HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 冬眠哺乳類の細胞はいかにして低温ストレスに対処するか？ |
| Author(s) | 曽根, 正光; 山口, 良文 |
| Citation | 低温科学, 81, 159-172 |
| Issue Date | 2023-03-20 |
| DOI | 10.14943/lowtemsci.81.159 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/89100 |
| Type | bulletin (article) |
| Note | 第二章：恒温動物（哺乳類） |
| File Information | 17_p159-172_LT81.pdf |

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 159-172
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 159

# 冬眠哺乳類の細胞はいかにして低温ストレスに対処するか？

曽根　正光[1)]，山口　良文[1)]

2023 年 1 月 23 日受付，2023 年 1 月 24 日受理

小型の冬眠哺乳類は冬眠時に体温が非常に低くなるが，それによってダメージを受けることがない．それは，少なくとも部分的には，冬眠哺乳類由来の培養細胞は低温下で長く生存するというような，冬眠哺乳類が生得的にもつ細胞レベルの低温耐性能力によって説明される．近年ヒト細胞株を用いた研究から低温における細胞死は過酸化脂質の蓄積によって引き起こされるフェロトーシスと呼ばれるタイプの細胞死に類似することが明らかになってきた．本稿では，冬眠哺乳類の細胞がどのようにして低温誘導性のフェロトーシスを回避しているか，最近のがん研究の成果も交えて考察するとともに，高次の臓器・全身レベルの低温耐性機構についても触れる．

## How do cells of mammalian hibernators cope with cold stress?

Masamitsu Sone[1] and Yoshifumi Yamaguchi[1]

The body temperatures of small mammalian hibernators drop to very low levels during hibernation, but the animals are not damaged by it. This can be explained, at least in part, by a cellular tolerance to low temperatures, such as the ability of cultured cells from hibernators to survive longer at low temperatures than those from non-hibernators. Recent studies using human cell lines have shown that cell death at low temperatures resembles a type of cell death called ferroptosis, which is caused by the accumulation of lipid peroxide. In this article, we discuss how mammalian hibernators avoid low-temperature-induced ferroptosis at cellular level, including recent results from cancer research, and also discuss the mechanisms of low-temperature tolerance at organ and systemic levels.

キーワード：冬眠，低温耐性，フェロトーシス，活性酸素種，ビタミン E
hibernation, low-temperature tolerance, ferroptosis, ROS, vitamin E

## 1．はじめに

哺乳類の冬眠は，著しい低代謝状態をとることでエネルギーを節約し，冬季を生存するための適応戦略である．小型の冬眠哺乳類は冬眠期において，熱産生を減弱して低体温となり不動状態が数日間続く深冬眠と，そこから急速に体温を回復して通常体温で活動をする 1 日以下の中途覚醒を幾度も繰り返す．深冬眠時の体温は外気温より 1℃程度高い状態に保たれ，巣穴の中が氷点下になりうるホッキョクジリス（arctic ground squirrel，AGS）においてはときに 0℃を下回る体温となるとされる（Barnes, 1989）．もしもヒトのような非冬眠哺乳類がこのように劇的な体温低下を経験すれば，脳や心臓，呼吸器が機能を停止し，あらゆる臓器で細胞死が引き起こされて死に至るであろう．従って，冬眠哺乳類には，低体温によって生じるストレスに対処するための特別な分子

連絡先
曽根　正光
北海道大学低温科学研究所冬眠代謝生理発達分野
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011-706-7439
e-mail：msone@lowtem.hokudai.ac.jp

1）北海道大学低温科学研究所冬眠代謝生理発達分野
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Hibernation Metabolism, Physiology and Development Group, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University・Kita-19, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo, 060-0819, Japan

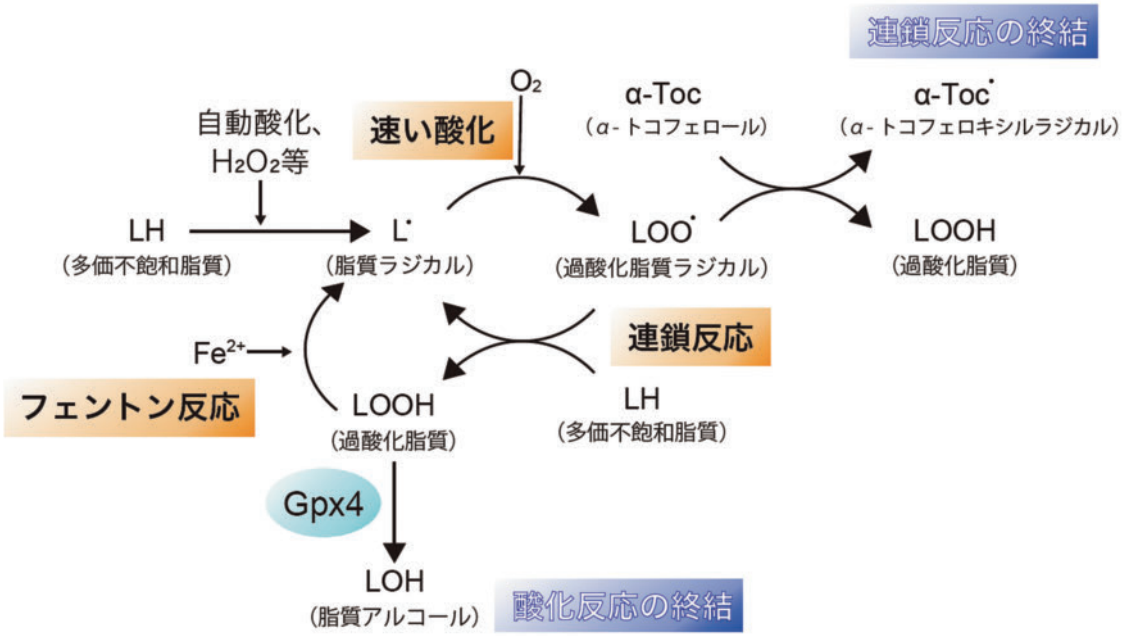


図 1：フェロトーシスにおける脂質の酸化反応．Gpx4 とビタミン E 同属体の一つ α トコフェロールによるフェロトーシス抑制作用についても示す．

メカニズムが備わっていると考えられる．本稿では，主に細胞レベルの，冬眠哺乳類が持つ生得的な低温耐性機構について論じ，臓器レベル，全身レベルでの低温耐性機構についても触れる．

## 2．低温における哺乳類細胞の細胞死（≒フェロトーシス）

非冬眠哺乳類と冬眠哺乳類の培養細胞を 10℃以下の低温環境下に置いて比較すると，前者は多くの場合，2，3 日のうちに死滅するのに対し，後者は 5 日以上生存するという，明らかな低温耐性能力の違いが観察される（Anegawa et al., 2021; Hendriks et al., 2020; Hendriks et al., 2017; Ou et al., 2018）．個体及び臓器から切り離された培養皿上の細胞が低温に耐性を持つことから，こうした能力は細胞自律的と言える．冬眠哺乳類の細胞がどのような分子基盤に基づいて低温耐性能力を発揮するのかを議論する上で，まず，低温での細胞死がいかにして生じるかを述べる．

服部らは，活性酸素種（ROS）によって活性化される Appoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）-p38 MAPK 経路が低温刺激によっても活性化すること，さらに ASK1 または p38 を機能阻害すると低温によって引き起こされる細胞死が抑制されることを，複数のヒト細胞株において見出した（Hattori et al., 2017）．次いで彼らは，この低温誘導性の細胞死がどういった種類の細胞死であるか，各種細胞死の阻害剤を用いて検証した．その結果，ヒトがん細胞の低温誘導性細胞死は，アポトーシスやネクロトーシスの阻害剤では抑制できない一方でフェロトーシス阻害剤によって完全に抑制されたことから，フェロトーシスに極めて近い性質を持つことが明らかとなった（Hattori et al., 2017）．

フェロトーシス（ferroptosis）とは，Ras がん原遺伝子に活性化型の突然変異を持つヒトがん細胞を特異的に細胞死させる薬剤エラスチンの薬理研究から比較的最近提唱された細胞死様式である（Dixon et al., 2012）．フェロトーシスでは，鉄イオンに依存した過酸化脂質及び脂質ラジカル体の蓄積によって，最終的に細胞形質膜が崩壊し，ネクローシスに似た細胞形態を呈する（Dixon et al., 2012）．特に，細胞内の多価不飽和脂肪酸は，脂質ラジカルの産生源となる．二重結合を有する炭素原子に挟まれる炭素原子（R1－C＝C－<u>C</u>－C＝C－R2 の下線部）に結合する水素原子が遊離して生成された脂質ラジカルは，分子酸素により速やかに酸化され過酸化脂質ラジカルとなる（図 1）（Conrad & Pratt, 2019）．こうした反応は自然酸化や ROS（過酸化水素（$H_2O_2$）など）の作用により細胞内で常時生じうる．次に過酸化脂質ラジカルは周囲の不飽和脂肪酸から水素を引き抜き，脂質ラジカルと過酸化脂質を生じる．過酸化脂質は比較的安定な物質ではあるが，除去されず蓄積した場合，フェントン反応と呼

ばれる鉄イオンを介した反応などにより新たな脂質ラジカルが発生する．よって，1サイクルあたり脂質ラジカルが1個から2個に増加する反応となり，脂質ラジカル体が指数関数的に増加する．こうした脂質酸化の連鎖反応が細胞形質膜やオルガネラ膜を伝播して膜の崩壊へとつながると考えられている．細胞内でこのような反応を防ぐ主要な役割を果たす酵素がグルタチオンペルオキシダーゼ4（Gpx4）である．Gpx4はグルタチオン依存的に過酸化脂質を還元し脂質アルコールへと変換することで，脂質酸化の連鎖反応を回避している．これまでに開発されたフェロトーシス誘導性薬剤の大部分は直接的あるいは間接的にGpx4の機能を阻害することでフェロトーシスを誘導する（Yang et al., 2014）．

低温誘導性細胞死が脂質の酸化によって引き起こされるのだとすれば，それを回避する手段は3通り考えられる．脂質の酸化そのものが生じないようにすること，酸化脂質を速やかに除去すること，酸化脂質の拡大を防ぐことである．以降では，冬眠哺乳類の研究知見を中心に，非冬眠哺乳類での知見も交えつつ，この点について議論する．

## 3．冬眠哺乳類細胞における脂質酸化抑制機構

### 3.1　ミトコンドリア

通常ミトコンドリアは体内で消費される酸素の90%以上を消費するROSの最大の発生源である．低温において脂質酸化を引き起こすROSの発生源が何であるか不明であるが，ミトコンドリアは有力な候補の一つであり，冬眠哺乳類の細胞は低温においてミトコンドリアからのROSの発生を防ぐ何らかの機構を有する可能性が高い．この点に関する報告例をいくつか紹介する．

まず，ヒトとシリアンハムスター（以下ハムスター）の腎臓に由来する細胞株を比較すると，低温環境下でヒト細胞のミトコンドリアの膜電位が低下するのに対し，ハムスター細胞ではそうした変化が見られないとの報告がある（Hendriks et al., 2017）．また同論文において，ヒト細胞のミトコンドリアは通常温度では網目状の構造を取っており，低温でそれが断片化する様子が観察されるが，ハムスター細胞のミトコンドリアはそもそも断片化したミトコンドリアを有し，低温ストレスによって形態が変化しないと報告された．一方，ヒトおよびジュウサンセンジリス（thirteen-lined ground squirrel，TGS）由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化させた神経細胞を4℃の低温ストレスに曝すと，（前述の腎臓細胞株とは逆に）ヒト神経細胞のミトコンドリアは膜電位が上昇し過分極となるが，TGS神経細胞ではそうした変化が起こらない（Ou et al., 2018）．これらの知見は冬眠哺乳類のミトコンドリアが温度低下してもホメオスタシスを維持することを示唆する．さらに，ヒトのiPS由来神経細胞を低温処理すると，TGSのそれとは異なり，微小管構造が断片化し，破壊されてしまうが，低温処理時にミトコンドリアの脱共役剤を添加し，膜電位の上昇を抑制するとROSの発生が抑えられ，細胞骨格の崩壊を防ぐ（Ou et al., 2018）．従って，非冬眠哺乳類細胞においては低温時のミトコンドリアの機能異常がROSの上昇を引き起こし，細胞死の引き金となる可能性が考えられる．

それでは冬眠哺乳類の細胞はどのようにしてそれを回避しているのだろうか？　この遺伝子基盤に切り込んだ数少ない研究を紹介する．ホッキョクジリス（AGS）の神経前駆細胞で発現する遺伝子を組み込んだcDNA発現ライブラリーを用いて，マウスの神経前駆細胞にマイルドな低温ストレス（31℃）を含む種々のストレスに対する耐性を与える遺伝子をスクリーニングした実験の結果，ATP5G1が同定された（Singhal et al., 2020）．ATP5G1はミトコンドリアのATP合成酵素の構成因子であり，N末側に複数のAGS特異的なアミノ酸置換が存在する．そのうちの一つ（32番ロイシン）をミミックした変異ヒトATP5G1（Hu ATP5G1$^{P32L}$）を過剰発現すると，AGS ATP5G1と同様ヒト神経前駆細胞に31℃の低温ストレスへの耐性をもたらした．さらにゲノム編集技術によりAGS神経前駆細胞においてATP5G1の32番ロイシンをヒト型に変異させる（ATP5G1$^{L32P}$）とそのようなストレス耐性が若干減弱した．AGS ATP5G1がいかにしてストレス耐性を与えるか不明であるが，ミトコンドリア予備呼吸能（脱共役剤存在下で測定されるミトコンドリアの最大呼吸量）の増加との関連が示唆された（Singhal et al., 2020）．一方で，私たちが調べたところATP5G1の32番ロイシンはハムスターには保存されておらず，これが冬眠哺乳類に共通した低温耐性メカニズムとは考えにくい（未発表データ）．

Staplesらは，深冬眠期および中途覚醒期のTGSの肝臓から単離されたミトコンドリアを用いてState3呼吸能（ミトコンドリアが呼吸するのに必要な基質と高濃度のADPの存在下で測定される，共役状態での最大呼吸能）を37℃で測定すると，深冬眠期のミトコンドリア呼吸能が中途覚醒期に比べて低いこと，そしてそれは電子伝達系（electron transport chain，ETC）複合体IおよびIIの活性低下に起因することを明らかにした（Mathers et al., 2017）．深冬眠期から中途覚醒期に向かう際のミトコンドリア呼吸能は体温上昇と相関するように活性化

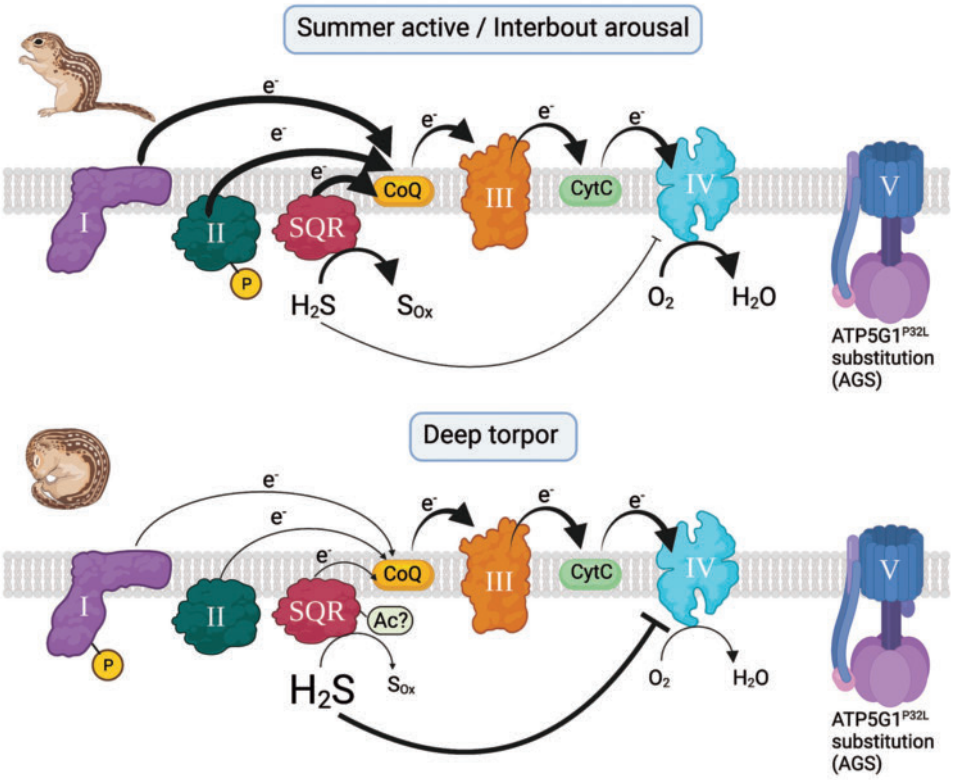


図 2：TGS のミトコンドリア電子伝達系複合体 I-IV および硫化水素分解酵素 SQR の活性についての活動期 / 中途覚醒期と深冬眠期の比較（Jensen et al., 2021; Mathers & Staples, 2019）．また AGS では複合体 V 構成タンパク質のアミノ酸置換がストレス耐性に関わるとの報告がある（Singhal et al., 2020）．

することから，低下した呼吸能の回復については体温の上昇に依存する可能性が示唆された（Armstrong & Staples, 2010）．一方で，中途覚醒期から深冬眠期に移行する際には，深冬眠開始直後の体温がまだ下がり始めたばかりの時期に，ミトコンドリア呼吸能はすでに最低体温の時期と同等の強い抑制を受けている（Chung et al., 2011; Staples, 2014）．従って，ETC 複合体 I と II の活性低下は，体温低下の結果もたらされるものではなく，むしろ代謝抑制のための能動的制御により体温低下に先んじて起こると考えられる．

そのメカニズムとして翻訳後修飾による深冬眠期の ETC 複合体 I および II の活性抑制機構が提唱された．Staples らは肝臓のミトコンドリアタンパク質の 2 次元電気泳動と質量分析により複数のタンパク質のリン酸化およびアセチル化状態が深冬眠期と中途覚醒期で異なることを見出した（Mathers & Staples, 2019）．中でも，リン酸化が，深冬眠期に顕著に増加するタンパク質として ETC 複合体 I の 75kDa サブユニットが，中途覚醒期に顕著に増加するタンパク質として ETC 複合体 II のフラボタンパク質サブユニットが同定された．ミトコンドリアホモジネートの脱リン酸化処理によって，深冬眠期の複合体 I の活性が上昇し，中途覚醒期の複合体 II の活性が減少したことから，これらの ETC 複合体タンパク質のリン酸化が冬眠期のミトコンドリア呼吸能のダイナミクスに重要な役割を果たすことが示唆された（図 2）（Mathers & Staples, 2019）．

高濃度の硫化水素（$H_2S$）は ETC 複合体 IV を阻害する．$H_2S$ をマウスに吸引させると代謝を低下させ，一過性に冬眠のような仮死状態を誘導するという衝撃的な報告があるが，その後，大型哺乳類にはそのような効果が認められなかったことなどからヒトへの応用については懐疑的な見方が広まっている（Blackstone et al., 2005; Jensen & Fago, 2021）．一方で，細胞内においてもシステイン合成などの副産物として $H_2S$ は内因性に合成される．TGS の肝臓では深冬眠期の $H_2S$ の濃度が夏季あるいは中途覚醒期と比較して 2 倍程度上昇しており，その原因はミトコンドリア局在性の $H_2S$ 分解酵素である SQR（sulfide quinone reductase）の活性が抑制されることにある（Jensen et al., 2021）．そのため，深冬眠期の肝臓から単離されたミトコンドリアを $H_2S$ に曝露すると，分解が遅いために長時間にわたって呼吸量の著しい活性低下が認められた．この論文の著者らはこれが SQR の

アセチル化によるものと予想しているが，まだ証明されてはいない．以上より *in vivo* における深冬眠期のミトコンドリア活性は，これまでの $H_2S$ 非存在下で測定した *in vitro* の実験データに基づいて考えられていたよりも強く抑制されている可能性がある（図 2）．

これら Staples のグループを中心とした一連の研究により，TGS では深冬眠時のミトコンドリア呼吸が能動的に不活化されることが明らかとなり，それは低温における ROS の抑制に寄与するものと予想された．しかしながら，深冬眠時の TGS から単離されたミトコンドリアの ROS 発生量を夏の活動期や中途覚醒時のそれと比較した場合，一部条件下では有意に低下するものの，ほとんどの条件下では低下するとは言えない（Brown et al., 2012）．こうした意外な結果は，上述の $H_2S$ レベルがそうであったように単離したミトコンドリアから発生する ROS を測定する際の実験条件が，生体の細胞内環境を正確に再現していないことによる可能性もあり，深冬眠時の翻訳後修飾を介した ETC 複合体の抑制が ROS の低減に寄与しないと結論するのは早計である．

一方，低温に脆弱なヒトがん細胞を用いた研究からも，低温誘導性細胞死へのミトコンドリアの関与が示唆される．ヒトがん細胞株において低温誘導性細胞死を制御する遺伝子を同定する目的で CRISPR ライブラリーの網羅的スクリーニングをしたところ，ミトコンドリア内膜に局在しマトリックスへの $Ca^{2+}$ の輸送を正に制御する MICU1 が同定された（Nakamura et al., 2021）．MICU1 遺伝子を欠損したヒトがん細胞株では低温培養時でも過酸化脂質が蓄積せず，細胞死も顕著に抑制される．その抑制メカニズムとしては，MICU1 欠損によるミトコンドリアマトリックス内 $Ca^{2+}$ 濃度の減少と，低温誘導性のミトコンドリア過分極の抑制が提唱されている．実際に，細胞質内の $Ca^{2+}$ をキレートする（この時ミトコンドリア内の $Ca^{2+}$ 濃度も減少する），あるいは脱共役剤などでミトコンドリア膜電位を下げることで低温誘導性細胞死が抑制される．興味深いことに，MICU1 機能阻害や $Ca^{2+}$ キレーターは，37℃でのシスチン輸送タンパク質（xCT）の阻害剤によりグルタチオンを枯渇させた場合に誘導されるフェロトーシスは抑制しない．このことから，ミトコンドリアの $Ca^{2+}$ 濃度異常がフェロトーシスの原因となるのは低温誘導性細胞死に特異的であるかもしれない．ミトコンドリア内の $Ca^{2+}$ 濃度を低下させるとなぜ低温誘導性細胞死が抑制されるのかについて，論文の著者らは $Ca^{2+}$ 依存性の ETC 複合体の活性が減少し ROS が減少するためであるとの仮説を立てている（Nakamura et al., 2021）．また，同論文ではヒト細胞株において低温により活性化される温度感受性 $Ca^{2+}$ チャネルである TRPM8（齋藤らの稿を参照）が低温環境下での細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇および低温誘導性細胞死に寄与することが示唆された．神経細胞において TGS やハムスターの TRPM8 をマウスやラットのそれと比較すると低温感受性が低いとの報告がある（Matos-Cruz et al., 2017）．従って TRPM8 の低温感受性の低下が冬眠哺乳類の神経細胞が低温で脱分極を引き起こすことを防ぐのみならず，冬眠哺乳類の細胞一般において低温誘導性細胞死の回避に寄与する可能性もある．

### 3.2 ミトコンドリア以外から発生する ROS

低温環境において哺乳類細胞のフェロトーシス様細胞死を引き起こす ROS の発生源がミトコンドリアの他に存在する可能性もある．低温により引き起こされるものではないが，フェロトーシスの際の ROS の発生源に関する先行研究をいくつか紹介する．まず，小胞体に存在するシトクロム P450 酸化還元酵素（P450 oxidoreductase，POR）が ROS を発生させ，フェロトーシスの要因となることが発見された（Yan et al., 2021; Zou, Li, et al., 2020）．POR は NADPH から電子を受け取りシトクロム P450，ヘム酸化酵素，スクアレン酸化酵素など様々な酸化酵素へ電子を受け渡して還元し，全体として細胞内の種々の基質を酸化することによって分解するシステムとして働くことが知られる．しかし，こうした本来の役割である酸化酵素の還元とは無関係に POR は NADPH 依存的に $H_2O_2$ を発生し，それが膜脂質を攻撃して過酸化脂質を生み出し，フェロトーシスの端緒となりうる（Yan et al., 2021）．同じく，ペルオキシソーム内で合成されるエーテル結合型リン脂質がフェロトーシスの原因となりうることも報告された．（Zou, Henry, et al., 2020）．この報告では ROS の発生源については調べられていないが，ペルオキシソームで $H_2O_2$ が産生される点を考慮すると，低温などのストレスにより細胞質に $H_2O_2$ が漏れ出してフェロトーシスの引き金となる可能性も考えられる．他には，主に細胞質で遊離した多価不飽和脂肪酸を酸化する 5-LOX，12-LOX，15-LOX と呼ばれる脂質酸化酵素群（lipoxygenases）が，膜のリン脂質も基質とすることがあり，それがフェロトーシスの原因となる現象が知られる（Shah et al., 2018; Shintoku et al., 2017; Wenzel et al., 2017）．

以上のように，細胞内の様々な因子により ROS が発生し脂質を酸化させ，フェロトーシスを引き起こしうる．低温環境において，哺乳類細胞のフェロトーシス様細胞死を起こす ROS が何に起因するのか，そして，冬眠哺乳

類はどのようなメカニズムでその発生を抑制しているのか，今後の研究による解明が期待される．

## 4．冬眠哺乳類細胞における酸化脂質の除去機構

グルタチオンの還元力を利用して ROS の還元を行う Gpx ファミリータンパク質は脊椎動物には 8 個存在するが，先に述べた Gpx4 は他の Gpx タンパク質とは異なるユニークな特徴を持つ．つまり，Gpx4 は他の多くの Gpx が 4 量体として機能するのに対し単量体として働くこと，他の Gpx に存在し基質の活性中心へのアクセスを制限すると考えられるタンパク質表面のループ構造を欠いていることが挙げられる（Savaskan et al., 2007; Scheerer et al., 2007）．こうした特徴から Gpx4 は幅広い ROS を基質とするが，特に過酸化脂質を直接還元するという他のタンパク質にはない機能を有する．そのため生存に不可欠で，*Gpx4* を欠損したマウスは胚発生初期（E7.5）に致死となる（Yant et al., 2003）．一般的な細胞では Gpx4 は選択的転写開始点の違いにより細胞質局在型およびミトコンドリア局在型の 2 つのフォームが発現し，活性中心付近の正に帯電した領域でリン脂質の頭部と相互作用することで生体膜にリクルートされ，膜表面から飛び出た過酸化脂質鎖を還元するモデルが提唱されている（Cozza et al., 2017）．また，Gpx ファミリータンパク質には Gpx4 を含め活性中心にセレノシステイン残基を持つものと，システイン残基を持つものが存在するが，Gpx4 をシステイン型に置き換えた *Gpx4*$^{Cys/Cys}$ マウスは生後 2，3 週間で致死となる（Ingold et al., 2018）．それはシステイン型 Gpx4 が $H_2O_2$ 等水溶性 ROS により不可逆的に酸化されることで過酸化脂質が還元できなくなるためと考えられ，Gpx4 のセレノシステイン残基の重要性を示唆する．以上のように，Gpx4 は過酸化脂質除去に働く，フェロトーシス抑制の要となるタンパク質であるが，冬眠哺乳類の低温耐性に関する Gpx4 の役割について報告はない．

近年，心筋梗塞などの血栓症や臓器移植などの医療場面で，血流が一時的に低下した後に回復すると細胞内で ROS が大量に発生し，フェロトーシスにより臓器傷害を引き起こすことを示す知見が蓄積している（Lillo-Moya et al., 2021; Yan et al., 2020）．そして，ミトコンドリア局在型 Gpx4 を過剰発現するとマウスにおいてこうした虚血再灌流傷害に対する耐性を高めるとの報告がある（Dabkowski et al., 2008）．AGS のような冬眠哺乳類は，通常体温においても全身性の虚血再灌流傷害に対する耐性があることが知られる（Bogren et al., 2014）．この冬眠哺乳類特有の耐性能力は，一過性に無酸素（＋無糖）環境に曝露し，酸素を再供給する実験系により培養皿上で再現される（Bhowmick & Drew, 2017）．腎臓の初代培養細胞を用いた虚血再灌流傷害モデルでは，無酸素時の Gpx4 の発現誘導と，酸素再供給時の xCT およびフェリチン（鉄イオン貯蔵タンパク質）の発現誘導の程度がマウスに比べハムスター細胞で高いことが報告されており，フェロトーシス抑制との関連が示唆された（Eleftheriadis et al., 2019）．しかしながら，転写と翻訳が不活性な低温環境下で発生する過酸化脂質の抑制にこのような発現制御機構が機能するかどうかは不明である．

## 5．冬眠哺乳類細胞における脂質酸化連鎖反応の抑制機構

フェロトーシスを回避する機構として，Gpx4 による直接的な過酸化脂質除去機構の他に，生成された過酸化脂質や過酸化脂質ラジカルから新たな脂質へと酸化反応が拡大していく連鎖を止める機構がある．

私たちの研究室では，冬眠期・非冬眠期によらずハムスターの肝臓から作製した初代培養細胞が 4℃で 5 日以上生存することを見出した（図 3A）（Anegawa et al., 2021）．これはマウスの初代肝細胞が 4℃，2 日でほぼ死滅するのとは対照的であった．しかしながら，偶然にも私たちの研究室が現所属大学へ移動したことをきっかけとしてハムスター肝細胞がマウスと同様の低温に対する脆弱性を示すようになった．この原因が何か，動物飼育に関する様々な要因を検討した結果，ハムスターに与える餌を変えたことが原因であった．すなわち，ある種の餌（日本農産 MR スタンダード餌，以下 STD 餌）で飼育したハムスターの肝細胞は低温誘導性細胞死を起こさないが，異なる餌（日本農産 MR ストック餌，以下 STC 餌）で飼育したハムスターの肝細胞は 2 日間で低温誘導性細胞死を起こした（図 3B）．STC 餌で飼育したハムスター肝細胞を低温に曝露した際，脂溶性抗酸化剤や鉄イオンキレーターで細胞死が抑制されること，過酸化脂質が蓄積することから，やはりフェロトーシス経路が活性化すると考えられた（図 3C）．STC 餌と STD 餌に含まれるどの栄養素の差が肝細胞の表現形の違いを生み出すのか調べるため，両者の成分表を比較した．いくつか含有量の異なる栄養素が存在したが，STC 肝細胞の低温誘導性細胞死がフェロトーシスであることを考え合わせ，STC 餌に比べ STD 餌にはビタミン E が 4 倍以上多く含まれることに着目した．ビタミン E は脂溶性のラジ

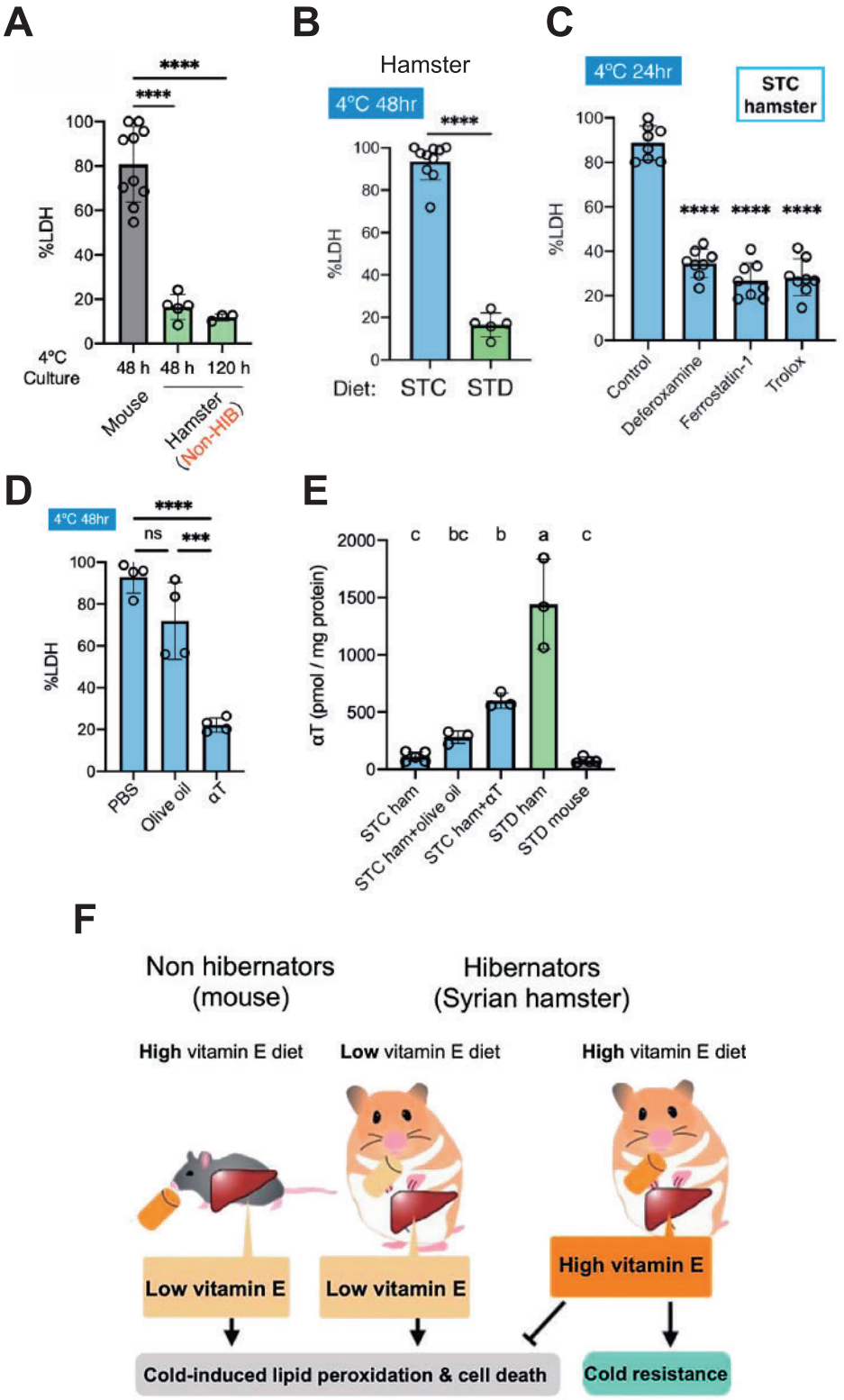


図 3：(A-D) LDH 法により測定した，4℃処理した初代培養肝細胞の死細胞割合．(A) マウスとハムスター肝細胞の比較．****p＜0.0001（Two-tailed Welch's t-test）(B) STC 餌と STD 餌を与えたハムスターの肝細胞の比較．****p＜0.0001（Two-tailed Welch's t-test）(C) STC 餌を与えたハムスターの肝細胞低温処理におけるフェロトーシス阻害剤の効果．Deferoxamine：鉄キレーター，Ferrostatin-1，Trolox：脂溶性抗酸化剤．****p＜0.0001（One-way ANOVA with the Tukey's multiple comparison test）．(D) STC 餌とともに与えた添加物の効果．αT：ビタミン E（α トコフェロール）．****p＜0.0001，***p＜0.001，ns p＞0.05（One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test）．(E) LC-MS で計測した，表示した餌および添加物を与えた動物の肝細胞が含有するビタミン E 量．a，b，c の文字は統計的有意性を示し，文字を共有しない場合は統計的優位（p＜0.05）に異なる（One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test）．(F) マウスとハムスターの肝細胞における餌含有ビタミン E に依存した低温耐性能力の違いについてのモデル．
Anegawa et al., 2021 を一部変更して引用．

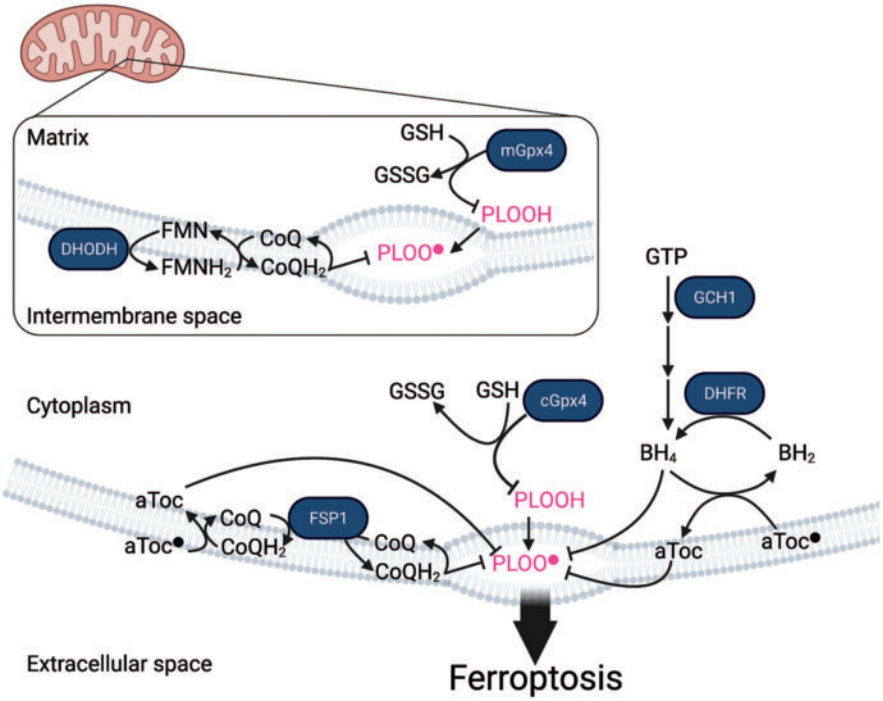


**図 4**：フェロトーシス抑制システムについての模式図．タンパク質を紺色の楕円で示す．それぞれの物質名の右肩に●の表示があるものはラジカル体を示す．$CoQH_2$ および $BH_4$ には，直接的あるいはαトコフェロールを介して間接的に過酸化脂質ラジカルを抑制する作用がある．aToc：αトコフェロール，$BH_2$：酸化型ビオプテリン，$BH_4$：還元型ビオプテリン，cGpx4：細胞質局在 Gpx4，CoQ：酸化型補酵素 Q，$CoQH_2$：還元型補酵素 Q，DHFR：ジヒドロ葉酸レダクターゼ，DHODH：ジヒドロオロト酸脱水素酵素，FMN：酸化型フラビンモノヌクレオチド，$FMNH_2$：還元型フラビンモノヌクレオチド，FSP1：フェロトーシス抑制タンパク質 1，GCH1：GTP シクロヒドラーゼ 1，GSH：還元型グルタチオン，GSSG：酸化型グルタチオン，GTP：グアニン 3 リン酸，mGpx4：ミトコンドリア局在 Gpx4.

カル捕捉抗酸化物質（radical trapping antioxidant, RTA）として古くから知られ，過酸化脂質ラジカルが他の脂質へと連鎖的に酸化反応を起こし伝播することを防ぐ天然のフェロトーシス阻害剤である（Carlson et al., 2016; Shah et al., 2019）（図 1）．実際，STC 餌に加えてビタミン E（正確には複数あるビタミン E 同族体のうち哺乳類生体での活性が高いαトコフェロール）をハムスターに与えると初代肝細胞の低温誘導性細胞死が抑制されたことから，餌のビタミン E 含有量の差が低温誘導性細胞死の表現形の違いの原因であることが示唆された（図 3D）．面白いことに，同じ STD 餌を与えた場合でも，肝細胞中に含まれるビタミン E 量はマウスの方がハムスターに比べて 10 分の 1 以下と非常に低かった．これらの結果から，ハムスターにはマウスよりもビタミン E を肝臓組織中に高濃度で蓄える仕組みが備わっていることが示唆された（図 3E）．以上より，ハムスターのような小型冬眠哺乳類は，脂溶性抗酸化物質であるビタミン E を組織中に蓄えることで，深冬眠時の低体温によって惹起されうるフェロトーシスを防止するという仮説が浮上した（図 3F）．これは自然界において夏から秋にかけて多く生産される種子や堅果類にビタミン E が豊富に含まれることを考えると理にかなった適応戦略のように思われる．また最近，生体において止血因子の合成経路に重要な役割を担うことがよく知られるビタミン K が，止血経路とは無関係に RTA としてフェロトーシスを強力に抑制することが報告された（Mishima et al., 2022）．ビタミン K もビタミン E と同じく脂溶性ビタミンであり，冬眠哺乳類の低温耐性に寄与する可能性がある．

Gpx4 と独立して働くフェロトーシス抑制機構の存在も最近の研究で相次いで発見された（図 4）．①形質膜 CoQ 還元経路：ミトコンドリア電子伝達系において電子のキャリアとして働く補酵素 Q（CoQ）は，形質膜にも存在することが古くから知られていたもののその意義は不明であった．FSP1（Ferroptosis suppressor protein1，別名 Aifm2）は細胞形質膜に局在し，NAD（P）H 依存的に CoQ を $CoQH_2$ へと還元し，$CoQH_2$ が過酸化脂質を還元するというサイクルを形成することで，フェロトーシス抑制に寄与する（Bersuker et al., 2019; Doll et al.,

2019）．また，FSP1 はビタミン E とビタミン K をそれぞれ間接的，直接的に還元する働きもあることが示唆されており（Doll et al., 2019; Mishima et al., 2022），FSP1 はこれら脂溶性ビタミンと相乗的にフェロトーシスを防ぐといえる．②ビオプテリン経路：チロシン水酸化酵素（ドーパミンなどの合成に関わる）を含む複数の酵素の補酵素として重要であることが知られるビオプテリンが膜の脂質過酸化を直接的，あるいはビタミン E を介して間接的に抑制することでフェロトーシスを防ぐという経路も存在する（Kraft et al., 2020; Soula et al., 2020）．様々ながん細胞株について調べるとビオプテリン合成の律速酵素である GCH1（GTP cyclohydrolase 1）の発現量がフェロトーシス誘導剤に対する抵抗性に相関するなど，この経路のフェロトーシス抑制における重要性が示唆された．③ミトコンドリア CoQ 還元経路：ミトコンドリア内膜においてウリジン合成経路に関わる DHODH（Dihydroorotate dehydrogenase）は，間接的に CoQ を還元することでミトコンドリアにおける過酸化脂質の蓄積を抑え，フェロトーシスの抑制に働く（Mao et al., 2021）．また，ミトコンドリア局在型グリセロール 3 リン酸脱水素酵素 2（GPD2）も同様の作用を持つことが報告された（Wu et al., 2022）．これらの結果から，形質膜に加えてミトコンドリアにおいても $CoQH_2$ を介した過酸化脂質の還元がフェロトーシスの抑制に重要であることが示唆される．これらの Gpx4 非依存的なフェロトーシス抑制経路を担うタンパク質群が冬眠哺乳類の低温耐性に関与するかについては未だ報告はない．

## 6．臓器機能の低温耐性

小型哺乳類が極端な低体温となる深冬眠時には，循環器や呼吸器はペースを極端に低下させながらも生命を維持するため活動を続けている．また，それら活動の制御のため，あるいは外部刺激の受容とそれに対する応答や周期的な中途覚醒の発動のため，神経系の一部のネットワークは活動している（Sonntag & Arendt, 2019）．こうした組織では低温において細胞死を起こさないというだけでは十分ではなく，その臓器機能を維持する必要がある．以下，いくつかの臓器機能に関する研究を紹介する．

①心臓：心筋の収縮は，洞房結節から伝播した活動電位により形質膜上の電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルから $Ca^{2+}$ が流入することで開始する．それにより筋小胞体が $Ca^{2+}$ を放出し，増加した細胞内 $Ca^{2+}$ に依存して筋原繊維が滑り運動を起こすことで心筋が収縮する．そして，$Ca^{2+}$ の細胞外への排出と筋小胞体への再取り込みにより細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度が低下して心筋は再び弛緩する．非冬眠哺乳類の心臓を低温に曝すと休止期の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇してしまい，このような収縮-弛緩サイクルを起こすことができず機能不全に陥る（Wang et al., 2002）．この原因は低温によって電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルの開口時間が伸びて過度の $Ca^{2+}$ が流入することであるが，冬眠哺乳類の冬眠期の心筋ではこのチャネルが発現低下し，またタンパク質レベルでリン酸化などにより不活性化されており，$Ca^{2+}$ の流入を防ぐ（Kokoz Yu et al., 2000; Kondo, 1986; Yatani et al., 2004）．通常 $Ca^{2+}$ の流入が低下すると心筋の収縮が弱まるが，冬眠期の心筋では筋小胞体上の $Ca^{2+}$ トランスポーター（SERCA2a）の発現量上昇と筋小胞体の体積増加により $Ca^{2+}$ 貯蔵量を増やし，収縮時には大量の $Ca^{2}$ を細胞質に放出することによって，活動期よりもむしろ高い収縮力を発揮する（Rosenquist, 1970; Skepper & Navaratnam, 1995; Yatani et al., 2004）．このように冬眠哺乳類の心筋は外部からの $Ca^{2+}$ の流入を抑え，筋小胞体-細胞質間の $Ca^{2+}$ のフローを増大することで冬眠期の収縮-弛緩サイクルを維持すると考えられる．

②脳神経系：深冬眠期には電気生理学的計測により活動電位が観察されなくなるなどほとんどの神経細胞は活動を停止する，または非常に低下させる（Krilowicz et al., 1988）．それは低温による受動的な機能低下によって大部分は説明されるが，能動的な抑制機構も存在する．冬眠哺乳類では，TRPM8 や cGMP 依存性陽イオンチャネルの CNGA3 といった低温に対する温度受容体の感受性が低いことや（Feketa et al., 2020; Matos-Cruz et al., 2017），冷感や痛覚を担う末梢感覚神経の一部の電位依存性 $Na^{+}$ チャネルを介した活動電位形成が深冬眠時に抑制されることから（Hoffstaetter et al., 2018），深冬眠における低温によって神経細胞が脱分極しないような制御機構の存在が考えられる．また，AGS の海馬の神経細胞は深冬眠時にグルタミン酸作動性陽イオンチャネルである NMDA 受容体が脱リン酸化し膜移行が抑制されることで，その応答性が抑制されており（Zhao et al., 2006），無酸素・無糖環境において細胞保護的に働くと考えられる（Ross et al., 2006）．一方で，血圧を感知し血圧反射に重要な役割を果たす圧受容神経細胞から脳幹の孤束核に存在する 2 次神経細胞へのシナプス伝達強度は，計測したどの温度でもハムスターの方がラットより 2 倍程度高い（Sekizawa et al., 2012）．低温（15℃）において，これらの神経細胞間の NMDA 受容体依存的シナプス電流はハムスターの方が高いが，ハムスターでは（特に冬眠期に）非 NMDA 受容体による興奮性シナプス後電流

の消失が早く，それによりNMDA受容体の開口タイミングを制限する可能性がある（Sekizawa et al., 2013）．こうしたハムスターの圧受容神経-脳幹の接続特性は深冬眠期に特有の間欠的な心臓の拍動を維持するのに重要な働きをするのかもしれない．また，冬眠哺乳類の海馬の神経細胞では深冬眠期の低体温により微小管結合タンパク質Tauのリン酸化が起こり，スパインの数が減少するなど細胞形態上の退縮が観察されるが，中途覚醒期にはそれが回復し，深冬眠前の記憶も保持される（Horowitz & Horwitz, 2019）．このような可逆性を可能とする分子メカニズムは不明であるが，低温誘導性RNA結合タンパク質（RNA binding motif protein 3, RBM3）の関与が示唆されている（Peretti et al., 2015）．その他，TGSの神経細胞では冬眠時にミトコンドリア脱共役タンパク質（Uncoupling protein 1，Ucp1）が発現誘導され，局所的な熱産生を行うことで深冬眠中の機能を維持するという仮説も提唱されている（Laursen et al., 2015）．

③肺：肺の肺胞表面には肺サーファクタントと呼ばれる界面活性物質が存在し，そのおかげで肺胞が表面張力によって潰れず，また，吸気時に肺が膨らむのに必要なエネルギーが少なくて済む（Perez-Gil, 2008）．TGSの肺サーファクタントは，ブタと比較して低温での活性が優れること，冬眠期には活動期に比べ不飽和脂質成分が増えることなどが報告されており，これらの特性は低温での肺機能の維持に重要であるかもしれない（Suri et al., 2012）．

## 7．全身性の低温耐性

深冬眠期および中途覚醒期には様々な臓器で，脂質およびタンパク質の酸化レベルが上昇する（Duffy & Staples, 2022）．こうした冬眠期の酸化ストレスを低減しうる抗酸化酵素や低分子量ROSスカベンジャーの血中や脳脊髄液中における量について調べられてきた（Drew et al., 2002）．水溶性の抗酸化物質であるビタミンC（アスコルビン酸）は深冬眠期においてAGSとTGSの血中で3〜5倍，およびAGSの脳脊髄液中で2倍程度増加するが，同じく抗酸化作用のあるグルタチオンは変化しない（Drew et al., 1999）．興味深いことに増加したビタミンCは中途覚醒期の呼吸量の増加とともに急速に消費される（Toien et al., 2001）．また，血中ビタミンC量の低下と呼応して血中の尿素の量が増加する．尿素はキサンチン酸化酵素による核酸の分解反応によって生じるが，その際フリーラジカルや$H_2O_2$を産生することから，ビタミンCは血中や脳脊髄液中でこうしたROSを消去するのに用いられるという解釈が成り立つ．実際，ハムスターの脳においてマイクロダイアリシスを用いた解析で，キサンチン酸化酵素の阻害剤を投与すると，中途覚醒期に細胞外液中のビタミンCの消費が抑えられるという報告があり，この仮説を支持している（Osborne & Hashimoto, 2007）．一方，ビタミンCはヒト，サル，モルモットなど一部を除く多くの脊椎動物では主に肝臓で合成されるが，ビタミンCの合成には等molのグルタチオンが必要とされるとの報告もあり，ビタミンCの増産が肝臓にとってフェロトーシス誘引性の負荷となることも考えられる（Banhegyi et al., 1996）．また，ハムスター血中においてカタラーゼによる$H_2O_2$の分解活性が中途覚醒時に上昇し，$H_2O_2$による細胞死を抑制することが示唆されている（Ohta et al., 2006）．

## 8．おわりに

深冬眠時の小型冬眠哺乳類が，体温を極端に低く維持しながらほとんど何の傷害も受けないという優れた低温耐性能力は，古くから人々の強い興味を惹いてきた．ヒトがん細胞を用いた研究から低温における細胞死は，脂質の酸化によって引き起こされるフェロトーシスと呼ばれる細胞死に近いことが近年明らかとなった．私たちの研究から，ハムスターは天然のフェロトーシス阻害剤であるビタミンEを組織中に高保持する能力を備えており，それによって冬眠期の細胞傷害性ストレスに対処する可能性が示唆された．さらに冬眠哺乳類に由来する培養細胞株は，同条件で継代を重ねても非冬眠哺乳類の細胞株に比べて高い低温耐性を持つことから，外部栄養に依らない低温耐性能力も備えると考えられる．こうした細胞自律的な能力を支える分子基盤については，近年急速に発展したゲノム編集技術を用いたスクリーニングシステムの応用や，がん研究分野の知見を流用することで，そう遠くない将来に明らかになると期待される．一方で，そうした細胞自律的な低温耐性能力が実際の冬眠に関与するかの解明や，深冬眠時の循環器や呼吸器，神経系の臓器機能を維持するメカニズム，さらにそうしたメカニズムを発動するための活動期から冬眠期への身体の作り替えのメカニズムの解明には，時間とコストを必要とする個体レベルでの解析が必須となるため，より多くの困難が伴うと予想される（図5）．しかしながら，近年の技術的進歩により，冬眠哺乳類のゲノム情報を活用しRNA-seq解析やプロテオーム解析などにより重要な遺伝子を絞り込んだうえで，ゲノム編集技術により逆遺伝

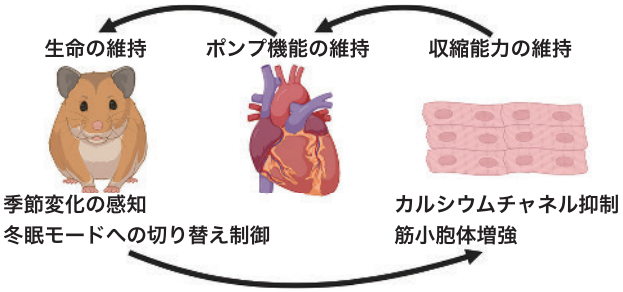


図 5：心臓を例とした，冬眠哺乳類の異なる階層の低温耐性能力.

学的に遺伝子機能を解析することが可能となった今，こうした高次の低温耐性能力についてもまた徐々に解き明かされていくであろう.

## 参考文献


Anegawa, D., Sugiura, Y., Matsuoka, Y., Sone, M., Shichiri, M., Otsuka, R., Ishida, N., Yamada, K. I., Suematsu, M., Miura, M., & Yamaguchi, Y. (2021). Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived alpha-tocopherol. *Commun Biol*, **4**(1), 796. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02297-6

Armstrong, C., & Staples, J. F. (2010). The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *J Comp Physiol B*, **180**(5), 775-783. https://doi.org/10.1007/s00360-010-0444-3

Banhegyi, G., Csala, M., Braun, L., Garzo, T., & Mandl, J. (1996). Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver. *FEBS Lett*, **381**(1-2), 39-41. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00077-4

Barnes, B. M. (1989). Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science*, **244**(4912), 1593-1595. https://doi.org/10.1126/science.2740905

Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, **575**(7784), 688-692. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2

Bhowmick, S., & Drew, K. L. (2017). Arctic ground squirrel resist peroxynitrite-mediated cell death in response to oxygen glucose deprivation. *Free Radic Biol Med*, **113**, 203-211. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.024

Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, **308**(5721), 518. https://doi.org/10.1126/science.1108581

Bogren, L. K., Olson, J. M., Carpluk, J., Moore, J. M., & Drew, K. L. (2014). Resistance to systemic inflammation and multi organ damage after global ischemia/reperfusion in the arctic ground squirrel. *PLoS One*, **9**(4), e94225. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094225

Brown, J. C., Chung, D. J., Belgrave, K. R., & Staples, J. F. (2012). Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **302**(1), R15-28. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00230.2011

Carlson, B. A., Tobe, R., Yefremova, E., Tsuji, P. A., Hoffmann, V. J., Schweizer, U., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., & Conrad, M. (2016). Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol*, **9**, 22-31. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.003

Chung, D., Lloyd, G. P., Thomas, R. H., Guglielmo, C. G., & Staples, J. F. (2011). Mitochondrial respiration and succinate dehydrogenase are suppressed early during entrance into a hibernation bout, but membrane remodeling is only transient. *J Comp Physiol B*, **181**(5), 699-711. https://doi.org/10.1007/s00360-010-0547-x

Conrad, M., & Pratt, D. A. (2019). The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, **15**(12), 1137-1147. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0408-1

Cozza, G., Rossetto, M., Bosello-Travain, V., Maiorino, M., Roveri, A., Toppo, S., Zaccarin, M., Zennaro, L., & Ursini, F. (2017). Glutathione peroxidase 4-catalyzed reduction of lipid hydroperoxides in membranes: The polar head of membrane phospholipids binds the enzyme and addresses the fatty acid hydroperoxide group toward the redox center. *Free Radic Biol Med*, **112**, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.010

Dabkowski, E. R., Williamson, C. L., & Hollander, J. M. (2008). Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free Radic Biol Med*, **45**(6), 855-865. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.021

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149**(5), 1060-1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Goya Grocin, A., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourao, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., . . . Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, **575**(7784), 693-698. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0

Drew, K. L., Osborne, P. G., Frerichs, K. U., Hu, Y., Koren, R. E., Hallenbeck, J. M., & Rice, M. E. (1999). Ascorbate and

glutathione regulation in hibernating ground squirrels. *Brain Res*, **851**(1–2), 1–8. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01969-1

Drew, K. L., Toien, O., Rivera, P. M., Smith, M. A., Perry, G., & Rice, M. E. (2002). Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **133**(4), 483–492. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00118-7

Duffy, B. M., & Staples, J. F. (2022). Arousal from Torpor Increases Oxidative Damage in the Hibernating Thirteen-Lined Ground Squirrel (Ictidomys tridecemlineatus). *Physiol Biochem Zool*, **95**(3), 229–238. https://doi.org/10.1086/719931

Eleftheriadis, T., Pissas, G., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2019). Factors that May Protect the Native Hibernator Syrian Hamster Renal Tubular Epithelial Cells from Ferroptosis Due to Warm Anoxia-Reoxygenation. *Biology (Basel)*, **8**(2). https://doi.org/10.3390/biology8020022

Feketa, V. V., Nikolaev, Y. A., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2020). CNGA3 acts as a cold sensor in hypothalamic neurons. *Elife*, **9**. https://doi.org/10.7554/eLife.55370

Hattori, K., Ishikawa, H., Sakauchi, C., Takayanagi, S., Naguro, I., & Ichijo, H. (2017). Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway. *EMBO Rep*, **18**(11), 2067–2078. https://doi.org/10.15252/embr.201744228

Hendriks, K. D. W., Joschko, C. P., Hoogstra-Berends, F., Heegsma, J., Faber, K. N., & Henning, R. H. (2020). Hibernator-Derived Cells Show Superior Protection and Survival in Hypothermia Compared to Non-Hibernator Cells. *Int J Mol Sci*, **21**(5). https://doi.org/10.3390/ijms21051864

Hendriks, K. D. W., Lupi, E., Hardenberg, M. C., Hoogstra-Berends, F., Deelman, L. E., & Henning, R. H. (2017). Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Sci Rep*, **7**(1), 15482. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15606-z

Hoffstaetter, L. J., Mastrotto, M., Merriman, D. K., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2018). Somatosensory Neurons Enter a State of Altered Excitability during Hibernation. *Curr Biol*, **28**(18), 2998–3004 e2993. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.020

Horowitz, J. M., & Horwitz, B. A. (2019). Extreme Neuroplasticity of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in Hibernating Mammalian Species. *Front Neuroanat*, **13**, 9. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00009

Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Roveri, A., Peng, X., Porto Freitas, F., Seibt, T., Mehr, L., Aichler, M., Walch, A., Lamp, D., Jastroch, M., Miyamoto, S., Wurst, W., Ursini, F., Arner, E. S. J., . . . Conrad, M. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, **172**(3), 409–422 e421. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.048

Jensen, B. S., & Fago, A. (2021). Sulfide metabolism and the mechanism of torpor. *J Exp Biol*, **224**(17). https://doi.org/10.1242/jeb.215764

Jensen, B. S., Pardue, S., Duffy, B., Kevil, C. G., Staples, J. F., & Fago, A. (2021). Suppression of mitochondrial respiration by hydrogen sulfide in hibernating 13-lined ground squirrels. *Free Radic Biol Med*, **169**, 181–186. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.009

Kokoz Yu, M., Grichenko, A. S., Korystova, A. F., Lankina, D. A., Pimenov, O., & Markevich, N. I. (2000). The regulation of L-type Ca2 + currents in cardiac myocytes of hibernating animals. *Membr Cell Biol*, **14**(2), 277–284. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093588

Kondo, N. (1986). Excitation-contraction coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks: effects of isoprenaline, a high calcium medium, and ryanodine. *Circ Res*, **59**(2), 221–228. https://doi.org/10.1161/01.res.59.2.221

Kraft, V. A. N., Bezjian, C. T., Pfeiffer, S., Ringelstetter, L., Muller, C., Zandkarimi, F., Merl-Pham, J., Bao, X., Anastasov, N., Kossl, J., Brandner, S., Daniels, J. D., Schmitt-Kopplin, P., Hauck, S. M., Stockwell, B. R., Hadian, K., & Schick, J. A. (2020). GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *ACS Cent Sci*, **6**(1), 41–53. https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01063

Krilowicz, B. L., Glotzbach, S. F., & Heller, H. C. (1988). Neuronal activity during sleep and complete bouts of hibernation. *Am J Physiol*, **255**(6 Pt 2), R1008–1019. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.255.6.R1008

Laursen, W. J., Mastrotto, M., Pesta, D., Funk, O. H., Goodman, J. B., Merriman, D. K., Ingolia, N., Shulman, G. I., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2015). Neuronal UCP1 expression suggests a mechanism for local thermogenesis during hibernation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**(5), 1607–1612. https://doi.org/10.1073/pnas.1421419112

Lillo-Moya, J., Rojas-Sole, C., Munoz-Salamanca, D., Panieri, E., Saso, L., & Rodrigo, R. (2021). Targeting Ferroptosis against Ischemia/Reperfusion Cardiac Injury. *Antioxidants (Basel)*, **10**(5). https://doi.org/10.3390/antiox10050667

Mao, C., Liu, X., Zhang, Y., Lei, G., Yan, Y., Lee, H., Koppula, P., Wu, S., Zhuang, L., Fang, B., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2021). DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, **593**(7860), 586–590. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03539-7

Mathers, K. E., McFarlane, S. V., Zhao, L., & Staples, J. F. (2017). Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *J Comp Physiol B*, **187**(1), 227–234. https://doi.org/10.1007/s00360-016-1022-0

Mathers, K. E., & Staples, J. F. (2019). Differential posttransla-

tional modification of mitochondrial enzymes corresponds with metabolic suppression during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **317** (2), R262-R269. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00052.2019

Matos-Cruz, V., Schneider, E. R., Mastrotto, M., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2017). Molecular Prerequisites for Diminished Cold Sensitivity in Ground Squirrels and Hamsters. *Cell Rep*, **21**(12), 3329–3337. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.083

Mishima, E., Ito, J., Wu, Z., Nakamura, T., Wahida, A., Doll, S., Tonnus, W., Nepachalovich, P., Eggenhofer, E., Aldrovandi, M., Henkelmann, B., Yamada, K. I., Wanninger, J., Zilka, O., Sato, E., Feederle, R., Hass, D., Maida, A., Mourao, A. S. D., . . . Conrad, M. (2022). A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature*, **608**(7924), 778–783. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05022-3

Nakamura, T., Ogawa, M., Kojima, K., Takayanagi, S., Ishihara, S., Hattori, K., Naguro, I., & Ichijo, H. (2021). The mitochondrial Ca(2 +) uptake regulator, MICU1, is involved in cold stress-induced ferroptosis. *EMBO Rep*, **22**(5), e51532. https://doi.org/10.15252/embr.202051532

Ohta, H., Okamoto, I., Hanaya, T., Arai, S., Ohta, T., & Fukuda, S. (2006). Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **143** (4), 484–491. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.002

Osborne, P. G., & Hashimoto, M. (2007). Brain ECF antioxidant interactions in hamsters during arousal from hibernation. *Behav Brain Res*, **178**(1), 115–122. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.12.006

Ou, J., Ball, J. M., Luan, Y., Zhao, T., Miyagishima, K. J., Xu, Y., Zhou, H., Chen, J., Merriman, D. K., Xie, Z., Mallon, B. S., & Li, W. (2018). iPSCs from a Hibernator Provide a Platform for Studying Cold Adaptation and Its Potential Medical Applications. *Cell*, **173** (4), 851–863 e816. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.010

Peretti, D., Bastide, A., Radford, H., Verity, N., Molloy, C., Martin, M. G., Moreno, J. A., Steinert, J. R., Smith, T., Dinsdale, D., Willis, A. E., & Mallucci, G. R. (2015). RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature*, **518** (7538), 236–239. https://doi.org/10.1038/nature14142

Perez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1778** (7–8), 1676–1695. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.003

Rosenquist, T. H. (1970). Ultrastructural changes in the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum of myocardial cells during hibernation. *Cryobiology*, **7**(1), 14–18. https://doi.org/10.1016/0011-2240(70)90040-4

Ross, A. P., Christian, S. L., Zhao, H. W., & Drew, K. L. (2006). Persistent tolerance to oxygen and nutrient deprivation and N-methyl-D-aspartate in cultured hippocampal slices from hibernating Arctic ground squirrel. *J Cereb Blood Flow Metab*, **26** (9), 1148–1156. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600271

Savaskan, N. E., Ufer, C., Kuhn, H., & Borchert, A. (2007). Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem*, **388** (10), 1007–1017. https://doi.org/10.1515/BC.2007.126

Scheerer, P., Borchert, A., Krauss, N., Wessner, H., Gerth, C., Hohne, W., & Kuhn, H. (2007). Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*, **46** (31), 9041–9049. https://doi.org/10.1021/bi700840d

Sekizawa, S., Horowitz, J. M., Horwitz, B. A., & Chen, C. Y. (2012). Realignment of signal processing within a sensory brainstem nucleus as brain temperature declines in the Syrian hamster, a hibernating species. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **198** (4), 267–282. https://doi.org/10.1007/s00359-011-0706-x

Sekizawa, S., Horwitz, B. A., Horowitz, J. M., & Chen, C. Y. (2013). Protection of signal processing at low temperature in baroreceptive neurons in the nucleus tractus solitarius of Syrian hamsters, a hibernating species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **305**(10), R1153–1162. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00165.2013

Shah, R., Farmer, L. A., Zilka, O., Van Kessel, A. T. M., & Pratt, D. A. (2019). Beyond DPPH: Use of Fluorescence-Enabled Inhibited Autoxidation to Predict Oxidative Cell Death Rescue. *Cell Chem Biol*, **26**(11), 1594–1607 e1597. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.007

Shah, R., Shchepinov, M. S., & Pratt, D. A. (2018). Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Cent Sci*, **4**(3), 387–396. https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00589

Shintoku, R., Takigawa, Y., Yamada, K., Kubota, C., Yoshimoto, Y., Takeuchi, T., Koshiishi, I., & Torii, S. (2017). Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3. *Cancer Sci*, **108**(11), 2187–2194. https://doi.org/10.1111/cas.13380

Singhal, N. S., Bai, M., Lee, E. M., Luo, S., Cook, K. R., & Ma, D. K. (2020). Cytoprotection by a naturally occurring variant of ATP5G1 in Arctic ground squirrel neural progenitor cells. *Elife*, **9**. https://doi.org/10.7554/eLife.55578

Skepper, J. N., & Navaratnam, V. (1995). Ultrastructural features of left ventricular myocytes in active and torpid hamsters compared with rats: a morphometric study. *J Anat*, **186** (Pt 3)(Pt 3), 585–592. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559131

Sonntag, M., & Arendt, T. (2019). Neuronal Activity in the Hibernating Brain. *Front Neuroanat*, **13**, 71. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00071

Soula, M., Weber, R. A., Zilka, O., Alwaseem, H., La, K., Yen, F., Molina, H., Garcia-Bermudez, J., Pratt, D. A., & Birsoy, K. (2020). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers. *Nat Chem Biol*, **16** (12), 1351–1360. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0613-y

Staples, J. F. (2014). Metabolic suppression in mammalian hibernation: the role of mitochondria. *J Exp Biol*, **217**(Pt 12), 2032–2036. https://doi.org/10.1242/jeb.092973

Suri, L. N., McCaig, L., Picardi, M. V., Ospina, O. L., Veldhuizen, R. A., Staples, J. F., Possmayer, F., Yao, L. J., Perez-Gil, J., & Orgeig, S. (2012). Adaptation to low body temperature influences pulmonary surfactant composition thereby increasing fluidity while maintaining appropriately ordered membrane structure and surface activity. *Biochim Biophys Acta*, **1818** (7), 1581–1589. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.021

Toien, O., Drew, K. L., Chao, M. L., & Rice, M. E. (2001). Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**(2), R572–583. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572

Wang, S. Q., Lakatta, E. G., Cheng, H., & Zhou, Z. Q. (2002). Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J Exp Biol*, **205**(Pt 19), 2957–2962. https://doi.org/10.1242/jeb.205.19.2957

Wenzel, S. E., Tyurina, Y. Y., Zhao, J., St Croix, C. M., Dar, H. H., Mao, G., Tyurin, V. A., Anthonymuthu, T. S., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I. H., Kenny, E. M., Yang, Q., Rosenbaum, J. C., Sparvero, L. J., Emlet, D. R., Wen, X., Minami, Y., . . . Kagan, V. E. (2017). PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell*, **171** (3), 628–641 e626. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.044

Wu, S., Mao, C., Kondiparthi, L., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2022). A ferroptosis defense mechanism mediated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **119** (26), e2121987119. https://doi.org/10.1073/pnas.2121987119

Yan, B., Ai, Y., Sun, Q., Ma, Y., Cao, Y., Wang, J., Zhang, Z., & Wang, X. (2021). Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol Cell*, **81**(2), 355–369 e310. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.024

Yan, H. F., Tuo, Q. Z., Yin, Q. Z., & Lei, P. (2020). The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zool Res*, **41**(3), 220–230. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, **156**(1–2), 317–331. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010

Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., Motta, L., Richardson, A., & Prolla, T. A. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, **34**(4), 496–502. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01360-6

Yatani, A., Kim, S. J., Kudej, R. K., Wang, Q., Depre, C., Irie, K., Kranias, E. G., Vatner, S. F., & Vatner, D. E. (2004). Insights into cardioprotection obtained from study of cellular Ca2 + handling in myocardium of true hibernating mammals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**(6), H2219–2228. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01096.2003

Zhao, H. W., Ross, A. P., Christian, S. L., Buchholz, J. N., & Drew, K. L. (2006). Decreased NR1 phosphorylation and decreased NMDAR function in hibernating Arctic ground squirrels. *J Neurosci Res*, **84** (2), 291–298. https://doi.org/10.1002/jnr.20893

Zou, Y., Henry, W. S., Ricq, E. L., Graham, E. T., Phadnis, V. V., Maretich, P., Paradkar, S., Boehnke, N., Deik, A. A., Reinhardt, F., Eaton, J. K., Ferguson, B., Wang, W., Fairman, J., Keys, H. R., Dancik, V., Clish, C. B., Clemons, P. A., Hammond, P. T., . . . Schreiber, S. L. (2020). Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion. *Nature*, **585**(7826), 603–608. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2732-8

Zou, Y., Li, H., Graham, E. T., Deik, A. A., Eaton, J. K., Wang, W., Sandoval-Gomez, G., Clish, C. B., Doench, J. G., & Schreiber, S. L. (2020). Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol*, **16**(3), 302–309. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0472-6