

4. SOCS1 の欠損は HIV-1 粒子の増殖と Gag の動きを阻止する

SOCS1 の働きと、Gag や HIV-1 の関係をさらに深く解明するため siRNA を用いて SOCS1 を欠損させた細胞を作成した。その結果、pNL4-3 や SOCS1 の siRNA を形質移入した細胞は、HIV-1 粒子と細胞内 Gag protein の量がどちらも減少していた。つまり、SOCS1 siRNA による HIV-1 の複製は内因性 SOCS1 の availability に依存する。この発見は、SOCS1 は、核周囲から PM へ、Gag protein が運ばれる際に重要な役目を担っていることを意味する。

さらに、核周囲の Gag は、SOCS1 の抑制によって PM への Gag の移動も抑制される際、プロテアゾームよりむしろ、リソソームによって消化されることが示された。

最後にヒト T 細胞で SOCS1 の特異的な抑制が、HIV-1 の粒子増殖に影響を与えるのかを検討した。その結果、SOCS1 の働きを抑えると、Gag が PM へ移行しなくなり、リソソームによる消化を受けやすくなり、ヒト細胞で、HIV-1 の増殖を抑えるという結果になった。

E. 結論

今回、私たちは、SOCS1 が HIV-1 感染を助け、IFN 非依存的に後期ウイルス増殖過程において重要な役割を担うことを示した。

HIV-1 は感染により、機能性高分子を免疫細胞に送り込み、自己の複製を行う。ウイルスの増幅経路に関わる細胞因子の同定は、ウイルスが細胞に感染するメカニズムを解明する上で大きな役割を担ってきた。今回、われわれは SOCS1 と呼ばれる

cytokine のブレーキとでも言える因子が、HIV-1 の増殖経路でその後期段階を調節し、宿主細胞にある HIV-1 感染を促進させる因子となっている可能性を報告した。SOCS1 は、HIV-1 の p55 と呼ばれる Gag タンパク質のマトリックスやヌクレオキャプシドと直接結合することが出来、その結果、HIV-1 は、効率よくウイルス粒子を産生させることができる。siRNA を使い SOCS1 を抑えると、Gag タンパク質の Trafficking やアセンブリーが抑制され、核周囲で放置されることにより最終的にはリソソームの働きで消滅する。これらのことは、SOCS1 が細胞内で HIV-1Gag をコントロールする重要な細胞因子でありことを示唆しており、AIDS などの治療における標的因子として新しい治療法の確立につながる可能性がある」と期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* in press.
- 2) Saito Y Yamamoto, N. Dewan Z, Sugimoto H, Martinez Bryun VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa I, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, and Yamaoka S. Overexpressed NF-kB inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell

- leukemia and Hodgkin
Reed-Sternberg cells. *Blood*. in press.
- 3) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(1):294-9, 2008.
- 4) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ (null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol*. 81(23):13259-64, 2007.
- 5) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. 197(1):134-41, 2008.
- 6) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*. 109:212-8, 2007.
- 7) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS*. 21:575-82, 2007.

謝辞

プラスミドを分与いただいた University of Massachusetts の Dr. H Gottlinger 氏に感謝の意を表する。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(共同研究者；梁明秀、澤崎達也)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

宿主微小管ネットワークおよびユビキチンシグナルを介した HIV-1 Gag 細胞内輸送の分子機構の解明

分担研究者 梁 明秀 国立感染症研究所エイズセンターグループ長

研究要旨： HIV-1p55Gag タンパク質はポリソームで合成後、細胞膜にターゲットされ多重重合化するが、そのためには、宿主因子による Gag タンパク質への直接的な相互作用が必要であることが示唆されていた。今回われわれは、HIV-1p55Gag と直接結合する SOCS1 を分子プローブとして用いることにより、HIV-1p55Gag の細胞内輸送の分子機構の解明を試みた。その結果、SOCS1 は HIV-1p55Gag のモノユビキチン化を促進させることにより、Gag タンパク質が宿主微小管ネットワークを介して効率的にを形質膜へターゲットされることが明らかとなった。以上の知見は、HIV-1Gag の細胞内輸送分子機構をはじめて解明したものであり、AIDS や関連疾患の治療における新しい治療法の確立につながる可能性がある。

A. 研究目的

HIV 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV タンパク質間の相互作用が必須であり、そのものがウイルスの増殖・生活環、および病原性発現機構に重要な役割を果たす。また、感染にともなう宿主個体のウイルスに対する細胞内免疫応答機構の1つとして、宿主因子によるウイルスタンパク質の修飾、ウイルス-宿主タンパク質複合体の形成について考慮する必要がある。そのために、それらの質的、時間的、空間的な関係を十分に理解する必要がある。

HIV-1Gag は前駆タンパク質 p55Gag として合成された後、はウイルス性プロテアーゼによって、マトリックス (MA/p17)、キャプシド(CA/p24)、ヌク

レオキャプシド(NC/p7)と p6、さらに SP1 と SP2 と呼ばれる分子量の小さなペプチドから成る断片に切断される。MA のミリストイル化した N-terminal の部位は、プラズマ膜への Gag 標的を促進し、一方 CA と NC は Gag の multimerization を促進する。

最近我々はサイトカインシグナル抑制因子 SOCS1 が HIV-1 感染 T 細胞において特異的にその発現が誘導され、HIV-1 Gag タンパク質と複合体を形成することにより、ウイルス粒子タンパク質の細胞内輸送と感染性ウイルス粒子の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした (Ryo et al., PNAS, 2008)。これらの結果は SOCS1 が HIV-1 複製の後期過程の形成における重要な宿主因子であることを示唆し

ている。一方で、SOCS1 がどのようなメカニズムで細胞内 Gag タンパク質の輸送を調節しているか、このプロセスに関わる詳細な分子機構は明らかではなかった。

一方、近年、宿主細胞のアクチンや微小管 (microtubule) などの細胞骨格系が HIV-1 粒子形成に重要な役割を果たす事が示唆されている。実施に HIV-1Gag は微小管モータ Kif4 タンパク質と結合することが知られている。また、HIV-1Gag タンパク質ユビキチン化修飾は、Gag の細胞内輸送や粒子形成に関与する可能性も提示されている。しかし、それらの関連因子の同定や、詳細な分子機構の解明は未だ成されていない。

我々は本研究において、SOCS1 を分子マーカーとすることにより、HIV-1Gag の細胞内輸送分子メカニズムの解明することを試みた。その結果、HIV-1Gag/SOCS1 複合体は、微小管を介した宿主輸送系により細胞膜へターゲットされること、また、そのためには SOCS1 による Gag のユビキチン化修飾が必須であることが明らかとなった。

B. 研究方法

免疫染色

pNL4-3 分子クローンを発現させた各種細胞を 3%ホルマリンで 15 分間、続いて -20℃ の 100%メタノールで 15 分間固定後、5%ヤギ血清を用いてブロッキングを行い、抗 HIV-1 p24 マウスモノクローナル抗体、抗 SOCS1 ウ

サギポリクローナル抗体を、室温で 2 時間反応させた。続いて、Alexa488 および Alexa568 2 次抗体で処理し、DAPI 染色を行った。マウント後、共焦点顕微鏡で観察した。

HIV-1 感染実験

培養液中のウイルスコピー数の定量を行った。HIV-RNA は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system (PE Biosystems) で定量した。

GST pulldown analysis

C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) を 293T に発現させ、細胞抽出液と GST-fused SOCS1 を混合後、遠心により結合タンパク質を回収した。

Microtubule spin-down assay

pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞の細胞抽出液を、Taxol および GTP 存在下で重合させた、ウシ微小管と混合後、50000rpm で超遠心を行い、ペレットを微小管結合分画とした。その後、各種タンパク質を SDS-PAGE 法およびウエスタン法にて同定した。

(倫理面への配慮)

研究にはヒト末梢血を使用するため、下記の点を留意して実験を行った。1.末梢血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血している。採血に伴う身体への危険性はありうるが、これは通常の

診療行為を越えるものではない。

2. 個人情報やプライバシーの保護・管理に留意し、患者やクライアントの人権や利益の尊重等に細心の配慮を行う。

C. 研究結果

1. SOCS1-HIV-1Gag 複合体は微小管に沿って局在する

過去の報告によると、SOCS1 は microtubule organizing center (MTOC) に局在し、Stat タンパク質の細胞内輸送を制御していることが示された。そこで、われわれは SOCS1-Gag 複合体が微小管 (microtubule) に沿った局在を示すかどうかについて検討をおこなうため、SOCS1/HIV-1Gag 共発現 Cos-1 細胞をそれぞれの抗体をよび、抗 alpha-tubulin 抗体を用いて 3 重染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、SOCS1-HIV-1Gag 複合体は宿主微小管に沿って局在することがあきらかとなった。これを生化学的に証明するために、我々は、pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞の細胞からライセートを回収し、Taxol および GTP 存在下で重合させたウシ微小管と混合後、50000rpm で超遠心を行い、ペレットを SDS-PAGE 法にて展開した。その後のイムノブロットにより、SOCS1 および HIV-1Gag がともに微小管に結合すること、SOCS1 は HIV-1Gag の微小管への結合量を促進させることが明らかになった。反対に、SH2 ドメインや SOCS box を欠損させ

た変異型は上記の機能を欠いており、その両方のドメインが Gag の微小管結合促進のために必須であることが分かった。以上のことは、SOCS1/Gag 複合体は微小管と物理的に結合しており、SOCS1 が HIV-1Gag タンパク質の微小管への親和性を増強していることを示すものである。

2. 宿主細胞微小管安定性は SOCS1 による HIV-1Gag の細胞内輸送に必須である。

上記のとおり、SOCS1/Gag が微小管に局在していることから、宿主微小管ネットワークの安定性が Gag の細胞内輸送やウイルス複製に影響することが示唆された。そのことを証明するために、HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 や、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞に感染させ、各種微小管重合阻害剤 (ノコダゾール、コルヒチン、ビンブラスチン) を処理後、上清中に放出されたウイルスを回収し、anti-p24 抗体を使いイムノブロットを行った。その結果、アクチン重合阻害剤やエンドソーム輸送阻害剤は特に影響しなかったが、微小管重合阻害は SOCS1 によるウイルス粒子形成を顕著に抑制した。また、微小管重合阻害タンパク質 stathmin を pNL4-3 、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞にと共発現し、ウイルス粒子形成能を検討した結果、上記微小管重合阻害剤と同様に SOCS1 による HIV-1 粒子形成促進を顕著に抑制した。したがって、宿主細胞の微小管安定性が SOCS1 による Gag タンパク質の細胞内輸送やそ

の後の粒子形成に重要な役割を果たす事が示唆された。

3. SOCS1 は微小管安定性を増加させる

SOCS1 が HIV-1 感染により、その遺伝子発現が誘導される (Ryo et al., PNAS, 2008)。上記の結果から、SOCS1 が微小管を介して、Gag の細胞内輸送に関与することから、次に、SOCS1 が宿主細胞微小管安定性に寄与するか否かについて考察した。SOCS1 強制発現細胞では、微小管の安定性の指標である、アセチル化アルファチューブリンの発現がコントロールと比較して顕著に増加していた。反対に、SOCS1^{-/-}マウス胎児線維芽細胞では野生型細胞と比較して、ノコダゾールに抵抗性を示す微小管が有意に減少していた。これらの結果は、HIV-1 感染によって発現の増強した SOCS1 が直接的に Gag に結合するだけではなく、微小管の安定性をも増加させることにより、Gag の細胞内輸送を促進することを示すものである。

4. SOCS1 は HIV-1Gag のユビキチン化を促進する

SOCS1 は C 末端の SOCS-box を介して、Jak2 や p65/RelA などの基質タンパク質を特異的にユビキチン化することが知られている。SOCS1 は elonginB/C, Rbx1, Culin2/5 とユビキチンリガーゼ (E3) コンプレックスを形成する。我々は先ず *in vitro* において、HIV-1Gag がこれらの SOCS1-E3 複合体と相互作用するかどうか考察した。小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を

用いて SOCS1、elonginB/C, Rbx1, および、ビオチン化標識 Culin 2 を合成し、リコンビナント Gag タンパク質と混合した後、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンを行った。その結果、HIV-1Gag は SOCS1-ElonginB/C-Rbx-Culin2 と複合体を形成することが明らかとなった。続いて、実際に SOCS1 が HIV-1Gag のユビキチン化に関与するか否かについて、293T 細胞を用いて実験を行った。C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) と myc タグの付加した Ubiquitin, さらにはコントロールベクターまたは SOCS1 を 293T 細胞に共発現させ、myc 抗体で免疫沈降後、FLAG 抗体で、ユビキチン化 Gag を定量した。その結果、SOCS1 は Gag のユビキチン化を顕著に促進した。

5. HIV-1 Gag のユビキチン化は Gag タンパク質の細胞内輸送やアッセンブリーに重要である

続いて、SOCS1 によって成された Gag のユビキチン化が、Gag タンパク質の細胞内輸送や、ウイルス粒子形成に必須であるかどうかを確認するため、C 末端の 2 つのグリシンを欠如させた、ユビキチン (myc-Ub Δ GG) を作製した。この変異体は基質タンパク質にコンジュゲートされないため、ユビキチン化シグナルをドミナントネガティブ的に抑制することが知られている。今回我々はこのユビキチン変異体を SOCS1/HIV-1Gag 強制発現細胞に共発現させたところ、SOCS1 による Gag の細胞内輸送や粒子形成が顕著に抑

制された。また、この現象がユビキチン化特異的であることを示すため、ユビキチン結合タンパク質が結合できないユビキチン変異体 (myc-Ub Δ GG-L8A/I44A) を用いて上記と同様の実験を行ったところ、SOCS1 による Gag 輸送への抑制効果は認められなかった。これらの結果は、SOCS1 による Gag のユビキチン化が、そのユビキチン化部位に結合する未知のエフェクタータンパク質を介して、Gag の細胞内輸送に制御することを示唆するものである。まとめると、SOCS1 が Gag のユビキチン化、特にモノユビキチン化を亢進し、そのユビキチン化が目印 (タグ) となり、Gag タンパク質が微小管を介した宿主細胞輸送系へと委譲されるというモデルが考えられる。

D. 考察および E. 結論

今回、我々は、宿主細胞の微小管ネットワークの安定性および SOCS1 による Gag のユビキチン化が、Gag の細胞内輸送において重要な役割を担うことを示した。細胞内分子やオルガネラの輸送には、微小管を介した、ダイニン/キネシンモータータンパク質による細胞内輸送が知られている。種々のウイルス粒子タンパク質の細胞内輸送においても、宿主細胞骨格系、特に微小管やアクチン系との関連については過去に報告があり、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、アフリカ豚コレラウイルス (ASFV) では微小管ネットワークを介した active transport の役割が示されている。しか

し、HIV-1 粒子タンパク質の細胞内輸送における細胞骨格系の関与については、様々な相反する意見が出されており、現時点において統一する見解は得られていない。この原因としては、第一に Gag タンパク質と相互作用する細胞側因子が同定されていないこと、第二に、HIV-1 感染細胞における宿主細胞骨格輸送系に関連した、詳細な細胞生物学的解析が行われてこなかったことが上げられる。本研究において、我々は、SOCS1 の Gag 細胞内輸送に対する機能を指標とすることにより、Gag のユビキチン化修飾が trigger となり、微小管依存的輸送系によって Gag タンパク質が輸送されることを示した。今後の課題としては、実際にどのモータータンパク質が重要なのか?、Gag のユビキチン化部位をどのようなエフェクター (またはアダプター) タンパク質が認識し、作用するのか? などの疑問について詳細に解析していく必要がある。これらによって、HIV-1 Gag タンパク質の細胞内輸送系の詳細な分子機構が明らかになるばかりではなく、HIV-1 感染にともなう宿主細胞の物質輸送系の影響やその病態との関連についても明らかにすることができるものと考えられる。

我々は SOCS1 が HIV-1 感染により誘導され、HIV-1 Gag タンパク質に直接結合することにより、HIV-1 は効率的にウイルス粒子を産生させることができることを示した (山本の稿参照)。また SOCS1 特異的抑制により、効率

的に Gag タンパク質の Trafficking やアセンブリーが阻害され、リソソームにおける Gag の分解が促進されることも示した。それに加え、今回の我々の研究成果は、SOCS1 を介した Gag タンパク質の細胞内輸送の分子機構をさらに詳細に明らかにしたものであり、SOCS1 やその関連因子が AIDS/HIV 治療における有望な宿主側標的因子として新しい治療法の確立につながることを期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo A., Nishi M, Tsurutani N, Ohba K, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement of microtubule integrity and distinct ubiquitin signaling in SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag, submitted.
- 2) Ryo A., Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(1):294-9.
- 3) Ryo A., Hirai A, Nishi M, Liou YC, Perrem K, Lin SC, Hirano H, Lee SW,

Aoki I. A suppressive role of the prolyl-isomerase pin1 in cellular apoptosis mediated by the death-associated protein daxx. *J Biol Chem*. 2007 282(50):36671-81.

- 4) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A., Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) *The Journal of AIDS Research*. 2007 9;102-107

2. 学会発表

- 1) 梁明秀、澤崎達也、山本直樹 Post-translational regulation of HIV-1 proteins revealed a new type of virus-host cell interaction for HIV-1 replication and pathogenesis. 第 21 回エイズ学会年会. 広島, 2007 年 11 月 28-30 日.
- 2) 大庭賢二、梁明秀、寺嶋一夫、山本直樹 濾胞樹状細胞 (FDC) による HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス複製刺激機構: P-selectin/RSGL-1 と Syk pathway の関与の可能性. . 第 21 回エイズ学会年会. 広島, 2007 年 11 月 28-30 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ウイルスタンパク質相互作用阻害剤探索システム (出願予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(共同研究者; 山本直樹、澤崎達也)

宿主細胞側機能的リン酸化タンパク質の同定および解析

分担研究者 澤崎達也 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 准教授

研究要旨：HIVタンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネースによりリン酸化されていることがわかってきた。タンパク質のリン酸化は細胞内の主要シグナル伝達機構として、タンパク質輸送や転写・複製機構を制御していることから、HIVはそのリン酸化を通じてタンパク質輸送などの宿主細胞内機能を利用しているものと想像されている。そのため、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的な探索は、細胞内HIV増殖機構の解明だけでなく、抗エイズ創薬を進める上で必須なアプローチである。本研究では、網羅的なHIVタンパク質リン酸化宿主プロテインカイネースの探索を可能とする、コムギ無細胞タンパク質合成系による宿主プロテインカイネースライブラリーの作成とAlphaScreenによる高感度、ハイスループット検出系の開発に成功した。

A. 研究目的

近年の報告から、HIVはヒト細胞内のタンパク質を利用し、複製・増殖を行っていることがわかってきており、最近、HIVタンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネースによりリン酸化されていることがわかってきた。このリン酸化は、細胞内の主要シグナル伝達機構として、タンパク質輸送や転写・複製機構を制御していることから、HIVはそのリン酸化を通じてタンパク質輸送などの宿主細胞内機能を利用しているものと想像されている。そのため、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的な探索は、細胞内HIV増殖機構の解明だけでなく、抗エイズ創薬を進める上で必須なアプローチである。しかし、ヒトゲノム上には518種類のプロテインカイネースがコードされており、細胞内からHIVタンパク質をリン酸化するプロテインカイネースを探索することは不可能である。そこで、本研究では我々

が開発してきた真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を用いてプロテインカイネースライブラリーの構築を行い、*in vitro*でHIVタンパク質をリン酸化する宿主タンパク質の探索を可能とする系の開発を目指した。

B. 研究方法

MGCとFANTOMクローン、そして我々の研究室でクローニングされた合計410種類の完全長プロテインカイネース遺伝子をもつ大腸菌からPCR法を用いて、鋳型DNAの構築を行い、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインカイネースタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、ビオチン化に必要な配列をN末端に付加し、ビオチンリガーゼBirAとビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルした基質タンパク質を得た。基質タンパク質のリン酸化は、AlphaScreen法により検出した。さらに、PKC ζ による

HIV-Gag タンパク質のリン酸化は、上記無細胞系で合成された、HIV-全長 Gag、およびそのプロセッシングフォームを用いた *in vitro* kinase アッセイ系により行った。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人情報の管理には万全を期し、本研究はタンパクレベルの研究でありヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年告示）の対象外であるが、それに準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。

C. 研究結果

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、410 種類の完全長プロテインカイネースライブラリーの作成に成功した。また、上記の無細胞系と AlphaScreen 系を用いることにより、基質タンパク質の特異的なリン酸化反応をハイスループットに検出することができた。特に、リン酸化結合タンパク質である Pin1 を分子プローブとすることにより、効率的に機能的リン酸化部位を複数同定することが可能となった。

我々は、この技術を利用し、HIV-1Gag タンパク質を直接的に機能的リン酸化するキナーゼの同定を試みた。その結果、AKT1 および PKC ζ が Gag タンパク質をリン酸化することを検出することができた。293T 細胞を用いた検討により、これらのキナーゼは HIV-1 複製の後期課程に採用し、HIV-1 の粒子形成を正に制御することが明らかとなった。今後はこれら

キナーゼによる Gag のリン酸化が、どのように Gag のアッセムブリーやウイルス粒子の出芽に作用するかについて、さらに詳細に検討する。

D. 考察

本研究は、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースタンパク質の網羅的探索技術の開発を目指している。網羅的なタンパク質のプロテインカイネースの解析には、1) プロテインカイネースライブラリーの整備、2) 未精製タンパク質を用いた高感度な検出系、という2つのコア技術の開発が必須である。本年度のコムギ無細胞タンパク質合成系とAlphaScreenを組み合わせることで、これらコア技術の開発に成功し、またHIV-Gagタンパク質のピオチン化の成功により、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的探索に向けた基盤技術を開発することができた。また、PKC ζ によるHIV-Gagのリン酸化を*in vitro*系で検出することに成功したことから、阻害剤スクリーニングへの道が開けた。

E. 結論

本年度の研究により、世界に先駆けた HIV タンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的な探索技術の開発ができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S,

Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(1):294-9.

- 2) Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, Saeki M, Tsuchimochi M, Morishita R, Endo Y. Arabidopsis HY5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA microplate. *FEBS Lett*. 2008, 582(2):221-8.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. The Wheat Germ Cell-Free Based Production of Malaria Proteins for Discovery of Novel Vaccine Candidates. *Infect Immun*. 2008, In press
- 4) Sawasaki T, Morishita R, Gouda MD, Endo Y. Methods for high-throughput materialization of genetic information based on wheat germ cell-free expression system. *Methods Mol Biol*. 2007, 375:95-106.

2. 学会発表

- 1) 梁明秀、澤崎達也、山本直樹
Post-translational regulation of HIV-1

proteins revealed a new type of virus-host cell interaction for HIV-1 replication and pathogenesis. 第21回エイズ学会年会. 広島, 2007年11月28-30日.

- 2) 正岡崇志、赤木達也、嘉村奈美、澤崎達也、遠藤弥重太 A new approach for protease substrate screening based on the wheat cell-free system. 第七回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島, 2007年9月1-5日
- 3) 松永智子, 松岡和弘, 竹尾暁, 澤崎達也, 坪井敬文, 遠藤弥重太, コムギ無細胞タンパク質合成により作製したタンパク質ライブラリーを用いたマラリア感染により誘導される自己抗体の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 横浜, 2007年12月11-15日
- 4) 赤木達也、嘉村奈美、澤崎達也、遠藤弥重太 カスパーゼ3により切断されるプロテインカイネーシスの探索システムの構築. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 横浜, 2007年12月11-15日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ウイルスタンパク質相互作用阻害剤探索システム (出願予定)

2. 実用新案登録

3. その他

(共同研究者; 山本直樹、梁明秀)

III. 業績一覽 (2007)

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
山本直樹					
Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, <u>Yamamoto N.</u>	Humanized mice for human retrovirus infection.	<i>Curr Top Microbiol Immunol.</i>		in press	
<u>Ryo A</u> , Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N.	SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	105	294-9	2008
Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, <u>Yamamoto N</u> , Tanaka Y.	Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses.	<i>J Infect Dis.</i>	197	134-41	2008
Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, <u>Yamamoto N.</u>	Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis.	<i>J Virol.</i>	81	13259-64	2007
Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, <u>Yamamoto N.</u>	Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R{gamma}null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses.	<i>Blood</i>	109	212-8	2007
Shimizu S, Urano E,	Inhibiting lentiviral replication	<i>AIDS</i>	21	575-82	2007

Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J.	by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex.				
梁明秀					
Ryo A, Nishi M, Tsurutani N, Ohba K, Morikawa Y, Yamamoto N.	Requirement of microtubule integrity and distinct ubiquitin signaling in SOCS-1 mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag.			submitted	
Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N.	SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	105	294-9	2008
Ryo A, Hirai A, Nishi M, Liou YC, Perrem K, Lin SC, Hirano H, Lee SW, Aoki I.	A suppressive role of the prolyl-isomerase pin1 in cellular apoptosis mediated by the death-associated protein daxx.	<i>J Biol Chem.</i>	282	36671-81	2007
Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H.	Regulation of Gag trafficking and functions. (Review)	The Journal of <i>AIDS Research.</i>	9	102-7	2007
澤崎達也					
Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.	The Wheat Germ Cell-Free Based Production of Malaria Proteins for Discovery of Novel Vaccine Candidates.	<i>Infect Immun.</i>		in press	2008
Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I.	SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	105	294-9	2008

Morikawa Y, Yamamoto N.					
Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, Saeki M, Tsuchimochi M, Morishita R, Endo Y.	Arabidopsis HY5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA microplate.	<i>FEBS Lett.</i>	582	221-8	2008
Sawasaki T, Morishita R, Gouda MD, Endo Y.	Methods for high-throughput materialization of genetic information based on wheat germ cell-free expression system.	<i>Methods Mol Biol.</i>	375	95-106	2007

IV. 刊行物別刷（抜粹）

SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag

Akihide Ryo^{a,b,c}, Naomi Tsurutani^d, Kenji Ohba^{b,e}, Ryuichiro Kimura^{e,f}, Jun Komano^b, Mayuko Nishi^a, Hiromi Soeda^a, Shinichiro Hattori^b, Kilian Perrem^g, Mikio Yamamoto^h, Joe Chiba^f, Jun-ichi Mimayaⁱ, Kazuhisa Yoshimura^j, Shuzo Matsushita^j, Mitsuo Honda^b, Akihiko Yoshimura^k, Tatsuya Sawasaki^l, Ichiro Aoki^a, Yuko Morikawa^d, and Naoki Yamamoto^{b,c}

^aDepartment of Pathology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fuku-ura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan; ^bAIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan; ^cKitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Shirokane 5-9-1, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan; ^dDepartment of Molecular Virology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan; ^eMolecular Oncology Laboratory, Department of Pathology, Royal College of Surgeons in Ireland, Smurfit Building, Beaumont Hospital, Dublin 9, Ireland; ^fDepartment of Biochemistry II, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama 359-8513, Japan; ^gDepartment of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan; ^hDivision of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital, 860 Urushiyama, Aoi-ku, Shizuoka 420-8660, Japan; ⁱDivision of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan; ^jDivision of Molecular and Cellular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan; and ^kCell Free Science and Research Center, Ehime University, Ehime 790-8577, Japan

Edited by Robert C. Gallo, University of Maryland, Baltimore, MD, and approved November 19, 2007 (received for review May 24, 2007)

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) utilizes the macromolecular machinery of the infected host cell to produce progeny virus. The discovery of cellular factors that participate in HIV-1 replication pathways has provided further insight into the molecular basis of virus–host cell interactions. Here, we report that the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the late stages of the HIV-1 replication pathway. SOCS1 can directly bind to the matrix and nucleocapsid regions of the HIV-1 p55 Gag polyprotein and enhance its stability and trafficking, resulting in the efficient production of HIV-1 particles via an IFN signaling-independent mechanism. The depletion of SOCS1 by siRNA reduces both the targeted trafficking and assembly of HIV-1 Gag, resulting in its accumulation as perinuclear solid aggregates that are eventually subjected to lysosomal degradation. These results together indicate that SOCS1 is a crucial host factor that regulates the intracellular dynamism of HIV-1 Gag and could therefore be a potential new therapeutic target for AIDS and its related disorders.

AIDS | pathogenesis | drug target | lysozyme

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is a multistep and multifactorial process mediated by a complex series of virus–host cell interactions (1, 2). The molecular interactions between host cell factors and HIV-1 are vital to our understanding of not only the nature of the resulting viral replication, but also the subsequent cytopathogenesis that occurs in the infected cells (3). The characterization of the genes in the host cells that are up- or down-regulated upon HIV-1 infection could therefore provide a further elucidation of virus–host cell interactions and identify putative molecular targets for the HIV-1 replication pathway (4).

The HIV-1 p55 Gag protein consists of four domains that are cleaved by the viral protease concomitantly with virus release. This action generates the mature Gag protein comprising the matrix (MA/p17), capsid (CA/p24), nucleocapsid (NC/p7), and p6 domains, in addition to two small spacer peptides, SP1 and SP2 (5, 6). The N-terminal portion of MA, which is myristoylated, facilitates the targeting of Gag to the plasma membrane (PM), whereas CA and NC promote Gag multimerization. p6 plays a central role in the release of HIV-1 particles from PM by interacting with the vacuolar sorting protein Tsg101 and AIP1/ALIX (7–9). Several recent studies have implicated the presence of host factors in the control of the intracellular trafficking of Gag. AP-3 δ is a recently charac-

terized endosomal adaptor protein that binds directly to the MA region of Gag and enhances its targeting to the multivesicular body (MVB) during the early stages of particle assembly (10). The *trans*-Golgi network (TGN)-associated protein hPOSH plays another role in Gag transport by facilitating the egress of Gag cargo vesicles from the TGN, where it assembles with envelope protein (Env) before transport to PM (11). Although the involvement of these host proteins in the regulation of intracellular Gag trafficking has been proposed, the detailed molecular mechanisms underlying this process are still not yet well characterized.

In our current work, we demonstrate that the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) directly binds HIV-1 Gag and facilitates the intracellular trafficking and stability of this protein, resulting in the efficient production of HIV-1 particles. These results indicate that SOCS1 is a crucial host factor for efficient HIV-1 production and could be an intriguing molecular target for future treatment of AIDS and related diseases.

Results

SOCS1 Is Induced upon HIV-1 Infection and Facilitates HIV-1 Replication via Posttranscriptional Mechanisms. We and others have shown that HIV-1 infection can alter cellular gene expression patterns, resulting in the modification of viral replication and impaired homeostasis in the host cells (4, 12). Hence, to elucidate further the genes and cellular pathways that participate in HIV-1 replication processes, we performed serial analysis of gene expression (SAGE) using either a HIV-1 or mock-infected human T cell line, MOLT-4 (12). Further detailed analysis of relatively low-abundance SAGE tags identified *SOCS1* as a preferentially up-regulated gene after HIV-1 infection. This finding was validated by both semiquantitative RT-PCR and immunoblotting analysis with anti-SOCS1 anti-

Author contributions: A.R. and N.T. contributed equally to this work; A.R., A.Y., Y.M., and N.Y. designed research; A.R., N.T., K.O., R.K., M.N., H.S., S.H., T.S., I.A., and Y.M. performed research; J.K., S.H., M.Y., J.C., J.-i.M., K.Y., S.M., M.H., and A.Y. contributed new reagents/analytic tools; A.R., N.T., K.O., M.N., H.S., K.P., M.Y., K.Y., S.M., T.S., I.A., Y.M., and N.Y. analyzed data; and A.R., K.P., and N.Y. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: aryo@nih.go.jp or nyama@nih.go.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0704831105/DC1.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

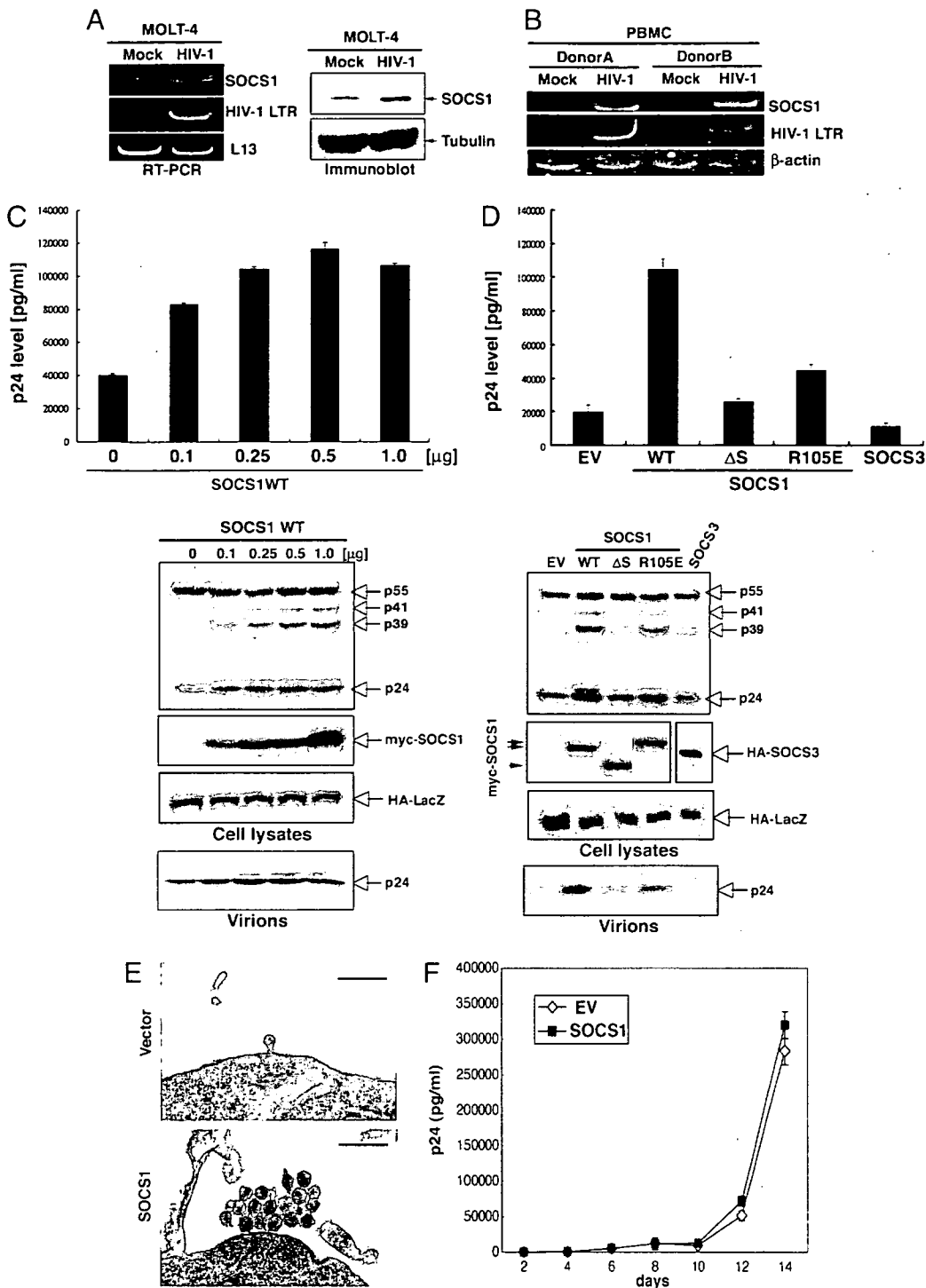


Fig. 1. SOCS1 is induced upon HIV-1 infection and enhances HIV-1 particle production. (A) MOLT-4 cells were mock-infected or infected with HIV-1_{NL4-3}, and then total RNA and protein extracts derived from these cells were subjected to semiquantitative RT-PCR (Left) and immunoblotting (Right), respectively. (B) PBMC from two healthy individuals were infected with HIV-1_{NL4-3} or were mock-infected, and SOCS1 expression was examined by semiquantitative RT-PCR. (C) 293T cells were transfected with pNL4-3 and cotransfected with various amounts of pcDNA-myc-SOCS1. Forty eight hours after transfection, p24 antigen release into the supernatant in each case was measured by antigen-capture ELISA (Upper), and the cell lysates and pelleted viruses were analyzed by immunoblotting (Lower). The data shown represent the mean \pm SD from three independent experiments. HA-LacZ is a transfection control. (D) 293T cells were transfected with pNL4-3 and cotransfected with control vector, SOCS1 (WT), SOCS1 Δ S (Δ SOCS box), SOCS1R105E, or SOCS3. Cell lysates and pelleted viruses were then collected after 48 h and subjected to ELISA (Upper) or immunoblotting (Lower), as described in C. (E) 293T cells cotransfected with either pNL4-3 plus control vector, or pNL4-3 plus myc-tagged SOCS1 were analyzed by TEM. Note that substantial numbers of mature virus particles can be observed in the myc-SOCS1-transfected cells. (Scale bars: 500 nm.) (F) Jurkat cells were infected with virions (adjusted by p24 levels) from either control vector (EV)- or SOCS1-transfected 293T cells. Supernatant p24 levels at the indicated time points were measured by ELISA.

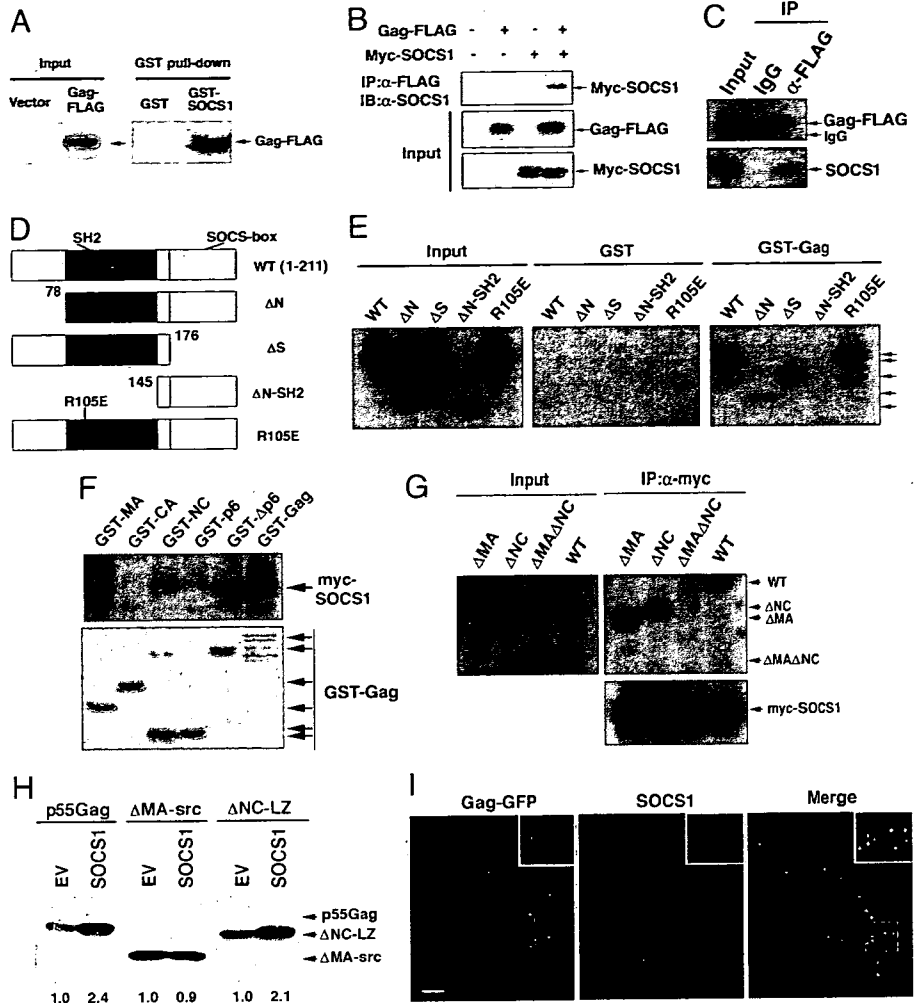
bodies (Fig. 1A). In addition, *SOCS1* was found to be up-regulated also in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from two different individuals (following HIV infection, Fig. 1B).

Our initial findings that SOCS1 is induced upon HIV-1 infection prompted us to examine whether this gene product affects viral replication. We first cotransfected 293T cells with a HIV-1 infectious molecular clone, pNL4-3 (13), and also pcDNA-myc-SOCS1, and then monitored the virus production levels in the resulting supernatant. We then performed ELISA using an anti-p24 antibody and found that wild-type SOCS1 significantly increases the production of HIV-1 in the cell supernatant in a dose-dependent

manner (Fig. 1C Upper). In contrast, neither the SH2 domain-defective mutant (R105E) nor the SOCS box deletion mutant (Δ S) of SOCS1 could promote virus production to the same levels as wild type, indicating that both domains are required for this enhancement (Fig. 1D Upper). Furthermore, another SOCS box protein, SOCS3, failed to augment HIV-1 replication in a parallel experiment (Fig. 1D Upper), indicating that the role of SOCS1 during HIV-1 replication is specific.

We next performed immunoblotting analysis using cell lysates and harvested virus particles in further parallel experiments (Fig. 1C and D Lower). Consistent with our ELISA analysis, the expres-

Fig. 2. SOCS1 interacts with HIV-1 Gag. (A) Extracts of 293T cells transfected with either empty vector or Gag-FLAG were subjected to pull-down analyses using glutathione-agarose beads with GST-SOCS1 in the presence of 10 ng/ml RNase followed by immunoblotting with anti-FLAG antibodies. (B) Extracts of 293T cells transiently expressing myc-SOCS1 and Gag-FLAG were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-FLAG monoclonal antibodies in the presence of 10 ng/ml RNase followed by immunoblotting (IB) analysis with either anti-FLAG or anti-myc polyclonal antibodies. (C) 293T cells were transiently transfected with Gag-FLAG, and cell lysates were then subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG antibodies followed by immunoblotting with an antibody directed against endogenous SOCS1. (D and E) 293T cells expressing various myc-tagged SOCS1 mutants (schematically depicted in D) were analyzed by GST pull-down analysis with either GST or GST-Gag recombinant protein (E). (F) GST fusion proteins of the indicated regions of Gag were bound to glutathione beads and incubated with cell lysates from 293T cells expressing myc-SOCS1 in the presence of 10 ng/ml RNase followed by immunoblotting with anti-myc antibodies. (G) SOCS1 binds p55 Gag via either its MA or NC domains. 293T cells were transfected with myc-SOCS1 and cotransfected with Gag-FLAG, Gag Δ MA-FLAG, Gag Δ NC-FLAG, or Gag Δ MA Δ NC-FLAG. At 24 h after transfection, cell lysates treated with 10 μ g/ml RNase were subjected to coimmunoprecipitation with anti-myc monoclonal antibodies followed by immunoblotting with anti-FLAG or anti-myc polyclonal antibodies. (H) Functional interaction of SOCS1 with MA but not NC. 293T cells were transfected with wild-type Gag, Δ MA-src, or Δ NC-LZ (Z_{IL}-p6) and cotransfected with either control vector or SOCS1. Supernatant virus particles were then collected after 24 h and subjected to immunoblotting with anti-p24 antibody. Numerical values below the blots indicate fold induction of supernatant p55 signal intensities derived by densitometry. (I) Colocalization of SOCS1 with Gag. HeLa cells were transiently transfected with Gag-GFP. After 24 h, the cells were fixed, permeabilized, and immunostained with anti-SOCS1 polyclonal antibody followed by fluorescently labeled secondary antibodies before confocal microscopy. (Scale bar: 10 μ m.)



sion of wild-type SOCS1, but neither its SH2 nor SOCS box mutant counterparts, resulted in a marked and dose-dependent increase in the level of intracellular Gag protein, particularly in the case of CA (p24) and intermediate cleavage products corresponding to MA-CA (p41) and CA-NC (p39). This increase was found to be accompanied by an enhanced level of HIV-1 particle production in the supernatant (Fig. 1 C and D Lower). These results together indicated that SOCS1 facilitates HIV-1 particle production in infected cells and that this role of SOCS1 requires the function of both its SH2 and SOCS box domains. For further details about SOCS1 interaction with MA and NC and SOCS1-enhanced particle production, see supporting information (SI) Text.

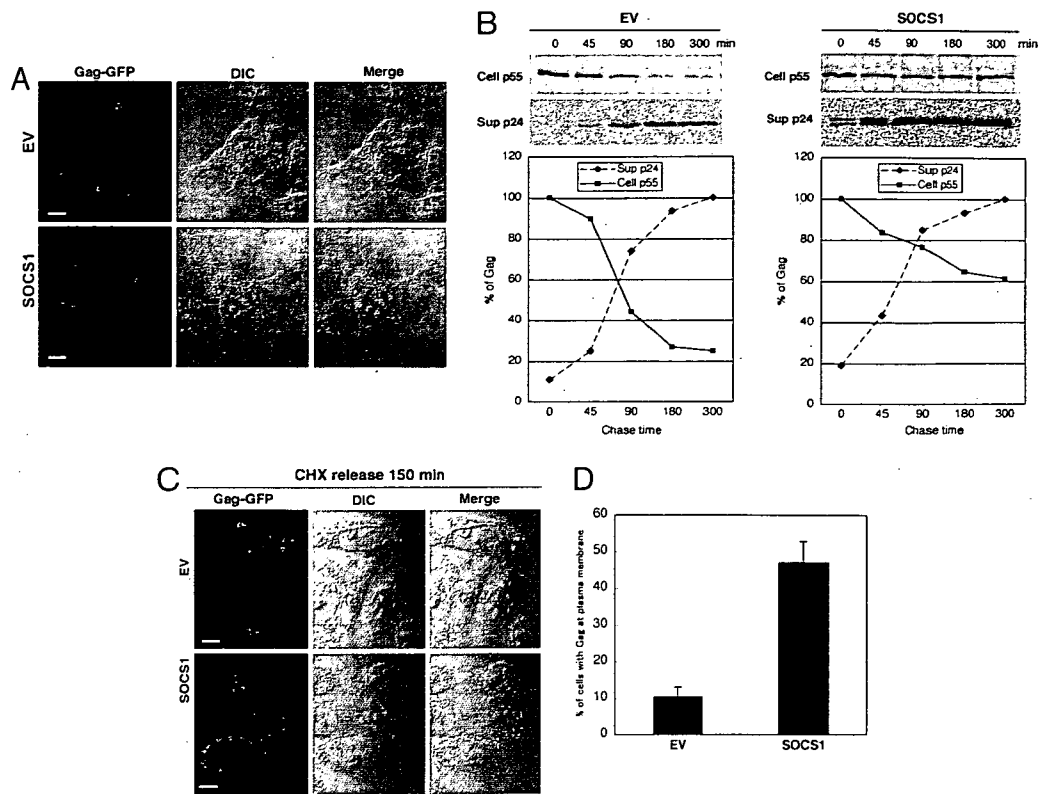
To examine the morphological aspects of HIV-1 particle production, transmission electron microscopy (TEM) was performed. 293T cells that had been cotransfected with pNL4-3, and either a control vector or a SOCS1 expression construct, were subjected to TEM analysis after fixation in glutaraldehyde. In SOCS1-transfected cells, a significantly increased number of mature virus particles was observed on the surfaces of PM compared with the control vector-transfected cells (Fig. 1E). There were also no obvious malformations of the virus particles in SOCS1-expressing cells, such as doublet formation or tethering to PM, which are characteristic of particle budding arrest (14) (Fig. 1E). Consistent with this observation, virions from SOCS1-transfected cells were found to be infectious as control viruses in Jurkat cells when the

same amounts of virus were infected (Fig. 1F). These results together indicate that SOCS1 enhances mature and infectious HIV-1 particle formation.

To elucidate the specific step in HIV-1 production that is enhanced by SOCS1, we next performed gene reporter assays using either luciferase expression constructs under the control of wild-type HIV-LTR (pLTR-luc), or a full-length provirus vector (pNL4-3-luc) (15). Interestingly, SOCS1 overexpression was found not to affect the transcription of these reporter constructs (data not shown), indicating that SOCS1 enhances HIV-1 replication via posttranscriptional mechanisms during virus production.

SOCS1 Interacts with the HIV-1 Gag Protein. The results of our initial experiments indicated that SOCS1 enhances HIV-1 production via a posttranscriptional mechanism. We therefore next tested whether SOCS1 could bind directly to HIV-1 Gag. GST pull-down analysis using C-terminal FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) and GST-fused SOCS1 revealed that p55 Gag undergoes specific coprecipitation with GST-SOCS1 (Fig. 2A). Furthermore, both ectopically expressed myc-tagged SOCS1 and endogenous SOCS1 were found to undergo coimmunoprecipitation with Gag-FLAG in 293T cells (Fig. 2B and C). Additionally, GST pull-down analysis with various SOCS1 mutants, as depicted in Fig. 2D, further demonstrated that a mutant lacking the both N-terminal and SH2 domain (Δ N-SH2) could not bind

Fig. 3. SOCS1 enhances both the stability and trafficking of HIV-1 Gag. (A) HeLa cells cotransfected with pNL4-3 and either control vector (EV) or SOCS1 were immunostained with antibodies targeting anti-p24 (CA). Confocal microscopy with differential interference contrast (DIC) was then performed. (Scale bars: 10 μ m.) (B) 293T cells were transfected with either a control empty vector (EV) (Left) or myc-SOCS1 (Right) and cotransfected with pNL4-3. After 48 h, cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine or [³⁵S]cysteine for 15 min and chased for the durations indicated. Cell lysates and pelleted supernatant virions were immunoprecipitated with anti-p24 antibodies followed by autoradiography. (C and D) HeLa cells seeded on poly-L-lysine-coated cover slides were transfected with either vector control or SOCS1. After 24 h, cells were again transfected with Gag-GFP for 3 h and then treated with 100 μ g/ml CHX for 5 h to inhibit protein synthesis. This treatment was followed by incubation with fresh medium; then 150 min after the CHX release, cells were fixed and subjected to confocal microscopy (C). (Scale bars: 10 μ m.) Cells with Gag protein on the plasma membrane were scored out of 200 transfected cells (D).



p55 Gag, whereas an N-terminal or a SOCS box deletion did not affect the binding of SOCS1 to Gag in 293T cells (Fig. 2E). This finding indicates that the SH2 domain is important for the interaction of SOCS1 with HIV-1 Gag. Interestingly, the R105E mutant of SOCS1, which disrupts the function of the SH2 domain, still binds Gag (Fig. 2E), indicating that the Gag-SOCS1 association is independent of the tyrosine phosphorylation of Gag, as is the case for both HPV-E7 and Vav (16, 17).

To elucidate the SOCS1-binding region of the Gag protein, GST pull-downs with various GST-fused Gag domain constructs were performed. SOCS1 was detected in glutathione bead precipitates with GST-wild-type Gag, GST- Δ p6, GST-MA, and GST-NC, but not with other domain constructs (Fig. 2F), indicating that SOCS1 interacts with Gag via its MA and NC domains. Consistent with these results, the deletion of both the MA and NC domains of p55 Gag (Δ MA Δ NC) completely abolishes its interaction with SOCS1 in coimmunoprecipitation experiments (Fig. 2G). Furthermore, *in vitro* analysis with purified proteins also demonstrated that SOCS1 can indeed interact with both the MA and NC regions of HIV-1 Gag in the absence of nucleic acids or other proteins (SI Fig. 5).

We next wished to determine the functional interaction domain in HIV-1 Gag through which SOCS1 functions in terms of virus-like particle production. To this end, we used a MA-deleted Gag mutant with an N-terminal myristoyl tag derived from src (Δ MA-src) (18) and also an NC-deleted Gag mutant with a GCN4 leucine zipper in place of NC, which we herein denote as Δ NC-LZ but which has been described as Z_{IL}-p6 (19). Both of these mutants have been shown still to assemble and bud (18, 19). We found that SOCS1 overexpression can still augment the particle formation of both wild-type Gag and Δ NC-LZ but not Δ MA-src (Fig. 2H), indicating that the functional interaction between SOCS1 and HIV-1 Gag is in fact mediated through MA.

To confirm further the direct interaction between SOCS1 and Gag in cells, we examined the intracellular localization of these two proteins. Confocal microscopy revealed that endogenous SOCS1

forms dotted filamentous structures in the cytoplasm and that Gag localizes in a very punctate pattern with SOCS1 from the perinuclear regions to the cell periphery (Fig. 2I). These data indicate that SOCS1 interacts with HIV-1 Gag in the cytoplasm during HIV-1 particle production.

SOCS1 Promotes both the Stability of Gag and Its Targeting to the Plasma Membrane. Because we had found from our initial data that SOCS1 increases HIV-1 particle production as a result of its direct interaction with intracellular Gag proteins, we next addressed whether SOCS1 positively regulates Gag stability and subsequent trafficking to PM. Our immunofluorescent analysis with the anti-p24 (CA) antibody initially revealed that SOCS1 overexpression increases the levels of Gag at PM when cotransfected with pNL4-3 at 48 h after transfection, although it was detected at PM in both control and SOCS1-expressing cells (Fig. 3A). Furthermore, the levels of cytoplasmic Gag were found to be much lower in the SOCS1-expressing cells compared with the control cells (Fig. 3A). These results indicate that SOCS1 enhances Gag trafficking to PM.

To examine next whether SOCS1 affects the stability and trafficking of newly synthesized Gag proteins, we performed pulse-chase analysis. This experiment revealed that SOCS1 significantly increases the stability of the intracellular p55 Gag polyprotein as well as the levels of p24 in the supernatant (Fig. 3B). Importantly, p24 was detectable at an earlier time point and reached maximum levels in a shorter period in the cell supernatant of SOCS1-transfected cells compared with control vector-transfected cells (Fig. 3B). This finding again suggests that SOCS1 facilitates the intracellular trafficking of newly synthesized Gag proteins to PM.

To confirm this hypothesis further, we performed cycloheximide (CHX) analysis with HeLa cells transfected with either vector control or SOCS1. After 24 h, cells were again transfected with Gag-GFP for 3 h and treated with CHX for 5 h to inhibit protein synthesis. Cells were then cultured in fresh medium without CHX for an additional 150 min and subjected to confocal microscopy. At