

3. 自然免疫系における DNA センサー

高岡 晃教, 篠原 茂樹

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野

自然免疫系におけるパターン認識受容体 (pattern recognition receptors ; PRRs) は感染をいち早く前線において感知し, その後, 細胞内にシグナルを伝え, I 型インターフェロン (interferons; IFNs) や炎症性サイトカイン・ケモカインの発現誘導といった自然免疫応答の活性化の switch を ON にする役割がある. さらに適応免疫系の活性化へとつなぎ, 特異的な免疫応答発動を導く. このような PRRs による自然免疫系と適応免疫系の連携は効率のよい病原体の排除に重要である. RNA センサーに関する研究はかなり進んでいる一方で, DNA センサーとしては TLR9 (Toll-like receptor 9) のみしか知られていなかった. しかしながら TLR9 非依存性経路に関する報告が数多くなされており, TLR9 以外の DNA センサーの存在が強く示唆された. この流れの中で, 最初の細胞質 DNA センサーとして DAI (DNA-dependent activator of IRFs; 別名 DLM-1/ZBP1) という分子が同定された. この分子を介して IFN 調節因子 (IFN-regulatory factors ; IRFs) や NF- κ B の活性化が誘導されることが示された. また最近の報告では, DAI (DLM-1/ZBP1) 以外の DNA センサーの存在を示唆する結果も示されている. さらに NLR (Nod-like receptor) ファミリーメンバーや ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), caspase-1 の複合体からなるインフラマソーム (inflammasome) が微生物および宿主由来の DNA の細胞質内での認識機構に関与しており, TLR9 や DAI (DLM-1/ZBP1) とは無関係に, 炎症性サイトカインの誘導を引き起こすことも報告されている. 一方で, DAI(DLM-1/ZBP1) にみられる Z-DNA 結合領域 (Z α や Z β) と相同のモチーフをもつ宿主あるいはウイルス由来のタンパク質が細胞質 DNA によって活性化される免疫応答に対し, 負に制御することが示された. このように自然免疫系活性化を誘導する DNA 認識機構は複雑なメカニズムによって制御されており, その機能障害は免疫異常の病態を引き起こす可能性が考えられる.

はじめに

我々の体内には, 病原体の侵入を知らせるセンサー分子が存在している. この微生物認識機構に関しては, 従来, 適応免疫系において詳細な研究が進められており, B および T リンパ球上の発現している抗原受容体によって抗原を認識することで抗原特異的な免疫応答が活性化されること

が知られている. この受容体は遺伝子再構成を行うことで親和性の高いものが作り出される仕組みとなっている. 一方で, マクロファージや樹状細胞などによって担われる自然免疫系は非特異的な免疫応答で微生物の排除が行われると考えられていたが, Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) の発見や樹状細胞 (dendritic cells; DCs) を中心とした諸研究の急速な進展により, 適応免疫系における抗原認識ほどの親和性や特異性は高くない, 特徴的な微生物認識機構が存在していることが明らかとなってきた. とくに TLRs に代表される細胞内にシグナルを伝達する認識受容体は感染をいち早く前線においてキャッチするという役割のみならず, その後, 細胞内にシグナルを伝え, 自然免疫系活性化の switch を ON にする重要な役割がある. その意味において, これまで知られていた自然免疫系の活性化によって誘導される I 型 IFNs 等のサイトカインやケモカ

連絡先

〒060-0815 札幌市北区北 15 条西 7 丁目
北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野
TEL : 011-706-5020
FAX : 011-706-7541
E-mail : takaoka@igm.hokudai.ac.jp

イン,そして抗原提示に関与する分子群の遺伝子発現誘導と,その後の適応免疫系の活性化へと連携させて特異的な免疫応答発動へと導くという経路が明らかとなった。

微生物認識受容体は,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,核酸からなる分子パターン(病原体関連分子パターン: pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)を認識していることが示され、『パターン認識受容体 (PRRs)』と総称されている^{8,23)}。この PRRs のうち,受容体下流でシグナル伝達を行うタイプは,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。TLRs は膜貫通型 PRRs の代表的な存在であり,一方,細胞質型 PRRs としては RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) /MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) の RLRs (RIG-I-like receptors) ファミリー²⁵⁾や, NOD1 や NOD2 が含まれる NLRs が挙げられる。PAMPs として核酸に着目した場合,膜貫通型として TLR3/7/8 および TLR9 がそれぞれ RNA および DNA を認識する PRRs として知られている。細胞質型核酸認識受容体としては, RIG-I/MDA5 が RNA センサーとして知られていた。細胞質 DNA センサーはその存在は示唆されていたが^{6,19)},その実体は明らかにされていなかった。今回,我々はこの細胞質内 DNA センサーの候補分子の1つとして DAI (DLM-1/ZBP1) を見出すに至った。本稿においては,細胞質 DNA センサーについて,この DAI (DLM-1/ZBP1) を中心に,その自然免疫応答活性化につながるシグナル経路について解説する。

1. 自然免疫系の核酸認識受容体について

自然免疫系の PRRs のなかでも,微生物由来の核酸を sensing する受容体が核酸受容体である。現在のところ,自然免疫系における核酸認識受容体はその細胞内の局在から膜貫通型と細胞質型に大きく分けられ,さらにリガンドとなる核酸の種類によってそれぞれ細分化して考えることができる²⁰⁾。まず,膜貫通型の RNA センサーとして TLR3 や TLR7/TLR8 が同定されており,各々,二本鎖 RNA (double-stranded RNA; ds-RNA) と一本鎖 RNA (single-stranded RNA; ss-RNA) を認識する核酸認識受容体として知られている。さらに膜貫通型の DNA センサーとして,TLR9 が非メチル化 CpG-DNA を認識する受容体として知られている。一方,細胞質の RNA センサーは, RNA ヘリカーゼドメインを有する RIG-I や MDA5 がそれぞれ 5' triphosphate ss-RNA および ds-RNA を認識することが示されており,詳細な解析が行われているのに対し,細胞質の DNA センサーは明らかにされていないのが現状である。しかし,細胞質の DNA センサーの存在を示唆する報告がなされている。1つは,審良氏らのグループによるもので, B 型 DNA (通常の DNA の立体構造をとったもので, poly (dA: dT) · poly (dT: dA) がその合成 DNA として用いられ

ることが多い;以下 B-DNA と省略する)を,陽イオン性脂質であるリポフェクトアミンによって細胞質内に投与した際に TLRs や RIG-I 非依存性に I 型 IFNs やケモカインの遺伝子発現誘導が生じることが示されている⁶⁾。さらにこの B-DNA による IRF-3 の活性化を介する IFN- β の産生誘導は TBK1 (TANK-binding kinase 1) や IKK ϵ /i (inhibitor of κ B kinase ϵ /i) のキナーゼ依存性であることも示している。もう一つは, Medzhitov 氏らによるもので,この場合は, ISD (IFN-stimulatory DNA) という 45 塩基の合成 DNA を細胞内にトランスフェクトすると I 型 IFN 誘導が起こるが,これは TLR 非依存性に, IRF-3 の活性化を介して行われることが報告されている¹⁹⁾。この2つの報告はともに細胞質内に DNA を投与することで I 型 IFN 遺伝子が発現されるが,これまで知られている唯一の DNA センサーである TLR9 ではないという結果を示している。興味深いことに前者の条件では, NF- κ B 経路の活性化が起こるのに対し,後者では,それが観察されないという違いがある。その意味では,これらは別の細胞質 DNA センサーを介していることを示唆しているのかもしれない。一方, DCs のサブセットの1つである形質細胞様樹状細胞の前駆細胞 (plasmacytoid dendritic cell precursors; pDCs)¹¹⁾ においては TLR9 を介して大量の I 型 IFNs を産生誘導することが知られている。脾臓由来の pDCs は DNA ウイルスである 1 型単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus type 1; HSV-1) により感染を受けると, TLR9 を介して I 型 IFNs の発現がみとめられるが,骨髄由来の pDCs や cDCs (conventional DCs) における HSV-I による I 型 IFN 発現誘導に関しては, TLR9 非依存性の経路も存在することが示されている³⁾。またリステリアという細菌が感染した細胞においてリステリア由来の DNA を介して TLR 非依存性に I 型 IFN 誘導が起こることが報告されている¹⁹⁾ (項目 3. 参照)。

2. DNA センサーとその下流で活性化されるシグナル伝達経路

(1) 膜貫通型 DNA センサー: TLR9

これまで DNA センサーとして唯一知られていた TLR9 に関しては多くの研究がなされ,その詳細がかなり明らかになってきている。図 1a に示したように, TLR9 はエンドソームやライソソームにおいて細胞外に存在する DNA を認識する受容体として機能し, I 型 IFNs や炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。この両者とも MyD88 依存性のシグナル伝達経路を介するが,前者が IRAK1/IKK α -IRF-7 が関与するのに対し,後者では, NF- κ B や IRF-5 や MAP キナーゼの経路が関与する。MyD88 には IRF-7 や IRF-5 の他に, IRF-1 や IRF-4 が会合することが知られているが^{5,15,16,22)}, TLR9 下流で関与する IRF 転写因子の種類や役割は細胞の種類によって異なっている。一方, TLR9

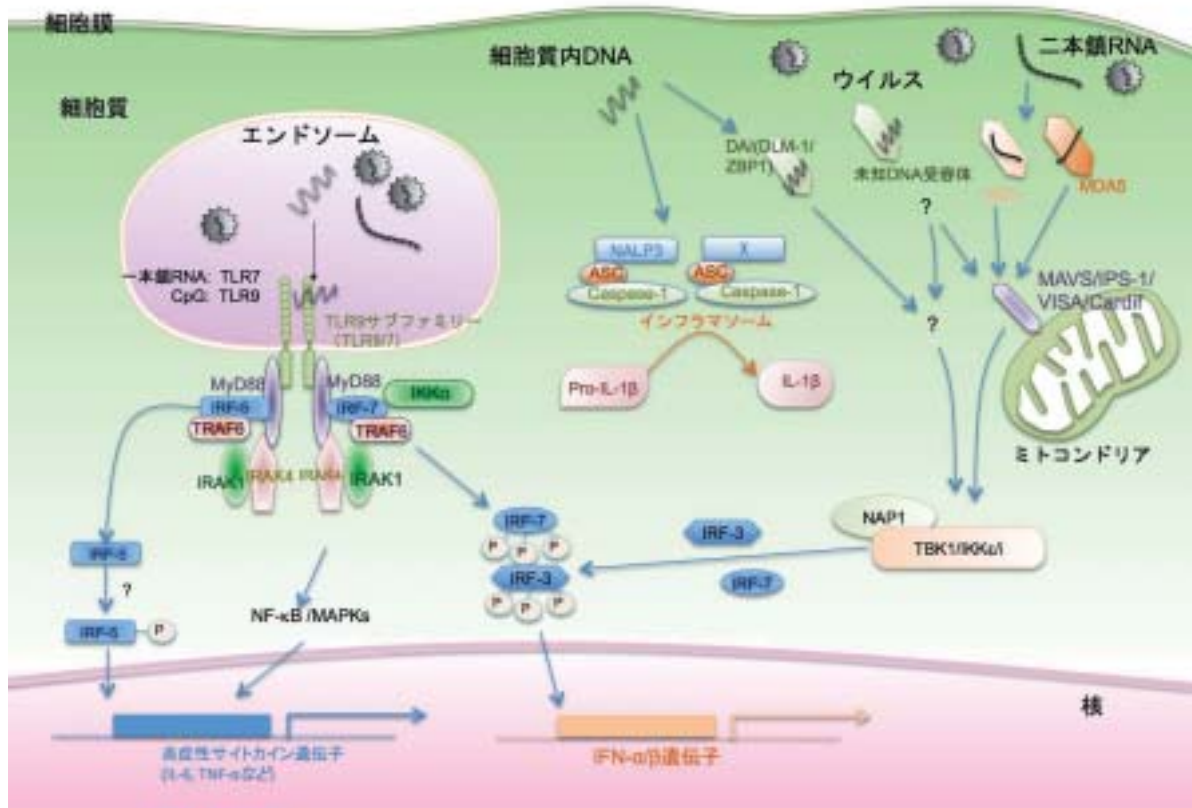


図 1a : 自然免疫系における核酸受容体とシグナル伝達

自然免疫系のパターン認識受容体 (pattern recognition receptors ; PRRs) の一つである核酸受容体は、膜貫通型と細胞質型の 2 種類が存在する。膜貫通型の核酸受容体には TLR9 や TLR7 などがあり、それぞれ非メチル化 CpG-DNA、及び一本鎖 RNA を認識する。これらは MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) 依存的な経路で IRF-5 や IRF-7/IRF-3 をリン酸化し、炎症性サイトカインや I 型 IFN 遺伝子の発現を誘導する。一方、細胞質型の核酸受容体としては RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) / MDA5 (melanoma differentiation associated-gene 5) が二本鎖 RNA を認識し、TBK1 (TANK-binding kinase 1) 依存的に I 型 IFNs を産生することが知られていた。しかし、細胞質型の DNA 認識機構については不明なことも多く、DAI (DLM-1/ZBP1) や未知なる DNA 受容体に認識された後、TBK1 依存的に I 型 IFN 遺伝子の発現誘導が起こることが示唆されている。また、細胞質内での DNA 刺激により、ある種のインフラマソームが活性化され、炎症性サイトカインである IL-1 β の成熟を促進するシグナル伝達経路も知られている。IRF, interferon regulatory factor ; NF- κ B, nuclear factor-kappa B ; MAPKs, mitogen-activated protein kinases ; TLR, Toll-like receptor ; IL, interleukin ; IKK α , inhibitor of κ B kinase α ; TNF, tumor necrosis factor ; TRAF, TNF receptor-associated factor ; IRAK, IL-1 receptor-associated kinase ; NAP, nucleosome assembly protein ; PYD, pyrin domain ; NALP, nacht domain-, leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein ; CARD, caspase activating and recruitment domain ; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD ; MAVS, mitochondrial antiviral signaling ; IPS-1, IFN-inducing β promoter stimulator-1 ; VISA, virus-induced signaling adaptor ; Cardif, CARD adaptor inducing IFN- β

非依存性経路を示唆する現象が複数報告されており、TLR9 以外の DNA センサーの存在が示唆されている。

(2) 細胞質 DNA センサー：DAI (DLM-1/ZBP1)

今回、細胞質内の DNA を認識する分子として DAI (DLM-1/ZBP1) が新たに同定された²¹⁾。まずマウス線維芽細胞株である L929 細胞において、レトロウイルスを用いた系で DAI (DLM-1/ZBP1) を発現させた場合と RNA

干渉を用いて DAI (DLM-1/ZBP1) の発現を抑制した場合の 2 つの方法で関連性を調べたところ、細胞質内 DNA に反応して誘導される IFN 誘導および炎症性サイトカイン誘導の両方の経路の活性化に DAI (DLM-1/ZBP1) が関与していることが示された。次に蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) 解析および共沈実験、さらには DAI (DLM-1/ZBP1) のリコンビ

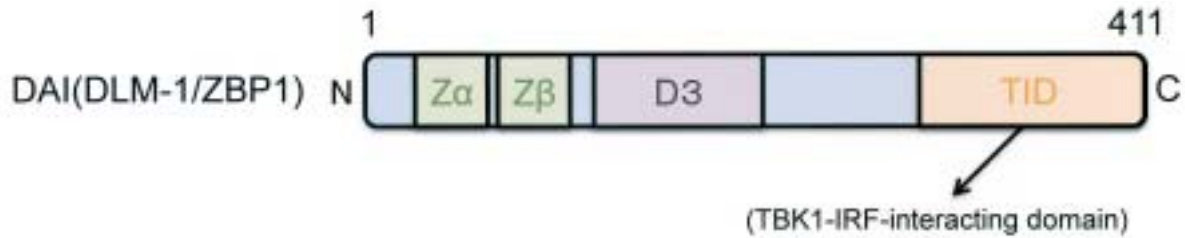


図 1b : DAI (DLM-1/ZBP1) のドメイン構造

DAI (DNA-dependent activator of IRFs) は N 末端に Z 型 DNA (Z-DNA) との結合能を有する $Z\alpha$ ドメインと、その相同領域である $Z\beta$ ドメインを有する。さらに、 $Z\beta$ ドメインの C 末端側には DNA 結合に関与する D3 ドメインが、また DAI (DLM-1/ZBP1) の C 末端側の約 100 アミノ酸に相当する領域には TBK1 (TANK-binding kinase 1) 及び IRF-3 が会合する TID (TBK1-IRF-interacting domain) ドメインが存在することが示された。尚、DAI (DLM-1/ZBP1) の D3 ドメインが B-DNA との会合に関与する重要な領域であるが、DAI (DLM-1/ZBP1) の活性化には $Z\alpha$ 、 $Z\beta$ 、及び D3 の 3 つのドメインが必要である。



図 1c : マウス DAI (DLM-1/ZBP1) 遺伝子のプロモーター領域

マウス線維芽細胞由来の L929 細胞において DAI (DLM-1/ZBP1) 遺伝子の転写開始点から上流 200 塩基以内にコンセンサス配列と一致する GAS (IFN- γ -activated site) と ISRE (IFN-stimulated responsive element) がみとめられた。

ナントタンパク質を行い、DAI (DLM-1/ZBP1) 分子と B-DNA との直接的な会合がみとめられたことより、DAI (DLM-1/ZBP1) が細胞質内の DNA 認識分子であることが示された。

DAI (DLM-1/ZBP1) は元々腫瘍間質に発現される遺伝子 *DLM-1* としてクローニングされている²⁾。その後、N 末部分に Z 型 DNA (Z-DNA) 結合領域 ($Z\alpha$) およびその相同性の高い $Z\beta$ 領域の 2 つ有することが示され (図 1b)、ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) と名付けられた¹⁸⁾。しかしその役割について充分には明らかにされていなかった。

DAI (DLM-1/ZBP1) は広い範囲の組織で発現しており、IFN によって発現レベルが増強される。実際に転写開始点から上流に 200 塩基遡った範囲内にコンセンサス配列と 100% 一致する GAS (IFN- γ -activated site) と ISRE (IFN-stimulated responsive element) をそれぞれ 1 ずつみとめた (図 1c)²¹⁾。DAI (DLM-1/ZBP1) が B-DNA と会合する必須の領域は $Z\beta$ 領域の C 末側に新たに見出された D3 ドメインであることが示された²⁴⁾。しかしながら DAI (DLM-1/ZBP1) の full の活性化には $Z\alpha$ 、 $Z\beta$ および D3 の 3 つのドメインがすべて必要である。これら全てを欠失

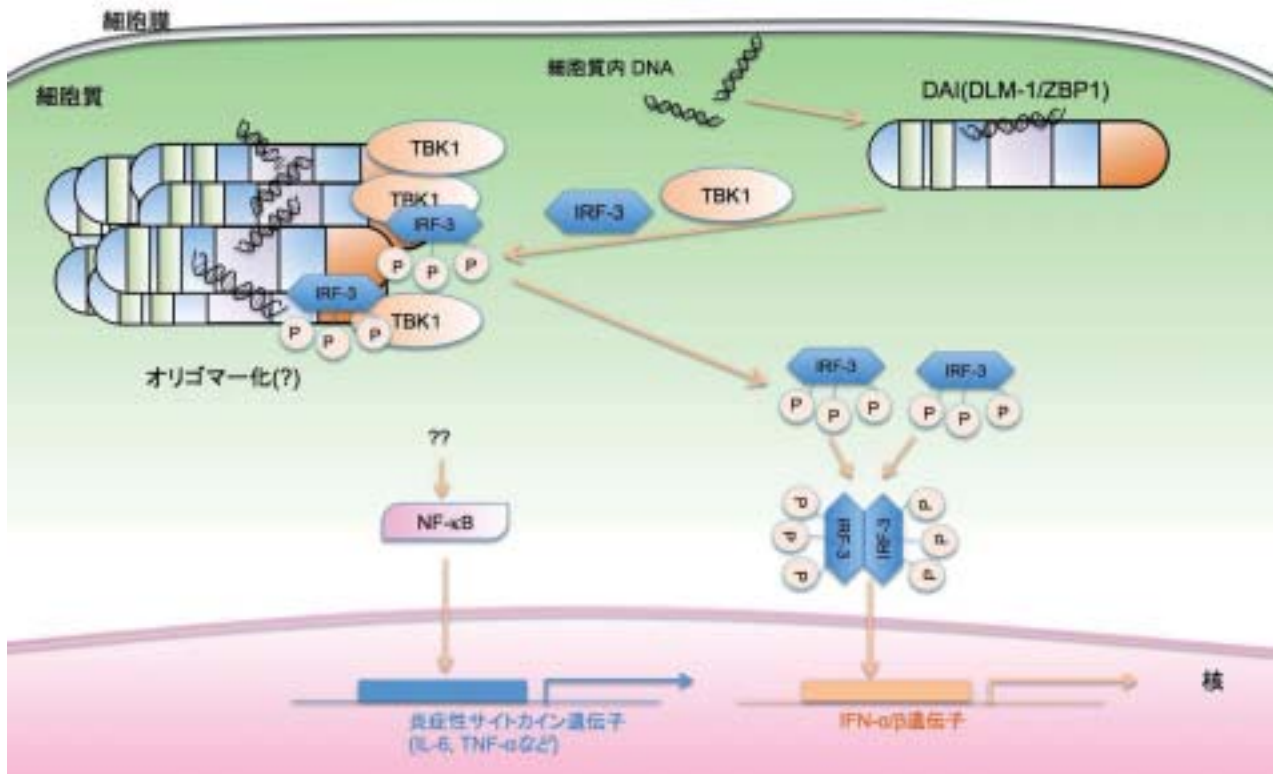


図 2 : DAI (DLM-1/ZBP1) を介するシグナル伝達経路の活性化機構

DAI (DNA-dependent activator of IRFs) は細胞質内の DNA によってオリゴマー化することが示唆されている。これに続き、TBK1 (TANK-binding kinase 1) が DAI (DLM-1/ZBP1) の C 末端側の領域 (TID) と結合して IRF-3 がリン酸化され、I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導されると考えられる。DAI (DLM-1/ZBP1) の下流では NF- κ B を介して炎症性サイトカイン遺伝子発現を誘導する経路も存在すると考えられているが、その詳細は不明である。

させ、TBK1 や IRF-3 が会合する C 末端 100 アミノ酸領域 (TBK1-IRF-interacting domain; TID) (図 1b) を残した DAI (DLM-1/ZBP1) 変異体では spontaneous な活性化はおこらないことから²⁴⁾、DAI (DLM-1/ZBP1) の活性化には、RIG-I などにみられる autoinhibitory な制御は存在しないことが示唆された。一方、artificial に DAI 分子の 2 量体を形成させると、B-DNA が存在しなくても IFN 誘導がみとめられたことから、図 2 に示したように、おそらく B-DNA 複数の DAI (DLM-1/ZBP1) 分子の集合体を形成する結果、TBK1 や IRF-3 がリクルートできるようになり、IFN 発現誘導に必要なシグナル伝達が活性化されると推測される。実際にリガンドとしての B-DNA がある程度 (500-1000bp) の長さを持たないと十分な DAI (DLM-1/ZBP1) の活性化が見られない²⁴⁾。また、おそらく TBK1 によって、DAI (DLM-1/ZBP1) の 352 番目と 353 番目のセリン残基がリン酸化されることで、TBK1 や IRF-3 が効率よく DAI (DLM-1/ZBP1) にリクルートでき、活性化されるメカニズムの存在を示唆する結果が示されている²⁴⁾。

DAI (DLM-1/ZBP1) にみられる Z-DNA 結合領域を有するタンパク質がいくつか知られている¹⁾ (図 3)。Vaccinia ウイルス由来のタンパク質である E3L は 1 つの Z α ドメインを有している。またゼブラフィッシュでは PKZ (PKR-like kinase) が Z α および Z β を 1 つずつもっており、さらに哺乳類においては adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1) が Z α および Z β の両方を有しているが、加えて ds-RNA 結合領域を 3 つと脱アミノ化酵素活性を示す領域も有している。ADAR1 は DAI (DLM-1/ZBP1) と同様に IFN 誘導遺伝子でもあり、抗ウイルス防御応答に関与していることが報告されている。ADAR1 と E3L はともに細胞質 DNA 刺激により誘導される IFN- β の発現を負に制御することが示された²⁴⁾。実際にこれらの 2 つの因子による抑制効果が細胞質 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が、前者は DAI (DLM-1/ZBP1) などの細胞質 DNA センサーに対する抑制因子としての可能性が示唆される一方で、後者は DNA センサーを阻害することで、ウイルスの複製に都合のよいように宿

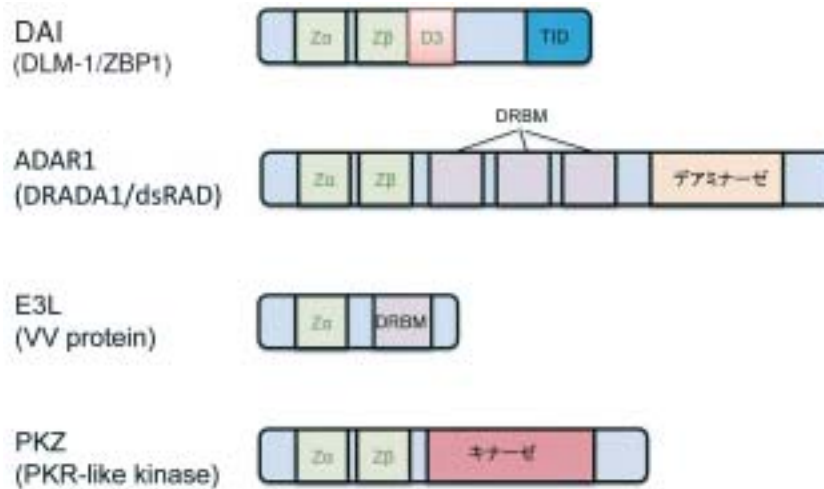


図3：DAI (DLM-1/ZBP1) とその関連メンバー

Z α はZ型DNA結合ドメイン (Z-form DNA-binding domain; ZBD) であり、それと同一性の高い領域が3'側に存在し、Z β と呼ばれている。Z α は元々、ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA1) で発見されたドメインである。ADAR1には二本鎖RNA結合領域 (double-strand-RNA binding domains; DRBM) とデアミナーゼドメインも存在する。また、Z α とDRBMを有するタンパク質としては vaccinia virus (VV) に由来する E3L が存在する。さらに、2つのZBDsを有するタンパク質として、DAI (DLM-1/ZBP1) 以外に、ゼブラフィッシュの PKZ (protein kinase containing A-DNA-binding domains) が知られている。

主細胞による IFNs などの抗ウイルス防御から逃れるメカニズムの1つとして考えることができるかも知れない。

(3) インフラマソーム：細胞質 DNA の認識のためのプラットフォームとしての可能性

感染防御においては、I型IFNsのみならず、炎症性サイトカインの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。最近、アデノウイルス感染細胞において NLR ファミリーメンバーである NALP3 (NLRP3) を介して interleukin (IL)-1 β や tumor necrosis factor (TNF)- α 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¹⁴⁾。NALP3 (NLRP3) は細菌由来のペプチドグリカンをはじめ、ATP や尿酸を認識することで活性化して、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 (Inflammasome)”¹⁷⁾ と呼ばれている複合体を形成することが知られていたが、アデノウイルス感染においては、その DNA がインフラマソーム活性化の主要なトリガーとなっていることが示されている¹⁴⁾ (図1)。さらに様々な微生物をはじめ、哺乳類や合成 DNA (250bp 以上) を細胞内にトランスフェクトした場合にも ASC や caspase-1 依存性のインフラマソームを介した IL-1 β の誘導がみられるが、アデノウイルスの感染時とは異なり、NALP3 (NLRP3) 非依存性である。おそらく別の NLR などのセンサー分子を介していることが予想される。このインフラマソームを介する経路は I 型 IFNs の発現には全く無関係であり、IL-1 β や TNF- α 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。このようにインフラマソームが細胞質内に存在する DNA 認識のプラットフォームとして機能している可能性は示唆されるが、そ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。

3. 感染防御における細胞質 DNA センサーの役割

細胞質内に存在している DNA センサーは如何なる場合に機能しうるか？ おそらくウイルスや細菌が細胞に感染した際に、なんらかの原因によって細胞質内に現れた微生物の DNA を結合することで、微生物の侵入を感知し、感染初期の自然免疫系における防御応答を引き起こすものと予想される。例えば肝炎ウイルスのなかで唯一 DNA ウイルスである HBV (hepatitis B virus) は細胞内で脱核を起こし、細胞質内に DNA が遊離される可能性が考えられるが、このとき、細胞質 DNA センサーのターゲットになる可能性は考えられる。しかし HBV の DNA 複製は、形成されたヌクレオキャプシドコア粒子の中で行われることが知られており、このために細胞質 DNA センサーによる認識が免れているかも知れない。また DNA ウイルスのみならず、HIV (human immunodeficiency virus) などのレトロウイルスもその対象になる可能性が考えられる。レトロウイルスは中間体として細胞質内に DNA を作り出す過程が存在するからである。

pDCs から産生誘導される大量の I 型 IFNs は特定のウイ

ルス感染に対する感染防御応答の上で重要な役割をしていることが示されており、その産生メカニズムに関する研究も盛んに行われてきた。ウイルス感染による I 型 IFN 遺伝子発現誘導においてとくに脾臓由来の pDCs では TLRs を介するシグナルが重要な役割を担っていることが示されている。なかでも水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus; VSV) やインフルエンザウイルスなどの ds-RNA ウイルスによる感染では TLR7 依存性であるのに対し、HSV1 型および 2 型や、マウスサイトメガロウイルス (murine cytomegalovirus; MCMV) といった DNA ウイルスでは TLR9 依存性である^{9,10,12}。しかしながら、TLR9 非依存性経路を介する DNA ウイルスの I 型 IFN 遺伝子発現経路についても報告されており、細胞質 DNA 認識受容体の関連性を考える上で興味深い。

前項で述べたように、HSV 感染による IFN- α 産生は脾臓由来の pDCs においては完全に TLR9 に依存しているのに対し、骨髄由来の pDCs では TLR9 非依存的に行われることが示されている³。ごく最近、骨髄由来の pDCs に対して、細胞内に B-DNA を投与した際の IFN- β やケモカイン誘導は DAI (DLM-1/ZBP1) 欠損細胞では正常に应答することが報告されたが⁷、実際の HSV 感染における DAI (DLM-1/ZBP1) の関連性については興味深い今後の課題であると考えている。マウスの線維芽細胞株である L929 細胞において siRNA (small interfering RNA) を用いた解析では、HSV-1 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²¹。

一方、MCMV は hepatotropism を示す DNA ウイルスとして知られており、MCMV に対する抗ウイルス応答やウイルス排除には I 型 IFNs が重要な役割をしていることが示されている。この場合の I 型 IFN 誘導の大部分は肝臓に存在する pDCs によって担われている⁴。しかも肝臓の pDCs による I 型 IFN 産生誘導メカニズムは、脾臓の pDCs によるメカニズムとは異なっていることが報告されている⁴。すなわち、後者は TLR9-MyD88 依存性の経路によるのに対し、前者は MyD88 には依存するものの TLR9 はもとよりその他の TLR2,3,4,7 には非依存性経路であることが示されている。興味深いことに、この場合、MyD88 依存性であることから、DAI (DLM-1/ZBP1) や報告されている細胞質 DNA 認識機構を介するものではなく、新しい認識受容体の存在が示唆される⁴。同一のウイルスでも感染する細胞や臓器の種類によって自然免疫応答の活性化を引き起こすセンサー分子が異なっており、さらに既存のセンサーでは説明がつかない場合もあることが示されている。ウイルスの侵入経路が臓器や細胞によって異なるため、宿主側で感知するセンサー分子の種類も使い分けされていることが予想される。

病原体や哺乳類の DNA は多くの場合ヒストンなどの DNA 結合タンパク質と複合体を形成していることが知られ

ているが、実際に細胞質内に naked な DNA が存在しうるのだろうか？この点については現時点では明らかではないが、このような DNA とタンパク質の複合体によって作りださせるパターンを認識する可能性も考えられる。*Listeria monocytogenes* という細菌は、マクロファージによって貪食された場合、分解を逃れるためにリステリオリジン O (LLO) という膜融解に働くタンパク質によって細胞質内へ移行することが知られている。これにより I 型 IFNs が発現誘導されるが、リステリア抽出液の中で同様に IFN 誘導性を示すのは DNA 分画であったことから、おそらく細胞質内でリステリアの DNA を認識するセンサーの存在が示唆されている。細菌のなかには、IV 型分泌装置を使ってタンパク質や DNA を宿主の細胞質内へ注入するのが知られている。*Legionella pneumophila* は IV 型分泌装置を発現するために、感染した細胞では、細胞内に注入された DNA によって I 型 IFNs が発現誘導される¹⁹。このようなウイルスや細菌由来の DNA を細胞内で感知して自然免疫応答を発動するセンサー分子が何であるかは現時点ではまだ明らかにされていない。今回見出された DAI (DLM-1/ZBP1) 分子の関与については今後の課題と考えている。

おわりに

今回、細胞質内の DNA センサーの 1 つとして DAI (DLM-1/ZBP1) が同定された。DAI (DLM-1/ZBP1) 分子が、実際に感染防御系においてどのような微生物に対して細胞質内 DNA センサーとして機能するかについては、遺伝子欠損マウスの解析などを行うことで明らかにする必要のある今後の重要な課題であると考えられる。最近、審良氏のグループが DNA ワクチンに関する論文において DAI (DLM-1/ZBP1) の遺伝子欠損マウスの関するデータを発表している⁷。興味深いことに、DAI (DLM-1/ZBP1) 欠損マウス由来の胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) において細胞質内に投与した DNA に対する IFN 応答は野生型の細胞と同等である結果が示されている。我々の DAI (DLM-1/ZBP1) に関する一連の実験はマウスの線維芽細胞株である L929 細胞を用いて行っているという点が異なっており、細胞の種類によって機能する DNA センサーの種類が異なっている可能性が考えられる。実際に MEFs を用いた RNA 干渉の実験ではその抑制は著明ではない結果が得られている²⁴。したがって、おそらく DAI (DLM-1/ZBP1) 以外にも細胞質 DNA 認識受容体が存在している可能性を示唆しているものと考えられる。一方、ADAR1 は DAI (DLM-1/ZBP1) に存在する Z-DNA 結合領域を有する関連メンバーとして考えられるが、DAI (DLM-1/ZBP1) とは反対に、細胞質 DNA に対する IFN 応答に対して負の作用を示すことが報告された。さらに NLR メンバーによって構成されるインフラマソームが細胞内

DNA の認識に関連するプラットフォームとして機能し、IFN 産生誘導とは異なった経路で炎症性サイトカインの誘導に関わっている可能性も示されている¹⁴⁾。このように、細胞質 DNA 認識機構は複数のシステムが存在していることが予想され、今後は関連する DNA センサーを見い出し、DAI (DLM-1/ZBP1) を含めた、これらの細胞質 DNA sensing に関わる分子の感染防御における役割の違いを明らかにすることが課題と考えられる。一方で、このような細胞質 DNA 認識に関連する報告はいずれも宿主 (自己) の DNA に対しても応答性を示すことが共通している。全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematoses; SLE) や関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) など多くの自己免疫疾患において、自己の DNA に対する抗体の出現や自己 DNA の分解処理の異常がその過剰な炎症病態形成に大きな影響を与えていることがわかってきている。このような観点からも、DNA 認識に関する研究は、感染防御の解明のみならず、自己免疫疾患の病態解明へつながる発展性も期待できる。

謝 辞

本稿で紹介した DAI (DLM-1/ZBP1) 関連の研究は東京大学免疫学講座の谷口維紹教授の御指導をいただき、とくに王志超、崔明権、藩龍馬君らをはじめ、多くの共同研究者の方々のご協力のもとになされたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また本稿の図作成にあたりご協力いただいた檜木美美さんや後藤翔平さんにも併せて御礼申し上げます。

文 献

- 1) Athanasiadis A, Placido D, Maas S, Brown BA, 2nd, Lowenhaupt K, Rich A: The crystal structure of the Zbeta domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains. *J. Mol. Biol.* 351: 496-507, 2005.
- 2) Fu Y, Comella N, Tognazzi K, Brown LF, Dvorak HF, Kocher O: Cloning of DLM-1, a novel gene that is up-regulated in activated macrophages, using RNA differential display. *Gene* 240: 157-163, 1999.
- 3) Hochrein H, Schlatter B, O'Keefe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H: Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11416-11421, 2004.
- 4) Hokeness-Antonelli KL, Crane MJ, Dragoi AM, Chu WM, Salazar-Mather TP: IFN- α / β -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 179: 6176-6183, 2007.
- 5) Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T: Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 15416-15421, 2004.
- 6) Ishii KJ, 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: A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 7: 40-48, 2006.
- 7) Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi O, Takeshita F, Coban C, Akira S: TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451: 725-729, 2008.
- 8) Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002.
- 9) Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M: Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*. 103: 1433-1437, 2004.
- 10) Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionic A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M: TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21: 107-119, 2004.
- 11) Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 275-306, 2005.
- 12) Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 513-520, 2003.
- 13) Martinon F, Tschopp J: NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26: 447-454, 2005.
- 14) Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J: The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452: 103-107, 2008.
- 15) Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T, Honda K: Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 15989-15994, 2005.
- 16) Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, Takayanagi H, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K: Evidence for licensing of IFN- γ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 15136-15141, 2006.
- 17) Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J: The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 615-622, 2007.
- 18) Schwartz T, Behlke J, Lowenhaupt K, Heinemann U, Rich A: Structure of the DLM-1-Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins.

- Nat. Struct. Biol. 8: 761-765, 2001.
- 19) Stetson DB, Medzhitov R: Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93-103, 2006.
 - 20) Takaoka A, Taniguchi T: Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 847-857, 2008.
 - 21) Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T: DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-505, 2007.
 - 22) Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243-249, 2005.
 - 23) Takeuchi O, Akira S: Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220: 214-224, 2007.
 - 24) Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T: Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 5477-5482, 2008.
 - 25) Yoneyama M, Fujita T: RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 545-551, 2007.

DNA sensors in innate immune system

Akinori TAKAOKA and Shigeki SHINOHARA

Division of Signaling in Cancer and Immunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University
 Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-0815, Japan. Phone: 81-11-706-5020 Fax 011-706-7541
 E-mail: takaoka@igm.hokudai.ac.jp

Microbial sensing mediated by pattern recognition receptors (PRRs) is the first key step to trigger innate immune responses, represented by the induction of type I interferons (IFNs), proinflammatory cytokines and chemokines. This innate signaling elicits an efficient activation of more specific responses in adaptive immunity. Such coordinated responses in the two systems are essential for the optimal elimination of invading microbes. Despite a major advance in our understanding of RNA sensors, TLR9 remained the only known sensor of DNA. On the other hand, there has been accumulating evidence supporting the existence of TLR9-independent DNA recognition mechanism. In this regard, DAI (also termed as DLM-1/ZBP1), the first sensor of cytosolic DNA, has recently been identified with its activation of IFN-regulatory factors (IRFs) and NF- κ B transcriptional factors. Several recent papers suggest the involvement of an additional cytosolic DNA sensor(s). There is also a recent report that cytosolic microbial and host DNA can trigger pro-inflammatory responses via the TLR- and IRF-independent pathway mediated by the inflammasome, which is consisted of NLR family members together with the adaptor protein ASC and caspase-1. In addition, evidence has been provided that host- and virus-derived proteins, which contain DNA-binding motifs ($Z\alpha$ and/or $Z\beta$) similar to those of DAI(DLM-1/ZBP1), negatively regulates the immune response that is activated by cytosolic DNA. Thus, these recent findings reveal the complex DNA-sensing mechanism for triggering the activation of innate immunity, and the breakdown of this sensing mechanism may lead to autoimmune abnormalities.

