

## 細胞質内パターン認識受容体 NLR の構造と機能

猪原直弘

NLR (Nod-like receptor) は中央に NOD モジュールを持つ細胞内タンパク質であり、いくつかの NLR は自然免疫や炎症に関わる。NLR はその自己重合化により下流実行分子複合体の近接活性化を引き起こす。Nod1, Nod2 は RICK との, NLRP3, NLRC4 は ASC, カスパーゼ-1 との結合を介して、それぞれ NF- $\kappa$ B などの転写調節因子による遺伝子発現を誘導したり、カスパーゼ-1 による IL-1 $\beta$  の成熟・分泌を誘導する。NLR の変異による免疫応答の異常は自己炎症疾患などの免疫疾患の原因となる。本稿では NLR のパターン認識受容体、スイッチ分子としての機能とその調節機構に絞り概説した。

## 1. はじめに

NLR (Nod-like receptor) は Nod1, Nod2 と相同性を有する一連の細胞質内タンパク質である<sup>1)</sup>。NOD-LRR, CATERPILLER とも称される<sup>1,2)</sup>。NLR は nucleotide binding-oligomerization domain (NOD) モジュールと呼ばれる、自己重合と構造変化に関わるためのドメイン複合領域を分子中央に持つ (図 1)。NOD を持つタンパク質は NOD と近接するドメインの違いにより、多様な情報伝達系で中心的スイッチ分子として働く。ヒトでは Nod1, Nod2 のほか、NLRP3 (CIAS1, Cryopyrin), NLRPC4 (Ipaf, CARD12), NLRP1, NAIP, CIITA など約 20, マウスで 30 強、魚類で数百種の NLR ファミリータンパク質が存在し、植物で数千種ほどある細胞質性病原耐性 (R) 遺伝子産物と構造上の相同性を持つ<sup>2)</sup>。RLR (RIG-I like receptor) 同様に、NLR の中には細菌成分などのパターン認識受容体 (PRR) として機能するものがあり、さらに植物 R 遺伝子産物も特異的病原体認識に重要であることから、NLR は外来成分の認識に関わる極めて保存されたしくみの構成員とも言える<sup>2)</sup>。動植物の細胞膜上にも PRR が存在する。動物の TLR

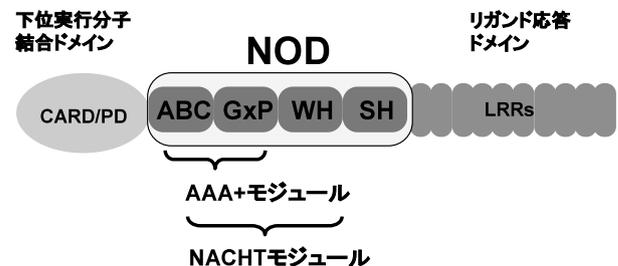


図 1 自然免疫・炎症に関わる NLR の一般構造

NLR は中央に NOD モジュールを持つタンパク質である。このドメインモジュール中には多量体化界面を形成する ABC ドメインと構造変化に伴うシグナル伝達に関わる GxP ドメイン、それにその調節に関わる WH とスイッチ領域 (SH) が存在する。ABC と GxP をあわせた領域は AAA+, さらに WH を加えた領域は NACHT とも呼ばれる。NOD の C 末端側には、リガンド認識に関わる LRR ドメインが存在し、その意味で TLR のリガンド認識機構と類似し、CARD と AAA+ を持つ点が RLR と類似する。N 末端側には下流実行分子に結合するドメインが存在し、Nod1 と NLRC4 では 1 個の CARD が、Nod2 で 2 個の CARD が存在する。NLRP3 は CARD と類似構造を持つ PD を持つ。Nod1, Nod2 は CARD を介して下流実行分子 RICK に、NLRC4 は ASC, カスパーゼ-1 と結合することが知られている。ASC, カスパーゼ-1 はこれらの NLR の CARD と相同な CARD を持つ。ASC はまた PD も持ち、NLRP3 の PD に結合する。各略号は本文を参照されたい。

(Toll-like receptor) などである。PRR である NLR, RLR, TLR の介する免疫応答の細胞内情報伝達系は重なる部分もある。それゆえに PRR の介する免疫応答で複数の PRR 刺激が相乗的・相加的に働く。もちろん、個々の PRR の介する免疫応答には独自の部分もあり、この独自性と共通性の巧みな組み合わせで、特定の病原体に対する抵抗性等

ミシガン大学医学部病理部門 (1500 W. Medical Center Dr., Ann Arbor, MI 48109, USA)

Structures and functions of NLRs, intracellular pattern recognition receptors

Naohiro Inohara (Department of Pathology, University of Michigan Medical School, 1500 W. Medical Center Dr., Ann Arbor, MI 48109, USA)

を可能にしている。本稿では、自然免疫や炎症に関わる NLR に絞って、その構造と細胞内情報伝達との関係について概説する。

## 2. 外来成分を認識する NLR ファミリータンパク質群

表 1 に外来成分認識に関わる NLR とそのリガンドとの関係を示した。Nod1, Nod2 は細菌のペプチドグリカン (PGN) 関連小分子群に反応し、その認識コア構造は、それぞれ  $\gamma$ -D-グルタミル-メソジアミノピメリン酸 (iE-DAP) と MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu (ムラミルジペプチド, MDP) である<sup>3,4)</sup>。NLRP3 や NALPC4 もまた、外来成分の認識に関わる。しかし、両者を刺激できる成分は次々と報告されているものの、実際に何を直接的に認識しているのか、不明な点が多い。細菌 RNA, 結晶化尿酸, アルム, 結晶シリカ,  $\beta$  アミロイドなど実に多くの物質が NLRP3 を介して IL-1 $\beta$  分泌を誘導するらしい<sup>5-13)</sup>。細胞外 ATP 共存下では多くの免疫刺激性外来成分が NLRP3 依存性の IL-1 $\beta$  分泌を誘導する<sup>14,15)</sup>。細胞外 ATP は、一定分子サイズ以下の分子を細胞内に透過させることのできるチャンネル分子である P2X7 の開放を引き起こし、これが NLRP3 依存性の IL-1 $\beta$

分泌に重要である。いくつかの細菌毒素は NLRP3 活性化を引き起こすが、ATP 非依存的に孔を形成するため、ATP を必要としない<sup>16)</sup>。一方、NLRC4 は細菌の鞭毛成分であるフラジェリンの細胞質内受容体であるらしい<sup>17-22)</sup>。ただし、NLRC4 はフラジェリンを持たない赤痢菌に対する応答性も決めており<sup>21)</sup>、NLRC4 を介する免疫応答を誘導する分子も宿主細胞内フラジェリンだけではない可能性がある。

NLR は本当に PRR なのか？ 受容体に詳しい方は疑問を持たれるかもしれない。それにはいくつか理由がある。まず、NLR とリガンドとの直接的結合が示されるべきだが、現在までその結合の直接的証明がなされていない。Nod1, Nod2 は細胞内に存在するにも関わらず、リガンドである水溶性分子を細胞外に加えても応答する。細胞外にあるリガンドがどのように細胞質内にある NLR にたどり着くのか、そのしくみについては不明な点が多い。

しかし、NLR が PRR とする間接的証拠は発見の経緯を含めて蓄積されている。第一に、Nod1, Nod2 の発現量が極めて低い HEK293 系培養細胞で Nod1, Nod2 を発現させると、それぞれ iE-DAP, MDP を認識するようになる<sup>3,4)</sup>。

表 1 自然免疫, 炎症に関わる NLR 群

NLR 名	Nod1	Nod2	NLRP3	NLRC4
リガンド	iE-DAP コア含有のペプチドグリカン関連小分子	MDP コア含有のペプチドグリカン関連小分子	(炎症性刺激 プラス膜孔形成またはダメージ分子)	細胞内フラジェリン
下位因子	RICK	RICK	ASC	ASC, カスパーゼ-1
恒常的高発現部位	非貪食細胞 (中皮, 上皮など)	貪食細胞系 (単球系, 好中球など) Paneth 細胞	貪食細胞系 (単球系, 好中球, 肥満細胞など)	貪食細胞系 (単球系, 好中球など)
発現増強	炎症系刺激	炎症系刺激	炎症系刺激	炎症系刺激
主要応答	NF- $\kappa$ B, p38 活性化	NF- $\kappa$ B, p38 活性化	IL-1 $\beta$ 分泌	IL-1 $\beta$ 分泌
関連疾患	アレルギー疾患 クローン病	〈機能欠損型〉 クローン病 アレルギー疾患 移植片対宿主病  〈恒常的活性化型〉 Blau 症候群 EOS	〈恒常的活性化型〉 FCAS, NOMID, MWS	

EOS, 若年発症サルコイドーシス; FCAS, 家族性寒冷自己炎症性症候群; MWS, Muckle-Wells 症候群; NOMID, neonatal onset multisystem inflammatory disease. NLR の名称は HUGO 命名法<sup>1)</sup>に従った。下位因子は直接結合する因子で必須の因子を示した。各 NLR の主要応答は遺伝子欠損マウスの表現型で消失した顕著な応答のみを示した。このほか、ヒトの場合、Nod1, Nod2 の刺激でも IL-1 $\beta$  分泌は起きるし、ASC 共存下、NLRP3, NLRC4 を導入した細胞では NF- $\kappa$ B, p38 活性化が認められる。NLR は p38 のほか、Erk1/2, JNK も活性化するが、マイクロアレイ解析等から、いくつかの TLR のような IRF の活性化は引き起こさないことが知られている。Nod1 遺伝子の非コード領域の多型がアレルギー疾患とクローン病の罹患性に関わるが、この多型が Nod1 の発現等に対してどのような影響を及ぼすかは未報告である。しかし、疫学的解析からアレルギー疾患高罹患と関わる多型は機能欠損型であることが示唆されている。Blau 症候群と EOS は同じ残基の変異だが、それぞれ家族性と孤発性のものを指すことが多い。NLRP3 変異で起きる類似した自己炎症性疾患はその症状の重篤さによって表中の三つの病名に分類できる。

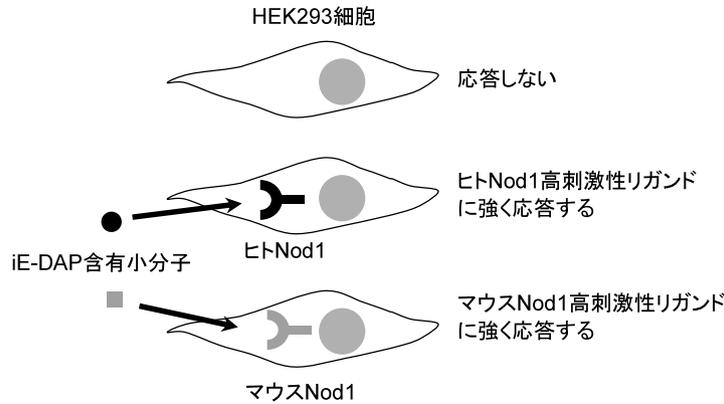


図2 Nod1がPRRであることを示す実験

ヒト胚腎臓 (HEK) 293系細胞はNod1をほとんど発現していない。これに遺伝子を導入しNod1を発現させるとiE-DAP含有小分子群に反応するようになる。このとき、ヒトとマウスではiE-DAP含有分子の種類によって刺激の強さが異なる。Nod1を発現するヒト細胞はテトラペプチドを持つiE-DAP含有分子よりもトリペプチドを持つiE-DAP含有分子により強く反応する。一方、マウスは反対にテトラペプチドを持つ分子に強く反応する。HEK293にヒトNod1を発現させるとトリペプチドを持つ分子に強く反応し、マウスNod1を発現させると、テトラペプチドを持つ分子に強く反応するようになる。細胞にはiE-DAP含有分子に対する受容体はNod1以外にはないので、このことはNod1そのものが分子形状を認識していることを示している。略号は本文を参照されたい。

また、Nod1, Nod2を欠くマウスの細胞はそれぞれiE-DAP, MDPコア含有分子に反応しない<sup>3,23)</sup>。しかし、これはNod1, Nod2がPGN関連小分子の認識に必須であるということの意味するだけで、受容体であるという証拠にはならない。これに対してNod1を使っておもしろい実証がなされた(図2)。Nod1の場合、ヒトとマウスでは若干構造の異なるリガンドを認識できる<sup>24)</sup>。そこで、Nod1の発現量の低いヒトの細胞でマウスNod1を発現させると、マウス細胞と同じリガンドを認識できるようになる<sup>24)</sup>。こうしたことから、未だNLRはリガンド結合性という受容体としての決定的な根拠を欠くものの、PRRであると言える。

### 3. NLRの構造

それでは、NLRファミリーはどのようにして情報伝達系でPRRとして働くのだろうか？まず、パターン認識はC末端側に存在するLRR (leucine-rich repeat) を持つドメインによって行われる(図1)。LRRはTLRにおいてもパターン認識で必須な役割を果たしている。多くのタンパク質が結合相手を認識するドメインとしてこのLRR領域を持ち、立体構造が決定されている。LRRはβ鎖とαヘリックス各1本を含んでいて、βシートを分子内側に向け、αヘリックスがそれを取り囲む構造をとる。Nod1, Nod2の場合、C末端側で11回LRRが繰り返されており、半馬蹄型構造をとると予想される<sup>25)</sup>(図3)。LRR領域を

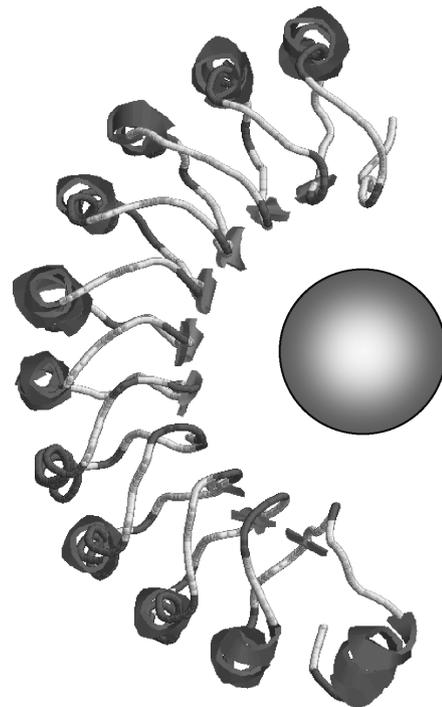


図3 Nod2のLRR領域の推定構造

Nod2のLRR領域の構造を、立体構造が既知のLRRタンパク質である胎盤RNaseインヒビターとの比較から推定した。LRR領域は半馬蹄型の構造をとり、各LRRの持つβ鎖は馬蹄の内側に、αヘリックスは外側に位置する。点変異解析からリガンド(球体で示した)の認識面は馬蹄内側に位置する残基で行われているものと推定される。

欠く変異タンパク質は恒常的に活性化されるようになるため、LRR領域はリガンド非存在下で機能抑制ドメインとして働くと考えられる<sup>25-28</sup>。類似のNODタンパク質であるApaf-1においても、C末端側のリガンド認識領域(シトクロムc結合領域)が、リガンド非存在下ではN末端側への下位分子結合やNODの多量体化を阻害することで、分子機能を抑制する<sup>29,30</sup>。一連の欠失型変異タンパク質を作ると、Nod1, Nod2のLRR領域のC末端半分にこの抑制活性があることがわかる<sup>25</sup>。多くのLRR含有タンパク質同様に、Nod1, Nod2においても半馬蹄型LRR領域の内側の面に存在するβシート上の親水性残基がリガンド認識で中心的な役割を果たしている<sup>25,31</sup>。また、変異体解析から、これらの残基だけではなく、LRR領域から一つでもLRRが欠けるとリガンド認識とカップルした分子活性化が起きないこともわかっている<sup>25</sup>。

次にNLRの特徴であるNODの機能は何だろうか？

NODのN末端側半分はAAA+ドメインモジュールである(図1)<sup>2</sup>。この領域はATPase活性を持つと思われるATP結合カセット(ABC)ドメインとαヘリックスに富んだGxPドメインより成る<sup>2,32</sup>。AAA+を持つタンパク質は、この2ドメインの界面で一般的に六量体、タンパク質種によっては二量体から八量体までの環状ホモ多量体を形成することで機能する<sup>2</sup>(図4A)。こうして環状構造により連結された下位実行分子結合ドメイン同士が近位をとり、このドメインに結合した下位実行分子が近接することで、活性化される<sup>33</sup>。下位実行分子結合ドメインはp97のような

他のAAA+タンパク質ではC末端側に存在する場合もあるが、NLRの場合、CARD(caspase-recruitment domain)、PD(pyrin domain)といった下位実行分子結合ドメインはN末端側に位置する<sup>2</sup>。

CARDとPDはdeath domain(DD)フォールドドメインという同じスーパードメインファミリーに属する<sup>33</sup>。これらはαヘリックスに富んだホモフィリック結合ドメインで、NLRと下位実行分子との異種分子間結合を取り持つ<sup>1,2</sup>。Nod1, Nod2はそれぞれ1個または2個のCARDをN末端に持ち、CARDを持つ下位因子RICKと結合する<sup>26,35</sup>。一方、NLRC4, NLRP3はそれぞれCARD, PDを介してCARDとPDをともに持つASCと結合できる<sup>27,28</sup>。また、NLRC4はCARDを持つカスペーゼ-1とも結合することが知られている(表1)<sup>36</sup>。ホモフィリック結合ドメインでありながら、DDフォールドドメインが異種分子間でヘテロ多量体を形成できるのは分子間結合に関わる界面の残基が異種分子間で異なり、特にイオン結合・水素結合など、平たくいうと鍵と錠の関係に当たる構造を作るためである<sup>34</sup>。こうした下流分子との結合に重要な残基間結合を変異導入で断つと、NLRは下流分子を活性化できないのみならず、ある種の変異はドミナントネガティブな効果をもたらす<sup>25</sup>。これはNLRが下流実行分子の活性化に自己多量体化と下流実行分子への結合という二つの独立のイベントをどう結びつけて下流実行分子活性化するかという以下で述べるしくみと密接に関連しているものと思われる。

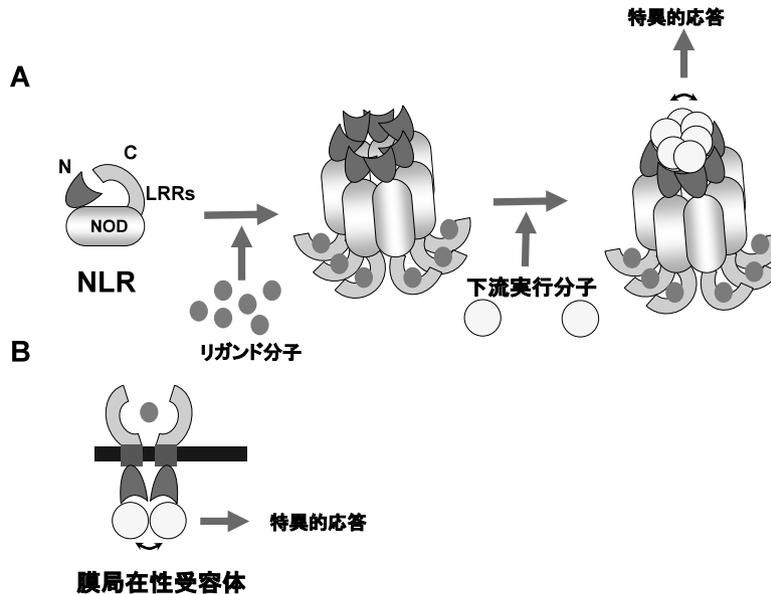


図4 NLR(A)と膜局在性受容体(B)の多量体化による下流実行分子の活性化機構の違い

膜局在性受容体ではリガンドの結合が受容体の重合化を引き起こすことで受容体に結合する下流分子の近接を引き起こすのに対し、NLRはNODを介してリガンド依存的自己重合を起こし、下流因子の近接を起こすと考えられる。各略号は本文を参照されたい。

#### 4. NLRの活性化とその調節機構

細胞内情報伝達系では、下流実行分子（複合体）は近接することで活性化する性質を持つものが多い。膜局在性の受容体では、細胞外でのリガンド分子の結合により受容体の多量体化が起きる（図4B）。例えば、TNF $\alpha$ が三量体であるため、受容体であるTNFR1は結合することによって原形質膜上で多量体化する。これによって、細胞質側に存在する下流実行分子群は近接でき、活性化される。Nod1, Nod2のリガンドであるPGN関連小分子群はむしろiE-DAP, MDPコア構造単体に近いものほど活性が高く<sup>3,4)</sup>、こうした膜局在性受容体による下流分子の活性化としくみが異なる。同じNODタンパク質であるApaf-1においてもリガンドであるシトクロムcは単量体であり、事情は同じである。この細胞質内での多量体化を可能にするのがAAA+モジュールである<sup>32)</sup>。NODを含むAAA+ではATP（またはGTP, dATP）の加水分解と共役した立体構造変化が活性化に必須である。ABCにはATP結合および加水分解に関わる残基群、いわゆるWalkerの共通配列が存在するが、Nod1のWalkerの共通配列への変異導入により、その活性化機能が失われる<sup>33)</sup>。Gタンパク質やApaf-1の類似性から、ATPの加水分解はNLRの構造変換に重要であると考えられるが<sup>2)</sup>、詳細な解析は未報告である。AAA+の不活性化型は通常単量体または活性化型のものとは異なる界面で結合した二量体などの多量体である<sup>2,32)</sup>。この構造変化の詳細は不明だが、リガンド刺激と結びつくLRR領域とその間に存在するスーパーヘリックス(SH)をとると予想されるスイッチ領域との共役によって引き起こされる<sup>25)</sup>（図1）。この機能共役にはランダム変異導入や後述の疾患関連変異の解析から、スイッチ領域とともに、AAA+モジュールに存在する残基も関わる。スイッチ領域やAAA+モジュール中の調節機能に重要な残基の中には、変異により下流分子活性化機能の消失につながるものもあれば、反対に恒常的な活性化を起こすものもある<sup>25)</sup>。スイッチ領域の変異による機能欠損はLRR領域の変異により相補され、また反対に、LRR領域の変異による機能欠損はスイッチ領域の変異によって相補されるため<sup>25)</sup>、スイッチ領域における恒常的な活性化変異は負の制御領域であるLRR領域との相互作用に問題があるものと思われる。一方、リガンド非依存的に活性化を起こすAAA+モジュール中の変異を持つNod2タンパク質でも、下流分子への結合は起こり、かつリガンド応答性を保持するが、さらに過剰活性化を引き起こす<sup>25)</sup>。従って、AAA+モジュールは他のAAA+タンパク質の自己重合および下流実行分子活性化機能から予想されるように、スイッチ領域/LRR領域によるリガンド依存的な調節の下流にあって、下流実行分子の活性化に繋がる重要な機能が担うものと推定され

る。

#### 5. NLRによる下流実行分子の活性化のしくみ

遺伝子欠損マウスの解析から、Nod1, Nod2はPGN関連小分子によるNF- $\kappa$ Bなどの炎症系転写調節因子の活性化に必須であり<sup>3,23)</sup>、NLRP3, NLRC4はその刺激因子によるカスパーゼ-1活性化およびIL-1 $\beta$ , IL-18の成熟・分泌に必須である<sup>5~22)</sup>（表1）。

Nod1, Nod2はどのようにして免疫応答を誘導するのであろうか。ヒトNod1, Nod2が刺激されると、I $\kappa$ Bキナーゼ（IKK）やp38キナーゼが活性化され、次いで転写調節因子NF- $\kappa$ BやAP-1などが活性化される<sup>2)</sup>。その結果、ケモカイン遺伝子などの転写が誘導される<sup>37,38)</sup>。図5にNF- $\kappa$ Bの活性化の機構についての知見をまとめた。まず、はじめにNod1, Nod2はリガンド刺激を受けると自己重合化するとともにCARD間相互作用を介して下流因子RICKと結合すると考えられる<sup>2)</sup>。結合したRICKは近接し、このことが引き金となり、最終的にNF- $\kappa$ B阻害因子I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化・分解を伴ういわゆる古典的な活性化経路が働き出す<sup>33)</sup>。RICKはN末端側にタンパク質キナーゼドメイン、中央に中間ドメイン（IM）、C末端にCARDを持つ<sup>39)</sup>。RICKのキナーゼドメインはNod1, Nod2によるNF- $\kappa$ Bの活性化に必須であるが、これはキナーゼドメイン内の209番目のリジン（K209）のポリユビキチン（Ub）化がNodによるNF- $\kappa$ B活性化に重要であるからである<sup>40)</sup>。RICKのキナーゼ活性はNod情報伝達系の最適化に必要であるが、NF- $\kappa$ B活性化に必須ではない<sup>33,40)</sup>。RICKのK209はTRAF2, TRAF5依存的にUb化を受け、このUbはさらにリジン63（K63）を介して伸張したポリUb鎖を形成する<sup>40)</sup>。K63連結型ポリUb鎖はNF- $\kappa$ B活性化の普遍的調節因子TAK1/TAB1/TAB2・3複合体と結合する<sup>40)</sup>。一方で、IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ 複合体は調節サブユニットであるNEMO（IKK $\gamma$ ）を介して、RICKの中間（IM）ドメインに結合することでNod/RICK複合体に呼び寄せられる<sup>33,40)</sup>。このRICKとNEMOとの結合はリガンド刺激を必要としない<sup>40)</sup>。しかし、IKK複合体はRICKを介したNod複合体への呼び寄せのみでは酵素的に活性化されない<sup>40)</sup>。Nod活性化依存性で形成されたポリUb化を介してRICKに呼び寄せられたTAK1複合体があって初めてIKKは活性化される<sup>40)</sup>。即ち、RICKはTAK1 $\rightarrow$ IKKの足場タンパク質的な役割を果たす。TNF $\alpha$ などの情報伝達系においてTAK1は触媒サブユニットであるIKK $\alpha$ とIKK $\beta$ のトランス活性化ループのセリンをリン酸化することで両サブユニットの酵素活性を上昇させるので<sup>41)</sup>、Nod情報伝達系でも同様のしくみでのIKK活性化が考えられる。Nod1情報伝達系ではIKK $\alpha$ とIKK $\beta$ 、特にIKK $\beta$ が必須の役割を果たしているが、いずれかがあれば、NF- $\kappa$ Bを活性化できる<sup>42)</sup>。なお、

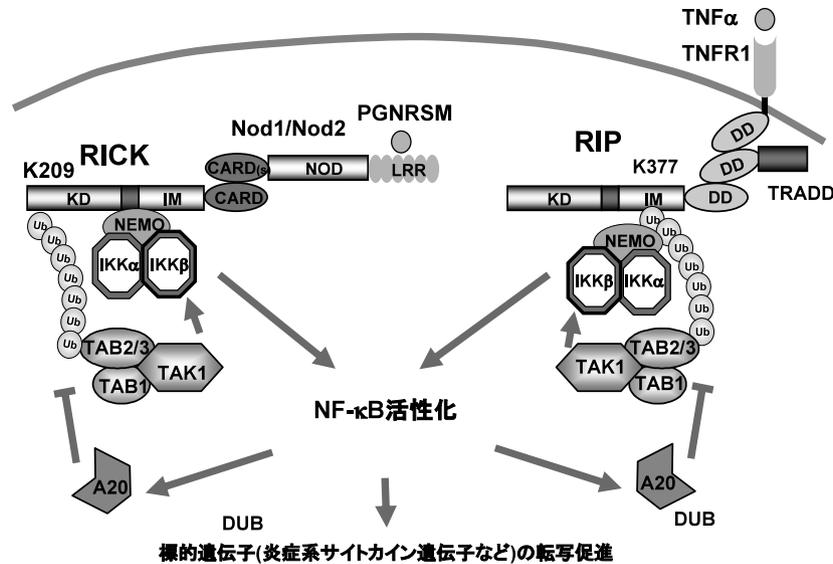


図5 Nod1, Nod2 と TNFR1 の刺激によって起こる NF-κB 活性化の類似性  
 Nod1, Nod2 はペプチドグリカン関連小分子 (PGRSM) で活性化されると、自己重合化により、CARD を介して結合した下流分子 RICK を近接させる。RICK 分子(またはそれと結合した分子群の複合体)同士が近接すると、タンパク質キナーゼドメイン (KD) 中にある K209 が TRAF2, TRAF5 依存的に K63 結合型のポリ Ub 化を受ける。次いで、このポリ Ub 鎖に TAK1, TAB1, TAB2/TAB3 複合体が結合する。RICK の中間ドメイン (IM) には NEMO との結合を介して IKK 複合体が呼び寄せられ、TAK1 により IKKα, IKKβ が活性化される。活性化された IKK は IκBα のリン酸化とそれに続くプロテアソーム依存性の分解を起こし、RelA を含む NF-κB の核移行を引き起こす。NF-κB は炎症性サイトカイン遺伝子などの多くの遺伝子の転写を活性化するが、そのうちのの一つに A20 遺伝子がある。A20 は K63 型ポリ Ub 鎖を分解する酵素 (DUB) であり、この脱 Ub 化により Nod1, Nod2 刺激によって起きた細胞内応答が終了することで、一過的な情報伝達を可能にしている。この Nod1, Nod2 による情報伝達経路は TNFR1 のものと類似する。即ち、TNFα 刺激された TNFR1 には DD を介して RICK と相同性の高い RIP が呼び寄せられる。RIP の場合は IM が TRAF2, TRAF5 依存的に K63 結合型ポリ Ub 化を受ける。NLR 情報伝達系と異なるもう一つの点は、TAK1 複合体に加えて、IKK 複合体がこのポリ Ub 鎖に結合すると報告されているところである。しかし、現在のところ、どのようにして RICK が IKK にポリ Ub 鎖非依存的に結合しているのかは不明である。TAK1 による IKK 活性化以降の経路は NLR と TNFR1 による情報伝達系間で共通である。各略号は本文を参照されたい。

最近、Nod1, Nod2 情報伝達系における c-IAP1, cIAP-2 の重要性がクローズアップされたが<sup>44)</sup>、同グループの実験系で用いられている DAP は Nod1 を刺激できないし<sup>44)</sup>、TRAF6 は Nod1/Nod2 情報伝達系では必須でない<sup>40)</sup>、他者による今後の検討が不可能である。基質の K48 ポリ Ub 化とプロテアソーム依存性タンパク質分解を起こす E3 である両 cIAP が Nod 情報伝達系の NF-κB 活性化に関わる場合、どのような形で活性化に関わる K63 ポリ Ub 化を引き起こすのか、今後の課題として残されている。

Nod1, Nod2 の刺激が専ら NF-κB などの転写調節因子の活性化による遺伝子誘導であるのに対し、NLRP3 や NLRC4 は下流因子 ASC との結合を介してカスパーゼ-1 を活性化することで、IL-1β の分泌に必須の役割を果たす。NLRP3 や ASC は TLR を介した IL-1β 分泌においても必須の役割を果たすこと<sup>20)</sup>、カスパーゼ-1 の活性化には ATP

依存性小分子チャネルの開放が必要であることが知られているが<sup>20)</sup>、これらの情報伝達系がどのように NLRP3 情報伝達系に繋がるのかは不明である。ASC の NLRP3 への結合は活性化依存性であり、NLRP3 による IL-1β 分泌の最重要段階に見える<sup>45)</sup>。一方、ゼブラフィッシュ・オーソログの解析から ASC とカスパーゼ-1 との結合だけでは活性化に不十分であり、ASC を介したカスパーゼ-1 の自己近接が重要であることが示唆される<sup>46)</sup>。カスパーゼ-1 も自己近接により活性化される酵素の一種であることから<sup>47)</sup>、NLRP3 においても Nod1 や Nod2 同様に自己多量体化による近接活性化が下流分子である ASC/カスパーゼ-1 の活性化を引き起こすと考えられる<sup>2)</sup>。NLRC4 においても変異体解析から自己重合化が下流因子の活性化に重要であることが示唆されている<sup>27)</sup>。しかし NLRC4 刺激がどのように ASC を介してカスパーゼ-1 を活性化するのか、その詳細

は不明である。

## 6. Nod1, Nod2, NLRP3 情報伝達系の異常が原因となる免疫系疾患

ヒトでは Nod2, NLRP3 の変異が原因となる疾患が見つかる (表 1)。Nod2 の機能欠損多型は発症原因不明の炎症性腸疾患であるクローン病 (CD) の罹患率を押し上げる<sup>48-50</sup>。ヒトの Nod2 は生存に必須ではなく、特に白人で多くの機能欠損多型が存在する。機能欠損型 Nod2 遺伝子のみを持つ人では CD 罹患率が対照群と比べて約 20 倍、対立遺伝子の少なくとも一方が機能欠損型である個人では 1.5~2 倍高い<sup>48-50</sup>。つまり、やや対立遺伝子数依存性を示すものの、劣性遺伝形式を示す。日本人と異なり白色人種の CD 患者では家族歴を持つ者が多いが、これは白色人種は遺伝的背景として複数の CD 罹患感受性遺伝子座を持つためである。その多くが一般的な大腸炎や潰瘍性大腸炎など、他の炎症性腸疾患に対する感受性にも関わるのに対して、Nod2 変異のみが CD 特異的であり、しかももっとも高頻度で患者中に見出される<sup>48-50</sup>。特に 3020 InsC, G908R, R702W の 3 多型がもっとも多く認められる<sup>48-50</sup>。このうち、Nod2 3020InsC はまったく MDP に応答できないのに対して、G908R, R702W 多型を持つ Nod2 は顕著に低下した MDP 応答性を示す<sup>41</sup>。実際、これらの変異多型をホモで持つ個人の単核球系細胞は MDP に応答することができない<sup>41</sup>。なお、マウスに 3020InsC 相当の変異 Nod2 遺伝子を導入したマウスでは MDP に対する過剰応答性が報告されたが<sup>51</sup>、実際のヒト CD の病態と異なるのみならず<sup>4, 38</sup>、一連の変異解析から予想される Nod2 機能ドメイン構造の結果とも矛盾するため<sup>25</sup>、今後の追試が待たれる。

Nod2 では恒常的活性化型変異も知られている。家族性のものは Blau 症候群、孤発のものは若年発症性全身性サルコイドーシスと呼ばれており、CD と異なり、炎症部位は全身の様々な部位で認められる<sup>52-54</sup>。Blau 症候群は Nod2 の機能亢進変異と関わるため、機能欠損変異と関連する CD と異なり、遺伝形式は優性である<sup>52, 53</sup>。機能亢進型変異型 Nod2 では MDP 非存在下でも有意なレベルの NF- $\kappa$ B 活性化を示し、さらに MDP や細菌に応答して野生型よりさらに高い炎症応答を誘導する<sup>25</sup>。この機能亢進型変異は NOD 中の活性化に関する二つの領域、すなわち ATP 結合カセット (ABC) およびスイッチ領域を中心に局在する。

NLRP3 においてもこうした機能亢進変異が知られており、多臓器で炎症を引き起こす類似の 3 自己炎症性疾患である、新生児期発症多臓器性炎症性疾患 (NOMID, 別名: CINCA), Muckle-Wells 症候群 (MWS), 家族性感冒自己炎症性症候群 (FCAS, 別名: 家族性寒冷尋麻疹) を引き

起こす<sup>55</sup>。これら 3 疾患の症状の発症は変異優性であり、類似点が多く、さらに同一の変異を持つ場合もある。NLRP3 変異も Blau 症候群関連 Nod2 変異と同様に NOD 中に存在し、興味深いことに Blau 症候群の Nod2 変異と CAPS の NLRP3 変異を比較すると、R260W/Q (CAPS)  $\rightarrow$  R334W/Q, (Blau) などタンパク質構造上同じ位置に相当するものが見つかる<sup>52-55</sup>。すなわち、NLRP3, Nod2 では変異による炎症活性化・発症に共通機構が存在する。

このほか、Nod2 の機能欠損変異は臓器移植時に起きるいわゆる拒絶反応、移植片対宿主病やアレルギー疾患の罹患性にも関わる事が知られている<sup>56, 57</sup>。Nod2 同様に Nod1 の遺伝子多型もアレルギー疾患や CD の罹患性に関わる<sup>(58, 59)</sup>。しかし、Nod1, Nod2 がこれらの免疫疾患の罹患性とどのように関わるかは現在のところ不明である。高罹患性と関わる Nod1 または Nod2 の多型を持つ大半の人は健常であるため、CD をはじめとする疾患の発症は何かの環境因子または他の遺伝的背景との組み合わせが必要と考えられる。アロ反応、アレルギー反応、病原体に対する応答と関連するこうした NLR 機能欠損関連疾患は、Th1, Th2 のみならず MHC-I, MHC-II 拘束性いずれかの応答の強度または負の制御に関わる免疫応答の異常と関連すると考えられ、今後、NLR が関わる免疫応答の研究とともに、NLR 情報伝達系を標的とした創薬が進むことで、NLR 関連疾患の治療に役立てられていくものと期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した我々の仕事のうち、複数の論文が楠本正一、深瀬浩一、藤本ゆかり (大阪大学)、橋本雅仁 (鹿児島大学)、Gabriel Nunez (Michigan 大学)、Judy Cho (Yale 大学)、Jose Fernandez-Luna (Marques de Valdecilla 医学校) 各先生およびその研究室との方々との共同研究によって成されたものであり、この場を通じて感謝の意を表します。また、このほかの論文で共同研究を賜った、多くの共同研究者の方に感謝申し上げますとともに失礼とは存じますが、お名前を割愛させていただいた非礼をお詫び申し上げます。

## 文 献

- 1) Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L.J., Núñez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V., & Ward, P.A. (2008) *Immunity*, 28, 285-287.
- 2) Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C., & Núñez, G. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 355-383.
- 3) Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu,

- S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Núñez, G., & Inohara, N. (2003) *Nat. Immunol.*, **4**, 702–707.
- 4) Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L., & Núñez, G. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5509–5512.
  - 5) Kanneganti, T.D., Ozören, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Akira, S., & Núñez, G. (2006) *Nature*, **440**, 233–236.
  - 6) Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006) *Nature*, **440**, 237–241.
  - 7) Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., & Dixit, V.M. (2006) *Nature*, **440**, 228–232.
  - 8) Muruve, D.A., Pétrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S. A., Ross, P.J., Parks, R.J., & Tschopp, J. (2008) *Nature*, **452**, 103–107.
  - 9) Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., & Tschopp, J. (2008) *Science*, **320**, 674–677.
  - 10) Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., & Flavell, R.A. (2008) *Nature*, **453**, 1122–1126.
  - 11) Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., Carter, A.B., Rothman, P.B., Flavell, R.A., & Sutterwala, F.S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9035–9040.
  - 12) Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., & Golenbock, D.T. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 857–865.
  - 13) Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., & Latz, E. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 847–856.
  - 14) Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G.S., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Galán, J.E., Askenase, P.W., & Flavell, R.A. (2006) *Immunity*, **24**, 317–327.
  - 15) Pan, Q., Mathison, J., Fearn, C., Kravchenko, V.V., Da Silva Correia, J., Hoffman, H.M., Kobayashi, K.S., Bertin, J., Grant, E.P., Coyle, A.J., Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Flavell, R.A., & Ulevitch, R.J. (2007) *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 177–183.
  - 16) Marina-García, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Miller, D., McDonald, C., Boons, G.J., & Núñez, G. (2008) *J. Immunol.*, **180**, 4050–4057.
  - 17) Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., & Núñez, G. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 576–582.
  - 18) Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., & Aderem, A. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 569–575.
  - 19) Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Ozören, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., & Núñez, G. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 35217–35223.
  - 20) Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T.D., Verma, A., Rappal, R., & Núñez, G. (2007) *Eur. J. Immunol.*, **37**, 3030–3039.
  - 21) Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., & Núñez, G. (2007) *PLoS Pathog.*, **3**, e111.
  - 22) Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., & Flavell, R.A. (2007) *J. Exp. Med.*, **204**, 3235–3245.
  - 23) Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Núñez, G., & Flavell, R.A. (2005) *Science*, **307**, 731–734.
  - 24) Magalhaes, J.G., Philpott, D.J., Nahori, M.A., Jéhanno, M., Fritz, J., Le Bourhis, L., Viala, J., Hugot, J.P., Giovannini, M., Bertin, J., Lepoivre, M., Mengin-Lecreulx, D., Sansonetti, P.J., & Girardin, S.E. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 1201–1207.
  - 25) Tanabe, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M.M., Tromp, G., Williams, C.J., Inohara, N., & Núñez, G. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1587–1597.
  - 26) Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, Liu, D., Ni, J., & Núñez, G. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14560–14568.
  - 27) Masumoto, J., Dowds, T.A., Schaner, P., Chen, F.F., Ogura, Y., Li, M., Zhu, L., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Gumucio, D.L., Núñez, G., & Inohara, N. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **303**, 69–73.
  - 28) Dowds, T.A., Masumoto, J., Chen, F.F., Ogura, Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **302**, 575–580.
  - 29) Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., & Akey, C.W. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 423–432.
  - 30) Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R., & Shi, Y. (2005) *Nature*, **434**, 926–933.
  - 31) Girardin, S.E., Travassos, L.H., Hervé, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., & Mengin-Lecreulx, D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 41702–41708.
  - 32) Proell, M., Riedl, S.J., Fritz, J.H., Rojas, A.M., & Schwarzenbacher, R. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e2119.
  - 33) Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., & Núñez, G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27823–27831.
  - 34) Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., & Wu, H. (2007) *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 561–586.
  - 35) Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., & Núñez, G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 4812–4818.
  - 36) Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E.S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28309–28313.
  - 37) Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S.A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S.J., Horie, Y., Mak, T.W., Núñez, G., Chinnaiyan, A.M., Fukase, K., & Inohara, N. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**, 203–213.
  - 38) Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., Hedl, M., Nicolae, D.L., Abraham, C., & Cho, J.H. (2004) *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1715–1725.
  - 39) Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S., & Núñez, G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 12296–12300.
  - 40) Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P.C., Nakano, H., Fukase, K., Núñez, G., & Inohara, N. (2008) *EMBO J.*, **27**, 373–383.
  - 41) Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., & Karin, M. (1999) *Science*, **284**, 309–313.
  - 42) Muto, A., Ruland, J., McAllister-Lucas, L.M., Lucas, P.C., Yamaoka, S., Chen, F.F., Lin, A., Mak, T.W., Núñez, G., & Inohara, N. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31871–31876.
  - 43) Bertrand, M.J., Doiron, K., Labbé, K., Korneluk, R.G., Barker, P.A., & Saleh, M. (2009) *Immunity*, **30**, 789–801.
  - 44) Hasegawa, M., Kawasaki, A., Yang, K., Fujimoto, Y., Masumoto, J., Breukink, E., Núñez, G., Fukase, K., & Inohara, N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11757–11764.

- 45) Dowds, T.A., Masumoto, J., Zhu, L., Inohara, N., & Núñez, G. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 21924–21928.
- 46) Masumoto, J., Zhou, W., Chen, F.F., Su, F., Kuwada, J.Y., Hidaka, E., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Ngo-Hazelett, P., Postlethwait, J.H., Núñez, G., & Inohara, N. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 4268–4276.
- 47) MacCorkle, R.A., Freeman, K.W., & Spencer, D.M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3655–3660.
- 48) Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., & Thomas, G. (2001) *Nature*, **411**, 599–603.
- 49) Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Núñez, G., & Cho, J.H. (2001) *Nature*, **411**, 603–606.
- 50) Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J.E., Foelsch, U.R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., & Mathew, C.G. (2001) *Lancet*, **357**, 1925–1928.
- 51) Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., & Karin, M. (2005) *Science*, **307**, 734–738.
- 52) Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A.M., Manouvrier-Hanu, S., Häfner, R., Chamaillard, M., Zouali, H., Thomas, G., & Hugot, J.P. (2001) *Nat. Genet.*, **29**, 19–20.
- 53) Wang, X., Kuivaniemi, H., Bonavita, G., Mutkus, L., Mau, U., Blau, E., Inohara, N., Núñez, G., Tromp, G., & Williams, C.J. (2002) *Arthritis Rheum.*, **46**, 3041–3045.
- 54) Kanazawa, N., Okafuji, I., Kambe, N., Nishikomori, R., Nakata-Hizume, M., Nagai, S., Fuji, A., Yuasa, T., Manki, A., Sakurai, Y., Nakajima, M., Kobayashi, H., Fujiwara, I., Tsutsumi, H., Utani, A., Nishigori, C., Heike, T., Nakahata, T., & Miyachi, Y. (2005) *Blood*, **105**, 1195–1197.
- 55) Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., & Kolodner, R.D. (2001) *Nat. Genet.*, **29**, 301–305.
- 56) Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P.J., Hahn, J., Eissner, G., Schölmerich, J., & Andreesen, R. (2004) *Blood*, **104**, 889–894.
- 57) Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S.K., & von Mutius, E. (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**, 813–817.
- 58) Hysi, P., Kabesch, M., Moffatt, M.F., Schedel, M., Carr, D., Zhang, Y., Boardman, B., von Mutius, E., Weiland, S.K., Leupold, W., Fritzschn, C., Klopp, N., Musk, A.W., James, A., Núñez, G., Inohara, N., & Cookson, W.O. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 935–941.
- 59) McGovern, D.P., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D.A., Moffatt, M.F., Carey, A., Cookson, W.O., & Jewell, D.P. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1245–1250.
-