

平成 10 年度
厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括・分担研究報告書

アルツハイマー型痴呆の病態に関する研究：
 β アミロイドとプレセニリンの病因的意義の解明

主任研究者 岩坪 威 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室・教授
分担研究者 丸山 敬 東京都精神医学総合研究所分子生物部門・室長
分担研究者 西道隆臣 理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白制御
研究チーム・チームリーダー

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

アルツハイマー型痴呆の病態に関する研究：

β アミロイドとプレセニリンの病因的意義の解明

主任研究者 岩坪 威 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室教授

研究要旨

本研究は、アルツハイマー病(AD)の病態を、(1) β アミロイドペプチド(A β)の産生機構、ことにその蓄積に大きな影響を与えるカルボキシ(C)末端の形成に關与する γ -secretase の同定と作用機序の解明、(2)家族性 AD (FAD)原因遺伝子 presenilin (PS)の AD 発症における役割、特に A β 産生機構に対する影響の解明、の 2 点に絞って明らかにし、その治療法開発に指針を与えることを目的とする。昨年度は、変異 PS がアミロイドとして蓄積しやすい A β 42 分子種の分泌を増加させることを示した我々の結果をふまえ、細胞内、脳内の主要存在様式である断片型変異 PS 分子のみでは A β 42 の分泌の増強効果を持たないことを証明した。本年度はこの結果をさらに発展させ、PS 分子の最 C 末端構造が A β 42 産生に重要な役割を果たすことを実証し、また PS の機能型分子が安定化を受けた断片型分子複合体であることを示した。さらに、細胞内 A β 42 産生コンパートメントとして trans Golgi network を同定し、トランスジェニック動物脳における A β 蓄積の免疫組織化学及び神経細胞死の検討を行った。また脳アミロイド中の非 β 蛋白新規成分の同定に進捗が見られた。

分担研究者：丸山敬（東京都精神研室長）
西道隆臣（理研 BSI チームリーダー）

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の大多数は弧発例であるが、 β アミロイドペプチド(A β)、ことに第 42 残基で終わる A β 42 の蓄積によって導かれるアミロイド蓄積は、弧発例を含む全ての AD に共通する病理学的特徴である。このため A β 42 分子種の産生を抑制することは、AD の根本的治療法として、最も有望な方法の一つと考えられる。本研究においては AD の病態を、(1) A β

の産生機構、ことにその蓄積に大きな影響を与えるカルボキシ(C)末端の形成に關与する γ -secretase の同定と作用機序の解明、(2)家族性 AD (FAD)原因遺伝子 presenilin (PS)の AD 発症における役割、特に A β 産生機構に対する影響の解明、の 2 点を中心に明らかにし、その治療法開発に指針を与えることを目的とする。

B. 研究方法

(1)PS2C 末端の A β 42 産生及び機能型 PS 複合体形成における役割：断片型・全長型 PS のいずれかが A β 42 産生亢進能を持

つ機能型かを知るため、断片型 PS2 をコードする cDNA を培養細胞に発現させ、A β 分泌を検討した。さらに PS 最 C 末端に着目し、3~7 残基のアミノ酸欠損、6 残基のアミノ酸付加、最終残基 Ile448 のアルギニンへの置換などの A β 42 産生への影響を調べた。(2) γ -secretase 候補分子に関する検討 : SREBP 切断酵素欠損細胞株 M19 の A β 分泌を検討した。(3) PS 変異を有する FAD 剖検脳の免疫組織化学的検討 : 50 例以上の PS1 及び PS2 変異例剖検脳を A β C 末端特異抗体で染色し、A β 40,42 蓄積量を免疫組織化学的に検討した。(4) トランスジェニック動物脳の免疫組織学的検討 : 変異 PS1 と変異 APP 遺伝子を共発現したダブルトランスジェニック動物脳の A β 蓄積と神経細胞脱落を組織学的に検討した。(5) PS1 の細胞内トラフィックにおける役割の解明 : PS1 ノックアウト細胞を用い、APP 以外の蛋白の運搬、成熟を検討した。(6) 細胞内 A β 42 産生部位の同定 : 細胞内各コンパートメントへの局在シグナルを付加した APP 分子を発現し、A β 40,42 の分泌を検討した。(7) 脳アミロイド非 A β 成分の同定 : AD 脳の A β 以外の脳アミロイド構成蛋白を精製し、構造を解析した。

C. 研究結果

(1) PS2C 末端の A β 42 産生及び機能型 PS 複合体形成における役割 : 生体内に存在する PS 蛋白のほとんどはプロセッシングを受けた断片型蛋白である。断片型 PS2 を

コードする cDNA を培養細胞に発現させると、全長分子と異なり、A β 42 の分泌は全く増加しなかった(Tomita T et al. J Biol Chem1998)。さらに PS 最 C 末端数残基の欠如、アミノ酸付加、最終残基 Ile448 のアルギニンへの置換も A β 42 産生亢進及び断片型 PS の安定化を阻害した(1999 年 Keystone Meeting 口頭発表)。(2) γ -secretase 候補分子に関する検討 : SREBP 切断酵素欠損細胞株の A β 分泌は全く正常であった(Tomita T et al. Neuroreport 1998)(3) PS 変異を有する FAD 剖検脳の免疫組織化学的検討 : PS1 及び PS2 変異例では A β 40,42 蓄積量がともに増加していることを示した(第 6 回国際アルツハイマー病学会にて発表)。(4) トランスジェニック動物脳の免疫組織学的検討 : 変異 PS1 と変異 APP 遺伝子を共発現したダブルトランスジェニック動物脳において A β 蓄積が顕著に促進されているが、顕著な神経細胞脱落は生じていないことを示した(平成 10 年日本痴呆学会にて発表)。(5) PS1 の細胞内トラフィックにおける役割の解明 : Sisodia らとの共同研究により PS1 が APLP1, TrkA など APP 以外の蛋白の運搬、成熟に重要な機能を果たしていることを示した(Naruse S et al. Neuron, 1998)。(6) 細胞内 A β 42 産生部位の同定 : 分泌 A β 42 は A β 40 とともにトランスゴルジネットワーク以降で産生されていることを証明した。(7) 脳アミロイド非 A β 成分の同定 : AD 脳の primitive plaque を中心に大

量に蓄積する、A β 以外の脳アミロイド構成蛋白として新規の 50~100kDa 蛋白を精製・同定した。現在その cDNA クローニングを進めている(第 6 回国際アルツハイマー病学会にて発表)。

D. 考察

PS の病的機能を担うのは安定化とプロセシングを受けた断片型 PS であること、その A β 42 亢進作用には PS 最 C 末端が重要な役割を果たすことが明らかになった。最 C 末端の役割としては PS の安定化を保証する結合分子の結合部位として働く可能性、PS 分子が安定化を受けるために必要なコンフォメーションをとるのに重要な役割を果たしている可能性が考えられる。今後 PS C 末端の役割をさらに追求することにより、PS を通じた AD の発症機序と治療原理にヒントがもたらされるものと期待される。また新規に同定した 50~100 kDa アミロイド成分は、非 A β アミロイド成分の major component である可能性が高く、今後その構造と機能の追求が重要である。

E. 結論

PS の変異が A β 42 の産生を亢進させるメカニズムの追究は、AD 全般の病因解明に重要な示唆を与えるものと考えられる。今後 PS の正常・病的機能を保証する細胞内機構の解明が急務である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)Tomita T, Chang TY, Kodama T,

Iwatsubo T: β APP γ -secretase and SREBP site 2 protease are two different enzymes. *Neuroreport* 5: 911-913, 1998

2)Sakai K, Homma H, Lee J-A, Fukushima T, Santa T, Tashiro K, Iwatsubo T, Imai K: Localization of D-aspartic acid in elongate spermatids in rat testis. *Arch Biochem Biophys* 351: 96-105, 1998

3)Tokuhiko S, Tomita T, Iwata H, Kosaka T, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: The presenilin 1 mutation (M146V) linked to familial Alzheimer's disease attenuates the neuronal differentiation of Ntera 2 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 244: 751-755, 1998

4)Baba M, Nakajo S, Tu P-H, Tomita T, Nakaya K, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Iwatsubo T: Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998

5)Iwatsubo T: A β 42, presenilins, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19: 11-13, 1998

6)Iwatsubo T: Amyloid β protein in plasma as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19: 161-163, 1998

7)Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K,

- Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y: Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid β -protein ($A\beta$)₄₂ in the brain. *J Neurochem* 71:313-322, 1998
- 8)Shinozaki K, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Tomita T, Iwatsubo T, Obata K: The presenilin 2 loop domain interacts with the μ -calpain C-terminal region. *Int J of Mol Med* 1: 797-799, 1998
- 9)Tomita T, Tokuhiko S, Hashimoto T, Aiba K, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides: Inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of $A\beta$ ₄₂. *J Biol Chem* 273: 21153-21160, 1998
- 10)Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Abe K, Iwatsubo T, Kosaka T, Watanabe M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Mizushima K, Nakamura T, Igeta Y, Ikeda Y, Amari M, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K, Okamoto K, Hirai S, Shoji M: Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, $A\beta$ ₁₋₄₀ and $A\beta$ ₁₋₄₂₍₄₃₎ in Alzheimer's disease: A study in Japan. *Ann Neurol* 44: 17-26, 1998
- 11)Takigawa Y, Homma H, Lee J-A, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Imai K: D-aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. *Biochem Biophys Res Comm* 248: 641-647, 1998
- 12)Mann DMA, Pickering-Brown SM, Baba M, Iwatsubo T: Amyloid β protein ($A\beta$) deposition in dementia with Lewy bodies: predominance of $A\beta$ ₄₂₍₄₃₎ and paucity of $A\beta$ ₄₀ compared with sporadic Alzheimer's disease. *Neuropathol Applied Neurobiol* 24: 187-194, 1998
- 12)Tu P-H, Galvin JE, Baba M, Giasson B, Tomita T, Leight S, Nakajo S, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α -synuclein. *Ann Neurol* 44: 415-422, 1998
- 13)Long Z, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Yamada R, Imai K: Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Lett* 434:231-235, 1998
- 14)Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T, Lee VM-Y: Fatal attractions: Abnormal

protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell Death and Differentiation* 5: 832-837, 1998

15) Sakai K, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Tashiro K, Iwatsubo T, Imai K: Emergence of D-aspartic acid in the differentiating neurons of the rat central nervous system. *Brain Res* 808: 65-71, 1998

16) Lippa CF, Fujiwara H, Mann DMA, Giasson B, Baba M, Schmidt ML, Nee LE, O'Connell B, Pollen DA, St George-Hyslop P, Ghetti B, Nochlin D, Bird TD, Cairns NJ, Lee VM-Y, Iwatsubo T, Trojanowski JQ: Lewy bodies contain altered α -synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am J Pathol* 153:1365-70, 1998

17) Hosoda R, Saido TC, Otvos LJr, Arai T, Mann DMA, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Iwatsubo T: Quantification of modified forms of amyloid β peptides in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1089-1095, 1998

18) Naruse S, Thinakaran G, Luo J-J, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS: Effects of PS1

deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 17:181-190, 1998

19) Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubo T, Yokota T, Ogawa M, Arita M, Aoki J, Arai H, Inoue K: Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci Lett* 256:159-162 1998

20) Iseki E, Marui W, Kosaka K, Akiyama H, Ueda K, Iwatsubo T: Degenerative terminals of the perforant pathway are human α -synuclein-immunoreactive in the hippocampus of patients with diffuse Lewy body disease. *Neurosci Lett* 258:81-84, 1998

21) Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, la Pompa JL, Furlonger K, Paige C, Hui Cc, Fischer KD, Kishimoto H, Iwatsubo T, Katada T, Woodgett JR, Penninger JM Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 126:505-516, 1999

G. 知的所有権の取得状況

とくになし

分担研究報告書

プレセニリン結合蛋白質の解析

分担研究者

丸山 敬 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・助教授

研究要旨

従来より申請者は、培養細胞系を用いてアルツハイマー病アミロイド蛋白質 (APP) の代謝や presenilin (PS) との関連を調べてきた。アルツハイマー病の病因として $A\beta 40$ と $A\beta 42$ の違いが注目されている。PS が報告されて以来、その cDNA を PCR 法によって得て、培養細胞での発現実験を行い、疾患関連変異を持った PS 2 を COS 細胞で APP と共発現させると、また、APP を発現している Neuro 2a 細胞に発現させると、 $A\beta 42$ の比率が増大することを見いだした。以上の研究をふまえて、APP や PS の生理機能の研究のために two-hybrid 法によって結合タンパク質のスクリーニングを開始し、PS 2 のループ領域と μ カルパインの C 末側が結合することを見いだした。この結合は COS 細胞での共発現と免疫沈降でも確認された。本年度は、カルパイン活性に及ぼす PS 効果やカルパインによる PS のプロセッシングを検討した。

研究方法及び結果

1 : PS によるカルパインの活性抑制

COS 細胞でカルパインを過剰発現して、カゼインの分解を指標に、その蛋白質分解活性を測定することを可能とした。この系で、PS を共発現すると、カルパイン活性が抑制される傾向が見られた。カルパインには、相同性は高いが活性に必要なカルシウム濃度が異なる m-カルパインと μ -カルパインがある。two-hybrid 法で確認された結合は、PS 2 と μ -カルパインのみのものであったが、カルパイン活性の抑制に関しては、PS 1 も PS 2 も、m-カルパインと μ -カルパインそれぞれに対して観察され

た。PS の抑制効果は、共発現 (cDNA を同時に同じ培養細胞に遺伝子導入させて発現させる) 条件だけではなく、それぞれの cDNA を別個に発現させて、その細胞抽出液を加える条件でも観察された。

2 : PS のプロセッシングに及ぼすカルパインの影響

PS は細胞内で N 末断片と C 末断片に切断されることが、アルツハイマー病の病態やその生理作用に重要であると考えられている。PS の代謝をイムノプロットで検討したところ、カルパインを加えると PS 1 に新たな断片が出現した。

PS 結合タンパク質として、 β カテ

ニンが報告され、最近では新規のカルシウム結合性タンパク質 calsenilin が見いだされ、カルシウム制御機構とPSの関係が示唆されている。カルパインも細胞内の重要なカルシウム受容タンパク質であり、本研究の結果から、PSの生理機能やアミロイド形成に関する分子機構の解明への寄与が期待される。

研究業績

1. Shinya Tokuhiko, Taisuke Tomita, Hiroshi Iwata, Takuo Kosaka, Takaomi C. Saido, Kei Maruyama and Takeshi Iwatsubo.

The Presenilin 1 mutation (M146V) linked to familial Alzheimer's disease attenuates the neuronal differentiation of NTera cells. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 751-755

2. Fumitaka Oyama, Naoya Sawamura, Kimio Kobayashi, Maho Morishima-Kawashima, Takashi Kuramochi, Mamoru Ito, Taisuke Tomita, Kei Maruyama, Takaomi C. Saido, Takeshi Iwatsubo, Anja Capell, Jochen Walter, Juergen Grueberg, Yoshito Ueyama, Christian Haass, and Yasuo Ihara

Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid β -protein 42 in the brain. (1998) *J. Neurochem.* 71, 313-322

3. Taisuke Tomita, Shinya Tokuhiko, Tadafumi Hashimoto, Keiko Aiba, Takaomi C. Saido, Kei Maruyama and Takeshi Iwatsubo

Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 21153-21160

4. Hideaki Kume, Kei Maruyama, Kohki

Shinozaki, Hiroko Kuzume and Kunitiko Obata

Phosphorylation and spatiotemporal distribution of KW8 (NDRF/NeuroD2), a NeuroD family basic helix-loop-helix protein.

(1998) *Mol. Brain Res.* 60, 107-114

5. 魚住 拓也, 丸山 敬
プレセニリンの分子生物学

(1998) *Molecular Medicine* 35, 1440-1450

分担研究報告書

β アミロイド蓄積の免疫化学的解析

分担研究者 西道隆臣

理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白制御研究チーム

研究要旨

アルツハイマー病の発症機構は不明の点が多いが、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリンの病理作用を解析することによって、 β アミロイド蓄積が発症過程に本質的に関与することが明らかになった。

A. 研究目的

アルツハイマー病における因果関係を検討するに当たっては、いかなの問題点を伴う。[1] 人間と同等の動物モデルが存在しない。[2] 病理学的な変化を非破壊的に観測することが不可能である。[3] 病気の原因と結果の間の時間的ギャップが大きいため、因果関係の検討が困難である。[4] 孤発性ADは老化と密接に関連するが、発症年齢等において個人差が大きい。これらを解決する手段として、数は少ないが遺伝的原因の同定されたものにおける発症メカニズムを検討することが有効である。そこで、家族性アルツハイマー病における主要な原因遺伝子であるプレセニリンの作用を検討した。

B. 結果

まず、実際の患者由来の脳について病理学的解析を行ったところ、プレセニリンの変異を伴う家族性アルツハイマー病患者では、孤発性の患者に比べて、脳内の各部位において、蓄積性 β アミロイドペプチド(A β 42)がより

顕著に蓄積していることが判明した。

また、細胞生物学的にプレセニリン変異を導入した培養細胞や、発生工学的に作成したトランスジェニック動物においても、A β 42の産生が上昇していることが確認された。さらに、プレセニリンと特異的に相互作用する細胞内カルシウム結合蛋白も同定した。

D. 考察

3つの独立した遺伝子座に存在するアミロイド前駆体蛋白質 (APP: Amyloid Precursor Protein)・プレセニリンI・プレセニリンIIにおける病原性突然変異のいずれもが、蓄積性 β アミロイドペプチド(A β x-42)の産生を上昇させることが明らかになった。これらの作用が偶然である可能性はきわめて低く、 β アミロイド蓄積が痴呆に至るカスケードの主要経路であるとする「 β アミロイド仮説」がほぼ実証されたといつてよい。さらに、プレセニリンと特異的に相互作用する細胞内カルシウム結合蛋白については、

今後さらに検討を加えたい。

E. 結論

以上の結果から、家族性アルツハイマー病における A β の蓄積機構については、かなり明らかになったが、孤発性においては、A β 産生の上昇は希であり、蓄積の原因は全く不明である。孤発性アルツハイマー病は、全患者数の大半（9割以上）を占める上に、平均寿命の上昇に伴って増加する（家族性 AD は基本的に総人口に比例するのみである）。したがって、孤発性アルツハイマー病における A β 蓄積機構が、今後に残された大きな課題である。我々は孤発性アルツハイマー病に至る β アミロイド蓄積の鍵を握るものとして、 β アミロイド分解システムに着目している。今後、この検討にも力を入れたい。

F. 研究発表

1. Saido, T.C. (1998). Alzheimer's disease as proteolytic disorders: Anabolism and catabolism of β -amyloid. *Neurobiol. Aging*, 19, S69-S75.
2. Tekirian, T.L., Saido, T.C., Markesbery, W.R., Russell, M.J., Wekstein, D.R., Patel, E., Geddes, J.W. (1998). Amino terminus heterogeneity of Parenchymal and Cerebrovascular β -amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 76-94.

3. Sorimachi, Y., Harada, K., Saido, T.C., Ono, T., Kawashima, S., Yoshida, K. (1997). Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J. Biochem.* 122, 743-748.
4. Inomata, M., Nomura, K., Takehana, M., Saido, T.C., Kawashima, S., Shumiya, S. (1997). Evidence for involvement of calpain in the cataractogenesis in Shumiya Cataract Rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1362, 11-23.
5. Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Saido, T.C., Perl, D., Schuck, T., Iwatsubo, T., Trojanowski, J.Q. (1998). Amyloid plaques in Guam ALS and Parkinsonism-dementia complex contain species of A β similar to those found in the amyloid plaques of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, in press.
6. Oyama, F., Sawamura, N., Kobayashi, K., Morishima-Kawashima, M., Kuramochi, T., Ito, M., Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Iwatsubo, T., Capell, A., Walter, J., Grunberg, J., Ueyama, Y., Haass, C., Ihara, Y. (1998). Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Effect on an age-dependent increase of amyloid β -protein (A β)₄₂ in brain. *J. Neurochem.*, 71, 313-322.
7. Frautschy, S.A., Yang, F., Irrizarry,

- M., Hyman, B., Saido, T.C., Hsiao, K., Cole, G.M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, 152, 307-317.
8. Tokuhira, S., Tomita, T., Iwata, H., Kosaka, T., Saido, T.C., Maruyama, K., Iwatsubo, T. (1998). The presenilin 1 mutation (M146V) linked to familial Alzheimer's disease attenuates the neuronal differentiation of Ntera 2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 244, 751-755.
9. Shinozaki, K., Maruyama, K., Kume, H., Tomita, T., Saido, T.C., Iwatsubo, T., Obata, K. (1998). The presenilin 2 loop domain interacts with the μ -calpain C-terminal region. *Int. J. Mol. Med.*, 1, 797-799.
10. Sudoh, S., Kawamura, Y., Sato, S., Wang, R., Saido, T.C., Oyama, F., Sakaki, Y., Komano, H., Yanagisawa, K. The presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease elevate a production of N-terminally truncated A β 42 variant, A β 11-42, which is generated through distinct processing pathway from A β 1-42. (1998). *J. Neurochem*, 1535-1543.
11. Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T.C., Ito, Y., Yokofujita, J., Odaka, R., Ihara, Y. (1998). Astrocytes containing amyloid β -protein (A β)-positive granules are associated with A β 40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am. J. Pathol.*, 152, 983-992.
12. Kimura, Y., Koga, H., Araki, N., Mugita, N., Fujita, N., Takeshima, H., Nishi, T., Yamashima, T., Saido, T.C., Yamasaki, T., Moritake, K., Saya, H., Nakao, M. (1998). The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Med.*, 8, 915-922.
13. Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T.C., Beckmann, J.S., Ishiura, S., Suzuki, K. (1998). Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with Limb-Girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.*, 273, 17073-17078.
14. Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T.C., Ihara, Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol.*, 95, 217-222.
15. Meredith, J.Jr., Mu, Z., Saido, T.C., Du, X. (1998). Cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin β 3 subunit during endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273, 19525-19531.

16. Akiyama, H., Mori, H., Saido, T.C., Kondo, H., Ikeda, K., McGeer, P.L. (1998). Occurrence of the diffuse deposits with numerous amyloid β -protein(A β)-containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Glia*, in press.
17. Tomita, T., Tokuhira, S., Hashimoto, T., Aiba, K., Saido, T.C., Maruyama, K., Iwatsubo, T. (1998). Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides. *J. Biol. Chem.*, 273, 21153-21160.
18. Frautschy, S.A., Horn, D.L., Sigel, J.J., Harris-White, M.E., Mendoza, J.J., Yang, F., Saido, T.C., Cole, G.M. (1998). Protease inhibitor coinfusion with amyloid β -protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain. *J. Neurosci.*, 18, 8311-8321.
19. Hiwasa, T., Nakamura, Y., Ozaki, T., Kondo, K., Saido, T., Nakagawara, A. and Sakiyama, S. (1998). Down-regulation of protein kinase C α and γ and enhanced TPA-induced neurite formation in DAN-transfected neuroblastoma cells. *FEBS Lett.*, 440, 25-28.
20. Ishidoh, K., Saido, T.C., Kawashima, S., Hirose, M., Watanabe, S., Sato, N., Kominami, E. (1998). Multiple processing of procathepsin L to cathepsin L *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 202-207.
21. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Saido, T.C., Ohtuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Mabuchi, T., Yanagihara, T., Hori, M. (1999). Species differences in fodrin proteolysis in the ischemic brain. *J. Neurosci. Res.*, in press.
22. Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Merchen, M., Takahashi, H., Murayama, O., Murayama, M., Sato, K., Omori, A., Tsubuki, S., Saido, T.C., Takashima, A. (1999). Dual roles of proteasome in the metabolism of presenilin 1. *J. Neurochem.*, 72, 255-261.
23. Hosoda, R., Saido, T.C., Otvos, L.Jr., Arai, T., Mann, D.M.A., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Iwatsubo, T. (1998). Quantitation of modified amyloid β peptides in Alzheimer disease and down syndrome brains *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 1089-1095.
24. Yokota, M., Tani, E., Tsubuki, S., Yamaura, I., Nakagaki, I., Hori, S., Saido, T.C. (1999). Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage. *Brain research*, 819, 8-14.
25. Kubo, H., Matsushita, M., Kotani, M., Kawasaki, H., Saido, T.C., Kawashima, S., Katagiri, C., Suzuki, A. (1999). Molecular basis

for oviductin-mediated processing from gp43 to gp41, the predominant glycoproteins of *Xenopus* egg envelopes. **Dev. Genet.**, in press.

26. Eto, A., Saido, T.C., Fukushima, K., Tomioka, S., Imai, S., Nishizawa, T., Hanada, N. (1999). Inhibitory effect of a self-derived peptide on glycosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Possible novel anticaries measures. **J. Biol. Chem.**, in press.

27. Ray, S.K., Shields, D.C., Saido, T.C., Matzelle, D.C., Wilford, G.G., Hogan, E.L., Banik, N.L. (1999). Calpain activity and translational expression increased in spinal cord injury. **Brain Res.**, in press.

28. Nakagawa, Y., Nakamura, M., McIntosh, T.K., Rodriguez, A., Berlin J.A., Smith, D.H., Saatman, K.E., Raghupathi, R., Clemens, J., Saido, T.C., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (1999). Traumatic brain injury in young PDAPP transgenic mice induces marked ipsilateral hippocampal atrophy and diminished A β deposition during aging. **J. Comp. Neurol.**, in press.