

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390099
 研究課題名（和文） 認知機能関連遺伝子同定と機能解析
 研究課題名（英文） Identification of Genes for Cognition and Their Functional Analysis

研究代表者 戸田 達史（TODA TATSUSHI）
 神戸大学大学院・医学研究科・教授
 研究者番号：30262025

研究成果の概要（和文）：MR 患者 28 症例のコピー数異常領域検出を行い、3 症例は、既知の症候群、6 症例 12 領域について未知のコピー数異常を見いだした。知能指数 IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現プロファイリング解析で、それぞれの双子の IQ が低い方の検体で、炎症性サイトカインの発現が上昇する傾向にあることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：By microarray analysis, we detected copy number abnormality in MR patients. We also found that inflammatory cytokines had different expression between IQ-discordant monozygotic twins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

脳は精神作用である「こころ」が宿る場であり、その複雑な機能の解明は昔方から今日に至るまで人類の知的関心の対象となってきた。「認知機能と遺伝子・分子」は21世紀の神経科学の中心的テーマの1つであると言っても過言ではない。

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、広くヒトや動物の脳において、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である。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。このことから、特定の知的能力だけではなく全般の知的能力に関わる「一般的」な認知能力因子

の存在が考えられ、これは一般知能因子 g と呼ばれており、今では多くの研究者は、「知能」とは「すべての知的能力に関わる g 因子」であるという立場をとっている。知能測定にはウェクスラー式知能検査が現在一般的に使われており、その結果は知能指数 IQ で表される。すなわち g 因子は知能指数 IQ で測定できる量的形質である。

以前から g 因子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、今では g 因子は本質的に多因子遺伝的であるというコンセンサスになっている。健常人集団を用いた関連解析による、正常範囲内の知能 IQ のばらつきに関わるような弱い影響力を持つ多因子遺伝性の g 因子関連遺伝子の同定を目指した研究も、候補遺伝子多型などいくつか報告されているが、definiteなものはない。

ヒトの知能に関する双生児研究では、二卵性と比べ一卵性では IQ が近いということで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であっても完全に IQ が一致するわけではない。中には、IQ が 30 以上違う (2 SD 差) 一卵性双生児もまれに存在する。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知能関連遺伝子の発現の違いによるものではないかと考えられる。本研究では、IQ 差が著しい一卵性双生児 11 組のリンパ芽球を使って、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイリング解析、メチル化解析を行い、共通して発現、メチル化に差のある遺伝子群を見出し、 g 因子関連遺伝子の同定を目指す。

さらに近年、マウスの中には他のマウスよりも賢いものがあるという報告があった。ある行動学習テストで最高得点をとったマウスは、他のテストでも高得点をあげる傾向が

あるという。つまりマウスにも一般知能因子 g が存在し、マウスの知能に関連する遺伝子の存在が示唆された。その遺伝子を同定することは、将来的にヒトの知能に関連する遺伝子を探す手がかりになる可能性がある。本研究では、一卵性双生児同様ゲノムが均一な近交系マウスの個体差に注目し、作業記憶テストをはじめとする行動テストバッテリーを用いて多数のマウスを学習させ行動を得点化し、マイクロアレイによりヒトでは不可能な脳の遺伝子発現プロファイリング解析、メチル化解析を行い、得点差と関連する遺伝子群を同定する。さらにヒトでの解析と共通する因子の同定を目指す。

一方、発達期において IQ が 70 未満である精神遅滞は、一般人口の 3% 程度の頻度とされ、極めて頻度の高い疾患群である。突然変異が認知能力に強い影響を及ぼしている単一遺伝子疾患である精神遅滞について、遺伝学的な研究がなされてきた。例えば、脆弱 X 症候群は *FMR1* 遺伝子の異常で、レット症候群は *MeCP2* 遺伝子の異常で起きることが発見され、また非特異的 X 連鎖性精神遅滞の中から低分子量 G タンパク質 Rho に関係する遺伝子がいくつも原因遺伝子として同定されている。しかし、個々の遺伝子における変異は稀であり、未同定の原因遺伝子も多く存在していると考えられている。

さらに原因不明とされてきた精神遅滞患者の一部において、近年、微細な染色体コピー数異常が存在することが示されてきた。本研究では、臨床的に原因を特定できない精神遅滞患者試料から、アレイ CGH などを用い、通常の染色体検査では同定できない微細な染色体コピー数異常をスクリーニングする。そのような領域には精神遅滞原因遺伝子が存在している可能性があり、検出された異常領域から原因遺伝子の同定を行う。我々はこ

の方法を用いて、精神遅滞 1 患者において、*GRIA3* 遺伝子の重複の同定に成功している (*Am J Med Genet* 2007)。精神遅滞は治療がないとされてきたが、近年脆弱 X 症候群のモデル動物で、AMPA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストの投与により短期記憶や中枢神経障害が回復されたことが報告され、治療の可能性が示唆されている。また、すでに原因として報告のある精神遅滞の遺伝子には、*JARIDIC* はヒストン脱メチル化酵素を、*MeCP2* はメチル化 DNA 結合タンパク質をコードしているなど、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる遺伝子が多く含まれており、治療ターゲットの可能性がある。本研究により様々な原因遺伝子を同定し病態を解析することで、有効な治療ターゲット分子を発見し、ゲノム創薬を目指す。

2. 研究の目的

「認知機能と遺伝子・分子」は 21 世紀の神経科学の中心的テーマの 1 つであり、全般の知的能力に関わる「一般的」な認知能力因子の存在が考えられ、一般知能因子 *g* と呼ばれており、本質的に多因子遺伝的である。また発達期において IQ が 70 未満である精神遅滞は、一般人口の 3% 程度の頻度とされ、極めて頻度の高い疾患群である。本研究では、2 方面の認知機能関連分子に焦点をおき、1) アレイ CGH による精神遅滞の新規原因遺伝子の同定と機能解析、2) IQ 差が著しい一卵性双生児や認知能力に個体差を示す近交系マウスの遺伝子発現プロファイリング解析、メチル化解析による *g* 因子関連遺伝子同定と機能解析、を行い、知能発現の分子メカニズムの解明、精神遅滞・自閉症などの病態解明、治療法の開発、を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、知能に関わる遺伝子の同定と

その機能解析、知能発現の分子メカニズムの解明、精神遅滞の病態解明、治療法の開発を目指し、平成 20 年度では、精神遅滞の原因遺伝子の同定、双生児試料を用いた *g* 因子関連遺伝子の同定、マウス行動解析を用いたマウス *g* 因子関連遺伝子の同定を行う。

①精神遅滞の原因遺伝子の同定

・微細な染色体コピー数異常のスクリーニング

すでに DNA の収集・保存を行っている 31 人の精神遅滞患者試料を用いて、BAC アレイと高密度の SNP アレイ CGH により、染色体微細構造変化をスクリーニング、特定する。最近注目されているゲノム上のコピー数多型に注意を払う必要があり、発見した微細構造変化が健常者では見られないことを同時に証明する。

②知能指数 IQ の差が顕著な一卵性双生児を用いた遺伝子発現プロファイリング解析

・遺伝子発現プロファイリング解析

一卵性であると卵性診断が確定された、IQ 差が 15 以上 (1 SD) の一卵性双生児 11 組のリンパ芽球はすでに細胞株として確立し保存されている。その細胞を用いて、RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイリング解析を行う。双生児間で発現差の見られる遺伝子群を特定する。遺伝子発現量の差は、定量 RT-PCR にて確認する。

③マウスの行動解析による得点化と遺伝子発現プロファイリング解析

・マウスの行動解析と得点化

・マウス脳由来 RNA を用いた遺伝子発現プロファイリング解析

・各種行動パラメーターの得点による二群分けと遺伝子発現との関連解析

4. 研究成果

①まず認知機能の異常である精神発達遅

滞について解析を行った。精神発達遅滞(MR)の原因は多岐にわたるが、詳細な検査でも原因を特定できない症例も多い。近年、そういった症例の中に通常の染色体検査では検出し得ない微細なゲノムコピー数の異常を持つ例が含まれていることが報告されている。我々はAffymetrix社の500K SNPチップを用いてMR患者28症例のコピー数異常領域検出を開始した。

解析はGEMCA(Genotyping microarray based CNV analysis)にて行い、1症例当たり、最多26箇所、最少4箇所、平均13箇所のコピー数変化領域が検出できた。これらのうち、データベースを参照し、既報告である領域を除外し、対象とする候補領域を16領域(10症例)に絞り込んだ。次に定量PCRでコピー数変化の検討を行ったところ、全ての領域でコピー数変化が確認できた。そのうち3症例は、既知の症候群(Sotos症候群, 22q11.2欠失症候群, Potocki-Lupski症候群)、1症例は既知の欠失であった。残りの6症例12領域について、日本人正常50例での多型性の検討を行い、正常例で認めないことを確認した。我々はこれらの領域について、患者家族のコピー数変化の検索、遺伝子の発現等の詳細な解析を進めている。

②IQ差の顕著な一卵性双生児を用いた網羅的遺伝子発現・DNAメチル化解析を行った。認知機能は多因子形質であり、遺伝要因と環境要因の影響を受けることが明らかになっている。一部の卵性双生児では兄弟間に顕著な知的レベルの不一致が認められる。この現象は、一卵性双生児間における認知機能関連遺伝子のエピジェネティックな相違やゲ

ノムのde novo変異の存在を示唆している。

認知機能に関するエピジェネティックな要因の同定を目指し、IQ差の顕著な一卵性双生児6組12検体のリンパ芽球由来RNAを用いてAffymetrix HG U133 plus 2.0 arrayによる遺伝子発現プロファイリング解析を行った。アレイから得られた発現値は兄弟毎にRobust Multichip Average methodで補正し、Gene Set Enrichment Analysisによって兄弟間で有意に発現の変動が見られる遺伝子群を抽出した。結果、それぞれの双子のIQが低い方の検体で、炎症性サイトカインの発現が上昇する傾向にあることが明らかになった。さらに新たなIQ不一致一卵性双生児11組の網羅的遺伝子発現・DNAメチル化解析を行った。リンパ芽球からRNAを抽出し、Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrayと、Partek Genomics Suiteデータ解析ソフトウェアを用いた遺伝子発現プロファイリング解析を行っている。11組では、現在のところ新たな不一致一卵性双生児にて兄弟間で有意に発現の変動が見られる遺伝子は同定できていない。

また、リンパ球由来DNAを用いて網羅的DNAメチル化解析を行なった。解析には、Affymetrix GeneChip Human Promoter 1.0R ArrayとModel based Analysis of Tiling-arrays (MAT)データ解析ソフトウェアを用い、兄弟間のメチル化状態に顕著な違いが見られる領域を候補メチル化領域として抽出した。これらの領域のメチル化状態をより定量的なbisulfite genomic sequencingで確認した。現在のところ、いくつかの遺伝子が同定されている。そのうちの1遺伝子については、すでにコンディショナルノックアウトマウス作製のES細胞がバンクに登録されており、当該マウス作成を計画している。

③マウスの行動解析による得点化と遺伝子発現解析：すでに得られているマウス41匹の行動解析データを主成分分析したところ、寄与率は予想よりも小さいが、g因子と考えられる成分が抽出された。これらマウスの海馬由来のRNAを抽出し、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて遺伝子発現データを得た。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計53件)

1. Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T. Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. **J Hum Genet** 56(4):330-334, 2011 (査読有)
2. Kojima K, Nosaka H, Kishimoto Y, Nishiyama Y, Fukuda S, Shimada M, Kodaka K, Saito F, Matsumura K, Shimizu T, Toda T, Takeda S, Kawachi H, Uchida S. Defective glycosylation of α -dystroglycan contributes to podocyte flattening. **Kidney Int** 79: 311-316, 2011 (査読有)
3. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. **Proc Natl Acad Sci U S A** 108: 3701-3706, 2011 (査読有)
4. Kanagawa M, Omori Y, Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T. Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. **J Biol Chem** 285: 31208-31216, 2010 (査読有)
5. Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Mizuno Y, Kubo S, Toda T, Hattori N. Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: screening strategy in parkinsonism. **Neurosci Lett** 455:159-161, 2009 (査読有)
6. Xiong H, Wang S, Kobayashi K, Jiang Y, Wang J, Chang X, Yuan Y, Liu J, Toda T, Fukuyama Y, Wu X. Fukutin gene retrotransposal insertion in a non-Japanese Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) patient. **Am J Med Genet** 149A:2403-2408, 2009 (査読有)
7. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. **Nature Genet** 41:1303-1307, 2009 (査読有)
8. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, ...Toda T (62名中59番目), et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. **N Engl J Med** 361:1651-1661, 2009 (査読有)
9. Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effect on polyglutamine disease mice. **Neurosci Lett** 449:87-92, 2009 (査読有)
10. Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J, Fukuda Y, Date H, Iwata A, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. **Arch Neurol** 66:571-576, 2009 (査読有)
11. Shikishima C, Hiraishi K, Yamagata S, Sugimoto Y, Takemura R, Ozaki K, Okada M, Toda T, Ando J. Is g an entity? A Japanese twin study using syllogisms and intelligence tests. **Intelligence** 37:256-267, 2009 (査読有)
12. Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation in novel model mice to dystroglycanopathy. **Hum Mol Genet** 18:621-631, 2009 (査読有)
13. Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress

- polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 283:26188-26197, 2008 (査読有)
14. Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nature Neurosci* 11:923-931, 2008 (査読有)
 15. Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, Nakabayashi Y, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Nakashima K, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and α -synuclein in Parkinson's disease. *Hum Genet* 124:89-94, 2008 (査読有)
 16. 小林千浩 戸田達史. 認知と遺伝子. *Cognition and Dementia* 7: 35-43, 2008(査読無)
[学会発表] (計 10 件)
 1. 小林千浩. 認知能力の差が顕著な一卵性双生児の網羅的遺伝子発現・DNAメチル化解析. 日本パーソナリティ心理学第19回大会(招待講演). 2010年10月 慶應義塾大学三田キャンパス
 2. 小林千浩、古川 真理、游 智傑、敷島 千鶴、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分子遺伝学的解析. 日本人類遺伝学会第55回大会. 2010年10月 大宮ソニックシティ
 3. 小林千浩、古川 真理、游 智傑、敷島 千鶴、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. 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会. 2010年12月 神戸ポートアイランド
 4. 小林千浩、古川 真理、游 智傑、敷島 千鶴、瀬々 潤、菅原 裕子、岩本和也、加藤 忠史、安藤 寿康、戸田 達史. Genome-wide gene expression and DNA methylation analyses of significantly discordant monozygotic twins for cognitive ability. American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting. 2010年11月 Washington D. C., 米国
 5. 小林千浩、古川 真理、游 智傑、敷島 千鶴、安藤 寿康、戸田 達史.

- Genetic Analysis of Monozygotic Twins Discordant for Cognitive Abilities. 第59回米国人類遺伝学会年会. 2009年10月Hawaii, 米国
6. 小林千浩、古川 真理、游 智傑、敷島 千鶴、安藤 寿康、戸田 達史. Genomic analysis of monozygotic twins discordant for cognitive ability. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月 パシフィコ横浜
 7. 古川 真理、小林千浩、游 智傑、瀬々潤、敷島 千鶴、安藤 寿康、戸田 達史. Expression analysis of monozygotic twins discordant for cognitive ability. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月 パシフィコ横浜
 8. 牟禮 岳男、小林千浩、金城 薫、千代延 友裕、西村 陽、平井 清、森本 昌史、松尾 雅文、稲澤 譲治、戸田 達史. 精神発達遅滞児(者)における500K SNPチップを用いたコピー数変化領域のスクリーニングと原因遺伝子の同定. 日本人類遺伝学会第53回大会. 2008年9月 パシフィコ横浜
 9. 小林千浩、牟禮 岳男、金城 薫、千代延 友裕、西村 陽、平井 清、森本 昌史、松尾 雅文、稲澤 譲治、戸田 達史. 精神発達遅滞における500K SNPチップを用いたコピー数変化領域のスクリーニングと原因遺伝子の同定. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会. 2008年12月 神戸ポートアイランド
 10. 小林千浩、牟禮 岳男、金城 薫、千代延 友裕、西村 陽、平井 清、森本 昌史、松尾 雅文、稲澤 譲治、戸田 達史. Copy number variation screening with the 500k SNP array in patients with mental retardation. The American Society of Human Genetics. 58th Annual Meeting. 2008年11月 Philadelphia, 米国
[図書] (計 2 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im3/rinsyo/shinkei/index.html>
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
戸田 達史 (TODA TATSUSHI)
神戸大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号: 30262025