

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659935

研究課題名（和文） CASKノックアウトマウスを用いた口蓋裂形成シグナルの解明

研究課題名（英文） Analysis of cleft palate signal by using CASK knockout mouse

研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

研究成果の概要（和文）：本研究では，CASK ノックアウトマウスが口蓋裂を起こすことから，CASK のシグナルがどのように口蓋裂に作用するかを調べるため，CASK に結合する物質を Q-TOF LC/MS で探した．これらの中から候補を Neurexin に絞り，どこに結合するかを調べ，相互作用を調べた．また，CASK の flox マウスを導入し口蓋裂のおこる原因を検討した．また，口蓋裂における顔貌の形態の違いを評価するための方法を開発した．

研究成果の概要（英文）：We hypothesize that CASK signal affects cleft palate formation because CASK knock out mouse has cleft palate. To clarify this signal we identified the candidate molecules that associate with CASK by using Q-TOF LC/MS. We selected Neurexin as a signal transduction molecule, then adherent domain and interaction between molecules was analyzed. In addition CASK flox/flox mouse was analyzed and estimated the role of CASK in cleft palate formation. On the other hand we developed a new method which evaluate morphological similarity to use mouse facial deformity.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯科口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

通常の唇顎口蓋裂（奇形症候群を除く）の発生は，相加的に働く多数の遺伝子と多数の環境因子との相互作用によって発症すると考えられている．すなわち，口蓋裂の易罹患性は変動していて，それが一定の閾値を越えた時に発症する，多因子閾モデル (multifactorial/Threshold model)で説明されている．しかし，近年，遺伝子改変マウスのフェノタイプ解析から，単因子の遺伝子欠損でおこる口蓋裂について解ってきた．その中の遺伝子のひとつとして，

Calcium/calmodulin-associated Ser/Thr kinase (CASK)の遺伝子ノックアウトマウスは，X連鎖劣性遺伝性の口蓋裂発症をすることが知られている．ノックアウトマウスは胎生致死であるが，ごく少量だけ CASK が発現するノックダウンマウスではフェノタイプは口蓋裂のみを残す．また，ヒトでは CASK のミスセンス・ミューテーションは FG 症候群（Opitz-Kaveggia 症候群）を引き起こし，この遺伝子が顎顔面や口蓋裂の形成に関わっていることは明らかである．一方，CASK は神経伝達に中心的な役割を果たしており，膜の興奮性やシナプスの機能に異常が生じ

ていることが知られている。研究分担者の田淵らは、神経伝達の解析を行っている最中に、CASK ノックアウトの口蓋裂の原因がCASKのシグナルの周辺にあることに気づき、一方、柳川らは骨形成に関わるノックアウトマウスの研究をしていたため、本現象の口蓋裂発症の上での重要性に気づき、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、神経伝達に関連する遺伝子である Calcium/calmodulin-associated Ser/Thr kinase (CASK)のノックアウトマウスが、X連鎖遺伝の口蓋裂をおこすことや、CASKの変異が人ではFG症候群を起こすことから、CASKシグナルが口蓋の形成にかかわること着目し、口蓋裂発症の原因についてCASKノックアウトマウスを用いて解明するため本研究計画を立案した。

本研究は、1本研究では、この2年間に1) CASK ノックアウトマウスの胎児を用いて形態学的に解析をおこない、CASKの口蓋裂の形成がどの過程で起こるかを調べる。2) 口蓋裂を発症する際のCASKの新規結合物質を質量分析(TOF-MS)で検索する。3) リン酸化シグナル伝達の経路を検討する。4) 同定した物質の局在を調べ、シグナルのルートを解析する。以上により、発生の過程で、CASKのシグナルが口蓋裂形成にどのように関与するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* の解析

ノックアウトマウスの解析—CASK flox/floxマウスを導入し、CASKのタンパク質の発現量をウェスタンブロットングにより調べた。また、発現量と口蓋裂の表現型についての関連を調べた。さらにAyu-Cre, TNAP Creマウスなどとの掛け合わせによる完全欠失のマウスの制作を検討したが、震災のためのマウス導入の遅延、研究者の施設移転とマウスのウイルス感染によるコロニーの一時閉鎖のため、完全欠失マウスの解析に至らなかった。

(2) *in vitro* の解析

1) 質量分析による結合物質の同定：CASKのPDZ-SH3-Gukドメインを含むGST-fusionタンパク質を作成し、マウス脳抽出液をカラムに通し、電気泳動で分離し、GSTのみのコントロールと差があるバンドを結合物質とし、Q-TOF LC/MSで分離した。

2) 結合物質の確認と、結合部位のドメイン

解析：PDZドメイン、SH3ドメイン、GuKドメインに分割し、3つとも含むもの、PDZドメインのみのもの、SH3+GuKドメイン、GuKドメインに分割し、それぞれGSTフュージョン・タンパクを制作した。ついで、GSTカラムに固定し、マウス脳抽出液から溶出させ、Neurexin抗体によりウェスタンブロットを行った。

3) 等温滴定熱測定

等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter: ITC) は、一定温度下で滴定に伴う熱量変化を検出する装置で、分子同士が結合する時に発生する微小な熱量変化を計測し、得られる滴定曲線から、相互作用解析に用いられる。MicroCal iTC200を用いてCASKのPDZ-SH3-GuKのフュージョンタンパクをサンプルセル内に入れ、Neurexinを滴定シリンジに挿入し熱力学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) CASKのfloxノックアウトマウスを導入し、観察を行ったところ、CASKノックアウトマウスではCASK flox/floxでもCASKの発現はタンパクレベルで低下している事が解った。一方、発現の低下にも関わらず、死亡したマウスでは口蓋裂が見られないため、口蓋裂と胎生致死との因果関係が否定された。また口蓋裂形成にはCASKの遺伝子が完全に除去されていることが必要になることが判明した。低発現量で機能を維持する場合、

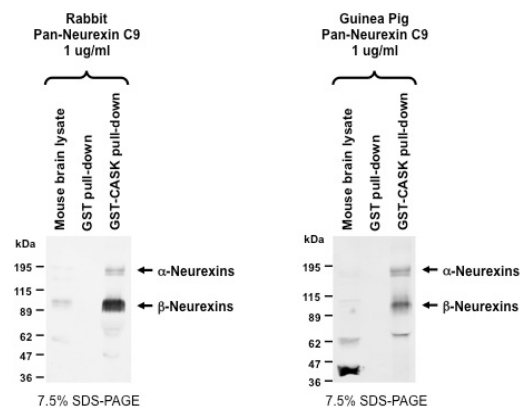


図1 免疫沈降法による結合の確認

enzymatic activity等による可能性が高く、multi-functional proteinとして知られるCASKにおいて、口蓋裂はCASKの酵素活性等によって制御されていることが示唆された。

(2) 質量分析による結合物質の同定：CASK

の PDZ-SH3-Guk ドメインを含む GST-fusion タンパク質を作成し、マウス脳抽出液をカラムに通し、電気泳動で分離し、GST のみのコントロールと差があるバンドを結合物質とし、Q-TOF LC/MS で分離したところ、CNTNAP2, Tenascin-R, Syndecan-4, AGPAT1, Desmoplakin, Desmoglein 1, Junction, Plakoglobin, Neurexin が同定された。この中から Neurexin がシグナルの伝達としてもっとも有望であったため、これを選択し、結合するかの確認作業をおこなった。GST-CASK による pull down アッセイをおこなったところ、ウェスタンブロットで Neurexin は確認され、結合することが証明された(図 1)。

(3) ドメイン解析: CASK のどのドメインに Neurexin が結合するかを調べるために、ドメイン解析を行った。ドメイン解析には PDZ ドメイン, SH3 ドメイン, GuK ドメインに



図 2 結合ドメインの位置の推定

分割し、3つとも含むもの、PDZ ドメインのみのもの、SH3+GuK ドメイン、GuK ドメインに分割し、それぞれ GST フュージョン・タンパクを制作した。ついで、GST カラムに固定し、マウス脳抽出液から溶出させ、ウェスタンブロットにより Neurexin の結合部位を同定したところ、CASK には、PDZ と SH3 GuK の複数のドメインを含まないと Neurexin に結合しないことが予想された。

(4) 等温滴定熱測定: 等温滴定熱測定を行っ

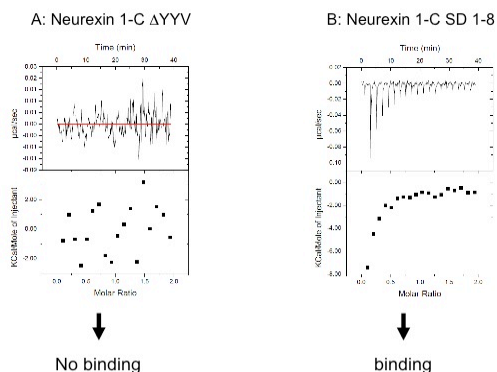


図 3 熱力学的解析

た結果、Neurexin の C 末端についている PDZ ドメインの主要な部分(YVV)を消去すると結合性が完全に消失するが、Neurexin の細胞内領域にある 8 つのセリンをリン酸化型変異 (S を D に置換) では結合性が保たれる (=Neurexin のリン酸化は CASK との結合性には影響を与えない) ことが示された。

(5) その他: 出生後のマウスの顎の変形を解析するため、ハウドルフ距離を用いて対称性を数値化する方法を考案し、また臨床で唇顎口蓋裂患者の顔貌の変形の評価への応用の可能性を示し発表した。ハウドルフ距離は数学で二つの図形がどれだけ近いかを表す数値で、これらを利用して、人での鼻孔の形状が対称であるかを数値化して調べたところ、視覚的評価と相関があり、検出力の高い方法であることが解った。

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) Presurgical nasopalveolar molding orthopedic treatment improves the outcome of primary cheiloplasty of unilateral complete cleft lip and palate, as assessed by naris morphology and cleft gap. Sasaki H, Togashi S, Karube R, Yanagawa T, Nakane S, Tabuchi K, Ishibashi N, Shinya Y, Ito H, Yamagata K, Onizawa K, Adachi K, Sekido M, Bukawa H. J Craniofac Surg. 2012 23(6):1596-601. 査読有 doi:10.1097/SCS.0b013e31825196dc.

(2) Karube R, Sasaki H, Togashi S, Yanagawa T, Nakane S, Ishibashi N, Yamagata K, Onizawa K, Adachi K, Tabuchi K, Sekido M, Bukawa H. A novel method for evaluating postsurgical results of unilateral cleft lip and palate with the use of Hausdorff distance: presurgical orthopedic treatment improves nasal symmetry after primary cheiloplasty. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012 114(6):704-11. 査読有 doi: 10.1016/j.oooo.2012.01.042.

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

(2) 研究分担者

田淵 克彦 (TABUCHI KATSUHIKO)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：20546767