

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500322

研究課題名（和文）TDP-43 標的遺伝子・結合タンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of TDP-43 target genes and binding proteins

研究代表者 佐藤 準一 (SATO JUN-ICHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30274591

研究成果の概要（和文）：【目的・方法】TDP-43 は N 末端側 RNA 結合ドメインと C 末端側タンパク結合ドメインを有する核タンパクある。Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)/Frontotemporal dementia(FTD)脳では、TDP-43 が異常リン酸化・ユビキチン化・C 末端切断の修飾を受け細胞質へ移行し、封入体を形成している(TDP-43 proteinopathy)。しかし TDP-43 の生理的な機能は明らかでない。最近 Freibaum らは免疫沈降と質量分析により、ヒト TDP-43 結合タンパク数百種類を同定した(J Proteome Res 9: 1104-20, 2010)。Sephton らは次世代シーケンサーを用いた RIP-seq 解析により、ラット TDP-43 結合 RNA(標的遺伝子候補)数千種類を同定した(J Biol Chem 286: 1204-1215, 2011)。本研究ではこれらの網羅的解析データを KeyMolnet(KM), Ingenuity Pathway Analysis(IPA), KEGG, DAVID に入力、TDP-43 標的遺伝子と結合タンパクの分子ネットワークの生物学的意味付けを行った。【結果】ラット TDP-43 標的遺伝子(n = 4163)の分子ネットワークは、axon guidance, RNA post-transcriptional modification, transcriptional regulation by p53 と、ヒト TDP-43 結合タンパク(n = 227)の分子ネットワークは、ribosome, spliceosome, protein synthesis, spliceosome assembly と密接に関連していた。ラット遺伝子 ID をヒト遺伝子 ID に変換し、ヒト TDP-43 標的遺伝子(n = 4063)と結合タンパク(n = 227)を統合した包括的分子ネットワークを解析すると、ribosome, axon guidance, spliceosome, RNA-binding, RNA post-transcriptional modification, transcriptional regulation by p53 との関連性を認めた。【結論】TDP-43 は核では spliceosome(RNA splicing, mRNA processing)と細胞質では ribosome(protein synthesis)と密接にリンクし、神経細胞機能維持を制御していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) is an evolutionarily conserved nuclear protein that regulates gene expression by forming a multimolecular complex with a wide variety of target RNAs and interacting proteins. Abnormally phosphorylated, ubiquitinated, and aggregated TDP-43 proteins constitute a principal component of neuronal and glial cytoplasmic and nuclear inclusions in the brains of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD), establishing a novel clinical entity designated TDP-43 proteinopathy. Although increasing evidence suggests that the neurodegenerative process underlying ALS and FTLD is attributable to a toxic gain of function or a loss of cellular function of TDP-43, the precise molecular mechanisms remain largely unknown. Recent advances in systems biology enable us to characterize the global molecular network extracted from large-scale data of the genome, transcriptome, and proteome with the pathway analysis tools of bioinformatics endowed with a comprehensive knowledge base. The present study was conducted to characterize the comprehensive molecular network of TDP-43 target RNAs and interacting proteins, recently identified by deep sequencing with next-generation sequencers and mass spectrometric analysis. Our results propose the systems biological view that TDP-43 serves as a molecular coordinator of the RNA-dependent regulation of gene transcription and translation pivotal for performing diverse neuronal functions and that the disruption of TDP-43-mediated molecular coordination induces neurodegeneration in ALS and FTLD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
総 計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：TDP-43・標的遺伝子・結合タンパク質・分子ネットワーク・筋萎縮性側索硬化症・神経細胞死・次世代シーケンサー・バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

TAR DNA-binding protein-43(TDP-43)は、第 1 染色体 1p36.22 上の TARDBP 遺伝子でコードされる 43-kDa タンパク質で、ヒトから線虫まで保存され、様々な細胞の核内で構造的に発現している。TDP-43 は標的遺伝子 DNA, RNA の TG/UG repeats, 3'UTR に結合し、スプライシングや mRNA 安定化の制御、マイクロ RNA の発現制御を行っている(Wang et al. Trends Mol Med 14:479-85, 2008)。現在までに同定された標的遺伝子は、CFTR, Apo AII, SP-10, NFL だけである。NFL 以外は発現分布が神経細胞特異的ではない。TDP-43 は N 末端側に RNA 認識モチーフ RRM1, RRM2 が存在し、C 末端側にグリシンリッチドメインが存在する。RRM1 は CFTR exon 9, Apo AII exon 3 の TG repeats を認識し、C 末端は heterogeneous ribonucleoproteins と結合する。

近年、神経難病であるユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions; FTLD-U)および筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)の神経細胞封入体における TDP-43 の異常蓄積が発見され(Arai et al. BBRC 351:602-11, 2006)、新しい疾患概念 TDP-43 proteinopathy(TDP-43 蓄積神経変性症)が提唱された。ALS や FTLD-U の罹患脳では、TDP-43 はリン酸化・ポリユビキチン化・カスパーゼ切断等の翻訳後修飾を受け、不溶性凝集性 C 末端タンパクが細胞質へ移行し、封入体に蓄積している(Hasegawa et al. Ann Neurol 64:60-70, 2008)。現在まで国内外の研究を通じて、TDP-43 の生理機能・標的遺伝子・結合タンパク・凝集機構・神経変性機序に関しては十分解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者佐藤は、過去 20 年間以上、神経

難病発症機構の基礎的研究に従事して来た。その経験と実績に立脚し、「TDP-43 結合タンパクネットワークの破綻が凝集を促進し、神経細胞死を誘導する」との独自の作業仮説を考案し、TDP-43 標的遺伝子と結合タンパクを網羅的に解析して、再構築系を用いて神経細胞分化や細胞死における役割と封入体形成のメカニズムを解明する研究を着想した。本研究では 3 年間で、(1)神経細胞特異的 TDP-43 標的遺伝子(TDP-43TG)の網羅的解析、(2)TDP-43 結合タンパク(TDP-43BP)の網羅的解析、(3)TDP-43 標的遺伝子と結合タンパクの統合的分子ネットワークの解明、(4)TDP-43 分子ネットワークの神経細胞死における生物学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

最近 Freibaum らは免疫沈降と質量分析により、ヒト TDP-43 結合タンパク数百種類を同定した(J Proteome Res 9: 1104-20, 2010)。Sephton らは次世代シーケンサー(next generation sequencer; NGS)による RNA immunoprecipitation followed by deep sequencing (RIP-seq)解析により、TDP-43 の標的遺伝子候補であるラット TDP-43 結合 RNA を数千種類同定した(J Biol Chem 286: 1204-1215, 2011)。本研究ではこれらの網羅的解析データを KeyMolnet(KM), Ingenuity Pathway Analysis(IPA), KEGG, DAVID に入力、TDP-43 標的遺伝子と結合タンパクの包括的分子ネットワークの生物学的意味付けを行った。

4. 研究成果

ラット TDP-43 標的遺伝子(n = 4163)の分子ネットワークは、axon guidance, RNA post-transcriptional modification, transcriptional

regulation by p53 と、ヒト TDP-43 結合タンパク (n = 227) の分子ネットワークは、ribosome, spliceosome, protein synthesis, spliceosome assembly と密接に関連していた。ラット遺伝子 ID をヒト遺伝子 ID に変換し、ヒト TDP-43 標的遺伝子 (n = 4063) と結合タンパク (n = 227) を統合した包括的分子ネットワークを解析すると、ribosome, axon guidance, spliceosome, RNA-binding, RNA post-transcriptional modification, transcriptional regulation by p53 との関連性を認めた。

TDP-43 は核では RNA splicing, mRNA processing 機能を有する spliceosome と細胞質では protein synthesis 機能を遂行する ribosome と密接にリンクし、神経細胞の全般的な機能維持に関する遺伝子・タンパク質発現を制御していると考えられる。ALS の約 10% では家族性に発症し、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), TAR DNA-binding protein (TDP-43), fused in sarcoma (FUS), optineurin (OPTN), ubiquilin 2 (UBQLN2), chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72) などの遺伝子変異に起因する。最近、欧州では C9orf72 non-coding region の 6 塩基リピート GGGGCC の異常伸長 (500-1600 コピー) を認める症例が、familial ALS/FTD の 30% 以上を占めていることが判明した (Lancet Neurol 11: 323-330, 2012)。C9orf72 変異に起因する ALS/FTD の脳でも TDP-43 が蓄積する。しかしながら現在まで国内外の研究を通じて、C9orf72 の生理学的機能、特にヒト中枢神経系における分布、細胞内局在、発現制御、結合タンパク質、標的遺伝子は解明されていない。現在 TDP-43 と C9orf72 の分子間相互作用に注目して、ALS 脳組織や培養運動ニューロンを用いて解析を進めている (Satoh J et al. Dystrophic neurites express C9orf72 in Alzheimer's disease brains. Alzheimers Res Ther 4: e33, 2012)。以上の研究成果は、Satoh J. Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In Technological Advancements in Biomedicine for Healthcare Applications, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, USA, pp. 314-335, 2012 に掲載された。

5. 主な発表論文等

(1) 英文論文発表

1. Satoh J, Obayashi S, Tabunoki H, Wakana T, Kim SU. Stable expression of neurogenin 1 induces LGR5, a novel stem cell marker, in an immortalized human neural stem cell line

HB1F3. Cellular and Molecular Neurobiology 査読有 30(3): 415-426, 2010. DOI: 10.1007/s10571-009-9466-3.

2. Shiina Y, Arima K, Tabunoki H, Satoh J. TDP-43 dimerizes in human cells in culture. Cellular and Molecular Neurobiology 査読有 30(4): 641-652, 2010. DOI: 10.1007/s10571-009-9489-9.
3. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3. Neuropathology and Applied Neurobiology 査読有 36(49): 320-330, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01076.x.
4. Satoh J. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: Aberrant microRNA expression in Alzheimer disease brains. Journal of Pharmacological Sciences 査読有 114(3): 269-275, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10R11FM>.
5. Satoh J. Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. Clinical and Experimental Neuroimmunology 査読有 1(3): 127-140, 2010. DOI: 10.1111/j.1759-1961.2010.00013.x.
6. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K. Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. Neuropathology 査読有 31(4): 363-375, 2011. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2010.01174.x.
7. Numasawa Y, Yamaura C, Ishihara S, Shintani S, Yamazaki M, Tabunoki H, Satoh J. Nasu-Hakola disease with a splicing mutation of TREM2 in a Japanese family. European Journal of Neurology 査読有 18(9): 1179-1183, 2011. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03311.x.
8. Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, Satoh J. Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2. Cellular and Molecular Neurobiology 査読有 31(7): 1009-1020, 2011. DOI: 10.1007/s10571-011-9698-x.

9. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, Satoh J. BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* 査読有6(3): e17683, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017683.
 10. Satoh J, Tabunoki H. Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 査読有4: e17, 2011. DOI: 10.1186/1756-0381-4-17.
 11. Nakamagoe K, Shioya A, Yamaguchi T, Takahashi H, Koide R, Monzen T, Satoh J, Tamaoka A. A Japanese case with Nasu-Hakola disease of DAP12 gene mutation exhibiting precuneus hypoperfusion. *Internal Medicine* 査読有50(22):2839-2844, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.50.5891>.
 12. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有38(2): 132-141, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2011.01206.x.
 13. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K. Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 査読有32(2): 149-157, 2012. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01256.x.
 14. Satoh J. Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* 査読有235(2): 436-446, 2012. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.09.003.
 15. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H. Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 査読有32(3): 337-343, 2012. DOI: 10.1007/s10571-011-9769-z.
 16. Tabunoki H, Saito N, Suwanborirux K, Charupant K, Satoh J. Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. *Cancer Cell International* 査読有12(1): e14, 2012. DOI: 10.1186/1475-2867-12-14.
 17. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Dystrophic neurites express C9orf72 in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 査読有4(4): e33, 2012. DOI: 10.1186/alzrt136.
 18. Satoh J. Molecular network analysis of human microRNA targetome: from cancers to Alzheimer's disease. *BioData Mining* 査読有5(1):e17, 2012. DOI: 10.1186/1756-0381-5-17.
 19. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMA in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有39(2): 109-120, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2012.01281.x.
 20. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 査読有 in press, 2013. DOI: 10.4137/GRSB.S11433.
 21. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes. *Multiple Sclerosis* 査読有 in press, 2013. DOI: 10.1177/1352458512471873.
 22. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有 in press, 2013. DOI: 10.1111/nan.12036.
 23. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Immunology* 査読有 in press, 2013. DOI: 10.1111/cen3.12011.
- (2) 国際学会発表
1. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K. Immunopathogenesis of Nasu-Hakola disease brain lesions. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan, 2010.8.23.
 2. Satoh J, Tabunoki H, Kim SU, Ishida T, Jinnai K, Arima K. Immunopathogenesis of

- brain lesions of Nasu-Hakola disease. The 10th International Congress of Neuroimmunology. Barcelona, Spain, 2010.10.27.
3. Satoh J, Tabunoki H, Arima K. Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. The 63rd Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, HI, USA, 2011.4.12.
 4. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brains. The 9th International Workshop on Advanced Genomics. Revolution of Genome Science. Tokyo, Japan, 2011.7.12.
 5. Tabunoki H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Satoh J. BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. Queenstown Molecular Biology Meetings 2011. Queenstown, New Zealand, 2011.8.30.
 6. Tabunoki H, Shimada T, Mita K, Banno Y, Satoh J. BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. 2011 Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington DC, USA, 2011.11.14.
 7. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H. Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. The 7th International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs. Tokyo, Japan, 2012.2.5.
 8. Satoh J, Tabunoki H, Arima K. Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein (GSAP) expression in Alzheimer's disease brains. The 64th Annual Meeting of American Academy of Neurology. New Orleans, LA, USA, 2012.4.25.
 9. Satoh J, Tabunoki H. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMA in amyloid plaques: a pathological hallmark of regeneration failure in Alzheimer's disease brains. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Aging and Diseases of Aging. Tokyo, Japan, 2012.10.25.
 10. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network analysis of ChIP-Seq-based vitamin D Target genes. The 11th International Congress of Neuroimmunology. Boston, MA, USA, 2012.11.6.
 11. Satoh J. Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo, Japan, 2012.12.4.
 12. Nojima Y, Tabunoki H, Satoh J. Isolation and characterization of SOD1 and SOD2 in silkworm *Bombyx mori*. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo, Japan, 2012.12.4.
 13. Kawana N, Tabunoki H, Nojima Y, Satoh J. Identification of a key uric acid synthesis regulator in a novel silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. The JSPS 3rd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Scientific Platform Program. Tokyo, Japan, 2012.12.4.
- (3) 英文著書
1. Satoh J. Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In Technological Advancements in Biomedicine for Healthcare Applications, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, pp. 314-335, 2012.
 2. Satoh J. Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In Systems Biology in Cancer Research and Drug Discovery, ed by Azumi AS. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 247-266, 2012.
 3. Satoh J. Gene expression profiling and pathway analysis for identification of molecular targets in MS. In Multiple Sclerosis Immunology - a Foundation for Current and Future Treatments, ed by Gran B and Yamamura T. Springer, Dordrecht, Netherlands, in press, 2013.

[雑誌論文] (計 28 件)

〔学会発表〕（計 49 件）

〔図書〕（計 9 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.my-pharm.ac.jp/~satoj/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐藤 準一

(〒204-8588) 東京都清瀬市野塩 2-522-1

明治薬科大学・薬学部・バイオインフォマテ
イクス・教授

研究者番号：30274591

(2) 研究分担者 天竺桂 弘子

(〒204-8588) 東京都清瀬市野塩 2-522-1

明治薬科大学・薬学部・バイオインフォマテ
イクス・助教

研究者番号：80434190

(3) 連携研究者 有馬 邦正

(〒187-8551) 東京都小平市小川東町 4-1-1

国立精神・医療研究センター病院・精神科・
部長

研究者番号：20250227