

### ③HGF 髄腔内投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み

発症直前かつ脊髄運動ニューロン脱落開始直後の18週齢 (pre-symptomatic, Pre 期)、および発症後期にあたる22週齢 (symptomatic, Sym 期) の His46Arg(H46R)変異 SOD1 Tg ラットに対して、hrHGF (総量 100  $\mu$ g/匹) を2週間にわたり浸透圧ポンプ (Alzet model 2002, 流量 0.5  $\mu$ L/時) によって髄腔内に持続投与した。vehicle としては人工髄液を用いた。HGF 投与群と vehicle 投与群 (各群 n=4~5) いずれに対しても hrHGF 投与期間の後半1週間にチミジン類似体 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を1日1回腹腔内投与 (50 mg/kg 体重) して新生細胞を標識した。2週間の投与期間終了翌日に脊髄腰膨大部の灌流固定後凍結切片を作成して蛍光免疫組織化学的に解析した。一個体につき少なくとも5切片以上の多重切片を得て、一横断切片あたりの BrdU 陽性細胞数を計測、統計学的検討を加えた。

④再生誘導因子 EGF と FGF-2 の髄腔内同時投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み  
発症後 (23週齢) の H46R 変異 SOD1 Tg ラットを対象とし、上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) の同時投与群 (EGF+FGF-2 群, n=5) と、人工髄液のみを投与する対照群 (n=5) に分けた。EGF+FGF-2 群に対してヒトリコンビナント EGF, ヒトリコンビナント FGF-2 各々6,000 ng を常法にしたがい作成した人工髄液に希釈し、正常ラット血清アルブミン、ヘパリンを各々100  $\mu$ g/mL, 10 IU/mL となるように調整して総量 200  $\mu$ L とした。

上述の7日間投与終了翌日に、エーテル深麻酔下のラットより4%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液による灌流固定および浸漬固定後の凍結切片を作成。腰膨大部脊髄の12  $\mu$ m 厚切片において BrdU と各種選択的マーカーとの多重蛍光免疫組織化学を行った。さらに、

Tg ラットにおける EGF 受容体 (EGFR)、FGF 受容体 1 型 (FGFR1) の局在、前角細胞脱落の程度、ユビキチン陽性封入体の存在についても免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

### C. 研究結果

#### ①ALS ラットに対する HGF 髄腔内投与による病態進行抑制

平均発症は HGF 投与群が 126.8 $\pm$ 13.1 日、対照群が 126.3 $\pm$ 13.8 日 (p=0.87455) と有意差は認められなかった。平均死亡は HGF 投与群が 154.3 $\pm$ 16.4 日、対照群が 143.25 $\pm$ 17.0 日 (p=0.02323) と HGF 投与群が対照群より有意に遅延した (図1)。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5 $\pm$ 11.1 日間、対照群が 16.9 $\pm$ 8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7%の増大を示し、発症期の投与によっても HGF が Tg ラットの罹病期間を大幅に延長させることが示された。foot print と体重は、HGF 投与群が対照群よりも保たれ、両者とも 118 日齢で統計学的な有意差を認めた (foot print : 118 日齢 p= 0.0424、体重 : 118 日齢 p=0.0047)。

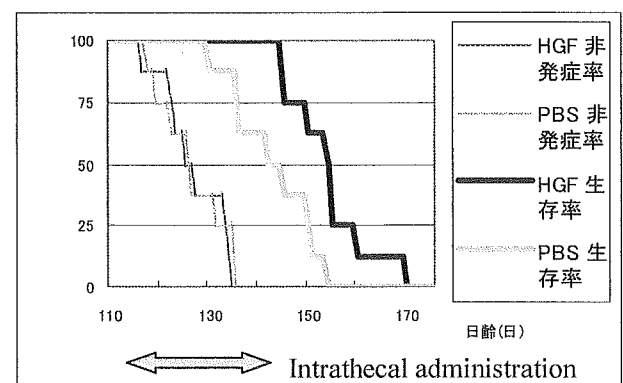


図1. 115日齢からのHGF投与による病態進行抑制効果

第5腰髄の前角運動神経細胞数は、HGF 投与群は平均 14.5 個、対照群は平均 8.33 個 ( $p=0.02846$ ) と HGF 投与群の運動神経細胞数が対照群よりも有意に保持されていた(図2)。免疫染色の結果は、活性型の HGF 受容体であるリン酸化 C-met は HGF 投与群のほうが強く染色された。active caspase-3 および active caspase-9 は対照群のほうが強く染色され HGF 投与群では抑制されていた。

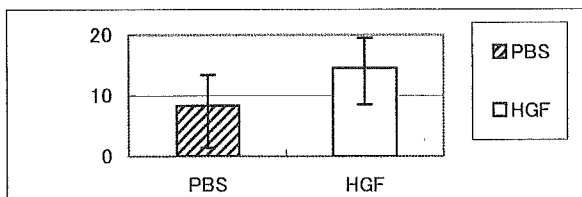


図2. 運動神経細胞数 (第5腰髄前角)

ウェスタンブロットでは各バンドの density を定量解析し、内部標準との比の平均値を算出した。HGF 投与群が対照群よりも caspase-3、9 のバンドが減弱し、caspase-3 では有意差を認めた (pro-caspase-9:  $p=0.694$ , active caspase-9:  $p=0.2364$ , pro-caspase-3:  $p=0.0031$ , active caspase-3:  $0.0154$ )。GFAP のバンドは HGF 投与群と対照群とほぼ同様だった。一方、XIAP、EAAT2 のバンドは HGF 投与群の方が対照群よりも増強しており (XIAP:  $p=0.0099$ , EAAT2:  $0.0417$ )、特に EAAT2 では HGF 投与群が正常ラットよりもバンドが増強していた。

## ②抗 HGF 抗体の髄腔内投与

Tg ラット腰髄では正常同腹仔に比して内因性 HGF の誘導が発症前 (約 14 週齢) より認められた。

コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では、より早期に発症する傾向 ( $P=0.1843$ )、有意に速い進行 ( $P=0.0299$ , 図3)、より早期の死亡が認められた ( $P=0.0463$ )。

抗 HGF 抗体投与群の死亡時病理学的所見では、脊髄前角ニューロンの著明な脱落と著

しいミクログリア、アストロサイト増生を認め、コントロール群と同様であった。

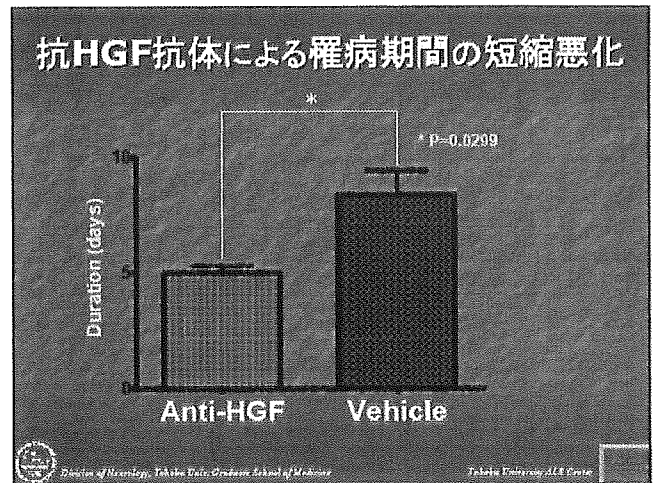


図3. 罹病期間は抗 HGF 抗体投与群で有意に短縮悪化していた ( $P=0.0299$ )。

## ③HGF 髄腔内投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み

Pre 期と Sym 期の vehicle 投与群だけを比較すると、病期の進行に伴い BrdU 陽性細胞数が増加していた。これに対して、Pre 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して BrdU 陽性細胞数がさらに増加する傾向が認められた (有意差なし)。一方、Sym 期の HGF 投与群では vehicle 群に比較して優位に BrdU 陽性細胞数が増加していた (図4)。

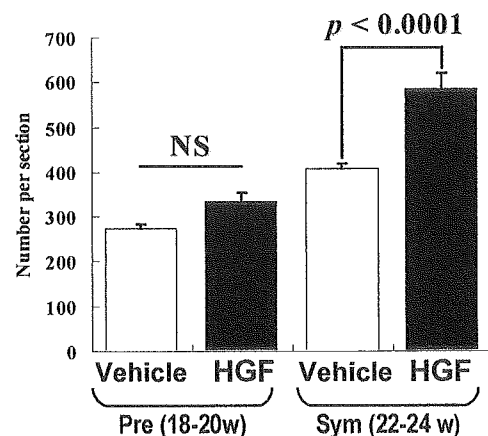


図4. 腰髄 BrdU 陽性細胞数の変化 (本文参照)

④再生誘導因子 EGF と FGF-2 の髄腔内同時投与による内在性神経前駆細胞の賦活の試み EGF+FGF-2 群と対照群における NeuN (成熟神経細胞マーカー) 陽性面積を前角で比較すると両者に有意差はなかった。

BrdU 陽性の新生細胞は脊髄灰白質および白質において有意に EGF+FGF-2 群で増加しており、実質広くにわたって増殖促進されていた。また、総じて灰白質より白質に分布する新生細胞が多く、この傾向は両群とも同様であった。

より未分化な細胞群として nestin および NG2 (それぞれ未分化神経前駆細胞およびグリア前駆細胞の選択的マーカー) を発現する新生細胞をみると、これも脊髄腹側を中心に EGF+FGF-2 群で有意な増加が認められた。さらに成熟グリア細胞への分化を検討するためアストログリアのマーカー GFAP 陽性の新生細胞を検索すると、これも EGF+FGF-2 群で有意に増加していた。現在、その他の細胞選択的マーカー (希突起膠細胞、神経細胞等) を発現する新生細胞についても検討中である。

一方、EGFR は主として神経細胞の胞体および神経突起に、また FGFR1 は神経細胞の胞体と中心管周囲の上衣層に明らかな陽性像を認め、前角および白質には FGFR1/GFAP 二重陽性細胞を多数確認できた。

#### D. 考察

発症時期からの投与により罹病期間延長効果が得られたことから、臨床において発症後 ALS と診断されてから ALS 患者に HGF を投与開始しても、病態進行抑制効果が期待できる可能性が示された。このことは、臨床への応用という点に関して、注目すべき結果と考える。

HGF 投与による病態進行抑制の機序として、caspase cascade の主な実行因子とされている、

caspase-3、9 の抑制効果を認めたことから caspase cascade、またはその上流の細胞死機序を抑制することが示唆された。EAAT2 が発現増加し XIAP が保持されたことから、細胞保護機能の維持・増強が示され、またアストロサイトなどの神経細胞以外の神経組織構成細胞にも HGF が作用することが示された。

また、本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、病態が悪化することが明らかとなった。すなわち、抗 HGF 抗体投与は ALS 様病態の進行を促進したと考えられた。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆される。内因性 HGF の意義 (作用点) をさらに明らかにするためには、本研究で示された抗 HGF 抗体投与による病態加速メカニズムの解明が有用と考えられる。

鳥取大学の加藤らは、変異 SOD1 関連家族性 ALS だけでなくヒト孤発性 ALS においても剖検脊髄の残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met の発現を報告しており、ヒト ALS における HGF の重要性を示唆している。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する理論的かつ有力な新規治療法になり得ると考えられる。HGF による新規治療法開発の次なる段階としては上述の既報をふまえ、齧歯類よりヒトに近い霊長類における HGF 投与の安全性試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。

本来、成体ラット脊髄では生理的条件下においても一定の新生細胞が存在し、おもにグリア細胞新生にあずかっているとされる。我々はこれまでに、ALS ラットモデル脊髄では発症期以前から新生細胞が進行性に増加し

てグリア細胞新生 (gliogenesis) の亢進が認められるとともに、運動ニューロン脱落が顕著となった末期に至っては未分化神経前駆細胞も増殖していることを報告してきた。

本研究では、まず HGF 投与によって病態下脊髄で増加しつつある新生細胞をさらに増加させることが示された。近年、*in vitro* で HGF が neurosphere 形成細胞の増殖、ニューロンへの分化促進といった再生誘導能を示すことが報告されている。本研究により *in vivo* でも、HGF が神経前駆細胞を賦活させる可能性が示された。しかし、HGF は多様な機能をもつサイトカインであることから、神経前駆細胞への直接賦活効果だけでなく、運動ニューロン死抑制効果、astrocyte 機能改善効果を介した間接効果もまた想定される。したがって、HGF が増殖促進した細胞群についての解析に加え、HGF 受容体 c-Met の発現や前駆細胞以外の細胞種、細胞外環境への効果についても検討を要する。

また、運動ニューロン脱落開始直後 (Pre 期) よりは、より進行期 (Sym 期) に HGF を投与する方が新生細胞増加促進の度合いが大きいことが示された。このことは、運動ニューロン脱落が一定レベル以上に生じた環境の方がより新生細胞の増加を許容しやすいという可能性を示唆し、細胞外環境 (液性因子等) の関与が想定される。

さらには EGF と FGF-2 を同時に髄腔内持続投与することによって発症後の ALS ラットモデル脊髄の新生細胞をさらに増加させられることが示された。中でも未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞のマーカーを発現する新生細胞が有意に増加していたことは、分化誘導しうる細胞の由来 (ソース) を移植によってではなく、活性化した内在性神経前駆細胞からも誘導できる可能性を示唆している。今後、より効果的な内在性神経前駆細胞活性化のために至適投与時期 (病期)、投与量の検討が必要と考えられる。

未分化神経前駆細胞に対する増殖・分化誘導活性が知られる因子の中で、EGF、FGF-2 はもっとも基本的で重要なものとされている。とりわけ FGF-2 には他にも神経細胞保護効果、神経細胞の突起伸展作用など多様な活性も併せ持つことが知られている。したがって、EGF、FGF-2 が増殖促進した細胞群についての増殖・分化誘導活性だけでなく、運動神経細胞そのものへの効果、細胞外環境 (niche) への効果についても検討課題となりうる。

EGFR、FGFR1 蛋白の局在をみるといずれも神経細胞に陽性像を認めたが、EGF+FGF-2 持続投与群において前角細胞脱落の程度に差がないことから、今回の神経前駆細胞活性化が神経細胞死抑制に伴う二次的な効果である可能性は低く、神経前駆細胞への直接効果が主である可能性が高い。今回 FGFR1 陽性像を認めた中心管上衣層や実質の細胞群の性質をより詳細に明らかにするとともに、本病態下の EGF、FGF-2 作用メカニズムを検討することが重要と考えられる。

本研究で“髄腔内投与”による再生誘導因子の効果を明らかにしたことは、将来的な臨床応用の観点からまた重要と考えられる。すなわち、脳血液関門を通過しにくい因子を効率よく、全身性副作用を軽減して中枢神経広汎に投与したいといった系統的神経変性疾患の場合、有用な投与方法であることをあらためて示したと考えられる。

## E. 結論

発症時期からの投与により罹病期間延長効果を示した HGF は、臨床での治療効果が大きい期待できる。その作用機序として細胞死抑制、細胞保護機能の維持・増強が確認された。さらに内因性の HGF は ALS 様病態の進行抑制因子として重要な生理的意義をもっている可能性が示唆された。外来性 HGF の供給は ALS の新しい治療法を開発する上で理論的かつ有力な戦略として期待できるが、HGF の髄

腔内投与により脊髄の新生細胞増殖の促進が確認された。さらには EGF・FGF-2 の複合投与によって、発症後の病態下においても未分化神経前駆細胞やグリア前駆細胞をも含めた神経前駆細胞の増殖促進が可能であることが示唆された。今後、他の再生誘導因子や分化調節因子との複合／漸次投与、さらには再生阻害因子の抑制、治療的遺伝子導入などとの組み合わせを検討することで、内在性神経前駆細胞を利用した新規治療法開発へとつながることが期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-133, 2006
- 2) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S. Multiple death pathways in motor neurons: underediting of GluR2 mRNA selectively occurs in sporadic ALS but not ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 54: 11-4, 2006
- 3) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 25: 365-370, 2005
- 4) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 82: 63-70, 2005
- 5) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T,

Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 110: 101-112, 2005

- 6) Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, Kato T: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 194: 203-211, 2005
- 7) Suzuki N, Aoki M, Hinuma Y, Takahashi T, Onodera Y, Ishigaki A, Kato M, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y: Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL). *Neurosci Res* 52: 47-60, 2005
- 8) Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M and Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1, *J Biol Chem* 279: 11327-35, 2004
- 9) 青木正志、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬の開発、*Bio ベンチャー* 4: 36-40, 2004

### 2. 学会発表

Yamagishi S, Katayama T, Imaizumi K, Katoh M, Aoki M, Itoyama Y, Tohyama M. Analysis of L84V SOD1 mutant in SK-N-SH Cells, 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 7-12, 2003.

割田 仁 ほか、外来性再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み、第 46 回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

(資料 1.)

平成15年度

総括研究報告書

研究成果の刊行に関する一覧表およびその刊行物

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発と  
その基盤研究

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野 教授

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科

生化学）

中川原章（千葉県がんセンター生化学研究部）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科

分子組織再生学分野）

青木正志（東北大学病院神経内科）

解な治療効果を示し、次世代の ALS の治療薬として注目されている。一方、本研究グループで開発された ALS Tg ラットは HGF の髄腔内投与実験を可能にさせ、予備実験では臨床的にも病的にも有効性を示している。これらの結果を基盤に運動ニューロンの選択的細胞死のメカニズムと HGF の有効性の機序を解明しつつ HGF を用いた ALS の新規治療法を確立していきたい。

#### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因不明の進行性の難治性神経筋疾患である。運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、最終的には呼吸筋の麻痺をきたすという極めて予後が不良な疾患であり、未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法が確立していない。世界的にも ALS に対する新たな治療法が切望されているが、国内外での臨床試験の結果は絶望的なものと云わざるをえない。本研究の目的はこの神経難病 ALS に対して挑戦的な治療法の開発と確立をめざすことである。

日本で発見された新規の神経栄養因子である肝細胞増殖因子（HGF）は ALS トランスジェニック（Tg）マウスに対して遺伝子工学的に明

#### B. 研究方法

ALS の病因と病態は不明であるが、家族性 ALS の病因遺伝子 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）の関与が最も重要なものと考えられる。本研究グループは変異 SOD1 導入 ALS モデル動物に対して HGF の治療実験を完成させ、早期に臨床応用にもってゆくことを目的として、①新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明、②HGF の運動ニューロン死抑制機序の解明、③ ALS モデル動物に対する HGF の髄腔内投与実験の研究を行う。

1) 新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 は生体内で構造変化を起こし



aggregation を起し神経細胞毒性を示すことが考えられている。この構造変化の機序を解析する為にもモノクローナル抗体 (mAb) の反応性を検討した。正常 SOD と変異 SOD1 (G93A、G37R、A4V、H46R) の cDNA を昆虫細胞発現ベクターに組み込み、それぞれの SOD 蛋白を精製し 3 種の mAb を反応させた。

②神経芽種の発現遺伝子解析の過程で同定された新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 に結合するタンパクの検討を酵母 two-hybrid 法により行ったところ、小胞体トランスロコンを構成し SOD1 変異体と結合することが報告されている TRAP- $\delta$  が同定された。そこで、NEDL1 が品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスフォールド蛋白としての SOD1 変異体に作用するのか、作用するのであればそれは遺伝子治療の可能性が考えられるのか、あるいは病的な意味があるのかなどを明らかにした。

2) HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

①HGF が ALS Tg マウスに有効であることは HGF-ALS ダブル Tg マウスによって遺伝子工学的手法によって示されている。しかしこの効果は発症から死亡までの disease duration の延長には及んでいない点を実際の ALS 治療には問題点であった。そこで ALS Tg マウスの末期において disease duration に関与する各種活性化型カスパーゼや Bcl ファミリー分子に与える HGF の影響を解析した。

②将来的に HGF を用いた遺伝子治療の可能性を見据えて HSV や AAV の発現ウイルスベクターの構築を検討した。

3) ALS モデル動物に対する HGF 髄腔内投与実験

次世代の ALS 治療薬として注目されている HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する

HGF の髄腔内投与実験を行う。G93A Tg ラットの髄腔内にリコンビナントヒト HGF (rh HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて持続投与した。3 群(各群 n=8)の Tg ラットそれぞれに vehicle (PBS) および rh HGF の 40  $\mu$  g と 200  $\mu$  g を ALS を発症していない 100 日齢から一ヶ月間にわたって投与してその臨床病像と脊髄内における運動ニューロン数を定量化して比較した。さらに G93A Tg ラットに対する ALS 発症後の病態進展に対する HGF の効果を検討した。rh HGF 蛋白 200  $\mu$  g と vehicle をそれぞれ 8 匹の G93A Tg ラットの髄腔内に臨床的に発症時期の直前である 115 日齢から 4 週間持続投与し、その体重と発症日と寿命の観察を行った。

### C. 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明

①3 種の mAb は野生型 SOD1 には強い反応性を示したが、A4V、G37R、G93A はほとんど反応しなかった。また、DTT や SDS や熱処理によって野生型 SOD1 は mAb との反応性が増大したが、A4V、G37R、G93A は逆に減弱していった。3 種類の mAb は SOD1 の Greek key loop 部分を認識するので、この Greek key loop 部分では、野生型と変異型では還元や熱などによって変性した構造が異なることを示唆している。Greek key loop 部分は SOD1 ホモダイマーの安全性に大きく寄与しており、この部分が変化しやすいことはタンパク全体の不安定性や aggregation のなりやすさにつながると考えられる。

②新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 は、Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とし、また小胞体トランスロコンの構造タンパ

クである TRAP- $\delta$  と結合した。NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こした。興味深いことには、その結合、ユビキチン化、分解および SOD1 二量体化の程度は、SOD1 変異体が引き起こす ALS の重症度と相関性を示した。免疫組織化学染色でも NEDL1 はヒト FALS 並びに SOD1 変異体 Tg マウスの脊髄運動ニューロン Lewy body-like hyaline inclusions (LBHI) に陽性であった。加えて NEDL1 の基質である Dvl-1 と SOD1 変異体の異常な相互作用が新たに惹起され、Dvl-1 の機能である Wnt 分配因子機能に障害が生じた。以上の結果から、SOD1 変異体は神経特異的品質管理ユビキチンリガーゼとしての NEDL1 によるユビキチン化を受けるが、結果的に、NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などと細胞内タンパク質凝集体を形成し、それら構成因子やオルガネラの機能障害を引き起こすことが SOD1 変異体由来の FALS の発症の一因となっている可能性が示唆された。

## 2) HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

①ALS-HGF Tg と ALS Tg につき HGF による発症前後での各種 ALS 病態進行分子機構に対する影響について解析した。ALS Tg において活性型カスパーゼ 9 は ALS 発症中期の運動ニューロンに誘導され、ALS 末期には一部反応性アストロサイトにも誘導された。HGF レベルが高く維持された ALS-HGF Tg マウスは 8 か月齢でも生存し、そのマウスにおいては活性型カスパーゼ 9 の誘導が抑制されるとともに運動ニューロンの変性も抑制されていた。すなわち ALS の disease duration の進行に関わる主要分子機構である活性型カスパーゼ 9 の誘導を、HGF が抑制する効果を明らかにした。このことから ALS 末期の脊髄に十分量の HGF 蛋白を持続的に供給する手段を開発することによりさらなる

ALS の寿命延長を期待できると考えられた。

②髄腔内投与以外の将来に向けた新しい HGF 供給法の検討の為に、各種の HGF 発現ウイルスベクターの構築と解析および投与法の検討を行なった。HGF 発現ウイルスベクター即ち HSV-HGF および各種 AAV-HGF の構築を全て終了し、ウイルスベクターの HGF の発現を、ELISA 法、ウエスタンブロット法、生物アッセイ法で解析したところ、いずれも発現ベクターの作成に成功していることを確認した。今後、ALS モデル動物で HGF 発現ウイルスベクターの理想的投与法を確認できれば、現在進めている髄腔内 HGF 投与療法に加えて新たな HGF 治療法の開発も期待される。

## 3) ALS モデル動物に対する髄腔内投与実験

HGF の臨床応用のために ALS ラットに対して rhHGF の髄腔内持続投与を行なった。HGF 投与群においては vehicle 投与群に比較して有意に腰髄運動ニューロン数が保たれていることが明らかになり、このことは HGF 投与量に依存的であった。臨床的には対照 (vehicle) 群と比較して rh HGF 蛋白 200  $\mu$ g/固体群では発症日には差が認められなかったが、発症から死亡までの平均罹病期間は対照群の 16.9 日に対して HGF 投与群では 27.5 日であり、有意に延長が認められた。HGF の投与開始の 115 日齢は臨床的発症直前であり、病理学的には既に脊髄前角の運動ニューロンの脱落が認められる時期である。この時期での投与で約 63%の罹病期間の延長効果が確認されたことは、HGF の髄腔内持続投与の臨床応用が十分に期待される。今後は HGF 有効性のメカニズムのさらなる解明と、髄腔内投与における副作用の有無などについてもより詳細な検討が必要である。

## E. 結論

本研究の目的は苛酷な神経難病の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する次世代の新規治療薬として期待される肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法の開発とそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 SOD1 による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていない。今回、SOD1 変異体は新規の神経特異的ユビキチンリガーゼである NEDL1 のユビキチン化を受けるが、最終的に NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などの細胞内タンパク質凝集体を形成し機能障害を引き起こすことが神経細胞死の一因ではないかと示唆された。HGF はその凝集体形成で引き起こされたシグナル伝達の改善に寄与して細胞死を抑制する可能性も考えられる。HGF が ALS Tg マウスに対して遺伝子工学的に有効性を示すものの disease duration を十分に延長させない弱点があった。今回 HGF が ALS 病変進行に重要な活性型カスパーゼ 9 の誘導を抑制することが明らかにされ、HGF の持続供給投与方法が改善されたら更に延命効果が期待されると考えられた。HGF の ALS 患者への臨床応用を目指して本研究グループで開発された ALS Tg ラットに対し髄腔内持続 HGF 投与実験を行ってきている。今回 ALS が臨床的に発症する時期から HGF を投与しても有意に ALS の罹病期間を延長することが示され、臨床応用に向けて次なるステップへ進むことが可能になった。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose

Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J Biol Chem.* (in press)

Takamiya R, Takahashi M, Theingi M, Park Y-S, Miyazawa N, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N. Glycation proceeds faster in mutant Cu,Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 17:938-940, 2003

Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to mutant SOD-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis patients and transgenic rats expressing human mutant SOD1. *Acta Neuropathol (Berl)*, 107:149-158, 2004

Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 106(2):112-120, 2003

### 2. 学会発表

Fujiwara N, Miyamoto Y, Takahashi M, Takamiya R, Honke K, Suzuki K, Taniguchi N. Differences in stability and conformational change between wild-type and mutant

copper, zinc-superoxide dismutase linked with familial amyotrophic lateral sclerosis. HUPO 2<sup>nd</sup> Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8-11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstract, 28, 2003).

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、石垣あや、松本有史、割田 仁、船越 洋、中村敏一、糸山泰人、HGF 髄腔内持続投与による ALS トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の抑制; 第 44 回日本神経学会総会 2003. 5 横浜

#### H. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

著者	論文タイトル名	掲載誌名	巻ページ	出版年
Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A	NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1	J Biol Chem		in press
Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E	Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models	Acta Neuropathol (Berl)	107 149-58	in press
Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, Koyama S, Wada M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Goto K, Kato T	Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice	Biochem Biophys Res Commun	303 496-503	2003
Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N	Oxidative Stress Caused by Inactivation of Glutathione Peroxidase and Adaptive Responses	J Biol Chem	384 567-574	2003
Takamiya R, Takahashi M, Myrint T, Park YS, Miyazawa N, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N	Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis	FASEB J	17 938-940	2003
Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A	Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets	Oncogene	22 5525-36	2003

<p>H. Funakoshi, T. Nakamura</p>	<p>Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications</p>	<p>Clinica Chimica Acta</p>	<p>327(1-2) 1-23</p>	<p>2003</p>
<p>S. Kato, H. Funakoshi, T. Nakamura, M. Kato, I. Nakano, A. Hirano, and E. Ohama</p>	<p>Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation</p>	<p>Acta Neuropathol (Berl)</p>	<p>106(2) 112-120</p>	<p>2003</p>
<p>H. Takahashi, H. Funakoshi, and T. Nakamura</p>	<p>LIM-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis</p>	<p>Cytogenic and Genome Research</p>		<p>in press</p>

書籍

著者	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	巻ページ	出版年
青木正志、糸山泰人	治療戦略に有用な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の動物モデルの開発		神経治療学	日本神経治療学会	20 527-532	2003
船越 洋、中村敏一	ALSと神経栄養因子：HGFによる新しい治療法開発の可能性		脳と神経		55 841-845	2003
船越 洋、中村敏一	肝細胞増殖因子 (HGF) は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の進行を遅らせる		神経治療学	日本神経治療学会	20 533-540	2003
中村健二、船越 洋、 中村敏一	神経再生因子としての肝細胞増殖因子 (HGF)		脳の科学		25 増刊号 (神経の再生) 108-115	2003

## NEDL1, a Novel Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase for Dishevelled-1, Targets Mutant Superoxide Dismutase-1\*

Received for publication, November 12, 2003, and in revised form, December 16, 2003  
Published, JBC Papers in Press, December 18, 2003, DOI 10.1074/jbc.M312389200

Kou Miyazaki‡, Tomoyuki Fujita‡, Toshinori Ozaki‡, Chiaki Kato‡, Yuka Kurose‡, Maya Sakamoto‡, Shinsuke Kato§, Takeshi Goto¶, Yasuto Itoyama||, Masashi Aoki||, and Akira Nakagawara‡\*\*

From the ‡Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba 264-8717, Japan, the §Division of Neuropathology, Institute of Neurological Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan, ¶Hisamitsu Pharmaceutical Company Incorporated, Tokyo 100-622, Japan, and the ||Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan

Approximately 20% of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS) arises from germ-line mutations in the superoxide dismutase-1 (SOD1) gene. However, the molecular mechanisms underlying the process have been elusive. Here, we show that a neuronal HECT-type ubiquitin-protein isopeptide ligase (NEDL1) physically binds translocon-associated protein- $\delta$  and also binds and ubiquitinates mutant (but not wild-type) SOD1 proportionately to the disease severity caused by that particular mutant. Immunohistochemically, NEDL1 is present in the central region of the Lewy body-like hyaline inclusions in the spinal cord ventral horn motor neurons of both FALS patients and mutant SOD1 transgenic mice. Two-hybrid screening for the physiological targets of NEDL1 has identified Dishevelled-1, one of the key transducers in the Wnt signaling pathway. Mutant SOD1 also interacted with Dishevelled-1 in the presence of NEDL1 and caused its dysfunction. Thus, our results suggest that an adverse interaction among misfolded SOD1, NEDL1, translocon-associated protein- $\delta$ , and Dishevelled-1 forms a ubiquitinated protein complex that is included in potentially cytotoxic protein aggregates and that mutually affects their functions, leading to motor neuron death in FALS.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)<sup>1</sup> is a progressive, fatal, neurodegenerative disease that is characterized by selective loss of motor neurons in the spinal cord, brain stem, and motor cortex. The sporadic and familial forms of the disease have

\* This work was supported in part by Hisamitsu Pharmaceutical Co. Inc. (to A. N.), by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (to A. N. and Y. I.), and by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (to A. N., Y. I., and M. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AB048365 (Nbla0078 and human NEDL1), AB002320 (KIAA0322), and AB083710 (mouse Nedd1).

\*\* To whom correspondence should be addressed: Div. of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Inst., 666-2 Nitona, Chuoh-ku, Chiba 264-8717, Japan. Tel.: 81-43-264-5431; Fax: 81-43-265-4459; E-mail: akiranak@chiba-crci.chuo.chiba.jp.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; FALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; SOD1, superoxide dismutase-1; E3, ubiquitin-protein isopeptide ligase; NEDL1, NEDD4-like ubiquitin-protein ligase-1; TRAP- $\delta$ , translocon-associated protein- $\delta$ ; ER, endoplasmic reticulum; Dvl1, Dishevelled-1; RT, reverse transcription; LBHI, Lewy body-like hyaline inclusion; JNK, c-Jun N-terminal kinase.

similar clinical and pathological features. About 10% of ALS cases are familial, and mutation of superoxide dismutase-1 (SOD1) is found in 20% of familial ALS (FALS) patients (1, 2). Mice that express mutant SOD1 transgenes develop an age-dependent ALS phenotype independent of levels of dismutase activity, suggesting that FALS pathology is because of a toxic gain of function in SOD1 and that the abnormal protein structure of mutant SOD1 is critical in the pathogenesis of motor neuron death (3–6). Recently, proteasome expression and activity have been reported to decrease with age in the spinal cord (7, 8). Furthermore, mutant SOD1 turns over more rapidly than wild-type SOD1, and an inhibitor of proteasome action inhibits this turnover and thus selectively increases the steady-state level of mutant SOD1 (8). These results suggest the involvement of the ubiquitin-proteasome function in the cause of FALS. However, the biochemical nature of this gain-of-function mutation in SOD1 and the mechanism by which SOD1 mutations cause the degeneration of motor neurons have remained elusive.

We show here the identification of a novel HECT-type ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3), NEDL1, which is expressed in neuronal tissues, including the spinal cord, and selectively binds to and ubiquitinates mutant (but not wild-type) SOD1. NEDL1 is physically associated with translocon-associated protein- $\delta$  (TRAP- $\delta$ ), one of the endoplasmic reticulum (ER) translocon components that has previously been reported to bind mutant SOD1 (9, 10). Both NEDL1 and TRAP- $\delta$  form a complex with mutant SOD1, with the binding intensity among these proteins being roughly proportionate to the rapidity of progression of the associated FALS phenotype. Immunohistochemical study has shown that NEDL1 is positive in the Lewy body-like hyaline inclusions in the spinal cord motor neurons of both FALS patients and mutant SOD1 transgenic mice. We have also found that NEDL1 targets Dishevelled-1 (Dvl1) for ubiquitination-mediated degradation and that mutant (but not wild-type) SOD1 affects the function of Dvl1. Our observations suggest that NEDL1 is a quality control E3 that recognizes mutant SOD1 to form a tight complex with the physiological targets of NEDL1 in motor neurons of FALS patients.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Transfection**—Human neuroblastoma-derived cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. COS-7 and Neuro2a cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. All cells were maintained in a humidified 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub>.



All transfections were carried out with LipofectAMINE Plus transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. In some experiments, transfected cells were treated with MG-132 for 30 min at a final concentration of 40  $\mu$ M.

**RNA Analysis**—A human multiple tissue mRNA blot and a fetal human multiple mRNA blot (Invitrogen) were hybridized with a  $^{32}$ P-labeled ApaI-ScaI restriction fragment of *NEDL1* cDNA under standard conditions. For reverse transcription (RT)-PCR analysis, cDNA derived from adult human neural system (BioChain Institute, Hayward, CA) was subjected to PCR amplification using the following primers: *NEDL1*, 5'-CCGATTTGAGATCACTTCCCTCC-3' (sense) and 5'-CCGCTTCCATCAGGTTGTT-3' (antisense); and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' (sense) and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisense). The amplified products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide post-staining. Amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an internal control.

**In Vitro Ubiquitination Assays**—*In vitro* ubiquitination assays were performed as follows. Reaction mixtures containing 0.5  $\mu$ g of purified glutathione *S*-transferase fusion proteins, 0.25  $\mu$ g of yeast ubiquitin-activating enzyme (BostonBiochem, Cambridge, MA), 1  $\mu$ l of crude lysates from *Escherichia coli* expressing ubiquitin carrier proteins, and 10  $\mu$ g of bovine ubiquitin (Sigma) were incubated in 250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1.2 M NaCl, 50 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 30 mM dithiothreitol. Reactions were terminated after 2 h at 30 °C by the addition of SDS sample buffer. Samples were resolved by SDS-PAGE, transferred to membranes, and immunoblotted with anti-ubiquitin monoclonal antibody 1B3 (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan).

**Immunofluorescence Staining**—Cells grown on coverslips were processed for immunofluorescence. Briefly, cells were fixed in 3.7% formaldehyde, permeabilized in 0.2% Triton X-100, and finally incubated with anti-NEDL1 antibody (diluted 1:100). The primary antibody was detected with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (diluted 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Images were taken using an Olympus confocal microscopy system.

**Yeast Two-hybrid Screening**—Yeast two-hybrid screening was performed using the Gal4-based Matchmaker two-hybrid system with the cDNA library derived from fetal human brain (first screening) and adult human brain (second screening) (Clontech, Palo Alto, CA). *Saccharomyces cerevisiae* CG1945 cells were transformed with pAS2-1-NEDL1-1 (amino acids 757–1114; first screening) or pAS2-1-NEDL1-2 (amino acids 382–1448; second screening), which did not activate the transcription of *lacZ* alone. The transformants were subsequently transformed with the cDNA library, and the *lacZ*-positive colonies were selected. The plasmid DNAs were extracted from these positive colonies, and their nucleotide sequences were determined.

**Immunoprecipitation and Western Blot Analysis**—Anti-NEDL1 and anti-TRAP- $\delta$  polyclonal antibodies were raised in rabbits against an NEDL1 oligopeptide (amino acids 460–482) and a TRAP- $\delta$  oligopeptide (amino acids 93–126), respectively. For immunoprecipitation, COS-7 or Neuro2a cells were cotransfected with the expression plasmids in various combinations and lysed 48 h later in 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride supplemented with protease inhibitor mixture (Sigma). Whole cell lysates were immunoprecipitated with anti-NEDL1, anti-FLAG (M2; Sigma), or anti-Myc (9B11; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) antibody. Immune complexes were recovered on protein G-Sepharose beads, eluted by boiling in Laemmli sample buffer, electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon, Millipore Corp., Bedford, MA) by electroblotting. For ubiquitination experiments, cell lysis was performed in radioimmune precipitation assay buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 1 mM EDTA), followed by strong sonication and freeze-thaw. The membrane was probed with the indicated primary antibodies and then incubated with the appropriate secondary antibodies labeled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. and Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). Immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence technique (ECL, Amersham Biosciences). For the detection of c-Jun phosphorylation, we used anti-c-Jun (sc-45, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-phospho-Ser<sup>63</sup> c-Jun (Cell Signaling Technology) antibody.

**Cloning of Human NEDL1 cDNA**—A forward primer (5'-GGTTTT-TAGGCCTGGCCGCC-3') and a reverse primer (5'-CAATGAGGTA-CATGCCAATCC-3') were used to amplify the 5'-part of the *NEDL1* cDNA using cDNA libraries derived from human neuroblastoma and

fetal human brain (Stratagene, La Jolla, CA) as templates. The full-length human *NEDL1* cDNA was generated by fusion of the PCR-amplified fragment (nucleotides +1 to +68, where position +1 represents the translation initiation site) and the *KIAA0322* cDNA (a gift from T. Nagase, Kazusa DNA Institute). Gel electrophoresis and Western blot analysis were carried out as described above.

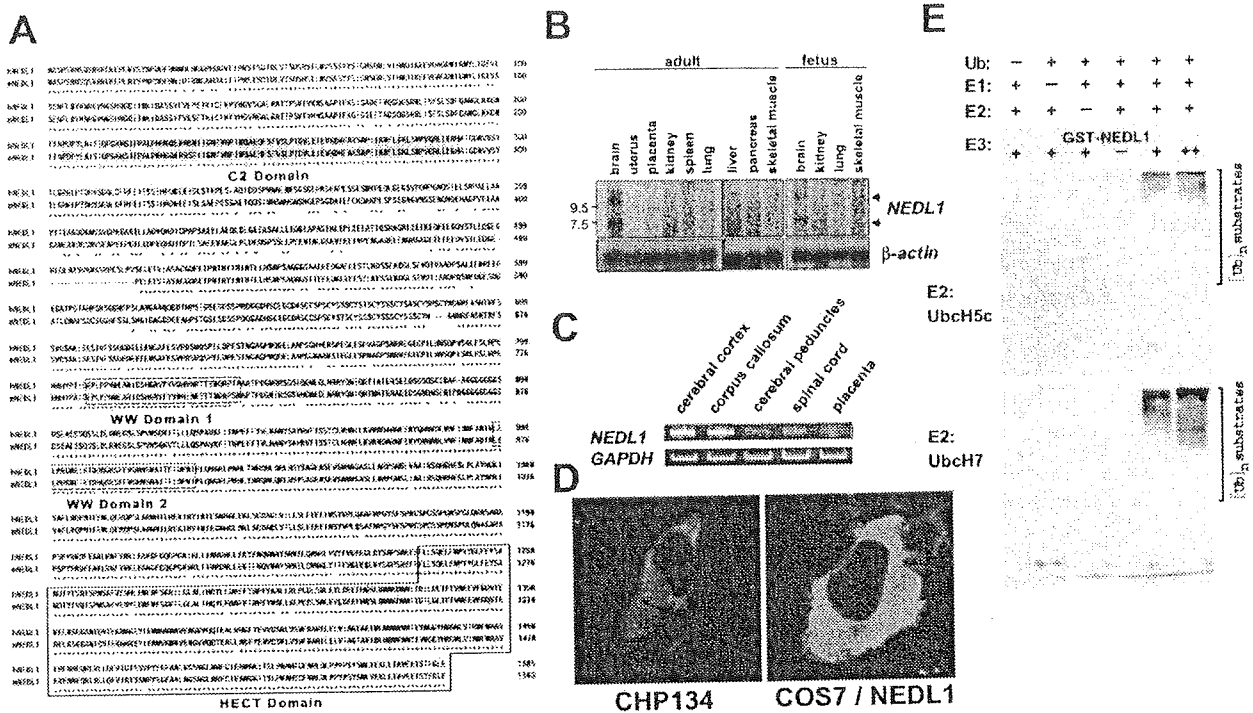
**Expression Constructs**—The mammalian expression plasmids for hemagglutinin-tagged and His<sub>6</sub>-tagged ubiquitin were kind gifts of D. Bohmann. The full-length *NEDL1* cDNA was inserted into the mammalian expression plasmid pEF1/His (Invitrogen) or pIRESpuro2 (Clontech). cDNAs encoding wild-type and mutant forms of SOD1 were fused to the FLAG or Myc epitope tag sequence at their C termini and subcloned into pIRESpuro2. Similarly, the FLAG or Myc epitope tag sequence was attached to the C terminus of TRAP- $\delta$ . Also similarly, the FLAG or Myc epitope tag sequence was attached to the N terminus of Dvl1. Coding sequences were verified by automated DNA sequencing.

**Protein Stability Experiments**—Neuro2a cells were transfected with the expression plasmid for the wild-type or mutant form of SOD1 with or without the NEDL1 expression plasmid. Twenty-four hours after transfection, cycloheximide (50  $\mu$ g/ml) was added to the culture medium, and the cells were harvested at the indicated time points by lysis in radioimmune precipitation assay buffer. The protein concentrations were determined using the Bradford protein assay system (Bio-Rad) according to the instructions of the manufacturer.

**Immunohistochemistry**—The immunohistochemical studies were performed as described previously using affinity-purified rabbit anti-NEDL1 antibody (11). Patient tissues were obtained at autopsy from two FALS siblings from a Japanese family. The clinical course of the sister, who died at age 46, was 18 months (case 1), and that of the brother, who died at age 65, was 11 years (case 2) (11). The *SOD1* gene was mutated with a 2-bp deletion at codon 126 (11, 12). Normal spinal cord tissues were obtained from three neurologically and neuropathologically normal individuals. The same study was performed on spinal cord tissues from three normal rats and a transgenic ALS rat carrying a mutant allele of the human *SOD1* gene (H46R) (13). These mice were killed at 180 days. As a negative control, some sections were incubated with anti-NEDL1 antibody that had been pre-absorbed with an excess of NEDL1 antigen. Bound antibodies were visualized by the avidin-biotin-immunoperoxidase complex method.

## RESULTS

**Cloning and Expression of the NEDL1 E3 Gene**—To detect novel molecules that are important in regulating neuronal programmed cell death, we constructed oligonucleotide-capping cDNA libraries from a mixture of three fresh human neuroblastoma tissues (stages 1 and 2) that were undergoing gradual spontaneous regression, probably by neuronal apoptosis (14). Screening of 1152 novel genes by RT-PCR revealed that 194 genes were expressed differentially in regressing neuroblastomas with favorable prognosis and in aggressive tumors with poor prognosis. Among these genes, we found a partial cDNA sequence with an HECT-like domain (*Nbla0078*) that partially matched the *KIAA0322* gene. Because *KIAA0322* lacks a 5'-coding region, we used a genome-based PCR procedure to clone the corresponding full-length cDNA. This is predicted to encode a protein product of 1585 amino acids with homology to NEDD4 E3 (15, 16), which includes a C2 domain at the N-terminal region supposed to mediate its membrane localization in a calcium-dependent manner, two WW motifs important for protein-protein interaction through binding to specific proline-rich clusters, and a conserved catalytic HECT domain at the C terminus (Fig. 1A). We named this novel ligase, which mapped to chromosome 7p13, NEDL1 (*NEDD4*-like ubiquitin-protein ligase-1). We also cloned the mouse counterpart of *NEDL1* cDNA, whose amino acid sequence is 78% identical to the human sequence. Tissue-specific expression of *NEDL1* mRNA of ~10 and 7 kb in size was observed, with predominant expression in adult and fetal brains as examined by Northern blot analysis (Fig. 1B). Its expression was also weakly detected in adult kidney, where the size of the expressed transcript appeared to be <7 kb. Expression of *NEDL1* in specific regions of the nervous system was further confirmed

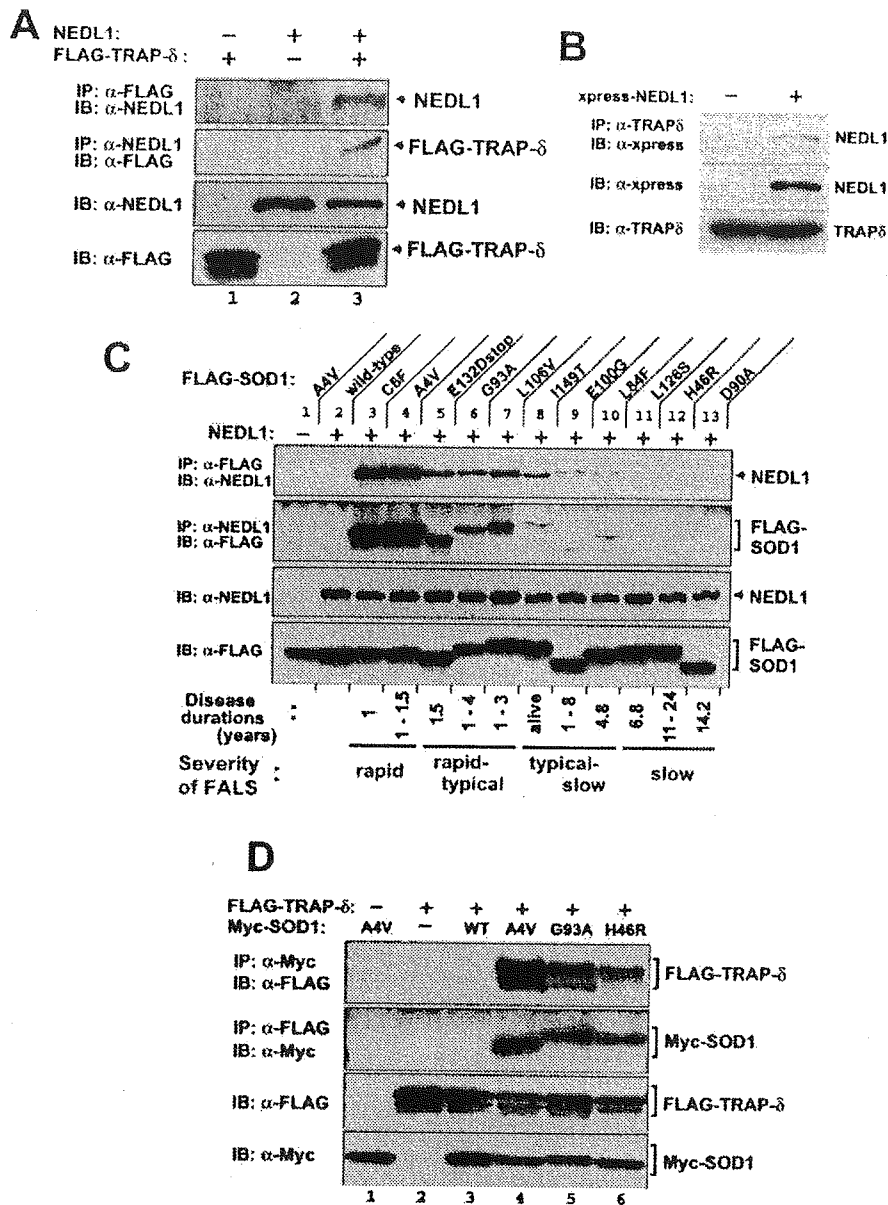


**FIG. 1. Amino acid sequence, brain-specific expression, and subcellular localization of NEDL1 E3.** A, alignment of conserved amino acid sequences of human NEDL1 (*hNEDL1*) and its mouse homolog (*mNEDL1*). Numbers on the right indicate the number of residues to the initiator methionine. The C2 domain (shaded), two WW domains (dashed boxes), and the HECT domain (solid box) are indicated. B, brain-specific expression of *NEDL1* mRNA. Total RNAs derived from the indicated adult (left panel) and fetal (right panel) human tissues were analyzed by Northern blotting using a <sup>32</sup>P-labeled human *NEDL1* cDNA restriction fragment as a probe. Control hybridization with a human  $\beta$ -actin cDNA probe verified the equal amount of RNA loaded. C, expression of *NEDL1* in human brain subsections. Total RNA from the cerebral cortex, corpus callosum, cerebral peduncles, spinal cord, or placenta was subjected to RT-PCR using specific primers for *NEDL1* or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). RT-PCR analysis for *NEDL1* in the placenta provided a negative control. Amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as an internal control. D, confocal microscopic images of human neuroblastoma CHP134 cells and COS-7 cells transfected with an expression plasmid for NEDL1 (right panel). Cells were subjected to immunofluorescence analysis using rabbit anti-NEDL1 polyclonal antibody, followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG. E, *in vitro* ubiquitination assays showing that NEDL1 has a ubiquitin-protein ligase activity. The degree of ubiquitination was increased in an NEDL1-dependent manner. In this assay, yeast ubiquitin-activating enzyme (E1), bacterially expressed ubiquitin carrier protein (E2; UbcH5c or UbcH7), and bacterial lysates were incubated in the presence or absence of increasing amounts of glutathione *S*-transferase (GST-NEDL1). Polyubiquitinated bacterial proteins appeared to migrate in a high molecular mass complex. Ub, ubiquitin.

in the cerebral cortex, corpus callosum, cerebral peduncles, and spinal cord by RT-PCR (Fig. 1C). Thus, NEDL1 is a novel HECT-type E3 preferentially expressed in neuronal tissues, including the spinal cord. Using a specific anti-NEDL1 polyclonal antibody that we generated, we localized NEDL1 primarily to the cytoplasm in both intact human neuroblastoma CHP134 cells and COS-7 cells transiently expressing NEDL1 (Fig. 1D). The *in vitro* system containing UbcH5c or UbcH7 demonstrated that NEDL1 has a ubiquitin-protein ligase activity (Fig. 1E).

**NEDL1 Physically Interacts with TRAP- $\delta$  and Mutant SOD1**—We then sought protein-binding partners of NEDL1 by yeast two-hybrid screening using the region including two WW protein interaction domains (amino acids 757–1114) as bait. Of 96 positive clones subjected to DNA sequencing, one was a full-length cDNA for TRAP- $\delta$ ; this was of considerable interest, as TRAP- $\delta$  was previously reported to bind mutant (G85R and G93A), but not wild-type, SOD1 (9). TRAP- $\delta$  is a protein component of the translocon in the ER membrane (10). We therefore examined the interaction among NEDL1, TRAP- $\delta$ , and SOD1 by an immunoprecipitation assay after cotransfecting the corresponding expression constructs into COS-7 cells. As shown in Fig. 2 (A and B), NEDL1 was physically associated with both exogenous and endogenous TRAP- $\delta$  probably through the region of two WW domains, as originally suggested by the

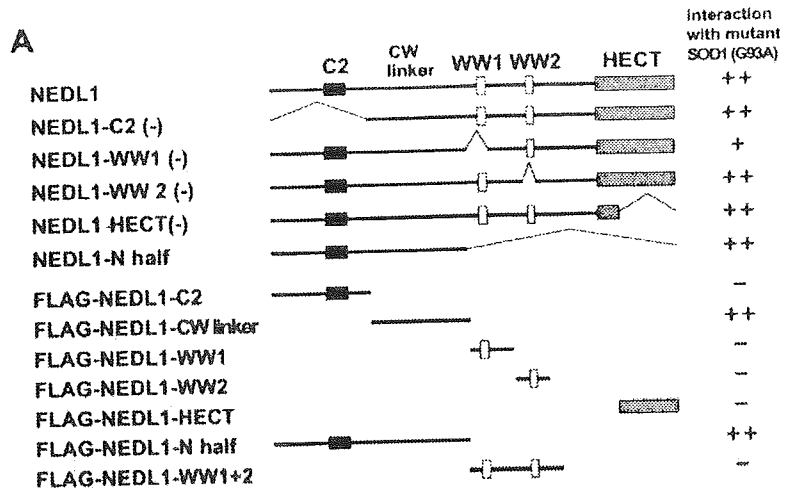
result of two-hybrid screening. Surprisingly, NEDL1 bound to mutant (but not wild-type) SOD1 (Fig. 2C). Furthermore, the degree of binding between NEDL1 and different mutant SOD1 proteins was roughly proportionate to the rapidity of progression (time from clinical onset to death) of the associated FALS phenotype (17–23). For example, two mutant SOD1 proteins associated with an extremely rapid clinical course (C6F and A4V) interacted very strongly with NEDL1. By contrast, the binding of NEDL1 to other mutants was less striking and decreased proportionately to the falloff of disease severity corresponding to those mutants. Of further interest, like the NEDL1-mutant SOD1 interaction, the binding intensity between TRAP- $\delta$  and mutant SOD1 was also dependent on the disease severity (Fig. 2D). These observations suggest that NEDL1 and TRAP- $\delta$  are normally associated with each other, but that misfolded mutant SOD1 makes a complex with them. Such a complex is not formed with wild-type SOD1. The experiments using the *in vitro* translated proteins suggested that association of mutant SOD1 and TRAP- $\delta$  was direct (data not shown). It therefore appears that mutant SOD1 forms tightly bound protein complexes with NEDL1 and TRAP- $\delta$  and that the tightness of binding in the complex is determined in part by properties of the mutant enzyme that also modulate disease severity of the resulting ALS phenotype. Such complexes do not form in cells with wild-type SOD1.



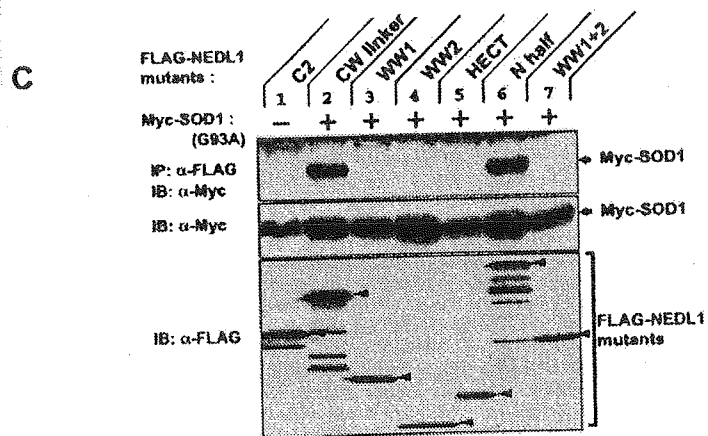
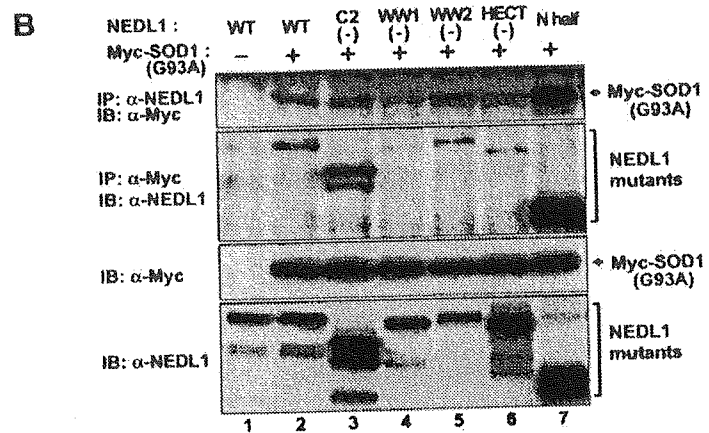
**FIG. 2. NEDL1 interacts with TRAP- $\delta$  and FALS-associated mutant forms of SOD1, but not with wild-type SOD1.** *A*, NEDL1 interacts with TRAP- $\delta$ . COS-7 cells were cotransfected with the indicated expression plasmids, and whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG (first panel) or anti-NEDL1 (second panel) antibody. Immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting (IB) using the indicated antibodies. Whole cell lysates were analyzed for expression levels of each protein by immunoblot analysis (third and fourth panels). Detection was performed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. *B*, NEDL1 also binds to endogenous TRAP- $\delta$ . *C*, interaction between NEDL1 and mutant SOD1. Whole cell lysates from COS-7 cells overexpressing NEDL1 and one of the FLAG-tagged SOD1 mutants or wild-type SOD1 were immunoprecipitated with anti-FLAG (first panel) or anti-NEDL1 (second panel) antibody and then immunoblotted with anti-NEDL1 or anti-FLAG antibody, respectively. The expression of NEDL1 or FLAG-tagged SOD1 mutants was analyzed by immunoblotting using anti-NEDL1 (third panel) or anti-FLAG (fourth panel) antibody, respectively. Patients carrying the SOD1(C6F) and SOD1(A4V) mutations have a rapid clinical course, whereas mutant SOD1(L126S), SOD1(H46R), or SOD1(D90A) is associated with a slow clinical course. *D*, interaction of TRAP- $\delta$  with mutant SOD1. COS-7 cells were transiently cotransfected with the expression plasmid for FLAG-tagged TRAP- $\delta$  and the expression plasmid encoding one of the Myc-tagged SOD1 mutants or wild-type (WT) SOD1. Whole cell lysates were immunoprecipitated with anti-Myc (first panel) or anti-FLAG (second panel) antibody, followed by immunoblotting with anti-FLAG or anti-Myc antibody, respectively. The levels of overexpression of FLAG-tagged TRAP- $\delta$  (third panel) and Myc-tagged SOD1 (fourth panel) were analyzed by immunoblotting using anti-FLAG and anti-Myc antibodies, respectively.

**Determination of the Interaction Domains**—We next examined the domains of NEDL1 required for formation of the SOD1-NEDL1-TRAP- $\delta$  complex. We generated various constructs of NEDL1 with deletions of each domain. Fig. 3 shows the results of immunoprecipitation assay for the association between deletion mutants of NEDL1 and mutant SOD1(G93A).

Mutant SOD1 bound weakly to NEDL1 lacking WW domain-1 (Fig. 3A), suggesting that WW domain-1 and its surrounding portion are the region involved in their interaction. Immunoprecipitation analysis using the specific regions of NEDL1 clearly showed that the region between the C2 domain and WW domain-1 (CW linker region) is necessary for binding to mutant



**FIG. 3. The region of NEDL1 between the C2 domain and WW domain-1 is required for interaction with mutant SOD1.** A, schematic illustration of wild-type NEDL1 and a series of deletion mutants of NEDL1. CW linker indicates the region between the C2 domain and WW domain-1 (WW1). B and C, immunoprecipitation and immunoblot analyses. In B, Myc-tagged mutant SOD1(G93A) was overexpressed together with wild-type (WT) NEDL1 or the indicated deletion mutants of NEDL1 in COS-7 cells. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-NEDL1 (first panel) or anti-Myc (second panel) antibody, followed by immunoblotting (IB) with anti-Myc or anti-NEDL1 antibody, respectively. The expression levels of each protein were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies (third and fourth panels). In C, whole cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and then immunoblotted with anti-Myc antibody (upper panel). Whole lysates were also analyzed by Western blotting for each protein (middle and lower panels).



SOD1(G93A). Mutant SOD1(A4V) was also associated with NEDL1 through the same region, and TRAP-δ bound to the two WW domains of NEDL1 (data not shown).

**NEDL1 Ubiquitinates Mutant SOD1 for Degradation Depending on the Disease Severity of FALS**—Because NEDL1 is an E3, we next tested whether it ubiquitinates TRAP-δ and mutant SOD1 for degradation. As shown in Fig. 4A, NEDL1 clearly ubiquitinated mutant SOD1(A4V), but not TRAP-δ (data not shown). Furthermore, the degree of ubiquitination of mutant SOD1 by NEDL1 was dependent on the disease severity of FALS (A4V > G93A > H46R) (Fig. 4A). Fig. 4B shows the

time course of degradation of wild-type and mutant SOD1 in the presence or absence of NEDL1. As reported previously, mutant SOD1 was degraded more rapidly than wild-type SOD1. NEDL1 did not affect wild-type SOD1 degradation. As expected from the co-immunoprecipitation and ubiquitination analyses, degradation of mutant SOD1 was stimulated by NEDL1 proportionately to the disease severity of FALS caused by the particular SOD1 mutant (A4V > G93A > H46R ≥ wild-type). Thus, NEDL1 targeted mutant SOD1 for ubiquitin-mediated degradation in the cell in parallel with the binding intensity.