

存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により測定した。HSC-F 細胞へのウイルスエンターリーの効率は Gag (p24)-ELISA 法を用いて定量した。

3. ウイルスゲノムのシーケンスはアブライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。
4. Env の構造解析は国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士により行なわれた。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行なっていない。

C. 研究結果

1. HSC-F 細胞での馴化・適応により増殖効率が向上した HIV-1 クローン MN4 (X4 ウイルス) および MN5 (R5 ウイルス) に存在したゲノム変異を一個づつ親ウイルスクローンである NL-DT5R および NL-DT5R5-1 に導入し、トランスフェクション・感染実験を行い、有意義のものを検索した。その結果、それぞれ、Pol-*IN* と Env-gp120 の一アミノ酸変異の二ヶ所のみが重要であった。MN4 の V234I 変異 (Pol-*IN*) と E427K 変異 (Env-gp120 C4 領域)、および、MN5 の N222K 変異 (Pol-*IN*) と S304G 変異 (Env-gp120 V3 領域) である。
2. 構造解析の結果では、MN4 の Env E427K 変異はヒト CD4 との親和性に影響なくカニクイザル CD4 との親和性を増大させると予想される。実際、ヒト M8166 細胞での感染実験においては、この変異はウイルス学的効果を示さなかった。
3. 構造解析の結果では、MN5 の Env S304G 変異は CCR5 との親和性を増大させると予測される。これに合致して、MN5 の HSC-F 細胞へのエンターリー効率は著しく増加し、コレセプターアンタゴニスト TAK-779 に対する感受性が顕著に減少していた。

4. 我々が構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 である NL-DT5R はカニクイザル TRIM5 α による増殖抑制を解除できていないため (Microbes Infect, inpress, 2009)、これに関わると予想される Gag-CA helix 6/7 loop 構造 (S 配列) を SIVmac239 の対応領域に置換した MN4S と MN5S を作製した (大阪大学微生物病研究所 塩田達雄教授らとの共同研究)。親クローンである MN4/MN5 と比較すると、カニクイザル HSC-F 細胞ではそれほど顕著な差が認められなかったが、アカゲザル HSR5.4 細胞では、S 配列を持つと感染が持続し、長期間ウイルスが産生されるようになった。
5. 上記 4 の結果に基づき、MN4S と MN5S を HSR5.4 細胞に感染させ、長期培養によるウイルス馴化を試みた。長期培養後に得られたウイルスを分子クローンし、トランスフェクション・感染実験により調べたところ、親クローンより格段に増殖能が向上したウイルスクローンが取得できた (MN5Rh)。このクローンには Gag-CA 領域に三個、Pol-*IN* 領域に一個の変異が存在するのみであった。MN5Rh より MN4Rh を構築した。

D. 考察

HIV-1 の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIV や SHIV ではなく HIV-1 そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった (1) HIV-1 の病原性発現機構の解析、(2) 分子・細胞レベルでは不明の点の多い HIV-1 アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、(3) HIV-1 感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究 が実現可能となる。本研究で得られた HIV-1 の分子クローン (MN4Rh および MN5Rh) はこれらの目標に向け極めて有望である。

サル細胞におけるウイルス増殖効率の向上に貢献する変異の同定とその機序の詳細な解析は、基礎研究としての意義だけでなく今後のウイルスゲノムの改良に繋がる重要な情報をもたらす可能性がある。Env 変異は

もちろんであるが、この意味で、別個のウイルスクローンに共通して認められた IN C 末端領域の変異 (N222K および V234I) は大変興味深い。

E. 結論

本研究により、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R クローン) より増殖効率等で格段に優れた X4 および R5 ウイルスの分子クローンが得られた。カニクイザルだけでなく、アカゲザル細胞でのウイルス複製に適応したクローン (MN4Rh および MN5Rh) が得られたことは、我々の最終目標達成に向け大きく前進したと考えられる。MNRh クローンに新たに同定された変異のうちサル細胞での増殖効率の向上に貢献しているものを決定することが重要である。その結果、サル細胞での増殖に関してより適化したウイルスが得られる可能性が示されれば、速やかにゲノム改変に取り組む。

本研究により、複製抑制がかかるサル細胞内での HIV-1 変異・適応・進化が系統的かつ実験的に解析できることが明らかになった。本研究で認められた変異・適応の再現性を確認するため、カニクイザルとアカゲザル細胞での馴化実験を繰返し行なう予定である。また、HIV-1 感受性に関するサル種間差や個体差も観察されているので、その機構についても詳細に検討したい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and Adachi, A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus

engineering. *Reviews in Medical Virology* 18: 261-275.

- 2) Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *Journal of Virology* 82: 7752-7756.
- 3) Yamashita, T., Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the *vif* gene. *Journal of Medical Investigation* 55: 236-240.
- 4) Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* 10: 960-967.
- 5) Yamashita, T., Kamada, K., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes and Infection* 10: 1142-1149.
- 6) Hatcho, K., Kamada, K., Yamashita, T., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Replication potentials of *vif* variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R. *Microbes and Infection* 10: 1218-1222.
- 7) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10: 1387-1392.
- 8) Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., Igarashi, T., and Sugita, M. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 889-893.
- 9) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA⁻ and APOBEC-mediated restrictions is

insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*, in press.

- 10) Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation*, in press.

2. 学会発表

- 1) Nomaguchi M., Doi, N., and Adachi, A. HIV-1 adapts and evolves to grow efficiently in simian cells. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2008, Awaji, Japan.
- 2) 藤田美歌子、大塚雅巳、野間口雅子、足立昭夫 HIV-2 Vpx の富プロリン領域は蛋白質の安定性に必須である。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
- 3) 土肥直哉、野間口雅子、山下知輝、足立昭夫 サル細胞で効率よく複製する HIV-1 の構築。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を著しく増強する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
- 5) 足立昭夫 アクセサリー蛋白質と抗ウイルス細胞因子。第 56 回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム 3 (HIV 感染症)、2008 年 10 月 27 日、岡山。
- 6) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 新規 HIV-1/サルモデルの開発；新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 28 日、岡山。
- 7) 野間口雅子 HIV-1 の病原性：細胞から個体へ。第 22 回日本エイズ学会学術集

会シンポジウム 4 (ヒトはなぜエイズになるのか)、2008 年 11 月 26 日、大阪。

- 8) 海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 新規 HIV-1/サルモデルの開発；新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 27 日、大阪。
- 9) 野間口雅子、足立昭夫 HIV-1 のサル細胞における適応進化。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 28 日、大阪。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし。
2. 新案登録
なし。
3. その他
なし。

サル指向性 HIV-1 感染による宿主免疫応答に関する解析

研究分担者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

エイズ動物モデルは、HIV-1 感染増殖・エイズ発症機序の解明および抗エイズ治療薬・ワクチンの開発に重要である。現時点では、ヒトと同じように HIV-1 が持続感染しエイズ発症に至る動物モデルは存在せず、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染マカクサルモデルが最適のエイズ動物モデルと考えられている。本研究班のこれまでの研究では、カニクイサルにおいて、持続感染成立には至らないものの、一過性のウイルス血症を呈する程度の感染性を有するサル馴化型 HIV-1 が得られてきている。そこで、私どもは、このサル馴化型 HIV-1 の一過性の感染増殖により誘導される宿主免疫反応を解析することとした。平成 20 年度には、まず、第 2 世代サル馴化型 HIV-1（MN4-5S と MN5-10S）感染カニクイサルの急性期において誘導される免疫反応について、特にウイルス複製抑制に重要と考えられる HIV-1 Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応の解析を行った。その結果、解析サルのいずれにおいても感染急性期の Gag 特異的 CTL 反応の誘導が観察された。次に、平成 19 年度に第 1 世代サル馴化型 HIV-1（DT5R）を接種したカニクイサルの感染慢性期に SIV スーパーチャレンジを行ったところ、SIV 感染は成立したものの、その持続感染は抑制された。したがって、HIV-1 感染により誘導される宿主免疫反応は、HIV-1 だけでなく SIV の複製に対しても抑制効果を有する可能性が示唆された。これらの成果は、サルにおける HIV-1 特異的 CTL 反応解析系の樹立という意義に加えて、新たな HIV-1 複製抑制機序の発見に結びつく可能性が期待される。

A. 研究目的

エイズ動物モデルは、HIV-1 感染増殖・エイズ発症機序の解明および抗エイズ治療薬・ワクチンの開発に必要である。現時点では、ヒトと同じように HIV-1 が持続感染しエイズ発症に至る動物モデルは存在せず、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染マカクサルモデルが最適のエイズ動物モデルと考えられている。

HIV-1 のサル細胞への感染効率ヒト細胞への感染効率より劣っており、サルでは従来の HIV-1 感染によるウイルス血症は認められない。しかし、本研究班のこれまでの研究により、カニクイサル

において、持続感染成立には至らないものの、一過性のウイルス血症を呈する程度の感染性を有するサル馴化型 HIV-1 が得られてきている。このサル馴化型 HIV-1 研究の進展は、HIV-1 感染サルエイズモデルの開発、および持続感染に必要な機序の同定に結びつくという点で大きな意義がある。私どもは、このサル馴化型 HIV-1 の一過性の感染増殖により誘導される宿主免疫反応を解析することとした。

平成 20 年度には、まず、サル馴化型 HIV-1 感染サルで誘導される免疫反応の解析として、第 2 世代サル馴化型 HIV-1（MN4-5S と MN5-10S）感

染カニクイサルの急性期において、特にウイルス複製抑制に重要と考えられる HIV-1 Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応の解析を行った。次に、サル馴化型 HIV-1 感染サルで誘導される免疫反応の SIV 感染増殖への影響を調べる目的で、第 1 世代サル馴化型 HIV-1 (DT5R) を接種したカニクイサルの慢性期に SIV スーパーチャレンジ実験を行った。

B. 研究方法

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 (MN4-5S と MN5-10S) チャレンジを行ったカニクイサルのうち 3 頭について、チャレンジ後 2 週目の末梢血単核球 (PBMC) を用い、HIV-1 Gag ペプチド刺激特異的インターフェロ γ 誘導を細胞内染色により測定することにより、HIV-1 Gag 特異的 CTL レベルを調べた。抗原刺激には、HIV-1 Gag overlapping peptides の mixture (# 1-3 [Gag 1 - 89]、#4-6 [Gag 79 - 174]、#7-9 [Gag 164 - 263]、#10-12 [Gag 253 - 351]、#13-15 [Gag 341 - 434]、#16-18 [Gag 424 - 516]) を用いた。

また、平成 19 年度に第 1 世代サル馴化型 HIV-1 (DT5R) チャレンジを行ったカニクイサル 2 頭の感染慢性期に、SIVmac239 スーパーチャレンジ (静注) を行った。対照実験として、2 頭のナイーブカニクイサルにも SIVmac239 スーパーチャレンジを行った。これらのサルのチャレンジ後 10 日目および 7 週目の血漿中ウイルス量 (SIV RNA コピー数) を測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、東京大学医科学研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて開始した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 をチャレンジしたカニクイサル 3 頭の感染急性期 (2 週目) の HIV-1 Gag 特異的 CTL レベルを図 1 に示す。いずれの個体も Gag 特異的 CTL 反応が認められ、そのうち 2 頭では比較的 broad な反応が検出された。

一方、第 1 世代サル馴化型 HIV-1 をチャレンジしたサルへの SIV スーパーチャレンジでは (図 2)、感染急性期 (10 日目) の血漿中 SIV 量は対照群と同程度であった。しかし、セットポイント期 (7 週目) の血漿中 SIV 量は、対照群の 2 頭は検出可能なレベルであったのに対し、第 1 世代サル馴化型 HIV-1 チャレンジ後 SIV をスーパーチャレンジした 2 頭では検出限界以下であった。

D. 考察

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染急性期の宿主免疫反応の解析では、HIV-1 Gag 特異的 CTL 反応誘導が確認できた。この HIV-1 Gag 特異的 CTL が HIV-1 複製にどのような影響を及ぼしているかについては今後の課題である。

SIV スーパーチャレンジ実験では、HIV-1 感染により誘導される宿主免疫反応が、HIV-1 だけでなく SIV の複製に対しても抑制効果を有する可能性が示唆された。この SIV 複製抑制機序の解明は、新たな HIV-1 複製抑制機序の発見に結びつく可能性が期待される。

E. 結論

カニクイサルにおいて、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 (MN4-5S と MN5-10S) 感染急性期の HIV-1 Gag 特異的 CTL 反応誘導を確認した。また、第 1 世代サル馴化型 HIV-1 (DT5R) を接種したカニクイサルへの感染慢性期の SIV スーパーチャレンジでは、SIV 感染は成立したものの、その持続感染は抑制された。これらの成果は、サルにおける HIV-1 特異的 CTL 反応解析系の樹立という意義に加えて、新たな HIV-1 複製抑制機序の発見に結びつく可能性が期待される。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008.
- (2) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22:993-994, 2008.
- (3) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52:318-325, 2008.
- (4) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206, 2008.

2 学会発表

- (1) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/19/2008.
- (2) 武内寛明、石井洋、桑野哲夫、稲垣奈都子、明里宏文、俣野哲朗. Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞性因子である。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/27/2008.
- (3) 稲垣奈都子、川田真幹、俣野哲朗. SIV Gag CA の N domain の変異に対する C domain の代償性変異。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/26/2008.
- (4) 堀場聡、川田真幹、武内寛明、俣野哲朗. サル細胞とヒト細胞で複製能への影響が異なる gag 変異を有する SIV. 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/28/2008.
- (5) 俣野哲朗. CTL のエイズウイルス複製抑制効果：サルエイズモデルにおける解析。京都大学ウイルス研究所シンポジウム「霊長類を用いた生命科学研究」、京都、2/18/2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

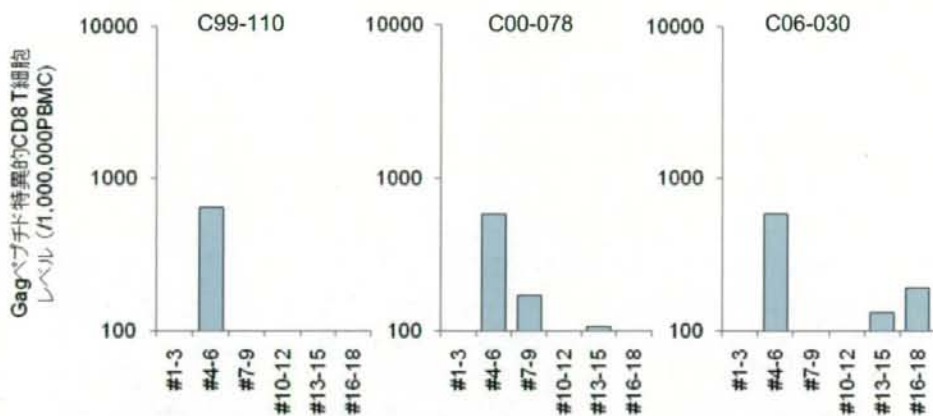


図1 サル指向性HIVチャレンジ後2週目のHIV Gag特異的CD8 T細胞反応

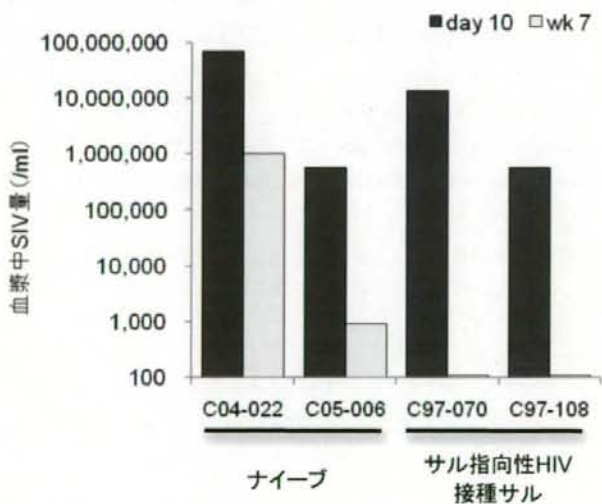


図2 SIVスーパーチャレンジ後10日目・7週目の血漿中SIV量

分担研究報告書

サル指向性 HIV-1 及びその馴化ウイルスの成熟粒子形成能に関する解析

研究分担者 櫻木淳一 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス感染制御分野 助教

研究要旨 サル指向性 HIV-1 による *in vivo* 感染モデル系が実現しつつある現在、個体内ウイルス変異に伴うウイルスの性状の変化を多角的に解析するための実験系が必要となる。研究分担者は主としてウイルスゲノム RNA に関する解析を推進する目的で、動物レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築を試みた。その結果現在までに以下の成果を上げた。

1. 異なるゲノム二量体化シグナル (DLS) を持つ二株のウイルス間のゲノム組換え効率を迅速に計測するシステムを構築した。
2. 異なるゲノム二量体化シグナル (DLS) を持つ二株のウイルス間のゲノム二量体化効率を詳細に計測するシステムを構築した。
3. レトロウイルスゲノム組換えが起きるために必要な、2本の RNA 上の相同配列間のような様々な条件を解析する系を構築した。
4. レトロウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳との関係について RNase プロテクションアッセイ (RPA) を用いて解析する系を構築した。

A. 研究目的

サル指向性 HIV-1 による *in vivo* 感染モデル系の確立が視野に入りつつある。モデル個体内でのウイルス増殖が現実となった場合には、当然ながら個体内ウイルス変異に伴うウイルスの性状の変化を多角的に解析することが必要となる。ウイルス増殖の素過程の詳細は明らかでない部分も多い。研究分担者はこれまでにレトロウイルスのウイルスゲノム RNA に関する多くの独創的な研究を行い、報告している。研究分担者が蓄積してきたこうした知見を活用し、感染実験に備えて様々な実験系を構築し試行することは、モデル系の開発・改良に貢献しうる試みであると考えられた。研究分担者は主としてウイルスゲノム動態の解析を推進す

る目的で、動物レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築を試みた。

B. 研究方法

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。HIV-1 各サブタイプの感染性 DNA クローンもしくは分離株の分与を受け、クローン DNA やウイルス感染細胞 DNA より PCR にて各サブタイプの E/DLS をクローニングし、pNL43 とのキメラを作成した。異なる DLS 間の二量体化効率を測定することを目的として、同一ゲノム上に2つの DLS を保持する変異体も多数作成した。

マウスの表面抗原遺伝子(mCDs)および緑色蛍光蛋白(GFP)をpNL43の非必須遺伝子領域に組み込んだ組換えウイルスを作成した。これとサブタイプキメラクローンを組み換えてマーカー付きキメラウイルスクローンを多数作成した。GFPはN末あるいはC末に変異を導入したものをを用いて、この二変異体間で組換えが起こった場合のみ蛍光励起されるGFPが発現するようにした(Fig.1)。別途開発した1ベクターによる組換え効率検出システムでは、遺伝子フレーム内に組換えマーカーとして一部配列を重複させたGFP(GFFP)と、感染マーカーとしてmCDをベクターに挿入し、GFPの重複間の組換えによって起きるGFPの再構成を検出した(Fig.3A)。これらのベクターを293T細胞にVSVG発現ベクターとコトランスフェクトし、産生ウイルスの感染により発現するmCDsおよびGFPの発現率をFACS解析した。mCDsの発現率から組換えの理論的発現率を算出し、実際のGFP発現率との比較により組換え効率を測定した。

様々なレトロウイルスの翻訳不能変異体を作成し、野生株とのコトランスフェクションにより産生するウイルス粒子中のゲノムの割合を算出した。

ウイルスの精製・感染・ノザンハイブリダイゼーション・RNaseプロテクション・定量PCRは定法に従って行った。(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) ゲノム二量体化をパッケージングから切り離して解析する、ノイズの低い極めてユニークな実験系を構築した。これをリファインすることで簡便に実験用

ベクターを作成することも可能とした。様々なHIV-1サブタイプ内・サブタイプ間のヘテロゲノム二量体化効率を測定した結果、サブタイプの組合せによって二量体形成の効率に差があることが示唆された。変異導入実験の結果二量体化開始部位(DIS)が効率決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) 二種のmCDsとGFP変異体を用いることで、ヘテロゲノム間組換えを迅速簡便に定量する系を構築し、この系による値がこれまでの文献による値と一致していることを示した。ゲノム二量体化効率と平行してヘテロゲノム間組換え効率を測定した結果、この二つの効率にほぼ完全な順相関が確認された(Fig.2)。

(3) HIVゲノム組換えの必要条件検索において、相同配列長による組換えへの影響を検討した。GFFPの重複長を30から250塩基まで段階的に変えた一連の変異体の感染実験において、単位長さあたりの組換え効率は重複長に従い上昇し60塩基でプラトーに達した(Fig.3B)。重複部分の相同性を変化させると、わずか10%の相同性低下によって劇的な組換え効率の低下が観察された。また、重複配列間に挿入するRNAスペーサーを複数種用いることで自由エネルギーを変化させても、組換え効率は大きく増減した。

(4) ウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳の関係性を探索する目的で、翻訳・非翻訳ゲノムを同時に細胞内で発現させ、産生ウイルス粒子あたりの両種のパッケージング効率を算出した。HIV-1においては効率は翻訳の有無に影響されなかったが、HIV-2においてはやや翻訳されるゲノムの方がパッケージされやすい傾向があった。しかしそのバイアスは文献で見られたものに比べかなり低いものであった。

D. 考察

HIVを含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖RNAゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組換えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。HIVゲノム二量体化及びゲノムパッケージング・組換えの機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としているHIVの制圧の端緒となり、ワクチン開発を実施する科学的基盤を提供することが期待されている。次年度よりさらに本格化することが予想されるサル指向性HIV-1 in vivo感染実験においても、ウイルス増殖素過程の基礎的知見の解析は重要な情報となると考えられ、実験系の構築と検証は不可欠である。研究分担者が今年度までに構築した様々な実験系はこれまでに示された理論的・実験的な数値に対して矛盾無い結果を与えることが確認され、有用であると考えられた。これらの実験系を用いて、今後感染実験の過程で分離されるサル指向性HIV-1の変異株の解析を行っていくことを第一義とするが、さらに様々なウイルス種や細胞種を用いた実験も平行して行うことでそれぞれのウイルスの一般則や宿主特異性についても追求し、感染モデル実験へとフィードバックさせることが可能となると考えられる。

E. 結論

ウイルスゲノム RNA に関する解析を推進する目的で、動物レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築を試みた。その結果現在までに以下の成果を上げた。

1. 異なるゲノム二量体化シグナル (DLS) を持つ二株のウイルス間のゲ

ノム組換え効率を迅速に計測するシステムを構築した。

2. 異なるゲノム二量体化シグナル (DLS) を持つ二株のウイルス間のゲノム二量体化効率を詳細に計測するシステムを構築した。

3. レトロウイルスゲノム組換えが起きるために必要な、2本の RNA 上の相同配列間様の様々な条件を解析する系を構築した。

4. レトロウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳との関係について RNase プロテクションアッセイ (RPA) を用いて解析する系を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) J-i Sakuragi*, S Sakuragi, M Ohishi, and T Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection*, 10 (2008) p396-404.

2. 学会発表

1) HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 第56回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

2) HIV-1 Gag前駆体プロセッシングのゲノム二量体化への影響 大石真久・塩田達雄・櫻木淳一 第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。

3) HIV-1ゲノム二量体化とウイルスゲノム組換えの厳密な相関 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

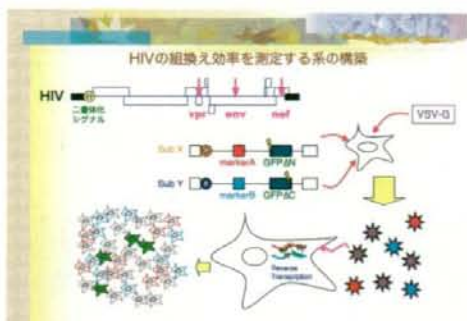


Fig.1 サブタイプ間ゲノム組換え測定システム

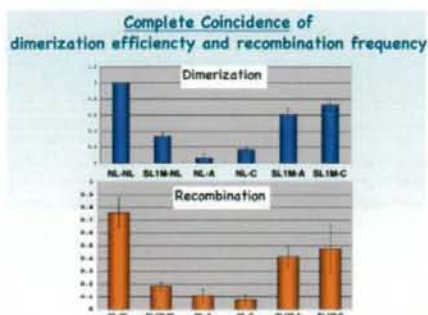


Fig.2 ゲノム組換えと二量体化効率の一致

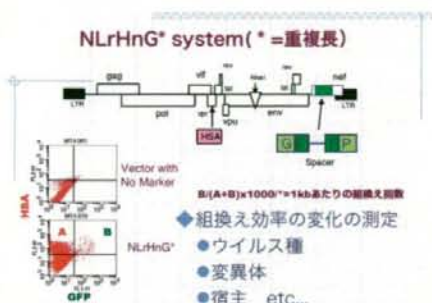


Fig.3A ゲノム組換え能計測システム

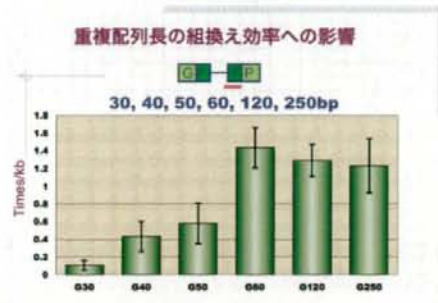


Fig.3B 重複配列長の組換えへの影響

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, <u>Akari H</u> , Motoyoshi K, Okada S	Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor	Blood	11 1	243-250	2008
Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009
<u>Akari H</u> , Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection	Microbiol. Immunol.	53	53-57	2009
Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Science		印刷中	2009
Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and <u>Adachi, A.</u>	Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering.	Rev. Med. Virol.	18	261-275	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages.	J. Virol.	82	7752-7756	2008
Yamashita, T., Doi, N., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the <i>vif</i> gene. Journal of Medical Investigation.	J. Med. Invest.	55	236-240	2008
Nomaguchi, M., Fujita, M., and <u>Adachi, A.</u>	Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis.	Microbes Infect.	10	960-967	2008
Yamashita, T., Kamada, K., Hacho, K., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F.	Microbes Infect.	10	1142-1149	2008

Hatcho, K., Kamada, K., Yamashita, T., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Replication potentials of <i>vif</i> variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R.	Microbes Infect.	10	1218-1222	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein.	Microbes Infect.	10	1387-1392	2008
Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., <u>Adachi, A.</u> , Igarashi, T., and Sugita, M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	37 7	889-893	2008
Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, <u>Matano T</u>	Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques.	J. Virol.	82	5093-5098	2008
Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, <u>Akari H, Matano T</u>	Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial.	J. Virol.	82	10199-10206	2008
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	22	993-994	2008
Takeuchi H, <u>Matano T.</u>	Host factors involved in resistance to retroviral infection.	Microbiol. Immunol.	52	318-325	2008
<u>J-i Sakuragi*</u> , S Sakuragi, M Ohishi, and T Shioda.	A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker	Microbes Infect.	10	396-404	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷

blood

2008 111: 243-250
Prepublished online Sep 24, 2007;
doi:10.1182/blood-2007-04-086017

Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor

Masateru Hiyoshi, Shinya Suzu, Yuka Yoshidomi, Ranya Hassan, Hideki Harada, Naomi Sakashita, Hirofumi Akari, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/111/1/243>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:
Signal Transduction (1919 articles)
Gene Expression (1080 articles)
Immunobiology (3397 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.
Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor

Masateru Hiyoshi,¹ Shinya Suzu,¹ Yuka Yoshidomi,¹ Ranya Hassan,¹ Hideki Harada,¹ Naomi Sakashita,² Hirofumi Akari,³ Kazuo Motoyoshi,⁴ and Seiji Okada¹

¹Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research; ²Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto; ³Laboratory of Disease Control, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki; and ⁴Third Department of Internal Medicine, National Defense Medical College, Saitama, Japan

Nef is a multifunctional pathogenetic protein of HIV-1, the interaction of which with Hck, a Src tyrosine kinase highly expressed in macrophages, has been shown to be responsible for the development of AIDS. However, how the Nef-Hck interaction leads to the functional aberration of macrophages is poorly understood. We recently showed that Nef markedly inhibited the activity of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), a primary cytokine for macrophages. Here, we show

that the inhibitory effect of Nef is due to the Hck-dependent down-regulation of the cell surface expression of M-CSF receptor Fms. In the presence of Hck, Nef induced the accumulation of an immature under-N-glycosylated Fms at the Golgi, thereby down-regulating Fms. The activation of Hck by the direct interaction with Nef was indispensable for the down-regulation. Unexpectedly, the accumulation of the active Hck at the Golgi where Nef prelocalized was likely to be another

critical determinant of the function of Nef, because the expression of the constitutive-active forms of Hck alone did not fully down-regulate Fms. These results suggest that Nef perturbs the intracellular maturation and the trafficking of nascent Fms, through a unique mechanism that required both the activation of Hck and the aberrant spatial regulation of the active Hck. (Blood. 2008;111:243-250)

© 2008 by The American Society of Hematology

Introduction

HIV-1 infections lead to the development of AIDS by causing progressive degeneration of the immune system.¹⁻³ The main cellular targets of HIV-1 are CD4⁺ T cells and macrophages, and the depletion of CD4⁺ T cells caused by an infection is suggested to account for many aspects of the pathogenesis of HIV-1.¹⁻³ Meanwhile, a number of studies have revealed the functional aberration of HIV-1-infected macrophages.^{4,5} Infected macrophages showed an altered profile of the production of cytokine/chemokines⁴ or migratory capacity,⁵ which might contribute to the uncontrolled homeostasis of the immune system. Indeed, functional analyses of HIV-1 Nef protein have revealed that macrophages as well as CD4⁺ T cells play an important role in the development of AIDS.

Nef is a 25- to 30-kDa protein with no enzymatic activity encoded by the HIV-1 genome.^{6,7} Studies of HIV-1-infected patients have clearly demonstrated Nef to be a critical determinant of the development of AIDS: HIV-1 strains without an intact Nef gene were frequently isolated from nonprogressive long-term survivors.^{8,9} Subsequent study of HIV-1 transgenic mice confirmed the pathogenetic activity of Nef: targeted expression of the entire coding sequence of HIV-1 in CD4⁺ T cells and macrophages caused a severe AIDS-like disease in mice, which was completely abolished by the disruption of the Nef gene.¹⁰ Importantly, only an amino acid substitution in the proline-rich (PxxP) motifs of Nef was sufficient to protect mice from the development of AIDS-like disease.¹¹ A number of studies have revealed that Nef interacts with a subset of cellular Src family tyrosine kinases, via the PxxP motifs.¹²⁻¹⁵ The Nef PxxP motifs had an affinity for the Src

homology (SH3) domain of Hck, Lyn, and possibly c-Src, but not of Fgr, Fyn, Lck, and Yes.¹²⁻¹⁵ In particular, the interaction between the Nef PxxP motifs and the Hck SH3 domain was likely to be important, because the interaction caused the activation of Hck.¹³⁻¹⁵ Indeed, a study with HIV-1 transgenic mice clearly demonstrated the importance of the Nef-Hck interaction for the development of AIDS: the appearance of the AIDS-like disease was significantly delayed when the HIV-1 transgenic mice expressing an intact Nef gene were crossed with an *hck*^{-/-} background.¹¹ Given that Hck is expressed in macrophages but not in CD4⁺ T cells,¹⁶ the finding indicates that the Nef-Hck interaction in macrophages is at least in part responsible for the development of AIDS. However, little is known of the molecular mechanisms by which the Nef-Hck interaction contributes to the functional aberration of macrophages and the development of AIDS. The fact that Src kinases including Hck have both positive and negative roles in cell signaling pathways¹⁶⁻¹⁹ makes it difficult to predict the functional consequences of the Nef-Hck interaction.

A well-characterized function of Nef is the down-regulation of the cell surface expression of CD4^{6,7,20} or major histocompatibility complex class I (MHC I).^{6,7,21-23} Nef accelerates the endocytosis of CD4,²⁰ the receptor for HIV-1,¹⁻³ which allows an efficient viral release from the host cells.^{6,7} Nef reduces the level of the surface expression of MHC I through multiple mechanisms,²¹⁻²³ which diminishes the recognition of the infected cells by cytotoxic T cells.^{6,7} However, these hallmark functions of Nef may not fully account for the functional significance of the Nef-Hck interaction,

Submitted April 17, 2007; accepted September 18, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 24, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-04-086017.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

because the down-regulation of CD4 or MHC I occurs even in the absence of Hck (ie, in CD4⁺ T cells).²⁰⁻²³ Meanwhile, we and others have recently identified the functions of Nef that are dependent on Hck.²⁴⁻²⁶ Drakesmith et al demonstrated that Nef down-regulated the surface expression of HFE, an iron homeostasis regulator expressed on macrophages, which was abolished by a dominant-negative Hck.²⁴ Briggs et al demonstrated that Nef mimicked the cell growth-promoting activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a cytokine that supports the proliferation and differentiation of monocyte/macrophages,²⁷ possibly through a mechanism that required Hck and the Stat3 transcription factor.²⁵ Nef might contribute to the survival of macrophages by mimicking GM-CSF receptor pathways, allowing long-term viral replication.²⁵ In contrast to the latter finding, we demonstrated that Nef inhibited the growth of human myeloid leukemia TF-1-fms cells mediated by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF),²⁶ another cytokine essential for the proliferation and differentiation of monocytes/macrophages.²⁸ The growth inhibition of the cells correlated well with the impaired activation of the M-CSF receptor Fms,²⁶ which is a tyrosine kinase encoded by the proto-oncogene *c-fms*.²⁸ Impaired activation of Fms was also observed in human embryonic 293 cells coexpressing Nef and Hck, but not in cells expressing Nef alone or Hck alone.²⁶ Thus, these data indicated that Nef inhibited the activation of Fms through a mechanism that required Hck.

The functions of macrophages are distinctly regulated by M-CSF and GM-CSF,^{27,28} as evidenced by the marked difference in the morphology of macrophages derived from these cytokines.²⁹ Moreover, these macrophages showed different profiles of the production of chemokines/cytokines.²⁹ Thus, it is possible that Nef affects the functions of macrophages by differentially modulating the activities of M-CSF and GM-CSF, contributing to the uncontrolled immune system. However, little is known of the molecular mechanisms by which Nef differentially modulates the activities of these cytokines, through the common target Hck. In this study, we therefore attempted to clarify how the Nef-Hck interaction caused the impaired activation of Fms.

Methods

Hematopoietic cell lines and culture conditions

Human myeloid leukemia TF-1 cells³⁰ were maintained with RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS and 2 ng/mL recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF; PeproTech, Rocky Hill, NJ). TF-1-fms cells,³¹ which were obtained by introducing the plasmid pCEF-c-fms encoding the human *c-fms* gene into the TF-1 cells, were maintained with RPMI1640-10% FCS in the presence of 100 ng/mL rhM-CSF (a gift from Morinaga Milk Industry, Kanagawa, Japan) and 200 µg/mL G418 (Calbiochem, Darmstadt, Germany). TF-1-fms-Nef-ER cells²⁶ were obtained by introducing pEBB-Nef-ER-IRE5-puro³² into TF-1-fms cells, and maintained in the presence of rhM-CSF, G418, and 1.5 µg/mL puromycin (Sigma, St Louis, MO). The plasmid encoded the Nef-ER fusion protein composed of Nef (derived from the NL4-3 strain of HIV-1) and the hormone-binding domain of the murine estrogen receptor (ER).³² In this system, Nef was basally inactive but it was induced to function by the estrogen analog, 4-hydroxytamoxifen (4-HT; Sigma).³² We also established TF-1 cells expressing the Nef-ER fusion protein (TF-1-Nef-ER) by using the same plasmid. The transfection was performed with Lipofectin reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations. Transfected cells were selected in media containing rhGM-CSF and puromycin, followed by limiting dilution to isolate stable clones. The expression of Nef-ER in these clones was determined by Western blotting²⁶ with anti-Nef rabbit antiserum obtained through the National Institutes of Health (NIH)

AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD).³³ The cell growth was determined by colorimetric assay with MTT reagent (Sigma), and the absorbance of each culture was measured at 595 nm with a microplate reader (Thermo Electron, Vantaa, Finland). The expression of Fms on TF-1-fms-Nef-ER cells and that of GM-CSF receptors on TF-1-Nef-ER cells was analyzed on a FACScalibur using Cell Quest Software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).²⁶ Anti-Fms rat monoclonal IgG (clone 12-2D6; Zymed, South San Francisco, CA) was labeled with FITC using Fluorescein Labeling Kit-NH₂ (Dojindo, Kumamoto, Japan). FITC-labeled anti-GM-CSF receptor α chain (clone 4H1) and PE-labeled anti-GM-CSF β chain (clone 1C1) were purchased from eBioscience (San Diego, CA).

Macrophages and nucleofection

Human peripheral blood samples were collected from adults donors after informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and based on a protocol approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University. Monocytes were enriched from peripheral blood mononuclear cells by adherence to dishes for 1 hour. Macrophages were prepared by culturing the monocytes with RPMI1640 medium supplemented with 15% FCS and 100 ng/mL rhM-CSF for 5 to 7 days. The nucleofection with the Human Macrophage Nucleofector Kit and the Nucleofector II device (Amaxa, Cologne, Germany) was performed according to the manufacturer's recommendations. In brief, 5×10^5 macrophages were nucleofected with 5 µg plasmid and then cultured with Macrophage-SFM medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 15% FCS and 10 ng/mL rhGM-CSF for 8 to 12 hours. The nucleofected macrophages were cultured with GM-CSF, because M-CSF caused the down-regulation of Fms (Figure S2B,C). To identify the Nef-expressing macrophages, we used the pRc/CMV-CD8-Nef plasmid³⁴ encoding Nef (derived from the SF2 strain of HIV-1) fused to the extracellular/transmembrane regions of CD8. As a control, we used the plasmid encoding only those regions of CD8 (pRc/CMV-CD8).³⁴ The nucleofected macrophages were detached from the culture dishes using the enzyme-free cell dissociation buffer (Gibco), and then subjected to flow cytometric analysis on a FACScalibur. Labeled antibodies used were PE-labeled anti-Fms (clone 3-4A-4; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), APC-labeled anti-CD8 (clone DK25; Dako, Glostrup, Denmark), and PE-labeled anti-CD4 (clone S3.5; Caltag, Burlingame, CA).

293 cell lines, transfection, and plasmids

Human embryonic kidney 293 cells (Invitrogen) were maintained with DME medium supplemented with 10% FCS. We also used 293 cells stably expressing Fms, both Fms and Hck, or CD4. 293-Fms cells were established by transfecting pCEF-c-fms³¹ followed by the enrichment of Fms^{high} cells with a JSAN cell sorter (Bay Bioscience, Kobe, Japan). 293-Fms/Hck cells were established by further transfecting a human Hck expression plasmid into the 293-Fms cells. For this purpose, Hck cDNA³⁵ cloned in the vector pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA) was subcloned into pIRES-bleo3 (Clontech). An Hck^{high} clone was isolated from the transfected cells by Western blotting. 293-CD4 cells were established by transfecting pNeoMOS-CD4³⁶ followed by the enrichment of CD4^{high} cells by the sorting. These cells were maintained with media containing 200 µg/mL G418 or 200 µg/mL phleomycin D1 (Invitrogen), or both. Transient transfection experiments with these 293 cell lines were performed essentially as described previously.²⁶ In brief, cells grown on a 12-well tissue culture plate were transfected with a total of 1.6 µg plasmid using LipofectAMINE2000 reagent (Invitrogen).

The transient expression of Fms was achieved with pCEF-c-fms. The transient expression of Hck was mostly achieved with Hck cDNA cloned in pcDNA3.1 (Invitrogen), except for the flow cytometric analysis in which Hck cDNA cloned in pIRES2-EGFP was used (Figure 2A). Based on an earlier report,¹⁴ we also prepared constitutive-active (YF and AxxA) and kinase-dead (KE) forms of Hck by using QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, CA). The transient expression of Nef was achieved mostly with pRc/CMV-CD8-Nef,³⁴ the Nef of which was

derived from the SF2 strain of HIV-1. In a selected experiment (Figure 4A), we used Nef of the NL4-3 strain, as the mutants used in the analysis were derived from the strain. WL/AA, LL/AA, and AxxA mutants were provided by A. Adachi (University of Tokushima, Tokushima, Japan) and subcloned into the vector pRc/CMV-CD8. The M20A mutant³⁷ was also subcloned into this vector.

Western blotting, flow cytometry, and immunofluorescence with 293 cells

The preparation of total cell lysate and Western blotting were performed essentially as described.^{26,38} In a selected experiment (Figure 2C), a monolayer of transfected 293 cells was treated with trypsin or control PBS buffer for 3 minutes at room temperature immediately prior to the lysis. Total cell lysate was also subjected to a lectin pull-down assay,³⁹ using wheat germ agglutinin (WGA)-agarose and concanavalin A (Con A)-agarose (both from Wako, Osaka, Japan). Alternatively, total cell lysate was treated with either endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo-H) or peptide-N-glycosidase F (PNGase F) (both from Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Primary antibodies used were as follows: anti-N-terminal portion of Fms (H-300; Santa Cruz Biotechnology), anti-C-terminal portion of Fms (C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti-Nef rabbit antiserum,³³ anti-Hck (clone 18; Transduction Laboratories, Lexington, KY), and anti-ERK (K-23; Santa Cruz Biotechnology).

The transfected cells were detached from the culture dishes and subjected to a flow cytometric analysis with anti-Fms-PE, anti-CD4-PE, or anti-CD8-APC as above. For immunostaining, cells were directly fixed in 2% paraformaldehyde, permeabilized with ethanol, and stained with primary antibodies for 12 hours followed by labeled secondary antibodies.^{40,41} The primary antibodies used were as follows: anti-Fms rat IgG (clone 3-4A4-E4; Abcam, Cambridge, MA), anti-GM130 mouse IgG (Transduction Laboratories), anti-CD8 rabbit IgG (H-160; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit IgG specific for Hck phosphorylated at Tyr411 (Santa Cruz Biotechnology). The labeled secondary antibodies used were as follows: anti-rat IgG-AlexaFluo488, anti-mouse IgG-AlexaFluo568, and anti-rabbit IgG-AlexaFluo488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes). The fluorescent signals were visualized with a BZ-8000 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) equipped with Plan-Fluor ELWD 20 \times /0.45 objective lenses (Nikon, Tokyo, Japan). Image processing was performed using BZ-Analyzer (Keyence) and Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Results

Nef selectively inhibits M-CSF-dependent growth and down-regulates Fms

In this study, we initially attempted to confirm the stimulatory effect of Nef on GM-CSF reported by another group,²⁵ using the same system in which we found the inhibitory effect on M-CSF.²⁶ We previously established human myeloid TF-1-fms cells expressing a conditionally active Nef-ER fusion protein.^{26,32} Although TF-1-fms was an M-CSF-dependent clone derived from GM-CSF-dependent TF-1 cells,^{30,31} TF-1-fms cells lost their growth response to GM-CSF due to long-term maintenance with M-CSF.⁴² Thus, we also established TF-1 clones expressing the Nef-ER fusion proteins, the level of which was comparable with that in the pre-established TF-1-fms-Nef-ER clone (Figure S1A, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). The inducible activation of Nef by the estrogen analog 4-HT was verified by the down-regulation of CD4 expression (data not shown). As shown (Figure S1A,B) and consistent with the results of the other group,²⁵ the activation of Nef did not inhibit but enhanced the GM-CSF-dependent growth of TF-1-Nef-ER cells, albeit slightly. However, the activation of Nef

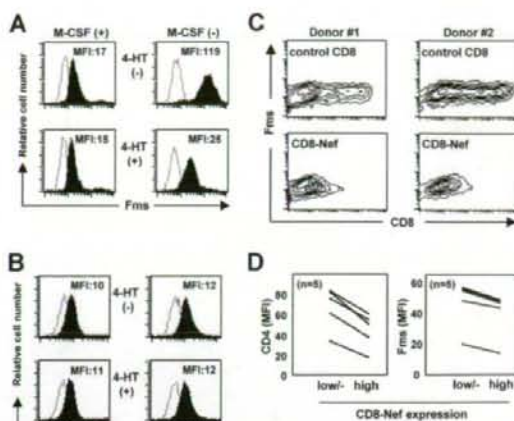


Figure 1. Nef inhibits surface expression of Fms. (A) In the left histograms, TF-1-fms-Nef-ER cells were precultured with M-CSF-containing media in the absence (upper) or presence (lower) of 0.1 mM 4-HT for 24 hours. In the right histograms, TF-1-fms-Nef-ER cells were precultured with M-CSF-free media in the absence (top) or presence (bottom) of 0.1 μ M 4-HT for 12 hours. The expression of Fms on these cells was analyzed by flow cytometry with PE-labeled anti-Fms antibody. The mean fluorescence intensity (MFI) of Fms expression is indicated. (B) TF-1-Nef-ER cells were precultured with GM-CSF-free media in the absence (top) or presence (bottom) of 0.1 μ M 4-HT for 12 hours. The surface expression of GM-CSF receptors was analyzed with FITC-labeled anti- α chain (left) and PE-labeled anti- β chain (right) antibodies. The MFI of GM-CSF receptor expression is indicated. (C) Macrophages were nucleofected with the control CD8 plasmid or CD8-Nef plasmid and then costained with APC-labeled anti-CD8 and PE-labeled anti-Fms. Results with macrophages obtained from 2 different donors are shown as contour plots. (D) As in panel C, the nucleofected macrophages were costained with APC-labeled anti-CD8 and PE-labeled anti-Fms, or with APC-labeled anti-CD8 and PE-labeled anti-CD4. The MFI of the expression of Fms or CD4 in the populations of CD8^{low} or CD8^{high}, CD8-Nef^{low}, or CD8-Nef^{high} was analyzed. The results with macrophages obtained from 5 different donors are summarized.

markedly inhibited the M-CSF-dependent growth of TF-1-fms-Nef-ER cells (Figure S1A,C). These results confirmed that Nef did not actively induce the death of these cells but selectively inhibited the activity of M-CSF.

Next, we carefully examined whether Nef down-regulated the surface expression of Fms, as a possible mechanism for the selective inhibitory effect of Nef on the activity of M-CSF. In a previous study in which TF-1-fms-Nef-ER cells cultured under M-CSF-containing conditions were used, we failed to observe an obvious down-regulation of Fms expression by Nef.²⁶ However, the effect of Nef might have been underestimated under such conditions, because M-CSF itself down-regulated the expression by inducing the internalization/degradation of Fms.⁴³ Indeed, the addition of M-CSF caused the down-regulation of Fms in both TF-1-fms-Nef-ER cells (Figure S2A) and primary macrophages (Figure S2B) in a dose-dependent manner and an obvious effect of Nef on the surface level of Fms was not detected under such conditions (Figure 1A left panels). However, under the M-CSF-free Fms-high conditions, a significant reduction in the surface expression of Fms was observed in the Nef-active TF-1-fms-Nef-ER cells (Figure 1A right panels). The surface expression of CD29 (integrin β 1), CD33, and CD54 (ICAM-1) was unaffected by the same treatment (data not shown). Furthermore, such down-regulation was not observed with the α chain and β chain of GM-CSF receptors (Figure 1B). Thus, the inhibitory effect of Nef on the activity of M-CSF but not of GM-CSF was likely to be due to the selective down-regulation of Fms expression.

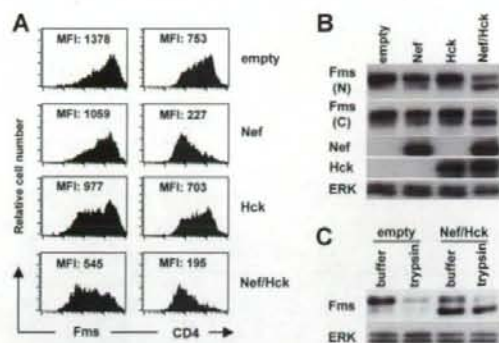


Figure 2. Nef reduces surface expression of Fms in 293 cells and increases intracellular gp130Fms, in the presence of Hck. (A) In the left panels, parental 293 cells were transfected with the Fms plasmid, alone or in combination with the plasmid for Nef (CD8-Nef) or Hck (IRES-EGFP), and then stained with PE-labeled anti-Fms. In the right panels, 293 cells stably expressing CD4 were transfected with the indicated plasmids and stained with PE-labeled anti-CD4. These cells were costained with APC-labeled anti-CD8, and the data for cells positive for both CD8 and EGFP are shown. The MFI of the expression of Fms or CD4 is indicated. (B) As in panel A, parental 293 cells were transfected with the Fms plasmid, alone or in combination with the plasmid for Nef or Hck. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blotting with antibodies against the N-terminal portion of Fms (N), the C-terminal portion of Fms (C), Hck, Nef, or ERK. (C) 293 cells stably expressing Fms were cotransfected with Nef and Hck (Nef/Hck), or transfected with empty vectors (empty), and then treated with trypsin or control buffer. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blotting with antibodies against the C-terminal portion of Fms or ERK. (B,C) The ERK blot is a loading control. The \blacktriangle indicate the position of gp150Fms or gp130Fms.

The novel function of Nef was further confirmed by nucleofecting Nef into human primary macrophages (Figure 1C,D). The purity of the macrophage preparations was usually more than 95% and 85% when assessed by the expression of CD14 and Fms, respectively (Figure S3). We used the CD8-Nef plasmid encoding Nef fused to the extracellular/transmembrane regions of CD8³⁴ to identify Nef-positive macrophages. The nucleofection of the control CD8 plasmid encoding only those regions of CD8 did not affect the expression of Fms (Figure 1C "control CD8" panels). In contrast, in the CD8-Nef-nucleofected macrophages, the Fms^{high} population was reduced as the expression of CD8-Nef increased (Figure 1C "CD8-Nef" panels). Such down-regulation of Fms as well as CD4 in the CD8-Nef^{high} population was reproducibly observed with macrophages derived from different donors (Figure 1D). The supernatant obtained from macrophages nucleofected with the CD8-Nef plasmid did not affect the level of Fms in TF-1-fms cells (data not shown), suggesting that production of M-CSF, if any occurred, was not involved in the Nef-induced down-regulation of Fms in macrophages.

Down-regulation of Fms by Nef is Hck-dependent and due to inhibition of intracellular maturation/trafficking of Fms

As both TF-1-fms cells²⁶ and macrophages¹⁶ endogenously expressed Hck, it was possible that Hck was involved in the down-regulation of Fms caused by Nef. To examine this possibility and clarify the molecular mechanisms by which Nef down-regulated Fms, we next performed a transfection experiment using human 293 cells. As shown (Figure 2A left panels), the cotransfection of Nef and Hck markedly reduced the surface expression of Fms, although the transfection of Nef alone or Hck alone was effective to a certain degree. This was in contrast with the finding that the transfection of Nef alone was almost sufficient to reduce the surface expression of CD4 (Figure 2A right panels). The

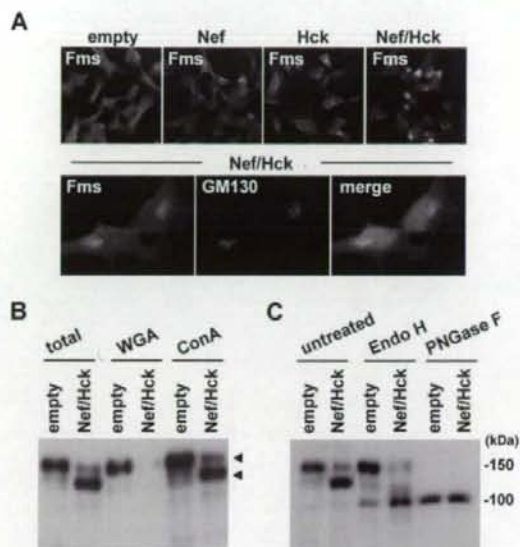


Figure 3. gp130Fms appearing in 293 cells coexpressing Nef/Hck is Golgi-localized underglycosylated Fms. (A) 293 cells stably expressing Fms were transfected with the control CD8 plasmid (empty) or CD8-Nef plasmid (Nef). Similarly, 293 cells stably coexpressing Fms and Hck were transfected with the control CD8 plasmid (Hck) or CD8-Nef plasmid (Nef/Hck). These cells were stained with anti-Fms antibody (top panels). In the bottom panels, 293 cells stably coexpressing Fms and Hck were transfected with CD8-Nef and costained with anti-Fms antibody (green), anti-GM130 antibody (red), and DAPI (blue). (B) 293 cells stably expressing Fms were cotransfected with Nef and Hck (Nef/Hck), or transfected with empty vectors (empty). The total cell lysate was subjected to Fms Western blotting directly (total) or after pull down with WGA-agarose or Con A-agarose. The arrowheads indicate the position of gp150Fms or gp130Fms. (C) Total cell lysate prepared as in panel B was subjected to Fms Western blotting directly (untreated) or after treatment with endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) or peptide-N-glycosidase F (PNGase F).

reduced surface expression of Fms was confirmed by Western blotting. As shown (Figure 2B), the amount of Fms species with a molecular weight of 150 kDa (gp150Fms, upper arrowhead) in the cells coexpressing Nef/Hck was obviously less than that in cells expressing Nef alone or Hck alone. Indeed, gp150Fms was the cell surface form of Fms, because the treatment of the cell surface with trypsin resulted in the loss of gp150Fms (Figure 2C). The trypsin-resistant gp150Fms might represent an intracellular pool of mature Fms that would be rapidly inserted into the plasma membrane. Interestingly, in parallel with the decrease in the expression of gp150Fms, an increase in the expression of a lower molecular weight species (130 kDa, lower arrowheads) was observed in the cells coexpressing Nef/Hck (Figure 2C). The 130-kDa species was a Fms-related product, because the 2 antibodies against the different portions of Fms (the N-terminus and C-terminus) detected the species (herein referred to as gp130Fms). In contrast to gp150Fms, gp130Fms was an intracellular form of Fms, because it was unaffected by the trypsin treatment (Figure 2C). Thus, the down-regulation of Fms observed in TF-1-fms-Nef-ER cells and macrophages was reproducible in 293 cells cotransfected with Nef and Hck, and associated with the increase of the intracellular gp130Fms.

To further characterize the intracellular gp130Fms that appeared in the cells coexpressing Nef/Hck, we next performed immunofluorescence microscopy. As shown (Figure 3A top panels; Figure S4 top panels), the pattern of Fms staining in the coexpressing cells was quite different from that in cells expressing Nef alone