

3-페닐-1-이소퀴놀린아민이 신경세포에서 베타 아밀로이드 전구단백질의 대사에 미치는 영향

임재윤[#] · 조원제^{*}

우석대학교 약학대학, *전남대학교 약학대학

(Received November 26, 2010; Revised December 1, 2010; Accepted December 3, 2010)

Effects of 3-Phenyl-1-isoquinolinamine on the Metabolism of β -Amyloid Precursor Protein in Neuroblastoma Cells

Jae-Yoon Leem[#] and Won-Jea Cho^{*}

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 565-701, Korea

*College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Kwangju 500-757, 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. Recently, we investigated that a quinoline compound from natural product reduced the secretion of $A\beta$ from the neuroblastoma N2a cells (NL/N cell line) overexpressing *APP^{swe}*. In this study, 3-phenyl-1-isoquinolinamine, a synthetic isoquinoline compound was analyzed to determine its effects on the metabolism of APP. It inhibited the secretion of $A\beta$ peptides from the N2a NL/N cell line. Beta-site APP cleaving enzyme (BACE) fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay revealed that it inhibited BACE activity in a dose dependent manner. Immunoblotting study showed that it inhibited APP stabilization and expression and it slightly increased the stabilization and the expression of γ -secretase component from the N2a NL/N cell line. We suggest that 3-phenyl-1-isoquinolinamine inhibits APP metabolism and $A\beta$ generation by the means of BACE inhibitory mechanism. This is the first report that 3-phenyl-1-isoquinolinamine inhibits the secretion of $A\beta$ peptides from neuroblastoma cells.

Keywords □ Alzheimer's disease, β -amyloid peptides, *APP^{swe}*, 3-phenyl-1-isoquinolinamine, BACE

한국의 노인인구 비율은 2010년 이미 10%를 초과했으며 2020년에는 15.6%로 예상되고 있다. 노인인구의 증가는 치매환자의 급속한 증가를 가져오는데, 2000년 치매환자수가 약 28만 명에서 2010년에는 46만 명으로 급격히 증가했으며, 2020년에는 약 70만 명에 이를 것으로 추정된다. 이러한 현실은 개인의 삶의 질을 저하시키며 과도한 의료비 지출로 인하여 국가 경쟁력을 감소시킴으로써 커다란 사회적 문제로 대두되고 있다.¹⁾ 한편, 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 뇌 조직에서는 신경세포 주위에서 생성되는 senile plaque와 세포내부에서 생성되는 neurofibrillary tangle과 같은 병리학적 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)}

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

알츠하이머형 치매는 familial type과 sporadic type으로 분류되며, 전체 질환의 90% 이상이 주로 65세 이상의 노인에게 sporadic type으로 나타난다.¹⁾ 발병원인은 familial type의 경우, amyloid precursor protein(APP), presenilin 1, presenilin 2 등의 변이 유전자가 알려져 있으며⁹⁾ sporadic type의 경우는 노화 및 ApoE4 대립형질이 보고되었다.^{10,11)} A β 의 축적에 의한 senile plaque는 familial type과 sporadic type 모두에서 공통적으로 나타나는 병리현상이다. A β 는 베타 아밀로이드 전구 단백질(Amyloid precursor protein, APP)이 2 종류의 protease에 의해 절단되어 생기는데, 아미노 말단을 절단하는 것이 β -secretase,¹²⁾ 카르복시 말단을 절단하는 것이 γ -secretase이다.¹³⁾ 알츠하이머형 치매 치료제 개발의 표적의 하나인 γ -secretase는 presenilin(PS), nicastrin(NCT), anteria pharynx defective gene(APH)-1, presenilin enhancer gene(PEN)-2 등으로 이루어진 complex 구조로 존재하며 Notch1, APLP1, ErbB4, Jagged, CD44 등 많은 물질을 기질로 하는 효소이므로 APP 특이적인 저해제를 개발해야 하는 문제점을 안고 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ β -secretase는 aspartyl protease의 특성을 가진 β -site APP cleaving enzyme(BACE)¹²⁾로서 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.

최근 본 연구실에서는 천연물로부터 분리한 퀴놀린 알칼로이드가 APP의 변이 유전자를 발현하는 신경세포주에서 A β 의 분비 저해활성을 관찰하였으며, 몇 가지 합성 이소퀴놀린 알칼로이드를 대상으로 BACE의 활성을 검정한 결과, 저해활성을 나타내는 화합물을 얻을 수 있었다.¹⁹⁾ 본 연구에서는 합성 이소퀴놀린 알칼로이드 화합물인 3-phenyl-1-isoquinolinamine이 APP의 변이 유전자를 발현하는 신경세포주로부터 A β 의 분비를 감소시켰으며 BACE의 활성을 저해하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

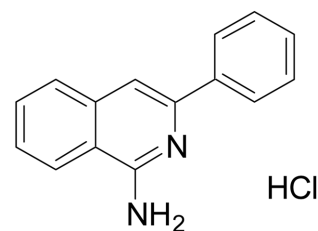


Fig. 1 – Structure of 3-phenyl-1-isoquinolinamine HCl.

실험방법

세포주

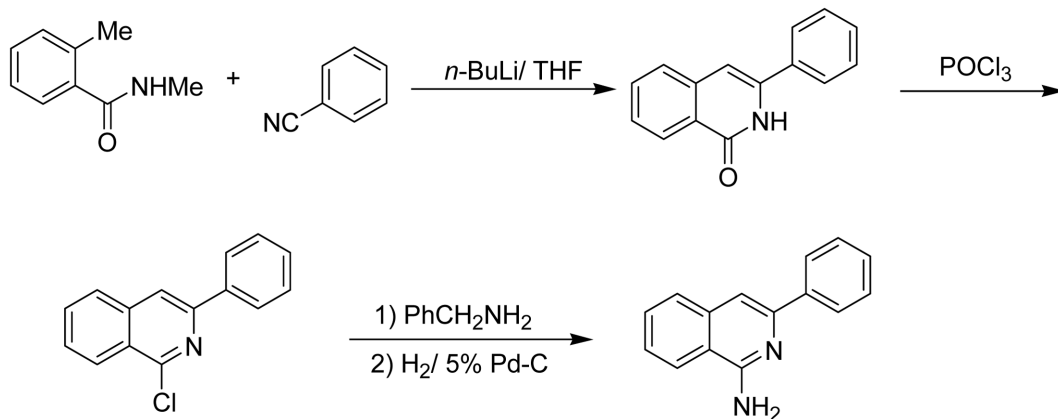
APP swedish 변이 유전자가 과잉 발현되는 생쥐유래 신경세포주인 N2a NL/N 세포주를 동경대학의 Iwatsubo 교수로부터 제공받아 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY), L-glutamic acid, penicillin/streptomycin, hygromycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma, St. Louis, MO) 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

시약

β -secretase inhibitor III(Calbiochem, Darmstadt, Germany), protease inhibitor(Sigma, St. Louis, MO), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT(Stressgen, Victoria, Canada), rabbit anti-amyloid precursor protein polyclonal antibody CT20(Calbiochem, Darmstadt, Germany), goat anti-Presenilin 1 polyclonal antibody N-19, goat anti-Nicastrin polyclonal antibody(Santa cruz Biotech., Santa cruz, CA), human amyloid β assay kit(ABL, Kunma, Japan)를 사용하였고 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

3-phenyl-1-isoquinolinamine 염산염의 합성

사용한 시약은 Aldrich사의 시약을 정제 없이, 용매는 Junsei



Scheme 1 – Synthesis of 3-phenyl-1-isoquinolinamine.

및 동양화학의 제품을 정제하여 사용하였다. Thin Layer Chromatography는 Kiesel gel 254 silica gel coated plate를, column chromatography에는 Kiesel gel 60(70~230 mesh)을 사용하였으며 1H-NMR은 Bruker AC 80을 사용하였다. 용점은 Electrothermal IA 9200을 사용하여 측정하였으며 IR은 Perkin Elmer 783 Spectrometer를 이용하여 측정하였다. Cho 등의 방법에 따라 합성하였으며 합성법은 Scheme 1에 요약하였다.²⁰⁾ 간략히 기술하면 N-methyl-*o*-toluamide와 benzonitrile을 축합하여 생성시킨 isoquinolin-1(2H)-one을 POCl₃로 imine chloride로 변환시킨 후 benzylamine을 K₂CO₃ 존재하에 도입하였다. Benzylamine은 Pd-C 촉매를 이용한 접촉환원을 통하여 primary amine으로 변환시켰다. 염산염을 생성시키기 위하여 acetone에 amine을 용해시킨 후 c-HCl을 가하였다. 1H-NMR(CDCl₃): 8.2~6.8(10H, m, aromatic-H), 4.53(2H, s, -NH₂).

Aβ의 분비에 대한 효과검정

N2a NL/N 세포주로부터 분비되는 Aβ의 양을 측정하기 위해 sandwich ELISA²¹⁾를 실시하였다. 1×10⁶ 세포를 60 mm dish에서 배양하여 serum-free DMEM으로 교환하고 16시간이 경과한 후 DMSO에 용해시킨 3-phenyl-1-isoquinolinamine 또는 양성대조군인 β-secretase inhibitor III²²⁾를 일정농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 protease inhibitor의 존재 하에 회수하여 시료로 사용하였다. Aβ(35-40) 특이적 monoclonal antibody 또는 Aβ(38-42) 특이적 polyclonal antibody가 각각 coating된 plate에 100 μl의 시료를 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시키고 7회 세척한 후, HRP conjugation된 Aβ(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 μl를 첨가하여 450 nm에서 Microplate Reader(Model 680, Bio-Rad, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

β-secretase에 대한 효과검정

β-secretase의 활성을 측정하기 위하여 BACE1(beta site APP cleaving enzyme) FRET assay²³⁾를 실시하였다. β-secretase에 특이적인 형광기질인 rhodamine-EVNLDAEFK-quencher 10 μl/ml와 3-phenyl-1-isoquinolinamine 또는 양성대조군인 β-secretase inhibitor III를 50 mM sodium acetate(pH 4.5)에 넣어 혼합한 후, BACE1을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 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.²⁴⁾

1×10⁶ 세포를 60 mm dish에서 배양하여 12시간 후에 DMSO에 녹인 3-phenyl-1-isoquinolinamine을 처리하였다. 24시간 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. 단백질을 50 μg을 7%, 14% Tris-glycine SDS-PAGE로 분리한 후, immunoblotting에 의해 APP, sAPP(soluble APP), PS1, NCT 등의 단백질 양상을 검출하였다.

통계처리

각 실험군 간의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 하였으며, P 값이 0.05, 0.01 이하를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과 및 고찰

Aβ 분비 저해효과

Aβ는 oligomer를 형성하며 서로 응집하여 신경세포의 폐쇄를 유발함으로써 비가역적인 퇴행성 파괴를 일으킨다.²⁵⁾ 특히 치매 환자의 뇌 및 척수액에서 Aβ42 정상인의 경우보다 많이 검출된다.²⁶⁾ 실험에 사용한 N2a NL/N 세포주는 치매환자의 병리와 유사하게 Aβ42의 분비량이 정상세포에 비해 2배 이상 증가되어 있어 분비저해 활성을 검색하기에 용이하다.²⁷⁾

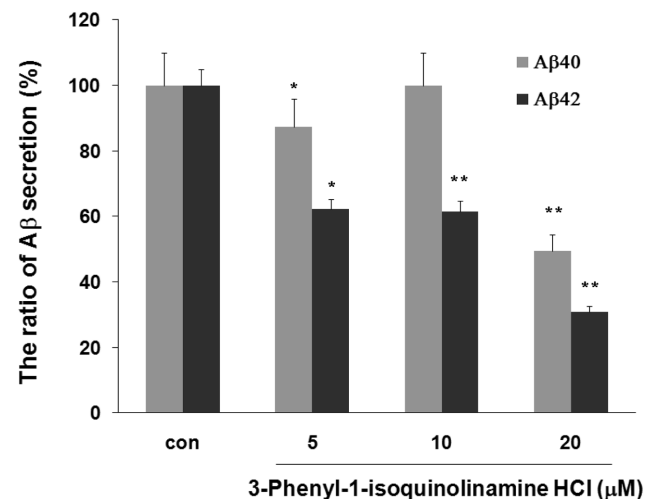


Fig. 2 – The effects of 3-phenyl-1-isoquinolinamine on the secretion of Aβ peptides. N2a NL/N cells were treated with DMSO (control) or 5, 10, and 20 μM of 3-phenyl-1-isoquinolinamine for 24 h and collected conditioned media in the presence of protease inhibitor. Quantitative analysis of secreted Aβ x-40 and Aβ x-42 in the conditioned media was performed using two-site ELISAs. The means±SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. The data are indicated as % of those observed in the absence of given compound. *P<0.05, **P<0.01.

이 세포주에 3-phenyl-1-isoquinolinamine을 각각 5, 10, 20 μM 을 처리한 후 배양액으로 분비된 $\text{A}\beta$ 의 양을 sandwich ELISA 방법으로 측정하여 비교 정량한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 음성 대조군인 DMSO를 처리한 시료의 $\text{A}\beta$ 의 양을 100%로 하여 3-phenyl-1-isoquinolinamine 처리시 분비량을 백분율로 표시하였다. 3-phenyl-1-isoquinolinamine 20 μM 처리시 $\text{A}\beta_{40}$ 및 $\text{A}\beta_{42}$ 의 분비량이 각각 음성대조군의 약 49.5, 30.9%이었으며 유의성 있게 감소시켰다. 양성 대조군인 β -secretase inhibitor III도 저해 활성을 나타내었다(자료 미제시). 3-phenyl-1-isoquinolinamine은 $\text{A}\beta_{40}$ 에 대해서보다는 $\text{A}\beta_{42}$ 에 대한 저해활성이 더욱 강하였다. 그리고 5, 10 μM 에서의 저해활성의 양상이 농도 의존적인 특성으로 유사하였는데 이는 비활성의 특징에서 기인하는 것으로 사료된다. 즉, 10 μM 과 20 μM 에서의 활성을 비교하면 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 한편, N2a NL/N 세포주에 대한 MTT assay를 실시하였으나 세포독성은 관찰되지 않았다(자료 미제시).

BACE1 저해효과

서론에서도 기술한 바와 같이, APP의 대사에 관련하는 β -secretase 또는 γ -secretase의 활성이 저해될 경우 $\text{A}\beta$ 분비가 감소된다.²⁸⁾ 3-phenyl-1-isoquinolinamine에 의한 $\text{A}\beta$ 분비 감소효과도 이들 효소활성의 저해가 원인일 것으로 예측되어 β -secretase의 효소활성을 측정하였으며, BACE1 FRET assay의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 음성 대조군인 DMSO를 처리한 시료의 효소활성을 100%로 하여 3-phenyl-1-isoquinolinamine 처리시 효소활

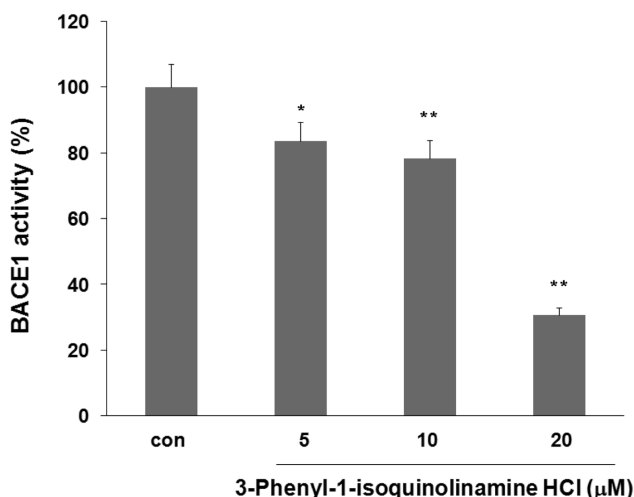


Fig. 3 – The effects of 3-phenyl-1-isoquinolinamine on the β -secretase. The activity of β -secretase was accessed by BACE1 FRET assay in the presence of DMSO (control) or 5, 10, and 20 μM of 3-phenyl-1-isoquinolinamine. The means SE from three independent experiments performed in triplicate are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

성을 백분율로 표시하였다. 3-phenyl-1-isoquinolinamine 5, 10, 20 μM 을 효소 및 기질과 함께 반응시킨 후, BACE 활성을 측정하였다. 그 결과 3-phenyl-1-isoquinolinamine 20 μM 에서 음성대조군의 30.75% 활성을 나타내었으며 이는 농도 의존적으로 BACE 활성을 유의성 있게 감소시켰음을 의미한다. 상기실험 결과에서 기술한 3-phenyl-1-isoquinolinamine의 $\text{A}\beta$ 의 분비저해 활성과 비교할 경우 동일 농도인 20 μM 에서 유사한 저해활성을 나타내었으며 이는 3-phenyl-1-isoquinolinamine의 $\text{A}\beta$ 의 분비 저해활성은 β -secretase를 저해함으로써 기인하는 것을 의미한다. 한편, Western blotting 방법에 의해 3-phenyl-1-isoquinolinamine를 처리한 후, 세포내 β -secretase의 활성을 그 기질분해 산물인 β -C-terminal fragment(β -CTF)를 통하여 확인한 결과 농도 의존적으로 β -CTF가 감소되었다(자료 미제시).

APP 및 관련 단백질 양상에 미치는 효과

N2a NL/N 세포주에 3-phenyl-1-isoquinolinamine을 각각 5, 10, 20 μM 처리하고 24시간 경과 후, 세포 lysate를 회수하여 Western blotting에 의해 APP의 단백질 양상을 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 3-phenyl-1-isoquinolinamine은 농도 의존적으로 APP의 단백질 양을 감소시켜 20 μM 처리시 음성대조군

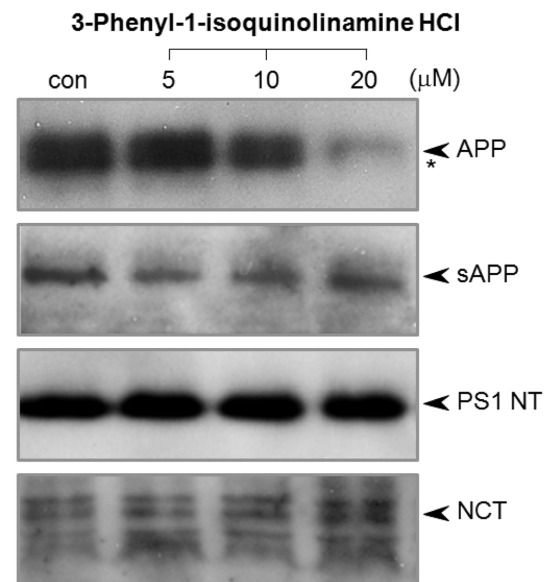


Fig. 4 – The effects of 3-phenyl-1-isoquinolinamine on the protein level of APP. N2a NL/N cells were treated with DMSO (control) or 5, 10, and 20 μM of 3-phenyl-1-isoquinolinamine for 24 h and lysed with cell lysis buffer. Detergent lysates or conditioned media were loaded on the 7% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit anti-APP polyclonal antibody to detect APP or sAPP. PS1 NT or NCT was detected on the 14% or 7% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with rabbit goat anti-Presenilin 1 polyclonal antibody N-19 or goat anti-Nicastrin polyclonal antibody.

에 비해 약 20%의 단백질을 검출할 수 있었다. 특히 APP는 일반적으로 미성숙형과 성숙형이 모두 관찰되지만 20 μ M 처리한 세포의 경우 미성숙형의 밴드(*로 표시)는 관찰할 수 없었다.

APP는 ribosome에서 합성된 후, endoplasmic reticulum(ER) 및 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 , P3, sAPP, CTF를 비롯한 대사물질을 생성한다.^{29,30} 20 μ M의 3-phenyl-1-isoquinolinamine는 세포 밖으로 분비된 sAPP를 증가시켰으며 이는 부분적으로 세포내 APP의 감소에 기인하는 것으로 사료된다. 한편, CTF 분석 결과, α -CTF의 증가가 관찰되었으며 이는 α -secretase의 활성이 증가되었음을 의미하는 것이다. α -secretase와 β -secretase는 서로 경쟁적으로 작용하는 효소로서 3-phenyl-1-isoquinolinamine은 β -secretase를 저해함으로써 α -secretase의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. 한편, γ -secretase의 구성분자인 PS1의 아미노 말단 단편인 PS1-N-terminal fragment(NTF)와 NCT는 3-phenyl-1-isoquinolinamine 농도 의존적으로 약간 증가하는 것으로 관찰되었다. 이는 3-phenyl-1-isoquinolinamine이 γ -secretase의 안정성을 증가시켜 분자의 세포내 반감기를 증가시킬 것으로 예측된다.

이상과 같이, 3-phenyl-1-isoquinolinamine이 A β 42의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한, A β 의 생성에 관여하는 β -secretase의 효소활성도 농도 의존적으로 저해하였다. 향후, 새로이 합성되는 APP의 경시적인 변화양상을 확인함으로써 APP의 maturation, trafficking, localization에 미치는 영향 및 γ -secretase의 활성에 대한 영향도 분석해야 할 것이다. 최근 천연의 이소퀴놀린 알칼로이드인 berberine이 β -secretase 저해활성 및 항산화 활성을 갖고 있다는 보고가 있어 치매 치료 약물 개발 분야에서 많은 관심을 갖고 있다.^{31,32} 본 연구자들이 보고하는 3-phenyl-1-isoquinolinamine도 치매 약물 개발을 위한 후보 물질로 응용할 수 있으며 치매의 기초 연구에 프로브(probe)로서 이용될 수 있다고 사료된다.

결 론

3-phenyl-1-isoquinolinamine은 APP의 대사를 down regulation 하며 A β 의 분비를 감소시켰다. 이것은 β -secretase의 효소활성을 저해하는 메커니즘에 의한 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구에 많은 도움을 준 최부진, 이혜정 연구원에게 감사하며, Infinite F200 fluorometer를 사용할 수 있게 배려해주신 우석대학교의 은재순 교수님께도 감사드립니다. 본 논문은 2010학

년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

참고문헌

- Bertram, L., Lill, C. M. and Tanzi, R. E. : The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*. **68**, 270 (2010).
- 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 etiology, 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).
- 13) Selkoe, D. J. : Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, 23 (1999).
 - 14) Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaevea, 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., Rogaeve, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, 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 β APP processing. *Nature* **407**, 48 (2000).
 - 15) 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- β precursor protein and Notch. *J. Biol. Chem.* **277**, 45013 (2002).
 - 16) 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 γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 39062 (2002).
 - 17) 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).
 - 18) Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Wong, P. C. : BACE1 is the major γ -secretase for generation of A peptides by neurons. *Nature Neurosci.* **4**, 233 (2001).
 - 19) Leem, J. Y., et al. : Effect of a quinoline compound from the oriental medicine on the metabolism of β -amyloid precursor protein in neuroblastoma cells. (*manuscript in preparation*).
 - 20) Cho, W. J., Min, S. Y., Le, T. N. and Kim, T. S. : Synthesis of new 3-arylisquinolinamines: effect on topoisomerase I inhibition and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 4451 (2003).
 - 21) Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E. and Sissodia, S. S. : The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* **271**, 31894 (1996).
 - 22) 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 β -secretase. *J. Med. Chem.* **45**, 259 (2002).
 - 23) 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).
 - 24) 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).
 - 25) 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 β -protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat. Med.* **3**, 67 (1997).
 - 26) 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 A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* **271**, 4077 (1996).
 - 27) 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 γ -secretase inhibitor that preferentially reduces A β 42 generation. *J. Biol. Chem.* **278**, 18664 (2003).
 - 28) 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).
 - 29) Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. and Lee, V. M. : Protein kinase C-dependent α -secretase competes with β -secretase for cleavage of amyloid- β precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* **275**, 2568 (2000).
 - 30) Nunan, J. and Small, D. H. : Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6 (2000).
 - 31) Kulkarni, S. K. and Dhir, A. : Berberine, a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res.* **24**, 317 (2010).
 - 32) Jung, H. A., Min, B. S., Yokozawa, T., Lee, J. H., Kim, Y. S. and Choi, J. S. : Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1433 (2009).