

アルツハイマー病発症関連分子A $\beta$ 42産生に寄与する  
Presenilin 1の構造活性相関解明

蔡 哲夫

1. 序論.....	8
1.1 Alzheimer Disease の病理.....	8
1.1.1 概歴.....	8
1.1.2 臨床・前臨床症状.....	8
1.1.3 Alzheimer disease の病態生理学.....	8
1.1.3.1 A $\beta$ .....	8
1.1.3.2 tau.....	9
1.1.3.3 ApoE.....	10
1.1.3.4 神経免疫の活性化.....	11
1.1.3.5 ウィルス感染.....	12
1.2 Alzheimer Disease の治療.....	13
1.2.1 Acetylcholine の亢進.....	13
1.2.2 Glutamate Cytotoxicity の緩和.....	14
1.2.3 Amyloid 仮説に着目した治療戦術.....	15
1.2.3.1 A $\beta$ 産生の抑制.....	15
1.2.3.2 A $\beta$ clearance の亢進.....	15
1.2.4 tau に着目した治療戦術.....	16
1.2.5 ApoE に着目した治療戦術.....	17
1.2.6 抗神経炎症.....	18
1.3 APP、A $\beta$ の歴史的背景.....	18
1.3.1 Amyloid Cascade 仮説について.....	18
1.3.2 APP の発見.....	19
1.4 APP 代謝と A $\beta$ 産生.....	19
1.4.1 APP 切断に関わる酵素.....	19
1.4.1.1 $\alpha$ -secretase.....	20
1.4.1.2 $\beta$ -secretase.....	20
1.4.1.3 $\gamma$ -secretase.....	21
1.4.2 $\gamma$ -secretase による切断様式.....	21
1.4.2.1 $\epsilon$ -cleavage.....	21
1.4.2.2 $\zeta$ -cleavage.....	21
1.4.2.3 $\gamma$ -cleavage.....	22
1.4.2.4 short A $\beta$ の産生.....	23
1.4.3 様々な N-, C-terminally truncated A $\beta$ .....	24
1.4.3.1 A $\beta$ 34.....	24
1.4.3.2 A $\beta$ 24.....	24
1.4.3.3 A $\beta$ 2-x.....	25
1.4.3.4 A $\beta$ 3-x と pE A $\beta$ 3-x.....	25
1.4.3.5 A $\beta$ 4-x.....	25

1.4.4 APP family .....	26
1.5 APP、A $\beta$ の生理機能 .....	26
1.5.1 凝集性.....	26
1.5.2 毒性 .....	27
1.5.2.1 興奮毒性 .....	27
1.5.2.2 NMDA receptor との関与.....	28
1.5.2.3 酸化ストレス .....	30
1.5.2.4 C99 ( $\beta$ -CTF)の毒性 .....	30
1.5.3 重金属イオンとの関与.....	31
1.5.3.1 A $\beta$ と Cu <sup>2+</sup> .....	31
1.5.3.2 A $\beta$ と Zn <sup>2+</sup> .....	32
1.5.3.3 APP と Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup> .....	32
1.5.4 脳組織の正常発達への関与.....	32
1.5.4.1 APP KO.....	32
1.5.4.2 APP DKO と TKO .....	33
1.5.5 転写調節.....	33
1.5.6 糖鎖修飾.....	34
1.6 $\gamma$ -Secretase の発見.....	34
1.7 $\gamma$ -Secretase の分子実態.....	35
1.7.1 複合体形成 .....	36
1.7.2 Nicastrin .....	36
1.7.3 Anterior Pharynx Defective (Aph-1) .....	37
1.7.4 Presenilin Enhancer 2 (Pen-2) .....	38
1.7.5 Presenilin .....	38
1.7.5.1 Transmembrane Domain 1.....	39
1.7.5.2 Helical Loop 1 .....	40
1.7.5.3 Transmembrane Domain 2.....	42
1.7.5.4 Helical Loop 2 .....	42
1.7.5.5 Transmembrane Domain 3.....	43
1.7.5.6 Transmembrane Domain 4.....	44
1.7.5.7 Helical Loop 4 .....	44
1.7.5.8 Transmembrane Domain 5.....	44
1.7.5.9 Transmembrane Domain 6.....	45
1.7.5.10 exon 8 領域.....	45
1.7.5.11 Transmembrane Domain 7.....	46
1.7.5.12 Helical Loop 7 .....	47
1.7.5.13 Transmembrane Domain 8 .....	47
1.7.5.14 PALP motif .....	47

1.7.5.15 Transmembrane Domain 9 .....	48
1.7.5.16 最 C 末端 .....	48
<b>1.8 <math>\gamma</math>-Secretase の機能、性質 .....</b>	<b>49</b>
<b>1.8.1 生理機能 .....</b>	<b>49</b>
1.8.1.1 転写調節 .....	49
1.8.1.2 運命決定 .....	49
1.8.1.3 細胞死の調節 .....	50
1.8.1.4 神経突起伸長と細胞接着 .....	50
<b>1.8.2 基質切断機構 .....</b>	<b>51</b>
1.8.2.1 膜内加水分解機構 .....	52
1.8.2.2 基質の親水性環境への移動 .....	52
1.8.2.3 基質の保持 .....	53
1.8.2.4 切断機構 .....	53
1.8.2.5 基質の不安定化 .....	54
1.8.2.6 基質特異性 .....	54
<b>1.8.3 金属イオンとの関与 .....</b>	<b>56</b>
1.8.3.1 重金属イオンとの関与 .....	56
1.8.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ との関与 .....	56
<b>1.8.4 活性中心 PS の代謝 .....</b>	<b>57</b>
1.8.4.1 PS 断片化 .....	57
1.8.4.2 PS NTF/CTF heterodimer .....	57
1.8.4.3 PS 断片化の意義 .....	58
<b>1.8.5 糖鎖付加 .....</b>	<b>58</b>
<b>1.8.6 細胞内局在 .....</b>	<b>58</b>
<b>1.9 <math>\gamma</math>-Secretase inhibitor .....</b>	<b>59</b>
<b>1.9.1 第 1 世代の GSI .....</b>	<b>59</b>
1.9.1.1 Transition-state analogue 型 GSI .....	59
1.9.1.2 Dipeptide 型 GSI .....	60
1.9.1.3 Benzodiazepine 型 GSI .....	61
1.9.1.4 Aib peptide 型 GSI .....	61
1.9.1.5 部分ペプチド型 GSI .....	62
1.9.1.6 第 1 世代の GSI の副作用 .....	62
<b>1.9.2 第 2 世代の GSI .....</b>	<b>62</b>
1.9.2.1 Sulfonamido 型 GSI .....	62
1.9.2.2 Sulfone 型 GSI .....	63
<b>1.9.3 <math>\text{A}\beta</math> rise 現象 .....</b>	<b>64</b>
<b>1.10 <math>\gamma</math>-Secretase modulator .....</b>	<b>65</b>
<b>1.10.1 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs .....</b>	<b>66</b>



1.10.2 第2世代のGSM.....	67
1.10.2.1 Phenylpiperidine 型 GSM.....	67
1.10.2.2 Phenylimidazole 型 GSM.....	67
1.10.3 GSM 様活性を持つ天然化合物.....	69
1.11 BACE1 inhibitor.....	70
1.11.1 第1世代のBSI.....	70
1.11.2 第2世代のBSI.....	71
1.11.3 第3世代のBSI.....	71
1.11.3.1 1,3-Thiazine 型 BSI.....	71
1.11.3.2 1,3-Oxazine、1,4-oxazine 型 BSI.....	72
1.11.3.3 Thiomorpholine-dioxide、thiadiazine-dioxide 型 BSI.....	74
1.11.3.4 Piperazine、pyrrolidine 型 BSI.....	74
1.11.3.5 1,3-Oxazoline 型 BSI.....	75
1.11.3.6 Tetrahydropyridine-2-amine 型 BSI.....	75
1.12 研究目標.....	75
2. 実験材料と実験手法.....	76
2.1 発現コンストラクトの作成.....	76
2.1.1 SCAM、Crosslink 用 Cys 置換 PS1.....	76
2.1.2 各種変異体導入型 PS1.....	77
2.1.3 大腸菌ベクターの作成.....	78
2.2 試薬、Buffer 組成.....	78
2.2.1 Cells.....	78
2.2.2 Buffers.....	79
2.2.3 Antibodies.....	80
2.3 実験手法.....	80
2.3.1 細胞の培養条件.....	80
2.3.2 DKO 細胞への retrovirus infection.....	80
2.3.3 ELISA.....	81
2.3.4 SDS-PAGE、Western Blotting 解析.....	81
2.3.5 SDS-Urea gel 電気泳動/Western Blotting.....	81
2.3.6 BCA assay.....	81
2.3.7 SCAM (intact cells).....	82
2.3.8 Preparing microsomes.....	82
2.3.9 SCAM (microsomes).....	82
2.3.10 Crosslink.....	83
2.3.11 Cell free assay.....	83
2.3.12 Preparing solubilized fraction.....	83
2.3.13 Photoaffinity Labeling (PAL).....	83

2.3.14 sC99 purification .....	84
2.3.15 <i>In vitro</i> assay .....	84
2.3.16 Luciferase assay .....	85
2.3.17 統計学的処理.....	85
3. 結果.....	86
3.1 TMD3 の topology 解析 .....	86
3.1.1 TMD3 single Cys PS1 Mt の活性評価 .....	86
3.1.2 TMD3 周囲の親水性環境 .....	87
3.1.3 Crosslinker による TMD3 の topology 解析 .....	87
3.2 TMD3 の面する活性中心ポアの解析.....	89
3.2.1 酵素活性化状態の活性中心ポアの変動 .....	89
3.2.2 A $\beta$ 42 産生増加時の活性中心ポアの変動 .....	89
3.2.2.1 FAD 変異による活性中心ポアの変動 .....	89
3.2.2.2 Pen-2 N 末端伸長による活性中心ポアの変動 .....	90
3.2.3 A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアの変動 .....	91
3.2.3.1 V236S 変異による活性中心ポアの変動.....	91
3.2.3.2 GSM による活性中心ポアの変動 .....	91
3.2.3.3 F176L 変異による活性中心ポアの変動.....	91
3.2.4 遷移状態の活性中心ポアの比較 .....	92
3.2.4.1 V236S 変異による活性中心ポアの変動との比較.....	92
3.2.4.2 GSM による活性中心ポアの変動との比較.....	92
3.3 A $\beta$ 42 産生を制御する TMD3 の構造変化の解析 .....	92
3.3.1 Crosslinker による距離の変動の検出.....	92
3.3.2 Crosslinker を構造固定剤として用いた検討.....	93
3.3.2.1 Cell free assay による検討.....	93
3.3.2.2 <i>In vitro</i> assay による検討 .....	94
3.4 水分子保持候補残基の検討 .....	94
3.4.1 水分子保持候補残基の変異体解析.....	95
3.4.2 水分子保持候補残基周囲の親水性の検出.....	95
3.5 TMD3 の構造変化と TMD1 の構造変化の関連性の検討.....	96
4. 考察.....	98
4.1 実験系の妥当性に関する考察.....	98
4.1.1 各 PS1 Mt 活性評価法の妥当性に関する考察.....	98
4.1.2 Cysless PS1 Mt を構造解析に用いる妥当性に関する考察 .....	99
4.1.3 Intact cell と microsome を用いた SCAM の標識率の違いに関する考察.....	99
4.1.4 SCAM/crosslink による標識の解釈の妥当性に関する考察 .....	100
4.2 TMD3 の topology に関する考察.....	101
4.2.1 TMD3 の面する活性中心ポアについて既報との整合性に関する考察.....	101

4.2.2 TMD3 の膜内境界残基に関する考察.....	102
4.2.3 TMD3 の topology について既報との整合性に関する考察.....	103
4.2.3.1 L383C との距離に関する考察.....	103
4.2.3.2 L435C との距離に関する考察.....	103
4.2.3.3 TMD3 の内腔側末端との距離に関する考察.....	104
4.2.3.4 TMD3 の可動性に関する考察.....	104
4.3 TMD3 の面する活性中心ポアに関する考察.....	105
4.3.1 遷移状態の活性中心ポアに関する考察.....	105
4.3.1.1 親水性が減少した部位に関する考察.....	105
4.3.1.2 親水性が増加した部位に関する考察.....	106
4.3.2 A $\beta$ 42 産生増加時の活性中心ポアに関する考察.....	107
4.3.2.1 F176L 変異に関する考察.....	108
4.3.2.2 G384A 変異に関する考察.....	109
4.3.2.3 FLAG-Pen-2 に関する考察.....	110
4.3.3 A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアに関する考察.....	110
4.3.3.1 TMD3 内腔側の活性中心ポアに関する考察.....	111
4.3.3.2 TMD3 細胞質側の活性中心ポアに関する考察.....	112
4.3.4 遷移状態と A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアの違いに関する考察.....	114
4.4 TMD3 の構造変化を引き起こす構造変化に関する考察.....	115
4.4.1 TMD1 と TMD3 の関係性に関する考察.....	115
4.4.2 TMD1 と TMD4 の関係性に関する考察.....	116
4.5 結語.....	116
5. 参考文献.....	118
6. 図表.....	192

## 1. 序論

### 1.1 Alzheimer Disease の病理

#### 1.1.1 概歴

Alzheimer disease (AD)は 1906 年に Alois Alzheimer により初めて報告された、進行性の認知・記憶障害を主症状とする神経変性疾患であり、認知症疾患のうち罹患数の最も多いものである。病理学的特徴として予てより神経細胞の顕著な脱落及び変性に加え、37 から 43 アミノ酸からなる  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ )を主成分とする老人斑が細胞外に蓄積すること、そして異常リン酸化を受けた tau を主成分とする neurofibrillary tangles (NFT)の細胞内蓄積が観察される。これらの構造物の形成が AD の原因であるか、結果であるかは長らく議論されてきたが、老人斑の蓄積は初期から優位に出現する病理変化であり、NFT の蓄積や神経細胞の脱落等に先んじて出現することが明らかとなった(Walsh et al. 2002)。 $A\beta$  の AD への寄与としては、当初様々な研究から  $A\beta$  の蓄積が神経脱落や tau の異常リン酸化を引き起こすことが報告され、 $A\beta$  の凝集・蓄積が神経細胞に障害を与え、細胞死へと導く amyloid cascade 仮説が提唱され、広く支持されてきたが(Hardy and Selkoe 2002)(Selkoe 2002a)、 $A\beta$  fibril による細胞死誘導に必要な  $A\beta$  濃度が高すぎることや、AD の認知機能障害と老人斑量の相関性が低いことなど、この仮説では説明しきれない事象が明らかになり、その後可溶性  $A\beta$  量の方が AD の重篤度と相関することや、可溶性  $A\beta$  凝集体( $A\beta$  oligomer)がシナプス機能を阻害することも報告されていたことなどから(Lambert et al. 1998)、oligomer hypothesis が唱えられ(Selkoe 2002a)、現在に至る。AD は臨床症状が確認されるようになってから 5~12 年で死亡する病であり(Vermunt et al. 2019)、その間の社会的な損失は非常に大きい。AD 治療薬の候補は悉く臨床試験を突破できていないが、世界各国で精力的な研究が続けられ、基礎病理の理解と治療標的やその戦略の幅はかなり広がっている。

#### 1.1.2 臨床・前臨床症状

臨床症状を呈する順番として、AD はまず早期から短期的な学習や記憶の障害が確認され、その後症状の悪化に伴って注意力の必要とする複雑な作業効率の低下、行動力の低下、言語障害、空間視覚の低下、社会行動力の低下等に加え、幻視等も見られることがある(McKhann et al. 2011)。しかしながら、こうした AD 様の症状は他の非認知症疾患の中に現れることもある。例えば posterior cortical atrophy は後頭、後頭側頭葉などの後頭部の神経が優位に変性する疾患だが、空間視覚が大幅に影響を受けることで現れる症状である幻視等が知られている(Tang-Wai et al. 2004)。原発性進行性失語は非流暢な発言や繰り返し発言に加え、言葉を探すのに苦勞する症状が AD と共通している(Gorno-Tempini et al. 2008)。AD の臨床症状の重度は現在主に Clinical Dementia Rating (CDR) (Morris 1997)によって、見当識、記憶力、判断力、問題解決力、自己管理能力や社会コミュニティー/自宅で行動力の観点から測定される。一方で、AD の神経病理の診断は CSF の採取や positron emission tomography (PET)イメージングによって大脳の  $A\beta$  量や tau の蓄積等を見るのが一般的である(Lowe et al. 2019)。

#### 1.1.3 Alzheimer disease の病態生理学

##### 1.1.3.1 $A\beta$

$A\beta$  は髄膜血管アミロイドの主要構成成分として最初に同定された後(Glenner and Wong 1984)、すぐに脳内の老人斑の構成物質でもあることが判明した(Masters et al. 1985)。現在では、脳内 PET などによって AD 病態はまず  $A\beta$  の蓄積に始まり、続いて tau 病態の進行と NFT の蓄積が起これ、最終的に認知機能の低下が臨床的に所見されるようになること

が分かっている。更に、microglia など神経細胞周辺の細胞の活性化が tau 病態に先んじて起こることも判明している(図 1)。この一連の流れの中で、tau 病態は A $\beta$  の蓄積が無い場合において嗅内野から進展することは無い(Pontecorvo et al. 2019)。更に PET を使った縦断的検討では、Amyloid 病態の進展は tau 凝集とよく相関し、認知機能の低下は tau 病態の進展度合いでよく説明できるとされている他(Hanseeuw et al. 2019)、iPSC 細胞から誘導された human 神経細胞内に優性遺伝形式を示す家族性 AD (familial AD; FAD)変異を持つ Amyloid Precursor Protein (APP: A $\beta$  の前駆タンパク)を過剰発現させると A $\beta$ 42 が大量に産生されるが、同様に過剰リン酸化 tau や tau 凝集体なども段違いに多く見られるようになるような報告もある(Choi et al. 2014)。の系に於いては、tau transgenic マウスと APP transgenic マウスの交配や A $\beta$ 42 fibril の tau transgenic マウスへの注射などを通じて、A $\beta$  と tau 病態の両方を有するマウスに於いて tau 蓄積と神経細胞死が悪化し、また AD 患者脳由来の tau fibril を A $\beta$  斑の蓄積のあるモデルマウスに投与すると tau の凝集や NFT の形成が促進される一方で、tau 病態の度合いで A $\beta$  病態に変化は無いことが明らかとなっている(Götz et al. 2001)(Bolmont et al. 2007)(Pooler et al. 2015)(He et al. 2018)。こうした研究から、脳内 A $\beta$  量の上昇だけで tau 病態の促進に十分つながるという見方が強い。

### 1.1.3.2 tau

A $\beta$  蓄積の後に生じる tau の凝集が神経細胞死そのもののトリガーとなる。と言うのも、A $\beta$  病態よりも tau 病態の進行度の方が認知機能の低下とより強い相関があり(Nelson et al. 2012)、tau の蓄積だけが認知機能の低下を予測し得るからである。しかし、amyloid-positive だが認知機能が正常な個体を縦断的に tau-PET で追跡すると、嗅内野の外側全体に広く tau が広がっていく様子が観察されることから、A $\beta$  程度部位特異的に伝播していくわけでも無いとも考えられている(Jack et al. 2018)。tau 病態はまず嗅内野と内側側頭葉での蓄積から始まるが(Crary et al. 2014)、この段階では認知機能に異常を認めることは出来ず、新皮質へと伝播されて初めて臨床症状が確認される(Price et al. 2009)。

tau は 17 番染色体上の *MAPT* 遺伝子にコードされており、脳内の神経細胞に多く発現する。50~75 kDa の分子量を持つが N-terminal domain と microtubule-binding domain によるスプライシングの違いで 6 つの isoform に分類することが出来(0N3R、0N4R、1N3R、1N4R、2N3R、2N4R)、脳の発生段階によって各々発現量が異なることが知られている。tau の生理機能はまだ分かっていないこともあるが、微小管結合タンパクであることから微小管形成から神経軸索の安定化、微小管輸送への関与などが考えられている(Dixit et al. 2008)。tau knock out (KO)マウスは発育への深刻な障害を見せることは無いが、神経の成熟に遅延が生じたりシナプス可塑性に障害が見られる(Dawson et al. 2001)(Ahmed et al. 2014)。

tau はリン酸化、アセチル化、糖鎖修飾、ユビキチン化、O-結合型アセチルグルコサミン化、窒化などの様々な翻訳後修飾を受ける(Marcelli et al. 2018)。その中でもリン酸化は AD 病態に直接的に関与する修飾である。tau は実に 85 もの異なる部位でリン酸化され(Guo et al., 2017)、AD 病態に繋がるリン酸化は NFT 形成以前から認められる。多くの場合異常リン酸化は tau の微小管への親和性を低下させ(Mandelkow et al. 2007)、結果的に遊離した tau 同士が fibril を形成するとされている。更に過剰リン酸化された tau は axon から離れ、樹状突起へと向かうことも知られている。そして樹状突起に於いて glutamate receptor の阻害やシナプス間隙の橋渡しの妨害を通じてシナプス機能を低下させることも考えられている(Hoover et al. 2010)。一方 tau のアセチル化はリン酸化 tau の分解を阻害し、tau 病態の増悪に関与しているとされているが(Min et al. 2010)、特定の部位のリン酸化を阻害し更なる凝集を抑えているとの意見もある(Cook et al. 2014)。その他にも tau のアセチル化でも細胞骨格の不安定化や tau 分子の樹状突起への異常局在に繋がるとする報告もあり(Sohn et al. 2016)、全体的には tau 病態増悪の働きが大きいように思える。AD 病態への関与が大きい tau のリン酸化プ

ロセスは主に3つの kinase (i.e. proline-directed serine-threonine protein kinase, non-proline directed serine-threonine protein kinase, 及び tyrosine protein kinase)によって制御を受けており、AD 治療の標的候補として期待されている。

tau は通常可溶性のタンパクであるが、条件が重なると oligomer を経て fibril へと凝集していく。特に NFT は螺旋構造を有する paired helical filament (PHF)の構造を取る(Mandelkew et al. 2007)。興味深いことに tau の fibril は様々な構造を取り(Frost et al. 2009)、人工的に合成したものと tau 病態を呈する患者から分離してきた fibril ですら構造を異にする。近年の cryo-EM を用いた検討に於いても全く異なる凝集様態が確認されている(Fitzpatrick et al. 2017)。human 若しくは mouse 由来の tau を後天的に tau 病態モデルマウスに投与するとそれが核となり更なる fibril 化を誘導することが観察されており、tau 核形成と凝集能を保ったまま並行して解剖学的に近傍の領域に広がっていくことで伝播していく(Frost et al. 2009)(Liu et al. 2012)(Iba et al. 2013)。

### 1.1.3.3 ApoE

Apolipoprotein E (ApoE)は脂質と結合してリポタンパクを形成し、脂質を正しく輸送するのに関わる。発現は脳と肝臓に最も多く見られ、脳内では astrocyte で主に発現し、microglia では発現量が多少落ちる。ApoE の3つの alleleのうち ApoE4 は晩期発症型(late onset AD; LOAD)の最大のリスク因子であり(Corder et al. 1993)、臨床的、病理学的、疫学的に、そして Genome-wide association studies (GWASs)によって立証されている(Kunkle et al. 2019)。この3つ allele はたった1つのアミノ酸残基しか違わない (ApoE2: C112/C158, ApoE3: C112/R158, ApoE4: R112/R158) のだが、ApoE4 を hetero、及び homo で有すると実に AD リスクがそれぞれ3~4倍、そして12倍に上昇する(Roses 1996)。実際 CSF や MRI、PET などを縦断的に調べると、ApoE4 保持者は非保持者に比べて若いうちから大脳皮質での A $\beta$  沈着と凝集が認められる(Risacher et al. 2015)(Bussy et al. 2019)。一方で ApoE2 は AD 病態に対して防御的に働く。

ApoE によって AD リスクが爆増するメカニズムとして最も有力なのが、A $\beta$  病態を通じたものであるとされている(Huynh et al. 2017)。まず ApoE は凝集斑を構成する A $\beta$  に直接結合することが示唆されており(Namba et al. 1991)、ApoE KO した transgenic モデル動物は fibril A $\beta$  の量や A $\beta$  の沈着などが大幅に減少したことが報告され、ApoE は A $\beta$  の clearance の阻害する働きがあるのではないかとされた(Bales et al. 1997)(Ulrich et al. 2018)。ApoE が A $\beta$  の clearance に関与していることは、の microdialysis でも実証されている(Castellano et al. 2011)。尚、in vivo に於いて可溶性 A $\beta$  や A $\beta$  monomer に ApoE が結合するということは殆ど無く、代わりに astrocyte 表面の LDLR-related protein 1 (LRP1) 等の A $\beta$  receptor に競合的に結合することで A $\beta$  の clearance を制御しているという見方が一般的である。即ち、ApoE KO マウスは A $\beta$  の結合を妨げる ApoE が欠如しているがために clearance が亢進しているということである(Verghese et al. 2013)。A $\beta$  の clearance として可能性のある経路としてまず astrocyte による取り込み(Basak et al. 2012)、microglia による貪食(Heckmann et al. 2019)、血液脳関門への輸送(Castellano et al. 2012)、中枢神経系に於けるリンパ系の役割を持つ glymphatic system への代謝(Iliff et al. 2012)等が考えられている。

その他の可能性のある経路としてまず、tau 病態への関与も示唆されている(Shi and Holtzman 2018)。tau は ApoE3 には結合するが ApoE4 には結合しないことが報告されている他(Strittmatter et al. 1994)、tauP301S transgenic マウスに於いて ApoE4 が tau による神経細胞死を悪化させたことも知られている(Shi et al. 2017)。同報告では ApoE を欠如させると transgenic マウスの神経死を減弱させ、astrocyte や microglia の活性化を抑制することも発表している。しかしながら、他の報告では ApoE4 ではなく寧ろ ApoE2 の方が tau 病態の悪化や行動障害に繋がるという報告もなされており(Zhao et al. 2018)、未だ実験系の誤差を払拭できないでいる。第2に免疫系や microglia の反応をコントロールすることで AD 発症の契機となりうることもされている。ApoE4 保持者は静脈内のリポ多糖に対して全身性の炎症反応を示しやすいことが知られており、同時に熱中症の罹患率が高く、血管内の腫瘍壊死因子の量も多いとされている(Gale et al. 2014)。

脳内に於いて ApoE は microglia の発現に影響を与えるとされ、ApoE 自体は microglia の A $\beta$  斑周囲への集積を促進する。しかしながら ApoE を欠損させると fibril 型の A $\beta$  量は減るものの斑全体は拡大し、密度がより下がる。更にその周囲には neuritic dystrophy がより顕著にみられるようになる(Ulrich et al. 2018)。また neprilysin や insulin 分解酵素によって細切れにされた A $\beta$  が endocytosis によって microglia に取り込まれる過程にも ApoE が必要とされている(Jiang et al. 2008)。第 3 はより直接的に神経細胞や神経ネットワークに影響を与えるとする経路である(Najm et al. 2019)。初代培養神経細胞に後天的に直接 ApoE4 を投与すると、神経軸索伸長が直接阻害される一方で ApoE3 は通常の伸長が見られたという(Holtzman et al. 1995)。加え、ApoE3 を発現する神経細胞は kainic acid による細胞外毒性に対して防御的であったのに対し ApoE4 はそのような防御作用などなく(Buttini et al. 1999)、ApoE2 と 3 に比して ApoE4 を発現するモデルマウスは皮質の樹状突起スパインの密度が低い、長さも短いことが報告されている(Dumanis et al. 2009)。これらのメジャーな経路とは別に、ApoE4 が直接血液脳関門を変化させることを示した報告も存在する。LRP1 を介した ApoE signal が消失すると、cyclophilin-A-NF $\kappa$ B-MMP-9 signaling cascade が活性化する。この cascade が活性化すると血管壁が緩くなり、serum protein 等が脳の柔組織に溢出することが報告され、神経細胞死の原因の一つになりうるとされている(Bell et al. 2012)(Zlokovic 2013)。

#### 1.1.3.4 神経免疫の活性化

未だ多くのことが不明瞭である領域ではあるが、多くの研究成果によると、神経免疫の活性化が AD 病態へ大きく関与しているとされている。そもそも astrogliosis と microgliosis の活性化は AD 病態に於いて主要な特徴の一つであり、*TREM2*、*CR1*、*SHIP1*、*BIN1*、*CD33*、*PICALM*、*MS4A* 等の遺伝子座を含む、免疫関連の遺伝子の SNPs が AD のリスク因子であることが GWAS 解析によって報告されている(Efthymiou and Goate 2017)。反対に、免疫機構との明確な関わりはともかく、*PCLG2* 遺伝子は AD リスクを下げる因子として発表された(van der Lee et al. 2019)。これらの遺伝子の SNPs のうち、*ApoE*、*Trem2*、*Cd33* などは A $\beta$  蓄積のモデル動物に於いて同定されたものも多く、実際に A $\beta$  の挙動に影響を与える因子として考えられている(van der Lee et al. 2019)。臨床的には、コホート研究から microglia の活性化度が AD 病態の進行と強い相関があること、そして A $\beta$  量や neuritic plaque の数との相関も非常に高いことが示されている(Felsky et al. 2019)。加え、AD 患者脳の切片由来の単一の核を用いた transcriptome assay では ApoE の発現量が上がっている microglia が認められている(Mathys et al. 2019)。

実は microglia が AD 病態を呈するモデルに於いて攻撃的に働くのか、はたまた防御的に働くのかを正確に解析するのは難しい。と言うのも、A $\beta$  の沈着がの初期段階では防御的に働くと考えられているが tau の凝集段階では寧ろ病態の促進に貢献していると考えられているからであり(Long and Holtzman 2019)、また現段階の研究報告の示す結果の方向性もバラバラである。

*TREM2* は AD リスク遺伝子の一つであるが、rare variant である R47H 変異は AD リスクを激増させる(Gratuze et al. 2018)。*TREM2* は主に microglia に発現しており、microglia の phagocytosis の誘導、炎症シグナルの調節などを通じて microglia の生存に関わる機能を持つ。更に *TREM2* は可溶性の A $\beta$  oligomer に結合するとともにされており、A $\beta$  の phagocytosis を促進する。R47H 変異型 *TREM2* はこうした機能を失う loss of function 変異である。*TREM2* の欠損、若しくはハプロ不全型のモデルマウスを使った検証では、興味深いことに 2 ヶ月齢で A $\beta$  斑の沈着が見られる前は A $\beta$  量を減少させる方向に働くものの、8.5 ヶ月齢で A $\beta$  斑の沈着が一定以上進行した段階では寧ろ A $\beta$  量の増加が確認されており、年齢依存若しくは脳内 A $\beta$  量で機能の方向性の転換のスイッチが入ることが示唆されている(Ulrich et al. 2014)。ここで重要なのは、A $\beta$  斑の密度が異常になったり、dystrophic neurite が A $\beta$  斑に集積する時には斑周囲の microglia 量も減少することが確認されており(Song et al. 2018)、*TREM2* 欠損型、若しくは R47H 変異を持つ *TREM2* 発現型マウスは A $\beta$  斑

沈着や tau 病態の進行が神経突起付近で顕著に増悪していることも報告された(Parhizkar et al. 2019)。こうした研究成果は TREM2 は A $\beta$  の細胞毒性や tau の凝集に対して抑制的に働くことを示唆するものである。CD33 は microglia 表面に発現し AD 感受性を示す glycoprotein である。CD33 の表面発現量の増加は microglia の活性化を抑制し、マウスに於いて microglia による phagocytosis の抑制や A $\beta$  病態の進行が確認されている他、CD33 の KO によって A $\beta$  病態と認知機能の改善が認められる(Bradshaw et al. 2013)。この時 CD33 KO の効果は TREM2 KO によって打ち消された一方で CD33 KO は TREM2 の効果に影響を与えなかったことから、signal cascade に於いて TREM2 の上流に CD33 が位置するとされている(Griciuc et al. 2019)。Microglia は LC3-associated endocytosis による A $\beta$  取り込みを行うが、この経路は同時に CD36 や TREM2、TLR4 等の A $\beta$  receptor を再び細胞表面に再輸送する recycle 経路でもある。その為、microglia の機能不全は A $\beta$  斑の取り込みを一層難しくさせているのは明白である(Heckmann et al. 2019)。

A $\beta$  の microglia による phagocytosis は更なる microglia の活性化に繋がる。その過程で A $\beta$  は NLRP3 inflammasome の活性化、caspase-1 の活性化や IL-1 $\beta$  の成熟等を引き起こす(Halle et al. 2008)。NLRP3 inflammasome は AD モデルマウスや AD 患者脳、特に軽度 AD や MCI の段階で顕著に活性化されており、NLRP3 や caspase-1 の欠損は A $\beta$  沈着の減少を起点として IL-1 $\beta$  の減少や認知機能の改善がマウスで見られている(Heneka et al. 2013)。NLRP3 の活性化は apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC) の monomer が fibril を形成するのを促進する。inflammasome が更に活性化すると ASC の fibril は副核体に凝集した後に細胞外に放たれ、近傍の microglia の免疫反応を維持するとされている。この時細胞外の ASC は A $\beta$  の oligomer と共に凝集体を形成することが APPS1 マウスで確認済みであり、ASC を遺伝的に欠損させるか、抗 ASC 抗体を用いることでこれらの病理を大幅に緩和することが出来る(Venegas et al. 2017)。それに加え、A $\beta$  病態モデルマウスの microglia を薬理的に枯渇させた時に A $\beta$  斑の形成が減少したことも報告されており(Spangenberg et al. 2019)、microglia は A $\beta$  病態に対して完全な諸刃の剣である、即ち A $\beta$  病態の拡大を防ぐことも出来るが悪化させる機能も有していると考えられている。

一方、tauopathy マウスでは TREM2 の欠損によって tau 由来の神経細胞死や astrogliosis が劇的に減弱したという報告がなされている(Sayed et al. 2018)。P301Ltau を発現するマウスモデルでは、嗅内皮質から海馬の歯状回に tau が拡散するのに microglia の exosome が必要である(Asai et al. 2015)ことが示唆されており、microglia の過活動の抑制が tau 病態の進行を食い止めることが出来るとされる。

#### 1.1.3.5 ウィルス感染

1991年に初めて、AD 患者脳に herpes ウィルスが存在していることが報告された(Jamieson et al. 1991)(Carbone et al. 2014)。最近のコホート研究からは、HHV-6 herpes ウィルスや HSV-1 herpes ウィルスの DNA が AD 患者脳から検出されており、脳内の免疫反応や APP の切断に影響を与える可能性がある(Readhead et al. 2018)。A $\beta$  は抗菌 peptide 様の特徴を有する。合成された A $\beta$  も AD 脳由来の A $\beta$  もグラム陽性菌、グラム陰性菌どちらの成長を阻害することが報告されている(Soscia et al. 2010)。また herpes ウィルスへの抗菌作用も有すると同時に herpes ウィルスの感染も防ぐとのことである(Bourgade et al. 2015)。実験的には、*In vitro* 系に於いて A $\beta$  は微生物や菌類の細胞を包み込んで凝集体を形成すること(Spitzer et al. 2016)、5xFAD モデルマウスでは A $\beta$  はサルモネラ菌由来の脳脊髄炎に対して防御的に働くことも示されている(Kumar et al. 2016)。同モデルマウスでは脳実質の A $\beta$  が存在することで HSV herpes ウィルスによる死亡率が減少し、逆にウィルスに感染した脳では A $\beta$  の沈着が増加している(Eimer et al. 2018)。こうした実験結果より、脳へのウィルス感染が A $\beta$  の凝集を誘導し、A $\beta$  病態を進行させる要因となるという仮説が提唱された(Moir et al. 2018)。近年の報告によると、HSV-1 ウィルスが A $\beta$ 42 の fibril 化を直に触媒し、ウィルスの表面と A $\beta$  が相互作用することで凝集核となっているという(Ezzat et al. 2019)。



近年台湾で HSV herpes ウィルスと VZV ウィルスへの感染と認知症発症のリスクを評価した、後ろ向きコホート研究が行われた。そこで、50 歳を超えて新たに HSV herpes ウィルスに感染すると認知症発症リスクが上昇するが、抗 herpes 治療を施された患者は認知症発症リスクが下がることが示された(Tzeng et al. 2018)。一方 VZV ウィルスに関しても HSV herpes ウィルスに比べると微弱だが認知症発症リスクを上げ、同様に抗ウィルス治療によってリスクが低下する(Chen et al. 2018)。

その他興味深い報告として、口内のウィルス感染が AD 病態の進展に貢献することが挙げられる。AD 患者の口内から gingipain という歯周菌由来の protease が発見された他、歯周病の原因菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* を野生型マウスに感染させると脳実質の A $\beta$  が増加したり、gingipain の活性阻害が A $\beta$  量の減少や神経炎症の軽減に繋がったりすることも近年報告されている(Dominy et al. 2019)。そしてなんと、gingipain 阻害剤 COR388 の軽度から中程度の AD 患者に対する影響を見る第 II/III 相臨床試験が進んでいる。

## 1.2 Alzheimer Disease の治療

後述する通り、2020 年初頭の段階で利用可能な AD 治療薬は 4 つの対症療法に限られている。2019 年 10 月に biogen 社の A $\beta$  抗体 aducanumab が高用量投与時に軽度 AD 患者に対して有意な認知機能改善と A $\beta$  斑の減少を 3285 人もの大規模なデータセットで示すことが出来た以外、全ての原因療法薬が臨床試験で頓挫している。多くの場合軽度若しくは中程度の AD 患者を被験者として登録しているが、臨床的には middle stage ではあるものの病態生理学的には AD 発症時は既に late stage であり、決定的で不可逆的な神経細胞死や病態の cascade が脳内ではかなり進行しているのである(Gómez-Isla et al. 1996)(Vermunt et al. 2019)。この為、AD への介入は明確な臨床症状が現れる前から行われるべきだいう意見が強い。本項では Amyloid 仮説のみならず様々な経路に着目した治療法について紹介する(図 2)。

### 1.2.1 Acetylcholine の亢進

1970 年に神経伝達物質の研究が多く行われ、AD 脳の大脳皮質では acetylcholine (ACh) 合成酵素の choline acetyltransferase 活性、ACh 分解酵素の choline esterase (ChE) 活性の低下が発見された(Bowen et al., 1976)(Davies et al., 1976)。これらの研究により提唱されたのが、ACh 作動性神経の脱落、障害が AD に於ける認知症発現の主因であるとす、コリン仮説である。実際 AD 脳ではマイネルト基底核やその他の中隔核から広く皮質に投射しているコリン作動性神経が大幅な脱落が見られる(Bartus et al. 1982)。この仮説に素直になれば、脳内 ACh の増強が AD 病治療に繋がるという自然な結論に至る。

最も straight forwardなのが、ChE inhibitor (ChEI)である。つまり、分解を抑制して ACh の濃度を上げようという目論見である。本書執筆当時で認可されているたった 4 つの AD 病治療薬のうち 3 つがこれに属する。donepezil、rivastigmine、そして galantamine である。donepezil は 1996 年に FAD により認可された最初の AD 病治療薬であり、rivastigmine や galantamine が効かなくなった中~重度の AD 病患者に対して使用されることが多い。中枢神経系への移行が高く、末梢組織での ChE 阻害作用による副作用が少ないのも特徴である。臨床所見から、前頭葉の血流が低い患者であるほど donepezil による認知機能改善は著しく見られる事が多い。rivastigmine は ChE 以外にも butylcholine esterase (BuChE) の両方を阻害する。実は AD の進行に伴ってグリア細胞に発現する BuChE の活性は増加することが知られており、rivastigmine による BuChE 阻害作用はシナプス間隙の ACh 濃度はより増加することが望まれる。製剤として経口投与用の錠剤だけでなく、パッチ剤も開発されており、経口投与時に比べて血中濃度が安定しやすく、副作用も少なく、消化器症状の認容性やコンプライアンスの向上が見込まれる。galantamine は ChE 阻害効果に加え、nicotine 性 ACh receptor

(nAChR)の allosteric modulator としても機能し、nAChR 機能の亢進が期待できる。その為、シナプス前終末の nAChR に作用することで ACh 以外の神経伝達物質の遊離を促進し、認知機能障害や行動異常、精神症状への効果が推定されている。実際、薬剤としての歴史は galantamine が最も古く、1950 年台ソ連で既に筋無力症や中枢神経系に関係した感覚運動機能障害の治療に用いられていたという。これら全ての治療薬はあくまでも ACh 量低下による認知機能障害を改善する対症療法薬であり、AD を根本から治療する事はできない。更に、ChEI に対する感受性が年を追う毎に落ちる為、投与開始から 5 年後には認知機能が投与前まで低下することが殆どである。

これらは ACh の神経伝達経路に焦点を当てた治療戦略であるが、脳内の伝達物質は ACh だけではない。AD 病が進行すると serotonin を介した脳内神経伝達経路が侵害されることが知られており、また同時に、脳内、中枢神経系に於いて発現の多い serotonin receptor である 5-HT<sub>6</sub> receptor の阻害によって ACh の分泌も促進されることから、認知機能や学習能力の向上に繋がると考えられてきた(Ramírez 2013)。大塚製薬株式会社とデンマーク Lundbeck 社が共同開発した世界初の 5-HT<sub>6</sub> receptor 選択的 antagonist である idalopirdine は、臨床試験 phase II で有意な効果と安全性を示すことが出来た。この時、donepezil を服用している患者との併用試験も行ったが、donepezil 単体での服用よりも強い認知機能の改善が患者に確認され、5-HT<sub>6</sub> receptor と ChE 両方の阻害が有効であることを示した。しかし残念ながら idalopirdine は phase III 試験で有意な有効性を示せず、市場に出回ることにはなかった。2 つ目の 5-HT<sub>6</sub> receptor 選択的 antagonist、intepirdine も phase III 相に進んだが、同様に認知機能への改善効果が見られずに頓挫している。

また、histamine を介した伝達経路も AD に関与していることとされている。AD 病患者の脳内では histamine 量の減少、そして増加が見られるという相反する結果を報告した論文が混在しており、未だに議論がされている(Vohora et al., 2012)が、histamine receptor の H<sub>1</sub>~H<sub>4</sub> receptor の中で中枢神経系に多く発現する H<sub>3</sub> receptor は活性化すると dopamine や ACh、GABA などの神経伝達物質の放出を抑制する効果を持つという統一見解が存在する(Sander et al., 2008)。ABT-288、GSK239512 などの幾つかの H<sub>3</sub> receptor antagonist が臨床試験に進んだが、何れも phase II で認知機能等の有意な改善が見られなかった。現在では新たな SUVN-G3031 が臨床試験 phase I に進んでいるが、有効な結果が出るかは中々怪しいところである。

現在模索されているその他の方法としては、nicotinic AChR (nAChR)を介した治療が挙げられる。AChR はイオンチャネル型の nAChR と GPCR 型の muscarinic AChR (mAChR)の 2 種類に分けられる。AD 脳の新皮質と海馬領域に於いて、発病初期では nAChR の低下が見られる一方で mAChR の発現量に差が見られなかったことから、前者の nAChR の方が AD 病態に大きく関わっていると考えられている(Shimohama et al., 1986)。動物実験から、nicotine の刺激によってシナプス前終末の nAChR を活性化すると、ACh だけでなく glutamate や adrenaline、dopamine、GABA などの様々な神経伝達物質の産生が増大することが知られており、このことから AD の経過としてシナプス神経終末の変性を通じて nAChR の破綻が招来され、様々な神経伝達物質の低下によって認知機能の低下、行動異常、精神症状の症状発現に関与していることが考えられている。更に興味深いことに、中でも  $\alpha 7$ nAChR は細胞外の A $\beta$  に結合し A $\beta$  の神経細胞毒性を緩和する作用があることが発見され、A $\beta$  の detoxification の過程に重要な役割を持つことが明らかとなっている(Hung et al., 2015)。 $\alpha 7$ nAChR の部分選択的 agonist である encenicline は AD と統合失調症患者の治療薬として開発され、ACh と併用することで認知機能の向上があることが報告されたものの、AD 患者を対象にした phase III 試験に於いて消化器系に重篤な副作用を呈することが分かり、米国 FDA が 2015 年に臨床試験実施保留命令を下している。

### 1.2.2 Glutamate Cytotoxicity の緩和

過剰な glutamate 等によって NMDA receptor が過活性化すると、細胞に対して興奮毒性を示すことが明らかとなっている(Danysz et al., 2012)。これには細胞外の A $\beta$  が関与していることが考えられている。現在 FDA により認可されてい

る AD 治療薬の最後の 1 つ、memantine は NMDA receptor antagonist であり、過剰な NMDA receptor の活性化を抑えて AD を対症療法的に治療することを目的としている(病態の進行の遅延等の効果は無いとされる)。中度から重度の AD 患者で且つ他の AChE inhibitor の効果が見込めない時に処方されることが多いが、臨床の現場では軽度の AD 患者に対して処方されることも多々あるという。しかしながら、軽度(mild)AD 患者への有意な効果の有無は議論的となっている (Schneider et al., 2011)。

glutamate の細胞毒性を軽減する方向性の治療薬として、他に riluzole が挙げられる。riluzole は現在、donepezil を服用している軽度 AD 患者を対象とした phase II 試験に進んでいる。薬理作用として、シナプス前終末の glutamate 遊離の抑制と glutamate transporter の活性化が明らかとなっており (Fumagalli et al., 2008)、更に P301L 変異 tau の transgenic マウスを用いた検討の結果、riluzole 処理によって海馬での glutamate 再取り込みの増加や遊離の減少も確認されている (Hunsberger et al. 2015)。

### 1.2.3 Amyloid 仮説に着目した治療戦略

AD 脳では A $\beta$  から構成される老人斑が主な病理学的特徴として観察されることから、A $\beta$  が主病因であるとする amyloid 仮説が現在最も支持されている。A $\beta$  は前駆体タンパクである amyloid precursor protein (APP) から  $\beta$ -と  $\gamma$ -secretase の概して二段階の切断を経て産生されることも知られている。これらのことから、A $\beta$  やそれを切断する酵素に着目した創薬が進められてきている。

#### 1.2.3.1 A $\beta$ 産生の抑制

大きく分けて  $\beta$ -secretase (BACE) に作用するもの、 $\gamma$ -secretase に作用するものと別れているが、いずれも後述で詳細に記述するので、本項では説明を省く。

一方、APP のもう一つの A $\beta$  を産生しない経路に関与する  $\alpha$ -secretase に着目した  $\alpha$ -secretase enhancer もマイナーながら開発が進められてきた。Etazole は GABAA receptor の allosteric な modulator であり、 $\alpha$ -secretase を刺激して sAPP $\alpha$  の産生を増加させる (Marcade et al. 2008)。第二相治験では mild-to-moderate な AD 患者に対して認知機能の改善が見られ、しかし一方で不安の増強などの副作用も報告されている (Kumar et al. 2018)。その他  $\alpha$ -secretase と BACE 両方に作用する Exebryl-1 (Snow et al. 2009) など幾つかの治療候補薬は存在するが、未だ実用化されていない。

#### 1.2.3.2 A $\beta$ clearance の亢進

A $\beta$  clearance の向上を通じた治療戦略に、抗体を用いた免疫療法が挙げられ、能動免疫<sup>1</sup>、受動免疫<sup>2</sup>共に研究開発が進められている。

能動免疫による治療記録は 1999 年が最初であり (Schenk et al. 1999) (Gallardo and Holtzman 2017)、AN-1792 が軽度~中程度の AD 患者を対象とした第 II 相試験まで進んでいる。ところが重篤な髄膜脳炎を 6% の患者に認められた為、開発が頓挫している (Holmes et al. 2008)。これは T 細胞の過活性化が原因だと考えられ、epitope をより特異的にすることで

---

<sup>1</sup> ワクチンなどの抗原を投与して自身の T 細胞や B 細胞を活性化せ、抗体作成能力を高める免疫療法。宿主の免疫細胞を活性化させるので、長い間免疫効果を持続させることが可能である。また、多種類の細胞由来の polyclonal な抗原抗体反応を引き起こす為、抗原に似たタンパクも認識することが可能である。一方、免疫細胞の活性化までに数日掛かるのが欠点であり、更に T 細胞の過剰な免疫応答で有害な作用が出る事例もあるという。

<sup>2</sup> 抗原に対する特異的な monoclonal 抗体を直接体内に注入し、自身の免疫細胞を介さずに抗原を除去する免疫療法。即座な免疫反応が発生するので迅速に抗原を除去でき、特異性も高い。歴史的にヒト以外の動物由来の抗体の注射を行ってきたが、抗体を抗原として認識した場合のアレルギー反応が甚大で、近年はヒト由来の抗体を注射することが多い。ところがヒト monoclonal 抗体は非常に高価で、また外部由来の抗体故迅速に体内で代謝されてしまう為、定期的な投与が必要で治療費が高額になる場合が多い。

免疫反応を制御する工夫が試みられた。CAD106 がその例で、嘗ては full length の A $\beta$ 42 を epitope にしていたのに対し、A $\beta$  の第 1 から第 6 までの 6 残基に絞ることで B 細胞の epitope として機能させた(Winblad et al. 2012)。しかし第 III 相に進まずして開発が中断された。その他にも A $\beta$ 1-7 の ACC-001 などがあるが、こちらは第 II 相試験で開発が中止されている。

一方、受動免疫による治療の開発は能動免疫より活発である。monoclonal 抗体の使用により患者ごとの変動が少なく、また各抗体の力価が厳密にコントロールしやすい為、副作用が少ないのが受動免疫の利点でもある。A $\beta$  の N 末端をエピトープとする bapineuzumab は最初に開発された monoclonal 抗体で、可溶性及び fibril A $\beta$  と結合する。第 III 相臨床試験まで進んだが、軽度から中程度 AD 患者に於いて認知機能の改善や ADL テストのスコア改善が見られなかった(Salloway et al. 2014)。更に高濃度になるとアミロイド関連画像異常浮腫性変化や微小出血などの悪影響も報告されている。solanezumab はヒト化マウス monoclonal 抗体であり、可溶性 A $\beta$  のみに結合する。この抗体は血漿と CNS の A $\beta$  の平衡を変化させる可能性(DeMattos et al. 2001)が考えられたが、第 III 相試験で軽度から中程度の AD 患者に対して認知機能の改善が見受けられることは無かった(Doody et al. 2014)。その他、可溶性 A $\beta$  の 16-24 残基を認識する sonanezumab、oligomer や fibril 状態の A $\beta$  に高い親和性を持つヒト IgG4 抗体 crenezumab、A $\beta$  fibril を認識するヒト IgG1 抗体 gentenerumab 等が開発されてきたが、いずれも有効性が認められず第 III 相試験で開発が中止されている。唯一、凝集体 A $\beta$  に結合するヒト IgG1 抗体 aducanumab だけは AD 患者脳の老人斑を有意に減少させた報告が成された後一旦第 III 相試験で頓挫したものの(Sevigny et al. 2016)(Hung et al., 2017)(Selkoe 2019)、被験者の数を増やして協議したところ高濃度で有意な A $\beta$  斑の減少と認知機能の改善が見られ、FDA 承認間近の薬となる可能性が高い。Eisai 社の BAN2401 はヒト化 murine 抗体で *in vitro* で比較的大きい可溶性 A $\beta$  protofibril へ結合するが、第 II 相試験で顕著な A $\beta$  斑の減少と潜在的な認知機能改善の可能性が報告され(Logovinsky et al. 2016)、現在第 III 相試験が行われている。

他の治療戦略と同じように失敗の多い抗体医薬でもあるが、将来的に病態を改善する第一次、及び第二次予防試験が行われている抗体も現在存在する。例えば solanezumab や gantenerumab には DIAN-TU 試験が行われており(Bateman et al. 2017)、crenezumab は API ADAD Colombia 試験で FAD 変異を持つ被検体にその効果を評価されている(Tariot et al. 2018)。能動免疫療法 CAD106 抗体に至っては、APOE  $\epsilon$ 4 を homo で保有する被検体に対して試験が行われている(Lopez Lopez et al. 2019)。

#### 1.2.4 tau に着目した治療戦略

tau は 50~75 kDa の分子量を持つタンパク質で、0N3R、1N3R、2N3R、0N4R、1N4R、2N4R の 6 つの splice variants が存在する。概して tau 微小管に結合して重合を促進する働きを持つ。ところが tau が何らかの理由で過剰にリン酸化されると微小管から外れ、細胞内に可溶性の状態に漂うことになるが、これらの soluble な tau タンパクが互いに結合し合うことで NFT が形成され、微小管の不安定化を通じて神経細胞死を引き起こすことが分かっている(Panza et al. 2016)。それ故、tau も AD の治療戦略の標的の 1 つとなり得る。現在では tau の凝集阻害、リン酸化 tau の clearance の促進、そして微小管安定化剤が主に開発の対象となっている。

tau の凝集阻害剤で最も初期の物は、面白いことに methylene blue という色素であった。この色素は tau の fibril 化などを阻害し、autophagy の誘導を通じて tau 病態の軽減に働くとされている(Wischik et al. 1996)(Congdon et al. 2012)。その後、methylene blue の誘導体である methylthioninium chloride が元々中毒性メトヘモグロビン血症の治療薬として使われていたものの tau タンパクの凝集を抑制することが確認され、AD 患者を対象とした臨床試験に持ち込まれた。しかし、下痢、頻尿、尿時の痛み、めまい等の症状が酷く、直ぐに中止されている(Baddeley et al. 2015)。また、同じく

methylen blue の誘導体の 1 つ LMTM も臨床試験に進み、こちらは phase III まで行ったが、軽度から中程度の AD 患者に対して認知機能の改善及び ADL スコアに有意な差を得られず開発が頓挫した(Gauthier et al. 2016)。

別の戦術として、tau kinase 阻害剤を用いることで tau の異常リン酸化を防ぐものを挙げる事が出来る。この例に当てはまるのは tideglusib という GSK-3 阻害剤であり、tau と APP の double transgenic mouse を用いた前臨床検討では、tau のリン酸化の減少や A $\beta$  斑の顕著な減少が見受けられた(Serenó et al. 2009)。しかしながら、第 II 相試験ではプラセボ群に比して認知機能を有意に改善することは無かった(Lovestone et al. 2015)。

微小管安定化剤には、*Taxus brevifolia* (タイヘイヨウイチイ)から単離された有糸分裂阻害剤として抗癌療法に用いられる paclitaxel、これまた抗癌剤として開発された epothilone D (epothilone D 自体は生体内での活性が弱く、抗癌剤として実際用いられるのは専ら epothilone の誘導体であるが)、そして tubulin に結合して安定化する TPI 287 が挙げられる。ところがこの手の化合物らで現在臨床試験中なのは TPI 287 だけであり、paclitaxel と epothilone D はそれぞれ AD 患者への著しい副作用、及び有効性の欠如が確認され、開発が断念されている。

A $\beta$  と同じように tau タンパクに対する抗体によって能動免疫反応で除去する方法も試みられている。現在注目されているのは AADvac-1 と ACI-35 の 2 つであり、いずれも phase II の段階にある。AADvac-1 は tau の 294 から 305 までのアミノ酸残基(KDNIKHVPGGGS) から構成される peptide で、aluminum hydroxide を adjuvant として keyhole limpet hemocyanin とカップリングする(Novak et al. 2019)。詳細なメカニズムは明らかにされていない。一方 ACI-35 は、S396 と S404 がリン酸化された tau の 393 から 408 までの 16 残基から成る peptide であり、liposomal vaccine の形で臨床試験に進んでいる。抗体を用いた受動免疫療法も盛んに開発が行われている。抗 human tau monoclonal マウス抗体である HJ8.5 は、PS19 マウスに於いて tau の凝集や過剰リン酸化を抑制し、thioflavin S による染色も減少させ、脳萎縮や認知機能の悪化を食い止める(Yanamandra et al. 2013)(Yanamandra et al. 2015)。この抗体は後にヒト化され、進行性核上性麻痺を呈する患者に於いて投与後に血漿中の tau 量の増加が見られ、PS19 モデルマウスでも血漿中 tau と脳実質の tau 量に強い逆相関が確認され、脳実質の tau レベルは CNS で起きる tau の量の変動を反映していると考えられる(Yanamandra et al. 2017)。HJ8.5 のヒト化されたバージョンは早期 AD 患者と進行性核上性麻痺患者に対する有効性を第 II 相試験で評価されている(West et al. 2017)。ここで重要になってくるのが、tau の凝集が細胞外に存在する tau 経路で行われるのか、そしてヒトでもこの経路が存在するか、という疑問を明らかにすることである。と言うのも、抗体は分子量の巨大なタンパク複合体で通常細胞内に入り込むことが不可能であり、tau 病態の終着点である NFT は細胞内の凝集体だからである。もし脳実質の tau 凝集体が抗 tau 抗体によって減少するならば、細胞外領域の tau 凝集が tau 病態の過程に含まれることを意味し、更に細胞内の tau 凝集体すら抗 tau 抗体によって減少するのならば、抗 tau 抗体は既存の tau 凝集体や NFT にも効果を持つことを強く示唆する。

### 1.2.5 ApoE に着目した治療戦術

今まで ApoE に着目した薬剤が臨床試験のパイプラインに載ったことは無い。しかしながら LOAD の最大のリスク遺伝子であり、A $\beta$  clearance に関わるとする ApoE を標的とするのは非常に理にかなっている。HAE-4 は、リポタンパク複合体を形成しておらず、A $\beta$  斑に集積している ApoE3 と ApoE4 に結合する monoclonal 抗体であり、大脳や血漿中の ApoE 量を変動させることなく可溶性、不溶性、fibril 状 A $\beta$  を減らすことが報告されている。興味深いことにこの抗体は ApoE への結合を通じて A $\beta$  斑のオプソニン化を促進しており、A $\beta$  の phagocytosis 活性化によって A $\beta$  の除去をしているのではないかと考えられた(Liao et al. 2018)。

別の戦術として、遺伝子治療と通じて APOE $\epsilon$ 4 homo 保有者に ApoE2 を過剰発現させ、ApoE4 による loss of function を克服する試みも存在する(Rosenberg et al. 2018)。この研究では最小限の外科的処置で大脳が広く形質転換したことが

報告され、臨床試験まで計画されている。しかしながら、ApoE4 による AD 病態の悪化が loss of function によるもので、そして ApoE2 が優位に ApoE4 に対して保護機能を示さない限りこの治療法は大きな効果をもたらさないとされている。且つ、多くの報告で ApoE2 が AD 病態に対して防御的であることを支持する結果を出しているものの(Hudry et al. 2013)(Hu et al. 2015)、実験系による違いなのか ApoE2 が AD 病態を増悪させる報告もなされており(Zhao et al. 2018)、ApoE2 遺伝子導入が単純に ApoE 量を減らす方法より優れているかはまだ定かではない。

### 1.2.6 抗神経炎症

A $\beta$  斑の蓄積と tau の NFT 集積後、神経細胞の炎症が AD 病態に寄与していることが明らかとなっている。と言うのも、amyloid 斑の周囲に astrocyte を初めとする glia 細胞の集積が確認され、また臨床の知見からも microglia の過活性化が AD 病態へ寄与していることが示唆されている。この点から microglia の活性阻害剤も AD 治療薬として開発がなされてきている。過去に臨床試験を受けたものに tramiprosate があるが、2007 年に第Ⅲ相で開発が止まっている。また、 $\gamma$ -secretase modulator (GSM)の全身となる non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)である ibuprofen と flurizan も過去に臨床試験に進んだが、何れも有意な認知機能改善を示さなかった。現在臨床試験継続中なのは microglia modulator の CHF5074 であり、Tg2576 マウスの海馬で microglia の M2 マーカーの発現を上げていることが報告されている(Porrini et al., 2015)。

## 1.3 APP、A $\beta$ の歴史的背景

### 1.3.1 Amyloid Cascade 仮説について

amyloid cascade 仮説は大雑把に言えば、A $\beta$ 、特にその dimer や oligomer の蓄積が引き金になって tau タンパクの異常リン酸化が起き、最終的に神経細胞死を引き起こし AD 発症に至ると言う多段階の病的過程を示すものであった。FAD 変異は須らく A $\beta$ 42 産生比率、A $\beta$  産生総量、若しくは fibril 化を促進し、AD 病態の悪化につながっていることや、A673T 変異が A $\beta$  産生の減少と AD リスクの軽減に貢献している(Jonsson et al. 2012)ことから、A $\beta$  が AD 発症に寄与しているとされてきた。更に、最大の AD リスク遺伝子である APOE がその allele の違いによって A $\beta$  の核形成や clearance に影響していることも報告され、Amyloid Cascade 仮説を支持している(Bales et al. 1997)。しかしながら、A $\beta$  の存在は必須なもの AD 発症に十分ではなさそうということもわかっている。例えば A $\beta$  の蓄積量と認知機能の低下には最小限の相関性しかないことが示されている(Nelson et al. 2012)。最近、ApoE3 に Christchurch 変異を有するコロンビア人女性が、 $\gamma$ -secretase の活性中心サブユニット Presenilin 1 (PS1)に FAD 変異 E280A(通常 40 代後半で発症する)を保持するにも関わらず、70 歳になっても日常生活に支障の全くない軽微な短期記憶障害しか呈さないことが報告された(Arboleda-velasquez et al. 2019)。この女性は 40 代で発症した場合の E280A 変異保持者よりもはるかに多くの脳内 A $\beta$  蓄積が確認されたが、tau 病態の進行は殆ど無く、AD に対する ApoE3 の変異の強力な防御効果が明らかとなった。この報告より A $\beta$  の蓄積凝集はあくまでも AD 発症のトリガーであり、より下流に存在する要因によって実際の臨床症状の強さが左右され、且つ A $\beta$  蓄積以降のポイントも治療標的として有用であることが立証された。

即ち、ApoE が A $\beta$  と tau 病態の架け橋となりえることが示唆されたわけであるが、NMDA receptor が amyloid cascade に於いて A $\beta$  と tau を繋ぐ役割の 1 つである可能性も示唆されている。一方 tau は、通常は大半が微小管と結合し軸索上に存在するが、リン酸化されると微小管との結合能が低下し微小管非結合の遊離型 tau が増加する。このリン酸化が AD での重要な病態機序であるとされている。また、tau は Fyn を樹状突起に輸送する役割を演じ、NMDA receptor-postsynaptic density protein-95 (PSD95)-Fyn-Tau 複合体を形成する。この NMDA receptor は GluN2B サブユニットで

構成されていることから、GluN2B がその構成の主体であるシナプス外 NMDA receptor (eNMDA receptor) で複合体が構成され、 $A\beta$  による神経毒が誘導されると推定される (Petralia et al. 2010) (Martel et al. 2012)。tau のリン酸化に関しては様々な kinase が関与していることが明らかとなっている。複合体形成に伴って eNMDA receptor の刺激により、GSK3 $\beta$  (Mondragón-rodríguez et al. 2012)、CDK5 (Qu et al. 2011)、p38MAPK (Li et al. 2011) 等が活性化することが知られている他、これらの kinase の中には自身の活性化自体に tau が関与していることが示唆されている。

こうした報告から、以下のようなストーリーが立てられている。 $A\beta$  oligomer による eNMDA receptor 活性化はさらに病的  $A\beta$  産生を助長し、さらに PrP<sup>C</sup> との結合により eNMDA receptor との複合体を構成する Fyn を活性化させる。これにより生じる eNMDA receptor の活性化は GSK3 $\beta$  や CDK5 などの tau kinase を活性化し、tau のリン酸化が増加し、これを起点とした tau の微小管結合能の低下、微小管の不安定化、遊離したリン酸化 tau 同士の重合などが起き、AD 病理が進んでいく。また、 $A\beta$  oligomer 自体 tau のリン酸化を誘導することが知られており、これも AD 病態の発展に寄与する。最終的には eNMDA receptor の活性化が進んで  $Ca^{2+}$  の過剰流入、酸化ストレスの増大を介して神経細胞死をもたらす。この一連の流れは eNMDA receptor を介していることから、eNMDA receptor 仮説とも言われ、AD 治療の介入点を提供するものとして今後更なる研究が発展することが期待される。

### 1.3.2 APP の発見

AD はその殆どが孤発性 (sporadic AD; SAD) であるが、極一部に常染色体優性遺伝形式を示す家族性のものも存在する。発症年齢によって 65 歳未満で発症するものを早期発症型 (early onset AD; EOAD)、それ以外を LOAD と呼び、区別することがある。元々第 21 番染色体のトリソミーである down 症患者の脳実質に於いて、老人斑や NFT がよく観察されていたことからこの染色体が注目されていたが、第 21 番染色体上に  $A\beta$  の前駆体タンパクである APP 遺伝子が存在することが明らかとなった (Kang et al. 1987) (Britain 1989)。その後、APP 遺伝子上の 717 位の London mutation が FAD の最初の病因遺伝子として特定され、続いて 670/671 の二重変異、Swedish mutation も同定された (Goate et al. 1991) (Mullan et al. 1992)。このような  $A\beta$  産生量若しくは  $A\beta_{42}$  産生比率を上昇させるような missense mutation が FAD 発症に関与していること (Citron et al. 1992) (Cai et al., 1993)、PS1 にも FAD 発症に関与する mutation が存在し、 $A\beta_{42}$  比率の上昇を通じて  $A\beta$  の異常沈着を促進していること (Sherrington et al. 1995)、そして V717F mutation を持つヒト APP をマウスに発現させると老人斑を形成すること (Games et al. 1995)、などの研究結果から、APP から産生される  $A\beta$  が AD 発症に関与することが確実視されるようになった。老人斑の形成と蓄積に関しては、先述の通り AD 発症以前にかなり初期の段階から始まっていることが報告されたが、現在では老人斑の蓄積は早ければ 20 代から始まることが明らかとなっている (Baker-Nigh et al. 2015)。更に老人斑の形成過程は  $A\beta$  monomer が集まって可溶性 oligomer を形成し、oligomer 同士が集まって fibril を形成して老人斑をなすというステップが一般的に支持されている。ところがその後研究が進むにつれ、最終形成物である老人斑の蓄積数、部位が AD 発症と相関が無く (Lue et al. 1999) (Näslund et al. 2000)、寧ろ oligomer に毒性があることも複数のグループから報告が上がるようになった (Walsh and Selkoe 2007) (Castellani et al. 2008) (Tomiyama et al. 2010)。

## 1.4 APP 代謝と $A\beta$ 産生

### 1.4.1 APP 切断に関わる酵素

$A\beta$  は全身に発現している I 型膜タンパクである APP の切断を通じて産生され、その産生経路には  $A\beta$  非産生経路と  $A\beta$  産生経路が存在する (Kang et al. 1987) (図 3)。 $A\beta$  非産生経路では、 $A\beta$  配列内を K687/L688 を  $\alpha$ -secretase によって切断

され、まず sAPP $\alpha$  を分泌する。残った C 末端断片は C83 と呼ばれ、 $\gamma$ -secretase による膜内切断を受けて p3 を内腔へ分泌し、Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) を細胞質に放出する。一方、A $\beta$  産生経路では APP は M671/D672 で  $\beta$ -secretase による切断を受け、sAPP $\alpha$  より若干短い sAPP $\beta$  を分泌する。残った C 末端断片は C99 となり、 $\gamma$ -secretase の切断を受けて A $\beta$  と AICD に分かれる(Selkoe 2002b)。

AD 発症に関わるのは後者の  $\beta$ -、 $\gamma$ -secretase によって産生される A $\beta$  であり、38、40、42 アミノ酸からなる A $\beta$ 38、40、42 が主要な産生物として分泌される。最も優位に産出されるのは A $\beta$ 40 ではあるが、疎水性の高さから凝集性は A $\beta$ 42 が強く、minor species ではあるものの、AD 主要病因であると考えられている(Burdick et al. 1992)。更には、A $\beta$ 42 は斑形成時に中心核をなすとも示唆されており(Iwatsubo et al. 1994)、A $\beta$ 42 が形成する核の周囲に量の多い A $\beta$ 40 が徐々に凝集してくるモデルが唱えられている。一方、A $\beta$  非産生経路の A $\beta$  に相当する p3 は凝集性を有さないことも知られている(Hardy and Selkoe 2002)。また、両者から産生される AICD はアポトーシスの誘導や神経細胞の有害な刺激への応答性への関与、及びに APP、GSK3 $\beta$ 、KAI1、nephrilysin、BACE1 などの遺伝子転写調節としても機能することが示唆されている(Zhang et al. 2011)。

#### 1.4.1.1 $\alpha$ -secretase

ヒトの脳や培養細胞に於ける sAPP $\alpha$  の配列を解析した結果、幾つかの minor cleavage も存在するものの主に K687 の直後(A $\beta$  配列では K16)を切断されていることが示唆された(Esch et al. 1989)(Pasternack et al. 1992)。 $\alpha$ -secretase の実態としては、ADAM9 や ADAM10、ADAM17 などの ADAM family が幾つか同定され、 $\alpha$ -secretase 活性を保有することが確認されている(Allinson et al. 2003)(Asai et al. 2003)。その一方でビタミン A 誘導体の化合物が  $\alpha$ -secretase の発現量を上昇させ、同時に A $\beta$  の産生量が減少したことも確認されており、 $\alpha$ -secretase は確かに A $\beta$  量を調節する酵素であると共に、メジャーではないが治療標的であるとされている(Tippmann et al. 2009)。

#### 1.4.1.2 $\beta$ -secretase

A $\beta$  は  $\beta$ -secretase による切断を期に産生されることから、この pathway に関わる  $\beta$ -secretase はより関心を集めてきた。幾つかのグループにより、 $\beta$ -secretase は I 型膜貫通型タンパク質であり、典型的な D (T/S) G motif を有する aspartic protease であることが報告された。APP の  $\beta$ -site を切断することから、この酵素は  $\beta$ -site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 (BACE1) と名付けられた(Vassar et al. 1999)。 $\alpha$ -secretase に比べると、 $\beta$ -secretase は primary sequence に一定の特異性を持って基質を切断することが示唆されている。cathepsin D や napsin A、pepsin などの一般的な aspartic protease と同様、 $\beta$ -secretase は P1 に位置する leucine を認識し優位に切断することが示されており、有名な Swedish mutation は P2 位と P1 位の K670/M671 が N670/L671 に変異する APP FAD であるが、この FAD が入ることによって  $\beta$ -cleavage が起きやすくなることが説明できる(Gruninger-Leitch et al. 2002)。 $\beta$ -secretase は他の臓器に比べて脳での発現が非常に高いが、 $\beta$ -secretase ノックアウトマウスは致命的な機能欠損が生じるわけでもなく、A $\beta$  産生量もほぼ観察出来ない量まで低下することから、 $\beta$ -secretase 活性を抑制することが AD 治療への道の 1 つであると考えられている(Vassar et al. 1999)(Bennett et al. 2000)(Vassar and Kandalepas 2011)。

糖鎖修飾はタンパクの翻訳後修飾の 1 つであり、タンパクの輸送や正常な折り畳み、また機能の発揮に際して重要な役割を果たす。GnT-III は N-acetylglucosamine (GlcNAc) を Mannose の枝分かれ部分に付加する bisect 反応を行う糖鎖修飾酵素である。興味深いことに AD 患者では GnT-III が高発現であることがあり、その場合には bisect N-glycan の付いた  $\beta$ -secretase が多く発現している。そして、この GnT-III をコードしている *Mgat3* 遺伝子を欠損させたマウスは、 $\beta$ -secretase の発現量の低下及び老人斑の有意な減少が確認された(Kizuka et al. 2015)。詳細なメカニズムについては不明であるが、



筆者らは糖鎖修飾が変化し bisect GlnNAc が減少したことで lysosomal pathway へ  $\beta$ -secretase が移行しやすくなり、分解量が多くなったのではないかと推測している。

#### 1.4.1.3 $\gamma$ -secretase

$\gamma$ -secretase は毒性種 A $\beta$ 42 の産生量を決定する酵素であるだけでなく、疎水性環境である脂質二重膜内で加水分解を行う為、予てより強い興味を持たれてきた。幾つものグループによる精力的な解析結果より、 $\gamma$ -secretase の実態は PS、Nct、Aph-1、Pen-2 からなる複合体であり、自身の内部に親水性のポアを有しそこで基質の切断を行う新奇 aspartic protease であることが明らかとなったが、詳細に関しては  $\gamma$ -secretase の項目で記述する。

### 1.4.2 $\gamma$ -secretase による切断様式

#### 1.4.2.1 $\epsilon$ -cleavage

$\alpha$ -secretase と  $\beta$ -secretase はそれぞれ APP の異なる残基を切断し、その結果 p3 と A $\beta$  という長さの異なる 2 種類のタンパク質を分泌する。しかし、いずれも同じ AICD を細胞質側に放出し、また  $\gamma$ -cleavage で切断された A $\beta$  の C 末端は 40 位若しくは 42 位の残基である為、AICD はその次の残基、即ち 41 位若しくは 43 位の残基から始まる fragment であると考えられていた。かつて AICD は CTF $\gamma$  とも呼ばれていたが、これは  $\gamma$ -secretase に“1 回”切られたものの CTF の方、と言う意味合いを込めてつけられたものだろう。ところが引き続き研究の結果、AICD fragment は 50 位ないし 49 位の残基から始まるものであることが明らかとなった(Gu et al. 2001)(Yu et al. 2001)(Weidemann et al. 2002)。これらの報告が決定打となり、 $\gamma$ -secretase は 49 位若しくは 50 位を起点として複数回基質を切断することが明らかとなった。そして、この切断は  $\epsilon$ -cleavage (図 4A)と名付けられた。なお、 $\epsilon$ -cleavage で切断される APP の部位は、 $\gamma$ -secretase の別の基質である Notch の S3 site と等価の位置にあることも知られている(Schroeter et al., 1998)。

#### 1.4.2.2 $\zeta$ -cleavage

先述のように  $\epsilon$ -cleavage は同定されたわけだが、A $\beta$ 40/42 の切断部位からは 9 アミノ酸程度も離れている為、 $\epsilon$ -cleavage が果たして必要な切断であるかどうか議論的となった(Sisodia and George-hyslop 2002)。その時考えられた可能性は 3 つあった。1 つ目は C99 がまず  $\gamma$ -secretase によって A $\beta$ 40 若しくは A $\beta$ 42 の切断部位で切断を受け、残った CTF 側(41-99 又は 43-99)が何かしらの aminopeptidase、endopeptidase、若しくは 2 度目の  $\gamma$ -secretase による切断を受けて AICD を産出すると言うもの、2 つ目は逆にまず  $\epsilon$ -cleavage によって AICD を産出した後に  $\gamma$ -cleavage で A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 を分泌するというもの、そして 3 つ目は  $\gamma$ -cleavage と  $\epsilon$ -cleavage の間には全く関係性がなく、同時に発生するだけの別の切断機構であるというものであった(Gu et al. 2001)(Yu et al. 2001)(Weidemann et al. 2002)。強いて言えばこの中で最も有り得そうな説と言え、 $\epsilon$ -cleavage が先立って起こると言う 2 つ目の説であった、と言うのも  $\epsilon$ -cleavage は細胞膜と細胞質の境目近傍で起こる切断であり、加水分解に必要な水分子がアクセスし易い位置にあったからであった。しかし、これを議論するには、41 位若しくは 43 位を N 末端とする AICD 種と 48 位若しくは 49 位を C 末端とする A $\beta$  種が今まで発見されてこなかった為、困難であった。これを考えるに当たって、また説が 3 種類唱えられた。1 つ目は、上記の特殊な A $\beta$  種や AICD は不安定でありすぐさま切断を受けて A $\beta$ 40/42 などに分解されるというもの、2 つ目は、今まで注目されてこなかった脂質二重膜や細胞質にこうした特殊な分解産物が存在するというもの、そして 3 つ目は、先述の通り  $\epsilon$ -cleavage と  $\gamma$ -cleavage は無関係な切断であるが為にそもそも中間産物など存在しない、というものであった(Xu 2009)。この検証の為、複数のグループは尿素を含んだ Urea-gel を用いる特殊な SDS-PAGE によってアミノ酸残基長の微々たる差で A $\beta$  を分離する手法を開発し、その結果 APP を過剰発現させた培養系細胞と transgenic マウスに於いて A $\beta$ 46 の存在を確認した

(Zhao et al. 2004)(Qi-Takahara et al. 2005)。また同時に、この A $\beta$ 46 が TSA 型 GSI によって産生量を著しく落とす為、切断には  $\gamma$ -secretase が関与していることも明らかとなった。これらの結果より、新しい切断部位の存在が新たに発見され、この切断を  $\zeta$ -cleavage と呼ぶようになった。

とは言うもの、これらの結果からではこの  $\zeta$ -cleavage と  $\epsilon$ -cleavage、そして  $\gamma$ -cleavage の 3 つの切断の間にある関係性を解き明かすことは出来ない。切断順序などのより詳細な切断機構の解明には、他にも必要なデータがあった。その研究で  $\gamma$ -secretase 複合体と A $\beta$ 46 が強い相互作用をしている可能性を示唆する報告や(Zhao et al. 2005)、DAPT や DAPM、compound E などの dipeptide 型 GSI によって細胞内 A $\beta$ 46 が蓄積するという報告などがなされ(Zhao et al. 2004)、 $\gamma$ -cleavage に先立って  $\zeta$ -cleavage がなされるのがもっともらしいだろうと考えられるようになったものの、TSA 型 GSI などでは A $\beta$ 46 の蓄積が見られず、ひょっとしたら  $\zeta$ -cleavage は PS や PS 様タンパクを含み、且つ dipeptide 型 GSI と TSA 型 GSI に対して異なる sensitivities を有する別酵素による切断である可能性が、依然捨てきれずにいた。そこで Zhao らは培養細胞系に DAPM を含む培地で incubate することでまず A $\beta$ 46 を蓄積させ、一定時間後に培地を L-685,458 を含む新しいものに置換することで新たな A $\beta$ 46 の産生を阻止しながら incubate を続けた結果、L-685,458 を添加した後は時間依存的に A $\beta$ 46 の量が減少し、逆に A $\beta$ 40/42 の産生量が増加することを確認した(Zhao et al. 2005)(Zhao et al. 2007)。この実験結果より、 $\zeta$ -cleavage は  $\gamma$ -cleavage に先立って起こるものであり、A $\beta$ 46 は A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 に切断されていくことが明らかとなった(図 4A)。

#### 1.4.2.3 $\gamma$ -cleavage

$\zeta$ -cleavage は  $\gamma$ -cleavage に先立って起こるものであることはこれで証明されたことになる。すると最後に残る疑問は、 $\epsilon$ -cleavage の位置付けである。Zhao et al.は細胞 lysate を用いた免疫共沈降実験によって A $\beta$ 49 を観察し、その結果 GSI 非存在下でのみ A $\beta$ 49 の存在を確認することが出来た。また同時に A $\beta$ 49 は GSI 非存在下で最終的に A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 に切り進められること、更には DAPT などの dipeptide 型 GSI の添加時には A $\beta$ 46 まで切り進められることも報告され(Zhao et al. 2005)、これらの一連の研究結果によって、 $\epsilon$ -cleavage は最初に受ける切断であり、続いて  $\zeta$ -cleavage、そして  $\gamma$ -cleavage の順に切断が進んでいくことが明らかとなった。なお、 $\gamma$ -cleavage は最後のステップであると同時に  $\zeta$ 、 $\epsilon$ -cleavage 依存的な切断である為、この 2 つの切断は、特に  $\epsilon$ -cleavage は A $\beta$  産生の律速段階であるとも考えられるようになった。

主要な A $\beta$  分種である A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 は  $\gamma$ -cleavage の過程で生産される。生体内では A $\beta$ 40 の産生が最も多いことが確認されている。先述の通り、 $\gamma$ -cleavage は  $\zeta$ -cleavage、 $\zeta$ -cleavage は  $\epsilon$ -cleavage 依存的なので、A $\beta$ 40 は A $\beta$ 49 から、A $\beta$ 42 は A $\beta$ 48 からそれぞれ 3 アミノ酸残基毎の切断を受けて産生される。これらの切断を行う  $\gamma$ -secretase は活性中心に 3 つの S' pocket を有しており、これが 3 アミノ酸毎の切断を可能にしていると考えられている(David M Bolduc et al. 2016)。中でも S2' pocket はサイズが小さく、芳香環を含む側鎖を持つようなアミノ酸残基は入り込むことが出来ない。故に、この S2' pocket と bulky なアミノ酸の位置関係によって、基質の膜内配列の切断箇所(図 4B)を認識しているとされている。APP の phenylalanine 置換体を用いた解析では、I45F、T48F が A $\beta$ 42 比率を増加させ、V44F と I47F は A $\beta$ 42 比率を低下させること、つまり A $\beta$ 40、42 産生系列それぞれ切断を受けて CTF 側に生ずる tripeptide を 1 ブロックとした時に、真ん中の残基を phenylalanine に置換するとその産生系列での切断が進みにくくなることが報告され、A $\beta$  の産生の制御に基質の配列が大きく関与することが明らかとなった(David M Bolduc et al. 2016)。

アミノ酸残基レベルで C99 と  $\gamma$ -secretase の相互作用に着目した研究では、膜内配列では V44 と L49 が PS1 NTF、M51 と L52 が PS1 CTF との主な相互作用部位であると報告している(Fukumori and Steiner 2016)。ここの結合は L-685,458 と DAPT によって阻害がかかっていることから、基質切断時に活性中心付近で捕捉される時の結合部位であると考えられている。興味深いのは、V44 より N 末端側に PS1 と強い相互作用をする残基が見つからなかったことである。

生体内で A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 が主要な産物であるのは、V44 が tripeptide として切断されてしまうと基質の残りの残基で  $\gamma$ -secretase に十分に相互作用できず、分泌してしまうからであろう。

現在 PS1 と APP 併せて 270 の FAD 変異が確認されているが、酵素側、基質側何れの FAD 変異でも、A $\beta$ 40 に対する毒性種 A $\beta$ 42 の産生比率を上昇させる。この切断様式の変化に寄与するメカニズムとしては、現在の所後記の 3 つが考えられている。1) 基質となる APP の  $\gamma$ -secretase に対する位置の安定性を変え、 $\epsilon$ -cleavage を A $\beta$ 48 配向性にし、A $\beta$ 42 の産生量を上げる、2)  $\gamma$ -secretase の基質切断速度に影響を与えて  $\gamma$ -cleavage の不安定化させ、切断回数を減少させて short A $\beta$  に対する A $\beta$ 42 の比率を増加させる (Chávez-Gutiérrez et al. 2012)、3)  $\zeta$ 、 $\gamma$ -cleavage と進む中で A $\beta$ 40 産生系列が A $\beta$ 42 産生系列に移行する (David M Bolduc et al. 2016)。この何れかが正答であると言う訳ではなく、mutation の種類によって与える効果が異なるのが筆者の意見である。また、A $\beta$ 40 産生系列と A $\beta$ 42 産生系列の配向性は基質と酵素の相互作用によって大きく決定され、FAD 変異はその相互作用に干渉することで A $\beta$ 42 産生系列での切断を助長することが明らかとなっている (Fukumori and Steiner 2016) (Szaruga et al. 2017)。Fukumori et al. は、膜内配列をそれぞれ *p*-Benzoylphenylalanine (Bpa) に置換した C99 と PS1 NTF を UV 照射で結合させ、その結合量から基質の各残基と PS1 NTF との相互作用の強さを推定した所、僅かな A $\beta$ 42 産生比率上昇しかもたらさない弱い FAD 変異、A246E では V49 と K52 で PS1 NTF との相互作用が減弱した。一方、現在最も強力な FAD 変異である L166P はその 2 つに加え V40、V44、I45、L51 と PS1 NTF の相互作用が弱まり、逆に V46 と T48 が control に比べ 3 倍近く強く結合した。各種 A $\beta$  産生時に切断を受ける部位を考慮すると、V40、V44 と I45、L49 は A $\beta$ 40 産生系列に於いてそれぞれ V40、V44~V46、I47~L49 のブロックに含まれ、V46 と T48 は A $\beta$ 42 産生系列の V46~T48 ブロックに該当する (図 4B)。このことから、V40 と酵素、V44 と I45 の酵素との相互作用の減少がそれぞれ short A $\beta$  と A $\beta$ 40 の産生減少に、V46 と T48 の相互作用の増強が A $\beta$ 42 産生増加に繋がることは容易に想像できる。加えて面白いのは、強力な L166P の方がより多くの箇所に干渉していることである。

この様に最終的に A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 を産生する  $\gamma$ -cleavage は、基質側の膜内配列の特徴と酵素の構造によって決定され、それらの相互作用が変化することで産生する A $\beta$  種が変動する。APP の膜内配列には  $\gamma$ -secretase による切断を受けやすくするような特異的なポイントが 2 つ見受けられる。1 つ目に、 $\gamma$ -cleavage を複数回受ける箇所に Valine や Isoleucine、そして Threonine といった  $\beta$  分枝鎖アミノ酸残基が犇めき合っていることである。 $\beta$  分枝鎖残基は helix 間の相互作用を安定化させる作用以外にも、extend  $\beta$ -structure を取りやすくなる効果があり、膜内の helix 構造を不安定化させることが考えられている (Deber et al. 1993) (T. Sato et al. 2009)。しかし生理環境下に於いて APP の膜内配列はしっかりと helical である。2 つ目に、A $\beta$ 37 の切断箇所の更に上、Luminal 側にかけて Glycine が 4 残基毎に見受けられることである。Glycine はその側鎖の小ささからタンパクの高次元構造に flexibility を与え、不安定化させる (Li and Deber 1992)。こうした特徴が重なり、APP は  $\gamma$ -secretase によって膜内を複数回切断されるのかもしれない。

#### 1.4.2.4 short A $\beta$ の産生

short A $\beta$  とはアミノ酸残基数が 40 より少ない、主に A $\beta$ 37、A $\beta$ 38、A $\beta$ 39 の分子種を指す。元々これらの分子種は minor species として生体内に存在し、培養細胞系に於いても産生が認められているものであり、20 年以上前に A $\beta$ 38 がカルシウムホメオスタシスを不安定化し、皮質ニューロンが毒性やストレスに対してより感受性が高くなることを報告した論文がある (Mattson et al. 1992)、A $\beta$  の切断機構との関わりについては 2000 年に入って報告されたものが最初であろう。丁度その頃 NSAIDs が A $\beta$ 42 産生量を下げることが注目された頃であったが、Weggen らは sulindac sulfide が A $\beta$ 42 の産生量低下に伴って A $\beta$ 38 の産生量上昇を確認しており (Weggen et al. 2001)、A $\beta$ 38 の産生は A $\beta$ 42 と何かしらの関係があることが強く示唆された。その後も同じように別の GSM でも A $\beta$ 42 産生の減少に伴う A $\beta$ 38 や A $\beta$ 37 の増加が見られた

り(Beher et al. 2004)、逆に A $\beta$ 42 の産生増加時にはほぼ決まって A $\beta$ 38 が減少することも報告され(Zhao et al. 2007)、A $\beta$ 38 は A $\beta$ 42 の更に切断を受けた姿であることが強く示唆された。しかし直後に A $\beta$ 38 と A $\beta$ 42 の産生には何ら関係性は無いと言い切る論文も発表された。スイスの Page et al. は FAD 変異を導入した PS を含む  $\gamma$ -secretase を幾つかデザインし、それらの幾つかが sulindac sulfide 添加時に A $\beta$ 42 の産生減少を認めないにも関わらず A $\beta$ 38 の産生が増加したということから、そのような結論を導いている。しかし現在の一般論では A $\beta$ 37、A $\beta$ 38 はそれぞれ A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 から切断を受けて産生されると考えられている(Olsson et al. 2014)。少なくとも Page et al. の研究結果に対しては、A $\beta$ 38 は A $\beta$ 42 から産生されるとすると、A $\beta$ 42 は C99 からの切断最終産物であると同時に A $\beta$ 38 の基質でもあるので sulindac sulfide による活性化に伴って A $\beta$ 42 の産生と分解が同時に起き、結果的に A $\beta$ 42 の最終的な産生量が不変のまま A $\beta$ 38 が蓄積する可能性がある為、彼らの結果では A $\beta$ 38 と A $\beta$ 42 の関係性を断ち切ることは出来ていないと筆者は考えている。

ところがこれに似た研究結果が近年報告されている。先述の理論に基づき、V44F と I45F の double mutation を APP に導入し、A $\beta$ 42 と A $\beta$ 43 への切断を阻害した時に、確かに A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の産生は著しく減少するが、A $\beta$ 38 の産生は寧ろ野生型 APP の何倍もの値まで上昇したのである(David M Bolduc et al. 2016)。これについて該当論文の筆者らは A $\beta$ 38 の産生は A $\beta$ 42 の延長線上にはないと否定したわけではなく、G37 と G38 の 2 つの glycine が helix を不安定化しやすく、酵素による切断が受けやすい状態であった為だと考察を加えている。それでもなお、A $\beta$ 42 を通じないルートで A $\beta$ 38 の産生が生ずる可能性を示唆した点で、頭の隅に置いておきたいことである。

### 1.4.3 様々な N-, C-terminally truncated A $\beta$

一方で A $\beta$ 37、38、39、以外にもより minor な short A $\beta$  種は複数存在する。特に Mass spectrum で徐々に明らかになったものの中には C 末端だけでなく、N 末端も切断を受けたものも存在し、これらをまとめて N-, C-terminally truncated A $\beta$  と呼ぶことがある。

#### 1.4.3.1 A $\beta$ 34

過去の検討より、APP と BACE1 の過剰発現細胞で A $\beta$ 34 の上昇が報告されていることから、A $\beta$ 34 は  $\beta$ -secretase 依存的に産生される意見があった(Vandermeeren et al. 2001)(Dunys et al., 2018)。しかしながら  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI) による阻害効果が A $\beta$ 34 にも表れることから、その説が正しいかどうかの判断はついていない。更に一方で Matrix Metalloprotease である MMP-2 と MMP-9 によって切断される可能性も報告されており(Hernandez-Guillamon et al. 2015)、A $\beta$ 34 に関する正確な産生経路は依然として不明な点が多い。なお、この 2 つは A $\beta$  を更に切り進めて A $\beta$ 30 と A $\beta$ 16 を産生することも示唆されている。

評価系の不足により A $\beta$ 34 の詳細な生理学的機能はまだ不明な点が多い。とはいえ組織学的な検討より、AD 病患者脳内で A $\beta$ 34 はよく見られる A $\beta$  であることが示唆されている(Wiltfang et al. 2002)。加齢に伴って  $\beta$ -secretase の活性が上がり、それに付随して A $\beta$ 34 も増えることから多くの種類と同様 A $\beta$ 34 も toxic なものであると考えられているが、HEK 細胞を使った実験ではむしろ保護的な効果があるとの意見もある(Caillava et al. 2014)。

#### 1.4.3.2 A $\beta$ 24

A $\beta$ 24 は glia 細胞の活性化に伴って産生することが知られているが、この種類自体 AD 病患者の脳内ではまだ見つかってはいない。また、A $\beta$ 24 が産生する時に受ける valine と glycine の間の切断は通常の endopeptidase や exopeptidase に見られない切断であり、どのような切断酵素によるものかははっきりしていない。しかし、A $\beta$ 24 の合成 peptide をマウス

頭蓋内に投与した場合に A $\beta$ 42 の凝集が加速することが確認されている(Mazzitelli et al. 2016)。このことから実際の病理でも A $\beta$ 24 は病気の進行に関与しているのではないかと考えられている。

#### 1.4.3.3 A $\beta$ 2-x

A $\beta$  peptide の N 末の aspartic acid acid が切断を受け、第 2 位の alanine が N 末端に来る A $\beta$ 2-x は孤発性、家族性問わず AD 病患者の脳内や CSF に確認されている (Wiltfang et al. 2001)。しかしながら、A $\beta$ 2-x の産生は PS1 非依存的であることも知られている。一方で PS1 の allele である PS2 は細胞内の局在が異なり、切断様式も変わることが知られており、PS2 の寄与が大きいのではと考えられている(Sannerud et al. 2016)。

#### 1.4.3.4 A $\beta$ 3-x と pE A $\beta$ 3-x

pE とはピログルタミル化を表す(図 5)。生体内ではタンパクが様々な酵素によって切断、分解を受けているが、こうした分解から peptide を守る為にこの反応が進化したとされている。Glutamate 内の carboxyl 基と amino 基が分子内縮合し、五員環を形成する。この反応は glutaminyl cyclase (QC) (Schilling et al. 2008)、環構造を再度開くには pyroglutamate aminopeptidase による酵素反応が必要である。

A $\beta$  のピログルタミル化にはまず第 1,2 位の aspartic acid acid と alanine の切断から始まる必要がある。aminopeptidase A (APA) は N 末端を切断する酵素の候補の 1 つである(Sevalle et al. 2009)。APA は酸性アミノ酸と親和性が高いことが知られ、これが N 末端を切断する要因の 1 つと考えられている。一方で MALDI-TOF マススペクトルを使った検討で、dipeptidyl peptidase (DPP) も N 末端 2 残基の切断に関与しているとされている(Antonyan et al. 2018)。特に DPPIV が大きな関与をしているとされ、面白いことに A $\beta$ 42 より A $\beta$ 40 の方がより DPPIV による切断を受けやすい。

一旦 N 末端の 2 残基が切除された後は先述の通り QC による環化が始まる。この QC は脳内に均一に分布しているわけではないが AD 病患者脳での発現が上昇していることが報告されている他(Morawski et al. 2014)、QC タンパクと mRNA の発現が pE A $\beta$ 3-x とよく相関していたり、また QC の過剰発現がモデル動物に於いて認知症様行動を引き起こす一方で QC を欠損させるとこうした障害を rescue すること(Jawhar et al. 2011)などが報告されている。現在、QC も AD 治療標的の一つとしてとらえられている。

#### 1.4.3.5 A $\beta$ 4-x

N 末端の 3 残基が削り取られた A $\beta$ 4-42 は N-truncated 種の中では最も初期に報告されたものであり、AD 脳の中で多く見られる。A $\beta$ 4-x は迅速に凝集を促進することが知られており、特に A $\beta$ 4-42 は pE A $\beta$ 3-x と A $\beta$ 42 と同程度の毒性を保持する(Bouter et al. 2013)。同論文では、野生型のモデルマウスに A $\beta$ 4-42 を注射したところ、Y 迷路試験での記憶が低下したことを報告していることから、AD 病への負の寄与があると考えられている。A $\beta$ 4-x の産生について多くは知られていないが、第 3 位の glutamate が露出してピログルタミル化する前、若しくは一度ピログルタミル化した後に開環し、そのあとに切断を受けることが予想される。こうした切断が可能な酵素の候補としては、1 つ目に酸性アミノ酸と親和性の高い APA があり、環化する前の glutamate を攻撃して切断している可能性がある(Sevalle et al. 2009)。pE 残基を切断対象とする酵素には pyroglutamyl peptidase I と II があり、いずれも A $\beta$ 4-x 産生への寄与が示唆されている(Dunys et al., 2018)。pyroglutamyl peptidase I は pE を P1 ポケットで認識すれば P2 と P3 位に大きな特異性を要しない酵素であり、一方で pyroglutamyl peptidase II は pE-His-X の tripeptide をメインに切断する。どちらが主要な切断酵素かは未だわかっていない。

#### 1.4.4 APP family

哺乳類においては APP 以外に amyloid precursor-like protein1/2 (APLP1/2) が存在し、APP と相補的に機能していることが知られている (Wasco et al. 1992) (Wasco et al. 1993)。局在に関して、APP と APLP2 は ubiquitous に発現しているものの特に neuron での発現が高いのに対し、APLP1 は主に神経系に発現していることが知られている (Lorent et al., 1995)。この 3 種のタンパクは細胞外ドメイン E1、E2、そして細胞内ドメインの保存性が高く、一方で A $\beta$  配列は APP 特異的であることも知られている。その為、APP や APLP 同士が相補的に機能して発揮する生理現象に A $\beta$  は基本的に関与しないだろうというのが妥当な考えである。

とは言え、APLP1 と APLP2 は何れも APP のように ectodomain shedding を受け、soluble な sAPLP を分泌することが、培養細胞系及びヒト CSF で確認されている (Slunt et al. 1994) (Webster et al. 1995)。APLP1 と APLP2 の切断機構の差と言えば、APLP2 は  $\alpha$ -secretase と  $\beta$ -secretase 両方に切断されることが示されているが、APLP1 の shedding は BACE inhibitor (BSI) による阻害を受けないことから、APLP1 は  $\beta$ -secretase 切断を受けないことが示唆されている (Eggert et al. 2004)。しかし、同時に  $\beta$ -secretase による切断によって強力に切断産物の量が制御されているわけでもなく、BACE knock out (KO) マウスと過剰発現マウスを用いた検討で BACE によらず ICD の放出量がほぼ一定であったことや sAPLP の分泌量に微々たる差しか確認できなかったことも報告されている (Frigerio et al. 2010)。APLP の切断様式に関しては更なる検討が必要そうだ。

### 1.5 APP、A $\beta$ の生理機能

#### 1.5.1 凝集性

*in vivo*、*in vitro* どちらでも A $\beta$ 40 が predominant に生成され、続いて A $\beta$ 42 や A $\beta$ 38、そして A $\beta$ 37 と A $\beta$ 39 が続く (Olsson et al. 2014)。それ以外の長さの A $\beta$  も決して分泌されないわけではないが、分泌 A $\beta$  はほぼこの 5 種が占めている (Weggen et al. 2001)。現在では最も凝集性の高い、毒性の高い種は A $\beta$ 42 であることが分かっているが、これは元々 AD 脳の老人斑を免疫組織化学的に解析した結果、大部分が A $\beta$ 42 から構成されており、また diffuse plaque は A $\beta$ 42 のみを含むことから、最初期に沈着するのは A $\beta$ 42 であり、その凝集性の高さが示された (Iwatsubo et al. 1994) (Vandersteen et al. 2012)。ちなみにこの時 Iwatsubo らは同時に A $\beta$ 43 の存在についても少々言及したが、これは後に単体で見た時に A $\beta$ 43 は A $\beta$ 42 よりも毒性と凝集性が高いことが示された (Saito et al. 2011)。とは言うものの、生体内での A $\beta$ 43 の産生量は極僅かであり、産生量を加味して言えば依然として A $\beta$ 42 の AD 発症への寄与がより高いのは確かである。

しかし A $\beta$  が如何にして凝集し、沈着するのは当初問題であった、と言うのも当初発見されたのは可溶性の A $\beta$  であったからだ (Haass et al. 1992) (Shoji et al. 1992)。1993 年、Jarrett らは合成 A $\beta$  peptide を用いて重合実験を行い、その結果 A $\beta$ 40 よりも A $\beta$ 42 は極めて凝集しやすく、一旦凝集するとそれが核としての役割を果たし、A $\beta$ 40 までも重合が促進されていくという現象を発見した (Jarrett and Lansbury 1993)。この発見を期に、A $\beta$ 42 の脳内蓄積が AD 発症へ寄与していることが明らかとなり、A $\beta$  分子種の意義が徐々に解明されていく。

A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 の切断部位付近は valine や alanine、glycine などの疎水性残基が密集しており、A $\beta$ 42 は A $\beta$ 40 よりも 2 残基分疎水性アミノ酸が多い為 (Munter et al. 2007)、この C 末端側の疎水性の強さが凝集性の高さに関わっていることが昔から考えられてきたが、厳密にどのような機序で凝集性を獲得するかは長らく不明のままであった。Morimoto らは proline 置換を含む mutant 解析を行い、その結果 A $\beta$ 42 は E22 と D23 で折れ曲がり、その前後が  $\beta$ -sheet 取る構造を有し、それらが被さることで凝集していくというモデルを発表した (Morimoto et al. 2004) (図 6A)。事実この 2 つの残基の置換、及び Arctic 変異や Iowa 変異などの FAD 変異は凝集性に違いを与えることが報告されている (Pera et al. 2009) (Tycko

et al. 2009)。似たような turn は 33、34、38、39 位の残基にも見られるが、これは A $\beta$ 42 を環状に近い構造に維持し、安定化に寄与していると考えられている。また、彼らは C 末端側の残基は A $\beta$ 42 の凝集性に関与しているが同時に関与していないという面白い仮説も立てている。関与していないと言うのは、彼らが C 末端 I41 と A42 を threonine に置換した時に凝集性の増加を認めたと、C 末端の残基自体は凝集性に関与していないということであり、関与していると言うのは、Williams らが発表した A $\beta$ 40 の conformer との大きな相違は A $\beta$ 42 の C 末端が  $\beta$ -sheet 構造をとっており、この  $\beta$ -sheet が凝集時の安定性に一役買っている可能性が高いということである(Williams et al. 2004)。

その後、この A $\beta$ 42 の conformer は Masuda らによって更に詳細な解析をされることになる。彼らは NMR を用いることで実は生体内では G25 と S26 で turn する conformer が優位に産生されており、この構造は凝集性や毒性が低いということ、そして以前 Morimoto らが発表した E22 と D23 で turn する conformer は minor であることを報告した(Masuda et al. 2009)。しかし後者の conformer は、turn する場所が悪い為 Y10 と M35 が近接し、遷移金属の存在下に於いて M35 の S 原子の酸化を通じて radical が生成する、そしてその radical は C 末端の carboxylic group によって安定化され、安定して凝集することができるという(図 6B)。このモデルでは 33、34、38、39 位で turn することが凝集性獲得の要である点では Morimoto らの発表と一致しているが、C 末端が  $\beta$ -sheet を取っているからではなく、その長さが turn した後に丁度 M35 に来る長さであることが重要と言える点で異なっている。どちらがより肝心か、或いはどちらも凝集性に寄与しているかは、未だ不明のままである。

一方近年の cryo-EM による解析で、合成 A $\beta$ 42 peptide の cross- $\beta$  sheet 凝集構造が解かれている(Gremer et al. 2017)。その中で、7 nm から 8 nm の amyloid fibril は主に(特に神経突起を有し神経損傷に関わるとされる neuritic plaque)の中央に存在している一方、oligomer レベルの凝集体は斑の突起、つまり斑の周囲に多く存在することが分かっている(Masters and Selkoe 2012)。こうした A $\beta$  の蓄積には microglia による A $\beta$  の取り込みや、それに引き続く細胞内核形成や凝集が先んじて生ずると考えられている(Sosna et al. 2018)。こうした一連の凝集過程はプリオンに通ずるところもあり、例えば misfold  $\beta$  sheet 構造を持つ微量の A $\beta$  が核となることが知られている(Walker and Jucker 2015)。In vivo の実験系でも、AD 脳や APP transgenic mice から抽出した微量の核を別の APP transgenic 動物へ注入すると amyloidosis を誘導することが報告されている(Eisele et al. 2009)(Eisele et al. 2010)。

構造学的観点から若干ずれるが、生化学的に凝集について面白い報告がなされている。Kim らは A $\beta$ 40 を選択的に分泌する BRI-40A $\beta$  マウスと A $\beta$ 42 を選択的に分泌する BRI-42A $\beta$  マウスを Tg マウスと交配させた結果、前者との交配マウスは純 Tg マウスに比べて A $\beta$  plaque の蓄積が抑えられ、逆に後者との交配マウスは純 Tg マウスに比べて A $\beta$  plaque の蓄積が促進されたという結果を残している(J. Kim et al. 2007)。この結果から彼らは生体内で predominant に生成する A $\beta$ 40 は実は老人斑形成に対して抑制的に働くのではないかという仮説を立てている。これは GSM などの A $\beta$ 42 産生比率を下げて老人斑蓄積を抑える薬剤にとっては支持的な研究報告ではあるものの、Kim らの研究報告では A $\beta$ 42 の産生量のベースラインが各マウス間で統一できておらず、即ち A $\beta$  plaque の蓄積が阻害されたと見えたマウスではただ単に A $\beta$ 42 の産生量が少なかったからであった可能性が否めない点に関しては、筆者は否定的である。

## 1.5.2 毒性

### 1.5.2.1 興奮毒性

glutamate や aspartic acid は、N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor などの glutamate receptor を介して興奮性の刺激を伝達する、興奮性アミノ酸(Excitatory Amino Acid; EAA)である(図 7)。EAA は receptor に結合した後、チャネルを開口させて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させる。ことで下流にシグナルを伝える。この時細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は 100 nM 程度である一方で細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度は 1 mM 以上であり、その差は 10000 倍にもなる。その為通常チャネルは一瞬だけ開くの

だが、何らかの要因でチャネルの開閉に支障が生じると  $\text{Ca}^{2+}$  の異常流入が発生し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が激増し、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の酵素などが暴走し、細胞に対して様々な悪影響を及ぼす。これを興奮毒性と言う。例えば NO 合成酵素(NOS)は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に NO を産生する酵素だが(Padula et al., 2008)、NO は最終的に活性酸素の産生に繋がる。即ち高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  は活性酸素の増加を介して細胞に対する酸化ストレスを増加させ、細胞死に繋がるのである。

AD に於ける神経細胞死と  $\text{A}\beta$  との関係は様々なものが示唆されてきているが、そのうちの 1 つが興奮毒性を通じたものかもしれない。1992 年の報告で  $\text{A}\beta_{38}$  の incubate で glutamate の興奮毒性に対する神経細胞の感受性を上げることが示唆されている(Mattson et al. 1992)。 $\text{A}\beta_{38}$  は先述の通り  $\text{A}\beta_{42}$  から更に切断を受けて分泌される  $\text{A}\beta$  種である。生体内に於いては  $\text{A}\beta_{42}$  とほぼ同等量産生されるが、凝集性は低く、毒性も殆ど無いと考えられている(Vandersteen et al. 2012)。現在の AD 治療薬候補として開発されてきた GSM は、 $\gamma$ -secretase の活性を上げ  $\text{A}\beta_{42}$  を  $\text{A}\beta_{38}$  へ切り進めることで毒性の強い  $\text{A}\beta_{42}$  の量を減らす為、この報告は非常に嫌なものである。しかしながら、Mattson らの研究では  $\text{A}\beta_{38}$  と  $\text{A}\beta_{25-35}$  の 2 種類しか検討しておらず、様々な  $\text{A}\beta$  種に比して  $\text{A}\beta_{38}$  の毒性が高いと言えるものではない。事実、 $\text{A}\beta_{42}$  単体では興奮毒性を増強させないものの(Koh et al., 1990)(しかしながら後述のように完全に無関係と言う訳ではないだろう)、 $\text{A}\beta_{40}$  にも同様な効果が見出されている(Yankner et al., 1990)ことを考えると、興奮毒性を増強させるのは  $\text{A}\beta_{38}$  特異的でなく、 $\text{A}\beta$  全体の特性であるだろうと捉えて良いだろう。更に、 $\text{A}\beta$  が興奮毒性を増強させた報告は全て  $\mu\text{M}$  レベルの  $\text{A}\beta$  を実験系に加えて確認されたものであるが、明らかに生体内での  $\text{A}\beta$  濃度を遥かに上回る濃度である。興奮毒性を増強するのは超濃度の  $\text{A}\beta$  の持つ特性であり、生体レベルの話では無視できることかもしれない。

### 1.5.2.2 NMDA receptor との関与

前章で、神経細胞死に繋がる故、過剰な細胞外 glutamate は有害であることを記述した。臨床的な知見から、AD に於ける NMDA receptor を介した病態の背景には、glutamate cycle の異常が関与していることが分かっている。glutamate cycle とは 1) 前シナプスから放出された glutamate が astrocyte に取り込まれて除去され、2) astrocyte 内で glutamine に変換し、神経細胞に供給された後に再度 glutamate に変換、3) シナプス小胞内に glutamate を保持し放出する、と言う過程である。AD ではこれら各過程で、早期からの glutamate 除去障害や astrocyte 内の glutamine synthetase 量の低下による細胞外 glutamate 量の増加(Masliah et al. 1996)、VGLUT1 と 2 の減少による神経細胞内の glutamate 貯蓄障害(Poirel et al. 2008)と言った機能異常が生じ、glutamate のホメオスタシスを保てなくなると考えられている。これらは、 $\text{A}\beta$  の NMDA receptor への関与によるものであるとする可能性が大きい。一昔前の報告で、 $\text{A}\beta_{25-35}$  の海馬神経に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を通じた神経毒性は NMDA receptor antagonist によって軽減されること(Brorson et al. 1995)、 $\text{A}\beta$  による酸化ストレスも同様に NMDA receptor antagonist によって block されること(Parks et al. 2001)、 $\text{A}\beta_{42}$  の取り込みが NMDA receptor antagonist によって阻害されること(Bi et al. 2002) (Danysz et al., 2012)などが報告されたことから、 $\text{A}\beta$  の NMDA receptor への関与に注目が集まるようになった。

glutamate receptor の 1 つである NMDA receptor は学習や記憶に重要な役割を持ち、神経可塑性や神経保護にも関連がある。免疫組織学的に NMDA receptor はシナプス(sNMDA receptor)だけでなく、シナプス外にも存在することが明らかとなり(Li et al. 1998)、機能も異なることが徐々に分かっている。特に病的な状態では、eNMDA receptor が活性化し、神経伝導障害や神経細胞死を誘導することも報告されている(Parsons and Raymond 2014)為、病的状態での eNMDA receptor の役割やその阻害による効果に注目が集まっている。NMDA receptor はシナプスとシナプス外を移動することが知られており、これは receptor の co-agonist である glycine や D-serine と NMDA receptor のサブユニットとの結合の差が移動性に関与する可能性が指摘されている(Papouin et al. 2012)。ヒトでの s と eNMDA receptor の比率は不明であるが、ラット海馬の培養細胞は日を経る毎に eNMDA receptor の割合が変化したとの報告がある(Ivanov et al.



2006)。しかし、例えば eNMDA receptor はシナプス外に弥漫性に広がっている訳でなく、軸索や軸索突起、glia 細胞突起などの細胞突起周辺に不連続的に存在する。特に樹状突起と astrocyte の突起が接する付近に多く発現するが、これは astrocyte と神経細胞の間で行われる生理相互作用に関連しているとされている(Petralia et al. 2010)。古典的には sNMDA receptor と eNMDA receptor はほぼ同一のものであると捉えられており、NMDA receptor の活性化による  $Ca^{2+}$  流入が細胞死に繋がる、即ち NMDA 活動の量的な変化によって神経保護から神経毒性に変化するという説が一般であった。しかし、その後の研究により sNMDA receptor は神経保護的に、eNMDA receptor は病的状態下で亢進し神経毒性を示すと言う、同じ NMDA receptor が相反作用を示す「NMDA receptor パラドックス仮説」が唱えられるようになった。これを支持するもので、培養神経細胞に glutamate を添加する実験系に於いて、一般的に 10  $\mu$ M 程度の glutamate は神経細胞死を誘導しないが、それ以上の濃度、~100  $\mu$ M の glutamate によって細胞死が誘発された報告がある(Zhou et al. 2013)。通常の生理的興奮時に於いても、シナプスの glutamate 濃度は 1000  $\mu$ M に達するとされている為(Featherstone and Shippy 2008)、この低濃度で細胞死が誘導されるのは、より glutamate に感受性の高い eNMDA receptor が過活性化しているからだ、と言う主張である。この様に、神経細胞死と特に eNMDA receptor の関わりが注目されるようになっている。

A $\beta$  が NMDA receptor を介して AD 病態に影響する機序として現在主に 3 つ考えられている。

glia 細胞からの glutamate 分泌促進...実験的に培養 astrocyte に A $\beta$  oligomer を添加すると、 $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine ( $\alpha$ 7nACh) receptor を介して astrocyte の活性化に伴う細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇と glutamate の分泌増加が観察される。この時、eNMDA receptor 由来の緊張性電流が pM オーダーの A $\beta$  oligomer で観察されるが、A $\beta$  monomer ではこの現象は生じなかった。また、同現象は eNMDA receptor antagonist の memantine によって抑制されることも明らかとなっており、これら eNMDA receptor の活性化は A $\beta$  oligomer の直接作用ではなく、astrocyte に対する刺激による glutamate 分泌増加が関与しているとされている(Talantova et al. 2013)。

eNMDA receptor/sNMDA receptor 比率の増加...sNMDA receptor の endocytosis によるシナプス上の sNMDA receptor の減少、及び NMDA receptor のシナプスからシナプス外への移動の誘発の 2 つの機構によって eNMDA receptor の比率を上げているとされる。Snyder らは A $\beta$  を培養細胞に添加した際の NMDA receptor の細胞全体と細胞膜画分内の発現量を western blotting で測定し、全体量に差はない一方で細胞膜画分での発現減少を報告している(Snyder et al. 2005)。更に免疫染色によるシナプスの NMDA receptor の観察では、A $\beta$  の添加により western blotting 以上の著しい減少が確認されたことから、シナプス外への NMDA receptor の再分布が行われているのではないかと推測されている。

APP 切断様式の変化...APP は  $\alpha$ -、若しくは  $\beta$ -secretase によって切断を受けて C83 と sAPP $\alpha$ 、又は C99 と sAPP $\beta$  に分かれ、C99 が更に  $\gamma$ -secretase によって切断を受けた後に A $\beta$  が産出される。マウスの培養神経細胞を用いた検討では、sNMDA receptor の刺激によって  $\alpha$ -cleavage が促進され、逆に eNMDA receptor の刺激では  $\beta$ -cleavage が亢進したとの報告がある(Hoey et al., 2009)。これは APP の isoform の変化が原因であると考えられている。APP はアミノ酸残基数の違いで 695,751,770 の 3 つの isoform が存在するが、生体内の中樞神経系では 695 アミノ酸残基の isoform がメインであり、この isoform は Kunitz Protease Inhibitor (KPI) domain を含んでいない。sNMDA と eNMDA receptor それぞれを刺激すると前者は APP695 が isoform の殆どを構成していたのに対し、後者では半数が KPI domain を含む isoform に変化していた。KPI domain は APP の二量体化、trafficking や切断などに影響を与える他、KPI domain を含む APP の増加は  $\beta$ -cleavage を増加させるとも考えられている(Lesne et al. 2005)(Khalifa et al. 2012)。この一連の現象は、A $\beta$  が eNMDA receptor を活性化させるだけでなく、その活性化自体が A $\beta$  の産生を増加させると言う、負の連鎖を生み出していることを示唆している。尚、この現象は 1  $\mu$ M 程度の memantine で阻害される。

これらの作用は A $\beta$  が直接的に、或いは間接的に eNMDA receptor に作用するが、現時点では未だ明らかとなっていない。A $\beta$  が glutamatergic neuron の周囲に優位に凝集することが分かっている(Willén et al. 2017)が、例 A $\beta$  oligomer が直接

eNMDA receptor に結合するとしても、それだけでは病態の発現に不十分であると考えられている。近年の研究では PrP<sup>C</sup> を介した NMDA receptor への関与が分かっている。A $\beta$  と PrP<sup>C</sup> の結合は下流に存在する Src kinase の一つである Fyn を活性化し、Fyn は GluN2B のリン酸化を行い樹状突起に存在する PSD95 と結合して NMDA を細胞膜上に固定する(Larson et al. 2012)。これにより、先述した A $\beta$  による NMDA receptor を介した glutamate 毒性が増強するのである。

### 1.5.2.3 酸化ストレス

酸化ストレスとは、活性酸素や活性窒素等による酸化的障害とこれら化合物から生体を防御する抗酸化作用とのバランスが崩れ、前者がより優勢になった状態であるが、AD 脳に於いては脂質、タンパク、核酸の酸化的障害が認められることが多く、AD の病態に於ける酸化ストレスが注目されている。酸化刺激によって *in vitro* に於いて細胞内 A $\beta$  の量 (特に A $\beta$ 42 の量) が、増加することが認められており(Misonou et al., 2000)(Ohyagi et al. 2000)(Paola et al. 2000)、更には AD のリスク因子である ApoE の isoform 依存的な抗酸化作用が関与する可能性が示唆されていることから(Beffert et al. 1999)(Ramassamy et al. 1999)(Ramassamy et al. 2000)、酸化ストレスは AD 病態の cascade の上流に於いて重要な意義を保持している可能性が高いと考えられる。免疫組織学的には神経細胞内に amyloid fibril は見られない為、monomer か oligomer の状態として A $\beta$ 42 は蓄積されると考えられているが、細胞内に蓄積された A $\beta$ 42 は amyloid  $\beta$  peptide alcohol dehydrogenase (ABAD) と結合して mitochondria を障害し、free radical を惹起することが示されている(Yan and Stern 2005)。また別ベクトルでの知見として、細胞内 A $\beta$ 42 が p53 promotor に直接結合し、p53mRNA の発現を促進することで細胞のアポトーシスを誘導すると言う、転写因子としての働きを有することを示唆する結果も報告されている(Ohyagi et al. 2004)。即ち、これらの知見を併せて考えれば、小胞体での過剰生産や酸化ストレスなどが起因して細胞内に蓄積した A $\beta$ 42 が mitochondria や proteasome などの障害を生むと同時に一部が核に移行した後に p53 依存性のアポトーシスを誘導するというメカニズムが浮かび上がってくる。また、凝集性の項目で先述した通り、毒性 conformer は M35 の radical の生成を増強させており、ここで生成された radical が細胞組織へ与える酸化ストレスにも注目が集まっている(Murakami et al. 2005)(Masuda et al. 2009)(Murakami et al. 2010)。

### 1.5.2.4 C99 ( $\beta$ -CTF)の毒性

先述の通り、full length の APP が  $\beta$ -secretase によって切断されると、CTF 側は C99 となり、細胞膜に残留する。この C99 は予てより細胞に毒性を示すことが知られていた(Kim and Suh 1996)。実際に培養細胞系に於いても、C99 過剰発現細胞が通常より脆く、confluent にあまりならないことが確認されている他、C99 の発現が上昇した線維芽細胞では一部 AD 患者やダウン症患者に見られるような形態学的及び機能上のエンドサイトーシスの異常が見つかった(Y. Jiang et al. 2010)。また、*in vivo* での実験では、亜慢性的にラット海馬領域への C99 注入が、working memory の低下と海馬苔状繊維に於ける限局的なアポトーシスを誘導することも報告として挙げられている(Jinno et al. 2009)。C99 がどのようにして神経毒性を発揮するのかについては諸説あり、その中でも最初期に唱えられたのは C99 が非特異的なカチオンチャネルを形成するからだというものであった(Kim et al. 1999)。例えば Ca<sup>2+</sup>は前の項目で細胞内外の濃度が健全な細胞維持に重要であると分かったが、過剰なカチオンチャネルの形成によってそのバランスが崩れることは想像に難くない。

近年、AD モデルマウスの海馬に於ける  $\gamma$  及び  $\theta$  波<sup>3</sup>の 2 種類の脳波を測定する実験が行われ、モデルマウスのこの 2 つの脳波がより不安定であることが示された(Mondragón-Rodríguez et al. 2018)。面白いことにこうした現象は A $\beta$  斑の蓄

<sup>3</sup> 脳波には  $\delta$ 、 $\theta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  そして  $\gamma$  波の 5 種類の脳波があり、それぞれ脳の活動に大きな影響を与えることが知られている。最も周波数の高い  $\gamma$  波は認知機能や学習に重要であり、 $\gamma$  波が弱いと ADHD や学習障害、認知機能の低下に繋がる。 $\theta$  波は  $\delta$  波に続いて 2 番目に周波数が低く、深く落ち着いた状態に発生する。

積が観察される前に既に確認されていたことから、C99の蓄積が関与しているのではないかと考察された。C99は三量体Gタンパク質のGaoと直接相互作用することが知られていて過剰なC99がGao依存性の神経毒性を発揮すること、また実際にAD患者脳では正常なGao-APP相互作用が障害を受けていること(Copenhaver and Kögel 2017)、更にはGaoのsignalが過剰に活性化すると細胞内のCa<sup>2+</sup>の濃度が上昇することも示されていることから(Ramírez et al., 2016)、C99の増加が最終的にCa<sup>2+</sup>濃度の増加を通じた神経細胞毒性を示していると考えられる。

### 1.5.3 重金属イオンとの関与

生体内に於いてCu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、そしてFe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>イオンは普遍に存在するイオンである。transgenicマウスの脳内でグルタミン酸作動神経とvesicular zinc、そして老人斑の局在にかなり被りがあることや(Stoltenberg et al. 2007)、実際AD患者脳に於いてこれらのイオンの量が上昇することが報告されてきたこともあり(Rajendran et al. 2009)、APPやAβとの関わりが予てより注目されてきた(Colin L Masters and Selkoe 2012)。Cu<sup>2+</sup>やZn<sup>2+</sup>についてはグルタミン酸作動性シナプスでneuromodulatorとして機能することが知られており、またNMDA/AMPA receptorsに活性をmodulateする働きがあることも報告されている(Wang et al. 2002)(Frederickson et al., 2005)(Stys et al., 2012)。また、APPやAβの何れにもmetal-binding motifが備わっていることも明らかとなっており(Faller 2009)(Duce et al. 2010)、実際に結合も認められている(Mital et al. 2015)。その為、Aβの凝集時にこれらのイオンがmetal “chaperone”のような機能を果たしていることが考えられるようになり、金属イオンの”therapeutic chelation”も治療ターゲットの1つとなりうるという意見もある(Rodriguez-Rodriguez et al. 2009)(Dickens et al., 2011)。

#### 1.5.3.1 AβとCu<sup>2+</sup>

合成Aβ peptideから成るsoluble Aβ monomerやoligomer、そしてinsolubleなAβ fibrilは何れもCu<sup>2+</sup>との解離定数が10<sup>-10</sup>程度であることが報告されている(Rozga et al. 2010)(Xiao and Wedd 2010)。即ち、ヒト血清アルブミンを含むより親和性の高いmetallo-chaperoneタンパクはCu<sup>2+</sup>とAβの結合を阻害するということであり(Perrone et al. 2010)、脳実質から離れた神経突起やシナプスではAβは金属と結合していない状態であることを示している。AβとCu<sup>2+</sup>との結合を競合するような薬剤は脳実質でしか効果を発揮しないことが考えられるだろう。

一方、AβとCu<sup>2+</sup>の結合部位は1つ以上存在することが示唆されている他(Jun et al. 2009)(Sarell et al. 2009)、化学量論に基づく、AβとCu<sup>2+</sup>の相互作用によってAβ monomerがoligomer化し、そしてfibrilとして沈着し始めるのを促進するだろうと考えられている(Brzyska et al., 2009)(Tougu et al. 2009)(Haefner et al., 2010)。この時Cu<sup>2+</sup>が主に結合する部位は、Aβ配列N末端側16残基、特に冒頭のD1とA2、そしてH6、H13、H14の3つのhistidineであることが示唆されており、Aβ凝集に多面的な作用を与えていると思われる(Drew et al. 2009)(Hureau et al. 2009)。特にpH依存的なhistidineのプロトン化が大きな寄与をしているとされ、endosomeやlysosome pathwayでのAβの形態とextracellular環境でのAβの形態は全く異なるだろうと推測できる。

さらに、Cu<sup>2+</sup>はredox-activeであり、Aβタンパクを酸化修飾するだろうとも考えられている。今まで示されているのは、Aβ配列の中のY10同士がdityrosine共有結合を作ること(Drew et al. 2009)(D. Jiang et al. 2010)、M35のradical生成(Barman et al., 2008)(Masuda et al. 2009)などであろうか。しかし、これらのmodified Aβがどのような効果をもたらしているのかは定かではない。事実、細胞内のCu bioavailabilityを増やすことでAβのoligomer化とtauタンパクの異常リン酸化に対して抑制的効果を発揮すること(Crouch et al. 2008)、寧ろfibril化したAβを解き、より小さな構造であるoligomerやその他の無定形に近い凝集体に構造レベルを落とし込むこと(Keskitalo et al. 2014)などが報告されており、Cu<sup>2+</sup>との関係性はまだまだ議論の余地がありそうだ。

### 1.5.3.2 A $\beta$ と Zn $^{2+}$

Cu $^{2+}$ とは異なり、Zn $^{2+}$ は redox-inactive なイオンである為、A $\beta$  の酸化には寄与しないとされている。しかしながら、A $\beta$  配列内には Zn $^{2+}$ との多面的な結合部位を有し(Damante et al. 2008)(Talmard et al., 2009)、依然として A $\beta$  の凝集を促進する可能性が残されている。また、Zn $^{2+}$ によって形成促進された A $\beta$  oligomer は AD 脳に於いてシナプス障害に関与していることを示唆した報告も出されている他(Deshpande et al. 2009)、Zn $^{2+}$ と A $\beta$  の複合体は *in vitro* に於いてタンパク分解に対する耐性を獲得し、結果的に A $\beta$  の凝集に繋がる可能性があることも報告され(Crouch et al. 2009)、はたまた脳内で APP が担う ferroxidase の役割を Zn $^{2+}$ が阻害し、細胞内 Fe $^{2+}$ による酸化ストレスを増加させていると言う報告もなされたり(Duce et al. 2010)、幅広く AD 病態への寄与の可能性を示唆する金属イオンである。

### 1.5.3.3 APP と Fe $^{2+}$ / Fe $^{3+}$

AD 脳に於いては、元々 Zn $^{2+}$ が A $\beta$  の中核をなしているのではないかという知見があり(Miller et al. 2006)(Adlard et al. 2008)、同時に新皮質の神経細胞内に Fe $^{2+}$ が異常蓄積することが知られていた(Bartzokis et al. 1994)(Honda et al. 2005)。これらの蓄積した Fe $^{2+}$ は細胞組織に酸化ストレスを与え、神経細胞死を始め、tau タンパクの異常リン酸化、そして NFT 形成といった病態にも関与しているだろうと考えられてきた。しかし、その Fe $^{2+}$ が蓄積する原因が一体何なのかは長らく不明であった。

通常血漿中に存在する鉄イオンは Fe $^{3+}$ であるが、これは過酸化物質と反応して free radical を生成し、DNA やタンパクを始めとする様々な組織や構造物を損傷することが知られている。その為、血漿中には transferrin という約 80kDa のタンパクが存在し、1 タンパクで最大同時に 2 つの Fe $^{3+}$ に結合し運搬することでイオン状態の Fe による毒性を抑えている。一方、細胞内の鉄イオンは Fe $^{2+}$ である。これは細胞膜にある transferrin receptor に transferrin が受容されて Fe $^{3+}$ が endocytosis で細胞内に取り込まれると、lysosome 内の酸性環境によって Fe $^{3+}$ が Fe $^{2+}$ に還元されるからである。Fe $^{2+}$ は mitochondria の働きに必要である他、DNA 合成や細胞周期の制御などに必要な因子ではあるものの、過剰蓄積は癌を誘発することも示唆されている為(Elliott and Head 2012)(Torti and Torti 2013)、細胞内外の Fe $^{2+}$ /Fe $^{3+}$ バランスを保つことが必要になってくる。この時細胞外から内部に取り込む器官として transferrin receptor が先述の通り挙げられるが、細胞内から外部へと排出する時は ferroxidase 活性を持つ ferroportin による Fe $^{2+}$ の Fe $^{3+}$ への酸化を経て排出されることが知られている(Donovan et al. 2005)。

ferroxidase 活性を発揮するには REXXE という ferroxidase consensus motif が必要であるのだが(Gutierrez et al. 1997)、Duce らは APP の細胞外側の配列にもこの motif が存在することに注目し、神経細胞に於いて APP が pH5.0-9.0 の範囲内で強い ferroxidase 活性を有することを確認した(Duce et al. 2010)。更に、この活性は Zn $^{2+}$ によって阻害される、H-ferritin 様の活性(Bakkers et al., 1986)であることも明らかにされた。この報告によって、APP は脳内で ferroportin の役割果たしていることが示唆されるようになった。APP の異常や変異、または沈着した A $\beta$  plaque に存在する Zn $^{2+}$ 、更には AD 脳において往々にして発現が低下している metallothionein (III)などの Zn $^{2+}$  ligand(Uchida et al. 1991)によって増加した遊離 Zn $^{2+}$ などの要因によって ferroxidase 活性が低下することで、細胞内 Fe $^{2+}$ 蓄積を通じた細胞障害に発展することが AD 発症メカニズムの一環であることが強く伺えるだろう。

## 1.5.4 脳組織の正常発達への関与

### 1.5.4.1 APP KO

APLP1 と APLP2 は生体内で APP と相補的に働くことは先述の通りだが、APLP1 と APLP2 の単独 KO は重篤な phenotype を示さない。APLP1 KO マウスは身体的な発育に僅かな障害が生じるだけで、APLP2 KO は殆ど phenotype として観察できる症状を呈さない(Von-Koch et al. 1997)(Heber et al. 2000)。しかし APPKO マウスは最大 20%の体重減少と 10%弱の脳質量減少が確認されている(Anliker et al., 2006)。この脳質量の減少は主に前脳部分の縮小と脳梁の無形成によるところが多く、APP が神経突起の伸長と axonal pathfinding に関与しているという既報を支持するものである(Zheng et al. 1995)(Magara et al. 1999)。また、モリスの水迷路試験に於いて APPKO マウスは長期増強(LTP)が悪く、学習能力と空間記憶が劣っていると言う報告もなされており(Dawson et al. 1999)(Phinney et al. 1999)、APP の異常が脳の正常発達を阻害することが強く示唆されている。ところが、高齢の APPKO マウスの海馬組織に於ける神経細胞やシナプスの数は正常状態に近かった故(Phinney et al. 1999)、これらの学習能力の低下や記憶障害は神経細胞やシナプスの大規模な脱落によるものではないだろうと考えられている。また、APP 欠損によって脳皮質の神経細胞の先端樹状突起に於ける spine 密度が上がる事が報告されており(Bittner et al. 2009)、APP は寧ろ脳組織の発達に於いて抑制的に働き、過形成を阻止する働きがあるのだろうと考えられる。

#### 1.5.4.2 APP DKO と TKO

APLP1/APLP2、若しくは APP/APLP2 の double knock out (DKO)マウスは生後直ぐに死ぬことが、APP/APLP1 DKO マウスは特筆すべき異常性を来さず生き続けることができると報告されている(Von-Koch et al. 1997)(Heber et al. 2000)。これを説明する事象として APLP2 が APLP1 より重要な生理的機能を有していることが考えられる。DKO マウスの検討直後は、APLP2 を含む DKO マウスの脳には際立った病理組織学的な異常は認められなかった為、暫くその機能への理解は停滞していたが、APP/APLP2 DKO マウスはグルタミン酸作動性シナプス基底部分での伝達能が落ちていると言う、それぞれの single KO では見られなかったような phenotype が確認されたり(Schrenk-Siemens et al. 2008)、新生 APP/APLP2 DKO マウスの diaphragm preparations に神経の過剰伸長や神経伝達の低下を認めたり(Wang et al. 2005)、はたまた APP/APLP2 DKO マウスの顎下神経節の active zone size の減少、シナプス小胞の密度や docked vesicle の減少などを確認できるようになった(Yang et al. 2005)。これらの知見より、APP や APLP2 は神経筋の形成やその正常機能の獲得に必要であるだろうと考えられるようになった。

一方、APP/APLP1/APLP2 の triple knock out (TKO)マウスは出生後死ぬことが確認されている。なおこの時、DKO mutants とは異なり、組織学的な異常が頭蓋部に認められた、特にヒトの II 型無脳回症を髣髴とさせるような局所性の脳形成異常や大脳皮質の Cajal-Retzius 細胞の脱落が確認されたという(Herms et al. 2004)。更に、こうした組織学的異常の認められた部位に於いて、皮質板から伸びる神経細胞がくも膜下空間に向かって正常範囲外に突き出すような形で伸長異常、形成異常を起こしていたことも確認されている。これらの病理学的観察から、APP、APLP1/2 は神経細胞の正常な伸長や接着に関わるタンパクであろうことが示唆されている(Herms et al. 2004)(Young-pearse et al. 2007)。また、APP の interactor である Fe65、Fe65L1 を欠損した KO マウスにも、似たような phenotype が見られる(Guenette et al. 2006)。即ち、APP family タンパクは一部 APP/Fe65 signaling complex を介してその生理機能を発揮すると考えることができる。

#### 1.5.5 転写調節

$\epsilon$ -cleavage で生成した AICD は adaptor タンパクである Fe65 や histone acetyltransferase である Tip60 と結合し、三者複合体を形成する。多くの研究から、この複合体は核に局在し、転写活性化因子として機能していると考えられている(Cao and Sudhof 2001)(Kimberly et al. 2001)(Cao and Sudhofs 2004)(Ozaki et al. 2006)。特にこの複合体は、細胞接着因子 KAI1 遺伝子の promoter 領域に作用することが報告されている(Baek et al. 2002)。KAI1 は癌転写抑制因子として

発見され、その後の研究で様々な膜 receptor 相互作用し機能調節を行うことも明らかとなっている。これらの研究から、AICD は転写調節を行っている一般的に考えられるようになった。しかし引き続き研究からは、寧ろ AICD は細胞質に free の状態で存在していることを示唆するような報告がなされており (Hebert et al. 2006)(Waldron et al. 2008)、疑問の声も上がった。北海道大学の Suzuki のグループは APP のリン酸化に焦点を当てて解析を行った結果、細胞質内にはリン酸化、非リン酸化 AICD が存在するが核内には後者のみが存在すること、Fe 非依存的に AICD は核内移行することなどを見出し、膜状に存在する APP FL が定常的に Fe65 を捕捉しており、リン酸化を受けると Fe65 が細胞質に放出されるというモデルが考察された(Nakaya et al., 2006)。なお APP のリン酸化と A $\beta$  産生は無関係であると考えられており、APP リン酸化部位を Alanine に置換した T668A mutant は野生型と A $\beta$  量に差が無かったことも報告されている(Sano et al. 2006)。一方、APLP1、2 も Fe65 依存性の転写調節に関与しているとされている(Scheinfeld et al. 2002)(Pardossi-Piquard et al. 2005)。

### 1.5.6 糖鎖修飾

BACE1 が活性を維持する至適 pH の範囲を考えると、endosome や trans-Golgi ネットワーク等の酸性オルガネラで A $\beta$  の切断が起きていることが考えられる(Barão et al. 2016)(Kizuka et al., 2017)。即ち、それらのオルガネラの luminal 側など、多くのタンパクが N-、O-結合型グリコシル化されているような環境に於いて A $\beta$  産生やクリアランスが行われている。実際、APP や BACE1、nicastatin、 $\alpha$ -secretase、nephrilysin など、A $\beta$  産生や代謝に関わる多くのタンパクが糖鎖付加を受けることが知られている(Schedin-weiss et al., 2014)。糖鎖修飾自体は非常に大きな役割を持ち、N-glycan は細胞局在や酵素活性からタンパク間相互作用、タンパクの折りたたみ、分泌まで幅広く生理機能を modulate することが知られていることから(Ohtsubo et al., 2006)(Varki 2017)、AD 病態に於いてもタンパクの糖鎖付加の影響があると推測できる。

APP に於いては、N-型糖鎖付加を受ける配列が 2 箇所存在し、その構造も明らかにされている(Akasaka-manyu et al., 2008)。また、遺伝学的、薬理的な研究から APP の N-、O-glycan 構造は輸送や分泌、代謝に大きく影響を与えることが報告されている(Tomita et al., 1998)(Akasaka-manyu et al. 2017)。事実、swainsonine や deoxymannojirimycin などの mannosidase inhibitor による N-glycan の成熟阻害によって APP の輸送や分泌への影響が確認されている(McFarlane et al. 1999)。更に、sialyltransferase の過剰発現によるシアル酸付加の亢進によって A $\beta$  産生の増加が確認されており、同時にこれはシアル酸付加が起きない CHO-Lec2 細胞や N-型糖鎖付加を受ける配列が存在しない変異 APP では観察されないことも明らかとなっている(Nakagawa et al. 2006)。APP の糖鎖修飾は、細胞腫によって N-glycan が多種に渡るにも関わらず immature 型と mature 型の両方が見られることが知られており、特に神経芽細胞腫に発現させた場合、野生型 APP と Swedish 変異型 APP (APP<sup>sw</sup>)の間で付加される糖鎖の構造が異なることも報告されている(Akasaka-manyu et al. 2008)。Swedish 変異はスウェーデンの家系から見つかって 1992 年に報告され、 $\beta$ -secretase による切断が受け易くなり A $\beta$  産生量が増加する FAD 変異である(Mullan et al. 1992)。培養細胞では A $\beta$ 42 の産生比率低下が認められることが多く、APP 細胞内局在が変化している可能性が指摘されている。これらの知見から、APP の糖鎖付加は A $\beta$  の産生や AD 発症への寄与があると考えられている。しかしながら、詳細な関係性が未だ不明であり、*in vivo* のデータも欠如しているのも事実であり、今後の研究が待たれる。

## 1.6 $\gamma$ -Secretase の発見

$\gamma$ -secretase の発見は、その構成因子の発見から話が始まる。予てより Alzheimer's Disease (AD) は極一部に常染色体優性遺伝形式を示す家族例(familial AD; FAD)が知られていた。遺伝学的研究により、数々の変異が同定されてきたが、その

殆どが第 14 番染色体に連鎖することが分かってきた(Schellenberg et al. 1992)。その後、St. George-Hyslop らの研究グループにより、この病因遺伝子の同定がなされ、*presenilin 1* (PS1, *psen1*)と命名された(Sherrington et al. 1995)。またその直後に、PS1 に相同な分子が第 1 番染色体に発見され、*presenilin 2* (PS2, *psen2*)と命名された(Levy-Lahad et al. 1995)。PS1 に連鎖しない家系の多く、Volga German Family などはほぼこの PS2 遺伝子に連鎖することが明らかとなった。この 2 つの遺伝子は全身に発現し相同性の高い多回膜貫通型タンパクをコードすることが分かった(Sherrington et al. 1995)(Lee et al. 1996)(Benkovic et al. 1997)(Lah et al. 1997)。PS1、PS2 はそれぞれ 467 と 448 アミノ酸から構成され、両者の相同性は 67%、膜貫通部位のみならば 80%にまで登る。なお、現在までに 200 を超える *psen1* の変異、及び 20 弱の *psen2* 変異が報告されており(AD & FTD Mutation Database, <http://www.molgen.ua.ac.be/Admutations/>)、FAD 家系のほぼ全てを網羅している。PS は生物間に於いて様々な homologue (PSH)が存在し、PS1 と PSH は 19 %強の相同性、50 %以上の類似性を示すが、こうした FAD の半数以上はこれらの類似配列上で見つかった(Li et al. 2013)。

その後、PS1 KO mouse の初代培養神経細胞を用いた APP 代謝の検討により、*psen1* 欠損により  $\gamma$  切断が阻害され、基質である C83 と C99 が蓄積し、代謝産物である p3 と A $\beta$  の分泌が低下することが示された(De Strooper et al. 1998)(Xia et al. 1998)。さらに C83 と C99 の代謝が PS1 欠損細胞に於いて顕著な減少を示し、且つその時に sAPP $\alpha$  と sAPP $\beta$  は PS1 の有無に関わらず産生が認められ、PS1 と PS2 のダブルノックアウトマウスの細胞を用いた研究により、 $\gamma$ -secretase 活性が消失したことなどから、PS1 と PS2 が酵素活性に必須な分子であることが考えられるようになった(Herreman et al. 2000)(Zhang et al. 2000)。

一方、酵素の基質切断様式に関しては様々に議論がなされていたが、aspartic protease 阻害剤である difluoroketone 構造を持つ化合物によって  $\gamma$  切断が阻害され、A $\beta$ 40、42 付近のアミノ酸配列を模した基質模倣ペプチドも酵素活性を阻害するなどの報告より、 $\gamma$ -secretase は aspartic protease であると考えられるようになってきた(Wolfe et al. 1998)(Wolfe, Xia, Moore, et al. 1999)。実際  $\gamma$ -secretase が基質の膜貫通部位を切断し、同時に PS の第 6、7 膜貫通領域にそれぞれ aspartic acid が存在する為、その後の研究で同残基を置換した変異体 PS を作製し、 $\gamma$ -secretase の基質切断への影響を確認したところ、変異体 PS を含む  $\gamma$ -secretase は基質切断を抑制されることを発見し、 $\gamma$ -secretase は構成因子 PS に活性中心を持つ膜内配列切断型 aspartic protease であるという仮説が提唱され(Wolfe, Angeles, et al. 1999)(Wolfe, Xia, and Ostaszewski 1999)、酵素が疎水性環境である膜内で加水分解切断を行うという考えが発表された。だが、当初異論は多かった。というのも、疎水性環境内で加水分解を行うのは事実上異常なことであり、またそもそも従来の aspartic protease が持つ D(T/S) G(T/S)コンセンサス配列を持たなかった。しかしその後の研究で部分精製した  $\gamma$ -secretase 画分と PS1 の所在が一致し、逆に PS1 で免疫沈降した画分から  $\gamma$ -secretase 活性が確認されたこと(Li, Xu, et al. 2000)、TSA 型 GSI の標的分子が PS1、PS2 であることが分かったこと(Esler et al. 2000)、PS の第 7 膜貫通部位の aspartic acid 付近に存在する GLGD 配列が、type 4 prepilin peptidase (TFPP)や signal peptide peptidase (SPP)の活性中心 aspartic acid 付近の配列と相同性を有すること(Steiner et al. 2000)(Haass et al. 2002)、そして rhomboid や S2P など膜内配列を切断する酵素ファミリーが同定された(Wolfe and Kopan 2004)ことより、 $\gamma$ -secretase は PS を含む高分子複合体であり、PS はその活性中心を担うと考えられるようになった。

## 1.7 $\gamma$ -Secretase の分子実態

前述の検討より  $\gamma$ -secretase は PS を含む複合体であることが予想され、その後構成因子の探索を行った結果、PS 以外の構成因子としてまず St George-Hyslop のグループが Nicastrin (Nct)を最初に同定した(Yu et al. 2000)。続いて同様のスクリーニングを線虫で行った結果、anterior pharynx-defective (Aph-1)と presenilin enhancer (pen-2)が PS と Nct 変

異と同じ表現型を示す遺伝子として同定された(Goutte et al., 2002)(Francis et al. 2002)。これらの因子と PS が高分子複合体を形成し、 $\gamma$ -secretase が酵素活性を発揮するために必要であることが、複数の実験的手法により明らかにされた(Edbauer et al., 2002)(Lee et al. 2002)(Steiner et al. 2002)(Takasugi et al. 2003)(Kim et al., 2003)。また更なる研究により、PS、Nct、Aph-1、Pen-2 の 4 つを共発現させることにより  $\gamma$ -secretase の再構成の成功が報告され(Edbauer et al. 2003)、かつ哺乳類細胞に於いて過剰発現  $\gamma$ -secretase の精製によってこれらの 4 つの構成因子以外のタンパクは確認できなかった(Fraering, Ye, et al. 2004)。よって、活性発揮に必要な  $\gamma$ -secretase 複合体の最小構成はこの 4 つのタンパクであることが明らかとなった(図 8)。4 つのタンパクについての詳細は後述する。しかしながら、その後の研究より、少なくとも一部の  $\gamma$ -secretase 複合体にはこの 4 つの構成因子以外のタンパクも組み込まれていることが確認された。一例を挙げると、TMP21 が  $\epsilon$ -cleavage には作用せずに  $\gamma$ -cleavage を modulate することが報告されている(Chen et al. 2006)。他にも様々な膜タンパクが複合体に組み込まれる可能性が示唆されているが、このように切断に関与するものは酵素の基質特異性に関与する可能性が大きく、より一層の理解が求められるだろう。

しかしながら、 $\gamma$ -secretase 活性が発揮される為に全ての構成因子が揃っている必要は無いのかもしれない。後述の Nct を欠損した  $\gamma$ -secretase はそれでも基質を切断することが可能であって(G. Zhao et al., 2010)、更に近年では PS1 と Pen-2 だけで Notch 切断が確認されたとの報告も上がっている(Hu et al. 2017)。特に後者の報告は興味深く、最低でも Aph-1 までは必要であるという今までの認識や、とりあえずは PS1 と Pen-2 だけで切れるのは Notch であるというある種の特異性から、複合体の構成に基質切断の特異性が起因するとの可能性が浮上する。今後の研究発展が期待される。

### 1.7.1 複合体形成

$\gamma$ -secretase は段階的な過程を経て複合体を形成することが複数の研究によって示されている。まず RNAi 法により Pen-2 をノックダウンすると PS Full Length (FL)が蓄積するがこの時  $\gamma$ -secretase 活性が失われ、またこの PS FL には Nct と Aph-1 が必要であった(Francis et al. 2002)(Luo et al. 2003)(Takasugi et al. 2003)。また Aph-1 の過剰発現により PS FL が蓄積し、Nct との共発現を行うとその蓄積が促進され、Pen-2 の発現を加える毎に PS が断片化し、 $\gamma$ -secretase 活性の上昇が確認された(Takasugi et al. 2003)。さらに、Nct と Aph-1 は  $\gamma$ -secretase の成熟に先立ち安定なサブコンプレックスを形成し、Nct の膜貫通領域が PS の C 末端側と相互作用する可能性も示されている他(Capell et al. 2003)(Morais et al. 2003)(Kaether et al. 2004)、 $\gamma$ -secretase の複合体は ER で生じることも示された(Kim et al., 2004)。PS1、Nct、Pen-2 は ER-retention signal を持っており、golgi 体に誤って輸送されてきたタンパクを ER に送り返す役割を持つ Rer1p によって認識されるものもある(Jurisch-Yaksi et al. 2013)。以上の結果から、 $\gamma$ -secretase の複合体は以下のような過程を経て形成されることが考えられる：まず Nct と Aph-1 がサブコンプレックスを形成し、その後 PS FL と相互作用して安定化する。続いて Pen-2 が PS/Nct/Aph-1 複合体に加わることで PS FL が断片化し、 $\gamma$ -secretase 活性を獲得する。この複合体が形成されて初めて  $\gamma$ -secretase は COP II によって ER から輸送される(Jinoh Kim et al. 2007)。

### 1.7.2 Nicastrin

線虫、ショウジョウバエとマウスの Nicastrin (Nct)変異体、若しくはノックアウト個体では Notch シグナリング異常が観察されるとともに APP の  $\gamma$  切断の異常が確認され、Nct は  $\gamma$ -secretase の構成因子であることが考えられた(Chung et al., 2001)(Levitan et al., 2001)(Edbauer et al. 2002)(Li et al., 2003)。構造的特徴として、Nct は 709 アミノ酸からなる I 型 1 回膜タンパクであり、高度に N 型糖鎖修飾された巨大な膜外ドメインと短い C 末端 tail を有する(Yu et al. 2000)。

Nct は Aph-1 とサブコンプレックスを形成し、PS の CTF に結合すると考えられる(Fraering, Lavoie, et al. 2004)が、PS の CTF に直接結合するのは Aph-1 であることが単粒子構造解析の結果から分かっている(Bai, Rajendra et al., 2015)。



巨大な細胞外ドメインは amino peptidase と相同性を持ち shedding を受けた基質の N 末端側と結合することが示唆され (Chen et al., 2001)(Shah et al. 2005)、基質受容体の機能を果たしていると考えられるようになった。100 を超える  $\gamma$ -secretase の基質の特異性の低さ(Haapasalo and Kovacs 2011)と、切断の為に  $\alpha$ -secretase や  $\beta$ -secretase などによる膜近傍の第一段階切断を先んじて要するという特徴はこの考えに基づけば説明がつく。この時、高度に保存された D336-S340 から成る DYIGS motif が基質認識やタンパク間相互作用に大きく寄与していることが考えられている他(Kopan and Goate 2002)(Shah et al. 2005)、その直前の G333 が substrate recruitment pocket として機能するとの見解もある(Dries et al. 2009)。Nct の細胞外領域は large lobe (LL) と small lobe (SL) に分けることが出来、DYIGS motif は丁度その中間地点に存在する。LL と SL は構造学的に酵素と基質の相互作用に影響を与え、LL と SL が回転することで initial binding site が露出することが提唱されている(Xie et al. 2014)。また、Nct の細胞外ドメインを破壊すると酵素がより長い基質をも切断するようになることから(Bolduc et al., 2016)、Nct は  $\gamma$ -secretase の門番の様な役割を果たし、巨大な基質を物理的にガードして不適切な切断が発生しないように制御しているとされる(Urban 2016)。近年ではシミュレーションの結果から、LL が蓋のように開け閉めするだけでなく、膜貫通 domain に対して rotation すること、そして更にはこの蓋が開く時に PS1 が "open" な構造、即ち活性状態になるも示唆されている他、蓋らしく細胞外 domain が閉じている状態では GSM の結合量が著しく低下する(J. Y. Lee et al., 2017)。この時、F287 が蝶番の役割を果たすと考えられている(Bai, Yan, et al. 2015)(Lee et al. 2017)。膜貫通部位は近年の解析で  $\alpha$ -helix 構造をとることが明らかにされた。この時 GxxxG motif が膜貫通部位内に存在し、Nct が dimer 化する可能性も示唆されている(Li et al. 2016)。一方膜貫通部位の C 末端から始まる C 末端 tail は  $\gamma$ -secretase 複合体形成に必要なではないとされてきた(Xie et al. 2014)。しかし、V696-A700 のアミノ酸残基が solvent protected であることからこれらの領域が細胞膜や酵素のその他構成タンパクとの相互作用に関係するとの知見や(Li et al. 2016)、構造上その付近の領域が Aph-1 と相互作用していると考えられることから(Bai, Yan, et al. 2015)、C 末端 tail も Aph-1 との相互作用を通じて複合体安定化へ寄与しているのではないかという見方が強まっている。なお興味深いことに、MEF 細胞での検証により、PS1/Aph-1a/Pen-2 の Nct 欠損  $\gamma$ -secretase 複合体が僅かながら基質を切断することも確認されている(G. Zhao et al., 2010)。しかしこの 3 種のタンパクから成る特殊な複合体は大変不安定であるため、Nct はこの複合体安定化の働きをしているのではないかと推測された。

Nct の細胞外ドメインの糖鎖修飾には 2 段階あり、まず ER に於いて Nct は高マンノース型糖鎖付加を受けて immature 型 Nct (imNct) になり、その後ゴルジ体へと輸送されて複合型糖鎖付加を受け、imNct より寿命の長い mature 型 Nct (mNct) になる。この時、同時に trypsin 耐性を獲得することが知られている(Shirotani et al. 2003)。Psen1/2 double knockout 細胞では mNct が完全に発現しないことからこの一連の流れには PS を要することが明らかとなっている (Herreman et al. 2003)、同時に PS の分子内切断に先立って起こることも示されている(Watanabe et al. 2005)。mNct と断片化 PS の量は相互制御されており(Leem, Vijayan, et al. 2002)、mNct が優位に PS と結合するため(Tomita et al., 2002)、mNct は  $\gamma$ -secretase 活性の調節役を果たしていると考えられてきた。ところが、ゴルジ体に於ける糖鎖付加を阻害しても Nct と PS は相互作用し且つ酵素活性に変化がなかったことから、mNct の複合型糖鎖付加は結果生じたものによらず、 $\gamma$ -secretase 活性獲得には寄与しないと考えられるようになった(Shirotani et al. 2003)(Herreman et al. 2003)。

### 1.7.3 Anterior Pharynx Defective (Aph-1)

Anterior Pharynx Defective (Aph-1) はおよそ 30kDa の分子量を持つ、7 回膜貫通型タンパクである。Aph-1 は ER に於いて imNct と安定なサブコンプレックスを作成し(Morais et al. 2003)、その後 PS の CTF と結合することで複合体に組み込まれる(Steiner et al. 2008)。その機能は、PS の安定化や構造変化の惹起であると考えられている(Takeo et al., 2012)。

GxxxG motif は helix 同士の相互作用に必要な配列であるが、Aph-1 の TMD4 にもその motif が存在し、PS との相互作用や  $\gamma$ -secretase 複合体形成に重要であることが示されている(Lee et al., 2004)。

Aph-1 には大きく分けて Aph-1a と Aph-1b の 2 つのアイソフォームが存在する。更に Aph-1a には splicing variant が 2 つ、それぞれ 247 アミノ酸の Aph-1aS、265 アミノ酸の Aph-1aL が存在する。Aph-1b は 257 アミノ酸であり、ヒトでは以上 3 種類の Aph-1 を発現するが、齧歯類には Aph-1b の duplication によって Aph-1c なるものも存在する。3 種類の Aph-1 はいずれも活性型  $\gamma$ -secretase を構成できるが(Shirotani et al., 2007)、存在比率は部位によって異なることも明らかである(Hebert et al. 2004)(Dejaegere et al. 2008)。Aph-1a ノックアウトマウスは血管新生異常や奇形、体節形成異常によって致死となる一方、Aph-1b とマウス特有の Aph-1c ダブルノックアウトマウスは致死とならない。さらに Aph-1a が Notch シグナリングなどの多くの  $\gamma$ -secretase 活性に関与する一方で Aph-1b が A $\beta$  産生を担うことも示されているなど、異なるアイソフォーム間で異なる働きを担っていることが考えられる(Shirotani et al., 2004)(Serneels et al. 2005)。実際、A $\beta$ 42 の産生比率は Aph-1b を含む  $\gamma$ -secretase の方が Aph-1a が組み込まれた  $\gamma$ -secretase に比べて高いことが示されている(Serneels et al. 2009)。

#### 1.7.4 Presenilin Enhancer 2 (Pen-2)

Pen-2 は 101 アミノ酸からなるタンパクである。線虫に於いて PS と Nct 変異と同じ表現型を示す遺伝子として同時に *pen-1* も同定されたが、後にそれは *aph-1* と同一であったことが判明している(Francis et al. 2002)。 $\gamma$ -secretase の構成因子で最小のタンパクであり、従来は 2 回膜貫通型タンパクであると考えられていたが、最新の構造解析の結果、第 2 膜貫通領域(TMD2)が膜内部で折れ曲がり、極短の TMD3 が存在する特殊な構造を有することが分かった(L. Sun et al. 2015)。同年に生化学的にもこの理論が実証されている(Zhang, Yu, and Sisodia 2015)。Pen-2 の RNAi により PS/imNct/Aph-1 の複合体量が増加すること、Pen-2 と結合しない変異 PS を含む PS/imNct/Aph-1 複合体は PS full length (FL)が増加すること(Watanabe et al. 2005)などから、Pen-2 は複合体に最後に組み込まれて PS の分子内切断や Nct の成熟に関与すると考えられ(Takasugi et al. 2003)(Prokop et al., 2004)、未成熟  $\gamma$ -secretase の ER への局在保持(Fassler et al. 2010)や  $\gamma$ -secretase の構造変化などに寄与する機能(Takeo et al. 2012)も報告されている。

構造上の特徴としては PS の TMD4 にある WNF motif に結合することが示唆されている。これは、WNF motif を AAA に置換したところ Pen-2 との結合が見られなくなったことや、膜タンパクの CD4 に TMD4 を挿入した人工タンパクが WNF 配列依存的に Pen-2 と結合したことからそう考えられている(Watanabe et al. 2005)。また、Pen-2 の TMD1 N 末端側を無関係な膜タンパク SEREBP の TMD2 と置換したところ PS1 の断片化が観察できなくなったことより、TMD1 N 末端が PS1 との結合に必要であると考えられている(Kim et al. 2005)。なお、最 N 末端側は Nct の細胞外ドメインと相互作用していることが示唆されている(L. Sun et al. 2015)。Pen-2 は Substituted Cysteine Accessibility Methods [SCAM; (Cai and Tomita 2018)]による詳細な構造解析も行われている。数年前の報告では Pen-2 TMD1 の細胞外領域に親水性領域が存在することが示され、同時に Pen-2 の E49 が PS1 CTF とクロスリンクされた。さらに Pen-2 の細胞側ループ領域が PS1 TMD8 の 6.8Å 以内の距離にあることも報告された(Bammens et al., 2011)。また、Pen-2 の N 末端側のタグによる伸長により、タグの種類非特異的に A $\beta$ 42 産生が増加したものの、A $\beta$  総量の変化は確認できず、また活性中心に面する PS のアミノ酸残基の親水性環境が変化したことも報告され(Isoo et al. 2007)、Pen-2 の N 末端は PS の活性中心ポアの構造を変え、 $\gamma$ -secretase の活性を modulate する可能性が示されている。

#### 1.7.5 Presenilin

PSにはPS1とPS2の2つのアイソフォームがあり、それぞれ467と448アミノ酸からなる9回膜貫通タンパクである(図9A)。 $\gamma$ -secretaseの活性中心を担うだけあってFAD変異の多くはこのタンパクに分布しており、中でもTMD領域などの疎水性の高い部位に多く分布する(Jozwiak et al. 2006)。PS1とPS2いずれも $\gamma$ -secretase活性を与えることが分かっているが(Strömberg et al. 2005)、PS2以上にPS1ノックアウトマウスが重篤な表現型を示すことから、生体内ではPS1を含む $\gamma$ -secretaseが主要であると考えられている(Herreman et al. 1999)。

$\gamma$ -secretase複合体が形成された後、PSは分子内切断を受けてN-terminal fragment (NTF)とC-terminal fragment (CTF)に分解する(Thinakaran et al. 1996)。この時TMD6と7の間で分裂が起きるが、TMD6直後のHelical Loop (HL6)がごっそり抜け落ちる為、NTFとCTFの分子量の総和はFLより若干小さい。NTFとCTFは1:1で安定なヘテロダイマーを形成する(Seeger et al. 1997)。分子内切断と $\gamma$ -secretase活性は密接な関係があり、活性中心であるD257のAlanine変異は $\gamma$ -secretase活性を失い、分子内切断も確認できない(Brunkan, Martinez, Walker et al., 2005)。とはいえ、切断部位を欠いたPS1  $\Delta$ exon 9変異体や切断配列の変異であるPS1 M292Dは分子内切断を起ささないが、 $\gamma$ -secretase活性は保持されていることも知られており(Prihar et al. 1999)(Steiner, Romig, Pesold, et al. 1999)、断片化によって活性化されるわけではないと考えられる。

活性化機構の1つとしては、PSの活性中心の構造変化がその実態であるという仮説がある(Takeo et al. 2012)が、未だ詳細は明らかにされていない。しかし様々な研究により、 $\gamma$ -secretaseの活性状態とPS1の大まかな構造との関連は明らかにされつつある。FADをPS1に導入した時、PS1のNTFとCTF、若しくは細胞質側のHL6がより近接した位置関係、所謂“closed”な構造をとることが示唆されている(Berezovska et al. 2005)(Uemura et al. 2009)。その一方で、 $A\beta$ 42産生比率を下げるNSAIDs型GSMなどを添加した場合には、PS1が逆に“open”な構造をとることが報告されている(Lleó et al. 2004)(Uemura et al. 2009)(Ohki et al. 2011)。こうした構造変化の全容は明らかになっていないが、近年のANM analysis、CG MD simulationなどからはPS1が「息をする(breathing)」ように伸縮していることが観察され、TMD2、3、7から成る領域(主にN190-S132の距離)とTMD2、6、9から成る領域(主にS132-D450の距離)が逆相関して伸縮する(Lee et al. 2017)。これらの結果から、閉じた構造、開いた構造と $\gamma$ -secretaseの活性に強い相関があることが考えられる。ところが別の研究では、FAD変異ではなくGSIを入れた時にも $\gamma$ -secretase全体が“closed”な構造をとる傍らで、FADの1つである $\Delta$ exon 9 mutationを導入した時に $\gamma$ -secretaseが“open”な構造をとることも示されている(Elad et al. 2015)。勿論 $\gamma$ -secretaseが閉じた構造をとるからと言って構成因子のPS1も“closed”であるとは限らないが、 $\gamma$ -secretaseの活性とその構造、及びPS1の構造の間には、もう少し複雑な関係がありそうだ。

“open”な構造の持つこの二方向性の意味について、近年の $\gamma$ -secretaseのシミュレーション解析が一步進んだ結果をもたらしている。細胞膜に埋まっているという条件の基では $\gamma$ -secretaseは“open”、“semiopen”、“closed”の3つのconformationを主に取るが、 $A\beta$  peptideとの結合シミュレーションを行った所、最も結合定数が大きかったのは“semiopen”な構造であったという(Somavarapu et al., 2017)。つまり、酵素が“closed”な、若しくは“open”過ぎる構造のどちらに変化するのにはFAD変異やGSIの種類によって決められ、何れも $\gamma$ -secretaseの活性を落とす結果に落ち着くことが考えられる。

ところで、PS1は活性中心を有することから、 $\gamma$ -secretase構成タンパクの中でも最も詳細に研究が進められてきた。以下にPSの各主要領域の考えられる機能や役割をまとめる。

#### 1.7.5.1 Transmembrane Domain 1

Transmembrane domain 1 (TMD1)はPS1ではG78からI100、PS2ではG84からI106までの23アミノ酸領域である(Takagi et al., 2010) (図10)。初期の解析で変異体を用いた検討の結果、TMD1とTMD2のdeletion型PS1は断片化が起きず、 $\gamma$ -secretase活性が失われることが報告された(Leem, Saura, et al. 2002)。この報告より、TMD1はPSの機能

ドメインであると考えられるようになった。特にアミノ酸レベルでの詳細な検討によって、TMD1 C 末端付近の V96 が  $\gamma$ -secretase 活性の発揮に重要であることが示唆されており (Brunkan, Martinez, Wang et al., 2005)、実際 SCAM などに用いる為の V96C Cys(-) mutant PS1 は、発現すらしない数少ない single cysteine mutant である。また swap 変異を用いた検討では、TMD1 は複合体の安定性へ寄与することが示唆されている (Watanabe et al., 2010) 他、TMD1 は基質との作用を示唆させるような解析報告が多数なされている。

TMD1 が機能ドメインであることが報告された頃、TMD1 は APP や Notch などの基質との結合が確認され、基質認識や保持を含む基質結合の働きを担うことが考えられた (Annaert et al. 2001) (Gupta-Rossi et al. 2004)。SCAM を用いた解析では、N 末端側の V82 と L85 が基質との相互作用がある残基であると考察されており (Takagi et al. 2010)、近年 L85 は APP のみと相互作用し、Notch とは結合しないとの考察もなされている (Zhou et al. 2019)。一方、基質との結合のみならず、基質選択性や A $\beta$  の産生比率の決定にも大きな関与があると考えられている。アミノ酸としては、TMD1 中央付近に位置する F86 の cysteine 置換体 PS1 が A $\beta$  産生と E-cadherin 切断の大幅な減少を認めたのと共に、Notch 切断は保持されていたことが確認され (Takagi et al. 2010)、TMD1 の基質選択性への関与を示唆している。一方、phenylpiperidine 型 GSM である Merck 社の GSM-1 が TMD1 を結合ターゲットとしていることも明らかにされ (Ohki et al. 2011)、直接的な結合ではないものの別型の phenylimidazole 型 GSM は TMD1 直下の Y106 との相互作用が示されている (Takeo et al. 2014) (Cai et al., 2017)。更に興味深いことに、TMD1 を別のタンパクである CLAC-P と置換したところ、A $\beta$ 42、45、48 など A $\beta$ 42 産生系列に属する長さの A $\beta$  の産生のみが産生抑制され、その時 CLAC-P と PS1 TMD1 の性質の類似したアミノ酸残基が  $\alpha$ -helix の片面に集中して分布していたことから、TMD1 は helix の別々の面でそれぞれ A $\beta$ 40 系列と A $\beta$ 42 系列を認識している可能性も報告された (Ohki et al. 2014)。これらは TMD1 が A $\beta$  産生比率の決定に重要な役割を持つことを示す研究報告である。

構造学的に重要な知見も 1 つ得られている。Takagi らは L-685,458、DAPT、pep15 の添加時に TMD1 N 末端の G78 が膜外の開いた親水性環境へ、C 末端の I100 が膜内の疎水性環境へ移動することを示し、この動きから  $\gamma$ -secretase 活性を阻害した時に TMD1 全体が細胞内親水性環境方向に 1 アミノ酸分「piston movement」をすることを見出した (Takagi et al. 2010)。事実この垂直方向の運動は integrin (Williams et al., 1994) や電位依存性  $K^+$  channel (Gandhi et al., 2003)、 $\beta$ 2-adrenergic receptor (Spijker et al., 2006) など幾つもの膜タンパクに於いて、リガンドとの結合時に引き起こされることが報告済みであり、そのうち電位依存性  $K^+$  channel では膜電位の変化時にこの垂直運動が観察されることも知られており (Gandhi et al. 2003)、様々なタンパクで機能発揮に重要な動きであると考えられている。Takagi らは引き続きこの動きを検証し、C 末端直下の K101 と S102 をターゲットとする抗体 9D11 を作成し、予想される TMD1 の動きを阻害したところ、 $\gamma$ -secretase 活性が低下した (Takagi-Niidome et al., 2013)。以上のように  $\gamma$ -secretase の基質との作用を考察する上で TMD1 は重要なドメインであり、今後更なる詳細な解析が待たれる。

### 1.7.5.2 Helical Loop 1

Helical loop 1 (HL1) は PS1 では K101 から M139 までの 39 アミノ酸から成る膜外領域である (図 10)。TMD の予想プログラムから HL1 の領域は幾つかの可能性が示されているが、SCAM による各アミノ酸の親水性領域への露出調査の結果、I140 から急激に親水性が低下し膜内疎水環境の増加が示唆されたことより、先述の領域が HL1 に該当すると考えられる。全体が膜外領域に属し自由度の高い構造を有しているが、T122 から S132 の 11 アミノ酸で  $\alpha$ -helix 構造を取ることが報告された (Takagi-Niidome et al. 2015)。これは SCAM による MTSEA-biotin の標識率に該当領域で 3~4 アミノ酸毎に周期性を認めたことを起点とし、二次構造予測ソフトで  $\alpha$ -helix を取るという予測結果及び T122 からの S132 の配列を持つ短ペプチドが  $\alpha$ -helix のスペクトルを示したことから結論付けられたものである。この helix 構造は  $\gamma$ -secretase が活

性を発揮するのに重要な役割を持ち、生物種間の保存性は高くない一方で多くの生物で  $\alpha$ -helix 構造をとることが二次構造予測ソフトから推測されている(高木穂香 博士論文)。更に最近の単粒子構造解析の結果からは、確かに当領域は  $\alpha$ -helix を形成しているが、TMD2 と直接連結しており、TMD2 の膜外領域であるとの報告も出ている(Bai, Rajendra, et al. 2015)。よりミクロな研究では、helix 内部とその直後に位置する L130 と L134 に helix breaker である proline を置換したところ、 $\gamma$ -secretase 活性が失われることがわかっている(Takagi-Niidome et al. 2015)。この時、Aib ペプチド型 GSI の結合部位が消失していることも確認されており、更に変異体が  $\alpha$ -helix のスペクトルを示さず、且つ L130 と L134 の単独変異は  $\gamma$ -secretase 活性を残していたことなどから、 $\alpha$ -helix 構造自体が機能欠損に繋がっていることが考えられる。しかしこの helix breaker の導入にも関わらず、TSA 型 GSI の結合部位は形成されていたことも確認されており、この報告は基質結合部位と活性中心は独立したプロセスで形成されていることをも証明している。なお、SCAM による標識率からこの  $\alpha$ -helix は部分的に細胞膜に埋もれていると考えられる。このような、脂質との相互作用の為に膜に埋もれる構造は既に知られてはいるが(Enkvetchakul et al., 2007)、 $\gamma$ -secretase に於いてこの現象に具体的にどのような役割があるのかは明らかになっていない。

また、HL1 冒頭に位置する 3 アミノ酸、K101、S102 と V103 は SCAM でのラベル率が著しく高い(Takagi-Niidome et al. 2015)(Cai et al. 2017)。恐らく膜脂質と殆ど相互作用していないだけでなく、立体的に突き出たヘアピンのような構造をとっていることが考えられる。先述の TMD1 の piston movement の時に蝶番やパネのような働きをしていることが構造上考え得るが、この点について深掘りした報告はなく、未だ詳細は不明である。

HL1 の機能については、基質に関与するものが幾つか報告に上がっている。HL1 の  $\alpha$ -helix を形成するアミノ酸の最後の 1 つ S132 は pep15 による標識競合が確認できたことから、基質結合部位であることが示唆されている(Takagi-Niidome et al. 2015)。事実基質である APP の内腔側領域が切断活性に関わるという研究報告も有り(Tian et al., 2010)、S132 が基質と相互作用する可能性は高い。一方、この  $\alpha$ -helix を形成する S132 付近の領域内部は FAD 変異が少なく、その僅かな FAD 変異も  $\alpha$ -helix を破壊しないだろうと二次構造予測ソフトから推測されている。つまり、この領域は A $\beta$  の産生比率決定には大きな影響を与えないことが考えられる。とはいえ、近年の報告では APP の内腔側の膜内領域が PS1 NTF と比較的強く相互作用することや(Fukumori and Steiner 2016)、PS1 の Q112C と C83 の V695 C が disulfate 結合でしっかりと cross-link されることも報告されており

(Zhou et al. 2019)、場所こそ違えど HL1 が基質結合の役割を持つことを支持する内容でもある。また、その  $\alpha$ -helix 形成領域を含めた HL1 内の広範囲のアミノ酸欠損変異体を作成したり、複数個の残基をまとめて alanine に置換する Alanine Scanning を行ったりしたところ、APP と Notch と cadherin 切断それぞれ特異的に切断したり切断抑制したりすることに成功したという報告もある(Gong et al. 2010)。

HL1 の前半部分は特に大きな構造的特徴を有していることを示す報告は出ていないが、phenylimidazole 型 GSM の主要結合部位が Y106 であることが示されている(Takeo et al. 2014)(Cai et al. 2017)。同時に、そこへの GSM の結合が結合部位直前の TMD1 を内腔側へ引き上げていることも示されている。基本的にこれは生化学的に証明されているが、draggability simulation の結果もこれを支持している(Lee et al. 2017)。ANM simulation の結果からは、Y106 と Y115、Y240 の tyrosine が稼働性が高く、PS1 のダイナミクスに大きく関与するとされている(Lee et al. 2017)。また、HL1 の N 末端側の K101 から D110 までのアミノ酸 single deletion 変異 PS1 は例外なく野生型 PS1 に比して A $\beta$ 42 産生比率を上げていることも分かっている(Cai et al. 2017)。この現象は、アミノ酸残基の欠損によって HL1 全体や TMD1 などを含む周辺構造が flexible な動きを抑制され、野生型 PS1 が取るべき活性型構造を取りづらくなった結果であると筆者は考えている。以上の研究報告などから、HL1 前半部分は A $\beta$  産生比率を決定する動きの引き金となり得る領域であると考えられる。

### 1.7.5.3 Transmembrane Domain 2

TMD2 は PS1 では I140 から始まる膜貫通領域である(図 10)。構成領域は様々な議論があったが、Takagi らの SCAM 解析により、M139 以前は膜外親水性環境に属していることが分かった(Takagi-Niidome et al. 2015)。TMD2 の C 末端側の終わりについては当初 9 つ程度の短い HL2 が続いていると考察されていたが、C 末端側の SCAM 解析の結果、PS1 では C158 と Y159 が膜内親水性環境に面しており、その前後については疎水性の高い環境に埋もれていることが示唆された(高木穂香 博士論文)。即ち、TMD2 の膜内配列はたったの 18 残基程度であり、膜内で折り返して TMD3 へ続いていることが示唆されたわけであるが、膜を一度貫通せずに内部で折れ曲がる構造を持つタンパクは予てより報告されており(Shinoda et al., 2009)、先述した Pen-2 なども含め膜内ループを持つタンパクは存在する。最近の単粒子構造解析による  $\gamma$ -secretase の構造解析でも、確かに TMD2 と TMD3 を繋ぐループは高い位置に存在していることが確かめられている(Bai, Rajendra, et al. 2015)。

TMD2 の機能としては、基質の結合部位の役割を持つことが強く考えられてきた。pull down assay や免疫共沈降によって基質結合部位の可能性が示された後(Annaert et al. 2001)(Gupta-Rossi et al. 2004)、PS1 の TMD2 を CD4 に置換した swap 体が pep11 のプローブ化合物 pep11-Bt と結合しないことから、その可能性は一層高まった(Watanabe et al. 2010)。また、 $\gamma$ -secretase は膜内に親水性の活性中心を持ち加水分解を行う酵素である為、大まかな切断機構として疎水性環境下に存在する基質結合部位にまず基質が結合した後に何らかのステップを踏んで親水性の活性中心へ移動するものと考えられる。また先述の通り TMD2 全体が疎水性環境下にあることが明らかとなっており、これらを併せると、TMD2 は基質結合部位でも特に基質進入時に最初に結合するゲートのような役割を持つことが考えられる。最近のシミュレーションからも、TMD2/3、3/4、4/5 各々の間の loop 領域がとても短く、細胞膜を突き抜ける基質が侵入する上での障害になるということ(Somavarapu et al., 2017)、TMD2 と TMD6 の間の距離が大きく変動すること(Kong et al., 2015)、TMD2 自体が  $\gamma$ -secretase の conformation によって大きく構造を変える可塑性の高い domain であり、且つの可塑性は DAPT の添加によって大幅に低下すること(Bai, Rajendra, et al. 2015)など、TMD2 が基質を取り込む lateral gate であることを支持する報告は何件もある。

一方、興味深いことに TMD2 の FAD 変異を  $\alpha$ -helix 上に並べると、片面に集中することから(Hardy and Crook 2001)、TMD2 の片面だけが基質との相互作用を起こしている事も考えられる。さらに TMD2 の半分の 9 個のアミノ酸残基を valine、threonine、isoleucine が占め、これらは全て  $\beta$ -branched アミノ酸である。しかもこれらの殆どは  $\alpha$ -helix 上にほぼ一直線上に並び、 $\gamma$ -secretase の外側を向いていることも特筆に値する。 $\beta$ -branched アミノ酸はそのエントロピーの高さから helix を回転異性体的に制約し、TMD 間の相互作用を助長すると考えられている(MacKenzie et al.1998)。基質である APP 側にも切断部位周辺に valine などの  $\beta$ -branched アミノ酸残基が同じように密集している。ところが Notch などその他の基質では切断部位付近にそのようなアミノ酸が集まっているわけではなく、このことより TMD2 と APP の間に何らかの特異性が発生している可能性もある。

### 1.7.5.4 Helical Loop 2

HL2 は先述の通り C158 と Y159 のみからなる短小ループである(高木穂香 博士論文)(Cai, Morishima, et al. 2019) (図 10)。これは SCAM を用いた解析結果であるが、構造予測ソフトではその付近のアミノ酸数残基を含む 10 弱のループが HL2 の実態であるという結果であった。この差については、K155、R157、K160 などの電荷を持つ残基が関わっていると考察されている。SCAM では必ず検出対象を cysteine に置換しなければならず、元々が荷電性残基であった場合置換することで電荷を失い、その結果疎水性環境へ埋もれ込み、標識されなかったということである。このことから考えると野

生型 PS1 の HL2 はもう少し長いループを有していることは十分にありえる。しかし単粒子構造解析では HL2 は少なくとも膜内にあることがわかっており、その点に関して整合性は取れている。

### 1.7.5.5 Transmembrane Domain 3

PS1 の TMD3 は K160 から L182 までのアミノ酸から成るとされる(Cai, Morishima, et al. 2019) (図 10)。C 末端については SCAM の検討から、嵩高さにより膜外親水性環境下にある cys 残基のみを認識できる MTS-TEAE によって MTSEA-biotin のラベルに競合がなかったことより、G183 以降は膜外にあることが明らかとなった。TMD3 はドメインをまるごと置換しても野生型とほぼ同様の代謝を受け、且つ酵素活性をある程度保持できるとの報告があり(Watanabe et al. 2010)、この時顕著な A $\beta$ 42 産生比率上昇と Notch 切断効率が著しく低下していた。FAD 変異を有する PS が loss of function 型変異であることを考えると、この表現型は非常によく似ており、TMD3 が酵素の活性に直接関与していることを強く示している(De Strooper 2007)。なお、現在までに知られている中で最も強力な FAD 変異である L166P は TMD3 の細胞内側に位置し、この変異の存在下で各種薬剤への感受性が低下することが知られている(Kornilova et al., 2006)(Page et al. 2008)。また TMD3 は  $\gamma$ -secretase 阻害剤の potency を決定するドメインでもあることが分かった(Zhao et al. 2008)。同時に alanine scanning も行った結果、TMD3 内の幾つかの残基の変異が様々な阻害剤の potency を変化させ、TMD3 が阻害剤の結合部位としても重要である可能性が示唆された。

構造学的な観点からでは、SCAM の検証により複数のアミノ酸残基に MTSEA-biotin ラベルが入ったことから、TMD3 は活性中心ポアに面していると考えられる(Cai, Morishima, et al. 2019)。なおこの時ラベルを確認した残基は  $\alpha$ -helix 構造の一面に集中し、且つ TMD3 の内腔側に多いことも確認されている。これより、TMD3 は内腔側の半分で活性中心を形成しているドメインであると考えられる。また、TMD3 は  $\gamma$ -secretase の活性に相関してドラスティックな動きをすることが確認されている。SCAM の結果から、GSM や A $\beta$ 42 産生比率を低下させる変異を入れた時に TMD3 の面する親水性環境が全体的に広がることが確認されている。最近の電子顕微鏡による解析では  $\gamma$ -secretase 活性が上昇した時に酵素全体が extended conformation をとることが観察されており(Elad et al. 2015)、TMD3 周りの親水性環境の増加、即ち活性中心ポアの拡大はその一環の動きであることが考えられる。またこのような構造変化を与えた GSM は HL1 に結合し(Takeo et al. 2014)(Cai et al. 2017)、TMD1 とも TMD3 とも異なる TMD5 に位置する A $\beta$ 42 産生減少 mutation V236S(Cai, Morishima, et al. 2019)からも同様の構造変化が確認できることなどから、TMD3 のこの動きは一連の構造変化においてかなり下流の動きであることが考えられる。A $\beta$ 42 産生増加時に関しては、TMD3 の内腔側と細胞質側で若干異なる動きが確認されている。幾つかの FAD 変異を導入した時、TMD3 内腔側では親水性環境が減弱するのに対し、細胞質側では親水性環境に有意な変化が見られない(Cai, Morishima, et al. 2019)。これは元々内腔側の方が広い親水性環境に面していたことにより、細胞質側より変化がドラスティックに観察できたからであろう。タンパク構造シミュレーション解析では、面白いことに  $\gamma$ -secretase の構造変化に伴い TMD3 の N 末端側と活性中心の距離が大きく変動すると言う結果を出している(Somavarapu and Kepp 2017)。論文の著者らは、構造変化が見られたのが TMD3 の一部であること、且つそれが TMD2 側の領域であることから、TMD3 の構造変化単独が基質の切断に大きく作用するとは考えにくく、TMD2 と共役している可能性を主張しているが、親水性環境が A $\beta$  産生比率に大きく関与することから、TMD3 自体に大きな役割があることは確からしいだろう。

一方よりミクロな視点では、TMD3 内部でも W165 と S169 の重要性が指摘されている。S169 は cryo-EM で解かれた  $\gamma$ -secretase と C83 の複合体構造に於いて C83 の I712 と水素結合することが示されており、W165 は V715 との相互作用と S169 の安定化作用を持つとされている(Zhou et al. 2019)。留意したいのは、解析で用いている  $\gamma$ -secretase は D385A 変異を導入して活性を失っている為、 $\epsilon$  切断が行われる前の段階の相互作用を反映しているということである。事実 I712

は A $\beta$ 40 と 42 の切断部位の間にある残基であり、 $\gamma$ 切断が進行するにつれて基質が離れる、若しくは基質を活性中心に運ぶような動きをする可能性があるだろう。加えて上記の通り細胞質側の構造変化が大きいことから S169 を中心としてこの領域が  $\gamma$ 切断を最終的に決定する部位の 1 つである可能性は高い。

#### 1.7.5.6 Transmembrane Domain 4

PS1 に於ける TMD4 は V191 から I213 までのアミノ酸残基から構成される(図 10)。SCAM の解析から殆どの残基が疎水性環境に位置しているが、TMD4 の C 末端側細胞質側の数残基にラベルが入り、親水性環境に面していると考えられる。その為、TMD4 は C 末端側に移行するに連れて活性中心に近づき、またポアを形成していると考えられている(Tominaga et al., 2016)。活性中心ポア形成付近の疎水性アミノ酸残基 G206、G209、I213 は種間の保存性が高いことが知られ、活性に重要な役割を果たすと考えられる。これらの残基は活性中心から離れた場所に位置するが(Bai, Rajendra, et al. 2015)、酵素の活性化に伴う構造変化は確認されている。先述の I213 は親水性環境に面しており、MTS クロスリンカーによる残基間の距離測定の結果、酵素活性上昇時に I213 が活性中心に近づき、活性減少時には活性中心から遠ざかることが示されている(Tominaga et al. 2016)。また、G206 と G209 には幾つもの FAD 変異が報告されている(Poorkaj et al. 1998)(Park et al., 2008)(Chen et al. 2014)(An et al. 2016)。2016 年現在までに併せて 7 つの mutation が知られているが、親水性や疎水性、サイズまで変異先のアミノ酸残基の特徴は多岐に渡る。これは、glycine は  $\alpha$ -helix 中では helix breaker としての機能を果たし(Dong et al., 2012)、glycine が存在することで TMD がより flexible に動くことができるが、アミノ酸置換によって電荷や bulky 度による障害が発生し、TMD が十分に構造変化を起こせなくなることが原因だと考えられる。

また、TMD4 内で特筆すべき特徴は、中間に位置する WNF motif であろう。Pen-2 の項目で記述したが、ここは Pen-2 との結合領域であることが示されている(Watanabe et al. 2005)(Kim et al. 2005)。元々 DDM による  $\gamma$ -secretase の可溶化を行うと、PS1 CTF と Aph-1/Nct のサブコンプレックス、そして PS1 NTF と Pen-2 のサブコンプレックスの 2 つに解離することが知られており(Fraering, Lavoie, et al. 2004)、PS1 NTF と Pen-2 の相互作用は示唆されていた。Watanabe らは TMD をまるごと置換する swap 変異体を作成したところ、TMD4 swap 体のみに Pen-2 との結合が見られないこと、CD4 のキメラタンパクの解析から TMD4 が Pen-2 に直接結合することを示した。更にその後の解析で WNF の 3 アミノ酸からなる WNF motif が結合に重要であること、そして特に N204 の mutation が Pen-2 との結合を顕著に失うことから、N204 の面する境界面が Pen-2 との結合面であるだろうと考えられた。

#### 1.7.5.7 Helical Loop 4

HL4 は TMD4 と TMD5 の間に位置し、H214 から R220 までの 7 アミノ酸から構成される(図 10)。特にその中間に位置する G217 は面白いことに SCAM による標識がなされず、膜内に埋め込まれていることが考えられる(Tominaga et al. 2016)。また G217 には Arginine と Aspartic acid の 2 種類の FAD 変異が知られており、いずれも疎水性残基から親水性残基への変異であることから、ループ中間の親水性の程度が A $\beta$ 42 産生比率に影響を与える可能性がある。

#### 1.7.5.8 Transmembrane Domain 5

PS1 に於ける TMD5 は L221 から F237 までである(図 10)。SCAM の結果から L226 と V236 が親水性環境に面していることが示されたが、内 L226 は興味深いことに広い親水性環境に面している。しかし、TMD5 のアミノ酸残基の多くが疎水性であり  $\alpha$ -helix 構造をとっていること、そして細胞膜の厚さが 30Å であるため最低 20 程度の数の残基からなる helix 構造を有する必要があること、及び HL4 以後にも複数の疎水性環境に存在するアミノ酸残基があることから、L226 は膜



外にあるわけではなく、代わりに周囲に特異的に広い親水性環境が広がっていると考えられる。事実 L226 は L383 と L387 と直接架橋できるほど近接しており、活性中心付近の広いポアに面していることが考えられた(富永綾 博士論文)。また、TMD5 の C 末端側 V236 と F237 の cysteine mutant はそれぞれ著しく A $\beta$ 42 産生比率を低下、増加させることが示されており(Tominaga et al. 2016)、この領域が A $\beta$ 42 比率決定に重要である可能性がある。

#### 1.7.5.9 Transmembrane Domain 6

TMD6 の殆どの残基が疎水性環境に面しているが、活性中心である D257 の他、A246、L250、A260 が親水性ポアに面しているとされている(Sato et al., 2006) (図 10)。TMD6 の中心付近には活性中心の D257 が存在する。ここは変異導入により基質切断活性が完全に失われることが報告されている(Wolfe, Angeles, et al. 1999)(Wolfe, Xia et al., 1999)。また、この aspartic acid を含む周辺配列は YD motif と呼ばれ、種間の保存性が非常に高いことが知られている。更に言えば、ここは xYDxx motif と呼ぶこともでき、この x には valine や alanine などの疎水性残基が当てはまり、YD と同じように種間で高度に保存されている(Smolarkiewicz et al., 2014)(Dang et al. 2015)。この motif 内に分布する FAD 変異は 2019 年現在、1 つを除いて全く報告されておらず(Miklossy et al. 2003)、それは僅かな構造変化自体が  $\gamma$ -secretase 活性を著しく損ない個体に致命的な表現型を与えるから、もしくは疎水性残基同士の置換であれば有意な活性変化を来さないから、などであると考えられよう。活性中心付近の疎水性残基らの具体的な重要性は特に分かっていないが、活性中心の aspartic acid との親水性のメリハリをつけることで、TMD 構造を強行に保持しつつ D257 を活性中心ポアに突き出させているような構造を取らせているのだろうと考えている。

また、近年の電子顕微鏡による解析に於いて、基質が入り込むと大きく構造変化を起こすことも明らかになってきた。元々 TMD6 は一本の helix 構造を取っているのだが、基質が入り込むと A260 前後を中心として折れ曲がり、直後が短い  $\alpha$ -helix を形成する(Zhou et al. 2019)。この付近の領域では折れ曲がった後、特に R278 や E280 が TMD2 の Y154 や HL2 の Y159、L271 や T274 が V151 や Y154 と水素結合や van der Waals 力によって安定化されることが示されている。興味深いことに、結合に関与している残基の多くに FAD 変異が発見されており(Rogaeva et al. 2001)(Kwok et al. 2003)(Hattori et al. 2004)、基質と酵素の複合体の安定性に関与し  $\gamma$  切断を決定している 1 つの要因であることが強く伺える。

#### 1.7.5.10 exon 8 領域

PS1 の exon 8 領域は、正確には TMD や HL を形成しているわけではなく、D257 から S290 までをコードし、種間で高度に保存されている領域である。また、exon 8 領域内には多数の FAD 変異が報告されており、且つ極僅かではあるが exon 8 領域を欠損した alternative splicing isoform が脳内に存在し、それらは  $\gamma$ -secretase 活性を失っていることも知られており(Rogarv et al. 1995)(Rogaev et al. 1997)(Kwok et al. 2003)、この領域が  $\gamma$ -secretase 活性獲得過程に於いて重要な働きを担っていることが考えられている。ちなみに  $\Delta$ exon 8 PS1 は D257 を回復させても A $\beta$  産生と Notch 切断が観察されなかったため、exon 8 欠損による構造変化自体に原因があると考えられる(渡邊直登 修士論文)。更に、本領域内の詳細な検討により、PS1 NTF と PS1 CTF の共発現解析では Y288 が酵素活性発揮に重要であること(Laudon et al. 2004)、T281 と L282 が一部 GSI の potency を決定していること(B. Zhao et al., 2008)、L271V の FAD 変異が exon 8 の splicing を変化させ A $\beta$ 42 比率上昇に繋がること(Kwok et al. 2003)、 $\Delta$ exon 8 PS1 は Net との相互作用が確認され複合体に組み込まれていることが示唆されつつも、PS1<sup>-/-</sup>マウスの示す phenotype を回復させない(Brautigam et al. 2015)、 $\Delta$ exon 8 PS1 を組み込んだ  $\gamma$ -secretase の活性消失は特に保存性の高い C263 から N279 までのアミノ酸残基が関与していること(渡邊直登 修士論文)などが示されてきた。また、 $\Delta$ exon 8 PS1 を含む  $\gamma$ -secretase は野生型と同様ゴルジ体への輸送が確

認されており(渡邊直登 修士論文)、これらの知見から exon 8 領域を欠損していてもゴルジ体への輸送まではしっかりとされるが、その後の PS1 の自己断片化やそれに伴う基質切断活性の発揮に何らかの支障が出ていることが考えられる。未だ exon 8 領域の明確な役割は示されていないが、この領域が活性中心 D257 を含み、PS 活性化に伴う自己断片化時の切断部位である T291/M292(Steiner, Romig, Pesold, et al. 1999)に隣接した領域であることを考えると、exon 8 は基質を活性中心に提示する働きや、自己断片化後の hetero dimer 形成に関わっているという説が濃厚だろうか。

#### 1.7.5.11 Transmembrane Domain 7

PS1 の TMD7 は C 末端に G394 が位置し、中間に活性中心の D385 が存在する(図 10)。N 末端については定かではないが、恐らく L383 であると考えられる。これは SCAM の結果から細胞質側については R377 から L383 (G382 を除く)までが細胞内外親水性環境に面していること、内腔側については I387 を除く全てのアミノ酸残基が疎水性環境下にあることから、当初 F388 から G394 までが half-helix を形成し、それより N 末端側は loop 様構造をとることが考えられたのが始まりであり(Sato et al. 2006)、その後単粒子構造解析の結果では L383 が  $\alpha$ -helix の N 末端に位置するという結果が報告され(Bai, Rajendra, et al. 2015)、以前の SCAM の結果を支持するものとなった。

TMD7 の機能は基質切断時の鋏の刃の片割れを TMD6 と共に担うことである。TMD7 にも幾つかの FAD 変異が報告されており、また SCAM 実験に於いて cysteine への置換で活性を著しく落としたり、若しくは発現自体を損なったりする残基が多い。例えば Y389 と S390 は cysteine への置換によって発現自体はある程度保持できたものの、A $\beta$  産生は著しく低下していたことが報告されている(佐藤千尋 博士論文)。これは、それぞれの持つ phenol group や hydroxy group が基質切断時に於ける電子供与や、水素結合による触媒部位の構造保持に関わっていた為、cysteine への置換でそれらの機能が失われたからであると考えられることができる。

TMD7 には活性中心 D385 を含む GxGD motif (xGxGD motif)が存在する。これは TMD6 の YD motif と同様非常に保存性が高く、x には疎水性残基が当てはまる(Smolarkiewicz et al. 2014)(Dang et al. 2015)。この領域もとても sensitive であり、特に保存性の高い 2 つの glycine に関しては 1 つ、L381 については 2 つが現在のところ報告されている(Steiner et al. 2000)(Ikeuchi et al. 2008)(Dolzhanskaya et al., 2014)。いずれも bulky 度や性質の大きく変わらない mutation ではあるが、それだけ小さな変化ですら critical な影響を PS1 の構造に与えるということである。SCAM 解析に於いても、本領域内の glycine の cysteine への置換体は断片化が殆ど見られなかった(佐藤千尋 博士論文)。一方で x に当てはまる leucine は両側の glycine に比べて mutation への感受性が薄い。また motif 内の L383 の phenylalanine 変異体は A $\beta$  産生を残したまま Notch signaling を消失させることが知られている(Yamasaki et al. 2006)。またこの結果を補完する研究としてその他のアミノ酸残基を網羅的に解析したところ、phenylalanine や tyrosine などに代表される芳香環を持つアミノ酸残基、helix を破壊する proline、また正電荷を持つ lysine と arginine は APP の切断を大きく変動させることなく Notch と CD44 の切断を大幅に低下させることが示された(Kretner et al. 2013)。筆者らはこの結果から GxGD motif の x が  $\gamma$ -secretase の基質選択性を決定する一つの要因であると推察した。しかしながら、結果はあくまでも APP 切断に影響させない Notch と CD44 の切断活性低下であり、これは単なる酵素活性の低下でも部分的に説明可能である(それでも x は基質を認識していることに他ならないが)。今のところ APP の切断活性を下げ、一方で Notch 切断は維持する変異体は見つかっていない為、この判断は若干時期尚早であると考えられる。

TMD7 の N 末端側は構造上決まった形をとることは少ないが、基質が入り込むと  $\beta$ -strand 構造に固定される(Zhou et al. 2019)。R377 から L381 までの 5 残基から成る構造だが、PAL motif と共同で基質の安定化に寄与していると考えられている。なお、同論文で該当領域を欠損させた変異体を作成したところ、酵素の切断活性が完全になくなることをも確認している。

### 1.7.5.12 Helical Loop 7

HL7 は K395 から T407 までで構成されると考えられている(図 10)。この領域内に於いて、SCAM 解析時に G402、D403、W404 の 3 残基を cysteine に置換することによって PS1 が発現を完全に失うことが確認されている(佐藤千尋 博士論文)。比較的 flexibility が高いはずの loop 領域に於いて、mutation の導入によってタンパクの発現自体が完全に消失することはあまり無いケースである為、この領域が何かしらの重要な機能を有していることが示唆されている。

### 1.7.5.13 Transmembrane Domain 8

SCAM の解析の結果、I408 から A431 まで全てが疎水性環境下にあり(図 10)、TMD8 として  $\alpha$ -helix を形成していることが分かった。具体的な機能については殆ど分かっていないが、G417 の cysteine への置換によって PS1 の自己断片化が観察されなくなることが知られている。これはサイズの小さい glycine が helix 内で kink の役割を果たしており、cysteine への置換によってその機能が失われたことが原因だと考えられる(Nakai et al. 1999)(Sato et al., 2008)。

### 1.7.5.14 PALP motif

HL8 については直接的に領域を一義的に決めるのが難しく、ここでは HL8 と思われる領域内の重要な配列である PALP motif について解説を加える(図 10)。PALP も活性中心付近の motif と同じように種間の保存性が高く(Smolarkiewicz et al. 2014)、酵素の機能発揮に必要な部位であることが示唆されてきた。構造学的観点からまとめると、この PALP motif 周辺は細胞質側からアクセスできる親水性環境に面していることが SCAM によって示されている(Sato et al. 2008)。ただし PALP motif の 2 つの proline に関しては、cysteine への置換によってタンパク自体の発現が失われた為、実際周辺構造と同様に親水性環境に面するかは定かでない。これらの配列の内、I437 は比較的広い親水性環境に面していることが知られている(Sato et al. 2008)が、最新の単粒子構造解析結果と重ね併せれば、これは I437 がタンパクの外側を向いており、且つその周辺に他の TMD が位置していないからであると分かる(Bai, Rajendra, et al. 2015)。この構造は TMD9 などの周辺構造の動きにも関与し(Sato et al. 2008)、特に基質切断時の TMD9 や活性中心の動きを制御する可能性が提示されている(Tolia et al. 2008)。

Presenilin family の SPE-4 タンパクの PALP 変異が *C.elegans* の sperm 形成に異常を来すことから、PALP motif の重要性は予てより考えられてきた(Arduengo et al., 1998)。Tomita らや Wang らは presenilin に mutation を導入し、この motif が  $\gamma$ -secretase 複合体形成には影響を与えない一方で PS の断片化や  $\gamma$ -secretase 活性に必要であることを示した(Tomita et al. 2001)(J. Wang et al., 2004)(J. Wang et al. 2006)。 $\gamma$ -secretase と同様の活性中心を有する SPP も PAL motif を持ち、それが活性中心形成関与する可能性が示唆されていたことから、PALP motif は 2 つの aspartic acid と共に活性中心の形成に関わっていると考えられた。事実 PALP motif は GSI の 1 つである Merck C の結合に関与していることが示され(J. Wang et al. 2006)、また単粒子構造解析からも PALP motif が 2 つの活性中心と同等に近距離に位置していることも報告され(Bai, Rajendra, et al. 2015)、この説は非常に確からしいと言える。また、PS1 CTF 側の様々な欠損部分ペプチドを CD4 タンパクと融合させ、他の  $\gamma$ -secretase 構成因子の影響を排除して細胞内分布の検討を行ったところ、PALP motif 周辺が ER retention signal である可能性が示唆されている(Kaether et al. 2004)。

構造的観点から、最近のシミュレーションの結果からは、PALP motif が基質を取り込む lateral gate を開くのに関与する結果が出ている。PALP motif を含む TMD8 と TMD9 の間の領域は非常にダイナミックな動きをし、PALP motif の直前に位置する K430 と A431 は TMD6 cytoplasmic 側の R269 と 4 Å 以内の距離にあるが、更に近づき互いに水素結合を形成することがあることが示されている(Kong et al. 2015)。また、cryo-EM の結果より、PALP motif 基質 C 末端と結合

し、基質の安定切断を可能にしていることが明らかとなっている(Yang et al. 2018)(Zhou et al. 2019)。光親和性標識を用いた実験で基質 APP の  $\epsilon$  切断以下 C 末端寄り数残基が PS1 CTF との相互作用が強いとの結果が出ていたのだが、これはおそらく PALP 若しくは先述 TMD7 の N 末端  $\beta$ -strand のいずれかであるだろう(Fukumori and Steiner 2016)。

近年の mutation 解析からは、S438P が  $\epsilon$  切断を下げ、しかし  $\gamma$  切断を活性化させる興味深い報告が出ている(Imai et al., 2018)。この結果は、 $\epsilon$  切断と  $\gamma$  切断が別機構で制御されている説を支持するだけでなく、PALP motif 付近がいずれにも関与していることを示唆するものである。helix breaker である proline の導入により PALP motif 一帯の可動性がより高くなることで基質との結合がどこかしらで強化された一方、活性中心ポアの形成に何かしらの欠落が生じたものと推測される。

### 1.7.5.15 Transmembrane Domain 9

TMD9 は全体的に疎水性が低く、複数のグループによる解析で統一された見解が得られておらず、中には細胞質側で脂質二重膜と相互作用する部位であるとも考えられてきた(X. Li et al. 1996)(Lehmann et al. 1997)(Nakai et al. 1999)。その後、活性を維持した上で糖鎖付加部位を導入した PS1 を利用した検討を行ったところ、PS1 の最 C 末端が糖鎖付加を受け、この領域が内腔側に位置することが示された(Oh et al. 2005)(Laudon et al. 2005)。つまり、PS1 は 9 回膜貫通型タンパクであり、TMD9 が存在することが証明されたのである。

Sato らによる SCAM 解析では、標識されたアミノ酸残基に周期性が見られ、しかし Q454/P455 を期に周期性にずれが見られることから、PALP motif の後半から T449 ままで TMD9 として膜を貫通し、D450 から Q454 ままで膜外領域に出た  $\alpha$ -helix を形成し、P455 で折れ曲がり F456 から H463 ままで別の膜外  $\alpha$ -helix を形成していることが示されている(Sato et al. 2008) (図 10)。特に膜外  $\alpha$ -helix を形成しているアミノ酸残基の内、強い標識が見られないものについても SCAM によって弱い標識はよく見られることから、HL1 後半部分と似たように部分的に膜に埋もれていることが示唆される。TMD9 のうち、まず G442 が cysteine への置換によってタンパクの発現を失った。これは TMD8 の G417 の場合と同じように、側鎖の小ささが PALP motif や L443 以降の TMD9 の可動性に寄与し、cysteine への置換でそれが失われたためであることが考えられよう。また F456 と H463 も cysteine への置換でタンパク発現が失われた。前者は最 C 末端領域の中でも非常に高く保存された残基であり、両親媒性側鎖の存在から脂質二重膜内での安定存在に寄与していることが考えられ、後者は imidazole 基を有しこれが遷移金属の配位子としての機能を持ち合わせているのでプロトン移動に関与することが考えられる。一方、D450 は Aib 型 GSI である pep15 の添加によって親水性環境が減弱した部位でもある(Sato et al. 2008)。即ちその残基が基質結合部位、若しくは基質が結合した状態でアロステリックな構造変化を起こして疎水性環境に埋もれ込むことが考えられる部位である。なお、TMD9 と TMD7 は非常に近い位置関係にあるものの、cross link されないことが報告されており(Tolia et al. 2008)、両者の間には疎水性環境が広がっていることが示唆される。これは Sato らの SCAM 報告とも合致しており、彼女らの報告では TMD9 でラベルの入った残基は  $\alpha$ -helix 上で一面に並ぶことが示されているが、最新の単粒子構造解析で明らかとなった構造に照らし合わせれば、この面は TMD7 に面した向きにはない。

TMD9 の機能としては、その予想される可動性の高さ、基質との結合の可能性、活性中心人の距離などを総合的に考えると、基質と結合し活性中心に受け渡す役割を担う可能性が提示される(Annaert et al. 2001)(Tolia et al. 2008)。

### 1.7.5.16 最 C 末端

最 C 末端は F465、Y466、I467 の 3 残基から構成され、その全てが膜内に埋もれていることが明らかとなっている(Sato et al. 2008)。当初から PS の C 末端側が  $\gamma$ -secretase 活性発揮に重要であることが指摘されていたが、mutation 解析と種

間の保存性解析から、PS1 の I467 の疎水性が特に重要であることが報告された(Tomita et al. 1999)。また最 C 末端を欠損させると、PS1 の自己断片化や Nct の成熟、 $\gamma$ -secretase 活性が失われることが報告された(Bergman et al., 2004)(Shiraishi et al. 2006)。更には Nct/Aph-1 サブコンプレックスが PS1 CTF のみを発現させても結合が認められ(Bergman et al. 2004)、CD4 の TMD 直下に PS1 TMD8 以降の配列を融合した時に Nct との結合が確認されたことから(Kaether et al. 2004)、PS1 最 C 末端、特に I467 が特に Nct との結合を担うことが考えられた。しかし単粒子構造解析の結果、Nct は TMD9 に結合していないどころか、PS1 の近傍にはまず Aph-1 が配置されていることが明らかとなった(Bai, Rajendra, et al. 2015)。これは、Kaether らの報告では PS1 の C 末端をキメラタンパクとして発現させていたため、活性型 PS1 の構造を反映しておらず、生理条件下で行われない結合を観察していたから、または Nct/Aph-1 サブコンプレックスとして存在していた Nct が Aph-1 を介して結合したものを解析した為であると考えられる。

## 1.8 $\gamma$ -Secretase の機能、性質

### 1.8.1 生理機能

$\gamma$ -secretase が発見された当初、AD の病原物質である A $\beta$  の産生を司る以外の生理的意義は当初不透明であった。しかし、 $\gamma$ -secretase を標的として創薬を行う場合、生体内での  $\gamma$ -secretase の役割をより具体的に理解することは非常に重要である。ここ近年の研究のお陰で様々な基質が  $\gamma$ -secretase によって切断されることが明らかとなり、その数は 90 を超える(Shah et al. 2005)(Haapasalo and Kovacs 2011)。その基質らの中で最も存在意義が確立されているのは、APP(別紙記載)と Notch signaling(Selkoe et al. 2003) であろう。

APP や Notch 以外の  $\gamma$ -secretase の基質としては、ErbB-4 や CD44、APLP1&2、Nectin- $\alpha$ 、E-cadherin、N-cadherin、Delta、Jagged、ephrinB などが挙げられる(Ni et al. 2001)(Lammich et al. 2002)(LaVoie et al. 2003)(Tomita et al. 2006)(Parks et al. 2007)。これらの分子は極めて切断部位の配列の相同性が低い(Beel and Sanders 2008)。しかし、多くの基質に共通することとして、1)  $\gamma$ -secretase による切断の前に細胞外側の膜近傍で他の酵素による切断を受けていること、2) 基質が I 型膜タンパクであること、3)  $\gamma$ -secretase により生成した ICD が細胞核に移行することが示されており、酵素切断が signal 伝達を行っていることが考えられ、 $\gamma$ -secretase は多種多様な膜タンパク質の膜内、膜近辺の加水分解依存的な signal 伝達機構に於いて、重要な役割を持っていることが明らかになってきている。以下に、 $\gamma$ -secretase の基質やその切断物が有する機能についてまとめる。

#### 1.8.1.1 転写調節

転写を調節する因子としてまず挙げられるのは APP の ICD、AICD だろう。これについては先述の通りである。その他にも、核への局在や reporter gene assay を通じて転写調節因子として機能するだろうと考えられているものも存在する。Alcadein の ICD(Araki et al. 2004)、CD44(Okamoto et al. 2001)、DCC(Taniguchi et al., 2003)、Notch(Schroeter et al., 1998)、Notch の ligand である Delta と Jagged(Bland et al., 2003)(Ikeuchi et al., 2003)、E-と N-cadherin(Marambaud et al. 2003)(Ferber et al. 2008)、receptor-like protein tyrosine phosphatase (RPTP)(Anders et al. 2006)、leukocyte-common antigen related (LAR)(Haapasalo et al. 2007)などが報告に挙げられている。例えば cadherin や RPTP は細胞接着に関与しているがそれらの ICD は転写に関わるなど、全長型とその一部で異なる役割を持つものが殆どである。

#### 1.8.1.2 運命決定

細胞分化や運命決定に関与する  $\gamma$ -secretase の基質で最も研究が進んでいるのは、恐らく Notch であろう。Notch は元々 *Drosophila melanogaster* に於いて見出され(Artavanis-tsakonas et al. 1999)、Notch シグナルの阻害は腸管毒性や下痢などの作用をもたらす(Purow 2012)。これは Notch は腸管に於いて腸管前駆細胞を上皮細胞へ分化させる役割を持ち、Notch signaling の欠如によって細胞がより多く杯分泌細胞(secretory goblet cell)に分化してしまっただけの結果であると考えられている。また、Notch signaling の低下は皮膚癌の一種である基底細胞癌のリスクを上げることも知られている(Thélu et al., 2002)一方で、シグナルの抑制が幾つかの癌治療となりうるという報告もされており(Purow 2012)(Espinoza et al., 2013)(Vinson et al., 2016)、Notch signal は作用する組織によって癌遺伝子とも癌抑制遺伝子ともなりうることを示唆されている。

Notch の他にも同様の機能を持つものが報告されている。ErbB4 は  $\gamma$ -secretase によって ErbB4-ICD を放出する(Linggi et al., 2006)。ErbB4-ICD は様々な転写因子と相互作用して遺伝子の転写を制御する他、ErbB4 の pro-apoptotic な働きを伝えることもあるという(Vidal et al., 2005)。更に ErbB4 の切断は脳に於ける細胞の運命決定に関わるという報告も存在する。 $\gamma$ -secretase 阻害は ErbB4-ICD の核への移行を阻害し、ミエリン形成に関わるタンパクの発現も落とすことが報告されている。また、in vivo 実験で、発達段階のマウス脳に於いて  $\gamma$ -secretase シグナル依存的な ErbB4 核シグナルが、astrogenesis の時間調節を行っているという知見もある(Sardi et al., 2006)。筆者らは neurogenic 段階で、アストロサイトの分化に抑制的に働くことによって神経前駆細胞の維持に  $\gamma$ -secretase 依存性 ErbB4 シグナルが重要であることを報告している。

### 1.8.1.3 細胞死の調節

$\gamma$ -secretase による切断を受ける基質が担う働きには、細胞死の調節も含まれている。LRP1 は予てより APP の endocytosis を調節し、 $A\beta$  の産生量と細胞内取り込みを増加させることが知られている(Bu et al., 2006)。その一方で、 $\gamma$ -secretase 依存性の LRP1 cleavage は虚血性の細胞死に働きかけることも報告されている(Polavarapu et al., 2008)。マウスに於いて中大脳動脈閉塞(MCAO)は虚血状態に陥った脳部位の  $\gamma$ -secretase の発現を上昇させ、LRP1-ICD の核移行も増えている。これは脳皮質への GSI 注射によって阻害することが可能であり、この時 MCAO によって惹起されるはずの caspase-3 の活性化が抑制され、虚血状態による脳傷害を抑え、神経学的に見たマウスの挙動も改善されていたと言う。これらの結果から、脳虚血では  $\gamma$ -secretase 依存性の LRP1 cleavage は細胞死を誘導するだろうと考えられる。

その他には、RAGE が挙げられる。RAGE は細胞表面に局在する receptor であり、transgenic マウスを用いた解析により血液脳関門を通過する  $A\beta$  の脳への輸送に関与するとされ、結果的に神経機能の阻害に繋がるとされている(Deane et al. 2003)(Arancio et al. 2004)。RAGE-ICD の過剰生産は細胞の生存率を下げ、アポトーシスを起こす細胞を増やし、p38 や JNK などのストレス応答性 kinase の活性化に繋がることから、RAGE-ICD は細胞のアポトーシスに関与すると考えられている(Galichet et al., 2008)。興味深いことに、ここまで挙げた  $\gamma$ -secretase の基質や、同様に細胞死に関与するとされている p75 を含め、殆どの基質が  $A\beta$  との相互作用が仄めかされている。

### 1.8.1.4 神経突起伸長と細胞接着

神経突起伸長、軸索誘導、そして細胞接着などは発達段階で重要なイベントであるが、大人の脳に於いてでも学習時や傷害への応答時などにニューロン間で新たな結合が生じる際にも見られる。多くの研究により、 $\gamma$ -secretase は様々な方向からこれらのイベントに重要な役割を担っていることが明らかとなっている。AD 病因である  $A\beta$  の前駆体タンパク APP もそのような働きがあると考えられているが、詳しくは別紙に記載する。

その他同様の働きを持つ基質としては、DCC がまず挙げられる。DCC は、発達段階に置ける細胞移動や軸索移動に関わる netrin-1 の受容体である(Moore et al., 2007)。マウスの神経芽腫細胞に於いて DCC FL は神経突起伸長を誘発する働きがあるとされているが、一方で過剰量の DCC-ICD は逆に神経突起伸長を阻害し、DCC による細胞間 signaling に抑制的に働くことも示されている(Parent et al., 2005)。

Eph receptor や ligand の ephrin も  $\gamma$ -secretase による切断を受け、シナプス可塑性に重要である。ephrin family の 1 つ ephrinB1 は  $\gamma$ -secretase による切断を受けると、神経伸長への影響が出ると報告されている(Tomita et al. 2006)。一方 EphB receptor はもう 1 つの ligand である ephrinB2 の切断を誘導する。この ephrinB2 の  $\gamma$ -secretase による切断産物である ephrinB2-ICD は cell sprouting に関与するとされているが、同時に過剰量生産されると自身の前駆体タンパクの切断を抑制する傾向があることから、Eph-ephrinB2 signaling システムにおいて抑制性フィードバックを行う機能を有するとされている(Georgakopoulos et al. 2006)。また EphB-ephrinB は細胞接着にも関与していると考えられており、 $\gamma$ -secretase による ephrinB2 cleavage は c-Src を通じた転写調節により細胞基質間焦点接着の形成を調節し、EphB2-ephrinB2 signaling を阻害すると、細胞間接着が脆くなるなどの報告も上がっている(Litterst et al. 2007)(Waschbusch et al. 2009)。EphA に関しては、ephrin によって EphA4 が活性化した時に樹状突起の retraction が起こることが知られていた。しかし一方で、海馬のシナプスに局在する  $\gamma$ -secretase によって産生される EphA4-ICD は Rac signaling を介して樹状突起形成が促進され、シナプス活動が  $\gamma$ -secretase の EphA4 cleavage も促進する効果を持つことから、双方向性の ephrin-Eph receptor signaling は結果的に  $\gamma$ -secretase によって制御を受けており、FL 型が持つ signaling の効果は切断を受けた後に真逆の効果に変わったり無くなったりすると示唆されている(Inoue et al. 2009a)。

細胞接着に関わる基質は、E-cadherin- $\beta$ -catenin 接着複合体が最も有名であろう。E-cadherin が  $\gamma$ -secretase による切断を受けると、この複合体形成が阻害され、接着結合が不安定になることが報告されている(Marambaud et al. 2002)。しかし面白いことに nectin-1 $\alpha$  の場合、PS1 の阻害によって接着結合の不安定化が起こるとされている(D. Y. Kim et al., 2002)。 $\gamma$ -secretase が接着結合の安定化か不安定化のどちらに寄与するのかは、基質によるだろう。

### 1.8.2 基質切断機構

$\gamma$ -secretase は疎水性環境下にある細胞膜内に於いて基質の加水分解を行う aspartic protease である。このタイプに属する protease としては他に例えば SPP が存在する(Weihofen et al., 2002)。SPP は透過型電子顕微鏡とコンピューターによる解析で 22Å の解像度ではあるものの分子内に大きなチャンパーがあることが報告された(Miyashita et al. 2011)。また TFPP ファミリー分子である FlaK の結晶構造も報告され、こちらは膜外に存在すると示唆されるループ領域に活性中心の aspartic acid が存在することが明らかとなった(Hu et al.2011)。この 2 つのタンパクでは 2 つの活性中心 aspartic acid 直下に存在する leucine 残基の相互作用が TMD 間のパッキングに寄与していることが示唆され、PS に於いてもそのような保存性の高い leucine が存在することから、PS の機構にも似たようなことが示唆できる。

一方、Wang らによって Rhomboid のホモログである GlpG の結晶構造が報告されたのを期に様々な Rhomboid ホモログの結晶構造が解析された(Y. Wang et al. 2006)(Wu et al. 2006)(Ben-shem et al.2007)。現在では結晶構造に基づいた解析やシミュレーションなどから Rhomboid が機能発揮に必要な部位の特定、動的挙動や基質特異性を生み出す機構についてもかなり理解が深まってきている(Strisovsky 2013)。これらの解析結果は  $\gamma$ -secretase の切断機構にもかなりの示唆を与えるものである。

元来  $\gamma$ -secretase のような複雑な構造を持つ膜貫通タンパクは、結晶化するのが非常に難しい。特に  $\gamma$ -secretase では、複雑な成熟過程、活性化に脂質が関与していること、Nct の糖鎖付加、溶媒に溶かし込むと subcomplex に分解しやすいこと、PS1 と Aph-1 の isoform の存在、結晶化に必要な量を大量精製するのが困難であることなど、複数の要因が絡み合

い、結晶化による高分解能の構造解析への妨げになっている(H. Li et al., 2009)。しかしながら、ここ数十年の技術革新により試料の急速冷凍、画像記録装置、検出カメラの向上により、cryo-EMによる構造解析が台頭している(Kühlbrandt 2014)。この手法はタンパクの結晶化や同位元素でラベルする必要がない故、天然に近い状態のタンパク試料を直接解析できる強みを持ち、 $\gamma$ -secretaseの解析も急速に進んでいる(Bai, Yan, et al. 2015)(Yang et al. 2018)(Zhou et al. 2019)。

### 1.8.2.1 膜内加水分解機構

加水分解は文字通り水分子を用いてタンパクなどを切断する反応機構である。その為、完全に疎水性である細胞膜内で加水分解機構が働く為には、何らかの形で水分子が入り込む、若しくは親水性のポアが存在している必要がある。一方で、親水性環境下で特異的に反応する MTS 試薬を使った SCAM の検討では、明らかに膜内の配列残基が標識されたことから、親水性のポアが形成されている説が唱えられた(Sato et al. 2006)。 $\gamma$ -secretase と同じ family である Rhomboid でも、細胞外側を向いた大きな V 型の親水性ポアが膜内に存在し、そこに水分子が検出された(Y. Wang et al. 2006) (Wu et al. 2006)(Ben-shem et al.,2007)。この時、細胞外若しくは細胞内側から水分子がアクセス可能な構造を取っていたが、ポアの大きさから開閉口 whichever の構造でも水分子が入りうるとも考察された(Beel and Sanders 2008)。このポアは少なくとも酵素を貫通してはいないとされている。膜内切断は脂質二重膜内で行われるのではなく、酵素そのものが作り出す脂質内の親水性環境下で行われていることが明らかとなった。 $\gamma$ -secretase に於いては、cryo-EM による解析で、 $\gamma$ -secretase 内部に 8-10 nm 程度の、水分子が侵入するとされるポアがあることが発見され、他の膜内切断酵素と変わらず活性中心の presenilin に膜内親水性環境を有することが明らかとなった(Lazarov et al. 2006)。

### 1.8.2.2 基質の親水性環境への移動

膜内切断酵素による分解を受ける場合、元々脂質二重膜内に存在する基質は疎水性環境から親水性環境に移動する必要がある。この動きは、基質などが親水性環境の細胞質で合成されて小胞体上の translocon を介して脂質二重膜に埋め込まれる動きと逆であり、translocon の機構から基質の移動をある程度考察することが可能である。translocon の場合、X 線結晶構造解析から複数の TMD から構成されるポアが脂質二重膜に対して開く lateral gate なる構造をとることが考えられている(Rapoport 2007)。つまり  $\gamma$ -secretase でも酵素内に lateral gate が存在し、基質に対する門の役割を果たしていると考えることができよう。Rhomboid については、幾つかの報告を総合的に考えることによって、TMD5 の傾きが構造により異なることが明らかとなり、最大 35°傾くことによって、そして TMD5 上部の L5 loop が除かれることによって活性中心ポアへの入り口が開くモデルが提唱された(Wu et al. 2006)(Y. Wang et al., 2007)(Vinothkumar et al. 2010)(Strisovsky 2013)。面白いことに TMD5 を強制的に傾ける mutation を導入したところ、*in vitro*での Rhomboid 活性が 10 倍に跳ね上がることも確認されており(Baker et al., 2007)、このモデルを支持している。しかし一方で、mutation や阻害剤の添加によって L5 loop は簡単に不安定化し、TMD5 と L5 loop が繋がっていることを考えると TMD5 の C 末端側が僅かに構造変化しただけで L5 loop の位置関係が変わり得るとい指摘があり、TMD5 自体の動きに大きな重要性があるかについては疑問視する意見もある(Strisovsky 2013)。いずれにせよ、酵素単独の構造から予測されるゲート機構の証明には、基質との関係性の解明が必要である。Rhomboid の場合でも基質と酵素の複合体の解析が試みられているが、結晶化は未だ出来ていないとされる。

$\gamma$ -secretase の場合、SCAM を使った解明や阻害剤を使った検討から、PS1 の TMD2 や 6 が lateral gate としての機能を保持すると考えられている。しかし  $\gamma$ -secretase を一単位として見た時に、基質が最初に結合する部位はこの lateral gate ではない。APP の  $\beta$ -cleavage 産物である C99 を用いた  $\gamma$ -secretase の基質捕捉を調べた検証では、C99 の E3、H6 や A30 がそれぞれ PS1 NTF の膜外領域、Nct、そして Pen-2 に結合する部位であると推定されている(Fukumori and Steiner



2016)。そして、これらの結合が TSA 型 GSI である L-685,458 によって増強することが示されており、活性中心への進入が阻害された為に基質進入 pathway の上流で詰まってしまった結果であると考察されている。即ち、Nct や Pen-2 等がまず基質と相互作用し、活性中心を持つ PS1 が active conformation に構造変化すると基質が酵素内部に誘導されるということである。なお、この 3 箇所残基と  $\gamma$ -secretase との相互作用は、Notch によって阻害されることから、このメカニズムは APP だけでなく、 $\gamma$ -secretase の基質に普遍的に共通するものであると考えられる。

### 1.8.2.3 基質の保持

疎水性環境から入り込んだ基質は最終的に加水分解を受ける為親水性の領域に収まる必要がある。SCAM による解析では TMD2 と TMD8 を除く全ての TMD に親水性環境に面した残基が存在することが確認されているが、親水性環境の分布は基質が入り込む活性中心ポアと 100%の相関があるわけではないようである。そもそも基質は細胞膜に対して 90°直角方向を維持しながら  $\gamma$ -secretase に入り込むのではなく、酵素に保持されて切断を受ける時には多少傾いている(Zhou et al. 2019)。基質の C 末端は PALP motif や TMD1 などとの接触が示されている一方で、N 末端側は TMD2、3、5 や活性中心を含むドメインの間に収まっている。この中で興味深いのは TMD2 であり、SCAM では膜内親水性環境の存在が示されていなかったものの、基質を保持するポアを構成し実際に複数の残基間で基質との相互作用が考察されている。立体構造上で TMD2 は親水性残基の多い TMD3 や活性中心のある TMD6、7 とは多少離れた場所に存在すること、また TMD2 は lateral gate の機能を保持すると考えられていることから、TMD2 は外部から基質を保持し、疎水性環境を保ったまま基質を内部に送り込み安定化していると思われる。更に活性中心ポアには親水性と疎水性の 2 つの領域が存在しており、加水分解に必要な水分子も片側に局在していることも示唆されたことになる。

FAD 変異の局在にもこうした構造上の特徴が強く反映されている。既知の FAD 変異のうち 59 残基は 2 種類以上の変異先が発見されており、これら recurring 変異は元々の残基が酵素活性に重要な役割を持つと考えられている。TMD2 の FAD 変異は helix の片側に局在しているのは先述した通りだが、2 番以外の TMD 以外にも多くの FAD は局在が集中していることが多く、主要な変異は helix の片面を向いている(Hardy and Crook 2001)。更に、同様にポアの内部を向き、基質と相互作用していると思われる残基のほぼ全てで総計 19 個のアミノ酸残基に FAD 変異が同定されている(Zhou et al. 2019)。加え、17 残基がまた別に TMD2 と TMD6 に見られ、これら 36 残基は基質との相互作用、または基質切断時に基質を保持する役割に何らかの支障を来す変異であると推察される。一方、基質との相互作用とは立体的に直接的な関りは無さそうな領域にも recurring 変異は見られ、G206、G209、L174 等が例に挙げられる。こうした残基は構造変化によって間接的な影響を与えるとされ、G206 と G209 は L174 と相互作用することで TMD3 が基質と相互作用する位置が決定されるが変異によってそれが不安定になるとのことである。当研究室でも過去に TMD4 の細胞質側が活性中心に近づくことが基質切断を亢進するとの結果を報告しているが(Tominaga et al. 2016)、Zhou らの cryo-EM による結果は支持する結果となった。

### 1.8.2.4 切断機構

$\gamma$ -secretase は切断活性発揮に 2 つの aspartic acid を必要とし、pepstatin などの一般的な aspartic protease の TSA 型阻害剤によって活性が阻害される報告もあり(Shearman et al. 2000)(Evin et al. 2005)、 $\gamma$ -secretase も古典的 aspartic protease と同じ活性中心を有することが示唆される。しかし一般的な aspartic protease の活性中心である D (T/S) G motif は至適 pH が酸性側であるのに対し、 $\gamma$ -secretase の xGxGD motif は弱酸性~中性であることが報告されている(Li, Lai, et al. 2000)。

$\gamma$ -secretase とその他膜内配列切断酵素との違いは、他にも大きく 2 つ存在する。1 つ目に、他の多くの膜内配列切断酵素は単独で活性を保有するのに対し、 $\gamma$ -secretase は活性中心をもつ PS だけでは活性を発揮できず、Nct、Aph-1、Pen-2 から 3 つのタンパクとの複合体形成が必要不可欠である。2 つ目に、S2P や Rhomboid の基質には配列特異性が存在し、helix 構造を不安定化して切断されやすくする NP や GA などの helix breaking motif を含むことが知られているが (Grishin et al., 2000)(Lemberg et al., 2002)(Urban et al., 2003)、 $\gamma$ -secretase の基質には配列特異性がなく (Beel and Sanders 2008)、helix を不安定化する motif も見られない。その為、 $\gamma$ -secretase は一般的な膜内配列切断酵素とはまた違う特異的な性質を有していることが示唆され、今後  $\gamma$ -secretase 自身の構造解析や切断機構解析の解明が必要になってくるであろう。

一方、長年の研究の蓄積で、基質の切断部位のアミノ酸残基の種類がその後の切断産物の産生に大きく影響を与えることが分かっている。そもそも  $\gamma$ -secretase の活性中心には 3 つの S' pocket が存在し、ここで基質を認識することとされている。これは、tripeptide から構成される TSA 型 GSI を、tripeptide から dipeptide にすると化合物の potency が大きく減少すること、tripeptide から tetrapeptide にしても potency に大幅な変動はないことからそうとされている (Esler et al., 2004)。 $\gamma$ -secretase の主要な基質である APP は 3 残基毎に切断を受けるが、これは S' pocket が 3 つあることに依るところが大きい。そして興味深いことに、構造活性相関解析に依るとこの 3 つの pocket (S1'~S3'とする)の内、S2'に当たる、つまり tripeptide の中央の残基は bulky 度の低い残基でないと potency が低くなることが報告されており、即ち  $\gamma$ -secretase の S2' pocket は S1'と S3'に比して小さいことが想定されている (Esler et al. 2004)。APP の変異体を用いた検討では、S2' 部位に芳香環を持つ残基を導入すると、基質の切断が大きく変化することが報告されている (David M Bolduc et al. 2016)。 $\gamma$ -secretase の基質の多くが芳香環を含むアミノ酸残基を持っており (Notch は膜内配列に 3 箇所)、このことから  $\gamma$ -secretase は S2'に基質の bulky な残基が当てはまらないように膜内配列を認識し、切断を行っていることが推測される。

#### 1.8.2.5 基質の不安定化

疎水性環境である細胞膜内では水素結合を形成するのは非常にエネルギーを要する為、膜貫通タンパクの膜内領域は  $\alpha$ -helix 様の構造をとるとされている。しかし、親水性の protease などは通常  $\alpha$ -helix や  $\beta$ -sheet 内の peptide 結合を切断することは無く、膜内切断酵素が基質を切断するには helix を巻いている基質を解くなどして不安定化させる必要があると考えられてきており (Beel and Sanders 2008)、実際基質の切断直前には切断部位前後計 4 残基程度の helix 構造がほぐれ、直後の領域が  $\beta$ -strand 構造を取り酵素によって安定化を受ける構造が解かれている (Zhou et al. 2019)。

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、側鎖の小さい glycine (Urban and Freeman 2003)、及び水素結合を形成できない proline (Nilsson et al. 1998) は helix 構造を不安定化させることが知られている。それに加え、proline 残基の導入で非基質を rhomboid の基質に変化させることに成功したり (Moin and Urban 2012)、深紫外先端増強ラマン散乱と分子動力学シミュレーションを用いた最近の研究では、膜内配列切断酵素の 1 つである GlpG rhomboid の基質の proline 残基が切断を受ける際に基質の helix 構造を解くのに重要であり、alanine に置換すると切断活性が減少することを見出している (Brown et al. 2018)。更に、基質の切断部位付近は 3 残基で一周する  $3_{10}$ -helix を形成しており、このタイプの helix が通常の  $\alpha$ -helix よりも不安定であることも重要であるとしている。しかし、同じ膜内配列切断酵素であっても  $\gamma$ -secretase の基質 C99 には proline がなく、glycine 残基も切断部位には存在していない。加え、配列特異性の低さのある為、 $\gamma$ -secretase にこの理論がそのまま適応できるかは未だ定かでないと思われる。

#### 1.8.2.6 基質特異性

GSMは $\gamma$ -secretaseの様々な基質の中でも $A\beta$ の産生のみに影響し、 $A\beta$ 種の産生比率を変動させる(Xia 2019)。過去の検討よりGSMは基質C99には結合せず、 $\gamma$ -secretaseの中でも主にPS1のみに作用することが判明している為(Ohki et al. 2011)(Takeo et al. 2014)(Cai et al. 2017)、基質側のみならず $\gamma$ -secretaseの中にも基質特異性や選択性を決定する要素があり、GSMは直接的若しくは間接的に作用することで $A\beta$ 切断のみに影響を与えることが出来ると考えられる。

HL1...GongらはHL1領域(残基101から132まで)をいくつかのセグメントに分けてalanine置換や欠損型変異体を作成し、それぞれの基質の切断を評価したところ、APP、Notch、N-cadherinの切断がそれぞれ特異的に抑制されることを見出した(Gong et al. 2010)。HL1は様々な先行研究により基質を認識する部位であることが示唆されている。しかしながら、興味深いことにそのような基質選択性を与える変異体を用いても基質と共に免疫沈降されてくるため、少なくとも基質と $\gamma$ -secretaseは複合体を形成していることが分かる。つまり、これらの変化は基質結合部位のみならず、遷移経路か活性中心にも影響を与えていることが示唆されている。

基質特異的に認識する残基...とあるアミノ酸残基が一部の種類の基質しか相互作用しないか結合しないならそれは確実に基質特異性や選択性に繋がる。興味深いことに、認識対象の基質が異なる残基がこれまで様々な場所に特定されてきた。

TMD1のV82とL85が基質と相互作用すると考察されており(Takagi et al. 2010)、F86のcysteine置換体PS1が $A\beta$ 産生とE-cadherin切断の大幅な減少を認めたのと共に、Notch切断は保持されていたことも確認された(Takagi et al. 2010)。一方でL85はAPPのみと相互作用し、Notchとは結合しないとの考えられている他、基質C99のM722が入り込むポケットを形成している(Zhou et al. 2019)。このことから基質特異性の鍵はL85残基であると考えられ、F86のcysteine変異体の結果はアロステリックにL85に影響を与えた可能性が高い。なおZhouらの結果は $\epsilon$ 切断直前のモデルを示している為、 $A\beta$ が切り進められる時のL85の役割を議論することはまだできない。しかし、同じポケットが $\gamma$ 切断を行う際に周囲の残基を捕捉しているならば、L85の相互作用が $A\beta$ の多段切断を可能にしている可能性もある。

TMD7には保存性の高いxGxGD motifが存在しており、xにはPSの場合leucineが当てはまる。このL383には基質選択的に切断阻害効果を発揮する変異が複数(主にprolineや芳香環を持つ残基)報告されている(Yamasaki et al. 2006)(Kretner et al. 2013)。xGxGD motifの中で基質と直接的な作用を持つ残基はG384である為(Zhou et al. 2019)、L383は構造を著しく破壊する変異が入ることで隣のG384の位置関係を大幅に変え、基質選択性を発揮すると考えられる。奇しくもG384と相互作用するのはC99ではT719、NotchではG1753であり、bulky度の小さいglycineが構造変化後のG384と相互作用することが出来たので、 $A\beta$ 切断が保持されたままNotch切断が失われるのであろう。

C99との相互作用のみに関与する残基として他にはTMD2のT147とHL6のI287が報告された(Zhou et al. 2019)。T147はM146とL268と一緒にポケットを作り、C99のI718がそのポケットに入り込んでこれらの残基と相互作用するとされている。APPとNotchの立体構造を比較すると、I718の位置はNotchのF1748とG1751の間であり、残基の表面が若干突出している構造である。T147との特異的な相互作用はこうした構造の差から生み出されている可能性もある。一方I287を含む領域(I287から4残基)はC99が $\epsilon$ 切断を受ける直前に $\beta$ -sheet構造を取り、C99のC末端部分を安定化する作用を持つ。ただI287がどこと相互作用しているかはまだ定かではない。

一方、Notchのみと相互作用する残基は多く同定されている(Zhou et al. 2019)。M139やV236等の例外もあるが、TMD3(i.e. I168、L173、F176、F177)やC末端領域との相互作用部位(i.e. L150、V261、V272)に殆どが集中する。しかし、これらの候補残基が必ずしもAPP、ひいてはC99と相互作用しないと決めつけることはできないであろう。1つにZhouらの発表した $\gamma$ -secretase-substrate複合体はinitialな $\epsilon$ 切断が発生する直前のものであり、 $\zeta$ と $\gamma$ 切断が進むにつれて酵素側の構造変化が発生する可能性がある。2つ目に切断回数の問題がある。C99は合計4、5回の切断を受けることになる一方、Notchは1回若しくは2回である(Tetering and Vooijs 2011)。切断回数が増えれば、全切断が終わるまで基質を強固に保持する為により強い相互作用が必要になるのが自然な考察である。 $\epsilon$ 切断から $\zeta$ や $\gamma$ 切断へ移行する際に基

質との相互作用部位が大幅に変わることは十分あり得るだろう。3 つ目に、Zhou らが同定した Notch のみに相互作用する残基全てに FAD 変異が見つかっている(Campion et al. 1999)(Rogaeva et al. 2001)(Wallon et al. 2012)(Sassi et al. 2014)(Sun et al., 2016)。厳密に言えば V236 には FAD 変異ではなく、V236S という A $\beta$ 42 を減らす変異ではあるが(Cai, Morishima, et al. 2019)。変異が allosteric に構造変化を起こし、C99 との特異的結合部位に影響を与えている可能性も否定は出来ないが、A $\beta$ 42 を産生する  $\gamma$  切断の過程に於いて C99 の切断に影響を直接的に与えることを同等に示唆するものであり、 $\epsilon$  切断時と  $\gamma$  切断時に基質との相互作用部位が大きく異なる可能性は依然として考えても良いであろう。

### 1.8.3 金属イオンとの関与

#### 1.8.3.1 重金属イオンとの関与

金属イオンのうち、特に Cu<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>はグルタミン酸作動性シナプスで neuromodulator として機能することが知られており(D. Wang et al., 2002)(Frederickson et al., 2005)、その為 A $\beta$  と Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>がシナプス近傍に共局在し、A $\beta$  の凝集にこの 2 種の重金属が関与していることが考えられてきた(Duce et al., 2010)。Greenough らは PS1-と PS2- MEF cell を用いた検討で Cu<sup>2+</sup>の細胞内取り込みが減少していることを示し、同時にこの作用が PS1 の方が強く保持していること、また活性中心 mutation であり  $\gamma$ -secretase 活性を完全に消失させる D385A mutation PS1 を PS1- MEF cell に発現させてもある程度の Cu<sup>2+</sup>細胞内取り込みが回復したこと、DAPT の添加で取り込み量に変化は無かったことなどから、この機能が PS 由来で  $\gamma$ -secretase 活性とは無関係であることが示唆された(Greenough et al. 2011)。Zn<sup>2+</sup>については、PS1-/PS2- MEF cell に野生型 PS1 を発現させた時に取り込みが同様に回復することを確認しているが、Cu<sup>2+</sup>とは違って PS1 単独発現では十分な回復が見られなかったことから Zn<sup>2+</sup>細胞内取り込みは PS2 の関与も大きく、また D385A mutation PS1 の発現では Zn<sup>2+</sup>の取り込みは回復しなかった(Greenough et al. 2011)。さらに彼らは PS1- MEF cell に於いて superoxide dismutase 1 (SOD1)の活性が下がることをも示している。SOD1 は細胞内に発生した活性酸素を分解する酵素である(McCord et al., 1988)。ヒトでは SOD1~SOD3 の 3 種類を持ち、内 SOD1 は intracellular に発現し、金属補因子として Cu<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>を必要とする(Sea et al. 2015)。この SOD1 の活性低下は、補因子として必要な 2 種の重金属イオンが不足しているからではなかった、と言うのも Cu<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>の basal level が PS の欠損によらずほぼ一定だった為、turnover 全体が slow down していることが考えられたからだ。その代わり、Cu<sup>2+</sup>を取り込む copper chaperon of SOD1 (CCS)の発現は PS double knock out MEF cell に於いて著しく低下しており、これが直接的な原因だと見られる。結果的に金属イオンに直接的に作用して AD 病態に寄与しているわけでは無かったが、CCS の減少が BACE による  $\beta$  切断を促進し A $\beta$  産生量を上昇させることが示唆されていることから(Gray et al., 2010)、PS の活性低下が CCS を減少させ、BACE を通じた A $\beta$  産生量上昇に繋がるのが考えられる。なお、FAD mutation である M146V、M146L はそれぞれ oxygen radical production の上昇と脳内 SOD1 活性の低下が確認されており、この残基が機能の発揮に重要であることが考えられよう(Guo et al. 1999)(Leutner et al. 2000)。

#### 1.8.3.2 Ca<sup>2+</sup>との関与

細胞内の Ca<sup>2+</sup>量が増加するにつれて A $\beta$ 、特に A $\beta$ 42 の産生量が増加することが知られていた(Querfurth et al., 1994)。最近の研究では、GFP と RFP を PS1 の両端に結合させた合成タンパクと用いた解析により、glutamate や KC1 による刺激で電位依存性カルシウムチャンネルが脱分極して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると PS1 がより“closed”な構造をとることが明らかとなっている(Kuzuya et al. 2016)。予てよりこの PS1 の閉じた構造は A $\beta$ 42 産生比率時に見られていた構造であり(Lleó et al. 2004)(Berezovska et al. 2005)(Uemura et al. 2009)、A $\beta$ 42 の産生との関連は既報に沿っている。しかし、A $\beta$ 42 の産生と Ca<sup>2+</sup>濃度の関係性は不明な点が多かった。Kuzuya らは Synaptotagmin 1(Syt1)に着目することで、この

謎を明らかにした。Syt1 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に synaptic vesicle(SV)の exocytosis を調節しているタンパクである(Brose et al., 1992)。このタンパクは  $\gamma$ -secretase の基質ではないが、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的 PS1 NTF に結合し、PS1 を modulate することが示された(Kuzuya et al. 2016)。なお、Syt1 KD PC12 細胞を使った検討の結果 APP CTF の量も減少していたことから、Syt1 は  $\alpha$  や  $\beta$ -secretase にも影響を与えていることが考えられる。以上の結果から考えると、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上がり Syt1 の結合量が上昇すると PS1 は”closed”な構造をとるようになって  $\text{A}\beta_{42}$  産生比率が上昇するというのが妥当なメカニズムであろうが、なんと Kuzuya らは同時に Syt1 KD PC12 細胞に於いて PS1 がよりコンパクトな構造をとり、且つ  $\text{A}\beta_{42}$  産生比率が上昇すると言う真逆の結果も得ている。Syt1 に関してはある一定の適度な量の存在が PS1 の”open”な構造の維持に必要なのであろう。

## 1.8.4 活性中心 PS の代謝

### 1.8.4.1 PS 断片化

$\gamma$ -secretase の活性中心サブユニットである PS を培養細胞に発現させると、N 末端断片 (N-terminal fragment; NTF) と C 末端断片 (C-terminal fragment; CTF) が観察できる。内因性には PS の大部分は NTF 及び CTF の形で存在しており、FL はほぼ検出されない(Thinakaran et al. 1996)。これは PS FL が ER で合成された後に  $\gamma$ -secretase 構成因子と複合体を形成し、presenilinase によって HL6 で分子内切断を受けて生成すると考えられている。FAD に連鎖した PS mutation の内、exon 9 を欠損した  $\Delta$ exon 9 mutation は PS の分子内切断部位を欠損しており、これは FL として存在することが確認されている(Prihar et al. 1999)。また、これとは別にアポトーシス刺激などによって通常よりも C 末端側よりに切断を受けることもあり、この切断が caspase 3 に依存するものであることも報告されているが、生理的意義は不明である(T. Kim et al., 1997)。

Presenilinase 活性を担う酵素の実態は不明である。しかし、pepstatin A の阻害剤により阻害がかかるがその他の protease 阻害剤では阻害されないこと、この阻害能には aspartic protease の遷移状態を模倣した残基を必要とすることなどから、presenilinase は aspartic protease であると考えられている(Campbell et al., 2002) (Campbell et al., 2003)。とは言うものの、TSA 型 GSI が presenilinase を阻害し、PS FL の蓄積を引き起こすことも知られている一方で、TSA 型 GSI 以外は  $\gamma$ -secretase 活性を阻害するが presenilinase 活性に影響をほぼ与えないことが多く、presenilinase は  $\gamma$ -secretase そのものである autoproteolysis 説は議論の余地が残っている(Beher et al. 2001)。逆に  $\text{A}\beta$  や AICD の産生よりも presenilinase 活性を強く阻害する GSI も報告されており、presenilinase は  $\gamma$ -secretase と同様の活性中心を持つ aspartic protease の特徴を有する一方、生化学的相違も見られる。

### 1.8.4.2 PS NTF/CTF heterodimer

免疫共沈降の実験から、PS NTF と PS CTF は 1:1 で安定に相互作用し、heterodimer を形成していることが明らかにされている(Seeger et al. 1997)(Capell et al. 1998)。この heterodimer の形成に関して、人為的に発現させた PS NTF は内因性の heterodimer には組み込まれないこと、PS1 NTF と PS2 CTF、若しくは PS2 NTF と PS1 CTF も heterodimer を形成することが可能で、 $\gamma$ -secretase 複合体に組み込まれることも明らかにされた(Ratovitski et al. 1997)(Saura et al. 1999)(Strömberg et al. 2005)。先述の通り、現在では 4 つの構成因子が  $\gamma$ -secretase 複合体を形成した後に PS が分子内切断を受け、それに連続して NTF/CTF heterodimer を形成すると考えられている。

この断片化 PS は非常に安定である。cycloheximide 処理によってタンパク合成を阻害した培養細胞内に於いて、PS NTF/CTF heterodimer は 24 時間以上安定に存在するのに対し、PS FL は半減期約 1 時間程度で分解される(Kim, Pettingell, Hallmark, et al. 1997)(Ratovitski et al. 1997)(Steiner et al. 1998)。また、培養細胞に PS NTF、PS CTF の

みを発現させても安定化されず  $\gamma$ -secretase 活性は持たないこと、分子内切断部位を欠損、変異させた PS は断片化しないものの一部は安定化を受けて  $\gamma$ -secretase 活性を有していることなどが報告され、現在では PS の安定化は分子内切断に先立って起こる事象であり、活性に必要であると考えられている (Jacobsen et al. 1999)(Steiner, Romig, Pesold, et al. 1999)(Tomita et al. 1999)(Saura et al. 2000)。安定性は Nct/Aph-1 サブコンプレックスによって獲得されると想定されているが、詳細は不明である。

培養細胞に PS を過剰発現させると、PS FL は大幅に上昇するが PS NTF、PS CTF の量はほぼ上昇せず、その量としては一定に保たれ  $\gamma$ -secretase 活性の上昇もほぼ観察できない。更にこの時内因性の PS NTF と PS CTF の量は減少し、外因性 PS が内因性 PS を置換していると示唆されることから PS の replacement 現象と呼ばれる (Thinakaran et al. 1996)(Thinakaran et al. 1997)。置換される程度は外因性 PS の発現量に依存し、断片化 PS の量はタンパクレベルで制御を受けていることから、PS には断片化 PS の形成や維持に関わる因子が存在し、それが一定量である限り断片化 PS 量が規定されるだろうと考えられた。なお、この因子と結合した PS のみが安定化し、それ以外は迅速に分解される。現在では、断片化 PS の安定化因子として Pen-2 が明らかとなっている (Prokop et al. 2004)。

#### 1.8.4.3 PS 断片化の意義

断片化 PS が生体内での主要な分子種であること、断片化 PS は安定であり長い寿命を持つこと、PS NTF と PS CTF 量が厳密に規定されていること、そして  $\gamma$ -secretase 複合体には PS FL は存在せず断片化 PS のみが組み込まれるなどと言った知見から、PS FL は未成熟型であり、断片化 PS が成熟型で機能を持つと考えられよう。とは言うものの、 $\Delta$ exon 9 mutation や M292D などの PS 自己断片化部位を欠損、変異した mutation でも一部は安定化を受けて複合体に組み込まれ、 $\gamma$ -secretase 活性を有することから、断片化自体に活性化反応としての働きは無いと考えるのが妥当である (Steiner, Romig, Pesold, et al. 1999)(Steiner, Romig, Grim, et al. 1999)。一方、PS 自己断片化部位を含む exon 9 部分のペプチドが  $\gamma$ -secretase を基質と競合的に阻害することが報告されている (Knappenberger et al. 2004)。つまり、exon 9 部分が  $\gamma$ -secretase の基質結合部位に結合し auto inhibition が起きる為、断片化によってこれを回避しているという説が唱えられている。この場合、 $\Delta$ exon 9 mutation では exon 9 が欠損しているため、M292D mutation では exon 9 部位の構造変化等によって auto inhibition が発生せず、それぞれ FL として活性を持ち得ることが考えられる。断片化された状態の PS それ自体が活性に必要であるかは議論の余地があるが、少なくとも断片化を含め、自己断片化部位の活性獲得に伴う構造変化が  $\gamma$ -secretase の基質切断機構に関与していることは間違いないだろう。

#### 1.8.5 糖鎖付加

$\gamma$ -secretase の構成因子の中で糖鎖付加を受けるのは Nct だけであるが、PS1/2 は直接的若しくは間接的に他のタンパクの糖鎖付加を制御することが指摘されている。例えば PS1 欠損細胞では lysosome の pH 値の上昇や autophagy 関連タンパクの分解が阻害されるなどの現象が確認されており、これが V-ATPase V0a1 の糖鎖付加が低下したり ER で捕捉されることによるものであると考えられている (Lee et al. 2010)(J. Lee et al., 2015)。しかしながら、PS1 が V0a1 の糖鎖付加と autophagy とは無関係だとする報告も挙がっている為、未だ結論には至っていない (Z. Zhang, Garbett et al., 2012)。

#### 1.8.6 細胞内局在

細胞内で合成されたタンパク質は様々な器官を通じて細胞の各所に輸送されていく。新規に合成されたタンパク質は COP I、COP II 被覆小胞に入って小胞体膜、小胞体の順に通過し、ゴルジ体で糖鎖修飾を受け、その後分泌経路に入る。ゴルジ体から輸送されるタンパク質の行き先は複数存在する。その内分解経路に進む場合、late endosome に transgolgi

network から clathrin 被覆を持つ輸送小胞によって運ばれ、その後 lysosome へと送り込まれる。lysosome 内は  $H^+$  pump の影響で pH は 5 付近に保たれており、pH 5 付近で最大活性を示す加水分解酵素によってタンパク質を分解する。一方、細胞表面から細胞内部の lysosome へと向かう経路の始まりは endocytosis であり、endocytosis は細胞外タンパクを取り込んだ後 early endosome になる。early endosome に於いて、後に加水分解酵素となる前駆体タンパク zymogen が外部から送られてくるが、内部 pH が 6 程度であり、不活性状態にある為、endocytosis で取り込んだタンパクの選別が行われる。分解経路に進む場合はそのまま endosome 内に残って late endosome の段階に進むが、再利用される場合は recycling endosome として early endosome から分離した後細胞膜まで輸送される。また第 3 の経路として trans golgi network から secretory vesicle を介して細胞膜へと輸送する経路、または特別なシグナル無しに直接細胞膜へ輸送される経路が存在する。

免疫染色の結果から、活性型  $\gamma$ -secretase の多くは late endosome と lysosome に局在することが分かっているが、clathrin assembly lymphoid myeloid (CALM) を欠損させると  $\gamma$ -secretase が細胞膜表面に集まってくる (Kanatsu et al. 2014)(Kanatsu et al., 2016)。また、CALM 内の ANTH domain が Nct と相互作用しており、 $\gamma$ -secretase の細胞内局在は CALM によって制御されていると考えられている。

PS には 2 つの isoform、PS1 と PS2 が存在する。PS の分布は広く ER や golgi 体を始め(Annaert et al. 1999)、細胞膜 (Marambaud et al. 2002)、endosome(Vetrivel et al. 2004)、lysosome(Pasternak et al. 2003)、mitochondria(Ankarcrona and Hultenby 2002)等に発現が確認されている。内 PS1 は細胞内部の様々な小器官、特に golgi 体や細胞膜、endosome での局在が最も多く見られる一方、PS2 は late endosome, lysosome に局在する(Sannerud et al. 2016)。これは primary neuron 細胞や脳細胞に於いても同じである。PS2 の endosome での局在は 19 番目の serine のリン酸化によってコントロールされていることが分かっている他、PS1 は CTF 側の loop、PS2 は NTF 側の loop にリン酸化部位を持つが、後者 2 つの局在への関与はまだ不明な点が多い(Sannerud et al. 2016)(Oikawa and Walter 2019)。更に、PS1 の FAD mutation の phenocopy を PS2 に導入したところ、PS2 の局在が更に late endosome と lysosome 寄りになったとの報告がある (Sannerud et al. 2016)。PS2 を含む  $\gamma$ -secretase は PS1 の場合より A $\beta$ 42 の産生比率が高いことから、late endosome や lysosome では A $\beta$ 42 の産生量が増加するという見解があり、こうした compartment への輸送を担う CALM を欠損させると A $\beta$ 42 の産生比率が減少する(Kanatsu et al. 2014)。late endosome と lysosome は先述の通り pH が低いが、*in vitro* 実験で pH を下げても A $\beta$ 42 産生比率が増加した。また、PS2 は細胞内に、凝集性の高い A $\beta$ 42 が集まった A $\beta$  pool が形成される原因であるとも報告された(Sannerud et al. 2016)。

## 1.9 $\gamma$ -Secretase inhibitor

amyloid cascade 仮説に基づいて A $\beta$  の蓄積を阻害する為、まず標的となったのは A $\beta$  の産生経路である。創薬業界では当初、A $\beta$  の C 末端側の切断を行いその凝集性を決定する酵素である  $\gamma$ -secretase に注目し、その活性を阻害する GSI の開発に躍起になった。開発時系列ごとに第 1 世代、第 2 世代の阻害剤に大別される。

### 1.9.1 第 1 世代の GSI

#### 1.9.1.1 Transition-state analogue 型 GSI

transition-state analogue (TSA)型阻害剤はその名の通り、酵素の遷移状態に入り込み、その構造を固定することで阻害能を示す阻害剤である(図 11A)。その作用メカニズムは酵素の遷移状態によって様々であり、基本的に構造は酵素ベースで変わってくる。即ち、TSA 型阻害剤の嵌まり込んだ状態の酵素は、活性発揮一步手前であることが伺え、その酵素の性

質等を議論する上で非常に有用な化合物である。 $\gamma$ -secretase に関して話せば、当初 cysteine protease である calpain の阻害剤が  $\gamma$ -secretase を阻害し、 $A\beta$  分泌を阻害したという報告がなされた(Klafkia et al. 1995)(Higaki et al. 1995)。その後、プロテアソーム阻害剤や MG132、ALLN といった化合物でも  $\gamma$ -secretase 阻害能を示すことが報告された(Abramowski 1996)(Yamazaki et al. 1997)が、いずれも本来のターゲットより遥かに高濃度側に  $IC_{50}$  を持つことから、これらが  $\gamma$ -secretase に直接作用するという決定的根拠がないまま数年すぎることになる。さらには、calpain 阻害剤である ALLN に関しては、高濃度で  $A\beta$  産生を減少させるにも関わらず低濃度側では逆に  $A\beta$  産生を増加させるという報告も出ており、これは ALLN による分解経路の阻害で C100 が増加し、結果的に  $A\beta$  の産生増加につながるという考察がなされ、 $\gamma$ -secretase との関りは一度途切れることになる(Zhang, Song, and Parker 1999)。

1998 年に、APP の  $\gamma$  切断部位のアミノ酸配列を元に、aspartic protease の遷移状態を模倣した、difluoroketone 構造を有する MW167 が開発され(Wolfe et al. 1998)、当初これは serine と cysteine protease を阻害すると考えられたが、この誘導体から  $\gamma$ -secretase は S1 ポケットを有しており、特異性の低い aspartic protease であることが示された(Moore et al. 2000)。その後 Merck 社の Shearman らはかの有名な L-685,458 の開発に成功する(Shearman et al. 2000) (図 11B)。この化合物は HIV-1 aspartyl protease 阻害剤のエピマーであり、aspartyl protease の遷移状態を模倣する。阻害様式は、構造中の hydroxyethylene isostere が酵素活性中心の aspartic acid に結合することであるが、その光学異性体は阻害能を持たない(Shearman et al. 2000)。さらに、L-685,458 の N 末端側が PS1 CTF に、C 末端側が PS1 NTF へ結合し、活性型の PS のみへの結合を認めることも既報にある(Li, Xu, et al. 2000)。一方、L-685,458 は serine protease の trypsin や cysteine protease の calpain は阻害しない。また、引き続き開発で、hydroxyethylene 構造を持つ 31C や(図 11C)、構造を異にする BrA-1 などが報告され(Esler et al. 2000)、かつ aspartic protease の 1 つ pepsin の TSA 型 GSI として開発された pepstatin が  $\gamma$ -secretase 阻害能を有することより、 $\gamma$ -secretase は新規 aspartic protease であることが 2000 年前半で結論付けられることになった。

L-685,458 の属する hydroxyethylene dipeptide 型阻害剤には、hydroxyethylamines 型と hydroxyethylureas 型の 2 種類がある。L-685,458 自体は前者に属する。hydroxyethylureas 型は hydroxyethylamines 型と非常に似通った基本構造を有しているが、Esler らは hydroxyethylamines の chiral な炭素原子を achiral な窒素原子に置き換えることで hydroxyethylureas 型 GSI を初めて創出した(Esler et al. 2004)。さらにその直後、L 体よりも D 体の方がより potency の高いことを発見した(Bakshi and Wolfe 2004)。一般的に hydroxyethylamines 型に比べると hydroxyethylureas 型の方が化学合成しやすいため、 $\gamma$ -secretase の構造を解析するにあたって様々な GSI がデザインされた。

### 1.9.1.2 Dipeptide 型 GSI

dipeptide 型阻害剤の歴史は 2001 年に始まる。Elan 社によって 2 万以上の化合物スクリーニングが行われた結果、新規の阻害剤として DAPT が報告された(Dovey et al. 2001)。DAPT はその阻害剤種の名前の示す通り、分子内にペプチドを 2 つもつ(図 12A)。活性には phenylglycine と difluoro phenylacetic acid が必要であることが確かめられており(Dovey et al. 2001)、光親和性標識実験の結果によってその標的は PS1 CTF に存在することが分かっている(Morohashi et al. 2006)。その次に開発されたのは Compound E であろうか(図 12A)。DuPont 社から報告されたこの化合物は DAPT と構造が類似しており、ペプチドを 2 つ所有する、difluorophenyl 基を保持することが特徴すら共通していた(Seiffert et al. 2000)。ところが興味深いことに DAPT とは異なり、Compound E、およびその後開発された DBZ については、直接標的は PS1 NTF である(Fuwa et al. 2007)。これはすなわち活性発揮に必要な構造と結合部分は全く別であり、DAPT のそれは PS1 CTF に親和性を持ち、Compound E などは逆に PS1 NTF に親和性を持ったと伺える。また仮に両者ターゲットとする PS1 の部分(実際に阻害能を示す相手としての)が同じであれば、結合部位もその近傍に位置し、かつそれは PS1 構



造上 NTF と CTF が近接している場所でもあるということである。なお、最近の研究結果より、Compound E は initial substrate-binding site に結合することで、酵素の基質との結合を阻害するという作用機序を持つと考えられている(Li et al. 2014)。

一方、一時的に実用性への希望(阻害剤の衰退については後述参考)を初めて持たせてくれた阻害剤もこの種類である。2003年に Eli Lilly 社により、Caprolactam 骨格を有する LY411575(別名:Compound 1)が開発された(Lewis et al. 2003)。この誘導体 DBZ は LY411575 と共に *in vivo* で脳内 A $\beta$  レベルの低下が観察されたが、残念ながら Notch シグナルの抑制も認められた(Wong et al. 2004)(Lanz et al. 2004)。しかし mouse への投与実験では、投与量をうまく調節すれば副作用を抑えつつある程度の A $\beta$  産生阻害効果を発揮出来ることが示され(Hyde et al. 2006)、A $\beta$  産生阻害量域と Notch 切断阻害量域に差があり、その差が大きければ実用化が可能であることを見出すことになる。その後 LY411575 の誘導体である LY450139 (図 12A)が semagacestat として臨床治験 Phase I・II 試験に進み、CSF 中の A $\beta$  の有意な変化はなかったものの、血漿中と脳脊髄液中の A $\beta$ 40 の低下がみられ、副作用として軽度の腹痛、下痢、消化管出血などが報告された。しかし引き続き Phase III 試験において、投与群に不可逆的な認知機能の低下、および皮膚がんのリスク上昇が認められたことから、開発の中止が言い渡された(Extance et al., 2010)(Doody et al. 2013)。GSI は Notch 切断も阻害し、それが皮膚がんのリスク上昇につながると言う認識は、この治験結果から来ている。なおこの認知機能の低下は、C99 の蓄積(Mitani et al. 2012)若しくは EphA4 切断の阻害(Inoue et al. 2009b)が関わっていることが考えられている。

補足であるが、compound E の結合した  $\gamma$ -secretase は大きな構造変化を起こし、通常は界面活性剤 DDM0.5% で十分可溶化できる量の  $\gamma$ -secretase が耐性を獲得することが報告されている(Li et al. 2014)。これは Compound E の結合によって複合体の構成因子がより近傍に位置し、締まった構造をとるようになる事によるものだと考えられている。

### 1.9.1.3 Benzodiazepine 型 GSI

Merck 社の Churcher らは high throughput screening (HTS)において、強い活性を持つ benzodiazepine 型 GSI を発見した。この GSI は structure-activity relationship (SAR) study で C-5 carboxamide グループが強い活性発揮に必要な構造であることを見出している(Churcher, Ashton, et al. 2003)。Castro らは SAR study により benzodiazepine 型 GSI の 354531 を見出した(John' L Castro et al. 2004)。この化合物は C-5 phenyl-cyclopentyl dioxidegun 群を含み、極性を増大させて *in vivo* の吸収率を上げている。さらに化合物内に含まれる N-1 carboxamidomethyl の一部の構造が高い potency を齎し、バイオアベイラビリティの向上に貢献していると報告され(Owens et al. 2003)、C-4 carboxamide を除き、C-3 の側鎖に代わりに 4-fluorophenyl 群を導入し、塩素原子をフッ素原子に置き換えた化合物はさらに高い potency を有し、membrane 透過性も良いとのデータもある(Churcher, Ashton, et al. 2003)。

全体的に benzodiazepine は非常に高い potency を有し、既存の GSI の中で最も強力なものの 1 つはこの種類に含まれている。Merck 社により報告されている GSI XIX が、培養細胞系における IC<sub>50</sub> は驚きの 60pM をたたき出している(Churcher, Williams, et al. 2003)。

### 1.9.1.4 Aib peptide 型 GSI

Das らは、APP の膜内配列で A $\beta$ 40、42 の切断部位付近の配列に、 $\alpha$ -helix を誘導する  $\alpha$ -aminoisobutyric acid(Aib)を複数導入した pep15 が、GSI の機能を持つことを報告した(Das et al. 2003) (図 12B)。その後 pep15 の valine と Isoleucine を D 体に変え、phenylalanine を threonine に置換した pep11 (図 12B)についても  $\gamma$ -secretase 阻害能が観察され、FLIM を用いた検討から Aib ペプチド存在下で APP と PS との結合が失われていることから、このタイプの GSI は基質結合部位を標的とすることが考えられた(Das et al. 2003)。一般的に Aib peptide 型 GSI は D 体が L 体に比べて同等以上の

potency を有することが多い(Das et al. 2004)。また同じエナンチオマー内ではペプチド鎖数による potency の違いが報告されており、ペプチド鎖数が 10 から 16 の間で  $\gamma$ -secretase 阻害能を観察できる。なお、より活性の高い D 体では 13 アミノ酸のものが IC<sub>50</sub>140pM という高い potency を獲得している(Das et al. 2004)が、Aib ペプチド型 GSI も Notch 切断の阻害から、臨床治験を行う前に AD 治療薬目的の開発は断念されてる。

Aib peptide 型 GSI は基質結合部位の探索に用いられることが多い。benzophenone を含む非天然アミノ酸 p-benzoyl L phenylalanine(Bpa)を導入したプローブが PS NTF を標識すること、およびこの標識が TSA 型 GSI の共存下で阻害されないことから、基質結合部位が活性中心とは別に存在することが示された(Kornilova et al. 2006)ことが事の始まりである。また、この pep15 を用いた数々の標識実験の結果で結合部位であると示唆される PS の領域が複数存在することが確認され、基質はストレートに活性部位に入っていくのではなく、PS の様々な部位を辿って最終的に活性部位に嵌まり込んで切断を受けるという説が支持されるようになってきた(Takagi et al. 2010)(Takagi-Niidome et al. 2015)。

#### 1.9.1.5 部分ペプチド型 GSI

ペプチドを模したという点では、このタイプの GSI も Aib ペプチド型 GSI と似ている。AstraZeneca 社の Scott らは、TMD6 から始まる膜外領域である HL6 にまたがる exon 9 領域のうちの 30 アミノ酸ペプチドが、*in vitro* assay 系に於いて GSI 能を持つことを明らかにした(Knappenberger et al. 2004)。この研究結果で、ペプチドが競合型阻害様式を示し、かつ TSA 型 GSI との結合競合が確認されなかったことから、結合対象が基質結合部位の 1 つであると考えられた。

さらに似たような研究で Strooper のチームは GST 融合リコンビナントタンパクを用いたところ、基質結合部位として PS1 の TMD1 と TMD2、及び PS の最 C 末端が候補に挙がることとなる(Annaert et al. 2001)。

#### 1.9.1.6 第 1 世代の GSI の副作用

現在まで、 $\gamma$ -secretase の基質として知られている膜タンパクは 90 を超えている(Deyts et al. 2016)。A $\beta$  の前駆体タンパクである APP(C99)以外にも、細胞分化や正常発生にかかわる Notch、細胞接着分子である Cadherin、ニューレグリン受容体ファミリーで上皮成長因子の ErbB4 などが有名どころである。GSI の AD 治療目的としての利用を一層不可能に近づけているのは、この基質の多さに由来するところが多く、即ち単純な  $\gamma$ -secretase 阻害は A $\beta$  の産生を阻害するだけでなく、生体維持に必須なその他タンパク分泌やシグナル伝達をも阻害してしまうということである。Notch は神経や造血、血管や上皮細胞など広く分布する、遺伝子調節を担うタンパクであり、その阻害の結果実に多様に富んだ副作用を被ることとなる。報告されているものでは、免疫異常(Hadland et al. 2001)、大腸癌リスク上昇(Vinson et al. 2016)、T 細胞胸腺細胞の分化異常(Doerfler et al. 2001)など、多岐に渡る。実質ヒトで出たものとしては、前述した LY450139 の Phase III 相試験の敗北の原因となった、健常者 AD 患者無差別的に認められた腹痛、下痢、消化管出血、腸閉塞などが挙げられ、いずれも Notch 切断の抑制によるものであると考えられている(Fleisher et al. 2008)。その為、今後 AD 治療薬を使用主目的とした創薬開発には、APP 切断のみを対象とした阻害薬の開発が避けられない。

### 1.9.2 第 2 世代の GSI

#### 1.9.2.1 Sulfonamido 型 GSI

GSI の不可避な副作用に希望の光を照らしたのが第 2 世代の GSI 達である。共通の特徴として、APP への選択性がある、若しくは APP 特異的である。実は最も初期に APP への選択性を確認した GSI は LY450139 の臨床試験が始まる以前、2001 年に報告が確認されている。4-chloro-isocoumarin から合成された JLK 類(図 13A)は、A $\beta$ 40、42 の産生を阻害するのにも関わらず、Notch の切断による細胞内シグナル分子 NICD への影響、及び E-cadherin 切断への影響は確認で

きないことが報告されている(Petit et al. 2001)(Petit et al. 2003)。また、sulfonamido 骨格を有する、Bristol-Meyers Squibb (BMS)社の BMS-299897(Anderson et al. 2005) (図 13B)は、A $\beta$  産生阻害濃度領域と Notch 切断阻害濃度領域の間に大きな差があり、実質ほぼ特異的に A $\beta$  産生を阻害できることが *in vivo* で報告されている。これらの阻害剤は Notch 切断を阻害しないことから、「Notch-Sparing GSI」と呼ばれ、注目を浴びている。sulfonamido 骨格型の GSI らは、BMS-299897 を基にした光親和性標識プローブの解析結果より、PS1 NTF を結合標的とすることが報告されている(杉本康昭修士論文)。その他の Notch-Sparing GSI に関しては、元々慢性骨髄性白血病治療薬として用いられている imatinib mesylate も APP 切断のみを阻害することが知られているが(Netzer et al. 2003)、面白いことにその阻害様式は、 $\gamma$ -secretase のヌクレオチド結合部位への ATP 結合との競合によると報告されている(Fraering et al. 2005)。

しかし、現在 sulfonamido 骨格を持つこれらの GSI は、臨床試験段階で苦難に直面している。Parker らがデザインした BMS-708163 (avagacestat: 図 13B)は、GSI としては久しぶりに臨床試験第 II 相まで進んだ。APP 選択性を有し(Gillman et al. 2010)、イヌへの長期投与の結果、脳内 A $\beta$  を 30%減らし、その時に Notch 切断阻害による副作用は観察されなかった(Albright et al. 2013)。ところが第 II 相試験に於いて、Notch シグナリング阻害による副作用が観察された(De Strooper 2014)為、開発を中止することとなった。臨床試験失敗の原因として、Crump らは Notch 切断活性をも失っていることを述べている(Crump et al. 2012)。さらに 100mg から 125mg の投与群に於いて、認知機能の悪化も確認されている(Coric et al. 2012)。これは非特異的に  $\gamma$ -secretase を阻害する第 1 世代の GSI と同じである。Notch に対する APP の選択性は百数倍にも見積もられていたにも関わらず臨床試験で Notch 阻害様の副作用を観察した原因については、基礎研究に於いて両方に対する potency を測定する時に全く別の assay を用いたことだと推測されている。事実、 $\epsilon$  と  $\gamma$  切断をシングル assay で測定した時には、両者の potency は 3 倍も違わなかったという(Bursavich et al., 2016)。

更に、近年の研究から GSI の長期的な処理によって基質の切断が逆に増加する報告もなされている。第 1 世代 GSI の DAPT と第 2 世代 GSI の BMS-708163 それぞれ SH-SY5Y 細胞に処理すると C99 の増加が観察されるが、rat に 21 日間投与し続けると、cortex で C99 の量が減少することが発見されたというのである(Sogorb-estevé et al. 2017)。この論文では A $\beta$  量を直接的に見てはいないが、基質切断の増加を示す結果であると考えられよう。この時、C99 の増加によって PS1 の発現増加が引き起こされており、筆者らはこれが C99 の減少、即ち切断の増加に繋がったとしている。

なお、近年 BMS-708163 の結合メカニズムが複数のグループから報告された。Somavarapu らは Schrödinger 社開発プログラムの 1 つ「Glide」を用いたコンピュータ・シミュレーションを行い、その結果 BMS-708163 が 2 つの活性中心 aspartic acid に跨って結合、若しくは TMD2、6 からなる基質侵入ゲートを塞ぐ形で結合するというモデルを打ち立てた(Somavarapu et al., 2016)。しかし前者のモデルでは、sulfonamido に直結した chlorobenzene-塩素を含む環状構造は sulfonamido 型 GSI の中心となる構造であるが PS1 との結合に関与していない。一方 Gertsik らは、BMS-708163 をベースにした probe 化合物を作成し、MS/MS スペクトル解析を行った結果、L282 を中心として S170、R278、F283、そして G382 が主に結合に関与していると言うモデルを考案している(Gertsik et al. 2017)。これらの残基は主に exon 8 領域に属し、PS1 の自己断片化の起きる場所にも近く、G382 も活性中心 D385 の近くに位置していることから、これらの機能阻害を通じた阻害効果発揮を行うと考えているようであり、さらに DAPT によって BMS-708163 の probe の結合量が減少するのだが、これは本領域が DAPT 結合部位と報告されている領域(Bai, Rajendra, et al. 2015)と一部被っていることと一致する。何れのモデルもごく最近発表されたものであり、更なる詳細な検討が必要とされるであろう。PAL 解析を行う筆者としては後者のモデルを信じたいところではあるが。

### 1.9.2.2 Sulfone 型 GSI

Merck 社の Churcher らは sulfone 構造を持つ MRK-560(Barten et al. 2005) (図 13C)を創出した。この化合物は Notch-Sparing GSI の一種であり、マウスへの長期投与で脳内 A $\beta$  斑が有意に減少し、典型的な Notch 切断阻害による副作用も観察されなかったが、*in vitro* では大した選択性を確認できなかった(Best et al. 2006)。一方引き続き研究に於いて、この化合物は PS1 を含む  $\gamma$ -secretase を、PS2 を含む  $\gamma$ -secretase に比べてより強力に阻害することも発見され(Lee et al. 2011)、GSI が保有すべき選択性についての理解の幅が広がり、sulfone 型 GSI の実用化に向けての様々な研究が始まる。

sulfone 型 GSI が阻害能を発揮するキーとして最初に報告されたのは、極性に関することであった。MRK-560 を開発した Churcher は cyclohexane ring に極性基が直接付いていることが強い potency 発揮に必要であり、また水溶性の低さが経口投与時の吸収率にも影響するとの考えを示した(Churcher et al. 2006)。加え、B-trans 体では sulfone 群が axial に配置されるため阻害能を失うことも見出し、conformational flipping を抑制するために spirocycle が C-3 に結合し、difluorophenyl 群が C-2 に結合して新たな環状構造を形成した誘導体を作製することで、active な椅子型構造を持たせることに成功した(Jelley et al. 2006)。

その後はより強い potency を持たせるために、cyclohexane ring に結合した環状官能基の修飾を行うことになる。最終的に IC<sub>50</sub> が 2nM という強力な 851599 を開発し(図 13C)、幾つかの生化学的 assay で PS1 への強い選択性を確認し、同時に hERG と CYP2C9 阻害もしないことが報告された(Zhao et al. 2015)。現在ではこの 851599 とその analogue に Merck 社が特許を取得しており、今後の実用化に向けての更なる研究開発が期待されている。

### 1.9.3 A $\beta$ rise 現象

以前より、APP 若しくは C99 を過剰発現させた培養細胞に GSI を添加した時、阻害能を示さない低濃度域に於いて、分泌 A $\beta$  量が微増する現象が確認されていた(Abramowski 1996)(Yamazaki et al. 1997)(Durkin et al. 1999)。この意味する所は、AD 治療の際に適切な濃度域を外れると逆に AD 病態を悪化させる可能性を示唆するものであり、原因の解明が待たれていた。その後 *in vivo* 系でも、AD モデルマウスに(Lanz et al. 2004)、gunia pig に(Lanz et al. 2006)、そしてヒトに投与した場合でも plasma の A $\beta$  量の一時的増加を認めた。近年では極低濃度の inhibitor は細胞外の A $\beta$  oligomer 量をも増加させることも明らかとなっている(Agholme et al. 2017)。この oligomer の増加は、低濃度において inhibitor が PS1 優位に阻害する為、酸性度の高い late endosome で切断を行う PS2 による切断(Sannerud et al. 2016)が相対的増加し、細胞内の A $\beta$  凝集体が増加したとされている。更に、異骨格の GSI にも同様の効果が認められたことにより、この現象は化合物特異的ではなく、 $\gamma$ -secretase に直接影響を与えた結果であることが伺えた。

A $\beta$  rise 現象はまず培養細胞に発現させる基質の量に逆相関して確認されなくなっていき、*in vitro* 系では同様の現象は確認されないことが報告され、続いて GSM には見られないことから A $\beta$  rise 現象は GSI 特異的だと考えられた。そして基質として APPwt を用いた場合のみに A $\beta$  rise 現象は確認され、APP Swedish Mt を基質として過剰発現した場合と、C83 を  $\gamma$ -secretase が切断して産生した分泌タンパクである p3 の産生にはそのような効果を認められないことが立て続けに報告された(Burton et al. 2008)。この結果の解釈をするに当たって、酵素基質の局在場所と A $\beta$  産生の関係が関与してくる。主に APPNL からの A $\beta$  産生や p3 産生は late secretory pathway で起きる(Kuentzel et al. 1993)(Haass et al. 1995)のに対し、APPwt では endocytotic pathway で起きることが指示されている(Haass et al. 1995)。つまり、基質濃度が低い場合には低濃度の GSI による阻害効果により、endocytotic pathway に蓄積した C99 と  $\gamma$ -secretase が相互作用する機会が増加し(Zhang et al. 2005)、結果的に A $\beta$  産生の増加に繋がる、ということが考えられた。また、A $\beta$  peptide の長さに着目した研究では、A $\beta$ 34 と A $\beta$ 35 にはこうした A $\beta$  rise 現象が見られず、極低濃度の inhibitor でも濃度依存的に A $\beta$  量が減少することも示されている(Agholme et al. 2017)。このメカニズムは不明であるが、A $\beta$ 34 は  $\gamma$ -secretase による切断を経た後に  $\beta$ -secretase によって産生されることが報告されており(Portelius et al. 2014)、若干矛盾を生み出し解釈が

難しい。しかしながら総じて、これは副作用が甚大な第 1 世代の GSI だけでなく Notch 切断を回避できるとして注目された第 2 世代の GSI にも当てはまることであり、GSI 実用化の障壁となっている。しかし一方で、脳内化合物濃度が低下した場合に観察される現象であることも事実なので、投与頻度を引き上げることで極力脳内化合物濃度を一定水準に保つことで A $\beta$  rise 現象を回避できるという考えもある。

### 1.10 $\gamma$ -Secretase modulator

$\gamma$ -secretase を通じた A $\beta$  産生制御には、GSI とは違った別ルートが存在する。それが、GSM による酵素の活性「修飾」である。これらの化合物は従来の GSI のように  $\gamma$ -secretase の活性を落とし、基質切断を妨げることで A $\beta$  産生の抑制に寄与するのではなく、 $\gamma$ -secretase の活性を変化させるように「修飾」することで活性を上昇させ、毒性種 A $\beta$ 42 をより短い A $\beta$ 38 へ切断することで A $\beta$ 42 の産生を減らしている。A $\beta$ 42 産生を「阻害する」ものではなく、GSI と競合しないことは、最初に Beher らが発表している (Beher et al. 2004)。このような作用機序から  $\gamma$ -secretase “modulator” と呼ばれている。なお、GSM には A $\beta$ 42 産生比率現象だけでなく、真逆の A $\beta$ 42 産生比率上昇効果を持つものも存在する。これらを inverse-GSM (iGSM) と呼ぶ。iGSM は全てのタイプの GSM に存在し、NSAIDs では fenofibrate が例として挙げられる (Uemura et al. 2009)。その為 fenofibrate を高脂血症改善薬として用いた時に AD リスクが果たして上昇するのかという議論があったが、培養細胞系で数十～数百  $\mu$ M オーダーで漸く有意な変化が認められることより、通常の投与範囲内では問題ないというのが一般的認識となっている。

GSM はその大きな長所として、APP 切断抑制への強い選択性が挙げられる。N $\beta$  への切断効率に多少の影響を与えるクラスの GSM は存在する (Wanngren et al. 2012)。しかし、第 2 世代の GSI と比してもう一つ挙げるとすれば、GSM は概して A $\beta$  rise 現象を引き起こさない、という点であろうか。この A $\beta$  rise 現象については、GSI の項目で説明済みである。

$\gamma$ -secretase の切断様式を変えることは、以下の 2 つの可能性から説明が可能である：1) long A $\beta$  の分泌が遅くなる ( $k_b$  の低下)、2) さらなる切断の亢進 ( $k_{cat}$  の増加)。 $\gamma$ -secretase は endopeptidase 活性 ( $\epsilon$  切断) と carboxypeptidase 活性 ( $\gamma$  切断) を有し、複数回基質を切断する酵素であるが、Chavez-Gutierrez らは GSM によって  $\epsilon$  切断の  $k_{cat}$  は変化しないが FAD の導入によって減少することを見出した (Chavez-Gutierrez et al. 2012)。またその後の研究で  $\gamma$  切断の酵素反応速度定数を測定したところ、GSM が  $k_{cat}$  を増加させて  $k_b$  を減少させる一方で、FAD は全く逆の反応を示したことが報告された (Okochi et al. 2012)。これらの報告は、GSM には PS の変異による活性低下を回復させる強い証拠である。

これは一般論であり全 GSM に当てはまるというわけではないが、GSM の作用機序については当初紆余曲折あったものの、少なくともそのターゲット分子は  $\gamma$ -secretase そのものだという説が一般的になっている。この紆余曲折の原因の発端となったのが、この論文である (Kukar et al. 2008)。筆者らは NSAIDs (後述参照) であり fenofibrate を基にして光標識プローブを添加した fen-B を用いることにより、GSM 分子と APPCTF の結合を観察できたと報告した。そしてその作用機序は、APPCTF の dimerization、即ち二量体化の形態を変えることにより A $\beta$ 42 の産生を調節するのだと考察された。事実 GxxxG モチーフが APPCTF に存在し、そこに変異を持つ APP は A $\beta$ 42 比率の減少が観察されている (Munter et al. 2007)。ところがその翌年には名指しでその論文に対抗する反論が出版された (Beel et al. 2010)。彼らの言い分では Kukar らの用いた光標識プローブの濃度が濃すぎること、その濃度では非特異的な膜タンパクへの結合が認められることであり、さらに高濃度の GSM が凝集し、酵素活性を阻害している可能性があるというものであった。果たして一瞬で主張を覆された Kukar らはどんな心境であったであろうか。なお、現在までに sulindac sulfate が APP の膜内配列に存在する二量体化領域に作用して A $\beta$ 42 産生を modulate する (Richter et al. 2010) 意見や APP の膜近傍領域の変異によって NSAIDs

の応答性が変化する(Sagi et al. 2011)などと主張する「substrate-targeting」派存在すれば、GSM と PS 分子との結合を観察したり(Ebke et al. 2011)、Richter らに真っ向対抗して NSAIDs は自己凝集を引き起こすと述べた Barrett ら(Barrett et al. 2011)「enzyme-target」派など、議論は下火ながら続いている。しかし前述したように、多くの GSM が PS タンパクとの結合を確認できることから、「enzyme-target」説が今のところ主流である。とは言え、結合ターゲットに関して言えば同系統の化合物ながら副次的に別タンパクへの結合が見られることは何も不思議なことではない。後述する phenylimidazole 型 GSM では、ST1120 が PS1 NTF と Aph-1 への結合を認めたのに対し(Takeo et al. 2014)、Eisai 社の E2012 では Aph-1 への結合が認められない(Cai et al. 2017)。これは活性発揮に必要な基本共通骨格とは別の修飾基による作用が大きいと思われ、今後様々な GSM の解析を進めていくうえで多角的な視点が必要になってくることを示すよい例である。

### 1.10.1 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs

GSM の歴史は全く無関係な薬剤に端を発する。予てより非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)服用患者が AD 発症リスクを下げていることが指摘されてきた(England 2001)(Walther et al. 2009)。自分の認知する限りでは、1990 年の McGeer による(Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease)が初だろうか。数々の NSAIDs のうち、sulindac sulfide、ibuprofen、indomethacin 等(図 14)が  $\gamma$ -secretase に直接作用し、*in vitro* や *in vivo* 両方で A $\beta$ 42 産生を優位に阻害し、A $\beta$ 38 産生を上げることが報告され、同時に Notch 切断へ影響しないことも認められた(Weggen et al. 2001)(Moriyama et al. 2002)(Takahashi et al. 2003)。ただし高濃度では A $\beta$ 40 産生、及び Notch 切断への抑制効果を認められたことから、高濃度では阻害様式を示すことが示唆されている(Takahashi et al. 2003)。これらの特徴より、NSAIDs 若しくはその誘導体型 GSM を俗に第 1 世代の GSM と呼ぶこともある。ここから一連の研究報告を受け、瞬く間に NSAIDs の AD 治療薬としての開発が幕を開けた。しかし、NSAIDs の誘導体の 1 つである R-Flurbiprofen (図 14)について、*in vivo* で GSM 効果を有することが報告されたにもかかわらず(Eriksen et al. 2003)(Kukar et al. 2007)、米国での Phase III 相試験で有意な効果が認められなかったことから、開発の終止符を打たれた。これは以下に記述するその他 GSM の多くにも言えることだが、GSM の臨床試験の失敗のほとんどはヒトでの potency の低さ、そして脳移行性の低さが主な原因である。少なくとも NSAIDs 類は元来抗炎症薬であって主用途が AD 治療ではない為、培養細胞系での potency は数十  $\mu$ M レベルにもなり、とてもではないが実用的からは程遠い。さらに脳への移行性にも乏しく、かつ COX 阻害効果も確認されている(Geisslinger and Schaible 1996)(Zettl et al. 2010)。R-Flurbiprofen の場合、*in vitro* で IC<sub>50</sub> = 250  $\mu$ M 程度しかなかった上に脳髄液/血漿比が 1.3% と低いことが実は分かっていた(Moriyama et al. 2002)(Peretto et al. 2005)。更に Eriksen らの前向きな実験結果は全く追試できておらず、Kukar らの結果に於いて各グループから幾つかのマウス個体が意図的に統計学的分析の対象から除外されている等、手法にも大きな問題があったと報告されている(Imbimbo 2009)。

NSAIDs の失敗要因として考えられていることとして、microglia の阻害効果が挙げられる。microglia は AD 病理を減弱する方向に働くと考えられており(Britschgi and Wyss-Coray 2007)、phagocytosis の亢進を経て A $\beta$  斑のクリアランスを助長する。遺伝子改変マウスを用いた検討では、microglia に欠陥が生じると amyloidogenesis を促進する結果が出ている(El Khoury et al. 2007)。特に microglia 細胞の数が不変、若しくは増加しているにも関わらず A $\beta$  斑が増加しているケースの多い患者脳では、老化に伴って microglia の A $\beta$  クリアランス能が低下していると指摘されている(Hickman et al. 2008)。つまり、NSAIDs の抗炎症効果による microglia の活性低下により、A $\beta$  斑除去能が大幅に落ち、AD 病理が寧ろ悪化した線が強いのである。その為、引き続き開発で、各製薬会社はより強い potency を有する GSM の開発に奮起し、結果多種多様な基本骨格を有する GSM の開発を遂行する。それらの GSM を NSAIDs 型と対比させて、第 2 世代の GSM と一括りで呼ぶこともある。

## 1.10.2 第2世代のGSM

### 1.10.2.1 Phenylpiperidine 型 GSM

GSM として最もよく知られているものの1つが Merck 社開発の GSM-1 であろう (Page et al. 2008) (図 15A)。GSM-1 も元々は NSAIDs 誘導体型の GSM ではあるが、phenylpiperidine 構造を内部に含むため、phenylpiperidine 型 GSM として分類されることもある。培養細胞系で 5  $\mu\text{M}$  の投与で顕著な A $\beta$  量の変化が観察されるものの、現在知られている中で最も強力な FAD の1つである PS1 の L166P、PS2 の N141I 変異には有意な A $\beta$ 42 減少効果を認めることができなかった。ただなぜかより短い切断断片である A $\beta$ 38 の産生上昇は有意な差を認めたことから (Page et al. 2008)、A $\beta$  全体の産生量を底上げした可能性が残されている。強力な GSM ではあり、類似型の GSM-2 を含め、モデルマウス (Mitani et al. 2012) やサル (Ling et al. 2015) などの *in vivo* 系で有意な A $\beta$ 42/40 比率減少を確認できたものの、2013 年の時点で既に開発はストップされている。これは、治療量域での投与時に、ヒトでは全くそのような変化を観察できなかったからである (Ling et al. 2015)。

phenylpiperidine 型 GSM の作用の特徴として最たるものは、A $\beta$ 42 産生系列のみに影響を与える、即ち A $\beta$ 42 から A $\beta$ 38 への切断亢進効果はあるものの、A $\beta$ 40 の産生量に有意な変化を与えないという点にある。1  $\mu\text{M}$  を超えてくると有意な A $\beta$ 40 産生量減少を示すデータもあるが (Ohki et al. 2011)、これは NSAIDs が高濃度で  $\gamma$ -secretase への阻害効果を呈することを加味すればこれも阻害の1つであるという考察と、一方後述の phenylimidazole 型の GSM は切断亢進により A $\beta$ 40 を A $\beta$ 37 へ切り進める為、純粋に治療量域で有意な差がみられていないだけだという考察も可能である。これに決着をつけるには高濃度で A $\beta$ 37 や 38 などの short A $\beta$  の産生量を確認すればよい。

このタイプの GSM の作用機序を考察する1つの重要なポイントが iGSM との構造の差から見えてくる。Merck 社の GSM-1 と全く同じ基本構造を持つ iGSM の NS-1017 は (図 15A)、細胞系に於いて 1  $\mu\text{M}$  で有意な A $\beta$ 42 ratio 上昇を認めるが、GSM-1 と NS-1017 は上部の構造が carboxylic acid か benzylamido かだけしか変わらないのだ。つまり基本骨格に付随した部分の極性によって A $\beta$ 42 の産生に対する影響の方向性が決まるということであり、A $\beta$  産生制御に電子的要因が関与していることが強く示唆される。

phenylpiperidine 型 GSM の作用機序についてはある程度まで絞り込みができています。Ohki らは光標識プローブを導入した GSM-1-BpB を作製してその標識ターゲットを探ったところ、GSM-1 が PS1 NTF の TMD1 を標的とすることが明らかとなった (Ohki et al. 2011)。また同時により詳細な結合部位として、K80 から D110 までの間に結合することが示唆されている。これは sulfonamido 型 GSI の BMS-708163 や Aib 型 GSI の pep11、及び後述する phenylimidazole 型 GSM すらとも結合部位が異なる (Pozdnyakov et al. 2013)。これは、GSI などの阻害能発揮時とは全く別の経路で  $\gamma$ -secretase の活性を上げていることを示唆する研究結果である。

### 1.10.2.2 Phenylimidazole 型 GSM

ここ数年の non-carboxylic acid GSM の多くはこのタイプ所属である。爆発的な開発の起爆剤となったのは、2005 年に Eisai 社が開発した E2012 である (Hashimoto et al. 2010) (図 15B)。GSM 能を発揮する活性は phenylimidazole 環にあり、alkenyl 骨格の反対側の修飾基、官能基を変えることで potency の異なる化合物を開発してきた。このタイプの GSM の特徴は NSAIDs や phenylpiperidine 型 GSM とは異なり、A $\beta$ 40 の産生量をも減少させる。即ち A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の切断両方を亢進し、A $\beta$ 37 や A $\beta$ 38 などの short A $\beta$  の産生を増加させる (Lessard et al. 2015)。とは言え、A $\beta$ 40 より A $\beta$ 42 の減少割合の方が顕著なので、相対的に A $\beta$ 42 の比率は下がることになる (Pozdnyakov et al. 2013)。これは先述の通り、phenylpiperidine 型 GSM と同じく PS1 NTF を結合標的としているが微々たる結合部位の差が生み出す違いであろう。

最初に開発された E2012 については *in vivo* に於いてはイヌの CSF で有意な A $\beta$  量の変動を確認できたものの (Portelius et al. 2010)、臨床試験 phase I の途中で、マウスでの安全性試験に於いて、薬物投与群で眼球の白濁を確認し、長期投与で白内障を引き起こしたマウスも現れた。これは E2012 が 24-dehydrocholesterol reductase を阻害することで、desmosterol の増加と cholesterol の減少を引き起こしたことが原因だと考えられている (Nakano-Ito et al. 2014)。しかしその後のサルへの 13 週間の投与実験に於いては、経口投与時の毒性も無ければ plasma での desmosterol の増加も見られなかった為、この副作用は齧歯類特異的であろうと結論付けられた。では、臨床試験はどうなったのか？結果は phase I で plasma 内の A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 有意な変動を認めたものの (Nagy et al. 2010)、Eisai 側がより強力な potency を持つ E2212 の開発に成功した為、phase II への移行は中止となった。しかし、現在のところ E2212 の開発の続報は聞かない。その後の研究で E2012 をベースに ketone を環化させた oxadiazoline 構造を持つ GSM が開発され、幾つかは E2012 より高い potency を獲得することに成功した (Z. Sun et al. 2015)。一連の化合物は高い potency や能率、そして安全性を兼ね備えた非常に有用な治療薬候補となったが、高い cLogP 値<sup>4</sup>や低い multi-parameter optimization (MPO) 値<sup>5</sup>など、drug-like properties が乏しいことが悩みの種である (Bursavich et al. 2016)。

有機化学の分野では、様々に構造を変えてみることでより有用な phenylimidazole 型 GSM の開発を目指した。Janssen Research & Development では olefin を窒素鎖に置換し、複素二環構造の導入、そして aniline の benzene 環を pyridine 環に置換するなど様々な変換がなされてきたが、drug-like properties の劇的改善には繋がらなかった (Bischoff et al. 2012)。その後、Bristol-Meyers Squibb 社は E2012 のベースに改良を加えた BMS-869780 と BMS-932481 を開発した (Bursavich et al. 2016) (図 15B)。前者は olefin を窒素鎖に置換した後に methylimidazole を chlorimidazole に置き換えたもの、後者は imidazole 環を triazole 環に置き換えたことが最大の特徴であり、どちらも *in vitro* での EC<sub>50</sub> が 5~7 nM レベルの potency を有することが確認された。BMS-869780 はマウスとラットで顕著な効能を示したが、ヒトへの投与時の安全性への懸念からさらなる開発は現在中止されている。BMS-932481 はヒトに於いて CSF 内の A $\beta$ 42 が有意な減少を示し (Soares et al. 2016)、臨床試験 phase I でも前向きな結果となった。現在のところ、続報待ちである。

その他 imidazole 環を持つ GSM に対して行われてきた構造変換の多くは、imidazole 環(若しくはそこに位置するその他五員環構造)に隣接する aniline の変換を通じたものが多い。Torrey Pines Therapeutics の開発グループは aniline を環状化し、thiazole 構造を持つ GSM を開発し、その potency を改良した GSM は雌 Tg2576 マウスへの繰り返し経口投与で脳内 A $\beta$ 42 の有意な減少を確認できた (Kounnas et al. 2010)。thiazole を持つ GSM については Wagner のグループがその後の研究で cLogP 値が低く drug-like properties が改善された GSM を開発した (Wagner et al. 2014) が、現在のところ *in vivo* での結果は聞かない。Merck 社の開発チームは aniline の窒素鎖を triazole 環に変換することでより有用な GSM の模索を行い、最初期に導出した lactam 環を持つ GSM はその potency の高さと hERG に干渉しないこと (Fischer et al. 2012)、そして優良な drug-like properties とは裏腹に経口投与時に全く効果が出ず、blood to plasma ratio が 0.1 を切っていたことから、薬物動態の改良に踏み切ることとなる (Bursavich et al. 2016)。引き続き研究では lactam 環に fluorobenzene を直接融合させた 6-fluorobenzazepinon 構造を有する化合物が開発され、そのうちの 1 つは齧歯類とアカゲザル (rhesus monkey) で脳内 A $\beta$ 42 の有意な減少を確認した (Fischer et al. 2015)。しかし、アカゲザルに対してはボーラス注入では有意な効果が表れたものの経口バイオアベイラビリティは非常に低かった。さらに IC<sub>50</sub>=32nM で serotonin

<sup>4</sup> 化合物の親油性、脂溶性を示す数値であり、経口投与薬剤の有用性を決める 1 つの指標である。炭素鎖を 1 つ伸長するごとに値がおおよそ 0.5 増加するが、環化するとその値は低下する。炭化しながら環化する前後では cLogP 値はほぼ同じであることが多い。ただ環化する場所にもよってその値は変動する。創薬に於いて低分子化合物の cLogP 値は、膜透過性、溶解度、代謝、CYP 阻害、バイオアベイラビリティ、毒性など複数項目を加味して 1~3 の間をとるのがよいとされている (Waring 2010)。

<sup>5</sup> cLogP 値、cLogD 値、分子量、pKa 値など、化合物を評価する幾つもの値のうちから、対象薬物の評価に必要なパラメーターを選択し、それを総合的に評価して最適化した値のことである。評価基準は化合物やそれが対象とする疾患により多種多様なので、MPO 値、若しくはその値の幅は実に多岐に渡るが、一般に値が高いほど薬剤として有用であるとされている。



再取り込みトランスポーターに対する阻害がかかることも報告され(Bursavich et al. 2016)、同系統の GSM の今後の開発にはそれらのモニタリングが必要だということが示唆された。なお、imidazole 若しくは類似構造を基本骨格とする GSM はその他にも様々な方面での開発がなされ、武田薬品工業開発の piperazine を持ち A $\beta$ 40 産生には影響を与えない一連の GSM や(Takai, Koike, et al. 2015) imidazole 環を oxazole 環に変えた GSM(Takai, Hoashi, et al. 2015)、大日本住友製薬開発の piperidine amido 構造を持つ phenylimidazole 型 GSM(Kobayashi et al. 2014)などが発表された。また Pfizer 社は amido の窒素鎖が pyridine 環に結合し二環構造を取る pyridopyrazine-1,6-diones 種を開発し(Pettersson et al. 2014)、その後 PS1 NTF への結合が示された(Pettersson et al. 2015)。こうした化合物は多くがマウスやラットの *in vivo* 検証で脳内や CSF での有意な A $\beta$ 42 減少を確認できているが、修飾基によっては CYP 阻害を始めとした副作用が見られることもあり、また殆どが *in vitro* の potency と脂溶性、そして drug-like properties などとの釣り合いが取れず、未だにブレイクスルーを起こした化合物は出ていない。CYP 阻害については arylimidazole group、即ち imidazole 環が関与していることが示唆されおり、根本的に基本骨格を練り直す必要があるだろう(Sekioka et al. 2017)。Sekioka et al は arylimidazole group を潰した上で同等の活性を持つ GSM 様化合物の創出に努めている。

構造学的な作用機序については解明が待たれているが、基本構造が imidazole であろうとその類似構造であろうと、PS1 NTF への結合が強く示唆されている(Pozdnyakov et al. 2013)(Pettersson et al. 2015)。この結合部位は先述の通り NSAIDs とも阻害剤らとも場所を異にしており、全く新しい機序での  $\gamma$ -secretase の活性化を引き起こしていると考えられる。その後 phenylimidazole 型 GSM の ST1120 を使った解析により、このタイプの GSM が PS1 TMD1 C 末端側に伸びる HL1 の Y106 を始めとした、幾つかの親水性環境に面した残基と相互作用していることが明らかとなった(Takeo et al. 2014)(Cai et al., 2017)。現在は周辺構造との関連を探りながらその作用機序の解明が進められている。

### 1.10.3 GSM 様活性を持つ天然化合物

天然物及び天然物誘導体は古来治療薬として用いられることが多かった。GSM に関しても例外ではなく、幾つかの天然物から GSM 様活性が報告されている。Satori Pharmaceuticals はキンボウゲ科の black cohosh (*Actaea racemosa*)から triterpene glycoside 構造を有する化合物を見出した(Findeis et al. 2012) (図 16A)。しかし当初見つけた化合物は enol ether、glycoside 及び acetate ester 構造の不安定さにより体内のクリアランスが高く、brain exposure が非常に低いことが問題であった。その後、enol ether の 2 重結合や morpholine 構造の導入などを経て、クリアランスやバイオアベイラビリティの向上に成功するものの(Fuller et al. 2012)(Loureiro et al. 2013)、2013 年にサルへの投与試験で腎機能障害を引き起こすリスクが確認されてからは、以後の開発は中止されている。

またフロリダ大学の研究チームは 170 の天然及び人工 steroid を CHO 細胞でスクリーニングした結果、幾つかの steroid に GSM 様活性を認めた(Jung et al. 2013)。ただこの時最も活性が高かったのは 5 $\beta$ -cholanic acid という元来体内で生合成されない胆汁酸であったが、スクリーニングの結果から幾つかの天然胆汁酸にも弱いながらも A $\beta$ 42 減少効果を確認できた為、引き続き研究で体内合成される steroid のスクリーニングを行った結果、より強い potency を持つ 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid が見出された(Jung et al. 2015) (図 16B)。とは言え、この化合物の EC<sub>50</sub> はせいぜい 250 nM であり、Jung らも炭素鎖を延ばすなどの幾つかの構造置換を行ったが、potency が 100nM を切ることはなかった。こうした steroid は GSM 活性に carboxylic acid が重要な役割を果たすと考えられている。Jung らのスクリーニングでは S15 という 5 $\beta$ -cholanic acid によく似た steroid が高 potency で A $\beta$  産生比率を変えるが(Jung et al. 2013)、その作用は真逆で A $\beta$ 42 比率を上昇させるものである。この 2 つの steroid の最も大きな違いは 5 $\beta$ -cholanic acid の carboxylic acid の部分が S15 では ester になっていることであり、carboxylic acid を amido に変えることで A $\beta$ 42 産生の挙動が真逆になる phenylpiperidine 型 GSM とその点でよく似通っている。作用機序は解明が進められていないが、steroid 系は膜表面に滞

在し酵素と基質の結合を間接的に変化させることもあり、その場合は  $\mu\text{M}$  オーダー程度の potency であることが多いことから、 $\text{nM}$  レベルの potency を持つ物については  $\gamma$ -secretase との直接作用が考えられる。なお steroid は低分子化合物と比較すると高い cLogP 値と低い MPO 値を持つことが多く、今後実用的な創薬に向けての研究を進めるだけの価値があるかは議論されている。

### 1.11 BACE1 inhibitor

$\beta$ -secretase は  $\alpha$ -secretase と並んで APP を最初に切断する 1 回膜貫通型タンパクである。 $\beta$ -secretase は 16 残基ほど N 末端よりを切断する為、凝集力のある  $\text{A}\beta$  が後の  $\gamma$ -secretase の切断によって産生されることになる(Barão et al. 2016)。 $\beta$ -secretase による切断は  $\text{A}\beta$  生産過程の中の律速段階である他、ノックアウトマウスは  $\beta$ -secretase 活性と共に C99 切断も完全に失われていることが報告されている(Roberds et al. 2001)。 $\text{A}\beta$  を AD 病理の主原因とする amyloid cascade 仮説が主に遺伝学的研究から広く信じられるようになったが、 $\beta$ -secretase 切断部位に近い FAD 変異が  $\beta$ -secretase 切断を亢進することで FAD 発症を促すことや(Fede et al. 2009)(Zhou et al. 2011)、同じ部位の別の変異が  $\beta$ -secretase 切断を阻害することで AD リスクを有意に下げている等の報告もあり(Jonsson et al. 2012)、 $\gamma$ -secretase より遅れながらも AD 治療の標的の一つとして創薬研究が始まった。

$\beta$ -secretase には BACE1 と BACE2 の 2 つの homologue が存在するが、興味深いことに *in vivo* で BACE2 には APP 切断活性が存在しない(Timmers et al. 2017)。よって以下 APP 切断能を有する  $\beta$ -secretase を BACE1 と表記する。とは言え、初期の BSI は 2 つの BACE に対して選択性をあまり持たなかったことから、GSI と同じように副作用が甚大になるケースも多かった(Hsiao et al. 2019)。BACE2 について分かっていることはかなり限られているが、human islet amyloid polypeptide (IAPP) を 2 か所で切断することが知られている(Stützer et al. 2013)。それ故、BACE2 阻害によって高アミラーゼ血症の症状を呈したり(Rulifson et al. 2016)、皮膚や眼球内の PMEL の切断が阻害されることによる脱色素等も見られるようになる(Rochin et al. 2013)。更には、BACE2 は glia 細胞での発現も広く見られ、TNF- $\alpha$  の発現上昇による神経細胞炎症に反応し、Vcam1 の切断を著しく上昇させることも報告されている(Voytyuk et al. 2018)。

この為、BACE2 の切断を阻害しない選択性の鍵となるポイントを探ることが必要であった。BACE1 の活性中心は 2 つの aspartic acid、D32 と D228 であるが、付近に S1-S4 と S'1-S'4 からなる subpockets が存在し、基質の切断部位付近を包み込む働きを有している(図 17A)。この subpockets の入り口には逆並行の  $\beta$ -sheet のヘアピン構造が居座っており、S'2 pocket への基質の侵入をコントロールしている。このヘアピンには BACE1 と BACE2 とでアミノ酸残基の違いがあるが、BACE1 では open な構造時にこのヘアピン構造がより安定している(Kumalo and Soliman 2016)。また S'2 pocket を構成するアミノ酸残基にも違いがあり、選択性を有する BSI をデザインする上で考慮されるポイントともなっている(Malamas et al. 2010)。一方、S1 と S3 pocket には通常それぞれ芳香環が当てはまるが、この 2 つの芳香環の間に linker を導入すると 2 つの芳香環がと pocket の親和性が上昇し、より強い阻害能と選択性を呈するようになる(Low et al. 2017)。後者の S3 pocket の直近にはループ構造があることも分かっており、ここも BACE1 と BACE2 の間でアミノ酸残基の違いがあり、BACE1 選択性を発揮させるポイントにもなっている。

#### 1.11.1 第 1 世代の BSI

最も初めにデザインされた BSI は、APP の BACE1 切断部位のアミノ酸配列が同定された後にその部位を模倣した TSA 型 BSI であった(Sinha et al. 1999)(Hong et al. 2002)(Vassar 2014)(Vassar 2016)。ペプチド型阻害剤は *in vitro* で強力な阻害効果を示したものの、*in vivo* では BBB 透過性、経口バイオアベイラビリティや半減期で良い値を示さず開発

はすぐに中断され、非ペプチド型でより強力な BSI 創出に力を注ぐようになった。同時期の研究結果も併せて、細胞膜と endosome 膜両方を通過して BACE1 の活性中心に行き届くよう、十分な親油性も必要とされるようになった。

### 1.11.2 第 2 世代の BSI

その後、BACE1 とペプチド型 BSI の複合体の X 線結晶構造が解かれると、BSI の開発にも少し前進が見えた(Hong et al. 2000)。酵素との結合様式が分かったことで、より drug-like properties が向上した BSI が幾つか誕生した(Probst and Xu 2012)。しかし残念ながら、こうした第 2 世代の BSI の殆どが、血液脳関門上で ATP 依存的に薬剤排泄を行う P 糖タンパク質(Marques et al. 2013)の基質となってしまう、脳内の濃度が理想値に全く届くことは無かった。

### 1.11.3 第 3 世代の BSI

これ以降、様々な中心骨格を持つ BSI がデザインされていくことになる。化合物の多様性はかなり高いが、開発時系列的に第 3 世代の BSI とまとめて呼ぶことがある。

#### 1.11.3.1 1,3-Thiazine 型 BSI

1,3-Thiazine 型 BSI は最も幅広く創薬研究が行われたタイプの BSI である。Eli Lilly 社がデザインした LY-2811376 は BSI の中で最初に臨床試験まで進んだ化合物である(May et al. 2011)。後に BMS 社 C6 位に dimethylisoxazole 基を導入することで BACE1 阻害活性を大幅に高めた。結晶構造からは、先述の BACE1 subpockets 付近のヘアピン構造の T72 と E73 と水素結合をしていることも発見された(Wu, Guernon, Yang, et al. 2016)が、結局のところ *in vivo* で経口投与で 30 mg/kg 程度の効果しかなく、CNS 通過や代謝に対する安定性も低かった(Hsiao et al. 2019)。その後、かねてより発表されていた Eli Lilly 社の LY-2886721 をベースにして benzamide を導入したのも創出したが(図 17B)、こちらは経口投与でマウスの脳内アミロイドが有意に減ったのが確認されている。

Thiazine 型の中でも、tetrahydrofuran (THF) 若しくは tetrahydropyran (THP) が thiazine に融合した aminodihydrothiazine 誘導体という種類があり、これは Eisai 社によって初めて発見されたものである。この化合物をベースにして THF 環を様々に弄繰り回すことで多様性を深めていった。Eisai 社は他にも furo[3,2-d][1,3]thiazine 構造を持つ BSI を開発し、BMS 社からは furo[2,3-d][1,3]thiazine 構造を有する BSI が発表された(Wu, Guernon, Rajamani, et al. 2016)(Hsiao et al. 2019)。Eisai 社は更に THF 環の Methyl 基の水素にフッ素を 1 つずつ置換し、これらの一連の化合物は *in vivo*, *in vitro* の薬理は良好な状態を保ちつつ BACE1 の BACE2 に対する選択性が高まったことが報告されている。一方 BSI の先駆けとなった Eli Lilly 社は、THF 環の Methyl 基を difluoroethane 基に固定し、もう一端の pyrazine 環の修飾を行った。その中でも、difluoromethane 基の代わりに triazole 基を結合させた化合物は、BACE1 の BACE2 に対する選択性がおおよそ 400 倍にもなり(BACE1  $IC_{50}$  = 1.19 nM; BACE2  $IC_{50}$  = 479 nM)、大きな話題を呼んだ。

これに対し、Pfizer 社は benzamide 基を含む下部を切り取った pyrono[3,4-d][1,3]thiazine-2-amines を発表した(図 17B)。こうすることで、benzamide 基が間違っても BACE1 の S2' pocket に入り込むことが無くなる。実は先行していた LY-2811376 の大きな副作用として Cathepsin D 阻害効果による網膜毒性があり(Zuhl et al. 2016)(Ellis et al. 2017)、これは benzamide 基が S3 pocket に入り込まないようにすることで回避できるとわかっていた。X 線結晶構造解析では、THP 官能基が上述 BACE1 活性中心付近のヘアピン構造と強く総合作用するとのことである(Butler et al. 2015)。この化合物の fluoromethyl 基の代わりに N-methyl pyrazole 基を導入した化合物は薬剤の potency を大幅に引き上げたが(Brodney et al. 2015)、CYP2D6 阻害効果が強く見られてしまった。この CYP 阻害は、1,3-thiazine 基の C6 位を修飾することである程度軽減されており、Pfizer 社はここに fluoromethyl を導入している。Pfizer 社は他にも 1,3-thiazine の代

わりに thiazole 基を用いた化合物も創出している。そのうちの 1 つ、PF-06751979 は臨床試験第 1 相まで進んだ。この thiazole 基は電子吸引性が非常に高く、amidine の pKa を大幅に減少させている(Hsiao et al. 2019)。

この頃、Eli Lilly 社は Merck 社が発表していた aminodihydropyrimidone 骨格を持つ BSI(Mandal et al. 2012)に近い、pyrrolidine 環が融合した aminodihydrothiazine 型の BSI の創出に取り組んでいた。2013 年に最初に特許を取った化合物は Pfizer 社の物と同様 benzamide が欠落していたが、薬効が低かった為、potency を延ばす為、潜在的な Cathepsin D 阻害効果が出てこないように、S3 pocket に入る尻尾を慎重に伸ばしていった。中でも、中央に fluorophenyl 環を持つ LY-3202626 は薬効と drug-like properties の両立が良く、臨床試験第 2 相まで進んだ(図 17B)。興味深いことに、ここまで修飾基を拡張していても脳透過性に大きな影響は無く、1 mg の経口投与で 50 %、6 mg では 90 %もの A $\beta$  の減少がみられたと言う。ちなみに、Eisai 社も pyrrolidine 融合骨格を持つ BSI を開発している(Hsiao et al. 2019)。

その他、Amgen 社も(difluoro)cyclopropyl annulated 1,3-thiazine という独自の骨格を作り出し、開発していた。Amgen 社の化合物は Cathepsin D に対する選択性には優れていたものの、BACE2 に対する選択性を上手く作り出すことが出来なかった。これに対して詳細な考察はされていないものの、1,3-thiazine に融合した三員環が subpockets 付近のヘアピン構造に対して強い選択性を発揮できなかったのが原因だと考察している。というのも、先述の通り Pfizer 社化合物の THP はヘアピンと相互作用するので、構造的に同じ位置にある三員環も相互作用することが容易に推定できるからである。一方、塩野義社は THF や THP 非融合型の thiazine 型 BSI を開発してきた。一連の中でも、thiazine 環の C5 位に fluorocyclobutyl 環と言う独特な官能基を導入した化合物はヘアピン構造を標的に BACE2 に対する選択性を高めることに成功している。また BSI 開発に於いて塩野義社と提携している Janssen 社は、独自に tricyclic thiazine 環を開発し、pyridine 環に 4-tetrahydropyranylmethyl 基を導入することで、薬効を底上げしている。1,3-thiazine 型 BSI は幅広く研究開発されてきたが、BACE1 選択性に優れているのが大きな特徴である。

2019 年後半現在臨床試験で生き残っている BSI は皆無である。最後まで戦ったのは Eisai 社開発の 1,3-Thiazine 型 BSI、elenbecestat (E2609)だけである(図 17B)。E2609 は臨床試験第 1 相で頭痛やめまいなどの軽度な副作用はあったものの、体内動態は良い結果を示した。また、200 mg の投与で 90%の脳内 A $\beta$  の減少も確認され、2014 年末には Biogen 社との共同開発で臨床試験第 2 相に進めることになった。第 2 相試験には MCI、若しくはアミロイド PET 陽性だが臨床症状のない被験者が 700 参加し、2018 年の endpoint で統計的に有意ではなかったもののアミロイド PET で減少傾向が見られた。臨床試験第 3 相は 2020 年に終結する見込みであったが、安全性上の懸念から 2019 年 9 月 13 日に中止が発表された。しかしながら、E2609 は 2019 年には、2020 年から始まる一次予防試験<sup>6</sup>と二次予防試験の対象に選ばれており、A $\beta$  産生系に着目した療方は明確に「治療」から「予防」へと変遷している。この予防試験には Alzheimer's Clinical Trials Consortium (ACTC)や United States National Institute on Aging (NIA)等の大御所の組織が多額の資金を出し合っており、各所の本気度が分かる。

### 1.11.3.2 1,3-Oxazine、1,4-oxazine 型 BSI

1,3-oxazine 型 BSI は、1,3-thiazine の硫黄を酸素に置き換えた oxazine を中心骨格とする。Oxazine 骨格の導入は、Eli Lilly 社の Ly-2886721 や Janssen 社の atabecestat で報告されていた毒性を懸念してのことだった(Lahiri et al. 2014)。しかしながら oxazine 導入は同時に pKa 値の上昇と potency の低下を往々にしてもたらした為、このタイプの開発は主に薬剤の塩基度の最適化と potency の強化に焦点を当てている。

<sup>6</sup> 症状を呈している患者対象に治療効果を検証する一般的な臨床試験とは異なり、健康人や軽微な症状の患者に薬剤を投与し、その影響を長期間に渡ってモニタリングする、薬剤の予防効果を検証する試験である。試験期間が長い為、開発に掛かる金銭が莫大になることが最大の懸念点である。

最も精力的な研究を行っていたのが Roche 社であり、彼らは pKa 値をフッ素化によって調節し(Hilpert et al. 2013)、その結果 16 もの 1,3-oxazine 骨格を持つ化合物を特許申請した他、RO-550888 を臨床試験に送り出している(図 18A)。pKa 値の最適化によって P 糖タンパクとの相互作用の減少、CYP2D6 阻害効果の減弱を通じて *in vivo* potency の改善が報告された(Woltering et al. 2013)。その他にも Roche 社は様々な試みを行っており、oxazine 環に六員環ないし五員環が融合した、bicyclic difluoro 1,3-oxazine 化合物も創出している。これらの化合物も比較的良好な体内動態と potency を示すと同時に CYP2D6 阻害効果が弱いと発表された。更に、5,5-difluoro-修飾や 6-trifluoromethyl 修飾した 1,3-oxazine 環を据えて、下部の amide linker を dihydroquinazoline 基や isoxazole 基に変えた化合物も試しており、こちらもなかなか良い potency を示した。

スイスのもう一つの大手製薬企業 Novartis 社は化合物中央の fluorophenyl 環を fluoropyridine 環に置換した化合物を発表している(Hsiao et al. 2019)。この置換は先行していた Roche 社の化合物に比して *in vivo* で非常に高い薬効と体内動態を示している。なお、遅れること 18 か月、Roche 社も同じ中心骨格を持つ化合物を発表した。

米国では、1,3-thiazine 型 BSI で先陣を切った Eli Lilly 社が THF を thiazine 環に融合させるという同じテクニックを oxazine 環にも適応しようとしていた。残念ながら最初にデザインした化合物は Roche 社の物と potency に大きな差を生むことは無かったが、その後 BACE1 の BACE2 に対する選択性がおよそ 600 倍 (BACE1 IC<sub>50</sub> = 11.9 nM: BACE2 IC<sub>50</sub> = 602 nM)もある化合物の創出に成功している。この化合物は THF 環に defluoroethyl 基を導入しており、BACE1 と BACE2 の選択性にカギになる上記ヘアピン構造に上手く作用したことが選択性獲得の要因だとされている。なおイヌへの投与実験では、1 mg/kg の経口投与によって 48 時間で 55 %もの Aβ の低下が CSF で確認できている。

一方 Amgen 社は cyclopropyl 環を oxazine 環に融合させた骨格の BSI を独自に開発していた(Low et al. 2018)。この cyclopropyl 環も *in vitro* の薬効と浸透性を向上させている他、興味深いことに cyclopropyl 環を amidine 環に対して trans 型に配置させた方が、cis 型よりも potency が 4 倍程向上した。また、trans 型の cyclopropyl fused oxazine 環に fluoromethyl 基を導入すると、potency が nM オーダーを切ることも報告されている。

塩野義社も thiazine 型と並行して研究を進めてきた。彼らは thiazine 型の時と同様、oxazine 環に spirooxetane や spirodifluorocyclobutane などの環状構造を置換し、THF 環を直接 oxazine 環に融合させた。これら一連の化合物は程よい酵素阻害効果と高い細胞力価を有していた。また、塩野義社は臨床試験第 3 相まで進んだ atabecestat の thiazine 環をそのまま oxazine 環に置き換えた化合物(図 18A)をベースに開発を並行させ(Fuchino et al. 2018)、薬剤の塩基度を低下させることに努めていた。この化合物は残念ながらそのままでは *in vivo* で Aβ 減少は全く見られなかった上に 5 μM の濃度で hERG 阻害効果を呈した。更にこれを改善すべく oxazine 環の二重結合部分に置換基を様々導入してみたが、今度はイヌやサル体内半減期がおおよそ 5 時間程度であることが判明した。そこで今度は oxazine 環の二重結合両端にフッ素や fluoromethyl 基を導入したところ、良好な pKa 値と薬効を示した他、P 糖タンパクへの結合も見られないようになった(Nakahara et al. 2018)。なお、下部尻尾の部分を pyrazine 環に変えたところ、CYP2D6 阻害効果も減弱したという。

一方、マイナーではあるが、C4 位に酸素が位置する 1,4-oxazine 型 BSI も存在する。代表的なのが Novartis 社の CNP-520 である(Neumann et al. 2018) (図 18A)。この化合物は 3 か月の健常者への投与実験に於いて、一日一回 85 mg の投与で CSF から実に 90 %もの Aβ を除くことに成功している。2015 年には Novartis 社と Amgen 社合同で 2 つの臨床試験第 2/3 相、GENERATION1 と GENERATION2 を始めている。前者には homo で ApoE4 を持つ 60 から 75 歳の 1340 名、後者には homo、若しくは hetero で ApoE4 を有する 60 から 75 歳の 2000 名をリクルートしてきたが、一部の認知機能の指標に於いて薬剤投与群で悪化が確認され、2019 年 7 月に両方ともに中止の宣告を発令した。なお、1,4-oxazine 骨格を持つ化合物として Eli Lilly 社も遅れながら 1 つ発表した。この化合物は、中心骨格ではなく尻尾の部分を 5-cyano[1,3]-thiazole-[5,4b]-pyridine-2-carboxamide に置換することで高い BACE1 選択性を獲得した珍しい化合物である。

### 1.11.3.3 Thiomorpholine-dioxide、thiadiazine-dioxide 型 BSI

このタイプの BSI は thiazine 環や oxazine 環の代わりに thiomorpholine-dioxide や thiadiazine-dioxide を配置した化合物であり、代表的な物に Merck 社の MK-8931 (verubecestat)がある(図 18B)。2018 年初めにリスク対ベネフィットのバランスがよろしくないという結論に達し、臨床試験第 3 相が取りやめになった。とは言え、最初期に臨床試験に突入した化合物として、このタイプに BSI も幅広く研究開発がなされてきた。特に開発元の Merck は、2014 年から 2018 年 MK-8931 を基にした化合物を 21 種類特許申請している。

最初に報告したのが、spiro iminothiazine dioxide、及び spiro imino thiadiazine 骨格を有するタイプの BSI であった。この spiro 環を有する化合物は往々にして iminothiazine dioxide 群の方が imino thiadiazine 群より薬効が高いことが多かったが、BACE1 選択性に欠けるのが難点であった。また、環状構造を thiomorpholine 環や thiadiazine 環に融合させた構造も Merck 社は開発しており、中には Eli Lilly 社の LY-2886721 の sulfonyl analogue もあった。他には、中心骨格と amidine を酸素を含む環状構造でつなぎ、tetrahydro benzoxepine 融合型も発表されている(thiadiazine 環と融合させたものは Merck 社のものだが、thiomorpholine 環融合型は Amgen 社の化合物である)。この化合物は thiadiazine 環と tetrahydro benzoxepine 構造の間の水素の向きで trans 型と cis 型の 2 種類があるが、cis 型は trans 型に比べて活性が数十倍も低下すると報告されている。同時にこの化合物は BACE1 選択性も高く、なかなか drug-like properties は良かったという。一方で Amgen 社の thiomorpholine 環融合型は、Cathepsin D 阻害が殆ど見られず、更に trans 型と cis 型の間で決定的な potency の差は無かった。

一方、sulfoximine や sulfonimidamide 誘導体は特殊な物理化学的な特性を持っていることが知られており(Frings et al. 2017)、主に Merck 社と Roche 社によって様々な修飾が施されてきた。特に Roche 社は guanidyl 基の窒素が thiadiazine 環の窒素、若しくは thiomorpholine 環で対応する位置の炭素と結合して環状構造を有した bicyclic sulfonimidamide 構造を持つ一連の化合物を創出した。中でも、guanidyl 基の窒素を thiomorpholine 環の C3 位炭素とリンクし五員環を成した化合物が非常に高い potency を有しており、マウス *in vivo* 実験では 30 mg/kg の経口投与で 4 時間後には 86 %もの A $\beta$  が減少したと報告された。なお、一連の化合物は、中央に fluoropyridinyl 環を配置した方が、fluorophenyl 環より potency が高い。

マイナーな修飾としては、Amgen 社が行ったフッ素置換がある。これは、中央の amide 環を bioisoster である fluorotethene に置換したものであり(Choudhary and Raines 2011)、良好な potency と BACE1 選択性を示していた(1 日 1 回の 10 mg/kg 経口投与でラット脳内 A $\beta$  を 90 %以上取り除いた)。

### 1.11.3.4 Piperazine、pyrrolidine 型 BSI

窒素のみを含む複素環化合物の開発は Janssen 社が主に行っていた。彼らは中心骨格となる piperazine 環に animidazole 環や triazole 環、CHF<sub>2</sub>-imidazole 環等を融合させたが、いずれもその高い *in vitro* 活性とは裏腹に *in vivo* 効果は薄かった。その後 Janssen 社は THF 環を融合させる試みも行ったが(Bel Abed et al. 2015)、pKa 値の低下と同時に薬効の低下も見られ、臨床試験入りすることは無かった。

また Janssen 社は 2015 年に pyrrolidine 環を中心骨格とする BSI も発表している(Mateu et al. 2015)。一連の化合物は pKa 値も高く、IC<sub>50</sub> が  $\mu$ M オーダー以上になるものも多かった為、結局は深い研究がなされることは無かったが、構造の中心にある六員環と pyrrolidine 環を spiro 環で結ぶことによって化合物がエネルギー的に安定になって BACE との間で立体障害が生じなくなることが、薬効を激減させたという興味深い結果を報告する形となった。

### 1.11.3.5 1,3-Oxazoline 型 BSI

AstraZeneca 社開発の AZD-3293 (lanabecestat) は五員環を有する heteroaryl 環を中心骨格とし、2 つの spiro 環状構造を導入した BSI であり、2018 年に臨床試験の中止が発表されている(図 18C)。現在では下火になっているが、AZD-3293 の imidazole 環を oxazole 環に置換した 1,3-oxazoline 型 BSI も AstraZeneca 社主体で開発がなされていた。このタイプの BSI も創薬方面としてはともかく、BACE1 との共結晶構造の解析を通じて S3 pocket への相互作用やヘアピン構造との立体障害を予測し、コンピューター上で効果的に置換基をデザインすることで、AZD-3292 には殆どなかった BACE1/BACE2 選択性に 50 倍を超える差をつけることに成功したという点から、基礎科学研究への貢献は非常に大きかったと言える(Johansson et al. 2018)。

### 1.11.3.6 Tetrahydropyridine-2-amine 型 BSI

このマイナーなタイプの BSI は、tetrahydropyridine 環の C2 位に amine 基を置換した構造を中心骨格とする BSI であり、デンマークの Lundbeck 社が主に開発を進めてきた(Hsiao et al. 2019)。比較的 potency も高く、P 糖タンパクとも作用しないので CNS 透過性も非常に高いことが長所である。同社は主に tetrahydropyridine 環をフッ素化修飾してきたが、2017 年に発表された THF 環融合型の化合物は in vivo の薬効が最大になり、10 mg/kg と 30 mg/kg の投与でラット脳内 A $\beta$  をそれぞれ 48 % と 64 % 減少させている。

## 1.12 研究目標

AD は全世界で患者数が 4000 万人かそれ以上に上り、認知症患者の大部分を占める神経変性疾患である。現時点では 4 つの対症療法薬によって認知機能の低下を抑えるしか AD に対抗する手段が無く、AD 発症の原因となる A $\beta$ 42 や tau を取り除く確固たる原因療法薬の開発が急務である。近年、Biogen 社の Aducanumab が FDA 主導のビッグデータの再解析の結果患者に於ける有意に認知機能低下を遅らせることが判明して FDA への認可を再申請しており、A $\beta$  病態に基づく Amyloid 仮説が AD 治療に有効だと再評価されている。A $\beta$  の産生を決定する  $\gamma$ -secretase はかつて AD 治療の主要な標的であったが、度重なる  $\gamma$ セクレターゼ創薬の失敗の影響で現在は研究開発が下火になっている。確かに  $\gamma$ -secretase の構造や基質切断の制御法等不明な点はまだまだ多いのは事実だが、前述 Amyloid 仮説の有効性の証明や、GSM という高い選択性と低い副作用を持つ化合物の研究開発の実績もあることから、AD 治療のターゲットとして筆者は依然魅力的に感じている。加え、低分子化合物は投与法の簡便さやそのコストから患者の負担が一番少ない治療法である上、単剤投与ではなく抗体医薬や再生療法等との併用による工夫でまだまだ有効な治療効果を発揮できると考えている。本研究は  $\gamma$ セクレターゼの特に活性中心サブユニットである PS1 の構造、及び構造活性相関、特に毒性種 A $\beta$ 42 の産生を制御する構造活性相関に迫り、それを解き明かすことで  $\gamma$ セクレターゼを標的とした AD 治療薬開発に貢献することを目標としている。

## 2. 実験材料と実験手法

### 2.1 発現コンストラクトの作成

#### 2.1.1 SCAM、Crosslink 用 Cys 置換 PS1

*PS1*<sup>-/-</sup>*PS2*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblast (DKO MEF) に、Retrovirus infection 法(Morita et al., 2000)(Kitamura et al. 2003)により遺伝子導入を行い、発現コンストラクトを作製した。SCAM による解析に用いる変異体は Cys PS1 Mt を発現させた。野生型 PS1 には、5 つの内因性 cysteine (C92、C158、C263、C410、C419) を保持するため、これらの cysteine を Serine に置換した Cysless PS1 Mt の cDNA を、Retrovirus ベクターである pMXs-puro の multicloning site (MCS) の Hpa1、Xho1 サイトに導入したものを template とした。この template と primer を用いて、後述の long PCR により、SCAM 用には 1 アミノ酸だけ、Crosslink 実験には 2 アミノ酸だけ cysteine を持つ PS1 をコードする発現コンストラクトを作製した。ただし、Cys PS1 Mt の  $\gamma$  活性を測定する際は、Cysless PS1 Mt ではなく PS1wt を Hpa1、Xho1 サイトに導入したものを template とした。用いた primer は以下に記載する。なお、forward の primer のみを記載し、相補的な配列である reverse の primer は省いた。また、導入 cysteine のコドンには下線を引いた。

Primer の名前	Primer の DNA 配列
G78C	5'-ggaagaagatgaggagctgacattgaaatattg <u>cgcca</u> agcatgtg-3'
I100C	5'-gtcgtggctacctg <u>taagtc</u> agtcagc-3'
C158C	5'-gtataaatacaggtg <u>ctata</u> aggatccatgcc-3'
Y159C	5'-gtataaatacaggtg <u>ctata</u> aggatccatgcc-3'
K160C	5'-gtataaatacaggtg <u>ctata</u> aggatccatgcc-3'
V161C	5'-caggtgctataag <u>tgcat</u> ccatgcctggc-3'
I162C	5'-ggctctataaggtc <u>tgcat</u> gctgctgcttattatcatctc-3'
H163C	5'-ggctctataaggtc <u>tgcat</u> gctgctgcttattatcatctc-3'
A164C	5'-ggctctataaggtc <u>tgcat</u> gctgcttattatcatctc-3'
W165C	5'-cctataaggtcatccatg <u>ctgct</u> tattatcatctc-3'
L166C	5'-cctataaggtcatccatg <u>ctgct</u> tattatcatctc-3'
I167C	5'-ggctcatccatgctgctt <u>gtata</u> tcatctctattgttgc-3'
I168C	5'-ggctcatccatgctgctt <u>gtata</u> tcatctctattgttgc-3'
S169C	5'-ccatgctgcttattat <u>atgct</u> ctctattgttgcgttc-3'
S170C	5'-ccatgctgcttattat <u>atgct</u> ctctattgttgcgttc-3'
L171C	5'-ggcttattatcatctct <u>gctg</u> ctgcttcttttttcattc-3'
L172C	5'-ggcttattatcatctct <u>gctg</u> ctgcttcttttttcattc-3'
L173C	5'-ggcttattatcatctct <u>gctg</u> ctgcttcttttttcattc-3'
L174C	5'-ggcttattatcatctct <u>gctg</u> ctgcttcttttttcattc-3'
F175C	5'-ctctattgttgc <u>gtgct</u> ttttttcattcatttactggggg-3'
F176C	5'-ctctattgttgc <u>gtgct</u> ttttttcattcatttactggggg-3'
F177C	5'-ctctattgttgc <u>gtgct</u> ttttttcattcatttactggggg-3'



S178C	5'-ctattgttgcgttctctttttt <u>gtttc</u> atttacttggggg-3'
F179C	5'-ctattgttgcgttctcttttttagct <u>gc</u> atttacttggggg-3'
I180C	5'-gctgttcttttttccattct <u>gtt</u> acttgggggaagtg-3'
Y181C	5'-gttcttttttccattcattt <u>gctt</u> gggggaagtgtttaaacc-3'
L182C	5'-gttcttttttccattcatttact <u>gc</u> gggggaagtgtttaaacc-3'
G183C	5'-gttcttttttccattcatttactt <u>gtgc</u> gaagtgtttaaacc-3'
E184C	5'-cattcatttacttggggt <u>gc</u> gtgtttaaaccctataacg-3'
V185C	5'-catttacttgggggaat <u>gc</u> tttaaaccctataacgttgc-3'
F186C	5'-catttacttgggggaagt <u>gtg</u> ttaaaccctataacgttgc-3'
K187C	5'-catttacttgggggaagtgtttt <u>gc</u> acctataacgttgc-3'
L383C	5'-ggaaaggggagtaaaacttggat <u>gc</u> ggagatttcattttctacagtg-3'
I387C	5'-cttgattgggagatttct <u>gtt</u> tctacagtgttctggttgg-3'
L435C	5'-caagaaagcattgccagtt <u>gt</u> ccaatcctcatcacctttg-3'

### 2.1.2 各種変異体導入型 PS1

Point mutation の PS1 に対して惹起する構造変化を検出する場合、1 アミノ酸だけ Cys を有する PS1 を発現するコンストラクトを template とし、それぞれ primer を用いて FAD 変異を template に導入した。導入変異体が Cys 置換部位に近い場合、template に合わせて該当残基を予め Cys の配列に変化させた特殊 primer を設計した。使用プライマーは forward のみ以下に記す。なお、変異体については変異箇所を下線を引いた。

Primer の名前	Primer の DNA 配列
I100C/Y106A	5'-cct <u>g</u> taagtcagtcagcttt <u>g</u> taccgggaaggatgggc-3'
Y106A	5'-ccattaagtcagtcagcttt <u>g</u> taccgggaaggatgggc-3'
P117L	5'-gggcagctaactctataccct <u>a</u> ttcacagaagataaccg-3'
M139V	5'-aattctgaatgctgccatc <u>g</u> tgatcagtgctattgttgc-3'
H163F	5'-caggtgctataaggtcate <u>ttt</u> gcctggettattatcatc-3'
H163A	5'-caggtgctataaggtcate <u>gct</u> gcctggettattatcatc-3'
H163L	5'-caggtgctataaggtcate <u>ctt</u> gcctggettattatcatc-3'
H163T	5'-caggtgctataaggtcate <u>act</u> gcctggettattatcatc-3'
S169F	5'-catcatgcctggcttattatatttctctattgttgcgttc-3'
S169A	5'-catcatgcctggcttattatag <u>cat</u> ctctattgttgcgttc-3'
S169T	5'-catcatgcctggcttattata <u>ac</u> atctctattgttgcgttc-3'
S169Y	5'-catcatgcctggcttattatattctctattgttgcgttc-3'
S170A	5'-ccatgcctggcttattatcatcagctctattgttgcgttcttttttc-3'
S170L	5'-ccatgcctggcttattatca <u>ctt</u> ctattgttgcgttcttttttc-3'
S170T	5'-ccatgcctggcttattatca <u>act</u> ctattgttgcgttcttttttc-3'
S170Y	5'-ccatgcctggcttattatcat <u>a</u> tctattgttgcgttcttttttc-3'

F176L	5'-catctctattgttgcgtgttc <u>cttttt</u> cattcatttac-3'
F177L	5'-catctctattgttgcgtgttc <u>ttttt</u> gcattcatttacttg-3'
F177C/F176L	5'-catctctattgttgcgtgttc <u>tttgc</u> agcttcatttac-3'
F177C/Y181A	5'-gctgttcttttgcctcattcattgc <u>cttggggg</u> aagtgtttaa <sup>aac</sup> -3'
Y181A	5'-gctgttcttttttcattcattgc <u>cttggggg</u> aagtgtttaa <sup>aac</sup> -3'
E184D	5'-cattcatttactgggggacgtgtttaa <sup>aac</sup> ctataac-3'
Y195A	5'-cctataacgttgctgtggac <u>ccc</u> attactgttgactcctgatc-3'
Q222F	5'-gaaagggtccacttcgactc <u>ttt</u> caggcatatctcattatgattag-3'
Q222A	5'-gaaagggtccacttcgactc <u>ggc</u> aggcatatctcattatgattag-3'
Q222L	5'-gaaagggtccacttcgactc <u>ctg</u> caggcatatctcattatgattag-3'
Q222T	5'-gaaagggtccacttcgactc <u>cag</u> caggcatatctcattatgattag-3'
Q222Y	5'-gaaagggtccacttcgactc <u>tacc</u> aggcatatctcattatgattag-3'
Q223F	5'-gtccacttcgactccag <u>ttt</u> gcatatctcattatgattag-3'
Q223A	5'-gtccacttcgactccag <u>ggc</u> gcatatctcattatgattag-3'
Q223L	5'-gtccacttcgactccag <u>ctg</u> gcatatctcattatgattag-3'
Q223T	5'-gtccacttcgactccag <u>acg</u> gcatatctcattatgattag-3'
Q223Y	5'-gtccacttcgactccag <u>tacg</u> catatctcattatgattag-3'
V236S	5'-gattagtgcctcatggcctgtc <u>cttt</u> tacaagtacc-3'
L383C/G384A	5'-ggggagttaaactggatg <u>ggc</u> gagatttcattttctacagtg-3'
G384A	5'-taaaactggattg <u>gc</u> agatttcattttcta-3'
I387C/G384A	5'-taaaactggattg <u>gc</u> agatttctg <u>ttt</u> tcta-3'

### 2.1.3 大腸菌ベクターの作成

上記 primer を用いて、Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagane)の原理に従い、Cys 置換型 PS1 を作製した。Polymerase として Platinum1 Pfx DNA polymerase (*Invitrogen*)、若しくは KOD-Plus-Neo (TOYOBO)を用いた。PCR の条件は、Pfx DNA polymerase の場合は 95 °C 5 min の denature 後、95 °C 1 min の denature、52 °C 1 min、68 °C 5 min を 18 cycle 繰り返し、その後 68 °C 10 min の extension を行った。KOD-Plus-Neo の場合は 94 °C 2 min の denature 後、98 °C 10 sec、68 °C 1 min/kb の extension を 15 cycle 繰り返した。続いて反応液に 1 μL の Dpn1 (NEB)を加え、37 °C 4.5 h の incubate により template プラスミドを分解し、反応後の溶液を大腸菌 DH5α にトランスフォームし、目的プラスミドを回収した。塩基配列はユーロフィンジェノミクス株式会社シーケンシングサービスにより解析した。

## 2.2 試薬、Buffer 組成

### 2.2.1 Cells

■ PS1<sup>-/-</sup>PS2<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblast (DKO) (Herreman et al. 2000)  
 PS1 と PS2 を DKO した Psen1<sup>-/-</sup>Psen2<sup>-/-</sup>マウス胎児の線維芽細胞由来の培養細胞。Dr. Bart De Strooper (KU Leuven) よりご供与頂いた。

#### ■ DKONL

DKO 細胞に K670M/N671L Swedish 変異 human APP (APP<sup>sw</sup>) を過剰発現させた細胞。Stable の維持のため、puromycin 1 µg/mL を含む培地で培養した。APP<sup>sw</sup> は β-secretase による切断が亢進する為、Aβ の産生総量が上昇し、ELISA にて分泌 Aβ の量が測定可能になる。

#### ■ #1210 (Imamura et al. 2009)(Futai et al. 2016)

DKO 細胞に SPC99-GAL4/VP16-6myc、UAS-Firefly luciferase、Nde-6myc、CSL-Renilla luciferase、CMV-EGFP を stable に過剰発現させた細胞。Luciferase assay にて APP と Notch の切断活性を同時に測定することが出来る。

#### ■ HEK293A

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞より、接着性が高く扁平な細胞としてサブクローニングされた HEK293A 細胞は一條秀憲先生(東京大学)よりご供与頂いた。

#### ■ Plat-E (Morita et al., 2000)

ベクタープラスミドを用いた遺伝子導入によりその遺伝子が細胞染色体 DNA に組み込まれ、転写で生じたベクター-RNA ゲノムをウイルス粒子に取り込み、組み換えレトロウイルスを産生する。HEK293T を改良した細胞。ウイルス産生能の維持の為、Blasticidin 10 µg/mL、puromycin 1 µg/mL を含む培地で培養した。北村俊雄先生(東京大学)よりご供与頂いた。

### 2.2.2 Buffers

#### ■ Western blotting

1 × Sample Buffer : 2 % SDS、80 mM Tris-HCl pH 6.8、15 % glycerol、Briliant green、CBB-G250、断りが無ければ 1 % 2-mercaptoethanol が常に入っているものとする。

1 × Running Buffer (Tris-Glycine) : 250 mM Tris base、2 M Glycine、1 % SDS

1 × Running Buffer (Tris-Tricine) (陽極) : 0.2 M Tris base pH 8.9

1 × Running Buffer (Tris-Tricine) (陰極) : 0.1 M Tris base、0.1 M Tricine、0.1 % SDS

1 × Blotting Buffer : 25 mM Trizma base、190 mM Glycine、20 % Methanol

TS : 50 mM Trizma base、150 mM NaCl、pH 7.6

TS-tween : 0.1 % Tween20、50 mM Trizma base、150 mM NaCl

#### ■ SDS-Urea gel Electrophoresis/Western blotting

Gel Buffer : 3 M Tris base、3 % SDS (pH 8.45)

AA solution : 6.75 M Acrylamide、100 mM Bis-Acrylamide

#### ■ ELISA

EC Buffer : 400 mM NaCl、2 mM EDTA、10 % Block Ace、0.2 % BSA、0.05 % NaN<sub>3</sub>、0.075 % CHAPS、in 20mM phosphate buffer、pH7.0

C Buffer : 500 mM NaCl、2 mM EDTA、10 % Block Ace、0.2 % BSA、0.1 % Thimerosal、in 20 mM phosphate buffer、pH 7.0

Coating Buffer : 0.1 M sodium bicarbonate、pH9.5

Blocking Buffer : 25 % Block Ace、0.05 % NaN<sub>3</sub>、in PBS

#### ■ SCAM、Crosslink

1 × D-PBS : 2.7 mM KCl、1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140 mM NaCl、8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O

1 × PBS : 8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、131mM NaCl、pH7.4

#### ■ Preparing microsomes、Cell free assay、Preparing solubilized fraction、PAL

1 × HEPES Buffer : 10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH7.4

1 × Homogenize Buffer : 20 mM HEPES、140 mM KCl、0.25 M Sucrose、1 mM EGTA、complete protease inhibitor cocktail

Solubilization Buffer : 1 % CHAPSO、10 mM HEPES、150 mM NaCl

#### ■ sC99 purification、*In vitro* assay

1 × Lysis Buffer : 50mM Tris base、150mM NaCl、1% Nonidet P-40、complete protease inhibitor cocktail、pH7.4

Wash Buffer : 50mM Tris base、0.25% n-dodecyl β-D-maltoside、complete protease inhibitor cocktail、pH7.4

Elution Buffer : 100mM Glycine、0.25% n-dodecyl β-D-maltoside、pH2.7

Neutralization Buffer : 1M Tris base、pH8.0

1 × HEPES Buffer : 10mM HEPES、145mM KCl、pH7.6

### 2.2.3 Antibodies

82E1 : 抗原部位 Aβ 1-16 (IBL)

G1Nr5 : 抗原部位 PS1 2-70 (Sato et al. 2008)

G1L3 : 抗原部位 PS1 297-379 (Tomita et al. 1999)

PNT3 : 抗原部位 Pen-2 1-26 (Hayashi et al. 2004)

APP(C) : 抗原部位 human APP CTF (IBL)

## 2.3 実験手法

### 2.3.1 細胞の培養条件

MEF 細胞、Plat-E 細胞何れもリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含まず、penicilin (*Invitrogen*) 50 unit/mL、streptomycin 50 mg/mL、10 %非働化ウシ胎児血清(*Cell Culture Technologies*)を含む高グルコースダルベッコ 改変イーグル培地 (DMEM *Invitrogen*)中、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air、37 °C湿式インキュベーター内で培養し、70 ~ 90 % confluency 時に継代した。

### 2.3.2 DKO 細胞への retrovirus infection

6 well plate に Plat-E 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well でまいた。37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 24 h 培養後、transfection を行った。transfection は、次の要領で行った。Polyethylenimine (PEI) : Opti-MEM = 8  $\mu$ L : 100  $\mu$ L で混合し 5 min 室温で放置した後、DNA を 1000 ng/well 加え混合した。さらに 25 min 室温で放置し、その溶液のうち 100  $\mu$ L を 1 mL/well の培地と培地交換した Plat-E に添加し、軽く振って混ぜた。transfection 後、さらに培養し約 24 h 後、培地を 1 mL/well の新しい培地と交換した。培地交換から 24 h 後、上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターに通して virus 溶液とした。一方、6 well または 24 well plate に DKO MEF 細胞を前者には  $2 \times 10^5$ 、後者には  $2 \times 10^4$  cells/well になるようにまき、24 h 培養後、培地を抜き 3 倍に希釈し virus 溶液と final 5.0  $\mu$ g/mL となるよう polybrene 溶液を添加した。co-infection を行う場合、2 種類の virus 溶液を半分ずつ足し合わせ、合計で通常 infection 時の溶液量と等しくなるようにした。その後 6 well の場合は 24 h 後、24 well の場合は 6 h 後、培地交換を行った。pMXs-puro ベクターを Plat-E に transfection し DKO 細胞に infection した後 stable 細胞を作製した際は、puromycin 2.5  $\mu$ g/mL を含む培地で selection をかけ、selection 後は 1.0  $\mu$ g/mL に濃度を落として発現維持した。

### 2.3.3 ELISA

サンプルの A $\beta$  濃度の測定は、Human/Rat  $\beta$  Amyloid (40) ELISA Kit II、若しくは Human/Rat  $\beta$  Amyloid (42) ELISA Kit II (和光純薬)を用い、説明書に従って発色後、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

### 2.3.4 SDS-PAGE、Western Blotting 解析

サンプルと分子量マーカー Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (BIO-RAD) を SDS-PAGE で泳動した。このマーカーは、250、150、100、75、50、37、25、20、15、10、5、2 kDa の分子量に検出される。stacking 時の泳動条件は 50 V、500 mA、30 min で行い、running 時の泳動条件は 120 V、500mA、40 min (夏)若しくは 45 min (春秋)若しくは 50 min (冬)で行った。泳動後、ゲルを取り出し、methanol にさらして Blotting buffer で浸透した PVDF 膜(membrane) と重ね、転写した。転写は、1000 V、250 mA、120 min もしくは 60 V、500 mA、90 min 電流を流して行った。転写後 membrane を、5 % skim milk (BD)含む TS-Tween で 30 min 振盪し、その後 TS-Tween で軽く wash した。次に、一次抗体を 82E1 ならば Immuno-enhancer Reagent A (Wako)、その他一次抗体は 2.5 % skim milk/TS-tween 若しくは適度な濃度に希釈し、その中に membrane を入れ、4 °C で O/N 振盪した。その後、一次抗体を回収し membrane を TS-Tween で 10 min  $\times$  3 wash し、二次抗体を A $\beta$  観察時には Immuno-enhancer Reagent B (Wako)、その他の場合は 2.5 % skim milk/TS-Tween で 10000 倍希釈し、その中に membrane を入れ、室温で 2 h 振盪した。その後、再び TS-Tween で 10 min  $\times$  3 wash し、調製した発色液 ImmunoStar™ Kit (Wako)若しくは ImmunoStarBasic (Wako)若しくは Super Signal (Thermo)に浸し、LAS-4000 (FUJI FILM、GE)で検出した。

### 2.3.5 SDS-Urea gel 電気泳動/Western Blotting

A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 以外の A $\beta$  分子種を検出するため、A $\beta$ 37 から A $\beta$ 42 までの分子種を分離できる Urea を加えたアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。Urea 2.40 g、AA solution 1.01 mL、Gel buffer 1.67 mL、DW 0.45 mL、10 % APS 25  $\mu$ L、TEMED 7.5  $\mu$ L で separating gel を作製し、AA solution 125  $\mu$ L、Gel buffer 390  $\mu$ L、DW 1.05 mL、10 % APS 7.5  $\mu$ L、TEMED 3.75  $\mu$ L で stacking gel を作製した。低温で Urea が析出するため、Western Blotting は 1000 V、250 mA、120 min の条件で室温で行った。Blotting 後、1  $\times$  PBS で membrane を 5 min boil した。

### 2.3.6 BCA assay

各種 *in vitro* のタンパク実験ではタンパク濃度を揃える必要がある為、以下の手順で BCA assay を行い、タンパク濃度を測定した。96 穴プレートに 1×HEPES Buffer で希釈したスタンダードを 10  $\mu$ L、若しくは 2-melcaptoethanol を含まない 1×Sample Buffer で 10 倍希釈したタンパク溶液 10  $\mu$ L を添加し、そこに Pierce<sup>R</sup> BCA Protein Assay Kit を用いて作成した酵素基質液を 200  $\mu$ L 加え、37 °C で 20 ~ 30 min インキュベートした。その後、プレートリーダーで 562 nm の吸光度を測定し、タンパク濃度を計測した。

### 2.3.7 SCAM (intact cells)

Retrovirus infection 法により各種変異 PS1 を stable に DKO MEF 細胞で発現させた。それぞれの変異 PS1 を発現した細胞を 1×10<sup>6</sup> cells/well になるように 12 well plate に撒き、12 h 後に confluent になるようにした。GSI と GSM の競合実験の場合、5000 倍希釈で化合物をこの段階で添加する。12 h 後、培地を抜いて 1×PBS で 1 回 wash した後、50 倍希釈した MTSEA-biotin を終濃度 1 mM で添加した DMEM (Cys-) を 450  $\mu$ L ずつ入れ、遮光して 4 °C で 30 min、incubate した。薬物を添加する実験の場合、MTSEA-biotin の incubation の前に各種薬剤を 1000 倍希釈で適切な濃度に希釈した DMEM (Cys-) を 500  $\mu$ L 加え、遮光して 4 °C で予め 30 min incubate し、薬物との結合を保持する為 wash はしなかった。MTS 競合剤による競合実験の場合、MTSEA-biotin の incubation の前に MTS 競合剤を終濃度 2 mM に希釈した DMEM (Cys-) を 500  $\mu$ L 加え、遮光して 4 °C で予め 30 min incubate し、薬物との結合を保持する為 wash はしなかった。MTSEA-biotin incubation 後 PBS による Wash を 2 回行い、過剰分の MTSEA-biotin を除き、用時調整した 1 % SDS/PBS で細胞を回収し、amplify 35 % で 2 min 30 sec sonication を行った。うち Input 用にサンプルをとり、1/4 量の 5×Sample Buffer を加えた。残りに、予め 1×D-PBS で溶媒を置換した Sepharose<sup>TM</sup> High Performance beads (GE Healthcare) を 30  $\mu$ L 加え、3 h Rotate した。その後用時調整した 1 % SDS/PBS で ×5 wash し、1×sample buffer を加え、input 用の sample と同時に 1 min 100 °C で boil した。それらのサンプルで、Western Blotting により PS1 NTF を検出した。

### 2.3.8 Preparing microsomes

Retrovirus infection 法により変異 PS1 を stable に DKO 若しくは DKONL 細胞で発現させ、15 cm dish にまいた。90 % confluency 到達後、それぞれの細胞を 1×PBS で wash 後、1×D-PBS 5 mL/plate を加えてスクレイパーで剥ぎ取り、回収した。15 cm dish 2 枚分を 1 サンプルとし、750 ×g 10 min で centrifuge し上清を除去し、ペレットを得た。そのペレットに 1×Homogenize Buffer 2 mL/sample を加え 27 G 針で数回 suspend し、Strength 4 で 1 min homogenize した。1400 ×g で 10 min centrifuge し、上清をとった。ペレットにはもう一度 1×Homogenize Buffer 2 mL/sample を加え、同様に homogenize、遠心し、上清をとった。2 つの上清を併せ、今度は 29000 ×g で 40 min centrifuge し、上清を破棄した。このペレットを microsome 画分とし、使用時まで -80°C で保存した。

### 2.3.9 SCAM (microsomes)

2.3.8 の手法で得た microsome 画分に 200  $\mu$ L の 1×D-PBS を加え、BCA assay でタンパク濃度測定した後に 1×D-PBS で 1 mg/mL までタンパク溶液を希釈した。反応には終濃度 1 mM になるよう MTSEA-biotin を加え、遮光して 4 °C で 5 min incubate した。薬物を添加する実験の場合、MTSEA-biotin の incubation の前に各種薬剤を適当濃度になるよう加え、遮光して 4 °C で予め 30 min incubate してある。Incubation 後、12900 ×g、5 min、4 °C で遠心して microsome 画分を沈殿させ、上清を 200  $\mu$ L の 1×D-PBS に置換して優しくピペティングし、同様の操作をもう一度繰り返した。その後上清を 500  $\mu$ L の 1 % SDS/PBS に置換し、室温で 30 min Rotate して可溶化した。可溶化後は一部を input として

取得し、残りは予め 1×D-PBS で溶媒を置換した Sepharose™ High Performance beads (GE Healthcare)を 30 µL 加え、室温、3 h Rotate した。その後は intact cell の場合と同じように wash し、western blotting で解析した。

### 2.3.10 Crosslink

2.3.8 の手法で得た microsome 画分に 200 µL の 1×D-PBS を加え、比較群の間でタンパク濃度量が同じになるように調整した。27 G シリンジで優しくピペッティングした後、DMSO で 8 mM の濃度に調整した MTS クロスリンカーを 40 倍希釈で終濃度 0.2 mM になるように加え、37 °C 30 min incubate した。MTS クロスリンカーの代わりに Copper-phenanthroline (Cu-PNT)を使用する場合は、DMSO に溶かした 120 mM の CuSO<sub>4</sub> と 500 mM の phenanthroline をそれぞれ終濃度 3 mM と 15 mM になるように加え、室温にて 2 h incubate した。薬物を添加する実験の場合、クロスリンカーや Cu-PNT の incubation の前に各種薬剤を適当濃度になるよう加え、遮光して 4 °C で予め 30 min incubate してある。その後、5M の N-Ethylmaleimide を終濃度 10 mM になるように加えて crosslink の反応を止めた後、2-mercaptoethanol を含まない 5×sample buffer を 1/4 量加えて即日 western blotting で解析した。

### 2.3.11 Cell free assay

Double Cys 変異 PS1 を過剰発現させた DKONL 細胞の microsome 画分は 2.3.8 の方法で取得された。Cell free assay にあたっては、終濃度で 0.5 mM diisopropylfluorophosphate、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 µg/mL tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride、1µg/m L antipain、1 µg/mL leupeptine、10 µg/mL phosphoramidon、1 mM EGTA、5 mM EDTA、5 mM phenanthroline を含む 1×Homogenize buffer でタンパク濃度を 2.5 mg/mL に調整し、microsome 溶液 40 µL に 8 mM のクロスリンカーを終濃度 0.2 mM になるように加え、適切な長さ incubation した。その後、5M の N-Ethylmaleimide を終濃度 10 mM になるように加えてクロスリンクの反応を止めた。薬剤による構造変化の有無を検出する際はその後適切な濃度と時間で incubation を行った。反応後のサンプルは PS1 NTF と PS1 CTF 解析用、及び Aβ 測定用に分割した。前者は 2-mercaptoethanol を含まない 5×Sample buffer を 1/4 量加えて boil をせずに western blotting で解析した。後者は以下のクロメタ沈殿によってタンパクを不要な脂質と分離し、SDS-Urea gel 電気泳動にて解析した。まず chloroform : methanol = 2 : 1 溶液をタンパク液の 4 倍量加えて転倒混和した後、タンパク液の 10 倍量の methanol を加えて分離する。不溶性のタンパクは 4 °C 5700 ×g 20 min の遠心で沈殿させた後に上清を破棄して風乾させ、25 µL の 1×Sample buffer に溶けきるまで 100 °C で boil した。

### 2.3.12 Preparing solubilized fraction

2.3.8 で記述した方法により得られた microsome 画分 4 サンプルを 500 µL の Solubilization Buffer に溶かし込み、140000 ×g 60 min で centrifuge した。この時得られた上清を可溶化画分とし、残ったペレットは同様に半分 250 µL の Solubilization Buffer に溶かし込み、centrifuge して上清を取得、これを再可溶化画分とし、長期保存は避けず実験に使用した。

### 2.3.13 Photoaffinity Labeling (PAL)

2.3.12 の手順で得られた可溶化画分のタンパク濃度を BCA assay で測定し、タンパク終濃度が 1 mg/mL、CHAPSO 0.25 %になるよう、Solubilization Buffer と 1×HEPES Buffer を用いて希釈した。ここから一部 input としてサンプルを取得した。Cu-PNT による構造固定時にはまず 333 倍希釈で 1 M CuSO<sub>4</sub> を、33.3 倍希釈で 0.5 M phenanthroline を終濃度それぞれ 3 mM と 15 mM になるように加え、室温で 2 h incubation した。その後 500 倍希釈で 5 M NEM を終濃度

10 mM になるように加え crosslink 反応を停止させた。標識にはプローブ化合物を 1000 倍で終濃度 20  $\mu$ M になるよう希釈し、遮光して on ice で 5 min incubation した。Incubation 後、溶液を 6 well plate に移し、UV ランプ(XX-15BLB lamp) を 90 min 照射した。その後 20 % SDS/HEPES を 52.6  $\mu$ L 加え、予め 1  $\times$  D-PBS で溶媒を置換した Sepharose™ High Performance bead (GE Healthcare) を 40  $\mu$ L 加え、室温、O/N で Rotate した。翌日、1 % SDS/PBS で wash  $\times$  5 し、1  $\times$  sample buffer を加え、input 用の sample と同時に 1 min 100  $^{\circ}$ C で boil した。それらのサンプルは Western Blotting で解析された。

### 2.3.14 sC99 purification

sC99 の精製には、DKO 細胞とは別の方法で transfection し一過性に発現させた HEK293A 細胞を使った。Transfection 2 日前にまず 10 cm dish 半分量の HEK293A 細胞を 15 cm dish にまいた。2 日後 penicilin (*Invitrogen*) 50 unit/mL、streptomycin 50 mg/mL のみを含み 10 % 非働化ウシ胎児血清(*Cell Culture Technologies*)を含有しない高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM *Invitrogen*) 1825  $\mu$ L に PEI 125  $\mu$ L を混ぜて 5 min incubation した後 25000 ng/well の sC99-3  $\times$  FLAG の DNA を加えて室温にて 20 min incubate した。静置後は培地交換した HEK293A の培地中に 2 mL の DNA 溶液を加えてインキュベーター内で 8 h incubation した。8 h 後、産生される sC99 の切断を阻害する為に 25000 倍希釈で Compound E を終濃度 2  $\mu$ M で、5000 倍希釈で GM6001 を終濃度 10  $\mu$ M で含む培地と交換し、更に 16 h incubation を続けた。第 2 incubation 終了後は 2.3.8 の手順通りに HEK293A のペレットをとり、ペレットのごく一部を TLC 画分として 1  $\times$  sample buffer に溶かして取得した。TLC 画分は amplify 35 % で 2 min 30 sec sonication して DNA を破断し、精製度合いの確認に用いた。1  $\times$  Lysis buffer 6 mL を加えて 4  $^{\circ}$ C にて 2 h rotation して可溶化した。この時の画分は NP 画分として取り分け、精製度合いの確認に用いた。可溶化したサンプルは 4  $^{\circ}$ C 下で 253500  $\times g$  20 min で超遠心し、得られた上清は予め 1  $\times$  Lysis buffer で置換した M2-agarose (*Sigma-Aldrich*) 400  $\mu$ L を加えた後 4  $^{\circ}$ C O/N で rotation して sC99-3  $\times$  FLAG に結合させた。超遠心で残ったペレットには 1 % SDS/PBS を入れて懸濁した後室温にて 30 min rotation して更に可溶化した。可溶化後は同様に 4  $^{\circ}$ C 下で 253500  $\times g$  20 min で超遠心し、2 度目の上清は SDS 画分として取り分け、精製度合いの確認に用いた。翌日、反応後の溶液を一部 FL 画分として精製度合いの確認用に取り分けた後、4  $^{\circ}$ C 下で 335  $\times g$  5 min で wash buffer を用いて M2-agarose を洗浄した。その後 200  $\mu$ L の Elution buffer を加えて室温で 10 min rotation してタンパクを溶出し、4  $^{\circ}$ C 5700  $\times g$  1 min で沈殿物と分離した。上清はすぐさま Neutralization buffer 8  $\mu$ L で中和され、Elu1 画分として精製度合いを確認した。残ったペレットにも同様の溶出作業を行い、得られた上清は Elu2 画分として同じく精製度合いを確認した。

### 2.3.15 *In vitro* assay

2.3.12 の手順で得られた可溶化画分のタンパク濃度を BCA assay で測定し、タンパク終濃度が 1 mg/mL、CHAPSO 0.25 % になるよう、Solubilization Buffer と 1  $\times$  HEPES Buffer を用いて希釈し、更に終濃度で 0.05 % phosphatidylcholine、5 mM phenanthroline、10  $\mu$ g/mL phosphoramidon、5 mM EDTA、そして 1  $\times$  Complete になるよう各化合物を調整した。まず構造固定の為に 8 mM のクロスリンカーを終濃度 0.2 mM で、若しくは 120 mM の CuSO<sub>4</sub> と 500 mM の phenanthroline を終濃度それぞれ 3 mM と 15 mM で添加し、37  $^{\circ}$ C で 6 h incubation した。その後、5M の N-Ethylmaleimide を終濃度 10 mM になるように加えて crosslink の反応を止め後、50 mM の E2012 を終濃度で 100  $\mu$ M になるように、そして 2.3.14 で精製した sC99 150  $\mu$ M を 10 倍希釈で終濃度 15  $\mu$ M になるように加えて 37  $^{\circ}$ C で 15 h 基質切断反応を続けた。反応後のサンプルは ELISA にて基質を定量した。



### 2.3.16 Luciferase assay

前日に  $2 \times 10^5$  cells/well 量で撒いた#1210 細胞に、virus 溶液を infection、若しくは co-infection した。24 h incubation 後、細胞を  $1 \times$  PBS で wash して  $-80$  °C と  $37$  °C にて 30 min ずつ計 3 cycle incubation を繰り返し、細胞を破碎した。細胞の完全な溶解には  $1 \times$  PicaGene Dual Cell Lysis Reagent を  $560$   $\mu$ L/well 加えて室温にて 30 min shaking した。その後、説明書に従って Mithras LB940 (Berthold Technologies)を用いて Luciferase assay を行い、蛍光タンパクの発光量を測定した。

### 2.3.17 統計学的処理

得られた定量データに関して、2 群間の比較には Student *t*-test、若しくは Student paired *t*-test で有意差の検討を行い、多群間比較には Tukey test を用いた。検定は Kyplot、若しくは Excel の分析ツールにて行った。特に断りが無い限り、\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$ 、\*\*\*:  $p < 0.001$  を表す。

## 3. 結果

### 3.1 TMD3 の topology 解析

#### 3.1.1 TMD3 single Cys PS1 Mt の活性評価

本研究で PS1 の構造活性相関を解き明かすにあたり、PS1 の TMD3 に着目している。TMD3 は II 型の配向性で細胞膜を貫通するドメインで、Cryo-EM による解析の結果 TMD3 は活性中心 Aspartic acid から離れた場所に位置していることが明らかとなっており、付近の TMD2 や TMD4、TMD5 との間に大きな空洞がある構造が報告されている(Bai, Rajendra, et al. 2015) (図 19A)。後に実際に基質が内包される部位であると分かることになるが(Zhou et al. 2019)、基質が recruit されその後に切断を受けるであろう部位として筆頭候補であると考えて差し支えないであろう。また、TMD3 は凡そ PS1 のアミノ酸残基配列の 5 %程度の部位であるにも関わらず(図 20A)、30 以上の FAD 変異が同定されている部位でもある(図 20B)。この数は既知の FAD 変異の実に 15%近くを占めている(出典: AD & FTD Mutation Database: <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/>)。この FAD 変異の中には、20 代後半での発症が報告されている強力な L166P 変異(Moehlmann et al. 2002)も含まれている。こうした背景から、TMD3 は毒性種 A $\beta$ 42 の産生制御に重要な部位であると考え、研究対象に設定した。なお、本研究では TMD3 とその周辺領域である C158 から K187 までの 30 残基を解析している(図 19B)。

本研究では、構造解析や機能解析を手段として SCAM を導入した(Karlin and Akabas 1998)(Tomita 2017)(Cai and Tomita 2018)。SCAM は methanethiosulfonate 基を有する MTSEA-biotin (図 21A)を用いた標識実験であり、この methanethiosulfonate 基が水分子存在下でのみ cysteine の thiol と反応して新たに disulfide 結合を形成することが可能である。その為、標的 cysteine が膜内活性中心ポアや膜外親水性環境に位置している場合にのみ MTSEA-biotin が結合し、biotin 基を通じて沈降したタンパクを western blotting で検出することが出来るのである(図 21B)。言い換えれば western blotting のバンドの強弱は標的 cysteine がどれだけ強い親水性環境に面しているかを反映しているとも言え、バンドが強いほど広く accessible な親水性環境に面しているということになる(図 21C)。しかしながら、SCAM のデメリットは解析対象の cysteine への置換、及び内因性 cysteine の Serine への置換による避けられない構造変化と酵素活性の変化が挙げられる。解析対象の PS1 は内部に 5 か所の cysteine を保有しており(図 19B)、本研究では全て Serine に置換した Cysless PS1 Mt を用いており、更に標的残基を cysteine に置換した single Cys PS1 Mt はこの時点で 6 重変異体である。その為、single Cys PS1 Mt は完全に PS1wt の構造や活性を保持しているわけではなく、実際に発現が失われる事例も存在する(Sato et al. 2006)(Takagi et al. 2010)。本研究ではまず作成した single Cys PS1 Mt の機能確認を行った。PS1 は酵素活性発揮時に NTF と CTF に自己断片化し、基質 C99 から A $\beta$  を切断することが知られている。これを踏まえ、本研究では single Cys PS1 Mt の機能や活性を以下の基準により評価し、2 ないし 3 項目を満たす single Cys PS1 Mt のみ機能や活性を保持しているとし、解析対象とした。

- 1) single Cys PS1 Mt の発現が確認され、且つ断片化が western blotting で確認されること。
- 2) single Cys PS1 Mt を含む  $\gamma$ -secretase が A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 を産生し、ELISA で確認されること。
- 3) (薬剤処理実験に於いて) GSI や GSM による A $\beta$  産生変動が ELISA で確認されること。

まず TMD3 及び周辺領域の各残基をそれぞれ cysteine に置換した single Cys PS1 Mt を DKONL 細胞に transient に過剰発現させ、その A $\beta$  分泌量を ELISA で測定した。その結果、極少数の single Cys PS1 Mt が Cysless PS1 Mt と同等の A $\beta$  産生量を保持していたものの、大多数が特に A $\beta$ 42 産生量を大幅に増加させた(図 22)。しかしながら、A $\beta$  は  $\gamma$ -

secretase の酵素活性によって産生されている為、A $\beta$  産生が確認されたと言うことは酵素活性が大幅に変動するような甚大な構造変化は起きていないと考えた。

続いて上記 single Cys PS1 Mt を DKO 細胞に stable に過剰発現させ、その発現を western blotting で検出した。その結果、程度の差はあれ全ての single Cys PS1 Mt に於いて自己断片化産物である PS1 NTF の発現が確認された(図 23A input)ことから、 $\gamma$ -secretase の酵素活性は失われていないとされた。以上の結果より、本研究では C158 から K187 まで全ての single Cys PS1 Mt を以降の構造機能解析の対象とした。

### 3.1.2 TMD3 周囲の親水性環境

先述の通り、cryo-EM の検討により TMD3 の周辺に活性中心ポアが面していることが示唆される。そこで、まず TMD3 周辺に親水性環境に面している残基が存在するかどうかを、intact cell を用いた SCAM による検出を試みた。MTSEA-biotin は細胞膜非透過性の化合物である為、内腔側の膜外親水性環境、及び活性中心ポアを含む内腔から access 出来る膜内親水性環境が標識されると考えられる。その結果、複数の残基に於いて標識が確認された(図 23A)。更にこうした残基を helix モデル上にマッピングしたところ、殆ど全ての残基が helix の片面に集中することも明らかとなった(図 23B、C)。この段階では膜内親水性環境と膜外親水性環境の区別はついていないが、cryo-EM 構造上で明らかに膜内に位置していると推測される残基や、複数の二次構造予測ソフトによる解析で細胞膜内領域であると推測された残基(森島果南 学士論文)で強い標識が確認されたことなどを踏まえ、この結果より TMD3 は片面が膜内親水性活性中心ポアに面するドメインであることが示唆された。

続いて、TMD3 の膜内配列の特定を試みた。この目的は TMD3 の topology をより詳細に知る為、特に先述の SCAM 解析によって同定された残基が面する親水性環境が膜内なのか膜外なのかを正確に確定する為である他、この後の TMD3 の機能や構造の解析で TMD3 の内腔側と細胞質側両方から網羅的に解析する為である。まず TMD3 細胞質側の境界残基を特定する為、各種 single Cys PS1 Mt を stable に過剰発現する DKO 細胞の microsome 画分を用いた SCAM を行った。Microsome 画分は right-side-out と inside-out の両配向性が混合する為、intact cell とは異なり通常は access 不可能な細胞質側親水性環境に面する cysteine も標識することが可能になる(図 24)。その結果、K160C から大幅な標識の減少が確認された(図 25A)。実際 K160C は Cysless PS1 Mt に比して多少のラベルが確認されており、構造的には部分的に細胞膜内に埋もれていると考えられ、K160 が TMD3 細胞質側末端残基であるとされる(図 25B)。

一方、TMD3 内腔側の境界面の特定には、MTS 試薬を用いた競合実験を行った。MTS 試薬は MTSEA-biotin 同様 methanethiosulfonate 基を有しており親水性環境下で cysteine と結合するが、嵩高い官能基や電荷を有する為、それぞれ膜内親水性環境への入り込みやすさが異なる(図 26A)。特に MTSET や MTS-TEAE は脂質二重膜内の閉じた親水性環境には入り込まず、膜外のオープンな親水性環境下の cysteine にもみ結合するとされている(Seal et al., 1998)。そこで MTS 競合剤による incubation 後に MTSEA-biotin で標識することで、標的 cysteine が広い親水性環境に面している場合にのみ MTS 競合剤と MTSEA-biotin の間で競合が発生し、標識の減弱が確認される(図 26B)。その結果、I180C では最小の MTSES による標識の競合が確認されたものの、G183C 以降で全 3 種類の競合剤による標識の減弱が観察された(図 27A)。即ち、G183C 以降が膜外親水性環境に面する部位であると推測された。これらの結果を総括すると、TMD3 の膜内領域は K160 から L182 までで構成されており、L166、I167、F176、F177、F179、I180 が膜内親水性環境である活性中心ポアに面する部位で、C158 と Y159 は少なくとも親水性環境に、G183、E184 と K187 は内腔側膜外親水性環境に面していることが分かった(図 27B)。

### 3.1.3 Crosslinker による TMD3 の topology 解析

続いて TMD3 の詳細な topology の解析を行う為、crosslink 実験を行い、TMD3 とその他のドメインや領域との距離の測定を行った。Crosslink は crosslinker と呼ばれる化合物を用いて親水性環境に面する 2 つの cysteine を架橋する実験であり(Loo and Clarke 2001) (図 28A)、互いの cysteine 間の距離の測定や構造の固定等に応用が出来る。PS1 は酵素活性発揮時に自己断片化して NTF と CTF に分かれるが、この 2 つの断片の間位に disulfide 結合は存在しない為、非還元状態の SDS-PAGE を行っても行わなくても、boil 操作を行っても行わなくても、同じ位置にタンパクが分離される。その為、内因性 cysteine を全て潰した PS1 の NTF と CTF それぞれに cysteine を 1 つずつ導入すると、仮に crosslink が成されている場合、互いの monomer タンパクのバンドが減少し、それに反して互いが crosslink された heterodimer のバンドが増加することを確認できる(図 28B)。Crosslinker には 2 種類の形態が存在する(図 29)。1 つは炭素鎖の両端に methanethiosulfonate 基が加わった鎖状化合物で、親水性環境下の cysteine 2 つを架橋するものである。もう 1 つは copper と phenanthroline (Cu-PNT)を触媒として用い、2 つの cysteine 残基の間に直接 disulfide 結合を生じさせるものである。前者は炭素鎖の距離以下の cysteine であれば架橋出来るのに対し、後者は凡そ 2.1 Å 以下の距離で無ければ disulfide 結合を生じさせることが出来ない。本研究では、NTF 側の残基として TMD3 に位置する L166、L172、F177、I180、G183 を選定し、一方で CTF 側の残基として活性中心 Aspartic acid に近い L383 と I387、そして活性中心ポアを構成するとされる PALP motif(Tomita et al. 2001)内部の L435 の 3 つを選び、それぞれを掛け合わせて架橋し、TMD3 と活性中心との距離を調査した(図 30)。なお、本検討で用いた CTF 側の 3 つの残基は全て親水性環境に面していることが明らかとなっており(Takagi et al. 2010)、この 3 つの残基の single Cys PS1 Mt と crosslinker との incubation でバンドの移動が見られないのも確認済みである(Sato et al. 2006)。

まずデザインした double Cys PS1 Mt が酵素活性を保持しているかを確認する為、各 double Cys PS1 Mt を DKONL 細胞に transient に過剰発現させ、A $\beta$  切断活性を ELISA にて測定した。その結果、全ての double Cys PS1 Mt に於いて A $\beta$  産生活性が確認された(図 31)ことから、酵素活性は保持していると判断した。更に、各 double Cys PS1 Mt の断片化についても確認したところ、いずれも自己断片化後の PS1 NTF と CTF が見られた(図 32、33、34 DMSO 群参照)ことも併せ、全ての double Cys PS1 Mt は機能保持型であるとし、以降の crosslink 検討に用いることにした。

Crosslink の結果は図表の通りで(図 32、33、34)、それぞれのまとめイラストも掲載した(図 35、36、37)。以下にも小括を記載する。

- 1) L166C/L383C は Cu-PNT、及び M2M-M11M で crosslink された(M14M 及び M17M は未検証)。
- 2) L172C/L383C は M8M-M17M で crosslink された。
- 3) F177C/L383C は M8M-M17M で crosslink された。
- 4) I180C/L383C は M8M-M17M で crosslink された。
- 5) G183C/L383C は crosslink されなかった。
- 6) F177C/I387C は M8M-M17M で crosslink された。
- 7) I180C/I387C は M17M で crosslink された。
- 8) G183C/I387C は crosslink されなかった。
- 9) L166C/L435C は M17M で crosslink された。
- 10) L172C/L435C は M8M-M17M で crosslink された。
- 11) F177C/L435C は M8M-M17M で crosslink された。
- 12) I180C/L435C は crosslink されなかった。
- 13) G183C/L383C は crosslink されなかった。

これらの結果は TMD3 と活性中心の topology について詳細な情報を与えると共に、先行の SCAM による解析で TMD3 が活性中心ポアに面することを支持するものとなる。また、L166 と L383 間が最短で 2.1 Å 程度まで近づくことが示された。なお、cryo-EM で得られた  $\gamma$ -secretase の構造の中に於ける各残基間の距離とも比較できるよう、表にまとめた(図 38)。

### 3.2 TMD3 の面する活性中心ポアの解析

#### 3.2.1 酵素活性化状態の活性中心ポアの変動

$\gamma$ -secretase は酵素活性が増加し基質の切断が亢進すると A $\beta$ 42 をより短く切り進めて A $\beta$ 38 の産生を亢進させ、逆に酵素活性が低下すると A $\beta$ 38 への切断が抑えられることでその直接的な前駆体である A $\beta$ 42 の産生量が増加する。本研究の大きな目標の一つは、 $\gamma$ -secretase の活性促進と活性抑制状態の構造解析を通じて A $\beta$ 42 の産生を制御する上で重要な構造活性相関を解明することである。 $\gamma$ -secretase に於いて基質は最終的に親水性の活性中心ポアに入り込んで切断を受ける為、活性中心ポアの変動を理解するのは重要である。本研究ではまず手始めに L-685,458 に引き起こされる活性中心ポアの変化を検出した。L-685,458 は基質を模倣した構造を持つ TSA 型 GSI であり(図 11B)、酵素の活性中心 Aspartic acid に直線的に入り込んで結合することで酵素活性を阻害する(Li, Xu, et al. 2000)(Shearman et al. 2000)。その為、 $\gamma$ -secretase はこの時活性化状態に近い遷移状態の構造を取っているとされており、L-685,458 によるポアの変動は活性化状態の活性中心ポアを反映していると考えた。

まず、TMD3 内部に位置する L166、L172、F176、F177、F179、I180 に cysteine を導入した single Cys PS1 Mt を DKO 細胞に stable に過剰発現させ、予め L-685,458 で incubation した後 SCAM で各残基周囲の活性中心ポアの変動を確認した。その結果、L166C から F177C の標識が有意に増加し、一方で F179C の標識が有意に減少するのが観察された(図 39A)。このことから、TMD3 周囲の活性中心ポアは細胞質側及びドメイン中腹部で全体的に広がり、親水性が増強したことが示唆された(図 39B)。更に、この時に生じる構造変化を検出する為、TMD3 の F177 と活性中心 Aspartic acid 付近の I387 を crosslink で結び(図 40A)、L-685,458 の有無で生じる互いの距離の変動を検出した。その結果、元々 M8M 以上の長さの crosslinker で架橋されていた F177C/I387C が全 crosslink されなくなった(図 40B)。以上の結果から、L-685,458 が活性中心に入り込んで  $\gamma$ -secretase の活性化状態の構造を誘導すると TMD3 と活性中心の距離を押し広げられ、その結果 TMD3 周囲の活性中心ポアが広がって親水性環境が増強すると考えられた。

#### 3.2.2 A $\beta$ 42 産生増加時の活性中心ポアの変動

##### 3.2.2.1 FAD 変異による活性中心ポアの変動

続いて、実際に A $\beta$ 42 産生が増加時に生じる TMD3 周囲の活性中心ポアの変動を調べた。解析対象は TMD3 内部の L166 と F177 の 2 か所を選んだ。この 2 か所を選択した理由は以下の 3 つである。

- 1) TMD3 の内腔側と細胞質側両方から全体的に解析する為。
- 2) SCAM 検討で比較的強い標識が確認されたことから活性中心ポアへの寄与が大きいと考えた為。
- 3) TSA 型 GSI による標識の変動が大きく、構造変化に対して sensitive な部位であると考えた為。

A $\beta$ 42 産生を上昇させるものとして FAD 変異が挙げられ、本研究では 6 つの FAD 変異を導入した(図 41A)。まず PS1 NTF で TMD3 領域外に位置する変異として P117L (Wisniewski et al. 1998) と M139V (Larner and Du Plessis 2003) を選定し、PS1 NTF で TMD3 領域内に位置する変異として F176L (Müller et al., 2013)、F177L (Rogaeva et al. 2001) と E184D (Yasuda et al. 1997) を選択し、そして PS1 CTF 側からは活性中心 Aspartic acid の隣に位置する G384A (Tanahashi et al. 1996) を選んだ(図 41B)。これらの FAD 変異は F176L を除いて全て既報通り A $\beta$ 42 産生比率を PS1wt に比して有意

に増加させた(図 42)。また酵素活性保持の確認の為、各 FAD 変異を発現させた single Cys PS1 Mt の A $\beta$  切断活性も ELISA で測定した。その結果、全ての single Cys PS1 Mt に於いて FAD 変異が有意に A $\beta$ 42 産生比率を増加させていた(図 43、44)。G384A 変異のみ single Cys PS1 Mt に導入すると A $\beta$  産生総量を著しく落とすことを確認した。しかしながら、G384A 変異は元来 A $\beta$ 42 比率のみならず A $\beta$  産生の総量も大幅に落とすことが知られており、luciferase assay による細胞内 AICD の量の測定の結果 G384A 変異は他の FAD 変異と比べて AICD の産生量が特に少ない(図 46A)。さらに、内因性の cysteine を全て置換した Cysless PS1 Mt が PS1wt に比して活性がある程度落ちている(Sato et al. 2006)ことを加味すると、G384A を含む single Cys PS1 Mt は活性を失ったのではなく活性を著しく落としていると考えられる。それを支持するかの様に他の FAD 変異と同様、G384A 変異を含む single Cys PS1 Mt は自己断片化産物である PS1 NTF が確認されている(図 49Ainput)。従って、本研究では A $\beta$ 42 産生を上昇させる FAD 変異として G384A 変異を引き続く解析に用いている。一方 PS1wt に比して A $\beta$ 42 を有意に上昇させなかった F176L 変異(図 42B)は、L166C single Cys PS1 Mt に導入すると A $\beta$ 42 産生を有意に上昇させたものの、F177C single Cys PS1 Mt に導入すると A $\beta$ 42 比率を逆に有意に減少させることが明らかとなった(図 45)。そこで、L166C/F176L single Cys PS1 Mt を A $\beta$ 42 産生を増加させる変異として、F177C/F176L single Cys PS1 Mt を A $\beta$ 42 産生を減少させる変異として用いた。最終的に解析に用いた変異は、#1210 細胞に transient に過剰発現させ、AICD と NICD の切断活性を luciferase assay で測定した。その結果、殆ど全ての FAD 変異で有意な AICD/NICD 切断活性の減少が確認された(図 46A、B)。

実際の活性中心ポアの変動について、各 FAD 変異を保持する各 single Cys PS1 Mt を stable に発現させた DKO 細胞を作成し、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、まず TMD3 領域外に位置する P117L と M139V 変異は L166C の標識を変えず、F177 の標識のみを有意に減弱させた(図 47A)。このことから、A $\beta$ 42 産生が増加する時には活性中心ポアの特に内腔側に於いてポアの縮小、親水性の低下が起きていることが示唆された(図 47C)。一方で TMD3 領域内に位置する 2 つの FAD 変異である F177L と E184D は、F177C のみならず L166C の標識も減弱させた(図 47B)。また F176L 変異に関しては L166C のみの検証だが、標識の減弱が確認された(図 48A)。即ち、この場合内腔側に加えて細胞質側の活性中心ポアの減衰、親水性の低下が発生していると考えられる(図 47C、48B)。以上の結果を併せると、TMD3 内腔側の活性中心ポアの縮小が A $\beta$ 42 産生増加時に共通して起こる変動であり、内腔側のポアの縮小は TMD3 内部の変異によるローカルな構造変化の可能性が考えられた。

しかしながら、G384A 変異を保持する各種 single Cys PS1 Mt を用いて G384A 変異の TMD3 周囲の活性中心ポアへの影響を調べた結果、G384A によって L166C と F177C 何れにも標識の変化が見られなかった(図 49A)。このことから、PS1 CTF 側の変異である G384A は TMD3 周囲の活性中心ポアの変化を通さずに(図 49B) A $\beta$ 42 産生比率を上昇させることが示唆された。

### 3.2.2.2 Pen-2 N 末端伸長による活性中心ポアの変動

$\gamma$ -secretase の構成因子である Pen-2 の N 末端を伸長すると、伸長に用いた配列非依存的に A $\beta$ 42 産生比率が上昇することが報告されている(Isoo et al. 2007)。そこで本研究では Pen-2 の N 末端(図 50A)に FLAG 配列を導入した FLAG-Pen-2 を作成し(図 50B)、Pen-2wt を持つ  $\gamma$ -secretase の PS1 の活性中心ポアと FLAG-Pen-2 を組み込んだ  $\gamma$ -secretase の PS1 の活性中心ポアの違いを調べた。まず FLAG-Pen-2 を組み込んだ  $\gamma$ -secretase の A $\beta$  切断活性を ELISA で測定した。その結果、Pen-2wt を持つ  $\gamma$ -secretase に比べ、FLAG-Pen-2 は既報通り A $\beta$ 42 産生比率を有意に増加させた(図 50C)。また、FAD 変異と同様に #1210 細胞に transient に PS1 と共に共発現させ、AICD と NICD の切断活性を luciferase assay で測定した。その結果、有意な AICD/NICD 切断活性の変化は確認されず(図 46A、B)、FLAG-Pen-2 は A $\beta$  総量を変化させることなく A $\beta$ 42 の比率だけを変動させることが分かった。

実際の活性中心ポアの変動について、各 single Cys PS1 Mt と FLAG-Pen-2 を stable に共発現させた DKO 細胞を作成し、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、FLAG-Pen-2 による L166C 及び F177C の標識の有意な変動は確認されなかった(図 51A)。このことより、Pen-2 の N 末端の伸長による A $\beta$ 42 産生比率の上昇は活性中心ポアの変動とは別の機構を通じて制御されているものと推測される(図 51B)。

### 3.2.3 A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアの変動

#### 3.2.3.1 V236S 変異による活性中心ポアの変動

数ある A $\beta$  の最終産物の中でも AD 発症の寄与が大きいのは A $\beta$ 42 であること(Burdick et al. 1992)、そして先述の検討で A $\beta$ 42 産生増加時の活性中心ポアの変動を調べたことから、本研究では引き続き A $\beta$ 42 の産生減少時に伴う活性中心ポアの変動を調査した。ここで本研究では V236S 変異を導入した。V236S 変異は TMD5 内腔に位置する人為的な point mutation であり(図 52A)、A $\beta$ 42 の切断を亢進してより短い short A $\beta$  に切り進めさせることで A $\beta$ 42 産生比率を減少させる効果を持つ(Cai, Morishima, et al. 2019) (図 52B)。検討に用いた、V236S 変異を有する L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt についても V236S 変異を持たない各 single Cys PS1 Mt に比べ有意に A $\beta$ 42 産生比率を低下させることを確認している他(図 53)、酵素活性発揮に伴う PS1 の自己断片化も見られている(図 54A input)。

実際の活性中心ポアの変動について、V236S 変異を保持する各 single Cys PS1 Mt を stable に発現させた DKO 細胞を作成し、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、V236S 変異によって L166C 及び F177C の標識の有意な増加が観察された(図 54A)。このことより、V236S 変異によって TMD3 が面する活性中心ポア全体的に拡大し、親水性が増強することが示唆された(図 54B)。

#### 3.2.3.2 GSM による活性中心ポアの変動

V236S 変異に続き、A $\beta$ 42 産生比率を低下させるものとして本研究では GSM を用いた。GSM は元々 AD の治療薬の候補として開発されてきた低分子化合物の総称であり、非常に高い特異性をもって A $\beta$ 42 産生比率を濃度依存的に低下させることが知られている(Bursavich et al. 2016)。本研究で用いた GSM は Eisai 社開発の E2012 (Pozdnyakov et al. 2013)(Cai et al. 2017)、過去に GSM として報告の上がっている ST1120 (Takeo et al. 2014)、そして E2012 と ST1120 と同じ phenylimidazole 骨格を有する HK1138 の 3 種類である。いずれも PS1wt を保有する  $\gamma$ -secretase の産生する A $\beta$ 42 の比率を低下させる(図 55)。更に、本研究で用いた L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt への濃度依存的な A $\beta$ 42 減少効果も同様に確認している(図 56、57、58)。

実際の活性中心ポアの変動について、各 single Cys PS1 Mt を stable に発現させた DKO 細胞を作成し、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、各 GSM の incubation によって L166C 及び F177C の標識の有意な増加が観察された(図 59A)。この結果は、先述の V236S 変異を用いた検討結果と一致するものである。先ほどの結果と合わせると、A $\beta$ 42 産生減少時には、PS1 の TMD3 が面する活性中心ポアが全体的に拡大し、親水性が増加することが考えられる(図 59B)。

#### 3.2.3.3 F176L 変異による活性中心ポアの変動

最後に、F176L 変異の導入によって A $\beta$ 42 産生比率が低下すると判明した F177C/F176L single Cys PS1 Mt を用いて、intact cell を用いて SCAM を行い、F176L 変異導入時の F177 周囲の活性中心ポアの変動を確認した。その結果、F177C の標識に有意な増加は見られなかった(図 60A)。即ち、F176L 変異は V236S 変異や GSM とは異なり、活性中心ポアの内部側を変化させることなく(図 60B) A $\beta$ 42 産生比率を低下させることが示唆された。

### 3.2.4 遷移状態の活性中心ポアの比較

#### 3.2.4.1 V236S 変異による活性中心ポアの変動との比較

これまでの検討で、TMD3 の面する活性中心ポアの拡大及び親水性の増強を引き起こすのは、以下の 2 つの場合であることが明らかとなった。

- 1) L-685,458 によって遷移状態構造を誘導した時(図 39)。
- 2) 変異や化合物によって A $\beta$ 42 産生が減少した時(図 54、59)。

V236S 変異や GSM 類によって A $\beta$ 42 産生が減少するのは A $\beta$ 42 の切断を亢進する「活性化効果」を通じたものであり、A $\beta$ 42 への切断を抑制する「阻害効果」によるものではない。従って、V236S 変異や GSM によって A $\beta$ 42 の切断が亢進する時にも  $\gamma$ -secretase は遷移状態の構造を取ることが考えられ、1)と 2)によって観察された活性中心ポアの変動は類似するものであることが推察される。これを確かめる為、V236S 変異や GSM によって増強した TMD3 周囲の親水性が L-685,458 によって更に増加するか否か検証した。仮に両者が別機構であり、A $\beta$ 42 の切断亢進が遷移状態構造を通じたものではないのであれば、ここで L-685,458 による活性中心ポアの更なる拡大が観察されると考えられる。

まず、V236S 変異を保持する L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt を stable に発現させた DKO 細胞を作成し、intact cell を用いて予め L-685,458 を incubation した後 SCAM を行った。各 single Cys PS1 Mt に対する L-685,458 の薬理効果は実証しており、A $\beta$  産生を止めることを確認した(図 61)。その結果、L166C と F177C 共に L-685,458 による標識増加が見られていたところ、V236S 変異の導入によって上昇した以上に L-685,458 が標識を有意に増加させることは無かった(図 62A)。即ち、V236S による活性中心ポアの拡大に上乗せして L-685,458 が活性中心ポアに影響を与えることは無いと示唆された(図 62B)。

#### 3.2.4.2 GSM による活性中心ポアの変動との比較

引き続き、V236S 変異と同様 A $\beta$ 42 の切断を亢進させてその産生比率を下げる GSM についても同様の検討を行った。

ここで、L166C single Cys PS1 Mt を stable に発現させた DKO 細胞を作成し、予め各種 GSM を一晩 incubation した intact cell を用い、L-685,458 をその後 incubation した後 SCAM を行った。その結果、L-685,458 による標識増加が見られていたところ、予め GSM によって上昇した以上に L-685,458 が標識を有意に増加させることは無かった(図 63A)。即ち、GSM の場合も V236S 変異と同様に L-685,458 が GSM による活性中心ポアの拡大とは別に影響を与えることは無いと考えられ(図 63B)、L-685,458 による活性中心ポアの拡大と V236S 変異や GSM による活性中心ポアの拡大は類似の機構であり、V236S 変異や GSM は PS1 の遷移状態の構造を誘導することで A $\beta$ 42 の切断を亢進させその産生量を減少させる可能性が存在することが示唆された。

## 3.3 A $\beta$ 42 産生を制御する TMD3 の構造変化の解析

### 3.3.1 Crosslinker による距離の変動の検出

これまでの検討で、A $\beta$ 42 産生の変動と TMD3 の面する活性中心ポアの関係性を明らかにした。しかしながら、SCAM で用いた MTSEA-biotin は水分子の存在下で cysteine の thiol 基と反応することから、標識率増加は正確には活性中心ポアの増大ではなく水分子の存在量の増加、及び親水性の増強を反映しているに過ぎない。加え、活性中心ポアは TMD3 のみならず活性中心の存在する TMD6 や 7 (Sato et al. 2006)、PALP motif の存在する TMD8 細胞質末端(Sato et al. 2008)、膜内親水性環境に面することが明らかとなっている TMD1 (Takagi et al. 2010)など、複数のドメインによって構成されており、TMD3 の構造変化が無くともその他の構成ドメインの構造変化によっても活性中心ポアの形や広さに影響が出る可



能性がある。そこで本研究では続いて A $\beta$ 42 の産生を制御する TMD3 の構造変化そのものに焦点を当て、検討した。TMD3 の構造変化の検出に TMD3 から SCAM による検討でも用いた細胞質側の L166 と内腔側の F177 を選択し、それぞれ PS1 CTF 側の活性中心 Asp 近傍の L383 と I387 と crosslinker で結ぶことを考えた(図 64A)。仮に TMD3 に活性中心 Asp に近づくような構造変化が生じているならば定常状態より短い crosslinker でも結合が可能になるか、同じ crosslinker でもより強固に結合できると考えられ、一方 TMD3 が活性中心 aspartic acid から離れる構造変化を起こしているのであれば定常状態で結合できた crosslinker が結合できなくなることが予想される(図 64B)。

まず、A $\beta$ 42 産生が増加する時の TMD3 の構造変化を解析する為、P117L と G384A の 2 種類の FAD 変異を用いた。P117L 若しくは G384A を有する L166C/L383C を stable に過剰発現する DKO 細胞の microsomal fraction を用いて crosslink を行ったところ、FAD 変異の導入によって Cu-PNT による S-S 結合の量に差が見られることは無く(図 65A)、また crosslinker による 2 つの cysteine の crosslink にも変動は見られなかった(図 65B、C、D)。一方 P117L 若しくは G384A を有する F177C/I387 変異についても同様の crosslink の検証を行ったところ、G384A の導入によって M8M 以上の crosslinker 全てのバンドが消失したが(図 66A、C)、P117L については F177C/I387C の crosslink に変化を与えなかった(図 66A、B)。以上の結果より、G384A 変異の TMD3 内腔側への影響を除き、A $\beta$ 42 産生増加時に TMD3 の構造変化は起きていないと推察される。

続いて A $\beta$ 42 産生が減少する時の TMD3 の構造変化を解析する為、GSM である E2012 を用いた。なお、本検討に用いる L166C/L383C 及び F177C/I387C double Cys PS1 Mt を含む  $\gamma$ -secretase の A $\beta$ 42 切断量を E2012 が濃度依存的に減少させることは検証済みである(図 67)。各 double Cys PS1 Mt を stable に過剰発現する DKO 細胞の microsomal fraction を用い、予め E2012 を incubation した後 crosslink を行ったところ、薬物の有無によって crosslink のバンドパターンに変化は無く(図 68)、E2012 による A $\beta$ 42 産生変動は TMD3 の構造変化を通じたものではないことが示唆された。FAD 変異を用いた検討結果と合わせると、G384A 変異の TMD3 内腔側への影響を除き、A $\beta$ 42 の産生変動は TMD3 の構造変化によるものではない可能性が浮上した。

### 3.3.2 Crosslinker を構造固定剤として用いた検討

しかしながら、crosslink の検出限界を考えた時、上記の方法では正確に構造変化を検出できない可能性がある。そもそもタンパクは親水性環境下や細胞膜内等で揺らぎをもって動く分子である。しかしながら crosslink はタンパク内の 2 つの領域が揺れ動く中で取り得る最短の距離を捕捉し、結合してしまう。その為、生じた構造変化の中でターゲットとなる領域の間の最短距離に変動が無ければ、同じ長さの crosslinker で結合できてしまうので、構造変化が検出できないことになる(図 69A)。そこで、crosslinker を長さの測定を行う定規としてではなく、2 つの cysteine 間を最短距離で結ぶ構造固定剤として用いることを考えた。仮に化合物などが特定の 2 つのドメインの拡張を通じて A $\beta$ 42 産生を制御しているのであれば、最短距離にドメインを予め固定しておくことでその化合物の惹起する構造変化が阻害される為、A $\beta$ 42 の変動が観察されなくなると考えられる(図 69B)。Crosslink でドメインを固定した後に PS1 の構造変化を起こすスキーム上 PS1 の point mutation は使えないので、以降の検討は全て化合物 E2012 に絞った。なお、解析対象は引き続き L166C/L383C と F177C/I387C である。

#### 3.3.2.1 Cell free assay による検討

本検討ではまず各 double Cys PS1 Mt を stable に過剰発現させた intact cell に crosslinker を添加して構造固定を試みたが、crosslinker の長さ非依存的に細胞毒性を呈した為(データ未掲載)、各 double Cys PS1 Mt を過剰発現する DKONL 細胞由来の microsomal fraction を用いた cell free assay による検討を試みた。まず F177C/I387C を用いて条件検討を行った。

Crosslink による構造固定の有無による E2012 の A $\beta$ 42 産生減少の有無を明確に検討する為、本検討ではまず A $\beta$  非産生条件下で構造固定を施し、その後化合物による A $\beta$ 42 産生制御を行うのが理想である。その為、最初に通常 37 °Cで行う crosslinker の incubation を 4 °Cに下げ、A $\beta$  の産生が行われない一方で crosslink が成される条件検討を行った。その結果、4 °Cで F177C/I387C の crosslink が確認された(図 70A)。しかしながら、4 °Cに於いても A $\beta$ 42 の産生が見られることが分かった(図 70B)。そこで、続いて crosslinker の incubation 時の温度を-80 °Cまで下げて検討した。しかし、今度は-80 °Cで crosslink による western blotting のバンドシフトすら確認できなかつた(図 70C)。以上より、検討に必要な理想条件を達成できないと断定し、cell free assay による検討を諦めた。

### 3.3.2.2 *In vitro* assay による検討

そこで、cell free assay の代わりに *In vitro* assay による検討を行った。*In vitro* assay では精製した基質を、酵素を含む可溶化画分と混ぜ合わせて酵素による基質切断活性を測定する為、基質無添加状態で crosslinker による構造固定を行った後に基質と共に化合物を添加し、化合物の基質切断に与える影響を検討することが可能になる。本検討では基質として sC99 3 $\times$ FLAG を精製した(図 71A)。sC99 3 $\times$ FLAG は  $\gamma$ -secretase の基質で A $\beta$  の直接の前駆体タンパクである C99 の C 末端側に精製用の 3 $\times$ FLAG タグが結合したものである(図 71B)。検討法のスキームとしては、まず  $\gamma$ -secretase を含む可溶化画分を適切な時間最短距離を結ぶ crosslinker と incubation し、NEM によってその反応を止めた後基質 sC99 3 $\times$ FLAG と E2012 を同時に添加し、化合物の存在下で A $\beta$  の産生を行った。

その結果、元々 E2012 の添加によって有意に A $\beta$ 42 産生比率が減少していたところ L166C/L383C 間を Cu-PNT によって直接結合させると A $\beta$ 42 減少効果が失われることを確認した(図 72)。ところが、F177C/I387C の間を最短距離の M8M で crosslink しても、crosslink しない場合と比べて E2012 は同等の A $\beta$ 42 産生減少効果を呈した(図 73)。この 2 つの結果より、TMD3 の細胞質側が活性中心から離れる動きをすることが、A $\beta$ 42 産生減少に繋がることを示唆された。

しかしながら、crosslink した時の L166C/L383C への E2012 応答性低下が構造固定によるものではなく、crosslink による何かしらの pathway で E2012 の結合量が低下した為である可能性がある。そこで、その可能性を探る為、引き続き PAL を行った。PAL は薬効を示す化合物と biotin 基を benzophenone で結んだ probe と呼ばれる化合物を用いて化合物とタンパクの結合量を測定する実験である(図 74A)。化合物の部分で標的部位に結合した後、十分近傍( $\sim 3.0$  Å)であるならば benzophenone がタンパクとの間でラジカル反応を起こして共有結合を形成する。この為、タンパクとの結合強度は western blotting のバンドの強度に反映される。なお、化合物を除いた benzophenone と biotin 基だけではタンパクとの結合が見られないことは検証済みである(竹尾浩史 博士論文)。また、PAL の検討では化合物の incubation は 4 °Cで行っているが、Cu-PNT による L166C/L383C 間の crosslink が多少見られる(データ未掲載)。そこで、本検討では PS1 NTF のバンドのみで正確な定量を行う為、western blotting 直前に 100 °Cで boil し、生じた disulfide 結合を全て切断し、PS1 NTF と CTF の heterodimer を分離させた。Western blotting のバンド定量の結果、Cu-PNT の有無で L166C/L383C double Cys PS1 Mt への probe の標識率に変化は見られなかつた(図 74B、C)。これらの結果より、L166C/L383C double Cys PS1 Mt に Cu-PNT を添加した際に E2012 による A $\beta$ 42 産生減少効果が見られなくなつたのは、crosslink によって E2012 が結合出来なくなつたからではなく、L166C と L383C を架橋したことによるものであると分かつた。

## 3.4 水分子保持候補残基の検討

これまでの検討で明らかとなつたこととして、大きく分けて以下の二つに分けられる。

- 1) TMD3 周囲の活性中心ポアは A $\beta$ 42 の産生変動に関連し、特に A $\beta$ 42 産生が減少する時は活性中心ポアが拡大する。

2) TMD3 の特に細胞質側が活性中心から離れるような動きをすることで A $\beta$ 42 の産生が減少する。

これらの動きが A $\beta$ 42 産生に影響を与えるメカニズムの検討を本研究では行うことにした。

$\gamma$ -secretase と同じ膜内配列切断酵素として、EGFR シグナルなどに関わる rhomboid が存在する(Strisovsky 2013)。Rhomboid は X 線結晶構造解析が成された際に内部の空洞に水分子が存在することが明らかとなっている(Y. Wang et al. 2006)。Rhomboid family である大腸菌 rhomboid について MD シミュレーションを行った報告の中で、4 つの残基(i.e. H141、S181、S185、Q189)から構成される部位に於いて水分子が保持されており、酵素活性化に伴う構造変化の中で活性中心に水分子を受け渡している可能性が示唆されている(Zhou et al. 2012)。そこで本研究では、これらのアミノ酸残基に焦点を当て、その特性を解析した。PS1 内部に於いて histidine、serine、glutamine は複数存在するが、TMD3 内部、或いは3次元的にその近傍に位置し、TMD3 の構造変化や活性中心ポアの変動の影響を受ける可能性がある残基は H163、S169、S170、Q222、Q223 の 5 つである(図 75A)。

### 3.4.1 水分子保持候補残基の変異体解析

まずは候補となる 5 つの残基に変異を導入し、それが A $\beta$  切断活性に与える影響を評価した。本研究で用いたのは、嵩高い側鎖を持ち大きな立体障害を生じさせる phenylalanine と tyrosine、疎水性アミノ酸である alanine と leucine、そしてヒト細胞で水分子の保持機能を有するとされている threonine の 5 種類である。これらを 5 つの候補残基と掛け合わせた PS1 Mt のうち、性質や大きさの全く異なる threonine 以外の残基に置換することで大幅な A $\beta$  切断活性が低下し、一方水分子の保持機能があるとされる threonine への置換では機能が損なわれないので PS1wt と同等の A $\beta$ 42 切断比率を有すると考えた。また、既に FAD 変異として報告の上がっている変異[H163Y (Murayama et al. 1999)、S169L (Taddei et al. 1998)、S170F (Piccini et al. 2007)]は解析対象から除外した。

各 PS1 Mt を DKONL 細胞に transient に過剰発現させ、培養上清中に分泌した A $\beta$  の量を ELISA にて測定した。その結果、仮説通り 5 つの threonine 変異は全て PS1wt と比べ A $\beta$ 42 の産生に有意な差を示さなかった(図 75B、76、77)。また、その他の 4 種類のアミノ酸残基への変異は、Q222L 変異を除き全て PS1wt と比べて有意な A $\beta$ 42 産生比率の上昇が見られた(図 75B、76、77)。これらの結果は元々の仮説に沿うものであり、検討した 5 つの残基が水分子の保持に関わっている可能性を示唆するものである。

### 3.4.2 水分子保持候補残基周囲の親水性の検出

水分子の保持に関与しているのであるならば、その残基の周囲には水分子が存在する。SCAM 解析で用いる MTSEA-biotin は水分子存在下で cysteine の thiol 基と disulfide 結合を形成することから、水分子保持残基への標識が入ることが考えられる。本検討の対象である 5 つの残基のうち H163、S169、S170 は SCAM による解析で予め親水性の活性中心ポアに面さないことが明らかとなっており(図 23)、また既報より Q222 と Q223 も疎水性環境に面していることが分かっている(Tominaga et al. 2016)。しかしながら、変異や化合物によって活性化した状態で構造が変わる可能性を考え、E2012 による構造変化によって生ずる、各候補残基の親水性の変化を検出することにした。

各候補残基を cysteine に置換した single Cys PS1 Mt を DKO 細胞に stable に過剰発現させ、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、E2012 による構造変化の下では S169C の標識のみが有意に増加し、親水性が凡そ 4 倍になることを確認した(図 78A)。この結果より、E2012 によって  $\gamma$ -secretase が活性化し、A $\beta$ 42 の切断が更に亢進する時には S169 の親水性が増加することが明らかとなった(図 78B)。

### 3.5 TMD3 の構造変化と TMD1 の構造変化の関連性の検討

A $\beta$ 42 産生制御を司る PS1 の一連の構造変化の流れ、及びこれまでに明らかとなった TMD3 の細胞質側の構造変化の重要性の検討として、続いて A $\beta$ 42 の産生に関連した既存の他部位の構造変化との関連性を調べた。化合物などによって基質の産生が変動する時、タンパクはアロステリックに構造変化し、結合部位とは 3 次元的に離れた場所の構造変化を順々に引き起こすことで最終的に基質切断への影響が顕現する。筆者の修士課程の研究で、A $\beta$ 42 の産生の変動に呼応して PS1 の TMD1 が垂直運動を行うことを明らかにしており(Cai et al. 2017)、本研究では TMD1 と TMD3 の構造変化の関連性を解き明かす。TMD1 と TMD3 どちらがどちらの構造変化に影響するのかを解析することで TMD3 の構造変化の重要性を担保できると考えた。

検討にあたり、変異を用いて TMD1 と TMD3 いずれか片方の構造変化を阻害した際にもう片方に観察されていた構造変化や親水性の変動を観察することを考えた。構造変化を惹起させる化合物として、本検討でも E2012 を用いたが、E2012 は PS1 の HL1 に位置する Y106 を結合部位とすることが報告されており(Cai et al. 2017)、また TMD3 内の Y181 と TMD4 付近の Y195 を結合部位とすると示されている ST1120 と化合物の中心骨格とその結合部位と共にするとも報告されていることから(Takeo et al. 2014)(Cai et al. 2017)、Y106、Y181、Y195 を E2012 の主要な結合部位だと考えた(図 79A)。これらの alanine に置換した変異体のうち、Y106A 及び Y181A PS1 Mt は PS1wt に比べて E2012 への応答性が低下した(図 79B、80)が、Y195A PS1 Mt は PS1wt と同等の応答性を示すことを確認した(図 81A)。なお、この tyrosine 二か所に alanine を置換した Y181A/Y195A PS1 Mt は E2012 への応答性を完全に失った(図 81B)。よって、それぞれの位置を考え、Y106A を E2012 が TMD1 に与える影響を阻害し、Y181A を E2012 が TMD3 に与える影響を阻害する変異として仮定した。検出に際し、TMD3 にあたる影響としてこれまでの検討より TMD3 周辺の活性中心ポアの増大と親水性の増強を指標とした。一方、TMD1 の構造変化に関しては過去の検討を習って TMD1 細胞質側末端残基である G78 と内腔側末端残基である I100 周囲の親水性の変動を指標とした(Cai et al. 2017) (図 82)。

まず、Y106A 変異及び Y181A 変異の導入によってそれぞれ E2012 が TMD1 と TMD3 に与える影響が失われるかを検証した。Y106A を持つ G78C 若しくは I100C single Cys PS1 Mt を stable に DKO 細胞に過剰発現させて SCAM を行ったところ、E2012 の添加で見られていた G78C の標識減少と I100 の標識増加が Y106A 変異の導入によって観察されなくなることを示された(図 83A)。この結果より、E2012 によって引き起こされていた TMD1 の内腔側への垂直運動が Y106A 変異によって阻害されたことが示される(図 83B)。一方、Y181A を持つ L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt を stable に DKO 細胞に過剰発現させ、intact cell を用いて SCAM を行ったところ、E2012 の添加で見られていた両部位での標識増加が Y181A 変異の導入によって観察されなくなることを示された(図 84A)。この結果より、E2012 によって引き起こされていた TMD3 周辺の活性中心ポアの拡大が Y181A 変異によって阻害されたことが示される(図 84B)。以上を以って、Y106A と Y181A はそれぞれ E2012 による TMD1 と TMD3 への影響を阻害する変異であるという仮定が立証された。なお、E2012 への応答性を失わなかった Y195A 変異については、E2012 による L166C の標識増加は見られるが F177C の標識増加を失わせたことも確認された(図 85A)。即ち、Y195A 変異の導入後でも E2012 によって L166 周囲の活性中心ポアは拡大することが示唆される(図 85B)。

続いて、TMD1 と TMD3 の構造変化の阻害時に互いに与える影響を調査した。まず TMD3 周辺の活性中心ポアの拡大を阻害した際の TMD1 の動きの有無を調べる為、Y181A 変異を保有する G78C 若しくは I100C single Cys PS1 Mt を stable に DKO 細胞に過剰発現させて SCAM を行った。その結果、E2012 の添加で見られていた G78C の標識減少と I100 の標識増加が Y181A 変異導入後でも同様に観察された(図 83A、86A)。この結果より、Y181A による活性中心ポア拡大の阻害とは無関係に TMD1 が垂直運動とすると考えられる(図 86B)。一方、TMD1 の垂直運動を阻害した場合の TMD3 周辺の活性中心ポアの変動を調べる為、Y106A を持つ L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt を stable に DKO 細胞に

過剰発現させ、intact cell を用いて SCAM を行った。その結果、E2012 の添加で見られていた両部位での標識増加が Y106A 変異の導入によって観察されなくなることが示された(図 84A、87A)。この結果より、Y106A によって E2012 に誘起される TMD1 の内腔側への垂直運動が阻害されると TMD3 周囲の活性中心ポアが拡大しなくなることが示唆された(図 87B)。更に、本検討で用いた single Cys PS1 Mt について、Y181A 変異を導入すると G78C 及び I100C single Cys PS1 Mt の E2012 への応答性(図 88)、Y106A 変異を導入すると L166C 及び F177C single Cys PS1 Mt の E2012 への応答性(図 89) がそれぞれ失われることが示された。更に、A $\beta$ 42 産生比率を減少させる V236S 変異(図 52B)を導入した際の TMD1 の垂直運動についても調査した。V236S 変異は TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大を通じて A $\beta$ 42 産生を低下させることは既に検討済みである(図 54)。ここでは、V236S 変異を保有する G78C 若しくは I100C single Cys PS1 Mt を stable に DKO 細胞に過剰発現させて SCAM を行った。その結果、同じ A $\beta$ 42 低下効果を持つ E2012 の添加で見られていた G78C の標識減少と I100 の標識増加が V236S 変異によって誘導されることは無いことが明らかとなった(図 83A、90A)。この結果は、V236S 変異は TMD1 の構造変化を引き起こさないことを示している(図 90B)。これらの結果を併せると、Y106A 変異導入時には E2012 によって惹起されるはずの TMD1 の内腔側への垂直運動が阻害され、その為に TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大が起こらず A $\beta$ 42 の産生に変動が見られなかったこと、また Y181A 変異導入時には E2012 によって TMD1 の内腔側への垂直運動は発生するものの Y181A 変異によって TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大が起こらず、A $\beta$ 42 の産生に変動しなかったというメカニズムがそれぞれ推察される。即ち、A $\beta$ 42 産生を低下させる一連の構造変化の中で TMD1 の垂直運動が先立って発生し、その後 TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大が起こると考えられた。V236S 変異については、より下流に位置する TMD3 の構造変化に作用していると考えられる。

ここで一つの懸念として、TMD1 の垂直運動の消失、及び TMD3 周囲の活性中心ポアの変動の消失が、各 PS1 Mt への E2012 の結合力の差に由来している可能性がある。そこで、Y106A と Y181A 変異を持つ PS1 Mt を発現させた DKO 細胞由来の可溶化画分を用いた PAL を行い、それぞれの PS1 Mt へ E2012 の結合能の差を測定した。その結果、PS1wt に比して Y106A PS1 Mt と Y181A PS1 Mt への E2012 の結合力はどれも弱まっているものの、Y106A PS1 Mt と Y181A PS1 Mt の間では結合力に差は無かったことが分かった(図 91)。寧ろ Y106A PS1 Mt への結合力より Y181A PS1 Mt への結合力の方が弱い傾向にあるようにも見える。この結果より、Y106A や Y181A 変異による TMD1 の垂直運動の消失や TMD3 周囲の活性中心ポアの変動が消失したのは、E2012 が各 PS1 Mt への結合力を弱めたことが原因では無いことが示された。尚、TMD3 に位置する Y181A 変異、及び TMD4 に位置する Y195A 変異をそれぞれ若しくは両方保有する Y181A PS1 Mt、Y195A PS1 Mt、Y181A/Y195A PS1 Mt について E2012 の結合能を確認したところ、いずれの PS1 Mt も全て PS1wt と比べて有意に E2012 の結合能が低下していたが、Y181A PS1 Mt と Y181A/Y195A PS1 Mt に比べて Y195A PS1 Mt への結合能はまだ有意に高かったことも分かった(図 92)。

## 4. 考察

本研究では TMD3 について以下のことが明らかとなった(図 93、94)。

- 1) PS1 TMD3 は、基質切断の場である親水性活性中心ポアに面する。
  - 2) PS1 TMD3 の面する活性中心ポアは A $\beta$ 42 産生に応じて変動し、A $\beta$ 42 産生増加時はポアの内腔側が縮小する。
  - 3) PS1 TMD3 の面する活性中心ポアは A $\beta$ 42 産生に応じて変動し、A $\beta$ 42 産生減少時はポアが全体的に拡大する。
  - 4) PS1 TMD3 の細胞質側が活性中心から離れる構造変化を起こすことで、A $\beta$ 42 産生が減少する。
  - 5) A $\beta$ 42 産生を減少させる構造変化の中で PS1 TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大は TMD1 の垂直運動の後に起こる。
- 本項目では、これら主要な判明事項を含めた研究結果、及び本研究で用いた実験系の妥当性に関して議論する。

### 4.1 実験系の妥当性に関する考察

#### 4.1.1 各 PS1 Mt 活性評価法の妥当性に関する考察

本研究では point mutation を軸とした解析を多く行っていることから、各 PS1 Mt の活性の評価が不可欠である。本研究では以下の 3 つのポイントを評価基準としている。

- 1) single Cys PS1 Mt の発現が確認され、且つ断片化が western blotting で確認されること。
- 2) single Cys PS1 Mt を含む  $\gamma$ -secretase が A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 を産生し、ELISA で確認されること。
- 3) (薬剤処理実験に於いて) GSI や GSM による A $\beta$  産生変動が ELISA で確認されること。

$\gamma$ -secretase の複合体形成過程の最終段階で PS1 が自己断片化することで酵素活性が発揮されることから、自己断片化が活性発揮の必要条件とされている。しかしながら、これは完全に相関するわけではない。例えば、PS1 の自己断片化部位の FAD 変異である M292D や M292E PS1 Mt は断片化した PS1 NTF が観察されず、自己断片化しない Mt であるとされているが、A $\beta$  産生は確認されることが報告されている(Steiner, Romig, Pesold, et al. 1999)(Anne L Brunkan et al. 2005)。本研究では A $\beta$ 42 の産生変動に応じた構造変化や活性中心ポアの変動に重点を当てた解析を行っている為、評価基準 1)に加え 2)を併せて考察することが重要になると考えている。しかしながら、評価基準 2)も  $\gamma$ -secretase の酵素活性評価としては完璧なものではない。 $\gamma$ -secretase は  $\epsilon$ -cleavage によって A $\beta$ 48 若しくは A $\beta$ 49 を産生した後、3 ないし 4 残基毎に切断を行う為、中途産物として A $\beta$ 45 や A $\beta$ 46、A $\beta$ 43 等も産生される他、A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 の切断が進んだ産物である A $\beta$ 37 や A $\beta$ 38 も産生される。その為、A $\beta$ 42 の減少が酵素活性の増強による A $\beta$ 42 切断の亢進によるものなのか、若しくは酵素活性の低下によって A $\beta$ 42 への切り出し自体が減少した結果のものなのかを、A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 以外の分子種でも評価する必要がある。しかしながら、本研究で用いた V236S 変異と GSM 類は全て  $\gamma$ -secretase の酵素活性を増強させて A $\beta$ 42 を減らすことが知られており、一方各種 FAD 変異は全て酵素活性の減弱によって A $\beta$ 42 の切断を減らすものであることが報告されていることから、本研究に於いて A $\beta$ 42 の減少を酵素活性増加、A $\beta$ 42 の増加を酵素活性減少の指標として用いるのは妥当であると考えている。L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt に G384A 変異を導入した L166C 若しくは F177C/G384A single Cys PS1 Mt は A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 産生が殆ど観察されなかった(図 43)が、各 single Cys PS1 Mt の自己断片化産物が確認されており、また A $\beta$ 42 への切断を殆ど阻害し A $\beta$ 45 までの切断で止めてしまっている可能性を考慮し、本研究では検討に用いたが、本来ならば特に A $\beta$ 42 以上の長い分子種の産生も観察すべき対象ではあった。

一方、 $\gamma$ -secretase は実に 100 もの基質の切断に関与していることが明らかとなっている(Beel and Sanders 2008)。これらの基質の切断回数には差があり、また変異や化合物によって基質特異的に切断を阻害、若しくは変化させる事例は数多

く報告されている(Gong et al. 2010)(Bursavich et al. 2016)。その為、作成した PS1 Mt が A $\beta$  の産生を特異的に阻害するようなものであった場合、これらの評価系では正しく活性評価がされない可能性がある。こういった観点では、作成した PS1 Mt について C99 以外の基質、例えば Notch 等の切断活性も全て確認することが望ましい。しかしながら、本研究ではあくまでも A $\beta$  の産生の変動に関与する構造変化の検出を念頭に置いており、また作成した PS1 Mt で原則全て A $\beta$  の切断が観察されていることから、本研究では大きな問題点ではないと結論付けた。

#### 4.1.2 Cysless PS1 Mt を構造解析に用いる妥当性に関する考察

本研究では構造解析に MTS 試薬を用いた手法を用いている。MTS 試薬は thiol 基と特異的に反応する為、標的部位へ特異的に結合させる為に原則内因性の cysteine を全て別アミノ酸残基に置換する必要がある。ところが、タンパクはその機能を部分的に一次構造に依存させている側面があり、例えば cysteine に関して言えば唯一 thiol 基を所持していることもあり、S-palmitoylation や S-nitrosylation によるシグナル伝達等への関与が挙げられる(Jones 2004)(Anand and Stamler 2012)。その為、単一のアミノ酸残基の置換でも機能に大きな欠陥が生じる可能性は否定できない。本研究では PS1 の内因性の 5 つの cysteine を側鎖の大きさの近い serine に置換した Cysless PS1 Mt をベースに用いているが、Cysless PS1 Mt も PS1wt に比して A $\beta$ 42 産生が数倍増加している(Sato et al. 2006)。更に、FAD 変異等酵素活性を低下させる変異を用いた検討では A $\beta$ 42 産生上昇時に  $\gamma$ -secretase が”closed”な構造を採ることが報告されている背景もあり(Elad et al. 2015)、PS1wt と Cysless PS1 Mt の間で大幅な構造の違いが生じている可能性は大いにある。しかし、既報の SCAM による検討では酵素活性は保持されていると報告されている(Bogdanov et al. 2005)他、本研究の各検討に於いて A $\beta$  産生が確認されている場合は少なくとも活性を発揮する為のクリティカルな構造変化は起きていると考えられる。更に、薬剤処理実験に於いて評価基準 3) GSI や GSM による A $\beta$  産生変動が ELISA で確認されること、を満たしていれば、薬剤に対する応答性は残されており、A $\beta$ 42 産生を変動させる為に重要な構造変化は保持されていると考えられるので、本研究では評価基準 1) ~ 3) を満たしていれば Cysless PS1 Mt をベースにした PS1 Mt は PS1wt に於ける A $\beta$ 42 産生制御に重要な構造変化は凡そ反映していると考えて解析している。

とは言え、MTS 試薬を用いた検討の特徴を考えれば、そもそも全ての cysteine を置換する必要は無いとも考えられる。SCAM で用いられる MTSEA-biotin は水分子存在下のみ cysteine と反応し、また細胞膜非透過性の化合物である。この為、完全に疎水性環境下にあると明らかになっている残基については cysteine のまま保持させても MTSEA-biotin による標識に影響は出ないと推測され、更に intact cell を用いた検討では細胞質側の cysteine も置換する必要性は低い。例えば PS1 の TMD8 には C410 と C419 の 2 つが存在するが、何れも細胞膜内に存在する cysteine であり、intact cell でも microsome を用いた SCAM でも標識はされない(Sato et al. 2008)。無論、全ての cysteine を置換した cysless Mt と該当 cysteine を戻した Mt と SCAM による標識の有意な差が無いことが保証されることが前提となるが、cysteine の置換による構造変化や機能の欠損が著しい場合、こうした負の影響を最低限に留める最終手段として用いることが出来ると考えられる。

#### 4.1.3 Intact cell と microsome を用いた SCAM の標識率の違いに関する考察

本研究では細胞質側の親水性環境に面する残基の検出の為に microsome を用いた SCAM を行っている。Microsome 画分には right-side-out 型と inside-out 型の画分が混在している(図 24)ことから、intact cell で標識された残基も microsome 画分では標識される。本検討では L166C と I167C の 2 つが intact cell と microsome 画分いずれでも標識されたが、intact cell では L166C に対して I167C の標識が少なかったのに対し、microsome 画分ではどちらも同程度の標識率であった(図 23A、25A)。そもそも内腔側、細胞質側からの標識は microsome 画分の中に含まれる right-side-out 型と inside-out 型の

microsome 画分の割合に依存するが、right-side-out 型と inside-out 型の比率が同じでないのであれば L166C と I167C いずれにも影響が出るので、本検討の結果では重要な要因ではないと考えている。これを説明しうることとして、以下の 2 つを考えている。

1) 内腔側と細胞質側からの access のしやすさの違い。現時点で PS1 の活性中心ポアの詳細な構造や形、水分子の分布は不明である。しかしながら、cryo-EM やシミュレーションの結果から推察するに綺麗な円柱型では勿論無く、各 TMD の形に合わせて凹凸が存在すると考えられる(Bai, Rajendra, et al. 2015)(Lee et al. 2017)(Zhou et al. 2019)。その為、標識される cysteine の付近に別の TMD が物理的に近い位置にある、活性中心ポアの形がねじれている等の理由により、内腔側からは access にくい、若しくはその逆の場合が発生することは何ら不思議ではない。しかしながら本研究の生化学的な検討からのみでは判断は出来ない為、cryo-EM 等による 3 次元構造上に親水性環境に面する残基をマッピングするなどして複合的に解釈する必要がある。

2) 細胞内局在部位による PS1 の構造の違い。PS1 は細胞膜表面から endosomes、golgi 体、lysosome まで広く分布している。その中で intact cell を用いた検討では細胞表面膜にある PS1 しか認識しない。一方で microsome 画分は細胞を破砕する為、細胞膜だけでなく細胞内膜系も含まれており、細胞内小器官に局在している PS1 への標識も一定割合存在すると考えて差し支えないだろう。しかしながら、近年の報告では PS1 の H131 が pH センサーとして機能していることが報告され、late endosome や lysosome 内腔の低 pH 環境下で構造変化を引き起こして A $\beta$ 42 の産生比率を変動させる可能性が示唆されている(Cai, Hatano, et al. 2019)。この為、細胞内膜系を含む microsome 画分では細胞膜に存在する PS1 とは異なる構造を持つ PS1 への標識もなされてしまい、標識率への違いが現れる原因となっていることが考えられる。この懸念点に対しては、Optiprep や glycerol 密度勾配遠心法等によって microsome 画分を更に細かく分画した上で標識実験を行うことで対処が出来る。

#### 4.1.4 SCAM/crosslink による標識の解釈の妥当性に関する考察

本研究では SCAM や crosslink による標識の増減、及び化合物や変異体存在下での標識の増減によって活性中心ポアの変動や 2 つの cysteine の距離を議論している。標識のそれぞれの変化の基本的な解釈、及びその妥当性に関して以下に列挙する。

1) SCAM で標識が増加した場合。SCAM では活性中心ポアの変化を検出しており、標識の増加によって活性中心ポアの拡大を意味すると解釈した。しかしながら、MTSEA-biotin は水分子存在下で cysteine の thiol 基と結合できることを考えると、標識の増加が直接的に意味するところは水分子量の増加及び標的 cysteine 周囲の親水性の増加であり、活性中心ポアの構造変化ではない。本検討の中で L166C と F177C はいずれも A $\beta$ 42 産生減少時には両者の標識が増加し親水性が増したと示唆されたが(図 54A、59A)、活性中心 aspartic acid との距離の変動が検出できたのは L166 だけであったことから(図 72、73)、SCAM の標識増加とその部位の構造変化は必ずしも一致しないことが理解できる。この誤差に関しては後述する各項目の考察の中で逐一議論していく。とは言え、標的 cysteine に水分子が access しやすくなった裏には、標的 cysteine そのものでは無いにせよ、どこかしらの部位での構造変化によるものであるとは考えられるので、SCAM で標識増加について本研究の中では広義な意味で活性中心ポアの拡大を指し示すものとする。

2) SCAM で標識が減少した場合。本研究では、1)とは反対に活性中心ポアの縮小を意味すると解釈している。しかしながら、実際に親水性が低下して MTSEA-biotin が反応しづらくなったこと以外にも、TMD3 とは別のドメインが標的 cysteine に近づき、物理的に MTSEA-biotin が access する経路を遮断したことによって標識率が低下した可能性も十分考えられる。この懸念点は本研究で用いた生化学的手法では検証出来ない為、cryo-EM 等によるマクロな構造解析結果と



併せ、多角的に議論する必要がある。この可能性も上記と同様、後述する各項目の考察の中で必要に応じて個別に議論する。

3) crosslinker による crosslink が減少した場合。ある特定長さの鎖状化合物でドメイン同士を結ぶことが出来なくなることは、一般的にドメイン同士が鎖状化合物以上の距離に伸長した為であると考えるのが最も妥当であり、筆者も基本的には同意見である。しかしながら、SCAM で標識が減少した場合と同様、PS1 のいずれかのドメインが crosslinker の結合領域に侵入するような構造変化を引き起こしたことが為に crosslinker の結合が物理的に阻害され、crosslink のバンドが観察されなかった可能性もあり得る。この可能性についても、cryo-EM 等の結果と併せて考察し、個別の結果の中で多角的に逐一議論していく。

## 4.2 TMD3 の topology に関する考察

### 4.2.1 TMD3 の面する活性中心ポアについて既報との整合性に関する考察

本研究の結果、TMD3 の膜内配列の中で複数の残基が SCAM で標識され(図 23A)、更に標識された残基が helix モデル上で殆ど一面に集中する(図 23C)ことから、TMD3 は膜内活性中心ポアに面していると考察した。このことは 2015 年に上がった cryo-EM による 3 次元構造上にマッピングしても、同様に helix の片面を向くことが分かる(図 23B)。しかしながら、cryo-EM によって解かれた構造上ではこれらの残基が PS1 膜内の活性中心ポアに面しているようには見えず、齟齬が生じているように思える。この点について、以下の 2 つの基準から考察を加える。

1) TMD3 の回転運動。回転運動自体は膜タンパクに普遍的に見られる構造変化の 1 つである。例えば rhomboid タンパクは TMD の内の 1 つが回転運動を行うことで基質切断活性が制御されている可能性が示唆されており(Wang and Ha 2007)(Strisovsky 2013)、電位依存性イオンチャネルのドメインがチャネルの開閉に伴って回転運動するとも考えられている(Tombola et al., 2006)。PS1 についても TMD1 がそれぞれ別の面で A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 を認識している報告(Ohki et al. 2014)より何かしらに起因して TMD1 が回転運動を行う可能性も考えられることから、TMD3 が回転運動したとしても何ら不思議ではない。ここで仮に TMD3 が回転運動を行うとした時に TMD3 の各残基の親水性の変動を考えると、円柱型の TMD の表面は一樣に移動する為、親水性が増加、減少する残基は規則性をもって helix モデル上にマッピング出来るはずである(蔡哲夫 修士論文参照)。しかしながら、本研究の中で TSA 型 GSI である L-685,458 による TMD3 周囲の活性中心ポアの変動を調べたところ、多くの残基で親水性の上昇が確認された(図 39)。特に、アミノ酸残基配列上近傍に位置するが helix の表面上では離れた位置に分布する L172、F176、F177 の親水性が一樣に増加している。勿論、回転運動と共に活性中心ポアが拡大した為に回転運動を反映させた SCAM 標識の規則的な変化がマスキングされてしまった可能性も考えられるが、本研究ではより詳細には検討できず、また 2015 年に cryo-EM を用いて発表された  $\gamma$ -secretase の 3 つの安定な構造(Bai, Rajendra, et al. 2015)の間で TMD3 の顕著な回転運動は見られないことから、TMD3 の回転運動による差であるとは考えにくい。

2) Cryo-EM の手技上の問題。SCAM は細胞膜に埋もれた  $\gamma$ -secretase をそのままの状態 で解析する手法である。一方、cryo-EM は細胞膜に発現した膜タンパク分子を amphipol 等の界面活性剤(Popot et al. 2011)に置き換えてミセルに包み込み、極低温で急速冷凍してサンプルを作成する(Lu et al. 2014)(Bai, Yan, et al. 2015)。このように解析までに複数の過程を踏む中で例えば細胞膜からミセルへの移し替え、極低温という生理条件からかけ離れた環境への暴露を通じて  $\gamma$ -secretase の大幅な構造変化が生じた可能性が高い。また、 $\gamma$ -secretase は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate や phosphatidylcholine 等の組成の比率で A $\beta$  産生に変化が起きることが報告されており(Landman et al. 2006)(Osawa et al. 2008)、 $\gamma$ -secretase は周囲の脂質二重膜と相互作用しておりその構成成分の違いから構造変化が起き A $\beta$  産生を変動させ

ることが考えられる。Amphipol は cryo-EM において  $\gamma$ -secretase の分解能を大幅に改善したが、この観点から考えると amphipol のミセルに  $\gamma$ -secretase を包み込んだ時点で生理条件下では見られない構造変化が起きた可能性もあり得る。事実、基質と PS1 の間で crosslink をさせることで達成し得た  $\gamma$ -secretase と APP の複合体の cryo-EM 構造の中では、活性中心ポアに面すると本研究で判断し TMD3 の各残基が基質を格納する PS1 の空洞に面していることが分かる(Zhou et al. 2019)。こうした背景から、2015 年に報告された cryo-EM による  $\gamma$ -secretase の安定構造は完璧には生理条件下の構造を反映出来ていないと考えている。

以上、本研究で観察した通り、TMD3 は活性中心ポアに面していると判断できる。また、SCAM は生理条件を保つ膜タンパクの構造を簡便に解析できる手法であることが改めて示された他、cryo-EM で各ドメインや残基の正確な向きや周辺構造との関係性等、overall な構造情報以上を的確に検出するには、細胞膜に埋没している段階等膜タンパクの精製段階前に於いて crosslink 等生理条件下の構造を固定出来る何かしらの方法を予め処理する必要があることが示唆された。

#### 4.2.2 TMD3 の膜内境界残基に関する考察

SCAM 及び MTS 試薬を用いた競合実験を行うことで、TMD3 の膜内配列が K160 から L182 であることを突き止めた(図 27B)。本項目では、この解釈の妥当性について以下の 3 つのポイントから考察を加える。

1) 予測プログラムとの違いについて。複数の二次構造予測プログラムを使った以前の検討では、TMD3 の内腔側境界残基について多くは L172 であると予測しているが、細胞質側の境界残基は I162、若しくは A164 であるという結果に落ち着いている(森島果南 学士論文)(Viklund and Elofsson 2004)(Bernsel et al. 2008)(Viklund and Elofsson 2008)(Bernsel et al. 2009)。こうした予測プログラムはデータベースの照らし合わせを基にしたアルゴリズムによって実行されているが、膜内に親水性環境が存在するタンパクのデータベースは親水性タンパクやより単純な膜貫通タンパクに比べて乏しく、精度の高い予想はしにくい。本検討では基本的に K160 が細胞質側の境界残基であると言う結果を支持するが、これについての妥当性を以下の 2 項目で更に議論する。

2) 細胞質側の競合実験について。TMD3 の膜内配列と膜外配列の正確に決定する為、本検討では MTS 試薬を用いた競合実験を内腔側に対して実施したが、細胞質側については実行していない。これは既に過去の報告内で行われているからである(高木穂香 博士論文)。その検討の中で MTS-TEAE による競合実験が行われたが、MTS-TEAE は MTSEA-biotin の標識と競合することは無かった。MTS-TEAE の有する headgroup は 8 Å 程度あることが知られており(McNally et al. 2009)、この競合剤による競合が見られなかったことより C158 と Y159 の 2 残基は 8 Å より小さい親水性の空洞に位置していることが分かる。Cryo-EM による 3 次元構造の中でこの 2 残基の付近には  $\gamma$ -secretase に所属するタンパクの何かしらのドメインや構造が何も位置しないことや TMD3 が斜めに膜に差し込まれていることを加味すると、C158 と Y159 の 2 残基は細胞膜内親水性環境下に存在する残基であることが強く伺える。つまり、C158 と Y159 から構成される短い HL2 は膜を完全に貫通せずに細胞膜内で loop を形成していることになるわけだが、例えば PS1 の HL1 の S104 から SCAM による標識率が激減したことから HL1 は部分的に細胞膜に埋もれている可能性がある(蔡哲夫 修士論文)他、HL1 の後半の標識率の規則的な減少より HL1 後半部分は helix 構造を採りながら細胞膜に埋もれていることが示唆されている(Takagi-Niidome et al. 2015)、cryo-EM の構造解析より  $\gamma$ -secretase を構成する Pen-2 が細胞膜内で loop を形成しスパンしている(Bai, Yan, et al. 2015)、X 線結晶構造解析によって膜を貫通せず途中で折り返して第 2 の TMD を形成するタンパクが知られている(Shinoda et al. 2009)等と言った過去の報告を考えると、この解釈は何らおかしくは無いと考えられる。

3) 細胞質側の境界残基について。本検討によって K160 が TMD3 の細胞質側末端残基であると示されたが、これは興味深い結果である。と言うのも lysine は塩基性アミノ酸であり、通常ならば細胞膜外に位置する残基であると考えるのが普通だからである。実際、lysine は serine や threonine に並んでリン酸化を受けることのあるアミノ酸残基であることも

知られており (Cozzzone 1988)(Stock et al., 1989)、また同じ膜内配列切断酵素である rhomboid では細胞膜外領域に位置する塩基性アミノ酸残基が脂質二重膜と酵素の相互作用の仲介役として機能している可能性も示されている (Bondar et al., 2009)(Urban 2010)ことから、lysine は細胞外領域に出ることで機能を発揮するアミノ酸残基であると考えられる。本研究では K160 を cysteine に置換した上で SCAM を行っている為、cysteine への置換によって電荷が失われ、細胞膜内にうずもれた可能性は払拭出来ない。実際、K160 の標識は C158 と Y159 より圧倒的に弱く、しかし確かに観察されており、これは native な lysine が通常なら親水性環境下に位置していることを示している可能性もある。

#### 4.2.3 TMD3 の topology について既報との整合性に関する考察

本研究では crosslinker を用いて 2 つの任意に置換した cysteine 間の距離を測定することで、TMD3 の topology を解析した(図 32、33、34、35、36、37)。一方、cryo-EM によってよりマクロな視点でも  $\gamma$ -secretase の構造解析が成されており、40 万の  $\gamma$ -secretase 分子を解析した結果 3 つの安定な構造(Apo-Class 1、2、3)を見出している(Bai, Rajendra, et al. 2015)。これらの安定構造中の各残基間の距離と本研究で得られた topology を比較した結果(図 38)、以下の 3 つのグループに分けることが可能である。

1) Cryo-EM の報告より短く crosslink された : L166-L383、F177-L383、I180-L383、L172-L435、F177-L435 (図 32A、32C、32D、34B、34C)

2) Cryo-EM の報告と同じ長さで crosslink された : L172-L383、F177-I387、L166-L435、I180-L435、G183-L435 (図 32B、33A、34A、34D、34E)

3) Cryo-EM の報告より長く crosslink、若しくは crosslink されなかった : G183-L383、I180-I387、G183-I387 (図 32E、33B、33C)

本項目では、それぞれの結果について crosslink による結果と cryo-EM で得られた結果の相違について、以下の通り議論する。

##### 4.2.3.1 L383C との距離に関する考察

Cryo-EM の報告より短く crosslink された距離の内、L166-L383、F177-L383、I180-L383 に共通するのが活性中心 aspartic acid 付近の L383 である。L383 は活性中心 D385 を含む GxGD motif の残基の一つであり、この領域は種間で保存性が非常に高い(Smolarkiewicz et al. 2014)。実際この領域で発見されている FAD 変異は G384A という最小の残基がそれより一回り大きい残基に置き換わったものただ一つであり(Tanahashi et al. 1996)、また cysless PS1 Mt の G382 と G384 に cysteine を導入すると PS1 の発現が失われることから(Sato et al. 2006)、この motif のアミノ酸残基配列の保存の重要性は明白である。GxGD motif の直接的な機能は未だ不明ではあるが、cryo-EM の検討から GxGD motif は TMD7 の末端に位置することや(Bai, Rajendra, et al. 2015)、R377 から L381 までの領域が基質切断時に新たに  $\beta$ -sheet 構造を採り基質と相互作用すること(Zhou et al. 2019)から、非常に高い可動性を持ち周辺部位の構造変化やその維持に関与している可能性がある。この時、側鎖の小さい glycine はその可動性の高さに貢献するとされる。Crosslinker によって cryo-EM による 3 次元構造以下の距離で crosslink 出来たのは、この可動性の高さに由来するところが大きいと考えている。TMD7 の構造状態と  $\gamma$ -secretase の活性状態との関連性は本研究では検討していないが、cryo-EM では基質を含まない  $\gamma$ -secretase を単離し解析していることに加え安定構造を優先的に取得し解析することから、L383 周囲の可動性が発揮されるのは遷移状態や基質切断時等であると推測される。

##### 4.2.3.2 L435C との距離に関する考察

Cryo-EM の報告より短く crosslink された距離の内、L172-L435、F177-L435 に共通するのが活性中心 aspartic acid 付近の L435 である。L435 は TMD8 と TMD9 を繋ぐ領域に存在する保存性の高い PALP motif 内の残基であり、PS の断片化や  $\gamma$ -secretase 活性に必要であることが示されている (Tomita et al. 2001)(J. Wang et al., 2004)(J. Wang et al. 2006)。この領域は helix 構造を破壊する proline (Nilsson et al. 1998) が 2 つも含まれていることから可動性が高いことが示唆されており、実際 cryo-EM の構造上で PALP は完全な loop 様構造を採ることが分かっている (Bai, Rajendra, et al. 2015)。ちなみに、この時活性中心 aspartic acid 付近の L250 と L435 の距離は cryo-EM 構造上で凡そ 9 ~ 15 Å である。この PALP motif 周辺は細胞質側から access 出来る親水性環境に面しており、MTS 試薬を用いた crosslink では L250 と L435 は M2M crosslinker で強固な架橋が観察され、その距離は 5.2 Å 以下であると判明している (Sato et al. 2008)。生化学的解析とコンピューター解析との間に距離にして凡そ 2 倍の誤差があることから、この時点で PALP motif が大きな可動性を持っている可能性が高い。機能的及び構造的解析を併せると、L435 を含む PALP motif は  $\gamma$ -secretase 活性発揮時に伴ってダイナミックな構造変化を起こし得ると考えて良いだろう。こうした背景を複合的に考えると、L172-L435 間および F177-L435 間の距離は主に L435 の可動性の高さによって cryo-EM による報告より短く架橋されたのだろうと考えられる。

#### 4.2.3.3 TMD3 の内腔側末端との距離に関する考察

ここで TMD3 に焦点を当てた議論をしたい。Cryo-EM の報告より長く crosslink された、若しくは crosslink されなかった G183-L383、I180-I387、G183-I387 に共通するのが、TMD3 の内腔側末端 (I180、G183) との距離である。Cryo-EM の構造を参考にすると、TMD3 の近傍には TMD5 が存在することが分かるが、実はこの TMD5 は TMD3 と TMD7 の間に切り込むようにして膜を貫通しているのである (Bai, Rajendra, et al. 2015)。Cryo-EM による  $\gamma$ -secretase の 3 次元構造上で測定した距離は勿論両残基の直線最短距離である。この構造上の特徴を考えると、TMD3 内腔側末端残基と TMD7 活性中心付近を結ぶ最短直線上に TMD5 が横たわっているが故に crosslinker は TMD5 を迂回して回り込むようにして crosslink することになった結果、cryo-EM による報告より長めに crosslink、若しくは crosslink が出来なかったと考えられよう。

興味深いのは、TMD3 の内腔側末端と TMD7 との crosslink の中でも I180-L383 間の距離は cryo-EM による報告より短く crosslink されていることである。この特殊な crosslink を説明しうるポイントは 2 つある。1 つ目は上記で説明した通り、L383 を含む GxGD motif の可動性の高さによって TMD7 側がダイナミックな構造変化を起こし、cryo-EM での報告距離以上に TMD3 に近づく為である。そして 2 つ目は、I180 と L383 は何れも G183 と I387 に比べて細胞質側の残基であるので、TMD5 による物理的な crosslink 阻害の影響を受けることなく crosslinker が両 cysteine の間に入り込めたからだと考えている。

#### 4.2.3.4 TMD3 の可動性に関する考察

上記の項目の中で TMD3 と様々な部位との距離、及び cryo-EM による結果との差異を考察したが、全て TMD3 では無い領域の可動性に起因したものと説明を行った。ここで、TMD3 そのものが構造変化し得る可能性について考えることにする。しかしながら、crosslink はあくまでも 2 つの cysteine の間を測定する距離であり、その距離が変動したからと言って TMD3 が構造変化をする保証にはならない。相棒 cysteine が所属する領域の構造変化に起因する可能性だってあり得るからだ。その為、過去の研究結果と併せた多角的考察が必須である。

結果から述べると、TMD3 に可動性はあると考える。これについて支持する理由は以下の通りである。

1) Cryo-EM による報告から。Cryo-EM によって報告された 3 つの  $\gamma$ -secretase の安定構造(Apo-Class 1、2、3)の中それぞれの解析残基間の距離の違いをまとめた(図 38)が、この中で L166-L383 間及び L166-L435 間の距離のみ Apo-Class 間に於ける差が激しいことが分かる。先述の検討で L383 と L435 何れも高い可動性を有していると考察した。しかし、L383 と L435 を含むその他の 2 残基間の Apo-Class 間に必ずしも大きな距離の隔たりがあるわけではない。また、L166-L383 間に関しては、本検討で 2.1 Å 以下になり得る程接近し得ることから、L166 周辺構造の高い可動性無くしては達成し得ないと考えている。尚、本研究では検討していないが、L166-I387 間の距離について Apo-Class 1、2、3 毎にそれぞれ 12~18 Å、15~21 Å、17~23 Å であった。このことから L166 周囲に可動性があると考えられる。

2) シミュレーションによる報告から。シミュレーションを用いた最近の検討から、 $\gamma$ -secretase の構造は”closed”、”semi-open”、”fully-open”の 3 つに分類出来、その中で特に TMD3 の細胞質側がダイナミックな構造変化を起こしていると報告されている(Somavarapu and Kepp 2017)。L166 は TMD3 の細胞質側に位置する残基である為、シミュレーションの結果からも L166 付近は高い可動性があると考えることが出来る。

以上より、TMD3 の特に細胞質側に可動性があり、本研究の topology 解析の結果と cryo-EM による結果の相違を生み出す一端を担っていると考える。

### 4.3 TMD3 の面する活性中心ポアに関する考察

#### 4.3.1 遷移状態の活性中心ポアに関する考察

本検討で L-685,458 の添加によって TMD3 の多くの残基で SCAM の標識が変化した(図 39A)。このことより、酵素が遷移状態構造を採る時に TMD3 の面する親水性活性中心ポアに大きな変動が生じたことが示唆された(図 39B)。標識が増加した残基、及び標識が減少した残基について以下の通り周辺構造との関連性を吟味する。

##### 4.3.1.1 親水性が減少した部位に関する考察

本研究で調査した残基の内、F179 の標識が L-685,458 によって有意に減弱した。SCAM による標識の減少は標的部位の親水性の減少を意味する為、一般的に何かしらの構造変化が引き起こされて活性中心ポアが縮小した可能性が高い。しかしながら、本検討では化合物 L-685,458 を予め incubation してあることから、L-685,458 が F179 に直接結合した為に MTSEA-biotin の標識が競合され減少した可能性も残されている。過去の検討により、TMD6 の A246 と L250、TMD7 の L381 と L383、PALP motif 付近の L432、A434、L435、I437、S438 と I439、及び TMD9 の L443 に於ける SCAM の標識が L-685,458 の preincubation によって減弱したことが報告されている(Sato et al. 2006)(Sato et al. 2008)。一方 L-685,458 の阻害様式は構造中の hydroxyethylene isostere が酵素活性中心の aspartic acid に結合することだとされている。さらに、L-685,458 の N 末端側が PS1 CTF に、C 末端側が PS1 NTF へ結合し、活性型の PS のみへの結合を認めることも既報にある(Li, Xu, et al. 2000)。L-685,458 の詳細な結合様式はまだ不明であるが、こうした背景から活性中心 aspartic acid を始め、Sato らが見出した上記の残基の何れか複数に結合するものと推測される。更に、L-685,458 は凡そ 17~18 Å 程度の化合物であるが、cryo-EM の構造上で F179-D257 と F179-D385 間の距離はそれぞれ 30~35 Å と 26~31 Å であること、及び本検討で I180 と L383 若しくは I387 の crosslink の距離が L-685,458 化合物一つ分以上であることを考えると、F179 への L-685,458 の結合はほぼ不可能であり、本検討で F179C の標識が減少したのは L-685,458 の結合による標識の競合の所為では無いと考えるのが妥当であろう。

よって、F179C の標識の減少は F179 を中心とする構造変化によるものであると考えられる。しかしながら、それが TMD3 の構造変化によるものなのか、活性中心ポアの縮小によって生ずるものなのかは本研究では明らかに出来ない。事

実、TMD3の内腔末端側はTMD5の内腔末端側と距離が近く、TMD5の内腔末端側自体V236S変異や複数のFAD変異を保有しており、ある程度の可動性もあることから(Aguayo-ortiz and Dominguez 2018)、L-685,458の結合に伴ってTMD5の構造変化が発生し、F179に近づくことで水分子の侵入する余地がなくなり、標識が減少した可能性もある。F179C single Cys PS1 Mtで置換したcyteineは極性官能基を持つ残基であり、S-π結合の形成や、protonの供与を通じて水素結合を形成することが知られている(Pal and Chakrabarti 1998)(Chakrabarti and Bhattacharyya 2007)(Alauddin et al. 2015)。3次的に近傍に位置するS230、M233、F237等といった極性残基や芳香環側鎖を有する残基との相互作用が理論上可能である。F179Cの置換元は元々phenylalanineであり、元から側鎖が相互作用に関わっている可能性もあるが、L-685,458による構造変化の中でTMD5に位置するこれらの残基とF179Cが新たに相互作用し、結果的に親水性が下がったとも考えられ得る。本研究結果ではF179から1残基しか離れていないI180で親水性の変化が見られず、一方で2残基離れているF177では親水性が増加しており、TMD3内腔側の親水性の変動に統一性が無い。その為、TMD3のダイナミックな構造変化や複数残基を巻き込んだ活性中心ポアの変動より、F179Cと付近の残基との相互作用という特異的な原因がF179CのL-685,458 incubation後の標識減少に関与していると考えている。

#### 4.3.1.2 親水性が増加した部位に関する考察

本研究で調査した残基の内、L166、L172、F176、F177の標識がL-685,458によって有意に増強された。続くcrosslinkの結果F177C/I387がL-685,458のincubationによってcrosslinkされなくなった(図40B)ことから、F177-I387間の距離が増大したことが考えられ、基本的にはTMD3とPS1CTF側の距離が離れることによって活性中心ポアの構造が拡大し、水分子が流入して標識が増加したと考えるのが妥当である。しかしながら、F177-I387間の距離の増大が直接的な原因であることに筆者は懐疑的である。その根拠は以下の通り。

1) 実測値の信憑性。Cryo-EMの結果からF177-I387間の距離は凡そ13Å前後であり、本研究のcrosslinkの結果もそれを支持している(図38)。一方L-685,458によってcrosslinkが全て消失しことから、化合物添加後に距離が伸長しているならば24.7Å以上に、実に2倍近くも距離が伸びていることになる。これはダイナミックな構造変化を起こすと考察したL166-L383間のcryo-EM構造の中に於ける最大距離(19Å)よりも長いことから、TMD3内腔側のF177が同程度以上の構造変化を起こした可能性は皆無に等しいと考えられよう。

2) G384A変異との整合性。先述の通りI387は直接的なL-685,458の結合部位ではないとされているが、L-685,458のincubationによって標識が減弱したL381やL383にL-685,458が結合していれば、活性中心aspartic acidやPALP motif構造等との距離が固定され、TMD3から距離が離れるような構造変化を起こす可能性もあるだろう。本検討で後にG384A変異を含むF177C/I387C double Cys PS1 Mtのcrosslinkを行っているが、G384A変異がcrosslinkを消失させることも明らかにしている(図66C)。その為、L381~L383当たり、活性中心aspartic acid D385の細胞質側のloop様構造の可動性が欠落することでD385より内腔側の構造変化が惹起されると考えれば、L-685,458による変化との整合性は高く見える。しかしながら、G384A変異によってL166及びF177両部位の親水性に有意な変動は来さなかった(図49)ことから、実際のところL-685,458の引き起こす構造変化と活性中心ポアの変動とG384A変異が誘導する構造変化は別物であることが示唆される。

以上の2点から、F177C/I387C double Cys PS1 Mtのcrosslinkは距離の伸長ではない場所に原因が存在すると考えられる。可能性としては周辺構造によってF177-I387直線距離上への物理的な干渉によるcrosslink阻害や、L-685,458結合時に発生するTMD7の回転運動等が考えられよう。しかしながら、本研究ではこれ以上追及できない。近年DAPT処理時のγ-secretaseを単離してくることでDAPT結合時のγ-secretaseの構造が解析された(Bai, Rajendra, et al. 2015)が、

L-685,458 についても同じ解析を行うことで、L-685,458 結合時に生じる構造変化をマクロな視点で知ることが出来るだろう。

実際に L-685,458 の添加によって引き起こされる活性中心ポアの増大や親水性の増加について本研究では詳細に検討は出来ていないが、PALP motif の関与が高いと推察される。先述の通り PALP motif は活性中心ポアを形成する部位であると考えられているが、活性中心 aspartic acid との距離も非常に近い。上記 L-685,458 の結合部位の候補残基と活性中心 aspartic acid の距離について cryo-EM の 3 次元構造上では、Apo-Class 1、2、3 毎に例えば D385-L435 間は 4 ~ 8 Å、4 ~ 7 Å、6 ~ 10 Å であり、D385-I437 間は 8 ~ 13 Å、9 ~ 13 Å、13 ~ 17 Å であり、L-685,458 1 分子以下のサイズである。こうした残基間に L-685,458 が入り込み、PALP motif を押し広げることで活性中心ポアを拡張した結果、TMD3 周囲の親水性が増大した可能性もある。TMD3 の特に細胞質側から中腹までの L166、L172、F176、F177 残基のみで親水性の増大が確認され、I180 では SCAM 標識が変化しなかったことも、この仮説を支持していよう。

#### 4.3.2 Aβ42 産生増加時の活性中心ポアに関する考察

本検討の中で FAD 等を保有する single Cys PS1 Mt を解析した結果、L166 と F177 周囲の親水性、特に内腔側 F177 側の親水性が減弱するケースが多く、TMD3 周囲の活性中心ポアが特に内腔側で縮小していることが示唆された(図 47B、48B)。G384A 変異や FLAG-Pen-2 等の例外は後述し、まずは活性中心ポアの縮小、親水性の減弱と Aβ42 産生の増加の関連性を論じる。

γ-secretase のマクロな構造と Aβ42 産生の間には相関があることが複数の研究によって報告されている。Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)を用いた検討では、Aβ42 産生を増加させる FAD 変異の導入によって γ-secretase が閉じた”closed”な構造を採ることが報告されている(Berezovska et al. 2005)(Uemura et al. 2009)。その後、FAD 変異の中でも γ-secretase を”open”な構造にするものも報告され(Elad et al. 2015)Aβ42 産生増加と γ-secretase の構造との統一された構造変化の存在が疑問視されかけたが、直後にシミュレーションを用いた解析から γ-secretase には”closed”と”semi open”、そして”fully open”の 3 種類の構造が存在し、Aβ ペプチドとの親和性は須らく”semi open”型 γ-secretase が高かった(Somavarapu and Kepp 2017)。これらの報告は全て γ-secretase 全体の構造変化を報告したものであるため、PS1 自体が γ-secretase に合わせて”closed”や”open”な構造を採ることと直結はしないものの、少なくとも Somavarapu らのシミュレーションでは、”semi open”や”open”な構造時には PS1 が開いて内部に基質が入り込むモデルを提唱しており、γ-secretase の拡大に伴って PS1 の構造拡大も起きていると考えて良いだろう。FAD 変異類を導入すると TMD3 周囲の親水性が減弱し、活性中心ポアが縮小することを見出した本研究は、こうした既報と一致していると言え、FAD 変異を導入すると PS1 が”closed”な構造に誘導され、活性中心ポアが縮小し、Aβ42 産生が増加するというモデルが立てられる。

ここで考察すべき事項が、どこの構造が親水性の減少に直接的に寄与しているか、である。本研究では、P117L 変異を導入した L166C/L383C、及び F177C/I387C double Cys PS1 Mt の crosslink を行っており、その結果 P117L 変異は L166-L383 間、F177-I387 間の距離を何れも変化させることは無かった(図 65A、B、C、図 66A、B)。P117L 変異によって L166 周囲の活性中心ポアは変動していないので crosslink とのコンセンサスは取れているように見える。しかし F177 周囲の活性中心ポアの減少は少なくとも TMD3 と活性中心の距離の変動によって生ずるものではないことが考えられる。本研究では構造変化を SCAM と crosslink で検出し考察しているが、この 2 つの手法は特定残基の周囲の変化と 2 残基間の距離の変動を検出する方法であり、得られる構造情報は 0 次元的、そして 1 次元的である。片や活性中心ポアの変動は水分子の流入口や空洞の変化によって生じるので、2 次元的及び 3 次元的な情報を基に考察する必要がある。この観点から、SCAM や crosslink だけでは全てを語る事が出来ない。実際、親水性環境か疎水性環境下に関わらず、基質を最終的に内包する活性中心ポアを構成するのは TMD3 だけではなく、活性中心 aspartic acid の存在する TMD6 や TMD7、また近傍の

TMD2 や 5 等も活性中心ポアに面するドメインであることから、TMD3 とこれらのドメイン、若しくは TMD3 の内腔側領域は全く関係せずに別のドメイン同士の距離が狭まったが為に水分子の流入が減少して TMD3 の内腔側の親水性が間接的に減少した可能性も高いだろう。Cryo-EM によって解かれた  $\gamma$ -secretase の複数の安定構造の間で F177-I387 間の距離に大きな変動が無く、本研究の crosslink もそれに近い値を示したことから(図 38)、そもそも F177-I387 間は大きな構造変化を起こす部位では無いとも考えられる。今後は TMD3 とその他のドメイン同士、若しくは TMD3 を除く他のドメイン同士の crosslink を PS1 内腔側で網羅的に解析することで、内腔側活性中心ポアの縮小に直接関与する部位の特定が可能であると考えられる。

また、活性中心ポアの縮小、TMD3 周囲の親水性の減弱が A $\beta$ 42 産生増加にどのような寄与を与えているのかも、考察すべき疑問である。一般的に helix は水分子の存在下で容易に解かれる(Soman et al., 1991)が、親水性の減弱を通して helix がより強固に保持され、結果的に切断が起こりにくくなるが為に A $\beta$  切断活性が A $\beta$ 42 の切断までで止まってしまい、A $\beta$ 42 の産生量が増加する可能性がもっともらしいように思える。特に  $\gamma$ -secretase は基質切断時に基質の helix 構造を解くことが分かっている他、FAD 変異間で高い相同性を以って変化した TMD3 内腔側に位置する F177 は基質と非常に近傍に位置する(Zhou et al. 2019)が、F177 周囲の親水性の変動は直に基質へ影響を与えると推測される。しかしながら本研究では FAD 変異を用いた解析を行っていることから、単一残基の置換自体が直接的な原因なのか、或いは置換によって引き起こされた活性中心ポアの縮小、親水性の減弱が直接的な原因なのか、結論を出すことは出来ない。例えば M139 と F177 は基質との相互作用が可能な距離に存在することが示唆されている他(Zhou et al. 2019)、M139V、F176L、F177L は全て leucine と valine への変異である。Valine は  $\beta$ -branched アミノ酸残基であり、helix-helix 相互作用を促進する効果を持つとされている(K. R. MacKenzie and Engelman 1998)他、leucine は tyrosine との相互作用によって非極性表面から水分子を除外する効果を持つと考えられている(Padmanabhan and Baldwin 1994)。Phenylalanine も tyrosine と同様に芳香環を持つが leucine との相互作用が可能だと思われるが、TMD3 の内腔側には多くの phenylalanine が並んでおり、変異先の leucine と新たに相互作用を形成することで疎水性を高めたかもしれない。しかしながら、後述する G384A 変異や FLAG-Pen-2 の伸長では TMD3 周囲の活性中心ポアの変動が確認されない(図 49、51)にも関わらず A $\beta$ 42 産生増加が確認されていることから、活性中心ポアの縮小は A $\beta$ 42 産生増加の要因の一端に過ぎない、若しくは FAD 変異がもたらした付属の構造変化で A $\beta$ 42 産生増加そのものには寄与しない可能性も高い。今後は iGSM を用いた検討を行いたいと考えているが、何かしら point mutation や化合物に頼らない方法で TMD3 内腔側親水性環境を減弱させる方法を以って A $\beta$ 42 の産生量の変化を確認することが理想的ではある。

#### 4.3.2.1 F176L 変異に関する考察

F176L 変異は、元々最初の AD 患者である Auguste Deter の脳内で見つかった変異であり(Graeber 1999)、PSEN1 の 176 番目のコドンに T > C 変異が入っていたことから AD 病態への関連がある FAD 変異だと推察された(Müller et al. 2013)。しかしながら、この時の sequence の精度が非常に低いことも同時に問題となっており、実際元々の thymine と変異後の cytosine の spectrum 強度がほぼ同程度であったことから、別の研究グループが追試した結果、より高い精度の sequence で Auguste Deter 脳内に F176L 変異など無かったと言う結論に落ち着いた(Rupp et al. 2014)。その為、現在一般的にこの変異が AD 病態へ関与しているかどうかは疑わしいとされている。本研究結果でも F176L 変異を含む PS1 Mt と PS1wt を組み込んだ  $\gamma$ -secretase の A $\beta$ 42 産生比率に変動が無かった(図 42B)ことから、FAD 変異ではない説を支持する。

しかしながら、興味深いことに L166C single Cys PS1 Mt に組み込むと A $\beta$ 42 産生が FAD 変異と同様に増加し、反対に F177C single Cys PS1 Mt に組み込むと A $\beta$ 42 産生が減弱することも発見している(図 45)。その為、本研究では F176L



を保有する L166C single Cys PS1 Mt を、A $\beta$ 42 産生を増加させる Mt として用い、結果的に F177L や E184D 等と同じように L166 周囲の親水性環境を減弱させることが明らかとなった(図 48)。ここで興味深いのは、PS1wt に F176L 変異を導入しても A $\beta$ 42 の産生に変化は無いが、L166C single Cys PS1 Mt に導入すると A $\beta$ 42 産生比率が有意に上がり、F177C single Cys PS1 Mt に導入すると A $\beta$ 42 産生比率が有意に下がることである。まず A $\beta$ 42 産生比率に有意な差をもたらしたのは何れも Cysless PS1 Mt であることから、PS1wt の内因性 cysteine 5 つを serine に置換したことで A $\beta$  産生の F176L に対する応答性が獲得されたと考えるのが妥当である。5 つの内因性 cyteine の内、膜内でスパンしている HL2 に位置する C158 は TMD3 の細胞質側末端にも近い。具体的にどのような機構によって F176L 変異への応答性を獲得するかは不明であるが、PS1wt の 5 つの内因性 cysteine を 1 つずつ、若しくは 2 つ 3 つ組み合わせて serine に置換した PS1 Mt を作成し、そこに F176L 変異を導入して A $\beta$ 42 産生量を測定することで、更なる考察が可能になると考えられる。一方、L166C/F176L single Cys PS1 Mt と F177C/F176L single Cys PS1 Mt の違いは、L166C/F176L と F177C/F176L それぞれの 2 つの変異の組み合わせによって生ずるものであると考えられる。この 2 つの single Cys PS1 Mt の TMD3 の変異の中で用いられている残基の中で、まず phenylalanine 同士による  $\pi$ - $\pi$  相互作用(Hunter et al., 1991)、そして thiol 基と芳香環の間で生ずる S-H/ $\pi$  相互作用(Forbes et al. 2017)が働いていると考えられる。Phenylalanine 同士の  $\pi$ - $\pi$  相互作用は、互いの芳香環が平行に面する face-to-face の向きより、片方の芳香環の平面がもう片方の芳香環の端に面する edge-to-face の向きが安定であり、最大で 8 Å 離れても相互作用するとされている。一方、芳香環と thiol 基を持つ化合物の結晶構造を調べた研究では、芳香環と thiol 基の距離は 2 ~ 3 Å の距離であるとしている。こうした背景を踏まえ、L166C/F176L single Cys PS1 Mt と F177C/F176L single Cys PS1 Mt の変異導入毎の A $\beta$ 42 産生比率の変動、及び残基毎の潜在的な相互作用の変化を以下にまとめる。

1) Cysless PS1 Mt  $\rightarrow$  L166C single Cys PS1 Mt: A $\beta$ 42 産生比率上昇(L166C 変異による、機序は不明)、L166C single Cys PS1 Mt  $\rightarrow$  L166C/F176L single Cys PS1 Mt: A $\beta$ 42 産生比率上昇(F176 と F175/F177/F179 の  $\pi$ - $\pi$  相互作用の消失)

2) Cysless PS1 Mt  $\rightarrow$  F177C single Cys PS1 Mt: A $\beta$ 42 産生比率上昇(F177 と F175/F176/F179 の  $\pi$ - $\pi$  相互作用の消失、及び C177 と F175/F176/F179 の S-H/ $\pi$  相互作用の獲得)、F177C single Cys PS1 Mt  $\rightarrow$  F177C/F176L single Cys PS1 Mt: A $\beta$ 42 産生比率減少(C177 と F176 の S-H/ $\pi$  相互作用の消失)

上記を加味すると、TMD3 の内腔側で phenylalanine 同士の  $\pi$ - $\pi$  相互作用の消失が A $\beta$ 42 産生比率上昇に関わっており、S-H/ $\pi$  相互作用の少なくとも部分的な消失が A $\beta$ 42 産生比率減少に関与すると推測される。本研究ではより詳細な検討はしていないが、この理論が正しければ F175L 変異も F176C single Cys PS1 Mt の A $\beta$ 42 産生比率を減少させることが予想される。また、F177C 変異と F176L 変異が local に TMD3 内腔側に直接影響して、或いは TMD3 細胞質側の構造変化を引き起こして A $\beta$ 42 産生を変動させるかは不明だが、この結果は TMD3 が A $\beta$ 42 産生比率の変動に影響を与える部位であることを大きく支持する研究結果であると考えている。

#### 4.3.2.2 G384A 変異に関する考察

G384A 変異は TMD3 周囲の親水性の減弱、活性中心ポアの縮小を通さずして A $\beta$ 42 産生比率を増加させた(図 49)。近年の cryo-EM を用いた構造解析の中で、G384 は基質と相互作用する部位であることが報告されている(Zhou et al. 2019)。この為、glycine から alanine への変化によって基質のポジショニングが変化した可能性が考えられる。特に A $\beta$  は最初の切断部位が 1 つずれることで A $\beta$ 49 と A $\beta$ 48 に切り分けられ、最終的に A $\beta$ 42 比率の決定に繋がることから、G384A 変異によって基質が A $\beta$ 42 切断系列配向性に固定されやすくなったこと、若しくは G384A 変異によって TMD7 の構造変化が起き、活性中心 aspartic acid の場所が変化し、A $\beta$ 42 切断系列で切られやすくなったこと、或いはその両方の可能性が考えられる。本研究では基質についての検討は行っていないが、G384A を導入することで TMD3 と活性中心 aspartic acid

付近との crosslink が変動することを見出している。特に、G384A 導入によって L166-L383 間の距離は変動が無かった(図 65A、B、D)のに対し、F177-I387 間の距離は全く crosslink されなくなっている(図 66A、C)。変異体特異的な表現型な可能性もあるが、G384A を含む L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt は A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の産生量が著しく減少している(図 43)ことから、一見するとそもそも基質が捕捉できずに切断が不可能になる程度まで距離が広がっているようにも思える。しかしながら、この crosslink の結果は L166-L383 間の距離は 2.1 Å 以下、F177-I387 間の距離は 24.7 Å 以上であることを示しているのだが、L166-F177 間の直線距離が平均 15 Å 程度、また L383-I387 間の直線距離が平均 5.5 Å 程度であることを加味すると、幾何学的に crosslink 通りの値をとるのは不可能である。つまり、先述した考察と同様、G384A 変異によって F177-I387 間の crosslink が見られなくなったのは距離が伸長したのではなく、構造変化によって F177-I387 間の crosslink が妨害されたからであると考えるのが妥当である。こうした考察から、G384A 変異は TMD7 の回転運動等によって活性中心の構造を変え、結果的に A $\beta$ 42 産生系列へシフトさせたことが考えられる。

#### 4.3.2.3 FLAG-Pen-2 に関する考察

G384A 変異に引き続き、FLAG 配列による Pen-2 N 末端の伸長も TMD3 周辺の活性中心ポアの変動を来すこと無く A $\beta$ 42 産生を上昇させることが分かった(図 51)。過去の検討より Pen-2 の N 末端を伸長すると活性中心付近の A246 と L250 の親水性が減少することが報告されており、Pen-2 の N 末端は活性中心構造に直接影響を与えて A $\beta$ 42 産生を変動させる可能性がある(Isoo et al. 2007)。他の FAD 変異では検証していないが、多くの FAD 変異は TMD3 周囲の親水性の減少を通じて、そして Pen-2 N 末端の伸長は活性中心への直接的な影響を通じて A $\beta$ 42 産生を増加させるものであるとするならば、両者は別の機構を持つことになる。事実、使用した point mutation は全て AICD と NICD 産生を減弱させているのに対し、FLAG-Pen-2 はどちらも変化させない結果が出ている(図 46A、B)。また、PAL を用いた検討では C99 の細胞質側が PS1 CTF と、内腔側が PS1 NTF と強い相互作用があること(Fukumori and Steiner 2016)、TMD3 と TMD6 は基質を挟んで活性中心ポアの真反対側に位置しており、PS1 CTF 側に結合する Aph-1 の親水性ポアから PS1 活性中心に水分子が流入してきている可能性があること(Aguayo-ortiz and Dominguez 2019)等から、A246 と L250 の面する活性中心ポアは A $\beta$  産生の最初のステップである  $\epsilon$  切断に影響を与えず、その後の A $\beta$ 42 産生比率を決定する  $\gamma$  切断のみに関与する場所であり、Pen-2 の N 末端伸長はその機構特異的に影響を与えたことが考えられる。

#### 4.3.3 A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアに関する考察

本研究に於いて V236S 変異と GSM 3 種類を用いた検討より、A $\beta$ 42 産生減少時には TMD3 の面する活性中心ポアが全体的に増加することが示唆された(図 54、59)。先述した通り、 $\gamma$ -secretase には”closed”、”semi-open”、”open”の構造が存在することが示されており、過去の検討で A $\beta$ 42 産生を下げる NSAIDs 等を加えた時には  $\gamma$ -secretase が open な構造を採ることが知られている(Lleó et al. 2004)(Uemura et al. 2009)(Ohki et al. 2011)。こうした背景より、PS1 の構造が全体的に広がり、それに伴って活性中心ポアが拡大し、親水性が増加し、A $\beta$ 42 産生比率が低下したモデルが立てられる。本研究で用いた ST1120 は過去の検討で Km 値を減少させることが知られている(Takeo et al. 2014)ことから、本研究で見出した活性中心ポアが増大した時の構造は、基質との親和性が最も高い”semi open”な構造を反映していると考えられる(Somavarapu and Kepp 2017)。ただし、Elad らによって一部 FAD 変異が  $\gamma$ -secretase の”open”な構造をとらせることも報告されており(Elad et al. 2015)、“open”構造を採らせる FAD 変異の TMD3 周囲の活性中心ポアに与える影響を調べる必要性もあると考えられる。

この活性中心ポアの拡大、及び TMD3 周囲の親水性の増大に直接寄与する PS1 の構造変化について議論する必要がある。本研究では V236S 変異と 3 つの GSM が全て TMD3 周囲の活性中心ポアを拡大する結果となったが、これら全てが

同じ構造変化を通じて親水性の増大を引き起こすかどうかは懐疑的である。V236S は TMD5 の内腔側末端に位置する人為的な point mutation である。この領域も大きく構造変化を起こす可能性を秘めている部位であり、実際 cryo-EM による  $\gamma$ -secretase の構造上で、Apo-Class 1、2、3 毎に F177-V236 間は 10~14 Å、4~8 Å、3~8 Å 程度である。このことから、構造変化に伴って内腔側親水性領域から水分子が流入し、F177 周囲の親水性を増加させた可能性が考えられる。更に、intact cell を用いた SCAM による検討から内腔側より MTSEA-biotin が L166C を標識することが出来たので(図 23A)、内腔より水分子が L166 まで到達した結果、細胞質側の親水性も増大した可能性が高い。その一方で、GSM の結合部位は TMD1 内腔側から伸びる HL1 に位置する Y106 (Cai et al. 2017)、及び TMD3 内の Y181 と TMD4 付近の Y195(竹尾浩史 博士論文)である。この為、本検討で用いた GSM は全て同じ中心骨格を持っていることから全て同じ部位を標的とすることが考えられ(Cai et al. 2017)、主に TMD3 への関与によって構造変化を引き起こすことが考えられる(TMD1 と TMD3 の関係性は後述)。勿論、V236S 変異が近傍の TMD3 内腔側に作用して TMD3 の構造変化を引き起こすことや、PS1 TMD5 の Y239 への作用(Takeo et al. 2014)によって TMD5 の構造変化を引き起こす可能性も考えられるが、E2012 は TMD3 細胞質側と活性中心 aspartic acid の距離の増加を通じて A $\beta$ 42 産生を下げることを本研究で明らかにしている(図 72、93)こともあり、両者が必ずしも同じ機構を以ってして TMD3 周辺の活性中心ポアの増大を引き起こしているとは限らない。

以下 TMD3 の細胞質側と内腔側の親水性の増加の違い、また活性中心ポアが増大することの意義について考察する。

#### 4.3.3.1 TMD3 内腔側の活性中心ポアに関する考察

V236S 変異と 3 種類の GSM によって、本検討では L166 と F177 両方の標識が増加したことから、A $\beta$ 42 産生が減少する時には活性中心ポアが細胞質側と内腔側両方で拡大することが示唆された。しかしながら、こうした動きが A $\beta$ 42 産生減少をもたらす原因なのか、A $\beta$ 42 産生が減少した結果引き起こされるものなのかは不明である。そこで、本研究では SCAM による標識実験以外による検証でこの疑問の答えを探した。

結論から述べると、TMD3 の内腔側の親水性の変化は基質の切断に影響を与えないと考えている。その根拠は以下の通りである。

1) Crosslink の結果からの考察。TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大を引き起こす構造変化を検出する為、本研究ではまず TMD3 と活性中心 aspartic acid 付近の残基を結び、E2012 による構造変化によって距離の変動の有無を調べた。その結果、L166-L383 間と F177-I387 間の距離何れも E2012 によって変動することは無かった(図 68)。しかしながら、先述した考察より TMD3 と両残基の最短距離に変動が無ければ crosslink でその差を検出することが出来ない(図 69)ことから、*in vitro* assay による検討も行った。すると、F177-I387 間を結んでも E2012 は A $\beta$ 42 産生減少効果を保持したままであることが明らかとなった(図 73)。即ち、A $\beta$ 42 産生は TMD3 内腔側と活性中心 aspartic acid の距離によって制御されているわけではないということである。とは言え、複数のドメインで構成されている活性中心ポアの変動を 1 ペアのドメイン間の距離の変動で議論することは不可能である。

2) SCAM の結果からの考察。もう少し決定的なのが SCAM による反例の発見である。F177C single PS1 Mt に F176L 変異を入れると A $\beta$ 42 産生が減少することが確認された(図 45)が、この時 TMD3 内腔側の活性中心ポアは変動していない(図 60)。即ち、F177C single PS1 Mt に於いて F176L 変異は内腔側活性中心ポアを変動させることなく A $\beta$ 42 産生を減少させることが示唆されたことになる。似たような現象は Y195A 変異を入れた場合でも確認され、Y195A PS1 Mt は PS1wt とほぼ同程度 E2012 への応答性を示す(図 80、81A)が、Y195A 変異は TMD3 の内腔側の活性中心ポアに影響を与えず、細胞質側のみ活性中心ポアの拡大を引き起こすことが明らかとなった(図 85)。つまり、Y195A 変異は内腔側活性中心ポアを変動させることなく、A $\beta$ 42 産生を減少させる E2012 に応答していることを指し示している。

これらの研究結果より、内腔側活性中心ポアの拡大、親水性の増加は A $\beta$ 42 産生比率を変動させるのに無関係な構造変化であると考えられる。しかしながら、内腔側の親水性の増大が何らかの機能を有しているかは依然として議論の余地はある。

#### 4.3.3.2 TMD3 細胞質側の活性中心ポアに関する考察

本研究で V236S 及び 3 つの GSM によって L166 周辺の親水性が増大し、活性中心ポアが増加したことが示された(図 54、59)。F176L 変異を L166C single Cys PS1 Mt に入れると A $\beta$ 42 産生が増加した為(図 45)、F176L 変異によって A $\beta$ 42 産生が減少する時の TMD3 細胞質側の活性中心ポアの変動は調査できないが、本研究で用いた変異と化合物では全て同じ結果を齎した。この時、代表して E2012 による TMD3 の構造変化を検出したところ E2012 による L166-L383 間の距離の変動は見られなかったものの(図 68A)、L166-L383 を最短距離に固定した時に E2012 による A $\beta$ 42 産生減少効果が消失したことが確認された(図 72)。これら一連の研究結果より、A $\beta$ 42 産生減少に TMD3 細胞質側の活性中心ポアの変動が関与しており、特に TMD3 細胞質側と活性中心が離れるような動きをする時に活性中心ポアが増大し、A $\beta$ 42 産生が減少することが示唆された。以下、細胞質側の活性中心ポアの拡大、親水性の増加について考察する。

まず、膜内配列切断酵素は疎水性膜内で加水分解を行うことで基質を切断する。その為、親水性の活性中心ポアに基質を取り込んでその内部で切断を行う。即ち、活性中心ポアの増大、親水性の増大の意義一つは取り込んだ水分子を用いて加水分解を行うことである可能性がある。例えば  $\gamma$ -secretase と同じ膜内配列切断酵素である rhomboid は内部の空洞に水分子が存在することが明らかとなっている他(Y. Wang et al. 2006)、rhomboid family である大腸菌 rhomboid については 4 つの水分子保持残基が、酵素活性化に伴う構造変化の中で活性中心に水分子を受け渡している可能性が示唆されている(Zhou et al. 2012)。活性中心ポアの増大、親水性の増大のもう一つの意義は基質の不安定化である可能性がある。Helix 構造は膜内等の疎水性環境下では安定的に形成されるが、親水性環境下では非常に不安定であり、水分子によって容易に解かれることが分かっている(Soman et al. 1991)。 $\gamma$ -secretase に於いても切断を受ける際に切断部位付近のアミノ酸残基の helix が形成と崩壊の平衡にあることが NMR で示されており(Takeshi Sato et al. 2009)、cryo-EM による解析でも切断時に helix 構造が解かれることが分かっている(Zhou et al. 2019)。このどちらに寄与しているかを本研究では明確には出来ないが、以下に示すいくつかのデータから、後者であると考えている。

1) 活性中心との位置関係。活性中心ポアは TMD3 のみならず TMD2 や TMD6、TMD7 等複数のドメインから成る空洞であるが、親水性環境下にある残基は TMD3 の L166 や F177 だけでは無く、例えば活性中心 aspartic acid D257 に近い A246 や L250、PALP motif の A434 や L435 も SCAM で標識されており、付近に水分子が存在することが明らかとなっている(Sato et al. 2006)(Sato et al. 2008)。これらの部位は TMD3 に比べて活性中心 aspartic acid に圧倒的に近い位置に存在しており、更に Aph-1 の結合部位にも近い。尚、Aph-1 は内部に親水性の空洞を有すると報告があり、そこから活性中心へ水を供与している可能性が示されているのは先述した通りである(Aguayo-ortiz and Dominguez 2019)。一方 TMD3 は cryo-EM の 3 次元構造上で基質を挟んで活性中心 aspartic acid の真反対側に位置していることが示されている(Zhou et al. 2019)。無論、TMD3 周囲の水分子がそのまま活性中心まで回り込む可能性もあるが、物理的な距離を考えると、TMD3 が直接的に基質の加水分解に関与する水分子を制御しているとは考えにくい。

2) 基質との位置関係。近年の cryo-EM による解析結果から、基質切断時に TMD3 は基質と非常に近づくことが報告されており、特に S169 は基質の I712 と直接的に相互作用し得る距離まで近づくこととされている(Zhou et al. 2019)。本研究でも E2012 の添加によって S169C の標識が有意に増加したことを示しており(図 78)、A $\beta$ 42 産生低下時に S169 付近の親水性が増加することが示唆される。この基質の I712 は A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 の切断部位に近い(Xu 2009)。この為、V236S や GSM

等によって A $\beta$ 42 の産生比率が減少するのは、S169 周囲の親水性が上昇したことで水分子による基質不安定化が一層進み、更なる切断が亢進して A $\beta$ 38 等の short A $\beta$  が増加したからだというモデルが提唱される(図 94)。

3)  $\epsilon$  切断と  $\gamma$  切断への関与。既に述べた通り、A $\beta$  は漸次的切断を受け、AICD と A $\beta$ 48 若しくは A $\beta$ 49 が産生する切断を  $\epsilon$  切断と呼び、2 回目を  $\zeta$  切断、3 回目以降を  $\gamma$  切断と一般的に呼ぶ。GSM 類等は原則 A $\beta$  総量を変えずに A $\beta$ 42 産生比率を減少させること、C99 の AICD 側は PS1 CTF と相互作用する一方で A $\beta$  側は PS1 NTF との相互作用が強いこと (Fukumori and Steiner 2016)、DAPT は  $\zeta$  切断産物の A $\beta$ 46 の細胞内蓄積を促すこと (Zhao et al. 2004) 等から、これらの切断は別機構で制御されているとするのが一般的である。本研究では活性中心ポアの変動を来す FAD 等の AICD や NICD 切断量を定量したが、V236S 変異を含む PS1 Mt は PS1wt に比べて AICD と NICD 産生量が有意に低下していた(図 46A、B)。一方、本研究で用いた E2012 は C99 の切断に変化を与えない、つまり AICD 産生に影響を与えないことが示されており (Cai et al. 2017)、また ST1120 についても同様の報告がある (Takeo et al. 2014)。これら  $\epsilon$  切断に与える影響がバラバラである V236S と GSM 類が全て活性中心ポアを増大させたことを考えると、今回見出した TMD3 周辺の活性中心ポアの拡大は  $\epsilon$  切断に関与するメカニズムではないと推測される。 $\epsilon$  切断も  $\gamma$  切断も制御を受ける機構は別々であるされているが何れも同じ活性中心 aspartic acid によって加水分解受けることから、活性中心への水分子の供与はどの段階でも同様の機構によって制御されていると考えられるので、本研究で見出した TMD3 周囲の活性中心ポアの増大は基質の加水分解に直接関わるものではないであろう。

以上の考察より、本研究では TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大、親水性の増加は基質の不安定化に関わっている仮説を支持する。

またここで、本研究で行った評価系の妥当性についても議論する必要がある。本研究ではまず、PS1 に於ける水分子保持候補残基として H163、S169、S170、Q222、Q223 に着目し、それぞれを別の置換した PS1 Mt を作成してそれらの A $\beta$  切断活性を測定した(図 75B、76、77)。この時、側鎖の大きい残基として phenylalanine と tyrosine、疎水性アミノ酸残基として leucine と alanine、そして水分子保持機能があるとされる threonine に分けて評価した。その結果、どの PS1 Mt でも threonine に置換した場合に PS1wt と比べて有意な A $\beta$ 42 産生比率の変動を見せず、これらの候補残基が水分子を保持する可能性があること議論した。しかしながらこれは非常に不十分な議論である。そもそもタンパクの機能にアミノ酸残基が影響を与える方法としてはその側鎖の有する特性も然り、その側鎖の大きさによるタンパク全体の構造保持に関与することも挙げられる。特に本研究結果の中で例えるならば、serine と threonine はどちらも性質の似通った側鎖を持つものの、その嵩高さにも大きな差は無く、S169T と S170T PS1 Mt が PS1wt の切断活性に近かったのはその機能が同じである以外にも側鎖の大きさが近かった為に PS1 の構造に大きな影響を与えなかった為である可能性も払拭できない。この為、本研究では引き続き、A $\beta$ 42 産生低下時の各候補残基周囲の親水性の変化を SCAM で検出した。その結果、S169 のみ約 4 倍もの標識の増加が見られ(図 78)、 $\gamma$ -secretase 活性化時には S169 周囲に水分子が流れ込むことが示唆された。このことから S169 周囲の親水性が基質不安定化に関わっていると考察したのは先述の通りである。この S169 については、cryo-EM を用いた研究報告の中では基質と直接相互作用する部位であると記載されている (Zhou et al. 2019)。しかしながら、Zhou らの研究の中では crosslink を使って基質と酵素を固定したり活性中心に変異を入れて基質の切断の阻害をしたりしてはいるものの、原則酵素活性を修飾する point mutation や化合物は何も導入していない native な酵素の構造を観察している。本研究では  $\gamma$ -secretase を活性化させ、A $\beta$ 42 産生を低下させる E2012 を導入した時の構造を観察している点に於いて異なることは留意すべきである。このことから、定常時では S169 は基質との相互作用と関わっているかもしれないが、化合物等によって A $\beta$ 42 産生が低下する時には S169 の部位に水分子が流入し、基質との相互作用の代わりに基質の不安定化に関わるようになる、と考えても何ら矛盾は無いと言える。今後は、シミュレーションによって  $\gamma$ -secretase 活性化時の水分子の流動を調べる、若しくは安定な試料作成を確立させて中性子線を用いた中性子タンパク質構

造解析によって酵素活性化時の水分子の分布を調べる、等と言った構造学的手法で水分子を実際に観察することで、そして *in vitro* 系でリコンビナント A $\beta$ 45 や A $\beta$ 46 を用い、A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42、A $\beta$ 38 への切断効率の変動を算出する等と言った生化学的手法を組み合わせ、更に詳細に調べていきたい。

#### 4.3.4 遷移状態と A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアの違いに関する考察

本研究にて L-685,485 と V236S 変異、及び GSM を使った検討により、それぞれによる TMD3 周辺の親水性の増加に有意な差は無く、また L-685,458 は V236S 変異や GSM によって上昇した親水性を更に引き上げることは無いことが分かった(図 62、63)。この結果より、V236 変異や GSM 類は遷移状態を形成することで酵素活性を引き上げ、A $\beta$ 42 産生を低下させていることが考えられた。本項ではこの議論の妥当性について考える。

本検討で用いた化合物の対、ST1120 は過去の検討によって L-685,458 と同じ TSA 型 GSI である 31C の結合を増加させることが報告されている(Takeo et al. 2014)。また、基質が存在しない状態では GSM によって PS1 の構造変化が誘導されることが無いとされていることから(Uemura et al. 2010)、GSM は遷移状態そのものではなく、遷移状態を取り易くするような構造変化を誘導していることが考察される。しかしながら、本研究に於いて V236S 変異と GSM 類、及び L-685,458 は全て TMD3 周辺の活性中心ポアを等しく増大させており、互いに効果を上乘せることは無かったという結果が出ている。この点に関して、まず本研究では MTSEA-biotin の反応を親水性の強度に対して線形性を持った濃度で行っているか未検証である点に問題がある。即ち、例えば標的残基付近の水分子の量に対して標識剤が圧倒的に少ないような場合、MTSEA-biotin の反応が飽和してしまい、親水性の強度に比例した標識量が得られなくなる。この点に関して、例えば rhomboid のような、X 線結晶構造解析やシミュレーション等で活性中心ポアの広さや水分子の分布がある程度分かっている酵素を標識し、水分子の量と MTSEA-biotin の標識効率の相関関係を明らかにした上で本研究の SCAM protocol を再デザインする必要があるとも言える。

もし線形性が保たれた状態で検討が行われているとすれば、この齟齬は構造変化の違いに起因するものであると考えられよう。まず本研究では TMD3 周囲の親水性に着目した解析を行っている。TMD3 は活性中心付近とは離れていつつも親水性環境下に広く面している特殊な部位ではある。しかし、活性中心ポアは TMD3 以外にも複数のドメインによって構成されており、TMD3 と活性中心 aspartic acid の間には完全疎水性の TMD2 と TMD5 が存在している(Zhou et al. 2019)。その為、活性中心ポアには一様に水分子が分布しているのではなく、TMD3 周辺と活性中心ポア周辺の親水性環境は完全に独立したものであると推測される。その為、GSM 類が TMD3 と TMD6 両方に影響を与え、TMD3 には上記考察で述べた通り基質不安定化に関与する構造変化を引き起こし、TMD6 の活性中心 aspartic acid 付近に対しては遷移状態に移行しやすいような構造変化を引き起こす可能性がある。今後は V236S 変異や GSM 等が TMD6 や PALP motif が面する活性中心ポアに与える影響を調べることでより詳細に検討出来る。また、L-685,458 の添加によって F177-I387 間が crosslink 出来なくなった(図 40B)一方で、E2012 は F177-I387 間の距離に変動を与えない(図 68B)ことも本研究で実証済みである。即ち、遷移状態をとりやすくさせるような GSM による構造変化は TMD3 内腔側と活性中心の距離に依存しないが、PS1 が遷移状態をとる時には活性中心 aspartic acid 付近が大きな構造変化を起こす(先述の考察参照)ことが考えられ、GSM が直接的に遷移状態そのものを形成するわけではない説を支持している。とは言え、L-685,458 が TMD3 周辺の活性中心ポアを変動させる機構については依然不明であるが、形の違う容器が同量の水を内包出来るのと同じように、TMD3 と活性中心の構造関係を異にしても部分的な親水性の強度は同程度である可能性も高い。以上の考察より、遷移状態と A $\beta$ 42 産生低下時の活性中心ポアは異なるものであると考えることが出来よう。

## 4.4 TMD3 の構造変化を引き起こす構造変化に関する考察

### 4.4.1 TMD1 と TMD3 の関係性に関する考察

A $\beta$ 42 産生減少時に引き起こされる一連の構造変化の中に於ける TMD3 の構造変化、活性中心ポアの変動の重要性を位置づける為、TMD1 と TMD3 の関連性に関する検討を行った。その結果、TMD1 の垂直運動が TMD3 周辺の活性中心ポアの変動に先んじて起こることが示唆された。これらの研究結果に関する妥当性を考察していきたい。

妥当性に関して筆者は以下の 3 点から議論する。

1) TMD3 解析について。本研究では TMD1 の構造変化と TMD3 周囲の親水性の変化の紐づけと行う研究を遂行した。しかしながら、既に議論したように、活性中心ポアは複数のドメインによって構成されており、ある 2 か所の構造変化による活性中心ポアの変化が全く無関係な部位の親水性に現れる可能性は依然としてある。即ち、TMD1 の垂直運動によって TMD3 以外のドメインの構造が実は引き起こされており、TMD3 周囲の親水性の増加はそれに付随した変化に過ぎない可能性があるということである。この懸念点を拭う為には、TMD3 の構造変化を阻害した上で TMD1 の垂直運動の有無を検出する必要がある。今後、TMD3 と活性中心 aspartic acid 付近を crosslink した条件下で E2012 による TMD1 の垂直運動が依然として引き起こされるかどうかを確かめていきたい。

2) 導入変異体について。本検討では Y106A 変異を TMD1 の垂直運動を阻害する変異、Y181A 変異を TMD3 周囲の活性中心ポアの増大を阻害する変異として扱った。TMD1 の垂直運動が TMD3 周囲の親水性増大を引き起こす検討結果が真であるならば、理論上 TMD1 の垂直運動が阻害されている状態でも TMD3 の活性中心ポアの増大が引き起こされれば A $\beta$ 42 の産生が減少することになる。本検討では当初 Y106A 変異をそのような point mutation として考えてはいたが、結果的に TMD3 周辺の活性中心ポアにも影響を与えることが判明した(図 87)。また、Y106 と Y181 の 2 か所は E2012 等の phenylimidazole 型 GSM の結合部位であることが判明している。PAL による検討から、Y106A 変異、Y181A 変異それぞれが TMD1 と TMD3 に与える影響の差は E2012 の結合力によるものでは無いことが推測されてはいる(図 91)が、alanine への置換で E2012 の効果が TMD1 や TMD3 に伝達しなくなってしまった可能性を完全に捨てることは出来ない。この懸念点を一度に払拭するのが V236S 変異を用いた検討結果であり、V236S 変異は TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大を引き起こす(図 54)が TMD1 の構造変化には影響を与えないことが判明した(図 90)。即ち、TMD1 の構造変化が無くとも V236S 変異は TMD3 の構造変化を通じて A $\beta$ 42 の産生比率を低下させており、Y181A 変異存在下の E2012 の検討結果と対を成すものと言える。つまり、TMD3 の構造変化、活性中心ポアの拡大は TMD1 の垂直運動の下流に位置することを示唆するものである。

3) ELISA と SCAM の結果の齟齬について。本検討結果の中でも、Y181A 変異は E2012 による TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大を阻害する(図 84)が、Y181A PS1 Mt の E2012 に対する応答性は明確に低下してはいるものの高濃度で A $\beta$ 42 産生の有意な減少が認められる(図 80) (A $\beta$ 42 の減少が見られることについての考察は後述参照)。この差は、ELISA は PS1wt ベースで、SCAM は single Cys PS1 Mt ベースで解析したことに起因すると考えられる。PS1 を含む  $\gamma$ -secretase は活性発揮時に大きな構造変化を伴い、伸縮することが一般的に知られている(Lee et al. 2017)(Somavarapu and Kepp 2017)。PS1 の内因性 cysteine を全て serine に置換した Cysless PS1 Mt は PS1wt に比べると A $\beta$ 42 産生比率が有意に上昇しており(Sato et al. 2006)、この変動は FAD 変異と同じであることから、Cysless PS1 Mt はより”closed”な構造をとっており、PS1wt に比べて flexibility に乏しいことが推測される。つまり、Y181A 変異を導入した single Cys PS1 Mt で活性中心ポアに変動が見られなかったのは、Y181A 変異による構造変化の阻害と Cysless PS1 Mt ベースが E2012 への応答性を低下させたことの 2 つに起因しているのではないかと考えている。この点に案しては、Y181A を保持する L166C 若しくは F177C single Cys PS1 Mt の E2012 への濃度依存的な応答性を測定すれば瞬時に判別のつくことではある。

以上の考察から、本研究では TMD1 の垂直運動が TMD3 周囲の親水性ポアの増大、及び TMD3 の構造変化に先立つことを完璧に証明できたわけではないとは言え、Y181A 変異によって TMD1 の垂直運動が阻害される一方で TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大が抑制され、A $\beta$ 42 の産生減少が観察されなくなること、及び V236S 変異が TMD1 の垂直運動に影響を与えずに TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大を通じて A $\beta$ 42 の産生減少を誘導する結果は、TMD1 の垂直運動が TMD3 周囲の活性中心ポアの拡大に先んじて起こることを示唆するのに十分な結果であると考えている。

#### 4.4.2 TMD1 と TMD4 の関係性に関する考察

興味深いことに Y181A PS1 Mt は E2012 に対する応答性を完全には失っておらず、Y181A/Y195A PS1 Mt になって初めて E2012 への応答性を完全に喪失する(図 80、81B)。一方 Y195A PS1 Mt は PS1wt とほぼ同程度 E2012 に応答する(図 80、81A)。これらの PS1 Mt に対して E2012 の結合力を PAL で測定したが、Y195A PS1 Mt への結合力だけ有意に高く(図 92)、ELISA による結果とよく相関していると言える。即ち、E2012 を始めとする phenylimidazole 型 GSM は Y181 と Y195 何れにも結合するが、Y181 の方が主要な結合部位であるということが推測される。また、Y181 に結合が出来なくても代わりに Y195 に結合することで A $\beta$ 42 産生減少効果を呈することが出来ることも示唆された。

Y181 は TMD3 に位置する残基であり、一方 Y195 は TMD4 に位置する。TMD4 は近年発表された cryo-EM による 3 次元構造の中で TMD3 の細胞質側と作用していることが報告され、G206 や G209 を含む TMD4 の細胞質側領域は FAD 変異の hotspot でもある(Zhou et al. 2019)。実際この部位の glycine はその可動性の高さが重要であると考察されており、また A $\beta$ 42 の産生変動に伴って構造変化を起こす部位でもあることが示されている(Tominaga et al. 2016)。この報告の中で TMD4 細胞質側は A $\beta$ 42 産生低下時に活性中心に近づくという、TMD3 とは逆のモデルを提唱しているが、TMD4 は TMD3 を引っ張るような構造変化を起こすのではなく、スライドさせるようにして TMD3 の構造変化を引き起こしているとも考えられる。即ち、Y181A 変異によって TMD3 に生じるはずであった構造変化などが阻害されても、Y195 への代替的な結合でかろうじて A $\beta$ 42 産生の減少を引き起こすことが可能である、というメカニズムが立てられる。Y181A/Y195A PS1 Mt の E2012 への完全な応答性の欠如は、何れの結合部位にも結合できなくなった為に引き起こされた結果であると考えられ、A $\beta$ 42 産生制御に於いて TMD3 の構造変化が重要であることが再確認されたと言えよう。しかしながら、上記で考察した通り Y106A 変異が TMD1 の構造変化及び TMD3 の活性中心ポアの変動の両方を阻害することから、Y106A PS1 Mt が E2012 への応答性を完全に失ったこと(図 79B)が TMD1 の垂直運動の阻害によるものなのか TMD3 の構造変化を間接的に妨害したことによるものなのか、と言う点については本研究で明らかになっておらず、やはり E2012 の結合部位に依らずにそれぞれの構造変化を阻害する変異を用いた検討が必要である。

#### 4.5 結語

本研究で、筆者は MTS 試薬を用いた SCAM や crosslink を行い、PS1 NTF の TMD3 が親水性の活性中心ポアに面しており、TMD3 の細胞質側が活性中心 aspartic acid から離れるような動きをすることで A $\beta$ 42 産生を減少させることを明らかにした。更に、TMD3 は A $\beta$ 42 の産生変動時に構造変化を起こすと判明している TMD1 や TMD4 と比べ、A $\beta$ 42 産生減少により直結していることを示唆し、そして TMD3 の構造変化とその周辺の活性中心ポアの拡大は基質の不安定化を介して A $\beta$ 42 産生を減少させるモデルを提唱した。

GSM は一部の基質を除き(Wanngren et al. 2012)、高い特異性を以って A $\beta$ 42 の産生量を減少させることが出来る化合物であり、かつては副作用の少ない  $\gamma$ -secretase の治療薬の候補として開発が進められてきた背景を持つ。しかしながら、現在その開発は殆ど行われていない。その理由として GSM 本体の *in vivo* での薬効の低さ、そして脂溶性、バイオアベイ



ラビリティ、脳移行性、毒性等その他の *drug properties* とのバランスの取れにくさがまず挙げられる(Bursavich et al. 2016)。現行の GSM はその結合部位が TMD1 周辺にあることが知られているが、本研究で TMD3 がより A $\beta$ 42 の産生制御に直接関わっていると推測される。今後、全く新しい中心骨格を持つ GSM をデザインする中で TMD3 の構造に直接的に影響を与える化合物を創出出来れば、より薬効が高く、*in vivo* でも強い効果を持つ化合物として AD 治療に貢献できると考えられる。

また、近年の創薬のトレンドとして、標的タンパクの立体構造に基づいて薬剤設計を行うインシリコ創薬が用いられてきている。インシリコ創薬自体は数十年前から登場している概念であるが、当時はシミュレーション精度が 5 %程度と、実用には程遠いものであった。ところが、スーパーコンピューター「京」の登場によって、タンパクを剛体ではなく揺らぎのある分子としてとらえ、水分子や脂質二重膜が存在する環境下で、アミノ酸残基間原子間の相互作用があるものとして高度なシミュレーションが可能になり、その精度が 70 %まで飛躍的に向上した背景を持つ。本研究では  $\gamma$ -secretase の活性、及び A $\beta$ 42 の産生制御に重要な構造活性相関情報を明らかにした。今後、このような構造活性相関に関する詳細な情報を更に突き詰めていくことで、更に精度の高い薬剤設計シミュレーションが可能となるだけでなく、 $\gamma$ -secretase の自由な活性制御が可能になると考えている。

今後、 $\gamma$ -secretase による毒性種 A $\beta$ 42 産生の制御に関わる構造活性相関解析を通して、 $\gamma$ -secretase を標的とした AD 治療薬、予防薬の開発に向け、研究を続けていきたい。

## 5. 参考文献

- Abramowski, D. 1996. "The Carboxyl Termini of  $\beta$ -Amyloid Peptides 1 – 40 and 1 – 42 Are Generated by Distinct  $\gamma$ -Secretase Activities." *The Journal of Biological Chemistry* 271(45):28655–59.
- Adlard, Paul A., Robert A. Cherny, David I. Finkelstein, Elisabeth Gautier, Elysia Robb, Mikhalina Cortes, Irene Volitakis, Xiang Liu, Jeffrey P. Smith, Keyla Perez, Katrina Laughton, Qiao-xin Li, Susan A. Charman, Joseph A. Nicolazzo, Simon Wilkins, Karolina Deleva, Toni Lynch, Gaik Kok, Craig W. Ritchie, Rudolph E. Tanzi, Roberto Cappai, Colin L. Masters, Kevin J. Barnham, and Ashley I. Bush. 2008. "Article Rapid Restoration of Cognition in Alzheimer's Transgenic Mice with 8-Hydroxy Quinoline Analogs Is Associated with Decreased Interstitial A $\beta$ ." *Cell* 59(1):43–55.
- Agholme, Lotta, Marcus Clarin, Eleni Gkanatsiou, Petronella Kettunen, Jasmine Chebli, Gunnar Brinkmalm, Kaj Blennow, Petra Bergström, Erik Portelius, and Henrik Zetterberg. 2017. "Low-Dose  $\gamma$ -Secretase Inhibition Increases Secretion of A $\beta$  Peptides and Intracellular Oligomeric A $\beta$ ." *Molecular and Cellular Neuroscience* 85:211–19.
- Aguayo-ortiz, Rodrigo and Laura Dominguez. 2018. "Simulating the  $\gamma$ -Secretase Enzyme : Recent Advances and Future Directions." *Biochimie* 147:130–35.
- Aguayo-ortiz, Rodrigo and Laura Dominguez. 2019. "APH-1A Component of  $\gamma$ -Secretase Forms an Internal Water and Ion-Containing Cavity." *ACS Chemical Neuroscience* 10(6):2931–38.
- Ahmed, Zeshan, Jane Cooper, Tracey K. Murray, Katya Garn, Emily McNaughton, Hannah Clarke, Samira Parhizkar, Mark A. Ward, Annalisa Cavallini, Samuel Jackson, Suchira Bose, Florence Clavaguera, Markus Tolnay, Isabelle Lavenir, Michel Goedert, Michael L. Hutton, and Michael J. O'Neill. 2014. "A Novel in Vivo Model of Tau Propagation with Rapid and Progressive Neurofibrillary Tangle Pathology: The Pattern of Spread Is Determined by Connectivity, Not Proximity." *Acta Neuropathologica* 127(5):667–83.
- Akasaka-manya, Keiko, Hiroshi Manya, Yoko Sakurai, Boguslaw S. Wojczyk, Steven L. Spitalnik, and Tamao Endo. 2008. "Increased Bisecting and Core-Fucosylated N -Glycans on Mutant Human Amyloid Precursor Proteins." *Glycoconjugate Journal* 25(8):775–86.
- Akasaka-manya, Keiko, Hiroki Tsumoto, Yuriko Tachida, Hiroyuki Hatsuta, Yuri Miura, Shin-ichi Hisanaga, Shigeo Murayama, Yasuhiro Hashimoto, Hiroshi Manya, and Tamao Endo. 2017. "Excess APP O-Glycosylation by GalNAc-T6 Decreases A $\beta$  Production." *The Journal of Biochemistry* 161(1):99–111.
- Alauddin, Mohammad, Himansu S. Biswal, Eric Gloaguen, and Michel Mons. 2015. "Intra-Residue Interactions in Proteins: Interplay between Serine or Cysteine Side Chains and Backbone Conformations, Revealed by Laser Spectroscopy of Isolated Model Peptides." *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(3):2169–78.
- Albright, Charles F., Randy C. Dockens, Jere E. Meredith, Richard E. Olson, Randy Slemmon, Kimberley A. Lentz, Jun-sheng Wang, R. Rex Denton, Gary Pilcher, Paul W. Rhyne, Joseph J. Raybon, Donna M. Barten, Catherine Burton, Jeremy H. Toyn, Sethu Sankaranarayanan, Craig Polson, Valerie Guss, Randy White, Frank Simutis, Thomas Sanderson, Kevin W. Gillman, John E. Starrett, Joanne Bronson, Oleksandr Sverdllov, Shu-pang Huang, Lorna Castaneda, Howard Feldman, Vlad Coric, Robert Zaczek, John E. Macor, John Houston, Robert M. Berman, and Gary Tong. 2013. "Pharmacodynamics of Selective Inhibition of  $\gamma$ -Secretase by Avagacestat." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 344(3):686–95.

- Allinson, Tobias M. J., Edward T. Parkin, Anthony J. Turner, and Nigel M. Hooper. 2003. "ADAMs Family Members As Amyloid Precursor Protein  $\alpha$ -Secretases." *Journal of Neuroscience Research* 74(3):342–52.
- An, Seong Soo A., Eva Bagyinszky, Hye Ryouon Kim, Ju-won Seok, Hae-won Shin, Seunoh Bae, Sangyun Kim, and Young Chul Youn. 2016. "Novel PSEN1 G209A Mutation in Early-Onset Alzheimer Dementia Supported by Structural Prediction." *BMC Neurology* 1–6.
- Anand, Puneet and Jonathan S. Stamler. 2012. "Enzymatic Mechanisms Regulating Protein S-Nitrosylation: Implications in Health and Disease." *Journal of Molecular Medicine* 90(3):233–44.
- Anders, Lars, Philipp Mertins, Sven Lammich, Marta Murgia, Dieter Hartmann, Paul Saftig, Christian Haass, Axel Ullrich, Anders E. T. Al, and M. O. L. C. E. L. L. B. Iol. 2006. "Furin<sup>-</sup>, ADAM 10<sup>-</sup>, and  $\gamma$ -Secretase-Mediated Cleavage of a Receptor Tyrosine Phosphatase and Regulation of  $\beta$ -Catenin's Transcriptional Activity." *Molecular and Cellular Biology* 26(10):3917–34.
- Anderson, Jeffery J., Greg Holtz, Patricia P. Baskin, Mary Turner, Blake Rowe, Bowei Wang, Maria Z. Kounnas, Bruce T. Lamb, Donna Barten, Kevin Felsenstein, Ian McDonald, Kumar Srinivasan, Ben Munoz, and Steven L. Wagner. 2005. "Reductions in  $\beta$ -Amyloid Concentrations in Vivo by the  $\gamma$ -Secretase Inhibitors BMS-289948 and BMS-299897." *Biochemical Pharmacology* 69:689–98.
- Ankarcrona, Maria and Kjell Hultenby. 2002. "Presenilin-1 Is Located in Rat Mitochondria." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295(3):766–70.
- Anliker, Brigitte and Ulrike Müller. 2006. "The Functions of Mammalian Amyloid Precursor Protein and Related Amyloid Precursor-Like Proteins." *Neurodegenerative Diseases* 3(4–5):239–46.
- Annaert, Wim G., Cary Esselens, Veerle Baert, Christine Boeve, Greet Snellings, Philippe Cupers, Kathleen Craessaerts, and Bart De Strooper. 2001. "Interaction with Telencephalin and the Amyloid Precursor Protein Predicts a Ring Structure for Presenilins." *Neuron* 32:579–89.
- Annaert, Wim G., Lyne Levesque, Kathleen Craessaerts, Inge Dierinck, Greet Snellings, David Westaway, Peter St George-hyslop, Barbara Cordell, Paul Fraser, and Bart De Strooper. 1999. "Presenilin 1 Controls  $\gamma$ -Secretase Processing of Amyloid Precursor Protein in Pre-Golgi Compartments of Hippocampal Neurons." *The Journal of Cell Biology* 147(2):277–94.
- Antonyan, Alvard, Dagmar Schlenzig, Stephan Schilling, Marcel Naumann, Svetlana Sharoyan, Sona Mardanyan, and Hans Ulrich Demuth. 2018. "Concerted Action of Dipeptidyl Peptidase IV and Glutaminyl Cyclase Results in Formation of Pyroglutamate-Modified Amyloid Peptides in Vitro." *Neurochemistry International* 113:112–19.
- Araki, Yoichi, Naomi Miyagi, Naoko Kato, Tomohiro Yoshida, Sachiyo Wada, Masaki Nishimura, Hiroto Komano, Tohru Yamamoto, Bart De Strooper, Kazuo Yamamoto, and Toshiharu Suzuki. 2004. "Coordinated Metabolism of Alcadein and Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor Regulates FE65-Dependent Gene Transactivation." *The Journal of Biological Chemistry* 279(23):24343–54.
- Arancio, Ottavio, Hui Ping Zhang, Xi Chen, Chang Lin, Fabrizio Trinchese, Daniela Puzzo, Shumin Liu, Shi Fang Yan, Alan Stern, John S. Luddy, Lih-fen Lue, G. Douglas, Alex Roher, Manuel Buttini, Lennart Mucke, Weiyang Li, Ann Marie, Mark Kindy, Paul A. Hyslop, David M. Stern, Shirley Shi, and Du Yan. 2004. "RAGE

Potentiates A $\beta$ -Induced Perturbation of Neuronal Function in Transgenic Mice.” *The EMBO Journal* 23(20):4096–4105.

- Arboleda-velasquez, Joseph F., Francisco Lopera, Michael O. Hare, Santiago Delgado-tirado, Claudia Marino, Natalia Chmielewska, Kahira L. Saez-torres, Dhanesh Amarnani, Aaron P. Schultz, Reisa A. Sperling, David Leyton-cifuentes, Kewei Chen, Ana Baena, David Aguillon, Silvia Rios-romenets, Margarita Giraldo, Edmarie Guzma, Daniel J. Norton, Enmanuelle Paredilla-delgado, Arabiye Artola, Justin S. Sanchez, Juliana Acosta-uribe, Matthew Lalli, Kenneth S. Kosik, Matthew J. Huentelman, Pradeep Thiyyagura, Yi Su, Gyungah R. Jun, Marcus Naymik, Xiaowu Gai, and Moiz Bootwalla. 2019. “Resistance to Autosomal Dominant Alzheimer’s Disease in an APOE3 Christchurch Homozygote : A Case Report.” *Nature Medicine*.
- Arduengo, P. Michele, Ollie Kelly Appleberry, Peale Chuang, and Steven W. L. Hernault. 1998. “The Presenilin Protein Family Member SPE-4 Localizes to an ER / Golgi Derived Organelle and Is Required for Proper Cytoplasmic Partitioning during Caenorhabditis Elegans Spermatogenesis.” *Journal of Cell Science* 3654:3645–54.
- Artavanis-tsakonas, Spyros, Matthew D. Rand, and Robert J. Lake. 1999. “Notch Signaling : Cell Fate Control and Signal Integration in Development.” *Science* 284(5415):770–77.
- Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, and Tsuneya Ikezu. 2015. “Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation.” *Nature Neuroscience* 18(11):1584–93.
- Asai, Masashi, Chinatsu Hattori, Beata Szabo, Noboru Sasagawa, Kei Maruyama, Sei-ichi Tanuma, and Shoichi Ishiura. 2003. “Putative Function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP  $\alpha$ -Secretase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301(1):231–35.
- Baddeley, Thomas C., Jennifer Mccaffrey, John M. D. Storey, John K. S. Cheung, Valeria Melis, David Horsley, Charles R. Harrington, and Claude M. Wischik. 2015. “Complex Disposition of Methylthioninium Redox Forms Determines Efficacy in Tau Aggregation Inhibitor Therapy for Alzheimer’s Disease.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (January):110–18.
- Baek, Sung Hee, Kenneth A. Ohgi, David W. Rose, Edward H. Koo, Christopher K. Glass, and Michael G. Rosenfeld. 2002. “Exchange of N-CoR Corepressor and Tip60 Coactivator Complexes Links Gene Expression by NF- $\kappa$ B and  $\kappa$ -Amyloid Precursor Protein.” *Cell* 110(1):55–67.
- Bai, Xiao-Chen, Eeson Rajendra, Guanghui Yang, Yigong Shi, and Sjors Hw Scheres. 2015. “Sampling the Conformational Space of the Catalytic Subunit of Human  $\gamma$ -Secretase.” *ELife* 4:e11182.
- Bai, Xiao-Chen, Chuangye Yan, Guanghui Yang, Peilong Lu, Dan Ma, Linfeng Sun, Rui Zhou, Sjors H. W. Scheres, and Yigong Shi. 2015. “An Atomic Structure of Human  $\gamma$ -Secretase.” *Nature* 525(7568):212–17.
- Baker-Nigh, Alaina, Shahrooz Vahedi, Elena Goetz Davis, Sandra Weintraub, Eileen H. Bigio, William L. Klein, and Changiz Geula. 2015. “Neuronal Amyloid- $\beta$  Accumulation within Cholinergic Basal Forebrain in Ageing and Alzheimer’s Disease.” *A Journal of Neurology* 1–16.
- Baker, Rosanna P., Keith Young, Liang Feng, Yigong Shi, and Sinisa Urban. 2007. “Enzymatic Analysis of a Rhomboid Intramembrane Protease Implicates Transmembrane Helix 5 as the Lateral Substrate Gate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(20):8257–62.

- Bakkers, Gerald R. and Rodney F. Boyerg. 1986. "Iron Incorporation into Apoferritin. The Role of Apoferritin as a Ferroxidase." *The Journal of Biological Chemistry* 261(28):13182–85.
- Bakshi, Pancham and Michael S. Wolfe. 2004. "Stereochemical Analysis of (Hydroxyethyl) Urea Peptidomimetic Inhibitors of  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Medicinal Chemistry* 47:6485–89.
- Bales, Kelly R., Tatyana Verina, Richard C. Dodel, Yansheng Du, Larry Altstiel, Mark Bender, Paul Hyslop, Sheila P. Little Edward M. Johnstone, David J. Cummins, Bernardino Ghetti Pedro Piccardo, and Steven M. Paul. 1997. "Lack of Apolipoprotein E Dramatically Reduces Amyloid  $\beta$ -Peptide Deposition." *Nature Genetics* 17(3):263–64.
- Bammens, Leen, Alexandra Tolia, An Zwijsen, and Bart De Strooper. 2011. "Functional and Topological Analysis of Pen-2, the Fourth Subunit of the  $\gamma$ -Secretase Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 286(14):12271–82.
- Barão, Soraia, Diederik Moechars, Stefan F. Lichtenthaler, and Bart De Strooper. 2016. "BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Trends in Neurosciences* 39(3):158–69.
- Barman, Arghya, Woody Taves, and Rajeev Prabhakar. 2008. "Insights into the Mechanism of Methionine Oxidation Catalyzed by Metal ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Fe}^{3+}$ ) -Amyloid Beta ( $\text{A}\beta$ ) Peptide Complexes: A Computational Study." *Journal of Computational Chemistry* 30(9):1405–13.
- Barrett, P. J., C. R. Sanders, S. A. Kaufman, K. Michelsen, and J. B. Jordan. 2011. "NSAID-Based Gamma-Secretase Modulators Do Not Bind to The Amyloid-Ss Polypeptide." *Biochemistry*.
- Barten, M., V. L. Guss, J. A. Corsa, A. Loo, S. B. Hansel, M. Zheng, B. Munoz, B. Wang, B. J. Robertson, C. T. Polson, J. Wang, S. B. Roberts, P. Hendrick, J. J. Anderson, J. K. Loy, R. Denton, T. A. Verdoorn, D. W. Smith, and M. Felsenstein. 2005. "Dynamics of  $\beta$ -Amyloid Reductions in Brain, Cerebrospinal Fluid, and Plasma of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Treated with a  $\gamma$ -Secretase Inhibitor." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312(2):635–43.
- Bartus, R., R. Dean, B. Beer, and A. Lippa. 1982. "The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction." *Science* 217(4558):408–14.
- Bartzokis, George, Jim Mintz, David Sultzer, Peter Marx, James S. Herzberg, C. Kelly Phelan, and Stephen R. Marder. 1994. "In Vivo . MR Evaluation of Age-Related Increases in Brain Iron." *American Journal of Neuroradiology* 15(6):19–22.
- Basak, Jacob M., Philip B. Verghese, Hyejin Yoon, Jungsu Kim, and David M. Holtzman. 2012. "Low-Density Lipoprotein Receptor Represents an Apolipoprotein E-Independent Pathway of  $\text{A}\beta$  Uptake and Degradation by Astrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 287(17):13959–71.
- Bateman, Randall J., Tammie L. Benzinger, Scott Berry, David B. Clifford, Cynthia Duggan, Anne M. Fagan, Kathleen Fanning, Martin R. Farlow, Jason Hassenstab, Eric M. McDade, Susan Mills, Katrina Paumier, Melanie Quintana, Stephen P. Salloway, Anna Santacruz, Lon S. Schneider, Guoqiao Wang, and Chengjie Xiong. 2017. "The DIAN-TU Next Generation Alzheimer's Prevention Trial: Adaptive Design and Disease Progression Model." *Alzheimer's and Dementia* 13(1):8–19.

- Beel, A. J. and C. R. Sanders. 2008. "Substrate Specificity of  $\gamma$ -Secretase and Other Intramembrane Proteases." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(9):1311–34.
- Beel, Andrew J., Paul Barrett, Paul D. Schnier, Stephen A. Hitchcock, Dhanashri Bagal, Charles R. Sanders, and John B. Jordan. 2010. "Non-Specificity of Binding of  $\gamma$ -Secretase Modulators to the Amyloid Precursor Protein." *Biochemistry* 48(50):11837–39.
- Beffert, Uwe, Jeffrey S. Cohn, Caroline Petit-Turcotte, Michel Tremblay, Nicole Aumont, Charles Ramassamy, Jean Davignon, and Judes Poirier. 1999. "Apolipoprotein E and  $\beta$ -Amyloid Levels in the Hippocampus and Frontal Cortex of Alzheimer's Disease Subjects Are Disease-Related and Apolipoprotein E Genotype Dependent." *Brain Research* 843(1–2):87–94.
- Behr, Dirk, Earl E. Clarke, Jonathan D. J. Wrigley, Agnes C. L. Martin, Alan Nadin, Ian Churcher, and Mark S. Shearman. 2004. "Selected Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Their Derivatives Target  $\gamma$ -Secretase at a Novel Site." *The Journal of Biological Chemistry* 279(42):43419–26.
- Behr, Dirk, Jonathan D. J. Wrigley, Alan Nadin, Colin L. Masters, Timothy Harrison, L. Castro, and Mark S. Shearman. 2001. "Pharmacological Knock-down of the Presenilin 1 Heterodimer by a Novel  $\gamma$ -Secretase Inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 276(48):45394–402.
- Bel Abed, Hassen, Sven F. A. Van Brandt, Juan Antonio Vega, and Harrie J. M. Gijzen. 2015. "Simple Approach to the Synthesis of Novel Tricyclic BACE1 Inhibitor Warhead through  $\beta$ -Lactam Opening." *Tetrahedron Letters* 56(26):4028–30.
- Bell, Robert D., Ethan A. Winkler, Itender Singh, Abhay P. Sagare, Rashid Deane, Zhenhua Wu, David M. Holtzman, Christer Betsholtz, Annika Armulik, Jan Sallstrom, Bradford C. Berk, and Berislav V. Zlokovic. 2012. "Apolipoprotein e Controls Cerebrovascular Integrity via Cyclophilin A." *Nature* 485(7399):512–16.
- Ben-shem, Adam, Deborah Fass, and Eitan Bibi. 2007. "Structural Basis for Intramembrane Proteolysis by Rhomboid Serine Proteases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(2):462–66.
- Benkovic, Stanley A., Eileen M. McGowan, Nancy J. Rothwell, Michael Hutton, David G. Morgan, and Marcia N. Gordon. 1997. "Regional and Cellular Localization of Presenilin-2 RNA in Rat and Human Brain." *Experimental Neurology* 564(145):555–64.
- Bennett, Brian D., Safura Babu-khan, Richard Loeloff, Jean-claude Louis, Eileen Curran, Martin Citron, Robert Vassar, and M. Science. 2000. "Expression Analysis of BACE2 in Brain and Peripheral Tissues." *The Journal of Biological Chemistry* 275(27):20647–51.
- Berezovska, Oksana, Alberto Lleo, Lauren D. Herl, Matthew P. Frosch, Edward A. Stern, Brian J. Bacskai, and Bradley T. Hyman. 2005. "Familial Alzheimer's Disease Presenilin 1 Mutations Cause Alterations in the Conformation of Presenilin and Interactions with Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Neuroscience* 25(11):3009–17.
- Bergman, Anna, Hanna Laudon, Bengt Winblad, Johan Lundkvist, and Jan Na. 2004. "The Extreme C Terminus of Presenilin 1 Is Essential for  $\gamma$ -Secretase Complex Assembly and Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 279(44):45564–72.

- Bernsel, Andreas, Håkan Viklund, Jenny Falk, Erik Lindahl, Gunnar Von Heijne, and Arne Elofsson. 2008. "Prediction of Membrane-Protein Topology from First Principles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(20):7177–81.
- Bernsel, Andreas, Håkan Viklund, Aron Hennerdal, and Arne Elofsson. 2009. "TOPCONS: Consensus Prediction of Membrane Protein Topology." *Nucleic Acids Research* 37(SUPPL. 2):465–68.
- Best, Authors Jonathan D., David W. Smith, Michael A. Reilly, Ruth O. Donnell, D. Lewis, Samantha Ellis, Neil Wilkie, Thomas W. Rosahl, Philippe A. Laroque, Christine Boussiquet-Ieroux, Ian Churcher, John R. Attack, and Timothy Harrison. 2006. "The Novel  $\gamma$  Secretase Inhibitor MRK-560 Reduces Amyloid Plaque Deposition without Evidence of Notch-Related Pathology in the Tg2576 Mouse. a ) A  $\beta$  Plaque Reduction without Peripheral Pathology."
- Bi, X., Á. C. M. Gall, J. Zhou, and G. Lynch. 2002. "UPTAKE AND PATHOGENIC EFFECTS OF AMYLOID BETA PEPTIDE 1-42 ARE ENHANCED BY INTEGRIN ANTAGONISTS AND BLOCKED BY NMDA RECEPTOR ANTAGONISTS." *Neuroscience* 112(4):827–40.
- Bischoff, Francois, Didier Berthelot, Michel De Cleyn, Gregor Macdonald, Garrett Minne, Daniel Oehrich, Serge Pieters, Michel Surkyn, A. Trabanco, Gary Tresadern, Sven Van Brandt, Ingrid Velter, Mirko Zaja, Herman Borghys, Chantal Masungi, Marc Mercken, and Harrie J. M. Gijzen. 2012. "Design and Synthesis of a Novel Series of Bicyclic Heterocycles As Potent  $\gamma$ -Secretase Modulators." *Journal of Medicinal Chemistry* 55(Figure 1):9089–9106.
- Bittner, Tobias, Martin Fuhrmann, Steffen Burgold, Christian K. E. Jung, Christiane Volbracht, Harald Steiner, Gerda Mitteregger, Hans A. Kretzschmar, Christian Haass, and Jochen Herms. 2009. " $\gamma$ -Secretase Inhibition Reduces Spine Density In Vivo via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway." *The Journal of Neuroscience* 29(33):10405–9.
- Bland, Christin E., Priscilla Kimberly, and Matthew D. Rand. 2003. "Notch-Induced Proteolysis and Nuclear Localization of the Delta Ligand." *The Journal of Biological Chemistry* 278(16):13607–11.
- Bogdanov, Mikhail, Wei Zhang, Jun Xie, and William Dowhan. 2005. "Transmembrane Protein Topology Mapping by the Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM TM): Application to Lipid-Speci W c Membrane Protein Topogenesis." *Methods* 36(2):148–71.
- Bolduc, David M., Daniel R. Montagna, Yongli Gu, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2016. "Nicastrin Functions to Sterically Hinder  $\gamma$ -Secretase–Substrate Interactions Driven by Substrate Transmembrane Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(5):E509–18.
- Bolduc, David M, Daniel R. Montagna, Matthew C. Seghers, Michael S. Wolfe, and Dennis J. Selkoe. 2016. "The Amyloid-Beta Forming Tripeptide Cleavage Mechanism of  $\gamma$ -Secretase." *ELife* 5:e17578.
- Bolmont, Tristan, Florence Clavaguera, Melanie Meyer-Luehmann, Martin C. Herzog, Rebecca Radde, Matthias Staufenbiel, Jada Lewis, Mike Hutton, Markus Tolnay, and Mathias Jucker. 2007. "Induction of Tau Pathology by Intracerebral Infusion of Amyloid- $\beta$ -Containing Brain Extract and by Amyloid- $\beta$  Deposition in APP x Tau Transgenic Mice." *American Journal of Pathology* 171(6):2012–20.
- Bondar, Ana-Nicoleta, Caral de Val, and Stephen H. White. 2009. "Rhomboid Protease Dynamics and Lipid Interactions." *Structure* 17(3):395–405.

- Bourgade, Karine, Hugo Garneau, Geneviève Giroux, Aurélie Y. Le Page, Christian Bocti, Gilles Dupuis, Eric H. Frost, and Tamàs Fülöp. 2015. "β-Amyloid Peptides Display Protective Activity against the Human Alzheimer's Disease-Associated Herpes Simplex Virus-1." *Biogerontology* 16(1):85–98.
- Bouter, Yvonne, Katharina Dietrich, Jessica L. Wittnam, Nasrollah Rezaei-Ghaleh, Thierry Pillot, Sophie Papot-Couturier, Thomas Lefebvre, Frederick Sprenger, Oliver Wirths, Markus Zweckstetter, and Thomas A. Bayer. 2013. "N-Truncated Amyloid β (Aβ) 4-42 Forms Stable Aggregates and Induces Acute and Long-Lasting Behavioral Deficits." *Acta Neuropathologica* 126(2):189–205.
- Bowen, DM, CB Smith, P. White, and AN Davison. 1976. "Neurotransmitter-Related Enzymes and Indices of Hypoxia in Senile Dementia and Other Abiotrophies ." *Brain* 99(3):459–96.
- Bradshaw, Elizabeth M., Lori B. Chibnik, Brendan T. Keenan, Linda Ottoboni, Towfique Raj, Anna Tang, Laura L. Rosenkrantz, Selina Imboywa, Michelle Lee, Alina Von Korff, Martha C. Morris, Denis A. Evans, Keith Johnson, Reisa A. Sperling, Julie A. Schneider, David A. Bennett, and Philip L. De Jager. 2013. "CD33 Alzheimer's Disease Locus: Altered Monocyte Function and Amyloid Biology." *Nature Neuroscience* 16(7):848–50.
- Brautigam, Hannah, Cesar L. Moreno, John W. Steele, Alexey Bogush, Dara L. Dickstein, John B. J. Kwok, Peter R. Schofield, Gopal Thinakaran, Paul M. Mathews, Patrick R. Hof, Sam Gandy, and Michelle E. Ehrlich. 2015. "Physiologically Generated Presenilin 1 Lacking Exon 8 Fails to Rescue Brain PS1<sup>-/-</sup> Phenotype and Forms Complexes with Wildtype PS1 and Nicastrin." *Scientific Reports* 5(August):17042.
- Britain, Great. 1989. "Cerebral Amyloidosis , Ageing and Alzheimer 's Disease: A Contribution From Studies on Down 's Syndrome." *Neurobiology of Aging* 10(5):397–99.
- Britschgi, Markus and Tony Wyss-Coray. 2007. "Immune Cells May Fend off Alzheimer Disease." *Nature Medicine* 13(4):408–9.
- Brodney, Michael A., Elizabeth M. Beck, Christopher R. Butler, Gabriela Barreiro, Eric F. Johnson, David Riddell, Kevin Parris, Charles E. Nolan, Ying Fan, Kevin Atchison, Cathleen Gonzales, Ashley E. Robshaw, Shawn D. Doran, Mark W. Bundesmann, Leanne Buzon, Jason Dutra, Kevin Henegar, Erik LaChapelle, Xinjun Hou, Bruce N. Rogers, Jayvardhan Pandit, Ricardo Lira, Luis Martinez-Alsina, Peter Mikochik, John C. Murray, Kevin Ogilvie, Loren Price, Subas M. Sakya, Aijia Yu, Yong Zhang, and Brian T. O'Neill. 2015. "Utilizing Structures of CYP2D6 and BACE1 Complexes to Reduce Risk of Drug-Drug Interactions with a Novel Series of Centrally Efficacious BACE1 Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry* 58(7):3223–52.
- Brorson, James R., Vytautas P. Bindokas, Toshi Iwama, Charles J. Marcuccilli, Jane C. Chisholm, and Richard J. Miller. 1995. "The Ca<sup>2+</sup> Influx Induced by β-Amyloid Peptide 25-35 in Cultured Hippocampal Neurons Results from Network Excitation." *Developmental Neurobiology* 26(3):325–38.
- Brose, Nils, Alexander G. Petrenko, Thomas C. Sudhof, and Reinhard Jahntt. 1992. "Synaptotagmin : A Calcium Sensor on the Synaptic Vesicle Surface." *Science* 256(5059):1021–25.
- Brown, Mia C., Alaa Abdine, Jose Chavez, Adam Schaffner, Celia Torres-Arancivia, Brian Lada, Renee D. JiJi, Roman Osman, Jason W. Cooley, and Iban Ubarretxena-Belandia. 2018. "Unwinding of the Substrate Transmembrane Helix in Intramembrane Proteolysis." *Biophysical Journal* 114(7):1579–89.



- Brunkan, A. L., M. Martinez, J. Wang, E. S. Walker, D. Beher, M. S. Shearman, and A. M. Goate. 2005. "Two Domains within the First Putative Transmembrane Domain of Presenilin 1 Differentially Influence Presenilinase and  $\gamma$ -Secretase Activity." *Journal of Neurochemistry* 94:1315–28.
- Brunkan, Anne L, Maribel Martinez, Emily S. Walker, and Alison M. Goate. 2005. "Presenilin Endoproteolysis Is an Intramolecular Cleavage." *Molecular and Cellular Neuroscience* 29(1):65–73.
- Brzyska, Maria, Katarzyna Trzesniewska, and Agnieszka Wieckowska. 2009. "Electrochemical and Conformational Consequences of Copper (Cu I and Cu II) Binding to  $\beta$ -Amyloid (1–40)." *ChemBioChem* 10(6):1045–55.
- Bu, Guojun, Judy Cam, and Celina Zerbinatti. 2006. "LRP in Amyloid- $\beta$  Production and Metabolism." *Annals of the New York Academy of Science* 1086:35–53.
- Burdick, Debra, Brian Soreghan, Michael Kwon, Joseph Kosmoski, Mary Knauer, Agnes Henschen, John Yatest, and Charles Glabell. 1992. "Assembly and Aggregation Properties of Synthetic Alzheimer's A4/ $\beta$  Amyloid Peptide Analogs." *The Journal of Biological Chemistry* 267(1):546–54.
- Bursavich, Matthew G., Bryce A. Harrison, and Jean-Francois Blain. 2016. "Gamma Secretase Modulators : New Alzheimer's Drugs on the Horizon?" *Journal of Medicinal Chemistry* 59(16):7389–7409.
- Burton, Catherine R., Jere E. Meredith, Donna M. Barten, Margi E. Goldstein, Carol M. Krause, Cathy J. Kieras, Lisa Sisk, Lawrence G. Iben, Craig Polson, Mark W. Thompson, Xu-alan Lin, Jason Corsa, Tracey Fiedler, Maria Pierdomenico, Yang Cao, Arthur H. Roach, Joseph L. Cantone, Michael J. Ford, Dieter M. Drexler, Richard E. Olson, Michael G. Yang, Carl P. Bergstrom, Kate E. Mcelhone, Joanne J. Bronson, John E. Macor, Yuval Blat, Robert H. Grafstrom, Andrew M. Stern, Dietmar A. Seiffert, Robert Zaczek, Charles F. Albright, and Jeremy H. Toyn. 2008. "The Amyloid- $\beta$  Rise and  $\gamma$ -Secretase Inhibitor Potency Depend on the Level of Substrate Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 283(34):22992–3.
- Bussy, Aurélie, B. Joy Snider, Dean Coble, Chengjie Xiong, Anne M. Fagan, Carlos Cruchaga, Tammie L. S. Benzinger, Brian A. Gordon, Jason Hassenstab, Randall J. Bateman, and John C. Morris. 2019. "Effect of Apolipoprotein E4 on Clinical, Neuroimaging, and Biomarker Measures in Noncarrier Participants in the Dominantly Inherited Alzheimer Network." *Neurobiology of Aging* 75:42–50.
- Butler, Christopher R., Michael A. Brodney, Elizabeth M. Beck, Gabriela Barreiro, Charles E. Nolan, Feng Pan, Felix Vajdos, Kevin Parris, Alison H. Varghese, Christopher J. Helal, Ricardo Lira, Shawn D. Doran, David R. Riddell, Leanne M. Buzon, Jason K. Dutra, Luis A. Martinez-Alsina, Kevin Ogilvie, John C. Murray, Joseph M. Young, Kevin Atchison, Ashley Robshaw, Cathleen Gonzales, Jinlong Wang, Yong Zhang, and Brian T. Oneill. 2015. "Discovery of a Series of Efficient, Centrally Efficacious BACE1 Inhibitors through Structure-Based Drug Design." *Journal of Medicinal Chemistry* 58(6):2678–2702.
- Buttini, Manuel, Matthias Orth, Stefano Bellosta, Hassibullah Akeefe, Robert E. Pitas, Tony Wyss-Coray, Lennart Mucke, and Robert W. Mahley. 1999. "Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe(-/-) Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration." *Journal of Neuroscience* 19(12):4867–80.
- Cai, Tetsuo, Aki Hatano, Kunihiro Kanatsu, and Taisuke Tomita. 2019. "Histidine 131 in Presenilin 1 Is the PH-Sensitive Residue That Causes the Increase in A $\beta$ 42 Level in Acidic PH." *Journal of Biochemistry*.

- Cai, Tetsuo, Kanan Morishima, Shizuka Takagi-Niidome, Aya Tominaga, and Taisuke Tomita. 2019. "Conformational Dynamics of Transmembrane Domain 3 of Presenilin 1 Is Associated with the Trimming Activity of  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Neuroscience* 39(43):8600–8610.
- Cai, Tetsuo and Taisuke Tomita. 2018. "Structural Analysis of Target Protein by Substituted Cysteine Accessibility Method." *Bio-Protocol* 8(17):1–11.
- Cai, Tetsuo, Masahiro Yonaga, and Taisuke Tomita. 2017. "Activation of  $\gamma$ -Secretase Trimming Activity by Topological Changes of Transmembrane Domain 1 of Presenilin 1." *The Journal of Neuroscience* 37(50):12272–80.
- Cai, Xiao-dan, Todd E. Golde, and Steven G. Younkin. 1993. "Release of Excess Amyloid  $\beta$  Protein from a Mutant Amyloid  $\beta$  Protein Precursor." *Science* 259(5049):514–16.
- Caillava, Céline, Sébastien Ranaldi, Inger Lauritzen, Charlotte Bauer, Jeannette Fareh, Jean Daniel Abraham, and Frédéric Checler. 2014. "Study on A $\beta$ 34 Biology and Detection in Transgenic Mice Brains." *Neurobiology of Aging* 35(7):1570–81.
- Campbell, William A., Maria-karnina Iskandar, Megan L. O. Reed, and Weiming Xia. 2002. "Endoproteolysis of Presenilin in Vitro : Inhibition by  $\gamma$ -Secretase Inhibitors †." *Biochemistry* 41(10):3372–79.
- Campbell, William A., Megan L. O. Reed, Jennifer Strahle, Michael S. Wolfe, and Weiming Xia. 2003. "Presenilin Endoproteolysis Mediated by an Aspartyl Protease Activity Pharmacologically Distinct from  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Neurochemistry* 85(6):1563–74.
- Campion, Dominique, Cecile Dumanchin, Didier Hannequin, Bruno Dubois, Serge Belliard, Michele Puel, Catherine Thomas-anterion, Agnes Michon, Cosette Martin, Francoise Charbonnier, Gergory Raux, Agnes Camuzat, Christiane Penet, Valerie Mesnage, Maria Martinez, Francoise Clerget-Darpoux, Alexis Brice, and Thierry Frebourg. 1999. "Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease : Prevalence , Genetic Heterogeneity , and Mutation Spectrum." *American Journal of Human Genetics* 65(3):664–70.
- Cao, Xinwei and Thomas C. Sudhof. 2001. "A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60." *Science* 293(5527):115–20.
- Cao, Xinwei and Thomas C. Sudhofs. 2004. "Dissection of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein-Dependent Transcriptional Transactivation." *The Journal of Biological Chemistry* 279(23):24601–11.
- Capell, Anja, Jurgen Grunberg, Brigitte Pesold, Anke Diehlmann, Martin Citron, Ralph Nixon, Konrad Beyreuther, Dennis J. Selkoe, Christian Haass, and S. S. Neuron. 1998. "The Proteolytic Fragments of the Alzheimer 's Disease-Associated Presenilin-1 Form Heterodimers and Occur as a 100 – 150-KDa Molecular Mass Complex \*." *The Journal of Biological Chemistry* 273(6):3205–11.
- Capell, Anja, Christoph Kaether, Dieter Edbauer, Keiro Shirovani, Sabine Merkl, Harald Steiner, and Christian Haass. 2003. "Nicastrin Interacts with  $\gamma$ -Secretase Complex Components via the N-Terminal Part of Its Transmembrane Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 278(52):52519–23.
- Carbone, Iliaria, Tiziana Lazzarotto, Manuela Ianni, Elisa Porcellini, Paola Forti, Eliezer Masliah, Liliana Gabrielli, and Federico Licastro. 2014. "Herpes Virus in Alzheimer's Disease: Relation to Progression of the Disease." *Neurobiology of Aging* 35(1):122–29.

- Castellani, Rudy J., Hyoung-gon Lee, Xiongwei Zhu, George Perry, and Mark A. Smith. 2008. "Alzheimer Disease Pathology As a Host Response." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67(6):523–31.
- Castellano, Joseph M., Rashid Deane, Andrew J. Gottesdiener, Philip B. Verghese, Floy R. Stewart, Tim West, Andrew C. Paoletti, Tristan R. Kasper, Ronald B. DeMattos, Berislav V. Zlokovic, and David M. Holtzman. 2012. "Low-Density Lipoprotein Receptor Overexpression Enhances the Rate of Brain-to-Blood A $\beta$  Clearance in a Mouse Model of  $\beta$ -Amyloidosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(38):15502–7.
- Castellano, Joseph M., Jungsu Kim, Floy R. Stewart, Hong Jiang, Ronald B. DeMattos, Bruce W. Patterson, Anne M. Fagan, John C. Morris, Kwasi G. Mawuenyega, Carlos Cruchaga, Alison M. Goate, Kelly R. Bales, Steven M. Paul, Randall J. Bateman, and David M. Holtzman. 2011. "Human ApoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- $\beta$  Peptide Clearance." *Science Translational Medicine* 3(89):89ra57.
- Chávez-Gutiérrez, Lucía, Leen Bammens, Iryna Benilova, Annelies Vandersteen, Manasi Benurwar, Marianne Borgers, Sam Lismont, Lujia Zhou, Simon Van, Hermann Esselmann, Jens Wiltfang, Lutgarde Serneels, Eric Karran, Harrie Gijzen, Joost Schymkowitz, Frederic Rousseau, Kerensa Broersen, and Bart De Strooper. 2012. "The Mechanism of  $\gamma$ -Secretase Dysfunction in Familial Alzheimer Disease." *The EMBO Journal* 31(10):2261–74.
- Chakrabarti, Pinak and Rajasri Bhattacharyya. 2007. "Geometry of Nonbonded Interactions Involving Planar Groups in Proteins." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 95(1–3):83–137.
- Chen, F., G. Yu, S. Arawaka, M. Nishimura, T. Kawarai, H. Yu, A. Tandon, A. Supala, Y. Q. Song, E. Rogaeva, P. Milman, C. Sato, C. Yu, C. Janus, J. Lee, L. Song, L. Zhang, P. E. Fraser, and P. H. St George-Hyslop. 2001. "Nicastrin Binds to Membrane-Tethered Notch." *Nature Cell Biology* 3(8):751–54.
- Chen, Fusheng, Hiroshi Hasegawa, Gerold Schmitt-ulms, Toshitaka Kawarai, Christopher Bohm, Taiichi Katayama, Yongjun Gu, Nobuo Sanjo, Michael Glista, Ekaterina Rogaeva, Yosuke Wakutani, Kirk Hansen, David Westaway, Peter St George-hyslop, and Paul Fraser. 2006. "TMP21 Is a Presenilin Complex Component That Modulates  $\gamma$ -Secretase but Not  $\beta$ -Secretase Activity." *Nature* 440(7088):1208–12.
- Chen, Vincent Chin Hung, Shu I. Wu, Kuo You Huang, Yao Hsu Yang, Ting Yu Kuo, Hsin Yi Liang, Kuan Lun Huang, and Michael Gossop. 2018. "Herpes Zoster and Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study." *Journal of Clinical Psychiatry* 79(1).
- Chen, Wei Ting, Yi Fang Hsieh, Yan Jing Huang, Che Ching Lin, Yen Tung Lin, Yu Chao Liu, Cheng Chang Lien, and Irene Han Juo Cheng. 2014. "G206D Mutation of Presenilin-1 Reduces Pen2 Interaction, Increases A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Ratio and Elevates ER Ca<sup>2+</sup> Accumulation." *Molecular Neurobiology* 52(3):1835–49.
- Choi, Se Hoon, Young Hye Kim, Matthias Hebesch, Christopher Sliwinski, Seungkyu Lee, Carla D'Avanzo, Hechao Chen, Basavaraj Hooli, Caroline Asselin, Julien Muffat, Justin B. Klee, Can Zhang, Brian J. Wainger, Michael Peitz, Dora M. Kovacs, Clifford J. Woolf, Steven L. Wagner, Rudolph E. Tanzi, and Doo Yeon Kim. 2014. "A Three-Dimensional Human Neural Cell Culture Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 515(7526):274–78.
- Choudhary, Amit and Ronald T. Raines. 2011. "An Evaluation of Peptide-Bond Isosteres." *ChemBioChem* 12(12):1801–7.

- Chung, Hui-min and Gary Struhl. 2001. "Nicastrin Is Required for Presenilin- Mediated Transmembrane Cleavage in *Drosophila*." *Nature Cell Biology* 3(12):1129–32.
- Churcher, Ian, Kate Ashton, John W. Butcher, Earl E. Clarke, Timothy Harrison, Huw D. Lewis, Andrew P. Owens, Martin R. Teall, and Jonathan D. J. Wrigley. 2003. "A New Series of Potent Benzodiazepine  $\gamma$ -Secretase Inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13:179–83.
- Churcher, Ian, L. Castro, Earl E. Clarke, Dirk Beher, Jonathan D. Best, Amy Gentry, Timothy Harrison, Laure Hitzel, Euan Kay, Sonia Kerrad, Huw D. Lewis, Pablo Morentin-gutierrez, Russell Mortishire-smith, Paul J. Oakley, Michael Reilly, Duncan E. Shaw, Mark S. Shearman, Martin R. Teall, Susie Williams, and Jonathan D. J. Wrigley. 2006. "4-Substituted Cyclohexyl Sulfones as Potent , Orally Active  $\gamma$ -Secretase Inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:280–84.
- Churcher, Ian, Susie Williams, Sonia Kerrad, Timothy Harrison, Mark S. Shearman, Huw D. Lewis, Earl E. Clarke, Jonathan D. J. Wrigley, and Dirk Beher. 2003. "Design and Synthesis of Highly Potent Benzodiazepine  $\gamma$ -Secretase Inhibitors : Preparation of ( 2 S , 3 R ) -3- ( 3 , 4- Hydroxy- N - (( 3 S ) -1-Methyl-2-Oxo-5- Diazepin-3- Yl ) Butyramide by Use of an Asymmetric Ireland - Claisen Rearrangement." *Journal of Medicinal Chemistry* 46:2275–78.
- Citron, Martin, Tilman Oltersdorf, Christian Haass, Lisa McConlogue, Albert Y. Hung, Peter Seubert, Carmen Vigo-Pelfrey, Ivan Lieberburg, and Dennis J. Selkoe. 1992. "Mutation of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Familial Alzheimer's Disease Increases  $\beta$ -Rotein Production." *Nature* 360(6405):672–74.
- Congdon, Erin E., Jessica W. Wu, Natura Myeku, Yvette H. Figueroa, Mathieu Herman, Paul S. Marinec, Jason E. Gestwicki, Chad A. Dickey, W. Haung Yu, and Karen E. Duff. 2012. "Methylthioninium Chloride (Methylene Blue) Induces Autophagy and Attenuates Tauopathy in Vitro and in Vivo." *Autophagy* 8(4):609–22.
- Cook, Casey, Yari Carlomagno, Tania F. Gendron, Judy Dunmore, Kristyn Scheffel, Caroline Stetler, Mary Davis, Dennis Dickson, Matthew Jarpe, Michael DeTure, and Leonard Petrucelli. 2014. "Acetylation of the KXGS Motifs in Tau Is a Critical Determinant in Modulation of Tau Aggregation and Clearance." *Human Molecular Genetics* 23(1):104–16.
- Copenhaver, Philip F. and Donat Kögel. 2017. "Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10(January):1–15.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, and M. A. Pericak-Vance. 1993. "Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families." *Science* 261(5123):921–23.
- Coric, Vladimir, Christopher H. Van Dyck, Stephen Salloway, Niels Andreasen, Mark Brody, Ralph W. Richter, Hilka Soinen, Stephen Thein, Thomas Shiovitz, Gary Pilcher, Susan Colby, Linda Rollin, Randy Dockens, Chahin Pachai, Erik Portelius, Ulf Andreasson, Kaj Blennow, Holly Soares, Charles Albright, Howard H. Feldman, and Robert M. Berman. 2012. "Safety and Tolerability of the  $\gamma$ -Secretase Inhibitor Avagacestat in a Phase 2 Study of Mild to Moderate Alzheimer Disease." *Archives of Neurology* 69(11):1430–40.
- Cozzone, Aj. 1988. "Protein Phosphorylation in Prokaryotes." *Biochimie* 42:97–125.

- Crary, John F., John Q. Trojanowski, Julie A. Schneider, Jose F. Abisambra, Erin L. Abner, Irina Alafuzoff, Steven E. Arnold, Johannes Attems, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Dennis W. Dickson, Marla Gearing, Lea T. Grinberg, Patrick R. Hof, Bradley T. Hyman, Kurt Jellinger, Gregory A. Jicha, Gabor G. Kovacs, David S. Knopman, Julia Kofler, Walter A. Kukull, Ian R. Mackenzie, Eliezer Masliah, Ann McKee, Thomas J. Montine, Melissa E. Murray, Janna H. Neltner, Ismael Santa-Maria, William W. Seeley, Alberto Serrano-Pozo, Michael L. Shelanski, Thor Stein, Masaki Takao, Dietmar R. Thal, Jonathan B. Toledo, Juan C. Troncoso, Jean Paul Vonsattel, Charles L. White, Thomas Wisniewski, Randall L. Woltjer, Masahito Yamada, and Peter T. Nelson. 2014. "Primary Age-Related Tauopathy (PART): A Common Pathology Associated with Human Aging." *Acta Neuropathologica* 128(6):755–66.
- Crouch, Peter J., Deborah J. Tew, Tai Du, Diem Ngoc Nguyen, Aphrodite Caragounis, Gulay Filiz, Rachel E. Blake, Ian A. Trounce, Cynthia P. W. Soon, Katrina Laughton, Keyla A. Perez, Qiao-Xin Li, Robert A. Cherny, Colin L. Masters, Kevin J. Barnham, and Anthony R. White. 2009. "Restored Degradation of the Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Peptide by Targeting Amyloid Formation." *Journal of Neurochemistry* 108(5):1198–1207.
- Crouch, Peter J., Lin Wai, Paul A. Adlard, Mikhailina Cortes, Varsha Lal, and Gulay Filiz. 2008. "Increasing Cu Bioavailability Inhibits A $\beta$  Oligomers and Tau Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(2):381–86.
- Crump, Christina J., Suita V Castro, Feng Wang, Nikolay Pozdnyakov, T. Eric Ballard, Sangram S. Sisodia, Kelly R. Bales, Douglas S. Johnson, and Yue-ming Li. 2012. "BMS-708,163 Targets Presenilin and Lacks Notch-Sparing Activity." *Biochemistry* 51:7209–11.
- Damante, Chiara A., O. Katalin, Giuseppe Pappalardo, Giulia Grasso, Giuseppe Impellizzeri, Enrico Rizzarelli, and Imre So. 2008. "The Metal Loading Ability of  $\gamma$ -Amyloid N-Terminus : A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Copper (II) Complexes with  $\gamma$ -Amyloid (1-16), Its Short or Mutated Peptide Fragments , and Its Polyethylene Glycol (PEG) -Ylated Analogue." *Inorganic Chemistry* 47(20):9669–83.
- Dang, Shangyu, Shenjie Wu, Jiawei Wang, Hongbo Li, Min Huang, Wei He, Yue-Ming Li, Catherine C. L. Wong, and Yigong Shi. 2015. "Cleavage of Amyloid Precursor Protein by an Archaeal Presenilin Homologue PSH." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(11):3344–49.
- Danzysz, Wojciech and Chris G. Parsons. 2012. "Alzheimer's Disease ,  $\beta$ -Amyloid, Glutamate, NMDA Receptors and Memantine – Searching for the Connections." *British Journal of Pharmacology* 167(2):324–52.
- Das, Chittaranjan, Oksana Berezovska, Thekla S. Diehl, Cedric Genet, Ilya Buldyrev, Jui-yi Tsai, Bradley T. Hyman, and Michael S. Wolfe. 2003. "Designed Helical Peptides Inhibit an Intramembrane Protease." *Journal of the American Chemical Society* 125(39):11794–95.
- Das, Chittaranjan, Michael J. Bowman, and Michael S. Wolfe. 2004. "Discovery of a Subnanomolar Helical D - Tridecapeptide Inhibitor of  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Medicinal Chemistry* 47(16):3931–33.
- Davies, P. and A. J. Maloney. 1976. "Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease." *The Lancet* 308(8000):1963.
- Dawson, G. R., G. R. Seabrook, H. Zheng, D. W. Smith, S. Graham, G. O. Dowd, B. J. Bowery, S. Boyce, M. E. Trumbauer, H. Y. Chen, L. H. T. V. A. N. D. E. R. Ploeg, and D. J. S. Sirinathsingji. 1999. "AGE-RELATED COGNITIVE DEFICITS , IMPAIRED LONG-TERM POTENTIATION AND REDUCTION IN SYNAPTIC

MARKER DENSITY IN MICE LACKING THE  $\gamma$ -AMYLOID PRECURSOR PROTEIN.” *Neuroscience* 90(1):1–13.

- Dawson, Hana N., Adriana Ferreira, Michele V. Eyster, Nupur Ghoshal, Lester I. Binder, and Michael P. Vitek. 2001. “Inhibition of Neuronal Maturation in Primary Hippocampal Neurons from Tau Deficient Mice.” *Journal of Cell Science* 114(6):1179–87.
- Deane, Rashid, Shi Du Yan, Ram Kumar Subramanian, Barbara Larue, Suzana Jovanovic, Elizabeth Hogg, Deborah Welch, Lawrence Manness, Chang Lin, Jin Yu, Hong Zhu, Jorge Ghiso, Blas Frangione, Alan Stern, Ann Marie Schmidt, Don L. Armstrong, Bernd Arnold, Birgit Liliensiek, Peter Nawroth, Florence Hofman, Mark Kindy, David Stern, and Berislav Zlokovic. 2003. “RAGE Mediates Amyloid- $\beta$  Peptide Transport across the Blood-Brain Barrier and Accumulation in Brain.” *Nature Medicine* 9(7):907–13.
- Deber, C. M., a R. Khan, Z. Li, C. Joensson, M. Glibowicka, and J. Wang. 1993. “Val<sup>10</sup>Ala Mutations Selectively Alter Helix-Helix Packing in the Transmembrane Segment of Phage M13 Coat Protein.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(24):11648–52.
- Dejaegere, T., L. Serneels, M. K. Schafer, J. Van Biervliet, K. Horre, C. Depboylu, D. Alvarez-Fischer, A. Herreman, M. Willem, C. Haass, G. U. Hoglinger, R. D’Hooge, and B. De Strooper. 2008. “Deficiency of Aph1B/C- $\gamma$  Secretase Disturbs Nrg1 Cleavage and Sensorimotor Gating That Can Be Reversed with Antipsychotic Treatment.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(28):9775–80.
- DeMattos, Ronald B., Kelly R. Bales, David J. Cummins, Jean Cosme Dodart, Steven M. Paul, and David M. Holtzman. 2001. “Peripheral Anti-A $\beta$  Antibody Alters CNS and Plasma A $\beta$  Clearance and Decreases Brain A $\beta$  Burden in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15):8850–55.
- Deshpande, Atul, Hideki Kawai, Raju Metharate, Charles G. Glabe, and Jorge Busciglio. 2009. “A Role for Synaptic Zinc in Activity-Dependent A $\beta$  Oligomer Formation and Accumulation at Excitatory Synapses.” *The Journal of Neuroscience* 29(13):4004–15.
- Deyts, Carole, Mary Clutter, Stacy Herrera, Natalia Jovanovic, and Anna Goddi. 2016. “Loss of Presenilin Function Is Associated with a Selective Gain of APP Function.” *ELife* 5:1–24.
- Dickens, Marina G. and Katherine J. Franz. 2011. “A Prochelatase Activated by Hydrogen Peroxide Prevents Metal-Induced Amyloid Beta Aggregation.” *ChemBioChem* 11(1):59–62.
- Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, and Erika L. F. Holzbaur. 2008. “Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau.” *Science* 319(5866):1086–89.
- Doerfler, Petra, Mark S. Shearman, and Roger M. Perlmutter. 2001. “Presenilin-Dependent  $\gamma$ -Secretase Activity Modulates Thymocyte Development.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(16):9312–17.
- Dolzhanskaya, Natalia, Michael A. Gonzalez, Fiorella Sperziani, Shannon Stefl, Jeffrey Messing, Guang Y. Wen, Emil Alexov, Stephan Zuchner, and Milen Velinov. 2014. “A Novel p.Leu(381)Phe Mutation in Presenilin 1 Is Associated with Very Early Onset and Unusually Fast Progressing Dementia as Well as Lysosomal Inclusions Typically Seen in Kufs Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 39(1):23–27.
- Dominy, Stephen S., Casey Lynch, Florian Ermini, Malgorzata Benedyk, Agata Marczyk, Andrei Konradi, Mai Nguyen, Ursula Haditsch, Debasish Raha, Christina Griffin, Leslie J. Holsinger, Shirin Arastu-Kapur, Samer

- Kaba, Alexander Lee, Mark I. Ryder, Barbara Potempa, Piotr Mydel, Annelie Hellvard, Karina Adamowicz, Hatice Hasturk, Glenn D. Walker, Eric C. Reynolds, Richard L. M. Faull, Maurice A. Curtis, Mike Dragunow, and Jan Potempa. 2019. "Porphyromonas Gingivalis in Alzheimer's Disease Brains: Evidence for Disease Causation and Treatment with Small-Molecule Inhibitors." *Science Advances* 5(1):eaau3333.
- Dong, Hao, Mukesh Sharma, Huan-xiang Zhou, and Timothy A. Cross. 2012. "Glycines: Role in  $\alpha$ -Helical Membrane Protein Structures and a Potential Indicator of Native Conformation." *Biochemistry* 51:4779–89.
- Donovan, Adriana, Christine A. Lima, Jack L. Pinkus, Geraldine S. Pinkus, Leonard I. Zon, Sylvie Robine, and Nancy C. Andrews. 2005. "The Iron Exporter Ferroportin/Slc40a1 Is Essential for Iron Homeostasis." *Cell Metabolism* 1(3):191–200.
- Doody, Rachele S., Karl Kieburtz, Feng He, Xiaoying Sun, Ronald G. Thomas, D. Ph, and Paul S. Aisen. 2013. "A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 369(4):341–50.
- Doody, Rachele S., Ronald G. Thomas, Martin Farlow, Takeshi Iwatsubo, Bruno Vellas, Steven Joffe, Karl Kieburtz, Rema Raman, Xiaoying Sun, Paul S. Aisen, Eric Siemers, Hong Liu-Seifert, and Richard Mohs. 2014. "Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *New England Journal of Medicine* 370(4):311–21.
- Dovey, H. F., V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. De Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztyńska, K. L. Hu, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. A. Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. C. Clemens, D. L. Czilli, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. A. Hyslop, E. M. Johnstone, W-y Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, B. Ni, J. S. Nissen, W. J. Porter, B. D. Potts, J. K. Reel, D. Stephenson, Y. Su, L. A. Shipley, C. A. Whitesitt, T. Yin, and J. E. Audia. 2001. "Functional Gamma-Secretase Inhibitors Reduce Beta-Amyloid Peptide Levels in Brain." *Journal of Neurochemistry* 76:173–81.
- Drew, Simon C., Christopher J. Noble, Colin L. Masters, Graeme R. Hanson, and Kevin J. Barnham. 2009. "Pleomorphic Copper Coordination by Alzheimer's Disease Amyloid Peptide." *Journal of the American Chemical Society* 131(3):1195–1207.
- Dries, Daniel R., Sanjiv Shah, Yu Hong Han, Cong Yu, Sophie Yu, Mark S. Shearman, and Gang Yu. 2009. "Glu-333 of Nicastrin Directly Participates in  $\gamma$ -Secretase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 284(43):29714–24.
- Duce, James A. and Ashley I. Bush. 2010. "Biological Metals and Alzheimer's Disease: Implications for Therapeutics and Diagnostics." *Progress in Neurobiology* 92(1):1–18.
- Duce, James A., Andrew Tsatsanis, Michael A. Cater, Simon A. James, Elysia Robb, Krutika Wikhe, Su Ling Leong, Keyla Perez, Timothy Johanssen, Mark A. Greenough, Hyun-hee Cho, Denise Galatis, Robert D. Moir, Colin L. Masters, Catriona Mclean, Rudolph E. Tanzi, Roberto Cappai, Kevin J. Barnham, Giuseppe D. Ciccotosto, Jack T. Rogers, and Ashley I. Bush. 2010. "Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease." *Cell* 142(6):857–67.

- Dumanis, Sonya B., Joseph A. Tesoriero, Lenard W. Babus, Madeline T. Nguyen, Justin H. Trotter, Mary Jo Ladu, Edwin J. Weeber, R. Scott Turner, Baoji Xu, G. William Rebeck, and Hyang Sook Hoe. 2009. "ApoE4 Decreases Spine Density and Dendritic Complexity in Cortical Neurons in Vivo." *Journal of Neuroscience* 29(48):15317–22.
- Dunys, Julie, Audrey Valverde, and Frédéric Checler. 2018. "Are N- and C-Terminally Truncated A $\beta$  Species Key Pathological Triggers in Alzheimer's Disease?" *Journal of Biological Chemistry* jbc.R118.003999.
- Durkin, John T., Seetha Murthy, E. Jean Husten, Stephen P. Trusko, Mary J. Savage, David P. Rotella, Barry D. Greenberg, and Robert Siman. 1999. "Rank-Order of Potencies for Inhibition of the Secretion of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 Suggests That Both Are Generated by a Single  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Biological Chemistry* 274(29):20499–504.
- Ebke, Amelie, Thomas Luebbbers, Akio Fukumori, Keiro Shirotani, Christian Haass, Karlheinz Baumann, and Harald Steiner. 2011. "Novel  $\gamma$ -Secretase Enzyme Modulators Directly Target Presenilin Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 286(43):37181–86.
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Christian Haass, and Harald Steiner. 2002. "Presenilin and Nicastrin Regulate Each Other and Determine Amyloid  $\beta$ -Peptide Production via Complex Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13):8666–71.
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Joerg T. Regula, Brigitte Pesold, Harald Steiner, and Christian Haass. 2003. "Reconstitution of  $\gamma$ -Secretase Activity." *Nature Cell Biology* 5(5):486–88.
- Efthymiou, Anastasia G. and Alison M. Goate. 2017. "Late Onset Alzheimer's Disease Genetics Implicates Microglial Pathways in Disease Risk." *Molecular Neurodegeneration* 12(1):1–12.
- Eggert, Simone, Krzysztof Paliga, Peter Soba, Genevieve Evin, Colin L. Masters, Andreas Weidemann, and Konrad Beyreuther. 2004. *The Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein Gene Family Members APLP-1 and APLP-2 Involves  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\epsilon$ -Like Cleavages*. Vol. 279.
- Eimer, William A., Deepak Kumar Vijaya Kumar, Nanda Kumar Navalpur Shanmugam, Alex S. Rodriguez, Teryn Mitchell, Kevin J. Washicosky, Bence György, Xandra O. Breakefield, Rudolph E. Tanzi, and Robert D. Moir. 2018. "Alzheimer's Disease-Associated  $\beta$ -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection." *Neuron* 99(1):56-63.e3.
- Eisele, Yvonne S., Tristan Bolmont, Mathias Heikenwalder, Franziska Langer, Laura H. Jacobson, Zheng Xin Yan, Klaus Roth, Adriano Aguzzi, Matthias Staufenbiel, Lary C. Walker, and Mathias Jucker. 2009. "Induction of Cerebral  $\beta$ -Amyloidosis: Intracerebral versus Systemic A $\beta$  Inoculation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31):12926–31.
- Eisele, Yvonne S., Ulrike Obermüller, Götz Heilbronner, Frank Baumann, Stephan A. Kaeser, Hartwig Wolburg, Lary C. Walker, Matthias Staufenbiel, Mathias Heikenwalder, and Mathias Jucker. 2010. "Peripherally Applied A $\beta$ -Containing Inoculates Induce Cerebral  $\beta$ -Amyloidosis." *Science* 330(6006):980–82.
- Elad, Nadav, Bart De Strooper, Sam Lismont, Wim Hagen, Sarah Veugelen, Muriel Arimon, Katrien Horré, Oksana Berezovska, Carsten Sachse, and Lucia Chavez-Gutierrez. 2015. "The Dynamic Conformational Landscape of  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Cell Science* 128(3):589–98.



- Elliott, Robert L. and Jonathan F. Head. 2012. "Cancer : Tumor Iron Metabolism , Mitochondrial Dysfunction and Tumor Immunosuppression ; ' A Tight Partnership — Was Warburg Correct ?'" *Journal of Cancer Therapy* 3:278–311.
- Ellis, Christopher R., Cheng Chieh Tsai, Fang Yu Lin, and Jana Shen. 2017. "Conformational Dynamics of Cathepsin D and Binding to a Small-Molecule BACE1 Inhibitor." *Journal of Computational Chemistry* 38(15):1260–69.
- England, The New. 2001. "NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS AND THE RISK OF ALZHEIMER ' S DISEASE." *The New England Journal of Medicine* 345(21):1515–21.
- Enkvetchakul, Decha, Iana Jeliaskova, Jaya Bhattacharyya, and Colin G. Nichols. 2007. "Control of Inward Rectifier K Channel Activity by Lipid Tethering of Cytoplasmic Domains." *The Journal of General Physiology* 130(3):329–34.
- Eriksen, Jason L., Sarah A. Sagi, Tawnya E. Smith, Sascha Weggen, Pritam Das, D. C. Melendon, Victor V Ozols, Kevin W. Jessing, Kenton H. Zavitz, Edward H. Koo, and Todd E. Golde. 2003. "NSAIDs and Enantiomers of Flurbiprofen Target  $\gamma$ -Secretase and Lower A  $\beta$  42 in Vivo." *The Journal of Clinical Investigation* 112(3):440–49.
- Esch, Fred S., Pamela S. Keim, Eric C. Beatrice, Russell W. Blacher, Alan R. Culwell, Tilman Oltersdorf, Donald McClure, and Pamela J. Ward. 1989. "Cleavage of Amyloid I8 Peptide During Constitutive Processing of Its Precursor." *Science* 541(1988):1122–24.
- Esler, William P., Chittaranjan Das, and Michael S. Wolfe. 2004. "Probing Pockets S2–S4' of the  $\gamma$ -Secretase Active Site with (Hydroxyethyl) Urea Peptidomimetics." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14:1935–38.
- Esler, William P., W. Taylor Kimberly, Beth L. Ostaszewski, Thekla S. Diehl, Chad L. Moore, Jui-yi Tsai, Talat Rahmati, Weiming Xia, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2000. "Transition-State Analogue Inhibitors of  $\gamma$ -Secretase Bind Directly to Presenilin-1." *Nature Cell Biology* 2:428–34.
- Espinoza, Ingrid and Lucio Miele. 2013. "Notch Inhibitors for Cancer Treatment." *Pharmacology and Therapeutics* 139(2):95–110.
- Evin, Geneviève, Louise D. Canterford, David E. Hoke, Robyn A. Sharples, Janetta G. Culvenor, and Colin L. Masters. 2005. "Transition-State Analogue  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Stabilize a 900 KDa Presenilin/Nicastrin Complex." *Biochemistry* 44(11):4332–41.
- Extance, Andy, On August, and Eli Lilly. 2010. "NEws & AnALysIs Alzheimer ' s Failure Raises Questions." *Nature Publishing Group* 9(10):749–51.
- Ezzat, Kariem, Maria Pernemalm, Sandra Pålsson, Thomas C. Roberts, Peter Järver, Aleksandra Dondalska, Burcu Bestas, Michal J. Sobkowiak, Bettina Levänen, Magnus Sköld, Elizabeth A. Thompson, Osama Saher, Otto K. Kari, Tatu Lajunen, Eva Sverremark Ekström, Caroline Nilsson, Yevheniia Ishchenko, Tarja Malm, Matthew J. A. Wood, Ultan F. Power, Sergej Masich, Anders Lindén, Johan K. Sandberg, Janne Lehtiö, Anna Lena Spetz, and Samir EL Andaloussi. 2019. "The Viral Protein Corona Directs Viral Pathogenesis and Amyloid Aggregation." *Nature Communications* 10(1):2331.
- Faller, Peter. 2009. "Copper and Zinc Binding to Amyloid- $\beta$ : Coordination , Dynamics , Aggregation , Reactivity and Metal-Ion Transfer." *ChemBioChem* 10(18):2837–45.

- Fassler, Matthias, Michael Zocher, Sebastian Klare, Alerie Guzman de la Fuente, Johanna Scheuermann, Anja Capell, Christian Haass, Christina Valkova, Anbazhagan Veerappan, Dirk Schneider, and Christoph Kaether. 2010. "Masking of Transmembrane-Based Retention Signals Controls ER Export of  $\gamma$ -Secretase." *Traffic* 11(2):250–58.
- Featherstone, David and Scott A. Shippy. 2008. "Regulation of Synaptic Transmission by Ambient Extracellular Glutamate." *The Neuroscientist* 14(2):171–81.
- Fede, Giuseppe Di, Marcella Catania, Michela Morbin, Giacomina Rossi, Silvia Suardi, Giulia Mazzoleni, Marco Merlin, Anna Rita Giovagnoli, Sara Prioni, Alessandra Erbetta, Chiara Falcone, Marco Gobbi, Laura Colombo, Antonio Bastone, Marten Beeg, Claudia Manzoni, Alberto Spagnoli Bruna Francescucci, Laura Cantù6, Elena Del Favero, Efrat Levy, Mario Salmon, and Fabrizio Tagliavini. 2009. "A Recessive Mutation in the APP Gene with Dominant-Negative Effect on Amyloidogenesis." *Ecological Research* 323(5920):1473–78.
- Felsky, Daniel, Tina Roostaei, Kwangsik Nho, Shannon L. Risacher, Elizabeth M. Bradshaw, Vlad Petyuk, Julie A. Schneider, Andrew Saykin, David A. Bennett, and Philip L. De Jager. 2019. "Neuropathological Correlates and Genetic Architecture of Microglial Activation in Elderly Human Brain." *Nature Communications* 10(1):1–12.
- Ferber, Emma C., Mihoko Kajita, Anthony Wadlow, Lara Tobiansky, Carien Niessen, Hiroyoshi Ariga, Juliet Daniel, and Yasuyuki Fujita. 2008. "A Role for the Cleaved Cytoplasmic Domain of E-Cadherin in the Nucleus." *The Journal of Biological Chemistry* 283(19):12691–700.
- Findeis, Mark A., Frank Schroeder, Timothy D. McKee, Debra Yager, Patrick C. Fraering, Steffen P. Creaser, Wesley F. Austin, Jon Clardy, Rong Wang, Dennis Selkoe, and Christopher B. Eckman. 2012. "Discovery of a Novel Pharmacological and Structural Class of Gamma Secretase Modulators Derived from the Extract of *Actaea Racemosa*." *ACS Chemical Neuroscience* 3(11):941–51.
- Fischer, Christian, Susan L. Zultanski, Hua Zhou, Joey L. Methot, Sanjiv Shah, Ikuo Hayashi, Bethany L. Hughes, Christopher M. Moxham, Nathan W. Bays, Nadya Smotrov, Armetta D. Hill, Bo Sheng Pan, Zhenhua Wu, Lily Y. Moy, Flobert Tanga, Candia Kenific, Jonathan C. Cruz, Deborah Walker, Melanie Bouthillette, George N. Nikov, Sujal V. Deshmukh, Valentina V. Jeliazkova-Mecheva, Damaris Diaz, Maria S. Michener, Jacquelynn J. Cook, Benito Munoz, and Mark S. Shearman. 2015. "Discovery of Novel Triazolobenzazepinones as  $\gamma$ -Secretase Modulators with Central A $\beta$ 42 Lowering in Rodents and Rhesus Monkeys." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 25(17):3488–94.
- Fischer, Christian, Susan L. Zultanski, Hua Zhou, Joey L. Methot, Sanjiv Shah, Hugh Nuthall, Bethany L. Hughes, Nadya Smotrov, Armetta Hill, Alexander A. Szewczak, Christopher M. Moxham, Nathan Bays, Richard E. Middleton, Benito Munoz, and Mark S. Shearman. 2012. "Triazoloamides as Potent  $\gamma$ -Secretase Modulators with Reduced HERG Liability." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(9):3140–46.
- Fitzpatrick, Anthony W. P., Benjamin Falcon, Shaoda He, Alexey G. Murzin, Garib Murshudov, Holly J. Garringer, R. Anthony Crowther, Bernardino Ghetti, Michel Goedert, and Sjors H. W. Scheres. 2017. "Cryo-EM Structures of Tau Filaments from Alzheimer's Disease." *Nature* 547(7662):185–90.
- Fleisher, Adam S., Rema Raman, Eric R. Siemers, Lida Becerra, Christopher M. Clark, Robert A. Dean, Martin R. Farlow, James E. Galvin, Elaine R. Peskind, F. Joseph, Abdullah Sherzai, B. Brooke Sowell, Paul S. Aisen, and

- Leon J. Thal. 2008. "Phase II Safety Trial Targeting Amyloid Beta Production with a Gamma-Secretase Inhibitor in Alzheimer's Disease." *Archives of Neurology* 65(8):1031–38.
- Forbes, Christina R., Himal K. Ganguly Sudipta K. Sinha, Shi Bai, Glenn P. A. Yap, Sandeep Patel, and Neal J. Zondlo. 2017. "Insights into Thiol-Aromatic Interactions: A Stereoelectronic Basis for S–H/π Interactions." *Journal of American Chemical Society* 139(5):1842–55.
- Fraering, Patrick C., Matthew J. Lavoie, Wenjuan Ye, Beth L. Ostaszewski, W. Taylor Kimberly, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2004. "Detergent-Dependent Dissociation of Active  $\gamma$ -Secretase Reveals an Interaction between Pen-2 and PS1-NTF and Offers a Model for Subunit Organization within the Complex." *Biochemistry* 43:323–33.
- Fraering, Patrick C., Wenjuan Ye, Matthew J. Lavoie, Beth L. Ostaszewski, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2005. " $\gamma$ -Secretase Substrate Selectivity Can Be Modulated Directly via Interaction with a Nucleotide-Binding Site." *The Journal of Biological Chemistry* 280(51):41987–96.
- Fraering, Patrick C., Wenjuan Ye, Jean-marc Strub, Georgia Dolios, Matthew J. Lavoie, Beth L. Ostaszewski, Alain Van Dorsselaer, Rong Wang, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2004. "Purification and Characterization of the Human  $\gamma$ -Secretase Complex." *Biochemistry* 43(30):9774–89.
- Francis, Ross, Garth Mcgrath, Jianhuan Zhang, David A. Ruddy, Mary Sym, Javier Apfeld, Monique Nicoll, Mark Maxwell, Bing Hai, Michael C. Ellis, Annette L. Parks, Wei Xu, Jinhe Li, Mark Gurney, Richard L. Myers, Carol S. Himes, Ronald Hiebsch, Cara Ruble, Jeffrey S. Nye, Daniel Curtis, and South San Francisco. 2002. "Aph-1 and Pen-2 Are Required for Notch Pathway Signaling,  $\gamma$ -Secretase Cleavage of BAPP, and Presenilin Protein Accumulation." *Cell* 3:85–97.
- Frederickson, Christopher J., Jae-young Koh, and Ashley I. Bush. 2005. "THE NEUROBIOLOGY OF ZINC IN HEALTH AND DISEASE." *Nature Reviews Neuroscience* 6:449–62.
- Frigerio, Carlo Sala, Julia V Fadeeva, Aedin M. Minogue, Martin Citron, Fred Van, Matthias Stufenbiel, Paolo Paganetti, Dennis J. Selkoe, and M. Dominic. 2010. " $\beta$ -Secretase Cleavage Is Not Required for Generation of the Intracellular C-Terminal Domain of the Amyloid Precursor Family of Proteins." *FEBS Journal* 277(6):1503–18.
- Frings, Marcus, Carsten Bolm, Andreas Blum, and Christian Gnam. 2017. "Sulfoximines from a Medicinal Chemist's Perspective: Physicochemical and in Vitro Parameters Relevant for Drug Discovery." *European Journal of Medicinal Chemistry* 126:225–45.
- Frost, Bess, Julian Ollesch, Holger Wille, and Marc I. Diamond. 2009. "Conformational Diversity of Wild-Type Tau Fibrils Specified by Templated Conformation Change." *Journal of Biological Chemistry* 284(6):3546–51.
- Fuchino, Kouki, Yasunori Mitsuoka, Moriyasu Masui, Noriyuki Kurose, Shuhei Yoshida, Kazuo Komano, Takahiko Yamamoto, Masayoshi Ogawa, Chie Unemura, Motoko Hosono, Hisanori Ito, Gaku Sakaguchi, Shigeru Ando, Shuichi Ohnishi, Yasuto Kido, Tamio Fukushima, Hirofumi Miyajima, Shuichi Hiroyama, Kiyotaka Koyabu, Deborah Dhuyvetter, Herman Borghys, Harrie J. M. Gijzen, Yoshinori Yamano, Yasuyoshi Iso, and Ken Ichi Kusakabe. 2018. "Rational Design of Novel 1,3-Oxazine Based  $\beta$ -Secretase (BACE1) Inhibitors: Incorporation of a Double Bond to Reduce P-Gp Efflux Leading to Robust A $\beta$  Reduction in the Brain." *Journal of Medicinal Chemistry* 61(12):5122–37.

- Fukumori, Akio and Harald Steiner. 2016. "Substrate Recruitment of  $\gamma$ -Secretase and Mechanism of Clinical Presenilin Mutations Revealed by Photoaffinity Mapping." *The EMBO Journal* 35(15):1628–43.
- Fuller, Nathan O., Jed L. Hubbs, Wesley F. Austin, P. Creaser, Timothy D. Mckee, Robyn M. B. Loureiro, Barbara Tate, Weiming Xia, L. Ives, Mark A. Findeis, and Brian S. Bronk. 2012. "Initial Optimization of a New Series of  $\Gamma^-$  Secretase Modulators Derived from a Triterpene Glycoside." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3:908–13.
- Fumagalli, Elena, Marcella Funicello, Thomas Rauen, Marco Gobbi, and Tiziana Mennini. 2008. "Riluzole Enhances the Activity of Glutamate Transporters." *European Journal of Pharmacology* 578(2–3):171–76.
- Futai, E., S. Osawa, T. Cai, T. Fujisawa, S. Ishiura, and T. Tomita. 2016. "Suppressor Mutations for Presenilin 1 Familial Alzheimer Disease Mutants Modulate  $\gamma$ -Secretase Activities." *Journal of Biological Chemistry* 291(1).
- Fuwa, Haruhiko, Yasuko Takahashi, Yu Konno, Naoto Watanabe, Hiroyuki Miyashita, Makoto Sasaki, Hideaki Natsugari, Toshiyuki Kan, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2007. "Divergent Synthesis of Multifunctional Molecular Probes To Elucidate the Enzyme Specificity of Dipeptidic $\gamma$ -Secretase Inhibitors." *ACS Chemical Biology* 2(6):408–18.
- Gale, Stephen C., Li Gao, Carmen Mikacenic, Susette M. Coyle, Nicholas Rafaels, Tanda Murray Dudenkov, Jennifer H. Madenspacher, David W. Draper, William Ge, Jim J. Aloor, Kathleen M. Azzam, Lihua Lai, Perry J. Blackshear, Steven E. Calvano, Kathleen C. Barnes, Stephen F. Lowry, Siobhan Corbett, Mark M. Wurfel, and Michael B. Fessler. 2014. "APO $\epsilon$ 4 Is Associated with Enhanced in Vivo Innate Immune Responses in Human Subjects." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134(1):127–34.
- Galichet, Arnaud, Mirjam Weibel, and Claus W. Heizmann. 2008. "Biochemical and Biophysical Research Communications Calcium-Regulated Intramembrane Proteolysis of the RAGE Receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370(1):1–5.
- Gallardo, Gilbert and David M. Holtzman. 2017. "Antibody Therapeutics Targeting A $\beta$  and Tau." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7(10):a024331.
- Games, Dora, David Adams, Ree Alessandrini, Robin Barbour, Patricia Berthelette, Catherine Blackwell, Tony Carr, James Clemens, Thomas Donaldson, Frances Gillespie, Terry Guido, Stephanie Hagopian, Lelly Johnson-wood, Karen Khan, Mike Lee, Paul Leibowitz, Ivan Lieberburg, Sheila Little, Eliezer Masliah, Lisa McConlogue, Martin Montoya-zavala, Lennart Mucke, Lisa Paganini, Elizabeth Penniman, Mike Power, Dale Schenk, Peter Seubert, Ben Snyder, Ferdle Sorlano, Hua Tan, James Vitale, Sam Wadsworth, Ben Wolozin, and Jun Zhao. 1995. "Alzheimer-Type Neuropathology in Transgenic Mice Overexpressing V717F  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein.Pdf." *Nature* 373(6514):523–27.
- Gandhi, Chris S., Eliana Clark, Eli Loots, Arnd Pralle, and Ehud Y. Isacoff. 2003. "The Orientation and Molecular Movement of a K<sup>+</sup> Channel Voltage-Sensing Domain." *Neuron* 40:515–25.
- Gauthier, Serge, Howard H. Feldman, Lon S. Schneider, Gordon K. Wilcock, Giovanni B. Frisoni, Jiri H. Hardlund, Hans J. Moebius, Peter Bentham, Karin A. Kook, Damon J. Wischik, Bjoern O. Schelker, Charles S. Davis, Roger T. Staff, Luc Bracoud, Kohkan Shamsi, John M. D. Storey, Charles R. Harrington, and Claude M. Wischik. 2016. "Efficacy and Safety of Tau-Aggregation Inhibitor Therapy in Patients with Mild or Moderate Alzheimer's Disease: A Randomised, Controlled, Double-Blind, Parallel-Arm, Phase 3 Trial." *The Lancet* 388(10062):2873–84.

- Geisslinger, Gerd and Hans Georg Schaible. 1996. "New Insights into the Site and Mode of Antinociceptive Action of Flurbiprofen Enantiomers." *Journal of Clinical Pharmacology* 36(6):513–20.
- Georgakopoulos, Anastasios, Enrico Ghersi, Lia Baki, Chijie Xu, Geo Serban, and Nikolaos K. Robakis. 2006. "Metalloproteinase/Presenilin1 Processing Phosphorylation and Signaling." *The EMBO Journal* 25(6):1242–52.
- Gertsik, Natalya, Christopher W. Ende, Kieran F. Geoghegan, Uthpala Seneviratne, Douglas S. Johnson, Yue-ming Li, Natalya Gertsik, Christopher W. Ende, Kieran F. Geoghegan, Chuong Nguyen, and Paramita Mukherjee. 2017. "Mapping the Binding Site of BMS-708163 on  $\gamma$ -Secretase with Cleavable Photoprobes Brief Communication Mapping the Binding Site of BMS-708163 on  $\gamma$ -Secretase with Cleavable Photoprobes." *Cell Chemical Biology* 1–6.
- Gillman, Kevin W., John E. Starrett, Michael F. Parker, Kai Xie, Joanne J. Bronson, Lawrence R. Marcin, Kate E. McElhone, Carl P. Bergstrom, Robert A. Mate, Richard Williams, Jere E. Meredith, Catherine R. Burton, Donna M. Barten, Jeremy H. Toyn, Susan B. Roberts, Kimberley A. Lentz, John G. Houston, Robert Zaczek, Charles F. Albright, Carl P. Decicco, John E. Macor, and Richard E. Olson. 2010. "Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable  $\gamma$ -Secretase Inhibitor." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1:120–24.
- Glenner, George G. and Caine W. Wong. 1984. "Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(3):885–90.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, and L. James. 1991. "Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 349(6311):704–6.
- Gómez-Isla, Teresa, Joseph L. Price, Daniel W. McKeel, John C. Morris, John H. Growdon, and Bradley T. Hyman. 1996. "Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience* 16(14):4491–4500.
- Gong, Ping, Kulandaivelu S. Vetrivel, Phuong D. Nguyen, Xavier Meckler, Haipeng Cheng, Maria Z. Kounnas, Steven L. Wagner, Angèle T. Parent, and Gopal Thinakaran. 2010. "Mutation Analysis of the Presenilin 1 N-Terminal Domain Reveals a Broad Spectrum of  $\gamma$ -Secretase Activity toward Amyloid Precursor Protein and Other Substrates." *Journal of Biological Chemistry* 285(49):38042–52.
- Gorno-Tempini, M. L., S. M. Brambati, V. Ginex, J. Ogar, N. F. Dronkers, A. Marcone, D. Perani, V. Garibatto, S. F. Cappa, and B. L. Miller. 2008. "The Logopenic Variant of Primary Progressive Aphasia." *Neurology* 71(16):1057–67.
- Götz, J., F. Chen, J. Van Dorpe, and R. M. Nitsch. 2001. "Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A $\beta$ 42 Fibrils." *Science* 293(5534):1491–95.
- Goutte, Caroline, Makoto Tsunozaki, Valerie A. Hale, and James R. Priess. 2002. "APH-1 Is a Multipass Membrane Protein Essential for the Notch Signaling Pathway in Caenorhabditis Elegans Embryos." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(2):775–79.
- Graeber, Manuel B. 1999. "No Man Alone: The Rediscovery of Alois Alzheimer's Original Cases." *Brain Pathology* 9(2):237–40.

- Gratuze, Maud, Cheryl E. G. Leyns, and David M. Holtzman. 2018. "New Insights into the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease." *Molecular Neurodegeneration* 13(1):1–16.
- Gray, Emma H., Kurt J. De Vos, Colin Dingwall, and Michael S. Perkinson. 2010. "Deficiency of the Copper Chaperone for Superoxide Dismutase Increases Amyloid- $\beta$  Production." *Journal of Alzheimer's Disease* 21(4):1101–5.
- Greenough, Mark A., Irene Volitakis, Qiao-xin Li, Katrina Laughton, Genevieve Evin, Michael Ho, Andrew H. Dalziel, James Camakaris, and Ashley I. Bush. 2011. "Presenilins Promote the Cellular Uptake of Copper and Zinc and Maintain Copper Chaperone of SOD1-Dependent Copper / Zinc Superoxide Dismutase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 286(11):9776–86.
- Gremer, Lothar, Daniel Schölzel, Carla Schenk, Elke Reinartz, Jörg Labahn, Raimond B. G. Ravelli, Markus Tusche, Carmen Lopez-iglesias, Wolfgang Hoyer, Henrike Heise, Dieter Willbold, and Gunnar F. Schröder. 2017. "Fibril Structure of Amyloid- $\beta$ (1-42) by Cryo-Electron Microscopy." *Science* 358(6359):116–19.
- Griciuc, Ana, Shaun Patel, Anthony N. Federico, Se Hoon Choi, Brendan J. Innes, Mary K. Oram, Gea Cereghetti, Danielle McGinty, Anthony Anselmo, Ruslan I. Sadreyev, Suzanne E. Hickman, Joseph El Khoury, Marco Colonna, and Rudolph E. Tanzi. 2019. "TREM2 Acts Downstream of CD33 in Modulating Microglial Pathology in Alzheimer's Disease." *Neuron* 103(5):820-835.e7.
- Grishin, Nick V, Joseph L. Goldstein, Michael S. Brown, Jin Ye, and Utpal P. Dave. 2000. "Asparagine-Proline Sequence within Membrane-Spanning Segment of SREBP Triggers Intramembrane Cleavage by Site-2 Protease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5123–28.
- Gruninger-Leitch, Fiona, Daniel Schlatter, Erich Kung, Peter Nelbock, and Heinz Dobeli. 2002. "Substrate and Inhibitor Profile of BACE ( $\beta$ -Secretase ) and Comparison with Other Mammalian Aspartic Proteases." *The Journal of Biological Chemistry* 277(7):4687–93.
- Gu, Yongjun, Hiroaki Misonou, Toru Sato, Naoshi Dohmae, Koji Takio, and Yasuo Ihara. 2001. "Distinct Intramembrane Cleavage of the  $\beta$ -Amyloid Cleavage of Notch." *The Journal of Biological Chemistry* 276(38):35235–39.
- Guenette, Suzanne, Yang Chang, Thomas Hiesberger, A. James, Christopher B. Eckman, Elizabeth A. Eckman, Robert E. Hammer, and Joachim Herz. 2006. "Essential Roles for the FE65 Amyloid Precursor Protein-Interacting Proteins in Brain Development." *The EMBO Journal* 25(2):420–31.
- Guo, Qing, Lois Sebastian, Bryce L. Sopher, Miles W. Miller, Carol B. Ware, George M. Martin, and Mark P. Mattson. 1999. "Increased Vulnerability of Hippocampal Neurons from Presenilin-1 Mutant Knock-In Mice to Amyloid  $\beta$ -Peptide Toxicity : Central Roles of Superoxide Production and Caspase Activation." *Journal of Neurochemistry* 72:1019–29.
- Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2017. "Roles of Tau Protein in Health and Disease." *Acta Neuropathologica* 133(5):665–704.
- Gupta-Rossi, Neetu, Emmanuelle Six, Odile LeBail, Frédérique Logeat, Patricia Chastagner, Annie Olry, Alain Israël, and Christel Brou. 2004. "Monoubiquitination and Endocytosis Direct  $\gamma$ -Secretase Cleavage of Activated Notch Receptor." *Journal of Cell Biology* 166(1):73–83.

- Gutierrez, Jesus A., Jianming Yu, Susan Rivera, and Marianne Wessling-resnick. 1997. "Functional Expression Cloning and Characterization of SFT, a Stimulator of Fe Transport." *The Journal of Cell Biology* 139(4):895–905.
- Haapasalo, Annakaisa, Doo Yeon Kim, Bryce W. Carey, Mari K. Turunen, Warren H. Pettingell, and Dora M. Kovacs. 2007. "Presenilin/ $\gamma$ -Secretase-Mediated Cleavage Regulates Association of Leukocyte-Common Antigen-Related (LAR) Receptor Tyrosine Phosphatase with  $\beta$ -Catenin." *The Journal of Biological Chemistry* 282(12):9063–72.
- Haapasalo, Annakaisa and Dora M. Kovacs. 2011. "The Many Substrates of Presenilin/ $\gamma$ -Secretase." *Journal of Alzheimer's Disease* 25(1):3–28.
- Haass, Christian, Cynthia A. Lemere, Anja Capell, Martin Citron, Peter Seubert, Dale Schenk, Lars Lannfelt, and Dennis J. Selkoe. 1995. "The Swedish Mutation Causes Early-Onset Alzheimer's Disease by  $\beta$ -Secretase Cleavage within the Secretory Pathway." *Nature Medicine* 1(12):1291–96.
- Haass, Christian, Michael G. Schlossmacher, Albert Y. Hung, Carmen Vigo-Pelfrey, Angela Mellon, Beth L. Ostaszewski, Ivan Lieberburg, Edward H. Koo, Dale Schenk, David B. Teplow, and Dennis J. Selkoe. 1992. "Amyloid  $\beta$ -Peptide Is Produced by Cultured Cells during Normal Metabolism." *Nature* 359(6393):322–25.
- Haass, Christian and Harald Steiner. 2002. "Alzheimer Disease  $\gamma$ -Secretase : A Complex Story of GxGD-Type Presenilin Proteases." *Cell Biology* 12(12):556–62.
- Hadland, Brandon K., Nancy R. Manley, Dong-ming Su, Gregory D. Longmore, Chad L. Moore, Michael S. Wolfe, Eric H. Schroeter, and Raphael Kopan. 2001. " $\gamma$ -Secretase Inhibitors Repress Thymocyte Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(13):7487–91.
- Haeflner, Fredrik, Kevin J. Barnham, and Ashley I. Bush. 2010. "Generation of Soluble Oligomeric  $\beta$ -Amyloid Species via Copper Catalyzed Oxidation with Implications for Alzheimer's Disease : A DFT Study." *Journal of Molecular Modeling* 16(6):1103–8.
- Halle, Annett, Veit Hornung, Gabor C. Petzold, Cameron R. Stewart, Brian G. Monks, Thomas Reinheckel, Katherine A. Fitzgerald, Eicke Latz, Kathryn J. Moore, and Douglas T. Golenbock. 2008. "The NALP3 Inflammasome Is Involved in the Innate Immune Response to Amyloid- $\beta$ ." *Nature Immunology* 9(8):857–65.
- Hanseuw, Bernard J., Rebecca A. Betensky, Heidi I. L. Jacobs, Aaron P. Schultz, Jorge Sepulcre, J. Alex Becker, Danielle M. Orozco, Cosio, Michelle Farrell, Yakeel T. Quiroz, Elizabeth C. Mormino, Rachel F. Buckley, Kathryn V. Papp, Rebecca A. Amariglio, Ilse Dewachter, Adrian Ivanoiu, Willem Huijbers, Trey Hedden, Gad A. Marshall, Jasmeer P. Chhatwal, Dorene M. Rentz, Reisa A. Sperling, and Keith Johnson. 2019. "Association of Amyloid and Tau with Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study." *JAMA Neurology* 915–24.
- Hardy, John and Richard Crook. 2001. "Presenilin Mutations Line up along Transmembrane  $\alpha$ -Helices." *Neuroscience Letters* 306:203–5.
- Hardy, John and Dennis J. Selkoe. 2002. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease : Progress and Problems on the Road to Therapeutics." *Science* 297(5580):353–56.

- Hashimoto, Toshihide, Akira Ishibashi, Hiroaki Hagiwara, Yoshiyuki Murata, Osamu Takenaka, and Takehiko Miyagawa. 2010. "E2012: A Novel Gamma-Secretase Modulator-Pharmacology Part." *Alzheimer's & Dementia* 6(4):S242.
- Hattori, Sayoko, Kenji Sakuma, Yosuke Wakutani, Kenji Wada, Masaru Shimoda, Katsuya Urakami, Hisanori Kowa, and Kenji Nakashima. 2004. "A Novel Presenilin 1 Mutation ( Y154N ) in a Patient with Early Onset Alzheimer ' s Disease with Spastic Paraparesis." *Neuroscience Letters* 368(3):319–22.
- Hayashi, Ikuo, Yasuomi Urano, Rie Fukuda, Noriko Isoo, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2004. "Selective Reconstitution and Recovery of Functional  $\gamma$ -Secretase Complex on Budded Baculovirus Particles." *The Journal of Biological Chemistry* 279(36):38040–46.
- He, Zhuohao, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Sneha Narasimhan, Hyesung Kim, Lakshmi Changolkar, Bin Zhang, Ronald J. Gathagan, Cuiyong Yue, Christopher Dengler, Anna Stieber, Magdalena Nitla, Douglas A. Coulter, Ted Abel, Kurt R. Brunden, John Q. Trojanowski, and Virginia M. Y. Lee. 2018. "Amyloid- $\beta$  Plaques Enhance Alzheimer's Brain Tau-Seeded Pathologies by Facilitating Neuritic Plaque Tau Aggregation." *Nature Medicine* 24(1):29–38.
- Heber, Sabine, Jochen Herms, Vladan Gajic, Johannes Hainfellner, Adriano Aguzzi, Thomas Ru, Hans Kretzschmar, Cornelia Von Koch, Sangram Sisodia, Phillippe Tremml, Hans-peter Lipp, David P. Wolfer, and Ulrike Mu. 2000. "Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members." *The Journal of N* 20(21):7951–63.
- Hebert, S. Sebastien, Lutgarde Serneels, Alexandra Tolia, Katleen Craessaerts, Carmen Derks, Mikhail A. Filippov, Ulrike Muller, and Bart De Strooper. 2006. "Regulated Intramembrane Proteolysis of Amyloid Precursor Protein and Regulation of Expression of Putative Target Genes." *EMBO Reports* 7(7):739–45.
- Hebert, Sebastien S., Lutgarde Serneels, Tim Dejaegere, Katrien Horre, Michal Dabrowski, Veerle Baert, Wim Annaert, Dieter Hartmann, and Bart De Strooper. 2004. "Coordinated and Widespread Expression of  $\gamma$ -Secretase in Vivo: Evidence for Size and Molecular Heterogeneity." *Neurobiology of Disease* 17(2):260–72.
- Heckmann, Bradley L., Brett J. W. Teubner, Bart Tummers, Emilio Boada-Romero, Lacie Harris, Mao Yang, Clifford S. Guy, Stanislav S. Zakharenko, and Douglas R. Green. 2019. "LC3-Associated Endocytosis Facilitates  $\beta$ -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease." *Cell* 178(3):536-551.e14.
- Heneka, Michael T., Markus P. Kummer, Andrea Stutz, Andrea Delekate, Stephanie Schwartz, Ana Vieira-Saecker, Angelika Griep, Daisy Axt, Anita Remus, Te Chen Tzeng, Ellen Gelpi, Annett Halle, Martin Korte, Eicke Latz, and Douglas T. Golenbock. 2013. "NLRP3 Is Activated in Alzheimer's Disease and Contributes to Pathology in APP/PS1 Mice." *Nature* 493(7434):674–78.
- Herms, Jochen, Brigitte Anliker, Sabine Heber, Sabine Ring, Martin Fuhrmann, Hans Kretzschmar, Sangram Sisodia, and Ulrike Mu. 2004. "Cortical Dysplasia Resembling Human Type 2 Lissencephaly in Mice Lacking All Three APP Family Members." *The EMBO Journal* 23(20):4106–15.
- Hernandez-Guillamon, Mar, Stephanie Mawhirt, Steven Blais, Joan Montaner, Thomas A. Neubert, Agueda Rostagno, and Jorge Ghiso. 2015. "Sequential Amyloid- $\beta$  Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9." *Journal of Biological Chemistry* 290(24):15078–91.



- Herreman, An, Geert Van Gassen, Mustapha Bentahir, Omar Nyabi, Katleen Craessaerts, and Ulrike Mueller. 2003. "γ-Secretase Activity Requires the Presenilin-Dependent Trafficking of Nicastrin through the Golgi Apparatus but Not Its Complex Glycosylation." *Journal of Cell Science* 116(6):1127–36.
- Herreman, An, Dieter Hartmann, Wim Annaert, Paul Saftig, Katleen Craessaerts, Lutgarde Serneels, Lieve Umans, Hugo Vanderstichele, Veerle Baekelandt, Ralf Dressel, Philippe Cupers, Vincent Schrijvers, Danny Huylebroeck, An Zwijsen, Fred Van Leuven, and Bart De Strooper. 1999. "Presenilin 2 Deficiency Causes a Mild Pulmonary Phenotype and No Changes in Amyloid Precursor Protein Processing but Enhances the Embryonic Lethal Phenotype of Presenilin 1 Deficiency." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(21):11872–77.
- Herreman, An, Lutgarde Serneels, Wim Annaert, Desiré Collen, Luc Schoonjans, and Bart De Strooper. 2000. "Total Inactivation of γ-Secretase Activity in Presenilin-Deficient Embryonic Stem Cells." *Nature Cell Biology* 2:461–62.
- Hickman, Suzanne E., Elizabeth K. Allison, and Joseph El Khoury. 2008. "Microglial Dysfunction and Defective β-Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice." *Journal of Neuroscience* 28(33):8354–60.
- Higaki, Jeffrey, Diana Quon, Ziyang Zhong, and Barbara Cordell. 1995. "Inhibition of β-Amyloid Formation Identifies Proteolytic Precursors and Subcellular Site of Catabolism." *Neuron* 14:651–59.
- Hilpert, Hans, Wolfgang Guba, Thomas J. Woltering, Wolfgang Wostl, Emmanuel Pinard, Harald Mauser, Alexander V. Mayweg, Mark Rogers-Evans, Roland Humm, Daniela Kruppenacher, Thorsten Muser, Christian Schnider, Helmut Jacobsen, Laurence Ozmen, Alessandra Bergadano, David W. Banner, Remo Hochstrasser, Andreas Kuglstatter, Pascale David-Pierson, Holger Fischer, Alessandra Polara, and Robert Narquizian. 2013. "β-Secretase (BACE1) Inhibitors with High in Vivo Efficacy Suitable for Clinical Evaluation in Alzheimer's Disease." *Journal of Medicinal Chemistry* 56(10):3980–95.
- Hoey, Sarah E., Robert J. Williams, and Michael S. Perkinton. 2009. "Synaptic NMDA Receptor Activation Stimulates α-Secretase Amyloid Precursor Protein Processing and Inhibits Amyloid-β Production." *The Journal of Neuroscience* 29(14):4442–60.
- Holmes, Clive, Delphine Boche, David Wilkinson, Ghasem Yadegarfar, Vivienne Hopkins, Anthony Bayer, Roy W. Jones, Roger Bullock, Seth Love, James W. Neal, Elina Zotova, and James A. R. Nicoll. 2008. "Long-Term Effects of Aβ42 Immunisation in Alzheimer's Disease: Follow-up of a Randomised, Placebo-Controlled Phase I Trial." *The Lancet* 372(9643):216–23.
- Holtzman, David M., Robert E. Pitas, Joshua Kilbridge, Britto Nathan, Robert W. Mahley, Guojun Bu, and Alan L. Schwartz. 1995. "Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Apolipoprotein E-Dependent Neurite Outgrowth in a Central Nervous System-Derived Neuronal Cell Line." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(21):9480–84.
- Honda, Kazuhiro, Mark A. Smith, Xiongwei Zhu, Diane Baus, William C. Merrick, Alan M. Tartakoff, Thomas Hattier, Peggy L. Harris, Sandra L. Siedlak, Hisashi Fujioka, Quan Liu, Paula I. Moreira, Frank P. Miller, Akihiko Nunomura, Shun Shimohama, and George Perry. 2005. "RIBOSOMAL RNA IN ALZHEIMER DISEASE IS OXIDIZED BY BOUND REDOX-ACTIVE IRON." *The Journal of Biological Chemistry* 280(22):20978–86.

- Hong, Lin, Gerald Koelsch, Xinli Lin, Shili Wu, Simon Terzyan, Arun K. Ghosh, Xuenjun C. Zhang, and Jordan Tang. 2000. "Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 ( $\beta$ -Secretase) Complexed with Inhibitor." *Science* 290(5489):150–53.
- Hong, Lin, Robert T. Turner, Gerald Koelsch, Dongoo Shin, Arun K. Ghosh, and Jordan Tang. 2002. "Crystal Structure of Memapsin 2 ( $\beta$ -Secretase) in Complex with an Inhibitor OM00-3." *Biochemistry* 41(36):10963–67.
- Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, George A. Carlson, Lorene M. Lanier, Li Lian Yuan, Karen H. Ashe, and Dezhi Liao. 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68(6):1067–81.
- Hsiao, Chien Chi, Frederik Rombouts, and Harrie J. M. Gijzen. 2019. "New Evolutions in the BACE1 Inhibitor Field from 2014 to 2018." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 29(6):761–77.
- Hu, Chen, Junjie Xu, Linlin Zeng, Ting Li, Mei-zhen Cui, and Xuemin Xu. 2017. "Pen-2 and Presenilin Are Sufficient to Catalyze Notch Processing." *Journal of Alzheimer's Disease* 56(4):1263–69.
- Hu, Jian, Yi Xue, Sangwon Lee, and Ya Ha. 2011. "The Crystal Structure of GXGD Membrane Protease FlaK." *Nature* 475:528–31.
- Hu, Jin, Chia Chen Liu, Xiao Fen Chen, Yun Wu Zhang, Huaxi Xu, and Guojun Bu. 2015. "Opposing Effects of Viral Mediated Brain Expression of Apolipoprotein E2 (ApoE2) and ApoE4 on ApoE Lipidation and A $\beta$  Metabolism in ApoE4-Targeted Replacement Mice." *Molecular Neurodegeneration* 10(6).
- Hudry, Eloise, Jonathan Dashkoff, Alysson D. Roe, Shuko Takeda, Robert M. Koffie, Tadafumi Hashimoto, Maria Scheel, Tara Spires-Jones, Michal Arbel-Ornath, Rebecca Betensky, Beverly L. Davidson, and Bradley T. Hyman. 2013. "Gene Transfer of Human Apoe Isoforms Results in Differential Modulation of Amyloid Deposition and Neurotoxicity in Mouse Brain." *Science Translational Medicine* 5(212).
- Hung, Shih-ya and Wen-mei Fu. 2017. "Drug Candidates in Clinical Trials for Alzheimer's Disease." *Journal of Biomedical Science* 1–12.
- Hung, Shih-ya, Wei-pang Huang, Houg-chi Liou, and Wen-mei Fu. 2015. "Neuropharmacology LC3 Overexpression Reduces A  $\beta$  Neurotoxicity through Increasing A7nAchR Expression and Autophagic Activity in Neurons and Mice." *Neuropharmacology* 93:243–51.
- Hunsberger, Holly C., Daniel S. Weitzner, Carolyn C. Rudy, James E. Hickman, Eric M. Libell, Rebecca R. Speer, Greg A. Gerhardt, and Miranda N. Reed. 2015. "Riluzole Rescues Glutamate Alterations, Cognitive Deficits, and Tau Pathology Associated with P301L Tau Expression." *Journal of Neurochemistry* 135(2):381–94.
- Hunter, Christopher A., Juswinder Singh, and Janet M. Thornton. 1991. "II-II Interactions: The Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins." *Journal of Molecular Biology* 218(4):837–46.
- Hureau, Christelle, Veronique Balland, Yannick Coppel, Pier Lorenzo-Solari, Emiliano Fonda, and Æ. Peter Faller. 2009. "Importance of Dynamical Processes in the Coordination Chemistry and Redox Conversion of Copper Amyloid- $\beta$  Complexes." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14(7):995–1000.

- Huynh, Tien Phat V., Albert A. Davis, Jason D. Ulrich, and David M. Holtzman. 2017. "Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: The Influence of Apolipoprotein E on Amyloid- $\beta$  and Other Amyloidogenic Proteins." *Journal of Lipid Research* 58(5):824–36.
- Hyde, Lynn A., Nansie A. Mchugh, Joseph Chen, Qi Zhang, Denise Manfra, Amin A. Nomeir, Hubert Josien, Thomas Bara, John W. Clader, Lili Zhang, Eric M. Parker, and Guy A. Higgins. 2006. "Studies to Investigate the in Vivo Therapeutic Window of the in the CRND8 Mouse." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319(3):1133–43.
- Iba, Michiyo, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, and Virginia M. Y. Lee. 2013. "Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-like Tauopathy." *Journal of Neuroscience* 33(3):1024–37.
- Ikeuchi, Takeshi, Hiroyuki Kaneko, Akinori Miyashita, Hiroaki Nozaki, Kensaku Kasuga, Tamao Tsukie, Miyuki Tsuchiya, Yuki Imamura, Hideki Ishizu, Kenji Aoki, Atsushi Ishikawa, Osamu Onodera, Ryoza Kuwano, and Masatoyo Nishizawa. 2008. "Mutational Analysis in Early-Onset Familial Dementia in the Japanese." *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 26:43–49.
- Ikeuchi, Takeshi and S. Sangram Sisoida. 2003. "The Notch Ligands , Delta1 and Jagged2 , Are Substrates For." *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):7751–55.
- Iliff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, G. Edward Vates, Rashid Deane, Steven A. Goldman, Erlend A. Nagelhus, and Maiken Nedergaard. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid  $\beta$ ." *Science Translational Medicine* 4(147):147ra111.
- Imai, So, Tetsuo Cai, Chika Yoshida, Taisuke Tomita, and Eugene Futai. 2018. "Specific Mutations in Presenilin 1 Cause Conformational Changes in  $\gamma$ -Secretase to Modulate Amyloid  $\beta$  Trimming." *The Journal of Biochemistry* 165(1):37–46.
- Imamura, Yuki, Naoto Watanabe, Naoki Umezawa, Takeshi Iwatsubo, Nobuki Kato, Taisuke Tomita, and Tsunehiko Higuchi. 2009. "Inhibition of Gamma-Secretase Activity by Helical Beta-Peptide Foldamers." *Journal of the American Chemical Society* 131(21):7353–59.
- Imbimbo, Bruno P. 2009. "Why Did Tarenflurbil Fail in Alzheimer's Disease?" *Journal of Alzheimer's Disease* 17(4):757–60.
- Inoue, Eiji, Maki Deguchi-tawarada, Aki Togawa, Chiyuki Matsui, Kohei Arita, Sayaka Katahira-tayama, Toshitaka Sato, Emiko Yamauchi, Yoshiya Oda, and Yoshimi Takai. 2009a. "Synaptic Activity Prompts  $\gamma$ -Secretase-Mediated Cleavage of EphA4 and Dendritic Spine Formation." *The Journal of Cell Biology* 185(3):551–64.
- Inoue, Eiji, Maki Deguchi-tawarada, Aki Togawa, Chiyuki Matsui, Kohei Arita, Sayaka Katahira-tayama, Toshitaka Sato, Emiko Yamauchi, Yoshiya Oda, and Yoshimi Takai. 2009b. "Synaptic Activity Prompts  $\gamma$ -Secretase-Mediated Cleavage of EphA4 and Dendritic Spine Formation." *The Journal of Cell Biology* 185(3):551–64.
- Isoo, Noriko, Chihiro Sato, Hiroyuki Miyashita, Mitsuru Shinohara, Nobumasa Takasugi, Yuichi Morohashi, Shoji Tsuji, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2007. "A $\beta$ 42 Overproduction Associated with Structural Changes in the Catalytic Pore of  $\gamma$ -Secretase: Common Effects of Pen-2 N-Terminal Elongation and Fenofibrate." *Journal of Biological Chemistry* 282(17):12388–96.

- Ivanov, Anton, Christophe Pellegrino, Sylvain Rama, Iryna Dumalska, Yuriy Salyha, Yehezkel Ben-Ari, and Igor Medina. 2006. "Opposing Role of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Regulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) Activity in Cultured Rat Hippocampal Neurons." *Journal of Physiology* 572(3):789–98.
- Iwatsubo, Takeshi, Asano Odaka, Nobuhiro Suzuki, and Hidehiro Mizusawa. 1994. "Visualization of A $\beta$ 42 (43) and A $\beta$ 40 in Senile Plaques with End-Specific A $\beta$  Monoclonals : Evidence That an Initially Deposited Species Is A $\beta$ 42 (43)." *Neuron* 13(43):45–53.
- Jack, Clifford R., Heather J. Wiste, Christopher G. Schwarz, Val J. Lowe, Matthew L. Senjem, Prashanthi Vemuri, Stephen D. Weigand, Terry M. Therneau, Dave S. Knopman, Jeffrey L. Gunter, David T. Jones, Jonathan Graff-Radford, Kejal Kantarci, Rosebud O. Roberts, Michelle M. Mielke, Mary M. MacHulda, and Ronald C. Petersen. 2018. "Longitudinal Tau PET in Ageing and Alzheimer's Disease." *Brain* 141(5):1517–28.
- Jacobsen, Helmut, Dieter Reinhardt, Manfred Brockhaus, Daniel Bur, Christine Kocyba, Hanspeter Kurt, Melissa G. Grim, Ralf Baumeister, and Hansruedi Loetscher. 1999. "The Influence of Endoproteolytic Processing of Familial Alzheimer's Disease Presenilin 2 on A $\beta$ 42 Amyloid Peptide Formation." *The EMBO Journal* 274(49):35233–39.
- Jamieson, Gordon A., Norman J. Maitland, Gordon K. Wilcock, John Craske, and Ruth F. Itzhaki. 1991. "Latent Herpes Simplex Virus Type 1 in Normal and Alzheimer's Disease Brains." *Journal of Medical Virology* 33(4):224–27.
- Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury. 1993. "Seeding One-Dimensional Crystallization of Amyloid - a Pathogenic Mechanism in Alzheimers-Disease and Scrapie." *Cell* 73(6):1055–58.
- Jawhar, Sadim, Oliver Wirths, Stephan Schilling, Sigrid Graubner, Hans Ulrich Demuth, and Thomas A. Bayer. 2011. "Overexpression of Glutaminyl Cyclase, the Enzyme Responsible for Pyroglutamate A $\beta$  Formation, Induces Behavioral Deficits, and Glutaminyl Cyclase Knock-out Rescues the Behavioral Phenotype in 5XFAD Mice." *Journal of Biological Chemistry* 286(6):4454–60.
- Jelley, Richard A., Jason Elliott, Karl R. Gibson, Timothy Harrison, Dirk Beher, Earl E. Clarke, Huw D. Lewis, and Jonathan D. J. Wrigley. 2006. "3-Substituted Gem -Cyclohexane Sulfone Based  $\gamma$  -Secretase Inhibitors for Alzheimer's Disease : Conformational Analysis and Biological Activity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16:3839–42.
- Jiang, Dianlu, Xiangjun Li, Lin Liu, Gargey B. Yagnik, and Feimeng Zhou. 2010. "Reaction Rates and Mechanism of the Ascorbic Acid Oxidation by Molecular Oxygen Facilitated by Cu (II) -Containing Amyloid- $\beta$  Complexes and Aggregates." *The Journal of Physical Chemistry* 114(14):4896–4903.
- Jiang, Qingguang, C. Y. Danie. Lee, Shweta Mandrekar, Brandy Wilkinson, Paige Cramer, Noam Zelcer, Karen Mann, Bruce Lamb, Timothy M. Willson, Jon L. Collins, Jill C. Richardson, Jonathan D. Smith, Thomas A. Comery, David Riddell, David M. Holtzman, Peter Tontonoz, and Gary E. Landreth. 2008. "ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of A $\beta$ ." *Neuron* 58(5):681–93.
- Jiang, Ying, Kerry A. Mullaney, Corrinne M. Peterhoff, Shaoli Che, Stephen D. Schmidt, and Anne Boyer-boiteau. 2010. "Alzheimer's-Related Endosome Dysfunction in Down Syndrome Is A $\beta$ -Independent but Requires APP

- and Is Reversed by BACE-1 Inhibition.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(4):1630–35.
- Jinno, Shozo, Kumiko Araki, Yuji Matsumoto, Yoo-hun Suh, and Tsuneyuki Yamamoto. 2009. “Selective Apoptosis Induction in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway by Exposure to CT105 , the C-Terminal Fragment of Alzheimer ’ s Amyloid Precursor Protein.” *Brain Research* 1249:68–78.
- Johansson, Patrik, Karin Kaspersson, Ian K. Gurrell, Elisabeth Bäck, Susanna Eketjäll, Clay W. Scott, Gvido Cebers, Philip Thorne, Michael J. McKenzie, Haydn Beaton, Paul Davey, Karin Kolmodin, Jörg Holenz, Mark E. Duggan, Samantha Budd Haeberlein, and Roland W. Bürli. 2018. “Toward  $\beta$ -Secretase-1 Inhibitors with Improved Isoform Selectivity.” *Journal of Medicinal Chemistry* 61(8):3491–3502.
- Jones, Teresa L. Z. 2004. “Role of Palmitoylation in RGS Protein Function.” *Methods in Enzymology* 389:33–55.
- Jonsson, Thorlakur, Jasvinder K. Atwal, Stacy Steinberg, Jon Snaedal, Palmi V. Jonsson, Sigurbjorn Bjornsson, Hreinn Stefansson, Patrick Sulem, Daniel Gudbjartsson, Janice Maloney, Kwame Hoyte, Amy Gustafson, Yichin Liu, Yanmei Lu, Tushar Bhangale, Robert R. Graham, Johanna Huttenlocher, Gyda Bjornsdottir, Ole A. Andreassen, Erik G. Jonsson, Aarno Palotie, Timothy W. Behrens, Olafur T. Magnusson, Augustine Kong, Unnur Thorsteinsdottir, Ryan J. Watts, and Kari Stefansson. 2012. “A Mutation in APP Protects against Alzheimer’s Disease and Age-Related Cognitive Decline.” *Nature* 488(7409):96.
- Jose´ L. Castro, Ian Churcher, Dunmow Gb, Alexander Richard, Cambourne Gb, Great Dunmow Gb, Terlings Park, Eastwick Road, Andrew Madin, Alan John Nadin, Sawbridgeworth Gb, Andrew Pate, Huntington Gb, Jason Sparey, London Gb, Richard Teall, Stortford Gb, Susannah Williams, and Terlings Park. 2004. “BENZODIAZEPINE DERIVATIVES AS APP MODULATORS.” 1(19).
- Jozwiak, Krzysztof, Cezary Zekanowski, and Slawomir Filipek. 2006. “Linear Patterns of Alzheimer’s Disease Mutations along a -Helices of Presenilins as a Tool for PS-1 Model Construction.” *Journal of Neurochemistry* 98(5):1560–72.
- Jun, Sangmi, Joel R. Gillespie, Byong-kyu Shin, and Sunil Saxena. 2009. “The Second Cu (II) -Binding Site in a Proton-Rich Environment Interferes with the Aggregation of Amyloid- $\beta$  (1-40) into Amyloid Fibrils.” *Biochemistry* 48(45):10724–32.
- Jung, Joo In, Thomas B. Ladd, Thomas Kukar, Ashleigh R. Price, Brenda D. Moore, Edward H. Koo, Todd E. Golde, and Kevin M. Felsenstein. 2013. “Steroids as  $\gamma$ -Secretase Modulators.” *FASEB Journal* 27(9):3775–85.
- Jung, Joo In, Ashleigh R. Price, Thomas B. Ladd, Yong Ran, Hyo-Jin Park, Carolina Ceballos-Diaz, Lisa A. Smithson, Günther Hochhaus, Yufei Tang, Rajender Akula, Saritha Ba, Edward H. Koo, Gideon Shapiro, Kevin M. Felsenstein, and Todd E. Golde. 2015. “Cholestenic Acid, an Endogenous Cholesterol Metabolite, Is a Potent  $\gamma$ -Secretase Modulator.” *Molecular Neurodegeneration* 10:29.
- Jurisch-Yaksi, Nathalie, Applonia J. Rose, Huiqi Lu, Tim Raemaekers, Sebastian Munck, Pieter Baatsen, Veerle Baert, Wendy Vermeire, Suzie J. Scales, Daphne Verleyen, Roel Vandepoel, Przemko Tylzanowski, Emre Yaksi, Thomy de Ravel, H. Joseph Yost, Guy Froyen, Cammon B. Arrington, and Wim Annaert. 2013. “Rer1p Maintains Ciliary Length and Signaling by Regulating  $\gamma$ -Secretase Activity and Foxj1a Levels.” *Journal of Cell Biology* 200(6):709–20.

- K. Lorent, L. Overbergh, D. Moechars, B. de Strooper, F. van Leuven, H. van den Berghe. 1995. "Expression in Mouse Embryos and in Adult Mouse Brain of Three Members of the Amyloid Precursor Protein Family, of the Alpha-2-Macroglobulin Receptorlow Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and of Its Ligands Apolipoprotein E, Lipoprotein Lipase, A." *Neuroscience* 65(4):1009–25.
- Kaether, Christoph, Anja Capell, Edith Winkler, Bozidar Novak, Harald Steiner, and Christian Haass. 2004. "The Presenilin C-Terminus Is Required and c-Secretase Activity." *The EMBO Journal* 23(24):4738–48.
- Kanatsu, Kunihiko, Yuichi Morohashi, Mai Suzuki, Hiromasa Kuroda, Toshio Watanabe, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2014. "Decreased CALM Expression Reduces A $\beta$ 42 to Total A $\beta$  Ratio through Clathrin-Mediated Endocytosis of  $\gamma$ -Secretase." *Nature Communications* 5(3386):1–12.
- Kanatsu, Kunihiko and Taisuke Tomita. 2016. "Membrane Trafficking and Proteolytic Activity of  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's Disease." *Biological Chemistry* 397(9):827–35.
- Kang, Jie, Hans-Georg Lemaire, Axel Unterbeck, J. Michael. Salbaum, Colin L. Masters, Karl-Heinz Grzeschik, Gerd Multhaup, Konrad Beyreuther, and Benno Muller-Hill. 1987. "The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor.Pdf." *Nature* 325(6106):733–36.
- Karlin, Arthur and Myles H. Akabas. 1998. "Substituted-Cysteine Accessibility Method." *Methods in Enzymology* 293(1986):123–45.
- Keskitalo, Salla, Melinda Farkas, Michael Hanenberg, Anita Szodorai, Luka Kulic, Alexander Semmler, Michael Weller, Roger M. Nitsch, and Michael Linnebank. 2014. "Reciprocal Modulation of A $\beta$ 42 Aggregation by Copper and Homocysteine." *Frontiers in Aging Neuroscience* 6(237):1–10.
- Khalifa, Naouel Ben, Donatienne Tyteca, Claudia Marinangeli, Mathieu Depuydt, Pierre J. Courtoy, Jean-christophe Renauld, Stefan Constantinescu, and Pascal Kienlen-campard. 2012. "Structural Features of the KPI Domain Control APP Dimerization , Trafficking , and Processing." *FASEB Journal* 26(2):1–14.
- El Khoury, Joseph, Michelle Toft, Suzanne E. Hickman, Terry K. Means, Kinya Terada, Changiz Geula, and Andrew D. Luster. 2007. "Ccr2 Deficiency Impairs Microglial Accumulation and Accelerates Progression of Alzheimer-like Disease." *Nature Medicine* 13(4):432–38.
- Kim, Doo Yeon, Laura A. Mackenzie Ingano, and Dora M. Kovacs. 2002. "Nectin-1, an Immunoglobulin-like Receptor Involved in the Formation of Synapses , Is a Substrate for Presenilin / $\gamma$ -Secretase-like Cleavage." *The Journal of Biological Chemistry* 277(51):49976–81.
- Kim, Hee-Jeong, Yoo-Hun Suh, Mun-Han Lee, and Pan-Dong Ryu. 1999. "Cation Selective Channels Formed by a Cterminal Fragment of Amyloid Precursor Protein." *Neuroreport* 10(7):1427–31.
- Kim, J., L. Onstead, S. Randle, R. Price, L. Smithson, C. Zwizinski, D. W. Dickson, T. Golde, and E. McGowan. 2007. "A 40 Inhibits Amyloid Deposition In Vivo." *Journal of Neuroscience* 27(3):627–33.
- Kim, Jinoh, Bertrand Kleizen, Regina Choy, Gopal Thinakaran, Sangram S. Sisodia, and Randy W. Schekman. 2007. "Biogenesis of  $\gamma$ -Secretase Early in the Secretory Pathway." *Journal of Cell Biology* 179(5):951–63.
- Kim, Seong-hun, Takeshi Ikeuchi, Chunjiang Yu, and Sangram S. Sisodia. 2003. "Regulated Hyperaccumulation of Presenilin-1 and the ' $\gamma$ -Secretase' Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 278(36):33992–2.
- Kim, Seong-hun and Sangram S. Sisodia. 2005. "Evidence That the 'NF' Motif in Transmembrane Domain 4 of Presenilin 1 Is Critical for Binding with PEN-2." *The Journal of Biological Chemistry* 280(51):41953–66.

- Kim, Seong-hun and Yoo-hun Suh. 1996. "Neurotoxicity of a Carboxyl-Terminal Fragment of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein." *Journal of Neurochemistry* 67(3):1172–82.
- Kim, Seong-hun, Ye Ingrid Yin, Yue-ming Li, and Sangram S. Sisodia. 2004. "Evidence That Assembly of an Active  $\gamma$ -Secretase Complex Occurs in the Early Compartments of the Secretory Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 279(47):48615–19.
- Kim, Tae-wan, Warren H. Pettingell, Olivia G. Hallmark, Robert D. Moir, Wilma Wasco, and Rudolph E. Tanzi. 1997. "Endoproteolytic Cleavage and Proteasomal Degradation of Presenilin 2 in Transfected Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 272(17):11006–10.
- Kim, Tae-wan, Warren H. Pettingell, Yong-keun Jung, Dora M. Kovacs, and Rudolph E. Tanzi. 1997. "Alternative Cleavage of Alzheimer-Associated Presenilins During Apoptosis by a Caspase-3 Family Protease." *Science* 277(5324):373–76.
- Kimberly, W. Taylor, Jessica B. Zheng, Suzanne Y. Gue, and Dennis J. Selkoe. 2001. "The Intracellular Domain of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner." *The Journal of Biological Chemistry* 276(43):40288–92.
- Kitamura, Toshio, Yuko Koshino, Fumi Shibata, Toshihiko Oki, Hideki Nakajima, Tetsuya Nosaka, and Hidetoshi Kumagai. 2003. "Retrovirus-Mediated Gene Transfer and Expression Cloning : Powerful Tools in Functional Genomics." *Experimental Hematology* 31(11):1007–14.
- Kizuka, Yasuhiko, Shinobu Kitazume, Reiko Fujinawa, Takashi Saito, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. Saido, Miyako Nakano, Yoshiki Yamaguchi, Yasuhiro Hashimoto, Matthias Staufenbiel, Hiroyuki Hatsuta, Shigeo Murayama, Hiroshi Manya, Tamao Endo, and Naoyuki Taniguchi. 2015. "An Aberrant Sugar Modification of BACE 1 Blocks Its Lysosomal Targeting in Alzheimer's Disease." *EMBO Molecular Medicine* 7(2):175–89.
- Kizuka, Yasuhiko, Shinobu Kitazume, and Naoyuki Taniguchi. 2017. "N-Glycan and Alzheimer's Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- Klafkia, Hans-w, Paolo A. Paganettib, Bernd Sommera, and Matthias Staufenbiela. 1995. "Calpain Inhibitor I Decreases PA4 Secretion from Human Embryonal Kidney Cells Expressing  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Carrying the APP670/ 671 Double Mutation." *Neuroscience Letters* 201:29–32.
- Knappenberger, Katharine S., Gaochao Tian, Xiaomei Ye, Cynthia Sobotka-briner, Smita V Ghanekar, Barry D. Greenberg, and Clay W. Scott. 2004. "Mechanism of  $\gamma$ -Secretase Cleavage Activation : Is  $\gamma$ -Secretase Regulated through Autoinhibition Involving the Presenilin-1 Exon 9 Loop ?" *Biochemistry* 43(20):6208–18.
- Kobayashi, Tomonori, Seiji Iwama, Akira Fusano, Yoshihiro Kato, and Atsushi Ikeda. 2014. "Design and Synthesis of an Aminopiperidine Series of  $\gamma$ -Secretase Modulators." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24(1):378–81.
- Koh, Jae-young, Linda L. Yang, and Carl W. Cotman. 1990. " $\beta$ -Amyloid Protein Increases the Vulnerability of Cultured Cortical Neurons to Excitotoxic Damage." *Brain Research* 533(2):315–20.
- Kong, Ren, Shan Chang, Weiming Xia, and Stephen T. C. Wong. 2015. "Molecular Dynamics Simulation Study Reveals Potential Substrate Entry Path into  $\gamma$ -Secretase/Presenilin-1." *Journal of Structural Biology* 191(2):120–29.

- Kopan, Raphael and Alison Goate. 2002. "Aph-2/Nicastrin: An Essential Component of  $\gamma$ -Secretase and Regulator of Notch Signaling and Presenilin Localization." *Neuron* 33(3):321–24.
- Kornilova, Anna Y., Jennifer Kim, Hanna Laudon, and Michael S. Wolfe. 2006. "Deducing the Transmembrane Domain Organization of Presenilin-1 in  $\gamma$ -Secretase by Cysteine Disulfide Cross-Linking." *Biochemistry* 45(24):7598–7604.
- Kounnas, Maria Z., Anne M. Danks, Soan Cheng, Curtis Tyree, Elizabeth Ackerman, Xulun Zhang, Kwangwook Ahn, Phuong Nguyen, Dan Comer, Long Mao, Chengzhi Yu, David Pleynet, Paul J. Digregorio, Gonul Velicelebi, Kenneth A. Stauderman, William T. Comer, William C. Mobley, Yue-Ming Li, Sangram S. Sisodia, Rudolph E. Tanzi, and Steven L. Wagner. 2010. "Modulation of  $\gamma$ -Secretase Reduces  $\beta$ -Amyloid Deposition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neuron*. 67(5):769–80.
- Kretner, Benedikt, Akio Fukumori, Peer Hendrik Kuhn, Blanca Isabel Pérez-Revuelta, Stefan F. Lichtenthaler, Christian Haass, and Harald Steiner. 2013. "Important Functional Role of Residue x of the Presenilin GxGD Protease Active Site Motif for APP Substrate Cleavage Specificity and Substrate Selectivity of  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Neurochemistry* 125(1):144–56.
- Kuentzel, Sandra L., Shujath M. Ali, Richard A. Altman, Barry D. Greenberg, and Thomas J. Raub. 1993. "The Alzheimer  $\beta$ -Amyloid Protein Precursor / Protease Nexin-L1 Is Cleaved by Secretase in a Trans-Golgi Secretory Compartment in Human Neuroglioma." *Biochemical Journal* 295:367–78.
- Kühlbrandt, Werner. 2014. "The Resolution Revolution." *Science* 343(6178):1443–44.
- Kukar, Thomas L., Thomas B. Ladd, Maralyssa A. Bann, Patrick C. Fraering, Rajeshwar Narlawar, Ghulam M. Maharvi, Brent Healy, Robert Chapman, Alfred T. Welzel, Robert W. Price, Brenda Moore, Vijayaraghavan Rangachari, Bernadette Cusack, Jason Eriksen, Karen Jansen-West, Christophe Verbeeck, Debra Yager, Christopher Eckman, Wenjuan Ye, Sarah Sagi, Barbara A. Cottrell, Justin Torpey, Terrone L. Rosenberry, Abdul Fauq, Michael S. Wolfe, Boris Schmidt, Dominic M. Walsh, Edward H. Koo, and Todd E. Golde. 2008. "Substrate-Targeting  $\gamma$ -Secretase Modulators." *Nature* 453(7197):925–29.
- Kukar, Thomas, Sonya Prescott, Jason L. Eriksen, Vallie Holloway, Paul Murphy, Edward H. Koo, Todd E. Golde, and Michelle M. Nicolle. 2007. "Chronic Administration of R-Flurbiprofen Attenuates Learning Impairments in Transgenic Amyloid Precursor Protein Mice." *BMC Neuroscience* 54(8):1–12.
- Kumalo, H. M. and Mahmoud E. Soliman. 2016. "A Comparative Molecular Dynamics Study on BACE1 and BACE2 Flap Flexibility." *Journal of Receptors and Signal Transduction* 36(5):505–14.
- Kumar, Deepak Kumar Vijaya, Hoon Se Choi, Kevin J. Washicosky, William A. Eimer, Stephanie Tucker, Jessica Ghofrani, Aaron Lefkowitz, Gawain McColl, Lee E. Goldstein, Rudolph E. Tanzi, and Robert D. Moir. 2016. "Amyloid- $\beta$  Peptide Protects against Microbial Infection in Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease." *Science Translational Medicine* 8(340):340ra72.
- Kumar, Devendra, Ankit Ganeshpurkar, Dileep Kumar, Gyan Modi, Sanjeev Kumar Gupta, and Sushil Kumar Singh. 2018. "Secretase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Long Road Ahead." *European Journal of Medicinal Chemistry* 148:436–52.
- Kunkle, Brian W., Benjamin Grenier-Boley, Rebecca Sims, Joshua C. Bis, Vincent Damotte, Adam C. Naj, Anne Boland, Maria Vronskaya, Sven J. van der Lee, Alexandre Amlie-Wolf, Céline Bellenguez, Aura Frizzatti,



Vincent Chouraki, Eden R. Martin, Kristel Slegers, Nandini Badarinarayan, Johanna Jakobsdottir, Kara L. Hamilton-Nelson, Sonia Moreno-Grau, Robert Olaso, Rachel Raybould, Yuning Chen, Amanda B. Kuzma, Mikko Hiltunen, Taniesha Morgan, Shahzad Ahmad, Badri N. Vardarajan, Jacques Epelbaum, Per Hoffmann, Merce Boada, Gary W. Beecham, Jean Guillaume Garnier, Denise Harold, Annette L. Fitzpatrick, Otto Valladares, Marie Laure Moutet, Amy Gerrish, Albert V. Smith, Liming Qu, Delphine Bacq, Nicola Denning, Xueqiu Jian, Yi Zhao, Maria Del Zompo, Nick C. Fox, Seung Hoan Choi, Ignacio Mateo, Joseph T. Hughes, Hieab H. Adams, John Malamon, Florentino Sanchez-Garcia, Yogen Patel, Jennifer A. Brody, Beth A. Dombroski, Maria Candida Deniz Naranjo, Makrina Daniilidou, Gudny Eiriksdottir, Shubhabrata Mukherjee, David Wallon, James Uphill, Thor Aspelund, Laura B. Cantwell, Fabienne Garzia, Daniela Galimberti, Edith Hofer, Mariusz Butkiewicz, Bertrand Fin, Elio Scarpini, Chloe Sarnowski, Will S. Bush, Stéphane Meslage, Johannes Kornhuber, Charles C. White, Yuenjoo Song, Robert C. Barber, Sebastiaan Engelborghs, Sabrina Sordon, Dina Voijnovic, Perrie M. Adams, Rik Vandenberghe, Manuel Mayhaus, L. Adrienne Cupples, Marilyn S. Albert, Peter P. De Deyn, Wei Gu, Jayanadra J. Himali, Duane Beekly, Alessio Squassina, Annette M. Hartmann, Adelina Orellana, Deborah Blacker, Eloy Rodriguez-Rodriguez, Simon Lovestone, Melissa E. Garcia, Rachelle S. Doody, Carmen Munoz-Fernandez, Rebecca Sussams, Honghuang Lin, Thomas J. Fairchild, Yolanda A. Benito, Clive Holmes, Hata Karamujić-Čomić, Matthew P. Frosch, Hakan Thonberg, Wolfgang Maier, Gena Roschupkin, Bernardino Ghetti, Vilmantas Giedraitis, Amit Kawalia, Shuo Li, Ryan M. Huebinger, Lena Kilander, Susanne Moebus, Isabel Hernández, M. Ilyas Kamboh, Rose Marie Brundin, James Turton, Qiong Yang, Mindy J. Katz, Letizia Concari, Jenny Lord, Alexa S. Beiser, C. Dirk Keene, Seppo Helisalme, Iwona Kloszewska, Walter A. Kukull, Anne Maria Koivisto, Aoibhinn Lynch, Lluís Tarraga, Eric B. Larson, Annakaisa Haapasalo, Brian Lawlor, Thomas H. Mosley, Richard B. Lipton, Vincenzo Solfrizzi, Michael Gill, W. T. Longstreth, Thomas J. Montine, Vincenza Frisardi, Monica Diez-Fairen, Fernando Rivadeneira, Ronald C. Petersen, Vincent Deramecourt, Ignacio Alvarez, Francesca Salani, Antonio Ciaramella, Eric Boerwinkle, Eric M. Reiman, Nathalie Fievet, Jerome I. Rotter, Joan S. Reisch, Olivier Hanon, Chiara Cupidi, A. G. Andre Uitterlinden, Donald R. Royall, Carole Dufouil, Raffaele Giovanni Maletta, Itziar de Rojas, Mary Sano, Alexis Brice, Roberta Cecchetti, Peter St George-Hyslop, Karen Ritchie, Magda Tsolaki, Debby W. Tsuang, Bruno Dubois, David Craig, Chuang Kuo Wu, Hilikka Soininen, Despoina Avramidou, Roger L. Albin, Laura Fratiglioni, Antonia Germanou, Liana G. Apostolova, Lina Keller, Maria Koutroumani, Steven E. Arnold, Francesco Panza, Olympia Gkatzima, Sanjay Asthana, Didier Hannequin, Patrice Whitehead, Craig S. Atwood, Paolo Caffarra, Harald Hampel, Inés Quintela, Ángel Carracedo, Lars Lannfelt, David C. Rubinsztein, Lisa L. Barnes, Florence Pasquier, Lutz Frölich, Sandra Barral, Bernadette McGuinness, Thomas G. Beach, Janet A. Johnston, James T. Becker, Peter Passmore, Eileen H. Bigio, Jonathan M. Schott, Thomas D. Bird, Jason D. Warren, Bradley F. Boeve, Michelle K. Lupton, James D. Bowen, Petra Proitsi, Adam Boxer, John F. Powell, James R. Burke, John S. K. Kauwe, Jeffrey M. Burns, Michelangelo Mancuso, Joseph D. Buxbaum, Ubaldo Bonuccelli, Nigel J. Cairns, Andrew McQuillin, Chuanhai Cao, Gill Livingston, Chris S. Carlson, Nicholas J. Bass, Cynthia M. Carlsson, John Hardy, Regina M. Carney, Jose Bras, Minerva M. Carrasquillo, Rita Guerreiro, Mariet Allen, Helena C. Chui, Elizabeth Fisher, Carlo Masullo, Elizabeth A. Crocco, Charles DeCarli, Gina Bisceglia, Malcolm Dick, Li Ma, Ranjan Duara, Neill R.

Graff-Radford, Denis A. Evans, Angela Hodges, Kelley M. Faber, Martin Scherer, Kenneth B. Fallon, Matthias Riemenschneider, David W. Fardo, Reinhard Heun, Martin R. Farlow, Heike Kölsch, Steven Ferris, Markus Leber, Tatiana M. Foroud, Isabella Heuser, Douglas R. Galasko, Ina Giegling, Marla Gearing, Michael Hüll, Daniel H. Geschwind, John R. Gilbert, John Morris, Robert C. Green, Kevin Mayo, John H. Growdon, Thomas Feulner, Ronald L. Hamilton, Lindy E. Harrell, Dmitriy Drichel, Lawrence S. Honig, Thomas D. Cushion, Matthew J. Huentelman, Paul Hollingworth, Christine M. Hulette, Bradley T. Hyman, Rachel Marshall, Gail P. Jarvik, Alun Meggy, Erin Abner, Georgina E. Menzies, Lee Way Jin, Ganna Leonenko, Luis M. Real, Gyungah R. Jun, Clinton T. Baldwin, Detelina Grozeva, Anna Karydas, Giancarlo Russo, Jeffrey A. Kaye, Ronald Kim, Frank Jessen, Neil W. Kowall, Bruno Vellas, Joel H. Kramer, Emma Vardy, Frank M. LaFerla, Karl Heinz Jöckel, James J. Lah, Martin Dichgans, James B. Leverenz, David Mann, Allan I. Levey, Stuart Pickering-Brown, Andrew P. Lieberman, Norman Klopp, Kathryn L. Lunetta, H. Erich Wichmann, Constantine G. Lyketsos, Kevin Morgan, Daniel C. Marson, Kristelle Brown, Frank Martiniuk, Christopher Medway, Deborah C. Mash, Markus M. Nöthen, Eliezer Masliah, Nigel M. Hooper, Wayne C. McCormick, Antonio Daniele, Susan M. McCurry, Anthony Bayer, Andrew N. McDavid, John Gallacher, Ann C. McKee, Hendrik van den Bussche, Marsel Mesulam, Carol Brayne, Bruce L. Miller, Steffi Riedel-Heller, Carol A. Miller, Joshua W. Miller, Ammar Al-Chalabi, John C. Morris, Christopher E. Shaw, Amanda J. Myers, Jens Wiltfang, Sid O'Bryant, John M. Olichney, Victoria Alvarez, Joseph E. Parisi, Andrew B. Singleton, Henry L. Paulson, John Collinge, William R. Perry, Simon Mead, Elaine Peskind, David H. Cribbs, Martin Rossor, Aimee Pierce, Natalie S. Ryan, Wayne W. Poon, Benedetta Nacmias, Huntington Potter, Sandro Sorbi, Joseph F. Quinn, Eleonora Sacchinelli, Ashok Raj, Gianfranco Spalletta, Murray Raskind, Carlo Caltagirone, Paola Bossù, Maria Donata Orfei, Barry Reisberg, Robert Clarke, Christiane Reitz, A. David Smith, John M. Ringman, Donald Warden, Erik D. Roberson, Gordon Wilcock, Ekaterina Rogaeva, Amalia Cecilia Bruni, Howard J. Rosen, Maura Gallo, Roger N. Rosenberg, Yoav Ben-Shlomo, Mark A. Sager, Patrizia Mecocci, Andrew J. Saykin, Pau Pastor, Michael L. Cuccaro, Jeffery M. Vance, Julie A. Schneider, Lori S. Schneider, Susan Slifer, William W. Seeley, Amanda G. Smith, Joshua A. Sonnen, Salvatore Spina, Robert A. Stern, Russell H. Swerdlow, Mitchell Tang, Rudolph E. Tanzi, John Q. Trojanowski, Juan C. Troncoso, Vivianna M. Van Deerlin, Linda J. Van Eldik, Harry V. Vinters, Jean Paul Vonsattel, Sandra Weintraub, Kathleen A. Welsh-Bohmer, Kirk C. Wilhelmsen, Jennifer Williamson, Thomas S. Wingo, Randall L. Woltjer, Clinton B. Wright, Chang En Yu, Lei Yu, Yasaman Saba, Alberto Pilotto, Maria J. Bullido, Oliver Peters, Paul K. Crane, David Bennett, Paola Bosco, Eliecer Coto, Virginia Boccardi, Phil L. De Jager, Alberto Lleo, Nick Warner, Oscar L. Lopez, Martin Ingelsson, Panagiotis Deloukas, Carlos Cruchaga, Caroline Graff, Rhian Gwilliam, Myriam Fornage, Alison M. Goate, Pascual Sanchez-Juan, Patrick G. Kehoe, Najaf Amin, Nilifur Ertekin-Taner, Claudine Berr, Stéphanie Debette, Seth Love, Lenore J. Launer, Steven G. Younkin, Jean Francois Dartigues, Chris Corcoran, M. Arfan Ikram, Dennis W. Dickson, Gael Nicolas, Dominique Champion, Jo Ann Tschanz, Helena Schmidt, Hakon Hakonarson, Jordi Clarimon, Ron Munger, Reinhold Schmidt, Lindsay A. Farrer, Christine Van Broeckhoven, Michael C. O'Donovan, Anita L. DeStefano, Lesley Jones, Jonathan L. Haines, Jean Francois Deleuze, Michael J. Owen, Vilmundur Gudnason, Richard Mayeux, Valentina Escott-Price, Bruce M. Psaty, Alfredo Ramirez, Li San Wang, Agustin Ruiz, Cornelia M. van Duijn, Peter A. Holmans,

- Sudha Seshadri, Julie Williams, Phillippe Amouyel, Gerard D. Schellenberg, Jean Charles Lambert, and Margaret A. Pericak-Vance. 2019. "Genetic Meta-Analysis of Diagnosed Alzheimer's Disease Identifies New Risk Loci and Implicates A $\beta$ , Tau, Immunity and Lipid Processing." *Nature Genetics* 51(3):414–30.
- Kuzuya, Akira, Katarzyna M. Zoltowska, Kathryn L. Post, Muriel Arimon, Xuejing Li, Sarah Svirsky, Masato Maesako, Alona Muzikansky, Vivek Gautam, Dora Kovacs, Bradley T. Hyman, and Oksana Berezovska. 2016. "Identification of the Novel Activity-Driven Interaction between Synaptotagmin 1 and Presenilin 1 Links Calcium , Synapse , and Amyloid Beta." *BMC Biology* 1–24.
- Kwok, John B. J., Glenda M. Halliday, William S. Brooks, Georgia Dolios, Hanna Laudon, Ohoshi Murayama, Marianne Hallupp, Renee F. Badenhop, James Vickers, Rong Wang, Jan Naslund, Akihiko Takashima, Samuel E. Gandy, and Peter R. Schofield. 2003. "Presenilin-1 Mutation L271V Results in Altered Exon 8 Splicing and Alzheimer's Disease with Non-Cored Plaques and No Neuritic Dystrophy." *The Journal of Biological Chemistry* 278(9):6748–54.
- Lah, James J., Craig J. Heilman, Norman R. Nash, Howard D. Rees, Hong Yi, Scott E. Counts, and Allan I. Levey. 1997. "Light and Electron Microscopic Localization of Presenilin-1 in Primate Brain." *The Journal of Neuroscience* 17(6):1971–80.
- Lahiri, Debomoy K., Bryan Maloney, Justin M. Long, and Nigel H. Greig. 2014. "Lessons from a BACE1 Inhibitor Trial: Off-Site but Not off Base." *Alzheimer's and Dementia* 10(5):S411–19.
- Lambert, MP., AK. Barlow, BA. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, KL Viola, P. Wals, C. Zhang, CE. Finch, GA Krafft, and WL Klein. 1998. "Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from A $\beta$ 1 – 42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):6448–53.
- Lammich, Sven, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Christoph Kaether, Anja Capell, Ann-katrin Zimmer, Dieter Edbauer, Jochen Walter, Harald Steiner, and Christian Haass. 2002. "Presenilin-Dependent Intramembrane Proteolysis of CD44 Leads to the Liberation of Its Intracellular Domain and the Secretion of an A $\beta$ -like Peptide." *The Journal of Biological Chemistry* 277(47):44754–59.
- Landman, Natalie, Soon Youn Jeong, Sun Young Shin, Sergey V. Voronov, Geo Serban, Min Suk Kang, Myung Kyu Park, Gilbert Di Paolo, Sungkwon Chung, and Tae Wan Kim. 2006. "Presenilin Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease Cause an Imbalance in Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(51):19524–29.
- Lanz, Thomas A., John D. Hosley, Wade J. Adams, and Kalpana M. Merchant. 2004. "Studies of A $\beta$  Pharmacodynamics in the Brain, Cerebrospinal Fluid, and Plasma in Young (Plaque-Free) Tg2576 Mice Using the  $\gamma$ -Secretase Inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-Difluorophenyl)-2-Hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-Methyl-6-Oxo-6,7-Dihydro-5H-Dibenzo[b,d]Azepin-." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309(1):49–55.
- Lanz, Thomas A., Michael J. Karmilowicz, Kathleen M. Wood, Nikolay Pozdnyakov, Ping Du, Mary A. Piotrowski, Tracy M. Brown, Charles E. Nolan, Karl E. G. Richter, James E. Finley, Qing Fei, Charles F. Ebbinghaus, Yuhpyng L. Chen, Douglas K. Spracklin, Barbara Tate, Kieran F. Geoghegan, Lit-fui Lau, David D. Auperin, and Joel B. Schachter. 2006. "Concentration-Dependent Modulation of Amyloid- $\beta$  in Vivo and in Vitro Using

- the  $\gamma$ -Secretase Inhibitor, LY-450139." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319(2):924–33.
- Larner, A. J. and D. G. Du Plessis. 2003. "Early-Onset Alzheimer's Disease with Presenilin-1 M139V Mutation: Clinical, Neuropsychological and Neuropathological Study." *European Journal of Neurology* 10(3):319–23.
- Larson, Megan, Mathew A. Sherman, Fatou Amar, Mario Nuvolone, Julie A. Schneider, David A. Bennett, Adriano Aguzzi, and Sylvain E. Lesne. 2012. "The Complex PrPc-Fyn Couples Human Oligomeric A $\beta$  with Pathological Tau Changes in Alzheimer's Disease." *The Journal of Neuroscience* 32(47):16857–71.
- Laudon, Hanna, Emil M. Hansson, Karin Mele, Anna Bergman, Mark R. Farmery, Bengt Winblad, Urban Lendahl, Gunnar Von Heijne, and Jan Na. 2005. "A Nine-Transmembrane Domain Topology for Presenilin 1." *The Journal of Biological Chemistry* 280(42):35352–60.
- Laudon, Hanna, Helena Karlstro, Paul M. Mathews, Mark R. Farmery, Samuel E. Gandy, Johan Lundkvist, Urban Lendahl, and Jan Na. 2004. "Functional Domains in Presenilin 1." *The Journal of Biological Chemistry* 279(23):23925–32.
- LaVoie, Matthew J. and Dennis J. Selkoe. 2003. "The Notch Ligands , Jagged and Delta , Are Sequentially Processed by  $\gamma$ -Secretase and Presenilin /  $\gamma$ -Secretase and Release Signaling Fragments." *The Journal of Biological Chemistry* 278(36):34427–37.
- Lazarov, Vlado K., Patrick C. Fraering, Wenjuan Ye, Michael S. Wolfe, Dennis J. Selkoe, and Huilin Li. 2006. "Electron Microscopic Structure of Purified , Active  $\gamma$ -Secretase Reveals an Aqueous Intramembrane Chamber and Two Pores." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(18):6889–94.
- Lee, Ji Young, Zhiwei Feng, Xiang-Qun Xie, and Ivet Bahar. 2017. "Allosteric Modulation of Intact  $\gamma$ -Secretase Structural Dynamics." *Biophysical Journal* 113(12):2634–49.
- Lee, Ju-hyun, Mary Kate Mcbrayer, M. Devin Wolfe, Claire H. Mitchell, Emyr Llioyd-Evans, and Ralph A. Nixon. 2015. "Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca<sup>2+</sup> Homeostasis via TRPML1 by Regulating VATPase-Mediated Lysosome Acidification." *Cell Reports* 12(9):1430–44.
- Lee, Ju-hyun, W. Haung Yu, Asok Kumar, Sooyeon Lee, Panaiyur S. Mohan, Corrinne M. Peterhoff, Devin M. Wolfe, Marta Martinez-vicente, Ashish C. Massey, Guy Sovak, Yasuo Uchiyama, David Westaway, Ana Maria Cuervo, and Ralph A. Nixon. 2010. "Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations." *Cell* 141(7):1146–58.
- Lee, Julie, Lixin Song, Giuseppe Terracina, Thomas Bara, Hubert Josien, Theodros Asberom, Thavalakulamgar K. Sasikumar, Duane A. Burnett, John Clader, Eric M. Parker, and Lili Zhang. 2011. "Identification of Presenilin 1-Selective  $\gamma$ -Secretase Inhibitors with Reconstituted  $\gamma$ -Secretase Complexes." *Biochemistry* 50:4973–80.
- Lee, Michael K., Hilda H. Slunt, Lee J. Martin, Gopal Thinakaran, Grace Kim, Samuel E. Gandy, Mary Seeger, Edward Koo, Donald L. Price, and Sangram S. Sisodia. 1996. "Expression of Presenilin 1 and 2 ( PS1 and PS2 ) in Human and Murine Tissues." *The Journal of Neuroscience* 16(23):7513–25.
- Lee, Sheu-Fen, Sanjiv Shah, Hongqiao Li, Cong Yu, Weiping Han, and Gang Yu. 2002. "Mammalian APH-1 Interacts with Presenilin and Nicastrin and Is Required for Intramembrane Proteolysis of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein and Notch." *The Journal of Biological Chemistry* 277(47):45013–19.

- Lee, Sheu-fen, Sanjiv Shah, Cong Yu, W. Christian Wigley, Harry Li, Myungsil Lim, Kia Pedersen, Weiping Han, Philip Thomas, Johan Lundkvist, Yi-heng Hao, and Gang Yu. 2004. "A Conserved G XXX G Motif in APH-1 Is Critical for Assembly and Activity of the  $\gamma$ -Secretase Complex \*." *The Journal of Biological Chemistry* 279(6):4144–52.
- van der Lee, Sven J., Olivia J. Conway, Iris Jansen, Minerva M. Carrasquillo, Luca Kleineidam, Erik van den Akker, Isabel Hernández, Kristel R. van Eijk, Najada Stringa, Jason A. Chen, Anna Zettergren, Till F. M. Andlauer, Monica Diez-Fairen, Javier Simon-Sanchez, Alberto Lleó, Henrik Zetterberg, Marianne Nygaard, Cornelis Blauwendraat, Jeanne E. Savage, Jonas Mengel-From, Sonia Moreno-Grau, Michael Wagner, Juan Fortea, Michael J. Keogh, Kaj Blennow, Ingmar Skoog, Manuel A. Friese, Olga Pletnikova, Miren Zulaica, Carmen Lage, Itziar de Rojas, Steffi Riedel-Heller, Ignacio Illán-Gala, Wei Wei, Bernard Jeune, Adelina Orellana, Florian Then Bergh, Xue Wang, Marc Hulsman, Nina Beker, Niccolo Tesi, Christopher M. Morris, Begoña Indakoetxea, Lyduine E. Collij, Martin Scherer, Estrella Morenas-Rodríguez, James W. Ironside, Bart N. M. van Berckel, Daniel Alcolea, Heinz Wiendl, Samantha L. Strickland, Pau Pastor, Eloy Rodríguez Rodríguez, Bradley F. Boeve, Ronald C. Petersen, Tanis J. Ferman, Jay A. van Gerpen, Marcel J. T. Reinders, Ryan J. Uitti, Lluís Tàrraga, Wolfgang Maier, Oriol Dols-Icardo, Amit Kawalia, Maria Carolina Dalmaso, Mercè Boada, Uwe K. Zettl, Natasja M. van Schoor, Marian Beekman, Mariet Allen, Eliezer Masliah, Adolfo López de Munain, Alexander Pantelyat, Zbigniew K. Wszolek, Owen A. Ross, Dennis W. Dickson, Neill R. Graff-Radford, David Knopman, Rosa Rademakers, Afina W. Lemstra, Yolande A. L. Pijnenburg, Philip Scheltens, Thomas Gasser, Patrick F. Chinnery, Bernhard Hemmer, Martijn A. Huisman, Juan Troncoso, Fermin Moreno, Ellen A. Nohr, Thorkild I. A. Sørensen, Peter Heutink, Pascual Sánchez-Juan, Danielle Posthuma, G. Coppola, A. M. Karydas, A. Varpetian, T. M. Foroud, A. I. Levey, W. A. Kukull, M. F. Mendez, J. Ringman, H. Chui, C. Cotman, C. DeCarli, B. L. Miller, D. H. Geschwind, Jordi Clarimón, Kaare Christensen, Nilüfer Ertekin-Taner, Sonja W. Scholz, Alfredo Ramirez, Agustín Ruiz, Eline Slagboom, Wiesje M. van der Flier, and Henne Holstege. 2019. "A Nonsynonymous Mutation in PLCG2 Reduces the Risk of Alzheimer's Disease, Dementia with Lewy Bodies and Frontotemporal Dementia, and Increases the Likelihood of Longevity." *Acta Neuropathologica* 138(2):237–50.
- Leem, Jae Yoon, Carlos A. Saura, Claus Pietrzik, John Christianson, Christian Wanamaker, Lashaunda T. King, Margaret L. Veselits, Taisuke Tomita, Laura Gasparini, Takeshi Iwatsubo, Huaxi Xu, William N. Green, Edward H. Koo, and Gopal Thinakaran. 2002. "A Role for Presenilin 1 in Regulating the Delivery of Amyloid Precursor Protein to the Cell Surface." *Neurobiology of Disease* 11:64–82.
- Leem, Jae Yoon, Shrijay Vijayan, Ping Han, Dongming Cai, Michael Machura, Kryslaine O. Lopes, Margaret L. Veselits, Huaxi Xu, and Gopal Thinakaran. 2002. "Presenilin 1 Is Required for Maturation and Cell Surface Accumulation of Nicastrin." *The Journal of Biological Chemistry* 277(21):19236–40.
- Lehmann, Sylvain, Roberto Chiesa, and David A. Harris. 1997. "Evidence for a Six-Transmembrane Domain Structure of Presenilin 1." *The Journal of Biological Chemistry* 272(18):12047–51.
- Lemberg, Marius K. and Bruno Martoglio. 2002. "Requirements for Signal Peptide Peptidase-Catalyzed Intramembrane Proteolysis." *Cell* 10(4):735–44.

- Lesne, Sylvain, Carine Ali, Cecilia Gabriel, Nicole Croci, Eric T. Mackenzie, Charles G. Glabe, Michel Plotkine, Catherine Marchand-verrecchia, Denis Vivien, and Alain Buisson. 2005. "NMDA Receptor Activation Inhibits  $\alpha$ -Secretase and Promotes Neuronal Amyloid- $\beta$  Production." *The Journal of Neuroscience* 25(41):9367–77.
- Lessard, Christian B., Barbara A. Cottrell, Hiroko Maruyama, Suraj Suresh, Todd E. Golde, and Edward H. Koo. 2015. " $\gamma$ -Secretase Modulators and APH1 Isoforms Modulate  $\gamma$ -Secretase Cleavage but Not Position of  $\epsilon$ -Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (APP)." *Plos One* 10(12):e0144758.
- Leutner, Silke, Christian Czech, Katharina Schindowski, Nathalie Touchet, Anne Eckert, and Walter E. Mu. 2000. "Reduced Antioxidant Enzyme Activity in Brains of Mice Transgenic for Human Presenilin-1 with Single or Multiple Mutations." *Neuroscience Letters* 292(2):87–90.
- Levitan, Diane, Gang Yu, Peter St, George Hyslop, and Caroline Goutte. 2001. "APH-2 / Nicastrin Functions in LIN-12 / Notch Signaling in the Caenorhabditis Elegans Somatic Gonad." *Developmental Biology* 240(2):654–61.
- Levy-Lahad, Ephrat, Wilma Wasco, Parvoneh Poorkaj, Chang-en Yu, Paul D. Jondro, Stephen D. Schmidt, Kai Wang, Donna M. Romano, Junko Oshima, Warren H. Pettingell, David Galas, Ellen Nemens, Ellen M. Wijsman, Thomas D. Bird, Annette C. Crowley, Ying-Hui Fu, Suzanne Y. Guenette, Gerard D. Schellenberg, and Rudolph E. Tanzi. 1995. "Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer 's Disease Locus." *Science* 269:973–77.
- Lewis, Huw D., Blanca I. Pe, Alan Nadin, Joe G. Neduvellil, Timothy Harrison, Scott J. Pollack, and Mark S. Shearman. 2003. "Catalytic Site-Directed  $\gamma$ -Secretase Complex Inhibitors Do Not Discriminate Pharmacologically between Notch S3 and  $\gamma$ -APP Cleavages." *BiochemistryBioch* 42(24):7580–86.
- Li, Huilin, Michael S. Wolfe, and Dennis J. Selkoe. 2009. "Toward Structural Elucidation of the  $\gamma$ -Secretase Complex." *Structure* 17(3):326–34.
- Li, Jin Hong, Yue Hua Wang, Barry B. Wolfe, Karl E. Krueger, Lorenzo Corsi, Gabriella Stocca, and Stefano Vicini. 1998. "Developmental Changes in Localization of NMDA Receptor Subunits in Primary Cultures of Cortical Neurons." *European Journal of Neuroscience* 10(5):1704–15.
- Li, Shaomin, Ming Jin, Thomas Koeglsperger, Nina E. Shepardson, Ganesh M. Shankar, and Dennis J. Selkoe. 2011. "Soluble A $\beta$  Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors." *The Journal of Neuroscience* 31(18):6627–38.
- Li, Shun Cheng and Charles M. Deber. 1992. "Glycine and  $\beta$ -Branched Residues Support and Modulate Peptide Helicity in Membrane Environments." *FEBS Letters* 311(3):217–20.
- Li, Tong, Guojun Ma, Huaibin Cai, Donald L. Price, and Philip C. Wong. 2003. "Nicastrin Is Required for Assembly of Presenilin/ $\gamma$ -Secretase Complexes to Mediate Notch Signaling and for Processing and Trafficking of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Mammals." *The Journal of Neuroscience* 23(8):3272–77.
- Li, Xiajun and Iva Greenwald. 1996. "Membrane Topology of the C. Elegans SEL-12 Presenilin." *Neuron* 17(5):1015–21.
- Li, Xiaochun, Shangyu Dang, Chuangye Yan, Xinqi Gong, Jiawei Wang, and Yigong Shi. 2013. "Structure of a Presenilin Family Intramembrane Aspartate Protease." *Nature* 493(7430):56–61.
- Li, Yan, Lynette Sin Yee Liew, Qingxin Li, and CongBao Kang. 2016. "Structure of the Transmembrane Domain of Human Nicastrin-a Component of  $\gamma$ -Secretase." *Scientific Reports* 6:19522.

- Li, Yi, Stephen Hsueh Jeng Lu, Ching Ju Tsai, Christopher Bohm, Seema Qamar, Roger B. Dodd, William Meadows, Amy Jeon, Adam McLeod, Fusheng Chen, Muriel Arimon, Oksana Berezovska, Bradley T. Hyman, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, Christopher M. Johnson, Lindsay A. Farrer, Gerold Schmitt-Ulms, Paul E. Fraser, and Peter H. St George-Hyslop. 2014. "Structural Interactions between Inhibitor and Substrate Docking Sites Give Insight into Mechanisms of Human PS1 Complexes." *Structure* 22(1):125–35.
- Li, Yue-ming, Ming-tain Lai, Min Xu, Qian Huang, Jillian Dimuzio-mower, Mohinder K. Sardana, Xiao-ping Shi, Kuo-chang Yin, Jules A. Shafer, and Stephen J. Gardell. 2000. "Presenilin 1 Is Linked with  $\gamma$ -Secretase Activity in the Detergent Solubilized State." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11):6138–43.
- Li, Yue-ming, Min Xu, Ming-tain Lai, Qian Huang, Jose L. Castro, Jillian Dimuzio-mower, Timothy Harrison, Colin Lellis, Alan Nadin, Joseph G. Neduveilil, R. Bruce Register, Mohinder K. Sardana, Mark S. Shearman, Adrian L. Smith, Xiao-ping Shi, Kuo-chang Yin, Jules A. Shafer, and Stephen J. Gardell. 2000. "Photoactivated  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Directed to the Active Site Covalently Label Presenilin 1." *Nature* 405(8):689–94.
- Liao, Fan, Aimin Li, Monica Xiong, Nga Bien-Ly, Hong Jiang, Yin Zhang, Mary Beth Finn, Rosa Hoyle, Jennifer Keyser, Katheryn B. Lefton, Grace O. Robinson, Javier Remolina Serrano, Adam P. Silverman, Jing L. Guo, Jennifer Getz, Kirk Henne, Cheryl E. G. Leyns, Gilbert Gallardo, Jason D. Ulrich, Patrick M. Sullivan, Eli Paul Lerner, Eloise Hudry, Zachary K. Sweeney, Mark S. Dennis, Bradley T. Hyman, Ryan J. Watts, and David M. Holtzman. 2018. "Targeting of Nonlipidated, Aggregated ApoE with Antibodies Inhibits Amyloid Accumulation." *Journal of Clinical Investigation* 128(5):2144–55.
- Ling, I. Fang, Todd E. Golde, Douglas R. Galasko, and Edward H. Koo. 2015. "Modulation of A $\beta$ 42 in Vivo by  $\gamma$ -Secretase Modulator in Primates and Humans." *Alzheimer's Research & Therapy* 7(1):55.
- Linggi, B., Q. C. Cheng, A. R. Rao, and G. Carpenter. 2006. "The ErbB-4 S80 Intracellular Domain Is a Constitutively Active Tyrosine Kinase." *Oncogene* 160–63.
- Litterst, Claudia, Anastasios Georgakopoulos, Junichi Shioi, Enrico Ghersi, Thomas Wisniewski, Rong Wang, Andreas Ludwig, and Nikolaos K. Robakis. 2007. "Ligand Binding and Calcium Influx Induce Distinct Ectodomain/ $\gamma$ -Secretase-Processing Pathways of EphB2 Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 282(22):16155–63.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. "Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology in Vivo." *PLoS ONE* 7(2):e31302.
- Lleó, Alberto, Oksana Berezovska, Lauren Herl, Susan Raju, Amy Deng, Brian J. Bacskai, Matthew P. Frosch, Michael Irizarry, and Bradley T. Hyman. 2004. "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Lower A $\beta$ 42 and Change Presenilin 1 Conformation." *Nature Medicine* 10(10):1065–66.
- Logovinsky, Veronika, Andrew Satlin, Robert Lai, Chad Swanson, June Kaplow, Gunilla Osswald, Hans Basun, and Lars Lannfelt. 2016. "Safety and Tolerability of BAN2401 - A Clinical Study in Alzheimer's Disease with a Protofibril Selective A $\beta$  Antibody." *Alzheimer's Research and Therapy* 8(1):1–10.
- Long, Justin M. and David M. Holtzman. 2019. "Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies." *Cell* 1–28.

- Loo, Tip W. and David M. Clarke. 2001. "Determining the Dimensions of the Drug-Binding Domain of Human P-Glycoprotein Using Thiol Cross-Linking Compounds as Molecular Rulers." *The Journal of Biological Chemistry* 276(40):36877–81.
- Lopez Lopez, Cristina, Pierre N. Tariot, Angelika Caputo, Jessica B. Langbaum, Fonda Liu, Marie Emmanuelle Riviere, Carolyn Langlois, Marie Laure Rouzade-Dominguez, Martin Zalesak, Suzanne Hendrix, Ronald G. Thomas, Vissia Viglietta, Rob Lenz, J. Michael Ryan, Ana Graf, and Eric M. Reiman. 2019. "The Alzheimer's Prevention Initiative Generation Program: Study Design of Two Randomized Controlled Trials for Individuals at Risk for Clinical Onset of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* 5:216–27.
- Loureiro, Robyn M., Jo Ann Dumin, Timothy D. McKee, Wesley F. Austin, Nathan O. Fuller, Jed L. Hubbs, Ruichao Shen, Jeff Jonker, Jeff Ives, Brian S. Bronk, and Barbara Tate. 2013. "Efficacy of SPI-1865, a Novel Gamma-Secretase Modulator, in Multiple Rodent Models." *Alzheimer's Research & Therapy* 5(2):19.
- Lovestone, Simon, Mercè Boada, Bruno Dubois, Michael Hüll, Juha O. Rinne, Hans Jürgen Huppertz, Miguel Calero, María V. Andrés, Belén Gómez-Carrillo, Teresa León, and Teodoro Del Ser. 2015. "A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 45(1):75–88.
- Low, Jonathan D., Michael D. Bartberger, Kui Chen, Yuan Cheng, Mark R. Fielden, Vijay Gore, Dean Hickman, Qingyian Liu, E. Allen Sickmier, Hugo M. Vargas, Jonathan Werner, Ryan D. White, Douglas A. Whittington, Stephen Wood, and Ana E. Minatti. 2017. "Development of 2-Aminooxazoline 3-Azaxanthene  $\beta$ -Amyloid Cleaving Enzyme (BACE) Inhibitors with Improved Selectivity against Cathepsin D." *MedChemComm* 8(6):1196–1206.
- Low, Jonathan D., Michael D. Bartberger, Yuan Cheng, Doug Whittington, Quifen Xue, Stephen Wood, Jennifer R. Allen, and Ana E. Minatti. 2018. "Diastereoselective Synthesis of Fused Cyclopropyl-3-Amino-2,4-Oxazine  $\beta$ -Amyloid Cleaving Enzyme (BACE) Inhibitors and Their Biological Evaluation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 28(6):1111–15.
- Lowe, Val J., Emily S. Lundt, Sabrina M. Albertson, Scott A. Przybelski, Matthew L. Senjem, Joseph E. Parisi, Kejal Kantarci, Bradley Boeve, David T. Jones, David Knopman, Clifford R. Jack, Dennis W. Dickson, Ronald C. Petersen, and Melissa E. Murray. 2019. "Neuroimaging Correlates with Neuropathologic Schemes in Neurodegenerative Disease." *Alzheimer's and Dementia* 15(7):927–39.
- Lu, P., X. C. Bai, D. Ma, T. Xie, C. Yan, L. Sun, G. Yang, Y. Zhao, R. Zhou, S. H. Scheres, and Y. Shi. 2014. "Three-Dimensional Structure of Human Gamma-Secretase." *Nature* 512(7513):166–70.
- Lue, Lih-Fen, Yu-Min Kuo, Alex E. Roher, Libuse Brachova, Yong Shen, Lucia Sue, Thomas Beach, Janice H. Kurth, Russel E. Rydel, and Joseph Rogers. 1999. "Soluble Amyloid  $\beta$  Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease." *The American Journal of Pathology* 155(3):853–62.
- Luo, Wen-jie, Hong Wang, Hongqiao Li, Benny S. Kim, Sanjiv Shah, Hahn-jun Lee, Gopal Thinakaran, Tae-wan Kim, Gang Yu, and Huaxi Xu. 2003. "PEN-2 and APH-1 Coordinately Regulate Proteolytic Processing of Presenilin 1 \*." *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):7850–54.



- MacKenzie, K. R. and D. M. Engelman. 1998. "Structure-Based Prediction of the Stability of Transmembrane Helix-Helix Interactions: The Sequence Dependence of Glycophorin A Dimerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7):3583–90.
- MacKenzie, Kevin R and Donald M. Engelman. 1998. "Structure-Based Prediction of the Stability of Transmembrane Helix – Helix Interactions : The Sequence Dependence of Glycophorin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3583–90.
- Magara, Fulvio, Ulrike Muller, Zhiwei Li, Hans-Peter Lipp, Charlies Weissmann, Marijana Stagljjar, and David P. Wolfer. 1999. "Genetic Background Changes the Pattern of Forebrain Commissure Defects in Transgenic Mice Underexpressing the  $\beta$ -Amyloid-Precursor Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(8):4656–61.
- Malamas, Michael S., Keith Barnes, Matthew Johnson, Yu Hui, Ping Zhou, Jim Turner, Yun Hu, Erik Wagner, Kristi Fan, Rajiv Chopra, Andrea Olland, Jonathan Bard, Menelas Pangalos, Peter Reinhart, and Albert J. Robichaud. 2010. "Di-Substituted Pyridinyl Aminohydantoinas as Potent and Highly Selective Human  $\beta$ -Secretase (BACE1) Inhibitors." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18(2):630–39.
- Mandal, Mihirbaran, Zhaoning Zhu, Jared N. Cumming, Xiaoxiang Liu, Corey Strickland, Robert D. Mazzola, John P. Caldwell, Prescott Leach, Michael Grzelak, Lynn Hyde, Qi Zhang, Giuseppe Terracina, Lili Zhang, Xia Chen, Reshma Kuvelkar, Matthew E. Kennedy, Leonard Favreau, Kathleen Cox, Peter Orth, Alexei Buevich, Johannes Voigt, Hongwu Wang, Irina Kazakevich, Brian A. McKittrick, William Greenlee, Eric M. Parker, and Andrew W. Stamford. 2012. "Design and Validation of Bicyclic Iminopyrimidinones As Beta Amyloid Cleaving Enzyme-1 (BACE1) Inhibitors: Conformational Constraint to Favor a Bioactive Conformation." *Journal of Medicinal Chemistry* 55(21):9331–45.
- Mandelkow, Eckhard, Martin Von Bergen, Jacek Biernat, and Eva Maria Mandelkow. 2007. "Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease." *Brain Pathology* 17(1):83–90.
- Marambaud, Philippe, Junichi Shioi, Geo Serban, Anastasios Georgakopoulos, Shula Sarner, Vanja Nagy, Lia Baki, Paul Wen, Spiros Efthimiopoulos, Zhiping Shao, Thomas Wisniewski, and Nikolaos K. Robakis. 2002. "A Presenilin-1/ $\gamma$ -Secretase Cleavage Releases the E-Cadherin Intracellular Domain and Regulates Disassembly of Adherens Junctions." *EMBO Journal* 21(8):1948–56.
- Marambaud, Philippe, Paul H. Wen, Anindita Dutt, Junichi Shioi, Akihiko Takashima, Robert Siman, and Nikolaos K. Robakis. 2003. "A CBP Binding Transcriptional Repressor Produced by the PS1/ $\gamma$ -Cleavage of N-Cadherin Is Inhibited by PS1 FAD Mutations." *Cell* 114(5):635–45.
- Marcade, Maryline, Jérôme Bourdin, Nadia Loiseau, Hélène Peillon, Aurélie Rayer, Dominique Drouin, Fabien Schweighoffer, and Laurent D  sir  . 2008. "Etazolate, a Neuroprotective Drug Linking GABAA Receptor Pharmacology to Amyloid Precursor Protein Processing." *Journal of Neurochemistry* 106(1):392–404.
- Marcelli, Serena, Massimo Corbo, Filomena Iannuzzi, Lucia Negri, Fabio Blandini, Robert Nistico, and Marco Feligioni. 2018. "The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease." *Current Alzheimer Research* 15(4):313–35.
- Marques, Fernanda, João Carlos Sousa, Nuno Sousa, and Joana Almeida Palha. 2013. "Blood-Brain-Barriers in Aging and in Alzheimer's Disease." *Molecular Neurodegeneration* 8(38):1–9.

- Martel, Marc-Andre, J. Tomas Ryan, Karen F. S. Bell, Jill H. Fowler, Aoife McMahon, Bashayer Al-mubarak, Noboru H. Komiyama, Karen Horsburgh, Peter C. Kind, Seth G. N. Grant, David J. A. Wyllie, and Giles E. Hardingham. 2012. "The Subtype of GluN2 C-Terminal Domain Determines the Response to Excitotoxic Insults." *Neuron* 74(3):543–56.
- Masliah, E., M. Alford, R. Deteresa, M. Mallory, and L. Hansen. 1996. "Deficient Glutamate Transport Is Associated with Neurodegeneration in Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 40(5):759–66.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther. 1985. "Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(12):4245–49.
- Masters, Colin L. and Dennis J. Selkoe. 2012. "Biochemistry of Amyloid  $\beta$ -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(6).
- Masters, Colin L. and Dennis J. Selkoe. 2012. "Biochemistry of Amyloid  $\beta$ -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(6):1–24.
- Masuda, Yuichi, Satoko Uemura, Ryutaro Ohashi, Azusa Nakanishi, K. Takegoshi, Takahiko Shimizu, Takuji Shirasawa, and Kazuhiro Irie. 2009. "Identification of Physiological and Toxic Conformations in A $\beta$  42 Aggregates." *ChemBioChem* 10(2):287–95.
- Mateu, Natalia, Myriam Ciordia, Oscar Delgado, María Sánchez-Roselló, Andrés A. Trabanco, Michiel Van Gool, Gary Tresadern, Laura Pérez-Benito, and Santos Fustero. 2015. "A Versatile Approach to CF<sub>3</sub>-Containing 2-Pyrrolidones by Tandem Michael Addition-Cyclization: Exemplification in the Synthesis of Amidine Class BACE1 Inhibitors." *Chemistry - A European Journal* 21(33):11719–26.
- Mathys, Hansruedi, Jose Davila-Velderrain, Zhuyu Peng, Fan Gao, Shahin Mohammadi, Jennie Z. Young, Madhvi Menon, Liang He, Fatema Abdurrob, Xueqiao Jiang, Anthony J. Martorell, Richard M. Ransohoff, Brian P. Hafner, David A. Bennett, Manolis Kellis, and Li Huei Tsai. 2019. "Single-Cell Transcriptomic Analysis of Alzheimer's Disease." *Nature* 570(7761):332–37.
- Mattson, Mark P., Bin Cheng, Dave Davis, Karin Bryant, Ivan Lieberburg, and E. Rydel. 1992. " $\beta$ -Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity." *The Journal of Neuroscience* 12(2):376–89.
- May, Patrick C., Robert A. Dean, Stephen L. Lowe, Ferenc Martenyi, Scott M. Sheehan, Leonard N. Boggs, Scott A. Monk, Brian M. Mathes, Dustin J. Mergott, Brian M. Watson, Stephanie L. Stout, David E. Timm, Elizabeth Smith LaBell, Celedon R. Gonzales, Masako Nakano, Stanford S. Jhee, Mark Yen, Larry Ereshefsky, Terry D. Lindstrom, David O. Calligaro, Patrick J. Cocks, D. Greg Hall, Stuart Friedrich, Martin Citron, and James E. Audia. 2011. "Robust Central Reduction of Amyloid- $\beta$  in Humans with an Orally Available, Non-Peptidic  $\beta$ -Secretase Inhibitor." *Journal of Neuroscience* 31(46):16507–16.
- Mazzitelli, Sonia, Fabia Filipello, Marco Rasile, Eliana Lauranzano, Chiara Starvaggi-Cucuzza, Matteo Tamborini, Davide Pozzi, Isabella Barajon, Toni Giorgino, Antonino Natalello, and Michela Matteoli. 2016. "Amyloid- $\beta$  1-24 C-Terminal Truncated Fragment Promotes Amyloid- $\beta$  1-42 Aggregate Formation in the Healthy Brain." *Acta Neuropathologica Communications* 4(1):110.

- McCord, Joe M. and Irwin Fridovich. 1988. "Superoxide Dismutase: The First Twenty Years (1968–1988)." *Free Radical Biology & Medicine* 5(5–6):363–69.
- McFarlane, I., N. Georgopoulou, C. M. Coughlan, A. M. Gillian, and K. C. Breen. 1999. "The Role of the Protein Glycosylation State in the Control of Cellular Transport of the Amyloid Beta Precursor Protein." *Neuroscience* 90(1):15–25.
- McKhann, Guy M., David S. Knopman, Howard Chertkow, Bradley T. Hyman, Clifford R. Jack, Claudia H. Kawas, William E. Klunk, Walter J. Koroshetz, Jennifer J. Manly, Richard Mayeux, Richard C. Mohs, John C. Morris, Martin N. Rossor, Philip Scheltens, Maria C. Carrillo, Bill Thies, Sandra Weintraub, and Creighton H. Phelps. 2011. "The Diagnosis of Dementia Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 7(3):263–69.
- McNally, Beth A., Megumi Yamashita, Anita Engh, and Murali Prakriya. 2009. "Structural Determinants of Ion Permeation in CRAC Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(52):22516–21.
- Miklossy, Judith, Kevin Taddei, Domizio Suva, Giuseppe Verdile, Justin Fonte, Christopher Fisher, Anastazija Gnjec, Joseph Ghika, Françoise Suard, Pankaj D. Mehta, Catriona A. Mclean, Colin L. Masters, William S. Brooks, and Ralph N. Martins. 2003. "Two Novel Presenilin-1 Mutations (Y256S and Q222H) Are Associated with Early-Onset Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 24(5):655–62.
- Miller, Lisa M., Qi Wang, Tejas P. Telivala, Randy J. Smith, Antonio Lanzirotti, and Judit Miklossy. 2006. "Synchrotron-Based Infrared and X-Ray Imaging Shows Focalized Accumulation of Cu and Zn Co-Localized with  $\beta$ -Amyloid Deposits in Alzheimer's Disease." *Journal of Structural Biology* 155(1):30–37.
- Min, Sang Won, Seo Hyun Cho, Yungui Zhou, Sebastian Schroeder, Vahram Haroutunian, William W. Seeley, Eric J. Huang, Yong Shen, Eliezer Masliah, Chandrani Mukherjee, David Meyers, Philip A. Cole, Melanie Ott, and Li Gan. 2010. "Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy." *Neuron* 67(6):953–66.
- Misonou, Hiroaki, Maho Morishima-kawashima, and Yasuo Ihara. 2000. "Oxidative Stress Induces Intracellular Accumulation of Amyloid  $\beta$ -Protein ( $A\beta$ ) in Human Neuroblastoma Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 273(2):695–699.
- Mital, Mariusz, Nina E. Wezynfeld, Tomasz Fraczyk, Magdalena Z. Wiloch, Urszula E. Wawrzyniak, Arkadiusz Bonna, Carolin Tumpach, Kevin J. Barnham, Cathryn L. Haigh, Wojciech Bal, and Simon C. Drew. 2015. "A Functional Role for  $A\beta$  in Metal Homeostasis? N-Truncation and High-Affinity Copper Binding." *Angewandte Chemie - International Edition* 54(36):10460–64.
- Mitani, Yasuyuki, Junko Yarimizu, Kyoko Saita, Hiroshi Uchino, Hiroki Akashiba, Yoshitsugu Shitaka, Keni Ni, and Nobuya Matsuoka. 2012. "Differential Effects between  $\gamma$ -Secretase Inhibitors and Modulators on Cognitive Function in Amyloid Precursor Protein-Transgenic and Nontransgenic Mice." *Neurobiology of Disease* 32(6):2037–50.
- Miyashita, Hiroyuki, Yuusuke Maruyama, Hayato Isshiki, Satoko Osawa, Toshihiko Ogura, Kazuhiro Mio, Chikara Sato, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2011. "Three-Dimensional Structure of the Signal Peptide Peptidase." *The Journal of Biological Chemistry* 286(29):26188–97.

- Moehlmann, Tobias, Edith Winkler, Xuefeng Xia, Dieter Edbauer, Jill Murrell, Anja Capell, Christoph Kaether, Hui Zheng, Bernardino Ghetti, Christian Haass, and Harald Steiner. 2002. "Presenilin-1 Mutations of Leucine 166 Equally Affect the Generation of the Notch and APP Intracellular Domains Independent of Their Effect on A $\beta$ 42 Production." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12):8025–30.
- Moin, Syed M. and Sinisa Urban. 2012. "Membrane Immersion Allows Rhomboid Proteases to Achieve Specificity by Reading Transmembrane Segment Dynamics." *ELife* (1):e00173.
- Moir, Robert D., Richard Lathe, and Rudolph E. Tanzi. 2018. "The Antimicrobial Protection Hypothesis of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 14(12):1602–14.
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Ning Gu, Frederic Manseau, and Sylvain Williams. 2018. "Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and  $\beta$ -CTF Fragment Accumulation: Reversal by  $\beta$ -Secretase Inhibition." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12(May):121.
- Mondragón-rodríguez, Siddhartha, Emilie Trillaud-doppia, Anthony Dudilot, Catherine Bourgeois, Michel Lauzon, Nicole Leclerc, and Jannic Boehm. 2012. "Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N -Methyl- D -Aspartate Receptor-Dependent Tau Phosphorylation \*." *The Journal of Biological Chemistry* 287(38):32040–53.
- Moore, Chad L., Dartha D. Leatherwood, Thekla S. Diehl, Dennis J. Selkoe, and Michael S. Wolfe. 2000. "Difluoro Ketone Peptidomimetics Suggest a Large S1 Pocket for Alzheimer 's  $\gamma$ -Secretase : Implications for Inhibitor Design †." *Journal of Medicinal Chemistry* 43:3434–42.
- Moore, Simon W., Marc Tessier-lavigne, and Timothy E. Kennedy. 2007. "Netrins and Their Receptors." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 621:17–31.
- Morais, Vanessa A., Adam S. Crystal, Donald S. Pijak, Dan Carlin, Júlia Costa, Virginia M. Y. Lee, and Robert W. Doms. 2003. "The Transmembrane Domain Region of Nicastrin Mediates Direct Interactions with APH-1 and the  $\gamma$ -Secretase Complex." *Journal of Biological Chemistry* 278(44):43284–91.
- Morawski, Markus, Stephan Schilling, Moritz Kreuzberger, Alexander Waniek, Carsten Jäger, Birgit Koch, Holger Cynis, Astrid Kehlen, Thomas Arendt, Maik Hartlage-Rübsamen, Hans Ulrich Demuth, and Steffen Roßner. 2014. "Glutaminyl Cyclase in Human Cortex: Correlation with (PGLu)-Amyloid- $\beta$  Load and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 39(2):385–400.
- Morihara, T., T. Chu, O. Ubeda, W. Beech, and G. M. Cole. 2002. "Selective Inhibition of A $\beta$ 42 Production by NSAID R-Enantiomers." *Journal of Neurochemistry* 83(4):1009–12.
- Morimoto, Akira, Kazuhiro Irie, Kazuma Murakami, Yuichi Masuda, Hajime Ohigashi, Masaya Nagao, Hiroyuki Fukuda, Takahiko Shimizu, and Takuji Shirasawa. 2004. "Analysis of the Secondary Structure of  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ 42) Fibrils by Systematic Proline Replacement." *The Journal of Biological Chemistry* 279(50):52781–88.
- Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura. 2000. "Plat-E: An Efficient and Stable System for Transient Packaging of Retroviruses." *Gene Therapy* 7(12):1063–66.
- Morohashi, Yuichi, Toshiyuki Kan, Yusuke Tominari, Harujiko Fuwa, Yumiko Okamura, Naoto Watanabe, Chihiro Sato, Hideaki Natsugari, Tohru Fukuyama, Takeshi Iwatsubo, and Taisuke Tomita. 2006. "C-Terminal Fragment of Presenilin Is the Molecular Target of a Dipeptidic  $\gamma$ -Secretase-Specific Inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-

- Difluorophenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine t-Butyl Ester)." *The Journal of Biological Chemistry* 281(21):14670–76.
- Morris, John C. 1997. "Clinical Dementia Rating: A Reliable and Valid Diagnostic and Staging Measure for Dementia of the Alzheimer Type." *International Psychogeriatrics* 9(SUPPL. 1):173–76.
- Mullan, Mike, Fiona Crawford, Karin Axelman, Henry Houlden, Lena Lilius, Bengt Winblad, and Lars Lannfelt. 1992. "A Pathogenic Mutation for Probable Alzheimer's Disease in the APP Gene at the N-Terminus of  $\beta$ -Amyloid." *Nature Genetics* 1(5):345–47.
- Müller, Ulrich, Pia Winter, and Manuel B. Graeber. 2013. "A Presenilin 1 Mutation in the First Case of Alzheimer's Disease." *The Lancet Neurology* 12(2):129–30.
- Munter, Lisa-marie, Philipp Voigt, Anja Harmeier, Daniela Kaden, E. Gottschalk, Christoph Weise, Michael Schaefer, and Gerd Multhaup. 2007. "GxxxG Motifs within the Amyloid Precursor Protein Transmembrane Sequence Are Critical for the Etiology of A $\beta$  42." *The EMBO Journal* 26(6):1702–12.
- Murakami, Kazuma, Kazuhiro Irie, Hajime Ohigashi, Hideyuki Hara, Masaya Nagao, Takahiko Shimizu, and Takuji Shirasawa. 2005. "Formation and Stabilization Model of the 42-Mer A Radical : Implications for the Long-Lasting Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." *Journal of the American Chemical Society* 127(43):15168–74.
- Murakami, Kazuma, Yuichi Masuda, Takuji Shirasawa, Takahiko Shimizu, and Kazuhiro Irie. 2010. "The Turn Formation at Positions 22 and 23 in the 42-Mer Amyloid b Peptide : The Emerging Role in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *Geriatrics Gerontology International* 10(1).
- Murayama, Ohoshi, Taisuke Tomita, Naomi Nihonmatsu, Miyuki Murayama, Xiaoyan Sun, Toshiyuki Honda, Takeshi Iwatsubo, and Akihiko Takashima. 1999. "Enhancement of Amyloid  $\beta$  42 Secretion by 28 Different Presenilin 1 Mutations of Familial Alzheimer's Disease." *Neuroscience Letters* 265(1):61–63.
- Nagy, Christa, Edgar Schuck, Akira Ishibashi, Yosuke Nakatani, Bhaskar Rege, and Veronika Logovinsky. 2010. "E2012, a Novel Gamma-Secretase Modulator, Decreases Plasma Amyloid-Beta (A $\beta$ ) Levels in Humans." *Alzheimer's & Dementia* 6(4):S574.
- Najm, Ramsey, Emily A. Jones, and Yadong Huang. 2019. "Apolipoprotein E4, Inhibitory Network Dysfunction, and Alzheimer's Disease." *Molecular Neurodegeneration* 14(1):1–13.
- Nakagawa, Kazuhiro, Shinobu Kitazume, Ritsuko Oka, Kei Maruyama, Takaomi C. Saido, Yuji Sato, Tamao Endo, and Yasuhiro Hashimoto. 2006. "Sialylation Enhances the Secretion of Neurotoxic Amyloid- $\beta$  Peptides." *Journal of Neurochemistry* 96(4):924–33.
- Nakahara, Kenji, Kouki Fuchino, Kazuo Komano, Naoya Asada, Genta Tadano, Tsuyoshi Hasegawa, Takahiko Yamamoto, Yusuke Sako, Masayoshi Ogawa, Chie Unemura, Motoko Hosono, Hisanori Ito, Gaku Sakaguchi, Shigeru Ando, Shuichi Ohnishi, Yasuto Kido, Tamio Fukushima, Deborah Dhuyvetter, Herman Borghys, Harrie J. M. Gijzen, Yoshinori Yamano, Yasuyoshi Iso, and Ken Ichi Kusakabe. 2018. "Discovery of Potent and Centrally Active 6-Substituted 5-Fluoro-1,3-Dihydro-Oxazine  $\beta$ -Secretase (BACE1) Inhibitors via Active Conformation Stabilization." *Journal of Medicinal Chemistry* 61(13):5525–46.
- Nakai, Toshiki, Aya Yamasaki, Masao Sakaguchi, Kenji Kosaka, Katsuyoshi Mihara, Yoshihiro Amaya, and Satoshi Miura. 1999. "Membrane Topology of Alzheimer's Disease-Related Presenilin 1 EVIDENCE FOR THE

EXISTENCE OF A MOLECULAR SPECIES WITH A SEVEN MEMBRANE-SPANNING AND ONE MEMBRANE-EMBEDDED STRUCTURE.” *The Journal of Biological Chemistry* 274(33):23647–58.

Nakano-Ito, Kyoko, Yasuhiro Fujikawa, Taro Hihara, Hiroko Shinjo, Sadaharu Kotani, Akiyoshi Suganuma, Toyohiko Aoki, and Kazuo Tsukidate. 2014. “E2012-Induced Cataract and Its Predictive Biomarkers.” *Toxicological Sciences* 137(1):249–58.

Nakaya, Tadashi and Toshiharu Suzuki. 2006. “Role of APP Phosphorylation in FE65-Dependent Gene Transactivation Mediated by AICD.” *Genes to Cells* 11(6):633–45.

Namba, Yoshio, Masanori Tomonaga, Hiroshi Kawasaki, Eiichi Otomo, and Kazuhiko Ikeda. 1991. “Apolipoprotein B Immunoreactivity in Cerebral Amyloid Deposits and Neurofibrillary Tangles in Senile Dementia of Alzheimer Type.” *Clinical Neurology* 541(1):163–66.

Näslund, Jan, Vahram Haroutunian, Richard Mohs, K. L. Davis, P. Davies, P. Greengard, and J. D. Buxbaum. 2000. “Correlation between Elevated Levels of Amyloid Beta-Peptide in the Brain and Cognitive Decline.” *Jama* 283(12):1571–77.

Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, Barbara J. Crain, Peter Davies, Kelly Del Tredici, Charles Duyckaerts, Matthew P. Frosch, Vahram Haroutunian, Patrick R. Hof, Christine M. Hulette, Bradley T. Hyman, Takeshi Iwatsubo, Kurt A. Jellinger, Gregory A. Jicha, Enikő Kövari, Walter A. Kukull, James B. Leverenz, Seth Love, Ian R. MacKenzie, David M. Mann, Eliezer Masliah, Ann C. McKee, Thomas J. Montine, John C. Morris, Julie A. Schneider, Joshua A. Sonnen, Dietmar R. Thal, John Q. Trojanowski, Juan C. Troncoso, Thomas Wisniewski, Randall L. Woltjer, and Thomas G. Beach. 2012. “Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes with Cognitive Status: A Review of the Literature.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71(5):362–81.

Netzer, William J., Fei Dou, Dongming Cai, Darren Veach, Stephanie Jean, Yueming Li, William G. Bornmann, Bayard Clarkson, Huaxi Xu, and Paul Greengard. 2003. “Gleevec Inhibits  $\beta$ -Amyloid Production but Not Notch Cleavage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(21):12444–49.

Neumann, Ulf, Mike Ufer, Laura H. Jacobson, Marie - Laure Rouzade - Dominguez, Gunilla Huledal, Carine Kolly, Rainer M. Lüönd, Rainer Machauer, Siem J. Veenstra, Konstanze Hurth, Heinrich Rueeger, Marina Tintelnot - Blomley, Matthias Staufienbiel, Derya R. Shimshek, Ludovic Perrot, Wilfried Frieauff, Valerie Dubost, Hilmar Schiller, Barbara Vogt, Karen Beltz, Alexandre Avrameas, Sandrine Kretz, Nicole Pezous, Jean - Michel Rondeau, Nicolau Beckmann, Andreas Hartmann, Stefan Vormfelde, Olivier J. David, Bruno Galli, Rita Ramos, Ana Graf, and Cristina Lopez Lopez. 2018. “The BACE - 1 Inhibitor CNP 520 for Prevention Trials in Alzheimer’s Disease.” *EMBO Molecular Medicine* 10(11):e9316.

Ni, Chang-yuan, M. Paul Murphy, and Todd E. Golde. 2001. “ $\gamma$ -Secretase Cleavage and Nuclear Localization of ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase.” *Science* 294(5549):2179–81.

Nilsson, I., A. Saaf, P. Whitley, G. Gafvelin, C. Waller, and G. von Heijne. 1998. “Proline-Induced Disruption of a Transmembrane Alpha-Helix in Its Natural Environment.” *J Mol Biol* 284(4):1165–75.

Novak, Petr, Norbert Zilka, Monika Zilkova, Branislav Kovacech, Rostislav Skrabana, M. Ondrus, L. Fialova, E. Kontsekova, M. Otto, and Michal Novak. 2019. “AADvac1, an Active Immunotherapy for Alzheimer’s Disease

- and Non Alzheimer Tauopathies: An Overview of Preclinical and Clinical Development.” *The Journal of Prevention of Alzheimer’s Disease* 6(1):63–69.
- Oh, Young S. and R. James Turner. 2005. “Topology of the C-Terminal Fragment of Human Presenilin 1.” *Biochemistry* 44(35):11821–28.
- Ohki, Yu, Takuya Higo, Kengo Uemura, Naoaki Shimada, Satoko Osawa, Oksana Berezovska, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2011. “Phenylpiperidine-Type  $\gamma$ -Secretase Modulators Target the Transmembrane Domain 1 of Presenilin 1.” *The EMBO Journal* 30(23):4815–24.
- Ohki, Yu, Naoaki Shimada, Aya Tominaga, Satoko Osawa, Takuya Higo, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2014. “Binding of Longer A $\beta$  to Transmembrane Domain 1 of Presenilin 1 Impacts on A $\beta$ 42 Generation.” *Molecular Neurodegeneration* 9(1):1–10.
- Ohtsubo, Kazuaki and Jamey D. Marth. 2006. “Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease.” *Cell* 126(5):855–67.
- Ohyagi, Yasumasa, Hideaki Asahara, De-hua Chui, Yuko Tsuruta, Nobutaka Sakae, Katsue Miyoshi, Takeshi Yamada, Hitoshi Kikuchi, Takayuki Taniwaki, Hiroyuki Murai, Koji Ikezoe, Hirokazu Furuya, Takeshi Kawarabayashi, Mikio Shoji, Frederic Checler, Toru Iwaki, Takao Makifuchi, Kazuya Takeda, Jun-ichi Kira, Takeshi Tabira, Biophysiological Science, and National Saigata. 2004. “Intracellular A $\beta$ 42 Activates P53 Promoter: A Pathway to Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease.” *The FASEB Journal* 19(2):1–29.
- Ohyagi, Yasumasa, Takeshi Yamada, Kenichi Nishioka, Nigel J. Clarke, Andy J. Tomlinson, Stephen Naylor, Yusaku Nakabeppu, Jun-ichi Kira, and Steven G. Younkin. 2000. “Selective Increase in Cellular A $\beta$ 42 Is Related to Apoptosis but Not Necrosis.” *Neuroreport* 11(1):167–71.
- Oikawa, Naoto and Jochen Walter. 2019. “Presenilins and  $\gamma$ -Secretase in Membrane Proteostasis.” *Cells* 8(3):1–16.
- Okamoto, Isamu, Yoshiaki Kawano, Daizo Murakami, Takashi Sasayama, Norie Araki, Toru Miki, Albert J. Wong, and Hideyuki Saya. 2001. “Proteolytic Release of CD44 Intracellular Domain and Its Role in the CD44 Signaling Pathway.” *Cell* 105(5):755–62.
- Okochi, Masayasu, Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Mako Takami, Takashi S. Kodama, Kohji Mori, Taisuke Nakayama, Yasuo Ihara, and Masatoshi Takeda. 2012. “Report  $\gamma$ -Secretase Modulators and Presenilin 1 Mutants Act Differently on Presenilin /  $\gamma$ -Secretase Function to Cleave A $\beta$  42 and A b 43.” *Cell* 3:42–51.
- Olsson, Fredrik, Staffan Schmidt, Veit Althoff, Lisa M. Munter, Shaobo Jin, Susanne Rosqvist, Urban Lendahl, Gerd Multhaup, and Johan Lundkvist. 2014. “Characterization of Intermediate Steps in Amyloid Beta (A $\beta$ ) Production under Near-Native Conditions.” *The Journal of Biological Chemistry* 289(3):1540–50.
- Osawa, Satoko, Satoru Funamoto, Mika Nobuhara, Satoko Wada-Kakuda, Masafumi Shimojo, Sosuke Yagishita, and Yasuo Ihara. 2008. “Phosphoinositides Suppress  $\gamma$ -Secretase in Both the Detergent-Soluble and -Insoluble States.” *Journal of Biological Chemistry* 283(28):19283–92.
- Owens, Andrew P., Alan Nadin, Adam C. Talbot, Earl E. Clarke, Timothy Harrison, Huw D. Lewis, Michael Reilly, and D. J. Wrigley. 2003. “High Affinity , Bioavailable 3-Amino-1 , 4-Benzodiazepine-Based -Secretase Inhibitors.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13:4143–45.

- Ozaki, Toshinori, Yuanyuan Li, Hironobu Kikuchi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, and Akira Nakagawara. 2006. "The Intracellular Domain of the Amyloid Precursor Protein (AICD) Enhances the P53-Mediated Apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351(1):57–63.
- Padmanabhan, S. and Robert L. Baldwin. 1994. "Helix-Stabilizing Interaction between Tyrosine and Leucine or Valine When the Spacing Is  $i, i + 4$ ." *Journal of Molecular Biology* 241(5):706–13.
- Padula, Pablo La, Juanita Bustamante, and Lidia E. Costa. 2008. "Time Course of Regression of the Protection Conferred by Simulated High Altitude to Rat Myocardium : Correlation with MtNOS." *Journal of Applied Physiology* 105(3):951–57.
- Page, Richard M., Karlheinz Baumann, Masanori Tomioka, Blanca I. Pe, Akio Fukumori, Helmut Jacobsen, Alexander Flohr, Thomas Luebbers, Laurence Ozmen, Harald Steiner, and Christian Haass. 2008. "Generation of A $\beta$ 38 and A $\beta$ 42 Is Independently and Differentially Affected by Familial Alzheimer Disease-Associated Presenilin Mutations and  $\gamma$ -Secretase Modulation." *The Journal of Biological Chemistry* 283(2):677–83.
- Pal, Debnath and Pinak Chakrabarti. 1998. "Different Types of Interactions Involving Cysteine Sulfhydryl Group in Proteins." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 15(6):1059–72.
- Panza, Francesco, Vincenzo Solfrizzi, Davide Seripa, Bruno P. Imbimbo, Madia Lozupone, Andrea Santamato, Chiara Zecca, Maria Rosaria Barulli, Antonello Bellomo, Alberto Pilotto, Antonio Daniele, Antonio Greco, and Giancarlo Logroscino. 2016. "Tau-Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer's Disease." *BioMed Research International* 1–15.
- Paola, Dimitri, Cinzia Domenicotti, Mariapaola Nitti, Antonella Vitali, Roberta Borghi, Damiano Cottalasso, Damiano Zaccheo, Patrizio Odetti, Paola Strocchi, Umberto M. Marinari, Massimo Tabaton, and Maria A. Pronzato. 2000. "Oxidative Stress Induces Increase in Intracellular Amyloid  $\beta$ -Protein Production and Selective Activation of BI and BII PKCs in NT2 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 646(2):642–46.
- Papouin, Thomas, Laurent Ladepeche, Jerome Ruel, Silvia Sacchi, Marilynne Labasque, Marwa Hanini, Thomas Papouin, Laurent Lade, Laurent Groc, Loredano Pollegioni, Jean-pierre Mothet, Neurocentre Magendie, and Crnm U. M. R. Cnrs. 2012. "Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists." *Cell* 150(3):633–46.
- Pardossi-Piquard, Raphaëlle, Agnès Petit, Toshitaka Kawai, Claire Sunyach, Cristine Alves Da Costa, Bruno Vincent, Sabine Ring, Luciano D'Adamio, Jie Shen, Ulrike Müller, Peter St George Hyslop, and Frédéric Checler. 2005. "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A $\beta$ -Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of BAPP and APLP." *Neuron* 46(4):541–54.
- Parent, T., Natalie Y. Barnes, Yoshihito Taniguchi, Gopal Thinakaran, and Sangram S. Sisodia. 2005. "Presenilin Attenuates Receptor-Mediated Signaling and Synaptic Function." *The Journal of Neuroscience* 25(6):1540–49.
- Parhizkar, Samira, Thomas Arzberger, Matthias Brendel, Gernot Kleinberger, Maximilian Deussing, Carola Focke, Brigitte Nuscher, Monica Xiong, Alireza Ghasemigharagoz, Natalie Katzmarski, Susanne Krasemann, Stefan F. Lichtenthaler, Stephan A. Müller, Alessio Colombo, Laura Sebastian Monasor, Sabina Tahirovic, Jochen Herms, Michael Willem, Nadine Pettkus, Oleg Butovsky, Peter Bartenstein, Dieter Edbauer, Axel Rominger, Ali Ertürk, Stefan A. Grathwohl, Jonas J. Neher, David M. Holtzman, Melanie Meyer-Luehmann, and



- Christian Haass. 2019. "Loss of TREM2 Function Increases Amyloid Seeding but Reduces Plaque-Associated ApoE." *Nature Neuroscience* 22(2):191–204.
- Park, Hyun Kyung, Lyul Na Duk, Jae Hong Lee, Jong Won Kim, and Chang Seok Ki. 2008. "Identification of PSEN1 and APP Gene Mutations in Korean Patients with Early-Onset Alzheimer's Disease." *Journal of Korean Medical Science* 23(2):213–17.
- Parks, Annette L. and Daniel Curtis. 2007. "Presenilin Diversifies Its Portfolio." *Trends in Genetics* 23(3):140–50.
- Parks, Janice K., Trisha S. Smith, Patricia A. Trimmer, James P. Bennett Jr, and W. Davis Parker Jr. 2001. "Neurotoxic A $\beta$  Peptides Increase Oxidative Stress in Vivo through NMDA-Receptor and Nitric-Oxide-Synthase Mechanisms , and Inhibit Complex IV Activity and Induce a Mitochondrial Permeability Transition in Vitro." *Journal of Neurochemistry* 76(4):1050–56.
- Parsons, Matthew P. and Lynn A. Raymond. 2014. "Review Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders." *Neuron* 82(2):279–93.
- Pasternack, Jennifer M., Mark R. Palmert, Marianne Usiak, Rang Wang, Heidi Zurcher-neely, Patricia A. Gonzalez-dewhitt, Michael B. Fairbanks, Tobun Cheung, Deborah Blades, Robert L. Heinrikson, Barry D. Greenberg, Robert J. Cotter, and Steven G. Younkin J. 1992. "Alzheimer's Disease and Control Brain Contain Soluble Derivatives." *Biochemistry* 31(44):10936–40.
- Pasternak, Stephen H., Richard D. Bagshaw, Marianne Guiral, Sunqu Zhang, Cameron A. Ackerley, Brian J. Pak, John W. Callahan, and Don J. Mahuran. 2003. "Presenilin-1, Nicastrin, Amyloid Precursor Protein, and Gamma-Secretase Activity Are Co-Localized in the Lysosomal Membrane." *The Journal of Biological Chemistry* 278(29):26687–94.
- Pera, Alex, Andreas Barth, Ludmilla Morozova-roche, and Astrid Gra. 2009. "Influence of Residue 22 on the Folding , Aggregation Profile , and Toxicity of the Alzheimer's Amyloid  $\beta$  Peptide." *Biophysical Journal* 97(1):277–85.
- Peretto, Ilaria, Stefano Radaelli, Carlo Parini, Michele Zandi, Luca F. Raveglia, Giulio Dondio, Laura Fontanella, Paola Misiano, Chiara Bigogno, Andrea Rizzi, Benedetta Riccardi, Marcello Biscioli, Silvia Marchetti, Paola Puccini, Silvia Catinella, Ivano Rondelli, Valentina Cenacchi, Pier Tonino Bolzoni, Paola Caruso, Gino Villetti, Fabrizio Facchinetti, Elda Del Giudice, Nadia Moretto, and Bruno P. Imbimbo. 2005. "Synthesis and Biological Activity of Flurbiprofen Analogues as Selective Inhibitors of  $\beta$ -Amyloid1-42 Secretion." *Journal of Medicinal Chemistry* 48(18):5705–20.
- Perrone, Lorena, Emmanuelle Mothes, Maeva Vignes, and Anaïs Mockel. 2010. "Copper Transfer from Cu – A b to Human Serum Albumin Inhibits Aggregation , Radical Production and Reduces A $\beta$  Toxicity." *ChemBioChem* 11(1):110–18.
- Petit, A., A. Pasini, C. Alves Costa, E. Ayral, J. F. Hernandez, C. J. Phiel, P. Marambaud, S. Wilk, M. Farzan, P. Fulcrand, J. Martinez, D. Andrau, and F. Checler. 2003. "JLK Isocoumarin Inhibitors : Selective  $\gamma$ -Secretase Inhibitors That Do Not Interfere With Notch Pathway In Vitro or In Vivo." *Journal of Neuroscience Research* 74(3):370–77.

- Petit, Agnès, Frédéric Bihel, Cristine Alvès, Olivier Pourquié, Frédéric Checler, and Jean-louis Kraus. 2001. "New Protease Inhibitors Prevent  $\gamma$ -Secretase-Mediated Production of A $\beta$ 40/42 without Affecting Notch Cleavage." *Nature Cell Biology* 3:507–11.
- Petralia, R. S., Y. X. Wang, F. Hua, Z. Yi, A. Zhou, L. Ge, F. A. Stephenson, and R. J. Wenthold. 2010. "Organization of NMDA Receptors at Extrasynaptic Locations." *Neuroscience* 167(1):68–87.
- Pettersson, Martin, Douglas S. Johnson, John M. Humphrey, W. Christopher, Edelweiss Evrard, Ivan Efremov, Gregory W. Kauffman, Antonia F. Stepan, Cory M. Stiff, Longfei Xie, Kelly R. Bales, Eva Hajos-korcsok, Heather E. Murrey, Leslie R. Pustilnik, Stefanus J. Steyn, Kathleen M. Wood, and Patrick R. Verhoest. 2015. "Discovery of Indole-Derived Pyridopyrazine-1,6-Dione  $\gamma$ -Secretase Modulators That Target Presenilin." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(4):908–13.
- Pettersson, Martin, Douglas S. Johnson, Chakrapani Subramanyam, Kelly R. Bales, Christopher W. Ende, Benjamin A. Fish, Michael E. Green, Gregory W. Kau, Patrick B. Mullins, Thayalan Navaratnam, Subas M. Sakya, Cory M. Sti, Tuan P. Tran, Longfei Xie, Liming Zhang, Leslie R. Pustilnik, Beth C. Vetelino, Kathleen M. Wood, Nikolay Pozdnyakov, Patrick R. Verhoest, and Christopher J. O. Donnell. 2014. "Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of a Novel Series of Pyridopyrazine-1,6-Dione  $\gamma$  - Secretase Modulators." *Journal of Medicinal Chemistry* 57:1046–62.
- Phinney, A. L., M. E. Calhoun, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, and H. Zheng. 1999. "No Hippocampal Neuron or Synaptic Bouton Loss in Learning-Impaired Aged  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein-Null Mice." *Neuroscience* 90(4):1207–16.
- Piccini, Alessandra, Gianluigi Zanusso, Roberta Borghi, Cristiana Noviello, Salvatore Monaco, Roberta Russo, Gianluca Damonte, Andrea Armirotti, Matteo Gelati, Renzo Giordano, Pamela Zambenedetti, Claudio Russo, Bernardino Ghetti, and Massimo Tabaton. 2007. "Association of a Presenilin 1 S170F Mutation with a Novel Alzheimer Disease Molecular Phenotype." *Archives of Neurology* 64(5):738–45.
- Poirel, Odile, Catherine Videau, Jean Philippe, Alireza Kashani, Catherine Fallet-bianco, Axelle Simon, and Bruno Giros. 2008. "Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the Prefrontal Cortex Is Correlated with Cognitive Decline in Alzheimer Disease." *Neurobiology of Aging* 29(11):1619–30.
- Polavarapu, Rohini, Jie An, Chen Zhang, and Manuel Yepes. 2008. "Regulated Intramembrane Proteolysis of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Ischemic Cell Death." *The American Journal of Pathology* 172(5):1355–62.
- Pontecorvo, Michael J., Michael D. Devous, Ian Kennedy, Michael Navitsky, Ming Lu, Nicholas Galante, Stephen Salloway, P. Murali Doraiswamy, Sudeepti Southekal, Anupa K. Arora, Anne McGeehan, Nathaniel C. Lim, Hui Xiong, Stephen P. Truocchio, Abhinay D. Joshi, Sergey Shcherbinin, Brian Teske, Adam S. Fleisher, and Mark A. Mintun. 2019. "A Multicentre Longitudinal Study of Flortaucipir (18F) in Normal Ageing, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Dementia." *Brain : A Journal of Neurology* 142(6):1723–35.
- Pooler, Amy M., Manuela Polydoro, Eduardo A. Maury, Samantha B. Nicholls, Snigdha M. Reddy, Susanne Wegmann, Christopher William, Lubna Saqran, Ozge Cagsal-Getkin, Rose Pitstick, David R. Beier, George A. Carlson, Tara L. Spires-Jones, and Bradley T. Hyman. 2015. "Amyloid Accelerates Tau Propagation and Toxicity in a Model of Early Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 3:14.

- Poorkaj, Parvoneh, Vikram Sharma, Leojean Anderson, Ellen Nemens, Ma Elias Alonso, Harry Orr, June White, Leonard Heston, Thomas D. Bird, and Gerard D. Schellenberg. 1998. "Missense Mutations in the Chromosome 14 Familial Alzheimer's Disease Presenilin 1 Gene." *Human Mutation* 11:216–21.
- Popot, J. L., T. Althoff, D. Bagnard, J. L. Banères, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, L. J. Catoire, P. Champeil, D. Charvolin, M. J. Cocco, G. Crémel, T. Dahmane, L. M. de la Maza, C. Ebel, F. Gabel, F. Giusti, Y. Gohon, E. Goormaghtigh, E. Guittet, J. H. Kleinschmidt, W. Kühlbrandt, C. Le Bon, K. L. Martinez, M. Picard, B. Pucci, J. N. Sachs, C. Tribet, C. van Heijenoort, F. Wien, F. Zito, and M. Zoonens. 2011. "Amphipols From A to Z." *Annual Review of Biophysics* 40:379–408.
- Porrini, V., A. Lanzillotta, C. Branca, M. Benarese, E. Parrella, L. Lorenzini, L. Calza, R. Flaibani, P. F. Spano, B. P. Imbimbo, and M. Pizzi. 2015. "CHF5074 (CSP-1103) Induces Microglia Alternative Activation in Plaque-Free Tg2576 Mice and Primary Glial Cultures Exposed to Beta-Amyloid." *Neuroscience* 302:112–20.
- Portelius, Erik, Bianca Van Broeck, Ulf Andreasson, Mikael K. Gustavsson, Mar Mercken, Henrik Zetterberg, Herman Borghys, and Kaj Blennow. 2010. "Acute Effect on the A $\beta$  Isoform Pattern in CSF in Response to  $\gamma$  Secretase Modulator and Inhibitor Treatment in Dogs." *Journal of Alzheimer's Disease* 21(3):1005–12.
- Portelius, Erik, Robert A. Dean, Ulf Andreasson, Niklas Mattsson, Anni Westerlund, Maria Olsson, Ronald Bradley Demattos, Margaret M. Racke, Henrik Zetterberg, Patrick C. May, and Kaj Blennow. 2014. " $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1(BACE1) Inhibitor Treatment Induces A $\beta$ 5-X Peptides through Alternative Amyloid Precursor Protein Cleavage." *Alzheimer's Research & Therapy* 6(75):1–8.
- Pozdnyakov, Nikolay, Heather E. Murrey, Christina J. Crump, Martin Pettersson, T. Eric Ballard, Christopher W. Am Ende, Kwangwook Ahn, Yue Ming Li, Kelly R. Bales, and Douglas S. Johnson. 2013. " $\gamma$ -Secretase Modulator (GSM) Photoaffinity Probes Reveal Distinct Allosteric Binding Sites on Presenilin." *Journal of Biological Chemistry* 288(14):9710–20.
- Price, Joseph L., Daniel W. McKeel, Virginia D. Buckles, Catherine M. Roe, Chengjie Xiong, Michael Grundman, Lawrence A. Hansen, Ronald C. Petersen, Joseph E. Parisi, Dennis W. Dickson, Charles D. Smith, Daron G. Davis, Frederick A. Schmitt, William R. Markesbery, Jeffrey Kaye, Roger Kurlan, Christine Hulette, Brenda F. Kurland, Roger Higdon, Walter Kukull, and John C. Morris. 2009. "Neuropathology of Nondemented Aging: Presumptive Evidence for Preclinical Alzheimer Disease." *Neurobiology of Aging* 30(7):1026–36.
- Prihar, Guy, Auli Verkkoniemi, Jordi Perez-Tur, Richard Crook, Sarah Lincoln, Henry Houlden, Mirja Somer, Anders Paetau, Hannu Kalimo, Andrew Grover, Liisa Myllykangas, Mike Hutton, John Hardy, and Matti Haltia. 1999. "Alzheimer Disease PS-1 Exon 9 Deletion Defined." *Nature Medicine* 5(10):1090.
- Probst, Gary and Ying Zi Xu. 2012. "Small-Molecule BACE1 Inhibitors: A Patent Literature Review (2006 - 2011)." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 22(5):511–40.
- Prokop, Stefan, Keiro Shirovani, Dieter Edbauer, Christian Haass, and Harald Steiner. 2004. "Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N- / C-Terminal Fragment Heterodimer within the  $\gamma$ -Secretase Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 279(22):23255–61.
- Purow, Benjamin. 2012. "NOTCH INHIBITION AS A PROMISING NEW APPROACH TO CANCER THERAPY." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 727:305–19.

- Qi-Takahara, Y., Maho Morishima-Kawashima, Tanimura Yu, Geogia Dolios, Naoko Hirotsu, Yuko Horikoshi, Fuyuki Kametani, Masahiro Maeda, Saido takaomi C, Rong Wang, and Yasuo Ihara. 2005. "Longer Forms of Amyloid Protein: Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Neuroscience* 25(2):436–45.
- Qu, Jing, Tomohiro Nakamura, Gang Cao, Emily A. Holland, Scott R. Mckercher, and Stuart A. Lipton. 2011. "S-Nitrosylation Activates Cdk5 and Contributes to Synaptic Spine Loss Induced by  $\beta$ -Amyloid Peptide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(34):14330–35.
- Querfurth, H. W. and D. J. Selkoe. 1994. "Calcium Ionophore Increases Amyloid Beta Peptide Production by Cultured Cells." *Biochemistry* 33(15):4550–61.
- Rajendran, Reshmi, Ren Minqin, Maria Dolores, Gemma Casadesus, Mark A. Smith, George Perry, Barry Halliwell, and Frank Watt. 2009. "Biochemical and Biophysical Research Communications A Novel Approach to the Identification and Quantitative Elemental Analysis of Amyloid Deposits — Insights into the Pathology of Alzheimer ' s Disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382(1):91–95.
- Ramassamy, Charles, Daiana Averill, Uwe Beffert, Stephane Bastianetto, Louise Theroux, Suzanne Lussier-Cacan, Jeffry S. Cohn, Yves Christen, Jean Davignon, Remi Quirion, and Judes Poirier. 1999. "OXIDATIVE DAMAGE AND PROTECTION BY ANTIOXIDANTS IN THE FRONTAL CORTEX OF ALZHEIMER ' S DISEASE IS RELATED TO THE APOLIPOPROTEIN E GENOTYPE." *Free Radical Biology & Medicine* 27(5–6):544–53.
- Ramassamy, Charles, Diana Averill, Uwe Beffert, Louise Theroux, Suzanne Lussier-cacan, Jeffrey S. Cohn, Yves Christen, Alain Schoofs, and H. Jean Davignon. 2000. "Oxidative Insults Are Associated with Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer ' s Disease Brain." *Neurobiology of Disease* 7(1):23–37.
- Ramírez, María Javier. 2013. "5-HT 6 Receptors and Alzheimer ' s Disease." *Alzheimer's Research & Therapy* 5(2):1–8.
- Ramírez, Valerie T., Eva Ramos-Fernández, and Nibaldo C. Inestrosa. 2016. "The Gao Activator Mastoparan-7 Promotes Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons." *Neural Plasticity* 2016.
- Rapoport, Tom A. 2007. "Protein Translocation across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes." *Nature* 450:663–69.
- Ratovitski, Tamara, Hilda H. Slunt, Gopal Thinakaran, Donald L. Price, Sangram S. Sisodia, and David R. Borchelt. 1997. "Endoproteolytic Processing and Stabilization of Wild-Type and Mutant Presenilin." *The Journal of Biological Chemistry* 272(39):24536–41.
- Readhead, Ben, Jean Vianney Haure-Mirande, Cory C. Funk, Matthew A. Richards, Paul Shannon, Vahram Haroutunian, Mary Sano, Winnie S. Liang, Noam D. Beckmann, Nathan D. Price, Eric M. Reiman, Eric E. Schadt, Michelle E. Ehrlich, Sam Gandy, and Joel T. Dudley. 2018. "Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus." *Neuron* 99(1):64-82.e7.
- Richter, Luise, Lisa-marie Munter, Julia Ness, Peter W. Hildebrand, Muralidhar Dasari, and Stephanie Unterreitmeier. 2010. "Directly Bind to A $\beta$  and Interfere with Amyloid Precursor Protein ( APP ) Transmembrane Dimerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(33):14597–602.

- Risacher, Shannon L., Sungeun Kim, Kwangsik Nho, Tatiana Foroud, Li Shen, Ronald C. Petersen, Clifford R. Jack, Laurel A. Beckett, Paul S. Aisen, Robert A. Koeppe, William J. Jagust, Leslie M. Shaw, John Q. Trojanowski, Michael W. Weiner, Andrew J. Saykin, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). 2015. "APOE Effect on Alzheimer's Disease Biomarkers in Older Adults with Significant Memory Concern." *Alzheimer's and Dementia* 11(12):1417–29.
- Roberds, Steven L., John Anderson, Guriqbal Basi, Michael J. Bienkowski, Daniel G. Branstetter, Karen S. Chen, Stephen B. Freedman, Normand L. Frignon, Dora Games, Kang Hu, Kelly Johnson-Wood, Karl E. Kappenman, Thomas T. Kawabe, Ismail Kola, Ralf Kuehn, Michael Lee, Weiqun Liu, Ruth Motter, Nanette F. Nichols, Michael Power, David W. Robertson, Dale Schenk, Michael Schoor, George M. Shopp, Mary E. Shuck, Sukanto Sinha, Kjell A. Svensson, Gwen Tatsuno, Hartmut Tintrup, John Wijsman, Sarah Wirhgt, and Lisa McConlogue. 2001. "BACE Knockout Mice Are Healthy despite Lacking the Primary Beta-Secretase Activity in Brain: Implications for Alzheimer's Disease Therapeutics." *Human Molecular Genetics* 10(12):1317–24.
- Rochin, Leila, Ilse Hurbain, Lutgarde Serneels, Cecile Fort, Brenda Watt, Pascal Leblanc, Michael S. Marks, Bart De Strooper, Graça Raposo, and Guillaume Van Niel. 2013. "BACE2 Processes PMEL to Form the Melanosome Amyloid Matrix in Pigment Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(26):10658–63.
- Rodriguez-Rodriguez, Cristina, Natalia Sanchez-de-Groot, Albert Rimola, Angel Alvarez-Larena, Vega Lloverras, Vidal Gancedo, Salvador Ventura, Josep Vendrell, Mariona Sodupe, and Pilar Gonzalez-Duarte. 2009. "Design , Selection , and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer ' s Disease." *Journal of the American Chemical Society* 131(4):1436–51.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, C. Wu, G. Levesque, Y. Liang, E. a Rogaeva, M. Ikeda, K. Holman, C. Lin, W. J. Lukiw, P. J. de Jong, P. E. Fraser, J. M. Rommens, and P. St George-Hyslop. 1997. "Analysis of the 5' Sequence, Genomic Structure, and Alternative Splicing of the Presenilin-1 Gene (PSEN1) Associated with Early Onset Alzheimer Disease." *Genomics* 40(3):415–24.
- Rogaeva, E. a, K. C. Fafel, Y. Q. Song, H. Medeiros, C. Sato, Y. Liang, E. Richard, E. I. Rogaev, P. Frommelt, a D. Sadvnick, W. Meschino, K. Rockwood, M. a Boss, R. Mayeux, and P. St George-Hyslop. 2001. "Screening for PS1 Mutations in a Referral-Based Series of AD Cases: 21 Novel Mutations." *Neurology* 57(4):621–25.
- Rogarv, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, S. Sorbi, B. Nacmias, S. Piacentini, L. Amaducci, I. Chumakov, D. Cohen, L. Lannfelt, P. E. Fraser, J. M. Rommens, and P. H. ST George-Hyslop. 1995. "Familial Alzheimer's Disease in Kindreds with Missense Mutations in a Gene on Chromosome 1 Related to the Alzheimer's Disease Type 3 Gene." *Nature* 376(31):775–78.
- Rosenberg, Jonathan B., Michael G. Kaplitt, Bishnu P. De, Alvin Chen, Thomas Flagiello, Christiana Salami, Eduard Pey, Lingzhi Zhao, Rodolfo J. Ricart Arbona, Sebastien Monette, Jonathan P. Dyke, Douglas J. Ballon, Stephen M. Kaminsky, Dolan Sondhi, Gregory A. Petsko, Steven M. Paul, and Ronald G. Crystal. 2018. "AAVrh.10-Mediated APOE2 Central Nervous System Gene Therapy for APOE4-Associated Alzheimer's Disease." *Human Gene Therapy Clinical Development* 29(1):24–47.

- Roses, Allen D. 1996. "Apolipoprotein E Alleles As Risk Factors in Alzheimer's Disease." *Annual Review of Medicine* 47:387–400.
- Rozga, Małgorzata, Marcin Klonecki, Michał Dadlez, and Wojciech Bal. 2010. "A Direct Determination of the Dissociation Constant for the Cu (II) Complex of Amyloid 1 - 40 Peptide." *Chemical Research in Toxicology* 23(2):336–40.
- Rulifson, Ingrid C., Ping Cao, Li Miao, David Kopecky, Linda Huang, Ryan D. White, Kim Samayoa, Jonitha Gardner, Xiaosu Wu, Kui Chen, Trace Tsuruda, Oliver Homann, Helene Baribault, Harvey Yamane, Tim Carlson, Jed Wiltzius, and Yang Li. 2016. "Identification of Human Islet Amyloid Polypeptide as a BACE2 Substrate." *PLoS ONE* 11(2):e0147254.
- Rupp, Carsten, Konrad Beyreuther, Konrad Maurer, and Stefan Kins. 2014. "Short Report A Presenilin 1 Mutation in the First Case of Alzheimer's Disease : Revisited." *Alzheimer's & Dementia* 10(6):869–72.
- Sagi, Sarah A., Christian B. Lessard, Kellen D. Winden, Hiroko Maruyama, Jeremy C. Koo, Sascha Weggen, Thomas L. Kukar, Todd E. Golde, and Edward H. Koo. 2011. "Substrate Sequence Influences  $\gamma$ -Secretase Modulator Activity , Role of the Transmembrane Domain of the Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 286(46):39794–803.
- Saito, Takashi, Takahiro Suemoto, Nathalie Brouwers, Kristel Slegers, Satoru Funamoto, Naomi Mihira, Yukio Matsuba, Kazuyuki Yamada, Per Nilsson, Jiro Takano, Masaki Nishimura, Nobuhisa Iwata, Christine Van Broeckhoven, Yasuo Ihara, and Takaomi C. Saido. 2011. "Potent Amyloidogenicity and Pathogenicity of A $\beta$  43." *Nature Publishing Group* 14(8):1023–32.
- Salloway, Stephen, Reisa Sperling, Nick C. Fox, Kaj Blennow, William Klunk, Murray Raskind, Marwan Sabbagh, Lawrence S. Honig, Anton P. Porsteinsson, Steven Ferris, Marcel Reichert, Nzeera Ketter, Bijan Nejadnik, Volkmar Guenzler, Maja Miloslavsky, Daniel Wang, Yuan Lu, Julia Lull, Iulia Cristina Tudor, Enchi Liu, Michael Grundman, Eric Yuen, Ronald Black, and H. Robert Brashear. 2014. "Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *New England Journal of Medicine* 370(4):322–33.
- Sander, Kersti n , Tim Kottke, and Holger Stark. 2008. "Histamine H<sub>3</sub> Receptor Antagonists Go to Clinics." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(12):2163–81.
- Sannerud, Ragna, Cary Esselens, Paulina Ejsmont, Rafael Mattera, Leila Rochin, Arun Kumar Tharkeshwar, Aets, Greet De Baets, Veerle De Wever, Roger Habets, Veerle Baert, Wendy Vermeire, Christine Michiels, Arjan J. Groot, Rosanne Wouters, Katleen Dillen, Katlijn Vints, Pieter Baatsen, Sebastian Munck, Rita Derua, Etienne Waelkens, Guriqbal S. Basi, Mark Mercken, Marc Vooijs, Mathieu Bollen, Joost Schymkowitz, Frederic Rousseau, Juan S. Bonifacino, Guillaume Van Niel, Bart De Strooper, and Wim Annaert. 2016. "Restricted Location of PSEN2/ $\gamma$ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A $\beta$  Pool." *Cell* 166(1):193–208.
- Sano, Yoshitake, Tadashi Nakaya, Steve Pedrini, Shizu Takeda, Kanae Iijima-ando, Koichi Iijima, and Paul M. Mathews. 2006. "Physiological Mouse Brain A $\beta$  Levels Are Not Related to the Phosphorylation State of Threonine-668 of Alzheimer ' s APP." *PLoS ONE* 1(1).
- Sardi, S. Pablo, Joshua Murtie, Samir Koirala, Brooke A. Patten, and Gabriel Corfas. 2006. "Presenilin-Dependent ErbB4 Nuclear Signaling Regulates the Timing of Astrogenesis in the Developing Brain." *Cell* 127(1):185–97.

- Sarell, Claire J., Christopher D. Syme, Stephen E. J. Rigby, and John H. Viles. 2009. "Copper (II) Binding to Amyloid- $\beta$  Fibrils of Alzheimer's Disease Reveals a Picomolar Affinity: Stoichiometry and Coordination Geometry Are Independent of A $\beta$  Oligomeric." *Biochemistry* 48(20):4388–4402.
- Sassi, Celeste, Rita Guerreiro, Raphael Gibbs, Jinhui Ding, Michelle K. Lupton, Claire Troakes, Safa Al-sarraj, Michael Niblock, Jean-marc Gallo, Jihad Adnan, Richard Killick, Kristelle S. Brown, Christopher Medway, Jenny Lord, James Turton, Jose Bras, Kevin Morgan, John F. Powell, Andrew Singleton, and John Hardy. 2014. "Investigating the Role of Rare Coding Variability in Mendelian Dementia Genes ( APP, PSEN1, PSEN2, GRN, MAPT, and PRNP) in Late-Onset Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 35:1–6.
- Sato, Chihiro, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2006. "Structure of the Catalytic Pore of  $\gamma$ -Secretase Probed by the Accessibility of Substituted Cysteins." *The Journal of Neuroscience* 26(46):12081–88.
- Sato, Chihiro, Shizuka Takagi, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2008. "The C-Terminal PAL Motif and Transmembrane Domain 9 of Presenilin 1 Are Involved in the Formation of the Catalytic Pore of the  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Neuroscience* 28(24):6264–71.
- Sato, T., T. -c. Tang, G. Reubins, J. Z. Fei, T. Fujimoto, P. Kienlen-Campard, S. N. Constantinescu, J. N. Octave, S. Aimoto, and S. O. Smith. 2009. "A Helix-to-Coil Transition at the  $\epsilon$ -Cut Site in the Transmembrane Dimer of the Amyloid Precursor Protein Is Required for Proteolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(5):1421–26.
- Sato, Takeshi, Tzu Chun Tang, Gabriella Reubins, Jeffrey Z. Fei, Taiki Fujimoto, Pascal Kienlen-Campard, Stefan N. Constantinescu, Jean Noel Octave, Saburo Aimoto, and Steven O. Smith. 2009. "A Helix-to-Coil Transition at the  $\epsilon$ -Cut Site in the Transmembrane Dimer of the Amyloid Precursor Protein Is Required for Proteolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(5):1421–26.
- Saura, Carlos A., Taisuke Tomita, Frances Davenport, Christie L. Harris, Takeshi Iwatsubo, and Gopal Thinakaran. 1999. "Evidence That Intramolecular Associations between Presenilin Domains Are Obligatory for Endoproteolytic Processing." *The Journal of Biological Chemistry* 274(20):13818–23.
- Saura, Carlos A., Taisuke Tomita, Salvador Soriano, Masaaki Takahashi, Jae-yoon Leem, Toshiyuki Honda, Edward H. Koo, Takeshi Iwatsubo, and Gopal Thinakaran. 2000. "The Nonconserved Hydrophilic Loop Domain of Presenilin ( PS ) Is Not Required for PS Endoproteolysis or Enhanced A  $\beta$  42 Production Mediated by Familial Early Onset Alzheimer's Disease-Linked PS Variants." *The Journal of Biological Chemistry* 275(22):17136–42.
- Sayed, Faten A., Maria Telpoukhovskaia, Lay Kodama, Yaqiao Li, Yungui Zhou, David Le, Axel Hauduc, Connor Ludwig, Fuying Gao, Claire Clelland, Lihong Zhan, Yonatan A. Cooper, Dimitrios Davalos, Katerina Akassoglou, Giovanni Coppola, and Li Gan. 2018. "Differential Effects of Partial and Complete Loss of TREM2 on Microglial Injury Response and Tauopathy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(40):10172–77.
- Schedin-weiss, Sophia, Bengt Winblad, and Lars O. Tjernberg. 2014. "The Role of Protein Glycosylation in Alzheimer Disease." *FEBS Journal* 281(1):46–62.
- Scheinfeld, Meir H., Enrico Ghersi, Karen Laky, B. J. Fowlkes, and Luciano D. Adamio. 2002. "Processing of  $\beta$ -Amyloid Precursor-like Protein-1 and -2 by  $\gamma$ -Secretase Regulates Transcription." *The Journal of Biological Chemistry* 277(46):44195–201.

- Schellenberg, Gerard D., Thomas D. Bird, Ellen M. Wijsman, Harry T. Orr, Leojean Anderson, Ellen Nemens, June A. White, Lori Bonnycastle, James L. Weber, M. Elisa Alonso, Huntington Potter, Leonard L. Heston, and George M. Martin. 1992. "Genetic Linkage Evidence for a Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 14." *Science* 21(22):668–71.
- Schenk, Dale, Robin Barbour, Whitney Dunn, Grace Gordon, Henry Grajeda, Teresa Guido, Kang Hu, Jiping Huang, Kelly Johnson-wood, Karen Khan, Dora Kholodenko, Mike Lee, Zhenmei Liao, Ivan Lieberburg, Ruth Motter, Linda Mutter, Ferdie Soriano, George Shopp, Nicki Vasquez, Christopher Vandevent, Shannan Walker, Mark Wogulis, Ted Yednock, Dora Games, and Peter Seubert. 1999. "Immunization with Amyloid- $\beta$  Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse." *Nature* 400(6740):173–77.
- Schilling, Stephan, Ulrike Zeitschel, Torsten Hoffmann, Ulrich Heiser, Mike Francke, Astrid Kehlen, Max Holzer, Birgit Hutter-Paier, Manuela Prokesch, Manfred Windisch, Wolfgang Jagla, Dagmar Schlenzig, Christiane Lindner, Thomas Rudolph, Gunter Reuter, Holger Cynis, Dirk Montag, Hans Ulrich Demuth, and Steffen Rossner. 2008. "Glutamyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A $\beta$  and Alzheimer's Disease-like Pathology." *Nature Medicine* 14(10):1106–11.
- Schneider, Lon S., Karen S. Dagerman, and Julian P. T. Higgins. 2011. "Lack of Evidence for the Efficacy of Memantine in Mild Alzheimer Disease." *Archives of Neurology* 68(8):911–18.
- Schrenk-Siemens, Katrin, Siro Perez-Alcala, Jens Richter, Emmanuel Lacroix, Joseph Rahuel, Martin Korte, Ulrike Müller, Yves-Alain Barde, and Miriam Bibel. 2008. "Embryonic Stem Cell-Derived Neurons as a Cellular System to Study Gene Function: Lack of Amyloid Precursor Proteins APP and APLP2 Leads to Defective Synaptic Transmission." *Stem Cells* 26(8):2153–63.
- Schroeter, Eric H., Jeffrey A. Kisslinger, and Raphael Kopan. 1998. "Notch-1 Signalling Requires Ligand-Induced Proteolytic Release of Intracellular Domain." *Nature* 393(6683):382–86.
- Sea, Kevin, Se Hui Sohn, Armando Durazo, Yüwei Sheng, Bryan F. Shaw, Xiaohang Cao, Alexander B. Taylor, Lisa J. Whitson, Stephen P. Holloway, P. John Hart, Diane E. Cabelli, Edith Butler Gralla, and Joan Selverstone. 2015. "Insights into the Role of the Unusual Disulfide Bond in Copper-Zinc Superoxide Dismutase." *The Journal of Biological Chemistry* 290(4):2405–18.
- Seal, Rebecca P., Barbara H. Leighton, and Susan G. Amara. 1998. "Transmembrane Topology Mapping Using Biotin-Containing Sulfhydryl Reagents." *Methods in Enzymology* 296(1989):318–31.
- Seeger, Mary, Christer Nordstedt, Suzana Petanceska, Dora M. Kovacs, Gunnar K. Gouras, Solveig Hahne, Paul Fraser, Lyne Levesque, Andrew J. Czernik, Sangram S. Sisodia, Peter St George-Hyslop, Gopal Thinakaran, Rudolph E. Tanzi, Paul Greengard, and Sam Gandy. 1997. "Evidence for Phosphorylation and Oligomeric Assembly of Presenilin 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(10):5090–94.
- Seiffert, Dietmar, Jodi D. Bradley, Cynthia M. Rominger, David H. Rominger, Fude Yang, Jere E. Meredith Jr, Qian Wang, Arthur H. Roach, Lorin A. Thompson, Susan M. Spitz, Jeffrey N. Higaki, Shimoga R. Prakash, Andrew P. Combs, Robert A. Copeland, Stephen P. Arneric, Paul R. Hartig, David W. Robertson, Barbara Cordell, Andrew M. Stern, Richard E. Olson, and Robert Zaczek. 2000. "Presenilin-1 and -2 Are Molecular Targets for  $\gamma$  Secretase Inhibitors." *The Journal of Biological Chemistry* 275(44):34086–91.



- Sekioka, Ryuichi, Eriko Honjo, Shugo Honda, Hideyoshi Fuji, Hiroki Akashiba, Yasuyuki Mitani, and Shingo Yamasaki. 2017. "Discovery of Novel Scaffolds for  $\gamma$ -Secretase Modulators without an Arylimidazole Moiety." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 450:4–11.
- Selkoe, Dennis J. 2002a. "Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure." *Science* 298:789–92.
- Selkoe, Dennis J. 2002b. "Deciphering the Genesis and Fate of Amyloid  $\beta$ -Protein Yields Novel Therapies for Alzheimer Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 110(10):1375–81.
- Selkoe, Dennis J. 2019. "Alzheimer Disease and Aducanumab: Adjusting Our Approach." *Nature Reviews Neurology* 15(7):365–66.
- Selkoe, Dennis and Raphael Kopan. 2003. "NOTCH AND PRESENILIN: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration." *Neuroscience* 26:565–97.
- Serenó, L., M. Coma, M. Rodríguez, P. Sánchez-Ferrer, M. B. Sánchez, I. Gich, J. M. Agulló, M. Pérez, J. Avila, C. Guardia-Laguarta, J. Clarimón, A. Lleó, and T. Gómez-Isla. 2009. "A Novel GSK-3 $\beta$  Inhibitor Reduces Alzheimer's Pathology and Rescues Neuronal Loss in Vivo." *Neurobiology of Disease* 35(3):359–67.
- Serneels, Lutgarde, Jérôme Van Biervliet, Katleen Craessaerts, Tim Dejaegere, Katrien Horr , Tine Van Houtvin, Hermann Esselmann, Sabine Paul, Martin K. Schäfer, Oksana Berezovska, Bradley T. Hyman, Ben Sprangers, Raf Sciot, Lieve Moons, Mathias Jucker, Zhixiang Yang, Patrick C. May, Eric Karran, Jens Wiltfang, Rudi D. Hooge, and Bart De Strooper. 2009. " $\gamma$ -Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease." *Science* 324(5927):639–43.
- Serneels, Lutgarde, Tim Dejaegere, Katleen Craessaerts, Katrien Horr , Ellen Jorissen, Thomas Tousseyn, Sébastien Hébert, Marcel Coolen, Gerard Martens, An Zwijsen, Wim Annaert, Dieter Hartmann, and Bart De Strooper. 2005. "Differential Contribution of the Three Aph1 Genes to  $\gamma$ -Secretase Activity in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(5):1719–24.
- Sevalle, Jean, Audrey Amoyel, Philippe Robert, Marie Claude Fourni -Zaluski, Bernard Roques, and Frédéric Checler. 2009. "Aminopeptidase A Contributes to the N-Terminal Truncation of Amyloid  $\beta$ -Peptide." *Journal of Neurochemistry* 109(1):248–56.
- Sevigny, Jeff, Ping Chiao, Thierry Bussiere, Paul H. Weinreb, Leslie Williams, Marcel Maier, Robert Dunstan, Stephen Salloway, Tianle Chen, Yan Ling, John O. Gorman, Fang Qian, Mahin Arastu, Mingwei Li, Sowmya Chollate, Melanie S. Brennan, Omar Quintero-monzon, Robert H. Scannevin, H. Moore Arnold, Thomas Engber, and Kenneth Rhodes. 2016. "The Antibody Aducanumab Reduces A  $\beta$  Plaques in Alzheimer's Disease." *Nature Publishing Group* 537(7618):50–56.
- Shah, Sanjiv, Sheu Fen Lee, Katsuhiko Tabuchi, Yi Heng Hao, Cong Yu, Quincey LaPlant, Haydn Ball, Charles E. Dann, Thomas S dhof, and Gang Yu. 2005. "Nicastrin Functions as a  $\gamma$ -Secretase-Substrate Receptor." *Cell* 122(3):435–47.
- Shearman, Mark S., Dirk Beher, Earl E. Clarke, Huw D. Lewis, Tim Harrison, Peter Hunt, Alan Nadin, Adrian L. Smith, Graeme Stevenson, and Jose L. Castro. 2000. "L-685,458, an Aspartyl Protease Transition State Mimic, Is a Potent Inhibitor of Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor  $\gamma$ -Secretase Activity." *Biochemistry* 39(30):8698–8704.

- Sherrington, R., EI. Rogaev, Y. Liang, EA Rogaeva, G. Lebasque., M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, JF Foncin, AC Bruni, MP Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, Rj Polinsky, W. Wasco, har da Silva, JI Haines, Ma Pericak-Vance, RE Tanzi, Ad Roses, PE Fraser, JM Rommens, and PH St George-Hysiop. 1995. "Cloning of a Gene Bearing Missense Mutations in Early-Onset Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 375(6534):754–60.
- Shi, Yang and David M. Holtzman. 2018. "Interplay between Innate Immunity and Alzheimer Disease: APOE and TREM2 in the Spotlight." *Nature Reviews Immunology* 18(12):759–72.
- Shi, Yang, Kaoru Yamada, Shane Antony Liddelow, Scott T. Smith, Lingzhi Zhao, Wenjie Luo, Richard M. Tsai, Salvatore Spina, Lea T. Grinberg, Julio C. Rojas, Gilbert Gallardo, Kairuo Wang, Joseph Roh, Grace Robinson, Mary Beth Finn, Hong Jiang, Patrick M. Sullivan, Caroline Baufeld, Michael W. Wood, Courtney Sutphen, Lena McCue, Chengjie Xiong, Jorge L. Del-Aguila, John C. Morris, Carlos Cruchaga, Anne M. Fagan, Bruce L. Miller, Adam L. Boxer, William W. Seeley, Oleg Butovsky, Ben A. Barres, Steven M. Paul, and David M. Holtzman. 2017. "ApoE4 Markedly Exacerbates Tau-Mediated Neurodegeneration in a Mouse Model of Tauopathy." *Nature* 549(7673):523–27.
- Shimohama, Shun, Takashi Taniguchi, Motohatsu Fujiwara, and Masakuni Kameyama. 1986. "Changes in Nicotinic and Muscarinic Cholinergic Receptors in Alzheimer-Type Dementia." *Journal of Neurochemistry* 46(1):288–93.
- Shinoda, Takehiro, Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, and Chikashi Toyoshima. 2009. "Crystal Structure of the Sodium – Potassium Pump at 2.4 Å Resolution." *Nature* 459(7245):446–50.
- Shiraishi, Hirohisa, Toshihiro Marutani, Hua-qin Wang, Yasuhiro Maeda, Akihiko Takashima, Wataru Araki, Masaki Nishimura, and Katsuhiko Yanagisawa. 2006. "Reconstitution of  $\gamma$ -Secretase by Truncated Presenilin (PS) Fragments Revealed That PS C-Terminal Transmembrane Domain Is Critical for Formation of  $\gamma$ -Secretase Complex." *Genes to Cells* 11:83–93.
- Shirotani, Keiro, Dieter Edbauer, Anja Capell, Julia Schmitz, Harald Steiner, and Christian Haass. 2003. " $\gamma$ -Secretase Activity Is Conformational Change of Nicastrin." *The Journal of Biological Chemistry* 278(19):16474–77.
- Shirotani, Keiro, Dieter Edbauer, Stefan Prokop, Christian Haass, and Harald Steiner. 2004. "Identification of Distinct  $\gamma$ -Secretase Complexes with Different APH-1 Variants." *The Journal of Biological Chemistry* 279(40):41340–45.
- Shirotani, Keiro, Masanori Tomioka, Elisabeth Kremmer, Christian Haass, and Harald Steiner. 2007. "Pathological Activity of Familial Alzheimer's Disease-Associated Mutant Presenilin Can Be Executed by Six Different  $\gamma$ -Secretase Complexes." *Neurobiology of Disease* 27(1):102–7.
- Shoji, Mikio, Todd E. Golde, Jorge Ghiso, Tobun T. Cheung, Steven Estus, Lillian M. Shaffer, Xiao-dan Cai, Deborah M. McKay, Ron Tintner, Bias Frangione, and Steven G. Younkint. 1992. "Production of the Alzheimer Amyloid P3 Protein by Normal Proteolytic Processing." *Science* 258(5079):126–29.
- Sinha, Sukanto, John P. Anderson, Robin Barbour, Guriqbal S. Basi, Russell Caccavello, David Davis, Minhtam Doan, Harry F. Dovey, Normand Frigon, Jin Hong, Kirsten Jacobson-Croak, Nancy Jewett, Parmela Keim, Jeroen Knops, Ivan Lieberburg, Michael Power, Hua Tan, Gewn Tatsuno, Jay Tung, Dale Schenk, Peter Seubert, Susanna M. Suomensaaari, Shuwen Wang, Donald Walker, Jun Zhao, Lisa Mconlogue, and Varghese

- John. 1999. "Purification and Cloning of Amyloid Precursor Protein B-Secretase from Human Brain." *Nature* 402(6761):537–40.
- Sisodia, Sangram S. and Peter H. St George-hyslop. 2002. "γ -SECRETASE , NOTCH , A β AND ALZHEIMER 'S DISEASE : WHERE DO THE PRESENILINS FIT IN ?" *Nature Reviews Neuroscience* 3:281–90.
- Slunt, Hilda H., Gopal Thinakaran, Cornelia Von Koch, Amy C. Y. Lo, Rudolph E. Tanzi, and Sangram S. Sisodia. 1994. "Expression of a Ubiquitous, Cross-Reactive Homologue of the Mouse β-Amyloid Precursor Protein (APP)." *Journal of Biological Chemistry* 269(4):2637–44.
- Smolarkiewicz, Michalina, Tomasz Skrzypczak, Michał Michalak, Krzysztof Le, and J. Ross Walker. 2014. "Gamma-Secretase Subunits Associate in Intracellular Membrane Compartments in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Experimental Botany* 65(12):3015–27.
- Snow, Alan D., Joel Cummings, Thomas Lake, Qubai Hu, Luke Esposito, Judy Cam, Michael Hudson, Elizabeth Smith, and Steve Runnels. 2009. "Exebryl-1: A Novel Small Molecule Currently in Human Clinical Trials as a Disease-Modifying Drug for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's & Dementia* 5(4):P418.
- Snyder, Eric M., Yi Nong, Claudia G. Almeida, Surojit Paul, Timothy Moran, Eun Young Choi, C. Nairn, Michael W. Salter, Paul J. Lombroso, Gunnar K. Gouras, and Paul Greengard. 2005. "Regulation of NMDA Receptor Trafficking by Amyloid-β." *Nature Neuroscience* 8(8):1051–58.
- Soares, Holly D., Maciej Gasior, Jeremy H. Toyn, Jun-sheng Wang, Quan Hong, Flora Berisha, Michael T. Furlong, Joseph Raybon, Kimberley A. Lentz, Francis Sweeney, Naiyu Zheng, Billy Akinsanya, Robert M. Berman, Lorin A. Thompson, Richard E. Olson, John Morrison, Dieter M. Drexler, John E. Macor, Charlie F. Albright, and Michael K. Ahljianian. 2016. "The γ-Secretase Modulator , BMS-932481 , Modulates A b Peptides in the Plasma and Cerebrospinal Fluid of Healthy Volunteers." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 358:138–50.
- Sogorb-esteve, Aitana, Maria-Salud Garcia-Ayllon, Marta Llansola, Vicente Felipo, Kaj Blennow, and Javier Saez-Valero. 2017. "Inhibition of γ -Secretase Leads to an Increase in Presenilin-1." *Molecular Neurobiology* 1–12.
- Sohn, Peter Dongmin, Tara E. Tracy, Hye In Son, Yungui Zhou, Renata E. P. Leite, Bruce L. Miller, William W. Seeley, Lea T. Grinberg, and Li Gan. 2016. "Acetylated Tau Destabilizes the Cytoskeleton in the Axon Initial Segment and Is Mislocalized to the Somatodendritic Compartment." *Molecular Neurodegeneration* 11(1):1–13.
- Soman, Kizhake V, Afshin Karimi, and David A. Case. 1991. "Unfolding of an α-Helix in Water." *Biopolymers* 31(12):1351–61.
- Somavarapu, Arun Kumar and Kasper P. Kepp. 2016. "The Dynamic Mechanism of Presenilin-1 Function: Sensitive Gate Dynamics and Loop Unplugging Control Protein Access." *Neurobiology of Disease* 89:147–56.
- Somavarapu, Arun Kumar and Kasper P. Kepp. 2017. "Membrane Dynamics of Γ-Secretase Provides a Molecular Basis for B-Amyloid Binding and Processing." *ACS Chemical Neuroscience* 8(11):2424–36.
- Song, Wilbur M., Satoru Joshita, Yingyue Zhou, Tyler K. Ulland, Susan Gilfillan, and Marco Colonna. 2018. "Humanized TREM2 Mice Reveal Microglia-Intrinsic and -Extrinsic Effects of R47H Polymorphism." *Journal of Experimental Medicine* 215(3):745–60.

- Soscia, Stephanie J., James E. Kirby, Kevin J. Washicosky, Stephanie M. Tucker, Martin Ingelsson, Bradley Hyman, Mark A. Burton, Lee E. Goldstein, Scott Duong, Rudolph E. Tanzi, and Robert D. Moir. 2010. "The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid  $\beta$ -Protein Is an Antimicrobial Peptide." *PLoS ONE* 5(3):e9505.
- Sosna, Justyna, Stephan Philipp, Ricardo Iii Albay, Jorge Mauricio Reyes-Ruiz, David Baglietto-Vargas, Frank M. LaFerla, and Charles G. Glabe. 2018. "Early Long-Term Administration of the CSF1R Inhibitor PLX3397 Ablates Microglia and Reduces Accumulation of Intraneuronal Amyloid, Neuritic Plaque Deposition and Pre-Fibrillar Oligomers in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Molecular Neurodegeneration* 13(1):1–11.
- Spangenberg, Elizabeth, Paul L. Severson, Lindsay A. Hohsfield, Joshua Crapser, Jiazhong Zhang, Elizabeth A. Burton, Ying Zhang, Wayne Spevak, Jack Lin, Nicole Y. Phan, Gaston Habets, Andrey Rymar, Garson Tsang, Jason Walters, Marika Nespi, Parmveer Singh, Stephanie Broome, Prabha Ibrahim, Chao Zhang, Gideon Bollag, Brian L. West, and Kim N. Green. 2019. "Sustained Microglial Depletion with CSF1R Inhibitor Impairs Parenchymal Plaque Development in an Alzheimer's Disease Model." *Nature Communications* 10(1):1–21.
- Spijker, Peter, Nagarajan Vaidehi, Peter L. Freddolino, Peter A. J. Hilbers, and William A. Goddard. 2006. "Dynamic Behavior of Fully Solvated B2-Adrenergic Receptor, Embedded in the Membrane with Bound Agonist or Antagonist.Pdf." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(13):4882–87.
- Spitzer, Philipp, Mateja Condic, Martin Herrmann, Timo Jan Oberstein, Marina Scharin-Mehlmann, Daniel F. Gilbert, Oliver Friedrich, Teja Grömer, Johannes Kornhuber, Roland Lang, and Juan Manuel Maler. 2016. "Amyloidogenic Amyloid- $\beta$ -Peptide Variants Induce Microbial Agglutination and Exert Antimicrobial Activity." *Scientific Reports* 14(6):32228.
- Steiner, Harald, Anja Capell, Brigitte Pesold, Martin Citron, Peter M. Kloetzel, Dennis J. Selkoe, Helmut Romig, Klaus Mendla, and Christian Haass. 1998. "Expression of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin-1 Is Controlled by Proteolytic Degradation and Complex Formation." *The Journal of Biological Chemistry* 273(48):32322–31.
- Steiner, Harald, Marcus Kostka, Helmut Romig, Gabriele Basset, Brigitte Pesold, John Hardy, Anja Capell, Liane Meyn, Melissa L. Grim, Ralf Baumeister, Katja Fichteler, and Christian Haass. 2000. "Glycine 384 Is Required for Presenilin-1 Function and Is Conserved in Bacterial Polytropic Aspartyl Proteases." *Nature Cell Biology* 2(11):848–51.
- Steiner, Harald, Helmut Romig, Melissa G. Grim, Uwe Philipp, Brigitte Pesold, Martin Citron, Ralf Baumeister, and Christian Haass. 1999. "The Biological and Pathological Function of the Presenilin-1  $\Delta$ Exon 9 Mutation Is Independent of Its Defect to Undergo Proteolytic Processing \*." *The Journal of Biological Chemistry* 274(12):7615–19.
- Steiner, Harald, Helmut Romig, Brigitte Pesold, Uwe Philipp, Miriam Baader, Martin Citron, Hansruedi Loetscher, Helmut Jacobsen, and Christian Haass. 1999. "Amyloidogenic Function of the Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 in the Absence of Endoproteolysis." *Biochemistry* 38(44):14600–605.
- Steiner, Harald, Edith Winkler, Dieter Edbauer, Stefan Prokop, Gabriele Basset, Aya Yamasaki, Marcus Kostka, and Christian Haass. 2002. "PEN-2 Is an Integral Component of the  $\gamma$ -Secretase Complex Required for Coordinated Expression of Presenilin and Nicastrin." *The Journal of Biological Chemistry* 277(42):39062–65.

- Steiner, Harald, Edith Winkler, and Christian Haass. 2008. "Chemical Cross-Linking Provides a Model of the  $\gamma$ -Secretase Complex Subunit Architecture and Evidence for Close Proximity of the C-Terminal Fragment of Presenilin with APH-1." *The Journal of Biological Chemistry* 283(50):34677–86.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock. 1989. *Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria*. Vol. 53.
- Stoltenberg, M., A. I. Bush, G. Bach, K. Smidt, A. Larsen, J. Rungby, S. Lund, P. Doering, and G. Danscher. 2007. "AMYLOID PLAQUES ARISE FROM ZINC-ENRICHED CORTICAL LAYERS IN APP / PS1 TRANSGENIC MICE AND ARE PARADOXICALLY ENLARGED WITH DIETARY ZINC DEFICIENCY." *Neuroscience* 150(2):357–69.
- Strisovsky, Kvido. 2013. "Structural and Mechanistic Principles of Intramembrane Proteolysis – Lessons from Rhomboids." *FEBS Journal* 280(7):1579–1603.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, M. Goedert, K. H. Weisgraber, L. M. Dong, R. Jakes, D. Y. Huang, M. Pericak-Vance, D. Schmechel, and A. D. Roses. 1994. "Isoform-Specific Interactions of Apolipoprotein E with Microtubule-Associated Protein Tau: Implications for Alzheimer Disease." *Clinics in Geriatric Medicine* 91(23):11183–86.
- Strömberg, Kia, Emil M. Hansson, Hanna Laudon, Susanne Bergstedt, Jan Näslund, Johan Lundkvist, and Urban Lendahl. 2005. " $\gamma$ -Secretase Complexes Containing N- and C-Terminal Fragments of Different Presenilin Origin Retain Normal  $\gamma$ -Secretase Activity." *Journal of Neurochemistry* 95(3):880–90.
- De Strooper, Bart. 2007. "Loss-of-Function Presenilin Mutations in Alzheimer Disease. Talking Point on the Role of Presenilin Mutations in Alzheimer Disease." *EMBO Reports* 8(2):141–46.
- De Strooper, Bart. 2014. "Lessons from a Failed  $\gamma$ -Secretase Alzheimer Trial." *Cell* 159(4):721–26.
- De Strooper, Bart, Paul Saftig, Katleen Craessaerts, Hugo Vanderstichele, Gundula Guhde, Wim Annaert, Kurt Von Figure, and Fred Van Leuven. 1998. "Deficiency of Presenilin-1 Inhibits the Normal Cleavage of Amyloid Precursor Protein." *Nature* 391(January):387–90.
- Stützer, Ina, Nathalie Selevsek, Daria Esterházy, Alexander Schmidt, Ruedi Aebersold, and Markus Stoffel. 2013. "Systematic Proteomic Analysis Identifies  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) Substrates in Pancreatic  $\beta$ -Cells." *Journal of Biological Chemistry* 288(15):10536–47.
- Stys, Peter K., Haitao You, and Gerald W. Zamponi. 2012. "Copper-Dependent Regulation of NMDA Receptors by Cellular Prion Protein : Implications for Neurodegenerative Disorders." *The Journal of Physiology* 590(6):1357–68.
- Sun, Linfeng, Lingyun Zhao, Guanghui Yang, Chuangye Yan, Rui Zhou, Xiaoyuan Zhou, Tian Xie, and Yanyu Zhao. 2015. "Structural Basis of Human  $\gamma$ -Secretase Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(19):6003–8.
- Sun, Linfeng, Rui Zhou, Guanghui Yang, and Yigong Shi. 2016. "Analysis of 138 Pathogenic Mutations in Presenilin-1 on the in Vitro Production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 Peptides by  $\gamma$ -Secretase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(4):E476–85.
- Sun, Zhong-yue, Theodoros Asberom, Thomas Bara, Chad Bennett, Duane Burnett, Inhou Chu, John Clader, Mary Cohen-williams, David Cole, Michael Czarniecki, James Durkin, Gioconda Gallo, William Greenlee, Hubert

- Josien, Xianhai Huang, Lynn Hyde, Nicholas Jones, Irina Kazakevich, Hongmei Li, Xiaoxiang Liu, Julie Lee, Malcolm Maccoss, Mihir B. Mandal, Troy Mccracken, Amin Nomeir, Robert Mazzola, Anandan Palani, Eric M. Parker, Dmitri A. Pissarnitski, Jun Qin, Lixin Song, Giuseppe Terracina, Monica Vicarel, Johannes Voigt, Ruo Xu, Lili Zhang, Qi Zhang, Zhiqiang Zhao, Xiaohong Zhu, and Zhaoning Zhu. 2015. "Cyclic Hydroxyamides as Amide Isosteres: Discovery of Oxadiazolines and Oxadiazines as Potent and Highly Efficacious  $\gamma$ -Secretase Modulators in Vivo †." *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Szaruga, Maria, Bogdan Munteanu, Sam Lismont, Sarah Veugelen, Katrien Horr , Marc Mercken, Takaomi C. Saido, Natalie S. Ryan, Tatjana De Vos, Savvas N. Savvides, Rodrigo Gallardo, Joost Schymkowitz, Frederic Rousseau, Nick C. Fox, Carsten Hopf, Bart De Strooper, and Lucía Chávez-Gutiérrez. 2017. "Alzheimer's-Causing Mutations Shift A $\beta$  Length by Destabilizing  $\gamma$ -Secretase-A $\beta$ n Interactions." *Cell* 170(3):443-456.e14.
- Taddei, Kevin, John B. J. Kwok, Jillian J. Kril, Glenda M. Halliday, Helen Creasey, Marianne Hallupp, Christopher Fisher, William S. Brooks, Christopher Chung, Colin Andrews, Colin L. Masters, Peter R. Schofield, and Ralph N. Martins. 1998. "Two Novel Presenilin-1 Mutations (Ser169Leu and Pro436Gln) Associated with Very Early Onset Alzheimer's Disease." *NeuroReport* 9(14):3335-39.
- Takagi-Niidome, S., T. Sasaki, S. Osawa, T. Sato, K. Morishima, T. Cai, T. Iwatsubo, and T. Tomita. 2015. "Cooperative Roles of Hydrophilic Loop 1 and the C-Terminus of Presenilin 1 in the Substrate-Gating Mechanism of  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Neuroscience* 35(6):2646-56.
- Takagi-Niidome, Shizuka, Satoko Osawa, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2013. "Inhibition of  $\gamma$ -Secretase Activity by a Monoclonal Antibody against the Extracellular Hydrophilic Loop of Presenilin 1." *Biochemistry* 52(1):61-69.
- Takagi, Shizuka, Aya Tominaga, Chihiro Sato, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2010. "Participation of Transmembrane Domain 1 of Presenilin 1 in the Catalytic Pore Structure of the  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Neuroscience* 30(47):15943-50.
- Takahashi, Yasuko, Ikuo Hayashi, Yusuke Tominari, Kentaro Rikimaru, Yuichi Morohashi, Toshiyuki Kan, Hideaki Natsugari, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2003. "Sulindac Sulfide Is a Noncompetitive  $\gamma$ -Secretase Inhibitor That Preferentially Reduces A $\beta$  42 Generation." *The Journal of Biological Chemistry* 278(20):18664-70.
- Takai, Takafumi, Yasutaka Hoashi, Yoshihide Tomata, Sachie Morimoto, Minoru Nakamura, Tomomichi Watanabe, Tomoko Igari, and Tatsuki Koike. 2015. "Discovery of Novel 5,6,7,8-Tetrahydro[1,2,4]Triazolo[4,3-a]Pyridine Derivatives as  $\gamma$ -Secretase Modulators." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(19):4245-49.
- Takai, Takafumi, Tatsuki Koike, Eiji Honda, Yuichi Kajita, Minoru Nakamura, Sachie Morimoto, Yasutaka Hoashi, Makoto Kamata, Tomomichi Watanabe, Tomoko Igari, and Jun Terauchi. 2015. "Design and Synthesis of Piperazine Derivatives as a Novel Class of  $\gamma$ -Secretase Modulators That Selectively Lower A $\beta$ 42 Production." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 23(9):1923-34.
- Takasugi, Nobumasa, Taisuke Tomita, Ikuo Hayashi, Makiko Tsuruoka, Manabu Niimura, Yasuko Takahashi, Gopal Thinakaran, and Takeshi Iwatsubo. 2003. "The Role of Presenilin Cofactors in the  $\gamma$ -Secretase Complex." *Nature* 422(6930):2114-17.

- Takeo, Koji, Shun Tanimura, Takehiro Shinoda, Satoko Osawa, Ivan Krasmirov Zahariev, Naoki Takegami, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Naoko Shinya, Shizuka Takagi-Niidome, Aya Tominaga, Noboru Ohsawa, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Satoshi Yokoshima, Shigeyuki Yokoyama, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2014. "Allosteric Regulation of  $\gamma$ -Secretase Activity by a Phenylimidazole-Type  $\gamma$ -Secretase Modulator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(29):10544–49.
- Takeo, Koji, Naoto Watanabe, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2012. "Contribution of the  $\gamma$ -Secretase Subunits to the Formation of Catalytic Pore of Presenilin 1 Protein." *Journal of Biological Chemistry* 287(31):25834–43.
- Talantova, Maria, Sara Sanz-Blasco, Xiaofei Zhang, Peng Xia, Mohd Waseem Akhtar, Shu-ichi Okamoto, Tomohiro Nakamura, Gustavo Dziewczapolski, Gang Cao, Alexander E. Pratt, Yeon-Joo Kang, Shichun Tu, Elena Molokanova, Scott R. McKercher, Samuel Andrew Hires, Hagit Sason, David G. Stouffer, Matthew W. Buczynski, James P. Solomon, Sarah Michael, Evan T. Powers, Jeffery W. Kelly, Amanda Roberts, Gary Tong, Traci Fang-Newmeyer, James Parker, Emily A. Holland, Dongxian Zhang, Nobuki Nakanishi, H. S. Vincent Chen, Herman Wolosker, Yuqiang Wang, Loren H. Parsons, Rajesh Ambasudhan, Eliezer Masliah, Stephen F. Heinemann, Juan C. Piña-Crespo, and Stuart A. Lipton. 2013. "A $\beta$  Induces Astrocytic Glutamate Release, Extrasynaptic NMDA Receptor Activation, and Synaptic Loss." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27):E2518–27.
- Talmard, Christine, Rodrigue Leuma-Yona, and Peter Faller. 2009. "Mechanism of Zinc (II) -Promoted Amyloid Formation: Zinc (II) Binding Facilitates the Transition from the Partially  $\alpha$ -Helical Conformer to Aggregates of Amyloid  $\beta$  Protein (1–28)." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14(3):449–55.
- Tanahashi, Hiroshi, Shinobu Kawakatsu, Mitsuo Kaneko, Hideki Yamanaka, Keikichi Takahashi, and Takeshi Tabira. 1996. "Sequence Analysis of Presenilin-1 Gene Mutation in Japanese Alzheimer's Disease Patients." *Neuroscience Letters* 218(2):139–41.
- Tang-Wai, D. F., N. R. Graff-Radford, B. F. Boeve, D. W. Dickson, J. E. Parisi, R. Crook, R. J. Caselli, D. S. Knopman, and R. C. Petersen. 2004. "Clinical, Genetic, and Neuropathologic Characteristics of Posterior Cortical Atrophy." *Neurology* 63(7):1168–74.
- Taniguchi, Yoshihito, Seong Hun Kim, and Sangram S. Sisodia. 2003. "Presenilin-Dependent ' $\gamma$ -Secretase' Processing of Deleted in Colorectal Cancer (DCC)." *Journal of Biological Chemistry* 278(33):30425–28.
- Tariot, Pierre N., Francisco Lopera, Jessica B. Langbaum, Ronald G. Thomas, Suzanne Hendrix, Lon S. Schneider, Silvia Rios-Romenets, Margarita Giraldo, Natalia Acosta, Carlos Tobon, Claudia Ramos, Alejandro Espinosa, William Cho, Michael Ward, David Clayton, Michael Friesenhahn, Howard Mackey, Lee Honigberg, Sandra Sanabria Bohorquez, Kewei Chen, Trisha Walsh, Carolyn Langlois, and Eric M. Reiman. 2018. "The Alzheimer's Prevention Initiative Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease Trial: A Study of Crenezumab versus Placebo in Preclinical PSEN1 E280A Mutation Carriers to Evaluate Efficacy and Safety in the Treatment of Autosomal-Dominant Alzheimer's Diseases." *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* 4:150–60.

- Tetering, G. Van and M. Vooijs. 2011. "Proteolytic Cleavage of Notch : 'HIT and RUN.'" *Current Molecular Medicine* 11(4):255–69.
- Thélu, Jacques, Patricia Rossio, and Bertrand Favier. 2002. "Notch Signalling Is Linked to Epidermal Cell Differentiation Level in Basal Cell Carcinoma , Psoriasis and Wound Healing." *BMC Dermatology* 2(7):1–12.
- Thinakaran, Gopal, David R. Borchelt, Michael K. Lee, Hilda H. Slunt, Lia Spitzer, Grace Kim, Tamara Ratovitsky, Frances Davenport, Christer Nordstedt, Mary Seeger, John Hardy, Allan I. Levey, Samuel E. Gandy, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, Donald L. Price, and Sangram S. Sisodia. 1996. "Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo." *Neuron* 17(1):181–90.
- Thinakaran, Gopal, Christie L. Harris, Tamara Ratovitski, Frances Davenport, Hilda H. Slunt, Donald L. Price, David R. Borchelt, and Sangram S. Sisodia. 1997. "Evidence That Levels of Presenilins ( PS1 and PS2 ) Are Coordinately Regulated by Competition for Limiting Cellular Factors." *The Journal of Biological Chemistry* 272(45):28415–22.
- Tian, Yuan, Bhrandeo Bassit, Deming Chau, and Yue-ming Li. 2010. "An APP Inhibitory Domain Containing the Flemish Mutation Residue Modulates  $\gamma$ -Secretase Activity ForA $\beta$  Production." *Nature Structural & Molecular Biology* 17(2):151–58.
- Timmers, Maarten, Soraia Barão, Bianca Van Broeck, Ina Tesseur, John Slemmon, Katja De Waepenaert, Jennifer Bogert, Leslie M. Shaw, Sebastiaan Engelborghs, Dieder Moechars, Marc Mercken, Luc Van Nueten, Luc Tritsmans, Bart De Strooper, and Johannes Rolf Streffer. 2017. "BACE1 Dynamics Upon Inhibition with a BACE Inhibitor and Correlation to Downstream Alzheimer's Disease Markers in Elderly Healthy Participants." *Journal of Alzheimer's Disease* 56(4):1437–49.
- Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, K. Endres, and F. Fahrenholz. 2009. "Up-Regulation of the  $\gamma$ -Secretase ADAM10 by Retinoic Acid Receptors and Acitretin." *The FASEB Journal* 23(6):1643–54.
- Tolia, Alexandra, Katrien Horre, and Bart De Strooper. 2008. "Transmembrane Domain 9 of Presenilin Determines the Dynamic Conformation of the Catalytic Site of  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Biological Chemistry* 283(28):19793–803.
- Tombola, Francesco, Medha M. Pathak, and Ehud Y. Isacoff. 2006. "How Does Voltage Open an Ion Channel ?" *Annual Reviews Cell and Developmental Biology* 22:23–52.
- Tominaga, A., T. Cai, S. Takagi-Niidome, T. Iwatsubo, and T. Tomita. 2016. "Conformational Changes in Transmembrane Domain 4 of Presenilin 1 Are Associated with Altered Amyloid- $\beta$  42 Production." *The Journal of Neuroscience* 36(4):1362–72.
- Tomita, Susumu, Yutaka Kirino, and Toshiharu Suzuki. 1998. "Cleavage of Alzheimer' s Amyloid Precursor Protein (APP) by Secretases Occurs after O-Glycosylation of APP in the Protein IDENTIFICATION OF INTRACELLULAR COMPARTMENTS IN WHICH APP CLEAVAGE OCCURS WITHOUT." *The Journal Of* 273(11):6277–84.
- Tomita, T. 2017. "Probing the Structure and Function Relationships of Presenilin by Substituted-Cysteine Accessibility Method." *Methods in Enzymology* 584:185–205.
- Tomita, Taisuke, Ryohei Katayama, Rie Takikawa, and Takeshi Iwatsubo. 2002. "Complex N-Glycosylated Form of Nicastrin Is Stabilized and Selectively Bound to Presenilin Fragments." *FEBS Letters* 520(1–3):117–21.



- Tomita, Taisuke, Rie Takikawa, Akihiko Koyama, Yuichi Morohashi, Nobumasa Takasugi, Takaomi C. Saido, Kei Maruyama, and Takeshi Iwatsubo. 1999. "C Terminus of Presenilin Is Required for Overproduction of Amyloidogenic A $\beta$ 42 through Stabilization and Endoproteolysis of Presenilin." *The Journal of Neuroscience* 19(24):10627–34.
- Tomita, Taisuke, Sayaka Tanaka, Yuichi Morohashi, and Takeshi Iwatsubo. 2006. "Presenilin-Dependent Intramembrane Cleavage of Ephrin-B1." *Molecular Neurodegeneration* 1(2):1–9.
- Tomita, Taisuke, Tomonari Watabiki, Rie Takikawa, Yuichi Morohashi, Nobumasa Takasugi, Raphael Kopan, Bart De Strooper, and Takeshi Iwatsubo. 2001. "The First Proline of PALP Motif at the C Terminus of Presenilins Is Obligatory for Stabilization, Complex Formation, and  $\gamma$ -Secretase Activities of Presenilins." *The Journal of Biological Chemistry* 276(35):33273–81.
- Tomiya, Takami, Shogo Matsuyama, Hiroyuki Iso, Tomohiro Umeda, Hiroshi Takuma, Kiyohisa Ohnishi, Kenichi Ishibashi, Rie Teraoka, Naomi Sakama, Takenari Yamashita, Kazuchika Nishitsuji, Kazuhiro Ito, Hiroyuki Shimada, Mary P. Lambert, William L. Klein, and Hiroshi Mori. 2010. "A Mouse Model of Amyloid  $\beta$  Oligomers : Their Contribution to Synaptic Alteration , Abnormal Tau Phosphorylation , Glial Activation , and Neuronal Loss In Vivo." *Neurobiology of Disease* 30(14):4845–56.
- Torti, Suzy V and Frank M. Torti. 2013. "Iron and Cancer : More Ore to Be Mined." *Nature Reviews Cancer* 13(5):342–55.
- Tougu, Vello, Ann Karafin, Kairit Zovo, Roger S. Chung, Claire Howells, Adrian K. West, and Peep Palumaa. 2009. "Zn(II)- and Cu(II)-Induced Non-Fibrillar Aggregates of Amyloid-Beta (1-42) Peptide Are Transformed to Amyloid Fibrils, Both Spontaneously and under the Influence of Metal Chelators." *Journal of Neurochemistry* 110(6):1784–95.
- Tycko, Robert, Kimberly L. Sciarretta, Joseph P. R. O. Orgel, and Stephen C. Meredith. 2009. "Evidence for Novel  $\beta$ -Sheet Structures in Iowa Mutant  $\beta$ -Amyloid Fibrils." *Biochemistry* 48(26):6072–84.
- Tzeng, Nian Sheng, Chi Hsiang Chung, Fu Huang Lin, Chien Ping Chiang, Chin Bin Yeh, San Yuan Huang, Ru Band Lu, Hsin An Chang, Yu Chen Kao, Hui Wen Yeh, Wei Shan Chiang, Yu Ching Chou, Chang Huei Tsao, Yung Fu Wu, and Wu Chien Chien. 2018. "Anti-Herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections—a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan." *Neurotherapeutics* 15(2):417–29.
- Uchida, Yoko, Koji Takio, Koiti Titani, and Yasuo Ihara. 1991. "The Growth Inhibitory Factor That Is Deficient Alzheimer ' s Disease Brain Is a 68 Amino Acid Protein." *Neuron* 7(2):337–47.
- Uemura, Kengo, Katherine C. Farner, Tadafumi Hashimoto, Navine Nasser-Ghods, Michael S. Wolfe, Edward H. Koo, Bradley T. Hyman, and Oksana Berezovska. 2010. "Substrate Docking to  $\gamma$ -Secretase Allows Access of  $\gamma$ -Secretase Modulators to an Allosteric Site." *Nature Communications* 1(8):130.
- Uemura, Kengo, Christina M. Lill, Xuejing Li, Jessica A. Peters, Alexander Ivanov, Zhanyun Fan, Bart DeStrooper, Brian J. Bacskai, Bradley T. Hyman, and Oksana Berezovska. 2009. "Allosteric Modulation of PS1/ $\gamma$ -Secretase Conformation Correlates with Amyloid  $\beta$  42/40 Ratio." *Plos One* 4(11):e7893.

- Ulrich, Jason D., Mary Beth Finn, Yaming Wang, Alice Shen, Thomas E. Mahan, Hong Jiang, Floy R. Stewart, Laura Piccio, Marco Colonna, and David M. Holtzman. 2014. "Altered Microglial Response to A $\beta$  Plaques in APPPS1-21 Mice Heterozygous for TREM2." *Molecular Neurodegeneration* 9(1):1–9.
- Ulrich, Jason D., Tyler K. Ulland, Thomas E. Mahan, Sofie Nyström, K. Peter Nilsson, Wilbur M. Song, Yingyue Zhou, Mariska Reinartz, Seulah Choi, Hong Jiang, Floy R. Stewart, Elise Anderson, Yaming Wang, Marco Colonna, and David M. Holtzman. 2018. "ApoE Facilitates the Microglial Response to Amyloid Plaque Pathology." *Journal of Experimental Medicine* 215(4):1047–58.
- Urban, Sinisa. 2010. "Taking the Plunge: Integrating Structural, Enzymatic and Computational Insights into a Unified Model for Membrane-Immersed Rhomboid Proteolysis." *Biochemical Journal* 425(3):501–12.
- Urban, Sinisa. 2016. "Nicastrin Guards Alzheimer's Gate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(5):1112–14.
- Urban, Sinisa and Matthew Freeman. 2003. "Substrate Specificity of Rhomboid Intramembrane Proteases Is Governed by Helix-Breaking Residues in the Substrate Transmembrane Domain." *Cell* 11(6):1425–34.
- Vandermeeren, Marc, Martine Geraerts, Stefan Pype, Lieve Dillen, Carl Van Hove, and Marc Mercken. 2001. "The Functional  $\gamma$ -Secretase Inhibitor Prevents Production of Amyloid  $\beta$  1-34 in Human and Murine Cell Lines." *Neuroscience Letters* 315(3):145–48.
- Vandersteen, Annelies, Ellen Hubin, Rabia Sarroukh, Greet De Baets, Joost Schymkowitz, Frederic Rousseau, Vinod Subramaniam, Vincent Raussens, Holger Wenschuh, Dirk Wildemann, and Kerensa Broersen. 2012. "A Comparative Analysis of the Aggregation Behavior of Amyloid- $\beta$  Peptide Variants." *FEBS Letters* 586(23):4088–93.
- Varki, Ajit. 2017. "Biological Roles of Glycans." *Glycobiology* 27(1):3–49.
- Vassar, Robert. 2014. "BACE1 Inhibitor Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's Research and Therapy* 6(89):1–14.
- Vassar, Robert. 2016. "BACE1 Inhibition as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease." *Journal of Sport and Health Science* 5(4):388–90.
- Vassar, Robert, Brian D. Bennett, Safura Babu-khan, Steve Kahn, Elizabeth A. Mendiaz, Paul Denis, David B. Teplow, Sandra Ross, Patricia Amarante, Richard Loeloff, Yi Luo, Seth Fisher, Janis Fuller, Steven Edenson, Jackson Lile, Mark A. Jarosinski, Anja Leona Biere, Eileen Curran, Teresa Burgess, Jean-claude Louis, Frank Collins, James Treanor, Gary Rogers, and Martin Citron. 1999. " $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE." *Science* 286(5440):735–42.
- Vassar, Robert and Patty C. Kandalepas. 2011. "The  $\beta$ -Secretase Enzyme BACE1 as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's Research & Therapy* 3(3):1–6.
- Venegas, Carmen, Sathish Kumar, Bernardo S. Franklin, Tobias Dierkes, Rebecca Brinkschulte, Dario Tejera, Ana Vieira-Saecker, Stephanie Schwartz, Francesco Santarelli, Markus P. Kummer, Angelika Griep, Ellen Gelpi, Michael Beilharz, Dietmar Riedel, Douglas T. Golenbock, Matthias Geyer, Jochen Walter, Eicke Latz, and Michael T. Heneka. 2017. "Microglia-Derived ASC Specks Crossseed Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease." *Nature* 552(7685):355–61.

- Verghese, Philip B., Joseph M. Castellano, Kanchan Garai, Yinong Wang, Hong Jiang, Aarti Shah, Guojun Bu, Carl Frieden, and David M. Holtzman. 2013. "ApoE Influences Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Clearance despite Minimal ApoE/A $\beta$  Association in Physiological Conditions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(19):E1807–16.
- Vermunt, Lisa, Sietske A. M. Sikkes, Ardo van den Hout, Ron Handels, Isabelle Bos, Wiesje M. van der Flier, Silke Kern, Pierre Jean Ousset, Paul Maruff, Ingmar Skoog, Frans R. J. Verhey, Yvonne Freund-Levi, Magda Tsolaki, Åsa K. Wallin, Marcel Olde Rikkert, Hilka Soininen, Luisa Spuru, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, Philip Scheltens, Graciela Muniz-Terrera, Pieter Jelle Visser, B. Vellas, E. Reynish, P. J. Ousset, S. Andrieu, A. Burns, F. Pasquier, G. Frisoni, E. Salmon, J. P. Michel, D. S. Zekry, M. Boada, J. F. Dartigues, M. G. M. Olde-Rikkert, A. S. Rigaud, B. Winblad, A. Malick, A. Sinclair, L. Frölich, P. Scheltens, C. Ribera, J. Touchon, P. Robert, A. Salva, G. Waldemar, R. Bullock, M. Tsolaki, G. Rodriguez, L. Spuru, R. W. Jones, G. Stiens, G. Stoppe, M. Eriksdotter Jönhagen, A. Cherubini, P. M. Lage, T. Gomez-Isla, V. Camus, E. Agüera-Morales, F. Lopez, S. Savy, C. Cantet, and N. Coley. 2019. "Duration of Preclinical, Prodromal, and Dementia Stages of Alzheimer's Disease in Relation to Age, Sex, and APOE Genotype." *Alzheimer's and Dementia* 15(7):888–98.
- Vetrivel, Kulandaivelu S., Haipeng Cheng, William Lin, Takashi Sakurai, Tong Li, Nobuyuki Nukina, Philip C. Wong, Huaxi Xu, and Gopal Thinakaran. 2004. "Association of  $\gamma$ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes." *The Journal of Biological Chemistry* 279(43):44945–54.
- Vidal, Gregory A., Anjali Naresh, Luis Marrero, and Frank E. Jones. 2005. "Presenilin-Dependent  $\gamma$ -Secretase Processing Regulates Multiple ERBB4/HER4 Activities." *The Journal of Biological Chemistry* 280(20):19777–83.
- Viklund, Håkan and Arne Elofsson. 2004. "Best  $\alpha$ -Helical Transmembrane Protein Topology Predictions Are Achieved Using Hidden Markov Models and Evolutionary Information." *Protein Science* 13(7):1908–17.
- Viklund, Håkan and Arne Elofsson. 2008. "OCTOPUS: Improving Topology Prediction by Two-Track ANN-Based Preference Scores and an Extended Topological Grammar." *Bioinformatics* 24(15):1662–68.
- Vinothkumar, Kutti R., Kvido Strisovsky, Antonina Andreeva, Yonka Christova, Steven Verhelst, and Matthew Freeman. 2010. "The Structural Basis for Catalysis and Substrate Specificity of a Rhomboid Protease." *The EMBO Journal* 29(22):3797–3809.
- Vinson, Kaitlyn E., Dennis C. George, Alexander W. Fender, Fred E. Bertrand, and George Sigounas. 2016. "The Notch Pathway in Colorectal Cancer." *International Journal of Cancer* 138(8):1835–42.
- Vohora, Divya and Malay Bhowmik. 2012. "Histamine H3 Receptor Antagonists/Inverse Agonists on Cognitive and Motor Processes: Relevance to Alzheimer's Disease, ADHD, Schizophrenia, and Drug Abuse." *Frontiers in Systems Neuroscience* 6(72):1–10.
- Von-Koch, C. S., Zheng H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. T. Van-der-Ploeg, D. L. Price, and S.S.Sisodia. 1997. "Generation of APLP2 KO Mice and Early Postnatal Lethality in APLP2 / APP Double KO Mice." *Neurobiology of Aging* 18(6):661–69.
- Voytyuk, Iryna, Stephan A. Mueller, Julia Herber, An Snellinx, Dieder Moechars, Geert van Loo, Stefan F. Lichtenthaler, and Bart De Strooper. 2018. "BACE2 Distribution in Major Brain Cell Types and Identification of Novel Substrates." *Life Science Alliance* 1(1):e201800026.

- Wagner, Steven L., Can Zhang, Soan Cheng, Phuong Nguyen, Xulun Zhang, Kevin D. Ryneerson, Rong Wang, Yueming Li, Sangram S. Sisodia, William C. Mobley, and Rudolph E. Tanzi. 2014. "Soluble  $\Gamma^-$  Secretase Modulators Selectively Inhibit the Production of the 42-Amino Acid Amyloid  $\beta$  Peptide Variant and Augment the Production of Multiple Carboxy-Truncated Amyloid  $\beta$  Species." *Biochemistry* 53(4):702–13.
- Waldron, Elaine, Simone Isbert, Andreas Kern, Sebastian Jaeger, Anne M. Martin, Sébastien S. Hébert, Christian Behl, Sascha Weggen, Bart De Strooper, and Claus U. Pietrzik. 2008. "Increased AICD Generation Does Not Result in Increased Nuclear Translocation or Activation of Target Gene Transcription." *Experimental Cell Research* 314(13):2419–33.
- Walker, Lary C. and Mathias Jucker. 2015. "Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept." *Annual Review of Neuroscience* 38:87–103.
- Wallon, David, Stephane Rousseau, Anne Rovelet-Lecrux, Muriel Quillard-Muraine, Lucie Guyant-Marechal, Olivier Martinaud, Jeremie Pariente, Michele Puel, Adeline Rolline-Sillaire, Florence Pasquier, isabelle le Ber, Marie Sarazin, Bernard Croisile, Claire Boutoleau-Bretonniere, Catherine Thomas-Anterion, Claire Paquet, Olivier Moreaud, Audrey Gabelle, Francois Sellal, Mathilde Sauvee, Annie Laquerriere, Charles Duyckaerts, Marie-Bernadette Delisle, Nathalie Steichenberger, Beatrice Lannes, Thierry Frebourg, Didier Hannequin, and Dominique Campion. 2012. "The French Series of Autosomal Dominant Early Onset Alzheimer ' s Disease Cases : Mutation Spectrum and Cerebrospinal Fluid Biomarkers." *Journal of Alzheimer's Disease* 30(4):847–56.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. 2002. "Amyloid- $\beta$  Oligomers: Their Production, Toxicity and Therapeutic Inhibition." *Biochemical Society Transactions* 30(4):552–57.
- Walsh, Dominic M. and Dennis J. Selkoe. 2007. "A $\beta$  Oligomers – a Decade of Discovery." *Journal of Neurochemistry* 101(5):1172–84.
- Walther, K., B. B. Bendlin, E. L. Glisky, T. P. Trouard, J. R. Lisse, J. O. Posever, and L. Ryan. 2009. "Anti-Inflammatory Drugs Reduce Age-Related Decreases in Brain Volume in Cognitively Normal Older Adults." *Neurobiology of Aging* i.
- Wang, Dian-shi, Hai-lei Zhu, Zhen Hong, and Ji-shuo Li. 2002. "Cu<sup>2+</sup> Inhibition of Glycine-Activated Currents in Rat Sacral Dorsal Commissural Neurons." *Neuroscience Letters* 328(2):117–20.
- Wang, Jun, Dirk Behr, Andrew C. Nyborg, Mark S. Shearman, Todd E. Golde, and Alison Goate. 2006. "C-Terminal PAL Motif of Presenilin and Presenilin Homologues Required for Normal Active Site Conformation." *Journal of Neurochemistry* 96(1):218–27.
- Wang, Jun, Anne L. Brunkan, Silva Hecimovic, Emily Walker, and Alison Goate. 2004. "Conserved " PAL " Sequence in Presenilins Is Essential for  $\gamma$ -Secretase Activity , but Not Required for Formation or Stabilization of  $\gamma$ -Secretase Complexes." *Neurobiology of Disease* 15:654–66.
- Wang, Pei, Guang Yang, Dennis R. Mosier, Paul Chang, Tahire Zaidi, Yan-dao Gong, Nan-ming Zhao, Bertha Dominguez, Kuo-fen Lee, Wen-biao Gan, and Hui Zheng. 2005. "Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2." *The Journal of Neuroscience* 25(5):1219–25.

- Wang, Yongcheng and Ya Ha. 2007. "Open-Cap Conformation of Intramembrane Protease GlpG." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(7):2098–2102.
- Wang, Yongcheng, Yingjiu Zhang, and Ya Ha. 2006. "Crystal Structure of a Rhomboid Family Intramembrane Protease." *Nature* 444:179–83.
- Wanngren, Johanna, Jan Ottervald, Santiago Parpal, Erik Portelius, Kia Strömberg, Tomas Borgegård, Rebecka Klintonberg, Anders Juréus, Jenny Blomqvist, Kaj Blennow, Henrik Zetterberg, Johan Lundkvist, Susanne Rosqvist, and Helena Karlström. 2012. "Second Generation  $\gamma$ -Secretase Modulators Exhibit Different Modulation of Notch  $\beta$  and A $\beta$  Production." *Journal of Biological Chemistry* 287(39):32640–50.
- Waring, Michael J. 2010. "Lipophilicity in Drug Discovery." *Expert Opinion on Drug Discovery* 5(3):235–48.
- Waschbusch, Dieter, Simone Born, Verena Niediek, Norbert Kirchgessner, Irfan Y. Tamboli, and Jochen Walter. 2009. "Presenilin 1 Affects Focal Adhesion Site Formation and Cell Force Generation via C-Src Transcriptional and Posttranslational Regulation." *The Journal of Biological Chemistry* 284(15):10138–49.
- Wasco, Wilma, Keith Bupp, Margaret Magendantz, James F. Gusellat, Rudolph E. Tanzit, and Frank Solomon. 1992. "Identification of a Mouse Brain CDNA That Encodes a Protein Related to the Alzheimer Disease-Associated Amyloid B Protein Precursor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10758–62.
- Wasco, Wilma, Sarada Gurubhagavatula, Marc D. Paradis, Donna M. Romano, Sangram S. Sisodia, Bradley T. Hyman, Rachael L. Neve, and Rudolph E. Tanzi. 1993. "Isolation and Characterization of APLP2 Encoding a Homologue of the Alzheimer's Associated Amyloid Beta Protein Precursor." *Nature Genetics* 5(1):95–100.
- Watanabe, Naoto, Shizuka Takagi, Aya Tominaga, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. 2010. "Functional Analysis of the Transmembrane Domains of Presenilin 1: Participation of Transmembrane Domains 2 and 6 in the Formation of Initial Substrate-Binding Site of  $\gamma$ -Secretase." *Journal of Biological Chemistry* 285(26):19738–46.
- Watanabe, Naoto, Taisuke Tomita, Chihiro Sato, Toshio Kitamura, Yuichi Morohashi, and Takeshi Iwatsubo. 2005. "Pen-2 Is Incorporated into the  $\gamma$ -Secretase Complex through Binding to Transmembrane Domain 4 of Presenilin 1." *The Journal of Biological Chemistry* 280(51):41967–75.
- Webster, Marie-therese, Nigel Groome, Paul T. Francis, Brian R. Pearce, Fiona E. Sherriff, Kevin M. Felsenstein, Wilma Wasco, Rudolph E. Tanzi, and David M. Bowen. 1995. "A Novel Protein, Amyloid Precursor-like Protein 2, Is Present in Human Brain, Cerebrospinal Fluid and Conditioned Media." *Biochemical Journal* 310:95–99.
- Weggen, Sascha, Jason L. Eriksen, Pritam Das, Sarah A. Sagi, Michael P. Murphy, Thomas Bulter, and David E. Kang. 2001. "A Subset of NSAIDs Lower Amyloidogenic A $\beta$ 42 Independently of Cyclooxygenase Activity." *Nature* 414:212–16.
- Weidemann, Andreas, Simone Eggert, Friedrich B. M. Reinhard, Markus Vogel, Krzysztof Paliga, Gottfried Baier, Colin L. Masters, and Konrad Beyreuther. 2002. "A Novel  $\epsilon$ -Cleavage within the Transmembrane Domain of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein Demonstrates Homology with Notch Processing." *Biochemistry* 41(8):2825–35.

- Weihofen, Andreas, Kathleen Binns, Marius K. Lemberg, Keith Ashman, and Bruno Martoglio. 2002. "Identification of Signal Peptide Peptidase, a Presenilin-Type Aspartic Protease." *Science* 296:2215–19.
- West, T., Y. Hu, P. B. Verghese, R. J. Bateman, J. B. Braunstein, I. Fogelman, K. Budur, H. Florian, N. Mendonca, and D. M. Holtzman. 2017. "Preclinical and Clinical Development of ABBV-8E12, a Humanized Anti-Tau Antibody, for Treatment of Alzheimer's Disease and Other Tauopathies." *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 4(4):236–41.
- Willén, Katarina, Agnieszka Sroka, Reisuke H. Takahashi, and Gunnar K. Gouras. 2017. "Heterogeneous Association of Alzheimer's Disease-Linked Amyloid- $\beta$  and Amyloid- $\beta$  Protein Precursor with Synapses." *Journal of Alzheimer's Disease* 60(2):511–24.
- Williams, Angela D., Erik Portelius, Indu Kheterpal, Jun-tao Guo, Kelsey D. Cook, Ying Xu, and Ronald Wetzel. 2004. "Mapping A $\beta$  Myloid Fibril Secondary Structure Using Scanning Proline Mutagenesis." *Journal of Molecular Biology* 335(3):833–42.
- Williams, Michael J., Paul E. Hughes, Timothy E. O'Toole, and Mark H. Ginsberg. 1994. "The Inner World of Cell Adhesion: Integrin Cytoplasmic Domains." *Trends in Cell Biology* 4:1–4.
- Wiltfang, J., H. Esselmann, M. Bibl, A. Smirnov, M. Otto, S. Paul, B. Schmidt, H. W. Klafki, M. Maler, T. Dyrks, M. Bienert, M. Beyermann, E. Rütger, and J. Kornhuber. 2002. "Highly Conserved and Disease-Specific Patterns of Carboxyterminally Truncated A $\beta$  Peptides 1-37/38/39 in Addition to 1-40/42 in Alzheimer's Disease and in Patients with Chronic Neuroinflammation." *Journal of Neurochemistry* 81(3):481–96.
- Wiltfang, Jens, Hermann Esselmann, Philippe Cupers, Manuela Neumann, Hans Kretzschmar, Michael Beyermann, Detlev Schleuder, Holger Jahn, Eckart Rütger, Johannes Kornhuber, Wim Annaert, Bart De Strooper, and Paul Saftig. 2001. "Elevation of  $\beta$ -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells." *Journal of Biological Chemistry* 276(46):42645–57.
- Winblad, Bengt, Niels Andreasen, Lennart Minthon, Annette Floesser, Georges Imbert, Thomas Dumortier, R. Paul Maguire, and Kaj Blennow. 2012. "Safety, Tolerability, and Antibody Response of Active A $\beta$  Immunotherapy with CAD106 in Patients with Alzheimer's Disease: Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, First-in-Human Study." *The Lancet Neurology* 11(7):597–604.
- Wischik, C. M., P. C. Edwards, R. Y. K. Lai, M. Roth, and C. R. Harrington. 1996. "Selective Inhibition of Alzheimer Disease-like Tau Aggregation by Phenothiazines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(20):11213–18.
- Wisniewski, T., Wieslaw K. Dowjat, Joseph D. Buxbaum, Olga Khorkova, Spiros Efthimiopoulos, Jerzy Kulczycki, Wanda Lojkowska, Jerzy Wegiel, H. M. Wisniewski, and B. Frangione. 1998. "A Novel Polish Presenilin-1 Mutation (P117L) Is Associated with Familial Alzheimer's Disease and Leads to Death as Early as the Age of 28 Years." *Neuroreport* 9(2):217–21.
- Wolfe, Michael S., Joseph De Los Angeles, Duane D. Miller, Weiming Xia, and Dennis J. Selkoe. 1999. "Are Presenilins Intramembrane-Cleaving Proteases? Implications for the Molecular Mechanism of Alzheimer's Disease." *Biochemistry* 38(35):11223–30.

- Wolfe, Michael S., Martin Citron, Thekla S. Diehl, Weiming Xia, Isaac O. Donkor, and Dennis J. Selkoe. 1998. "A Substrate-Based Difluoro Ketone Selectively Inhibits Alzheimer's  $\gamma$ -Secretase Activity." *Journal of Medicinal Chemistry* 2623(97):6–9.
- Wolfe, Michael S. and Raphael Kopan. 2004. "Intramembrane Proteolysis : Theme and Variations." *Science* 305(5687):1119–23.
- Wolfe, Michael S., Weiming Xia, Chad L. Moore, Dartha D. Leatherwood, Beth Ostaszewski, Talat Rahmati, Isaac O. Donkor, and Dennis J. Selkoe. 1999. "Peptidomimetic Probes and Molecular Modeling Suggest That Alzheimer's." *Biochemistry* 38(15):4720–27.
- Wolfe, Michael S., Weiming Xia, and Beth L. Ostaszewski. 1999. "Two Transmembrane Aspartates in Presenilin-1 Required for Presenilin Endoproteolysis and  $\gamma$ -Secretase Activity." *Nature* 117(1907):513–17.
- Woltering, Thomas J., Wolfgang Wostl, Hans Hilpert, Mark Rogers-Evans, Emmanuel Pinard, Alexander Mayweg, Martin Göbel, David W. Banner, Jörg Benz, Massimiliano Travagli, Martina Pollastrini, Guido Marconi, Emanuele Gabellieri, Wolfgang Guba, Harald Mauser, Matteo Andreini, Helmut Jacobsen, Eoin Power, and Robert Narquizian. 2013. "BACE1 Inhibitors: A Head Group Scan on a Series of Amides." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 23(14):4239–43.
- Wong, Gwendolyn T., Denise Manfra, Frederique M. Poulet, Qi Zhang, Hubert Josien, Thomas Bara, Laura Engstrom, Maria Pinzon-ortiz, Jay S. Fine, Hu-jung J. Lee, Lili Zhang, Guy A. Higgins, and Eric M. Parker. 2004. "Chronic Treatment with the  $\gamma$ -Secretase Inhibitor LY-411,575 Inhibits  $\beta$ -Amyloid Peptide Production and Alters Lymphopoiesis and Intestinal Cell Differentiation \*." *The Journal of Biological Chemistry* 279(13):12876–82.
- Wu, Yong Jin, Jason Guernon, Ramkumar Rajamani, Jeremy H. Toyn, Michael K. Ahlijanian, Charles F. Albright, Jodi Muckelbauer, Chieh Ying Chang, Dan Camac, John E. Macor, and Lorin A. Thompson. 2016. "Discovery of Furo[2,3-d][1,3]Thiazinamines as Beta Amyloid Cleaving Enzyme-1 (BACE1) Inhibitors." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 26(23):5729–31.
- Wu, Yong Jin, Jason Guernon, Fukang Yang, Lawrence Snyder, Jianliang Shi, Andrea McClure, Ramkumar Rajamani, Hyunsoo Park, Alicia Ng, Hal Lewis, Chieh Ying Chang, Dan Camac, Jeremy H. Toyn, Michael K. Ahlijanian, Charles F. Albright, John E. Macor, and Lorin A. Thompson. 2016. "Targeting the BACE1 Active Site Flap Leads to a Potent Inhibitor That Elicits Robust Brain A $\beta$  Reduction in Rodents." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 7(3):271–76.
- Wu, Zhuoru, Nieng Yan, Liang Feng, Adam Oberstein, Hanchi Yan, Rosanna P. Baker, Lichuan Gu, Philip D. Jeffrey, Sinisa Urban, and Yigong Shi. 2006. "Structural Analysis of a Rhomboid Family Intramembrane Protease Reveals a Gating Mechanism for Substrate Entry." *Nature Structural & Molecular Biology* 13(12):1084–91.
- Xia, Weiming. 2019. " $\gamma$ -Secretase and Its Modulators: Twenty Years and Beyond." *Neuroscience Letters* 701:162–69.
- Xia, Weiming, Jimin Zhang, Beth L. Ostaszewski, William Taylor Kimberly, Peter Seubert, Edward H. Koo, Jie Shen, and Dennis J. Selkoe. 1998. "Articles Presenilin 1 Regulates the Processing of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragments and the Generation of Amyloid  $\gamma$ -Protein in Endoplasmic Reticulum And." *Biochemistry* 37(47):16465–71.

- Xiao, Zhiguang and Anthony G. Wedd. 2010. "The Challenges of Determining Metal-Protein Affinities." *Natural Product Reports* 27(5):768–89.
- Xie, Tian, Chuangye Yan, Rui Zhou, Yanyu Zhao, Linfeng Sun, Guanghui Yang, Peilong Lu, and Dan Ma. 2014. "Crystal Structure of the  $\gamma$ -Secretase Component Nicastrin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(37):13349–54.
- Xu, Xuemin. 2009. " $\gamma$ -Secretase Catalyzes Sequential Cleavages of the A $\beta$ PP Transmembrane Domain." *Journal of Alzheimer's Disease* 16(2):211–24.
- Yamasaki, Aya, Stefan Eimer, Masayasu Okochi, Agata Smialowska, Christoph Kaether, Ralf Baumeister, Christian Haass, and Harald Steiner. 2006. "The GxGD Motif of Presenilin Contributes to Catalytic Function and Substrate Identification of  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Neuroscience* 26(14):3821–28.
- Yamazaki, Tsuneo, Christian Haass, Takaomi C. Saido, Satoshi Omura, and Yasuo Ihara. 1997. "Specific Increase in Amyloid  $\beta$ -Protein 42 Secretion Ratio by Calpain Inhibition." *Biochemistry* 2960(97):8377–83.
- Yan, Shi Du and David M. Stern. 2005. "Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Amyloid- $\beta$  Peptide Alcohol Dehydrogenase (ABAD)." *International Journal of Experimental Pathology* 86(3):161–71.
- Yanamandra, Kiran, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2015. "Anti-Tau Antibody Reduces Insoluble Tau and Decreases Brain Atrophy." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2(3):278–88.
- Yanamandra, Kiran, Najla Kfoury, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Shengmei Ma, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2013. "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition in Vivo." *Neuron* 80(2):402–14.
- Yanamandra, Kiran, Tirth K. Patel, Hong Jiang, Suzanne Schindler, Jason D. Ulrich, Adam L. Boxer, Bruce L. Miller, Diana R. Kerwin, Gilbert Gallardo, Floy Stewart, Mary Beth Finn, Nigel J. Cairns, Philip B. Verghese, Ilana Fogelman, Tim West, Joel Braunstein, Grace Robinson, Jennifer Keyser, Joseph Roh, Stephanie S. Knapik, Yan Hu, and David M. Holtzman. 2017. "Anti-Tau Antibody Administration Increases Plasma Tau in Transgenic Mice and Patients with Tauopathy." *Science Translational Medicine* 9(386):1–12.
- Yang, Guang, Yan-dao Gong, Kai Gong, Wu-ling Jiang, Elaine Kwon, Pei Wang, Hui Zheng, Xiu-fang Zhang, Wen-biao Gan, and Nan-ming Zhao. 2005. "Reduced Synaptic Vesicle Density and Active Zone Size in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-like Protein 2." *Neuroscience Letters* 384(1–2):66–71.
- Yang, Guanghui, Rui Zhou, Qiang Zhou, Xuefei Guo, Chuangye Yan, Meng Ke, Jianlin Lei, and Yigong Shi. 2018. "Structural Basis of Notch Recognition by Human  $\gamma$ -Secretase." *Nature* 565:192–97.
- Yankner, Bruce A., Lawrence K. Duffy, and Daniel A. Kirschner. 1990. "Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid Beta Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides." *Science* 250(4979):279–82.
- Yasuda, Minoru, Kiyoshi Maeda, Yoshitaka Ikejiri, Toshio Kawamata, Shigetoshi Kuroda, and Chikako Tanaka. 1997. "A Novel Missense Mutation in the Presenilin-1 Gene in a Familial Alzheimer's Disease Pedigree with Abundant Amyloid Angiopathy." *Neuroscience Letters* 232(1):29–32.
- Young-pearse, Tracy L., Jilin Bai, Rui Chang, Jessica B. Zheng, Joseph J. Loturco, and Dennis J. Selkoe. 2007. "A Critical Function for  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference." *The Journal of Neuroscience* 27(52):14459–69.

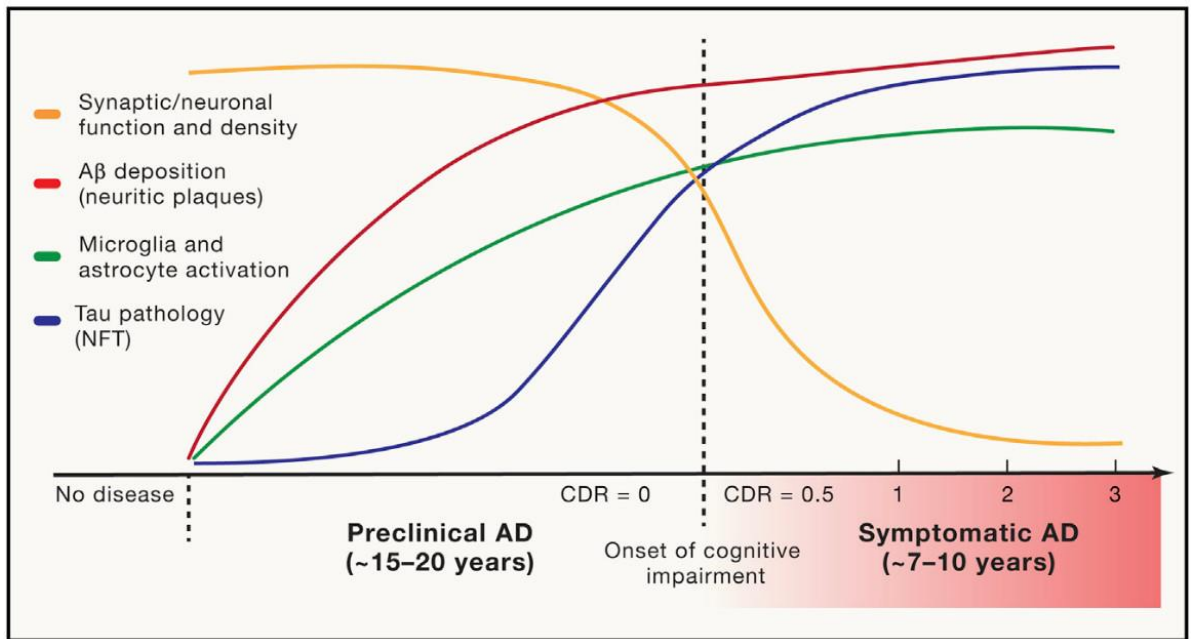


- Yu, Chunjiang, Seong-hun Kim, Takeshi Ikeuchi, Huaxi Xu, Laura Gasparini, Rong Wang, and Sangram S. Sisodia. 2001. "Characterization of a Presenilin-Mediated Amyloid Precursor Protein Carboxyl-Terminal Fragment  $\gamma$  Evidence for DIsTinct Mechanisms Involved in  $\gamma$ -Secretase Processing of the APP and Notch 1 Transmembrane Domains." *The Journal of Biological Chemistry* 276(47):43756–60.
- Yu, Gang, Masaki Nishimura, Shigeki Arawaka, Diane Levitan, Lili Zhang, Anurag Tandon, You-qiang Song, Ekaterina Rogaeva, Fusheng Chen, Toshitaka Kawarai, Agnes Supala, Lyne Levesque, Haung Yu, Dun-sheng Yang, Erin Holmes, Paul Milman, Yan Liang, Dong Mei Zhang, Dong Hong Xu, Christine Sato, Evgeny Rogaev, Marsha Smith, Christopher Janus, Yanni Zhang, Ruedi Aebersold, Lindsay Farrer, Sandro Sorbi, Amalia Bruni, Paul Fraser, and Peter St George-hyslop. 2000. "Nicastrin Modulates Presenilin- Mediated Notch/Glp-1 Signal Transduction and BAPP Processing." *Nature* 407(6800):48–54.
- Zettl, Heiko, Sascha Weggen, Petra Schneider, and Gisbert Schneider. 2010. "Exploring the Chemical Space of  $\gamma$ -Secretase Modulators." *Trends in Pharmacological Sciences* 31(9):402–10.
- Zhang, Lili, Lixin Song, and Eric M. Parker. 1999. "Calpain Inhibitor I Increases  $\beta$ -Amyloid Peptide Production by Inhibiting the Degradation of the Substrate of  $\gamma$ -Secretase." *The Journal of Biological Chemistry* 274(13):8966–72.
- Zhang, Xulun, Chunjiang J. Yu, and Sangram S. Sisodia. 2015. "The Topology of Pen-2, a  $\gamma$ -Secretase Subunit, Revisited: Evidence for a Reentrant Loop and a Single Pass Transmembrane Domain." *Molecular Neurodegeneration* 10(1):4–11.
- Zhang, Yun-wu, Wen-jie Luo, Hong Wang, Ping Lin, Kulandaivelu S. Vetrivel, Fang Liao, Feng Li, Philip C. Wong, Marilyn G. Farquhar, Gopal Thinakaran, and Huaxi Xu. 2005. "Nicastrin Is Critical for Stability and Trafficking but Not Association of Other Presenilin / $\gamma$ -Secretase Components." *The Journal of Biological Chemistry* 280(17):17020–26.
- Zhang, Yun-wu, Robert Thompson, Han Zhang, and Huaxi Xu. 2011. "APP Processing in Alzheimer 's Disease." *Molecular Brain* 4:3.
- Zhang, Zhuohua, Philip Nadeau, Weihong Song, Dorit Donoviel, Menglan Yuan, Alan Bernstein, and Bruce A. Yankner. 2000. "Presenilins Are Required for  $\gamma$ -Secretase Cleavage of  $\beta$ -APP and Transmembrane Cleavage of Notch-1." *Nature Cell Biology* 2(7):463–65.
- Zhang, Zulun, Krassimira Garbett, Karthikeyan Veeraraghavalu, Brian Wilburn, Reid Gilmore, Karoly Mirnics, and Sangram S. Sisodia. 2012. "A Role for Presenilins in Autophagy Revisited: Normal Acidification of Lysosomes in Cells Lacking PSEN1 and PSEN2." *Journal of Neuroscience* 32(25):8633–48.
- Zhao, Byron, Mei Yu, Martin Neitzel, Jennifer Marugg, Jacek Jagodzinski, Mike Lee, Kang Hu, Dale Schenk, Ted Yednock, and Guriqbal Basi. 2008. "Identification of  $\gamma$ -Secretase Inhibitor Potency Determinants." *The Journal of Biological Chemistry* 283(5):2927–38.
- Zhao, Guojun, Mei-zhen Cui, Guozhang Mao, Yunzhou Dong, Jianxin Tan, Longsheng Sun, and Xuemin Xu. 2005. " $\gamma$ -Cleavage Is Dependent on  $\zeta$ -Cleavage during the Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein within Its Transmembrane Domain \*." *The Journal of Biological Chemistry* 280(45):37689–97.

- Zhao, Guojun, Zhenyi Liu, Ma Xenia G. Ilagan, and Raphael Kopan. 2010. “ $\gamma$ -Secretase Composed of PS1/Pen2/Aph1a Can Cleave Notch and Amyloid Precursor Protein in the Absence of Nicastrin.” *The Journal of Neuroscience* 30(5):1648–56.
- Zhao, Guojun, Guozhang Mao, Jianxin Tan, Yunzhou Dong, Mei-zhen Cui, Seong-hun Kim, and Xuemin Xu. 2004. “Identification of a New Presenilin-Dependent  $\zeta$ -Cleavage Site within the Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein.” *The Journal of Biological Chemistry* 279(49):50647–51.
- Zhao, Guojun, Jianxin Tan, Guozhang Mao, Mei-zhen Cui, and Xuemin Xu. 2007. “The Same  $\gamma$ -Secretase Accounts for the Multiple Intramembrane Cleavages of APP.” *Journal of Neurochemistry* 100(5):1234–46.
- Zhao, Na, Chia Chen Liu, Alexandra J. Van Ingelgom, Cynthia Linares, Aishe Kurti, Joshua A. Knight, Michael G. Heckman, Nancy N. Diehl, Mitsuru Shinohara, Yuka A. Martens, Olivia N. Attrebi, Leonard Petrucelli, John D. Fryer, Zbigniew K. Wszolek, Neill R. Graff-Radford, Richard J. Caselli, Monica Y. Sanchez-Contreras, Rosa Rademakers, Melissa E. Murray, Shunsuke Koga, Dennis W. Dickson, Owen A. Ross, and Guojun Bu. 2018. “APOE E2 Is Associated with Increased Tau Pathology in Primary Tauopathy.” *Nature Communications* 9(1):1–11.
- Zhao, Zhiqiang, Dmitri A. Pissarnitski, Hubert B. Josien, Wen-lian Wu, Ruo Xu, Hongmei Li, John W. Clader, Duane A. Burnett, Giuseppe Terracina, Lynn Hyde, Julie Lee, Lixin Song, Lili Zhang, and Eric M. Parker. 2015. “Discovery of a Novel, Potent Spirocyclic Series of  $\gamma$  - Secretase Inhibitors.” *Journal of Medicinal Chemistry* 58:8806–17.
- Zheng, Hui, Minghao Jiang, Myrna E. Trumbauer, Ruth Hopkins, David W. Smith, Robert P. Heavens, Gerard Ft Dawson, Susan Boyce, Michael W. Conner, Karla A. Stevens, Hilda H. Slunt, Sangram S. Sisodia, Howard Y. Chen, Lex H. T. Van Der Ploeg, and Terlings Park. 1995. “ $\beta$ -Amyloid Precursor Protein-Deficient Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity.” *Cell* 81(4):525–31.
- Zhou, Lujia, Nathalie Brouwers, Iryna Benilova, Annelies Vandersteen, Marc Mercken, Koen Van Laere, Philip Van Damme, David Demedts, Fred Van Leuven, Kristel Slegers, Kerensa Broersen, Christine Van Broeckhoven, Rik Vandenberghe, and Bart De Strooper. 2011. “Amyloid Precursor Protein Mutation E682K at the Alternative  $\beta$ -Secretase Cleavage  $\beta'$ -Site Increases A $\beta$  Generation.” *EMBO Molecular Medicine* 3(5):291–302.
- Zhou, Rui, Guanghui Yang, Xuefei Guo, Qiang Zhou, Jianlin Lei, and Yigong Shi. 2019. “Recognition of the Amyloid Precursor Protein by Human  $\gamma$ -Secretase.” *Science* 363(6428):1–8.
- Zhou, X., D. Hollern, J. Liao, E. Andrechek, and H. Wang. 2013. “NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity Depends on the Coactivation of Synaptic and Extrasynaptic Receptors.” *Cell Death and Disease* 4:e560.
- Zhou, Yanzi, Syed M. Moin, Sinisa Urban, and Yingkai Zhang. 2012. “An Internal Water-Retention Site in the Rhomboid Intramembrane Protease GpG Ensures Catalytic Efficiency.” *Structure* 20(7):1255–63.
- Zlokovic, Berislav V. 2013. “Cerebrovascular Effects of Apolipoprotein E: Implications for Alzheimer Disease.” *JAMA Neurology* 70(4):440–44.
- Zuhl, Andrea M., Charles E. Nolan, Michael A. Brodney, Sherry Niessen, Kevin Atchison, Christopher Houle, David A. Karanian, Claude Ambroise, Jeffrey W. Brulet, Elizabeth M. Beck, Shawn D. Doran, Brian T. O'Neill, Christopher W. Am Ende, Cheng Chang, Kieran F. Geoghegan, Graham M. West, Joshua C. Judkins, Xinjun

Hou, David R. Riddell, and Douglas S. Johnson. 2016. "Chemoproteomic Profiling Reveals That Cathepsin D Off-Target Activity Drives Ocular Toxicity of  $\beta$ -Secretase Inhibitors." *Nature Communications* 7:13042.

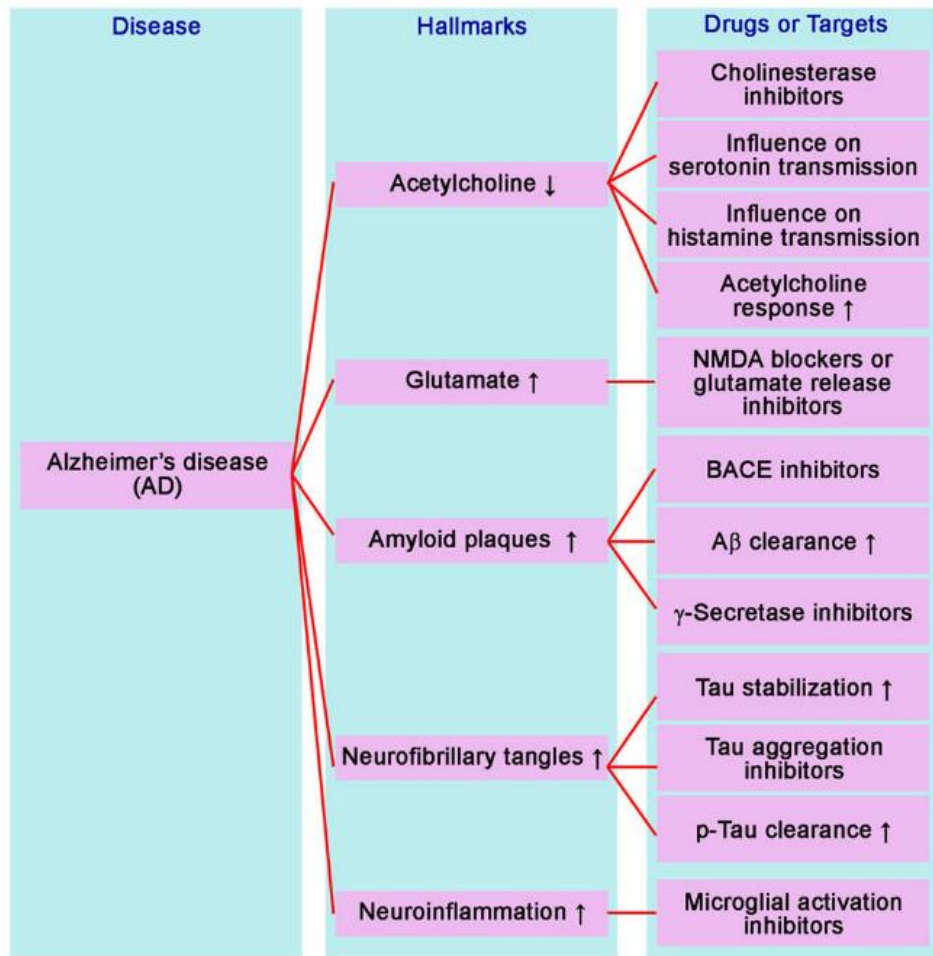
## 6. 图表



(Long et al., 2019)

### 図1. AD発症に関与する各病態の形成時期

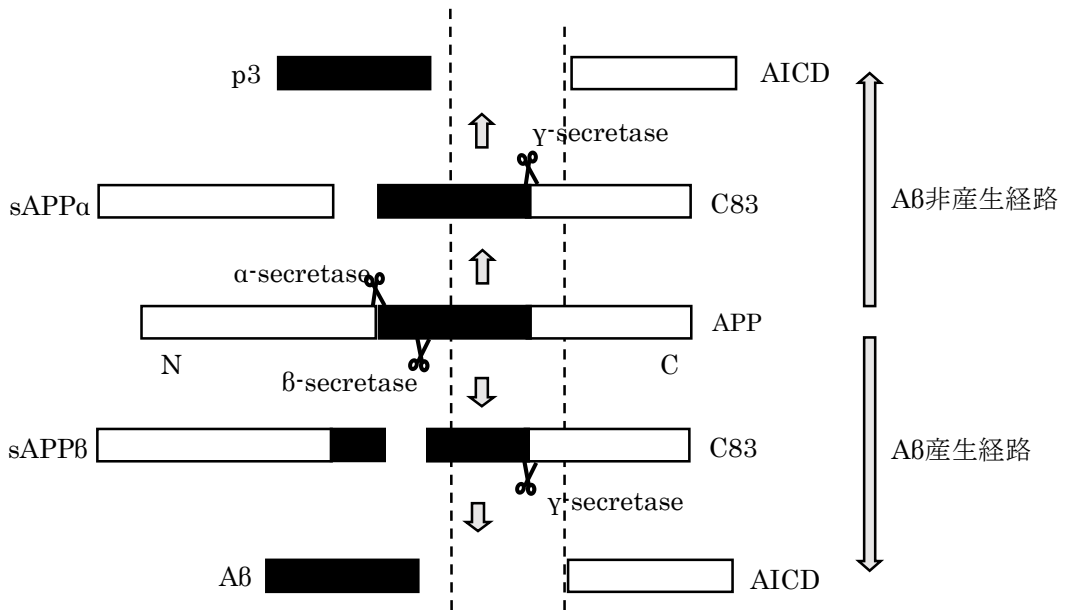
Aβ病態形成が最初期に発生する。この時Amyloid PETによるイメージングで強いシグナルが観察されると共にCSFや血漿中のAβ42の減少も確認される。その後に観察されるのがPK11195 PETなどによって検出されるmicrogliaの活性化である。tau病態はその後に起こり、tau異常リン酸化の延長線上に確認されるNFTの蓄積が進んでいく。一般的にAβ病態はtau病態とよく相関しており、神経細胞死や認知機能の低下はtau病態から直結するとされている。



(Hung et al., 2017)

## 図2. AD治療戦略一覧

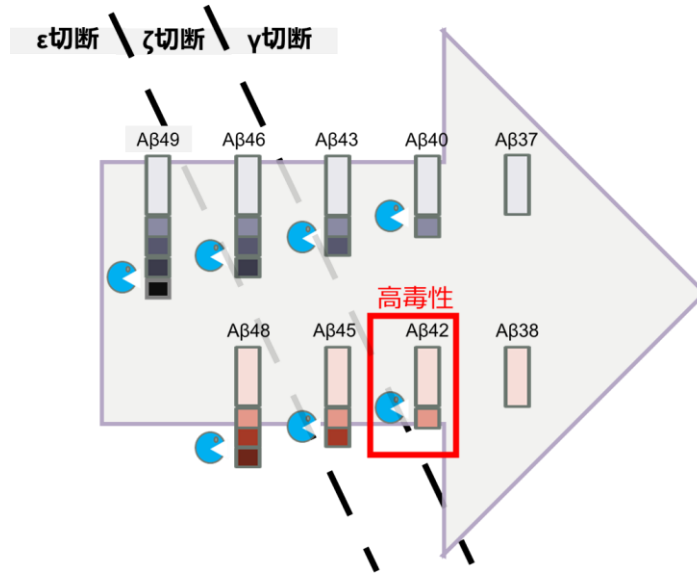
現行のAD治療薬のうち、donepezil、rivastigmineそしてgalantamineはAChEの阻害を通じて神経内ACh濃度を上げるChE inhibitorである。残る1つはNMDA receptorの活性化を抑えるNMDA receptor antagonistのmemantineである。これら4つの治療薬は全て対症療法薬であり、且つ時間経過で患者の応答性が鈍くなる。執筆当時にFDAへの再申請を試みているAducanumabはAβの代謝を促進する抗体医薬であるが、それ以外の治療戦略は未だ薬剤創出の成果を出せていない。



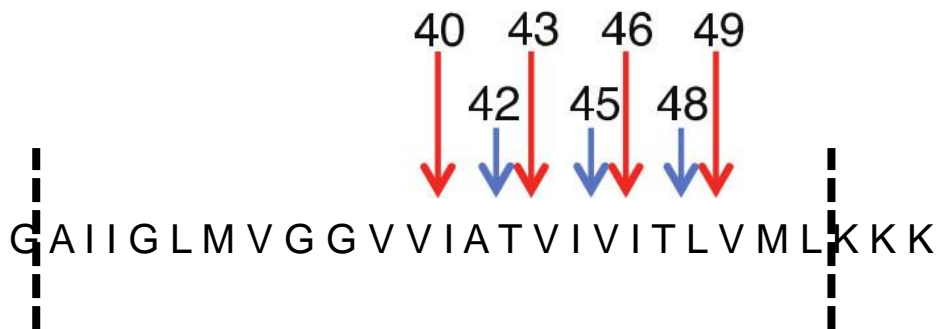
**図3.  $\alpha$ -と $\beta$ -secretaseによる2つのAPP切断経路**

APPの代謝には、 $\alpha$ -secretaseの切断を受けるA $\beta$ 非産生経路と、 $\beta$ -secretaseの切断を受けるA $\beta$ 産生経路の2つが存在する。

A



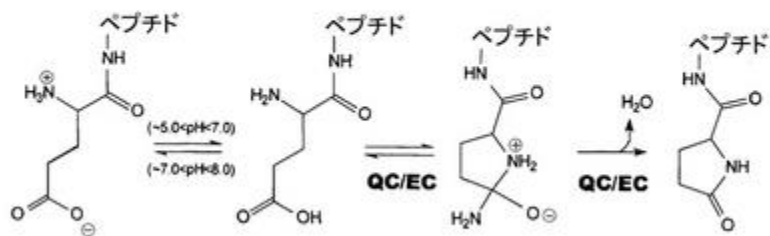
B



**図4.  $\gamma$ -secretaseによるA $\beta$ の産生、切断**

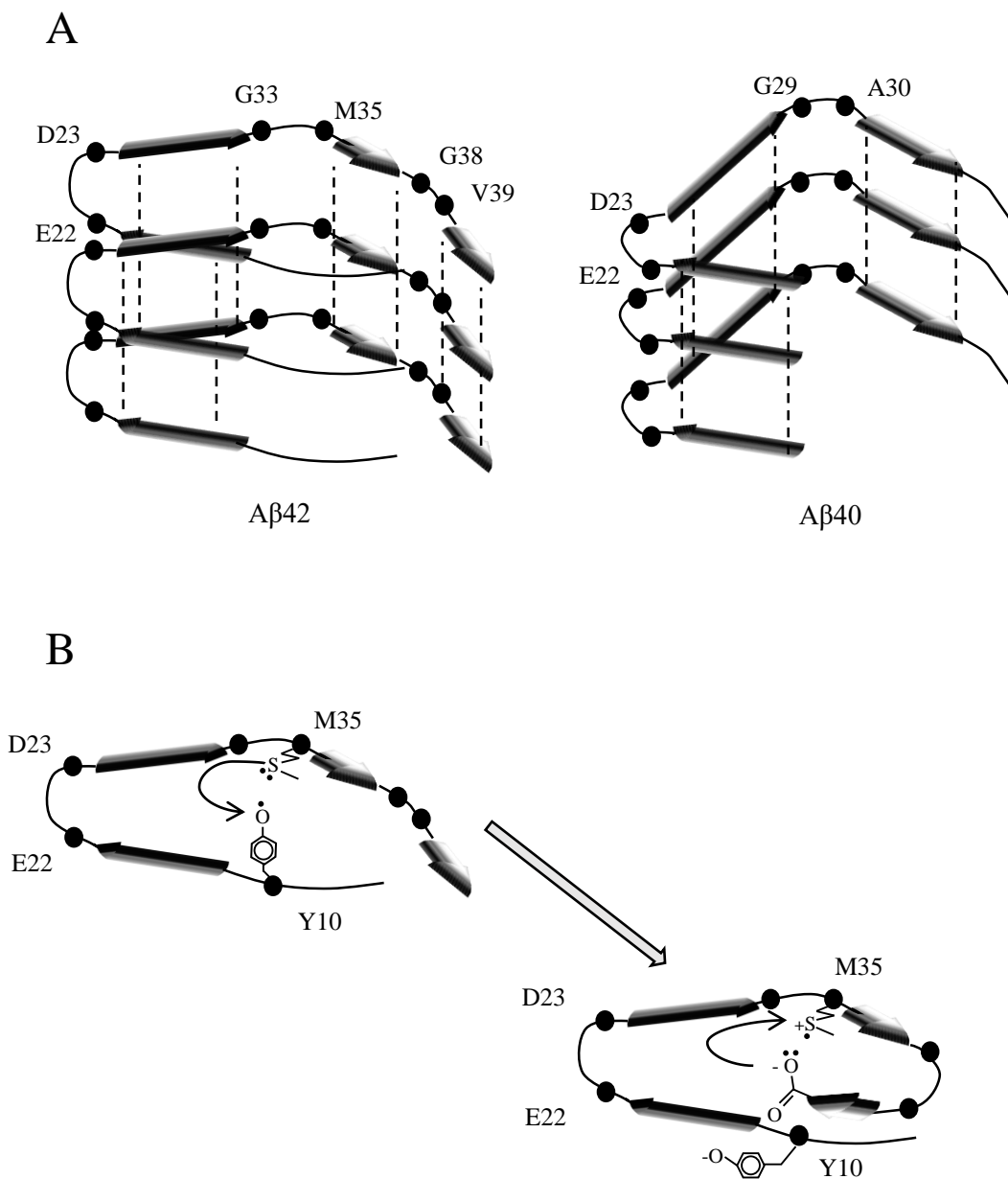
- A.  $\gamma$ -secretaseによるA $\beta$ の産生機構。まず $\epsilon$ -切断によってAICDを産生した後、 $\zeta$ -切断で一度切断し、続く $\gamma$ -切断によってA $\beta$ 40/A $\beta$ 42が産生する。生体内での産生量、凝集性、細胞毒性を加味すると、A $\beta$ 42種の危険性が最も高い。
- B. A $\beta$ の膜内配列と、各切断部位。





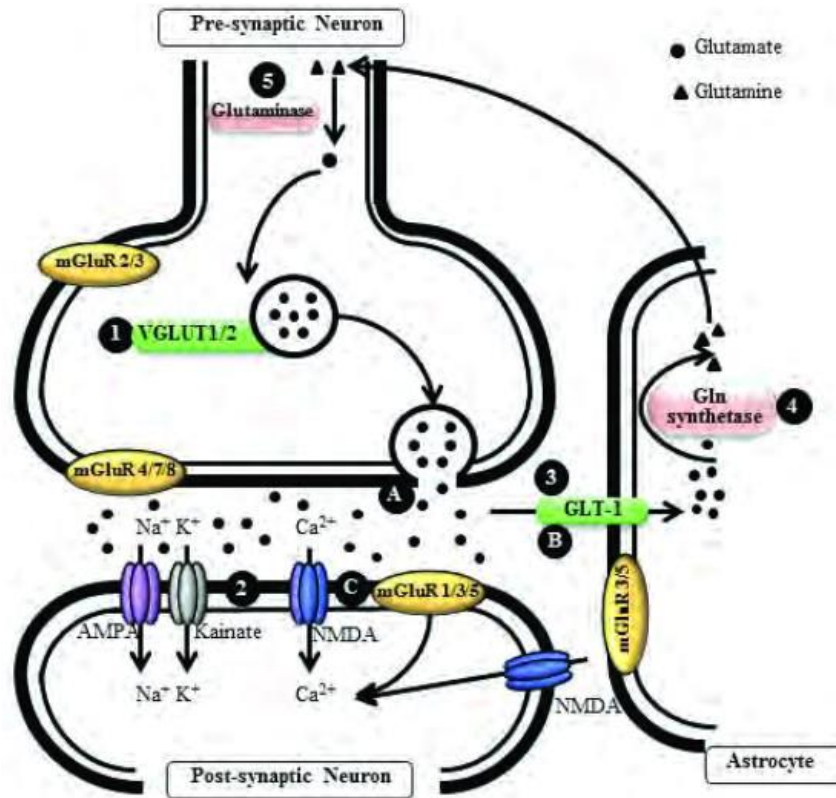
### 図5. ピログルタミル化

Aβの第3の残基はグルタミン酸であり、第1、第2とN末端の切断を受けたAβは更にピログルタミル化される経路が存在する。ピログルタミル化は脳内のglutaminyl cyclase (QC)によって反応が進むが、QCは脳内炎症で誘導される可能性があり、AD脳でpE型Aβの増加が確認されることの説明になることが示唆されている。



### 図6. Aβの凝集

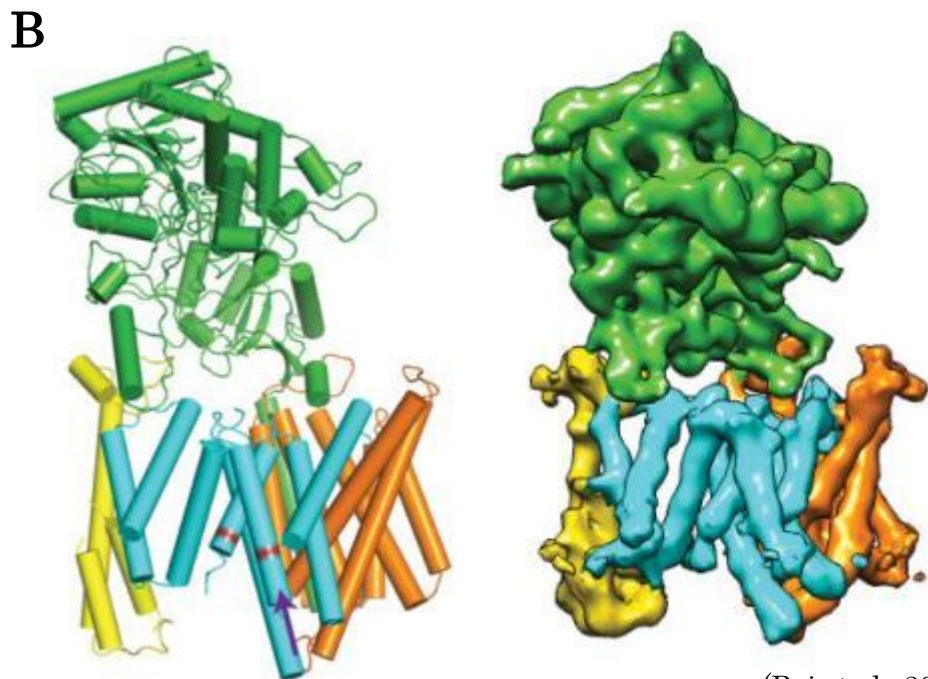
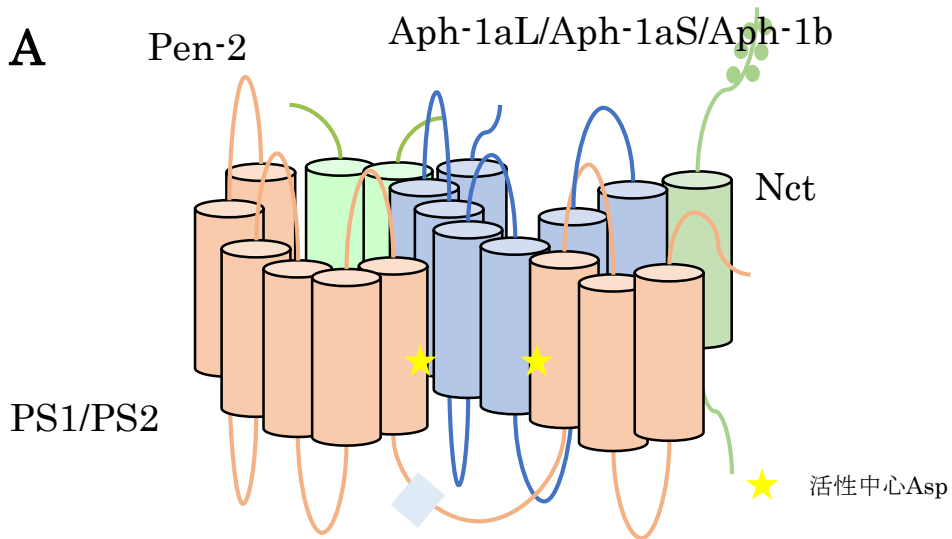
- A. MorimotoらによるAβの凝集モデル。左がAβ42、右がAβ40。
- B. Aβ42の毒性conformerではY10とM35が近い位置にあり、MetのS原子をラジカル化した後に、C末端のcarboxylic acidとの間で安定化作用が働くことで、凝集性が高まる。この為、長さのあるAβ42がより安定化されやすく、凝集性が高い原因であると考えられている。



(Revett et al., 2013)

**図7. Glutamate cycleの模式図**

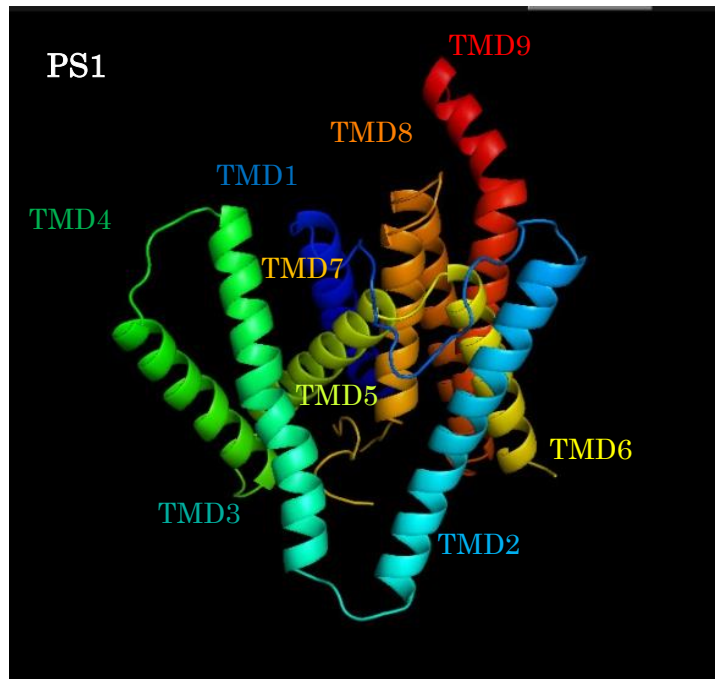
神経伝達物質としてのglutamateの合成、分泌、そして放出の一連の流れ。



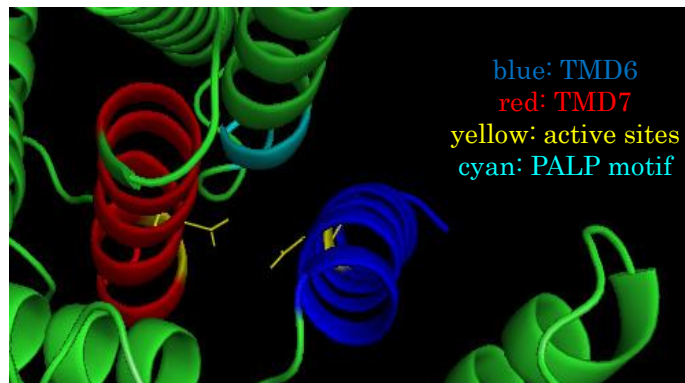
### 図8. $\gamma$ -secretase複合体

- A.  $\gamma$ -secretase複合体4因子の模式図。PSは活性中心を有し、Nctは成熟に伴い細胞外ドメインが糖鎖付加を受ける。
- B. 最新の単粒子構造解析で明らかとなった $\gamma$ -secretase複合体の実態。Nctの細胞外側ドメインが蓋のようにTMDに被さり、またPen-2はTMD2の途中が膜内で折れ曲がり、TMD3を形成していることが分かった。

A



B



### 図9. PS1の3D図

A. Cryo-EMによるPS1の3D画像。

B. PALP motif付近のcryo-EM画像。PALP motifはTMD8と9の間に位置するが、活性中心の非常に近傍に位置しており、酵素活性に影響を与えることが示唆されている。

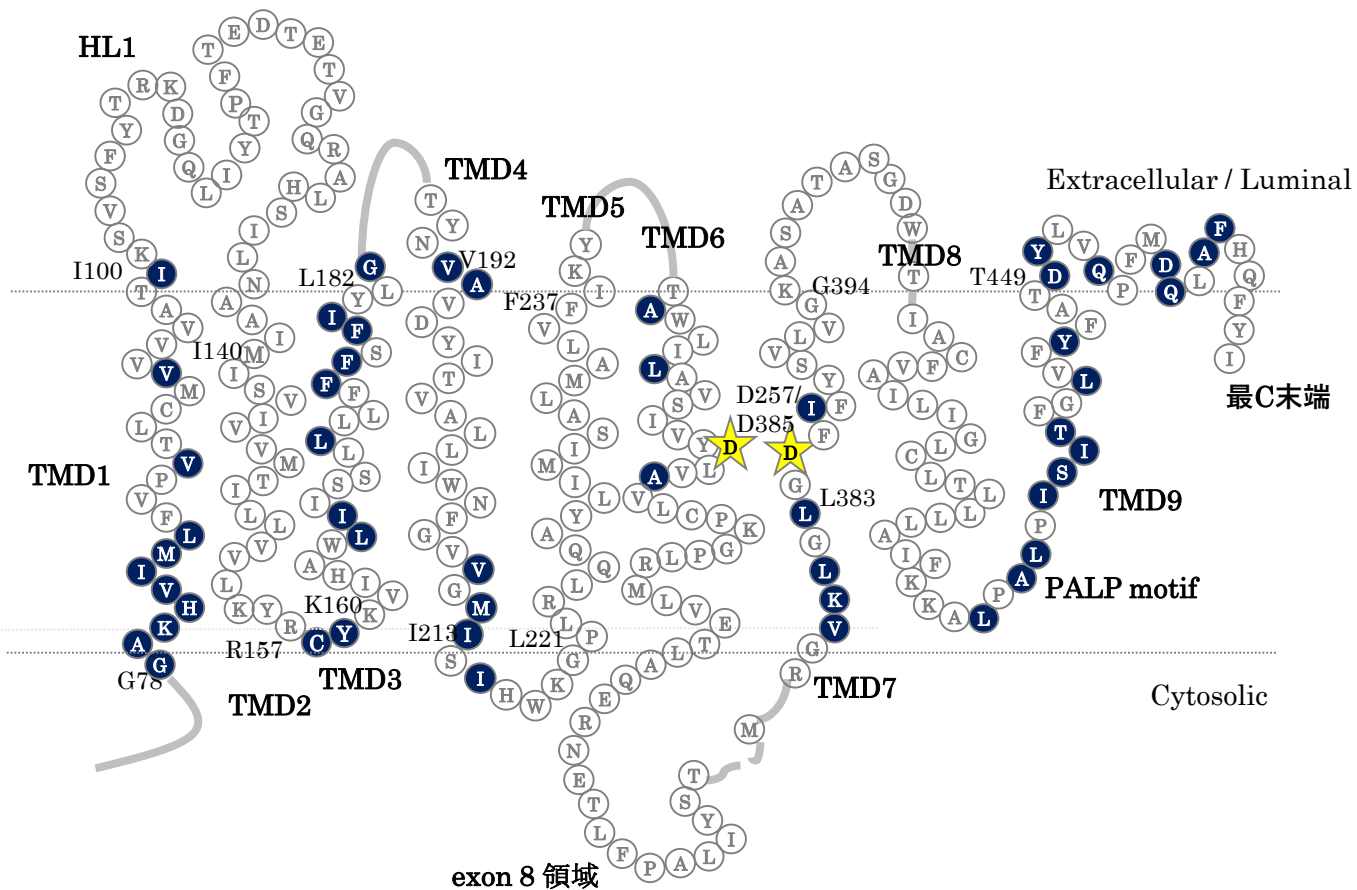
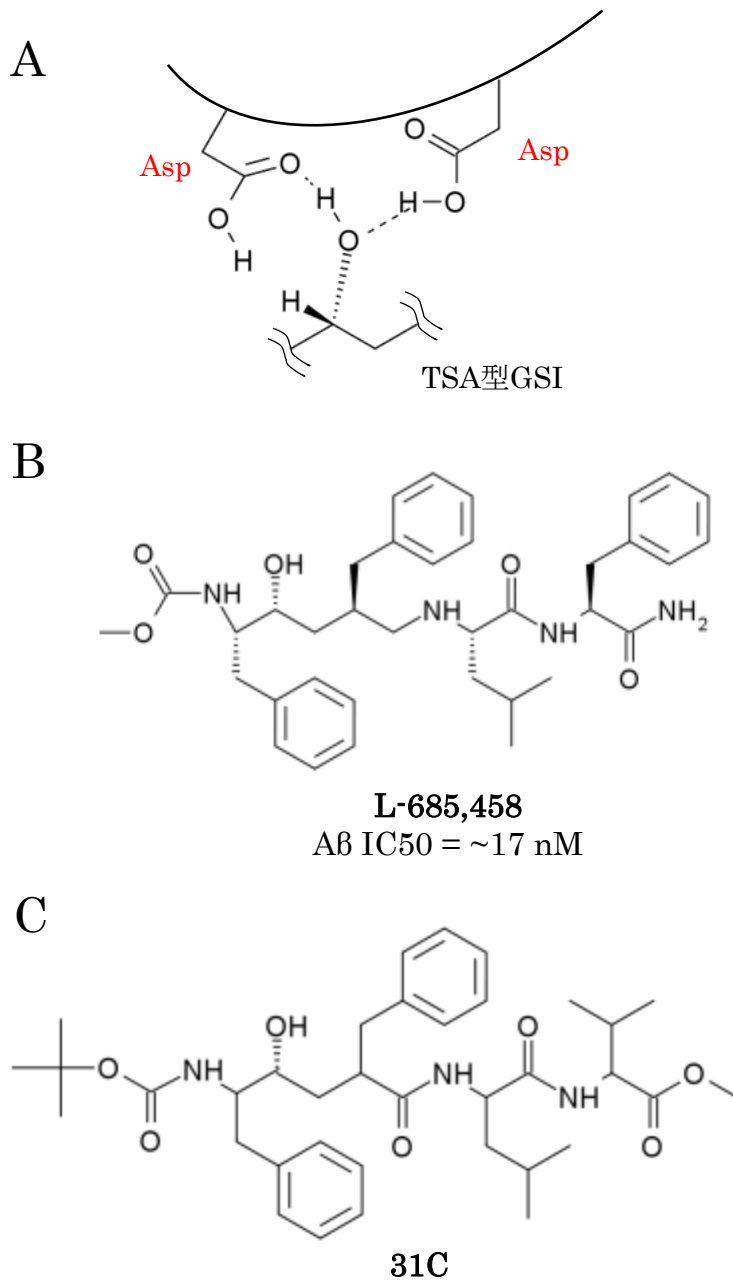


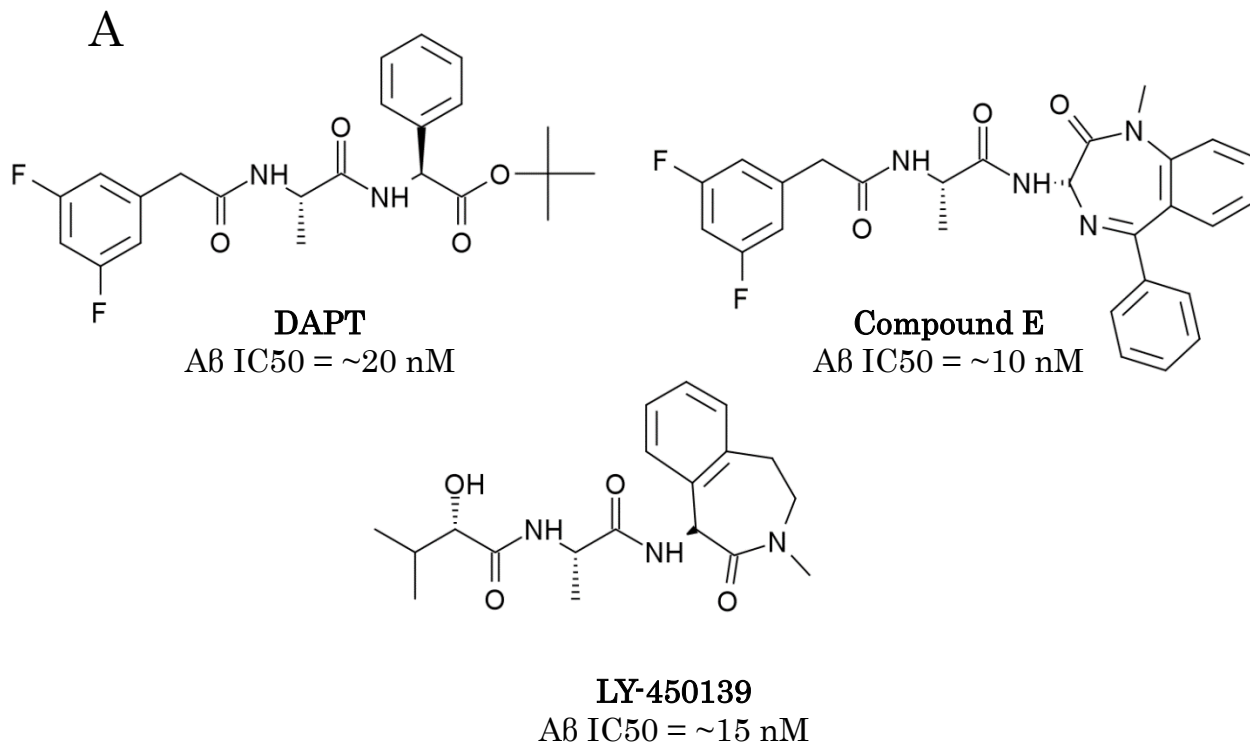
図10. PS1のアミノ酸配列

PS1は9回膜貫通型タンパク質であり、 $\gamma$ -secretaseの活性中心を担う。活性中心のaspは黄色の星印に位置する。親水性環境にある残基は青く塗りつぶされている(ループ構造は除く)。



**図11. TSA型GSI**

- A. 結合様式(Esler et al., 2000)。hydroxy groupのO原子H原子それぞれが2つの活性中心 Aspと水素結合を作って結合し、阻害能を発揮する。
- B. L-685,458の化学構造。
- C. 31Cの化学構造。



**B**

Boc-<sup>D</sup>Val-Gly-Aib-<sup>D</sup>Val-<sup>D</sup>Val-<sup>D</sup>Ile-Aib-<sup>D</sup>Thr-<sup>D</sup>Val-Aib-  
OMe

**pep.11**

Aβ IC<sub>50</sub> = ~90 nM

Boc-Val-Gly-Aib-Val-Val-Ile-Aib-Phe-Val-Aib-OMe

**pep.15**

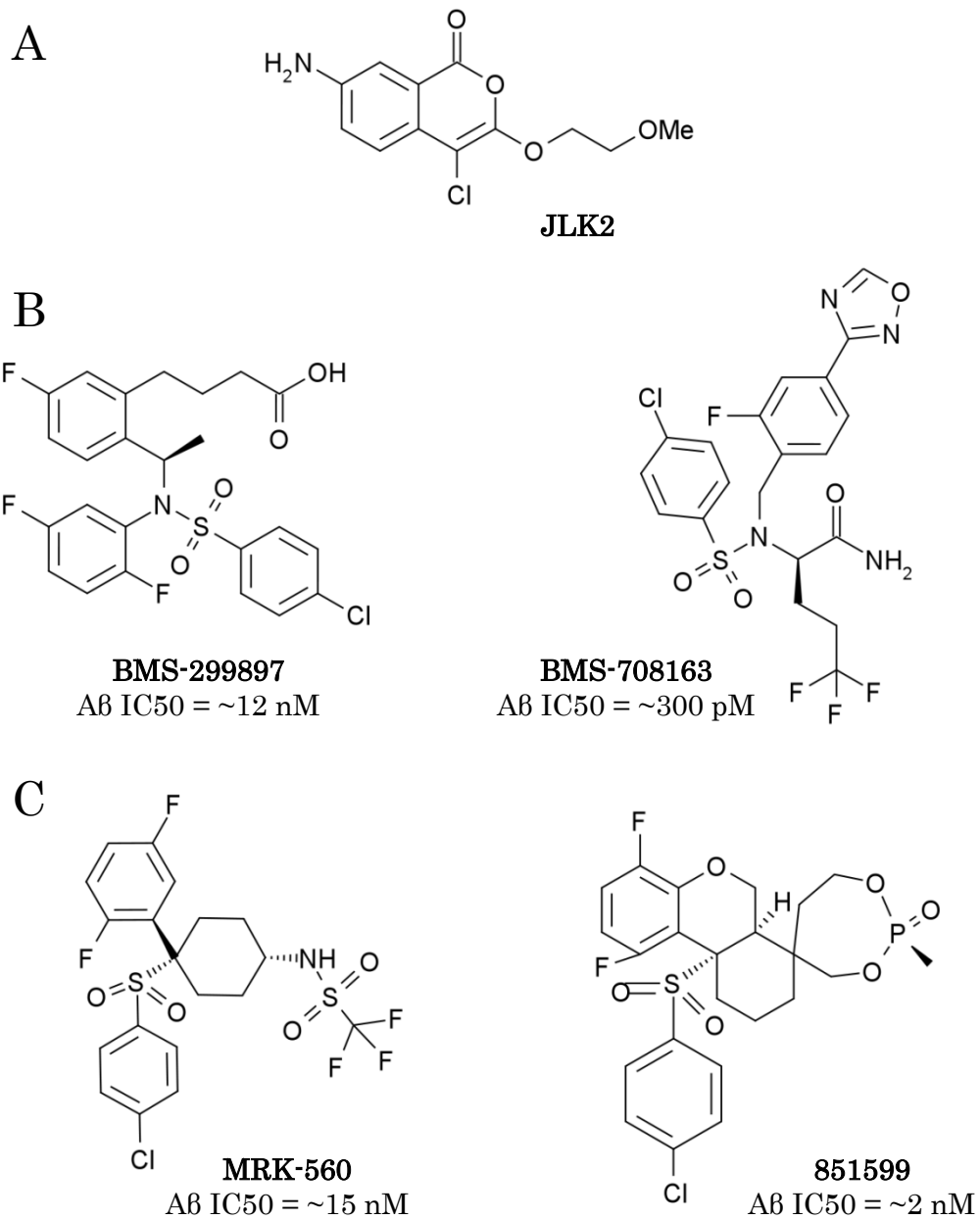
Aβ IC<sub>50</sub> = ~180nM

図12. その他第1世代のGSI

A. dipeptide型GSIの化学構造

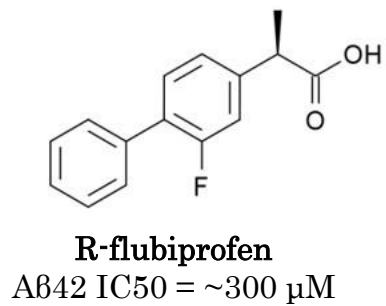
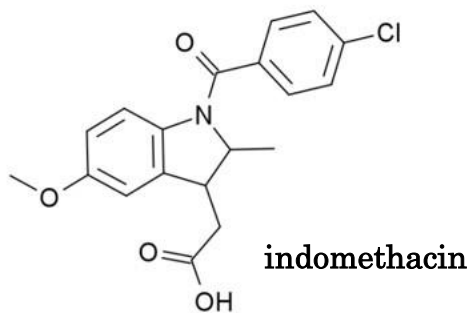
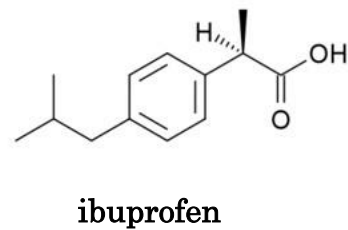
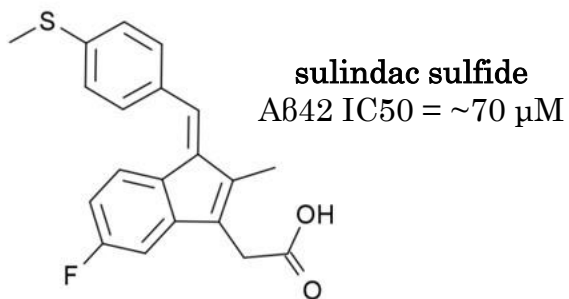
B. Aib peptide型GSIの化学構造





### 図13. 第2世代のGSI

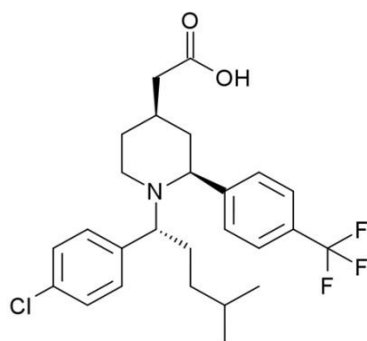
- A. JLKの一つ、JLK2の化学構造。  
 B. sulfonamido型GSIの化学構造。  
 C. sulfone型GSIの化学構造。



#### 図14. NSAIDs

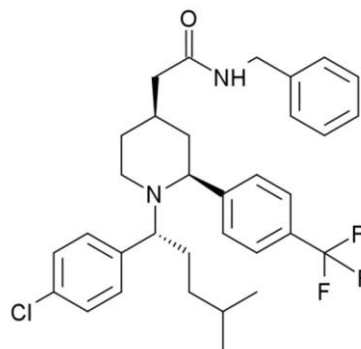
GSM開発のきっかけとなったNSAIDsの化学構造。

A



**GSM-1**

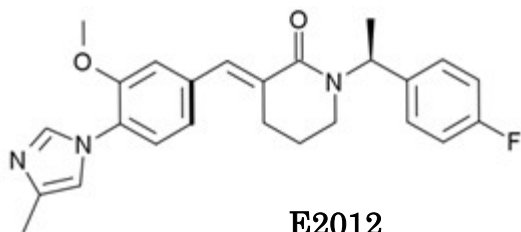
A842 IC<sub>50</sub> = ~180 nM



**NS-1017 (iGSM)**

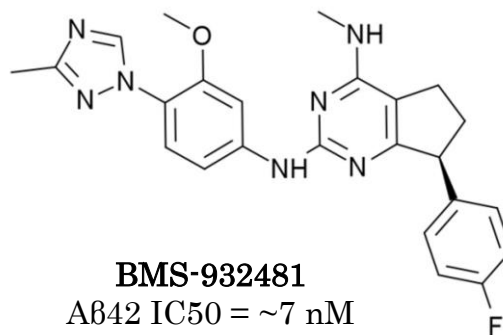
細胞系1 μMで有意なA842増加

B



**E2012**

A842 IC<sub>50</sub> = ~90 nM

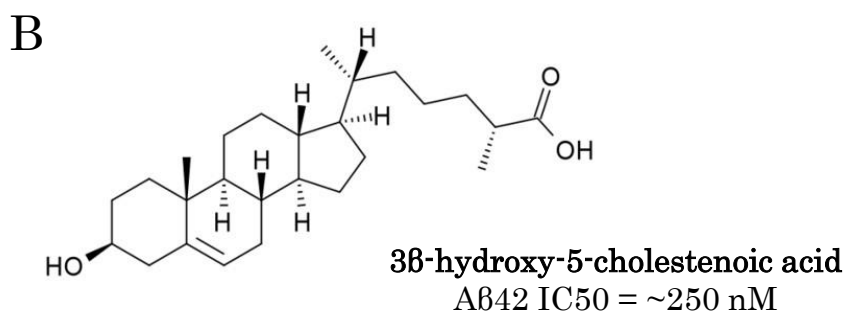
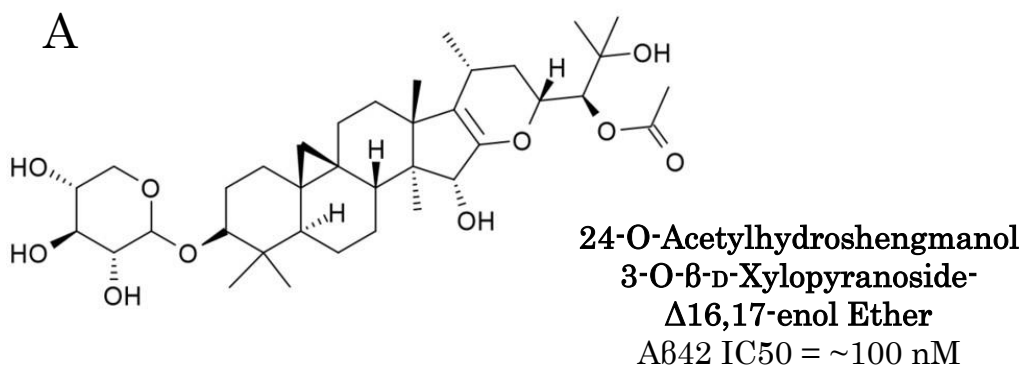


**BMS-932481**

A842 IC<sub>50</sub> = ~7 nM

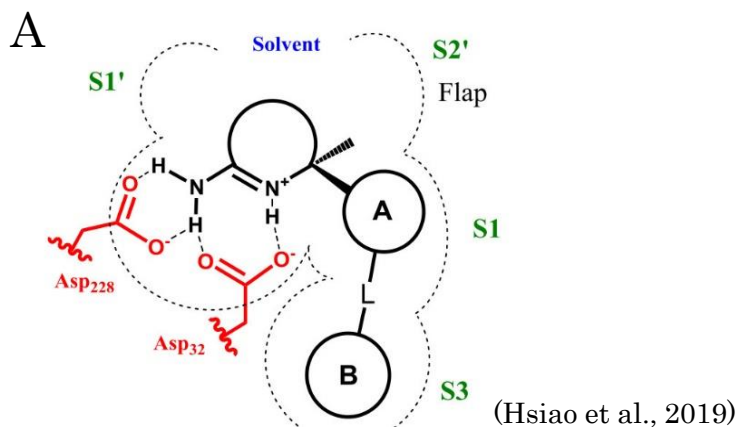
**図15.第2世代のGSM**

- A. phenylpiperidine型GSMの化学構造。
- B. phenylimidazole型GSMの化学構造。

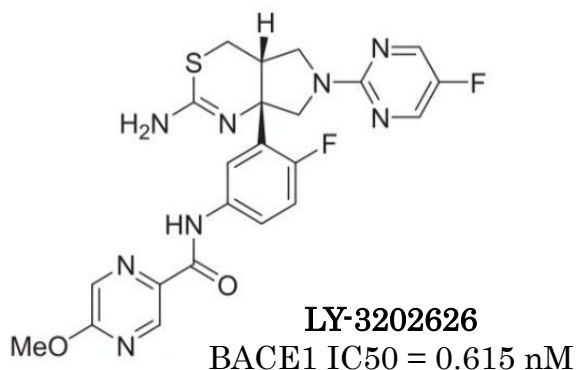
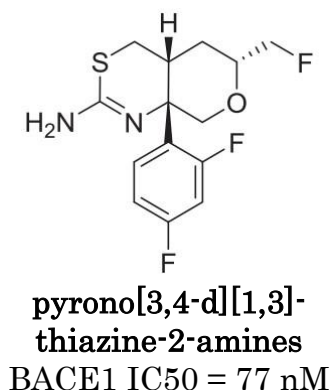
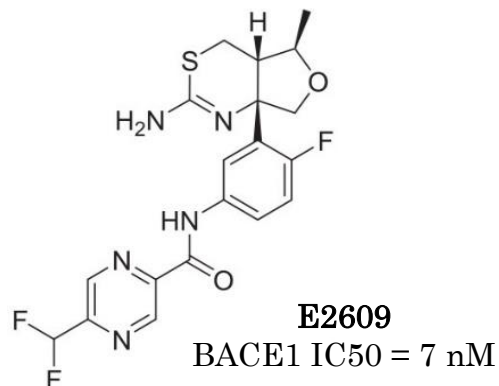
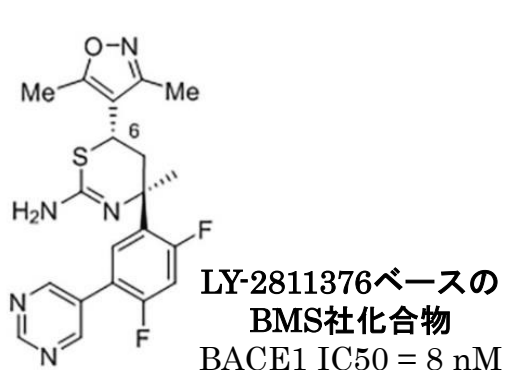


**図16. GSM活性を持つ化合物**

- A. black cohoshから単離された、GSM活性を持つsteroidの化学構造。  
B. 胆汁酸の基本骨格を持つ、GSM活性を持つsteroidの化学構造。



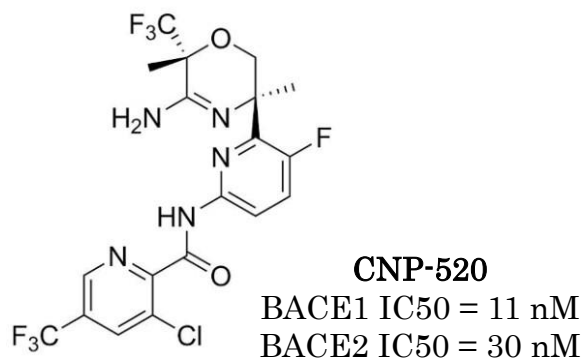
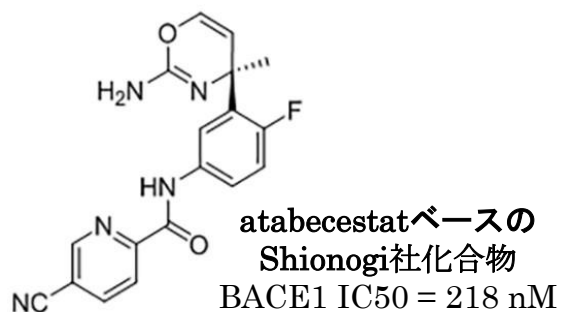
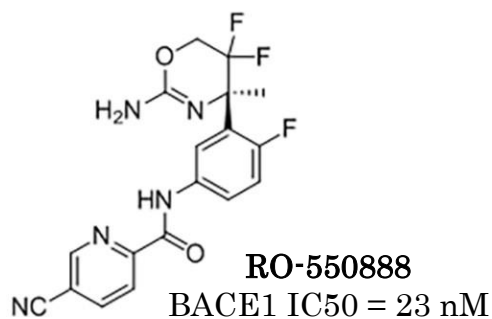
**B**



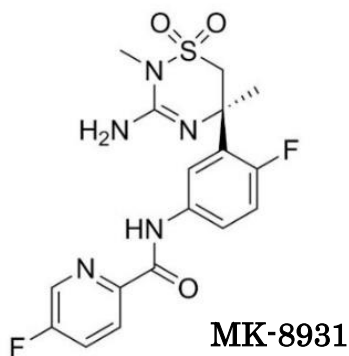
### 図17. 1,3-Thiazine型BSI

- A. BACE1活性中心付近とBSIファーマコフォアの模式図。Flapと示したヘアピン構造や、S2' pocket、S1、S3 pocketのアミノ酸残基の違いでBACE1とBACE2の選択性を創出する。
- B. 様々な1,3-Thiazine型BSIの化学構造。

A



B



C

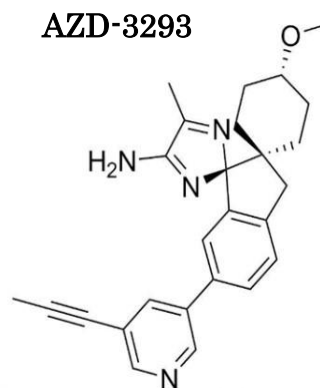
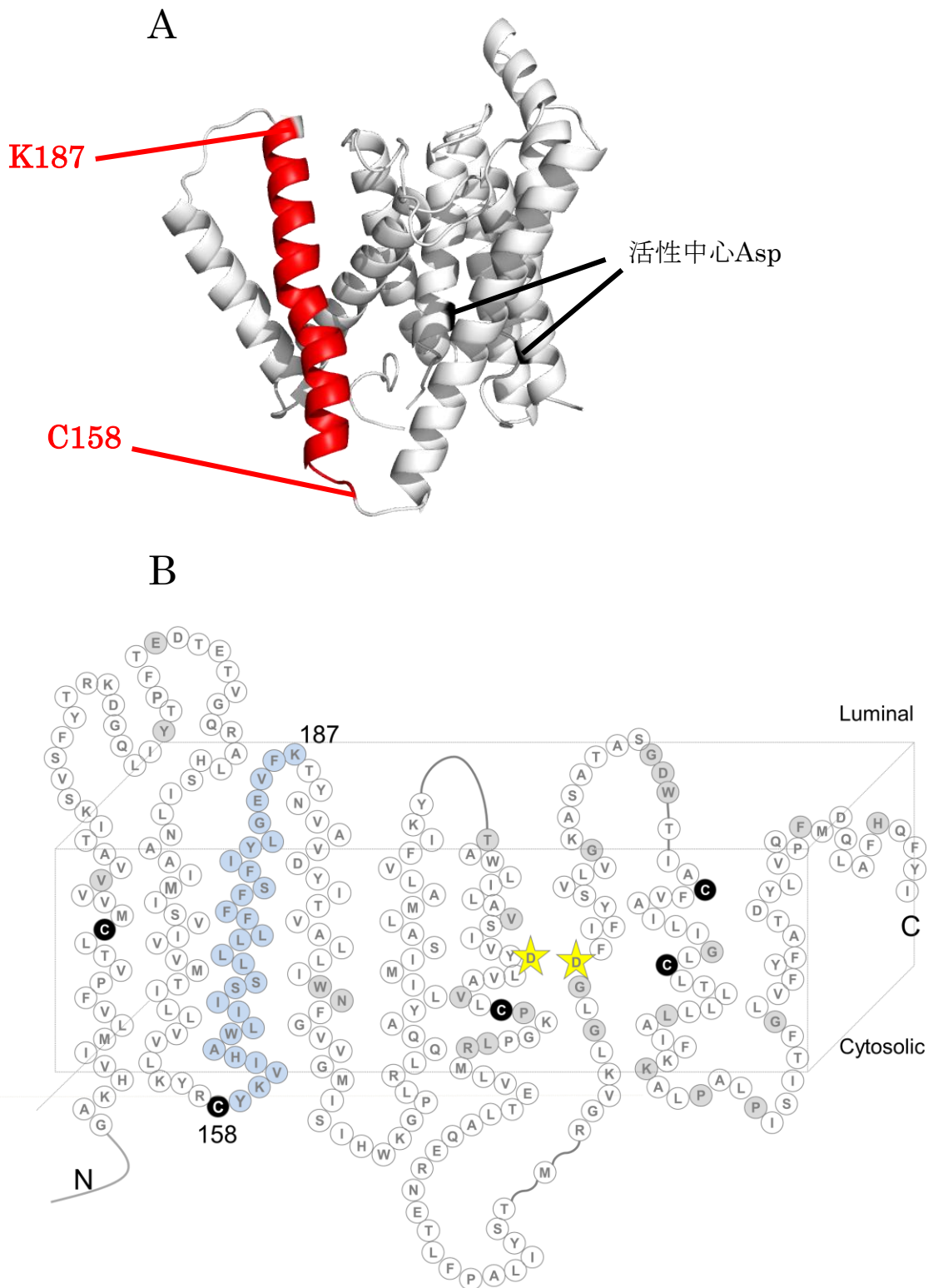


図18. その他第3世代のBSI

- A. 1,3-Oxazine、1,4-Oazine型BSI
- B. Thiadiazine-dioxide型BSIであるMK-8931 (verubecestat)の構造。
- C. 1,3-Oxazoline型BSIであるAZD-3293 (lanabecestat)の構造。



**図19. TMD3の構造**

- A. クライオ電子顕微鏡によるPS1構造。赤い領域がTMD3及びその付近の配列である。活性中心Asp(i.e. D257とD385)は黒色で示してある。
- B. TMD3のアミノ酸残基配列。本研究ではC158からK187までを解析した。内因性Cys残基は黒で、活性中心Aspは黄色で示してある。

# A

MTELPAPLSY	FQNAQMSEDN	HLSNTVRSQN	DNRERQEHND
RRSLGHPEPL	SNGRPQGNSR	QVVEQDEEED	EELTLKYGAK
HVIMLFVPT	LCMVVVVATI	KSVSFYTRKD	GQLIYTPFTE
DTETVGQRAL	HSILNAAIMI	SVIVVMTILL	VVLYKYR <b>CYK</b>
<b>VIHAWLISS</b>	<b>LLLLFFFSFI</b>	<b>YLGEVFK</b> TYN	VAVDYITVAL
LIWNFGVVGM	ISIHWKGPLR	LQQAYLIMIS	ALMALVFIKY
LPEWTAWLIL	AVISVYDLVA	VLCPKGPLRM	LVETAQERNE
TLFPALIYSS	TMVWLVNMAE	GDPEAQRRVS	KNSKYNAEST
ERESQDTVAE	NDDGGFSEEW	EAQRDShLGP	HRSTPESRAA
VQELSSSILA	GEDPEERGK	LGLGDFIFYS	VLVGKASATA
SGDWNTTIAC	FVAILIGLCL	TLLLLAIFKK	ALPALPISIT
FGLVIFYFATD	YLVQPFMDQL	AFHQFYI	

# B

Y159	Y159F	Kerchner, 2012	S170	S170F	Snider, 2005
H163	H163Y	Clark, 1995		S170P	Irwin, 2013
	H163P	Kim, 2012	L171	L171P	Ramirez-Duenas, 1998
	H163R	Campion, 1995 Yagi, 2014	L173	L173W	Campion, 1999
A164	A164V	Roeber, 2015		L173S	Wang, 2019
W165	W165G	Higuchi, 2000		L173F	Kasuga, 2009
	W165C	Wallon, 2012	L174	L174M	Bertoli-Avella, 2002
L166	L166V	Sassi, 2014		L174del	Tiedt, 2013
	L166del	Knight, 2007	F175	L174R	Klunemann, 2004
	L166H	Rantieri, 2005		F175S	Colacicco, 2002
	L166P	Moehlmann, 2002	F176	F175del	Voglein, 2019
I167	I167I168del	Janssen, 2002	F177	F176L	Rogaeva, 2001
				F177S	Rogaeva, 2001
I168	I168T	Sassi, 2014	F177L	F177L	Raux, 2005
S169	S169P	Lleo, 2002	S178	S178P	Rogaeva, 2001
	S169L	Taddei, 1998	I180	I180N	Lanoiselee, 2017
	S169S170del	Guo, 2010	G183	G183V	Dermaut, 2004
			E184	E184D	Yasuda, 1997
				E184G	Wallon, 2012

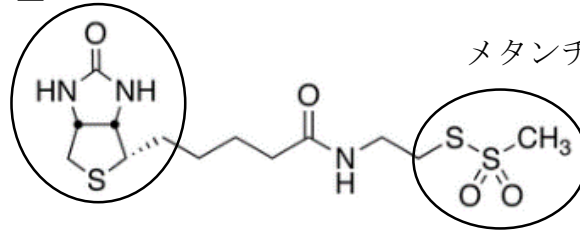
図20. PS1のアミノ酸残基配列及びTMD3領域の既知のFAD変異

- A. human PS1のアミノ酸残基全配列。本研究で解析したC158からK187までは黄色の網掛けで強調してある。
- B. 本研究で解析したTMD3領域内に報告されているFAD変異一覧(出典: ALZFORUM; <https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>)。



A

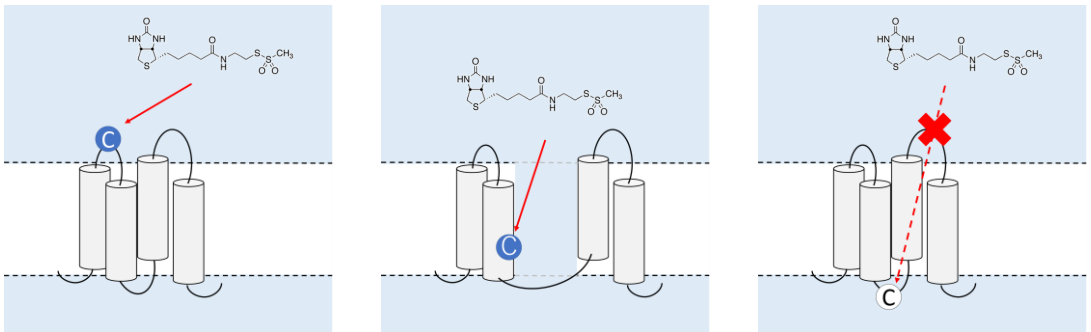
ビオチン基



メタンチオスルフォネート基

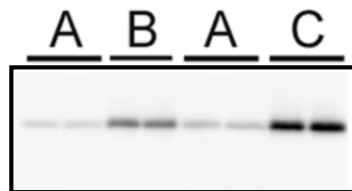
MTSEA-ビオチン

B



(一部 Cai and Tomita, 2018)

C



親水性の強さ、広さ  
C > B > A

### 図21. SCAMの原理

- MTSEA-ビオチンの構造。メタンチオスルフォネート基で親水性環境下のCys基を認識し、ビオチン基を通じてStreptAvidinビーズによる結合タンパクの沈殿分離を行う。
- MTSEA-ビオチンは水分子存在下においてのみthiol基特異的に結合する為、膜外親水性環境下(左)や活性中心ポア等の膜内親水性環境下(中)でのみCys基との結合が可能である。しかしMTSEA-ビオチンは膜非透過性でもある為、疎水性環境下(右)ではCys基と結合できない。
- ターゲット残基の面する親水性環境の強さや広さはwestern blottingによるタンパクバンドのintensityに比例する。図表の場合、バンドが最も強いCが最も広い親水性環境下に存在し、バンドが一番薄いAが疎水性環境下に位置していることが分かる。

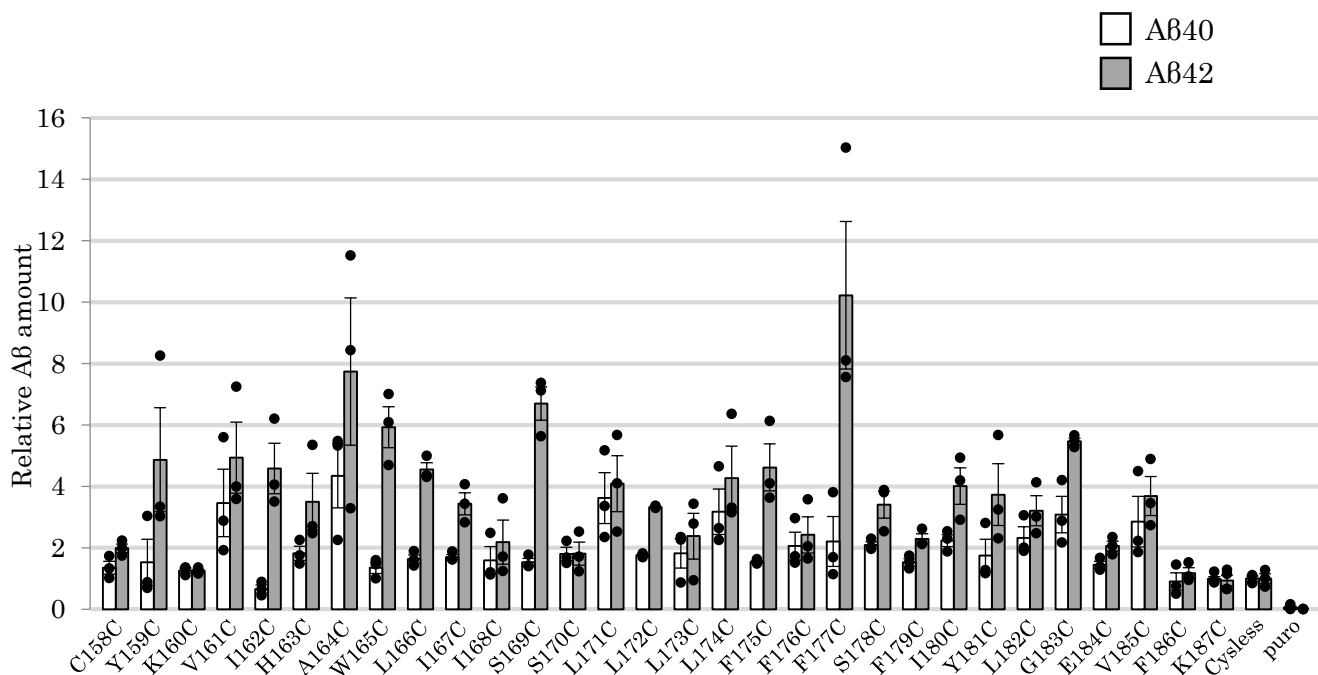
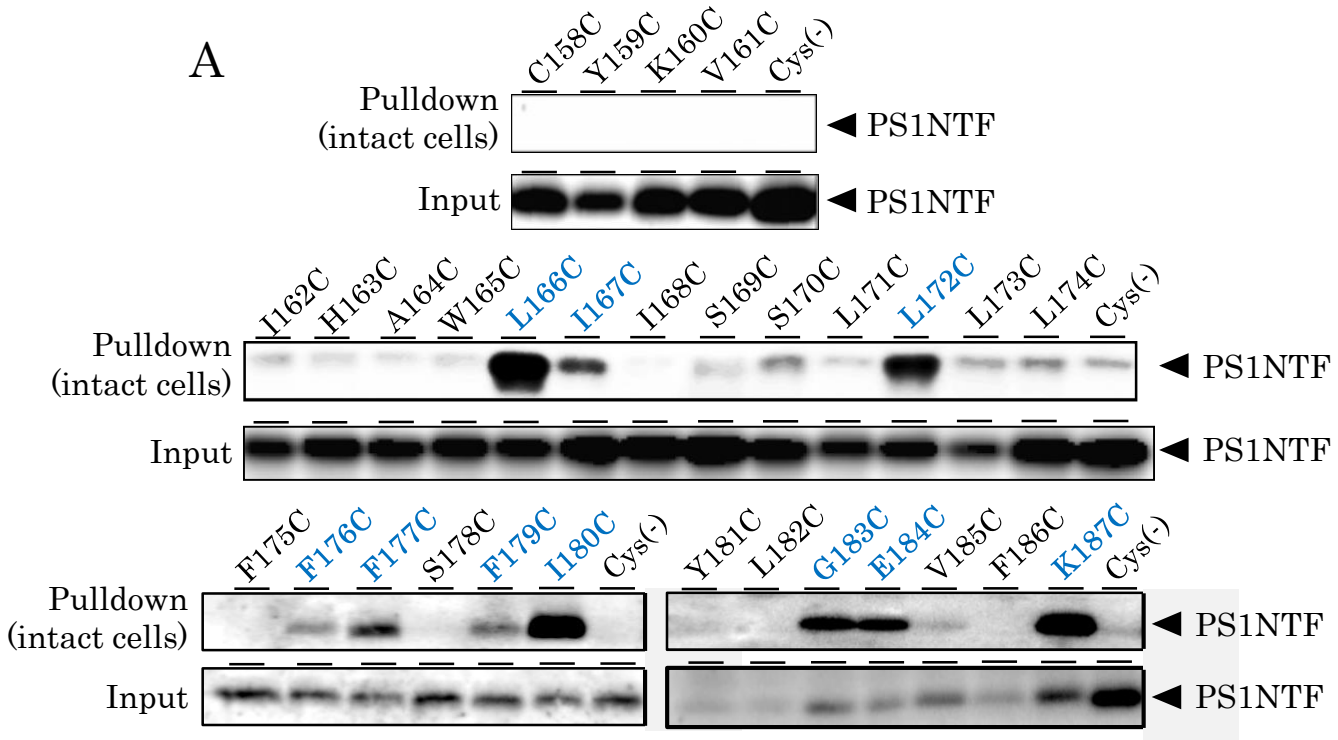
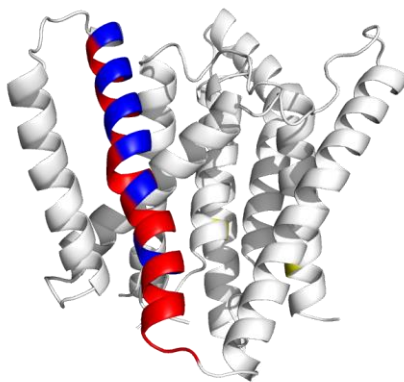


図22. Single Cys PS1 Mtを含む $\gamma$ -secretaseのA $\beta$ 切断活性測定

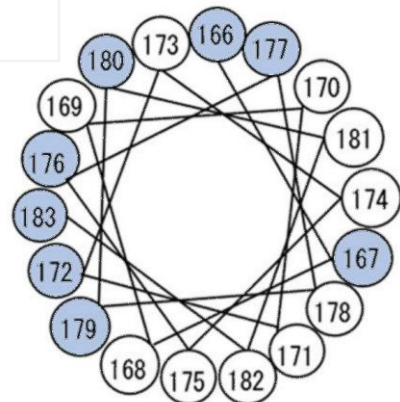
DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したA $\beta$ 40及びA $\beta$ 42量をELISAによって測定した。内因性Cys基を全てSer基に変えたコントロール群Cysless細胞のA $\beta$ 分泌量によって規格化してある(n = 3~4)。



**B**

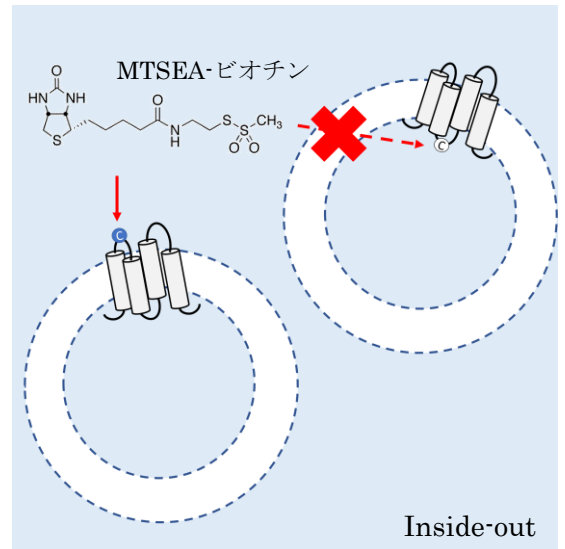
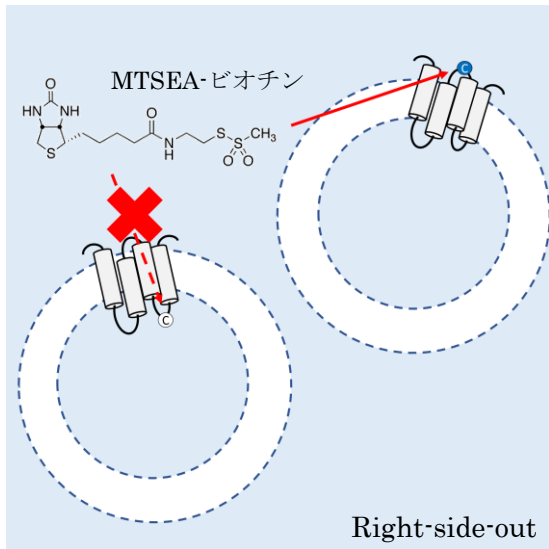


**C**



**図23. intact cellsを用いたTMD3のSCAM解析**

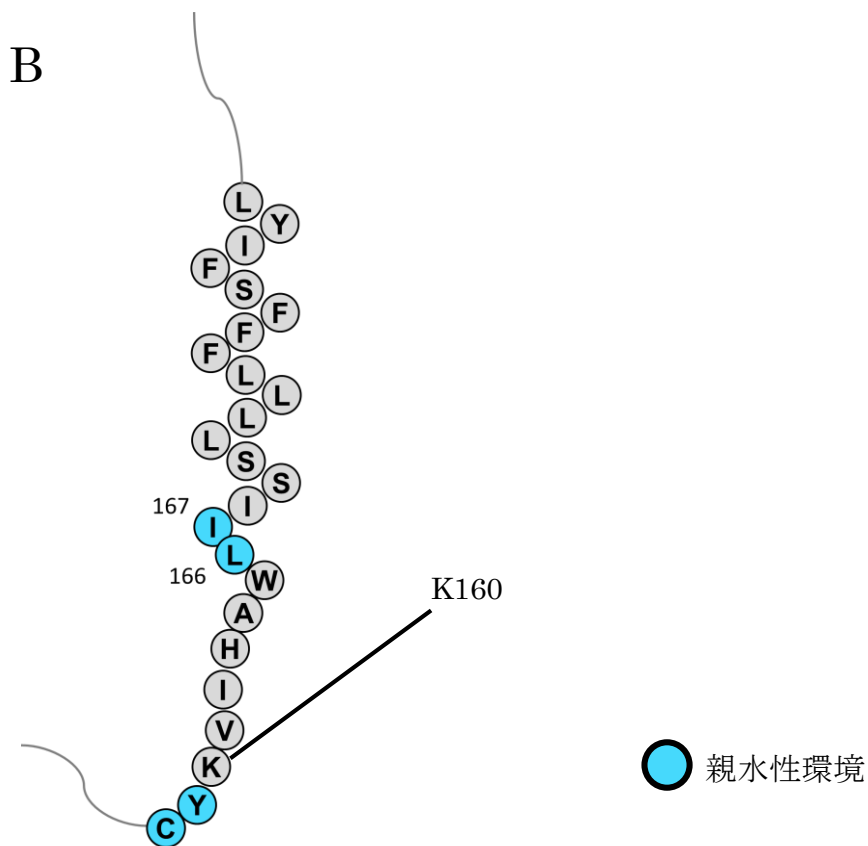
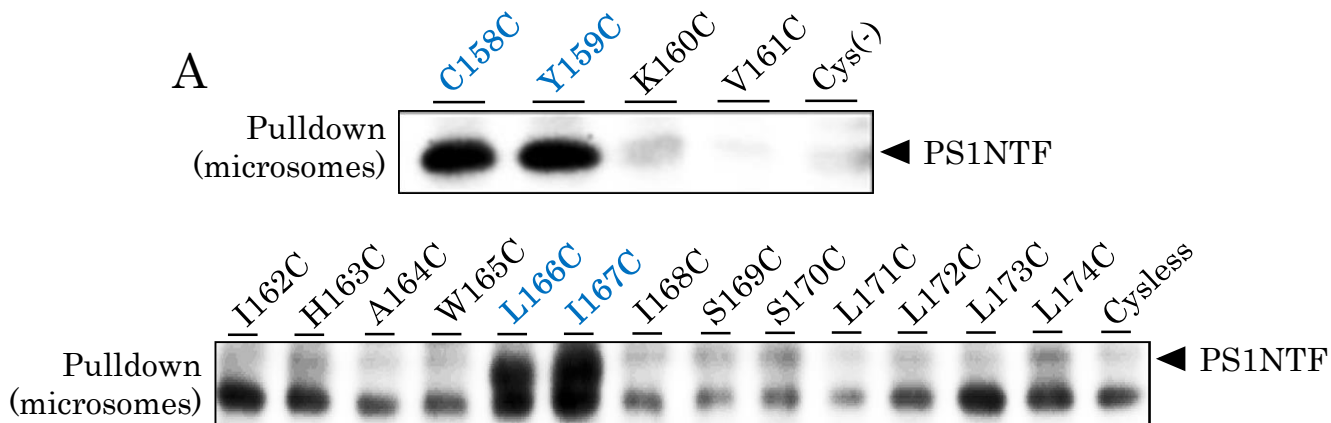
- A. TMD3領域の残基をCys基に置換し、intact cellsを用いてSCAM解析を行った。青い太文字でハイライトした残基が標識された箇所であり、親水性環境に面している部位である。Anti-PS1抗体にはG1Nr5を使用した。
- B. 最初に報告されたCryo-EMによるPS1の構造(Bai et al., 2015)上に、親水性に面する残基を青色でマッピングした。赤いドメインがTMD3領域である。
- C. Helixモデル上に標識された残基をマッピングすると、殆どがhelixの片面に集中することが分かる。



(一部 Cai and Tomita, 2018)

#### 図24. microsomeを用いたSCAMの原理

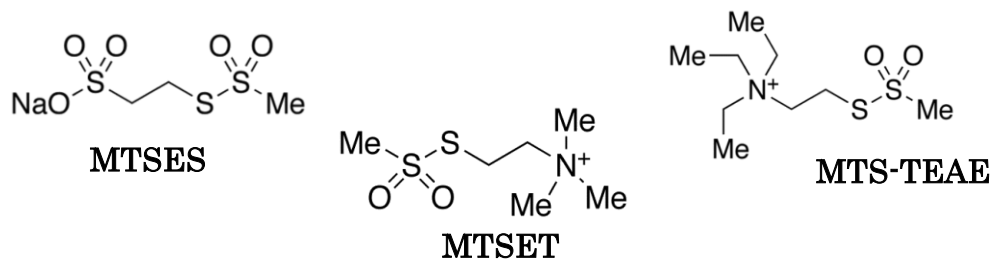
細胞を破碎すると細胞膜が分断され、intact cellsと同じように内腔側と細胞質側がそれぞれ内側と外側を向くright-side-out型のvesicle (左)と、intact cellsとは逆に内腔側と細胞質側がそれぞれ外側と内側を向くinside-out型のvesicle (右)の2種類が存在する。その為、内腔側膜外親水性環境下は勿論、intact cellsでは認識されない細胞質側膜外親水性環境下に位置するCys基もSCAMによる標識が可能となる。



**図25. TMD3細胞質側の境界残基の決定**

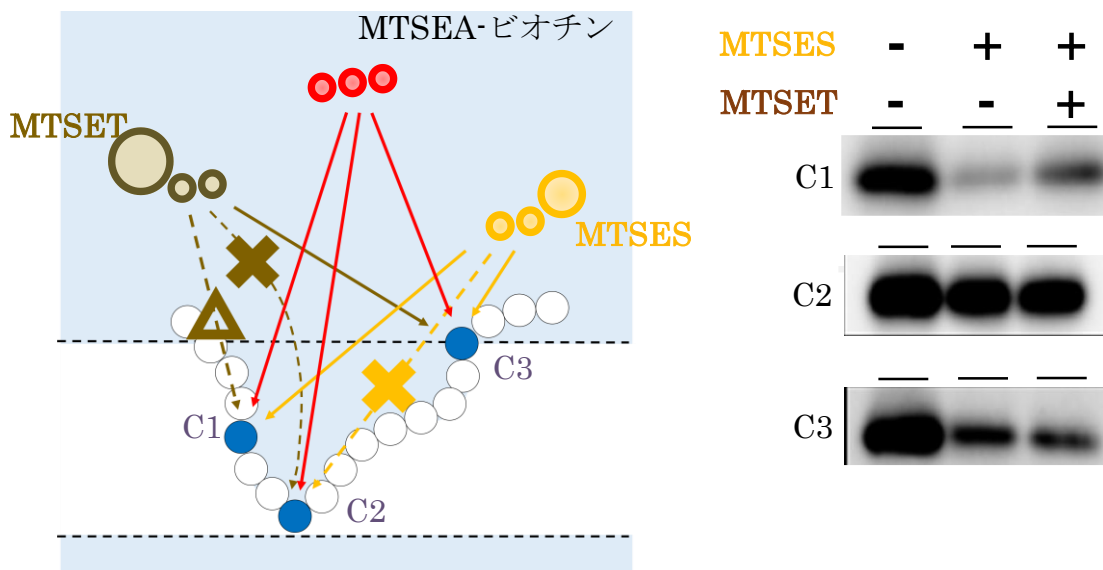
- A. TMD3領域の残基をCys基に置換し、microsomeを用いてSCAM解析を行った。青い太文字でハイライトした残基が標識された箇所であり、親水性環境に面している部位である。Anti-PS1抗体にはG1Nr5を使用した。
- B. TMD3の模式図。膜外親水性環境を青、膜内親水性環境を水色で示した。

A



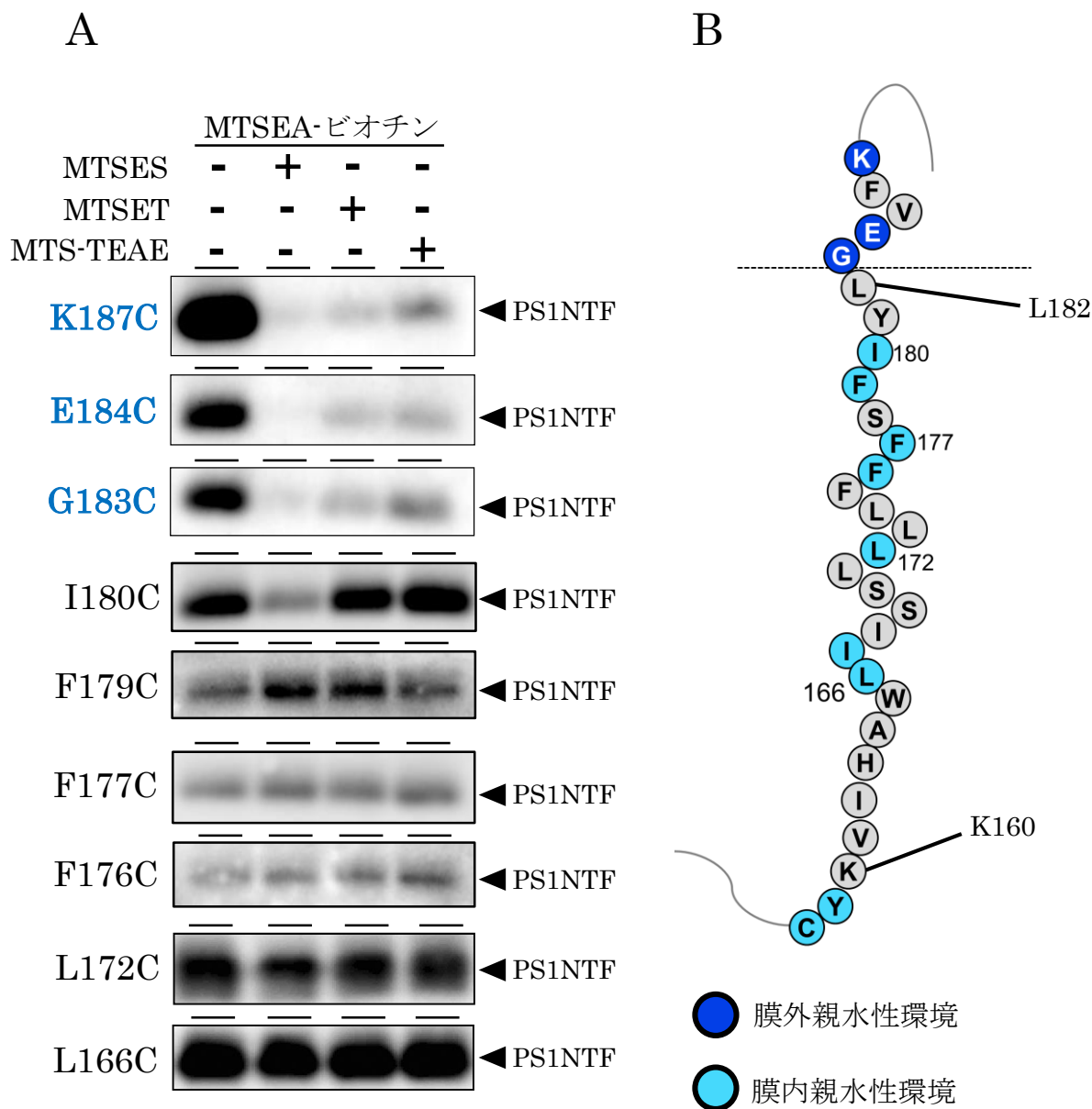
小 大  
 嵩高さ

B



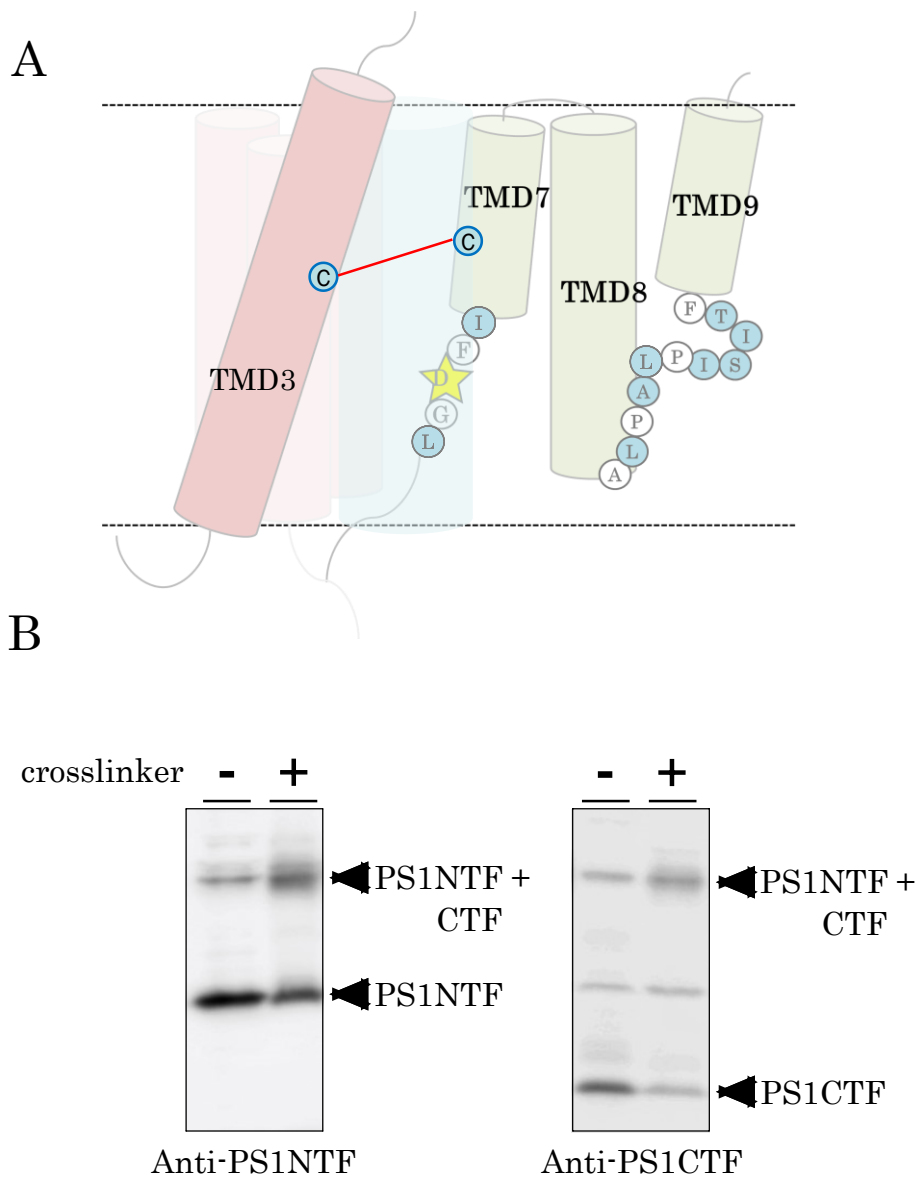
### 図26. SCAM競争実験の原理

- A. 本実験で用いた3種のMTS競合剤(i.e. MTSES、MTSET、MTS-TEAE)の構造。電荷や官能基のサイズによって嵩高さが異なり、MTSES < MTSET < MTS-TEAEの順に狭い親水性環境下に入り込みづらくなっていく。特にMTS-TEAEは一般的に膜外親水性環境のCys基のみに結合できるとされている。
- B. MTS競合剤によるMTSEA-ビオチンの標識の競争模式図。狭い親水性環境下に競合剤は入り込めないのでMTSEA-ビオチンの標識に変動はない(C2)。膜外などの広い親水性環境下では競合剤による競合が確認される(C3)。また、競合剤の嵩高さによって標識の競争率が変わり、MTSESの方がより狭い環境下に入り込めるのでMTSETよりバンドの低下が顕著に見られる場合もある(C1)。



### 図27. TMD3内腔側の境界残基の決定

- A. TMD3領域内で親水性環境下に面すると判明した残基に対し、intact cellsを用いてSCAM競合実験を行った。青い太字で示したG183以降の残基より全ての競合剤による競合が見られたことから、L182までが膜内領域だと考えられる。Anti-PS1抗体にはG1Nr5を使用した。
- B. TMD3の模式図。膜外親水性環境を青、膜内親水性環境を水色で示した。



### 図28. Crosslinkの原理

- A. MTS crosslinkerは親水性に位置する2つのCys基を結び、両者の間の距離を測る手法である。
- B. PS1が活性化に伴って自己断片化することを利用し、PS1NTFとCTFそれぞれにCys基を導入すると、crosslinkが成されてる場合はそれぞれのモノマーが減少し、crosslinkされたヘテロダイマーのバンドがwestern blottingで観察できる。



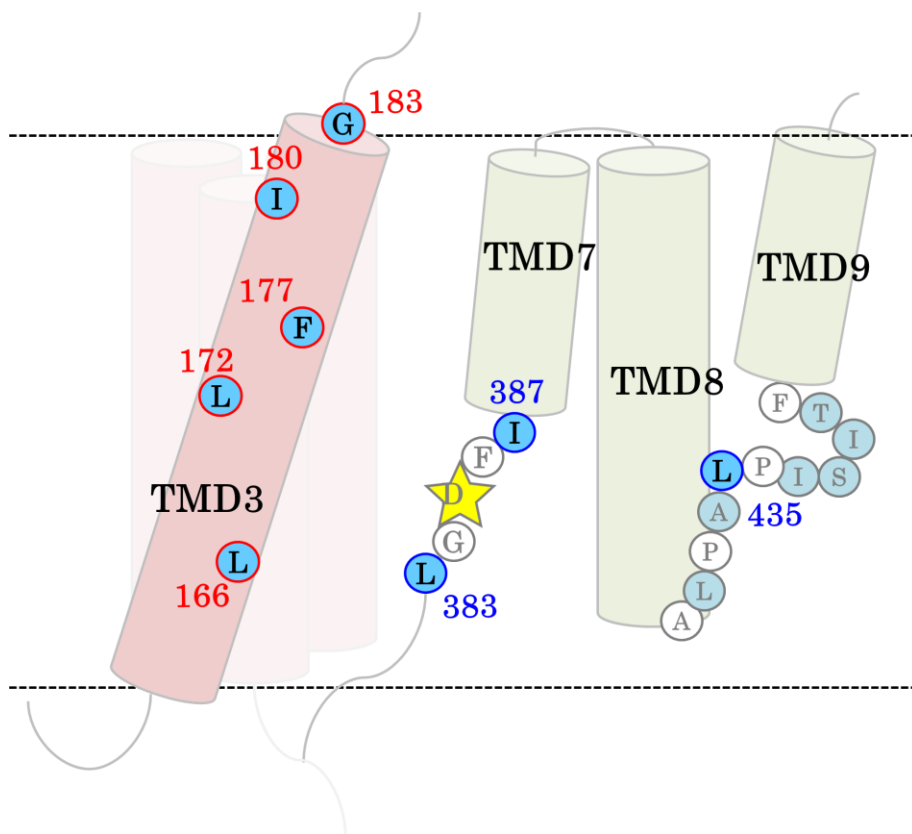
名称	架橋最長距離	構造
Cu-PNT	2.1 Å	
M2M	5.2 Å	
M3M	6.5 Å	
M4M	7.8 Å	
M6M	10.4 Å	
M8M	13.0 Å	
M11M	16.9 Å	
M14M	20.8 Å	
M17M	24.7 Å	

S-S結合形成

リンカー  
架橋

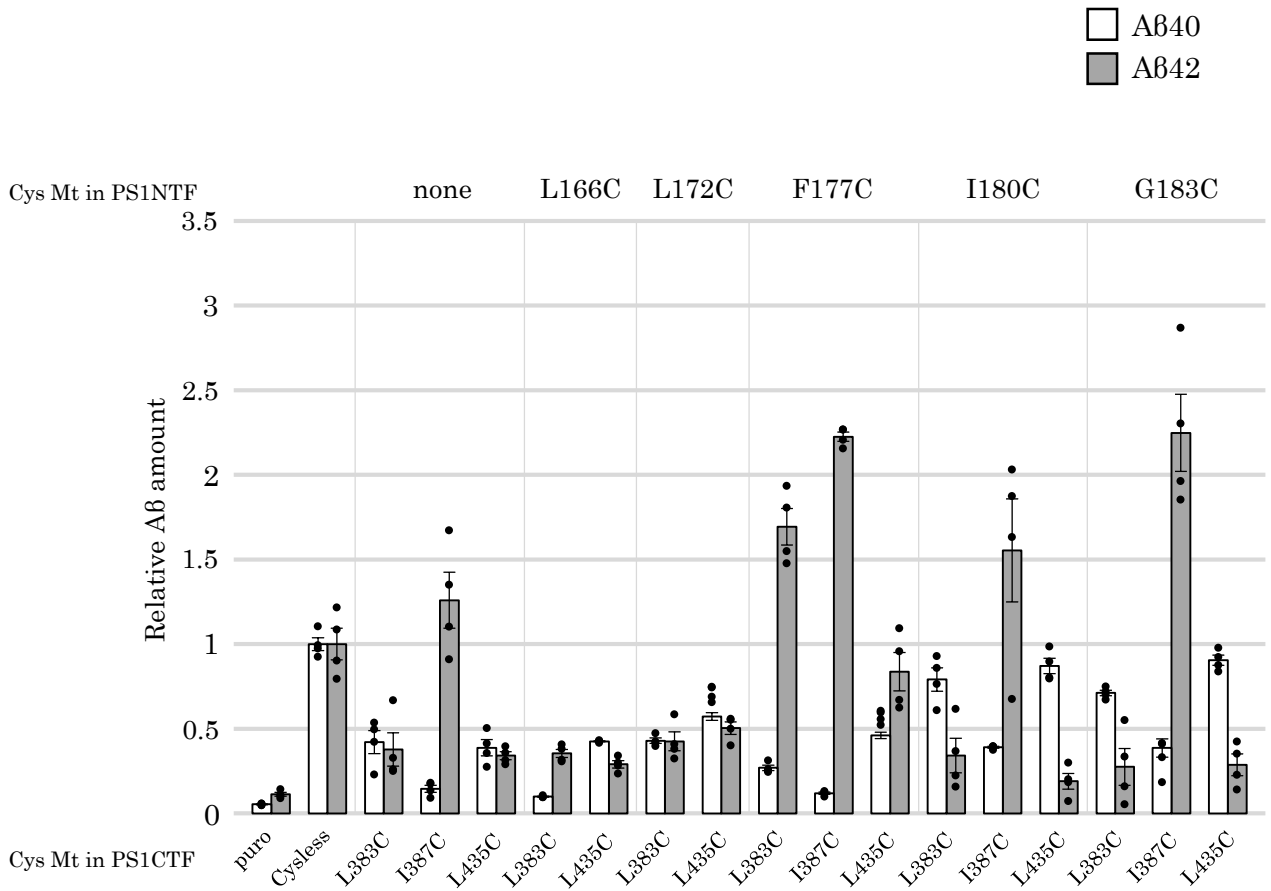
### 図29. Crosslinker一覧

本研究で使用したcrosslinkerの一覧。Copper-phenanthroline (Cu-PNT)は2つのCys基同士が2.1 Å以下である場合にジスルフィド結合を形成して直接結合させる。その他crosslinker (i.e. M2M ~ M17M)はMTS試薬の一種であり、両端のメタンチオスルフォネート基によってそれぞれ該当距離以下の場合に2つのCys基を結ぶ。



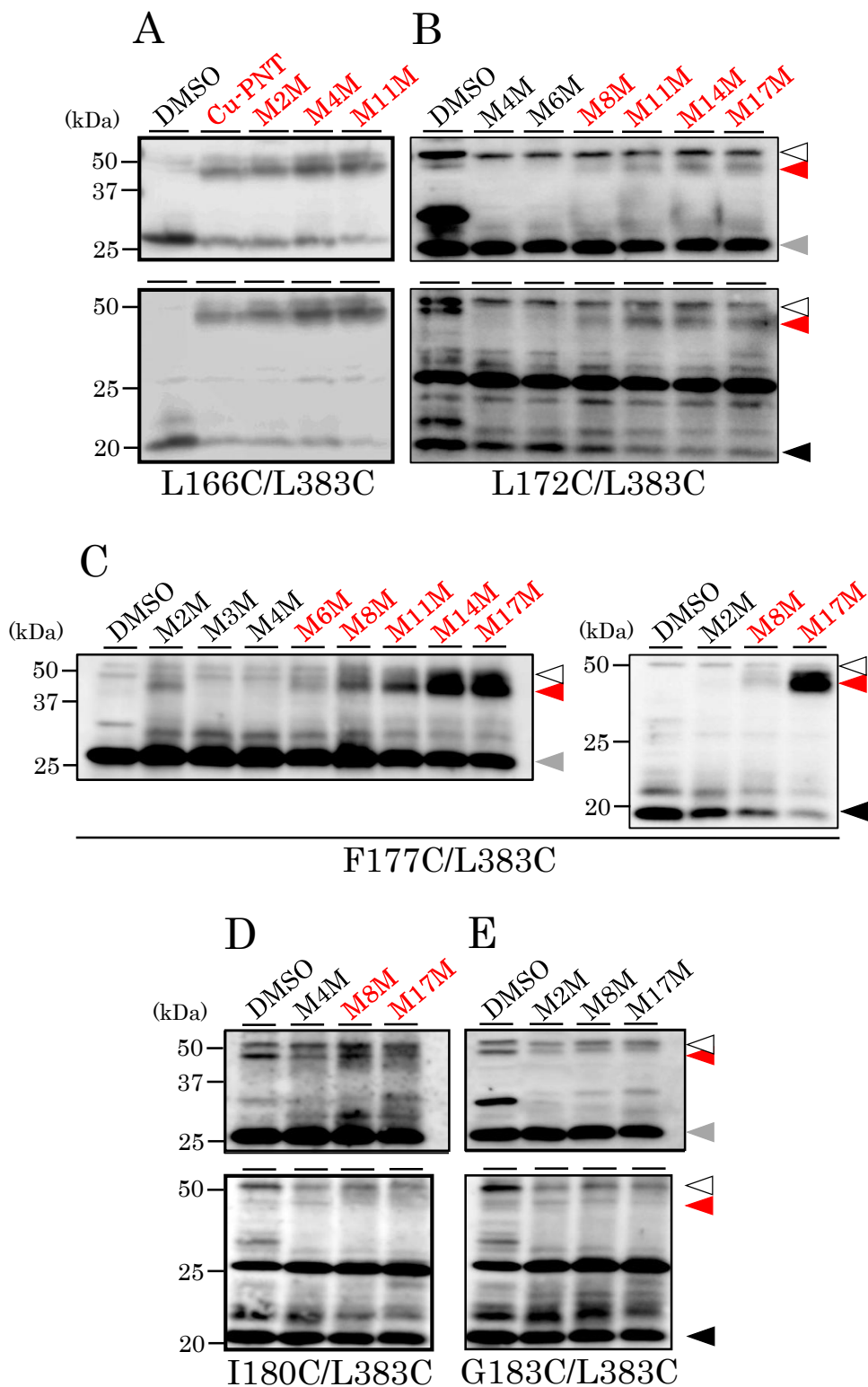
### 図30. Topology解析で用いたCys基変異箇所

本研究では、PS1NTF側TMD3から5つの残基(i.e. L166、F172、F177、I180、G183)を選択し、それぞれPS1CTF側の活性中心Aspに近いL383とI387、若しくはPALP motifのL435の3つの残基とcrosslinkし、距離の測定を行った。



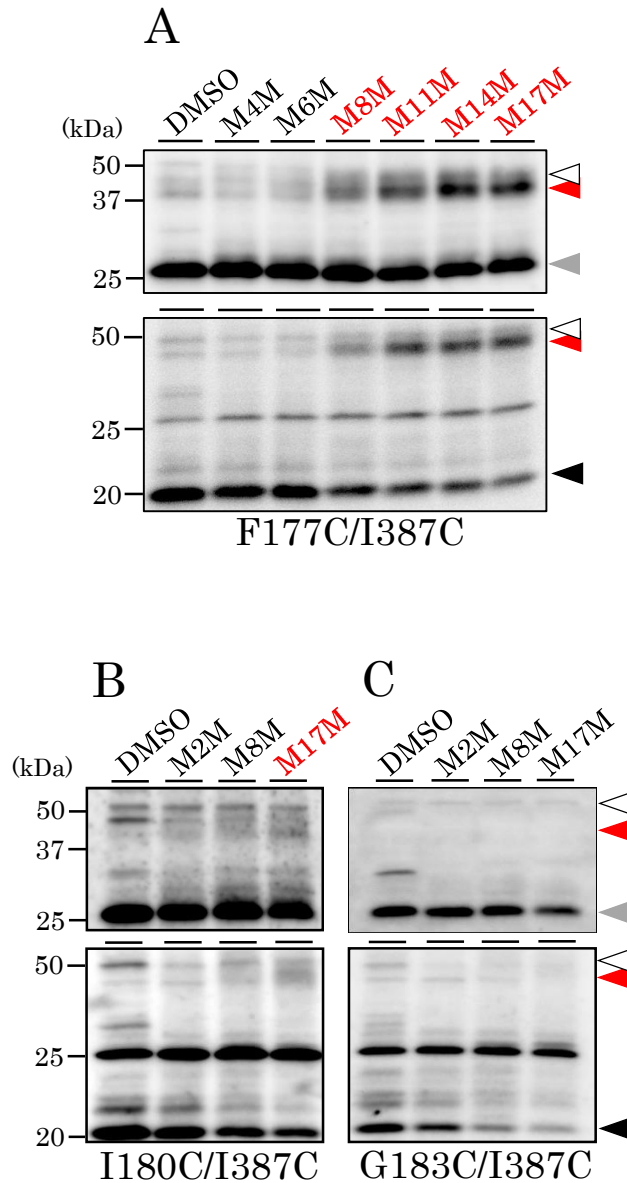
**図31. Topology解析で用いたCys PS1 Mtを含む $\gamma$ -secretaseのA $\beta$ 切断活性測定**

DKONL細胞に各種single/double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したA $\beta$ 40及びA $\beta$ 42量をELISAによって測定した。内因性Cys基を全てSer基に変えたコントロール群Cysless細胞のA $\beta$ 分泌量によって規格化してある(n = 4)。



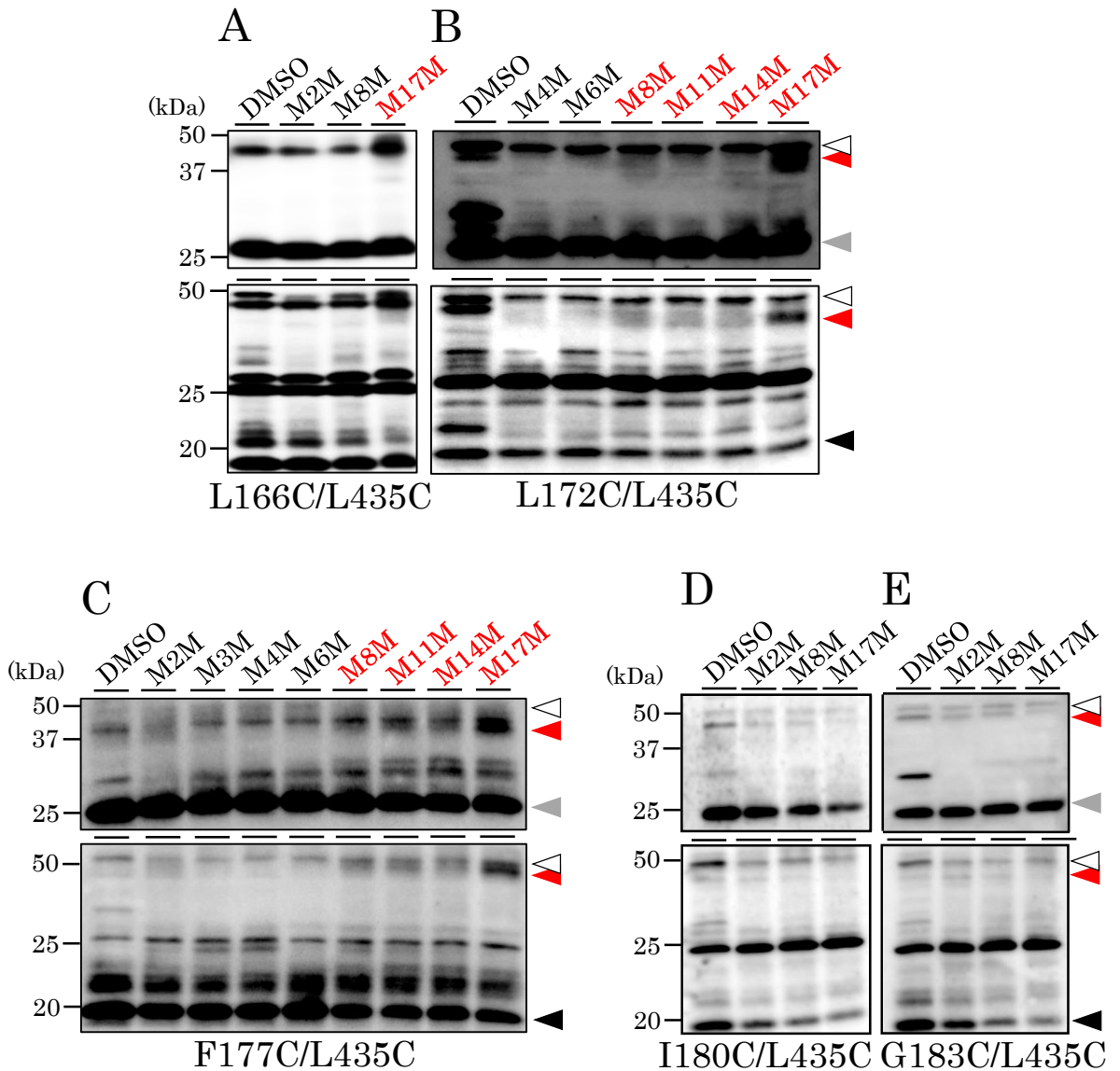
**図32. L383をベースにしたdouble Cys PS1 Mtのcrosslink**

A-E. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



**図33. I387をベースにしたdouble Cys PS1 Mtのcrosslink**

A-C. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



**図34. L435をベースにしたdouble Cys PS1 Mtのcrosslink**

A-E. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。

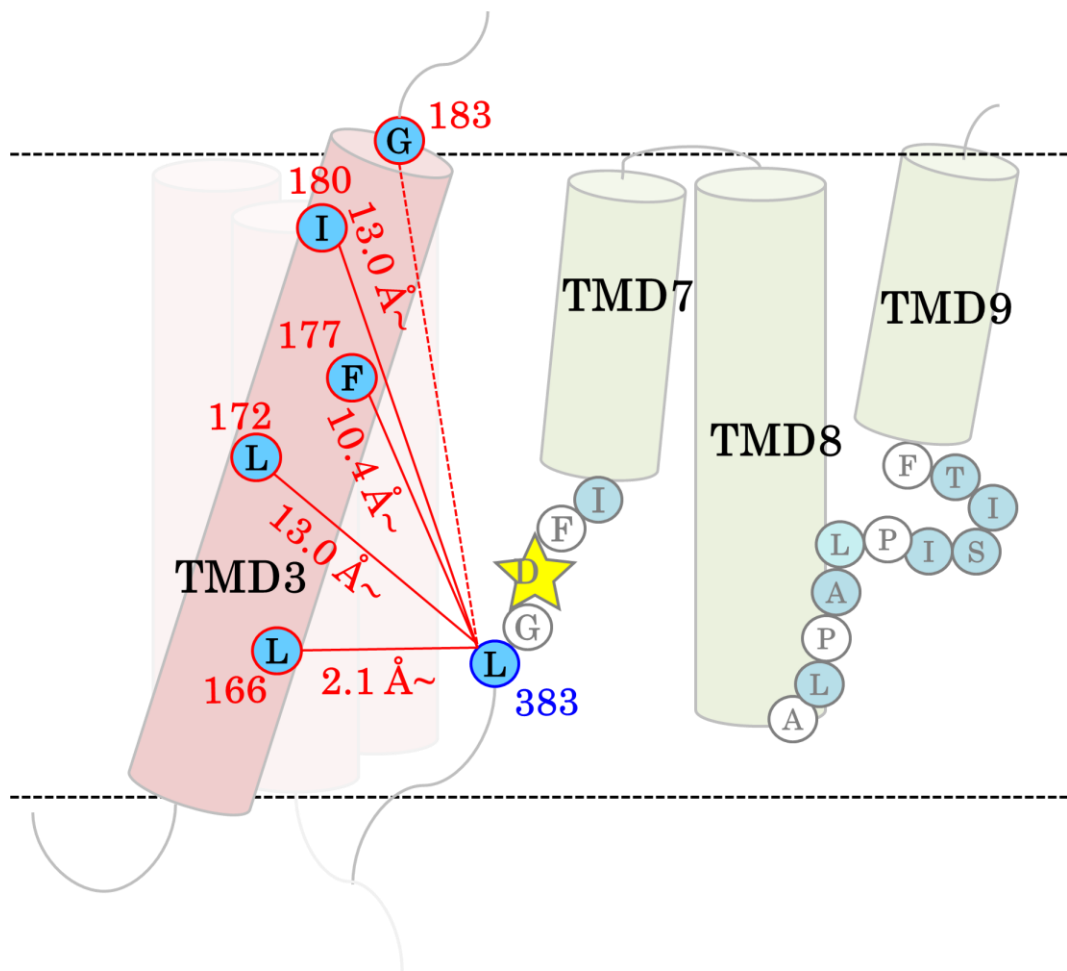


図35. TMD3とL383の距離

Crosslinkされたものは実線で結び、取りうる最短距離を記載した。Crosslinkされなかったものは点線で結んだ。なお、Crosslinkが見られなかった組み合わせについては、最短距離が24.7 Åより遠いと推測される。

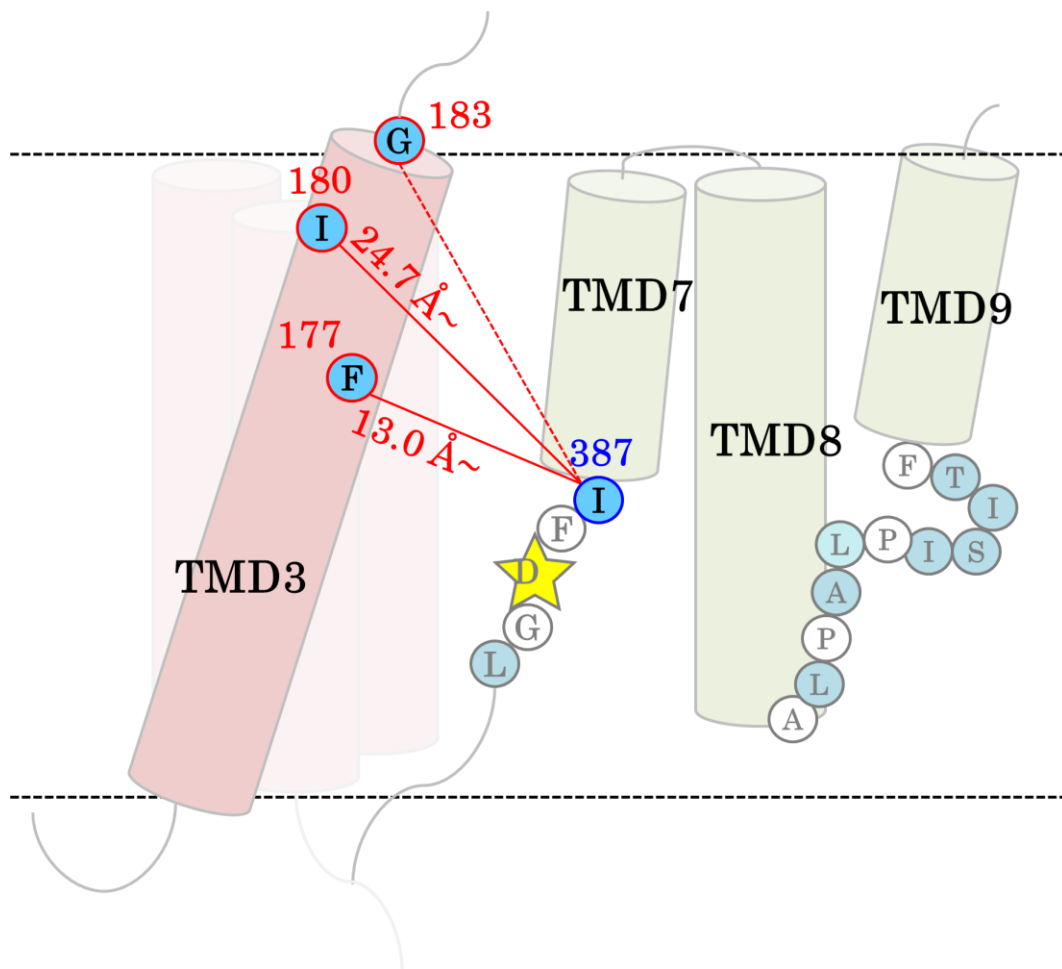


図36. TMD3とI387の距離

Crosslinkされたものは実線で結び、取りうる最短距離を記載した。Crosslinkされなかったものは点線で結んだ。なお、Crosslinkが見られなかった組み合わせについては、最短距離が24.7 Åより遠いと推測される。



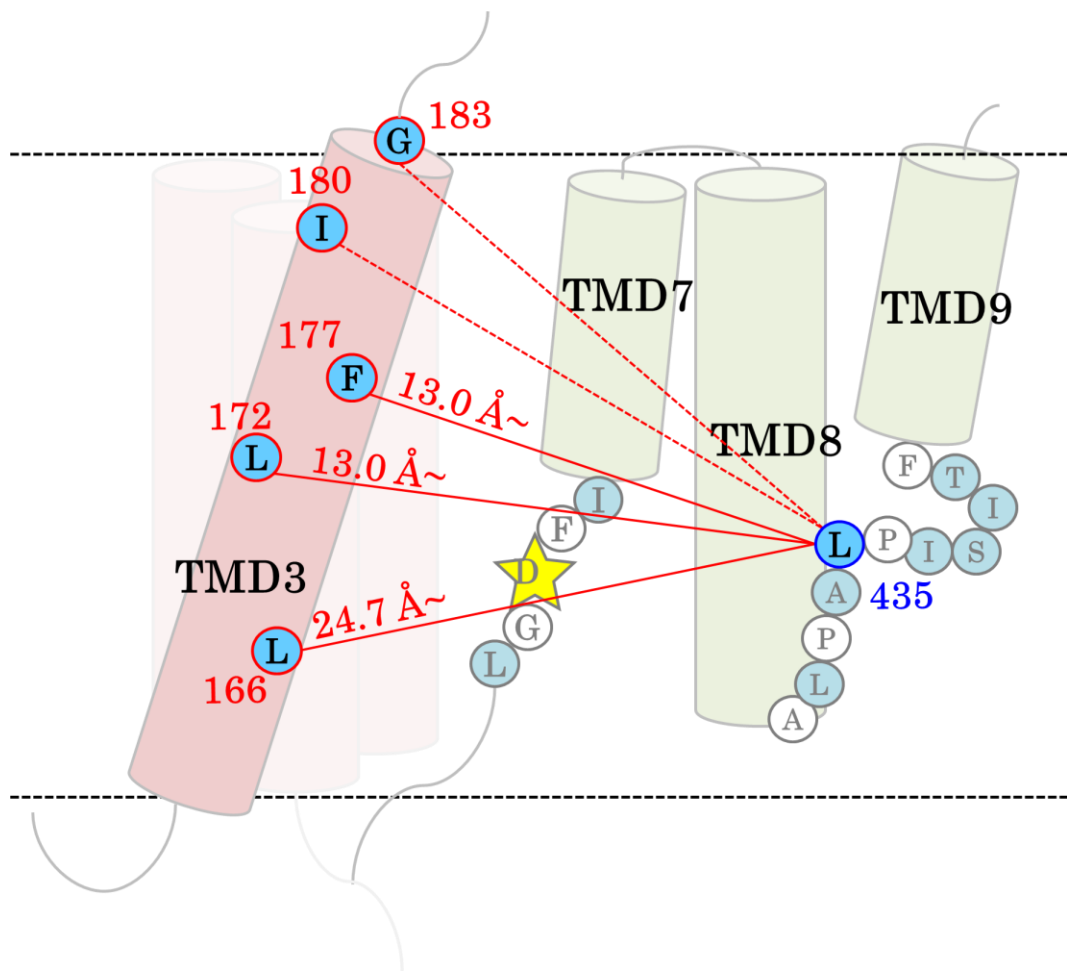


図37. TMD3とL435の距離

Crosslinkされたものは実線で結び、取りうる最短距離を記載した。Crosslinkされなかったものは点線で結んだ。なお、Crosslinkが見られなかった組み合わせについては、最短距離が24.7 Åより遠いと推測される。

残基	Apo-Class 1	Apo-Class 2	Apo-Class 3	Crosslink
L166-L383	10 ~ 15 Å	12 ~ 17 Å	14 ~ 19 Å	2.1 Å ~
L172-L383	13 ~ 18 Å	13 ~ 19 Å	14 ~ 20Å	13.0 Å ~
F177-L383	14 ~ 18 Å	14 ~ 18 Å	14 ~ 18 Å	10.4 Å ~
I180-L383	19 ~ 23 Å	18 ~ 22 Å	17 ~ 22 Å	13.0 Å ~
G183-L383	22 ~ 27 Å	22 ~ 28 Å	22 ~ 27 Å	— (24.7 Å <)
F177-I387	11 ~ 15 Å	10 ~ 15 Å	11 ~ 16 Å	13.0 Å ~
I180-I387	16 ~ 20 Å	15 ~ 19 Å	15 ~ 19 Å	24.7 Å ~
G183-I387	20 ~ 23 Å	20 ~ 22 Å	20 ~ 23 Å	— (24.7 Å <)
L166-L435	19 ~ 24 Å	21 ~ 26 Å	25 ~ 30 Å	24.7 Å ~
L172-L435	24 ~ 29 Å	24 ~ 28 Å	25 ~ 32 Å	13.0 Å ~
F177-L435	21 ~ 26 Å	20 ~ 25 Å	21 ~ 27 Å	13.0 Å ~
I180-L435	27 ~ 31 Å	25 ~ 29 Å	26 ~ 30 Å	— (24.7 Å <)
G183-L435	30 ~ 34 Å	30 ~ 32 Å	30 ~ 34 Å	— (24.7 Å <)

図38. 本研究で明らかとなったTMD3のtopologyとcryo-EMによる報告のまとめ

本研究の中で解き明かした、TMD3とL383、I387、L435の距離の範囲と、cryo-EMによる $\gamma$ -secretaseの3つの安定構造(Apo-Class 1、2、3)内での各2残基間の距離をまとめたもの。Crosslinkされなかった2残基間は24.7 Åより長く、—で示した。

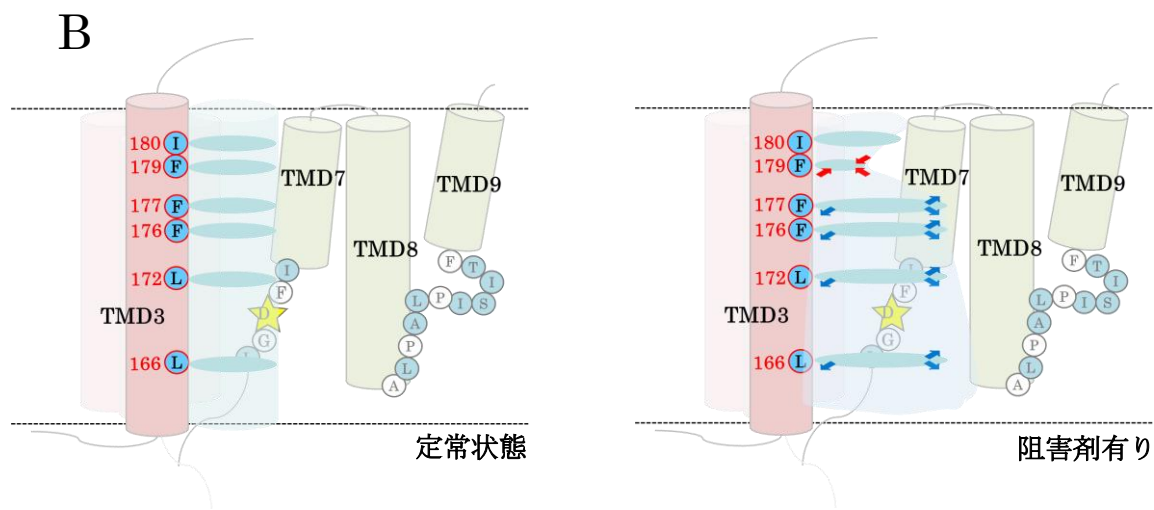
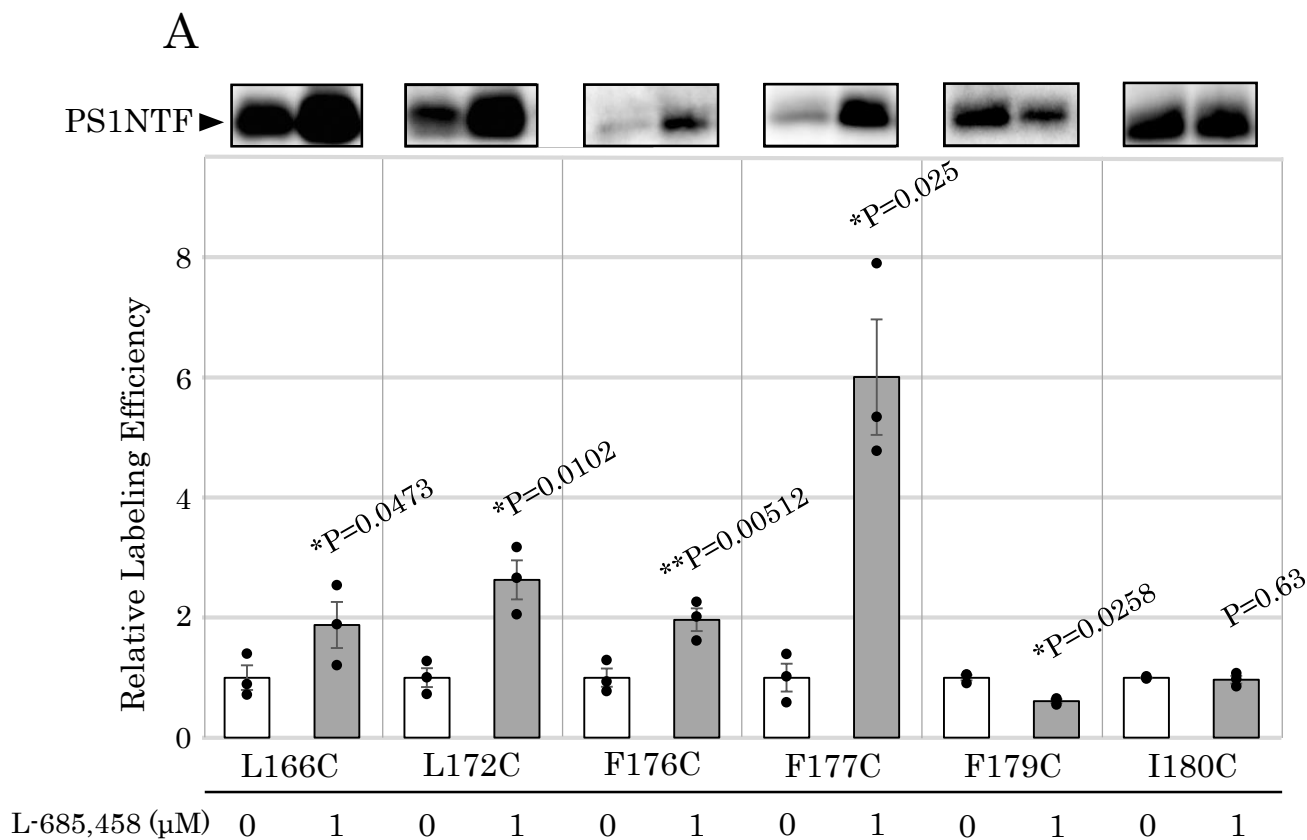
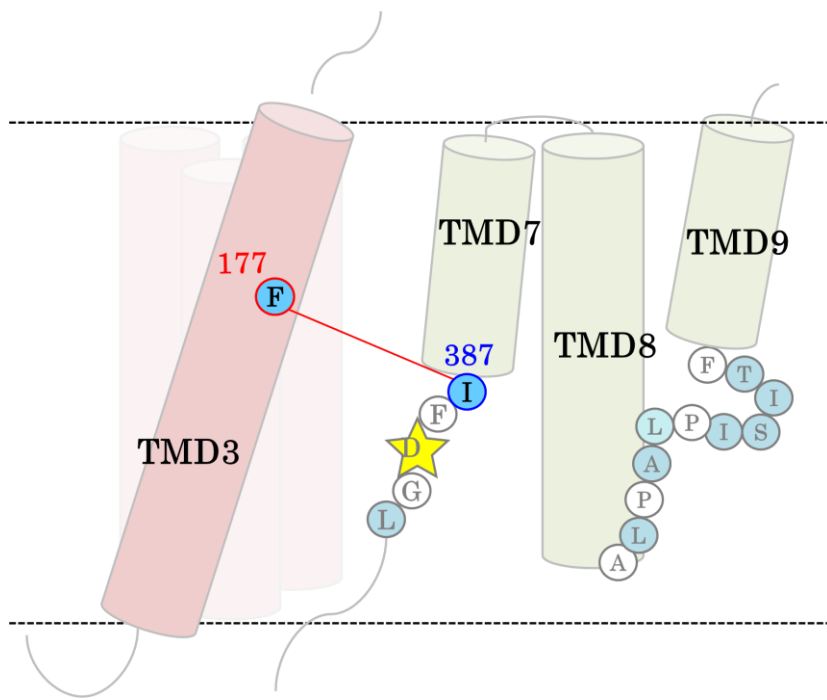


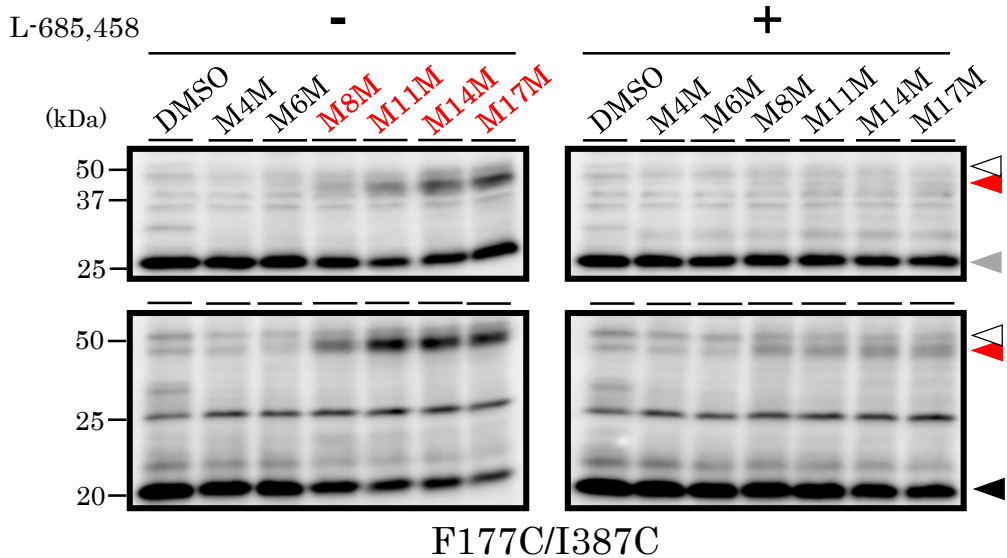
図39. TSA型GSI、L-685,458によるTMD3周囲の親水性環境の変化

- A. DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、intact cellsを用いてL-685,458によるSCAM標識の変化を調べた(n = 3; mean ± SEM; by Student *t*test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。

A



B



#### 図40. TSA型GSI、L-685,458によるTMD3の構造変化

- A. L-685,458によるTMD3の構造変化を調べる為、TMD3からF177、PS1CTFからI387を選択し、crosslinkで結合させた。
- B. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してL-685,458によるincubation後にcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。結果、L-685,458によってcrosslinkが大幅に減少した。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。

A

変異	位置	報告
P117L	HL1	Wisniewski, 1998
M139V	TMD2	Larner, 2003
F176L	TMD3	Müller, 2013
F177L	TMD3	Rogaeva, 2001
E184D	HL3	Yasuda, 1997
G384A	TMD7	Tanahashi, 1996

B

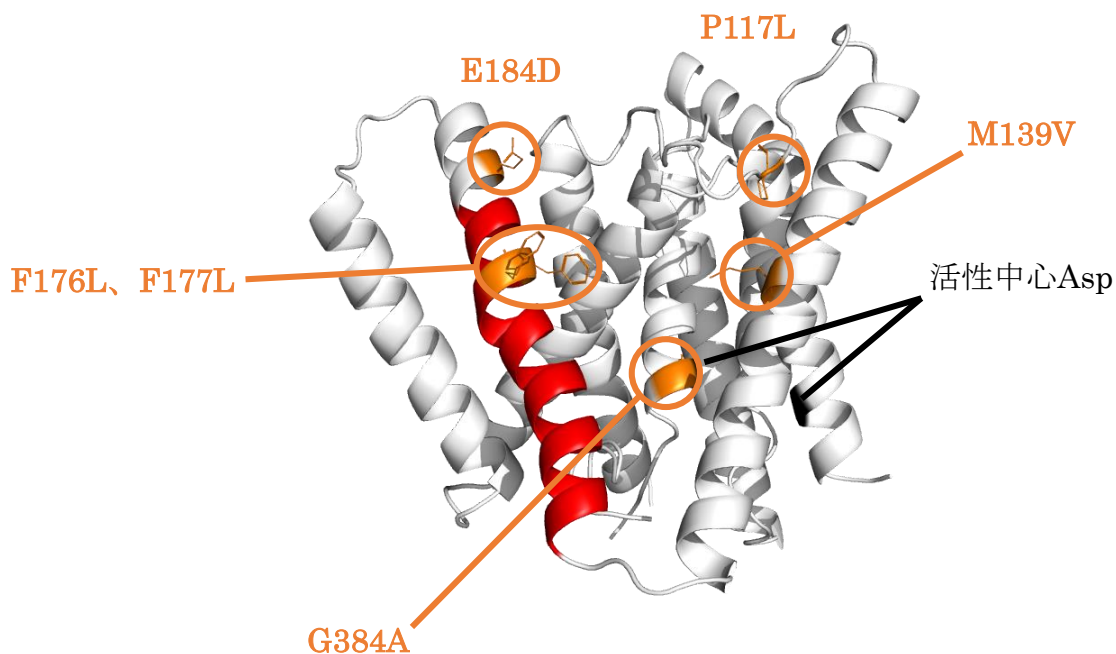


図41. A $\beta$ 42産生変動時のTMD3周囲の活性中心ポアの解析に用いたFAD変異一覧

- A. 本検討では部位別に6つの変異を導入した。PS1NTF側よりまずHL1に位置するP117L、TMD2内腔側に位置するM139V、TMD3内部と周辺からF176L、F177L、及びE184D、そしてPS1CTF側より活性中心Aspの隣のG384Aを選択した。
- B. 6つのFAD変異の位置をcryo-EM構造上にマッピングしたもの。TMD3の膜内領域は赤色で示した。橙色、及び黒色はそれぞれ導入FAD変異と活性中心Aspを示す。

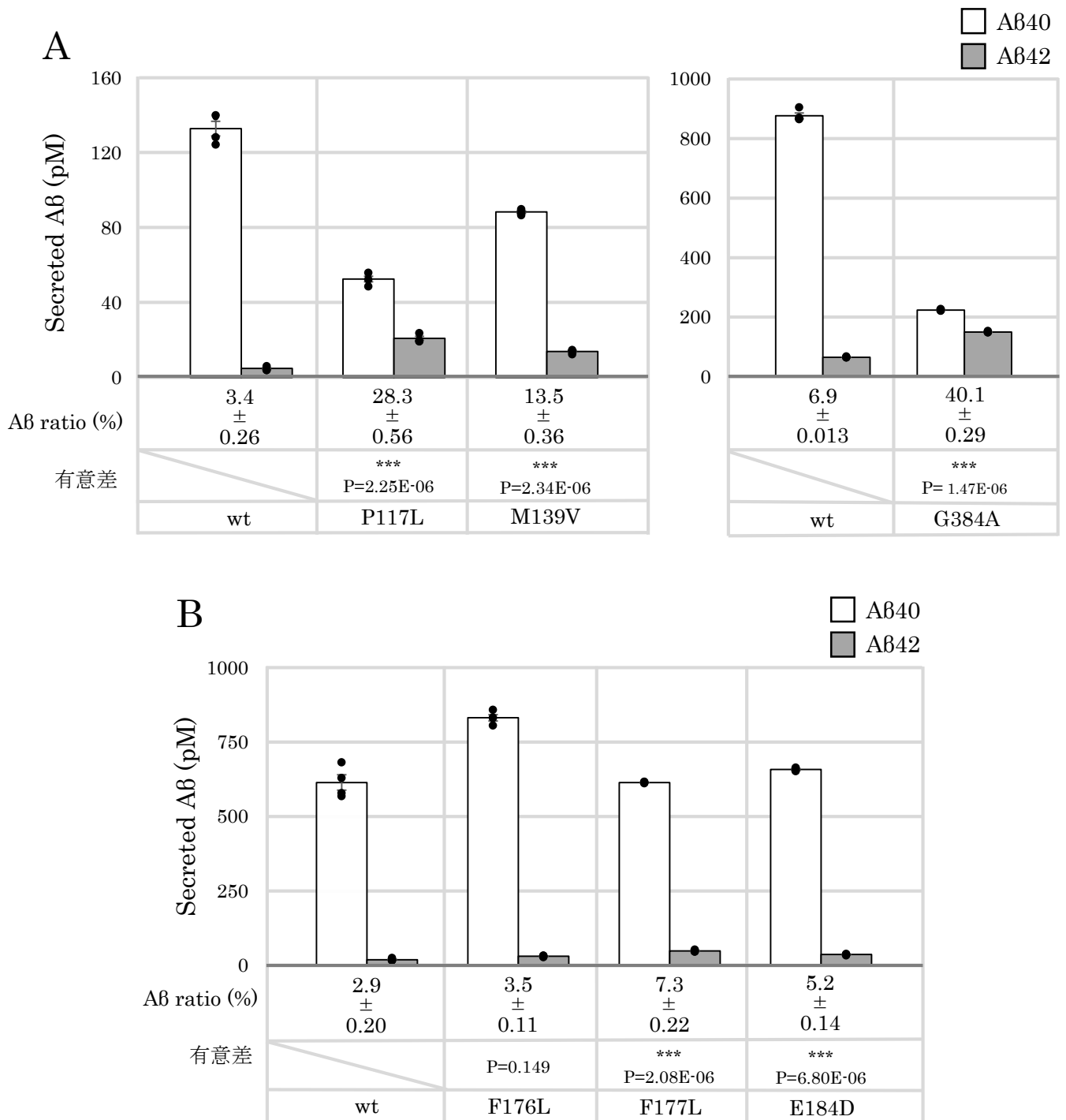


図42. Aβ42産生変動時のTMD3周囲の活性中心ポアの解析に用いたFAD変異の活性評価

- A. P117LとM139V、G384Aの活性評価。DKONL細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test for P117L and M139V and by Student *t* test for G384A)。
- B. F176L、F177LとE184Dの活性評価。DKONL細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。

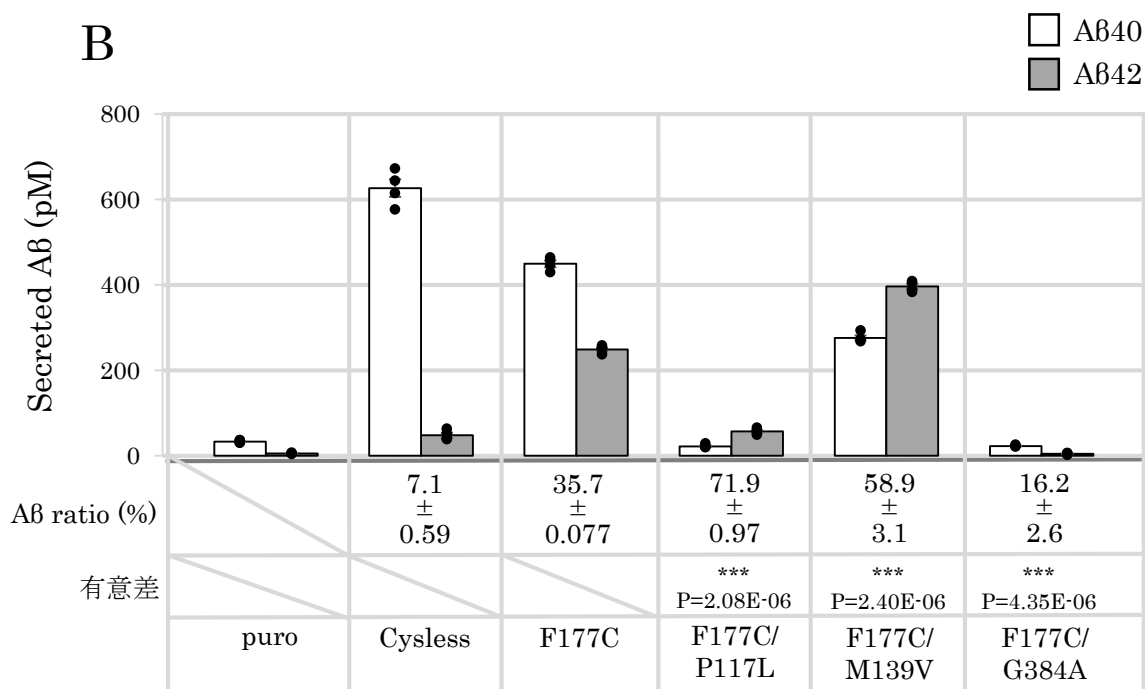
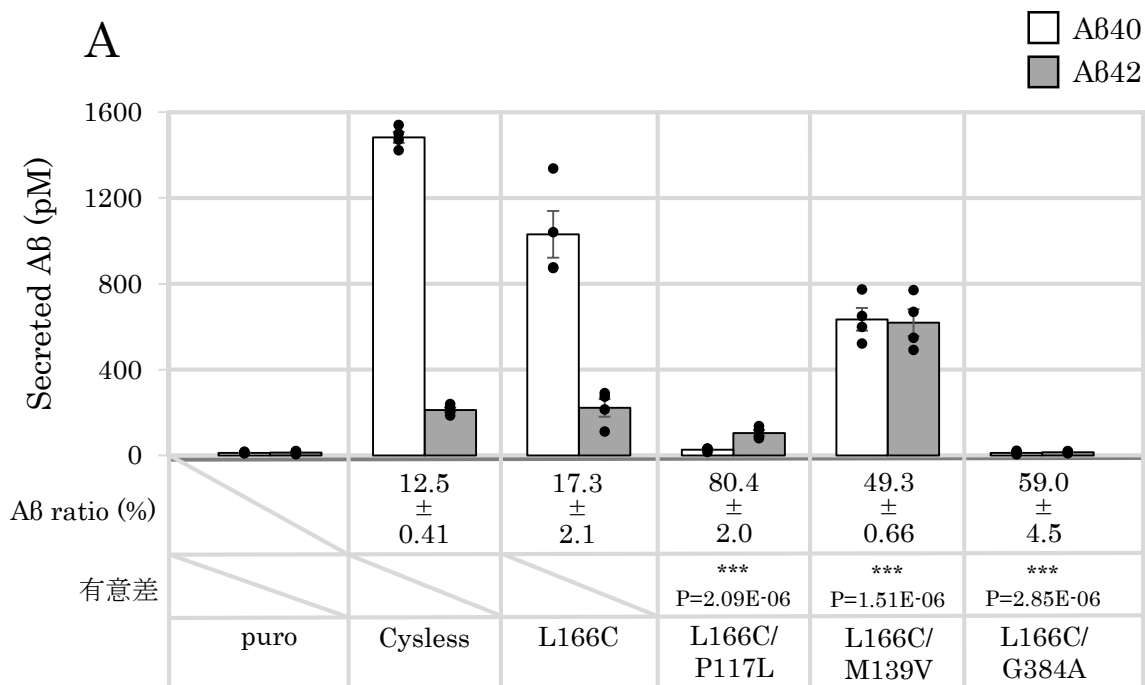


図43. Aβ42産生変動時のTMD3周囲の活性中心ポアの解析に用いたsingle Cys PS1 Mt with FAD変異の活性評価 1

- A. L166CベースのPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with L166C by Tukey test)。
- B. F177CベースのPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with F177C by Tukey test)。

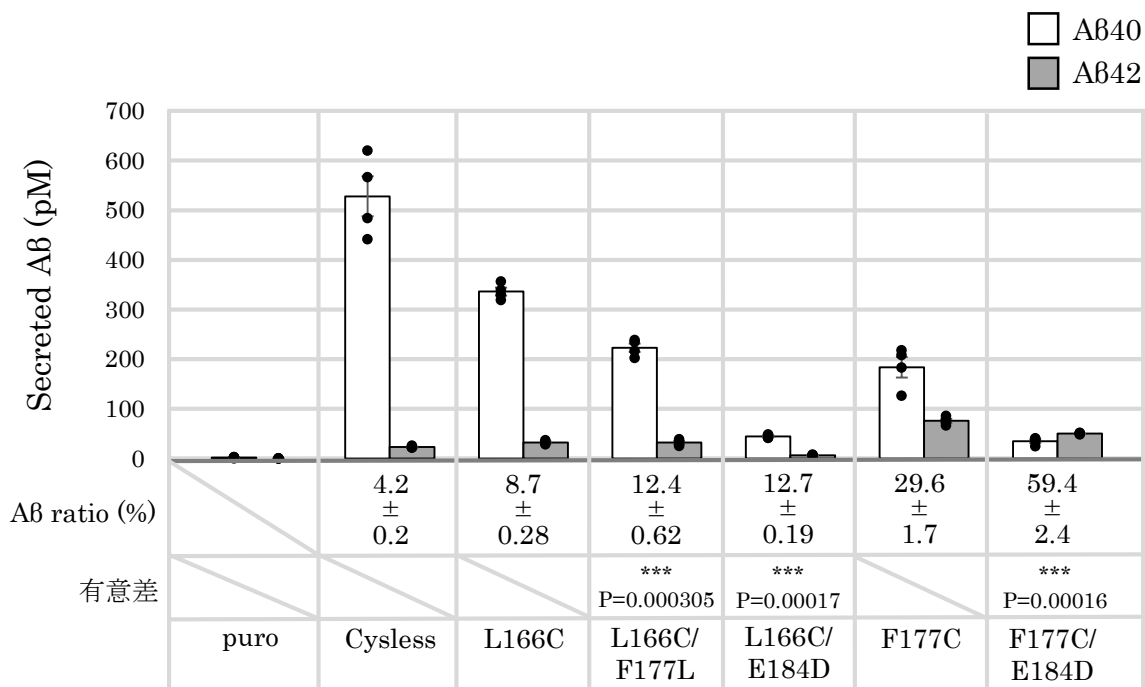
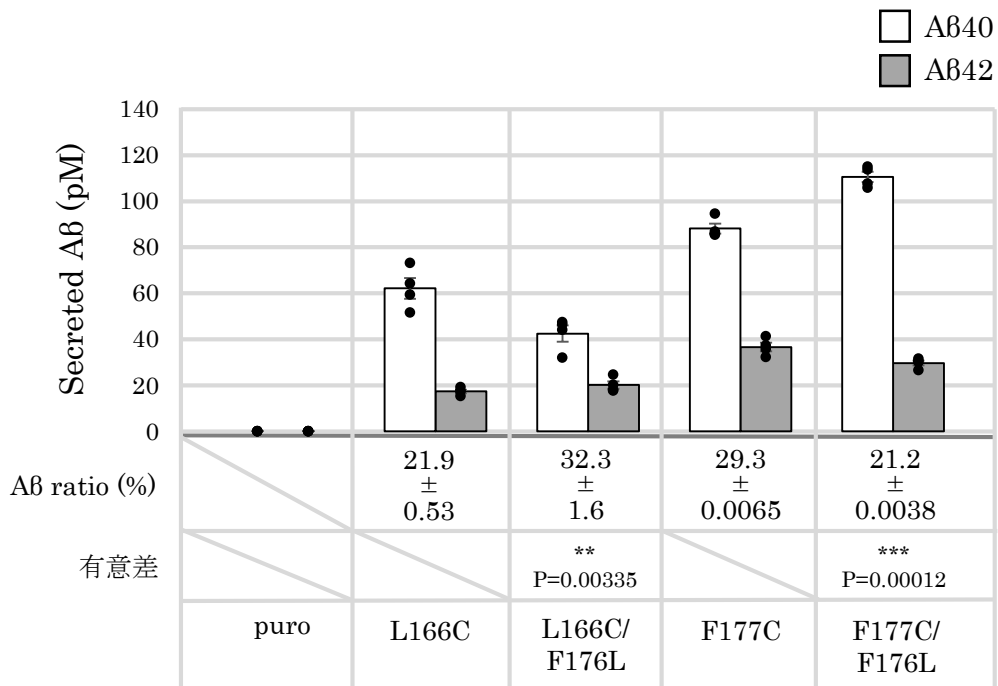


図44. Aβ42産生変動時のTMD3周囲の活性中心ポアの解析に用いたsingle Cys PS1 Mt with FAD変異の活性評価 2

L166C、及びF177CにF177L若しくはE184D変異を導入したPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test for L166C single PS1 Mt and Student t-test for F177C single PS1 Mt)。





**図45. L166C or F177C/F176L single Cys PS1 Mtの活性評価**

L166C、及びF177CにF176L変異を導入したPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t* test)。

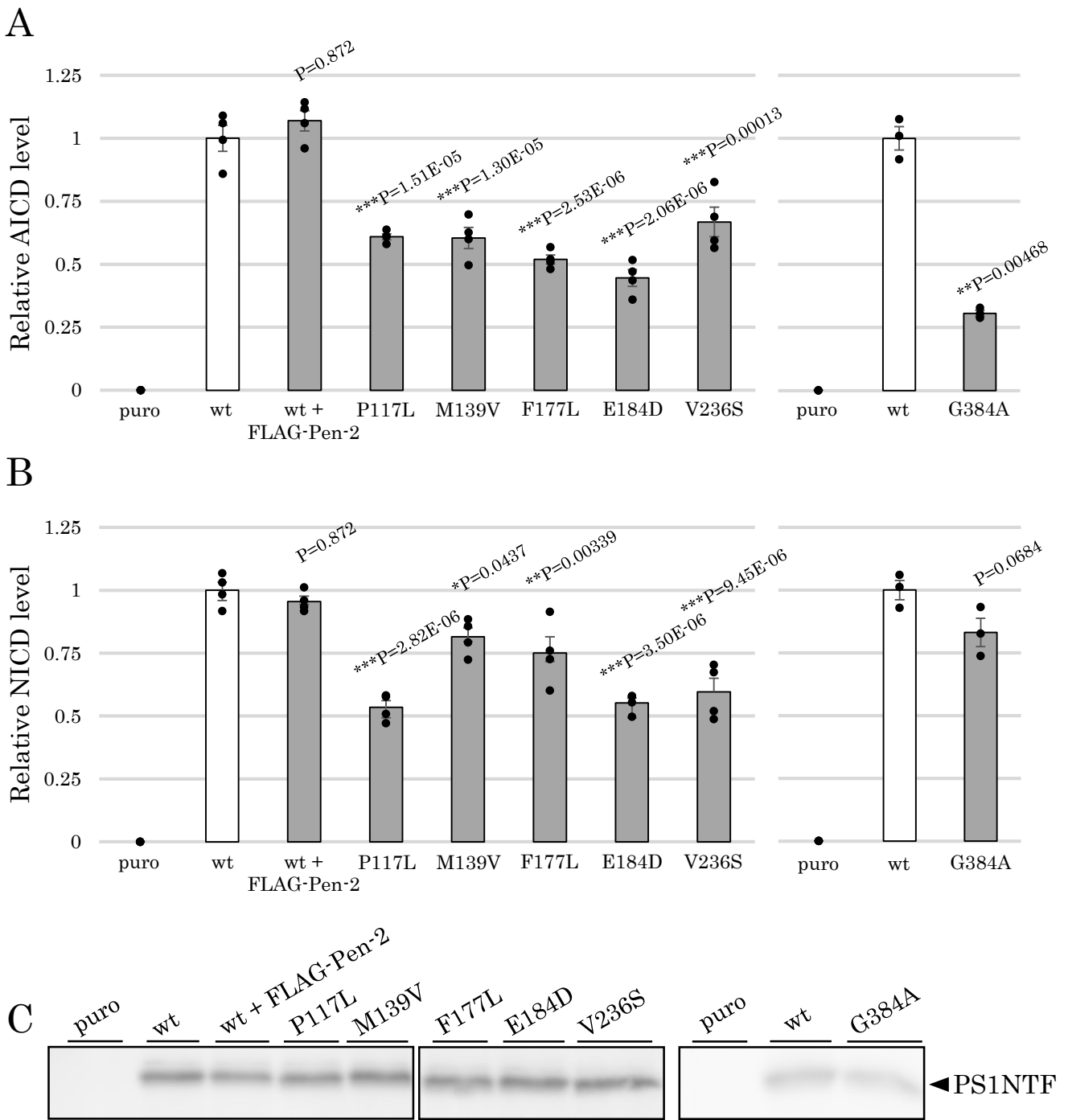


図46. Aβ42産生変動時のTMD3周囲の活性中心ポアの解析に用いたFAD変異、及びFLAG-Pen-2のAICD/NICD切断活性評価

- A. AICD切断活性評価。#1210細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、細胞内に産生されたAICD量をLuciferase assayによって測定した。測定量は各種PS1の発現量毎に値を調整し、wtで規格化してある(n = 3 ~ 4; mean ± SEM; compared with wt by Student *t*-test for G384A and Tukey test for others)。
- B. NICD切断活性評価。#1210細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、細胞内に産生されたNICD量をLuciferase assayによって測定した。測定量は各種PS1の発現量毎に値を調整し、wtで規格化してある(n = 3 ~ 4; mean ± SEM; compared with wt by Student *t*-test for G384A and Tukey test for others)。
- C. 各種PS1の#1210細胞での発現量。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。

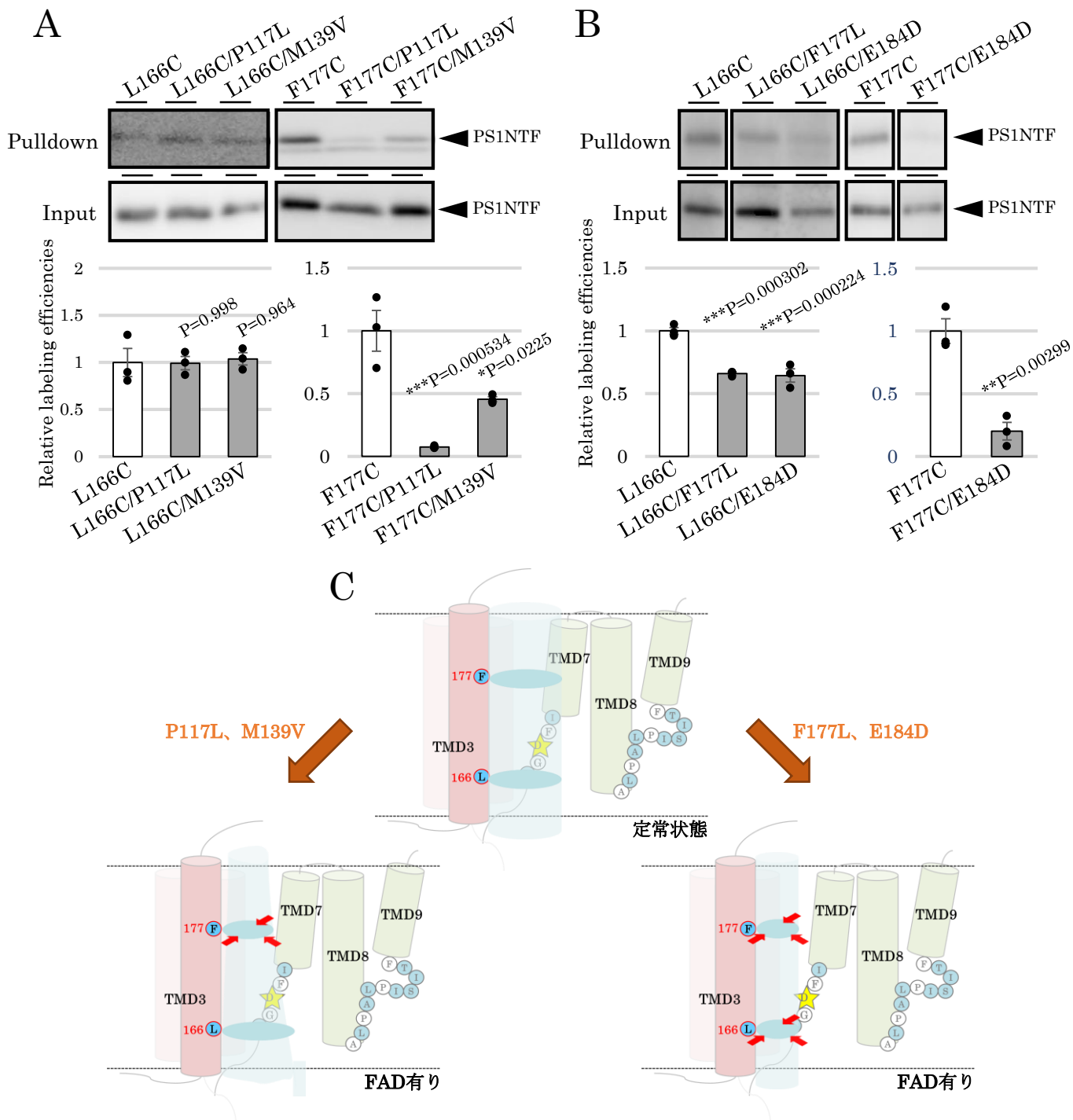
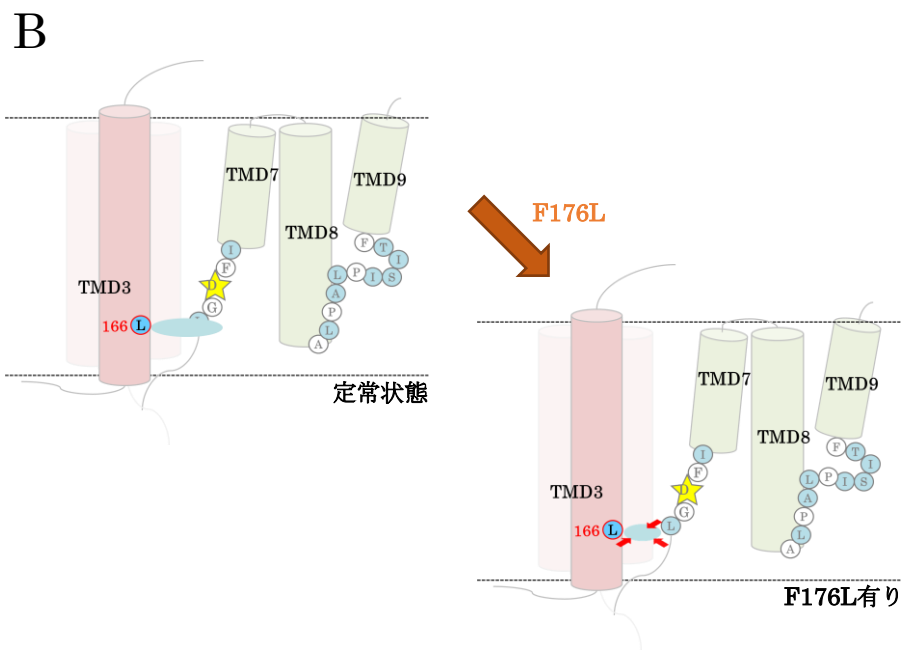
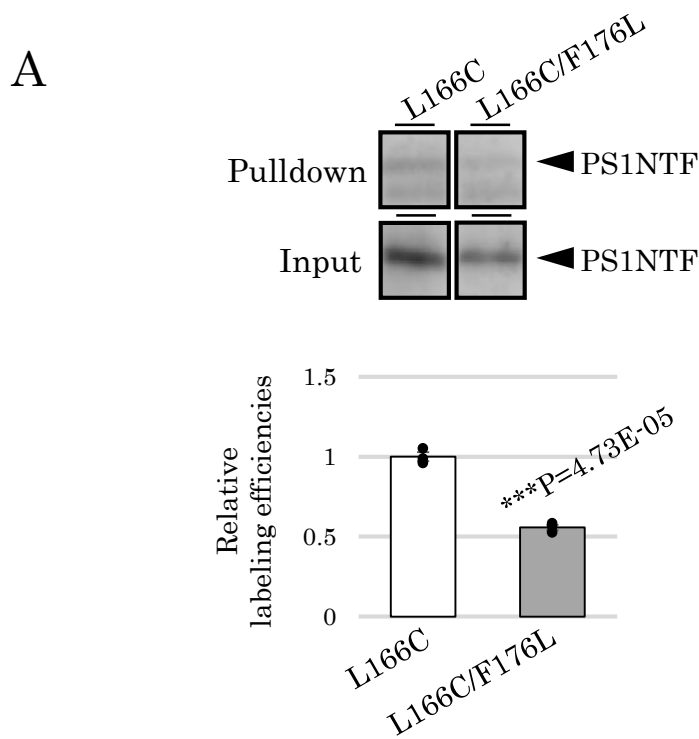


図47. FAD変異によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

- A. P117LとM139Vによる活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. F177LとE184Dによる活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- C. 活性中心ポアの変動の模式図。



**図48. F176L変異によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動**

- A. F176Lによる活性中心ポアの変化。DKO細胞にL166C single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。

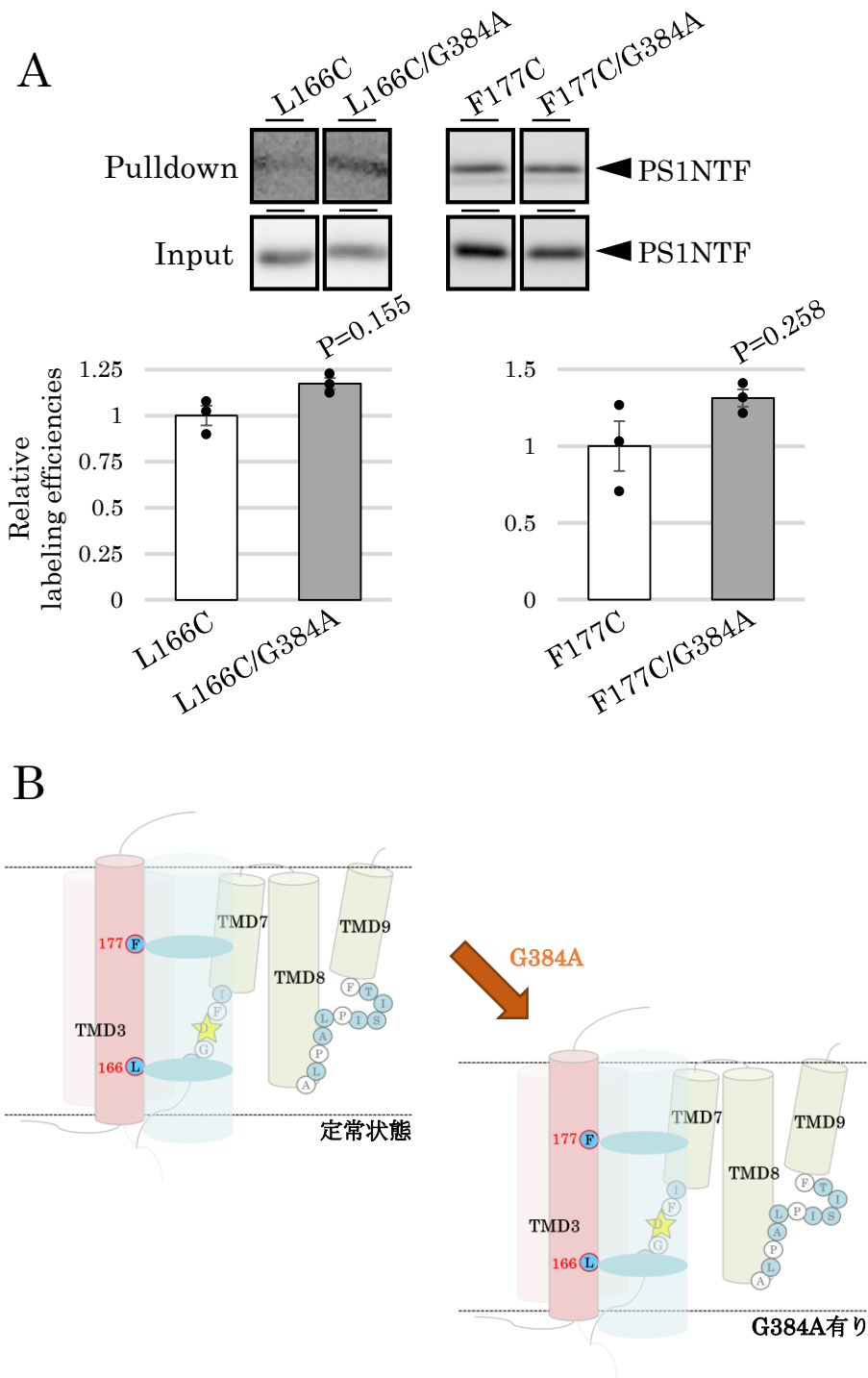
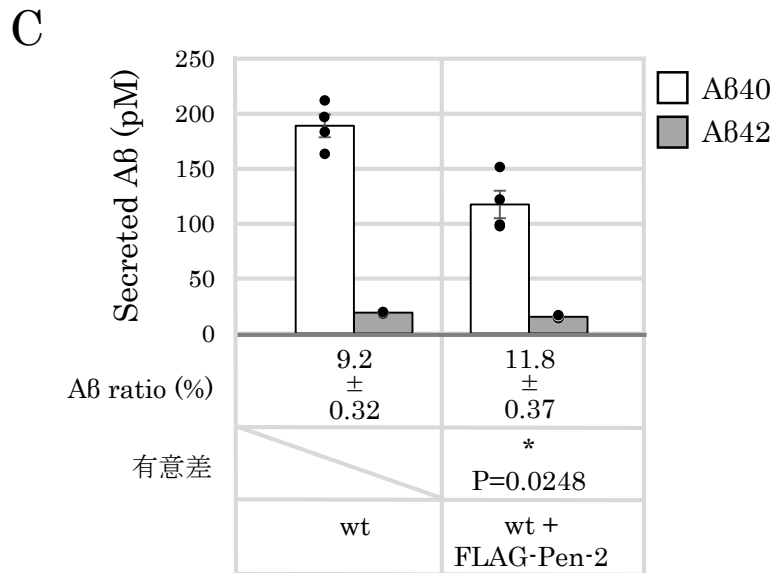
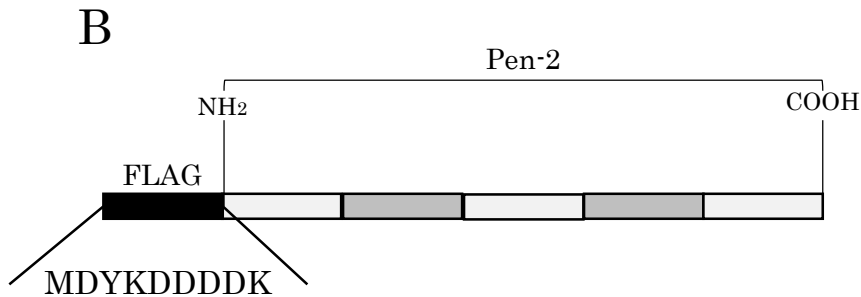
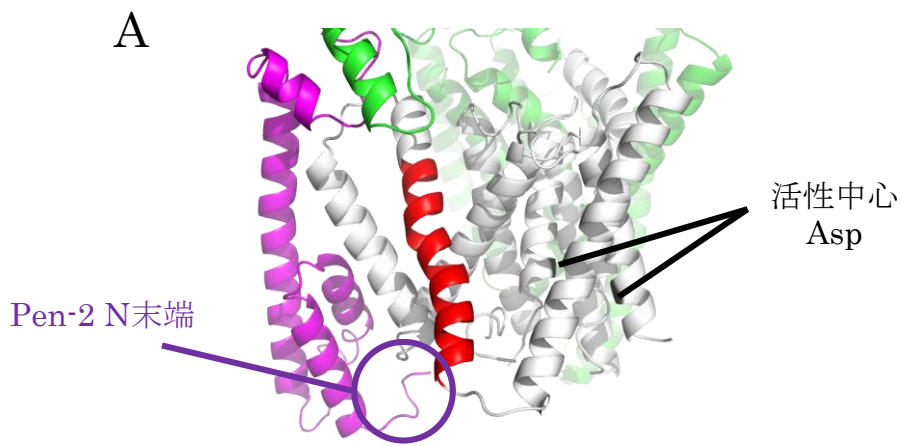


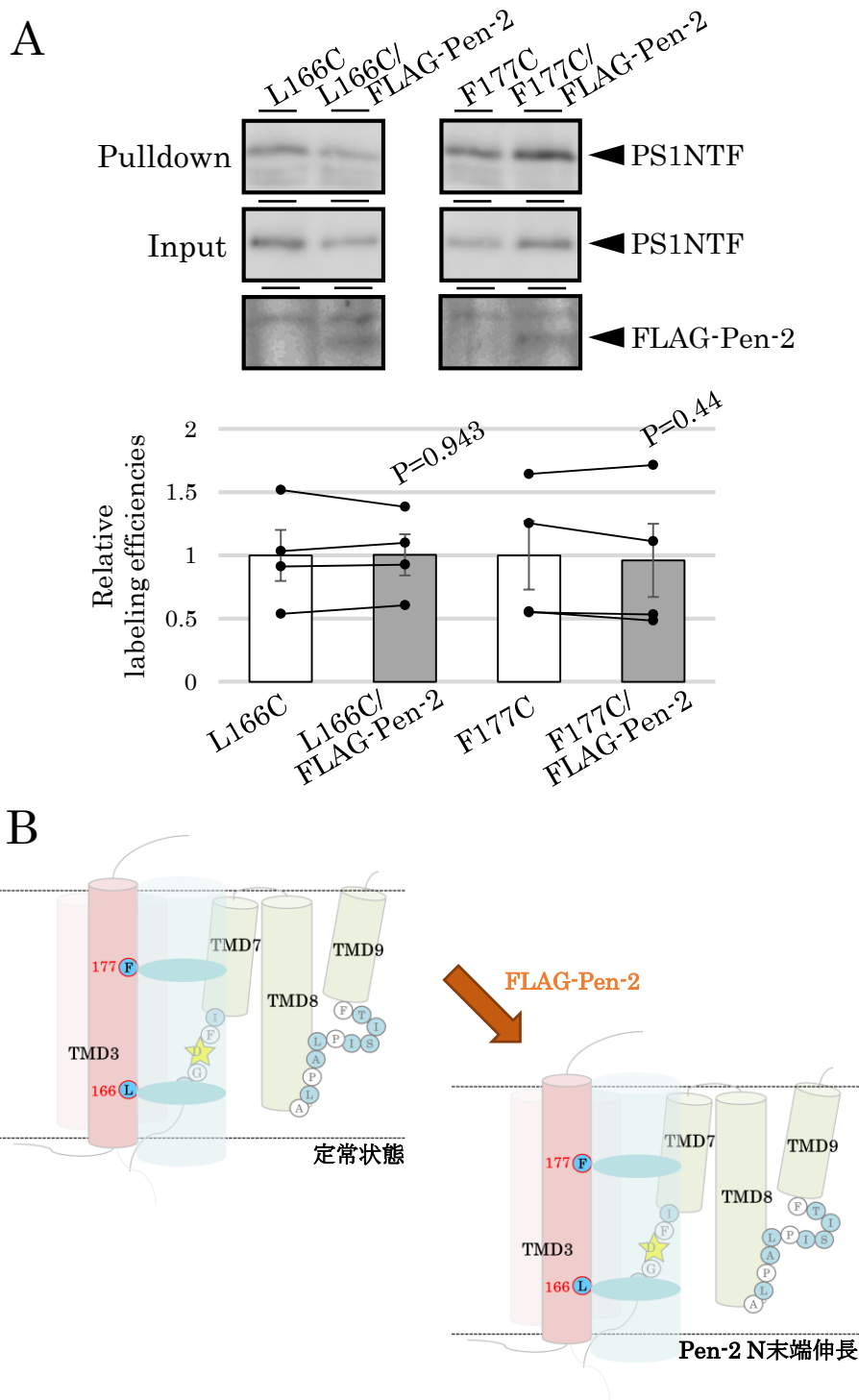
図49. G384A変異によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

- A. G384Aによる活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



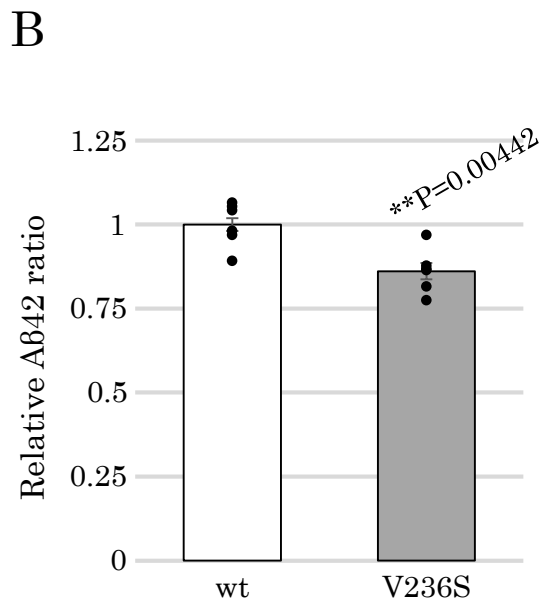
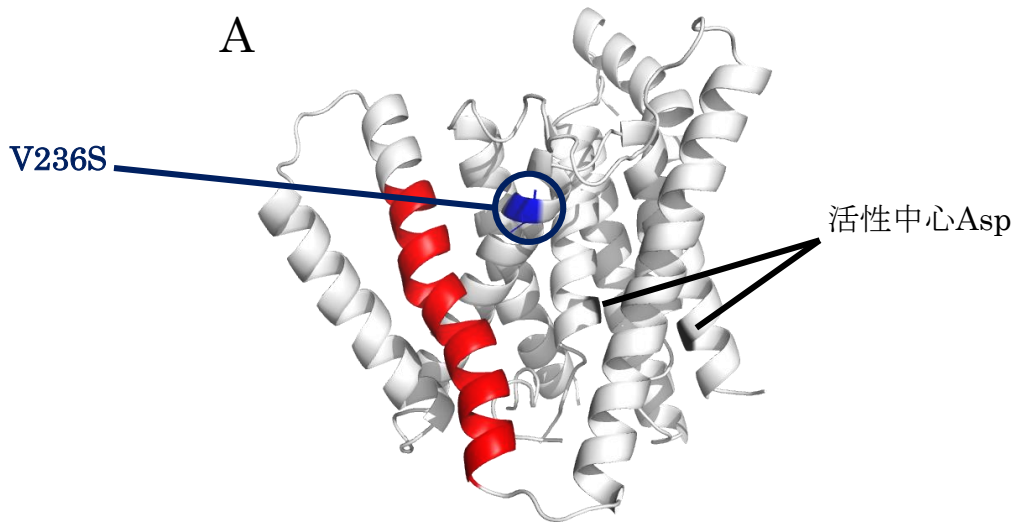
**図50. FLAG-Pen-2のAβ42産生への影響**

- A.  $\gamma$ -Secretaseの構造。白色がPS1、赤色がPS1TMD3、マゼンタがPen-2を示す。Nct、若しくはAph-1は黄緑色で示している。また、活性中心Aspは黒色で塗った。
- B. FLAG-Pen-2の模式図。
- C. FLAG-Pen-2を導入したPS1の活性評価。DKONL細胞に各種PS1wtとFLAG-Pen-2を両方過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Student *t* test)。



**図51. FLAG-Pen-2によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動**

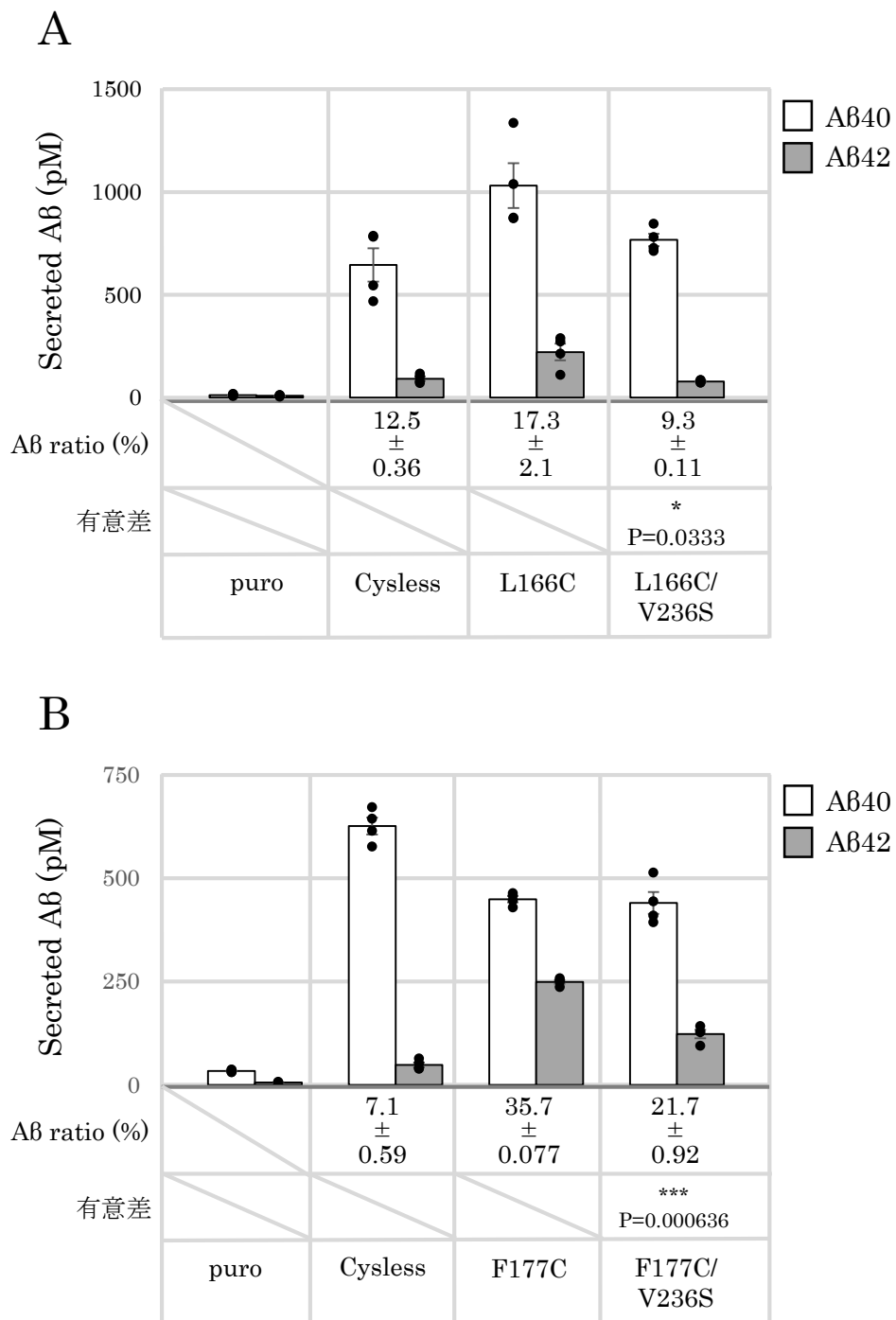
- A. Pen-2 N末端伸長による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 MtとFLAG-Pen-2をstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by paired Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-Pen-2抗体にはPNT3抗体を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



### 図52. V236S変異のAβ42産生への影響

- A. V236S変異の位置をcryo-EM構造上にマッピングしたもの。TMD3の膜内領域は赤色で示した。青色、及び黒色はそれぞれV236S変異と活性中心Aspを示す。
- B. V236Sの活性評価。DKONL細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出し、wtで規格化してある(n = 6; mean ± SEM; compared with wt by Student *t* test)。





**図53. L166C or F177C/V236S single Cys PS1 Mtの活性評価**

- A. L166CにV236S変異を導入したPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with L166C by Student *t*-test)。
- B. F177CにV236S変異を導入したPS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with F177C by Student *t*-test)。

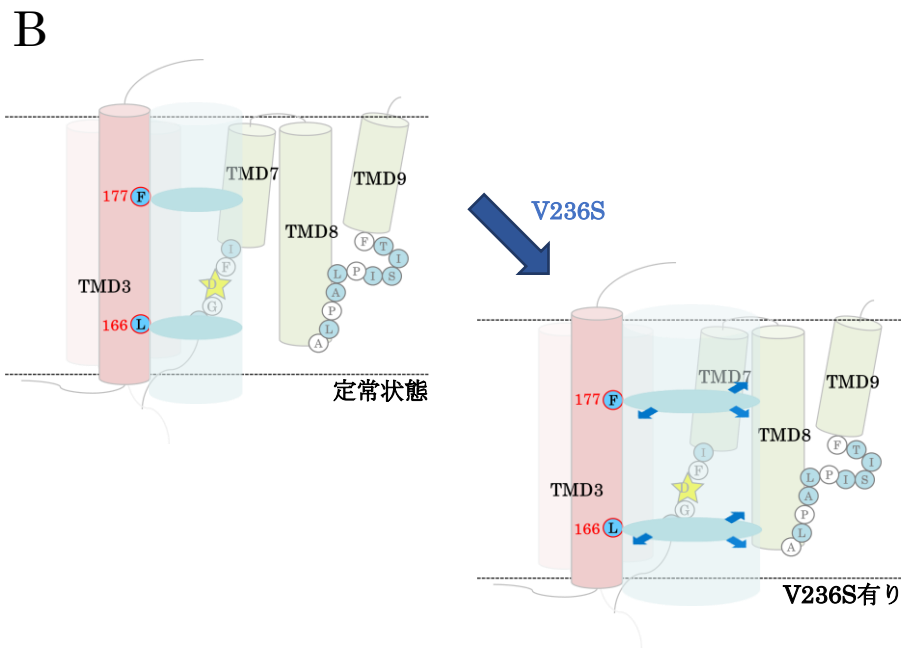
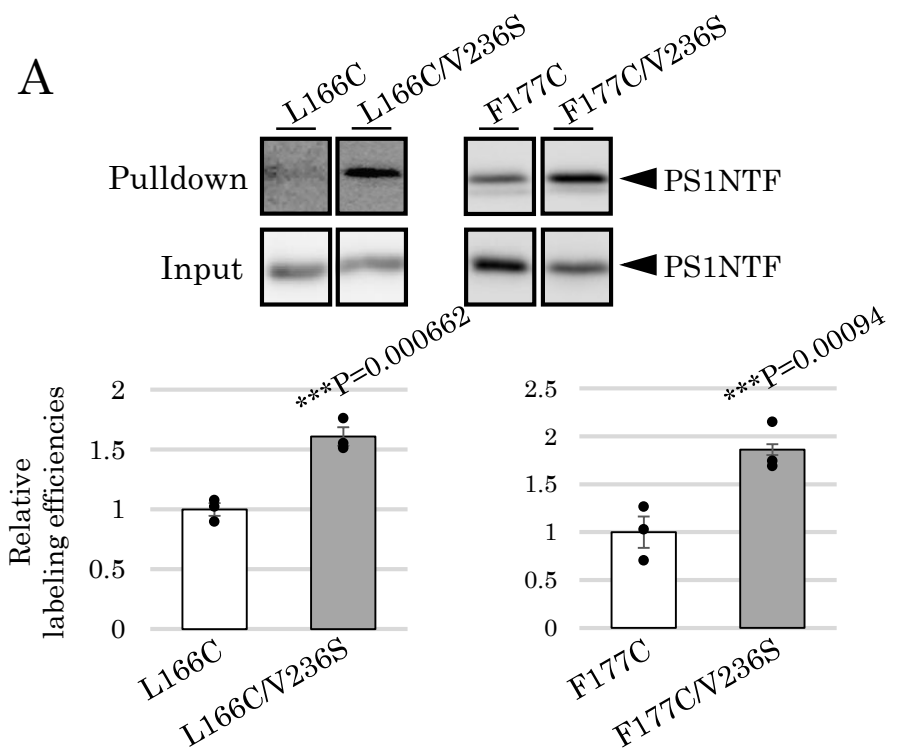
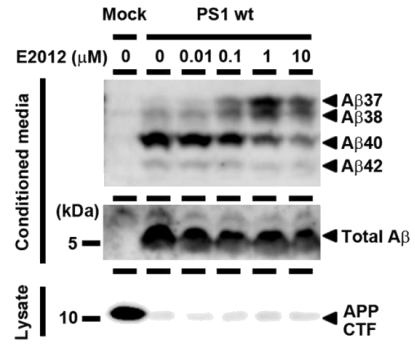
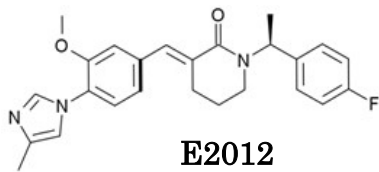
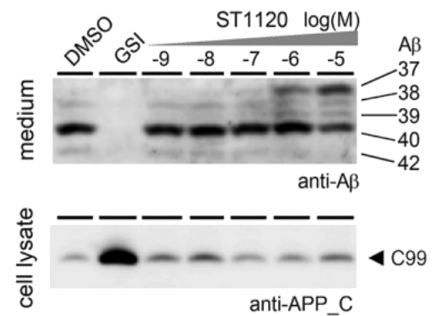
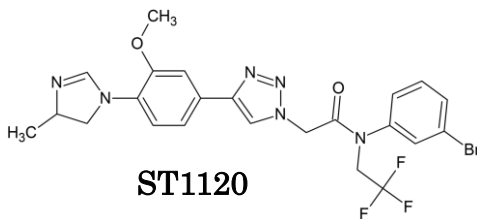


図54. V236S変異によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

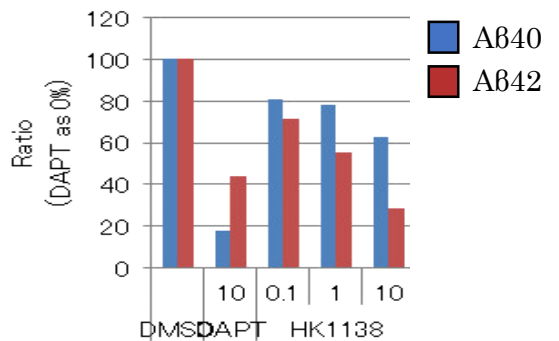
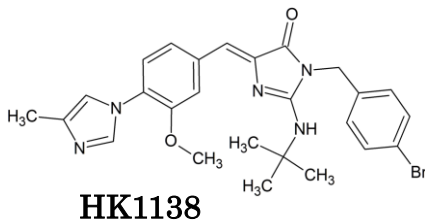
- A. V236Sによる活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



(Cai et al., 2017)

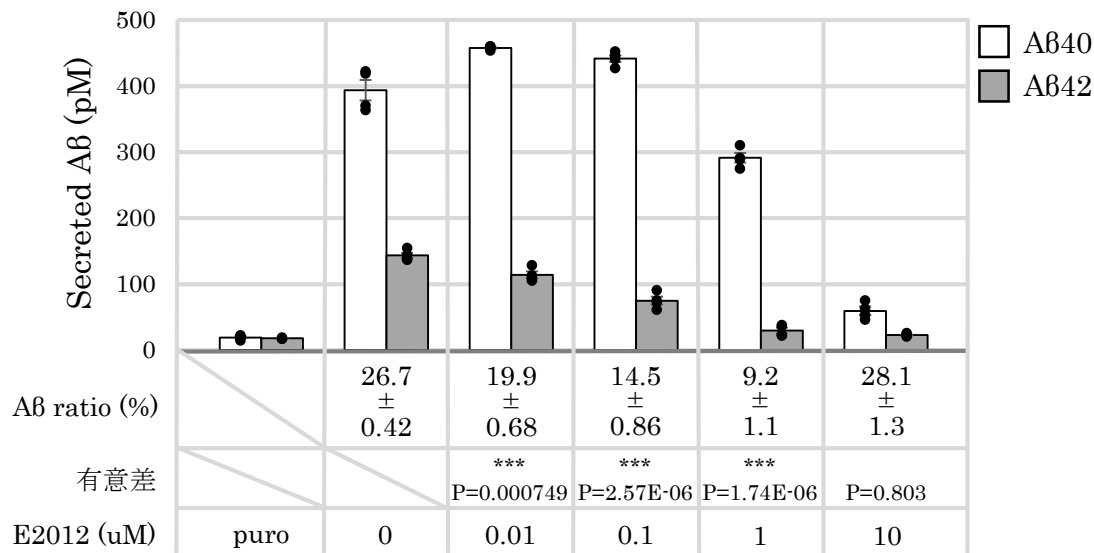
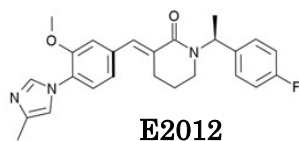


(Takeo et al., 2014)



### 図55. E2012、ST1120、HK1138の薬理効果(PS1wt)

本検討で用いた3種類のGSM (i.e. E2012、ST1120、HK1138)の構造と野生型PS1に対する薬理効果。



**図56. E2012の薬理効果(L166C single Cys PS1 Mt)**

本検討で用いたE2012の構造とL166C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にL166C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。AB ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。

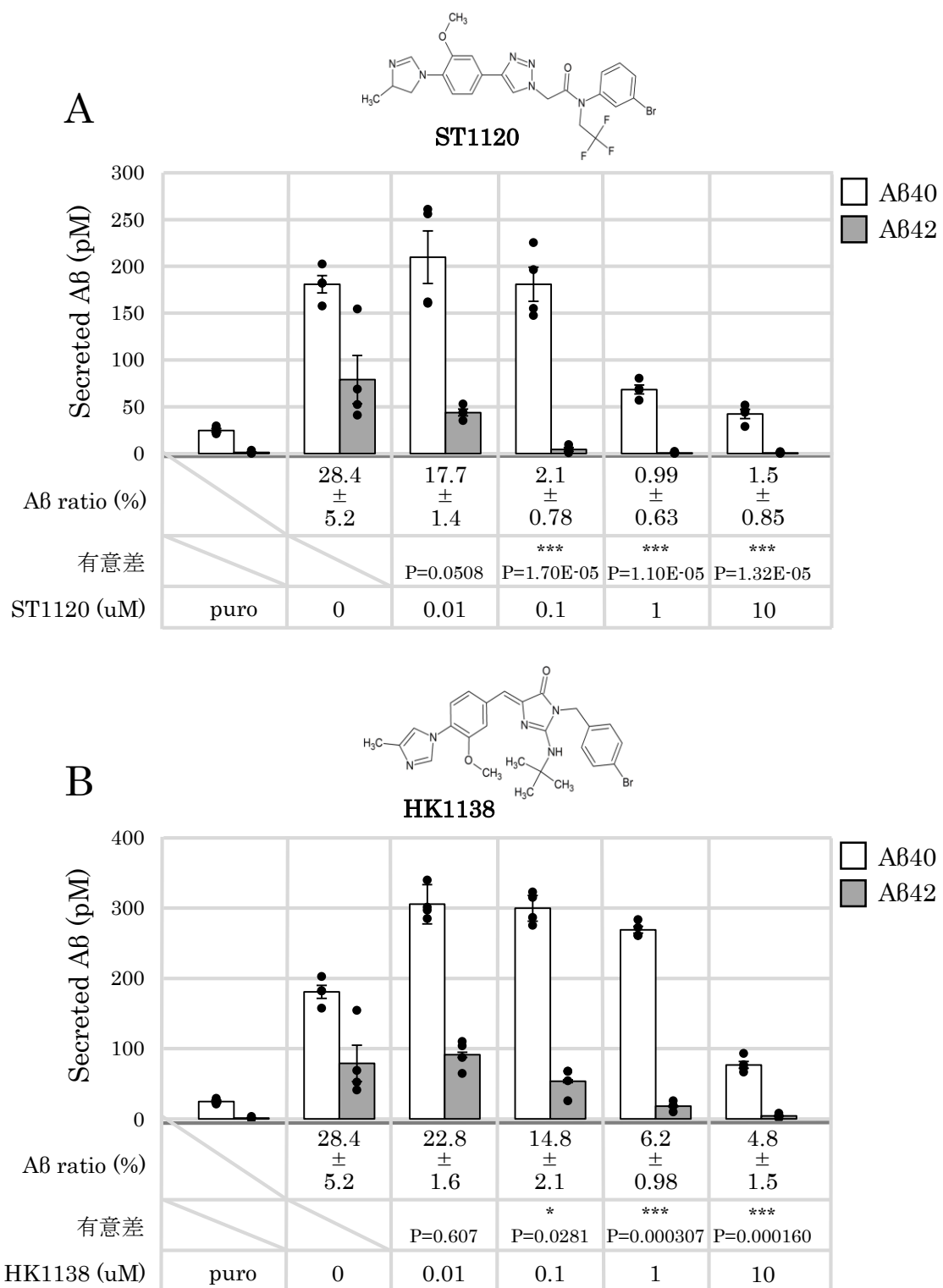
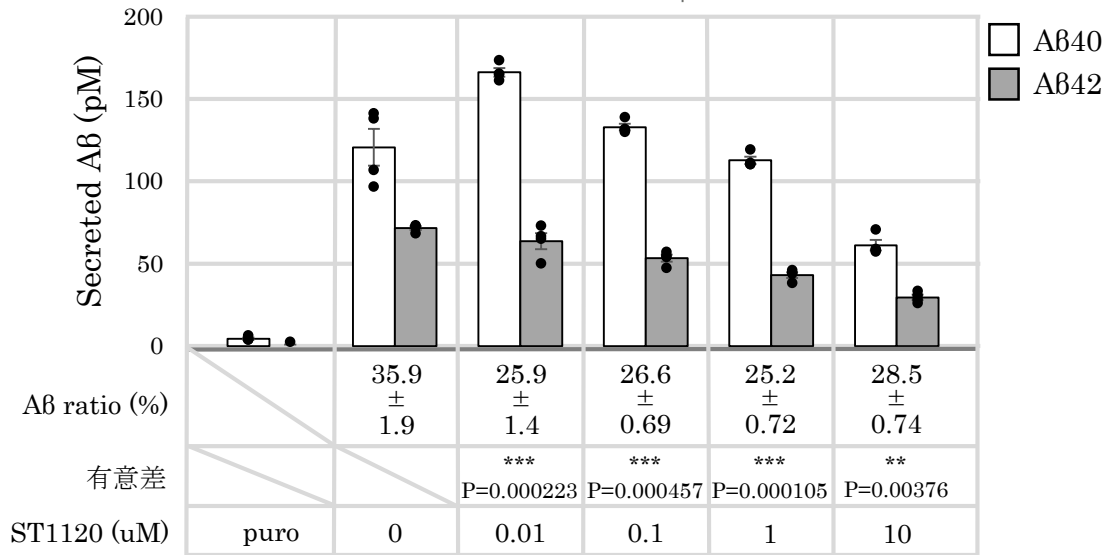
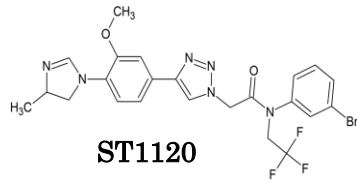


図57. ST1120、HK1138の薬理効果(L166C single Cys PS1 Mt)

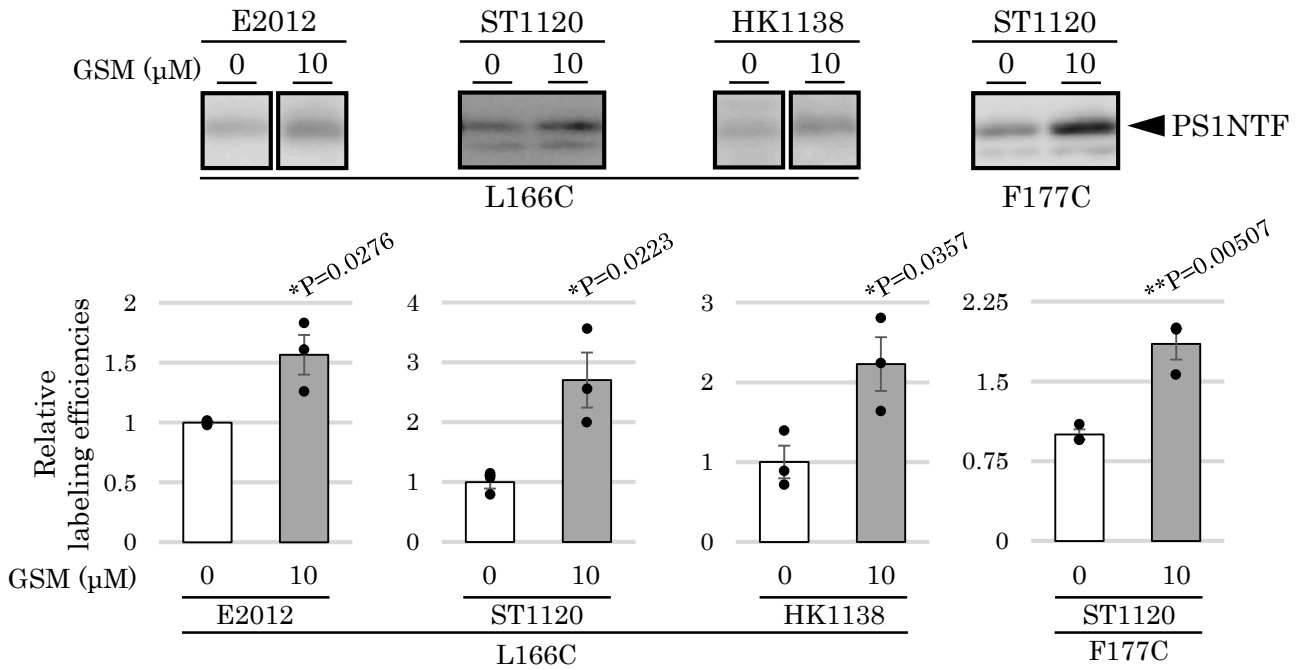
- A. 本検討で用いたST1120の構造とL166C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にL166C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。
- B. 本検討で用いたHK1138の構造とL166C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にL166C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。



### 図58. ST1120の薬理効果(F177C single Cys PS1 Mt)

本検討で用いたST1120の構造とF177C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にF177C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。AB ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。

A



B

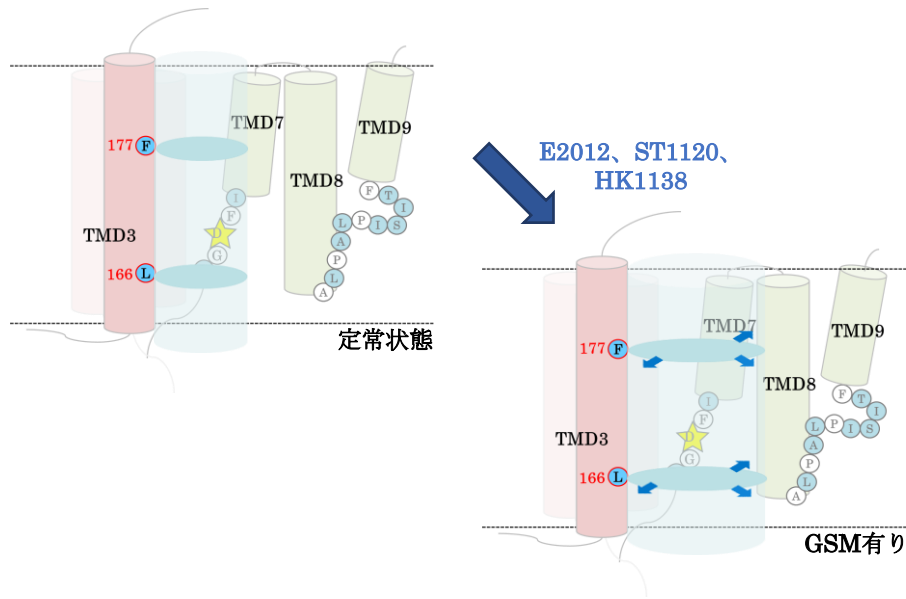
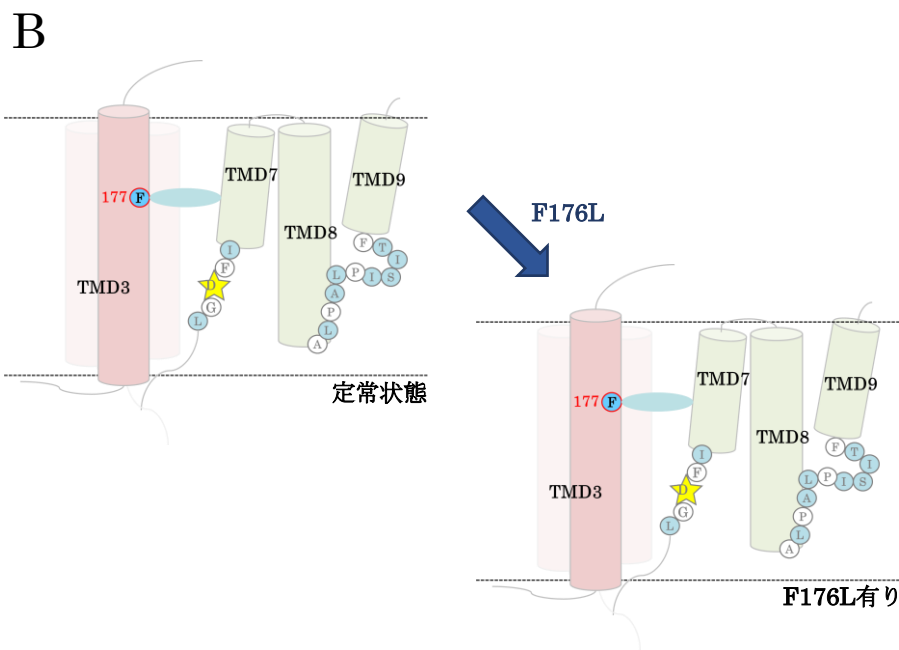
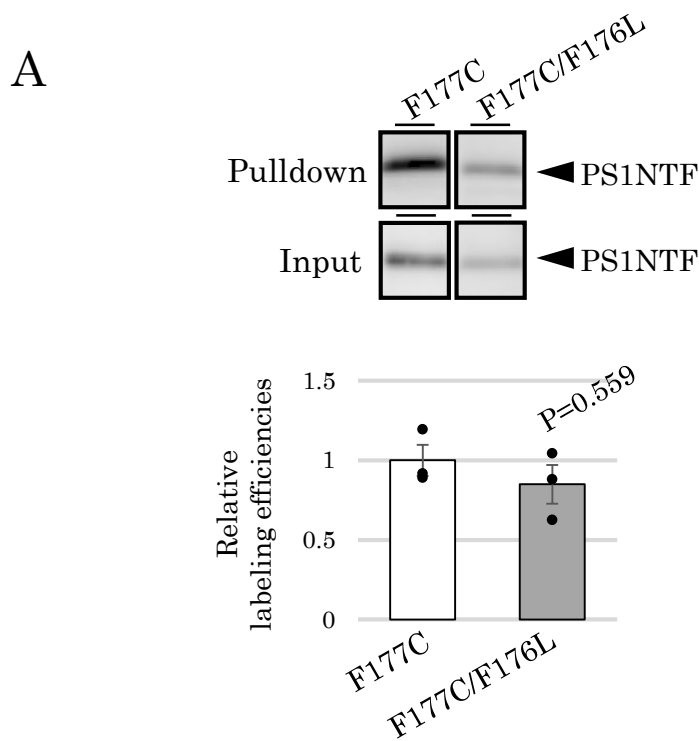


図59. GSMによるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

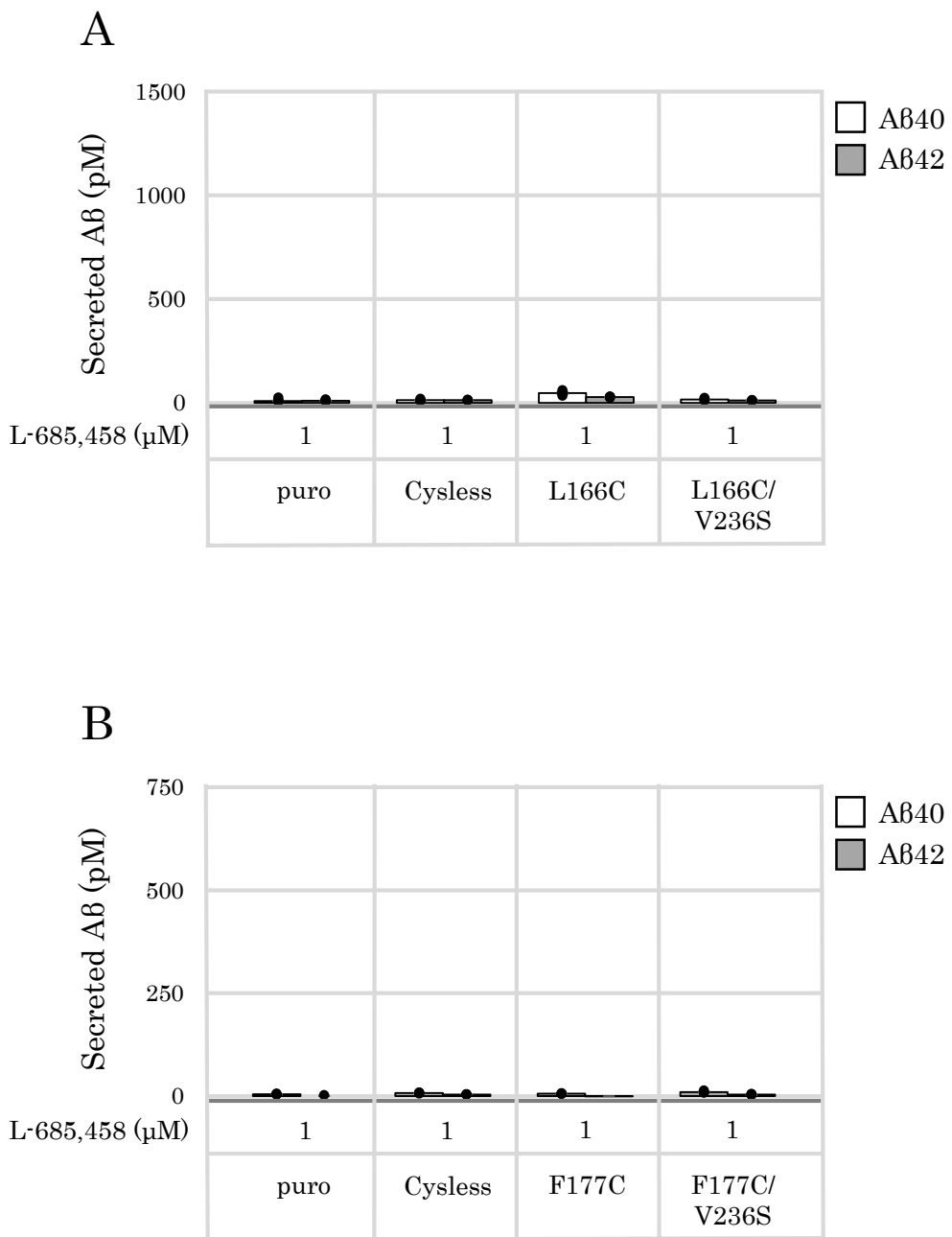
- A. 3種類のGSMによる活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



**図60. F176L変異によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動**

- A. F176Lによる活性中心ポアの変化。DKO細胞にF177C single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SEM; compared with control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。





**図61. L-685,458の薬理効果(L166C or F177C single Cys PS1 Mt)**

- A. 本検討で用いたL-685,458のV236S変異を持つL166C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。L-685,458を入れていない比較群については、図53Aを参照のこと。
- B. 本検討で用いたL-685,458のV236S変異を持つF177C single Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。L-685,458を入れていない比較群については、図53Bを参照のこと。

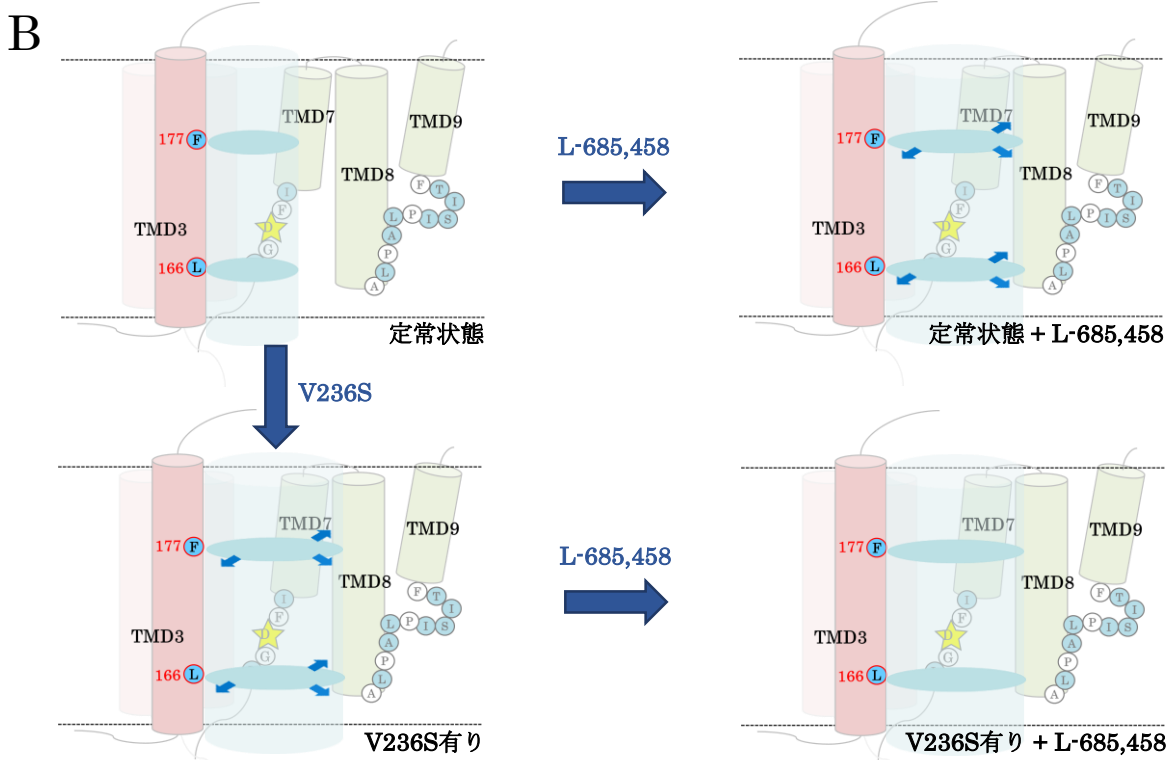
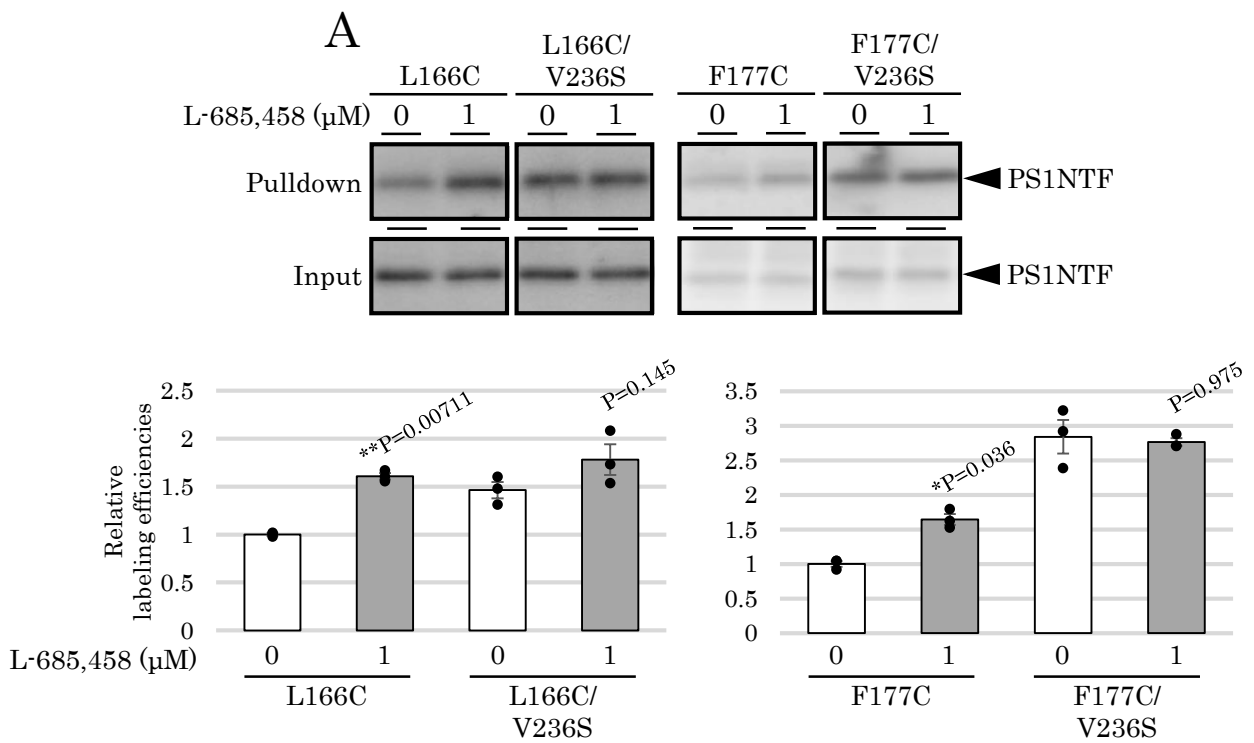
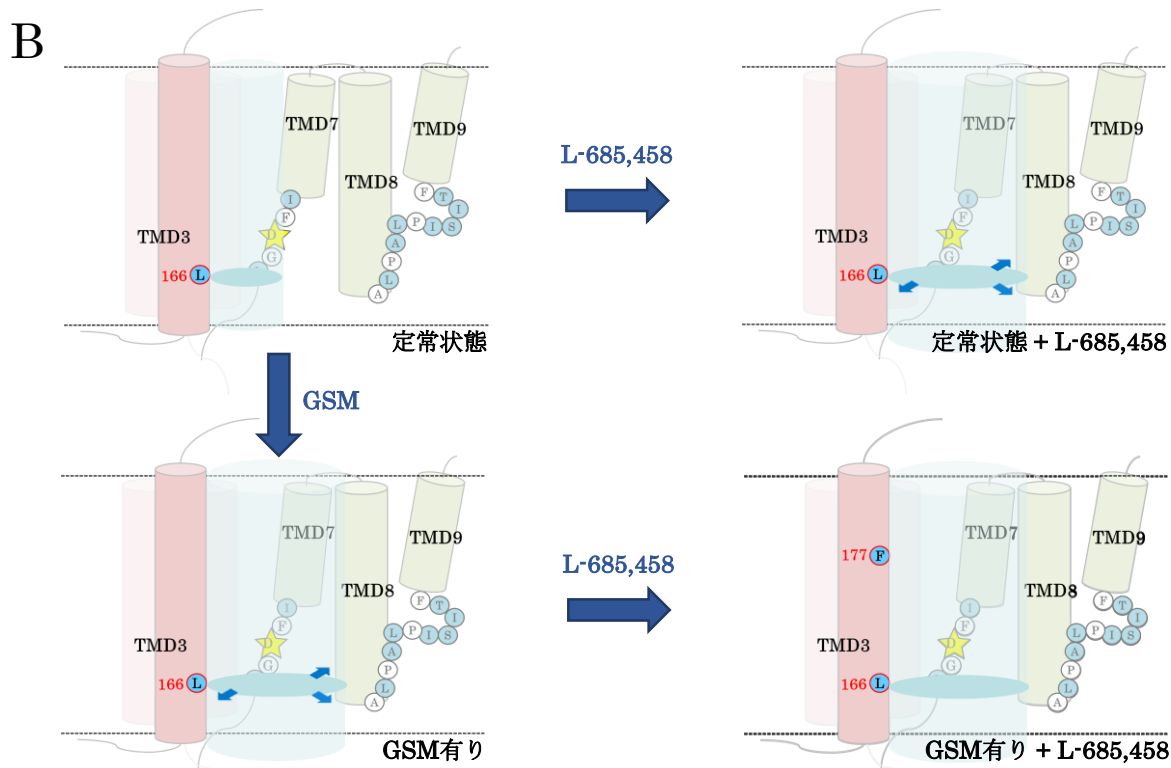
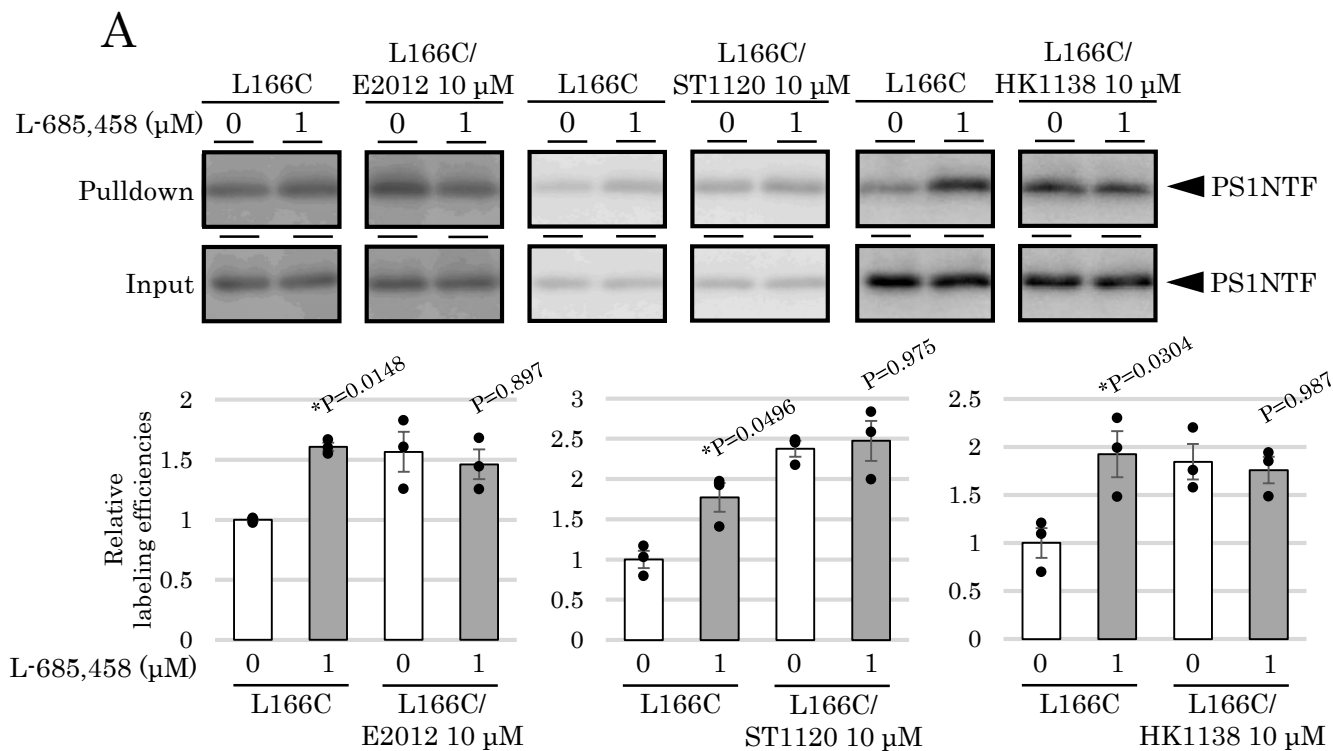


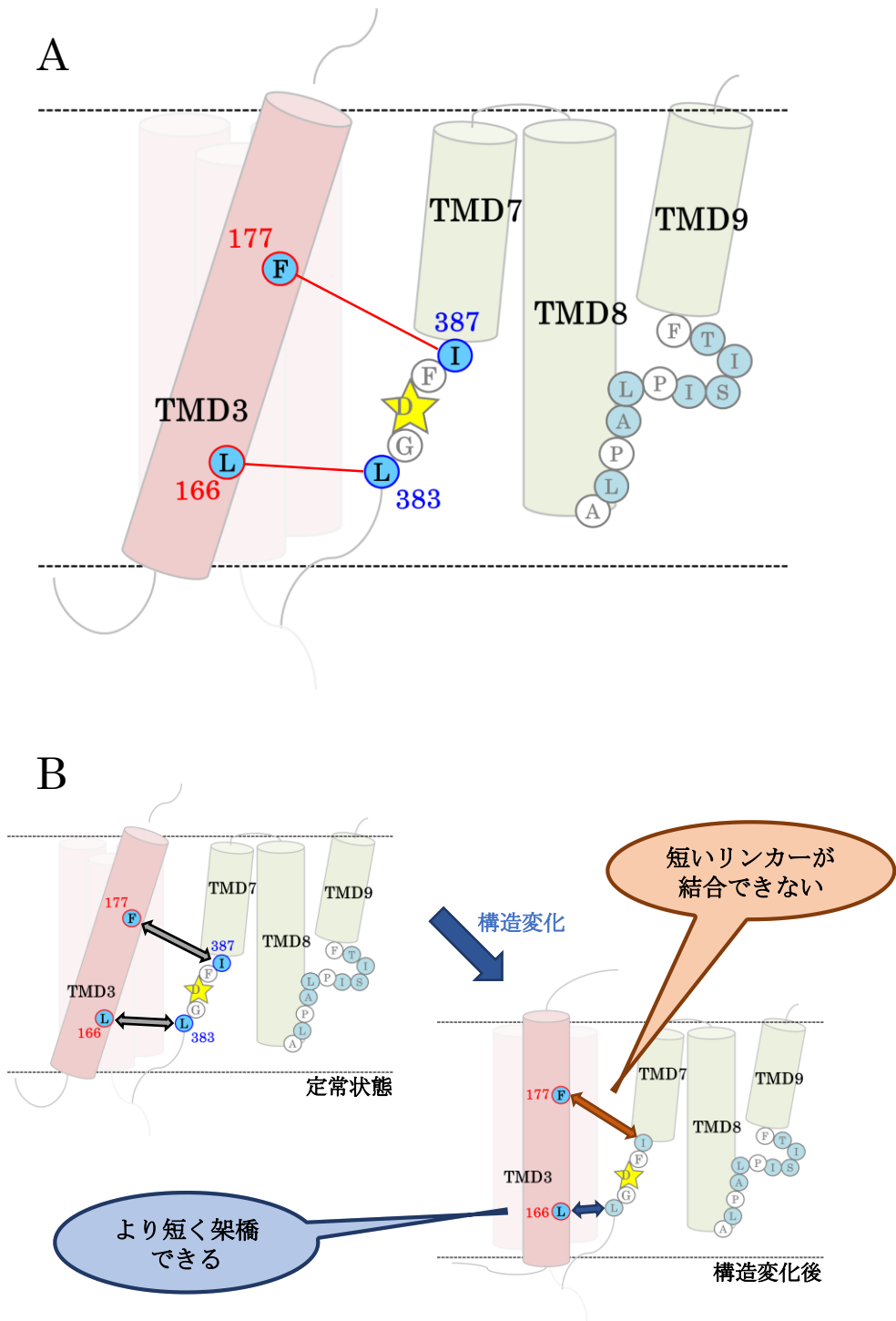
図62. V236S変異存在下でのL-685,458によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

- A. L-685,458による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMでL166CとF177Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean  $\pm$  SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



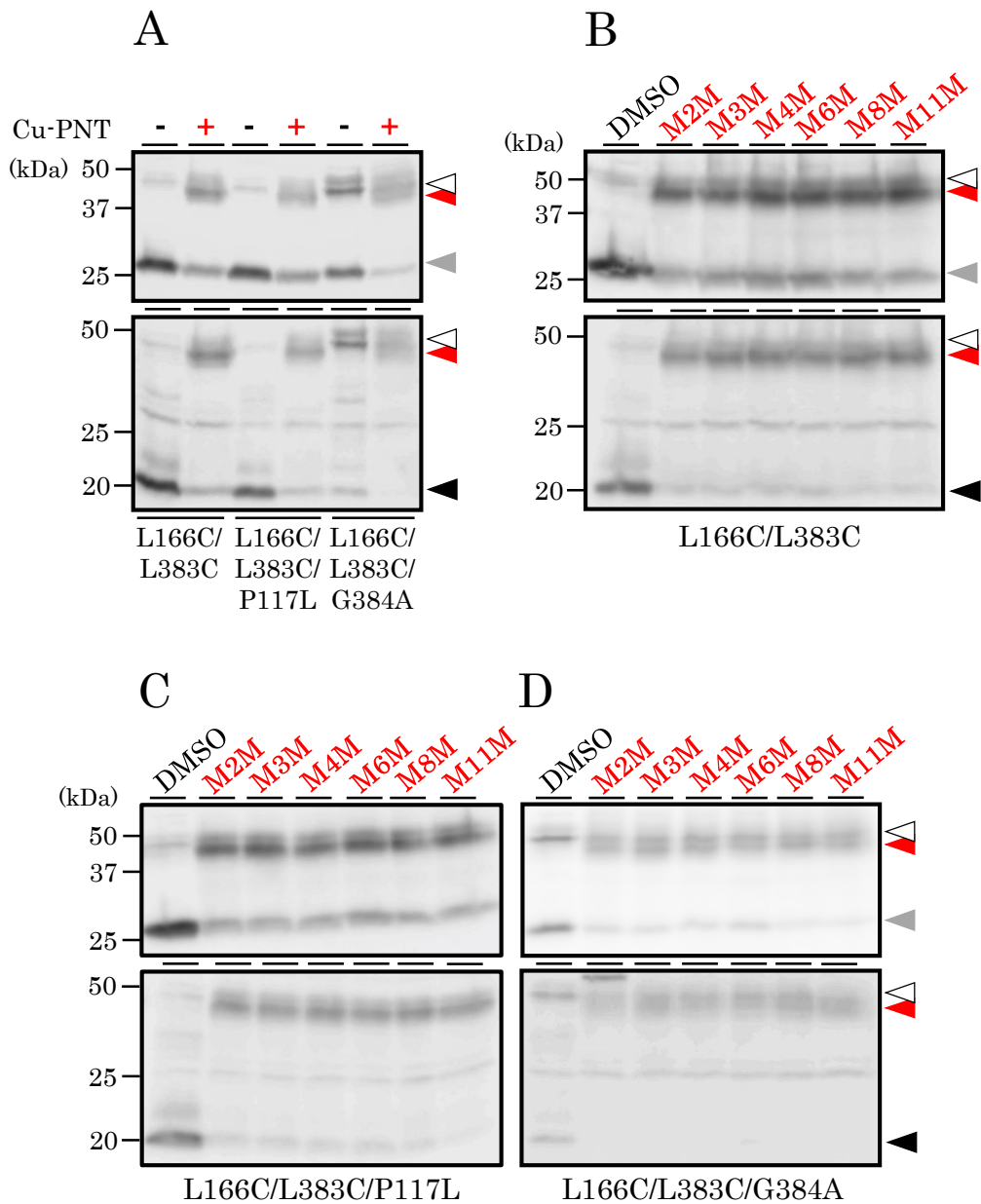
**図63. GSM存在下でのL-685,458によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動**

- A. L-685,458による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させて予め一晚GSMとincubationし、SCAMでL166Cの親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean  $\pm$  SEM; compared with each control group by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



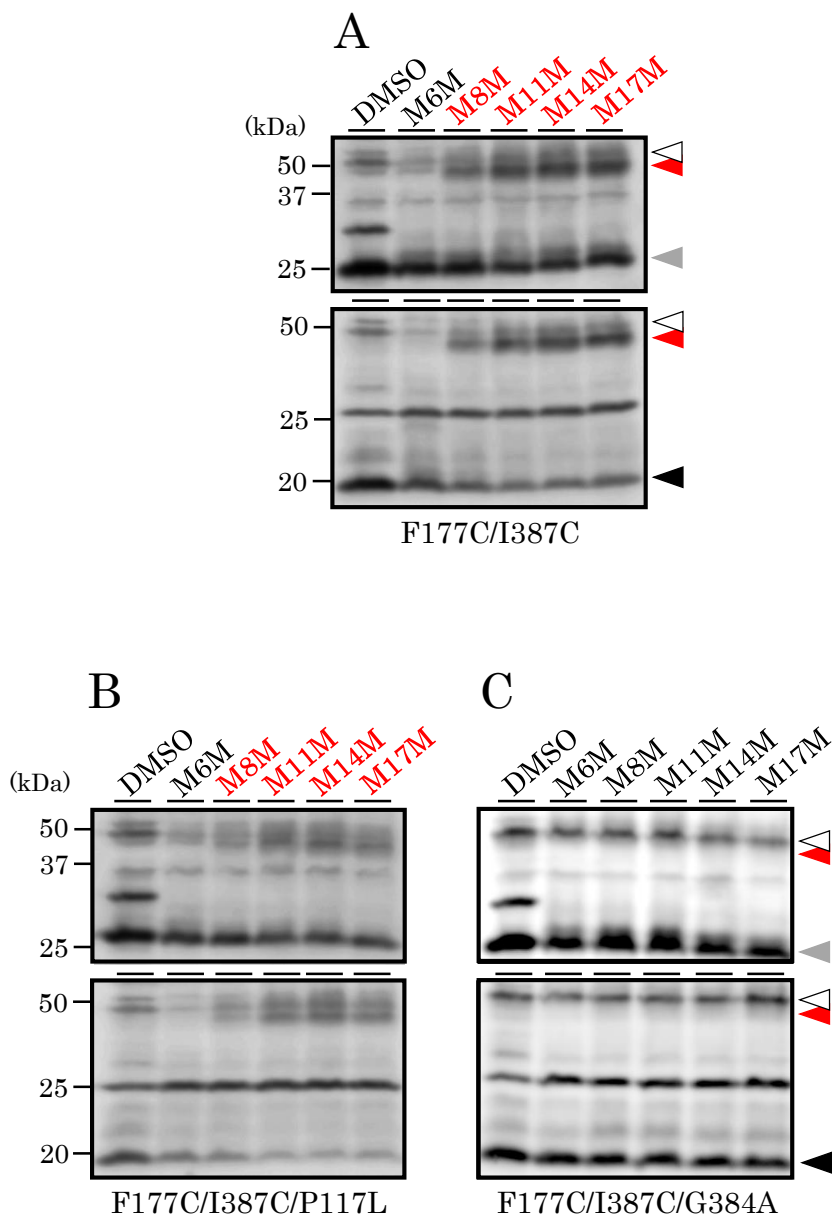
**図64. Crosslinkによる構造変化の検出**

- A. TMD3と活性中心Aspの距離を近似的に測定する為、D385付近のL383をL166に、I387をF177に対応させ、crosslinkで距離を測定した。
- B. 構造変化検出の模式図。距離の変動によってcrosslinkerの結合の有無に違いが生じることを期待し、western blottingで検出する。



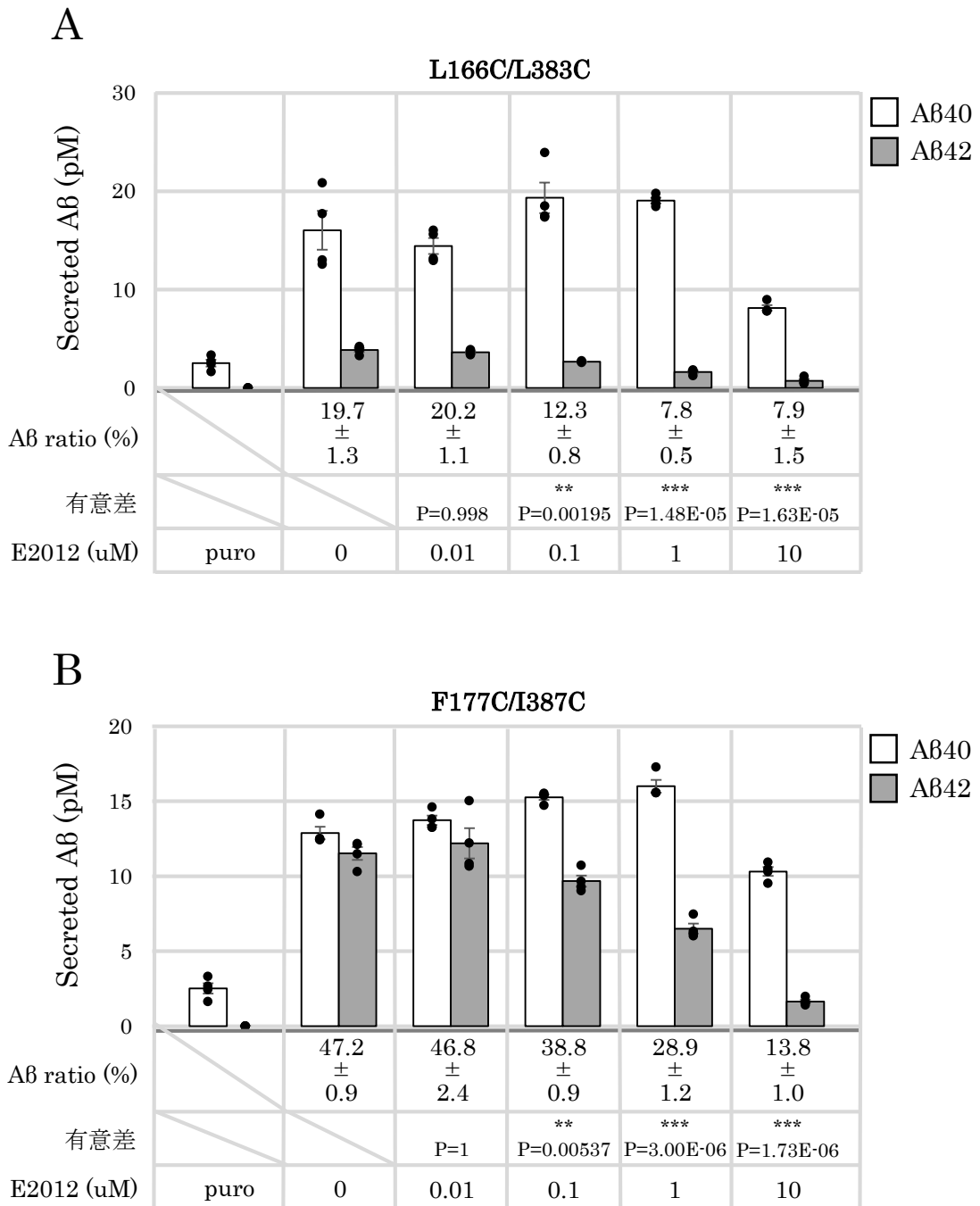
**図65. FAD変異を含むL166C/L383C double Cys PS1 Mtのcrosslink**

A-D. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



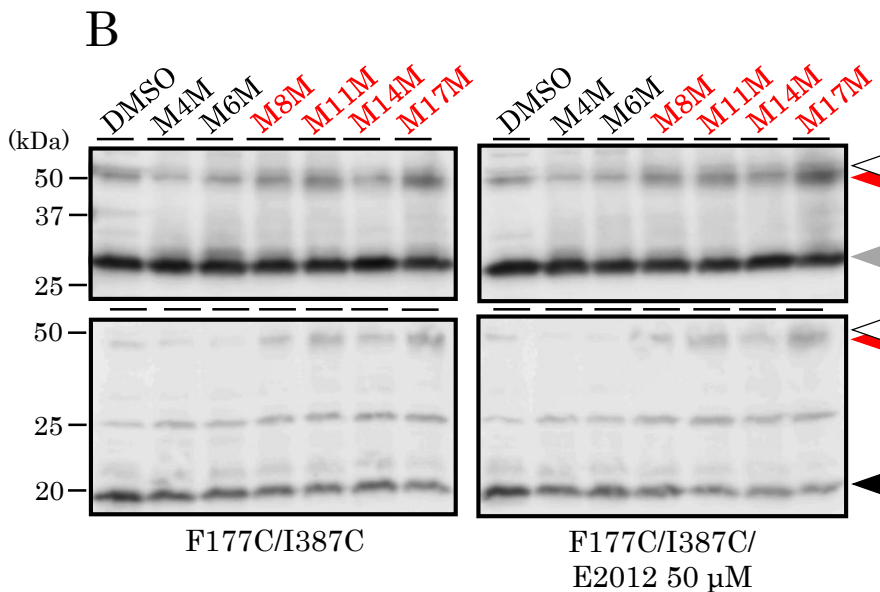
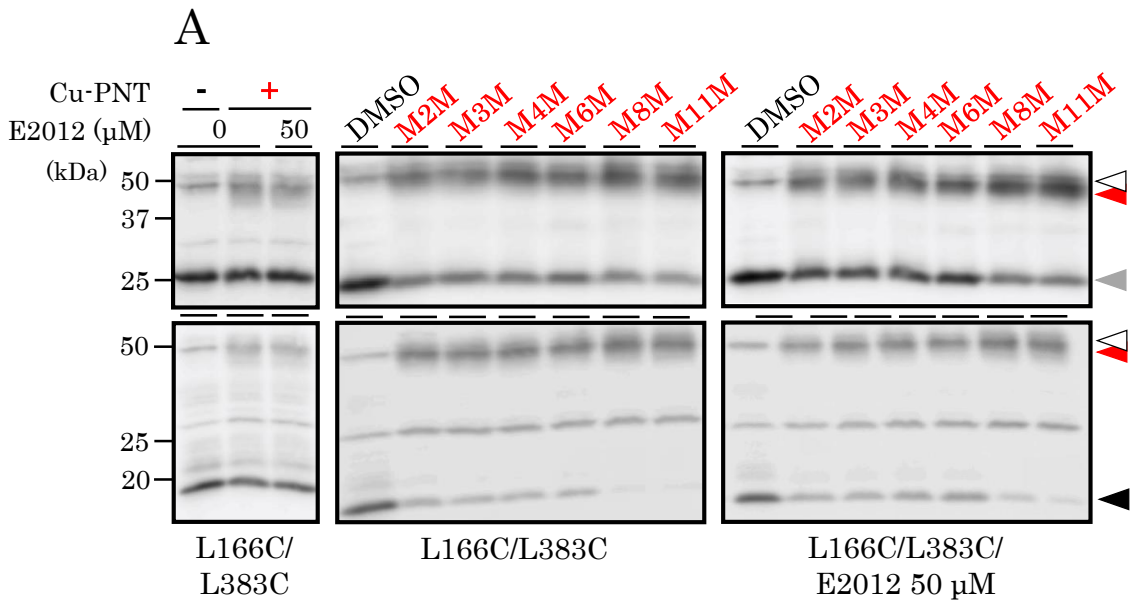
**図66. FAD変異を含むF177C/I387C double Cys PS1 Mtのcrosslink**

A-C. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



**図67. E2012の薬理効果(L166C/L383C、F177C/I387C double Cys PS1 Mt)**

- A. 本検討で用いたE2012のL166C/L383C double Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にL166C/L383C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。
- B. 本検討で用いたE2012のF177C/I387C double Cys PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。

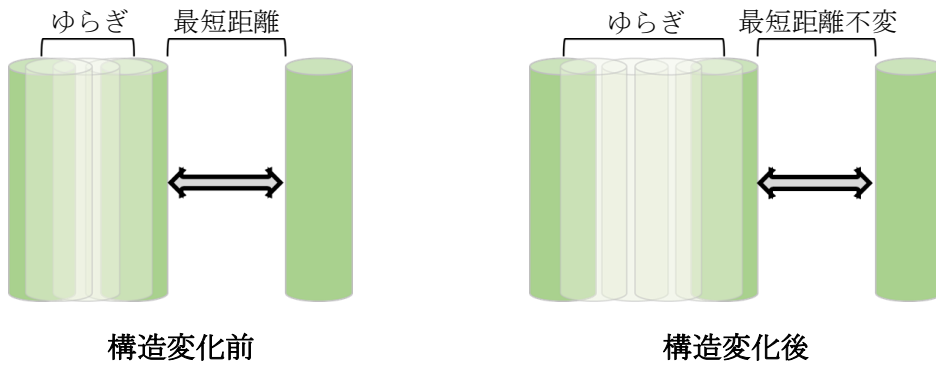


**図68. GSM存在下のL166C/L383C or F177C/I387C double Cys PS1 Mtのcrosslink**

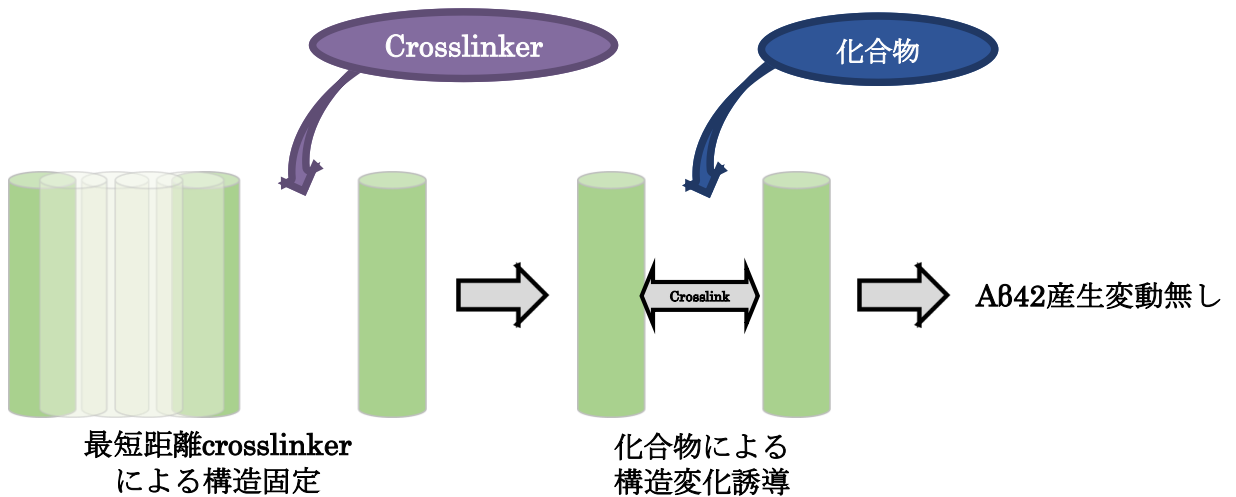
A-B. DKO細胞に各種double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得してcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



A



B



**図69. Crosslinkによる構造固定**

- A. Crosslinkerは揺らぎのあるタンパクの構造の、瞬間的に取り得る最短距離を捕捉する。その為構造変化後の最短距離が不変であるならば、crosslinkでの検出は不可能である。
- B. Crosslinkerを構造固定剤として用いる代替案。2ドメイン間の距離の拡大がAβ42産生減少に直結するならば、化合物による構造変化が阻害されてAβ42の産生変動が無くなると考えられる。

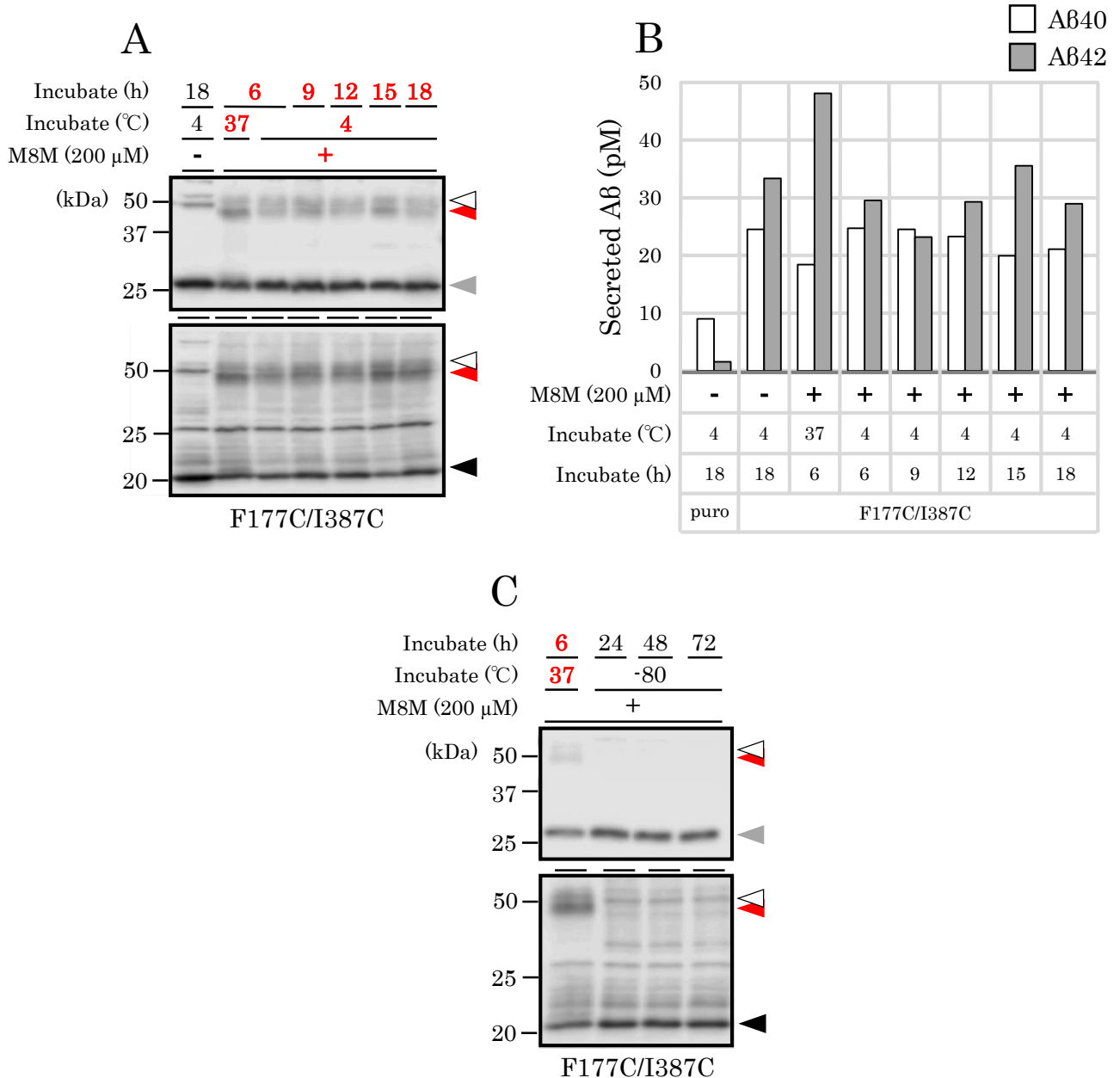
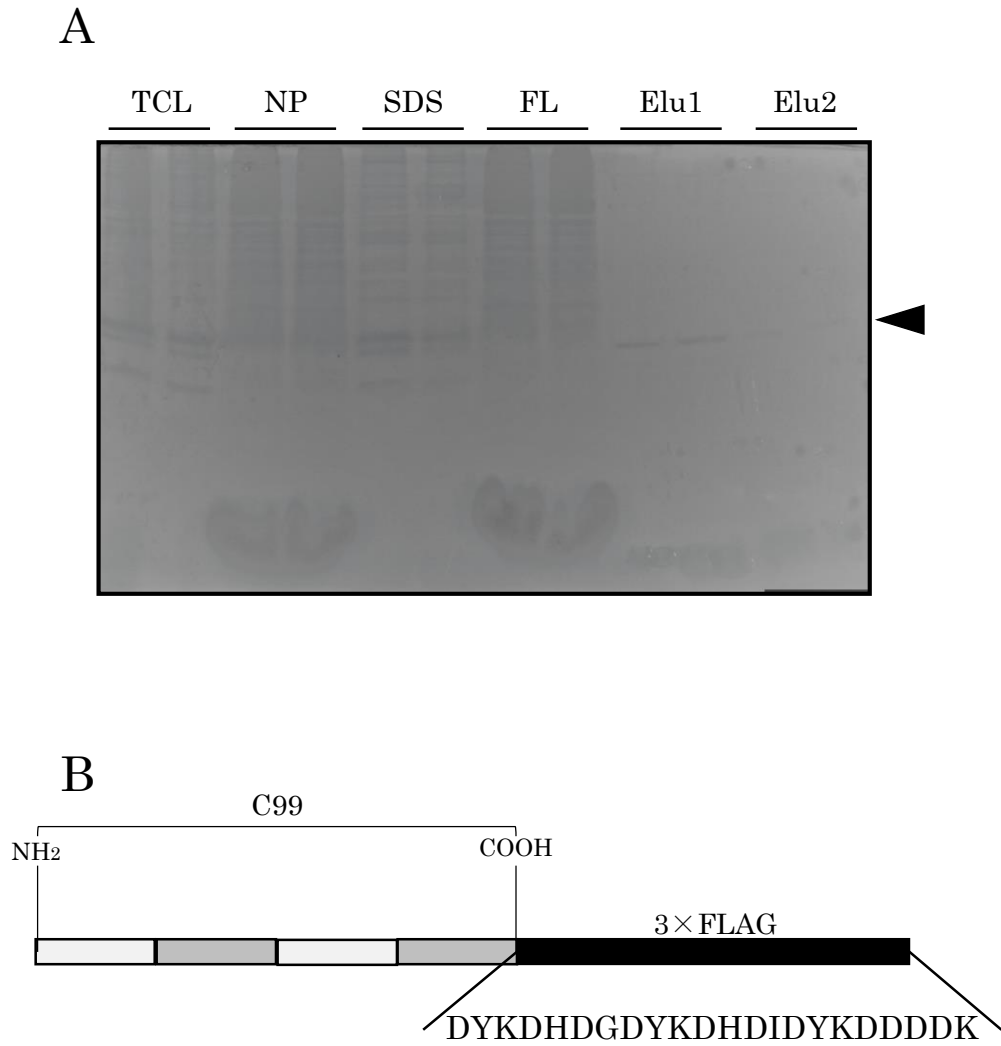


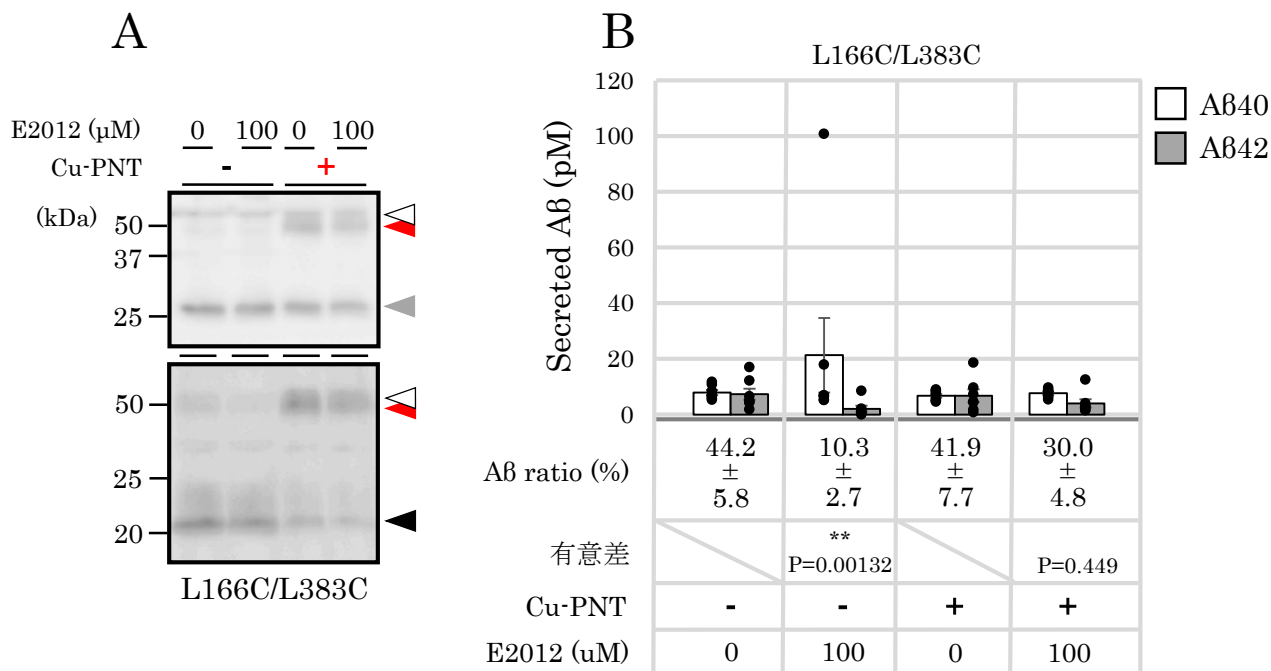
図70. Cell free assayによる構造固定時のAβ42産生検出条件検討

- A. DKONL細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得して各条件でcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。
- B. DKONL細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、cell free assayで分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。
- C. DKONL細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、microsomeを取得して各条件でcrosslinkを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。



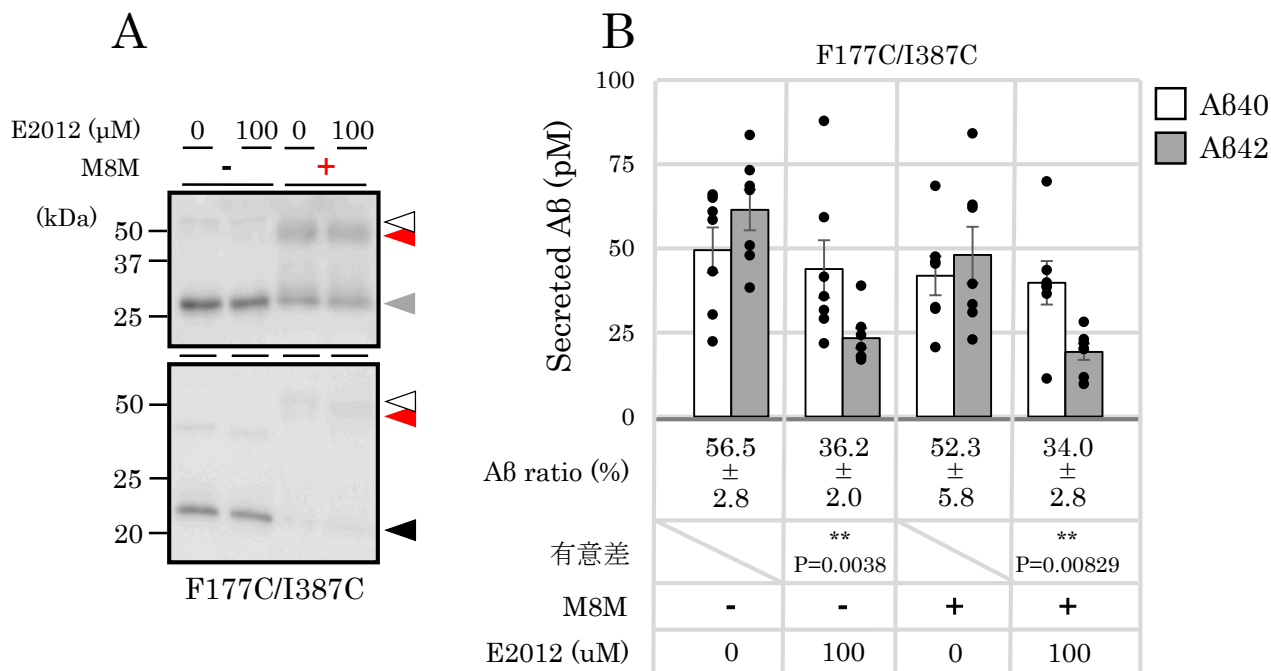
**図71. sC99の精製**

- A. *In vitro* assay で用いた sC99 3×FLAG 精製結果。  
 B. sC99 3×FLAG の模式図。



**図72. In vitro assayによるL166C/L383C間固定時のAβ42産生変動**

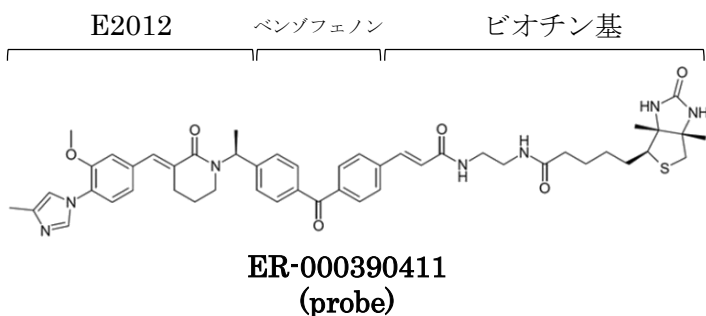
- A. DKO細胞にL166C/L383C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得してcrosslinkした後、精製sC99の切断をin vitro assayを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。
- B. DKO細胞にL166C/L383C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、in vitro assayで分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 7; mean ± SEM; compared with each non-compound-treated group by Tukey test)。



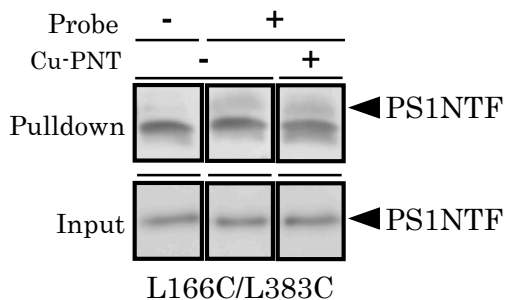
**図73. In vitro assayによるF177C/I387C間固定時のA $\beta$ 42産生変動**

- A. DKO細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得してcrosslinkした後、精製sC99の切断をin vitro assayを行った。Crosslinkされたものは赤い太字で示してある。灰色と黒色の矢印はそれぞれPS1NTFとPS1CTFを示す。白色と赤色の矢印はそれぞれPS1FL、及びPS1NTFとPS1CTFのcrosslink産物を示す。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5、anti-PS1CTF抗体にはG1L3抗体を用いた。
- B. DKO細胞にF177C/I387C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、in vitro assayで分泌したA $\beta$ 40及びA $\beta$ 42量をELISAによって測定した。A $\beta$  ratio = A $\beta$ 42/(A $\beta$ 40 + A $\beta$ 42)で算出した(n = 7; mean  $\pm$  SEM; compared with each non-compound-treated group by Tukey test)。

A



B



C

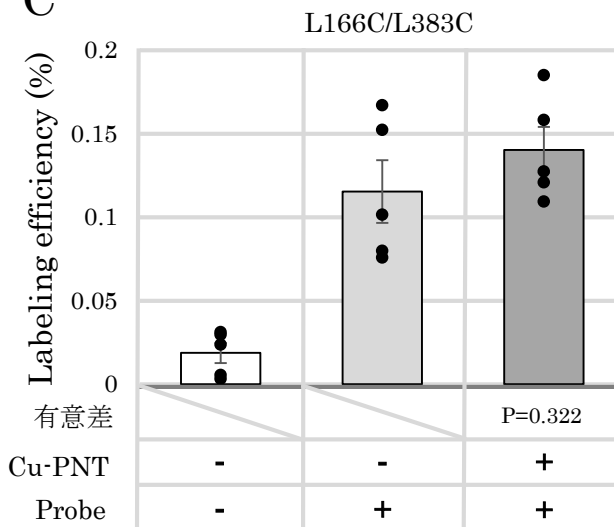
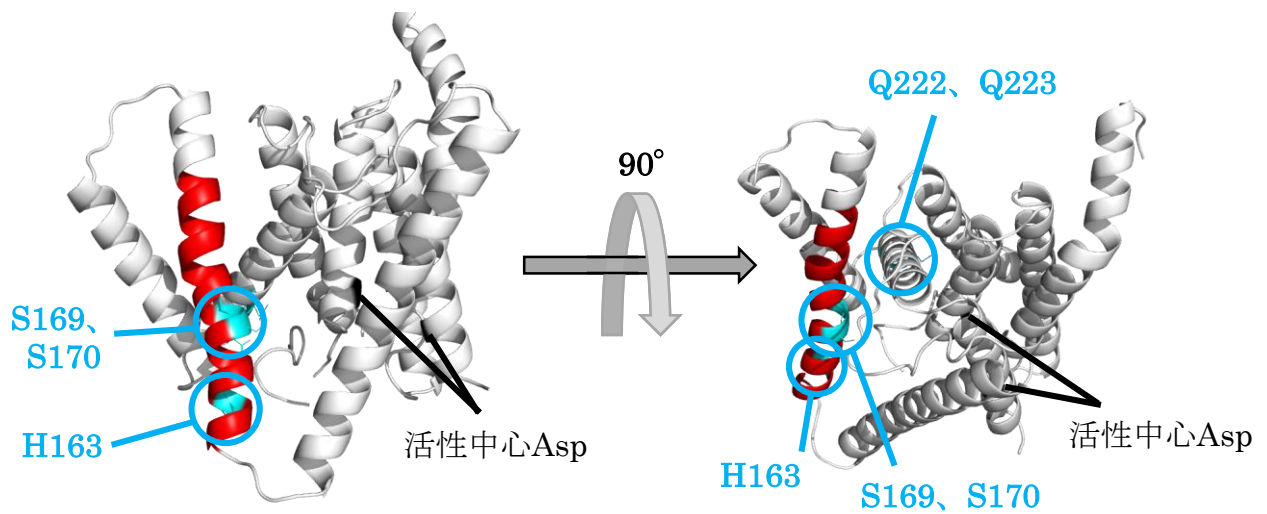


図74. PALによるL166C/L383C double Cys PS1 MtへのE2012結合能の測定

- A. E2012のprobeであるER-000390411の構造。
- B. DKO細胞にL166C/L383C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得してcrosslinkした後、PALを行った。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- C. DKO細胞にL166C/L383C double Cys PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得して行ったPALのバンド強度を定量した (n = 5; mean ± SEM; compared with non-crosslinked group by Student *t* test)。

A



B

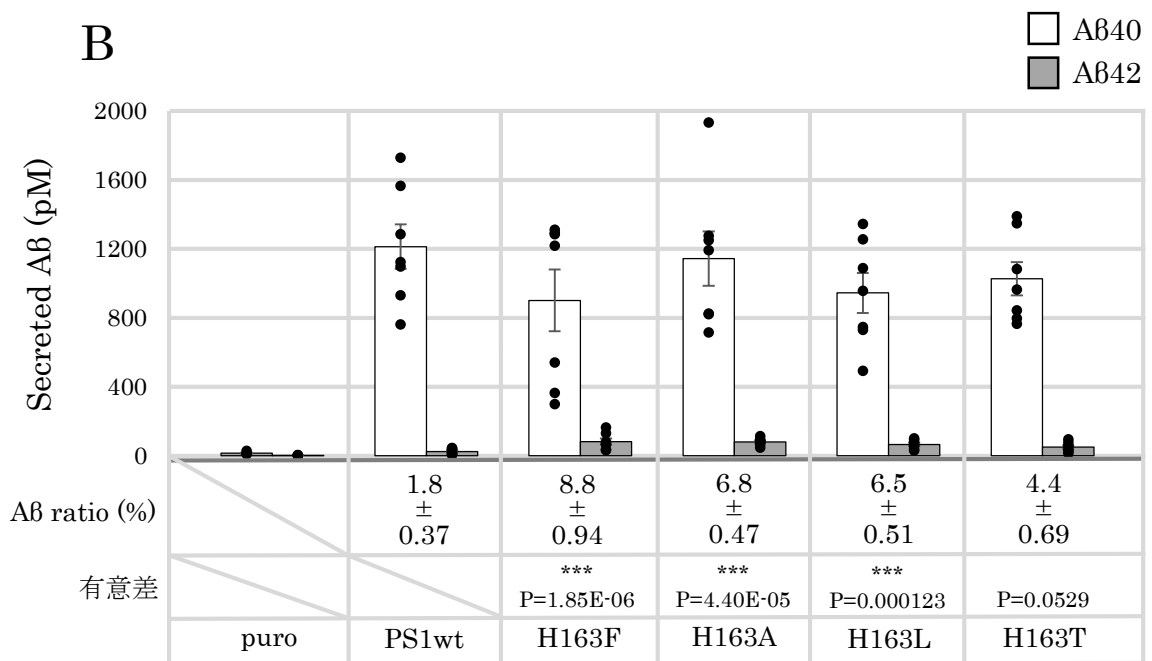
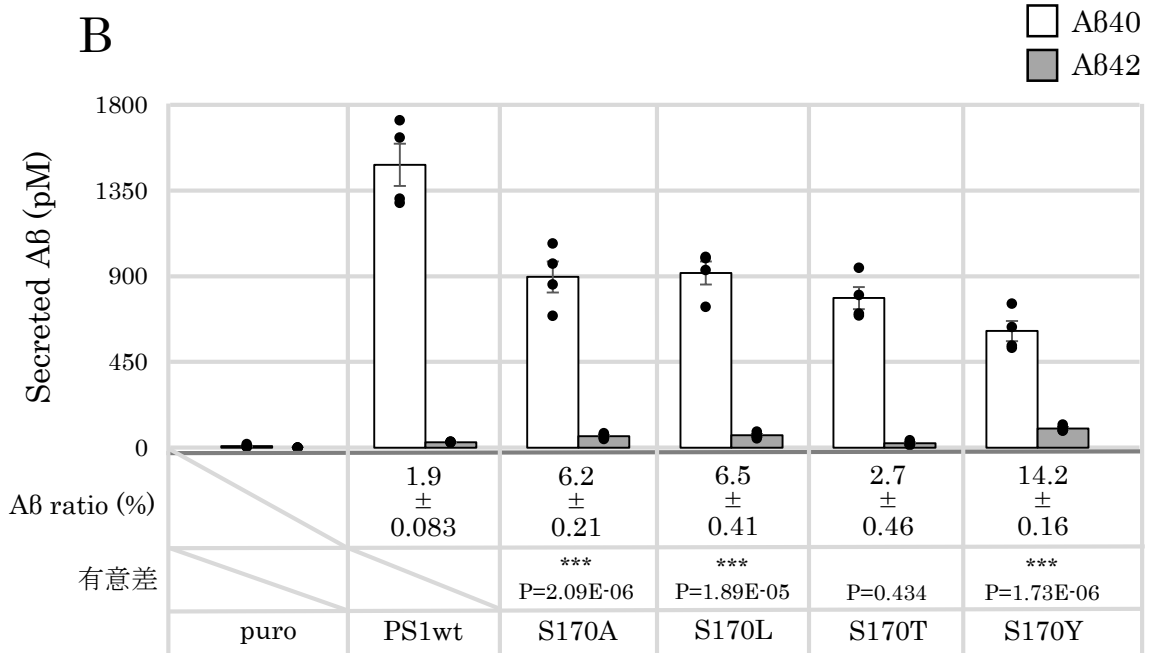
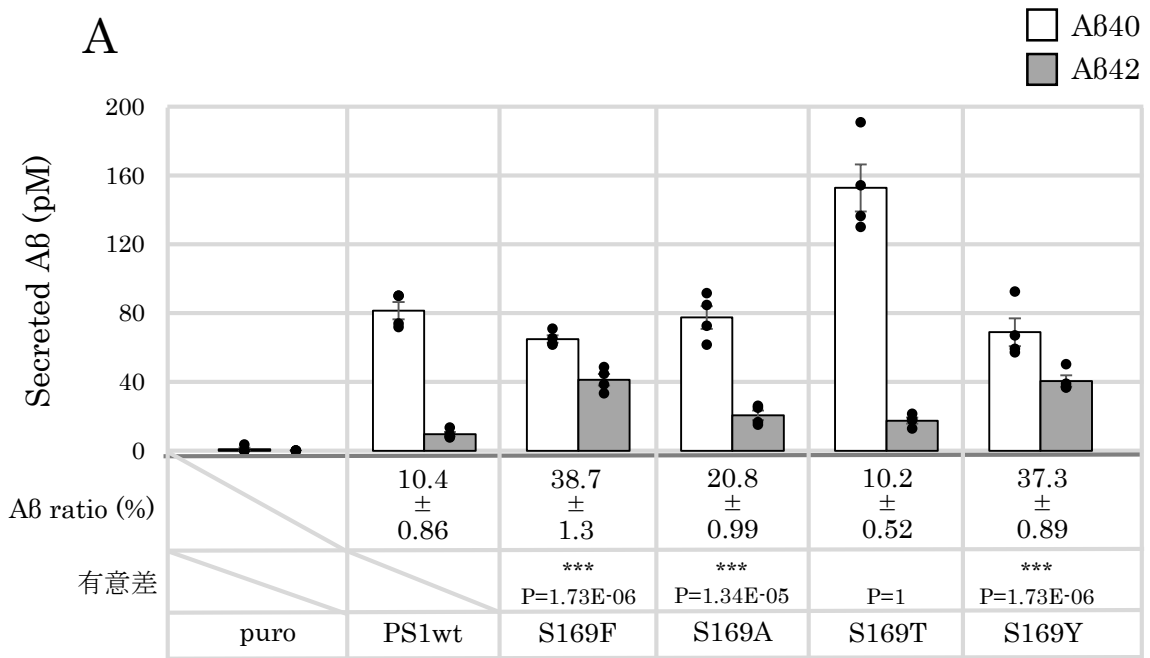


図75. H163各PS1 Mtの活性評価

- A. 各水分子保持候補残基をcryo-EM構造上にマッピングしたもの。TMD3の膜内領域は赤色で示した。水色、及び黒色はそれぞれ候補残基と活性中心Aspを示す。
- B. H163 PS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種H163 PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 7; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。



**図76. S169及びS170各PS1 Mtの活性評価**

- A. S169 PS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種S169 PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。
- B. S170 PS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種S170 PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。



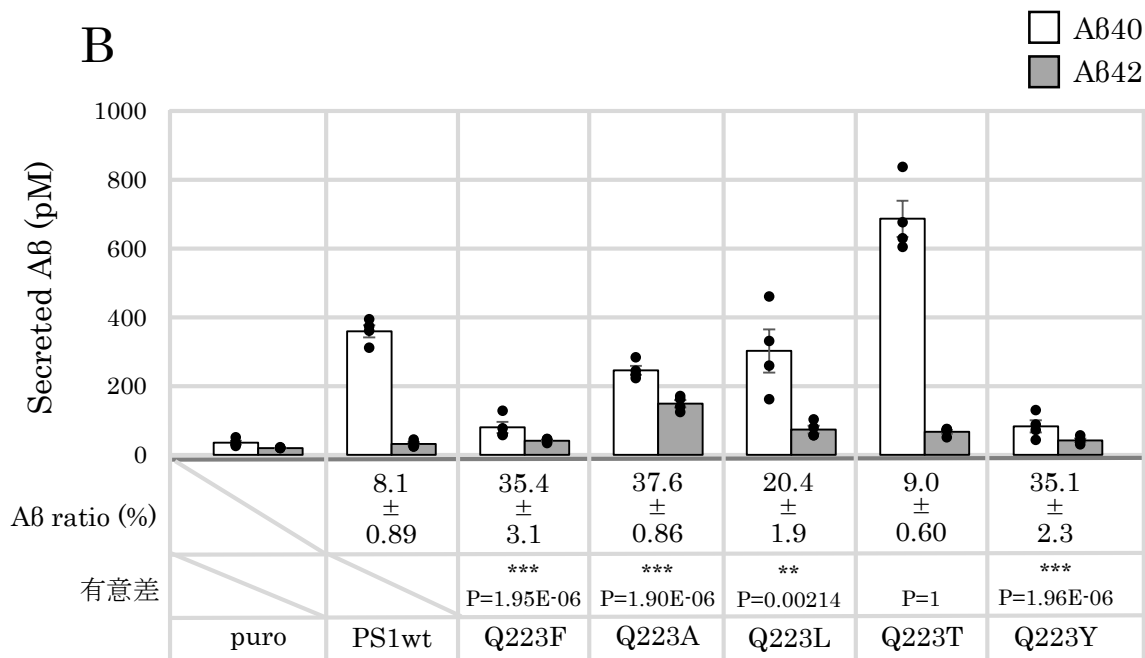
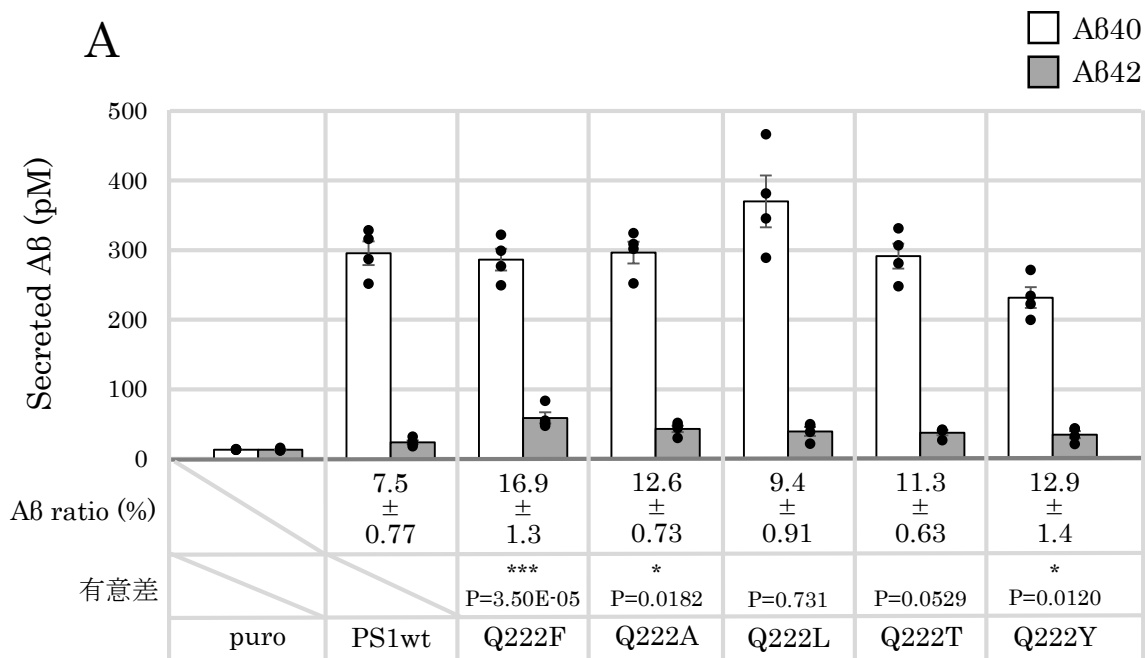
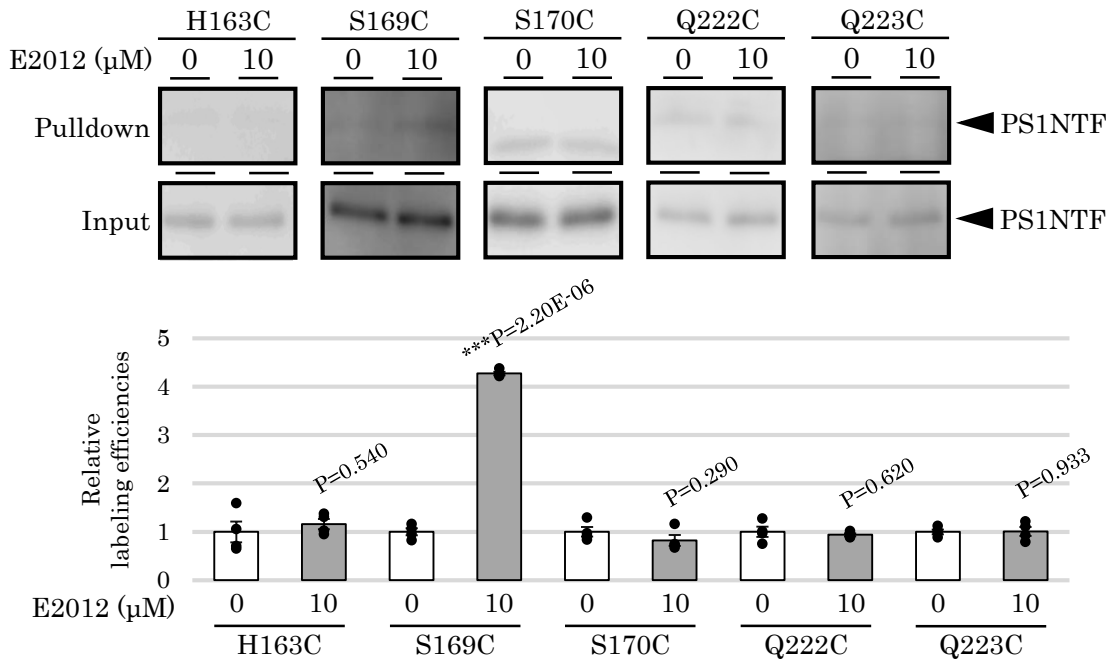


図77. Q222及びQ223各PS1 Mtの活性評価

- A. Q222 PS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種Q222 PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。
- B. Q223 PS1 Mtの活性評価。DKONL細胞に各種Q223 PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with wt by Tukey test)。

A



B

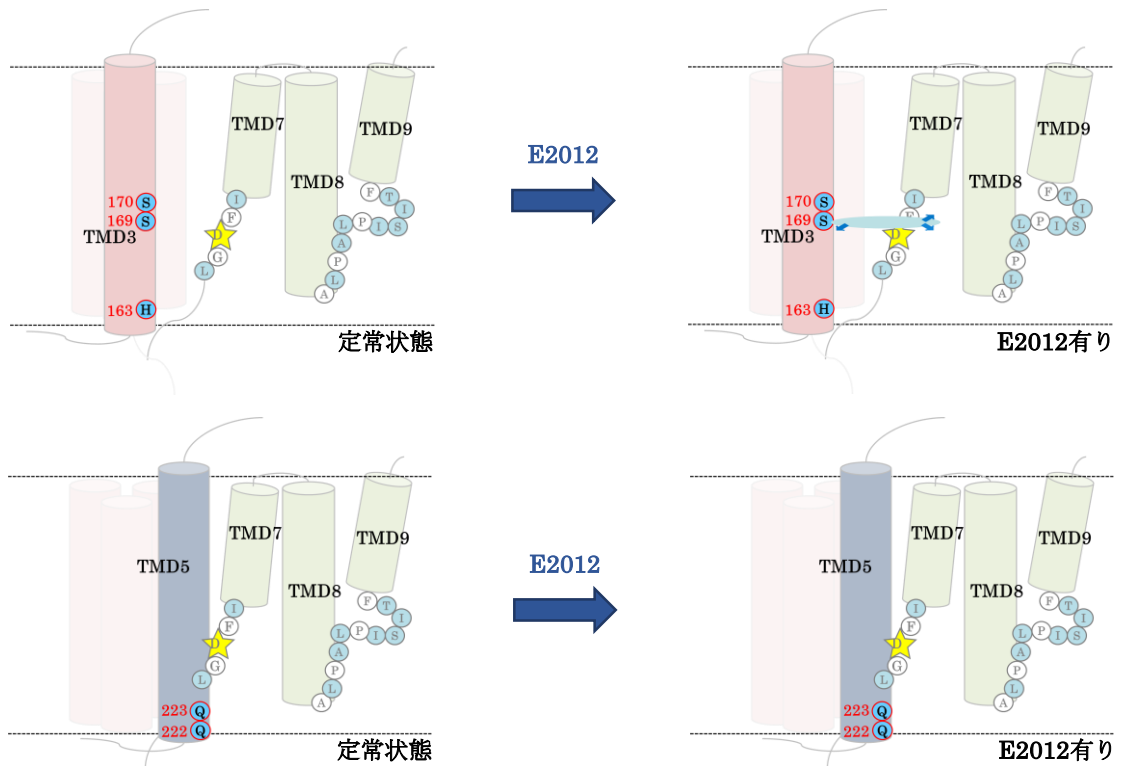
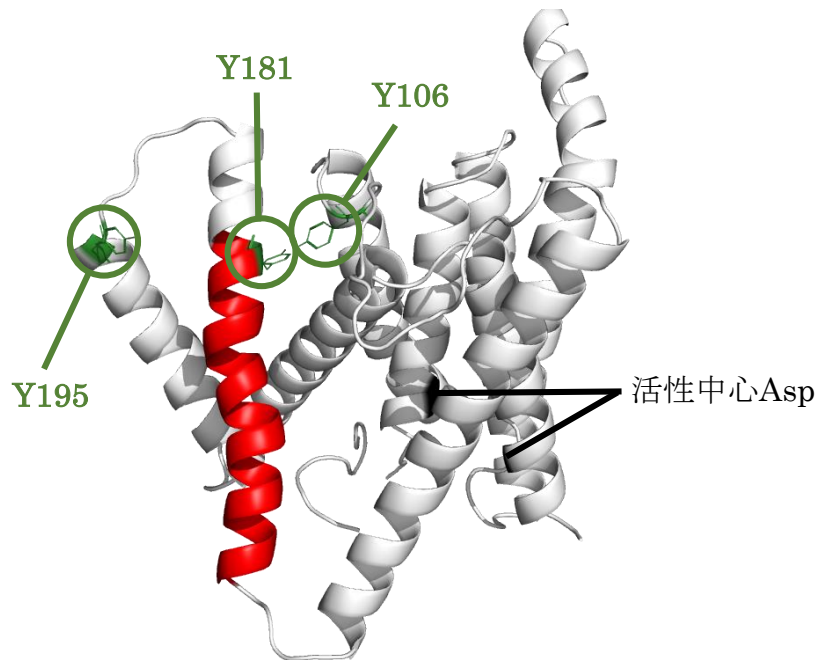


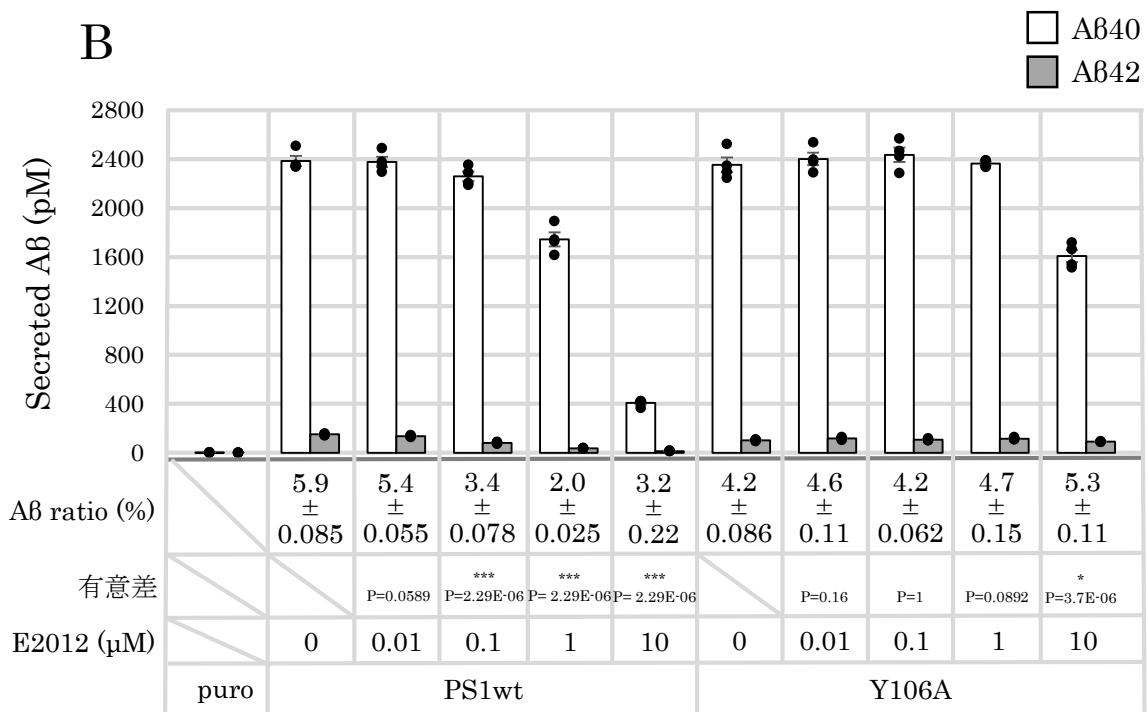
図78. GSM存在下での水分子保持候補残基周囲の親水性の変動

- A. E2012による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t* test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。

A



B



### 図79. E2012の薬理効果(Y106A PS1 Mt)

- A. GSM結合残基をcryo-EM構造上にマッピングしたもの。TMD3の膜内領域は赤色で示した。緑色、及び黒色はそれぞれGSM結合残基と活性中心Aspを示す。
- B. 本検討で用いたE2012のY106A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にY106A PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。

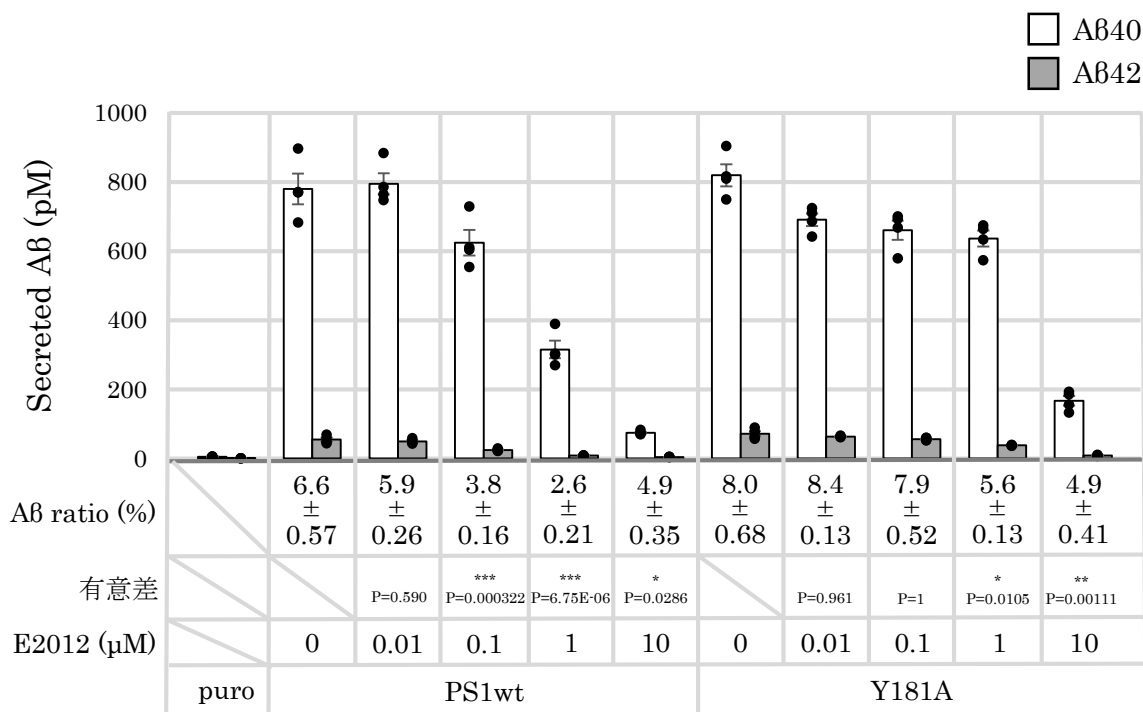
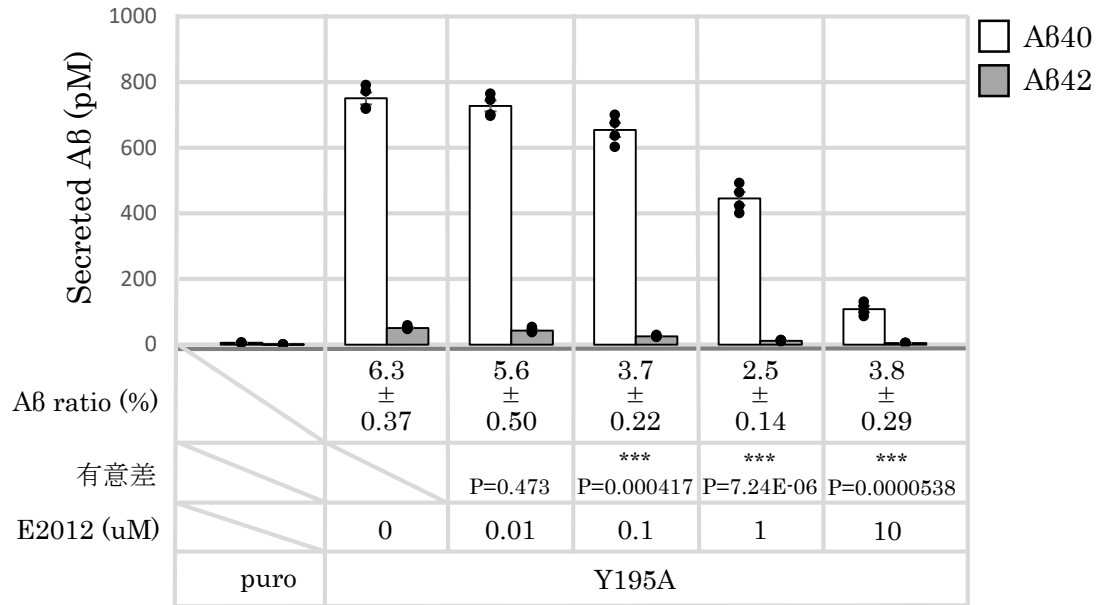


図80. E2012の薬理効果(Y181A PS1 Mt)

本検討で用いたE2012のY181A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にY181A PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。

A



B

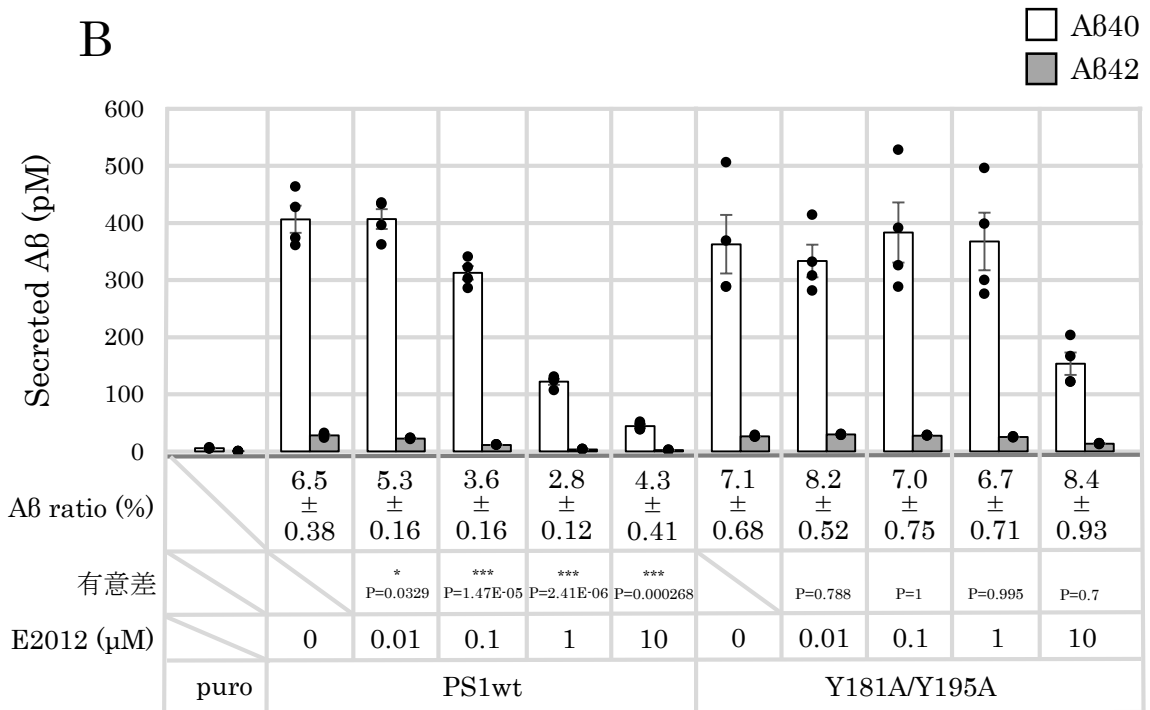
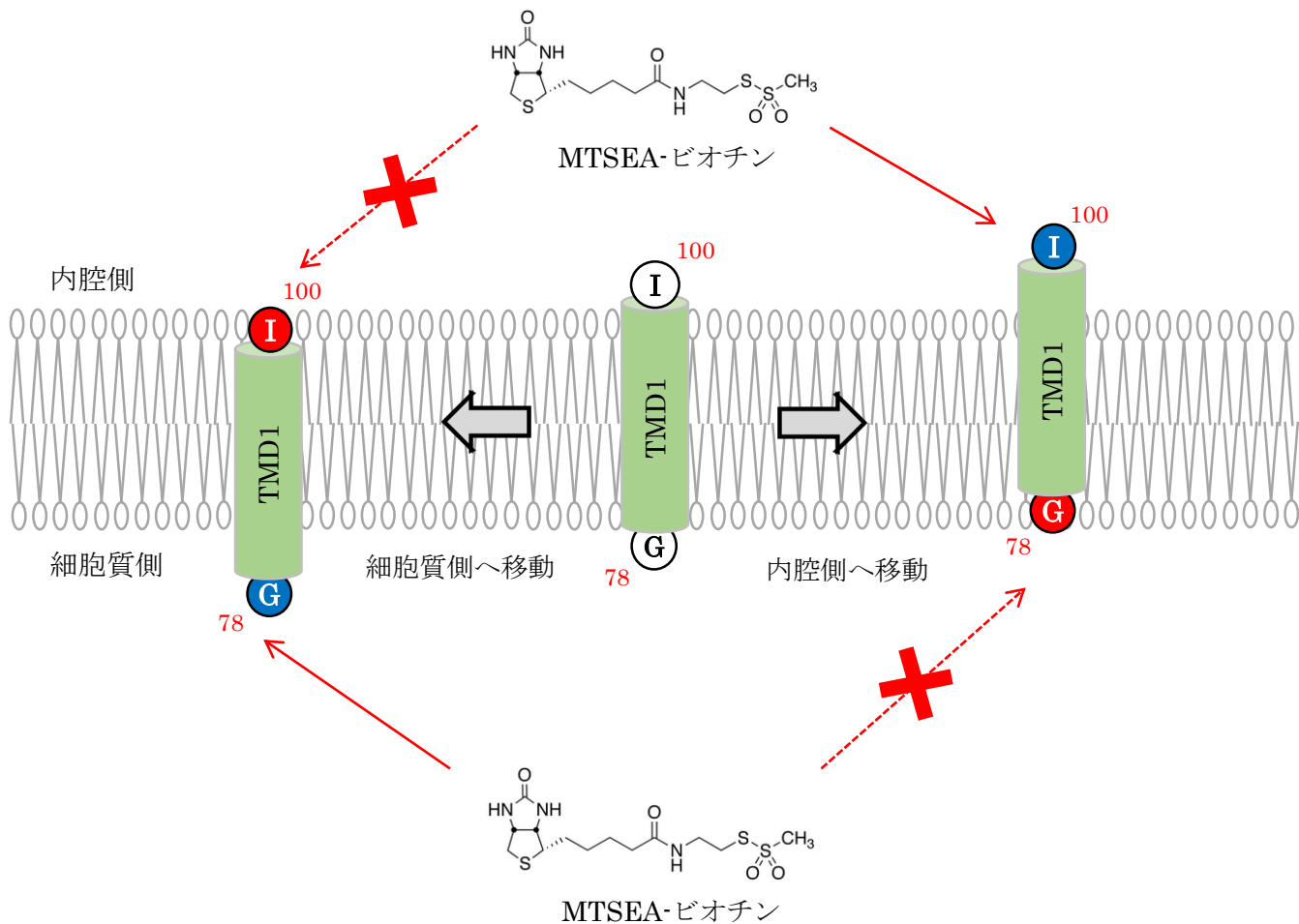


図81. E2012の薬理効果(Y195A、Y181A/Y195A PS1 Mt)

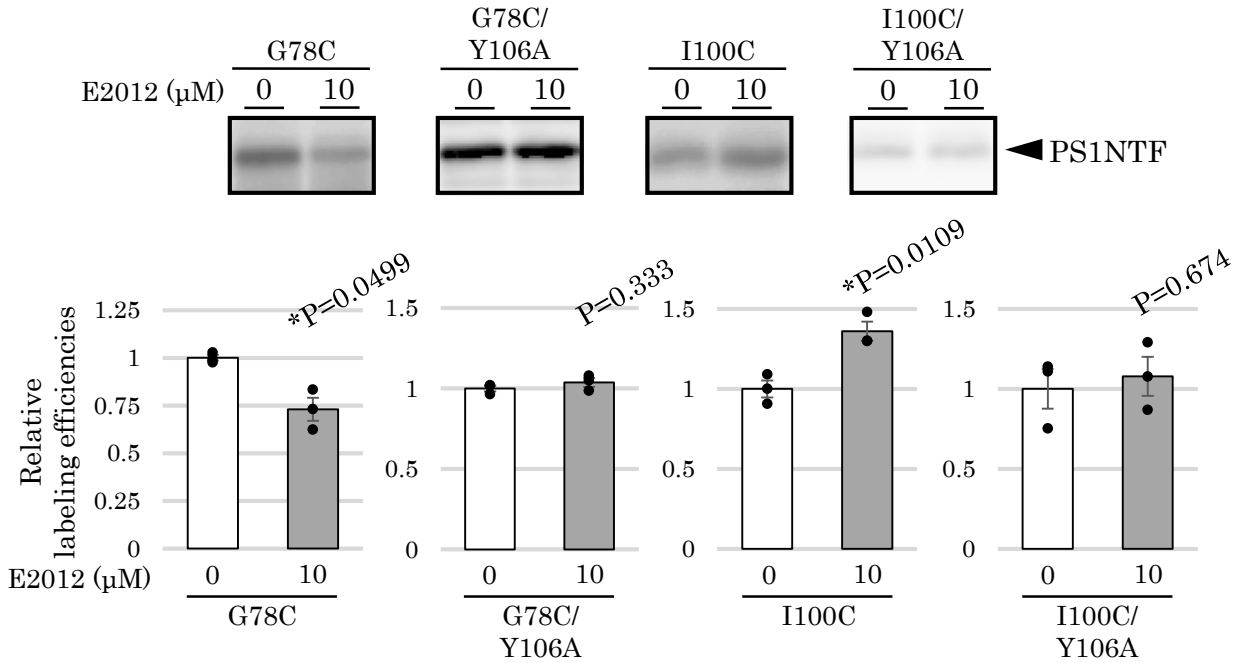
- A. 本検討で用いたE2012のY195A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にY195A PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with control group by Tukey test)。PS1wtとの比較は図76Bを参照。
- B. 本検討で用いたE2012のY181A/Y195A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞にY181A/Y195A PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。



**図82. TMD1の垂直運動の模式図**

細胞膜内でTMD1が垂直運動する模式図。細胞質側へ移動した場合、細胞質末端残基であるG78の親水性が上がり、内腔側末端残基であるI100の親水性が低下する。一方、内腔側へ移動した場合、細胞質末端残基であるG78の親水性が下がり、内腔側末端残基であるI100の親水性が増加する。

A



B

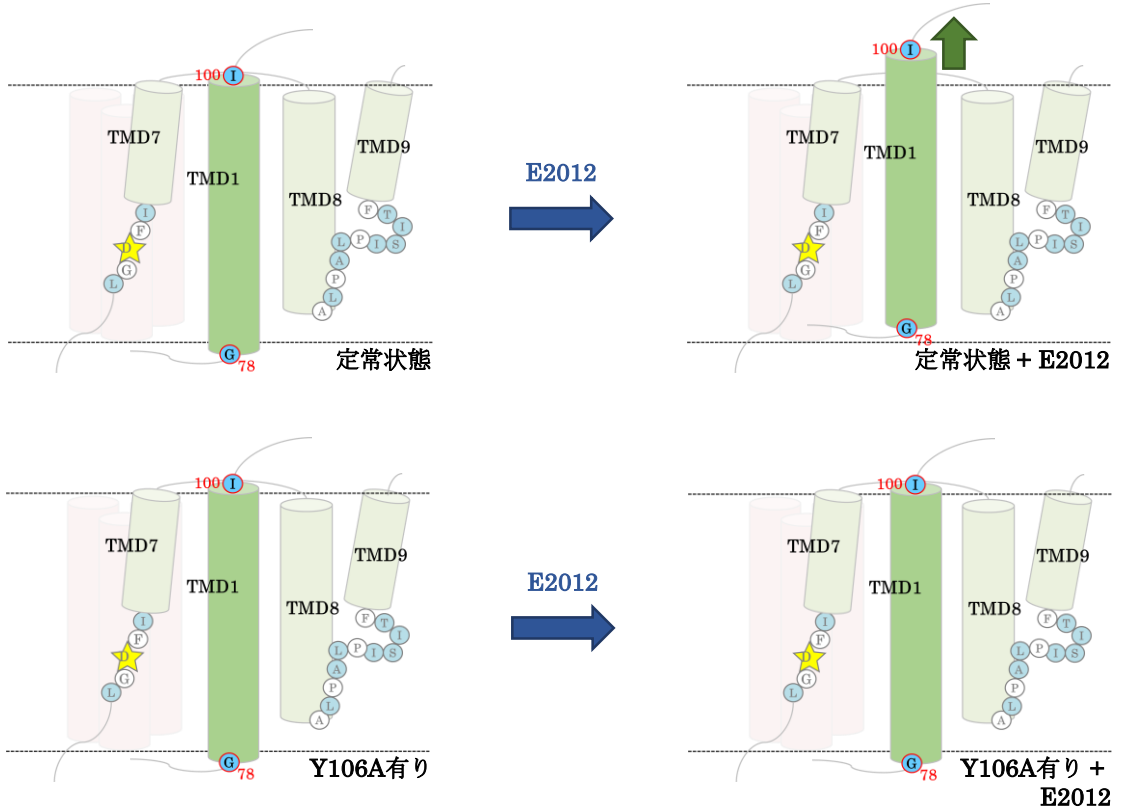
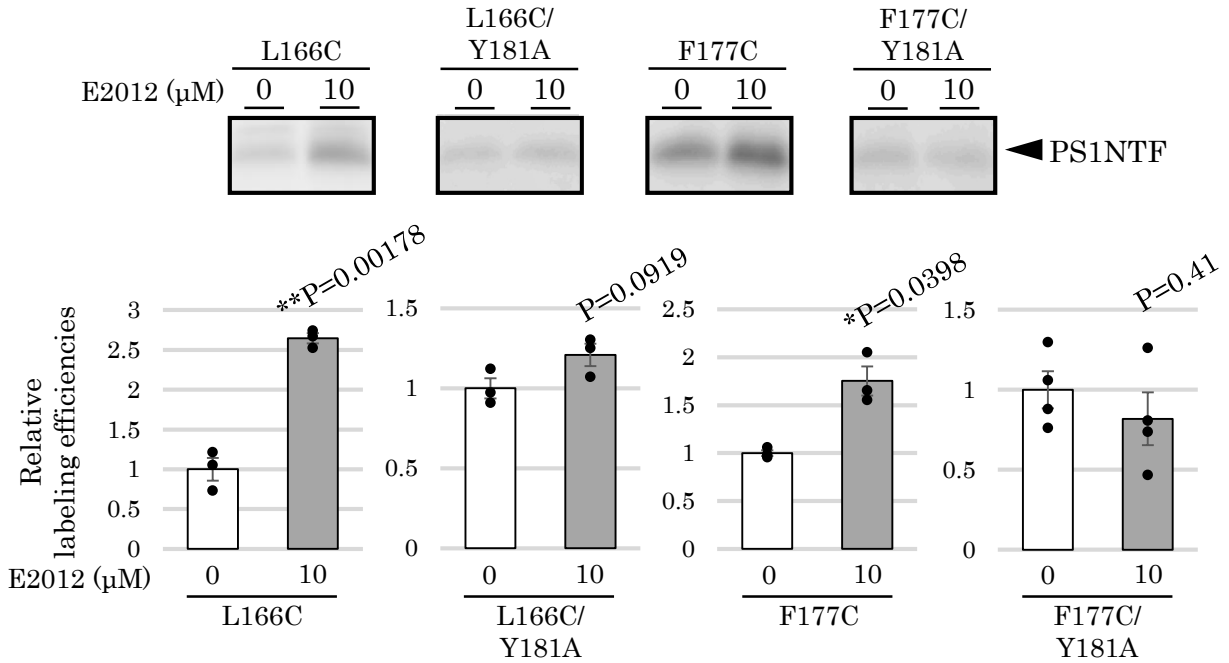


図83. Y106A変異存在下でのE2012によるTMD1の垂直運動の検出

- A. E2012による垂直運動の変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある (n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 垂直運動の変化の模式図。

A



B

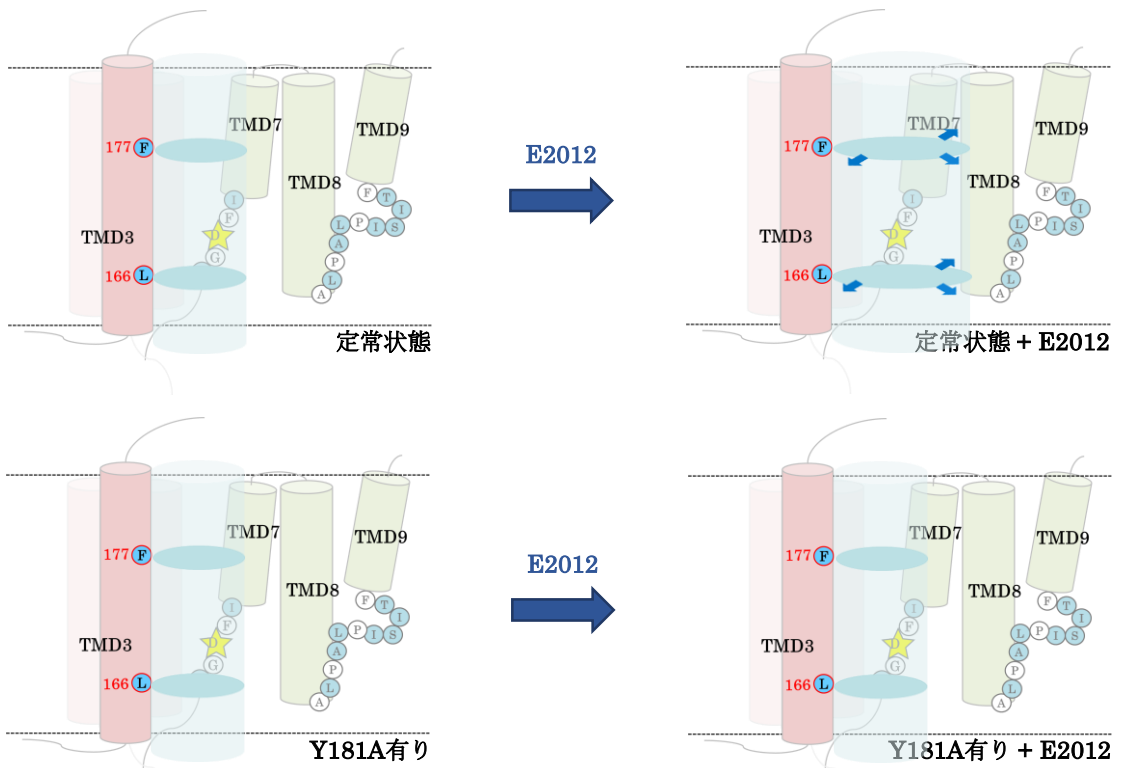
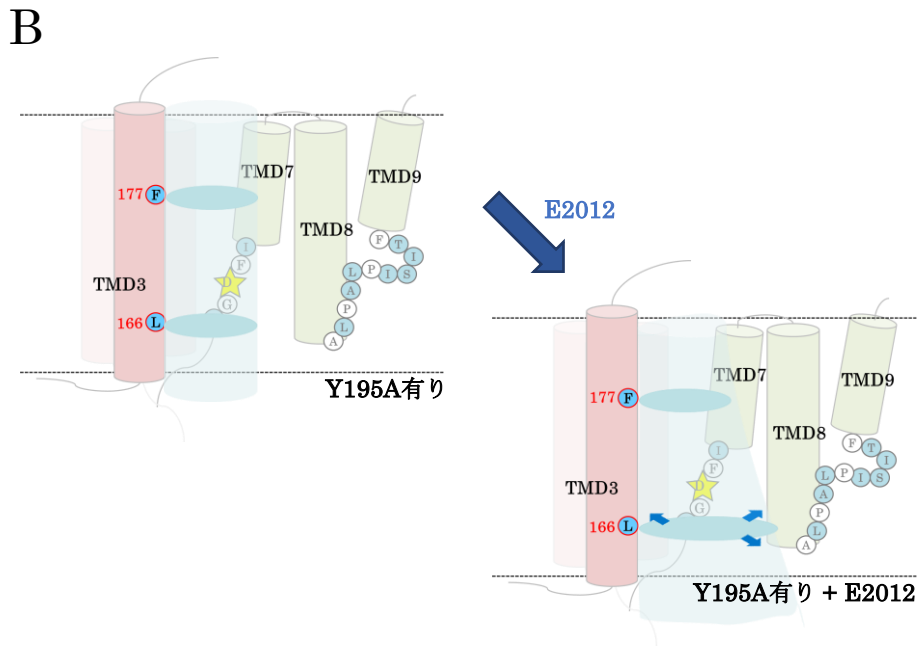
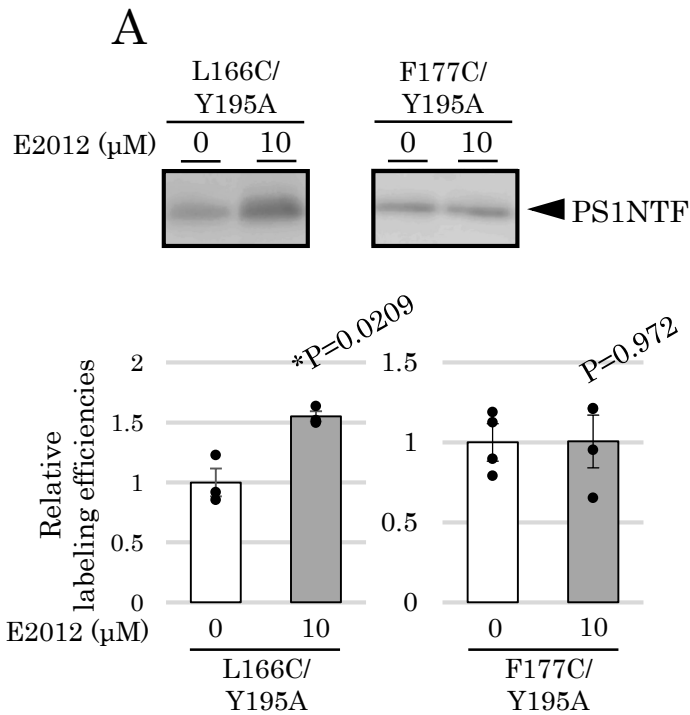


図84. Y181A変異存在下でのE2012によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

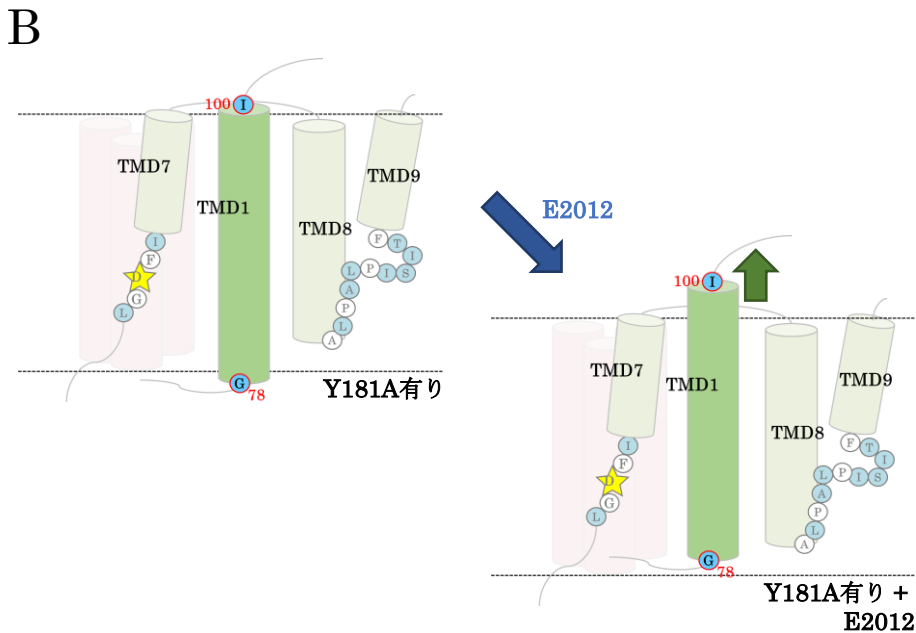
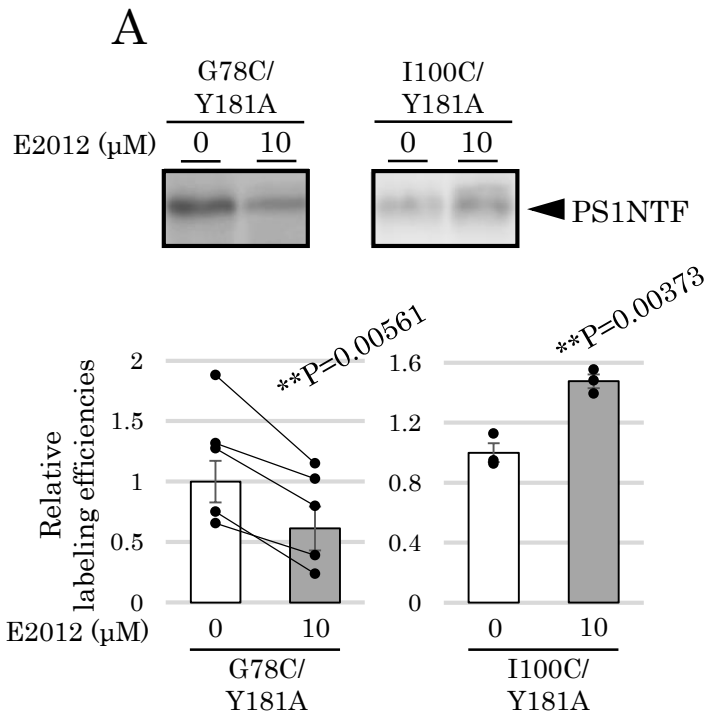
- A. E2012による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3 ~ 4; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。





**図85. Y195A変異存在下でのE2012によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動**

- A. E2012による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3 ~ 4; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



**図86. Y181A変異存在下でのE2012によるTMD1の垂直運動の検出**

- A. E2012による垂直運動の変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある (n = 3 ~ 5; mean ± SEM; compared with each control group by paired Student *t*-test for G78C/Y181A and Student *t*-test for I100C/Y181A)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 垂直運動の変化の模式図。

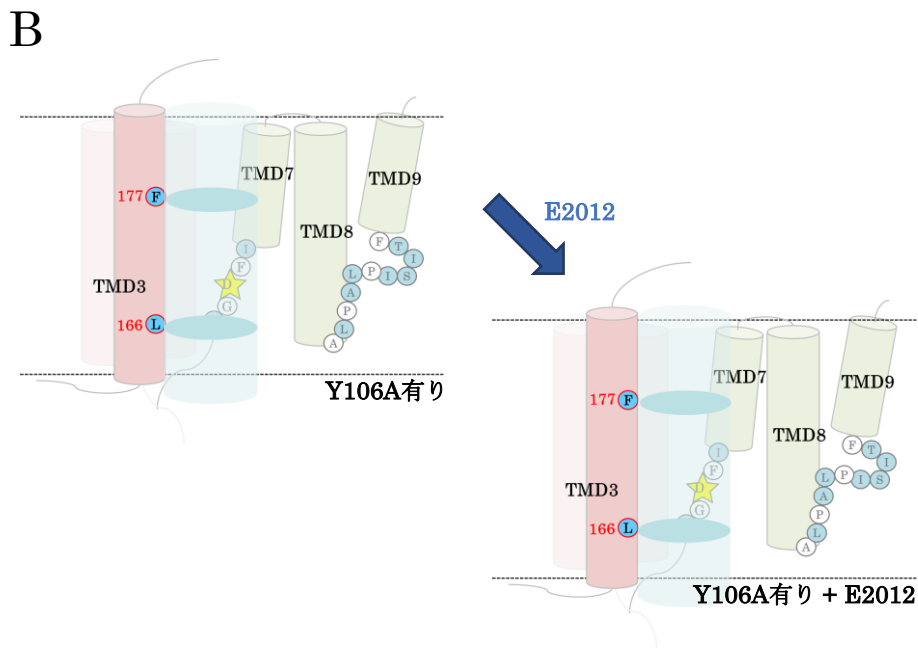
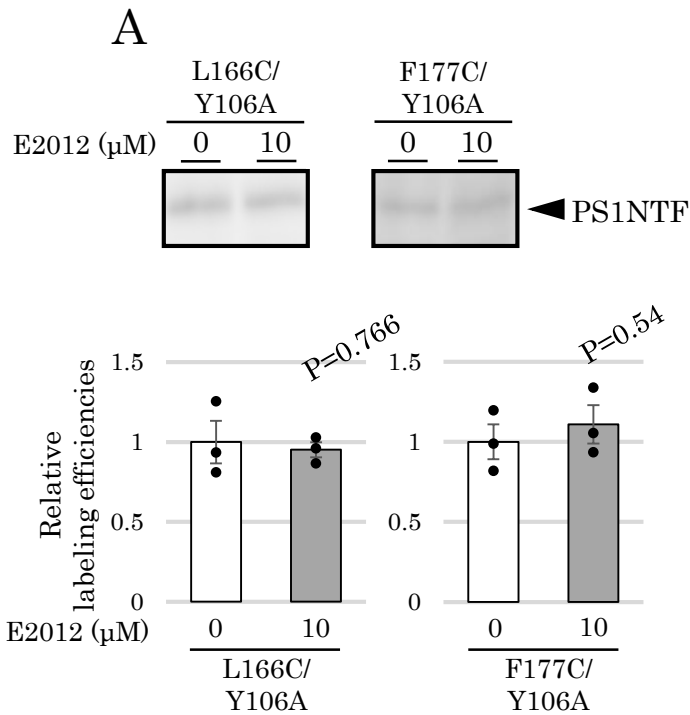
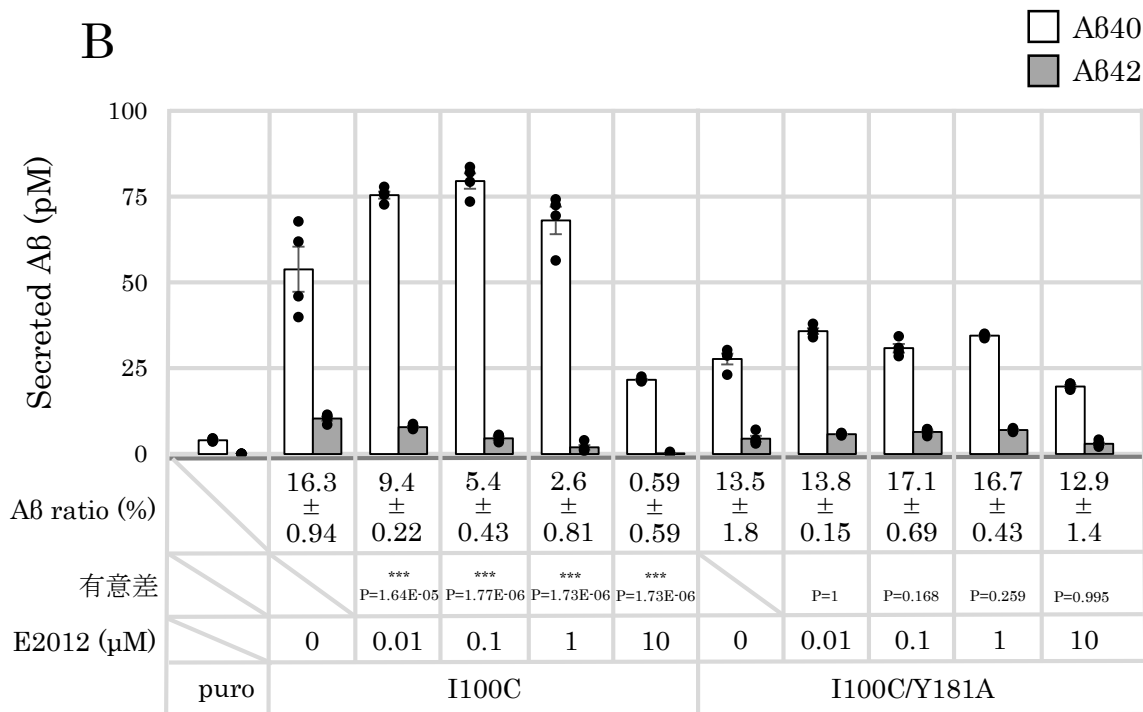
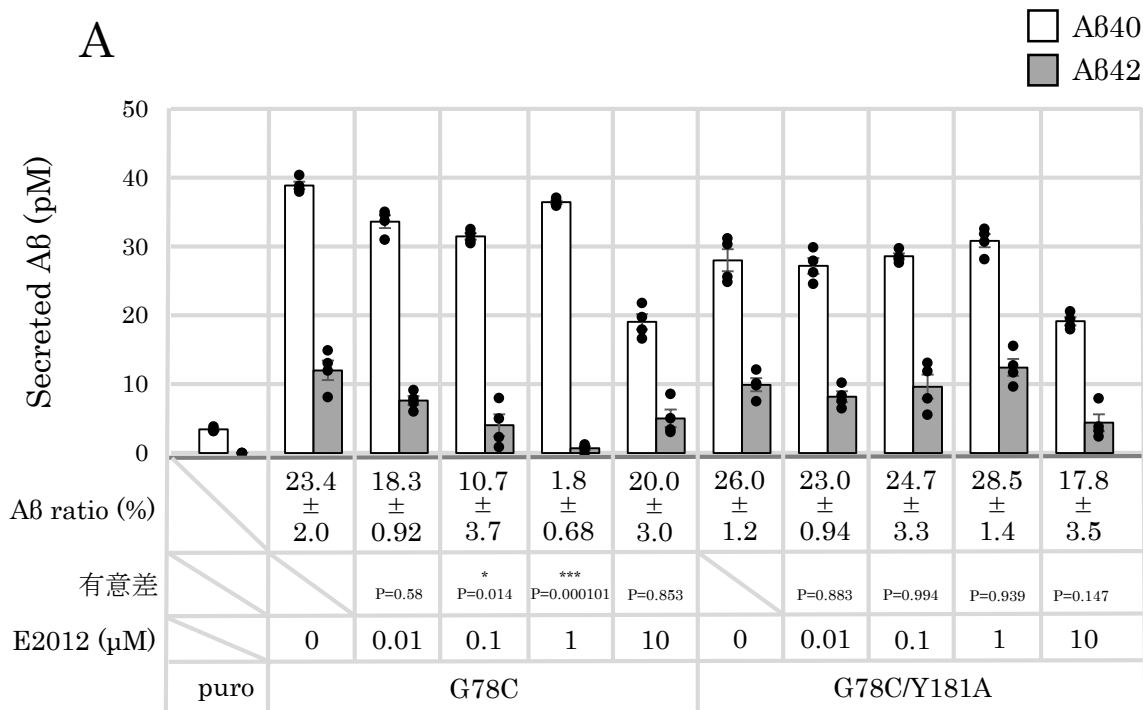


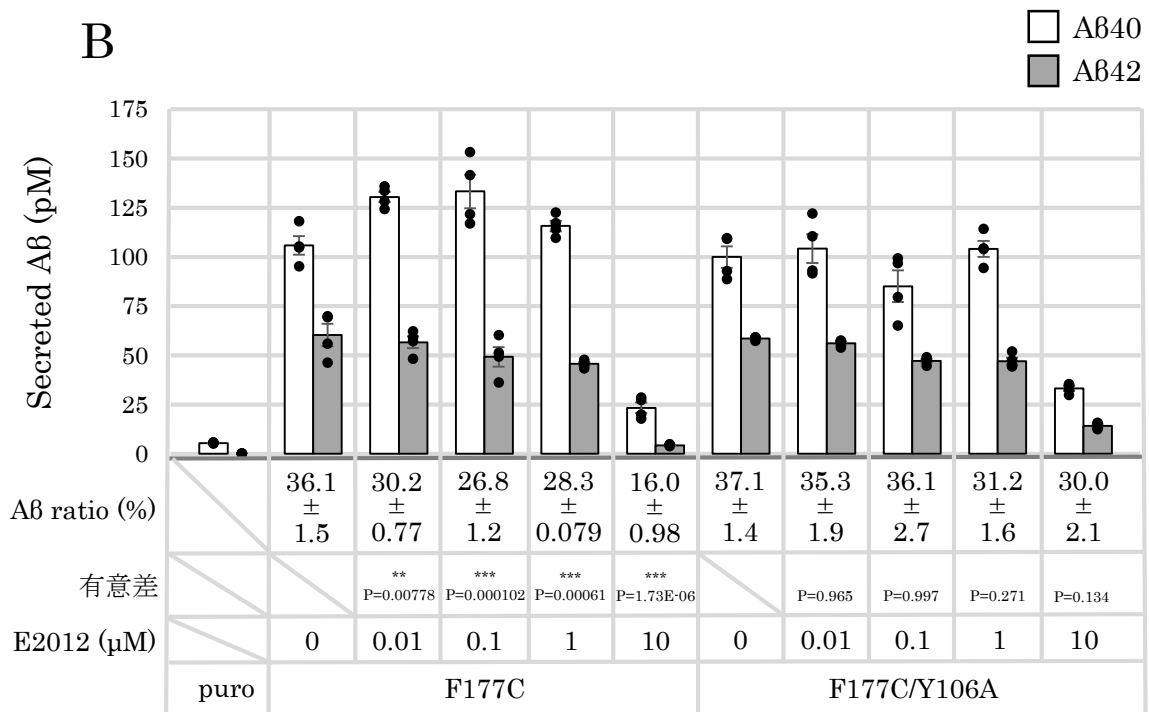
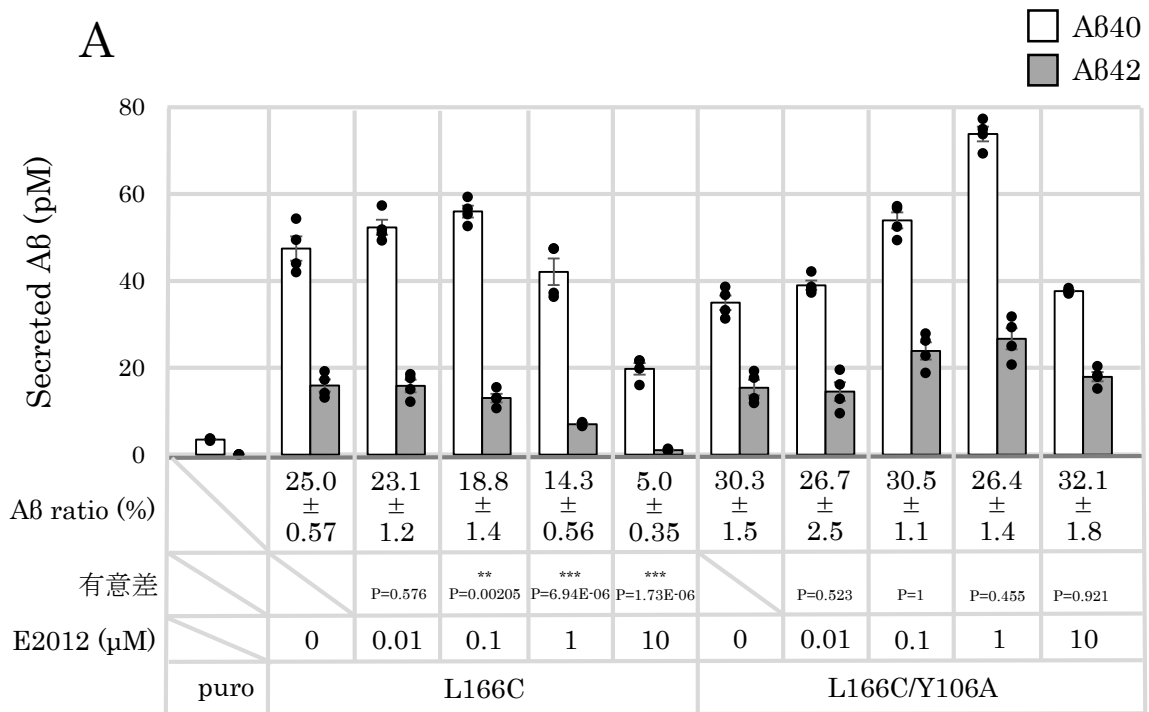
図87. Y106A変異存在下でのE2012によるTMD3周囲の活性中心ポアの変動

- A. E2012による活性中心ポアの変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 活性中心ポアの変動の模式図。



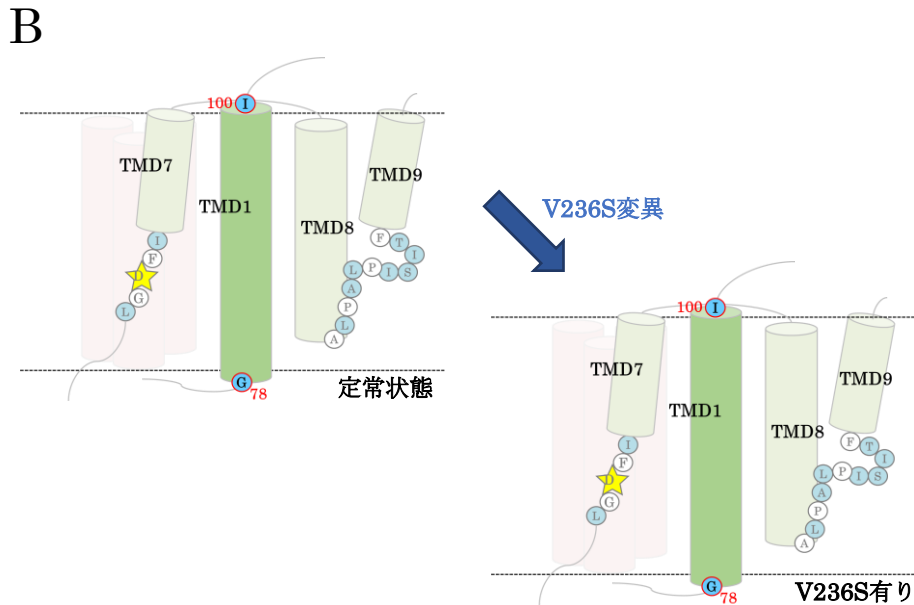
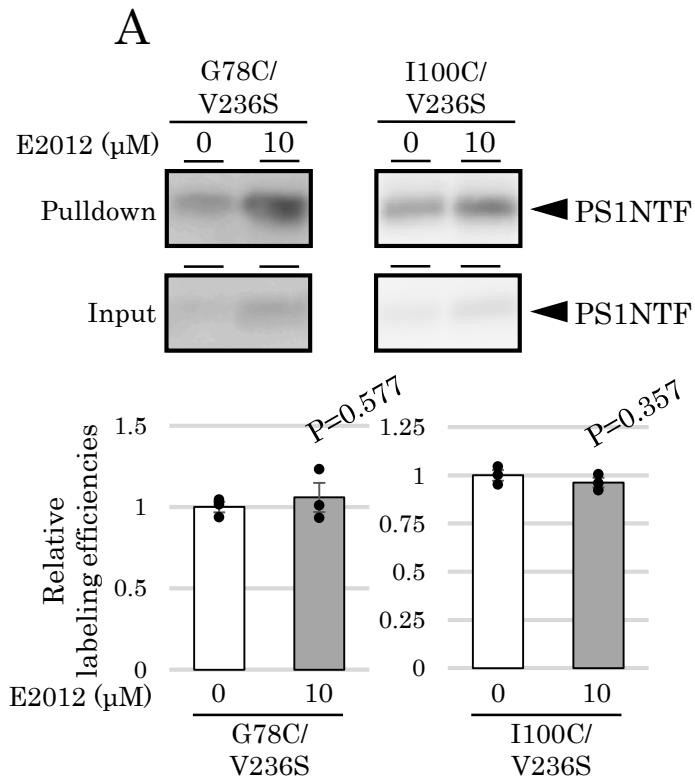
**図88. E2012の薬理効果(G78C、G78C/Y181A、I100C、I100C/Y181A PS1 Mt)**

- A. 本検討で用いたE2012のG78C、G78C/Y181A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各種G78C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。
- B. 本検討で用いたE2012のI100C、I100C/Y181A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各種I100C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。



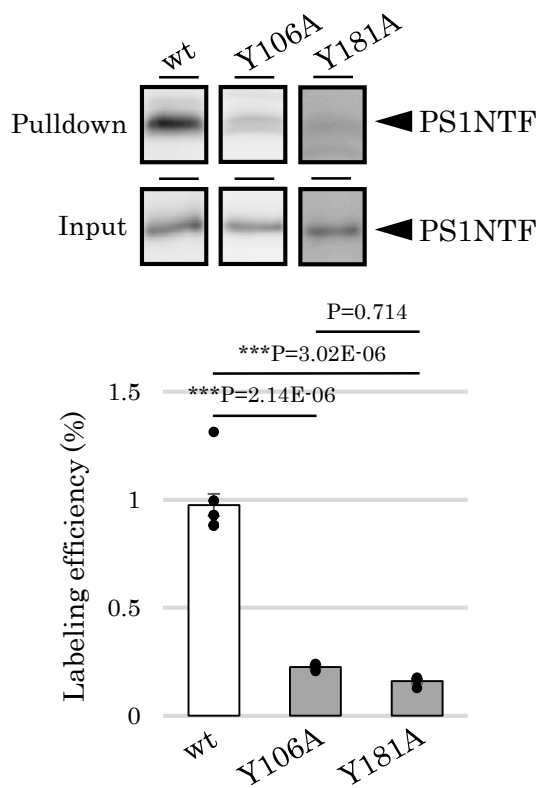
**図89. E2012の薬理効果(L166C、L166C/Y106A、F177C、F177C/Y106A PS1 Mt)**

- A. 本検討で用いたE2012のL166C、L166C/Y106A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各種L166C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。
- B. 本検討で用いたE2012のF177C、F177C/Y106A PS1 Mtに対する薬理効果。DKONL細胞に各種F177C single Cys PS1 Mtを過剰発現させ、培養上清中に分泌したAβ40及びAβ42量をELISAによって測定した。Aβ ratio = Aβ42/(Aβ40 + Aβ42)で算出した(n = 4; mean ± SEM; compared with each control group by Tukey test)。



**図90. V236S変異存在下でのTMD1の垂直運動の検出**

- A. V236S変異による垂直運動の変化。DKO細胞に各種single Cys PS1 Mtをstableに過剰発現させ、SCAMで各部位の親水性の変化を検出した。定量結果は各control群で規格化してある(n = 3; mean ± SEM; compared with each control group by paired Student *t*-test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。
- B. 垂直運動の変化の模式図。



**図91. PALによるY106A、Y181A PS1 MtへのE2012結合能の測定**

DKO細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得してcrosslinkした後、PALのバンド強度を定量した(n = 3 ~ 8; mean ± SEM; compared by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。

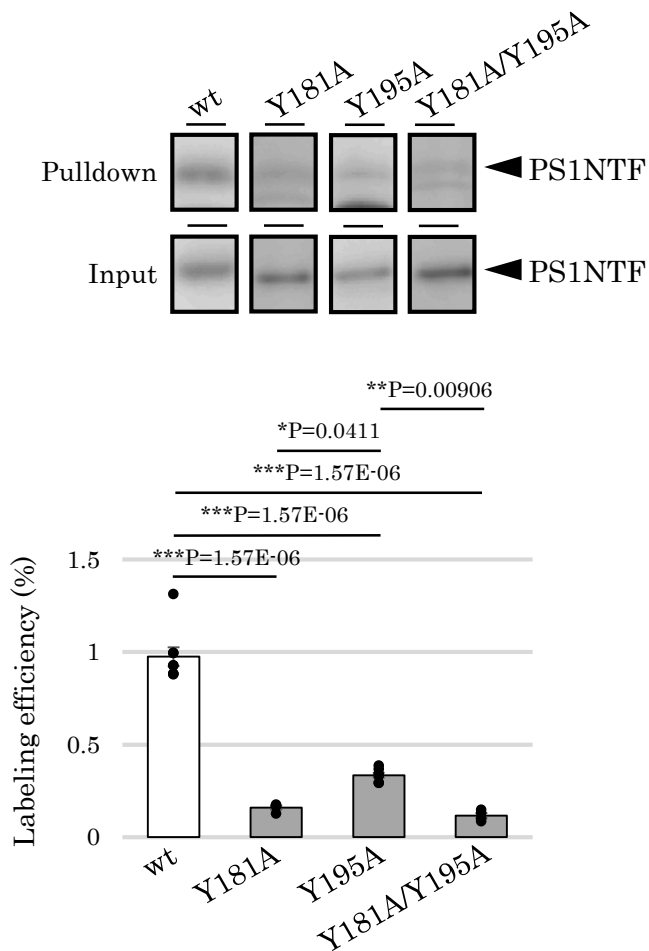


図92. PALによるY181A、Y195A、Y181A/Y195A PS1 MtへのE2012結合能の測定

DKO細胞に各種PS1 Mtを過剰発現させ、可溶化画分を取得してcrosslinkした後、PALのバンド強度を定量した(n = 4 ~ 8; mean ± SEM; compared by Tukey test)。Anti-PS1NTF抗体にはG1Nr5を用いた。



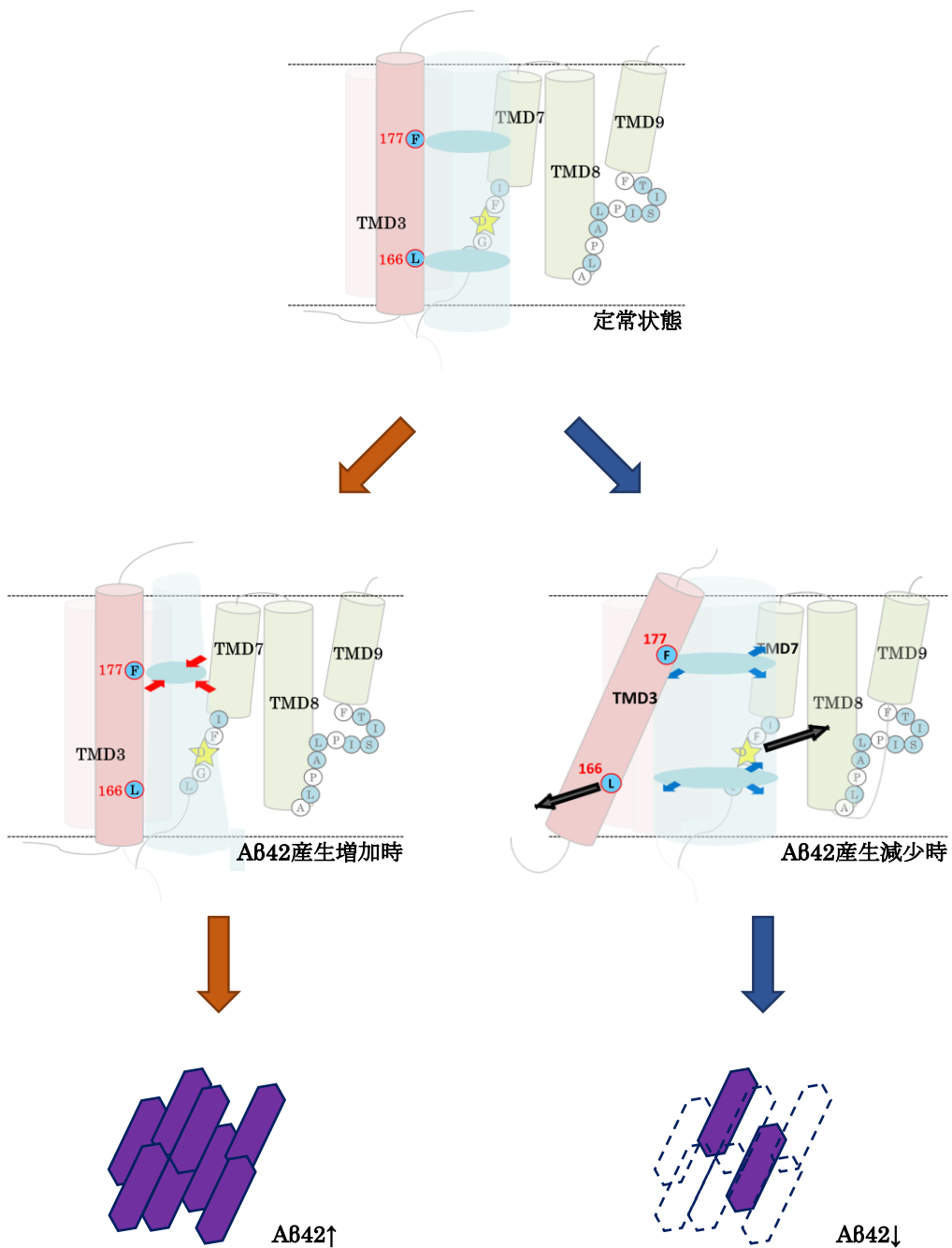


図93. Aβ42産生変動時に引き起こされる構造変化

Aβ42の産生変動とTMD3の構造変化の関連の模式図。一部を除き、Aβ42産生が増加する時にTMD3周囲の特に内腔側の活性中心ポアが縮小し、親水性が減少する。Aβ42産生が減少する時にTMD3周辺の活性中心が原則的に全体的に拡大し、親水性が増加する。なお、この時細胞質側のポアの変動はTMD3と活性中心Aspの距離が増大することで制御されている。

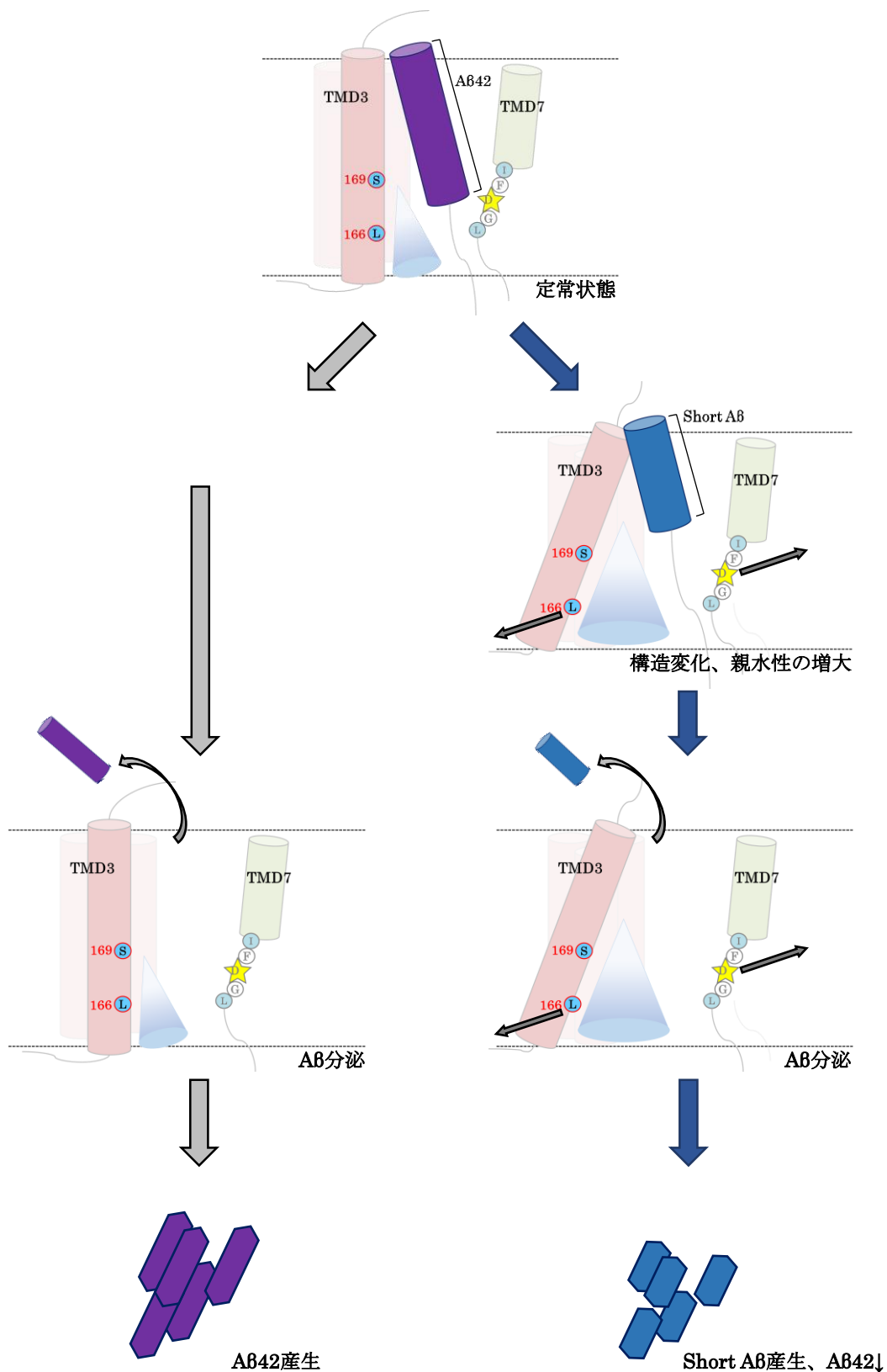


図94. TMD3周囲の親水性増大による基質不安定化

TMD3細胞質側の活性中心ポアの拡大による基質不安定化、及びAβ42産生低下メカニズムの模式図。TMD3と活性中心Aspの距離が広がるとS169を含むTMD3細胞質側の親水性が増加し、基質のhelix構造を不安定化して解き、Aβ42を更に切り進める。

## 謝辞

初めに、本研究を遂行するにあたり、6年間熱心にご鞭撻頂きました東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室 富田泰輔教授に厚く御礼申し上げます。富田先生には実験に於ける基本的な姿勢からサイエンスのディスカッションの仕方、更には研究生活についても様々ご指導いただきました。シカゴでの貴重な体験は私の一番の思い出です。

機能病態学教室の方々には大変お世話になりました。

師匠として研究の手技を教えて下さった森島果南学士に深く感謝いたします。また、森島学士の卒業後は、伊藤特任講師、堀講師、高鳥助教、樽谷特任助教には実験に於ける様々な手法や知識をご享受頂きました。心から感謝いたします。

更に、6年間研究を遂行するにあたり、多くのことをご指導頂き、また支えて下さった同研究室の方々（木棚博士、宮川博士、入江さん、栗谷さん、鈴木さん、金津博士、建部博士、名尾博士、小島修士、黒田修士、塩原修士、塚田学士、湯本修士、木村新吾学士、海老沼博士、徐寧博士、劉修士、田村修士、三浦学士、山下学士、飯田修士、王修士、小座間修士、小澤修士、邱修士、鶴谷修士、長友修士、畑野修士、松田修士、吉澤修士、荒木修士、須藤修士、根本修士、野中修士、藤田修士、吉田修士、芳永学士、井口学士、鈴木学士、横山学士、伊藤学士、佐藤学士、熊学士、徐楽佳学士、鵜巢学士、三谷学士、宗藤学士、鶴川君、竹本君、長井さん、中村君、山根君）に心より感謝いたします。先輩後輩問わず皆さんから研究に対する重要なアドバイスとご指摘をたくさん頂けたこと、そしてこれだけ優秀な人材に囲まれた6年間を過ごすことが出来たこと、大変幸せに思います。

そして、共に苦しみ、支えてくれた同期の菊池一徳修士、木村美咲修士、そして松崎将也学士に感謝致します。菊池修士からはサイエンスに対する柔軟な姿勢を、木村修士からは研究に対する不断の努力の姿勢を、そして松崎学士からは人間的な成長を学ぶことが出来ました。心より感謝します。

最後に、如何なる時も支えてくれた父、母、弟、祖母、そして天国の祖父に感謝いたします。

2020年（令和2年）2月