

最新医学・2006年・9月増刊号（別刷）

臨床遺伝子学 '06

神経系疾患の遺伝子学

秦 野 伸 二 池 田 穰 衛

最 新 医 学 社

● 総論

神経系疾患の遺伝子学

* 東海大学 総合医学研究所 分子神経科学部門 助教授

** 東海大学大学院医学研究科 脳・神経疾患研究センター 教授

秦野 伸二* Shinji Hadano 池田 穰衛** Joh-E Ikeda

|| 要 旨 ||

近年、神経変性疾患責任遺伝子および関連遺伝子が続々と同定され、それにより神経変性疾患の発症メカニズムに関する研究も飛躍的な進歩を遂げている。多くの神経変性疾患に共通してみられる神経細胞の機能障害・細胞死の要因として、遺伝子転写、タンパク質分解、小胞体、およびミトコンドリアなどの細胞内の分子・オルガネラ機能障害の存在が明らかとなる中、本総説では、最近注目されているトラフィッキング異常と神経変性疾患との関連に焦点を当てる。

は じ め に

神経変性疾患は、特定の神経細胞の機能障害ならびに神経細胞の脱落を特徴とする一群の脳・神経疾患を指す。代表的なものとしては、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ハンチントン病 (HD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などが含まれている。これら疾患は、疾患分類の基礎となる臨床診断学・病理学的研究の膨大な知見により、それぞれの独自の疾患として体系的に分類されている。これに対して、疾患の原因を解析する疾患解明研究はいまだ黎明期にあり、ごく近年に至るまで多くの神経変性疾患の原因は不明であり、よって

キーワード：神経変性疾患，トラフィッキング，エンドソーム，膜小胞

その治療法・治療薬に関しても、一部の例外（PD の L-dopa 治療など）を除いて、ほとんどないと言っても過言ではなかった。しかしながら、近年の分子遺伝学ならびにヒトゲノム研究の進展により、このような混沌とした状況が大きく変わりだすこととなった。すなわち、神経変性疾患の中でも単一遺伝性疾患群を中心にそれらの原因となる責任遺伝子変異の同定が進行し、それにより脳神経・筋疾患に限ってみても 500 個を超える疾患責任遺伝子が明らかにされるまでに至った。さらには、孤発性・多因子性神経変性疾患の分子遺伝学的解析により、多くの疾患関連遺伝子が同定されつつある。本総説では、疾患症候・診断学および病理学を基盤として進歩を遂げた神経疾患研究に、新たに分子病態研究が加わることにより、徐々に疾患発症のメカニズムが解きほぐされつつある現状に触れ、特に神経変性疾患発症のメカニズム研究に関する新たな潮流について解説したい。

神経変性疾患原因究明の研究戦略

従来 of 疾患原因の探求に関する研究は、生化学・薬理学的あるいは疫学的手法により原因となる物質・因子を特定しようとするものであった。しかし、生化学・薬理学的に同定され生体内における疾患関連因子が疾患の原因であるのか、あるいは疾患発症の結果として生じた変化であるのかを特定することは困難であった。また、疫学的研究により見いだされたさまざまな危険因子に関しても原因・関連因子であるのか、あるいは偶然による相関なのかを結論づけることは困難であった。その後、幾つかの神経変性疾患において、その発症頻度は低いものの明確なメンデル遺伝形式を表わす家族性疾患を対象とした分子遺伝学的解析が確立され、遺伝性疾患の病因遺伝子の特定が可能となった。その結果、さまざまな単因子性神経変性疾患の疾患責任遺伝子および疾患の原因となる遺伝子変異が同定された。神経変性疾患において同定されたすべての責任遺伝子を列挙することは紙面の都合上できないが、筆者らが研究対象としている運動ニューロン疾患（MND）に限ってみても多くの遺伝子座ならびに責任遺伝子変異が同定されている（表1）。さらに、現在では多因子性疾患遺伝子の探索研究の進行により、神経変性疾患における多くの疾患発症危険因子（遺伝子）

表1 遺伝性上位/下位運動ニューロン疾患の病因遺伝子

分類	疾患名 (略記)	*OMIM No	遺伝子座	遺伝子	遺伝子産物
Herededitary ALS					
Dominant	ALS 1	105400	21q22.1	<i>SOD1</i>	SOD1
	ALS 3	606640	18q21		
	ALS 4	602433	9q34	<i>SETX</i>	Senataxin
	ALS 6	608030	16q12.1-16q12.2		
	ALS 7	608031	20p13		
	ALS 8	608627	20q13.3	<i>VAPB</i>	# VAPB
	ALS-ANG	105850	14q11	<i>ANG</i>	Angiogenin
	ALS-FTD	105550	9q21-q22		
	ALS-FTD 2		9p13.2-p21.3		
	ALS-FTD 3	609512	2p11.2	<i>CHMP2B</i>	# CHMP2B
	ALS-FTDP / DDPAC	600274	17q21	<i>MAPT</i>	# Tau
Recessive	ALS 2	205100	2q33	<i>ALS2</i>	# ALS2 (alsin)
	ALS 5	602099	15q15.1-q21.1		
X-linked	ALS X		Xp11-q12		
Others	Neurofilament, Heavy subunit	162230	22q12.2	<i>NEFH</i>	# NF-H
	Peripherin	170710	12q12-q13	<i>PRPH</i>	# Peripherin
Bulbar syndrome					
	Kennedy's Syndrome (SBMA)	313200	Xq12	<i>AR</i>	Androgen receptor
Spinal muscular atrophy (SMA)					
Recessive SMA	SMA1	253300	5q12.2-q13.3	<i>SMN1 / SMN</i>	# SMN1 / SMN2
	SMA2	253550			
	Lower motor neuron syndrome		1p36		
X-linked SMA	X-linked Infant SMA & Arthrogryposis	301830	Xp11		
Dominant, Proximal SMA	Congenital with leg weakness	600175	12q23		
	HMSN-P (Okinawa type)	604484	3q13		
Distal SMA	HMN 1, Distal				
	HMN 2	158590	12q24	<i>HSPB8</i>	HSPB8 (HSP22)
	HMN 5	600794	7p15	<i>GARS</i>	glycyl-tRNA synthetase
	HMN 5B	606158	11q13	<i>BSCL2</i>	Seipin
	HMN 7 (Vocal cord)	158580	2q14		
	HMN-Vocal cord 2	607641	2p13	<i>DCTN1</i>	# Dynactin 1
	HMN J	605726	9p21.1-p12		
	HMN-Upper motor neuron	608465	9q34	<i>SETX</i>	Senataxin
	Diaphragm-Neonatal (SMARD1)	604320	11q13	<i>IGHMBP2</i>	IGHMBP2
	Distal SMA 4	607088	11q13-q21		
	Distal SMA, X-linked	300489	Xq13		

分類	疾患名 (略記)	*OMIM No	遺伝子座	遺伝子	遺伝子産物
Famillial Spastic Paraplegia (SPG)	Distal HMN	608634	7q11	<i>HSPB1</i>	HSPB1 (HSP 27)
	Dominant				
	SPG3A	182600	14q11-q21	<i>SPG3A</i>	# Atlastin
	SPG4	182601	2p22	<i>SPG4</i>	# Spastin
	SPG6	600363	15q11.1	<i>NIPA1</i>	NIPA1
	SPG8	603563	8q23-q24		
	SPG9	601162	10q23.3-q24.1		
	SPG10	604187	12q13	<i>KIF5A</i>	# Kinesin Family Member 5A
	SPG12	604805	19q13		
	SPG13	605280	2q33.1	<i>HSPD1</i>	Heart-Shock 60-Kd Protein 1
	SPG17	270685	11q13	<i>BSCL2</i>	Seipin
	SPG18				
	SPG19	607152	9q33-q34		
	SPG29	609727	1p31.1-p21.1		
	SPG31	610250	2p12	<i>REEP1</i>	REEP1
	SPG33	610244	10q24.2	<i>ZFYVE27</i>	# ZFYVE27
	SPG12q		12q		
	Recessive				
	SPG5A	270800	8q11.1-q21.2		
	SPG5B	600146			
	SPG7 (5C)	602783	16q24.3	<i>SPG7</i>	Paraplegin
	SPG11	604360	15q13-q15		
	SPG14	605229	3q27-q28		
	SPG15	270700	14q22-q24		
	SPG20	275900	13q12.3	<i>SPG20</i>	# Spartin
	(Troyer syndrome)				
	SPG21	248900	15q22.31	<i>ACP33</i>	# Maspardin
	(Mast syndrome)				
	SPG23	270750	1q24-q32		
	SPG24	607584	13q14		
	SPG25	608220	6q23.3-q24.1		
	SPG26	609195	12p11.1-q14		
	SPG27	609041	10q22.1-q24		
	SPG28	609340	14q21.3-q22.3		
	SPG30		2q37.3		
	IAHSP	607225	2q33	<i>ALS2</i>	# ALS2 (alsin)
	X-linked				
	SPG1	303350	Xq28	<i>L1CAM</i>	L1CAM
	SPG2	312920	Xq22	<i>PLP1</i>	Proteolipid protein
	SPG16	300266	Xq11.2		

* : Online Mendelian Inheritance in Man / NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

: トラフィックング関連因子

および関連因子の同定が進行している。このような遺伝学的手法により同定された遺伝子を手掛かりとして、さらに生化学的あるいはモデル生物を用いた遺伝学的研究により新たな疾患関連因子が次々と同定されている。

これまで原因が不明であった大多数の神経変性疾患の新たな治療戦略を立てるうえで重要なことは、同定された疾患責任・関連遺伝子の細胞および個体での機能、ならびに変異遺伝子に起因する細胞機能傷害のメカニズムを解明することである。これまでの事例をみると、疾患遺伝子変異が同定された場合でも、その時点で多くは遺伝子産物の細胞・個体における機能は不明である。したがって、疾患遺伝子の分子機能解析の研究は遺伝子発見と同様に極めて重要な研究課題であると考えられる。現在、その解析方法としては、生化学・細胞生物学的手法に加えて、遺伝子操作生物（マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫、酵母）を利用した生体・個体レベルでの変異遺伝子機能解析などの手法が用いられている。そして、遺伝性神経変性疾患の責任遺伝子発見後の地道な機能解析で得られた研究成果は、最近では、大多数は遺伝性を示さないような AD, PD, ALS などの孤発性・散在性疾患の発症メカニズムの理解にも大きく貢献しつつある点は強調したい。しかし一方では、遺伝子操作疾患モデル動物（マウス）が発症せず、あるいは似て非なる神経病理像を呈することから、責任遺伝子および責任遺伝子産物機能を主体とする分子病態解析が難行している例も多々みられる。また、解析遺伝子数が飛躍的に増えたために遺伝子産物の解析方法論の進歩が追いつかず、疾患責任遺伝子の発見後 5 年以上が経過しても機能解析が遅々として進まず、当該遺伝子産物・変異タンパク質機能が全く不明であるケースも少なくない。

神経疾患発症の分子メカニズム

神経細胞は、一部の幹細胞を除いては基本的には分裂せず、極度に機能分化した細胞である。これまでに 500 以上の神経変性疾患責任遺伝子が同定されていることはすでに述べたが、これは神経細胞の分化と生存・機能維持に多く（500 種以上）のタンパク質が直接・間接あるいは統合的にかかわっていることを示すものである。運動ニュー

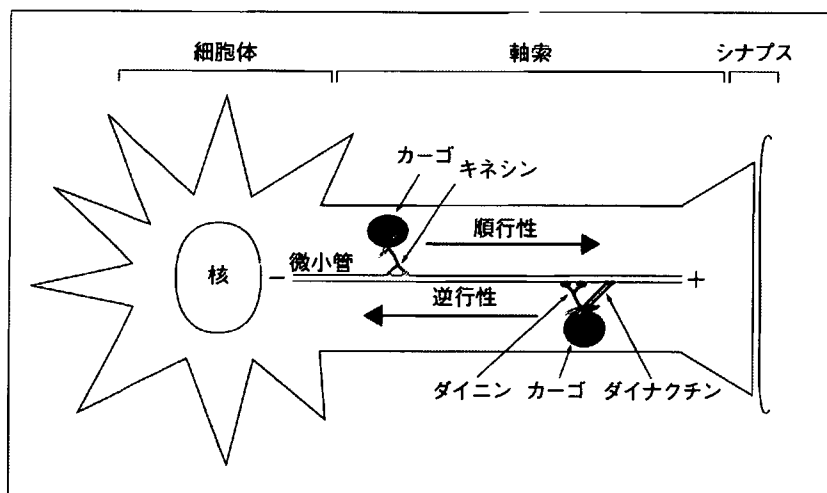
ロンのように軸索の長さが1メートルを超えるような極めて大きなサイズの細胞があるように、形態も脳神経系以外の臓器・器官を形成する細胞とは大きく異なった特徴を有する。したがって、そのような神経細胞が長期間（生涯）にわたり正常な状態で活動するためには、細胞の恒常性を巧妙に維持するための制御機構が必須とされ、その担い手であるオルガネラ（細胞小器官）が正常に機能することは極めて重要なことである。事実、近年の研究から明らかになってきたことは、細胞内のさまざまなオルガネラ・分子システムが神経変性疾患において異常を来しているということである。例えば、異常タンパク質の凝集・蓄積によるユビキチン-プロテアソーム系の変調ならびに小胞体ストレス、ミトコンドリア機能障害ならびに酸化ストレス、細胞骨格異常、膜小胞・分子トラフィッキング異常、オートファジー系異常など数々の系における傷害が報告されている。また、ある種の神経変性疾患ではグルタミン酸受容体異常による興奮性神経細胞死も想定されている。そして、このような細胞内分子・オルガネラ機能の異常により、アポトーシスあるいはその他の細胞死をもたらす分子シグナル系が亢進し、最終的に神経細胞は変性・細胞死に至ると考えられている。

これらの中で、細胞内のトラフィッキング異常に関しては、以前から中間径ニューロフィラメントの蓄積が特定の疾患患者脳・脊髄において観察されていたことから、神経変性のメカニズムとしての関連が注目されていた。最近の分子病態研究の進展により、神経変性疾患の中でも最も患者数の多いAD、PDのみならず、多くのMNDおよび末梢神経疾患においても、細胞内トラフィッキング系の異常が疾患の背景にあるとの知見が蓄積されてきた。次項以降では、改めて注目されつつある細胞内トラフィッキング異常と神経変性疾患との関連に焦点を当てる。

細胞内トラフィッキングの基礎

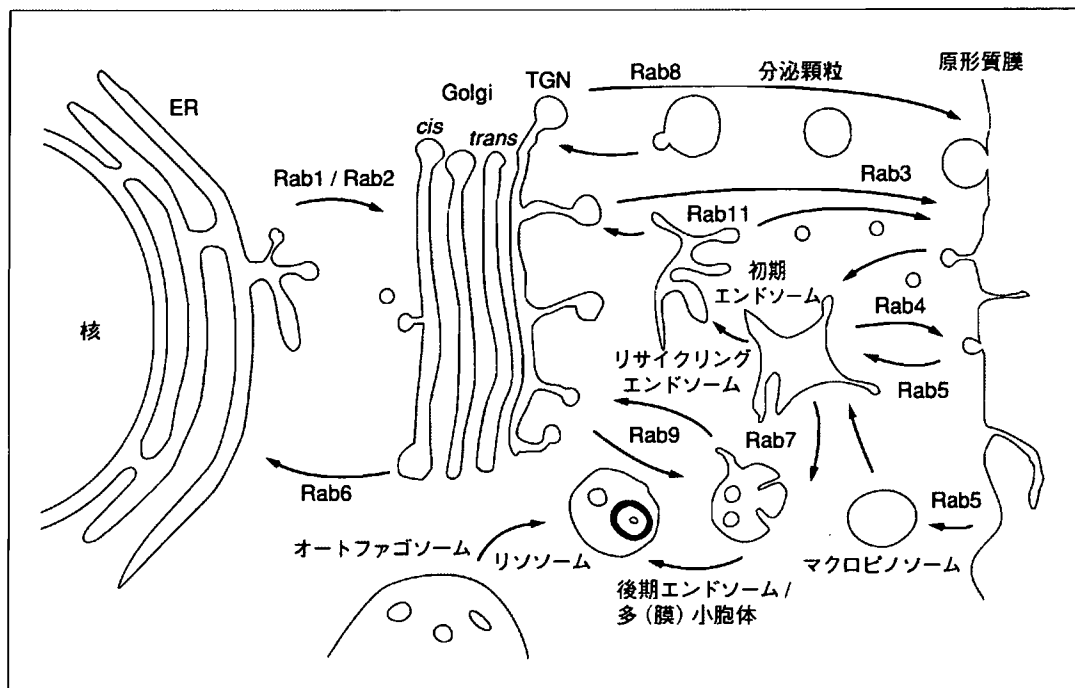
神経細胞に限らずすべての細胞は、細胞内においてさまざまな物質を移動させることにより、細胞の恒常性を維持している。このような物質移送システム全般をここでは「トラフィッキング」と称することとする。細胞内におけるトラフィッキングは、3種類のカテゴリーに

図1 神経細胞軸索におけるキネシンおよびダイニン複合体による順行性および逆行性輸送



含まれる分子・オルガネラ群, すなわち「細胞骨格」, 「モーター分子」および「カーゴ分子・オルガネラ」によりその活動が担われている。鉄道システムに形容すれば, 細胞骨格はレール, モーター分子は列車, カーゴは乗客あるいは荷物に相当するものである。細胞骨格はその直径の違いから, 最も細い (～5 nm) マイクロフィラメント, 中程度の太さ (～10 nm) である中間径フィラメント, および太いフィラメント (～25 nm) である微小管の3種類に分類されるが, トラフィッキングの基本システムとして主に機能するものはマイクロフィラメントと微小管である。また, モーター分子に関しても, ミオシン類, キネシン類, ダイニンの3種類に分類され, ミオシン類はマイクロフィラメント上を, キネシン類およびダイニンは微小管上をそれぞれ移動する¹⁾。キネシン類は, 一般的に微小管上をマイナス端からプラス端に移動するが, 例外があることも知られている。ダイニンはその逆に微小管上をプラス端からマイナス端に移動することが知られている。神経細胞の軸索においては微小管の極性が一定であり, 神経終末側がプラス端であり細胞体側がマイナス端である。したがって, 軸索においてはキネシン類が細胞体から神経終末側への順行性トラフィッキングを担うモーター分子であり, 逆にダイニンは逆行性トラフィッキングを担うモーター分子である (図1)。微小管上でのキネシン類およ

図2 細胞内の膜小胞トラフィックおよび低分子量Gタンパク質 Rab ファミリーの分布



びダイニンによるトラフィックは、遠距離の速い細胞内物質移送にとって必須のシステムであるとされている。特に、長い軸索・樹状突起構造を有する神経細胞においては、その恒常性維持のために神経末端-細胞体間のトラフィックは極めて重要な細胞内システム系であると考えられる。

一方、これらのトラフィックシステムにおいて運搬されるカーゴには多様なものが含まれ、膜系オルガネラ（ミトコンドリア、エンドソーム、リソソーム、小胞体、ゴルジ小胞、ペルオキシソームなど）や非膜系オルガネラ（中間径フィラメント、リボソームなど）、神経栄養因子などのさまざまなタンパク質、mRNA、さらには変性タンパク質などの分子群も移送されることが明らかとなっている。この中で、膜小胞をカーゴとする膜トラフィックはさまざまなオルガネラ間の細胞内で生成されるタンパク質・脂質の移送のみならず、細胞外からの栄養素、情報伝達分子の取込み（エンドサイトーシス）、情報伝達分子の放出（エクソサイトーシス）においても極めて重要な役割を果たしている（図2）。このような膜小胞トラフィックの巧

妙な制御・調節において、低分子量Gタンパク質 Rab ファミリー分子群は特に重要な役割を果たしていることが知られている (図2)²⁾。加えて、長い軸索・樹状突起構造を有する神経細胞においては、神経末端あるいは軸索先端において受け取ったさまざまな情報 (例えば、神経細胞維持に必須である神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの神経栄養因子シグナル) を細胞体まで安定して伝える必要があるが、そのメカニズムとして、受け取ったシグナル情報をエンドソーム中に蓄えたままダイニン依存性の逆行性膜小胞トラフィッキングにより細胞体まで運ぶという「シグナリングエンドソーム仮説」が現在注目されている³⁾。

トラフィッキング異常と神経変性疾患

本項では、神経変性疾患とトラフィッキング異常との関連についての最近の研究を紹介する。

1. アルツハイマー病 (AD)/ 認知症

AD は、脳内におけるアミロイド β ($A\beta$) ペプチドおよび微小管結合タンパクであるタウを主成分とする封入体 (PHF) の蓄積を特徴としている。Stamer らはタウタンパク質の過剰発現が神経培養細胞においてキネシン依存性のペルオキシソーム、ニューロフィラメントおよびゴルジ由来の膜小胞の神経細胞突起への順行性移送を阻害すること、さらにはアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の樹状突起・軸索への移送の阻害により細胞体での APP 蓄積を上昇させることを報告した⁴⁾。Pigino らは、遺伝性アルツハイマー責任遺伝子 Presenilin 1 (PS1) における遺伝子変異がキネシン依存性軸索輸送能を低下させることを明らかにした⁵⁾。また、Grbovic らは、APP からのプロセッシングにより生成される APP-C 末端フラグメント (β CTF) および $A\beta$ 量が、エンドソーム動態調節因子である低分子量Gタンパク質 Rab5 の過剰発現により顕著に高まることを示した⁶⁾。さらに最近、Salehi らは APP 遺伝子の過剰発現マウスにおいては、神経細胞内エンドソームへの APP の蓄積により NGF などの神経栄養因子の (恐らくシグナリングエンドソームを介した) 逆行性情報伝達が阻害され、その結果コリン作動性神経細胞の変性が引き起される

ことを示した⁷⁾。一方, Skibinski らは $A\beta$ の蓄積を伴わない常染色体優性前頭側頭葉変性型認知症 (FTD3) の責任遺伝子産物が, エンドソームに局在する ESCRTIII 複合体サブユニット CHMP2B であることを明らかにした⁸⁾。以上のことから, AD あるいはその他の認知症においても, エンドソームならびに膜小胞トラフィッキング異常を背景とする神経細胞の変性・細胞死が進行しているものと推察される。

2. パーキンソン病 (PD)

PD は, 黒質・青斑核の神経細胞の脱落と, α -シヌクレイン (α Syn) を主成分とするレヴィー小体という封入体の蓄積を特徴とする。Cooper らは, 酵母, ショウジョウバエ, 線虫およびラット培養神経細胞を用いた実験により, α Syn の過剰発現が小胞体-ゴルジ間の膜小胞トラフィッキングを阻害することを明らかにした。そして, その阻害作用は低分子量Gタンパク質 Rab1 の発現を高めることにより顕著に低下した。このことから, Rab1 は α Syn 過剰発現により引き起されるドパミン作動性神経細胞の細胞死を抑制する因子であることが明らかとなった⁹⁾。

3. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)/運動ニューロン疾患 (MND)

ALS は, 上位ならびに下位運動ニューロンの選択的傷害による進行性筋萎縮を主症状とする。孤発例の患者組織の病理学的解析により, 脊髓前角での近位軸索部位への中間径ニューロフィラメントの蓄積などの所見が得られており, 以前からトラフィッキング異常が神経変性の候補要因として位置づけられていた。事実, Collard らは変異型 SOD1 遺伝子を過剰発現する常染色体優性遺伝性 ALS1 型のモデルマウスを用いた解析により, 運動ニューロンの軸索輸送が傷害されていることを明らかにした¹⁰⁾。2001 年, 筆者らは, 上位運動ニューロン傷害優位である常染色体劣性 2 型 ALS の責任遺伝子を同定し¹¹⁾, その遺伝子産物 (ALS2 タンパク質) が低分子量Gタンパク質 Rab5 の活性化因子であり, 細胞内においてはエンドソームにおける膜融合を調節する因子であることを発見した¹²⁾。また, ALS8 型の責任遺伝子産物 (VAPB) は, 正常では小胞体-ゴルジ膜に局在するが, 病変異型タンパク質は凝集体を形成し, 膜小胞と共存しないことが報告された¹³⁾。一方, 上位運動ニューロン傷害を主徴とする遺伝性痙性対麻

痺 4 型 (SPG4) では微小管動態の調節に関与する spastin 遺伝子の変異が、そして同 10 型 (SPG10) では順行性トラフィッキングのモーター分子であるキネシン類に属する KIF5A 遺伝子変異がそれぞれの疾患の病因であることが明らかにされている¹⁴⁾。下位運動ニューロンの選択的変性を示す脊髄性筋萎縮症 (SMA) では、病因タンパク質 SMN の機能喪失により、神経軸索末端への順行性アクチン mRNA のトラフィッキングが傷害され、その結果、局所でのアクチン生成が低下するために運動ニューロンが機能不全に陥ると考えられている¹⁵⁾。さらに、遺伝性 MND 患者において逆行性モーター分子であるダイニン複合体の構成因子 dynactin の遺伝子変異が発見され、またモデルマウスを用いた研究によりダイニン複合体機能不全が運動ニューロン変性をもたらすことが証明された¹⁶⁾。

4. ハンチントン病 (HD)/ポリグルタミン病

HD は、常染色体優性遺伝を示す遺伝性神経変性疾患であり、大脳基底核の特に尾状核の神経細胞の選択的変性により起る進行性の不随意運動を主徴とする。責任遺伝子内に存在する CAG 繰り返し配列の異常伸長変異によって、翻訳された遺伝子産物 (huntingtin) はポリグルタミン鎖の増大した異常タンパク質となり、それが凝集することにより封入体を形成する。その過程で神経細胞の機能障害、細胞死が引き起されると考えられている。同様なポリグルタミン鎖の増大により引き起される神経変性疾患は HD を含めて 10 種類知られており (球脊髄性筋萎縮症: SBMA, HD, ハンチントン病様 2 型: HDL2, 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症: DRPLA, 脊髄小脳失調症 1 型: SCA1, 同 2 型: SCA2, 同 3 型: SCA3/マシャド・ジョセフ病, 同 6 型: SCA6, 同 7 型: SCA7, 同 17 型: SCA17), それらを総称してポリグルタミン病と呼んでいる。近年、さまざまな研究からポリグルタミン病においても細胞内トラフィッキング異常が病態の根底にあるのではないかと考えられている。Pal らは、huntingtin-HAP40 複合体が低分子量 G タンパク質 Rab5 のエフェクターであることを示し、HD 患者細胞のエンドソーム動態に異常が生じていることを報告した¹⁷⁾。また、Ravikumar らは、ダイニン複合体変異により HD モデルマウスが早期に発症すること、脳内での凝集体蓄積レベルが上昇

することを明らかにし、それらが凝集タンパク質のオートファジーによる処理能力の低下に起因することを示した¹⁸⁾。したがって、ポリグルタミン凝集体の処理の一部は、ダイニン依存性オートファゴソーム-リソソーム間のトラフィッキングにより調節されているものと推定される。

5. その他の神経変性疾患

遺伝性リソソーム蓄積症であるニーマン・ピック病C型 (NPC) は、小脳プルキンエ細胞の変性を伴う神経変性疾患であり、エンドソーム-リソソーム系調節因子である NPC1 あるいは NPC2 遺伝子の変異による細胞内コレステロールのエンドソームへの蓄積、コレステロール動態の異常が疾患発症の原因となっている¹⁹⁾。一方、常染色体優性遺伝を示す末梢神経症シャルコー・マリー・トゥース病 2A1 型 (CMT2A1) は、キネシン分子をコードする KIF1B 遺伝子の変異により引き起され、また同 2B 型 (CMT2B) はエンドソーム-リソソーム間の膜小胞トラフィッキングの制御因子である低分子量Gタンパク質 Rab7 の遺伝子変異により発症することが知られている²⁰⁾。

本項で取り上げた個々の責任遺伝子は全身いたるところで発現している。にもかかわらず、責任遺伝子変異によるトラフィッキング (シグナル伝達) 系の不全あるいは阻害を背景とする細胞死・変性が特定の神経細胞に限られていることを忘れてはならない。この一見不可解な特徴は統合された細胞系 (生体) においてのみみられる現象でもある。そして、その分子機序はいまだ手付かずのままである。

神経変性疾患の治療ターゲットとしてのトラフィッキング

さまざまな種類の神経栄養因子 (グリア細胞由来神経栄養因子: GDNF, 脳由来神経栄養因子: BDNF, インスリン様増殖因子 1: IGF-1, 肝細胞増殖因子: HGF, NGF, 血管内皮増殖因子: VEGF, 毛様体神経栄養因子: CNTF など) が有する神経細胞保護作用に関して、マウス疾患モデルを用いたさまざまな研究が進行している。特に最近、インスリン様増殖因子である IGF-1 の有する運動ニューロン保護作用が注目されている²¹⁾。多くの神経栄養因子が有する固有分子情報は、神経栄養因子がそれぞれの神経栄養因子受容体と結合した

後、その一部はエンドサイトーシスされることによりエンドソームまで運ばれ、その後エンドソーム（シグナリングエンドソーム）を介したシグナル伝達により、核を含めた細胞内全体へと伝えられる。実際、そのようなシステムが傷害されることにより、神経細胞死が誘起されることはすでに述べたとおりである（前項1. アルツハイマー病）⁷⁾。また、膜小胞トラフィックの傷害により異常タンパク質の蓄積が加速すること⁹⁾¹⁸⁾、その逆にトラフィック効率を上げることにより異常タンパク質の蓄積および神経細胞死が抑制されることも示されている（前項2. パーキンソン病）⁹⁾。したがって、多くの神経変性疾患の治療法（特に神経栄養因子補充療法）を開発するにあたり、細胞内でのエンドソーム動態・膜小胞トラフィックを正常に維持したり、また低下しているのであれば回復させることは、効率的な栄養因子シグナル伝達、正常なタンパク質生成-分解バランスを保証する意味において極めて重要であると考えられる。

お わ り に

本総説では紙面の都合上、神経細胞はその細胞独自のプログラムによってその生死が決定されているとの考えに基づき、神経細胞自体の異常についてのみ扱った。しかしながら、ALS モデル動物の研究からも明らかにされているように、神経細胞の維持・生存さらに細胞死は、神経細胞の周囲に存在するグリア細胞によっても左右されていると考えられている²²⁾。したがって、今後のトラフィックに関する研究については、膜小胞トラフィックを基盤にした細胞内での情報処理メカニズムのみならず、特定因子の分泌・取込みとそれによる細胞間コミュニケーションの分子メカニズム、およびその異常についても解析していく必要があるだろう。また、神経変性疾患の発症メカニズムに関しては、次第にその様相が明らかになりつつある。しかし、細胞内トラフィックに関連したものも含めて、多くの疾患責任遺伝子ならびに疾患関連遺伝子の発現パターンからは、各疾患に特徴的な選択的変性・細胞死を説明することはできない。神経細胞死における選択性・特異性のメカニズムは、現在の神経変性疾患研究における最大の謎であると言っても過言ではない。今後のより詳細な研究を通し

て神経変性疾患の発症メカニズムが解明され、疾患に対する新たな治療法・治療薬が開発されることを期待したい。そして、神経疾患の分子病態解析はもとより、治療法・治療薬の的確な開発・評価系としても、病徴と神経病理像を忠実に再現する新たな動物（マーマセットなど）モデルの開発を忘れてはならない。

文 献

- 1) Vale RD: The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112 (4): 467-480, 2003.
- 2) Zerial M, et al: Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2): 107-117, 2001.
- 3) Zweifel LS, et al: Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6 (8): 615-625, 2005.
- 4) Stamcr K, et al: Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156 (6): 1051-1063, 2002.
- 5) Pigino G, et al: Alzheimer's presenilin 1 mutations impair Kinesin-based axonal transport. *J Neurosci* 23 (11): 4499-4508, 2003.
- 6) Grbovic OM, et al: Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular β -cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and $A\beta$ production. *J Biol Chem* 278 (33): 31261-31268, 2003.
- 7) Salehi A, et al: Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Cell* 51 (1): 29-42, 2006.
- 8) Skibinski G, et al: Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37 (8): 806-808, 2005.
- 9) Cooper AA, et al: α -Synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313 (5785): 324-328, 2006.
- 10) Collard J-F, et al: Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 375 (6526): 61-64, 1995.
- 11) Hadano S, et al: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29 (2): 166-173, 2001.
- 12) Otomo A, et al: ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12 (14): 1671-1687, 2003.
- 13) Nishimura AL, et al: A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 75 (5): 822-831, 2004.
- 14) Soderblom C & Blackstone C: Traffic accidents: molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol Ther* 109 (1-2): 42-56, 2006.
- 15) Jablonka S, et al: Distinct and overlapping alterations in motor and sensory

neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 15 (3): 511-518, 2006.

- 16) Hafezparast M, et al: Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300 (5620): 808-812, 2003.
- 17) Pal A, et al: Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172 (4): 605-618, 2006.
- 18) Ravikumar B, et al: Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* 37 (7): 771-776, 2005.
- 19) Nixon R A: Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 26 (3): 373-382, 2005.
- 20) Scherer SS: Finding the causes of inherited neuropathies. *Arch Neurol* 63 (6): 812-816, 2006.
- 21) Kaspar B K, et al: Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301 (5634): 839-842, 2003.
- 22) Clement A M, et al: Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302 (5642): 113-117, 2003.

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

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; Cudkovic 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

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).

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

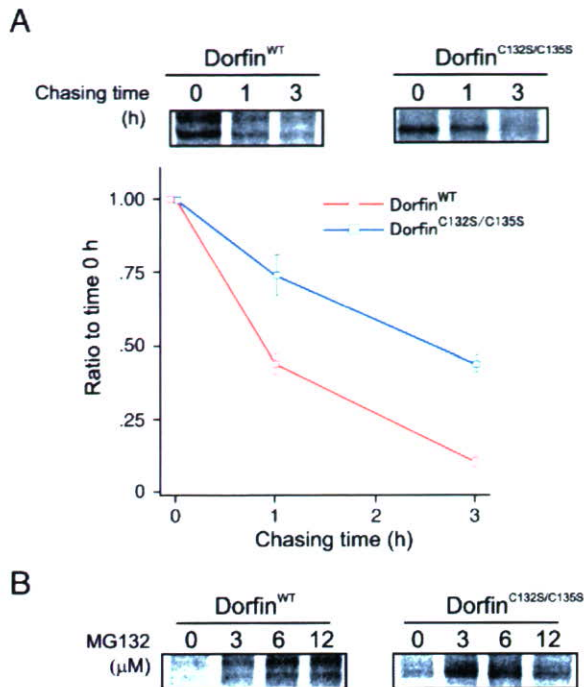


Fig. 1. Pulse-chase analysis of Dorfin^{WT} and Dorfin^{C132S/C135S}. (A) Dorfin^{WT} or Dorfin^{C132S/C135S} was overexpressed in HEK293 cells. After overnight incubation, [³⁵S]-labeled Met/Cys pulse-chase analysis was performed. Cells were harvested and analyzed at 0, 1, or 3 h after labeling and immunoprecipitation 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.

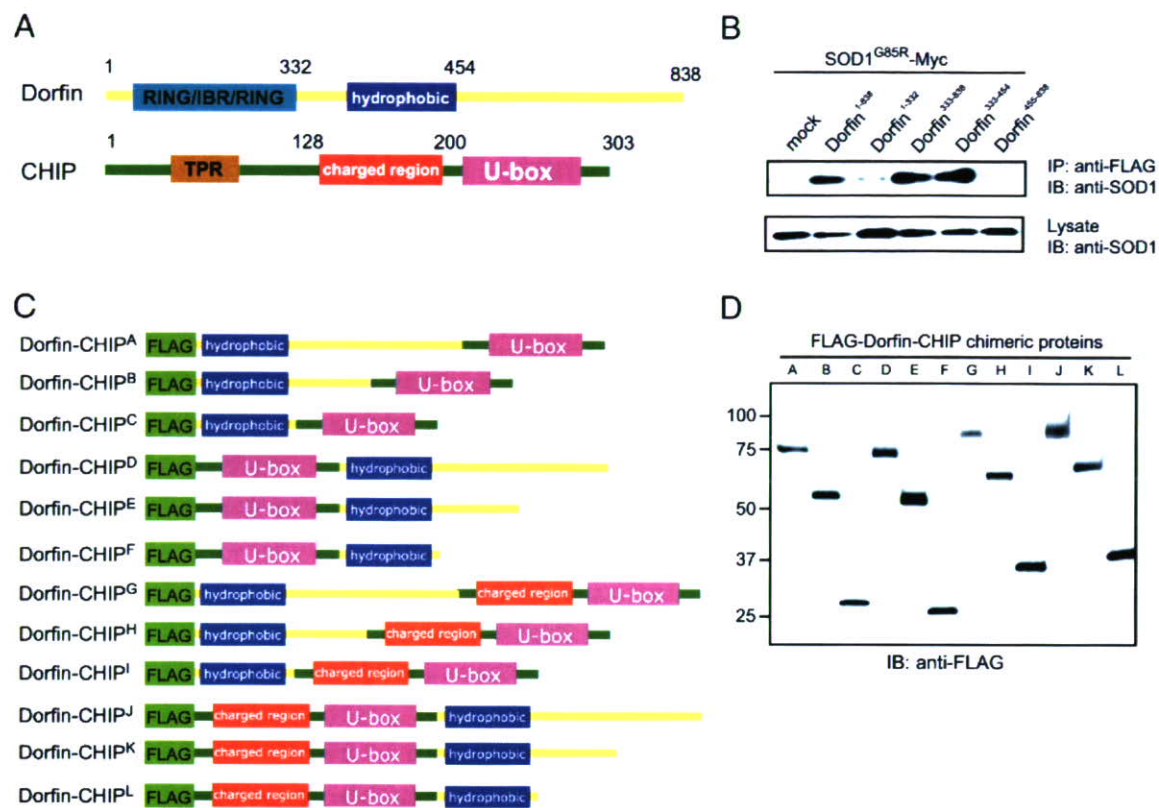


Fig. 2. Construction of Dorfin-CHIP chimeric proteins. (A) Dorfin has a RING/IBR domain in its N-terminus and a substrate-binding portion in the C-terminus. CHIP contains a TPR domain that binds to heat-shock proteins at the N-terminus; its C-terminal U-box domain has strong E3 ubiquitin ligase activity. (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 Dorfin^{333–454} bound to SOD1^{G85R}-Myc, indicating that the hydrophobic region of Dorfin (Dorfin^{333–454}) 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 (Dorfin^{333–454}) 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.

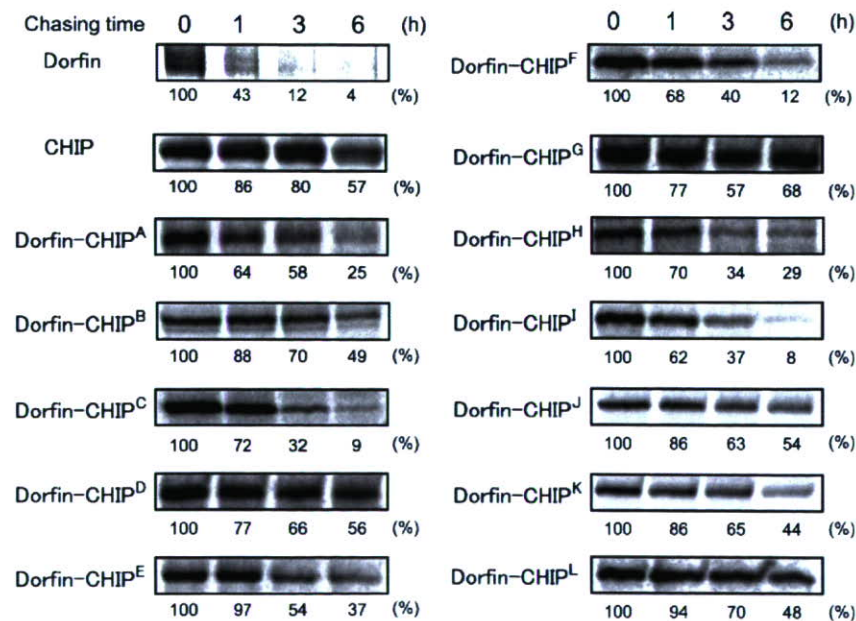


Fig. 3. The stability of Dorfin-CHIP chimeric proteins. Pulse-chase analysis using [³⁵S]-Met/Cys was performed. Dorfin, CHIP, and all the Dorfin-CHIP chimeric proteins were overexpressed in HEK293 cells and labeled with [³⁵S]-Met/Cys. Immunoprecipitation using anti-FLAG antibody and SDS-PAGE analysis 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.