

博士論文
2023 年度

小胞体レドックスによる
カルシウムイオンチャネル IP3 受容体の制御機構の解明

京都産業大学大学院
生命科学研究科 生命科学専攻
博士後期課程 3 年
学生証番号 789231
氏名 藤井唱平

目次

1. 要旨	3
2. 略語表	5
3. 序論	
3.1 細胞内のカルシウムイオン環境	7
3.2 カルシウムイオンチャネルとしての IP3 受容体の発見	8
3.3 IP3 受容体の構造と制御	8
3.4 細胞内のレドックス環境	9
3.5 細胞内の環境を感知するセンサータンパク質	10
3.6 小胞体の機能と環境、分子スイッチとしてのレドックス状態	10
3.7 レドックス制御によるカルシウム恒常性維持	11
3.8 本研究の目的	12
4. 実験材料および方法	
4.1 細胞培養	16
4.2 プラスミド DNA	16
4.3 プラスミドのトランスフェクションと安定発現株の樹立	17
4.4 PDI _s と IP3 受容体遺伝子欠損細胞株の樹立	17
4.5 ウェスタンブロッティングと免疫沈降	17
4.6 IP3 受容体のレドックス状態の検出 (ゲルシフトアッセイ)	19
4.7 リン酸化 IP3 受容体の検出	19
4.8 カルシウムイメージング	19
4.9 レドックスイメージング	20
4.10 ショ糖密度勾配遠心	21
4.11 データ解析	21
5. 結果	
5.1 IP3 受容体と相互作用する PDI ファミリータンパク質の探索	22
5.2 PDI ファミリー遺伝子の欠損細胞株の樹立	22
5.3 IP3 受容体を介したカルシウムイオン放出に関わる PDI _s の探索	22
5.4 PDI _s 遺伝子の欠損細胞株の定常的なカルシウムイオン環境と酸化還元環境	22
5.5 IP3 受容体の小胞体内腔にある 4 つのシステインの働き	23
5.6 IP3 受容体の C3-C4 は四量体形成に必要である	23
5.7 IP3R1 の酸化による IICR 増強	24
5.8 IP3 受容体の C1-C2 への直接的な相互作用	24
5.9 IICR に対する ERdj5 の効果	25
5.10 IP3 受容体の C1-C2 システインへの ERdj5 の影響	25
5.11 ERdj5 による IP3R1 還元反応の検証	25

5.12	IP3R1 の酸化還元状態とリン酸化修飾-----	26
6.	考察	
6.1	PDI ファミリータンパク質の IICR への関与-----	39
6.2	IP3R1 のシステインペアは 2 つの異なる役割をもつ-----	39
6.3	IP3R1 に対する直接的な酸化還元酵素 ; ERp46 および ERdj5-----	40
6.4	ERdj5 を介した小胞体のカルシウム恒常性維持機構モデル-----	40
6.5	疾患との関わり -----	40
6.6	今後の課題 -----	41
7.	論文目録 -----	44
8.	謝辞 -----	45
9.	参考文献 -----	47

1. 要旨

小胞体は分泌タンパク質および膜タンパク質の成熟の場、脂質の代謝の場、カルシウムイオン (Ca^{2+}) の細胞内貯蔵庫となるなど、様々な細胞機能を担う細胞小器官 (オルガネラ) であり、小胞体に存在するタンパク質はこれらの現象を緻密に制御している。本論文では、これらの機能を支える小胞体の環境がどのようにして維持されているのかについて、 Ca^{2+} 環境と酸化還元 (レドックス) 環境に焦点を当てて研究を行い、明らかにした「小胞体レドックスによるカルシウムイオンチャネル IP3 受容体の制御機構」について報告する。

IP3 受容体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ; IP3R) は、小胞体からサイトゾルに Ca^{2+} を放出する Ca^{2+} チャネルのうち、2種類存在する四量体型 Ca^{2+} チャネルの1つである。IP3 依存的に IP3 受容体を介して放出される Ca^{2+} は、さまざまな細胞応答の基本的なセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている。小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度はサイトゾルと比較して約1万倍高く維持されており、その恒常性維持には膜上の Ca^{2+} ポンプやチャネルが重要な役割を果たしている。小胞体膜上に存在する SERCA2b Ca^{2+} ポンプ (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; SERCA) や Ca^{2+} チャネル IP3 受容体が小胞体内腔のレドックス状態によって制御されることが報告された。また、様々な疾患や老化の原因とされる細胞内レドックス環境の破綻が、 Ca^{2+} を介した適切なシグナル伝達を妨げるとされているにもかかわらず、その原因は明らかではなかった。本研究では、酸化還元酵素による IP3R1 の制御機構の解明を目的とし、小胞体の内腔環境と IP3R1 の Ca^{2+} チャネル活性変化という観点からも研究を行った。

ヒト胎児腎細胞 (HEK293T) を用いて、小胞体のおよそ20種類の PDI ファミリータンパク質 (protein disulfide isomerases ; PDIs) のうち酸化還元酵素活性が明らかになっている8種類を過剰発現し、内在性 IP3R1 との相互作用解析を共免疫沈降法で行ったところ、IP3R1 と多くの PDIs の相互作用が示唆された。そこで、レドックス依存的な IP3 受容体の活性変化をおこす酸化還元酵素を探索するため、先の実験で共沈降した PDIs と PDIs 酸化酵素として知られる ER oxidoreductin 1 (ER01A) の遺伝子欠損 HeLa 細胞を CRISPR-Cas9 を用いて樹立し、IP3 依存的な Ca^{2+} 放出 (IP3-induced calcium release ; IICR) への影響を FRET 型 Ca^{2+} センサータンパク質 YC3.6 によるカルシウムイメージングで検証したところ、野生型 HeLa 細胞と比較して酸化還元酵素欠損細胞において IICR の増減が見られた。一方で、これらの遺伝子欠損が小胞体内腔の環境に与える影響についても ESIPT 型 Ca^{2+} センサータンパク質 GEM-CEPIA1er と FRET 型レドックスセンサータンパク質 CY-RL7er でそれぞれ検証したが、ERp57 欠損細胞で定常時の Ca^{2+} 濃度が上昇し、ER01A 欠損細胞で小胞体の酸化的な環境が還元的にシフトしているのみであった。過去の報告では、小胞体ストレスによって発現誘導される ER01A により IICR が亢進することが示唆されている。本研究でも ER01A 欠損細胞において IICR が低下したことを踏まえると、ER01A の IICR への効果は小胞体内腔のレドックス環境変化による間接的な影響であったことが示唆された。小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度変化

やレドックス環境の変化の影響を考慮し、IP3R1 の制御にかかわる候補因子の絞り込みを行い、IP3R1 のレドックス依存的な制御因子を決定するため、IP3R1 の小胞体内腔に存在する4つのシステイン残基に変異を導入した Cys 変異体を用いた解析を行った。IP3 受容体はサブタイプが3種類存在し、ヘテロ四量体としてチャネル形成が可能のため、3つの IP3 受容体サブタイプをすべて欠損した三重欠損細胞に IP3R1 野生型および Cys 変異体を安定発現させ、特定のシステイン変異を含むホモ四量体のみとすることで、レドックス特異的な影響を解析した。IP3R1/Cys 変異体を用いて、共免疫沈降法による相互作用解析とカルシウムイメージングを行ったところ、IP3R1 のシステイン残基依存的な相互作用とチャネル活性への影響を示した新規制御因子として、酸化酵素 ERp46 と還元酵素 ERdj5 をそれぞれ同定した。

遺伝子欠損によって IICR を低下させた ERp46、PDI、ER01 はいずれも小胞体内のレドックスネットワークの中で、基質タンパク質の酸化に寄与する酵素であり、IP3R1 の活性化には PDI-ER01 をハブとする酸化力供給経路が重要であることが示唆された。

また、IP3R1 の小胞体内腔4つのシステイン残基のレドックス状態を検出する実験系を新規に構築し、ERdj5 欠損細胞において IP3R1 が酸化型に偏り、ERdj5 の入れ戻しにより野生型と同様のレドックス状態に回復することを確認した。したがって、ERdj5 が細胞内で IP3R1 の還元に関わる責任酵素として働くことがわかった。

より詳細に IP3R1/Cys 変異体のチャネル活性を解析したところ、野生型よりも Ca^{2+} チャネル活性が低いことが明らかになった。つまり、酸化型 IP3R1 ではチャネルの開口活性が高くなるのに対し、還元型 IP3R1 ではチャネルの開口活性が低くなるという2段階の状態をとることが示唆された。興味深いことに、 Ca^{2+} チャネル活性への寄与が知られるリン酸化修飾と IP3R1 の酸化還元状態とは無関係であった。したがって、IP3R1 の小胞体内腔に形成されるジスルフィド結合は、サイトゾルにおける制御と独立して、分子スイッチとして IP3R1 の活性を自律的に制御していることが示唆された。

以前の報告で、SERCA2b のレドックス制御では、ERdj5 は小胞体の Ca^{2+} レベルの低下を感じ、ジスルフィド還元活性を用いて SERCA2b を還元することで小胞体への Ca^{2+} 取り込みを促進すること、小胞体の Ca^{2+} レベルが高くなると ERdj5 は多量体化し、不活性化することを明らかにしている。この制御と本研究の成果を合わせて、ERdj5 は小胞体の Ca^{2+} レベル低下に応じて、チャネルとポンプの両方を還元し、チャネルは抑制、ポンプは活性化することで、小胞体から放出される Ca^{2+} を減らしながら、小胞体への Ca^{2+} の取り込みを増やすというレシプロカルな制御で、合目的的に小胞体の Ca^{2+} レベルを回復させるカルシウム恒常性維持機構のキーファクターであることを明らかにした。

2. 略語表

ADP: adenosine diphosphate
ANOVA: analysis of variance
ATP: adenosine triphosphate
BiP: immunoglobulin-binding protein
BK: bradykinin
BPB: bromophenol blue
Cas9: CRISPR-Associated Proteins 9
CFP: cyan fluorescent protein
CICR: calcium-induced calcium release
CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRT: calreticulin
DAG: diacylglycerol
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA: deoxyribonucleic acid
DPS: 2,2-dipyridyl disulfide
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N,N tetraacetic acid
em: emission
ESIPT: excited-state intramolecular proton transfer
ER: endoplasmic reticulum
ER01: ER oxidoreductin 1
ex: excitation
FBS: fetal bovine serum
FRET: Förster resonance energy transfer
GPCR: G protein-coupled receptor
HA: hemagglutinin
HEK293T: human embryonic kidney cells 293 with SV40 Large T-antigen
IB: immunoblotting
IP: immunoprecipitation
IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R: inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
IICR: IP3-induced calcium release
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
KO: knockout

NEM: N-ethylmaleimide
PBS: phosphate buffered saline
PDI: protein disulfide isomerase
PEG: polyethylene glycol
PEI: polyethyleneimine
Pi: inorganic phosphate
PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC: phospholipase C
RNA: ribonucleic acid
ROS: reactive oxygen species
RyR: ryanodine receptor
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
sgRNA: single-guide RNA
SOCE: store-operated calcium entry
STIM: stromal interaction molecule
TBST: tris buffered saline with Tween 20
TCA: trichloroacetic acid
Tg: thapsigargin
TMD: transmembrane domain
TKO: triple knockout
WT: wild type
YC: yellow cameleon
YFP: yellow fluorescent protein

アミノ酸については、一般に用いられる 3 文字表記、1 文字表記に従った。

3. 序論

3.1 細胞内のカルシウムイオン環境

さまざまな細胞応答のトリガーとして働くカルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内において膜に囲まれた細胞小器官 (オルガネラ) にそれぞれ蓄えられているが¹、小胞体が最も主要な貯蔵庫として機能している²。小胞体内腔に高濃度に Ca^{2+} が貯蔵されている (約 500 μM) 一方で、サイトゾルは極めて低い濃度に維持されている (通常 100 nM 以下)。オルガネラからサイトゾルに放出された Ca^{2+} は種々の細胞応答のセカンドメッセンジャーとして機能することが知られているが³、恒常的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はカルシウム依存性プロテアーゼの活性化やアポトーシスの引き金ともなり得るため、厳密に流出入を制御する必要がある⁴。

小胞体を基盤とした Ca^{2+} の流出入経路は、カルシウム誘導カルシウム放出 (calcium-induced calcium release ; CICR)、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (inositol 1 4 5-trisphosphate ; IP3) 誘導カルシウム放出 (IP3-induced calcium release ; IICR)、ストア作動性カルシウム流入 (store-operated calcium entry ; SOCE) の3つがある⁵。CICR は、主に筋収縮や神経発火など、刺激に応じたポジティブフィードバックが必要な場面で機能している。細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルから流入した Ca^{2+} を小胞体膜上のリアノジン受容体 (ryanodine receptor ; RyR) が受容し、筋/小胞体からの Ca^{2+} 放出を促す。この速やかなサイトゾルの Ca^{2+} 濃度上昇を CICR と呼ぶ (図 3-1A)。IICR は、細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor ; GPCR) などの活性化に伴って、活性化するホスホリパーゼ C (phospholipase C ; PLC) によって産生された IP3 を IP3 受容体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ; IP3R) が受容し、小胞体から Ca^{2+} を放出する仕組みである (図 3-1B)。

この仕組みは、多くのシグナル伝達経路の合流地点となっており、細胞種を問わず広く用いられているが、組織ごとの関連因子の発現パターンによって制御系が多様化している。また、IP3 受容体自身も3つのサブタイプが存在し、制御因子に対する親和性が異なるため、極めて理解が複雑である⁶。中枢神経系において広く発現している IP3R1 をノックアウトしたマウスは、てんかん様発作と小脳失調を示し、生後 20 日前後で死亡することが知られ、IP3R1 は特に重要な生理機能を担っていると考えられている⁷。また、IP3R2 や IP3R3 を単独でノックアウトしたマウスは顕著な表現型を示さないが、IP3R2 と IP3R3 の二重欠損マウスでは消化器系の機能不全が報告された⁸。それぞれのサブタイプの組織分布に応じた表現型の解析が精力的に続けられている。

SOCE は、小胞体内腔の Ca^{2+} を感知するセンサータンパク質である STIM タンパク質 (stromal interaction molecule) が、小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度が低下したとき多量体化し、細胞膜上の Ca^{2+} チャンネル Orai1 を開口し、細胞外から細胞膜と小胞体のコンタクトサイトに Ca^{2+} を放出する経路であり、 Ca^{2+} ポンプである SERCA (sarco/endoplasmic

reticulum Ca²⁺-ATPase ; SERCA) を通して小胞体への Ca²⁺取り込みも促進する経路である (図 3-1C)。これら 3 つの経路を介して、細胞内の Ca²⁺は巧みに、かつ厳密に制御され、細胞全体のカルシウム恒常性が維持されている。

3.2 カルシウムイオンチャネルとしての IP3 受容体の発見

Ca²⁺がさまざまな細胞応答を引き起こすトリガーになることは古くから知られていたが⁹、どこから Ca²⁺が供給されているのかなどについて明らかになったのは比較的最近のことである。IP3 がセカンドメッセンジャーとして、細胞内の Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすことが明らかにされたことで¹⁰、IP3 受容体の存在が仮定され、IP3 のシグナルを Ca²⁺へと変換する分子の探索が進められた。

その過程で、IP3 が PLC によって産生されることや¹¹、IP3 のシグナリングではミトコンドリアからの Ca²⁺放出は起こらないことが報告された¹²。そして、筋小胞体から得たマイクロソームを用いたシングルチャネルレコーディングにより、IP3 を介して Ca²⁺放出を引き起こすチャネル分子が筋小胞体に存在することが明らかになった¹³。

一方で、小脳失調となるマウスの変異体を解析していた御子柴らは、当時 P400 と呼ばれるタンパク質が少ないことが小脳失調の原因であることを見出し、P400 の機能解析を進めていた¹⁴。この P400 遺伝子のクローニングと機能解析から、P400 が小胞体膜に存在する IP3 結合タンパク質であることが判明し¹⁵、精製した P400 タンパク質を用いた再構成系によって、IP3 受容体は Ca²⁺チャネル内蔵型の受容体であることが確定した^{16,17}。また、御子柴らが P400 遺伝子の全長配列を発表したのと同じ号の Nature 誌に、のちにメンブレントラフィックの功績でノーベル賞を受賞することになる Thomas C. Südhof の研究グループもリアノジン受容体に似た配列をもつタンパク質として IP3 受容体のクローニングを報告している¹⁸。

3.3 IP3 受容体の構造と制御

IP3 受容体は単量体が分子量 300 kDa をこえる巨大な 6 回膜貫通型の膜タンパク質であり、四量体を形成してはじめて Ca²⁺チャネルとして機能する。IP3 受容体の N 末端側ドメインと C 末端側ドメインは、ともにサイトゾルに露出し、IP3 受容ドメインや様々な相互作用因子との作用領域を形成している¹⁹。チャネルの制御とは別に非常に多くのタンパク質と相互作用することから、パートナータンパク質の集積地点として、IP3 受容体は細胞内シグナル伝達のハブとしても働くと考えられている²⁰。IP3 受容体の小胞体内腔側には 3 つのループ領域があるが、主要な領域は 3 番目のループ領域のみであり、この領域がチャネルの孔 (ポア) を形成する重要な領域となっている²¹(図 3-2A, B)。また、この領域に 4 つのシステイン残基が存在する (Cys2505、Cys2513、Cys2536、Cys2542)。IP3 受容体の制御に関与すると報告された小胞体のレドックスタンパク質 ERp44 が相互作用するシステイン残基は N 末端側から 3 つであり (今後、5-6 番目の膜貫通ドメイン (TMD) 間のループ領域に存在す

るシステイン残基を N 末側から Cys1 から Cys4、あるいは一文字表記で C1 から C4 と呼ぶ)、そのうちの Cys1-Cys2 ペアの分子内ジスルフィド結合は形成されることが報告されている²² (図 3-2B, C)。

また、リン酸化修飾によっても IP3 受容体は制御を受ける²³。Tyr353 のリン酸化修飾は IP3 受容体と IP3 のアフィニティを上昇させることが知られ²⁴、Ser1598 と Ser1764 のリン酸化修飾は、シングルチャネルレコーディングの解析からチャネルの開口率を上げることが報告されている²⁵。しかし、非常に多くの潜在的なリン酸化修飾サイトをもつため、その全容は依然として明らかになっていない。

3.4 細胞内のレドックス環境

細胞内にはグルタチオンという Glu-Cys-Gly からなるトリペプチドのチオール分子が、システインなど他のチオール基を持つ分子よりも高濃度 (0.1~10 mM) に存在する。そのため、細胞内のレドックス環境は、還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) によって緩衝され、その酸化還元比 ($[GSH]^2 / [GSSG]$) に基づいて、酸化還元電位 (レドックスポテンシャル) を考える²⁶。また、個々の分子のレドックスポテンシャルを生化学的に求めることで、細胞内の環境において酸化還元反応がどちらに進みやすいかを予測することが出来る。サイトゾルでは GSH の割合が高く ($[GSH] : [GSSG]$ で、およそ 100 : 1)、還元的な環境 (約 -300 mV) とされる²⁷。このような環境下では、ジスルフィド結合が形成されることはほとんどない。対して、小胞体は GSSG の比率が高く ($[GSH] : [GSSG]$ で、およそ 1~10 : 1)、サイトゾルと比較して相対的に酸化的な環境といえる。これまでも生化学的手法によって、グルタチオンの量が測定され、細胞内のグルタチオンの濃度や酸化還元比が見積もられてきたが、生細胞内の GSH 濃度、特にオルガネラ内の GSH 濃度を正確に測定することは困難であった。しかし、近年、新たな測定方法が提案され、生細胞内の GSH 濃度の測定が可能になった²⁸。小胞体の総量としてのグルタチオン濃度 (GSH と GSSG 両方を含む) は 15 mM とサイトゾルの総量としてのグルタチオン濃度 (7 mM) よりも高く、小胞体膜を隔てたサイトゾルとの間に濃度勾配が存在すると示唆されている²⁹。小胞体のレドックスポテンシャルはいまだに決定的な値は定かではないが、およそ -150 mV から -200 mV 程度と考えられている^{30,31}。このような環境下において、GSH やシステインが小胞体の酸化還元酵素 PDI ファミリータンパク質 (protein disulfide isomerases ; PDIs) によって酸化されやすいことが説明でき、PDI から PDI 酸化還元酵素である ER oxidoreductin 1 (ER01) への電子伝達もレドックスポテンシャルから考えると進行しやすい反応であることがわかる。つまり、小胞体のレドックスポテンシャルが約 -200 mV という環境のもとで平衡状態を考えたとき、チオール基として存在するよりも、ジスルフィド結合を形成した方が安定であり、その存在比が多くなるということである。また、酸化的なレドックスポテンシャルをもつ PDI ファミリータンパク質の活性中心は、ほとんどが開裂した還元型として存在することになり、常にドナーから電子を供給される

ことになるため、酸化酵素として機能する。一方、レドックスポテンシャルが小胞体の環境よりも低い ERdj5 は、小胞体内では酸化型が多く存在することになり、常にアクセプターに対して電子を与えることになるため、還元酵素として機能する³²。また、GSH は活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) と反応して酸化型へと変換される。したがって、サイトゾルの環境とは対照的に、グルタチオン平衡系における GSSG の比率が大きくなることで、システイン残基は還元されにくく、かつ PDI ファミリータンパク質によって絶えず酸化される環境にある。このことが、小胞体を酸化的フォールディングの場とし、ジスルフィド結合形成が小胞体で優位に進む理由である。

3.5 細胞内の環境を感知するセンサータンパク質

前述のような細胞内環境は、以前から細胞を破碎したサンプルを生化学的に解析する、あるいはケミカルプローブを用いて定量するというアプローチによって明らかにされてきた。これらの手法では、サンプリング過程で起こる変化のために生きた細胞の環境を反映していない可能性があり、またケミカルプローブをオルガネラ特異的に標識することは容易ではなく、正確な測定が困難であった。近年、遺伝的にコードされた蛍光タンパク質を改変することで、ケミカルプローブが抱えていたオルガネラへの標的化などに関する問題が克服されつつある。特定のオルガネラへの標的化配列を蛍光タンパク質に付加することで、生きた細胞内のオルガネラを特異的に観察することができる³³。このような蛍光タンパク質をベースに設計されたセンサータンパク質は、分子内フェルスター共鳴エネルギー転移 (Förster resonance energy transfer ; FRET) を用いた 2 蛍光タンパク質型のものと一分子改変型のもの開発が進んでいる³⁴。特に Ca²⁺ のイメージングを目指したセンサータンパク質の開発は、さまざまな細胞内環境のイメージングにさきがけて行われた³⁵。その後、ライブセルイメージングにおける実用性を求めて、Ca²⁺ に対する感受性の改良などが現在も継続的に行われている^{36,37}。

他のイオンや小分子に対するセンサータンパク質の開発は、センサー領域に用いるタンパク質を置換することで作製される³⁸。レドックス環境の測定では、センサー領域にシステイン残基を少なくとも 2 つ持たせたセンサータンパク質が開発されている^{39,40}。前述のように、細胞内でチオール基が酸化されるかどうかは、定常条件ではグルタチオン緩衝系に依存すると考えられるため、人工的に導入したシステインにジスルフィド結合が形成されるかどうかを指標とすることが出来る。

本論文においても、サイトゾルと小胞体内腔という 2 つの全く異なる細胞内環境を定量的に測定するため、それぞれの環境の測定に適したバリエーションを選別し、さらに蛍光強度比にもとづいたレシオ測定が可能なセンサータンパク質を採用し、実験に用いた。

3.6 小胞体の機能と環境、分子スイッチとしてのレドックス状態

哺乳類動物細胞における小胞体の機能は多様である。具体的には、分泌タンパク質・膜タ

ンパク質の生合成と成熟、翻訳後修飾、Ca²⁺の細胞内貯蔵、脂質の代謝などがよく知られている。このような機能を適切に発揮するために、小胞体も特異な環境を維持していると考えられている。なかでも分泌タンパク質および膜タンパク質の量は、全タンパク質の3割以上にあたるともいわれ⁴¹、小胞体の中で行われるタンパク質の翻訳後修飾と成熟という機能の重要度は高い。タンパク質の立体構造の安定化に寄与するジスルフィド結合形成という酸化反応にとって、小胞体の酸化的環境は有利な環境であると言える⁴²。多くの研究から、これらの小胞体の機能と環境は互いに独立したものではなく、相互に緊密な連携を取りながら全体の機能を維持していると考えられる⁴³。また、近年盛んにオルガネラ間の接触部位の研究が行われているように、小胞体の恒常性は小胞体と相互作用するオルガネラの制御にも寄与し、細胞全体の恒常性を担保していることが明らかになりつつある⁴⁴。

さらに、環境の変化を細胞内で検知し、細胞応答を引き起こす巧みな仕組みが明らかになってきている。例えば、細胞内でミトコンドリアの異常などによってサイトゾルの過酸化水素が過剰になると酸化ストレス応答と呼ばれる、細胞内の異常を取り除くための転写誘導が行われる⁴⁵。この時、酸化ストレスを検知する仕組みとして、サイトゾルで通常は形成されることのないジスルフィド結合が形成されることによって、Keap1という酸化ストレスセンサータンパク質の構造変化が引き起こされ、活性化するというモデルが提唱されている⁴⁶。このように、タンパク質のジスルフィド結合の形成は単に分泌タンパク質の立体構造を安定化させるという役割だけではなく、ジスルフィド結合の形成の有無によってタンパク質の機能を切り替える分子スイッチとしての役割が明らかになってきている⁴⁷。

3.7 レドックス制御によるカルシウム恒常性維持

これまでに、小胞体膜上に存在するCa²⁺チャネル、ポンプ、センサーについては、数多くの制御因子が同定されてきたが、これらの制御因子はサイトゾルに局在するものであり、小胞体内腔の因子は発見されてこなかった。しかし、近年、相次いで小胞体内腔からの制御因子が報告された。興味深いことに、それらはいずれも小胞体に局在する分子シャペロンや酸化還元酵素であった⁴⁸⁻⁵³。また、小胞体のレドックス環境を攪乱した際に、Ca²⁺環境が乱されること、あるいはCa²⁺環境を攪乱した際に、レドックス環境が乱されるというレドックス環境とCa²⁺環境間にクロストークが存在する可能性も報告されている⁵⁴。

Ca²⁺ポンプSERCAによるCa²⁺取り込みは、小胞体のCa²⁺濃度を恒常的に維持するために、重要な役割を果たしている。ユビキタスに発現しているSERCA2bは小胞体内腔側のループ領域にシステイン残基を2つ有しており、このシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成し、酸化状態になると活性が低下する。このジスルフィド結合形成は酸化酵素ERp57およびレクチン様分子シャペロンCRTが寄与していると報告されている^{48,55}

我々は、還元酵素ERdj5がSERCA2bの小胞体内腔側のジスルフィド結合を還元し、ポンプ活性を上昇させることを明らかにしてきた。また、ERdj5は高いCa²⁺濃度の環境下では、自身が多量体化し、SERCA2bと解離することで、Ca²⁺濃度に応じた活性制御を行っているこ

とを明らかにした⁵⁶(図 3-3)。一方で、Ca²⁺の放出を担う Ca²⁺チャネル IP3 受容体については、還元状態で活性化する SERCA2b とは対照的に、還元的環境下で不活性化し酸化的環境下で活性化すると考えられている。この機序は、PDI ファミリータンパク質の一つである ERp44 が還元状態の IP3R1 とチャネルポア近傍で相互作用すること、および小胞体酸化酵素 ER01 に依存した小胞体ストレス時の活性化が報告されてきたことによる^{51, 57, 58}(図 3-3)。しかし、ERp44 に還元活性はないことが報告されており⁵⁹、ERp44 が直接 IP3R1 を還元することは起こりえない。すなわち、他の酸化還元酵素の作用が必要であることが想定される。

3.8 本研究の目的

IP3 受容体の Ca²⁺チャネルとしての活性は、病理学的な解析や精製 IP3 受容体を用いた解析から、酸化によって変動することが報告されている⁶⁰。小胞体内腔の環境変化が IP3 受容体の活性に影響を及ぼすことも示唆されていたが、その制御メカニズムは明らかではなかった。そこで、本研究では IP3 受容体に対して小胞体内腔から行われるレドックスによる制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。とくに小胞体内腔の PDI ファミリータンパク質群に着目し、IP3 受容体の酸化還元に関わる因子の同定を目指した。

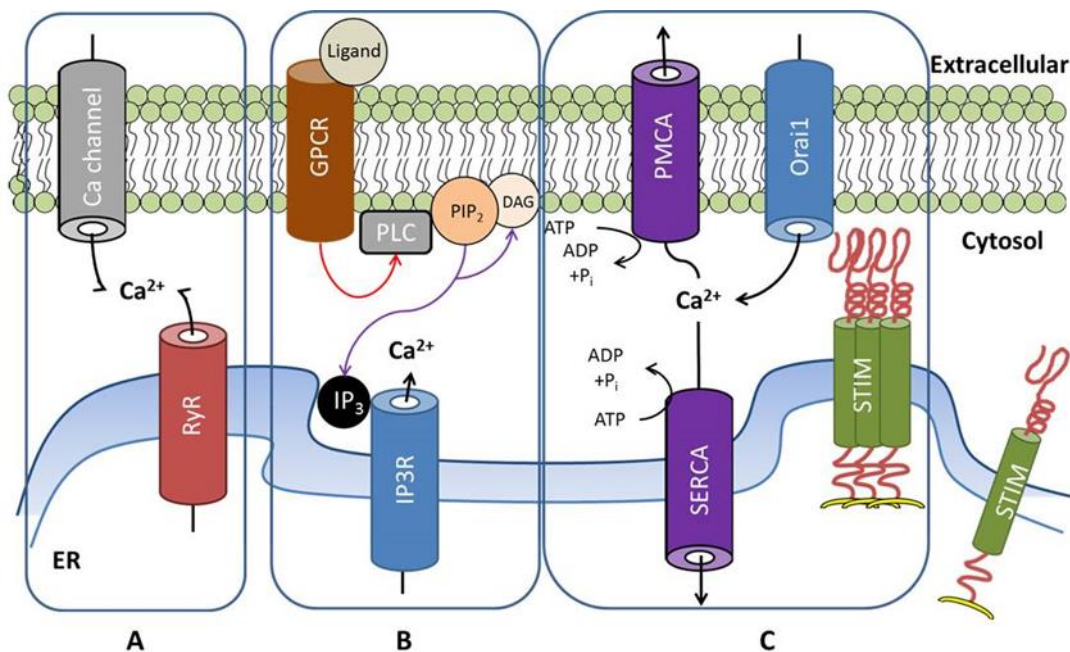


図 3-1：小胞体が関わる細胞内のカルシウム動態

- A) CICR は、細胞膜上の Ca^{2+} チャネルと RyR に依存し、サイトゾルの Ca^{2+} 濃度を上昇させる経路である。
- B) IICR は、GPCR がリガンドと結合したとき、PLC が活性化され、膜成分である PIP₂ を DAG と IP₃ に切断し、サイトゾルに放出された IP₃ を IP₃R が受容することで小胞体からサイトゾルへの Ca^{2+} 放出を促す経路である。
- C) SOCE は、小胞体の Ca^{2+} センサーSTIM が小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度低下によって多量体化し、細胞膜の Ca^{2+} チャネル Orai1 を開口させ、サイトゾルへ流入した Ca^{2+} が SERCA を介して小胞体へと取り込まれる経路である。

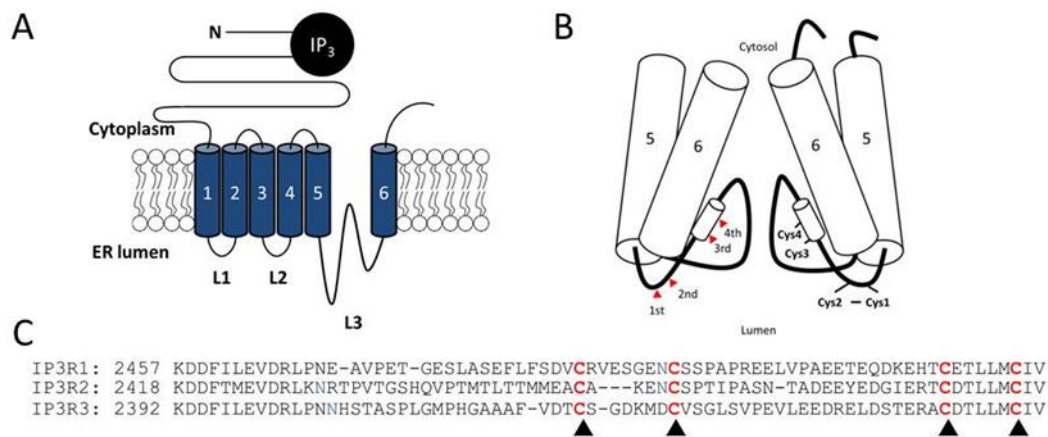


図 3-2 : IP3 受容体の基本構造

- A) IP3 受容体のドメイン構造を示す。IP3 受容体は 6 つの膜貫通ドメイン (TMD) とサイトゾルに IP3 結合領域を持つ。小胞体内腔側ループ領域は 3 つ存在する (L1、L2、L3) が、チャネルとしての機能的なドメインを形成しているのは L3 のみである。
- B) チャネルポアを形成する 5 番目と 6 番目の TMD 間におけるシステイン残基の配置を模式的に示す。C1 と C2 は内腔のループ領域に、C3 と C4 は膜内部のヘリックス近傍に位置する。
- C) ヒト IP3 受容体の L3 領域のアミノ酸配列を比較すると、TMD5-6 の間に存在する 4 つのシステインは全てのサブタイプにおいて保存されている。

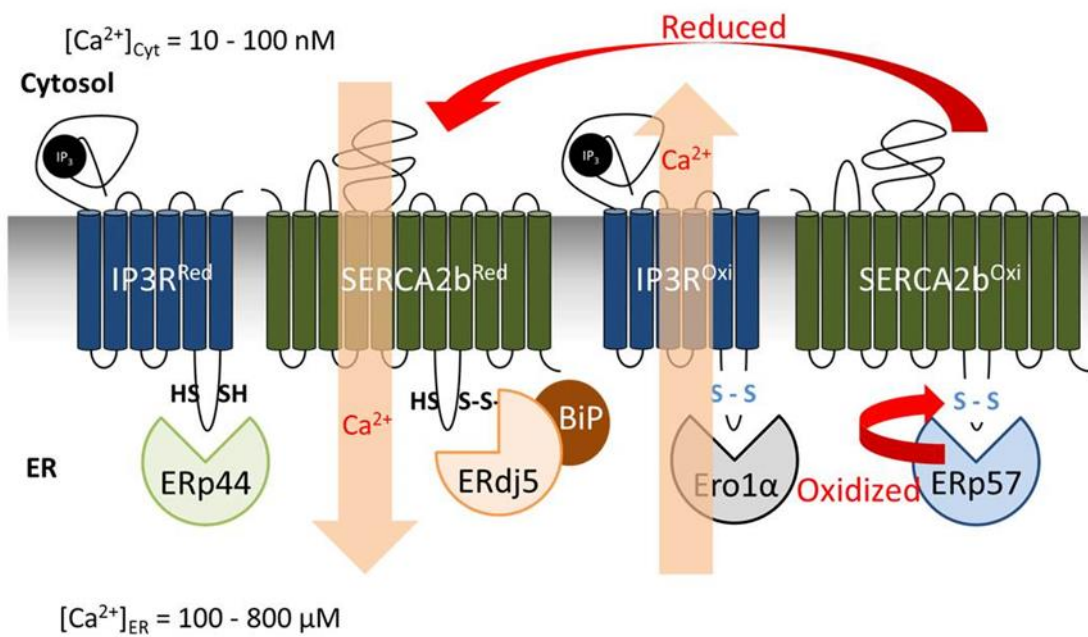


図 3-3：小胞体の酸化還元酵素によるカルシウム制御

小胞体内腔環境が還元的な時、IP3 受容体は ERp44 により負に制御される。一方で、SERCA2b は ERdj5 により活性化される。対照的に、酸化的環境では、IP3 受容体は Ero1 依存的な活性化が起こる。また、SERCA2b は ERp57 によりポンプ活性が抑えられる。

4. 実験材料および方法

4.1 細胞培養

HeLa-Kyoto、HEK293T 細胞は、高グルコース含有ダルベッコ変性イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium ; DMEM) (11995; Gibco) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS) を 10% (v/v) になるように混合し、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (06168-34; Nacalai Tesuque) を 1% (v/v) になるように加えたものを培地として使用し、37°C の 7% 炭酸ガスインキュベーター (以下 CO₂ インキュベーター) 内で培養した。

蛍光タンパク質を用いた蛍光輝度の測定用には、FluoroBrite DMEM (A1896701; Gibco) に、10% FBS と 1% GlutaMAX (35050061; Thermo Fisher Scientific) になるように加えた培地を用いて、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。全ての培養細胞は培養細胞が 80% コンフルエントになる頃にダルベッコリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline ; PBS) で洗浄したのちトリプシン溶液 (0.05% Trypsin、50 mM EDTA/1×PBS) 溶液を 1 ml 加えてセルカルチャーディッシュから剥離し、継代培養を行った。実験用に細胞を播種する際には、10 μl のトリパンブルーに 10 μl の細胞懸濁液を混ぜ、自動セルカウンター Countess II (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞数を計測し、任意の細胞数でディッシュ、96 ウェルプレート (165305; Thermo Fisher Scientific) または 3.5 ϕ ガラスボトムディッシュ (D11131H; Matsunami Glass) に播種し、CO₂ インキュベーターで一晩培養した。なお、普段の培養細胞の観察には、位相差顕微鏡を用いた。

4.2 プラスミド DNA

ヒト PDI ファミリータンパク質の PDI、ERP57、ERP72、PDIR、P5、ERP46、ERP18、DNAJC10、ERO1A は、pcDNA3.1(-) ベクター (Thermo Fisher Scientific) に導入されている⁶¹。ヒト IP3R1 はかずさ DNA 研究所より購入した cDNA を pcDNA3.1(+) と pcDNA3.1(+)/Hygro ベクター (Thermo Fisher Scientific) に導入した。これらの遺伝子には hemagglutinin (HA) tag (YPYDVPDYA)、PA tag (GVAMPGAEDDVV)、または FLAG tag (DYKDDDDK) をペプチドタグとして C 末端 (小胞体残留シグナルが存在する場合には、その直前) に導入した。点変異、およびフラグメント変異体 (IP3R1/TMD5-6C 変異体) は、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (R046A; TaKaRa bio) を用いて作製した。プラスミドは、QIAGEN MAXI kit (12163; Qiagen) を用い、推奨プロトコルに従い、精製した。本研究で用いた CRISPR-Cas9 の single guide RNA (sgRNA) 標的配列は以下の通り。Human IP3R1 (5' -GTACGCGGAGGGATCGACAAA-3')、Human IP3R2 (5' - GACTCGGCCAGAAGCAGTAC-3')、Human IP3R3 (5' -TATGTATTCTGGTTAACAC-3')、Human PDI (5' -CCCTGGTGC GCGCCGACGCCCC-3')、Human ERP57 (5' - CCCGCTCGCCGCTGCTCCGAC-3')、Human PDIA5/PDIR (5' -CCGGCCGCGTGGCTGCTGCTG-3')、Human PDIA6/P5 (5' -TGTGTGGGTGTCGCGACACTGG-3')、Human ERP46 (5' -GTACACGGCCGACATGTTCA-3')、Human ERP18 (5' -GGAGACGCGCCTCGTCTCGGG-3')、Human

DNAJC10/ERdj5 (5' -TAAGAAAGAGAATGGGAGTC-3') 、 Human ERO1A (5' -GCCGGAGCTGCAATGGGCCG-3') 。 これらの配列を pSpCas9(BB)-2A-puro/pX459 (Addgene #48138)から3×FLAG タグ配列を削除したプラスミドに挿入した。CY-RL7er はオリジナルと同じセンサー配列となるように、FRET probe を mSECFP (理化学研究所の宮脇敦史博士から分与していただいた) と moxVenus (Addgene # 8068)を用いて作製した^{62,63}。Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6)は大阪大学の永井健治博士から分与していただいた⁶⁴。GEM-CEPIA1er は Addgene (#58217)から購入し、定常時のカルシウム測定に使用した³³。

4.3 プラスミドのトランスフェクションと安定発現株の樹立

polyethylenimine (PEI) max (24765; Polysciences)を用いて以下の方法で行った。6 cm² のディッシュ 1 枚あたり 500 μ l の Opti-MEM (31985062; Gibco)を1本のチューブに分注し、12 μ g の PEI max と混合し、室温で5分静置した。別のチューブにプラスミド 2 μ g を分注しておき、5分静置した PEI max 混合 OPTI-MEM と混合した。混合後、室温で少なくとも5分静置し、全量をディッシュに滴下した。CO₂ インキュベーターで培養し、二日以上培養するときは、24時間後に培地交換を行い、培養した。6 cm² のディッシュを用いない実験では、培養面積に対して同じ量比になるように適宜調整した。

安定発現株の樹立には、pcDNA3.1(+)/Hygro ベクターを用いた遺伝子導入後の細胞をハイグロマイシン (ant-hg; InvivoGen)で10日以上選択圧をかけて選別した。細胞の増殖度合いにあわせて、培地交換、継代をおこない、コンフルエントにならないようにした。

4.4 PDI s と IP3 受容体遺伝子欠損細胞株の樹立

それぞれの遺伝子を標的とする sgRNA をもつ pX459 ベクターをトランスフェクションし、24時間培養したあと、継代し、コンフルエンスを50%以下にし、1 μ g/ml のピューロマイシン (A1113803; Gibco)を含む培地に培地交換することで48時間選択圧をかけた。その後、ピューロマイシンを含まない培地に交換し、細胞を生育させた。この時点でウェスタンブロットティングにより十分な発現レベルの低下が見られた場合には、限界希釈法によりクローン化し、各クローンを特異的抗体によるウェスタンブロットティングで確認し、遺伝子欠損細胞を得た。一度目のピューロマイシン処理後の細胞集団のタンパク質の発現レベルの低下が弱いときは、同様の操作を再度行ったのちに、限界希釈法によりクローンを得た。

4.5 ウェスタンブロットティングと免疫沈降

細胞可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM N-ethylmaleimide; 1% Triton X-100; EDTA-free protease inhibitors (03969; Nacalai Tesque))により細胞を可溶化し、氷上で20分静置してから、14,000 \times g で20分間遠心した。遠心後、上清を回収し、5 \times Laemmli sample buffer を1 \times Laemmli sample buffer (46.7 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% glycerol; 1.67% sodium dodecyl sulfate (SDS); 1.55% DTT, 0.02% bromophenol

blue (BPB))となるように、混和し、電気泳動用サンプルとした。電気泳動用サンプルはヒートブロック上で60°C、10分インキュベートし、使用するまで冷凍保存した。免疫沈降には、anti-FLAG M2 affinity gel (A2220; Sigma-Aldrich)を混和して2時間4°Cでローテーション、あるいはanti-HA antibody (561; MBL)と混和して1時間4°Cでローテーション、さらにAb-Capcher MAG2 (P-052; ProteNova) と混和して1時間で4°Cローテーションした。沈降物をwashing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 1% Triton X-100)で3回洗い、sample bufferを加えて溶出した。SDS-PAGEは8%ゲル、あるいはPDIファミリータンパク質を検出するときは10%WIDE RANGE Gel (07831-94; Nacalai Tesque)を用いて、ロングゲル1枚あたり15 mAの定電流でBPBが流れきるまで泳動した。タンク式転写装置を用いて、Amersham Protran nitrocellulose membranes (10600042; Cytiva)に転写した。ウェスタンブロッティングは、それぞれ下記の一次抗体をCan Get Signal Solution 1 (NKB-201; TOYOBO)に希釈したものを用いて、4°Cで一晩反応させた。検出は主に、アルカリフォスファターゼ標識の二次抗体をもちいて、SIGMAFASTBCIP/NBT (B5655; Sigma)により発色させた。得られたウェスタンブロッティングの画像はFiji software⁶⁵ (ImageJ; National Institutes of Health)とPhotoshop CS6 (Adobe)をもちいて、直線性が失われないうように、レベル補正により明るさとコントラストを調整した。

本研究で用いた抗体とその希釈倍率を列記する。

anti-PDI (Cell Signaling Technology, 3501S, RRID:AB_2156433; 1:1000), anti-ERP57 (GeneTex, GTX113719, RRID:AB_10720538; 1:1000), anti-PDIA5 (ATLAS Antibody, HPA030355, RRID:AB_10602200; 1:1000), anti-PDIA6 (Abcam, ab154820, RRID:AB_2714011; 1:1000), anti-ERP46 (GeneTex, GTX106914, RRID:AB_11170188; 1:1000), anti-ERP19 (Santa Cruz Biotechnology, sc376410, RRID:AB_11150289; 1:500), anti-DNAJC10 (Abnova, H00054431M01, RRID:AB_534841; 1:1000), anti-ERO1A (Merck Millipore, MABT376; 1:1000), anti-IP3R1 (ATLAS Antibodies, HPA014765, RRID:AB_1851843; 1:1000), anti-IP3R2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-398434; 1:500), anti-IP3R3 (BD Bioscience, 610313, RRID:AB_397705; 1:1000), anti- Phospho-IP3 Receptor (Ser1756) (Cell Signaling Technology, 8548; RRID:AB_10949506; 1:1000), anti- Phospho-IP3 Receptor 1 (Ser1588, Ser1598) (Thermo Fisher Scientific, PA5-38628; RRID:AB_2555223; 1:1000), anti- Phospho-IP3 Receptor 1 (Tyr353) (Thermo Fisher Scientific, PA5-64735; RRID:AB_2662549; 1:500), anti-SERCA2 (Cell Signaling Technology, 9580; 1:1000), anti-B2R (Santa Cruz Biotechnology, sc-136216, RRID:AB_2064180; 1:500), anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F3165, RRID:AB_259529; 1:1000), anti-FLAG (ROCKLAND antibodies & assays, 600-401-383, RRID:AB_219374; 1:1000), anti-PA (FUJIFILM Wako, 012-25863; 1:1000), anti-HA (MBL, 561, RRID:AB_591844; 1:1000), anti-HA (MBL, M180-3, RRID:AB_10951811; 1:1000), anti- α -tubulin (MBL,

PM054, RRID:AB_10598496; 1:1000), anti-BiP (BD Bioscience, 610978, RRID:AB_398291; 1:1000), AP-conjugated goat polyclonal anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 111-055-144, RRID:AB_2337953; 1:1000), AP-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-055-146, RRID:AB_2338538; 1:1000), AP-conjugated goat polyclonal anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 112-055-003, RRID:AB_2338148; 1:1000), HRP-conjugated goat polyclonal anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, 65-6120, RRID:AB_2533967; 1:2000)

4.6 IP3 受容体のレドックス状態の検出 (ゲルシフトアッセイ)

PA タグを付加した IP3R1/TMD5-6C 変異体を発現させた細胞を PBS で洗浄したのち、PBS に懸濁した細胞を、還元剤処理 (10 mM DTT)、酸化剤処理 (1 mM dipyridyl disulfide (DPS)) と未処理の 3 条件に晒し、終濃度 10%(vol/vol) trichloroacetic acid (TCA) となるように氷冷 TCA を加え、TCA 沈殿を行った。12,000 × g で遠心し、ペレットをアセトンで 3 回以上洗ったのち、風乾させた。その後、ペレットを可溶化し、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol ; PEG) が付加されたマレイミド試薬 (2K-PEG mal) を用いてチオール基の修飾を行った。具体的には、10 mM 2K-PEG mal (SUNBRIGHT ME-020MA; Nichiyu) を含む 1× Laemmli sample buffer で可溶化し、室温に静置して反応させた後、ウェスタンブロッティングを行った⁵⁶。

4.7 リン酸化 IP3 受容体の検出

HA タグを付加した IP3R1 を安定発現する細胞から細胞可溶化液を、ホスファターゼ阻害剤 (07575-51; Nacalai Tesque) を含む細胞可溶化バッファーで調製した。上述の方法と同様に、anti-HA antibody (M180-3; MBL) と Ab-Capcher MAG2 をもちいて、免疫沈降を行った。陰性コントロールとして脱リン酸化サンプルを調製するため、ホスファターゼ阻害剤を含まない細胞可溶化バッファーでサンプリングし、洗浄後の沈降サンプルに protein phosphatase (P0753; NEB) を推奨プロトコルに従って加えたものをあわせて用意した。1× Laemmli sample buffer で溶出したサンプルを SDS-PAGE により展開し、nitrocellulose membranes に転写した。メンブレンは Blocking One-P (05999-84; Nacalai Tesque) でブロッキングし、抗体反応後は TBST で洗浄し、Amersham ECL Prime (RPN2232; Cytiva) と LAS-4000 system (Fujifilm) をもちいて検出した。

4.8 カルシウムイメージング

Ca²⁺センサータンパク質 YC3.6 または GEM-CEPIA1er を遺伝子導入した細胞を 96-well plate (165305; Thermo Fisher Scientific)、あるいは poly-L-lysine-coated glass-bottom dish (D11131H; Matsunami glass) に FluoroBrite DMEM 培地を用いて播種し、一晚培養した。

YC3.6の蛍光は、cyan fluorescent protein (CFP; excitation (ex) wavelength, 435 nm; emissions wavelength (em), 480 nm), yellow fluorescent protein (YFP; ex, 510 nm; em, 535 nm), FRET (ex, 435 nm; em, 535 nm) の3条件を VARIOSKAN LUX fluorescent plate reader (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。測定および薬剤の希釈には FluoroBrite DMEM 培地を用いて行い、VARIOSKAN LUX のディスペンサーを用いて、終濃度が表記の濃度になるように薬剤を添加した。

FRET signals は次の式に従って計算した。

$$YC \text{ signal } (\Delta R/R_0) = (R-R_0)/R_0$$

$R = \text{FRET/CFP}$, $R_0 = \text{average signal before stimulation}$

YC signals の標準化は、それぞれのトレースの最大値を抽出し、KO 細胞のシグナルと野生型細胞のシグナルの比として行った。

GEM-CEPIA1er を用いたカルシウム濃度の測定は先行研究に従った³³。

$$[Ca^{2+}]_{\text{free}} = [(R-R_{\text{min}})/(R_{\text{max}}-R)]^{1/n} \times K_d,$$

ここで、 $R = (F \text{ at } 466 \text{ nm})/(F \text{ at } 510 \text{ nm})$, $n=1.37$ and $K_d=558 \mu\text{M}$.

定常時の蛍光比の取得に続いて、 R_{min} を 20 μM digitonin, 15 μM ionomycin, 10 mM EGTA の処理によってカルシウムを細胞から完全にキレートすることで得た。さらに、 CaCl_2 を終濃度 100 mM となるように細胞外液に添加し、蛍光比の最大値 (R_{max}) を得た。

YC3.6 を発現させた HEK293T 細胞を用いたタイムラプス測定では、蛍光顕微鏡 DeltaVision Elite を使用した。20× U Apo 340 (1-UB765; Olympus, NA0.75) のレンズを使用し、3秒または5秒おきに画像取得を行った。YC3.6 を励起し、蛍光を得るために用いたフィルターセットは、次の通りである。

excitation and emission filters: 438 \pm 24 nm and 475 \pm 24 nm for ECFP, 513 \pm 17 nm and 548 \pm 22 nm for Venus

FRET シグナルについては、上述と同様の計算式を用いて算出した。

4.9 レドックスイメージング

カルシウムイメージングと同様に、レドックスセンサータンパク質 CY-RL7er を発現させた細胞を 96-well plate に播種し、蛍光プレートリーダー VARIOSKAN LUX を用いて測定した。それぞれの蛍光輝度を CFP (ex, 435 nm; em, 480 nm), YFP (ex, 510 nm; em, 535 nm), FRET (ex, 435 nm; em, 535 nm) の3条件で取得した。また、CY-RL7er の相対酸化度 (Oxidative ratio) を次のように算出した。

$$\text{Oxidative ratio} = [(R-R_{\text{red}})/(R_{\text{ox}}-R_{\text{red}})]$$

ここで、 R は定常時の FRET 蛍光と CFP の蛍光輝度の比である。 R_{ox} と R_{red} はそれぞれ 5 mM diamide による酸化処理と 10 mM DTT による還元処理を行ったときの FRET 蛍光と CFP の蛍光輝度の比であり、VARIOSKAN LUX のディスペンサーを用いて、終濃度が表記の濃度になる

ように薬剤をそれぞれの測定条件から連続して添加し、測定を行った。

4.10 ショ糖密度勾配遠心

15%-60% (w/v) のリニアなショ糖密度勾配は、gradient buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 150 mM NaCl) にショ糖を溶かした溶液を、Gradient Master (BioComp) を用いて、装置のプロトコルに従って作製した。細胞可溶化液をショ糖密度勾配の上に静かに積層し、超遠心機による遠心 (36,000 × g, 16 h) を行った。遠心後、上から 250 μL ずつフラクションを回収し、5× Laemmli sample buffer を 1× になるようにそれぞれのフラクションに加え、SDS-PAGE に用いるサンプルとした。

4.11 データ解析

DeltaVision Elite によるカルシウムイメージングの画像解析は、Fiji を用いて行った。統計解析は、プレートリーダーなどから得た生の輝度情報から Excel を用いて蛍光強度比に換算するなど必要な計算を行ったあと、GraphPad Prism を用いて unpaired two-tailed Student's t-test、one-way analysis of variance (ANOVA) を適宜行いグラフ化した。全ての検定は野生型に対する変異体の差として解析し、有意水準は p 値が 0.05 以下とした。濃度反応曲線におけるシグモイド曲線のフィッティングは、GraphPad Prism の非線形回帰、可変傾斜 (4 パラメータ) のモデルを用いた。

5. 結果

5.1 IP3 受容体と相互作用する PDI ファミリータンパク質の探索

哺乳類細胞には、およそ 20 種類の PDI ファミリータンパク質 (PDIs) が存在している。そのなかで酸化還元活性モチーフ (Cys-Xaa-Xaa-Cys, CXXC) を持つチオレドキシシン様ドメインを含む 8 種類の PDIs に注目した (図 5-1A)。IP3 受容体が PDIs の基質タンパク質になるかを検証するため、CXXC モチーフの 2 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体 (CXXA: CA 変異体) を用いて、免疫沈降実験により IP3 受容体が共沈降するかどうかを確認した。その結果、ERp72 を除く 7 種類の PDI ファミリータンパク質で共沈降が見られ、相互作用する可能性が示唆された (図 5-1B)。

5.2 PDI ファミリー遺伝子の欠損細胞株の樹立

次に、ERp72 を除く 7 種類の PDIs が IP3 受容体の活性に影響を与えている可能性を検証するため、これらの PDI ファミリー遺伝子の欠損細胞株を CRISPR-Cas9 システムにより樹立した (図 5-2A)。それぞれの特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、各 PDI ファミリー遺伝子の欠損が成功していることを確認した。また、これら PDIs の遺伝子欠損は IP3 受容体、ブラジキニン (bradykinin; BK) 受容体 B2R、SERCA2 など Ca^{2+} シグナルに影響するタンパク質の発現量に影響を与えなかった (図 5-2A)。また、IP3 受容体のサブタイプ (IP3R1-3) の三重欠損細胞 (TKO 細胞) も樹立し、使用している IP3 受容体に対する抗体がサブタイプ特異的に認識していることが確認された (図 5-2B)。

5.3 IP3 受容体を介したカルシウムイオン放出に関わる PDIs の探索

PDI ファミリー遺伝子の欠損細胞株を用いて、IP3 誘導性カルシウム放出 (IICR) に与える影響を評価するために、蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質 Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6) を一過的に発現させ、GPCR リガンドである BK で細胞を刺激し、IP3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出 (IICR) を測定した (図 5-3A)。それぞれの遺伝子欠損細胞で見られた一過的な Ca^{2+} 放出の振幅の最大値を、野生型細胞の振幅の最大値で補正し、それぞれの PDIs の遺伝子欠損による影響を比較したところ、IICR の増減が見られた (図 5-3B)。IICR は酸化酵素 ERp46 の遺伝子欠損によって大幅に減少し、PDI の欠損によってもやや減少した。PDI 酸化酵素である ER01A の欠損も IICR の減少を引き起こし、これは以前の報告と一致した⁵⁷。対照的に、還元酵素 ERdj5 と PDIR の遺伝子欠損によって IICR が増加した。

5.4 PDIs 遺伝子の欠損細胞株の定常的なカルシウムイオン環境と酸化還元環境

一過的な Ca^{2+} の放出量は小胞体のカルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_{ER}$) に依存するため、IP3 受容体の活性制御を正しく評価するには、定常状態の $[Ca^{2+}]_{ER}$ の変化に依存しないことを示す必要がある。そこで Ca^{2+} センサータンパク質 GEM-CEPIA1er を PDIs 遺伝子欠損細胞に一過的

に発現させ、センサータンパク質の飽和輝度と最小輝度をそれぞれ、塩化カルシウム添加による最大変化とカルシウムキレーターによる最小変化から測定し、定常時の Ca^{2+} 濃度を定量した。各 PDI_s 遺伝子欠損細胞の定常時の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を定量したところ、ERp57 欠損細胞でのみ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ が上昇していた (図 5-4A)。このことから ERp57 欠損による IP3 受容体からの Ca^{2+} 放出の上昇は、ERp57 による直接的な IP3 受容体の制御ではないと考えられた。

さらに、小胞体内腔の酸化還元環境が IP3 受容体に影響を及ぼす可能性を考え、FRET 型レドックスセンサータンパク質 CY-RL7er を用いて小胞体内腔のレドックス環境を測定した。レドックスセンサータンパク質の相対酸化度 (Oxidative Ratio) は酸化剤処理後と還元剤処理後の FRET 変化に基づいて算出した。ER01A 遺伝子欠損以外の遺伝子欠損細胞では小胞体内腔の酸化還元環境に変化は見られなかった (図 5-4B)。そのため、PDI ファミリータンパク質の遺伝子欠損によって引き起こされる IP3 受容体の活性変化はレドックス環境の変化によるものではないことが示唆された。

5.5 IP3 受容体の小胞体内腔にある 4 つのシステインの働き

PDI_s が IP3 受容体に対して、直接的な酸化還元反応によって制御していることが示唆されたため、IP3 受容体の小胞体内腔 4 つのシステインに着目し、変異体を作製した (たとえば C1 をアラニンに置換した変異体を ACCC、C1 と C2 に対する変異体を AACC と表記する)。これらのアラニン変異体を IP3 受容体サブタイプ三重欠損 (TKO) 細胞に、YC3.6 とともに発現させ、 Ca^{2+} チャネル活性を測定した。TKO 細胞は全ての IP3 受容体を欠損しているため、BK 刺激後の Ca^{2+} 放出は起こらなかった。野生型 IP3 受容体 (IP3R1/WT) の発現により、 Ca^{2+} 放出の回復が確認された。しかし、3 番目あるいは 4 番目のシステイン残基の一方にでも変異が入るとチャネル活性は失われたままであった。興味深いことに、AACC 変異体では、 Ca^{2+} 放出は回復したものの、野生型に対して 7 割ほどしか活性をもたなかった (図 5-5A)。

より詳細に Ca^{2+} チャネル活性に対するシステインペアの効果を検証するため、BK 誘導の Ca^{2+} 放出の濃度反応曲線を得たところ、同様に野生型よりも AACC 変異体は低い最大活性を示した。しかし、50%効果濃度 (EC_{50}) には差がないことから、IP3 受容体の IP3 に対するアフィニティの変化をもたらすものではなく、 Ca^{2+} チャネル活性そのものを変化させていることを示唆した (図 5-5B)。

5.6 IP3 受容体の C3-C4 は四量体形成に必要である

IP3 受容体は四量体として Ca^{2+} チャネル活性を発揮するため、 Ca^{2+} チャネル活性の破綻が構造異常に起因する可能性を考えた。チャネル複合体を解析するため、ショ糖密度勾配遠心による分画を行った (図 5-6)。内在性 IP3R1 と一過的に発現させた IP3R1/WT の両方が、分子量サイズ約 1.2 MDa の四量体として検出されることを確認した (フラクション 11~13)。一方、ショ糖密度勾配遠心によって得られた IP3R1/AAAA 変異体のバンドパターンは、二量体のサイズ (約 0.6 MDa) に対応するフラクション 7~9 にピークを持って検出された。

IP3R1/AACC 変異体は四量体に相当するフラクションに検出され、IP3R1/CCAC および CCCA 変異体は二量体画分にピークがあった (図 5-6A)。まとめると、図 5-5 に示す結果は、IP3R1 の C3 および C4 変異体の機能喪失が、四量体を形成できないことによって引き起こされたことを示唆している。一方で、C1-C2 システイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成し、C3-C4 システイン残基のペアでジスルフィド結合を形成するという仮定は、過去の構造解析によって支持されてきた^{22,66,67}。したがって、IP3 受容体の小胞体内腔側のループにあるシステイン残基の役割は、2つの異なる機能ペアに分けることができる。なお、PDI ファミリータンパク質を遺伝子欠損しても IP3 受容体の四量体形成に影響はなかった (図 5-6B)。

5.7 IP3R1 の酸化による IICR 増強

図 5-3 に示すように、複数の酸化還元酵素が IP3 受容体の制御に関与していることが示唆された。特に、酸化酵素 ERp46、PDI、および ER01A の遺伝子欠損は、IP3 受容体の Ca²⁺チャネル活性を有意に抑制した。以前の報告では、ERp46 が基質から電子を受け取り、それを PDI-ER01 ハブ複合体に伝達するという、レドックスタンパク質間の電子カスケードが明らかにされた⁶¹。この酸化的カスケードによる IP3 受容体の制御を確認するために、IP3R1 を安定発現する IP3 受容体 TK0 細胞に ERp46、ER01A、および PDI を過剰発現させ、YC3.6 を用いて IICR を測定した。図 5-3 の遺伝子欠損の結果と一致して、IICR は ER01A、PDI、または ERp46 の過剰発現によって上昇した (図 5-7A 上図)。次に、これらの酸化酵素による IICR の上昇が IP3R1 の小胞体内腔ループの C1-C2 ペアに依存するかどうかを調べるために、IP3 受容体 TK0 細胞に IP3R1/AACC 変異体を安定的に発現する細胞株をもちいた。IP3R1/WT 安定発現細胞への効果とは対照的に、IICR に対するこれらの酸化酵素の過剰発現の効果は IP3R1/AACC 変異体安定発現細胞では観察されなかった (図 5-7B 上図)。さらに、SERCA 阻害剤であるタプシガルギン (thapsigargin; Tg) で処理し、小胞体からの Ca²⁺漏出を観察することにより、これらの酸化酵素の過剰発現によって [Ca²⁺]_{ER} が変化していないことを確認した (図 5-7A, B 下図)。

5.8 IP3 受容体の C1-C2 への直接的な相互作用

次に、IP3 受容体の C1-C2 ジスルフィド結合への PDI ファミリータンパク質の相互作用を免疫沈降実験により検証した。IP3R1/AACC 変異体と PDIs の CA 変異体を用いた共免疫沈降実験から、C1-C2 ジスルフィド結合ペアは IP3R1 と ERp46 との相互作用に必須であるが、PDI との相互作用には必須ではなかった (図 5-8A)。また、還元酵素の候補であった PDIR と ERdj5 についても同様に解析したところ、ERdj5 のみが IP3 受容体のシステイン依存的に相互作用した (図 5-8B)。これらの結果から、ERp46 と ERdj5 が直接的な IP3R1 の制御因子であることが強く示唆された。

5.9 IICR に対する ERdj5 の効果

IICR に対する ERdj5 の効果を確認するために、BK 誘導 IICR の濃度反応曲線をプロットした。BK は HeLa 細胞において IICR を濃度依存的に誘発した。この BK 誘導 IICR は、ERdj5 遺伝子の欠損により亢進した (図 5-9)。この ERdj5 欠損細胞において観察された IICR の EC₅₀ は、野生型細胞と比較して有意な差は認められなかった。一方、IICR の最大反応については、ERdj5 欠損細胞の値の方が野生型細胞における値と比較して有意に大きかった。それ故、ERdj5 は IP₃ の受容体への結合を競合的に阻害するのではなく、非競合的に Ca²⁺チャネル活性を負に調節することが示唆された。

5.10 IP₃ 受容体の C1-C2 システインへの ERdj5 の影響

次に、IP₃R1/WT または AACCC 変異体を安定して発現する細胞から、ERdj5 を遺伝子欠損することにより、Ca²⁺チャネル活性の抑制が ERdj5 による IP₃R1 の C1-C2 ジスルフィド結合の還元によって引き起こされるかどうかを調べた。これまで用いてきた IP₃ 受容体の TKO 細胞と IP₃R1 安定発現株から ERdj5 を欠損させ、ウェスタンブロットングにより発現を確認した (図 5-2B)。これらの細胞株を用いて、IP₃R1/WT または IP₃R1/AACCC 発現細胞における BK 誘導 IICR に対する ERdj5 の効果を観察した。ERdj5 の遺伝子欠損は、IP₃R1/WT 発現細胞における IICR を有意に増加させた (図 5-10A 上図)。また、SERCA2b の阻害剤である Tg による Ca²⁺漏出では差が無かったため、IICR の増強は小胞体内腔から放出可能な遊離 Ca²⁺ の減少によるものではなかった (図 5-10A 下図)。対照的に、ERdj5 の遺伝子欠損による IICR の増強は、IP₃R1/AACCC 変異体発現細胞では観察されなかった (図 5-10B 上図)。Tg 処理後に観察された小胞体からの Ca²⁺の漏出量を考慮すると、Ca²⁺放出活性に変化はなかったと結論付けることができる (図 5-10B 下図)。これらの結果は、ERdj5 が IP₃R1 の負の調節因子であり、その変化が調節ドメインとなる C1-C2 ジスルフィド結合ペアの還元によって引き起こされたことを示唆した。

5.11 ERdj5 による IP₃R1 還元反応の検証

IP₃R1 のチャネルドメインのみを持つ PA タグ付き欠失変異体 (IP₃R1/TMD5-6C-PA) を作製することにより、IP₃R1 のすべての小胞体内腔システイン残基 (C1、C2、C3、および C4) の酸化還元状態を評価する系の構築を目指した。この欠失変異体は SDS 耐性で還元剤感受性を示す四量体を形成することが知られており⁶⁸、確かに四量体を形成することを確認した (図 5-11A)。この変異体は 7 つのシステイン残基を持ち、そのうち 4 つのシステイン残基 (C1 から C4) が小胞体内腔のループ領域に位置する。これらのシステイン残基の酸化還元状態を、ポリエチレングリコール (PEG) が付加されたマレイミド (2K-PEG ma1) による遊離チオール基修飾によって引き起こされるバンドシフトで評価した。さらに、小胞体内腔のシステイン残基に対応するバンドを、小胞体内腔のすべてのシステイン残基がアラニン残基に置換された変異体 (TMD5-6C/AAAA) と比較して検討した (図 5-11B)。TMD5-6C/AAAA 変異体の残りの

3つのチオール基はすべて 2K-PEG mal によって修飾されており、この変異体を発現する細胞を還元剤 DTT で処理してもバンドパターンに差はなかった(図 5-11B、レーン 11 および 13)。この結果は、小胞体内腔にない 3つのシステイン残基が常に還元状態であることを示し、これらの 3つのシステイン残基が還元的環境と見なされるサイトゾルに露出しているという事実と一致する。TMD5-6C/WT では3つまたは5つのチオール基の修飾が観察され(図 5-11B、レーン 6)、これは小胞体内腔の4つのシステイン残基が、すべて酸化状態にある(酸化型である)場合と、1つのジスルフィド結合ペアが還元状態(還元型)にある場合が通常は混在していることを示す。一方、ERdj5 欠損細胞では、還元型の存在比が大幅に減少していることがわかった(図 5-11B、レーン 9)。さらに、ERdj5 の過剰発現が ERdj5 欠損細胞の還元型をレスキューすることが確認された(図 5-11B、レーン 10)。

同様に、C1 および C2 の酸化還元状態への影響を調べるために、2K-PEG mal によるゲルシフトアッセイを行い、C1 と C2 に対するそれぞれの変異体の酸化還元状態を比較した(図 5-11C)。IP3R1/AAAA 変異体および IP3R1/AACC 変異体は、サイトゾルのシステイン残基のみが修飾された位置にバンドが検出され(図 5-11C、レーン 7 および 11)、これらの変異体の酸化還元状態は ERdj5 の過剰発現によって変化しなかった(図 5-11C、レーン 8 および 12)。対照的に、IP3R1/ACCC および IP3R1/CACC 変異体を発現させた細胞では、4つのシステイン残基(細胞質ドメインの3つのシステイン残基に加えて、小胞体内腔の1つのシステイン残基)が 2K-PEG mal により修飾されていた(図 5-11C、レーン 15 および 18)。これらの結果は、IP3R1 の C1-C2 に形成されるジスルフィド結合を還元するために ERdj5 が必要であることを強く示唆した。

5.12 IP3R1 の酸化還元状態とリン酸化修飾

IP3 受容体の活性制御はサイトゾルにおけるリン酸化修飾が知られているため、IP3 受容体の小胞体内腔のレドックス状態とリン酸化修飾が共役する可能性について検証した。ERdj5 の遺伝子欠損により、IP3 受容体が酸化型に偏ること(図 5-11)、また AACC 変異体は還元型ミミックとしてレドックス状態の影響を受けないことから(図 5-7 および図 5-10)、図 5-2B で示した IP3R1 の野生型および AACC 変異体の安定発現細胞を用いて、IP3 受容体のリン酸化修飾をウェスタンブロッティングにより検出した。それぞれチャンネルの活性化に寄与するリン酸化サイトについて、抗リン酸化 IP3 受容体抗体で検出したが、IP3 受容体のリン酸化状態に、酸化還元状態による差は見られなかった(図 5-12)。

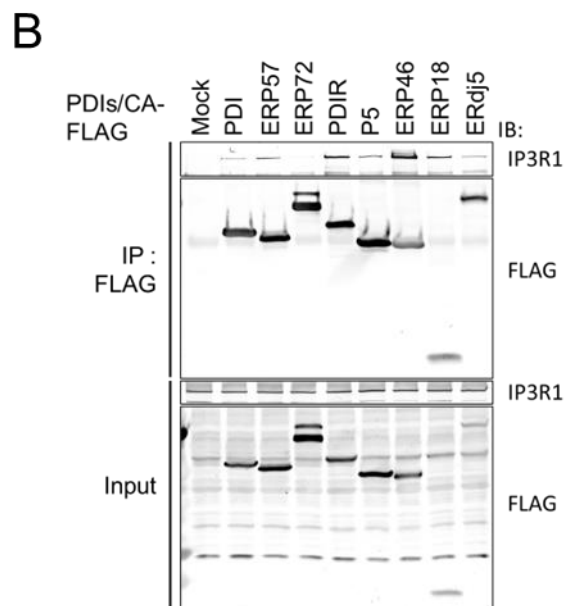
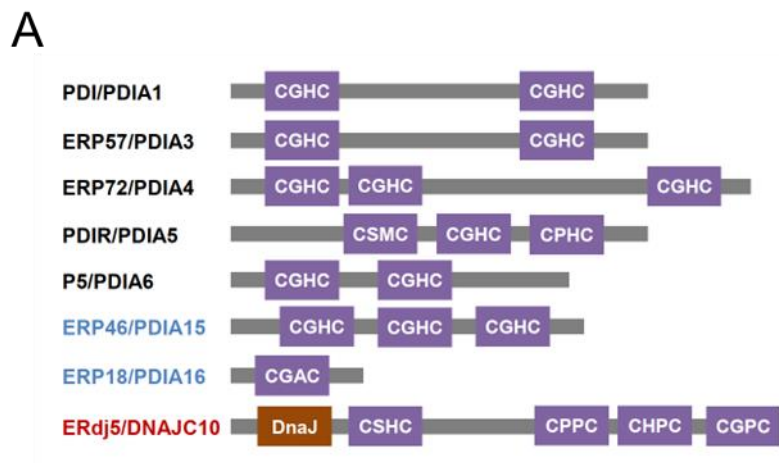


図 5-1：小胞体に局在する PDI ファミリータンパク質は IP3R1 と共沈降した

- A) 本研究で用いたヒト PDI ファミリータンパク質の模式図。酸化還元活性を持つチオレドキシシンモチーフ (CXXC) と BiP 結合領域である DnaJ ドメインを示した。黒：酸化、還元、異性化の活性が既報。青：酸化活性のみが既報。赤：還元活性のみが既報。
- B) HEK293T 細胞に表記の PDIs をトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行い、ウェスタンブロッティングにより検出した。

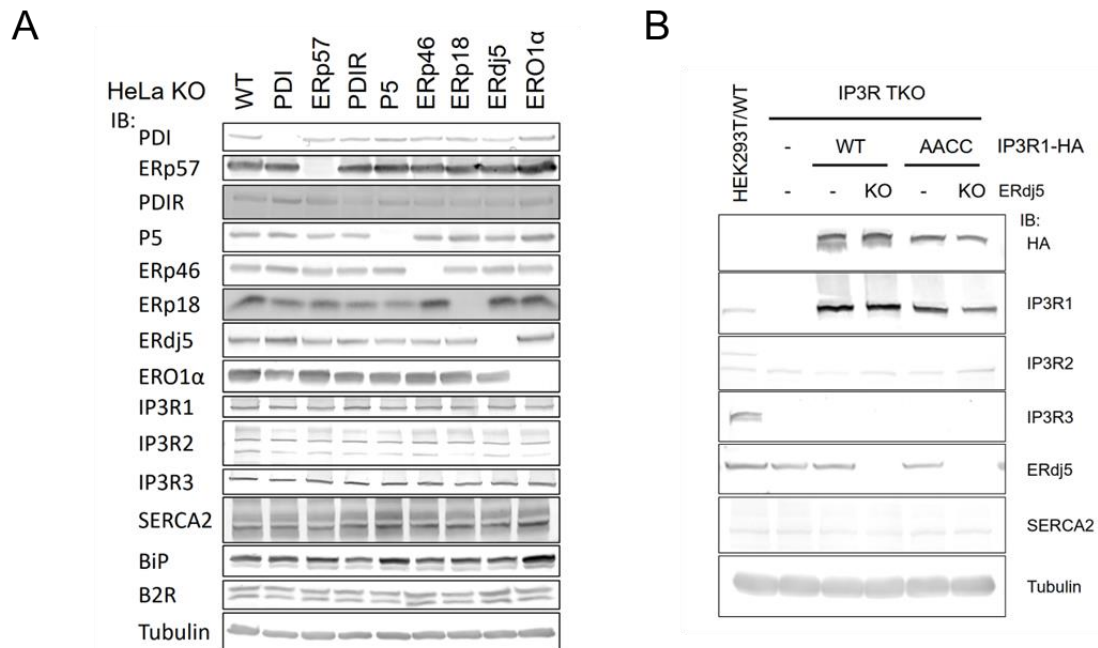
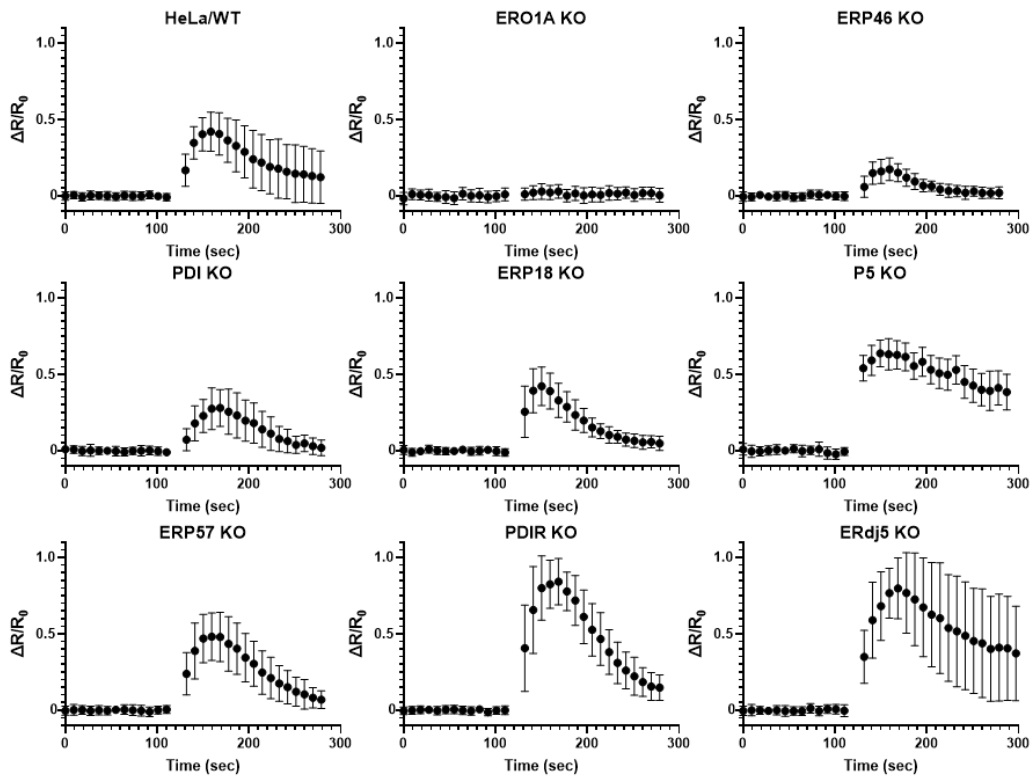


図 5-2 : PDIs 遺伝子欠損細胞と IP3 受容体遺伝子欠損細胞の樹立

- A) HeLa 細胞に表記の PDIs を標的とする CRISPR-Cas9 を導入し、限界希釈法により得た遺伝子欠損細胞株のウェスタンブロッティングを示す。表記の特異的抗体によるウェスタンブロッティングで目的遺伝子の発現の消失を確認した。
- B) A) と同様に、HEK293T 細胞を用いて、IP3R 受容体サブタイプ (IP3R1-3) TKO 細胞を樹立した。また、HA タグを付加した IP3R1/WT とシステイン変異体 IP3R1/AACC の安定発現株および ERdj5 欠損細胞も樹立し、特異的抗体によるウェスタンブロッティングで目的遺伝子の発現を検出した。

A



B

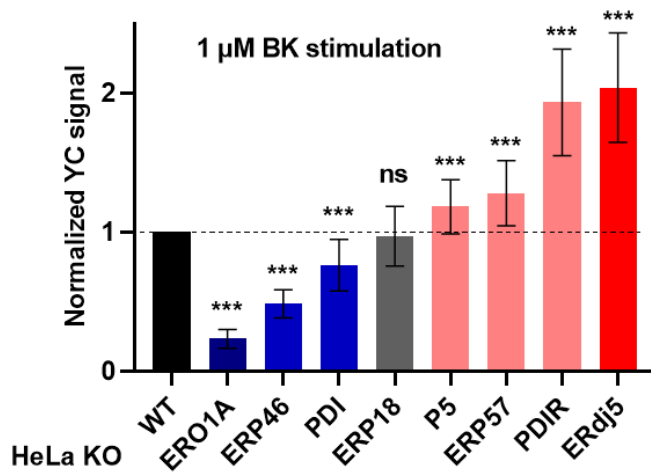
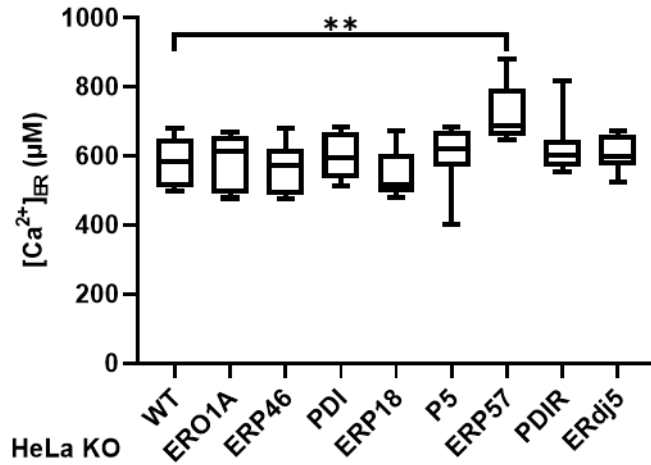


図 5-3 : PDIs KO 細胞における IICR

- A) 表記の PDI ファミリータンパク質遺伝子欠損細胞における BK 誘発の IICR を YC3.6 によって測定した。計測開始から 120 秒後、終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように BK を添加した。
- B) 各細胞での最大振幅を野生型細胞の最大振幅で補正し、シグナルが小さい順に並べた。野生型細胞よりも低下したものを青で示し、増加したものを赤で示した。
 *** $P < 0.001$ 、ns; 有意差なし。

A



B

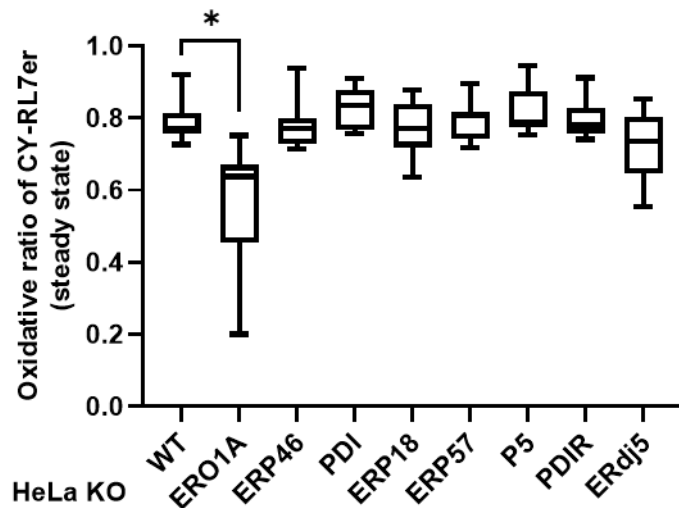
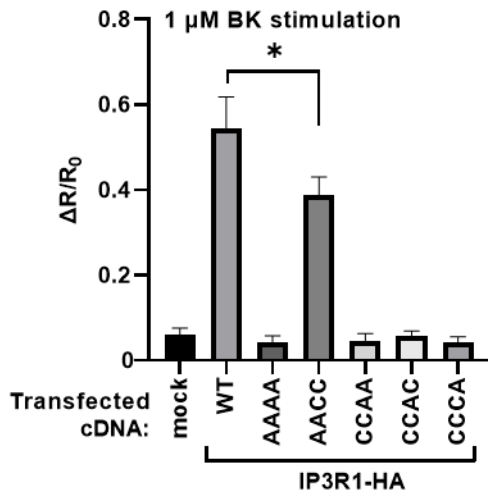


図 5-4 : PDIs KO 細胞における小胞体の内腔環境

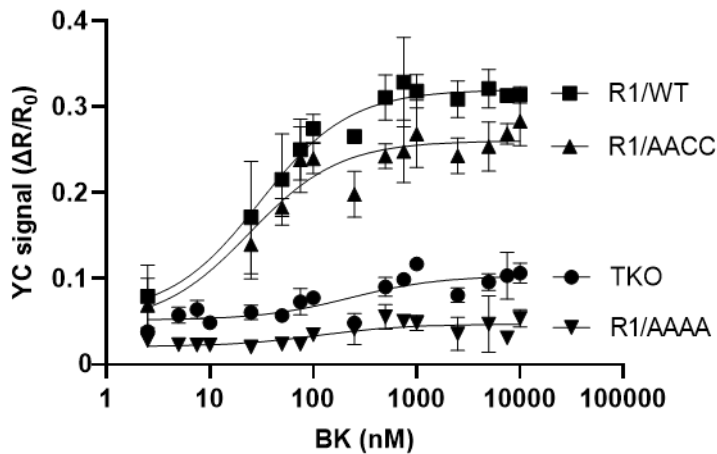
- A) 表記の PDI ファミリータンパク質遺伝子欠損細胞に Ca^{2+} センサータンパク質 GEM-CEPIA1er を発現させ、小胞体内腔の定常時のカルシウム濃度を定量した。
- B) A) と同様に、レドックスセンサータンパク質 CY-RL7er を発現させ、定常時の小胞体の酸化還元環境を測定した。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。中央値：線、上・下四分位値：箱、1.5 四分位範囲：ひげ。

A



B



Cell line	Best-fit values			95% CI (profile likelihood)		
	Bottom	Top	EC ₅₀ (nM)	Bottom	Top	EC ₅₀ (nM)
IP3R TKO	0.052	0.10	226.3	0.042 to 0.060	0.094 to 0.11	68.50 to 641.6
IP3R TKO; IP3R1/WT	0.058	0.32	30.34	0.011 to 0.10	0.31 to 0.33	18.07 to 50.57
IP3R TKO; IP3R1/AACC	0.047	0.26	24.32	-0.0044 to 0.091	0.25 to 0.27	12.14 to 46.69
IP3R TKO; IP3R1/AAAA	0.021	0.05	113.5	0.013 to 0.028	0.041 to 0.054	31.14 to 394.9

図 5-5 : IP3R1/AACC 変異体ではチャンネル活性が低下する

- A) IP₃ 受容体 TKO 細胞に IP₃ 受容体の野生型およびシステイン変異体を発現させた細胞を用いて、BK 刺激による IICR を測定した。*P<0.05
- B) A) と同様に、BK 刺激による IICR を BK の濃度反応曲線としてプロットし、非線形回帰により得たパラメータの値をそれぞれ示した。

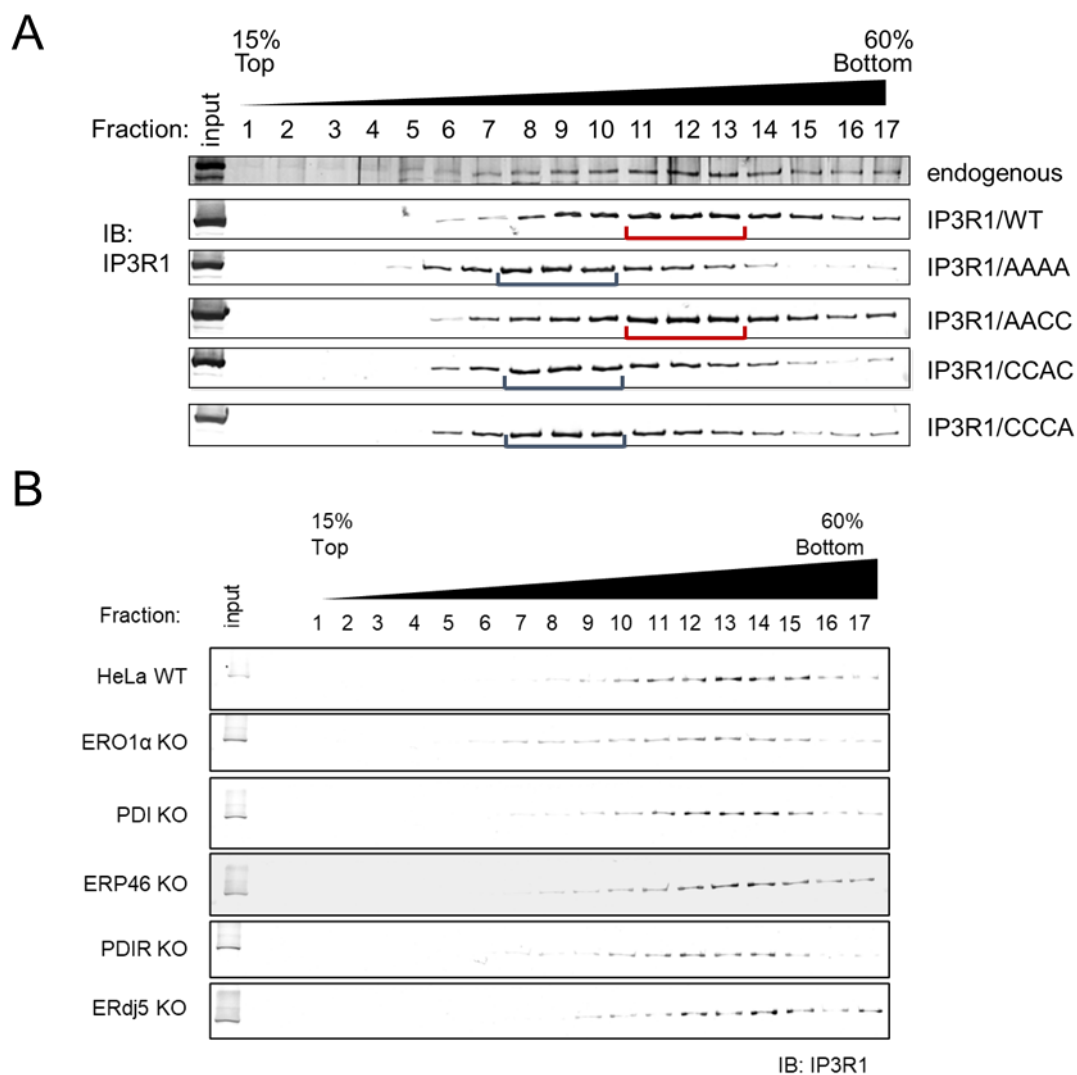


図 5-6 : ショ糖密度勾配遠心による IP3 受容体の四量体解析

- A) 表記の通り、IP3 受容体の野生型およびシステイン変異体を発現させた細胞から調製した細胞可溶化液をショ糖密度勾配遠心により、分画し、各フラクションをウェスタンブロットティングにより検出した。
- B) A) と同様に、表記の遺伝子欠損細胞を用いて、ショ糖密度勾配遠心による IP3 受容体の四量体を検出した。

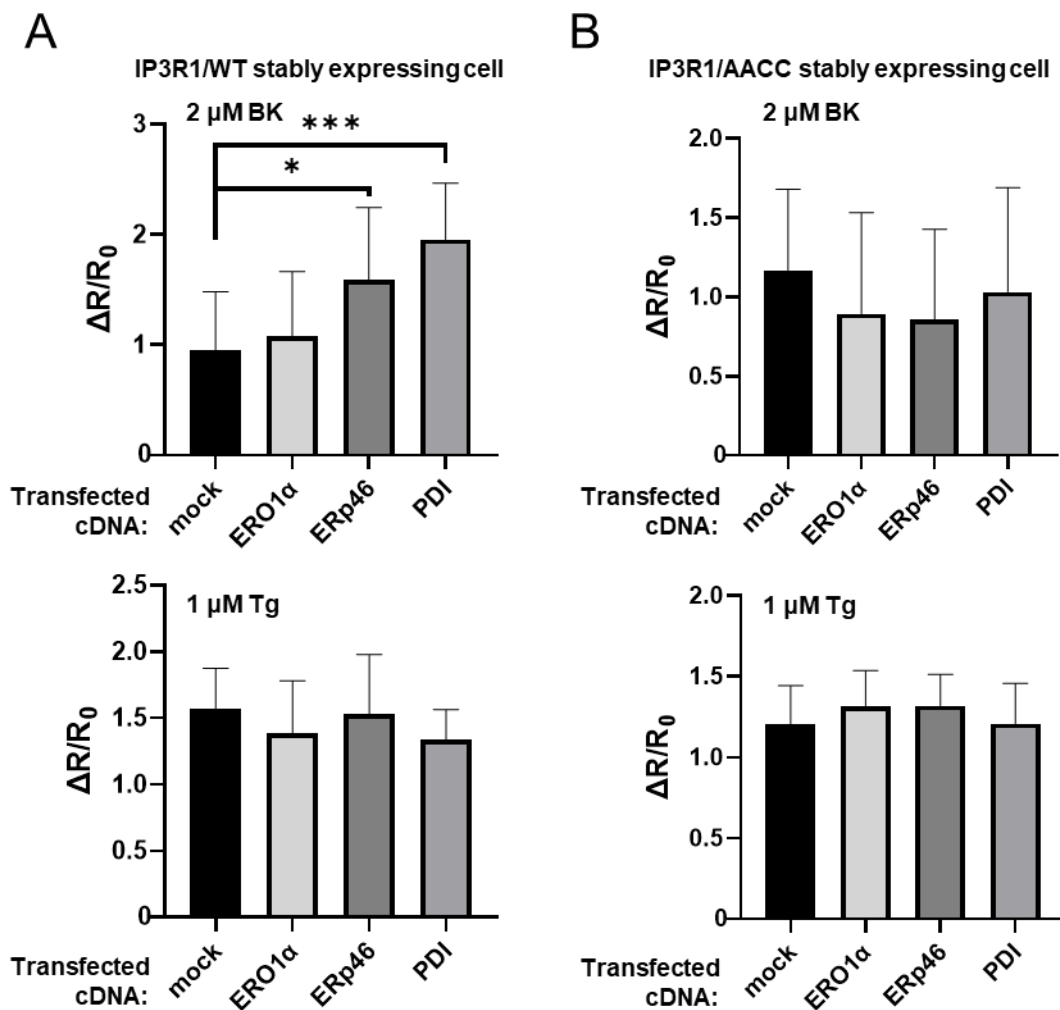


図 5-7：酸化酵素過剰発現による IICR の亢進

- A) 図 5-2 で樹立した IP3R1/WT のみを安定発現する細胞に、表記の酸化酵素を一過的に発現させ、YC3.6 を用いたカルシウムイメージングで IICR を定量した。BK 刺激による IICR の亢進は見られたが（上図）、小胞体内の Ca^{2+} レベルを Tg 処理による Ca^{2+} 漏出で検討したところ差が無かった（下図）。
- B) 同様の実験を、IP3R1/AACC 変異体のみを安定発現する細胞を用いて行った。IICR の亢進も小胞体内の Ca^{2+} レベルにも変化がなかった。

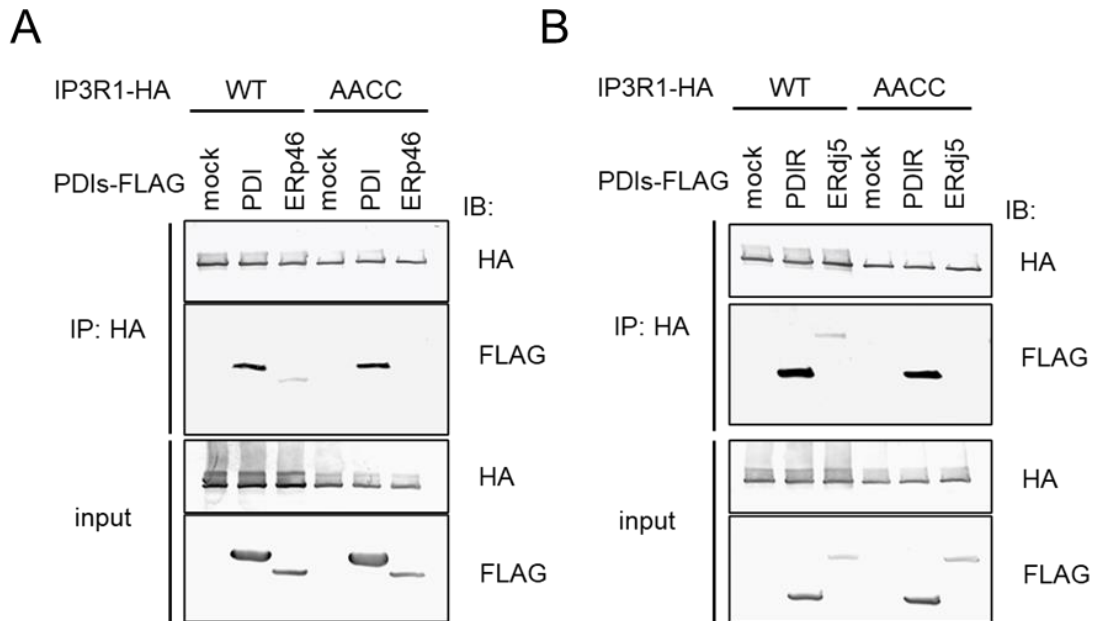
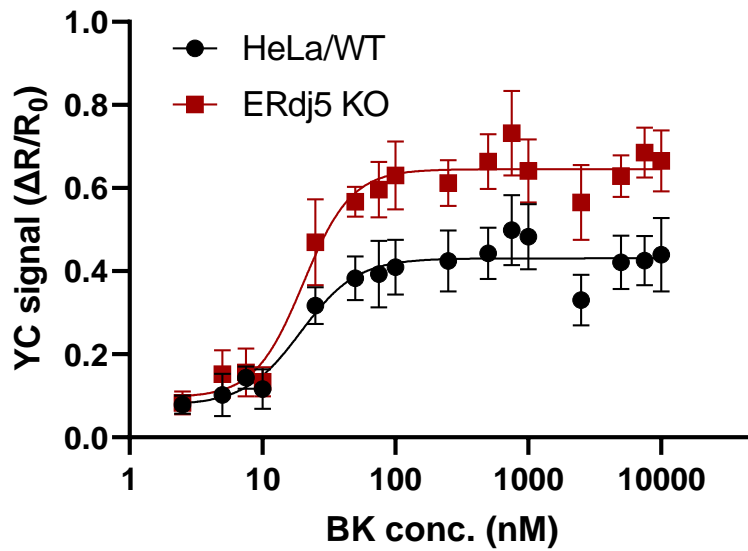


図 5-8 : ERp46 と ERdj5 は IP3R1 の C1-C2 システイン依存的に相互作用した

- A) 図 5-2 で樹立した IP3R1/WT のみを安定発現する細胞と IP3R1/AACC 変異体のみを安定発現する細胞にそれぞれ表記の PDI_s を発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行った。ERp46 は IP3R1 のシステイン依存的な相互作用を示した。
- B) A) と同様の免疫沈降実験を行った。ERdj5 は IP3R1 のシステイン依存的な相互作用を示した。



Cell line	Best-fit values			95% CI (profile likelihood)		
	Bottom	Top	EC ₅₀ (nM)	Bottom	Top	EC ₅₀ (nM)
HeLa/WT	0.077	0.43	19.45	0.028 to 0.11	0.42 to 0.45	14.97 to 24.40
HeLa/ERdj5 KO	0.096	0.65	20.25	0.052 to 0.13	0.63 to 0.66	17.40 to 23.26

図 5-9 : ERdj5 欠損細胞における BK 誘発 IICR の濃度反応曲線

図 5-2 で樹立した ERdj5 欠損細胞を用いて BK 誘発 IICR の濃度反応曲線をプロットし、非線形回帰により得たパラメータの値をそれぞれ示した。ERdj5 欠損細胞では IICR の最大値が上昇したが、EC₅₀ には野生型細胞との間に差がなかった。

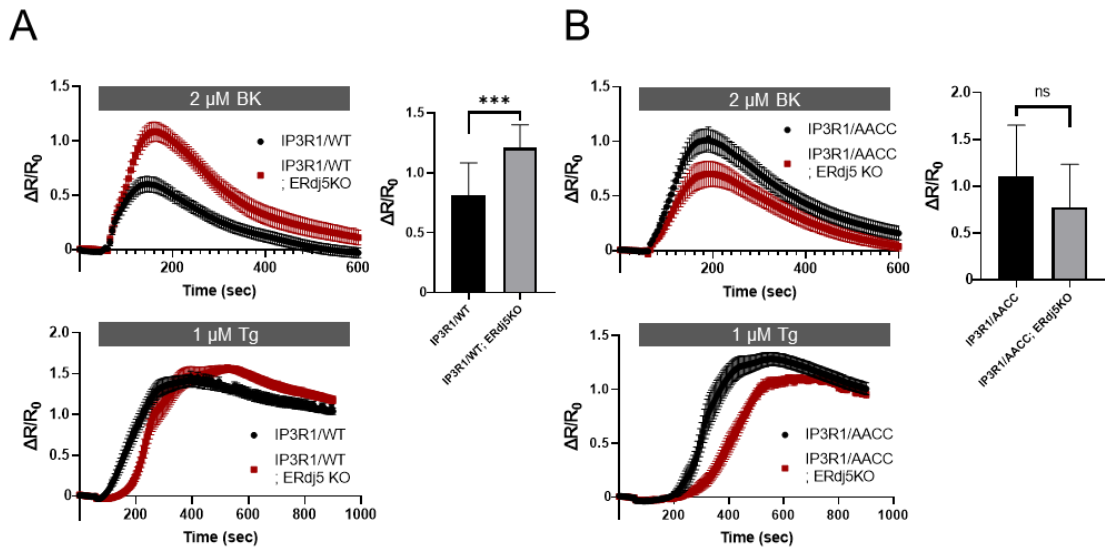


図 5-10 : ERdj5 欠損による IICR 亢進は IP3R1 のシステインに依存する

- A) IP3R1 を安定発現する細胞と YC3.6 によるカルシウムイメージングを行った。計測開始から 60 秒後、表記の終濃度となるよう薬剤を添加した。野生型 IP3R1 を発現する細胞から ERdj5 を遺伝子欠損すると IICR が亢進した (上図)。小胞体内の Ca^{2+} レベルを Tg 処理による Ca^{2+} 漏出で検討したところ差が無かった (下図)。
- B) IP3R1/AACC 変異体を発現する細胞から ERdj5 を遺伝子欠損しても IICR の亢進は見られなかった。

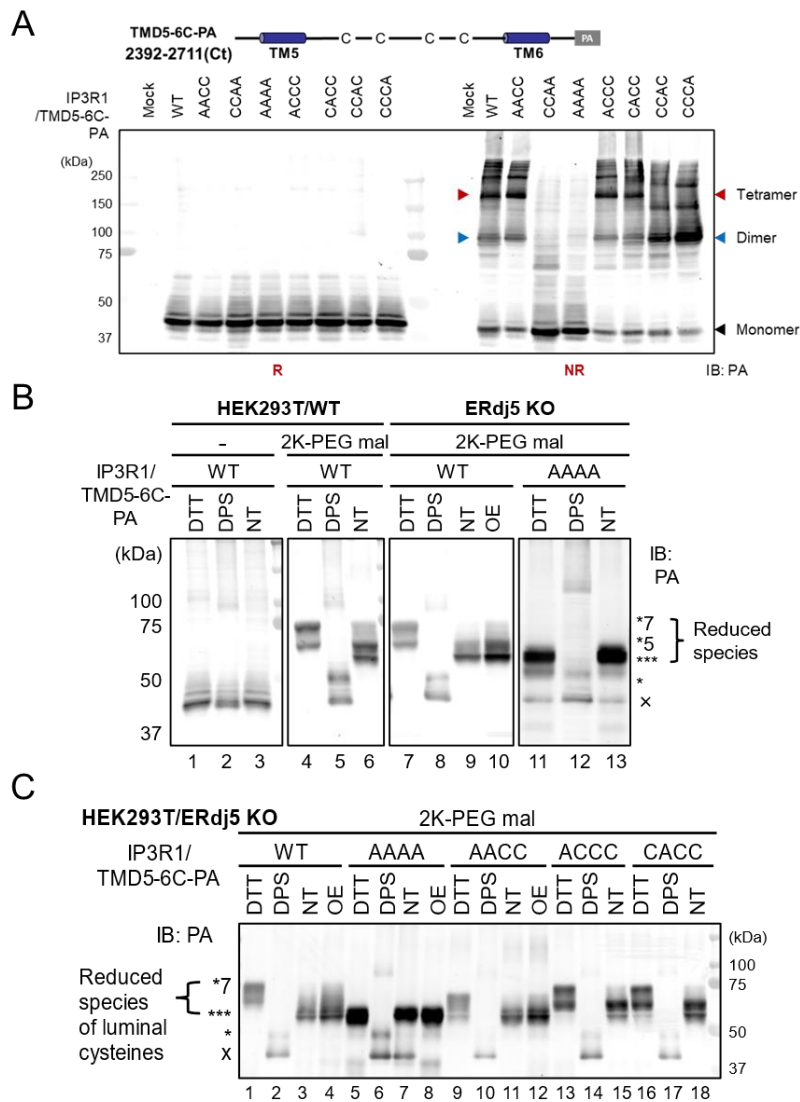


図 5-11 : IP3R1 のレドックス状態

- A) IP3R1 のチャネルポア領域のみを発現するコンストラクトを用意し、還元条件 (R) と非還元条件 (NR) で SDS-PAGE とウェスタンブロッティングを行った。IP3R1 はチャネルポア領域のみでもジスルフィド結合依存的な四量体を形成した。二量体相当のバンドを青矢じり、四量体相当のバンドを赤矢じりで示した。
- B) ERdj5 欠損細胞と野生型細胞を用いて 2K-PEG mal によるゲルシフトアッセイを行い、IP3R1 のレドックス状態を比較した。2K-PEG mal を反応させなかったサンプルと AAAA 変異体を泳動度変化を判断するコントロールとした。DTT : 還元処理、DPS : 酸化処理、NT : 未処理
- C) システイン変異体を用いて、B) と同様にゲルシフトアッセイによるレドックス状態の検出を行った。DTT : 還元処理、DPS : 酸化処理、NT : 未処理、OE : ERdj5 過剰発現

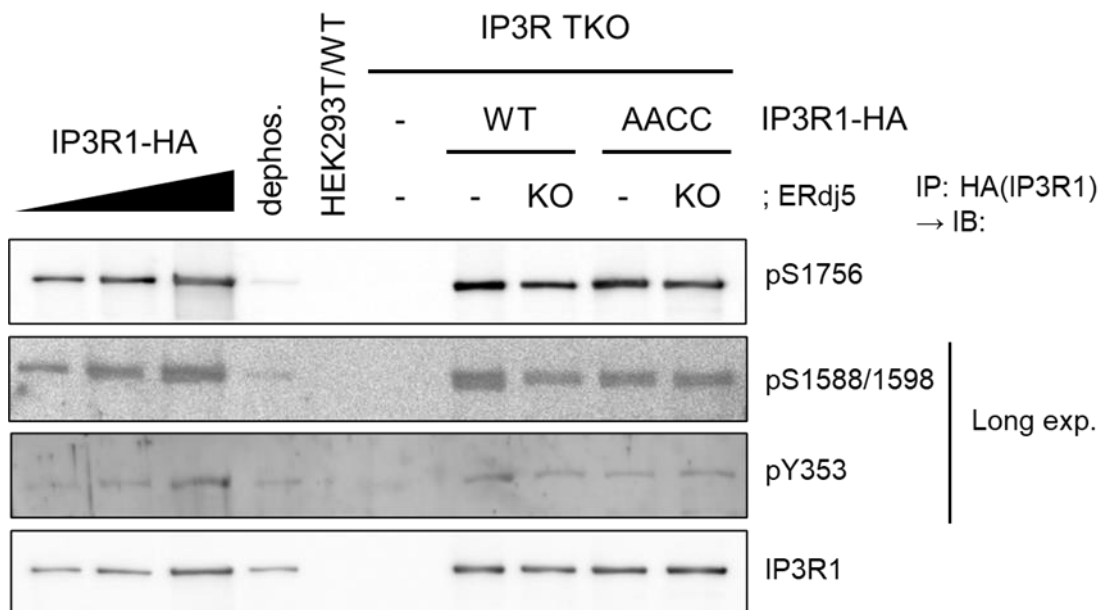


図 5-12 : IP3R1 のリン酸化修飾へのレドックス状態の影響

表記の遺伝子変異を含む IP3R1 安定発現株から IP3R1 を免疫沈降により回収し、表記の抗リン酸化 IP3R1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

dephos: 脱リン酸化処理サンプル、HEK293T/WT: IP3R1 を発現していない細胞のセルライゼートを用いたネガティブコントロール

6. 考察

6.1 PDI ファミリータンパク質の IICR への関与

本研究では、ジスルフィド結合形成という単純な修飾が Ca^{2+} 放出活性を直接変化させる IP3 受容体のレドックス依存的な制御メカニズムを実証した。CRISPR-Cas9 システムを使用して、PDI ファミリータンパク質のそれぞれがノックアウトされた細胞株を樹立し、定常状態の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ および酸化還元環境を考慮して、各細胞株の IICR を評価した。興味深いことに、IICR への影響はさまざまであったが、ERp57 が欠損された場合を除いて、定常状態の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ はほとんど変化しなかった。ERp57 は SERCA2 の負の調節因子として作用する可能性があるため、ERp57 欠損細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ の増加は以前の研究と一致する⁴⁸。したがって、IICR のわずかな増加は、ERp57 欠損細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ の増加によって引き起こされた可能性が高い。

対照的に、IICR に対する他の PDIs の影響には、複合的な原因が考えられる。P5 は miR-322 とともに Ca^{2+} のホメオスタシスに関与することが知られており、P5 の発現が抑制されると、SOCE を介した Ca^{2+} の取り込みが増加する傾向にある⁶⁹。この影響により、野生型細胞よりも P5 欠損細胞において、サイトゾルへの見かけの Ca^{2+} の変化量が上昇したと考えられる。PDIR は転写因子として機能する ATF6 の機能調節に関与しており⁷⁰、その発現の抑制は ATF6 の下流の遺伝子の発現を弱める⁷¹。ATF6 欠損細胞では、カルシウム結合タンパク質である CRT の発現が減少するため、遊離の Ca^{2+} が小胞体から漏れやすくなる^{72,73}。そのため、PDIR 欠損が ATF6 の機能喪失を引き起こし、CRT の発現低下のために見かけの IICR が上昇した可能性がある。

6.2 IP3R1 のシステインペアは 2 つの異なる役割をもつ

IP3R1 の小胞体内腔のシステイン残基 (C1 から C4 ; Cys2505、Cys2513、Cys2536、Cys2542) の変異体解析により、機能的に独立した 2 つのシステインペアの役割が明らかになった。特に、C3-C4 ジスルフィド結合が IP3R1 の四量体形成に必須の要素であることを初めて見出した。また、レドックス状態をゲルシフトアッセイによって解析したとき、IP3R1 のこれら 4 つのシステイン残基が 2 つずつバンドシフトしたことから、形成されるジスルフィド結合ペアに決まりがあることを支持している。本研究では、この 2 つのジスルフィド結合ペアのうち、C1 と C2 からなるペアは IP3R1 の Ca^{2+} チャネル活性調節に関与するのに対し、C3 と C4 からなるもう一つのペアは IP3 受容体の四量体形成に関与する、という役割の違いまで明らかにした。構造解析では、C3 と C4 からなるジスルフィド結合がサブユニット分子内で形成されていることが示されている^{21,66}。単離した IP3 受容体のサブユニット同士を混合しても四量体を形成しないため⁷⁴、このジスルフィド結合が一過的に、翻訳に共役した複合体形成過程で形成された後、架けかえられるのではないかと思われる。しかし、どのような形成過程を経るのかは、さらなる解析が必要である。

6.3 IP3R1 に対する直接的な酸化還元酵素 ; ERp46 および ERdj5

小胞体に存在する酸化酵素 ERp46 を IP3R1 の活性化因子として、還元酵素 ERdj5 を IP3R1 の直接の負の調節因子として同定することに成功した。ERp46 は小胞体内腔の酸化還元酵素がつくる酸化力供給ネットワークの中で、相対的に PDI とのアフィニティが強い⁶¹。今回、IP3 受容体の活性に影響を与えた PDI と ER01 は小胞体内腔で酸化力供給経路のハブとなるタンパク質でもあるため、IP3 受容体の酸化はこれらの酸化力供給ネットワークを介して ERp46 によって行われることがわかった(図 6-1)。さらに、ERdj5 が IP3R1 の小胞体内腔のシステイン残基 C1 と C2 の間に形成されたジスルフィド結合を直接還元し、このジスルフィド結合の還元が IICR 抑制につながることを明確に示した。そして、この IP3R1 のレドックス制御は、サイトゾルドメインにおけるリン酸化修飾による IP3R1 の調節とは独立したメカニズムであることが示唆された。

6.4 ERdj5 を介した小胞体のカルシウム恒常性維持機構モデル

以前に、Ca²⁺濃度に応じた ERdj5 のフィードバック制御メカニズムを SERCA2b カルシウムポンプの活性化の観点から実証している⁵⁶。ERdj5 は SERCA2b を還元し、ポンプ活性を上昇させるが、サイトゾルからの Ca²⁺の取り込みにより [Ca²⁺]_{ER} が十分に高くなった時に、ERdj5 は多量体を形成し、不活性化されることを示した。そして、SERCA2b は酸化され、ジスルフィド結合の形成により、ER 内腔への Ca²⁺取り込みが抑制される。ここに本研究の結論を組み込むことにより、IP3R1 および SERCA2b の制御に関して ERdj5 のレシプロカルな制御メカニズムを提唱する(図 6-2)。

[Ca²⁺]_{ER} が低い条件下では、ERdj5 は還元活性を發揮し、IP3R1 と SERCA2b の両方を還元し、SERCA2b の活性化と IP3R1 の不活性化を引き起こす。したがって、Ca²⁺の取り込みが促進され、小胞体からの放出が抑制される。この機構によって、小胞体内にカルシウムが供給され、[Ca²⁺]_{ER} が十分に高くなると、ERdj5 は多量体化によって不活性化され、小胞体内の酸化的な環境によって、IP3R1 と SERCA2b は再び酸化状態となり、IP3R1 の活性化と SERCA2b の不活性化が誘導される。この条件下では、必要に応じて活性化された IP3R1 によって小胞体内腔の Ca²⁺が積極的に放出されるが、SERCA2b による Ca²⁺の取り込みは抑制される。このレシプロカルで合目的な制御によって、サイトゾルと小胞体の大きな濃度勾配が維持されていると考えられる。

6.5 疾患との関わり

加齢ともなって小胞体の酸化還元環境が還元的になることが報告されている⁷⁵。神経変性疾患モデルにおいても小胞体の酸化還元環境は還元的にシフトし、興味深いことに、IP3 受容体や RyR は神経変性疾患の原因遺伝子との相互作用も報告されており、変性タンパク質の凝集体に巻き込まれる可能性が示唆されている⁷⁶。これらは、小胞体のカルシウム恒常性と酸化還元環境のクロストークが、細胞全体の恒常性に重要とされる例であると

言える。さらに、ERdj5 が生体内でカルシウム制御の主要因子として働いている可能性については、ERdj5 を発現抑制した表現型が興味深い。ERdj5 を発現抑制した線虫の筋肉の細胞、および哺乳類細胞を観察すると、通常は管状の構造をとっているミトコンドリアが断片化する⁷⁷。ミトコンドリアの融合と分裂の運命決定を担う因子は、Ca²⁺応答性因子による制御が報告されており、ERdj5 による Ca²⁺チャネルとポンプの制御が、ERdj5 欠損によって恒常的に破綻し、異常なミトコンドリアの形態を引き起こしていることをこれまでに明らかにした⁷⁸。

一方で、個体レベルでは ERdj5 のノックアウトマウスは、唾液腺において小胞体ストレスの亢進が見られる以外、顕著な表現型を示さない⁷⁹。小胞体ストレスが惹起される原因は、唾液腺から分泌される消化酵素である α -アミラーゼがミスフォールドし、小胞体に蓄積するためと考えられているが、詳細は不明である。しかし、興味深いことに、IP3R2 と IP3R3 の二重欠損では Ca²⁺シグナルを介したアミラーゼの分泌が起こらなくなるという類似した表現型が報告されている⁸⁰。したがって、カルシウム恒常性がバランスよく保たれることがタンパク質の分泌には重要であり、IP3 受容体の活性が正負両面どちらに偏ったとしても、分泌タンパク質の分泌異常につながる可能性が示唆される。

以上より、ERdj5 を介したカルシウム恒常性維持機構は、細胞機能制御、生体機能制御としても重要な役割を担っていると考えられる。

6.6 今後の課題

本研究では、IP3R1 のホモ四量体のみを分析したが、IP3 受容体の小胞体内腔のシステイン残基 (C1 から C4) は他のサブタイプでも保存されている。IP3R1 に注目した理由は、ERp44 による調節が IP3R1 特異的と報告され⁵¹、酸化還元制御が IP3R1 のみに起こる特異的な現象である可能性があったからである。また、IP3 受容体は異なるサブタイプ間でヘテロ四量体を形成できるため、本研究では IP3 受容体の TKO 細胞を親細胞株として使用し、IP3R1 入れ戻し安定発現による実験系でデータを収集し、システイン変異を含むホモ四量体のみを焦点を当てた。実験系を単純化することにより、IP3R1 の小胞体内腔における酸化還元制御のメカニズムを明確に検証することができたが、一方で、酸化還元制御が IP3R2 や IP3R3 にも存在するかどうか、あるいはヘテロ四量体としてどのように影響を受けるかなど、IP3 受容体のレドックス制御を完全に理解するには、依然として検討の余地がある。

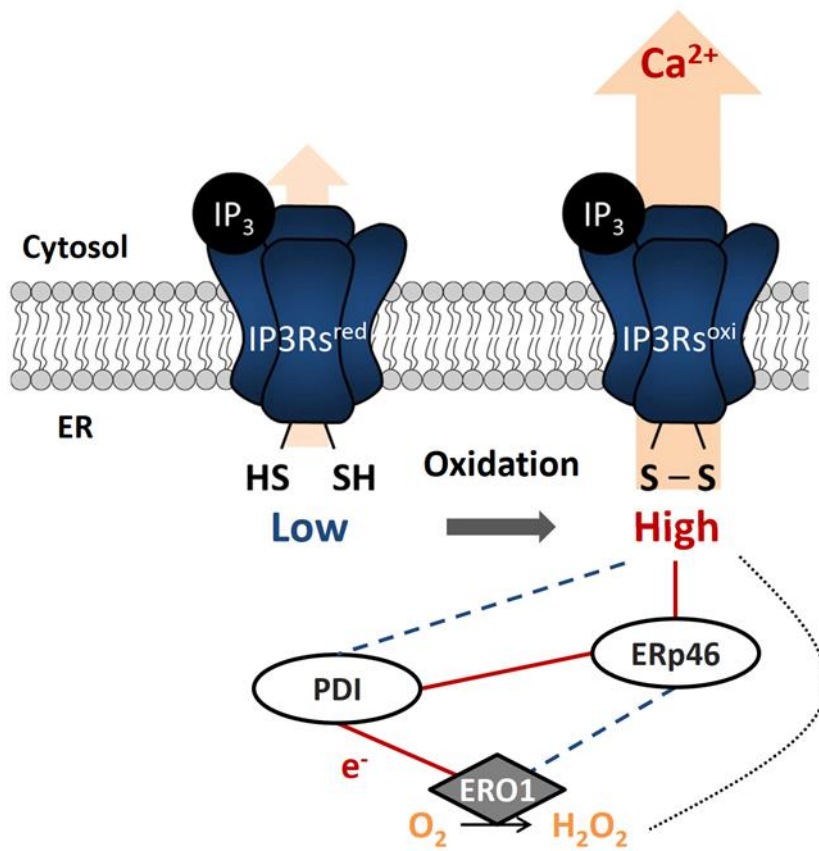


図 6-1 : 小胞体の酸化力供給ネットワークを介した IP3R1 の活性化モデル

IP3Rs は小胞体内腔のシステインが酸化されることでチャネル活性が上昇する。ERp46 は IP3R に対する直接的な酸化酵素であり、PDI-ERO1 をハブとする小胞体のレドックスネットワークを介して電子を運搬する。赤線は相互作用と電子の移動を示し、青の破線は間接的な影響を示す。また過酸化水素が IP3Rs を酸化する可能性も示唆されている。

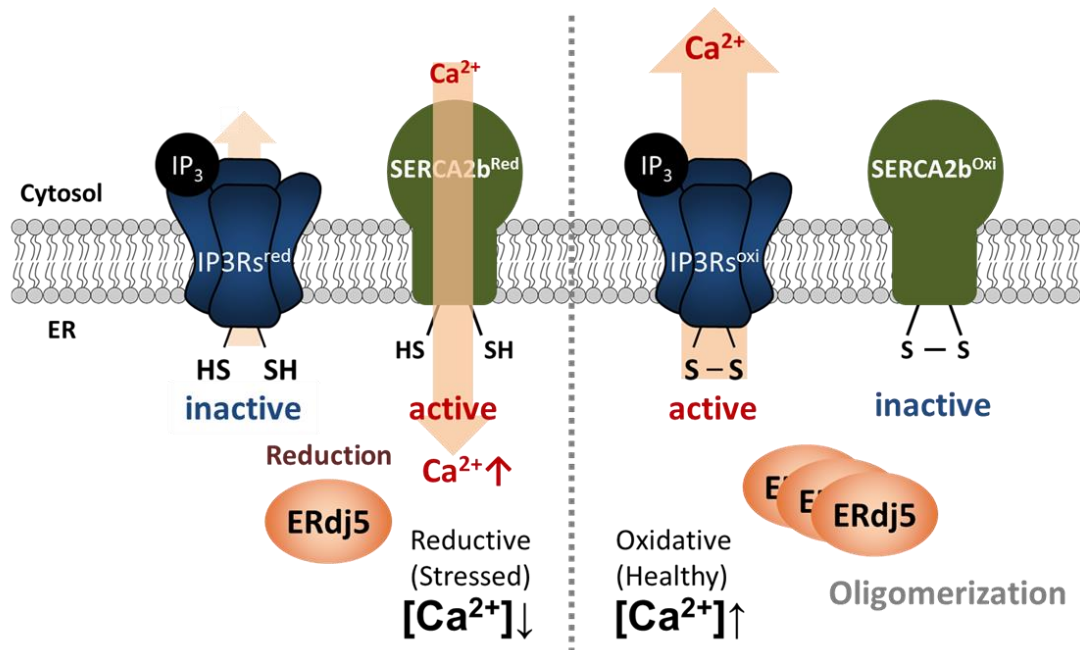


図 6-2 : ERdj5 によるレドックス依存的なカルシウム恒常性維持機構モデル

$[Ca^{2+}]_{ER}$ が低い条件下では、ERdj5 は還元活性を發揮し、IP3R1 と SERCA2b の両方を還元し、SERCA2b の活性化と IP3R1 の不活性化を引き起こす。したがって、 Ca^{2+} の取り込みが促進され、小胞体からの放出が抑制される。対照的に、 $[Ca^{2+}]_{ER}$ が十分に高い場合、ERdj5 は多量体化によって不活性化され、IP3R1 と SERCA2b はそれぞれ活性と不活性になる。この条件下では、必要に応じて活性化された IP3R1 によって小胞体内腔の Ca^{2+} が積極的に放出されるが、SERCA2b による Ca^{2+} の取り込みは抑制される。このようにレシプロカルで合目的な制御によって、小胞体の恒常性が維持されていると考えられる。

7. 論文目録

本論文中に示した研究成果は、

Redox states in the endoplasmic reticulum directly regulate the activity of calcium channel,
inositol 1,4,5-trisphosphate receptors

(小胞体内腔の酸化還元状態は、カルシウムイオンチャネルであるイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の活性を直接的に制御する)

藤井唱平、潮田亮*、永田和宏*

*責任著者

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA Vol. 120, No. 22, e2216857120

2023 年 5 月 22 日

に発表した。

8. 謝辞

本研究は、京都産業大学 分子細胞生物学教室にて永田和宏先生、潮田亮先生をはじめとする多くの方々のご指導とご協力を受けて行うことができました。

永田和宏教授、潮田亮准教授には充実した研究環境を与えていただいただけでなく、学生である私も一人の研究者として接してもらったことで、自然と自立した研究を行うことができました。あらゆる自由があったことに、心より御礼申し上げます。また、国内外の様々な学会や研究会に参加する機会をいただきました。京都らしく「ほんまもんを知らんと、ほんまもんになられへん」を地で行く教育方針で、自分がどれだけニセモノなのかを思い知ることも多く厳しい教育だったように思いますが、沢山の先生とディスカッションさせて頂いたことでニセモノなりに「ほんまもん」に近づく努力を否応なく続けることが出来ました。特に、JST-CREST、AMED-CRESTの領域会議は日本国内のトップの研究者が集う会議であり、そこで先生がプレゼンテーションに使うデータを準備したことや、ポスター発表の機会を与えていただいたことは、当時の自分の能力を鑑みれば無茶な仕事でしたが、最高の教育だったと思います。海外の学会に参加させていただいたことはかけがえのない貴重な経験であり、カルシウムの専門家たちの潮流を知り、主論文の体裁を決める後押しとなりました。たいした実力もない学生であった私に長らく投資を続けていただき、心から感謝申し上げます。

京都産業大学 生命科学部 遠藤斗志也先生には指導教員を引き受けていただき、永田研で研究を進めているにもかかわらず、多くの申請書類の作成にも対応していただきました。これまで色々な場面で含蓄のあるお話を伺うことができ、私の研究の進捗にも気遣いをいただけてきました。心より感謝申し上げます。

京都産業大学 生命科学部 棚橋靖行先生には、本論文の作成にあたり副査として非常に建設的なご助言を賜りました。イオンチャネルの専門家の見解を論文に反映させることで、より正確な記述へと修正出来たと考えています。ここに深謝の意を表します。

コロキウム3のときに副査を担当していただき、多くのご助言を賜りました近藤寿人先生（当時・京都産業大学 生命科学部教授、現・JT 生命誌研究館 顧問・表現ディレクター）に心より感謝いたします。近藤先生の研究に対する厳しき、特にオリジナリティと理想を現実化するという点、は私の心の中に刻み込まれています。あの時、あの機会が無ければ、PNASのリバイズに耐えるメンタリティは生まれ得なかったと思います。

論文のデータとすることが出来ず悔しい限りですが、東北大学の稲葉謙次先生と平野愛弓先生の協力のもと仙台に滞在し、イオンチャネルの電気生理学的解析を行ったことは、本研究の結論を確信する最高の機会でありました。異なる視点から研究を俯瞰し、勉強しなす機会を与えてくださった、両先生方に心から感謝申し上げます。

永田先生の秘書である石田玉美さんがいなければ、事務手続きに抜けが多い私はここまで研究に集中することができませんでした。ラボメンバーへの気遣いもとてもとても優しく、本当に感謝しております。また、他大学の先生への対応の仕方や主催会議の運営において、勉強になることが大変多く、ありがたい経験をたくさんさせていただきました。

徹底的に研究に本気で取り組んでいた永田研究室、潮田研究室の諸先輩方及びスタッフの皆様、いつも活力を与えてくれた後輩達に心よりお礼申し上げます。いつも議論が核心からぶれない森戸大介博士のディスカッション能力、ちょっと皮肉混じりに聞かれたくないデータの甘いところを見逃さない伊藤進也博士のおかげで、進捗報告会は緊張感のある時間となり、研究を常に向かうべき方向へ進めることが出来ました。新木和孝博士が研究室に残した PDI ファミリータンパク質群の発現ベクターという財産を活用することで、私の研究は成立しました。とても有益な情報と試料をいつも惜しみなく提供していただいたことに感謝申し上げます。山下龍志博士には ERdj5 欠損細胞の解析を通じて共著者に加えていただき、アクセプトに至るまでの長い格闘がありましたが、得難い経験をさせてもらい感謝しております。テクニカルスタッフの福田泰子さんが私たちの抜けをバックアップしてくれているおかげで、いつでも実験がスムーズ進む状況が維持されていました。皆様には感謝してもしきれません。

最後に、家族にはここまでサポートをしていただいたことに深く感謝申し上げます。

9. 参考文献

1. Suzuki, J., Kanemaru, K. & Iino, M. Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophys. J.* **111**, 1119–1131 (2016).
2. Billaud, M. *et al.* Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. *Pharmacol. Rev.* **66**, 513–569 (2014).
3. Mikoshiba, K. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 217–227 (2015).
4. Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E. & Rizzuto, R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **27**, 6407–6418 (2008).
5. Trebak, M. & Kinet, J. P. Calcium signalling in T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 154–169 (2019).
6. Zhang, S., Fritz, N. & Ibarra, C. Regulation of Calcium Oscillations. 1175–1185 (2011). doi:10.1007/s11064-011-0457-7
7. Matsumoto, M. & Nagata, E. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor knock-out mice: Their phenotypes and their meaning in neuroscience and clinical practice. *J. Mol. Med.* **77**, 406–411 (1999).
8. Futatsugi, A. *et al.* Cell signaling: IP₃ receptor types 2 and 3 mediates exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science (80-.)*. **309**, 2232–2234 (2005).
9. Ringer, S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J. Physiol.* **4**, i–iii, 1–42 (1883).
10. Berridge, M. J. & Fain, J. N. Inhibition of phosphatidylinositol synthesis and the inactivation of calcium entry after prolonged exposure of the blowfly salivary gland to 5-hydroxytryptamine. *Biochem. J.* **178**, 59–69 (1979).
11. Berridge, M. J. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. **212**, 849–858 (1983).
12. Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. & Schulz, I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67–69 (1983).
13. Watras, B. E. E. & J. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* **336**, 583–586 (1988).
14. Mikoshiba, K., Huchet, M. & Changeux, J. P. Biochemical and immunological studies on the P400 protein, a protein characteristic of the Purkinje cell from mouse and rat

- cerebellum. *Dev. Neurosci.* **2**, 254–275 (1979).
15. Furuichi, T. *et al.* Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* **342**, 32–38 (1989).
 16. Ferris, C. D., Haganir, R. L. & Snyder, S. H. Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2147–2151 (1990).
 17. Hirota, J. *et al.* Kinetics of calcium release by immunoaffinity-purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**, 19046–19051 (1995).
 18. Mignery, G. A., Südhof, T. C., Takei, K. & De Camilli, P. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* **342**, 192–195 (1989).
 19. Prole, D. L. & Taylor, C. W. Structure and function of ip3 receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, (2019).
 20. Prole, D. L. & Taylor, C. W. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. *J. Physiol.* **594**, 2849–2866 (2016).
 21. Fan, G. *et al.* Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature* **527**, 336–341 (2015).
 22. Kang, S. *et al.* Effects of redox potential and Ca²⁺ on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor L3-1 loop region: Implications for receptor regulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 25567–25575 (2008).
 23. Vanderheyden, V. *et al.* Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 959–970 (2009).
 24. Cui, J. *et al.* Regulation of the Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Phosphorylation at Tyrosine 353. *J. Biol. Chem.* **279**, 16311–16316 (2004).
 25. LeBeau, A. P., Yule, D. I., Groblewski, G. E. & Sneyd, J. Agonist-dependent Phosphorylation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J. Gen. Physiol.* **113**, 851–872 (1999).
 26. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3217–3266 (2013).
 27. Meyer, A. J. & Dick, T. P. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxidants Redox Signal.* **13**, 621–650 (2010).
 28. Bilan, D. S. & Belousov, V. V. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. *Free Radic. Biol. Med.* **109**, 167–188 (2017).

29. Montero, D., Tachibana, C., Rahr Winther, J. & Appenzeller-Herzog, C. Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biol.* **1**, 508–513 (2013).
30. Kolossov, V. L. *et al.* Experimental Biology and Medicine endoplasmic reticulum reveals highly oxidative environment. **237**, 652–662 (2012).
31. Lohman, J. R. & Remington, S. J. Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments. *Biochemistry* **47**, 8678–8688 (2008).
32. Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K. & Jansen, G. ERdj5 Is Required as a Disulfide Reductase for Degradation of Misfolded Proteins in the ER. **307**, 569–573 (2008).
33. Suzuki, J. *et al.* Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* **5**, 1–13 (2014).
34. Pérez Koldenkova, V. & Nagai, T. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 1787–1797 (2013).
35. Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882–887 (1997).
36. Greotti, E., Wong, A., Pozzan, T., Pendin, D. & Pizzo, P. Characterization of the ER-targeted low affinity Ca²⁺ probe D4ER. *Sensors (Switzerland)* **16**, (2016).
37. Zhang, Y. *et al.* Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature* **615**, (Springer US, 2023).
38. Terai, K., Imanishi, A., Li, C. & Matsuda, M. Two decades of genetically encoded biosensors based on Förster resonance energy transfer. *Cell Struct. Funct.* **44**, 153–169 (2019).
39. Kolossov, V. L. *et al.* Development of a high-dynamic range, GFP-based FRET probe sensitive to oxidative microenvironments. *Exp. Biol. Med.* **236**, 681–691 (2011).
40. Hanson, G. T. *et al.* Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *J. Biol. Chem.* **279**, 13044–13053 (2004).
41. Uhlén, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-.)*. **347**, (2015).
42. Oka, O. B. V. & Bulleid, N. J. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 2425–2429 (2013).
43. Araki, K. & Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–25 (2012).
44. Phillips, M. J. & Voeltz, G. K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 69–82 (2016).
45. Forman, H. J. & Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and

- limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 689–709 (2021).
46. Suzuki, T. *et al.* Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1. *Cell Rep.* **28**, 746–758.e4 (2019).
 47. Fra, A., Yoboue, E. D. & Sitia, R. Cysteines as redox molecular switches and targets of disease. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–9 (2017).
 48. Li, Y. & Camacho, P. Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J. Cell Biol.* **164**, 35–46 (2004).
 49. Marino, M. *et al.* SEPNI1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1843–1855 (2014).
 50. Prins, D., Groenendyk, J., Touret, N. & Michalak, M. Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO Rep.* **12**, 1182–1188 (2011).
 51. Higo, T. *et al.* Subtype-Specific and ER Luminal Environment-Dependent Regulation of Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44. **120**, 85–98 (2005).
 52. Chernorudskiy, A. L. & Zito, E. Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox : A Close-Up of the ER / Mitochondria Connection. *J. Mol. Biol.* **429**, 620–632 (2017).
 53. Hayashi, T. & Su, T. P. Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell* **131**, 596–610 (2007).
 54. Avezov, E. *et al.* Lifetime imaging of a fluorescent protein sensor reveals surprising stability of ER thiol redox. *J. Cell Biol.* **201**, 337–349 (2013).
 55. Camacho, P. & Lechleiter, J. D. Calreticulin Inhibits Repetitive Intracellular Ca²⁺ + Waves. **82**, 765–771 (1995).
 56. 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).
 57. Li, G. *et al.* Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* **186**, 783–792 (2009).
 58. Anelli T, Bergamelli L, Margittai E, Rimessi A, Fagioli C, Malgaroli A, Pinton P, Ripamonti M, Rizzuto R, S. R. Ero1 α regulates Ca(2+) fluxes at the endoplasmic reticulum-mitochondria interface (MAM). *Antioxid Redox Signal.* **16**, (2012).
 59. Wang, L. *et al.* Crystal structure of human ERp44 shows a dynamic functional modulation by its carboxy-terminal tail. *EMBO Rep.* **9**, 642–647 (2008).
 60. Kaplin, A. I., Ferris, C. D., Voglmaier, S. M. & Snyder, S. H. Purified reconstituted

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Thiol reagents act directly on receptor protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 28972–28978 (1994).
61. Araki, K. *et al.* Ero1- α and pdis constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell Biol.* **202**, 861–874 (2013).
 62. Kolossov, V. L. *et al.* Förster resonance energy transfer-based sensor targeting endoplasmic reticulum reveals highly oxidative environment. *Exp. Biol. Med.* **237**, 652–662 (2012).
 63. Costantini, L. M. *et al.* A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 64. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. & Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10554–10559 (2004).
 65. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 66. Fan, G. *et al.* Cryo-EM reveals ligand induced allostery underlying InsP3R channel gating. *Cell Res.* **28**, 1158–1170 (2018).
 67. Paknejad, N. & Hite, R. K. Structural basis for the regulation of inositol trisphosphate receptors by Ca²⁺ and IP₃. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 660–668 (2018).
 68. Parker, A. K. T., Gergely, F. V. & Taylor, C. W. Targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to the endoplasmic reticulum by multiple signals within their transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* **279**, 23797–23805 (2004).
 69. Groenendyk, J. *et al.* Interplay between the oxidoreductase PDIA6 and microRNA-322 controls the response to disrupted endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Sci. Signal.* **7**, 1–15 (2014).
 70. Oka, O. B. *et al.* ER p18 regulates activation of ATF 6 α during unfolded protein response. *EMBO J.* **38**, 1–18 (2019).
 71. Higa, A. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Transcription Factor ATF6 Requires the Disulfide Isomerase PDIA5 To Modulate Chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1839–1849 (2014).
 72. Burkewitz, K. *et al.* Atf-6 Regulates Lifespan through ER-Mitochondrial Calcium Homeostasis. *Cell Rep.* **32**, 108125 (2020).
 73. Nguyen, D. T. *et al.* The ATF6 β -calreticulin axis promotes neuronal survival under endoplasmic reticulum stress and excitotoxicity. *Sci. Rep.* **11**, 1–17 (2021).
 74. Monkawa, T. *et al.* Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 14700–14704 (1995).
 75. Kirstein, J. *et al.* Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis

- across cellular compartments. *EMBO J.* **34**, 2334–2349 (2015).
76. Hetz, C. & Mollereau, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 233–249 (2014).
 77. Muñoz-Lobato, F. *et al.* Protective Role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 217–235 (2014).
 78. Yamashita, R., Fujii, S., Ushioda, R. & Nagata, K. Ca²⁺ imbalance caused by ERdj5 deletion affects mitochondrial fragmentation. *Sci. Rep.* **11**, 1–11 (2021).
 79. Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K. & Iwawaki, T. Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *Biochem. J.* **425**, 117–125 (2010).