

わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」、等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来試料を用いる実験においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの法令等を遵守して研究を行った。

### C. 研究成果および D. 考察

(1)脳内 ApoE-HDL レベルを上昇させる seed 化合物を3つ同定した。薬剤開発を目指して企業と共同研究を開始した。実用化へ向けた1歩を踏み出した。また、ApoE-HDL による BBB 形成・機能調節の分子機構を明らかにした。BBB 機能(脳内 A $\beta$  排出)調節を創薬標的にできる。BBB へのアクセスは血液側からも可能であり、治療薬開発に有利になる。さらに、アンチセンス -microRNA-33 が脳内 ApoE-HDL を増加させることが明らかになり、マイクロ核酸治療薬の可能性を示した。(2)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)は、新規 A $\beta$  結合分子であり A $\beta$  レベルの低下を標的にした LPL 発現調節薬の開発の可能性を示せた。(3)歯周病、歯牙欠損が、AD モデルマウスで認知機能障害と AD 分子病態の増悪を引き起こすことが明らかになり、歯科疾患の予防治療が AD 発症予防になる可能性があり、臨床試験をすべきと考えられる。前年度までの研究成果では、(i) A $\beta$  は血液脳関門(BBB)を介して排出される。BBB 培養モデル系を確立して検討した結果、ApoE4 型の BBB はバリア形成が脆弱であること、ApoE-HDL が BBB 形成・機能維持に重要なこと、

HDL 産生が低い ABCA1-KO マウスで BBB 機能が低下すること、(ii)High glucose は HDL 産生を低下させることを発見した。(iii)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A $\beta$  結合分子であり、A $\beta$  の細胞内分解を促進することを発見した。(iv)HDL 産生を調節する micro-RNA33 のアンチセンス処理で HDL 産生が増加することを確認した(新規治療標的)。本年度は、それらの研究をさらに進めるものとなった。

### E. 結論

(1)脳内 ApoE-HDL レベルを上昇させる化合物を低分子化合物ライブラリーを使用してスクリーニングし、3つの seed 化合物を同定した。現在、薬剤開発を目指して企業と共同研究を開始した。また、BBB 形成・機能調節には、ApoE-HDL が深く関与することを明らかにした。この分子機構解明により、新たな創薬標的が得られる。BBB へのアクセスは血液側からも可能であることから、治療薬開発に有利になる可能性がある。さらに、アンチセンス -microRNA-33 が脳内 ApoE-HDL を増加させることが明らかになり、治療薬になる可能性を示すことができた。(2)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)は、新規 A $\beta$  結合分子であることを突き止めた。その発現調節による A $\beta$  レベルの低下について現在マウス脳で解析を継続中である。(3)歯周病、歯牙欠損を AD モデルマウスで惹起させたところ、双方とも認知機能障害と AD 分子病態の増悪を引き起こすことが明らかになった。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito J, Kheirollah A, Nagayasu Y, Ueda H, Yokoyama S, Michikawa M.

Involvement of cdc42/Rho kinase in apoA-I-mediated cholesterol efflux through interaction between cytosolic lipid-protein particles and microtubules in rat astrocytes.

**J Neurosci Res**, in press.

Hoshino H, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Takeda-Uchimura Y,

Michikawa M, Kadomatsu K and Uchimura K. KSGal6ST is

essential for the 6-sulfation of galactose within keratan sulfate in early postnatal brain

**J Histochem Cytochem**, in press

Oue H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung CG, Michikawa M, Akagawa, Y. Tooth loss

induces memory impairment and neuronal cell loss in APP

transgenic mice. **Behav Brain Res** 252: 318-325, 2013

Zou K, Liu J, Watanabe A, Hiraga S, Liu S, Tanabe C, Maeda T,

Terayama Y, Takahashi S, Michikawa M, Komano H. A $\beta$ 43

is the earliest depositing A $\beta$  species in APP transgenic mouse brain and is converted to A $\beta$ 41 by two active domains of ACE.

**Am J Pathol**, 182: 2322-2331, 2013

Ito J, Nagayasu Y, Hoshikawa M, Kato K.H., Miura Y, Asai K,

Hayashi H, Yokoyama Y, Michikawa M. Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide. **Brain Res.**, 1552: 12-21, 2013

2. 学会発表

Makoto Michikawa

Effects of apoE on lipid transport in the brain and Alzheimer disease

ApoE, ApoE receptors and Neurodegeneration Symposium

June 4th-5th, 2012, Mayo Clinic Jacksonville, FL, USA

道川 誠

口腔疾患とアルツハイマー病  
第14回抗加齢歯科医学研究会  
2012年11月11日、東京

道川 誠

アルツハイマー病の血管因子  
第31回日本認知症学会 シンポジウム「血管性認知症研究の最前線」  
2012年10月26日、つくば

Michikawa M.

Oral diseases as a risk for Alzheimer disease

Nagoya City University and Hallym University joint symposium.

2013,1.14, Hallym University, Korea

道川 誠

脳内脂質代謝変動とアルツハイマー病分子病態

—Apolipoprotein E 依存的脂質輸送との関連から—

北海道大学大学院薬学研究院  
2012-7-2

Michikawa M. et al, Arachidonic acid diet prevents memory impairment and brain Abeta deposition in Tg2576 mice.

Symposium: PUFA and its derivatives- Brain and neuroprotective agents for senescence. ISN-ESN, Aug 30, 2011, Athens, Greece.

道川 誠  
口腔疾患とアルツハイマー病  
日本抗加齢医学会総会 シンポジウム  
2012年6月23日(土) 横浜

道川 誠  
特別講演1. Apolipoprotein Eの脳内機能とアルツハイマー病  
第9回合同地方会  
2012年2月9日(土)、岡山

ゾウケン、劉俊俊、渡邊淳、劉しゅ余、  
田邊千晶、前田智司、寺山靖夫、高橋智、道川誠、駒野宏人  
Early deposition of Ab43 in APP transgenic mouse brain  
第31回日本認知症学会 2012年10月26日、つくば

辻田麻紀・秋田展克・横山信治・野路久仁子・道川 誠  
高グルコースにより誘発される低HDL産生の分子制御機構の解明  
High D-glucose reduced apoA-I and HDL generation in liver cells  
第85回日本生化学会、2012年12月15日、福岡

伊藤仁一、星川真理子、長安祐子、道川 誠

アストロサイトによって放出されるFGF-2のapoE/HDL新生促進作用  
第85回日本生化学会、2012年12月15日、福岡

Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, M Anwar Hossain, Frank J Gonzalez, Shinji Yokoyama and Makoto Michikawa  
Stress-mediated acute corticosterone production is depending on plasma HDL level but not long-term stress response in mice  
チトクロームP450発見50周年記念シンポジウム、2012年12月2日、福岡

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)  
(分担)研究報告書  
Aβ分解酵素活性調節によるアルツハイマー病治療薬の開発  
西道 隆臣  
理化学研究所脳科学総合研究センター

研究要旨

本研究では、ADの発症に深く関与するAβの脳内における代謝を制御する神経ペプチド-受容体-シグナル伝達システムを同定し、その機構を明らかにし、これを治療標的として、アルツハイマー病の予防と治療に応用することを目的とした。Aβ分解酵素ネプリライシンの活性は、神経成長因子を起点とするMAPK経路により抑制され、ソマトスタチンを起点とするPP1aを介した経路によりネプリライシン活性が増強されることが明らかになった。また、ソマトスタチンは、SSTR-1およびSSTR-4を介してシグナル下流のPP1aの活性化に関与している事も示された。これらの結果から、ネプリライシン活性賦活化の新規創薬標的を提示できた。ネプリライシンを基軸としたAβ分解促進のための新たな抗AD戦略を示せた(意義)。

A. 研究目的=本研究では、アルツハイマー病(AD)の発症に深く関与するAβの脳内における代謝を制御する神経ペプチド-受容体-シグナル伝達システムを同定し、その機構を明らかにする。これを治療標的として、アルツハイマー病の予防と治療に応用することを目的とする。

B. 研究方法:Aβ分解酵素ネプリライシン活性制御因子として、神経ペプチドの一つソマトスタチンや神経成長因子(NGF, BDNF, NT-3, NT-4)の同定に至っている。これらによるネプリライシン活性制御機構の詳細を明らかにし、新たな創薬標的を提示する。(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組換え実験およびヒト由来試料を用いる実験は、それぞれの研究施設の審査機関(倫理委員会または実験動物倫理委員会等)で審査を受け、承認を得て行った。動物実験に

ついては、国際医科学評議会(CIOMS)によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」などの動物福祉の基本原則と、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」、等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来試料を用いる実験においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの法令等を遵守して研究を行った。

C. 研究結果と考察=神経成長因子(NGF, BDNF, NT-3, NT-4)によるネプリライシンの活性制御機構の解析から、ネプリライシンの局在は、ネプリライシン細胞内領域(N末端から6残基目のセリン)のリン酸化/脱リン酸化により制御されている事が明らか

となった。特に、protein phosphatase 1a (PP1a)が、ネプリライシン活性の増強に関与している事が明らかとなった。これは、以前我々が報告した、ネプリライシン活性増強因子：ソマトスタチンの作用と共通の分子機構である可能性が示唆された。そこで、初代培養神経細胞へソマトスタチンを添加した結果、PP1a の発現が増強する事を明らかにした。また、PP1a は、DARPP32 の作用により活性化している事も示唆された。次に、ネプリライシン活性に対するソマトスタチン受容体(SSTR)アゴニストのスクリーニングを行った結果、SSTR-1 と SSTR-4 特異的なアゴニストにより、ネプリライシン活性が増強する事を明らかにした (論文未発表)。現在、SSTR サブタイプノックアウトマウス (ダブルノックアウトマウスを含む) を用いた解析を行っている。

A $\beta$  分解酵素ネプリライシンの活性は、その細胞内領域のリン酸化/脱リン酸化状態により規定されていることから、これら制御に関与する因子が新規創薬候補として挙げられる。特に、ネプリライシン活性の増強に関与するソマトスタチンは、その受容体 SSTR がヘテロダイマーを形成することや、SSTR-4 単独の欠損マウスの解析では、ネプリライシン活性の変化や脳内 A $\beta$  量に変化が認められていないことから、SSTR-1 と SSTR-4 が協調的に作用している可能性が考えられる。細胞膜に局在する受容体は、創薬標的として好都合であり、今後の詳細な解析が待たれる。

D. 結論=A $\beta$  分解酵素ネプリライシンの活性は、神経成長因子を起点とする MAPK 経路により抑制され、ソマ

トスタチンを起点とする PP1a を介した経路によりネプリライシン活性が増強される。また、ソマトスタチンは、SSTR-1 および SSTR-4 を介してシグナル下流の PP1a の活性化に関与している事も示唆された。このように、ネプリライシン活性の制御機構が明らかになったことで、ネプリライシン活性賦活化のための新規創薬標的を提示できた。ネプリライシンを基軸とした A $\beta$  分解促進のための新たな抗 AD 戦略へ発展することが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Funamoto, S., Sasaki, T., Ishihara, S., Nobuhara, M., Nakano, M., Watanabe-Takahashi, M., Saito, T., Kakuda, N., Miyasaka, T., Nishikawa, K., Saido, T. C., and Ihara, Y. (2013) *Nature communications* 4, 2529

Iwata, A., Nagata, K., Hatsuta, H., Takuma, H., Bundo, M., Iwamoto, K., Tamaoka, A., Murayama, S., Saido, T., and Tsuji, S. (2013) *Human molecular genetics*

Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., Zhang, M. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Ono, M., Masamoto, K., Takano, H., Sahara, N., Iwata, N., Okamura, N., Furumoto, S., Kudo, Y., Chang, Q., Saido, T. C., Takashima, A., Lewis, J., Jang, M. K., Aoki, I., Ito, H., and Higuchi, M. (2013) *Neuron* 79, 1094-1108

Huang, Z., Rose, A. H., Hoffmann, F.

- W., Hashimoto, A. S., Bertino, P., Denk, T., Takano, J., Iwata, N., Saido, T. C., and Hoffmann, P. R. (2013) *J Immunol* **191**, 3778-3788
- Frost, J. L., Le, K. X., Cynis, H., Ekpo, E., Kleinschmidt, M., Palmour, R. M., Ervin, F. R., Snigdha, S., Cotman, C. W., Saido, T. C., Vassar, R. J., St George-Hyslop, P., Ikezu, T., Schilling, S., Demuth, H. U., and Lemere, C. A. (2013) *The American journal of pathology* **183**, 369-381
- Hubener, J., Weber, J. J., Richter, C., Honold, L., Weiss, A., Murad, F., Breuer, P., Wullner, U., Bellstedt, P., Paquet-Durand, F., Takano, J., Saido, T. C., Riess, O., and Nguyen, H. P. (2013) *Human molecular genetics* **22**, 508-518
- Yamashita, T., Hideyama, T., Hachiga, K., Teramoto, S., Takano, J., Iwata, N., Saido, T. C., and Kwak, S. (2012) *Nature communications* **3**, 1307
- Kitazume, S., Yoshihisa, A., Yamaki, T., Oikawa, M., Tachida, Y., Ogawa, K., Imamaki, R., Hagiwara, Y., Kinoshita, N., Takeishi, Y., Furukawa, K., Tomita, N., Arai, H., Iwata, N., Saido, T., Yamamoto, N., and Taniguchi, N. (2012) *The Journal of biological chemistry* **287**, 40817-40825
- Shanab, A. Y., Nakazawa, T., Ryu, M., Tanaka, Y., Himori, N., Taguchi, K., Yasuda, M., Watanabe, R., Takano, J., Saido, T., Minegishi, N., Miyata, T., Abe, T., and Yamamoto, M. (2012) *Neurobiology of disease* **48**, 556-567
- Kakiya, N., Saito, T., Nilsson, P., Matsuba, Y., Tsubuki, S., Takei, N., Nawa, H., and Saido, T. C. (2012) *The Journal of biological chemistry* **287**, 29362-29372
- Abramowski, D., Rabe, S., Upadhaya, A. R., Reichwald, J., Danner, S., Staab, D., Capetillo-Zarate, E., Yamaguchi, H., Saido, T. C., Wiederhold, K. H., Thal, D. R., and Staufenbiel, M. (2012) *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 1273-1283
- Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Takano, J., Suemoto, T., Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., and Saido, T. C. (2012) *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 1204-1217
- Ryu, M., Yasuda, M., Shi, D., Shanab, A. Y., Watanabe, R., Himori, N., Omodaka, K., Yokoyama, Y., Takano, J., Saido, T., and Nakazawa, T. (2012) *Journal of neuroscience research* **90**, 802-815

## 2. 学会発表

Saido TC.

Pyroglutamyl A $\beta$  deposition in the Single-locus knockin mouse model of AD.

11<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease (AD/PD 2013),

Mar 7, 2013, Florence, Italy

Saido TC.

New and more relevant mouse models of Alzheimer's disease: Distinguishing facts from artifacts.

OECD Expert Consultation on "Unlocking Global Collaboration to Accelerate Innovation for Alzheimer' Disease and Dementia"

June 20, 2013, Oxford, England

Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Iwata N, Takano J, Nilsson P, Saido TC.

Update of novel type and more relevant model mouse for Alzheimer's disease.

Alzheimer's Association International Conference 2013(AAIC 2013)

July 15, 2013, Boston, USA

Saido TC.

Single APP locus knockin mouse models of Alzheimer's disease: Distinguishing facts from artifacts.

Alzheimer's Association International Conference 2013(AAIC 2013)

July 17, 2013, Boston, USA

Saido TC.

Single APP locus knockin mouse models of Alzheimer's disease: Distinguishing facts from artifacts.

Public Seminar of The Hong Kong University of Science and Technology

Aug. 26, 2013, Kowloon, Hong Kong

Saido TC.

Single APP locus knockin mouse models of AD.

The Cold Spring Harbor Asia

conference Molecular Basis of Aging & Disease

Sep. 12, 2013, Suzhou, China

垣矢直雅、齊藤貴志、Per Nilsson, 西道隆臣

ソマトスタチンを介したネプリライシン活性制御機構の解明によるAD新規創薬標的の提起

第86回日本生化学会大会 2013年9月13日、横浜

Saido, T.C.

Current status of the single APP locus knock-in mouse models of AD.

Workshop on Alzheimer's disease and related disorders.

Oct. 11, 2013, Kyoto, Japan

西道隆臣

次世代型アルツハイマー病モデルマウスの作製と応用

第32回日本認知症学会学術集会、2013年11月9日、松本

西道隆臣

アルツハイマー病の治療標的：アミロイド前とアミロイド後

日本学術会議公開シンポジウム、2013年1月21日、六本木

西道隆臣

次世代型アルツハイマー病モデルマウスとアルツハイマー病遺伝子治療の現状。新たな時代への躍進！

診断・治療・創薬研究のStrategy～がん 老化 再生医療～、学術セミナー、2013年1月21日、品川

H. 特許申請 なし

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

(分担)研究報告書

A $\beta$  産生分子機構の解明と特異的制御法による治療法の開発

研究分担者: 富田泰輔 東京大学大学院薬学系研究科

研究要旨

A $\beta$  は前駆体タンパク APP より、 $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼによる切断を受け産生・分泌される。この A $\beta$  産生システムはいずれも膜タンパクであり、細胞膜脂質環境と小胞輸送系に大きく影響を受けることが知られている。申請者はこれまでに、1) スフィンゴ脂質経路に関連する低分子化合物として SKI II、ABC294640、THI を見出し、これらを用いて S1P が直接  $\beta$  セクレターゼの膜貫通領域と結合することでアロステリックに切断活性を制御することを見出した。一方、S1P 受容体アンタゴニストである FTY720、KRP203 が  $\gamma$  セクレターゼの活性を抑制することを見出し、その標的候補分子として RNAi スクリーニングにより脂質結合型オーファン GPCR である EDG3 を同定した。また FTY720 の AD モデルマウスへの準慢性投与により、脳内 A $\beta$  量の低下が認められた。2) AD の遺伝学的危険因子である BIN1 はリサイクリングエンドソームにおいて脂質と結合し、 $\beta$  セクレターゼのリソソームへの輸送を促進する A $\beta$  産生抑制因子であることを明らかにした。一方、PICALM は  $\gamma$  セクレターゼの細胞表面膜からの内在化速度を決定し、A $\beta$ 42 産生活性を規定している分子であることが明らかとなった。特に AD 発症を低下させ、PICALM が結合する PI(4,5)P の結合部位におけるアミノ酸置換を惹起する Rare variant 変異や、PI(4,5)P 産生を抑制する化合物が A $\beta$ 42 産生を低下させることを見出した。

**A. 研究目的**＝本研究計画においては、神経細胞膜脂質組成及び小胞輸送系に着目し A $\beta$  産生を選択的に阻害する創薬標的分子の同定と低分子化合物のスクリーニングを行った。特に、1) スフィンゴ脂質・セラミド代謝経路による A $\beta$  産生制御機構の分子機構解明と *in vivo* における治療効果の解析、2) GWAS より同定された孤発性 AD の遺伝学的危険因子の機能解明、の 2 点について解明を進めた。

**B. 研究方法**＝1) スフィンゴ脂質・セラミド代謝経路に関連する低分子化合物および RNAi スクリーニングを培養細胞、初代培養神経細胞を用いて実施し、A $\beta$  産生に与える

影響を検討した。また利用可能な化合物については *in vivo* における治療効果を検討した。2) 孤発性 AD の遺伝学的危険因子の中でも、特に膜脂質系に関連する遺伝子 BIN1、PICALM について機能解明を行い、AD 発症経路への影響を検討した。

**C. 結果および D. 考察**＝1) スフィンゴ脂質経路に関連する低分子化合物として SKI II、ABC294640、THI を見出し、これらを用いて S1P が直接  $\beta$  セクレターゼの膜貫通領域と結合することでアロステリックに切断活性を制御することを見出した。一方、S1P 受容体アンタゴニストである FTY720、KRP203 が  $\gamma$  セクレターゼの活性を抑制す



ることを見出し、その標的候補分子として RNAi スクリーニングにより脂質結合型オーファン GPCR である EDG3 を同定した。また FTY720 の AD モデルマウスへの準慢性投与により、脳内 A $\beta$  量の低下が認められた。2) AD の遺伝学的危険因子である BIN1 はリサイクリングエンドソームにおいて脂質と結合し、 $\beta$  セクレターゼのリソソームへの輸送を促進する A $\beta$  産生抑制因子であることを明らかにした。一方、PICALM は  $\gamma$  セクレターゼの細胞表面膜からの内在化速度を決定し、A $\beta$ 42 産生活性を規定している分子であることが明らかとなった。特に AD 発症を低下させ、PICALM が結合する PI(4,5)P の結合部位におけるアミノ酸置換を惹起する Rare variant 変異や、PI(4,5)P 産生を抑制する化合物が A $\beta$ 42 産生を低下させることを見出した。

**E. 結論** = A $\beta$  産生経路における膜脂質環境の重要性が明確となった。特に  $\beta$  セクレターゼについてはスフィンゴ脂質やセラミドが  $\beta$  セクレターゼの安定性や活性に大きな影響を与えること、また  $\gamma$  セクレターゼ活性制御については PI(4,5)P を始めとするフォスファチジルイノシトールが制御する細胞内小胞輸送経路が重要であることが明らかとなった。今後これらの脂質の変化が孤発性 AD 脳で生じているか、また AD 発症リスクを診断するバイオマーカーとしての可能性について検証する。そしてこれらの経路が創薬における介入点となりうるかについて、前臨床モデルを用いて検討する。

**F. 健康危険情報**  
なし

**G. 研究発表**

## 1. 論文発表

- Takagi-Niidome, S., Osawa, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) *Biochemistry* **52**, 61-69
- Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2012) *Neuron* **76**, 410-422
- Takeo, K., Watanabe, N., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2012) *The Journal of biological chemistry* **287**, 25834-25843
- Hayashi, I., Takatori, S., Urano, Y., Miyake, Y., Takagi, J., Sakata-Yanagimoto, M., Iwanari, H., Osawa, S., Morohashi, Y., Li, T., Wong, P. C., Chiba, S., Kodama, T., Hamakubo, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2012) *Oncogene* **31**, 787-798
- Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Tomita, T., and Morohashi, Y. (2013) *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* **53**, 956
- Li, Y., Lu, S. H., Tsai, C. J., Bohm, C., Qamar, S., Dodd, R. B., Meadows, W., Jeon, A., McLeod, A., Chen, F., Arimon, M., Berezovska, O., Hyman, B. T., Tomita, T., Iwatsubo, T., Johnson, C. M., Farrer, L. A., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., and St George-Hyslop, P. H. (2013) *Structure*
- Hoshi, M., Ohki, Y., Ito, K., Tomita, T., Iwatsubo, T., Ishimaru, Y., Abe, K., and Asakura, T. (2013) *BMC biochemistry* **14**, 16

Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) *PloS one* **8**, e64050

Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) *The Journal of biological chemistry* **288**, 14673-14680

Imamura, Y., Umezawa, N., Osawa, S., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Kato, N., Tomita, T., and Higuchi, T. (2013) *Journal of medicinal chemistry* **56**, 1443-1454

Tsuji, H., Arai, T., Kametani, F., Nonaka, T., Yamashita, M., Suzukake, M., Hosokawa, M., Yoshida, M., Hatsuta, H., Takao, M., Saito, Y., Murayama, S., Akiyama, H., Hasegawa, M., Mann, D. M., and Tamaoka, A. (2012) *Brain : a journal of neurology* **135**, 3380-3391

## 2. 学会発表

Taisuke Tomita\*: Development of preemptive medicine for Alzheimer disease based on molecular basis of A $\beta$  production and synaptic toxicity. April 25-26, 2013, Symposium "Memory Traces and Tags". Queretaro, Mexico

Taisuke Tomita\*, Koji Takeo, Shun Tanimura, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. May 13-17, 2013, CSH - ASIA Meeting, MEMBRANE PROTEIN STRUCTURE & FUNCTION, Suzhou, China

Aya Tominaga, Taisuke Tomita\*, Takeshi Iwatsubo: Identification of the structural change of Presenilin 1 associated with altered A $\beta$ 42 production. May 13-17, 2013, CSH - ASIA Meeting, MEMBRANE PROTEIN STRUCTURE & FUNCTION, Suzhou, China

Taisuke Tomita\*, Kunimichi Suzuki, Azusa Shiohara, Satoko Osawa, Takeshi Iwatsubo: Pathophysiological role of proteolytic cleavage of Neuroligins. July 20-25, 2013, AAIC, Boston, USA

Nobumasa Takasugi, Tomoki Sasaki, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- $\beta$  production in neurons. July 20-25, 2013, AAIC, Boston, USA

Taisuke Tomita\*: Modulation of BACE1 activity by membrane environment. Oct 6-8, 2013, Kloster Seeon Meeting on BACE Proteases in Health and Disease. Bavaria, Germany.

Taisuke Tomita\*: Mechanistic insight of the  $\gamma$ -secretase-mediated intramembrane cleavage. Oct 20-24, 2013, 8th General Meeting of the International Proteolysis Society. Cape Town, South Africa.

Kunihiko Kanatsu, Yuichi Morohashi, Toshio Watanabe, Taisuke Tomita\*, Takeshi Iwatsubo: CALM impacts on A $\beta$ 42 production ratio through modulation of clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. Neuroscience 2013. November 9-13, 2012, San Diego, USA

Taisuke Tomita\*, Koji Takeo, Shun Tanimura, Satoshi Yokoshima, Tohru

Fukuyama, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. Neuroscience 2013. November 9-13, 2013, San Diego, USA

岩坪威、橋本唯史、若林朋子、富田泰輔\*、諸橋雄一:アルツハイマー病:遺伝学的・環境的リスク因子に関する実験的検証の現況 2013年5月29日-6月1日 第54回日本神経学会学術大会 東京

富田泰輔\*:シナプス接着分子 Neuroligin の神経活動依存性プロセッシング 2013年6月7日 平成25年度生理学研究所研究会「シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻」岡崎

富田泰輔\*:アルツハイマー病の分子病態解明:先制医療の開発に向けて 2013年6月8日 東京大学生命科学シンポジウム 東京

富田泰輔\*:アルツハイマー病先制医療の開発に向けて:現状と展望 2013年6月9日 星薬科大学認定薬剤師研究 薬剤師生涯学習・講演会シリーズ 東京

Taisuke Tomita\*: For the study of human cerebral neurodegeneration. June 20-23, 2013, Neuro2013. Kyoto, Japan.

Taisuke Tomita: Biology of  $\gamma$ -secretase. June 23-27, 2013, 11th World Congress of Biological Psychiatry. Kyoto, Japan.

富田泰輔\*:国際誌に論文を投稿するのは四苦八苦 2013年7月5日 英語論文セミナー 2013~国際誌に投稿するために知っておきたいこと~ 東京

Taisuke Tomita\*: Structure and function relationship of intramembrane-cleaving  $\gamma$ -secretase. 2013年9月12日 第86回日本生化学会 横浜

富田泰輔\*:先制医療を目指したアルツハイマー病治療薬開発に向けて 2013年9月23日 第46回日本薬剤師会学術大会 大阪

富田泰輔\*:先制医療を目指したアルツハイマー病治療薬開発に向けて 2013年10月2日 第9回東京女子医大テニュアトラック教員支援セミナー

富田泰輔\*:先制医療の開発に向けたアルツハイマー病の分子病態解明 2013年10月26日 第57回日本薬学会関東支部大会 東京

木棚究、秋下雅弘、大内尉義、富田泰輔\*、岩坪威:グリア系培養細胞上清中に含まれるセリンプロテアーゼ様 A $\beta$  分解活性の解析 2013年11月8-10日 第32回日本認知症学会学術集会 松本

**H. 特許申請**  
なし

## AD 患者脳の異常タウのプリオン様性質とその中心構造の解析

研究分担者：長谷川成人<sup>1)</sup>

研究協力者：宮田悠<sup>1,2)</sup>、亀谷富由樹<sup>1)</sup>、久永真市<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室

<sup>2)</sup> 首都大学東京 大学院理工学研究科生命科学コース

### 研究要旨

タウ蛋白の異常病変形成機序として、最初に凝集核(シード)が形成され、正常タウがシードに結合して線維化が進行することが想定される。培養細胞にタウを発現し、そこへ AD 患者の不溶性画分を導入すると、患者脳で認められる病的なタウのリン酸化や蓄積が再現される。タウ蓄積のない患者脳不溶性画分の場合には蓄積がおこらないこと、また不溶性画分からタウを免疫除去すると蓄積が起こらないことから、不溶性画分内の異常タウがシードとして働き、発現したタウが不溶化することが強く示唆される。患者脳の異常タウは異常プリオンと同様、熱やプロテアーゼに対して強い安定性を有していることから、トリプシンや **Proteinase K** 処理した異常タウについて、各種抗体を用いた生化学解析、質量分析を用いた蛋白化学解析を行った。その結果、3R タウと 4R タウの微小管結合領域が逆平行βシート構造をとったものがその本体であることを明らかにした。

### A.研究目的

アルツハイマー病(AD)の患者脳におけるタウの異常蓄積メカニズムを明らかにし、タウ病変の広がりを抑える薬剤や治療法を開発することを目的とする。我々は、線維化したタウをリポフェクションにより細胞内に導入すると細胞内で発現した正常タウが異常に変換されて、リン酸化やユビキチン化を受けて細胞内に蓄積することを見いだしている。また昨年度は AD をはじめとするタウの異常が認められるタウオパチー患者脳の不溶性画分を細胞内に導入することで、タウ蓄積がおこることを報告した。さらにその正常タウを異常に変換するシード能は熱やプロテアーゼに高い安定性を示すことも報告した。

今年度は、AD 脳に蓄積するタウのプリオン様性質を示す中心構造を明らかにすることを目的とした。

### B.研究方法

AD 患者剖検脳 (側頭葉あるいは頭頂葉)から 1% Sarkosyl, 0.8M NaCl を含むトリス緩衝液に不溶性を示す画分を調製し、得られた画分を生理食塩水にて洗浄後、少量のリン酸緩衝液にけん濁し、超音波処理により均一に分散させた。これをシードとして、ヒト3リピート(3R)タウ、4リピート(4R)タウを発現する SH-SY5Y 細胞に遺伝子導入試薬を用いて導入し、そのシード能を検討した。細胞を回収後、不溶性画分について、抗タウ抗体 (T46, HT7)、抗リン酸化タウ抗体(pS396)等を用いてイムノブロット解析を行ない、シード能の変化を調べた。

患者脳のプロテアーゼ耐性領域の免疫化学、蛋白化学解析は、サルコシル不溶性画分をトリプシン、**proteinase K** 処理した後、各種の抗タウ抗体でイムノブロット解析を行った。またプロテアーゼ耐性タウの断片をさらにゲル内消化し質量分析での解析を行った。

(倫理面への配慮)

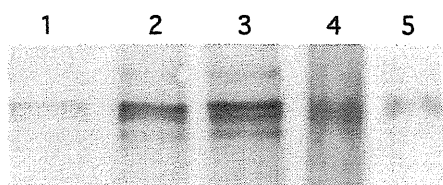
すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員

会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。また、剖検脳からの試料調製については当研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

### C. 研究結果

#### 1. AD 患者脳に蓄積するタウのプリオン様性質

AD 脳からサルコシル不溶性画分を調製し、それを 3R タウ、あるいは 4R タウを発現する培養細胞に導入すると、いずれのタウアイソフォームも培養細胞内にリン酸化を受けて蓄積することが示された。不溶性画分からタウを免疫除去するとその活性が消失することから、不溶性画分に含まれる異常タウが正常タウを異常に変換するシード能を有していることが示唆された。次に 100°C、5 分の熱処理、あるいはトリプシン、proteinase K 処理などの各種プロテアーゼ処理を施し、そのシード能が変化するかどうかが調べた。その結果、熱処理した後でも、活性は消失することなく、むしろ強くなる蛍光が観察された。さらに、トリプシン、キモトリプシン、Protenase K などのプロテアーゼで処理した患者脳由来不溶性画分をタウ発現細胞に導入しても、タウが蓄積することが示された。下図は AD 不溶画分を処理後に細胞に導入し、3 日後の細胞内のタウ蓄積のイムノブロット解析を示す。



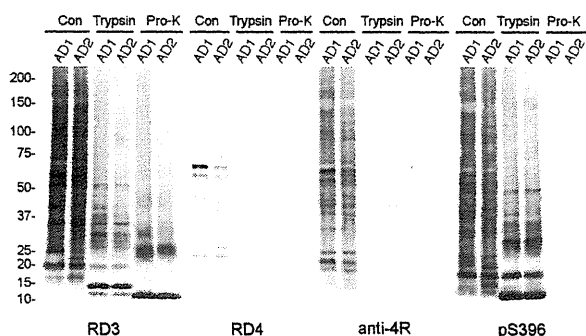
1. 未処理、2. 100°C、5min、3. トリプシン、4. キモトリプシン、5. Proteinase K 処理した不溶性画分を導入した細胞におけるタウの蓄積。

この結果から、タウオパチー患者脳に蓄積した異常タウ線維は異常プリオンと同様、プロテアーゼに安定の性質を持っていることが示された。

#### 2. AD 患者脳に蓄積するプロテアーゼ耐性タウの免疫化学、蛋白化学解析

AD 脳に蓄積するタウをトリプシン、キモトリプシン、proteinase K 処理を行った後でも、正常タウを異常に変換するプリオン様活性が保持されていることから、それらプロテアーゼに耐性を示すタウがプリオン様活性の本体であると考えられる。そこで、耐性を示す部分がタウのどの領域から構成されているか、各種部位特異抗体を用いて免疫化学的に解析した。その結果、3R タウ特異抗体である RD3 (htau 209-224)はトリプシン、proteinase K 処理後も 10~25kDa のプロテアーゼ耐性断片が検出されたのに対し、RD4 (htau 275-291)、anti-4R(htau 275-291)の反応はプロテアーゼ処理により消失することが示された。また pS396 はトリプシン処理で残るものの proteinase K ではほぼ消失することが明らかとなった。

(図は 2 例の AD の不溶画分をトリプシン、あるいは proteinase K 処理した後に各種抗体でイムノブロットしたものを示す)。



#### 3. proteinase K 耐性タウの LC/MS/MS 解析

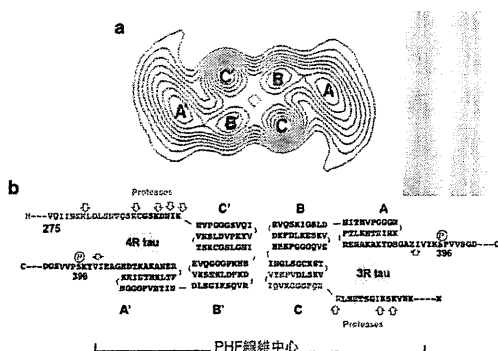
トリプシンで処理した AD 患者脳不溶性画分を SDS-PAGE で分離後に CCB 染色すると、10~15kDa に複数バンドが確認された。これらのバンドがトリプシンに耐性を示す領域であると考えられ、バンドを切り出し、さらにトリプシンでゲル内消化を行い、LC/MS/MS による質量分析を行って解析した。その結果、ヒトタウの 260~395(3R タウ)、あるいは 299~383(4R タウ)の領域にお

けるペプチドが検出された。この結果は、過去の報告とほぼ一致する結果であった (Hasegawa, 1993, Novak, 1991)。

一方、Proteinase K で処理した AD 患者脳不溶性画分を SDS-PAGE で分離し CBB で染色すると、約 12kDa の位置にブロードなバンドが検出された。このバンドが Proteinase K に耐性を示す領域であると考えられ、同様に質量分析を行った。その結果、262~393 の領域における 3R タウと 4R タウのペプチドが検出され、トリプシン耐性領域とほぼ同じ領域が Proteinase K でも耐性であることが示された。

### 3. AD 脳に蓄積する線維化タウの中心構造

今回の AD 脳に蓄積するプロテアーゼ耐性タウ領域の同定と、過去に報告された電顕観察、免疫電顕などによる解析などから、タウの重合構造を予測した。トリプシン、proteinase K 耐性領域の質量分析、RD3、RD4 などの抗体の反応性の評価などから、3R タウは RD3 のエピトープのあたりから PHF の中心構造に組み込まれているのに対し、4R タウは RD4 のエピトープが中心領域から外れて外側に少し露出しているものと考えられる。一方、pS396 抗体の認識部位はトリプシンには耐性であるが、proteinase K 処理では消失したことから、このリン酸化部位も PHF の中心構造からは少し外れて存在していると考えられる。



左下図の説明

a. Crowther が報告した PHF の断面の電子顕微鏡による解析と PHF の電顕像。PHF の中心部分には

主に 3 つの電子密度が高い領域が存在し、それらが C の形態をとって互いに向き合って存在している。b. 今回の解析結果と過去の報告から、3R タウの 3 つのリピートと 4R タウの 3 つのリピートがその高密度領域を形成し、3R タウと 4R タウがそれぞれのリピート部分を介して逆平行  $\beta$  シート構造をとって会合していると予測し、タウのアミノ酸配列を Crowther のモデルにあわせるように配置した。

### E. 考察

昨年度の解析に引き続き、今年度は、AD 患者脳に蓄積する異常タウが正常タウを異常に変換する活性(シーディング能)について、その本体を解明すべく、プロテアーゼ耐性を示すタウの免疫組織化学、蛋白化学解析を行った。その結果、RD3 が認識する領域は明らかな耐性を示すのに対し、RD4 が認識する領域はプロテアーゼ処理によって消失することが示された。しかしながらトリプシンや proteinase K 耐性タウバンドの質量分析による解析からは、3R タウと RD4 エピトープが切断されたタウの C 末端断片が検出された。またその割合は、3R タウと 4R タウがほぼ同じ程度であった。以上の結果といくつかの過去の詳細な解析結果から、3R タウと 4R タウのそれぞれの 3 つのリピート部分が逆平行  $\beta$  シート構造を形成して PHF の中心構造を作っていると予測された。この構造は、AD では 3R タウと 4R タウのアイソフォームがほぼ同量蓄積する理由を明解に説明できるだけでなく、PHF というユニークな線維構造が 3R タウと 4R タウのヘテロダイマーが中心構造を構成しているためであると考えれば理解できる。

免疫組織染色による神経病理学的解析から、AD では、はじめに 4R タウが蓄積し、その後で 3R タウが蓄積するという報告もあるが、NFT の老化を捉えた可能性があり注意が必要である。一つは RD4 抗体の認識部位内にある 279 番目のアスパラギン残基において、蛋白質の老化の一種である脱アミド化がおこり、そのために RD4 が反応し

なくなることがある(Dan et al, 2013)。もう一つは、AD 脳に蓄積するタウは先の図にしめたように、RD4 のエピトープは PHF の中心領域から少し外れて存在するが、RD3 の認識部位は PHF の中心部分に存在する。このため、RD4 は比較的の外側に露出されていて、反応しやすい反面、プロテアーゼに対する影響も受けやすく、ghost tangle などではエピトープが切断されて消失していると考えられる。一方中心部分に存在する RD3 のエピトープは、プロセッシングを受けていない場合は反応しにくく、プロテアーゼによって攻撃を受けた後の方が逆にエピトープが露出して反応性が上がると考えられる(Hasegawa et al, 2014)。このようにエピトープが近いにも関わらず、全く逆の反応性を示す場合があるために注意が必要である。

AD 脳に蓄積するタウは、6 種類のタウアイソフォームすべてが含まれているが、なぜ、どのようにして、6 種類のアイソフォームが蓄積するのか明らかではない。しかしながら、今回の解析から、3R タウと 4R タウのリピート部分が会合するようにヘテロダイマーを形成して蓄積するのではればこのなぞも用意に説明できるものと思われる。

今回の解析で明らかにした PHF の中心構造は、AD におけるタウ病変の本体であると考えられる。この異常構造が正常タウと結合することで、正常分子を異常構造に変換して、異常タウが増幅され、それが細胞間を伝わって病変が広がる可能性が高い。このような異常構造を持ったタウと特異的に結合し、正常タウとの結合を阻害するような低分子化合物や、異常タウが細胞間を伝えることを防ぐ薬剤の開発が AD の進行を抑える根本治療薬として求められる。

## F.結論

培養細胞に AD 患者剖検脳由来の不溶性タウを導入すると患者脳で見られるタウの異常リン酸化と蓄積が再現された。このタウのプリオン様性質は、熱安定、プロテアーゼ安定性を示した。AD 患者脳のプロテアーゼ耐性領域を生化学、組織化学、蛋白

化学的に解析し、その領域を同定し、過去の電子顕微鏡による報告と総合して、プリオン様活性を有する本体の構造予測を行った。この構造をもとに治療薬や治療法の探索、開発が期待される。

## F.健康危険情報

特になし

## G：研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

### 1：論文発表

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4:124-34.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136:1128-38.

Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One* 8:e67433.

Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Comm* 1: 68.

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F,

Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Comm* 1: 54.

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 288: 7968-77.

2 : 学会発表

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea Japan Symposium, Seoul [2013. 2. 26]

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]

長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]

長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序 - 患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証 - 平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 生命科学系3分野 がん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]

長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]

H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1 : 特許取得

なし

2 : 実用新案登録

なし

3 : その他

2013年7月、米国科学誌「Cell Reports (セルリポート)」での論文発表について、東京都広報部よりプレスリリースすると共に、東京都医学総合研究所のホームページにて成果の概要を掲載。

<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2013/0704.html>



### III.研究成果の刊行に関する一覧表

## 論文一覧

著者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito J, Kheirollah A, Nagayasu Y, Ueda H, Yokoyama S, Michikawa M.	Involvement of cdc42/Rho kinase in apoA-I-mediated cholesterol efflux through interaction between cytosolic lipid-protein particles and microtubules in rat astrocytes.	<b>J Neurosci Res</b>			In press
Okihara H <sup>2</sup> , Ito J, Kokai S, Ishida T, Hiranuma M, Kato C, Yabushita T, Ishida K, Ono T, Michikawa M	Liquid diet induces memory impairment accompanied by a decreased number of hippocampal neurons in mice	<b>J Neurosci Res</b>			In press
Hoshino H, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Takeda-Uchimura Y, Michikawa M, Kadomatsu K and Uchimura K	KSGal6ST is essential for the 6-sulfation of galactose within keratan sulfate in early postnatal brain	<b>J Histochem Cytochem,</b>			
Oue H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung CG, Michikawa, M, Akagawa, Y.	Tooth loss induces memory impairment and neuronal cell loss in APP transgenic mice.	<b>Behav Brain Res</b>	252	318-325	2013
Zou K, Liu J, Watanabe A, Hiraga S, Liu S, Tanabe C, Maeda T, Terayama Y, Takahashi S, Michikawa M, Komano H	A $\beta$ 43 is the earliest depositing A $\beta$ species in APP transgenic mouse brain and is converted to A $\beta$ 41 by two active domains of ACE.	<b>Am J Pathol</b>	182	2322-2331	2013

Ito J, Nagayasu Y, Hoshikawa M, Kato K.H., Miura Y, Asai K, Hayashi H, Yokoyama Y, Michikawa M.	Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide.	<b>Brain Res.,</b>	1552:	12-21	2013
Kanatsu K, Morohashi, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T*, Iwatsubo T	Decreased CALM expression reduces A $\beta$ 42 to total A $\beta$ through clathrin-mediated endocytosis of $\gamma$ -secretase.	<b>Nat. Comm.</b>	5	3386	2014
Ohki Y, Shimada N, Higo T, Tokoshima S, Fukuyama T, Tomita T*, Iwatsubo T	Binding of longer A $\beta$ to transmembrane domain 1 of presenilin 1 impacts on A $\beta$ 42 generation.	<b>Mol. Neurodegener.</b>	9(1)	7	2014
Taniguchi A, Sasaki D, Shiohara A, Iwatsubo T, Tomita T*, Sohma Y, Kanai M	Attenuated aggregation and neurotoxicity of amyloid- $\gamma$ peptide by catalytic photo-oxidation.	<b>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</b>	53(5)	1382-1385	2014
Li Y, Hsueh-Jeng Lu S, Tsai CJ, Bohm C, Qamar S, Dodd RB, McDonald B, Meadows W, Jeoh A, McLeod A, Chen F, Arimon M, Berezovska O, Hyman BT, Tomita T, Iwatsubo T, Schmitt-Ulms, S, Fraser P, St. George-Hyslop P	Biophysical analysis of reciprocal allosteric interactions between $\gamma$ -secretase inhibitor and initial substrate binding sites give insight into human presenilin-1 complex function.	<b>Structure</b>	22(1)	125-135	2014
Hoshi M, Ohki Y, Ito K, Tomita T, Iwatsubo T, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T	Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide	<b>BMC Biochem</b>	14	16	2013

	peptidase of <i>Arabidopsis thaliana</i> .				
Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, Takeo K, Tomita T*, Iwatsubo T	FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- $\beta$ production in neurons.	<b>PLoS ONE</b>	8(5)	e64050	2013
Morohashi Y, Tomita T*	Protein trafficking and maturation regulates intramembrane proteolysis.	<b>BBA-Biomembranes</b>	1828(12)	2855-61	2013
Tomita T*, Iwatsubo T	Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases.	<b>J. Biol. Chem.</b>	288(21)	14673-14680	2013
Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., Tanaka, M., Iwata, N., Saito, T., <u>Saido, T.C.</u>	A $\beta$ secretion and plaque formation depend on autophagy.	<b>Cell Reports</b>	5(19)	61-69	2013
Sörgjerd, K.M., Zako, T., Sakono, M., Stirling, P.C., Leroux, M.R., Saito, T., Nilsson, P., Sekimoto, M., <u>Saido, T.C.</u>	Human prefoldin inhibits amyloid- $\beta$ (A $\beta$ ) fibrillation and contributes to formation of nontoxic A $\beta$ aggregates.	<b>Biochemistry</b>	52	3532-3542	2013
Funamoto, S., Sasaki, T., Ishihara, S., Nobuhara, M., Nakano, M., Watanabe-Takahashi, M., Saito, T., Kakuda, N., Miyasaka, T., Nishikawa, K., <u>Saido, T.C.</u> , Ihara, Y.	Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of $\gamma$ -secretase.	<b>Nat. Commun.</b>	4:2529	doi:10.1038/ncomms3529	2013