

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 駒野宏人

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析	1
駒野宏人	
II. 分担研究報告書	
1. アミロイド $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) 産生酵素の解析	7
駒野宏人	
2. $\beta$ 老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析	10
西道隆臣	
3. アミロイド $\beta$ 蛋白前駆体結合蛋白の解析に関する研究	14
鈴木利治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	20

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析

主任研究者 駒野宏人 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部室長

研究要旨 老化に伴い、脳内に生じるアミロイド蛋白(A $\beta$ )がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる A $\beta$ の急激な増加に着目し、その増加機構を明らかにすることを目的とし、A $\beta$ 産生系分解系に関与する分子についてそれぞれ同定を行った。その結果、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を高めることによって A $\beta$ 産生を促進する cDNA が同定され、また、A $\beta$ 分解酵素として neprilysin と呼ばれるペプチターゼの関与が示された。さらに、APP 結合蛋白として同定された X11L が転写因子 NF- $\kappa$ B を介して、A $\beta$ 産生をあげることが明らかとなった。

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 チームリーダー
鈴木利治	東京大学 大学院薬学系研究科 助教授

し、その増加機構を明らかにすることを目的とする。生体内の A $\beta$ 量は、A $\beta$ の産生量と分解量によって決まるが、老化に伴う A $\beta$ の変動が、生体内で産生系分解系のどちらの変動によっておきているのかは明らかとなっていない。老化に伴う A $\beta$ 量の急激な増加について、その原因を分子レベルで解析するため、初年度は、A $\beta$ の産生系および分解系に関与する分子について同定することを目的とした。

A. 研究目的

老化に伴い、50 歳代からヒトの脳内に A $\beta$  がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。A $\beta$ は細胞毒性があり、A $\beta$ の増加は老化に伴う脳機能の低下の要因の一つと思われる。また、老人斑として知られる A $\beta$ の異常蓄積は、アルツハイマー病の要因と考えられている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる A $\beta$ の急激な増加に着目

B. 研究方法

(1) A $\beta$ 産生に関与する因子の同定。

A $\beta$ の N 末端と C 末端は、APP が、それぞれ、 $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。 $\beta$ -セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロ

テアーゼであることが明らかとなったが、 $\gamma$ -セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなっている。すなわち、 $\gamma$ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなった。従って、 $A\beta$ 産生に関与する因子とする因子として、 $\gamma$ -セクレターゼ活性に必要な因子の cDNA を同定することを目標とした。方法として、スクリーニングを容易にするため、 $\gamma$ -セクレターゼによる切断がおこると細胞がピューロマイシン耐性になるという独自の系を構築し、これを用いてスクリーニングを行った（詳細は、主任研究者 駒野 分担研究報告書参照）。

#### (2) $A\beta$ の分解酵素の同定

分担研究者（西道）により、すでに、脳内における  $A\beta$ の分解は、neprilysin あるいはその類似のペプチダーゼによっておこることが明らかにされている（Iwata et al., Nature Med. 6: 143-145 2000）。さらに詳細に、実際に生体内で  $A\beta$ 分解に関与する酵素の実体を明らかにするため、平成 12 年度は neprilysin 類似ペプチダーゼを DNA 上でのホモロジーを利用した遺伝子工学的手法により同定した。

(3)  $A\beta$ 産生に影響を与える APP 結合蛋白の同定  
まず、酵母 two hybrid 法による APP 結合蛋白の同定し、その中から、 $A\beta$ 産生系に影響を与える APP 結合蛋白を同定した。

### C. 研究結果

#### $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する遺伝子の同定

$\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する因子の同定は、 $\gamma$ -セクレターゼによって切断を受けると、細胞

がピューロマイシン耐性になるという独自の細胞株を構築し、これを用いて行った。細胞  $4 \times 10^6$  を cDNA library でトランスフェクトした結果、32 クローンがピューロマイシン耐性となった。さらに、これら細胞の培地中に産生する  $A\beta$ をイムノプロット法により検出した結果、約半分の 12 クローンが、 $A\beta$ の産生をあげていることが明らかとなった。次にベクターの部分の塩基配列をプライマーにして、細胞中にある cDNA を単離し、これを、Human kidney 293 cells (HK293 細胞)に再びトランスフェクトし、APP から産生される  $A\beta$ に及ぼす影響を確認した。その結果、現在、4 種類の cDNA について、APP から産生される  $A\beta$ を上昇することが明らかとなった。現在、これら cDNA の塩基配列の解析中であるが、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることが明らかとなった。

#### neprilysin 類似ペプチダーゼの同定と解析

分担研究者（西道）により、すでに、脳内における  $A\beta$ の分解は、neprilysin あるいはその類似のペプチダーゼによっておこることが明らかにされている。さらに詳細に、実際に生体内で  $A\beta$ 分解に関与する酵素の実体を明らかにするため、平成 12 年度は neprilysin 類似ペプチダーゼの同定した。その結果、4 種の neprilysin 類似ペプチダーゼが同定された。さらに、それぞれの脳での存在量を解析した結果、neprilysin 類似ペプチダーゼではなく、脳では neprilysin が主に存在することが明らかとなった。また、neprilysin の脳内での  $A\beta$ 分解の関与を直接解析するため、neprilysin ノックアウトマウスを作製した。

#### $A\beta$ 産生に影響を与える APP 結合蛋白の同定

分担研究者（鈴木）は、酵母 two hybrid 法による APP 結合蛋白の同定を進めた。その結果、複数の新規 APP 結合蛋白が同定された。また、結合蛋白の一つ X11L と相互作用する分子として、転写因子 NF- $\kappa$ B が同定され、X11L は、NF- $\kappa$ B を介して、A $\beta$ 産生をあげることが明らかとなった。

#### D. 考察

A $\beta$ 産生に必要な $\gamma$ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなってきた。しかし、それが、どのような因子による複合体か、その実体が明らかになっていない。今回同定された cDNA は、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を上昇させることから、 $\gamma$ -セクレターゼ複合体の因子である可能性が高く、老化における A $\beta$ 産生を制御している可能性が考えられた。また、A $\beta$ の分解酵素に関しては、neprilysin あるいはその類似のペプチダーゼによっておこることが指摘されていたが、今回の結果から、脳内での A $\beta$ 分解酵素は、neprilysin そのものである可能性が強く示唆された。現在、これを検証するため、neprilysin ノックアウトマウスを作製し解析をすすめている。APP 結合蛋白として脳特的に発現している X11L と命名した蛋白が同定された。この蛋白は、転写因子 NF- $\kappa$ B を介して、A $\beta$ 産生をあげることが明らかとなった。今後は、実際に、老化におけるこの蛋白の A $\beta$ 産生における役割を解析する必要がある。

#### E. 結論

$\gamma$ -セクレターゼ活性を高めることによって A $\beta$ 産生を促進する cDNA が同定できた。脳

内での A $\beta$ 分解酵素としては、neprilysin の関与が強く示唆された。また、A $\beta$ 産生に影響を与える APP 結合蛋白 X11L が同定できた。今後は、これらの作用機構と、老化における A $\beta$ 量の変動との関連を詳細に解析する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama K, Komano H and Yanagisawa K.

Intracellular site of  $\gamma$ -secretase for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a cells harboring presenilin 1 mutation.

Eur. J. Biochem. 267: 2036-2045, 2000

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H.

Inhibitory effect of presenilin 1 mutation on the Wnt signaling pathway through enhance of phosphorylation of  $\beta$ -catenin. (Submitted)

Taniguchi S, Fujita Y, Takahashi H, Hayashi S, Kakita A, Murayama S, Saido T.C., Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. FEBS Lett (in press)

Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Arai H, Aizawa H, Iwata N, Saido T.C. Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: Identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. Eur. J. Neurosci. (in press)

Kawarabayashi T, Younkin L.H., Saido T.C., Shoji M, Hsiao A and Younkin S.G..

Age-dependent changes in brain, cerebrospinal fluid, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurosci., 2001 (in press)

Iwata S, Tsubuki Y, Takaki K, Watanabe M, Sekiguchi E, Hosoki M, Kawashima-Morishima, H-J. Lee, E Hama, Y Sekine-Aizawa and Saido T.C.,

Identification of the major A $\beta$ 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. Nature Med. 6: 143-151, 2000

Iwata N, Tsubuki S, Hama E, Takaki Y, Shirotni K and Saido T.C.  
Clearance of amyloid  $\beta$ -peptide from brain: transport or metabolism?  
Nature Med. 6: 718-719, 2000

Harigaya Y, Saido T.C., Eckman C.B., Prada C.-M., Shoji M and Younkin S.  
Amyloid  $\beta$  protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain.  
Biochem Biophys. Res. Commun. 276: 422-427, 2000

Saido T.C.  
Degradation of amyloid- $\beta$  peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention, and therapy. NeuroSci. News 5(3): 52-62, 2000

Lee H.-J., Tomioka M, Takaki Y, Masumoto H, and Saido T.C.  
Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus.  
Biochim. Biophys. Acta. 1493:273-278, 2000

Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard N.P., Gerard C, Lee H.-J., Shirotni K and Saido T.C.  
Biochemical Identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid  $\beta$  peptide in brain.  
J. Biochem. 128: 897-902, 2000

Russo C, Schettini G, Saido T.C., Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M and Teller J.K..  
Preferential deposition of truncated amyloid- $\beta$  peptides in brain of presenilin 1 gene mutation carriers. Nature 405:531-532, 2000

Saido T.C. Involvement of polyglutamine endolysis followed by pyroglutamate formation in the pathogenesis of triplet repeat/polyglutamine-expansion diseases.  
Med. Hypotheses 54:427-429, 2000

Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saido T.C., Funakoshi A, Miyasaka K, Ohota S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA).  
J.Epiderm 54:46-55, 2000

Nakagawa Y, Reed L, Nakamura M, McIntosh

T.K., Smith D.H., Saatman K.E., Raghupathi R, Clemens J, Saido T.C., Lee Virginia M.E., Trojanowski J.Q.  
Brain trauma in aged transgenic mice induces regression of established A $\beta$  deposit.  
Exper.Neurol. 163:244-252,2000

Lankiewicz S, Luetjens C.M., Bui N.T., Krohn A.J., Poppe M, Cole G.C., Nicholson D.W., Saido T.C., Prehn H.M. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. J. Biol. Chem. 275:17064-17071,2000

Takeuchi A, Irizarry M.C., Duff K, Saido T.C., Hsiao, Ashe K, Hasegawa M, Mann D.M.A., Hyman B.T., Iwatsubo T. Age-related A $\beta$  deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and  $\beta$  amyloid precursor protein is not associated with global neuronal loss. Am. J. Pathol. 157: 331-339,2000

Hiwasa T, Arase Y, Kikuno K, Hasegawa R, Sugaya S, Kita K, Saido T.C., Yamamori H, Maki M, Suzuki N. Increase in ultraviolet sensitivity by overexpression of calpastatin in ultraviolet-resistant UVr-1 cells derived from ultraviolet-sensitive human R5a cells. Cell death and Differentiation 7: 531-537,2000

Koike H, Kouchi Z, Kinouchi T, Maeda T, Sorimachi H, Saido T.C., Maruyama K, Okuyama A, Suzuki K, Ishiura S. Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a  $\beta$ -secretase candidate. Cytotechnol. Cytotechnology 33: 213-219,2000

Kitagaki H, Tomioka S, Yoshizawa T, Sorimachi H, Saido T.C., Ishiura S, Suzuki K. Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 689-695,2000

Shoji M, Kawarabayashi T, Sato M, Sasaki A, Saido T.C., Matsubara E, Yomidokoro Y, Kanai M, Shizuka M, Ishiguro K, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S. Age-related amyloid  $\beta$  protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. J. Pathol. 191:93-101,2000

Yamaguchi A, Yamamoto N, Akamatsu N, Saido T.C., Kaneda M, Umeda M, Tanoue K. PS-liposome and ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183) of

CD 36: a new study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody. *Thromb. Res.*97:317-326,2000

Maruyama K, Usami M, Kametani F, Tomita T, Iwatsubo T, Saido T.C., Mori H, Ishiura S. Molecular interactions between presenilin and calpain: inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, mu-calpain, *Int. J. Mol. Med.*5: 269-273,2000

Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll D.E., Saido T.C., Fox J.E.B. Evidence that  $\beta 3$  integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J. Cell Biol.* 151:685-695,2000

Tomita S, Fujita T, Kirino Y and Suzuki T. PDZ domain-dependent suppression of NF- $\kappa$ B/p65-induced A $\beta$ 42 production by a neuron specific X11-like protein. *J. Biol. Chem.* 275: 13056-13060,2000

Lee, D-S., Tomita, S., Kirino, Y. and Suzuki. Regulation of X11L-dependent amyloid precursor protein metabolism by XB51, a novel X11L-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275: 23134-23138,2000

Iijima K, Ando K., Takeda S, Satoh Y, Seki T, Greengard P, Kirino Y, Nairn A. C. and Suzuki T. Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* 75:1085-1091,2000

Yagi Y, Tomita S, Nakamura M and Suzuki T. Over-expression of human amyloid precursor protein in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 4: 43-49,2000

Boyt A. A., Suzuki T., Hone E, Grjec A and Martins R. N. The structure and multifaced function of the amyloid precursor protein. *Clin. Biochem. Rev.*, 21: 22-41,2000

鈴木利治「APP代謝とA $\beta$ 生成に関する新知見、—APP細胞質ドメインの機能を中心として—」最新医学 55巻7号「Alzheimer病-病態解明の新展開-」p11-p19,2000

2. 学会発表  
川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さ

ゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人  
Wntシグナル伝達系におけるプレセニン1の役割  
第73回日本生化学会 2000年10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人  
Wntシグナル伝達系における変異プレセニン1の抑制作用  
第43回日本神経化学会 2000年10月18-20日 金沢

Lee D-S., Tomita S, Takeda S, Martins R and Suzuki T. Isolation of cDNA encoding a novel protein that associates with neuron-specific X11L protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA).2000

Ando K, Iijima K, Kirino Y and Suzuki T. Novel regulation of interaction between APP and its binding proteins. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

Iijima K, Ando K, Kirino Y, Suzuki T. (2000) Isolation and characterization of a novel APP binding protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA)2000

Suzuki T. Function of proteins interacting with the cytoplasmic domain of APP. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

Taru H, Yagi Y, Hase M, Tomita S, Kirino Y and Suzuki T. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel *Drosophila* APP binding protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

鈴木利治 A $\beta$ の産生を制御する遺伝子群の発現調節機構 第73回日本生化学会大会シンポジウム講演 2000年10月11-14日 横浜

安藤香奈絵、飯島浩一、桐野豊、鈴木利治 APPとその結合タンパク質の相互作用におけるAPPリン酸化の機能 第73回日本生化学会大会 2000年10月11-14日 横浜

飯島浩一、安藤香奈絵、桐野豊、鈴木利治。新規APP結合タンパク質の単離と機能解析 第73回日本生化学会大会 2000年10月11-14日 横浜

鈴木利治、富田進、李東錫、安藤香奈絵、飯島浩一、多留偉功、高島愛子、馳桃子、八木克将、武田志津 APP 細胞質ドメインおよび X11L を中心とした細胞内 Protein Interaction Mapping の解析 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸

佐野良威、武田志津、高島愛子、富田進、桐野豊、糸原重美、鈴木利治 X11L/Mint2 ノックアウトマウスの作成と解析 第 23 回日本分子生物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1-1. A $\beta$ 産生抑制剤の新しいスクリーニング系(予定)

1-2. A $\beta$ 産生に関与する新規遺伝子 GAF (予定)



分担研究報告書

アミロイドβ蛋白（Aβ）産生酵素の解析

主任研究者 駒野 宏人 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部室長

研究要旨

Aβの N 末端と C 末端は、APP が、それぞれ、β-セクレターゼとγ-セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。このうち、γ-セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなってきた。

平成 12 年度は、γ-セクレターゼ複合体の実体を明らかにするため、γ-セクレターゼ活性を促進する cDNA を同定することを目標とした。スクリーニングを容易にするため、γ-セクレターゼによる切断がおこると細胞がピューロマイシン耐性になるという独自の系を構築し、これを用いてスクリーニングを行った。この系で、まず、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクションし、この cDNA が Aβ産生活性をもつかどうかを次に確認した。その結果、γ-セクレターゼ活性を上げる cDNA を、少なくとも 4 種類同定し、このうちのひとつは、新規蛋白をコードする cDNA であることが明らかとなった。

A. 研究目的

老化に伴い、脳内に生じるアミロイド蛋白 (Aβ) がほぼ指数関数的に急激に増加していることが明らかになっている。本研究は、老化に伴いある年齢を境に脳内に生じる Aβ の急激な増加に着目し、その増加機構を明らかにすることを目的とし、分担研究者は、Aβ 産生に関与する分子について同定し、その解析を行う。

Aβ の N 末端と C 末端は、アミロイド蛋白前駆体 (APP) が、それぞれ、β-セクレターゼと γ-セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。β-セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロテアーゼであることが同定され、γ-セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかとなった。すなわち、γ-セクレター

ゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなった。しかしながら、この複合体がプレセニリン以外にどのような分子よりなっているのか、その実体は明らかにされていない。

そこで、平成 12 年度は、これら γ-セクレターゼ活性複合体の実体を明らかにするため、γ-セクレターゼ活性を上げる因子の cDNA を同定することを目標とした。

B. 研究方法

γ-セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、Aβ の N 末端から γ-セクレターゼ切断部位を含む APP 領域 (C53) と

Notch(Schroeter et al., Nature393:382-386 1998)のC端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得る。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が $\gamma$ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。平成 12 年度は、この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセクションし、この cDNA が A $\beta$ 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離する。

#### C. 研究結果

上記の fusion gene を安定に遺伝子導入された細胞 4X10<sup>6</sup> を cDNA library でトランスフェクトした結果、32 クローンがピューロマイシン耐性となった。さらに、これら細胞の培地中に産生する A $\beta$  をイムノブロット法により検出した結果、約半分の 12 クローンは、A $\beta$  の産生をあげていることが明らかとなった。次にベクターの部分の塩基配列をプライマーにして PCR 法で細胞中にある cDNA を単離し、これを、Human kidney 293 cells (HK293 細胞) に再びトランスフェクトし、APP から産生される A $\beta$  に及ぼす影響を確認した。その結果、現在、4 種類の cDNA について、APP から産生される A $\beta$  を上昇することが明らかとなった。現在、これら cDNA の塩基配列の解析中であるが、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることが明らかとなった。

#### D. 考察

独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定できること明らかとなり、その結果、すく

なくとも 4 種類の cDNA が  $\gamma$ -セクレターゼ活性を上げることが確認できた。これらが、 $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成因子なのか、あるいは、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を調節する因子なのか、その作用機構を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

本研究により、独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を上げる cDNA を 4 種類同定できた。また、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることがわかった。今後は、まだ、未解析の cDNA を解析し、これらが、 $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成因子なのか、あるいは、その調節因子なのかを詳細に検討する必要がある。また、老化に伴って認められる A $\beta$  量変動におけるこれら因子の役割を解析する必要がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama K, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a cells harboring presenilin 1 mutation. Eur. J. Biochem. 267: 2036-2045, 2000

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H. Inhibitory effect of presenilin 1 mutation on the Wnt signaling pathway through enhance of phosphorylation of  $\beta$ -catenin. (Submitted)

##### 2. 学会発表

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人  
Wntシグナル伝達系におけるプレセニリン1の役割  
第73回日本生化学会 2000年10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さ

ゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人

Wntシグナル伝達系における変異プレセニリン

1の抑制作用

第43回 日本神経化学会 10月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1-1. A $\beta$ 産生抑制剤の新しいスクリーニング系(予定)

1-2. A $\beta$ 産生に關与する新規遺伝子 GAF（予定）

分担研究報告書

β老化に伴うアミロイド蛋白代謝変化の機構解析

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質制御研究チーム

研究要旨

孤発性アルツハイマー病におけるβアミロイド蓄積の原因として、分解システムの低下が考えられる。脳内の分解システムを解析したところ、中性エンドペプチダーゼが律速を担っていることを見いだした。分解活性の低下が蓄積を促進することから、分解システムは予防や治療のための作用点となりうることを示している。

A. 研究目的

アルツハイマー病の大半を占める孤発性アルツハイマー病において、何故βアミロイドが蓄積するのか、今の時点では全く不明である。家族性アルツハイマー病と異なり、βアミロイド合成の上昇が普遍的な現象として認められないことから、老化に伴うβアミロイドの分解システムの低下が脳内のβアミロイドレベルを上昇させ、蓄積の原因となる可能性が考えられる。しかしながら、脳内におけるβアミロイド分解システムの実体は未解明であった。そこで、本研究では、*in vivo*の分解過程を把握する新しい研究システムを作成し、分解酵素を同定することを第一の目的とした。さらに、分解システムの分子多様性についても検討を加えた。

B. 結果

ラジオアイソトープで多重標識した 42mer のβアミロイドペプチドをラット海馬に投与し、代謝過

程を捕捉する実験系を確立し、以下の点を明らかにした。[1]βアミロイドペプチドは脳実質内のプロテアーゼによって分解される。[2] 分解における主要な中間体は Aβ10-37 であり、この中間体の生成が律速過程を担う。[3] この中間体を生成するプロテアーゼは、ネプリライシン様のメタロエンドペプチダーゼである。[4] 動物脳において分解システムを抑制することによってβアミロイドの蓄積が促進される。この結果に基づいて分解酵素の分子多様性について検討したところ、脳内にはネプリライシン様の中性エンドペプチダーゼが少なくとも6種類 (neprilysin, neprilysin-like peptidase α・β・γ, PEX, XCE/DINE) 存在すること、この中でネプリライシンが脳内における主要なエンドペプチダーゼであり、Aβ分解活性がもっとも強いことを明らかにした。

D. 考察

以上の結果は、ヒト脳においても、老化に伴うネ

プリライシン活性の低下がアミロイド蓄積の原因となりうること、および、分解系を促進することによって蓄積を抑制できる可能性のあることを示唆している。

#### E. 結論

βアミロイド分解システムは、孤発性アルツハイマー病におけるβアミロイド蓄積の機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。さらに、ネプリライシンの活性制御を介してアルツハイマー病の予防や治療へと発展する可能性がある。孤発性アルツハイマー病は脳老化の終末像であると考えられることから、βアミロイド蓄積を制御することは脳老化の制御へと発展することが期待される。また、本研究は新たなアルツハイマー病動物モデル作成に応用させることも期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawarabayashi T, Younkin L.H., Saido T.C., Shoji M, Hsiao A and Younkin S.G.. Age-dependent changes in brain, cerebrospinal fluid, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 2001 (in press)

Iwata S, Tsubuki Y, Takaki K, Watanabe M, Sekiguchi E, Hosoki M, Kawashima-Morishima, H-J. Lee, E Hama, Y Sekine-Aizawa and T.C. Saido. Identification of the major Aβ<sub>1-42</sub>-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition *Nature Med.* 6: 143-151, 2000

Iwata N, Tsubuki S, Hama E, Takaki Y, Shirotani K and Saido T.C. Clearance of amyloid β-peptide from brain: transport or metabolism?

*Nature Med.* 6: 718-719, 2000

Harigaya Y, Saido T.C., Eckman C.B., Prada C.-M., Shoji M and Younkin S. Amyloid β protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 422-427, 2000

Saido T.C. Degradation of amyloid-β peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention, and therapy. *NeuroSci. News* 5(3): 52-62, 2000

Lee H.-J., Tomioka M, Takaki Y, Masumoto H, and Saido T.C. Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1493:273-278, 2000

Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard N.P., Gerard C, Lee H.-J., Shirotani K and Saido T.C. Biochemical Identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid β peptide in brain. *J. Biochem.* 128: 897-902, 2000

Russo C, Schettini G, Saido T.C., Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M and Teller J.K.. Preferential deposition of truncated amyloid-β peptides in brain of presenilin 1 gene mutation carriers. *Nature* 405:531-532, 2000

Saido T.C. Involvement of polyglutamine endolysis followed by pyroglutamate formation in the pathogenesis of triplet repeat/polyglutamine-expansion diseases. *Med. Hypotheses* 54:427-429, 2000

Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saido T.C., Funakoshi A, Miyasaka K, Ohta S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J. Epiderm* S46-55, 2000

Nakagawa Y, Reed L, Nakamura M, McIntosh T.K., Smith D.H., Saatman K.E., Raghupathi R, Clemens J, Saido T.C., Lee Virginia M.E., Trojanowski J.Q. Brain trauma in aged transgenic mice induces regression of established Aβ deposit.

Exper.Neurol. 163:244-252,2000

Lankiewicz S, Luetjens C.M., Bui N.T., Krohn A.J., Poppe M, Cole G.C., Nicholson D.W., Saido T.C., Prehn H.M. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. J. Biol. Chem. 275:17064-17071,2000

Takeuchi A, Irizarry M.C., Duff K, Saido T.C., Hsiao, Ashe K, Hasegawa M, Mamm D.M.A., Hyman B.T., Iwatsubo T. Age-related A $\beta$  deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and  $\beta$  amyloid precursor protein is not associated with global neuronal loss. Am. J. Pathol. 157: 331-339,2000

Hiwasa T, Arase Y, Kikuno K, Hasegawa R, Sugaya S, Kita K, Saido T.C., Yamamori H, Maki M, Suzuki N. Increase in ultraviolet sensitivity by overexpression of calpastatin in ultraviolet-resistant UVr-1 cells derived from ultraviolet-sensitive human R5a cells. Cell death and Differentiation 7: 531-537,2000

Koike H, Kouchi Z, Kinouchi T, Maeda T, Sorimachi H, Saido T.C., Maruyama K, Okuyama A, Suzuki K, Ishiura S. Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a  $\beta$ -secretase candidate. Cytotechnol. Cytotechnology 33: 213-219,2000

Kitagaki H, Tomioka S, Yoshizawa T, Sorimachi H, Saido T.C., Ishiura S, Suzuki K. Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 689-695,2000

Shoji M, Kawarabayashi T, Sato M, Sasaki A, Saido T.C., Matsubara E, Yomidokoro Y, Kanai M, Shizuka M, Ishiguro K, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S. Age-related amyloid  $\beta$  protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. J. Pathol. 191:93-101,2000

Yamaguchi A, Yamamoto N, Akamatsu N, Saido T.C., Kaneda M, Umeda M, Tanoue K. PS-liposome and ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183) of CD 36: a new study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody. Thromb. Res.97:317-326,2000

Maruyama K, Usami M, Kametani F, Tomita T,

Iwatsubo,T, Saido T.C., Mori H, Ishiura S. Molecular interactions between presenilin and calpain: inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, mu-calpain, Int. J. Mol. Med.5: 269-273,2000

Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll D.E., Saido T.C., Fox J.E.B. Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. J. Cell Biol. 151:685-695,2000

Taniguchi S, Fujita Y, Takahashi H, Hayashi S, Kakita A, Murayama S, Saido T.C., Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. FEBS Lett (in press)

Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Arai H, Aizawa H, Iwata N, Saido T.C. Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: Identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. Eur. J. Neurosci. (in press)

## 2. 学会発表

$\beta$ -アミロイドペプチド(A $\beta$ 1-42)の脳内主要分解経路の同定  
岩田修永、津吹 聡、高木 淑江、渡邊 かおり、関口 みさき、細木 恵美、西道 隆臣  
第73回日本薬理学会年会 横浜

Saido T.C., Shoritani K, Takaki Y, Lu B, N.P. Gerard, Gerard C, Lee H.-J., Watanabe K, Hama E, Tsubuki S and Iwata N. Catabolism of A $\beta$ 42 and the mechanisms of A $\beta$  deposition in brain parenchyma. Society for Neuroscience 30<sup>th</sup> Annual meeting

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shoritani K, Lee H.-J., Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Lu B, Gerard N.P., Gerard C and Saido T.C. Decreased A $\beta$ 42 catabolism involving neprilysin contributes to pathological A $\beta$  accumulation. 30<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience

Shoritani K, Tsubuki S, Tomita T, Takaki Y, Harigaya W, Sekine-Aizawa Y, Iwata H, Iwata N, Iwatsubo T and Saido T.C.

Degradation of amyloid- $\beta$  1-42 peptide by neprilysin and neprilysin  
30<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience

Takahashi M, Iwata N, Watanabe K, Hama E, Ito Y, Saido TC.  
TIMP-2 Inhibits Glioma Angiogenesis In Vivo.  
4th A Congress of the European Association of Neuro-Oncology (Copenhagen, Denmark)

$\beta$ -アミロイドペプチド (A $\beta$ ) 分解酵素の同定  
岩田修永、津吹 聡、高木淑江、Hahn-Jun Lee、  
城谷圭朗、渡邊かおり、関口みさき、細木恵美、  
Bao Lu, Norma P. Gerard, Craig Gerard, 西道隆臣  
第 23 回 日本神経科学会 2000 年 9 月 4-6  
日 横浜

脳内の細胞外蛋白質分解系における MT5-MMP  
の解析  
関根 (藍沢) 陽子)、濱江美 渡邊かおり、金井  
克晃、金井正美、津吹聡、岩田修永、西道隆臣  
第 73 回 日本生化学会 2000 年 10 月 11-14 日 横  
浜

$\beta$ アミロイドペプチド (A $\beta$ ) 分解酵素の同定とそ  
の酵素活性の阻害による A $\beta$ 蓄積の誘発  
岩田修永、津吹聡、高木淑江、Lee Hahn-Jun、  
城谷圭朗、渡邊かおり、関口みさき、細木恵美、  
Lu, Bao, Gerard, P. Norma, Gerard, Craig, 西道隆臣  
第 73 回 日本生化学会 2000 年 10 月 11-14 日 横  
浜

A $\beta$ 分解酵素としての neprilysin (NEP) の in vivo  
系での検討  
高木淑江、津吹聡、岩田修永、城谷圭朗、Lee  
Hahn-Jun、西道隆臣  
第 73 回 日本生化学会 2000 年 10 月 11-14 日 横  
浜

グリオーマ増殖における宿主側 matrix  
metalloproteinase (MMP)-2 の関与について : in  
vivo 実験モデルを用いた解析  
高橋恵、岩田修永、井上敬一、城谷圭朗、濱江美、  
渡邊かおり、関根・藍沢陽子、糸原重美、伊東洋、  
西道隆臣 第 73 回 日本生化学会 2000 年 10 月  
11-14 日 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
特になし

分担研究報告書

アミロイドβ蛋白前駆体結合蛋白の解析に関する研究

分担研究者 鈴木利治 東京大学大学院薬学系研究科 助教授

研究要旨 アルツハイマー病の発症原因とされるβ-アミロイド(Aβ)は、前駆体タンパク質 APP から細胞内の代謝過程で生成されてくる。一回膜貫通型の膜タンパク質である APP の代謝は、APP の細胞質ドメインとそこに結合するタンパク質によって制御されている。従って、APP 細胞質ドメインと相互作用するタンパク質を単離・同定し、その機能を解析することで Aβ生成の分子機構を解明し、老化に伴う Aβ生成の質的・量的変化と神経変性の関係を理解する。

A. 研究目的

老化に伴うアミロイドタンパク質代謝変化の機構を解析するために、アミロイド前駆体タンパク質 APP の細胞質ドメインと相互作用を行うタンパク質を単離・同定し、β-アミロイド(Aβ)産生制御の分子機構の解明を行う。

B. 研究方法

酵母 Two- Hybrid 法を用いて、APP 細胞質ドメインに結合し、Aβ 生成を制御する神経特異タンパク質 X11L を単離している。X11 L の作用機構を解明するために、X11L の機能ドメインを同定し、そこと相互作用する分子を酵母 Two-Hybrid 法を用いて単離する。遺伝子は、市販のヒト由来 cDNA ライブラリーから単離したものであり、患者等由来のゲノム遺伝子は使用していない。実験は全て培養細胞を用いた。

C. 研究結果

X11L は APP との相互作用に分子中央部の PI ドメインが必要であり、Aβ 生成の制御には、PI ドメインより C-末端側の PDZ ドメインが必要であった。そこで、PDZ ドメインと相互作用する因子を酵母 Two- Hybrid 法を用いて、単離したところ転写因子 NF-κB を見いだした。細胞に NF-κB を過発現させると神経毒性を持つ Aβ42 の産生が上昇し、この産生は X11L の過発現によって抑制された。

D. 考察

これまで、X11L は APP との直接相互作用を介して Aβ40 の生成を制御していることが示されていたが、本研究により遺伝子発現を介した Aβ42 生成制御機構が存在する可能性が示唆された。NF-κB が発現を制御する遺伝子の中に、Aβ42 生成に関与するγ-セクレターゼ活性化因子等の遺伝子が含まれている事が考えられる。



最新医学 55 卷7号「Alzheimer 病-病態解明の新展開-」 p11-p19,2000

## E. 結論

(1) 神経特異的タンパク質 X11L は APP 細胞質ドメインと結合する。(2) X11L は NF- $\kappa$ B と相互作用を行い NF- $\kappa$ B の活性を制御する。

(3) NF- $\kappa$ B の下流の遺伝子が A $\beta$ 42 の産生に関与するタンパク質をコードしている。

## F. 健康危険情報

NF- $\kappa$ B は炎症により活性化される転写因子として知られている。脳内 A $\beta$ の産生を増加させないためには、脳傷害や感染による炎症を避ける事が大切である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomita S, Fujita T, Kirino Y and Suzuki T. PDZ domain-dependent suppression of NF- $\kappa$ B/p65-induced A $\beta$ 42 production by a neuron specific X11-like protein.

J. Biol. Chem. 275: 13056-13060,2000

Lee, D-S., Tomita, S., Kirino, Y. and Suzuki T. Regulation of X11L-dependent amyloid precursor protein metabolism by XB51, a novel X11L-binding protein.

J. Biol. Chem. 275: 23134-23138,2000

Iijima K, Ando K., Takeda S, Satoh Y, Seki T, Greengard P, Kirino Y, Nairn A. C. and Suzuki T. Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5.

J. Neurochem. 75:1085-1091,2000

Yagi Y, Tomita S, Nakamura M and Suzuki T. Over-expression of human amyloid precursor protein in Drosophila.

Mol. Cell Biol. Res. Commun. 4: 43-49,2000

Boyt A. A., Suzuki T, Hone E, Gnjec A and Martins R. N. The structure and multifaced function of the amyloid precursor protein.

Clin. Biochem. Rev., 21: 22-41,2000

鈴木利治「APP代謝とA $\beta$ 生成に関する新発見、—APP細胞質ドメインの機能を中心として—」

### 2. 学会発表

Lee D-S., Tomita S, Takeda S, Martins R and Suzuki T. Isolation of cDNA encoding a novel protein that associates with neuron-specific X11L protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA).2000

Ando K, Iijima K, Kirino Y and Suzuki T. Novel regulation of interaction between APP and its binding proteins. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

Iijima K, Ando K, Kirino Y, Suzuki T. (2000) Isolation and characterization of a novel APP binding protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA)2000

Suzuki T. Function of proteins interacting with the cytoplasmic domain of APP. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

Taru H, Yagi Y, Hase M, Tomita S, Kirino Y and Suzuki T. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel Drosophila APPL binding protein. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. (Washington D.C,USA) 2000

鈴木利治 A $\beta$ の産生を制御する遺伝子群の発現調節機構 第73回日本生化学会大会シンポジウム講演 2000年10月11-14日 横浜

安藤香奈絵、飯島浩一、桐野豊、鈴木利治 APPとその結合タンパク質の相互作用におけるAPPリン酸化の機能 第73回日本生化学会大会 2000年10月11-14日 横浜

飯島浩一、安藤香奈絵、桐野豊、鈴木利治。新規APP結合タンパク質の単離と機能解析 第73回日本生化学会大会 2000年10月11-14日 横浜

鈴木利治、富田進、李東錫、安藤香奈絵、飯島浩一、多留偉功、高島愛子、馳桃子、八木克将、武田志津 APP細胞質ドメインおよびX11Lを中心とした細胞内 Protein Interaction Mappingの解 第23回日本分子生物学会年会 2000年12月13-16日 神戸

佐野良威、武田志津、高島愛子、富田進、桐野  
豊、糸原重美、鈴木利治 X11 L/Mint2 ノック  
アウトマウスの作成と解析 第 23 回日本分子生  
物学会年会 2000 年 12 月 13-16 日 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Shibamoto S, Yanagisawa K, Komano H.	Inhibitory effect of presenilin 1 mutation on the Wnt signaling pathway through enhance of phosphorylation of $\beta$ -catenin.	(submitted)			
Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama K, Komano H, Yanagisawa K.	Intracellular site of A $\beta$ 42- $\gamma$ -cleavage which is enhanced by presenilin 1 mutations.	Eur. J. Biochem.	267	2036-2045	2000
Taniguchi S, Fujita Y, Takahashi H, Hayashi S, Kakita A, Murayama S, Saido T.C., Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M.	Degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains.	FEBS Lett (in press)			2001
Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Arai H, Aizawa H, Iwata N, Saido T.C.	Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: Identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum.	Eur. J. Neurosci. (in press)			2001
Kawarabayashi T, Younkin L.H., Saido T.C., Shoji M, Hsiao A and Younkin S.G..	Age-dependent changes in brain, cerebrospinal fluid, and plasma amyloid $\beta$ protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease	J. Neurosci.			2001
Iwata S, Tsubuki Y, Takaki K, Watanabe M, Sekiguchi E, Hosoki M, Kawashima-Morishima, H-J. Lee, E Hama, Y Sekine-Aizawa and T.C. Saido.	Identification of the major A $\beta$ 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition	Nature Med.	6	143-151	2000
Iwata N, Tsubuki S, Hama E, Takaki Y, Shirotani K and Saido T.C.	Clearance of amyloid $\beta$ -peptide from brain: transport or metabolism?	Nature Med.	6	718-719	2000
Harigaya Y, Saido T.C., Eckman C.B., Prada C.-M., Shoji M and Younkin S.	Amyloid $\beta$ protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	276	422-427	2000
Saido T.C..	Degradation of amyloid- $\beta$ peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention, and therapy.	NeuroSci. News	5	52-62	2000

Lee H.-J., Tomioka M, Takaki Y, Masumoto H, and Saïdo T.C.	Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus.	Biochim. Biophys. Acta.	1493	273-278	2000
Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard N.P., Gerard C, Lee H.-J., Shirotani K and Saïdo T.C.	Biochemical Identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid $\beta$ peptide in brain.	J. Biochem.	128	897-902	2000
Russo C, Schettini G, Saïdo T.C., Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M and Teller J.K.	Presenilin 1 gene mutation in Alzheimer's disease.	Nature	405	531-532	2000
Saïdo T.C.	Involvement of polyglutamine endolysis followed by pyroglutamate formation in the pathogenesis of triplet repeat/polyglutamine-expansion diseases.	Hypotheses	54	427-429	2000
Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saïdo T.C., Funakoshi A, Miyasaka K, Ohota S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N.	Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA).	J.Epiderm.		S46-55	2000
Nakagawa Y, Reed L, Nakamura M, McIntosh T.K., Smith D.H., Saatman K.E., Raghupathi R, Clemens J, Saïdo T.C., Lee Virginia M.E., Trojanowski J.Q.	Brain trauma in aged transgenic mice induces regression of established A $\beta$ deposit.	Exper.Neurol.	163	244-252	2000
Lankiewicz S, Luetjens C.M., Bui N.T., Krohn A.J., Poppe M, Cole G.C., Nicholson D.W., Saïdo T.C., Prehn H.M.	Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death.	J. Biol. Chem.	275	17064-17071	2000
Takeuchi A, Irizarry M.C., Duff K, Saïdo T.C., Hsiao, Ashe K, Hasegawa M, Mann D.M.A., Hyman B.T., Iwatsubo T.	Age-related A $\beta$ deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and $\beta$ amyloid precursor protein is not associated with global neuronal loss.	Am. J. Pathol.	157	331-339	2000
Hiwasa T, Arase Y, Kikuno K, Hasegawa R, Sugaya S, Kita K, Saïdo T.C., Yamamori H, Maki M, Suzuki N.	Increase in ultraviolet sensitivity by overexpression of calpastatin in ultraviolet-resistant UVr-1 cells derived from ultraviolet-sensitive human RSa cells.	Cell death and Differentiation	7	531-537	2000
Koike H, Kouchi Z, Kinouchi T, Maeda T, Sorimachi H, Saïdo T.C., Maruyama K, Okuyama A, Suzuki K, Ishiura S.	Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a $\beta$ -secretase candidate. Cytotechnol.	Cytotechnology	33	213-219	2000