

正常脳およびアルツハイマー病脳の神経形態形成における アクチン骨格制御因子

土谷大樹

Roles of actin cytoskeleton-regulating factors on neuronal development and pathogenesis of Alzheimer's disease

Daiju Tsuchiya

ABSTRACT

The actin cytoskeleton plays a critical role in the cellular morphological changes. Its organization is essential for neurite extension and synaptogenesis under the processes of neuronal development. Recently, N-WASP and WAVE have been identified as key molecules, which specifically participate in regulation of actin cytoskeleton through small GTPases. The functions of these factors have been investigated using cultured cells; however, in vivo developmental changes in these factors and roles of those in neuropathologies are not fully understood. In this article, we show the results of our studies on these factors in developing and Alzheimer's brains, and discuss the roles of those on neuronal development and neuropathogenesis.

はじめに

神経細胞における糸状仮足や葉状仮足の形成は神経系の発達初期段階や成熟段階などで顕著に認められ、シナプス形成や可塑性に必須であると考えられている¹⁾。このような細胞の動的な形態形成は、細胞内部の細胞骨格により規定される。細胞骨格のうちアクチン骨格の制御に低分子量 G 蛋白質 Ras-homologous member (Rho) ファミリーの関与が示されている²⁾。培養細胞を用いた研究により Rho ファミリーのうち、cell-division cycle 42 (Cdc42) および Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) がアクチン骨格の再構築を制御することで糸状仮足や葉状仮足の形成を誘導することが示された^{3,4)}。さらに近年、Cdc42 や Rac1 に下流で作用するエフェクター分子としてウィスコット・アルドリッチ症候群蛋白質 (Wiskott-Aldrich

syndrome protein ; WASP) ファミリーが同定された。WASP ファミリーの一つ neural WASP (N-WASP) は Cdc42 の下流で主に糸状仮足の形成に働き⁵⁾、同じく WASP ファミリーである WASP family verprolin-homologous protein (WAVE) は Rac1 の下流で主に葉状仮足の形成に関与する⁶⁾。また *in vitro* 再構成実験から、N-WASP は Cdc42 やホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) により活性化され、7つのサブユニットから構成される actin-related protein 2 and 3 (Arp2/3) 複合体を活性化し、この Arp2/3 複合体を介してアクチン重合を促進することが明らかとなった⁷⁾。さらに WASP 関連蛋白質として WASP interacting SH3 protein (WISH) が Cdc42 非依存的に N-WASP を活性化させ、糸状仮足の形成を促進することも示された⁸⁾。一方、WAVE は通常、高分子量の活性抑制蛋白質複合体と結合することによりその活性が抑制されているが、Rac1 や他の因子が WAVE に結合すると抑制蛋白質複合体が乖離し、WAVE が活性化される。この結果、アクチン重合が促進されることで葉状仮足の形成を誘導すると想定されている^{9,10)}。このようにアクチン関連因子は細胞の形態形成に深く関わっていることから、神経系におけるその機能を解析することにより神経発芽現象や神経形態形成に関わる知見が得られると考えられる。しかし、アクチン関連因子の機能は主に培養細胞を用いて研究されており、生体内でもショウジョウバエや線虫を用いた解析がごく少数報告されているが、*in vivo* における解析は現在のところ行われていない。また、これらの因子とヒトの病態、特に神経疾患との関連性についても不明である。神経系における細胞形態の異常は神経回路網の機能失調、さらには認知機能や精神機能といった脳高次機能が障害されると考えられる。脳高次機能障害と細胞形態の異常が関連すると考えられる疾患の一つとしてアルツハイマー病 (AD) が挙げられる。

急速に進む現代の高齢化社会において深刻な問題となっているアルツハイマー病 (AD) は、記憶力の低下、見当識障害、失語、判断力の低下、行動障害等を随伴し、最終的には寝たきり状態に陥る進行性の神経変性疾患である。近年、AD 発症患者数は増加の一途をたどっており、予防・治療法を確立するために、病因の解明や早期診断法の確立、さらに治療戦略の考案が急務である。AD 脳の病理学的特徴として、多数の老人斑の形成および神経原線維変化の出現、さらに神経細胞死に伴う顕著な脳萎縮が挙げられる。その他の変化として、神経異常発芽やシナプスの機能障害が挙げられるが、これらの病的変化が AD 病態進行の本質を担っていると考えられる。しかしながら、異常発芽のメカニズムやさらにシナプス構造の破綻に至るメカニズムに関する研究はほとんど行われていない。このような背景のもと、我々は正常脳発達時および AD 脳内に見られる神経異常発芽および異常形態形成における形態形成に関わる因子の役割について解析した。本稿では我々の解析結果ならびにこの研究領域における近年の研究の動向をふまえて、形態形成と脳発達および AD との関連性について考察したい。

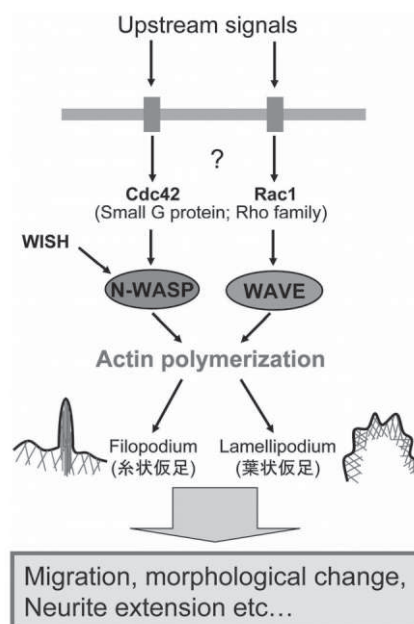


Fig.1. Putative mechanism of actin cytoskeleton regulation by Rho and WASP families.

(1) ラット脳の正常発達過程および老化におけるアクチン関連因子の解析

ヒトの中枢神経系は 1000 億個もあるといわれている多様な神経細胞により高度に組織化されたネットワークである。その機能は神経細胞によって構築される複雑な神経ネットワークのはたらきによって支えられている。神経細胞は他の種類の細胞には認められない非常に複雑な細胞形態を有しているが、機能的な神経ネットワークの構築のためには、適切な時期および方向に神経細胞体から神経軸索や樹状突起が発芽し、正しく伸長することが必須である¹¹⁾。この神経解剖学的な形態形成は、微小管やアクチン骨格など細胞内部の細胞骨格系により制御されている¹⁾。

アクチン骨格は様々な細胞外刺激によって起こる応答のうち細胞形態の変化に必須な役割を果たしている。また、神経系の成熟や発達の過程において細胞運動や神経突起の伸長、シナプス形成にアクチン骨格が重要である^{12,13)}。神経系の発達過程の初期段階において、伸長しつつある神経突起の先端部分に形成される成長円錐と呼ばれるセンサー様構造体にアクチン骨格が豊富に濃縮される^{14,15)}。成長円錐は運動性に富んだ構造体であり、多数のガイダンス分子の存在を感知して正確な神経投射やシナプス形成を誘導する¹⁴⁾。その先端部分ではアクチン骨格系の再構築が積極的に行われ、糸状仮足および葉状仮足が形成されており、これらの構造が神経突起伸長の方向性と速度を規定していると考えられている¹⁾。したがって、神経細胞におけるアクチン骨格再構築の制御メカニズムを理解することは、神経系の発生や発達、さらには神経形態形成の一端の解明に役立つと考えられる。

近年、アクチン骨格系の制御に、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーおよびその下流で働く

WASPファミリーなどのエフェクター分子の関与が示されている。これらの分子による制御メカニズムは培養細胞を用いて示されたものであり、*in vivo* 脳における解析は全く行われていなかった。ここでは、ラット脳を用いて、神経発芽や神経細胞の形態変化が顕著に認められる *in vivo* 正常脳発達時におけるアクチン関連因子の役割について解析した¹⁶⁾。

1. 脳発達過程におけるアクチン関連因子の蛋白質量の変動

生後0日齢から16週齢のラット脳発達過程におけるアクチン関連因子の脳内蛋白質量の変動を解析するため、大脳皮質および海馬から可溶性分画および細胞膜分画をそれぞれ調製し、イムノブロットング法で解析した (Fig. 2)。大脳皮質のN-WASP、WISH、WAVE、Cdc42およびRac1の蛋白質量は、細胞膜分画において脳発達とともに増加した。一方、アクチンは脳発達に伴う可溶性分画から細胞膜分画へのトランスロケーションが認められた。大脳皮質および海馬のそれぞれのアクチン関連因子の蛋白質量変動の傾向はほぼ同様だった。

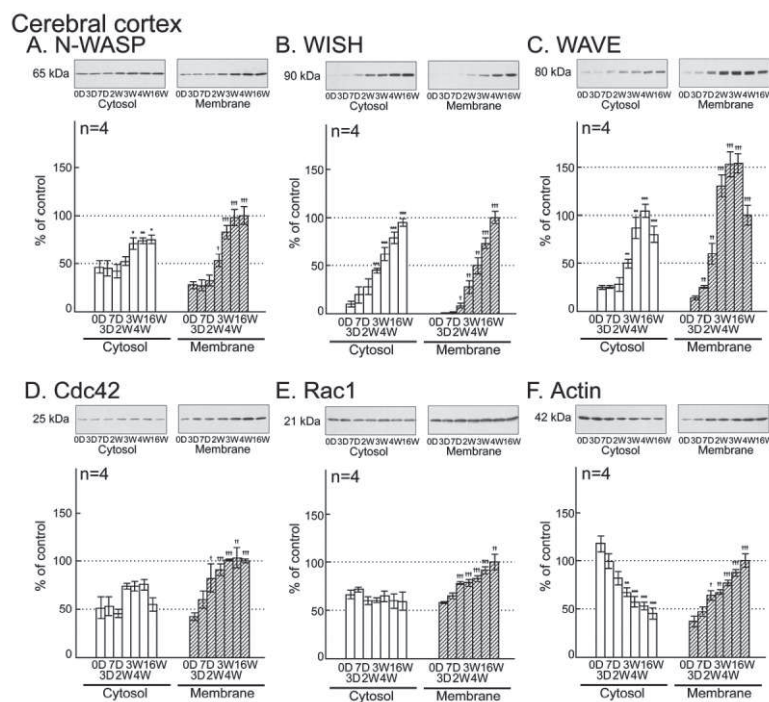


Fig. 2. Developmental changes in protein expression of actin-related factors in the rat cerebral cortex. The cytosolic and membranous fractions of cerebral cortices (age: 0 and 3 days, 1, 2, 3, 4 and 16 weeks) were subjected to immunoblot analysis (upper panels) of antibodies against N-WASP (A), WISH (B), WAVE (C), Cdc42 (D), Rac1 (E) and actin (F), and then the protein bands of N-WASP, WISH, WAVE, Cdc42, Rac1 and actin were assessed (lower panels). Each value is the mean \pm S.E.M. of four rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the cytosolic fraction of 0-day-old rats. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$ vs. the membranous fraction of 0-day-old rats.

N-WASP や WAVE は細胞膜直下にリクルートされ、そこで Cdc42 や WISH、Rac1 により活性化され、糸状仮足や葉状仮足の形成といった膜のダイナミックな変化を誘導することが報告されている^{6-8,17,18}。また、アクチンは伸長神経突起先端部位の成長円錐に豊富に含まれており、N-WASP などにより活性化された Arp2/3 複合体を介して重合され、アクチン骨格を形成する^{15,19}。これらのことから、N-WASP や WAVE などアクチン関連因子は成熟しつつある神経細胞の細胞膜に集積し、そこでアクチン骨格の形成を促進することで、神経ネットワークの形成や成熟に働くことが示唆される。

2. 生後2週齢および16週齢海馬 CA1 領域－歯状回領域の層構造におけるアクチン関連因子およびシナプス関連蛋白質の局在

脳発達過程において最も顕著な変化が認められる脳部位の1つとして海馬が知られている。そこでラットの海馬 CA1 領域－歯状回領域の層構造におけるアクチン関連因子およびシナプス関連蛋白質の免疫反応性の局在パターンを解析した。ラット右側海馬 CA1 領域－歯状回領域の模式図を Fig. 3 に示している。

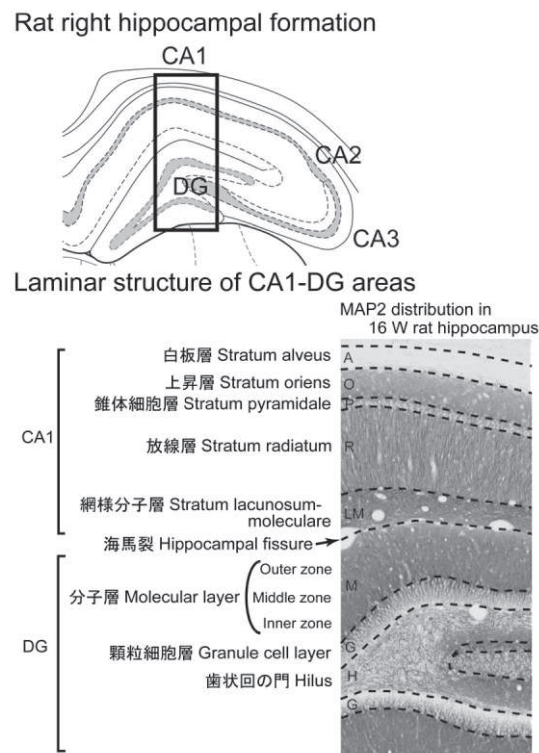


Fig. 3. Laminar structure of rat right hippocampal CA1-dentate gyrus (DG) areas.

まず、2週齢ラット海馬層構造において各蛋白質の局在を比較・解析した (Fig. 4)。生後2週齢ラット海馬層構造において、Cdc42、WISH、N-WASP、Rac1 および WAVE は GAP43 やシナプトフィジンの免疫反応性の陽性領域に局在しており、NMDAR1 の免疫反応性陽性領域とは比較的に対照的な局在を示すことが明らかとなった。

さらに脳成熟段階である生後16週齢ラット海馬層構造において各蛋白質の局在を解析した (Fig. 5)。この段階において、より明瞭な神経構造へ発達していた。CA1 領域の錐体神経細胞は基底樹状突起を上昇層へ、先端樹状突起を放線層および網状分子層へ投射している。CA3 領域から CA1 領域へ投射されるシャッフアー側枝 (Schaffer collaterals) はグルタミン酸作動性の神経軸索で、上昇層や放線層において錐体神経細胞や GABA 作動性のインターニューロン (バスケット細胞や重層状細胞) の樹状突起叢とシナプスを形成している。一方、嗅内皮

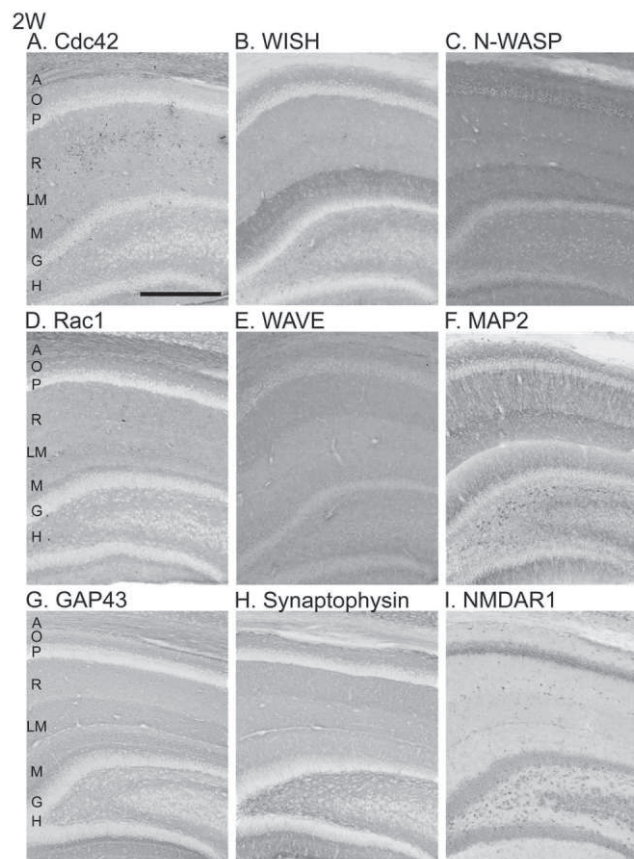


Fig. 4. Immunohistochemical localization of actin-related factors and synaptic proteins in 2-week-old rat hippocampal laminar structures in CA1 and DG areas. Immunoreactivities for Cdc42 (A), WISH (B), N-WASP (C), Rac1 (D), WAVE (E), MAP2 (F), GAP43 (G), synaptophysin (H) and NMDAR1 (I) in hippocampal areas of 2-week-old rat brain are shown at high magnification. Abbreviations: strata alveus (A), oriens (O), pyramidale (P), radiatum (R), lacunosum-moleculare (LM) of CA1, and molecular layer (M), granule cell layer (G), hilus (H) of DG. Scale bar = 400 μ m.

質から CA1 領域へ投射される神経軸索は網状分子層においてシナプスを形成する。インターニューロンも錐体神経細胞とシナプスを形成する。さらに、成熟段階の CA1 領域放線層の厚さは2週齢脳と比較して約2倍になったことから、脳発達の過程で放線層領域では顕著に

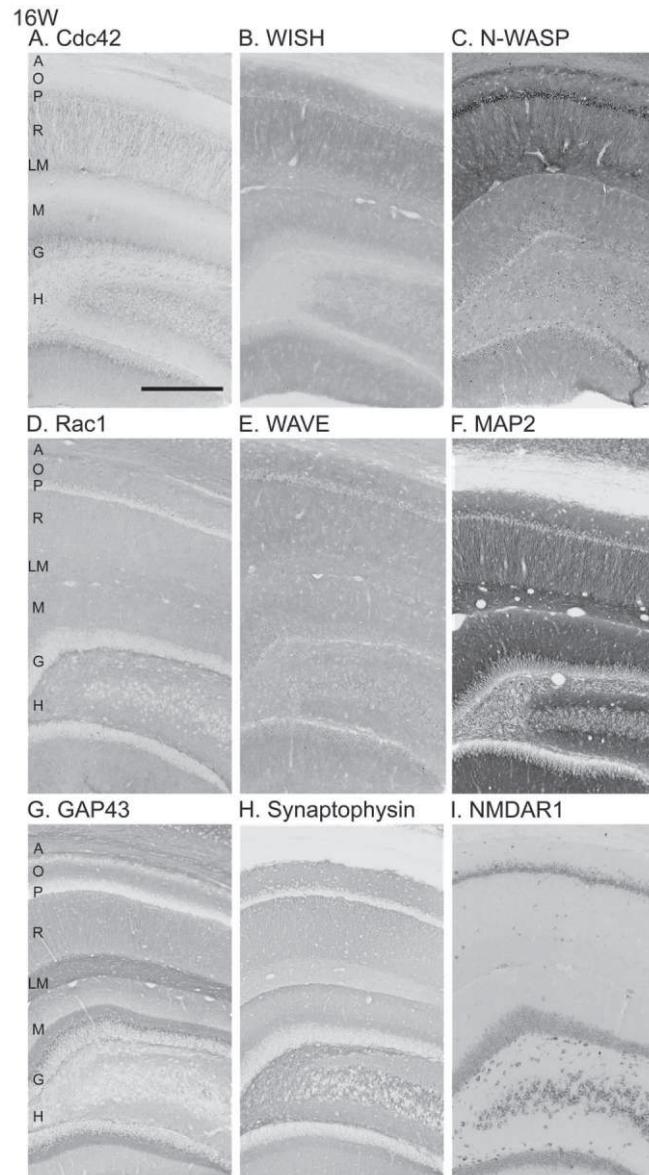


Fig. 5. Immunohistochemical localization of actin-related factors and synaptic proteins in 16-week-old rat hippocampal laminar structures in CA1 and DG areas. Immunoreactivities for Cdc42 (A), WISH (B), N-WASP (C), Rac1 (D), WAVE (E), MAP2 (F), GAP43 (G), synaptophysin (H) and NMDAR1 (I) in hippocampal areas of 16-week-old rat brain are shown at high magnification. Abbreviations: strata alveus (A), oriens (O), pyramidale (P), radiatum (R), lacunosum-moleculare (LM) of CA1, and molecular layer (M), granule cell layer (G), hilus (H) of DG. Scale bar = 400 μ m.

シナプスが形成されることが考えられる。成熟ラット海馬層構造において、N-WASP および WAVE は少なくともそれぞれの関連因子の免疫反応性陽性領域に局在し、さらにプレシナプス蛋白質の局在と部分的に類似した局在を示すことが明らかとなった。

さらに、初代培養神経細胞を用いて、糸状仮足様の神経突起における WASP 関連蛋白質の分布と局在を解析した (Fig. 6)。N-WASP、WISH および WAVE は培養神経細胞において、少なくとも線維状アクチンに富む糸状仮足様の伸長神経突起先端部位で線維状アクチンと共存することが分かった。

3. 考察：脳発達とアクチン骨格制御因子

2 週齢ラット脳において N-WASP、WISH、WAVE、Cdc42、Rac1 の免疫反応性はお互いに分布が類似しており、GAP43 やシナプトフィジンの局在とも比較的類似していた。一方、これらの蛋白質は NMDAR1 の局在とは対照的な局在を示していた。CA1 領域の放線層では、N-WASP、WISH および WAVE の免疫反応性は GAP43 やシナプトフィジンと同じくニューロピルに認められた。さらに、CA1 領域で WISH と GAP43 の共局在が認められた。GAP43 は主にプレシナプス末端に発現しており、シナプトフィジンは主にシナプス小胞に含まれており、共にシナプスの機能や可塑性に関与していると考えられている²⁰⁻²²。GAP43 は成長円錐にも豊富に存在しており、神経突起伸展に関わることが知られている^{15,23}。対照的に、グルタミン酸受容体のサブユニットの1つである NMDAR1 はポストシナプス蛋白質として知られている²⁴。一方、多くの研究により、Rho ファミリーがアクチン骨格を制御することで神経発芽や軸索ガイダンス、シナプスの形成などの一連の過程の全ての段階において関与する

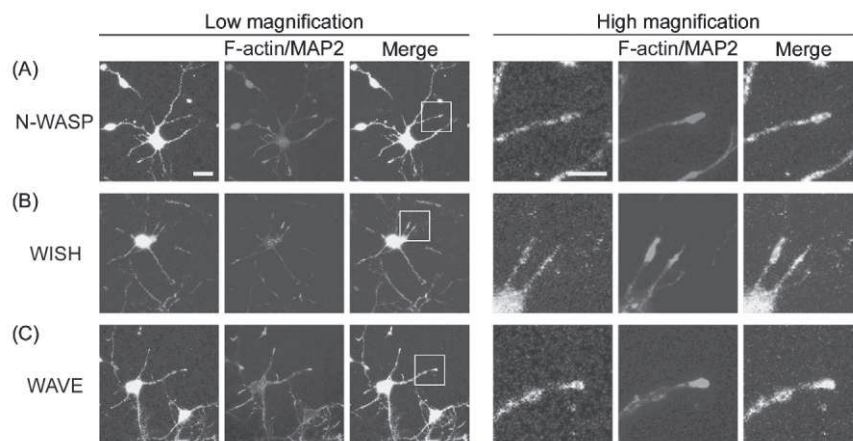


Fig. 6. Distributions of N-WASP, WISH and WAVE in rat cultured neurons. Neurons were immunocytochemically analyzed using an antibody against N-WASP (A), WISH (B) or WAVE (C). Fluorescence for F-actin labeled by phalloidin and MAP2 labeled by the antibody was also observed simultaneously. Filopodial structures of a neuron are shown at high magnification. Scale bars = 20 μ m in low magnification images, 10 μ m in high magnification images.

ことが明らかになりつつある^{3,12)}。培養神経細胞において、N-WASPが突起伸展に必須であること²⁵⁾やWAVEが成長円錐や樹状突起のスパインに存在すること^{26,27)}も報告された。事実、本解析において、N-WASP、WISHおよびWAVEが培養神経細胞の糸状仮足様突起で線維状アクチンと共存することを確認した。したがって、WASP、WAVEおよびその関連因子はシナプスに局在しており、シャッファー側枝の軸索末端など少なくともプレシナプス部位に局在していることが示唆される。一方、CA1領域放線層においてN-WASPおよびWISHの免疫反応性は樹状突起にも認められた。本解析ではNMDAR1は錐体神経細胞や顆粒神経細胞の細胞体に限局した局在を示していたが、他のいくつかのグルタミン酸受容体サブユニットは放線層の樹状突起を含む海馬の多くの場所で発現していることが報告されている²⁸⁻³⁰⁾。錐体神経細胞や顆粒神経細胞の樹状突起の表面には大量のスパインが形成されており、そこで軸索とシナプスを形成し、グルタミン酸作動性入力を受け取る¹¹⁾。したがって、N-WASPおよびWISHはポストシナプス側の樹状突起にも局在している可能性が考えられる。また、N-WASP免疫反応性はCA1領域の錐体神経細胞の細胞体および樹状突起にも強く認められたことから、N-WASPは細胞体で生合成された後に神経突起へ輸送される可能性がある。以上のことをまとめて考察すると、N-WASP、WAVEおよびその関連因子は発達段階にある脳において、成長円錐の機能や軸索ガイダンスの制御、樹状突起スパインの形成等を介して、神経突起伸展やシナプス形成に関与することが示唆される。

現在のところ、WAVEは3つのアイソフォームとして同定されている³¹⁾。WAVE2は全身に普遍的に存在しており、特に血管・血球系での発現量が高いが、WAVE1およびWAVE3は主に脳に限局した分布を示し、伸長突起先端部分などに局在する^{26,27,31)}。近年、WAVE1ノックアウトマウスが作成された。WAVE1の欠失により、脳の特に神経線維の豊富な部位(大脳皮質、線条体、脳梁など)の著明な低形成や生後4週間までに死亡すること³²⁾、感覚運動機能の遅滞や学習記憶障害が生じること³³⁾が報告された。このことはWAVE、特にWAVE1が神経ネットワークの正常な成熟や維持、脳容積の増大、さらに脳機能に重要であることを示している。

N-WASPノックアウトマウスも樹立され、N-WASP欠失により胎児期の神経管および心臓の発生に重度の異常が生じ、胎生致死に至ることが示された³⁴⁾。さらに最近、核内N-WASPがRNAポリメラーゼ依存性転写を制御し、HSP90など多くの遺伝子の発現調節に関与することが明らかとなった³⁵⁻³⁸⁾。本解析では発達脳および成熟脳においてN-WASPは神経細胞体および神経突起ともに局在していた。これらのことから、N-WASPは脳内では通常、遺伝子発現を調節することで神経細胞や中枢神経系の機能を維持しているが、脳の発達やシナプス構造のリモデリングなど特殊な条件下においては、細胞骨格系を制御することにより神経系の形態形成や維持に関与しているのかもしれない。

(2) AD脳内の神経異常発芽におけるN-WASP、WISHおよびWAVEの解析

前述のように、ADの特徴的な病理所見として、脳実質における多数の老人斑の形成、神

神経原線維変化の出現、さらには神経細胞の脱落に伴う顕著な脳萎縮が挙げられる。老人斑の主要構成成分は細胞外で線維状に凝集した A β であり、AD 病態形成の初期段階において海馬や大脳皮質に沈着すると考えられている。また A β は老人斑の中心部位であるコアを形成し、神経毒性を有している。また反応性ミクログリアやアストロサイトが老人斑やそのコアを取り囲むように集積している^{39,40)}。このようなことから A β は AD の発症や病理形成に大きく関わっているとされており、実際に世界中で A β をターゲットとした治療戦略の開発が取り組まれている。

一方、神経原線維変化は細胞体や細胞体に近接する神経突起内に認められる細胞内の異常な構造体である。主要構成成分は過剰にリン酸化されたタウ蛋白質であり、これがねじれた対らせん状フィラメント (paired-helical filaments; PHFs) を形成し、さらに神経細胞内で蓄積・凝集することで神経原線維変化が出現すると考えられている。近年、PHFs 形成が神経細胞内の微小管の不安定化に関連することが示された⁴¹⁾。神経細胞内の微小管は軸索輸送などに重要な役割を果たしているため、微小管の機能障害はシナプス構造や神経ネットワークの破綻、さらには栄養分や神経伝達物質の枯渇による神経細胞死や神経症状の発現の大きな一因になると考えられている。

さらに AD 脳内では、神経細胞における異常な糸状仮足様あるいは葉状仮足様の構造体の形成、すなわち神経異常発芽や異常形態形成が認められる⁴²⁻⁴⁴⁾。老人斑のコア周囲には「dystrophic neurites」と呼ばれる変性した軸索や樹状突起が多数含まれており、異常な突起形成や形態異常が顕著に認められる^{45,46)}。また、神経原線維変化とは独立して脳実質全体に散在して認められるニューロピルスレッド (neuropil threads) も神経異常発芽の結果形成されると考えられている⁴⁷⁾。これら異常発芽部位には PHFs が含まれており、他にもシナプス関連蛋白質や神経発芽マーカー蛋白質である GAP43、A β の原料となるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) など多くの分子が共存している^{45,48-50)}。AD 脳の様々な部位における神経異常発芽のパターンも報告されている^{42,47,48,51,52)}。これら神経異常発芽は神経原線維変化と共に、神経細胞死の程度や AD 症状の進行度とよく相関することが知られている⁵³⁾。さらに、AD 脳における著しい神経発芽はシナプス構造の破綻をもたらし、神経機能の障害、ひいては神経細胞死の引き金になる可能性が示唆されているが^{42,50)}、AD 脳内における神経異常発芽からシナプス障害にいたる詳細なメカニズムについては不明である。

近年、我々および他の研究グループにより、AD 病態下ではシナプス関連蛋白質や低分子量 G 蛋白質群の量的変動が生じていることを報告している⁵⁴⁻⁵⁶⁾。本章ではアクチン関連因子のうち特に N-WASP、WISH および WAVE に着目し、AD 病態下における量的変動および神経異常発芽との関連性について解析した⁵⁷⁾。

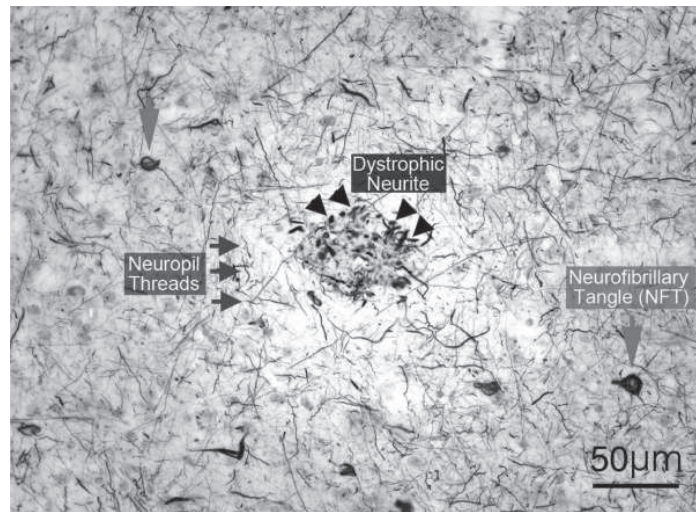


Fig. 7. AD brain section with silver staining. Silver staining method visualizes cytoskeletal abnormalities of AD brain, such as neurofibrillary tangles, dystrophic neurites and neurofilament threads. These pathologies can not be observed in non-demented control brains.

1. AD脳における N-WASP、WISH および WAVE の蛋白質量

ヒト剖検脳側頭葉皮質における WASP 関連蛋白質の蛋白質量を対照脳および AD 脳で比較検討した (Fig. 8)。AD 脳の N-WASP 関連蛋白質量は対照脳に比べ、細胞膜分画において有意に増加していた。

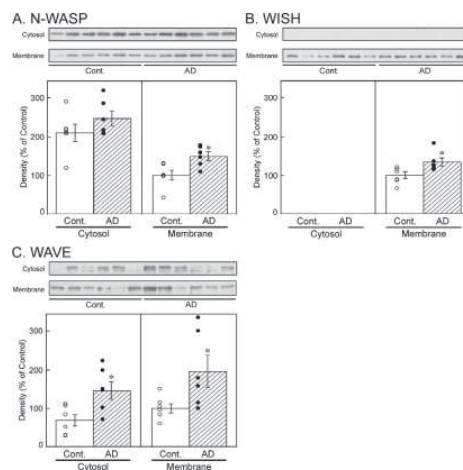


Fig. 8. Protein levels of N-WASP, WISH and WAVE in control and AD brains. Samples were subjected to immunoblot analysis for N-WASP (A), WISH (B) and WAVE (C). The immunoblot of six control (open column) and six AD cases (hatched column) was quantified by scanning densitometry (lower panels). Each value is the mean \pm S.E.M. of six samples. The density in individual control (open circle) and AD (closed circle) cases is also shown in B. * $P < 0.05$ vs. the value in the controls.

2. AD 脳における N-WASP、WISH および WAVE の局在

AD 脳における WASP 関連蛋白質の局在を免疫組織化学的に解析した (Fig. 9)。対照脳における N-WASP、WISH、WAVE の免疫反応性はニューロピルおよび神経細胞やグリア細胞の細胞体にわずかに認められた。AD 脳内における N-WASP の免疫反応性は神経原線維変化様構造を有する神経細胞体に強く認められた。また、老人斑に近接する dystrophic neurites 様構造にも強く認められた。WISH も N-WASP と同様のパターンでその免疫反応性が認められた。WAVE の免疫反応性は dystrophic neurites 様構造において特に強く認められた。

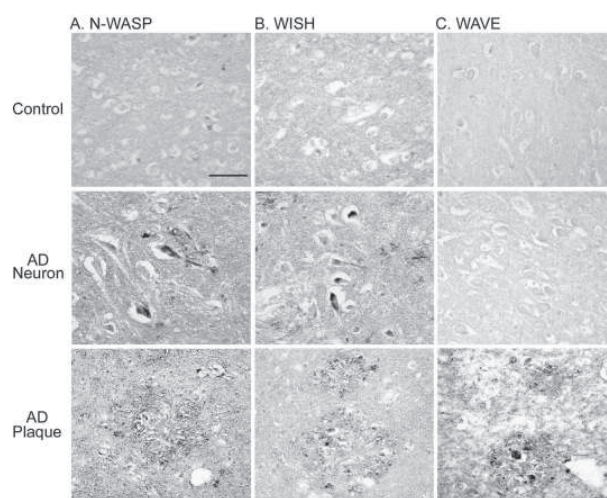


Fig. 9. Immunohistochemical localization of N-WASP, WISH and WAVE in temporal cortices of control and AD brains. Brain sections from control and AD cases were immunostained with anti-N-WASP, WISH or WAVE antibody. Photomicrographs show N-WASP (A), WISH (B) and WAVE (C) immunoreactivity in control sections (upper panels), AD neurons (middle panels) and plaque neurites (lower panels). Scale bar, 50 μ m.

3. 考察 : AD とアクチン骨格制御因子

AD 脳内では顕著なシナプス構造の破綻や神経細胞の脱落が認められ⁵⁰⁾、さらに神経細胞の異常な糸状仮足・葉状仮足の形成、つまり神経異常発芽が認められる^{43,45,48)}。老人斑に近接する dystrophic neurites は主に軸索終末の病変であること^{45,48)}、ニューロピルスレッドの多くは樹状突起の病変であること^{42,47)}が報告されている。興味深いことに、AD 脳抽出液を培養神経細胞に処置すると顕著に突起伸展が誘導される^{58,59)}。突起伸展を阻害する成長阻害因子 (growth inhibitory factor; GIF) が AD 脳において減少しており⁵⁹⁾、このことが AD の異常神経発芽の一因であると考えられるが、そのほかにも未知の因子や機序が存在している可能性がある。

近年、Cdc42 や Rac1 が正常な神経細胞体や細胞形態が異常化しつつあると思われる一部の神経細胞体に局在することが明らかになった⁵⁶⁾。Cdc42 および Rac1 は N-WASP および WAVE の上流に位置する活性化因子であり、また WISH も N-WASP を活性化する^{7-9,60)}。さらに PC12 細胞およびラット初代培養神経細胞において N-WASP が突起伸展に重要であることが示されている²⁵⁾。本解析では、AD 脳内において N-WASP、WISH および WAVE は増加しており、その免疫反応性は神経原線維変化様構造を有する神経細胞体や老人斑に近接する dystrophic neurites に強く局在していた。近年、リン酸化された collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) が AD 脳で増加し、神経原線維変化や dystrophic neurites、一部のニューロピルスレッドに局在することが報告された⁶¹⁾。CRMP-2 は軸索形成に必須な因子で、軸索先端の成長円錐の糸状仮足や葉状仮足に濃縮されている⁶²⁻⁶⁴⁾。これらのことから、N-WASP、WISH および WAVE は CRMP-2 と同様に、AD 病態下では増加し、神経異常発芽や神経形態異常に関与することが示唆される。

AD 脳内ではシナプトフィジンやシナプトブレビンなどシナプス関連蛋白質が減少していることが明らかとなっている⁵⁴⁾。同様にプレシナプス蛋白質であり、発芽部位マーカーでもある GAP43 は、AD 脳内で蛋白質量が減少している一方で、神経原線維変化様構造や dystrophic neurites、ニューロピルスレッドに濃縮されていることが示されている^{45,48,52)}。本解析では、増加した N-WASP、WISH および WAVE が神経原線維変化様構造あるいは dystrophic neurites に局在していた。また、AD 患者脳のアセチルコリン作動性神経において A β が神経異常発芽を惹起することが報告された⁶⁵⁾。AD 様病理を一部再現する APP トランスジェニックマウスやラット培養神経細胞を用いた研究により、グルタミン酸や A β が軸索や軸索末端の形態異常や軸索からの異常発芽を起こすことが示された^{66,67)}。さらに近年、当研究グループにより、生後の神経発芽を促進することが知られている high mobility group box protein-1 (HMGB1) が AD 脳内で増加し、老人斑周囲に沈着し、さらに A β の神経毒性を強化することが明らかにされている^{68,69)}。これらの知見から、神経毒性・神経障害性を有する因子が脳内に蓄積することが老人斑や神経原線維変化、神経異常発芽などの AD 病理形成を引き起こす可能性があること、さらに N-WASP、WISH および WAVE などの AD 脳内で増加した因子が神経異常発芽に関与し、シナプス機能や神経機能の障害の一因となる可能性が示唆される。

最近、日本人の晩期発症型 AD 患者の遺伝子連鎖解析により、ダイナミン結合蛋白質 (dynamin-binding protein; DNMBP) 遺伝子における一塩基多型 (SNP) が AD 発症に関連することが報告された⁷⁰⁾。同様な大規模連鎖解析により、ソーティリン関連受容体 SORL1 遺伝子における SNP も AD 発症に関連することが示された⁷¹⁾。DNMBP および SORL1 は共にシナプス部位に豊富に局在し、シナプス小胞の輸送やシナプス関連蛋白質の輸送に関与することが想定されている一方で、AD 脳内では減少していることが示されている^{70,72,73)}。また DNMBP はその構造から N-WASP などと結合すると予測されている⁷⁰⁾。さらに末端方向への軸索輸送やシナプス小胞輸送に関与する分子モーター蛋白質キネシン 1 の構成サブユニットにおける

SNP も AD 発症に関連する⁷⁴⁾。培養神経細胞において WAVE1 は CRMP-2 や Sra-1 と複合体を形成し、キネシン 1 依存的に軸索輸送されて軸索の伸長や成熟に関与する⁷⁵⁾。トランスジェニックマウスなどを用いた研究では、キネシン 1 の機能不全により軸索輸送が障害され、これに伴い軸索内部での細胞骨格系およびその関連因子の不安定化・凝集・蓄積、銀染色で染め出される異常形態軸索や異常神経突起の形成、さらにはシナプス部位など局所における Aβ 産生促進・蓄積が引き起こされることが報告された⁷⁶⁾。また、Aβ により軸索輸送が障害され、軸索内部でのアクチン凝集体の形成および軸索の形態異常と異常発芽が惹起されること⁶⁷⁾、Aβ 蓄積により軸索の神経走行異常や軸索末端の形態異常、dystrophic neurites 様構造など神経異常発芽部位の形成促進などが起こることが示されている⁶⁶⁾。軸索輸送の停滞が神経伝達物質や栄養物質の枯渇をもたらし、シナプス構造や神経ネットワークの破綻や機能不全、さらには Aβ の蓄積促進を引き起こすという仮説もある⁷⁷⁾。軸索輸送や細胞骨格系の異常あるいは脳内 Aβ 蓄積など AD 発症においてどの現象が上流に位置するかは未だに仮説の域を出ないが、少なくとも軸索輸送や細胞骨格系の異常、さらに神経の異常形態形成や神経異常発芽が AD 病態進行に重要であり、病理形成の初期から関与しうることが推定される。

N-WASP や WAVE の活性化機序や活性調節機構の詳細についても徐々に明らかになりつつある。不活性型 N-WASP は分子内相互作用により折りたたまれたヘアピン様構造をとっているが、Cdc42 や WISH などが結合すると分子内相互作用が解除され、Arp2/3 複合体との結合・活性化を介してアクチン重合を制御する⁶⁰⁾。また、Fyn や v-Src などのキナーゼによりリン酸化されても N-WASP は活性化される⁷⁸⁾。さらに、活性化 N-WASP は不安定でプロテアソーム系により分解されやすいが、分子シャペロン蛋白質である HSP90 が活性化 N-WASP の分解を抑制しアクチン重合活性を促進することが明らかとなった³⁶⁾。本解析では、AD 脳内で N-WASP は増加していた。近年、当研究グループは AD 脳内で HSP90 が増加しており、老人斑付近に濃縮されていることを見出している³⁹⁾。N-WASP の発現制御機構は不明であるが、神経ネットワークの発達（神経突起の形成や伸長）に伴い N-WASP が増加することを考慮すると、AD 脳内では N-WASP 発現量の増加および分解の抑制が起こり、N-WASP 活性が亢進している可能性が考えられる。一方、WAVE 活性化機構は不明な点が多いが、不活性型 WAVE は細胞内で他の蛋白質と複合体を形成することでアクチンや Arp2/3 複合体との結合が抑制されていると考えられている。WAVE1 の場合、Abi1 や Sra-1/PIR121、Nap125 を含む蛋白質複合体が WAVE1 活性を抑制しており、活性化 Rac1 が結合することでこの蛋白質複合体が乖離し、フリーとなった WAVE1 は Arp2/3 複合体と結合してアクチン重合を制御すると考えられている¹⁰⁾。また、WAVE1 蛋白質複合体は CRMP-2 を介してキネシン 1 に結合し、軸索輸送される⁷⁵⁾。さらに WAVE1 はサイクリン依存性キナーゼ 5 (Cdk5) によるリン酸化を受け、活性が調節されることも示された⁷⁹⁾。Cdk5 は AD 脳内で活性が亢進しており、タウ蛋白質や CRMP-2 のリン酸化を引き起こす^{80,81)}。リン酸化されたタウ蛋白質や CRMP-2 は微小管や他の蛋白質複合体への結合能などの本来の機能を失っていると考えられており、AD 脳

において増加し、神経原線維変化や神経異常発芽部位に集積している⁶¹⁾。さらに Cdk5 は軸索輸送やシナプス小胞輸送に必須であることも示されている^{82,83)}。これらの知見および本解析の結果より、軸索輸送の停滞などにより細胞の生理機能や恒常性が変化し、Cdk5 の活性亢進やタウ蛋白質・CRMP-2 などの異常リン酸化、それに伴う各種蛋白質の機能異常が起こり、軸索輸送中の WAVE が異所的に活性化され、神経異常発芽に関与する可能性が考えられる。しかし、上記の N-WASP や WAVE の活性化機構や調節機構は主に培養細胞における知見であり、またその他の知見に関しても主にマウスやラットにおけるものであるため、ヒト由来細胞や実際のヒト脳内での制御・調節機構や機能は想像の域を出ない。今後の課題として、AD 脳内における N-WASP や WAVE のリン酸化状態の解析、HSP90 や CRMP-2、Sra-1 など調節蛋白質あるいはタウ蛋白質など他の蛋白質との相互作用の解析、プロモーターの解析による発現機構の解明、異常発芽を誘導する因子や上流メカニズムの探索などが挙げられ、これらの研究により神経異常発芽など AD 病理形成から AD 発症に至るメカニズムや N-WASP など形態形成に関わる因子の病態との関連性がより詳細に明らかになるかもしれない。

(3) 神経突起形成および神経形態形成における家族性 AD 関連遺伝子プレセニリン 1 の解析

家族性 AD は全 AD のうち約 5～10% を占めるとされ、通常、若年性の発症や常染色体優性遺伝の形式を特徴とする。家族性 AD 家系の連鎖解析により、家族性 AD 関連変異が最も顕著に見られる遺伝子であり、さらに変異により脳内 A β (1-42) 産生量の増大に関わる遺伝子としてプレセニリン 1 (PS1) が同定された^{84,85)}。PS1 は複数膜貫通型の構造をしている極めて多機能な蛋白質である。PS1 は γ セクレターゼ複合体の活性中心分子であると考えられており、この複合体の機能により APP や Notch などの膜内蛋白質プロセッシングを起こし、A β の産生や発生・分化、多くの細胞内シグナル伝達の制御に関わっているとされる⁸⁶⁻⁸⁸⁾。また、PS1 自身が β カテニンや N カドヘリンなどと直接結合し、その機能を調節することも報告されている^{89,90)}。さらに、PS1 が正常な脳の発生・発達過程において神経分化やシナプス形成に重要であり、成熟脳においてもシナプス可塑性に重要であることが示されつつある⁹⁰⁾。これらのことから、PS1 は神経系の形態形成やシナプス可塑性に関与する因子であると考えられるが、AD 脳内で観察される神経細胞の異常形態形成や神経異常発芽に対する関与は不明である。そこで、SH-SY5Y 細胞に野生型あるいは変異型ヒト PS1 を過剰発現させることで、細胞形態への影響、さらに形態形成に関わる細胞骨格関連因子の蛋白質量への影響について解析した⁹¹⁾。

1. SH-SY5Y 細胞の形態および細胞骨格関連因子の発現量

コントロール SH-SY5Y 細胞 (5YWT) および野生型あるいは変異型 PS1 を過剰発現させた細胞の形態を位相差顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生型 PS1 過剰発現細胞 (5YOE) および家族性 AD 関連 P117L 変異 PS1 過剰発現細胞 (5YAD) は、ネイティブな細胞とほぼ

同様の細胞形態および線維状アクチンの局在を示した一方、ドミナントネガティブ型 D385A 変異 PS1 過剰発現細胞 (5YDN) は他の細胞株に比べ劇的に形態変化を示した (Fig. 10)。また、各細胞における形態形成に関わる細胞骨格関連因子の発現量を解析し、比較した (Fig. 11)。その結果、いくつかの因子において、その細胞内蛋白質量に変動が生じた。

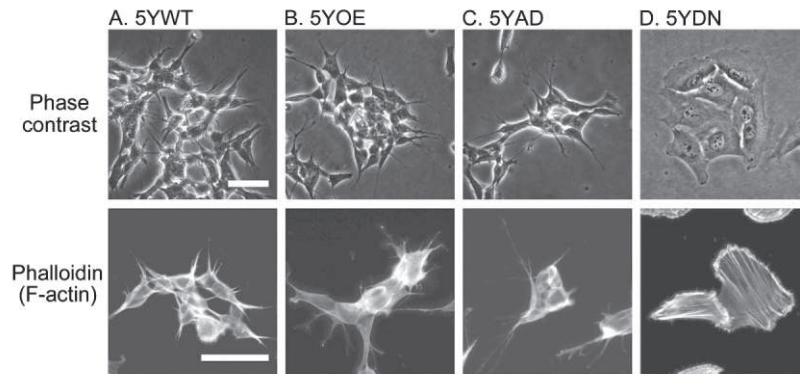


Fig. 10. Cell shapes in PS1-overexpressing SH-SY5Y cells. Native (5YWT, A), 5YOE (B), 5YAD (C), and 5YDN (D) cells were observed as phase-contrast images (upper panels). Each cell line was fixed and then labeled with rhodamine-phalloidin. Fluorescence was observed as visualized F-actin (lower panels). Scale bars, 50 μ m.

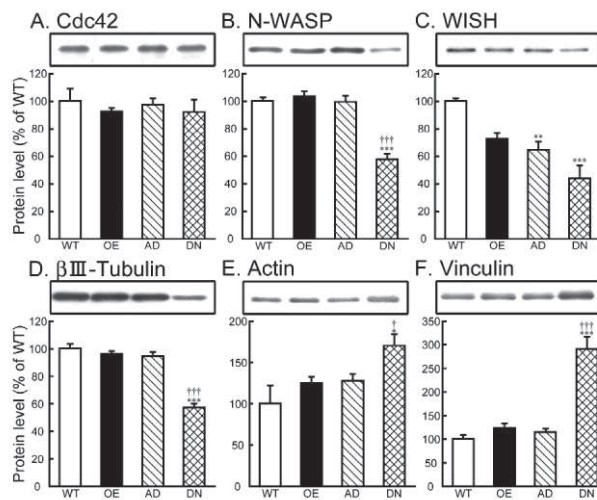


Fig. 11. Changes in protein levels of morphology-regulating proteins. Protein samples of 5YWT (WT), 5YOE (OE), 5YAD (AD), and 5YDN (DN) cells were subjected to immunoblot analysis of antibodies against Cdc42 (A), N-WASP (B), WISH (C), neuron-specific β III-tubulin (D), actin (E) and vinculin (F). The density of protein bands in 5YWT was taken as 100%. Each value is the mean \pm S.E.M. of three determinations. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. 5YWT. † P < 0.05, ††† P < 0.001 vs. 5YOE.

2. 考察：PS1 と形態形成および AD 発症との関連性

SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸の存在下でより成熟した神経様細胞へ分化することが知られているが、5YAD 細胞もレチノイン酸により正常に分化することが報告されている⁸⁹⁾。P117L-PS1 を発現するトランスジェニックマウスは少なくとも成獣に成長するまで生存可能であるが⁹²⁾、PS1 ノックアウトマウスは著明な神経発生の障害および胎生致死を示す^{93,94)}。これらのことから、PS1 における P117L 変異など家族性 AD 関連変異は胚発生期の神経の発生・分化にさほど影響を及ぼさないことが示唆される。また D385A-PS1 は γ セクレターゼ活性を示さず PS1 欠失を一部模倣していること^{95,96)}、PS1 が神経前駆細胞の生存や分化に重要であること⁹⁰⁾を考慮すると、ドミナントネガティブ型 PS1 発現細胞は神経の発生・分化そのものが抑制されていると考えられる。ところで、P117L 変異は培養細胞およびヒト家族性 AD 患者脳において A β 分子種の中でも毒性が強く高凝集性の A β (1-42) の産生を促進すること^{92,97)}、マウス成体海馬における神経新生を抑制すること^{92,98)}が報告された。様々な家族性 AD 関連 PS1 変異により小胞体ストレスなど細胞傷害性ストレスに対し細胞を脆弱化させることが報告されている⁹⁹⁾。これらのことから P117L 変異は、ストレス応答性など細胞の生理機能を変化させるなど、神経発生・分化や神経形態形成とは別の機序により家族性 AD 発症に関与することが推定される。

PS1 は γ セクレターゼ活性中心分子としての機能や PS1 自身が他の蛋白質と結合することなどにより、遺伝子発現を制御することが知られている⁹⁰⁾。本解析において、変異 PS1 の過剰発現により、細胞骨格関連因子の蛋白質量が変動することを示した。また当研究グループは N-WASP など形態形成に関わる細胞骨格関連因子が脳発達に伴い増加することを明らかにした¹⁷⁾。またコンディショナルノックアウトマウスなどを用いた研究により、PS1 は脳発達過程において重要であり、大脳皮質の層構造形成などに必須であることが明らかになっている⁹⁰⁾。現在のところ細胞骨格関連因子の発現メカニズムの詳細は不明であり、さらに PS1 がこの発現メカニズムにどのようにして関与しているかは明らかではない。しかし、本解析の結果やこれまでの知見をまとめて考察すると、神経の発生・分化、さらに神経形態形成や脳成熟において PS1 はかなり上流に位置する必須因子であることが考えられる。興味深いことに、核内 N-WASP が核内でのアクチン重合を調節することにより RNA ポリメラーゼ II 依存性遺伝子転写を制御することが報告された³⁵⁻³⁸⁾。RNA ポリメラーゼ II は真核生物において mRNA 合成のほとんどを担うと考えられていることから、N-WASP は遺伝子発現の制御に一般的に関与しており、他の細胞骨格関連因子の発現も調節しているかもしれない。

おわりに

以上の結果より、アクチン関連因子など形態形成に関わる因子が正常な脳神経ネットワークの構築や維持に関与している一方で、神経異常発芽の形成といった AD 病理形成にも関与する可能性が明らかとなった。さらに神経発芽や神経形態形成に必須な上流因子としての

PS1 が明らかとなった。

現在、世界中で脳科学分野における研究は他の分野の追従を許さないほどの展開を見せているが、AD を含めた神経疾患の病因や病態進行のメカニズムは不明な点が多く、いくつかの対症療法が存在するものの根治治療法は皆無である。しかしながら、様々な観点からのアプローチにより AD 研究を進め、その知見を統合することは、AD の病因や病態進行の全容を理解し、さらには根治治療法の開拓へとつながる。多くの研究が AD 病因として有力視されている Aβ に注目して行われている中、本研究はより病態進行に相関すると考えられている神経異常発芽や異常形態形成に着目して解析を進めた。また、形態形成に関わる因子の機能解析は主に *in vitro* 細胞実験系に限局されたものであったが、我々の研究は *in vivo* 神経系および病態脳において詳細に解析した結果を提示している。従って、今後の AD 病態の解明・新規治療戦略の開発など医薬分野のみならず、これらの因子の更なる生物学的機能の解明など生物学全般にわたって、本研究を初めとした新たな知見が活用されることを期待したい。最後に、本研究は京都薬科大学、京都大学、札幌医科大学、東京大学をはじめとした多くの研究機関および先生方の御協力・御尽力により行われた。この場を借りて深謝いたします。

参考文献

- 1) Da Silva JS, Dotti CG. 2002. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**:694-704.
- 2) Hall A. 1998. *Science*, **279**:509-514.
- 3) Threadgill R, Bobb K, Ghosh A. 1997. *Neuron*, **19**:625-634.
- 4) Bishop AL, Hall A. 2000. *Biochem. J.*, **348**:241-255.
- 5) Miki H, Miura K, Takenawa T. 1996. *EMBO J.*, **15**:5326-5335.
- 6) Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. 1998. *EMBO J.*, **17**:6932-6941.
- 7) Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. 1998. *Nature*, **391**:93-96.
- 8) Fukuoka M, Suetsugu S, Miki H, et al. 2001. *J. Cell Biol.*, **152**:471-482.
- 9) Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T. 2000. *Nature*, **408**:732-735.
- 10) Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, et al. 2002. *Nature*, **418**:790-793.
- 11) Shepherd GM (Ed.). 2004. *The Synaptic Organization of the Brain*. 5th Ed., Oxford University Press, NY, USA.
- 12) Luo L. 2002. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**:601-635.
- 13) Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A. 2002. *Annu. Rev. Neurosci.*, **25**:127-149.
- 14) Dickson BJ. 2002. *Science*, **298**:1959-1964.
- 15) Dent EW, Gertler FB. 2003. *Neuron*, **40**:209-227.
- 16) Tsuchiya D, Kitamura Y, Takata K, et al. 2006. *Neurosci. Res.*, **56**:459-469.
- 17) Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, et al. 2001. *J. Cell Sci.*, **114**:1829-1838.
- 18) Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. *Nature*, **420**, 629-635.

- 19) Pollard TD, Borisy GG. 2003. *Cell*, **112**:453-465.
- 20) Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI. 1991. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **627**:58-74.
- 21) Masliah E, Fagan AM, Terry RD, et al. 1991. *Exp. Neurol.*, **113**:131-142.
- 22) Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, et al. 1995. *Neuron*, **14**:467-475.
- 23) Meiri KF, Gordon-Weeks PR. 1990. *J. Neurosci.*, **10**:256-266.
- 24) Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. 1994. *J. Neurosci.*, **14**:667-696.
- 25) Banzai Y, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T. 2000. *J. Biol. Chem.*, **275**:11987-11992.
- 26) Nozumi M, Nakagawa H, Miki H, et al. 2003. *J. Cell Sci.*, **116**:239-246.
- 27) Pilpel Y, Segal M. 2005. *J. Neurochem.*, **95**:1401-1410.
- 28) Hampson DR, Huang XP, Oberdorfer MD, et al. 1992. *Neuroscience*, **50**:11-22.
- 29) Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, et al. 1993. *Neuroscience*, **53**:327-358.
- 30) Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ. 1996. *J. Neurosci.*, **16**:2044-2056.
- 31) Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. 1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**:296-302.
- 32) Dahl JP, Wang-Dunlop J, Gonzales C, et al. 2003. *J. Neurosci.*, **23**:3343-3352.
- 33) Soderling SH, Langeberg LK, Soderling JA, et al. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:1723-1728.
- 34) Snapper SB, Takeshima F, Anton I, et al. 2001. *Nat. Cell Biol.*, **3**:897-904.
- 35) Suetsugu S, Takenawa T. 2003. *J. Biol. Chem.*, **278**:42515-42523.
- 36) Park SJ, Suetsugu S, Takenawa T. 2005. *EMBO J.*, **24**:1557-1570.
- 37) Wu X, Yoo Y, Okuhama NN, et al. 2006. *Nat. Cell Biol.*, **8**:756-763.
- 38) Yoo Y, Wu X, Guan JL. 2007. *J. Biol. Chem.*, **282**:7616-7623.
- 39) Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, et al. 2002. *FASEB J.*, **16**:601-603.
- 40) Kitamura Y, Nomura Y. 2003. *Pharmacol. Ther.*, **97**:35-53.
- 41) Terry RD. 1998. *J. Neural Transm. Suppl.*, **53**:141-145.
- 42) Ihara Y. 1988. *Brain Res.*, **459**:138-144.
- 43) McKee AC, Kowall NW, Kosik KS. 1989. *Ann. Neurol.*, **26**:652-659.
- 44) Mori H, Ihara Y. 1991. *Brain Pathol.*, **1**:273-277.
- 45) Masliah E, Terry R. 1993. *Brain Pathol.*, **3**:77-85.
- 46) Selkoe DJ. 1999. *Nature*, **399 suppl.**:A23-A31.
- 47) Braak H, Braak E. 1988. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **14**:39-44.
- 48) Masliah E, Mallory M, Hansen L, et al. 1991. *Neuron*, **6**:729-739.
- 49) Masliah E, Mallory M, Hansen L, et al. 1992. *Brain Res.*, **574**:312-316.
- 50) Selkoe DJ. 2002. *Science*, **298**:789-791.
- 51) Masliah E, Mallory M, De Teresa R, et al. 1993. *Brain Res.*, **617**:258-266.
- 52) Bogdanovic N, Davidsson P, Volkman I, et al. 2000. *J. Neural Transm.*, **107**:463-478.
- 53) Gomez-Isla T, Hollister R, West H, et al. 1997. *Ann. Neurol.*, **41**:17-24.

- 54) Shimohama S, Kamiya S, Taniguchi T, et al. 1997. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**:239-242.
- 55) Shimohama S, Kamiya S, Taniguchi T, et al. 1999. *Int. J. Mol. Med.*, **3**:597-600.
- 56) Zhu X, Raina AK, Boux H, et al. 2000. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **18**:433-437.
- 57) Kitamura Y, Tsuchiya D, Takata K, et al. 2003. *Neurosci. Lett.*, **346**:149-152.
- 58) Uchida Y, Ihara Y, Tomonaga M. 1988. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**:1263-1267.
- 59) Uchida Y, Takio K, Titani K, et al. 1991. *Neuron*, **7**:337-347.
- 60) Takenawa T, Miki H. 2001. *J. Cell Sci.*, **114**:1801-1809.
- 61) Yoshida H, Watanabe A, Ihara Y. 1998. *J. Biol. Chem.*, **273**:9761-9768.
- 62) Minturn JE, Fryer HJL, Geschwind DH, Hockfield S. 1995. *J. Neurosci.*, **15**:6757-6766.
- 63) Inagaki N, Chihara K, Arimura N, et al. 2001. *Nat. Neurosci.*, **4**:781-782.
- 64) Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K. 2004. *J. Neurobiol.*, **58**:34-47.
- 65) Masliah E, Alford M, Adame A, et al. 2003. *Neurology*, **61**:206-211.
- 66) Phinney AL, Deller T, Stalder M, et al. 1999. *J. Neurosci.*, **19**:8552-8559.
- 67) Hiruma H, Katakura T, Takahashi S, et al. 2003. *J. Neurosci.*, **23**:8967-8977.
- 68) Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**:699-703.
- 69) Takata K, Kitamura Y, Tsuchiya D, et al. 2004. *J. Neurosci. Res.*, **78**:880-891.
- 70) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, et al. 2006. *Hum. Mol. Genet.*, **15**:2170-2182.
- 71) Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, et al. 2007. *Nat. Genet.*, **39**:168-177.
- 72) Salazar MA, Kwiatkowski AV, Pellegrini L, et al. 2003. *J. Biol. Chem.*, **278**:49031-49043.
- 73) Scherzer CR, Offe K, Gearing M, et al. 2004. *Arch. Neurol.*, **61**:1200-1205.
- 74) Dhaenens CM, Van Brussel E, Schraen-Maschke S, et al. 2004. *Neurosci. Lett.*, **368**:290-292.
- 75) Kawano Y, Yoshimura T, Tsuboi D, et al. 2005. *Mol. Cell Biol.*, **25**:9920-9935.
- 76) Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, et al. 2005. *Science*, **307**:1282-1288.
- 77) Terry RD. 1996. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55**:1023-1025.
- 78) Suetsugu S, Hattori M, Miki H, et al. 2002. *Dev. Cell*, **3**:645-658.
- 79) Kim Y, Sung JY, Ceglia I, et al. 2006. *Nature*, **442**:814-817.
- 80) Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, et al. 2003. *Neuron*, **40**:471-483.
- 81) Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, et al. 2005. *Genes Cells*, **10**:165-179.
- 82) Tomizawa K, Sunada S, Lu YF, et al. 2003. *J. Cell Biol.*, **163**:813-824.
- 83) Shea TB, Yabe JT, Ortiz D, et al. 2004. *J. Cell Sci.*, **117**:933-941.
- 84) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, et al. 1995. *Nature*, **376**:775-778.
- 85) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. 1995. *Nature*, **375**:754-760.
- 86) De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, et al. 1998. *Nature*, **391**:387-390.
- 87) De Strooper. 2003. *Neuron*, **38**:9-12.
- 88) Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, et al. 2003. *Nature*, **422**:438-441.

- 89) Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, et al. 2003. *J. Neurosci. Res.*, **73**:166-175.
- 90) Wines-Samuelson M, Shen J. 2005. *Neuroscientist*, **11**:441-451.
- 91) Tsuchiya D, Kitamura Y, Takata K, et al. 2006. *J. Pharmacol. Sci.*, **102**:354-358.
- 92) Wen PH, Shao X, Shao Z, et al. 2002. *Neurobiol. Dis.*, **10**:8-19.
- 93) Shen J, Bronson RT, Chen DF, et al. 1997. *Cell*, **89**:629-639.
- 94) Wong PC, Zheng H, Chen H, et al. 1997. *Nature*, **387**:288-292.
- 95) Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, et al. 1999. *Nature*, **398**:513-517.
- 96) Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, et al. 2000. *J. Biol. Chem.*, **275**:3173-3178.
- 97) Dowjat WK, Kuchna I, Wisniewski T, Wegiel J. 2004. *J. Alzheimers Dis.*, **6**:31-43.
- 98) Wen PH, Hof PR, Chen X, et al. 2004. *Exp. Neurol.*, **188**:224-237.
- 99) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, et al. 1999. *Nat. Cell Biol.*, **1**:479-485.