

自然免疫系におけるDNAセンサー

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野 高岡晃教

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これまで考えられていたが、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が、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の同定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からもその重要性は言うまでもなく、また、感知するのみならず、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型インターフェロン(IFN)等のサイトカインやケモカイン、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:PAMPs, pathogen-associated molecular patterns)を認識していることが示され、『パターン認識受容体(PRRs; pattern recognition receptors)』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。Toll様受容体(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 antigen 5)のRLRs (RIG-I-like receptors)ファミリー²⁵や、NOD1やNOD2が含まれるNLRs (NOD-like receptors)¹³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。近年、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。下記において、細胞質DNAセンサーについ

て、このDAI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ターゲットとして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IKKi(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I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-1によるI型IFNs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 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。

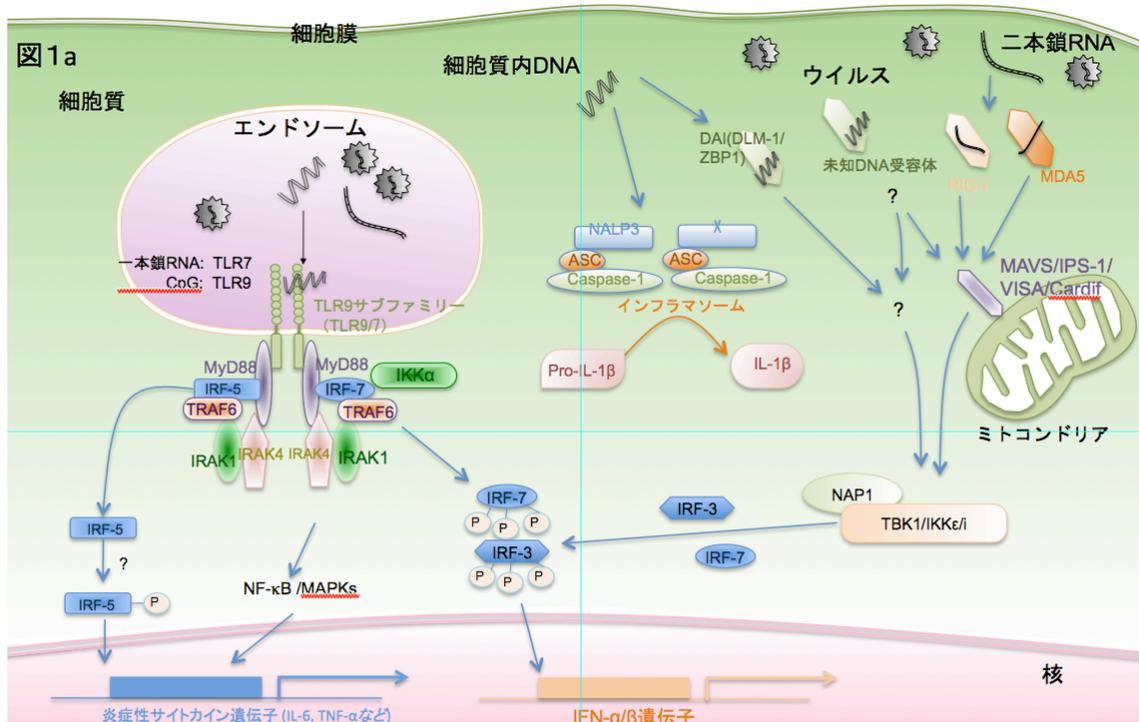


図 1a: 自然免疫系における核酸受容体とシグナル伝達
 自然免疫系のパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) の一つである核酸受容体は、膜貫通型と細胞質型の2種類が存在する。膜貫通型の核酸受容体にはTLR9やTLR7などがあり、それぞれ非メチル化CpG-DNA、及び一本鎖RNAを認識する。これらはMyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) 依存性の経路でIRF-5やIRF-7/IRF-3をリン酸化し、炎症性サイトカインやI型IFN遺伝子の発現を誘導する。一方、細胞質型の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; TRAF6, 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

(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(FRET; fluorescence resonance energy transfer)解析および共沈実験、さらにはDAI (DLM-1/ZBP1)のリコンビナントタンパク質を用いた実験で、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 α)およびその相同性の高いZ β 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。

図1b

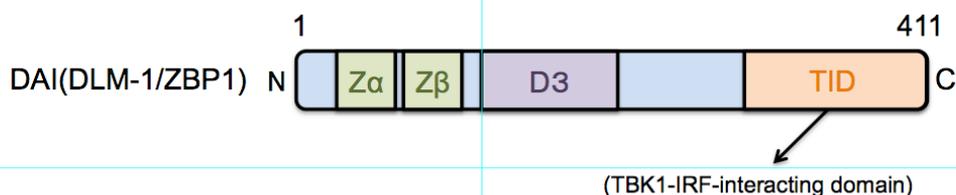


図1b: DAI (DLM-1/ZBP1) のドメイン構造

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 α ドメインと、そのホモロジーであるZ β ドメインを有する。さらに、Z β 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-interaction domain)ドメインが存在することが示された。尚、DAI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の活性化にはZ α 、Z β 、及びD3の3つのドメインが必要である。

在を示唆する結果が示されている²⁴。

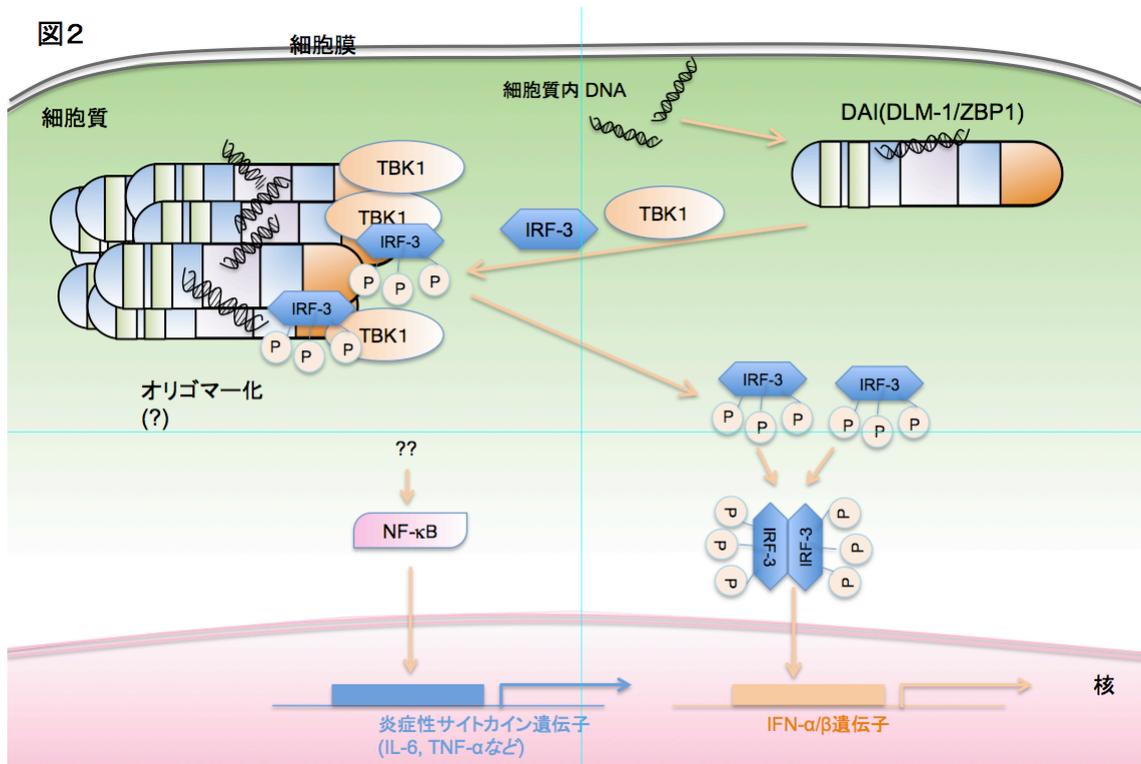


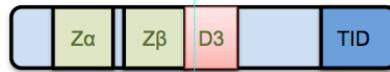
図2: DAIを介するシグナル伝達経路の活性化機構

DAI (DNA-dependent activator of IRF3) は細胞質内のDNAによってオリゴマー化する。これに続き、TBK1 (TANK-binding kinase 1) がDAIのC末端側の領域(TID)と結合してIRF-3がリン酸化され、I型インターフェロン遺伝子の発現が誘導されると考えられる。DAIの下流ではNF-κB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。

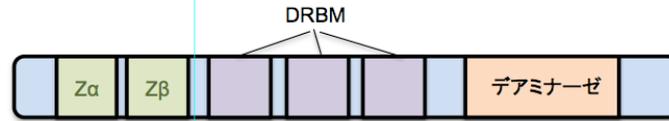
DAI (DLM-1/ZBP1)にみられる Z-DNA 結合領域を有するタンパク質がいくつか知られている¹(図3)。

図3

DLM1



ADAR1
(DRADA1/dsRAD)



E3L
(VV protein)



PKZ
(PKR-like kinase)

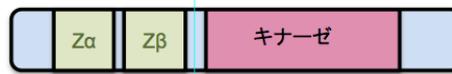


図3: DAIとその関連メンバー

ZαはZ型DNA結合ドメイン (Z-form DNA-binding domain; ZBD)であり、それと相同性の高い領域が3'側に存在し、Zβと呼ばれている。Zαは元々、ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA)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、Zα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/DLM1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。

Vaccinia ウイルス由来のタンパク質である E3L は1つの Zα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 Zα および Zβ 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 RNA (ADAR1)が Zα および Zβ 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) インフラマゾーム: 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)-1β 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”インフラマゾーム (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 がインフラマゾ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ゾームを介した 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。このインフラマゾームを介する経路はI型IFN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ゾームが細胞質内に存在するDNAの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 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 IFNs 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応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 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 IFNs 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 IFNs 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 が存在するのだろうか？ 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つく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ものが知られている。*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

細胞質内の DNA センサーの候補分子の1つとして同定された DAI (DLM-1/ZBP1)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、ADAR-1 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ゾームが細胞内 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 センサーの見出し、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分野であると認識される。

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'Keeffe 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, Dzionek 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.