

2. RNA ウイルス感染に対する自然免疫

押海 裕之, 松本 美佐子, 瀬谷 司

北海道大学大学院医学研究科

ウイルス感染に対する自然免疫機構の解明は RIG-I 様受容体や Toll 様受容体の発見により大きく進んだ。細胞質内に侵入したウイルス由来の RNA は主に RIG-I 様受容体により認識される。この時、HMGB1-3 分子群や DExD/H box 型の RNA ヘリケース分子群が、ウイルス RNA と RIG-I の結合を仲介する。RIG-I はウイルス由来の RNA を認識すると、アダプター分子の IPS-1 を介して I 型インターフェロンを含む炎症性サイトカインの産生を誘導する。このシグナルには Riplet や TRIM25 等のユビキチンライゲースにより RIG-I がユビキチン修飾を受けることが重要である。エンドソーム内のウイルス RNA は Toll 様受容体により認識され、TLR3 が二重鎖 RNA を認識し、TLR7 や 8 が一本鎖 RNA を認識する。ウイルスはこれらの過程を阻害する機構を持つ。C 型肝炎のコア蛋白質は DExD/H box 型 RNA ヘリケース分子の機能を阻害し、さらに、ウイルスの NS3-4A 分子が宿主の IPS-1 を切断し I 型インターフェロンの産生を抑制する。ウイルス感染に対する自然免疫機構の解明が進むにつれ、今後、ウイルスによる宿主免疫の抑制機構の理解も大きく進むと期待される。

はじめに

ウイルス由来の RNA は宿主の RNA と異なり、二重鎖 RNA を形成し、また、その 5' 末端がキャップされていない。その為、ウイルス由来の RNA は、微生物の構成成分の一つとして自然免疫により認識される。自然免疫で働く RIG-I 様受容体は細胞質内のウイルス RNA を認識し、Toll 様受容体はエンドソーム内のウイルス RNA を認識する。最近の研究の進展から、これら RIG-I 様受容体と Toll 様受容体によるウイルス認識のメカニズムの解明が進んだ。

細胞質内ウイルス RNA センサー RIG-I 様受容体による RNA ウイルス認識

細胞質内にウイルスが侵入すると、ウイルスの核酸は細胞質内のセンサー分子である RIG-I 様受容体により主に認

識され、強い抗ウイルス作用を持つ I 型インターフェロンを含む炎症性サイトカインの産生が誘導される¹⁻³⁾。RIG-I 様受容体は、RIG-I、MDA5、LGP2 の 3 つの分子が存在する^{2,4)}。RIG-I と MDA5 は N 末端に Caspase Activation and Recruitment domain (CARD) 様のドメイン、中央に DExD/H box 型の RNA ヘリケースドメイン、C 末端にウイルス RNA との結合ドメインを持つ (図 1)。この RIG-I の C 末端の立体構造は既に決定されており、塩基性アミノ酸に富む領域がウイルス由来の RNA と結合する⁵⁻⁷⁾。LGP2 は RIG-I や MDA5 と同様にヘリケースドメインと C 末端のウイルス RNA との結合ドメインを持つが、N 末端の CARD 様のドメインは持たない^{8,9)} (図 1)。N 末端の CARD 様ドメインはアダプター分子の IPS-1 と結合に必須である。

RIG-I はインフルエンザウイルスや C 型肝炎ウイルスなど表 1 に示す多くのウイルス RNA を特異的に認識する。一方で、MDA5 は主にピコルナウイルスを特異的に認識する¹⁰⁾。生化学的には、RIG-I は 5' 末端にリン酸基のついた比較的短い二重鎖 RNA を基質とするのに対し、MDA5 分子は 1kbp 以上の比較的長い二重鎖 RNA を認識する^{11,12)} (図 1)。RIG-I と MDA5 は活性化すると、ミトコンドリア外膜上に存在する IPS-1 と呼ばれるアダプター分子を介して炎症性サイトカイン産生誘導のシグナルを伝える¹³⁻¹⁶⁾。LGP2 は RIG-I や MDA5 と異なり、IPS-1 との結合に必要な

連絡先

〒060-8638

札幌市北区北 15 条西 7 丁目

北海道大学大学院医学研究科

TEL: 011-706-5056

FAX: 011-706-7866

E-mail: oshiumi@med.hokudai.ac.jp

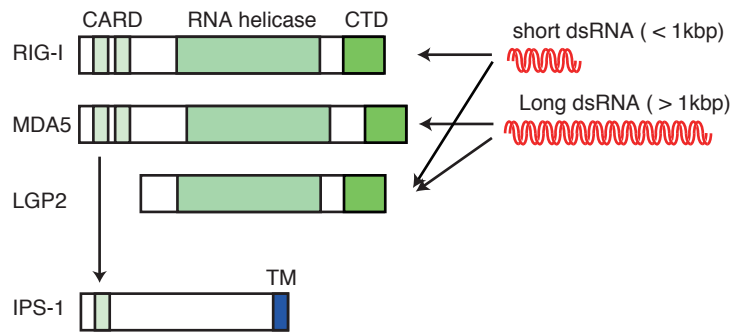


図1 RIG-I 様受容体と IPS-1 アダプター分子の構造

RIG-I 様受容体は RIG-I, MDA5, LGP2 の3つの分子が存在する。全て RNA ヘリケースドメインとウイルス RNA 認識に必要な C 末端領域を持つが, LGP2 は RIG-I と MDA5 とは異なり N 末端に IPS-1 との結合に必要な CARD 様ドメインを持たない。

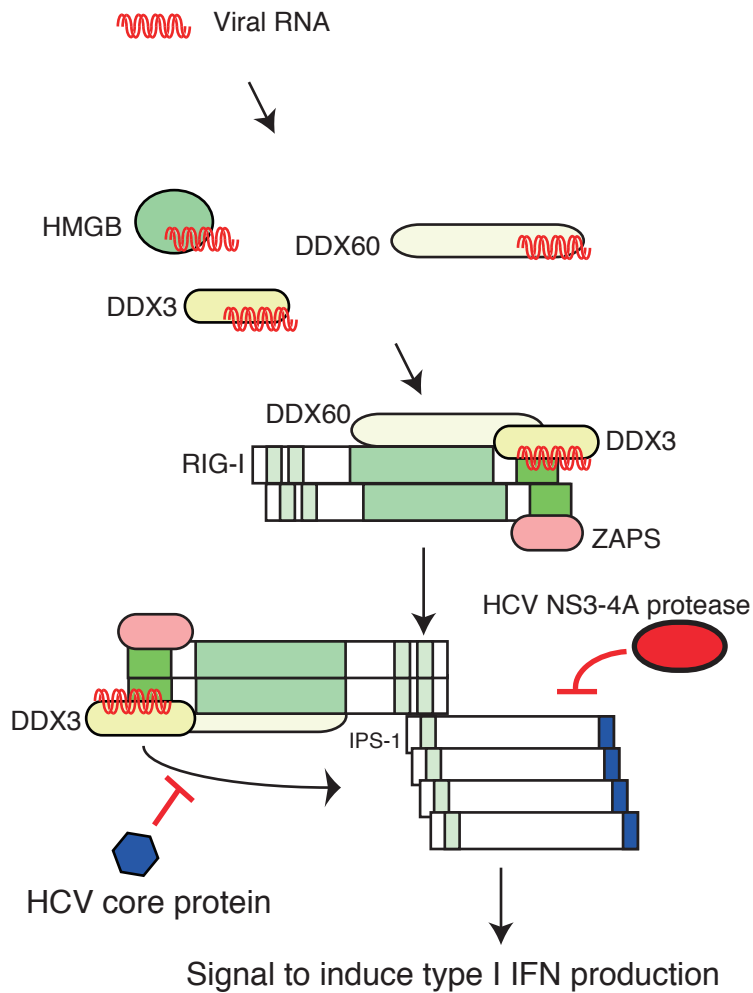


図2 RIG-I によるウイルス RNA 認識に関与する分子群

HMGB1-3 蛋白質群や DDX3, DDX60 RNA ヘリケースは, ウイルス RNA と結合し, RIG-I がウイルス RNA と結合に関与する。ZAPS 分子は RIG-I の活性化に必要である。DDX3 の C 末端には IPS-1 活性化領域が存在する。C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質は DDX3 による IPS-1 の活性化を阻害する。C 型肝炎ウイルスの NS3-4A プロテアーゼは IPS-1 を切断することでシグナルを阻害する。

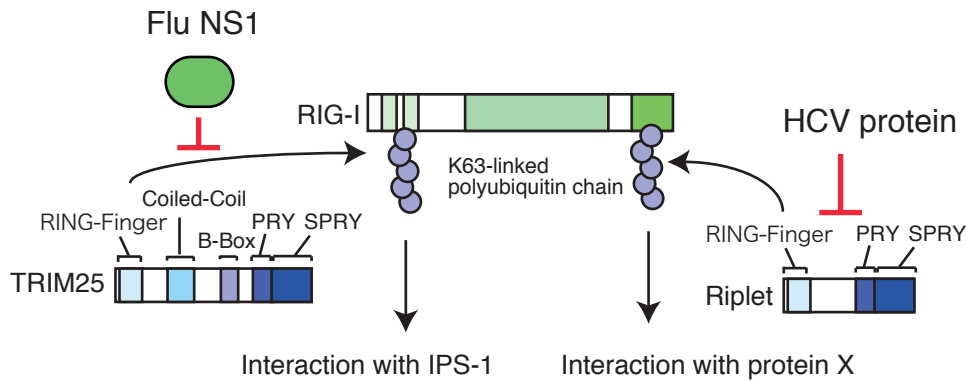


図3 RIG-Iのポリユビキチン化

RIG-IはK63鎖を介したポリユビキチン化を受ける。RIG-IのN末端のCARD様の領域はTRIM25ユビキチンライゲースによりユビキチン化を受け、C末端領域はRipletユビキチンライゲースによりユビキチン化を受ける。インフルエンザウイルスのNS1蛋白質はTRIM25によるRIG-Iのユビキチン化を阻害する。

CARD様のドメインを持たない。さらに、過剰発現系を用いた試験管内の解析等から、当初、LGP2はRIG-IやMDA5を抑制する分子と示唆されていた。しかし、ノックアウトマウスの解析から、LGP2はRIG-IとMDA5経路を促進する働きをすることが示された¹⁷⁾。

RIG-I経路で働くRNAヘリケース分子DDX3とDDX60の役割

RIG-IがウイルスのRNAと結合し、下流のシグナルを活性化するには、いくつかのRNA結合蛋白質の働きが必要である。これまでにHMGB1-3蛋白質群¹⁸⁾、ZAPS分子¹⁹⁾、DExD/H box型RNAヘリケースのDDX3分子とDDX60分子が報告されている²⁰⁻²²⁾。

DDX3 RNAヘリケースは、殆ど全ての細胞で高発現しており、ウイルス感染による発現量の変化は観察されない²¹⁾。このDDX3は、もともと宿主のmRNAの翻訳で働く分子であり²²⁾、HIVウイルスRNAの輸送やHCVの複製にも働く^{23,24)}。DDX3は、RIG-IとIPS-1の両方に結合する。DDX3はRIG-Iと二重鎖RNAとの結合を促進し²⁵⁾、DDX3のC末端の20アミノ酸の領域がIPS-1の活性化を助ける²¹⁾ (図2)。別のグループの解析からは、DDX3はRIG-I下流のTBK1分子等と結合し、その下流で働くことも報告されている^{26,27)}。

DDX60分子はRIG-Iと同様に、IFNにより発現が誘導される²⁰⁾。RNAヘリケースは多く存在するが、ウイルス感染後に、急速に発現上昇するRNAヘリケース分子は少数である。例えば、マウスの樹状細胞を用いたマイクロアレイ解析から、麻疹ウイルス感染後、非常に速やかに上昇するRNAヘリケースはRIG-I様受容体のRIG-I、MDA5、LGP2とDDX60の4つの分子だけである²⁰⁾。DDX60分子も、DDX3分子と同様にRIG-Iの二重鎖RNAへの結合を促進し、RIG-IによるI型インターフェロン産生誘導を促進する²⁰⁾ (図2)。網羅的解析からDDX60がC型肝炎ウ

イルスの複製を抑制することも報告されている²⁸⁾。

ユビキチンによるRIG-I活性化の制御機構

RIG-I分子はユビキチンによる修飾を受ける²⁹⁾。ユビキチンの48番目のリジン(K48)を介したターゲット蛋白質のポリユビキチン化はプロテアソームによる分解を受けるが、ユビキチンの63番目のリジン(K63)を介したポリユビキチン化では、プロテアソームによる分解を受けずにユビキチン結合ドメインを持つ蛋白質との相互作用を引き起こす^{30,31)}。RIG-Iはウイルス感染後、K63鎖を介したポリユビキチン化を受ける³²⁾。このポリユビキチン化を引き起こすユビキチンライゲースは二種類存在し、TRIM25分子とRiplet分子である²⁹⁾ (図3)。

TRIM25はRINGドメイン、コイルドコイル、B boxの3つのドメイン構造の特徴を持つTRIMファミリーメンバーに含まれ、ユビキチンライゲースとして働く。TRIM25はRIG-IのCARD様ドメインをユビキチン化し、これがIPS-1との結合を促す^{30,32,33)}。一方のRiplet分子は、そのアミノ酸配列がTRIM25と弱いながらも相同性を示すが、コイルドコイルとB boxドメインを持たないことからTRIMファミリーには分類されていない³⁴⁾。Ripletは、殆ど全ての臓器で発現し、繊維芽細胞、マクロファージ、樹状細胞で発現する。RIG-Iとは異なりウイルス感染前後においてmRNA量とタンパク量は変化しない。TRIM25がRIG-IのCARD様ドメインをポリユビキチン化するのに対し、Riplet分子はRIG-IのC末端領域にK63鎖を介したポリユビキチン化を引き起こすことで、RIG-Iを活性化する^{29,34)} (図3)。ユビキチン化したRIG-Iがミトコンドリア上のアダプター分子IPS-1と結合すると、IPS-1がプリオン様の凝集体を作ることで、I型インターフェロンを含む炎症性サイトカイン産生のシグナルが伝わる^{30,35)}。RipletがRIG-IのN末端領域と結合するという報告があ

表1 RIG-IとMDA5に認識されるウイルス

RIG-I	オルソミクソウイルス	A型, B型インフルエンザ ^{10,81)}
	パラミクソウイルス	センダイウイルス ¹⁰⁾ 麻疹ウイルス ⁸²⁾ RSウイルス ⁸³⁾ NDV ¹⁰⁾
	フラビウイルス	C型肝炎ウイルス ⁸⁴⁾ 日本脳炎ウイルス ¹⁰⁾ デング熱ウイルス ⁸¹⁾ 西ナイル熱ウイルス ⁸⁵⁾
	ラプトウイルス	牛水泡性口内炎ウイルス ¹⁰⁾ 狂犬病ウイルス ¹²⁾
	フィロウイルス	エボラウイルス ⁸⁶⁾
	レオウイルス	レオウイルス ⁸¹⁾ ロタウイルス ⁸⁷⁾
	<hr/>	
MDA5	ピコルナウイルス	EMCV ¹⁰⁾ ポリオウイルス ⁸⁸⁾
	フラビウイルス	西ナイル熱ウイルス ⁸⁹⁾ デング熱ウイルス ⁸¹⁾
	パラミクソウイルス	麻疹ウイルス ⁹⁰⁾
	レオウイルス	レオウイルス ⁸¹⁾ ロタウイルス ⁸⁷⁾

表2 TLR3とTLR7により認識される主なウイルス

TLR3	ピコルナウイルス	ポリオウイルス ^{61,62)} コクサッキーB3ウイルス ⁵⁹⁾
	ヘルペスウイルス	単純ヘルペスI型ウイルス ⁸⁰⁾
	フラビウイルス	西ナイル熱ウイルス ⁶⁰⁾ C型肝炎ウイルス ⁶³⁾
<hr/>		
TLR7	オルソミクソウイルス	A型インフルエンザウイルス ⁴²⁾
	パラミクソウイルス	センダイウイルス ⁹¹⁾
	ラプトウイルス	牛水泡性口内炎ウイルス ⁴¹⁾
	フラビウイルス	西ナイル熱ウイルス ⁹²⁾

るが³⁶⁾, 我々が実験した限りに於いては, RipletとRIG-IのN末端との結合は観察されなかった。

Ripletは別名RNF135と呼ばれ, ヒトではヘテロ欠損で, 発生にわずかな異常と学習障害等をもたらす³⁷⁾。しかし, ホモで変異を持つ患者は見つかっていない。一方で, Ripletのノックアウトマウスの解析からは, Riplet遺伝子のヘテロおよびホモ欠損のいずれでも, マウスでは発生に顕著な欠損はない。ウイルス感染時の炎症性サイトカインの産生を調べると, Riplet遺伝子をノックアウトすること

で, 胎児繊維芽細胞, 骨髄由来樹状細胞, マクロファージにおいて, ウイルス感染時のI型インターフェロンの産生が殆ど完全に遮断される^{29,38)}。マウス個体への感染実験においても, 血中のI型インターフェロンの産生はRipletに依存し, Ripletノックアウトマウスでは生存率も著しく低下する³⁸⁾。

一方で, RIG-IはK48鎖を介したポリユビキチン修飾も受ける。RNF125ユビキチンライゲースはRIG-Iを, K48を介したポリユビキチン化し, プロテアソームによる分解

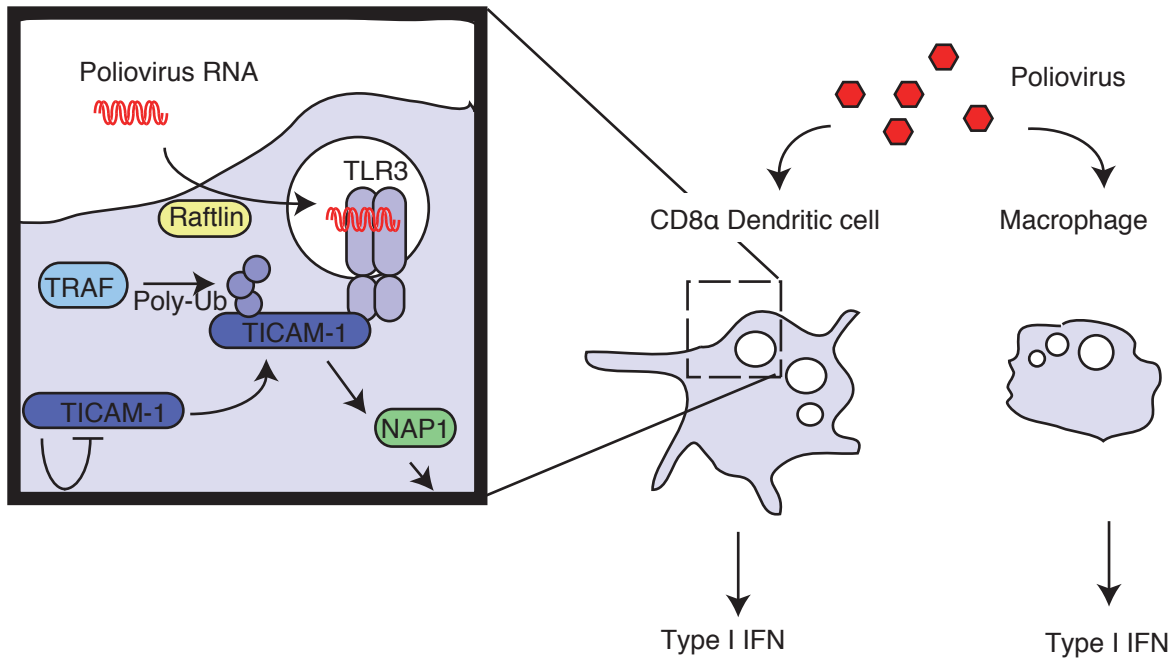


図4 TLR3を介したウイルスRNAの認識

TLR3はCD8 α 陽性の樹状細胞やマクロファージで発現が高く、エンドソーム上に存在する。Raftlinがなければ、TLR3は二重鎖RNAを認識できない。TICAM-1のN末端は活性化調節領域である。活性化したTICAM-1は、TRAF蛋白質によるK63鎖を介したポリユビキチン化を受ける。TICAM-1はNAP1等の分子を介しシグナルを伝える。

を促す³⁹⁾。RNF125はウイルス感染後に発現誘導されRIG-I経路の過剰な活性化を抑制する²⁹⁾。

Toll様受容体によるウイルスの認識

ヒトには10種類のToll様受容体が存在する⁴⁰⁾。ウイルス由来RNAの認識に関与するのはTLR3、TLR7、TLR8である。TLR3が二重鎖RNAを認識するのに対し、TLR7と8は一本鎖のRNAの認識に関与する⁴¹⁻⁴⁵⁾。TLR3は細胞の種類により細胞表面にいる場合と細胞内に存在する場合があります。細胞内ではエンドソームに存在する^{46,47)}。RIG-I様受容体が、ほぼ全ての細胞で発現するのに対し、TLRの発現は細胞特異性が高い。マウスでは、TLR3はマクロファージやCD8 α 陽性樹状細胞で高発現しており、TLR7は形質細胞様樹状細胞で高発現している^{48,49)}。これらは基本的に樹状細胞の成熟化と抗原提示・細胞性免疫のエフェクター誘導(NK、T細胞)に寄与する。TLR7は生体内において、インフルエンザウイルス感染時のI型インターフェロン産生および抗体産生に於いて重要な働きをする⁵⁰⁾。TLR3やTLR7により認識される主なウイルスについて表2に示した。

TLR3が二重鎖RNAやpolyIC等を効率よく認識するにはRaftlin分子を必要とする⁵¹⁾。TLR3はTICAM-1(別名:Trif)と呼ばれるアダプター分子を介して細胞内へとシグ

ナルを伝える⁵²⁻⁵⁴⁾。TICAM-1はTLR3とTLR4のアダプター分子として働き^{52,53,55)}。TICAM-1の活性化は、そのN末端にシグナル活性化の調節領域が存在する。TICAM-1は活性化するとTRAF2と6によるK63鎖を介したポリユビキチン化を受ける^{56,57)}。さらに、TICAM-1は、NAP1等の分子を介してTBK1を活性化しI型インターフェロン産生を誘導する⁵⁸⁾(図4)。

TLR3-TICAM-1依存的な経路は、ピコルナウイルス感染で重要な役割を果たす。コクサッキーB3ウイルス感染時にはTLR3依存的にII型インターフェロンが産生されウイルスの排除に働く⁵⁹⁾。また、TLR3はウイルス感染の増悪因子としても機能し、西ナイル熱ウイルス感染時には、TLR3を介した炎症性サイトカインの産生が、脳血管門を開き、脳へのウイルスの侵入を許す結果となる⁶⁰⁾。しかし、TLR3-TICAM-1経路によるI型インターフェロン産生経路がウイルスの抑制にどのように関与するかは最近まで不明であった¹⁾。我々は、ピコルナウイルス科のポリオウイルス感染のマウスモデルを使用し解析を行ったところ、TICAM-1がポリオウイルス感染時にマクロファージやCD8 α 陽性の樹状細胞によるI型インターフェロン産生に非常に重要な働きをし、これがポリオウイルスに対する感染防御に働くことを発見した^{61,62)}(図4)。また、TLR3は、樹状細胞に於いてC型肝炎ウイルス由来のRNA認識に於いても重要である⁶³⁾。

TLR3-TICAM-1 経路は, polyIC 等のアジュバントによる癌免疫でも重要な働きをする⁶⁴⁾. このとき TICAM-1 は樹状細胞による NK 活性化と CTL 誘導を引き起こす鍵因子となる. NK 活性化の場合, polyIC は INAM 分子を樹状細胞上に発現させ, NK 細胞依存性に癌を退縮させる⁶⁵⁾. TLR3-TICAM-1 は cross-presentation の主要経路であるが, 樹状細胞における TICAM-1 下流の責任分子はまだ同定されていない. 従って, dsRNA による CTL 誘導の分子機構は未解明である.

ウイルスによる自然免疫の阻害機構

HCV 等のウイルスは RIG-I や TLR3 による炎症性サイトカインの産生を抑制する. HCV のコア蛋白質は以前から DDX3 分子と結合することが報告されていた⁶⁶⁾. HCV は細胞内の脂肪滴周辺で複製を行うが⁶⁷⁾, HCV のコアが存在すると, ミトコンドリアに存在する IPS-1 分子周辺の DDX3 分子が脂肪滴周辺へと蓄積し, DDX3 と IPS-1 との結合が阻害される²⁵⁾. また, このとき RIG-I によるシグナル伝達も阻害されることから, HCV のコア蛋白質は, DDX3 の機能を阻害することで I 型インターフェロン産生を抑制している²⁵⁾ (図 2). さらに, HCV の非構造蛋白質である NS3-4A プロテアーゼは IPS-1 や TICAM-1 分子を切断する^{15,68)} (図 2). また我々は HCV の全長のレプリコンを含む細胞では Riplet の発現量が大きく減少することを見いだしており, これらの複数のメカニズムを介して HCV は RIG-I 依存的な炎症性サイトカインの産生を抑制すると考えられる (図 3).

インフルエンザの非構造蛋白質の NS1 は, ウイルス感染時の I 型インターフェロン産生を抑制する¹⁾. 最近になり, NS1 が TRIM25 蛋白質の機能を阻害することで RIG-I による I 型インターフェロン産生が抑制することが報告された⁶⁹⁾ (図 3). しかし, 様々なインフルエンザの NS1 分子を比較検討した結果, NS1 の TRIM25 への結合と NS1 によるインターフェロン産生の抑制は必ずしも相関していないことから, 未知の抑制機構も存在すると予想される⁷⁰⁾.

おわりに

RNA の認識機構は RIG-I 受容体の発見により大きく前進した一方で, DNA の認識機構は DAI⁷¹⁾ の発見を皮切りに, IFI16⁷²⁾ や DDX41⁷³⁾ など様々なセンサー分子が発見され, 逆にこれらの分子だけでは十分に説明がつかないとも指摘されている⁷⁴⁾. 未知の DNA センサー分子も含めて, これらの分子は全て小胞体上に存在する STING を介して TBK1 を活性化し I 型インターフェロンの産生を誘導する⁷⁵⁻⁷⁷⁾. 一方で DNA をゲノムに持つウイルスの認識は必ずしも, DNA センサーだけが関与するのではないことも報告されている. ヘルペスウイルス等は, 生活環の中で二重鎖 RNA を生成することから RNA センサーにより認識され

る. たとえば, RNA を認識する RIG-I は細胞質に存在する RNA ポリメラーゼ III によって転写された RNA を認識することで, 間接的に細胞質内の DNA を認識することが可能であり, RIG-I が直接 DNA と結合する活性を持つことも報告されている^{74,78,79)}. また, ヒトでは単純ヘルペス I 型ウイルスの認識に TLR3 が関与することも報告されている⁸⁰⁾. 今後, ウイルス由来 DNA の認識機構がさらに解明されるにつれ, DNA ウイルスが宿主の自然免疫を回避する仕組みの理解も進むと期待される.

参考文献

- 1) Diebold, S. S. et al., Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. 424: 324-328 2003.
- 2) Yoneyama, M. et al., Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*. 175: 2851-2858 2005.
- 3) Yoneyama, M. et al., The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 5: 730-737 2004.
- 4) Loo, Y. M. and Gale, M., Jr., Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 34: 680-692 2011.
- 5) Takahashi, K. et al., Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell*. 29: 428-440 2008.
- 6) Luo, D. et al., Structural Insights into RNA Recognition by RIG-I. *Cell*. 147: 409-422 2011.
- 7) Kowalinski, E. et al., Structural Basis for the Activation of Innate Immune Pattern-Recognition Receptor RIG-I by Viral RNA. *Cell*. 147: 423-435 2011.
- 8) Takahashi, K. et al., Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J Biol Chem*. 284: 17465-17474 2009.
- 9) Pippig, D. A. et al., The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res*. 37: 2014-2025 2009.
- 10) Kato, H. et al., Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 441: 101-105 2006.
- 11) Kato, H. et al., Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 205: 1601-1610 2008.
- 12) Hornung, V. et al., 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 314: 994-997 2006.
- 13) Xu, L. G. et al., VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 19: 727-740 2005.
- 14) Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J., Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122: 669-682 2005.
- 15) Meylan, E. et al., Cardif is an adaptor protein in the

- RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 437: 1167-1172 2005.
- 16) Kawai, T. et al., IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 6: 981-988 2005.
 - 17) Satoh, T. et al., LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. AOP: doi: 10.1073/pnas.0912986107 2010.
 - 18) Yanai, H. et al., HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 462: 99-103 2009.
 - 19) Hayakawa, S. et al., ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol*. 12: 37-44 2011.
 - 20) Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., and Seya, T., DDX60, a DEXD/H Box Helicase, Is a Novel Antiviral Factor Promoting RIG-I-Like Receptor-Mediated Signaling. *Mol Cell Biol*. 31: 3802-3819 2011.
 - 21) Oshiumi, H., Sakai, K., Matsumoto, M., and Seya, T., DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta-inducing potential. *Eur J Immunol*. 40: 940-948 2010.
 - 22) Lai, M. C., Lee, Y. H., and Tarn, W. Y., The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell*. 19: 3847-3858 2008.
 - 23) Ariumi, Y. et al., DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 81: 13922-13926 2007.
 - 24) Yedavalli, V. S. et al., Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*. 119: 381-392 2004.
 - 25) Oshiumi, H. et al., Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS One*. 5: e14258 2010.
 - 26) Soulat, D. et al., The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *Embo J*. 27: 2135-2146 2008.
 - 27) Schroder, M., Baran, M., and Bowie, A. G., Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *Embo J*. 27: 2147-2157 2008.
 - 28) Schoggins, J. W. et al., A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 472: 481-485 2011.
 - 29) Oshiumi, H., Matsumoto, M., and Seya, T., Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem*. 2011.
 - 30) Zeng, W. et al., Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell*. 141: 315-330 2010.
 - 31) Lo, Y. C. et al., Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. *Mol Cell*. 33: 602-615 2009.
 - 32) Gack, M. U. et al., TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 446: 916-920 2007.
 - 33) Gack, M. U. et al., Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 16743-16748 2008.
 - 34) Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., and Seya, T., Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem*. 284: 807-817 2009.
 - 35) Hou, F. et al., MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 146: 448-461 2011.
 - 36) Gao, D. et al., REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-I. *PLoS One*. 4: e5760 2009.
 - 37) Douglas, J. et al., Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nat Genet*. 39: 963-965 2007.
 - 38) Oshiumi, H. et al., The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe*. 8: 496-509 2010.
 - 39) Arimoto, K. et al., Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 7500-7505 2007.
 - 40) Kawai, T. and Akira, S., Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 34: 637-650 2011.
 - 41) Lund, J. M. et al., Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 5598-5603 2004.
 - 42) Diebold, S. S. et al., Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 303: 1529-1531 2004.
 - 43) Hemmi, H. et al., Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 3: 196-200 2002.
 - 44) Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413: 732-738 2001.
 - 45) Matsumoto, M. et al., Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 293: 1364-1369 2002.
 - 46) Johnsen, I. B. et al., Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO J*. 25: 3335-3346 2006.
 - 47) Matsumoto, M. et al., Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 171: 3154-3162 2003.
 - 48) Schulz, O. et al., Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 433: 887-892 2005.
 - 49) Iwasaki, A. and Medzhitov, R., Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 5: 987-995 2004.

- 50) Koyama, S. et al., Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol.* 179: 4711-4720 2007.
- 51) Watanabe, A. et al., Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem.* 286: 10702-10711 2011.
- 52) Yamamoto, M. et al., Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301: 640-643 2003.
- 53) Hoebe, K. et al., Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 424: 743-748 2003.
- 54) Oshiumi, H. et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 4: 161-167 2003.
- 55) Oshiumi, H. et al., TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem.* 278: 49751-49762 2003.
- 56) Tatematsu, M. et al., A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J Biol Chem.* 285: 20128-20136 2010.
- 57) Sasai, M. et al., Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol Immunol.* 47: 1283-1291 2010.
- 58) Sasai, M. et al., NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol.* 177: 8676-8683 2006.
- 59) Negishi, H. et al., A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 20446-20451 2008.
- 60) Wang, T. et al., Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 10: 1366-1373 2004.
- 61) Oshiumi, H. et al., The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol.* in press 2011.
- 62) Abe, K. et al., The Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol.* in press 2011.
- 63) Ebihara, T. et al., Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology.* 48: 48-58 2008.
- 64) Akazawa, T. et al., Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 252-257 2007.
- 65) Ebihara, T. et al., Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med.* 207: 2675-2687 2010.
- 66) Owsianka, A. M. and Patel, A. H., Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology.* 257: 330-340 1999.
- 67) Miyanari, Y. et al., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097 2007.
- 68) Li, K. et al., Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 2992-2997 2005.
- 69) Gack, M. U. et al., Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe.* 5: 439-449 2009.
- 70) Kuo, R. L., Zhao, C., Malur, M., and Krug, R. M., Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon-beta transcription. *Virology.* 408: 146-158 2010.
- 71) Takaoka, A. et al., DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 448: 501-505 2007.
- 72) Unterholzner, L. et al., IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 11: 997-1004 2010.
- 73) Zhang, Z. et al., The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol.* 12: 959-965 2011.
- 74) Choi, M. K. et al., A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 17870-17875 2009.
- 75) Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G. N., STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 461: 788-792 2009.
- 76) Ishikawa, H. and Barber, G. N., STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature.* 455: 674-678 2008.
- 77) Ishii, K. J. et al., TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature.* 451: 725-729 2008.
- 78) Chiu, Y. H., Macmillan, J. B., and Chen, Z. J., RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 138: 576-591 2009.
- 79) Ablasser, A. et al., RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* 10: 1065-1072 2009.
- 80) Zhang, S. Y. et al., TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 317: 1522-1527 2007.
- 81) Loo, Y. M. et al., Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol.* 82: 335-345 2008.
- 82) Plumet, S. et al., Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One.* 2: e279 2007.

- 83) Liu, P. et al., Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol.* 81: 1401-1411 2007.
- 84) Saito, T. et al., Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* 454: 523-527 2008.
- 85) Fredericksen, B. L. and Gale, M., Jr., West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J Virol.* 80: 2913-2923 2006.
- 86) Cardenas, W. B. et al., Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol.* 80: 5168-5178 2006.
- 87) Sen, A. et al., The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol.* 85: 3717-3732 2011.
- 88) Barral, P. M. et al., MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol.* 81: 3677-3684 2007.
- 89) Fredericksen, B. L. et al., Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol.* 82: 609-616 2008.
- 90) Berghall, H. et al., The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect.* 8: 2138-2144 2006.
- 91) Melchjorsen, J. et al., Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol.* 79: 12944-12951 2005.
- 92) Town, T. et al., Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity.* 30: 242-253 2009.

Innate Immune Response to RNA Virus Infection

Hiroyuki OSHIUMI, Misako MATSUMOTO, and Tsukasa SEYA

Graduate School of Medicine, Hokkaido University

E-mail: oshiumi@med.hokudai.ac.jp

Viral RNA is recognized by RIG-I-like receptors and Toll-like receptors. RIG-I is a cytoplasmic viral RNA sensor. High Mobility Group Box (HMGB) proteins and DExD/H box RNA helicases, such as DDX3 and 60, associate with viral RNA. Those proteins promotes the RIG-I binding to viral RNA. RIG-I triggers the signal via IPS-1 adaptor molecule to induce type I IFN. RIG-I harbors Lys63-linked polyubiquitination by Riplet and TRIM25 ubiquitin ligases. The polyubiquitination is essential for RIG-I-mediated signaling. Toll-like receptors are located in endosome. TLR3 recognizes viral double-stranded RNA, and TLR7 and 8 recognize single-strand RNA. Virus has the ability to suppress these innate immune response. For example, to inhibit RIG-I-mediated signaling, HCV core protein suppresses the function of DDX3. In addition, HCV NS3-4A protein cleaves IPS-1 to inhibit the signal. Molecular mechanism of how viral RNA is recognized by innate immune system will make great progress on our understanding of how virus escapes from host immune system.

