

201108022A

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

ヒト TRIM5~~α~~による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析  
(H22-政策創薬-一般-015)

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者：佐久間 龍太  
東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学分野 助教

平成 24 (2012) 年 5 月

## 目次

I. 総括研究報告書	
ヒト TRIM5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析 -----	1
佐久間 龍太	
II. 分担研究報告書	
研究分担者無し -----	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	11

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト TRIM5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析

(H22-政策創薬-一般-015)

研究代表者：佐久間 龍太

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学分野 助教

#### 研究要旨

旧世界ザルの宿主因子 TRIM5 $\alpha$ は HIV-1 の侵入と産生の両面をそれぞれ異なる機序により強力に抑制する。一方、ヒト TRIM5 $\alpha$  (HuT5 $\alpha$ ) の増殖阻害活性は非常に弱い、少なくともウイルス産生の段階で影響している。そこで、弱い抗 HIV-1 活性を増強するため、アカゲザル TRIM5 $\alpha$  (RhT5 $\alpha$ ) が宿主内で利用している宿主因子・パスウェイの発見、HuT5 $\alpha$ への応用を目的とした。既に RhT5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害に重要な因子の候補を選定し、複数の候補因子に関して詳細な解析を実施中で、RhT5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害に関わる宿主因子、及び HIV-1 の複製に重要な働きを持つ宿主因子が挙げられている。また現在、多数の候補因子群から更なる絞込みを行うための準備を行なっている。

研究分担者：なし

#### A. 研究目的

近年 HIV-1 感染症に対する治療法として多剤を併用する HAART が大きな成果を上げている。しかしながら、HAART では生涯にわたり多くの薬剤を飲み続けなければならず、投薬状況の悪化は薬剤耐性ウイルスの出現を招く。旧世界ザル TRIM5 $\alpha$ が HIV-1 の感染を抑制することは良く知られていたが、研究代表者による先行研究より、アカゲザル TRIM5 $\alpha$  (RhT5 $\alpha$ ) が HIV-1 の感染のみならず増殖をも阻害することが明らかになった。(Nat Med. 2007;13(5):631-5) 侵入阻害の場合とは異なり、過剰発現させたヒト TRIM5 $\alpha$  (HuT5 $\alpha$ ) は

HIV-1 の増殖を阻害できなかったが、HIV-1 粒子の成熟を遅らせる事が明らかとなり、HuT5 $\alpha$ でも HIV-1 の増殖を阻害できる可能性が示めされた。SIV が TRIM5 $\alpha$ や APOBEC といった「種の壁」を乗り越えてヒトへと移ってきたことを考えると、ヒト内在性の種間バリアは強力な抗ウイルス機構と考えられ、その一因である HuT5 $\alpha$ を利用し、HIV-1 感染症への対策とすることは効果的だと考えられる。本研究では種間バリアに関する学術的な意義のみならず、AIDS 発症予防・HIV-1 感染拡大の防止に応用可能な知見を得られると考えられ、その必要性は高いと言える。そこで本研究では、RhT5 $\alpha$ による HIV-1 の複製阻害のメカニズムを解明し、HuT5 $\alpha$ がなぜ HIV-1 の複製を阻害できないのかを明らかに

することを目的とし、更に得られた知見に基づき HuT5 $\alpha$ による HIV-1 複製阻害活性の誘導を試みる。

## B. 研究方法

### 1. DNA Transfection

細胞は 60% confluent 程度の濃度で用意し、FuGene 6 (Roche)を用いたりポフェクション法にて遺伝子導入した。本研究で行われた全ての遺伝子導入実験では DNA 1  $\mu$ g あたり 2.5  $\mu$ l の FuGene 6 を用いた。

### 2. HIV-1 の力価測定

ウイルス感染の指示細胞として TZM-bl 細胞を用いた。48-well プレートに蒔かれた 5x10<sup>4</sup> の TZM-bl 細胞に、0.45  $\mu$ m のフィルターを通して精製したウイルス上清 100  $\mu$ l を感染させ、24 時間後に細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

### 3. ウイルス粒子内タンパク質の 2 次元解析

昨年度と同様の方法にて実施、ただし染色方法として CBB 染色、銀染色を適宜用いた。RhT5 $\alpha$ の存在によって強度に増減を認めたスポットを切り出し MALDI/TOFMS 解析にて含まれているタンパク質を解析した。ウイルスタンパク質の二次元展開像の例を図 1 に示した。

### 4. siRNA による一過性ノックダウン

siRNA はライフテック社のステルスシリーズより保証付きのものを購入、もしくは文献上実績のあるものを使用した。siRNA とプラスミド DNA の co-transfection にはライフテック社の LipofectAMIN 2000 を用いた。

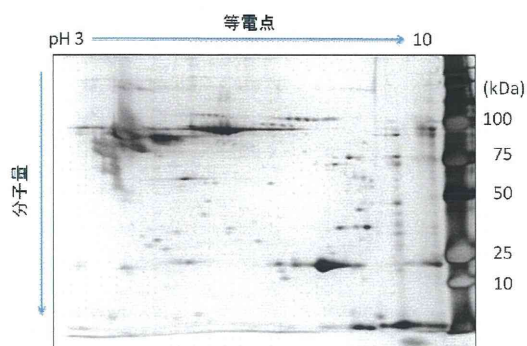


図 1 HIV-1 ウイルス粒子の二次元展開像

p24 量で 30ng 相当の HIV-1 を 2 次元展開し銀染色を行ったもの

### 5. ノックダウン細胞の樹立

shRNA はレンチウイルスベクターにて標的細胞に導入、約 2 週間のピューロマイシンによる選択を経て標的 mRNA の現象を確認した。

### 6. 定量 PCR 法

本研究では SYBR Green (ABI) を用いた q-PCR 法を採用した。

## C. 研究結果

### 1. 計画初年度（平成 22 年度）のサマリー

RhT5 $\alpha$ がヒト細胞内で利用している宿主因子・パスウェイの発見を目的とした実験系を樹立した。共免疫沈降法によって TRIM5 $\alpha$ と結合するタンパク質の同定、解析を、ウイルス粒子内タンパク質の二次元電気泳動を用いて抑制状態のウイルス粒子そのものを調べる実験系をそれぞれ樹立し、複数の候補タンパク質を同定した。本年度は候補となる宿主因子のリスト化、HIV-1 産生阻害との関連が予想される因子の機能解析を行った。

### 2. ウイルス粒子内タンパク質の解析

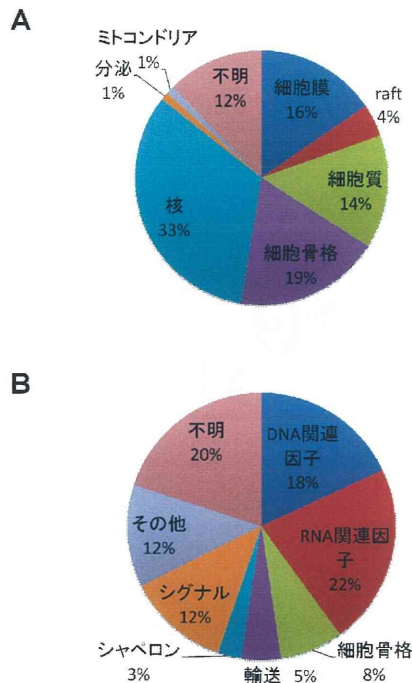


図2 同定された候補因子の性質  
細胞内での局在 (A) もしくは既知の機能 (B) を指標に分類した。

研究計画書年度と同様に RhT5 $\alpha$ 存在、非存在下で産生された HIV-1 粒子の精製・二次元展開を行い、候補となる因子の同定を行った。現在までに得られた候補因子の総数は 97 個で、既に HIV-1 ウイルスタンパク質との相互作用が報告されているものが約半数の 45 種類含まれていた。また、既に粒子内への取り込みが報告されている HSP70 や TRIM5 $\alpha$ をウイルス粒子内より検出することに成功した。また、XRCC1 などその SNP と HIV-1 感染者における血中ウイルス量に相関が報告されている因子も同定された。

また細胞内での局在を指標に分類すると核タンパク質が約 33%と非常に多く検出された、その他出芽の場と考えられている raft 上に存在するタンパク質が約 4%、また細胞骨格形成、細胞骨格上のタンパク質輸送に関与している

タンパク質が約 14%検出された (図 1)。更に細胞内での局在が未知なタンパク質が約 12%検出された。同様に、宿主細胞内での既知の働きを指標に分類したところ DNA 及び RNA の結合因子、修復因子などが全体の約 40%を占めていたが、タンパク質輸送のカーゴタンパク質、シヤペロン活性を持つタンパク質など、HIV-1 がウイルス産生に利用していることが期待できるタンパク質も検出された (図 1)。機能面でも不明なタンパク質も約 20%同定された。

### 3. 同定された宿主因子の機能解析

以下、本研究で得られた具体的な宿主因子に関して、HIV-1 の増殖に対する機能・RhT5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害における役割に関して解析を進めているので、因子ごとにまとめて記載する。

#### 3.1. CORN1C 及び Vimentin

前年度同定された因子のうち、細胞骨格、及び骨格上のタンパク質輸送に関する因子の解析を行った。CORN1C は、細胞骨格上のタンパク質輸送に関わるモータータンパク質と考えられており、その機能の多くは未知である。また、Vimentin は中関係フィラメント形成因子で、これら細胞骨格系の宿主因子群を利用して HIV-1 Gag がアセンブリの場である細胞膜直下へ移動しており、その途中で RhT5 $\alpha$ による攻撃を受けている可能性を考えた。

まず、CORN1 の Transient でのノックダウンには成功したものの、文献上有効な shRNA を用いても Stable なノックダウン細胞の樹立ができなかった。この結果は CORN1C の細胞内での働きの重要性を示唆するものであ

るが、HIV-1 産生における CORN1C の役割は解明できていない。この問題を解決するために SIGMA 社よりノックダウン効果の確認された別の shRNA を追加購入し、また文献上でドミナントネガティブ効果を持つとされる変異体を用いて検証すべく作製済みである。更に、候補因子として同じコロニンファミリーの CORN2A も挙がっていることから同時に検証を進めていく計画である。

Vimentin も同様にノックダウン細胞を樹立し、ウイルス産生実験を試みた。しかし、Vimentin は細胞骨格そのものであるため、ノックダウンされた細胞が接着細胞としてのフェノタイプを維持できず、HIV-1 産生を詳細に検討することができなかった。そこで、Vimentin の既知のドミナントネガティブ変異体を用いることとした。

Vimentin は N 末端からヘッドドメイン、ロッドドメイン、テイルドメインを持ち、更にロッドドメインは 4 つのサブドメインに分かれる。ヘッドドメインとロッドの最初のサブドメインのみを過剰発現させると中間径フィラメント形成を一過的に阻害することが知られており、文献上 N 末端に GFP を融合したものが広く採用されていたため、本研究でも同じものを採用した。

過剰発現したドミナントネガティブ (DN) Vimentin 存在下で RhT5 $\alpha$  の HIV-1 産生に対する影響を調べた。DN-Vimentin を導入すると TRIM5 $\alpha$  の有無に関わらず HIV-1 の産生が低下した。また、DN-Vimentin 導入時、単位 p24 あたりのウイルス感染価も低下した (Fig 5B)。以上より、残念ながら RhT5 $\alpha$  による HIV-1 産生阻害との関与は認められなかったが、Vimentin は HIV-1 産生に重要な役割を

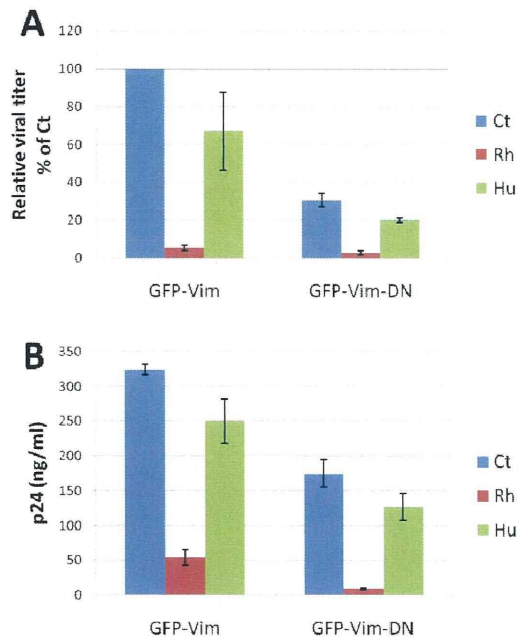


図3 Vimentin-DNによるHIV-1産生抑制

293T細胞にpNL4-3、pRhT5 $\alpha$ -HAあるいはpHuT5 $\alpha$ -HA、pGFP-Vim-DNあるいはpGFP-Vimを導入した。導入後48時間後のウイルス産生量をTZM-bl細胞への感染(A)とp24 ELISA(B)を指標に解析した。■CtはpcDNA3.1、■RhはpRhT5 $\alpha$ -HA、■HuはpHuT5 $\alpha$ -HAを導入した結果を示す。横軸のGFP-VimはWTを、GFP-Vim-DNはDNを導入した結果を示す。

持つことが示唆された (図3)。

### 3.2. SOCS1

SOCS1はサイトカインシグナル抑制タンパク質の1つでありHIV-1 Gagをライソソームでの分解から救い出すことでHIV-1の増殖を促進する。SOCS1をノックダウンした細胞でGagタンパク質の分解が抑制され、結果としてウイルス産生は質・量ともに回復した。そこで、SOCS1、RhT5 $\alpha$ 、Gagの三者の相互作用を過剰発現系での共免疫沈降法により解析した。SOCS1を過剰発現させることで

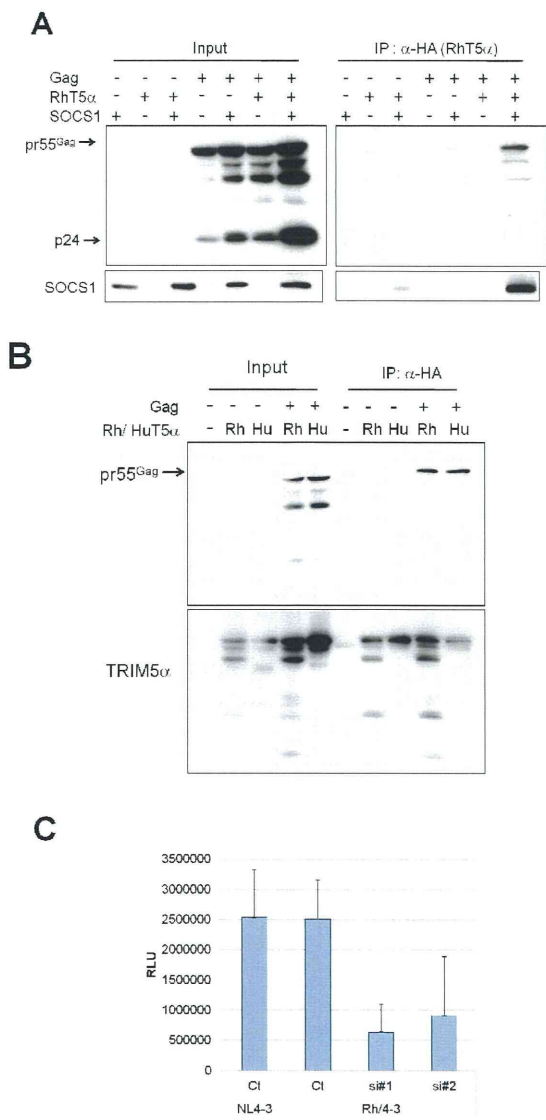


図4 HIV-1 産生阻害における SOCS1 の効果

(A) 293T 細胞に Gag 発現プラスミド TRIM5a 発現プラスミド、SOCS 発現プラスミドを図中に示す組み合わせで co-transfection し、48 時間後に HA (TRIM5a) を用いて IP を行った結果。左側のパネルが IP 前のインプットを右側が IP 後のタンパク質をそれぞれウエスタンブロットしたもの。(B) A と同様の実験を TE671 において行った。ただし SOCS1 発現プラスミドは用いていない。(C) TE671 に SOCS1 に対する siRNA、RhT5a 発現プラスミド、pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後のウイルス産生を測定した結果。

SOCS1・RhT5α・Gag の 3 者での共沈殿が認められた。またこの時、SOCS1、RhT5α の 2 者での相互作用も認められた (図 4A)。以上から、RhT5α が Gag の分解を誘導する過程で SOCS1 が重要な働きをしていることが示唆された。そこで、RhT5α による HIV-1 産生阻害が起こらない TE671 細胞での内在 SOCS1 の mRNA 量を解析したところ、293T よりも最大で約 10 倍高い発現を認め、また TE671 細胞を用いると、内在の SOCS1 発現レベルで RhT5α と Gag タンパク質の共沈殿が認められた (図 4B)。これらから、RhT5α の抗 HIV-1 活性には内在性の SOCS1 発現量が重要であることが示唆され、HIV-1 は宿主 SOCS1 タンパク質を利用してウイルスタンパク質を安定化していることが予想された。そこで RhT5α の抗 HIV-1 活性に対する内在 SOCS1 の役割を調べるために、SOCS1 ノックダウン細胞からのウイルス産生を観察した。TE671 細胞では、SOCS1 のノックダウンにより RhT5α が HIV-1 の産生を阻害できるようになった (図 4C)。これらの結果より内在性 SOCS1 の発現・活性をコントロールすることで、TRIM5α の抗ウイルス活性をコントロールできる可能性が示めされた。

### 3.3. S ファミリータンパク質

(現在のところ未発表の新規因子の為、知的財産権を考慮して、念のため分子の具体名と構造を伏せさせていただきます。)

S ファミリーの構成因子で S1, S2, S3 は T 細胞系で発現しており、S4 の発現は認められないため、S1~3 を評価の対象とした。S1, S2 は細胞質、もしくは細胞膜表面に局在すると考えられ、機能解析も進められているが、S3 の機能・性状についての報告は殆どなされ

ていない。これらファミリーに共通の構造的特徴から HIV-1 の増殖に関与する因子である可能性を考え、まず過剰発現系でその効果を検討したところ S3 タンパク質が HIV-1 の増殖に必須な因子である事が示唆された。そこで、siRNA をもちいて内在性 S3 タンパク質の発現を抑制したところ HIV-1 産生量の低下が認められた。更なる解析の結果、S3 は核に局在し、S3 をノックダウンすることで、細胞質中の HIV-1 Gag の RNA レベルが低下することが示された (図 5)。現在のところ本因子と RhT5a の相関を示すデータは得られていないが、S3 は HIV-1 の増殖に重要であることから新規抗ウイルス戦略の標的となる可能性が示された。

#### D. 考察

##### 候補宿主因子群の評価

プロテオミクス解析より得られた宿主因子群には、ウイルス粒子内に取り込まれる事が明らかになっているもの、ウイルスタンパク質と相互作用することが明らかになっている宿主因子が含まれており、ウイルス粒子内タンパク質の同定方法として信頼性の高い方法と考えられる。また、現在のところ HIV-1 のライフサイクルとの関連が未知の因子も多数含まれており、新規抗ウイルス戦略開発、新規抗ウイルス薬開発の標的が含まれている事が期待できる。

しかしながらプロテオミクス解析から得られた候補因子は 97 種と多く、網羅的な解析には時間を要してしまう。そこで、更なる絞り込みのために本年度に作製した cDNA ライブラリーを改変する。RhT5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害が起こる細胞である 293T と起こらない細胞である TE671 との比較により、293T にの

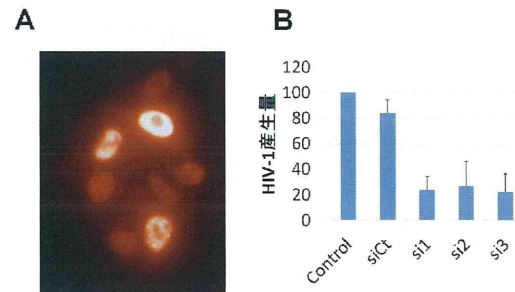


図 5 HIV-1 産生における S3 タンパク質の性状

(A) HeLa 細胞における S3 タンパク質の局在を免疫染色法で検出した。(B) 293T 細胞に S3 タンパク質に対する siRNA と pNL4-3 を co-transfection し、48 時間後のウイルス産生量を測定した結果。

み発現する cDNA をサブトラクションライブラリーとし範囲を狭めてスクリーニングを行う。このサブトラクションライブラリーの質のコントロールとしてマイクロアレイによる mRNA 発現量の比較を計画している。

##### 組替えタンパク質発現系

昨年度大腸菌において発現が確認された GST を融合させた組替え TRIM5 $\alpha$ タンパク質のグルタチオンビーズとの結合が認められなかった。この点に関してレトロウイルス関連の国際会議等で、多数の経験豊富な研究者と Discussion を行ったが、TRIM5 $\alpha$ と GST を連結させることでタンパク質の立体構造が不安定となり、グルタチオンと結合できなくなることが強く予想されている。GST との融合タンパク質作製、精製はごく一般的な方法であったものの、この方法で TRIM5 $\alpha$  の安定したタンパク質精製を実現するのは困難であり、実験系の大きな変更を余儀なくされた。一方で、本実験は当初の研究計画に含まれていない予備的な実験系であることから、一時

中断することとし、今後本研究計画でのタンパク質間相互作用の解析は主に共免疫沈降法に基づき行う予定である。

#### 進捗状況と自己評価

当初の研究計画通り、候補となる因子の選定が進んでおり、一部の因子における機能解析が進んでいる。cDNA ライブラリーの作製活用に関しては、当初の計画と異なる進行となるが、網羅的なプロテオミクス解析の結果に更に網羅的な cDNA ライブラリーの結果を加えるのではなく、プロテオミクス解析で得られた結果を絞り込むために使用することとしたい。現在のところ、cDNA ライブラリーの使用目的の変更などで、研究の実施順の前後等はあるものの、期待できる因子の解析も進んでおり、研究目標到達へ順調に進行していると考えている。

また、実験計画の最終年度となる3年目は以下の点を中心に進めていく。

- (1) プロテオミクス解析の結果の絞込み
- (2) 現在解析中の因子、及び(1)で絞りこまれた因子の解析を進め、HuT5 $\alpha$ の抗 HIV-1 活性増強に繋がるかの検証を行う。

#### E. 結論

本研究計画の目的は RhT5 $\alpha$ による HIV-1 産生阻害機序を理解することであり、得られた知見を下に HuT5 $\alpha$ の抗ウイルス活性を惹起することである。RhT5 $\alpha$ による抗ウイルス活性の理解のためには関与する宿主因子の同定が不可欠であるため、既に具体的な因子の機能解析に着手し、一定の成果を挙げている。しかしながら、未だ手付かずの候補因子も多く存在することから、更なるスクリーニングを組み合わせることで、候補因子のしぼり込

む必要があり、3年目となる平成24年度では、具体的な因子の機能解析と並行して、絞込みを繰り返すことで、意味のある宿主因子の発見へとつなげたい。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

アカゲザル TRIM5 $\alpha$ (RhT5 $\alpha$ )による HIV-1 の感染・産生阻害に重要な宿主因子の探索  
鹿間さおり、助川明香、佐久間龍太、山岡昇司

日本エイズ学会 平成23年12月1日 (東京)

アカゲザル TRIM5 $\alpha$  (RhT5 $\alpha$ )による HIV-1 産生阻害活性の細胞特異性における SOCS1 の役割

助川明香、佐久間龍太、大嶺青河、池田靖弘、山岡昇司

日本エイズ学会 平成23年12月1日 (東京)

Involvement of Actin Binding Protein Coronin 1C in HIV-1 Replication and Rhesus Macaque TRIM5 $\alpha$ -Mediated Restriction

Saori Shikama, Ryuta Sakuma, Sayaka Sukegawa, Shoji Yamaoka

IUMS2011 平成23年9月14日 (北海道)

Suppressor of Cytokine Signaling 1 is a Possible

Cause of the Cell Line Dependency of the Rhesus Macaque TRIM5 $\alpha$ -Mediated Late Restriction

Sayaka Sukegawa, Ryuta Sakuma, Seiga Ohmine, Yasuhiro Ikeda, Shoji Yamaoka

IUMS2011 平成 23 年 9 月 13 日 (北海道)

The Role of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Rhesus Macaque TRIM5 $\alpha$ -Mediated Late Restriction and its Cell Line Dependency

Ryuta Sakuma, Sayaka Sukegawa, Seiga Ohmine, Yasuhiro Ikeda and Shoji Yamaoka

CSH Retrovirus meeting 平成 23 年 5 月 26 日 (NY, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在、特許等を申請できる状況には無いが、

新規宿主因子の探査であることから、継続審査時の審査員の助言に従い、特許取得が可能な状態を維持する形での慎重な研究活動・成果報告を心がけたい。

2. 実用新案登録

前述 1 に準じる。

3. その他

Retroviral Host Cell Factors: TRIM5, APOBEC3G and Cyclophilins

Ryuta Sakuma and Hiroaki Takeuchi

HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies, ISBN: 978-953-307-665-2

## II. 分担研究報告書

研究分担者無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	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
Ryuta Sakuma and Hiroaki Takeuchi	Retroviral Host Cell Factors: TRIM5, APOBEC3G and Cyclophilins	Nancy Dumas	HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies	InTech	Croatia	2011	183-192

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Retroviral Host Cell Factors: TRIM5, APOBEC3G and Cyclophilins

Ryuta Sakuma and Hiroaki Takeuchi

*Department of Molecular Virology, Tokyo Medical and Dental University,  
Japan*

## 1. Introduction

The conventional innate and adaptive immune systems are very effective at viral infections. However, for retroviral infections, there is another immune system that can recognize at multiple levels e.g. expression of internal host factors with antiviral activity. This is a component of viral recognition and subsequent restriction that has been called "intrinsic immunity" (Bieniasz, 2004). Intrinsic immunity can distinguish from innate and adaptive immunity, and it does not need to be induced by viral infections. Retrovirus replication has many steps in common with other retroviruses. Upon entry into the cytoplasm of target cells, some host factors are required for efficient retroviral replication cycle, and others act as restriction factors that block reverse transcription and ligation of viral cDNA to chromosomal DNA. Recently, several host factors have been identified such as the proline isomerase cyclophilin A (CypA), ApoB mRNA editing catalytic subunit (APOBEC) and tripartite motif protein 5 alpha (TRIM5 $\alpha$ ) against retrovirus infection. This review will focus on how these host factors modulate retroviral activity. It will then present our current understanding of the mechanism that may explain zoonotic transmission of retroviruses.

### 1.1 Fv1 and Fv4: Restriction factors that block infection by Friend-MLV in murine cells

The most intensively studied anti-cellular gene is Friend virus susceptibility (Fv) gene in laboratory mice. Fv1 and Fv4 were of special interest in Fv alleles because cultured murine cells containing them were resistant to infection by Friend murine leukemia virus (MLV) (Gardner et al., 1980; Hartley et al., 1970; Pincus et al., 1971; Rasheed and Gardner, 1983; Suzuki, 1975). Fv1-mediated restriction of MLV, for instance, is a well-studied representative of a class of restriction factors that act after membrane fusion, are highly virus-specific (Goff, 2004). Fv1 has two alleles, Fv1<sup>n</sup> and Fv1<sup>b</sup>, targeting B- and N-tropic MLV, respectively (Rein et al., 1976). Fv4 was shown to encode an ecotropic MLV-like *env* gene and recent report showed that Fv4 inhibits infection by exerting dominant negative effect on MLV Env (Takeda and Matano, 2007). Although the precise mechanism of Fv1 restriction remains unclear, the important point is that the viral determinants for this type of restriction have been mapped to the capsid protein (MLV amino acid 110) and as a target of host factors that can modulate retroviral life cycle (Gautsch et al., 1978; Kozak and Chakraborti, 1996).

### 1.2 Ref1 and Lv1: Fv1-type restriction factors in human or primate cells

A host factor that belongs to the same category of Fv1-type restriction factors is Ref1 (restriction factor 1). Ref1 is expressed in human and other non-murine cells and imposes a similar restriction of Fv1 that is controlled by relationship between the same capsid residue (MLV CA 110) and Fv1 (Towers et al., 2000). The difference between Ref1 and Fv1 function is that Ref1 restricts retroviral replication at a step prior to reverse transcription while Fv1 seems to impose a post-reverse transcription block (Goff, 2004). Another restriction factor, lentivirus susceptibility factor 1 (Lv1), was found to be responsible for restricting HIV-1 and N-tropic MLV but not rhesus macaque simian immunodeficiency virus (SIVmac) replication in Old World monkey cells (Besnier et al., 2002; Cowan et al., 2002; Munk et al., 2002).

### 1.3 TRIM5 $\alpha$ : Fv1-type host factor restricting HIV-1 in primate cells

Recently, the host protein which dictates Ref1 activity was identified as an  $\alpha$ -isoform of rhesus macaque TRIM5 $\alpha$  protein by the laboratory of Dr. Joseph Sodroski (Stremlau et al., 2004). TRIM5 is a member of the tripartite motif (TRIM) family of proteins, and has RING, B-box 2 and coiled-coil as common and conserved domains among the family and B30.2(PRYSPRY) domain on its c-terminal region (Nisole et al., 2005). Subsequently, the human and non-human primates homologues of TRIM5 $\alpha$  were shown to explain restriction activity against retroviruses, N-MLV, and equine anemia virus (Hatzioannou et al., 2004b; Keckesova et al., 2004; Perron et al., 2004; Si et al., 2006; Song et al., 2005; Yap et al., 2004; Ylinen et al., 2005). Rhesus monkey TRIM5 $\alpha$  has strong anti-HIV-1 activity, only modest restriction against SIVmac, and does not block MLV infection, whereas its human homologue does not active against HIV-1 infection.

TRIM5 $\alpha$  recognizes incoming viral core, but not a monomeric capsid protein, through its B30.2(PRYSPRY) domain. B-box2 and coiled-coil domains are required for TRIM5 $\alpha$  multimerization, and both coiled-coil and B30.2(PRYSPRY) domains are essential for viral core binding (Reymond et al., 2001; Stremlau et al., 2006). TRIM5 $\alpha$  captures HIV-1 core at a very early step(s) after infection, immediately after the release of core into cytoplasm. To restrict HIV-1 infection and to recognize viral core, TRIM5 $\alpha$  must be oligomerized through its B-box 2 and coiled-coil domains. Its RING domain has E3 ubiquitin ligase activity, and self-ubiquitination is occurred, then TRIM5 $\alpha$  is quickly degraded. This quick degradation of TRIM5 $\alpha$  is not necessary for post-entry restriction, since replacement of TRIM5 $\alpha$  RING domain with the corresponding domain of TRIM21 which has lower self-ubiquitination activity and longer half life than TRIM5 $\alpha$  didn't alter the antiviral activity. When TRIM5 $\alpha$  was over expressed, cytoplasmic body is formed, and the cytoplasmic body is supposed to be required for its antiviral activity. During TRIM5 $\alpha$ -mediated post-entry restriction, disassembly of viral core is induced too quickly and the accumulation of viral RT-products is reduced. MG132 treatment inhibits to induce quick-disassembly, but still HIV-1 infectivity was restricted. Two reports showed that TRIM5 $\alpha$  could block not only viral cDNA accumulation but also the nuclear import of viral cDNA (Berthoux et al., 2004; Wu et al., 2006). Thus TRIM5 $\alpha$ -mediated post-entry restriction is thought to have at least two phases: (i) TRIM5 $\alpha$  induces quick-disassembly of viral core in a proteasome dependent manner and (ii) TRIM5 $\alpha$  degrades HIV-1 cDNAs in a proteasome independent manner. The determinant of specificity and magnitude of the post-entry restriction lies on B30.2(PRYSPRY) domain. Recently, Pacheco *et al.* reported that new world monkey TRIM5 $\alpha$  restricts foamy virus

infection (Pacheco et al., 2010). Another consideration is the clinical significance of TRIM5 $\alpha$  against acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human. Moreover several reports showed that the efficacy of TRIM5 $\alpha$ -mediated suppression of HIV-1 replication might interfere with disease progression of AIDS in humans (Cagliani et al., 2010; van Manen et al., 2008). Thus, TRIM5 $\alpha$ -mediated restriction may occur multi step in retrovirus replication with the relationship between other host factor(s).

Recently, the lab of Dr. Yasuhiro Ikeda reported that rhesus macaque TRIM5 $\alpha$  also inhibits HIV-1 production by inducing the degradation of a viral precursor Gag protein (Sakuma et al., 2007). To restrict HIV-1 production, amino acid residues in B-box 2 and coiled-coil domains dictated the specificity of the restriction. In the late restriction, the accumulation of HIV-1 RNA was not affected but the accumulation of precursor Gag was inhibited in an ubiquitine-proteasome independent manner. This TRIM5 $\alpha$ -mediated late-restriction is still controversial (Zhang et al., 2008), yet it is presumable that TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection and production in two distinct mechanisms. Although TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in broad range of cells, its late restriction depends on a cell line (Sakuma et al., 2007).

Here is another notable class of the TRIM family called TRIM-Cyp isolated from new world monkeys (NWM). A report from the laboratory of Dr. Jeremy Luban demonstrated that owl monkey has TRIM-Cyp that restricts HIV-1 infection (Sayah et al., 2004). Although TRIM-Cyp has a cyclophilin A sequence in its C-terminal region instead of B30.2(PRYSPRY) domain that dictates the specificity and the magnitude of post entry restriction in OWM-TRIM5 $\alpha$ -mediated post-entry restriction, it recognizes incoming core structure and restricts HIV-1 infection (Stremlau et al., 2006). Recently, TRIM-Cyp mRNA was also detected in a rhesus macaque cell, and over-expressed rhesus TRIM-Cyp restricts HIV-1 infection and production (Brennan et al., 2008; Dietrich et al., 2010; Sakuma et al., 2010; Wilson et al., 2008).

Not like other restriction factors, the counter part of TRIM5 $\alpha$ -mediated restrictions is not accessory gene product of HIV-1, and human TRIM5 $\alpha$  has just a modest restriction activity. NWM cell doesn't have TRIM5 $\alpha$ , yet even without B30.2(PRYSPRY), TRIM5-Cyp can be a defense against viral infection. These evidences suggest that TRIM5 $\alpha$  could be a key molecule to explain the species-species barrier. And if so, TRIM5 $\alpha$ 's dual antiviral activities can block the viral transmission even from closer species like to human from monkeys.

#### **1.4 APOBEC: Enzymatic restriction factor that target retroviruses**

Replication of HIV-1 in primary CD4+ T cells, monocyte and some immortalized T cell lines depends on the presence of HIV-1 accessory gene product, Vif (stands for virus infectivity factor)(Fisher et al., 1987; Strebel et al., 1987), and it works in a host cell-specific manner. Vif is required for enhanced HIV-1 replication in some cell types called non-permissive cells, in contrast HIV-1 replication is Vif-independent in permissive cells (Akari et al., 1992; Blanc et al., 1993; Borman et al., 1995; Fan and Peden, 1992; Gabuzda et al., 1992; Sakai et al., 1993; von Schwedler et al., 1993). Recently, some cytidine deaminases were identified as a new class of host restriction factors that target retroviruses such as HIV-1 or SIV (Cullen, 2006; Harris and Liddament, 2004). APOBEC3G (Apo3G), a member of the APOBEC family of cytidine deaminases, is the first identified enzymatic restriction factor and the determinant that makes cells permissive or non-permissive. Unlike TRIM5 $\alpha$  nor Fv1, Apo3G does not exert its antiviral activity by targeting the viral capsid protein, but it has to be incorporated into a newly synthesized virion during a production step, and then inhibits virus replication

by targeting single-stranded viral cDNA during an infection step. HIV-1 counteracts Apo3G with Vif expression. During the production of progeny virions, Vif binds to Apo3G and induces Apo3G's proteosomal degradation, resulting in the decreased steady-state levels of human Apo3G (hApo3G) (Yu et al., 2003).

There are several antiretroviral mechanisms of Apo3G against HIV-1 infection. First, Apo3G-containing virus can be resulted in a large number substitution that register as cytidine (C) to thymine (T) in a virus minus-strand during reverse transcription, resulting guanine (G) to adenine (A) mutations in a viral plus strand, known as 'G to A hypermutation' (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Mariani et al., 2003; Yu et al., 2004; Zhang et al., 2003). Second, Apo3G can inhibit tRNA annealing or tRNA processing during reverse transcription (Guo et al., 2006; Guo et al., 2007; Mbisa et al., 2007). Third, Apo3G inhibits DNA strand transfer or integration (Li et al., 2007; Luo et al., 2007; Mbisa et al., 2007). Although Apo3G has the most potent anti-HIV-1 activity among the APOBEC family of proteins, another member of the family, APOBEC3F (Apo3F) was shown to inhibit HIV-1 infection in the absence of Vif (Bishop et al., 2004a; Liddament et al., 2004; Wiegand et al., 2004; Zheng et al., 2004), whereas APOBEC3B (Apo3B) can inhibit HIV-1 infection in both the presence and absence of Vif (Bishop et al., 2004a; Doehle et al., 2005; Rose et al., 2005).

Although we can imagine the broad range of antiretroviral activity of APOBEC family because APOBEC proteins from non-human species can also inhibit HIV-1 infection (Bishop et al., 2004a; Bishop et al., 2004b; Cullen, 2006; Mariani et al., 2003; Wiegand et al., 2004), the Vif-Apo3G interaction is thought to be species specific (Mariani et al., 2003; Simon et al., 1998). Accordingly, hApo3G is insensitive to SIVagm Vif while african green monkey Apo3G (agmApo3G) is insensitive to HIV-1 Vif and the determinant of this species specificity depends on amino acid 128 of hApo3G and agmApo3G (Bogerd et al., 2004; Mangeat et al., 2004; Mariani et al., 2003; Schrofelbauer et al., 2004; Xu et al., 2004). However, such species specificity is not strictly controlled, for example a report from the laboratory of Klaus Strebel demonstrated that SIVagm Vif supported replication of SIVagm virus in the hApo3G-positive human A3.01 T cell line. Replication of *vif*-defective SIVagm in A3.01 cells was severely restricted, resulted in an accumulation of cytidine deaminase-induced G-to-A mutations in SIVagm genome (Takeuchi et al., 2005). Therefore, it is probable that SIV Vif has evolved to counteract hApo3G restriction and this might contribute zoonotic transmission of SIV.

Although the antiviral activity of Apo3G is clearly correlated with its deaminase activity (Iwatani et al., 2006; Mangeat et al., 2003; Navarro et al., 2005; Opi et al., 2006; Shindo et al., 2003; Zhang et al., 2003), some members of APOBEC family have additional anti-retrovirus activities that do not require catalytically activity of itself (Li et al., 2007; Luo et al., 2007). In fact, several reports showed that deaminase-defective Apo3G and Apo3F have antiviral activity, and some antiviral-inactive mutants of both Apo3G and Apo3F have cytidine deaminase activity (Bishop et al., 2006; Holmes et al., 2007; Newman et al., 2005; Shindo et al., 2003).

However, deaminase-defective Apo3G mutant with C288S/C291A substitutions did not show any anti-viral activity and over-expression of the mutant could work as a dominant negative agent of wild-type Apo3G, suggesting a tightly-relationship between antiviral and deaminase activities (Miyagi et al., 2007; Opi et al., 2006). Recently, it was demonstrated that hApo3G has an intrinsic immune effect on viral DNA synthesis, which may account for cytidine deaminase-independent antiviral activity of Apo3G, and did not abort replication

steps following reverse transcription (Iwatani et al., 2007). Therefore, precise mechanism of Apo3G-dependent restriction of retroviral infection still remains unclear.

### **1.5 Cyclophilin A: positive factor against retrovirus replication (or restriction factor?)**

Cyclophilins are ubiquitous proteins and first identified as the target of cyclosporine A (CsA), an immunosuppressive reagent (Takahashi et al., 1989). CypA has proline-isomerase activity that catalyzes the cis-trans isomerization of proline residue (Fischer et al., 1989). The binding of cyclosporine A to cyclophilin A inhibits this isomerase activity (Takahashi et al., 1989). In retrovirus replication, CypA was found to bind HIV-1 capsid (CA) in the yeast two-hybrid system (Luban et al., 1993). The sequence Ala88-Gly89-Pro90-Ile91 of CA protein is the major fragment bound to the active site of CypA (Franke et al., 1994; Gamble et al., 1996; Zhao et al., 1997). Interestingly, The peptidyl-prolyl bond between Gly89 and Pro90 of the CA fragment has a trans conformation, in contrast to the cis conformation observed in other known CypA-peptide complexes (Bosco et al., 2002; Zhao et al., 1997), and Gly89 preceding Pro90 has an unfavorable backbone formation usually only adopted by glycine, suggesting that special Gly89-Pro90 sequence but not other Gly-Pro motif is required for the binding of CA protein to CypA. Therefore, CypA might be likely to act as a molecular chaperone but not a cis-trans isomerase (Zhao et al., 1997). However, one report showed that CypA does not only bind CA protein but also catalyzes efficiently cis-trans isomerization of Gly89-Pro90 peptidyl-prolyl bond (Bosco et al., 2002). The relationship between the Gly89-Pro90 bond and catalysis of cis-trans isomerization by CypA still remain unclear.

It has been well established that CypA promotes an early step of HIV-1 infection in human cells (Braaten et al., 1996a; Braaten et al., 1996c; Braaten and Luban, 2001; Franke and Luban, 1996; Franke et al., 1994; Hatzioannou et al., 2005; Sokolskaja et al., 2004; Thali et al., 1994). CypA is efficiently encapsidated into HIV-1 produced from infected cells through interaction with the CA domains of the Gag polyprotein and disruption of CypA incorporation into virions by CsA or HIV-1 Gag mutants caused a decrease in replication efficiency (Ackerson et al., 1998; Braaten et al., 1996a; Braaten and Luban, 2001; Bukovsky et al., 1997; Franke et al., 1994; Ott et al., 1995; Thali et al., 1994). It is still unclear how CypA is efficiently packaged into HIV-1 virion, but several report showed that both dimerization of CA and multimerization of CypA is required for efficient binding each other (Colgan et al., 1996; Javanbakht et al., 2007). Although CA-CypA interaction is required for infectivity, the important point is that CypA interacts with incoming HIV-1 cores in newly target cells than occurring as core assemble during HIV-1 budding from the virion producer cells, indicated that target cell CypA promotes HIV-1 infectivity (Kootstra et al., 2003; Sokolskaja et al., 2004; Towers et al., 2003).

CypA-dependent virus replication is only limited the retroviruses which encode CA that binds CypA. In fact, only those retroviruses are dependent upon CypA for replication (Braaten et al., 1996c; Franke and Luban, 1996; Franke et al., 1994; Luban et al., 1993; Thali et al., 1994). These observations suggested that CA-CypA interaction might contribute tropism determinants for retroviruses. HIV-1 infection in non-human primate cells inhibits prior to reverse transcription after virus entry (Besnier et al., 2002; Cowan et al., 2002; Hatzioannou et al., 2003; Himathongkham and Luciw, 1996; Hofmann et al., 1999; Munk et al., 2002; Shibata et al., 1995; Towers et al., 2003). This restriction is thought to be the same step in the retrovirus life cycle where CypA works (Braaten et al., 1996b). Indeed, Analysis of CypA-binding region of CA with chimeric viruses of HIV-1 and SIV showed the viral determinant for species-specificity (Berthoux et al., 2004; Bukovsky et al., 1997; Cowan et al., 2002;

Dorfman and Gottlinger, 1996; Hatziioannou et al., 2004a; Hatziioannou et al., 2006; Ikeda et al., 2004; Kamada et al., 2006; Kootstra et al., 2003; Owens et al., 2004; Owens et al., 2003; Sayah et al., 2004; Shibata et al., 1991; Shibata et al., 1995; Stremlau et al., 2004; Towers et al., 2003).

Human CypA is required for efficient HIV-1 infection but not SIV. There is no known role for CypA in SIV infection in human cells. Recently, the first report from the laboratory of Klaus Strebel showed that human CypA acts as restriction factor against SIV infection in human cells, and SIV Vif counteracts a CypA-imposed inhibition against SIV infection with exclusion of CypA from SIV vision (Takeuchi et al., 2007). This phenomenon could distinguish from the function of SIV Vif against hApo3G previously reported from same laboratory (Takeuchi et al., 2005) because they used human cells lacking detectable deaminase activity. This observation raised the possibility that SIV Vif is crucial for zoonotic transmission of SIV from monkey to human.

## 2. Conclusion

Viral replication requires a lot of host cell factors, whose species specificity may affect viral tropism. On the other hand, there exist host factors that restrict viral replication. The anti-viral system mediated by some of these restriction factors, termed intrinsic immunity, which is distinguished from the conventional innate and adaptive immunity has been indicated to play an important role in making species-specific barriers against viral infection. As discussed in this chapter, we describe the current progress in understanding of such restriction factors against retroviral replication, especially focusing on TRIM5 $\alpha$  and APOBEC whose anti-retroviral effects have recently been recognized. Additionally, we mentioned CypA that is essential for HIV-1 replication in human cells and may affect viral tropism. Understanding of these host factors would contribute to identification of the determinants for viral tropism. Finally, understanding of the factors mediating intrinsic immunity may lead to the development of antiviral agents that can boost their potency and thereby lead to treatments for viral disease.

## 3. References

- Ackerson, B., Rey, O., Canon, J., and Krogstad, P. (1998). Cells with high cyclophilin A content support replication of human immunodeficiency virus type 1 Gag mutants with decreased ability to incorporate cyclophilin A. *Journal of virology* 72, 303-308.
- Akari, H., Sakuragi, J., Takebe, Y., Tomonaga, K., Kawamura, M., Fukasawa, M., Miura, T., Shinjo, T., and Hayami, M. (1992). Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 mutants in human peripheral blood mononuclear cells. *Archives of virology* 123, 157-167.
- Berthoux, L., Sebastian, S., Sokolskaja, E., and Luban, J. (2004). Lv1 inhibition of human immunodeficiency virus type 1 is counteracted by factors that stimulate synthesis or nuclear translocation of viral cDNA. *Journal of virology* 78, 11739-11750.
- Besnier, C., Takeuchi, Y., and Towers, G. (2002). Restriction of lentivirus in monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11920-11925.
- Bieniasz, P.D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nature immunology* 5, 1109-1115.

- Bishop, K.N., Holmes, R.K., and Malim, M.H. (2006). Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *Journal of virology* 80, 8450-8458.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., and Malim, M.H. (2004a). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14, 1392-1396.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., and Malim, M.H. (2004b). APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* (New York, NY 305, 645.
- Blanc, D., Patience, C., Schulz, T.F., Weiss, R., and Spire, B. (1993). Transcomplementation of VIF- HIV-1 mutants in CEM cells suggests that VIF affects late steps of the viral life cycle. *Virology* 193, 186-192.
- Bogerd, H.P., Doehle, B.P., Wiegand, H.L., and Cullen, B.R. (2004). A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3770-3774.
- Borman, A.M., Quillent, C., Charneau, P., Dauguet, C., and Clavel, F. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *Journal of virology* 69, 2058-2067.
- Bosco, D.A., Eisenmesser, E.Z., Pochapsky, S., Sundquist, W.I., and Kern, D. (2002). Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5247-5252.
- Braaten, D., Aberham, C., Franke, E.K., Yin, L., Phares, W., and Luban, J. (1996a). Cyclosporine A-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants demonstrate that Gag encodes the functional target of cyclophilin A. *Journal of virology* 70, 5170-5176.
- Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. (1996b). Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *Journal of virology* 70, 3551-3560.
- Braaten, D., Franke, E.K., and Luban, J. (1996c). Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. *Journal of virology* 70, 4220-4227.
- Braaten, D., and Luban, J. (2001). Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *The EMBO journal* 20, 1300-1309.
- Brennan, G., Kozyrev, Y., and Hu, S.L. (2008). TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3569-3574.
- Bukovsky, A.A., Weimann, A., Accola, M.A., and Gottlinger, H.G. (1997). Transfer of the HIV-1 cyclophilin-binding site to simian immunodeficiency virus from *Macaca mulatta* can confer both cyclosporin sensitivity and cyclosporin dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10943-10948.
- Cagliani, R., Fumagalli, M., Biasin, M., Piacentini, L., Riva, S., Pozzoli, U., Bonaglia, M.C., Bresolin, N., Clerici, M., and Sironi, M. (2010). Long-term balancing selection maintains trans-specific polymorphisms in the human TRIM5 gene. *Hum Genet* 128, 577-588.