

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650136

研究課題名（和文） 認知機能に関連する遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Molecular analyses of genes related to cognitive abilities.

## 研究代表者

小林 千浩 (KOBAYASHI KAZUHIRO)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90324780

研究成果の概要（和文）：近交系マウスを行動解析により高低パフォーマンス群に分け、群間で発現差のある遺伝子群を同定した。IQ 差の顕著な一卵性双生児を用い、兄弟間で発現差のある遺伝子群を同定し、さらに兄弟間で DNA メチル化に差のある遺伝子を同定した。また精神遅滞患者で、既知の重複・欠失症候群と未知のコピー数変化 CNV を検出した。これらの遺伝子あるいは CNV は、認知機能と関連している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We divided the inbred mice into high and low performance groups by behavioral analysis, and we identified some gene sets that showed differential expression between the groups. Using monozygotic twins discordant for IQ scores, we also identified some gene sets that expressed differentially between siblings and one gene that showed differential DNA methylation status. In patients with mental retardation, we detected several known duplication or deletion syndromes and unknown copy number changes, CNVs. These genes and CNVs could be associated with cognitive abilities.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・認知科学

キーワード：脳認知科学

## 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、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している。

## 2. 研究の目的

本研究では、認知機能の遺伝因子を同定するためのユニークな研究を提案する。まずその方法として、多因子遺伝性疾患の研究で用いられるゲノムワイド関連解析が考えられるが、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。世界でも、健常人集団を用いた関連解析による g 因子関連遺伝子の同定を目指した研究がいくつか報告されているが、サンプル数の少なさが問題となっており、データの信頼性が低い。そこで本研究では、サンプル数が少なくても済む以下の3つの方法で遺伝因子の同定をすることを考えている。そして、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
- (2) 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
- (3) 精神遅滞の原因遺伝子の同定

## 3. 研究の方法

(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

### ① マウスの行動解析と得点化

正常の雄マウス (C57BL/6J) を 41 匹使用した行動テストバッテリーによる行動解析はすでに終了している。行動解析は 10 週齢から開始、約 3 ヶ月間一連の行動テストを行い、各種パラメーターについて得点化した。

これらの行動テストのデータを先行研究として統計学的に因子分析したところ、g 因子の存在を示唆する結果が得られている。

② マウス脳由来 RNA を用いた遺伝子発現解析

41 匹の各マウスから脳を採取し、片側の大脳半球から海馬、大脳皮質の RNA を抽出した。別の半球は DNA メチル化解析、クロマチン解析あるいはタンパク質レベルの解析に用いるために保存している。抽出した海馬と大脳皮質の RNA でマイクロアレイを用いて遺伝子発現を解析する。

③ 各種行動パラメーターの因子分析と遺伝子発現との関連解析

行動パラメーターの数は 200 を超えるが、交絡因子の影響を最小限になるようにパラメーターを取捨選択して組み合わせ、因子分析により g 因子を抽出、1 匹ずつのマウスを再得点化する。統計学的処理により、得点に関連するような発現が見られる遺伝子群を同定する。

④ MeDIP-on-chip による遺伝子発現調節の

解析

MeDIP-on-chip を行い、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査する。その遺伝子の発現量の差は、定量 RT-PCR にて確認する。また、ヒストン修飾の状況を調べる ChIP-on-chip 解析も検討する。

(2) 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

### ① 遺伝子発現解析

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 19 組のリンパ芽球はすでに細胞株として樹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。

先行研究ですでに 6 組の双生児に関しては発現解析が終了し、兄弟で発現に差のある遺伝子群を見出している (未発表)。サンプルを増やして再現性を確認することや、ノックアウトマウスの作成など他の方法を用いて、認知機能に関連しているかを確認する。またその遺伝子群の発現を変化させることが知られている既知の薬剤をマウスに投与し、行動テストにより行動変化を調べる。

② MeDIP-on-chip による遺伝子発現調節の解析

リンパ芽球を用い 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、差のある遺伝子を探査する。その遺伝子発現量の差は、定量 RT-PCR にて確認する。また、ヒストン修飾の状況を調べる ChIP-on-chip 解析も検討する。

### ③ ゲノム上の de novo CNV 変化の同定

血液から採取した 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、兄弟間で異なる CNV を特定する。

(この(2)では、脳ではなく血液由来サンプルを用いることによる問題が起こる可能性がある。その場合は iPS 細胞を樹立し神経細胞に分化させたサンプルを用いることも検討する。)

(3) 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、すでに 31 人検体分の DNA が収集され保存されている。

① 上で同定した認知機能候補遺伝子についての変異スクリーニング

患者試料を用いて、同定した候補遺伝子についての遺伝子変異を検索する。

### ② ゲノム上の de novo CNV 変化の同定

血液から採取した 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、

de novo の CNV 変化によって異常になっている遺伝子をデータベース上で特定し、原因遺伝子候補とする。遺伝子発現の変化や遺伝子産物の変化を DNA、RNA、タンパク質各レベルで解析する。

#### (4) 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

各遺伝子にコードされるタンパク質についての機能を明らかにし、機能別に分類する。それぞれのタンパク質の分子相互作用を調べ、また新たに相互作用するタンパク質を質量分析等で同定することで、分子ネットワークを構築する。培養神経細胞で遺伝子を RNAi によりノックダウンして樹状突起の伸長変化を観察する等、in vitro での各遺伝子、タンパク質の役割を明らかにする。遺伝子を強制発現、あるいはノックダウンすることで、発現量が増加する他の遺伝子をマイクロアレイ等で調べ、下流の遺伝子を同定する。各遺伝子グループにおける、薬剤や生活環境因子による発現変化を探る。遺伝子群の発現を変化させる薬剤をマウスに投与し、行動変化を調べる。ノックアウトマウスの作成にとりかかる。知能に関する関連解析や、自閉症等の発達障害の関連解析の報告と照らし合わせ、疾患との関連性を調べる。これらの実験を総合し、知能発現の分子メカニズムを解明する。

#### 4. 研究成果

本研究により、以下のことについて明らかにした。

##### (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

正常の雄マウス (C57BL/6J) 41 匹の各マウスから脳を採取し、抽出した海馬の RNA でマイクロアレイを用いて遺伝子発現を解析した。認知機能を強く反映している行動テストパラメーターを取捨選択して組み合わせ、因子分析による第一主成分より高パフォーマンスマウス 5 匹と低パフォーマンスマウス 8 匹を選び出した。これらのマウスについて、GSEA 解析により、パフォーマンスと関連している発現が見られる遺伝子群をいくつか同定した。タンパク質合成に関係する遺伝子群の発現が高パフォーマンスマウスで高く、一方、細胞膜関連の遺伝子群の発現が低パフォーマンスマウスで高くなっていた。これらの遺伝子群は認知機能に関わる可能性があると考えられるが、サンプル数が少なく信頼性に欠ける点が問題となった (論文準備中)。DNA メチル化・ヒストン修飾については、冷凍庫事故により、解析不可能となった。

##### (2) 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

STR 法により一卵性であると卵性診断で確定した、IQ 差が 15 以上 (1 SD) の一卵性双生児 17 組のリンパ芽球から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、高 IQ と低 IQ 兄弟間で発現差の見られる遺伝子群をいくつか特定した。タンパク質合成に関係する遺伝子群の発現が高 IQ で高く、一方、細胞膜関連の遺伝子群の発現が低 IQ で高くなっていた。また血液由来 DNA を用いて MeDIP-on-chip 解析を行い、双子兄弟間でプロモーター領域の DNA メチル化に差のある低分子 G タンパク質関連遺伝子を 1 つ特定した。これらの遺伝子群・遺伝子は、認知機能に関わる可能性がある (論文投稿中)。予備実験での結果と一致しなかったが、サンプル数が少なかったことが原因であると考えられた。一方で血液由来 DNA を用いたゲノムワイドの CNV 解析を行ったが、兄弟間で異なる CNV は同定されなかった。一卵性双生児でのゲノムの違い、特に CNV の違いが最近報告されているが、頻度としてはほとんど無いことが本研究により示唆された。

##### (3) 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 27 人検体分の血液由来 DNA を用い、ゲノムワイドの CNV 解析をマイクロアレイで行い、既知の重複・欠失症候群 (Potocki-Lupski 症候群、22q11.2 欠失症候群、Sotos 症候群) と、未知の CNV を検出した。未知の CNV から、精神遅滞の原因になりそうな遺伝子を選び出したが、原因であると結論するための証拠に欠けることが問題となった (論文準備中)。

##### (4) 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

詳細な遺伝子の機能解析を行うことができなかったが、(1) と (2) の研究から、同じような機能を持つ遺伝子群が同定されていることより、これらの遺伝子機能が認知機能に関わる可能性が非常に高いことを、本研究は示唆していると考えられる。今後データを追加することにより、より確からしい認知機能関連遺伝子が同定できると思われる。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 游 智傑、Genome-Wide DNA Methylation and Gene Expression Analyses of Monozygotic Twins Discordant for Intelligence Levels、日本人類遺伝学会第 56 回大会、2011 年 11 月 12 日、幕張メッセ (千葉県)

② Chihchieh Yu 、 Genome-Wide DNA Methylation and Gene Expression Analyses of Monozygotic Twins Discordant for Intelligence Levels、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜（神奈川県）

〔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・医学研究科・准教授

研究者番号：90324780

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者