

総説

豚の Toll-like receptors とその一塩基多型及び疾病との関連に関する研究

宗田吉広¹⁾、新開浩樹²⁾、上西博英²⁾(1)農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域、²⁾農研機構 生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域)

Muneta Y., Shinkai, H. and Uenishi, H. (2018). Studies on porcine Toll-like receptors, their polymorphisms and relationship with the disease.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 72, 24-30.

キーワード：Disease susceptibility、Porcine、SNP、TLR

はじめに

Toll-like receptors (TLRs) は病原体の構成成分 (Pathogen associated molecular patterns; PAMPs) を認識する Pattern recognition receptors (PRRs) として、最も広く研究が進んでいる分子群である。そのリガンドである病原体の構成成分としては、TLR1 が (TLR2 と共同で) トリアシルリポプロテイン、TLR2 がペプチドグリカンやリポアラビノマンナン、TLR3 が二本鎖 RNA、TLR4 がリポポリサッカライド (LPS)、TLR5 がべん毛 (Flagellin)、TLR6 が (TLR2 と共同で) ジアシルリポプロテイン、TLR7 が 1 本鎖 RNA、TLR8 も一本鎖 RNA、TLR9 が CpG-オリゴ DNA であることがすでに明らかになっているが、TLR10 のリガンドはまだ同定されておらず、その機能も不明である⁴⁵⁾。一方、各種の TLRs が病原体の侵入により病原体の構成成分を認識すると、細胞内の各種シグナル伝達経路をへて、最終的には核内の Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や Interferon regulatory factor (IRF) と呼ばれる転写因子の活性化をもたらす。前者の場合は炎症性サイトカイン群の発現、後者の場合はインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子群の発現を通じて、細菌感染やウイルス感染に対する自然免疫応答を引き起こし、ひいては獲得免疫応答にも影響を及ぼす⁴⁷⁾。しかしながら、これらの病原体の構成成分に対する宿主の応答は均一ではなく、TLR をはじめとする PRRs には多くの多様性が存在し、その中には宿主の病原体に対する認識に影響を及ぼす遺伝子多型が存在し、宿主の病原体に対する自然免疫応答に影響を及ぼすことから、疾病に対する感受性や抵抗性にも影響を及ぼすことが想定され、マウスやヒトにおいては非常に多く

の研究がこれまで報告されてきている^{7),36)}。

本総説では、マウスやヒトにおける代表的な TLR の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) と疾患の関連性について簡潔に述べた後に、主題である豚の各種 TLRs に関する多様性や SNPs およびそれらの疾患との関連についてこれまでの文献を挙げながら解説する。

先行研究

マウスにおける先行研究の多くは、各種 TLRs やそのシグナル伝達経路の分子のノックアウトマウスを用いて研究されている⁷⁾。C3H/HeJ マウスにおける、LPS に対する応答性の欠如とグラム陰性菌感染に対する感受性の高さは、TLR4 の712番目のアミノ酸がプロリンからヒスチジンに変わっていることに起因している²⁹⁾。また、TLR2 欠損マウスは脳からの菌の排除が低下し、炎症が増加することから、*Streptococcus pneumoniae* による髄膜炎に感受性であることが報告されている¹¹⁾。一方で、TLR3 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、ウェストナイルウイルス感染に対して、抵抗性で脳におけるウイルス量や炎症反応、病理所見が軽減されることが報告されている⁵¹⁾。TLR5 欠損マウスにおいては、腸炎を自然発症すること及び大腸菌による経尿路感染に対して野生型マウスよりも感受性であることが報告されている^{50),2)}。また、多くの TLRs のシグナル伝達経路のアダプター分子として重要な Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) の欠損マウスにおいても、*Staphylococcus aureus* 感染に対して非常に感受性が高くなり、別のアダプター分子である Toll-interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) についても、その欠損マウスでは大腸菌感染に対して、肺における免疫応答が低下し、早期の死亡と高い肺内での菌の蓄積

と散布が認められている^{46,16)}。

ヒトにおいては、TLR1のプロモーター領域である(-7202A > G)において、G型アリルではTLR1依存性のサイトカイン応答やNF- κ Bの活性化、高いTLR1の細胞表面への発現を認め、敗血症患者におけるコホート研究では、変異型であるG型アリルは死亡率や臓器不全がより増悪し、関連する肺障害やグラム陽性菌の分離成績も高かったことが示されている⁵⁴⁾。また、TLR2では結核との関連が多く報告されており、2029C > T(Arg767Trp)、2258G > A(Arg753Gln)のいずれもArgに対してTrpとGlnが、結核に対する感受性の増加と関連すると報告されている^{3,26)}。しかし、TLR3では、Leu412Pheはヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染の自然抵抗性に貢献し、412Pheのヒト末梢血単核球ではHIVの増殖が抑制されるという論文が示されている⁴³⁾。TLR4では2つの非同義置換(Asp299Gly及びThr399Ile)が最も多く報告されており、様々な疾病との関連が報告されているが、結晶構造解析の結果、TLR4/MD-2/LPS複合体の形成に影響を及ぼし、Thr399Ileと比較してAsp299Glyのほうがより大きな構造変化をもたらすことが示されている²⁷⁾。さらに、TLR5においては、392番目のアミノ酸がストップコドンに変わるSNP(Arg392Stop)が存在するがこの変異は*Legionella pneumophila*によるレジオネラ肺炎の感受性を増加させることが報告されている¹⁴⁾。TLR7及びTLR8については、TLR7の第2イントロンであるintervening sequence2(IVS2)-151G > A及びTLR8の-129G > Cの組み合わせにより、-151G及び-129GではC型肝炎ウイルスへの感受性が高くなるという報告がある⁵²⁾。TLR9については、1635A > GというSNPにおいて、1635Aをホモで持つ患者は、HIV-1感染症の臨床症状や、CD4陽性細胞数の低下及びHIV-1ウイルスの血中ウイルス量の増加が認められるという報告があり、疾病との関連は不明であるが、Pro99Leuという多型は、CpG-ODNに対する反応性の欠如と関連することも報告されている^{44,18)}。

これらのマウスやヒトにおける研究については、それぞれ、Carpenter and O'NeillおよびSkevakiらにより詳細な総説が書かれているので、興味がある方はご一読をお勧めする^{7,36)}。

豚の各種TLRsにおける研究

2012年に豚の全ゲノム解読が完了し、豚のゲノム上にはTLR1-10の10種類のTLRsが存在することが明ら

かとなっている¹³⁾。ここでは、それぞれの豚TLRsについて、その同定から一塩基多型等の情報についての文献及び疾病との関連を示唆する文献についてあげながら解説する。

1-1 TLR1

豚TLR1の遺伝子配列及びゲノム構造は2006年にShinkaiらによって明らかにされた³⁹⁾。TLR1遺伝子の近傍には、TLR6およびTLR10の遺伝子も存在し、TLR10-TLR1-TLR6の遺伝子クラスターを形成している。このクラスター領域には6種類の多様性を有するマイクロサテライトマーカーが存在することを報告した³⁹⁾。その後、Shinkaiらは、豚TLR1のコード領域に21個のアミノ酸変異を伴うSNPが存在することを明らかにし、その多くは、細胞外領域のロイシンリッチリピートの部分に存在することを示した⁴⁰⁾。また、Bergmanらは、ヨーロッパイノシシと家畜豚のTLR1間で、イノシシのほうが家畜豚よりもSNPの数が有意に少ないことを示している⁴⁾。さらに、TLR1は腸管粘膜や腸管関連リンパ組織のすべてで発現しており、腸管膜リンパ節での発現は新生子豚よりも成豚での発現が高いことが示されている⁴⁸⁾。前述のマイクロサテライトマーカーのうち、2個はTLR1遺伝子に近接する上流領域に位置して遺伝子発現に影響を与えている可能性があり、腸管疾病との関連の解明が期待される。

1-2 TLR2

豚TLR2の遺伝子配列については、2003年にMunetaらにより報告され、TLR6とともに*Mycoplasma hyopneumoniae*の認識に関与することが示唆された²¹⁾。その後、TLR2の406C > G(Pro136Ala)というSNP(表1)において、C型を保有する個体よりもG型を保有する個体の方が肺炎病変の出現率が高いという報告や、その一塩基多型の簡易なPCRによる検出法も開発された^{22,49)}。また、Borjiginらは、マイコプラズマ肺炎病変を小さくする方向で改良したランドレース種豚は、免疫組織におけるTLR2およびTLR4の遺伝子発現が選抜していないランドレース種豚に比べて高いことを報告している⁶⁾。さらに、近年のDarfour-Oduroらによる報告では、TLR2の376G > A(Ala126Thr)というSNPが、TLR2の三次元構造上で、N末に存在し他の分子との相互作用に影響を及ぼしうる表層に位置して、リガンド認識に影響を及ぼしうるこ

と及び Ala から Thr へのアミノ酸置換はタンパク質の機能に有害な影響を及ぼすことが予測されることを報告しており、細菌性の病原体に対する免疫応答に影響を及ぼすことを示唆している⁹⁾。

1-3 TLR3

豚の TLR3 に関しては、2008年に Sang らにより、塩基配列の報告がなされている³³⁾。さらに、Morozumi らによって2009年にそのゲノム構造が報告されている²⁰⁾。ゲノム構造は、ヒトやマウスと同様に保存されており、TLR1 や TLR2 等の細胞表面に発現している TLRs と比較してアミノ酸変異を伴うような SNP は少ないことが報告されている。しかしながら、Wang らは、TLR3 のコード領域の 5 種類の SNPs (Thr267Met, Ile311Met, Lys372Asn, Thr710Ser, Ile720Met) について、リガンドである Poly (I:C) 刺激に対するシグナル伝達能をレポーターアッセイで調べた結果、Ile311Met (SNP933A > G) (表1) において、二本鎖 RNA である Poly (I:C) の認識が低下していることを見出し、この SNP は中国のローカルな豚品種にのみ存在していることを報告している⁵³⁾。疾病との関連では、PRRSV との関連が報告されており、TLR3 リガンドで刺激した豚 TLR3 を強制発現させた MARC-145 細胞は PRRSV に対して抗ウイルス性を示し、逆に肺胞マクロファージにおける TLR3 の発現を small-interfering RNA で阻害すると、TLR3 の mRNA 発現が80%抑制され、PRRSV の感染性は増加したことが報告されている³⁴⁾。

1-4 TLR4

豚 TLR4 に関しては、2006年に Alvarez らにより塩基配列が報告され、Shinkai らが、コード領域に 7 箇所の SNPs を報告している^{1),40)}。その後、2009年には Palermo らが、プロモーター領域等も含めて、34箇所の SNPs を報告しており、2012年には Shinkai らが、リガンドである Lipid A の認識が欠如した 1518T > G (Cys506Trp) という SNP が日本イノシシのみに存在することを報告した (表1)^{28),42)}。また、Yang らは、いくつかの SNPs (611T > A, 962G > A 及び 1027C > A) において、サイトカイン発現や肺炎病変スコアとの関連を報告しており、TLR4 のシグナルが低下する SNP (1605G > T) についても示している (表1)^{55),56)}。さらに、Fang らは、1027C > A という SNP は、東洋品種と西洋品種との間で、大きく偏りが異なっており

東洋品種でのみ A 型アリルを保有していることを報告している。また、LPS に対する TLR4 の遺伝子発現が 1027CC 型で高く、一方で tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) や interleukin-1 beta (IL-1 β) といった炎症性サイトカインの発現は 1027AC 型より低くなることを報告し、グラム陰性菌に対する免疫応答に C 型アリルが有用な影響を及ぼすことを報告している¹²⁾。また、Kich らによる TLR4 の SNPs (第2イントロンの 298C > T 及び 3'untransrated region の 208C > T のハプロタイプ CC 型) とサルモネラの糞便中への細菌の増加との関連についての報告もある¹⁷⁾。

1-5 TLR5

豚 TLR5 については、2006年の Shinkai らの報告で、コード領域内に13箇所の SNPs が報告されており、2011年に Shinkai らは、そのうち Arg148Leu および Pro402Leu の2つの非同義置換については、*Salmonella Choleraesuis* の死菌体や *Salomonella Typhimurium* の Flagellin に対する応答が低下することを報告している (表1)^{40),41)}。中でも、リガンド認識に最も影響の大きい 1205C > T (Pro402Leu) という SNP については、Allele specific primer-PCR (ASP-PCR) を用いた簡易な型別法により商用豚品種ではランドレース種にほぼ特異的であった²³⁾。最近、Muneta らは、1205C > T (Pro402Leu) の In vivo における効果について、SPF ランドレースを用いた *Salomonella Typhimurium* の感染試験により検証した成績について報告している²⁴⁾。また、Shinkai らは、1205C > T (Pro402Leu) がサルモネラ以外にも大腸菌由来の Flagellin に対しても、認識を低下させていることを明らかにしており (未発表データ)、Flagellin と TLR5 を介するシグナルが気道の漿液分泌や抑制性サイトカインである interleukin-10 (IL-10) の発現と関連することも豚において示されている^{25),57)}。さらに、豚では、Flagellin 認識の Alternative Pathway である NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) と NLR family of apoptosis inhibitory protein (NAIP) の両者の遺伝子が欠損しており機能していないことも示されており、Flagellin 認識における TLR5 の重要性が強調される^{3),32),10)}。今後、TLR5 の 1205C > T (Pro402Leu) を活用した豚のサルモネラ症に対する抗病性育種の進展が期待されるところである。

1-6 TLR6

豚 TLR6 の塩基配列についても、2003年に Muneta らにより報告され、*Mycoplasma hyopneumoniae* 刺激による豚肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生への関与が示された²¹⁾。その後、Shinkai らによりコード領域の11箇所の SNP が報告され、Bergman らは、26箇所の SNP を検出して、そのうち1箇所の非同義置換を示す SNP (977G > A : Arg326Lys) は、リガンド認識に影響を及ぼす可能性を報告している⁴⁰⁾⁴⁾。さらに、Regia Silva Sousa らは、遺伝的に異なる2系統の豚品種間で、*Mycoplasma hyopneumoniae* ワクチンに対する TLR6 の遺伝子発現に差異があることを報告している³⁰⁾。また、Zheng らは、*Streptococcus suis* に対するサイトカイン応答が豚の品種間で異なり、TLR6 がより大きな影響を及ぼしていることを報告しており⁵⁹⁾、ワクチン応答の豚品種間での差異等に関して、今後の研究の進展が期待される。

1-7 TLR7

TLR7 に関しては、2008年に Zhang らにより豚 TLR7 がクローニングされており、他の動物種との類似性が高く、脾臓、リンパ節、扁桃腺や抗原提示細胞での mRNA の発現が確認されている⁵⁸⁾。疾病との関連で興味深い点は、口蹄疫ウイルス中に見出される免疫を刺激する RNA オリゴヌクレオチドが、TLR7 を介して、NF- κ B を活性化し、IFN- α の発現を誘導するという知見である⁵⁸⁾。2009年には Morozumi らにより、豚 TLR7 の多様性が報告され²⁰⁾、さらに近年では、Clop らにより Porcine TLR genotyping array という網羅的に TLRs の遺伝的多様性を検出する手法も報告されており⁸⁾、今後、口蹄疫ウイルスのような重要な豚の感染症に対する疾病感受性や抵抗性につながる遺伝子多型の同定につながることを期待される。

1-8 TLR8

TLR8 も TLR7 と同様に一本鎖 RNA を認識する PRR であり、ヒトでは TLR7 のみのリガンドである imiquimod に対して、豚では TLR7 と TLR8 の両者が imiquimod で活性化されることが報告されている⁶⁰⁾。さらに前述の Porcine TLR genotyping array による解析では、TLR8 には、アミノ酸置換によって Stop codon が生じる影響力の高い SNP を含めて、TLR7 よりも多くの多様性が見出されている⁸⁾。これらの多型が、どのように豚品種間で分布しており、豚のウイルス感染症

に対してどのような影響を及ぼしているのかについて今後の研究の進展が期待される。

1-9 TLR9

豚 TLR9 の塩基配列は、2003年に Shimosato らによって報告され、リガンドである CpG オリゴ DNA の認識に関与し、パイエル板や腸間膜リンパ節によく発現していることが報告されている³⁷⁾。さらに、Shimosato らは、乳酸菌由来の AT-オリゴヌクレオチドの認識にも関与し、TLR9 を介した免疫応答によって細菌由来の DNA に対する Th1/Th2 バランスの評価に有用であることを示唆している³⁸⁾。また、Schneberger らは、TLR9 が肺や気道上皮にも発現していることを報告し、腸管以外にも肺での粘膜免疫への重要性を示唆している³⁵⁾。豚 TLR9 の多様性を調査した報告は少ないが、Clop らは、豚 TLR の genotyping array を用いた研究で、TLR4 や TLR7 と同様に他の TLRs と比較して多様性は少ないが、たんばく質構造に中等度の影響を及ぼすことが予測される8箇所の多型を報告している⁸⁾。

1-10 TLR10

豚の TLR10 に関しては、2006年に Shinkai らの報告によって、初めてその遺伝子配列が報告され、そのゲノム構造はヒトと類似しているが、細胞内のシグナル伝達に関する構造が、TLR1 や TLR6 といった他の TLR とは異なっていることが報告されている³⁹⁾。2012年には Bergman らが、TLR10 の遺伝子多型について報告しており、33箇所の SNP (うち20個がアミノ酸変異を伴う SNP) が見出されたが、機能に影響を及ぼすような SNP は見出されておらず、アミノ酸変異を伴う SNP でヒンジ領域にあたる部分に存在する SNP もなかったことを報告している⁵⁾。TLR10 のリガンドに関しては、いまだ不明であるが、ヒトではインフルエンザウイルス感染マクロファージにおいて発現が強く誘導され、インフルエンザウイルスに対する自然免疫等に関与することが報告されており¹⁹⁾、獣医学領域においても TLR10 の多様性と豚インフルエンザウイルスに対する自然免疫応答等の研究の進展が期待される。

おわりに

以上述べてきたように、豚ゲノムの解読が完了した現在、ゲノム上に存在することが明らかとなった、豚 TLR1-10 についてはその遺伝子構造および多様性の情

表1 これまでに報告されている豚TLRsの一塩基多型とリガンド認識あるいは豚疾病との関連

TLRs	SNPs	アミノ酸変異	豚疾病との関連	豚品種	参考文献
TLR2	406C>G	Pro136Ala	肺炎病変の出現率との関連	ランドレース	49)
TLR3	933A>G	Ile311Met	Poly(I:C)に対する反応性低下	中国種	53)
TLR4	1027C>A	Gly343Leu	LPSに対する応答性の変化	不明	12)
"	1605G>T	Leu535Pro	TLR4シグナルの低下	中国種、イノシシ	56)
"	611T>A	Leu204His	肺炎病変スコアとの関連	不明	55)
"	1518T>G	Cys506Trp	LipidAに対する反応欠如	イノシシ	42)
TLR5	1205>T	Pro402Leu	サルモネラ症に対する感受性増加	ランドレース	24)
"	443G>T	Arg148Leu	サルモネラべん毛の認識低下	中国種	41)

報が蓄積され、各TLRのリガンド認識に影響を及ぼすSNPsや豚疾病とTLRsの発現の関連に関する報告は増加してきている。SNPsと疾病等との関連が示唆されているTLRの多型に関する報告は表1に示すようにまだ十分とはいえないが、近年では、ゲノム編集の技術が大きく進展し、一塩基多型を含む任意の遺伝子の編集が比較的容易となり、豚の遺伝的改良にも利用され始めている^{15),31)}。今後はこれらの新しい技術やSNPと疾病との関連に関する情報を活用した新たな豚の抗病性育種の実現に向けた更なる研究の進展が期待される。

利益相反状態の有無

すべての著者に開示すべき利益相反状態はない。

謝辞

本総説の執筆にあたり、関連する調査や研究の推進の一部においては、平成30年度日本中央競馬会畜産振興事業による助成により実施されましたので、ここに深謝いたします。

引用文献

- 1) Alvarez B, et al. (2006) Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4. *Dev Comp Immunol*, 30:345-355.
- 2) Andersen-Nissen E, et al. (2007) Cutting edge: TLR5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Immunol*, 178:4717-4720.
- 3) Ben-Ali M, et al. (2004) Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11:625-626.
- 4) Bergman IM, et al. (2010) European wild boars

and domestic pigs display different polymorphic patterns in the Toll-like receptor (TLR)1, TLR2, and TLR6. *Immunogenetics*, 62:49-58.

- 5) Bergman IM, et al. (2012) Extensive polymorphism in the porcine Toll-like receptor 10 gene. *Int J Immunogenet*, 39:68-76.
- 6) Borjigin L, et al. (2016) Immunogenic properties of Landrace pigs selected for resistance to mycoplasma pneumoniae of swine. *Anim Sci J*, 87:321-329.
- 7) Carpenter S and O'Neill LAJ. (2007) How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cellular Microbiol*, 9:1891-1901.
- 8) Clop A, et al. (2016) Identification of genetic variation in the swine toll-like receptors and development of a porcine TLR genotyping array. *Genet Sel Evol*, 48:28
- 9) Darfour-Oduro KA, et al. (2016) Evidence for adaptation of porcine Toll-like receptors. *Immunogenetics*, 68:179-189.
- 10) Dawson HD, et al. (2017) An in-depth comparison of the porcine, murine and human inflammasomes; lessons from the porcine genome and transcriptome. *Vet Microbiol*, 202:2-15.
- 11) Echchannaoui H, et al. (2002) Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*, 186:798-806.
- 12) Fang X, et al. (2013) Breed-linked polymorphisms of porcine toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 and the primary investigation on their relationship with prevention against *Mycoplasma pneumoniae* and bacterial LPS challenge. *Immu-*

- genetics, 65:829-834.
- 13) Groenen MA, et al. (2012) Analysis of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491:393-398.
 - 14) Hawn TR, et al. (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*, 198:1563-1572.
 - 15) Huang JJ, et al. (2017) Genome editing technologies drive the development of pig genetic improvement. *Yi Chuan*, 39:1078-1089.
 - 16) Jeyaseelan S, et al. (2005) Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP) is critical for early lung immune responses against *Escherichia coli lipopolysaccharide* and viable *Escherichia coli*. *J Immunol*, 175:7484-7495.
 - 17) Kich JD, et al. (2014) TLR4 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with Salmonella shedding in pigs. *J Appl Genet*, 55:267-271.
 - 18) Kubarenko AV, et al. (2010) A naturally occurring variant in human TLR9, P99L, is associated with loss of CpG oligonucleotide responsiveness. *J Biol Chem*, 285:36486-36494.
 - 19) Lee SMK, et al. (2014) Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:3793-3798.
 - 20) Morozumi T and Uenishi H. (2009) Polymorphism distribution and structural conservation in RNA-sensing Toll-like receptor 3, 7 and 8 in pigs. *Biochim Biophys Acta*, 1790:267-274.
 - 21) Muneta Y, et al. (2003) Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res*, 23:583-590.
 - 22) Muneta Y, et al. (2012) Development of allele-specific primer PCR for a swine TLR2 SNP and comparison of the frequency among several pig breeds of Japan and the Czech Republic. *J Vet Med Sci*, 74:553-559.
 - 23) Muneta Y, et al. (2012) Allele-specific primer polymerase chain reaction for a single nucleotide polymorphism (C1205T) of swine Toll-like receptor 5 and comparison of the allelic frequency among several pig breeds in Japan and the Czech Republic. *Microbiol Immunol*, 56:385-391.
 - 24) Muneta Y, et al. (2018) In vivo effect of a TLR5 SNP (C1205T) on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in weaned, specific pathogen-free Landrace piglets. *Microbiol Immunol*, 62:380-387.
 - 25) Muramatsu S, et al. (2013) Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305:L819-830.
 - 26) Ogun AC, et al. (2004) The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*, 23:219-223.
 - 27) Ohto U, et al. (2012) Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem* 287:40611-40617.
 - 28) Palermo S, et al. (2009) Toll-like receptor 4 genetic diversity among pig populations. *Anim Genet*, 40:289-299.
 - 29) Poltorak A, et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene. *Science*, 282:2085-2088.
 - 30) Regia Silva Sousa K, et al. (2011) Toll-like receptor 6 differential expression in two pig genetic groups vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *BMC Proc*, 5(Suppl 4):S9
 - 31) Ryu J, et al. (2018) Use of gene-editing technology to introduce targeted modifications in pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, 9:5
 - 32) Sakuma C, et al. (2017) Pig lacks functional NLRC4 and NAIP genes. *Immunogenetics*, 69:125-130.
 - 33) Sang Y, et al. (2008) Molecular identification and functional expression of porcine Toll-like receptor (TLR) 3 and TLR7. *Vet Immunol Immunopathol*, 125:162-167.
 - 34) Sang Y, et al. (2008) Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection. *Viral Immunol*, 21:303-313.
 - 35) Schneberger D, et al. (2011) Expression of toll-like receptor 9 in the lungs of pigs, dogs, and cattle. *Int J Exp Pathol*, 92:1-7.
 - 36) Skevaki C, et al. (2015) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility

- to infectious diseases. *Clin Exp Immunol*, 180:165-177.
- 37) Shimosato T, et al. (2003) Swine Toll-like receptor 9(1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochem Biophys Acta*, 1627:56-61.
- 38) Shimosato T, et al. (2005) Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 326:782-787.
- 39) Shinkai H, et al. (2006) Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Mol Immunol*, 43:1474-1480.
- 40) Shinkai H, et al. (2006) Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics*, 58:324-330.
- 41) Shinkai H, et al. (2011) Porcine Toll-like receptors: Recognition of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms. *Mol Immunol*, 48:1114-1120.
- 42) Shinkai H, et al. (2012) Toll-like receptor 4 polymorphism impairing lipopolysaccharide signaling in *Sus scrofa*, and its restricted distribution among Japanese wild boar populations. *DNA Cell Biol*, 31:575-581.
- 43) Sironi M, et al. (2012) A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol*, 188:818-823.
- 44) Soriano-Sarabia N, et al. (2008) Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 49:128-135.
- 45) Takeda K, et al. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21:335-376.
- 46) Takeuchi O, et al. (2000) Cutting edge: TLR2-deficient mice and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*, 165:5392-5396.
- 47) Takeuchi O and Akira S. (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*, 1:625-635.
- 48) Uddin MJ, et al. (2013) Expression patterns of porcine Toll-like receptors family set of genes (TLR1-10) in gut-associated lymphoid tissues alter with age. *Res Vet Sci*, 95:92-102.
- 49) Uenishi H, et al. (2011) Polymorphisms in pattern recognition receptors and their relationship to infection disease susceptibility in pigs. *BMC Proc*, 5(Suppl 4):S27
- 50) Vijay-Kumar M, et al. (2007) Mice lacking TLR5 develop spontaneous colitis. *J Clin Invest*, 117:3909-3921.
- 51) Wang T, et al. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*, 10:1366-1373.
- 52) Wang CH, et al. (2011) TLR7 and TLR8 gene variations and susceptibility to Hepatitis C virus infection. *PLoS ONE*, 6:e26235.
- 53) Wang L, et al. (2014) Functional characterization of genetic variants in the porcine TLR3 gene. *Genet Mol Res*, 13:1348-1357.
- 54) Wurfel MM, et al. (2008) Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 178:710-720.
- 55) Yang XQ, et al. (2012) Association of TLR4 polymorphism with cytokine expression level and pulmonary lesion score in pigs. *Mol Biol Rep*, 39:7003-7009.
- 56) Yang XQ, et al. (2012) Functional analysis of SNPs in porcine TLR4 gene. *Yi Chuan*, 34:1050-1060.
- 57) Yang X, et al. (2013) Association of TLR5 sequence variants and mRNA level with cytokine transcription in pigs. *Immunogenetics*, 65:125-132.
- 58) Zhang Y, et al. (2008) Molecular cloning and functional characterization of porcine toll-like receptor 7 involved in recognition of single-stranded RNA virus/ssRNA. *Mol Immunol*, 45:1184-1190.
- 59) Zheng H, et al. (2012) The role of toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol*, 156:147-156.
- 60) Zhu J, et al. (2008) Porcine TLR8 and TLR7 are both activated by a selective TLR7 ligand, imiquimod. *Mol Immunol*, 45:3238-3243.