

1. Toll-like receptor (TLR) と抗ウイルス応答

瀬谷 司, 新開 大史, 松本 美佐子

大阪府立成人病センター研究所免疫部門
北海道大学大学院医学研究科感染症制御学分野

TLRファミリーはロイシンリッチリピート (LRR) の細胞外領域と細胞内の TIR (Toll/IL-1 R homology) ドメインからなる。TLR はリガンドを認識すると細胞内の TIR ドメインへアダプター分子 MyD88などをリクルートし、NF- κ B と MAP kinase を活性化し、最終的にサイトカインやケモカインなどを産生誘導する。一方、骨髄性樹状細胞 (mDC) では TLR による IFN- β 産生や IFN 誘導遺伝子の発現、樹状細胞の成熟化などが誘起されるが、これらはアダプター分子、MyD88非依存性に起こる。TLR の IFN- β 産生系としては dsRNA 刺激による TLR 3 依存性経路、LPS 刺激による TLR 4 を介した IFN- β 産生経路などがある。リンパ球様樹状細胞 (pDC) では TLR 7/TLR 9 刺激で IFN- α が MyD88依存性に誘導される。我々は、本稿で TLR 3, TLR 4 を介した IFN- β 産生に関与するアダプター分子の構造と機能を総説し、新規の IFN- β 誘導経路に言及する。併せてウイルス成分認識性の TLR が type I IFN を誘導するシグナル経路、これらの経路とウイルス感染が誘起する抗ウイルスの細胞応答の連携を概説する。

はじめに

抗ウイルスの宿主応答はウイルスごとに多様である。抗ウイルス免疫の最も強力なエフェクターは CTL (cytotoxic T lymphocytes) である。ウイルスは一般に細胞内で宿主の因子を利用して複製する。従って宿命的にウイルス抗原は極めて効率良く TAP 依存性の class I 提示で CTL を誘導する。さらに、ウイルスは宿主細胞侵入のためにレセプター結合性の蛋白リガンドを表現する必要があり、これらは表面抗原である故に産生抗体と抗原-抗体応答を誘起する。CTL, 抗体は脊椎動物に備わる獲得免疫 (特異免疫) の代表的エフェクターである。「はしかに二度罹らない」のはこのためである。これら獲得免疫の誘導には一ヶ月程度を要する。

これに対し、ウイルスの急性感染症は一般に1週間程度の範囲で鎮静化する。一ヶ月かかる獲得免疫が一週間で治す抗ウイルス応答の主役のはずがない。抗ウイルスの最前

線の防御系は「自然免疫」と呼ばれてきたが、ウイルス感染からその排除に到る自然免疫の分子機構は長らく不明であった。ウイルス認識のパターン認識レセプターを樹状細胞が表現すること、Post-transcriptional gene regulation (PTGS) (RNAi) などが広義の抗ウイルス自然免疫として解明の途につくのはごく最近のことである¹⁾。逆に潜伏・持続感染性ウイルスは宿主免疫を回避する何らかの特異機構や免疫抑制の手段を内在するはずである。ウイルスに対する宿主防御機構の理解は自然免疫の展開とともに急速に広がりつつある。

自然免疫において I 型インターフェロン (IFN- α/β) が強力な抗ウイルスメディエーターであることは古くから知られていた。IFN- β の誘導機構は IRF (interferon regulatory factor) の KO マウスの解析などから IRF-3 活性化の下流で IFN- β 発現誘導が起きること、微量の IFN- β が誘導されていれば IRF-7 が positive feedback で大量の IFN- β を誘導すること、が示された²⁾。さらに IFN AR (レセプター)/IRF-9/STAT 1/2 を介して IFN-inducible genes が誘導され²⁾、この中には、OAS, MxA などの抗ウイルスエフェクターが含まれる。p53も IFN- α/β によって誘導される抗ウイルス産物である³⁾。しかし、ウイルスが感染細胞から I 型 IFN を誘導させるメカニズムは不明であった。RNA 結合ドメインをもつ kinase, PKR, PACT など

連絡先

〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目
TEL: 011-706-5073
FAX: 011-706-7866
E-mail: seya-tu@med.hokudai.ac.jp

の候補分子はノックアウトマウスの実験, などからウイルス感染時の IFN 誘導には主役でないことが示唆されていた。また PKR を活性化する上流分子も不明であった。

近年, IFN 産生が Toll-like receptor (TLR) による微生物成分の特異認識によって起動することが判明した⁴⁾。TLR はヒトでは10種からなるサブファミリーを形成する⁴⁾。TLR は一般に宿主にない微生物成分に特有の分子パターンを認識する⁴⁾。ウイルス成分認識性の TLR は核酸認識の TLR サブファミリー (TLR 3, TLR 7, TLR 8, TLR 9) と脂質・糖・蛋白認識性のサブファミリーに大別される (表 1)。当ラボでは TLR 3 がウイルス dsRNA を認識し, IFN- β を主に起動するレセプターであること⁵⁾, TLR 3 の下流で IRF-3 依存性に IFN- β を誘導する pathway を方向づけるのは TICAM-1 という TLR 3 結合性のアダプター分子であることを同定した⁶⁾。TICAM-1 は TRIF と呼ばれる⁷⁾。さらに本田, 谷口らは I 型 IFN が TLR 3 シグナルを増幅して抗ウイルスの樹状細胞成熟化を促進することを見出した⁸⁾。一方, IRF-3 活性化を誘起する上流分子を探索していたグループが IKK ϵ , TBK 1, を IRF-3 活性化の kinase と同定し, TICAM-1 の下流に位置することを示した⁹⁾。さらにウイルスが IRF-3 を活性化する分子を virus-activated kinase (VAK) と仮定して探索していたグループが, この IKK ϵ , TBK 1 こそが

VAK であるとのデータを公表した¹⁰⁾。一方, plasmacytoid dendritic cell (pDC) において polyU, ssRNA 依存性に IFN- α 誘導が起こること^{11,12)}, TLR 7^{-/-}マウス, TLR 9^{-/-}マウス由来の細胞がこの type I IFN の抗ウイルス応答を欠くこと¹¹⁻¹³⁾も報告された。これらの新知見を本論で解説する。

樹状細胞の Type I IFN/誘導経路と TLR

感染の初期応答の主役は樹状細胞 (DC) である。ヒトにおいて DC の主要なサブセット myeloid DC (mDC) は, TLR 3, TLR 8 を plasmacytoid DC (pDC) は TLR 7, TLR 9 を発現する (表 2)。これらは核酸認識の TLR サブファミリーである。なお, マウスでは TLR 8 は機能しないと報告されている。従って, mDC において TLR 3 の pathway を探索し, pDC において TLR 7/9 の pathway を調べることで, DC の抗ウイルス応答が明らかになるはずである。pDC はヒトでは, CD11c⁻/CD4⁺ の表現型を示し BDCA 4⁺ である。マウスでは CD11c⁺/CD11b⁻/GR-1⁺/B220⁺ である。ヒト・マウスの pDC 表現形の相違については他書を参照されたい¹⁴⁾。

mDC における TLR 3 の IFN- β 誘導経路

TLR ファミリーには一般に 2 つのシグナル系が存在し, MyD88 というアダプターに依存する経路 (MyD88-dependent) と MyD88 に依存しない経路があることが KO マウスの解析から判っていた^{15,16)}。さらに近年, MyD88 に依存しない経路には TICAM-1 (TRIF) という別のアダプターが関与することが示された^{6,7)}。MyD88 が NF- κ B を主に活性化するのに対し, TICAM-1 は主に IRF-3 を活性化し IFN- β を誘導する⁶⁻⁸⁾。ここでは後者を便宜上 TICAM-1 pathway と呼ぶ。この概念から TLR 3 はその主要リガンド dsRNA (表 1) によって TICAM-1 pathway が活性化し, IRF-3 のリン酸化と IFN- β の産生を誘起すると云える。事実, TICAM-1 KO または TICAM-1 変異マウスでは TLR 3 は IFN- β を誘導しなくなる^{17,18)}。故に mDC では TICAM-1 pathway が IRF-3 を活性化して IFN- β を誘導する。即ち, アダプターがシグナル分配を行う。

表 1 ヒトの TLR とそのリガンド

TLR	リガンド
TLR 1	細菌由来トリアシル化リポタンパク質
TLR 2	細菌由来アシル化リポタンパク質, ペプチドグリカン, リポアラビノマンナン, ザイモザン,
TLR 3	2 本鎖 RNA
TLR 4	LPS, F タンパク質 (RSV)
TLR 5	フラジェリン
TLR 6	マイコプラズマ由来ジアシル化リポタンパク質
TLR 7	イミダゾキノリン誘導体, ウイルス由来一重鎖 RNA
TLR 8	イミダゾキノリン誘導体, ウイルス由来一重鎖 RNA
TLR 9	非メチル化 CpG DNA
TLR10	?

TLR 1, 6 のリガンド認識には, TLR 2 とのヘテロダイマー形式が必須である。TLR10 のリガンドは現在不明である。

表 2 単クローン抗体によるヒト TLR の分布解析

DC subsets ³⁾	monoclonal antibodies against :						
	TLR 1 ²⁾	TLR 2 ²⁾	TLR 6 ²⁾	TLR 4 ²⁾	TLR 3 ¹⁾	TLR 7 ¹⁾	TLR 9 ¹⁾
Myeloid	+	++	+	+	++	-	-
Plasmacytoid	-	-	-	-	-	++	++
Neutrophil	+	+++	+	+	-	-	-

1) 核酸認識性 TLR は細胞内に分布する

2) 微生物産物認識性 TLR は原則的に細胞外に分布する

3) TLRs は T, B and NK 細胞にも分布するが, その機能は不明である

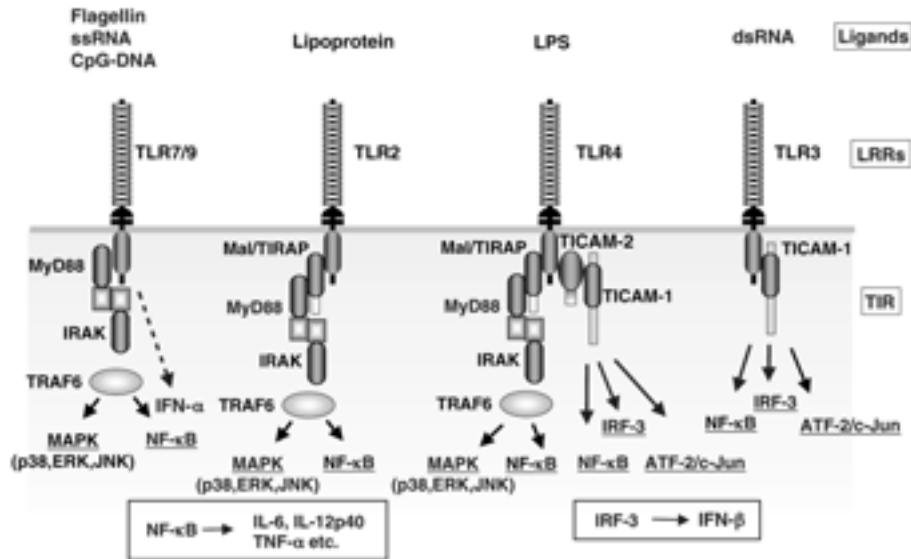


図1 TLR 刺激によって活性化される樹状細胞内シグナルとアウトプット
TLR 3 以外の TLR は MyD88 依存性の経路で NF- κ B, MAPK を活性化する. TLR 3 と TLR 4 は異なる組み合わせのアダプター分子を用いて微生物成分の認識と情報伝達を行なう. TLR 3, TLR 4 の共通点は TICAM-1 依存性に IRF-3, NF- κ B, ATF-2/c-Jun を活性化することである. TICAM-1 依存性の IRF-3 活性化経路 (TICAM-1 経路, 太い矢印) については本文と図3 参照. TLR 7/9 は MyD88 依存性に IFN- α を産生誘導するがそのシグナル伝達経路は未だ不明である. TLR 2 は MyD88 依存性経路のみをもち, I 型 IFN は誘導しない. TNF- α , IL-6, IL-12p40 などの炎症性サイトカイン産生は, MyD88 と TICAM-1 いずれかによる NF- κ B 活性化に依存する. 一方, CD80, CD86, CD83 などの副刺激分子の発現は MyD88 または TICAM-1 のみに依存せず, 他の未知経路を介して誘導される.

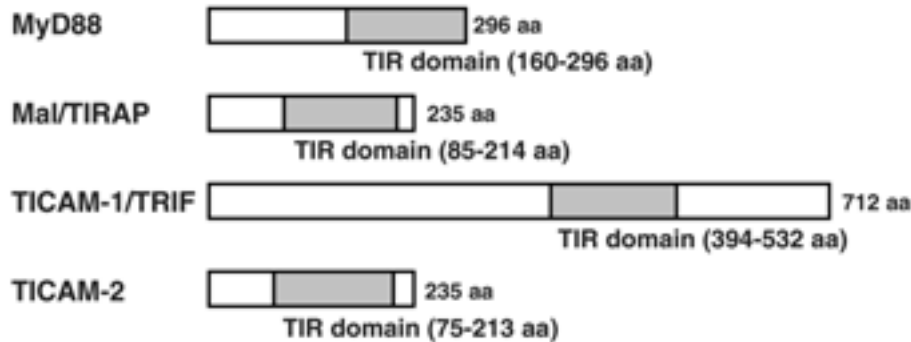


図2 TLR アダプター分子の模式図
TIR ドメインをマークして該当アミノ酸残基数を記した. MyD88 は N 末に death domain をもつ. TICAM-1 は長い N 末, C 末延長鎖をもち, proline-rich 領域を含む. TICAM-2 と Mal/TIRAP の全体構造は類似する. アミノ酸の相同性は TICAM-1 と TICAM-2 で最も高い⁶⁾.

一方, TLR 4 は TLR 3 と共通に IRF-3 を活性化することが知られていた. TLR 4 の主要リガンドは LPS やウイルスの構成成分である. TICAM-1-/-細胞の検討などから TLR 4 も TICAM-1 pathway を共有しうることが判明した¹⁷⁾. しかし, 免疫沈降によって TLR 3-TICAM-1 complex は証明できるが, TLR 4-TICAM-1 complex は証明

できなかった^{6,19)}. TLR 4 は第3の分子存在下に TICAM-1 と間接的に複合体を形成すると推定された (図1).

我々と他のグループは TICAM-1 と相同性の高い分子 TICAM-2 が TLR 4 と直接結合することを見出した¹⁹⁻²¹⁾. TICAM-2 は TICAM-1 とも結合するので TICAM-2-TICAM-1 複合体が TLR 4 アダプター分子として機能す

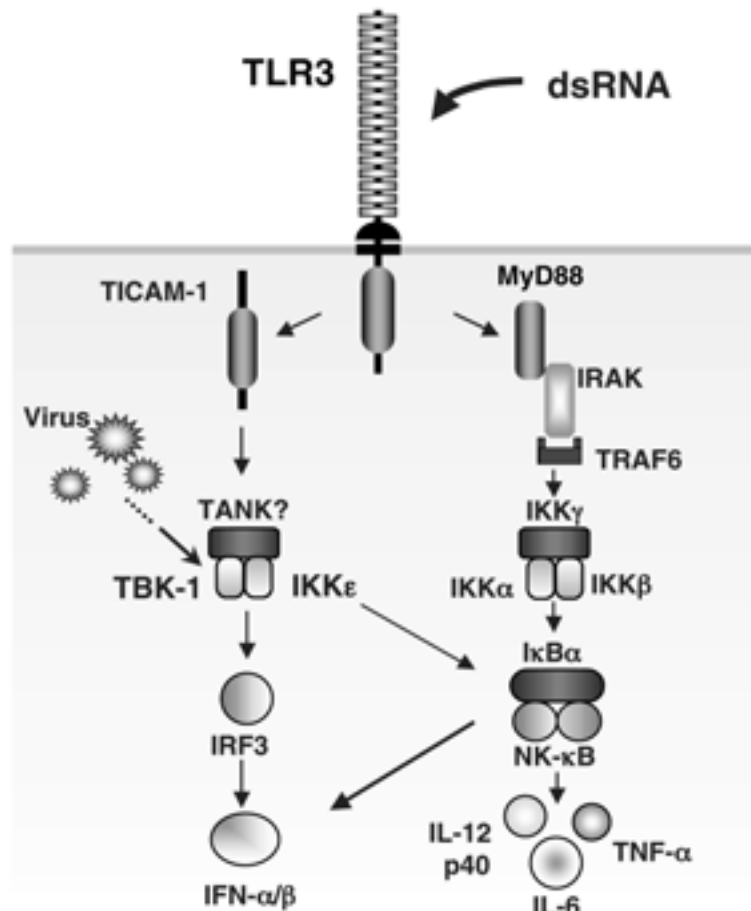


図3 TLR3-TICAM-1を介したNF- κ BとIRF-3の活性化経路
RNAiとKOマウスの解析と分子複合体の免疫沈析などから得られた結果をまとめた。矢印は必ずしも直接活性化を意味しない。破線は、否定的データもある経路を示す。この他にMAPK→c-Jun→AP-1のIFN- β 誘導系、PKRによるIFN- β 誘導系も存在し、TLR-TICAM-1 pathwayと相互にクロストークすると推定されている。

るとIRF-3が活性化するものと考えた(図1)。機能査定の結果もこの仮説を支持した。従ってTLR3, TLR4のIFN- β 誘導活性はTICAM-1 pathwayを共有してIRF-3を活性化する点に特徴がある。

TICAM-1 pathwayの分子モデル

TLR3, TLR4の共通点はIRF-3を活性化する点である(図1)。IFN- α/β の発現誘導にはIRFファミリーの中でIRF-3が初期誘導の必須因子、IRF-7が増幅誘導の鍵因子となる²⁾。IRF-3は外部刺激によってリン酸化されるとIFN- α/β の転写を誘導する。IRF-7は初期誘導のIFN- α/β によって発現誘導される²⁾。従って、TLRがIRF-3を活性化するなら、微生物成分認識からIRF-3活性化に到るシグナル経路が存在することになる。また、TLRの下流を調べることでIRF-3の上流を明らかにすることが可能になる。TICAM-1はTIRドメイン(図2)以外に

長いN末ドメインと短いC末鎖を持つ⁶⁾。N末, C末にはそれぞれ異なる分子群をリクルートすることから、シグナルの分配はこの両鎖に結合する分子の相違と深く関与する²²⁾(笹井ら, 未発表)。TICAM-1のTIRドメインはTLR3又はTICAM-2のTIRドメインとの相互結合に関与するらしい。また、細胞内でウイルス成分が直接TICAM-1に結合する可能性もある。

IRF-3の上流, IRF-3活性化のkinaseは不明であった。ManiatisのグループはIRF-3がTBK1とIKK ϵ の2つのkinaseでリン酸化(活性化)をうけることを見出した⁹⁾。TLR3-TICAM-1のIFN- β プロモーター活性化はIKK ϵ 又はTBK1のRNAi又はドミネガによって阻害された。従って両者はTICAM-1 pathwayに参加する。TBK1/IKK ϵ はIKK γ と相同性の非kinase蛋白質と複合体を形成することからこの複合体がIRF-3を活性化すると推定された(図3)。従って、IRF-3活性化のためにはその

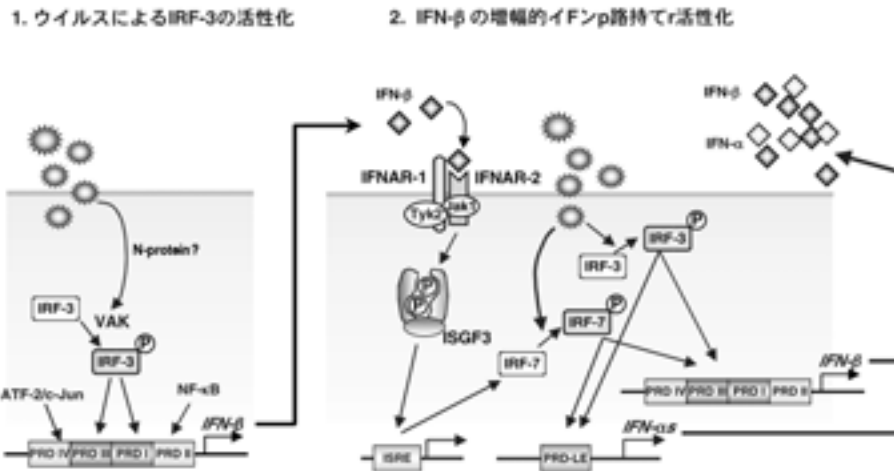


図4 ウィルス成分と VAK の相互作用による IRF-3 活性化のモデル図

N protein は nucleocapsid の主要構成蛋白質である．十分量の N protein が宿主細胞に供給されると N protein は細胞内の VAK と複合体を形成し，VAK を活性化する．N-VAK 複合体中には IRF-3 も存在し，直接か間接か不明だが IRF-3 の C 末リン酸化が誘導される．これによって IRF-3 は dimer or multimer を形成し，核へのトランスロケーションと IFN- β のプロモーター (PRD, positive regulatory domain) を活性化する強力な転写活性を発揮するという²⁶⁾．なおパラミクソウィルス以外のウィルス属では今後の検討が待たれる．麻疹の免疫抑制との関係も現時点では不明である．

上流で TBK 1 /IKK ϵ の 2 つの kinase が協調的に働く必要がある．ただし，これが直接に IRF-3 をリン酸化するかどうかは不明である．また，TICAM-1 に kinase 活性はないので，どのように TBK 1 /IKK ϵ を活性化するかは不明である．TICAM-1 /IRF-3 複合体に含まれる分子群を同定していく中に答がありそうに見える．少なくとも図 3 は複合体中の一部の構成物を示していると考えられる．

ウィルスによる IFN- β 誘導経路は TLR 3-TICAM-1 pathway と融合する

一方，IRF-3 活性化は LPS では N 末リン酸化，ウィルスや dsRNA では C 末リン酸化が誘導される^{23,24)}．LPS とウィルスでは IRF-3 活性化の上流 kinase の特異性が異なるかも知れない．C 末リン酸化する kinase は virus-activated kinase (VAK)²⁵⁾ と呼ばれてきたが，その実体は不明であった．VAK について，藤田らは IRF-3 の 386Ser をリン酸化することを明らかにした²⁴⁾．Hiscott らの研究成果²⁶⁾ を谷口らの IRF-3-IFN- β 産生の経路に重層すると (図 4) ウィルスの成分が VAK, IRF-3 と複合体を形成することが示唆される．最近の同グループの報告によると，IKK ϵ /TBK 1 が VAK の構成要素である¹⁰⁾．即ちウィルスによる IRF-3 の活性化とそれに続く IFN- β の発現はウィルス成分が細胞内で TICAM-1 pathway の構成成分を直接活性化することに起因する．これが正しければ，TLR 3-TICAM-1 pathway とウィルスによる IRF-3 活性化は IRF-3 の上流のどこかで収束することになる (図 3)．

これらの仮説を裏付ける結果として，mCMV 感染が TICAM-1 依存性に増悪し，これが IFN- β 誘導不全と相関することが報告された^{18,27)}．また，ロタウィルス (2 本鎖 RNA をゲノムとする) は mDC を TLR 3 依存性に活性化する²⁸⁾．このほか VSV, センダイ，などモノネガウィルスの一部は TICAM-1 経路を標的とするとの報告がある²⁹⁾．また，PKR 活性化も TLR 3 の下流に存在することも示唆されており^{30,31)}，細胞内 dsRNA でも活性化が誘導される．MyD88 依存性経路も IRF-3 活性化に到る NF- κ B, AP-1 などを生産するので³²⁾ ウィルスは種によって様々な宿主応答を誘起するのであろう．

TLR 7/9 の IFN- α 誘導経路

マウス pDC TLR 7 は polyU などの核酸誘導体刺激で IFN- α を誘導する^{11,12)}．TLR 7 を欠く pDC は同じ刺激で IFN- α を誘導しない．また TLR 3 と異なり IRF-3 を活性化を径由せず IFN- β を殆ど誘導しない．TLR 7 は MyD88 依存性に IFN- α を表現する¹¹⁻¹³⁾．この経路の全貌は明らかになっていない．マウス pDC の TLR 9, ヒトの TLR 9 も CpG DNA を認識して IFN- α を誘導する³³⁾．TLR 9 は TLR 7 と同様に IRF-3 を活性化せず IFN- α のみを誘導する．MyD88 依存性である点も共通である．この経路は TLR 7 と共通性が高いがやはり経路に参与する因子群は同定されていない．今後，TLR 7, TLR 9 がどのように IFN- α promoter を活性化するかは大切な問題になる．両者とも MyD88 が IRF-3 活性化に関与することが示されている⁴⁾．MyD88 依存性経路 (図 3) は IRAK-TRAF 6 を活

性化して遊離せしめ、AP-1やPKRを活性化する³²⁾。この経路が、TLR 3, TLR 4以外で働いてIFN promoterを活性化する可能性はある。また、IKK α /IKK β はNF- κ Bを活性化し、NF- κ BがIFN- β プロモーターを活性化する可能性、MAPKからAP-1を経てIFN- β プロモーターを活性化する可能性も残されている(図3)。

ウイルス感染とTLR 7/9経路

pDCのTLR 7がHIV-1由来のU/G-richのsingle-stranded RNA (ssRNA)を認識してIFN- α を産生誘導することが示された^{11,12)}。(この例ではFlt 3 ligand誘導性のpDCを用いている)。同様のU/G-rich oligonucleotideがヒトTLR 8発現細胞でNF- κ Bを活性化したと報告された¹²⁾。直接的なウイルス感染におけるTLR 7 IFN- α 応答の例として、Reis Sousaらのインフルエンザウイルス感染実験がある¹¹⁾。インフルエンザウイルスはNS1を発現するとdsRNAを介したtype I IFN誘導を阻害する³⁴⁾。また56°C加熱処理でウイルスは不活化するがHA蛋白は変性しない。65°C加熱ではHAも変性し、HAを介したレセプター応答も(取り込み)も阻害される。Sousaのグループは¹¹⁾インフルエンザウイルス(live, 56°C加熱)でpDCを刺激すると大量のIFN- α が誘導されることを見出した。65°C加熱ではIFN- α 産生は見られない。また、この応答はmDCでは起きず、TLR 7^{-/-}, MyD88^{-/-}のpDCでもおきない。CpG, dsRNAとは無関係な応答なのでssRNA(poly U-richインフルエンザmRNAなど)を調べた所、これらに反応してpDCにIFN- α が発現した。即ち、U又はU/G-richなssRNAがTLR 7のリガンドでMyD88依存性にIFN- α を発現誘導する¹¹⁾。同様のTLR応答はVSV感染でも見られた¹²⁾。

HSV-2のCpG DNAでpDCのIFN- α 産生がおきることはIwasakiらによって報告された³³⁾。TLR 9-MyD88がTLR 3 \rightarrow TICAM-1と共にウイルス感染によって活性化することはBentherらのmCMVの感染実験の報告にもある²⁷⁾。

今後の問題点

これらのウイルス感染とTLRは多くTLRノックアウトマウスで得られた結果である。マウスのウイルスであればtropismは問題にならないがヒトを宿主とするウイルスをマウス系で査定する場合、ナチュラルなウイルス応答を反映しないかも知れない。この点は留意すべきである³⁵⁾。

TLR領域の発展の急速化はすさまじく、今年に入ってから先行情報ではあたかもウイルス応答とTLR, TICAM-1 pathwayの全貌が明らかになった印象を与える。しかし、本総論の骨子は各論を殆ど含まない点に問題がある。ウイルスの種間相違は極めて大きく、一元的に語れないであろう。ウイルス応答の生体防御はPKR,

MAPK, TLR, PTGS, VAKを含んだ広い細胞シグナル系でウイルス種ごとに語られるストーリーであろう。ウイルスは長い宿主抗争を通して宿主防御機構を回避して今日の寄生関係を確立してきた。宿主もウイルスの遺伝子を取り入れて進化してきた形跡がある。ヒトゲノムの10%, マウスでは実に25%がウイルス由来と聞いてもさほど驚かない。これは宿主とウイルスの抗争史の長さや複雑さを反映して今日の両者の生理的共存と進化形態があることを意味する。新規の発見は各論のウイルス種で見出され、モデル図はさらに改変されていくであろう。ウイルスの一次応答の主役は樹状細胞(DC)であり、同時にこれがリザーブとして機能する。DCには多数のサブセットがあり、DC subsetごとにTLRの発現プロフィールは異なる²⁸⁾。CTLは二次応答の主役というべきである。本総論でNKの抗ウイルス応答にふれる余裕はないが、DCはNKの活性化にも関与する³⁶⁾。感染免疫の成立にはウイルスによるDCの変調とどのDC subsetがウイルス成分の標的かが潜伏感染や免疫抑制のメカニズムに深く関与するであろう。ウイルス感染の慢性化やそれに続く癌化などもこれらの基礎知見をベースに検討されるべきである。これらの点の解明は今後に残された課題である。

文 献

- 1) Saunders LR, Barber GN. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J*. 2003 Jun; **17**(9): 961-983.
- 2) Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 2001; **19**: 623-655. Review.
- 3) Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003 Jul 31; **424**(6948): 516-523.
- 4) Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov; **1**(2): 135-145. Review.
- 5) Matsumoto M, S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002, **293**: 1364-1369.
- 6) Oshiumi H, M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon β -induction. *Nature Immunol*. 2003, **4**: 161-167.
- 7) Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002 Dec 15; **169**(12): 6668-6672.

- 8) Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. Selective contribution of IFN- α/β signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003, **100** : 10872–10877.
- 9) Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK 1 are essential components of the IRF 3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 May ; **4** (5) : 491–496.
- 10) Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*. 2003 May 16 ; **300**(5622) : 1148–1151.
- 11) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR 7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5 ; **303**(5663) : 1529–1531. 2004
- 12) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford, G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5 ; **303**(5663) : 1526–1529. 2004
- 13) Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13 ; **101**(15) : 5598–603. Epub 2004
- 14) Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2002 Dec ; **63**(12) : 1126–1132. Review.
- 15) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR 2 and TLR 4. *Nature*. 2002 Nov 21 ; **420**(6913) : 324–329.
- 16) Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor-and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol*. 2001 Feb ; **22**(2) : 78–83. Review.
- 17) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1 ; **301**(5633) : 640–643.
- 18) Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. Identification of Lps 2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. 2003 Aug 14 ; **424**(6950) : 743–748.
- 19) Oshiumi, H., K. Sasai, T. Shida, M. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. Identification of the Toll-like receptor (TLR)-adapter that participates in TLR 4-mediated interferon-eta induction. 2003, *J. Biol. Chem*. 2003 Dec 12 ; **278**(50) : 49751–49762.
- 20) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 Nov ; **4** (11) : 1144–1150.
- 21) Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Vrintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR 4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003 Oct 6 ; **198**(7) : 1043–1055.
- 22) Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003 Oct 15 ; **171**(8) : 4304–4310.
- 23) Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14 ; **278**(11) : 9441–9447.
- 24) Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, Fujita T. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12 ; **279**(11) : 9698–9702.
- 25) Servant MJ, Grandvaux N, Hiscott J. Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep ; **64**(5–6) : 985–992. Review.
- 26) tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol*. 2002 Apr ; **76**(8) : 3659–3669. Erratum in : *J Virol* 2002 Jun ; **76**(12) : 6413.
- 27) Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9 ; **101**(10) : 3516–3521.
- 28) Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 2003 Sep 15 ; **171**(6) : 3154–3162.
- 29) Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Aug ; **15**(4) : 396–401. Review. McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk 1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6 ; **101**(1) : 233–238.
- 30) Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*. 2001 Sep ; **2** (9) : 835–841.

- 31) Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly (I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem.* 2003 May 9 ; **278** (19) : 16713-16719. Erratum in : *J Biol Chem.* 2003 Jun 20 ; **278** (5) : 23212.
- 32) Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem.* 2003 Jul 30 [Epub ahead of print].
- 33) 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.* 2003 Aug 4 ; **198** (3) : 513-520.
- 34) Dauber B, Heins G, Wolff T. The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol.* 2004 Feb ; **78** (4) : 1865-1872.
- 35) Seya T, Shingai M, Matsumoto M. Viral infection in association with Toll-like receptors. *Rev. Med. Virol.* (submitted), review, 2004.
- 36) Arase H, Arase H, Lanier LL. Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev Med Virol.* 2004 Mar-Apr ; **14** (2) : 83-93. Review.

Toll-like receptors that sense viral infection

Tsukasa Seya, Masashi Shingai and Misako Matsumoto

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases
Higashinari-ku, Osaka, 537-8511, and
Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine
Kita-ku, Kita-15 Nishi-7, Sapporo 060-8638 Japan
E-mail : seya-tu@med.hokudai.ac.jp

Anti-viral host defense harbors a variety of strategies to cope with viral infection. Recent findings suggested that Toll-like receptors (TLRs) and their signaling pathways involve type I IFN induction in response to virus-specific molecular patterns. TLR3 and TLR4 in myeloid dendritic cells (mDCs) recognize viral dsRNA and putative viral products, respectively, to induce IFN- β via IRF-3 activation. On the other hand, TLR7 and TLR9 in plasmacytoid DCs (pDCs) induce IFN- α in response to their ligands, U/G-rich ssRNA and non-methylated CpG DNA. We identified TICAM-1 which is recruited to the cytoplasmic domain (designated TIR) of TLR3 and allows to select the pathway to activation of IRF-3. We also identified TICAM-2 which binds TLR4 and together with TICAM-1 activates IRF-3. TICAM-1 knockdown by RNAi supported the key role of TICAM-1 in IFN- β induction. Hence, the IFN- β induction in mDCs appears in part due to the function of TICAM-1. Viruses are known to activate kinases that directly activate IRF-3 inside the cells, and this pathway may merge with the TLR3-TICAM-1 pathway. Here we review the relationship between the TLR3-TICAM-1 pathway and viral infection.