

図1 P18 特異的 CTL クローン (RT-1) の TCR 発現トランスジェニックマウス

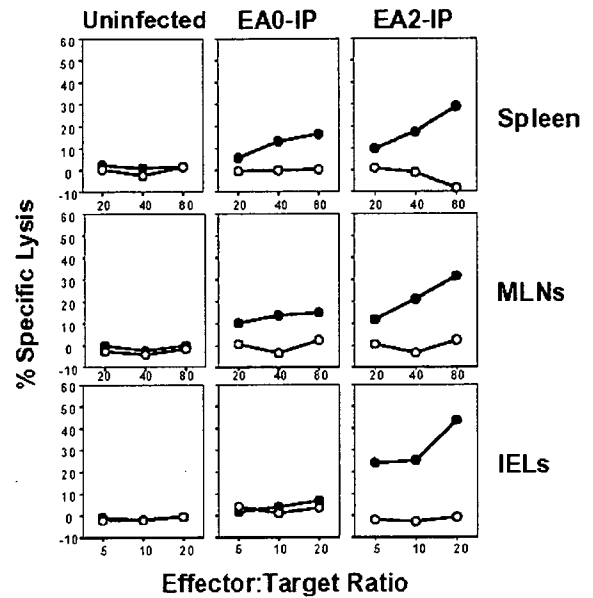
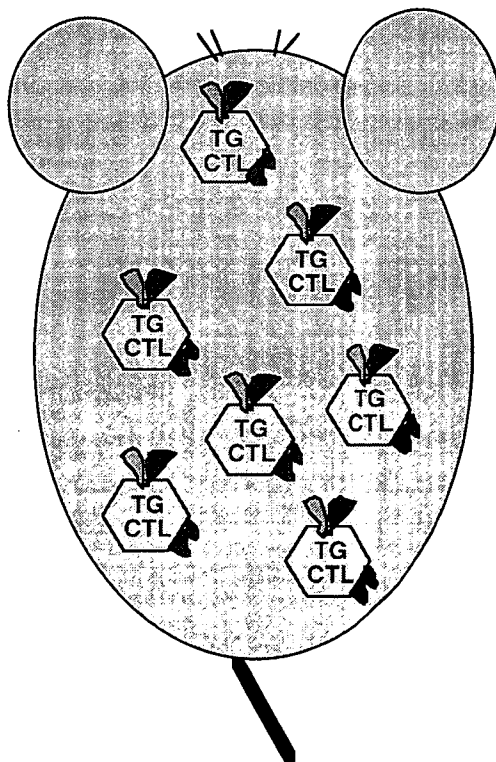


図2 rVV-EA2 発現ウイルスを制御する IEL 中の特異的 CTL

B. 研究方法

小腸粘膜 IEL 中に特異的 CTL を効率よく誘導するための方策を検討する目的で、当初 HIV-1-gp120 蛋白をコレラトキシン (CT) と共に経口投与し、P18 特異的な CTL が IEL 中に誘導されるための要件を探ったが、この HIV-1-gp120 蛋白自体が非常に高価であり、且つ大量の入手が困難であったことより、安価で特異的 CTL の誘導が可能であること、ならびにその認識エピープのアミノ酸配列 (SIINFEKL) およびクラス I MHC (Kb) 拘束性が判明している OVA を用いて、CT を利用した経口免疫法による IEL 中の CTL 誘導状況を H-2Kb/OVA-tetramer を用い Flow cytometry によって追跡すると同時に、その細胞傷害活性を同系腫瘍である (E. G7-OVA) ならびに SIINFEKL ペプチドをパルスした EL4 細胞を標的とし Chromium-51 release 法で測定した。

この際、コントロールアジュバントとしてコレラトキシンのサブユニットである A-サブユニット (CTA) と B-サブユニット (CTB) を用いるとともに、誘導された OVA 特異的 CTL の個体内における機能を確認する目的で、OVA 特異的 CTL によって傷害される腫瘍細胞 (E. G7) を同系の C57BL/6 マウスに接種し、その増殖抑制効果を経時的に追跡した。

C. 研究結果

1) 100 mg の OVA を 10 μg の コレラトキシン(CT) とともに C57BL/6 マウスに経口投与したところ、H-2Kb/OVA-tetramer 陽性の細胞群が、投与後 7 日目あたりをピークとして IEL 中に出現した(図 3)。この際、脾臓内にはほとんど tetramer 陽性細胞は検出されなかった。また、この tetramer 陽性細胞は、CD8 α β を発現し、同系の E. G7-OVA ならびに SIINFEKL ペプチドをパルスした EL4 細胞を特異的に傷害した。

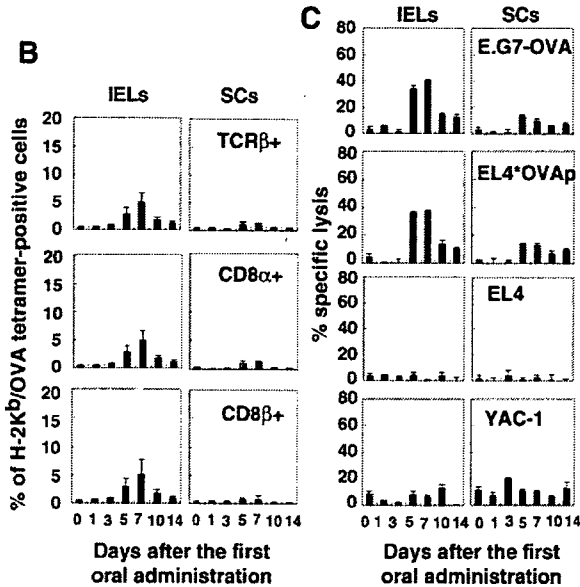


図 3 OVA+CT の経口投与による IEL 中 tetramer 陽性活性化 CTL の誘導

2) 経口投与によりほとんど活性が認められなかった脾臓由来の CD8 α β 細胞は、in vitro で の再刺激により標的細胞に対する特異的な傷害活性を示した(図 4)。

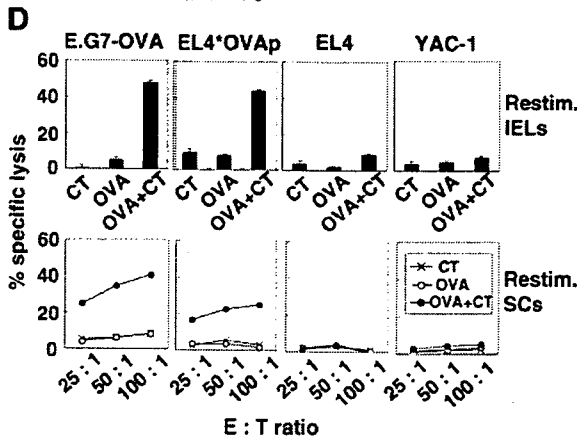


図 4 再刺激により活性化する CTL の特性

3) OVA による tetramer 陽性で特異的細胞傷害性を有する細胞群は、CT の亜分画である A-subunit(CTA)あるいは B-subunit(CTB)では全く誘導されなかった(図 5)。

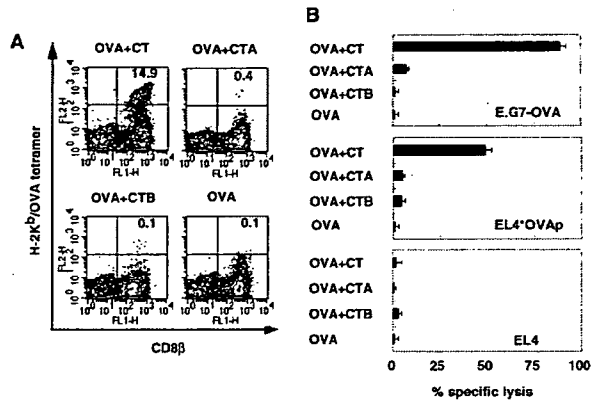


図 5 OVA+CT, CTA, CTB の経口投与による tetramer 陽性活性化 CTL 誘導の比較

4) こうした IEL 内 CTL の個体内における作用を検討するため、胃粘膜に OVA エピトープを発現した同系腫瘍である E. G7-OVA を接種し、3 日目にその生着を確認した後、CT と OVA を経口投与したところ、腫瘍の発育が強く抑制された(図 6)。また驚くべき事に、E. G7-OVA を皮内に接種した場合にも、同様の経口投与により顕著な腫瘍抑制効果が観察された。

なお、このような皮膚・粘膜における腫瘍抑制効果は、OVA 抗原を CT とともに経口投与した場合に最も顕著に認められ、腹腔内投与(i.p.)あるいは皮下投与(s.c.)投与ではほとんど認められなかった。

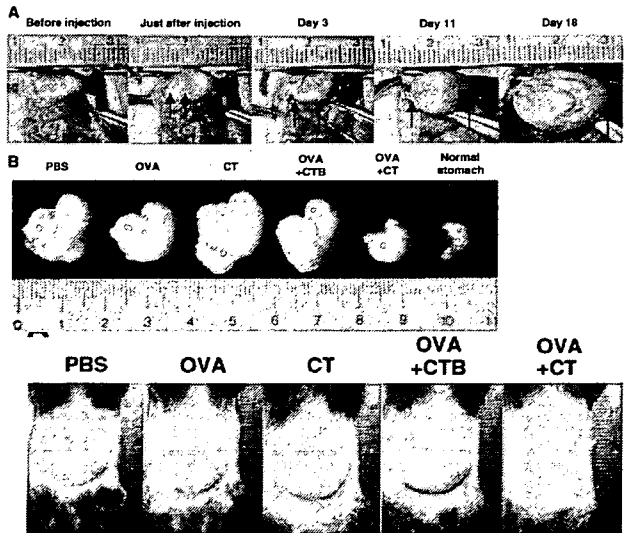


図 6 OVA+CT, CTA, CTB の経口投与による胃粘膜及び皮内接種腫瘍増殖抑制作用の比較

D. 考察

抗体を持たず CTL のみを有するマウスを作成しウイルスを接種し検討を重ねた結果、マウス小腸粘膜内の上皮内リンパ球 (IEL) 中における特異的な CTL が、最も強く且つ特異的な抗ウイルス作用を示すことを確認した。こうした IEL 内の CTL を効率よく誘導する方策を検討する目的で、OVA とコレラトキシン(CT)を経口投与し小腸粘膜内の IEL ならびに脾臓細胞中の CTL 誘導状況を及び細胞傷害活性を同系腫瘍を標的として測定したその結果、強い細胞傷害能を有する CD8 α β 陽性の CTL が粘膜内 IEL 中に誘導されることを見出した。この活性化は CT のサブユニットである A-サブユニット(CTA)と B-サブユニット(CTB)との併用では誘導されなかった。これら IEL 内 CTL の個体内における作用を検討するため、胃粘膜に OVA エピトープを発現した同系腫瘍 E.G7-OVA を接種した後、CT と OVA を経口投与したところ、腫瘍の発育が強く抑制された。またこの E.G7-OVA を皮内に接種した場合にも、同様の CT と OVA の経口投与により明白な腫瘍抑制効果を確認した。このような皮膚・粘膜における腫瘍抑制効果は、OVA 抗原を CT とともに経口投与した場合に最も顕著に認められ、腹腔内投与 (i.p.) あるいは皮下投与 (s.c.) 投与ではほとんど認められなかった。以上の結果は、従来のように脾臓や血液中の CTL を活性化するのではなく、適切な粘膜免疫賦活剤を抗原とともに経口投与することによって、粘膜 IEL 内の特異的 CTL の活性化することが、体表面からのウイルス侵入に対する防御網を構築する上で重要であることを示唆している。

E. 結論

真の感染防御免疫や抗腫瘍免疫を誘発するためには、従来のように脾臓や血液中の CTL を活性化するのではなく、適切な粘膜免疫賦活剤を抗原とともに経口投与することによって、粘膜 IEL 内の特異的 CTL の活性化することが、粘膜や皮膚を介したウイルス侵入に対する防御網を構築する上で非常に重要と考えられる。

F. 論文発表

1. Watanabe Y., Watari E., Matsunaga I., Hiromatsu K., Dascher C.D., Kawashima T., Norose Y., Simizu K., Takahashi, H., Yano I., Sugita M.: BCG vaccine elicits both T-cell

mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine*, 24: 5700-5707, 2007.

2. Nakagawa Y., Kikuchi H., Takahashi H. Molecular analysis of TCR and peptide/MHC interaction using P18-I10-derived peptides with a single D-amino acid substitution. *Biophysical J.*, 92: 2570-2582, 2007.

3. Takahashi M., Watari E., Shinya E., Shimizu T., Takahashi H. Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells. *Antiviral Res.*, 75: 152-158, 2007.

4. Wakabayashi A., Nakagawa Y., Shimizu M., Moriya K., Nishiyama Y., Takahashi H. Suppression of Already Established Tumor Growing through Activated Mucosal CTLs Induced by Oral Administration of Tumor Antigen with Cholera Toxin. *J. Immunol.*, 2007 (in press).

5. Fukazawa Y., Miyake A., Ibuki K., Inaba K., Saito N., Motohara M., Horiuchi R., Himeno A., Matsuda K., Matsuyama M., Takahashi H., Hayami M., Miura T. The small intestine is the most vulnerable target tissue regardless of virus pathogenicity in SHIV-infected rhesus macaques. *J. Virol.*, 2007 (submitted).

6. Saito N., Shinya E., Shimizu M., Owaki A., Watanabe E., Takahashi M., Hidaka C., Ibuki K., Miura T., Hayami M., Takahashi H. Invariant T-cell receptor mediated functional cross-reactivity of natural killer T cells to species-specific CD1d among primates and rodents. *J. Immunol.*, 2007 (submitted).

7. Inaba K., Fukazawa Y., Horiuchi R., Matsuda K., Himeno A., Matsuyama M., Ibuki K., Nakajima N., Sata T., Miura Y., Koya oyanagi Y., Nakajima A., Blumberg R., Takahashi H., Hayami M., Miura T. CD4+ cell reduction and enteropathy in small intestine can occur irrespective of viral load in SHIV-infection. *Virol.*, 2007 (submitted).

8. 山西慎吾、神谷茂、高橋秀実：ピロリ菌ウレアゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性. *日本ヘリコバクター学会誌*, 8:22-26, 2007.

9. 高橋秀実：母乳を介したエイズウイルスの感

染伝播. 日本エイズ学会誌, 9:11-16, 2007.

10. 林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実: ブラック微生物学 (第2版). 丸善出版, 2007.

11. 高橋秀実: 第5回日本中医学交流会大会: 感染症に対する温病治療-SARS は攻略できるか. 中医臨床, 28:374-379, 2007.

12. 高橋秀実: ワクチンによる特異的免疫機能の誘導: ヒトにおける抗原特異的免疫機構. 治療学, 41:1041-1045, 2007.

13. 高橋秀実: γ δ T細胞とリウマチ様関節炎. リウマチ科, 38:565-570, 2007.

14. 新谷英滋、高橋秀実: 樹状細胞の機能と HIV-1 Nef. 臨床免疫・アレルギー科, 48:623-629, 2007.

15. 高橋秀実: 免疫応答とエネルギーのめぐり. 癒しの環境, 13巻, 2008 (印刷中).

16. 若林あや子、高橋秀実: 感染症と栄養・機能性食品. 日本栄養学会雑誌, 2008 (印刷中).

17. 高橋めぐみ、高橋秀実: 遊離抗原による CD8+T 細胞のアポトーシス誘導. 臨床免疫・アレルギー科, 2008 (印刷中).

18. 高橋秀実: HIV に対する防御: 細胞性免疫の役割. 治療学, 2008 (印刷中).

19. 高橋秀実: HIV 感染伝播における母乳中細胞の役割. 血液フロンティア, 2008 (印刷中).

G. 学会発表

1. 山西慎吾、神谷茂、高橋秀実: ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性.

第13回日本ヘリコバクター学会
2007年6月22-23 (神戸).

2. 廣田薫、高久俊、日高千鶴乃、古賀実芳、平馬直樹、高橋秀実: 高 CPK 血症を伴い温裏剤と桃核承気湯の併用により著明な改善を示した冷え性の1例.

第58回日本東洋医学会学術総会
2007年6月15-17日 (広島).

3. 高橋秀実、廣田薫、日高千鶴乃、高久俊、真弓暢子、古賀実芳、平馬直樹: アレルギー疾患に関する解表剤の有効性.

第58回日本東洋医学会学術総会
2007年6月15-17日 (広島).

4. 日高千鶴乃、廣田薫、高久俊、古賀実芳、平

馬直樹、高橋秀実: 未治療の多発性硬化症に対する湯液治療の1例.

第58回日本東洋医学会学術総会
2007年6月15-17日 (広島).

5. 高橋秀実: 免疫学的な視点から見た SARS に対する温病的治療の意義.

第5回日本中医学交流会大会
2007年8月5日 (東京).

6. 高橋秀実: 温病における舌診の意義.

第5回日本中医学交流会大会
2007年8月5日 (東京).

7. Takahashi, H.: Cellular HIV dissemination and expansion at the mucosal compartment. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 20th Joint Scientific Meeting of AIDS Panels.

September 13-14, 2007 (Monterey).

8. 高橋めぐみ、渡理英二、清水真澄、新谷英滋、高橋秀実: 麻疹ウイルス変異株の持続感染に關与する宿主因子・その3.

第55回日本ウイルス学会学術集会.
2007年10月21-23日 (札幌).

9. 渡理英二、高橋めぐみ、渡辺恵里、大脇敦子、新谷英滋、高橋秀実: 樹状細胞およびランゲルハンス細胞サブセットの麻疹ウイルスの感受性とサイトカイン産生能.

第55回日本ウイルス学会学術集会.
2007年10月21-23日 (札幌).

10. 高橋秀実: HIV 感染と免疫応答.

第21回日本エイズ学会学術集会
2007年11月28-30日 (広島).

11. 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡邊恵理、高久千鶴乃、高橋秀実: Analysis of the down-regulation of CD1-mediated lipid /glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第21回日本エイズ学会学術集会
2007年11月28-30日 (広島).

12. 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、高久俊、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実: CD4 陽性 NKT 細胞と HIV-1 による感染拡大への相互作用.

第21回日本エイズ学会学術集会
2007年11月28-30日 (広島).

13. 松村次郎、清水真澄、高久千鶴乃、近江恭子、吉田岳市、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実: HIV 患者の腸管粘膜組織における感染細胞の探索.

第21回日本エイズ学会学術集会

2007年11月28-30日(広島)。

14. Higuchi T., Takahashi M., Kobayashi F., Inagaki S., Nakagawa Y., Kumagai Y., Takahashi H.: Study on a possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

15. Takeuchi H., Shimizu M., Mayumi N., Norose Y., Takahashi H.: Characterization of virus-producing breast milk monocytes transformed with HTLV-1.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

16. Kumagai Y., Takahashi H.: Analysis of the interaction between HIV-1-gp120 V3 region and β -chemokine receptor by using multivalent V3 epitopes grafted at the immunoglobulin hyper-variable regions.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

17. Shinya E., Owaki A., Shimizu M., Watanabe E., Matsumura J., Negishi Y., Takaku C., Takahashi H.: Down-regulation of CD1 lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

18. Takahashi H., Saito N., Shimizu M., Owaki A., Watanabe E., Takahashi M., Ohmi K., Takaku C., Shinya E.: Cross-reactive cytotoxicity of CD1d-NKT cell system between primates and rodents.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

19. Moriya K., Wakabayashi A., Shimizu M., Watanabe E., Takaku S., Dan K., Takahashi H.: Effects of 33D1+ or DEC-205+ dendritic cell depletion on cytokine secretion and tumor growing in mice.

第37回日本免疫学会総会
2007年11月20-22日(東京)。

20. 高橋秀実: 自然免疫システムと疾病: 慢性関節リウマチに対する新たなアプローチ。

第7回小児アレルギー免疫研究会
2008年2月16日(東京)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在 Enoyl-CoA hydratase を特異的に阻害する ssRNA の特許出願準備中(文献3参照)。

サル動物モデルを用いたマルチエピトープ発現 rDIs の抗 HIV 抗体価の検討

分担研究者 網 康至 国立感染症研究所 主任研究官

これまでの研究で、安全性が極めて高いワクシニアウイルスDIs(DIs)をワクチンベクターに用いて、HIVGagを発現する組換えワクシニアウイルスDIsを構築し、サルエイズモデルにおいて持続感染期の血中ウイルス量を抑制することを証明してきた。今回の研究では、DIsに2つ以上の構造遺伝子を同時に発現させるマルチエピトープワクチン発現rDIsを構築し、HIVワクチン実用化研究を計画した。発現させる遺伝子には、細胞障害活性誘導を目的とするSIVGagと中和活性誘導を目的とする改変型HIVEnvを用いてマルチエピトープ発現rDIsを構築し、ワクチンとしての効果判定をSHIVサル感染モデルで評価することを目的とする。本年度は、まずマルチエピトープワクチン発現rDIsを作製し、サル動物モデルにおいて抗HIVEnv抗体価を解析した。その結果、2回目の免疫後に抗HIV Env抗体価の上昇が認められた。

協力研究者：山本直樹 国立感染症研究所
：岡村智崇 国立感染症研究所

A. 研究目的

これまでの HIV ワクチン研究では、HIV 特異的細胞性免疫、特にウイルス感染細胞を排除する細胞障害性 T 細胞およびヘルパー T 細胞の誘導を目的としていた。しかし近年、細胞性免疫だけでなく、様々な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体の誘導が必要であると考えられる。

最新の報告で、ヒト型に至適化した HIV 構造遺伝子を発現する DNA ワクチンとアデノウイルスベクターのコンビネーションワクチンが、サル接種時に中和抗体および細胞性免疫を効率的に誘導することが報告されている。しかし、DNA ワクチンの免疫原性の不十分なことや、アデノウ

イルスの毒性が問題視されている。また多くのヒトが、1度はアデノウイルスに感染していることから、抗アデノウイルス抗体を保持していることが示唆され、この抗体がベクターの排除に働き、アデノウイルスベクターが有効な免疫原にはならないとも考えられている。

DIsは、安全かつ安価で実用化の可能性が最も高いワクチンベクターとして考えられている。またワクシニアの特徴として、2つ以上の遺伝子を同時に発現させることが可能という利点も持っている。そこで今回の研究では、HIV改変型遺伝子およびSIV改変型遺伝子の両方を発現するマルチエピトープ発現rDIsを作製し、サル動物モデルにおいて免疫誘導能を解析する。最終的にはSHIVの攻撃接種による実用化研究を行う。

B. 研究方法

1 免疫原であるマルチエピトープ rDIs の構築を行った。抗原には、米国立衛生研究所にて作製され分与を受けた HIV 改変型遺伝子を gp145 Δ CFI、gp140V1V2 Δ CFI および SIVGag-opt を用いた。今回の報告書では、gp140 Δ V1V2 Δ CFI を gp140 と gp145 Δ CFI を gp145 に、SIVGag-opt を SIVgag と表記する。発現ベクターには DIs を用いて、gp140V1V2 Δ CFI および SIVGag-opt を同時に発現するマルチエピトープ rDIs(rDIs/gp140-SIVgag)を作製した。また gp145 および SIVgag をそれぞれ単独で発現する rDIs(rDIs/gp145 および rDIs/SIVgag)も作製した。発現の確認には、HIVEnv ポリクローナル抗体と SIVGag 抗体をそれぞれ用いて Western blotting 法を行い、全て発現を確認した。

2 マルチエピトープ rDIs の免疫応答を解析するため、サル動物モデルを用いて抹消血における細胞性免疫、抗体価および中和能を経時的に解析を行い、マルチエピトープ rDIs の免疫原性を明らかにする。

免疫グループは3つに分け、免疫サルの内訳は、rDIs/gp140-SIVgag を3頭、rDIs/gp145 および rDIs/SIVgag を3頭、コントロールとして2頭に何も発現しない rDisgpt を接種した。投与量は、 2×10^7 PFU/monkey で3回接種し、投与間隔を9週間とした。免疫誘導能が十分であるかどうか IFN- γ ELISPOT 法、ELISA 抗体価および中和抗体価で検討する。

(倫理面への配慮)

本研究所では霊長類委員会によってサルを用いた実験の妥当性の検討とサルの適切な飼育と使用の監視がなされている。また、rDIs 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防

止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

今回の研究では、マルチエピトープ rDIs の構築およびサル動物モデルにおける免疫誘導能について、特に抗体価の推移について検討した。

構築した3種の rDIs は、Western blotting 法によって発現が確認された。また *in vitro* の解析で、これらの rDIs は CEF 細胞でのみ複製し、哺乳類細胞での複製は確認されなかった。

構築した rDIs/gp140-SIVgag および rDIs/gp145、rDIs/SIVgag を免疫したサルは、抗体誘導能に差が確認されるものの、2回目の免疫後に抗 HIV Env 抗体価の上昇が認められた。今後は、この抗体の中和活性を検討する予定である。

D. 考察

これまでの HIV 中和抗体の研究で、チンパンジーやサルによる感染実験において、中和抗体の投与により SIV 攻撃接種に対し完全阻止できる報告がなされていた。中和抗体の誘導は、HIV 感染症のワクチンとして非常に注目を集めている。これまでのワクチンベクターを用いた HIV ワクチンでは、有効な中和抗体を誘導することが困難であることから、ワクチン投与量を大幅に増やすなど試行錯誤がとられてきた。しかし投与量の増加に伴い、ワクチンベクターの副作用の危険があるなど開発には難しい。今回使用したワクシニアウイルス DIs は、過去に痘瘡ワクチンとしてヒトに接種された経験があり、とても安全性が高い。

rDIs/gp140-SIVgag 免疫群と rDIs/gp145、rDIs/SIVgag 免疫群において、抗体に差が認められている。しかしながら、どちらの免疫サルも抗体価の上昇が確認されたことから、今後はこれらの抗体の中和活性を解析し、有効な抗体を誘導で

きたかを検証していく予定である。また細胞性免疫の解析も合わせて検討する。

immunodeficiency virus in monkeys. *Virology*. 2007 ;367(2):390-7.

E. 結論

マルチエピトープワクチン発現 rDIs を作製し、サル動物モデルにおいて抗 HIV Env 抗体価の上昇を確認した。今後は、誘導した抗体を解析していく予定である。

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 健康危険情報

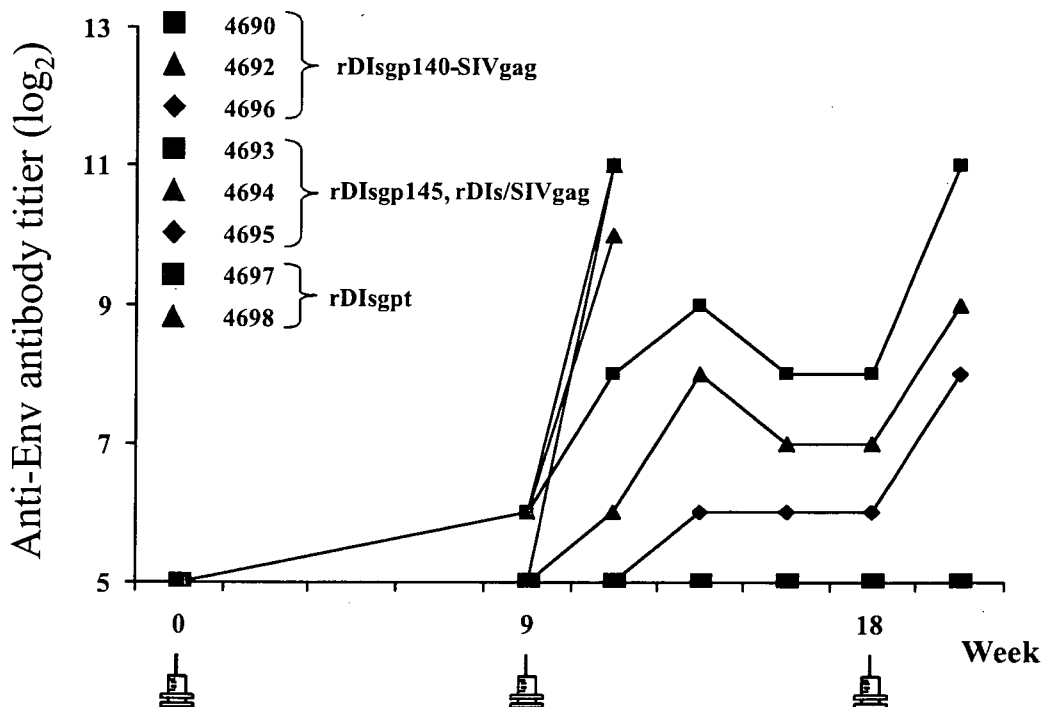
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K. Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human

マルチエピトープ rDIs ワクチン免疫サルの抗 HIV Env 抗体価



III. 業績一覽 (2007)

研究成果の刊行に関する一覧表

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
<u>Yasutomi Y.</u>	Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration.	Holland CR.	Structure-based viral replication.	World Scientific Publishing.	New Jersey	2007	in press
高橋秀実	特異免疫およびその賦活法に関する基本原理	林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実	ブラック微生物学	丸善出版	東京	2007	495-533

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
山本 直樹					
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, <u>Yamamoto N.</u>	SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.	PNAS	151	294-9.	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.	J Virol	81	13259-64.	2007
Tsurutani N, Yasuda J, <u>Yamamoto N.</u> , Choi BI, Kadoki M, Iwakura Y.	Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells.	J Virol.	81	677-88.	2007
Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, <u>Yamamoto N.</u>	Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1	J Gen Virol.	88	3139-44.	2007

	infection and its abrogation in CD4-dependent infection.				
Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, <u>Yamamoto N</u> , Honda M, Okuda K.	Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys.	Virology	367	390-7.	2007
Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, <u>Yamamoto N</u> , Ansari AA, Tanaka Y.	Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells.	Hum Immunol.	68	563-71.	2007
Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, <u>Yamamoto N</u> , Komano J.	Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex.	AIDS.	21	575-82.	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 γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses.	Blood	109	212-8.	2007
俣野 哲朗					
Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, <u>Matano T</u> .	Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope	AIDS		in press	2008
Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, <u>Matano T</u> .	Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences.	Microbes Infect		in press	2007
Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, <u>Matano T</u> .	Induction of CD8 ⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques.	J Virol.	81	11640-9	2007
Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, <u>Matano T</u> .	Post-infection immunodeficiency virus control by neutralizing antibodies.	PLoS ONE	2	e540	2007
Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, <u>Matano T</u> .	Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4 ⁺ T-cell preservation after non-sterile	J Virol	81	5202-11	2007

	protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine.				
Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, <u>Matano T</u> .	Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques.	J Gen Virol	88	652-9	2007
Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, <u>Matano T</u> , Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A.	Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) – based typing of multiple alleles in the rhesus macaques MHC class I Mamu-A and I Mamu-B loci.	Electrophoresis	28	918-24	2007
志田 壽利					
Takayanagi R, Ohashi T, Yamashita E, Kurosaki Y, Tanaka K, Hakata Y, Komoda Y, Ikeda S, Tsunetsugu-Yokota Y, Tanaka Y, <u>Shida H</u> .	Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner.	J Virol.	81	5908-18	2007
Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, <u>Shida H</u> , Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M.	SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus.	Vaccine	25	630-7	2007
庄司 省三					
Takahashi Y, Misumi S, Muneoka A, Masuyama M, Tokado H, Fukuzaki K, Takamune N, <u>Shoji S</u> .	Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: An effective poliovirus entry site.	Biochem Biophys Res Commun		in press	2007
Endo M, Inatsu A, Hashimoto K, Takamune N, <u>Shoji S</u> , Misumi S.	Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human breast cancer cells via CXCR4 is mediated by the viral envelope protein but not require CD4.	Current HIV research.		in press	2007
Takamune N, Gota K, Misumi S, Tanaka K, Okinaka S, <u>Shoji S</u> .	HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes.	Microbes and Infection		in press	2007
Misumi S, Takamune N, <u>Shoji S</u> .	Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection.	Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets	7	141-52	2007

玉村 啓和					
Kasiyanov A, Fujii N, <u>Tamamura H</u> , Xiong H.	Modulation of network-driven, GABA-mediated giant depolarizing potentials by SDF-1 in developing hippocampus.	Developmental Neuroscience		in press	2007
Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y.	CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells.	Am J Pathol	171	1249-57	2007
Tsutsumi H, Tanaka T, Ohashi N, Masuno H, <u>Tamamura H</u> , Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Oishi S, Fujii N.	The therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multi-functional agents.	Biopolymers: Peptide Science	88	279-89	2007
Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, <u>Tamamura H</u> , Bachelerie F, Heveker N.	Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and galphai activation.	J. Biol. Chem.	282	5111-5	2007
<u>Tamamura H</u> , Tanaka T, Tsutsumi H, Nemoto K, Mizokami S, Ohashi N, Oishi S, Fujii N.	Versatile use of acid-catalyzed ring-opening of β -aziridinyl- α,β -enoates to stereoselective synthesis of peptidomimetics.	Tetrahedron	63	9243-54	2007
Ueda S, Oishi S, Wang Z, Araki T, <u>Tamamura H</u> , Cluzeau J, Ohno H, Kusano S, Nakashima H, Trent JO, Peiper SC, Fujii N.	Structure-activity relationships of cyclic peptide-based chemokine receptor CXCR4 antagonists: Disclosing the importance of side-chain and backbone functionalities.	J. Med. Chem.	50	192-8	2007
Kubonishi S, Kikuchi T, Yamaguchi S, <u>Tamamura H</u> , Fujii N, Watanabe T, Arenzana-Seisdedos F, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M, Katayama Y.	Rapid hematopoietic progenitor mobilization by sulfated colominic acid.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	355	970-5	2007
Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, <u>Tamamura H</u> , Fujii N, Tokura Y.	CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	361	1012-6	2007
<u>Tamamura H</u> , Tsutsumi H, Masuno H, Fujii N.	Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide-scaffolds towards the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis.	Curr. Med. Chem.	14	93-102	2007
Tsutsumi H, <u>Tamamura H</u> , Fujii N.	Inhibitors of the chemokine receptor CXCR4. Chemotherapy of AIDS, metastatic cancer, leukemia and	Lett. Drug Design Discovery	4	20-6	2007

	rheumatoid arthritis.				
森 一泰					
Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, <u>Mori K.</u>	Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239 Induction of Rapid V1V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant.	J. Gen. Virol.		in press	2007
Onlamoon N, Rogers K, Mayne AE, Pattanapanyasat K, <u>Mori K.</u> , Villinger F, Ansari AA.	Soluble PD-1 rescues the proliferative response of SIV specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection.	J. Immunol.		in press	2007
Pereira LE, Villinger F, Onlamoon N, Bryan P, Cardona A, Pattanapanyasat K, Mori K, Hagen S, Picker L, Ansari AA.	SIV infection influences the level and function of Tregs in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys.	J. Virol	81	4445-56	2007
Ansari AA, Pereira LE, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F.	The role of disease stage, plasma viral load and regulatory T cells (Tregs) on autoantibody production in SIV-infected non-human primates.	J Autoimmun.	28	152-9	2007
Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, <u>Mori K.</u> , Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A.	Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci.	Electrophoresis	28	918-24	2007
三浦 智行					
Akiyama H, Ishimatsu M, <u>Miura T.</u> , Hayami M, Ido E.	Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells.	Microbes Infect.		in press	2008
Ishimatsu M, Suzuki H, Akiyama H, <u>Miura T.</u> , Hayami M, Ido E.	Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors.	Microbes Infect.	9	475-82	2007
Shimizu Y, Inaba K, Kaneyasu K, Ibuki K, Himeno A, Okoba M, Goto Y, Hayami M, <u>Miura T.</u> , Haga T.	A genetically engineered live-attenuated simian-human immunodeficiency virus that co-expresses the RANTES gene improves the magnitude	Virology	361	68-79	2007

	of cellular immunity in rhesus macaques.				
Kuwata T, Kodama M, Sato A, Suzuki H, Miyazaki Y, <u>Miura T</u> , Hayami M.	Contribution of monocytes to viral replication in macaques during acute infection with simian immunodeficiency virus.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	23	372-80	2007
保富 康宏					
Okabayashi S, Ohno C, Kato M, Nakayama H, <u>Yasutomi Y</u> .	Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>).	Vet. Path		in press	2007
Nishikubo K, Imanaka-Yoshida K, Tamaki S, Hiroe M, Yoshida T, Adachi Y, <u>Yasutomi Y</u> .	Establishment of a novel animal model of myocarditis by utilizing different immune responses to Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in mice.	J.Autoimmun	29	146-53	2007
Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, <u>Yasutomi Y</u> , Nagai Y, Kimura A.	Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci.	Electrophoresis	28	918-24	2007
高橋 秀実					
Wakabayashi A, Nakagawa Y, Shimizu M, Moriya K, Nishiyama Y, <u>Takahashi H</u> .	Suppression of Already Established Tumor Growing through Activated Mucosal CTLs Induced by Oral Administration of Tumor Antigen with Cholera Toxin.	J. Immunol.		in press	2008
Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, Hiromatsu K, Dascher C D, Kawashima T, Norose Y, Simizu K, <u>Takahashi H</u> , Yano I, Sugita M.	BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components.	Vaccine	24	5700-7	2007
Takahashi M, Watari E, Shinya E, Shimizu T, <u>Takahashi H</u> .	Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells.	Antiviral Res	75	152-8	2007
Nakagawa Y, Kikuchi H, <u>Takahashi H</u> .	Molecular analysis of TCR and peptide/MHC interaction using P18-110-derived peptides with a single D-amino acid substitution.	Biophys J	92	257-82	2007
高橋秀実					
若林あや子, <u>高橋秀実</u>	ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性.	日本栄養学会誌		印刷中	2008
高橋めぐみ, <u>高橋秀実</u>					
	遊離抗原による CD8+T 細胞	臨床免		印刷中	2008

	のアポトーシス誘導.	疫・アレルギー科			
高橋秀実	HIV に対する防御：細胞性免疫の役割.	治療学		印刷中	2008
高橋秀実	HIV 感染伝播における母乳中細胞の役割.	血液フロンティア		印刷中	2008
山西慎吾、神谷茂、高橋秀実	ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性.	日本ヘリコバクター学会誌	8	22-6	2007
高橋秀実	母乳を介したエイズウイルスの感染伝播	日本エイズ学会誌	9	11-6	2007
高橋秀実	第 5 回日本中医学交流会大会：感染症に対する温病治療-SARS は攻略できるか.	中医臨床	28	374-9	2007
高橋秀実	ワクチンによる特異的免疫機能の誘導：ヒトにおける抗原特異的免疫機構.	治療学	41	1041-5	2007
高橋秀実	$\gamma \delta$ T 細胞とリウマチ様関節炎.	リウマチ科	38	565-70	2007
網 康至					
Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K.	Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys.	Virology	367	390-7	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^a, 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-38 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

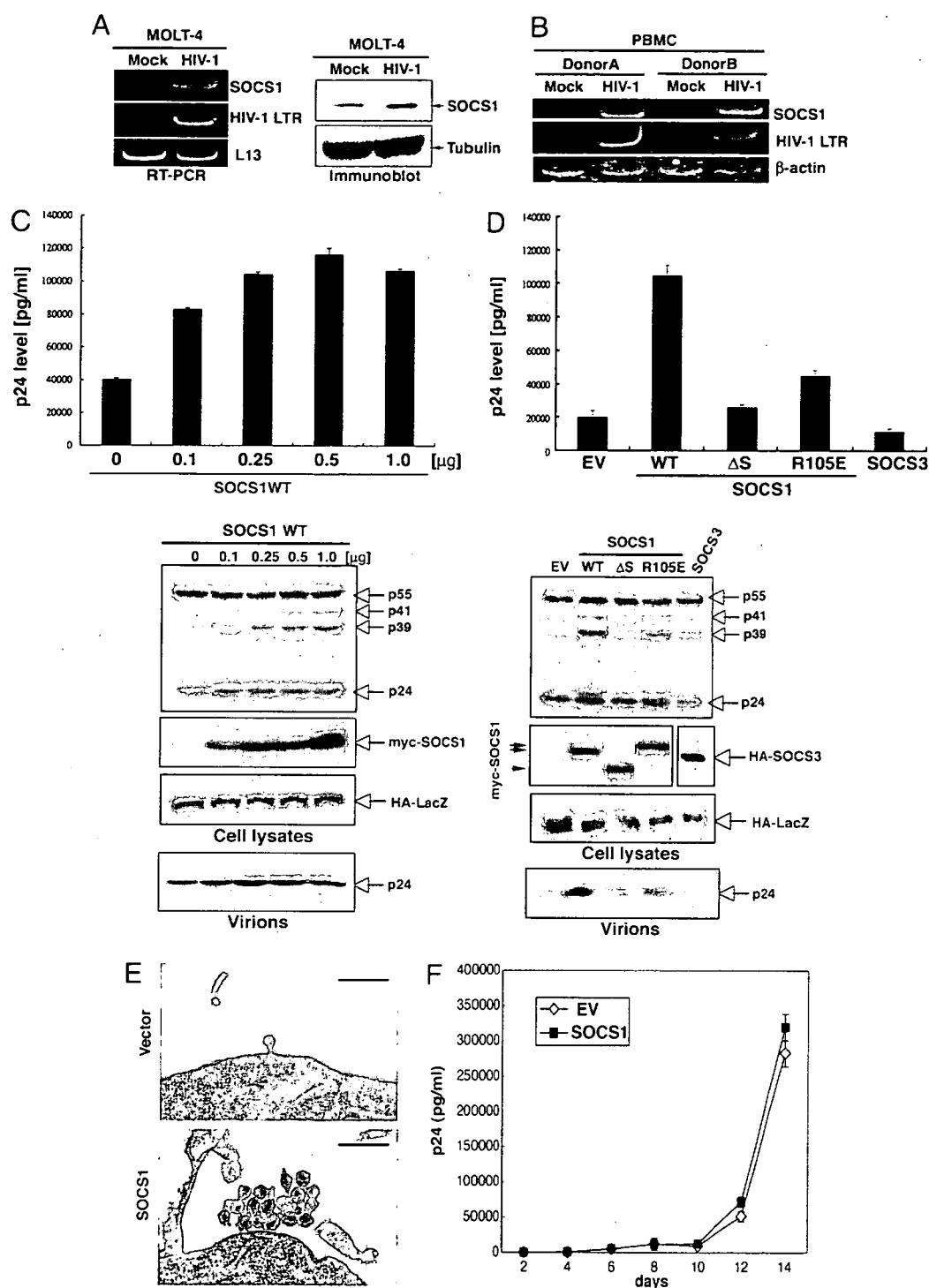


Fig. 1. SOCS1 is induced upon HIV-1 infection and enhances HIV-1 particle production. (A) MOLT-4 cells were mock-infected or infected with HIV-1_{NL4-3}, and then total RNA and protein extracts derived from these cells were subjected to semiquantitative RT-PCR (Left) and immunoblotting (Right), respectively. (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 (Left) and immunoblotting (Right), respectively. (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.

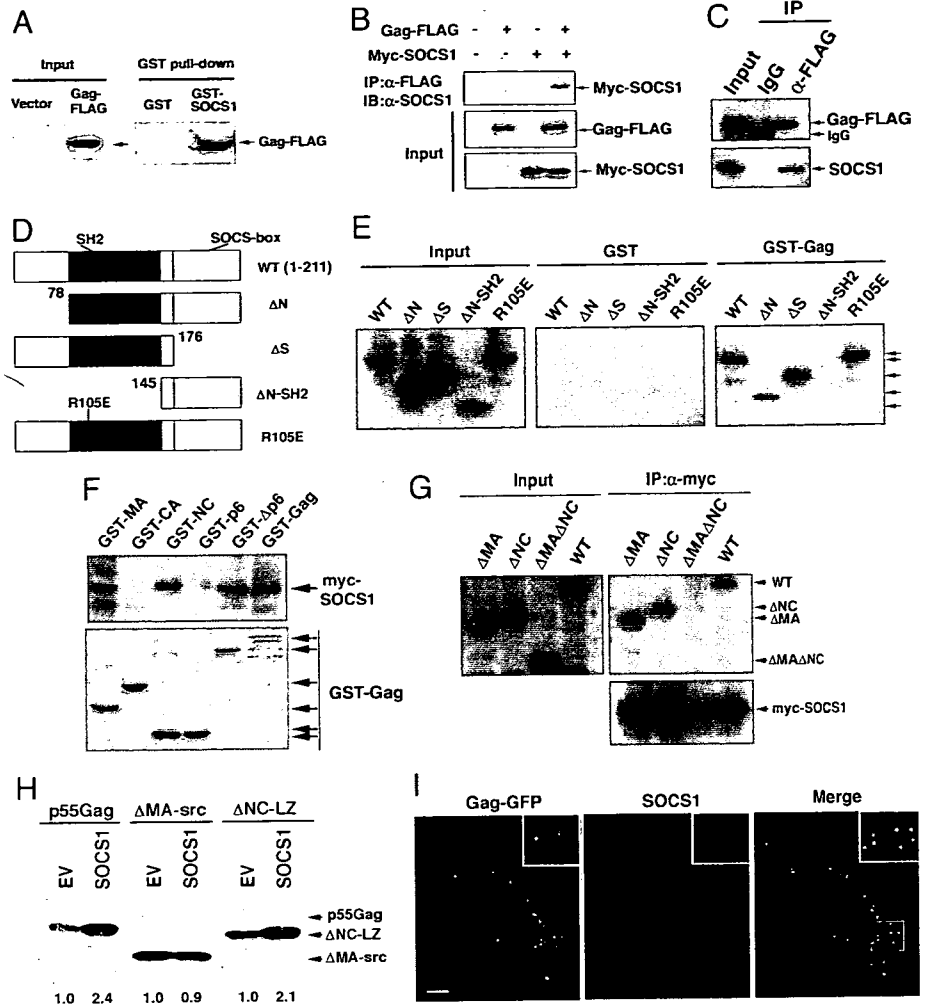
bodies (Fig. 1A). In addition, *SOCS1* was found to be up-regulated also in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from two different individuals (following HIV infection, Fig. 1B).

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 (Z₁-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