

学位論文（博士）

Characterization of *EDARADD* gene mutations
responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia
(*EDARADD* 遺伝子変異による
低汗性外胚葉形成不全症の発症機序の解明)

氏名 浅野 伸幸

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 皮膚科学講座

令和 3 年 12 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) 細胞培養と NF- κ B レポーターアッセイ	7
3) 共免疫沈降法と western blot(WB)	8
4 結果	8
1) 変異型 EDARADD 蛋白はその下流の NF- κ B の活性を低下させた。	8
2) 優性遺伝性変異型 EDARADD は、EDAR が過剰発現した 条件下では野生型 EDARADD の活性を有意に低下させた。	9
3) 変異型 EDARADD は EDAR と野生型 EDARADD の 親和性を維持した。	11
4) 優性遺伝性変異型 EDARADD は EDAR と野生型 EDARADD との 相互作用を有意に妨げた。	13
5) 優性遺伝性変異型 EDARADD は TRAF6 に対する結合能を 喪失した。	14
5 考察	16
6 謝辞	18
7 参考文献	19

1 要旨

低汗性外胚葉形成不全症 (hypohidrotic ectodermal dysplasia: HED)は、低汗症、乏歯症、乏毛症を特徴とする遺伝性疾患である。本疾患の家系のほとんどが X 連鎖劣性 (X-linked recessive: XR)の遺伝形式を示すが、稀に常染色体優性 (autosomal dominant: AD)または常染色体劣性 (autosomal recessive: AR)の遺伝形式を示す家系も存在する。XR の HED は *EDA* 遺伝子の変異で発症し、AD/AR の HED は *EDAR* または *EDARADD* 遺伝子のいずれかの変異で発症する。現在までに、*EDA* および *EDAR* の変異に関しては HED の発症機序が明らかにされてきたが、*EDARADD* の変異がどのように HED を引き起こすかについての情報は乏しかった。

本研究では、過去に HED の家系に同定された *EDARADD* 遺伝子変異のうち、AD の遺伝形式を示す p.D120Y、p.L122R、p.D123N と、AR の遺伝形式を示す p.E152K に着目し、培養細胞レベルでさまざまな解析を行った。*EDARADD* は、シグナル伝達の主要分子である TRAF6 と結合し、最終的に下流の NF- κ B を活性化させるが、AD の変異型 *EDARADD* は NF- κ B の活性化能を著しく喪失していた。一方で、AR の変異型 *EDARADD* の同活性化能の低下は軽度だった。また、解析した全ての変異型 *EDARADD* は、*EDAR* および野生型 *EDARADD* との親和性を維持していたが、AD の変異型 *EDARADD* は、*EDAR* と野生型 *EDARADD* との相互作用を dominant negative 効果によって阻害することを明らかにした。さらに、AD の変異型 *EDARADD* は TRAF6 との結合能を完全に失い、AR の変異 *EDARADD* も野生型に比べて TRAF6 との結合能が低下することを示した。

HED における臨床型と遺伝子型の相関関係は未だ明らかではないが、本研究で得られた知見は、*EDARADD* 遺伝子変異と HED の発症メカニズムの関連性の一端を解明したといえる。

2 背景と目的

HED は、毛包、歯牙、エクリン汗腺の形成異常を 3 徴候とする先天性疾患である。臨床的な特徴としては、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(図 1)、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^{1, 2}。大部分の HED は X 連鎖劣性遺伝 (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] 305100)だが、常染色体優性 (OMIM 129490)あるいは劣性遺伝 (OMIM 224900)の家系も存在する。X 連鎖劣性遺伝の HED は X 染色体に局在する ectodysplasin A (*EDA*)遺伝子の変異により生じる³。本邦においても HED のほとんどが X 連鎖劣性遺伝形式を示すために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¹。一方、常染色体遺伝性の HED は、ectodysplasin A receptor (*EDAR*)⁴ または EDAR-associated death domain (*EDARADD*) 遺伝子^{5,6} 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 isoform をコードするが、これらの中で EDA-A1 が最も多くのアミノ酸残基から構成される⁷。EDA-A1 は、tumor necrosis factor (TNF) リガンドスーパーファミリーに属する蛋白であり⁷⁻⁹、N 末端側の膜貫通ドメインを介して細胞膜に局在しているが、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(図 2)¹⁰。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、細胞外にはシステインが豊富なドメインを持つ¹¹。また、EDARADD は C 末端に DD を有する⁵。重要なことに、EDAR は EDA-A1 の特異的な受容体であり¹²、EDARADD は EDAR のアダプター蛋白であることが明らかになっている⁵。EDA-A1 は EDAR の細胞外ドメインと結合し、EDAR と EDARADD は DD を介して細胞質内で相互に作用する¹³。さらに EDARADD は TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) などのシグナル伝達の主要蛋白に結合し、最終的に下流の nuclear factor (NF)- κ B が活性化され¹⁴、外胚葉形成にかかわる多数の遺伝子の発現を誘導する(図 2)^{2,15}。このように、EDAR シグナル伝達系において、EDA-A1、EDAR および EDARADD は機能的に密に関連する”key players”であるため、いずれに異常が生じても HED を発症するのである。

過去の研究で、*EDA* 遺伝子と *EDAR* 遺伝子の変異による HED の発症メカニズムはかなり明らかになったが¹⁶⁻²¹、*EDARADD* 遺伝子変異による発症メカニズムについてはほとんど未解明だった。また、これまでに同定された *EDARADD* 遺伝子変異の数は限られており、多くがミスセンス変異だった^{5,6,22,23}。これらのミスセンス変異の中で、p.D120Y, p.L122R, p.D123N は常染色体優性遺伝形式を示し^{6,22,23}、p.E152K は常染色体劣性遺伝形式を示していた⁵。重要なことに、これらの変異はすべて EDARADD の DD 内か DD の近傍に局在していた(図 3)²⁴。

本研究では、上記 *EDARADD* 遺伝子変異による HED の発症機構を明らかにするため、培養細胞を用いて一連の生化学的解析を行った。

図 1. 低汗性外胚葉形成不全症の臨床像

EDA 遺伝子に病的変異が同定された成人男性。乏毛症に加え、前額部の突出、鞍鼻、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。



図 2. EDAR シグナル伝達系の模式図

EDA-A1/EDAR/EDARADD の下流では TRAF6 などの様々な分子が作用し、最終的に転写因子 NF- κ 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。

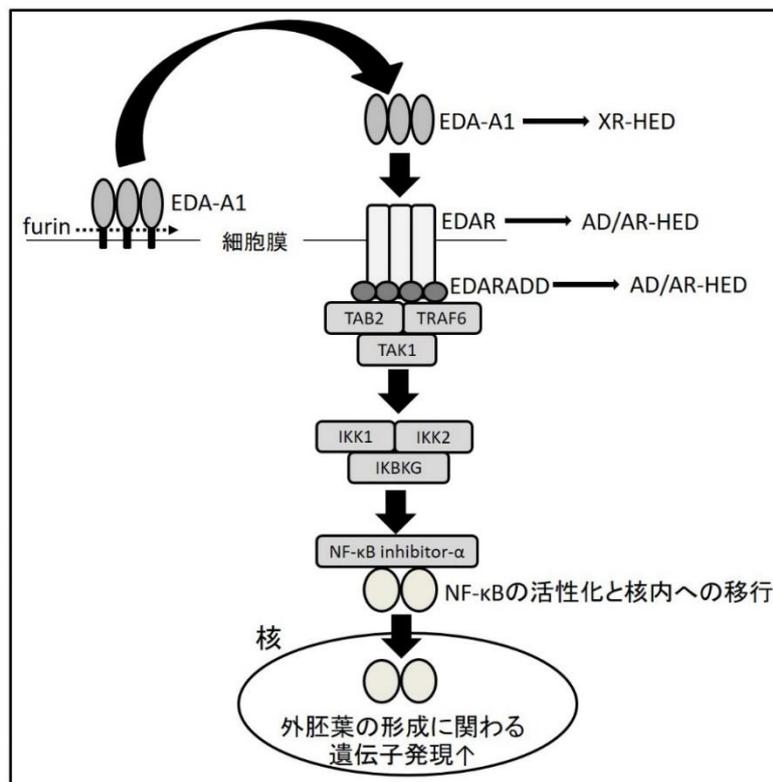
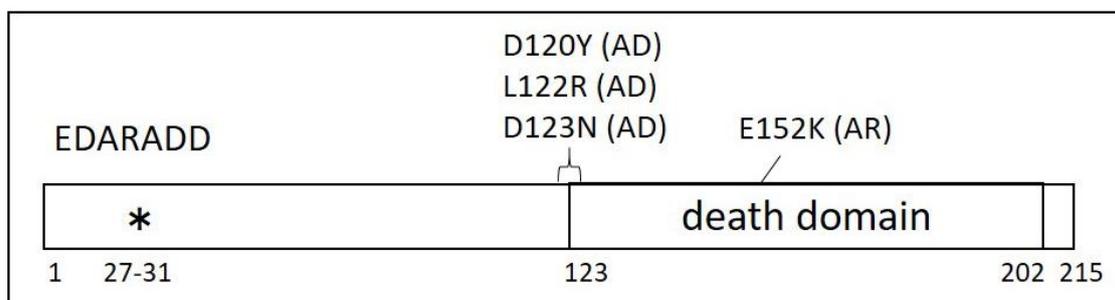


図 3. EDARADD の模式図と本研究で解析した変異の位置。(参考文献 24 より引用)

全ての変異が EDARADD の death domain (DD)内または DD の近傍に局在している。

*は TRAF6 が結合すると考えられるドメイン(27-31 番目のアミノ酸残基; Pro-Val-Glu-Asp-Thr)を示す。AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance。



3 方法

1) 発現ベクターの作製

N 末端に Flag-tag を付けた全長の野生型 EDAR を発現するベクター (pCXN2.1-Flag-EDAR-Wt)、N 末端に myc-tag を付けた野生型 EDAR の細胞内領域 (intracellular domain: IC)を発現するベクター (pCXN2.1-myc-EDAR-IC-Wt)、N 末端に Flag-tag または myc-tag を付けた野生型 EDARADD を発現するベクター (pCXN2.1-Flag-EDARADD-Wt, pCXN2.1-myc-EDARADD-Wt)、N 末端に hemagglutinin (HA)-tag を付けた野生型 TRAF6 を発現するベクター (pCXN2.1-HA-TRAF6-Wt)は、我々の研究グループによる過去の研究で既に作製されていた^{21, 25}。pCXN2.1-Flag-EDARADD-Wt ベクターを鋳型として使用し、EDARADD 遺伝子の塩基配列を polymerase chain reaction (PCR)によって増幅した。この際、HA-tag の塩基配列を導入した forward primer (5'-AAAGCGGCCGCCATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCATGGGC CTCAGGACGACTA-3')と reverse primer (5'-AAAGGTACCTAGAAGTGCCTGGAGG GGTC-3')を用いた。PCR 産物は pCXN2.1 ベクター²⁶の *NotI* と *KpnI* サイトに組み込み、pCXN2.1-HA-EDARADD-Wt ベクターと命名した。次に、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies)を用いて、pCXN2.1-Flag-EDARADD-Wt ベクターにミスセンス変異 c.358G>T (p.D120Y)、c.365T>G (p.L122R)、c.367G>A (p.D123N)および c.454G>A (p.E152K)をそれぞれ導入した。変異導入のために使用したプライマーを表 1 に示す。26-35 番目のアミノ酸残基が欠損した変異型 EDARADD を発現するベクターを作製するために、N 末端に Flag-tag をつけた EDARADD の 1-25 番目のアミノ酸残基をコードする塩基配列および 36-215 番目のアミノ酸残基をコードする塩基配列をそれぞれ pCXN2.1-Flag-EDARADD-Wt

ベクターから PCR で増幅させた。前者では forward primer (5'-AAAGCGGCCGCCACCATGGATT ACA-3')と reverse primer (5'-CTCAAGCTTTACCATATGATCCTCTTGG-3')を用い、後者では forward primer (5'-CTCAAGCTTTCCTTTAATATGTCAGACAAATATCC-3') と reverse primer (5'-AAAGGTACCTAGAAGTGCCTGGAGGGGTC-3')を用いた。2 つの PCR 産物を *Hind*III サイトで連結後、pCXN2.1 ベクターの *Not*I と *Kpn*I サイトに組み込んだ。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、実験に用いた。

表 1. PCR で使用したプライマー(参考文献 24 より引用)

Mutation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
c.358G>T (p.D120Y)	TTGCTCAATGATCAGTACTTACTAGACGTGA	TCACGTCTAGTAAGTACTGATCATTGAGCAA
c.365T>G (p.L122R)	ATGATCAGGACTTACGAGACGTGATCAGGAT	ATCCTGATCACGTCTCGTAAGTCTGATCAT
c.367G>A (p.D123N)	GATCAGGACTTACTAAACGTGATCAGGATAA	TTATCCTGATCACGTTTAGTAAGTCTGATC
c.454G>A (p.E152K)	GGGATGTCCTATGACAAATTGTGCTTCTGG	CCAGGAAGCACAAATTTGCATAGGACATCCC

2) 細胞培養と NF- κ B レポーターアッセイ

10%ウシ胎児血清 (Life Technologies)と 100IU/ml ペニシリン、100 μ g/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。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、野生型と変異型の pCXN2.1-Flag-EDARADD ベクター、pCXN2.1-Flag-EDAR-Wt ベクター、空の pCXN2.1 ベクター(それぞれ 10-30 ng)とともに、50 ng の pNF- κ BLuc ベクター (Clontech)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標準化するために、50 ng の β -galactosidase のレポーターベクター (Promega)も共にトランスフェクションした²⁷。トランスフェクションの 30 時間後に細胞溶解液を回収してアッセイに用いた。ルシフェラーゼ活性は、Luciferase Assay System (Promega)と Luminescencer-Octa (ATTO Corporation)を使用して測定した。 β -galactosidase 活性は、 β -galactosidase Enzyme Assay System (Promega) と、Model 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories)を用いて、415nm の吸光度で測定した。各条件を triplicate で実施し、さらに 3 回の同様の実験の代表データを提示した。各データについては、標準誤差で表し、一元配置分散分析を行い、Turkey's HSD test で事後解析を行った。 $p<0.05$ を統計学的に有意差あ

りと判定した。

3) 共免疫沈降法と western blot (WB)

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。myc-EDAR-IC、Flag-EDARADD、myc-EDARADD、HA-EDARADD、HA-TRAF6 の発現ベクター (各 1.0 μ 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空の 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、培養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, 1 \times Protease Inhibitor Cocktail (Takara Bio))でホモジェナイズした。その後、サンプルを 4 $^{\circ}$ 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。各溶解液はマウスモノクローナル抗 DDDDK (Flag)抗体アガロースゲル (MBL International)、またはマウスモノクローナル抗 HA 抗体アガロースゲル (Sigma-Aldrich)とともに、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートさせて免疫沈降を行った。アガロースゲルは溶解バッファーで 4 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 $^{\circ}$ C, 10 分で熱変性させた。続いて 4-12% NuPAGE ゲル (Life Technologies)での電気泳動と WB を過去の研究の方法に従って行った²⁸。使用した一次抗体は、ウサギポリクローナル抗 myc 抗体 (diluted 1:1,000; MBL International)、ウサギポリクローナル抗 DDDDK (Flag)抗体 (diluted 1:1,000; MBL International)、ウサギ抗 HA ポリクローナル抗体 (diluted 1:3,000; Abcam)である。それぞれの実験は計3回行った。共沈した myc-EDAR-IC の蛋白量は Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いて定量し、結果を Dunnett's t-test で解析した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

4 結果

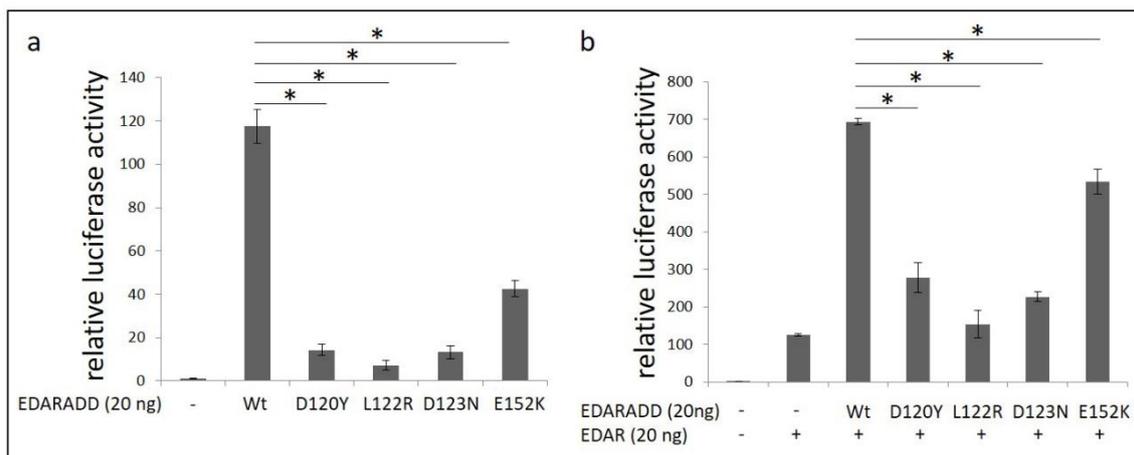
1) 変異型 EDARADD 蛋白はその下流の NF- κ B の活性を低下させた。

まず、野生型または変異型の EDARADD を HEK293T 細胞内でそれぞれ過剰発現させ、NF- κ B レポーターアッセイを行った。野生型 EDARADD と比較し、4 つの変異型 EDARADD ではルシフェラーゼ活性が有意に低く、特に優性遺伝性変異型である p.D120Y、p.L122R、p.D123N ではその傾向が強いことがわかった(図 4a)。次に EDAR を共発現させた系で NF- κ B レポーターアッセイを行った。EDAR を野生型 EDARADD と共発現させるとルシフェラーゼ活性は顕著に上昇したが、優性遺伝性変異型 EDARADD と共発現させた場合はわずかしこ上昇しな

かった(図 4b)。劣性遺伝性変異型の p.E152K の場合には、ルシフェラーゼ活性は比較的高かったが、野生型と比べると有意に低下していた(図 4b)。

図 4. NF- κ B レポーターアッセイの結果(参考文献 24 より引用)

変異型 EDARADD では統計学的に有意に NF- κ B の活性が低下した。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。



2) 優性遺伝性変異型 EDARADD は、EDAR が過剰発現した条件下では野生型 EDARADD の活性を低下させた。

変異型の EDARADD が野生型の EDARADD の機能に影響を与えるかどうかを調べるために追加の NF- κ B レポーターアッセイを行った。まず、EDARADD の野生型といずれかの変異型の組み合わせで過剰発現させた場合、4 つの変異型 EDARADD はすべて野生型 EDARADD によるルシフェラーゼ活性を低下させなかった(図 5a)。次に、EDAR を共発現させた条件で同アッセイを行った。この条件において、野生型 EDARADD を優性遺伝性変異型 EDARADD (p.D120Y, p.L122R, p.D123N) と共発現させた場合、野生型 EDARADD のみを発現させた場合と比較してルシフェラーゼ活性が軽度だが統計学的に有意に低下した(図 5b)。これに対し、劣性遺伝型の EDARADD (p.E152K) では、野生型 EDARADD による NF- κ B の活性を低下させなかった(図 5b)。すなわち、優性遺伝性変異型 EDARADD は野生型 EDARADD に対して dominant negative 効果を発揮しうることが示された。しかしながら、この効果は変異型 EDARADD の容量依存性には増強されなかった(図 5c)。

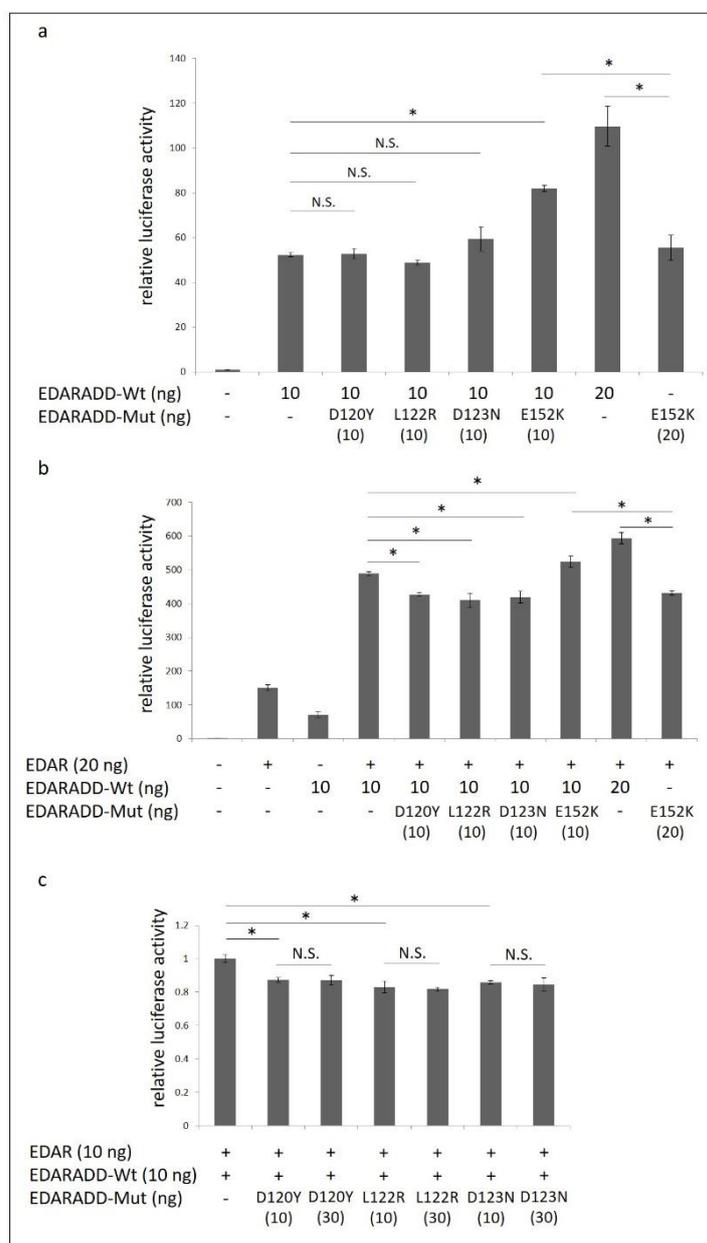
図 5. 優性遺伝性変異型の EDARADD は、EDAR を共発現させた条件下で野生型 EDARADD により誘導された NF- κ B の活性をわずかに低下させた。(参考文献 24 より引用)

(a) EDARADD のみを過剰発現させた場合、変異型 EDARADD は野生型 EDARADD によって誘導されたルシフェラーゼ活性を低下させなかった。

(b) EDAR を共発現させた場合、優性遺伝性変異型 EDARADD は野生型 EDARADD による NF- κ B 活性を軽度低下させたが、劣性遺伝性変異型 EDARADD は同活性を低下させなかった。

(c) 優性遺伝性変異型 EDARADD は野生型 EDARADD によって誘導された NF- κ B の活性を低下させたが、その効果は用量依存性には増強されなかった。

$p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した (N.S.: 統計学的有意差なし)。



3) 変異型 EDARADD は EDAR と野生型 EDARADD との親和性を維持していた。

変異型 EDARADD によって NF- κ B の活性が低下するメカニズムをさらに調べるために、野生型と変異型の Flag-EDARADD と、myc-EDAR-IC の間で共免疫沈降を行った。すると、全ての変異型 EDARADD は EDAR との結合能を維持していた(図 6)。次に、野生型 EDARADD 同士の結合能について検討した結果、野生型 EDARADD は互いに結合して重合する性質を有することが示された(図 7)。そこで、変異型 EDARADD では野生型 EDARADD との結合能が保たれるのかどうかを調べることにした。野生型または変異型の Flag-EDARADD と、野生型の myc-EDARADD の間で共免疫沈降を行ったが、解析した全ての変異型 EDARADD は野生型の EDARADD と結合した(図 8)。

図 6. 変異型 EDARADD は EDAR との親和性を維持していた。(参考文献 24 より引用)

Flag-EDARADD と myc-EDAR-IC の共免疫沈降の結果。免疫沈降は抗 Flag 抗体アガロースゲルを用いて施行した。myc-EDAR-IC は野生型および全 4 種の変異型 Flag-EDARADD と共沈降した。

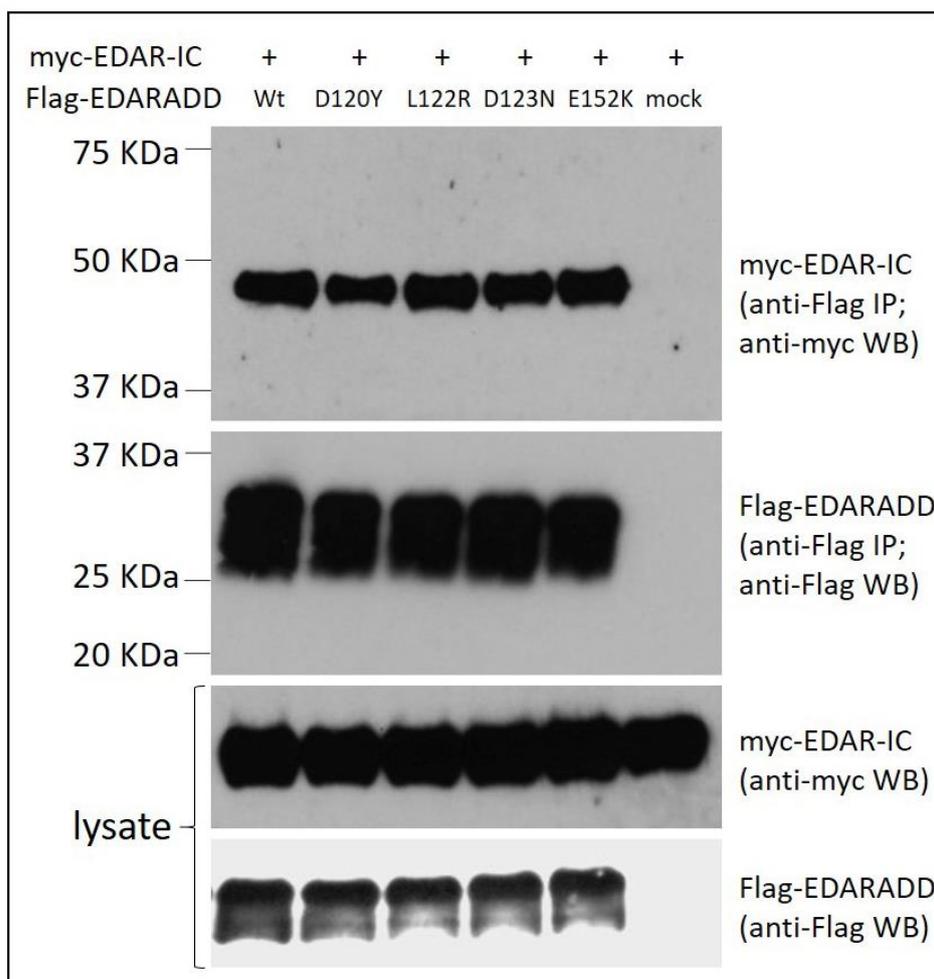


図 7. EDARADD 同士は重合する。(参考文献 24 より引用)

(a) Flag-EDARADD(野生型)を HEK293T 細胞で過剰発現させ、非還元または還元条件下で、細胞溶解液を 4-12% NuPAGE ゲルで電気泳動し分離した。その後、抗 Flag 抗体を用いて western blot(WB)を行った。二量体、三量体、四量体を示すバンドが非還元条件で認められた。WB でのコントロールとして抗 β アクチン抗体を用いた。

(b) Flag-EDARADD (野生型)、myc-EDARADD (野生型)、HA-EDARADD (野生型)を共発現させた系で抗 Flag 抗体アガロースゲルを用いて共免疫沈降を行ったところ、myc-EDARADD、HA-EDARADD は Flag-EDARADD と共沈降した。これは、EDARADD 同士が少なくとも 3 量体を形成することを示している。

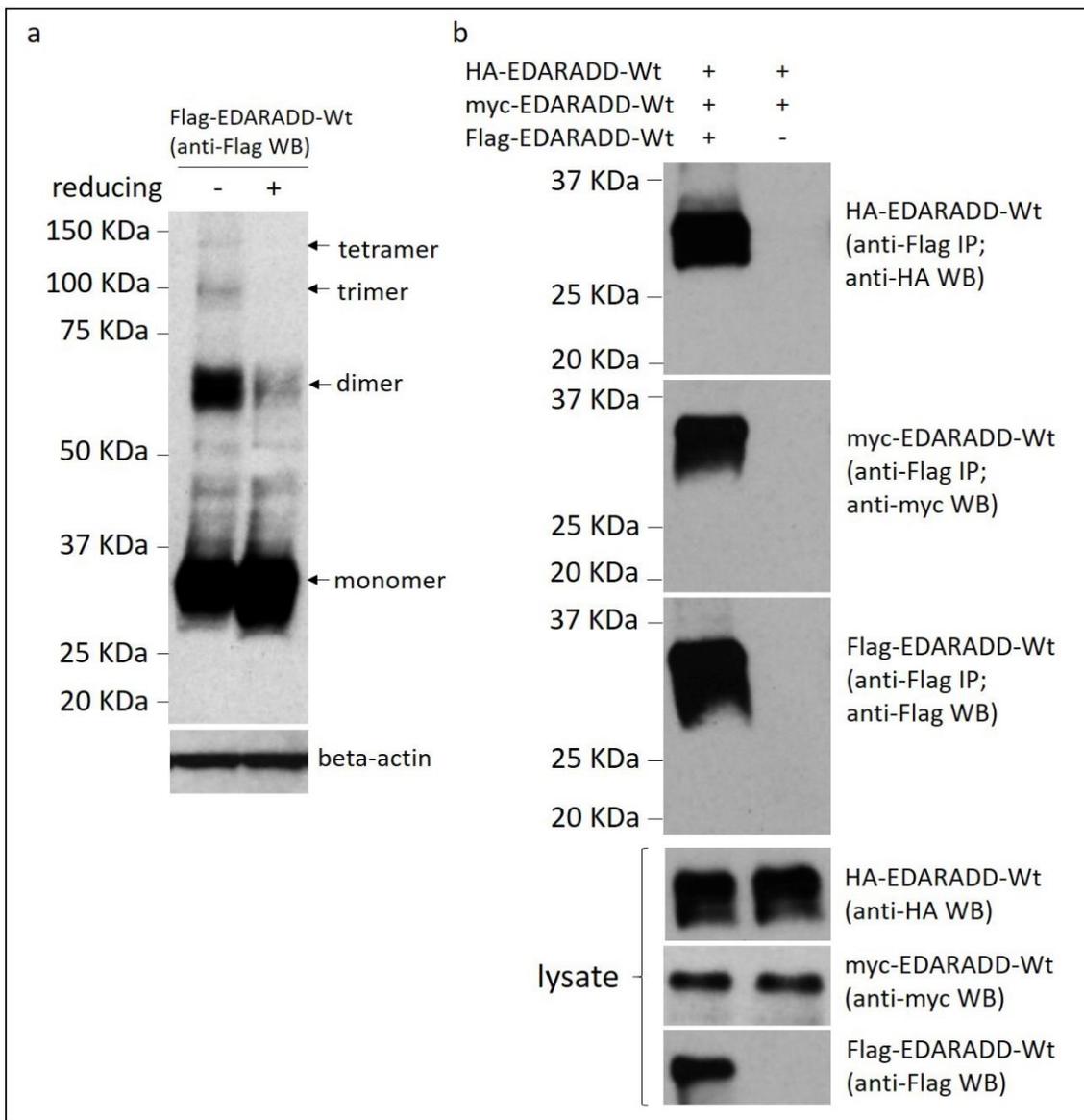
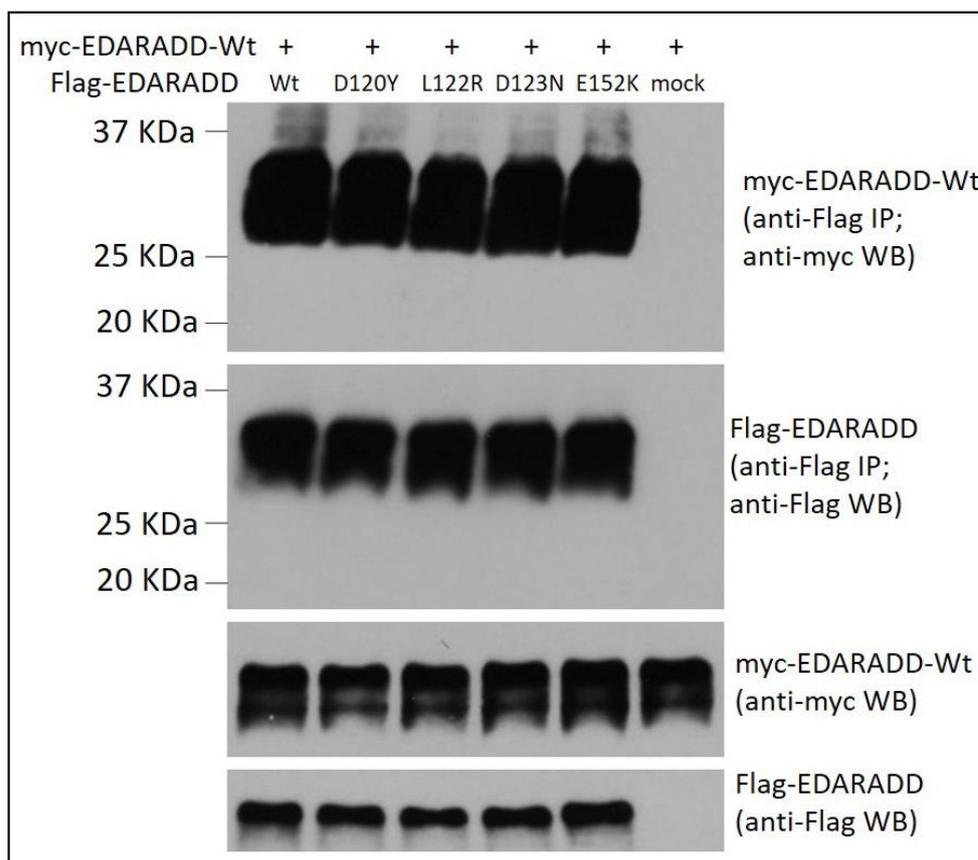


図 8. 変異型 EDARADD は野生型 EDARADD との親和性を維持した。(参考文献 24 より引用)

Flag-EDARADD と myc-EDARADD (野生型) の共免疫沈降の結果。免疫沈降は抗 Flag 抗体アガロースゲルを用いて施行した。myc-EDARADD (野生型) は野生型および全 4 種の変異型 Flag-EDARADD と共沈降した。IP: immunoprecipitation; WB: western blot。



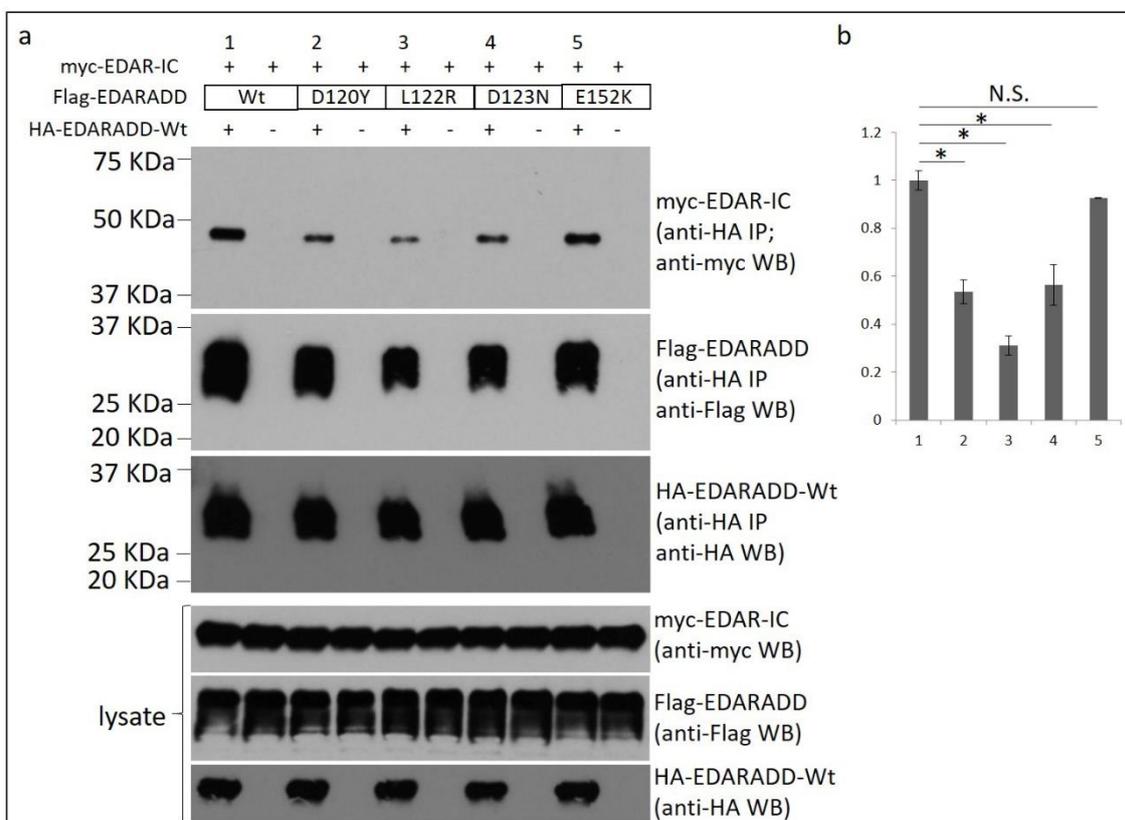
4) 優性遺伝性変異型 EDARADD は EDAR と野生型 EDARADD との相互作用を妨げた。

図 8 の結果をもとに、変異型の EDARADD の中には、野生型 EDARADD と強固に結合することにより、EDAR と野生型 EDARADD との相互作用に影響を及ぼすものがあるのではないかと予想した。この仮説を検証するために、myc-EDAR-IC、野生型または変異型の Flag-EDARADD、野生型の HA-EDARADD を HEK293T 細胞で過剰発現させ、溶解液を抗 HA アガロースゲルで免疫沈降させた。予想通り、野生型の HA-EDARADD を過剰発現させた場合、myc-EDAR-IC と Flag-EDARADD 両者の共沈降が認められた(図 9a)。しかしながら、特記すべきことに、免疫沈降で共沈した myc-EDAR-IC の量は、優性遺伝性変異型の Flag-EDARADD (p.D120Y, p.L122R, p.D123N) を過剰発現させた場合に有意に低下した(図 9a, b)。一方で劣性遺伝性変異型 (p.E152K) の場合は、myc-EDAR-IC と野生型

HA-EDARADD の相互作用に影響を及ぼさなかった (図 9b)。

図 9. 優性遺伝性変異型 EDARADD は EDAR と野生型 EDARADD の相互作用を阻害した。(参考文献 24 より引用)

(a) myc-EDAR-IC、Flag-EDARADD (野生型または変異型)、HA-EDARADD (野生型) を HEK293T 細胞で共発現させ、細胞溶解液を抗 HA アガロースゲルで免疫沈降を行った。沈降した myc-EDAR-IC の量は、優性遺伝性変異型 EDARADD を過剰発現させたときに有意に低下した。
 (b) 沈降した myc-EDAR-IC (図 9a 最上部) の量を ImageJ で定量した。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した (*)。1-5 の数字は、図 9a で示した列の数字に対応している。
 N.S.: 統計学的有意差なし。IP: immunoprecipitation; WB: western blot。



5) 優性遺伝性変異型 EDARADD は TRAF6 に対する結合能を喪失した。

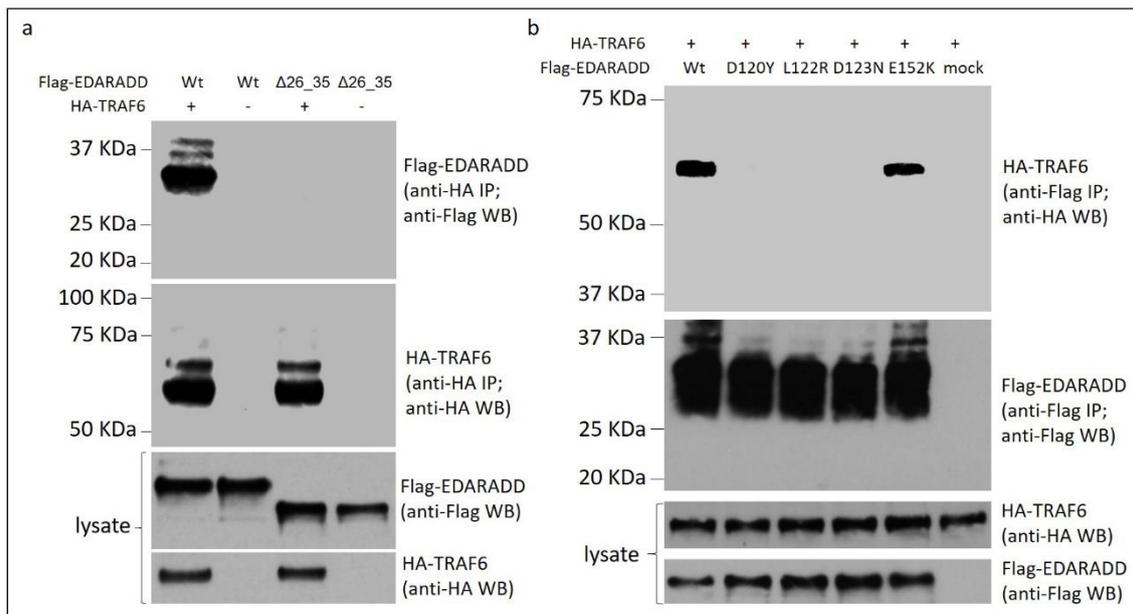
EDARADD の 27-31 番目のアミノ酸残基 (Pro-Val-Glu-Asp-Thr) は TRAF6 の結合配列 (Pro-X-Glu-X-X) と推測されていた (図 3)^{29, 30}。EDARADD が実際にこの部分で TRAF6 と結合することを確認するために、26-35 番目のアミノ酸残基が欠損した変異型 EDARADD (Flag-EDARADD-Δ26_35) の発現ベクターを作製した。共免疫沈降では、この変異型 EDARADD は TRAF6 との相互作用を完全に失った (図 10a)。つまり 27-31 番目のアミノ酸残基

は TRAF6 の結合領域であることが証明された。しかし、この結合領域以外で生じた EDARADD 変異も TRAF6 との親和性に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。興味深いことに、HA-TRAF6 と、野生型または変異型の Flag-EDARADD で免疫沈降を行ったところ、優性遺伝性変異型 (p.D120Y, p.L122R, p.D123N) は TRAF6 との結合能を完全に失っていた (図 10b)。一方で劣性遺伝性変異型 (p.E152K) については、TRAF6 との結合能は示したものの、共沈した HA-TRAF6 の量はわずかに減少していた (図 9b)。すなわち、TRAF6 と p.E152K 変異型 EDARADD の結合能は、TRAF6 と野生型 EDARADD の結合能よりも低下していることが示唆された。

図 10. TRAF6 と変異型 EDARADD の親和性は低下していた。(参考文献 24 より引用)

(a) HEK293T 細胞内で、HA-TRAF6 を Flag-EDARADD (野生型または 26-35 番目のアミノ酸残基が欠損した変異型) とともに共発現させ、細胞溶解液を抗 HA 抗体アガロースゲルで免疫沈降を行った。欠損型 EDARADD は TRAF6 との親和性を失っていた。

(b) HA-TRAF6 と Flag-EDARADD (野生型または変異型) を HEK293T 細胞内で共発現させ、細胞溶解液を抗 Flag 抗体アガロースゲルで免疫沈降を行った。優性遺伝性変異型 EDARADD は TRAF6 との結合能を完全に失っていたが、劣性遺伝性変異型 EDARADD ではその低下はわずかであった。IP: immunoprecipitation; WB: western blot。



5 考察

本研究では、過去に常染色体優性または劣性遺伝の HED を引き起こすと報告されていた計 4 種の *EDARADD* 遺伝子のミスセンス変異の詳細な機能解析を培養細胞レベルで行った^{5, 6, 22, 23}。本研究を通じ、優性遺伝性変異型 *EDARADD* と劣性遺伝性変異型 *EDARADD* ではそれぞれ異なる特徴があることを明らかにすることができた。まず、優性遺伝性変異型では下流の NF- κ B の活性化能はほとんど失われていた一方で、劣性遺伝性変異型ではその喪失の程度は軽度だった (図 4)。この結果を支持するように、優性遺伝性変異型 *EDARADD* は TRAF6 との結合能を完全に失っていたが、劣性変異型では若干の結合能の低下を認めたのみだった (図 10b)。これらの結果から、NF- κ B の活性化能という観点から見ると、p.D120Y, p.L122R, p.D123N はほぼ完全な機能喪失型変異であり、p.E152K は部分的な機能喪失型変異、いわゆる hypomorphic 変異であることが示唆される。本研究で解析した変異型 *EDARADD* が TRAF6 との結合能を喪失したり、結合能を低下させたりするメカニズムはまだ明らかにはなっていない。これらすべての変異は、N 末端の TRAF6 結合領域内には位置していなかったが (図 3, 10a)、*EDARADD* 蛋白の立体構造を顕著に変化させ、結果としてその結合領域が隠された可能性が示唆される。この仮説をより確固たるものにするためには構造解析が必要になるが、*EDARADD* の立体構造ほどのデータベースにも公開されていないため、検証することはできなかった。また、他の蛋白質で *EDARADD* と類似したものは存在しないため、homology modelling を行うこともできなかった。

重要なことに、NF- κ B レポーターアッセイによって、優性遺伝性の変異型 *EDARADD* は *EDAR* の存在下では野生型 *EDARADD* による NF- κ B 活性を抑制したが (図 5b)、このことは、p.D120Y, p.L122R, p.D123N 変異は、単なる機能喪失型ではなく、野生型 *EDARADD* に対して dominant negative 効果をもたらすことを示唆している (図 5b)。しかし、この効果は、別の実験条件では認められなかったように、比較的弱いもののようなものである (図 5a)。また、少なくとも本研究の条件下においては、野生型 *EDARADD* によって誘導されたルシフェラーゼ活性は変異型 *EDARADD* の用量に依存して抑制が強まらなかったことも、優性遺伝性の変異型 *EDARADD* による dominant negative 効果は限定的であることを示唆している (図 5c)。なお、本研究では初めて優性遺伝性変異型 *EDARADD* が *EDAR* と野生型 *EDARADD* の相互作用を抑制または競合することを示すことができた (図 9)。この現象は、p.D120Y, p.L122R, p.D123N 変異が dominant negative 効果を発揮する機序の 1 つであると考えられる。

過去に他のグループによって行われた研究では、野生型 *EDARADD* と同様に、p.D123N 変異型 *EDARADD* は *EDAR* に結合したが²³、p.E152K 変異型 *EDARADD* はほぼ完全にその結合能を失っていたと報告されている⁵。また、Balらは、p.L122R 変異型 *EDARADD* は *EDAR*

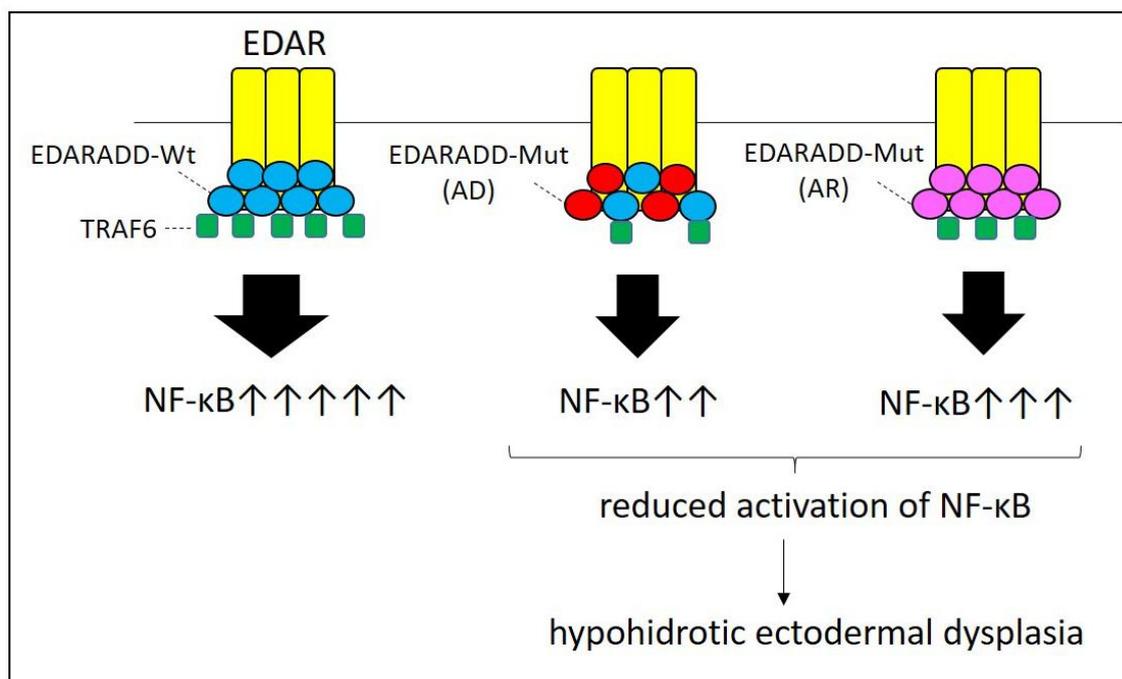
との結合能が強く低下していたが、p.E152K 変異型 EDARADD はその低下はわずかであったことを報告した⁶。本研究では、野生型 EDARADD と同様に、すべての変異型 EDARADD は EDAR との結合能を野生型 EDARADD と同様に有していたが(図 6)、我々の結果からは、EDAR と変異型 EDARADD との親和性が変化することが HED の主たる病態メカニズムではないと考えられた。しかし、実験条件を変えると結果が変わる可能性があるため、EDARADD 変異が EDAR との親和性に影響を及ぼすかどうかという問題については、今後さまざまな条件下でさらなる検討を要する。

本研究で得られた結果を踏まえると、優性遺伝性変異型 EDARADD は野生型 EDARADD と複合体を形成し、dominant negative 効果によって野生型 EDARADD と EDAR の相互作用を阻害し、NF- κ B の活性を低下させると考えられる(図 11)。また、ヘテロ接合型変異の状態(保因者)であれば劣性変異型 EDARADD は野生型 EDARADD と複合体を形成するが、EDAR と野生型 EDARADD の親和性には影響せず、したがって HED の臨床型を示さないとみられる。しかしながら、ホモ接合型変異の状態であれば、おそらく変異型 EDARADD と TRAF6 との親和性が野生型 EDARADD よりも弱いために NF- κ B の活性が低下すると推測される(図 11)。変異型 EDARADD と TRAF6 の相互作用が低下することが本当に重要かどうかを明らかにするためには、EDARADD と TRAF6 を共発現させた条件で NF- κ B レポーターアッセイを行う必要があるが、TRAF6 を過剰発現させると、それ自身が NF- κ B の活性を極めて顕著に高めて飽和状態に陥ってしまうために、他の蛋白を共発現させた際の変化を認めにくいという問題が残っている²⁵。

もし遺伝子型と臨床型(特に疾患の重症度)の明らかな相関関係が認められれば有益な情報であるが、過去の論文において各変異で生じた臨床症状については限られた記載しかないため^{5,6,22,23,31}、本研究で判明した各変異の特徴と臨床症状を照合して検討することが困難だった。しかしながら、本研究の結果は EDARADD 遺伝子変異が HED の発症機序を解明する一助になると考える。

図 11. *EDARADD* 遺伝子のミスセンス変異がもたらす HED の想定される病態メカニズム

健常人では EDAR、EDARADD (野生型)、TRAF6 は複合体を形成し、下流の NF- κ B を活性化させる (左)。優性遺伝性変異型 EDARADD は EDAR と EDARADD (野生型) の親和性を dominant negative 効果で阻害し、EDARADD (野生型) と TRAF6 の相互作用を減弱させ、NF- κ B の活性を低下させる (中央)。劣性遺伝性変異型 EDARADD も NF- κ B の活性を低下させるが、おそらく TRAF6 との親和性低下によるものと思われる (右)。AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance。



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。

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. 下村裕. 発汗異常を伴う遺伝性疾患. *発汗学*, 2020; 27: 20-25.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Bal E, Baala L, Cluzeau C et al. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the edaradd locus. *Hum Mutat* 2007; 28: 703-709.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Headon DJ, Overbeek PA. Involvement of a novel tnfr receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet* 1999; 22: 370-374.
12. 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.
13. Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet* 2014; 30: 24-31.
 14. Morlon A, Munnich A, Smahi A. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-kappaB activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptator Edaradd. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3751-3757.
 15. Mikkola ML. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 2031-2036.
 16. Schneider P, Street SL, Gaide O et al. Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *J Biol Chem* 2001; 276: 18819-18827.
 17. Fujimoto A, Farooq M, Sato N et al. Hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by a missense mutation in the EDA gene. *Eur J Dermatol* 2011; 21: 801-803.
 18. Kumar A, Eby MT, Sinha S, Jasmin A, Chaudhary PM. The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A. *J Biol Chem* 2001; 276: 2668-2677.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Wohlfart S, Söder S, Smahi A, Schneider H. A novel missense mutation in the gene EDARADD associated with an unusual phenotype of hypohidrotic ectodermal

- dysplasia. *Am J Med Genet A* 2016; 170A: 249-253.
24. Asano N, Yasuno S, Hayashi R, Shimomura Y. Characterization of EDARADD gene mutations responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Dermatol* 2021; 48: 1533–1541.
 25. Fujikawa H, Farooq M, Fujimoto A, Ito M, Shimomura Y. Functional studies for the TRAF6 mutation associated with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Br J Dermatol* 2013; 168: 629-633.
 26. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; 108: 193-199.
 27. 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.
 28. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A et al. *Apcdd1* is a novel wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* 2010; 464: 1043-1047.
 29. Ye H, Arron JR, Lamothe B et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002; 418: 443-447.
 30. Sadier A, Lambert E, Chevret P et al. Tinkering signaling pathways by gain and loss of protein isoforms: the case of the EDA pathway regulator EDARADD. *BMC Evol Biol* 2015; 15: 129.
 31. Munoz F, Lestringant G, Sybert V et al. Definitive evidence for an autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia clinically indistinguishable from the more common X-linked disorder. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 94-100.