

Review Article

自然免疫における分子パターン認識

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

Pathogen Associated Molecular Pattern Recognition in Innate Immunity

Toll-like receptors (TLRs) play a critical role in the detection of invading pathogens and subsequent immune response against them. Individual TLRs recognize distinct microbial components. The TLR is a type 1 transmembrane receptor that is composed of an extracellular leucine-rich repeat (LRR) domain and cytoplasmic domain homologous to that of the IL-1R family. Therefore, TLR and IL-1R family use the same signaling molecules. Cytokine production in response to each TLR ligand is completely abolished in MyD88-deficient cells, indicating that MyD88 is an essential signaling molecule shared among IL-1R/Toll family. However, accumulating evidence indicates that differential utilization of adaptors including MyD88, TIRAP, and TRIF may activate overlapping as well as distinct signaling pathways, and finally give rise to distinct biological effects exerted by individual TLR family.

Rec.3/31/2003, pp211-217

Shizuo Akira

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

Key words Innate Immunity, Pathogen, Toll-like receptor, NF- κ B, Adaptor

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大きく自然免疫と獲得免疫とに分けることができる。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持つ受容体を作製し、あらゆる外来抗原に対処する。一方、自然免疫は、主にマクロファージ、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、この自然免疫に関わる免疫細胞も、極めて特異的な受容体 Toll-like receptors (TLRs) を用いて微生物の侵入を認識していることが最近明らかとなった。体内に病原体が侵入してくると、自然免疫に関わる細胞が活性化されるだけでなく、サイトカインや副刺激分子の誘導が起こり、獲得免疫系の誘導も引き起こされる。この自然免疫と獲得免疫の活性化に、TLRが必須の役割を果たすことが明らかとなりつつある¹⁾。

IL-1/Toll-like receptor superfamily

Toll は、最初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。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明らかにされた²⁾。ショウジョウバエは真菌の感染を受けると抗真菌ペプチドを産生することによって対処する。しかしながら、Tollに変異のあるショウジョウバエでは抗真菌ペプチドが誘導されず、ハエは真菌にやられてしまう。この研究成果がきっかけとなって、哺乳動物におけるToll様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) に注意が向かった。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³⁾。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⁴⁾。われわれも、新たにTLR6、TLR9をクローニングした^{5,6)}。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。細胞内領域に相同性があることから、TLRsは、IL-1Rsと

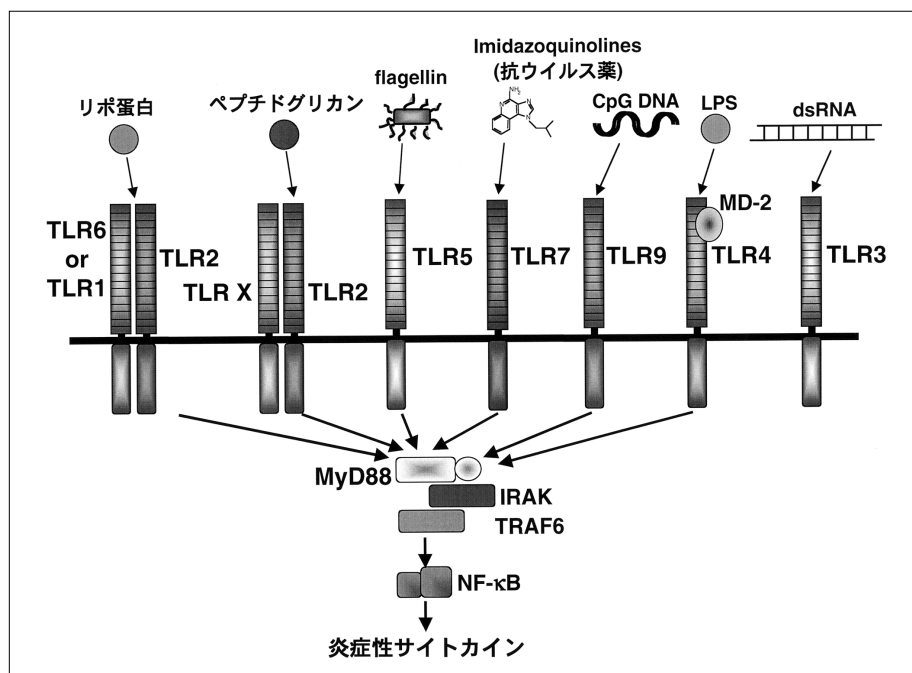


図1 Toll-like familyメンバーと認識するリガンド

大きなスーパーファミリーを形成している。しかし、細胞外領域はまったく異なっており、TLRはロイシン・リッチ・リピートと呼ばれる構造からなるのに対し、IL-1Rは3つの免疫グロブリン様ドメインからなる。

TLRとIL-1Rファミリーは、共通のシグナル伝達分子を利用している。IL-1や各種病原体成分の刺激で受容体が活性化されると、アダプターMyD88を介してIRAK (IL-1 receptor-associated kinase) が受容体複合体に結合し、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-κBとMAPキナーゼの活性化への経路が分岐する。

Toll-like receptor 4とLPSシグナル伝達

(図1に各TLRとリガンドの関係を示す)

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

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⁷⁻⁹⁾。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⁹⁾。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明らかとなった。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明らかとなっている¹⁰⁾。

TLR2とペプチドグリカン・リポ蛋白

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¹¹⁾。TLR2は、LPS受容体としてLPSシグナル伝達に関わることを示唆されていたが、TLR2ノックアウトマウスは、エンドトキシン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ることが明らかとなった。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

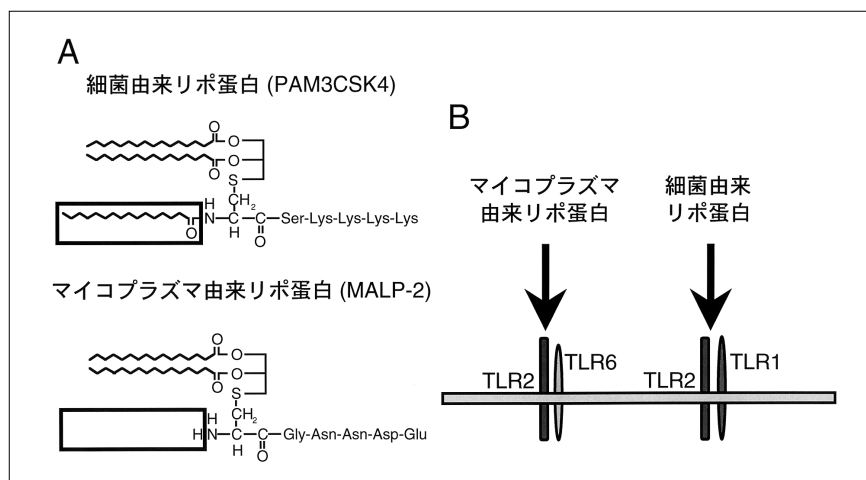


図2 ヘテロダイマーによるリポ蛋白認識

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明らかとなっている.

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¹²⁾.最近われわれは,TLR6 ノックアウトマウスを作製した.TLR6 ノックアウトマウスは,LPSやペプチドグリカンには正常に反応した.しかし,TLR6 ノックアウトマウス由来のマクロファージは,マイコプラズマ由来のリポ蛋白 (MALP-2)には反応しなかった.しかしながら,大腸菌由来のリポ蛋白 (Pam3CSK4) に対しては正常に反応した.もちろん,TLR2 ノックアウトマウス由来のマクロファージは,両方のリポ蛋白に反応しなかった.このことは,TLR6 が2つのリポ蛋白を識別していることを示唆した.リポ蛋白は,その活性中心がアミノ末端に存在する脂質部分に依存する.マイコプラズマ由来のリポ蛋白と大腸菌由来のリポ蛋白の脂質部分は構造が異なる.大腸菌由来のリポ蛋白のN末端に存在するシスチンは,3つのアシル基によって修飾されているが,マイコプラズマ由来のリポ蛋白のシスチンは,2つのアシル基しか存在しない.その違いがTLR6の関わりを反映していると思われた.実際,マイコプラズマ由来のリポ蛋白のシスチンを大腸菌由来のリポ蛋白のように3つのアシル基の修飾を施すと,

TLR6 ノックアウトマウス由来のマクロファージも,マイコプラズマ由来のリポ蛋白 (MALP-2) に反応するようになった.このように,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¹³⁾.最近,TLR1とTLR6の2量体を介して,大腸菌由来のリポ蛋白 (Pam3CSK4) が認識されることが判明した¹⁴⁾ (図2).ペプチドグリカンの場合は,TLR2のホモダイマーもしくはTLR2とTLR6以外のTLRとのヘテロダイマーによって認識されると考えられている.

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にはその頻度は少ない.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¹⁵⁾.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.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。われわれは、TLR9がバクテリアDNA(非メチル化CpG DNA)の認識に関わることを明らかにした⁶⁾。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。

鞭毛成分とTLR5

鞭毛は細菌が水中を動きまわるための装置である。鞭毛の構成成分はflagellinで、この成分は強く免疫細胞を活性化することが知られている。このflagellinの作用は、TLR5を介することが明らかとなっている¹⁶⁾。腸管上皮の管腔側にはTLR5の発現がみられず、体腔側に発現していることから、鞭毛を持つ細菌が消化管から体内に侵入した場合のみ、TLR5が活性化され、炎症反応が引き起こされる。

2本鎖RNAとTLR3

ウイルスは細胞内で増殖する際に2本鎖RNAを形成する。このウイルス特異的な2本鎖RNAも免疫細胞を活性化することが知られている。特に2本鎖RNAは抗ウイルス作用を発揮するIFN- α/β の産生を誘導する。この2本鎖RNAの認識にTLR3が関与する¹⁷⁾。TLR3ノックアウトマウスでは2本鎖RNAに対する反応性が低下していた。

抗ウイルス剤、ImidazoquinolinesとTLR7

イミダゾキノリン(imidazoquinolines)、ImiquimodとR-848(Resiquimod)は、現在、新たな抗ウイルス免疫賦活剤として注目を浴びてきている。従来の抗ウイルス薬は、ウイルスの増殖過程をブロックすることで作用を期待していたが、この薬剤は、体内からインターフェロンを誘導することによって免疫系に働きかけ、抗ウイルス活性を発揮する。そのため、従来のウイルスを直接ターゲットとした抗ウイルス剤と異なり、再発予防にも効果がある。Imiquimodは、もともと3M社がインターフェロン誘導剤をスクリーニングしている過程で見だし、免疫反応調整剤Aldalaという商品名で、1997年から米国でヒトパピローマウイルスによって引き起こされる尖型コンジロームの治療薬として使われ、現在、世界42カ国で発売されている。また、Imiquimodより100倍活性の強いR-848(Resiquimod)は、性器ヘルペスの治療薬として第3相試験が行われている。われわれは、TLR7ノックアウトマウスを作製し、こ

のマウスが、Imidazoquinolin誘導体に反応しないことを明らかにした¹⁸⁾。正常マクロファージは、これら化合物に反応して、TNF、IL-12の産生が濃度依存的に誘導されるのに対して、TLR7ノックアウトマウス由来のマクロファージはまったくそれらの産生が認められなかった。また、脾臓細胞のimidazoquinoline R848に対する増殖もまったくTLR7ノックアウトマウスでは認められなかった。さらに、骨髄由来樹状細胞においても正常細胞由来の場合は、R848の刺激で、副刺激分子CD40、CD80、CD86の誘導が認められたが、TLR7ノックアウトマウス由来の樹状細胞では認められなかった。

*In vivo*におけるTLR7の役割を調べるため、R848をマウスの腹腔内に投与し、その後の血中のサイトカイン、IFN- α 、TNF- α 、IL-12の産生を測定した。野生型のマウスでは、投与後、1時間で最高値のIFN- α 、TNF- α の産生、続いて3時間後をピークとするIL-12の産生が誘導されたが、TLR7ノックアウトマウスでは、まったくそれらのサイトカインの産生の誘導がみられなかった。これらのことは、イミダゾキノリン(imidazoquinolines)、ImiquimodとR-848(Resiquimod)に対する生体の応答は、TLR7を介するものであることを示している。

IL-1RおよびTLRファミリー・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¹⁹⁾。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。MyD88ノックアウトマウスではIL-1、IL-18刺激にまったく反応しなかった。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明らかとなった。さらに、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²⁰⁾。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。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。さらに、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明らかとなっている²¹⁾。

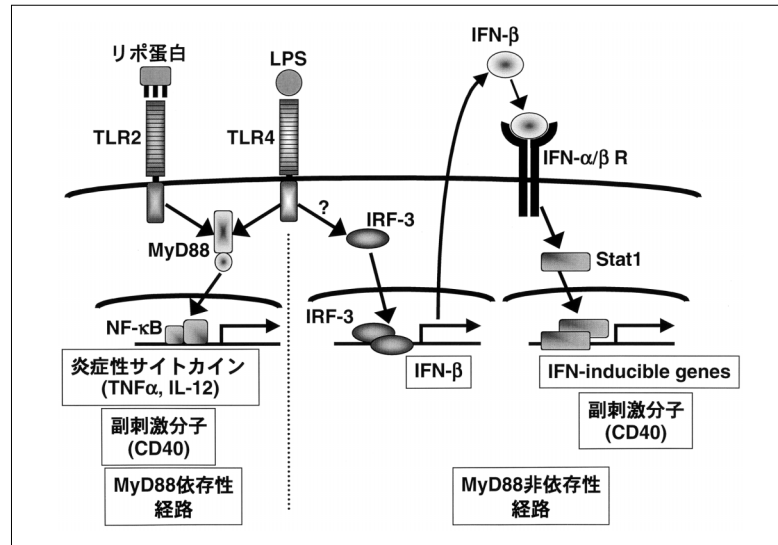


図3 TLR4シグナルにおけるMyD88依存性・非依存性経路

MyD88依存性・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-κBやMAPK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²⁰⁾。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・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-κBやMAPKキナーゼ群の活性化が全く認められず、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持つC3H/HeHマウス由来のマクロファージでもまったくNF-κBやMAPK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。これらのことは、TLR4の細胞内領域からMyD88を介さないでNF-κBやMAPK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。

われわれは、LPSシグナル伝達におけるMyD88非依存性経路の役割を調べるため、MyD88ノックアウトマウス由来のマクロファージのLPS刺激前後でcDNAライブラリーを作製し、MyD88非依存的にもLPSによって誘導されてくる遺伝子の同定を行った²²⁾。その結果、IP-10を中心としてGARG16, IRG1を含む、いわゆるIFN inducible genesがとれてきた。IP-10を含むIFN inducible genesは、従

来の研究からIRF-3と呼ばれる転写因子が重要な役割を果たしていることが知られている。IRF-3は、LPS, dsRNA, ウイルス感染によって細胞質内でリン酸化を受け、その後細胞質内から核に移行し、ISREと呼ばれるcis elementに結合し、転写活性を誘導する。IRF3の活性化とISRE結合能の誘導がMyD88ノックアウトマウス由来のマクロファージでも野生型のマクロファージと同程度に認められた。このように、LPSによるIRF3の活性化とISRE結合能の誘導、さらにはIFN inducible genesの誘導がMyD88非依存的に誘導されることが判明した(図3)。ところが、TLR2リガンドであるMALP-2の刺激では、野生型のマクロファージにおいてもIRF3の活性化とISRE結合能の誘導、さらにはIFN inducible genesの誘導が認められず、MyD88非依存経路は、TLR4に特異的である。

アダプターの組み合わせによるTLR特異的シグナル活性化

その後、MedzhitovやO'Neillらは、独立にTIRAP/Malと呼ぶ新たなアダプター分子を同定した^{23, 24)}。TIRAP/Malは、MyD88と異なり、TLR4の細胞内領域に特異的に結合し、他のTLRとは結合しない。TIRAP/Malを強制発現させるとNF-κB応答性レポーターが活性化される。このことから、TIRAP/Malは、TLR4シグナルのMyD88非依存経路に関与することが示唆された。われわれは、TIRAP/Malの役割を検討するため、TIRAP/Malノックアウトマウスを作製した²⁵⁾。TIRAP/Malノックアウトマウスは、TLR4リガンドであるLPSや、TLR2リガンドであるペプチドグリカンやリポ蛋白に対して炎症性サイトカインを誘導しなかった。しかし、他のTLRリガンドに対しては正常に反応し

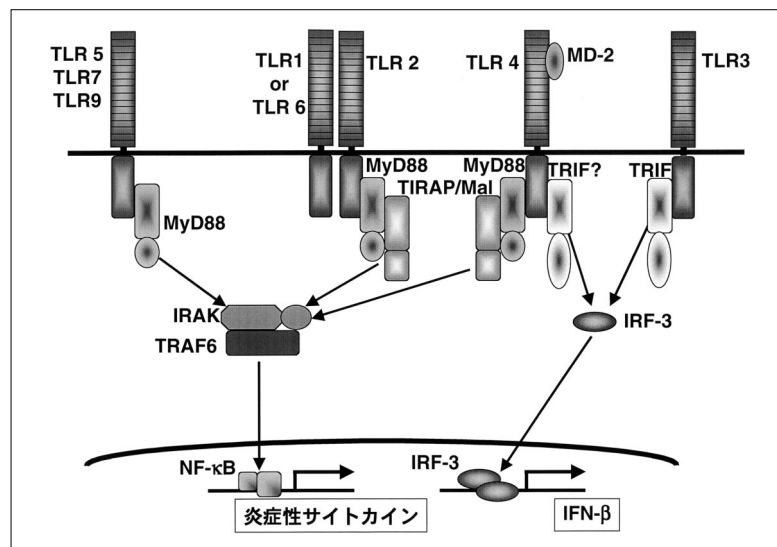


図4 TLRシグナルにおけるアダプターの役割

た。さらに興味深いことに、TIRAP/ Mal ノックアウトマウスは、LPS に対してサイトカインは誘導されないものの、IFN- β や IFN inducible genes の誘導や IRF3 の活性化は正常であり、TIRAP/ Mal は、TLR2 と TLR4 に対する反応において MyD88 依存経路に必須の役割を果たすが、TIRAP/ Mal が、TLR4 シグナルの MyD88 非依存経路に関わらないことが判明した。その後、われわれはデータベース上から、新たなアダプター TRIF を同定した²⁶⁾。TRIF の強制発現は、特異的に IFN- β プロモーターを活性化するとともに、ドミナントネガティブ TRIF の強制発現は、TLR3 シグナル経路を特異的に阻害した。このことは TRIF が TLR3 シグナル伝達に関わるアダプターである可能性を強く示唆している。この後、TRIF のノックアウトマウスの作製を通じてその役割が明らかにされるものと思われる。このように、当初、同一と考えられていた TLR シグナル経路が個々に異なり、その違いを生み出しているのがアダプターであると考えられるようになってきている（図4）。

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 年に明らかとなってから、ここ 5 年足らず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明らかとなった。各種の TLR が病原体の異なる成分を認識して細菌、ウイルスなどの病原体の体内への侵入を感知している。さらに、従来まで個々の TLR のシグナル伝達経路が同一とみなされていたが、異なるアダプターの組み合わせにより、異なるシグナル伝達経路が活性化され、最終的に異なる遺伝子発現を誘導することが明らかになりつつある。今後は、各 TLR の

変異や発現の異常がヒトにおける、ある特定の病原体に対する感染と関係があるかないか、また、それらが各種の免疫疾患の原因となっているかどうか明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2: 675-680, 2001.
- 2) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983, 1996.
- 3) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394-397, 1997.
- 4) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 588-593, 1998.
- 5) Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S: TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*, 231: 59-65, 1999.
- 6) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408: 740-745, 2000.
- 7) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X,

- Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282: 2085-2088, 1998.
- 8) Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, 189: 615-625, 1999.
 - 9) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 162: 3749-3752, 1999.
 - 10) Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189: 1777-1782, 1999.
 - 11) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-451, 1999.
 - 12) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A: 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*, 97: 13766-13771, 2000.
 - 13) Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S: Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 13: 933-940, 2001.
 - 14) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S: Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 169: 10-14, 2002.
 - 15) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, 72: 955-962, 1984.
 - 16) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1099-1103, 2001.
 - 17) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-738, 2001.
 - 18) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, 3: 196-200, 2002.
 - 19) Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S: Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, 9: 143-150, 1998.
 - 20) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11: 115-122, 1999.
 - 21) Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*, 12: 113-117, 2000.
 - 22) Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, 167: 5887-5894, 2001.
 - 23) Horng T, Barton GM, Medzhitov R: TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, 2: 835-841, 2001.
 - 24) Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA: Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413: 78-83, 2001.
 - 25) 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 of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420: 324-329, 2002.
 - 26) Yamamoto M, Sato S, Mori K, Takeuchi O, Hoshino K, Takeda K, Akira S: A novel TIR domain-containing adaptor that preferentially activates the interferon- β promoter. *J Immunol*, 169: 6668-6672, 2002.