

特集：生体防御メカニズムの分子基盤

自然免疫における核酸センサー分子

高岡晃教, 榎木芙美, 後藤翔平, 数馬田美香

自然免疫システムは病原微生物感染に対する重要な生体防御のプロセスであり、とくに感染初期においてパターン認識受容体を介して微生物の侵入を察知するのみならず、様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化させ、自然免疫応答を展開する。さらには次のステップである適応免疫システムの効率よい活性化へとつなげる役割がある。パターン認識受容体の中でもとくに病原体由来の核酸（DNAやRNA）を認識する核酸認識受容体は概してIRF（interferon regulatory factor）ファミリー転写因子を活性化し、I型インターフェロンの遺伝子発現を誘導し、ウイルス感染防御に働く。一方では、このような自然免疫における核酸認識受容体を介するシグナルの異常が自己免疫や炎症性疾患などの病態形成に関連していることも明らかになりつつある。本稿では、この核酸認識受容体およびその下流のシグナル経路に焦点を当て、感染防御システムにおける役割について解説する。

1. はじめに

免疫システムの活性化による病原体排除のプロセスは、まず病原微生物の侵入をいち早く察知（sensing）することから始まる。このような免疫システムの活性化につながる sensing メカニズムの研究は、Toll 様受容体（Toll-like receptors; TLRs）をはじめとする多くのシグナル伝達型のパターン認識受容体（pattern recognition receptors; PRRs）の発見により飛躍的に進展した¹⁻⁵⁾。これらのシグナル伝達型の PRRs の重要性は自然免疫系のみならず、適応免疫系の効率のよい活性化を誘導することに見出すことができる。PRRs は微生物由来の様々な構成分子の構造、即ち、糖や脂質、タンパク質、核酸からなる病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）を認識している^{4,5)}。しかしながらその特異性はあまり厳密なものではないことが知られている。これに関連し、自然免疫系に

における PRRs は感染のみならず、内的な異常に対するセンサーとしても機能していることがわかってきた。すなわち、微生物などに由来する外来性分子パターンの sensing のみならず、ストレスやがんなどによる組織障害の際に遊離される分子を認識することが示されている。このように外的および内的な要因を問わず、生体にとって危険な状態であることを迅速に sensing して“danger signal”を発することで⁶⁾、生体防御システムが活性化され、恒常性を維持することにつながると考えられる。

本稿では、このような sensing メカニズムの中でも核酸センサー分子に焦点を当てて、生体防御システムにおける分子機構について解説する。

2. 核酸認識受容体の分類

核酸認識受容体（センサー分子）は基本的に微生物由来の核酸からなる分子パターンを認識し、既知の核酸センサー分子はすべて受容体下流で細胞内へシグナルを伝達することが知られている。核酸センサー分子は、その局在様式からさらに膜貫通型と細胞質型に分類して考えることができる。膜貫通型の核酸センサー分子は TLR ファミリーメンバーの TLR3, TLR7, TLR8 および TLR9 が挙げられる⁷⁾。その他の核酸以外のタンパク質や脂質などをリガンドとする TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11)

北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野
(〒060-0815 札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

Nucleic acid sensors in innate immunity

Akinori Takaoka, Fumi Kashigi, Showhey Gotoh, and Mika Kazumata (Division of Signaling in Cancer and Immunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan)

が概して細胞表面に局在するのに対して、これらの核酸認識に関わる TLRs はすべて細胞内のエンドソームやリソソームなどの内腔に存在することが特徴である。一方、細胞質型の核酸センサー分子としては RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1)/MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) の RLR (RIG-I-like receptor) ファミリー⁸⁾が代表的なものとして挙げられる。さらに膜貫通型および細胞質型核酸センサー分子は各々 DNA センサーと RNA センサーに細分することができる (図 1)⁹⁾。一方、細胞質型の DNA センサーはその存在は示唆されていたが^{10,11)}、実体は明らかにされていなかった。近年、細胞質型 DNA センサーの候補分子の一つとして DAI (DNA-dependent activator of IRFs; 別名, DLM-1/ZBP1) が報告されている¹²⁾。これらの核酸センサー分子の多くは I 型インターフェロン (interferons; IFNs) の発現誘導経路を活性化させるという共通した特性を持ち、とくにウイルス感染に対する自然免疫応答での役割が明らかにされている。ウイルスは真菌や細菌とは異なり、その粒子を構成する大部分は宿主由来のものであるため、宿主との違いが認められない。しかしながら、ウイルス由来の DNA は宿主の DNA と比較して CG 配列のシトシンがメチル化されている割合が有意に少ない。また、ウイルス由来のメッセンジャー RNA (mRNA) は、7-メチルグアノシン CAP 構造が存在しないという違いが存在するため、ウイルス由来の核酸が宿主による感染防御の際に、核酸認識受容体を介して認識のターゲットとなる。したがって、DNA ウイルスにおいては、その DNA ゲノム自体がターゲットとなる他に、それを元に転写される mRNA もターゲットとなりうる。実際に、DNA ウイルスである Epstein-Barr virus (EBV) 由来の small RNAs (EBERs) が細胞質型 RNA センサーの一つである RIG-I によって認識されて自然免疫応答が活性化される¹³⁾。また、RNA ウイルスによる感染においては、ゲノムの RNA や mRNA が宿主の認識のターゲットとなる。現在のところ報告はないが、レトロウイルスの場合は逆転写された DNA が認識される可能性も考えられる。これらの PRRs による認識は、細胞や組織の種類においても主要な役割を担う PRRs が異なっており、いずれの場合も時空間的に複数のセンサーによる認識を介するシグナルの総和が、自然免疫応答の活性化に反映されるものと考えられる。以下に現在までに知られている自然免疫応答を活性化する個々の核酸認識受容体に着目し、その下流のシグナル伝達経路および実際の微生物感染における役割について解説する。

【I】 DNA センサー分子

(1) 膜貫通型 DNA センサー: TLR9

TLR9 はエンドソームやリソソームにおいて非メチル化 CpG-DNA を認識する。特徴的であるのは、I 型 IFNs を

大量に産生誘導する特性を持った形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells; pDCs)¹⁴⁾において優位に発現している点である。特にヒトでは、マウスとは異なり、TLR9 の発現は pDCs に局限していることが知られている。この TLR9 による I 型 IFNs の発現は TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) 依存性経路ではなく、MyD88 (myeloid differentiation marker 88) 依存性のシグナル経路を介することがもう一つの特徴でもある^{15,16)} (図 2)。TLR9 のシグナル経路では、MyD88 を中心として IRAK1 (IL-1 receptor associated kinase 1), IRAK4, TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) そして IRF-7 がおそらく複合体を形成して、下流のシグナル伝達を活性化する^{17,18)}。TLR9 は I 型 IFNs を発現する IRF-7 経路と、炎症性サイトカインなどの発現を誘導する NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 経路の二つの経路を活性化する。ともに、MyD88, IRAK4 および TRAF6 に依存しており、どのようなメカニズムでこの二つの経路が分岐されるのかは充分には明らかにされていない。異なるのは、前者が IRAK1 にも依存しているのに対し、後者は IRAK1 非依存性であるという点である¹⁹⁾。この IRAK1 は IRF-7 のキナーゼとしてそのリン酸化に関与することが示唆されている。さらに IRF-7 のキナーゼとして IKK α (I κ B kinase α) も候補に挙げられている²⁰⁾、両キナーゼの関連性については不明である。TLR9 下流で I 型 IFNs の誘導に関わる IRF 転写因子は IRF-7 が必須の転写因子であることが知られているが²¹⁾、IRF-3 が活性化されないのは IRAK1 や IKK α のキナーゼが細胞内において IRF-3 を活性化できないためと予想される。この MyD88 からのシグナルをこれらの IRF-7 キナーゼの活性化へつなぐ分子として TRAF3 が関与していることも明らかになってきた^{22,23)}。TRAF3 は MyD88 や IRAK1、そしておそらく IKK α とも会合しており、MyD88 を中心とした複合体から IRF-7 キナーゼ活性化そして IRF-7 経路を活性化へと分岐する役割を担っているとも考えられる。しかし TRAF3 の役割はかならずしも TLR9 に限ったものではなく、TLR3 や RIG-I/MDA5 下流の IRF-3 および IRF-7 のキナーゼである TBK1/IKKi (TANK-binding kinase 1/I κ B kinase-inducible) の活性化へつながる役割を持つことも示されている。

さらに細胞質内に存在しているオステオポンチン (intracellular osteopontin; Opn-i) が pDCs における I 型 IFNs の産生誘導に関与していることも報告されている²⁴⁾。Opn-i は pDCs において TLR9 刺激により Th1 (T helper type 1) の重要な転写因子として知られる T-bet (T-box expressed in T-cells) を介して発現増強される。Opn-i は MyD88 と会合しており、IRF-7 の活性化に関わっていることが示唆されている。実際に T-bet や Opn 欠損マウス由来の pDCs においては TLR9 による I 型 IFNs の産生誘導が障害される。

TLR9 を活性化させるリガンドとして CpG-K/B と CpG-D/A という合成オリゴ DNA が知られているが³²⁵⁾、CpG-D/A による刺激の方が CpG-K/B の場合と比較して圧倒的に I 型 IFNs の産生誘導が強力である。これらのリガンドに対し、異なった co-receptor が存在していることも考えられているが、少なくとも CpG-K/B と CpG-D/A とでは TLR9 との反応様式が異なっており、CpG-D/A はエンドソームにおいて持続して TLR9 と局在する。一方で、CpG-K/B はすぐにリソソームへ移行してしまうことが示されており²¹⁾、pDCs から大量の I 型 IFNs を産生するメカニズムとして何らかの時空間的な制御の存在が考えられている。

一方、IL-6 (interleukin-6) や TNF- α (tumor necrosis factor- α) などの炎症性サイトカイン誘導には NF- κ B や MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ経路の活性化が重要であるが、新たに IRF-3 や IRF-7 とは別の IRF 転写因子ファミリーメンバーである IRF-5 が協調して働いていることも示されている²⁶⁾。IRF-5 は MyD88 や TRAF6 と会合し、前述した複合体の一つのコンポーネントと考えられており、TLR9 刺激により、何らかの機序でリン酸化されて核移行する。IRF-4 は TLR9 刺激により発現増強され、この MyD88 と IRF-5 との会合を競合的に阻害する機序で作用する負の制御因子として考えられている²⁷⁾。IRF-5 に加え、TLR9 下流の NF- κ B 経路の活性化に関与するものとして IRF-8 が報告されている²⁸⁾。IRF-8 は MyD88 とは会合しないが TRAF6 と会合する。IRF-8 欠損マウス由来の DCs では、TLR9 刺激時に IKK α / β の活性化が抑制されるため、それに続く NF- κ B 経路が活性化されず、IL-6 および TNF- α の産生誘導が低下することが示されている。IRF-1 も MyD88 との会合が示されていたが、その役割は GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) で誘導した DCs (GM-DCs) に特異的にみとめられた²⁹⁾。IRF-1 遺伝子欠損マウス由来の GM-DCs の解析により、IRF-1 は CpG-K/B 刺激による IFN- β 、iNOS (inducible nitric oxide synthetase) および IL-12p35 の発現誘導に関与していることが示されている。このように、TLR9 を介するシグナルでの IRF ファミリー転写因子の役割は細胞の種類によって異なっていると考えられる。

このような TLR9 を介するシグナルの役割は、とくに DNA ウイルスによる感染時において pDCs から産生誘導される大量の I 型 IFNs によるところが大きい。例えば、単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus; HSV) I 型および II 型や、マウスサイトメガロウイルス (murine cytomegalovirus; MCMV) といった DNA ウイルス感染の場合、脾臓由来の pDCs における I 型 IFNs 産生誘導は TLR9 依存性である³⁰⁻³²⁾。一方で、同じ DNA ウイルスでも TLR9 非依存性に I 型 IFN 遺伝子発現を誘導する場合が報告さ

れている。HSV 感染の場合、骨髄由来の pDCs や cDCs (conventional DCs) の IFN- α の誘導は TLR9 や MyD88 には非依存的に行われることが示されており³³⁾、細胞質内の核酸認識受容体の関連性が示唆される。また MCMV 感染では肝臓局所に存在する pDCs は脾臓の pDCs とは異なり、TLR9 非依存性であるが、MyD88 には依存していることが示されており³⁴⁾、TLR9 以外の TLRs が関与する可能性が示唆されるが特定はされていない。このように、同じウイルスによる感染でも、細胞の種類が異なる場合や同じ種類の細胞でも由来する組織が異なる場合には使われる PRRs の種類も異なっていることが考えられる。おそらく細胞のタイプによってウイルスの侵入様式が異なるため、その状況に応じた PRRs が選択され、効率のよい自然免疫応答の誘導が行われるものと予想される。

一方で TLR9 は細菌の認識にも関わっていることが知られている。TLR9 シグナルを活性化する程度は、細菌のゲノムに CG ジヌクレオチドが含まれている割合と関連し、CG ジヌクレオチド含有率が高い *Pseudomonas aeruginosa* や *Mycobacterium tuberculosis* は、その含有率が低い *Streptococcus pneumoniae* や *Staphylococcus aureus* に比べて強く TLR9 シグナルを誘導する³⁵⁾。実際に TLR9 を介するシグナルは、マウスにおける *M. tuberculosis* 感染防御において TLR2 とともに重要であることが報告されている³⁶⁾。また *S. pneumoniae* によるマウスでの感染においては、感染初期における細菌の排除に TLR9 が重要であることが示唆されている³⁷⁾。さらに、*P. aeruginosa* や *Propionibacterium acnes* による感染防御の局面においても TLR9 シグナルが関連していることを示す報告がなされている^{38,39)}。TLR9 はマラリア感染を感知する役割も報告されており⁴⁰⁾、マラリア原虫が感染した赤血球内でヘモグロビンが分解されて生じるヘモゾイン (hemozoin) によって TLR9 は活性化される。

(2) 細胞質型 DNA センサー：DAI (DLM-1/ZBP1)

今まで、DNA 認識に関わる PRRs としては前述した TLR9 のみが知られていた。一方で、細胞質内に存在する DNA 認識に関わる PRRs も存在することが予想されていたが、その実体は明らかにされていなかった。この候補分子の一つとして DAI が同定された¹²⁾。DAI は様々な組織で発現しており、とくに腫瘍間質 (おそらくマクロファージなど) において発現が増強される DLM-1 として最初にクローニングされている⁴¹⁾。後に、そのタンパク質の N 末部分に Z 型 DNA (Z-DNA) の結合性が確認された領域 (Z α) とこれと相同性の高い領域 (Z β) がタンデムに存在していることが示され (図 1)、ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) と名付けられている⁴²⁾。しかしその他の部分については既存のモチーフと相同性を示さず、役割については十分に解

	膜貫通型	細胞質型
RNAセンサー	エンドソーム TLR3 TLR7/8 LRR LRR TIR TIR	CARD CARD ヘリカーゼ MDA5 RIG-I ヘリカーゼ LGP2
DNAセンサー	エンドソーム TLR9 LRR TIR	他のDNAセンサー? Zα Zβ D3 TID DAI (DLM-1/ZBP1)

図1 自然免疫系における核酸センサー分子の分類

自然免疫系においてはDNAおよびRNAの各々に対する認識受容体（センサー分子）が存在し、膜貫通型と細胞質型に分類できる。RNAセンサーの膜貫通型にはTLR3, TLR7/8があり、細胞外ドメインのロイシンリッチリピート（leucine-rich repeat; LRR）を介してリガンドを認識し、それぞれTIRドメインでアダプター分子（TLR3はTRIF/TICAM-1; TLR7/8はMyD88）と会合する。RNAセンサーの細胞質型にはMDA5, RIG-I, LGP2が存在する。いずれもヘリカーゼドメインを有しており、さらにRIG-IとMDA5には二つのCARDドメインがある。一方、DNAセンサーの膜貫通型にはTLR9が存在し、やはりTIRドメインでMyD88アダプター分子と会合する。DNAセンサーの細胞質型についてはDAI（DLM-1/ZBP1）が一つの候補分子となっている他に未知なる受容体の存在が示唆されている。（TLR: Toll-like receptor, TIR: Toll/IL-1 receptor, MDA5: melanoma differentiation-associated gene 5, RIG-I: retinoic acid-inducible gene-1, LGP2: laboratory of genetics and physiology 2, CARD: caspase recruitment domain, DAI: DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, TRIF: TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β , MyD88: myeloid differentiation marker 88, TID: TBK1-IRF-interacting domain）

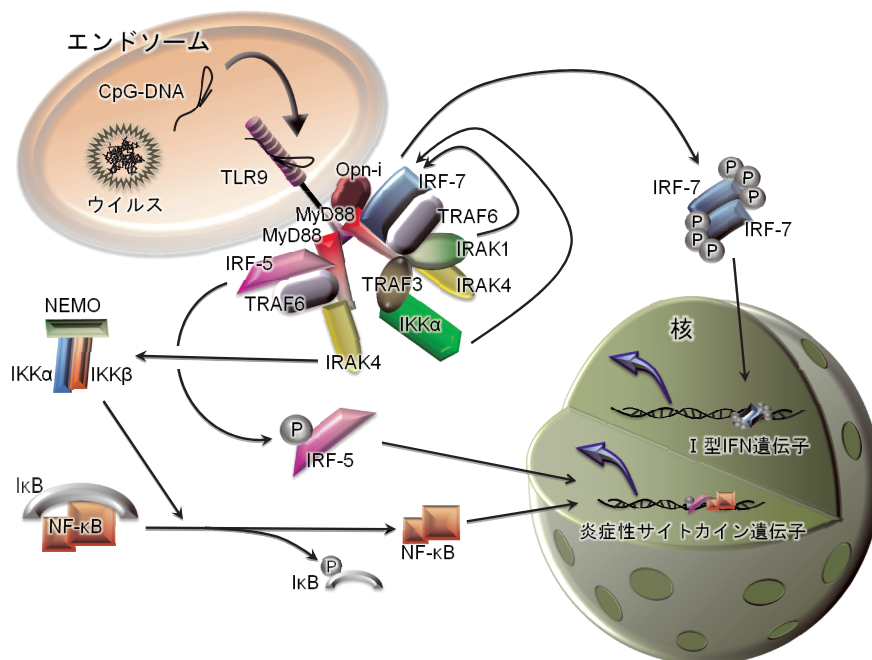


図2 TLR9を介するシグナル経路

膜貫通型のDNAセンサーであるTLR9は、ウイルスや細菌由来のDNAに特徴的な非メチル化CpGモチーフを認識し、アダプター分子MyD88を中心とした複合体を形成する。この下流には、IRF-7を介したI型IFNsを発現誘導する経路と、NF- κ BやIRF-5を介した炎症性サイトカインを発現誘導する経路の二つが存在する。前者においてIRF-7キナーゼとしてIRAK1とIKK α が考えられている。TLR9はおもにpDCsに発現が高い。（IRF: interferon regulatory factor, TRAF: TNF receptor associated factor, IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase, IKK: inhibitory kappa B kinase, Opn-i: intracellular osteopontin, NEMO: NF- κ B essential modulator, IkB: inhibitor kappa B）

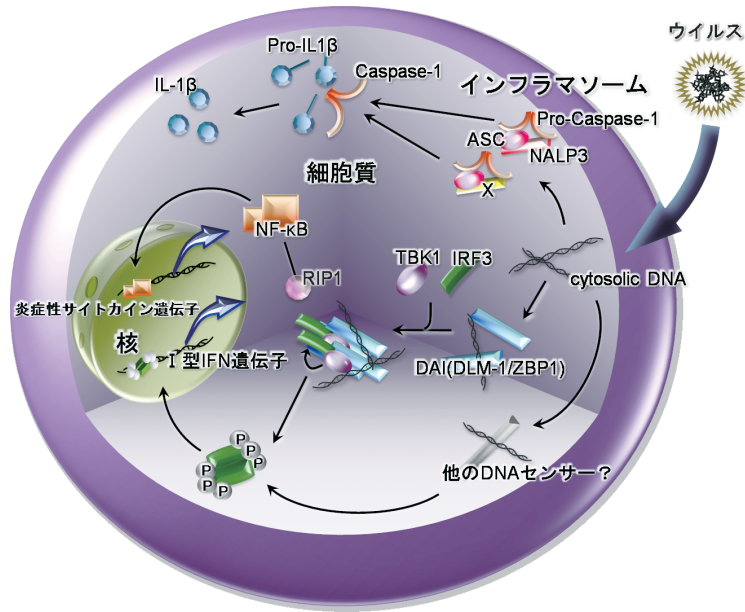


図3 細胞質型 DNA センサー分子と下流のシグナル経路

DNA センサーの候補分子 DAI (DLM-1/ZBP1) は、細胞質のウイルス DNA を認識し、TBK1 や IRF-3 とともに複合体を形成した後、IRF-3 がリン酸化・活性化されて核移行することで I 型 IFN 遺伝子の発現を誘導する。これとは別に、RIP-1 や NF-κB を介したシグナル伝達により炎症性サイトカインが産生される経路も存在する。また、アデノウイルス感染時には、NLR ファミリーメンバーである NALP3 が、通常の B-DNA ではおそらく別の NLR メンバー (X) がアダプタータンパク質である ASC や caspase-1 とともにインフラマソームを形成して IL-1β の産生が誘導される。(TBK1: TANK-binding kinase 1, NF-κB: nuclear factor-kappa B, NLR: NOD-like receptor, NALP3: nacht domain-, leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein 3, ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, IL: interleukin, RIP1: receptor interacting protein 1)

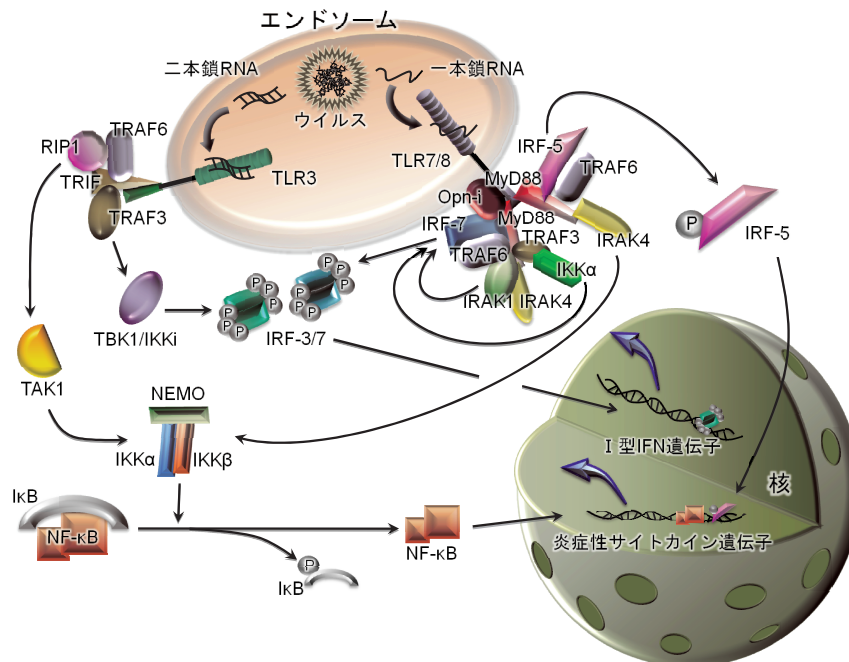


図4 膜貫通型 RNA センサー分子と下流のシグナル経路

TLR3, TLR7/8 はエンドソームに局在する膜貫通型タンパク質であり、いずれも主にウイルス由来の RNA を認識する。TLR7/8 シグナルは TLR9 の場合と同様に、MyD88 アダプター分子を中心とした複合体を介して、IRF-7-IFN 経路と IRF-5/NF-κB-炎症性サイトカイン遺伝子発現経路の二つがある。一方、TLR3 シグナルは TLRs の中で唯一 MyD88 にほとんど依存しない。TLR3 はウイルス RNA を認識すると TRIF/TICAM-1 と会合する。この下流では、TRAF6-RIP1-TAK1-NF-κB を介して炎症性サイトカイン遺伝子を発現誘導する経路と、TBK1/IKKi や IRF3/7 を介して I 型 IFNs を産生する経路の二つがある。(TBK1/IKKi: TANK-binding kinase 1/ IκB kinase-inducible, RIP1: receptor interacting protein 1)

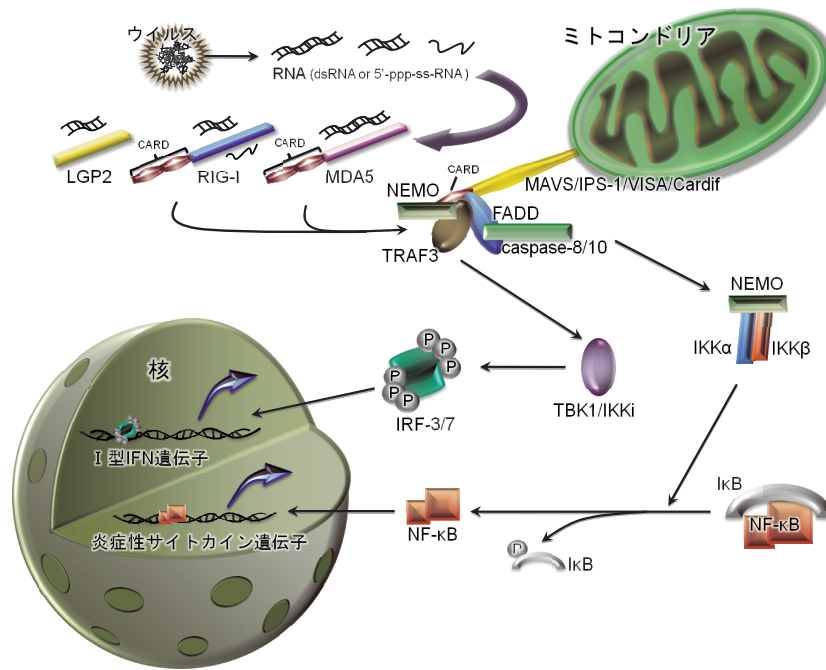


図5 細胞質型 RNA センサー分子と下流のシグナル経路

細胞内にウイルスなどの RNA が存在すると、細胞質型 RNA センサーである MDA-5 や RIG-I がそのヘリカーゼドメインを介して二本鎖 RNA (ds-RNA) を認識 (RIG-I は一本鎖 RNA である 5'-ppp-ss-RNA も認識する) する。この結果、センサー分子は MAVS/IPS-1/VISA/Cardif と CARD ドメインを介して会合し、さらに TBK1/IKKi 依存的に IRF-3/7 がリン酸化されて I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導される。一方で、FADD-caspase-8/10 依存性に IKK 複合体が活性化され NF-κB 経路を介して引き続く炎症性サイトカイン遺伝子発現誘導が行われる。LGP2 も RIG-I /MDA5 と同様ヘリカーゼドメインを持つが、CARD ドメインを持たないため、基本的には他の RIG-I および MDA5 の経路を負に制御していると考えられている。(MAVS: mitochondrial antiviral signaling, IPS-1: IFN-inducing β promoter stimulator-1, VISA: virus-induced signaling adaptor, Cardif: CARD adaptor inducing IFN-β, ds-RNA: double-stranded RNA, 5'-ppp-ss-RNA: 5'-triphosphate single-stranded RNA, FADD: Fas associated protein with death domain)

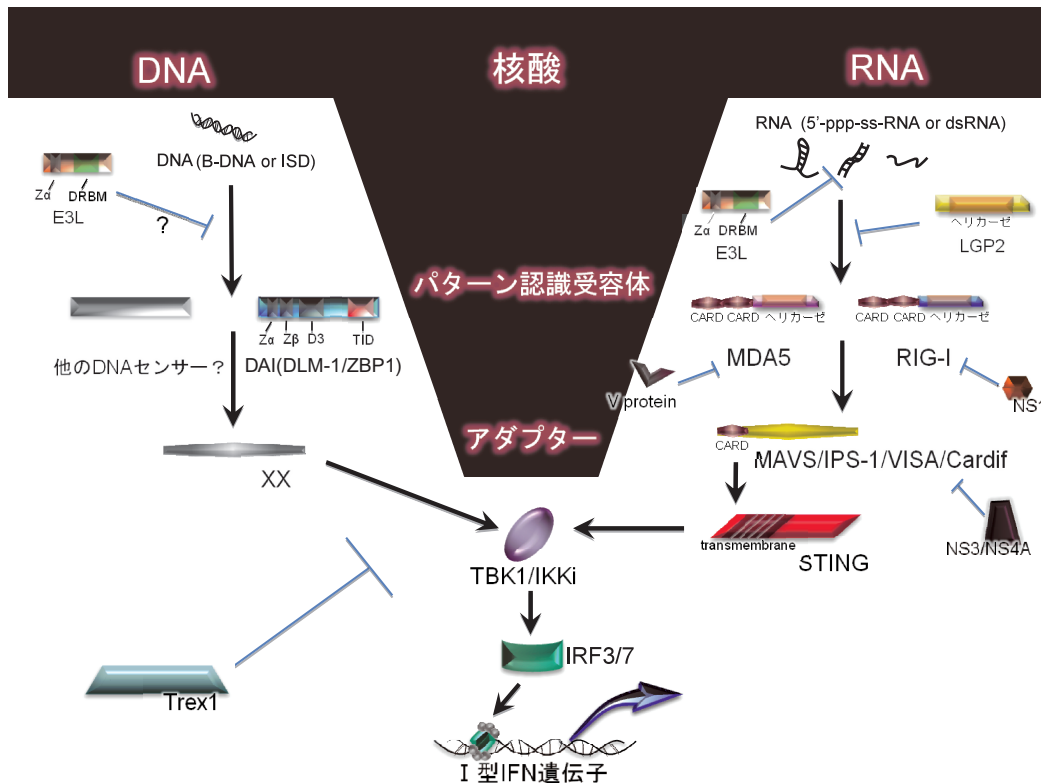


図6

析されていなかった。このような DNA 結合領域を有していることに加え、DLM-1/ZBP1 は細胞質に局在していることがわかっており、さらに B 型 DNA (B-DNA; ここでは poly(dA-dT) : poly(dT-dA) を使っている) を細胞質へ投与することにより、I 型 IFN 発現を介して DLM-1/ZBP1 の発現が増強されることが示された。これに基づき、DLM-1/ZBP1 分子の細胞質型の DNA センサーとしての可能性が調べられた。結果として、今回、細胞質に存在する DNA と会合し、その下流で IRF 転写因子を活性化し、I 型 IFNs の遺伝子発現を誘導することが示されたため、新たに DAI (DNA-dependent activator of IRFs) という名前を付けている。

マウス線維芽細胞株である L929 細胞において、まずレトロウイルスを用いた系で DAI (DLM-1/ZBP1) を発現させたところ、細胞質に B-DNA をトランスフェクトした際に誘導される IFN- β および IFN- $\alpha 4$ の発現レベルが顕著に増強した。逆に L929 細胞において siRNA (small interfering RNA) を用いて DAI (DLM-1/ZBP1) の発現を抑制した場合、IFN- β の発現誘導は有意に抑制を示した。同様の DAI (DLM-1/ZBP1) ノックダウンの条件下において、DNA ウイルスである HSV による感染時の IFN- β の発現誘導がおおよそ 50% 抑制されたのに対し、RNA ウイルスである NDV (Newcastle disease virus) による感染時の IFN- β の発現誘導は影響されなかった。また、これらの結果と一致して、I 型 IFNs の遺伝子発現誘導に重要な IRF-3 転写因子の活性化については、その指標となる IRF-3 の二量体形成が DAI (DLM-1/ZBP1) をノックダウンした細胞で低下する結果となった。さらに DAI (DLM-1/ZBP1) は細胞質 B-DNA により誘導される IRF-3 転写因子の活性化および I 型 IFNs の誘導のみならず、NF- κ B 経路の活性化や IL-6 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの発現誘導にも関与している結果が示された。

最近、DAI (DLM-1/ZBP1) を介する NF- κ B 経路の活性

化機構の一部に関する新たな知見が報告されている。RIP1 (receptor-interacting protein 1) は TRIF を介する NF- κ B 経路の活性化や、RIG-I などの RLRs を介する NF- κ B 経路や IRF-3/7 経路の活性化に重要であることがこれまで示されてきたが、この RIP1 と会合するモチーフが DAI (DLM-1/ZBP1) の分子内に見出された⁴³⁾。中でも DAI (DLM-1/ZBP1) の D3 領域内に見出された RHIM (RIP homotypic interaction motif) を介して RIP1 と会合することで、NF- κ B 経路の活性化にも関与していることが示されている (図 3)。さらにこの場合の RIP1 を介する NF- κ B 経路の活性化を RIP3 が増強する役割があることも示されている。

次に、DNA と DAI (DLM-1/ZBP1) との会合について、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET; fluorescence resonance energy transfer) 解析および共沈実験を用いて検討したところ、細胞内および *in vitro* の系において DAI (DLM-1/ZBP1) と DNA との会合が示された。大腸菌で調整した DAI (DLM-1/ZBP1) のリコンビナントタンパク質を用いた共沈実験においても DNA との会合が確認された。実際に DNA 結合に必要な領域は DAI (DLM-1/ZBP1) の N 末側に存在している既知の α および β の領域に加え、その C 末側に新たに見出された約 80 アミノ酸に相当する領域 (図 1 中、D3 領域) が DNA との会合に主体的な役割を担っている部分であることが示唆された^{12,44)}。これまでに細胞質 B-DNA による I 型 IFNs の遺伝子発現誘導には IRF-3/IRF-7 のキナーゼである TBK1 が重要であることが示されていた¹⁰⁾。そこで DAI (DLM-1/ZBP1) との関連性を検討したところ、B-DNA の刺激依存的に DAI (DLM-1/ZBP1) の C 末側に存在する約 100 アミノ酸から成る領域 (図 1 中、TBK1-IRF-interacting domain; TID) を介して TBK1 のみならず IRF-3 も会合することが示された。

さらに DAI (DLM-1/ZBP1) を人工的に二量体化させることで、B-DNA による刺激をしなくとも IFN- β の発現誘導が見られることから、おそらく DAI (DLM-1/ZBP1) 分

図 6 細胞質型核酸センサーにより活性化される I 型 IFN 遺伝子発現誘導経路と各種制御因子

細胞質に存在する核酸をパターン認識受容体 (PRRs) が認識することにより I 型 IFN 遺伝子が産生誘導される。細胞質の核酸認識機構には DNA 認識と RNA 認識の二つの大きな経路があり、前者 (図の左側) では現在のところ DAI (DLM-1/ZBP1) が一つの候補であるが、その他に DNA センサー分子の存在が示唆されている。また、この経路でのアダプター分子はまだ明らかではない (ヒトでは MAVS/IPS-1/VISA/Cardif の一部関与も示唆)。STING が正の調節因子として関与することが報告されているが、そのメカニズムは不明である。なお、Trex1 は 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、ISD 経路を負に制御していることが示唆されている (詳細は本文参照)。またこの DNA 経路に対して ADAR1 が負の制御をしていることが示唆されている。一方、細胞質内 RNA 認識機構としては (図の右側) RIG-I/MDA5 のヘリカーゼドメインにより RNA が認識されると、MAVS/IPS-1/VISA/Cardif が CARD ドメインを介して会合し、STING、TBK1/IKKi 依存的に IRF3/7 がリン酸化され I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導される。STING は RIG-I 依存性の経路でのみ働き、小胞体で TRAP 複合体 (SSR2/TRAP β) やトランスロコンのコンポーネント (SEC61 β) と会合することで関与している。LGP2 は負の制御作用の他に正の作用も予想されている。DNA および RNA 認識経路ともに TBK1/IKKi 依存的に IRF-3 や IRF-7 がリン酸化され I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導される。これらの二つの経路を標的とした代表的なウイルス回避機構としてウイルスタンパク質である E3L (DNA 経路を阻害することが予想)、NS1 (RIG-I を阻害)、V protein (MDA5 を阻害)、NS3/NS4A (MAVS/IPS-1/VISA/Cardif を切断して阻害) などが挙げられる¹⁰⁰⁾。(Trex1: 3' repair exonuclease 1, STING: stimulator of interferon genes, ISD: IFN-stimulatory DNA, 5'-ppp-ss-RNA: 5'-triphosphate single-stranded RNA, ds-RNA: double-stranded RNA, DRBM: double-stranded RNA binding motif, NS: nonstructural)

子が集合体を形成することが下流のシグナル経路の活性化に必要であると考えられる⁴⁴⁾。以上の結果より、DAI (DLM-1/ZBP1) は細胞質内に存在する B-DNA と結合し、おそらく B-DNA と複数の DAI (DLM-1/ZBP1) 分子により複合体を形成する結果、そこへ IRF-3 と TBK1 がリクルートし、それを足場として IRF-3 が TBK1 によってリン酸化を受け、二量体化し、核移行することで I 型 IFNs の遺伝子発現誘導を引き起こすというモデルが考えられる (図 3)。また、この際の DAI (DLM-1/ZBP1) 分子と TBK1/IRF-3 との会合には DAI (DLM-1/ZBP1) 分子自体のリン酸化が関与している可能性を示唆する結果も得られている⁴⁴⁾。一方、DAI (DLM-1/ZBP1) 分子を活性化するには、B-DNA の長さが 500bp 以上ないと効率のよい活性化が起こらない他は、リガンド特異性はあまり厳密ではないようである。

DAI (DLM-1/ZBP1) と同様に IFN 誘導遺伝子である ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA) は、DAI (DLM-1/ZBP1) の N 末側にみられる α および β 領域と相同性のある領域を持っていることが知られている。ADAR1 はその他に、三つの二本鎖 RNA 結合領域と脱アミノ化酵素ドメインも有しており、ウイルス二本鎖 RNA に対してはアデノシンをイノシンへ置換して変異を生じることにより、抗ウイルス防御作用を示すことが示唆されていた。例えばポリオマウイルスやデルタ型あるいは C 型肝炎ウイルスなどの感染時に ADAR1 はウイルスゲノム RNA に対してウイルス複製を阻害する。ADAR1 の遺伝子欠損マウス由来の細胞を解析した結果、ADAR1 は細胞質 DNA 刺激による IFN- β の発現誘導に対して抑制的に働く負の調節因子であることが示唆されている。一方で、ワクシニアウイルスや痘瘡 (天然痘) ウイルスなどのオルソポックス属ウイルスのタンパク質の一つである E3L は α 領域を一つ有しているが、E3L を過剰発現させることで、細胞質 DNA 刺激による IFN- β の発現が部分的に抑制される結果が示されている⁴⁴⁾。このことから、ウイルスタンパク質である E3L は宿主の細胞質 DNA に対する IFN 応答への阻害作用を示し、ウイルス防御システムから回避する役割をすることが予想される。いずれにしてもこれらの二つの因子による抑制効果が実際に ZBP 領域を介した細胞質 DNA センサーの活性化阻害によるものかについては今後の課題である。

細胞質型 DNA センサーの役割は、細胞がウイルスや細菌に感染して微生物由来の DNA が細胞質内に出現した際にこの DNA と結合することで微生物の侵入を感知し、その下流の様々なシグナル経路を活性化することにより、感染初期の自然免疫応答を引き起こすことと予想される。微生物感染に関与する DNA センサーとしては、これまで TLR9 のみが知られている。しかしながら、TLR9 非依存

的に I 型 IFN 応答などの自然免疫応答が活性化される報告が多くなされている。例えば、*Listeria monocytogenes* などの細菌は、リステリオリジン O (LLO) というタンパク質を発現しており、マクロファージによって貪食された後、この LLO による膜融解活性によって細胞質内へ移行することが知られている。*L. monocytogenes* 感染によって I 型 IFN 産生が認められるが、TLR9 や NODs (nucleotide binding oligomerization domains) 非依存性に行われることが示されており、おそらく細胞質内においてリステリア由来の DNA がセンサー分子によって認識されと考えられている¹¹⁾。その他に、IV 型分泌装置 (type IV secretion system; TFSS) を有する病原性の高い細菌は毒性因子をはじめとするタンパク質や DNA を宿主の細胞質内へ移入させるという特色を有することが知られているが、たとえば、IV 型分泌装置を持つ *Legionella pneumophila* が感染した細胞では、細胞内に移入された細菌由来の DNA によって I 型 IFN 応答が引き起こされることが示されている¹¹⁾。その他の TFSS を有する赤痢菌 (*Shigella flexneri*) や原虫のトリパノソーム (*Trypanosoma cruzi*) に感染した細胞が I 型 IFN 発現誘導を引き起こすことも報告されている⁴⁵⁾が、実際にどのような DNA センサーを介する認識により、IFN 応答が引き起こされるのかは明らかではなく、今後の重要な課題であると認識される。

一方、前項でも述べたように、HSV 感染による IFN- α 産生は脾臓由来の pDCs においては TLR9 に依存しているのに対し、骨髄由来の pDCs では TLR9 非依存的経路の存在が示されている³³⁾。この点において DAI (DLM-1/ZBP1) の関与も予想されるが、少なくとも DAI (DLM-1/ZBP1) 遺伝子欠損マウス由来の骨髄由来の pDCs での B-DNA 刺激における IFN- β の発現には異常がみとめられなかった。最近、DAI (DLM-1/ZBP1) の cell-type specific な役割あるいは redundant な役割が示唆される結果が報告されている。前述したように、マウスの線維芽細胞株である L929 細胞において siRNA を用いた解析では、HSV 感染による IFN- β 遺伝子発現誘導は部分的に抑制されるという結果が得られているが¹²⁾、マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) では siRNA による DAI (DLM-1/ZBP1) 発現抑制の影響がほとんどみとめられなかった⁴⁴⁾。また、DAI (DLM-1/ZBP1) 欠損マウス由来の MEFs や DCs において細胞質 B-DNA 刺激による IFN- β の発現は野生型細胞と比べ有意な差がみとめられなかった⁴⁶⁾。しかし一方では、マウスの内皮細胞株である SVEC4-10 細胞において、siRNA により DAI (DLM-1/ZBP1) をノックダウンさせた場合、B-DNA による IFN- β の発現は L929 細胞よりも顕著に抑制されるという結果も報告されている⁴³⁾。したがって、DAI (DLM-1/ZBP1) は細胞の種類や状況において特異的な役割を担っている可能性が示唆されている。今

後、DAI (DLM-1/ZBP1) 欠損マウスなどの解析を通してどのような細胞や組織でまたどのような微生物による感染において DAI (DLM-1/ZBP1) の役割があるのかについて詳細な検討が必要であると認識されるとともに、さらにこのような細胞特異性の機序についても興味深い課題と考えられる。

同時にこれらの結果は、DAI (DLM-1/ZBP1) 以外の細胞質 DNA センサーの存在を予想させる。これに関連して、Medzhitov らのグループでは人工的に合成した 45 塩基からなる ISD (IFN-stimulatory DNA) を使って実験をしている。この場合、B-DNA を細胞内へ投与した場合と比較すると、同様に IRF-3 を介する I 型 IFN 誘導経路は活性化されるが、NF- κ B 経路や MAP キナーゼ経路は全く活性化されないという結果が示されている¹⁰⁾。このことは、B-DNA 刺激による場合とは異なるセンサーによって認識されている可能性も否定できない。また、Z-DNA は B-DNA と異なり、その細胞内投与による I 型 IFN 誘導は非常に弱いに対し、CXCL10 (IP-10; interferon- γ -inducible protein-10 kDa) や CCL5 (RANTES; regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) のケモカイン遺伝子に関しては B-DNA に匹敵するほどの発現をみとめる。この場合の Z-DNA は、DAI (DLM-1/ZBP1) の Z α 領域を介して誘導される可能性も予想されるが、一方では、Z-DNA と B-DNA とでは認識される受容体が異なる可能性も考えられる。

【II】 RNA センサー分子

自然免疫システムにおける RNA 認識機構は、DNA 認識機構に比べ研究が進んでおり、膜貫通型および細胞質型ともに多くのセンサー分子が同定されて、その下流シグナルが解析されている。RNA センサーを介するシグナルは DNA センサーの場合と活性化機序は異なるが、いずれの場合も NF- κ B と IRF 転写因子の活性化を来とし、各々、炎症性サイトカインおよび I 型 IFN 産生を誘導することが共通している。本項目においては、特に細胞質 RNA センサーを主体に解説する。膜貫通型 RNA センサーである一連の TLRs に関する詳細については本特集松本・瀬谷らの総説をご参照頂きたい。

(1) 膜貫通型 RNA センサー：TLR3, TLR7, TLR8

膜貫通型の RNA センサーは、主にエンドソームにおいてウイルス由来の二本鎖 RNA を感知するセンサー分子である。その一つである TLR3 は、West Nile virus (WNV) や Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) をはじめ、A 型インフルエンザウイルスやレオウイルス科に属するウイルスによる感染によって活性化され、サイトカイン産生が誘導されることが報告されている。TLR3 を介する

シグナルも他の核酸センサーの場合と共通して I 型 IFNs を産生誘導するが、TLR9 や TLR7/8 が MyD88 依存性経路であるのに対し、TRIF/TICAM-1 (TIR domain-containing molecule 1) 依存性である (図 4)^{47, 48)}。リポ多糖類 (LPS; lipopolysaccharide) などの認識に関与する TLR4 も同様に TRIF 依存性であるが、この場合 TRIF アダプター分子と TLR4 をつなぐ役目をする TRAF がさらに必要となる。また興味深いことに、TLR4 は IFN- β のみの発現を誘導するのに対して TLR3 は IFN- α 及び IFN- β ともに発現を誘導する。この違いは、おそらく、前者では IRF-3 が主体的に活性化される一方で、後者では、IRF-3 に加え、IRF-7 の活性化も同様に引き起こされるためと予想される。また TLR4 は細胞表面に発現しているが、TLR3 はエンドソームに局在しており、両者のリガンド認識の場所の違いも関与しているのかも知れない。TRIF は RIP と TRAF6 に会合しており、これらは協調して NF- κ B 経路を活性化し、炎症性サイトカインの産生誘導を引き起こす。一方で、TRIF は TRAF3 を介することで、IRF-3/7 のキナーゼである TBK1 を活性化し、その結果、IRF-3/7 が二量体を形成し、核移行することで、IFN- α/β 遺伝子の発現が誘導されることになる。TLR3 以外の既知の全ての TLRs が MyD88 と会合し、MyD88 依存性のシグナルを生じるのに対し、TLR3 シグナルはほとんど MyD88 には依存していないのが特徴である。

一方、TLR7 (マウス) および TLR8 (ヒト) はエンドソームに局在しており、ウイルス由来の一本鎖 RNA を認識するセンサー分子である。一本鎖 RNA ウイルスである HIV (human immunodeficiency virus)、A 型インフルエンザウイルスまたはセンドイウイルス (SeV) がこの TLR7/8 を介して感知されることが報告されている。TLR7/8 は TLR9 サブファミリーを形成しており、TLR9 の項で述べたように、NF- κ B 経路も IFN 誘導経路とともに MyD88 依存性であること、さらにこれらの受容体は特に pDCs での発現が高く、これらのリガンドによって大量の I 型 IFN 産生誘導が引き起こされることが特徴である。この場合の IFN 遺伝子発現も TLR9 と同様の MyD88 を中心とするシグナル分子複合体を足場として IRF-3 ではなく IRF-7 のみが活性化されるという仕組みが考えられている (図 4)。また一方で同様に NF- κ B および IRF-5 も活性化を受け、炎症性サイトカインの遺伝子発現誘導が行われる。

(2) 細胞質型 RNA センサー：RIG-I, MDA5, LGP2

TLR3 が細胞外あるいはエンドソームに存在する二本鎖 RNA を認識するのに対し、細胞内へ移行したウイルスゲノム由来の二本鎖 RNA や複製された二本鎖 RNA を細胞質で認識するのが RIG-I に代表される RNA ヘリカーゼである (図 5)。RIG-I は N 末に二つの CARD (caspase recruit-

ment domain) と C 末に一つの DExD/H box ヘリカーゼドメインを有している。同様の構造を持つものに MDA5 も知られており、さらに DExD/H box ヘリカーゼドメインのみを有する LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) も併せて RLR ファミリーを形成している。

RIG-I と MDA5 はともに共通したアダプター分子である MAVS/IPS-1/VISA/Cardif⁽⁴⁹⁻⁵²⁾ の N 末に一つ存在する CARD ドメインを介して、homotypic に会合する。MAVS/IPS-1/VISA/Cardif はミトコンドリアの外膜に局在しており、おそらくここを足場として、MAVS/IPS-1/VISA/Cardif は TRAF3 と結合し、TBK1/IKKi キナーゼの活性化および IRF-3/7 のリン酸化を介して、I 型 IFN 遺伝子発現を誘導する (図 5)。一方で、MAVS/IPS-1/VISA/Cardif は CARD ドメインではない C 末の領域を介して FADD (Fas associated protein with death domain) や caspase-8/-10 と会合し、NF- κ B 経路を活性化する⁽⁵³⁾ (図 5)。FADD がウイルス感染による I 型 IFN 発現誘導に必須の因子であるかは議論の分かれるところである^(54,55)。一方、NEMO (NF- κ B essential modulator) は IRF および NF- κ B 両経路の活性化に重要である⁽⁵⁶⁾。最近、RIG-I タンパク質の修飾が RIG-I を介する抗ウイルス応答シグナルを調節することについて報告された⁽⁵⁷⁾。E3 ユビキチンリガーゼである TRIM (tripartite motif) 25 が RIG-I の N 末端の CARD 領域に会合することで、Lys63 を介するユビキチン化を起し、その結果、RIG-I を介する I 型 IFN 産生誘導が促進される⁽⁵⁷⁾。

RIG-I および MDA5 は線維芽細胞や cDCs における I 型 IFN 遺伝子の発現誘導に関して主体的な役割を担っており、多くの RNA ウイルスはこれらのセンサー分子依存的に IFN 誘導することが知られている。一方、pDCs においては、インフルエンザウイルスや SeV、水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus; VSV) などの RNA ウイルスによる I 型 IFN 発現誘導は、RLR ファミリーメンバーではなく、TLR7/8 が主体的に働くことが知られている⁽⁵⁸⁾。おそらく pDCs においては細胞質内へウイルスが移行することができないことが原因と考えられていた。しかし一方で、積極的にウイルス由来の RNA を TLR7 の局在しているエンドソームへ移送するメカニズムが示唆されている。VSV がマウス pDCs に感染した場合、細胞質で複製した RNA 中間産物をオートファゴソームの系を介してエンドソーム内へ移送することで、TLR7 によって認識され、細胞内へシグナルを伝達することが報告されている⁽⁵⁹⁾。一方、RIG-I 経路に対しては、オートファジーのプロセスに重要な因子である Atg5-Atg12 複合体は RIG-I や IPS-1 に会合し、I 型 IFN 産生誘導に対して抑制的作用することが報告されている⁽⁶⁰⁾。

RIG-I と MDA5 は、ともに二本鎖 RNA を認識するが、その RNA の長さという点で、リガンド特異性には違いが

みとめられる。RIG-I が 1 kbp 以下の短い二本鎖 RNA の認識に関わるのに対し、MDA5 はより長い 3 kbp 以上のものを認識する⁽⁶¹⁾。また、RIG-I は選択的に一本鎖 RNA (5'-triphosphate RNA) を認識することも知られている⁽⁶²⁾。宿主の mRNA は 5'側に 7-メチルグアノシン CAP 構造があり、また tRNA (transfer RNA) や rRNA (ribosomal RNA) の 5'側の 3 リン酸は切断されて除かれたり、rRNP (ribosomal ribonucleoprotein) と複合体を形成することで RIG-I には認識されないような仕組み⁽⁸⁾になっており、RIG-I は微生物由来の RNA を特異的に認識する興味深い特性を有している。

実際にこのようなりガンド特異性の違いは認識するウイルスの種類に反映されているようである。線維芽細胞や cDCs では、VSV による I 型 IFN 産生誘導は RIG-I 依存性であり、一方、脳筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus; EMCV) は MDA5 依存性であることが示されている⁽⁵⁸⁾。これと一致して、EMCV 感染細胞では、ゲノムの複製中間体由来と考えられる長さ 2 kb くらいの二本鎖 RNA が検出されるのに対し、VSV 感染細胞では、おそらく DI (defective interfering) particles 由来のものと予想されている 1 kb くらいの短い二本鎖 RNA が検出されることが示されている⁽⁶¹⁾。また、感染過程で二本鎖 RNA を作らないインフルエンザウイルスはその一本鎖 RNA (5'-triphosphate RNA) を RIG-I によって認識されることが考えられる⁽⁶¹⁾。一方、RIG-I と MDA5 がともに redundant な役割を担っている場合としては、Dengue virus type 2 や reovirus 感染による場合が知られている⁽⁶³⁾。さらに、RLR ファミリーは必ずしも RNA ウイルスのみの認識に関与しているだけではなく、DNA ウイルスの感染においても関与している。たとえば、EBV 由来の EBERs が細胞質型 RNA センサーの一つである RIG-I を介して I 型 IFN 産生を誘導するという報告がある⁽¹³⁾。また、E3L を欠損させたワクシニアウイルス (vaccinia virus; VV) は RIG-I-MAVS 依存性に IFN- β をはじめ、IL-6 などのサイトカイン誘導がみとめられることも示されている^(64,65)。このように RLR ファミリーは多くのウイルス感染細胞において、その認識を介した自然免疫応答に関与していることが明らかになりつつある。

一方で興味深いことに、インフルエンザウイルスのウイルスタンパクである NS1 (nonstructural protein 1) タンパク質は二本鎖 RNA 結合能を有しており、PKR (protein kinase double strand RNA dependent) や 2',5'-OAS (oligoadenylate synthase) の活性化に対しては阻害作用を示す一方で、この NS1 が示す IFN 産生の阻害作用は二本鎖 RNA 結合能には非依存的な機序によるものであることが示されている。すなわち、NS1 は MDA5 ではなく、選択的に RIG-I に会合することで、RIG-I による一本鎖 RNA (5'-triphosphate RNA) への結合を拮抗する⁽⁶⁶⁾。逆にこのこと

はインフルエンザウイルスの感染防御にとって RIG-I が大変重要な役割を担っていることがうかがえる。C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) も RIG-I/MDA5 シグナルを阻害する。HCV ゲノム NS3/4A からつくられるセリンプロテアーゼは、RIG-I および MDA5 を介するシグナルに共通するアダプター分子である MAVS /IPS-1 /VISA /Cardif を切断することにより阻害作用を示す⁴⁹⁾ (このプロテアーゼは TLR3 のアダプターである TRIF/TICAM-1 に対しても切断活性があることが示されている)⁶⁷⁾。

第 3 のメンバーである LGP2 は、シグナル伝達に重要な CARD ドメインが欠如しているという特徴から RIG-I や MDA5 に対する負の制御因子としての役割が考えられていた。実際に、LGP2 を過剰発現させることで、SeV や NDV による I 型 IFN 誘導や NF- κ B 経路の活性化が阻害される。LGP2 の作用は、より RIG-I に対して選択的なものであることも示唆されている。RIG-I が優位な認識受容体となる VSV 感染に対しては、*Lgp2* 遺伝子欠損マウスの MEFs における I 型 IFN 産生は野生型 MEFs に比べ増強するが、MDA5 依存性の EMCV 感染においては野生型 MEFs と同じように I 型 IFN は産生される⁶⁸⁾。その機序として、RIG-I の多量体化に必要な領域である RD (repressor domain) と相同の領域が LGP2 にも存在しており、これを介して RIG-I に結合することでその homotypic な会合を阻害する可能性が考えられている⁶⁹⁾。一方で、*Lgp2* 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージでは野生型細胞に比べ、むしろ I 型 IFN 産生が低下する。これは LGP2 が単に負の制御因子としてのみの役割ではなく、逆に抗ウイルス応答に関わっている可能性も示唆される⁶⁸⁾。

(3) その他の細胞質 RNA 認識分子

(i) 2',5'-OAS と PKR

IFN 処理した細胞由来の無細胞系において二本鎖 RNA (double stranded RNA; ds-RNA) によってタンパク質合成が阻害されることが知られていたが、このような背景において PKR と 2',5'-OAS が発見された。ともに IFN 誘導遺伝子であり、コードされるタンパク質はともに、ds-RNA によって活性化される。また両分子ともその下流での直接的な IRF 転写因子の活性は報告がなく、I 型 IFN 遺伝子発現誘導への関与よりも以下に示すようなタンパク質合成阻害作用の役割が大きいと考えられる⁷⁰⁾。

活性型 2',5'-OAS は、ATP を基質とし、2',5'-オリゴアデニル酸が合成される。次に 2',5'-オリゴアデニル酸が RNaseL (ribonuclease L) を活性化し、RNA を分解する⁷¹⁾。2',5'-OAS は複数のアイソフォームが知られており、一部のウイルスのとくに感染初期に抗ウイルス防御の役割を担っていることが示されている。たとえば、マウス *Oas1b* は一本鎖 RNA ウイルスである WNV 感染細胞におけるウ

イルス複製を阻害することやその他の flavivirus 科のウイルス (yellow fever, Dengue など) に対するマウスの感受性と *Oas1b* 遺伝子との関連性が示されている⁷²⁾。その他、ヒト *OAS3* がアルファウイルスに属する特定のウイルスの感染防御に関与しているなどが報告されている。また、ポリオウイルスや EMCV などの RNA ウイルスにおける IFNs の抗ウイルス効果の一部が 2',5'-OAS システムによって担われている。

PKR はセリンスレオニンキナーゼドメインを有しており、ds-RNA と結合することで PKR は 446 番目のスレオニンにおいて自己リン酸化を起こす。これによって活性化した PKR は二量体を形成することでタンパク質合成開始因子である eIF-2 (eukaryotic initiation factor-2) の α サブユニットをリン酸化し、その結果タンパク質翻訳阻害が生じる⁷³⁾。前述した VV の E3L タンパク質は Z α 領域の他に、ds-RNA 結合領域を一つ有していることから ds-RNA を結合させて PKR から隔離することで阻害的に作用することが考えられている⁷⁴⁾。同様の ds-RNA 結合活性を示すウイルスタンパク質として、インフルエンザウイルス由来の NS1 が知られている。NS1 は前述したような ds-RNA 結合活性に非依存的な RIG-I 活性化の抑制作用とは別に、その ds-RNA 結合活性依存的 PKR のみならず、同様に 2',5'-OAS の作用も阻害する⁷⁵⁾。一方、もう一つの VV 由来の K3L タンパク質は eIF-2 α のデコイとして働き、PKR の自己リン酸化および eIF-2 α へのリン酸化プロセスを障害する⁷⁶⁾。HCV が発現する NS5A は、PKR と会合することで PKR のキナーゼ活性を阻害することが示されたが、HCV 感染患者の IFN 治療抵抗性との関連性については明らかではない。また HCV1a または b のゲノムタイプのウイルスが発現する E2 タンパク質にはその N 末領域に PePHD (E2-PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain) と呼ばれる、PKR によるリン酸化モチーフと相同性のある領域があり、E2 が PKR に阻害的に働くことが示されたが、この E2 の PePHD モチーフの配列が IFN 治療抵抗性としての指標には関連しなかった。さらに、RIG-I によっても認識されることが知られている EBER-1 (EBV-encoded small RNA-1) は *in vitro* において偽基質として PKR によっても認識される。また EBV 由来の SM タンパク質も、PKR と直接結合し、ともに阻害作用を示す。

PKR と同様の活性を示す EIF2AK3 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3)/PERK (PKR-like ER kinase), EIF2AK4/GCN2 (general control nonderepressible-2) および EIF2AK1/HRI (heme-regulated inhibitor) も同様に ds-RNA 結合領域を有しており、eIF-2 α を標的としたタンパク質合成阻害を誘導することが知られており、eIF-2 α キナーゼファミリーを形成している。

2',5'-OAS と PKR の抗ウイルス作用は必ずしもタンパク

質合成阻害作用だけで説明されるものではないことも示されている。実際に、非依存性のアポトーシス誘導に関連があることも知られている⁷⁷⁾。また、PKR, HRI, PERK および GCN2 の四つの eIF-2 α キナーゼファミリーメンバーのウイルス防御は必ずしも eIF-2 α を介するものではないという報告もある⁷⁸⁾。これら四つの遺伝子欠損マウス由来の MEFs を用いた解析によると、VSV による感染では、PKR と HRI は関与しないが PERK と GCN2 がウイルス複製阻害に関与していることが示されている。しかし、この場合、これらのキナーゼの標的は eIF-2 α ではなく、ウイルス複製阻害に働く別の標的が存在していることが示唆されている。HSV-2 に対する IFNs による抗ウイルス効果は、2',5'-OAS には依存していない PKR 依存性経路によることが示されている⁷⁹⁾。一方、HSV-1 によるマウスの眼の感染における IFNs の抗ウイルス効果は、内因性の IFNs の場合は PKR が中心的な役割を担っており、一方、外因性に発現させた IFN- β に対しては OAS1a が関与している⁸⁰⁾ことが示されている。

(ii) APOBEC3G

ADAR1 と同様に IFN 誘導性である APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3G)/CEM15 は HIV-1 複製を抑制する代表的な宿主タンパク質の一つであり、シチジン脱アミノ酵素活性を持っている。逆転写されたウイルスの一本鎖 DNA においてシトシンをウラシルへ変異を導入することで、G/A 変異を生じることや、ウラシル DNA グリコシラーゼや AP (apurinic-apyrimidinic) endonuclease によるゲノム切断などにより、結果として HIV-1 の複製が阻害されることになる。興味深いことに、一方で、HIV 由来のウイルスタンパク質 Vif (viral infectivity factor) は APOBEC3G と結合し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解することで APOBEC3G によるウイルス防御作用を回避しようというウイルス側の戦略があることも知られている。最近、A キナーゼ (protein kinase A; PKA) により APOBEC3G の 32 番目のスレオニンがリン酸化を受けると、Vif タンパク質との結合が阻害され、Vif による分解に対して抵抗性になり、より強い抗 HIV-1 活性を示すことができることが報告されている⁸¹⁾。

3. 細胞質 DNA シグナルに関する最近のトピックス

(1) STING

DNA ウイルスおよび RNA ウイルスの両方の感染に関与し、IFN 産生を引き起こして自然免疫系を活性化する分子として STING (stimulator of interferon genes) が新たに同定された⁸²⁾(図 6)。これまで未知のタンパク質であった STING は、IFN- β 遺伝子のプロモーターの活性化を指標と

する発現スクリーニングの系で同定されたタンパク質で、五つの膜貫通領域と想定される部分を有している。さらに N 末にはロイシンに富んだ領域を持つ。その発現は様々な組織でみとめられ、とくに小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) に局在している。293T 細胞において STING を単独で発現させただけで、IRF-3 および I 型 IFN 誘導経路および NF- κ B 経路の活性化がみとめられる。Sting 遺伝子欠損マウスの解析により STING は LPS や poly(I:C) 刺激による TLRs を介する IFN 発現誘導には明らかな関与がなく、細胞質型核酸認識受容体を介するシグナルに関与していることが示された。とくに RLR ファミリーを介するシグナルに関しては、細胞内 poly(I:C) 投与や EMCV 感染による I 型 IFNs の誘導には関与せず、VSV や SeV による感染時においてその関与を示した。この結果を支持するように、STING は MDA5 ではなく、RIG-I と CARD 領域を介して会合する結果も示されている。IPS-1 単独発現による IFN- β の発現は STING が存在しない場合は顕著に抑制されることから IPS-1 下流で働いていることが予想される。また TBK1 とも相互作用を示すようである。一方で、翻訳されたタンパク質を ER の内腔へ移行させるために TRAP 複合体の一つである SSR2/TRAP β (translocon-associated protein subunit β) やその複合体と会合することが知られているトランスロコンの構成因子の一つである SEC61 β と STING が会合することから、STING の作用機序としては、このトランスロコンの機能の制御を介して I 型 IFN 発現の誘導に関わっていることが示唆されている。このように STING は、細胞内 RNA 認識に関わる RIG-I-IPS-1 下流のシグナル経路に選択的な関与を示すと同時に、詳細は不明であるが、細胞質 DNA 経路にも関連していることが考えられる (図 6)。

(2) Trex1

前述したように、Medzhitov らのグループが ISD という合成二本鎖 DNA を用いて細胞内 DNA により活性化される IRF-3 依存性 IFN 応答につながる自然免疫シグナル経路が存在することを示していた¹¹⁾。最近、Trex1 (3' repair exonuclease 1) 分子が ISD 応答の負の制御因子として働いていることが報告された⁸³⁾。Trex1 は哺乳類細胞において DNA に対する主要な 3'→5'エキソヌクレアーゼとして知られている。ヒトでは、脳脊髄液中リンパ球浸潤や I 型 IFN 高値を伴う重症の脳炎を引き起こすアイカルディ・ゴーシェ症候群 (Aicardi-Goutières syndrome; AGS)⁸⁴⁾と全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematoses; SLE) の皮膚病変である家族性の凍瘡状狼瘡はその症状が一部類似していることも知られていたが、共通して *Trex1* 遺伝子の機能喪失型変異が見出されていた。このように *Trex1* の異常は何らかの自己免疫疾患との関連性が示唆されてい

たが、その分子メカニズムについては不明であった。Trex1 は ISD と結合する分子として同定され、マクロファージを ISD で刺激することにより *Trex1* 遺伝子発現が誘導されることより、ISD のセンサー分子の可能性が考えられた。しかし *Trex1* 遺伝子欠損マウスの骨髓由来のマクロファージでは ISD による IFN- β や IL-6 の発現誘導は野生型と同レベルであることから、Trex1 は ISD 応答におけるセンサー分子自体ではなく、その DNA センサーのリガンドを代謝することで、ISD 経路を制御していると考えられた。実際、*Trex1* 遺伝子欠損マウスは心臓の組織に対する自己抗体が産生されることで重度の心筋炎による循環障害により死亡するが、ISD 経路の IFN 産生誘導に必須の IRF-3 や I 型 IFN 受容体 (IFNAR-1) 欠損マウスとの二重遺伝子欠損マウスではこのような症状は見られない。したがって、Trex1 の基質は ISD 経路のリガンドであり、通常それを代謝することによって ISD 経路を負に制御しているが (図 6)、Trex1 が欠損するとこれらの基質が蓄積するために ISD 経路を介した IRF3 依存性の I 型 IFN 産生が起こって自己抗体産生を誘導し、自己免疫が引き起こされると考えられる。さらに *Trex1* 遺伝子欠損マウスの心臓組織から内在性のレトロエレメントに由来する一本鎖 DNA が多数存在していることがわかり、これが Trex1 の基質になっていることが明らかとなった。このように、細胞固有の基質を Trex1 が代謝することによって正常な状態が保たれ、Trex1 の障害によってこの機能が失われることで開始される ISD 経路が AGS などの自己免疫疾患と関連することが示されたことは興味深い。また、これは内因性レトロウイルスと自己免疫との関連性の一端を説明することにもなり、これまでトランスポジション自体による遺伝子発現障害や内因性レトロウイルスによって免疫に影響を与えるタンパク質が発現されるなどの機序が考えられていたが、今回の研究で、内因性レトロウイルスのエレメントから逆転写された一本鎖 DNA が ISD 経路を介して自然免疫応答を異常活性化することが自己免疫の形成に寄与していることが示唆された。

(3) インフラマソーム

抗ウイルス応答においては、I 型 IFNs のみならず、TNF や IL-1 β といった炎症性サイトカイン産生誘導も病原体の排除の上で重要な役割を担っていることが知られている (図 3)。アデノウイルスによる感染では、NLR (NOD-like receptor)⁸⁵⁾ ファミリーメンバーの一つである NALP3 (nacht domain-, leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein 3, 別名: NLRP3, クリオピリンあるいは CIAS1) を介して TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインが産生誘導されることが示された⁸⁶⁾。NALP3 は細菌性ペプチドグリカン、ATP、尿酸などの外因性、内因性リガンドを認識

する PRRs として知られている。NALP3 はアダプタータンパク質である ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) や caspase-1 とインフラマソーム⁸⁷⁾ と呼ばれる複合体を形成する (図 3)。NALP3 が活性化すると、caspase-1 を通して、不活性な pro-IL-1 β や pro-IL-18 が活性型となる。さらに様々な微生物や哺乳類由来の DNA、または 250 bp 以上の合成 DNA を細胞内にトランスフェクトした場合、NALP3 非依存性に (おそらく別の NLR センサー分子を介して) ASC やインフラマソームを介した IL-1 β の誘導がみられる。このインフラマソームを介する経路は I 型 IFN 誘導は起こさず、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生誘導に選択的に関与している。またアルミニウム粒子はマクロファージによって貪食され、IL-1 β や IL-18 産生に関わっていることが知られていたが、一般的にアジュバンドとして使われている Alum の作用は、おそらく細胞内に尿酸を誘導することで、NALP3 を介するインフラマソームを活性化し、抗体産生など適応免疫応答の誘導を増強することが明らかになった⁸⁸⁾。しかし、NALP3 を介するインフラマソーム経路の詳細な認識のメカニズムについてはまだ明らかになっていない。

4. 核酸認識受容体と疾患との関連性

微生物に対する感染防御における核酸認識機構は、自己に存在しない、病原体特有の分子パターンである PAMPs を認識するという基本的な区別に基づいている。一方で、細胞死や組織障害が高度に生じた場合に通常では速やかに処理されるものが処理されないために DAMPs (damage-associated molecular patterns) という形で PRRs が認識し、その結果、異常な炎症反応や免疫応答の誘導につながることを示されている。とくに核酸認識受容体の場合、前述したような自己と非自己の区別をして認識される一方で、概して、自然免疫系での PRRs の認識は適応免疫系における抗原特異性に比べてもその精度は低いものである。したがって自己の核酸と非自己の核酸の区別はあまり厳密ではないとも考えられる。また近年、とくに DCs における TLRs を介するシグナルが、炎症反応の増悪や、末梢トレランスの破綻に関与している可能性を示す報告もされている⁸⁹⁾。感染症の併発が、各種自己免疫疾患の病態悪化につながるという報告に加え、自己免疫疾患の活動期に特定の TLRs の発現が増強することも示されており、TLRs を介するシグナルが、自己免疫疾患の病態形成や発症機序に深く関わっていることが推察される⁹⁰⁾。

TLR9 は、微生物特有の非メチル化 CpG モチーフを認識することで知られている。一方で、ヒトのゲノムの全 CpG の 70-90% はメチル化されていると報告されているが、逆に考えると 10-30% は非メチル化 CpG モチーフがあり、TLR9 のターゲットとなりうるということになる。

実際に病的な条件下ではヒトのDNAを認識するという報告もある⁹¹⁾。さらに細胞質DNA認識については、前述したコンホメーションの違いによる応答性の違いが存在するが、B型もZ型DNAも基本的には宿主側にも存在するものであり、微生物由来のDNAと自己のDNAとの区別は明らかでない。細胞質DNA認識についてははっきりとした特異性がないことは、哺乳類由来のDNAを細胞内にトランスフェクトしてもI型IFNsや炎症性サイトカインなどの誘導がみとめられることから予想される^{10,12)}。おそらく、通常の場合、核内限局することで細胞質と隔離されていることやDNA自体、多くの場合、ヒストンなどのDNA結合タンパク質によって被覆されているためにnakedなDNAは速やかに分解されることでDNAセンサーによる認識が起らないような仕組みが存在していると考えられる。しかしながら、高度の組織障害などにより処理能力をこえた量のDNAが存在するような事態においては、DNAセンサーの異常な活性化を来し、異常な炎症反応を誘導し、ひいては自己免疫の病態形成に寄与する可能性が考えられる。

マクロファージのリソソームに存在するDNase IIは、貪食したDNAをヌクレオチドにまで分解する役割があるが、このDNase II欠損マウスの肝臓では、赤血球の最終分化段階で脱核した核を貪食したマクロファージはIFN- β を発現することが報告されている⁹²⁾。おそらく貪食され処理されるはずのDNAが分解されないためと考えられている。この過剰になったDNAによるIFN応答のトリガーがどのようなメカニズムによるかは不明であるが、少なくともTLR9以外の何らかの未知なるDNA認識受容体が活性化されるためと予想される。このような過剰な量の自己DNAが生じる状況においてはおそらくDAI (DLM-1/ZBP1)を含めた、何らかのDNA認識受容体が活性化されることになり、免疫系が異常活性化し、炎症反応が引き起こされることで、各種疾患の増悪に関与することが予想される。また前項で述べたように、ISD経路の負の制御因子として明らかとなったTrex1の欠損マウスで自己免疫の病態を呈することやAGSなどの自己免疫疾患でその遺伝子異常をみとめることから、細胞内DNA経路の異常と自己免疫疾患との関連性が示されている⁸³⁾。この場合、Trex1は一本鎖DNAを基質とするが、実験上は二本鎖DNAを細胞内へ投与することでISD経路などの細胞内DNA経路が活性化される。この点に関してStetsonらは、一本鎖DNAを投与することでもISD経路が活性化されることから、ISD経路による認識では、二本鎖DNAは一本鎖になる何らかのプロセスを受けることを想定している⁸³⁾。

一方で、紫外線による組織障害などでSLEが増悪することが報告されている。このようなSLEをはじめ、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)⁹³⁾等の自己免疫疾患に

おいて、抗DNA抗体や抗RNP抗体などの出現など核酸に関連した病態が深く関与していることから、核酸認識受容体シグナルが影響する可能性が強く考えられる。実際に、MLR/lprマウスモデルを用いた系では、TLR9を介するシグナルが自己反応性B細胞の活性化および自己抗体産生の誘導に重要であることを示唆する所見も示されている⁹⁴⁾。また、C57BL/6バックグラウンドの抑制性のFc γ 受容体の欠損マウスを用いたSLEモデルでは、TLR9-MyD88経路がB細胞における抗DNA自己抗体のクラススイッチに関与していることが報告されている⁹⁵⁾。さらにヒトにおいてはpDCsに比較的特異的に発現しているTLR9がSLEなどの自己免疫疾患の病態形成と深く関わっていることが示されている⁹⁶⁾。例えば、急性期のSLE患者の皮膚や腎臓などの病変部位にpDCsが集簇していることをはじめ、活動期の患者血清中IFN- α の濃度が上昇しているという報告⁹⁷⁾や、乾癬の皮膚病変において内因性の抗菌ペプチドであるL37/CAMPなどが自己のDNAと複合体を形成することによりTLR9依存性にIFNを誘導するという報告もみとめられる⁹¹⁾。

5. おわりに

今回、生体防御システムの分子制御の一端として、自然免疫における核酸認識という局面に焦点を絞って、とくに核酸センサー分子を介するI型IFN発現誘導経路を中心とするシグナル伝達経路を解説し、実際のウイルスなどの微生物感染における役割を解説した。I型IFNsはウイルス防御に大変重要な役割を担っていることは言うまでもないが、感染するウイルスの種類や感染後の時間的経過あるいはその結果引き起こされる障害状況によって、ウイルス防御に必須となるI型IFNsの発現システムや発現する細胞の種類などが異なってくる。実際に、MAVS/IPS-1/VISA/Cardifの欠損マウスでは、このアダプター非依存性に発現されるpDCsからの大量IFNsが全身性に誘導されるにも関わらず、VSV感染による生存率が著明に低下する⁹⁸⁾。しかしVSV感染に対するウイルス防御にはI型IFNsの発現誘導は必須であることから、ウイルスの種類によって、適切にPRRsによる認識が行われ、その下流で局所あるいは全身性のI型IFN発現誘導が時空間的に制御されていることが考えられる。一方で、必ずしもI型IFNsがウイルス防御のすべてではない局面も存在することが示唆されている。実際に、前述したようにFADDはRIG-I/MDA5-MAVS下流においてI型IFN誘導経路とは別のNF- κ B経路を分岐するアダプター分子であるが、このFADD欠損マウス由来の線維芽細胞では、I型IFNを前処理しておいてもVSV感染を阻止することはできないことが示されている⁵⁴⁾。一方、とくに細胞質においてウイルスや細菌由来のDNAを感知する機構については未だ明

らかにされていないが、候補分子の一つである DAI (DLM-1/ZBP1) についてその役割は上皮細胞などの一部の細胞の種類に特異的なものであるかあるいは redundant なものであるかを示唆する結果が得られており、実際の微生物感染における役割の検討も含め、今後その詳細を解決すべき課題であると考えられる。同時に、他に細胞質型 DNA センサーを担う分子が存在していることが強く示唆されており、その同定により新たな細胞内認識機構の局面が明らかになると考えられる。このように核酸による自然免疫系の認識機構はウイルスのみならず、細菌感染においても関与していることが報告されているが、細菌感染により誘導される I 型 IFNs の役割などについてはまだ不明な点も多く、今後の検討が待たれる。同一の微生物による感染でも細胞や臓器の種類、あるいは感染後の時間経過によって自然免疫応答の活性化を導くセンサー分子は、微生物の侵入ルートによって使い分けされているようであり、かつ複数のセンサー分子によるシグナルの総和が結果として感染防御として働くことになると考えられる。核酸認識センサー分子により活性化されるシグナル経路とその他のセンサー分子によるシグナル経路とのクロストークについても今後の重要な課題であると考えられる。また一方で、DNA ワクチンのアジュバント効果としてプラスミド DNA がおそらく細胞質で認識されることで引き起こされる自然免疫応答が深く関わっていることが示されている。まだどのような受容体によって DNA が捉えられてシグナルが発生するかは明らかにされていないが、少なくとも TLR9 には非依存性であることが示されている⁴⁶⁾。またこのような自然免疫系のセンサーを介するアジュバント効果は内因性 DAMPs を介しても起こりうるという興味深い報告がなされている。すなわち、抗がん剤や放射線治療の際に破壊された腫瘍細胞から遊離される非ヒストン DNA 結合タンパク質である HMGB1 (high mobility group box1) が TLR4 を介して抗原提示細胞にシグナルを発生することで内因性に腫瘍抗原のクロスプレゼンテーションが促進され、腫瘍特異的な免疫応答につながることを示されている^{71,99)}。TLR 以外のパターン認識受容体の関与についてはまだ検討されていないため、とくに細胞内の核酸認識受容体の関与の可能性も含め、今後の興味深い課題と考えられる。また、自己免疫疾患や炎症性疾患の病態形成に微生物あるいは自己の核酸が深く関与していることが明らかになりつつあり、関連する核酸認識受容体の同定をはじめ、その役割を解明することにより、疾患をコントロールする分子基盤を見出すことが期待される。

文 献

- 1) Takeuchi, O. & Akira, S. (2008) *Curr. Opin. Immunol.*, **20**, 17-22.
- 2) Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006) *Cell*, **124**, 783-801.
- 3) Akira, S. & Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 499-511.
- 4) Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. (1997) *Cell*, **91**, 295-298.
- 5) Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. (2002) *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 197-216.
- 6) Gallucci, S. & Matzinger, P. (2001) *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 114-119.
- 7) Kawai, T. & Akira, S. (2007) *Semin. Immunol.*, **19**, 24-32.
- 8) Yoneyama, M. & Fujita, T. (2007) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **18**, 545-551.
- 9) Takaoka, A. & Taniguchi, T. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 847-857.
- 10) Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 40-48.
- 11) Stetson, D.B. & Medzhitov, R. (2006) *Immunity*, **24**, 93-103.
- 12) Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., & Taniguchi, T. (2007) *Nature*, **448**, 501-505.
- 13) Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., & Takada, K. (2006) *EMBO. J.*, **25**, 4207-4214.
- 14) Liu, Y.J. (2005) *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 275-306.
- 15) Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2002) *Int. Immunol.*, **14**, 1225-1231.
- 16) Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., & Akira, S. (2003) *J. Immunol.*, **170**, 3059-3064.
- 17) Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., & Akira, S. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 1061-1068.
- 18) Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., & Taniguchi, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15416-15421.
- 19) Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *J. Exp. Med.*, **201**, 915-923.
- 20) Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S., & Kaisho, T. (2006) *Nature*, **440**, 949-953.
- 21) Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., & Taniguchi, T. (2005) *Nature*, **434**, 1035-1040.
- 22) Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., & Karin, M. (2006) *Nature*, **439**, 204-207.
- 23) Oganessian, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., & Cheng, G. (2006) *Nature*, **439**, 208-211.
- 24) Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K. S., Glimcher, L.H., & Cantor, H. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 498-506.
- 25) Ishii, K.J. & Akira, S. (2006) *Trends Immunol.*, **27**, 525-532.
- 26) Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., & Taniguchi, T. (2005) *Nature*, **434**, 243-249.
- 27) Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., & Honda, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15989-15994.

- 28) Tsujimura, H., Tamura, T., Kong, H.J., Nishiyama, A., Ishii, K. J., Klinman, D.M., & Ozato, K. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 6820–6827.
- 29) Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., & Honda, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15136–15141.
- 30) Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., & Colonna, M. (2004) *Blood*, **103**, 1433–1437.
- 31) Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., & Colonna, M. (2004) *Immunity*, **21**, 107–119.
- 32) Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., & Iwasaki, A. (2003) *J. Exp. Med.*, **198**, 513–520.
- 33) Hochrein, H., Schlatter, B., O’Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M., & Wagner, H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11416–11421.
- 34) Hokeness-Antonelli, K.L., Crane, M.J., Dragoi, A.M., Chu, W. M., & Salazar-Mather, T.P. (2007) *J. Immunol.*, **179**, 6176–6183.
- 35) Dalpke, A., Frank, J., Peter, M., & Heeg, K. (2006) *Infect. Immun.*, **74**, 940–946.
- 36) Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., & Sher, A. (2006) *J. Immunol.*, **177**, 3515–3519.
- 37) Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., Akira, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2007) *Cell. Microbiol.*, **9**, 633–644.
- 38) Huang, X., Barrett, R.P., McClellan, S.A., & Hazlett, L.D. (2005) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 4209–4216.
- 39) Kalis, C., Gumenscheimer, M., Freudenberg, N., Tchaptchet, S., Fejer, G., Heit, A., Akira, S., Galanos, C., & Freudenberg, M.A. (2005) *J. Immunol.*, **174**, 4295–4300.
- 40) Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Hori, T., & Akira, S. (2005) *J. Exp. Med.*, **201**, 19–25.
- 41) Fu, Y., Comella, N., Tognazzi, K., Brown, L.F., Dvorak, H.F., & Kocher, O. (1999) *Gene*, **240**, 157–163.
- 42) Schwartz, T., Behlke, J., Lowenhaupt, K., Heinemann, U., & Rich, A. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 761–765.
- 43) Kaiser, W.J., Upton, J.W., & Mocarski, E.S. (2008) *J. Immunol.*, **181**, 6427–6434.
- 44) Wang, Z., Choi, M.K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., & Taniguchi, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5477–5482.
- 45) Hess, C.B., Niesel, D.W., Cho, Y.J., & Klimpel, G.R. (1987) *J. Immunol.*, **138**, 3949–3953.
- 46) Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., & Akira, S. (2008) *Nature*, **451**, 725–729.
- 47) Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., & Seya, T. (2003) *Nat. Immunol.*, **4**, 161–167.
- 48) Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002) *J. Immunol.*, **169**, 6668–6672.
- 49) Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., & Tschoopp, J. (2005) *Nature*, **437**, 1167–1172.
- 50) Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 981–988.
- 51) Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., & Chen, Z.J. (2005) *Cell*, **122**, 669–682.
- 52) Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005) *Mol. Cell*, **19**, 727–740.
- 53) Takahashi, K., Kawai, T., Kumar, H., Sato, S., Yonehara, S., & Akira, S. (2006) *J. Immunol.*, **176**, 4520–4524.
- 54) Balachandran, S., Thomas, E., & Barber, G.N. (2004) *Nature*, **432**, 401–405.
- 55) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 2851–2858.
- 56) Zhao, T., Yang, L., Sun, Q., Arguello, M., Ballard, D.W., Hiscott, J., & Lin, R. (2007) *Nat. Immunol.*, **8**, 592–600.
- 57) Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., & Jung, J.U. (2007) *Nature*, **446**, 916–920.
- 58) Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C., Reis, E., Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006) *Nature*, **441**, 101–105.
- 59) Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., & Iwasaki, A. (2007) *Science*, **315**, 1398–1401.
- 60) Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., & Okuda, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14050–14055.
- 61) Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., & Akira, S. (2008) *J. Exp. Med.*, **205**, 1601–1610.
- 62) Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006) *Science*, **314**, 994–997.
- 63) Loo, Y.M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M.A., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., & Gale, M., Jr. (2008) *J. Virol.*, **82**, 335–345.
- 64) Zhang, P. & Samuel, C.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 34580–34587.
- 65) Deng, L., Dai, P., Parikh, T., Cao, H., Bhoj, V., Sun, Q., Chen, Z., Merghoub, T., Houghton, A., & Shuman, S. (2008) *J. Virol.*, **82**, 10735–10746.
- 66) Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006) *Science*, **314**, 997–1001.
- 67) Loo, Y.M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita, T., Saito, T., Lee, W.M., Hagedorn, C.H., Lau, D.T., Weinman, S.A., Lemon, S.M., & Gale, M., Jr. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6001–6006.
- 68) Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., & Barber, G.N. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 6444–6455.
- 69) Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., & Gale, M., Jr. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 582–587.
- 70) Smith, E.J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A., & Levy, D.E. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 8951–8957.
- 71) Hartmann, R., Norby, P.L., Martensen, P.M., Jorgensen, P., James, M.C., Jacobsen, C., Moestrup, S.K., Clemens, M.J., & Justesen, J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3236–3246.
- 72) Mashimo, T., Simon-Chazottes, D., & Guenet, J.L. (2008) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **321**, 85–100.
- 73) Clemens, M.J. & Elia, A. (1997) *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 503–524.

- 74) Garcia, M.A., Meurs, E.F., & Esteban, M. (2007) *Biochimie*, 89, 799–811.
- 75) Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., & Jackson, D. (2008) *J. Gen. Virol.*, 89, 2359–2376.
- 76) Davies, M.V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B., & Kaufman, R.J. (1992) *J. Virol.*, 66, 1943–1950.
- 77) Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C. (2007) *Immunity*, 27, 370–383.
- 78) Krishnamoorthy, J., Mounir, Z., Raven, J.F., & Koromilas, A. E. (2008) *Cell Cycle*, 7, 2346–2351.
- 79) Carr, D.J., Tomanek, L., Silverman, R.H., Campbell, I.L., & Williams, B.R. (2005) *J. Virol.*, 79, 9341–9345.
- 80) Al-Khatib, K., Williams, B.R., Silverman, R.H., Halford, W., & Carr, D.J. (2004) *J. Immunol.*, 172, 5638–5647.
- 81) Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Yokoyama, M., Izumi, T., Matsui, M., Io, K., Sato, T., Sato, H., & Uchiyama, T. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 1184–1191.
- 82) Ishikawa, H. & Barber, G.N. (2008) *Nature*, 456, 274.
- 83) Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., & Medzhitov, R. (2008) *Cell*, 134, 587–598.
- 84) Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., Corry, P.C., Cowan, F.M., Frints, S.G., Klepper, J., Livingston, J.H., Lynch, S.A., Massey, R.F., Meritet, J.F., Michaud, J.L., Ponsot, G., Voit, T., Lebon, P., Bonthron, D.T., Jackson, A.P., Barnes, D.E., & Lindahl, T. (2006) *Nat. Genet.*, 38, 917–920.
- 85) Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., & Girardin, S.E. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 1250–1257.
- 86) Muruve, D.A., Pettrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S. A., Ross, P.J., Parks, R.J., & Tschopp, J. (2008) *Nature*, 452, 103–107.
- 87) Pettrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., & Tschopp, J. (2007) *Curr. Opin. Immunol.*, 19, 615–622.
- 88) Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., & Flavell, R.A. (2008) *Nature*, 453, 1122–1126.
- 89) Pasare, C. & Medzhitov, R. (2004) *Microbes Infect.*, 6, 1382–1387.
- 90) Marshak-Rothstein, A. (2006) *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 823–835.
- 91) Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.H., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J.M., Liu, Y.J., & Gilliet, M. (2007) *Nature*, 449, 564–569.
- 92) Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., & Nagata, S. (2005) *Nat. Immunol.*, 6, 49–56.
- 93) Nagata, S. (2008) *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 295–302.
- 94) Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M.J., & Marshak-Rothstein, A. (2002) *Nature*, 416, 603–607.
- 95) Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T.L., Aderem, A., & Ravetch, J.V. (2006) *J. Exp. Med.*, 203, 553–561.
- 96) Gilliet, M., Cao, W., & Liu, Y.J. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 594–606.
- 97) Kirou, K.A., Lee, C., George, S., Louca, K., Peterson, M.G., & Crow, M.K. (2005) *Arthritis Rheum.*, 52, 1491–1503.
- 98) Sun, Q., Sun, L., Liu, H.H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., & Chen, Z.J. (2006) *Immunity*, 24, 633–642.
- 99) Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F.J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J.P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2007) *Nat. Med.*, 13, 1050–1059.
- 100) Komuro, A., Bamming, D., & Horvath, C.M. (2008) *Cytokine*, 43, 350–358.