

細胞膜上でのアミロイド線維形成機構の可視化： アミロイドーシス発症の鍵分子ガングリオシド

若林真樹^{a,b}

Visualization of Amyloid Formation Processes on Cell Membranes: Gangliosides as Key Molecules for the Onset of Amyloidosis

Masaki WAKABAYASHI^{a,b}

^aGraduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University, 46-29 Yoshidasimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, and ^bDepartment of Molecular Pharmacology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

(Received May 31, 2010)

Deposition of insoluble amyloid fibrils in tissues is a common hallmark of a wide range of human diseases referred to as amyloidoses, including Alzheimer's disease, type II diabetes mellitus. The amyloid deposits cause cell dysfunction, death, and subsequently severe impairment in tissues. Elucidation of amyloid formation mechanisms is essential for prevention of the onset and development of amyloidoses. Accumulated experimental evidence demonstrates that membrane lipids enhance the fibril formation of amyloidogenic proteins. Our group demonstrated that amyloid formation by amyloid β -protein ($A\beta$) was facilitated by gangliosides in lipid raft-like model membranes. Phosphatidylserine and phosphatidylglycerol were also reported to trigger fibril formation by human islet amyloid polypeptide (hIAPP). However, it is not verified whether the proposed lipid-protein interactions can occur on plasma membranes of live cells. The author developed a method for visualizing amyloid fibrils on live cell membranes and investigated the roles of gangliosides and cholesterol in lipid rafts for amyloid formation. Congo red, an amyloid-specific dye, was found to be a promising compound for staining amyloids in live cells. $A\beta$ was accumulated on cholesterol-dependent ganglioside-rich domains in PC12 neuronal cells in a time- and concentration-dependent manner, leading to cell death. Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells increased both gangliosides and cholesterol and thereby greatly potentiated the accumulation and cytotoxic effect of $A\beta$. Amyloid formation by hIAPP was also facilitated by gangliosides in lipid rafts. Membrane lipid compositions, in this case, gangliosides in lipid rafts, actually caused striking change in amyloid formation on cell membranes.

Key words—amyloid fibril; ganglioside; cholesterol; amyloidosis; amyloid β -protein; human islet amyloid polypeptide

1. はじめに

アミロイド線維と呼ばれる不溶性のタンパク質凝集体が組織に沈着する疾患は、アミロイドーシスとして総称され、代表的な疾患としてアルツハイマー病・II型糖尿病・プリオン病などが挙げられる。いずれもアミロイド線維の沈着とともに患者組織の機能が障害されることが知られており、アミロイドーシスの発症・進展を防ぐためにはアミロイド線維形成・沈着機構を解明することが不可欠である。

アミロイド線維形成機構を解明するにあたり注目すべき点は、生理的条件下ではアミロイド原性タンパク質の線維化が起こらないことである。つまり、病態における産生・代謝・排出異常によるタンパク質の劇的な濃度上昇、若しくは他の病態因子により誘起される構造変化・局所濃度の上昇などを契機として線維化が開始される。後者に関し、細胞膜脂質が線維形成を促進するという報告が多数なされ、¹⁾病態における細胞膜脂質構成の変化・異常がアミロイドーシスを誘発する可能性が示唆されている。われわれのグループも、①神経細胞膜中に豊富に存在する糖脂質・ガングリオシドが、スフィンゴミエリン・コレステロールなどの脂質とともに形成する「脂質ラフト」²⁾と呼ばれるマイクロドメイン中で、

^a京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29), ^b国立循環器病研究センター分子薬理部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)
e-mail: m.waka@ri.ncvc.go.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞(物理系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

クラスターを形成すること, ②ガングリオシドクラスターの形成を契機としてアルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) が脂質膜へ結合すること, ③膜結合型の $A\beta$ が自身の線維形成を促進することをこれまでに報告し,³⁾ ガングリオシドを介した $A\beta$ 凝集モデルとして提唱してきた。また, フォスファチジルグリセロール (PG)⁴⁾ とフォスファチジルセリン (PS)⁵⁾ の2種類の脂質がヒト膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP) のアミロイド線維形成を促進されることも報告されている。しかし, これらの報告は人工モデル膜を用いた実験系で明らかにした結果であり, 生細胞膜上でのアミロイド線維形成を観察・検証した例はない。そこで本稿では, 生細胞膜上でのアミロイド線維形成過程を可視化する方法を確立し, この方法を用いて細胞膜脂質が $A\beta$ の線維形成に与える影響を調べた結果を紹介する。⁵⁾ また, 同様の方法により, II型糖尿病患者の膵臓ランゲルハンス島に沈着する hIAPP の線維形成過程に関して解析を行った結果も併せて紹介する。⁶⁾

2. 生細胞膜上でのアミロイド線維可視化法の確立

これまでに, 透過型電子顕微鏡⁷⁾ や蛍光顕微鏡^{8,9)} を用いて細胞表面で形成される $A\beta$ 線維の観察を試みた報告がなされているが, いずれも観察前に細胞の固定やその後の複雑な処理を必要とするものであった。細胞の固定処理を行うことで, 染色試薬などの細胞内分布が変化し得ることも報告されており,¹⁰⁾ アーティファクトが生じる可能性を極力排除し, 非侵襲的に生細胞膜上で起こるアミロイド線維形成過程を可視化するためには, 複雑な前処理を行わずに観察を行うことが必須となる。そこで, *in vitro* の実験系でアミロイド線維構造を特異的に認識する色素として汎用されている, thioflavin T (ThT), thioflavin S (ThS), Congo red の3つの色素¹¹⁻¹³⁾ について, 生細胞膜上に蓄積するアミロイド線維を特異的に染色できるかどうか検討を行った。

3種の色素をそれぞれ単独で細胞に投与し, 共焦点顕微鏡により観察を行ったところ, ThT, ThS は細胞内に取り込まれて蛍光を発するのに対し, Congo red の非特異的結合は観察されなかった [Figs. 1(a)-(f)]. 次に, 蛍光色素 Fluorescein でラベルした $A\beta$ (FL- $A\beta$) を PC12 細胞に投与し,

Congo red により染色を行ったところ, Congo red の蛍光は FL- $A\beta$ の蛍光が非常に強い領域にのみ共局在した [Figs. 1(g) and (h)]. この結果は FL- $A\beta$ が一定量蓄積し, アミロイド構造をとった時にのみ認識・結合することを示しており, Congo red を用いることで, 複雑な前処理を必要とせず生細胞膜上に蓄積したアミロイド線維を特異的に染色・観察可能であることが明らかとなった。

3. 細胞膜への $A\beta$ アミロイド線維蓄積様式の可視化

この観察法を用いてアミロイド線維の細胞膜上への蓄積を可視化し, 細胞膜脂質の分布と比較を行った。まず, ガングリオシドの特異的プローブであるコレラトキシン B サブユニットの蛍光色素付加体 (CTX-B) を用いて PC12 細胞膜を染色し, その分布を観察したところ, PC12 細胞膜の染色像は不均一であり, CTX-B の蛍光が顕著に強い (ガングリオシドリッチな) 領域が存在することが明らかとなった [Fig. 2(a)]. また, コレステロールリッチな領域に特異的に結合するポリエチレングリコール修飾コレステロールの蛍光色素付加体 (fPEG-cho)¹⁴⁾ がこのガングリオシドリッチな領域と共局在する [Figs. 2(a) and (b)] ことから, ガングリオシドリッチな領域はコレステロールリッチでもあり, 脂質ラフト様の性質を備えることが明らかとなった。

次に, $A\beta$ を PC12 細胞とインキュベート後 Congo red により染色を行い, そのアミロイド線維形成を追跡すると, Congo red の蛍光はガングリオシドリッチな領域と完全に一致し, アミロイド線維の蓄積がガングリオシドリッチな脂質ラフト様領域に特異的であることが明らかとなった [Figs. 2(e) and (f)]. ガングリオシド, コレステロールとともに脂質ラフトを形成していると考えられているスフィンゴミエリンが, 固体表面に支持した脂質二分子膜上で $A\beta$ の線維形成を促進するという報告もなされているが,¹⁵⁾ われわれのグループがリポソームを用いて行った実験結果とは相反するものである。¹⁶⁾ しかし, もしスフィンゴミエリンが生細胞膜上でガングリオシドリッチな領域に分布しているとすれば, なんらかの作用により $A\beta$ の線維化を促進している可能性も考えられる。

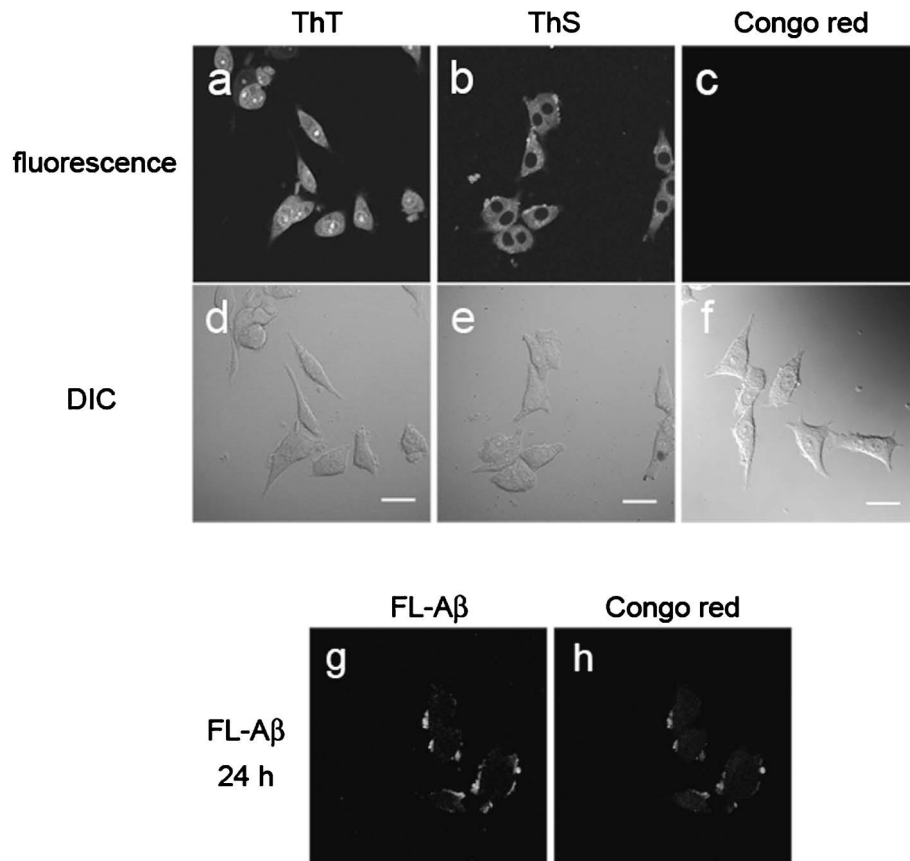


Fig. 1. Screening of Amyloid Specific Dyes

(a)–(f) PC12 cells were incubated with $2.5 \mu\text{M}$ ThT ((a) and (d)) or $0.05 \text{ w/v } \%$ ThS ((b) and (e)) for 8 min, or $20 \mu\text{M}$ Congo red ((c) and (f)) for 30 min in the absence of $\text{A}\beta$. (a)–(c) and (d)–(f) Fluorescence and differential interference contrast (DIC) images, respectively. Bar represents $20 \mu\text{m}$. (g) and (h) Validation of Congo red staining for visualizing amyloids on cell membranes. PC12 cells were incubated with $25 \mu\text{M}$ FL-A β for 24 h, and subsequently stained with $20 \mu\text{M}$ Congo red for 30 min. FL-A β and Congo red images are shown in (g) and (h), respectively.

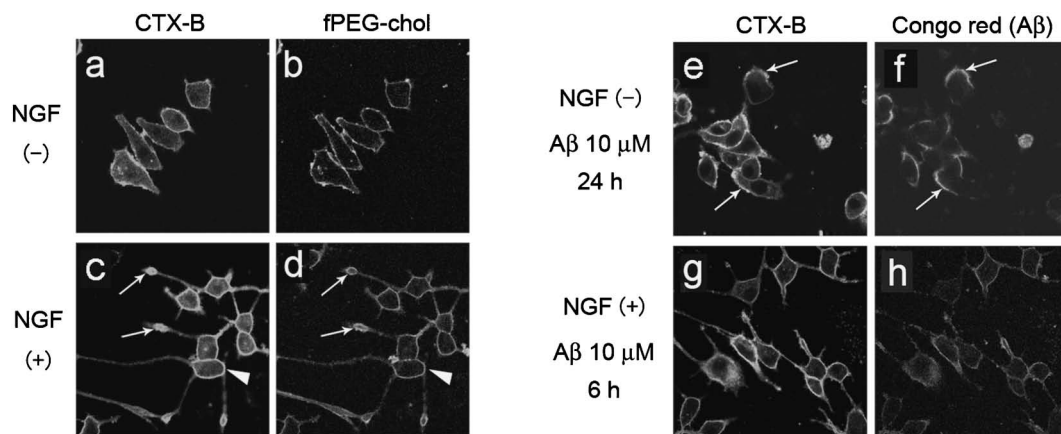


Fig. 2. Distribution of Gangliosides and Accumulated-A β on Live Cell Membranes

(a)–(d) Colocalization of ganglioside-rich domains with cholesterol-rich domains. Untreated ((a) and (b)) or NGF-treated ((c) and (d)) were stained with $10 \mu\text{g/ml}$ of CTX-B for 20 min and $1 \mu\text{M}$ fPEG-cho for 5 min. Arrowheads and arrows indicate the colocalization of ganglioside-rich domains with cholesterol-rich domains in cell bodies and distal neurites, respectively. (e)–(h) Selective accumulation of A β -(1–42) on ganglioside- and cholesterol-rich domains. Untreated ((e) and (f)) or NGF-treated cells ((g) and (h)) were incubated with $10 \mu\text{M}$ A β -(1–42) for 24 h or 6 h, respectively and the accumulated A β -(1–42) amyloid and cell surface gangliosides were stained with $20 \mu\text{M}$ Congo red for 30 min and $10 \mu\text{g/ml}$ of CTX-B for 20 min, respectively. Arrows show the colocalization of Congo red fluorescence with ganglioside-rich domains, in which ganglioside was brightly stained with CTX-B.

4. 神経分化誘導に伴う細胞膜脂質組成の変化と A β 線維蓄積量の増大

A β が持つ神経細胞特異的な毒性の原因を究明するため、神経成長因子 (NGF) により交感神経様細胞へと分化誘導を行った PC12 細胞を用いて同様の実験を行った。ガングリオシドかつコレステロールリッチな領域は主に突起先端部や細胞体に局在することが観察され [Figs. 2(c) and (d)], A β 線維の蓄積も同様の分布を示した [Figs. 2(g) and (h)]. 神経分化誘導のシグナルは、細胞膜上のガングリオシド量により調節されていることが報告されており,¹⁷⁾ ガングリオシドの局所的な分布との関連が示唆される。また、分化誘導前後の PC12 細胞に対して蓄積する A β 線維を、時間変化とともに追跡した観察像を Figs. 3(a)–(h) に示す。分化誘導前後のどちらの場合においても、インキュベーション時間の延長に伴い A β 線維の蓄積量は増大し、最終的に細胞内へと広がる様子が観察される。このような観察像が死細胞を示すことは以前の筆者らの報告により明らかとなっている。¹⁸⁾ さらに、分化誘導後の細胞においては、まず突起先端部の損傷が起こり、その後に細胞体が破壊される様子がみられる。この結果は、A β が培養海馬神経細胞の突起先端部を損傷させること¹⁹⁾ や、培養交感神経細胞のアポトーシスに先立って遠位軸索の損傷を引き起こすこと²⁰⁾ などと類似しており、A β が誘起するシナプスの消失や、引き続いて起こる神経細胞死と関連していると考えられる。

ここで注目すべき点は、神経分化誘導により A β 線維の蓄積量が著しく増大していることである。Congo red の蛍光強度をもとに細胞あたりの A β 線維蓄積量を見積もると、神経分化誘導前後の細胞に対しそれぞれ、 903 ± 48 , 3244 ± 586 となり、有意な差を示した ($p < 0.003$)。また、A β が誘導する細胞毒性を評価したところ、分化誘導前の細胞においては 72 時間のインキュベーション後でも 70% 程度の細胞生存率を示したのに対し、分化誘導後の細胞では 24 時間のインキュベーションで 56%, 72 時間のインキュベーションでは 28% と非常に低い生存率へと落ち込み、分化誘導後の細胞に対して A β が顕著に強い毒性を示すことが明らかとなった [Fig. 3(j)].

この神経分化誘導による A β 線維蓄積量の増大、細胞毒性の増強の要因を明らかにするため、分化誘

Table 1. Gangliosides and Cholesterol Contents of PC12 Cells

	Untreated	NGF-treated	NGF- and compactin-treated
Gangliosides ^{a,c} (per cell, a.u.)	(1) 193 ± 38	(2) 981 ± 78	(3) 517 ± 120
Cholesterol ^b ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	(4) 21.7 ± 1.0	(5) 48.3 ± 13.4	(6) 20.7 ± 2.6

The data shown are the mean \pm S.D. $p(1$ versus $2)$, $p(2$ versus $3)$, $p(1$ versus $3)$ < 0.003 . $p(4$ versus $5)$, $p(5$ versus $6)$ < 0.02 . The statistical analysis was performed by the two sample t -test. ^a $n=4$, ^b $n=3$, ^c GMI contents were estimated from CTX-B fluorescence intensity. See MATERIALS AND METHODS for details.

導前後の PC12 細胞が含有するガングリオシド、コレステロール量の比較を行うと、分化誘導後の細胞において、ガングリオシド量は約 5 倍、コレステロール量は約 2 倍と顕著に増大していることが確認された (Table 1)。ガングリオシド、コレステロールの両脂質が増加することで、A β 線維形成を促進する要因となるガングリオシドクラスターの形成が促進され、^{3,16)} これに伴って A β 線維蓄積量の増大、細胞毒性の増強が引き起こされたと考えられる。

5. A β のアミロイド線維形成に細胞膜中のコレステロールが与える影響

細胞膜中のコレステロール量が A β の線維形成に与える影響をさらに検証するため、分化誘導後にコレステロール合成阻害を施した PC12 細胞を用いて実験を行った。ヒドロキシメチルグルタリル-CoA エンザイム A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であるコンパクチンを投与することで、コレステロール含有量が約 43% 程度に減少すると同時にガングリオシド量の減少も観察され (Table 1)、これに伴い A β 線維蓄積量の減少、細胞毒性の減弱がみられた [Figs. 3(i) and (j)]. ここで、コレステロールとガングリオシドの両脂質の比率には変化がみられなかった (Table 1) ことや、ガングリオシドリッチな領域がコレステロールリッチな領域と完全に一致する (Fig. 2) ことから、ガングリオシドとコレステロールの生合成になんらかの関連があることが示唆される。また、コレステロール代謝はスフィンゴ脂質の輸送や選別などを含む複数の代謝、細胞内輸送機構に関与することが知られており、²¹⁾ コンパクチン処理の副次的効果としてガングリオシド量に変化が生じた可能性も考えられる。

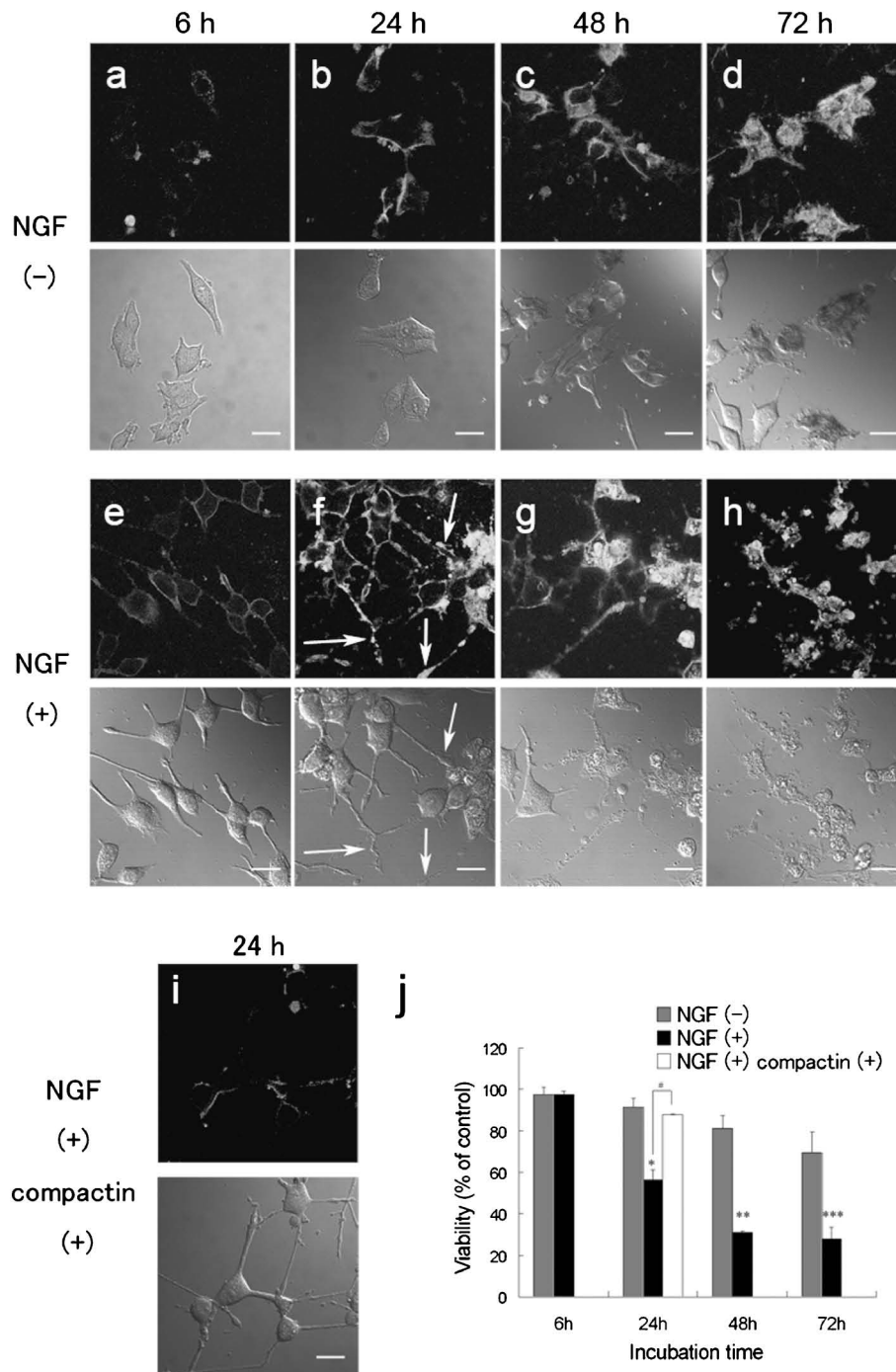


Fig. 3. Accumulation of A β Amyloids and the Cytotoxic Effect on NGF-differentiated PC12 Cells

((a)–(i)) Enhanced accumulation of A β -(1–42) on NGF-differentiated PC12 cell membranes and reduced accumulation by inhibition of cholesterol synthesis. Untreated ((a)–(d)) or NGF-differentiated ((e)–(h)) PC12 cells were incubated with 10 μ M A β -(1–42) for 6 ((a) and (e)), 24 ((b) and (f)), 48 ((c) and (g)), or 72 h ((d) and (h)). Arrows indicate disrupted neurites. (i) NGF-differentiated cells were treated with the cholesterol inhibitor compactin (1 μ M) for 48 h, and further incubated with 10 μ M A β -(1–42) for 24 h. The cells were subsequently stained with 20 μ M Congo red for 30 min. Congo red and DIC images in each set of conditions are shown. Bar represents 20 μ m. (j) Potentiation of A β -(1–42)-induced cytotoxicity by NGF-differentiation and reduction by compactin-treatment. NGF-treated cells (filled column), untreated cells (gray column), and NGF- and compactin-treated cells (open column) were incubated with 10 μ M A β -(1–42), and stained with 0.4 μ M Calcein-AM (live cells) and 0.4 μ M EthD-1 (dead cells) for 30 min. Stained cells (200–500) were counted in 8–11 images. Data are represented as mean \pm S.D. * p <0.001, ** p <0.0002 and *** p <0.005 relative to the Untreated (NGF(-)) groups, * p <0.001 (two sample *t*-test).

このように、コレステロールはガングリオシドのクラスター形成^{3,16)}、ガングリオシド分子のホメオスタシス、さらには A β 分子の産生^{22–24)}に関与する

ことで、A β のアミロイド線維形成に対して多角的に効果を及ぼす、アルツハイマー病の重要なリスクファクターである。^{25,26)}

6. A β の細胞毒性体

神経細胞を傷害する A β の毒性本体に関しては様々な議論がなされており、細胞膜脂質非存在下で形成させたプロトフィブリル（原線維）や A β -derived diffusible ligands (ADDLs) と呼ばれるオリゴマーが細胞毒性を持つという報告がなされている。²⁷⁻³⁰⁾しかし、Fig. 3 に示すように、A β が誘起する神経突起先端部の損傷、細胞毒性は、線維構造をとった A β が細胞膜上にある程度蓄積した後に観察されるものである。よって、生体内で形成される毒性体は、細胞膜中のガングリオシドに結合した A β を鋳型として Congo red 陽性の線維構造を形成する過程で生じると考えられる。実際に、ガングリオシドを含むリポソームとインキュベートすることで A β が毒性体を形成するという報告もなされている。³¹⁾

近年、ガングリオシドを含有するリポソームや脂肪酸といった細胞膜成分の存在下で形成させた可溶性のオリゴマーや、^{32,33)}高度不飽和脂肪酸により安定化されるプロトフィブリル構造³⁴⁾を持つ A β が毒性体であるという報告がなされている。一方で、アミロイド線維自体が神経細胞の機能障害や細胞死を誘起する³⁵⁻⁴⁰⁾という報告もなされており、毒性本体の構造に関しては依然として議論の余地が残る。

7. hIAPP アミロイド線維の蓄積様式

hIAPP は II 型糖尿病患者の膵臓ランゲルハンス島にみられるアミロイド沈着物の主要構成成分として知られている。^{41,42)} hIAPP のアミロイド線維形成と II 型糖尿病の発症との間の因果関係は明らかにされていないが、アミロイド沈着物が細胞機能を障害することから、病的過程に関与していると考えられる。また hIAPP は A β と同様に生理的濃度では自己凝集せず、⁴⁾ PG と¹⁾ PS の 2 種類の脂質によりアミロイド線維形成が促進されることが、人工モデル膜を用いた実験により示されている。しかしながら、主要な酸性脂質として知られる PG, PS はどちらも哺乳類細胞の細胞膜外葉には発現しておらず、生細胞膜上で線維形成を促進しているとは考え難い。一方、ガングリオシドは細胞膜外葉に発現する主要な酸性脂質であり、生細胞膜上での hIAPP の線維形成を媒介している可能性が十分に考えられる。

そこで hIAPP を PC12 細胞に投与後、Congo

red 染色を行い、アミロイド線維の細胞膜上への蓄積過程を観察した。Congo red 陽性の hIAPP 線維はガングリオシドリッチな領域に特異的に蓄積することが明らかとなった [Fig. 4(a)]。また、投与濃度に依存して hIAPP 線維の蓄積量は増加し、25 μ M の濃度では微分干渉像 (DIC) から明らかな細胞毒性を示した [Fig. 4(b)]。hIAPP の細胞毒性も、アミロイド線維がある程度細胞膜上に蓄積した後に観察される。よって、生体内で形成される毒性体は、A β の場合と同様に、Congo red 陽性の線維構造を形成する過程で生じると考えられる。さらに、hIAPP のアミロイド線維形成過程においてオリゴマーは形成されないことが報告されており、⁴³⁾毒性体は恐らくアミロイド線維と考えられる。また、培地中でプレインキュベートした hIAPP を PC12 細胞に投与しても、hIAPP 線維の蓄積は観察されないことから、hIAPP 線維も A β と同様細胞膜を介して形成されることが明らかとなった [Fig. 4(c)]。

次に、ガングリオシドやコレステロールが hIAPP の線維形成に必須であるかどうかを確認するために、D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP)、又はコンパクチンを投与することでそれぞれガングリオシド合成、コレステロール合成を阻害した PC12 細胞に対し蓄積する hIAPP 線維を観察した。PDMP 処理により、PC12 細胞膜中のガングリオシド量は約 43% に減少した [Fig. 5(a)]。コンパクチン処理により、コレステロール量と並行してガングリオシド量が減少することは上述したとおりである (Table 1)。PDMP、コンパクチン処理により hIAPP 線維の蓄積量は顕著に減少し、Congo red の蛍光強度をもとに見積もった細胞あたりの線維蓄積量は、未処理の細胞への蓄積量に対してそれぞれ約 28%、36%であった [Fig. 5(b)]。また、ガングリオシドを発現していない Chinese hamster ovary (CHO) 細胞 [Fig. 5(a)] に hIAPP を投与しても、線維形成は確認されなかった [Fig. 5(b)]。以上の結果は、ガングリオシド、コレステロールが hIAPP のアミロイド線維形成において重大な役割を担っていることを示している。膵島において発現しているガングリオシド量は、膵臓組織の他の領域に比べて顕著に多く、⁴⁴⁾このことが、hIAPP アミロイド線維の膵島への特異的な沈着^{45,46)}の要因になっていると考えられる。

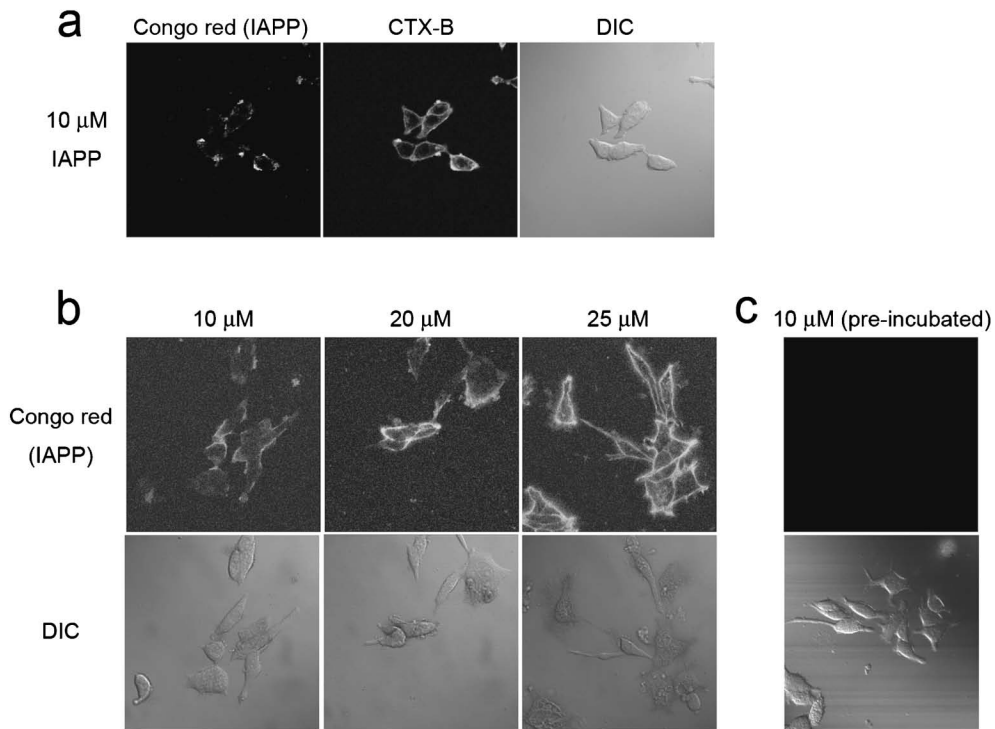


Fig. 4. Accumulation of hIAPP Amyloids on PC12 Cell Membranes

(a) PC12 cells were incubated with 10 μM hIAPP for 24 h and stained with Congo red and CTX-B. (b) PC12 cells were incubated with hIAPP at the indicated concentrations for 24 h and stained with Congo red. (c) Ten micromolar hIAPP was preincubated in culture medium for 24 h, and then applied to PC12 cells for 30 min.

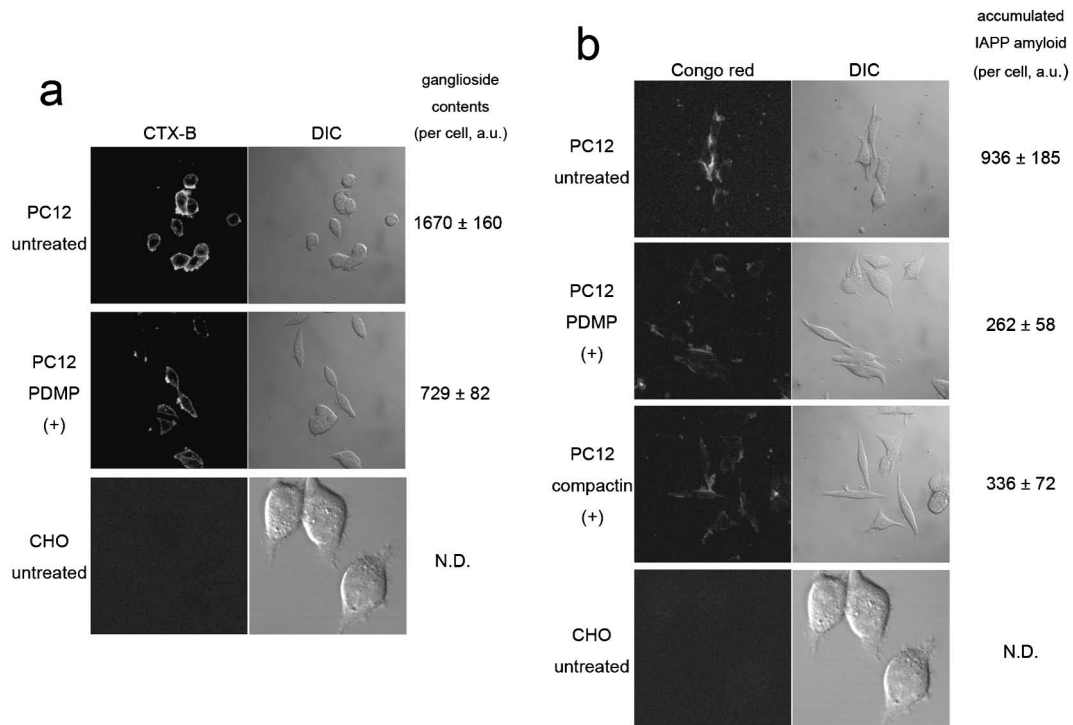


Fig. 5. Gangliosides- and Cholesterol-dependent Accumulation of hIAPP Amyloids on Plasma Membranes

(a) Cell surface gangliosides of PC12 or CHO cells in the indicated conditions were stained with CTX-B. Ganglioside contents were estimated from CTX-B fluorescence intensity. The data shown are the mean \pm S.D. ($n=4$). p (untreated versus PDMP-treated) <0.01 (two-sample t -test). (b) PC12 or CHO cells in the indicated conditions were incubated with 20 μM hIAPP for 24 h and then stained with Congo red. The amount of accumulated hIAPP amyloid was estimated from Congo red fluorescence intensity. The data shown are the mean \pm S.D. ($n=3$). p (untreated versus PDMP-treated) <0.02 , p (untreated versus compactin-treated) <0.02 (two-sample t -test).

8. おわりに

アミロイド線維形成過程において脂質分子の関与が報告されているアミロイド原性タンパク質は多数あるが、生細胞膜上でその形成過程が解析された例はなかった。本稿で紹介した方法により、生細胞膜上でアミロイド線維が蓄積する様子を非侵襲的に観察することが可能となり、脂質ラフト中のガングリオシドが、 $A\beta$ のみならず、hIAPPのアミロイド線維形成の足場としても機能していることが明らかとなった。ガングリオシドが媒介するアミロイド線維形成機構は、普遍的なメカニズムとして他の複数のアミロイド原性タンパク質の線維化を引き起こしている可能性もあり、今後の重要な研究課題である。本研究がアミロイドーシス発症機構の解明に向けた一助となることを期待してやまない。

REFERENCES

- Gorbenko G. P., Kinnunen P. K., *Chem. Phys. Lipids.*, **141**, 72–82 (2006).
- Simons K., Ikonen E., *Nature*, **387**, 569–572 (1997).
- Kakio A., Nishimoto S., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **41**, 7385–7390 (2002).
- Domanov Y. A., Kinnunen P. K., *J. Mol. Biol.*, **376**, 42–54 (2008).
- Wakabayashi M., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **371**, 924–933 (2007).
- Wakabayashi M., Matsuzaki K., *FEBS Lett.*, **583**, 2854–2858 (2009).
- Van Nostrand W. E., Melchor J. P., Ruffini L., *J. Neurochem.*, **70**, 216–223 (1998).
- Yamamoto N., Matsuzaki K., Yanagisawa K., *J. Neurochem.*, **95**, 1167–1176 (2005).
- Yamamoto N., Fukata Y., Fukata M., Yanagisawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1128–1137 (2007).
- Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L. V., Lebleu B., *J. Biol. Chem.*, **278**, 585–590 (2003).
- Ye L., Morgenstern J. L., Gee A. D., Hong G., Brown J., Lockhart A., *J. Biol. Chem.*, **280**, 23599–23604 (2005).
- Ban T., Hoshino M., Takahashi S., Hamada D., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y., *J. Mol. Biol.*, **344**, 757–767 (2004).
- Zhao H., Tuominen E. K., Kinnunen P. K., *Biochemistry*, **43**, 10302–10307 (2004).
- Sato S. B., Ishii K., Makino A., Iwabuchi K., Yamaji-Hasegawa A., Senoh Y., Nagaoka I., Sakuraba H., Kobayashi T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 23790–23796 (2004).
- Devanathan S., Salamon Z., Lindblom G., Grobner G., Tollin G., *FEBS J.*, **273**, 1389–1402 (2006).
- Kakio A., Nishimoto S. I., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 24985–24990 (2001).
- Nishio M., Fukumoto S., Furukawa K., Ichimura A., Miyazaki H., Kusunoki S., Ura-no T., Furukawa K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 33368–33378 (2004).
- Wakabayashi M., Okada T., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 1019–1023 (2005).
- Ivins K. J., Bui E. T., Cotman C. W., *Neurobiol. Dis.*, **5**, 365–378 (1998).
- Song M. S., Saavedra L., de Chaves E. I., *Neurobiol. Aging.*, **27**, 1224–1238 (2006).
- Hoekstra D., van IJzendoorn S. C. D., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 496–502 (2000).
- Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C. G. Simons K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6460–6464 (1998).
- Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P., Runz H., Kuhl S., Bertsch T., von Bergmann K., Hennerici M., Beyreuther K., Hartmann T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5856–5861 (2001).
- Eehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K., *J. Cell. Biol.*, **160**, 113–123 (2003).
- Wolozin B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5371–5373 (2001).
- Pappolla M. A., Bryant-Thomas T. K., Herbert D., Pacheco J., Fabra Garcia M., Manjon M., Girones X., Henry T. L., Matsubara E., Zambon D., Wolozin B., Sano M., Cruz-Sanchez F. F., Thal L. J., Petanceska S. S., Refolo L. M., *Neurology*, **61**, 199–205 (2003).
- Kayed R., Head E., Thompson J. L., McIntire T. M., Milton S. C., Cotman C. W., Glabe C. G., *Science*, **300**, 486–489 (2003).
- Hardy J., Selkoe D. J., *Science*, **297**, 353–356

- (2002).
- 29) Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., Wals P., Zhang C., Finch C. E., Krafft G. A., Klein W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6448–6453 (1998).
- 30) Hartley D. M., Walsh D. M., Ye C. P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P. M., Teplow D. B., Selkoe D. J., *J. Neurosci.*, **19**, 8876–8884 (1999).
- 31) Hayashi H., Kimura N., Yamaguchi H., Hasegawa K., Yokoseki T., Shibata M., Yamamoto N., Michikawa M., Yoshikawa Y., Terao K., Matsuzaki K., Lemere C. A., Selkoe D. J., Naiki H., Yanagisawa K., *J. Neurosci.*, **24**, 4894–4902 (2004).
- 32) Yamamoto N., Matsubara E., Maeda S., Minagawa H., Takashima A., Maruyama W., Michikawa M., Yanagisawa K., *J. Biol. Chem.*, **282**, 2646–2655 (2007).
- 33) Barghorn S., Nimmrich V., Striebinger A., Krantz C., Keller P., Janson B., Bahr M., Schmidt M., Bitner R. S., Harlan J., Barlow E., Ebert U., Hillen H., *J. Neurochem.*, **95**, 834–847 (2005).
- 34) Johansson A. S., Garlind A., Berglind-Dehlin F., Karlsson G., Edwards K., Gellerfors P., Ekholm-Pettersson F., Palmblad J., Lannfelt L., *FEBS J.*, **274**, 990–1000 (2007).
- 35) Grutzendler J., Helmin K., Tsai J., Gan W. B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1097**, 30–39 (2007).
- 36) Tsai J., Grutzendler J., Duff K., Gan W. B., *Nat. Neurosci.*, **7**, 1181–1183 (2004).
- 37) Lorenzo A., Yankner B. A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **777**, 89–95 (1996).
- 38) Jana A., Pahan K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 51451–51459 (2004).
- 39) Petkova A. T., Leapman R. D., Guo Z., Yau W. M., Mattson M. P., Tycko R., *Science*, **307**, 262–265 (2005).
- 40) Okada T., Wakabayashi M., Ikeda K., Matsuzaki K., *J. Mol. Biol.*, **371**, 481–489 (2007).
- 41) Cooper G. J., Willis A. C., Clark A., Turner R. C., Sim R. B., Reid K. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8628–8632 (1987).
- 42) Westermark P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D. W., O'Brien T. D., Johnson K. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3881–3885 (1987).
- 43) Soong R., Brender J. R., Macdonald P. M., Ramamoorthy A., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 7079–7085 (2009).
- 44) Saito M., Sugiyama K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **376**, 371–376 (2000).
- 45) Kahn S. E., Andrikopoulos S., Verchere C. B., *Diabetes*, **48**, 241–253 (1999).
- 46) Rocken C., Linke R. P., Saeger W., *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **421**, 339–344 (1992).