

Fig 4. 細胞種における URE-BP 活性の相違,

ゲルシフト法による middle band, lower band の検出を示している。コントロールを MOLT-4 細胞とし、特異的な結合性を示すためにおのおのコンペティターを加えている (x 200 倍)。MT4 (成人 T 細胞白血病), Jurkat (急性リンパ性白血病), H9 (急性リンパ性白血病) の lower band の特異性を示す。

2nd Purification Table of URE binding protein

	Protein (mg)	Total Activity ($\times 10^4$ units)	Specific Activity (units/ μ g)	Recovery (%)	Carrier DNA(μ g)
N.E.	240	3.46	0.144	100	5.0
DEAE	13.2	9.02	6.83	261	5.0
Superose 6	1.1	9.68	87.96	280	0.5

Table 2 Purification table of URE binding protein

MOLT-4細胞核抽出液を数段階カラムにかけ、その過程における目的タンパクの精製結果を示した。目的タンパクのURE領域結合活性の検出をゲルシフトアッセイで行い、1 unitを1pgのDNAをシフトさせる活性と定義した。

分担研究報告書

10. クリプティック分化抗原を用いた HIV 感染細胞の アポトーシス誘導に関する研究

分担研究者	牧野 正彦	(鹿児島大学医学部)
共同研究者	河村 正輝	(鹿児島大学医学部)
	馬場 昌範	(鹿児島大学医学部)

研究要旨. HIV-1 慢性感染細胞に対しアポトーシスを誘導することは HIV-1 感染者に対する有効な治療法の開発に繋がる。クリプティック分化抗原(CDA)は宿主由来の抗原であり、作成した CDA 抗体(抗 3F5-23 抗体)を用い HIV-1 慢性持続感染細胞株 OM-10.1 を刺激するとアポトーシスが誘導された。抗 3F5-23 抗体による刺激が加わると CD86・CD54 および CD11c 抗原の発現が認められ、このアポトーシスは Activation-induced cell death (AICD)と考えられた。正常健常者より供与を受けた非感染 CD4 陽性 T 細胞に HIV-1 を *in vitro* で感染させると 3F5-23 抗原の発現がみられ、さらに抗 CDA 抗体で刺激すると感染 T 細胞の明らかな増殖応答が観察された。AICD の発現機序を検索するため、OM-10.1 細胞を代謝回路阻害剤存在下で培養すると、OM-10.1 細胞は主に *de novo* 回路を使用していたのに対し、抗 CDA 抗体を添加すると Salvage 回路優位の代謝経路を使用することが明らかになった。そこで、OM-10.1 を AZT 存在下で抗 3F5-23 抗体で刺激するとより強いアポトーシスが誘導された。抗 CDA 抗体を用いた新しい HIV-1 感染細胞に対する治療法の開発をめざすため、HTLV-I asymptomatic carrier よりリンパ球の供与を受け、*in vitro* で T 細胞を抗 3F5-23 抗体で刺激すると明らかな増殖反応が観察された。新たな治療法開発への糸口が示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 感染細胞の増加はエイズ発症に直接的に関与するが、AC 期における HIV-1 の潜伏あるいは慢性感染細胞に対する治療法の開発も極めて重要な課題となっている。化学療法剤の開発に大きな期待が寄せられているが未だ完全な治療法の確立には至っていない。この点 HIV-1 慢性感染細胞をアポトーシス機序により除去することは有用な免疫療法となりうると考えられる。昨年度、クリプティック分化抗原 (Cryptic

Differentiation Antigen, CDA)である 3F5-23 抗原は HIV-1 持続慢性感染細胞株 OM10.1 に発現し、CDA に対する特異的モノクローナル抗体(抗 3F5-23 抗体)を用い、OM10.1 を刺激するとアポトーシスが誘導されることを報告した。本年度は、アポトーシスの発現機序を検索し、同時に *in vivo* での治療への応用性を探った。

B. 研究方法

細胞調整 正常健常者 5 名および HTLV-I asymptomatic carrier (AC)

患者より、十分なインフォームドコンセントを行った後末梢血リンパ球(PBMC)の供与を受けた。また、HIV-1 慢性持続感染細胞株 OM-10.1 (HL-60 由来)およびコントロールとしてリンパ腫由来細胞株 HL-60 (HIV-1 陰性、3F5-23 抗原陰性)および CEM (HIV-1 陰性、3F5-23 抗原陽性)を用いた。

細胞表面抗原の解析 CD4 陽性 T 細胞およびリンパ腫由来細胞株の細胞表面抗原の解析は、市販の抗体(CD86, CD54, CD11c)および抗 3F5-23 抗体を用い FACScan™にて行った。アポトーシスの検出は、FITC-annexin-V と Propidium iodide の二重染色を行った後 FACScan™で行った。

ウイルス感染 HL-60 および正常健康者由来 CD4 陽性 T 細胞へ in vitro で HIV-1 (IIIB 株)を IL-2 非存在下で感染させた。

細胞増殖応答の検索 代謝経路阻害剤として HAT (de novo 経路阻害)および 8-Azaguanin (2.5 μg/ml, salvage 経路阻害)を用い、OM-10.1 細胞を阻害剤存在下 4 日間培養後の生細胞数をトリパンブルー染色後数えた。HIV-1 感染および非感染細胞あるいは HTLV-I AC 患者 T 細胞の抗 3F5-23 抗体に対する増殖応答は 72 時間培養時の ³H-thymidine uptake で定量化した。抗 CDA 抗体に対するアイソタイプコントロールとして抗 10B2 抗体を用いた。

C. 研究結果

HIV-1 慢性持続感染細胞 OM-10.1 (3F5-23 抗原陽性)を抗 3F5-23 抗体で刺激した際に誘導されるアポトーシスの発現機序を検索するため、

OM-10.1 を抗 3F5-23 抗体で 24 時間刺激した際の細胞表面抗原を非感染細胞 CEM (3F5-23 抗原陽性、アポトーシス抵抗性)をコントロールとして解析した。刺激された OM-10.1 細胞は活性化マーカーである CD86, CD54 および CD11c 抗原を発現した。しかし、CEM ではこれらの抗原の発現は観察されなかった(図 1)。従って、抗 CDA 抗体による HIV-1 感染細胞のアポトーシスは Activation-induced cell death と考えられた。また、正常健康者より供与を受けた CD4 陽性 T 細胞に in vitro で HIV-1 (IIIB 株)を感染させると OM-10.1 と同様に 3F5-23 抗原を発現し、さらに感染細胞を抗 3F5-23 抗体で刺激すると明らかな増殖応答が観察された(図 2)。そこで、抗 CDA 抗体の活性化機構を解析するため、OM-10.1 細胞を用い細胞が増殖する際に用いている代謝経路を de novo および salvage 回路阻害剤を用いて検索した。その結果、OM-10.1 細胞は無刺激時には de novo 回路を使用して増殖していたが、抗 CDA 抗体で刺激すると主に salvage 回路を用いて増殖していることが判明した(図 3)。そこで、OM-10.1 細胞を AZT 存在下で抗 3F5-23 抗体で刺激したところより強いアポトーシスが誘導された(図 4)。このことは、抗 CDA 抗体と AZT の併用がより有効な HIV-1 感染細胞の体外排除に繋がると考えられた。そこで、HIV-1 と同様に 3F5-23 抗原の発現を誘導する HTLV-I を用いウイルス保有者(asymptomatic carrier, AC)の末梢血 T 細胞に対する抗 CDA 抗体の影響を調べた。その結果、HTLV-I AC 者 T 細胞は抗 3F5-23 抗

体に反応して強い増殖応答を示すことが明らかになった(図5)。

D. 考察

CDA は、メラノーマなど一部の癌化細胞への発現が認められている。本研究では、ヒトレトロウイルスである HIV-1 および HTLV-I 感染細胞にも発現していて、この抗原を介した特異的シグナルが加わると、細胞増殖を誘導する代謝回路を変更して、ウイルス感染細胞の活性化を促し、ひいては Activation-induced cell death を誘導することが明らかになった。今回用いた OM-10.1 細胞では、抗 CDA 抗体の刺激により salvage 回路が主に使われて細胞活性化が誘導されたため、AZT との併用効果を検討したが、AZT 抵抗性の OM-10.1 に対し、より強い細胞殺戮効果が観察された点極めて興味深い。HIV-1 感染症においては、AC 期におけるウイルス潜伏あるいは慢性持続感染細胞に対する治療法の開発が重要であるが、抗 CDA 抗体を用いた免疫療法が有効となる可能性が高いと考えられた。この点を検討するため、3F5-23 抗原を発現する HTLV-I 感染 asymptomatic carrier をモデルとして抗 CDA 抗体の効果を検討したところ、HTLV-I AC 患者末梢 T 細胞にも明らかな活性化が観察された点極めて興味深いと考えられる。ただ、AC 患者末梢単核球においては monocytes に 3F5-23 抗原の発現が主に観察されたため、この抗体による T 細胞の増殖応答に抗原提示細胞がどのような役割を果たすか検討を要すと考えられた。

E. 結論

HIV-1 慢性持続感染細胞に発現するクリプティック抗原に対して特異的シグナルを加えると Activation-induced cell death を誘導した。さらに、HTLV-I 感染 asymptomatic carrier 由来の T 細胞も抗 CDA 抗体に対し増殖応答を示したことから、レトロウイルス慢性感染細胞に対する新しい免疫療法開発の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu, P., R. A. Morawetz, S. Chattopadhyay, M. Makino, T. Kishimoto, and H. Kikutani. CD40-deficient mice infected with the defective murine leukemia virus LP-BM5def do not develop murine AIDS but produce IgE and IgG1 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 29:615-625, 1999.
- 2) Makino, M., M. Azuma, S. Wakamatsu, Y. Suruga, S. Izumo, M. M. Yokoyama, and M. Baba. Marked suppression of T cells by a benzothioephene derivative in patients with Human T-lymphotropic virus type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 6(3):316-322, 1999.
- 3) Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. The role of human T-

- lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 73(6): 4575-4581, 1999.
- 4) Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. Monocytes Drived Activation Induced Apoptotic Cell Death of HTLV-I-Infected T Cells. *J. Immunol.*, 163:3914-3919, 1999.
 - 5) Umemura, M., W. Wajiwalku, K. Hirose, M. Emoto, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production in murine AIDS mice might underlie susceptibility to mycobacterial infection. *J. Immunol.*, in press.
2. 学会発表
- 1) The role of HTLV-I-infected dendritic cells in the development of HAM/TSP. Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV, April, 1999, Kagoshima, Japan.
 - 2) Cryptic differentiation antigens expressed on the HTLV-I-infected T cells. Shimokubo, S., M. Makino, and M. Baba. Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV, April, 1999, Kagoshima, Japan.
 - 3) Functional influence of HTLV-I-infection to dendritic cells and their precursor monocytes. Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, and M. Baba. 11th International Congress of Virology, 9-13 August, 1999, Sydney, Australia.
 - 4) Monocytes derived activation induced apoptotic cell death of HTLV-I-infected T cells. Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. 11th International Congress of Virology, 9-13 August, 1999, Sydney, Australia.
 - 5) HIV-1 感染細胞のクリプティック分化抗原を介したアポトーシス誘導. 河村正輝, 牧野正彦, 下窪敏, 馬場昌範. 第47回日本ウイルス学会総会, 1999年10月, 横浜
 - 6) HTLV-I 感染細胞一樹状細胞癒合細胞を用いたウイルス抗原特異的 T 細胞性免疫応答の誘導. 若松伸一, 牧野正彦, 鄭 忠和, 馬場昌範. 第 47 回日本ウイルス学会総会, 1999年10月, 横浜
 - 7) HTLV-I 感染単球由来樹状細胞の機能解析と ATL 発症に果たす役割. 牧野正彦, 若松伸一, 下窪敏, 馬場昌範. 第47回日本ウイルス学会総会, 1999年10月, 横浜

- 8) HTLV-I 感染樹状細胞の HAM/TSP 発症に果たす役割. 牧野正彦, 下窪 敏, 若松伸一, 出雲周二, 馬場昌範. 第10回日本樹状細胞研究会, 1999年11月, 名古屋
- 9) HTLV-I 感染単球由来樹状細胞の

ATL 発症に果たす役割. 牧野正彦, 若松伸一, 下窪 敏, 馬場昌範. 第29回日本免疫学会総会, 1999年12月, 京都

G. 知的所有権の取得状況
なし

図1

3F5-23 mAb添加による細胞表面抗原の発現

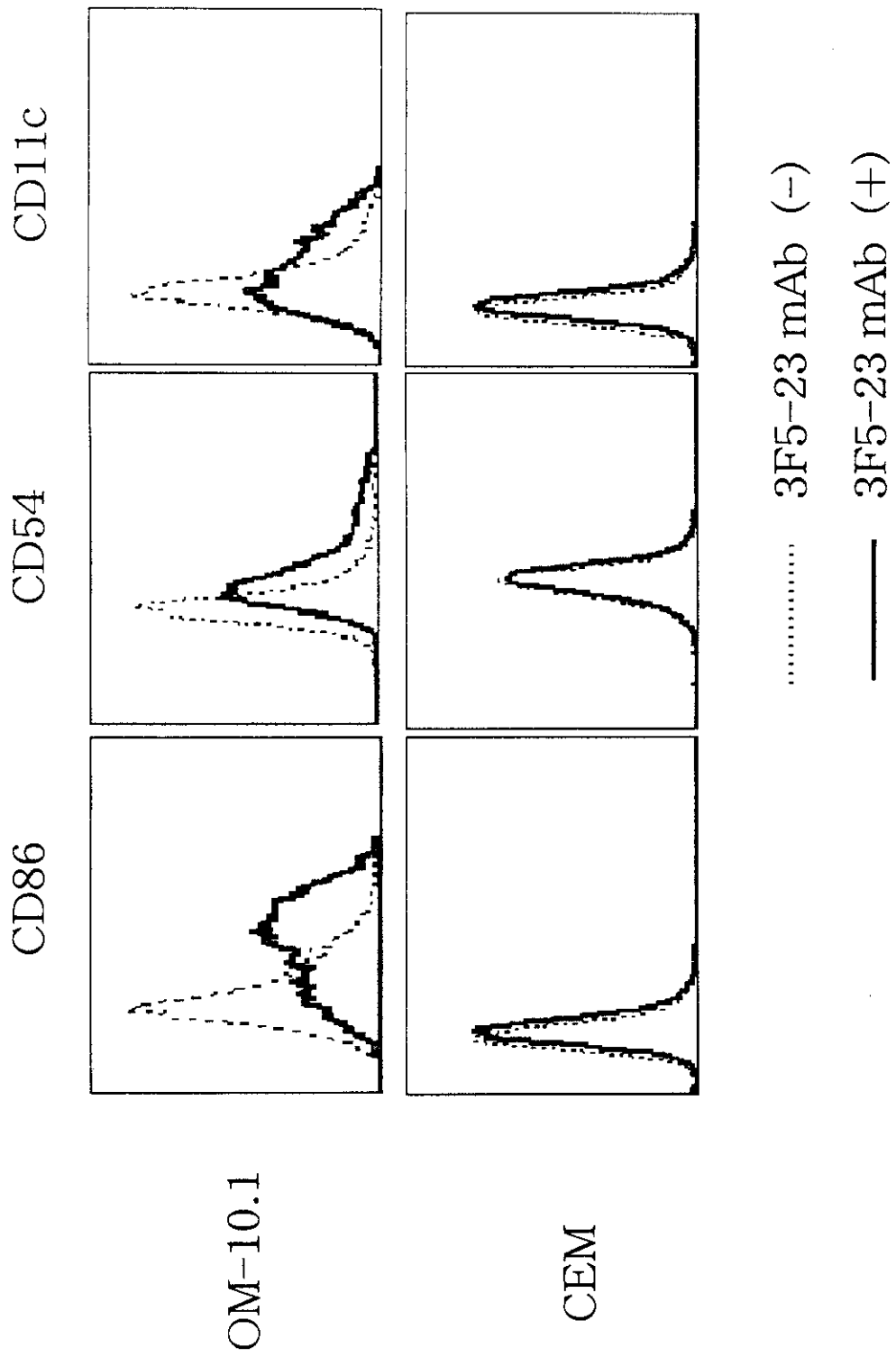


図 2

In vitroでHIV-1感染させたCD4陽性T細胞の3F5-23 mAbに対する増殖応答

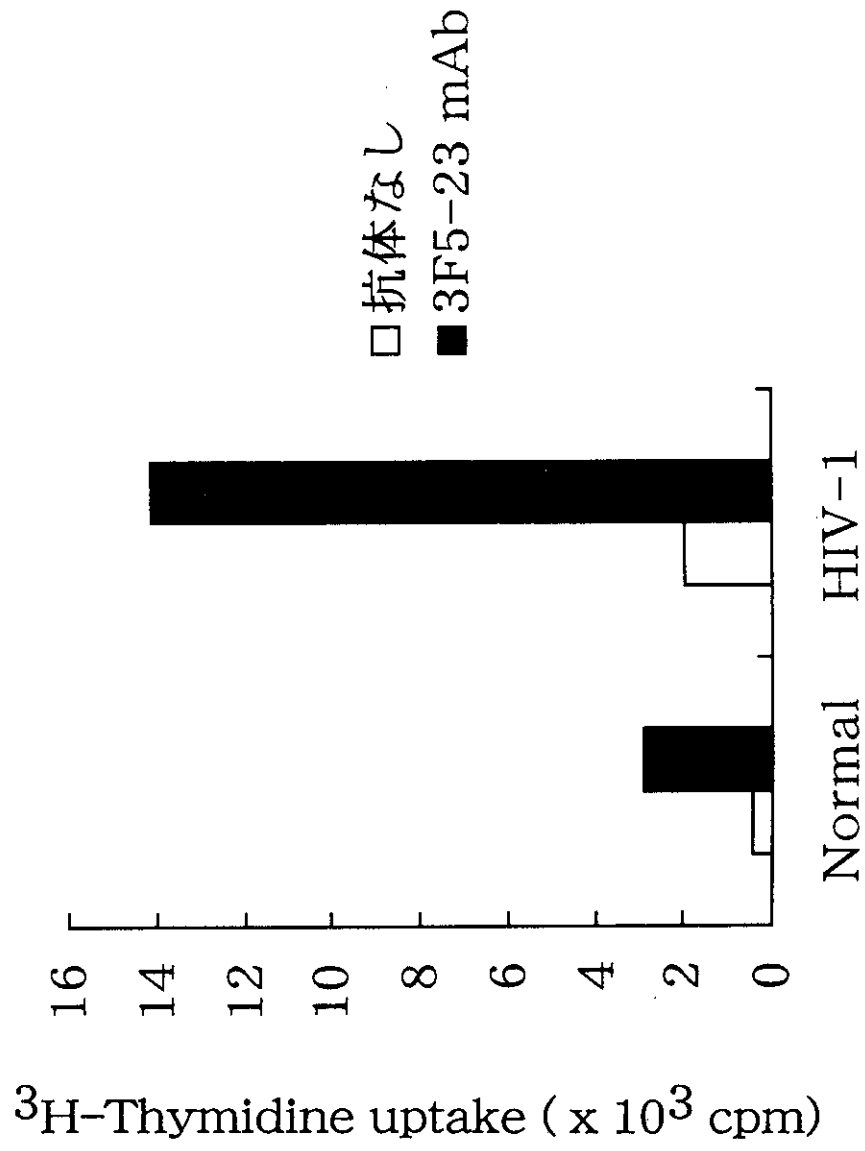


図 3.

3F5-23 mAb添加によるOM-10.1細胞の代謝回路の変化

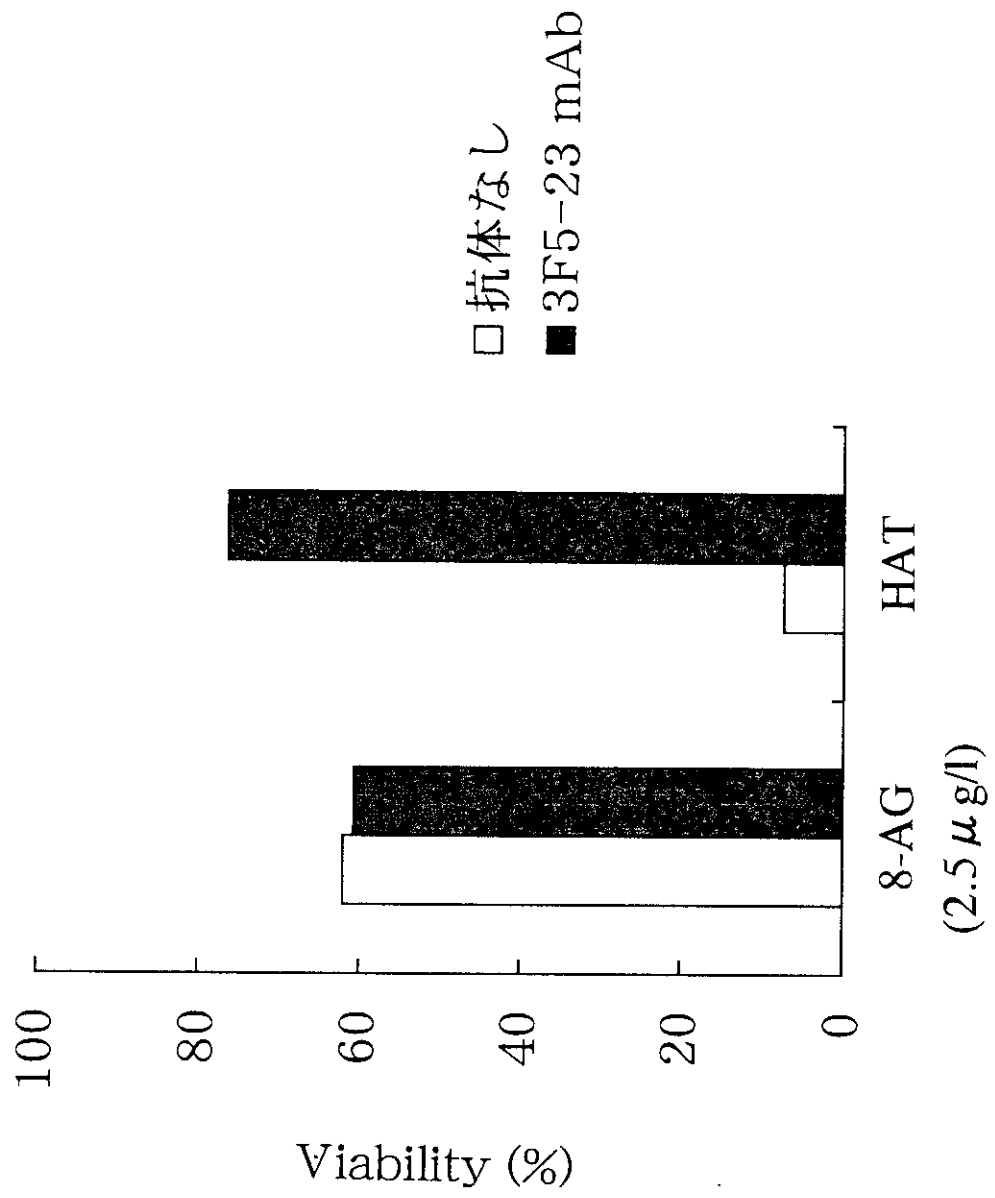


図 4.

HAT存在下におけるOM-10.1細胞に対する3F5-23 mAbとAZTの影響

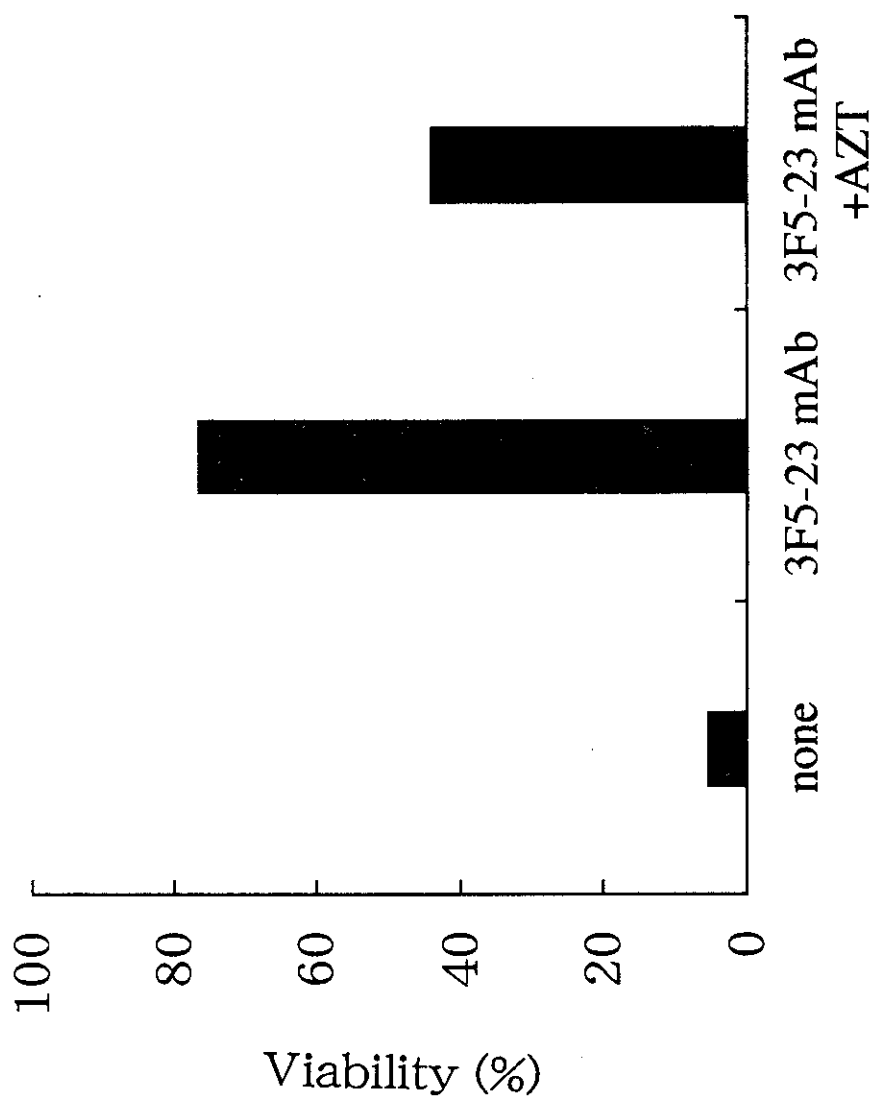
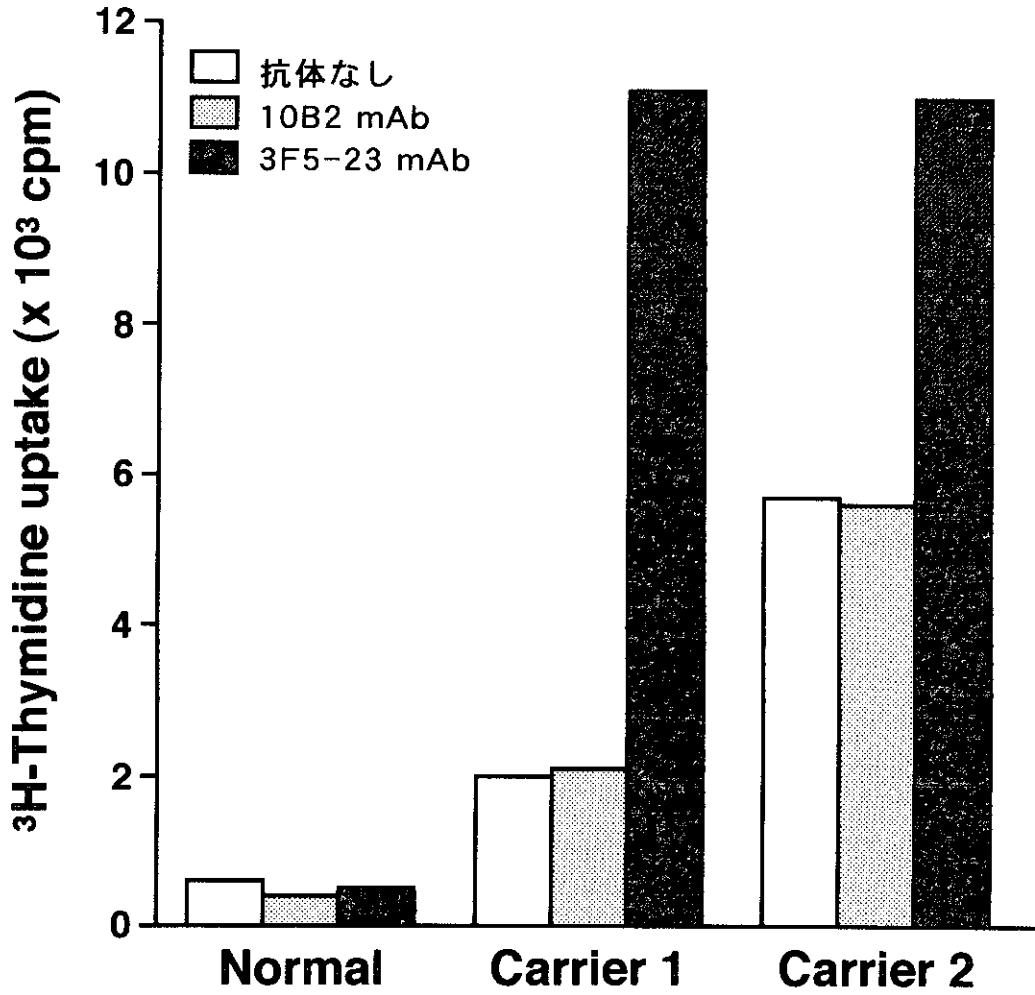


図 5.

HTLV-I asymptomatic carrier由来 CD4陽性T細胞の3F5-23 mAbに対する増殖応答



11. HIV-1 Nef に関する分子遺伝学的研究

協力研究者 足立昭夫 (徳島大学医学部ウイルス学教室)

研究要旨 HIV-1 Nef の N 末側には培養細胞でのウイルス感染性や MHC-I down-regulation などに関わる重要な機能がある。Nef の N 末から 20 番目にある Met を Ala あるいは Arg に変えた変異体を作製し、その変異体の機能を解析した。変異体の機能解析の結果、Met20 はウイルス感染性、Nef のウイルス粒子への取り込み、及び CD4 down-regulation には不必要であったが、MHC-I down-regulation には必須であった。このことから、MHC-I down-regulation に関わる Nef の領域 (構造) は他の活性を司るものと異なるものであることが明らかとなった。

A. 研究目的

HIV-1 Nef には様々な機能があることが報告されている。まとめると (1) 培養細胞レベルでのウイルス感染性に関するもの、および (2) ウイルス感染性との関係は明らかでないが、個体レベルでは重要と考えられるもの、に大別される。我々は昨年度までに (1) に関連して、Nef は複製後期に働いてウイルス粒子を修飾し、その粒子の初期過程の複製効率を増強することを報告してきた。本年度は主として、(2) の MHC-I down-regulation に関する解析を行なった。これらの研究により、エイズ発症に関与するとされ、また、多機能蛋白質である Nef の機能が総合的に検討され、HIV の生物学の理解、さらには抗 HIV 戦略の基礎を築くことができると期待される。

B. 研究方法

HIV-1 の感染性分子クローン pNL432 の Nef に関して点変異体を作製した。新た

に作製したのは Met1 をなくし、Nef を全く発現できない変異体 (M1T)、および Met20 を Ala (M20A) あるいは Arg (M20R) に変えた変異体である。これらの変異体を用いて、ウイルス感染性、Nef のウイルス粒子への取り込み、MHC-I down-regulation 能、および CD4 down-regulation 能などをトランスフェクション、ウエスタンブロットティング、MAGI アッセイ、FACS、などの手法により解析した。

C. 研究結果

新たに作製した変異体を FIG.1 に示した。FIG.1 に示したように Nef の変異はウイルス構造蛋白質の発現に影響を及ぼさなかった。次に、ウイルス粒子を集めて Nef-Core の有無と構造蛋白質の変化について検討した。M20A と M20R には大きな異常が認められなかった (FIG.2)。ウイルス感染性についても検討を加えた。多重および単一感染サイクルの両方のアッセイ系で、野

性株、M20A、M20R に大きな差がなかった(FIG.3)。しかしこれらの生物活性とは異なり、M20A と M20R は感染細胞の MHC-I down-regulation を惹起する能力には欠けていた(FIG.4)。一方、M20A あるいは M20R 感染細胞で CD4 の down-regulation は正常に起こっていた(FIG.5)。さらに、変異体 M20A あるいは M20R 感染リンパ球は CTL による細胞傷害を受けやすいことも明らかとなった(熊本大、滝口グループとの共同研究で未発表)。

D. 考察

HIV-1 Nef の MHC-I down-regulation 能は独立した機能であり、CTL による細胞傷害の阻害に重要であることが実証された。

E. 結論

これまでの我々の研究で HIV-1 Nef の主な機能を明らかにすることができた(FIG.6)。HIV-1 Nef が培養細胞レベルのみの研究では把握できない機能を持つことが一層明確となり、個体レベルの Nef 機能を意識した解析の重要性が確認された。このラインの研究を進めることにより抗 HIV 戦略の基礎を築くことを目指したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimano, R., Inubushi, R., and Adachi, A. 1999. Host cell-dependent replication of HIV-1 *gag* MA, CA and NC mutants is independent of the functions of Vif and Vpu. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 91-94.
2. Adachi, A., Iida, S., Fukumori, T., Tamaki, M., Inubushi, R., Shimano, R., Oshima, Y., Akari, H., and Koyama, A.H. 1999. Exchangeability of accessory Vif and Vpu proteins between various HIV/SIVs. *International Journal of Molecular Medicine* 3:193-197.
3. Fukumori, T., Kagawa, S., Iida, S., Oshima, Y., Akari, H., Koyama, A.H., and Adachi, A. 1999. Rev-dependent expression of three species of HIV-1 mRNAs. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 297-302.
4. Adachi, A., Oshima, Y., and Koyama, A.H. 1999. Activation of HIV-1 enhancer sequence by vaccinia virus. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 311-313.
5. Adachi, A., and Oshima, Y. 1999. Cell-dependent functional roles of HIV-1 Nef for viral replication. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 427-430.
6. Iida, S., Fukumori, T., Oshima, Y., Koyama, A.H., and Adachi, A. 1999. Growth characteristics of T-cell tropic HIV-1 *vpu* gene mutants in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medical Investigation* 46: 43-47.
7. Inubushi, R., and Adachi, A. 1999. Cell-dependent function of HIV-1 Vif for virus replication. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 473-476.
8. Kurokawa, M., Koyama, A.H., Yasuoka, S., and Adachi, A. 1999. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *International Journal of Molecular Medicine* 3: 527-530.
9. Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A.,

- Matsuda, M., Kurata, T., and Kojima, A. 1999. The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology* 257:285-289.
10. Akari, H., Nam, K.-H., Otani, I., Shibata, H., Adachi, A., Terao, K., and Yoshikawa, Y. 1999. Effects of SIVmac infection on peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus macaques. *Clinical Immunology* 91:321-329.
 11. Sakai, K., Horiuchi, M., Iida, S., Fukumori, T., Akari, H., and Adachi, A. 1999. Mutational analysis of the HIV-1 *vif* gene. *Virus Genes* 18:179-181.
 12. Iida, S., Fukumori, T., Oshima, Y., Akari, H., Koyama, A.H., and Adachi, A. 1999. Compatibility of Vpu-like activity in the four groups of primate immunodeficiency viruses. *Virus Genes* 18:183-187.
 13. Shimano, R., Inubushi, R., Oshima, Y., and Adachi, A. 1999. Inhibition of HIV/SIV replication by dominant negative *gag* mutants. *Virus Genes* 18:197-201.
 14. Hata, S., Koyama, A.H., Shiota, H., Adachi, A., Goshima, F., and Nishiyama, Y. 1999. Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes and Infection* 1:601-607.
 15. Adachi, A., Tamaki, M., Shimano, R., Inubushi, R., Naito, T., Yoshida, K., Oshima, Y., Kawamura, M., and Koyama, A.H. 1999. Cell-dependent replication potentials of HIV-1 *gag* mutants. *Microbes and Infection* 1:671-676.
 16. Koyama, A.H., Arakawa, T., and Adachi, A. 1999. Comparison of an antiviral activity of recombinant consensus interferon with recombinant interferon- α 2b. *Microbes and Infection* 1:1073-1077.
 17. Akari, H., Fukumori, T., Iida, S., and Adachi, A. 1999. Induction of apoptosis in herpesvirus saimiri-immortalized T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with CD80/CD86. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263:352-356.
 18. Akari, H., Uchiyama, T., Fukumori, T., Iida, S., Koyama, A.H., and Adachi, A. 1999. Pseudotyping HIV-1 by vesicular stomatitis virus G protein does not reduce the cell-dependent requirement of Vif for optimal infectivity: functional difference between Vif and Nef. *Journal of General Virology* 80:2945-2949.
 19. Isaka, Y., Sato, A., Miki, S., Kawauchi, S., Sakaida, H., Hori, T., Uchiyama, T., Adachi, A., Hayami, M., Fujiwara, T., and Yosie, O. 1999. Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determine the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* 264:237-243.
 20. Akari, H., Arold, S., Fukumori, T., Okazaki, T., Strebel, K., and Adachi, A. 2000. Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *Journal of Virology* 74:2907-2912.
 21. Yoshida, A., Shimomoto, J., Koh, K.-

- B., Fujita, M., and Adachi, A. 2000. The H9/M8166 tropism of various HIV mutants is determined by distinct cellular factors. *International Journal of Molecular Medicine* 5, in press.
22. Akari, H., Fukumori, T., and Adachi, A. 2000. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *Journal of Virology* 74, in press.
23. Koyama, A.H., Arakawa, T., and Adachi, A. 2000. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes and Infection*, in press.

2. 学会発表

1. 足立昭夫, 福森知治, 下元 純, 吉田亜希子, 高 圭範: HIV Vif 蛋白質の感染初期過程における機能解析. 第47回日本ウイルス学会総会, 1999年11月, 横浜.
2. 足立昭夫, 福森知治, 吉田亜希子, 高圭範, 下元 純: HIV-1 Nef 蛋白質のN末端領域の機能解析. 第47回日本ウイルス学会総会, 1999年11月, 横浜.
3. 足立昭夫, 福森知治, 高 圭範, 下元純, 吉田亜希子: HIV-1 Env gp41 C末端領域の機能解析. 第47回日本ウイルス学会総会 1999年11月, 横浜.
4. 福森知治, 香川 征, 明里宏文, 足立昭夫: VSV-G シュードタイプウイルスによる HIV-1 Vpr のアポトーシス調節機構の解析. 第22回日本分子生物学会年会, 1999年12月, 福岡.

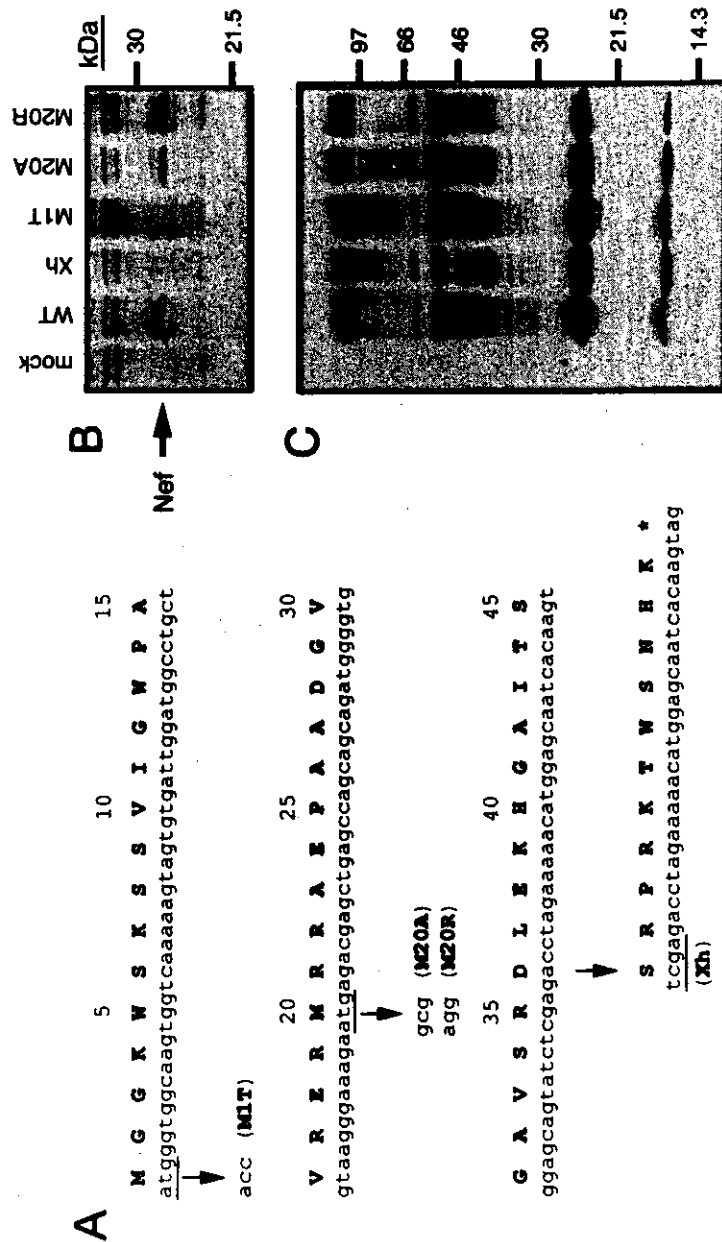


FIG. 1. Analysis of cellular expression of Nef proteins. (A) Sequences of HIV-1 *nef* mutants used here are shown. The N-terminal 45 residues of Nef and the corresponding nucleic acid sequence are depicted. The asterisk indicates the stop codon. (B and C) Lysates containing an equal amount of p24 capsid antigen were prepared from HeLa cells transfected with the respective proviral DNA clones and were analyzed by Western blotting with a rabbit anti-Nef antiserum (B) and a human anti-HIV-1 antiserum (C).

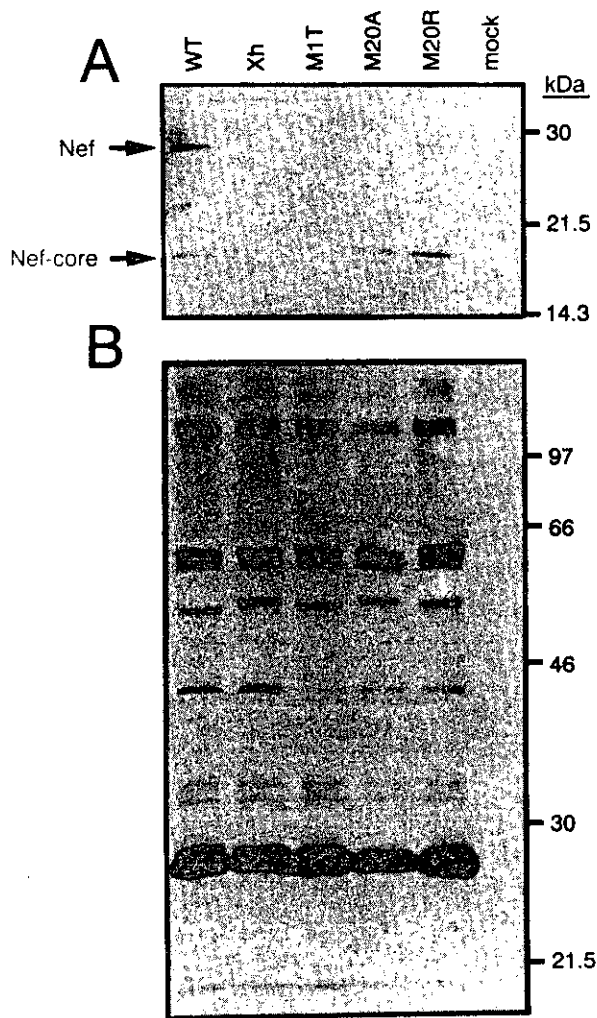


FIG. 2. Incorporation of Nef proteins into virions. HIV-1 WT and *nef* mutant viruses were prepared in HeLa cells transfected with the respective proviral DNA clones. Virus lysates containing an equal amount of p24 capsid antigen were analyzed by Western blotting with a rabbit anti-Nef antiserum (A) and a human anti-HIV-1 antiserum (B).

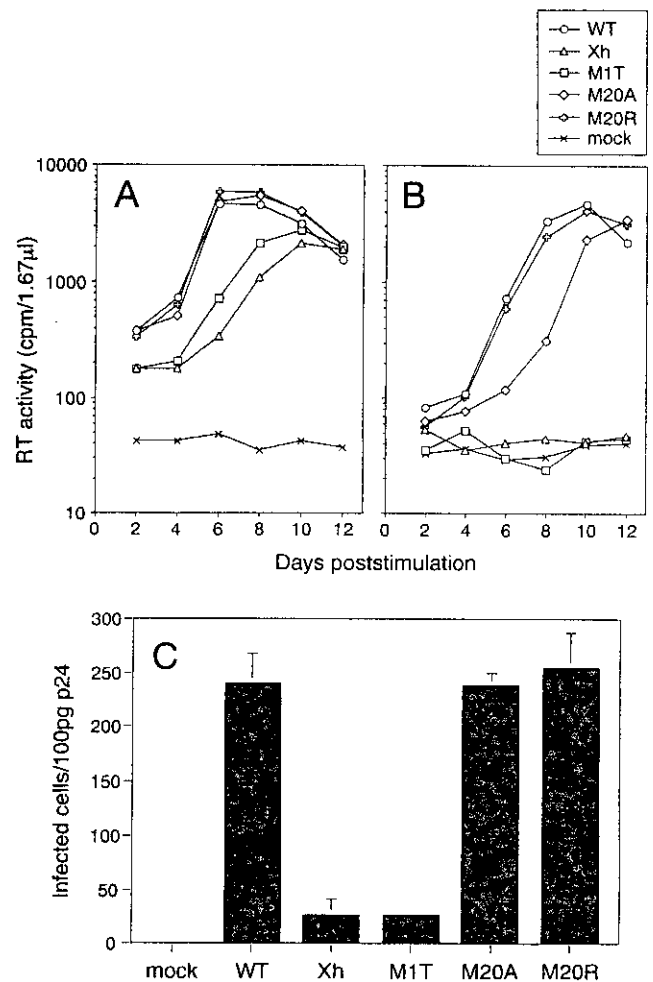


FIG. 3. Analysis of the infectivity of the WT and *nef* mutants of HIV-1. (A and B) Replication kinetics of the viruses in PBMCs. Viruses were obtained from HeLa cells transfected with WT and various *nef* mutant proviral clones. Unstimulated PBMCs (10^5) were infected with 1×10^5 (A) and 2×10^4 (B) cpm of RT from viruses, and 2 days later, cells were stimulated by the addition of $0.5 \mu\text{g}$ of phytohemagglutinin P per ml. A half volume of the culture supernatants was harvested and refed with the same volume of culture medium with 50 U of recombinant human interleukin-2 per ml every 2 days. Kinetics of RT production in the culture supernatants are indicated. (C) Single-round infectivity of the viruses. Infectivity was determined by counting blue foci of X-Gal-treated MAGI cells 2 days after inoculation with the viruses. Averages and standard deviations of triplicate titrations of the same viral stock are shown.

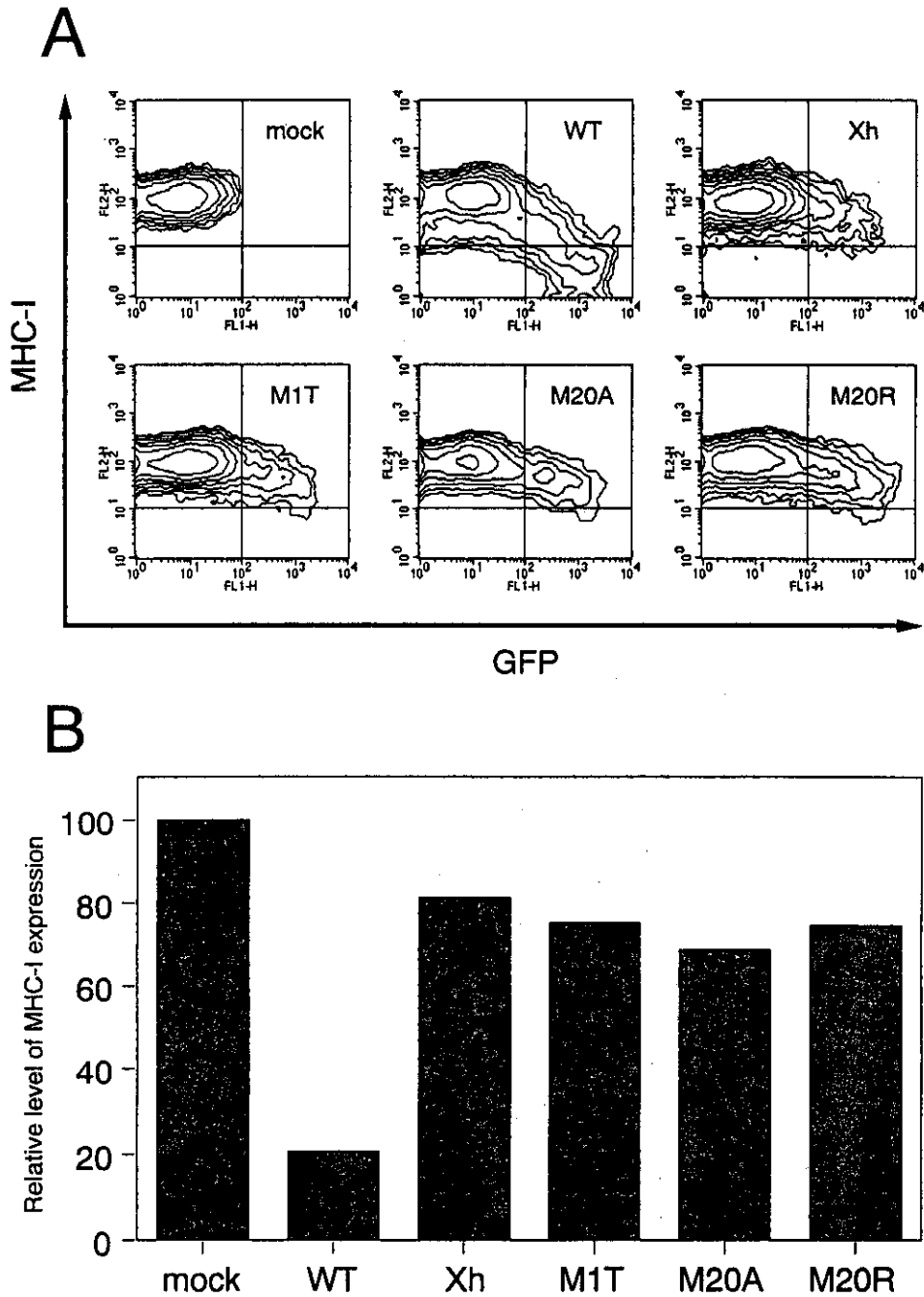


FIG. 4. Effect of mutations in Nef protein on MHC-I down-regulation on the surfaces of HIV-1-infected cells. (A) CEM-GFP cells (10^6) were infected with 5×10^5 cpm of RT from each virus obtained from transfected HeLa cells, and 3 to 5 days later the cells were reacted with an RPE-labeled anti-MHC-I antibody at 4°C for 1 h. The cells were washed, fixed with 1% formaldehyde, and analyzed for fluorescence intensity by flow cytometry. (B) The level of MHC-I expression on the GFP-positive population in virus-inoculated CEM-GFP cells was evaluated as geometric mean fluorescence using CELLQuest software (Becton Dickinson).

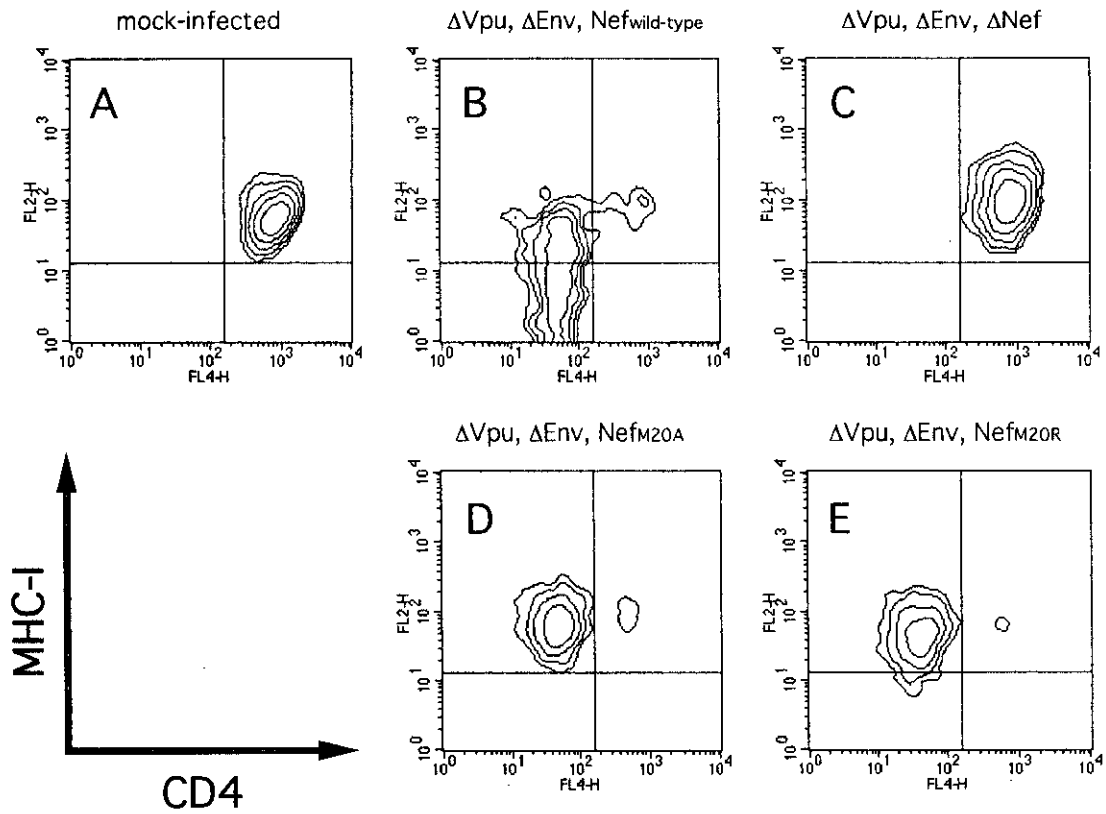


FIG. 5. Effect of mutations in the Nef protein on CD4 down-regulation on the surfaces of cells infected with VSV-G-HIV-1 pseudotyped virus. The pseudotyped viruses were prepared by cotransfection of pCMV-G and pNL43-Ude1.K1 (B), pNL43-Ude1.K1.nM1T (C), pNL43-Ude1.K1.nM20A (D), or pNL43-Ude1.K1.nM20R (E) into HeLa cells. CEM-GFP cells (10^5) were infected with 2.5×10^7 cpm of RT from each pseudotyped virus, and 2 days later, cells were treated at 4°C for 1 h with RPE-labeled anti-MHC-I antibody and allophycocyanin-labeled anti-CD4 antibody. The cells were then washed, fixed with 1% formaldehyde, and analyzed for fluorescence intensity for CD4 and MHC-I in the cell population expressing GFP by flow cytometry.

① 培養細胞での感染性に無関係

CD4 **down-regulation**
MHC-I **down-regulation**

② 培養細胞での感染性

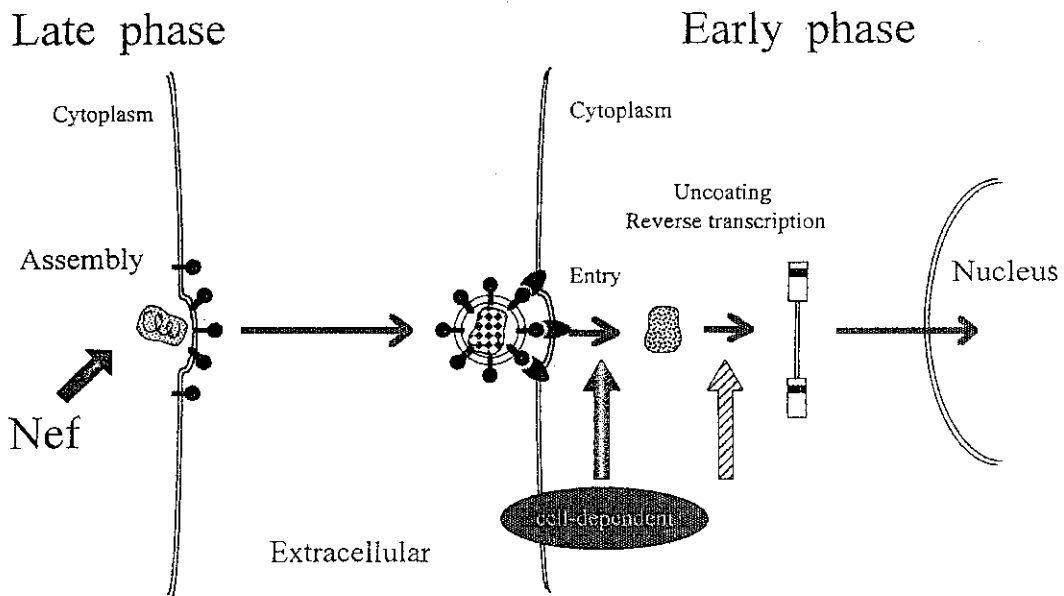


Fig.6 Functions of HIV-1 Nef