

# Vif関連感染抵抗性因子を回避する HIV-1 最適化に関する研究

研究分担者 高折 晃史 (京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科 教授)

## 研究要旨

HIV-1において霊長類間の壁を規定する因子としてAPOBEC3Gなどの宿主抑制因子が明らかになっており、HIV-1 Vifがサル類の宿主抑制因子を回避できないことがHIV-1がサル類に感染できない原因の一つと考えられている。HIV-1 Vifの機能と、それに関与する宿主因子との相互作用の詳細を明らかにすることは、HIV-1感染霊長類モデルの最適化にも重要である。研究分担者の高折はVifの機能のひとつとして、感染細胞の細胞周期停止誘導とそれによるウイルス複製促進に関して、p53が必須であることを突き止め報告したが、さらにVifがp53のセリン残基のリン酸化を促進すること、さらにそのなかでもSer-15のリン酸化が細胞周期停止に必須であることを見出した。Vifがどのような宿主因子を標的としてこのような現象を誘導しているかは今後の課題である。

## A. 研究目的

新規抗HIV-1薬やワクチン開発、有効性評価研究において、実験用動物を用いた前臨床試験は不可欠であるが、HIV-1は実験用サル類に感染発症しないため、HIV-1感染・発症霊長類モデルの確立が望まれている。HIV-1において霊長類間の壁を規定する因子としてAPOBEC3Gなどの宿主抑制因子が明らかになっており、HIV-1 Vifがサル類の宿主抑制因子を回避できないことがHIV-1がサル類に感染できない原因の一つと考えられている。本研究ではHIV-1 Vifの機能と、それに関与する宿主因子との相互作用の詳細を明らかにすることで、HIV-1感染霊長類モデルの最適化に寄与したい。

## B. 研究方法

研究分担者の高折はVifの機能のひとつとして、感染細胞の細胞周期停止誘導とそれによるウイルス複製促進に関して、p53が必須であることを突き止め報告したが、そのメカニズムは大部分未解明である。そこで、p53のリン酸化がVifの誘導する細胞周期停止およびウイルス複製促進に関与しているという仮説を立て、実際にVifがp53のリン酸化を誘導するかをイムノプロット法を用いて検証した。さらに、リン酸化を受ける部位の変異体を作成し、Vifがp53の転写活性や細胞周期、ウイ

ルス複製に影響を与えるかを検討した。

## (倫理面への配慮)

本研究ではヒトの検体を用いていないため、倫理面への配慮は特にしていない。

## C. 研究結果

p53を発現していないH1299細胞にVifとp53の発現ベクターをリポフェクションにより導入したところ、p53のSer-15、Ser-20、Ser-37およびSer-46のリン酸化が増強されたが、Ser9およびSer-392のリン酸化は増強されなかった。さらに、p53を内因性に発現している293T細胞にVifの発現ベクターをリポフェクションにより導入したところ、同様にSer-15、Ser-20、Ser-37およびSer-46のリン酸化が増強された。さらにT細胞株のひとつであるCEM-SS細胞にVifを持つウイルスとVifを持たないウイルスを感染させて比較したところ、Vifを持つウイルスでは同様にSer-15、Ser-20、Ser-37およびSer-46のリン酸化がより強かった。次に、これらのリン酸化がVifの機能発現に関与しているかを検討するために、p53のこれらのセリン残基がリン酸化を受けないような変異体である、S15A、S20A、S37AおよびS46Aを作成した。そのなかで、S15A変異体はVifにより転写活性が増強しないこ

とを見出した。さらに、H1299細胞を用いた一過性発現やJurkat細胞における安定発現株においても、S15A変異体はVifにより細胞周期停止を誘導しないということを見出した。さらに、Jurkat/p53 S15A細胞は、Vifによるウイルス産生促進も起こさないことを見出した。さらに、Vifによるアポトーシスの誘導にはp53が必須であること、この現象はp53 S46Aでは減弱していることを見出した。

#### D. 考察

Vifが誘導する細胞周期停止において、p53のSer-15のリン酸化が重要であることを見出した。また、Vifが誘導するアポトーシスの誘導においてもp53が必須であることを見出した。これらの知見は、HIV-1の重要な病態の一つである細胞死に関連するものであり、将来的には動物モデルの最適化に寄与する情報であるが、今後サルやマカク類の細胞やSIVmacのVifを用いた検証が必要である。

#### E. 結論

Vifの重要な機能の一つである細胞周期停止や細胞死についての重要な知見が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) Katsuhiko Ito, Keisuke Shindo, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Masanobu Shinohara and Akifumi Takaori-Kondo: Phosphorylation of p53 is enhanced by HIV-1 Vif and required for Vif-induced G2 cell cycle arrest. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2011
- 2) Taisuke Izumi, Katsuhiko Ito, Masaru Yokoyama, Masanobu Shinohara, Kotaro Shirakawa, Masashi Matsui, Hiroshi Kondoh, Takashi Uchiyama, Hironori Sato, Keisuke Shindo, and Akifumi Takaori-Kondo: Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. International Congress of Virology 2011

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# Gagと相互作用する感染抵抗性因子を回避する HIV-1最適化・検証研究

研究分担者 中山 英美 (大阪大学微生物病研究所 助教)

## 研究要旨

Gagと相互作用する感染抵抗性因子としてTRIM5 $\alpha$ と、TRIM5遺伝子にCypA遺伝子が挿入された変異によって生じるTRIMCypが知られている。HIV-1感染・発症霊長類モデルを最適化するためには、サルTRIM5 $\alpha$ TRIMCypの性質を調べ、これらのタンパク質による感染抑制を回避するウイルスを作成する必要がある。カニクイザルのTRIM5遺伝子を調べたところ、TRIMCypの頻度がアカゲザルに比較して高いことが明らかとなった。カニクイザルのTRIMCypタンパク質はHIV-1の感染を阻害したが、SIVmacの感染を阻害しなかった。更に頻度は少ないながらTRIMCypの中に多型の存在も検知したが、これまでに作成されたサル指向性HIV-1は、頻度の多いカニクイザルTRIMCypと少ないTRIMCyp両方の感染抑制を回避していることも明らかとなった。以上の結果から、今後、サル指向性HIV-1の感染実験はTRIMCyp変異を両染色体にもつ個体を用いることが望ましいと考えられる。

## A. 研究目的

TRIM5 $\alpha$ はアカゲザルで発見された抗HIV-1因子である。ワクチン開発に必須のHIV-1感染・発症霊長類モデルを最適化するためには、サルTRIM5の性質を調べ、TRIM5による感染抑制を回避するウイルスを作成する必要がある。アカゲザルにおいては、TRIM5遺伝子に多型があることが知られている。われわれは以前に、アカゲザルのTRIM5 $\alpha$ PRYSPRYドメインの339番目のアミノ酸のTFPとQの違いは、HIV-2に対する感染抑制効果を変化させることを報告した。近年、新世界サル(ヨザル)で報告されたTRIM5遺伝子へのサイクロフィリンA遺伝子の挿入が、旧世界ザル(ブタオザル、アカゲザル、カニクイザル)でも起きていることが報告された。本研究においてはHIV-1感染・発症霊長類モデルのために最適なサルは何なのかを知るため、カニクイザルのTRIM5遺伝子の多型と、それぞれのタンパク質の抗ウイルス効果を調べた。

## B. 研究方法

カニクイザル末梢血からゲノムDNAを抽出し、PCRにてTRIM5遺伝子を増幅した。アガロースゲル

電気泳動によりTRIM5遺伝子へのサイクロフィリンA遺伝子の挿入(TRIMCyp変異)の有無を判定した。また、PCR産物の塩基配列も決定した。さらにカニクイザル細胞HSC-Fおよびアカゲザル細胞HSR5.4からmRNAを単離し、RT-PCRにてTRIMCypのcDNAを得た。多型を持つTRIMCypを発現するcDNAはPCRを用いて変異を導入して作成した。TRIMCypを発現するセンダイウイルスベクターを構築した。それぞれのタンパク質の抗ウイルス効果を調べるために、株化T細胞MT4にカニクイザルTRIMCyp、TRIM5 $\alpha$ 及びPRYSPRY領域を欠いたTRIM5 $\alpha$ を発現するセンダイウイルスベクターを感染させ、9時間後にHIV-1(NL4-3)、HIV-2(GH123)、SIVmac239およびサル指向性HIV-1(NL-DT5)を感染させ、感染1、3、6日後の培養上清中のp24、p25、p27抗原量をELISAにて測定した。

## C. 研究結果

フィリピン、マレーシア、インドネシア産のカニクイザル77頭のTRIM5遺伝子の解析を行ったところ、TRIMCypの頻度は、フィリピンで86%、マレーシアで54%、インドネシアで38%と地域差が見られ、ミャンマー産で約20%、中国産では検

出されないと報告されているアカゲザルと比較して、カニクイザルではTRIMCyp遺伝子がむしろ優勢であることがわかった。更に詳しくカニクイザルTRIM $\alpha$ 遺伝子を調べると、TRIMCyp遺伝子を持たない12個体ではPRYSRY領域の339番目（アカゲザルではQあるいはTFPの多型が見られる場所）に多型は見られなかったが、TRIMCyp遺伝子を持つ64個体ではTRIMCypのCypA部分の配列に、66番目のアミノ酸がアスパラギン酸（D）でかつ143番目がリジン（K）のDKハプロタイプと、66番目のアミノ酸がアスパラギン（N）でかつ143番目がグルタミン酸（E）のNEハプロタイプの2つのハプロタイプが存在することが明らかになった。また、NEハプロタイプの頻度はどの地域においても、TRIMCyp遺伝子の10%程度存在していた。他にも図1に示す一塩基置換を見いだした。

TRIMCypタンパク質の抗ウイルス効果を調べた

ところ、DKハプロタイプのTRIMCypはアカゲザルTRIMCypとは異なりHIV-1の感染を抑制し、HIV-2およびSIVmacの感染は抑制しなかった。一方でNEハプロタイプのTRIMCypはアカゲザルTRIMCypと同様に、HIV-1よりもむしろHIV-2の感染を強く阻害したが、SIVmacの感染は阻害しなかった。更にNEハプロタイプに連鎖する285番目のアルギニンとグリシンのアミノ酸変異の抗HIV-1効果に対する影響を調べたところ、285番目にアルギニンよりもグリシンを持つTRIMCypのほうが抗HIV-1効果が若干だが弱くなった（図2）。

TRIMCypの結合は、いわゆるCypA結合ループとして以前から知られているカプシドのN末端から数えて4番目と5番目の $\alpha$ -ヘリックス間のループ（L4/5）と考えられる。これまでに作成されたサル指向性HIV-1はL4/5をSIVmac由来のものに置き換えてあるが、いまだカニクイザルTRIM5 $\alpha$ から

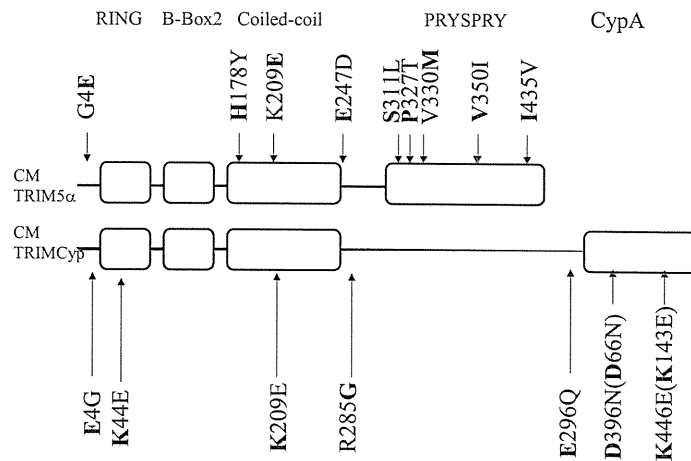


図1：カニクイザル（CM）TRIM5 $\alpha$ およびTRIMCypの多型

数字の前のアルファベットはHSC-F細胞のTRIM5 $\alpha$ とTRIMCypに見られたアミノ酸を表す。太字は頻度の高かったほうの対立遺伝子を示す。括弧内の数字はサイクロフィリンAのメチオニン開始コドンとして数えた場合の多型の位置を表す。

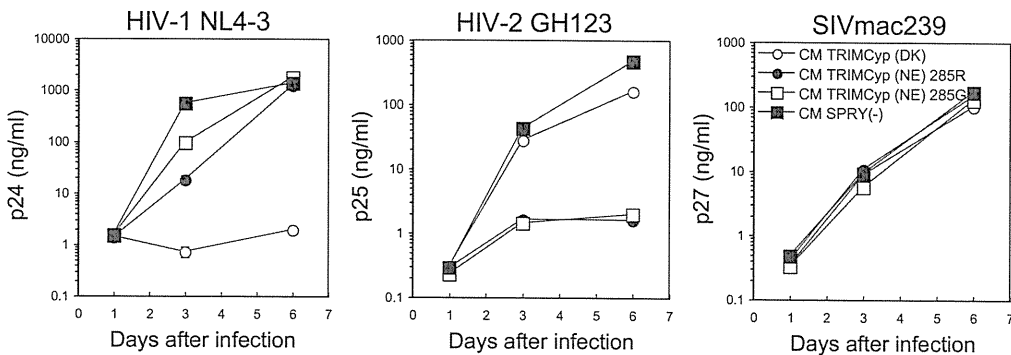


図2：カニクイザル（CM）TRIMCypの感染抑制効果

白丸はDKハプロタイプのTRIMCyp、黒丸はCypAがNEハプロタイプで285番目がアルギニンのTRIMCyp、白四角はCypAがNEハプロタイプで285番目がグリシンのTRIMCypを発現するMT4細胞でのウイルスの増殖を表す。黒四角はPRYSRY領域を欠損しているために抗ウイルス効果を持たないTRIM5を発現させた場合のウイルスの増殖を表す。

の逃避は完全ではない。しかし、DKおよびNEの両方のハプロタイプのカニクイザルTRIMCypによる抑制は回避していることが明らかとなった(図3)。

#### D. 考察

カニクイザルTRIMCypタンパク質は抗HIV-1効果を示さないという報告がBrennanらによって2008年になされているが、我々がHSC-F細胞から得たcDNAを基に発現させたDKハプロタイプのTRIMCypには強い抗HIV-1効果があった。TRIMCyp内のCypA部分の配列を比較したところ、前報のTRIMCypはHSC-F細胞由来と同じDとKをそれぞれCypAの66番目と143番目に持っているDKハプロタイプであったが、54番目のアミノ酸がアルギニンなのに対し、HSC-F細胞の持つTRIMCypはヒスチジンであり、TRIMCypを持つカニクイザル64頭の中では54Rは見つけることができなかったことから、大多数のカニクイザルのTRIMCyp(DKハプロタイプ)は抗HIV-1活性を持つと結論づけることができた。興味深いことに、7個体のTRIMCyp遺伝子のsplicingにより翻訳されないエキソン8の配列を調べたところ、いずれもPRYSRY領域の339番目に相当するアミノ酸はQで、報告されているアカゲザルの

TRIMCyp遺伝子の対応する領域の構造と酷似しており、CypAの挿入はカニクイザルとアカゲザルが分岐する前に生じていたと想像される。一方、ブタオザルのTRIMCyp遺伝子もアカゲザルのTRIMCyp遺伝子もいずれもNEハプロタイプであることから、カニクイザルでは頻度が少ないNEハプロタイプのほうが祖先配列かもしれない。ブタオザルではほとんどの個体がTRIMCyp遺伝子を持っていると報告されている。アカゲザルにおいては逆にTRIMCypの頻度は低く前述のとおりPRYSRY領域にQあるいはTFPの多型が生じている。カニクイザルはPRYSRY領域の339番目のアミノ酸はQのまま、TRIMCypの頻度が増え、更にDKハプロタイプが存在する(図4)。DKハプロタイプをカニクイザルだけが獲得したのか、それとも共通祖先で既に生じた多型をカニクイザルだけが現代に至るまで保持し続けているのかは不明であるが、3つのマカク属のサルが異なるTRIM5遺伝子多型を持つことの原因は、TRIM5遺伝子が抗レトロウイルス因子として、それぞれのサル種が過去に遭遇した病原レトロウイルス等の何らかの環境因子に合わせて進化してきた結果と考えられる。

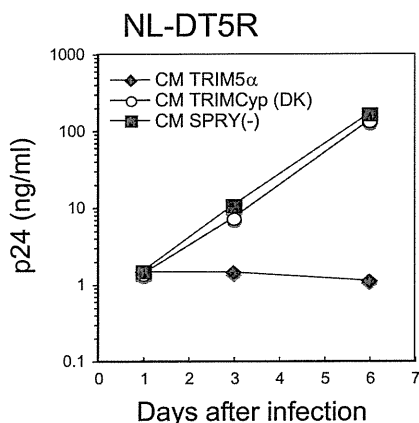


図3：サル指向性HIV-1 (NL-DT5R) とカニクイザル (CM) TRIM5 $\alpha$ /TRIM5Cyp

DKハプロタイプのTRIMCyp (白丸) あるいはTRIM5 $\alpha$ 存在下でのウイルスの増殖を表す。黒四角はPRYSRY領域を欠損しているために抗ウイルス効果を持たないTRIM5を発現させた場合のウイルスの増殖を表す。

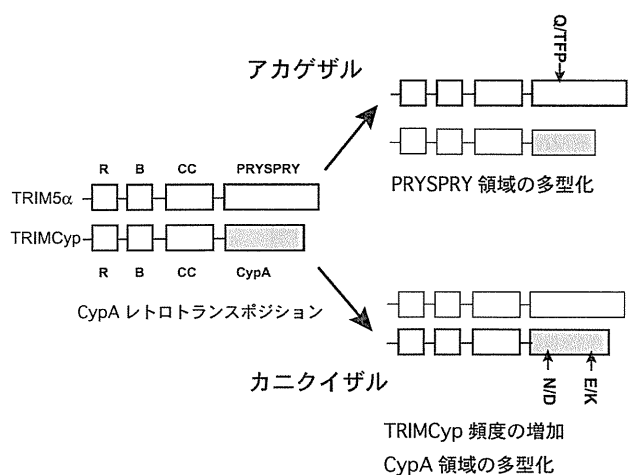


図4：想定されるTRIM5遺伝子の進化

Q/TFPはアカゲザルTRIM5 $\alpha$ の339番目のアミノ酸の多型を、N/D、E/KはそれぞれカニクイザルTRIM5CypのCypA配列のメチオニンから数えて66番目と143番目のアミノ酸の多型を示す。

## E. 結論

本研究で、サル指向性HIV-1が、カニクイザルTRIMCypからの回避は可能であることが明確になった。TRIMCyp変異の頻度の高さを勘案すると、フィリピン産カニクイザルであればTRIMCypを両方の染色体に持つ個体を実験に必要な頭数確保することが可能であると考えられる。変異頻度の少ないカニクイザルのTRIMCypの感染抑制スペクトラムを明らかにしたことにより、今後はTRIMCypかTRIM5 $\alpha$ かだけ検査すれば、詳しい多型まで検査する必要がないことが明らかとなった。

## F. 知的所有権の取得状況

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Microbes and Infection* 13, 58-64, 2011.
- 2) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE: A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . *PLoS ONE* 6, e22779, 2011.
- 3) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.
- 4) Nakayama EE, Shioda T: TRIM5 $\alpha$  and species tropism of HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 3, 13, 2012

### 2. 学会発表等

- 1) 中山英美、Likansakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tarkowski M, Riva A, 塩田達雄：抗レトロウイルス療法副作用の発症に関わる宿主因子 第25回エイズ学会学術集会・総会 2011年 東京
- 2) 齋藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、

明里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性 第25回エイズ学会学術集会・総会 2011年 東京

- 3) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H: Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5 $\alpha$  determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011年 札幌
- 4) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE : A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 $\alpha$  第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011年 札幌
- 5) Kono K., Kuroishi A., Nakayama EE, Hulme AE, Hope TJ, Shioda T : Simian-tropic HIV-1 NL-4/5S6/7SVIFS shows slower capsid uncoating in human cells 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011年 札幌

# サル指向性HIV-1 感染サルにおける細胞性免疫反応の解析

研究分担者 松岡 佐織 (国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員)

研究協力者 高橋 尚史 (国立感染症研究所エイズ研究センター 研究生)

## 研究要旨

HIV-1 感染症は慢性持続感染を呈することを特徴とし、エイズ発症に至る致死感染である。本研究班では、特に治療薬の評価に適したエイズ動物モデルの確立を目指し、サル指向性HIV-1 開発研究を展開している。研究代表者の明里、研究分担者の足立らを中心とするこれまでの研究で、サル細胞で増殖可能な第一世代サル指向性HIV-1 を構築し、さらにはカニクイサルで一過性の急性感染を呈する第三世代サル指向性HIV-1 獲得に至っている。本分担研究では、カニクイサルで慢性持続感染を呈する次世代サル指向性HIV-1 の獲得に貢献することを目的とし、サル指向性HIV-1 感染サルにおける免疫動態を解析して慢性持続感染成立の有無あるいは病原性に関与する免疫機序の同定を進めることとした。平成23年度は、急性感染は示したものの持続感染が成立しなかった第三世代サル指向性HIV-1 感染サル4頭の慢性期の末梢血リンパ球から、CD8陽性細胞を除去して培養することにより、ウイルスを回収することに成功した。この結果は、第三世代サル指向性HIV-1 感染サルの慢性期のウイルス複製の制御にCD8陽性細胞が中心的役割を果たしていることを示している。この回収したウイルス (X4指向性) とR5指向性サル指向性HIV-1 (Mn5Rh3) の増殖能を培養系で調べたところ、TRIM5alpha・TRIMcypヘテロ遺伝子型を有するサル由来のリンパ球では、両方のウイルスとも増殖を示した。一方、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサル由来のリンパ球では、回収したX4指向性サル指向性HIV-1 は増殖を示したが、Mn5Rh3は増殖を示さなかった。したがって、回収したHIV-1 は、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサルにおけるより高い増殖能を獲得していると考えられた。今後は、より高い増殖能を有し持続感染に結びつくR5指向性サル指向性HIV-1 の獲得を目指し、その感染・発症に関与する免疫反応の解析を進める予定である。

## A. 研究目的

HIV-1 感染症は慢性持続感染を呈することを特徴とし、エイズ発症に至る致死感染である。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・評価に必要である。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モデルとされている。しかし、HIV-1 の逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ等を標的とする治療薬の評価系と

しては、HIV-1 由来のこれらの蛋白をコードするゲノムを有するHIV-1 の感染モデルが必要となる。

そこで本研究班では、特に治療薬の評価に適したエイズ動物モデルの確立を目指し、サル指向性HIV-1 開発研究を展開している。研究代表者の明里、研究分担者の足立らを中心とするこれまでの研究で、サル細胞で増殖可能な第一世代サル指向性HIV-1 を構築し、さらにはカニクイサルで一過性の急性感染を呈する第三世代サル指向性HIV-1 獲得に至っている。このようなサル指向性HIV-1 研究の進展は、特に治療薬の評価に適したHIV-1

感染サルエイズモデルの開発に結びつくだけでなく、HIV-1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。

本分担研究では、カニクイサルで慢性持続感染を呈する次世代サル指向性HIV-1の獲得に貢献することを目的とし、サル指向性HIV-1感染サルにおける免疫動態を解析して、慢性持続感染成立の有無および病原性に関与する免疫機序の同定を進めることとした。平成23年度は、急性感染は示したものの持続感染が成立しなかった第三世代サル指向性HIV-1感染サル4頭の慢性期の末梢血リンパ球からのウイルス回収を試み、さらに回収ウイルスの増殖能の解析を行った。

## B. 研究方法

以前の研究で第三世代サル指向性HIV-1感染実験を行ったカニクイサル4頭の感染後5ヶ月目の末梢血より分離したリンパ球（PBMC）を用い、CD8陽性細胞を除去した後、PHA刺激を行い、培養を開始した。培養上清を経時的に採取し、上清中の逆転写酵素活性を測定した。

TRIM5alpha・TRIMcypヘテロ遺伝子型を有するサル由来のリンパ球およびTRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサル由来のリンパ球を用い、回収したHIV-1（X4指向性）とR5指向性サル指向性HIV-1（Mn5Rh3）の増殖能を調べた。両者の混合感染も行った。R5指向性サル指向性HIV-1獲得に重点をおき、X4阻害剤存在下における培養も試みた。

## （倫理面への配慮）

動物実験は、倫理面も含めて、実施機関および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。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）および機関承認済みである。

## C. 研究結果

第三世代サル指向性HIV-1感染サルの慢性期の末梢血リンパ球の培養実験では、上清中に逆転写酵素活性を確認することができ、4頭全てからウイルスを回収することに成功した（図1）。

この回収したウイルス（X4指向性）とR5指向性サル指向性HIV-1（Mn5Rh3）の増殖能を培養系で調べたところ、TRIM5alpha・TRIMcypヘテロ遺伝子型を有するサル由来のリンパ球では、両方のウイルスとも増殖を示した（図2）。両方のウイルスを混合して感染させた場合、上清中のRNAより増幅したウイルスゲノムcDNAの塩基配列を調べると、X4指向性env配列とR5指向性env配列が同程度に認められた。

一方、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサル由来リンパ球では、回収したX4指向性サル指向性HIV-1は増殖を示したが、R5指向性サル指向性HIV-1は増殖を示さなかった（図2）。両方のウイルスを混合して感染させた場合、上清中のRNAより増幅したウイルスゲノムcDNAの塩基配列を調べると、R5指向性env配列は認められず、X4指向性env配列のみが認められた。

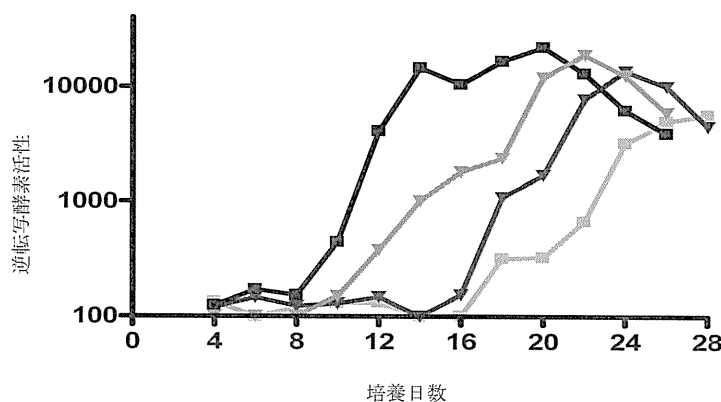


図1：サル指向性HIV-1感染サル慢性期のPBMCよりのウイルス回収

サル指向性HIV-1感染サルの感染後20週目の末梢血リンパ球よりCD8陽性分画を除き培養を開始した。培養上清中の逆転写酵素活性を測定した。



TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサル由来リンパ球において、両方のウイルスの混合感染系をX4阻害剤存在下で培養すると、培養上清中にウイルスが検出され、上清中のRNAより増幅したウイルスゲノムcDNAの塩基配列を調べると、R5指向性env配列が認められた。

#### D. 考察

第三世代サル指向性HIV-1感染サル4頭全ての慢性期の末梢血リンパ球からサル指向性HIV-1を回収することができた。この結果は、第三世代サル指向性HIV-1感染サルの慢性期のウイルス複製の制御にCD8陽性細胞が中心的役割を果たしていることを示している。持続感染を引き起こすには、このCD8陽性細胞によるウイルス複製抑制を乗り越えることが必要と考えられる。

R5指向性サル指向性HIV-1 (Mn5Rh3) と比較すると、回収したX4指向性サル指向性HIV-1は、TRIM5alpha・TRIMcypヘテロ遺伝子型を有するサルでは同程度の増殖能を有しているが、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサルにおけるより高い増殖能を獲得していると考えられた。一方、X4阻害剤を用いた実験では、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサル由来リンパ球でも増殖可能なR5指向性サル指向性HIV-1獲得の可能性が考えられた。今後は、より高い増殖能を有し持続感染に

結びつくR5指向性サル指向性HIV-1の獲得を目指し、その感染・発症に関する免疫反応の解析を進める予定である。

#### E. 結論

第三世代サル指向性HIV-1感染サル4頭全ての慢性期の末梢血リンパ球から、CD8陽性細胞を除去して培養することにより、ウイルスを回収することに成功した。この結果は、第三世代サル指向性HIV-1感染サルの慢性期のウイルス複製の制御にCD8陽性細胞が中心的役割を果たしていることを示している。R5指向性サル指向性HIV-1 (Mn5Rh3) と比べて、この回収したX4指向性HIV-1は、TRIM5alphaホモ遺伝子型を有するサルにおけるより高い増殖能を獲得していると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T: Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res*

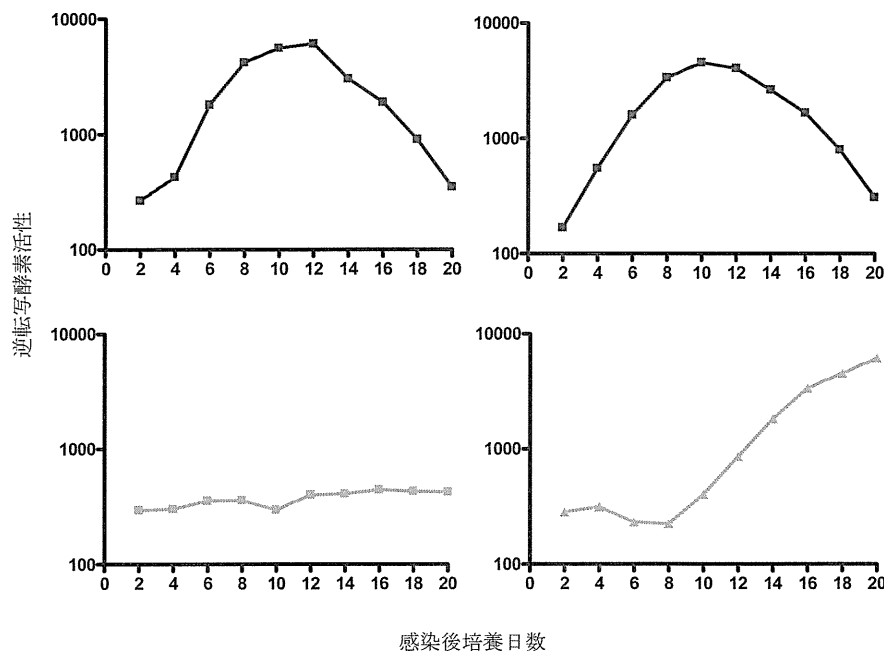


図2：サル指向性HIV-1のカニクイサルPBMCにおける増殖能

サル指向性HIV-1 (R5指向性Mn5Rh3) 感染 (左パネル) あるいは感染サルより回収したHIV-1 (X4指向性) とMn5Rh3との混合感染 (右パネル) 後の培養上清中の逆転写酵素活性を調べた。上段は、TRIM5alpha/Cyp heteroのサル、下段は、TRIM5alpha homoのサル由来のCD8-depleted PBMCにおける感染実験。

Commun 408:615-619, 2011.

- 2) Matsuoka S, Matano T: Strategy for prevention of HIV-1 transmission. Journal of Disaster Research 6:421-425, 2011.
- 3) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. Microbiol Immunol 55:768-773, 2011.
- 4) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T: Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. J Virol 86:738-745, 2012.

## 2 学会発表

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 2) Takahara Y, Nakamura M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会 東京 11/30/2011.
- 4) 中村 碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織：サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 第25回日本エイズ学会学術集会 東京 11/30/2011.
- 5) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T: Analysis of cytotoxic T lymphocyte responses under HAART in a macaque AIDS model. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on HIV/AIDS, Seoul, Korea, 12/10/2011.

## G. 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。

## 研究成果の刊行に関する一覧

明里 宏文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, <u>Akari H</u>	A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes	Journal of Virology	In press		2012
Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, <u>Akari H</u> , Matano T	Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication	Retrovirology	9	3	2012
Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, <u>Akari H</u> , Nakayama EE	Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> )	Journal of General Virology	93	594-602	2012
Saito Y, Naruse TK, <u>Akari H</u> , Matano T, Kimura A	Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques	Immunogenetics	64	131-41	2012
Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, <u>Akari H</u>	CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins	Archives of Virology	157	363-8	2012
Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, <u>Akari H</u>	Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications	Microbes and Infection	13	58-64	2011
Ohtani H, Nakajima T, <u>Akari H</u> , Ishida T, Kimura A	Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates	Immunogenetics	63	417-28	2011
Ito M, Katakai Y, Ono F, <u>Akari H</u> , Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I	Serotype-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses in cynomolgus monkeys after infection with multiple dengue virus serotypes	Archives of Virology	156	1073-77	2011
Naruse TK, Okuda Y, Mori K, <u>Akari H</u> , Matano T, Kimura A	ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey	Immunogenetics	63	501-9	2011
Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, <u>Akari H</u> , Kurane I	Common marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> ) as a primate Model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity	Journal of General Virology	92	2272-80	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H	Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets	Frontiers in Microbiology	2	240	2011

足立 昭夫

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
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Adachi A	Macaque-tropic HIV-1 derivatives: a novel experimental approach to understand viral replication and evolution <i>in vivo</i> .	Theresa L. Chang	HIV-Host Interactions	InTech	Croatia	2011	325-348

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
Nomaguchi M, Adachi A	HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest.	Future Microbiol.	6	375-378	2011
Doi N, Fujiwara S, Adachi A, Nomaguchi M	Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones.	Front. Microbio.	2	115. doi:10.3389/fmicb.2011.00115	2011
Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A	The fourth major restriction factor against HIV/SIV.	Front. Microbio.	2	132. doi:10.3389/fmicb.2011.00132	2011
Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T	HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice.	Int. Immunol.	23	433-441	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Adachi S, <u>Adachi A</u> , Nomaguchi M	Commentary on a new era of investigating 3D structure-based human- virus protein network dynamics.	Front. Microbio.	2	186. doi:10. 3389 /fmicb. 2011.00 186	2011
Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, <u>Adachi A</u> , Ode H, Sato H, Fackler Ot, Okada S, Suzu S	The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef- mediated wiral infectivity enhancement.	PLoS One	6	e27696. doi:10. 1371/jo urnal.p one.002 7696.	2011
Miyazaki Y, Miyake A, Nomaguchi M, <u>Adachi A</u>	Structural dynamics of retroviral genome and the packaging.	Front. Microbio.	2	264. doi:10. 3389 /fmicb. 2011.00 264	2011
Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, <u>Adachi A</u> , Shioda T, Akari H, Nakayama EE	Geographic, genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	J. Gen. Virol.	93	594-602	2012

## 中山 英美

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H	A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys.	Microbes and Infection	13	58-64	2011
Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE	A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5alpha.	PLoS ONE	6	e22779	2011
Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, <u>Nakayama EE</u>	Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	Journal of General Virology	93	594-602	2012
<u>Nakayama EE</u> , Shioda T	TRIM5a and species tropism of HIV/SIV.	Frontiers in Microbiology	3	13	2012

松岡 佐織

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahara Y, <u>Matsuoka S</u> , Kuвано T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T	Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge	Biochem Biophys Res Commun	408	615-619	2011
<u>Matsuoka S</u> , Matano T	Strategy for prevention of HIV-1 transmission	Journal of Disaster Research	6	421-425	2011
Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, <u>Matsuoka S</u>	Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques	Microbiol Immunol	55	768-773	2011
Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, <u>Matsuoka S</u> , Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T	Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques	J Virol	86	738-745	2012

# Geographical, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*)

Akatsuki Saito,<sup>1†</sup> Ken Kono,<sup>2†</sup> Masako Nomaguchi,<sup>3</sup> Yasuhiro Yasutomi,<sup>4</sup> Akio Adachi,<sup>3</sup> Tatsuo Shioda,<sup>2</sup> Hirofumi Akari<sup>1,4</sup> and Emi E. Nakayama<sup>2</sup>

## Correspondence

Hirofumi Akari  
akari@pri.kyoto-u.ac.jp  
Emi E. Nakayama  
emien@biken.osaka-u.ac.jp

<sup>1</sup>Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama 484-8506, Japan

<sup>2</sup>Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503, Japan

<sup>4</sup>Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba 305-0843, Japan

The antiretroviral factor tripartite motif protein 5 (*TRIM5*) gene-derived isoform (TRIMCyp) has been found in at least three species of Old World monkey: rhesus (*Macaca mulatta*), pig-tailed (*Macaca nemestrina*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macaques. Although the frequency of TRIMCyp has been well studied in rhesus and pig-tailed macaques, the frequency and prevalence of TRIMCyp in cynomolgus macaques remain to be definitively elucidated. Here, the geographical and genetic diversity of TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp in cynomolgus macaques was studied in comparison with their anti-lentiviral activity. It was found that the frequency of TRIMCyp in a population in the Philippines was significantly higher than those in Indonesian and Malaysian populations. Major and minor haplotypes of cynomolgus macaque TRIMCyp with single nucleotide polymorphisms in the cyclophilin A domain were also found. The functional significance of the polymorphism in TRIMCyp was examined, and it was demonstrated that the major haplotype of TRIMCyp suppressed human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) but not HIV-2, whilst the minor haplotype of TRIMCyp suppressed HIV-2 but not HIV-1. The major haplotype of TRIMCyp did not restrict a monkey-tropic HIV-1 clone, NL-DT5R, which contains a capsid with the simian immunodeficiency virus-derived loop between  $\alpha$ -helices 4 and 5 and the entire *vif* gene. These results indicate that polymorphisms of TRIMCyp affect its anti-lentiviral activity. Overall, the results of this study will help our understanding of the genetic background of cynomolgus macaque TRIMCyp, as well as the host factors composing species barriers of primate lentiviruses.

Received 2 October 2011

Accepted 22 November 2011

## INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) barely replicates in Old World monkeys such as cynomolgus macaques (CMs; *Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (RMs; *Macaca mulatta*). This species barrier has long hampered the use of Old World monkeys for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) research. Recently, a number of intrinsic anti-HIV-1 cellular factors, including

tripartite motif protein 5 $\alpha$  (TRIM5 $\alpha$ ), cyclophilin A (CypA), the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) family and tetherin were identified in Old World monkey cells (Nomaguchi *et al.*, 2008; Sauter *et al.*, 2010). Of these factors, TRIM5 $\alpha$  was found to strongly suppress HIV-1 replication, mainly by affecting the virus disassembly step, resulting in a decrease in reverse-transcription products (Nakayama & Shioda, 2010; Stremlau *et al.*, 2004). TRIM5 $\alpha$  contains a RING domain, a B-box domain, a coiled-coil domain and a PRYSPRY (B30.2) domain. Importantly, the PRYSPRY domain recognizes the capsid of incoming retroviruses, leading to post-entry restriction of infection. RM and CM TRIM5 $\alpha$  restrict HIV-1 but not simian immunodeficiency virus isolated from an infected rhesus macaque (SIVmac) (Nakayama *et al.*, 2005; Stremlau *et al.*, 2004; Yap *et al.*, 2004). In the case of HIV-2

†These authors contributed equally to this work.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of CM TRIMCyp-major (DK) and RM TRIMCyp are AB671588 and AB671589, respectively.

Two supplementary tables are available with the online version of this paper.



infection, viruses carrying proline (P) at aa 120 of the capsid protein are sensitive to CM TRIM5 $\alpha$ , whereas those with either alanine or glutamine (Q) are resistant (Song *et al.*, 2007). Both CM TRIM5 $\alpha$ -sensitive and -resistant HIV-2 strains are restricted by RM TRIM5 $\alpha$ , and three amino acid residues – threonine (T), phenylalanine (F) and P at aa 339, 340 and 341, respectively – of RM TRIM5 $\alpha$  are important for restricting particular HIV-2 strains, which are still resistant to CM TRIM5 $\alpha$  (Kono *et al.*, 2008). It is also known that TRIM5 $\alpha$  exhibits a high degree of sequence variation, even within macaque species. In some individual RMs, the TFP residues at aa 339–341 of TRIM5 $\alpha$  are replaced with a single Q (Newman *et al.*, 2006) and this TFP→Q polymorphism affects the anti-lentiviral activity of RM TRIM5 $\alpha$  (Kirmaier *et al.*, 2010).

Although pig-tailed macaques (PMs; *Macaca nemestrina*) have long been thought to exhibit a higher susceptibility to HIV-1 infection than RMs and CMs (Agy *et al.*, 1992), the underlying mechanism determining this difference remained unclear. Recently, a TRIM5–CypA chimeric protein, referred to as TRIMCyp, was discovered in PMs, and the monkeys exclusively expressed TRIMCyp but not TRIM5 $\alpha$  (Brennan *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2007). TRIMCyp is an alternatively spliced isoform of the *TRIM5* gene in which the PRYSPRY domain of TRIM5 $\alpha$  is replaced with a retrotransposed *CypA* gene. The retrotransposition of the *CypA* sequence in the 3' UTR of the *TRIM5* gene correlates with a single nucleotide polymorphism (SNP) at the exon 7 splice-acceptor site, leading to skipping of exons 7 and 8 encoding the PRYSPRY domain and splicing to the *CypA* insertion. Thus, the presence or absence of the *CypA* sequence in the 3' UTR results in expression of TRIMCyp or TRIM5 $\alpha$ , respectively.

*In vitro* analyses demonstrated that cells expressing PM TRIMCyp restricted HIV-2 but not HIV-1 infection (Brennan *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2007), suggesting that the characteristic isoform of the *TRIM5* gene in PMs may be one of the reasons for their greater susceptibility to HIV-1 infection. Furthermore, TRIMCyp was also identified in some individual RMs and CMs (Brennan *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008a). RM TRIMCyp, as well as that of PMs, is unable to restrict HIV-1 infection (Wilson *et al.*, 2008a). This report also showed that the frequency of TRIMCyp in Indian RMs was approximately 25%, whilst it was not found in the Chinese RM population, suggesting a geographical deviation in the frequency of TRIMCyp (Wilson *et al.*, 2008a). In the case of CMs, although the existence of TRIMCyp has been reported (Brennan *et al.*, 2008), the allele frequency, geographical distribution and relevance in antiviral activity of TRIMCyp remain to be elucidated. As the *TRIM5* gene-related factors are expected to have an impact on the replication of retroviruses, information about the genetic background of CM TRIMCyp will contribute to our understanding of host factors composing the species barrier. In the present study, we studied the geographical, genetic and functional diversity of CM TRIMCyp originating from South-West Asia (Indonesia, Malaysia and the Philippines). We showed a geographical deviation in the frequency of

TRIMCyp. Moreover, we found SNPs in CM TRIMCyp and analysed their impact on the anti-lentiviral functions, including their effect against HIV-1, HIV-2, SIVmac and monkey-tropic HIV-1 (HIV-1mt).

## RESULTS

### Geographical deviation in the frequency of CM TRIMCyp

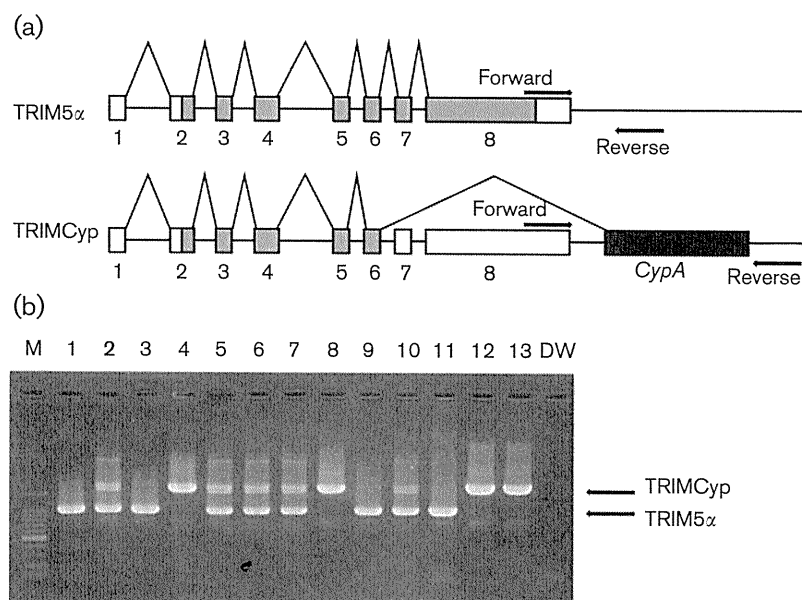
Initially, we analysed the frequencies of TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp genotypes in 126 CMs originating from three different regions – Indonesia, Malaysia and the Philippines – using a PCR-based assay designed to differentiate between the presence and absence of the *CypA* insertion (Fig. 1a) (Wilson *et al.*, 2008a). Insertion of the *CypA* gene in TRIMCyp resulted in a PCR product larger than the expected size for TRIM5 $\alpha$  (Fig. 1b).

As shown in Table 1, 35 of the 46 Philippine individuals were homozygous for TRIMCyp, ten were heterozygous and only one was homozygous for TRIM5 $\alpha$ . In contrast, only three of the 33 Indonesian individuals were homozygous for TRIMCyp, 17 were heterozygous and 13 were homozygous for TRIM5 $\alpha$ . Interestingly, the Malaysian population was of intermediate proportions: ten TRIMCyp homozygotes, 26 heterozygotes and 11 TRIM5 $\alpha$  homozygotes. As shown in Fig. 2, the percentages of individuals having each *TRIM5* genotype indicated that the frequency of TRIMCyp homozygotes in Malaysian CMs was twice that in Indonesian CMs. In contrast, the frequency of TRIM5 $\alpha$  homozygotes in Indonesian CMs was twice that in Malaysian CMs. Taken together, the calculated allele frequencies of TRIMCyp in the Philippine, Indonesian and Malaysian CM populations were 87.0, 34.8 and 48.9%, respectively (Table 1). Statistical analyses using a  $\chi^2$  test followed by Bonferroni correction demonstrated that the frequency of TRIMCyp in the Philippine population was significantly higher than that in the Indonesian ( $P < 0.0001$ ) and Malaysian ( $P < 0.0001$ ) populations. In contrast, there was no significant difference between the Indonesian and Malaysian populations ( $P = 0.2295$ ).

It should be noted that our method failed to distinguish homozygotes from hemizygotes, especially when the subjects exhibited no polymorphisms in the *TRIM5* gene. However, hemizygosity for the *TRIM5* gene is highly unlikely for the following reasons: (i) the *TRIM5* gene is on an autosomal chromosome, (ii) there is no precedent of deletion of the *TRIM5* gene in humans or primates, and (iii) all of the three CM populations in Table 1 are in Hardy–Weinberg equilibrium for *TRIM5* genotypes.

### Polymorphisms in the *CypA* domain of CM TRIMCyp

Previously, it was reported that aa 357 of CM TRIMCyp, corresponding to aa 54 counting from the methionine of



**Fig. 1.** Determination of *CypA* insertion. (a) Diagram indicating the splicing of TRIM5 $\alpha$  or TRIMCyp. Non-coding and coding exons (numbered) and *CypA* sequences are indicated as open, shaded and filled boxes, respectively. The primers used in this study are indicated by arrows. (b) Genomic DNA was extracted from PBMCs. To test for *CypA* insertion, the 3' region of the *TRIM5* gene was amplified by PCR with primers spanning the 3' UTR and the putative *CypA* insertion. DW, Distilled water control.

*CypA*, was arginine (R) (Brennan *et al.*, 2008). Subsequently, Ylinen *et al.* (2010) reported another allele of CM TRIMCyp encoding histidine (H) at this position. To determine the frequency of this R $\rightarrow$ H polymorphism, we examined 34 TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp heterozygotes and 30 TRIMCyp homozygotes for sequence variations in the *CypA* domain. The results showed that there was no TRIMCyp allele encoding R at position 357 (*Cyp* 54R). All 94 CM chromosomes carrying the TRIMCyp gene encoded TRIMCyp with H at this position. This result was consistent with the results reported recently by Dietrich *et al.* (2011).

Dietrich *et al.* (2011) also reported CM TRIMCyp polymorphisms at aa 369 and 446, corresponding to aa 66 and 143 in the *CypA* domain, respectively. Both Brennan *et al.* (2008) and Ylinen *et al.* (2010) reported that aa 369 (*Cyp*66) and 446 (*Cyp*143) are aspartic acid (D) and lysine (K), respectively (denoted as the DK haplotype), whilst Dietrich *et al.* (2011) showed the presence of another haplotype encoding asparagine (N) and glutamic acid (E) at positions 369 (*Cyp*66) and 446 (*Cyp*143), respectively (denoted as the NE haplotype). Our results showed that 12 CM chromosomes carried TRIMCyp with the NE haplotype, whilst the remaining 82 TRIMCyp were all the DK haplotype (Table 2). Residues 369N (*Cyp* 66N) and 446E (*Cyp* 143E) were also

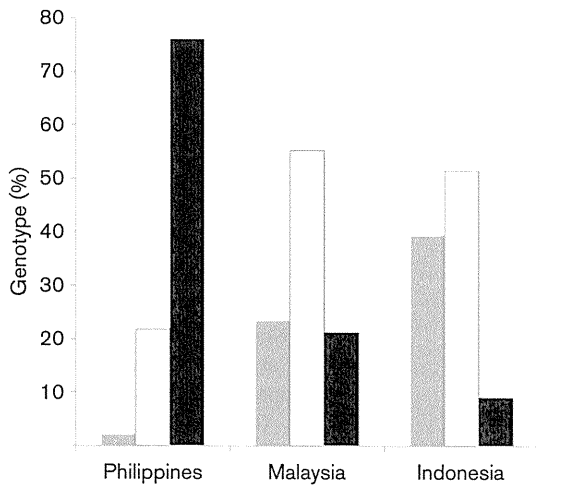
found in PM and RM TRIMCyps, and the *CypA* portion of the NE haplotype of CM TRIMCyp has the same amino acid sequence as RM TRIMCyp (GenBank accession no. EU157763). These results indicate that the previously recognized interspecies variations of the *CypA* sequence of TRIMCyp were in fact intraspecies variation within CMs. With respect to the geographical distribution of these haplotypes, we found no significant deviation in the frequencies of the haplotypes among the three origins (Table 2).

### Polymorphisms in the RING, B-box, coiled-coil, linker and PRYSPRY domains of CM TRIM5 $\alpha$ and TRIMCyp

To identify polymorphisms that are in possible linkage disequilibrium with either the DK or NE haplotype in regions other than the *CypA* domain, we determined nucleotide sequences of TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp cDNAs encoding the RING, B-box, coiled-coil and linker domains of six TRIMCyp homozygotes (three homozygotes of the DK haplotype and three heterozygotes for the DK and NE haplotypes) and three TRIM5 $\alpha$  homozygotes (see Supplementary Table S1, available in JGV Online). We found polymorphisms at positions 4 [E $\rightarrow$ glycine (G)] in

**Table 1.** Frequencies of TRIMCyp alleles in CM populations

Origin	No. of animals	Genotype (no. of animals)			Allele frequency (%)	
		TRIM5 $\alpha$ homozygote	TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp heterozygote	TRIMCyp homozygote	TRIM5 $\alpha$	TRIMCyp
Philippines	46	1	10	35	13.0	87.0
Malaysia	47	11	26	10	51.1	48.9
Indonesia	33	13	17	3	65.2	34.8



**Fig. 2.** Frequency of individuals having each *TRIM5* genotype. The percentages of *TRIM5α* homozygotes and heterozygotes and *TRIMCyp* homozygotes in each population were calculated. Grey bars, *TRIM5α* homozygote; white bars, heterozygote; black bars, *TRIMCyp* homozygote.

the N-terminal region, 44 (K→E) in the RING domain, 178 [H→tyrosine (Y)] and 209 (K→E) in the coiled-coil domain, and 247 (E→D) and 285 (G→R) in the linker domain (Fig. 3a). We found only one chromosome for minor allele 4G, two for 44E, four for 178Y, nine for 209E, five for 247D and four for 285R among 18 chromosomes from the six *TRIMCyp* homozygotes and three *TRIM5α* homozygotes. Among the six *TRIMCyp* homozygotes, we also found three E→Q substitutions at aa 296, which was present in *TRIMCyp* but absent from *TRIM5α*. There was no polymorphism that showed strong linkage disequilibrium with either the DK or NE haplotype except for G285R. The NE haplotype tended to link with 285G, although several DK haplotypes also linked with 285G (Supplementary Table S1). The numbers of polymorphic positions were relatively small among CMs compared with RMs (Fig. 3b). It is known that the coiled-coil region of *TRIM5* genes shows a high degree of genetic diversity in RMs (Johnson & Sawyer, 2009). In contrast, the coiled-coil

domain of CM *TRIM5α* and *TRIMCyp* showed no polymorphism at aa 184, 196, 208, 222, 230 and 236, which were all highly polymorphic in RMs (Newman *et al.*, 2006). These results suggest that the evolutionary pressures targeting the coiled-coil domain of the *TRIM5* gene were weaker in CMs than in RMs.

We also determined the nucleotide sequences of exon 8 encoding the PRYSPRY domain, of 12 *TRIM5α* homozygotes including the three *TRIM5α* homozygotes analysed above (see Supplementary Table S2, available in JGV Online). We found polymorphisms at aa 311 [serine (S)→leucine (L)], 327 (P→T), 330 [valine (V)→methionine (M)], 350 [V→isoleucine (I)] and 435 (I→V) in the PRYSPRY domain (Fig. 3a). Among the 12 *TRIM5α* homozygotes, we did not find a TFP allele at aa 339–341, which is a major determinant for different virus specificity between CM and RM *TRIM5α*s (Kono *et al.*, 2008) and is also critical for SIV from sooty mangabeys (SIVsm) (Kirmaier *et al.*, 2010) and SIVmac (Lim *et al.*, 2010) restriction by RM *TRIM5α*. We found only one chromosome for minor allele 311L, one for 327T, one for 350I and four for 435V among 11 *TRIM5α* homozygotes. We previously cloned CM *TRIM5α* cDNA from HSC-F cells (GenBank accession no. AB210052) (Nakayama *et al.*, 2005) and found that it contained 330V; however, all of the sequences determined in the present study showed M at this position. In contrast, exon 8 of the *TRIMCyp* gene of seven *TRIMCyp* homozygotes (all were heterozygotes for the DK and NE haplotypes), which encoded the PRYSPRY domain but was absent from the mRNA due to splicing, showed a uniform sequence identical to that of the Mamu 7 haplotype of RMs (307P, 313V, 327P, 332R, 333T, 334Q, 339Q, 345I, 383P, 414V, 420S and 488M). We only found one F→L substitution at position 454 among the seven *TRIMCyp* homozygotes. The Mamu 7 sequence is thus likely to be an ancient prototype sequence of *TRIMCyp* before the separation of CMs from RMs.

### Anti-lentiviral activity of CM *TRIMCyps*

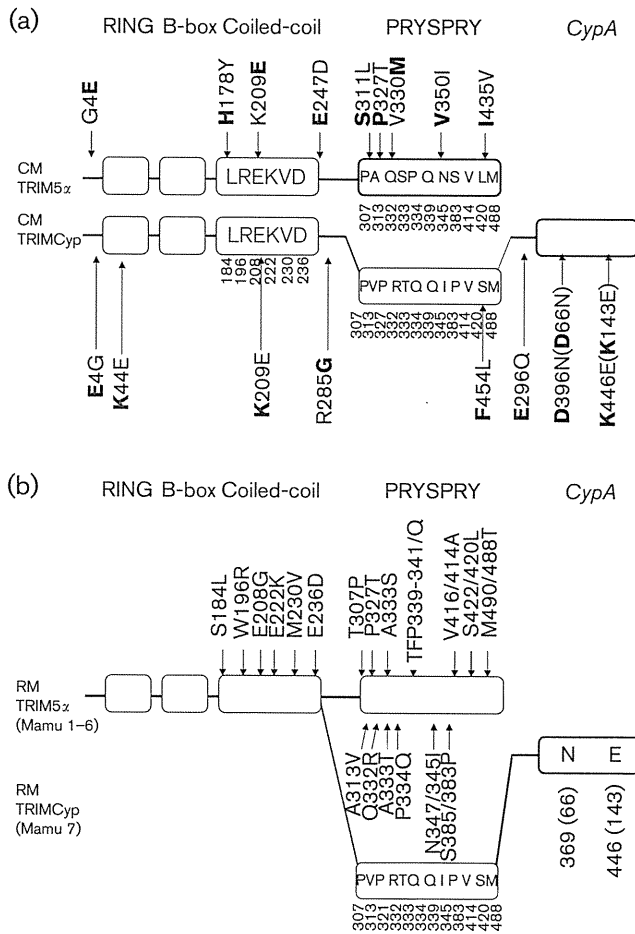
To elucidate the impact of CM *TRIMCyp* and its SNPs on the anti-lentiviral activity, we constructed a recombinant

**Table 2.** Frequencies of DK and NE haplotypes in CM *TRIMCyps*

Origin	No. of animals	Genotype (no. of chromosomes)				Frequency (%)	
		TRIM5α/TRIMCyp heterozygote*		TRIMCyp homozygote†		DK	NE
		DK	NE	DK	NE		
Philippines	28	6	1	36	6	85.7	14.3
Malaysia	21	14	1	10	2	88.9	11.1
Indonesia	15	12	0	4	2	88.9	11.1

\*Haplotypes were determined by direct sequencing of the PCR products.

†Haplotypes were inferred by maximum-likelihood estimation using the results of direct sequencing of the PCR products.



**Fig. 3.** Sequence variations in TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp. (a) Sequence variations in CM TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp. The RING, B-box, coiled-coil, PRYSPRY and CypA domains of CM TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp are indicated by open boxes. The box with thin lines shows exons 7 and 8 of the TRIMCyp gene, which is absent from the mRNA. Polymorphisms are shown outside the boxes, with downward and upward arrows indicating the polymorphisms observed among TRIM5 $\alpha$  homozygotes and TRIMCyp homozygotes, respectively. Amino acid residues found in HSC-F cells are shown in front of the amino acid positions, followed by the observed polymorphisms. Major alleles are shown in bold. Numbers in parentheses indicate amino acid positions counting from the initiation methionine codon of the CypA ORF. Amino acid residues in the boxes are polymorphic in the RM TRIM5 gene but lack polymorphism in CM TRIM5 $\alpha$  or TRIMCyp. Positions of these amino acid residues are shown below the boxes. (b) Sequence variations of RM TRIM5 $\alpha$  (Mamu 1-6) and TRIMCyp (Mamu 7). Downward and upward arrows indicate the polymorphisms observed in TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp, respectively. Amino acid residues in boxes indicate those of RM TRIMCyp. Positions of these amino acid residues are shown below the boxes.

Sendai virus (SeV) expressing a series of TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp: CM TRIM5 $\alpha$ , the DK and NE haplotypes of the CM TRIMCyp [CM TRIMCyp-major (DK) and CM TRIMCyp-minor (NE)], CM SPRY (-) in which the

PRYSPRY domain was deleted as a negative control for functional TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp, and an RM TRIMCyp. We also constructed a recombinant SeV expressing a CM TRIMCyp-minor (NE) carrying G at position 285 (CM TRIMCyp-minor R285G), as the NE haplotype seemed to be in linkage disequilibrium with G at this position (Supplementary Table S1). As shown in Fig. 4(a), upper panels], TRIMCyp-major (DK) completely restricted HIV-1 NL4-3, weakly restricted HIV-2 GH123 and failed to restrict SIVmac239. In contrast, TRIMCyp-minor (NE) and TRIMCyp-minor R285G inefficiently restricted HIV-1 NL4-3, barely restricted SIVmac239 and completely restricted HIV-2 GH123. These results indicated that the sequence variations in CM TRIMCyp greatly altered the spectrum of its anti-lentiviral activity. It should be noted that HIV-1 NL4-3 attained slightly higher titres at day 3 in cells expressing TRIMCyp-minor R285G than in those expressing TRIMCyp-minor (NE). The difference was small but reproducible in six independent experiments. This result indicated that aa 285 of TRIMCyp also affected its antiviral activity. In the case of RMs, in which the CypA domain of TRIMCyp has the same amino acid sequence as CM TRIMCyp-minor (NE), RM TRIMCyp showed the same spectrum of anti-lentiviral activity as CM TRIMCyp-minor (NE) (Fig. 4a, lower panels), consistent with previous reports (Price *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2008a).

Finally, we examined whether HIV-1mt NL-DT5R (Kamada *et al.*, 2006) could evade restriction by CM TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp. HIV-1mt possesses core antigen (CA) with the SIVmac239-derived loop between  $\alpha$ -helices 4 and 5 (L4/5), which corresponds to a CypA-binding loop of HIV-1, the entire SIVmac239 *vif* gene and two non-synonymous substitutions in the *env* gene (Fig. 4b). As shown in Fig. 4(c), NL-DT5R was restricted by TRIM5 $\alpha$  but completely evaded restriction by CM TRIMCyp-major (DK), suggesting that replacement of the CypA-binding loop of HIV-1 CA with the corresponding SIVmac239-derived sequence was sufficient to render HIV-1 resistant to the major haplotype of CM TRIMCyp but not TRIM5 $\alpha$ .

## DISCUSSION

In the present study, we analysed the geographical, genetic and functional diversity of CM TRIMCyp and found: (i) a clear geographical deviation in the frequency of TRIMCyp, (ii) no typical geographical deviation in the frequency of the DK/NE haplotypes in the CypA domain, and (iii) sequence variations in the CypA domain of CM TRIMCyp, which greatly altered the spectrum of its anti-lentiviral activity.

We first demonstrated that the allele frequency of TRIMCyp in CMs from the Philippines was significantly higher than those in Indonesian and Malaysian CMs. It is possible that some pathogen(s) resistant to the antiviral effect of either TRIM5 $\alpha$  or TRIMCyp may contribute to this deviation as a selective pressure. As primate lentiviruses such as HIV-1 and