

Radicicol이 신경세포에서 베타 아밀로이드 전구단백질의 대사에 미치는 영향

임재윤[#] · 이일화 · 이경아 · 공두균 · 최부진 · 이충수 · 은재순
우석대학교 약학대학

(Received June 28, 2007; Revised August 9, 2007)

Effects of Radicol on the Metabolism of β -Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Jae-Yoon Leem[#], Rihua Li, Kyung-A Lee, Du-Gyun Gong, Bu-Jin Choi, Choong-Soo Lee and Jae-Soon Eun
College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract — Alzheimer's disease (AD) is characterized pathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptides, which are generated by processing of amyloid precursor protein (APP). It is urgent to develop effective therapies for the treatment of AD, since our society rapidly accelerate aging. $A\beta$ peptides have been believed to be neurotoxic and now are also considered to have effects on the mechanism of memory formation. In this study, effects of radicol on the metabolism of APP were analyzed. Radicol inhibited the secretion of $A\beta$ from the Neuro2a cell line (APP_{swe} cell) expressing APP_{swe}. Beta-site APP cleaving enzyme (BACE) fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay revealed that it inhibited BACE activity in a dose dependently manner. Immunoblotting study showed that it inhibited intracellular heat shock protein (HSP)90 and it increased the secretion of HSP90 from the APP_{swe} cells. We suggest that radicol inhibits APP metabolism and $A\beta$ generation by the means of HSP90 inhibitory mechanism and partially BACE inhibitory mechanism. This is the first report that radicol inhibits the secretion of $A\beta$ peptides from neuroblastoma cells.

Keywords □ Alzheimer's disease, β -amyloid peptides, radicol, APP_{swe}, BACE, HSP90

고령화 사회로 진입함에 따라 치매환자가 급속히 증가하고 있는 현실은 개인의 삶의 질을 저하시키며 과다한 의료비 지출로 인하여 국가 경쟁력을 감소시킴으로써 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다.¹⁾ 현재 acetylcholine esterase 저해제인 donepezil, galantamine 및 rivastigmine 등이 임상에서 사용되고 있으나 부작용이 심하고 효과적인 치료제가 없는 실정이다.²⁻⁴⁾ 치매(dementia)는 뇌의 위축과 신경세포의 감소 및 노인 반(senile plaque)의 출현으로 인한 뇌신경의 비가역적인 파괴가 원인이 되어 기억력과 언어장애, 행동장애 등의 다양한 후천적 인지기능 장애 증상을 수반하는 증후군을 일컫는다.⁵⁾ 치매는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매 및 파킨슨 병에 의한 퇴행성 질환, 갑상선 기능 저하증에 의한 대사성 질환, 뇌종양 또는 감염성 질환 등에 기인하는 기타 치매로 분류된다.⁶⁾ 알츠하이머형 치매환자의 뇌조직에서는 신경세포 주위에서 생성되는 senile plaque

와 세포내부에서 생성되는 neurofibrillary tangle과 같은 병리학적인 특징을 관찰할 수 있다.^{7,8)} Neurofibrillary tangle은 tau protein의 과인산화에 의하여 형성되며, senile plaque는 세포 밖으로 분비된 β -amyloid($A\beta$)가 신경세포 주변에서 응집되어 형성된다.^{7,8)}

알츠하이머형 치매는 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 sporadic type으로 나타난다.¹⁾ 발병원인은 familial type의 경우, 베타 아밀로이드 전구 단백질(Amyloid precursor protein, APP), presenilin 1, presenilin 2 등의 변이 유전자가 알려져 있으며⁹⁾ sporadic type의 경우는 노화 및 ApoE4 대립형질이 보고되었다.^{10,11)} $A\beta$ 의 축적에 의한 senile plaque는 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. $A\beta$ 는 APP가 2 종류의 protease에 의해 절단되어 생기는데, 아미노 말단을 절단하는 것이 β -secretase,¹²⁾ 카르복시 말단을 절단하는 것이 γ -secretase이다.¹³⁾ 알츠하이머형 치매치료제 개발의 표적의 하나인 γ -secretase는 presenilin(PS), nicastrin, anterior pharynx defective gene(APH)-1, presenilin enhancer gene (PEN)-2 등으로 이루어진 complex 구조로 존재하며 Notch1,

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1575 (팩스) 063-290-1812
(E-mail) jyleem@woosuk.ac.kr

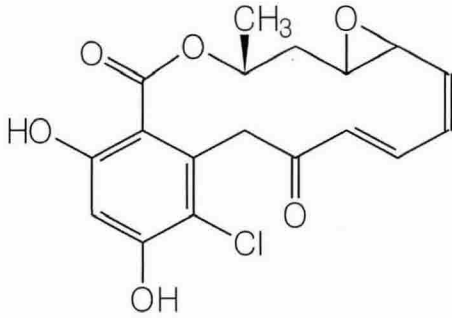


Fig. 1 - Structure of radicol.

APLP1, ErbB4, Jagged, CD44 등 많은 물질을 기질로 하는 효소이므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야하는 문제점을 안고 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ β -Secretase는 aspartyl protease의 특성을 가진 β -site APP cleaving enzyme(BACE)¹²⁾이며 BACE knock out 생쥐는 정상적으로 발육해 뇌에서도 특별한 이상은 관찰되지 않았다.¹⁸⁾ 따라서 BACE 저해제는 생체에 유해하지 않을 것으로 추측되므로 BACE가 치매 치료제 개발의 중요한 표적이 되고 있다.

본 연구에서는 HSP 저해제인 radicol¹⁹⁾(Fig. 1)이 APP의 변이 유전자를 발현하는 신경세포주로부터 A β 의 분비를 감소시켰으며 BACE의 활성을 저해하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

세포주

APP swedish 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주(APPsw)인 Neuro2a를 동경대학의 Iwatsubo 교수로부터 제공받아 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma, St. Louis, MO) 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

시약

Radicicol(A.G. Scientific, Inc. San Diego, CA), β -secretase inhibitor III(Calbiochem, Darmstadt, Germany), protease inhibitor(Sigma, St. Louis, MO), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody(Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-HSP 90 α / β H-114(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), human amyloid assay kit(ABL, Kunma, Japan), BACE1 FRET(fluorescence resonance energy transfer) assay kit(Panvera, Madison, WI)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

A β 의 분비에 대한 효과검정

APPsw 세포주로부터 분비되는 A β 의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA²⁰⁾를 실시하였다. 1 \times 10⁶ 세포를 60 mm dish에

서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16시간이 경과한 후 DMSO에 용해시킨 radicol 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III²¹⁾를 일정농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였다. A β (35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 A β (38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating된 plate에 100 μ l의 시료를 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시키고 7회 세척한 후, HRP conjugation된 A β (11-28) 특이적 monoclonal antibody를 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 9회 세척한 후 tetramethyl benzidine(TMB) 기질액을 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 정지액 100 μ l를 첨가하여 450 nm에서 Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

β -Secretase에 대한 효과검정

β -Secretase의 활성을 측정하기 위하여 BACE1 FRET assay²²⁾를 실시하였다. β -Secretase에 특이적인 형광기질인 rhodamine-EVNLDAEFK-quencher 10 μ l/ml와 radicol 또는 양성대조군인 β -secretase inhibitor III를 50 mM sodium acetate(pH 4.5)에 넣어 혼합한 후, BACE1을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 정지액 2.5 M sodium acetate를 첨가한 후 545 nm(excitation, 12 nm bandwidth) 및 585 nm(emission, 12 nm bandwidth)에서의 형광을 Infinite F200 fluorometer(Tecan, Union city, CA)로 측정하였다.

단백질 분석

단백질 분석은 Western blotting 방법에 의해 수행하였다.²³⁾ 1 \times 10⁶ 세포를 60 mm dish에서 배양하여 12시간 후에 DMSO에 녹인 radicol을 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 상기조건으로 회수하고 PBS로 세척한 세포에 protease inhibitor를 첨가한 cell lysis buffer(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA)를 넣고 분쇄하여 시료로 사용하였다. 동량의 단백질(50 μ g)을 7% Tris-glycine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP 및 HSP의 단백질 양상을 검출하였다. 단백질 밴드를 NIH에서 제공하는 Image J 분석 프로그램에 의해 정량하였다.

통계처리

각 실험군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 하였으며, P 값이 0.05 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과 및 고찰

A β 분비 저해효과

APPsw 세포주에 radicol 각각 1, 5, 10 μ M을 처리한 후 배

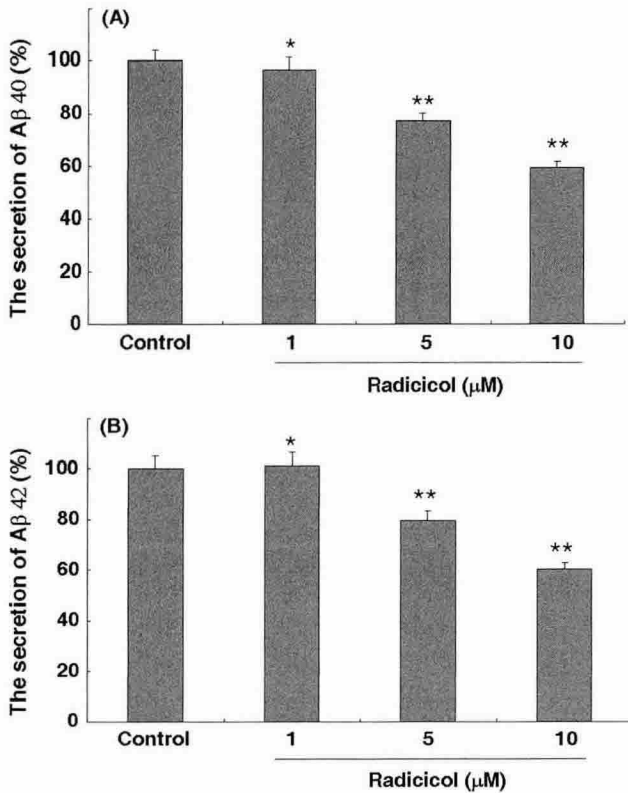


Fig. 2 – Effects of radicicol on the secretion of Aβ peptides. APPsw cells were treated with DMSO (control) or 1, 5, and 10 μM of radicicol for 24 h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted Aβ x-40 (A) and Aβ x-42 (B) in the conditioned media was performed using two-site ELISAs. The means ±SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. **P<0.05, *P<0.01

양액으로 분비된 Aβ의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 음성 대조군인 DMSO를 처리한 시료의 Aβ의 양을 100%로 하여 radicicol 처리 시 분비량을 백분율로 표시하였다. Radicicol 10 μM 처리 시 Aβ40(Fig. 2A) 및 Aβ42(Fig. 2B)의 분비량이 각각 음성대조군의 약 60%이었으며 농도 의존적이며 유의성 있게 감소하였다. 양성 대조군인 β-secretase inhibitor III도 저해 활성을 나타내었다(자료 미제시). 서론에서도 기술한 바와 같이, APP의 대사에 관련하는 β-secretase 또는 γ-secretase의 활성이 저해될 경우 A 분비가 감소된다.²⁴⁾ Radicicol에 의한 Aβ 분비 감소효과도 이들 효소활성의 저해가 원인일 것으로 예측되어 β-secretase의 효소 활성을 측정하였다. 한편, APPsw 세포주에 대한 MTT assay를 실시하였으나 세포독성은 관찰되지 않았다(자료 미제시).

BACE1 저해효과

β-Secretase 활성을 BACE1 FRET assay로 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 음성 대조군인 DMSO를 처리한 시료의 효

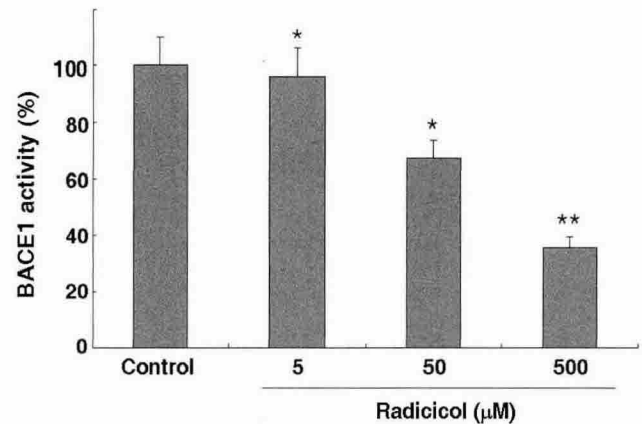


Fig. 3 – Effects of radicicol on the β-secretase. The activity of β-secretase was accessed by BACE1 FRET assay in the presence of DMSO (control) or 5, 50, 500 μM of radicicol. The means±SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. **P<0.05, *P<0.01.

소활성을 100%로 하여 radicicol 처리시 효소활성을 백분율로 표시하였다. Radicicol 5, 50, 500 μM을 효소 및 기질과 함께 반응시킨 후, BACE activity를 측정한 결과 radicicol 50 μM에서 음성대조군의 약 70% 활성을 나타내었으며 radicicol의 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되었다. 상기실험 결과에서 기술한 radicicol의 Aβ의 분비저해 농도와 비교할 경우 상대적으로 고농도에서 β-secretase 활성을 저해하였다. 이것은 radicicol의 Aβ의 분비 저해활성이 단지 β-secretase를 저해함으로써 기인하는 것이 아니라 또 다른 메커니즘이 존재한다고 사료된다.

APP 및 HSP90 단백질 양상에 미치는 효과

APPsw 세포주에 radicicol 각각 1, 5 μM을 처리하고 24시간 경과 후, 세포 lysate를 회수하여 Western blotting에 의해 APP의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Radicicol은 농도 의존적으로 APP의 단백질 양을 감소시켜 5 μM 처리시 음성대조군의 약 70%의 단백질을 검출할 수 있었다. 이러한 radicicol의 APP 대사에 대한 영향은 radicicol의 HSP90 저해 활성과도 관련이 있을 것으로 예측되어 HSP의 양상을 Western blot에 의해 분석하여 Fig. 5에 나타내었다. 세포내의 HSP90의 양은 농도 의존적으로 감소하여 5 μM 처리시 음성 대조군의 약 60%이었다. 같은 방법으로 세포의 배양액으로 분비된 HSP90의 양을 분석한 결과, radicicol 1, 5 μM을 처리한 세포 배양액으로부터 각각 음성대조군의 약 2배, 2.5배 증가된 HSP90이 검출되었다. 이것은 radicicol이 세포내의 HSP90을 세포외로 농도 의존적으로 증가시킨 것으로 사료된다(Fig. 5). 한편, HSP는 여러 환경인자나 스트레스, 열, 손상, 저산소 등의 병태생리적 자극에 의하여 유도되며, 단백질의 folding, translocation, refolding, macromolecular complex의 assembly와 disassembly와 같은

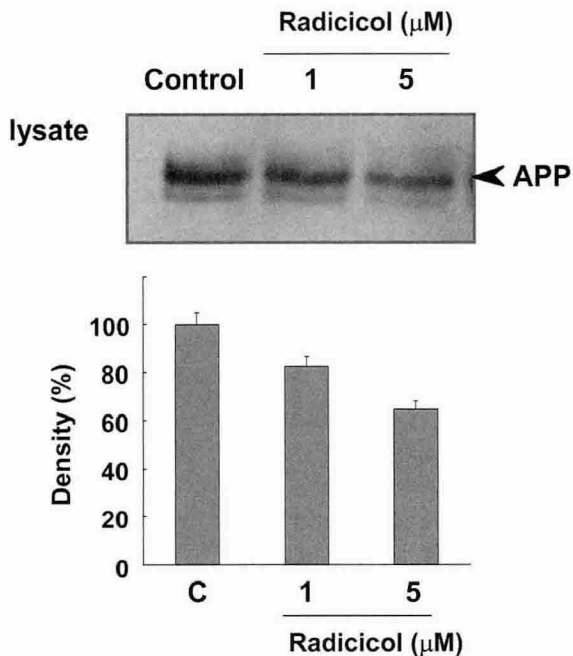


Fig. 4 - Effects of radicicol on the protein level of APP. APPsw cells were treated with DMSO (control) or 1, and 5 μ M of radicicol for 24 h and lysed with cell lysis buffer. Detergent lysates were loaded on the 7% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-APP polyclonal antibody. The levels of protein were quantitated by relative densitometry using Image J 1.37 software. Data shown are average \pm S.D. of three independent experiments.

molecular chaperone의 기능을 나타낸다.^{25,26} Radicicol은 macrocyclic 항진균제로서 *Monosporium bonorden*으로부터 분리되었다.¹⁹ Radicicol은 HSP90의 아미노 말단에 결합하여 progesterone 수용체 단백질의 조립을 저해하거나, Raf-1, p53 변이 단백질 등의 불안정화를 유도한다.²⁷

APP는 endoplasmic reticulum(ER)에서 합성되어 golgi체로 이동하며 당의 수식과정을 거쳐 성숙한 APP가 된 후, 다시 trans-Golgi network(TGN)를 거쳐 세포막으로 이동한다. 이 과정에서 α -secretase, β -secretase 및 γ -secretase 등에 의해 대사되어 A β 를 비롯한 대사물질을 생성한다.^{28,29} A β 는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다.³⁰ 특히 치매 환자의 뇌 및 척수액에서 A β 42가 정상인의 경우보다 많이 검출된다.³¹

실험에 사용한 APPsw 세포주는 치매환자의 병리와 유사하게 A β 42의 분비량이 정상세포에 비해 2배 이상 증가되어 있어 분비저해 활성을 검색하기에 용이하다.³² 상기한 바와 같이, HSP90 저해제인 radicicol이 A β 42의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한, A β 의 생성에 관여하는 β -secretase의 효소활성도 농도 의존적으로 저해하였다. 최근 β -secretase 저해제가 치료제 개발의 표적이 되고 있으므로 radicicol을 치매 약물 개발

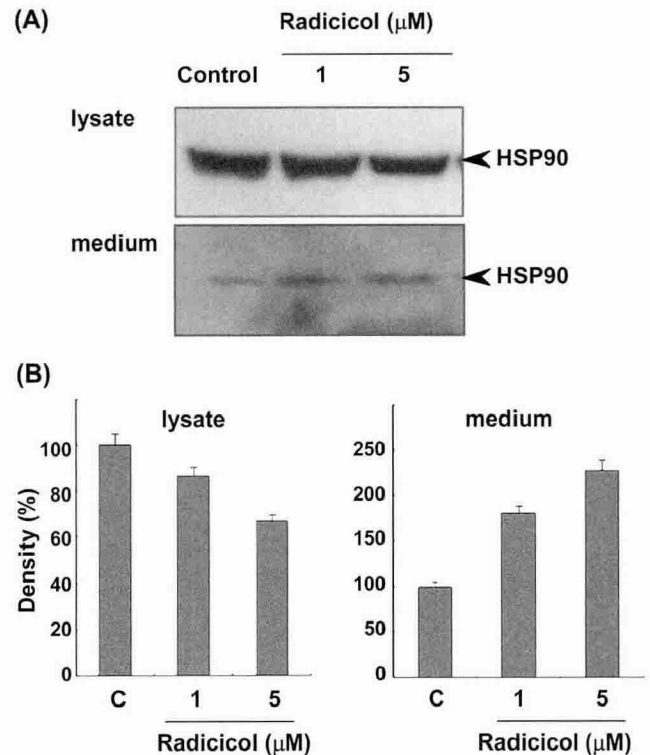


Fig. 5 - Effects of radicicol on the protein level of HSP. APPsw cells were treated with DMSO (control) or 1, and 5 μ M of radicicol for 24 h and collected conditioned media and lysed with cell lysis buffer. (A) The cell lysates and the conditioned media were loaded on the 7% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-HSP polyclonal antibody. (B) The levels of protein were quantitated by relative densitometry using Image J 1.37 software. Data shown are average \pm S.D. of three independent experiments.

을 위한 후보물질로 응용할 수 있으며 치매의 기초 연구에 프로브(probe)로서 이용될 수 있다고 사료된다. 본 연구자들은 radicicol을 비롯하여 특정 약물이 γ -secretase의 효소복합체 중 어느 분자에 특이적으로 영향이 있는 것을 관찰할 수 있었으며³³ 이들 약물을 이용하여 아직까지 확실하게 규명되지 않은 γ -secretase의 특성연구도 가능할 것으로 예상된다.

한편, Kakimura 등은 microglia 세포에서 HSPs가 phagocytosis를 활성화시켜 A β 42를 제거한다고 보고하였다.³⁴ 즉, 외부에서 첨가한 recombinant HSP90가 microglia 세포를 활성화 시킴으로써 세포외로 분비된 A β 42의 clearance를 증가시켰다는 것이다. 본 연구에서는 radicicol을 이용하여 내재성 HSP의 기능을 관찰한 것으로 HSP90은 APP가 정상적으로 성숙되는 과정에서 trafficking하는 것을 도와주는 것으로 사료된다. 최근 본 연구자들은 또 다른 HSP 저해제인 geldanamycin을 이용한 면역형광염색 실험과 siRNA 실험에서도 동일한 결과를 얻었다.³³ 향후 radicicol에 의한 HSP 저해활성과 A β 분비와의 분자상호작용을 면역형광염색법에 의해 분포를 확인함으로써 규명해야 할 것

이다. 또한, 새로이 합성되는 APP의 경시적인 변화양상을 확인함으로써 APP의 maturation과 trafficking에 미치는 영향 및 γ -secretase의 활성화에 대한 영향도 분석해야 할 것이다.

결 론

HSP90 저해제인 radicicol은 APP의 대사를 down regulation 하며 A β 42의 분비를 감소시켰다. 이것은 HSP90 및 BACE 저해 메커니즘에 의한 것으로 사료되며 HSP90은 APP의 trafficking 과 APP의 대사를 조절할 것으로 추정된다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 교육인적자원부 신진교수연구지원사업 (KRF-2004-E00194) 및 지방연구중심대학 육성사업에 의해 일부 지원되었습니다.

참고문헌

- Vellas, B. and Fitten, L. J. : *Research and Practice in Alzheimer's disease*. Springer Publishing Co. (2000).
- Sugimoto, H. : Donepezil hydrochloride: a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* **1**, 63 (2001).
- Zarotsky, V., Sramek, J. J. and Cutler, N. R. : Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **60**, 446 (2003).
- Jann M. W. : Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **20**, 1 (2000).
- Iqbal, K., Sisodia, S. S. and Winblad, B. : *Alzheimer's Disease: Advances in Etionlogy, Pathogenesis and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd. (2001).
- Morris, J. C. : Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **165**, 41 (1996).
- Braak, H., Braak, E. and Strothjohann, M. : Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett.* **171**, 1 (1994).
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. : The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733 (1987).
- Selkoe, D. J. : The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 447 (1998).
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. : Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8098 (1993).
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A. : Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921 (1993).
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. : β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735 (1999).
- Selkoe, D. J. : Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, 23 (1999).
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. and St. George-Hyslop, P. : Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* **407**, 48 (2000).
- Lee, S. F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W. and Yu, G. : Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J. Biol. Chem.* **277**, 45013 (2002).
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. : PEN-2 is an integral component of the -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 39062 (2002).
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. : The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353 (2002).
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Wong, P. C. : BACE1 is the major β -secretase for generation of A peptides by neurons. *Nature Neurosci.* **4**, 233 (2001).
- Delmotte, P. and Delmotte-Plaquee, J. : A new antifungal substance of fungal origin. *Nature* **171**, 344 (1953).
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E. and Sissodia, S. S. : The profile of soluble amyloid protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* **271**, 31894 (1996).

- 21) Tung, J. S., Davis, D. L., Anderson, J. P., Walker, D. E., Mamo, S., Jewett, N., Hom, R. K., Sinha, S., Thorsett, E. D. and John, V. : Design of substrate-based inhibitors of human beta-secretase. *J. Med. Chem.* **45**, 259 (2002).
- 22) Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C. and Hyman, B. T. : Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J. Cell. Sci.* **116**, 3339 (2003).
- 23) Leem, J. Y., Saura, C. A., Pietrzik, C., Christianson, J., Wanamaker, C., King, L. T., Veselits, M. L., Tomita, T., Gasparini, L., Iwatsubo, T., Xu, H., Green, W. N., Koo, E. H. and Thinakaran, G. : A role for presenilin 1 in regulating the delivery of amyloid precursor protein to the cell surface. *Neurobiol. Dis.* **11**, 64 (2002).
- 24) Sambamurti, K., Hardy, J., Refolo L. M. and Lahiri, D. K. : Targeting APP metabolism for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **56**, 211 (2002).
- 25) Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. : Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the HSP90 molecular chaperone. *Cell* **90**, 65 (1997).
- 26) Goetz, M. P., Toft, D. O., Ames, M. M. and Erlichman, C. : The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of Oncology* **14**, 1169 (2003).
- 27) Schulte, T. W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D. and Neckers, L. M. : Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones* **3**, 100 (1998).
- 28) Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. and Lee, V. M. : Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* **275**, 2568 (2000).
- 29) Nunan, J. and Small, D. H. : Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6 (2000).
- 30) Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. and Selkoe, D. J. : Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3**, 67 (1997).
- 31) Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J. and Roher, A. E. : Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* **271**, 4077 (1996).
- 32) Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T. and Iwatsubo, T. : Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation. *J. Biol. Chem.* **278**, 18664 (2003).
- 33) Eun, J. S., Lee, K. A., Li, R., Choi, B. J. and Leem, J. Y. : The effects of geldanamycin on the metabolism of APP. *submitted*
- 34) Kakimura, J., Kitamura, Y., Takata, K., Umeki, M., Suzuki, S., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J., Smith, M. A., Perry, G. and Shimohama, S. : Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J.* **16**, 601 (2002).