

とくに初期ですと、MIBG 心筋シンチが落ちなくともおかしくはないですし、画像上何も異常がないからパーキンソン病という場合が多いです。

服部 私自身は、MSA-P がパーキンソン病との鑑別がむずかしいと思います。最初は薬剤の反応もそれなりに——劇的とはいいがたいですが、しかし1年ぐらいすると、典型的なMSA-Pの臨床像を呈するケースがあります。村田先生は、いかがですか。

村田 1年どころではなくて、たしかに途中で「L-dopaの効きがちょっとわるいな」という印象はあったようですが、4~5年診ていて5年目ぐらいになって、「小脳や脳幹が少しやせているかもしれない」となり、さらに時間が経って、MSAとして典型的な画像を呈してきた患者さんが、当院にいました。

服部 佐藤先生は、L-dopa 負荷試験などはどう思われますか？ 教科書にも書いてありますが。

佐藤 やはり重要だと思いますし、順天堂では水野美邦 名誉教授も、必ず900 mgまで増やすようにといわれます。600 mgで効かない患者さんが、900 mgで効く場合もあります。ただそれが、実はMSA-Pである場合があるのかもしれないのですが、これは診断にどこまでこだわるかというところにも関わってくると思います。

たとえばMSA-Pであっても、薬剤の効果があれば、そのあいだはパーキンソン病として治療することで、患者さんにとっては何らのデメリットもないと思います。

服部 それはそうですね。

画像診断の有用性

服部 画像診断というのは非常にむずかしいと思うのですが、最近ではPET (positron emission tomography) や、MIBGがあります。鈴木先生は、ライフワークの一つとしてイメージング・スタディをやられています。その辺りについていかがで

しょうか。

鈴木 まず一般的に広く認識されていることですが、パーキンソン病ではMIBG 心筋シンチグラフィにおける心・縦隔比(H/M比)は多くの場合低下します。一方でMSAやPSP、脳血管障害性パーキンソン症候群や本態性振戦ではほとんど低下しません。したがってパーキンソン症候群の鑑別診断にH/M比が役立つと考えられます。しかしこのような結果を示した多くの研究は各疾患群ごとの群間比較の結果であり、しかもほとんどの論文の症例はautopsy provenではないため、外来で診る個々の症例をMIBG 心筋シンチグラフィの結果だけで鑑別するのは問題があると思います。

私見ではありますが、パーキンソン症候群を呈する患者のH/M比が低い場合は、パーキンソン病と診断して本当によいか、Lewy小体型痴呆の可能性はないか、服薬の影響はないか、また検査の順序が逆転しますが心臓病の可能性はないか、などの点に注意を払う必要があります。

また脳血流SPECTも、パーキンソン症候群の鑑別に有用と考えています。大脳半球における左右差、線条体や小脳の血流代謝の変化に注目し、臨床所見と対比しながら画像をみていくことが重要です。大脳皮質基底核変性症では、大脳皮質の左右差が特徴的です。PSPではややむずかしいのですが、脳幹や前頭葉内側面における集積が低下します。MSAは症例ごとに臨床所見が多彩で初期診断はむずかしいのですが、線条体や小脳半球での集積変化に注目します。

一方ドパミン系PET検査ですが、日本ではきわめて限られた施設でしか行われておらず一般的ではありませんが、パーキンソン病では線条体におけるドパミン系プレシナプスの変化が特徴的です。被殻の後方、背外側での低下と、この変化に対応したD₂受容体のupregulationの所見が認められます。一方MSAでは、D₂は病状とともに低



服部 信孝氏

下する特徴があり、パーキンソン病とMSAではPETを用いると、かなり明瞭に鑑別可能と思われます。

以上、パーキンソン症候群の発症早期、あるいは発症前であっても、このような核医学検査を組み合わせると診断精度はより向上すると考えられます。

服部 診断の補助的手段として、MIBG単独では判断するのは危険であるが、ある程度組み合わせることで診断に有効であるといつてよいと思います。

一方、海外では、核の曝露の問題があり、あまり行うべきではないという意見もあります。しかし、診断のメリットを考えたときには、人体に悪影響を与えるか否かは、あまり大きい問題ではないと考えてよいのでしょうか？

鈴木 そうですね。そのような背景があつてのことでしょうか、transcranial sonographyによる黒質における輝度の変化にも注目が集まっています。ただこの検査が日本において普及するかどうかは、まだわかりません。その他、嗅覚試験や拡散強調画像(DWI)のMRIなども、今後パーキンソン病の鑑別診断において重要な位置を占めるかもしれません。

いずれも核を使わないので、より低侵襲、いや、

ほとんど侵襲はないと考えてよいと思います。

服部 そういったものが主要になってくるわけですね。

鈴木 そうかもしれません。

パーキンソン病の治療

服部 次に治療についてですが、これにはいろいろ意見があります。L-dopaから開始してもよいという意見もちろんありますし、ドパミン受容体刺激薬がよいという意見もあります。村田先生、ご意見をいただけますか。

村田 治療を開始するときの患者さんの重症度には相当な差があると思います。最近では、比較的パーキンソン病という名前が知られるようになったので、非常に軽い、ごくわずかに静止時振戦が出て、診察してみると軽い固縮があるという程度の患者さんから、「よく今まで我慢してきましたね」というくらいの、無動がかなり強くて、動きが非常にわるい患者さんまでおられます。ですから、治療開始時に症状がどのようなレベルかというのが、まず重要だと思います。

また、その人の必要とされる改善レベルがどれくらいなのかも重要なポイントだと思います。自宅で自分のペースで生活をすればよい患者さんと、24時間フルに働きたい患者さんとは、おのずと要求されるレベルが異なります。また、できるだけ早くある程度のレベルに改善しないと失業する恐れがあるという場合もあります。

症状の軽い患者さんであれば、ドパミン受容体刺激薬(アゴニスト)から開始するというのがよい選択だと思います。しかし、ヤール(Yahr)Ⅲ以上はもちろんです、ヤールⅢは超えていなくても、動きがそれなりにわるく早めに症状を改善したい場合はL-dopaを使つてもよいと思います。職業に関わることもありますし、パーキンソン病という診断をきいて、もう症状は改善しないと思ひ込ん

村田美穂氏



でいるような場合は、早くよくしなければ、その後の人生が変わってきてしまいます。

服部 佐藤先生は、いかがでしょうか。

佐藤 今のお話は非常に勉強になりました。私は、今までガイドラインに型通りに従い、年齢で分けて考えてしまっている部分が大きかったです。比較的若い患者さんであれば、多少動きがわるくて困っていても、必ずドパミン受容体刺激薬からはじめています。「ゆっくりよくしていきましょう」という感じでしています。一方で、最近診ている患者さんは、練馬という地域の特性なのかもしれませんが、高齢の方が多いです。高齢発症の患者さんですと、比較的軽い症状でも L-dopa からはじめています。80 歳で初発という患者さんも意外と多いのですが、この年齢であれば、wearing-off など気にせずに L-dopa から開始します。高齢発症、若年発症と年齢で型通りに分けてしまっています。

ただ、治療の dose に関しては、本人の needs を大事にしています。Yahr I で症状が軽くても、本人が動きやふるえで困るという場合には、ドパミン受容体刺激薬を増量して max dose まで増やすこともあります。L-dopa でも同様に 600 mg, 900 mg と増量していき、患者さんの needs に合った投与量を決めていきます。この点では、日本はまだまだ投与量が少ないのではないかと思います。

一方で、Yahr III ぐらいでも、パーキンソン病の患者さんはわりと薬を嫌がる方が多いものですから、絶対に薬を飲みたくないという方には、Yahr III であっても投薬しない場合もあります。

村田 パーキンソン病の患者さんは薬についてもよく勉強してこられます。とにかくできるだけ薬を飲まないというのが、その患者さんの生活信条であるならば、それはそれでよいのかもしれませんが、「L-dopa が危ない」というのをどこかで聞

いて、それに凝り固まってしまい、誤解に基づく判断である場合もかなりあると思います。

その場合は、L-dopa は使い方さえ誤らなければ決して危ないものではないということを、きちんと伝えていくことも、最初の治療として、あるいは少し時間をかけて行う初期段階の治療として、かなり重要なのではないかと思います。

服部 鈴木先生は、いかがでしょうか。

鈴木 やはり、初診時には患者さんの重症度を正確に把握することに注意を払います。また、前医をすでに受診されていて、すでに抗パーキンソン病薬が処方されていることもありますので、その点にも気をつけています。

そのほかには、運動障害の仕事への影響も重要視しています。たとえば床屋さんが、手がふるえたりしていると仕事に支障をきたしてしまいます。そういう場合には、積極的に薬を導入していきます。一方、職業上それほど問題はないのだけれども、手の安静時振戦だけの患者さんや、明らかに病初期で ADL も十分維持されている方には経過を観察することもあります。ただ現実には、この経過観察という行為は日本人はあまり好きではないようですが……。

また薬の使い方ですが、ガイドラインを参考にしながら個々の症例で勘案しています。具体的に



佐藤健一氏

はドパミン受容体刺激薬から処方するケースが多いのですが、これから神経保護作用をもつ新薬が登場してきますと、患者さんのほうからいろいろな要望が出てくると思います。

服部 薬の使い方に関しては、型通りに使うことよりも、目の前の患者さんの ADL、あるいは QOL の要求度によって、当然、変えるべきであろうと私も思います。

ただ基本的には、私もドパミン受容体刺激薬から使用します。若年性のパーキンソン病を多く診る機会があるのもその理由です。軽症例の *de novo* の症例を診ることが多いので、そういった場合ではドパミン受容体刺激薬からはじめ、それから完全に足を引きずっているという症例には、L-dopa を 150 mg や、300 mg で治療します。一般的には 300 mg が多いですが、それを使ってみて、できるだけ職業を失わないようにする、あるいは ADL を高くするために、L-dopa から使うこともあります。しかし、比率では圧倒的にドパミン受容体刺激薬から使うことが多いのが現状です。

私もやはり、村田先生のおっしゃるように、目の前の患者さんが、はたしてどういったレベルを目指しているかということに着目したいと思います。ガイドラインに従うだけでなく、患者さんの QOL も考慮して治療方法を決定してよいのでは

ないかと思います。

鈴木先生からお話しのあったドパミン受容体刺激薬の位置づけということでもう一ついえば、麦角系と非麦角系の 2 群に分けられるわけですが、おそらく次のガイドラインは、この麦角系と非麦角系においても、優先順位が出てくる可能性があるかなと思います。実際にヨーロッパでは、そういう順位をつけたガイドラインが改訂されています。村田先生、その辺りについてお考えはございますか。

村田 私達がドパミン受容体刺激薬を使いはじめたころには、麦角系による消化器症状がかなり問題になり、なかなか十分な量の投与ができず、もどかしいことがありました。非麦角系は、比較的服用しやすいという印象があります。最近、麦角系で問題になっている心臓の弁膜の障害に関しても、実際に手術をしなければならない、または心不全になってしまうという症例はきわめてまれだとは思いますが、検査で弁膜変化の頻度が高いと、長期に使う薬だけに、多少の不安はあります。

眠気に関しては、はじめ非麦角系で問題になりましたが、現時点では、麦角系と非麦角系で有意な差はないとされています。しかし、いわゆる「sleep attack」、つまり突然の眠り込み発作については、私はやはり非麦角系のほうが多いという印象をもっています。眠気を別にすれば、非麦角系のほうが使いやすいという印象はあります。

非麦角系は比較的最近に承認されたこともあり、国内での許容量が海外とほぼ同じになっています。非麦角系は、のみやすいこともあり、分量が増えてしまい、幻覚が出てしまうこともあります。使いやすい反面、それなりに効果のある薬ですから、逆からみれば副作用も出るということ、よく認識して使わなければいけないと思っています。

服部 佐藤先生、いかがでしょうか。

鈴木正彦氏



佐藤 今までの薬は麦角系のほうが多かったのですが、麦角系を飲んでいて患者さんが圧倒的に多いですね。ですから、切り替えて非麦角系に変えるケースが増えています。

服部 具体的には、どういうケースですか。

佐藤 多いのは、むくみですね。心臓弁膜症で患者さん本人が困る症状が出ることを経験したことはないのですが、浮腫で困る患者さんは意外と多いです。pramipexole の場合は眠気がわりと強いのですから、私は非麦角系が使いやすいという感じはもっていません。むしろ、麦角系のほうを多く使っていたのですが、むくみで困る患者さんに関しては、非麦角系に変えています。

非麦角系でもむくみがありますが、そうすることで本当によくなり、びっくりするぐらい浮腫がとれる方もいます。眠気の副作用さえクリアできれば、非麦角系は使いやすいので、そういう意味では、今後は第一選択になっていくのかもしれませんが。

服部 鈴木先生はいかがでしょう。

鈴木 ドパミン受容体刺激薬のきちんとした選択基準はもっていませんが、pramipexole を使うと表情が明るくなったり、うつ症状が改善する患者さんがいます。Hamilton のうつスケールもときどき記録しますが、改善度がよくわかります。pergolide については、姿勢異常に効果があるような気がします。これはパーキンソン病だけでなく、MSA でも奏効した症例を経験しました。それから私は、麦角系から非麦角系へのスイッチング (switching) は、基本的にはしていません。ただし dropped head、つまり首下がり症候群を呈したため切り替えを行った症例の経験はあります。

また近年、各種ジャーナルで取り上げられている心臓弁膜症や線維症の問題ですが、私自身は経験がありません。しかしこれは先ほど村田先生からお話がありましたが、ドパミン受容体刺激薬の

処方用量が少ないからかもしれません。今後は、こういった有害事象の出現にも注意を払っていく義務が生じてきたなと感じています。

話は少し戻って先ほどご指摘のあった pramipexole ですが、やはり眠気が問題と感じていますので、カフェインを摂取することも対策の一つになると思います。強い眠気で仕事に差し支える、運転もできない、といったことでは困りますし、突発性睡眠による交通事故などの話を聞きますとちょっと恐くなってきます。こういった患者さんには、ropinirole という薬も登場しましたので、そちらはどうだろうかというように、いろいろ試行錯誤していくことになると思います。われわれの課題としては症状に対応した適切な処方の方あり方についての議論を深めることが重要だと思います。

日本発の新しい抗パーキンソン病薬の発見

服部 それぞれのドパミン受容体刺激薬のメリットがあって、それを生かして使うことが大事だろうと思います。一方で、valvulopathy の発生率が 0.03% ぐらいだというデータもありますので、症状をきたすような心臓弁膜症はほとんどないけれども、検査をしてグレード 2 くらいになってくると、やはり使っている側も注意を払う必要

が出てきます。そういう意味では、心エコーの検査を定期的にするということが、とくに麦角系を使っている場合には大事だろうと思います。

ドパミン受容体刺激薬とは別になりますが、最近の新聞に、zonisamide という新しい薬のことが大きく報道されました。Ca, Na などのイオンチャネル系が、パーキンソン病の治療薬として新しいターゲットになるのかなと思います。

zonisamide も、抗てんかん薬ということで、この薬のもつ新しいイメージをわれわれにもたらししてくれたわけですが、村田先生、zonisamide の開発のときのお話や、メリット、デメリットについて解説していただけますか？先生はいつも、「患者さんに使ったらよかったから」ということをおっしゃいますが、droxidopa では世界の人たちにトライして駄目だったということもあります。その辺りについても、何かコメントしていただければと思います。

村田 たまたまパーキンソン病の患者さんがてんかんの発作を起こされて、その時期に、これもたまたまですが、zonisamide に神経保護作用があるという話を聞いていたので、その患者さんが、抗パーキンソン病薬と、抗てんかん薬の両方をずっと飲んでいかなければいけないのなら、「神経保護作用のあるかもしれない薬のほうがいいかな？」というぐらいの考えで飲んでいただいたのです。そうしましたら、次の外来診察日におどろくほどパーキンソン症状もよくなっていました。

それまでは、家族の方が引っ張りあげるようにしてトイレに連れて行っていたのに、一人でトイレにも、お風呂にも入れるようになったということです。「そんなことがあるのかな」と思ったのですが、たしかに、目の前の状態もよいですし、その後もその状態が持続しました。

それで少し文献を探してみましたら、すでに弘前大学精神科グループが抗てんかん薬としての zonisamide の研究の中で、線条体でドパミンを増

やすことを報告していました。私も早速、ラットに投与したところ、確かに線条体のドパミン量が有意に増加しました。それで、「これはいけるかもしれない」と思ったのです。

もともと L-dopa の血中濃度を測っていたのですが、L-dopa は非常によい薬ですが、脳内移行がわるくて、半減期が短いのが欠点です。zonisamide は、脳内移行が非常によく、半減期が長い薬です。「しかも効くのなら、すごくいいじゃない？」との思い込みがスタートでした。

半減期が長いということがわかっていたので、おそらく wearing-off の患者さんなら効果がわかりやすいと考え、飲んでいただいたらそれが的中し、それをもとに治験がはじめられ、大規模試験までいったわけです。

ドパミンを増やすということは確かです。また、中等度のモノアミン酸化酵素(MAO-B)阻害作用があるのも確かです。しかも、その MAO-B 阻害作用というのが、服用量の脳内濃度で、線条体では 50% 阻害のレベルですが、末梢での IC₅₀ が非常に高く、末梢ではほとんど作用しません。つまり、末梢での MAO-B 阻害による副作用が非常ににくい薬であるということになります。

先ほど服部先生がいわれたように zonisamide は、T タイプ Ca チャネル拮抗薬で、かつ、Na チャネルの拮抗薬です。これらのチャネルに対する作用と抗パーキンソン病作用との関係は、現在検討中です。

それらも今後明らかにしていかなければいけないのですが、今回発表をしたときに、いくつか海外から手紙をいただきました。その中に一人、restless leg 症候群に対する効果について教えてくださった先生がいました。その先生は、restless leg 症候群を伴うてんかん症例に zonisamide を投与したところ、てんかん発作はもちろんのこと、restless leg 症状も全症例で消えたということです。ドパミン刺激作用があるので効いて当然とも思い

ますが、なかなか興味深いことだと思いました。

服部 restless leg 症候群とパーキンソン病には関連性があるわけですので、それはおもしろいですね。

佐藤先生は、zonisamide はお使いになったことがありますか。

佐藤 実際には、まだパーキンソン病に対して保険が通っていないので使ってはいません。村田先生、そのいちばん最初の患者さんは、L-dopa の効果はあったのですか。

村田 効果があった患者さんです。ドパミン受容体刺激薬も効果があって、10年ぐらいの経過で、けっこう動きがわるくなっていたのです。その方は zonisamide 投与の数年前に、某アゴニストの治験に参加していただいているのですが、それよりもよかったです(笑)。

佐藤 10年の経過で、L-dopa の効果が短くなった症例で効いたというわけですね。

村田 ええ。すでにあるいろいろな薬を使って、なおうまくいかない患者さんでないと、私としても、試すことを頼めなかったですね。どの薬を飲んでも効くだろうという患者さんに、効くかどうかかわからない薬を飲んでみてくださいとはいえないですから。いろいろな薬を使っていて、もうちょっとなんとかしたいという方々に飲んでいただきました。ある一人の患者さんは、次の受診日に、「先生、お見事！」と行ってくださいました。そのくらい、はっきりよくなったのです。

佐藤 でも抗てんかん薬ですから、副作用として眠気などありますでしょうか？

村田 そうですね、ありえます。ただ、抗てんかん薬として使うとしたら 300 mg ぐらい使いますが、パーキンソン病では 25~100 mg ぐらいでかなりよいのです。

佐藤 1日の量ですか。かなり少ない量で効果があるのですね。

村田 パーキンソン病で治療中にふるえが残っ

てしまう患者さんがいますよね。そういう方で、本人が 100 mg でかなりよいので、もっと飲みたいとおっしゃって 200 mg にすると、ぜんぜん眠気もなく、ふるえは消失したというケースもけっこうありました。

服部 私の患者さんは、けっこう眠気が強くて、100 mg だったのを 50 mg にして、少しオフの時間が短くなったかなと思っています。鈴木先生は、いかがですか。

鈴木 私は使用経験がないのですが、ある程度進行された患者さんが適応になるのですね。

村田 ええ。治験は進行例を対象にしました。

鈴木 薬が入っているわけですよね。そうすると、初歩的な質問ですが、zonisamide そのものの効果なのか、あるいは相互作用、つまり L-dopa が入ったうえでの zonisamide の効果なのかなど、いろいろ考えられると思うのですが、いかがでしょうか。

村田 L-dopa や、ドパミン受容体刺激薬で治療していて、はっきり wearing-off のある患者さんの on 時間が延びているので、相互作用ということはいえるかもしれませんが、zonisamide 単独の作用がメインだと思います。

鈴木 MAO-B の……。

村田 ええ、MAO-B 阻害作用があるので、もちろん L-dopa 併用での効果があるのは確実ですが、治験のときに、たまたま 50% の患者さんが selegiline を処方されておりました。MAO-B 阻害作用は zonisamide より selegiline のほうが強いですから、selegiline を飲んでいるグループは成績がわるいかと思っていたのです。ところが、逆に selegiline グループのほうが効果がよいぐらいで、ほとんど差がないという状況でした。ですから、作用機序の生体は MAO-B 阻害作用ではないだろうと考えました。

鈴木 そうしますと積極的に使う症例はどのようなケースですか。ある程度進行した患者で、L-

dopa がすでに処方されており、しかし ADL があまり上がらないという場合に 50~100 mg を使うとよい、ということになるでしょうか。

村田 そうですね。wearing-off のある患者さんは、効果が非常にわかりやすいです。いろいろな薬を使っても残ってしまったふるえに対しても、効果が高いと思います。

L-dopa の一番の欠点は半減期が短いことで、脳内でパルス様刺激になるのですが、サルの実験データですが、zonisamide を加えると L-dopa の効果がそのまま持続するかたちになっています。ということは、初期から少量の L-dopa と併用することで、L-dopa のパルス様刺激を防ぐ、つまり、wearing-off になりにくくすることが期待されます。実は比較的初期から服用している患者さんがいらして、その患者さんがたまたまよいのかもしれないませんが、かなりよい状態を保っています。

服部 L-dopa の持続的刺激 (continuous stimulation) ということですね。

佐藤 zonisamide をたくさん使うと、ジスキネジアは出ないのですか？

村田 たくさん使うと出ると思います。

佐藤 「たくさん使う」という言い方は変ですが、何年も経っているような患者さんですと、ジスキネジアがひどくなり wearing-off も強い方が多いと思うのですが、そういう方に使うと、ジスキネジアがひどくなるということはありませんか？

村田 L-dopa を頻回に飲んでる患者さんですと、zonisamide 併用により L-dopa の服用間隔が長くなります。それで結果的に L-dopa の量が減るので、むしろジスキネジアは減ります。治験のデータでは、ジスキネジアは増えていませんでした。実は、『Neurology』に出したときに、ジスキネジアはどうなっていたのかという質問が、やはり一番多かったので、もう一度解析をしておいたのですが、増えていませんでした。

これからの治療に期待するもの

服部 zonisamide の話をさせていただきましたが、佐藤先生、これからのパーキンソン病治療薬に期待するもの、ということはいかがですか。

佐藤 期待でしたら果てしなくあります。まだまだパーキンソン病の治療は、ある意味では対症療法にすぎないですね。ですから神経保護作用など、パーキンソン病を根治する治療ができるとよいですね。

そうなってくると、ほんとうに早期診断が非常に大事になってきて、早期診断をして「これを使えば治りますよ」といえる日がくるとよいですね。治るといえることがむずかしいとしても、進行を止めることができる治療があれば素晴らしいですね。でも現実には、まだまだ厳しいかなという気がしています。

服部 鈴木先生はいかがでしょう。

鈴木 近未来的には神経保護作用のある薬剤に期待が寄せられると思います。そういった意味では、ラサジリンなどの新規 MAO-B 阻害薬なども日本で使えるとよいのではないかと思います。しかし現状では非麦角系の神経保護作用はどうでしょうか。正常コントロールとの比較試験がないので何ともいえませんが、pramipexole の SPECT データ、ropinirole の PET データでは、保護作用の可能性を示しています。これらに少し期待してもよいのかなと思っています。

個人的には、村田先生が発見された zonisamide もいろいろなよい効果が期待できそうなので、進行期の患者さんのみならず、早期から使ってもよいのかもしれないと思いました。

early sign としての non-motor 症状

服部 パーキンソン病の治療薬の開発で重要なのは、発症時には、すでに 20% ぐらいのドパミン低下が存在するわけですね。そういう意味で、

パーキンソニズムの前駆状態として、最近是非・モーター(non-motor)が注目されています。このノン・モーターが非常に重要なのは、運動症状の出現する前の early sign としての捉え方が、今後、神経保護作用というところにつながるのだろうと思っています。

村田先生、そのノン・モーターについて、治療も含めて将来的な展望はございますか。

村田 たとえば REM 睡眠行動異常症(RBD)などは、今おっしゃったノン・モーターの一つだと思います。今まで、それほどいないと思っていたのですが、聞き方が変わったのでしょうか(笑)。RBD の話などが新聞に出ますと、患者さんがご自分で気づかれます。非常に軽いパーキンソン病で、実は 5~6 年前から RBD があったというような方が、だんだんみつかってきていまして、反省しています。

現在パーキンソン病の初期症状として注目されている RBD、嗅覚障害、抑うつなどは、いずれも頻度の高い症候なので、これらのある患者さんのうち、どのくらいでパーキンソン病になるかが問題です。これらがいくつもみつかって、それらの組み合わせが早期診断につながるとよいと思います。

服部 佐藤先生は、ノン・モーターについてはいかがでしょうか。

佐藤 私はまだまだ現病歴の取り方が不十分で、パーキンソン病の early sign についてあまり聞いていません。でも病院にいる患者さんは、ある程度症状がわるくなってからの方たちです。early sign としてのノン・モーターだけのときに病院にくるということは、実際にはないですね。現時点では、それで困ることもないですし、神経保護の治療はできないのが現状です。それこそ今後、早期に診断して、神経保護の薬が使えるようになったときには、われわれ神経内科医が大々的に社会にアピールしていかなければならないのか

もしれません。

ただ、こういう神経症状の患者さんが皆、神経内科にきたら大変かもしれませんが(笑)。今後がおもしろいという感じもあります。

服部 患者さんたちがご自分で症状をチェックするセルフアセスメントツール(MASAC)を、東海大学の高橋裕秀先生と、東京歯科大学の野川茂先生と、私とで作りました。その表にはモーターとノン・モーターの両方が入っていて、インターネットでダウンロードできるようになっていますので、ぜひ使ってみてください。

鈴木先生は、いかがでしょうか。

鈴木 ノン・モーターとして重要な症候はきわめて多岐にわたりますが、うつに注目しています。これは、QOL や治療に対する満足度に影響があるからです。最近精神科の先生からうつ先行型のパーキンソン病患者さんの紹介もありますし、外来通院中に、不安や意欲の低下などの軽度のうつ状態を呈する患者さんも少なくありません。ここでの注意点ですが、必ず drug-induced をまず除外することからはじめます。

服部 うつに関していうと、パーキンソン病に特徴的なうつと申しますか、気分障害などがいわれています。村田先生はたくさんの患者さんを診察なさっていますが、いかがでしょうか。

村田 普通、パーキンソン病に伴う抑うつでは、「大うつ病」といえるようなものはまれで、パーキンソン病との診断による反応性の抑うつがかなり多いと思います。しかしまれにある、初期から大うつ病に近いようなものがあり、そのあとにパーキンソニズムを発症される患者さんは——私自身はうつの内容をコメントできるほどの力量はないのですが、治療にはきわめて難渋します。

抑うつ的であるがゆえに、パーキンソン症状がわるくみえたり、薬を服用するに当たっても不安が先に立ってしまい、十分服用できないことも多く、治療が非常にむずかしいです。当院では、精

神科の先生に抑うつをきちんと治療してただけなので、心強いです。

服部 佐藤先生のところは、いかがでしょうか。

佐藤 たしかに抗パーキンソン病薬に対して懐疑的な患者さんがいますね。私は、抑うつ患者さんに対しては、選択的セロトニン再取込み阻害薬(SSRI)をまず試しています。そういう方々の中には、L-dopaを飲みたくないといいたす方もいるのですが、入院してもらって、多めにL-dopaを使用してある程度しっかり効かせてから退院してもらおうと、本人も納得する場合があります。

バイオマーカーの開発の可能性

服部 今、ノン・モーターは早期診断のサインということで、非常に注目されています。早期診断を可能にするにはバイオマーカーを見つけることができれば一番よいわけで、進行の指標となりうるようなバイオマーカーは一つのターゲットになると思います。鈴木先生、その辺りで何かコメントはありますか。

鈴木 早期診断のバイオマーカーとしてはやはり一般的に普及しうるものが重要で、これらはすでにこれまでの話に出ています MIBG 心筋シンチグラフィ、嗅覚検査、DWI-MRI、黒質超音波などの検査や RBD などに集約されるのではないのでしょうか。これらをうまく組み合わせるのが現実的ではないかと思います。一つの検査で診断を決定するのは非常に危険です。あくまでも、コンビネーションで病態を把握することが重要と考えます。

服部 村田先生はいかがでしょう。

村田 順天堂で研究されている、 α -synucleinの定量や、尿中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)はどうか。

服部 進行期の診断には、尿中 8-OHdG はまあよいのですが、早期の診断はむずかしいです。

村田 実はいま、「プロテインファクトリー」という共同研究があって、髄液や、血液からバイオマーカーを探すということをしています、なかなかむずかしいです(笑)。

服部 佐藤先生はいかがでしょう。

佐藤 本特集の企画を練っていたときに、ほかの内科の先生から、「パーキンソン病の診断が進歩して、たとえば血液で何かわかるようになったのですか？」と聞かれたのですが、「まだまだです」と答えるしかありませんでした。一般の内科の先生から、神経内科やパーキンソン病がむずかしいといわれるのは、これが一番大きい原因なのではないかと思います。血液を採って、「陽性でしたから、この病気です」というふうには、まだいえるものがないですね。

ですから鈴木先生がおっしゃったように、いろいろなものを組み合わせて行うしかないですね。MIBG 心筋シンチグラフィもかなりよいのですが、やはりそれだけにとられるわけにはいきませんので、そういう意味では、神経内科医による臨床症状の診察が、まだまだ重要視される疾患だということでしょうね。

服部 パーキンソン病は非常に長期にわたる、生涯、薬を飲み続けなければならない難病です。一方で、難病の認定などにもまだまだ大きな問題が残っています。

われわれにできることは、患者さんたちが tax payer であり続けるための治療、つまり、働き続けられるような治療を考えていくことで、そのためにやらなければならないことがたくさんあるということも、現段階でわかっています。

神経保護の薬が現実に生まれるかどうか？ これから先生方に研究、臨床とがんばっていただいて、患者さんたちがその恩恵を得られるようになればと思います。本日は、どうもありがとうございました。

A Neural-specific F-box Protein Fbs1 Functions as a Chaperone Suppressing Glycoprotein Aggregation*

Received for publication, December 5, 2006. Published, JBC Papers in Press, January 10, 2007, DOI 10.1074/jbc.M611168200

Yukiko Yoshida^{†§1}, Arisa Murakami^{†§}, Kazuhiro Iwai^{§¶}, and Keiji Tanaka[†]

From the [†]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, [§]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), Saitama 332-0012, and the [¶]Department of Molecular Cell Biology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahi-cyo, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

Fbs1 is an F-box protein present abundantly in the nervous system. Similar to the ubiquitously expressed Fbs2, Fbs1 recognizes *N*-glycans at the innermost position as a signal for unfolded glycoproteins, probably in the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. Here, we show that the *in vivo* majority of Fbs1 is present as Fbs1-Skp1 heterodimers or Fbs1 monomers but not SCF^{Fbs1} complex. The inefficient SCF complex formation of Fbs1 and the restricted presence of SCF^{Fbs1} bound on the endoplasmic reticulum membrane were due to the short linker sequence between the F-box domain and the sugar-binding domain. *In vitro*, Fbs1 prevented the aggregation of the glycoprotein through the N-terminal unique sequence of Fbs1. Our results suggest that Fbs1 assists clearance of aberrant glycoproteins in neuronal cells by suppressing aggregates formation, independent of ubiquitin ligase activity, and thus functions as a unique chaperone for those proteins.

The SCF (Skp1/Cul1/F-box protein) complex, the largest known class of sophisticated E3² ubiquitin ligases, consists of common components, Skp1, Cul1, and Roc1/Rbx1, as well as variable components known as F-box proteins that bind the substrates (1, 2). In this complex, the scaffold protein Cul1 (alias cullin1) interacts at the N terminus with the adaptor subunit Skp1 and at the C terminus with the RING-finger protein Roc1/Rbx1 that recruits a specific ubiquitin-activating enzyme (E2) for ubiquitylation. F-box proteins, interacting with Skp1 through the ~40 amino acid F-box motif, play an indispensable role in the selection of target proteins for degradation because each distinct F-box protein usually binds a protein substrate(s) with a degree of selectivity for ubiquitylation through C-terminal protein-protein interaction domains (3). The human genome contains 69 genes for F-box proteins and a large number of F-box proteins function in the specific ubiquitylation of a wide range of substrates. The F-box proteins are divided into three classes according to the type of substrate-binding domains. The two classes of binding domains are WD40

repeats and leucine-rich repeats, which are named Fbw (or FBXW) and Fbl (or FBXL) families, respectively (4). The third class of F-box proteins is the Fbx (or FBXO) family that does not contain any of these domains.

It has been reported that a subfamily under the Fbx family consists of at least five homologous F-box proteins containing a conserved FBA motif (5, 6). Among them, Fbs1/Fbx2/NFB42/Fbg1 and Fbs2/Fbx6b/Fbg2 can bind to proteins with high mannose oligosaccharides modification that occurs in the endoplasmic reticulum (ER) (7). Experiments using a fully reconstituted system showed that both Fbs1 and Fbs2 can form SCF-type ubiquitin ligase complexes specific for *N*-linked glycoproteins (7, 8). Overexpression of the Fbs1 or Fbs2 dominant-negative form or decrease of endogenous Fbs2 by small interfering RNA resulted in inhibition of degradation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates, suggesting the involvement of SCF^{Fbs1} and SCF^{Fbs2} in the ERAD pathway. Interestingly, x-ray crystallographic and NMR studies of the substrate-binding domain of Fbs1 have revealed that Fbs1 interacts with the innermost chitobiose in *N*-glycans of glycoproteins by a small hydrophobic pocket located at the top of the β -sandwich, indicating that both Fbs1 and Fbs2 efficiently recognize the inner chitobiose structure in Man₃₋₉GlcNAc₂ glycans (9). Indeed, the introduction of point mutation into the residues in the pocket impaired the binding activity toward its glycoprotein substrates. In general, the internal chitobiose structure of *N*-glycans in many native glycoproteins is not accessible by macromolecules. Fbs1 interacted with denatured glycoproteins more efficiently than native proteins, indicating that the innermost position of *N*-glycans becomes exposed upon protein denaturation and used as a signal of unfolded glycoproteins to be recognized by Fbs1 (10).

Of the Fbs family proteins, whereas Fbs2 is distributed ubiquitously in a variety of cells and tissues, Fbs1 is expressed only in neurons (7). In considering the involvement of these F-box proteins in the ERAD pathway in general, the restricted expression of Fbs1 in neurons remains a mystery. In this study, we found that the major population of Fbs1 protein did not form the SCF^{Fbs1} complex in cells although Fbs1 is known to act as a compartment of SCF-type ubiquitin ligase (8). Moreover, the results showed that the sequence of the intervening segment between the F-box domain and the substrate-binding domain of the Fbs1 hampered the assembly of the SCF^{Fbs1} complex in the cytosol without affecting the association with Skp1. The Skp1-Fbs1 heterodimers as well as SCF^{Fbs1} complex effectively prevented the aggregation of the glycoprotein *in vitro*, and this

* This work was supported by grants from the Ministry of Education Science and Culture of Japan (to Y. Y. and K. T.). 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.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-3823-2105; Fax: 81-3-3823-2965; E-mail: yyosida@rinshoken.or.jp.

² The abbreviations used are: E3, ubiquitin ligase; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; TBS, Tris-buffered saline; RNaseB, ribonuclease B; HA, hemagglutinin.

In Vitro Chaperone Functions of Skp1-Fbs1

activity was dependent on the presence of the N-terminal domain and the substrate-binding domain of Fbs1. Our data thus imply that Skp1 and Fbs1 may function in both SCF and non-SCF complexes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Affinity Purification and Immunoprecipitation of Brain Lysate—The preparation of lysates from mouse brains and purification of Fbs1 by using a ribonuclease B (RNaseB) column were performed as described previously (10). For immunoprecipitation, we used polyclonal antibody to Fbs1 as described previously (11). For immunoblotting, we used rabbit polyclonal antibodies against Fbs1, Cull1 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) and Skp1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for Fbs1 and Skp1 blots or horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG light chain (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for Cull1 blots. Lectin blotting was performed by using horseradish peroxidase-conjugated ConA (Seikagaku-kogyo, Japan) as described previously (11).

Glycerol Gradient Analysis—The fraction eluted with 0.1 M chitobiose from the RNaseB resin was prepared from 0.5 ml of lysates (14 mg/ml) from mouse brains. The eluate was dialyzed against TBS. The resultant fraction and a 1-mg lysate of brains were used for glycerol gradient analysis. Samples and molecular weight markers (Amersham Biosciences) were fractionated by 4–17% (v/v) linear glycerol density gradient centrifugation (22 h, 100,000 × *g*) as described previously (12).

Cell Culture and Immunological Analysis—PC12 cells were grown in RPMI medium 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% horse serum and 5% fetal bovine serum. For neuronal differentiation, PC12 cells were treated with 10–20 ng/ml nerve growth factor (Invitrogen) on collagen-coated plates. 293T and HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum and were transfected as described previously (8). FLAG-tagged Fbs1 mutant vectors consisting of Fbs1 and Fbs2 fragments were generated by PCR, and those sequences were verified. Whole cell lysates were prepared with 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl (TBS) containing 0.5% Nonidet P-40. The supernatant and precipitate fractions were prepared by ultracentrifugation of the supernatant that was prepared by centrifugation of freezing-and-thawing cell lysates in TBS at 8,000 × *g* for 20 min and at 100,000 × *g* for 60 min. The precipitate fraction was solubilized with Triton X-100. Each immunoprecipitation analysis was performed for whole cell lysates or subcellular fraction of cells by using the same amount of proteins. Monoclonal antibodies to calnexin and rhodopsin were purchased from BD Transduction Laboratories and Affinity Bioreagents (Golden, CO), respectively. Antibodies to FLAG, HA, and fetuin have been described previously (8).

Pulse-chase Analysis—The expression plasmid for P23H rhodopsin was kindly provided by M. E. Cheetham (University College London). Pulse-chase experiments were performed as described previously (7). Briefly, 293T cells were transfected with 1 μg of P23H rhodopsin expression plasmid and 1 μg of FLAG-tagged Fbs1 derivatives or pcDNA3-FLAG plasmid.

Twenty-four hours after transfection, the cells were starved for 30 min and labeled for 1 h with 150 μCi of Pro-Mix L-³⁵S *in vitro* cell labeling mix (Amersham Biosciences) per milliliter. After washing, the cells were chased with complete Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with fetal bovine serum in the presence or in the absence of 50 μg/ml MG132 (Peptide Institute, Tokyo, Japan) for the indicated time intervals. After the harvested cells were lysed by TBS containing 0.1% SDS and 1% Nonidet P-40, immunoprecipitation was performed with anti-rhodopsin and FLAG antibodies.

Preparation of Recombinant Proteins and *In Vitro* Ubiquitylation Assay—The His-tagged Fbs1 ΔF, Fbs1 ΔP baculovirus were produced by Bac-to-Bac baculovirus expression system (Invitrogen). The SCF^{Fbs1}, Skp1-Fbs1 dimers, Fbs1 Fbs1 ΔF, Fbs1 ΔP, Skp1-ΔP dimers, and Fbs1 ΔN were obtained by baculovirus-infected HighFive cells as described previously (10). These proteins were purified by affinity chromatography using RNaseB-immobilized beads as a ligand and chitobiose as an eluent, and the eluates were dialyzed to 1,000 volumes of TBS three times. *In vitro* ubiquitylation assays were performed as described previously (10).

Aggregation Assay—Jack bean α-mannosidase (Sigma) was desalted using a NAP-25 gel filtration column (Amersham Biosciences) equilibrated in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). The desalted protein was lyophilized and redissolved at 21.7 μM in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) and 6 M GdnHCl as described previously (13). After denaturation for 60 min at room temperature, samples were diluted to 0.3 μM in 1 ml of TBS containing various concentrations of bovine serum albumin or recombinant Fbs1 derivatives. Protein aggregation was monitored at 25 °C over a period of 60 min by measuring absorbance at 360 nm.

RESULTS

Multiple States of Fbs1 in Brain—Fbs1 has been found in the fraction eluted with di-*N*-acetyl-D-glucosamine (thereafter referred to as chitobiose) from GlcNAc-terminated fetuin of lysates prepared from mouse brain (8). Fbs1 and Skp1 proteins were detected in the eluted fraction with Coomassie Brilliant Blue staining, but we could not detect the apparent band of Cull1. However, the formation of the SCF^{Fbs1} complex was confirmed not only by reciprocal immunoprecipitation experiments in 293T cells but also by reconstitution of baculovirally expressed recombinant SCF^{Fbs1} proteins. To address these contradictory observations, we tested whether endogenous Fbs1 in the mouse brain forms the SCF complex by examining the interaction of Fbs1 with Cull1 (Fig. 1A). Fbs1 can be easily purified by affinity chromatography using RNaseB that contains a high mannose oligosaccharide as a ligand and chitobiose as an eluent (10). Since Fbs1 contains a single binding domain toward an *N*-glycan, it seems likely that the eluted Fbs1 protein or its complex from the RNaseB-immobilized resin is free from its substrates. Indeed, the glycoproteins modified with high mannose oligosaccharides were not included in the eluates by chitobiose (Fig. 1B). Although Skp1 was effectively co-immunoprecipitated with Fbs1 from the lysate of mouse brain, the amount of Skp1 that was eluted with Fbs1 from the RNaseB resin was small (Fig. 1A). Despite the difference in the quantities of Skp1 bound to Fbs1 in the fractions between eluates from

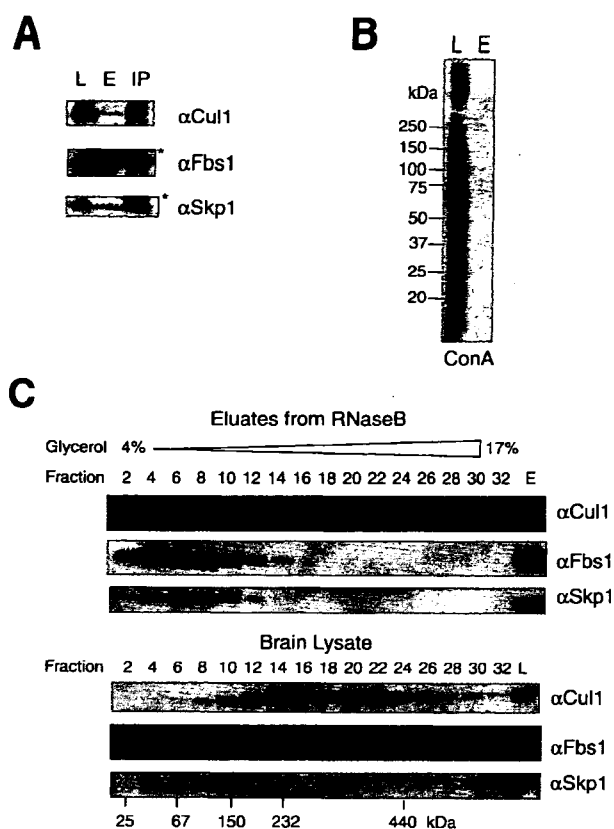


FIGURE 1. States of Fbs1 in mouse brain. A, 0.6 mg of lysate from adult mouse brain was subjected to RNaseB-immobilized affinity column and eluted with chitobiose (E) or subjected to immunoprecipitation with an antibody to Fbs1 (IP). Thirty μ g of lysate (L), one-tenth of eluate, and immunoprecipitate were analyzed by immunoblotting with antibodies to Cul1, Fbs1, or Skp1. Asterisks show Ig heavy chain (α Fbs1) and light chain (α Skp1). B, ConA lectin blot for brain lysate (L) and the eluate from the RNaseB resin (E) against the same amounts of proteins described in A. C, adult mouse brain lysate (lower panel, 0.7 mg) and lysate eluted with chitobiose from RNaseB (upper panel, started from 7 mg of the lysate) were separated by 4–17% glycerol density gradient centrifugation. One-third of each fraction was analyzed by immunoblotting with antibodies to Cul1, Fbs1, and Skp1. Molecular size markers are indicated below.

the RNaseB resin and immunoprecipitation with an anti-Fbs1 antibody, almost the same and small quantities of Cul1 were detected in these fractions. These results suggest that major populations of substrate-free Fbs1 and substrate-binding Fbs1 are present as Fbs1 monomers and Fbs1-Skp1 dimers, respectively, and the binding of substrates to Fbs1 does not influence the weak SCF complex formation.

To examine the behavior of endogenous Fbs1 in more detail, eluates from the RNaseB resin and lysates from the mouse brain were separated by a 4–17% glycerol density gradient centrifugation (Fig. 1C). The distribution of Fbs1 (~42 kDa) in the chitobiose eluates corresponded to the position of Fbs1 monomers (fraction 4) and Skp1-Fbs1 dimers (~63 kDa)(fraction 6). Although Cul1 was not detected in any fractions, the peak of Skp1 in eluates from the RNaseB resin was in the position of the Skp1-Fbs1 dimer. On the other hand, Fbs1 protein in brain lysate was detected in a broad range of fractions mainly larger than Fbs1-Skp1 dimers, indicating that most Fbs1, if not all, is associated with various glycoprotein substrates; *i.e.* Fbs1-Skp1 dimers maintain the association with glycoproteins *in vivo*. Cul1 (~90 kDa) in brain lysate was distributed broadly in

higher density fractions, indicating its association with various other SCF-components.

Minor Population of Fbs1 Forms SCF Complex on ER—We next expressed FLAG-tagged F-box proteins alone or their combination with HA-tagged Skp1 in 293T cells and immunoprecipitated with anti-FLAG and anti-HA antibodies (Fig. 2A). The expression of HA-tagged Skp1 increased the amount of exogenous F-box proteins, suggesting that Skp1 stabilizes F-box proteins (lanes 1–8). Cul1 was co-immunoprecipitated with Fbs2 and Fbg3, which are highly homologous with Fbs1, or β TrCP1/Fbw1, one of the Fbw family members (lanes 11–16). The interaction between Cul1 and these F-box proteins increased upon co-expression of Skp1. However, unlike these F-box proteins, Fbs1 was almost undetectable in the immune complex with Cul1, regardless of the overexpression of exogenous Skp1 (lanes 9 and 10), although Fbs1 was co-immunoprecipitated with Skp1 as well as other F-box proteins (lanes 18, 20, 22, and 24 in the α Flag panel). Moreover, the amount of Cul1 associated with exogenous Skp1 was lower in the presence of Fbs1 than in those of other F-box proteins, suggesting that expression of Fbs1 prevents forming other SCF complexes by dimerizing with Skp1 (lanes 18, 20, 22, and 24 in the α Cul1 panel). These results suggest that Fbs1 can strongly bind Skp1 but is weak in forming the SCF^{Fbs1} complex.

We have recently reported that Fbs1 is a cytosolic protein but that part of Fbs1 associates with the ER membrane through interaction with p97/VCP (valosin-containing protein) (11). We next examined whether the ER membrane-associated Fbs1 formed the SCF complex. Lysates of 293T and HeLa cells expressing FLAG-tagged Fbs1 were fractionated into the 100,000 \times g supernatant and precipitate fractions excluding the 8,000 \times g precipitate, and then Fbs1 was immunoprecipitated from these fractions by anti-FLAG antibody. As shown in Fig. 2B, Cul1 was co-immunoprecipitated with Fbs1 mainly from the precipitate (p) fraction (lanes 4 and 8). Although the association of Fbs1 with Skp1 occurred more effectively in the supernatant (s) fraction, the formation of the SCF complex, including Fbs1, was hardly detected in the supernatant fraction (lanes 3 and 7). Moreover, we examined whether endogenous Fbs1 formed the SCF complex in the precipitate fraction using nerve growth factor-treated PC12 cells, which endogenously express Fbs1 (14). As shown in Fig. 2C, part of Cul1 was co-immunoprecipitated with Fbs1 from the precipitate (p) fraction. These results indicate that the major population of endogenous Fbs1 is present as the Fbs1-Skp1 heterodimers or the Fbs1 monomers in the cytosol, and a minor population of Fbs1 forms the SCF complex bound on the ER membrane.

Linker Sequence of Fbs1 Prevents SCF Complex Formation—Although the SCF complex formation of Fbs1 was inefficient, Fbs2 formed the SCF complex effectively (Fig. 2A). To identify the region(s) of Fbs1 that impedes SCF complex formation, we examined the ability of various fusion proteins containing Fbs1 and Fbs2 fragments to form the complex and compared these findings with the full-length proteins in co-immunoprecipitation assay (Fig. 3A). Fbs1 Δ F was used as negative control that did not bind to Skp1 (Fig. 3B, lane 3). Fbs1 YW and Fbs1 Δ C, both of which are deficient in substrate binding, could not restore SCF complex formation, indicating that the interaction

In Vitro Chaperone Functions of Skp1-Fbs1

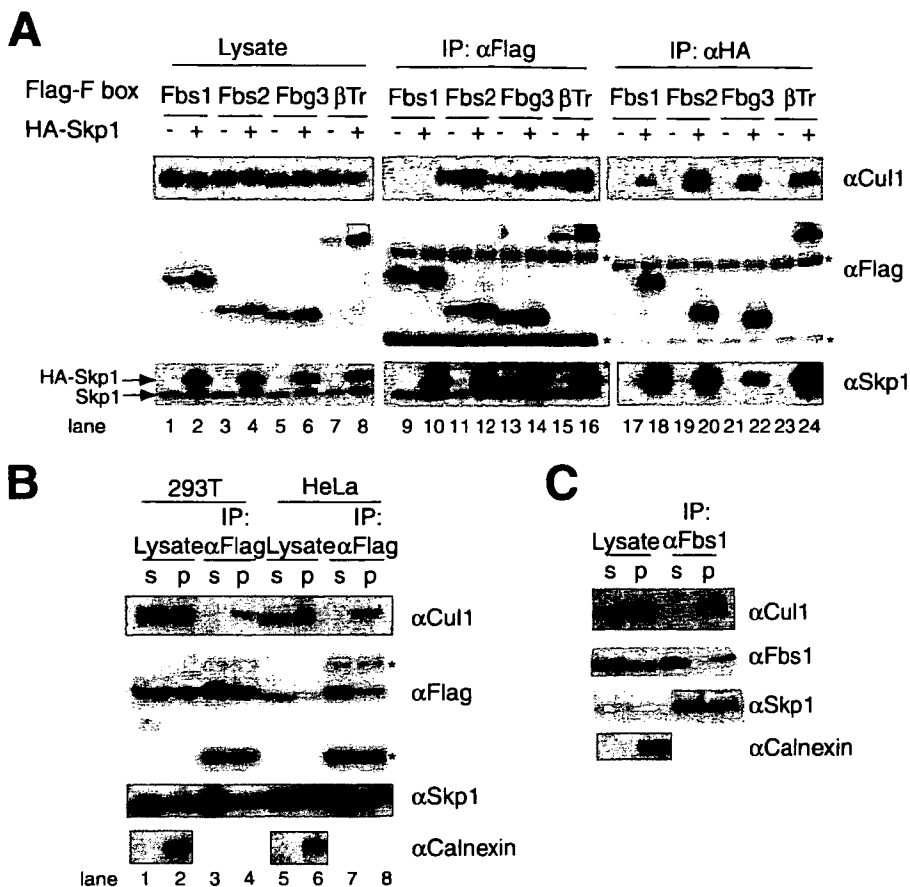


FIGURE 2. Major population of Fbs1 forms non-SCF complex in vivo. *A*, 293T cells were transfected with plasmids encoding various FLAG-tagged F-box proteins (Fbs1, Fbs2, Fbg3, and β TrCP1 (β Tr)) combination with empty HA plasmids (–) or plasmids encoding HA-tagged Skp1 (+). Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies to FLAG and HA, and lysates (15 μ g each) and one half of the resulting precipitates were analyzed by immunoblotting with antibodies to Cul1, FLAG, and Skp1. Asterisks show Ig heavy and light chains. *B*, 293T and HeLa cells were transfected with FLAG-tagged Fbs1. Cell lysates were fractionated by ultracentrifugation, and FLAG-Fbs1 was immunoprecipitated with an antibody to FLAG from the same amount of proteins of 100,000 \times *g* supernatant (s) and precipitate (p) fractions. The total amount of protein of the supernatant fraction was 2–3 times larger than that of the precipitate fraction. Lysates (15 μ g each) and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with antibodies to Cul1, FLAG, and Skp1. Asterisks show Ig heavy and light chains. To control for the fractionation, immunoblotting with an antibody to calnexin was performed. *C*, endogenous Fbs1 was immunoprecipitated with an antibody to Fbs1 from 100,000 \times *g* supernatant, and precipitate fractions of differentiated PC12 cells were treated with nerve growth factor. Lysates (15 μ g each) and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting. The immunoblotting analysis for separated supernatant and precipitate fractions was conducted as for *B*.

between Fbs1 and its substrates does not affect the complex formation (lanes 4 and 5). The N-terminal sequence of Fbs1 called the P domain is unique and is not seen in other F-box proteins, but the removal of this domain from Fbs1 or the addition to Fbs2 did not affect the complex formation (Fbs1 Δ P and Fbs2 P1: lanes 6 and 13). Exchange of the F-box domains between Fbs1 and Fbs2 caused the loss of the Skp1 binding activity, probably due to the incorrect folding (Fbs1 F2, Fbs1 Δ PF2, Fbs2 F1, and Fbs2 PF1: lanes 7, 8, 10, and 11, respectively). However, the replacement of the Fbs1 N-terminal region (which contains P and F-box domains and linker sequence) with the Fbs2 N-terminal region rescued the complex formation (Fbs-2N1C: lane 9). In contrast, the addition of the Fbs1 N-terminal region instead of the Fbs2 N-terminal region markedly reduced the activity of Fbs2 to form the SCF complex but did not affect the Skp1 binding (Fbs-1N2C: lane 12). The linker sequences of the intervening segments between the F-box domain and the substrate-binding domain showed

lower homology than other portions between Fbs1 and Fbs2, suggesting that the Fbs1 linker sequence is responsible for impeding the SCF^{Fbs1} complex formation. Indeed, only the Fbs1 mutant protein that contained the Fbs2 linker sequence could form the SCF complex, but the efficiency of the SCF complex formation was less than that of Fbs-2N1C (Fbs1 I2: lane 15). On the other hand, Fbs2 protein containing the Fbs1 linker sequence and the Fbs1 protein without its linker sequence did not seem to show the correct folding for Skp1 binding (Fbs2 I1 and Fbs1 Δ I: lanes 16 and 17). The Fbs1 mutant in which the F-box domain and the linker sequence are replaced with those of Fbs2 forms the SCF complex effectively. Thus, we conclude that the Fbs1 linker sequence between the F-box and substrate-binding domains hampers the SCF^{Fbs1} complex formation.

We next compared the localization of Fbs1, Fbs2, and the mutant Fbs1 proteins capable of forming the SCF complex: Fbs-2N1C and Fbs1 I2 (Fig. 3C). Although a minor population of Fbs1 in the precipitate (p) fraction formed the SCF complex, most Fbs2 formed the SCF^{Fbs2} complex in the supernatant (s) fraction as well as the precipitate fraction. Fbs-2N1C could form the SCF complex mainly in the supernatant fraction (Fig. 3C). Moreover, the amount of Cul1 co-immunoprecipitated with Fbs1 I2 was similar in both fractions. These results suggest that the linker sequence of Fbs1 does not only impede the formation of the SCF complex but also restricts the localization of the SCF complex bound on the ER membrane.

Expression of Mutant Fbs1 That Forms E3 Easily Induces Proteolysis of Its Substrates—To confirm that most Fbs1 in the cells is inactive to function as an E3 ubiquitin ligase, we next examined the ability of the mutant Fbs1 that readily forms the SCF complex (Fbs-2N1C) to ubiquitylate the substrates. It has been shown that P23H mutated rhodopsin (hereafter referred to as P23H) is an ERAD substrate, and its N-linked glycosylation is required for the degradation (15, 16). As reported previously, rhodopsin monomer is ~40–43 kDa, but the majority of P23H was detected as high molecular weight complex multimers by immunoblotting with anti-rhodopsin antibody (Fig. 4A). Wild-type Fbs1, but not the substrate-binding defective mutant Fbs1 YW, was able to associate with P23H effectively, suggesting that Fbs1 binds to P23H through its N-glycans. On the other hand,

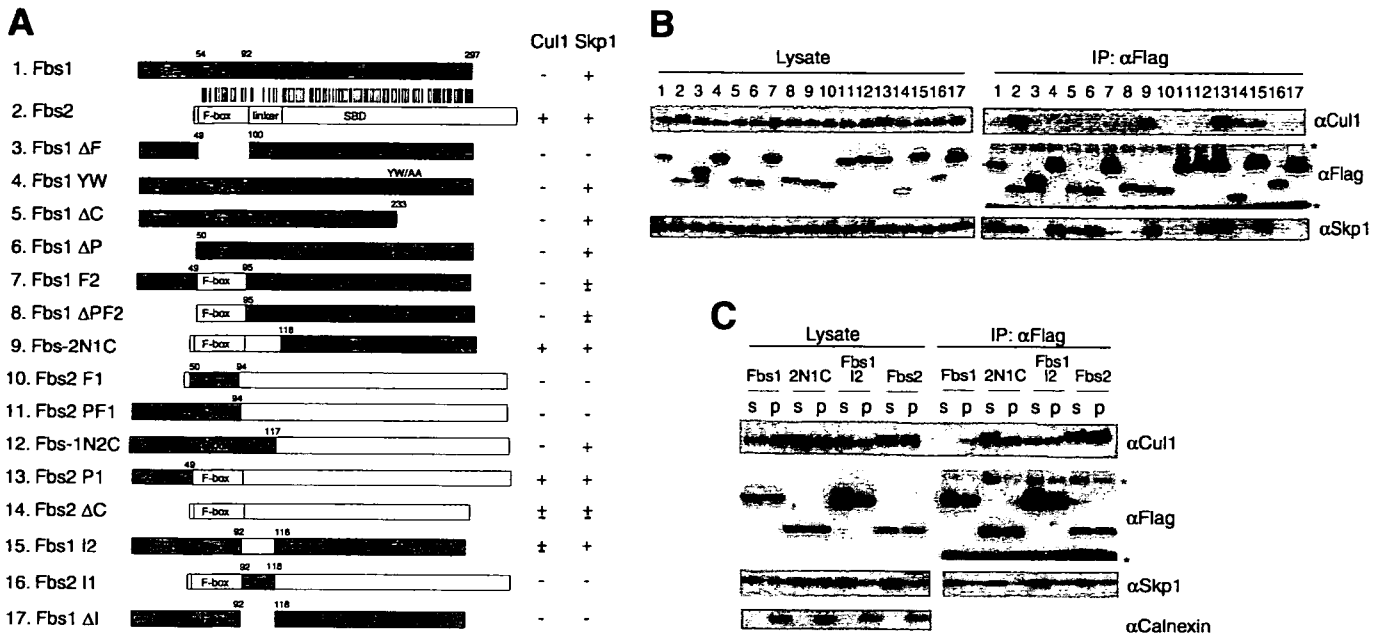


FIGURE 3. Linker sequence between F-box and substrate-binding domains of Fbs1 hampers SCF^{Fbs1} complex formation. *A*, schematic representation of constructs of fusion proteins consisting of Fbs1 and Fbs2 fragments. The fragments derived from Fbs1 and Fbs2 appear in gray and white boxes, respectively. The numbers above the constructs represent the amino acid position of Fbs1. The vertical bars represent identical amino acids between Fbs1 and Fbs2. P and F-box domains, linker sequence, and sugar-binding domain are represented by P, F-box, linker, and SBD, respectively. The binding activities of these constructs toward Cul1 and Skp1 shown in *B* are summarized on the right, with + representing strong binding, + representing weak binding, and – representing no binding. *B*, 293T cells were transfected with plasmids encoding the FLAG-tagged mutants F-box proteins represented in *A*. Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody to FLAG, and the resulting precipitates were analyzed by immunoblotting with antibodies to Cul1, Skp1, and FLAG. Asterisks show Ig heavy and light chains. *C*, 293T cells were transfected with FLAG-tagged Fbs1, Fbs-2N1C, Fbs1 I2, or Fbs2. Cell lysates were fractionated by ultracentrifugation, and FLAG-Fbs1 was immunoprecipitated with an antibody to FLAG from 100,000 × *g* supernatant (s) and precipitate (p) fractions. The resulting immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting as in Fig. 2B.

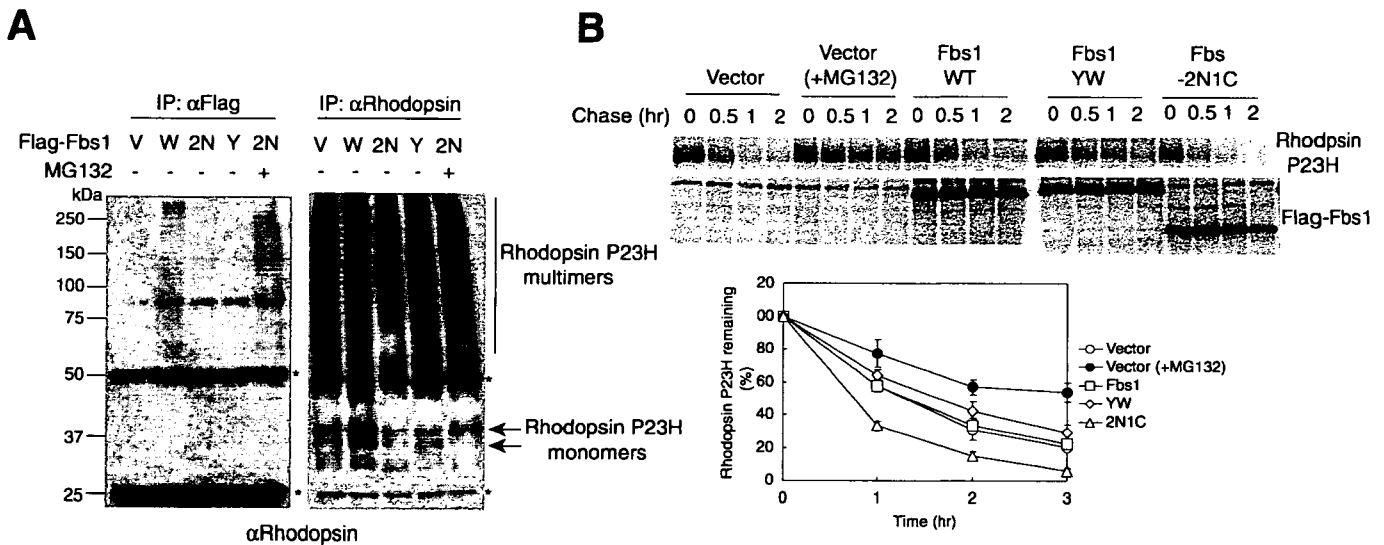


FIGURE 4. Expression of Fbs-2N1C promotes substrate degradation. *A*, 293T cells were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged empty vector (V), Fbs1 (W), Fbs-2N1C (2N), or Fbs1 YW (Y) and combination with rhodopsin P23H mutant. Some cells were treated with 10 μM MG132 for 16 h. Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with antibodies to FLAG and rhodopsin, and the resulting precipitates were analyzed by immunoblotting with an antibody to rhodopsin. Asterisks show Ig heavy and light chains. *B*, rhodopsin P23H was co-transfected with FLAG-tagged empty vector, Fbs1, Fbs-2N1C, or Fbs1 YW. Twenty-four hours after transfection, 293T cells were pulse-labeled with [³⁵S]Met/Cys for 1 h and chased for the indicated time intervals. Rhodopsin P23H and Fbs1 derivatives were immunoprecipitated with antibodies to rhodopsin and FLAG, respectively. The plotted data at the bottom show a quantification analysis of the stability of rhodopsin P23H over time in the upper panels. Data are the mean ± S.D. of three independent experiments. WT, wild type.

Fbs-2N1C could bind to P23H, although its binding to P23H seemed weaker than that of wild-type Fbs1 (Fig. 4A, left panel). Since the activity to bind RNaseB was not different between Fbs1 and Fbs-2N1C (data not shown), it seems likely that the SCF^{Fbs-2N1C} causes degradation of P23H through its ubiquitylation. Interestingly, the quantity of P23H decreased upon Fbs-

2N1C expression (Fig. 4A, right panel). It has been reported that the degradation of P23H was suppressed by MG132 treatment (15, 16). The quantities of both P23H associated with Fbs-2N1C and the P23H protein were recovered by the addition of MG132. Moreover, we performed pulse-chase analysis using 293T cells co-expressing the P23H mutant and FLAG-tagged

In Vitro Chaperone Functions of Skp1-Fbs1

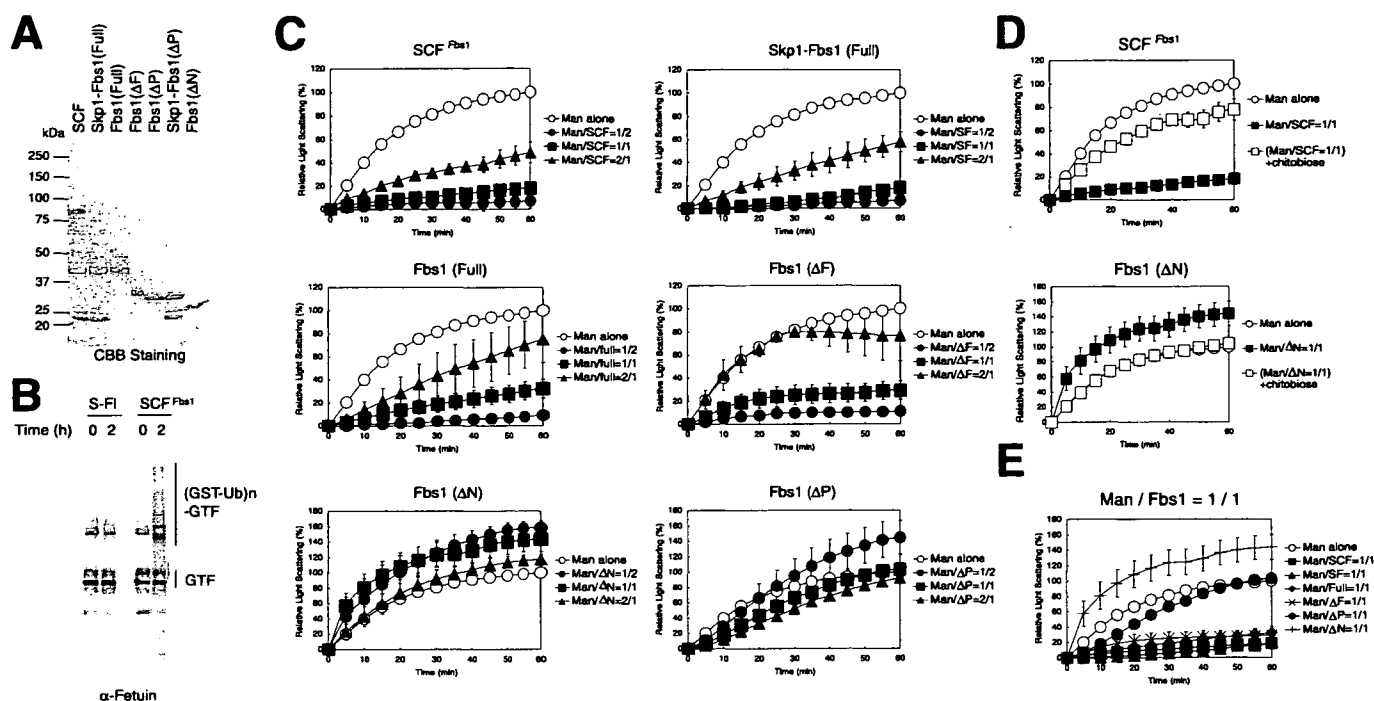


FIGURE 5. Fbs1 complexes suppress the aggregation of denatured α -mannosidase *in vitro*. *A*, electrophoretic pattern of the recombinant proteins produced by the baculovirus system. *CBB Staining*, Coomassie Brilliant Blue staining. *B*, GlcNAc-terminated fetuin (*GTF*) was incubated in a reaction mixture containing the ATP-regenerating system, recombinant ubiquitin-activating enzyme (*E1*), *Ubc4*, *GST-ubiquitin (GST-Ub)*, and *Skp1-Fbs1 dimer (S-F)* or *SCF complex (SCF)* in the presence of the *NEDD8* system at 30 °C. The high molecular mass ubiquitylated fetuin (*(GST-Ub)_n-GTF*) was detected by immunoblotting with anti-fetuin antibody. *C*, after denaturation in 6 M *GdnHCl*, α -mannosidase (*Man*) was diluted to a final concentration of 0.3 mM at 25 °C in the presence of the indicated concentrations of *SCF^{Fbs1}* (*SCF^{Fbs1}* or *SCF*), *Skp1* and *Fbs1 dimer (Skp1-Fbs1 (Full) or SF)*, *Fbs1 monomer (Fbs1 (Full) or Full)*, or *Fbs1 derivatives (ΔF , ΔN , or ΔP)*. Aggregation was measured by monitoring light scattering at 360 nm over a period of 60 min. Data are the mean \pm S.D. of at least three independent experiments. *D*, α -mannosidase was allowed to aggregate in the presence of equal mole of *SCF^{Fbs1}* or *Fbs1 (ΔN)*. 0.05 mM *N', N'*-diacetylchitobiose was added (+chitobiose), and the effects on aggregation were monitored by measuring light scattering at 360 nm. Data are the mean and standard deviation of three independent experiments. *E*, α -mannosidase was allowed to aggregate in the presence of equal mole of recombinant *Fbs1* complexes or derivatives. Data are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Fbs1 derivatives. The degradation of P23H was suppressed by MG132 treatment as reported previously (Fig. 4*B*). Although wild-type *Fbs1* or the YW mutant did not influence the kinetics of P23H degradation, co-expression of *Fbs1-2N1C* efficiently promoted its degradation. On the other hand, like wild-type *Fbs1*, *Fbs1 I2*, could associate with P23H, but its expression did not influence both the amount of P23H and the kinetics of P23H degradation (data not shown). These results demonstrate that the non-*SCF* complex of *Fbs1* can be converted to an active E3 ligase by introducing the complex-forming activity mapped onto the F-box domain and the linker sequence of *Fbs2*.

Fbs1* Suppresses Aggregation of Denatured Glycoprotein *in Vitro—We reported previously that the expression of *Fbs1* inhibits aggresome formation in *Cos7* cells (8). Furthermore, since *Fbs1* interacts with denatured glycoproteins more efficiently than native glycoproteins, we examined whether *Fbs1* functions as a molecular chaperone for glycoproteins *in vitro*. To this end, we prepared recombinant *SCF^{Fbs1}*, *Skp1-Fbs1* dimers, *Fbs1*, *Fbs1 ΔF* , *Fbs1 ΔP* , *Skp1- ΔP* dimers, and *Fbs1 ΔN* , all of which were produced by using a baculovirus system (Fig. 5*A*). To obtain highly purified recombinant proteins, we purified them by using the affinity for the RNaseB resin but not nickel resin toward His tag. The purified *SCF^{Fbs1}* but not *Skp1-Fbs1* dimers could ubiquitylate GlcNAc-terminated fetuin (*GTF*) effectively (Fig. 5*B*). We next assessed the ability of these proteins or their complexes to suppress the aggregation by

using denatured α -mannosidase that contains high mannose type oligosaccharides, a typical substrate for the glycoprotein aggregation assay (17). Although *Fbs1* alone suppressed the aggregation of denatured α -mannosidase in a concentration-dependent manner, the *Fbs1-Skp1* dimers as well as the *SCF^{Fbs1}* complex suppressed the aggregation much more effectively than *Fbs1* alone (Fig. 5*C*). Although the addition of half-molar of *Fbs1 ΔF* did not affect the aggregation of denatured α -mannosidase, ΔF was also active to suppress the aggregation at a level similar to that of *Fbs1* alone in an equal molar ratio, suggesting that the partial suppression by *Fbs1* is independent of the hydrophobic F-box domain. On the other hand, ΔN , consisting of substrate-binding domain alone, enhanced its aggregation. Both the aggregation-suppressing activity of *SCF^{Fbs1}*, *Skp1-Fbs1* dimers, or *Fbs1* and the aggregation-enhancing activity of ΔN were inhibited by chitobiose (Fig. 5*D* and not shown). In contrast, these recombinant *Fbs1* protein complexes had no effect on the aggregation of non-glycosylated proteins such as citrate synthase and luciferase (data not shown). Importantly, ΔP as well as the *Skp1- ΔP* dimers could not suppress the aggregation of α -mannosidase in an equal molar ratio (Fig. 5, *C* and *E*, and not shown). These results indicate that the *Skp1-Fbs1* dimers effectively suppress the aggregation of denatured glycoproteins by recognizing the exposed chitobiose in *N*-glycans and that the P domain of *Fbs1* is required for this aggregation suppressing activity.

DISCUSSION

The F-box family of proteins, which are the substrate-recognition subunits of the SCF ubiquitin ligase, play important roles in ubiquitin-dependent proteolysis in eukaryotes (18, 19). However, it is not clear whether all F-box proteins indeed function as receptor subunits of SCF complexes. For example, it has been reported that at least two F-box proteins, Ctf13 and Rcy1, out of 11 F-box proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, do not form SCF complexes (20–22). Since not all RING-finger proteins are ubiquitin ligases, it is possible that non-canonical F-box proteins that fail to form the SCF complex play some important roles other than ubiquitin ligase activity. In the present study, we showed that the SCF complex formation of Fbs1, which recognizes *N*-glycans, is not efficient and that the intervening segment between the F-box domain and the sugar-binding domain of Fbs1 suppresses the formation of the SCF complex. The major population of Fbs1 is present as Fbs1-Skp1 heterodimers or Fbs1 monomers, which can inhibit the aggregation of the glycoproteins. Our results show that Fbs1 contributes to a chaperone function in addition to the role of the SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase, opening new perspectives for cellular activities of F-box proteins.

Although most endogenous Fbs1 was not assembled into the SCF^{Fbs1} complex, a minor population of Fbs1 was capable of forming the SCF^{Fbs1} complex in cells. Moreover, the SCF^{Fbs1} complex could be produced in insect cells by infection with the baculovirus, indicating that Fbs1 can intrinsically form the SCF complex. It is worth noting that the SCF^{Fbs1} was mainly present in the 100,000 × *g* precipitate fraction including the microsome (Fig. 2, *B* and *C*). It is not clear why the SCF^{Fbs1} is bound to the ER membrane, although it is plausible that it plays a pivotal role in the ERAD pathway. To examine how the SCF complex formation of Fbs1 was promoted *in vivo*, we treated Fbs1-expressing cells with ER stress inducers, such as thapsigargin and dithiothreitol or a proteasome inhibitor MG132. These treatments, however, did not affect the SCF complex formation (data not shown). Furthermore, although the interaction between Fbs1 and its substrate glycoproteins did not affect the SCF complex formation (Figs. 1*A* and 3*B*), we examined the effects of overexpression of p97/VCP, Fbs1 substrates, Skp1, or Cull1. No protein other than Cull1 accelerated the SCF^{Fbs1} formation not only in the 100,000 × *g* precipitate fraction but also in the cytosol (Fig. 2*A* and data not shown). Intriguingly, whereas Fbs1 and Skp1 were mainly located in the cytosol (100,000 × *g* supernatant fraction), Cull1 was detected not only in the cytosol but also in the 100,000 × *g* precipitate fraction (Figs. 2, *B* and *C*, and 3*C*), suggesting that Cull1 is recruited to the microsome membrane where the SCF^{Fbs1} complex will be assembled to ubiquitylate efficiently the *N*-linked glycosylated ERAD substrates.

Fbs1 belongs to a subfamily consisting of at least five homologous F-box proteins that contain a conserved FBA motif in their C termini (5, 6). Among them, at least Fbs2 recognizes high mannose oligosaccharides as well as Fbs1 and forms an SCF-type ubiquitin ligase. The Fbs1 protein sequence shows highly homologous to that of Fbs2 other than the P domain of Fbs1 and C-terminal part of Fbs2, but the linker sequence

between the F-box and FBA domains shows lower homology than other portions (Fig. 3*A*). As shown in Fig. 3*B*, the difference in the ability for assembling into the SCF complex between Fbs1 and Fbs2 is ascribed to the short linker sequence (92–117 amino acids of Fbs1). Although Fbs2 formed the SCF complex efficiently in the cytosol as well as the 100,000 × *g* precipitate fraction, the SCF^{Fbs1} formation was mainly present bound on the ER membrane (Fig. 3*C*). Although it is not clear whether the linker sequence of Fbs1 prevents the SCF^{Fbs1} from being in the cytosol or causes the formation of the SCF^{Fbs1} bound on the ER membrane, this limited localization of SCF^{Fbs1} is also due to the linker sequence (Fig. 3*C*). Crystal structure and mutational analyses of Cdc4 and βTrCP1 revealed the importance of orientation and rigidity in the linker sequence between F-box and WD40 domains for their *in vivo* function (23, 24). The linker sequences of Cdc4 and βTrCP1 are longer than that of Fbs1 and form three or four helix globular domains. On the other hand, the linker sequence of Fbs1 is an unstructured domain that consists of a flexible linker loop and an α-helix and is too far from Cull1 to influence directly the SCF complex formation.³ The information of the structure of Skp1-Fbs1 suggests that the prevention of the SCF complex formation by this unstructured linker sequence can be cancelled by binding to the membrane or unidentified proteins on the ER.

In this study, we demonstrated that the Fbs1 could suppress the aggregation of denatured glycoproteins. This activity is due to the N-terminal P domain that is not seen in other F-box proteins. This N-terminal domain has been reported as a PEST sequence rich in proline, glutamic acid, serine, and threonine, which are often found in short-lived proteins (25). The N-terminal sequence in Fbs1, however, did not seem to act as a general PEST because the deletion of the P domain from Fbs1 or the addition to Fbs2 did not affect the protein stability (Fig. 3). More recently, it has been reported that U-box type E3 CHIP (C terminus of Hsc-70-interacting protein) is associated with Fbs1 through the P domain (26). Although we did not detect the E3 activity of the Skp1-Fbs1 dimers produced in the insect cells toward glycoprotein substrate GlcNAc-terminated fetuin (Fig. 5*B*), it is possible that an unknown chaperone molecule of insect cells was bound to the P domain of Fbs1. Skp1-Fbs1 dimers and Fbs1 monomers as well as the SCF^{Fbs1} complex showed activity to suppress the denatured glycoprotein aggregation, suggesting that the majority of Fbs1 is present as Skp1-Fbs1 dimers or Fbs1 monomers in cells and is not an intermediate prior to assembly of the SCF^{Fbs1} complex, but rather, a novel functional unit.

It is predicted that more than 30% of eukaryotic proteins contain substantial regions of disordered structure (27). One feature of intrinsically disordered proteins is their rapid degradation. Intracellular protein quality control, especially the degradation of proteins with aberrant structures, is thought to be important particularly in quiescent cells such as neurons (28). Fbs1 is expressed mainly in neuronal cells in the adult brain (14). Recently, it has been reported (29, 30) that loss of autophagy leads to neurodegeneration even in the absence of any

³ Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, K., unpublished data.

In Vitro Chaperone Functions of Skp1-Fbs1

aggregation-prone mutant proteins. Moreover, these reports have shown that the primary role of autophagy under normal conditions is the turnover of diffused cytosolic proteins, rather than direct elimination of inclusion bodies (29, 30). Our study suggests that Fbs1 contributes to the clearance of such cytosolic proteins by constitutive autophagy, like other chaperone systems, to suppress the aggregation of abnormal glycoproteins in neurons. For this, the N-terminal unique sequence of Fbs1, the P domain, having chaperone function, may have been made up during evolution. Since Cull1 is a common component of the SCF complexes and Fbs1 is abundant in neuronal cells, Fbs1 may also evolutionally acquire the linker sequence that suppresses the SCF^{Fbs1} complex formation to supply Cull1 toward other F-box proteins. It also seems possible that Fbs1 functions as a chaperone to keep the solubility of a particular glycoprotein(s) in the cytosol in neuronal cells. Further studies are needed to identify the Fbs1 target glycoproteins in neuronal cells, which may reveal the role of Fbs1 in maintaining homeostasis of neuronal cells.

Acknowledgment—We thank M. E. Cheetham for generously providing rhodopsin constructs.

REFERENCES

1. Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., and Deshaies, R. J. (1997) *Cell* **91**, 221–230
2. Skowrya, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1997) *Cell* **91**, 209–219
3. Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996) *Cell* **86**, 263–274
4. Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., and Harper, J. W. (2004) *Genes Dev.* **18**, 2573–2580
5. Ilyin, G. P., Serandour, A. L., Pigeon, C., Riolland, M., Glaise, D., and Guguén-Guillouzo, C. (2002) *Gene (Amst.)* **296**, 11–20
6. Winston, J. T., Koepp, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1180–1182
7. Yoshida, Y., Tokunaga, F., Chiba, T., Iwai, K., Tanaka, K., and Tai, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 43877–43884
8. Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) *Nature* **418**, 438–442
9. Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 365–370
10. Yoshida, Y. (2005) *Methods Enzymol.* **398**, 159–169
11. Yoshida, Y., Adachi, E., Fukuya, K., Iwai, K., and Tanaka, K. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 239–244
12. Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B., and Tanaka, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14336–14345
13. Paquet, M. E., Leach, M. R., and Williams, D. B. (2005) *Methods (Oxf.)* **35**, 338–347
14. Erhardt, J. A., Hynicka, W., DiBenedetto, A., Shen, N., Stone, N., Paulson, H., and Pittman, R. N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 35222–35227
15. Illing, M. E., Rajan, R. S., Bence, N. F., and Kopito, R. R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34150–34160
16. Saliba, R. S., Munro, P. M., Luthert, P. J., and Cheetham, M. E. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 2907–2918
17. Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y., and Williams, D. B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 39779–39787
18. Cardozo, T., and Pagano, M. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 739–751
19. Petroski, M. D., and Deshaies, R. J. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 9–20
20. Galan, J. M., Wiederkehr, A., Seol, J. H., Haguener-Tsapis, R., Deshaies, R. J., Riezman, H., and Peter, M. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 3105–3117
21. Kaplan, K. B., Hyman, A. A., and Sorger, P. K. (1997) *Cell* **91**, 491–500
22. Russell, I. D., Grancell, A. S., and Sorger, P. K. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 933–950
23. Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., and Sicheri, F. (2003) *Cell* **112**, 243–256
24. Wu, G., Xu, G., Schulman, B. A., Jeffrey, P. D., Harper, J. W., and Pavletich, N. P. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1445–1456
25. Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267–271
26. Nelson, R. F., Glenn, K. A., Miller, V. M., Wen, H., and Paulson, H. L. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 20242–20251
27. Fink, A. L. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 35–41
28. Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2004) *Nat. Med.* **10**, 1055–1063
29. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006) *Nature* **441**, 885–889
30. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) *Nature* **441**, 880–888

Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase

Tsunehiro Mizushima^{*†}, Yukiko Yoshida[‡], Taichi Kumanomidou^{*}, Yuko Hasegawa^{*}, Atsuo Suzuki^{*}, Takashi Yamane^{*§}, and Keiji Tanaka^{*§}

^{*}Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan; [†]Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan; and [‡]Laboratory of Frontier Science, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan

Edited by John Kuriyan, University of California, Berkeley, CA, and approved February 21, 2007 (received for review November 21, 2006)

The ubiquitin ligase complex SCF^{Fbs1}, which contributes to the ubiquitination of glycoproteins, is involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. In SCF ubiquitin ligases, a diverse array of F-box proteins confers substrate specificity. Fbs1/Fbx2, a member of the F-box protein family, recognizes high-mannose oligosaccharides. To elucidate the structural basis of SCF^{Fbs1} function, we determined the crystal structures of the Skp1–Fbs1 complex and the sugar-binding domain (SBD) of the Fbs1–glycoprotein complex. The mechanistic model indicated by the structures appears to be well conserved among the SCF ubiquitin ligases. The structure of the SBD–glycoprotein complex indicates that the SBD primarily recognizes Man₃GlcNAc₂, thereby explaining the broad activity of the enzyme against various glycoproteins. Comparison of two crystal structures of the Skp1–Fbs1 complex revealed the relative motion of a linker segment between the F-box and the SBD domains, which might underlie the ability of the complex to recognize different acceptor lysine residues for ubiquitination.

glycoprotein | tertiary structure | ubiquitin system

Ubiquitin-mediated proteolysis plays a regulatory role in a number of diverse cellular processes and involves the selective destruction of short-lived functional proteins (1). The ubiquitin–proteasome system also is responsible for the disposal of misfolded and unfolded cellular proteins, the aberrant accumulation of which usually causes cell death, which can lead to neurodegenerative diseases (2). Protein ubiquitination is catalyzed by a sophisticated cascade system consisting of the ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2), and ubiquitin-ligating (E3) enzymes (3). Among these enzymes, the E3 enzymes are responsible for the selection of target proteins. E3 enzymes are a diverse family of proteins and protein complexes. One of the best characterized groups of E3 enzymes is the SCF complex [composed of Skp1, Cull1, Rbx1 (also called Roc1), and an F-box protein], which regulates the degradation of a broad range of cellular proteins (4). F-box proteins consist of an N-terminal ≈40-aa F-box domain that binds to Skp1 and various C-terminal substrate-recognition regions and are subcategorized into three classes according to their substrate-binding domains. The Fbw (or FBXW) and Fbl (or FBXL) families possess WD40 repeats and leucine-rich repeats in their binding domains, respectively (5). The third class of F-box proteins is the Fbx (or FBXO) family, which does not contain any presumptive functional domains. However, we recently identified a subfamily within the Fbx family that consists of at least five homologous F-box proteins that recognize N-glycan; we named the sugar-binding domain (SBD)-containing proteins of this subfamily the Fbs (F-box protein that recognizes sugar chains; known previously as FBG) proteins (6).

In the SCF complex, Cull1 functions as a molecular scaffold that simultaneously interacts through its N and C termini with the crucial adaptor subunits Skp1 and Rbx1 together with a specific E2 enzyme, respectively. Skp1 is an adaptor protein that

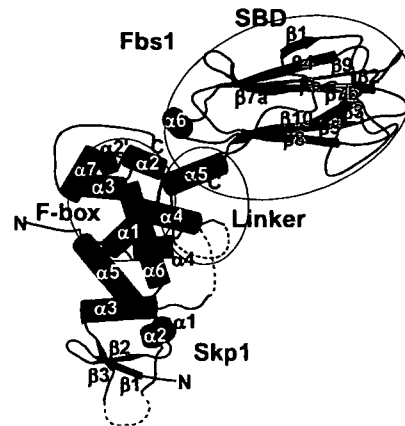


Fig. 1. Structure of the Skp1–Fbs1 complex. Skp1 and Fbs1 are colored blue and red, respectively. The secondary structure elements for Skp1 and Fbs1 are labeled. Dotted lines represent disordered regions. The F-box, linker, and SBD domains of Fbs1 are circled.

links Cull1 and one of the F-box proteins (6). Fbw and Fbl proteins usually recognize the phosphorylation status of the substrate, and structural models of the SCF complexes of some of these proteins, such as Fbw1/β-TrCP1 (7), Fbw7/Cdc4 (8), and Fbl1/Skp2 (9–11), have been reported. Structural information, however, is available only for the recognition of phosphorylated protein substrates.

N-linked glycosylation of proteins takes place in the endoplasmic reticulum and plays a key role in protein quality control (12). Misfolded proteins and unassembled protein complexes that fail to assume their functional states in the endoplasmic reticulum are subjected to endoplasmic reticulum-associated degradation, which involves retrotranslocation into the cytosol and degradation by the ubiquitin–proteasome system. SCF^{Fbs1} is an N-linked glycoprotein-specific ubiquitin ligase complex that contains the neuron-specific F-box protein Fbs1/Fbx2/NFB42 (13–16). We previously reported x-ray crystal structures of the Fbs1 SBD alone and in complex with di-N-acetylchitobiose (chitobiose, GlcNAc–GlcNAc, or GlcNAc₂), which revealed that the binding site is formed by a small hydrophobic pocket located at the top of a β-sandwich (17). The molecular mechanism

Author contributions: T.Y. and K.T. designed research; T.M., Y.Y., T.K., and Y.H. performed research; A.S. analyzed data; and T.M., Y.Y., and K.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: RNaseB, ribonuclease B; SBD, sugar-binding domain.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 2E31, 2E32, and 2E33).

[§]To whom correspondence may be addressed. E-mail: yamane@nubio.nagoya-u.ac.jp or tanakak@rinshoken.or.jp.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

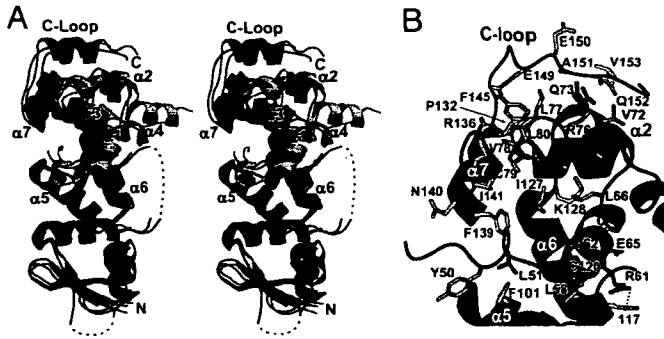


Fig. 2. Structure of the Skp1-Fbs1 interface. (A) Stereo views of the Fbs1 F-box domain (red) and Skp1 (blue) are compared with the structures of Skp1-Skp2 and Skp1- β -TrCP1. Skp1 is purple, Skp2 is green, Skp1 is orange, and β -TrCP1 is yellow. The secondary structure elements for Skp1 and Fbs1 are labeled with black and red letters, respectively. (B) Close-up view of the interface between Skp1 and Fbs1 showing intermolecular contacts. Fbs1 is red and Skp1 is blue.

underlying the ubiquitination of N-glycoproteins by the SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase, however, is unknown at present. To understand the mechanistic details of the SCF^{Fbs1}-mediated ubiquitination reaction, we determined the crystal structures of the SBD-glycoprotein and Skp1-Fbs1 complexes.

Results

Overall Structure of the Skp1-Fbs1 Complex. The Skp1-Fbs1 complex has an overall L-shaped structure with Skp1 and the Fbs1 subunits oriented $\approx 90^\circ$ to each other (Fig. 1). Skp1 and the chitobiose-binding site (17) are located at the opposite ends of

Fbs1. Fbs1 consists of four distinct domains: the PEST domain (residues 1-54), the F-box domain (residues 55-95), a linker domain (residues 96-124), and the SBD (residues 125-297). The electron densities of the N-terminal PEST domain (residues 1-47) and part of the linker domain (residues 104-108) are not visible, suggesting that these regions are flexible. Although the Skp1-Fbs1 complex was crystallized in the presence of 30 mM chitobiose, the chitobiose molecule is not visible in this structure. The F-box domain comprises four α helices, which is the same structural motif observed in the Skp1-binding domains of Skp2 and β -TrCP1 (Fig. 2A). The SBD in the Skp1-Fbs1 complex is composed of a 10-stranded antiparallel β -sandwich, and it can be superposed on the previously reported structure of SBD alone with an average rms deviation of 0.39 Å for the C α atoms, indicating that the structures are very similar. On the other hand, the C-terminal linker helix $\alpha 5$ assumes slightly different positions in the two structures because of crystal packing and the flexibility of the linker domain, which consists of $\alpha 5$ and a loop structure.

The Skp1 in the Skp1-Fbs1 complex adopts the same BTB/POZ fold (18) observed in previously reported structures of Skp1 (7-9). Interestingly, the C-terminal α -helix $\alpha 8$ of previously reported structures of Skp1 complexed with other F-box proteins is replaced with an extended structure (C loop: residues 146-155) (Fig. 2A). The differences in the secondary structure of Skp1 may reflect different roles of the protein. With the exception of the C-terminal loop, the overall structure of Skp1 is almost identical to those of the protein in the Skp1-Skp2 and Skp1- β -TrCP1 complexes (rms deviations for the C α atoms: 1.8 and 2.1 Å, respectively).

Skp1-F-Box Interface. Whereas the F-box domain of Fbs1 contains the same four-helix ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) structure seen in the domains of

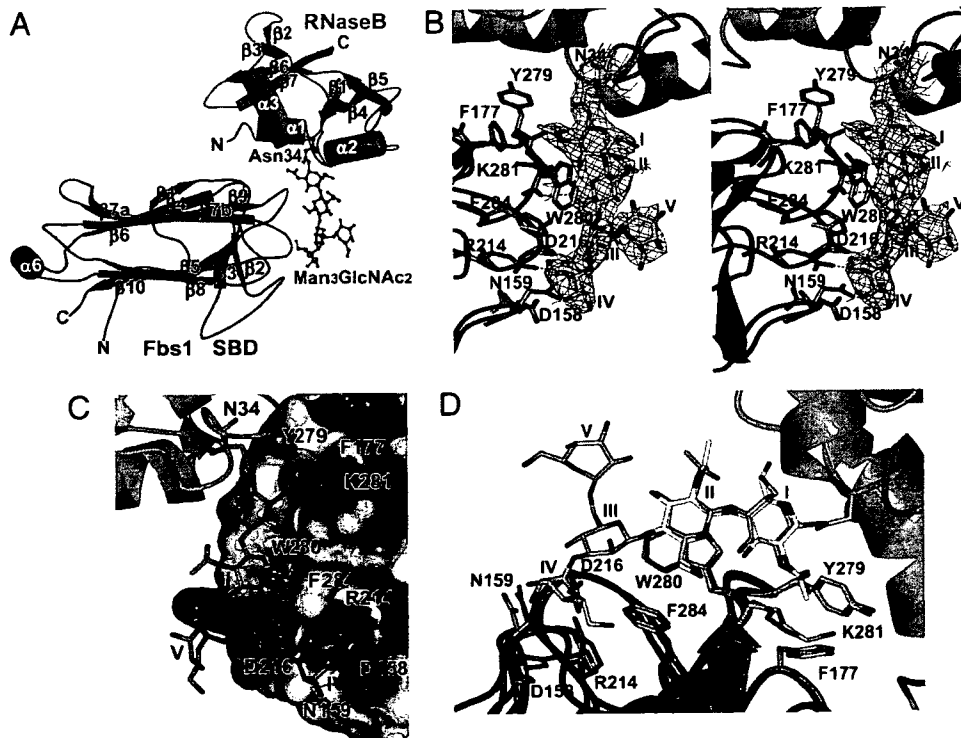


Fig. 3. Structure of the SBD-RNaseB complex. (A) The SBD is red and RNaseB is cyan. The secondary structure elements of the SBD and RNaseB are labeled. (B) Stereo view of the interface between the substrate-binding pocket of the SBD and the sugar of RNaseB. The Man₃GlcNAc₂ was modeled with the electron density map ($2F_o - F_c$ omit map of Man₃GlcNAc₂) contoured at 1.1 rms deviation. Fbs1 is red and RNaseB is cyan. (C) Surface representation of the substrate-binding pocket of the SBD bound to Man₃GlcNAc₂. The surface is colored according to the electrostatic potential of the residues (blue, positive; red, negative). (D) Comparison between the substrate-binding sites of the Fbs1 SBD (green) bound to chitobiose (yellow) and the Fbs1 SBD (red) bound to glycosylated RNaseB (cyan).