

- 23 Adachi, K., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Seki, E., Nakano, H., Takeuchi, O., Takeda, K. et al., *Plasmodium berghei* infection in mice induces liver injury by an IL-12-and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2001. 167: 5928–5934.
- 24 Shear, H. L., Srinivasan, R., Nolan, T. and Ng, C., Role of IFN- $\gamma$  and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J. Immunol.* 1989. 143: 2038–2044.
- 25 Finney, C. A. M., Taylor, M. D., Wilson, M. S. and Maizels, R. M., Expansion and activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 1874–1886.
- 26 Ohata, J., Miura, T., Johnson, T. A., Hori, S., Ziegler, S. F. and Kohsaka, H., Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum.* 2007. 56: 2947–2956.
- 27 Couper, K. N., Blount, D. G., de Souza, J. B., Suffia, I., Belkaid, Y. and Riley, E. M., Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J. Immunol.* 2007. 178: 4136–4146.
- 28 Watanabe, K., Mwinzi, P. N., Black, C. L., Muok, E. M., Karanja, D. M., Secor, W. E. and Colley, D. G., T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007. 77: 676–682.
- 29 Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A. M., Lamb, J. R. and Maizels, R. M., Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005. 202: 1199–1212.
- 30 Telford, G., Wheeler, D. J., Appleby, P., Bowen, J. G. and Pritchard, D. I., *Heligmosomoides polygyrus* immunomodulatory factor (IMF), targets T-lymphocytes. *Parasite Immunol.* 1998. 20: 601–611.
- 31 Rzepecka, J., Lucius, R., Doligalska, M., Beck, S., Rausch, S. and Hartmann, S., Screening for immunomodulatory proteins of the intestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.* 2006. 28: 463–472.
- 32 Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C. and Stevenson, M. M., Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 1887–1904.
- 33 Tosta, C. E., Sedegah, M., Henderson, D. C. and Wedderburn, N., *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*: isolation of infected erythrocytes from blood by colloidal silica gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.* 1980. 50: 7–15.
- 34 Matsuoka, Y., Malaria ELISA. In Tanabe, K., Waki, S., Kojima, S. and Kita, K. (Eds.), *Malariaology Laboratory Manuals*. Kinokuniya, Tokyo 2000, pp. 123–126.

Abbreviations: ES: excretory/secretory · Foxp3: forkhead box p3 · Hp: *Heligmosomoides polygyrus* · pRBC: *Plasmodium yoelii*-parasitized erythrocyte · Py: *Plasmodium yoelii* 17XNL

Full correspondence: Dr. Kohhei Tetsutani, Department of Parasitology, Kyushu University Graduate School of Medical Science, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-0054, Japan  
 Fax: +81-92-642-6118  
 e-mail: tetzutani@gmail.com

Received: 18/3/2009  
 Revised: 8/5/2009  
 Accepted: 24/6/2009

# 原虫感染と IL-12 サイトカインファミリー

The role of IL-12 cytokine family in protozoa infection

吉田裕樹・濱野真二郎

Th1 型 CD4 陽性細胞は、インターフェロン- $\gamma$  を産生することにより細胞内寄生性原虫の排除に重要な細胞性免疫をつかさどっている。IL-12 サイトカインファミリーメンバーは、Th1 分化誘導作用をもつとともに、炎症誘導や免疫抑制など多彩な作用をもつ。IL-12 は Th1 の分化と維持に重要なサイトカインであり、原虫に対する感染防御に不可欠なサイトカインである。IL-27 は、原虫感染時の過剰な免疫応答を制御し、致死的な炎症から宿主を守る機能ももっている。IL-12 ファミリーサイトカインは、T 細胞の分化や免疫反応を制御することにより、原虫感染においてさまざまな役割を果たしている。

**Key words** ●原虫 ●サイトカイン ●IL-12 ●Th1 ●免疫抑制

## はじめに

原虫（原生動物）は単核の真核生物で、原生生物界に区分される。原虫のなかにはヒトを含む動物に寄生するものがあり、病原性をもつ原虫はときに感染症をひき起こす。ヒトにおいては、赤痢アメーバによるアメーバ赤痢、トリパノソーマ類によるアフリカ睡眠病やシャーガス病、リーシュマニア類による内臓/皮膚/皮膚粘膜型リーシュマニア症、各種マラリア原虫によるマラリアなどが、重篤な原虫感染症として知られている。

原虫に対する防御免疫のなかでは、CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) が重要な役割を果たすことが知られている。ナイーブ CD4 陽性細胞が抗原を認識し活性化すると、Th1 および Th2 という、2つの異なる性格をもつ細胞群に分化することが知られていた。原虫感染に関しては、Th1 が産生するインターフェロン (IFN)- $\gamma$  によりマクロファージなどの食細胞が活性化し、細胞内寄生性原虫\*1 を排除する機構が重要である。近年、Th1/2 と性質を異にするヘルパー T 細胞集団 Th17 が同定された<sup>1,2)</sup>。Th17 は、炎症誘導にかかわるインターロイキン (IL)-17 を産生し、好中球の遊走を介して細胞外病原体の排除に関与する。

こうした T 細胞の分化には、IL-12 ファミリーサイトカインや IL-4 などのサイトカインが重要な役割を果たして

いる。本稿では、IL-12 ファミリーサイトカインの役割を概説し、とくに注目を集めている IL-27 と IL-23 を中心に、原虫感染におけるこれらのサイトカインのもつ多彩な機能について解説する。

## IL-12 サイトカインファミリー

### 1. リガンドと受容体

IL-12 は p35 と p40 の2つのサブユニットからなり抗原提示細胞 (antigen-presenting cell : APC) により産生される、1細胞群の誘導・維持に重要なサイトカインである。近年、IL-12 類似サイトカイン IL-23<sup>3)</sup>、IL-27<sup>4)</sup>、および IL-35<sup>5,6)</sup> が同定された。IL-23 は p35 様サブユニット p19 と p40 サブユニット (IL-12 の p40 と同一分子) からなる。IL-27 は、p40 様サブユニット Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI-3) と p35 様サブユニット p28 からなる。さらに近年になって、IL-12 の p35 と EBI-3 からなる IL-35 が同定された。IL-12, 23, 27 は、活性化した樹状細胞などから産生されるが、IL-35 は制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) から産生されるとされている。

IL-12 受容体は、 $\beta 1$  と  $\beta 2$  の2つのサブユニットからなり、その下流では転写因子 signal transducer and activator of transcription (STAT) 4 が活性化し、直接 IFN- $\gamma$  産生を誘導する。IL-23 受容体は、IL-12 受容体  $\beta 1$  鎖、および IL-23 特異的受容体サブユニットからなり、その下流では、STAT1, 3, 4, 5 が活性化する。IL-27 受容体は、WSX-1 分子と IL-6 受容体のシグナル伝達コンポーネントである gp130 からなり、その下流では、STAT1, 3 が活性化する。IL-35 の受容体は同定されていない。

Hiroki Yoshida<sup>1</sup>, Shinjiro Hamano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 佐賀大学医学部 分子生命科学講座, <sup>2</sup> 九州大学大学院医学研究院 感染免疫・熱帯医学分野

E-mail : yoshidah@med.saga-u.ac.jp

URL : www.mcis.med.saga-u.ac.jp

## 2. それぞれのサイトカインの機能

IL-12は、ナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞やT細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を誘導する、Th1分化に必須なサイトカインである<sup>7)</sup>。

IL-23は、メモリータイプのT細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を誘導すると報告されたが<sup>3)</sup>、その後、Th17の分化を誘導することが明らかになった。Th17分化はIL-6+TGF- $\beta$ 2より開始され、IL-23がその維持に必要であることがわかっている。

IL-27<sup>4)</sup>は、STAT1を活性化することによりTh1特異的転写因子T-betの活性化を誘導し、Th1の分化を促進する<sup>8)</sup>。IL-27には、このTh1分化誘導に加えて、Th17の分化抑制作用が認められる。WSX-1分子を欠損するマウスでは、Th17によって引き起こされる実験的自己免疫性脳脊髄炎\*2が増悪し、また脳内でTh17が増加する<sup>9,10)</sup>。さらに、IL-27は、IL-10産生誘導を介して、活性化T細胞によるサイトカイン産生を抑制する作用を有している<sup>11-13)</sup>。

IL-35は、Th1誘導作用をもつとともに、Tregの増殖を誘導し、その一方でエフェクター細胞の増殖を抑制す

る<sup>6)</sup>。またIL-35自体がTregから産生されるとされている<sup>5)</sup>。IL-35は、IL-27と一部共通した作用を有しているが、その詳細に関しては不明な点が多い。図1に、IL-12, 23, 27, 35, およびその受容体の構造とおもな役割を示す。

## 3. Th1分化と原虫感染免疫

Mosmannらにより、ナイーブCD4陽性細胞が、Th1とTh2という異なる性質をもつ2つの細胞集団に分かれることが報告されたのち<sup>14)</sup>、その分化機構や生理的役割の詳細が明らかにされてきた。IL-12は、NK細胞やT細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を誘導するサイトカインとして同定され、さらにTh1群の分化・維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。IL-12刺激によりTh1などから産生されるIFN- $\gamma$ は、マクロファージなどに作用して、MHC分子の発現を上昇させるなどの機構によりその抗原提示能を亢進させるほか、誘導性一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : iNOS) の発現を亢進させ、産生される一酸化窒素の作用などにより、さまざまな細胞内寄生性病原体の排除にかかわっている。Locksleyらのグループにより、*Leishmania major* に対して抵抗性を示すC57BL/6などのマウスにおいては感染時にTh1が分化

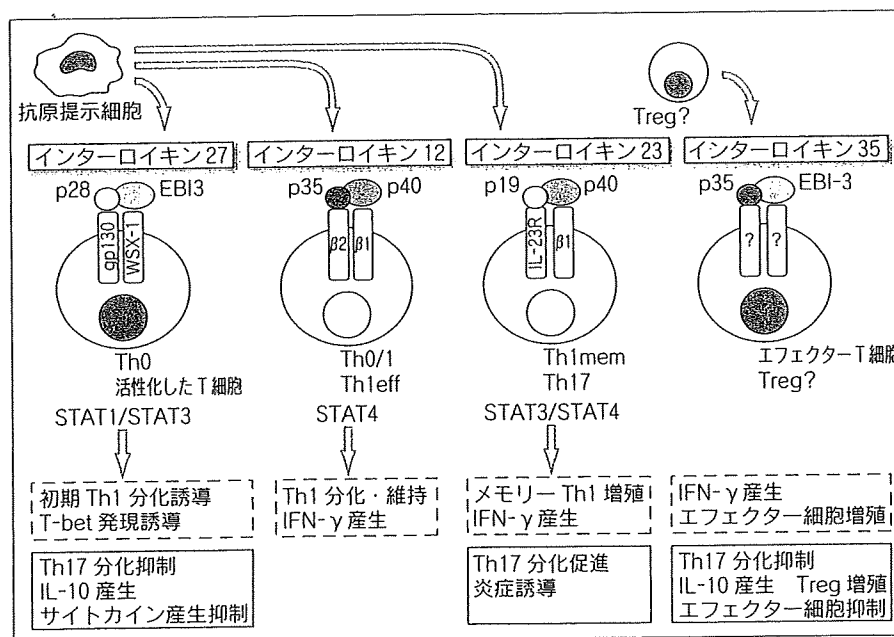


図1 IL-12/IL-23 サイトカイン/受容体ファミリー

IL-12 サイトカインファミリーメンバーとその受容体、活性化する転写因子を示す。IL-12, 23, 27 は活性化した樹状細胞から産生される。IL-35 は制御性T細胞 (Treg) から産生されるとの報告がある。破線四角は、Th1分化に関する各サイトカインの役割、実線四角はTh1分化以外の役割を示す。IL-27は、活性化したT細胞に対してはサイトカイン産生抑制作用を示す。IL-23は、Th17に作用し、その分化を促進する。IL-35は、エフェクターT細胞に対する抑制作用と、Tregに対する増殖作用をもつ。Th1eff : エフェクターTh1, Th1mem : メモリーTh1.

\*1 細胞内寄生性原虫：病原性細菌の一部には食細胞などに食菌されたのち、その殺菌機構をかいくぐって食細胞内で増殖できるものがある。本稿で示す原虫類のほか、結核菌、チフス菌などが知られ、感染時にはおもに細胞内で増殖し、病原性の発揮につながる。

\*2 実験的自己免疫性脳脊髄炎：ミエリンオリゴ糖蛋白質などの神経関連蛋白質をマウスに免疫することにより発症する自己免疫性の脳脊髄炎、中枢神経系に炎症が生じ、四肢麻痺などを呈する。ヒトの多発性硬化症のモデルとして研究されている。

誘導されるが、感染感受性の高いBALB/cなどのマウスにおいてはTh1が誘導されないことが報告され、原虫感染防御におけるTh1の重要性が明確に示された<sup>15)</sup>。L. major 以外にも、Trypanosoma cruzi や Toxoplasma gondii など多くの細胞内寄生性原虫が、活性化したマクロファージ内で排除されることが知られている。

## II 原虫感染におけるIL-12サイトカインファミリーの役割

これまでに、さまざまなサイトカインの生体内における役割が、サイトカインや抗サイトカイン抗体の投与、およびサイトカイン遺伝子欠損(ノックアウト:KO)マウスの解析などにより明らかにされてきた。KOマウスは遺伝子産物の機能を明らかにするうえで強力なツールであるが、IL-12サイトカインファミリーのようなヘテロ2量体構造をとるサイトカインの場合には注意を要する。たとえばIL-12p40のKOマウスはIL-12に加えてIL-23を産生できないし、当初IL-12だけの欠損と考えられていたIL-12p35 KOマウスはIL-35も産生できない。同様のことはサイトカイン受容体のKOマウスでも当てはまる。以下に、これまでに明らかにされているIL-12サイトカインファミリーの原虫感染における役割を示すが、サイトカインとその受容体のサブユニットの組合せを念頭においての理解が必要である。

### 1. IL-12

前述のように、IL-12はNK細胞やTh1によるIFN- $\gamma$ の産生やCD8陽性T細胞の活性化を誘導し、IFN- $\gamma$ によるマクロファージの活性化は細胞内寄生性原虫の排除にはたらく。マクロファージに寄生し、そのファゴリソームの中で増殖するリーシュマニア原虫の排除には、このIL-12が決定的な役割を果たし<sup>15,16)</sup>、IL-12投与が皮膚型に加えて内臓型リーシュマニア症にも奏効することが見出された<sup>17,18)</sup>。病態のコントロールに内因性のIL-12が不可欠であることは、まずIL-12に対する中和抗体を投与する実験で示され<sup>19)</sup>、次いでIL-12p35 KOやIL-12p40 KOマウスを用いた研究で示された<sup>20)</sup>。IL-12p35 KOに比べてIL-12p40 KOマウスにおける原虫の増加がより大きいことより、IL-12に加えてIL-23もリーシュマニア原虫に対する感染防御に関与していることが示唆されている。

IL-12の重要性はマクロファージに選択的に寄生するリ

ーシュマニア原虫に対してだけでなく、多様な細胞に感染する*T. gondii*や*T. cruzi*の感染においても示された<sup>21,22)</sup>。また住血原虫であり細胞外で増殖する*Trypanosoma brucei brucei*や*Trypanosoma evansi*に対する感染防御においてもIL-12が不可欠であることが示された<sup>23)</sup>。IFN- $\gamma$ 受容体KOマウスも両原虫に対して同様に感受性を示し、またIFN- $\gamma$  KOマウスも*T. b. rhodesiense*に対して感受性となるなどの知見から、アフリカ睡眠病やナガナ病をひき起こす病原体に対してもIL-12はIFN- $\gamma$ の産生誘導を介して感染防御に機能していると考えられる。マラリアの場合、マラリア原虫は肝細胞の中で増殖する赤外型と赤血球の中で増殖する赤内型をとりうるが、いずれの場合もIL-12がIFN- $\gamma$ の産生誘導を介して感染防御に機能することが齧歯類に寄生するマラリア原虫を用いた研究から明らかにされた<sup>24)</sup>。ただしマラリアにおいてIL-12/IFN- $\gamma$ は、原虫排除のみならず自己の組織破壊をもたらすこともあり、*Plasmodium berghei* ANKAによってひき起こされる脳炎や*Plasmodium berghei* NK65による肝炎はIL-12/IFN- $\gamma$ によってひき起こされることが知られている<sup>25)</sup>。*Cryptosporidium parvum*は腸管上皮細胞に感染する細胞内寄生原虫であり、小児や免疫不全状態にある人に下痢をひき起こす日和見病原体である。この*Cryptosporidium*に対する感染防御機構の詳細はいまだに十分には理解されていないものの、IL-12/IFN- $\gamma$ の重要性については繰り返し報告されている<sup>26,27)</sup>。

### 2. IL-23

原虫感染防御におけるIL-23の役割に関する報告は多くはないが、*T. gondii*の感染系において比較的研究が進んでいる。IL-23p19 KOマウスは野生型マウスと同様のT細胞応答を示し、原虫数もうまくコントロールできるので、*Toxoplasma*の急性感染に対する防御にはIL-23は必須ではないようである<sup>28)</sup>。ただし、IL-12p40 KOマウスはIL-12p35 KOマウスに比べて病態が重篤で、かつIL-12p40 KOにリコンビナントIL-23を加えると病態がやや改善を示すことより、IL-12が存在しないような状況下ではIL-23が部分的に感染防御を補完すると考えられている。このときの防御はIFN- $\gamma$ 非依存的なメカニズムによると報告されている。

IL-23によって分化するTh17からは、IL-17をはじめとするサイトカインが産生される。原虫感染におけるIL-17の役割に関する報告は少ないが、KellyらはIL-17受容

体欠損マウスにおいて好中球の遊走が低下し、*T. gondii* に対する感染抵抗性が減弱することを報告している<sup>29)</sup>。また、筆者らは IL-17 欠損マウスにおいて炎症性サイトカイン産生低下を伴って *T. cruzi* 感染抵抗性が減弱することを見出している (未発表データ)。

### 3. IL-27

前述したように、IL-27 には、これまでに免疫亢進と免疫抑制という 2 つの相反する作用が認められる。IL-27 の役割は、とくに KO マウスを用いた原虫感染の実験系で明らかにされてきた<sup>30)</sup>。

筆者らの作製した IL-27 受容体  $\alpha$  鎖 (WSX-1) 欠損マウスにおいては、*L. major* に対する感染抵抗性が野生型に比べて著しく低下していた<sup>31)</sup> (図 2a, b)。WSX-1 欠損マウスでは、感染早期における所属リンパ節 CD4 陽性細胞の Th1 への分化が障害されており、原虫抗原特異的 IFN-

$\gamma$  産生も低下していた。興味深いことに、感染後期になると、IFN- $\gamma$  産生は野生型と同程度にまで回復し、一部の WSX-1 欠損マウスでは感染部位の腫脹の軽減も認められることから、*L. major* に対する防御免疫における IL-27 の必要性は、感染早期に限定されるものと推察された。同様の結果が EBI-3 欠損マウスについても報告されており<sup>32)</sup>、*in vitro* の解析結果も併せて、IL-27/WSX-1 が *L. major* 感染早期の Th1 分化誘導に必須の役割を果たしていることが明らかにされた。

WSX-1 欠損マウスは *T. cruzi* や *T. gondii* に対しても感染感受性を示したが、このとき Th1 分化の障害は認められず、むしろ IFN- $\gamma$  を含むさまざまな炎症性サイトカインの過剰産生が生じ、肝細胞壊死に伴う肝機能障害などによって死亡していくことが示された (図 2c, d)。IL-12 や IFN- $\gamma$  を欠損するマウスでは、*T. cruzi* 感染時に原虫の排除能が低下し血中の原虫数は野生型に比べ著しく増

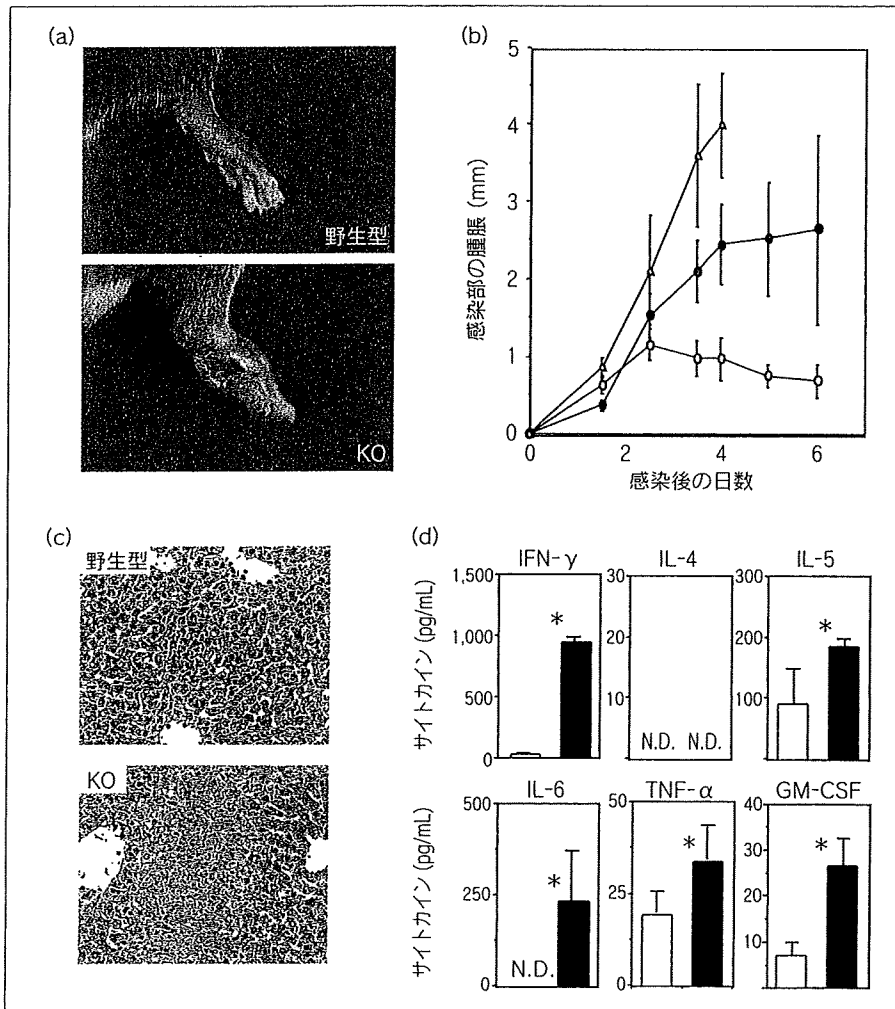


図 2 原虫感染における IL-27 の 2 つの役割

(a, b) WSX-1 欠損マウスにおける *Leishmania major* 感染部位の腫脹。  
 (a) WSX-1 欠損マウス (KO) は、Th1 初期分化が障害されているため、*L. major* 感染抵抗性が減弱し、野生型に比べて著しい感染部位の腫脹をきたす。  
 (b) C57BL/6 マウス (O) は分化した Th1 により原虫を排除するが、BALB/c マウス ( $\Delta$ ) では Th1 分化障害のため原虫を排除できない。WSX-1 欠損マウス (●) は、C57BL/6 マウスの遺伝的背景をもつが、Th1 分化異常のため原虫排除が障害されている。  
 (c, d) WSX-1 欠損マウスにおけるサイトカインの過剰産生。  
 (c) *Trypanosoma cruzi* 感染時、WSX-1 欠損マウス (KO) では肝臓の広範なネクロシス像が認められる。  
 (d) *T. cruzi* 感染後、WSX-1 欠損マウスの血清中 (■) には、野生型マウス (□) に比べ、さまざまな炎症性サイトカインの過剰産生が見られる。\* :  $p < 0.05$  で有意差を認める。N. D. : 検出限界以下。  
 (文献 31, 35 より転載, 一部改変)

加するが、肝細胞壊死はほとんど生じない。このことから、この肝障害は主としてIFN- $\gamma$ によって引き起こされており、IL-27にはIFN- $\gamma$ を含む炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、感染に伴う過剰な炎症を抑制するはたらきがあることが明らかになった。IL-12の項で述べたように、感染時にTh1などによって産生されるIFN- $\gamma$ は、宿主にとって諸刃の剣であり、病原体を排除するとともに自らに致命的な炎症を引き起こしうる。IL-27はサイトカインの産生を抑制することにより、こうした過剰な炎症を制御していると考えられる。IL-27によるサイトカイン産生抑制の観点から、Artisらは、WSX-1欠損マウスにおける*L. major*に対する抵抗性の減弱は、感染初期の一過性のIL-4産生に対するIL-27による抑制作用が失われ、Th2分化が促進されたためという仮説を提示している<sup>33)</sup>。

*T. gondii* 感染では脳炎などの神経症状が引き起こされることがある。WSX-1欠損マウスで免疫抑制により*T. gondii*による慢性感染を誘導すると、マウスはTh17依存性のトキソプラズマ脳炎により死亡する。WSX-1欠損マウスでは、Th17に依存した実験的自己免疫性脳炎も増悪することから、IL-27にはTh17分化を抑制する作用があることも明らかになった。IL-27によるTh17分化抑制機構もIL-17産生制御を介して感染に伴う過剰な炎症の抑制にかかわっているものと考えられる。IL-27/WSX-1欠損マウスにおける原虫感染の解析結果を表1にまとめる。なお、ヒトの原虫感染症におけるIL-27の役割は明らかにされておらず、今後の研究が待たれる。

#### 4. IL-35

原虫感染におけるIL-35の役割は明らかにされていない。前述のように、EBI-3欠損マウスにおけるTh1分化障害と*L. major*に対する抵抗性減弱が報告されているが<sup>32)</sup>、この結果がIL-27とIL-35のどちらに依存したものを明らかにするためには、p28単独欠損マウスやWSX-1欠損マウスとの詳細な比較、およびそれぞれのサイトカイン投与の結果などとの比較検討を必要とする。IL-35は、それ自体に免疫抑制作用があり、またTregを増殖させ、同時にTreg自体から産生されるとの報告があることなどから、Tregによる免疫抑制にかかわっていると推測されているが、その詳細は明らかではない。Tregからは、IL-10やTGF- $\beta$ などの免疫抑制にかかわる他のサイトカインも産生されるが、原虫感染におけるこれらのサイトカインの役割に関しては、すでに多くの報告があり、本稿ではその説明は割愛する。

#### おわりに

Th1/2という性質の異なるヘルパーT細胞サブセットの発見、およびTh1分化を誘導するIL-12の発見により、細胞内寄生性病原体に対する防御免疫におけるTh1/IL-12/IFN- $\gamma$ の重要性が広く認識されてきた。しかしながら、近年IL-12関連サイトカインが相次いで同定され、さらにTh17やTregなどの新しいCD4陽性細胞サブセットが同定され、ヘルパーT細胞の分化と、免疫制御におけるその役割の理解は新しい局面を迎えている(図3)。IL-12ファミリーサイトカインは、それぞれTh1分化誘導作用を

表1 IL-27/IL-27受容体欠損マウスの原虫感染における表現型

マウス(欠損する遺伝子)	病原体	Th 反応	感染病態	文献
WSX-1 <sup>-/-</sup>	<i>Leishmania major</i>	初期 Th1 の低下	感染感受性の亢進 感染後期には正常な Th1	32
WSX-1 <sup>-/-</sup>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Th1, Th2, Th17 の亢進	サイトカインの過剰産生による肝臓などの炎症の増悪	36
WSX-1 <sup>-/-</sup>	<i>Toxoplasma gondii</i> (急性)	IFN- $\gamma$ の過剰産生	IFN- $\gamma$ の過剰産生による肝臓などの炎症の増悪	37
TCCR <sup>-/- a)</sup>	<i>Leishmania donovani</i>	Th1 の亢進	肝臓の炎症の増悪	38
WSX-1 <sup>-/-</sup>	<i>Toxoplasma gondii</i> (慢性, 感染性脳炎)	Th17 の亢進	感染性脳炎の増悪	9
EBI-3 <sup>-/-</sup>	<i>Leishmania major</i>	初期 Th1 の低下	感染感受性の亢進 感染後期には正常な Th1	33

a) TCCR (=WSX-1, IL-27受容体 $\alpha$ 鎖の別名)ノックアウトマウス<sup>38)</sup>。

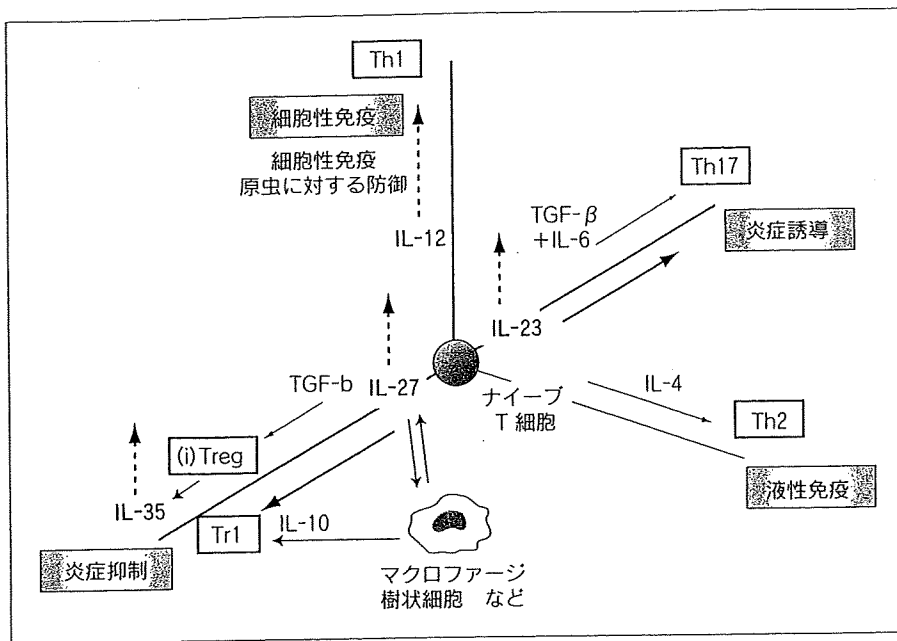


図3 多能的なヘルパーT細胞の分化とIL-12サイトカインファミリーによる分化制御

Th1とTh2に加え、IL-23により分化が促進されるTh17が同定された。IL-12サイトカインファミリーは、Th1分化誘導能をもつとともに、特異的な分化制御作用をもつ。IL-23は、Th17の分化誘導作用をもつ。IL-27はTh17の分化を抑制し、さらにT細胞やマクロファージなどによるIL-10産生を誘導する作用をもち、Tr1とよばれる抑制性T細胞に類似した細胞集団への分化を促進すると考えられる。IL-35は制御性T細胞(Treg, 誘導型のもの)はiTregとされる)から産生され、免疫抑制作用を示す。

太字はIL-12サイトカインファミリーメンバーを示し、それぞれTh1分化誘導能を有している(破線矢印)。

もつとともに、免疫抑制や炎症誘導などの特異的な機能ももっており、感染免疫のみならず、免疫の関与するさまざまな疾患の病態生理において重要な役割を果たしている。

IL-12サイトカインファミリーメンバーのうち、原虫に対する感染防御の観点から最も興味深いサイトカインは、IL-12とIL-27である。IL-12は、直接Th1に作用し、IFN- $\gamma$ 産生を誘導することから、原虫を含む細胞内寄生性病原体の排除において最も重要なサイトカインであると考えられ、実際、原虫感染における治療効果も確認されている。一方IL-27は、ナイーブT細胞がTh1への分化を開始するうえで鍵となるサイトカインであり、原虫抗原で免疫する際に、Th1型免疫を誘導するアジュバント<sup>\*3</sup>としての作用も認められる(未発表データ)。その一方で、IL-27は、感染によりひき起こされる過剰な免疫・炎症を抑制する作用を有しており、組織損傷を防ぐことで、感染宿主を守るとともに、組織破壊に続発しうる自己免疫病態を抑制する作用をもっているものと考えられる。

IL-12サイトカインファミリーメンバーは、相互にそのサブユニットを共有しており、それぞれのサブユニットの発現は、異なる転写制御を受けている<sup>34)</sup>。今後、新たな組合せによる新しいサイトカインが同定され、それぞれ

のサイトカインについて知られていた機能が、別の(組合せによる)サイトカインの作用であることが判明する可能性もある。IL-12サイトカインファミリーメンバーの解析がさらに進むことにより、感染防御免疫の新しい制御法が確立されることが期待される。

## 文 献

- 1) Harrington, L. E. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 6, 1123-1132 (2005)
- 2) Park, H. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 6, 1133-1141 (2005)
- 3) Oppmann, B. *et al.* : *Immunity*, 13, 715-725 (2000)
- 4) Pflanz, S. *et al.* : *Immunity*, 16, 779-790 (2002)
- 5) Collison, L. W. *et al.* : *Nature*, 450, 566-569 (2007)
- 6) Niedbala, W. *et al.* : *Eur. J. Immunol.*, 37, 3021-3029 (2007)
- 7) Trinchieri, G. *et al.* : *Prog. Growth Factor Res.*, 4, 355-368 (1992)
- 8) Takeda, A. *et al.* : *J. Immunol.*, 170, 4886-4890 (2003)
- 9) Stumhofer, J. S. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 7, 937-945 (2006)
- 10) Batten, M. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 7, 929-936 (2006)
- 11) Yoshimura, T. *et al.* : *J. Immunol.*, 177, 5377-5385 (2006)
- 12) Fitzgerald, D. C. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 8, 1372-1379 (2007)
- 13) Awasthi, A. *et al.* : *Nat. Immunol.*, 8, 1380-1389 (2007)
- 14) Mosmann, T. R., Coffman, R. L. : *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 145-173 (1989)
- 15) Reiner, S. L., Locksley, R. M. : *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 151-177 (1995)
- 16) Heinzel, F. P. *et al.* : *J. Exp. Med.*, 177, 1505-1509 (1993)

\*3 アジュバント: 抗原やワクチンの免疫原性を高める目的で抗原とともに生体に投与される試薬類。免疫賦活剤, あるいは免疫増強剤の一種とも考えられる。

- 17) Murray, H. W., Hariprashad, J. : *J. Exp. Med.*, 181, 387-391 (1995)
- 18) Ghalib, H. W. *et al.* : *J. Immunol.*, 154, 4623-4629 (1995)
- 19) Heinzl, F. P. *et al.* : *J. Immunol.*, 155, 730-739 (1995)
- 20) Mattner, F. *et al.* : *Eur. J. Immunol.*, 26, 1553-1559 (1996)
- 21) Gazzinelli, R. T. *et al.* : *J. Immunol.*, 153, 2533-2543 (1994)
- 22) Aliberti, J. C. *et al.* : *Infect. Immun.*, 64, 1961-1967 (1996)
- 23) Barkhuizen, M. *et al.* : *J. Infect. Dis.*, 196, 1253-1260 (2007)
- 24) Sedegah, M. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10700-10702 (1994)
- 25) Yoshimoto, T. *et al.* : *J. Immunol.*, 160, 5500-5505 (1998)
- 26) Chen, W. *et al.* : *Infect. Immun.*, 61, 3928-3932 (1993)
- 27) Urban, J. F., Jr. *et al.* : *J. Immunol.*, 156, 263-268 (1996)
- 28) Lieberman, L. A. *et al.* : *J. Immunol.*, 173, 1887-1893 (2004)
- 29) Kelly, M. N. *et al.* : *Infect. Immun.*, 73, 617-621 (2005)
- 30) Yoshida, H. *et al.* : *J. Biomed. Biotechnol.*, 2007, 79401 (2007)
- 31) Yoshida, H. *et al.* : *Immunity*, 15, 569-578 (2001)
- 32) Zahn, S. *et al.* : *Eur. J. Immunol.*, 35, 1106-1112 (2005)
- 33) Artis, D. *et al.* : *J. Immunol.*, 172, 4672-4675 (2004)
- 34) Goriely, S. *et al.* : *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 81-86 (2008)
- 35) Hamano, S. *et al.* : *Immunity*, 19, 657-667 (2003)
- 36) Villarino, A. *et al.* : *Immunity*, 19, 645-655 (2003)
- 37) Rosas, L. E. *et al.* : *Am. J. Pathol.*, 168, 158-169 (2006)
- 38) Chen, Q. *et al.* : *Nature*, 407, 916-920 (2000)



## XI. 感染症制御における制御性T細胞

Kobayashi Takashi

小林 隆志\*<sup>1)</sup>

Kawasumi Miyuri

川澄みゆり\*

Hamano Shinjiro

濱野真二郎\*\*

\*慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター<sup>1)</sup> 特別研究准教授  
\*\*九州大学大学院医学研究院感染免疫・熱帯医学分野

感染症から個体を守るためには、病原体に対する効果的な免疫応答を惹起しなければならないが、同時に過剰な免疫応答による自己組織のダメージも最小限に抑えなければならない。近年、制御性T細胞の実態が明らかになって、感染症における制御性T細胞の役割が注目されている。本稿では、感染症における制御性T細胞の役割について最近の知見をまとめ、現在の論点を概説する。

感染モデル/ヒト感染症/制御性ネットワーク/持続感染/自己組織傷害/ワクチン

### はじめに

多くの病原体は、それらが長期間生存するための戦略として宿主側の免疫防御機構を回避する。例えば、抗原取り込みや抗原提示の妨害、自然免疫による食作用や殺菌作用からの回避、液性免疫や細胞性免疫からの回避などが挙げられる。さらに、宿主側の制御性ネットワークを利用して、免疫のエフェクター機能を抑制し、生存に有利な環境を作り出すことも知られている。これには、免疫抑制性のサイトカインであるインターロイキン(IL)-10やtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ を自然免疫担当細胞や感染細胞などから直接産生させる方法と、制御性の細胞群を誘導して免疫応答を抑制する方法が知られている。これまで長

らく抑制活性を有するT細胞やIL-10を産生するT細胞が感染時に誘導されることは指摘されていたが、最近制御性T細胞の実態が明らかとなり、感染症における制御性T細胞の役割が注目されている<sup>1)</sup>。

### I. 胸腺由来制御性T細胞と誘導型制御性T細胞

制御性T細胞は、もともと自己応答性のリンパ球の増殖を抑え、自己免疫疾患を抑制するCD4陽性ヘルパーT細胞として同定された。現在のところ、制御性T細胞は、その起源、発生様式、抑制活性の機序などによって、いくつかの制御性T細胞群に分類されているが、主に2つに大別される<sup>2)</sup>(吉村の稿を参照)。その1つは、胸腺由来制

IL (インターロイキン)

TGF (transforming growth factor)

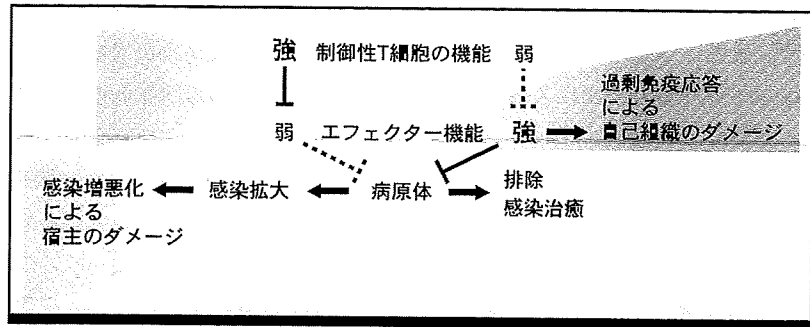


図1 感染症における制御性T細胞の役割

制御性T細胞による抑制が過剰になると、エフェクター機能が抑制され十分な感染防御応答が発揮されない。結果的に感染増悪化による宿主への損傷がもたらされる。一方、制御性T細胞の制御機構が十分に働かないと、過剰な免疫応答による自己組織のダメージへとつながる。

御性T細胞 (nTreg) であり、それらは胸腺で発生し末梢で自己応答性T細胞を抑制する。もう1つは、誘導型制御性T細胞 (iTreg) であり、末梢において免疫抑制性サイトカインの刺激、あるいは微生物が産生する物質にさらされた樹状細胞 (DC) の刺激を受け、未感作 CD4 陽性T細胞 (ナイーブT細胞) から誘導される。どちらのタイプの制御性T細胞も、感染時において免疫応答のエフェクター機能を調節していると考えられている。しかしながら、nTregの発生と機能に重要である転写因子 Foxp3<sup>3</sup>が、TGF- $\beta$ 存在下でT cell receptor (TCR) 刺激を受けるとナイーブT細胞からも発現誘導されるという最近の発見によって<sup>31</sup>、nTregとiTregの違いが曖昧になってきた。特に、個体において両者を区別する手段はなく、感染症におけるこれらの細胞集団の機能的役割の違いは今後の課題となっている。従って、感染症におけるFoxp3陽性制御性T細胞を議論する場合、nTregとは感染前から宿主に存在する制御性T細胞であり、iTregとは感染後に制御性機能を

獲得した細胞であると便宜的に定義するのが妥当であろう。iTregには、IL-10を産生するTr1細胞、TGF- $\beta$ を産生するTh3細胞が知られているが、IL-10は制御性T細胞以外のヘルパーT細胞やその他多くの細胞種からも産生される<sup>21</sup>。

## II. 感染モデルにおける制御性T細胞の役割

制御性T細胞の初期の研究では、胸腺における選択を逃れた自己応答性T細胞が自己組織を破壊することで引き起こされる自己免疫疾患の発症を、nTregが抑えていることが示された。即ち、制御性T細胞は、自己応答性のT細胞や自然免疫応答を抑制することで、過剰な免疫応答による副次的な自己組織損傷を最小限に抑えていると考えられる。感染症においても同様のことがあてはまる。つまり、制御性T細胞は、常に免疫応答を監視し、感染により引き起こされた過剰な免疫応答に対し、不利益な組織損傷から個体を保護していると考えられる (図1)。例えば、マンスン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) のマウス感染モデルでは、

nTreg (胸腺由来制御性T細胞)  
DC (樹状細胞)

iTreg (誘導型制御性T細胞)  
TCR (T cell receptor)

制御性T細胞を除去すると肝障害が亢進することが報告されている<sup>4)</sup>。また、ヘルペス単純ウイルス (herpes simplex virus ; HSV) のマウス感染モデルでも、ウイルス感染による炎症をnTregが抑えている<sup>5)</sup>。これらの例は、感染症において制御性T細胞が宿主の保護に働いていることを示唆している。

しかし、抑制性の制御が強すぎると、宿主は病原体の増殖を抑えられず、結果的に宿主の生存が危ぶまれる。例えば、久枝らはネズミマラリア (*Plasmodium yoelii*) XL株 (致死株) の感染において、nTregを除去すると寄生虫を排除する強力な免疫応答が惹起されマウスは致死的状态から逃れることを示した<sup>6)</sup>。ヒトの糸状虫 (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*) によって引き起こされるフィラリア症では、宿主の免疫応答が著しく抑制されることが知られている。この原因が胸腔内のnTregの蓄積に起因することが指摘されているが、実際に、nTregを除去することで寄生虫の排除が促進されることが報告されている<sup>7)</sup>。このように、感染症において制御性T細胞が宿主にとって有益に働くか有害となるかは、感染病原体の種類によって大きく異なる。

一方、制御性T細胞が宿主と病原体にとってお互いに有利な環境を作り出す例も報告されている<sup>8)</sup>。リーシュマニア (*Leishmania major*) 原虫感染では、抵抗性のマウス系統で原虫の排除がほぼ完了したあとでも、初期感染部位に僅かな数の原虫が持続感染している。この時、初期感染部位には制御性T細胞が集積しており、局所でエフェクター細胞の機能を抑制していることが知られている。この抑制により完全な寄生虫の排除が妨げられるものの、この持続感染状態は宿主の免疫記憶

にとっても重要で、後々の寄生虫再感染に対する効果的な感染防御の発動には不可欠である<sup>9)</sup>。これは、いわゆる随伴免疫として知られる現象であるが、持続感染には制御性T細胞による免疫応答の抑制が必要であり、また局所の制御性T細胞の維持には病原体由来の抗原刺激が必須であると考えられている<sup>8), 9)</sup>。従ってこの場合、病原体と宿主間の微妙な応答バランスを制御性T細胞がコントロールし、平衡状態を保つことで共生関係を担保していると考えられる。

### III. ヒト感染症における制御性T細胞の役割

ヒトではマウスに比べFoxp3陽性制御性T細胞がより複数の集団から形成されているので、ヒトの感染症における制御性T細胞の役割はその解釈が難しい<sup>10)</sup>。また、ヒト制御性T細胞を対象とした研究は、採取しやすい末梢血の制御性T細胞を用いて、その割合や機能を調べたものが多い。しかし、末梢血を用いた試験結果が、全ての組織を代表している結果とは言い難い。なぜなら、いくつかの慢性感染症では、制御性T細胞は感染部位に蓄積しており、末梢血には反映していないからだ。

それでも、いくつかのヒト感染症では制御性T細胞の役割がはっきりとしている。ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus ; HIV) の慢性感染症患者の例では、制御性T細胞がウイルス感染部位に蓄積していることが示されており、感染部位におけるエフェクター細胞の機能を抑制していることが示唆される<sup>11)</sup>。B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus ; HBV) の感染患者では、Foxp3陽性制御性T細胞の数が末梢および肝臓で著しく増加しており、抗原特異的制御性T細胞

HSV (herpes simplex virus ; ヘルペス単純ウイルス)

HIV (human immunodeficiency virus ; ヒト免疫不全ウイルス)

HBV (hepatitis B virus ; B型肝炎ウイルス)

による抗原特異的エフェクター細胞の機能抑制と肝障害との関連が示唆されている<sup>12)</sup>。C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus ; HCV) の慢性感染患者では、健康者に比べより多くの制御性T細胞が末梢血中に含まれており、これらの制御性T細胞を除去すると、培養系における抗原特異的CD8陽性T細胞の応答が増強する<sup>13)</sup>ことより、HCVに対する感染防御においても制御性T細胞が抑制的に働き、C型肝炎の発症に寄与していると言われている。さらに様々なヒトウイルス感染症においても制御性T細胞の関連が報告されている<sup>14)</sup>。

HCV感染に限らず、HIV、HBV患者の末梢血やリンパ球の培養からCD4陽性CD25陽性制御性T細胞を除去すると、培養系においてウイルス特異的免疫応答を増強することが報告されている<sup>15)、16)</sup>。これらの結果から、制御性T細胞がウイルス特異的免疫応答を抑制することで、制御不能なウイルス増殖がもたらされることが推測される。また、HIVは、制御性T細胞にgp120依存的な生存シグナルを送り<sup>17)</sup>、一方、制御性T細胞のFoxp3は、HIV1プロモーターの転写活性を抑制して制御性T細胞内でHIVが増殖することを抑制する<sup>18)</sup>。この結果、HIV感染患者は制御性T細胞が優位な免疫不全状態に陥る。従って今までの知見を合わせ考えると、ヒトウイルス感染症において制御性T細胞は宿主にとって不利益な存在であるということになる。

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 感染においても同様に、制御性T細胞とTGF- $\beta$ が増加すること、また、制御性T細胞の除去により培養系における単核球の増殖およびマラリア原虫抗原に対するinterferon (IFN)- $\gamma$ の産生応答が亢進することが報告されている<sup>19)</sup>。

#### IV. 衛生仮説と制御性T細胞

我が国を含め、先進諸国においてアレルギーや喘息が増加している。この原因の1つが乳幼児期の感染症の減少にあるという衛生仮説 (hygiene hypothesis) が<sup>3)</sup>、1989年に提唱された<sup>20)</sup>。衛生環境の改善により、細菌やウイルスなどの感染曝露の頻度が乳幼児期に低下したことにより、アレルギー疾患の発症頻度が上昇したというものである。衛生仮説では、乳幼児期の感染曝露がアレルギー体質の決定に重要であり、成人になってから感染してもアレルギー疾患の発症頻度には影響しないとされている。このメカニズムの1つとして、乳幼児期に細菌やウイルスに感染することでTh1細胞が優位に発達し、アレルギー発症に重要なTh2細胞の機能が抑制されるという考え方が提唱されている。もう1つの説明として、感染により様々な制御性T細胞集団が増強されるという説がある<sup>21)</sup>。例えば、蠕虫感染によって腸内に誘導される制御性T細胞が、その後のアレルギーや自己免疫疾患の発症を抑制することが報告されている<sup>22)、23)</sup>。つまり、乳幼児期の感染によって、免疫応答が惹起されると、同時に制御性システムも活性化し、様々な制御性T細胞が誘導される (表1)。繰り返し感染することで、ある一定の制御性T細胞プールが体内に作られ、このことにより、免疫応答を惹起するための閾値が上がり、過敏な免疫応答が抑制されると考えられる<sup>21)</sup>。また、消化管内の細菌叢を改善し得る有益な微生物 (いわゆるプロバイオティクス) も、制御性T細胞を誘導することで炎症性腸疾患の治療に効果があることが報告されている<sup>24)</sup>。このような免疫制御のメカニズムが、進化の過程で宿主と腸内細菌叢の共

HCV (hepatitis C virus ; C型肝炎ウイルス)

IFN (interferon)

表1 制御性T細胞を誘導する病原体

寄生虫感染	ウイルス感染	細菌感染	真菌感染
<i>Schistosoma mansoni</i>	Friend virus	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Schistosoma japonicum</i>	Murine AIDS	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Leishmania major</i>	HSV	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	HIV	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	HBV	<i>Chlamydia trachomatis</i>	
<i>Plasmodium yoelii</i>	HCV		
<i>Plasmodium berghei</i>	HTLV-1		
<i>Plasmodium falciparum</i>	CMV		
<i>Brugia pahangi</i>	Vaccinia virus		
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	Influenza virus		
<i>Intestinal nematodes</i>	SIV		
	FIV		

(文献1より引用)

生関係から生まれてきた可能性が示唆される。確かに、腸内はTGF-βやレチノイン酸が豊富であるなど、制御性T細胞が誘導されやすい環境が整っている。従って、腸内やその他の末梢組織に存在する微生物によって活性化した制御性T細胞(nTregもiTregも両方とも)のプールが形成・維持されることで、宿主の免疫恒常性が保たれ、アレルギーや自己免疫疾患を引き起こす過剰な免疫応答が軽減されるものと推測される。

## V. ワクチンと制御性T細胞

近年、有効なワクチン接種を行うためには、制御性T細胞の誘導および活性化を抑制することが重要であるという研究結果が注目されている。培養系において、TCR刺激とTGF-β刺激の共存下で、ナイーブT細胞からFoxp3陽性T細胞が誘導されることが示されたが<sup>3)</sup>、このような転換は生体内においても、弱い免疫反応下での抗原刺激や<sup>25)</sup>、樹状細胞上の制御性受容体であるDEC205による抗原提示で誘導される<sup>26)</sup>。末梢で弱い抗原刺激に曝されることで、ナイーブT細胞

から転換した制御性T細胞が<sup>3)</sup>、その後、強い免疫反応下において抗原再刺激を受けると著しく増殖することが報告されている<sup>26)</sup>。従って、適切な条件下でワクチン接種が行われないと、ワクチン抗原に対する制御性T細胞が意に反して誘導されることになる<sup>27)</sup>。有効なワクチン接種の確立のためには、各微生物由来の抗原やアジュバントが<sup>3)</sup>、ワクチン接種によって制御性T細胞を誘導する可能性を精査し、制御性T細胞の誘導・活性化能の最も低いものを見いだすことが重要である。

現在のところ、マラリア、結核およびHIVなどの多くの致死的な感染症に対する有効なワクチンは確立されていない。様々な病原体が抑制性の応答を誘導しているということが認識されるようになり、感染初期の抑制性応答をいかに抑え効果的な感染防御を誘導するかが今後の課題となる。

## おわりに

感染症において、ある環境下では制御性T細胞による抑制が過剰となり、効果的な感染防御応答が阻害される。また、ある環境下ではこの制御機

構が十分に機能せず、過剰な免疫応答による自己組織のダメージへとつながる。制御性T細胞の機能を人為的に操作し、治療へ応用することで、これらの問題を克服することが可能となるかもしれない。

制御性T細胞は、病原体にとって持続感染に適した環境を作り出す一方で、感染微生物もまた制御性T細胞の誘導や生存に寄与する。実際に、いくつかの病原体は制御性T細胞の生存・増殖シグナルを送っていることが知られている<sup>17)</sup>。また制御性T細胞は、ある種の病原体により活性化したDCによる刺激や<sup>28)</sup>、制御性T細胞上に発現するToll様受容体やその他のパターン認識受容体からの直接的な刺激<sup>29)</sup>、抑制性サイトカインの産生誘導などを介して、活性化(あるいは誘導)され病原体の生存に有利に働くことが知られている。微生物の戦略を利用し、人為的に制御性T細胞を誘導・操作することで、感染症やアレルギー、自己免疫疾患の新たな治療方法の基盤が確立されることが期待される。

#### 文 献

- 1) Belkaid Y : Regulatory T cells and infection : a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7 : 875-888, 2007
- 2) 知念孝敏, 金城市子, 松村友美子ほか : TGF- $\beta$ , IL-10 を産生する抑制性ヘルパーT細胞の誘導とSTAT3/SOCS3による制御. *臨床免疫・アレルギー科* 50 : 283-246, 2008
- 3) Chen W, Jin W, Hardegen N et al : Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198 : 1875-1886, 2003
- 4) Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y et al : The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 172 : 3157-3166, 2004
- 5) Suvas S, Azkur AK, Kim BS et al : CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* 172 : 4123-4132, 2004
- 6) Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D et al : Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 10 : 29-30, 2004
- 7) Taylor MD, LeGoff L, Harris A et al : Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* 174 : 4924-4933, 2005
- 8) Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S et al : CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420 : 502-507, 2002
- 9) Suffia JJ, Reckling SK, Piccirillo CA et al : Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 203 : 777-788, 2006
- 10) Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA : Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol* 38 : 921-924, 2008
- 11) Andersson J, Boasso A, Nilsson J et al : The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 174 : 3143-3147, 2005
- 12) Xu D, Fu J, Jin L et al : Circulating and liver resident CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 177 : 739-747, 2006
- 13) Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J et al : Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38 : 1437-1448, 2003
- 14) Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S : Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 212 : 272-286, 2006
- 15) Kinter AL, Hennessey M, Bell A et al : CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200 : 331-343, 2004
- 16) Pereira LE, Villinger F, Onlamoon N et al : Simian immunodeficiency virus (SIV) infection influences the level and function of regulatory T cells in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J Virol* 81 : 4445-4456, 2007
- 17) Nilsson J, Boasso A, Velilla PA et al : HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated

- with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108 : 3808-3817, 2006
- 18) Grant C, Oh U, Fugo K et al : Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF- $\kappa$ B and CREB pathways. *PLoS Pathog* 2 : e33, 2006
- 19) Walther M, Tongren JE, Andrews L et al : Upregulation of TGF- $\beta$ , FOXP3, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23 : 287-296, 2005
- 20) Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL : The germless theory of allergic disease : revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1 : 69-75, 2001
- 21) Maizels RM : Infections and allergy – helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol* 17 : 656-661, 2005
- 22) Wilson MS, Taylor MD, Balic A et al : Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 202 : 1199-1212, 2005
- 23) Correale J, Farez M : Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61 : 97-108, 2007
- 24) Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M et al : Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- $\beta$ -bearing regulatory cells. *J Immunol* 174 : 3237-3246, 2005
- 25) Apostolou I, von Boehmer H : In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199 : 1401-1408, 2004
- 26) Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D et al : Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6 : 1219-1227, 2005
- 27) Shaw MH, Freeman GJ, Scott MF et al : Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN- $\gamma$ -dependent IL-10 reactivation. *J Immunol* 176 : 7263-7271, 2006
- 28) Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K et al : Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198 : 235-247, 2003
- 29) Suttmuller RP, Morgan ME, Netea MG et al : Toll-like receptors on regulatory T cells : expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27 : 387-393, 2006

# Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes

Yoshihisa Hirakawa, Kisaburo Nagamune, and Ken-ichiro Ishida<sup>1</sup>

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba 305-8572, Japan

Edited by John M. Archibald, Dalhousie University, Halifax, Canada, and accepted by the Editorial Board June 8, 2009 (received for review March 9, 2009)

Most plastid proteins are encoded by the nuclear genome, and consequently, need to be transported into plastids across multiple envelope membranes. In diverse organisms possessing secondary plastids, nuclear-encoded plastid precursor proteins (preproteins) commonly have an N-terminal extension that consists of an endoplasmic reticulum (ER)-targeting signal peptide and a transit peptide-like sequence (TPL). This bipartite targeting peptide is believed to be necessary for targeting the preproteins into the secondary plastids. Here, we newly demonstrate the function of the bipartite targeting peptides of an algal group, chlorarachniophytes, and characterize the functional domains of the TPL in the precursor of a plastid protein, ATP synthase delta subunit (AtpD), using a GFP as a reporter molecule. We show that the C-terminal portion of the TPL is important for targeting the AtpD preprotein from the ER into the chlorarachniophyte plastids, and several positively charged amino acids in the TPL are also necessary for transporting the preprotein across the 2 innermost plastid membranes. Compared with other groups with secondary plastids, the TPL functional domains of the chlorarachniophytes are unique, which might be caused by independent acquisition of their plastids.

ATP synthase delta subunit | secondary endosymbiosis | transit peptides | bipartite targeting peptide | periplastidal compartment

Plastids evolved either from the primary or the secondary endosymbioses (1, 2). Three major photosynthetic eukaryote groups [the green plants (land plants and green algae), red algae, and glaucophytes] evolved from a common ancestor that acquired plastids by a single primary endosymbiosis between a cyanobacterium and a nonphotosynthetic eukaryote. These plastids, which are surrounded by 2 envelope membranes, are called the “primary plastids” (3, 4). In subsequent secondary endosymbioses, different photosynthetic organisms with primary plastids (e.g., green and red algae) were engulfed and retained by 3 or more nonphotosynthetic eukaryotes of different lineages; they evolved into so-called “secondary plastids,” which are surrounded by 3 or 4 membranes (2, 5). Diverse algal groups, including chlorarachniophytes, cryptophytes, dinoflagellates, euglenophytes, haptophytes, heterokonts, and a nonphotosynthetic parasitic group, apicomplexans, harbor the secondary plastids (2).

In these endosymbiotic processes, numerous genes have transferred from the endosymbionts to the nuclear genomes of the host (6, 7), and the proteins expressed from these genes need to be sent back into the plastids (i.e., the former endosymbionts) across multiple plastid membranes (8–10). To be targeted correctly into the plastids, the precursors of nuclear-encoded plastid proteins generally possess plastid-targeting presequences (11). The acquisitions of the targeting sequences are thought to be essential factors for the integration of endosymbionts into host cells, to end up as organelles. The nuclear-encoded precursor proteins (preproteins) for the primary plastids have an N-terminal plastid-targeting sequence called a transit peptide (TP), and they are posttranslationally transported from the cytoplasm into the plastids (11–13). However, the preproteins for diverse secondary plastids commonly have N-terminal bipartite plastid-targeting sequences, each of which consists of a

signal peptide (SP) and a TP-like (TPL) sequence (11). The SP is known, in several groups with secondary plastids, to be responsible for the cotranslational transport of preproteins into the endoplasmic reticulum (ER), and the TPL is believed to be necessary for targeting the preproteins into the plastid stroma across multiple envelope membranes (8–11).

Among the eukaryotic groups possessing secondary plastids, the primary sequences of the N-terminal bipartite plastid-targeting peptides are not conserved (11), which makes it difficult to characterize the common sequence motifs or structural elements essential to their function. Recent *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies have revealed the functional domains of TPLs in several groups. Euglenophytes and dinoflagellates have secondary plastids surrounded by 3 smooth membranes. Many TPLs of those algal groups contain a remarkable hydrophobic region that anchors the preproteins to the ER-derived vesicular membrane during vesicular transportation from the ER into the plastids via Golgi bodies (14, 15). The plastids of heterokonts and cryptophytes are surrounded by 4 membranes; the outermost membrane is continuous with the ER. Their TPLs possess a conserved aromatic amino acid (such as phenylalanine) at the N terminus, and it has been demonstrated that this aromatic amino acid is necessary in allowing preproteins to pass through the 2 innermost plastid membranes (16–19). Apicomplexans have nonphotosynthetic plastids (apicoplasts) surrounded by 4 smooth membranes. It has been shown that several positively charged amino acids and a possible Hsp70 binding site in the TPLs are both important for targeting preproteins from the ER into the apicoplasts (20–22). These studies have indicated that, although “TPL” is commonly present in those eukaryotic groups, its function in the preprotein transport process seems differ among them. However, our knowledge of the TPL function is limited to a few groups. To obtain the “whole picture” of the diversity and evolution of plastid-targeting peptides in photosynthetic eukaryotes, we need to study other algal groups with secondary plastids that have not yet been sufficiently studied.

One such algal group is the chlorarachniophytes, a marine unicellular algal group that has acquired plastids via a secondary endosymbiosis between a green alga and a colorless cercozoan protist (23, 24). Each chlorarachniophyte plastid is bounded by 4 smooth membranes and contains a highly reduced nucleus, referred to as the nucleomorph, of the green algal endosymbiont in the periplastidal compartment (PPC), the space between the second and third plastid membranes (25, 26). The combination of these features is unique in secondary plastids, providing incentive to study plastid targeting in this algal group. Previous

Author contributions: K.-i.I. designed research; Y.H. performed research; K.N. contributed new reagents/analytic tools; Y.H. analyzed data; and Y.H. and K.-i.I. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

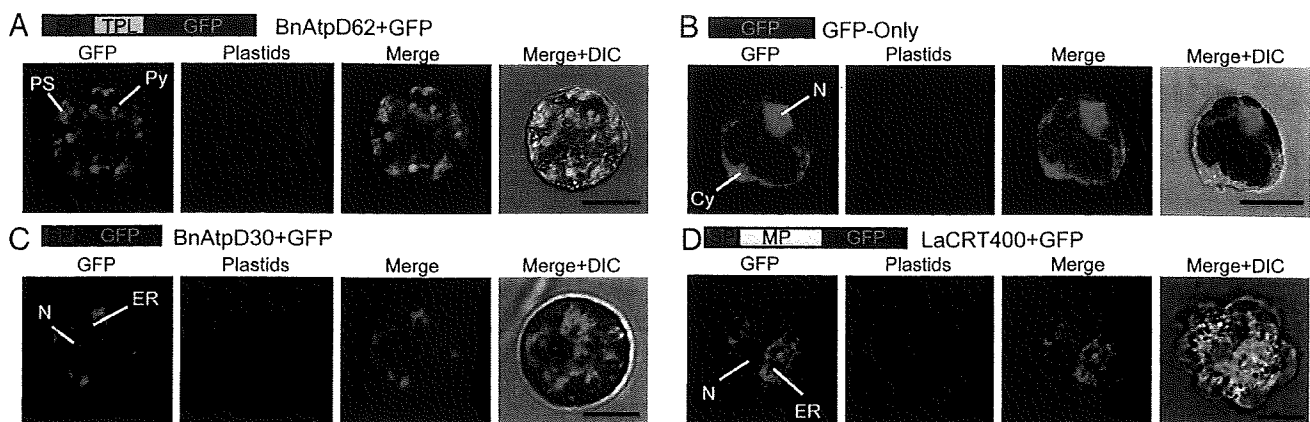
This article is a PNAS Direct Submission. J.M.A. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession no. FJ209028).

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: ishida@sakura.cc.tsukuba.ac.jp.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0902578106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0902578106/DCSupplemental).





**Fig. 1.** Confocal images of transformed *L. amoebiformis* cells, with GFP fluorescence. The images labeled GFP show GFP localization (green), and those labeled plastids show chlorophyll-autofluorescence (red). (A) A cell transformed with pBnAtpD62+GFP showing the GFP localization in the stroma and pyrenoids of plastids. (B) A cell transformed with pGFP-Only (a control), showing the GFP localization in the nucleus and cytoplasm. (C) A cell transformed with pBnAtpD30+GFP, showing the GFP localization in the putative ER. (D) A cell transformed with pLaCRT400+GFP, showing the GFP in the ER. (Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ .) DIC, differential interference contrast; Cy, cytoplasm; N, nucleus; PS, plastid stroma; Py, pyrenoid; MP, mature protein.

*in silico* analyses predicted that the nuclear-encoded plastid preproteins of chlorarachniophytes have N-terminal bipartite targeting peptides containing a SP and a TPL (27, 28). However, the TPL sequences are not well conserved among different preproteins and poorly characterized by those analyses, so detailed *in vivo* analyses are required to reveal the TPL functional domains in the chlorarachniophytes.

In this article, we demonstrate the function of bipartite targeting peptides in chlorarachniophytes, using a transient transformation system. We used one particular plastid-targeted preprotein [ATP synthase delta subunit protein of a chlorarachniophyte *Bigeloviella natans* (BnAtpD)] as a model; we then characterized the functional domains of its TPL, using GFP as a reporter molecule. We demonstrate that the C-terminal portion of the TPL is significant in transporting the preprotein from the ER into the chlorarachniophyte plastids, and that several positively charged amino acids within the TPL are also necessary, if the preprotein is to pass through the 2 innermost plastid membranes. We also carried out comparative analyses of bipartite targeting peptides among chlorarachniophytes and a few other organisms with secondary plastids. Here, we discuss the functional diversity among the TPLs for targeting preproteins into various secondary plastids.

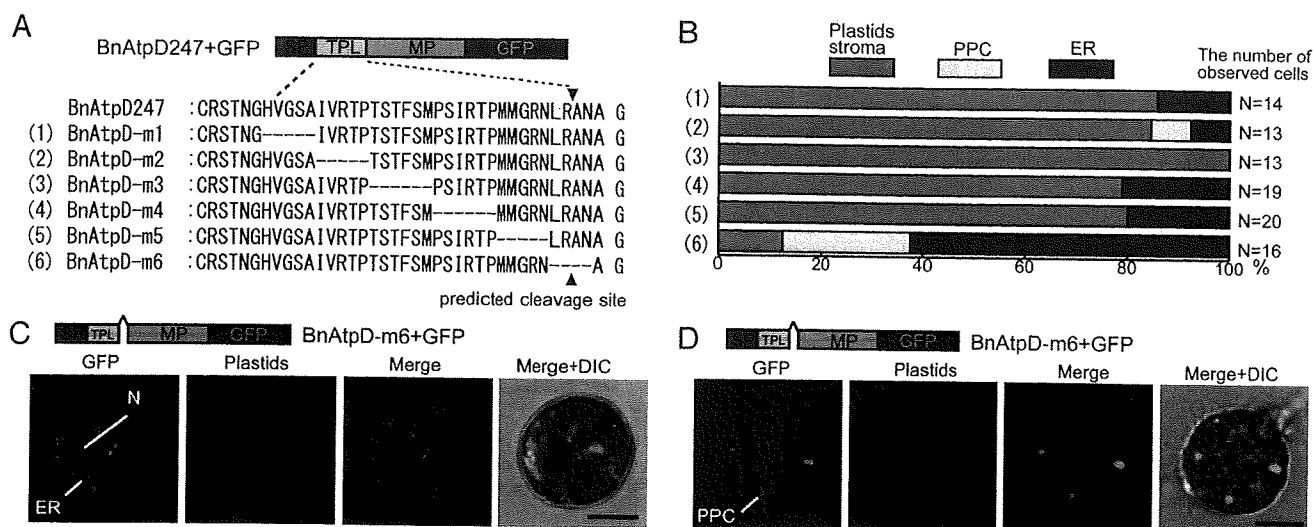
## Results and Discussion

**Confirmation of the Plastid-Targeting Ability of Putative N-Terminal Bipartite Targeting Peptides in Chlorarachniophytes.** We obtained the cDNA sequences of 3 plastid-targeted protein genes (*BnatpD*, *Bnfdx1*, and *Bnrl28*) from a chlorarachniophyte, *B. natans* (29). N-terminal bipartite targeting peptides in the deduced preprotein sequences of those genes were predicted by the signal peptide prediction server SignalP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)) (30), and the chloroplast TP prediction server ChloroP ([www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP](http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP)) (31). All 3 plastid-targeted preproteins were predicted to have N-terminal bipartite targeting peptides, an ER-targeting signal peptide (SP) followed by a TPL sequence (Fig. S1). The transient transformation system for the chlorarachniophyte *Lotharella amoebiformis* (32) was used to analyze the plastid-targeting abilities of these putative N-terminal targeting sequences *in vivo*. We prepared 3 plasmid constructs that expressed each of the putative bipartite targeting peptide regions of BnAtpD, BnFdx1, and BnRpl28 preproteins, fused with GFP; the cells were then transformed with each of these plasmids. In all 3 constructs (i.e.,

BnAtpD62+GFP, BnFdx94+GFP, and BnRpl88+GFP), the transformants exhibited GFP fluorescence in the plastid stroma and pyrenoid, which is a protein-rich structure in the plastid stroma (Fig. 1A and Fig. S2A and B), and these GFP localizations were clearly different from the control, the GFP-Only (Fig. 1B). Therefore, these putative bipartite targeting peptides successfully delivered the GFP into the plastids across 4 plastid membranes. This result confirms that the bipartite targeting peptide of BnAtpD, BnFdx1, and BnRpl28 are sufficient for targeting these preproteins into the plastids. The chlorarachniophytes use a bipartite targeting signal system that is similarly used in other secondary plastid-bearing eukaryotic groups, including heterokonts, cryptophytes, and apicomplexans (17, 20, 33). It is interesting to note that bipartite targeting peptides are commonly used for targeting proteins into the secondary plastids of diverse groups, even though the origins of their plastids are different.

**ER-to-Plastid Transport Signal in the TPL.** For detailed functional analyses of the N-terminal bipartite targeting peptide, we used a plastid-targeted preprotein, BnAtpD, as a model. First, to determine whether the putative SP is sufficient for targeting the preprotein into the ER, we created a plasmid construct that expresses the putative SP fused with GFP (BnAtpD30+GFP), and *L. amoebiformis* cells were transformed with this plasmid. In the transformed cells, GFP fluorescence was observed around the nucleus and in the cytoplasmic region (Fig. 1C). This localization was similar to that of GFP fused with an ER luminal protein, calreticulin (CRT), which had been isolated from *L. amoebiformis* (Fig. 1D and Fig. S2C). It appears that the GFP fused with the putative SP of BnAtpD was transported into the ER, but did not go into the plastids. This result demonstrates that, as in other cases, the SP is sufficient for delivering preproteins into the ER in the chlorarachniophytes. Combined with the fact that the whole bipartite targeting peptide of the BnAtpD preprotein can correctly deliver GFP into chlorarachniophyte plastids (Fig. 1A), these findings indicate that, in chlorarachniophytes, TPL is necessary for targeting preproteins from the ER into the plastids.

Although the requirement of TPL for the transport of preproteins from the ER to the inside of plastids has been confirmed in several eukaryotic groups with secondary plastids (11), it is still unclear whether the functional domain of chlorarachniophyte TPLs is similar or unique compared with TPLs of other



**Fig. 2.** In vivo targeting of GFP fused with BnAtpD precursors possessing various deletions in the TPL. (A) Amino acid sequences of 6 constructs used for the deletion analyses. (A) Dashed line indicates a deleted portion in the TPL of BnAtpD. Red arrowheads indicate the predicted TPL cleavage site. (B) In vivo targeting-efficiencies of GFP fusion proteins, when cells were transformed with each plasmid construct. (C) Confocal images of a cell transformed with pBnAtpD-m6+GFP, showing the GFP localization in the putative ER. (D) Another transformed cell, showing the GFP localization in the possible PPC.

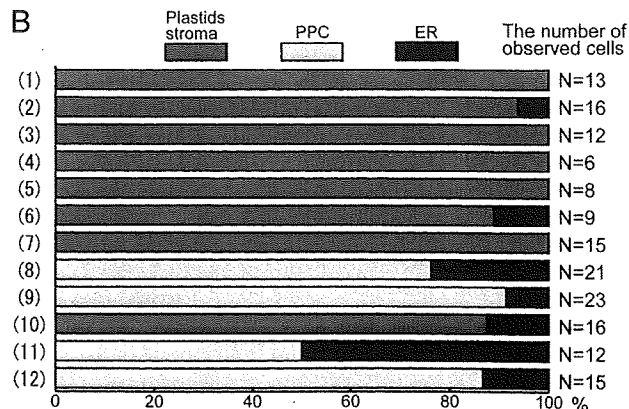
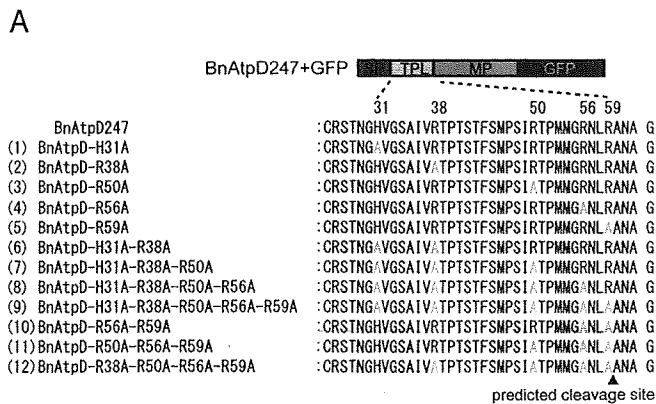
secondary plastids. To detect the functional domain within the TPL of BnAtpD preprotein, we performed deletion analyses of GFP fusion proteins in vivo. The TPL region was divided into 6 portions (m1, m2, m3, m4, m5, and m6) consisting of 4–6 amino acids; each of these portions was deleted from the BnAtpD247+GFP (BnAtpD full-length preprotein + GFP), as shown in Fig. 2A. When the cells were transformed with each of pBnAtpD-m1, pBnAtpD-m2, pBnAtpD-m3, pBnAtpD-m4, and pBnAtpD-m5, the GFP fusion proteins were transported into the plastid stromas, and the obstruction to plastid-targeting was not observed in most transformed cells (Fig. 2B). However, when the BnAtpD-m6 fusion proteins (i.e., the products of the pBnAtpD-m6 deletion construct) were expressed in the cells, GFP fluorescence was observed in the putative ER in  $\approx 60\%$  of the transformed cells, and the ratio of the cells in which the GFP was transported into the plastid stroma was only 10% (Fig. 2B and C). In the rest of the transformants, GFP was localized near the central region of each plastid, but the GFP fluorescence did not merge with chlorophyll autofluorescence (Fig. 2D). This localization pattern was similar to the localization of GFP fusion proteins targeted into PPC, as discussed in the following section (see Fig. 4). These results indicate that the m6 portion, which is in the vicinity of the putative cleavage site of the TPL, is important for targeting proteins from the ER into the plastids.

The amino acid sequence of the m6 portion in the BnAtpD preprotein was L-R-A-N-A. To know whether other plastid-targeted preproteins of chlorarachniophytes generally have this sequence in their putative TPLs, we searched for the L-R-A-N-A sequence in the TPL sequences of 36 plastid-targeted preproteins using the Teiresias algorithm (<http://cbsrv.watson.ibm.com/Tspd.html>) (34). This exact sequence was not found in other TPLs, but 12 of the 36 TPLs possessed sequences that were similar to the L-R-A-N-A sequence in chemical nature [i.e., (I/L/M/V)-X-(A/G)-X-(A/G)]. Intriguingly, 8 of the 12 TPLs had the motifs near the putative cleavage sites of the putative TPLs (Fig. S3). It is possible, at least for several proteins, that the C-terminal portion of TPL is involved in targeting a plastid preprotein from the ER into the chlorarachniophyte plastid, although further study is needed to determine what information (e.g., primary sequence, secondary structure, or chemical nature) in the functional portion is important for plastid targeting.

Because the plastids of chlorarachniophytes are not connected with any endomembrane in the cell, plastid preproteins are assumed to be transported via vesicular transports from the ER to the plastids (35). It is possible that the C-terminal functional domain of the chlorarachniophyte TPLs is involved in this transport step. This type of functional domain in TPL has not been known in any other plastid-bearing eukaryotic groups. The uniqueness of this TPL functional domain may reflect the differences of plastid membrane structure and protein transport pathway between the chlorarachniophytes and other groups. Unlike the chlorarachniophyte plastids, the outermost plastid membrane is continuous with the ER in the plastids of heterokonts, cryptophytes, and haptophytes, and plastid preproteins are believed to be transported from the ER into the plastids via the membrane connection (9, 35). It has been demonstrated in the heterokonts that the TPL functional domain localizes in the N-terminal portion (33). In euglenophytes and dinoflagellates, plastids are surrounded only by 3 membranes, and plastid preproteins are known to be transported from the ER to the plastids via Golgi bodies (8). The TPLs of these preproteins typically possess a remarkable hydrophobic region, which is known to act as a stop-transfer membrane anchor during the vesicular transportation via the Golgi bodies (14, 15).

The plastids of apicomplexans, apicoplasts, are surrounded by 4 smooth membranes, which is structurally similar to the chlorarachniophyte plastids, and plastid preproteins are transported from the ER to the apicoplasts directly via vesicular transports (36). However, in apicomplexans, a possible Hsp70 binding site and a net positive charge in the TPLs are both involved in targeting preproteins from the ER into the apicoplasts (20, 21). The difference in the feature of TPL functional domain between the apicomplexans and the chlorarachniophytes suggests that functional domains do not always correlate with the plastid membrane structures and protein transport pathways.

**PPC-to-Stroma Transport Signal in the TPL.** Based on the amino acid composition of TPLs in chlorarachniophyte plastid-targeted preproteins, TPL sequences typically contain several basic amino acids and very few acidic amino acids (27, 28). To demonstrate the role of basic amino acids in plastid-targeting, we performed substitution analyses on those amino acids within the



**Fig. 3.** In vivo targeting of GFP fused with BnAtpD preproteins possessing various substitutions in the TPL. (A) Amino acid sequences of 12 constructs used for the substitution analyses. Characters in blue indicate the alanine residues substituted at the positions of basic amino acids (red characters). Red arrowheads indicate the predicted TPL cleavage site. (B) In vivo targeting-efficiencies of GFP fusion proteins when cells were transformed with each plasmid construct.

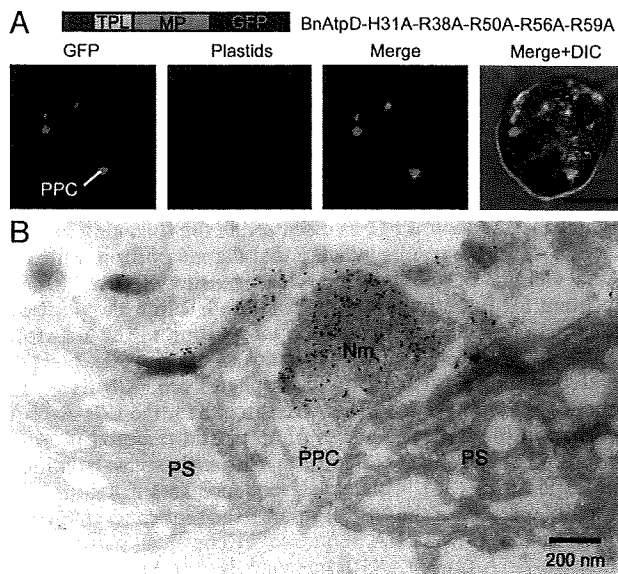
BnAtpD preprotein. The BnAtpD TPL contains a weak basic amino acid (histidine at the 31st position) and 4 strong basic amino acids (arginine at the 38th, 50th, 56th, and 59th positions) from the N-terminal end of this preprotein.

First, we created 5 plasmid constructs, each of which had an alanine substitution at each of the basic amino acids in BnAtpD247+GFP (Fig. 3A); *L. amoebiformis* cells were then transformed with each of these constructs. With all 5 constructs, GFP fusion proteins were correctly transported into the plastid stromas, and no plastid-targeting obstructions were observed (Fig. 3B, rows 1–5). Next, the numbers of alanine substitutions in the TPL were increased. When 2 to 3 basic amino acids from the N terminus were substituted, the GFP fusion proteins (BnAtpD-H31A-R38A and BnAtpD-H31A-R38A-R50A) were localized in the plastid stromas in almost all transformants (Fig. 3B, rows 6 and 7). In contrast, when 4 to 5 basic amino acids were substituted, the fusion proteins (BnAtpD-H31A-R38A-R50A-R56A and BnAtpD-H31A-R38A-R50A-R56A-R59A) were not transported into the plastid stromas at all, and >75% of the transformants showed GFP fluorescence in the possible PPC near the central part of each plastid (Fig. 3B, rows 8 and 9). Another GFP fusion protein, BnAtpD-R56A-R59A, in which 2 basic amino acids from the C terminus were substituted, was correctly transported into the plastid stroma (Fig. 3B, row 10). However, when 3 or 4 basic amino acids from the C terminus were substituted (i.e., BnAtpD-R50A-R56A-R59A and BnAtpD-R38A-R50A-R56A-R59A), GFP fluorescence was accumulated in the possible PPC regions in the majority of transformants (Fig. 3B, rows 11 and 12). To confirm the possible PPC localization of GFP, we performed an immunogold localization of GFP in the transformants with the pBnAtpD-H31A-R38A-R50A-R56A-R59A construct, using an anti-GFP antibody. The conjugated gold particles accumulated in the PPC including a nucleomorph in the transformed cells (Fig. 4); the average number of gold particles was  $326 \pm 66 \mu\text{m}^{-2}$  in the PPC, which was significantly higher than the count of cytoplasm and plastid stroma ( $5.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^{-2}$  and  $6.6 \pm 4.1 \mu\text{m}^{-2}$ , respectively). In nontransformed cells (WT), no accumulation of gold particles was observed in the PPC ( $4.2 \pm 1.2 \mu\text{m}^{-2}$ ).

The substitution experiments demonstrated that the GFP fusion proteins with at least 2 strong basic amino acids (arginine residues) in the TPL were correctly targeted into the plastid stroma; however, the use of >4 substitutions was found to impede plastid-targeting, and the GFP fusion proteins consequently accumulated in the PPC. This result suggests that the number of strong basic amino acids, positively charged amino

acids, in the TPL is significant, rather than their position. The net positive charge of TPLs might be important for preproteins in passing through the 2 innermost plastid membranes of chlorarachniophytes.

In green plants (i.e., land plants and green algae) with primary plastids surrounded by 2 envelope membranes, the TPs of plastid-targeted preproteins are comparatively depleted of negatively charged amino acids, and show an overall positive charge (11, 12). In the process of transporting these preproteins, the net positive charges of TPs are thought to assist the preproteins to interact electrostatically with the negatively charged plastid outer membrane and import receptors (37). The fact that positively charged amino acids are involved in protein transport across the 2 envelope membranes in both green plants and chlorarachniophytes leads us to believe that these 2 groups use



**Fig. 4.** Immunocytochemical localization of a GFP fusion protein in the PPC. (A) Confocal images of a *L. amoebiformis* cell transformed with pBnAtpD-H31A-R38A-R50A-R56A-R59A+GFP, showing the GFP localization in the PPC. (Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ .) (B) An immunoelectron micrograph of a plastid in a cell transformed with the pBnAtpD-H31A-R38A-R50A-R56A-R59A construct, showing the accumulation of conjugated gold particles (10 nm) in the PPC including a nucleomorph. Nm, nucleomorph.

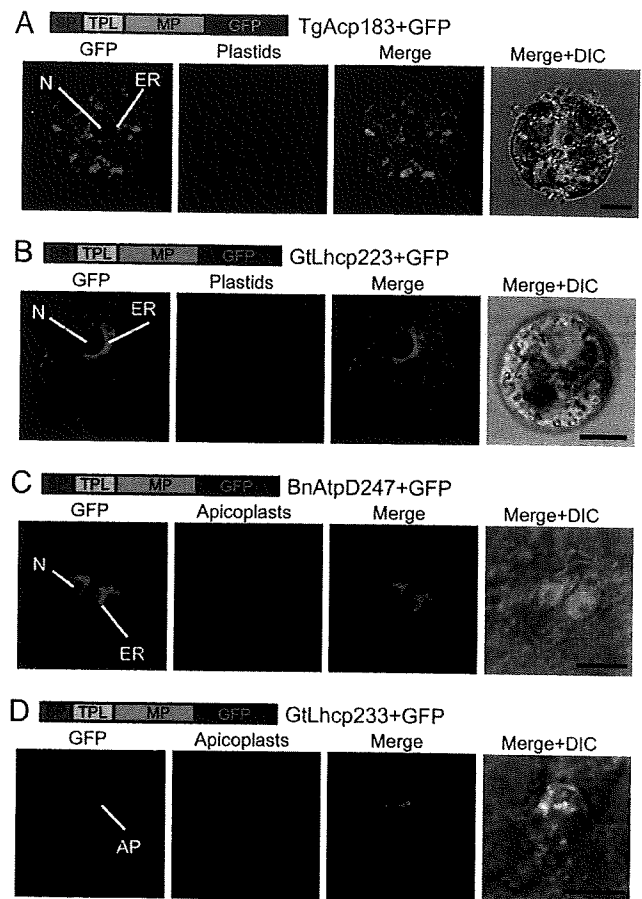
a similar mechanism for protein translocation. This idea is further supported by the discovery of a few genes for the translocons at the outer and inner envelope membranes of chloroplast (TOC and TIC) in a chlorarachniophyte nucleomorph genome (26). It is likely that the portion of the protein transport mechanism in the 2 innermost plastid membranes in the chlorarachniophyte directly evolved from the green algal endosymbiont, the ancestor of the chlorarachniophyte plastids, in the process of secondary endosymbiosis.

In cryptophytes, heterokonts, and perhaps apicomplexans, an N-terminal aromatic amino acid of TPL is involved in transporting preproteins across the 2 innermost plastid membranes (11, 16–19). These groups have red algal-derived secondary plastids, and it has been known that the TPs of red algae also possess a conserved aromatic amino acid at the N termini (11). In both primary and secondary plastids of red algal-lineages, the N-terminal aromatic amino acid of TPs and TPLs is believed to be essential for transporting preproteins into the plastids across the 2 innermost plastid membranes. These facts and our study imply that TPL functional domains for passing through the 2 innermost membranes of secondary plastids have generally derived from the TPs of the ancestor of their plastids.

#### Functional Compatibility of Bipartite Plastid-Targeting Peptide Among Eukaryotic Groups with Secondary Plastids.

The functional domains of TPLs are different among groups of organisms with secondary plastids. To understand the functional compatibility of TPLs among some of these groups, we tested the *in vivo* transports of heterologous preproteins, using the transformation systems of the apicomplexan *Toxoplasma gondii* and the chlorarachniophyte *L. amoebiformis*. First, we created 2 plasmid constructs that expressed the GFP fused with a plastid-targeted preprotein, the acyl carrier protein of *T. gondii* (TgAcp) or the light harvesting complex protein of the cryptophyte *Guillardia theta* (GtLhcp); the *L. amoebiformis* cells were then transformed with each of these plasmids. In the transformed cells, neither of the GFP fusion proteins (TgAcp183+GFP and GtLhcp233+GFP) was transported into the chlorarachniophyte plastids, and in both cases, GFP fluorescence was observed in the putative ER (Fig. 5A and B). Next we created 2 more plasmid constructs that expressed the GFP fused with the BnAtpD or GtLhcp preprotein, and the *T. gondii* cells were transformed with each plasmid. In the transformed cells with the pBnAtpD247+GFP, the GFP fusion proteins were localized in the putative ER, and no GFP fluorescence was observed in the apicomplexan plastid, the apicoplast (Fig. 5C). However, another GFP fusion protein, GtLhcp233+GFP, was targeted into the apicoplast (Fig. 5D).

These results indicate that the SPs of plastid-targeted preproteins have functional compatibility among cryptophytes, chlorarachniophytes, and apicomplexans, but the TPLs have no compatibility between chlorarachniophytes and apicomplexans, or between chlorarachniophytes and cryptophytes. In contrast, the plastid-targeting peptide of the cryptophytes is able to deliver the GFP to the plastid of the apicomplexans. This result is very interesting, because the plastids of apicomplexans and cryptophytes are different, in terms of the structure of the envelope membranes surrounding them. Also, these findings imply that the plastid-targeting peptide is functionally compatible among the photosynthetic lineages of the large phylogenetic group "chromalveolates," which further implies that all photosynthetic lineages of the chromalveolates (namely, the apicomplexans, cryptophytes, heterokonts, haptophytes, and dinoflagellates) possibly share a common plastid origin (38). This functional compatibility is also supported by 2 previous findings. The existence of an ER-associated degradation (ERAD)-like system for transporting preproteins across the second-from-the-outside of the 4 plastid-surrounding membranes in cryptophytes,



**Fig. 5.** Confirmation of functional compatibility of bipartite plastid-targeting peptides among the chlorarachniophytes, cryptophytes, and apicomplexans. Confocal images of transformed cells expressing heterologous plastid preproteins fused with GFP. (A) Localization of GFP fused with acyl carrier protein of *T. gondii* (TgAcp183+GFP) in a *L. amoebiformis* cell. (B) Localization of GFP fused with light harvesting complex protein of *G. theta* (GtLhcp233+GFP) in a *L. amoebiformis* cell. (C) Localization of GFP fused with an ATP synthase delta subunit of *B. natans* (BnAtpD247+GFP) in *T. gondii* cells. (D) Localization of the GtLhcp233+GFP protein in *T. gondii* cells. To detect apicoplasts in *T. gondii* cells, DsRed (red fluorescent protein) fused with an apicoplast-targeted preprotein of *T. gondii* (TgAcp183+DsRed) was used. AP, apicoplast. (Scale bar, 5  $\mu$ m.)

heterokonts, and apicomplexans (39); and the capability of cryptophyte plastid-targeting peptide to deliver GFP into the plastids of the heterokont *Phaeodactylum tricornutum* (17). It appears that photosynthetic chromalveolates with secondary plastids use, at least in part, the protein-targeting signals for plastids of the red algal endosymbiont, which eventually became their own plastids.

The present study clearly demonstrates that the functional domains of TPLs are different among plastid-bearing organisms, which contributes to providing a better interpretation of the evolution of diverse plastid-targeting peptides. However, further detailed study is required to understand the true diversity and evolution of protein-targeting mechanisms in secondary plastids, given that the detailed function of plastid-targeting peptides is still unclear in several secondary algal groups such as euglenophytes where even different classes of TPLs exist (15), haptophytes, and dinoflagellates. The development of good genetic transformation systems for these algal groups is likely essential to the advancement of the studies in this field.