

論 文 要 旨

氏 名

上垣 日育

細胞小器官の一つである小胞体は分泌・膜タンパク質のフォールディングの場であり、小胞体内腔の分子シャペロンや酸化還元酵素によるタンパク質品質管理によって恒常性が維持されている。小胞体のタンパク質品質管理において、翻訳後修飾の一つであるジスルフィド結合形成はタンパク質が安定的な立体構造を獲得するうえで重要な反応であり、一般的に小胞体でジスルフィド結合の形成過程を促進することは、小胞体のタンパク質フォールディングに対して有利に働くとされている。小胞体は酸化還元環境がサイトゾルと比較して酸化的な環境であり、ジスルフィド結合形成に適した場を構築している。さらに、小胞体は、リボソームから合成された新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成を効率的に促進するため、その酸化反応を触媒する PDI-Ero1 α 複合体による酸化的フォールディング機構がある。新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成に伴って生じる電子は、PDI に伝達され、PDI を介して Ero1 α へと伝達される。電子を受け取った Ero1 α は分子状酸素(O₂)へ電子を放出し、活性酸素種の一つである過酸化水素(H₂O₂)を産生する。この H₂O₂ の過剰な産生は小胞体の酸化還元環境を攪乱し、小胞体の恒常性破綻を引き起こす原因となる。一方、ERdj5 は酸化反応に特化した環境である小胞体でジスルフィド還元酵素として機能し、小胞体関連分解や小胞体のカルシウムイオン調節機構において中心的な役割を果たす。しかし、どのように ERdj5 が酸化的な環境である小胞体で電子(還元力)を受け取り、還元反応を触媒しているかは未解明のままであり、小胞体への還元力供給機構も不明であった。

本研究では、ERdj5 の電子ドナータンパク質として小胞体酸化酵素 Ero1 α を質量分析により同定し、Ero1 α が ERdj5 の還元酵素として働くことを明らかにした。また、ERdj5 が Ero1 α による新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングから電子を奪うことで、過剰な H₂O₂ 産生を抑え、小胞体の恒常性維持に寄与することも見出した。さらに、小胞体への還元力は新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングから生じる電子から供給されることを明らかにした。

博士論文

令和 5 年度

小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の
還元メカニズムの解明

京都産業大学大学院 生命科学研究科

博士後期課程

789079 上垣 日育

目次

1. 要旨
2. 略語表
3. 序論
 - 3-1.小胞体ストレス応答
 - 3-2.小胞体の酸化・異性化酵素による酸化的フォールディング
 - 3-3.PDI-Ero1 α 複合体における電子伝達機構とその制御
 - 3-4.抗酸化酵素による小胞体の過酸化水素消去機構
 - 3-5.タンパク質フォールディングにおける N 型糖鎖の役割
 - 3-6.小胞体関連分解
 - 3-7.小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の役割
 - 3-8.バクテリアのペリプラズムにおける電子伝達機構
4. 結果
 - 4-1.ERdj5 の電子ドナー候補タンパク質の同定
 - 4-2.Ero1 α による PDI および PDI ファミリータンパク質の酸化
 - 4-3.Ero1 α が及ぼす ERdj5 の酸化還元状態への影響
 - 4-4.分子間ジスルフィド結合を介した Ero1 α /ERdj5 複合体形成
 - 4-5.Ero1 α が及ぼす ERdj5 の Trx3・Trx4 ドメインの酸化還元状態への影響
 - 4-6.Ero1 α から ERdj5 への電子伝達の分子メカニズム
 - 4-7.NMR を用いた ERdj5 の C クラスタと Ero1 α の相互作用解析
 - 4-8.PDI による Ero1 α の活性化
 - 4-9.ドッキングシミュレーションによる ERdj5 と Ero1 α の複合体構造の解析
 - 4-10.ERdj5 が及ぼす Ero1 α の酸素消費と過酸化水素産生への影響
 - 4-11.新生鎖合成による ERdj5 の酸化還元状態への影響
 - 4-12.Ero1 α による過剰な過酸化水素産生に対する ERdj5 の役割
 - 4-13.ERdj5 の小胞体関連分解に対する Ero1 α の貢献
5. 考察
 - 5-1.ERdj5 の電子ドナータンパク質の同定

- 5-2.分子間ジスルフィド結合形成を介した Ero1 α /ERdj5 の相互作用解析
- 5-3.Ero1 α が及ぼす PDI ファミリータンパク質および ERdj5 の酸化還元状態への影響
- 5-4.Ero1 α が及ぼす ERdj5 の小胞体関連分解への影響
- 5-5.タンパク質間相互作用と酸化還元電位に基づいた Ero1 α から ERdj5 への電子伝達の分子メカニズム
- 5-6.Ero1 α による過剰な過酸化水素産生に対する ERdj5 の役割
- 5-7.リボソーム翻訳と共役した小胞体への新たな還元力供給機構
- 6. 実験方法
 - 6-1.試薬およびバッファー類
 - 6-2.使用した抗体
 - 6-3.細胞培養
 - 6-4.プラスミドの構築
 - 6-5.トランスフェクション
 - 6-6.細胞の可溶化
 - 6-7.ウェスタンブロッティング
 - 6-8.免疫沈降
 - 6-9.PEG マレイミドシフトアッセイ
 - 6-10.小胞体の過酸化水素のライブイメージング
 - 6-11.XBP1 の活性化の評価
 - 6-12.パルスチェイス実験
 - 6-13.タンパク質の発現と精製
 - 6-14.酸素消費測定
 - 6-15.ドッキングシミュレーション
 - 6-16.NMR 解析
- 7. 論文目録
- 8. 謝辞
- 9. 引用文献

1. 要旨

細胞小器官の一つである小胞体は分泌・膜タンパク質のフォールディングの場であり、小胞体内腔の分子シャペロンや酸化還元酵素によるタンパク質品質管理によって恒常性が維持されている。小胞体のタンパク質品質管理において、翻訳後修飾の一つであるジスルフィド結合形成はタンパク質が安定的な立体構造を獲得するうえで重要な反応であり、一般的に小胞体でジスルフィド結合の形成過程を促進することは、小胞体のタンパク質フォールディングに対して有利に働くとされている。小胞体は酸化還元環境がサイトゾルと比較して酸化的な環境であり、ジスルフィド結合形成に適した場を構築している。さらに、小胞体は、リボソームから合成された新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成を効率的に促進するため、その酸化反応を触媒する PDI-Ero1 α 複合体による酸化的フォールディング機構がある。新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成に伴って生じる電子は、PDI に伝達され、PDI を介して Ero1 α へと伝達される。電子を受け取った Ero1 α は分子状酸素(O $_2$)へ電子を放出し、活性酸素種の一つである過酸化水素(H $_2$ O $_2$)を産生する。この H $_2$ O $_2$ の過剰な産生は小胞体の酸化還元環境を攪乱し、小胞体の恒常性破綻を引き起こす原因となる。一方、ERdj5 は酸化反応に特化した環境である小胞体でジスルフィド還元酵素として機能し、小胞体関連分解や小胞体のカルシウムイオン調節機構において中心的な役割を果たす。しかし、どのように ERdj5 が酸化的な環境である小胞体で電子(還元力)を受け取り、還元反応を触媒しているかは未解明のままであり、小胞体への還元力供給機構も不明であった。

本研究では、ERdj5 の電子ドナータンパク質として小胞体酸化酵素 Ero1 α を質量分析により同定し、Ero1 α が ERdj5 の還元酵素として働くことを明らかにした。また、ERdj5 が Ero1 α による新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングから電子を奪うことで、過剰な H $_2$ O $_2$ 産生を抑え、小胞体の恒常性維持に寄与することも見出した。さらに、小胞体への還元力は新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングから生じる電子から供給されることを明らかにした。

2. 略語表

ADP: Adenosine diphosphate

ATF6: Activating Transcription Factor 6

ATP: Adenosine triphosphate

Ala: Alanine

Asn: Asparagine

BiP: Binding immunoglobulin Protein

CHX: cycloheximide

CNX: calnexin

CRT: calreticulin

Cp: peroxidatic cysteine

Cr: resolving cysteine

Cys: Cysteine

DPS: Dipyridyl disulfide

DTT: Dithiothreitol

DVSF: divinyl sulfone

EDEM1: ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1

ERAD: Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation

ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment

ERMan1: ER mannosidase 1

FAD: Flavin Adenine Dinucleotide

GSH: Reduced glutathione

GSSG: Oxidized glutathione

Glc: Glucose

GlcNAc: N-acetyl glucosamine

Gpx7/8: Glutathione peroxidase 7/8

IRE1: Inositol-Requiring Enzyme 1

LDL: Low Density Lipoprotein

LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor
Man: Mannose
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NHK: Null Hong Kong
OST: oligosaccharyltransferase
PDI: Protein disulfide isomerase
PEG-Mal: polyethylene glycol-maleimide
PERK: Protein kinase RNA-like Endoplasmic reticulum Kinase
Prdx4: Peroxiredoxin 4
RNase: Ribonuclease
S1P: Site-1 Protease
S2P: Site-2 Protease
SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase
Ser: Serine
TCA: trichloroacetic acid
TXNDC11: thioredoxin domain-containing protein 11
Tm: Tunicamycin
Trx: Thioredoxin
TrxR: Thioredoxin Reductase
UGGT: UDP-glucose/glycoprotein glucosyl transferase
UPR: unfolded protein response
XBP1: X-Box Binding Protein 1
eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
mRNA: messenger RNA

3. 序論

3-1. 小胞体ストレス応答

真核生物の細胞では、リボソームから合成される新生ポリペプチド鎖のうち、約 1/3 は小胞体へ移行し、分泌・膜タンパク質として成熟する。新生ポリペプチド鎖は、リボソームの翻訳と共役して小胞体に移行する経路(co-translational translocation)とサイトゾルで翻訳完了後に小胞体に移行する経路(post-translational translocation)の主に二つの経路によって小胞体に移行することが知られている^{1,2}。

小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖は小胞体内腔または小胞体膜に存在する分子シャペロンや糖鎖付加酵素、酸化・還元および異性化酵素による様々な翻訳後修飾を受け、正しい立体構造を獲得し、成熟する。しかし、遺伝的な変異や外的な種々のストレスによってタンパク質は正しい立体構造の獲得に失敗すること(ミスフォールディング)がある³。小胞体において、ミスフォールドタンパク質の蓄積はタンパク質恒常性(プロテオスタシス)を攪乱し、小胞体ストレス(ER stress)を惹起する⁴。小胞体ストレスは神経変性疾患や糖尿病に代表される重篤な病気の発症との関連性があることが知られており⁵、ミスフォールドタンパク質の蓄積は凝集体形成を引き起こし、細胞死を誘発する。そのため、小胞体には小胞体ストレスを感知し、それを緩和するための仕組みとして小胞体ストレス応答(UPR : unfolded protein response)が存在する(Fig 1)⁶。

小胞体ストレス応答は、小胞体膜にある PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic reticulum Kinase)、IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1)、そして ATF6 (Activating Transcription Factor 6)の 3 つの膜タンパク質によって制御されることが知られている⁷。これらは小胞体ストレスセンサーと呼ばれ、小胞体内腔の主要な分子シャペロン BiP (Binding immunoglobulin Protein)によって活性が調節されている^{8,9}。定常時は BiP が各ストレスセンサーの小胞体内腔側のドメインに結合し、活性を負に制御しているが、小胞体ストレス時には、小胞体ストレスセンサーから BiP が解離し、各ストレスセンサーがそれぞれのメカニズムによって活性化し、小胞体ストレス状態から細胞を保護する。

ATF6はIRE1やPERKと異なり、BiPの解離によって小胞体からゴルジ体へ輸送され、活性化が促される(Fig 1A)。ゴルジ体に輸送されたATF6はゴルジ体膜に局在するS1P(Site-1 Protease)とS2P(Site-2 Protease)の二つのプロテアーゼによる切断を受け、活性化する^{10,11}。S1PはATF6のゴルジ体内腔のC末端領域を切断し、S2PはATF6のサイトゾルのN末端領域を切断する。切断されたN末端領域のATF6は転写因子として働き、核内に移行して、小胞体ストレスを緩和する分子シャペロンの発現誘導を行う。

PERKはBiPが解離したのち、ホモ二量体化し、サイトゾル側のドメインが自己リン酸化をする(Fig 1B)。リン酸化したPERKはサイトゾル側にあるキナーゼドメインを介して、翻訳開始因子eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 alpha)をリン酸化する^{12,13}。このリン酸化によって、リボソームの翻訳が一時的に抑制され、小胞体のプロテオスタシスに対する負荷が軽減される。

IRE1は定常状態において、小胞体内腔のドメインを介してホモ二量体を形成し、BiPが解離した後に多量体化が引き起こされる^{14,15}。多量体化したIRE1はサイトゾル側のドメインを自己リン酸化する(Fig 1C)。自己リン酸化したIRE1は、サイトゾル側にあるRNase(Ribonuclease)ドメインが活性化し、サイトゾルに局在するmRNA(messenger RNA)であるXBP1(X-Box Binding Protein 1)のスプライシングを促進する¹⁶⁻¹⁸。スプライシングされたXBP1はサイトゾルで翻訳され、核内に移行されたのち、転写因子として役割を果たす。核内に移行したXBP1は、ミスフォールドタンパク質の分解機構である小胞体関連分解(序論 3-5)に関与する酸化還元酵素や分子シャペロンの発現を誘導し、細胞を小胞体ストレスから緩和させる。このように、小胞体はミスフォールドタンパク質が蓄積すると、ミスフォールドタンパク質の折りたたみ直しや小胞体関連分解関連因子・酸化還元酵素の発現誘導を行うことにより、小胞体ストレスから免れている。

近年、これら小胞体ストレスセンサーは小胞体内腔に蓄積したミスフォールドタンパク質による小胞体ストレスを感知するだけでなく、小胞体膜成分の脂質異常やサイトゾルの酸化ストレス、小胞体内腔の還元ストレスなどによって引き起こされるストレスを感知する経路があることが報告されている¹⁹⁻²¹。し

かし、詳細な分子機構は不明な点が多く、これらについて特異的な活性化機構を明らかにすることは、新しい小胞体ストレス応答の理解に繋がると期待される。

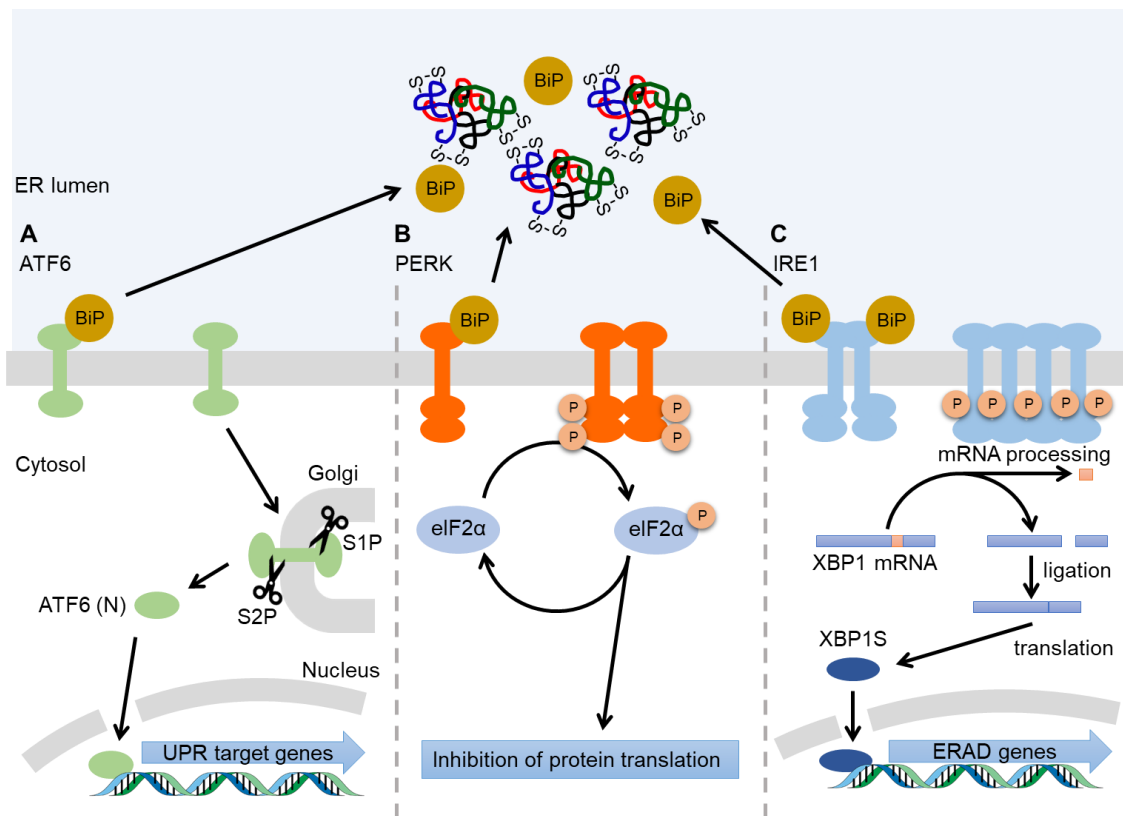


Fig.1 小胞体ストレス応答

A. ATF6 の活性化機構 B. PERK の活性化機構 C. IRE1 の活性化機構

3-2. 小胞体の酸化・異性化酵素による酸化的フォールディング

小胞体において分泌・膜タンパク質の成熟には、様々な翻訳後修飾が必要である。その一つとして、システイン残基(Cys : Cysteine)のチオール基(SH 基)の間で架橋されるジスルフィド結合がある。これは、小胞体のタンパク質フォールディングにおいて立体構造の安定化や複合体形成に重要な役割を果たす。ジスルフィド結合の形成効率は各細胞小器官の酸化還元環境に依存し、細胞内の酸化還元環境は生体内低分子であるグルタチオン(Glutathione)の酸化型グルタチオン(GSSG : Oxidized glutathione)と還元型グルタチオン(GSH : Reduced glutathione)の比が指標とされている²²。グルタチオンはサイトゾルで合成され、サイトゾルの GSSG : GSH 比は 1 : 10~100 に保たれている²³。それに対して、小胞体内腔の GSSG : GSH 比は 1 : 1~3 に維持されているため、小胞体内腔はサイトゾルと比較して酸化的な環境を構築していると言える(Fig 2)²³。この環境はジスルフィド結合形成を伴うタンパク質のフォールディング(酸化的フォールディング : Oxidative folding)に有利な場であり、さらに、小胞体には約 20 種類の酸化・異性化酵素が存在し、基質のジスルフィド結合形成を効率的に促進している²⁴。その中で、PDI (Protein disulfide isomerase)は小胞体における代表的な酸化酵素であり、長い間、PDI は基質のジスルフィド結合形成を触媒するときに必要な酸化力を GSSG から獲得していると考えられていた。しかし、小胞体において FAD (Flavin Adenine Dinucleotide)をコファクターとする Ero1p が酵母で発見され、分子状酸素(O₂)から酸化力を供給し、小胞体の酸化的フォールディングをより効率的に促進する機構が明らかとなった^{25,26}。この発見の後に、哺乳類細胞でも Ero1α/β が見付き、PDI と相互作用し、PDI を酸化することで、基質のジスルフィド結合形成を促進していることが見出された(Fig 2)^{27,28}。基質のジスルフィド結合形成に伴い PDI が奪った電子は、PDI から Ero1α/β に受け渡され、Ero1α/β の分子内にある FAD を介して O₂ へ伝達され、活性酸素種の一つである過酸化水素(H₂O₂)産生に消費される²⁹。さらに、Ero1α は PDI と複合体を形成することで、他の酸化・異性化酵

素と電子伝達ネットワークを構築し、基質のジスルフィド結合形成を効率的に触媒する酸化カスケードを実現していることが明らかになった³⁰。Ero1bは膵臓で特異的に発現し、インスリンの酸化的フォールディングに貢献することが知られている²⁸。

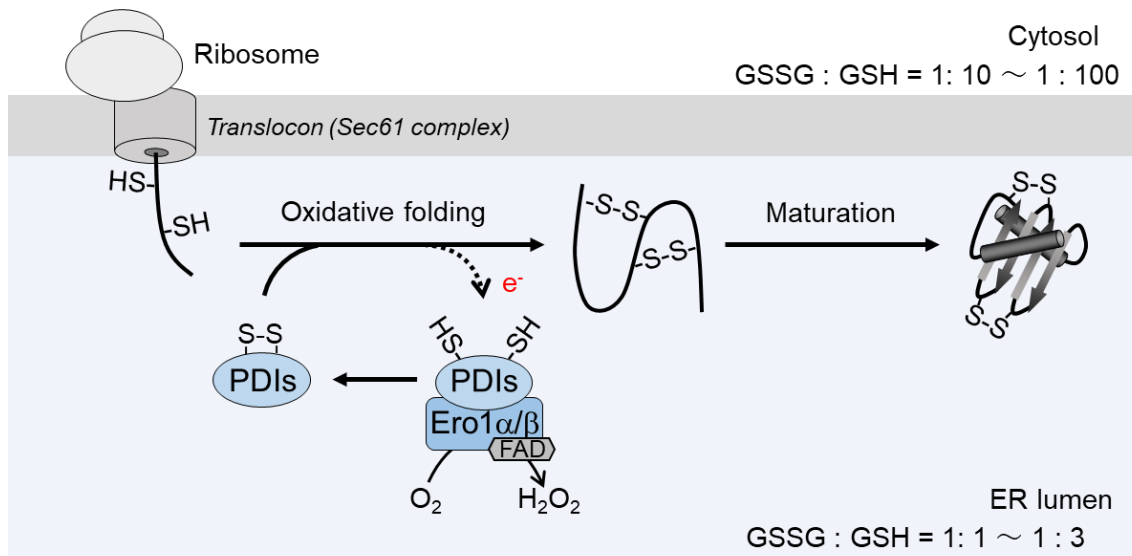


Fig.2 小胞体の酸化・異性化酵素による酸化的フォールディング

酸化的フォールディングはジスルフィド結合形成を伴うタンパク質フォールディングを意味し、小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖はジスルフィド結合形成に伴い電子(e^-)をPDIファミリータンパク質に受け渡す。電子を受け取ったPDIファミリータンパク質はEro1 α/β に電子を放出し、Ero1 α/β によって酸化される。PDIファミリータンパク質から電子を受け取ったEro1 α/β は電子を分子状酸素(O_2)に放出し、過酸化水素(H_2O_2)を産生する。また、小胞体の酸化型グルタチオン(GSSG)と還元型グルタチオン(GSH)の比はサイトゾルの比と比較してGSSGの割合が高く、小胞体は酸化的な環境を構築している。

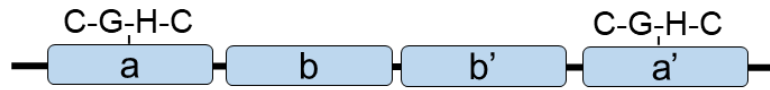
3-3. PDI-Ero1 α 複合体における電子伝達機構とその制御

PDI のドメイン構造は酸化還元反応の活性中心となる CXXC (Cys-X-X-Cys : X は任意のアミノ酸)モチーフを含むチオレドキシン(Trx : Thioredoxin)様ドメインを 2 つもち、それぞれ a ドメインと a'ドメインと呼ばれている(Fig 3A)。その 2 つのドメインの間に、CXXC モチーフを持たない、b ドメインと b'ドメインを有する。酸化反応の場合、まず基質のシステイン残基が CXXC モチーフに求核攻撃し、一つの電子が基質から CXXC モチーフの C 末端側のシステイン残基に受け渡される。その際、CXXC モチーフの N 末端側のシステイン残基は基質と分子間ジスルフィド結合を形成する。その後、基質の別のシステイン残基が基質と形成した分子間ジスルフィド結合に求核攻撃することで、その結合を切断する。このように、Trx ドメインは基質のジスルフィド結合形成を触媒する(Fig 3B 上図)。一方、還元反応の場合、まず CXXC モチーフの N 末端側のシステイン残基が基質のジスルフィド結合に求核攻撃し、一つの電子を基質に受け渡す。その際、CXXC モチーフの N 末端側のシステイン残基は基質と分子間ジスルフィド結合を形成する。その後、C 末端側のシステイン残基が基質と形成した分子間ジスルフィド結合に求核攻撃することで、その結合を切断する。このようにして、Trx ドメインは基質の分子内ジスルフィド結合を還元する(Fig 3B 下図)。そのため、Trx ドメインによる還元反応の基質となるタンパク質と Trx ドメインの相互作用解析には CXXC モチーフの C 末側のシステイン残基をアラニン残基(Ala : Alanine)もしくはセリン残基(Ser : Serine)に置換した CXXA (Cys-X-X-Ala)または CXXS (Cys-X-X-Ser)変異体(CA/CS 変異体)が用いられる³¹。実際、PDI から電子を受け取る Ero1 α は PDI の CS 変異体と強く結合することが知られている³²。また、PDI は b'ドメインを介して基質と相互作用し、a ドメインの CXXC モチーフでその基質のジスルフィド結合形成を触媒することが報告されている^{29,33}。これらのことから、PDI は b'ドメインを介して基質と結合し、a ドメインの酸化活性により基質のジスルフィド結合形成を触媒する(Fig 3C : Step 1)。新生ポリペプチド鎖から a ドメインに放出された電子は、PDI の a'ドメインにある CXXC モチーフへ伝達される(Fig 3C :

Step 2)。電子を受け取った a'ドメインは Ero1 α へと電子を伝達し、Ero1 α の酸化活性において中心的な役割を果たす 94 番目のシステイン(C94)を含んだシステインペアによって酸化される(Fig 3C : Step 3)。PDI によって還元された Ero1 α は FAD を介して O₂ へ電子を放出し、H₂O₂ を産生する(Fig 3C : Step 4)。

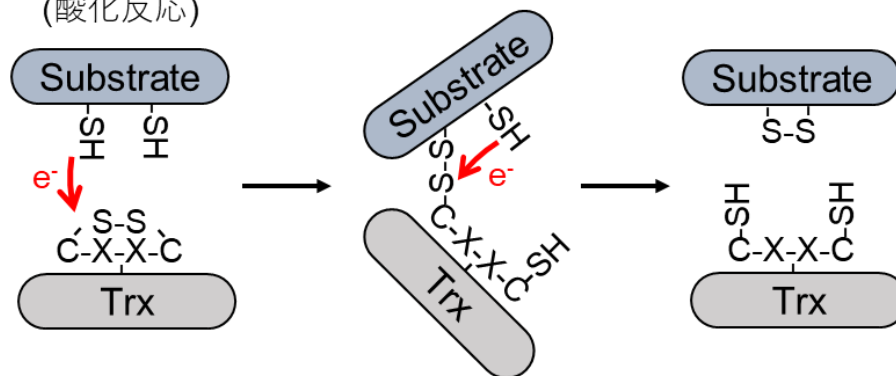
PDI から電子を受け取った Ero1 α は O₂ から酸化力を獲得し、PDI を効率よく酸化するが、その酸化活性は自身の分子内にあるいくつかのシステインペアによって厳密に制御されている(Fig 3D)。細胞内で Ero1 α は主に C94 と C131 および C99 と C104 が分子内ジスルフィド結合を形成し、酸化活性が抑制された不活性型(Ox2)として存在することが知られている³⁴。PDI から不活性型の Ero1 α に電子が供給されると、C94-C131 のシステインペアが還元され、Ero1 α は活性化し、活性型(Ox1)となる。活性型の Ero1 α は C94 と C99 がジスルフィド結合を形成し、このシステインペアを介して PDI を効率的に酸化する。PDI の酸化に伴って生じた電子は、Ero1 α の C94-C99 のシステインペアを介して分子内にある C394-C397 のシステインペアに受け渡され、FAD を介して O₂ に伝達される。電子を受け取った O₂ は H₂O₂ となる。活性化した Ero1 α は C94-C99 のシステインペアと C104 および C131 のシステイン残基が H₂O₂ によって再酸化され、不活性型となり、酸化活性が制御される。これら以外のシステインペアも Ero1 α の分子内あるいは分子間電子伝達やその制御に関与すると考えられている^{32,35}。例えば、Ero1 α の C208-C241 のシステインペアが PDI によって還元されると、Ero1 α の FAD 付近の構造変化が引き起こされ、その結果、O₂ の FAD へのアクセスが増えることで、Ero1 α の酸化活性が向上することが報告されている^{36,37}。また、活性制御に関わる C104 と C131 を欠損させた Ero1 α は H₂O₂ によるネガティブフィードバックが起これなくなる。これが原因で Ero1 α から産生される H₂O₂ が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを引き起こすことが報告されている^{34,38}。このように、小胞体の H₂O₂ 濃度を適切に調節することは小胞体の恒常性維持において重要である。

A

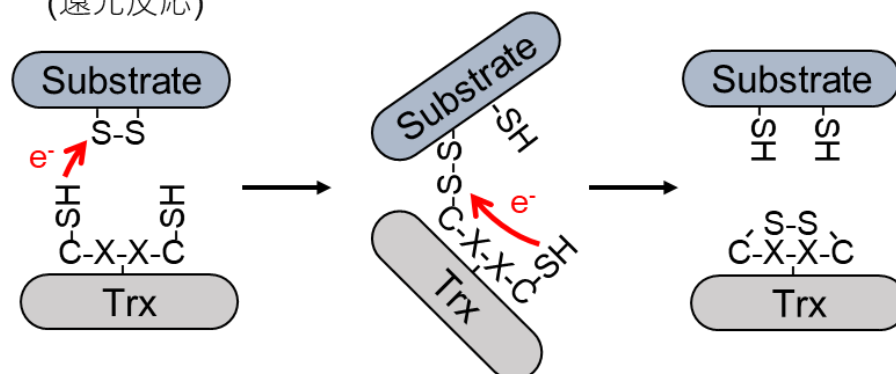


B

Oxidation reaction
(酸化反応)



Reduction reaction
(還元反応)



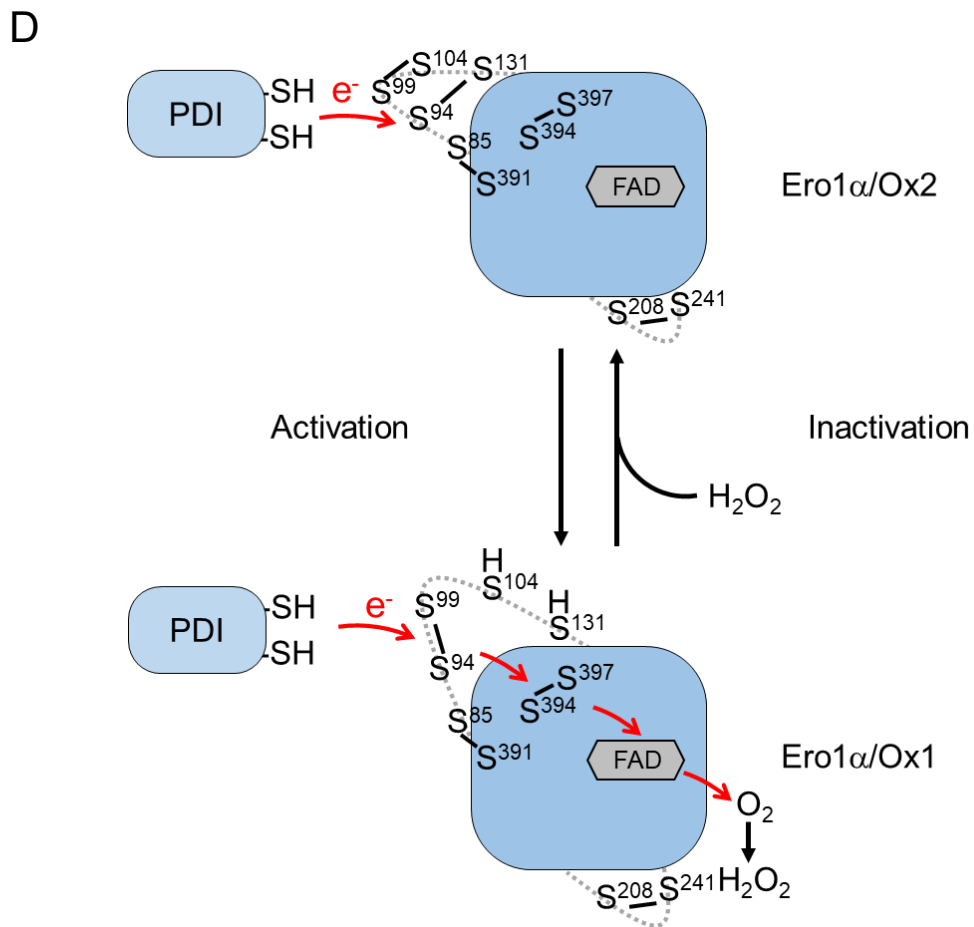
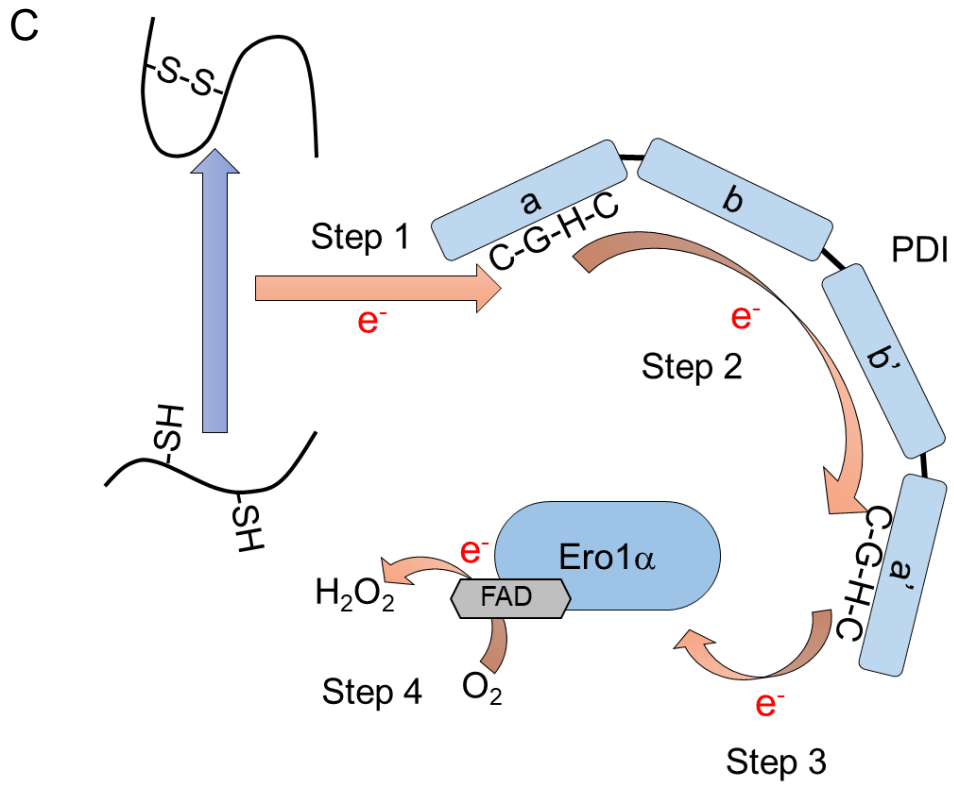


Fig.3 PDI-Ero1 α 複合体における電子伝達機構とその制御

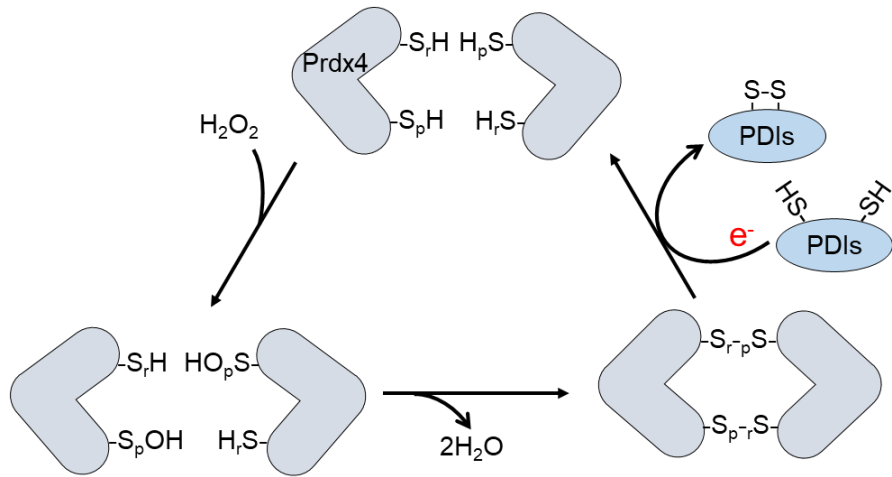
A. PDI のドメイン構成。B. チオレドキシンドメイン(Trx)による基質(Substrate)の酸化・還元反応。上図は酸化反応を示し、下図は還元反応を示す。赤矢印はシステイン残基の求核攻撃の方向性を示し、求核攻撃された Trx もしくは基質は電子を受け取る。C. Step 1: 新生ポリペプチド鎖からの電子は PDI の a ドメインに受け渡される。Step 2: 電子(e)を受け取った a ドメインは a' ドメインの CXXC モチーフに電子を伝達する。Step 3: a' ドメインを還元された PDI は Ero1 α へ電子を受け渡す。Step 4: 電子を受け取った Ero1 α は FAD を介して分子状酸素(O₂)に電子を伝達し、過酸化水素(H₂O₂)を産生する。D. Ero1 α の活性制御機構。Ero1 α の不活性型(Ox2)は C94-C131 (S⁹⁴-S¹³¹)および C99-C104 (S⁹⁹-S¹⁰⁴)が分子内ジスルフィド結合を形成している。PDI から電子を受け取った不活性型 Ero1 α は C94-C131 と C99-C104 が還元され、C94 と C99 が分子内ジスルフィド結合(S⁹⁴-S⁹⁹)を形成し、活性型(Ox1)となる。活性化した Ero1 α は O₂ から酸化力を獲得し、還元型 PDI を効率的に酸化し、その酸化反応で奪った電子は H₂O₂ の産生に消費される。活性型 Ero1 α は H₂O₂ に C94 および C99、C104、C131 が酸化されることで、過剰な活性化が抑制される。

3-4. 抗酸化酵素による小胞体の過酸化水素消去機構

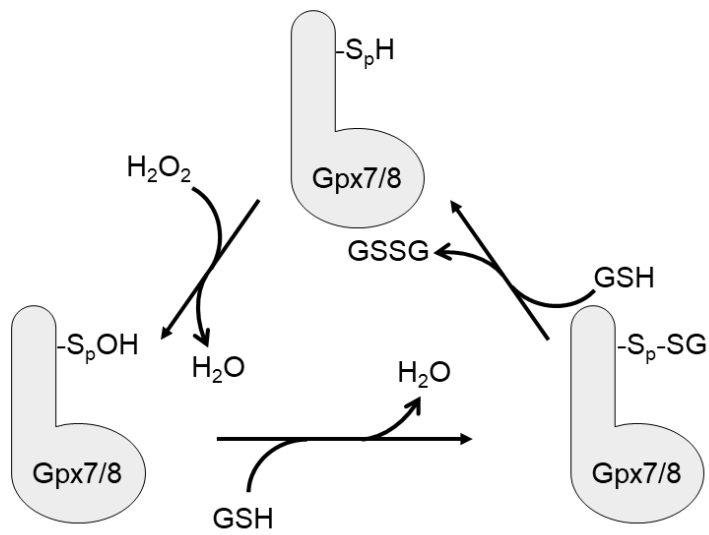
小胞体の H_2O_2 濃度は他の細胞小器官と比較して、高いことが報告されている³⁹。Ero1 α による酸化的フォールディングは小胞体における H_2O_2 の発生源のひとつであることが知られている⁴⁰。酸化的フォールディングによって産生された H_2O_2 は小胞体の抗酸化酵素によって還元され、 H_2O_2 によって酸化された抗酸化酵素はタンパク質のジスルフィド結合形成や GSSG の合成などを触媒する。

Prdx4 (Peroxiredoxin 4) は小胞体の酸化酵素であり、 H_2O_2 から酸化力を奪うことにより、基質のジスルフィド形成を促進する (Fig 4A)⁴¹。Prdx4 は自身の酸化還元活性中心として働く Cp (S_p: peroxidatic cysteine) と Cr (S_r: resolving cysteine) をもち、二分子の Prdx4 がユニットとなって H_2O_2 と酸化還元反応を行う。Cp は H_2O_2 と最初に反応し、スルフェン酸 (SOH) となる。その後、Cr がスルフェン酸となった Cp と反応することで、Cp と Cr 間で分子間ジスルフィド結合を形成する。この形成によって Prdx4 は二量体化し、二量体化した Prdx4 はその分子間ジスルフィド結合の酸化力で PDI ファミリータンパク質を酸化する。Gpx7/8 (Glutathione peroxidase 7/8) は H_2O_2 から酸化力を獲得し、GSH を酸化し、GSSG を合成する (Fig 4B)^{42,43}。Gpx7/8 は H_2O_2 を Cp で還元し、Cp がスルホン酸化される。そのスルホン酸化された Cp が GSH を酸化することにより GSSG を産生する。Gpx7/8 は GSSG を産生するだけでなく、 H_2O_2 によって酸化された後、PDI ファミリータンパク質を酸化することにより基質のフォールディングを促進することも報告されている (Fig 4C)。これらの酵素が小胞体から欠失すると、小胞体ストレスが誘導されることが報告されている。

A



B



C

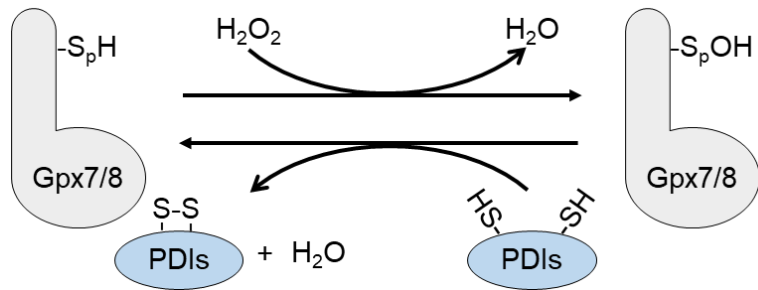


Fig.4 抗酸化酵素による小胞体の過酸化水素消去機構

A. Prdx4 の分子機構を示す。Prdx4 は一分子の過酸化水素(H_2O_2)に酸化された後、ジスルフィド結合を介して二量体化する。二量体化した Prdx4 は還元型 PDI を酸化する。
 B-C. Gpx7/8 の分子機構を示す。Gpx7/8 は一分子の H_2O_2 に酸化された後、還元型グルタチオン(GSH)によって還元され、酸化型グルタチオン(GSSG)を生産する。もしくは、PDI によって還元される(C)。

3-5. タンパク質フォールディングにおける N 型糖鎖の役割

リボソームから合成され、小胞体へ移行した新生ポリペプチド鎖は小胞体内で、ジスルフィド結合形成だけでなく、翻訳後修飾として N 型糖鎖付加も受ける。糖鎖が付加されたタンパク質は糖タンパク質と呼ばれ、小胞体で成熟するタンパク質の約 90%が N 型糖鎖付加を受けることが知られている⁴⁴。N 型糖鎖は、トランスロコン(Translocon)と相互作用している OST (oligosaccharyltransferase)複合体によって、小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖の N-X-S/T (Asn-X-Ser または Thr)配列の N に付加される(Fig 5)⁴⁵。付加される N 型糖鎖のコア構造は $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc : Glucose、Man : Mannose、GlcNAc : N-acetyl glucosamine)であり、付加されたのち、その糖タンパク質の成熟状態に応じて小胞体で糖鎖の切断がなされる(Fig 5)。コア構造の N 型糖鎖が付加されたポリペプチド鎖は、その糖鎖から二つのグルコースがグルコシダーゼ I および II によって除かれ、モノグルコシル化された糖鎖構造($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)となる⁴⁶。この状態の糖鎖は、レクチン様シャペロン分子の CNX (calnexin)や CRT (calreticulin)に認識される。CNX や CRT はシャペロン機能を有し、構造形成途上のポリペプチド鎖のフォールディングを促進し、凝集を防ぐ。また、立体構造形成に必要なジスルフィド結合は酸化・異性化酵素に触媒され、ポリペプチド鎖に導入される(序論 3-3)。さらに、モノグルコシル化糖タンパク質のグルコースがグリコシダーゼ II によって切断されると、CNX/CRT から解離する。UGGT (UDP-glucose/glycoprotein glucosyl transferase)はポリペプチド鎖を認識し、そのフォールディング状態を見分け、立体構造が形成されていない場合は、UGGT がグルコースを再付加する^{47,48}。再付加されたポリペプチド鎖は CNX/CRT により再び認識され、フォールディングが試みられる。このサイクルは CNX/CRT サイクルと呼ばれている(Fig 5)。

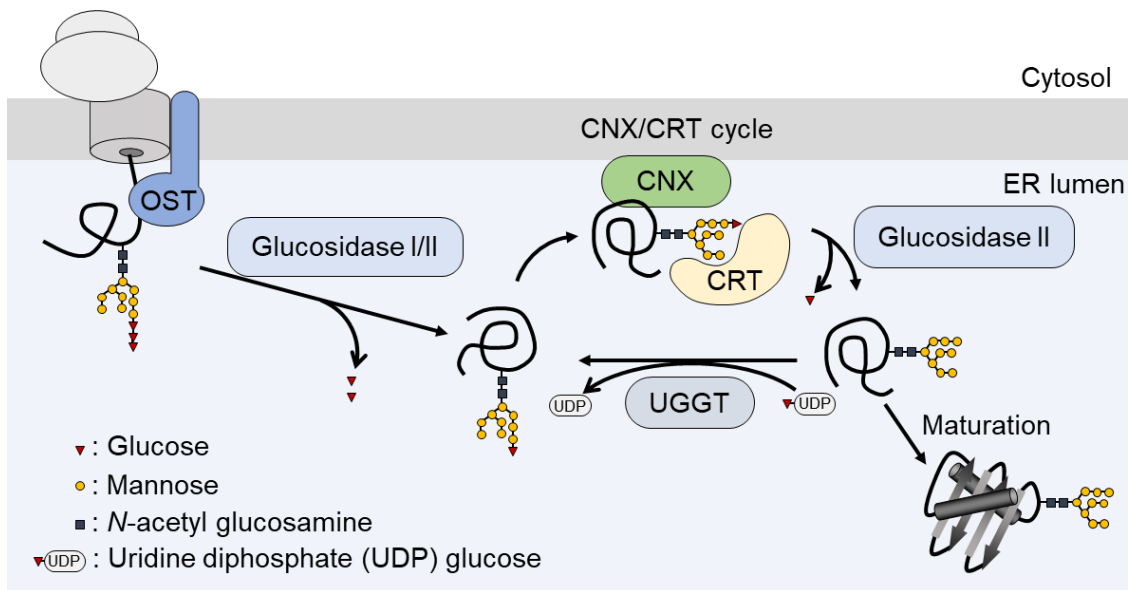


Fig.5 タンパク質フォールディングにおける N 型糖鎖の役割

小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖は OST によって N-X-T/S の配列の N に N 型糖鎖のコア構造が付加される。コア構造が付加された基質はグルコシダーゼ I/II (Glucosidase I/II)により糖鎖から二分子のグルコース(Glucose)が切断される。切断された糖鎖構造は CNX または CRT に認識され、その基質のフォールディングが促進される。その後、グルコシダーゼ II によって基質の糖鎖から最後のグルコースが切断され、正しい立体構造を獲得している場合は分泌経路へ進む。一方、正しい立体構造が形成されていなかった場合は UGGT がその基質を認識し、一分子のグルコースを糖鎖に再付加する。グルコースを再付加された基質は再び CNX/CRT によるフォールディングを受ける。この一連の過程は CNX/CRT サイクル(CNX/CRT cycle)と呼ばれる。

3-6. 小胞体関連分解

分泌・膜タンパク質は、小胞体ですべてが正しい立体構造を獲得し、成熟できるわけではない。小胞体にミスフォールドタンパク質が蓄積すると小胞体ストレスが惹起されるため、小胞体にはミスフォールドタンパク質を小胞体からサイトゾルへ輸送する逆行輸送チャネル(Dislocon)が小胞体膜にある⁴⁹⁻⁵¹。小胞体関連分解 (ERAD: Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation)は、その逆行輸送チャネルを介してミスフォールドタンパク質をサイトゾルへ輸送し、サイトゾルにあるユビキチン・プロテアソームで分解する系のことであり、ERADは小胞体のタンパク質品質管理において重要な機構として位置づけられている⁵²。ERADにおいて、分解基質の認識は小胞体内で厳密に制御されており、糖タンパク質の分解にはN型糖鎖が分解基質を選別する標識として利用される。序論3-6で述べたように、N型糖鎖はCNX/CRTなどの分子シャペロンが基質を認識するうえで重要な役割も果たす。しかし、基質が小胞体で分解すべきミスフォールドタンパク質とみなされた場合、その基質のN型糖鎖はERMan1 (ER mannosidase 1)によって切断され、糖鎖構造がMan₈GlcNAc₂ (Man: Mannose、GlcNAc: N-acetyl glucosamine)型となる (Fig 6)⁴⁴。

EDEM1 (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1)は小胞体ストレスで誘導される分子であり、Man₈GlcNAc₂型の糖鎖を認識し、分解基質をCNXから受け取ることで基質を逆行輸送チャネルにリクルートする (Fig 6)^{53,54}。EDEMファミリータンパク質にはEDEM1、EDEM2とEDEM3が存在し、これらの機能差異が明らかになりつつある⁵⁵。EDEM1とEDEM2はERMan1と比較してマンノシダーゼ活性が低い。しかし、そのマンノシダーゼ活性は小胞体膜の酸化還元酵素であるTXNDC11 (thioredoxin domain-containing protein 11)がEDEM1またはEDEM2と複合体を形成することで、増強される。このように、EDEM1とEDEM2はTXNDC11と複合体を形成し、ERADを促進している⁵⁶⁻⁵⁹。一方、EDEM3は小胞体内腔の酸化還元酵素であるERp46と複合体を形成し、自身のマンノシダーゼ活性を介して

ERAD に貢献している^{60,61}。

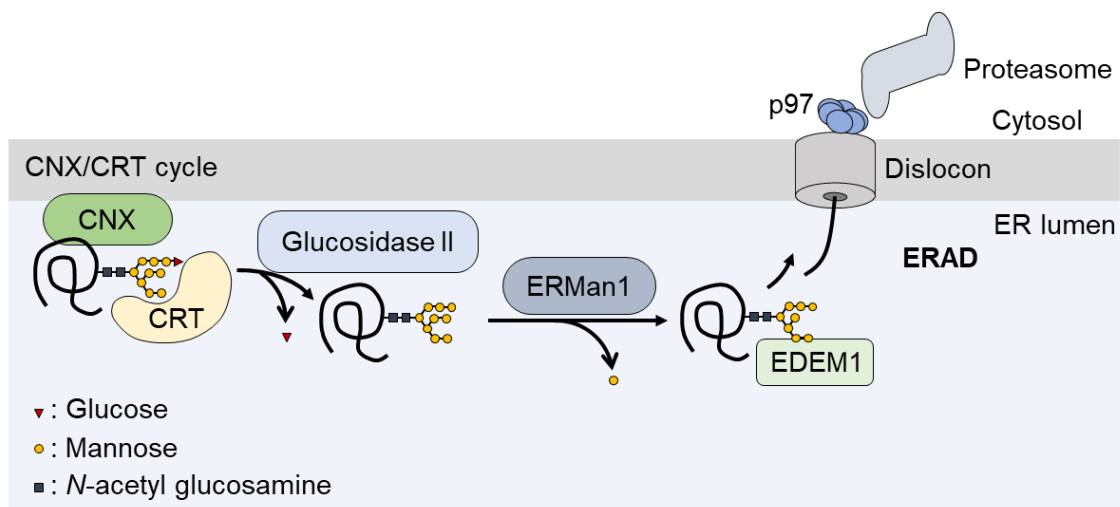


Fig.6 小胞体関連分解

CNX/CRT サイクルで正しい立体構造の獲得に失敗した糖タンパク質は、Glucosidase II によるグルコース(Glucose)の切断の後に、ERMan1 が糖鎖から一分子のマンノース(Mannose)が切断される。EDEM1 は切断された糖鎖構造を認識し、その基質を逆行輸送チャネル(Dislocon)にリクルートする。

3-7. 小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の役割

ERAD による糖タンパク質の分解において、N 型糖鎖の切断とその認識は分解基質を逆行輸送チャンネルまでリクルートする重要な役割をもつが、ERAD で基質をより効率的に分解するには、その分解基質が形成しているジスルフィド結合を切断(ジスルフィド還元 : Disulfide reduction)することが必要である。

ERdj5 は糖タンパク質の分解基質を認識する EDEM1 と相互作用する因子として同定された⁶²。ERdj5 は N 末側から J ドメインと酸化還元反応を触媒する活性中心となる CXXC モチーフを含む Trx ドメイン (Trx1~Trx4)を四つもち、J タンパク質およびチオレドキシソファミリに属している(Fig 7A)。C 末端側には小胞体に滞留するための KDEL (Lys : Asp : Glu : Leu)配列をもち、この配列が ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment)で KDEL 受容体に認識されることで、分泌から逃れている。J ドメインは Hsp70 ファミリータンパク質との結合能を有し、小胞体では主要な分子シャペロン BiP と結合し、BiP の ATPase 活性を促進する。Trx ドメインは CXXC モチーフを介して酸化還元反応を触媒するドメインである。これらのドメインを用いて、ERdj5 が小胞体内ではじめての還元酵素として働き、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元し、立体障害を低減することにより、効率よく ERAD を促進していることが明らかになった(Fig 7B)。さらに、X 線結晶構造解析と様々な生化学実験により、ERdj5-EDEM1-BiP の超分子複合体による ERAD 基質の認識からその基質の逆行輸送チャンネルへのリクルートまでの詳細な分子機構も明らかになった⁶³。ERdj5 の構造は J ドメインから Trx2 ドメインまでを含んだ N クラスタと、Trx3 および Trx4 ドメインを含んだ C クラスタに大きく分けることができる(Fig 7C)。C クラスタは EDEM1 との結合能があり、ERdj5 は C クラスタを介して EDEM1 と相互作用することで、EDEM1 がリクルートしてきた分解基質を認識する。ERdj5 に認識された分解基質は、ERdj5 の C クラスタを構成する Trx3 と Trx4 ドメインの活性中心によりジスルフィド結合が還元される。還元された基質は ERdj5 の J ドメインと相互作用する ATP (Adenosine triphosphate)結合型 BiP と結合し、基質と相互作用し

た ATP 結合型 BiP は ERdj5 の J ドメインによって ATPase 活性が促進され、ADP (Adenosine diphosphate) 結合型となる。ADP 結合型 BiP は BiP の構造がもつクレフトに基質を挟み、ERdj5 によって還元された基質のシステイン残基の再酸化を防ぐ。このように ERdj5 は EDEM1 および BiP と協調して、ERAD に貢献していることが見出された(Fig 7B)。

近年、ERdj5 には C クラスターが既知の構造(Form I)に対して約 110° 回転した新しい構造(Form II)が存在することが明らかになった(Fig 7C)⁶⁴。試験管内の溶液中において Form I と Form II の構造変化は動的平衡であり、その構造変化は ERdj5 の N クラスターと C クラスターの間にあるリンカー領域の構造が変化することで引き起こされる。細胞内で ERdj5 は大部分が Form I の構造で存在すると考えられているが、Form I と Form II の動的な構造変化は分子内または分子間ジスルフィド結合を介して多量体化した ERAD 基質の分解に貢献していることが見出されている。

ERdj5 による還元反応は小胞体の ERAD を促進するだけでなく、ジスルフィド結合の数が多い分泌・膜タンパク質のフォールディングにも貢献することが知られている⁶⁵。そのフォールディング基質のひとつである LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) は動脈硬化を促進する LDL (Low Density Lipoprotein) の受容体である。LDLR が機能的な構造を獲得するには、小胞体で 30 か所もの分子内ジスルフィド結合をその立体構造に対して正しい位置に形成する必要がある。しかし、LDLR は小胞体でのフォールディング過程において非天然型ジスルフィド結合を形成してしまうことが報告されている⁶⁶。

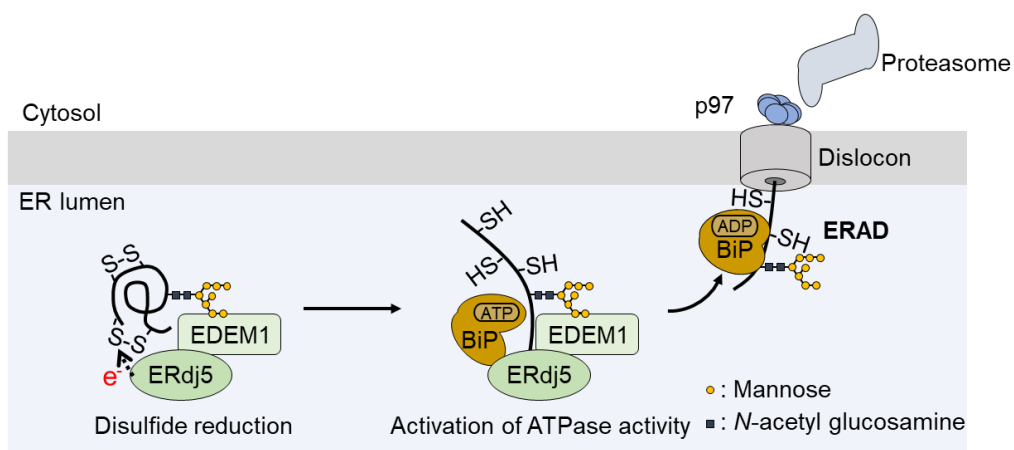
ERdj5 は LDLR がフォールディング時に形成した非天然型ジスルフィド結合を還元することで LDLR のフォールディングを助けることが明らかにされた。さらに、ERdj5 の働きは小胞体のカルシウム恒常性維持にも重要な役割を果たしている。小胞体のカルシウム濃度はサイトゾルと比較して 1 万倍高く、このカルシウム濃度を高く保持することは小胞体の恒常性維持において重要である⁶⁷。また、小胞体へのカルシウム輸送は小胞体膜に局在する SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase) ファミリータンパク質によって、サイトゾルから小胞体内腔へ ATP 依存的に取り込まれる。還元酵素

ERdj5はそのファミリータンパク質のひとつであるSERCA2bにジスルフィド結合依存的に結合し、SERCA2bの小胞体内腔のジスルフィド結合を還元することによって、小胞体内腔のカルシウム濃度を高濃度に維持することが明らかになった⁶⁸。また、ERdj5を欠損した細胞は小胞体のカルシウム恒常性が破綻し、サイトゾルの定常的なカルシウムイオン濃度が高くなることを見出された⁶⁹。それが原因となり、ミトコンドリア断裂因子であるDrp1 (dynamain-related protein 1)が活性化し、ミトコンドリアの過度な断裂が引き起こされることが明らかになった。このように、ERdj5はSERCA2bのポンプ活性を制御し、小胞体のカルシウムイオン濃度を一定に保つことで、細胞内のカルシウムシグナルを正常に調節している。

A



B



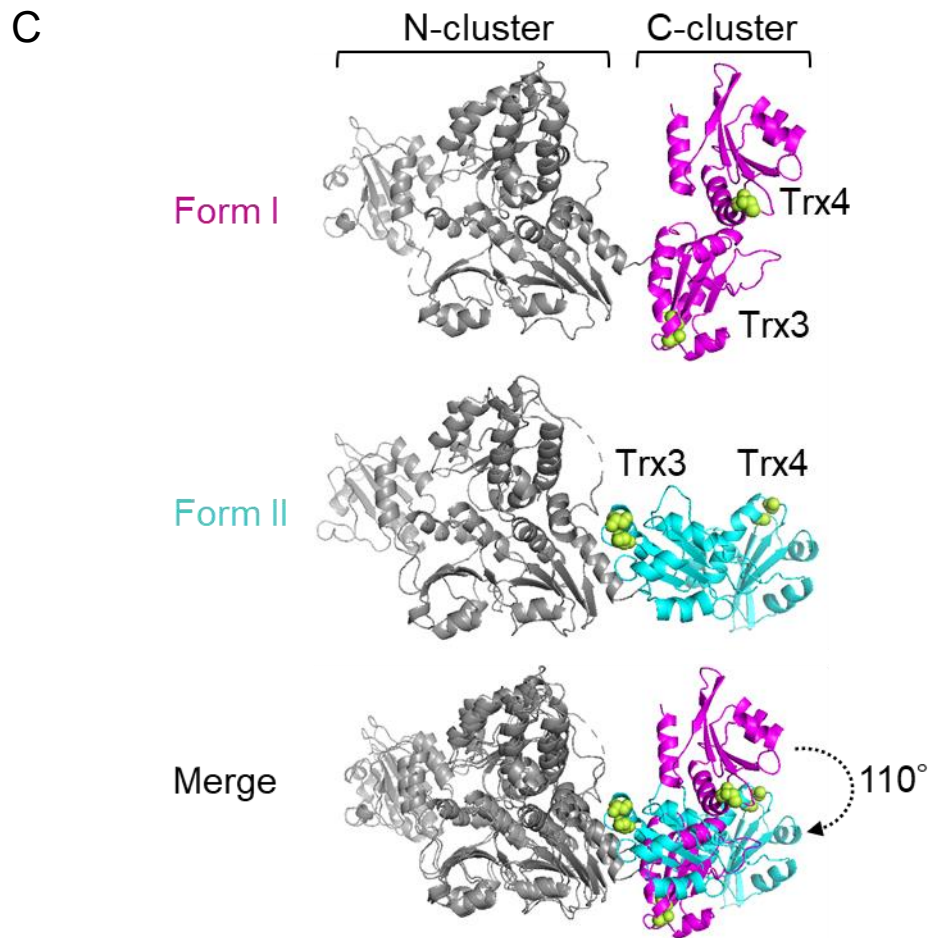


Fig.7 小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の役割

A. ERdj5 のドメイン構成。J は J ドメインを示し、このドメインは小胞体の分子シャペロン BiP の ATPase 活性を促進する役割がある。Trx はチオレドキシソドメドインを示し、Trx ドメドインに含まれる CXXC モチーフは酸化還元反応の触媒部位である。ERdj5 の構造は J ドメドインから Trx2 までの N クラスタと Trx3 から Trx4 までの C クラスタに分けることができる。B. ERdj5 は EDEM1 と相互作用することで EDEM1 がリクルートしてきた ERAD 基質を認識し、その基質のジスルフィド結合に電子(e)を与え、還元する(Disulfide reduction)。その後、ATP 型 BiP が ERdj5 の J ドメドインを介して ERdj5-EDEM1 複合体に相互作用し、BiP の ATPase 活性が促進される(Activation of ATPase activity)。ADP 型 BiP は ERdj5-EDEM1 複合体から分解基質を受け取り、逆行輸送チャネル(Dislocon)へ基質をリクルートする。C. X 線結晶構造解析により得られた ERdj5 の構造。N クラスタは灰色で示し、C クラスタはマゼンタ色(Form I)およびシアン色(Form II)で示す。黄緑色の球状で示したアミノ酸残基はそれぞれ Trx3 と Trx4 の CXXC モチーフのシステイン残基である。Form II は Form I に対して C クラスタが 110° 回転した構造をとる。

3-8. バクテリアのペリプラズムにおける電子伝達機構

哺乳類細胞において、小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 は小胞体のタンパク質品質管理やカルシウム恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし、酸化反応に適した環境とされる小胞体で、小胞体への電子(還元力)供給機構は未解明のままであり⁷⁰、どのように ERdj5 が電子(還元力)を獲得し、小胞体内腔で還元反応の触媒サイクルを回しているかは不明である。

哺乳類細胞の小胞体への還元力供給機構を考えるうえで、バクテリアのペリプラズムがそのモデル候補として挙げられている²²。ペリプラズムは小胞体と類似した酸化的な環境であり、バクテリアにおいて分泌タンパク質の合成の場として機能する。さらに、ペリプラズムには小胞体で分泌・膜タンパク質のジスルフィド結合形成を担う PDI-Ero1 α 複合体と同じ役割を果たす DsbA/DsbB システム(Fig 8A)やジスルフィド還元反応または異性化反応を触媒する DsbC/DsbD システム(Fig 8B 左図)が存在する²²。

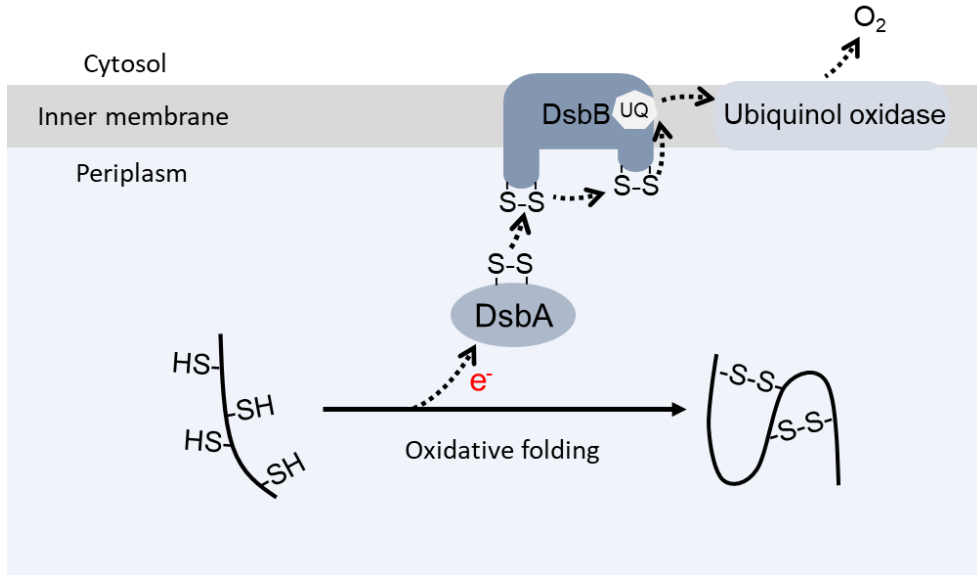
DsbA はペリプラズムでジスルフィド酸化酵素として機能し、ペリプラズムに合成された分泌タンパク質のジスルフィド結合形成を触媒する⁷¹。その形成に伴い生じた電子は、DsbA を介して内膜に局在する DsbB に伝達される⁷²。DsbA から電子を伝達された DsbB は自身の分子内にあるユビキノン(ubiquinone)に電子を放出し、電子を受け取ったユビキノンはユビキノール(ubiquinol)となる。ユビキノールはユビキノール酸化酵素によって酸化される。その酸化反応で生じた電子は最終電子受容体である O₂ に放出され、DsbA/DsbB システムによるジスルフィド結合形成に伴った電子伝達が終結することが知られている⁷³。

DsbC/DsbD システムでは DsbC がペリプラズムでジスルフィド還元・異性化酵素として機能し、分泌タンパク質のジスルフィド結合を還元する^{74,75}。電子を基質に放出した DsbC は酸化型となるため、内膜にある DsbD から電子を受け取り、再び還元酵素として働けるようになる^{76,77}。電子を失った DsbD はサイトゾルに局在するジスルフィド還元酵素である Trx から電子を奪い、再び還元力を獲得し、DsbC による還元反応の触媒サイクルを回している。電子を

DsbD に受け渡した Trx は自身の還元酵素として機能する TrxR (Thioredoxin Reductase) を介して NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) から電子を受け取る。したがって、DsbC/DsbD システムの電子供給源はサイトゾルの NADPH であると考えられている⁷³。哺乳類細胞では TrxR1 を阻害すると小胞体のタンパク質のジスルフィド結合形成に影響を与えることが報告されているが⁷⁸、哺乳類細胞の小胞体膜において DsbD 様の機能を有する膜タンパク質は同定されていない。

細菌の内膜には DsbD とは異なる機構でペリプラズムに電子を供給する CydDC 複合体が存在する (Fig 8B 右図)⁷⁹。CydDC 複合体は CydD と CydC がヘテロ二量体を形成し、細菌の内膜でグルタチオン輸送体として機能する。この複合体はサイトゾル側に ATPase ドメインがあり、この ATPase ドメインの活性を用いて、還元型グルタチオンを還元的な環境であるサイトゾルからペリプラズムへ能動的に輸送し、電子をペリプラズムに供給している。輸送された還元型グルタチオンは DsbC に電子を供給し、ペリプラズムの還元・異性化反応を促進する。しかし、近年、酵母では小胞体への新生ポリペプチド鎖のトランスロコンとして働く Sec61 が還元型グルタチオンチャネルとして働くことが見出されたが⁸⁰、細菌の CydDC 複合体のように能動的に還元型グルタチオンを輸送するトランスポーターは酵母と哺乳類細胞のどちらにおいても発見されていない。そこで、本研究では哺乳類細胞の小胞体内腔でジスルフィド還元酵素として機能する ERdj5 の電子ドナー候補タンパク質の同定を目的とし、小胞体還元力供給機構を明らかにすることにした。

A



B

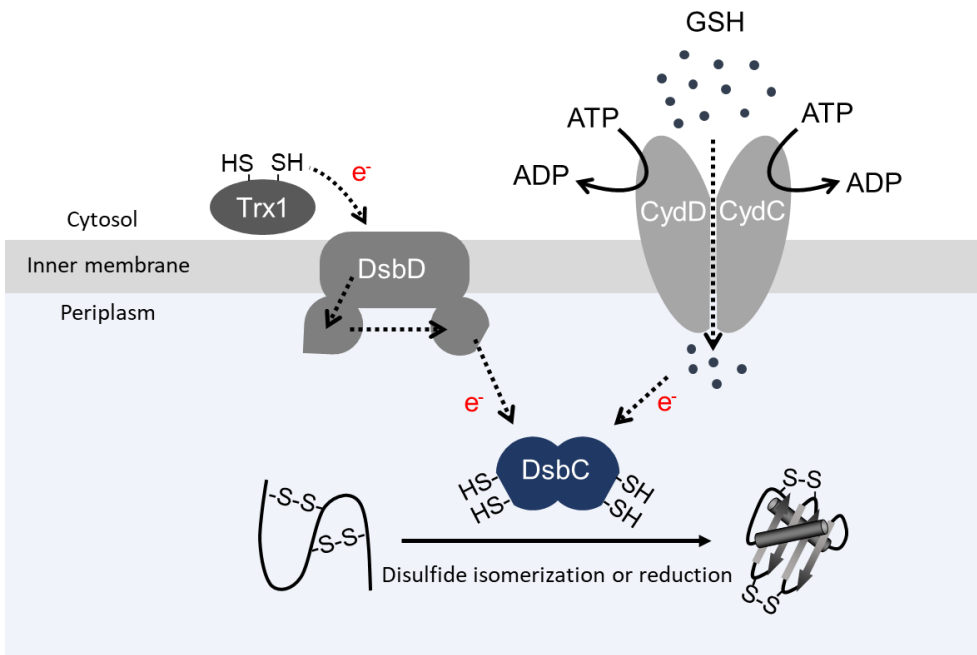


Fig.8 バクテリアのペリプラズムにおける電子伝達機構

A. DsbA/DsbB システムによる酸化的全フォールディング(Oxidative folding)。DsbA は基質から電子(e^-)を奪い、ジスルフィド結合形成を触媒する。電子を奪った DsbA は内膜 (Inner membrane)に局在する DsbB に電子を放出する。電子を受け取った DsbB は分子内電子伝達を介してユビキノン(UQ) に電子を伝達し、ユビキノールを産生する。ユビキノールはユビキノール酸化酵素(Ubiquinol oxidase)に酸化され、酸化に伴い生じた電子は分子状酸素(O_2)に放出される。B. DsbC/DsbD システムによるジスルフィド異性化・還元反応(Disulfide isomerization or reduction)と CydDC 複合体による還元型グルタチオンの輸送機構。内膜に DsbD はサイトゾルに局在する Trx1 から電子を受け取り、分子内電子伝達を介して DsbC へ電子受け渡す。CydDC 複合体は自身の ATPase 活性により還元型グルタチオンをサイトゾルからペリプラズムへ能動輸送する。輸送された GSH は DsbC に電子を与える。DsbD または還元型グルタチオンから電子を受け取った DsbC は基質のジスルフィド異性化・還元反応を触媒する。

4. 結果

4-1. ERdj5 の電子ドナー候補タンパク質の同定

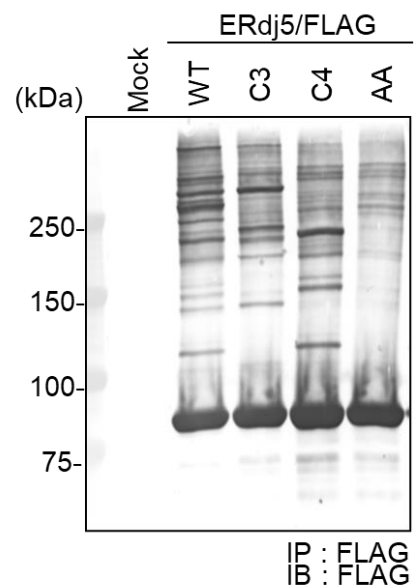
小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 は N 末側から BiP の ATPase 活性を促進する J ドメインと還元活性中心となる CXXC (Cys-X-X-Cys)モチーフを含んだ Trx1~Trx4 ドメインを有している(Fig 9A)。まず、ERdj5 の還元活性中心と特異的に結合するタンパク質と ERdj5 の相互作用を架橋するため、システイン残基のチオール基(SH 基)に特異的な架橋剤である DVSF (divinyl sulfone)を用い、FLAG タグを融合した ERdj5 とその結合タンパク質とを架橋し^{81,82}、FLAG 抗体によって免疫沈降を行い、ウェスタンブロットティング(Fig9B) および銀染色(Fig9C) により結合タンパク質を観察した。野生型 ERdj5 (ERdj5/WT)を過剰発現した細胞では、ERdj5 の分子量(90 kDa)よりも高い位置に複合体がバンドとして観察された(Fig 9B, C)。これらが ERdj5 の CXXC モチーフ依存的に形成した複合体であることを確認するため、ERdj5 のすべての CXXC モチーフを AXXA (Ala-X-X-Ala)に置換した変異体(ERdj5/AA)を作製し(Fig 9A)、同様の実験を行った。ERdj5/AA 変異体を発現させたサンプルでは、DVSF 処理依存的に形成される複合体バンドのいくつかを観察されなくなった(Fig 9B, C)。以前の報告より、ERdj5 は Trx3 と Trx4 ドメインを介して基質のジスルフィド還元反応を触媒することが知られている^{63,68,83}。ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフと特異的に結合するタンパク質に着目するため、Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフのみを残し、他の CXXC モチーフを AXXA に置換した変異体(ERdj5/C3、ERdj5/C4)を作製し(Fig 9A)、DVSF 処理依存的な複合体形成を観察した。ERdj5/C3 変異体および ERdj5/C4 変異体を発現させた細胞では、それぞれ、異なる複合体形成パターンを示した(Fig 9B, C)。これらの結果をもとに、銀染色をしたゲルから#1~#14 のバンドを切り出し、大阪大学・高島成二教授との共同研究により、それぞれバンドに含まれているタンパク質を質量分析によって同定した(Fig 9D)。その結果、大部分のバンドで小胞体の酸化・異性化反応を触媒する PDI ファミリータンパク質が同定された。#7 のバンドでは小胞体で酸化反応の中心的役割

を果たす酸化酵素 Ero1 α が結合タンパク質として同定された³⁰。また、#7 のバンドは ERdj5/C3 変異体もしくは ERdj5/C4 変異体を発現させた細胞でも検出されていたため、Ero1 α は ERdj5 の Trx3 と Trx4 の CXXC モチーフに結合しうることが考えられた(Fig 9C)。これらのことから、Ero1 α と ERdj5 の結合に着目し、Ero1 α が ERdj5 の電子ドナータンパク質として機能するか解析を進めた。

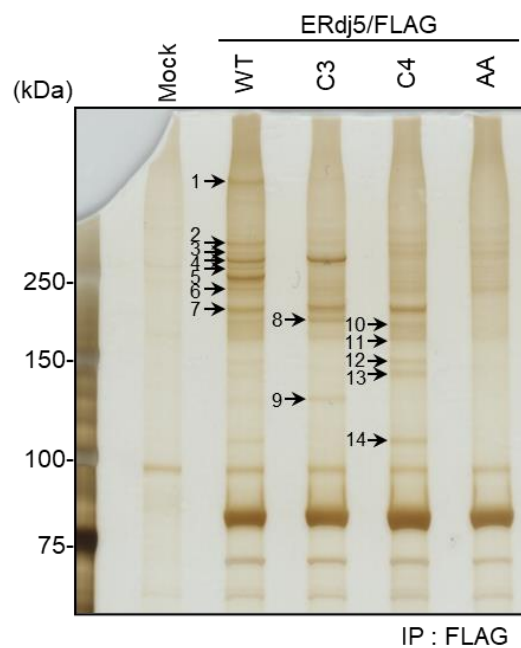
A



B



C



D

Gene name	Full name	Protein name	band number
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	ERp57	7,8,11,13
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	ERp72	1,2,3,4,6,10
PDIA6	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	p5	1,2,3,4,6,7,8,11,13
P4HB	Protein disulfide-isomerase	PDI	7,10,12
TXNDC5	Thioredoxin domain-containing protein 5	ERp46	7,8,10,13
TXNDC12	Thioredoxin domain-containing protein 12	ERp18	14
ERO1L	ERO1-like protein alpha	Ero1 α	7
FASN	Fatty acid synthase	FAS	5
HRNR	Hornerin	HRNR	10
RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	1,4,6,11
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	2,3,4

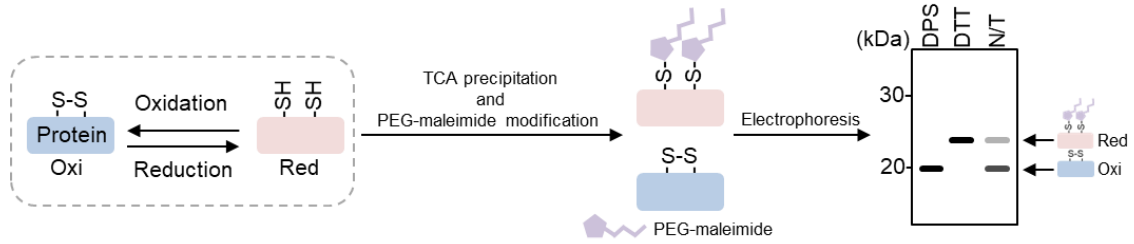
Fig.9 ERdj5 の電子ドナー候補タンパク質の同定

A. FLAG タグを融合した ERdj5/WT および ERdj5 の活性中心である CXXC モチーフを AXXA に置換した変異体のコンストラクション。例えば、ERdj5/C1 変異体は ERdj5 の Trx1 ドメインの CXXC モチーフのみを残し、他の CXXC モチーフを AXXA に置換している。ERdj5/AA 変異体は CXXC モチーフをすべて AXXA に置換している。B-C. FLAG タグを融合した ERdj5/WT および C3、C4、AA 変異体を HEK293T 細胞に過剰発現し、トランスフェクションした細胞を終濃度 100 μ M DVSF で 1 時間処理し、細胞を可溶化した。細胞可溶化液を抗 FLAG-M2 アフィニティーゲルと混合し、FLAG タグを融合した ERdj5 を含むタンパク質複合体を FLAG ペプチドで溶出させた。溶出したサンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティング(B)と銀染色(C)で解析した。D. 質量分析により同定された ERdj5/WT および ERdj5/C3、ERdj5/C4 変異体に結合したタンパク質の一覧。

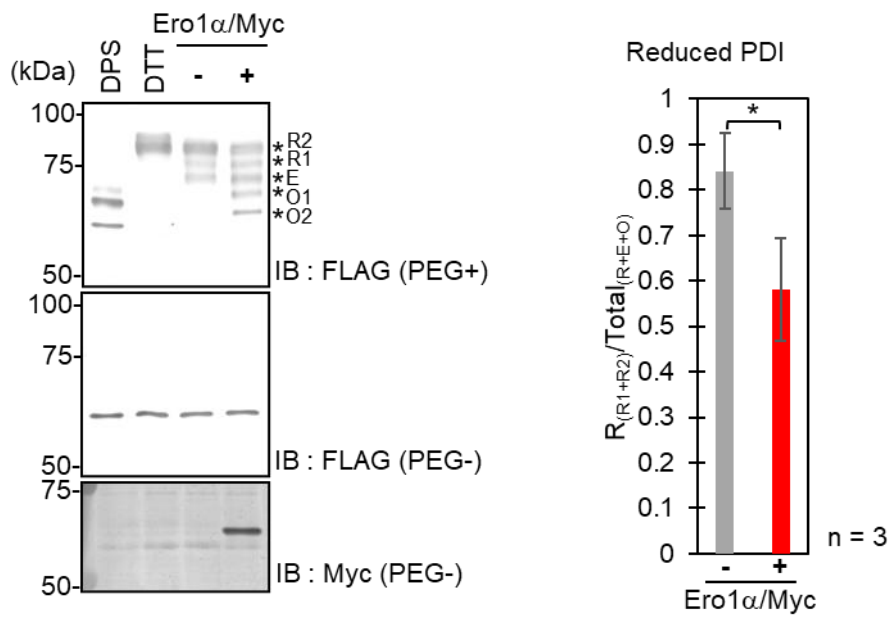
4-2. Ero1 α による PDI および PDI ファミリータンパク質の酸化

小胞体酸化酵素 Ero1 α は分子状酸素(O₂)から酸化力を獲得し、PDI ファミリータンパク質の代表である PDI に対して酸化酵素として機能する^{26,29,30}。まず、Ero1 α が PDI の酸化酵素として働くか確認するため、タンパク質の酸化還元状態を観察することができる PEG マレイミドシフトアッセイ(polyethylene glycol-maleimide shift assay)を行った(Fig 10A)。マレイミド基を有する PEG マレイミド(PEG-Mal)は、システイン残基の SH 基と特異的に結合する。実験には、2kDa の PEG-Mal を使用した。この系を用い、C 末端に Myc タグを融合した Ero1 α 過剰発現下における PDI の酸化還元状態を観察した(Fig 10B)。C 末端に FLAG タグを融合した PDI のみを過剰発現させた場合、Fig10B に示すように PDI の大部分が R2 (Reduced form 2)の位置にバンドシフトし、PDI の酸化還元状態は還元型が多いことがわかった。一方、Ero1 α と共発現させた場合、PDI は O2 (Oxidized form 2)までバンドシフトすることが観察された。これまでの報告通り、Ero1 α が PDI の酸化酵素として働くことを確認できた。Ero1 α は PDI と複合体を形成し、いくつかの PDI ファミリータンパク質を酸化することで小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖の効率的なジスルフィド結合形成を促すことが報告されている。PDI 以外の PDI ファミリータンパク質に対する Ero1 α の影響を調べるため、C 末端に FLAG タグを融合した p5 と ERp46、ERp57、PDIR それぞれと Ero1 α を共発現し、それぞれの酸化還元状態を観察した(Fig 10C : ERp57, D : ERp46, E : p5, F : PDIR)。その結果、上記 4 種類の PDI ファミリータンパク質の酸化還元状態は Ero1 α 共発現下において酸化型が増加した。Ero1 α は PDI 以外のいくつかの PDI ファミリータンパク質に対しても酸化酵素として機能することがわかった。

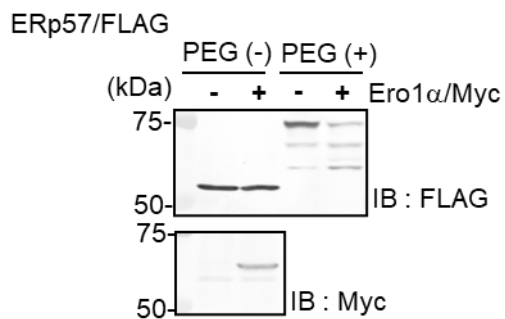
A



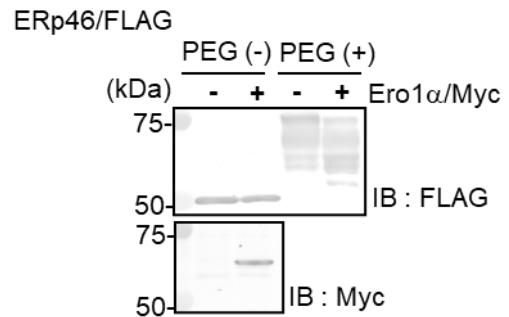
B



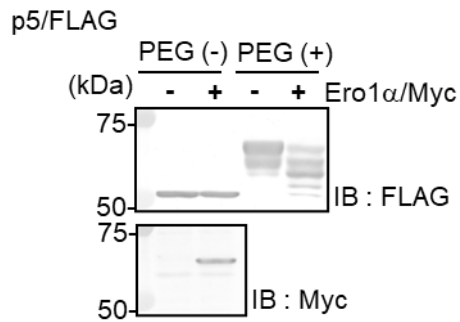
C



D



E



F

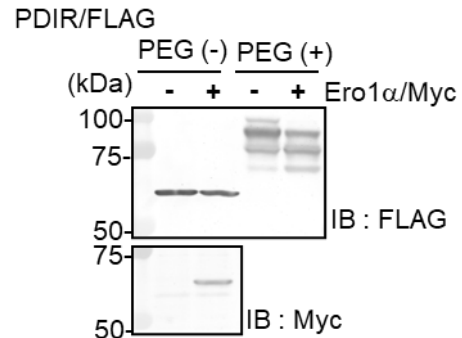


Fig.10 Ero1α による PDI および PDI ファミリータンパク質の酸化

A. PEG マレイミドの分析原理。細胞内で特定のタンパク質が酸化と還元の状態にある場合、トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿により酸化還元状態を固定することができる。TCA 沈殿後、システイン中の遊離チオール基は PEG マレイミドによって特異的に修飾される。例えば、2つのシステインを含む 20kDa のタンパク質の酸化還元状態を、2kDa の PEG マレイミド(2kDa-PEG-Mal)を用いてこの方法で分析すると、電気泳動後に還元状態が約 4kDa のシフトを示す。B-F. PEG マレイミドシフトアッセイを用いた PDI ファミリータンパク質の酸化還元状態の測定。Myc タグを融合した Ero1α と FLAG タグを融合した PDI (B)または FLAG タグを融合した PDI ファミリータンパク質(C: ERp57, D: ERp46, E: p5, F: PDIR)を HEK293T 細胞に共発現させた。PDI のサンプルは酸化還元状態の対照実験として細胞に 1 mM DPS または 10 mM DTT で 5 分間処理したものを用意した。その後、TCA 沈殿を行い、タンパク質の SH 基を 2kDa-PEG-Mal で修飾した。サンプルは SDS-PAGE を行った後、ウェスタンブロットを行った。各 PDI ファミリータンパク質の酸化還元状態は還元型を R、酸化型を O で示す。また、還元型 1 を R1、還元型 2 を R2、酸化型 1 を O1 そして酸化型 2 を O2 と示す。酸化還元平衡状態は E で示す。PDI の酸化還元状態は全レドックス状態(R+E+O)に対する還元型(R1+R2)のバンドの比率を ImageJ で定量した。定量データは 3 回の実験の平均 \pm の SD 値である。P 値は、*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 を示す。

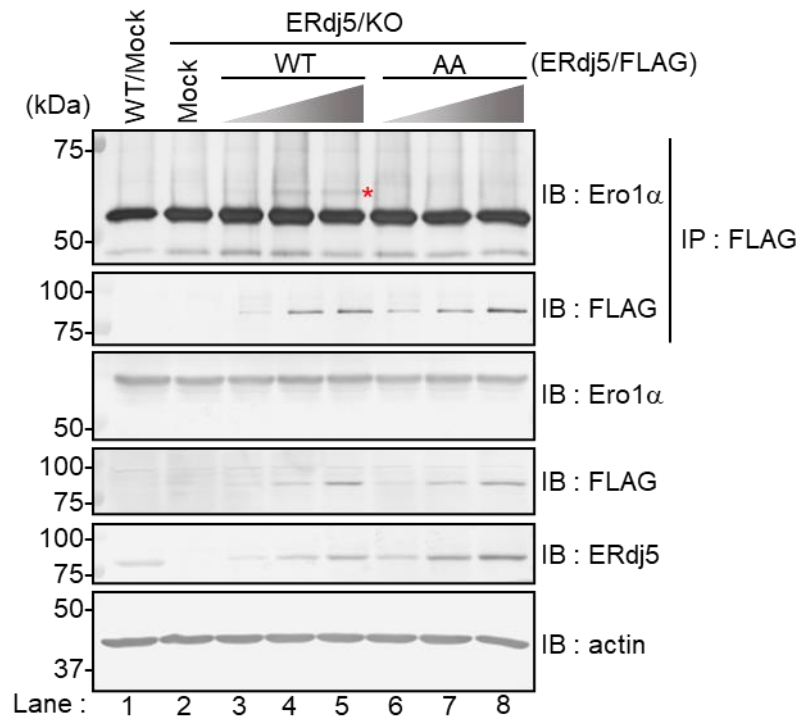
4-3. Ero1 α が及ぼす ERdj5 の酸化還元状態への影響

4-1 の結果から Ero1 α が ERdj5 の電子ドナー候補タンパク質として同定された。まず、SH 基特異的な架橋剤である DVSF 非存在下における Ero1 α と ERdj5 の結合を免疫沈降実験により確認した(Fig 11A)。実験は FLAG タグを C 末端に融合した野生型 ERdj5 および ERdj5/AA 変異体を ERdj5 欠損細胞 (ERdj5/KO) に発現させ、TCA (trichloroacetic acid) 沈殿で得た細胞可溶化液を用い、FLAG 抗体によって免疫沈降を行った。ERdj5/KO 細胞に入れ戻した ERdj5 の発現量は内在性 ERdj5 の発現量に相当することをウエスタンブロットで確認した(Fig 11A 上から 5 番目のメンブレン)。この発現量の条件下で、内在性の Ero1 α は野生型 ERdj5 と結合し(Fig 11A lane 3~5)、ERdj5/AA 変異体には結合しないことを確認した(Fig 11A lane 6~8)。さらに、Myc タグを C 末端に融合した Ero1 α と FLAG タグを融合した野生型 ERdj5 もしくは ERdj5/AA 変異体を共発現させた条件において、Ero1 α と ERdj5 の相互作用を観察した。その結果、野生型同士は結合したが、ERdj5/AA 変異体は Ero1 α と結合しなかった(Fig 11B lane 5, 6)。これらことから、Ero1 α は ERdj5 の CXXC モチーフに依存して ERdj5 と相互作用することが明らかになった。

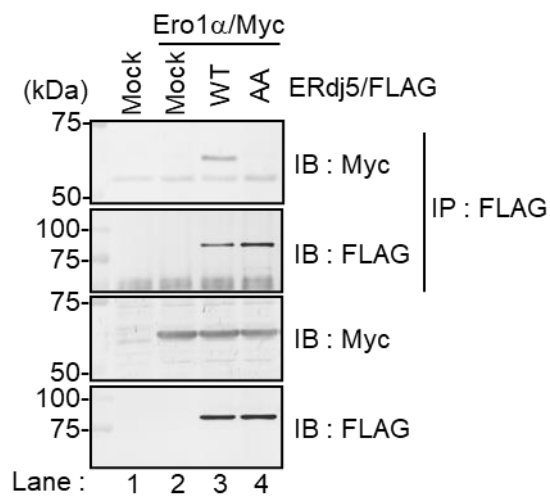
4-2 の結果で、Ero1 α は PDI およびいくつかの PDI ファミリータンパク質の酸化酵素として働くことを確認した。次に、PDI の酸化酵素である Ero1 α が ERdj5 の酸化還元状態にどのような影響をもたらすか PEG マレイミドシフトアッセイを用いて調べた(Fig 11C, D)。ERdj5 の定常的な酸化還元状態は O (Oxidized form) の割合が多いことがわかった。Ero1 α と共発現した場合、ERdj5 の R (Reduced form) が増加することがわかり、特に還元型 1 (Reduced form 1 : R1) が顕著に増加した(Fig 11C)。さらに、ERdj5 の酸化還元状態に対する内在性 Ero1 α の影響を観察するため、ERdj5 を過剰発現した細胞に Ero1 α に対する siRNA (si/Ero1 α) をトランスフェクションし、ERdj5 の酸化還元状態を調べた(Fig 11D)。内在性 Ero1 α は si/Ero1 α を細胞にトランスフェクションしてから 96 時間後に効率良くノックダウンされることを確認した(Fig 11D)。si/Ero1 α をトランスフェクションした細胞では ERdj5 の酸化還元状態が si/NS

(Nonspecific siRNA)をトランスフェクションした細胞と比較して還元型の割合が減少した(Fig 11D)。これらの結果から、Ero1 α はERdj5に電子を与え、ERdj5の還元酵素として機能することがわかった。

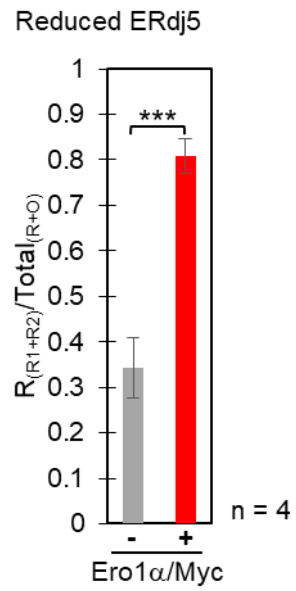
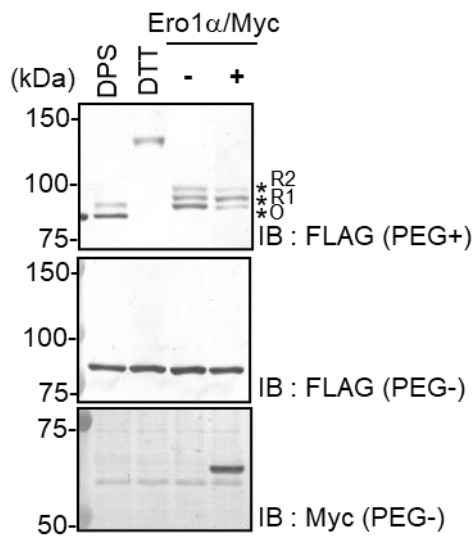
A



B



C



D

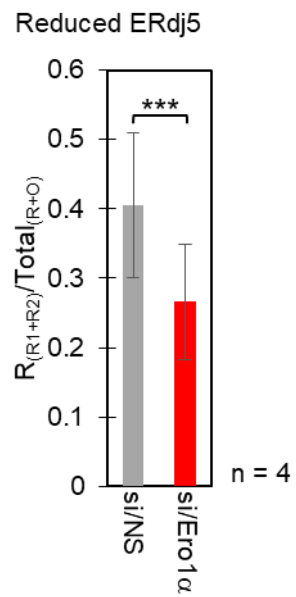
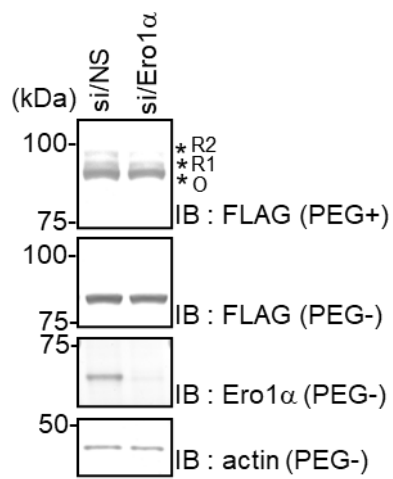


Fig.11 Ero1 α が及ぼす ERdj5 の酸化還元状態への影響

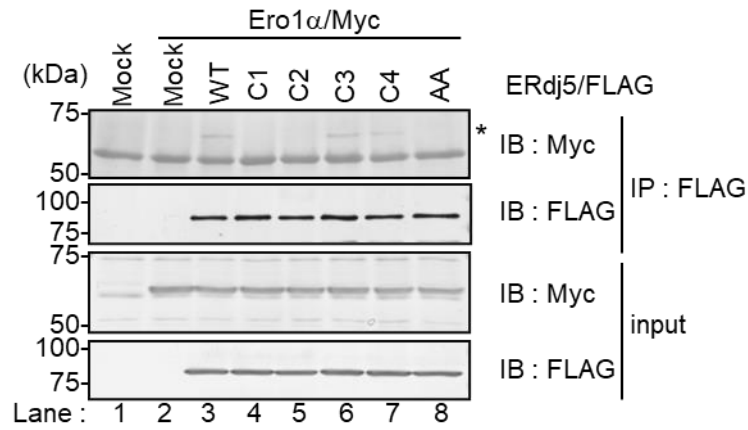
A. ERdj5 を欠損した HEK293T 細胞(ERdj5/KO)に FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは AA 変異体を発現させた。トランスフェクションした細胞を TCA 沈殿で可溶化し、細胞可溶化液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。サンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。赤アスタリスクは ERdj5 に結合した内在性の Ero1 α を示す。B. Myc タグを融合した Ero1 α /WT と FLAG を融合した ERdj5/WT もしくは AA 変異体を HEK293T 細胞に共発現させた。トランスフェクションした細胞を TCA 沈殿で可溶化し、細胞可溶化液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。サンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。C. Ero1 α 過剰発現下における ERdj5 の酸化還元状態の測定。Myc を融合した Ero1 α /WT と FLAG タグを融合した ERdj5/WT を HEK293T 細胞に共発現し、酸化還元状態の対照実験として細胞に 1 mM DPS または 10 mM DTT で 5 分間処理したものを用意した。サンプルは Fig. 10A の説明に既述した手順で作製した。作製したサンプルは SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングで解析した。D. FLAG を融合した ERdj5/WT を HEK293T 細胞に 24 時間、過剰発現させた後、その細胞に si/NS もしくは si/Ero1 α をトランスフェクションした。siRNA をトランスフェクションしてから 96 時間後、Fig. 2A の説明に既述した手順でサンプルを作製した。ERdj5/WT の酸化還元状態は還元型 1 を R1、還元型 2 を R2 そして酸化型を O で示す。ERdj5 の酸化還元状態は全レドックス状態(R+O)に対する還元型 R (R1+R2)のバンドの比率を ImageJ で定量した。定量データは 4 回の実験の平均 \pm の SD 値である。P 値は、*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 を示す。

4-4. 分子間ジスルフィド結合を介した Ero1 α /ERdj5 複合体形成

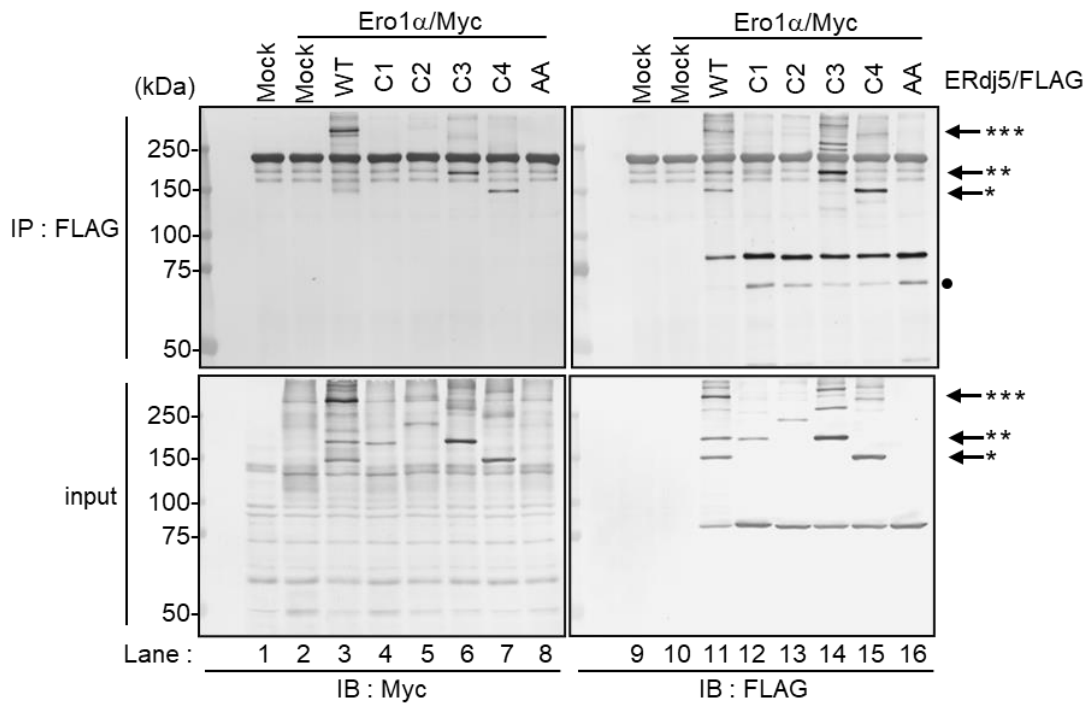
次に、Ero1 α がERdj5のどのCXXCモチーフに結合するか詳細に解析した。ERdj5にはN末側からCXXCモチーフを有するTrxドメインが4つある(Trx1~Trx4)。そこで、それぞれのTrxドメインのCXXCモチーフのみを残した変異体(ERdj5/C1およびERdj5/C2、ERdj5/C3、ERdj5/C4)を用い(Fig 9A)、Ero1 α とERdj5の結合を免疫沈降実験により解析した(Fig 12A)。Ero1 α はERdj5/C1およびERdj5/C2変異体には結合しなかったが(Fig 12A lane 4, 5)、ERdj5/C3もしくはERdj5/C4変異体と結合した(Fig 12A)。次に、非還元 SDS-PAGEを用い、Ero1 α とERdj5の分子間ジスルフィド結合形成を観察した(Fig 12B)。野生型同士の共発現下では、バンドが250kDa以上(***)の分子量の位置と150kDa(*)の位置に観察された(Fig 12B lane 3, 11)。ERdj5/C3変異体との共発現下では、バンドが約200kDa(**)の位置に検出されたが(Fig 12B lane 6, 14)、ERdj5/C4変異体との共発現下では、バンドが約150kDaの位置に観察された(Fig 12B lane 7, 15)。これらの結果から、ERdj5とEro1 α の分子間ジスルフィド結合を介した複合体には一分子のERdj5に対して二分子のEro1 α が結合する状態があることが考えられた(Fig 12E)。この結合比については6考察の章にて詳しく考察する。さらに、ERdj5のTrx3およびTrx4ドメインとEro1 α の結合を詳細に調べるため、ERdj5のTrx3もしくはTrx4ドメインのCXXCモチーフのみをSXXS(Ser-X-X-Ser)に置換した変異体(ERdj5/C3/SS、ERdj5/C4/SS)とTrxドメインのすべてのCXXCモチーフをSXXSに置換した変異体(ERdj5/SS)を作製し、Ero1 α との分子間ジスルフィド結合形成を観察した(Fig 12D)。ERdj5/C3/SS変異体との共発現下ではバンドが約150kDaの位置に検出され(Fig 12D lane 4, 10)、ERdj5/C4/SS変異体との共発現下ではバンドが約200kDaの位置に観察された(Fig 12D lane 5, 11)。これはFig 12Bの結合実験の結果と一致することから、約200kDaの位置に検出されるバンドはERdj5のTrx3ドメインとEro1 α が分子間ジスルフィド結合形成した複合体であり、約150kDaの位置に検出されるバンドはERdj5のTrx4

ドメインと *Ero1α* が分子間ジスルフィド結合形成した複合体であることが示唆された。つまり、*ERdj5* は *Trx3* と *Trx4* ドメインの CXXC モチーフを介して二分子の *Ero1α* と結合する可能性が裏付けられた。

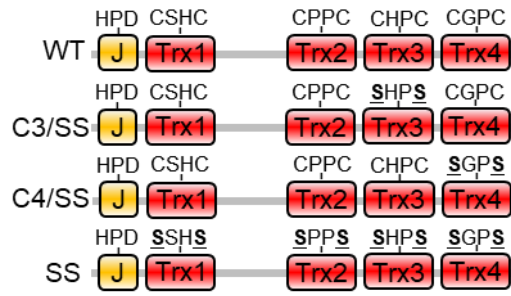
A



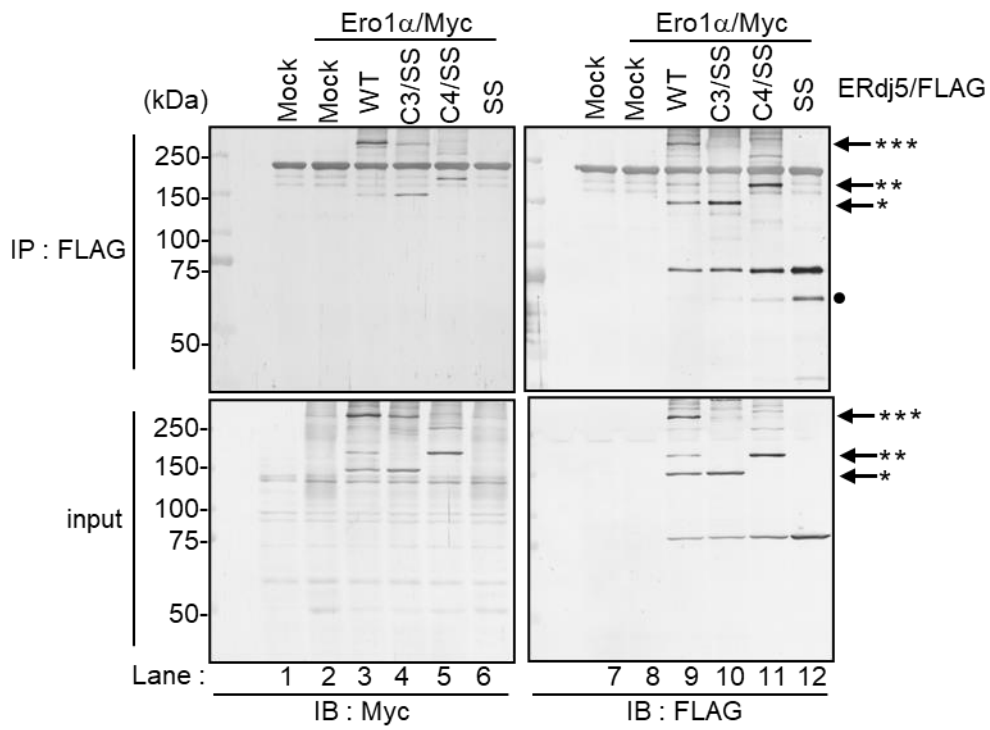
B



C



D



E

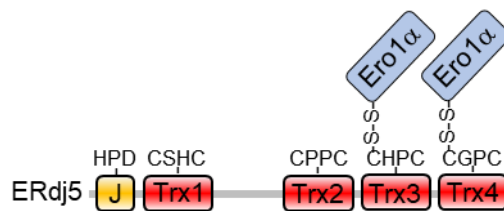
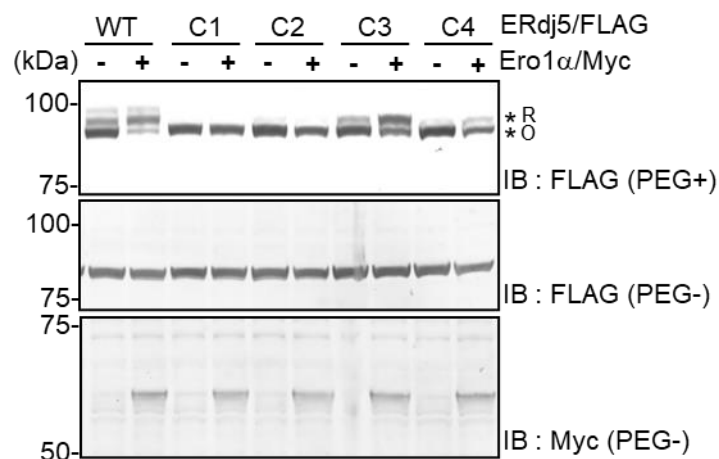


Fig.12 分子間ジスルフィド結合を介した Ero1 α /ERdj5 複合体形成

A. Myc タグを融合した Ero1 α /WT と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは C1、C2、C3、C4、AA 変異体を HEK293T 細胞に共発現させた。サンプルは Fig. 11A の説明に既述した手順で作製し、SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。黒アスタリスクは ERdj5 に結合した Ero1 α を示す。B. Fig. 12A で作製したサンプルを非還元 SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。シングルアスタリスク(*)は Ero1 α が ERdj5 の Trx4 ドメインに結合している複合体を示している。ダブルアスタリスク(**)は Ero1 α が ERdj5 の Trx3 ドメインに結合している複合体を示している。トリプルアスタリスク(***)は二分子の Ero1 α が一分子の ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインに結合している複合体を示す。黒色のサークルは ERdj5 の分解産物を示す。C. FLAG タグを融合した ERdj5/WT および ERdj5 の活性中心である CXXC モチーフを SXXS に置換した変異体のコンストラクション。例えば、ERdj5/C3/SS 変異体は ERdj5 の Trx3 ドメインの CXXC モチーフのみを SXXS モチーフに置換している。ERdj5/SS 変異体は CXXC モチーフをすべて SXXS に置換している。D. Myc タグを融合した Ero1 α /WT と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは C3/SS、C4/SS、SS 変異体を HEK293T 細胞に共発現させた。サンプルは Fig. 11A の説明に既述した手順で作製し、非還元 SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。E. 想定される ERdj5 と Ero1 α の結合化学量。一分子の ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフに Ero1 α が一分子ずつ結合している。

4-5. Ero1 α が及ぼす ERdj5 の Trx3・Trx4 ドメインの酸化還元状態への影響

4-3 の結果から、Ero1 α は ERdj5 の還元酵素として機能し、ERdj5 の Trx ドメインの活性中心である CXXC モチーフを還元することが明らかになった。次に、Ero1 α が ERdj5 のどの Trx ドメインの CXXC モチーフに電子を与えるかを調べるため、ERdj5/C1 および ERdj5/C2、ERdj5/C3、ERdj5/C4 変異体を用い、Ero1 α と共発現下における各変異体の酸化還元状態を PEG マレイミドシフトアッセイにより観察した(Fig 13)。Ero1 α と共発現していない細胞において、ERdj5/C1 と ERdj5/C2、ERdj5/C4 変異体の酸化還元状態は大部分が O (Oxidized form)であったのに対して、ERdj5/C3 変異体は他の変異体と比較して R (Reduced form)の割合が多いことがわかった。Ero1 α と共発現した場合、ERdj5/C1 と ERdj5/C2 の酸化還元状態は変化しなかったが、ERdj5/C3 および ERdj5/C4 の還元型の割合が顕著に増加することが観察された。これらの結果から、Ero1 α は ERdj5 の Trx3 または Trx4 ドメインの CXXC モチーフに特異的に電子を与えることが明らかになった。



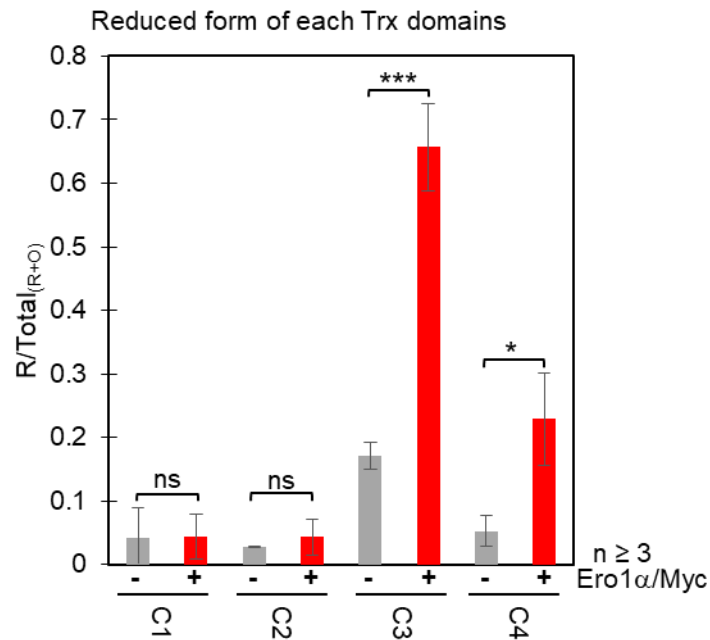


Fig.13 Ero1α が及ぼす ERdj5 の Trx3・Trx4 ドメインの酸化還元状態への影響
 Ero1α 過剰発現下における ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインの酸化還元状態の測定。
 Myc タグを融合した Ero1α/WT と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは C1、C2、
 C3、C4 変異体を HEK293T 細胞に共発現し、サンプルは Fig. 10A の説明に既述した手
 順で作製した。作製したサンプルは SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティング
 で解析した。ERdj5/C1、C2、C3、C4 変異体の酸化還元状態は還元型を R、酸化型 O で
 示す。ERdj5 の酸化還元状態は全レドックス状態(R+O)に対する還元型のバンドの比率
 を ImageJ で定量した。定量データは 3 回以上の実験の平均 \pm の SD 値である。P 値は、
 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 を示す。

4-6. Ero1 α から ERdj5 への電子伝達の分子メカニズム

Ero1 α は PDI との電子伝達に関与するシステインペアが自身の分子内に複数存在する。PDI の酸化酵素として Ero1 α が機能する場合は、主に C94 と C99 が分子内ジスルフィド結合を形成したシステインペア(C94-C99)で還元型 PDI と分子間ジスルフィド結合を形成し、PDI から電子を奪い、還元型 PDI を効率よく酸化することが報告されている^{32,34,84}。ERdj5 が Ero1 α の C94-C99 と分子間ジスルフィド結合を形成するか調べるため、C94 と C99 をアラニン(Ala : A)に置換した Ero1 α の変異体(C94A/C99A)を作製した。非還元条件の SDS-PAGE を用い、ERdj5 と Ero1 α の C94A/C99A 変異体との分子間ジスルフィド結合を介した複合体を観察した(Fig 14A)。野生型同士では ERdj5 と Ero1 α の分子間ジスルフィド結合を介した複合体がおおよそ 250kDa 以上(***)と 200kDa (**)、150kDa (*)の位置に検出された (Fig 14A lane 3, 16)。同様に、C94A/C99A 変異体は ERdj5 と分子間ジスルフィド結合を形成し、ERdj5 と複合体を形成した(Fig 14A lane 6, 19)。これらの結果から、ERdj5 は Ero1 α の C94-C99 とは直接結合しないことがわかった。

次に、Ero1 α の C94-C99 以外のシステインペアが ERdj5 と分子間ジスルフィド結合を形成し、ERdj5 への電子伝達に関与することを想定した。C85-C391 および C104-C131、C208-C241、C394-C397 の各システインペアは Ero1 α の電子伝達および活性制御に関わると考えられている^{32,35}。そこで、各システインペアをアラニンに置換した変異体(C85A/C391A、C104A/C131A、C208A/C241A、C394A/C397A)を作製し、Ero1 α と ERdj5 の分子間ジスルフィド結合形成を介した複合体を観察した(Fig 14A, B)。その結果、C85A/C391A 変異体のみが ERdj5 と分子間ジスルフィド結合を形成しなくなり(Fig 14B lane 6, 16)、ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 に結合して Ero1 α から電子を受け取ることが示唆された。そこで、Ero1 α の C85-C391 から ERdj5 への直接的な電子伝達を観察するため、還元型 Ero1 α と酸化型 ERdj5 を精製し、これらの電子伝達を試験管内で再構成した。以前の研究により、Ero1 α の酸化還元状態は非還元 SDS-PAGE 条件下で、3 つの状態(Ox2 : 不活性型、

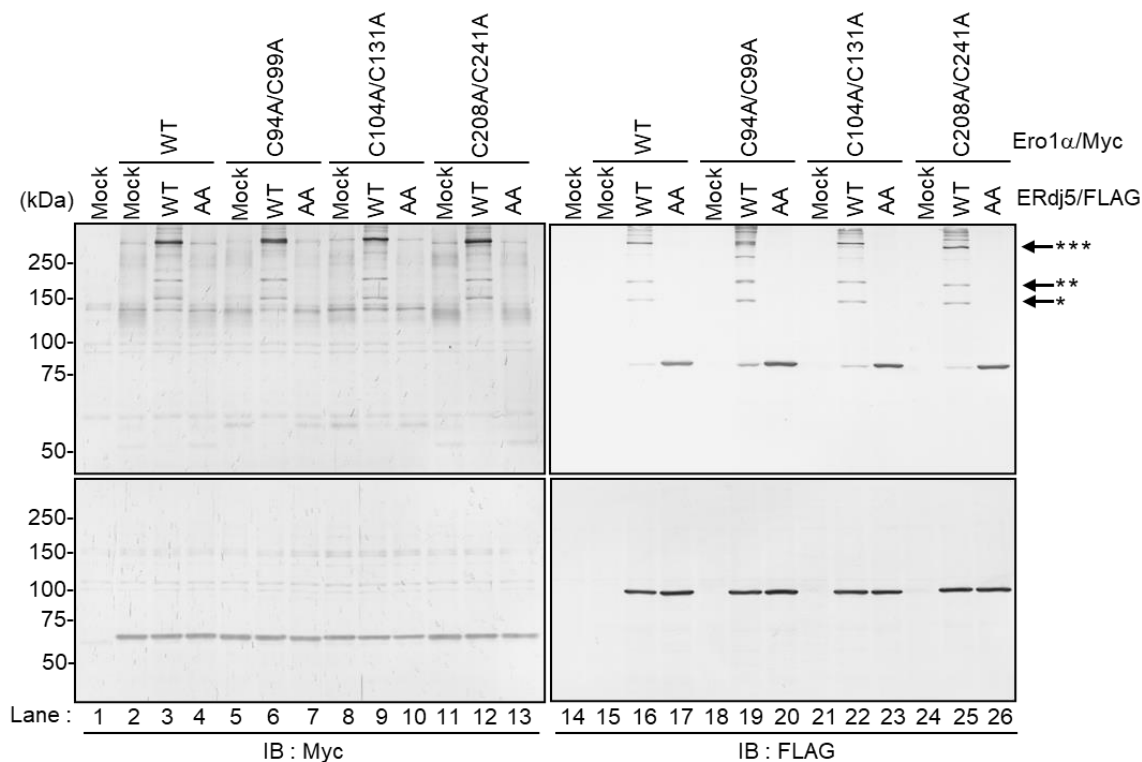
Ox1 : 活性型、Red : 還元型)に分離できることが知られている。そのうち、約 55 kDa 付近に観察されるバンドが Ox1 型であり、これは Ero1 α の C104-C131 が還元された状態であることが報告されている。一方、約 60 kDa 付近に検出されるバンドは還元型であり、Ero1 α の C85-C391 が還元された状態と予測されている。まず、この還元型 Ero1 α を準備するため、C104A/C131A および C85A/C104A/C131A/C391A 変異体を His カラムにより簡易精製した。その後、精製した Ero1 α の酸化還元状態を非還元 SDS-PAGE で観察した(Fig 14C)。その結果、C104A/C131A 変異体は約 60 kDa 付近にバンドとして検出され、その酸化還元状態は、還元型であることが予測された(Fig 14C lane 5)。そこで、この変異体に酸化剤である DPS を処理し、酸化還元状態を観察すると、還元型から Ox1 型へのバンドシフトが観察された(Fig 14C lane 6)。これに対して、酸化処理によって引き起こされるバンドシフトは、C85A/C104A/C131A/C391A 変異体において観察されなかった (Fig 14C lane 7, 8)。このことは C104A/C131A 変異体において C85-C391 が還元状態であることを示している。

この還元型 Ero1 α を用い、酸化型 ERdj5/C クラスターとの電子伝達を観察した。野生型 C クラスター(C-cluster/WT)は用量依存的に Ero1 α を還元型から Ox1 型へ移行させた(Fig 14D lane 2~4)。しかし、Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフを AXXA に置換した変異体(C-cluster/AA)は Ero1 α の還元型から Ox1 型へのバンドシフトを促進しなかった(Fig 14D lane 5~7)。つまり、ERdj5 は CXXC モチーフを介して Ero1 α の C85 と C391 のジスルフィド結合形成を触媒していることがわかった。また、Ero1 α の C85-C391 の酸化還元電位は ERdj5 の酸化還元電位よりも低いことが報告されていた(Fig 14E)⁸⁵。一般に、電子(e)は酸化還元電位が低い分子から高い分子へ放出される。したがって、酸化還元電位の観点からも ERdj5 が Ero1 α の C85-C391 から電子を効率的に受け取ることが示された。

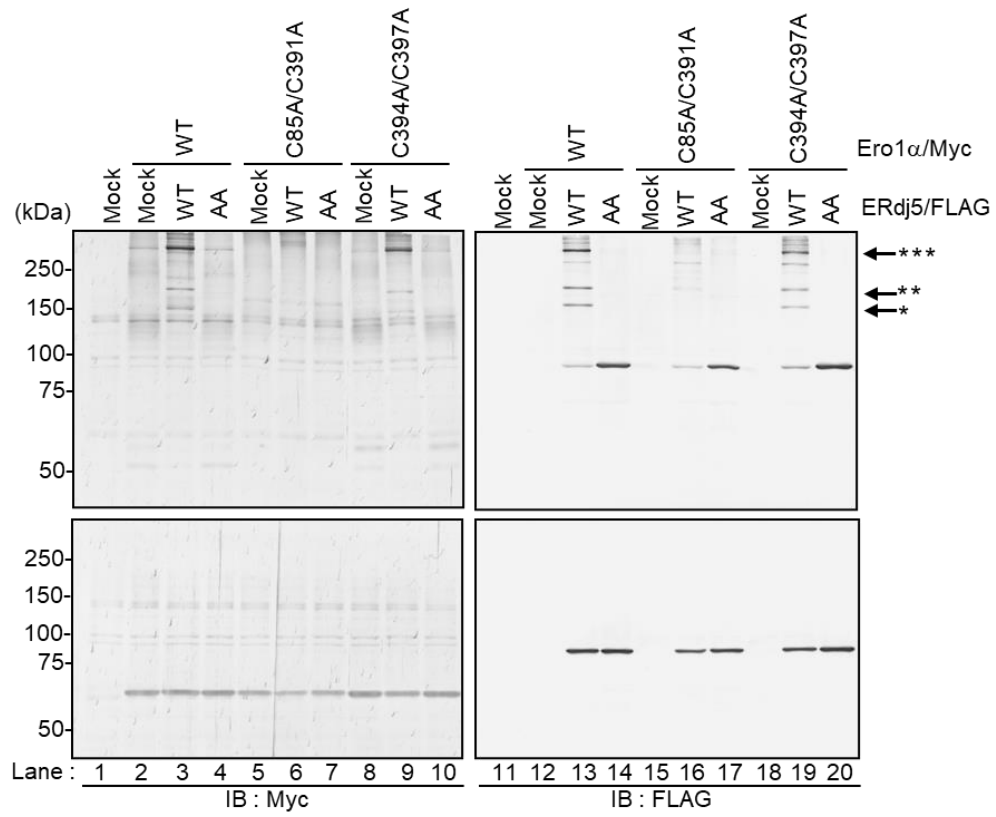
次に、細胞内における Ero1 α の C85-C391 を介した ERdj5 への電子伝達効率を調べるため、ERdj5 の酸化還元状態を PEG マレイミドシフトアッセイにより観察した(Fig 14F)。野生型 ERdj5 の酸化還元状態は野生型 Ero1 α との共

発現によって還元型 1 (Reduced form 1 : R1)の割合が顕著に増加したが、C85A/C391A と共発現した場合、その増加は抑制された。一方、C104A/C131A は野生型 Ero1 α と比較して ERdj5 の還元型 1 の増加をわずかに抑制した。さらに、ERdj5 の酸化還元状態に対する Ero1 α の C85-C391 の影響を詳細に解析するため、ERdj5/C3 と ERdj5/C4 変異体の酸化還元状態も観察した(Fig 14F)。ERdj5/C3 または ERdj5/C4 の酸化還元状態は、野生型 Ero1 α との共発現により還元型(Reduced form : R)の割合が顕著に増加したが、C85A/C391A の共発現下において、その増加は抑制された。野生型 ERdj5 の結果と同じく C104A/C131A 変異体は野生型 Ero1 α と比較して ERdj5/C3 および ERdj5/C4 の還元型の増加をわずかに抑制した。これらのことから、細胞内においても ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 を介して Ero1 α から電子を効率よく受け取っていることが示唆された。

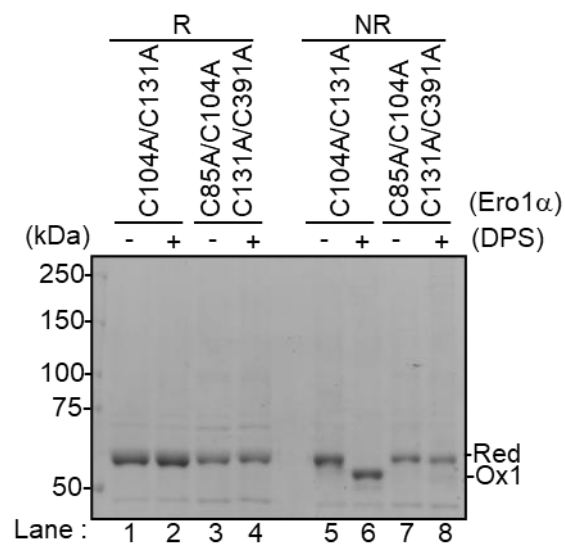
A



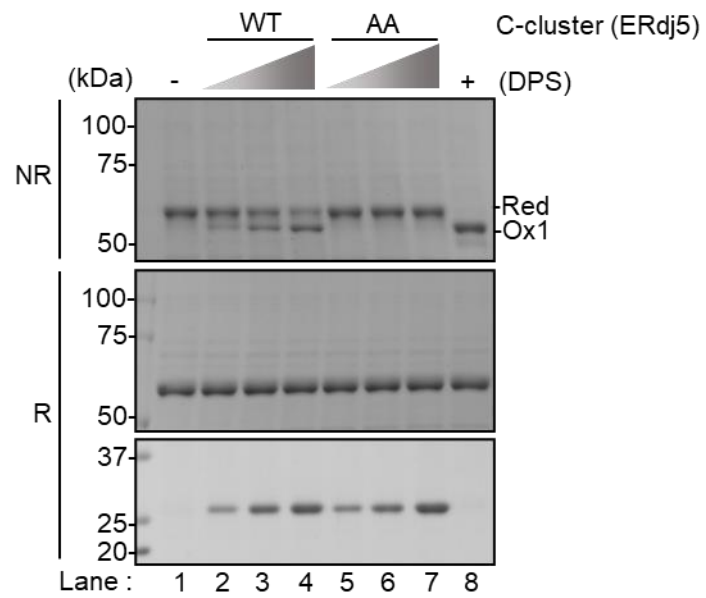
B



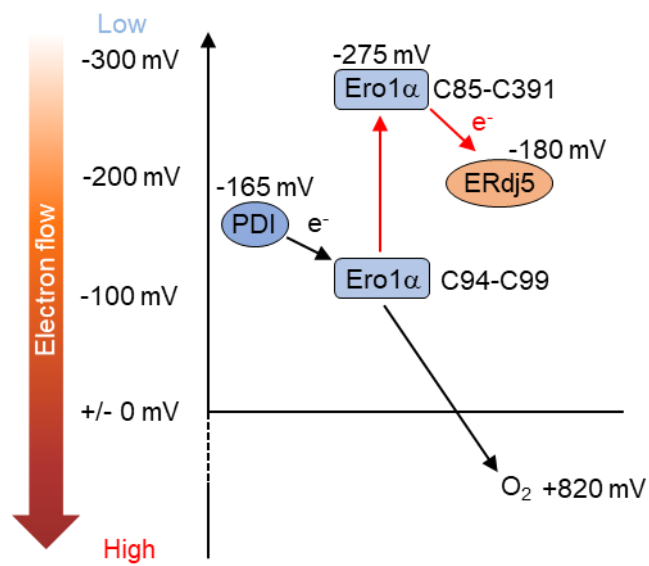
C



D



E



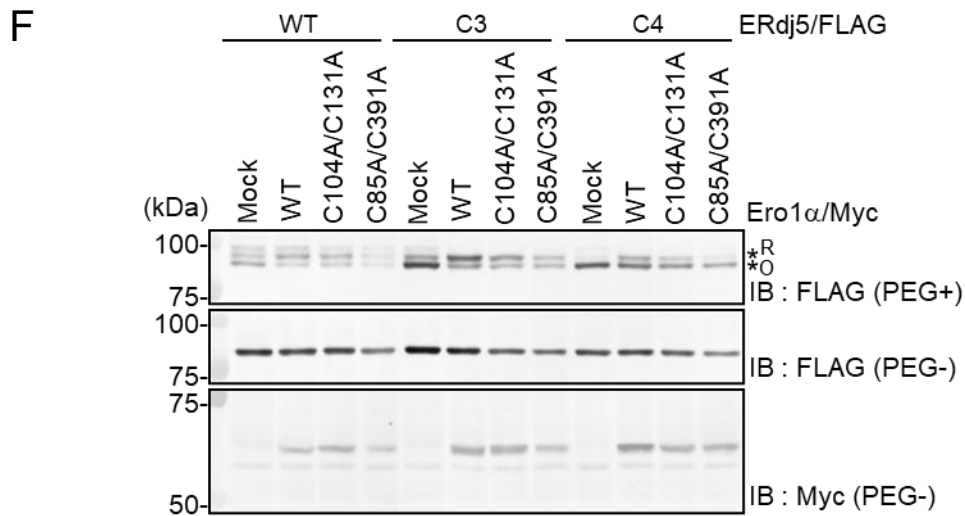


Fig.14 Ero1α から ERdj5 への電子伝達の分子メカニズム

A-B. Myc タグを融合した Ero1α/WT または Ero1α の各システインペアをアラニン(A)に置換した変異体と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは AA 変異体を HEK293T 細胞に共発現させた。トランスフェクションした細胞を TCA 沈殿で可溶化し、細胞可溶化液を非還元 SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングで解析を行った。シングルアスタリスク(*)は Ero1α が ERdj5 の Trx4 ドメインに結合している複合体を示している。ダブルアスタリスク(**)は Ero1α が ERdj5 の Trx3 ドメインに結合している複合体を示している。トリプルアスタリスク(***)は二分子の Ero1α が一分子の ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインに結合している複合体を示している。C. 精製した各 Ero1α (C104A/C131A/C166A, C85A/C104A/C131A/C166A/C391A) 変異体を、1 mM DPS (Dipyridyl disulfide) 処理あり(+)または(-)なしで、室温で 5 分間、反応させた。反応後、すべての最終サンプルは、非還元 SDS-PAGE (NR) もしくは SDS-PAGE (R) で泳動し、CBB 染色を行った。Red は還元型 Ero1α を示し、Ox1 は Ero1α の C85 と C391 がジスルフィド結合を形成した Ero1α を示す。D. 精製した還元型 Ero1α を 1 mM DPS (Dipyridyl disulfide) 処理あり(+)または(-)なし、もしくは、ERdj5 の C クラスター変異体(C-cluster/WT)または AA 変異体と室温で 5 分間、反応させた。反応後、すべての最終サンプルは、非還元 SDS-PAGE (NR) もしくは SDS-PAGE (R) で泳動し、CBB 染色を行った。E. 酸化還元電位に基づいた PDI と Ero1α、ERdj5 の電子伝達。F. Ero1α 過剰発現下における ERdj5 の酸化還元状態の測定。Myc タグを融合した Ero1α/WT または Ero1α の各システインペアをアラニン(A)に置換した変異体と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは C3、C4 変異体を HEK293T 細胞に共発現し、サンプルは Fig. 10A の説明に既述した手順で作製した。ERdj5/WT の酸化還元状態は還元型 1 を R1、還元型 2 を R2 そして酸化型を O で示す。C3、C4 変異体の酸化還元状態は還元型を R、酸化型 O で示す。

4-7. NMR を用いた ERdj5 の C クラスターと Ero1 α の相互作用解析

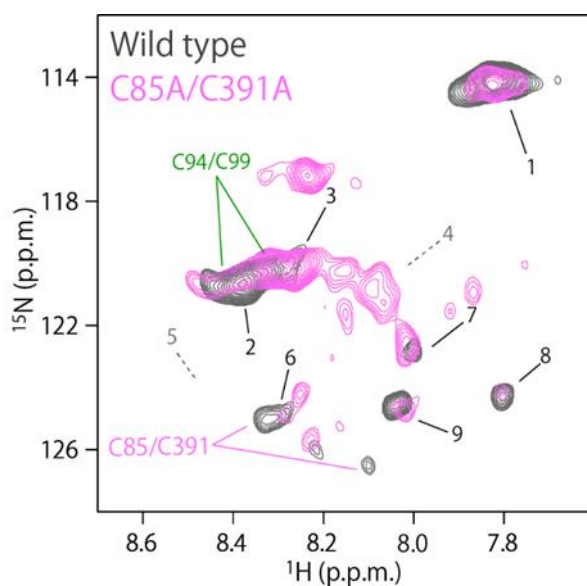
次に、ERdj5 の直接的な相互作用による Ero1 α の構造変化を観察するため、NMR を用い、Ero1 α の動的な構造を解析した。NMR は東京大学大学院薬学研究科竹内恒教授、徳永裕二助教との共同研究として行った。なお、本実験においては ERdj5 の相互作用部位に含まれる Ero1 α のシステイン残基の動態に焦点を当てるため、システイン残基を [^{15}N] L-cysteine でラベル化し、ラベル化した Ero1 α の核磁気共鳴を測定した。

まず、Ero1 α の C85-C391 および C94-C99 を帰属するため、各システインペアをアラニンに置換した Ero1 α (C85A/C391A、C94A/C99A) を精製し、NMR で解析した (Fig 15A, B)。C85A/C391A 変異体の測定では #6 の左隣に観察されたシグナルと #9 の左下に観察されたシグナルが消失したことから、これら二つのシグナルが C85 または C391 であることが判明した (Fig 15A)。C94A/C99A 変異体の測定では #2 の周辺にある二つのシグナルが消失し、この二つのシグナルが C94 または C99 であることを明らかにした (Fig 15B)。

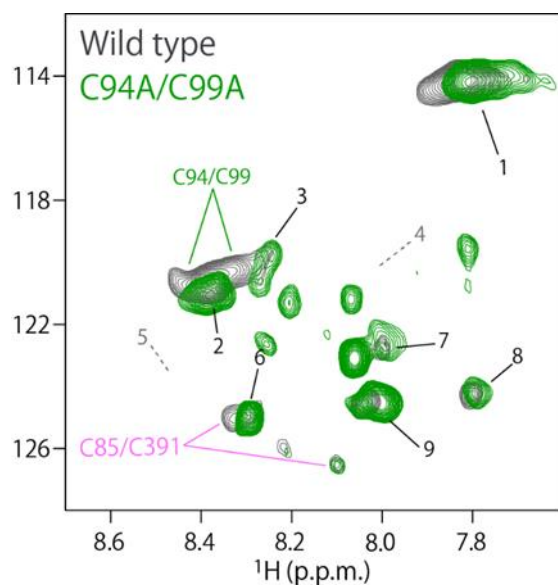
これまでの結果から、Ero1 α が ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインが有する CXXC モチーフと特異的に結合し、ERdj5 を還元することを明らかにしている。そこで、NMR による相互作用実験には、ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインを含む C クラスターを用い、Ero1 α のシステイン残基の動態が C クラスターの存在の有無によってどの程度変化するかを追跡した (Fig 15C)。また、分子間ジスルフィド結合非依存的な相互作用による Ero1 α の構造変化を観察するため、ERdj5 の C クラスターと Ero1 α のリコンビナントタンパク質は酸化型で用意し、NMR 解析を行った。その結果、C クラスターの存在下において Ero1 α の C85-C391 由来のシグナルが顕著な化学シフトを示すことが観察された。一方、Ero1 α の C94-C99 由来のシグナルはほとんど変化を示さなかった。これらのことから、ERdj5 の C クラスターは Ero1 α の C85-C391 の近傍に相互作用し、その動態に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、#3 および #6、#8、#9 のシグナルも C クラスターの存在下において化学シフトが起こる

ことが観察された。これらのシグナルを帰属することはできなかったが、#3 および#6、#8、#9の化学シフトは、Ero1 α のC85-C391以外のERdj5とEro1 α の結合部位を反映している可能性もしくはERdj5がEro1 α のC85-C391に結合することによって引き起こされたEro1 α の構造変化を反映している可能性が考えられた。これらの化学シフトから考察される意義は、考察で言及する。

A



B



C

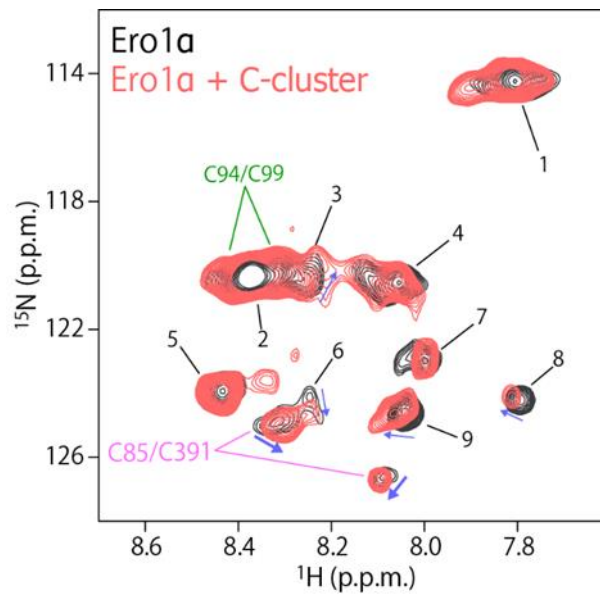


Fig.15 NMR を用いた ERdj5 の C クラスターと Ero1α の相互作用解析

A-B. NMR を用いた Ero1α の C94-C99 および C85-C391 の帰属。Ero1α/C104A/C131A/C166A および C94A/C99A/C104A/C131A/C166A、C85A/C104A/C131A/C166A/C391A 変異体のシステイン残基を¹⁵N L-cysteine でラベル化し、NMR によりその動態を観察した。A は C104A/C131A/C166A 変異体(黒)と C85A/C104A/C131A/C166A/C391A 変異体(ピンク)の NMR シグナルを重ね合わせた図を示す。B は C104A/C131A/C166A 変異体(黒)と C94A/C99A/C104A/C131A/C166A 変異体(緑)の NMR シグナルを重ね合わせた図を示す。C. Ero1α/C104A/C131A 変異体のシステイン残基を¹⁵N L-cysteine でラベル化し、NMR によりその動態を観察した。その結果で得られた NMR シグナル(黒)と ERdj5 の C クラスターを添加した場合で得られた NMR シグナル(赤)との違いを観察した。A および B の結果により帰属した Ero1α の C94-C99 由来の NMR シグナルを緑で示し、C85-C391 をピンクで示す。

4-8. PDI による Ero1 α の活性化

小胞体において Ero1 α は主に不活性型(Ox2)として存在し、不活性型は C94 と C131 および C99 と C104 が互いに分子内ジスルフィド結合(C94-C131、C99-C104)を形成した状態である(Fig 16A 上図)。Ero1 α の活性化には還元型 PDI からの電子供給が必要であり、この電子供給によって、不活性型 Ero1 α の C94-C131 と C99-C104 の分子内ジスルフィド結合の架け替え反応が起こる。その反応後、Ero1 α は C94 と C99 が分子内ジスルフィド結合(C94-C99)を形成した活性型(Ox1)となる(Fig 16A 下図)。この活性化を経て、Ero1 α は C94-C99 で PDI ファミリータンパク質と電子授受を行う^{30,34}。PDI による Ero1 α の活性化を確認するため、非還元の SDS-PAGE を用い、観察した。これまでの報告通り、野生型 PDI を共発現した条件では、Ero1 α が活性型に移行することを確認した(Fig 16B)。PDI のすべての CXXC モチーフを AXXA に置換した PDI/AA 変異体を共発現した条件では、Ero1 α の不活性型から活性型への移行が観察されなかった。

4-6 および 4-7 の結果から、ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 の近傍に相互作用し、そのシステインペアと分子間ジスルフィド結合を形成することで Ero1 α から電子を受け取ることが明らかになった。また、酸化還元電位を考慮しても Ero1 α の C85-C391 は ERdj5 の CXXC モチーフに電子を受け渡す可能性が示された(Fig 14E)。一方で、Ero1 α の C94-C99 の酸化還元電位はそのシステインペアに電子を受け渡す PDI の酸化還元電位よりも高いことが予測できる(Fig 14E)⁸⁶。これを考慮すると、PDI の酸化還元電位よりも低い酸化還元電位をもつ ERdj5 が Ero1 α の C94-C99 に電子を受け渡す可能性がある^{62,63}。そこで、Ero1 α の C94-C99 と ERdj5 間で電子伝達が成立するか調べるため、非還元の SDS-PAGE を用いて Ero1 α の不活性型から活性型への変化を観察した(Fig 16B)。その結果、Ero1 α の不活性型から活性型への移行は ERdj5 過剰発現下において観察されなかった。このことから、ERdj5 が Ero1 α の活性化に寄与しないことがわかった。すなわち、Ero1 α の C94-C99 と ERdj5 間での電子授受は成立しないことが明らかになった。

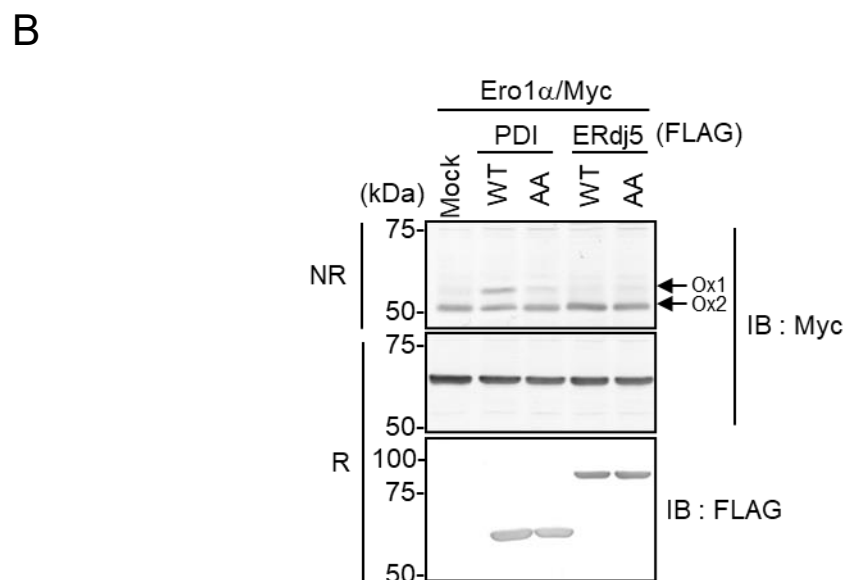
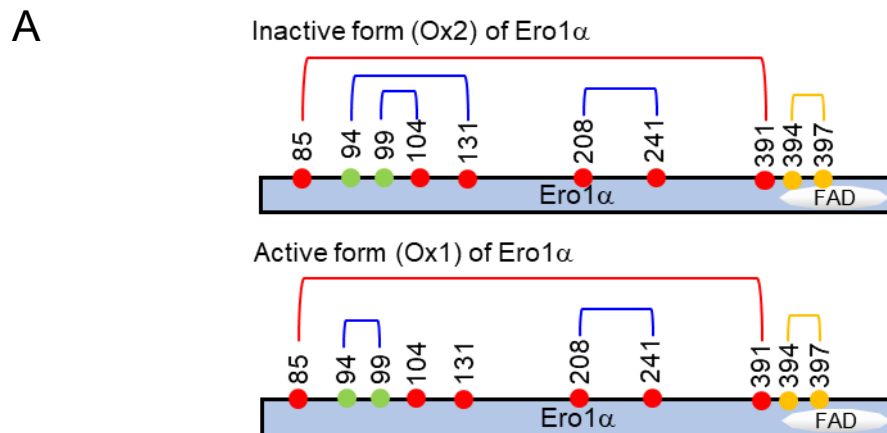


Fig.16 PDIによる Ero1 α の活性化

A. Ero1 α の不活性型(Ox2)または活性型(Ox1)の分子内ジスルフィド結合。Ero1 α の活性調節に関与するシステイン残基は赤で示す。PDIとの電子伝達に関与するシステイン残基を緑で示す。Ero1 α の分子内電子伝達に関与するシステイン残基は黄色で示す。番号はシステイン残基を表している。Ero1 α の活性調節に関与する分子内ジスルフィド結合は青線で示し、分子内電子伝達に関与する分子内ジスルフィド結合は黄線で示す。ERdj5との電子伝達関与するEro1 α の分子内ジスルフィド結合は赤線で示す。B. Mycタグを融合したEro1 α /WTとFLAGタグを融合したPDI/WTもしくはPDI/AA、ERdj5/WT、ERdj5/AAをHEK293T細胞に共発現し、トランスフェクションした細胞を可溶化した後、サンプルを非還元 SDS-PAGE (NR)もしくはSDS-PAGE (R)で泳動した。Ero1 α の活性型(Ox1)と不活性型(Ox2)をウエスタンブロットで解析した。

4-9. ドッキングシミュレーションによる ERdj5 と Ero1 α

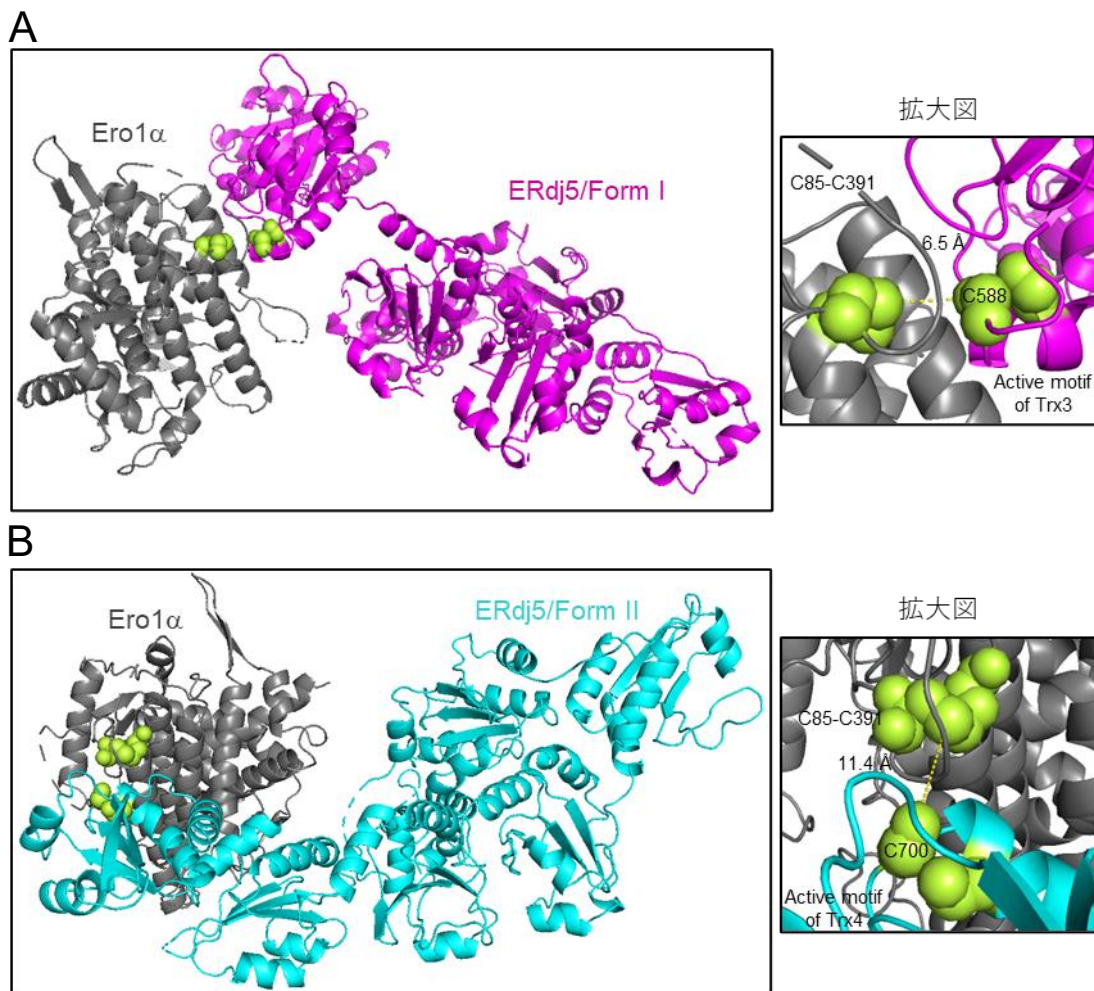
の複合体構造の解析

ERdj5 と Ero1 α 間での電子授受において、ERdj5 の Trx3 または Trx4 ドメインが Ero1 α から電子を受け取ることが明らかになった。どのように ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインが Ero1 α と相互作用するか構造学の観点から解析するため、東北大学・稲葉謙次教授との共同研究でドッキングシミュレーションにより ERdj5 の全長構造と Ero1 α の複合体構造を予測した。

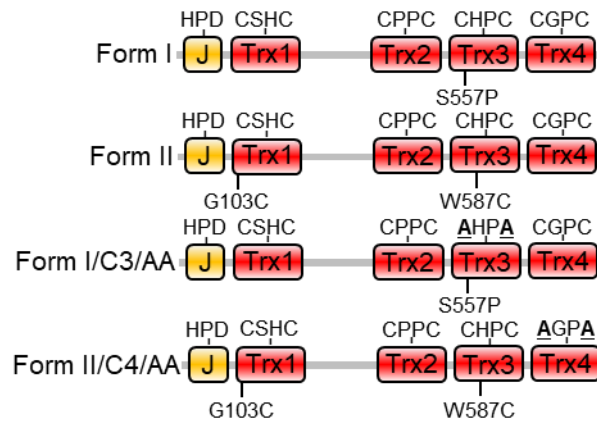
ERdj5 の構造には、Form I と Form II の二つが存在している。Form I の構造と Ero1 α をドッキングした結果、ERdj5 の Trx3 ドメインの CXXC モチーフが Ero1 α の C85-C391 の近傍に相互作用する複合体モデルが得られ(Fig 17A)、Trx3 の CXXC モチーフと C85-C391 の距離は約 6.5 Å であることがわかった(Fig 17A 拡大図)。しかし、ERdj5 の Form I を用いたドッキングシミュレーションでは、ERdj5 の Trx4 ドメインと Ero1 α が相互作用する有力な複合体モデルが得られなかった。そこで、Form II の構造を用い、再度、Ero1 α とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、ERdj5 の Trx4 ドメインの CXXC モチーフが Ero1 α の C85-C391 の近傍に相互作用する複合体モデルが得られ(Fig 17B)、Trx4 の CXXC モチーフと C85-C391 の距離は約 11.4 Å であることがわかった(Fig 17B 拡大図)。

ドッキングシミュレーションで得られた ERdj5 と Ero1 α の複合体モデルが正しいか確認するため、ERdj5 の構造を Form I と Form II に固定することができる変異体を作製し(Fig 17C)⁶⁴、Ero1 α による ERdj5 への電子伝達を PEG マレイミドシフトアッセイにより観察した(Fig 17D)。Ero1 α と共発現した時の Form I の酸化還元状態は R (Reduced form)の割合が増加した。特に、Form I の R1 (Reduced form 1)は Ero1 α と共発現した時の Form II の R1 の増加量と比較してより顕著な増加を示した。この結果は野生型 ERdj5 の R1 の増加量と一致していた。4-5 の結果で、Ero1 α は ERdj5 の Trx4 ドメインの CXXC モチーフよりも Trx3 ドメインの CXXC モチーフを強く還元することが明らかになった。この結果とドッキングシミュレーションで得た結果から、ERdj5 の

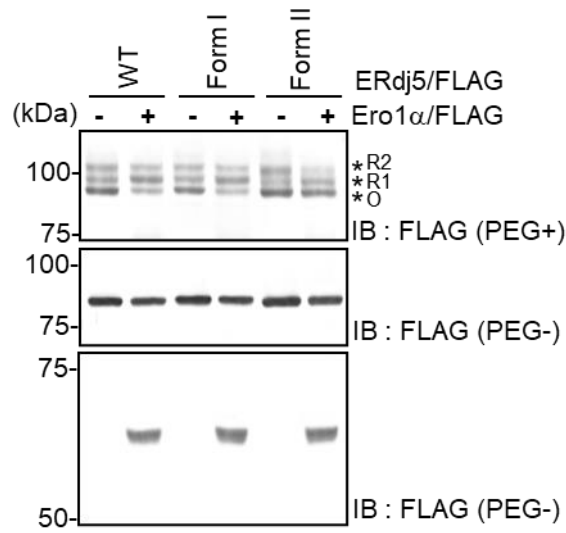
Form I では Trx3 ドメインの CXXC モチーフが Ero1 α によって還元され、Form II では Trx4 ドメインの CXXC モチーフが Ero1 α によって還元されると考えた。これを証明するため、Form I に構造を固定した ERdj5 の Trx3 ドメインの CXXC モチーフを AXXA に置換した変異体(Form I/C3/AA)と Form II に構造を固定した ERdj5 の Trx4 ドメインの CXXC モチーフを AXXA に置換した変異体(Form II/C4/AA)を作製し(Fig 17C)、それぞれの変異体の酸化還元状態に対する Ero1 α の影響を観察した(Fig 17E)。Ero1 α の共発現下において、Form I/C3/AA では R1 の増加が抑制された。Form II/C4/AA でも同様に Ero1 α の共発現による R1 の増加が観察されなくなった。これらの結果から、ドッキングシミュレーションによって得られた ERdj5 と Ero1 α の複合体モデルは正しいことが示唆された。



C



D



E

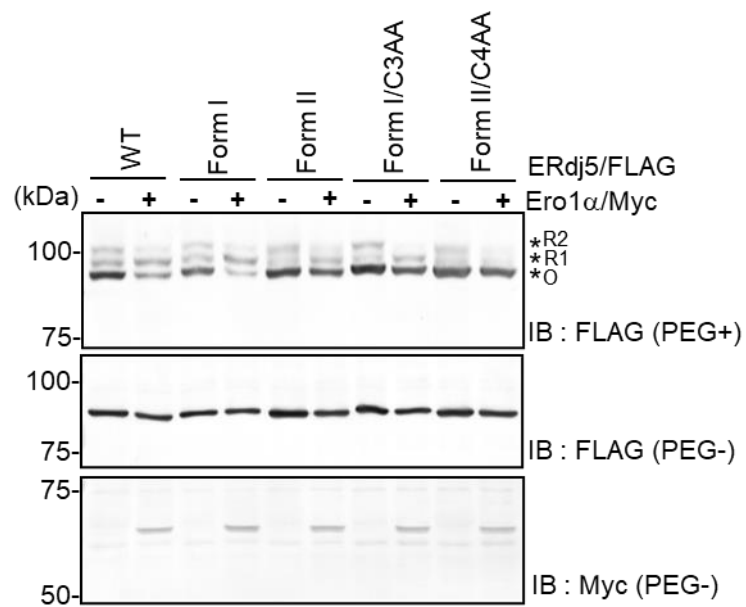


Fig.17 ドッキングシミュレーションを用いた ERdj5 と Ero1 α の複合体構造の解析

A. ERdj5/Form I と Ero1 α のドッキングシミュレーションで得られた複合体モデル。拡大図は Trx3 の CXXC モチーフと Ero1 α の C85-C391 との距離を示している。**B.** ERdj5/Form II と Ero1 α のドッキングシミュレーションで得られた複合体モデル。拡大図は Trx4 の CXXC モチーフと Ero1 α の C85-C391 との距離を示している。**C.** FLAG タグを融合した ERdj5/Form I および Form II のコンストラクション。Form I のコンストラクションは N 末側から 557 番目のセリン(S)をプロリン(P)に置換し、Form II のコンストラクションは N 末側から 103 番目のグリシン(G)と 587 番目のトリプトファン(W)をシステイン(C)に置換している。Form I/C3/AA は Form I の変異に加え、Trx3 ドメインの CXXC モチーフを AXXA に置換し、Form II/C4/AA は Form II の変異に加え、Trx4 ドメインの CXXC モチーフを AXXA に置換している。**D-E.** Ero1 α 過剰発現下における ERdj5 の酸化還元状態の測定。FLAG もしくは Myc タグを融合した Ero1 α /WT と FLAG タグを融合した ERdj5/WT もしくは Form I、Form II、Form I/C3/AA、Form II/C4/AA を HEK293T 細胞に共発現し、サンプルは Fig. 10A の説明に既述した手順で作製した。作製したサンプルは SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングで解析した。ERdj5/WT の酸化還元状態は還元型 1 を R1、還元型 2 を R2 そして酸化型を O で示す。

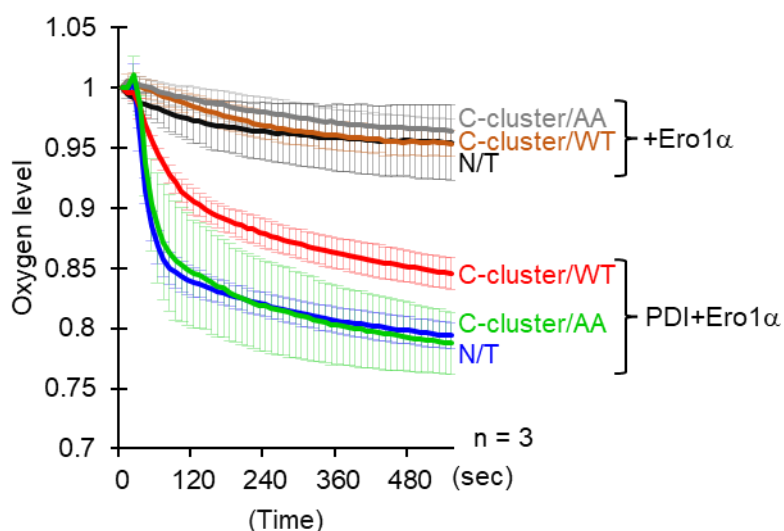
4-10. ERdj5 が及ぼす Ero1 α の酸素消費と過酸化水素産生への影響

小胞体酸化酵素 Ero1 α は分子状酸素(O₂)を消費し、酸化力を獲得することで、還元型 PDI を酸化する。このとき、還元型 PDI の酸化によって生じた電子は Ero1 α の分子内電子伝達を介して O₂ に受け渡され、過酸化水素(H₂O₂)産生に消費されることが知られている⁴⁰。これまでの結果から、Ero1 α は ERdj5 に電子を与え、その還元酵素として機能することが明らかになった。ERdj5 が Ero1 α から電子を受けとるのであれば、ERdj5 は Ero1 α の酸素消費とその反応に伴った H₂O₂ 産生に影響を与えることが考えられた。まず、Ero1 α の酸素消費に対する ERdj5 の影響を観察するため、還元型 PDI および Ero1 α 、ERdj5 の野生型 C クラスタ(C-cluster/WT)、AA 変異体の各リコンビナントタンパク質を用い、試験管の再構成系で測定した(Fig 18A)。Ero1 α 単独または ERdj5 の野生型 C クラスタもしくは AA 変異体と Ero1 α を混合した条件下では Ero1 α による酸素消費が観察されなかったが(Fig 18A 黒線、橙色の線：C-cluster/WT、灰色の線：C-cluster/AA)、還元型 PDI と混合した場合、Ero1 α は効率的な酸素消費を示した(Fig 18A 青線)。この条件に対して、ERdj5 の野生型 C クラスタを混合した場合は、Ero1 α の効率的な酸素消費が抑制された(Fig 18A 赤線)。一方、C クラスタの AA 変異体の場合、ERdj5 は Ero1 α の酸素消費を抑制しなかった(Fig 18A 緑色の線)。

次に、細胞内における Ero1 α の H₂O₂ 産生を測定するため、小胞体の相対的な H₂O₂ 濃度を測定することができる蛍光タンパク質センサーの ER-HyPer を小胞体に発現させ³⁹、ライブイメージングを行った(Fig 18B)。実験は si/NS または si/Ero1 α 、si/ERdj5 を ER-HyPer が発現した細胞にトランスフェクションし、各 siRNA をトランスフェクションしてから 96 時間後に ER-HyPer のライブイメージングを行った。測定開始 2 分後に 2 mM の DTT で小胞体の H₂O₂ を十分に枯渇させ、4 分後、DTT を含んだ培地を洗い流し、DTT を含まない新しい培地と置換した。その後の小胞体の H₂O₂ 産生速度を測定した。si/Ero1 α をトランスフェクションした細胞は si/NS をトランスフェクションし

た細胞と比較して小胞体の H_2O_2 産生速度が顕著に遅延した(Fig 18B 青線)。このことから、以前の報告通り、Ero1 α が小胞体の H_2O_2 の主要な産生源であることがわかった。一方、ERdj5 をノックダウンした細胞は小胞体の H_2O_2 産生速度が速くなった(Fig 18B 赤線)。これらの結果から、ERdj5 は Ero1 α から電子を奪うことで、Ero1 α の酸素消費を抑制し、Ero1 α の H_2O_2 産生を抑えることが示唆された。

A



B

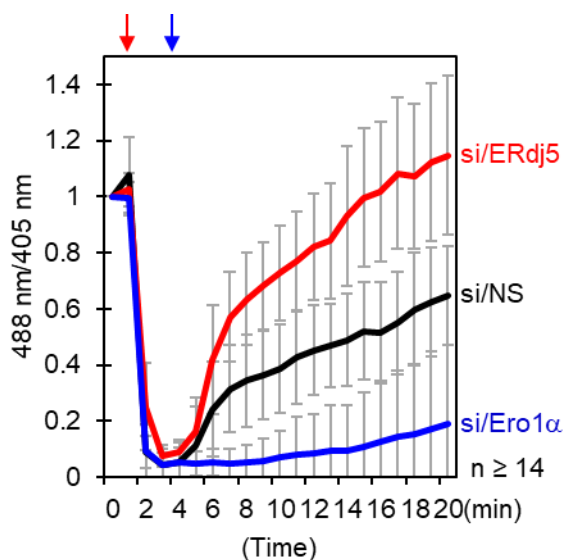


Fig.18 ERdj5 が及ぼす Ero1 α の酸素消費と過酸化水素産生への影響

A. 試験管内における Ero1 α (C104A/C131A/C166A)の酸素消費。飽和酸素濃度の約 250 μ M を 1 とみなし、Y 軸に示している。Ero1 α 単独測定条件は黒線で示し、ERdj5 の C クラスター(C-cluster/WT)もしくは AA 変異体と Ero1 α を混ぜた条件は橙色および灰色の線で示す。Ero1 α と還元型 PDI を混ぜた条件は青線で示し、Ero1 α 、C-cluster/WT もしくは AA 変異体と還元型 PDI を混ぜた条件は赤色および緑色の線で示す。それぞれのリコンビナントタンパク質濃度は Ero1 α : 1 μ M、ERdj5: 1 μ M、PDI: 100 μ M である。定量データは 3 回の実験の平均 \pm の SD 値である。B. ER-HyPer を用いた小胞体の過酸化水素(H₂O₂)のライブイメージング。ER-HyPer を HeLa 細胞に 24 時間、過剰発現させた後、その細胞に si/NS もしくは si/Ero1 α 、si/ERdj5 をトランスフェクションした。siRNA をトランスフェクションしてから 96 時間後、ライブイメージングを行った。si/NS のライブイメージングは黒線で示す。si/Ero1 α のライブイメージングは青線で示す。si/ERdj5 のライブイメージングは赤線で示す。定量データは 14 回以上の実験の平均 \pm の SD 値である。

4-11. 新生鎖合成による ERdj5 の酸化還元状態への影響

PDI は小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖から電子を奪い、そのジスルフィド結合形成を触媒する。基質から電子を受け取った還元型 PDI は Ero1 α の C94-C99 (S⁹⁴-S⁹⁹)に電子を放出し、Ero1 α に酸化される(Fig 19A 青線)。つまり、細胞内において Ero1 α は PDI の酸化酵素として働き、基質の酸化的フォールディングを促進することが知られている^{30,47}。その後、PDI を介して、基質からの電子を受け取った Ero1 α は自身の分子内にある C394-C397 (S³⁹⁴-S³⁹⁷)と FAD を介して分子状酸素(O₂)に電子を放出し、過酸化水素(H₂O₂)を産生する(Fig 19A 青線)。その一方で、これまでの結果により、ERdj5 が Ero1 α の C85-C391 (S⁸⁵-S³⁹¹)を介して、Ero1 α から電子を奪い、Ero1 α の酸素消費および H₂O₂ 産生を抑制することを見出した(Fig 19A 赤線)。これらの結果より、ERdj5 は Ero1 α による酸化的フォールディングを介して小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖の電子を受け取り、ERdj5 の還元力となることが考えられた。そこで、リボソームの翻訳阻害剤である CHX (cycloheximide)を細胞に処理し、内在性 ERdj5 の酸化還元状態を PEG マレイミドシフトアッセイにより観察した(Fig 19B)。その結果、ERdj5 の R (Reduced form)の割合が CHX 処理時間依存的に減少し、O (Oxidized form)の割合が増加することがわかった。このことから、Ero1 α による新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングから生じた電子が ERdj5 の還元力となることが明らかになった。

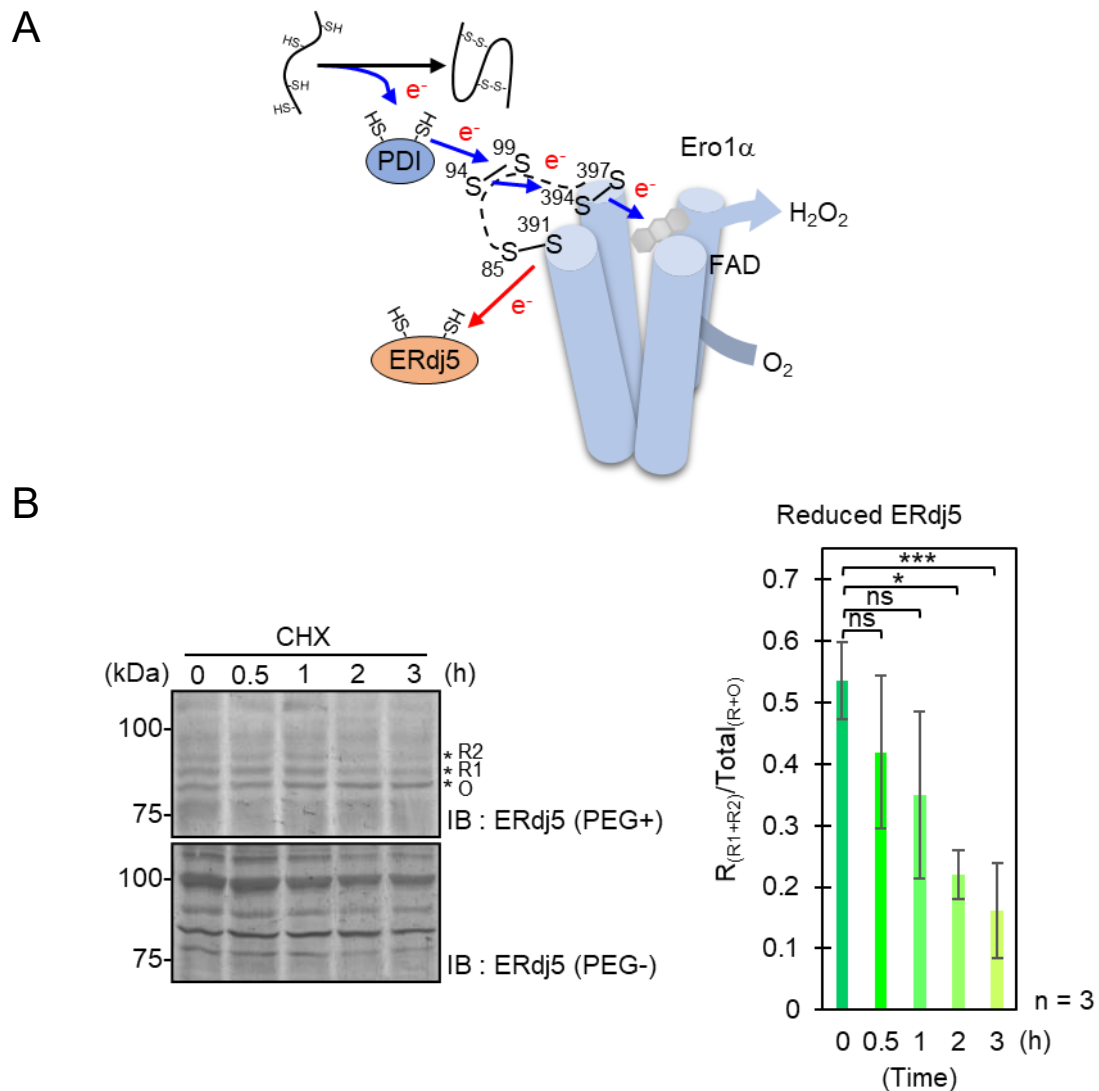
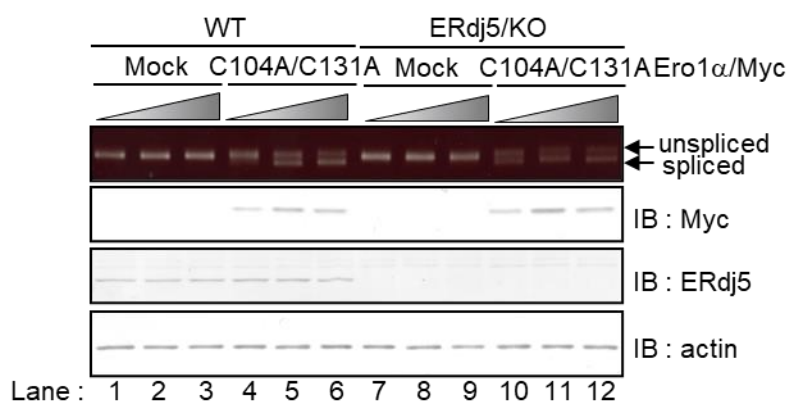


Fig.19 新生鎖合成による ERdj5 の酸化還元状態への影響

A. PDI、Ero1 α および ERdj5 における電子伝達機構。PDI は新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成を触媒し、新生ポリペプチド鎖から電子を受け取る。PDI は受け取った電子を Ero1 α の C94-C99 (94S、99S) に放出する。電子を受け取った Ero1 α は自身の分子内にある C394-C397 (394S、397S) に電子を受け渡し、FAD を介して分子状酸素(O $_2$) に電子を放出することで過酸化水素(H $_2$ O $_2$) を産生する。この電子伝達経路は青矢印で示す。ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 (85S、391S) から電子を受け取る。この電子伝達経路は赤矢印で示す。B. HEK293T 細胞にリボソームの翻訳阻害であるシクロヘキシミド (cycloheximide : CHX) を 50 ug/ml 処理し、Fig. 2A の説明に既述した手順でサンプルを作製した。ERdj5 の酸化還元状態は還元型 1 を R1、還元型 2 を R2 そして酸化型を O で示す。ERdj5 の酸化還元状態は全レドックス状態(R+O)に対する還元型 R (R1+R2) のバンドの比率を ImageJ で定量した。定量データは 3 回の実験の平均 \pm の SD 値である。P 値は、*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 を示す。

4-12. Ero1α による過剰な過酸化水素産生に対する ERdj5 の役割

以前の報告から、Ero1α から産生される H₂O₂ は、小胞体内腔に過剰に蓄積すると小胞体ストレスを引き起こすことが知られている^{34,38}。ERdj5 を欠損させた細胞(ERdj5/KO)に小胞体で H₂O₂ を常に産生する Ero1α の恒常活性型(C104A/C131A)を過剰発現し、小胞体ストレスを XBP1 の活性化で評価した(Fig 20)。野生型細胞(WT)では、恒常活性型 Ero1α の発現量が最も少ないときは XBP1 の成熟型(Spliced form)がほとんど増加しなかったが(Fig 20 lane 4)、恒常活性型 Ero1α の発現量依存的に XBP1 の成熟型が顕著に増加した(Fig 20 lane 5, 6)。これまでの報告通り、恒常活性型 Ero1α は小胞体ストレスを誘導することが確認された。一方、ERdj5/KO 細胞では恒常活性型 Ero1α の発現量が最も少ない条件において XBP1 の成熟型の顕著な増加が観察された(Fig 20 lane 9)。このことから、ERdj5 が Ero1α から電子を奪い、Ero1α の H₂O₂ 産生を抑制することで小胞体ストレスを抑えることを明らかにした。



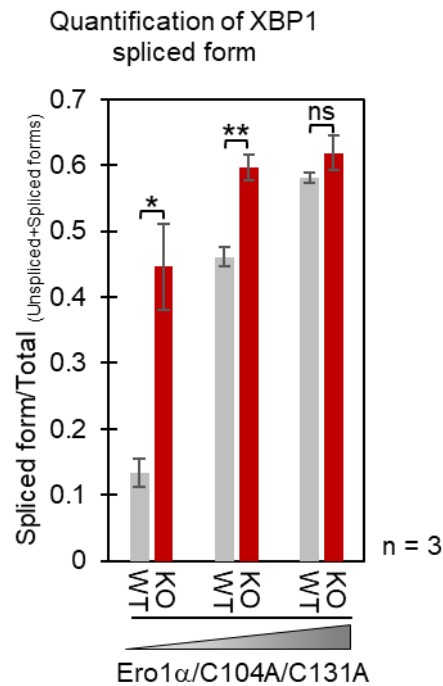
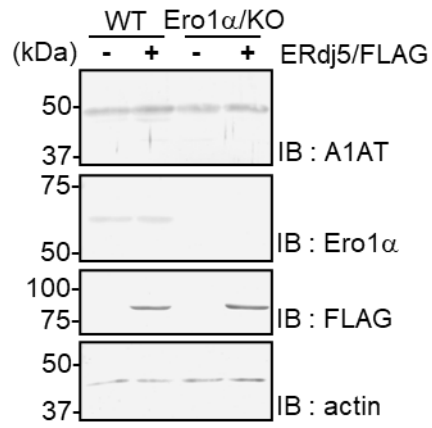


Fig.20 Ero1α による過剰な過酸化水素産生に対する ERdj5 の役割
 ERdj5 を欠損させた HEK293T 細胞 (ERdj5/KO) に Ero1α の恒常活性化型 (C104A/C131A) をプラスミド濃度依存的に過剰発現させた。トランスフェクションした細胞を可溶化した後、サンプルを SDS-PAGE で泳動し、ウエスタンブロットで解析した。小胞体ストレスは XBP1 の成熟型 (Spliced form) と前駆体 (Unspliced form) の存在比で評価した。XBP1 の全量 (Unspliced+Spliced form) に対する成熟型の比率を ImageJ で定量した。定量データは 3 回の実験の平均 \pm の SD 値である。P 値は、* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ を示す。

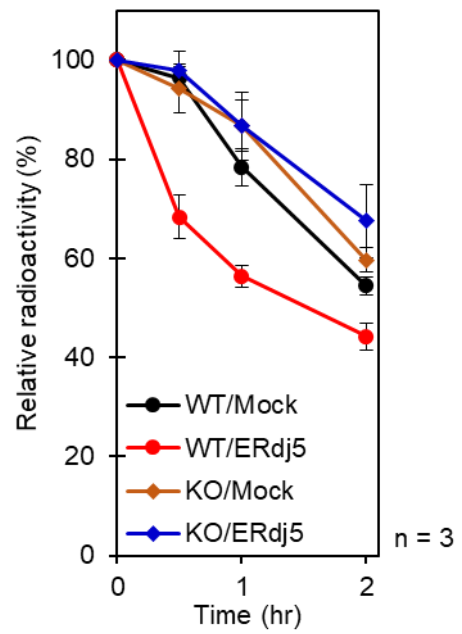
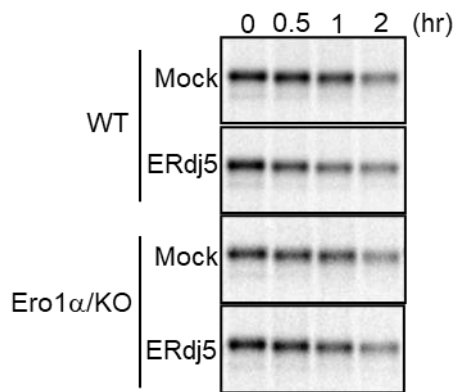
4-13. ERdj5 の小胞体関連分解に対する Ero1 α の貢献

以前の研究成果から、ERdj5 は自身の還元活性を介して小胞体関連分解 (ERAD) を促進することを報告している^{62,63,83}。ERdj5 の基質の一つである NHK (Null Hong Kong) を細胞に発現させ、ERdj5 の ERAD 促進効果をパルスチェイス実験により確認した (Fig 21)。定常的な NHK の発現量はウェスタンブロットティングで確認した (Fig 21A)。ERdj5 と NHK を共発現させた細胞では、NHK のみを発現させた野生型細胞 (WT) と比較して NHK の分解速度が速くなった。 (Fig 21B 黒線と赤線)。このことから、ERdj5 の過剰発現は NHK の分解を促進することを確認した。この系を用い、ERdj5 の電子ドナータンパク質である Ero1 α の貢献を調べるため、Ero1 α を欠損させた細胞 (Ero1 α /KO) を CRISPR-Cas9 システムにより作製した。Ero1 α が欠損されているかはウェスタンブロットティングで確認した (Fig 21A)。Ero1 α /KO 細胞は野生型細胞と比較して NHK の減少が少し抑制された (Fig 21B 橙色の線)。また、ERdj5 の過剰発現による NHK の分解促進効果が Ero1 α を欠損することによって観察されなくなった (Fig 21B 青線)。このことから、Ero1 α は ERdj5 の ERAD 促進効果に必要であることがわかった。さらに、ERdj5 の還元活性依存的な ERAD 促進効果に対する Ero1 α の影響を観察するため、非還元 SDS-PAGE を用いて、分子内ジスルフィド結合を介した二量体 NHK (NHK/dimer) の分解速度を観察した (Fig 21C)。二量体 NHK の分解速度は野生型細胞よりも ERdj5 と共発現させた細胞のほうが速くなった (Fig 21C 黒線と赤線)。これまでの報告通り、ERdj5 は二量体 NHK の分子内ジスルフィド結合を還元し、NHK の分解を促進することが明らかになった。一方、Ero1 α /KO 細胞は野生型細胞と比較して二量体 NHK の分解が少し抑制され (Fig 21C 橙色の線)、ERdj5 の過剰発現による二量体 NHK の効率的な分解促進が観察されなくなった (Fig 21C 青線)。これらの結果から、Ero1 α は ERdj5 の還元活性を介した ERAD 促進に寄与することが明らかになった。

A



B



C

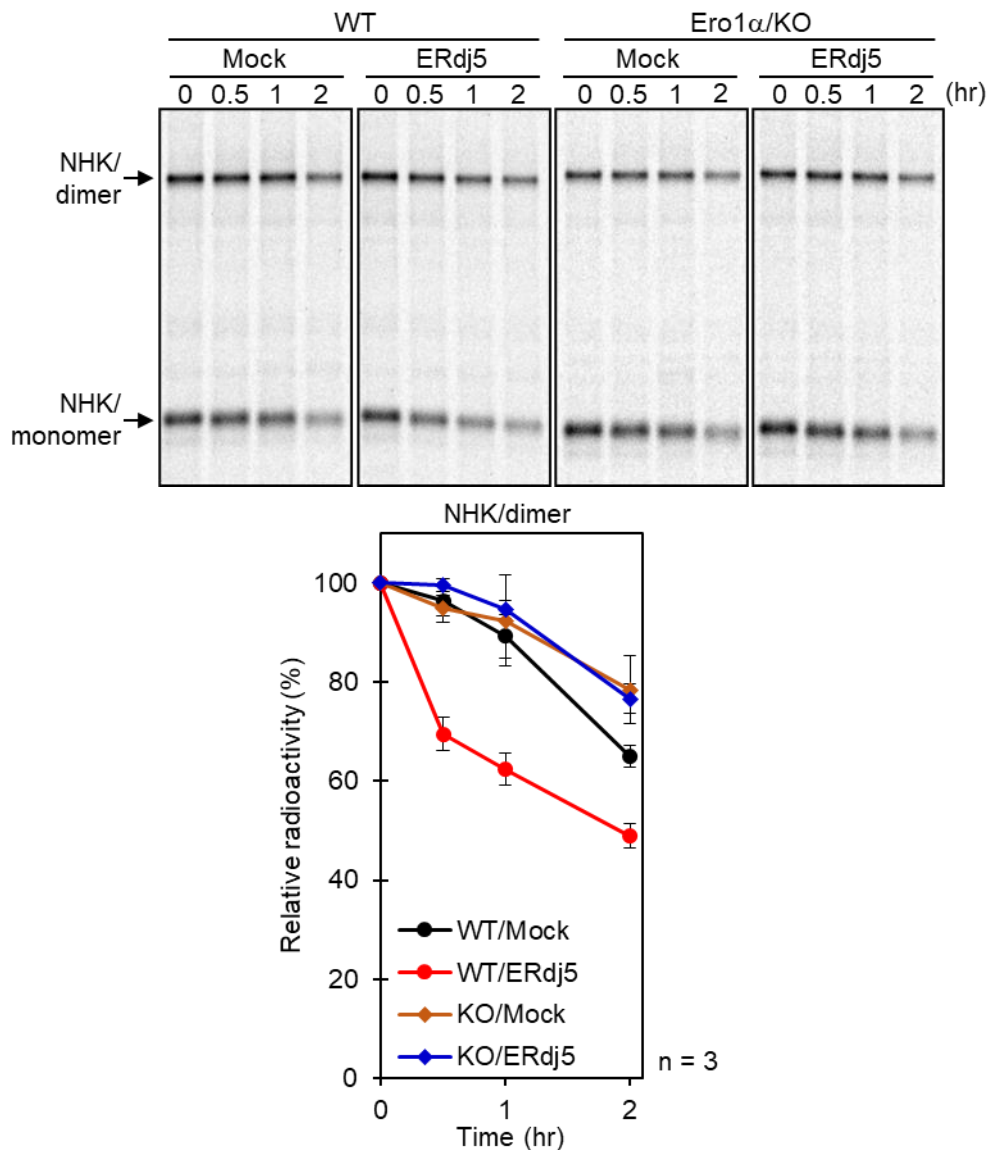


Fig.21 ERdj5 の小胞体関連分解に対する Ero1α の貢献

A. Ero1α を欠損させた HEK293T 細胞(Ero1α/KO)に NHK と FLAG タグを融合した ERdj5/WT を過剰発現させ、トランスフェクションした細胞を可溶化した後、サンプルを SDS-PAGE で泳動し、ウエスタンブロットで解析した。B-C. (A)の手順でトランスフェクションした細胞を用意し、細胞内のタンパク質を 15 分間、³⁵S でラベルした。その後、ラベルが入った細胞培養液を除き、指定の時間まで追跡を行い、その細胞を可溶化した。細胞可溶化液を抗 Alpha-1-Antitrypsin 抗体で免疫沈降を行い、サンプルは SDS-PAGE (B)と非還元 SDS-PAGE (C)で泳動した。検出された ³⁵S の放射活性を ImageJ で定量し、NHK の分解速度を調べた。二量体の NHK (NHK/dimer)の分解速度は二量体のみを定量し、グラフを作成した。定量データは 3 回の実験の平均±の SD 値である。

5. 考察

ERdj5 は小胞体で初めて見つかったジスルフィド還元酵素であるが、どのように ERdj5 が小胞体内腔で電子(還元力)を獲得し、ジスルフィド還元酵素として機能を発揮しているかは未解明のままであった。本研究では ERdj5 に結合するタンパク質の網羅的な解析を行い、ERdj5 の電子ドナータンパク質として小胞体酸化酵素 Ero1 α を同定した^{27,30}。ここでは、各項目別にそれらの未解決問題も含めて考察する。

5-1. ERdj5 の電子ドナータンパク質の同定

別グループの先行研究で、これまでに、ERdj5 のジスルフィド還元反応を触媒する CXXC モチーフに結合するタンパク質の網羅的な解析が行われていた⁶⁵。しかし、この研究では ERdj5 の CXXC モチーフを CXXA に置換した CA 変異体を用い、ERdj5 の結合タンパク質を同定した。CA 変異体は CXXC モチーフの C 末端側のシステイン残基がアラニン残基に置換されているため、N 末端側のシステイン残基が基質のジスルフィド結合に求核攻撃し、その基質と分子間ジスルフィド結合を不可逆的に形成する。故に、Trx ドメインの CA 変異体に相互作用するタンパク質は、通常、Trx ドメインの還元基質となる。このことを考慮すると、先行研究で ERdj5 の結合タンパク質として同定された候補タンパク質の中から ERdj5 の電子ドナータンパク質を探索することは困難であった。本研究ではサイトゾルにおける TrxR と Trx の還元反応を捉えることができる DVSF を用いたため^{81,82}、ERdj5 の電子ドナータンパク質として Ero1 α を同定することに成功したと考えている。また、Ero1 α が同定されていた#7 のバンドは ERdj5 の Trx3 または Trx4 ドメインの CXXC モチーフのみを残した変異体(ERdj5/C3、ERdj5/C4)のサンプルにおいても検出されていた(Fig 9C)。このことから、Ero1 α は ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインの CXXC モチーフに結合し、ERdj5 に電子を与える可能性が考えられた。

5-2. 分子間ジスルフィド結合形成を介した Ero1 α /ERdj5

の相互作用解析

質量分析で得られた結果を裏付けるものとして、Ero1 α が DVSF 非存在下で ERdj5 の Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフと特異的に結合することを明らかにした(Fig 12A)。さらに、非還元 SDS-PAGE を用いた解析により、Ero1 α と ERdj5 は分子間ジスルフィド結合を介して複合体を形成することが明らかとなり(Fig 12B)、Ero1 α と ERdj5 は電子授受を行うことが考えられた。

Ero1 α は分子間ジスルフィド結合を介して ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインの CXXC モチーフと特異的に結合するが、分子間ジスルフィド結合を介した Ero1 α と ERdj5 の複合体は非還元 SDS-PAGE において異なる分子量の位置に検出されることが明らかになった(Fig 12)。Ero1 α と ERdj5 の分子量はそれぞれ約 60kDa と 90kDa であることから、Trx4 ドメインとの複合体は一分子同士の複合体であることが明らかになった。一方、Trx3 ドメインとの複合体は約 50kDa の増加があり、Ero1 α と ERdj5 の一分子同士の複合体ではない可能性が考えられた。しかし、非還元 SDS-PAGE ではジスルフィド結合形成などの影響によりタンパク質の構造が変化し、その構造変化が原因となり泳動に差異が生じることがある⁸⁷。これを考慮すると、ERdj5 の Trx3 ドメインと Ero1 α の結合比は一対一である可能性も考えられた。一方、ERdj5 の Trx3 もしくは Trx4 の CXXC モチーフのみを SXXS に置換した変異体(C3/SS、C4/SS)を用いた解析結果では、野生型同士で形成される 250kDa 以上の複合体が検出されなくなった(Fig 12D)。この結果は、ERdj5 の Trx3 ドメインと Ero1 α の結合比が一対一である可能性が高いことを意味しており、Ero1 α と ERdj5 の分子間ジスルフィド結合形成を介した複合体は一分子の ERdj5 に対して二分子の Ero1 α が結合することが示唆された。しかし、この結合比を正確に決定するには更なる検証が必要である。

5-3. Ero1 α が及ぼす PDI ファミリータンパク質および

ERdj5 の酸化還元状態への影響

Ero1 α は小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成を触媒する PDI および PDI ファミリータンパク質の酸化酵素として役割を果たす。PDI や p5、ERp46、ERp57、PDIR の酸化還元状態は Ero1 α の共発現下において還元型から酸化型に移行した(Fig 10)。一方、ERdj5 の酸化還元状態は Ero1 α との共発現下で酸化型から還元型に移行し、Ero1 α のノックダウンでは酸化型に移行することがわかった(Fig 11)。これらの結果から、Ero1 α は PDI や PDI ファミリータンパク質に対して酸化酵素として機能するが、ERdj5 に対しては還元酵素として働くことが明らかになった。さらに、Ero1 α は ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインの CXXC モチーフを特異的に還元し、その還元効率も Trx3 ドメインの CXXC モチーフが Trx4 ドメインの CXXC モチーフよりも高いことがわかった(Fig 13)。Trx3 ドメインの CXXC モチーフの酸化還元電位は-172 mV であり、Trx4 ドメインの CXXC モチーフは-185 mV である⁶³。Trx3 ドメインは Trx4 ドメインよりも酸化還元電位の値が高いため、Ero1 α から効率よく電子を受け取り、還元されることが考えられた。

5-4. Ero1 α が及ぼす ERdj5 の小胞体関連分解への影響

先行研究で ERdj5 は Trx3 と Trx4 ドメインの CXXC モチーフを介して、ERAD 基質のジスルフィド結合を還元し、その分解を促進することが報告されている⁶³。ERdj5 の ERAD 基質の一つである NHK は分子内ジスルフィド結合を介した二量体を形成する。その二量体は ERdj5 の還元活性依存的に分解が促進されることが知られている^{62,63,83}。Ero1 α 欠損細胞では ERdj5 による二量体の NHK の分解促進効果が抑制されることがわかった(Fig 21)。これらのことから、Ero1 α は ERdj5 に電子を与えることで、ERdj5 の還元活性依存的な ERAD 促進に寄与することが明らかになった。

5-5. タンパク質間相互作用と酸化還元電位に基づいた

Ero1 α から ERdj5 への電子伝達の分子メカニズム

PDI は Ero1 α と電子授受を行う小胞体の代表的な酸化酵素として知られている^{29,30}。PDI は Ero1 α の C94 を含んだシステインペア(C94-C131 または C94-C99)と分子間ジスルフィド結合を形成し、Ero1 α の酸化活性によって CXXC モチーフが酸化されることが報告されている³⁴。これに対し、ERdj5 はこれらのシステインペアと分子間ジスルフィド結合を形成しないことが明らかになった(Fig 14A)。しかし、PDI、Ero1 α そして ERdj5 の個々の酸化還元電位を考慮すると、ERdj5 は Ero1 α の C94-C131 または C94-C99 と相互作用し、電子授受を行う可能性が考えられた。

ERdj5 の酸化還元電位は約-180 mV である^{62,63}。一方、Ero1 α の C94-C99 に電子を与える PDI は約-165 mV である⁸⁶。したがって、Ero1 α の C94-C99 は-165 mV よりも高い酸化還元電位をもつことが予測され、ERdj5 からも電子を受け取ることが可能である(Fig 14E)。しかし、細胞内で Ero1 α の C94-C99 と相互作用するには Ero1 α が不活性型(Ox2)から活性型(Ox1)に変化しなければならない^{32,34}。これまでの報告通り、PDI は Ero1 α を不活性型から活性型に変化させたが、ERdj5 はその活性化に寄与しないことがわかった(Fig 16B)。さらに、NMR を用いた ERdj5 の C クラスタと Ero1 α の相互作用実験の結果からも、ERdj5 が Ero1 α に結合する箇所は Ero1 α の C94-C99 付近ではないことが見出された(Fig 15C)。つまり、ERdj5 は Ero1 α の C94-C99 と異なるシステインペアと相互作用し、Ero1 α と電子を授受することがわかった。

Ero1 α の様々なシステインペアをアラニンに置換した変異体と ERdj5 の結合実験から、ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 と分子間ジスルフィド結合を形成することがわかった(Fig 14B)。さらに、試験管内および細胞内において、ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 を介して Ero1 α から直接、電子を受け取ることが明らかにした(Fig 14C, F)。これらのことから、Ero1 α の C85-C391 が ERdj5 に電子を効率よく与えるシステインペアであることが明らかになった。また、先行研究で、Ero1 α の C85-C391 の酸化還元電位は-275 mV であることが報告され

ていた⁸⁵。ERdj5 の酸化還元電位は-180 mV であることから、酸化還元電位の観点からも、ERdj5 は Ero1α の C85-C391 から電子を受け取ることが示唆された(Fig 14E)。

ERdj5 は Form I と Form II の構造をもつことが知られている(Fig 7C-E)⁶⁴。Ero1α とのドッキングシミュレーションの結果から、ERdj5 の Form I では Trx3 ドメインの CXXC モチーフが Ero1α の C85-C391 の近傍に相互作用し、Form II では Trx4 ドメインの CXXC モチーフが Ero1α の C85-C391 の近傍に相互作用することが明らかになった(Fig 17A, B)。さらに、Form I の ERdj5 は Trx3 ドメインの CXXC モチーフが Ero1α によって優先的に還元され、Form II は Trx4 ドメインの CXXC モチーフが選択的に還元されることがわかった(Fig 17E)。ERdj5 は Form I と Form II の構造状態が動的であることが報告されている⁶⁴。つまり、ERdj5 は Form I と Form II の構造変化を巧みに利用して、Ero1α の C85-C391 から電子を効率よく受け取っていることが示唆された。

これまで、Ero1α の C85-C391 と相互作用し、分子間ジスルフィド結合を形成するタンパク質の報告例はない。そのため、Ero1α の C85-C391 が ERdj5 の CXXC モチーフを還元する分子機構はまだ明らかではない。しかし、ドッキングシミュレーションの結果により、Ero1α の C85 が ERdj5 の Trx3 および Trx4 ドメインの CXXC モチーフに最も近接していることがわかった(Fig 17A, B)。このことから、Ero1α は以下に記載する分子機構により ERdj5 の CXXC モチーフを還元する可能性が考えられた(Fig 22)。まず、Ero1α の C85 が ERdj5 の CXXC モチーフに求核攻撃し、ERdj5 と分子間ジスルフィド結合を形成する。その後、その分子間ジスルフィド結合を Ero1α の C391 が切断することで、Ero1α は ERdj5 の CXXC モチーフを還元し、ERdj5 に電子を与えることが考えられた。

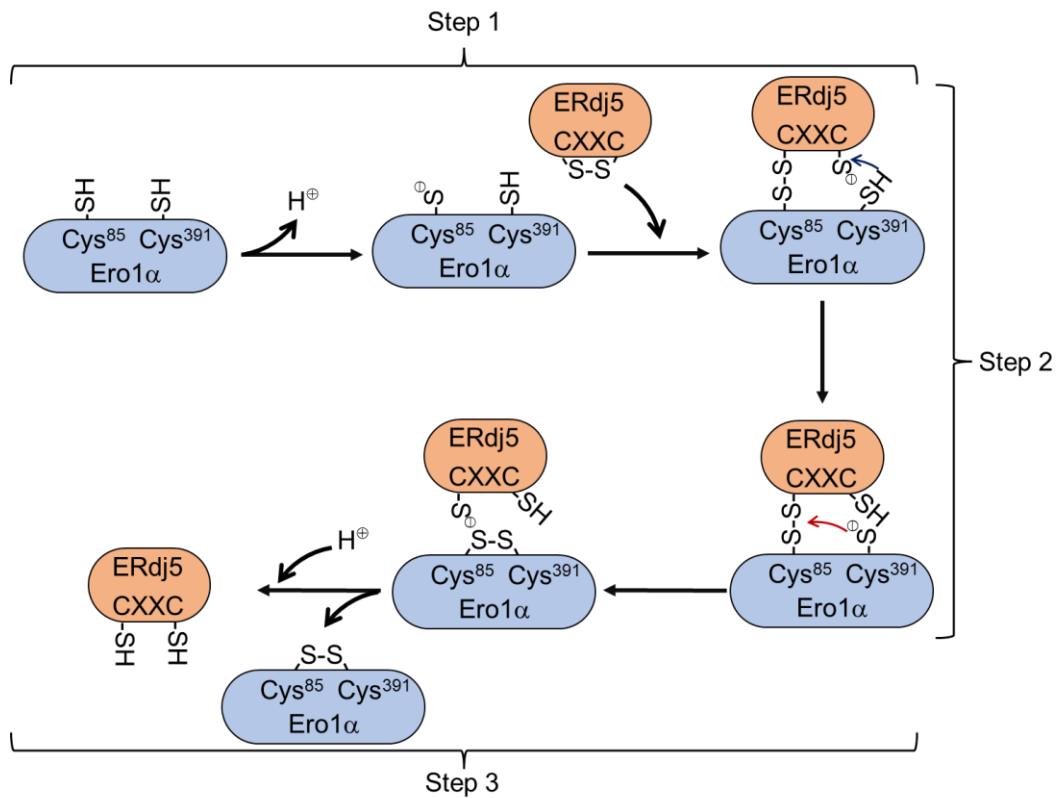


Fig.22 Ero1 α の C85-C391 による ERdj5 への電子伝達機構のモデル

Step 1 : Ero1 α の C85 (Cys⁸⁵)が脱プロトン化し、ERdj5 の CXXC モチーフに求核攻撃する。求核攻撃された ERdj5 は Ero1 α の C85 と分子間ジスルフィド結合を形成する。

Step 2 : Ero1 α の C391 (Cys³⁹¹)が ERdj5 の CXXC モチーフの C 末端側のシステインによって脱プロトン化され、C391 は Step 1 で形成された分子間ジスルフィド結合に求核攻撃する。

Step 3 : C391 が分子間ジスルフィド結合を切断した後、ERdj5 は Ero1 α から電子を受け取る。

Ero1 α は C94-C99 を介して還元型 PDI から電子を受け取ることが知られている^{29,84}。その後、Ero1 α は分子内にある C394-C397 に電子を伝達し、FAD を介して分子状酸素(O₂)にその電子を放出する。この電子伝達経路を介して Ero1 α は効率的な酸素消費を行う。溶存酸素系を用いた結果から、ERdj5 は Ero1 α の効率的な酸素消費を抑制することがわかった(Fig 19)。これまでの結果を踏まえると、ERdj5 は Ero1 α の C85-C391 を介して Ero1 α から電子を奪うことで、Ero1 α の酸素消費を抑えることが考えられた。しかし、どのように Ero1 α が C94-C99 で PDI から受け取った電子を C85-C391 へ伝達し、ERdj5 へ電子を放出しているのかは明らかではない。酸化還元電位の観点からも、C85-C391 が C94-C99 から電子を受け取るとは説明がつかなかった(Fig 14E)。その一方で、NMR の結果から、Ero1 α への ERdj5 の結合は Ero1 α の C94-C99 を除く、C85-C391 を含めたいくつかのシステインペアの動態に影響を与えることがわかった(Fig 15C)。また、低酸素条件下において Ero1 α は C85-C391 が効率良く還元状態になることが報告されている⁸⁸。つまり、O₂ との反応が Ero1 α の分子内電子伝達経路の方向性を決めていることが考えられる。この報告例と NMR で観察した結果から、Ero1 α への ERdj5 の相互作用は Ero1 α のシステインペアの構造的な配置を変化させることで、Ero1 α と O₂ の反応を弱め、その結果、Ero1 α の C85-C391 が C94-C99 から電子を受け取ることができる可能性が考えられた。このような機構により Ero1 α の C85-C391 は、C94-C99 との酸化還元電位の電位差を乗り越え、ERdj5 との電子伝達を成立させていることが想定されるが、この仮説は今後さらに検証する必要がある。

5-6. Ero1 α による過剰な過酸化水素産生に対する ERdj5 の役割

Ero1 α は O₂ に電子を放出した後、活性酸素種の一つである H₂O₂ を産生し、小胞体の H₂O₂ の主な発生源になることが報告されている⁴⁰。報告通り、Ero1 α をノックダウンした細胞は小胞体の H₂O₂ 産生が劇的に抑制された(Fig 18 青線)。一方、ERdj5 のノックダウンでは小胞体の H₂O₂ 産生が亢進した(Fig 18 赤線)。また、Ero1 α による過剰な H₂O₂ 産生は小胞体ストレスを惹起させることが知られている^{34,38}。ERdj5 欠損細胞は Ero1 α の過剰な H₂O₂ 産生に脆弱性を示し、小胞体ストレスが亢進することがわかった(Fig 20)。これらの結果から、ERdj5 は Ero1 α による過剰な H₂O₂ 産生を抑えることで、小胞体の酸化還元環境の恒常性を保つ役割を果たすことが示唆された。先行研究で、小胞体の H₂O₂ 産生を制御する因子として Prdx4 や Gpx7/8 があることが知られている⁴¹⁻⁴³。これらの因子はどちらも H₂O₂ を消去するために、それぞれ PDI と GSH からの電子供給が必要である。ERdj5 による H₂O₂ 産生抑制効果は Prdx4 や Gpx7/8 とは異なる機構で小胞体の H₂O₂ を調節しており、その冗長性は興味深い。

5-7. リボソーム翻訳と共役した小胞体への新たな還元力供給機構

細胞内で Ero1 α は PDI と複合体を形成し、小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖からの電子を PDI から受け取り、基質のジスルフィド結合形成を促す酸化的フォールディングを促進する^{30,47}。リボソームの翻訳阻害剤である CHX を処理すると、ERdj5 の酸化還元状態が還元型から酸化型に移行することが明らかになった(Fig 19)。このことから、ERdj5 の還元力は Ero1 α の酸化的フォールディングから供給されることが明らかになった(Fig 23)。

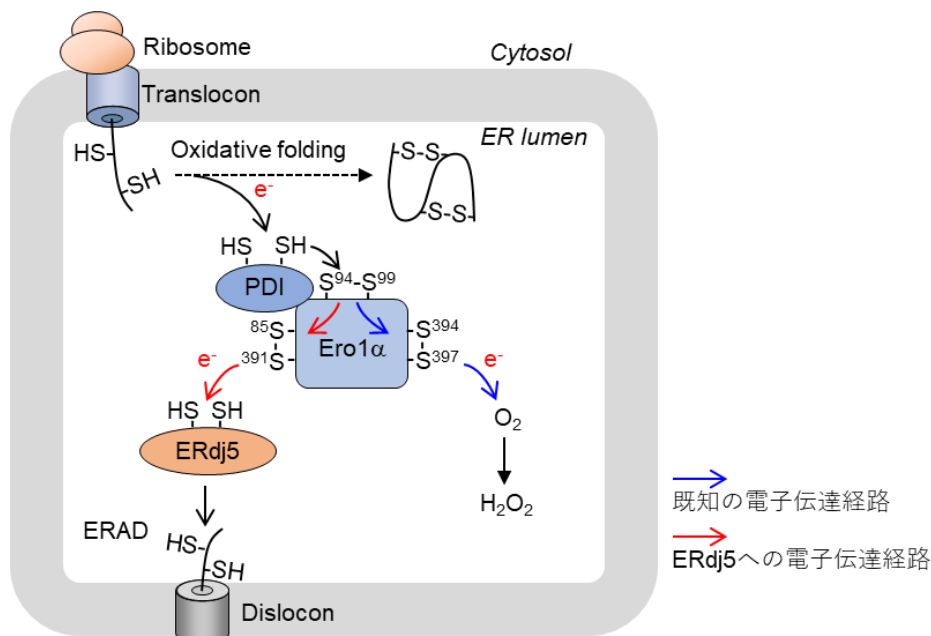


Fig.23 Ero1 α の酸化的フォールディングと共役した小胞体への還元力供給機構

PDI/Ero1 α 複合体は小胞体に移行した新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディングを促進し、新生ポリペプチド鎖から電子(e⁻)を奪う。奪った電子は Ero1 α を介して分子状酸素(O₂)に受け渡され、過酸化水素(H₂O₂)の産生に消費される(青矢印)。これが従来、知られていた電子伝達経路であったが、ERdj5 は PDI/Ero1 α 複合体による酸化的フォールディングから生じた電子を Ero1 α の C85-C391 (S⁸⁵-S³⁹¹)から受け取り、自身の還元力を獲得する(赤矢印)。

哺乳類細胞において小胞体で還元酵素として機能する ERdj5 が発見されて以来、小胞体への還元力は主に二つの経路によって供給されると考えられていた。その一つはバクテリアのペリプラズムへの電子供給を行う DsbD のような膜タンパク質による電子供給機構である(Fig 8B)^{76,77}。DsbD はバクテリアの内膜に局在する膜タンパク質であり、サイトゾルの還元酵素 Trx1 から電子をサイトゾル側で受け取り、ペリプラズムへ電子を放出する。Trx1 の還元酵素として働く TrxR は NADPH から電子を受け取るため、DsbD の電子供与体は NADPH であると考えられている⁷³。先行研究で、哺乳類細胞で TrxR1 の阻害剤を加えると、小胞体の分泌タンパク質のフォールディングに影響を与えることが示されており⁷⁸、サイトゾルの NADPH も小胞体の還元力となる可能性が考えられている。ERdj5 が膜タンパク質を介して TrxR1 から電子を受け取る可能性もまだ残されているが、まだそのような膜タンパク質は同定されていない。もう一つは CydDC 複合体のような還元型グルタチオン輸送体による電子供給機構である(Fig 8B)⁷⁹。CydDC 複合体もバクテリアの内膜に局在する膜タンパク質であり、ATPase 活性依存的にサイトゾルからペリプラズムへ還元型グルタチオンを輸送し、ペリプラズムの異性化・還元反応を促進すると考えられている。しかし、哺乳類細胞においてこのトランスポーターとして同じ機能を持つ膜タンパク質もいまだ同定されていない。一方、酵母では分泌タンパク質のトランスロコンである Sec61 が還元型グルタチオンを輸送するチャネルとして機能すると考えられているが⁸⁰、受動拡散で小胞体へ還元型グルタチオンを取り込む機構であるため、CydDC 複合体よりも電子供給効率は低いことが予測される。哺乳類細胞でも Sec61 が還元型グルタチオンのチャネルとして役割を果たす可能性が考えられるが、その報告例はない。さらに、先行研究で小胞体内腔の還元型グルタチオンを人工的に枯渇させても、ERdj5 の ERAD 基質である NHK の分解やフォールディング基質となる LDLR の成熟には影響がでないことが報告されていた⁸⁹。これは還元型グルタチオンが ERdj5 の還元力になる可能性が低いことを示唆している。また、還元型グルタチオンの酸化還元電位は約-230 mV であり、ERdj5 に電子を与える Ero1a の C85-C391 の酸化還元電位よりも高いため、還元型グルタチオンによる ERdj5 への電子伝達効

率は低いことも考えられた。さらに、本研究により明らかとなったリボソームの翻訳と共役した小胞体への還元力供給機構は、DsbD や CydDC 複合体のような電子伝達機構よりも効率よく電子を供給できることが考えられた。例えば、血清成分の一つであるアルブミンは小胞体で合成される分泌タンパク質であり、正しい立体構造の獲得に 17 個のジスルフィド結合形成が必要である^{47,90}。したがって、一分子のアルブミンが小胞体に合成されるだけで 34 個の電子が小胞体に供給されることになる。これに対して、DsbD による電子伝達供給は一回の反応で 2 個の電子を伝達することしかできない。一方、CydDC は電子を供給するために ATP のエネルギーが必要となる。つまり、リボソームの翻訳と共役した小胞体への還元力供給機構は細胞内のエネルギーロスを抑えた高効率な電子伝達経路であることが言える。

しかし、細胞が小胞体ストレス状態に陥ると、PERK の活性化により一時的にリボソームの翻訳が停止することが知られている(Fig 1B)¹³。そのため、小胞体ストレス下では、今回発見した小胞体への還元力供給機構と異なる機構により電子が小胞体へ供給される必要性があると考えられる。ERdj5 は小胞体ストレスで誘導される分子でもあるため⁶²、小胞体ストレス状態においても還元力となる電子が小胞体へ供給される仕組みがあるかもしれない。

ERdj5 は小胞体内腔で働くジスルフィド還元酵素として初めて見つかったが、最近の研究により、ERp18 も小胞体内腔でジスルフィド還元酵素として機能することが報告されている^{91,92}。また、小胞体膜には TMX1 や TMX4 などの還元酵素が存在しており⁹³⁻⁹⁵、これら還元酵素も小胞体の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、どのように ERdj5 以外の還元酵素が小胞体内腔あるいは小胞体膜で還元力を獲得しているかは未解明の問題として残されている。また、小胞体において還元反応は細胞全体の恒常性を保つうえで不可欠な要素であることが明らかになりつつあるが^{70,96}、これら還元酵素の冗長性や基質特異性については、今後、解析すべき重要な研究課題の一つである。

6. 実験方法

6-1. 試薬およびバッファー類

試薬は特記したもの以外は、ナカライテスクもしくは和光純薬社製のものを使用した。本実験に使用した特筆すべき細胞可溶化液や精製用バッファー、プライマーなどは表 1 に示す。

6-2. 使用した抗体

本研究で使用した抗体及びその希釈率は、表 2 に示す。

6-3. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞 HEK293T 細胞およびヒト子宮頸部癌由来細胞 HeLa 細胞 (HeLa Kyoto strain) は、DMEM 培地 (Gibco もしくはナカライテスク) 500 ml に 10% Fetal Bovine Serum (FBS : sigma) と 1% Penicilin-Streptomycin Mixed Solution を加え、37.0°C、5% CO₂ とした培養インキュベータで培養した。

6-4. プラスミドの構築

大腸菌発現用 Ero1 α と PDI のプラスミドおよび哺乳類細胞発現用 Ero1 α と各種 PDI ファミリータンパク質のプラスミドは、新木和孝博士より分与して頂いた。ER_HyPer は垣花太一博士より分与して頂いた。哺乳類細胞発現用 ERdj5 と NHK のプラスミドは潮田亮准教授および萩原誠智博士より分与して頂いた。本実験に使用したコンストラクションは表 3 に示す。

Ero1 α /WT/Myc は Ero1 α /WT/FLAG を鋳型とし、5'末端側に BamH I、3'末端側に Xho I の制限酵素サイトが挿入されるようにプライマーを設計し、KOD-plus-ポリメラーゼ (TOYOBO) によって PCR 産物を増幅させた。増幅した PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後、gel extraction kit (QIAGEN) で精

製し、PCDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific)に BamH I、Xho I サイト依存的に挿入し、作製した。Ero1 α の各システインペアに対する変異体は、Ero1 α /WT/Myc を鋳型とし、部位特異的変異用のプライマーを設計し、Pfu Turbo ポリメラーゼ(Stragene)によって PCR 産物を増幅させた。増幅した PCR 産物は Dpn I 処理を 37°C 、1 時間行い、鋳型 DNA を切断した。この反応液を大腸菌に形質転換し、正しく変異が導入されたクローンを選択した。大腸菌発現用 Ero1 α の変異体は His/Ero1 α /C104A/C131A/C166A を鋳型とし、作製した。ERdj5/Form I/C3AA/FLAG および ERdj5/Form II/C4AA/FLAG はそれぞれ ERdj5/Form I/FLAG と ERdj5/Form II/FLAG を鋳型とし、作製した。Ero1 α を欠損させるプラスミド(CRISPER/Ero1 α)は add gene から購入した px330 に、Bbs I サイト依存的に挿入し、作製した。ターゲット配列(Ero1 α target primer set)は、CHOP_CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)で検索し、作製した。

6-5. トランスフェクション

60~80%のコンフルエントになった細胞を用意し、プラスミド DNA を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞にトランスフェクションした。Lipofectamine 2000 のトランスフェクションは以下の手順で行った。Opti-MEM (Gibco)にプラスミド DNA と Lipofectamine 2000 を混合し、混合した溶液を細胞に降り掛け、24 時間培養した。また、siRNA を細胞にトランスフェクションする場合、RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。Opti-MEM に siRNA と RNAiMAX を混合し、混合した溶液を 2.0×10^5 cells/ml の濃度の細胞溶液に 3.5 ml に加え、6 cm dish に播種し、48 時間培養した。48 時間培養後、トランスフェクションした細胞を回収し、上記と同じ手順で再度、siRNA を RNAiMAX でトランスフェクションし、さらに 48 時間培養した。本研究で使用した siRNA とその濃度は表 4 に示す。

6-6. 細胞の可溶化

TCA 沈殿を用いた細胞の可溶化は以下の手順で行った。細胞から DMEM をアスピレーターで除き、PBS で 15 ml ファルコンチューブに回収し、1300 rpm、室温、3 分間で遠心し、PBS をアスピレーターで除いた。終濃度 10% TCA とした TCA バッファーを加え、10 回ピペッティングし、氷上で 30 分間静置した。静置後、10000 rpm、4°C、30 分間で遠心し、上清を除き、沈殿物に冷アセトンを加え、超音波破碎機で破碎した。この作業を 3 回繰り返した後、冷アセトンを除き、沈殿物を室温、15 分間風乾させた。風乾させた沈殿物に細胞溶解液(Cell resolved buffer)を加え、超音波破碎機で破碎し、溶解させた。溶解させたサンプルの一部は免疫沈降のサンプルとして使用した。免疫沈降の詳細な手順は 6-6 の章に記載した。残りの細胞可溶化液にはサンプルバッファーを加え、10 分間、60°C でインキュベートした。サンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。

哺乳類細胞用可溶化液 1 (Cell lysis buffer 1)を用いた細胞の可溶化は、以下の手順で行った。細胞を PBS で 2 回洗浄した。哺乳類細胞用可溶化液 1 を加え、1.5 ml エッペンドルフチューブに回収した。その後、10 回ピペッティングし、氷上で 20 分間静置した。静置後、12000 rpm、4°C、20 分間で遠心し、サンプルを可溶性画分と不溶性画分に分けた。質量分析の解析に使用した可溶性画分は、細胞をインキュベータ内で終濃度 100 μ M の DVSF を 1 時間処理し、哺乳類細胞用可溶化液 1 を用いた可溶化を行い、作製した。その後、DVSF 非依存的な相互作用を除くため、可溶性画分に終濃度 1% となるように SDS を加え、その可溶性画分を ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel と 4°C、24 時間反応させた。反応後のサンプル上清を除き、ビーズ洗浄バッファー A (High ionic buffer) で 2 回洗浄し、ビーズ洗浄バッファー B (Low ionic buffer) で 1 回洗浄を行った。洗浄後、終濃度 500 μ g/ml の 3xFLAG peptide 溶液で溶出した。各サンプルには、サンプルバッファーを加え、10 分間、60°C でインキュベートした。これらサンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングもしくは銀染色(コスモバイオ)を用い、解析した。銀染色はコスモバイオのマニュアルに従い、行った。銀染色したゲルから標的としたバンドを切り出し、そのバンドを MALDI-Qq-TOF MS/MS (Matrix-assisted

laser desorption/ionization-quadrupole-time-of-flight-tandem mass spectrometry)で解析し、タンパク質を同定した。

6-7. ウェスタンブロッティング

ニトロセルロース膜(Cytiva)を必要な大きさに切り取り、トランスファーバッファー(Transfer buffer)で親水化処理した。その後、7.5%アクリルアミドを含む分離ゲルで SDS-PAGE で流したゲルにメンブレンをのせ、トランスファーバッファー中で、100V、4℃、1時間で転写した。転写後のメンブレンは Blocking one の中で、室温 30 分間ブロッキングした。一次抗体反応は 4℃、1 時間反応させた。反応後、メンブレン洗浄バッファー(PBST buffer)の中で、室温、5 分間振盪させながら三回洗浄した。洗浄後、二次抗体反応は室温で 1 時間反応させた。反応後はメンブレン洗浄バッファーで三回洗浄した。バンド検出は暗所で SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich)を基質として検出した。

6-8. 免疫沈降

TCA 沈殿で回収し、細胞溶解液に溶解したサンプルの SDS 濃度が 0.1%となるように哺乳類細胞用可溶化液 1 を加え、そのサンプルに Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (F3165) (Sigma-Aldrich)を加え、4℃で一晩、ローテーションさせた。その後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva)を加え、4℃、1時間反応させた。パルスチェイス実験では、哺乳類細胞用可溶化液 1 を用いた方法で作製した可溶性画分に Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha-1-Antitrypsin (Agilent)を加え、4℃、一晩反応させた。その後、Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific)を加え、4℃、1時間反応させた。反応後のサンプル上清を除き、ビーズ洗浄バッファー A で 2 回洗浄し、ビーズ洗浄バッファー B で 1 回洗浄を行った。洗浄バッファーを完全に取り除いた後、サンプルバッファーを加え、10 分間、100℃でインキュベートし、12000 rpm、室温、10 分間遠心した。遠心後、上清を SDS-

PAGE で流し、ウェスタンブロッティングをした。

6-9. PEG マレイミドシフトアッセイ

細胞から DMEM をアスピレーターで除き、PBS で 15 ml ファルコンチューブに回収し、1300 rpm、室温、3 分間で遠心し、PBS をアスピレーターで除いた。終濃度 10% TCA とした TCA バッファーを加え、10 回ピペッティングし、氷上で 30 分間静置した。静置後、10000 rpm、4°C、30 分間で遠心し、上清を除き、沈殿物に冷アセトンを加え、超音波破砕機で破砕した。この作業を 3 回繰り返した後、冷アセトンを除き、沈殿物を室温、15 分間風乾させた。風乾させた沈殿物に PEG マレイミド修飾用バッファー(PEG-Mal modification buffer)を加え、超音波破砕機で破砕し、溶解させた。溶解したサンプルに、サンプルバッファーを加え、10 分間、60°C でインキュベートした。サンプルは SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティングで解析した。各酸化還元酵素の酸化型および還元型、平衡状態の割合を Image J (NIH : <https://imagej.nih.gov/ij/>) で定量した。

6-10. 小胞体の過酸化水素のライブイメージング

ER-HyPer をトランスフェクションした細胞を 1.5×10^4 cells/ml の濃度の細胞溶液にし、そのうち 300 μ l を triple-well glass-bottom dish (Iwaki) に播種した。細胞は FluoroBrite DMEM Media (Thermo Fisher Scientific) で培養した。レーザーは 405 nm と 488 nm で励起させ、レンズは Plan-Apochromat 63 \times /1.40 oil DIC を使用した。小胞体の過酸化水素濃度を一過的に減少させるため、終濃度 2 mM の DTT を 4 分間処理し、その後 DTT を含んだ培地を除き、新しい培地で 4 回培地交換を行い、20 分間タイムラプス観察を行った。

6-11. XBP1 の活性化の評価

細胞から DMEM をアスピレーターで除き、PBS で 2 ml エッペンドルフチ

ューブに回収し、3500 rpm、4°C、5分間で遠心し、PBSをアスピレーターで除いた。RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用い、細胞を可溶化し、RNAを抽出した。精製したRNAの濃度を100 ng/ulとし、XBP1に対するプライマー(XBP1 primer set)を用い、SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)によってPCR産物を増幅させた。XBP1の前駆体(unspliced form)と成熟型(spliced form)の割合をImage Jで定量した。

6-12. パルスチェイス実験

3.5 cm 培養皿で培養した細胞からDMEMを除き、37°CのPBSで洗浄し、10% FBSを加えたDMEM, high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine (Gibco)で、30分間、インキュベーター内で培養した。培養後、放射性濃度の終濃度が 4.07×10^3 KBqとなるようにEXPRES³⁵S³⁵S Protein Labeling Mix (PerkinElmer)を加え、15分間、タンパク質をラベルした。15分後、ラベル入りの培地を除き、37°CのPBSで洗浄し、DMEMを加え、指定時間、培養をした。細胞の可溶化は6-4で記載した哺乳類細胞用可溶化液1を用いた方法で行い、免疫沈降の手順は6-6で既述した。作製したサンプルはSDS-PAGEを行い、解析で得られた放射活性をImage Jで定量した。

6-13. タンパク質の発現と精製

Ero1 α の発現誘導およびリコンビナントタンパク質精製は以下の手順を進めた。大腸菌発現用プラスミドpET-Duet vectorにEro1 α を導入したプラスミドを大腸菌BL 21 (DE3)株に形質転換した。形質転換したコロニーをピックし、100 mlの100 ug/mlアンピシリンを含むLB培地にて前培養を37°C、180 rpmで行った。前培養した大腸菌を含むLB培地10 mLを100 ug/mlアンピシリンを含むLB培地1Lに加え、本培養を行った。OD₆₀₀ = 0.5になるまで37°C、180 rpmで培養し、タンパク質の発現はIPTGを終濃度500 μ Mになるように添加することで誘導させた。発現誘導は30°C、180 rpmで4時間行っ

た。発現誘導後、6000×g、4℃、15 分間遠心し集菌した。集菌したものは使用するまで-80℃で保存した。

集菌した菌体は、菌体量(g)に対して 10 倍量(ml)の大腸菌用可溶化液 A (E. coli lysis buffer A)に懸濁し、超音波破碎機(Q700, Qsonica)で菌体を破碎した。それらを 4℃、30100 rpm、1 時間、遠心し上清と沈殿に分けた。上清を 0.45 μm のフィルターを通し、His A バッファー1 (His A buffer 1)で平衡化した His Trap HP (Cytiva)にアプライした。His B バッファー1 (His B buffer 1)で、カラムから溶出させた。溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニット(Millipore)で濃縮し、濃縮したサンプルに終濃度 20 mM となるようにフェリシアン化カリウムを加え、酸化処理をした。これをゲルろ過バッファー1 (Gel filtration buffer 1)で平衡化した Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva)にアプライし、ゲルろ過を行った。溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。濃縮したサンプルを陰イオンバッファーA (Anion buffer A)で平衡化した Mono Q™ 10/100 GL (Cytiva)にアプライし、陰イオンバッファーB (Anion buffer B)による 0 mM~500 mM のリニアな NaCl 濃度勾配で、カラムから溶出させた。溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。

還元型 Ero1α のリコンビナントタンパク質は His Trap HP のカラムで簡易精製を行い、作製した。発現条件と精製条件は既述したとおりである。

PDI の発現誘導は Ero1α と同じ条件で行った。集菌した菌体は、菌体量に対して 10 倍量の大腸菌用可溶化液 A に懸濁し、超音波破碎機で菌体を破碎した。それらを 4℃、30100 rpm、1 時間、遠心し上清と沈殿に分けた。上清を 0.45 μm のフィルターを通し、His A バッファー1 で平衡化した His Trap HP にアプライした。His B バッファー1 で、カラムから溶出させた。溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。濃縮したサンプルを陰イオンバッファーA で平衡化した Mono Q™ 10/100 GL にアプライし、陰イオンバッファーB による 0 mM~500 mM のリニアな NaCl 濃度勾配で、カラムから溶出させた。溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。

C クラスターの発現誘導およびリコンビナントタンパク質精製は以下の手順

で進めた。大腸菌発現用プラスミド pET-Duet vector に C クラスターを導入したプラスミドを大腸菌 Origami™ B(DE3)株に形質転換し、100 ug/ml アンピシリンと 15 ug/ml カナマイシン、12.5 ug/ml テトラマイシンを含む LB 寒天培地で培養した。形質転換したコロニーをピックし、100 ml の 100 ug/ml アンピシリンと 15 ug/ml カナマイシン、12.5 ug/ml テトラマイシンを含む LB 培地にて前培養を 37°C、180 rpm で行った。前培養した大腸菌を含む LB 培地を 15 mL を 100 ug/ml アンピシリンを含む LB 培地 1L に加え、本培養を行った。OD600 = 0.5 になるまで 37°C、180 rpm で培養し、タンパク質の発現は IPTG を終濃度 100 uM になるように添加することで誘導させた。発現誘導は 18°C、150 rpm で 16 時間行った。発現誘導後、6000×g、4°C、15 分間遠心し集菌した。集菌したものは使用するまで-80°Cで保存した。

集菌した菌体は、菌体量に対して 10 倍量の大腸菌用可溶化液 B (E. coli lysis buffer B)懸濁し、超音波破碎機で菌体を破碎した。それらを 4°C、30100 rpm、1 時間、遠心し上清と沈殿に分けた。上清を 0.45 um のフィルターを通し、His A バッファー2 (His A buffer 2)で平衡化した His Trap HP にアプライした。His B バッファー2 (His B buffer 2)による 20 mM~500 mM のリニアなイミダゾール濃度勾配で、カラムから溶出させた。溶出画分を排除分子量 10 kDa の限外ろ過ユニット(Millipore)で濃縮した。濃縮したサンプルに終濃度 1 mM となるように DPS を加え、酸化処理をした。これをゲルろ過バッファー2で平衡化した Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライし、ゲルろ過を行った。溶出画分を排除分子量 10 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。

哺乳類細胞からの ERdj5 の精製は、引用文献を参考に行った。FLAG タグを融合した野生型 ERdj5 安定発現細胞は東北大学・稲葉謙次教授から分与して頂いた。15 cm の培養皿で 70~80%コンフルエントとなった安定発現細胞に終濃度が 300 ug/ml の p-イソプロピル安息香酸と 100 nM の PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate : Sigma-Aldrich)を加え、インキュベータ内で 48 時間培養し、発現誘導をした。発現誘導後、1500 rpm、室温、5 分間遠心し、細胞を集めた。

15 cm の培養皿 20 枚分に対して 10 ml の哺乳類細胞用可溶化液 2 (Cell lysis

buffer 2)を加え、テフロンホモジナイザーで細胞を破碎した。破碎した細胞溶解液に終濃度が1%となるように Tween-20 を加え、4°C、1時間ローテーションし、可溶化した。可溶化した溶液を4°C、14500 rpm、1時間、遠心し上清と沈殿に分けた。10 mlの上清に対して ERdj5 精製用バッファー(ERdj5 purification buffer)で平衡化したビーズ(DDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL: MBL) 1 ml を混合し、4°C、2時間ローテーションさせた。ローテーション後、上清を除き、10 mlの ERdj5 精製用バッファーで3回ビーズを洗浄した。洗浄したビーズに終濃度 200 ug/mlの DDDDK-tag peptide (MBL)を含む ERdj5 精製用バッファーを 5 ml 加え、4°C、2時間ローテーションし、溶出させた(溶出 1)。溶出した後のビーズに ERdj5 精製用バッファーを 10 ml 加え、再溶出させた(溶出 2)。溶出 1 と 2 を合わせた溶出画分に終濃度が 1 M となるように NDSB-201 を加え、4°Cで一晩、ローテーションさせた。排除分子量 50 kDa の限外ろ過ユニット(Millipore)で濃縮した。これをゲルろ過バッファー3(Gel filtration buffer 3)で平衡化した Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライし、ゲルろ過を行った。溶出画分を排除分子量 50 kDa の限外ろ過ユニットで濃縮した。

以上のカラム操作は全て ÄKTA pure 25 (Cytiva)を使い、4°Cで行い、すべての最終精製産物は液体窒素で瞬間凍結し、-80°Cで保存した。

6-14. 酸素消費測定

溶存酸素は FireStingO2 fibreoptic oxygen metre (Pyro Science)を用い、測定した。測定前に、溶存酸素測定用バッファー(Oxygen monitoring buffer)の溶存酸素濃度をエアーポンプで飽和させ、30°Cの条件で測定した。測定時に用いた Ero1 α (C104A/C131A/C166A)および ERdj5/C-cluster、PDI の濃度はそれぞれ 1 μ M および 1 μ M、100 μ M で、測定開始 30 秒後に PDI を加え、Ero1 α の酸素消費を観察した。PDI は Ero1 α の電子ドナーとして用いたため、還元型として用意した。還元型 PDI は以下の操作を行い、作製した。精製した PDI に終濃度 10 mM の還元剤 DTT を加え、氷上で 20 分間インキュベートし

た。その後、サンプルを PD-10 Column (Cytiva) にアプライし、残存の DTT を除き、溶出画分を排除分子量 30 kDa の限外ろ過ユニット (Millipore) で濃縮した。この作業におけるバッファーは溶存酸素測定用バッファーを用いた。

6-15. ドッキングシミュレーション

ERdj5 と Ero1 α の構造情報 (PDB ID 5AYK : ERdj5/Form I, PDB ID 5AYL : ERdj5/Form I, PDB ID 3AHQ : Ero1 α) を用い、ドッキングシミュレーションを行った。解析時にはこれらタンパク質の構造情報に基づいた分子表面や静電相互作用、疎水性相互作用を考慮し、Surfit Web Server (<https://sysimm.ifrec.osaka-u.ac.jp/docking/main/>) で複合体モデルを構築した。さらに、4-4 の章で示した分子間ジスルフィド結合を介した Ero1 α /ERdj5 複合体形成の結果を基に、分子間ジスルフィド結合形成の要素を評価し、ドッキングシミュレーションで得られた複合体モデルから妥当なものを選別した。

6-16. NMR 解析

NMR 解析に用いた Ero1 α の発現誘導は終濃度 50 mg/L [15 N] L-cysteine (Cambridge Isotope Laboratory) を含む M9 液体最小培地で行った。発現条件と精製条件は既述したとおりであり、ゲルろ過のバッファー条件をゲルろ過バッファー 2 (Gel filtration buffer 2) とした。その後、排除分子量 10 kDa の限外ろ過ユニットを用いて、精製した Ero1 α と C クラスターのバッファーを NMR 測定用バッファー (NMR measurement buffer) にバッファー交換した。このサンプルを 5mm マイクロボトムチューブ (Shigemi) に移し、Bruker Avance Neo-800 MHz spectrometer (Bruker) で解析した。Ero1 α 単独サンプルは 25°C、29 時間測定し、C クラスターと混合したサンプルは 25°C、39 時間測定した。得られたデータは TopSpin 3.1 Software (Bruker) を用い解析した。Ero1 α のシステインペアは標的としたシステインペアに対する変異体を作製し、帰属した。プラスミドの構築は 6-4 章に既述した。

表1	
プライマー	配列
Ero1a target primer set	5'-CACCGTGTGAACAAGCTGAACGACT-3'
	5'-AAACAGTCGTTTCAGCTTGTTCACAC-3'
XBP1 primer set	5'-GCCTTGTAGTTGAGAACCAGGA-3'
	5'-TGACTGGGTCCAAGTTGTCC-3'
バッファー	組成
Cell resolved buffer	[100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1% SDS, 20 mM NEM]
High ionic buffer	[20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 400 mM NaCl]
Low ionic buffer	[20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 150 mM NaCl]
Transfer buffer	(192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl, 20% MeOH)
PBST buffer	(1xPBS, 0.05% Tween 20)
PEG-Mal modification buffer	[100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1% SDS, 1 mM and 2 kDa PEG-Mal]
Cell lysis buffer 1	[20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40]
Cell lysis buffer 2	[50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 100 mM NaCl, 20% Glycerol 1 mM EDTA and 1 mM PMSF]
E. coli lysis buffer A	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.02% Triton X-100, and 1 mM PMSF]
E. coli lysis buffer B	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 M NDSB-201, 0.02% Triton X-100, and 1 mM PMSF]
His A buffer 1	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% Glycerol and 0.02% Triton X-100]
His A buffer 2	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole 1 M NDSB-201, 10% Glycerol and 0.02% Triton X-100]
His B buffer 1	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10% Glycerol and 0.02% Triton X-100]
His B buffer 2	[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 500 mM imidazole 1 M NDSB-201, 10% Glycerol and 0.02% Triton X-100]
Anion buffer A	[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]
Anion buffer B	[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA]
Gel filtration buffer 1	[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl]
Gel filtration buffer 2	[25 mM Tris-HCl (pH 7.1), 100 mM NaCl]
Gel filtration buffer 3	[20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10% Glycerol 1 M NDSB-201 and 0.05% Tween 20]
ERdj5 purification buffer	[50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 100 mM NaCl, 20% Glycerol, 1 mM EDTA, 0.2% Tween 20 and 1 mM PMSF]
Oxygen monitoring buffer	[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl]
NMR measurement buffer	[25 mM Tris-HCl (pH 7.1), 100 mM NaCl, and 10% D ₂ O]

表2		
一次抗体	WB	IP
Antibody for the detection of FLAG™ conjugated proteins (ROCKLAND™)	1/1000	-
Anti-Ero1 Antibody, clone 2G4/12 (Millipore)	1/1000	-
Anti-Myc-tag pAb (MBL)	1/1000	-
DNAJC10 monoclonal antibody (M01), clone 3C4 (Abnova)	1/500	-
Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha-1-Antitrypsin (Agilent)	-	1/100
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (F1804) (Sigma-Aldrich)	1/1000	-
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (F3165) (Sigma-Aldrich)	-	1/100
二次抗体	WB	
Alkaline Phosphatase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)	1/1000	-
Alkaline Phosphatase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)	1/1000	-

表3
コンストラクション
ERdj5/WT/FLAG in pcDNA3.1 (human)
ERdj5/AA/FLAG in pcDNA3.1 (human)
ERdj5/WT/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/SS/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C1/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C2/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C3/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C4/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/AA/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C3/SS/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/C4/SS/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/Form I/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/Form II/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/Form I/C3/AA/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
ERdj5/Form II/C4/AA/FLAG in pcDNA3.1 (mouse)
PDI/WT/FLAG in pcDNA3.1
p5/WT/FLAG in pcDNA3.1
ERp46/WT/FLAG in pcDNA3.1
ERp57/WT/FLAG in pcDNA3.1
PDIR/WT/FLAG in pcDNA3.1
Ero1a/WT/FLAG in pcDNA3.1
Ero1a/WT/Myc in pcDNA3.1
Ero1a/C94A/C99A/Myc in pcDNA3.1
Ero1a/C104A/C131A/Myc in pcDNA3.1
Ero1a/C208A/C241A/Myc in pcDNA3.1
Ero1a/C85A/C391A/Myc in pcDNA3.1
Ero1a/C394A/C397A/Myc in pcDNA3.1
ER-HyPer in pcDNA3.1
6xHis/Ero1a/C104A/C131A in pETDuet-1
6xHis/Ero1a/C104A/C131A/C166A in pETDuet-1
6xHis/Ero1a/C94A/C99A/C104A/C131A/C166A in pETDuet-1
6xHis/Ero1a/C85A/C104A/C131A/C166A/C391A in pETDuet-1
6xHis/PDI/WT in pETDuet-1
6xHis/ERdj5/C cluster/WT in pETDuet-1
6xHis/ERdj5/C cluster/AA in pETDuet-1
CRISPER/Ero1a in px330

表4		
	siRNA	使用濃度
Ero1α	5'-CAGGAACUUGUUACAGAAUAUUCAU-3'	50 nM
ERdj5	5'-UAAGCAUCCCUAUUCCAACCAUUGU-3'	50 nM
	siRNAは全てThermo Fisher Scientificから購入した。	

7. 論文目録

全章は主に次の論文から成る。

Kaiku Uegaki, Yuji Tokunaga, Michio Inoue, Seiji Takashima, Kenji Inaba,
Koh Takeuchi, Ryo Ushioda & Kazuhiro Nagata

“The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for
reductive reactions in the ER”

Cell Reports (2023年6月採択、7月公開)

DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112742

8. 謝辞

本研究は、JT 生命誌研究館の館長である永田和宏教授と京都産業大学大学院・生命科学研究科の潮田亮准教授のもと、多くの方にご指導とご協力を受けて行われました。

永田和宏教授には、学部生の時からこの研究室に配属させて頂き、本研究を進めるために十分な研究環境を提供していただきました。また、学会や会議で積極的に質疑応答を行う大切さを学びました。博士前期課程のはじめには、イタリアで開催された **ER and Redox Meeting** への出席、博士後期課程ではスペインで開催された **EMBO meeting** への出席や細胞生物学会をはじめとする様々な国内・国際会議に参加させていただき、心から感謝申し上げます。

潮田亮准教授には、学部生の頃から指導していただき、数多くの知識や実験技術を学ばせていただきました。また、本テーマの発案及び研究指針をご提案頂き、この研究に大きく貢献していただきました。さらに、研究者になるための考え方やあり方などの精神的な教育もしていただき、深く感謝いたします。また、研究以外でも、楽しく過ごさせていただいたことを感謝いたします。

東京大学大学院・薬学系研究科の竹内恒教授と徳永裕二助教授には、**Ero1 α** のリコンビナントタンパク質精製および **NMR** を行って頂き、**NMR** から得られた結果は本研究の結論を裏付けるものであり、大きく貢献いただいたことを深く感謝いたします。また、**NMR** 初心者の私に、データの説明や解釈を丁寧にご教示いただいたこと感謝いたします。

東北大学・多元物質科学研究所の稲葉謙次教授には **Ero1 α** と **PDI** のリコンビナントタンパク質精製をご指導頂いたことやドッキングシミュレーション用いた **ERdj5** と **Ero1 α** の複合体解析を快く引き受けていただいたこと深く感謝申し上げます。また、学会会場でお会いしたときには研究の進捗状況などについて議論していただいたこと感謝いたします。

大阪大学大学院・医学系研究科の高島成二教授には質量分析を用いた **ERdj5** の結合タンパク質の網羅的解析を快く引き受けていただいたこと心から感謝申し上げます。また、本論文の構成に関する助言や適切な指導をしていただいた

こと深く感謝申し上げます。

産業技術総合研究所の新木和孝博士には、プラスミド DNA の提供やタンパク質精製の実験条件を教えて頂き感謝しております。本研究テーマの様々な議論をしていただき、深く感謝申し上げます。

永田研究室の OB である森戸大介博士、山本洋平博士、伊藤進也博士には、研究室での会議の際、討論の仕方や考え方などの多くの議論をして頂き感謝しております。実験の中で起こったトラブルに対しても、チームの分け隔てなく、快く対応していただき深く感謝申し上げます。

堤智香さんには、研究室では本研究テーマのことや様々な研究のことを議論していただいたこと深く感謝申し上げます。また、パートナーとして研究生生活や私生活、精神面などを支えていただいたこと心から感謝いたします。

総合生命科学部の永田研究室の第一期生の先輩としての藤井唱平先輩には、研究・日常生活においてご指導して頂き感謝を申し上げます。

同チームの後輩である和田匠太君は、実験系の立ち上げから共同しデータを導き出せたことへの喜びと感謝を申し上げます。また、ERdj5 ノックアウト細胞を快く提供していただき感謝しております。

後輩諸氏からは、積極的に議論を行う様子や実験に真面目に取り組む様子から刺激を与えていただきました。

永田和宏教授の秘書である石田さんには出張手続きなど、様々な事務書類の際にお付き合い頂き深く感謝申し上げます。

技官の福田さんからは丁寧な機器点検や発注の仕方など指導していただいたこと感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を陰ながら支えてくれた二人の兄弟と、精神的にも経済的にもサポートしてくれた両親・親戚に心から感謝いたします。今後とも多くの方のご指導を頂きながら、一研究者として努力していきたいと思っております。

9. 引用文献

- 1 Hegde, R. S. & Keenan, R. J. The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 107-124 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00413-2>
- 2 Araki, K. & Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a007526 (2011). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007526>
- 3 Hipp, M. S., Kasturi, P. & Hartl, F. U. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 421-435 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- 4 Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- 5 Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 421-438 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- 6 Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086 (2011). <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- 7 Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80855-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80855-7)
- 8 Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332 (2000). <https://doi.org/10.1038/35014014>
- 9 Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. & Prywes, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* **3**, 99-111 (2002). [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4)
- 10 Chen, X., Shen, J. & Prywes, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* **277**, 13045-13052 (2002). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110636200>
- 11 Ye, J. *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**, 1355-1364 (2000). [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7)
- 12 Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274 (1999).

- <https://doi.org:10.1038/16729>
- 13 Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**, 897-904 (2000). [https://doi.org:10.1016/s1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org:10.1016/s1097-2765(00)80330-5)
- 14 Belyy, V., Zuazo-Gaztelu, I., Alamban, A., Ashkenazi, A. & Walter, P. Endoplasmic reticulum stress activates human IRE1 α through reversible assembly of inactive dimers into small oligomers. *Elife* **11** (2022). <https://doi.org:10.7554/eLife.74342>
- 15 Tran, N. H. *et al.* The stress-sensing domain of activated IRE1 α forms helical filaments in narrow ER membrane tubes. *Science* **374**, 52-57 (2021). <https://doi.org:10.1126/science.abh2474>
- 16 Shen, X. *et al.* Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* **107**, 893-903 (2001). [https://doi.org:10.1016/s0092-8674\(01\)00612-2](https://doi.org:10.1016/s0092-8674(01)00612-2)
- 17 Calton, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96 (2002). <https://doi.org:10.1038/415092a>
- 18 Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891 (2001). [https://doi.org:10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org:10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- 19 Tam, A. B. *et al.* The UPR Activator ATF6 Responds to Proteotoxic and Lipotoxic Stress by Distinct Mechanisms. *Dev Cell* **46**, 327-343.e327 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.devcel.2018.04.023>
- 20 Hourihan, J. M., Moronetti Mazzeo, L. E., Fernández-Cárdenas, L. P. & Blackwell, T. K. Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Mol Cell* **63**, 553-566 (2016). <https://doi.org:10.1016/j.molcel.2016.07.019>
- 21 Schindler, A. J. & Schekman, R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17775-17780 (2009). <https://doi.org:10.1073/pnas.0910342106>
- 22 Sevier, C. S. & Kaiser, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 836-847 (2002). <https://doi.org:10.1038/nrm954>
- 23 Hwang, C., Sinskey, A. J. & Lodish, H. F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**, 1496-1502 (1992).
- 24 Ellgaard, L. & Ruddock, L. W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* **6**, 28-32 (2005). <https://doi.org:10.1038/sj.embor.7400311>

- 25 Pollard, M. G., Travers, K. J. & Weissman, J. S. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **1**, 171-182 (1998). [https://doi.org:10.1016/s1097-2765\(00\)80018-0](https://doi.org:10.1016/s1097-2765(00)80018-0)
- 26 Tu, B. P. & Weissman, J. S. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **10**, 983-994 (2002). [https://doi.org:10.1016/s1097-2765\(02\)00696-2](https://doi.org:10.1016/s1097-2765(02)00696-2)
- 27 Cabibbo, A. *et al.* ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **275**, 4827-4833 (2000). <https://doi.org:10.1074/jbc.275.7.4827>
- 28 Zito, E., Chin, K. T., Blais, J., Harding, H. P. & Ron, D. ERO1-beta, a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis. *J Cell Biol* **188**, 821-832 (2010). <https://doi.org:10.1083/jcb.200911086>
- 29 Araki, K. & Nagata, K. Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *J Biol Chem* **286**, 32705-32712 (2011). <https://doi.org:10.1074/jbc.M111.227181>
- 30 Araki, K. *et al.* Ero1-alpha and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell Biol.* **202**, 861-874 (2013). <https://doi.org:10.1083/jcb.201303027>
- 31 Jessop, C. E., Tavender, T. J., Watkins, R. H., Chambers, J. E. & Bulleid, N. J. Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* **284**, 2194-2202 (2009). <https://doi.org:10.1074/jbc.M808054200>
- 32 Bertoli, G. *et al.* Two conserved cysteine triads in human Ero1alpha cooperate for efficient disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**, 30047-30052 (2004). <https://doi.org:10.1074/jbc.M403192200>
- 33 Klappa, P., Ruddock, L. W., Darby, N. J. & Freedman, R. B. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO J* **17**, 927-935 (1998). <https://doi.org:10.1093/emboj/17.4.927>
- 34 Appenzeller-Herzog, C., Riemer, J., Christensen, B., Sørensen, E. S. & Ellgaard, L. A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells. *EMBO J* **27**, 2977-2987 (2008). <https://doi.org:10.1038/emboj.2008.202>
- 35 Zhang, L. *et al.* Different interaction modes for protein-disulfide isomerase (PDI) as an efficient regulator and a specific substrate of endoplasmic reticulum oxidoreductin-1α (Ero1α). *J Biol Chem* **289**, 31188-31199 (2014).

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602961>
- 36 Ramming, T., Kanemura, S., Okumura, M., Inaba, K. & Appenzeller-Herzog, C. Cysteines 208 and 241 in Ero1 α are required for maximal catalytic turnover. *Redox Biol* **7**, 14-20 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.11.004>
- 37 Ramming, T. *et al.* A PDI-catalyzed thiol-disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1. *Free Radic Biol Med* **83**, 361-372 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.011>
- 38 Hansen, H. G. *et al.* Hyperactivity of the Ero1 α oxidase elicits endoplasmic reticulum stress but no broad antioxidant response. *J Biol Chem* **287**, 39513-39523 (2012). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405050>
- 39 Mehmeti, I., Lortz, S. & Lenzen, S. The H₂O₂-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu. *Free Radic Biol Med* **53**, 1451-1458 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.010>
- 40 Zito, E. ERO1: A protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. *Free Radic Biol Med* **83**, 299-304 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.011>
- 41 Zito, E. *et al.* Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol Cell* **40**, 787-797 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.010>
- 42 Wang, L., Zhang, L., Niu, Y., Sitia, R. & Wang, C. C. Glutathione peroxidase 7 utilizes hydrogen peroxide generated by Ero1 α to promote oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal* **20**, 545-556 (2014). <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5236>
- 43 Ramming, T., Hansen, H. G., Nagata, K., Ellgaard, L. & Appenzeller-Herzog, C. GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* **70**, 106-116 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.018>
- 44 Helenius, A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**, 253-265 (1994). <https://doi.org/10.1091/mbc.5.3.253>
- 45 Ruiz-Canada, C., Kelleher, D. J. & Gilmore, R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* **136**, 272-283 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.047>
- 46 Grinna, L. S. & Robbins, P. W. Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J Biol Chem* **254**, 8814-8818 (1979).
- 47 Rutkevich, L. A., Cohen-Doyle, M. F., Brockmeier, U. & Williams, D. B. Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the

- oxidative folding of human secretory proteins. *Mol Biol Cell* **21**, 3093-3105 (2010).
<https://doi.org:10.1091/mbc.E10-04-0356>
- 48 Williams, D. B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **119**, 615-623 (2006).
<https://doi.org:10.1242/jcs.02856>
- 49 Stein, A., Ruggiano, A., Carvalho, P. & Rapoport, T. A. Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* **158**, 1375-1388 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2014.07.050>
- 50 Schmidt, C. C., Vasic, V. & Stein, A. Doa10 is a membrane protein retrotranslocase in ER-associated protein degradation. *Elife* **9** (2020).
<https://doi.org:10.7554/eLife.56945>
- 51 Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-255 (2002).
<https://doi.org:10.1038/nrm780>
- 52 Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 944-957 (2008).
<https://doi.org:10.1038/nrm2546>
- 53 Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. & Nagata, K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* **299**, 1394-1397 (2003).
<https://doi.org:10.1126/science.1079181>
- 54 Hosokawa, N. *et al.* A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* **2**, 415-422 (2001). <https://doi.org:10.1093/embo-reports/kve084>
- 55 Kanehara, K., Kawaguchi, S. & Ng, D. T. The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 743-750 (2007).
<https://doi.org:10.1016/j.semcdb.2007.09.007>
- 56 Hosokawa, N., Wada, I., Natsuka, Y. & Nagata, K. EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin. *Genes Cells* **11**, 465-476 (2006). <https://doi.org:10.1111/j.1365-2443.2006.00957.x>
- 57 Hosokawa, N. *et al.* EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology* **20**, 567-575 (2010).
<https://doi.org:10.1093/glycob/cwq001>
- 58 George, G. *et al.* EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD. *Elife* **9** (2020).
<https://doi.org:10.7554/eLife.53455>
- 59 Shenkman, M. *et al.* Mannosidase activity of EDEM1 and EDEM2 depends on an

- unfolded state of their glycoprotein substrates. *Commun Biol* **1**, 172 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0174-8>
- 60 Hirao, K. *et al.* EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem* **281**, 9650-9658 (2006). <https://doi.org/10.1074/jbc.M512191200>
- 61 Yu, S., Ito, S., Wada, I. & Hosokawa, N. ER-resident protein 46 (ERp46) triggers the mannose-trimming activity of ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein 3 (EDEM3). *J Biol Chem* **293**, 10663-10674 (2018).
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003129>
- 62 Ushioda, R. *et al.* ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* **321**, 569-572 (2008).
<https://doi.org/10.1126/science.1159293>
- 63 Hagiwara, M. *et al.* Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol Cell* **41**, 432-444 (2011).
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.021>
- 64 Maegawa, K. I. *et al.* The Highly Dynamic Nature of ERdj5 Is Key to Efficient Elimination of Aberrant Protein Oligomers through ER-Associated Degradation. *Structure* **25**, 846-857.e844 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.001>
- 65 Oka, O. B., Pringle, M. A., Schopp, I. M., Braakman, I. & Bulleid, N. J. ERdj5 is the ER reductase that catalyzes the removal of non-native disulfides and correct folding of the LDL receptor. *Mol Cell* **50**, 793-804 (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.014>
- 66 Jansens, A., van Duijn, E. & Braakman, I. Coordinated nonvectorial folding in a newly synthesized multidomain protein. *Science* **298**, 2401-2403 (2002).
<https://doi.org/10.1126/science.1078376>
- 67 Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529 (2003).
<https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- 68 Ushioda, R. *et al.* Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6055-E6063 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1605818113>
- 69 Yamashita, R., Fujii, S., Ushioda, R. & Nagata, K. Ca. *Sci Rep* **11**, 20772 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99980-9>
- 70 Ellgaard, L., Sevier, C. S. & Bulleid, N. J. How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum? *Trends Biochem Sci* **43**, 32-43 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.006>

- 71 Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**, 581-589 (1991).
[https://doi.org:10.1016/0092-8674\(91\)90532-4](https://doi.org:10.1016/0092-8674(91)90532-4)
- 72 Missiakas, D., Georgopoulos, C. & Raina, S. Identification and characterization of the Escherichia coli gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7084-7088 (1993).
<https://doi.org:10.1073/pnas.90.15.7084>
- 73 Inaba, K. & Ito, K. Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 520-529 (2008).
<https://doi.org:10.1016/j.bbamcr.2007.11.006>
- 74 Shevchik, V. E., Condemine, G. & Robert-Baudouy, J. Characterization of DsbC, a periplasmic protein of Erwinia chrysanthemi and Escherichia coli with disulfide isomerase activity. *EMBO J* **13**, 2007-2012 (1994).
- 75 Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. & Beckwith, J. Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* **179**, 6602–6608 (1997).
- 76 Goldstone, D. *et al.* DsbC activation by the N-terminal domain of DsbD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9551-9556 (2001). <https://doi.org:10.1073/pnas.171315498>
- 77 Missiakas, D., Schwager, F. & Raina, S. Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in Escherichia coli. *EMBO J* **14**, 3415-3424 (1995).
- 78 Poet, G. J. *et al.* Cytosolic thioredoxin reductase 1 is required for correct disulfide formation in the ER. *EMBO J* **36**, 693-702 (2017).
<https://doi.org:10.15252/emj.201695336>
- 79 Pittman, M. S., Robinson, H. C. & Poole, R. K. A bacterial glutathione transporter (Escherichia coli CydDC) exports reductant to the periplasm. *J Biol Chem* **280**, 32254-32261 (2005). <https://doi.org:10.1074/jbc.M503075200>
- 80 Ponso, A. J. *et al.* Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip. *Mol Cell* **67**, 962-973.e965 (2017).
<https://doi.org:10.1016/j.molcel.2017.08.012>
- 81 Araki, K. *et al.* A crosslinker-based identification of redox relay targets. *Anal Biochem* **520**, 22-26 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.ab.2016.12.025>
- 82 Naticchia, M. R. *et al.* Bifunctional electrophiles cross-link thioredoxins with redox relay partners in cells. *Chem Res Toxicol* **26**, 490-497 (2013).
<https://doi.org:10.1021/tx4000123>
- 83 Ushioda, R., Hoseki, J. & Nagata, K. Glycosylation-independent ERAD pathway

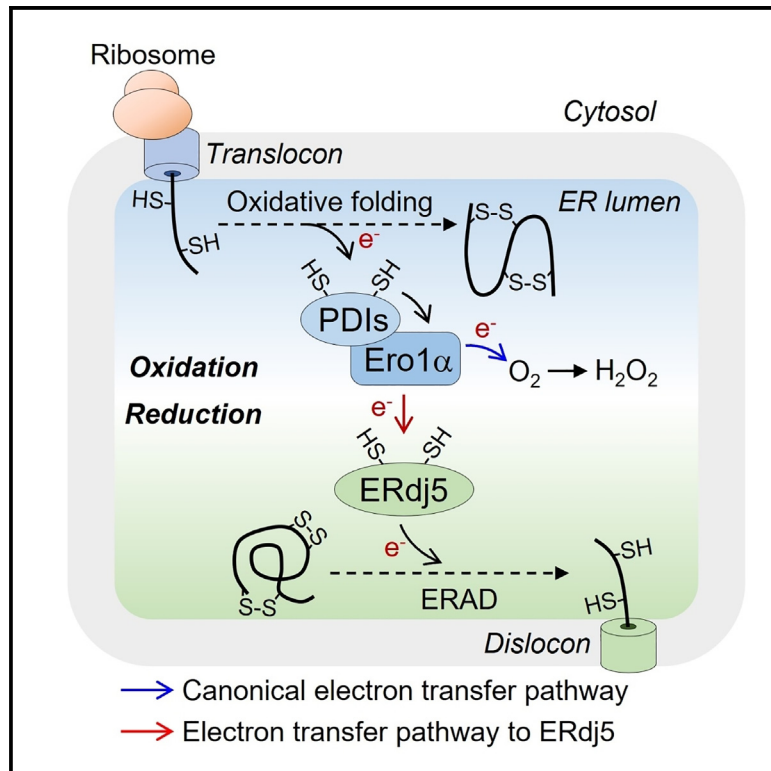
- serves as a backup system under ER stress. *Mol Biol Cell* **24**, 3155-3163 (2013).
<https://doi.org:10.1091/mbc.E13-03-0138>
- 84 Inaba, K. *et al.* Crystal structures of human Ero1 α reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *EMBO J* **29**, 3330-3343 (2010).
<https://doi.org:10.1038/emboj.2010.222>
- 85 Baker, K. M. *et al.* Low reduction potential of Ero1 α regulatory disulphides ensures tight control of substrate oxidation. *EMBO J* **27**, 2988-2997 (2008).
<https://doi.org:10.1038/emboj.2008.230>
- 86 Chambers, J. E. *et al.* The reduction potential of the active site disulfides of human protein disulfide isomerase limits oxidation of the enzyme by Ero1 α . *J Biol Chem* **285**, 29200-29207 (2010). <https://doi.org:10.1074/jbc.M110.156596>
- 87 Koba, H. *et al.* Reinvestigation of Disulfide-bonded Oligomeric Forms of the Unfolded Protein Response Transducer ATF6. *Cell Struct Funct* **45**, 9-21 (2020).
<https://doi.org:10.1247/csf.19030>
- 88 Koritzinsky, M. *et al.* Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *J Cell Biol* **203**, 615-627 (2013).
<https://doi.org:10.1083/jcb.201307185>
- 89 Tsunoda, S. *et al.* Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *Elife* **3**, e03421 (2014).
<https://doi.org:10.7554/eLife.03421>
- 90 Rombouts, I. *et al.* Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Sci Rep* **5**, 12210 (2015).
<https://doi.org:10.1038/srep12210>
- 91 Oka, O. B. V. *et al.* Activation of the UPR sensor ATF6 α is regulated by its redox-dependent dimerization and ER retention by ERp18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2122657119 (2022). <https://doi.org:10.1073/pnas.2122657119>
- 92 Oka, O. B. *et al.* ERp18 regulates activation of ATF6 α during unfolded protein response. *EMBO J* **38**, e100990 (2019). <https://doi.org:10.15252/emboj.2018100990>
- 93 Guerra, C. & Molinari, M. Thioredoxin-Related Transmembrane Proteins: TMX1 and Little Brothers TMX2, TMX3, TMX4 and TMX5. *Cells* **9** (2020).
<https://doi.org:10.3390/cells9092000>
- 94 Sugiura, Y. *et al.* Novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J Biol Chem* **285**, 7135-7142 (2010).
<https://doi.org:10.1074/jbc.M109.082545>
- 95 Schulman, S., Wang, B., Li, W. & Rapoport, T. A. Vitamin K epoxide reductase

prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 15027-15032 (2010). <https://doi.org:10.1073/pnas.1009972107>

- 96 Ushioda, R. & Nagata, K. Redox-Mediated Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11** (2019). <https://doi.org:10.1101/cshperspect.a033910>

The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER

Graphical abstract



Authors

Kaiku Uegaki, Yuji Tokunaga, Michio Inoue, ..., Koh Takeuchi, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata

Correspondence

ryo3ussy3@cc.kyoto-su.ac.jp (R.U.), nagata@cc.kyoto-su.ac.jp (K.N.)

In brief

The reductase activity of ERdj5 maintains ER homeostasis. However, the mechanism of electron supply to ERdj5 for reductase activity was unclear. Uegaki et al. identify ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α) as an electron donor for ERdj5 and reveal a specific electron transfer pathway in which ERdj5 salvages electrons from ER oxidative folding.

Highlights

- Ero1 α , a major ER-resident oxidase, acts as a reductase for ERdj5
- The nascent polypeptide is the electron source for reductive reactions in the ER
- ERdj5 suppresses Ero1 α -dependent H₂O₂ production in the ER



Article

The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER

Kaiku Uegaki,¹ Yuji Tokunaga,^{2,3} Michio Inoue,^{4,5} Seiji Takashima,⁶ Kenji Inaba,^{4,5} Koh Takeuchi,^{2,3} Ryo Ushioda,^{1,4,7,9,*} and Kazuhiro Nagata^{1,4,7,8,*}

¹Department of Molecular Biosciences, Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan

²Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo 135-0064, Japan

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

⁴Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama 332-0012, Japan

⁵Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Miyagi 980-8577, Japan

⁶Department of Medical Biochemistry, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan

⁷Institute for Protein Dynamics, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan

⁸JT Biohistory Research Hall, Murasaki Town 1-1, Takatsuki City, Osaka 569-1125, Japan

⁹Lead contact

*Correspondence: ryo3ussy3@cc.kyoto-su.ac.jp (R.U.), nagata@cc.kyoto-su.ac.jp (K.N.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112742>

SUMMARY

The endoplasmic reticulum (ER) maintains an oxidative redox environment that is advantageous for the oxidative folding of nascent polypeptides entering the ER. Reductive reactions within the ER are also crucial for maintaining ER homeostasis. However, the mechanism by which electrons are supplied for the reductase activity within the ER remains unknown. Here, we identify ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α) as an electron donor for ERdj5, an ER-resident disulfide reductase. During oxidative folding, Ero1 α catalyzes disulfide formation in nascent polypeptides through protein disulfide isomerase (PDI) and then transfers the electrons to molecular oxygen via flavin adenine dinucleotide (FAD), ultimately yielding hydrogen peroxide (H₂O₂). Besides this canonical electron pathway, we reveal that ERdj5 accepts electrons from specific cysteine pairs in Ero1 α , demonstrating that the oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER. Moreover, this electron transfer pathway also contributes to maintaining ER homeostasis by reducing H₂O₂ production in the ER.

INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) is the site of secretory and membrane protein folding in eukaryotic cells.^{1,2} Disulfide bond formation in nascent polypeptides entering the ER is crucial for the maintenance of the correct protein structure. This disulfide bond formation is mainly catalyzed by several ER-resident oxidoreductases, including protein disulfide isomerase (PDI) and ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α), which constitute an electron cascade for efficient oxidative folding.^{3,4} The ratio of oxidized glutathione to total glutathione in the ER is higher than that in the cytosol,^{5,6} which maintains the oxidative environment in the ER.

Despite the oxidative environment, we identified ERdj5 as a disulfide reductase in the ER of mammalian cells.⁷ This enzyme is involved not only in the degradation of misfolded proteins in the ER-associated degradation (ERAD) pathway but also in the protein folding of specific substrates.⁸ ERdj5 also regulates the activity of SERCA2b, a calcium influx pump on the ER membrane, to maintain the balance of calcium concentrations in the ER.⁹

Although ERdj5 is critical for maintaining protein and calcium homeostasis in the ER as a disulfide reductase, how ERdj5 acquires reductive force in the oxidative environment of the ER remains unknown.

In the bacterial periplasm, reductive force is provided by two major pathways.^{10–12} One is the DsbC/DsbD pathway.^{13,14} DsbC in the periplasm receives electrons from cytosolic thioredoxin (Trx) through DsbD on the cytoplasmic membrane. DsbC utilizes these electrons for the reduction or isomerization of substrates.^{15,16} The other is the CydDC complex on the cytoplasmic membrane, an ATP-binding cassette (ABC) transporter for reduced glutathione (GSH).¹⁷ The CydDC complex transports GSH into the periplasm using energy from ATP hydrolysis. The transported GSH acts as the electron donor for isomerization of the substrates. In contrast, the electron transfer pathway into the ER lumen in eukaryotic cells has never been identified.

Here, we propose a pathway for supplying electrons into the ER lumen by utilizing electrons produced during the oxidative folding of nascent polypeptides entering the ER. In this process,



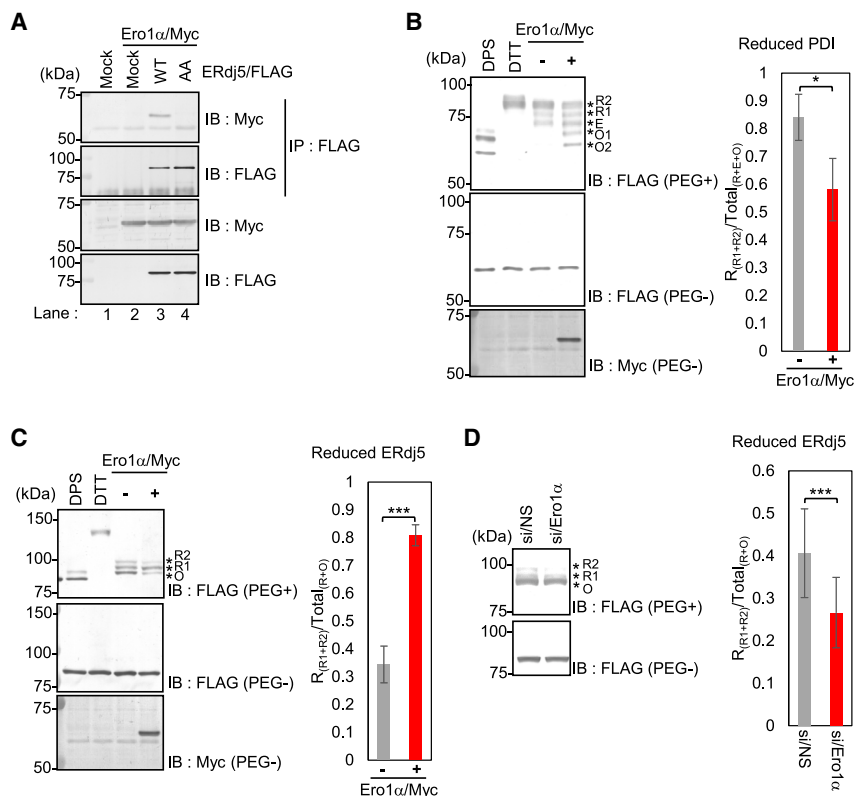


Figure 1. Ero1 α acts as the reductase for ERdj5

(A) 24 h after the cotransfection of Myc-tagged Ero1 α and FLAG-tagged ERdj5s into HEK293T cells, cell lysates were prepared for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody. The immunoprecipitates were subjected to reducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The transfection of empty vector is indicated by “mock.”

(B and C) Measurement of PDI and ERdj5 redox states using the polyethylene glycol (PEG)-shift assay. After the cotransfection of Myc-tagged Ero1 α and FLAG-tagged PDI (B) or FLAG-tagged ERdj5 (C) into HEK293T cells, the cells were incubated in the presence or absence of 1 mM dipyrindyl disulfide (DPS) or 10 mM dithiothreitol (DTT) for 5 min. After trichloroacetic acid (TCA) treatment, the free protein thiols were modified with 2K-PEG-maleimide. The samples were subjected to reducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The reduced or oxidized forms of each redox protein are indicated by “R” or “O,” respectively. A redox equilibrium state is indicated by “E.”

(D) After the transfection of nonspecific siRNA (si/NS) or specific siRNA against Ero1 α (si/Ero1 α) into HEK293T cells overexpressing ERdj5-FLAG, ERdj5 redox states were observed by the same procedure described in (B) and (C).

(B–D) The ratio of each band of the reduced form to the total protein amount was quantified by ImageJ. The means \pm SDs are shown (n = 3, B; n = 4, C; n = 4, D). *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

electrons provided to PDI from nascent polypeptides are transferred to ERdj5 through Ero1 α for subsequent reductive reactions in the ER.

RESULTS

Ero1 α is an electron donor for ERdj5

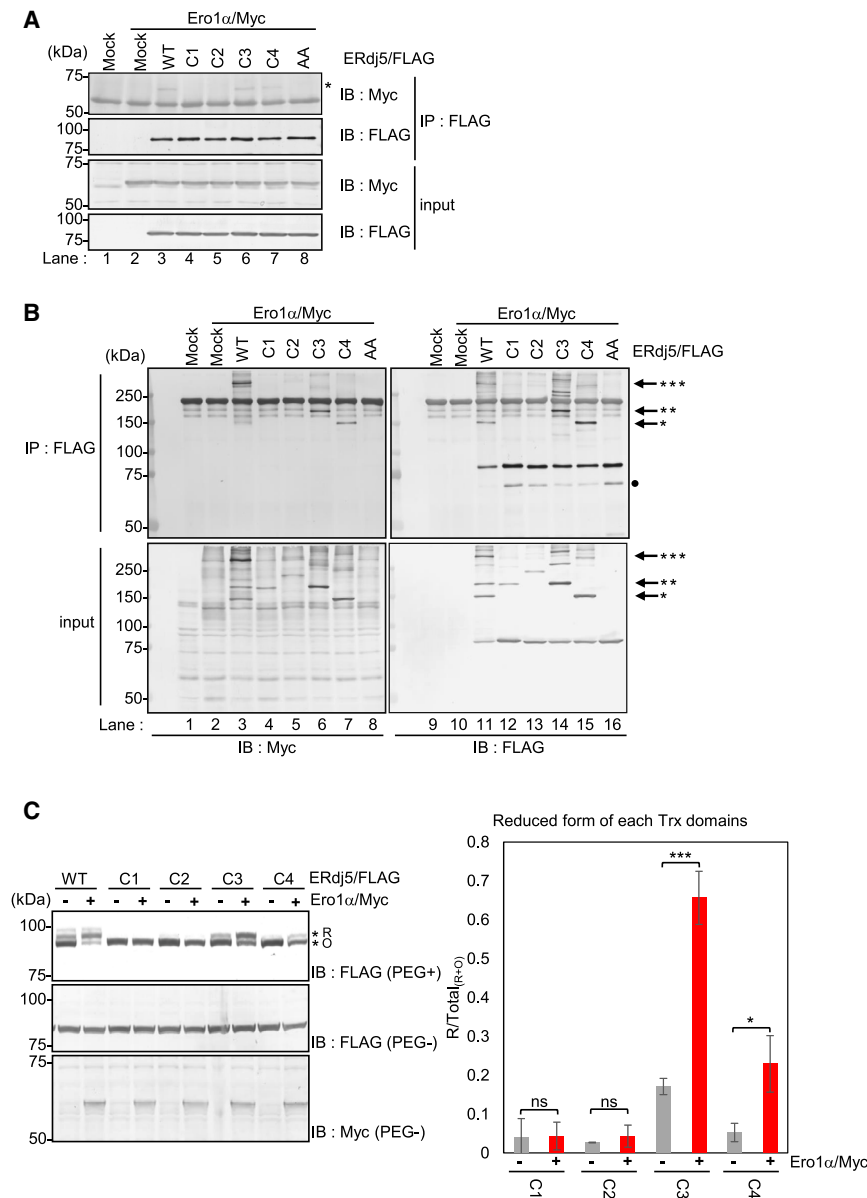
First, we tried to identify upstream molecules of ERdj5 that can provide electrons to ERdj5. As two Trx-like domains (Trx3 and Trx4) in the C-terminal cluster (C-cluster) of ERdj5 were reported to have disulfide reductase activity (Figure S1A),¹⁸ molecules that bind specifically to the Trx3 and Trx4 domains through intermolecular disulfide bonds were explored using the bifunctional electrophile divinyl sulfone (DVSF), a thiol-specific cross-linker.¹⁹ We identified molecules that interact with FLAG-tagged ERdj5/C3 and ERdj5/C4 mutants in which the catalytic center motifs (Cys-X-X-Cys [CXXC]) in only the Trx3 and Trx4 domains, respectively, were retained, whereas the remaining three CXXC motifs were substituted with AXXA (Figure S1A). Immunoprecipitation combined with mass spectrometry analysis revealed that in addition to several ER-resident oxidoreductases (Figures S1B and S1C), the ER-resident oxidase Ero1 α could interact with ERdj5/wild type (WT) and the ERdj5/C3 and ERdj5/C4 mutants but not the ERdj5/AA mutant (red arrows in Figure S1B). This interaction was also confirmed under coexpression of each protein (Figure 1A, lanes 3 and 4). Even in the absence of DVSF, we observed the binding of Ero1 α to ERdj5 at physiological expres-

sion levels; however, this binding was not detected in the ERdj5/AA mutant (Figure S1D, lanes 3 to 8), indicating that endogenous Ero1 α interacts with the CXXC motif(s) in ERdj5.

We then observed the effect of Ero1 α on the redox state of ERdj5. As previously reported, PDI and other PDI family proteins (ERp57, P5, ERp46, and PDIR) were oxidized by the overexpression of Ero1 α (Figures 1B and S2B–S2E),³ as detected by the modification of free thiol groups with 2K-polyethylene glycol (PEG)-maleimide (Figure S2A). In contrast, we found that ERdj5 was reduced by Ero1 α overexpression (Figure 1C). It is worth noting that our previous study showed that the redox state in the ER is not altered by the overexpression of Ero1 α .²⁰ Thus, these results suggest that Ero1 α specifically reduces the CXXC motif(s) in ERdj5 independently of the change in ER redox states under Ero1 α overexpression. Next, we treated cells with small interfering RNA (siRNA) against Ero1 α to determine whether endogenous Ero1 α is involved in the reduction in ERdj5 in the ER (Figure S2F). ERdj5 was present in a predominantly oxidative state in the ER due to its redox potential. However, Ero1 α knock-down caused a slight but evident shift of the ERdj5 redox state to its oxidized form (Figure 1D). These results suggest that Ero1 α serves as the reductase for ERdj5.

Active motifs in the Trx3 and Trx4 domains of ERdj5 accept electrons from Ero1 α

We then determined which CXXC motifs in ERdj5 are responsible for its binding to Ero1 α using ERdj5 C1–C4 mutants in which only



one CXXC motif among the four was intact, whereas the remaining three CXXC motifs were replaced with AXXA (Figure S1A). Ero1 α preferentially bound the C3 and C4 mutants (Figure 2A, lanes 6 and 7). Under nonreducing conditions, mixed disulfide complex formation between ERdj5/WT and Ero1 α was predominantly observed at over 250 kDa (Figure 2B, lanes 3 and 11). In contrast, Ero1 α formed mixed disulfide complexes with ERdj5/C3 and -C4 mutants, the sizes of which were approximately 200 (Figure 2B, lanes 6 and 14) and 150 kDa (Figure 2B, lanes 7 and 15), respectively, and these findings suggest that the two molecules of Ero1 α can bind to one molecule of ERdj5 (Figure S3C). We then analyzed the interaction between Ero1 α and ERdj5/C3/SS or C4/SS mutants in which the CXXC motif in only the Trx3 and Trx4 domains, respectively, was replaced with SXXS (Figure S3A). The molecular sizes of mixed disulfide

Figure 2. Ero1 α transfers electrons to the active motifs in the Trx3 and Trx4 domains of ERdj5

(A and B) Cell lysates were prepared for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody as described in Figure 1A. The immunoprecipitants were subjected to reducing (A) or nonreducing (B) SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies.

(A) The asterisk indicates immunoprecipitates of Myc-tagged Ero1 α that bound to ERdj5/WT, ERdj5/C3 mutant, or ERdj5/C4 mutant.

(B) The single, double, or triple asterisks denote the mixed disulfide complex between Ero1 α and the ERdj5/C4 mutant, ERdj5/C3 mutant, or ERdj5/WT, respectively. The transfection of empty vector is indicated by “mock.” The lower band shown as a black circle is the product of ERdj5 degradation. (C) The redox states of ERdj5s (WT or the indicated mutants) were observed using 2K-PEG-maleimide. These samples were prepared as described in Figures 1B and 1C. The ratio of each band of the reduced form to the total protein amount was quantified using ImageJ. The means \pm SDs are shown ($n > 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

complexes of Ero1 α with C3/SS and C4/SS mutants were observed to be approximately 150 (Figure S3B, lanes 4 and 10) and 200 kDa (Figure S3B, lanes 5 and 11), respectively. This result was consistent with the data shown in Figure 2B, which again suggested that ERdj5 binds to the two molecules of Ero1 α through the Trx3 and Trx4 domains (Figure S3C).

The reduction of each Trx domain of ERdj5 was more directly shown by PEG-maleimide analysis, as shown in Figure 2C. Although the Trx1 and Trx2 domains were not reduced by Ero1 α , the active motifs in the Trx3 and Trx4 domains of ERdj5 were specifically reduced by Ero1 α overexpression, and the reduction

in the Trx3 domain was higher than that in the Trx4 domain (Figure 2C). Taken together, these results suggest that Ero1 α transfers electrons to the active motifs of ERdj5 (the Trx3 and Trx4 domains), which provides reductive power to ERdj5 for various reductive reactions in the ER, an oxidative organelle.^{7,9,18,21}

C85-C391 pair in Ero1 α is required for electron transfer to ERdj5

To identify which cysteine pairs in Ero1 α are involved in electron transfer to ERdj5, we constructed Ero1 α cysteine mutants and examined mixed disulfide complex formation with ERdj5 under nonreducing SDS-PAGE (Figures 3A, S4A, and S4B). The mixed disulfide complex formation of ERdj5 with the Ero1 α mutants was only eliminated when cysteine residues in the C85-C391 pair were mutated to alanine residues

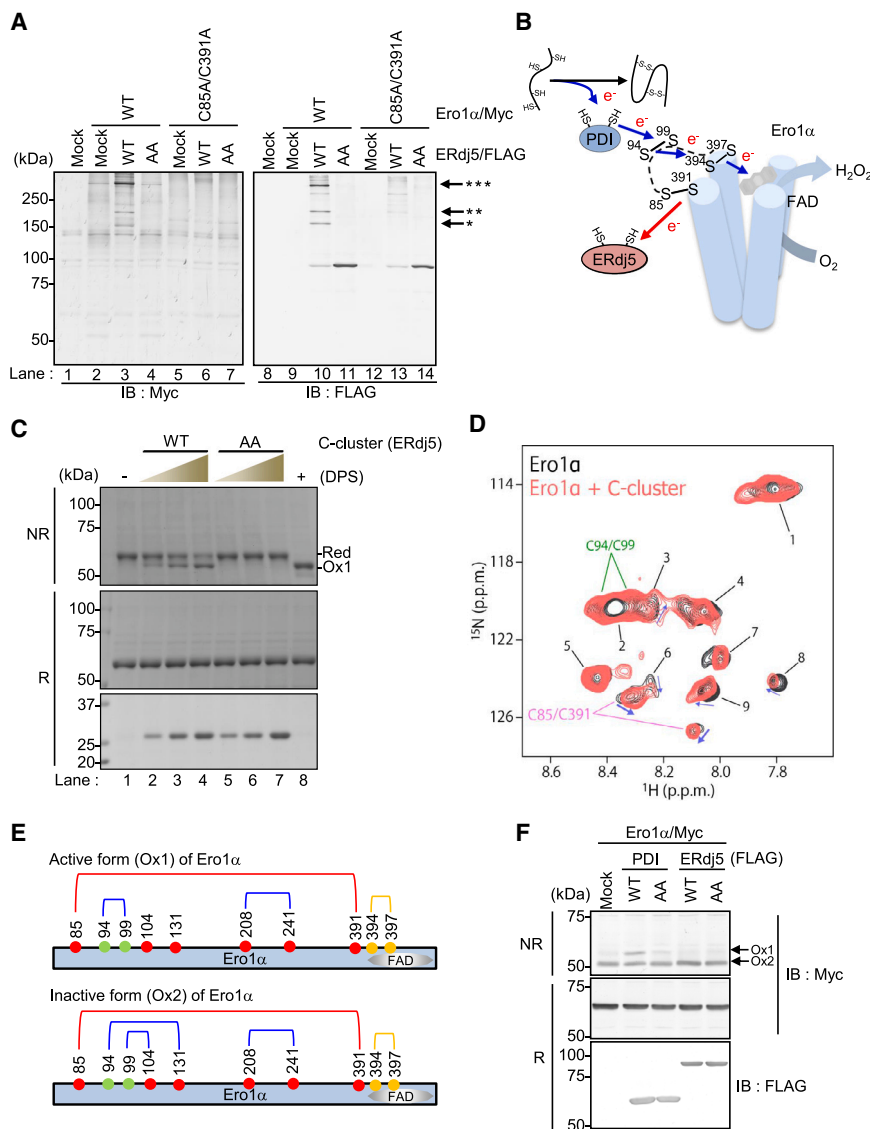


Figure 3. ERdj5 receives electrons from the C85-C391 pair in Ero1 α

(A) After the cotransfection of Myc-tagged Ero1 α (WT or C85-C391 mutants) and FLAG-tagged ERdj5s (WT or AA mutant) into HEK293T cells, cell lysates were subjected to nonreducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The transfection of empty vector is indicated by “mock.”

(B) Model of electron transfer from the nascent chain to ERdj5 through PDI and Ero1 α . After the oxidative folding of a nascent chain by PDI, reduced PDI releases an electron to the disulfide bridge formed by the C94-C99 pair (S⁹⁴-S⁹⁹) on the shuttle loop of Ero1 α . Then, Ero1 α transfers the electron to the disulfide bridge formed by the C394-C397 pair (S³⁹⁴-S³⁹⁷) and produces H₂O₂ by FAD binding to Ero1 α in the canonical electron pathway in Ero1 α . In contrast, ERdj5 can hijack the electron from the C85-C391 pair (S⁸⁵-S³⁹¹) in Ero1 α from the canonical electron transfer pathway.

(C) Purified red form of Ero1 α was treated with (+) or without (-) 1 mM DPS or coincubated with C-cluster/WT or AA mutant for 5 min at room temperature. All final samples for reducing (R) or nonreducing (NR) SDS-PAGE were in 1 \times Laemmli buffer, after which samples were subjected to Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining.

(D) Site-resolved analysis of the molecular interactions between Ero1 α and ERdj5. The ¹H-¹⁵N Transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of [Cys-¹⁵N] Ero1 α in the presence (red) and absence (black) of the C-cluster of ERdj5 are overlaid. Resonances from the C85-C391 and C94-C99 pairs are indicated in magenta and green, respectively. Other resolved but unassigned resonances are numbered arbitrarily. The chemical shift changes induced by the addition of the C-cluster are indicated by blue arrows.

(E) Disulfide arrangement in the active and inactive forms of Ero1 α . Description of disulfide bridges in the active form (Ox1) or the inactive form (Ox2) of Ero1 α . Cysteine residues are shown as red (regulatory site), green (outer active site), or yellow

(inner active site) dots with amino acid numbering, and disulfide bonds are depicted as green (shuttle disulfide bridge), yellow (inner active disulfide bridge), blue (reported regulatory disulfide bridge), or red (novel active disulfide bridge found in this study) lines.

(F) Detection of disulfide rearrangement in Ero1 α . After the cotransfection of Myc-tagged Ero1 α and FLAG-tagged PDIs (WT or the indicated mutants) or ERdj5s (WT or the indicated mutants) into HEK293T cells, cell lysates were subjected to R or NR SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The transfection of empty vector is indicated by “mock.”

(C85A/C391A), as shown in Figure 3A (lanes 6 and 13), which clearly indicated that ERdj5 binds to the C85-C391 cysteine pair through the mixed disulfide bridge and likely acquires the electron from Ero1 α .

Next, we confirmed the direct electron transfer from Ero1 α to ERdj5 by *in vitro* analysis using purified ERdj5 and Ero1 α . A previous study reported that Ero1 α shifts to the reduced form upon mutation of the C85-C391 pair to alanine residues under nonreducing SDS-PAGE,²² indicating that the C85-C391 pair is cleaved in the reduced form of Ero1 α . Then, we purified the C104A/C131A mutant and the C85A/C104A/C131A/C391A mutant to confirm the redox state in the reduced form of Ero1 α under nonreducing SDS-PAGE (Fig-

ure S5A, lanes 5–8). While the C104A/C131A mutant was dominantly purified in the reduced form (indicated as red in the figures), this mutant shifted to the active oxidized isoform 1 (Ox1; which is shown in Figure 3E) under oxidant treatment (Figure S5A, lanes 5 and 6). On the other hand, the shift from the reduced form to the Ox1 form was not observed in the C85A/C104A/C131A/C391A mutant regardless of the treatment with DPS, an oxidant (Figure S5A, lanes 7 and 8). This result suggests that the transition from the reduced form to Ox1 depends on disulfide bond formation between C85 and C391 in Ero1 α . Using this purified reduced form of Ero1 α , we examined the effect of the C-cluster of ERdj5 on the oxidation of Ero1 α . The results showed that the

C-cluster of WT ERdj5 promoted the transition from the reduced form of Ero1 α to Ox1 in a dose-dependent manner (Figure 3C, lanes 2–4). However, this transition was not observed upon incubation with the C-cluster/AA mutant in which the CXXC motifs in the Trx3 and Trx4 domains were substituted with AXXA (Figure 3C, lanes 5–7), suggesting that ERdj5 catalyzes the disulfide bond formation of C85 and C391 in Ero1 α through its CXXC motif. From these *in vivo* and *in vitro* analyses, we concluded that ERdj5 directly accepts the electron from Ero1 α via the C85-C391 cysteine pair.

Ero1 α is reported to indirectly receive electrons produced by the formation of disulfide in nascent polypeptides entering the ER. The electrons generated by disulfide formation are initially transferred to PDI and then to the C94-C99 pair in Ero1 α by direct binding with PDI (Figure 3B). From the C94-C99 pair, electrons are then transferred to the C394-C397 pair and FAD before their final transfer to molecular oxygen to produce hydrogen peroxide (H₂O₂) (Figure 3B). The redox potential of the C94-C99 cysteine pair in the shuttle loop of Ero1 α has not been determined, but this potential is assumed to be higher than that of PDI (approximately –165 mV), allowing electron transfer from PDI to Ero1 α (Figure S5B).²³ However, the redox potentials of the CXXC motifs in the Trx3 (–172 mV) and Trx4 (–185 mV) domains of ERdj5 were estimated to be lower than that of the C94-C99 cysteine pair,¹⁸ which indicated that electrons could not be transferred from the C94-C99 cysteine pair in Ero1 α (Figure S5B). This result is consistent with the finding that the C94-C99 pair of Ero1 α is not essential for disulfide complex formation with ERdj5 (Figure S4A, lanes 6 and 19). However, a previous study showed that the redox potential of the C85-C391 cysteine pair in Ero1 α was –275 mV.²⁴ This finding implies that once the C85-C391 cysteine pair receives electrons, these electrons can be efficiently transferred to the CXXC motif in the Trx3 or Trx4 domain of ERdj5 due to the much lower redox potential of the C85-C391 pair. As expected, mutation of the C85-C391 pair (C85A/C391A) in Ero1 α decreased the reduction of ERdj5 compared with that observed with WT Ero1 α (Figure S5C).

To confirm the direct contact of ERdj5 with the C85-C391 pair of Ero1 α , we examined the structural interaction between Ero1 α and the C-cluster domain of ERdj5 by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. For this purpose, ¹H-¹⁵N correlation spectra of the ¹⁵N cysteine-labeled, constitutively active C104A/C131A mutant of Ero1 α were measured (Figure 3D).^{4,25} Furthermore, we used an oxidized form of each recombinant protein to analyze the effect of ERdj5 binding on the structural position of cysteine pairs in Ero1 α in this experiment. Backbone amide resonances originating from the C85-C391 and C94-C99 pairs were identified by mutational analyses (Figure S6). When one molar equivalent of the C-cluster of ERdj5 was added to Ero1 α , the resonances of the C85-C391 pair, but not those of the C94-C99 pair, exhibited significant chemical shift changes. This finding strongly suggests that the C-cluster of ERdj5 is in close proximity to the C85-C391 pair of Ero1 α . Other resonances, #3, #6, #8, and #9, also showed chemical shift perturbations upon addition of the C-cluster. Although we do not have assignments of these resonances,

these changes may reflect the presence of additional contact sites between the C-cluster of ERdj5 and Ero1 α or the long-range structural changes induced to Ero1 α upon binding to the C-cluster.

Although the redox potential of ERdj5 is lower than that of the C94-C99 cysteine pair in Ero1 α , electrons were not transferred from ERdj5 to Ero1 α , as shown in Figure S5B. The inactive form of Ero1 α exists as Ox2, in which C94 forms a disulfide bond with C131 and C99 forms a disulfide bond with C104 (Figure 3E). Before the transfer of electrons from PDI, Ero1 α is converted to active Ox1, in which a disulfide bond is formed between C94 and C99; this cysteine pair receives electrons from PDI. These disulfide rearrangements of intramolecular disulfide bonds between Ox1 and Ox2 of Ero1 α have been determined in previous studies.^{22,26} When WT PDI was overexpressed, the Ox1 form of Ero1 α was observed, whereas the inactive form of PDI (AA mutant) did not convert Ox2 to Ox1 (Figure 3F). In contrast, the Ox1 form of Ero1 α was not observed following the overexpression of either WT or mutant (AA mutant) ERdj5, suggesting that electrons were not transferred from ERdj5 to Ero1 α . These data are also consistent with results showing that the binding of ERdj5 to Ero1 α affects the dynamics of the C85-C391 pair in Ero1 α but not that of the C94-C99 pair in the NMR analysis (Figure 3D).

A conformational change in ERdj5 allows electron transfer from Ero1 α

The electron transfer from Ero1 α to the C3 and/or C4 domains of ERdj5 was further examined based on the molecular structure. Because the molecular structures of Ero1 α and ERdj5 were available,^{18,25} we performed a docking simulation using an available algorithm.^{27,28} As shown in Figure 4A, Ero1 α C85 is separated from C588 at the redox-active site of ERdj5 Trx3 by a distance of only 6.5 Å, which likely allows efficient electron transfer from the Ero1 α C85-C391 pair to ERdj5 Trx3. However, this complex model hardly explains how electrons can also be transferred to the CXXC motif of ERdj5 Trx4. Recently, a structural analysis using X-ray crystallography revealed that ERdj5 can adopt another conformation (form II) in which the C-cluster is rotated by 110° relative to that of the original structure (form I) (Figure 4B).²⁹ While form I is dominant, forms I and II of ERdj5 are interconvertible by a conformational change via a flexible loop region between the N- and C-clusters. A docking simulation employing the crystal structure of form II provided another solution for the Ero1 α -ERdj5 complex, in which C85 of Ero1 α was located 11.4 Å from C700 at the redox-active site of ERdj5 Trx4 (Figure 4C), suggesting efficient electron transfer from the Ero1 α C85-C391 pair to ERdj5 Trx4.

These two pathways of electron transfer were verified by the production of two ERdj5 mutants, the S557P and G103C/W587C ERdj5 protein mutants, which were fixed in forms I and II, respectively (Figure 4D).²⁹ As shown in Figure 4E, Ero1 α reduced both form I and II ERdj5. However, Ero1 α did not reduce the form I ERdj5 mutant (S557P) with an inactive CXXC motif (AXXA) in its Trx3 domain (C3AA) or the form II ERdj5 mutant (G103C/W587C) with an inactive CXXC motif in its Trx4 domain (C4AA) (Figures 4D and 4F). These results clearly suggested

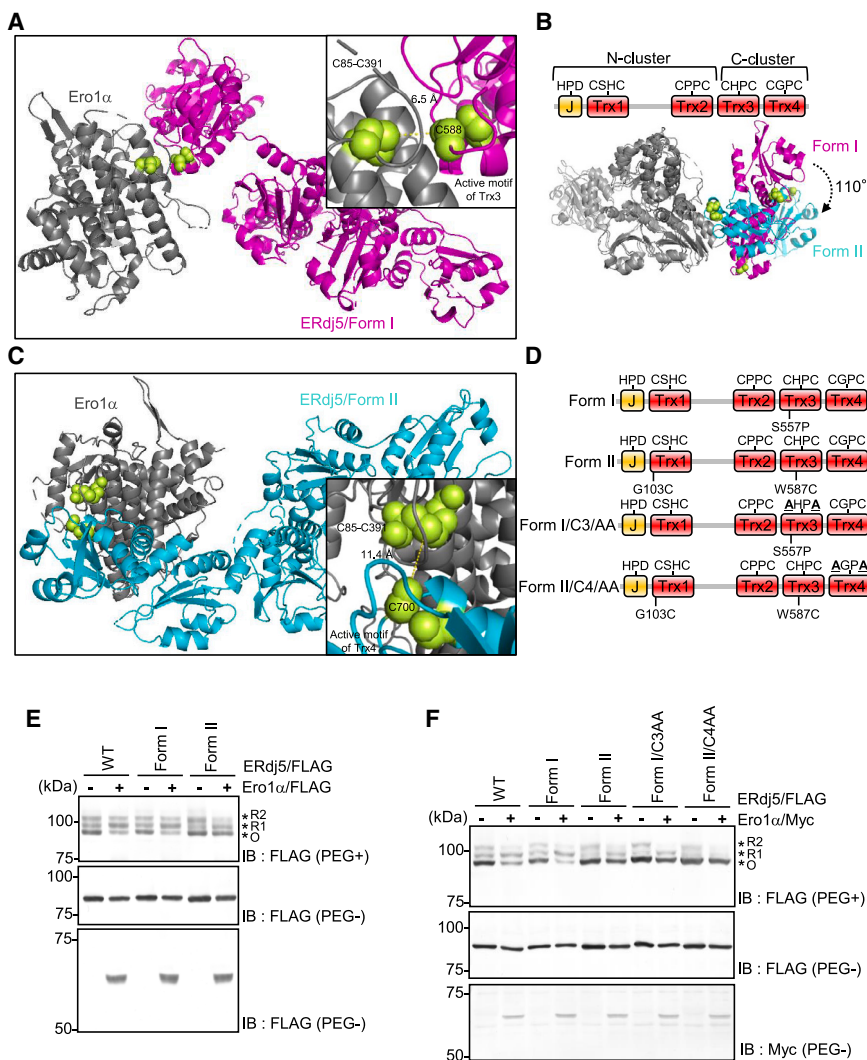


Figure 4. A conformational change in ERdj5 allows electron transfer from Ero1 α

(A and C) Docking simulation of the complex between Ero1 α (gray) and form I (magenta) (A) or form II (cyan) (C) ERdj5. Magnified pictures show the distance between the active site of ERdj5 and the C85-C391 pair in Ero1 α .

(B) Structural differences between forms I and II of ERdj5. The C-cluster is composed of the Trx3 and Trx4 domains, which have reductase activity. The C-cluster in form II is rotated by approximately 110° with respect to the same cluster in form I.

(D) The series of ERdj5 mutants constructed in this work.

(E and F) The redox states of ERdj5/S557P and G103C/W587C were observed using 2K-PEG-maleimide. These samples were prepared as described in Figures 1B and 1C.

than that without PDI (Figure 5A, blue and black line). However, oxygen consumption by Ero1 α and PDI was significantly reduced in the presence of C-cluster/WT but not in the presence of the AA mutant (Figure 5A, red line and green line). This suggests that ERdj5 hijacks electrons from the canonical electron transfer pathway. Next, the ER-localized H₂O₂ indicator ER-HyPer was used to investigate the effect of this electron transfer pathway on H₂O₂ production in the ER in living cells.³² First, as a control experiment, we examined the binding between ERdj5 and ER-HyPer to confirm whether ERdj5 reduces ER-HyPer as a substrate. Even the substrate-trapping ERdj5/CA mutant could not bind to ER-HyPer, confirming that ERdj5 does

that Ero1 α reduced the CXXC motif of the Trx3 domain in form I ERdj5 and that of the Trx4 domain in form II ERdj5 after form II of ERdj5 emerged following a conformational change.

The nascent chain provides electrons for reductive reactions in the ER

When PDI receives electrons from nascent polypeptides, those electrons are transferred to the C94-C99 cysteine pair in Ero1 α , then to the C394-C397 cysteine pair, and finally to molecular oxygen via FAD, producing H₂O₂ (Figure 3B).^{30,31} We have revealed that some of these electrons can be transferred to ERdj5 via the C85-C391 pair of Ero1 α . If this electron pathway exists, oxygen consumption through the PDI/Ero1 α pathway should be suppressed by the presence of ERdj5. To demonstrate this pathway, we measured the oxygen consumption of Ero1 α by an *in vitro* reconstituted system using purified recombinant ERdj5/C-cluster, PDI, and Ero1 α . In the presence of excess reduced PDI, oxygen consumption by constitutively active Ero1 α (C104A/C131A) was much faster

not directly affect the redox of ER-HyPer (Figure S7A). Live imaging of ER-HyPer showed that Ero1 α knockdown almost completely prevented the production of H₂O₂ after washing out 2 mM dithiothreitol (DTT) (Figure 5B, blue line). In contrast, ERdj5 knockdown promoted the production of H₂O₂ (Figure 5B, red line). These findings suggest that ERdj5 salvages the electrons consumed to produce H₂O₂ in the canonical electron transfer pathway. Next, we addressed the most important and interesting question about ERdj5: do nascent polypeptides actually supply electrons to ERdj5? If this is true, then translational inhibition should shift ERdj5 to a more oxidative state. This was the case. The redox state of endogenous ERdj5 gradually shifted to an oxidized state after treatment with cycloheximide (CHX), an inhibitor of translation (Figure 5C). Previously, it was shown that long-term treatment with CHX does not affect the balance between oxidized and reduced GSH in the ER.³³ Thus, the change in the redox state of ERdj5 induced by CHX treatment is not due to the perturbation of ER redox conditions. From these findings, we

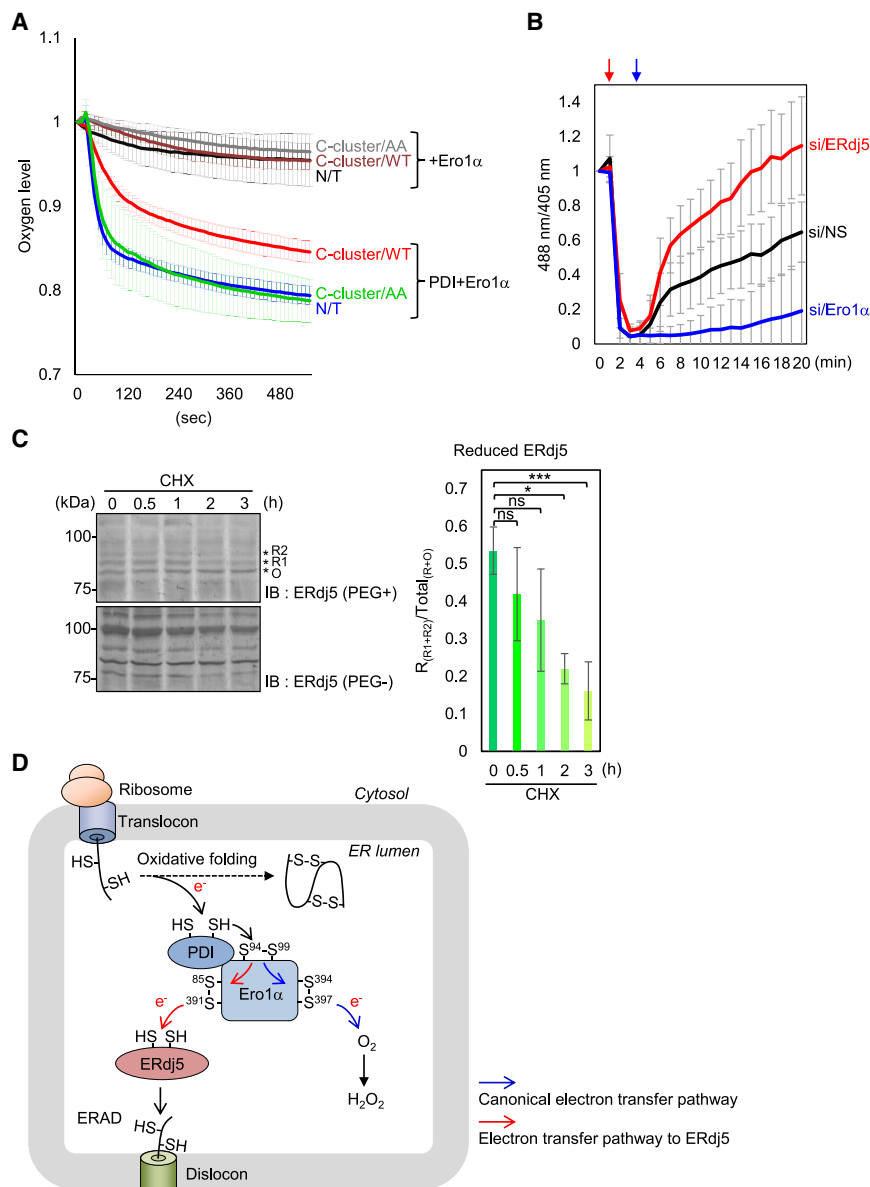


Figure 5. ERdj5 hijacks electrons produced from oxidative folding of PDI/Ero1 α

(A) Oxygen consumption by Ero1 α *in vitro*. Oxygen consumption assays were conducted in air-saturated buffer, which was designated 100% oxygen (~250 μ M oxygen). These assays were initiated by the injection of reduced recombinant PDI. Oxygen consumption during the incubation was monitored with an oxygen electrode. The means \pm SDs are shown (n = 3).

(B) The H₂O₂ concentration in the ER was measured with ER-HyPer, an ER-localized H₂O₂ indicator. The lines indicate a change in the ER H₂O₂ concentration in HeLa cells transfected with NS (black) or specific siRNA against ERdj5 (red) or Ero1 α (blue). The means \pm SDs are shown (n > 14). The timing of DTT treatment is indicated by the red arrow. The removal of DTT is indicated by the blue arrow.

(C) The redox states of endogenous ERdj5 under treatment with 50 μ g cycloheximide (CHX), an inhibitor of translation. The samples were prepared for the PEG-switch assay as described in Figures 1B and 1C. The left graph shows the quantification of reduced endogenous ERdj5 by ImageJ. The means \pm SDs are shown (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

(D) In the canonical oxidative folding pathway in the ER, reduced PDIs from nascent chains are oxidized by Ero1 α . Ero1 α releases electrons to molecular oxygen through FAD, producing H₂O₂ (black and blue arrow lines). Most electrons from the pathway of oxidative folding by PDI-Ero1 α are diverted to the production of H₂O₂, and some of those electrons are utilized to produce reductive force in ERdj5 (red arrow line). In fact, Ero1 α specifically binds the active sites of the Trx3 and Trx4 domains in ERdj5. ERdj5 is reduced by only Ero1 α and inhibits the oxygen consumption of Ero1 α , which implies that ERdj5 hijacks electrons from the canonical pathway of oxidative folding by PDI-Ero1 α .

concluded that nascent polypeptides supply electrons to the ER for reductive reactions (Figure 5D).

Electrons derived from oxidative folding in the ER are utilized for reductive reactions by ERdj5

We previously reported that the reductive activity of ERdj5 is involved in the acceleration of ERAD of misfolded proteins.^{7,18} Next, the effect of electron transfer from Ero1 α to ERdj5 on ERAD was examined by transfecting a null Hong Kong (NHK) variant of α 1-antitrypsin, an ERAD substrate, into Ero1 α -deficient cells (Ero1 α /knockout [KO]) (Figure S7B), followed by the examination of NHK degradation using pulse-chase experiments (Figure 6). Although the degradation of NHK was accelerated in ERdj5-overexpressing cells compared with WT cells (Figure 6A, black line and red line), its degradation was slightly repressed in

Ero1 α /KO cells (Figure 6A, orange line), which suggested that endogenous Ero1 α is involved in ERAD. Notably, the acceleration of NHK degradation by ERdj5 was clearly inhibited in Ero1 α /KO cells (Figure 6A, red line and blue line). Furthermore, to directly assess the acceleration of NHK degradation mediated by disulfide reduction of ERdj5, we observed the dimer species of NHK (NHK/dimer) under nonreducing SDS-PAGE (Figure 6B). NHK/dimer decreased more rapidly in ERdj5-overexpressing cells than in WT cells (Figure 6B, black line and red line). While the decreases in NHK/dimer in Ero1 α /KO cells were slightly slower than those in WT cells (Figure 6B, orange line and black line), the decrease in NHK/dimer depending on ERdj5-mediated disulfide reduction was obviously suppressed in Ero1 α /KO cells (Figure 6B, red line and blue line). These findings support the conclusion that electrons from nascent polypeptides are transferred to ERdj5 via Ero1 α and then utilized for reductive reactions by ERdj5, resulting in the acceleration of ERAD in the ER.

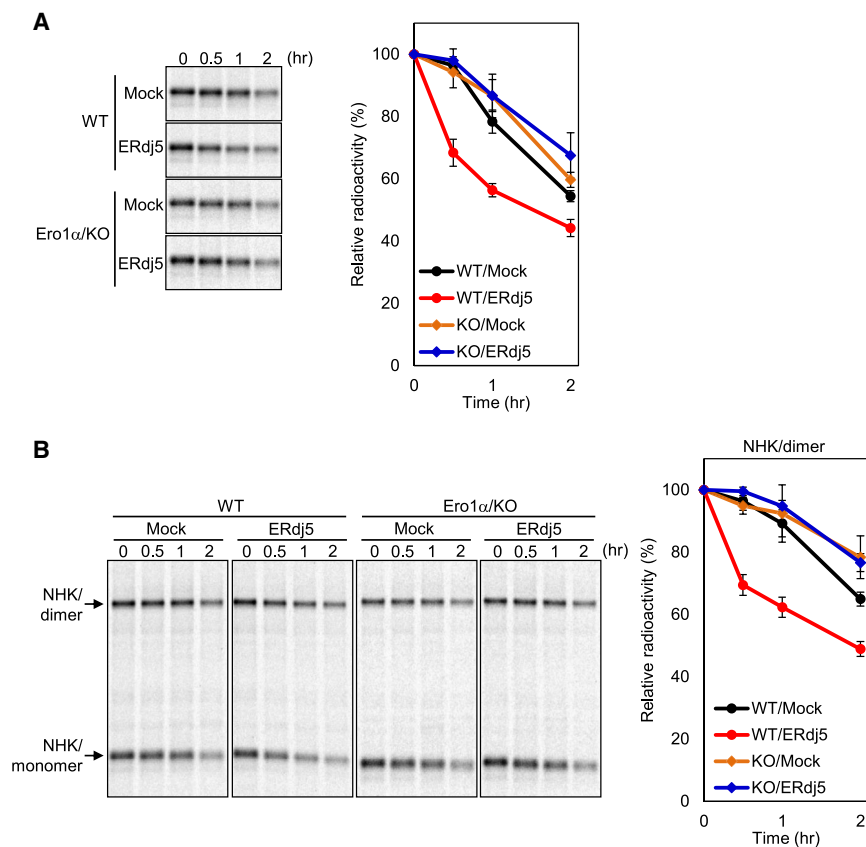


Figure 6. Electrons produced from oxidative folding in the ER are salvaged by ERdj5

24 h after transfection, HEK293T cells were labeled for 15 min with [³⁵S] methionine-cysteine (the transfection protocol is described in Figure S7B) and chased for the indicated periods. The metabolically labeled NHKs were immunoprecipitated with an α 1-antitrypsin-specific antibody and subjected to R (A) or NR (B) SDS-PAGE. The means \pm SDs are shown (n = 3, A; n = 3, B). The transfection of empty vector is indicated by "mock."

transfer into the ER by the Ero1 α /ERdj5 pathway proposed here might be much higher than that by GSH translocation across the ER membrane because one nascent polypeptide chain contains multiple disulfide bonds.

In Figure 4, the results from docking simulation and biochemical analysis indicate that the target CXXC motifs of electron transfer from Ero1 α differ between forms I and II of ERdj5. Previously, it was reported that this dynamic conformational change between forms I and II is involved in the efficient reduction of unfolded substrates in the ER.²⁹ According to our results, Ero1 α recognizes the respective structure of ERdj5 and efficiently transfers electrons to the active motifs in the Trx3 and Trx4 domains of ERdj5. However, it remains to be elucidated why two active motifs are required for efficient substrate reduction.

In Figure 3C, we clearly show that ERdj5 accepts the electron from the C85-C391 pair of Ero1 α using purified recombinant proteins. Furthermore, NMR interaction analysis and immunoprecipitation analysis revealed that ERdj5 preferentially binds to the C85-C391 pair of Ero1 α but not to the C94-C99 pair. We may argue that a conformational change in the C85-C391 pair induced by the binding of ERdj5 observed in the NMR interaction analysis could allow the C94-C99 residues in the flexible shuttle loop to access the C85-C391 pair, which is otherwise buried in the interior structure. Such an on-demand electron-transfer mechanism may be advantageous for the transfer of electrons to the noncanonical C85-C391 pair only when ERdj5 binds to Ero1 α and does not interfere with the canonical electron transfer to the C394-C397 pair when ERdj5 is not bound. However, the detailed mechanism by which the canonical electron transfer pathway (Figure 3, blue arrow) is switched to the pathway to ERdj5 via C85-C391 (Figure 3, red arrow) remains to be addressed in the future. In a previous study, it was observed that the C85-C391 pair in Ero1 α is reduced under hypoxic conditions.³⁹ This result indicates the possibility that molecular oxygen determines the electron transfer pathway in Ero1 α . In other words, the reaction efficiency of Ero1 α with molecular oxygen may control the cleavage of the C85-C391 pair to reduce ERdj5. In Figure 3D, we observed that ERdj5 binding induces a

DISCUSSION

Three paradigms for redox regulation in the ER are elucidated in our conclusion described above (Figure 5D). First, Ero1 α , a representative and hub oxidase in the ER redox network, can also act as a reductase for a specific substrate, ERdj5. Second, electrons previously thought to be automatically consumed to produce H₂O₂ through the canonical electron transfer pathway including PDI and Ero1 α can be salvaged and used for reductive reactions in the ER.

Third and most importantly, nascent polypeptides entering the ER can serve as electron donors to provide reductive force to the oxidative ER. In the periplasm of *Escherichia coli*, electrons are transferred from Trx, a typical reductase in the cytosol, to DsbD on the periplasmic membrane and used as an electron source for DsbC, a luminal reductase in the periplasm.^{34,35} In mammalian cells, however, no factors that, like DsbD, mediate electron transfer to luminal proteins in the ER have yet been identified.^{36,37}

The mechanism through which the ER acquires reductive force is currently unknown, except one recent report has shown that small reductive molecules, such as GSH, are transported through translocons on the ER membrane.³⁸ Specific transporters for small reductive molecules, such as GSH and NADPH, have not been reported. When one molecule of GSH is transported by this unidentified transporter, two electrons are introduced into the ER. In contrast, the efficiency of electron

conformational change in Ero1 α . From this observation and a previous report, we assume that the conformational change of Ero1 α by ERdj5 binding might affect its reaction with molecular oxygen, resulting in a change in the electron transfer pathway of Ero1 α .

Figures 5A and 5B demonstrate that some electrons for the production of hydrogen peroxide are salvaged by ERdj5 and become available for reductive activity. This mechanism also contributes to reducing H₂O₂ produced by Ero1 α , which may prevent the excess production of cytotoxic H₂O₂ in the ER. In Figure 6, we show that ERAD enhancement by ERdj5 overexpression is completely abrogated in Ero1 α -deficient cells, indicating that electron transfer by Ero1 α is sufficient to maintain the reductase activity of ERdj5. While GSH possibly serves as a reductant for ERdj5, the previous study reported that the depletion of ER luminal GSH has no effect on ERAD.⁴⁰ Based on these observations, we concluded that most of the electrons supplied to ERdj5 come from oxidative folding by the PDI-Ero1 α complex rather than GSH.

We previously reported that the ERdj5-mediated reductive reaction is directly involved in ERAD and the maintenance of calcium homeostasis, and thus the importance of reductive reactions in the ER, an oxidative organelle, is gaining increasing attention. We hereby established a paradigm regarding the mechanism through which the ER acquires reducing power, which is the basis of the reductive reaction.

Limitations of the study

Our findings reveal that ERdj5, a disulfide reductase in the ER, utilizes electrons from the oxidative folding of nascent polypeptide chains via the PDI-Ero1 α complex for reductive activity. However, we could not estimate the exact number of electrons transferred from Ero1 α to ERdj5 or to O₂. We also consider that switching these electron transfer pathways in Ero1 α is driven by the conformational change triggered by binding to ERdj5. Since the electron-transfer-associated interaction between Ero1 α and ERdj5 is a rapid reaction, it was challenging to observe detailed structural changes occurring in Ero1 α . Additionally, previous studies have suggested the possibility of other electron pathways from the cytosol to the ER.³⁶ Thus, exploring the functional redundancy and contribution of these electron transfer pathways into the ER will lead to understanding the significance of the electron network in the ER.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Plasmid and siRNA

- Antibodies
- Transfection
- Cell lysis and immunoprecipitation
- PEG shift assay
- Purification of recombinant proteins
- Oxygen consumption assay
- Live imaging of ER-HyPer
- Docking simulation
- Metabolic labelling and pulse chasing
- NMR experiments

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112742>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kazutaka Araki for providing the PDI and Ero1 α plasmids, Masaki Okumura for help with the measurement of oxygen consumption curves, and Shota Wada for providing ERdj5 KO HEK293T cells. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (S; 24227009) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (to K.N.); JSPS KAKENHI grant number JP18H04002 (to K.N.); the Takeda Science Foundation (to K.N.); CREST (to K.N.); a Grant-in-Aid for Scientific Research (A; 18H03978) from JSPS (to K.I.); the Uehara Foundation (to K.I.); a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the JSPS (grant number 25840079 to R.U.); a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (18K06140) from the JSPS (to R.U.); a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (22H02622) from the JSPS (to R.U.); a Grant-in-Aid for Transformative Research Areas (A) (21H05268) from the JSPS (to R.U.); the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) (grant number JP21GM1410008 to R.U.); Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (grant numbers 15H01545 and 18H04871 to R.U. and 26116001 to K.I.); and a grant from the Research Program for CORE lab of "Five-star Alliance" in "NJRC Mater. & Dev." (to R.U.). K.U. was supported by a fellowship from JSPS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.U., R.U., and K.N. designed the research. Y.T. performed the NMR analysis. M.I. contributed to the establishment of the purification process for the ERdj5 recombinant protein. S.T. performed the mass spectrometry. K.U. and R.U. performed the research and analyzed the data. K.U., Y.T., K.T., K.I., R.U., and K.N. wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

INCLUSION AND DIVERSITY

We support inclusive, diverse, and equitable conduct of research.

Received: July 27, 2022
Revised: March 20, 2023
Accepted: June 19, 2023

REFERENCES

1. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181–191. <https://doi.org/10.1038/nrm1052>.

2. Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 836–847. <https://doi.org/10.1038/nrm954>.
3. Araki, K., Iemura, S.I., Kamiya, Y., Ron, D., Kato, K., Natsume, T., and Nagata, K. (2013). Ero1-alpha and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell Biol.* 202, 861–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303027>.
4. Araki, K., and Nagata, K. (2011). Functional *in vitro* analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *J. Biol. Chem.* 286, 32705–32712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227181>.
5. Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H.G., Odermatt, A., Dick, T.P., Meyer, A.J., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J. Cell Sci.* 126, 1604–1617. <https://doi.org/10.1242/jcs.117218>.
6. Montero, D., Tachibana, C., Rahr Winther, J., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biol.* 1, 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.10.005>.
7. Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y., and Nagata, K. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* 321, 569–572. <https://doi.org/10.1126/science.1159293>.
8. Oka, O.B.V., Pringle, M.A., Schopp, I.M., Braakman, I., and Bulleid, N.J. (2013). ERdj5 is the ER reductase that catalyzes the removal of non-native disulfides and correct folding of the LDL receptor. *Mol. Cell* 50, 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.014>.
9. Ushioda, R., Miyamoto, A., Inoue, M., Watanabe, S., Okumura, M., Maegawa, K.I., Uegaki, K., Fujii, S., Fukuda, Y., Umitsu, M., et al. (2016). Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E6055–E6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605818113>.
10. Debarbieux, L., and Beckwith, J. (1999). Electron avenue: pathways of disulfide bond formation and isomerization. *Cell* 99, 117–119. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81642-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81642-6).
11. Shepherd, M. (2015). The CydDC ABC transporter of *Escherichia coli*: new roles for a reductant efflux pump. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 908–912. <https://doi.org/10.1042/BST20150098>.
12. Holyoake, L.V., Poole, R.K., and Shepherd, M. (2015). The CydDC family of transporters and their roles in oxidase assembly and homeostasis. *Adv. Microb. Physiol.* 66, 1–53. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2015.04.002>.
13. Missiakas, D., Schwager, F., and Raina, S. (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14, 3415–3424. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07347.x>.
14. Goldstone, D., Haebel, P.W., Katzen, F., Bader, M.W., Bardwell, J.C., Beckwith, J., and Metcalf, P. (2001). DsbC activation by the N-terminal domain of DsbD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9551–9556. <https://doi.org/10.1073/pnas.171315498>.
15. Shevchik, V.E., Condemine, G., and Robert-Baudouy, J. (1994). Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J.* 13, 2007–2012. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06470.x>.
16. Missiakas, D., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1994). The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* 13, 2013–2020. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06471.x>.
17. Pittman, M.S., Robinson, H.C., and Poole, R.K. (2005). A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J. Biol. Chem.* 280, 32254–32261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503075200>.
18. Hagiwara, M., Maegawa, K.I., Suzuki, M., Ushioda, R., Araki, K., Matsumoto, Y., Hoseki, J., Nagata, K., and Inaba, K. (2011). Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol. Cell* 41, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.021>.
19. Araki, K., Ushioda, R., Kusano, H., Tanaka, R., Hatta, T., Fukui, K., Nagata, K., and Natsume, T. (2017). A crosslinker-based identification of redox relay targets. *Anal. Biochem.* 520, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.025>.
20. Kakahana, T., Araki, K., Vavassori, S., Iemura, S.I., Cortini, M., Fagioli, C., Natsume, T., Sitia, R., and Nagata, K. (2013). Dynamic regulation of Ero1 α and peroxiredoxin 4 localization in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 29586–29594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.467845>.
21. Ushioda, R., Hoseki, J., and Nagata, K. (2013). Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. *Mol. Biol. Cell* 24, 3155–3163. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0138>.
22. Hansen, H.G., Schmidt, J.D., Soltfoft, C.L., Ramming, T., Geertz-Hansen, H.M., Christensen, B., Sørensen, E.S., Juncker, A.S., Appenzeller-Herzog, C., and Ellgaard, L. (2012). Hyperactivity of the Ero1 α oxidase elicits endoplasmic reticulum stress but no broad antioxidant response. *J. Biol. Chem.* 287, 39513–39523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405050>.
23. Chambers, J.E., Tavender, T.J., Oka, O.B.V., Warwood, S., Knight, D., and Bulleid, N.J. (2010). The reduction potential of the active site disulfides of human protein disulfide isomerase limits oxidation of the enzyme by Ero1 α . *J. Biol. Chem.* 285, 29200–29207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156596>.
24. Baker, K.M., Chakravarthi, S., Langton, K.P., Sheppard, A.M., Lu, H., and Bulleid, N.J. (2008). Low reduction potential of Ero1 α regulatory disulfides ensures tight control of substrate oxidation. *EMBO J.* 27, 2988–2997. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.230>.
25. Inaba, K., Masui, S., Iida, H., Vavassori, S., Sitia, R., and Suzuki, M. (2010). Crystal structures of human Ero1 α reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *EMBO J.* 29, 3330–3343. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.222>.
26. Appenzeller-Herzog, C., Riemer, J., Christensen, B., Sørensen, E.S., and Ellgaard, L. (2008). A novel disulfide switch mechanism in Ero1 α balances ER oxidation in human cells. *EMBO J.* 27, 2977–2987. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.202>.
27. Masui, S., Vavassori, S., Fagioli, C., Sitia, R., and Inaba, K. (2011). Molecular bases of cyclic and specific disulfide interchange between human ERO1 α protein and protein-disulfide isomerase (PDI). *J. Biol. Chem.* 286, 16261–16271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231357>.
28. Kanamori, E., Murakami, Y., Tsuchiya, Y., Standley, D.M., Nakamura, H., and Kinoshita, K. (2007). Docking of protein molecular surfaces with evolutionary trace analysis. *Proteins* 69, 832–838. <https://doi.org/10.1002/prot.21737>.
29. Maegawa, K.I., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., Ushioda, R., Nagata, K., Ogura, T., and Inaba, K. (2017). The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation. *Structure* 25, 846–857.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.001>.
30. Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2002). The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10, 983–994. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00696-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00696-2).
31. Zito, E. (2015). ERO1: a protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. *Free Radic. Biol. Med.* 83, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.011>.
32. Kirstein, J., Morito, D., Kakahana, T., Sugihara, M., Minnen, A., Hipp, M.S., Nussbaum-Krammer, C., Kasturi, P., Hartl, F.U., Nagata, K., and Morimoto, R.I. (2015). Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J.* 34, 2334–2349. <https://doi.org/10.15252/emboj.201591711>.
33. Avezov, E., Cross, B.C.S., Kaminski Schierle, G.S., Winters, M., Harding, H.P., Melo, E.P., Kaminski, C.F., and Ron, D. (2013). Lifetime imaging of

- a fluorescent protein sensor reveals surprising stability of ER thiol redox. *J. Cell Biol.* 201, 337–349. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211155>.
34. Joly, J.C., and Swartz, J.R. (1997). *In vitro* and *in vivo* redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry* 36, 10067–10072. <https://doi.org/10.1021/bi9707739>.
 35. Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G., and Beckwith, J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* 179, 6602–6608. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6602-6608.1997>.
 36. Poet, G.J., Oka, O.B., van Lith, M., Cao, Z., Robinson, P.J., Pringle, M.A., Amér, E.S., and Balleid, N.J. (2017). Cytosolic thioredoxin reductase 1 is required for correct disulfide formation in the ER. *EMBO J.* 36, 693–702. <https://doi.org/10.15252/embj.201695336>.
 37. Ellgaard, L., Sevier, C.S., and Balleid, N.J. (2018). How are proteins reduced in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* 43, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.006>.
 38. Ponsero, A.J., Igarria, A., Darch, M.A., Miled, S., Outten, C.E., Winther, J.R., Palais, G., D'Autréaux, B., Delaunay-Moisan, A., and Toledano, M.B. (2017). Endoplasmic reticulum transport of glutathione by Sec61 is regulated by Ero1 and Bip. *Mol. Cell* 67, 962–973.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.012>.
 39. Koritzinsky, M., Levitin, F., van den Beucken, T., Rumantir, R.A., Harding, N.J., Chu, K.C., Boutros, P.C., Braakman, I., and Wouters, B.G. (2013). Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *J. Cell Biol.* 203, 615–627. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307185>.
 40. Tsunoda, S., Avezov, E., Zyryanova, A., Konno, T., Mendes-Silva, L., Pinho Melo, E., Harding, H.P., and Ron, D. (2014). Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *Elife* 3, e03421. <https://doi.org/10.7554/eLife.03421>.
 41. Labun, K., Montague, T.G., Krause, M., Torres Cleuren, Y.N., Tjeldnes, H., and Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 47, W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>.
 42. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
 43. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12366–12371. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12366>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-Ero1 Antibody, clone 2G4/12	Millipore	Cat# MABT376; RRID: AB_2941031
Anti-Myc-tag pAb	MBL	Cat# 562; RRID: AB_591105
DNAJC10 monoclonal antibody (M01), clone 3C4	Abnova	Cat# H00054431-M01; RRID: AB_534841
Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha-1-Antitrypsin	Agilent	Cat# A001202; RRID: AB_578469
Anti GFP	ChromoTek	Cat# PABG1-20; RRID: AB_2749857
Antibody for the detection of FLAG TM conjugated proteins	ROCKLAND TM	Cat# 600-401-383; RRID: AB_219374
Monoclonal ANTI-FLAG [®] M2 antibody produced in mouse (F1804)	Sigma-Aldrich	Cat# F1804; RRID: AB_262044
Monoclonal ANTI-FLAG [®] M2 antibody produced in mouse (F3165)	Sigma-Aldrich	Cat# F3165; RRID: AB_259529
Alkaline Phosphatase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat# 115-055-146; RRID: AB_2338538
Alkaline Phosphatase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat# 111-055-144; RRID: AB_2337953
Bacterial and viral strains		
E.coli BL21(DE3)	Novagen	Cat# 69450
E.coli Origami TM B(DE3)	Novagen	Cat# 70837
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
DMEM, high glucose, pyruvate	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11995040
FluoroBrite DMEM Media	Thermo Fisher Scientific	Cat# A1896701
DMEM, high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine	Thermo Fisher Scientific	Cat# 21013024
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution	nakarai tesq	Cat# 26253-84
Fetal Bovine Serum USA origin, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich	Cat# 12103C-500ML
Fetal Bovine Serum, dialyzed, US origin, One Shot TM format	Thermo Fisher Scientific	Cat# A3382001
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11668019
Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent - Delivery of siRNA	Thermo Fisher Scientific	Cat# 13778150
Cycloheximide	nakarai tesq	Cat# 06741-91
Dithiothreitol	nakarai tesq	Cat# 14128-62
Stealth RNAi TM siRNA Negative Control Med GC Duplex #2	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12935112
SIGMAFAST TM BCIP [®] /NBT	Sigma-Aldrich	Cat# B5655-25TAB
Separating Gel Buffer Solution(*4)	Wako	Cat# 192-11041
Stacking Gel Buffer Solution(*4)	Wako	Cat# 192-11051
30w/v% Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1)	Wako	Cat# 016-15915
Blocking One	nakarai tesq	Cat# 03953-95
N-ethylmaleimide (NEM)	nakarai tesq	Cat# 15512-24
SUNBRIGHT [®] ME-020MA	NOF AMERICA CORPORATION	Cat# 883993-35-9
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Cytiva	Cat# 17061802

(Continued on next page)

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Millipore	Cat# A2220-5ML
Dynabeads Protein G	Thermo Fisher Scientific	Cat# DB10004
FLAG® Peptide	Millipore	Cat# F3290
Critical commercial assays		
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 23227
EXPRE ^{35S} Protein Labeling Mix	PerkinElmer	Cat# NEG772
HisTrap™ HP	Cytiva	Cat# 29051021
Mono Q™ 10/100 GL	Cytiva	Cat# 17516701
Superdex 200 Increase 10/300 GL	Cytiva	Cat# 28990944
Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit (Ultracel-30 regenerated cellulose membrane)	Millipore	Cat# UFC803024
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit (Ultracel-30 regenerated cellulose membrane)	Millipore	Cat# UFC503096
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit (Ultracel-10 regenerated cellulose membrane)	Millipore	Cat# UFC801024
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit (Ultracel-10 regenerated cellulose membrane)	Millipore	Cat# UFC501096
Experimental models: Cell lines		
Human: HEK293T	ATCC	CRL-3216; RRID: CVCL_0063
Human: HeLa Kyoto	S. Narumiya	RRID: CVCL_1922
Human: HEK293T ERdj5 KO	This paper	N/A
Human: HEK293T Ero1 α KO	This paper	N/A
Oligonucleotides		
siRNA targeting sequence for ERdj5, see the plasmid and siRNA section in method details	This paper	N/A
siRNA targeting sequence for Ero1 α , see the plasmid and siRNA section in method details	This paper	N/A
gRNA targeting sequence for ERdj5, see the plasmid and siRNA section in method details	This paper	N/A
gRNA targeting sequence for Ero1 α , see the plasmid and siRNA section in method details	This paper	N/A
Recombinant DNA		
Human ERdj5/WT/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
Human ERdj5/AA/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
Mouse ERdj5/WT/FLAG in pcDNA3.1	Ushioda et al. ⁷	N/A
Mouse ERdj5/SS/FLAG in pcDNA3.1	Ushioda et al. ⁷	N/A
Mouse ERdj5/C1/FLAG in pcDNA3.1	Hagiwara et al. ¹⁸	N/A
Mouse ERdj5/C2/FLAG in pcDNA3.1	Hagiwara et al. ¹⁸	N/A
Mouse ERdj5/C3/FLAG in pcDNA3.1	Hagiwara et al. ¹⁸	N/A
Mouse ERdj5/C4/FLAG in pcDNA3.1	Hagiwara et al. ¹⁸	N/A
Mouse ERdj5/AA/FLAG in pcDNA3.1	Hagiwara et al. ¹⁸	N/A
Mouse ERdj5/CA/FLAG in pcDNA3.1	Ushioda et al. ⁹	N/A
Mouse ERdj5/C3/SS/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Mouse ERdj5/C4/SS/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
Mouse ERdj5/Form I/FLAG in pcDNA3.1	Maegawa et al. ²⁹	N/A
Mouse ERdj5/Form II/FLAG in pcDNA3.1	Maegawa et al. ²⁹	N/A
Mouse ERdj5/Form I/C3/AA/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
Mouse ERdj5/Form II/C4/AA/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
PDI/WT/FLAG in pcDNA3.1	Araki et al. ³	N/A
p5/WT/FLAG in pcDNA3.1	Araki et al. ³	N/A
ERp46/WT/FLAG in pcDNA3.1	Araki et al. ³	N/A
ERp57/WT/FLAG in pcDNA3.1	Araki et al. ³	N/A
PDIR/WT/FLAG in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /WT/FLAG in pcDNA3.1	Araki et al. ³	N/A
Ero1 α /WT/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /C94A/C99A/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /C104A/C131A/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /C208A/C241A/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /C85A/C391A/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
Ero1 α /C394A/C397A/Myc in pcDNA3.1	This paper	N/A
ER-HyPer in pcDNA3.1	Kirstein et al. ³²	N/A
6xHis/Ero1 α /C104A/C131A in pETDuet-1	Araki et al. ³	N/A
6xHis/Ero1 α /C104A/C131A/C166A in pETDuet-1	This paper	N/A
6xHis/Ero1 α /C94A/C99A/C104A/C131A/C166A in pETDuet-1	This paper	N/A
6xHis/Ero1 α /C85A/C104A/C131A/C166A/C391A in pETDuet-1	This paper	N/A
6xHis/PDI/WT in pETDuet-1	Araki et al. ³	N/A
6xHis/ERdj5/C-cluster/WT in pETDuet-1	This paper	N/A
6xHis/ERdj5/C-cluster/AA in pETDuet-1	This paper	N/A
CRISPER/Ero1 α in px330	This paper	N/A
CRISPER/ERdj5 in px459	This paper	N/A
Software and algorithms		
ImageJ	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/
Pymol	Schrödinger	https://pymol.org/2/
Surfit Web Server	Osaka university	https://sysimm.ifrec.osaka-u.ac.jp/docking/main/
CHOPCHOP	Labun et al. ⁴¹	https://chopchop.cbu.uib.no/

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Ryo Ushioda (ryo3ussy3@cc.kyoto-su.ac.jp).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- All data reported in this paper will be shared by the [lead contact](#) upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyse the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

HEK293T and HeLa cells (HeLa Kyoto strain) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, 11995) supplemented with 10% inactivated foetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin.

METHOD DETAILS

Plasmid and siRNA

Human Ero1 α and PDI family member constructs were kindly provided by Dr. Kazutaka Araki. Ero1 α cysteine mutants (C94A/C99A, C104A/C131A, C208A/C241A, C85A/C391A and C394A/C397A) were generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). For target gene knockdown, stealth siRNAs were obtained from Life Technologies. The siRNA sequences were as follows: siERdj5, 5'-UAAGCAUCCCUAUUCCAACCAUUGU-3'; siEro1 α , 5'-CAGGAACUUGUACAGAAUUAUCAU-3'. Medium GC StealthTM RNAi duplexes were used as negative controls. The construction of the vector for Ero1 α and ERdj5 knockout by the CRISPR/Cas9 system was performed according to Zhang's protocol.⁴² The target sequences were investigated at the Chop-Chop site⁴¹, and a primer set (5'-CACCGTGTGAACAAGCTGAACGACT-3'), (5'-AAACAGTCGTTTCAGCTTGTTCACAC-3'), (5'-CACCGTAAGAAAGAGAATGGGAGTC-3'), and (5'-AAACGACTCCCATTCTCTTTCTTAC-3') was synthesized by Invitrogen Custom DNA Oligos. These primers were annealed and phosphorylated by T4PNK in the thermal cycler. Annealed and phosphorylated target sequences were digested by BbsI. Digested target sequences were inserted into px330 or px459.

Antibodies

Mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-FLAG antibodies were purchased from Sigma-Aldrich and Rockland, respectively. Rabbit polyclonal antibody against Myc-tag was purchased from Medical & Biological Laboratories. Mouse monoclonal anti-Ero1 α was purchased from Merck Millipore. Mouse monoclonal anti-ERdj5 antibody was purchased from Abnova. α 1-Antitrypsin antibody was purchased from DAKO. GFP antibody was purchased from Proteintech.

Transfection

Cell transfection with plasmids or siRNAs was performed using Lipofectamine 2000 and RNAiMAX (Life Technologies).

Cell lysis and immunoprecipitation

Cells were denatured and precipitated in ice-cold PBS containing 10% trichloroacetic acid (TCA). The precipitants were incubated on ice for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm and 4°C for 30 min. The pellets were washed three times with ice-cold acetone using an ultrasonic sonicator (Bioruptor, Cosmo Bio Co.). The pellets were completely dried and then incubated in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% SDS and 20 mM NEM for 1 h at room temperature. The samples were diluted 10 times in dilution buffer [20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40]. The diluted samples were incubated with specific antibodies for immunoprecipitation. The incubated antibodies were collected by incubation with Sepharose beads for 1 hour and centrifugation at 1,000 \times g for 3 min. The immunoprecipitants were eluted in 2 \times sample buffer for 10 min at 60°C and separated by SDS-PAGE. Immunoblotting was conducted under reducing or nonreducing conditions with the antibodies indicated in the text. Regarding the samples for mass analysis, the cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed in lysis buffer [20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40] supplemented with protease inhibitors (Nacalai Tesque) for 20 min on ice and then centrifuged at 15,000 \times g and 4°C for 20 min. The supernatants were incubated with specific antibodies for immunoprecipitation. Silver staining was performed with 2D-Silver Stain Reagent II (Cosmo Bio Co., Ltd.) as described in its manual. The target bands were excised from the gel and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole-time-of-flight-tandem mass spectrometry (MALDI-Qq-TOF MS/MS). To stably detect redox protein complexes, the cells were treated with 100 μ M DVSF for 1 hour before cell lysis.

PEG shift assay

Cells were treated with 10 mM DTT for 5 min or 1 mM Dipyridyl Disulfide (DPS) for 5 min, denatured and precipitated in ice-cold PBS containing 10% trichloroacetic acid (TCA). The precipitates were incubated on ice for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min at 4°C. The pellets were washed three times with ice-cold acetone using an ultrasonic sonicator (Bioruptor, Cosmo Bio Co.). After drying the pellets completely, the pellets were incubated in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% SDS and 1 mM 2K-PEG-maleimide for 1 h at room temperature. To detect endogenous proteins, samples were precipitated with 10% TCA again after PEG modification. All final samples for SDS-PAGE were in 1 \times Laemmli buffer, after which samples were subjected to immunoblotting with each antibody.

Purification of recombinant proteins

E. coli BL21 cells (Novagen) carrying pETDuet-TEV-PDI or Ero1 α were cultured in LB medium with ampicillin (Amp) at 37°C until an A600 of 0.5 was reached. Protein expression was induced with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) for 4 h at 30°C. For analysis of the interaction with the C-cluster of ERdj5 by NMR, a ¹⁵N cysteine-labelled Ero1 α sample of the constitutively active

C104A/C131A mutant was used. For the resonance assignments of C85–C391 and C99–C94 disulfide pairs, C85A/C391A and C94A/C99A double mutations, respectively, were additionally introduced into the C104A/C131A/C166A triple mutant. The C166A mutation was introduced to prevent disulfide dimer formation via C166. The *E. coli* cells were grown in M9 medium supplemented with 50 mg/L [¹⁵N] L-cysteine (Cambridge Isotope Laboratory) and other nonlabelled amino acids. Harvested cells were sonicated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 300 mM NaCl and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The cell lysate supernatant was loaded onto a HisTrap column (Cytiva) equilibrated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 300 mM NaCl and 20 mM imidazole. Proteins were eluted with a linear gradient of 50 mM to 0.5 M imidazole. Ero1 α was loaded onto a Hi Load 16/60 Superdex 200 pg column (Cytiva) equilibrated in buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl]. Eluted proteins were applied to a Mono QTM 10/100 GL column (Cytiva) preequilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.1). The samples were eluted with a linear NaCl gradient ranging from 0 to 500 mM in buffers A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] and B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA]. For purification of the reduced form of Ero1 α , harvested cells were sonicated in buffer [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.02% Triton X-100, and 1 mM PMSF]. The cell lysate supernatant was loaded onto a HisTrap column (Cytiva) equilibrated in buffer [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, and 0.02% Triton X-100]. Proteins were eluted with 0.5 M imidazole.

For purification of the C-cluster of ERdj5, *E. coli* OrigamiTM B(DE3) cells (Novagen) carrying the pETDuet-TEV-C-cluster were cultured in LB medium with Amp at 37°C until an A600 of 0.5 was reached. Protein expression was induced with 0.1 mM IPTG for 16 h at 18°C. The harvested cells were sonicated in buffer [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 M NDSB-201, 0.02% Triton X-100, and 1 mM PMSF]. The cell lysate supernatant was loaded onto a HisTrap column (Cytiva) equilibrated in buffer [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 M NDSB-201, and 0.02% Triton X-100]. Proteins were eluted with a linear gradient of 20 mM to 0.5 M imidazole. The C-cluster was loaded onto a Hi Load 16/60 Superdex 200 pg column (Cytiva) equilibrated in buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 100 mM NaCl].

Oxygen consumption assay

O₂ consumption was measured with a FireStingO2 fibreoptic oxygen meter (Pyro Science) by mixing 100 μ M reduced PDI with 1 μ M Ero1 α mutants in air-saturated buffer or 100 μ M reduced PDI with 1 μ M Ero1 α in the presence of 1 μ M C-cluster/WT or AA mutant at 30°C.

Live imaging of ER-HyPer

The cells were harvested on a triple-well glass-bottom dish (Iwaki) in FluoroBrite DMEM (Life Technologies). An LSM700 microscope equipped with a Plan-Apochromat 63 \times /1.40 oil DIC lens was used for live imaging. The cells were excited with a laser at 405 and 488 nm with 2.4 and 2.4% power, respectively. Fluorescence emission from ER-HyPer was detected with a 490/555 nm bandpass filter. Images were analysed using ZEN software. Ratios of fluorescence intensities at 405 nm/488 nm were determined from the average fluorescence intensities at regions of interest.

Docking simulation

Docking simulations to analyse the molecular surface, electrostatic potential and hydrophobicity complementarity were carried out online (<https://sysimm.ifrec.osaka-u.ac.jp/docking/main/>) and weighted by the conservation of interacting residues.^{27,28} To this end, we employed crystal structures of Ero1 α (PDB ID: 3AHQ) and ERdj5 (PDB ID: 5AYK for form I and 5AYL for form II).^{25,29}

Metabolic labelling and pulse chasing

Cells cotransfected with ERdj5 and NHK were preincubated in DMEM lacking methionine and cysteine (Invitrogen) for 30 min and labelled for 15 min with [³⁵S]methionine-cysteine (PerkinElmer Life Science). After labelling, the radioisotope was removed by washing with PBS. The cells were then incubated in DMEM during the chase period. The cells were washed with ice-cold PBS, lysed in lysis buffer [20 mM NEM, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40] supplemented with protease inhibitors (Nacalai Tesque) for 20 min on ice and then centrifuged at 15,000 \times g and 4°C for 20 min. The supernatants were incubated with α 1-antitrypsin-specific antibody for immunoprecipitation. The band intensity in pulse-chase experiments was quantitated by measuring radioactivity.

NMR experiments

Ero1 α and the C-cluster of ERdj5 samples were exchanged with NMR buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.1), 100 mM NaCl, and 10% D₂O by ultrafiltration using Amicon Ultra centrifugal devices (Millipore; MWCO 10K) and concentrated to a protein concentration of 150 μ M in 230 μ L. The NMR samples were transferred into a 5-mm microtube (Shigemi). NMR experiments were performed with a Bruker Avance Neo-800 MHz spectrometer equipped with a TCI triple-resonance cryoprobe (Bruker). Two-dimensional ¹H-¹⁵N TROSY HSQC spectra were acquired at 25°C.⁴³ The acquisition times in the direct and indirect dimensions were 40.0 ms (t₂, ¹H) and 13.2 ms (t₁, ¹⁵N), the spectral widths were 14 ppm (F₂, ¹H) and 32 ppm (F₁, ¹⁵N), and scans were accumulated 1,536 (free Ero1 α) and 2,048 (Ero1 α -ERdj5 mixture) times per indirect t₁ point with an interscan delay of 1 s. The experimental times were 29

and 39 hours, respectively. Data processing was performed using TopSpin 3.1 (Bruker). The time domain data were zero-filled in the indirect dimension and multiplied with a squared sine function in both dimensions followed by Fourier transformation to obtain 2D spectra.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All quantitative data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). ImageJ was used for data analysis and statistics. Two-tailed Student's t tests were used for comparison of means of data between two groups.

Cell Reports, Volume 42

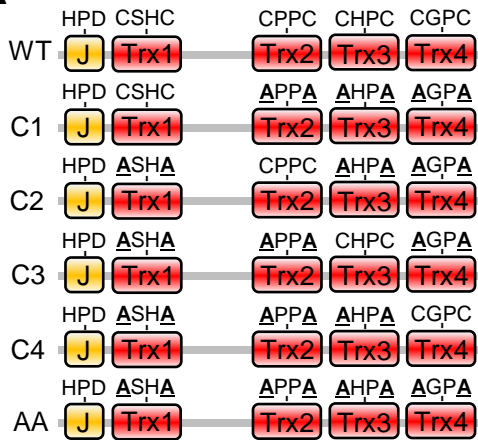
Supplemental information

**The oxidative folding
of nascent polypeptides provides electrons
for reductive reactions in the ER**

**Kaiku Uegaki, Yuji Tokunaga, Michio Inoue, Seiji Takashima, Kenji Inaba, Koh
Takeuchi, Ryo Ushioda, and Kazuhiro Nagata**

Supplemental Information S1

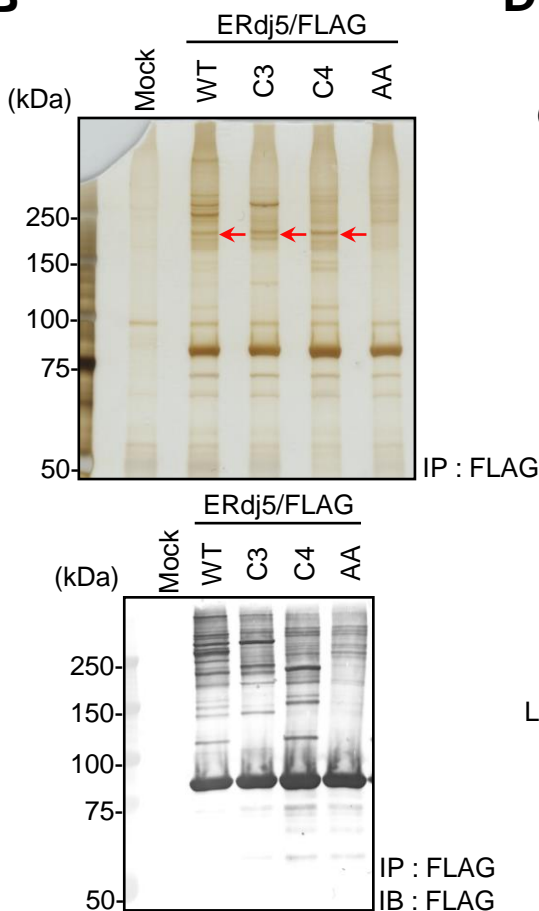
A



C

Gene name	Full name	Protein name
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	ERp57
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	ERp72
PDIA6	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	p5
P4HB	Protein disulfide-isomerase	PDI
TXNDC5	Thioredoxin domain-containing protein 5	ERp46
TXNDC12	Thioredoxin domain-containing protein 12	ERp18
ERO1L	ERO1-like protein alpha	Ero1 α
FASN	Fatty acid synthase	FAS
HRNR	Hornerin	HRNR
RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2

B



D

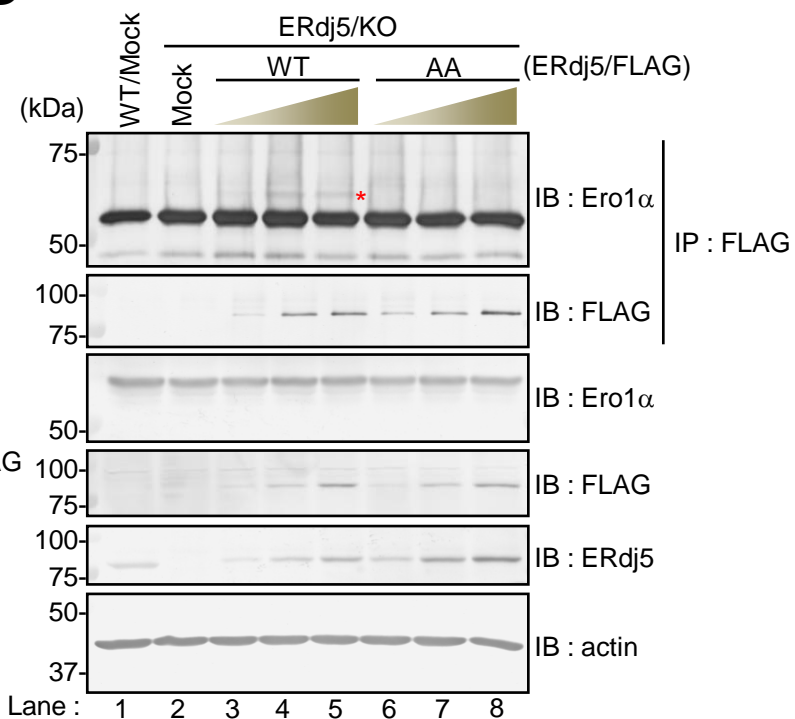
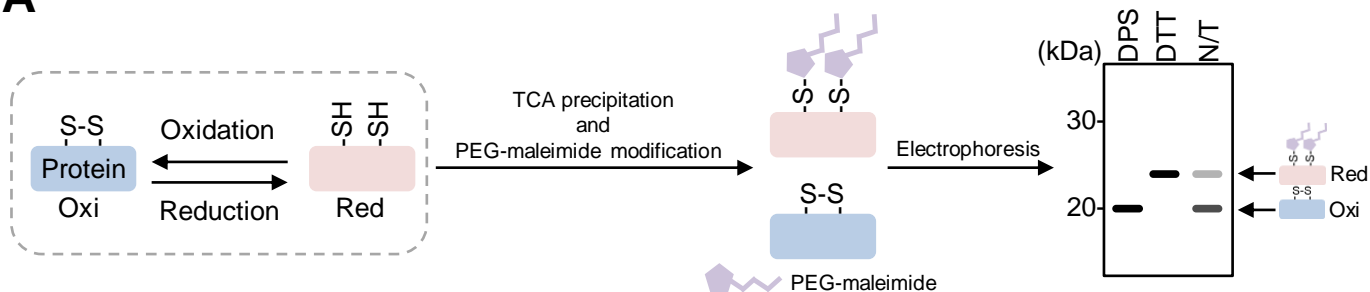


Figure S1. Identification of ERdj5-binding proteins using DVSF

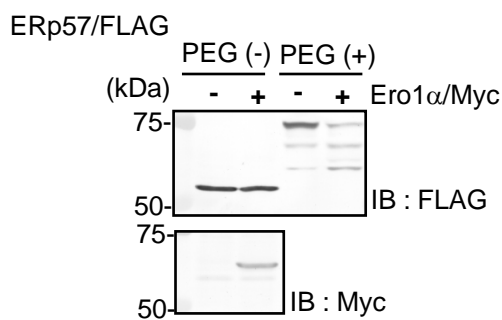
(A) The series of ERdj5 mutants constructed in this work. (B) Silver staining of proteins that bind ERdj5 and the indicated mutants. Twenty-four hours after the transfection of FLAG-tagged ERdj5 and ERdj5 mutants into HEK293T cells, the transfected cells were treated with 100 μ M DVSF for 1 hour. Cell lysates were mixed with anti-FLAG-M2 affinity gel, and protein complexes including FLAG-tagged ERdj5 were eluted with FLAG peptide. The eluted samples were subjected to reducing SDS-PAGE for analysis by silver staining (upper column) and immunoblotting with the indicated antibodies (lower column). The transfection of empty vector is indicated by "Mock". (C) List of the binding partners of ERdj5. (D) Twenty-four hours after the transfection of FLAG-tagged ERdj5/WT and ERdj5/AA mutant into ERdj5-deficient HEK293T cells (ERdj5/KO), cell lysates were mixed with anti-FLAG-M2 affinity gel, and protein complexes including FLAG-tagged ERdj5 were eluted with FLAG peptide. The eluted samples were subjected to reducing SDS-PAGE for analysis by immunoblotting with the indicated antibodies. The transfection of empty vector is indicated by "Mock". The red asterisk indicates immunoprecipitates of endogenous Ero1 α .

Supplemental Information S2

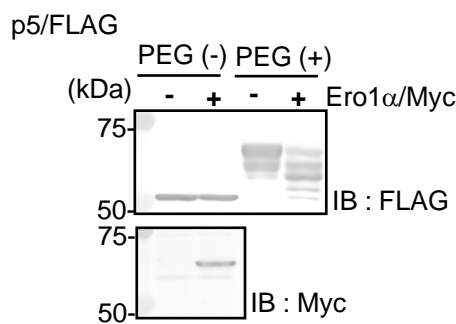
A



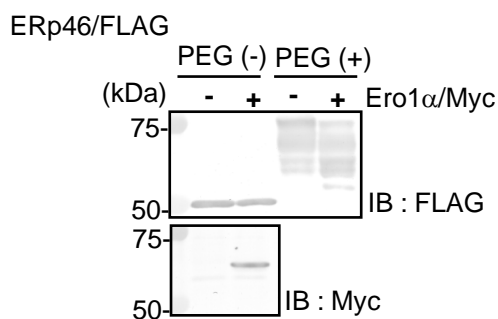
B



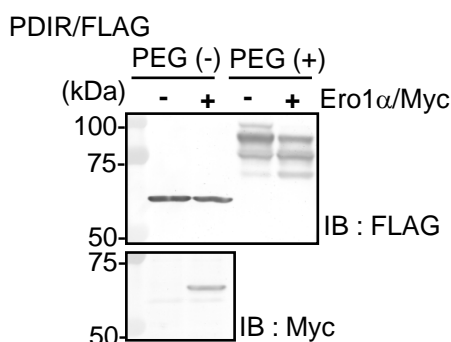
C



D



E



F

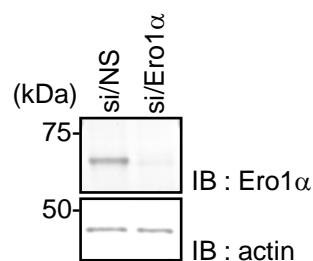
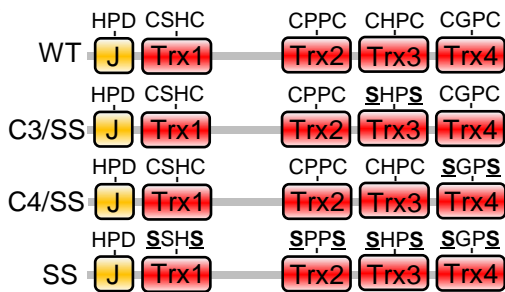


Figure S2. Other PDI family members are oxidized by Ero1 α .

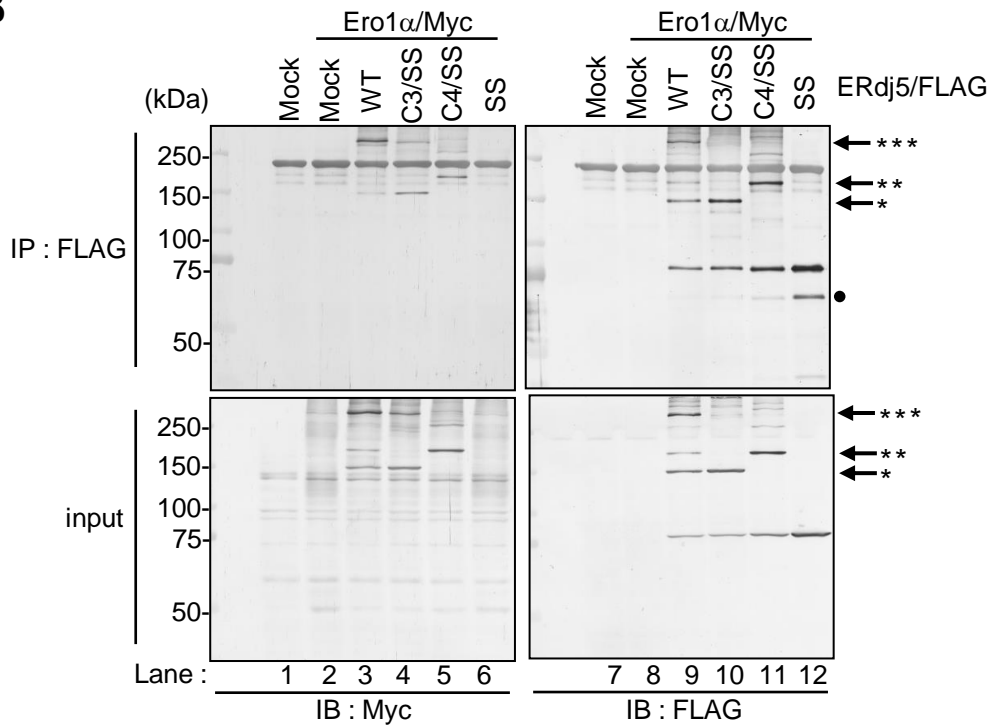
(A) The principle of PEG-maleimide analysis. If certain proteins are in equilibrium between oxidation and reduction in the cell, the redox state can be fixed by trichloroacetic acid (TCA) precipitation. After TCA precipitation, the free thiol group in cysteines is specifically modified by PEG-maleimide. For instance, if the redox state of a 20 kDa protein containing two cysteines is analysed by this method using 2 kDa PEG-maleimide, the reduced state shows an approximately 4 kDa shift after electrophoresis. (B-E) After the cotransfection of FLAG-tagged PDIs (ERp57 a, p5 b, ERp46 c, PDIR d) and Myc-tagged Ero1 α into HEK293T cells, the cells were prepared for the PEG-switch assay as described in Figure 1B and 1C. (F) After the transfection of nonspecific siRNA (si/NS) or specific siRNA against Ero1 α (si/Ero1 α) into HEK293T cells, cell lysates were subjected to SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies.

Supplemental Information S3

A



B



C

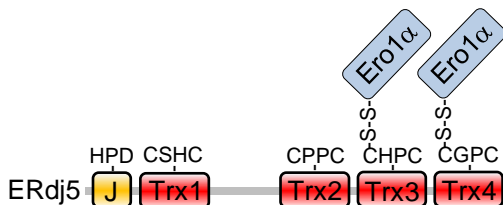
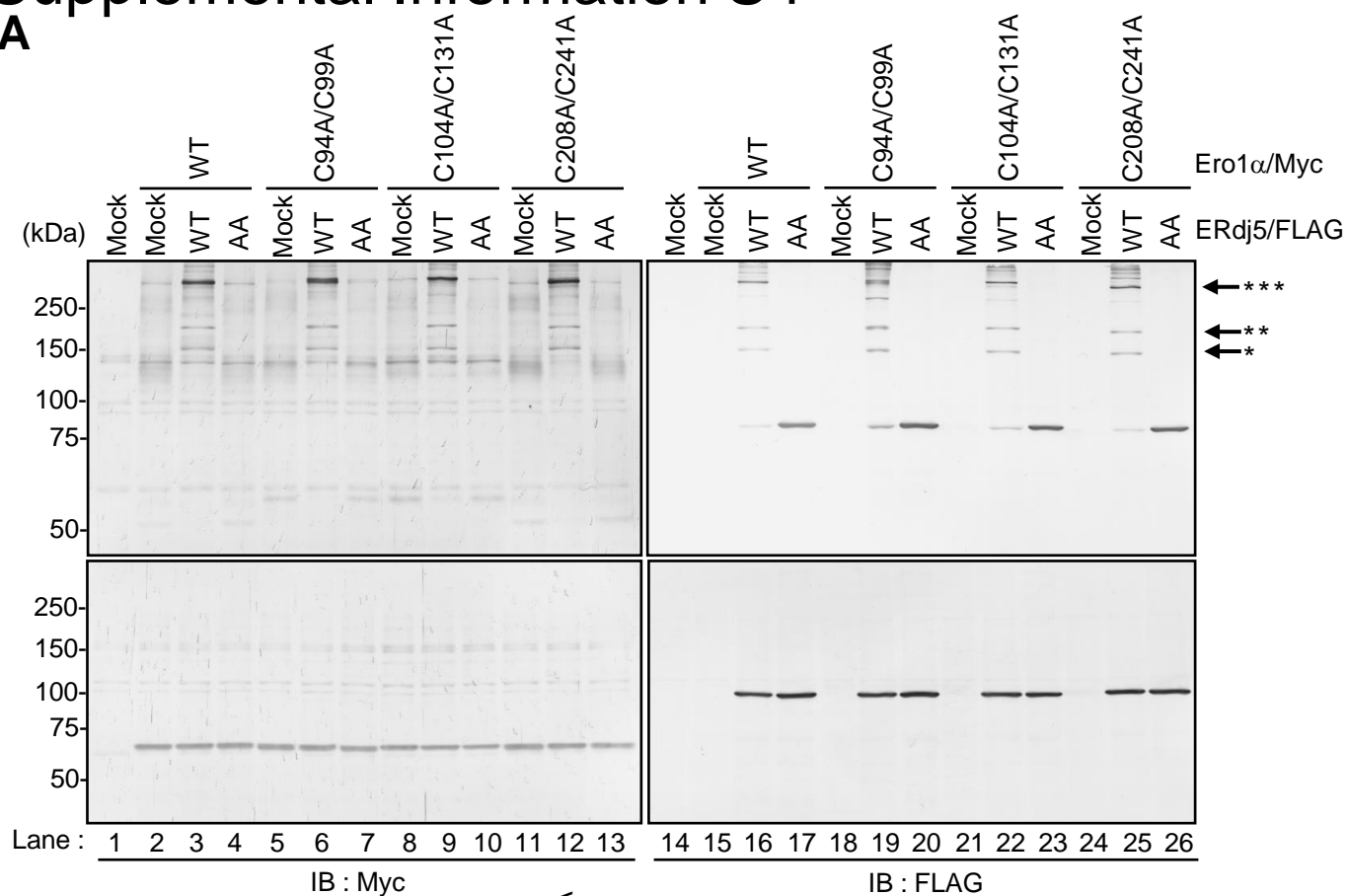


Figure S3. Ero1 α forms a mixed disulfide complex with ERdj5.

(A) Series of ERdj5 mutants constructed in this work. (B) Cell lysates were prepared for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody as described in Figure 1A. The immunoprecipitants were subjected to nonreducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. Single, double, or triple asterisks denote the mixed disulfide complex between Ero1 α and the ERdj5/C4 mutant, ERdj5/C3 mutant or ERdj5/WT, respectively. The transfection of empty vector is indicated by “Mock”. The lower band shown as a black circle is the product of ERdj5 degradation. (C) Binding stoichiometry between Ero1 α and ERdj5.

Supplemental Information S4

A



B

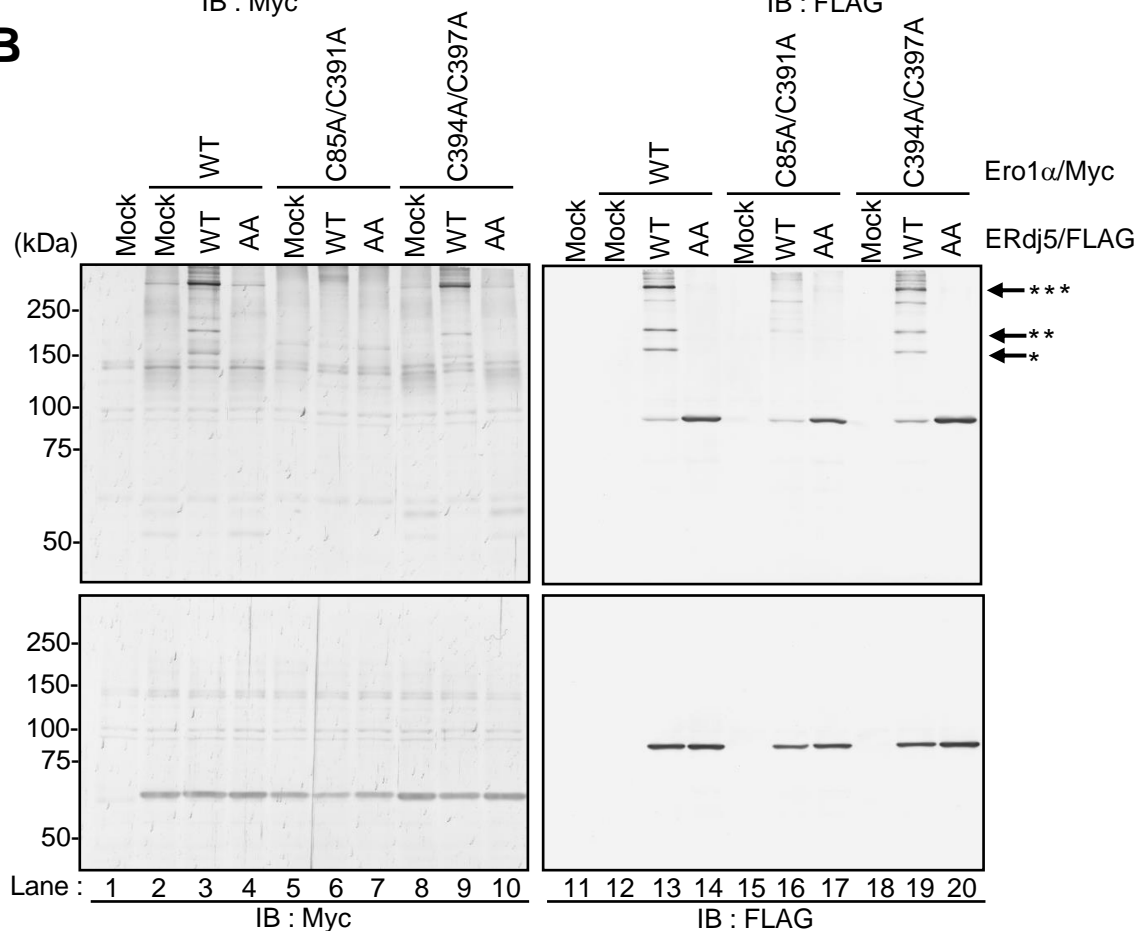


Figure S4. The interaction between Ero1 α and ERdj5 depends on disulfide bonds.

(A and B) After the cotransfection of Myc-tagged Ero1 α (wild-type or the indicated mutants) and FLAG-tagged ERdj5s (wild-type or AA mutant) into HEK293T cells, cell lysates were subjected to reducing (lower panel) or nonreducing (upper panel) SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The single, double, or triple asterisks denote the mixed disulfide complex between Ero1 α and the ERdj5/C4 mutant, ERdj5/C3 mutant or ERdj5/WT, respectively. The transfection of empty vector is indicated by "Mock".

Supplemental Information S5

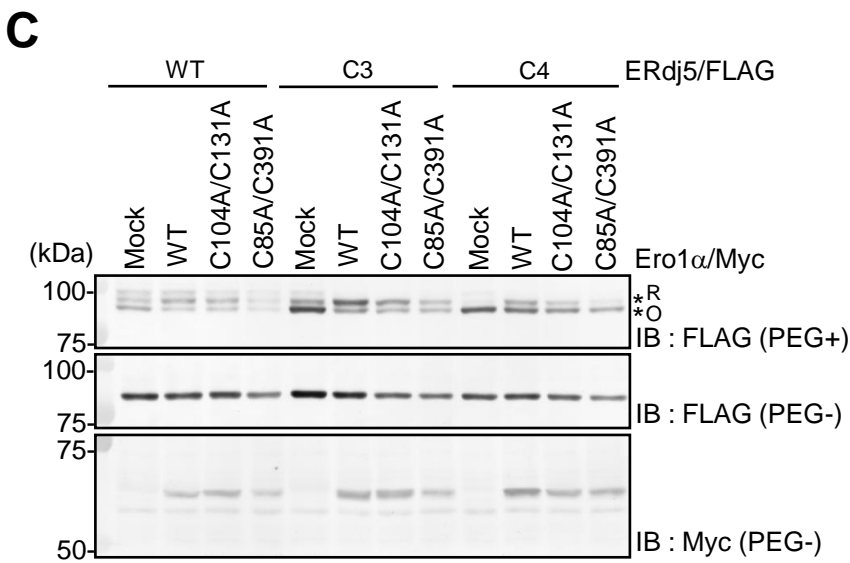
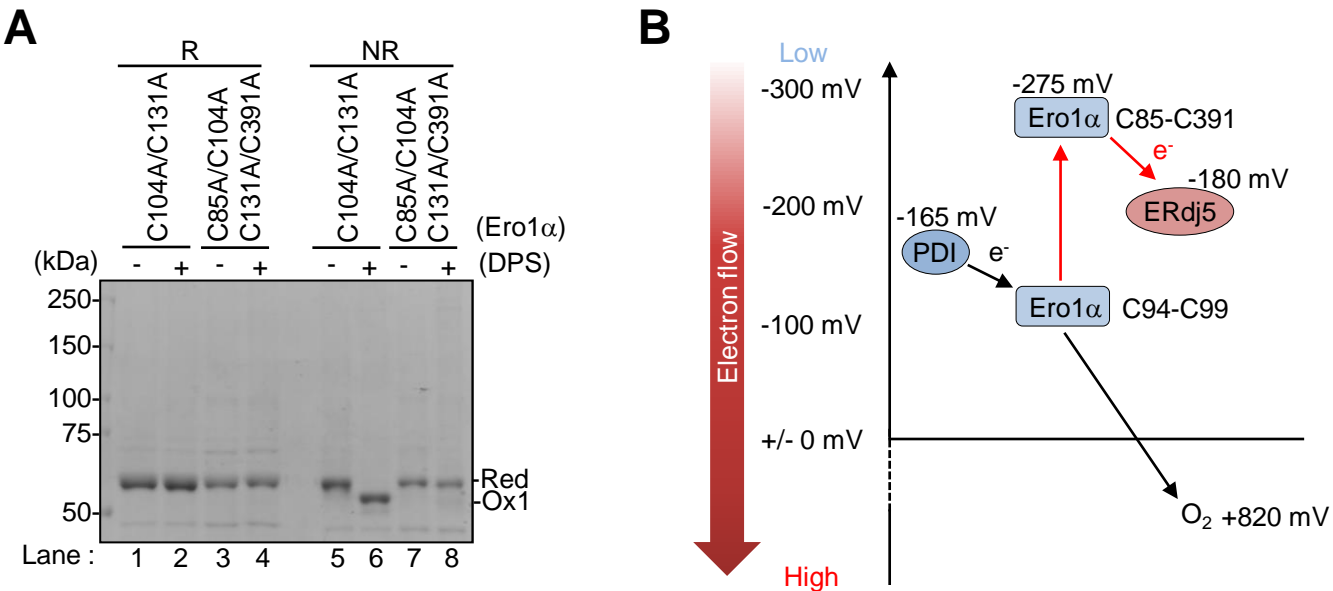


Figure S5. The C85-C391 pair in Ero1 α is required for the reduction of ERdj5.
 (A) Purified Ero1 α proteins were treated with (+) or without (-) 1 mM Dipyridyl Disulfide (DPS) for 5 min at room temperature. All final samples were subjected to reducing (R) or nonreducing (NR) SDS-PAGE before CBB staining.
 (B) Model of electron transfer from Ero1 α to oxygen (black arrow) and ERdj5 (red arrow). The horizontal axis indicates the individual redox potentials of PDI, Ero1 α , ERdj5 and molecular oxygen (O₂). The redox potentials of PDI and ERdj5 were measured with reduced and oxidized glutathione buffer in previous studies. On the other hand, the redox potential of the C85-C391 pair in Ero1 α was measured with reduced and oxidized thioredoxin 1 buffer in a previous study.
 (C) After the cotransfection of FLAG-tagged ERdj5 (wild-type, C3 mutant or C4 mutant) and Myc-tagged Ero1 α (wild-type or C85-C391 mutants) into HEK293T cells, the cells were prepared for the PEG-switch assay as described in Figure 1B and C. The transfection of empty vector is indicated by "Mock".

Supplemental Information S6

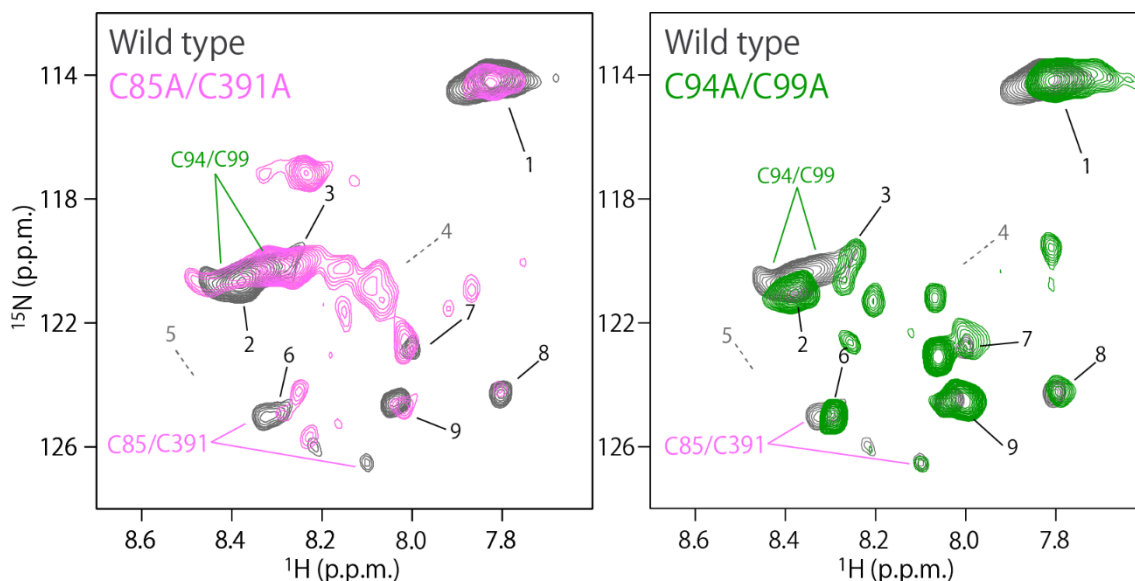


Figure S6. Assignments of C85-C391 and C94-C99 pairs in $\text{Ero1}\alpha$ by NMR.

Assignments of NMR resonances originating from cysteine residue pairs of interest. Two-dimensional ^1H - ^{15}N TROSY HSQC spectra of [Cys- ^{15}N] $\text{Ero1}\alpha$ C85A/C391A (left, magenta) and C94A/C99A (right, green) double mutants are overlaid with that of wild-type $\text{Ero1}\alpha$ (black). For each mutant, the positions of two resonances that disappeared upon mutation are indicated. The assignments were established using $\text{Ero1}\alpha$ proteins with both the constitutively active C104A/C131A mutations and the C166A mutation that prevents dimerization via intermolecular disulfide formation. The latter is not introduced in the $\text{Ero1}\alpha$ samples shown in Figure 3D. Thus, minor chemical shift differences were detected between the wild-type spectra in Figure 3D, and the resonances corresponding to #4 and #5 in Figure 3D were not identified in these mutational analyses. It should also be noted that we could not assign resonances to the C394-C397 pair because the C394A/C397A mutant was not expressed in the soluble fraction (data not shown). Some additional peaks observed only in the mutant spectra might originate from the structural inhomogeneity introduced by the Cys to Ala mutations.

Supplemental Information S7

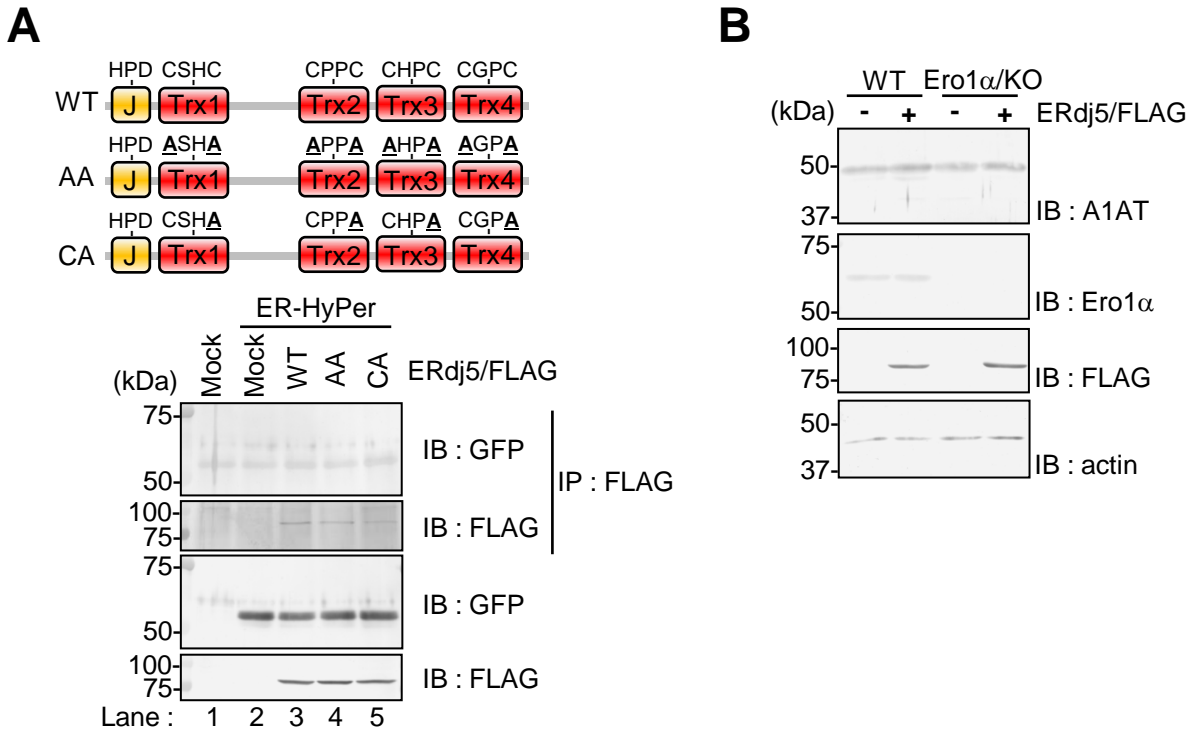


Figure S7. Interaction between ERdj5 and ER-HyPer and Expression of NHK in Ero1 α -deficient cells.

(A) The series of ERdj5 mutants constructed in this work. After the cotransfection of ER-HyPer and FLAG-tagged ERdj5s (wild-type, AA mutant, or CA mutant) into HeLa cells, cell lysates were prepared for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody as described in Figure 1A. The immunoprecipitates were subjected to reducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies. The transfection of empty vector is indicated by "Mock". (B) After the cotransfection of FLAG-tagged ERdj5 and NHK into HEK293T cells (WT) or Ero1 α -deficient HEK293T cells (Ero1 α /KO), the lysates were subjected to reducing SDS-PAGE before immunoblotting with the indicated antibodies.