

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300104

研究課題名(和文) 認知機能の関連遺伝子同定と分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Identifying the genetic basis and understanding the molecular mechanisms underlying cognitive function

研究代表者

小林 千浩 (Kobayashi, Kazuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90324780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、近交系もしくは異種交配マウスの行動解析と遺伝子発現解析・ゲノム解析、IQ 不一致一卵性双生児を用いた遺伝子発現解析とDNAメチル化解析、精神遅滞のゲノム解析、サルとヒトでの脳の遺伝子発現解析を行い、認知機能に関連する遺伝子の同定を目的とした。近交系マウスと一卵性双生児の解析から、認知機能関連候補であるいくつかの遺伝子および遺伝子群を同定し、また精神遅滞の解析から既知の原因遺伝子と未知の原因遺伝子候補を同定した。今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to identify genes or gene sets that are associated with cognitive function or intelligence, we planned to perform behavioral, gene expression, and genomic analyses using inbred or outbred mice, gene expression, DNA methylation, and genomic analyses using monozygotic twin pairs discordant for IQ scores, genomic analysis of patients with mental retardation, and gene expression analysis of chimpanzee and human brains. We found several genes and gene sets as candidates for cognition-associated molecules and pathways by the studies of inbred mice and discordant monozygotic twins. We also found mutations in the several genes of the mental retardation patients that are known to cause the disease, and some other genes as candidates for the disease-causative genes. Further investigations are required to understand the molecular mechanisms underlying cognitive function.

研究分野：人類遺伝学、ゲノム医科学

キーワード：認知 知能 ゲノム脳科学 遺伝子発現 DNAメチル化 エピジェネティクス マイクロアレイ 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能である「知能」に関しては、古くから多くの議論がなされており統一された定義はないが、脳において、情報を処理、記録、再生し、処理結果を適切に出力すること、またこれらの過程を活性化することと考えられる。この過程をより適応的に、効率よく、より速く行う場合に、知能が高い、頭が良い、などと形容される。言語能力、計算能力、空間認知能力、記憶力など認知の異なる領域を測定するための心理テストが存在するが、ある知的能力を測るテストで優れた点を取る人は、別の種類のテストでも優れた点を取る傾向が見られる。これは、一般知能因子 g と呼ばれる、全般の知的能力に関わる「一般的」な認知機能因子の存在を表しており、 g 因子がまさに知能であると考えられている。以前から g 因子の存在とその遺伝性について多くの議論がなされてきたが、膨大な数の双生児、兄弟、親子、養子縁組家族の調査より、 g 因子は存在し、本質的に遺伝的であるというコンセンサスになっている。現在世界ではこの g 因子に関わる遺伝子の同定へ向けた研究が、少しずつ行われている。

認知機能の異常である疾患として、精神遅滞が挙げられる。発達期において知能指数 IQ が 70 未満である精神遅滞は、世界的に一般人口の 3% 程度の頻度と報告され、極めて頻度の高い認知機能発達障害群である。突然変異が認知機能に強い影響を及ぼしている単一遺伝子疾患であり、これまで欧米を中心に、ポジショナルクローニング法などによる遺伝学的な研究がなされ、多くの原因遺伝子が同定されている。しかし、個々の遺伝子における変異の頻度は稀であり、未だ同定されていない原因遺伝子も多く存在する。

2. 研究の目的

認知機能に関するゲノムワイド関連解析を行うためには、知能指数 IQ のデータが揃った大多数のサンプルが必要となり、現在のところ現実的ではない。そこで本研究では、より少ないサンプル数で可能な研究計画にて認知機能に関連する遺伝子の同定とその機能解析を行い、知能発現の分子メカニズムの解明、環境因子との関係の解明、精神遅滞における原因遺伝子同定、病態解析と治療法開発を目指す。

(1) マウスの行動解析による得点化と遺伝子発現・DNA メチル化解析

本研究では、行動テストバッテリーを用いて多数の近交系マウスを学習させ、行動を得点化し、個々のマウスから脳を採取し、マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行い、得点と相関する遺伝子群を同定する。また DNA メチル化やヒストンアセチル化などの遺伝子発現調節についても解析する。こうして認知機能に関連する遺伝子の同定を目指す。行動解析によるマウス一般知能因子 g の存在を示した報告はいくつか存在するが、分子遺

学的な解析まで行って関連遺伝子を同定したという報告は未だにない。これまで g 因子存在の研究に使われたマウスは、異系交配された遺伝的に多様な系統であったが、本研究では、均一な近交系マウスを使う。ゲノムは一致しているため、環境因子によるゲノム上のエピジェネティックな変化が、遺伝子発現の違いを引き起こし、行動能力の差が出現すると考えられる。

(2) 異系交配マウスの行動解析による得点化と連鎖解析

賢いマウスとされている C57BL/6 系統と、あまり賢くないとされている 129 系統を異系交配し、雑種第 2 世代において、行動解析による得点化と DNA を用いた連鎖解析を行い、マウスの認知機能に関する遺伝子を同定する。

(3) IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現・DNA メチル化解析

ヒトの知能に関する双子研究では、二卵性と比べ一卵性で IQ が似ているということで、知能は遺伝的であるという結論に至っている。しかし、全く同じゲノム構成の一卵性であっても完全に IQ が一致するわけではなく、中には、IQ が 30 以上違う (2 SD 差) 一卵性双生児も存在する。これは、環境によるゲノム上のエピジェネティックな変化による認知機能関連遺伝子の発現の違いによるものだと考えられる。本研究では、IQ 差が顕著な一卵性双生児の試料を使って、マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行い、兄弟で発現に差のある遺伝子群を見出し、認知機能関連遺伝子の同定を行う。また DNA メチル化やヒストンアセチル化などの遺伝子発現調節についても解析する。さらに、一卵性双生児であっても、母体内での発生段階において、双生児の片方のゲノムに突然変異が起こることがある (特に CNV: コピー数多型)。そこで、不一致一卵性双生児の片方でゲノム上に起こっている突然変異をマイクロアレイや全ゲノム塩基配列決定にて検出することも試みる。

(4) 精神遅滞の原因遺伝子の同定

上で同定された認知機能に関連する遺伝子が、ヒトにおいて変異を起こし、精神遅滞を引き起こしている可能性がある。そこで、精神遅滞において、同定した遺伝子について変異のスクリーニングを行う。また逆に、精神遅滞のサンプルから、変異を同定し、認知機能に関連する遺伝子の発見へつなげる。

(5) サルとヒトの脳の遺伝子発現解析

認知機能のうち、ヒトの大きな特徴である言語能力に注目し、サルの脳とヒトの脳 (特に言語中枢であるウェルニッケ野とブローカー野) の遺伝子発現解析を行う。またヒトの脳の中でも、言語中枢とそれ以外の部分の遺伝子発現の相違を解析する。

認知機能については、心理学の分野で非常に関心の高いテーマでもあり、またこれまで論理学、統計学の分野と連携し、遺伝性と環

境性について詳細に解析されてきたが、分子遺伝学的解析はようやく行われ始めたところである。また本研究では、環境因子で発現変化しうる遺伝子を同定することができる。つまり、同定した遺伝子の発現を変化させるような環境、薬剤などが将来的に発見できれば、認知機能を向上させることができる可能性があり、精神遅滞の治療や、認知症の治療・予防にもつながると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、近交系もしくは異系交配マウスの行動解析を用いたマウス認知機能関連遺伝子の同定、IQ 不一致一卵性双生児を用いた認知機能関連遺伝子の同定を行い、また精神遅滞の原因遺伝子の同定、サルとヒトで発現の異なる言語遺伝子の同定、認知機能関連遺伝子として同定された遺伝子の産物の機能解析を行うことで、知能発現の分子メカニズムの解明、環境因子との関係の解明、精神遅滞における原因遺伝子同定、病態解析と治療法開発を目指す。

(1) 近交系マウスの行動解析による得点化と遺伝子発現・DNA メチル化解析

- ・マウスの行動解析、得点化と、各種行動パラメーターの主成分分析
- ・マウス脳由来 RNA を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析
- ・行動得点と遺伝子発現との関連解析
- ・遺伝子発現調節の解析

正常の雄マウス(C57BL/6J)を 41 匹使用し、10 週齢から開始、約 3 ヶ月間一連の行動テストを行い、各マウスから脳を採取し、海馬の RNA でマイクロアレイを用いて遺伝子発現を解析し、200 を超える各種行動パラメーターを得る。行動テストとパラメーターを取捨選択する。行動パフォーマンスの良いマウス群と悪いマウス群の遺伝子発現を比較する。解析するマウスを増やす。また、MeDIP-on-chip も行い、プロモーター領域の DNA メチル化の状況を調べ、差のある遺伝子を探索する。ヒストン修飾の状況を調べる ChIP-on-chip 解析も検討する。

(2) 異系交配マウスの行動解析による得点化と連鎖解析

- ・C57BL/6 系統と 129 系統のマウスの交配、雑種第二世代の作成
- ・マウスの行動解析、得点化
- ・マイクロアレイによるゲノムタイピング、行動得点との連鎖解析
- ・系統間で塩基配列の異なる遺伝子の同定

比較的賢いとされる C57BL/6 系統のマウスと、比較的賢くないとされる 129 系統のマウスを交配し、雑種第二世代約 300 匹を予定として作成する。行動テストにて行動解析を行い、マウスを得点化する。マイクロアレイを用いて SNP (一塩基多型) をタイピングし、連鎖解析により、行動得点と連鎖している染

色体部位を特定する。その周辺にある遺伝子を網羅的に解析し、系統間で塩基配列の異なる遺伝子を候補遺伝子として同定する。

(3) IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現・DNA メチル化解析

- ・卵性診断
- ・血液由来 RNA を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析
- ・遺伝子発現調節の解析
- ・ゲノム上の de novo CNV (コピー数多型) 変化の同定

一卵性であると卵性診断が確定した、IQ 差が 15 以上(1 SD)の不一致一卵性双生児 19 組について、リンパ球から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行う。双生児間で発現差の見られる遺伝子群を同定する。またリンパ球由来 DNA を用いて MeDIP-on-chip 解析を行い、プロモーター領域の DNA メチル化の状況を調べる。サンプルを増やして再現性を確認する。トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの作成などを行って、認知機能に関連しているかを行動解析などを用いて確かめる。ヒストン修飾の状況を調べる ChIP-on-chip 解析も検討する。リンパ球由来 DNA を用い、マイクロアレイによるゲノムワイドの CNV 解析を行い、双生児間で異なる CNV を特定する。

(4) 精神遅滞の原因遺伝子の同定

- ・認知機能関連候補遺伝子についての変異探索
- ・全エクソン塩基配列決定による原因遺伝子探索

原因不明の精神遅滞患者試料として、すでに 31 検体分の血液由来 DNA が収集され保存されている。マイクロアレイによる CNV 解析を行う。CNV に存在する遺伝子について、遺伝子発現の変化や遺伝子産物の変化を解析する。(1,2,3)で同定した認知機能関連候補遺伝子についての遺伝子変異を検索する。次世代シーケンサーを用い、遺伝子変異を検索する。

(5) サルとヒトの脳の遺伝子発現解析

- ・サルとヒトのウェルニッケ野とブローカー野の遺伝子発現解析
- ・ヒトのウェルニッケ野とブローカー野とそれ以外の部分の遺伝子発現解析

認知機能のうち、ヒトの大きな特徴である言語能力に注目し、サルの脳とヒトの脳(特に言語中枢であるウェルニッケ野とブローカー野)の遺伝子発現解析をマイクロアレイを用いて行う。またヒトの脳の中でも、言語中枢とそれ以外の部分の遺伝子発現の相違を解析する。

(6) 同定された遺伝子の機能解析と分子ネットワークの構築

以上(1,2,3,4,5)の実験を総合し、知能発

現の分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) 近交系マウスの行動解析による得点化と遺伝子発現・DNAメチル化解析

本研究において、以前から継続して行ってきたマウスの行動解析とマウス脳海馬由来 RNA を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析のより詳細な解析を行った。マウスの行動解析では、記憶に関する行動を解析できる5つの方法を選び、各種行動パラメーター実測値および学習曲線にあてはめた際の係数を用いた得点化とマウスの順位付け、各種行動パラメーターの主成分分析を行った。マウスの得点による順位と第1主成分の高い関連性が認められ、第1主成分が一般認知機能因子 g を示していることが示唆された。本研究の目的の1つであったマウスの匹数を増やすことはできなかったが、これまでのマウス41匹から、行動パフォーマンスの高い5匹と低い8匹を選び出すことができた。また、マウス脳海馬由来 RNA を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析によって得られているデータを用いて、行動パフォーマンスの良いマウス群と悪いマウス群の遺伝子発現を比較すると、両群間で差のある遺伝子群、すなわちタンパク質翻訳に関わる遺伝子群と、細胞膜受容体分子に関わる遺伝子群などを検出することができ、下記(3)の一卵性双生児の実験結果と一致する結果となった。さらに、すでにデータベース化されている各種疾患や薬剤についての遺伝子発現解析データとの比較検討を行ったところ、本実験で選出された認知機能に関連する遺伝子候補の上位100遺伝子には、既知の認知機能関連遺伝子、精神遅滞、自閉症、パーキンソン病とアルツハイマー型認知症の関連候補遺伝子が有意に多く含まれていることがわかった。一方で、DNAメチル化解析に向けて、マイクロアレイに代え、次世代シーケンサーを用いて予備実験を行ってきた。現在これらマウスの脳由来 DNA を用いた DNAメチル化解析を順次進めている。

(2) 異系交配マウスの行動解析による得点化と QTL 連鎖解析

本研究では、C57BL/6 系統と 129 系統のマウスの交配、雑種第二世代での連鎖解析による遺伝子同定を計画したが、当初の懸念通り 129 系統の脳奇形の遺伝子の同定につながる可能性が否定できないことが強く考えられ、別系統のマウスを使用することとした。しかし、過去の文献からは、マウスの賢さの判定が研究者により曖昧であり一定してないことがわかったため、独自のデータが必要であることがわかった。本研究での考察から、同じ 129 系統中の亜系統によって認知機能が異なることに注目し、次世代シーケンサーを用いた亜系統のゲノム解析を行い、相互比較することで、その認知機能の差を生むゲノム

の差異を検出する目的で準備を開始した。

(3) IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現・DNAメチル化解析

本研究において、以前から行ってきた IQ 差が 15 以上(1 SD)の不一致一卵性双生児について、リンパ球由来 RNA の遺伝子発現マイクロアレイ解析を継続して行った。不一致一卵性双生児 19 組についてリンパ球から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。双生児間で発現差の見られる遺伝子群、すなわちタンパク質翻訳に関わる遺伝子群と、細胞膜受容体分子に関わる遺伝子群などをいくつか同定することができ、それらは上記(1)の近交系マウスの実験結果と一致する結果となった。またリンパ球から採取した DNA を用いて MeDIP-on-chip 解析を行い、プロモーター領域の DNAメチル化の状況を調べたところ、ある1組の双生児間で差のある遺伝子 ARHGAP18 を同定した。また新たにサンプル数を増やす目的で、75組150人の双生児の卵性診断を行い、一卵性であると確定した IQ 差が 15 以上(1 SD)の不一致一卵性双生児のうち採血にご協力くださった 12 組について、まずリンパ球由来の DNA を用いて、染色体微細構造変化を検出するべく、マイクロアレイによるゲノムワイドの CNV 解析を行った。1 組において、新生 CNV と考えられる領域を同定した。今後も継続してサンプル数を増やし、不一致一卵性双生児の解析を行っていく。一方で、本研究で同定したプロモーター領域の DNAメチル化に差の見られた ARHGAP18 遺伝子について、トランスジェニックマウスを作製する準備を開始したが、つい最近ノックアウトマウスを用いた研究の論文が出版され、本マウスを入手すべく準備を行っている。

(4) 精神遅滞の原因遺伝子の同定

原因不明の精神遅滞患者試料として保存してある 31 患者分のリンパ球由来 DNA を用いて、うち 27 患者について、染色体微細構造変化を検出するために、マイクロアレイによる CNV 解析を行ってきた。既知の挿入欠失症候群であった 4 患者を同定した (Potocki-Lupski 症候群、22q11.2 症候群、ソトス症候群、7 番染色体長腕の大きな欠失)。また何人かの患者で、疾患原因の候補と考えられる CNV を見つけることができたが、原因遺伝子の特定までには至らなかった。また、特に兄弟発症を示す 2 つの家系について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン塩基配列決定を行い、1 家系において、既知の精神遅滞原因遺伝子 KDM5C に変異を同定した。もう 1 家系では、新規の原因遺伝子候補を同定した。候補のうちの 1 つである疾患との関わりは未知の X 染色体上の Rho GTPase 関連の遺伝子について、他の患者についてサンガー法にて塩基配列を調べたが、突然変異は検出されなかった。一方で、他の原因未知の患

者について次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行い、現在データ解析によって次々と既知の原因遺伝子内の変異(ATRX, ZNF41, FTSJ1)や新たな遺伝子変異候補を同定し、サンガー法にて確認している。

(5)サルとヒトの脳の遺伝子発現解析

本研究では、特に言語中枢であるウェルニッケ野とブローカー野の脳サンプルをチンパンジー2頭分保管しているのので、これについての遺伝子発現の解析方法について検討した。当初はヒトに対するマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行おうと予定していたが、塩基配列の種間差がそのデータに大きく影響を及ぼすことが想定されたので、次世代シーケンサーを用いた発現解析が妥当であると考え、条件検討を開始したところである。

(6)同定された遺伝子の機能解析と分子ネットワークの構築

本研究において、(1)と(3)では同様の結果、すなわち認知機能が高い群ではタンパク質翻訳に関わる分子の発現量が比較的高く、低い群では細胞膜受容体を含むシグナル伝達に関わる分子の発現量が比較的高くなっているという結果が得られた。また(1)で同定した認知機能関連遺伝子候補の100個の上位遺伝子には、既知の認知機能関連遺伝子、精神遅滞、自閉症、パーキンソン病とアルツハイマー型認知症の関連候補遺伝子が有意に多く含まれていることから、本研究で得られている結果は認知に関連のあるものであることが示唆され、また上記の疾患の発症機序や治療ターゲットを検索するためのデータとすることが可能であるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{雑誌論文}(計 2件)

1. Ando J, Fujisawa KK, Shikishima C, Hiraishi K, Nozaki M, Yamagata S, Takahashi Y, Ozaki K, Suzuki K, Deno M, Sasaki S, Toda T, Kobayashi K, Sugimoto Y, Okada M, Kijima N, Ono Y, Yoshimura K, Kakihana S, Maekawa H, Kamakura T, Nonaka K, Kato N, Ooki S. Two cohort and three independent anonymous twin projects at the Keio Twin Research Center (KoTReC). *Twin Res Hum Genet* 16: 202-216, 2013, 査読有, doi: 10.1017/thg.2012.131
2. Yu CC, Furukawa M, Kobayashi K, Shikishima C, Cha PC, Sese J, Sugawara H, Iwamoto K, Kato T, Ando J, Toda T. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins

discordant for intelligence levels. *PLoS ONE* 7: e47081, 2012, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0047081

{学会発表}(計 6件)

1. Pei-Chiang Cha, Kazuhiro Kobayashi, Yuko Ando, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Tatsushi Toda. Genes regulated by epigenetic mechanisms in determining general intelligence (g) are over-represented in disorders that affect cognition. 第37回日本分子生物学会, 2014年11月25日, パシフィコ横浜(神奈川県)
2. Pei-Chiang Cha, Kazuhiro Kobayashi, Yuko Ando, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Tatsushi Toda. Genes regulated by epigenetic mechanisms in determining general intelligence (g) are over-represented in disorders that affect cognition. 第59回日本人類遺伝学会, 2014年11月21日, タワーホール船堀(東京都)
3. Pei-Chiang Cha, Kazuhiro Kobayashi, Yuko Ando, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Tatsushi Toda. Genes regulated by epigenetic mechanisms in determining general intelligence (g) are over-represented in disorders that affect cognition. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2014年10月19日, サンディエゴ(アメリカ)
4. 小林 千浩, 認知能力の差が顕著な一卵性双生児のDNAメチル化解析と遺伝子発現解析, 慶應義塾大学「思考と行動判断」の研究拠点・思考と行動判断の双生児研究: その現状と展望, 2013年5月19日, 慶應義塾大学(東京都)
5. 游 智傑, 古川 真理, 小林 千浩, 敷島 千鶴, 謝 珮琴, 瀬々 潤, 菅原 裕子, 岩本 和也, 加藤 忠史, 安藤 寿康, 戸田 達史, 認知能力の差が顕著な一卵性双生児のDNAメチル化解析と遺伝子発現解析, 日本双生児研究学会第27回学術講演会, 2013年1月26日, 慶應義塾大学(東京都)
6. Chih-Chieh Yu, Mari Furukawa, Kazuhiro Kobayashi, Chizuru Shikishima, Pei-Chiang Cha, Jun Sese, Hiroko Sugawara, Kazuya Iwamoto, Tadafumi Kato, Yuko Ando, Tatsushi Toda. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins discordant for intelligence levels, The American

Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, 2012年11月8日, サンフランシスコ (アメリカ)

〔図書〕(計 1件)

1. 小林 千浩 他, 誠信書房, 誠信心理学辞典[新版]編集代表: 下山 晴彦, 2014, 1104 (776-779)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 千浩 (KOBAYASHI, Kazuhiro)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90324780

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: