

## 第76回総会教育講演

## 細菌感染と Toll-like receptors

審良 静男

大阪大学微生物病研究所癌抑制遺伝子研究分野

The 76th Annual Meeting Educational Lecture

BACTERIAL INFECTIONS AND TOLL-LIKE RECEPTORS

\*Shizuo AKIRA

\*Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Toll-like receptors are type-1 transmembrane receptors involved in microbial recognition. TLR4 has been shown to function as the lipopolysaccharide signaling receptor, while TLR2 recognizes peptidoglycans from Gram-positive bacteria, and lipoproteins. TLR9 is involved in the recognition of bacterial DNA (CpG DNA). Although various microbial cell wall components are recognized by different receptors, all of these responses are abrogated in MyD88-deficient cells. These results show that different TLRs recognize different microbial cell wall components, and that MyD88 is an essential signaling molecule shared among interleukin-1 receptor/Toll family members. However, in LPS signaling MyD88-independent pathway is present in addition to MyD88-dependent pathway.

**Key words** : TLR, LPS, CpG DNA, MyD88, Peptidoglycan

**キーワード** : TLR, LPS, CpG DNA, MyD88, ペプチドグリカン

## はじめに

免疫系は、微生物、ウイルス、異物などの外来抗原から生体を守るため、自己抗原と外来抗原を識別するために発達したシステムである。哺乳動物では、免疫反応をおおきく自然免疫と獲得免疫とにわけることができる。獲得免疫では、遺伝子再構成という方法で、B細胞やT細胞上に無数の個々に異なる抗原特異性をもつ受容体を

作製し、あらゆる外来抗原に対処する。一方、自然免疫は、おもにマクロファージ、白血球などによって担われ、非特異的な貪食作用によって外来抗原が処理される。しかしながら、この自然免疫にかかわる免疫細胞も、極めて特異的な受容体もちいて微生物の侵入を認識していることが、最近、B細胞やT細胞がなく獲得免疫が存在しない昆虫においてあきらかにされた。昆虫においては、細菌と真菌に対する認識は異なる細胞膜レセプター

\*〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1

\* 3-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan.  
(Received 30 May, 2001)

(Toll ファミリー) によってなされ、それに引き続く NF- $\kappa$ B の活性化、そして最終的に抗細菌ペプチドと抗真菌ペプチドの誘導がそれぞれ引き起こされ、微生物に対して感染防御が成立する。哺乳動物においても Toll の存在があきらかとなり、昆虫と同様の微生物認識の仕組みが現在でも機能していることが最近あきらかになりつつある<sup>1)</sup>。

### I. IL-1/Toll-like receptor superfamily

Toll は、最近ショウジョウバエの初期発生において形態形成に関わる受容体としてクローニングされた。Toll はショウジョウバエ胚の背腹軸に沿ったパターン形成に重要な役割を演じている<sup>2)</sup>。1996年に Toll が発生に関わるだけでなく、感染防御に極めて重要な役割を果たしていることが Hoffmann のグループによってあきらかにされた<sup>3)</sup>。ショウジョウバエは微生物の感染をうけると抗菌ペプチドを産生することによって対処する。これらの抗菌ペプチドは、ショウジョウバエの fat body (哺乳類では肝臓に相当する) によって合成され hemolymph (血リンパ) に分泌される。抗菌ペプチドは、作用する菌体によって大きく抗細菌ペプチド (cecropin, attacin, defensin, diptericin, drosocin など) と抗真菌ペプチド (drosomycin) にわけられる<sup>4)</sup>。このうち、抗真菌ペプチド drosomycin の誘導に Toll からのシグナルが関与するが、Toll と同源性のある 18-Wheeler と呼ばれるレセプターは、抗細菌ペプチドの産生に関与する。このように、ショウジョウバエの微生物に対する感染防御は、異なる Toll ファミリーを介して異なる抗菌ペプチドを産生することによってなされている。

IL-1 は、炎症性サイトカインとして炎症反応に重要な役割を果たし、その受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域からなる。ここ数年、IL-1 シグナル伝達経路が急速にあきらかとなってきている (Fig. 1)<sup>5)</sup>。IL-1R 複合体は、リガンド結合能をもつ IL-1RI とシグナル伝達に必要な IL-1RAcP からなる。IL-1 の刺激でアダプター MyD88 を介して IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) が IL-1R 複合体に結合し、リン酸化を受ける。その後、TRAF6 が IRAK に結合すると TRAF6 が活性化され、TRAF6 からは、2つの経路つまり NF- $\kappa$ B と MAP キナーゼの活性化への経路が分岐する。従来まで、哺乳動物においては IL-1R が Toll に相当するものと見なされていた。しかし、IL-1R と Toll は、シグナル伝達経路はきわめて類似しているものの、IL-1R のノックアウトマウスでは細菌感染に対する抵抗性の低下が認められず、哺乳動物では獲得免疫

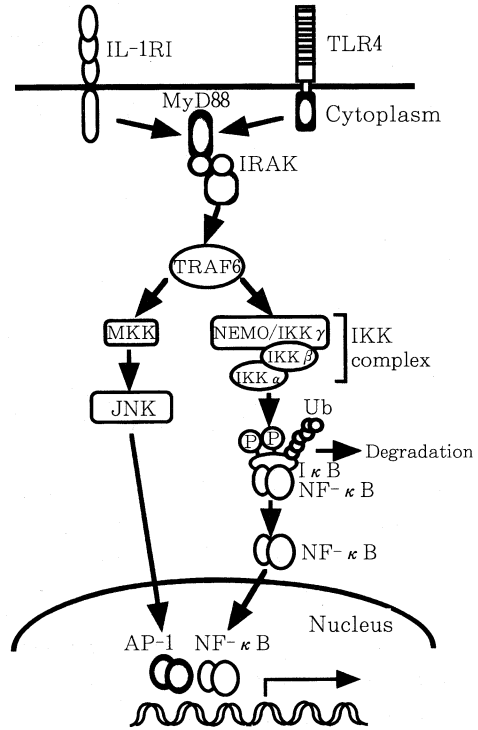


Fig. 1 Toll-like receptor/IL-1R family: structure and signaling.

The cytoplasmic portions of IL-1R and TLR family members are highly homologous. In contrast, the extracellular portions are different; those of IL-1R family are composed of three Ig-like domains whereas those of TLRs composed of leucine-rich-repeat. Binding of the ligand recruits IRAK to the receptor via an adaptor MyD88. IRAK then becomes autophosphorylated, disassociates from the receptor complex, and interacts with TRAF6. TRAF6 finally activates NF- $\kappa$ B. TRAF6 also activates MAP kinases including ERKs, JNK, and p38.

が生体防御の中心をなすものと考えられていた。そのようななかで、1997年に Janeway のグループは、ショウジョウバエの Toll のヒトホモログ (human Toll; TLR4) の存在を報告した<sup>6)</sup>。その後、DNAX の Bazan のグループは、Toll-like receptor がヒトでは 5 つ存在することを報告した<sup>7)</sup>。われわれも、新たに TLR6 をクローニングした<sup>8)</sup>。現在、TLR ファミリーメンバーは、10 の TLR メンバーが報告されている。ヒト TLR ファミリーの各メンバーもそのシグナル伝達に IL-1 シグナル伝達経路の各コンポーネントを利用している。現

在では、IL-1R と Toll の細胞内領域 (Toll/IL-1R (TIR) ドメインと名付けられた) と相同性のあるレセプター群を IL-1/Toll-like receptor スーパーファミリーと総称して呼ぶようになってきている。この IL-1/Toll-like receptor スーパーファミリーは、細胞外領域の違いによって IL-1R を代表とする免疫グロブリン様構造をもつものと、Toll を代表とするロイシン・リッチ・リピート (LRR) 構造をもつものに大きく二分される (Fig. 1)。LRR は、特定の位置にロイシンがならんだ 24-28 アミノ酸単位がいくつも連続した構造で、 $\alpha$ -シートと  $\beta$ -シートの繰り返し構造をとり、全体としては馬蹄形をなしている。IL-1R 型のメンバーとしては、IL-1RI 以外に IL-1RAcP, IL-1Rrp (IL-18R), IL-1RAcPL (IL-18RAcP), T1/ST2, IL-1RrP2, IL-1RAPL, SIGIRR が存在している。一方、Toll 型のメンバーは、Toll 以外にショウジョウバエでは、18-Wheeler, Mst-Prox, Tehao, Tollo, 哺乳動物では、Toll-like receptor 1-9 が知られている。

## II. Toll-like receptor 4 と LPS シグナル伝達

エンドトキシン (リポ・ポリサッカライド; LPS) は、グラム陰性細菌の菌体成分で、マクロファージなどの細胞に作用して炎症性サイトカイン・炎症性生理活性分子 (NO など) の産生を誘導する。適当量の LPS は免疫系を賦活させ生体にとって有利に働くが、多量の LPS は播種性血管内凝固, 多臓器不全, ショックなどの病態を引き起こし致命的となる。LPS の細胞上の受容体に関

しては、マクロファージ・単球の分化抗原である CD14 が従来から知られている。LPS は血清中の LPS 結合タンパク質 (LBP) と複合体を形成し、その複合体が CD14 と結合して細胞が活性化される。しかしながら CD14 は、膜貫通ドメインを持たず細胞とはグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって結合している。このようなことから LPS のシグナル伝達に関わるもう 1 つの受容体の存在が示唆されていた。実際、CD14 欠損マウスは LPS に対する反応性は低下するものの LPS に反応する。最近、TLR4 が、LPS 低応答性マウス C3H/HeJ における LPS 低応答性の原因遺伝子であり、C3H/HeJ マウスでは TLR4 の細胞質内ドメインに点変異が存在することが報告された<sup>9)~11)</sup>。一方、われわれは、TLR4 ノックアウトマウスを作製したが、このマウスも LPS に低応答性であった<sup>11)</sup>。このように TLR4 が LPS シグナル伝達に必須の分子であることがあきらかとなった。しかしながら、TLR4 のみでは、LPS シグナル伝達には十分でなく、MD-2 の存在が必要であることがあきらかとなっている (Fig. 2)。

## III. IL-1R ファミリーおよび LPS シグナル伝達における MyD88 の役割

われわれは、MyD88 の *in vivo* での役割を調べるため MyD88 ノックアウトマウスを作製した<sup>12)</sup>。MyD88 ノックアウトマウスは、メンデルの法則に従い生まれ、正常に生育し、外見上は異常は認められなかった。まず、MyD88 ノックアウトマウスでの IL-1 の作用を検討し

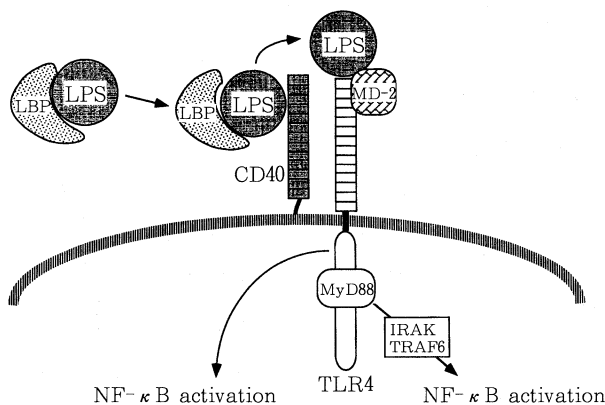


Fig. 2 *In vivo* cell activation and production of inflammatory mediators by LPS.

LPS liberated from the outer membrane of Gram-negative bacteria forms a complex with LBP, an acute phase protein produced from the liver. LBP acts catalytically to facilitate the binding of LPS to CD14, which is expressed on the cell surface of macrophages and neutrophils. Following the binding of LPS to CD14, the cells are activated via TLR4, and produce a variety of inflammatory mediators.

た。IL-1は、胸腺細胞の増殖を増大させるが、MyD88ノックアウトマウス由来の胸腺細胞はIL-1に対する増殖反応が見られなかった。また、IL-1静注後の急性期蛋白の肝臓からの誘導や血清TNF、IL-6の増加も認められなかった。このようにMyD88ノックアウトマウスではIL-1に対する反応が認められず、MyD88がIL-1シグナル伝達において必須の分子であることが判明した。さらに、MyD88ノックアウトマウスでは、IL-18によるNK活性の増強、IFN $\gamma$ のNK細胞、T細胞からの産生、Th1細胞分化の誘導のいずれもが障害されていた。IL-1Rを介してNF- $\kappa$ B、c-Jun N-terminal kinase (JNK)が活性化されるが、MyD88ノックアウトマウスではIL-18刺激によるこれらの分子の活性化も認められなかった。このように、MyD88がIL-18シグナル伝達において必須の役割を果たしていることがあきらかとなった。

われわれは、MyD88ノックアウトマウスを用いてLPSシグナル伝達におけるMyD88の役割を調べた<sup>13)</sup>。MyD88ノックアウトマウスに高濃度のLPSを腹腔内に投与し、生存率をモニターした。野生型マウスではほとんど全例が4日以内に死亡したのに対してMyD88ノックアウトマウスは全例生存した。さらにMyD88ノックアウトマウス由来のマクロファージ、B細胞、胎児線維芽細胞もすべてLPSに反応しないことが判明した。このことは、MyD88がLPS応答性に必須の分子であることを示している。以上のことから、LPSのシグナルはLPS/LBP複合体がマクロファージ上のCD14と結合したのち、TLR4受容体からMyD88を介して細胞内に伝達されるものと思われる。MyD88ノックアウトマウス由来の細胞は、LPS以外の多くの菌体成分にも反応せず、MyD88は、微生物認識に必須の役割を果たす分子であることがあきらかとなっている<sup>14)</sup>。

#### IV. MyD88依存性と非依存性経路

MyD88ノックアウトマウスではLPSに対する反応性が全く認められない。しかしながら、意外なことにIL-1シグナルに関わる各種コンポーネントの活性化を調べてみると、IL-1、IL-18のシグナル伝達の場合と異なり、野生型と同程度のNF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の活性化が認められた。しかし、それらの活性化は野生型と比べて遅れていた。このことは、IL-1Rファミリーを介するシグナル伝達の場合とは異なり、LPSシグナル伝達にはMyD88依存性と非依存性の経路が存在しており、MyD88依存性の経路がLPSによる細胞からの炎症性サイトカインの誘導を引き起こすためには必須であることを示している。TLR4ノックアウトマウスでは、LPSによるNF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の

活性化がまったく認められず、MyD88非依存性経路はTLR4に依存する。TLR4の細胞質内領域に点変異をもつC3H/HeHマウス由来のマクロファージでもまったくNF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の活性化が認められず、MyD88非依存性経路もTLR4の細胞質内領域を起点としてシグナルが伝播されることが示唆された。さらに、TRAF6ノックアウトマウスでもMyD88ノックアウトマウスと同様に野生型と同程度のNF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の活性化が認められ、しかもそれらの活性化は野生型と比べて遅れていた。これらのことは、TLR4の細胞内領域からMyD88-IRAK-TRAF6を介さないでNF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の活性化を引き起こす経路が存在することを強く示唆している。この経路の性状については現在のところ不明であるが、最近、この経路が樹状細胞の成熟に関与していることが判明した。骨髄細胞からGM-CSFで培養して未熟樹状細胞を樹立したのち、LPS刺激をおこなうと未熟樹状細胞は、IL-12、TNFなどのサイトカインを分泌するとともにCD40、CD83などの細胞表面マーカーを発現するようになり成熟する。興味深いことに、MyD88ノックアウトマウスから樹立した未熟樹状細胞はLPSに対してサイトカインの産生はしないが、CD40、CD83などの細胞表面マーカーを発現するようになり成熟することが判明した<sup>15)</sup>。このことは、MyD88非依存性経路が機能的な役割をはたしていること、サイトカインの産生にはMyD88依存性経路が必須であることを示している。今後、MyD88依存性と非依存性の経路の違いをあきらかにすることは、NF- $\kappa$ BやMAPキナーゼ群の不活化を行わずにサイトカインの分泌だけをシャットアウトするあらたなストラテジーが見つかる可能性を秘めている。

#### V. TLR2とグラム陽性細菌

われわれは、TLR2ノックアウトマウスを作製し、TLR2ノックアウトマウスとTLR4ノックアウトマウスの細菌細胞膜成分に対する反応性を比較した<sup>16)</sup>。TLR2は、LPS受容体としてLPSシグナル伝達に関わることが示唆されていたが、TLR2ノックアウトマウスは、エンドトキシショックに対する抵抗性の増強がみられず、TLR2ノックアウトマウス由来のマクロファージもLPSに対して正常レベルのサイトカインの産生が認められ、マウスにおいてTLR2は、LPSシグナル伝達に重要な役割を果たしていないことがあきらかとなった。しかし、グラム陽性細菌細胞膜に対する反応性はTLR4ノックアウトマウスが正常もしくは軽度の低下があるのに対してTLR2ノックアウトマウスでは著明に反応性が低下しており、TLR2がグラム陽性細

## Pathogen recognition by Toll-like receptor family

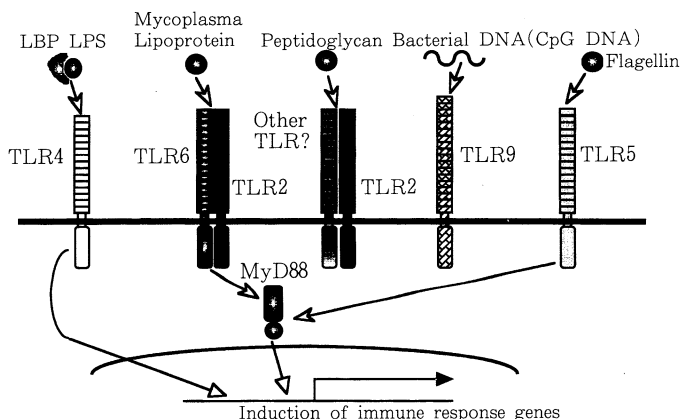


Fig. 3 Activation of different Toll-like receptors by different bacterial cell wall components.

TLR4 has been shown to function as the transmembrane component of the LPS receptor and also recognize lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria, while TLR2 recognizes peptidoglycans from Gram-positive bacteria, lipoproteins, and yeast. Mycoplasma lipopeptide is recognized by TLR2/TLR6 heterodimer. TLR5 recognizes Flagellin. TLR9 recognizes bacterial DNA (CpG DNA).

MyD88 is an essential signaling molecule shared among Toll-like receptor family members.

Unlike IL-1R- and TLR2-mediated signalings, TLR4-mediated signaling contains MyD88-dependent and -independent pathways, each of which finally activates NF- $\kappa$ B and AP-1.

菌細胞膜成分の認識に関わっていることが判明した。グラム陽性細菌細胞膜成分のうち TLR2 ノックアウトマウス由来のマクロファージは、ペプチドグリカンにまったく反応しなかった。一方、TLR4 ノックアウトマウス由来のマクロファージは、ペプチドグリカンに正常に反応した。TLR2 は、ペプチドグリカン以外にも、多くのリポ蛋白、酵母由来のザイモザンに対する反応に必須であることもあきらかとなっている<sup>17)~19)</sup> (Fig. 3)。

TLR2 の場合は、他の TLR とは異なり、単一の TLR では、微生物菌体構成成分を認識できないようである<sup>20) 21)</sup>。最近、TLR2 と TLR6 がヘテロダイマーを形成することにより、マイコプラズマ由来のリポ蛋白を認識することが判明した<sup>22)</sup>。ペプチドグリカンも TLR2 と TLR6 以外の TLR とヘテロダイマーによって認識されると考えられている。

## VI. CpG DNA と TLR9

CpG DNA も強く免疫細胞を賦活することが知られている。非メチル化された CpG モチーフは、細菌 DNA に多く存在し哺乳動物の DNA にはその頻度はすくな

い。さらに存在する場合でも哺乳動物においてはシトシンがメチル化されていることが多い。メチル化された CpG モチーフは免疫細胞を賦活化しない。そのため、宿主の DNA とは異なり細菌 DNA は、宿主によって認識され免疫反応が引き起こされることになる。CpG DNA の免疫賦活性は、1980 年代に Tokunaga らによる、BCG による抗腫瘍活性がその DNA 分画に存在するという知見によって最初に報告された<sup>23)</sup>。その後、合成 DNA が作製できるようになり、CpG モチーフに関して Krieg らは、Pur-Pur-CpG-Pyr-Pyr (DNA の一次配列)、Tokunaga らは、CpG 配列を含むパリンドローム配列の重要性を指摘した<sup>23) 24)</sup>。CpG DNA は、多くのアジュバントのなかでとりわけ副作用がなく Th1 反応を強く誘導することから、その臨床応用が期待されている。現在、癌、アレルギー、感染症を対象としての臨床治験が進行している。しかしながら、その作用機序は従来まで不明であった。CpG DNA の免疫賦活性には、細胞内に取り込まれる必要があること、DNA の細胞内取り込みはシクエンス非依存性のエンドサイトーシスによること、CpG DNA は最終的

にNF- $\kappa$ BとMAPキナーゼを活性化させること、クロキシンやBafilomycin Aのようなエンドゾームの酸性化や成熟を阻害する薬物ではCpG DNAの活性が消失し、CpGシグナルには、エンドゾームへの取り込みと活性酸素の産生が必要であることがあきらかとなっていた。特異的な配列しか免疫賦活活性がないので、なんらかの特異的な受容体の存在が示唆され、いくつかのグループが細胞内CpG受容体の同定をおこなっていた。

われわれは、さきにMyD88ノックアウトマウスを作製し、このミュータントマウスでは、IL-1R, IL-18Rに対する反応だけでなく、TLRを活性化させるLPSをはじめとする多くの細菌菌体成分にも反応しない(炎症性サイトカインを産生しない)ことを見だし、MyD88が、微生物認識に必須のシグナル伝達分子であることをあきらかにした<sup>14)</sup>。この所見は、MyD88ノックアウトマウスが反応しない免疫賦活物質は、IL-1R/TLRファミリーメンバーによってシグナルが伝えられている可能性を強く示唆している。そのためMyD88ノックアウトマウス由来マクロファージに各種の微生物由来の免疫賦活物質を処理し、サイトカインの産生を指標にスクリーニングをおこなったところ、バクテリアDNA(非メチル化CpG DNA)は、野生型のマクロファージから多量のTNF- $\alpha$ を産生したが、MyD88ノックアウトマウス由来マクロファージからは、まったくTNF- $\alpha$ の産生が認められなかった。このことは、バクテリアDNA(非メチル化CpG DNA)の認識は、TLRファミリーメンバーによることが示唆された<sup>25)</sup>。しかしながら、さきにわれわれがすでに作製していたTLR2, TLR4ノックアウトマウスは正常にTNF- $\alpha$ の産生が認められたことから、TLR2, TLR4以外のTLRが関与するものと考えられた。われわれは、データベース上から10以上のTLRの存在を確認しており、同時にそれら各メンバーのノックアウトマウスを作製していた。そのうちの新規TLR9がバクテリアDNA(非メチル化CpG DNA)に反応しないことが判明した<sup>26)</sup>。非メチル化CpG DNAは、マクロファージ, B細胞, 樹状細胞に作用して、それぞれ炎症性サイトカイン, 細胞増殖, 機能的成熟を促すが、TLR9ノックアウトマウス由来の細胞ではこれらの反応がまったく認められなかった。さらに、CpG DNAとD-galactosamineを腹腔内に投与すると、野生型マウスは、10時間以内に全例死亡したが、TLR9ノックアウトマウスは、すべて生存するとともに血清中の各種サイトカインの産生の増加も認められなかった。このことから、TLR9は、*in vitro* および *in vivo* ともに、バクテリアDNA(非メチル化CpG DNA)の認識に必須の分子であることが判明した。

## おわりに

哺乳動物でショウジョウバエ Toll のホモログであるTLRの存在が1997年にあきらかとなつてから、ここ数年で哺乳動物においてもTLRが微生物認識と感染防御に必須の分子であることがあきらかとなった。現在、ゲノムプロジェクトが進む中、ヒトとマウスにおいてTLRファミリーメンバーが増加しつつある。すでにショウジョウバエでは全ゲノムがあきらかとなっているが、8つのTollファミリーメンバーが同定されている。われわれは、公開されたデータベースを検索してヒトおよびマウスにおいて12のTLRファミリーメンバーを同定している。今後の興味ぶかい点はこれらのメンバーがそれぞれどのような役割を果たしているかということである。最近、ヒトにおけるTLRの発現が調べられ、各メンバーが特徴ある発現パターンを示していることが報告されている<sup>27)</sup>。その違いが、ヒトにおける、ある特定の細菌や真菌が特定の感染部位で疾患を引き起こすことと関係があるかもしれない。また、感染に対する個々の抵抗性の違いがTLRのミューテーションに起因する可能性もある。実際、ヒトのあるポピュレーションに見られるTLR4の細胞外領域のミューテーションがLPSに対する低応答性と関係することが報告された<sup>28)</sup>。TLRの変異が各種の微生物感染や免疫疾患の原因となっていることもあるのではないだろうか。

## 文 献

- 1) Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, et al.: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999; 284: 1313-1318.
- 2) Belvin MP, Anderson KV: A conserved signaling pathway: The *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996; 12: 393-416.
- 3) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973-983.
- 4) Hultmark D: Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet*. 1993; 9: 178-183.
- 5) O'Neil LAJ, Dinarello CA: The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*. 2000; 21: 206-209.
- 6) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway

- CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394–397.
- 7) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 588–593.
- 8) Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al.: TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*. 1999; 231: 59–65.
- 9) Poltorak A, He X, Smirnova I, et al.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085–2088.
- 10) Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, et al.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*. 1999; 189: 615–625.
- 11) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999; 162: 3749–3752.
- 12) Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al.: Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998; 9: 143–150.
- 13) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al.: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999; 11: 115–122.
- 14) Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, et al.: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. 2000; 12: 113–117.
- 15) Kaisho T, Akira S: Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends in Immunol*. 2001; 22: 78–83.
- 16) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999; 11: 443–451.
- 17) Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al.: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. 1999; 285: 736–739.
- 18) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999; 285: 732–736.
- 19) Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, et al.: Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol*. 2000; 164: 554–557.
- 20) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 13766–13771.
- 21) Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, et al.: Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR)2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*. 2000; 166: 15–19.
- 22) Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al.: Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 2001; 13: 933–940.
- 23) Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S: How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis*. 1999; 52: 1–11.
- 24) Krieg AM, Wagner H: Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today*. 2000; 21: 521–526.
- 25) Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, et al.: Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through Myeloid Differentiation Marker 88 and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) 6. *J Exp Med*. 2000; 192: 595–600.
- 26) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408: 740–745.
- 27) Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al.: Differential expression and regulation of

toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:5998-6004.

28) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al.: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genetics.* 2000;25:187-191.