

201210011A

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

ヒト TRIM5a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 24 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 25 (2013) 年 5 月

目次

I. 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 ----- 1

佐久間 龍太

II. 分担研究者報告

分担研究者無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 16

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (政策創薬マッチング研究事業))

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)

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 α 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 α (HuT5 α) 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 α が宿主内で利用している宿主因子・パスウェイの発見、HuT5 α への応用を目的としている。既に RhT5a 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行ない、RhT5 α 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得られてきた。そのうち複数の因子に関して詳細な解析が進んでおり、また、候補因子群から更なる絞込みを行い有望な新規因子を同定した。

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 α 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 α (RhT5 α) 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 α (HuT5 α) 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 α 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 α 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 α 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 α による HIV-1 の複製阻害のメカニズムを解明し、HuT5 α 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 α による HIV-1 複製阻害活性の誘導を試みる。

B. 研究方法

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 μ g あたり 2.5 μ l の FuGene 6 を用いた。

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 プレートにまかれた 5×10^4 の TZM-bl 細胞に、0.45 μ m のフィルターを通して精製したウイルス上清 100 μ l を感染させ、48 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。

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した。あるいは、文献上実績のあるものを合成し、使用した。プラスミド DNA と siRNA の co-transfection には LipofectAMINE 2000 (ライフテック)を用いた。

また、コントロール siRNA として non-target siRNA をコスモ・バイオ社より購入して用いた。

Nucleofection

MT4 細胞、SupT1 細胞への遺伝子導入には本研究で備品購入した Nucleofector-2B を利用した。それぞれ 10^6 細胞に 2 μ g のプラスミドを導入し、MT4 細胞には kit T を SupT1 細胞には kit V を用いた。

ノックダウン細胞の樹立

shRNA は SIGMA より主としてバリデイトされたものを購入した。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の mRNA の現象を確認した。

RNA 抽出

HIV-1 産生細胞からの RNA 抽出は qiagen 社の RNeasy mini kit を用い、RNase free DNase kit と組み合わせて使用した。

逆転写反応

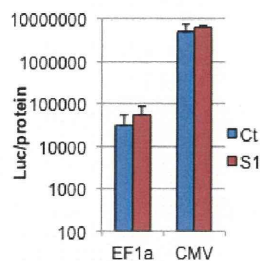


図 1 SOCS1 過剰発現はルシフェラーゼ活性に影響を与えない

293T 細胞に EF1 α プロモーター依存 Renilla luciferase 発現プラスミドもしくは CMVプロモーター依存 Firefly luciferase 発現プラスミドを SOCS1 発現プラスミド (S1) とともに co-transfection した。コントロール (Ct) として EGFP 発現プラスミドを用いた。48 時間後に細胞抽出液を回収しタンパク質濃度、ルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性をタンパク質濃度でノーマライズし、独立した 3 回の実験結果の平均を標準偏差とともに示した。

得られた RNA は superscript III (life technologies) を用いて、マニュアルに従って逆転写した。

細胞のフラクショネーション

Qiagen 社の Cell compartment kit を用いて細胞質、膜、核、細胞骨格分画に分けた。

免疫染色法

293T 細胞に TRIM5 α 変異体発現プラスミドを導入し 48 時間後に 4%PFA にて固定、TritonX-100 で処理した後に、 α -HA (3F10、Roche) を用いて染色した。二次抗体は FITC ラベルされた抗ラット抗体を用い、同時に Hoechst を用いて核を染色した。

定量 PCR 法

本研究では SYBR Green を用いた q-PCR を採用した。使用したプライマーの配列を

以下に示す。

GAPDH :

S: 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT-3'

AS: 5'- CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3'

HIV-1 US-RNA

S: 5'-CTC TAG CAG TGG CGC CCG AAC A-3'

AS: 5'- TCT CCT TCT AGC CTC CGC TAG TC-3'

SOCS1

S: 5'- GCA GCC GAC AAT GCA GTC T-3'
AS: 5'- GAA CGG AAT GTG CGG AAG TG-3'

S3

S: 5'- CCT CCT TCT GTA GCA GCC TG-3'

AS: 5'- CGC AGC TGT ACT CCA TGT GG-3'

C. 研究結果

1. 前年度までのサマリー

研究初年度 (平成 22 年度) には、RhT5 α 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 α 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。次年度 (平成 23 年度) は候補となる宿主因子のリスト化、

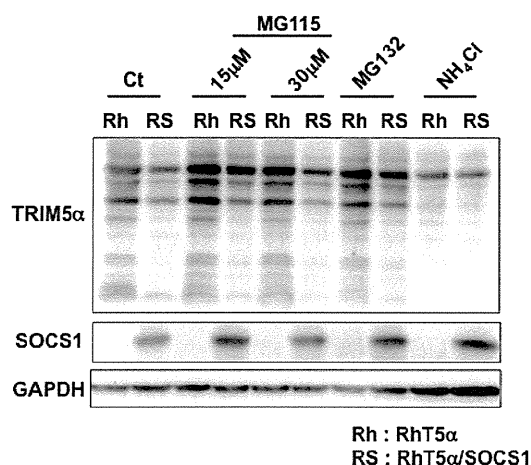


図 2 SOCS1 が誘導する RhT5 α の分解はプロテアソーム非依存的である
293T 細胞に RhT5 α 発現プラスミド単独 (Rh) 及び RhT5 α 発現プラスミドと SOCS1 発現プラスミドの両方 (RS) を導入し、24 時間後に MG115 (15 mM, 30 mM)、MG132 (30 mM)、もしくは NH₄Cl (10 mM) で処理した。Over-night の薬剤処理後、細胞を RIPA バッファーで溶解し、ウエスタンブロットにて抽出液中の TRIM5 α 、SOCS1 の量を解析した。なお、タンパク質濃度を測定し、各レーン 30 μ g を展開し、ローディングコントロールとして GAPDH を検出した。

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。先行して解析を行った細胞骨格系の宿主因子 Cornin や Vimentin の積極的な関与は示されなかったが、SOCS1 が TRIM5 α の抗ウイルス活性のコントロールに重要な役割を持っていること、S ファミリータンパク質が HIV-1 の増殖に重要なタンパク質であることを明らかとしてきた。本年度は、それら詳細な機能解析に加え、同定済みの候補因子群からの絞り込みを行った。

2. SOCS1 タンパク質

前年度までの研究により、RhT5 α による HIV-1 産生阻害を指示する 293T 細胞よりも指示しない TE671 細胞の方が内在性

SOCS1 の発現レベルが高いこと、SOCS1 の過剰発現により 293T 細胞における RhT5 α の HIV-1 産生阻害活性が起こらなくなることを示された。そこで SOCS1 の発現量・活性をコントロールすることで HuT5 α の抗ウイルス活性をコントロールできる可能性を考え、HIV-1 産生阻害における SOCS1 の役割を検討した。

2.1 SOCS1 過剰発現により産生阻害が起こらなくなるメカニズムの検討

SOCS1 がどのようにして RhT5 α による産生阻害をブロックしているのかを検討するために、RhT5 α 、SOCS1 をともに強発現している HIV-1 産生細胞内のタンパク質を解析したところ、SOCS1 の過剰発現によって RhT5 α 量の低下を認めた。一方で HuT5 α の発現量に変化は無く、CMV プロモーター、EF1 α プロモーターからのルンフェラーゼの発現に影響は無かった (図 1)。更に SOCS1 は HIV-1 Gag をライソソームでの分解からレスキューするという報告があるため、SOCS1 の過剰発現によって RhT5 α のタンパク質安定性に影響があり、分解が誘導されたものと考えた。そこで SOCS1 がどのような経路で RhT5 α の分解を誘導しているのかを調べるためにプロテアソーム阻害剤 (MG132) にて処理したが、発現量の回復は認められなかった (図 2)。よって非プロテアソーム系での分解誘導であることが示唆された。

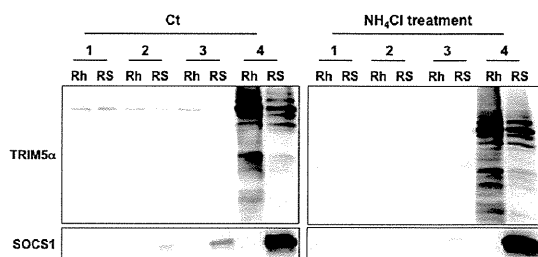


図 3 TRIM5 α は細胞骨格分画から検出された 293T 細胞に RhT5 α 発現プラスミドを Transfection し、24 時間後から over-night で NH₄Cl 処理を行った後、細胞を cell compartment kit にて抽出、細胞質 (1)、膜 (2)、核 (3)、細胞骨格 (4) 分画に分け抽出した。Transfection は RhT5 α 発現プラスミド単独 (Rh) 及び SOCS1 発現プラスミドとの co-transfection (RS) とを行い、SOCS1 の効果を検討した。フラクションを重ねていく度に界面活性剤の組成、濃度が劇的に変化するため、タンパク質濃度を測定することができなかったため回収量の 1/10、おおよそ 10⁶ 細胞分の抽出液が泳動されている。

2.2 TRIM5 α の局在に関する検討

RhT5 α はプロテアソーム非依存的な Gag の分解を誘導する。NH₄Cl で処理することで RhT5 α に誘導された Gag の分解が止まったように見えた一方で TRIM5 α のバンドの消失を認めた。これを解析するために NH₄Cl の処理、未処理細胞のタンパク質を細胞質、膜、核、細胞骨格の 4 フラクションに分けて回収し、TRIM5 α の局在を調べた。その結果、NH₄Cl 処理によって消えたように見えていた TRIM5 α は細胞骨格分画から検出され、TRIM5 α 総量の減少は認められなかった (図 3)。これらの知見より TRIM5 α の局在がその抗ウイルス活性に重要であることが示唆された。TRIM5 α を免疫染色法で検出した場合、細胞質で粒子様の構造を形成することが知られており、サイトプラズミックボディと呼ばれる。このサイトプラズミックボディの形成能と産生

阻害の間の相関を調べるために、文献上サイトプラズミックボディを形成しない変異体を作製した。また、サイトプラズミックボディの形成には TRIM5 α 中のリンカー2領域が重要であることが知られているため、その部分をヒト化した変異体を新たに作製した。作製した変異体は低いサイトプラズミックボディ形成効率を示したが、完全に形成しなくなるものはなかった。また、これらの変異体はいずれも HIV-1 産生阻害活性を示した。一方で、リンカー2 領域をヒト化した KPETFP ではサイトプラズミックボディは形成するものの HIV-1 産生阻害活性を示さなかった (図 4)。

2.3 SOCS1 の効果の種特異性の検討

HuT5 α はヒト SOCS1 の過剰発現による分解誘導を受けなかった。この分解誘導が RhT5 α をヒト細胞内で用いる事による副次的な効果であるのかを検討するためにアカゲザル由来 FRhK4 細胞より SOCS1 をクローニングし、その効果を検討した。ヒト、アカゲザルいずれの SOCS1 を用いた場合でも RhT5 α の分解が誘導され、HIV-1 産生細胞内での Gag の量の増加を認めたことから、本研究で観察された TRIM5 α の分解誘導は RhT5 α に対する特異的な反応であることが示唆された (図 5)。

3. S3 タンパク質

昨年度本研究において HIV-1 の産生に重要な役割を持つ宿主因子として同定された機能未知の S3 タンパク質の HIV-1 産生に対

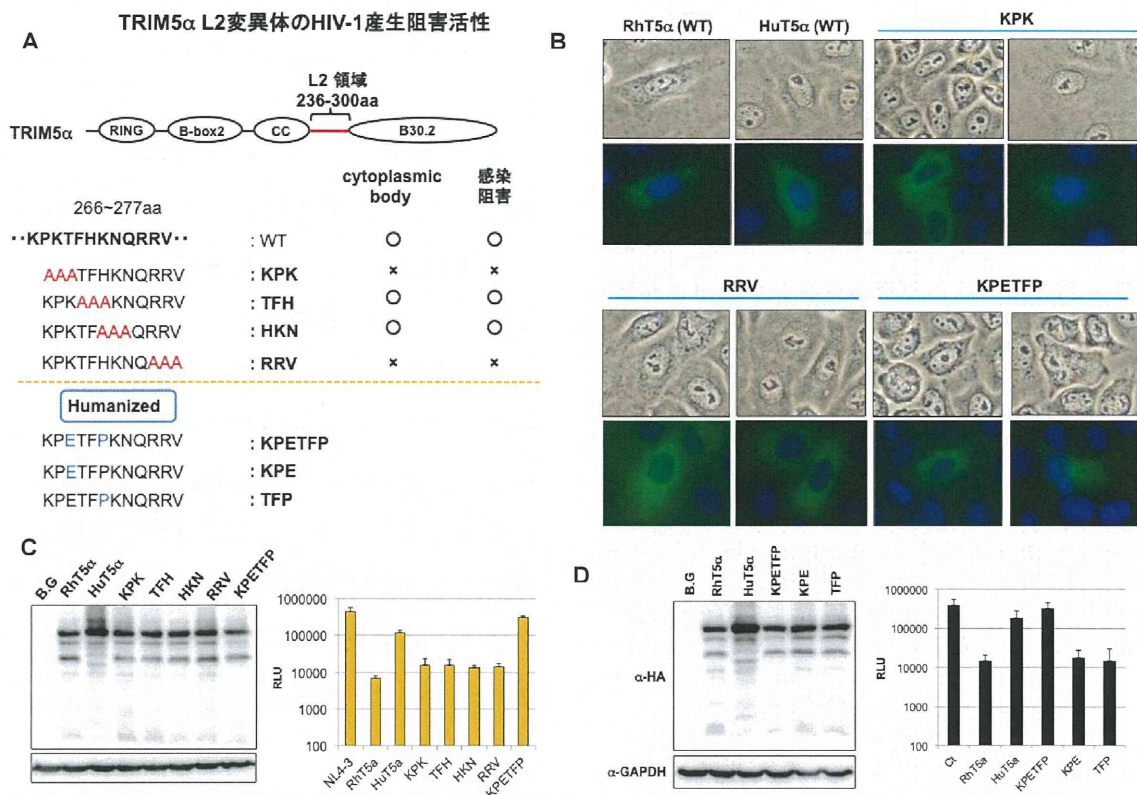


図 4 TRIM5 α サイトプラズミックボディー形成能と産生阻害の相関

(A) 本研究において作製したリンカー-2 (L2) 領域の変異 RhT5 α の模式図とアミノ酸配列を示した。また文献上報告されているサイトプラズミックボディー形成能力の有無と HIV-1 侵入後阻害活性 (感染阻害) との関連をまとめた。赤字で書かれた変異体がアラニンスキャンを青字で書かれた変異体はヒト化されていることを示す。(B) 作製した変異体によるサイトプラズミックボディー形成を免疫染色で検討した。各パネル上段が明視野での観察像を、下段が UV 励起時の観察像を示す。緑が FITC ラベルされた二次抗体を用いた TRIM5 α の検出像を青が Hoechst による染色像で核を示す。(C and D) 作製した変異体の発現チェックと HIV-1 産生阻害活性を示す。アラニンスキャンによる L2 変異体 (C) とヒト化変異体 (D) を 293T 細胞に Transfection して 48 時間後の発現量をウエスタンブロットにて検出した。これら変異体発現プラスミドを pNL4-3 と co-transfection し、48 時間後の産生されたウイルス量を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは独立した 3 回の実験結果の平均を標準偏差とともに示す。

する役割の解析を進めた。

3.1 S3 タンパク質ノックダウンの効果の細胞特異性の検討

前年度までの研究結果より S3 をノックダウンすることにより HIV-1 アンスプライズド RNA (US-RNA) の量が減少することが明らかとなっていたが、HIV-1 産生細胞として 293T 細胞を用いた結果であった。そ

こで本来の宿主細胞により近い T 細胞由来培養細胞を用いて同様の結果を得ることができるのかを検討した。MT4 細胞を用い、また細胞株による選択性を検討するために、293T 細胞と同様に接着細胞である HeLa 細胞を用いた。MT4 細胞では siRNA 導入では S3 タンパク質をノックダウンすることができず、また shRNA 発現ウイルスベクターの感染でもノックダウンを認めなか

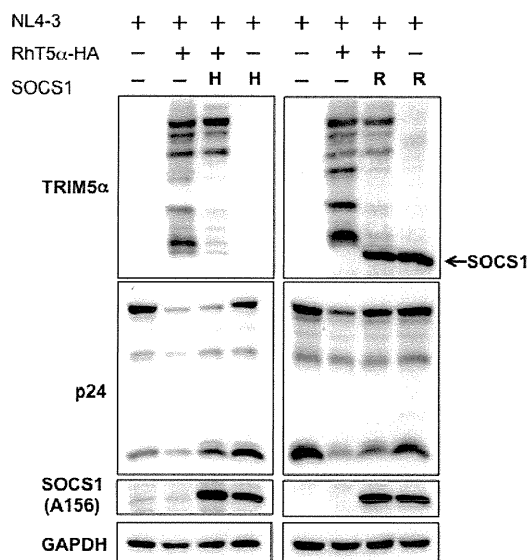


図 5 SOCS1 による RhT α 5 分解誘導の種特異性の検討

293T 細胞に pNL4-3、RhT5 α 発現プラスミド、及びヒト (H) もしくはアカゲザル (R) の SOCS1 発現プラスミドを co-transfection し、48 時間後に RhT5 α の発現量をウエスタンブロットにて解析した。なお、当初入手済みの SOCS1 抗体 (A156) がアカゲザル SOCS1 を認識するかが不明であったため SOCS1 には RhT5 α と同様に HA タグが付加されており、HA 検出ウエスタンブロットの像では同時に検出されている。また、それぞれのプラスミドを含まないコントロールの Transfection (-) では pcDNA3.1 を用いて Transfection DNA の総量を合わせている。

った、一方で Nucleofector を用いた shRNA 発現プラスミドの導入によって S3 タンパク質のノックダウンに成功した。用いた全ての細胞において 293T 細胞と同様の結果を得たため、S3 タンパク質は HIV-1 のウイルス産生に重要であることが強く支持された (図 6)。今回、SupT1 細胞を用いた検討を試みたが、本研究に用意した全ての shRNA において transfection 後に S3 タンパク質 mRNA レベルの上昇を認めたため、実験に用いることができなかった。また、TE671 細胞ではノックダウン後速やかに細胞が死んでしまい、ノックダウン細胞から

のウイルス回収を行うことができなかった。

3.1 LTR プロモーター活性に対する影響

先ず、S3 タンパク質が LTR のプロモーター活性に関与する可能性を検討した。また、LTR に限らず一般的な転写因子として働いている可能性を考え、CMV プロモーター、EF1 α プロモーターに対する影響も同時に調べることにした。LTR、CMV プロモーター、EF1 α プロモーターの下流にルシフェラーゼを挿入したレポータープラスミドと S3 に対する siRNA を co-transfection して 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。用いたレポータープラスミドは LTR、CMV からは Firefly luciferase を、EF1 α からは Renilla Luciferase を発現する。いずれのプロモーターを用いた場合でも、S3 のノックアウトによってルシフェラーゼ活性の有意な低下は認められなかった (図 7)。以上より US-RNA の減少は転写開始後に起こる反応であることが示唆された。

3.2 Tat に対する影響

HIV-1 LTR をプロモーターとする転写は HIV-1 の調節因子である Tat の働きで伸長する。そこで Tat の機能に S3 が必要である可能性を考え Tat 強発現下でのレポーターアッセイを行った。Tat による伸長反応をモニターするために LTR から転写が開始され、3' 末側、Nef のフレームにルシフェラーゼをコードする NL-Luc をレポーターとして用いた。コントロール siRNA を用いた場合、Tat の効果によりルシフェラーゼ

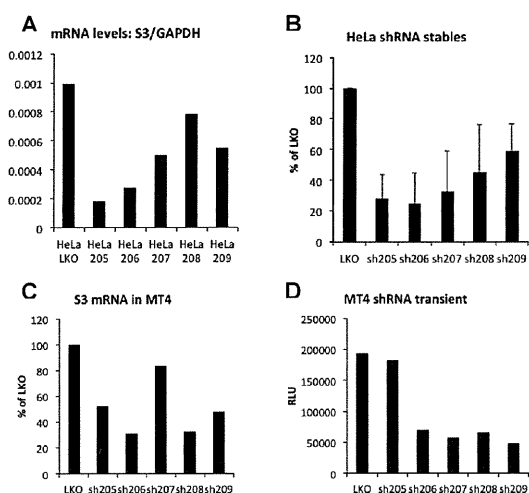


図6 S3タンパク質ノックダウンのHIV-1産生における効果の細胞特異性の検討

(A) HeLa細胞を用いて樹立したS3ノックダウン細胞で発現しているS3タンパク質のレベルを検討した。タグを持たないS3タンパク質を検出可能な抗体は入手したが、内在性のS3タンパク質は検出できないものであったため、発現量はmRNA量として示した。S3のmRNAは逆転写後、定量PCRで測定し、同じサンプルに含まれるGAPDHのmRNAレベルによってノーマライズした。(B) S3ノックダウンHeLa細胞にpNL4-3をTransfectionし48時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価をTZM-bl細胞を用いて定量した。グラフは独立した3回の実験結果の平均を標準偏差とともに示した。(C) MT4細胞におけるノックダウン試験の結果。MT4細胞ではshRNA発現プラスミドをnucleofectionすることで、一過性のS3ノックダウンに成功した。Nucleofectionの48時間後に細胞のTotal RNAを抽出、S3タンパク質のmRNAは逆転写後、定量PCRで測定し、同じサンプルに含まれるGAPDHのmRNAレベルによってノーマライズした。(D) NucleofectionによりS3に対するshRNA発現プラスミドとpNL4-3をco-transfectinした。48時間後に培養上清中に産生されたウイルスの力価をTZM-bl細胞にて定量した結果を示す。なお、(C)と(D)は同じ実験から得たサンプルであり、複数回の実験により同様の傾向が得られているが、nucleofectionの効率によって実験ごとに数値のばらつきが大きいため代表的なデータを記載した。

発現量は上昇したが、S3タンパク質をノックダウンするとTatを過剰発現させた場合でもルシフェラーゼ活性がTat非存在下と同程度まで抑えられた(図8)。よってTatの機能に影響を持つことが示唆された。

3.4 Revの機能に関する影響

HIV-1 US-RNAはウイルス由来の調節因子Revの働きによってスプライスを受けないまま核外へ輸送される。RevはHIV-1 RNA上、EnvのORF中に存在するrev responsible element (RRE)を認識し、RREを持つRNAの安定性を上げることが知られている。前項で用いたレポータープラスミドから転写されるRNAにはRREが含まれているため、Revの影響を無視することはできない。そこで、Revの効果を観察するためのレポーター実験系を過去の文献を参考に構築し、Revの機能に関するS3タンパク質の役割を解析した。作製したレポーターはCMVプロモーターの下流にHIV-1 Tatのエクソン1、イントロン、エクソン2を持ち、イントロンの内部にルシフェラーゼを挿入した。また、RREは元々HIV-1 Tatのイントロン中に存在し、それを利用して(図9)。このレポーター系を用いるとRev非存在下ではTatが発現し、Rev存在下でのみルシフェラーゼが発現する。このときsiRNAのco-transfectionによってS3タンパク質の発現を抑制すると、レポーター由来のRevの働きが50%程度まで抑制される事が分かり、Revの働きに重要な因子である可能性が示唆された(図9)。

3.5 プロモーター非依存的な作用

S3タンパク質の影響がTat、Revともに示されたため、プロモーター、RNA配列への依存を検討するために、CMVプロモーターの下流にHIV-1のRNAの大部分がコード

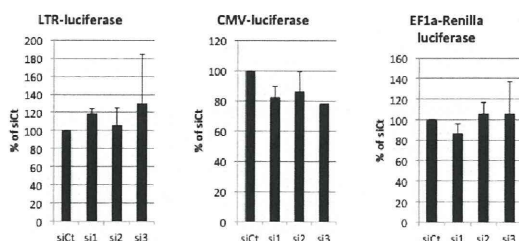


図 7 S3 ノックダウンの効果はプロモーターに依存しない

293T 細胞にレポーターとして LTR、CMV プロモーター依存 Firefly luciferase 発現プラスミド、もしくは EF1a プロモーター依存 Renilla luciferase 発現プラスミドを、またエフェクターとして S3 タンパク質に対する siRNA (si1、si2、si3) を co-transfection した。48 時間後に Transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、コントロール siRNA (siCt) を用いた結果を 100%として、プロモーター間での比較ができるように計算した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。

されたヘルパープラスミドからの Gag 発現における S3 タンパク質ノックダウンの効果を検討した。siRNA による S3 タンパク質のノックダウンによって、プロウイルスプラスミドからの Gag 発現が低下し、同様に 2 種のヘルパープラスミドからの Gag 発現の低下を認めた (図 10)。これらの結果より S3 タンパク質の役割は RNA の配列に依存することが示唆された。

4. その他因子の機能的スクリーニング

昨年までのスクリーニングによって解析が進んでいる宿主因子の他に、粒子内より得られた候補からの絞り込みを行い、更なる宿主因子の同定を試みた。(本セクションでは知財を考慮して因子の具体名等を伏せたまま結果を示しています。ご了解ください。)

4.1 293T 細胞と TE671 細胞間での遺伝子発現パターンの比較

RhT5α による産生阻害をサポートするために必要な因子を別の方法で絞り込むために、293T 細胞と TE671 細胞内のタンパク質発現パターンを比較した。HIV-1 産生時の両細胞から Total RNA を抽出し東レ株式会社のアレイ解析を依頼した。約 28000 種の解析結果より、数多くの宿主因子の発現パターンで違いが認められ 2160 個の遺伝子に関して TE671 より 293T の方が高い発現を示し、1709 個では逆に TE671 での発現が高かった。更に粒子内に取り込まれていた候補タンパク質と比較し、オーバーラップするものを絞り込んだところ、16 個の遺伝子に関して TE671 より 293T の方が高い発現を示し、12 個では逆に TE671 での発現が高いということが明らかとなった。

4.2 遺伝子パターンの違いに基づくパスウェイ解析

RhT5α が HIV-1 産生を抑制するために利用しているパスウェイの同定を行うために、アレイ解析の結果差が認められた宿主因子を多く含む細胞内パスウェイを解析した。本解析も東レのアレイ解析に付随するパスウェイ解析を利用した。脂質代謝やプロテアソームタンパク質分解系など 13 の細胞内経路に関して 293T 細胞内でより活性化傾向にあり、G1/M 期の細胞周期コントロールや DNA 修復系 16 のパスウェイでは TE671 がより高い傾向など向を示していた。これらのパスウェイに含まれる宿主因子と

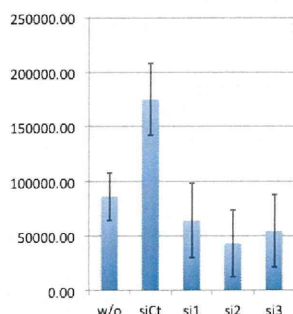


図 8 S3 タンパク質ノックダウンの Tat 活性に対する効果の検討

293T 細胞に LTR 依存 Firefly luciferase 発現プラスミドと Tat 発現プラスミドを S 3 タンパク質に対する siRNA (si1, si2, si3) もしくはコントロール siRNA (siCt) と co-transfection した。48 時間後に transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示した。

粒子内宿主因子を比較したところ、一部の SOCS1 や ZNF タンパク質など 6 個の粒子内宿主因子の関連が示唆された。

4.3 新規因子の HIV-1 産生に対する効果の検討

アレイ解析の結果や既知の機能から HIV-1 の増殖への関与が示唆された宿主因子群をノックダウンし HIV-1 産生への影響を調べた。29 個の shRNA をコードするプラスミドと HIV-1 プロウイルスを co-transfection し、48 時間後に培養上清中に放出されたウイルス量を TZM-bl アッセイで定量することでノックダウン細胞からの HIV-1 産生効率を検討した (図 11)。更に得られた候補因子の新規因子の TRIM5α 抗 HIV-1 産生活性への効果の検討を行うために、同様の shRNA セットの HIV-1 産生における効果の検討を TRIM5α 存在下において行った (図 12)。HuT5α 強発現下で特定の宿主因

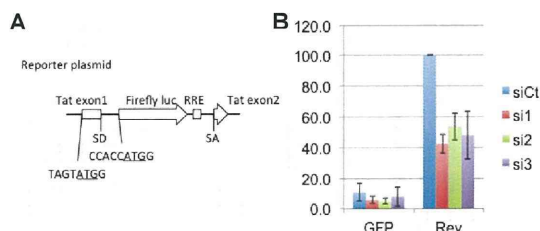


図 9 S3 タンパク質ノックダウンの Rev 活性に対する効果の検討

(A) 作製した Rev レポーターコンストラクトを図示した。レポータープラスミドは pcDNA3.1 のマルチクローニングサイトに NL4-3 の Tat をコードする領域をイントロンごと挿入したもののイントロン内部を改変し firefly luciferase を挿入した。この際、NL4-3 由来の RRE は残してある。また、Tat ATG の上流には Kozak 配列が無く、luciferase ATG は Kozak 配列を持つ。コンストラクト上のスプライスドナー、アクセプターの組み合わせは NL4-3 Tat のものをそのまま利用した。(B) 作製したレポータープラスミドと Rev 発現プラスミドを S3 に対する siRNA (si1, si2, si3) もしくはコントロール siRNA (siCt) とともに 293T 細胞に co-transfection した。Rev で活性化されないコントロールとして、EGFP 発現プラスミドを用いた (GFP)。48 時間後に Transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示した。

子をノックダウンしたところ HIV-1 産生が低下することが明らかとなった。

5. 既知の HuT5α SNP の持つ抗 HIV-1 活性の検討

本研究の最終目的は HuT5α の持つ弱い抗 HIV-1 活性の増強であり、ヒトの TRIM5α には複数の SNP が存在することが知られているため、それぞれの抗 HIV-1 活性について検討を行った。既報のヒト TRIM5α SNP 11 種を PCR による点変異導入法で作製し、それぞれの発現を確認した後に HIV-1 産生阻害活性を検討した (図 13)。その結果、ヒト TRIM5α 間でも抗ウイルス活性に強弱が存在し、H43Y を持つもの

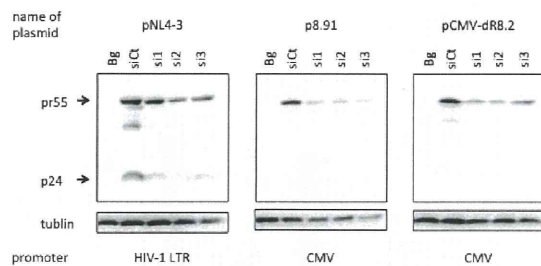


図 10 Gag タンパク質発現におけるプロモーター非依存的な S3 タンパク質の効果

293T細胞に pNL4-3、p8.91 もしくは pCMV-dR8.2 を S3 タンパク質に対する siRNA とともに co-transfection し 48 時間後に Gag の発現量をウエスタンブロット法にて検出した。p8.91、pCMV-dR8.2 はともにレンチウイルスベクター作製時のヘルパープラスミドとして用いられているもので、CMV プロモーター依存の HIV-1 タンパク質発現を示し、ともに Env を発現しない。バックグラウンドコントロールとして Transfection されていない 293T 細胞の抽出液が展開されている (Bg)。なお、タンパク質濃度を測定し、各レーン 30 mg を展開し、ローディングコントロールとして GAPDH を検出した。

抗ウイルス活性が最も高いことが示された。

D. 考察

SOCS1 による TRIM5 α の分解誘導

本研究成果より SOCS1 は RhT5 α を非プロテアソーム系で分解誘導していることが明らかとなった。また、以前の我々による研究結果から RhT5 α は同様に Gag の非プロテアソーム系での分解を誘導している。残念ながらこれらの詳細は未だ明らかにできていないが、これらの事実は三者が同じパスウェイの中で相互作用を持つという仮説を支持する。

サイトプラズミックボディ形成と抗ウイルス活性

本研究において副次的に発見された変異体

ではあるが、RhT5 α のリンカー領域をヒト化することで、サイトプラズミックボディ形成は行いが抗ウイルス活性を失った変異体を同定した。この領域の重要性は今まで報告されておらず、新規の変異体を構築したと言え、また、ウイルスのライフサイクルの前期課程における効果も報告されていないことから、RhT5 α が二つの異なるメカニズムによって HIV-1 の感染と産生を抑制していることが強く支持された。

アレイ解析における信頼性の評価

予算と期間の関係上、条件を検討しながらの複数回のアレイ解析を行うことができなかった。本研究ではおおよそ 10^7 細胞から抽出した RNA の一部をアレイに用いているため、特殊な状況の特殊な細胞による発現量の変化とは考えにくい。再現性をとるための実験は行えておらず、今回示された宿主因子の全てにおいて有意な差があるとする事は残念ながらできない。しかしながら、粒子内取り込みを認めた宿主因子とのオーバーラップとして評価することで宿主因子群に対して多面的に評価を行っており、候補因子絞り込みの方法としては有効であると考えている。

HuT5 α SNP の解析

HuT5 α の SNP 間で抗 HIV-1 活性に違いが認められた。この違いを生じた詳細なメカニズムは不明であり、今回最も強かった H43Y は RING ドメインの変異であるため E3 ユビキチンライゲース活性の亢進によ

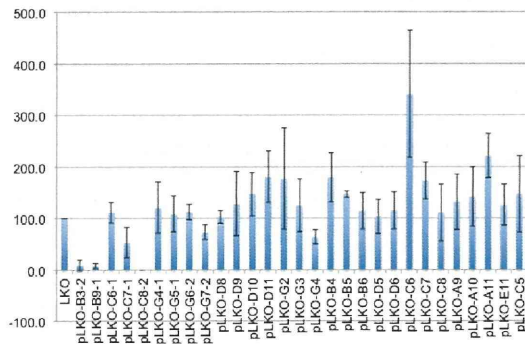


図 11 HIV-1 産生における候補因子群の関与の検討

293T 細胞に候補因子に対する shRNA 発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。shRNA 発現プラスミドの名称は当方での管理上の番号が記されており、実際の因子名を示唆するものではない。

るものと予想される。同様にして、それぞれ相手となる宿主因子とのアフィニティや酵素活性の強弱により SNP 間で活性の違いが生じたと考えられる。このことは HuT5 α のパートナーとなる宿主因子を探し、そのアフィニティを増大する・酵素活性を増強することで、HuT5 α に抗 HIV-1 産生活性を付与できる可能性を支持する。

進捗状況と自己評価、及び今後の発展

本研究開始時に挙げた目標は以下の 2 点であった。

- HuT5 α がなぜ HIV-1 産生を抑制できないのかを明らかにする。
- 得られた知見に基づき HuT5 α による HIV-1 複製阻害活性の誘導を試みる。

本研究成果より SOCS1 の発現レベルをコントロールすることで HuT5 α の活性を誘導できる可能性が示唆された。また、詳細

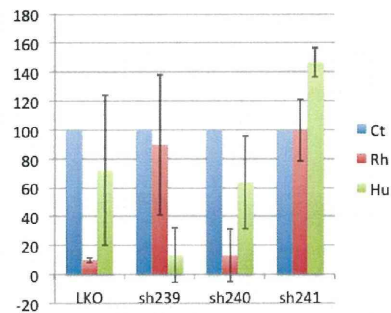


図 12 HuT5 α の HIV-1 産生阻害における候補因子群の関与の検討

293T 細胞に RhT5 α もしくは HuT5 α 発現プラスミド、候補因子に対する shRNA 発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示し、効果の認められた一部のデータを具体例として示す。Ct は TRIM5 α の代わりに EGFP 発現プラスミドを用いたコントロールであり、shRNA 間での比較が可能になるよう、この結果を 100% とした。shRNA 発現プラスミドの名称は当方での管理上の番号が記されており、実際の因子名を示唆するものではない。

な機序は未解明ではあるが HuT5 α の抗 HIV-1 活性を増強する可能性の高い宿主因子も同定することができた。HIV-1 粒子内より同定され、ウイルス増殖に、また RhT5 α による HIV-1 産生阻害に重要な宿主因子のリストに関しては現状で 97 種の宿主因子を同定し、更に他の実験データと組み合わせることで多面的に評価したことで、一定の成果を得ることができたと考えている。一方で今回得られたリストに関しては RhT5 α の作用機序に注目した場合のものであり、粒子内全ての宿主因子を評価可能なものではない。本研究計画を通じて得た HIV-1 粒子の精製、濃縮、内部タンパク質構成の解析方法・技術を用いて、PBMC で増幅した HIV-1、可能であれば HIV-1 感染者の血中から濃縮した HIV-1 の構成タン

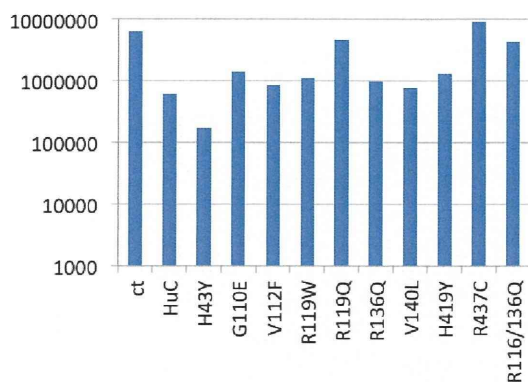


図 13 HuT5α SNP による HIV-1 産生阻害活性の比較

293T 細胞に各 SNP を持つ HuT5α の発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection 後、48 時間で培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。レーンの名称は導入された SNP の残基番号と置換前後のアミノ酸を一文字表記で示しており、HuC は野性型の HuT5α を用いた際の結果を、Ct は TRIM5α 非存在下での HIV-1 産生量を示す。

パク質を調べることで、新規抗 HIV-1 戦略を開発していく上で重要な知見につながると考えている。

E. 結論

本研究計画の最終年度として、申請時に予想された成果の一つであるウイルス粒子内より検出され HIV-1 のライフサイクルに重要な宿主タンパク質に関する情報を得ることはできたと考えている。また、当該因子をノックダウンすることで HuT5α による HIV-1 産生阻害を認めるもの同定されており、更なる精査、解析は必要であるものの本研究の目的は最低限達することができたと考えている。一方で、得られた因子の解析は完了したとは言えず、また詳細に解析を進めた因子の論文での発表も期間内には

終了しなかった。本報告書にもある SOCS1 に関しては近日中に成果をまとめて投稿する予定であり、S3 タンパク質についても少々の追加実験の後投稿予定である。その他の因子についても解析を継続する予定であり順次報告し続けていくことで、研究成果を還元していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakuma R, Takeuchi H.

SIV replication in human cells.

Front Microbiol. 3:162. 2012

2. 学会発表

佐久間龍太、助川明香、武内寛明、山岡昇司

HIV-1 の増殖に重要な新規宿主因子の同定
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)
2012

助川明香、佐久間龍太、大嶺青河、池田靖弘、山岡昇司

HIV-1 産生阻害におけるアカゲザル TRIM5a の細胞内動態の解析
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)
2012

堀恭徳、武内寛明、佐久間龍太、山岡昇司
ヒト CPSF6 の C 末欠損帯は HIV-1 感染後の逆転写効率に影響を及ぼす因子である
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)
2012

佐久間龍太、助川明香、武内寛明、山岡昇
司

HIV-1 の増殖に重要な新規宿主因子の同
定

第 26 回日本エイズ学会学術集会（神奈川県）

武内寛明、佐久間龍太、山岡昇司

機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーか
ら同定した新規 HIV 感染必須因子群の解析

第 26 回日本エイズ学会学術集会（神奈川県）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案

無し

3. その他

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
無し							

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
Sakuma R, Takeuchi H.	SIV replication in human cells.	Front Microbiol.	3	162	2012



SIV replication in human cells

Ryuta Sakuma and Hiroaki Takeuchi*

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

Edited by:

Akio Adachi, The University of
Tokushima Graduate School, Japan

Reviewed by:

Vanessa Hirsch, National Institute of
Allergy and Infectious Diseases, USA
Tomoyuki Miura, Kyoto University,
Japan

Klaus Strebel, National Institutes of
Health, USA

***Correspondence:**

Hiroaki Takeuchi, Department of
Molecular Virology, Tokyo Medical and
Dental University, 1-5-45 Yushima,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.
e-mail: htake.molv@tmd.ac.jp

Current human immunodeficiency virus type 1 pandemic is believed to originate from cross-species transmission of simian immunodeficiency virus (SIV) into human population. Such cross-species transmission, however, is not efficient in general, because viral replication is modulated by host cell factors, with the species-specificity of these factors affecting viral tropism. An understanding of those host cell factors that affect viral replication contributes to elucidation of the mechanism for determination of viral tropism. This review will focus an anti-viral effect of ApoB mRNA editing catalytic subunit, tripartite motif protein 5 alpha, and cyclophilins on SIV replication and provide insight into the mechanism of species-specific barriers against viral infection in human cells. It will then present our current understanding of the mechanism that may explain zoonotic transmission of retroviruses.

Keywords: HIV-1, SIV, APOBEC3G, TRIM5 α , cyclophilin A, cyclophilin B

INTRODUCTION

There is significant evidence that the ongoing worldwide acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic was caused by cross-species transmission of simian immunodeficiency viruses (SIVs) into the human population. Replication of primate lentiviruses in their natural hosts is generally non-pathogenic; however, cross-species transmission of these viruses can result in highly pathogenic phenotypes. How and when this transmission occurred is still debated but it is now generally accepted that HIV-2 originated from a sooty mangabeys strain of SIV (SIVsm; Hirsch et al., 1989; Chen et al., 1996) while HIV-1 appears to have originated from a chimpanzee strain of SIV (SIVcpz; Gao et al., 1999). Zoonotic transmission of SIVs, however, is not common and is controlled by host factors that generally prohibit SIV replication in human hosts and many human-derived cell lines.

Viral replication is modulated by host cell factors, with the species-specificity of these factors affecting viral tropism. Some of these host factors can restrict viral replication and the anti-viral systems mediated by such host restriction factors, termed intrinsic immunity, play an important role in determining species-specific barriers against viral infection. For instance, Fv-1 in mice is known to restrict replication of a murine leukemia virus (Rein et al., 1976; Gautsch et al., 1978; Towers et al., 2000) and tripartite interaction motif 5 α (TRIM5 α) recently has been found to be responsible for restricting HIV-1 but not SIV infection in Old World monkey (OWM) cells (Hatzioannou et al., 2004b; Keckesova et al., 2004; Stremlau et al., 2004; Yap et al., 2004; Song et al., 2005; Ylinen et al., 2005). Restriction of retroviral replication by these host cell factors takes place after viral entry, but before the integration step, and the viral determinants for this type of restriction have been mapped to the capsid (CA) protein (Gautsch et al., 1978; Kozak and Chakraborti, 1996; Towers et al., 2000; Goff, 2004; Stremlau et al., 2006). Two recent studies showed that the cellular protein SAMHD1 is myeloid-lineage cell-specific HIV-1 restriction factor

counteracted by Vpx proteins from HIV-2 and SIVsm (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011). Restriction of lentivirus infection by SAMHD1 is likely to take place at the reverse transcription step. Another anti-retroviral protein, tetherin (also referred to as BST-2, CD317, or HM1.24) inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu protein, Nef protein of many SIVs, or Env protein of HIV-2 (Neil et al., 2008; Le Tortorec and Neil, 2009; Zhang et al., 2009). Understanding how host cell factors affect viral replication, positively or negatively, would contribute to elucidating the molecular mechanism that determines viral tropism. Here, we discuss an anti-viral effect of ApoB mRNA editing catalytic subunit (APOBEC), TRIM5 α , and cyclophilins (Cyps) on SIV replication.

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 the HIV-1 accessory gene product, Vif (standing 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; Fan and Peden, 1992; Gabuzda et al., 1992; Blanc et al., 1993; Sakai et al., 1993; von Schwedler et al., 1993; Borman et al., 1995). Recently, some cytidine deaminases were identified as a new class of host restriction factors that target retroviruses such as HIV-1 or SIV (Harris and Liddament, 2004; Cullen, 2006). 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. Apo3G is also a host factor that restricts replication of human and simian lentiviruses in their respective target cells. Unlike TRIM5 α or Fv-1, Apo3G does not exert its anti-viral activity by targeting the viral CA 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 a subsequent infection step. HIV-1 counteracts Apo3G with Vif expression. During the production of progeny virions, Vif binds to Apo3G and induces Apo3G's proteasomal degradation, resulting in the decreased steady-state levels of human Apo3G (hApo3G; Yu et al., 2003).

There are several anti-retroviral mechanisms of Apo3G against HIV-1 infection. First, Apo3G-containing virus can accumulate in a large number of substitutions that register as cytidine (C) to deoxyuridine (dU) in a virus minus-strand during reverse transcription, resulting in 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; Zhang et al., 2003; Yu et al., 2004b). Second, Apo3G can inhibit tRNA annealing or tRNA processing during reverse transcription (Guo et al., 2006, 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 anti-retroviral activity of APOBEC family because APOBEC proteins from non-human species can also inhibit HIV-1 infection (Mariani et al., 2003; Bishop et al., 2004a,b; Wiegand et al., 2004; Cullen, 2006), the Vif-Apo3G interaction is thought to be species-specific (Simon et al., 1998; Mariani et al., 2003). 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 (Mariani et al., 2003; Bogerd et al., 2004; Mangeat et al., 2004; 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 (Takeuchi et al., 2005). 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).

Moreover, two independent groups showed that the different APOBEC3 family members function to neutralize specific lentiviruses (Yu et al., 2004a; Dang et al., 2006). One report from the lab of Dr. Nathaniel R. Landau showed that APOBEC3B and APOBEC3C were potent inhibitors of SIV (Yu et al., 2004a). Both enzymes were efficiently encapsidated by HIV-1 and SIV. Another report from the lab of Dr. Yong-Hui Zheng demonstrated that APOBEC3DE blocked the replication of both HIV-1 and SIV but not that of MLV (Dang et al., 2006) and APOBEC3H inhibited the replication of HIV-1 by a cytidine deamination-independent mechanism (Dang et al., 2008). These findings raise the possibility

that the various APOBEC3 family members protect against different lentiviruses and point to a possible role in the zoonotic transmission of SIV.

TRIM5 α : FV-1-TYPE HOST FACTOR RESTRICTING HIV-1 IN PRIMATE CELLS

The host protein which dictates Ref1 activity was identified as an α -isoform of rhesus macaque TRIM5 protein by the laboratory of Dr. Joseph Sodroski (Stremlau et al., 2004). TRIM5 is a member of the 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 primate homologs of TRIM5 α were shown to restrict retroviruses, such as N-MLV, and equine infectious anemia virus (Hatzioannou et al., 2004b; Keckesova et al., 2004; Perron et al., 2004; Yap et al., 2004; Song et al., 2005; Ylinen et al., 2005; Si et al., 2006). Rhesus monkey TRIM5 α (rhTRIM5 α) has strong anti-HIV-1 activity but only modestly restricts SIV isolated from a macaque monkey (SIVmac) and does not block MLV infection, whereas its human homolog does not restrict HIV-1 infection.

TRIM5 α recognizes incoming viral cores, but not a monomeric CA protein, through its B30.2 (PRYSPRY) domain. B-box 2 and coiled-coil domains are required for TRIM5 α 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 α captures HIV-1 core at a very early step(s) after infection, immediately after the release of the core into cytoplasm. To restrict HIV-1 infection and to recognize viral core, TRIM5 α must oligomerize through its B-box 2 and coiled-coil domains (Mische et al., 2005; Li and Sodroski, 2008). Its RING domain has E3 ubiquitin ligase activity. It self-ubiquitination occurs TRIM5 α is quickly degraded (Diaz-Griffero et al., 2006). This rapid degradation of TRIM5 α is not required for post-entry restriction since replacement of TRIM5 α RING domain with the corresponding domain of TRIM21, which has lower self-ubiquitination activity and a longer half-life than TRIM5 α did not alter the anti-viral activity (Kar et al., 2008). Recently, the laboratory of Dr. Mark Yeager discussed a novel architecture made with dimers of TRIM5-21R. TRIM5 α -21R forms a dimer through its B-box 2 and coiled-coil domains, and these dimers form six-sided rings on CA lattices to promote rapid core disassembly (Ganser-Pornillos et al., 2011). Overexpression of TRIM5 α leads to the formation of cytoplasmic bodies and is believed to be required for its anti-viral activity (Stremlau et al., 2006; Campbell et al., 2008). During TRIM5 α -mediated post-entry restriction, disassembly of viral cores is induced too quickly and the accumulation of viral RT-products is reduced (Stremlau et al., 2006). On the other hand, MG132 treatment inhibited quick-disassembly, yet HIV-1 infectivity was still restricted. Two reports showed that TRIM5 α 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 α -mediated post-entry restriction is thought to have at least two phases: (i) TRIM5 α induces rapid disassembly of viral core in a proteasome-dependent manner and (ii) TRIM5 α 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. Previous report showed that TRIM5 α alleles did not cluster by species between rhesus macaques and sooty mangabeys and none of the alleles from either species restricted SIV, suggesting that there is little effect of rhTRIM5 α on transmission of SIVsm within species (Newman et al., 2006). Recently, Pacheco et al. (2010) reported that New World monkey (NWM) TRIM5 α restricts foamy virus infection. Another consideration is the clinical significance of TRIM5 α against AIDS in human. Moreover, several reports showed that the efficacy of TRIM5 α -mediated suppression of HIV-1 replication might interfere with disease progression of AIDS in humans (van Manen et al., 2008; Cagliani et al., 2010; Takeuchi et al., 2012). Thus, TRIM5 α -mediated restriction may be a multi-step process in retrovirus replication with the relationship between other host factor(s).

Recently, the lab of Dr. Yasuhiro Ikeda reported that rhesus macaque TRIM5 α 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 ubiquitin-proteasome-independent manner. This TRIM5 α -mediated late-restriction is still controversial (Zhang et al., 2008), yet it is conceivable that TRIM5 α restricts HIV-1 infection and production in two distinct mechanisms. Although TRIM5 α restricts HIV-1 infection in a broad range of cells, its late restriction involved transient overexpression (Sakuma et al., 2007).

Here is another notable class of the TRIM family called TRIM-Cyp isolated from NWM. A report from the laboratory of Dr. Jeremy Luban demonstrated that owl monkey cells express TRIM-Cyp that restricts HIV-1 infection (Sayah et al., 2004). Although TRIM-Cyp has a cyclophilin A (CypA) 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 α -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 overexpressed rhesus TRIM-Cyp restricts HIV-1 infection and production (Newman et al., 2006; Brennan et al., 2008; Wilson et al., 2008; Dietrich et al., 2010).

Unlike other restriction factors, there is no known accessory gene product of HIV-1 to antagonize TRIM5 α -mediated restrictions. Indeed, human TRIM5 α has only a modest restriction activity against HIV-1 infection. TRIM5 proteins from several NWM species restrict infection by SIVmac and SIVagm (Song et al., 2005). This suggests that TRIM5 α could be a key molecule of the species-species barrier.

CYCLOPHILINS: HOST FACTORS INVOLVED IN RETROVIRUS REPLICATION

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 CsA to CypA inhibits this isomerase

activity (Takahashi et al., 1989). In retrovirus replication, CypA was found to bind HIV-1 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 (Zhao et al., 1997; Bosco et al., 2002), 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 remains unclear.

It has been well established that CypA promotes an early step of HIV-1 infection in human cells (Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Braaten et al., 1996a,c; Franke and Luban, 1996; Braaten and Luban, 2001; Sokolskaja et al., 2004; Hatzioannou et al., 2005). 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 (Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Ott et al., 1995; Braaten et al., 1996a; Bukovsky et al., 1997; Ackerson et al., 1998; Braaten and Luban, 2001). It is still unclear how CypA is efficiently packaged into HIV-1 virion, but several reports showed that both dimerization of CA and multimerization of CypA are required for efficient interaction (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 infected target cells rather than during HIV-1 budding from the virion producer cells, indicating that target cell CypA promotes HIV-1 infectivity (Kootstra et al., 2003; Towers et al., 2003; Sokolskaja et al., 2004).

CypA-dependent virus replication is only limited to retroviruses which encode CA that binds CypA. In fact, only those retroviruses are dependent upon CypA for replication (Luban et al., 1993; Franke et al., 1994; Thali et al., 1994; Braaten et al., 1996c; Franke and Luban, 1996). These observations suggested that CA-CypA interaction might contribute tropism determinants for retroviruses. HIV-1 infection in non-human primate cells is blocked prior to reverse transcription after virus entry (Shibata et al., 1995; Himathongkham and Luciw, 1996; Hofmann et al., 1999; Besnier et al., 2002; Cowan et al., 2002; Munk et al., 2002; Hatzioannou et al., 2003; 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 (Shibata et al., 1991, 1995; Dorfman and Gottlinger, 1996; Bukovsky et al., 1997;