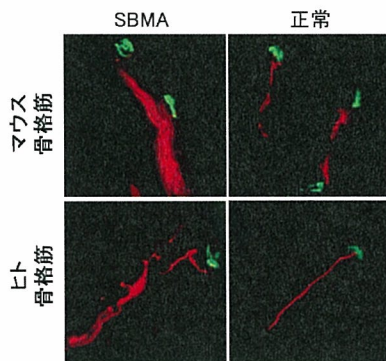
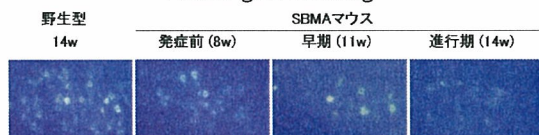


ころ、症状は可逆的に改善した。また、発症前の SBMA マウスでは逆行性に輸送されたフルオロゴールドによりラベルされるニューロンの数は野生型マウスより減少していたが、去勢後のマウスではその数の増加が認められた。併せて、去勢の前後で dynactin 1 の発現を解析したところ、神経症状発症後早期の SBMA マウスでは dynactin 1 の発現量が減少していたが、去勢後には野生型マウスのレベルに近いところまで増加した。また、SBMA の培養細胞モデルでも dynactin 1 の発現レベルが低下していたが、dynactin 1 を強制発現したところ、細胞死は有意に抑制された。以上から、dynactin 1 の発現量低下が SBMA の神経変性過程に深く関与していることが明らかとなった。

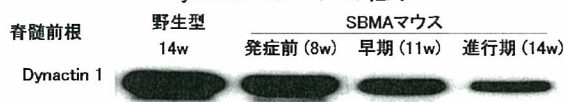
運動神経軸索終末へのニューロフィラメントの蓄積



運動ニューロンの逆行性標識 Fluoro-gold Labeling



Dynactin 1 レベルの低下



D. 考察

今回の検討により、SBMA の病変部位では初期から dynactin 1 の転写障害がみられ、このため逆行性軸索輸送障害がもたらされ、軸索内を輸送される細胞骨格やシナプス小胞関連端蛋白質などが軸索遠位に異常蓄積することが明らかとなった。Dynactin 1 の

遺伝子変異が家族性運動ニューロン疾患の原因であることが知られており、また dynactin 1 と複合体を形成する dynein の遺伝子変異によって運動ニューロン変性が生じることがマウスにおいて明らかにされている。また、軸索輸送障害や軸索蛋白質の異常蓄積は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や脊髄性筋萎縮症 (SMA) においてもみられることが多数報告されていることから、軸索輸送障害は運動ニューロン疾患の治療の標的として極めて重要であると考えられる。今後は軸索輸送を改善する薬剤の探索が重要であると考えられる。

E. 結論

SBMA マウスモデルおよび培養細胞モデルの解析により、本疾患における神経細胞機能障害は発症後早期であれば適切な治療により可逆的に改善すること、およびその分子機構として逆行性軸索輸送障害が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。軸索輸送障害は運動ニューロン疾患の治療法開発を考える上で、治療のターゲットとして極めて重要であると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. (2006) Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1086:1-10.

2. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. (2006) Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J Neurosci.* 26:12106-17.

3. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. (2006) Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG). *Ann N Y Acad Sci.* 1086:21-34.

4. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G. (2006) Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* 129: 1446-1455.

なし

5. Sugiura M, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. (2006) Clinicopathologic features of nonsystemic vasculitic neuropathy and microscopic polyangiitis-associated neuropathy: a comparative study. *J Neurol Sci* 241: 31-37.

2. 学会発表

1. Tanaka F, Jiang YM, Yamamoto M, Huang Z, Katsuno M, Adachi H, Niwa JI, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.

2. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Modulation of Hsp90 function: A molecular targeted therapy for neurodegenerative disorders. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.

3. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Jiang YM, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Reversible disruption of retrograde axonal transport in spinal and bulbar muscular atrophy. 17th International Symposium on ALS/MND. Yokohama, Japan, Nov-Dec 2006.

4. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tokui K, Sone J, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Alleviating polyglutamine-induced motor neuron degeneration by an Hsp90 inhibitor. 5th International Conference on Unstable Microsatellites & Human Disease. Granada, Spain, November 11-16, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・所長代行

研究要旨

運動ニューロンの恒常性監視機構を蛋白質代謝の動態に着目して研究すると共に、その破綻の結果として発症する神経変性疾病の原因を解明し、その治療法の開発を目指す。本研究では、とくにニューロン死に密接に関係することが示唆されている蛋白質の品質管理について二種のユビキチンリガーゼ(E3)、SCF^{Fbs1} (N-結合型糖蛋白質の糖鎖を識別してユビキチン化するユニークなE3)とCHIP(分子シャペロン依存的E3)を中心に解析を進めた。SCF^{Fbs1}は小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)に関与するE3として発見したが、その基質識別サブユニットFbs1はニューロンに特異的に発現している。本年は、このFbs1が小胞体(ER)膜に会合してSCF^{Fbs1}複合体を形成してERADに関与する他、サイトゾルではFbs1単独(実際にはSkp1との二量体)で、糖蛋白質の変性を防ぐ新規な分子シャペロンとして作用することを見出した。またCHIP研究においては、そのKOマウスが神経変性疾患様の症状を示した。さらにこれまでCHIPのパートナーシャペロンとしては、Hsp90とHsp70が知られているが、そのHsp70に対するCoシャペロンとしてニューロンに特異的に発現しているHsj-1を発見し、そのKOマウスも作出した。実際CHIPはHsp70・Hsj-1と協調してモデル蛋白質(熱変性ルシフェラーゼ)を効果的にユビキチン化した。これらの研究成果は、運動ニューロン疾患を初めとする様々な神経変性疾患の発症における蛋白質の品質管理装置の役割を理解する上で重要な知見と考えられる。

A. 研究目的

生物は遺伝子変異や環境汚染などによりしばしば蛋白質レベルでストレスを感じ恒常性の破綻をきたす。とくに運動ニューロンのような非分裂細胞がストレスを過剰に感受すると、ニューロンは死滅し、この状態が長く持続すると、ほとんどのニューロンが脱落し神経変性に陥る。

近年、運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、神経細胞内の蛋白質の品質管理機構(分子論的に言うと蛋白質の立体構造が正常であるか、異常であるかを識別して、損傷蛋白質を選択的に分解して除去する機構)の破綻が有力な説として登場し、国内外で注目されている。ニューロンが細胞内のストレスを感知するときのセンサーとして作用する機構は、多面的である。その代表例として昨今注目を浴びているオルガネラが、小胞体(ER: endoplasmic reticulum)である。

最近ER内で発生した異常蛋白質を処理する機構として小胞体関連分解(ERAD: ER

associated degradation)の研究が飛躍的に進展している。1992年、我々は、ERADに関与するN型糖蛋白質を標的とするユビキチンリガーゼSCF^{Fbs1}を発見した(1)。その後SCF^{Fbs1}について構造、機能、病態に関する多面的な研究を展開してきた。即ちFbs分子は少なくとも5個の分子種からなるファミリーを構成しているが、Fbs1のみがニューロン特異的に発現していること(2)を見出すと共にSCF^{Fbs1}の作用機構についてはFbs1とキトビオース(GlcNAc-GlcNAc)複合体のX線結晶構造解析による立体構造解析(3)とSCF^{Fbs1}の4次構造の解析(水島ら、投稿中)及び標的分子の変性度による識別機構の生化学的解明(4)で明確になった。その結果、Fbs1は全く新しいレクチン(糖鎖を認識して特異的に結合する分子群の総称)であることが判明した。

さてFbs1研究の大きな課題は、この分子がなぜニューロン特異的に分布しているかと言う課題である。これは、ニューロンの生存戦略に密接に関係する可能性を秘めて

おり、本年は、このポイントに焦点を絞って解析した。

他方、サイトゾル（細胞質）においても蛋白質の品質管理は極めて重要であり、我々はこれまでこのプロセスにおいて重要な働きを担っていると推定される Parkin（常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群 AR-JP の責任遺伝子産物で機能的にはユビキチンリガーゼである）について精力的に研究してきた。例えば、Parkin が RING-finger 型の E3 であること（6）、プロテアソームと相互作用すること（7）、正負の活性制御機構が存在すること（8）、インビトロでは、モノユビキチン化反応を触媒すること（9）、その KO マウスがドーパミン代謝に異常を引き起こすこと（10）などである。さらに本年度は CHIP ユビキチンリガーゼについてもこれまでの研究（11-13）をさらに発展させた。特にその新規パートナー分子として Hsj-1 を同定すると共にその詳しい解析を行った。

B. 研究方法

「プロジェクト I : SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明」

1) 構造生物学的な方法：目的蛋白質を大腸菌で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製蛋白質を結晶化してその立体（高次）構造を X 線結晶構造解析によって原子レベルで解析した。また必要に応じて NMR（核磁気共鳴装置）を使用して相互作用するアミノ酸残基を同定した。

2) 生化学的方法：リコンビナント蛋白質は、大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製した。これらを用いてインビトロのユビキチン化アッセイ系を構築し、ユビキチンリガーゼ活性を測定した。その他、電気泳動（SDS-PAGE）・Western blot 分析などについては、定法に従って行った。

「プロジェクト II : CHIP 及び Hsj-1 の機能解析研究」

1) CHIP と Hsj-1 のリコンビナント蛋白質は、大腸菌で合成し、精製した。ユビキチン化反応は、以前の方法（11）に従って調整した。基質は熱マイルド変性したルシフェラーゼを用いた。ユビキチン化蛋白質の同定は、SCF^{Fbs1} リガーゼのアッセイ方法に準じて行

った。

2) 遺伝子欠損（KO）マウスの作製

CHIP 遺伝子と Hsj-1 遺伝子について、定法に従ってターゲティングベクターを作製した後、SalI により線状化し、TT2 ES 細胞に GENE PULSERII を用いて 210V, 950uF にてエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行った。ES 細胞はエレクトロポレーション 48 時間後から 200ug/ml G418 により、6-8 日間選別した。ネオマイシン耐性クローンは PCR 法により遺伝子型同定を行った。この PCR 法により（及び最終的にサザン法によって確認し）、野生型アリル・変異型アリル・両方の遺伝子断片の増幅が見られるものをノックインアリルとして相同組み替え ES 細胞を同定した。PCR は LA-Taq を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウスを用いた基礎的研究およびリコンビナント蛋白質を用いた生化学的研究である。従って、これらの実験の実施には、倫理面への配慮は不要であった。

C. D. 研究結果と考察

「プロジェクト I : SCF^{Fbs1} リガーゼの分子構造と作用機構の解明」

分泌蛋白質や膜蛋白質などの分泌系蛋白質は粗面小胞体上のリボソームで合成される。これらは翻訳と共役して小胞体膜上の膜透過装置のチャネルを通して内腔側へ送り込まれる。小胞体内腔もしくは小胞体膜に組み込まれた新生蛋白質は、ほとんどが N 型糖鎖修飾を受ける。この糖蛋白質は、小胞体内の様々な分子シャペロンの助けを借りて、フォールディングやアセンブリーなどの高次構造形成（S-S 結合の形成を含む）が行われる。そこで正しい高次構造を形成した蛋白質だけが、輸送小胞によりゴルジ体以降のコンパートメントに輸送される。

細胞外に異常蛋白質が蓄積したり分泌されたりすると生体にとって有害になるので、分泌経路の入り口である小胞体には、高次構造形成に失敗した蛋白質を選別し、再生・破壊するための様々な機構が兼ね備えられている。このような異常蛋白質を送り出さない仕組みは「小胞体の品質管理」と呼ばれ

ている。前述したように小胞体には沢山の分子シャペロンが存在し高次構造形成（あるいは繰り返す反応による再生）に最適な条件を作り出しているにも関わらず、新生蛋白質の約30%以上は高次構造形成に失敗し、細胞内で分解を受けており、この分解機構は ERAD（小胞体関連蛋白質分解）と呼ばれている。

ERAD の基本経路は、小胞体内で ERAD の基質となる蛋白質の識別、小胞体から細胞質への逆行輸送、細胞質におけるユビキチン化とプロテアソームによる分解の3つのステップよりなる。その中で、分泌系蛋白質の多くは N-結合型糖鎖修飾を受けた糖蛋白質であるが、糖鎖が異常蛋白質の識別・ERAD へのターゲティング・分解の一連のタグとして機能していることが明確となってきている。近年我々は、糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして“SCF^{Fbs1}”を発見し、この酵素が ERAD に関与していることを突き止めた(1)。

即ち、我々は N 結合型糖蛋白質が結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbs1（別称 Fbx2/Fbg1）の分離に成功した。Fbs1 は F-box ファミリー蛋白質の一つであり、SCF 複合体 Skp1-Cullin1-F-box 蛋白質（略記：F-box）-Roc1 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。SCF 型ユビキチンリガーゼは Skp1-Cullin1-F-box-Rbx1/Roc1 から構成された4分子複合体であり、標的識別サブユニットである F-box を変換することによって多様性を確保したユニークな蛋白質識別機構を持ったユビキチンリガーゼである。

試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることを解明した(1)。更に我々は、Fbs1 単独分子及び Fbs1 とキトビオースとの複合体の X 線結晶構造解析による立体構造解析に成功し、Fbs1 による糖鎖識別機構を原子レベルで解明した(3 及び投稿中)。Fbs1 の糖鎖結合ドメイン(SBD)の立体構造は 10本の逆平行β構造が二層に重なったβサンドイッチ構造をしており、その一端に位置するループ領域により糖蛋白質では糖鎖の還元

末端に位置するキトビオース(GlcNAcβ1-4GlcNAc)を認識し結合している。レクチンの立体構造としてβサンドイッチ構造は一般的な構造であるが、これまでに立体構造の報告されたレクチンの糖鎖認識部位はβシート領域であったのに対し SBD ではループ領域で糖鎖と結合する新しい様式をとっていた。

標的となる糖蛋白質において修飾された糖鎖の根元部分は、通常自身のペプチド部分と相互作用しているため Fbs1 との結合は困難であると考えられる。しかし Fbs1 の標的となる糖蛋白質は ERAD において細胞質に輸送された高次構造の崩れた蛋白質であることから、根本のキトビオース部分も溶媒に露出していると考えられるために Fbs1 と相互作用が可能となると推定された。このことは同じ N 結合型糖蛋白質でも変性させた方が、Fbs1 と高い親和性を示すという実験事実とも一致しており(4)、これらのことから Fbs1 が分子の先端で糖鎖と特異的に結合することは、アンフォールド状態にある糖蛋白質と不必要な相互作用することなく、ユビキチンを付加するために合理化された機構であると考えられる。

また本年、Fbs1-Skp1 の二量体の X 線結晶構造解析に成功、SCF^{Fbs1} 全体の立体構造のモデル化も行った（論文投稿中）。さらに基質である RNase と結合した SCF^{Fbs1} 全体の立体構造解析にも成功した（論文投稿中）。この結果、SCF^{Fbs1} のユビキチンリガーゼとしての作用機構が分子レベルで判明した。

一方、ERAD はすべての細胞・臓器で普遍的に見られる現象であることから、Fbs1 がニューロンに特異的に発現していることの原因は、これまで推測の域を出ず大きな謎であった。当初我々はニューロンのような非分裂細胞では、蛋白質の品質管理機構を厳格に維持することが細胞の生存戦略として極めて重要であり、これらの細胞では、共通の Fbs2 に加えて Fbs1 を特異的に発現させ、神経細胞における品質管理を強化するための進化的に獲得したと考えていた。この仮説を検証するために、Fbs1 や Fbs2 を含むその他のファミリー分子群が正確に SCF 複合体を形成しているか否かを検証した。その結果、Fbs2 を含む他のユビキチン分子群はほとんど全てが、Cullin1 と結合して SCF^{Fbs2} などの 4 分子複合

体を形成していたが、Fbs1の大部分はCullin1と結合していなかった。しかし、小胞体膜結合型のFbs1はCullin1と結合しSCF^{Fbs1}の複合体として存在し、ERADに関与していることが示唆された。そこで、サイトゾルに存在する遊離のFbs1の役割を解析した結果、変性・凝集したClient N型糖蛋白質をフォールディングして正常な立体構造を持った分子に再生させる分子シャペロン作用をもつことが判明した(5)。この結果、Fbs1はニューロンでは、Cullin1と結合しSCF^{Fbs1}の複合体を形成してERADに関与するのが主目的でなく、寧ろその大部分は、糖蛋白質に特異的な分子シャペロンとして細胞質で働いていることが判明した。小胞体内腔においてはカルネキシンなど糖蛋白質に対するシャペロン分子は存在するが、細胞質では、Fbs1が初めてである。なぜニューロンにおいてこのような特殊なシャペロン分子を造成したかは、大きな謎であるが、その解明は、運動ニューロン疾患を含む神経変性疾患の発症機構解明に大きなヒントを与えると思われる。

「プロジェクト II : シャペロン依存性品質管理リガーゼ CHIP」

我々は CHIP が TPR (tetra-tricopeptide repeat) ドメインと U-box (RING-finger 都類似の構造) を併せ持つユニークな分子であり、前者で Hsp70 や Hsp90 の分子シャペロンと結合し、後者でユビキチンリガーゼ活性を発揮することにより、変性タンパク質を選択的にユビキチン化する E3 であることを見いだした(11)。このように CHIP は、分子シャペロンと提携して再生できなくなった変性蛋白質を迅速に分解するという典型的な品質管理リガーゼと考えられる。CHIP の生体内での機能を明らかにするため、CHIP 欠損マウスを作製し解析を行った。現在までのところ、CHIP 欠損マウスは、短寿命、白内障、失調歩行を呈しており、現在詳細にこの原因を探索中である(投稿準備中)。

一方 Hsp70 や Hsp90 の分子シャペロンには、これらの作用支援する Co シャペロンと呼ばれる多数の分子群が存在する。典型的には、Hsp70 に対する Hsp40 である(CHIP も当初はユキチンリガーゼとしてではなく Co シャペロンとして発見された分子である)。ゲ

ノム情報(データベース)を丹念に調べると、哺乳類には Hsp40 の Hsp70 と相互作用するドメイン (DnaJ) を持つファミリー分子が多数存在することが分かる。その中でも我々はニューロン特異的に存在する Hsj-1 に注目した。その理由は、Hsj-1 の C 末端側には、二つの UIM (ubiquitin-interacting motif) モチーフを有するドメインが存在したからである。即ち、Hsj-1 は、DnaJ ドメイン(Hsp70 と相互作用する配列)と UIM ドメイン(ユビキチンと相互作用する配列)を併せ持つユニークな分子であった。そして我々は、Hsj-1 が CHIP、Hsp70 とともに三者複合体を形成し、CHIP によるユビキチン化(熱変性したルシフェラーゼを基質として使用)を促進することを明らかにした(投稿準備中)。そして Hsj-1 の UIM モチーフを欠損させると、ユビキチン化活性は大幅に低下したことから、CHIP が触媒するユビキチン化反応には、Hsj-1 がポリユビキチン鎖と相互作用することが必須であることが判明した。さらに Hsj-1 のインビゴにおける機能を解析するために、Hsj-1 欠損させたマウスを作製した。Hsj-1 ノックアウトマウスは見かけ上正常に誕生し、生後1年を過ぎても、表現型として顕著な異常は観察されなかった(継続観察中)。

E. 結論

「プロジェクト I」

ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとして発見したニューロン特異的な SCF^{Fbs1} の機能解析を分子レベルで行った。そして Fbs1 とキトビオース(蛋白質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖)の結合(3)や RNase が結合した SCF^{Fbs1} の X線結晶解析による立体構造解析に成功(論文投稿中)し、原子レベルで標的(糖蛋白質)の識別機構を解明した。さらにニューロン特異的な Fbs1 が SCF^{Fbs1} リガーゼとしての役割以外に糖蛋白質のための分子シャペロンとしてサイトゾルで機能していることを初めて見出した(5)。この成果は、運動ニューロンの変性機構を解明するための有益な情報を得ることが出来ると期待できる。

「プロジェクト II」

CHIP の新規パートナーとして Hsj-1 を見出

し、生化学的及び遺伝学的解析を行った。また Hsj-1 は CHIP と同様に、神経組織に特異的に発現しており、CHIP とともに神経細胞におけるタンパク質品質管理に重要な役割を果たしていることが予想された。現在、CHIP 欠損マウスと Hsj-1 欠損マウスを交配して、二重ノックアウトマウスを作製中である。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, T., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin-ligase that recognizes sugar chains. **Nature** 418, 438-442.
- (2) Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. **J. Biol. Chem.** 2003; 278: 43877-43884
- (3) Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. **Nature Struct. Mol. Biol.** 11, 365-170.
- (4) Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. **EMBO Rep.** 6. 239-244.
- (5) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K., (2007) A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. **J Biol Chem.** in press.
- (6) Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, S. (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genet.** 25, 302-305.
- (7) Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K. (2003) Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain. **EMBO Rep.** 4, 301-306.
- (8) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) 14-3-3 \square is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. **EMBO J.** 25, 211-221.
- (9) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. **J. Biol. Chem.** 281, 3204-3209.
- (10) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. **J. Neurosci, Res.** 84,1350-1357.
- (11) Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. **EMBO Rep.** 2, 1133-1138.
- (12) Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. **J Biol Chem.** 280, 11635-11640.
- (13) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima , A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. **J. Neurochem.** 94, 1254-1263

2. 学会発表

Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] . January 12-13, 2006, Osaka, Japan.

Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder Society's (MDS) 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (November 1, 2006), Kyoto.

Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata : Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium "Biology of Protein Conjugation: Structure and Function". Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006), Okazaki.

Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami: Selective autophagy suppresses the formation of ubiquitin-positive aggregates, 4th International Symposium of Autophagy, October 1-4, 2006 Shizuoka, Japan.

Noriyuki Matsuda, Toshiaki Kitami, Toshiaki Suzuki, Yoshikuni Mizuno, Nobutaka Hattori and Keiji Tanaka : Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. World Parkinson

Congress February 22-26, 2006 Washington DC
(Convention center), USA.

Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil,
Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji
Tanaka ; Molecular assembly of mammalian 20S
proteasomes ; 20th IUBMB ; June 23 2006
Kyoto.

Yuko Hirano, Klavs B Hendil, Keiji Tanaka, Shigeo
Murata : Molecular Mechanism of assembly of
mammalian 20S proteasomes. American Society
for Cell Biology 46th Annual Meeting, December
9-13, 2006, San Diego, USA.

Yasushi Saeki, Akio Toh-e, Keiji Tanaka : The 26S
proteasome can recognize and degrade lysine
63-linked polyubiquitinated Sic1PY. FASEB
Summer Research Conference on Ubiquitin and
Cellular Regulation- July 22-27, 2006 Vermont,
USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧

祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

道勇 学 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G:	Dorfin-chip chimeric proteins potentially ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and Reduce their cellular toxicity.	Neurobiology of Disease,	25:331-341	2007
Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G.	Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis.	Ann. N. Y. Acad Sci.	1086:1-10.	2006
Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G.	Alleviating neurodegeneration by an anticancer agent: an Hsp90 inhibitor (17-AAG).	Ann. N. Y. Acad. Sci.	1086:21-34.	2006
Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G:	Reversible disruption of dynactin 1 - mediated retrograde axonal transport in polyglutamine ? induced motor neuron degeneration.	J Neurosci	26: 12106-12117,	2006
Huang Y, Niwa J, Sobue G, Breitwieser GE:	Calcium-sensing receptor ubiquitination and degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase dorfin.	J Biol Chem	281: 11610-11617,	2006

Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S:	Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA.	Neurosci Res,	54: 11-14,	2006
Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G:	Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: a pathogenic marker.	Ann Neurol	59: 520-526,	2006
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G:	Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients.	Brain	129: 1446-1455,	2006
Katsuno M, Adachi H, Waza M, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G:	Pathogenesis, animal models and therapeutics in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).	Exp Neurol	200: 8-18,	2006
Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G:	Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein.	J Mol Med	84: 635-646,	2006

Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G:	Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells.	J Biol Chem	281: 23842- 23851,	2006
---	---	-------------	-----------------------	------

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K.	14-3-3h is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase	EMBO J	25	211-221	2006
Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K.	Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro	J. Biol. Chem.	281	3204-3209	2006
Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.	Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration	Nature	441	880-884	2006
Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N.	Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography	J. Neurosci, Res.	84	1350-1357	2006
Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S.	A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes	EMBO J.	25	4524-4536	2006
Hirano, Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S.	Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes	Mol Cell	24	977-984	2006
Komatsu, M., Kominami, E., and Tanaka K.	Autophagy and neurodegeneration	Autophagy	2	315-317	2006
Sakata, E., Yamaguchi, Y., Miyauchi, Y., Iwai, K., Chiba, T., Saeki, Y., Matsuda, N., Tanaka, K., and Kato, K.	Direct interactions between Nedd8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes contribute to up-regulation of cullin-based E3 ligase activity	Nature Struct. Mol. Biol.	14	167-168	2007
Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K.	A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation	J Biol Chem.		in press	2007
Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K.	Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons	Cell Death and Differentiation		in press	2007

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tanaka, K., Yashiroda, H., and Murata, S.	Ubiquity and diversity of the proteasome system.	(Eds. By Mayer, R. J., Ciechanover, A., and Rechsteiner, M.)	Protein Degradation	Wiley-VC H Verlag GmbH,	Weinheim, Germany	2006	129-156

IV.研究成果の刊行物

Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity

Shinsuke Ishigaki,^{a,b} Jun-ichi Niwa,^a Shin-ichi Yamada,^a Miho Takahashi,^a Takashi Ito,^a Jun Sone,^a Manabu Doyu,^a Fumihiko Urano,^{b,c} and Gen Sobue^{a,*}

^aDepartment of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8500, Japan

^bProgram in Gene Function and Expression, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

^cProgram in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

Received 19 May 2006; revised 8 September 2006; accepted 22 September 2006

Available online 6 December 2006

The ubiquitin–proteasome system (UPS) is involved in the pathogenic mechanisms of neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Dorfin is a ubiquitin ligase (E3) that degrades mutant SOD1 proteins, which are responsible for familial ALS. Although Dorfin has potential as an anti-ALS molecule, its life in cells is short. To improve its stability and enhance its E3 activity, we developed chimeric proteins containing the substrate-binding hydrophobic portion of Dorfin and the U-box domain of the carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP), which has strong E3 activity through the U-box domain. All the Dorfin-CHIP chimeric proteins were more stable in cells than was wild-type Dorfin (Dorfin^{WT}). One of the Dorfin-CHIP chimeric proteins, Dorfin-CHIP^L, ubiquitylated mutant SOD1 more effectively than did Dorfin^{WT} and CHIP *in vivo*, and degraded mutant SOD1 protein more rapidly than Dorfin^{WT} does. Furthermore, Dorfin-CHIP^L rescued neuronal cells from mutant SOD1-associated toxicity and reduced the aggresome formation induced by mutant SOD1 more effectively than did Dorfin^{WT}.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Dorfin; ALS; SOD1; CHIP; Neurodegeneration; Ubiquitin–proteasome system

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CHIP, carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E3, ubiquitin ligase; FCS, fetal calf serum; IP, immunoprecipitation; LB, Lewy body; PD, Parkinson's disease; RING-IBR, in-between-ring-finger; SCF, Skp1-Cullin-F box complex; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SOD1, Cu/Zn super oxide dismutase; UPS, ubiquitin–proteasome system.

* Corresponding author. Fax: +81 52 744 2384.

E-mail address: sobueg@med.nagoya-u.ac.jp (G. Sobue).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

0969-9961/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nbd.2006.09.017

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), one of the most common neurodegenerative disorders, is characterized by selective motor neuron degeneration in the spinal cord, brainstem, and cortex. About 10% of ALS cases are familial; of these, 10%–20% are caused by Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene mutations (Rosen et al., 1993; Cudkowicz et al., 1997). However, the precise mechanism that causes motor neuron death in ALS is still unknown, although many have been proposed: oxidative toxicity, glutamate receptor abnormality, ubiquitin proteasome dysfunction, inflammatory and cytokine activation, neurotrophic factor deficiency, mitochondrial damage, cytoskeletal abnormalities, and activation of the apoptosis pathway (Julien, 2001; Rowland and Shneider, 2001).

Misfolded protein accumulation, one probable cause of neurodegenerative disorders, including ALS, can cause the deterioration of various cellular functions, leading to neuronal cell death (Julien, 2001; Ciechanover and Brundin, 2003). Recent findings indicate that the ubiquitin–proteasome system (UPS), a cellular function that recognizes and catalyzes misfolded or impaired cellular proteins (Jungmann et al., 1993; Lee et al., 1996; Bercovich et al., 1997), is involved in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases, among them ALS, Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease, polyglutamine disease, and prion disease (Alves-Rodrigues et al., 1998; Sherman and Goldberg, 2001; Ciechanover and Brundin, 2003). The ubiquitin ligase (E3), a key molecule for the UPS, can specifically recognize misfolded substrates and convey them to proteasomal degradation (Scheffner et al., 1995; Glickman and Ciechanover, 2002; Tanaka et al., 2004).

Dorfin, an E3 protein, contains an in-between-ring-finger (RING-IBR) domain at its N-terminus. The C-terminus of Dorfin can recognize mutant SOD1 proteins, which cause familial ALS (Niwa et al., 2001; Ishigaki et al., 2002b; Niwa et al., 2002). In cultured cells, Dorfin colocalized with aggresomes and ubiquitin-positive inclusions, which are pathological hallmarks of neurodegenerative diseases (Hishikawa et al., 2003; Ito et al., 2003). Dorfin also interacted with VCP/p97 in ubiquitin-positive inclusions in

ALS and PD (Ishigaki et al., 2004). Moreover, formation of this complex was found to be necessary for the E3 activity of Dorfin against mutant SOD1. These findings suggest that Dorfin is involved in the quality-control system for the abnormal proteins that accumulate in the affected neurons in neurodegenerative disorders.

Dorfin degrades mutant SOD1s and attenuates mutant SOD1-associated toxicity in cultured cells (Niwa et al., 2002). However, in Dorfin/mutant SOD1 double transgenic mice, we found only a modest beneficial effect on mutant SOD1-induced survival and motor dysfunction (unpublished data). These findings, combined with the short half-life of Dorfin protein, led us to hypothesize that the limiting effect of the Dorfin transgene may be a consequence of autodegradation of Dorfin, since Dorfin can execute autoubiquitination *in vivo* (Niwa et al., 2001).

Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) is also an E3 protein; it has a TPR domain in the N terminus and a U-box domain in the C terminus. The U-box domain of CHIP is responsible for its strong E3 activity, whereas the TPR domain recruits heat shock proteins harboring misfolded client proteins such as cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), denatured luciferase, and tau (Meacham et al., 2001; Murata et al., 2001, 2003; Hatakeyama et al., 2004; Shimura et al., 2004).

To prolong the protein lifetime of Dorfin and thereby obtain more potent ubiquitylation and degradation activity against mutant SOD1s than is provided by Dorfin or CHIP alone, we generated chimeric proteins containing the substrate-binding domain of Dorfin and the UPR domain of CHIP substitute for RING/IBR of Dorfin. We developed 12 candidate constructs that encode Dorfin-CHIP chimeric proteins and analyzed them for their E3 activities and degradation abilities against mutant SOD1 protein in cultured cells.

Experimental procedures

Plasmids and antibodies

We designed constructs expressing Dorfin-CHIP chimeric protein. In these constructs, different-length fragments of the C-terminus portion of Dorfin, including the hydrophobic substrate-binding domain (amino acids 333–838, 333–700, and 333–454) and the C-terminus UPR domain of CHIP with amino acids 128–303 or without amino acids 201–303, a charged region was fused in various combinations as shown in Fig. 2C. Briefly, Dorfin-CHIP^{A, B, C, G, H, and I} had the C-terminus portion of Dorfin in their N-terminus and the U-box of CHIP in their C-terminus; Dorfin-CHIP^{D, E, F, J, K, and L} had the U-box of CHIP in their N-terminus and the C-terminus portion of Dorfin in their C-terminus.

We prepared a pCMV2/FLAG-Dorfin-CHIP chimeric vector (Dorfin-CHIP) by polymerase chain reaction (PCR) using the appropriate design of PCR primers with restriction sites (*Clal*, *KpnI*, and *XbaI* or *EcoRI*, *Clal*, and *KpnI*). The PCR products were digested and inserted into the *Clal*–*KpnI* site in pCMV2 vector (Sigma, St. Louis, MO). These vectors have been described previously: pFLAG-Dorfin^{WT} (Dorfin^{WT}), FLAG-Dorfin^{C132S/C135S} (Dorfin^{C132S/C135S}), pFLAG-CHIP (CHIP), pFLAG-Mock (Mock), pcDNA3.1/Myc-SOD1^{WT} (SOD1^{WT}), pcDNA3.1/Myc-SOD1^{G93A} (SOD1^{G93A}), pcDNA3.1/Myc-SOD1^{G85R} (SOD1^{G85R}), pcDNA3.1/Myc-SOD1^{H46R} (SOD1^{H46R}), pcDNA3.1/Myc-SOD1^{G37R} (SOD1^{G37R}), pEGFP/SOD1^{WT} (SOD1^{WT}-GFP), and pEGFP/SOD1^{G85R} (SOD1^{G85R}-GFP) (Ishi-

gaki et al., 2004). We used monoclonal anti-FLAG antibody (M2; Sigma), monoclonal anti-Myc antibody (9E10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonal anti-HA antibody (12CA5; Roche, Basel, Switzerland), and polyclonal anti-SOD1 (SOD-100; Stressgen, San Diego, CA).

Cell culture and transfection

We grew HEK293 cells and neuro2a (N2a) cells in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 5 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. At subconfluence, we transfected these cells with the indicated plasmids, using Effectene reagent (Qiagen, Valencia, CA) for HEK293 cells and Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) for N2a cells. After overnight posttransfection, we treated the cells with 1 µM MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al; Sigma) for 16 h to inhibit cellular proteasome activity. We analyzed the cells 24–48 h after transfection. To differentiate N2a cells, cells were treated for 48 h with 15 µM of retinoic acid in 2% serum medium.

Immunological analysis

At 24–48 h after transfection, we lysed cells (4×10^5 in 6-cm dishes) with 500 µl of lysis buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), as well as a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). The lysate was then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove debris. We used a 10% volume of the supernatants as the lysate for SDS-PAGE. When immunoprecipitated, the supernatants were precleared with protein A/G agarose (Santa-Cruz). A specific antibody, either anti-FLAG (M2) or anti-Myc (9E10), was then added. We incubated the immune complexes, first at 4°C with rotation and with protein A/G agarose (Roche) for 3 h, after which they were collected by centrifugation and washed four times with the lysis buffer. For protein analysis, immune complexes were dissociated by heating in SDS-PAGE sample buffer and loaded onto SDS-PAGE. We separated the samples by SDS-PAGE (15% gel or 5%–20% gradient gel) and transferred them onto polyvinylidene difluoride membranes. We then immunoblotted samples with specific antibodies.

Immunohistochemistry

We fixed differentiated N2a cells grown in plastic dishes in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. The cells were then blocked for 30 min with 5% (vol/vol) normal goat serum in PBS, incubated overnight at 4°C with anti-FLAG antibody (M2), washed with PBS, and incubated for 30 min with Alexa 496 nm anti-mouse antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR). We mounted the cells on slides and obtained images using a fluorescence microscope (IX71; Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a cooled charge-coupled device camera (DP70; Olympus). Photographs were taken using DP Controller software (Olympus).

Analysis of protein stability

We assayed the stability of proteins by pulse-chase analysis using [³⁵S] followed by immunoprecipitation. Metabolic labeling was performed as described previously (Yoshida et al., 2003). Briefly, in the pulse-chase analysis of Dorfin proteins, HEK293 cells in 6-cm dishes were transiently transfected with 1 µg of

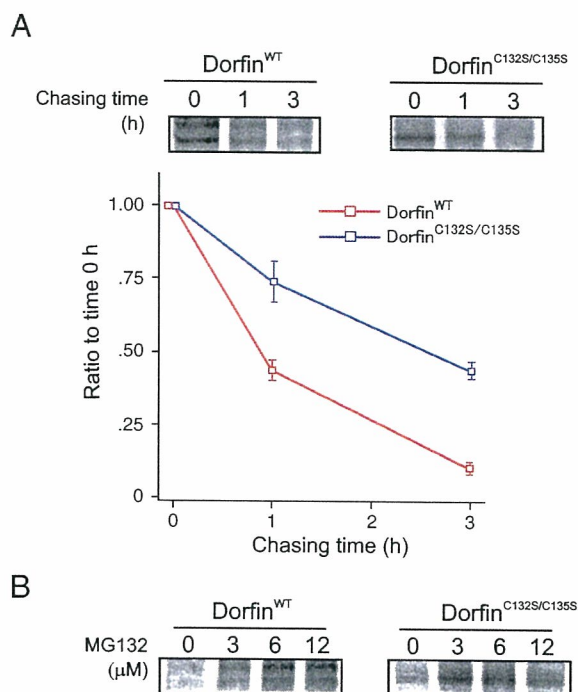


Fig. 1. Pulse-chase analysis of Dorfin^{WT} and Dorfin^{C132S/C135S}. (A) Dorfin^{WT} or Dorfin^{C132S/C135S} was overexpressed in HEK293 cells. After overnight incubation, [³⁵S]-labeled Met/Cys pulse-chase analysis was performed. Cells were harvested and analyzed at 0, 1, or 3 h after labeling and immunoprecipitation by anti-FLAG antibody (upper panels). To determine serial changes in the amount of Dorfin^{WT} or Dorfin^{C132S/C135S}, four independent experiments were performed and the amounts of Dorfin^{WT} and Dorfin^{C132S/C135S} were plotted. The differences between the amounts of Dorfin^{WT} and Dorfin^{C132S/C135S} were significant at 1 h ($p < 0.01$) and 3 h after labeling ($p < 0.001$) (lower panels). Values are the means \pm SE, $n = 4$. Statistics were done using an unpaired t -test. (B) Cells overexpressing Dorfin^{WT} or Dorfin^{C132S/C135S} were treated with different concentrations of MG132 for 3 h after labeling.

FLAG-Dorfin^{WT} or FLAG-Dorfin^{C132S/C135S}. In pulse-chase experiments using SOD1^{G85R}, N2a cells in 6-cm dishes were transiently transfected with 1 μ g of SOD1^{G85R}-Myc or SOD1^{G93A}-Myc and FLAG-Mock, FLAG-Dorfin, or FLAG-Dorfin-CHIP^L. FLAG-Mock was used as a negative control. After starving the cells for 60 min in methionine- and cysteine-free DMEM with 10% FCS, we labeled them for 60 min with 150 μ Ci/ml of Pro-Mix L- [³⁵S] *in vitro* cell-labeling mix (Amersham Biosciences). Cells were chased for different lengths of time at 37°C. In experiments with proteasomal inhibition, we added different amounts of MG132 in medium during the chase period. We performed immunoprecipitation using protein A/G agarose, mouse monoclonal anti-FLAG (M2), and anti-Myc (9E10). The intensity of the bands was quantified by ImageGauge software (Fuji Film, Tokyo, Japan).

MTS assay

We transfected N2a cells (5000 cells per well) in 96-well collagen-coated plates with 0.15 μ g of SOD1^{G85R}-GFP and 0.05 μ g of Dorfin, CHIP, Dorfin-CHIP^L, or pCMV2 vector (Mock) using Effecten reagent (Qiagen). Then we performed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) assays using Cell Titer 96

(Promega) at 48 h after incubation. This procedure has previously been described (Ishigaki et al., 2002a).

Aggregation assay

We transfected N2a cells in 6-cm dishes with 1.0 μ g of SOD1^{G85R}-GFP and 1.0 μ g of FLAG-Mock, FLAG-Dorfin, FLAG-CHIP, or FLAG-Dorfin-CHIP^L. After overnight incubation, we changed the medium to 2% FCS containing medium with 15 μ M retinoic acid (RA) for differentiation. In the MG132 (+) group, 1 μ M of MG132 was added after 24 h of differentiation stimuli. After 48 h of differentiation stimuli, we examined the cells in their living condition by fluorescence microscopy. The transfection ratio was equivalent (75%) among all groups. Visually observable macro aggregation-harboring cells were counted as “aggregation positive” cells (Fig. 7C). All cells were counted in fields selected at random from the four different quadrants of the culture dish. Counting was done by an investigator who was blind to the experimental condition.

Results

Dorfin degradation by the UPS *in vivo*

We analyzed the degradation speed of FLAG-Dorfin by the pulse-chase method using [³⁵S] labeling, finding that more than half of wild-type Dorfin (Dorfin^{WT}) was degraded within 1 h (Fig. 1A). This degradation was dose-dependently inhibited by MG132, a proteasome inhibitor (Fig. 1B). On the other hand, the RING mutant form of Dorfin (Dorfin^{C132S/C135S}), which lacks E3 activity (Ishigaki et al., 2004), degraded significantly more slowly than did Dorfin^{WT} (Fig. 1A and Table 1). As shown in Fig. 1A, Dorfin^{WT} showed two bands, whereas Dorfin^{C132S/C135S} had a single band. This was also seen in our previous study (Ishigaki et al., 2004) and may represent posttranslational modification.

Construction of Dorfin-CHIP chimeric proteins

It is known that the C-terminus portion of Dorfin can bind to substrates such as mutant SOD1 proteins or Synphilin-1 (Niwa et al., 2002; Ito et al., 2003). We attempted to identify the domain of Dorfin that interacts with substrates. Although there was no obvious known motif in the C-terminus of Dorfin (amino acids 333–838), its first quarter contained rich hydrophobic amino acids (amino acids 333–454) (Fig. 2A). Immunoprecipitation analysis revealed that the hydrophobic region of Dorfin (amino acids 333–454) was able to bind to SOD1^{G85R}, indicating that this hydrophobic region is responsible for recruiting mutant SOD1 in Dorfin protein (Fig. 2B).

To establish more effective and more stable E3 ubiquitin ligase molecules that can recognize and degrade mutant SOD1s, we

Table 1

Serial changes in the amounts of Dorfin^{WT}, Dorfin^{C132S/C135S}, and Dorfin-CHIP^L

	0 h (%)	1 h (%)	3 h (%)
Dorfin ^{WT}	100	43.7 \pm 7.0	10.3 \pm 4.4
Dorfin ^{C132S/C135S}	100	73.9 \pm 13.8	43.7 \pm 1.9
Dorfin-CHIP ^L	100	89.0 \pm 5.7	47.5 \pm 5.3

Values are the mean and SD of four independent experiments.

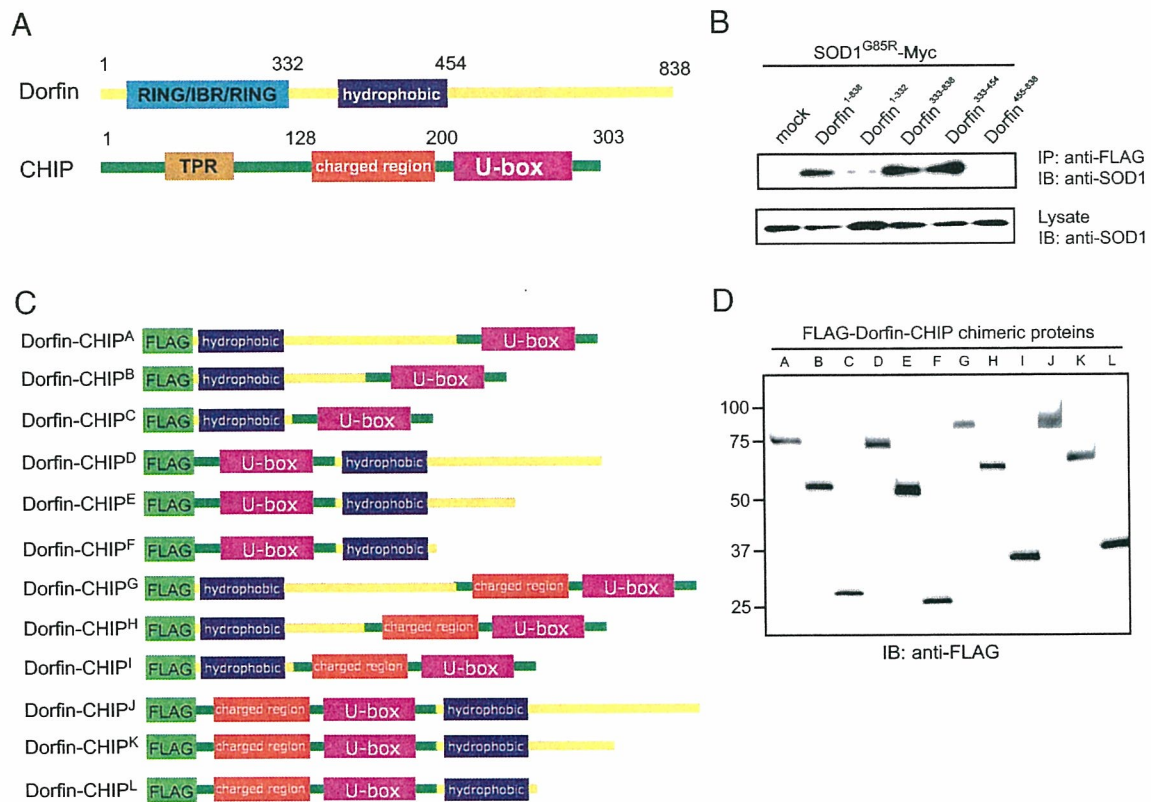


Fig. 2. Construction of Dorfin-CHIP chimeric proteins. (A) Dorfin has a RING/IBR domain in its N-terminus and a substrate-binding portion in the C-terminus. CHIP contains a TPR domain that binds to heat-shock proteins at the N-terminus; its C-terminal U-box domain has strong E3 ubiquitin ligase activity. (B) SOD1^{G85R}-Myc and FLAG-Dorfin derivatives were overexpressed in HEK 293 cells. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-myc antibody. Immunoblotting showed that FLAG-Dorfin derivatives containing Dorfin³³³⁻⁴⁵⁴ bound to SOD1^{G85R}-Myc, indicating that the hydrophobic region of Dorfin (Dorfin³³³⁻⁴⁵⁴) is essential for interaction with mutant SOD1 *in vivo*. (C) Scheme of engineered Dorfin-CHIP chimeric proteins. Three different lengths of C-terminal Dorfin containing the hydrophobic region of Dorfin (Dorfin³³³⁻⁴⁵⁴) and the U-box domain of CHIP with or without the charged region were fused. (D) Dorfin-CHIP chimeric proteins were overexpressed in HEK293 cells. Harvested cells were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-FLAG antibody.

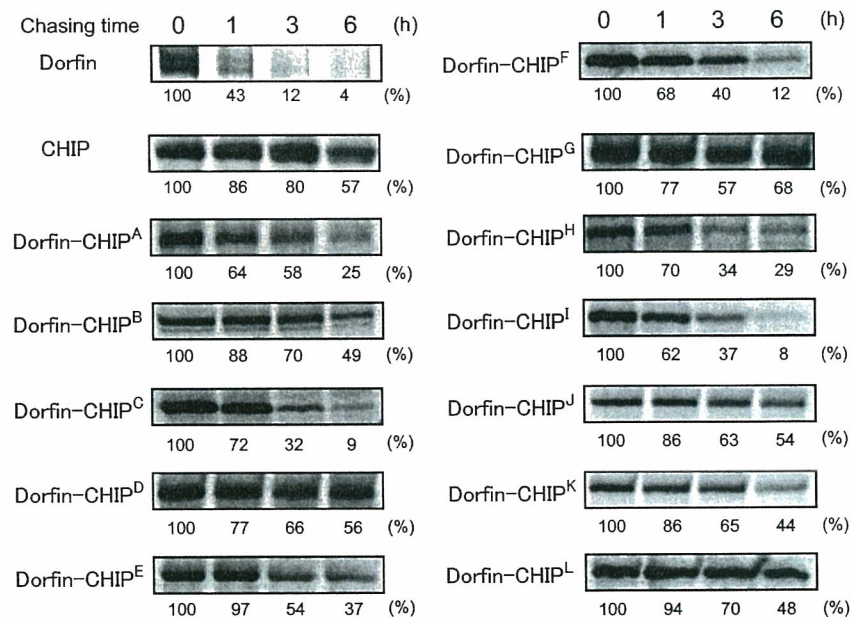


Fig. 3. The stability of Dorfin-CHIP chimeric proteins. Pulse-chase analysis using [³⁵S]-Met/Cys was performed. Dorfin, CHIP, and all the Dorfin-CHIP chimeric proteins were overexpressed in HEK293 cells and labeled with [³⁵S]-Met/Cys. Immunoprecipitation using anti-FLAG antibody and SOD-PAGE analysis revealed the degradation speed of FLAG-Dorfin-CHIP chimeric proteins. The amount of each Dorfin-CHIP chimeric protein was measured by quantifying the band using ImageGauge software.

designed Dorfin-CHIP chimeric proteins containing both the hydrophobic substrate-binding domain of Dorfin and the U-box domain of CHIP, which has strong E3 activity (Fig. 2C). We verified that all of the 12 candidate chimeric proteins were expressed in HEK293 cells (Fig. 2D).

Expression of Dorfin-CHIP chimeric proteins in cells

The half lives of all the Dorfin-CHIP chimeric proteins were more than 1 h. In some of these proteins, such as Dorfin-CHIP^{D, G, J, and L}, moderate amounts of protein still remained at 6 h after labeling, indicating that they were degraded much more slowly than was Dorfin^{WT} (Fig. 3). Repetitive experiments using Dorfin-CHIP^L

yielded a significant difference between the amount of Dorfin^{WT} and Dorfin-CHIP^L at 1 h and 3 h (Table 1).

E3 activity of Dorfin-CHIP chimeric proteins against mutant SOD1

Immunoprecipitation analysis demonstrated that Dorfin and CHIP bound to mutant SOD1^{G85R} in equivalent amounts and that all of the Dorfin-CHIP chimeric proteins interacted with mutant SOD1^{G85R} *in vivo*. Dorfin-CHIP^{A, D, E, F, J, K, and L} bound to the same or greater amounts of SOD1^{G85R} than did Dorfin, whereas Dorfin-CHIP^{B, C, G, H, and I} did not (Fig. 4A, upper panel). None of the Dorfin-CHIP chimeric proteins bound to SOD1^{WT} *in vivo*

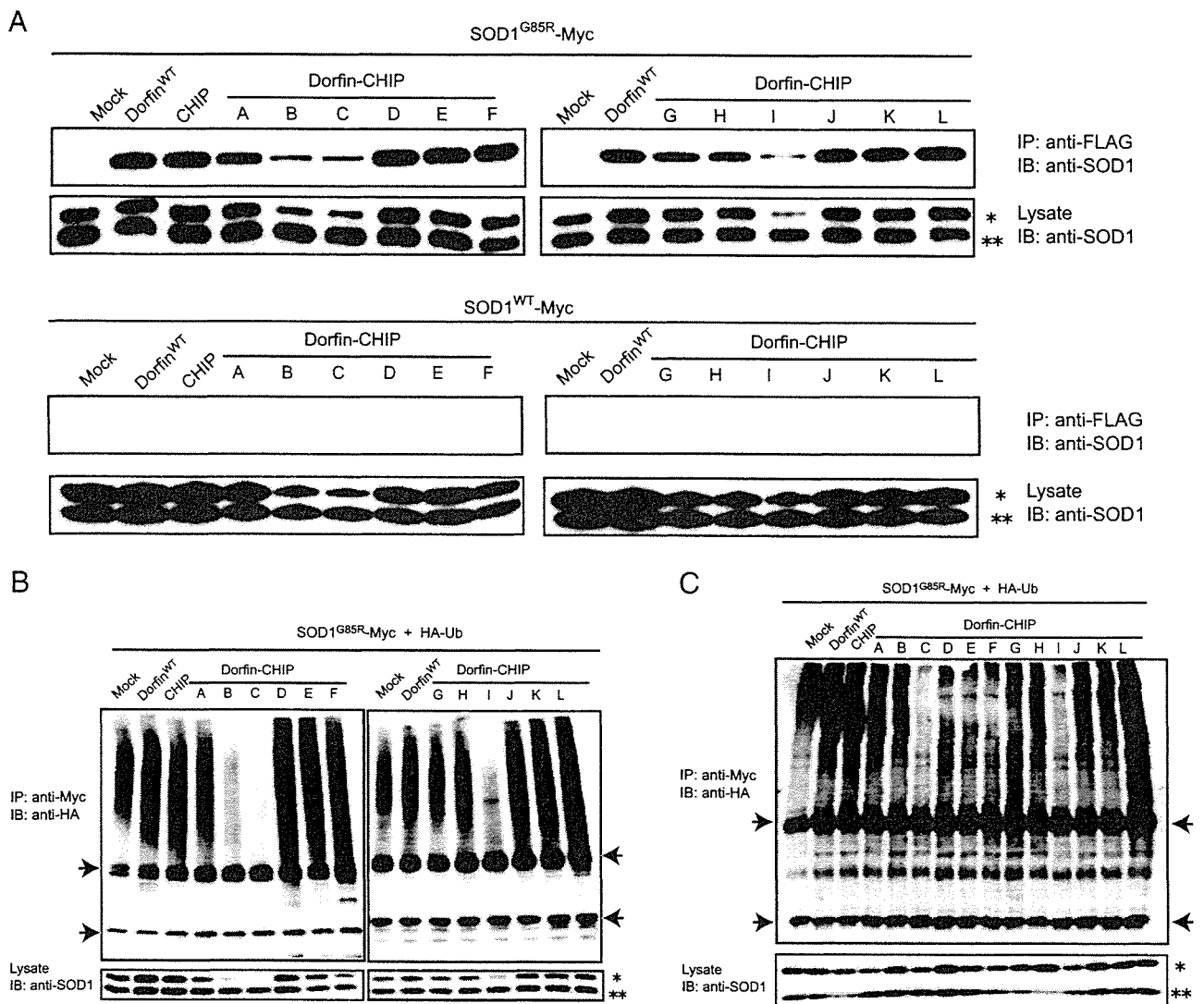


Fig. 4. The E3 activity of Dorfin-CHIP chimeric proteins on mutant SOD1 *in vivo*. (A) *In vivo* binding assay with both wild-type and mutant SOD1s. SOD1^{G85R}- or SOD1^{WT}-Myc and FLAG derivatives of Dorfin-CHIP chimeric proteins were coexpressed in HEK293 cells. Immunoprecipitation was done using anti-Myc antibody. Immunoblotting with anti-FLAG antibody revealed that all the Dorfin-CHIP chimeric proteins bound *in vivo* to SOD1^{G85R}-Myc but not to SOD1^{WT}-Myc. Single and double asterisks indicate overexpressed human SOD1s and mouse endogenous SOD1, respectively. (B) *In vivo* ubiquitylation assay in HEK293 cells. SOD1^{G85R}-Myc, HA-Ub, and FLAG derivatives of Dorfin-CHIP chimeric proteins were coexpressed in HEK293 cells. Immunoblotting with anti-HA antibody demonstrated the ubiquitylation level of SOD1^{G85R}-Myc by FLAG derivatives of Dorfin-CHIP chimeric proteins *in vivo*. Arrows indicate IgG light and heavy chains. Single and double asterisks indicate overexpressed SOD1 and mouse endogenous SOD1, respectively. (C) *In vivo* ubiquitylation assay in N2a cells. SOD1^{G85R}-Myc, HA-Ub, and FLAG derivatives of Dorfin-CHIP chimeric proteins were coexpressed in N2a cells. Arrows indicate IgG light and heavy chains. Single and double asterisks indicate overexpressed human SOD1s and mouse endogenous SOD1, respectively.

(Fig. 4A, lower panel). Some Dorfin-CHIP chimeric proteins, such as Dorfin-CHIP^{B, C, and I}, had lower amounts of both SOD1^{WT} and SOD1^{G85R} in the lysates. We performed quantitative RT-PCR using specific primers for SOD1-Myc, finding that coexpression of Dorfin-CHIP^{B, C, or I} suppressed the mRNA expression of overexpressed SOD1 gene (Supplementary Fig. 1). Considering the possibility that these Dorfin-CHIP chimeric proteins might have unpredicted toxicity for cells by affecting gene transcription via unknown mechanisms, we excluded them from further analysis. Other Dorfin-CHIP proteins did not affect SOD1-Myc gene expression, which validated the comparison among IPs and ubiquitylated mutant SOD1 in Figs. 4A–C.

To assess the effectiveness of the E3 activity of Dorfin-CHIP chimeric proteins, we did an *in-vivo* ubiquitylation analysis by coexpression of SOD1^{G85R}-Myc, HA-Ub, and Dorfin-CHIP chimeric proteins in HEK293 cells. We found that Dorfin and CHIP enhanced the ubiquitylation of SOD1^{G85R} protein and that the ubiquitylation levels of these two E3 ligases were almost equivalent. Moreover, Dorfin-CHIP^{D, E, F, J, K, and L} ubiquitylated SOD1^{G85R} more effectively than did Dorfin or CHIP (Fig. 4B).

Performing the same *in-vivo* ubiquitylation assay using N2a cells, we observed that the levels of ubiquitylation of SOD1^{G85R} by Dorfin and CHIP were equivalent, as they were in HEK293 cells. Among Dorfin-CHIP chimeric proteins, only Dorfin-CHIP^L

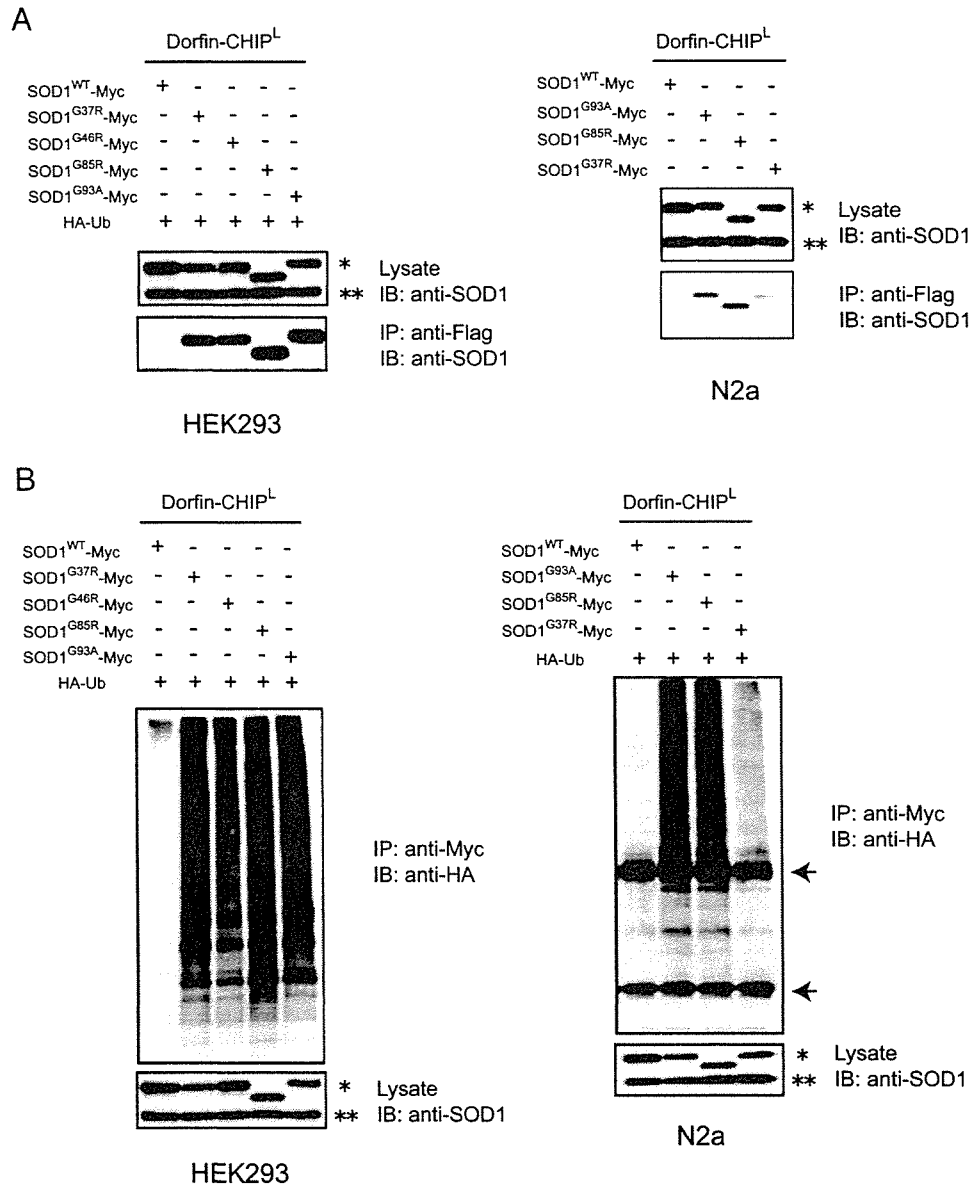


Fig. 5. Dorfin-CHIP^L specifically ubiquitylates mutant SOD1s *in vivo*. (A) *In vivo* binding assay with various mutant SOD1s. SOD1^{WT}-Myc, SOD1^{G93A}-Myc, SOD1^{G85R}-Myc, SOD1^{H46R}-Myc or SOD1^{G37R}-Myc, and FLAG-Dorfin-CHIP^L were coexpressed in HEK293 (left) and N2a cells (right). Immunoprecipitation was done using anti-Myc antibody. Immunoblotting with anti-FLAG antibody showed that both chimeric proteins specifically bound to mutant SOD1s *in vivo*. Single and double asterisks indicate overexpressed SOD1 and mouse endogenous SOD1, respectively. (B) *In vivo* ubiquitylation assay. SOD1^{WT}-Myc, SOD1^{G93A}-Myc, SOD1^{G85R}-Myc, SOD1^{H46R}-Myc or SOD1^{G37R}-Myc, as well as FLAG-Dorfin-CHIP^L and HA-Ub, was coexpressed in HEK293 (left) and N2a cells (right). Immunoblotting with anti-HA antibody showed the specific ubiquitylation of mutant SOD1-Myc by FLAG-Dorfin-CHIP^L *in vivo*. Arrows indicate IgG light and heavy chains. Single and double asterisks indicate overexpressed human SOD1s and mouse endogenous SOD1, respectively.