

## 固体 NMR を用いた膜貫通ペプチドの 脂質二重膜中における構造解析

佐藤 毅, 相本 三郎

生体膜では細胞が機能していくための様々な現象が生じており、その中心的役割を果たしているのは膜タンパク質である。生体膜という環境において、膜タンパク質が、どのようにその形を変え、どのように他のタンパク質や機能性分子と相互作用しているのか、そのメカニズムを膜タンパク質の膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを用いることによって解析することが可能である。アルツハイマー病に関連するアミロイド前駆体タンパク質膜貫通-膜近傍部位の固体 NMR を用いた脂質二重膜中における構造解析を例として、膜貫通ペプチドを用いた生体膜上での生物学的現象の解析研究の紹介を行う。

### 1. はじめに

生体膜は、細胞あるいは細胞小器官などにおいて、外側と内側を区画化し、外部からの情報や刺激を内部へ伝達可能な形に変換したり、外部と内部とでの物質輸送の制御を行うなど、生命秩序の形成に大きな役割を果たしている。このような生体膜上での事象において中心的役割を果たしているのは膜タンパク質である。膜タンパク質は膜貫通部位を有することによって特徴づけられ、最近のヒトプロテオームの解析結果<sup>1)</sup>では、生体内に存在するタンパク質の27%が膜貫通部位として $\alpha$ ヘリックスを有するタンパク質であることが示唆されている。

筆者らは膜タンパク質が生体膜上でどのように構造を変え、どのように他のタンパク質や機能性脂質分子と相互作用することによって一つの生物学的現象を引き起こしているのかを、構造を基盤として捉えることを目的として研究を行っている。このような研究において、対象としている

膜タンパク質の構造情報は重要である。しかしながら、膜タンパク質の構造解析は困難であり、構造に関する報告は指数関数的に増加しているものの、2008年時点では、200程度の膜タンパク質構造解析が達成されているにすぎない<sup>2)</sup>。生体における膜タンパク質の機能的な重要性や種類を考えると、決して満足のいく数字ではない。また、例えば全体構造に関する報告が存在していても、生体膜という様々な機能性分子が存在する環境下では、脂質などの組成が変化するとタンパク質の構造も変化してしまう可能性も否定できない。脂質二重膜の組成を変化させ、個々に全長タンパク質を用いて解析していくのは、途方もない労力が必要とし、現時点ではあまり現実的なアプローチではなさそうである。そこで、筆者らは合成ペプチドを用いた比較的シンプルな系で、生体膜上での現象の分子化学的理解を試みることにし、その第一歩として、膜タンパク質の膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜中における構造や挙動の解析を行っている。膜タンパク質における膜貫通-膜近傍部位は、生体膜からの影響を最も大きく受け、膜タンパク質の解析を困難とさせる原因となっている。しかし、膜タンパク質の機能発現機構を明らかにするうえで、この部位がブラックボックス的存在であり、生体膜上での生物学的事象を理解するには、当該部位の解析が必須である。筆者らは、受容体型チロシンキナーゼの機能発現機構や生体膜中における膜タンパク質のプロセッシング機構に注目し、関連

大阪大学蛋白質研究所 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2)

Structural studies on transmembrane peptides in lipid bilayers using solid state NMR

Takeshi Sato and Saburo Aimoto (Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

膜タンパク質の膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを合成化学的に調製し、固体NMRを中心とした各種分光学的手法により解析を行っている。

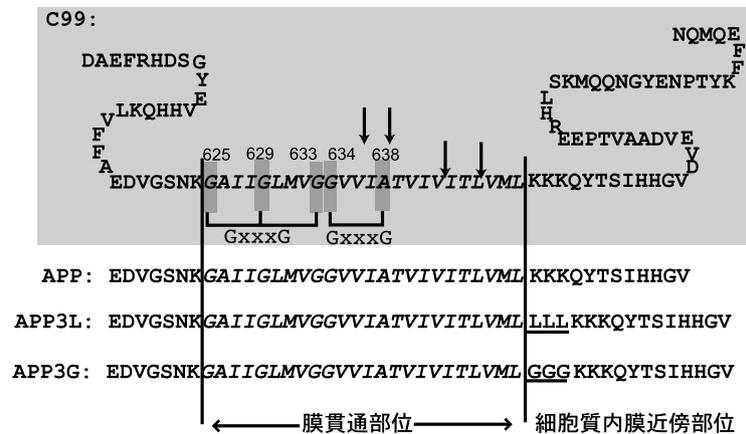
本稿では、筆者らが最近行った、アミロイドβ前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) の膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜中における構造解析研究<sup>3)</sup>を例として、膜貫通ペプチドを用いた生体膜上での生物学的現象の解析について紹介する。

## 2. APP 膜貫通-膜近傍配列ペプチドの化学合成

本研究における試料調製について述べる前に、膜タンパク質や膜貫通部位を有するペプチドがなぜ扱いにくいのかを考えてみる。大きな原因の一つには、膜貫通部位のアミノ酸組成や配列に起因する物性が挙げられる。膜貫通部位には Leu の含有率が最も高く、以下 Ala, Val, Phe, Ile, Gly, Thr が続く<sup>4)</sup>。Leu, Ile, Val, Phe は疎水性の高いアミノ酸であり、これらアミノ酸の含有率が高くなれば、分子全体の疎水性は高くなり水系溶媒には難溶となる。また、Gly は膜貫通ヘリックス中にてヘリックス-ヘリックス間のパッキングに關与する<sup>5)</sup>ことが知られている一方で、アミロイド線維構造にみられるシート-シート間のパッキング (β サンドイッチ構造) にも關与することが知られている<sup>6,7)</sup>。Gly や Ala は β サンドイッチ構造によくみられること、Ile, Val, Thr など側鎖に枝分かれを有するアミノ酸は β シート構造によく見出されることから、膜貫通ヘリックスを構成するアミノ酸配列は難溶性のアミロイド線維様構造を形成しやすい性質を有しているということも示唆されている<sup>6)</sup>。つまり、膜タンパク質の構造解析を進めていくには、疎水性の高さや会合を起こしやすい性質と

戦って行かねばならないということになる。

ペプチドの化学合成は固相法の登場<sup>8)</sup>、HPLC 装置の普及とともに、大きく発展した。アミノ酸 40~50 残基から構成されるペプチドは比較的容易に調製することができる。しかし、ペプチド合成分野で言われる“difficult sequence”を含んだ配列のペプチドの合成は容易ではない。Kent の定義に基づくと Ile, Thr, Val 等の側鎖に枝分かれを有するアミノ酸が多く含まれる配列が difficult sequence に相当する。このようなアミノ酸は、ペプチド鎖伸長におけるアミノ酸縮合反応効率が低く<sup>9)</sup>、さらに、それらアミノ酸が連続している場合、伸長途中のペプチド鎖が樹脂上で会合してしまう。膜貫通部位のアミノ酸配列は difficult sequence の連続であると言っても過言ではない。APP の膜貫通-膜近傍部位のアミノ酸配列を **図 1** に示す。典型的な difficult sequence であり、それ自身に会合体 (アミロイド線維) を形成するアミロイドβタンパク質 (Aβ) の配列が含まれる。合成途上にてペプチド鎖の伸長そのものが困難であることが予想された。先に述べた通り、difficult sequence を含んだペプチド鎖の伸長における困難な点は、アミノ酸縮合効率が低いこと、樹脂上においてペプチド鎖が会合してしまうことである。これらの問題に対して、筆者らはより高い縮合効率が期待できる 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt)、*O*-(7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)<sup>10)</sup> を縮合剤として用いること、さらに伸長途中のペプチド鎖の会合を抑制することにおいて効果があると考えられている疑似プロリン (pseudoproline)<sup>11)</sup> を用いることによって対処し、目的物である APP 膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドの合成を達成した。



**図 1** C99 と実験に用いた APP 膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドのアミノ酸配列

γ-セクレターゼの基質である C99 と本研究で用いた APP, APP3L, APP3G 変異体の膜貫通-膜近傍部位配列を合わせて示す。膜貫通部位と考えられる配列はイタリックで示し、矢印は、γ-セクレターゼによる切断部位を示す。下線部は導入した変異配列を示す。

合成ペプチドの精製は、一般的には逆相 HPLC を用いて行われ、溶離液にはトリフルオロ酢酸を含んだ水/アセトニトリルの混合溶媒、分離用担体には ODS (C18) カラムという組み合わせで用いられることが多い。しかし、膜貫通ペプチドは、含水アセトニトリルに難溶であることも珍しくなく、より溶解力の高い溶媒を用いる必要がある。筆者らは先の研究において、逆相 HPLC による膜貫通ペプチドの精製法の検討を行い<sup>12)</sup>、そこで見出された知見をもとに、溶離液には水/1-プロパノール/アセトニトリル、または水/ギ酸/1-プロパノールの混合溶媒、分離用担体には C4 カラムを用いることで今回の目的物の単離、精製に成功した。

### 3. APP の細胞膜中におけるプロセッシング

アルツハイマー病は記憶障害等の認知機能障害を主な症状とする疾患である。アルツハイマー病の脳では老人斑と呼ばれる蓄積物が初期段階で出現する<sup>13)</sup>。この老人斑の主な構成要素が A $\beta$  である。生体では複数の長さの A $\beta$  の生成が知られているが、そのほとんどはアミノ酸 40 残基からなる A $\beta$ 40 である。老人斑で見出されるのは、それより 2 残基長い A $\beta$ 42 である<sup>13)</sup>。この A $\beta$ 42 はアミロイド線維を形成し、その凝集性は A $\beta$ 40 と比べて高く<sup>14)</sup>、A $\beta$ 42 の分泌割合増加がアルツハイマー病発症につながると考えられている。

アルツハイマー病の原因物質となる A $\beta$  の生成機構を図 2 にまとめた。A $\beta$  は APP が生体膜上において各種セクレターゼと呼ばれる酵素によりプロセッシングされることで生成する。1 回膜貫通型タンパク質である APP は、まず、 $\beta$ -セクレターゼにより、その細胞外部位においてプロセッシングを受ける。その結果、細胞膜上には C99 と呼ばれる 99 残基からなるタンパク質断片が残る。この C99 は  $\gamma$ -セクレターゼと呼ばれるタンパク質複合体によって引き続きプロセッシングを受け、その結果、アミロイドを形成する A $\beta$

が生成する。A $\beta$  の配列は APP の膜貫通部位配列を含み、C99 はその膜貫通部位において  $\gamma$ -セクレターゼによりプロセッシングを受けるということになる。これは、細胞膜という疎水的環境において水分子を必要とする加水分解反応が生じているということの意味するのだろうか？ また、先に述べた複数の長さの A $\beta$  が存在するという点に関して、C99 の切断は膜貫通部位の C 末端側から、N 末端方向に順次切断されていくと考えられている<sup>15,16)</sup>。このプロセッシング機構を理解するには登場する役者の構造に関する情報が有効である。 $\gamma$ -セクレターゼの構造に関しては、低分解能のもの報告がある<sup>17)</sup>。また、APP についてはこのプロセッシングを受ける部位に関する報告はない。生体膜中でのプロセッシングの分子機構をイメージするには十分な構造情報は存在しない。そこで筆者らはこのプロセッシング機構を理解することを目指し、APP の膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜中における構造解析を行うこととした。

APP は 1 回膜貫通型タンパク質であり、細胞膜上において二量体を形成するということが複数報告されている<sup>18,19)</sup>。さらに、その膜貫通部位配列もそれ自身脂質二重膜上において二量体を形成すること<sup>20)</sup>が報告されている。また、APP の膜貫通部位には、膜貫通ヘリックスの会合部位によく見出される GxxxG 様モチーフが 2 組存在する (図 1)。G625-G629-G633 における Gly は  $\alpha$ ヘリックスを形成した場合、同じ側面に存在し、実質一つの GxxxG 様モチーフと考えられる。もう 1 組は G634-A638 の配列である。筆者ら、そして他のグループは、先の研究において、G625-G629-G633 に見られる GxxxG 配列は A $\beta$  の生成に必要なことを見出した<sup>20,21)</sup>。A $\beta$  の生成において、この GxxxG 配列がどのように関与しているのかを探るべく、筆者らは、まず、CHI という molecular dynamics 計算プログラム<sup>22)</sup>を用いることにより、APP の膜貫通部位の二量体構造における会合面に関する情報を得ることとした。その結果、二つの安定な構造が算出され、それらは、G625-

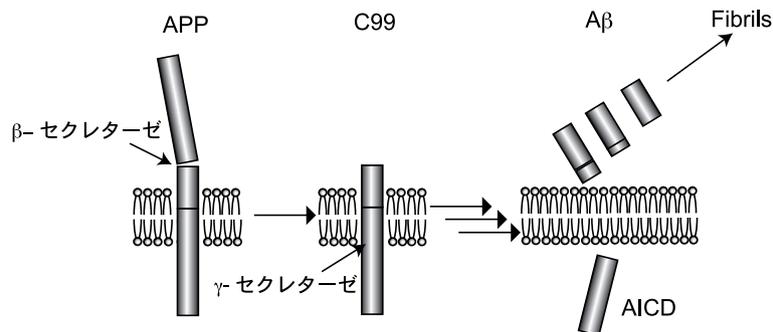


図 2 A $\beta$  の生成機構

APP はその膜外部位において  $\beta$ -セクレターゼによってプロセッシングを受け、その結果、膜上には C99 が残る。引き続き C99 は、その膜貫通部位において、 $\gamma$ -セクレターゼによる複数のプロセッシングを受け、異なる長さの A $\beta$  が生成する。

G629-G633,あるいはG634-A638を介しての二量体構造であった。G625-G629-G633に関しては、この部位がA $\beta$ の生成に何らかの形で関わっている<sup>21)</sup>ということが示唆されている。一方、G634-A638は、Gormanらにより、グリコホリンAとの配列の比較から、APPの二量体会合面に位置することが推察されている<sup>23)</sup>。膜貫通部位の構造が、どのようにしてプロセシングに影響を与えるのか、解析を行うこととした。

#### 4. APPタンパク質膜貫通-膜近傍部位の構造解析

APPが加水分解される部位周辺の構造と膜貫通部位の二量体会合面に関する情報を固体NMRを用いることによって得ることとした。

まず、APP膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜中における二次構造の解析を行った。実験は、部位特異的に<sup>13</sup>C標識されたアミノ酸を導入したAPP膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを数種類化学合成し、脂質二重膜に挿入の後、固体NMR、CP-MAS法にて、一次元の<sup>13</sup>Cスペクトルを得るというものである。<sup>13</sup>Cのケミカルシフトが、その二次構造を反映する<sup>24)</sup>ことを利用した実験である。なお、脂質二重膜としてはホスファチジルコリン(ここではDMPC)とホスファチジルグリセロール(ここではDMPG)から構成されるものを用いた。その結果、今回の系において、APP膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドは、その膜貫通部位では $\alpha$ ヘリックスを形成し、C末端側の膜近傍部位配列はランダムな構造を有していることがわかった。この $\alpha$ ヘリカル構造からランダム構造へのstructural transition(構造の変移)は脂質二重膜の表面付近で生じている(図3)。また、Notch1という別の $\gamma$ -セクレターゼの基質に関しても、その膜貫通-細胞質内膜近傍部位に関して同様の実験を行ったところ、APPと類似の構造がみられた。筆者ら

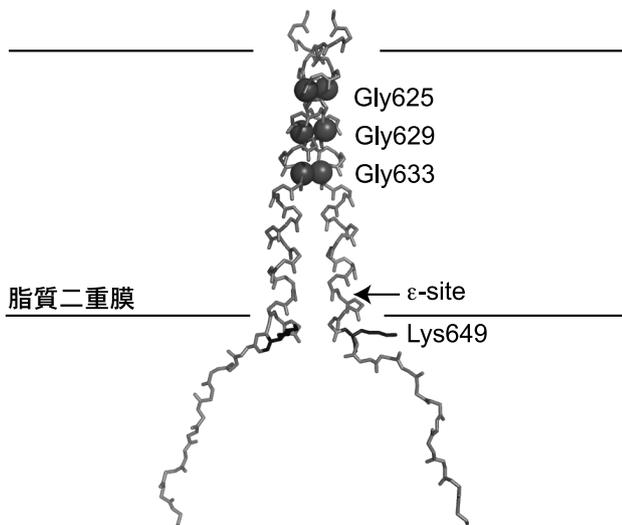


図3 APP膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜中での構造モデル

は、この構造の変移と $\gamma$ -セクレターゼによるプロセシングの因果関係を細胞を用いた実験で調べることとした。

実験は、膜貫通部位と細胞質内膜近傍部位の境界に存在するKKKという配列のN末端側にそれぞれ、LLL,またはGGGの3残基を挿入したAPP(図1)を細胞に発現させ、実際に $\gamma$ -セクレターゼによるプロセシングを観察するというものである。一般的にはLeuは「ヘリックスプロモーター」として、Glyは「ヘリックスブレーカー」としての性質が知られている<sup>25-28)</sup>。ここではLLLの挿入により $\alpha$ ヘリックスを1巻き長くし、一方GGGの挿入は野生型配列において $\alpha$ ヘリックスがほどける部位に構造変化を与えないことを想定した。調製した変異体が細胞膜の上で、意図した通りの構造を形成しているかどうか定かではないが、LLL, GGGをそれぞれ挿入した膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを化学合成し、脂質二重膜へ包埋して、注目部位の二次構造を固体NMRにて解析したところ、狙い通りの構造が形成されていることを確認した。

LLLを挿入したAPP(APP3L)とGGGを挿入した(APP3G)を、それぞれCHO細胞に発現させ、実際に $\gamma$ -セクレターゼによるプロセシングの生成物を観察したところ、APP3LにおいてはA $\beta$ の生成が抑えられ、さらにはA $\beta$ の生成に伴って、細胞質内に放出されるAPP細胞質内ドメイン(APP intracellular domain: AICD)の生成も抑えられることがわかった。これは $\gamma$ -セクレターゼによるプロセシングが生じていないことを示している。一方、APP3Gの切断に関しては、野生型と大きな差は見られなかった。つまり、細胞質内膜近傍部位における $\alpha$ ヘリカル構造からランダム構造への構造の変移がAPPの $\gamma$ -セクレターゼによるプロセシングにおいては重要であることが示唆されたと考えることができる。

次に、膜貫通部位二量体構造における会合面についての知見を得るべく、<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C間の距離情報が得られるdipolar assisted rotational resonance(DARR)のパルスプログラムを用いて実験を行った。その結果、APP膜貫通部位はG625-G629-G633のGxxxGモチーフを介して二量体を形成することがわかった(図3)。

#### 5. APP膜貫通-膜近傍部位の構造解析の考察

本研究ではAPPの膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを合成化学的に調製し、これらの脂質二重膜中での構造解析を固体NMRを用いて行い、二つの重要な生物学的知見が得られたものと考えている。

まず、APPの膜貫通部位と細胞質内膜近傍部位の境界において、 $\alpha$ ヘリカル構造からランダム構造への構造の変移が生じており(図3)、これが $\gamma$ -セクレターゼによる一連のプロセシングには必要である可能性が見出されたことである。

一般的に、タンパク質加水分解酵素の基質において、その切断部位付近の配列はほどけた構造を有していると考えられている。APPと同様、その膜貫通部位でプロセシングを受ける sterol regulatory element binding protein (SREBP) という膜タンパク質では、その膜貫通部位中の Asn-Pro という配列が、切断部位付近の配列をほどけた形にするのに必要であり、この Asn-Pro 配列を変異させてしまうとプロセシングが生じないことが示されている<sup>29)</sup>。APPの場合、その膜貫通部位相当配列は脂質二重膜中で安定した $\alpha$ ヘリックスを形成しているが、そのC末端膜近傍では、 $\alpha$ ヘリックスがほどけた構造をとっている。この部分が $\gamma$ -セクレターゼの活性部位に入り込み、最初の加水分解反応が Leu645-Val646 位 ( $\epsilon$ -site) で生じ、A $\beta$ 49 が生成する。この可能性を本実験結果が示している。その後は、順次、複数箇所での加水分解反応が生じ、短い A $\beta$  を生成していくと考えられているが、ここでもほどけた構造の形成 (helix unwinding) が鍵となると考えている。A $\beta$ 40 を生成する加水分解反応は V636-I637 位で生じるが、そのC末端側のアミノ酸配列は Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-The-Leu であり (図1)、一般的に $\alpha$ ヘリックスを不安定化させる性質を有するアミノ酸<sup>25-28)</sup>である Val, Ile, Thr が多く並ぶ。つまり $\gamma$ -セクレターゼによる加水分解反応が生じた後、 $\alpha$ ヘリックスがほどけ、さらに次の加水分解反応が生じるというサイクルが繰り返されていると考えている。これが筆者らの考えている progressive cleavage model である (図4)。

本実験によって見出された重要な二つ目のポイントは、APPの膜貫通部位は G625-G629-G633 の GxxxG モチーフを介して二量体を形成するという結果である。筆者らは先の研究において、G625 と G629 を同時に Leu に置換した APP 変異体 (GG625/629LL) を細胞に発現させ、 $\gamma$ -セクレターゼによる切断を解析した。その結果、AICD (APP intracellular domain) に関しては、野生型 APP と同程度の生成量が確認されたが、A $\beta$  の生成量は著しく減少するという結果を得た。さらに興味深いことに、GG625/629LL は SDS 存在下においても二量体を形成することがわかった。これは野生型配列よりも安定で強固な二量体を形成するこ

とを示唆する。また、GG625/629LL の膜貫通部位配列について、CHI により二量体会合面の予測計算を行ったところ、G634-A638 を介した二量体構造が最も安定な構造として算出された<sup>21)</sup>。この結果は、先に述べた野生型配列に関して Gorman らが予測した会合面に一致する<sup>23)</sup>。これらの結果から、 $\gamma$ -セクレターゼによる膜中でのプロセシングという現象において、基質である APP は特異な二量体構造を形成していることが必要であり、その二量体は G625-G629-G633 を会合面としていることが示唆される。

## 6. 展 望

以上、APP の膜貫通-膜近傍部位の脂質二重膜上における構造解析を例として、合成ペプチドと固体 NMR を用いることによる、筆者らの膜タンパク質の構造生物学的研究を示した。膜貫通-膜近傍部位ペプチドの合成から固体 NMR による測定、構造解析は十分現実的であり、さらに細胞生物学的手法と組み合わせることにより、様々な生体膜上での事象の解析が行えるものと考えている。ペプチド化学を専門分野としてきた筆者らが、生体膜上での現象の解析に関して、どのような研究を展開していくことが可能かを二つの点から考えてみる。

まず、膜タンパク質における膜貫通-膜近傍部位の機能構造解析についてである。筆者は、膜タンパク質が生体膜上において、どのように構造を変え、他のタンパク質や機能性脂質分子と、どのように相互作用することによって、一つの生物学的現象が生じているのかをイメージとして捉えることを目的とした研究を行っている。当該部位の機能は、理想的には全長タンパク質構造、または、膜外部位も含んだ形の標品で評価されるべきである。そのために、筆者らは、タンパク質断片同士を縮合させることによって、長鎖のタンパク質を合成する方法であるライゲーション法を用いた膜タンパク質の機能構造解析研究の準備を行っている。その概念図を図5に示す。一般的に、ライゲーションの合成ブロックにはC末端にチオエステルを有するタンパク質断片を用いる。合成化学的<sup>30)</sup>、生物学的<sup>31)</sup>にも、チオエステルを有するタンパク質断片の調製法は確立され

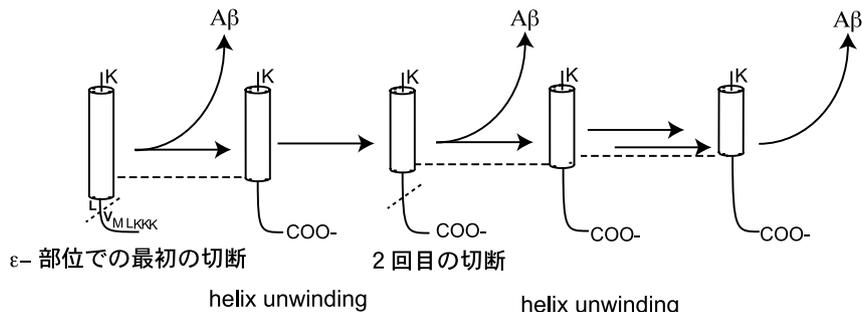


図4 本研究結果から提唱した APP の progressive cleavage モデル

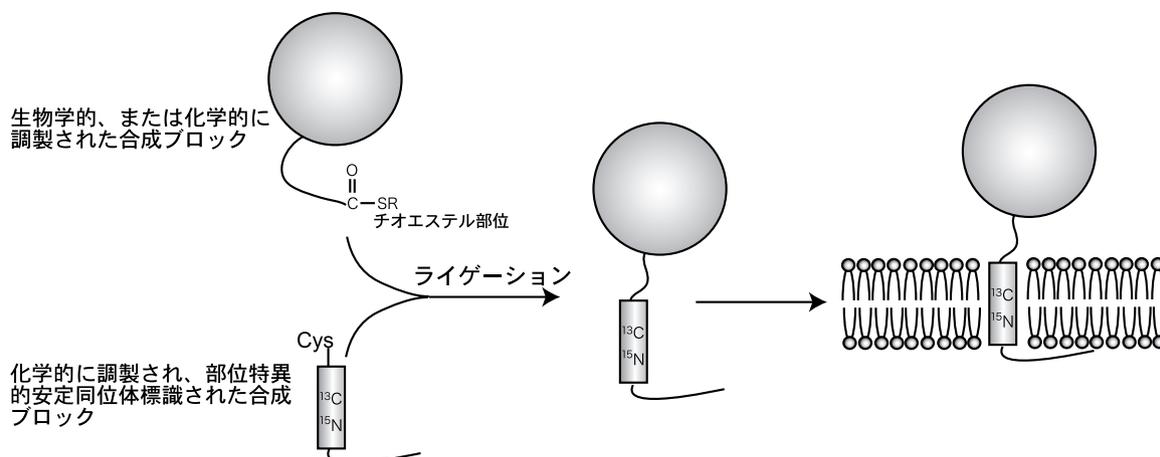


図5 ライゲーション法を用いた細胞外部位-膜貫通部位配列を含むタンパク質断片の調製の概念図

ライゲーションには任意のアミノ酸とCysの間で縮合を行うネイティブケミカルライゲーションを用いる。膜外部位のチオエステルを有する合成ブロックは、生物学的、または合成化学的にも調製が可能である。また、膜貫通部位は合成化学的に調製することによって部位特異的安定同位体標識を導入することができる。それらをライゲーションによって縮合し、得られたタンパク質断片を脂質二重膜中に包埋して、構造解析試料とする。

ている。従って、注目している膜貫通-膜近傍部位のみに安定同位体標識を導入し、固体NMRにより測定することが可能である。つまり、膜外部位が膜貫通部位に与える影響も合わせて解析することが可能となる。例えば、1回膜貫通型受容体の活性化メカニズムの解明においては、リガンド結合に伴った受容体膜貫通部位の構造変化を捉えることも可能となる。

次に、膜タンパク質と生体膜を構成する機能性脂質分子との相互作用の解析である。生体膜における生物学的現象はタンパク質の構造解析によってのみで理解が達成されることはなく、そのタンパク質と脂質分子との相互作用の解析も必要である。自らの系において安定であると考えているタンパク質構造であっても、脂質二重膜の組成が異なると全く異なった構造を形成する可能性も否定できない。理想的には、膜タンパク質の機能が再現される再構成系における構造解析が望ましい。そのような系を構築していくには、生体膜を構成している個々の機能性脂質分子と膜タンパク質の相互作用を詳細に解析していく必要がある。このような解析には、脂質からの影響を最も大きく受ける膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを用いた実験が有効であると考える。シンプルな系において特異的な相互作用が見出されることが期待できる。

これらプロジェクトが始まろうとしている。成果に期待したい。

## 文 献

- Almen, M.S., Nordstrom, K.J.V., Fredriksson, R., & Schioth, H.B. (2009) *BMC Biol.*, 7, 50.
- White, S.H. (2009) *Nature*, 459, 344-346.
- Sato, T., Tang, T.C., Reubins, G., Fei, J.Z., Fujimoto, T., Kienlen-Campard, P., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., Aimoto, S., & Smith, S.O. (2009) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 1421-1426.
- Eilers, M., Patel, A.B., Liu, W., & Smith, S.O. (2002) *Biophys. J.*, 82, 2720-2736.
- Javadpour, M.M., Eilers, M., Groesbeck, M., & Smith, S.O. (1999) *Biophys. J.*, 77, 1609-1618.
- Liu, W., Crocker, E., Zhang, W.Y., Elliott, J.I., Luy, B., Li, H.L., Aimoto, S., & Smith, S.O. (2005) *Biochemistry*, 44, 3591-3597.
- Sato, T., Kienlen-Campard, P., Ahmed, M., Liu, W., Li, H.L., Elliott, J.I., Aimoto, S., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., & Smith, S.O. (2006) *Biochemistry*, 45, 5503-5516.
- Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149-2154.
- Kent, S.B.H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 957-989.
- Carpino, L.A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4397-4398.
- Mutter, M., Nefzi, A., Sato, T., Sun, X., Wahl, F., & Wöhr, T. (1995) *Pept. Res.*, 8, 145-153.
- Sato, T., Kawakami, T., Akaji, K., Konishi, H., Mochizuki, K., Fujiwara, T., Akutsu, H., & Aimoto, S. (2002) *J. Pept. Sci.*, 8, 172-180.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994) *Neuron*, 13, 45-53.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., & Lansbury, P.T. (1993) *Biochemistry*, 32, 4693-4697.
- Yu, C.J., Kim, S.H., Ikeuchi, T., Xu, H.X., Gasparini, L., Wang, R., & Sisodia, S.S. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 43756-43760.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., & Ihara, Y. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 436-445.
- Lazarov, V.K., Fraering, P.C., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D. J., & Li, H.L. (2006) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 6889-6894.
- Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt,

- C., Beher, D., Bayer, T.A., Beyreuther, K., & Multhaup, G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 33923–33929.
- 19) Chen, C.D., Oh, S.Y., Hinman, J.D., & Abraham, C.R. (2006) *J. Neurochem.*, **97**, 30–43.
- 20) Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., & Multhaup, G. (2007) *EMBO J.*, **26**, 1702–1712.
- 21) Kienlen-Campard, P., Tasiaux, B., Van Hees, J., Li, M., Huysseune, S., Sato, T., Fei, J.Z., Aimoto, S., Courtoy, P.J., Smith, S.O., Constantinescu, S.N., & Octave, J.N. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 7733–7744.
- 22) Adams, P.D., Engelman, D.M., & Brunger, A.T. (1996) *Proteins*, **26**, 257–261.
- 23) Gorman, P.M., Kim, S., Guo, M., Melnyk, R.A., McLaurin, J., Fraser, P.E., Bowie, J.U., & Chakrabarty, A. (2008) *BMC Neurosci.*, **9**, 17.
- 24) Saitô, H., Tuzi, S., & Naito, A. (1998) *Annu. Rep. NMR Spect.*, **36**, 79–121.
- 25) Merutka, G., Lipton, W., Shalongo, W., Park, S.H., & Stellwagen, E. (1990) *Biochemistry*, **29**, 7511–7515.
- 26) Lyu, P.C., Liff, M.I., Marky, L.A., & Kallenbach, N.R. (1990) *Science*, **250**, 669–673.
- 27) Oneil, K.T. & Degrado, W.F. (1990) *Science*, **250**, 646–651.
- 28) Li, S.C. & Deber, C.M. (1992) *FEBS Lett.*, **311**, 217–220.
- 29) Ye, J., Dave, U.P., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., & Brown, M. S. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5123–5128.
- 30) Hojo, H. & Aimoto, S. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 111–117.
- 31) Hofmann, R.M. & Muir, T.W. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 297–303.
-