inhibits the function of only M2R among other types of G_{i/o} coupled receptors. But the S1R disease mutant E102Q does not inhibit the function of M2R. (2) By immunohistochemical staining and confocal imaging, it was observed that the expression level of M2R on PM is not clearly down regulated by S1R in HEK293T cells, and that of M2R on PM is slightly decreased by

S1R in HeLa cells. In both HEK293T and HeLa cells, S1R localizes close to M2R, suggesting an interaction with M2R at the ER-PM junction. (3) By co-immunoprecipitation, the interaction of M2R and S1R was confirmed. (4) By analyzing various chimeras and mutants between M2R and M4R, it was identified that Glu172 and Glu175 of M2R on the extracellular loop 2 region, as well as transmembrane domain 6 (TM6), are critical for the inhibition by S1R. The data demonstrate that S1R, not only decreases the expression level on the PM, but also inhibits the function of M2R, via the extracellular loop 2 and TM6.

Based on the preceding pharmacological studies, S1R is presumed to exist in various forms from monomer to octamer, and the functional forms of S1R are monomer and dimer. Agonist bound S1R favors monomeric or dimeric forms, while antagonist bound S1R favors tetrameric form which loses its function. BD1047 dihydrobromide (BD1047) is one of the representative antagonists of S1R. I have tried to inhibit the function of S1R using BD1047 in the patch-clamp study, and unexpectedly observed that BD1047 directly inhibits the GIRK1/2 current even without the expression of S1R.

In the second part, I aimed to clarify the effect of BD1047 on GIRK channels as well as the structural determinants. I performed two-electrode voltage clamp experiments using *Xenopus* oocytes as in vitro expression system and observed the following results: (1) BD1047 directly inhibits the current of GIRK channels. (2) BD1047 has a weak inhibition effect on GIRK2 channel and a remarkable inhibition effect on GIRK4 channel. (3) A GIRK4-GIRK2 chimera which contains only the cytoplasmic N-ter of GIRK4 showed a strong inhibition effect by BD1047. Leu77 on the N-ter of GIRK4 is essential for the inhibition effect. (4) Molecular docking analysis indicated the importance of the Leu77 for the docking. The data demonstrate that BD1047 directly inhibit the current of GIRK channels and GIRK4 Leu77 is essential for the inhibition effect by BD1047.

To summarize all the data, it is concluded that S1R partly decreases the expression of M2R on PM and also inhibits its function via its extracellular loop 2 and TM6, and that the antagonist of S1R, BD1047, directly binds to GIRK4 channel and inhibits the current at Leu77 in the N-ter cytoplasmic region.

博士論文審査結果

Name in Full

氏名 Liu, Chang

Title

論文題目 Structural determinants of the inhibition of M2R by Sigma-1R and the direct inhibition of GIRK channels by Sigma-1R antagonist

出願者 Liu, Chang 氏は、本論文において、電気生理学的解析を基盤に、細胞内小胞体膜上に発現する 1 回膜貫通型の Sigma-1 受容体 (S1R) が形質膜上に発現する 7 回膜貫通型のムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2R) シグナリングを負に制御する分子構造基盤を示し、また、S1R アンタゴニストが M2R の下流で活性化される $G_{i/o}$ タンパク質共役型内向き整流性 K⁺チャネル (GIRK) を直接阻害する構造基盤を、*in silico* 分子ドッキング解析との組み合わせにより明らかにした。

S1R について、シャペロン蛋白質と機能すること、小胞体膜と形質膜との接合領域に移行し、様々な細胞膜タンパク質と相互作用すること、C 端細胞内領域の変異 (E102Q) がヒト筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症に関連することが知られている。運動ニューロンの細胞体において、S1R と M2R が共局在することは知られていたが、機能的な共役の有無は未解明だった。出願者は、S1R、M2R、GIRK を共発現させたヒト胎児腎細胞株 HEK293T の whole cell patch-clamp 解析から、S1R が、GIRK の基礎電流には影響を与えず、M2R 活性化による GIRK 電流を抑制すること、同ファミリーに属する M4R の活性化は抑制しないことを見出した。一方、S1R (E102Q) 変異体では M2R の活性化は抑制されなかった。HEK293T 細胞を用いた免疫組織学的解析において、S1R 共発現により M2R の形質膜上の発現量の明確な減少は観察されなかった。また、M2R は形質膜に発現するのに対し、S1R は形質膜と小胞体膜との接合領域に発現することが示唆された。免疫沈降実験により、M2R と S1R が相互作用することも確認された。M2R と M4R のキメラ変異体を作成し、電気生理学的に解析した結果、M2R の細胞外第 2 ループに存在する Glu172 と Glu175、および 6 番目の膜貫通ドメイン (TM6) が S1R による機能抑制に重要であることが明らかとなった。

S1R に作用する化合物の作用に関する電気生理学的解析の最中に、S1R の代表的なアンタゴニストと認識されている BD1047 が S1R 非存在下においても GIRK1/2 電流を阻害するという予想外な知見を得た。そこで次に、アフリカツメガエル卵母細胞に GIRK のみを発現させ、二電極膜電位固定法による解析を行った。その結果、BD1047 は GIRK 電流を直接阻害すること、中でも GIRK4 に対する親和性が GIRK2 のそれと比べて高いことが明らかになった。GIRK4 と GIRK2 のキメラ変異体、および点変異体を作成し、BD1047 の阻害作用に必要な部位を調べた結果、GIRK4 の細胞質 N 末端領域が必須であり、特にその領域に存在する Leu77 が必須であることが示された。*In silico* 分子ドッキング解析の結果、GIRK4 の Leu77 が確かに BD1047 との結合に重要であることが構造的にも示された。

以上の結果は、S1R が小胞体膜-形質膜接合領域において M2R と相互作用し M2R の活性化を負に制御すること、その抑制に M2R の細胞外第 2 ループと TM6 が重要であること、ならびに、S1R 阻害薬として使われる BD1047 が S1R と関係なく GIRK を直接阻害することを明らかにした画期的な知見である。以上の研究結果から、全員一致で本論文が博士学位論文に相応しいと結論した。