

Functional studies for a dominant mutation in the *EDAR* gene  
responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia

(*EDAR* 遺伝子の優性変異による低汗性外胚葉形成不全症の発症機構の解明)

沖田 朋子

山口大学大学院医学系研究科  
医学専攻 皮膚科学分野

令和2年 1月

## 目次

1 要旨	3
2 背景と目的	3
3 方法	6
1) 発現ベクターの作製	6
2) 細胞培養、RT-PCR とウェスタンブロット	7
3) NF- $\kappa$ B レポーターアッセイ	8
4) 共免疫沈降法	8
4 結果	9
1) HEK293T 細胞には内在性に EDA-A1 が発現している	9
2) 変異型 EDAR は NF- $\kappa$ B の下流を活性化できず、また野生型 EDAR による活性化を抑制した	9
3) 変異型 EDAR は EDARADD との親和性を喪失したが、野生型 EDAR との相互作用は可能だった	12
4) 変異型 EDAR は野生型 EDAR と EDARADD との相互作用を妨げる	13
5 考察	14
6 謝辞	16
7 参考文献	17

## 1 要旨

低汗性外胚葉形成不全症 (hypohidrotic ectodermal dysplasia: HED)は、乏毛症、低汗症、乏歯症を特徴とする稀な遺伝性疾患である。本疾患は、X連鎖劣性 (X-linked recessive: XR)、常染色体優性 (autosomal dominant: AD)または常染色体劣性 (autosomal recessive: AR)の遺伝形式を示す。XR の HED は *EDA* 遺伝子の変異で発症し、AD/AR は *EDAR* または *EDARADD* 遺伝子のどちらかの変異で発症する。*EDAR* の劣性遺伝子変異に関しては発症機序が明らかにされてきたが、*EDAR* の優性遺伝子変異がどのように HED を引き起こすかについてはほとんど不明だった。

本研究では、*EDAR* 優性遺伝子変異の代表として p.F398\*に着目し、さまざまな *in vitro* 解析を行った。まず、p.F398\*変異型 *EDAR* は完全に *EDARADD* との親和性を失うこと、そしてドミナント・ネガティブ効果によって、野生型 *EDAR* により誘発される下流の NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することを示した。さらに、変異型 *EDAR* は野生型 *EDAR* に結合可能であり、それにより野生型 *EDAR* と *EDARADD* との間の相互作用を抑制することを明らかにした。

本研究で得られた知見は、*EDAR* と *EDARADD* との間の相互作用が外胚葉形成において必要不可欠な役割を担うことを改めて示しただけではなく、常染色体優性遺伝 HED の発症メカニズムの一端を解明したといえる。

## 2 背景と目的

HED は、毛包、エクリン汗腺、歯牙の形成異常で特徴づけられる稀な疾患である。乏毛症、低汗症、乏歯症が 3 徴候であるが、それらに加え、前額部の突出、鞍鼻、眼囲の色素沈着、下口唇の外反、耳介低位などの顔貌異常が認められる (図 1)<sup>1</sup>。また、一部の患者では、爪の低形成や掌蹠角化症なども呈しうる<sup>1</sup>。大部分の HED は X 連鎖劣性遺伝 (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] 305100)であり、X 染色体に局在する ectodysplasin (*EDA*)遺伝子の変異で発症することが知られている<sup>2</sup>。実際、本邦においても HED の患者の多くが男性で、*EDA* 遺伝子に病的変異が同定されている<sup>1</sup>。一方、稀ではあるが、常染色体優性 HED (OMIM 129490)あるいは劣性遺伝 HED (OMIM 224900)の家系も存在する。常染色体遺伝の HED は、ectodysplasin A receptor (*EDAR*)<sup>3</sup>または *EDAR*-associated death domain (*EDARADD*)<sup>4,5</sup> 遺伝子の変異で生じる。*EDA* 遺伝子は、選択的スプライシングにより複数の II 型膜貫通型蛋白のアイソフォームをコードする<sup>6-8</sup>。これらの中で *EDA-A1* が最も長いアイソフォームであり、tumor necrosis factor (TNF)リガンドスーパーファミリーに属し、furin という蛋白分解酵素によって細胞

外ドメインが細胞膜から遊離されることでリガンドとして作用する<sup>9</sup>。EDAR は、TNF 受容体スーパーファミリーに属する I 型膜貫通型蛋白であり、細胞内にデスドメイン (death domain: DD)を有するだけでなく、細胞外にシステインが豊富なドメインを持つ<sup>10</sup>。重要なことに、EDAR は EDA-A1 の特異的な受容体であること<sup>11</sup>、さらに EDARADD は EDAR のアダプター蛋白であること<sup>4</sup>が次々に明らかになった。三量体のリガンド EDA-A1 が三量体の受容体 EDAR と結合し、続いて DD を介して EDARADD と結合し、最終的に下流の NF- $\kappa$ B が活性化することで外胚葉の形成に重要な多数の遺伝子の発現が誘導される (図 2)<sup>12</sup>。EDAR-A1、EDAR、EDARADD は共通のシグナル伝達系 (EDAR signaling)において密接に互いに関連しているので、これら 3 つの分子のうちのいずれに変異が生じても同様の表現型を呈する<sup>13</sup>。

EDAR 遺伝子の変異に関しては、常染色体劣性変異による HED の発症機序は十分に解明されている。EDAR 遺伝子の上流の早期終止コドン (premature termination codon: PTC)変異の場合は大部分が mRNA レベルで崩壊し、EDAR の細胞外ドメイン内または DD 内のミスセンス変異であれば、それぞれ EDA-A1、EDARADD との結合能を失うことが示されている<sup>14-18</sup>。また、これら全ての劣性変異は野生型 EDAR に対してドミナント・ネガティブ効果を示さないと考えられる。なぜなら、変異をヘテロ接合型で有する保因者は HED の症状を示さないからである<sup>14-18</sup>。その一方で、EDAR 遺伝子の優性変異が結果としてどのように HED を引き起こすかについては大部分が明らかになっていない。現在までに、常染色体優性型 HED の原因として約 10 種類の EDAR 遺伝子変異が報告されているが、特記すべきことに、いずれも EDAR の DD 内に生じたミスセンス変異または PTC 変異である (図 3)<sup>3,16,19-22</sup>。本研究では、これらの優性変異の中で、EDAR 遺伝子の最終エクソンに存在し、コドン 398 で PTC を生じる (p.F398\*)と予測されるフレームシフト変異 c.1193\_1194delTT に注目した<sup>22</sup>。EDAR 遺伝子の同変異は過去に欧米人の HED の 5 世代家系に同定されたことより明らかな常染色体優性遺伝形式を示しており、真の優性遺伝子変異と判断できるからである<sup>22</sup>。

本研究では、常染色体優性 HED の分子機構を明らかにするため、培養細胞を用いて EDAR の p.F398\*変異の一連の機能的解析を行った<sup>23</sup>。



図 1. 低汗性外胚葉形成不全症の臨床像

乏毛症に加え、眼周囲の色素沈着、鞍鼻、口唇の肥厚などの顔貌異常を呈する。



図 2. EDAR signaling の模式図

EDA-A1/EDAR/EADARADD の下流は最終的に NF- $\kappa$ B の活性化につながり、外胚葉形成に重要な多数の遺伝子の発現が誘導される。

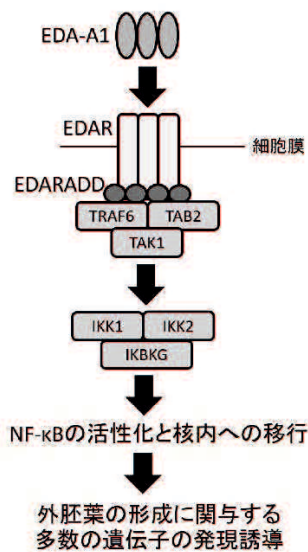
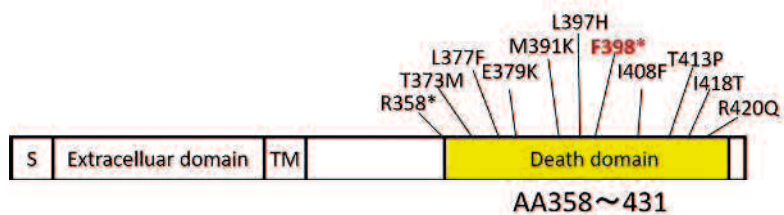


図 3. EDAR 蛋白の模式図と過去に報告された優性遺伝型の EDAR 遺伝子変異

全ての変異が EDAR の death domain (DD) に局在している。S, signal peptide;

EC, extracellular domain; TM, transmembrane domain; IC, intracellular domain。



### 3 方法

#### 1) 発現ベクターの作製

N-末端に myc-tag を付けた EDARADD を発現するベクター (pCMV-Tag3-EDARADD) と N-末端に Flag-tag を付けた EDARADD を発現するベクター (pCMV-Tag2-EDARADD)は過去の研究で既に作製されていた<sup>17,18</sup>。myc-EDARADD と Flag-EDARADD の塩基配列を制限酵素 *NotI* と *KpnI* によって各ベクターから切り出し、pCXN2.1 にサブクローニングした<sup>24</sup>。pCXN2.1 ベクターは chicken beta-actin promoter を有し、CMV promoter よりも強力に目的の蛋白を mammalian cell 内で過剰発現させることができる<sup>24</sup>。full-length の野生型 EDAR を発現するベクター (pCXN2.1-EDAR-Wt)も過去に作製されていた<sup>18</sup>。pCXN2.1-EDAR-Wt ベクターを鋳型として使用し、full-length の野生型 EDAR と p.F398\*変異型 EDAR の塩基配列を polymerase chain reaction (PCR)によって増幅した。PCR 産物は、N 末端に Flag-tag の付着した蛋白を発現する pCMV-Tag2 ベクター (Agilent Technologies, La Jolla, CA)の *EcoRI* と *KpnI* サイトにクローニングし、続いて Flag-EDAR 配列を切り出して pCXN2.1 ベクターの *NotI* と *KpnI* サイトにサブクローニングした。

pCXN2.1-EDAR-Wt ベクターを鋳型として使用し、野生型 EDAR と p.F398\*変異型 EDAR の細胞内ドメイン (intracellular domain: IC)をコードする塩基配列を PCR で増幅した。PCR 産物は N 末端に myc-tag が付いた蛋白を発現する pCMV-Tag3 vector (Agilent Technologies) の *EcoRI* と *KpnI* サイトにクローニングした。その後、myc-EDAR-IC の塩基配列を切り出して pCXN2.1 ベクターの *NotI* と *KpnI* サイトにサブクローニングした。

最後に pCXN2.1-EDAR-Wt ベクターを鋳型として、C 末端に Flag-tag が付いた full-length 野生型 EDAR と p.F398\*変異型 EDAR、C 末端に HA-tag が付いた full-length 野生型 EDAR を PCR で増幅した。それぞれの産物を pCXN2.1 vector の *NotI* と *KpnI* サイトに組み込んだ。

PCR で使用したプライマーを表 1 に示す。PCR には KOD-Plus (TOYOBO Life Science, Tokyo, Japan)を使用した。なお、作製した全てのベクターの塩基配列をサンガー法で確認した。

表 1. PCR で使用したプライマー(参考文献 23 より引用)

Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
To amplify the full-length wild-type EDAR:	
EDAR-full-F-EcoRI: AAAAGAATT <u>CGATGGCCCATGTGGGGGACT</u>	EDAR-Wt-R-KpnI: AAAAGGT <u>ACCACAGGCATGCTTTTCAGG</u>
To amplify the full-length p.F398* mutant EDAR:	
EDAR-full-F-EcoRI	EDAR-F398*-R-KpnI: AAAAGGT <u>ACCTCAGAGTTGCATGCCGTCTGTC</u>
To amplify the intracellular domain of wild-type EDAR:	
EDAR-IC-F-EcoRI: AAAAGAATT <u>CCTACATCCTGAAGACAAAGCCCT</u>	EDAR-Wt-R-KpnI
To amplify the intracellular domain of p.F398* mutant EDAR:	
EDAR-IC-F-EcoRI	EDAR-F398*-R-KpnI
To amplify a C-terminal Flag-tagged full-length wild-type EDAR:	
EDAR-full-F-NotI: AAAAGCGGCCCGCCACCATGGCC CATGTGGGGGACT	EDAR-Wt-R-Flag-KpnI: AAAAGGTACCTACTTATCGTCGTCATCCTTG TAATCGGATGCAGCATGTGGCTGG
To amplify a C-terminal Flag-tagged full-length p.F398* mutant EDAR:	
EDAR-full-F-NotI	EDAR-F398X-R-Flag-KpnI: AAAAGGTACCTACT TATCGTCGTCATCCTTG TAATCGAGTTGCATGCCGTCTGTCA
To amplify a C-terminal HA-tagged full-length wild-type EDAR:	
EDAR-full-F-NotI	EDAR-Wt-R-HA-KpnI: AAAAGGTACCTAGGCCGTAGTCGGGCACGTCG TAGGGGTAGGATGCAGCATGTGGCTGG

Restriction enzyme sites are underlined.

## 2) 細胞培養、RT-PCR とウェスタンブロット

10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA)と 100IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies)で HEK293T 細胞を培養した。HEK293T 細胞に EDA-A1 が内在性に発現していることを確認するために、細胞から RNeasy® Minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA)を用いて total RNA を抽出し、逆転写酵素 SuperScript III (Life Technologies)で first-strand cDNA を合成した。その後、EDA 遺伝子の cDNA の塩基配列を、forward primer (5'-AGAGGTCGTGAACGGCTGAGG-3') と reverse primer (5'-GGCTGCAACACCAATACACCTCAC-3')を用いて PCR で増幅し、0.8%アガロースゲルで泳動した。なお、健常人の頭部皮膚由来の total RNA から過去に合成した first-strand cDNA をコントロールとして用いた。

トランスフェクションの前日に細胞を 6 well plate に撒いた。Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いて、N 末端に Flag-tag が付いた full-length の野生型または p.F398\*変異型 EDAR を発現するベクター、またはカラの pCXN2.1 ベクターを 1 µg ずつ各 well にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後、細胞を回収して溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 0.5% Triton X, and 1X Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri))中でホモジェナイズした。その後、サンプルを 4°C, 15,000 g で 15 分間遠心分離し、上清を細胞溶解液として回収した。細胞溶解液を 4X LDS sample buffer と 10Xreducing agent (Life Technologies)

に混ぜ、75°Cで10分間加熱処理し、4-12%NuPAGE ゲル (Life Technologies)で泳動した。ウェスタンブロット (western blot: WB)は過去の論文に記載されている手法で行った<sup>25</sup>。使用した一次抗体は、マウスモノクローナル抗 DDDDK (Flag) 抗体 (diluted 1:5,000; MBL International, Woburn, MA)とウサギポリクローナル抗 beta-actin 抗体 (diluted 1:3,000; Sigma-Aldrich)である。

### 3) NF- $\kappa$ B レポーターアッセイ

トランスフェクションの前日に HEK293T 細胞を 12 well plate に撒いた。Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いて、25-75 ng の full-length の野生型 EDAR ベクター, full-length の変異型 EDAR ベクター、EDARADD ベクター、またはカラの pCXN2.1 ベクターと共に、25 ng の pNF- $\kappa$ BLuc ベクター (Clontech, Palo Alto, CA)を各 well にトランスフェクションした。さらに、トランスフェクションの効率を補正するために、25ng の  $\beta$ -galactosidase レポーターベクター (Promega, Madison, WI)も共にトランスフェクションした。細胞はトランスフェクションの24時間後に溶解し、過去の論文で行われた手法に従って luciferase および  $\beta$ -galactosidase の活性を測定した<sup>26</sup>。各条件を triplicate で実施し、さらに3回の実験で同様の傾向を示すことを確認し、その中から1回の実験データを提示した。統計学的解析は Student's t-test で行い、*p* 値を Bonferroni 法で補正した。*p*<0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

### 4) 共免疫沈降法

HEK293T 細胞をトランスフェクションの前日に 6 well plate に撒いた。EDAR と EDARADD の発現ベクター(各 1.0 または 2.0  $\mu$ g)を Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いてトランスフェクションした。それぞれの総ベクター量はカラの pCXN2.1 ベクターを加えて統一した。トランスフェクションの24時間後、細胞溶解物を2)に記載した手法で細胞から抽出した。各サンプルを、マウスモノクローナル抗 Flag M2 agarose gel またはマウスのモノクローナル抗 HA agarose gel (Sigma-Aldrich)で4°Cで2時間インキュベートさせて免疫沈降を行った。Agarose beads は溶解バッファーで計5回洗浄し、沈降した蛋白を 4X LDS sample buffer と 10X reducing agent (Life Technologies)で溶出し、75°C10分で加熱処理した。続いて4-12% NuPAGE ゲル (Life Technologies)での電気泳動と WB を2)と同様に行った。使用した一次抗体は、ウサギポリクローナル抗 myc 抗体 (diluted 1:1000; MBL International)、ウサギポリクローナル抗 DDDDK (Flag)抗体 (diluted 1:1000; MBL International)、ウサギ抗 HA ポリクローナル抗体 (diluted 1:3,000; Abcam, Cambridge, MA)である。それぞれの実験は3回行った。共沈した蛋白量は

Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いて定量し、結果を Student's t-test で解析後、 $p$  値を Bonferroni 法で補正した。 $p < 0.05$  を統計学的に有意と考えた。

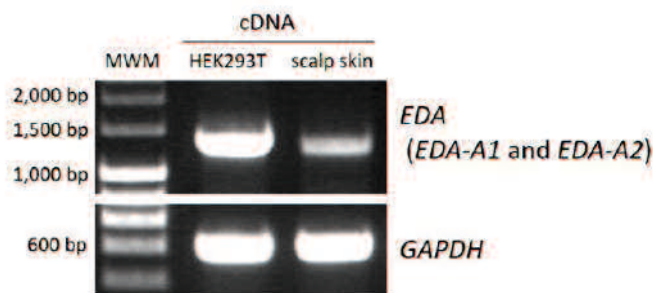
## 4 結果

### 1) HEK293T 細胞には内在性に EDA-A1 が発現している

本研究では、EDAR を過剰発現させた際に下流の NF- $\kappa$ B が効率よく活性化される細胞株を使用することが望ましい。すなわち、EDAR のリガンドである EDA-A1 と EDAR のアダプター蛋白である EDARADD が内在性に発現している細胞株がベストと考えた。過去の研究で、HEK293T 細胞には EDARADD が内在性に発現することが報告されていたが<sup>4</sup>、同細胞が EDA-A1 を発現しているかは不明だった。そこで、HEK293T 細胞から抽出した total RNA を用いて RT-PCR 法で *EDA* 遺伝子の cDNA の増幅を試みた。*EDA* に対する特異的なプライマーで増幅された産物をサンガー法で解析した結果、HEK293T 細胞には *EDA-A1* が mRNA レベルで豊富に発現していることが明らかになったため (図 4)、本細胞株を使用することにした。

#### 図 4. *EDA-A1* mRNA は内在的に HEK293T 細胞で発現している (参考文献 23 より引用)

HEK293T 細胞と健常人の頭部皮膚由来の total RNA から作製した first-strand cDNA を用いて、*EDA* 遺伝子の cDNA を PCR 法で増幅した。その後、サンガー法により、*EDA* 遺伝子から転写される主要な isoform である *EDA-A1* と *EDA-A2* が増幅されたことを確認した。なお、*GAPDH*-cDNA をコントロールとして増幅した。MWM, molecular weight markers。



### 2) 変異型 EDAR は NF- $\kappa$ B の下流を活性化できず、また野生型 EDAR による活性化を抑制した

野生型 EDAR は細胞内ドメインに DD を持っているが、p.F398\*変異型 EDAR は DD の途中で翻訳が終了するために C 末端側が欠損している (図 5a)。まず、HEK293T 細胞に N 末端に

Flag-tagを導入した野生型 EDAR と変異型 EDAR を過剰発現させ、抗 Flag 抗体を用いて WB を施行した結果、それぞれ予想される分子量にバンドが検出された (図 5b)。

次に、さまざまな条件で EDAR を HEK293T 細胞に過剰発現させた際に下流の NF- $\kappa$ B がどのように活性化されるかについて NF- $\kappa$ B レポーターアッセイで検討した。その結果、予想通り、野生型 EDAR は著しく NF- $\kappa$ B の活性化を誘導した (図 6a)。一方、変異型 EDAR を過剰発現させた条件では NF- $\kappa$ B の活性化はほとんど誘導されなかった (図 6a)。次に、野生型と変異型を共発現させたところ、両者を同量 (25 ng)トランスフェクションした条件では、野生型 EDAR 単独をトランスフェクションさせた条件と同様に NF- $\kappa$ B が活性化された (図 6a)。しかしながら、トランスフェクションする変異型 EDAR の量を増やした条件では (野生型 25 ng, 変異型 75 ng)、野生型単独の条件に比べて NF- $\kappa$ B が活性化が有意に抑制された (図 6a)。

HEK293T 細胞には内在性に EDARADD が発現しているが、「発現ベクターを用いて EDAR と EDARADD を共に過剰発現させれば EDAR のみを過剰発現させた条件よりも効率よく NF- $\kappa$ B を活性化させることができる」という仮説を立て、EDARADD の発現ベクターを共にトランスフェクションされた系で NF- $\kappa$ B レポーターアッセイを行った。その結果、野生型 EDAR と EDARADD を共に過剰発現させると、野生型 EDAR のみを過剰発現させた条件よりも NF- $\kappa$ B 活性が著明に増加した (図 6b)。一方、変異型 EDAR と EDARADD の共発現系では、EDARADD のみを過剰発現させた時と NF- $\kappa$ B の活性化のレベルは変わらなかった (図 6b)。次に、EDARADD を過剰発現させた条件下で野生型 EDAR と変異型 EDAR を共発現させた結果、変異型 EDAR の用量依存的に野生型 EDAR と EDARADD による NF- $\kappa$ B の活性化が抑制された (図 6b)。

#### 図 5. 野生型と p.F398\*変異型 EDAR 蛋白の模式図と、培養細胞における過剰発現系での western blot (WB)の結果 (参考文献 23 より引用)

##### (a) 野生型と p.F398\*変異型 EDAR タンパクの模式図

Death domain (DD)を黄色で示した。p.F398\*変異型 EDAR は、DD の途中から C 末端側の構造が欠損している。

##### (b) WB の結果

N 末端に Flag-tag を付けた野生型および p.F398\*変異型 EDAR を発現するベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 Flag 抗体を用いた WB で解析した。抗 beta-actin 抗体を用いた WB をコントロールとして行った。その結果、野生型・変異型ともに予想通りの分子量のバンドがほぼ同レベルで検出された。なお、本 WB では signal peptide が外れた mature form は検出不可である。

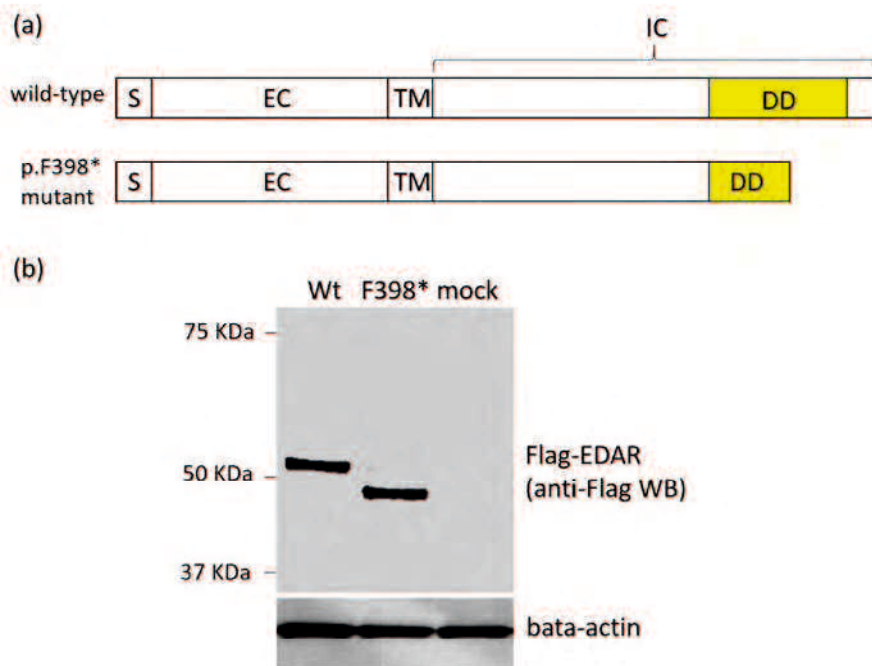
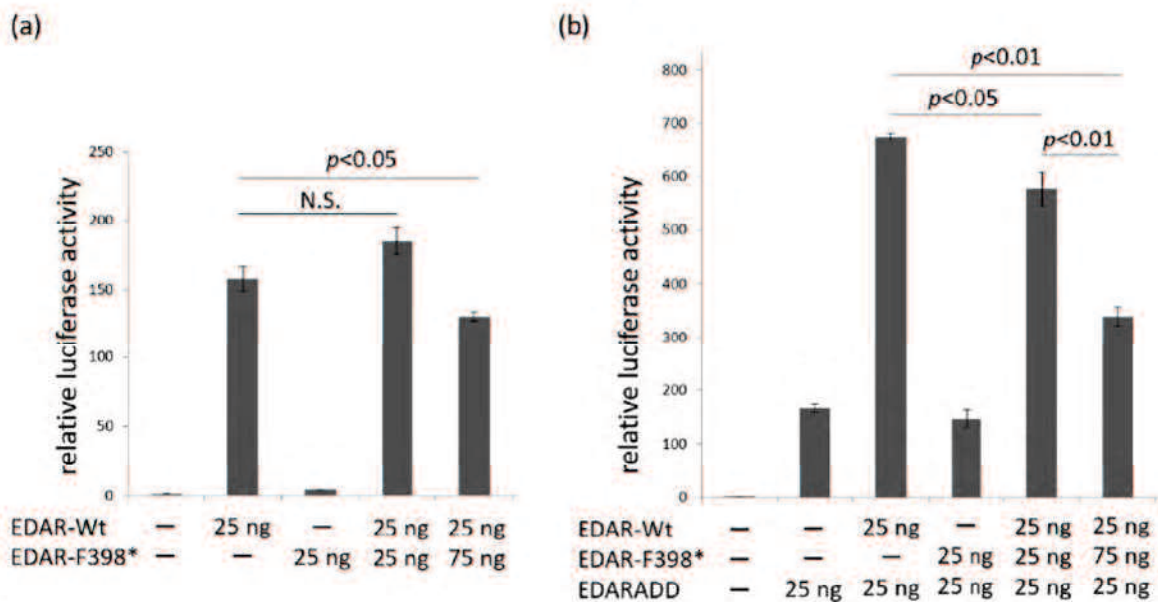


図 6. NF- $\kappa$ B レポーターアッセイの結果 (参考文献 23 より引用)

- (a) 野生型 EDAR は著しくルシフェラーゼを活性化したが、一方で p.F398\*変異型 EDAR は活性化しなかった。更に野生型 と変異型 EDAR の共発現系では、変異型 EDAR の量を増やした場合のみ、野生型 EDAR によって誘導されたルシフェラーゼ活性を有意に低下させた。
- (b) EDARADD が過剰発現している状態では、変異型 EDAR は野生型 EDAR によって誘発されたルシフェラーゼ活性を顕著に抑制した。N.S., 統計学的に有意差なし。





3) 変異型 EDAR は EDARADD との親和性を喪失したが、野生型 EDAR との相互作用は可能だった

変異型 EDAR の物理学的特徴を明らかにするため、最初に EDAR の細胞内ドメインと EDARADD と間で共免疫沈降法を行った。その結果、野生型 EDAR は EDARADD に結合し、その一方で変異型 EDAR は完全にその親和性を失うことが明らかになった (図 7)。次に、変異型 EDAR が野生型 EDAR に結合できるかどうかを検討するために、full-length の EDAR 蛋白間で共免疫沈降法を施行した。その結果、野生型蛋白間と同様に、変異型 EDAR は野生型 EDAR との結合能を維持することが示された (図 8)。

図 7. p.F398\*変異型 EDAR は完全に EDARADD との親和性を失う (参考文献 23 より引用)

N-末端に myc-tag を付けた野生型または変異型 EDAR の細胞内ドメイン(IC)を Flag-tag を付けた EDARADD と共に過剰発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降法 (IP)を行い、続いて抗 myc 抗体、抗 Flag 抗体を用いて WB を行った。野生型 EDAR (myc-EDAR-IC-Wt)は Flag-EDARADD と共免疫沈降された一方で、変異型 EDAR (myc-EDAR-IC-F398\*)は共免疫沈降されなかった。

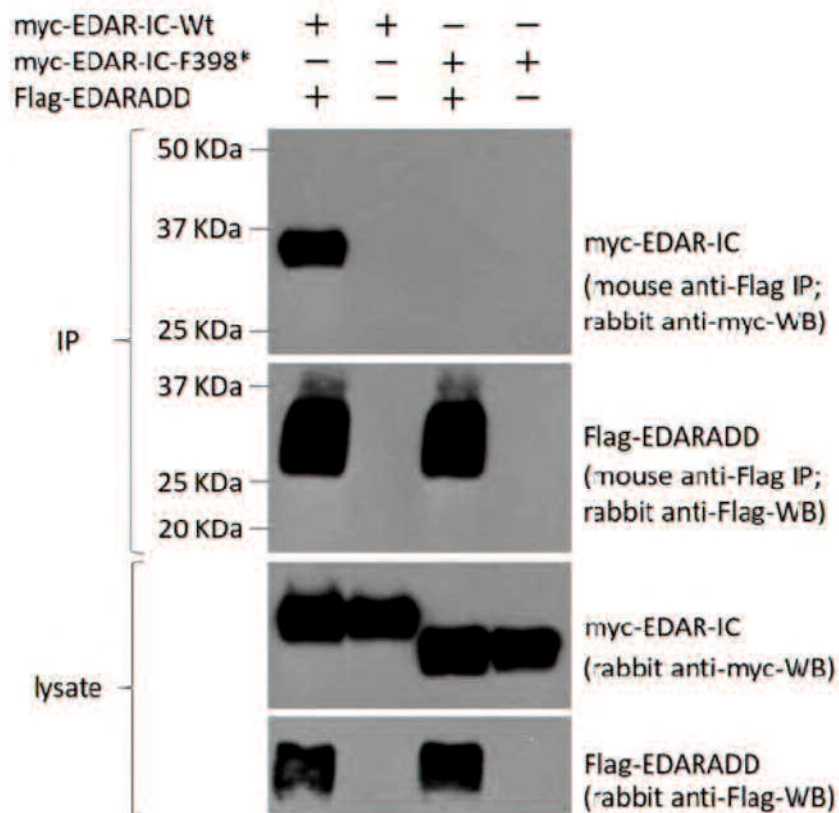
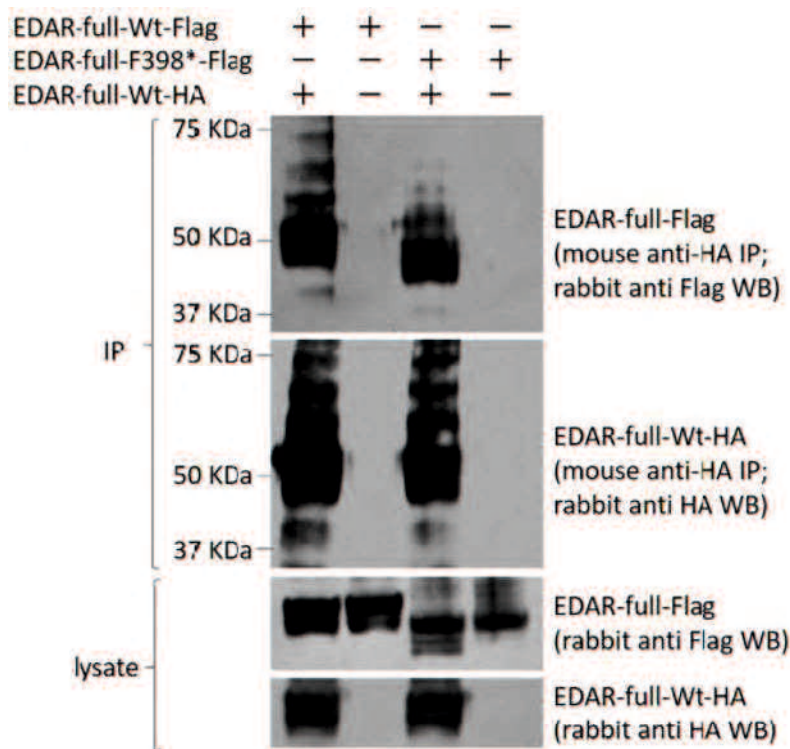




図 8. p.F398\*変異型 EDAR は野生型 EDAR との親和性を維持していた (参考文献 23 より引用)

C 末端に Flag-tag を付けた full-length の野生型 (EDAR-full-Wt-Flag) または p.F398\*変異型 EDAR (EDAR-full-F398\*-Flag) を C 末端に HA タグを付けた full-length の野生型 EDAR (EDAR-full-Wt-HA) と共に過剰発現させ、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降法 (IP) を行った。その後、抗 Flag 抗体、HA 抗体を用いて WB を行った。野生型 EDAR タンパクと同様に、p.F398\*変異型 EDAR は野生型 EDAR タンパクと結合することができた。



#### 4) 変異型 EDAR は野生型 EDAR と EDARADD との相互作用を妨げる

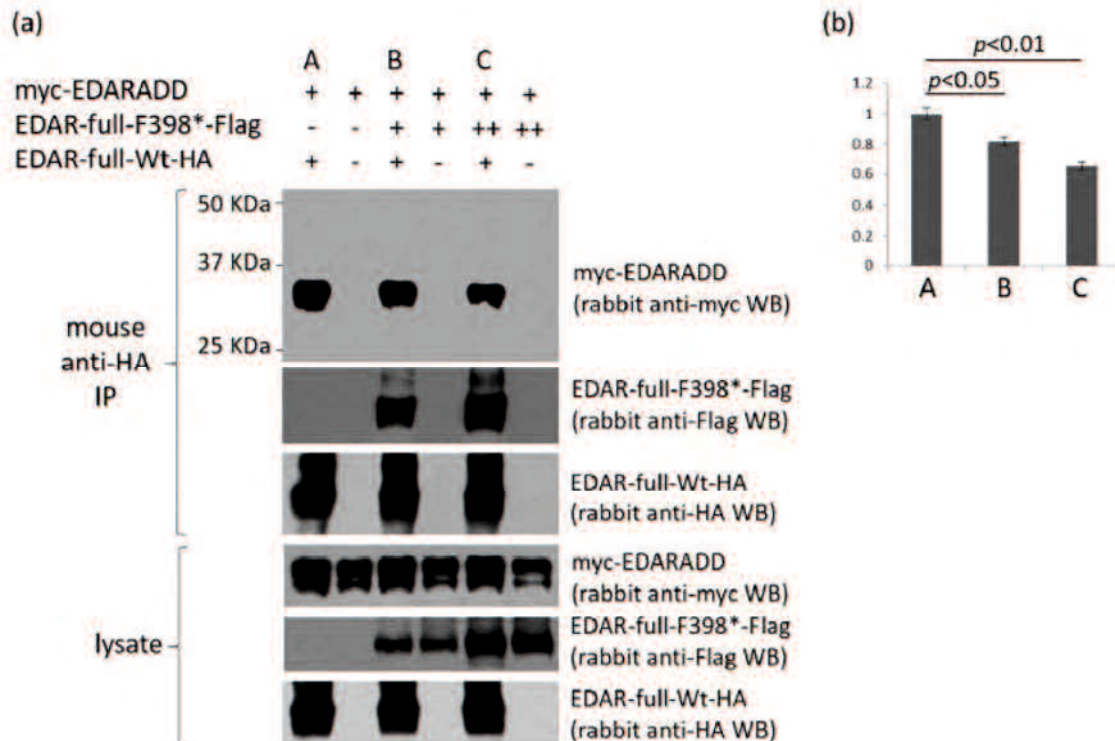
最後に、変異型 EDAR が野生型 EDAR と EDARADD 間の相互作用に影響を与えるかを調べるために共免疫沈降法を行った。本実験では、C 末端に HA-tag を付けた野生型 EDAR (EDAR-full-Wt-HA) を抗 HA アガロースゲルを用いて免疫沈降した。そして、N 末端に myc-tag を付けた EDARADD (myc-EDARADD) と C 末端に Flag-tag を付けた変異型 EDAR (EDAR-full-F398\*-Flag) の共免疫沈降を検討するために、それぞれ抗 myc 抗体と抗 Flag 抗体を用いて WB を行った。その結果、変異型 EDAR を共発現させた際に、共免疫沈降された EDARADD の量が変異型 EDAR の用量依存的に減少した (図 9a, b)。したがって、変異型 EDAR が野生型 EDAR と EDARADD との結合を妨げることが *in vitro* レベルで証明された。

図 9. p.F398\*変異型 EDAR は野生型 EDAR と EDARADD 間の相互作用を妨げた

(参考文献 23 より引用)

(a) HEK293T 細胞において、N 末端に myc-tag を付けた EDARADD (myc-EDARADD)、C 末端に HA-tag を付けた full-length 野生型 EDAR (EDAR-full-Wt-HA)、C 末端に Flag-tag を付けた full-length p.F398\*変異型 EDAR (EDAR-full-F398\*-Flag)を過剰発現させ、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降法を行い、続いて抗 myc 抗体、抗 Flag 抗体、抗 HA 抗体を用いて WB を行った。p.F398\*変異型 EDAR は野生型 EDAR と EDARADD 間の相互作用を変異型 EDAR タンパクの用量依存的に妨げた。

(b) 共免疫沈降された EDARADD の量を Image J で測定し、Student-t-test で統計的に分析した。 $p$  値はボンフェローニ補正で調整した。 $p < 0.05$  は統計的に有意であると考えた。A-C のレーンは、図 9a の A-C に対応している。



## 5 考察

本研究では、過去に常染色体優性遺伝の HED を引き起こすと報告されていた *EDAR* 遺伝子変異 c.1193\_1194delTT (p.F398\*)<sup>22</sup> の詳細な機能解析を *in vitro* で行った。同変異は *EDAR* 遺伝子の最終エクソンに位置しているため、その転写産物は nonsense-mediated mRNA decay によって mRNA レベルで崩壊することはなく、蛋白レベルで安定して発現すると予想した。常染色体劣性遺伝 HED の家系で同定された上流のエクソン内のナンセンス変異など、*EDAR* 遺伝子の発現が mRNA レベルでほぼ完全に喪失するタイプの変異をヘテロ接合型で有する保因者が HED の表現型を示さないという事実も本仮説を支持していると考えられた<sup>14-18</sup>。培養細胞にお

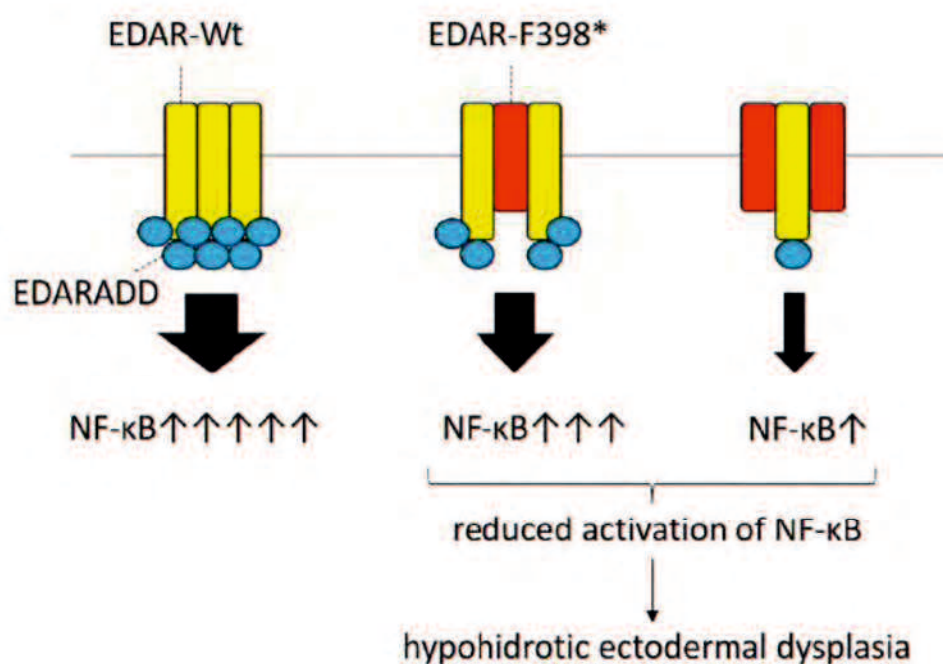
ける過剰発現系で p.F398\*変異型 EDAR の発現レベルが野生型 EDAR と同程度だったことから (図 5b)、生体内 (*in vivo*)でも同変異型 EDAR が安定に発現すると推測される。

本研究を通じ、p.F398\*変異型 EDAR の特徴を複数明らかにすることが出来た。予想通り、部分的に DD を欠いた変異型 EDAR タンパク (図 5a)は完全に EDARADD との親和性を失い (図 7)、下流の NF- $\kappa$ B を活性化することができなかった (図 6a)。さらに、特に EDARADD との共発現系において、野生型 EDAR の誘発する NF- $\kappa$ B の活性化を変異型 EDAR が顕著に抑制した (図 6b)。この結果から、変異型 EDAR が野生型 EDAR に対してドミナント・ネガティブ効果を発揮することが強く示唆された。

p.F398\*変異型 EDAR の動態を更に調べるために、full-length の野生型と変異型 EDAR 蛋白との間で共免疫沈降法を行った結果、変異型 EDAR が野生型 EDAR と結合可能であることが示された (図 8)。この結果により、p.F398\*変異をヘテロ接合型で持つ患者において、野生型と変異型 EDAR がヘテロ三量体を形成しうることが示唆された。すなわち、2 つの野生型 EDAR と 1 つの変異型 EDAR、または一つの野生型 EDAR と 2 つの変異型 EDAR でヘテロ三量体を構成する可能性がある (図 10)。そのような EDAR の異常な三量体が EDARADD との相互作用を減少させるという仮説を立てた。実際、共免疫沈降法において、野生型 EDAR と EDARADD との相互作用が変異型 EDAR によって妨害されることが示された (図 9)。これらの結果より、p.F398\*変異型 EDAR が野生型 EDAR とヘテロ三量体を形成し、結果として EDARADD との親和性を著しく減少させることが、同 EDAR 遺伝子変異による HED の主な発症機序であると結論付けた (図 10)。

本研究では、EDAR 遺伝子の 1 種類の優性変異が呈する異常を *in vitro* レベルで明らかにすることができたが、*in vivo* レベルでは未解明である。また、他の EDAR 遺伝子の優性変異も p.F398\*と同様の動態を示すかどうかについて解析する必要がある。さらに、DD 内に同定された劣性遺伝形式の EDAR 遺伝子のミスセンス変異についても本研究で実施した実験系で検討することが重要と考える。このように、今後に向けて多くの課題は残されているが、本研究は HED の発症機序の解明への一助になると考える。

図 10. p.F398\*変異型 EDAR によって生じる HED の予想される発症機序（参考文献 23 より引用）  
 野生型 EDAR の三量体は多く EDARADD と結合し、著しく NF- $\kappa$ B を活性化する(左)。対称的に、野生型と p.F398\*変異型 EDAR のヘテロ三量体は EDARADD との親和性が減少すると予想され、その結果 NF- $\kappa$ B の活性化を減少させ HED を生じる（中央と右）。



## 6 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導・ご鞭撻を頂きました山口大学大学院医学系研究科皮膚科学講座の下村 裕教授に御礼申し上げます。また実験方法に関してご指導・ご支援頂いた同講座の田中朱美技術補佐員に感謝致します。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究 (C) 18K08269；研究代表者：下村 裕)を使用して実施された。利益相反の申告はない。

## 7 参考文献

1. Okita T, Yamaguchi M, Asano N, Yasuno S, Kashiwagi K, Shimomura Y. Two Japanese families with hypohidrotic ectodermal dysplasia: Phenotypic differences between affected individuals. *J Dermatol* 2019; 46: e99-e101.
2. Kere J, Srivastava AK, Montonen O et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet* 1996; 13: 409-416.
3. Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 1999; 22: 366-369.
4. Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM et al. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 2001; 414: 913-916.
5. Bal E, Baala L, Cluzeau C et al. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the edaradd locus. *Hum Mutat* 2007; 28: 703-709.
6. Bayes M, Hartung AJ, Ezer S et al. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (eda) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-a with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1661-1669.
7. Ferguson BM, Brockdorff N, Formstone E, Ngyuen T, Kronmiller JE, Zonana J. Cloning of tabby, the murine homolog of the human eda gene: Evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1589-1594.
8. Srivastava AK, Pispá J, Hartung AJ et al. The tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the eda gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-a) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13069-13074.
9. Elomaa O, Pulkkinen K, Hannelius U, Mikkola M, Saarialho-Kere U, Kere J. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 953-962.
10. Headon DJ, Overbeek PA. Involvement of a novel tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet* 1999; 22: 370-374.

11. Yan M, Wang LC, Hymowitz SG et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 2000; 290: 523-527.
12. Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet* 2014; 30: 24-31.
13. Mikkola ML. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 2031-2036.
14. Al Balwi M, Ibrahim AA, Abdulrahman AS. Novel human pathological mutations. Gene symbol: EDAR. Disease: Ectodermal dysplasia, hypohidrotic. *Hum Genet* 2010; 127: 123.
15. Bibi N, Ahmad S, Ahmad W, Naeem M. Molecular genetic analysis of consanguineous Pakistani families with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Australas J Dermatol* 2011; 52: 37-42.
16. Chassaing N, Bourthoumieu S, Cossee M, Calvas P, Vincent MC. Mutations in EDAR account for one-quarter of non-ED1-related hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Hum Mutat* 2006; 27: 255-259.
17. Shimomura Y, Sato N, Miyashita A, Hashimoto T, Ito M, Kuwano R. A rare case of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by compound heterozygous mutations in the EDAR gene. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 649-655.
18. Masui Y, Farooq M, Sato N et al. A missense mutation in the death domain of EDAR abolishes the interaction with EDARADD and underlies hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Dermatology* 2011; 223: 74-79.
19. Valcuende-Cavero F, Martinez F, Pérez-Pastor G et al. Autosomal-dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by a novel mutation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 1508-1510.
20. Chaudhary AK, Mohapatra R, Nagarajaram HA et al. The novel EDAR p.L397H missense mutation causes autosomal dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31: e17-e20.
21. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat* 2011; 32: 70-72.

22. Callea M, Willoughby CE, Nieminen P et al. Identification of a novel frameshift mutation in the EDAR gene causing autosomal dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 1032-1034.
23. Okita T, Asano N, Yasuno S, Shimomura Y. Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Dermatol* 2019; 46: 710-715.
24. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; 108: 193-199.
25. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A et al. *Apcdd1* is a novel wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* 2010; 464: 1043-1047.
26. Shimomura Y, Wajid M, Shapiro L, Christiano AM. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* 2008; 135: 743-753.