

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06630

研究課題名(和文) ROS感知機構BAG-1/ATF4システムはフェロトーシスの制御システムか？

研究課題名(英文) Is ROS-sensing BAG-1/ATF4-system a regulatory system for ferroptosis?

研究代表者

久下 周佐 (Kuge, Shusuke)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50186376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Ferroptosis(フェロトーシス)は、鉄依存的な脂質の過酸化を介した新規な制御細胞死で、がん抑制遺伝子P53に依存した細胞死として着目されている。これまでに、BAG-1が細胞内ROSレベルを感知し、転写因子ATF4合成誘導とシスチントランスポーター(xCT, SLC7A11)の発現誘導することを示した。xCT以外への影響を検討するために、xCT阻害剤であるErastinで処理すると、BAG-1欠損によりROSレベルの顕著な増加とフェロトーシスが誘導された。BAG-1はATF4のレベルおよびHO-1のレベルをネガティブに制御してフェロトーシスを抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BAG-1はがん細胞に多く発現してその増殖や治療抵抗性に寄与することが示唆されているが、その分子機構は解明されていない。本研究は、細胞内酸化状態を感知してフェロトーシスを制御する分子機構を初めて示すと同時に、抗がん剤などによるフェロトーシスを介してがん細胞の増殖を抑制する過程でBAG-1が寄与する回避機構を解明するもので、がんの治療効率を上げる方法の開発につながる知見を与える。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis is a novel regulatory cell death mediated by iron-dependent lipid peroxidation, and is attracting attention as cell death dependent on the cancer suppressor gene P53. So far, we have shown that BAG-1 senses intracellular ROS levels and induces transcription factor ATF4 synthesis and cystine transporter (xCT, SLC7A11) expression. Treatment with the xCT inhibitor Erastin to investigate non-xCT effects induced a marked increase in ROS levels and ferroptosis due to BAG-1 deficiency. BAG-1 has been shown to have the potential to negatively regulate ATF4 and HO-1 levels to suppress ferroptosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：BAG-1 フェロトーシス シスチントランスポーター ヘムオキシゲナーゼ がん細胞 SLC7A11 Ferroptosis P53

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Ferroptosis(フェロトーシス)は、鉄依存的な脂質の過酸化を介した新たな制御細胞死で、がん抑制遺伝子 P53 に依存した細胞死として着目されている。P53 は、細胞周期の抑制やアポトーシスの抑制などと分離可能な機能として、細胞内にシスチンを取り込むシスチントランスポーター(xCT)サブユニットの遺伝子(SLC7A11)の発現抑制し、その結果 Ferroptosis (フェロトーシス)を誘導することが示された(Jiang, Nature 520, 2015)。我々は、これまでに HEP70 のコシャペロンである BAG-1 が細胞内 ROS レベルを BAG ドメインのシステイン残基(Cys)の酸化により感知し、eIF2 のリン酸化、転写因子 ATF4 の合成誘導につなげ SLC7A11 の発現を誘導する酸化ストレス応答システム(BAG-1/ATF4 システム)を示してきた。さらに感知機能がない BAG-1 変異体を持つ細胞ではシスチンの供給不足によるものと考えられる増殖阻害が起こるが、これらの BAG-1 の機能は P53 を持つ細胞に限られる。

### 2. 研究の目的

これまで我々が得ている知見から、BAG-1 が細胞内の ROS を感知してシスチン細胞内の取り込みを誘導しフェロトーシスを抑制に寄与する可能性を示唆している。

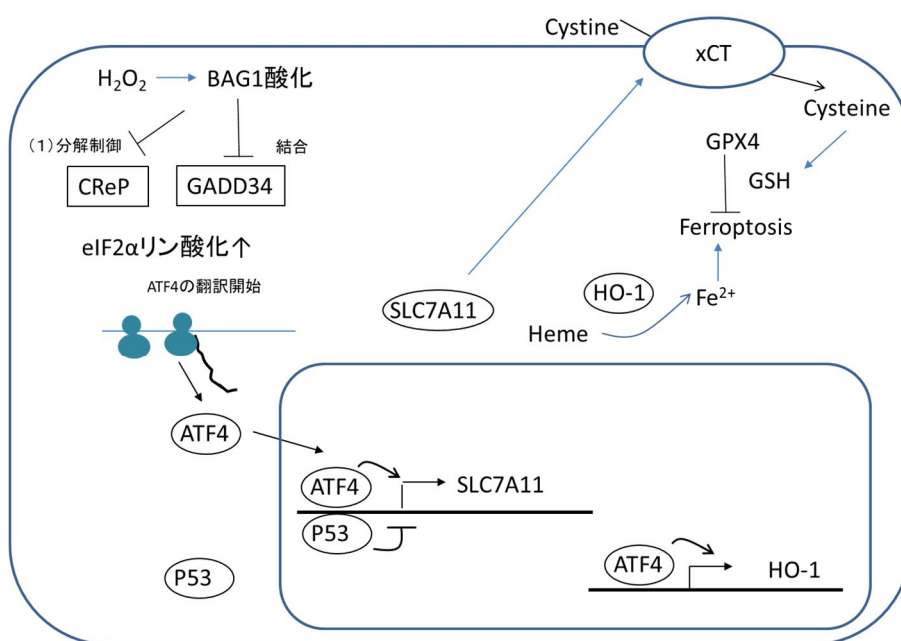
本研究では BAG-1/ATF4 システムが細胞の ROS を感知して P53 依存的なフェロトーシスをコントロールするかを解明し、ROS 感知システム BAG-1 の哺乳動物細胞の生理的意義を明確にする。また、がん組織の様に酸化ストレス下に置かれた細胞の BAG-1/ATF4 システムによる SLC7A11 遺伝子の発現誘導と P53 依存的発現抑制意義をしめす。

### 3. 研究の方法

ヒト非小細胞肺癌 H1299 細胞の BAG-1 遺伝子を CRISPR/CAS9 システムを用いて欠損した。BAG-1 欠損細胞に Cys 変異 BAG-1 および野生型 BAG-1 を発現させた。テトラサイクリンで誘導可能な P53 およびその変異体を導入した。フェロトーシスは xCT 阻害剤である Erastin を用いた。

### 4. 研究成果

(1) BAG-1 はアンチパラレルな 3 つの ヘリックスから構成される BAG ドメインを持つ。我々は、これまでに過酸化水素に反応して BAG ドメインの 1 番目と 3 番目のヘリックスの間でジスルフィド結合を形成すると eIF2 の脱リン酸化酵素サブユニット GADD34 と結合してその活性を阻害することを見出していった。eIF2 のリン酸化は ATF4 の翻訳開始を誘導し ATF4 依存的に SLC7A11 の転写を誘導する。しかし、GADD34 は ATF4 による誘導により増強されネガティブフィードバックの機能がある一方、eIF2 の脱リン酸化酵素サブユニットには非ストレス下でも



BAG-1によるATF4の制御とフェロトーシスの抑制機構

構成的に存在する CReP がありその抑制機構が不明であった。本研究では CReP が酸化ストレス下で一過的に不安定化することを見出した。CReP の分解には BAG-1 が必要であるが、BAG ドメインの Cys 変異体でも同様な活性があることが判明した。

(2) BAG-1 による SLC7A11 以外のフェロトーシスへの寄与を明らかにするため、H1299 BAG-1

欠損細胞を Erastin で処理した。野生型 H1299 に比べて BAG-1 欠損細胞は、顕著に ROS レベルが増加しフェロトーシスによる細胞増殖の阻害が起こることが明らかになった。興味深いことに Erastin 処理で誘導される ATF4 及びそのターゲットであるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は BAG-1 欠損細胞で顕著である。BAG-1 欠損によるフェロトーシスは HO-1 阻害剤の Zn protoporphine 9 で阻害されることから、BAG-1 は Erastin 存在下で ATF4 のレベルおよび HO-1 のレベルをネガティブに制御してフェロトーシスを抑制する可能性が示唆された。

<引用文献>

Jiang, L., Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression., Nature 520, 57-62, 2015.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 黒田 照夫, 松沢 厚, 久下 周佐	4. 巻 140
2. 論文標題 感染症の現状と対策 薬学領域が果たす役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 885-885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00255-F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayato Irokawa, Satoshi Numasaki, Shin Kato, Kenta Iwai, Atsushi Inose-Maruyama, Takumi Ohdate, Gi-Wook Hwang, Takashi Toyama, Toshihiko Watanabe, Shusuke Kuge	4. 巻 478
2. 論文標題 Comprehensive analyses of the cysteine thiol oxidation of PKM2 reveal the effects of multiple oxidation on cellular oxidative stress response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Biochemical journal	6. 最初と最後の頁 1453-1470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim MS, Takahashi T, Lee JY, Toyama T, Hoshi T, Kuge S, Fujiwara Y, Naganuma A, Hwang GW.	4. 巻 1
2. 論文標題 Methylmercury enhances cytotoxicity through inhibition of its activity by a decrease in PTEN solubility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim MS, Takahashi T, Lee JY, Toyama T, Hoshi T, Kuge S, Fujiwara Y, Naganuma A, Hwang GW	4. 巻 9
2. 論文標題 Methylmercury induces the expression of chemokine CCL4 via SRF activation in C17.2 mouse neural stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41127-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関根 僚也、岩崎 佑大、猪瀬 敦史、色川 隼人、久下 周佐
2. 発表標題 成熟型HCV Coreタンパク質のC末端を特異的に認識する抗体の作製とCoreのプロセッシングの解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 色川 隼人, 加藤 慎, 沼崎 賢史, 久下 周佐
2. 発表標題 解糖系律速酵素のレドックス制御多様性が酸化ストレス応答と抗がん剤感受性に与える影響
3. 学会等名 衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田 洸樹、色川隼人、久下周佐
2. 発表標題 HSP70 のコシャペロンである BAG-1 の酸化ストレスの応答における重要性
3. 学会等名 衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根 僚也、久下 周佐
2. 発表標題 HCV CoreのC末端領域の変異が小胞体膜蛋白質と小胞体ストレス応答に与える影響の解析
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久下周佐、武田洸樹、岩井健太、猪瀬（丸山）敦史、色川隼人
2. 発表標題 統合ストレス応答による酸化ストレスの制御メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 色川隼人、沼崎賢史、加藤慎、久下周佐
2. 発表標題 ピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) レドックス制御におけるCys 残基翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 生化学会東北支部第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久下周佐、色川隼人、高橋庄太、小暮高之、佐藤賢一
2. 発表標題 C型肝炎ウイルスCoreタンパク質による小胞体ストレスの誘導
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐
2. 発表標題 ピルビン酸キナーゼM2 型 (PKM2) のシステイン残基翻訳後修飾の多様性とその意義の解析
3. 学会等名 衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田洸樹、色川隼人、久下周佐
2. 発表標題 HSP70 コシヤペロンBAG-1 による酸化ストレス応答機構の解析
3. 学会等名 衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪瀬 丸山敦史、田口恵子、守田匡伸、山本雅之、久下周佐
2. 発表標題 Bag-1はGSH合成阻害剤BSO存在下における細胞増殖と細胞内GSHレベルの低下に寄与する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田洸樹、色川隼人、久下周佐
2. 発表標題 翻訳開始因子eIF2 を介した酸化ストレス感知機構の解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐
2. 発表標題 ピルビン酸キナーゼM2 に存在するシステイン残基の酸化修飾の多様性
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 色川 隼人、沼崎 賢史、加藤 慎、久下 周佐
2. 発表標題 解糖系律速酵素のレドックス制御が酸化ストレス応答と抗がん剤感受性に与える影響
3. 学会等名 第140年会日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 BAG-1によるeIF2 のリン酸化を介した酸化ストレス応答機構の解析
2. 発表標題 武田 洸樹、色川 隼人、久下 周佐
3. 学会等名 第140年会日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 色川隼人 , 加藤 慎, 沼崎賢史, 久下周佐
2. 発表標題 解糖系律速酵素ピルビン酸キナーゼ M2 ( PKM2 ) のレドックス制御
3. 学会等名 第91回生化学会東北支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 色川 隼人, 加藤 慎, 高橋 庄太, 沼崎 賢史, 久下 周佐
2. 発表標題 解糖系律速酵素ピルビン酸キナーゼM2 ( PKM2 ) の新規レドックス制御機構 の解析
3. 学会等名 フォーラム2018衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 色川 隼人, 沼崎 賢史, 加藤 慎, 高橋 庄太, 久下 周佐
2. 発表標題 活性酸素種により誘導されるピルビン酸キナーゼM2型 (PKM2) の酸化型システイン残基の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪瀬 敦史, 田口 恵子, 守田 匡伸, 山本 雅之, 久下 周佐
2. 発表標題 活性酸素種センサーBag-1遺伝子エキソン5領域欠失のマウス個体におよぼす影響解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久下周佐
2. 発表標題 チオール-ジスルフィド交換反応による過酸化水素感知機構
3. 学会等名 日本薬学会東北支部第40回東北薬学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 色川隼人、久下周佐
2. 発表標題 酸化ストレス負荷時のピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) を介した糖代謝制御
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久下周佐、色川隼人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊Vol136 No5 糖代謝とレドックス制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------