

201210013A

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）
（H22-政策創薬-一般-017）

HIV の宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 日吉 真照

平成 25（2013）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

HIVの宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究 ----- 1

研究代表者 日吉真照 (熊本大学エイズ学研究センター 特任助教)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

HIV の宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

研究代表者 日吉真照 熊本大学エイズ学研究センター 特任助教

研究要旨

HIV-1 は宿主細胞の様々なシステムを利用し、複雑な病態を引き起こす。特に、Nef はそれ自身には酵素活性は無いが、様々な宿主タンパク質と相互作用することでエイズ発症を誘導することが知られている。そのため、エイズ発症機構の理解、発症防止薬剤の開発、そして HIV-1 感染者の長期療養に関する課題の克服、全ての点で Nef の徹底的な解析は重要である。しかし現在までに、「何故 Nef が必須なのか、どの機能が重要か、どのような宿主因子との相互作用が必要か」などの根本的な点は未解明のままである。本研究では、Nef が複数の宿主因子を利用する性質を逆手に取ったユニークなアプローチで、これらの課題解決のための新たなツールと視点を提供することを目的とする。

Nef と強く結合する宿主因子のひとつとして酵素 Hck が知られている。これまでの Hck をツールとした研究によって、酵素領域を欠くドミナントネガティブ Hck 変異体は、Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力の増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下を完全に阻害することが明らかにされている。この阻害効果は、ドミナントネガティブ Hck 変異体が Nef と他の宿主因子の結合を阻害した結果と考えられる。そこで本研究では、ドミナントネガティブ Hck 変異体をもとにして、Nef 標的低分子ペプチドの同定を試みる。さらに、Nef 機能阻害低分子化合物の同定も試みる。

これまでに、我々は Nef に直接結合して Nef 機能を阻害する化合物 2C を同定している。本年度は、化合物 2C の抗 HIV-1 活性を更なる詳細な解析を行った。また、化合物 2C を用いて、Nef と結合して Nef の機能発現（ウイルス感染力増強、MHC-I 発現低下、及びウイルス産生低下）に重要な役割を担う宿主タンパク質の同定を試みた。

A. 研究目的

多くのコホート研究やサル感染モデルを用いた研究によって、HIV-1 Nef はエイズ発症に重要なタンパク質であることが明らかにされている。このことから、エイズ発症機構の理解、発症防止薬剤の開発そして HIV-1 感染患者の長期療養における課題の克服、これらの全ての点において、Nef の徹底的な解析は重要である。しかし現在もなお、「Nef のどの

機能が重要か、それら機能にどんな宿主因子が必要か」など根本的な点は未解明のままである。本研究は、Nef がその機能を発揮するために複数の宿主因子を利用する性質を逆手に取ったユニークなアプローチで、HIV-1 研究の新たなツールと視点（Nef 機能阻害ペプチドと関連宿主因子）を提供することを目的とする。

Nef と強く結合する宿主因子のひとつは酵素 Hck である。興味深いことに、酵素領域を欠損するドミナントネガティブ Hck 変異体を細胞に発現させると、ウイルス粒子感染力増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下という 2 つの重要な Nef の機能を阻害することが可能である。この 2 つの Nef 機能は、生体内高ウイルス量の維持、感染細胞の免疫監視からの逃避に重要である。この Nef 機能阻害は、ドミナントネガティブ Hck 変異体と Nef の強い結合によって、Nef と本来結合する他の宿主因子との結合が阻害された結果と考えられる。

以上の知見を逆手に取れば、以下の 2 つの点に応用できる。まず、ドミナントネガティブ Hck 変異体のアミノ酸配列をもとにして、上記 2 つの Nef の機能を阻害するペプチドの同定が可能である。さらに、ドミナントネガティブ Hck 変異体をプローブとして利用できる。すなわち、ドミナント Hck 変異体の存在下で Nef との結合が阻害されるタンパク質を同定することによって、上記 2 つの Nef 機能を担う宿主因子を明らかにすることができる。いずれも、エイズ発症過程、その中で果たす Nef の役割を解明する上で有用なツールと視点を提供することができる。しかし、これらの検討は未だなされていない。本研究では、ドミナントネガティブ Hck の配列をもとに、細胞透過性のある最も効果的な Nef 機能阻害ペプチドを同定することを目指す。一方、近年我々のグループは独自に Nef 結合化合物 2C を同定したが、この化合物 2C の Nef 機能阻害効果についても解析する。これらの研究によって、Nef をターゲットとした新たな抗 HIV-1 剤の候補となる分子の同定を試みる。さらに、ドミナントネガティブ Hck 変異体と化合物 2C をプローブとして使用し、Nef に結合する宿主因子(群)を同定し、Nef によるエイズ発症の分子メカニズムに

ついて新たな知見と視点を提供することを目指す。

B. 研究方法

我々が独自に同定した Nef 結合低分子化合物 2C の HIV-1 ウイルスに対する効果をさらに詳細に解析した。Nef 機能によってウイルス産生の増加と感染力増強効果について培養細胞 U87-CD4-CCR5 細胞を用いて解析を行った。まず、化合物 2C の U87-CD4-CCR5 細胞に対する細胞毒性の有無を確認した。そのために化合物 2C が 12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 及び 200 μ M の培養液中で U87-CD4-CCR5 細胞を培養した後、細胞数を MTT assay を行って計測した。さらに、化合物 2C のウイルス産生と感染力を予測するために、上記実験と同様の化合物 2C を含む培養液で培養した U87-CD4-CCR5 細胞に HIV-1 JRFL を感染させた後、MTT assay を行って生存する細胞数を計測した。

次に、化合物 2C をプローブとして、Nef と結合してその機能発揮のために重要な宿主タンパク質(群)の選別を行った。そのために、これまでに Nef と結合することが報告されているタンパク質について、化合物 2C によって Nef との結合が阻害されるかどうかを確認した。具体的には、まず、既知の Nef 結合性宿主タンパク質をサブクローニングし、Flag tag もしくは HA tag 融合タンパク質となるようにコンストラクトを作製した後、293 細胞に Nef (Flag tag もしくは HA tag を付加した Nef コンストラクト)と共発現させた。化合物 2C の存在下で 2 日間培養した後、細胞から細胞質溶液を調整し、抗 Flag tag 抗体もしくは抗 HA tag 抗体を用いて免疫沈降を行い、western blot によって免疫沈降産物にそれぞれの宿主タンパク質が存在するかを確認した。

前年度の研究から、Nef の機能を担う新規の宿主因子の同定を行ってきたが、今年度はその同定法の改良を行い、より

精度の高い宿主タンパク質の同定方法の確立を試みた。そのためにまず、Nef-Flag tag-Strep tag 融合タンパク質をコードした発現ベクターをトランスフェクション法によって 293A 細胞に導入した。2日間培養後、細胞から調整した細胞質抽出液から Strep-Tactin アフィニティゲルを用いて Nef-Flag-Strep 融合タンパク質を回収した。ビオチン溶液を用いてゲルから特異的に抽出した Nef-Flag-Strep 融合タンパク質を含む溶液を次に Flag 抗体アフィニティゲルを加えてインキュベートし、Nef-Flag-Strep 融合タンパク質を回収した。その後、化合物 2C 溶液を用いて抗 Flag 抗体アフィニティゲルからタンパク質を抽出した。ネガティブコントロールとして、同様の実験を DMSO 含有溶液を用いて行い抽出液を調整した。次に、Nef-Flag-Strep 融合タンパク質を含んだ溶液に Q-Sepharose を加えてインキュベートした後、50mM、100mM、200mM、300mM 及び 400mM の NaCl 溶液を用いてゲルからタンパク質を抽出した。それぞれの抽出溶液をアミコンウルトラ遠心式フィルターを用いて濃縮した後、SDS-PAGE-銀染色によって各サンプルに含まれるタンパク質を検出した。同様にネガティブコントロールについても銀染色を行い、その結果と比較することで、特異的に検出された宿主タンパク質の同定を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血液細胞は必要な委員会(熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会)の承認を得た上で規則に従って実施する。医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた場合のみ採血し、匿名化の後に実験に用いる。組換えDNA実験およびHIVウイルスを用いた実験は、学内の必要な委員会の承認を得た上で規則に従って実施する。所属研究室内のP3実験室で行い、実験終了後のウイルス

不活化など安全面には特に留意する。

本研究ではマウス等の実験動物を用いず、ヒトゲノム解析・遺伝子解析研究、疫学研究、遺伝子治療臨床研究、臨床研究、ヒト幹細胞を用いる臨床研究には該当しない。

C. 研究結果

化合物2CのNef機能抑制効果を調べるために、T細胞系よりもウイルス産生と感染力の維持にNef機能の影響が顕著であるU87-CD4-CCR5細胞を用いて解析を行った。まず、U87-CD4-CCR5細胞を用いて化合物2Cの細胞毒性があるか確認したところ、100 μ Mや200 μ Mという高濃度の化合物2Cを含んだ培地で培養したU87-CD4-CCR5細胞においても、ほとんど細胞毒性は見られなかった(図1、図2)。次に、HIV-1JRFLを感染させたU87-CD4-CCR5細胞に化合物2Cを作用させてウイルスの産生によって生じる細胞死に対する効果を測定したところ、化合物2Cは感染による細胞死を有意に抑制することがわかった(図3、図4)。

前年度から化合物2Cをプローブとして用いてNef結合宿主タンパク質の同定を試みていた。本年度はさらに、その作業を進めた。まず、これまでに報告されているNef結合宿主タンパク質について、化合物2CによってNefとの結合が阻害されるかを確認したところ、化合物2Cは非受容体型チロシンキナーゼであるTecファミリーキナーゼのTecタンパク質及びItkタンパク質とのNefの結合を阻害することが明らかになった(図5)。一方、Nefが結合する新規の宿主因子(群)を同定するために、前年度からNefと結合する宿主因子の中で化合物2C存在下では結合が阻害される宿主タンパク質の同定を試みてきた。本年度は、さらに同定法の改良を行った。その結果、精製カラムや抗体に非特異的に結合して検出されていたタンパク質の混入を減少さ

せ、より精製度の高いタンパク質サンプルを分離することができた。

D. 考察

ウイルス産生増加と感染力増強は Nef タンパク質の重要な機能であることが知られている。しかし、T 細胞では、Nef の存在、非存在下において、ウイルスの産生量と感染力増強には顕著な差が見られないことが知られている。一方で、マクロファージ系の細胞では Nef によってそのどちらも増強される。今回使用した U87-CD4-CCR5 細胞でも、Nef によってウイルス産生量と感染力の増強効果が見られる。以前の研究において、化合物 2C は 293 細胞に対して細胞毒性を示さないことを我々は明らかにしていたが、その結果と一致して、U87-CD4-CCR5 細胞において化合物 2C は細胞毒性を示さなかった。このことから、化合物 2C は細胞に対する毒性は低いと考えられる。さらに、これまでの研究結果と一致して、U87-CD4-CCR5 細胞においてウイルスの産生量が低いことを示唆する結果も得られた。このことは、化合物 2C は Nef をターゲットとする機能阻害薬剤の候補として有望である。しかし、Nef 機能を阻害するために必要な化合物 2C の濃度は 50~200 μ M と高いため、更なる改良が必要である。

今回、これまでに報告されている Nef と結合するタンパク質について、化合物 2C が Nef との結合を阻害するのか解析した。その結果、化合物 2C は非受容体型チロシンキナーゼである Tec タンパク質、及び Itk タンパク質の Nef との結合を阻害することを明らかにした。これらのタンパク質は Nef と結合することは明らかにされているが、どのように HIV-1 の病原性に関与するのかは未だ明らかになっていない。我々のこれまでの研究で、化合物 2C は Nef 機能であるウイルス産生量増加、MHC-I 発現量低下そしてウイルス

感染力増強を抑制することを明らかにしてきた。このことから、今回明らかにした Tec タンパク質及び Itk タンパク質が Nef によってどのように影響を受けるのかを解析することで、上記 Nef 機能の分子メカニズムを明らかにできる可能性がある。今後、更なる解析を行う必要がある。一方、前年度に、我々は化合物 2C をプローブとして用いて、Nef と結合する新規の宿主因子（群）の同定を試みた。これまでに 3 種類の候補タンパク質を選別することに成功していたが、質量分析を行うには、タンパク質サンプルの純度を上げる必要があった。そこで本年度、化合物 2C によって Nef との結合が阻害される宿主タンパク質サンプルから非特異タンパク質の除去を試みた。そのために、イオン交換クロマトグラフィーによる精製過程を加えてサンプルの調整を行ったところ、より非特異的なタンパク質を含まないサンプルを調整することができた。今後、このサンプルに含まれるタンパク質を質量分析を用いて同定する予定である。これらの研究により、Nef 機能の分子メカニズムについて、更なる知見が得られることが期待できる。

E. 結論

今回、化合物 2C についてさらに、細胞毒性の低さと Nef 機能の阻害効果が高いことを確認することができた。この化合物 2C は、既知の抗 HIV-1 薬剤と異なる作用点を持つ新たな薬剤の候補として有望であると考えられる。更なる改良を行うことが必要である。また、化合物 2C を用いることによって、Nef の重要な機能であるウイルスの産生能増加と感染力増強、及び MHC-I 発現低下に関与する可能性がある複数の宿主タンパク質を見出すことができた。今後、これらのタンパク質の同定やそれらが関与する分子メカニズムを明らかにすることで、HIV-1 の病原性発揮、エイズ発症などの分子メカニズム

について、新たな知見を得ることが期待される。

F. 健康危機情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, Tokunaga K and Suzu S.

Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.

Microbes Infect, in press.

2. 学会発表

日吉真照

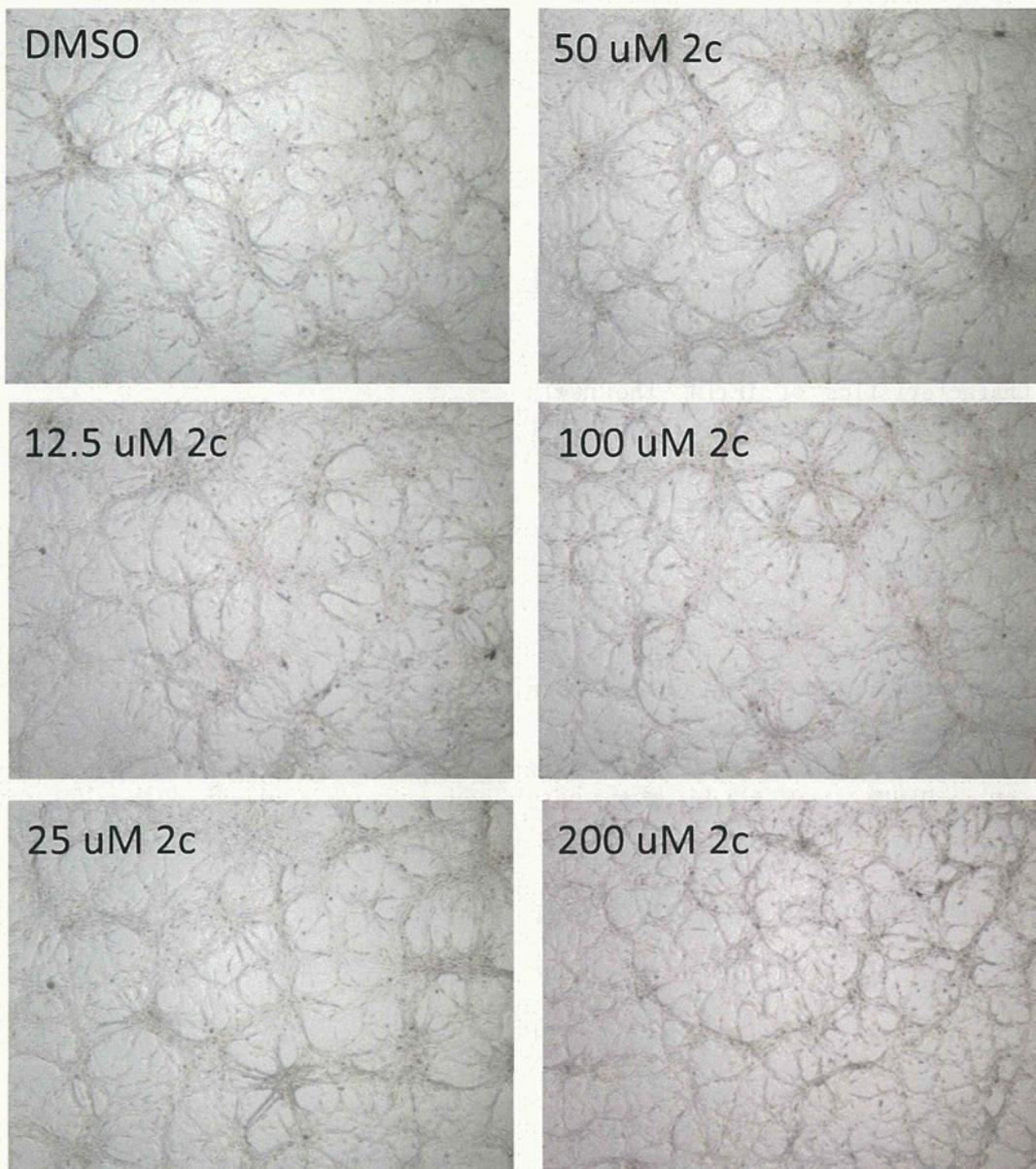
A mechanism for HIV-1 transmission from infected macrophages.

第13回熊本エイズセミナー・グローバルCOE 合同国際シンポジウム, 熊本, 2012年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

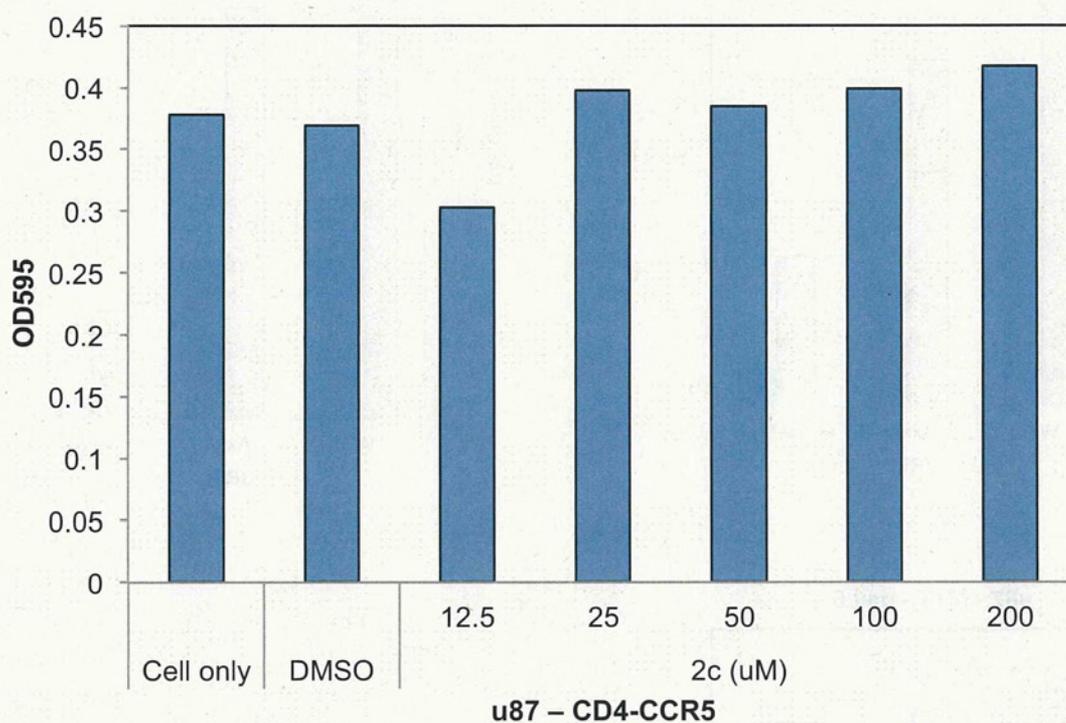
該当なし。

図1 化合物2CのU87-CD4-CCR5細胞に対する影響



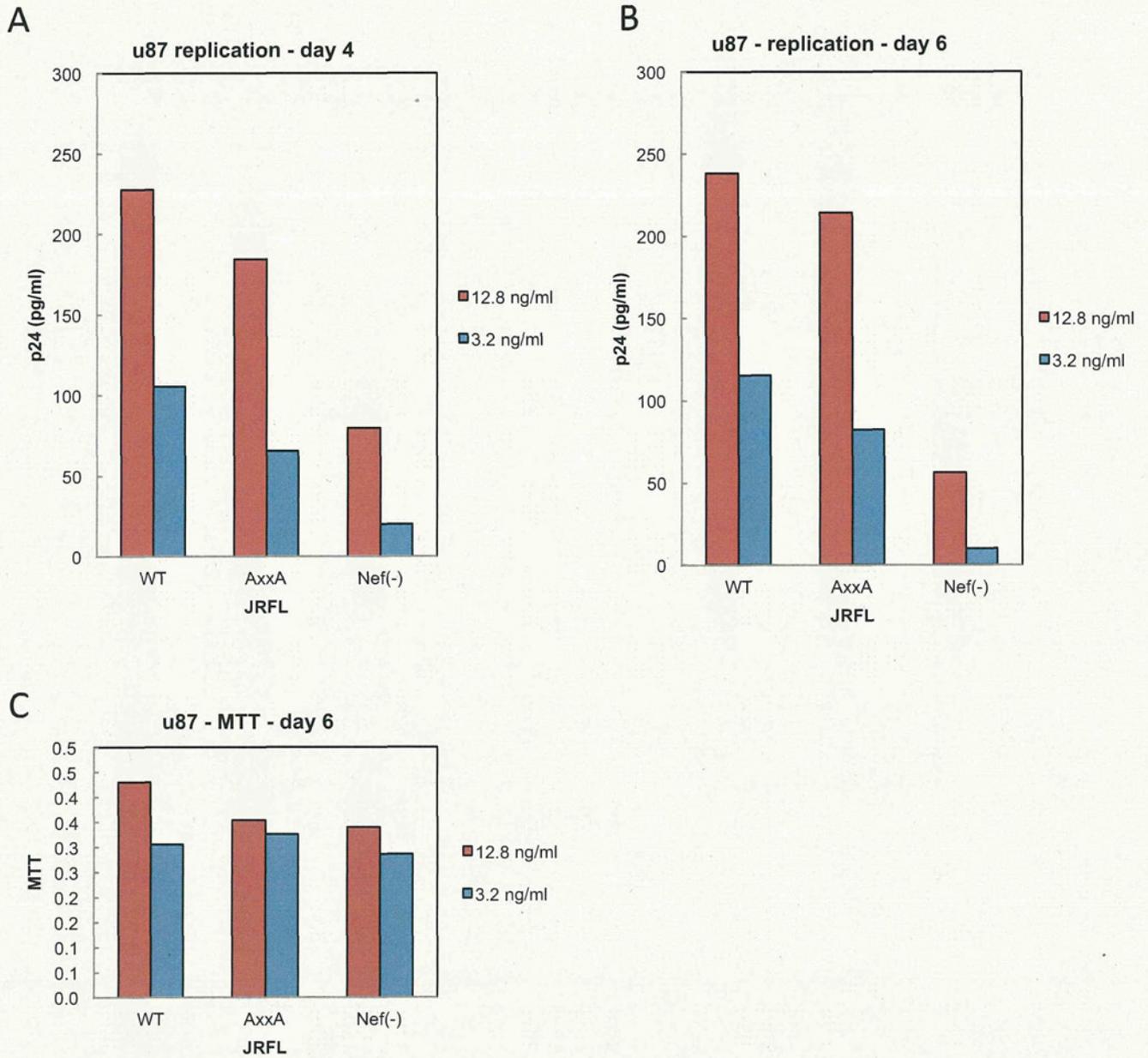
化合物2CはU87-CD4-CCR5細胞の細胞形態に対して、影響を与えなことが明らかになった

図2 化合物2CのU87-CD4-CCR5細胞に対する影響



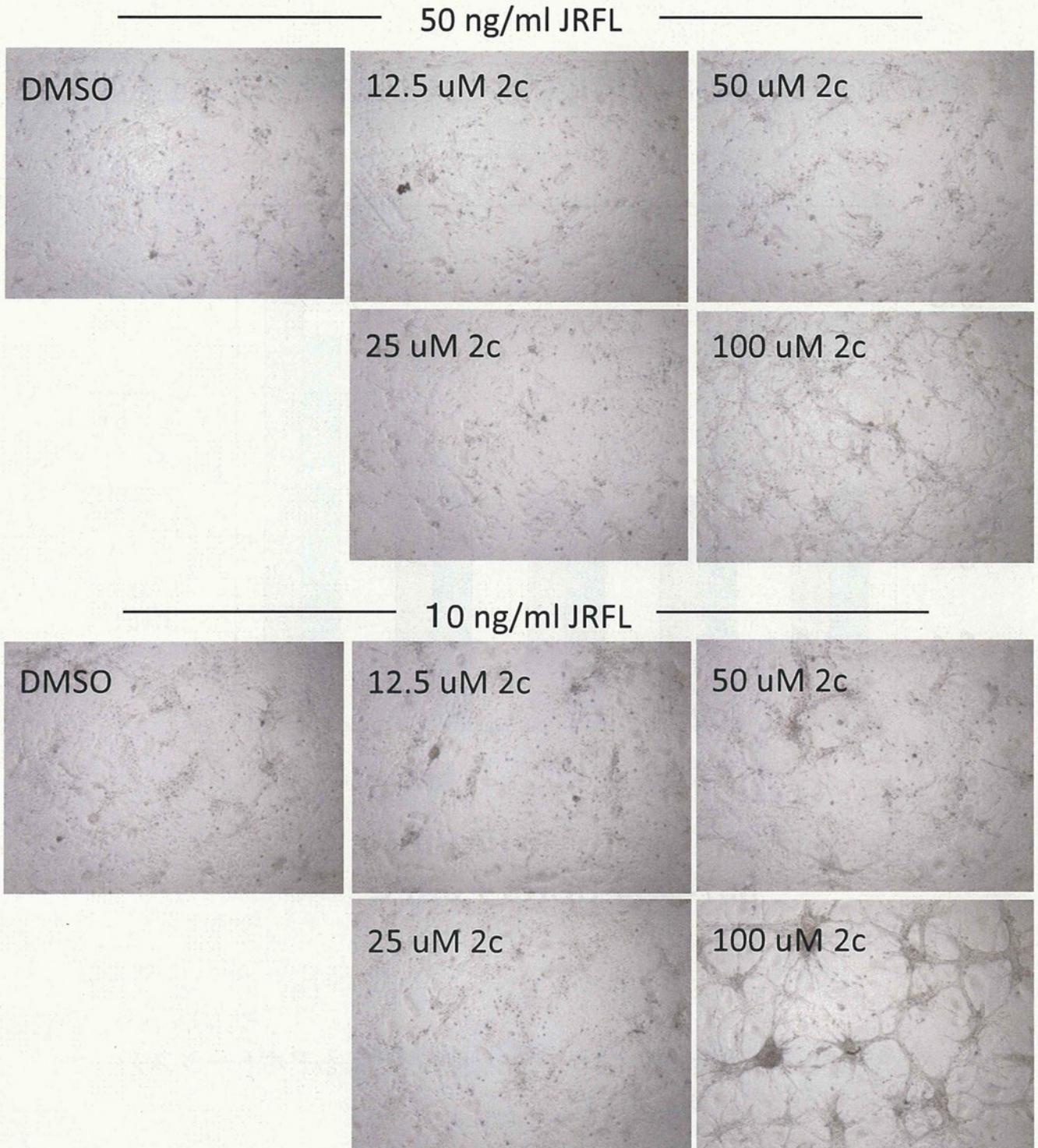
化合物2CはU87-CD4-CCR5細胞の増殖に影響がないことが明らかになった

図3 U87-CD4-CCR5細胞におけるHIV-1ウイルス産生のNefへの依存



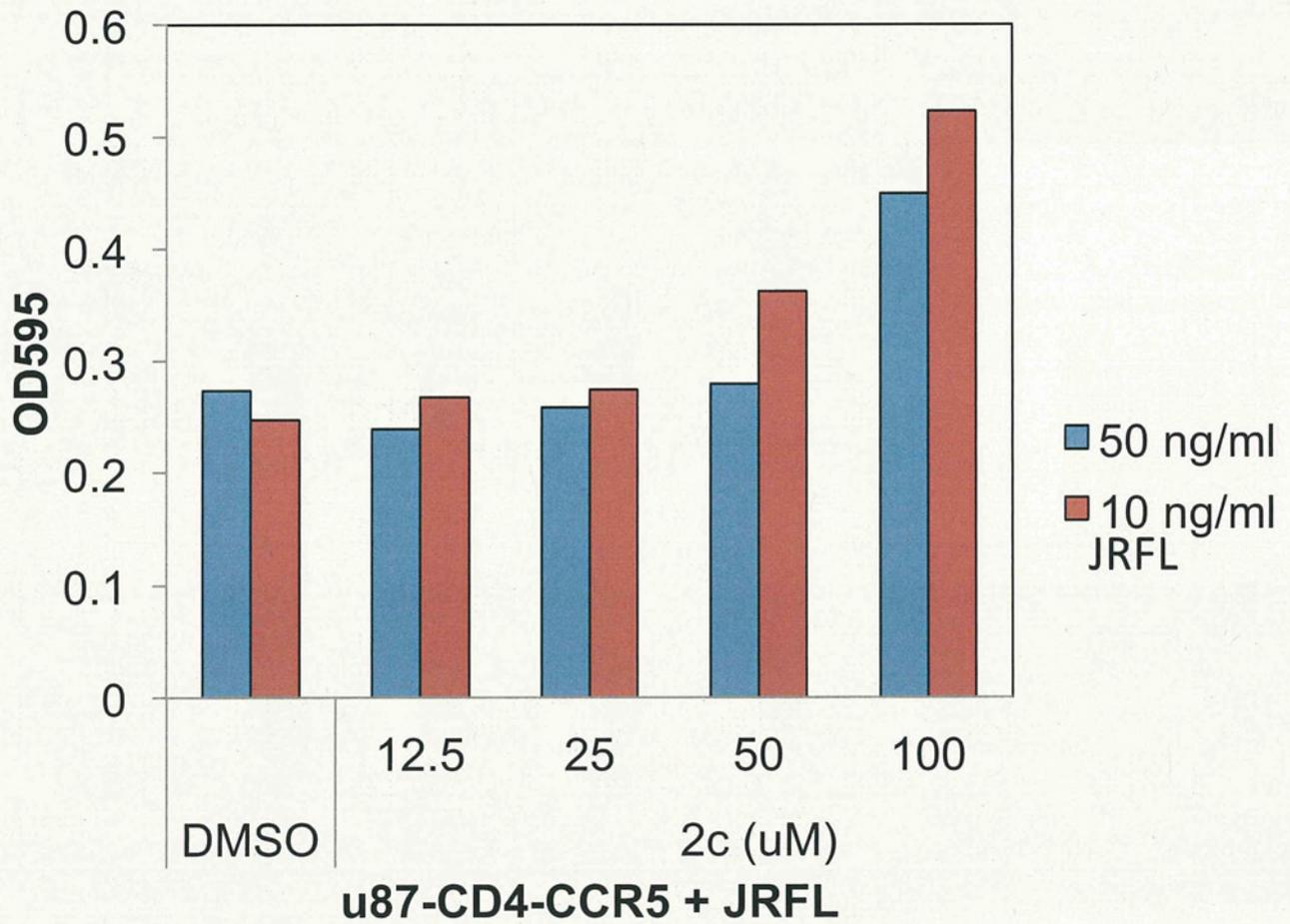
U87-CD4-CCR5細胞では、HIV-1ウイルス産生がNefの機能に強く依存することがわかった

図4 化合物2CのHIV-1感染U87-CD4-CCR5細胞に対する効果



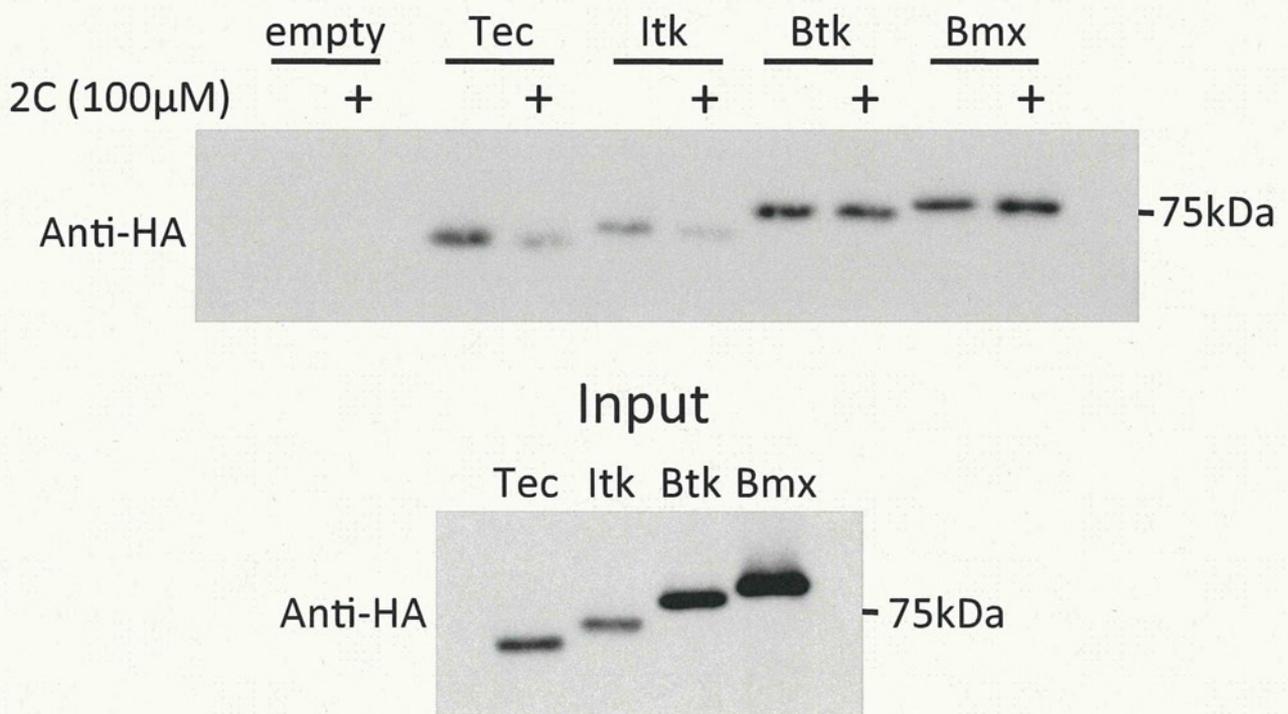
化合物2Cは感染U87-CD4-CCR5細胞で起こるアポトーシスを抑制することが明らかになった

図5 化合物2CのHIV-1感染U87-CD4-CCR5細胞に対する効果



化合物2Cは感染U87-CD4-CCR5細胞で起こるアポトーシスを抑制することが明らかになった

図6 化合物2CによってNefとの相互作用を抑制される宿主タンパク質



化合物2Cによって、Tecタンパク質及びItkタンパク質はNefとの結合が阻害されることが明らかになった

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M , Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, Tokunaga K and Suzu S..	Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.	Microbes Infect			In press



Institut Pasteur

Microbes and Infection xx (2013) 1–11



www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins

Nopporn Chutiwitoonchai^a, Masateru Hiyoshi^a, Yuka Hiyoshi-Yoshidomi^a,
Michihiro Hashimoto^a, Kenzo Tokunaga^b, Shinya Suzu^{a,*}

^a Center for AIDS Research, Kumamoto University, Honjo 2-2-1, Chuo-ku, Kumamoto-city, Kumamoto 860-0811, Japan

^b Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

Received 19 July 2012; accepted 10 December 2012

Abstract

IFN-inducible IFITM proteins (IFITM1, 2, and 3) inhibit the replication of various viruses including HIV-1 through poorly understood mechanisms. Here, we further analyzed characteristics of these newly identified HIV-1 restriction factors. Firstly, in contrast to other anti-HIV-1 proteins, such as tetherin and APOBEC3G, IFITMs were resistant to a down-regulation of surface expression or degradation by HIV-1 proteins. Secondly, the enforced expression of IFITMs reduced the production of HIV-1 viruses from cells transfected with proviral plasmids containing whole viral sequences. Although their inhibitory activities were modest when compared to that of tetherin, IFITMs, but not tetherin, directly reduced the expression of HIV-1 proteins including Gag, Vif and Nef. Of importance, however, IFITMs had no inhibitory effect when these viral proteins were expressed by codon-optimized cDNAs that bypassed the viral-specific expression machinery. Indeed, our results supported the idea that IFITMs interfere with viral protein expression mediated by double-stranded viral RNAs, such as RRE and TAR. Finally, the S-palmitoylation of IFITMs, which is crucial for their anti-influenza virus activity, was not required for their anti-HIV-1 activity, indicating that IFITMs restrict these viruses at different steps. These characteristics lead to a better understanding of the mechanism by which IFITMs restrict HIV-1 and other viruses.

© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: IFITM; Tetherin; APOBEC3G; HIV-1; IFN; Antiviral activity

1. Introduction

Type I interferons (IFN) are cytokines of the innate immune system that induce the expression of antiviral proteins upon viral infection. Viral recognition induces the activation of cellular signaling pathways that trigger the production of IFN, which leads to the expression of a set of IFN-stimulated genes that inhibit viral replication through diverse mechanisms [1,2]. The IFN-induced transmembrane (IFITM) genes were identified as IFN-stimulated genes [3]. Among this family of proteins, IFITM1, 2, and 3 are ubiquitously expressed. Although it has been reported that IFITM1 and IFITM3 play distinct

roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion [4], their precise physiological functions remain largely unknown. Intriguingly, recent studies have revealed that IFITM family proteins are potent inhibitors of influenza virus, West Nile virus, dengue virus [5–8], Marburg and Ebola filoviruses, SARS coronavirus [9], vesicular stomatitis virus [10], HCV [11], and HIV-1 [12,13]. However, it remains unclear how these small proteins, which are composed of approximately 130 amino acids, exert antiviral activity against a broad range of viruses.

Recently, Lu et al. showed that the knockdown of all three *ifitm* genes increased the susceptibility of TZM-bl HeLa cells to HIV-1 infection [12]. Consistent with this result, the enforced expression of IFITM1, 2, or 3 markedly suppressed HIV-1 replication in SupT1 T cells without affecting cell proliferation, the cell cycle, or the cell surface expression of

* Corresponding author. Tel.: +81 96 373 6828; fax: +81 96 373 6825.
E-mail address: ssuzu06@kumamoto-u.ac.jp (S. Suzu).

the HIV-1 entry receptor CD4 [12]. Schoggins et al. also reported that the enforced expression of IFITM2 or 3 had a similar inhibitory effect on HIV-1 replication using another T cell line, MT-4 [13]. Although HIV-1 entry step was clearly inhibited by IFITM2 and 3, the entry step might not be the primary target of IFITM1 during its restriction of HIV-1 replication, since IFITM1 did not affect HIV-1 entry but efficiently suppressed HIV-1 replication in SupT1 cells [12]. Indeed, it was shown that the intracellular region, rather than the N- or C-terminal extracellular domains, of IFITM1 is required for its inhibitory effect on HIV-1 [12]. Importantly, Lu et al. also showed that the enforced expression of IFITMs led to a reduction in the expression of the structural HIV-1 protein Gag, which might be simply due to the reduced viral replication. Nevertheless, it is also possible that IFITMs directly affect Gag expression.

In addition to the mechanism by which they suppress Gag expression, there are several unanswered questions regarding IFITMs. HIV-1 encodes proteins that antagonize the activities of IFN-inducible antiviral proteins. For instance, tetherin (also known as BST-2 or CD317) blocks the release of nascent virions from infected cells, but the HIV-1 accessory protein Vpu acts as a viral antagonist by inducing the down-regulation of tetherin expression at the cell surface [14–19]. Similarly, the cytidine deaminase APOBEC3G, whose expression is elevated by IFN [20], causes the hyper-mutation of HIV-1 cDNA, but another HIV-1 accessory protein, Vif, antagonizes its anti-HIV-1 activity by inducing the degradation of APOBEC3G [21–27]. However, it has not been examined whether HIV-1 antagonizes the anti-HIV-1 activity of IFITMs. Curiously, in contrast to the findings of two independent studies [12,13], Neil et al. failed to observe an inhibitory effect of the enforced expression of IFITMs on HIV-1 production in a study in which they identified tetherin as an HIV-1 restriction factor [15]. In this study, we therefore attempted to investigate whether HIV-1 proteins affect the expression and localization of IFITMs, how anti-HIV-1 activity of IFITMs and tetherin are different, and how IFITMs affect the expression of HIV-1 proteins in order to further understand the characteristics of these newly identified HIV-1 restriction factors.

2. Materials and methods

2.1. IFITM and tetherin plasmids

The N-terminal Flag-tagged human IFITM1, 2, and 3 cDNAs were provided by Liang [12], and subcloned into the pcDNA3.1 vector (Invitrogen). It was shown that IFITM3 was S-palmitoylated at three membrane-proximal cysteine residues (C71, C72, and C105) [7]. We therefore prepared three different mutants of Flag-tagged IFITM3, in which these cysteines had been mutated (singly or in combination) to alanine (C1/2A, C3A, and C1/2/3A; see Fig. 6A for details). As these cysteines are conserved in IFITM2 (C70, C71, and C104), similar mutants of IFITM2 were also prepared. The mutants were prepared using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and appropriate mutagenic primers

and cloned into the pcDNA3.1 vector. The nucleotide sequences of the mutants were verified using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Extracellular Flag-tagged human tetherin (BST-2-exFlag) cloned into the pCAGGS vector was prepared as described previously [28].

2.2. HIV-1 plasmids

A proviral NL43 plasmid and a *vpu*-deleted mutant version of the plasmid (pNL-uE65) were provided by Adachi [29]. A proviral JRFL plasmid in which the *nef* gene had been replaced with that of the SF2 strain was prepared as described previously [30]. A codon-optimized Gag–GFP fusion expression plasmid (synGag–GFP) cloned into the pcDNA3.1 vector (Ohmine et al., manuscript under review) was kindly provided by Y. Ikeda (Mayo Clinic, Rochester, MN). Codon-optimized Vpu (Vphu) and Vif (HVif) expression plasmids cloned into the pcDNA3.1 vector were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD), both of which were derived from the NL43 strain [31]. Two different Nef (the SF2 strain) expression plasmids were prepared as described previously [32,33]: Nef fused to the C-terminus of the extracellular/transmembrane regions of CD8 (CD8-Nef) was cloned into the pRc/CMV vector and Nef fused to the N-terminus of GFP (Nef–GFP) was cloned into the pAcGFP-N1 vector (Clontech). The NL43 strain Rev expression plasmid cloned into the pCAGGS vector was prepared as described previously [28]. In this study, we also created Gag and Gag/Pol expression plasmids (pCA-Gag-RRE and pCA-GagPol-RRE, respectively) by inserting PCR-amplified NL43-derived *gag* and *gag/pol* genes (nucleotides 790–2292 and 790–5096, respectively) together with a Rev-response element (RRE; nucleotides 7759–7992) into the pCAGGS vector.

2.3. Transfection

HEK293 cells (Invitrogen) were maintained in DME medium (Wako, Osaka, Japan) supplemented with 10% FCS (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). The cells were seeded onto 12-well tissue culture plates at a density of 1.8×10^5 cells/well and transfected with various plasmids using 4 μ l/well Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), as described previously [30,32]. The total amount (1.6 μ g/well) of the plasmid was normalized using appropriate control (empty) vectors. After 6 h of transfection, the culture medium was replaced with fresh medium, and the cells were cultured for an additional 42 h and then subjected to p24 Gag protein ELISA, Western blotting, flow cytometric analysis, or immunofluorescence analysis. In another experiment (see Fig. 5), the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) inhibitor C16 (imidazo-oxindole; Sigma) was added to the culture (0.1% v/v) during the changing of the medium. The inhibitor was dissolved in DMSO (Wako), and the same volume of DMSO was used as a vehicle control.

2.4. p24 Gag ELISA

Viral production was assessed by measuring the concentration of p24 Gag protein in the culture supernatant [30]. The supernatants of the transfected 293 cells were clarified by brief centrifugation, and their p24 concentrations were analyzed by ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). The absorbance of each well was measured at 450 nm with a microplate reader (Bio-Rad Laboratories).

2.5. Western blotting

The preparation of the total cell lysates and Western blotting was performed essentially as described previously [34]. Briefly, the cells were lysed on ice for 30 min with Nonidet P-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris, and 150 mM NaCl) containing protease inhibitors (1 mM EDTA, 1 μ M PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml pepstatin). The cell lysates were centrifuged and the resultant supernatants were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions. The proteins were transferred to a nylon membrane (Hybond-P; GE Healthcare). The antibodies used were as follows: anti-Gag (#65-004; BioAcademia, Osaka, Japan), anti-Nef (#2949; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), anti-Vif (#319; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), anti-GFP (#FL; Santa Cruz Biotechnology), anti-Flag (clone M2; Sigma), and anti-actin (#C-2; Santa Cruz Biotechnology). The detection was performed with HRP-labeled secondary antibodies (anti-rabbit or anti-mouse IgG; GE Healthcare), the Immunostar LD Western blotting detection reagent (Wako), and an image analyzer (ImageQuant LAS 4000; GE Healthcare).

2.6. Flow cytometry

The cell surface expression of the Flag-tagged IFITM or Flag-tagged tetherin was assessed by the flow cytometric analysis, essentially as described previously [35]. The transfected 293 cells were detached using the enzyme-free cell dissociation buffer (Gibco), stained on ice for 30 min with PE-labeled anti-Flag antibody (60 μ g/ml; Columbia Biosciences, Columbia, MD), and analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) and Cell Quest Software (Becton Dickinson). In a selected experiment (see Fig. 2C), 293 cells stably expressing human CD4 [32] were transfected and analyzed for the cell surface expression of CD4 using PE-labeled anti-CD4 antibody (clone RPA-T4, eBioscience).

2.7. Immunofluorescence

For immunostaining, the transfected 293 cells were directly fixed in 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and stained with the primary antibodies for 12 h followed by labeled secondary antibodies [32,33]. The following primary antibodies were used: anti-Flag (clone M2; Sigma, to detect Flag-tagged IFITM proteins) and anti-Gag (#65-004; BioAcademia). Anti-mouse IgG-AlexaFluor488

and anti-rabbit IgG-AlexaFluor568 (both from Molecular Probes) were used as the labeled secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes), and fluorescent signals were visualized with a BZ-8000 fluorescent microscope (Keyence, Osaka, Japan) equipped with Plan-Fluor ELWD 20 \times /0.45 objective lenses (Nikon). Image processing was performed using a BZ-analyzer (Keyence) and the Adobe Photoshop software (Adobe Systems).

2.8. Statistical analysis

The statistical significance of differences between samples was determined using the Student's *t*-test. *p* Values less than 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. IFITM3 and tetherin restrict HIV-1 at different steps

It has been shown that the knockdown of IFITMs increases the susceptibility of TZM-bl HeLa cells to HIV-1 infection and that their enforced expression suppresses HIV-1 replication and Gag expression in SupT1 cells [12]. However, in a study in which the enforced expression of tetherin was found to strongly inhibit viral release from 293 cells, IFITMs failed to display a similar inhibitory effect [15]. Therefore, we initially compared their anti-HIV-1 activities in the same system, i.e., the co-transfection into 293 cells. Viral production was monitored by assessing the concentration of p24 Gag protein in the culture supernatants. In this study, we found that IFITM3 significantly reduced viral production when it was co-transfected with the proviral NL43 plasmid containing the whole viral sequence (Fig. 1A, left graph). A similar inhibitory effect was also observed when IFITM3 was co-transfected with the *vpu*-deleted NL43 mutant (NL43- Δ Vpu; right graph). When analyzed using the TZM-bl reporter cells, the infectivity of the WT viruses produced in the presence of IFITM3 was comparable to that of the control viruses (data not shown). Tetherin also reduced viral production, but its inhibitory effect was more marked when it was co-transfected with NL43- Δ Vpu (Fig. 1A). This was due to the ability of Vpu to down-regulate the cell surface expression of tetherin [14–19]. In the experiment shown in Fig. 1A, we used 0.6 μ g IFITM3 expression plasmid. When the same amount of plasmid was used, tetherin displayed a lower expression level (Fig. 1B) but stronger inhibitory activity (Fig. 1A) than IFITM3. These results indicated that the inhibitory effect of IFITM3 on viral production is modest when compared with that of tetherin, which explains why Neil et al. [15] failed to observe an inhibitory effect of IFITMs in their study. The importance was that IFITM3 and tetherin restricted HIV-1 at different steps because IFITM3 but not tetherin significantly reduced the expression levels of the p55 and p24 Gag proteins in the cells (Fig. 1C). It therefore appears that tetherin inhibits the release of viruses without affecting intracellular Gag expression whereas IFITM3 directly reduces intracellular Gag expression, and thereby suppresses viral production.

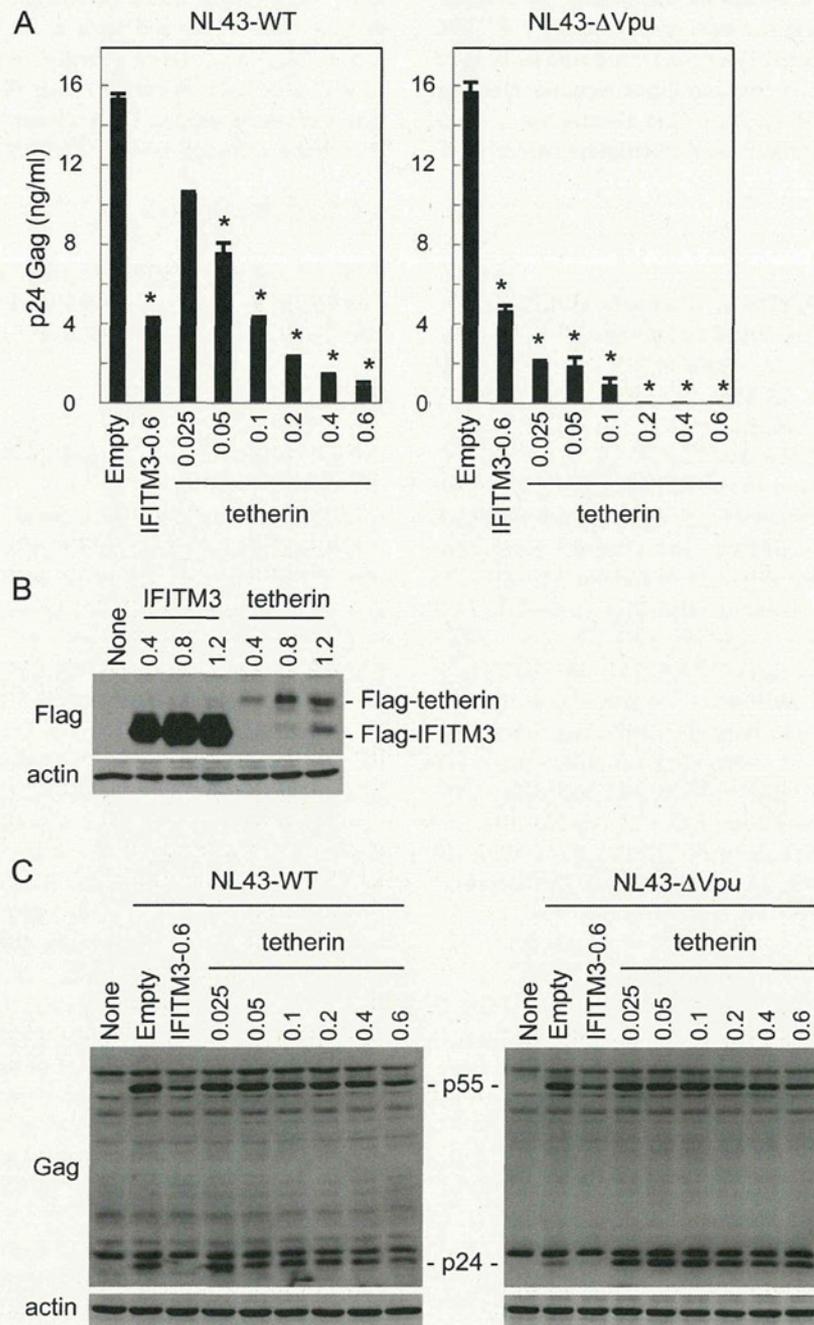


Fig. 1. The effects of IFITM3 and tetherin on viral production and Gag expression. (A) The 293 cells were transfected with the wild-type (NL43-WT, 0.6 μ g) or *vpu*-deleted NL43 proviral plasmid (NL43- Δ Vpu, 0.6 μ g), or co-transfected with the empty vector (Empty, 0.6 μ g), the IFITM3 expression plasmid (0.6 μ g), or the indicated amount (0.025–0.6 μ g) of the tetherin expression plasmid. The cells were cultured for 2 days, and the p24 Gag concentrations in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are shown as the mean \pm SD of triplicate assays and are representative of two independent experiments with similar results. * p < 0.05. (B) The 293 cells were transfected with the empty vector (None), or the indicated amount (0.4, 0.8, or 1.2 μ g) of the IFITM3 or tetherin expression plasmid, lysed after being cultured for 2 days, and analyzed for the expression of Flag-tagged IFITM3 or tetherin by Western blotting using anti-Flag antibody. The actin blot is a loading control. (C) The 293 cells were transfected as described in panel A, lysed after being cultured for 2 days, and analyzed for the expression of p55 and p24 Gag by Western blotting using anti-Gag antibody. The actin blot is a loading control. Data shown are representative of two independent experiments with similar results.

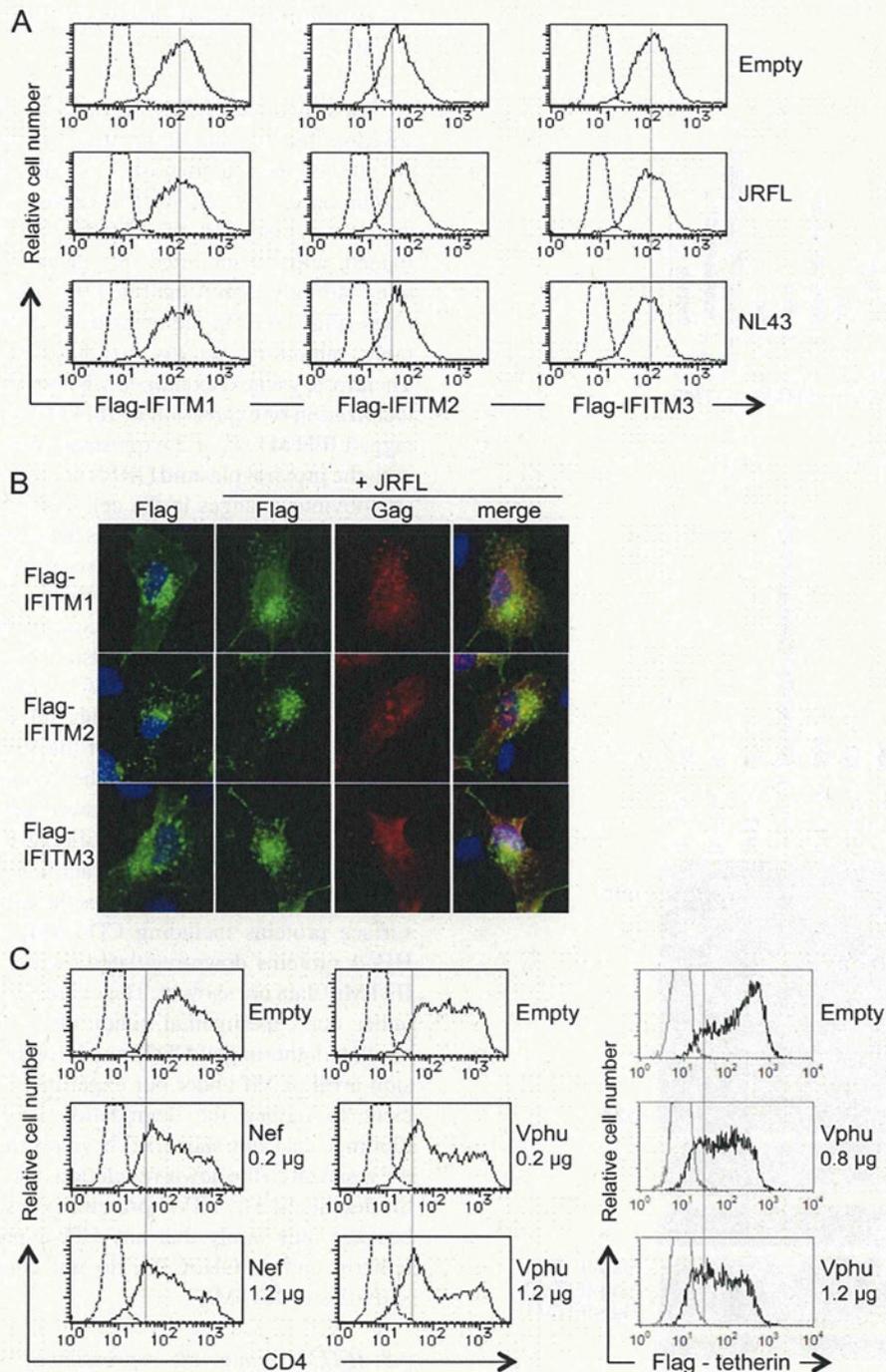


Fig. 2. The effects of HIV-1 proteins on the cell surface expression and intracellular distribution of IFITMs. (A) The 293 cells were co-transfected with the Flag-tagged IFITM1, -2, or -3 expression plasmid (0.4 µg) and the following plasmids (1.2 µg): the empty vector (Empty), the proviral NL43 plasmid, or the JRFL plasmid. The cells were cultured for 2 days, detached from the wells using the enzyme-free cell dissociation buffer, and analyzed for the cell surface expression of Flag-tagged IFITMs by flow cytometry using PE-labeled anti-Flag antibody. Data shown are representative of two independent experiments with similar results. (B) The 293 cells were transfected with the Flag-tagged IFITM1, 2, or 3 expression plasmid alone (0.4 µg) or co-transfected with the proviral JRFL plasmid (1.2 µg), cultured for 2 days, and co-stained with anti-Flag antibody (green), anti-Gag antibody (red), and DAPI (blue). (C) The 293 cells stably expressing human CD4 were transfected with the empty vector (Empty), the CD8-Nef fusion expression plasmid (0.2 or 1.2 µg), or the codon-optimized Vpu expression plasmid (Vphu, 0.2 or 1.2 µg). The cells were analyzed as in panel (A) using PE-labeled anti-CD4 antibody. Alternatively, 293 cells were co-transfected with Flag-tagged tetherin expression plasmid (0.4 µg) and the following plasmids: the empty vector (Empty, 1.2 µg) or the codon-optimized Vpu expression plasmid (Vphu, 0.8 or 1.2 µg). The cells were cultured for 2 days and analyzed as in panel (A). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

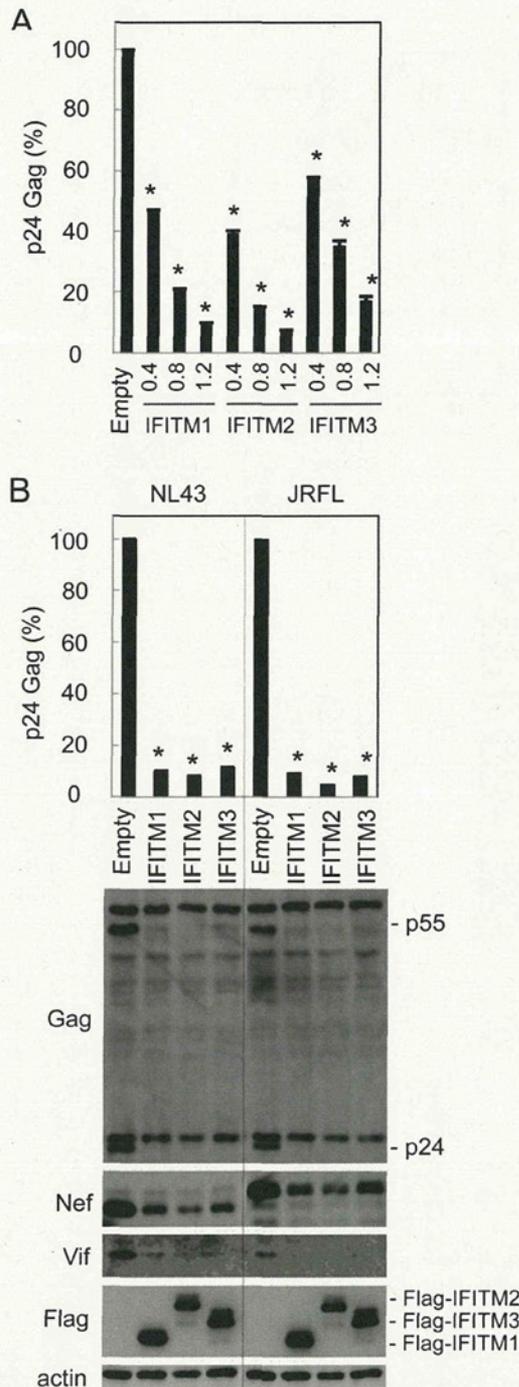


Fig. 3. The effects of IFITMs on viral production and the expression of Gag, Nef, and Vif. (A) The 293 cells were co-transfected with the proviral NL43 plasmid (0.4 μ g) and the indicated amount (0.4, 0.8, or 1.2 μ g) of the IFITM expression plasmids. The cells were cultured for 2 days, and the concentration of p24 Gag in the culture supernatants was determined by ELISA. The results are expressed as a percentage of the value for the sample on the far left. Data are shown as the mean \pm SD of triplicate assays. (B) The 293 cells were transfected with the proviral NL43 or JRFL plasmid (0.4 μ g), or co-transfected with the empty vector (Empty, 1.2 μ g) or IFITM expression plasmid (1.2 μ g), as indicated. The cells were cultured for 2 days, and the concentration of p24 Gag in the culture supernatants was determined by ELISA and analyzed as described in panel A. Alternatively, the cells were lysed and analyzed for the

3.2. The cell surface expression, total expression level, and intracellular localization of IFITMs are unaffected by HIV-1 proteins

Tetherin and APOBEC3G are well-characterized HIV-1 restriction factors, but it is also known that HIV-1 proteins counteract their activities. Vpu and Vif induce the down-regulation of the cell surface expression of tetherin [14–19] and the degradation of APOBEC3G [21–27], respectively. Indeed, tetherin inhibited the release of the Vpu (–) viruses more strongly than it inhibited the release of the wild-type viruses (Fig. 1A). On the other hand, IFITM3 exhibited comparable inhibitory activity to these two viruses (Fig. 1A). Therefore, we next examined whether HIV-1 proteins affect the localization or expression of IFITM family proteins. The Flag-tagged IFITM1, 2, or 3 expression plasmid was co-transfected with the proviral plasmid (JRFL or NL43), but we did not detect any obvious changes in the cell surface expression of IFITMs (Fig. 2A). Although IFITM3 has been found to localize not only to the plasma membrane but also to the perinuclear region [7], we did not detect any obvious changes in the intracellular distribution of IFITMs after their co-transfection with the proviral JRFL plasmid (Fig. 2B). We also tested the effect of the over-expression of individual HIV-1 proteins. The Flag-tagged IFITM1, 2, or 3 expression plasmid was co-transfected with the codon-optimized version of the Vpu (Vphu) or Vif (HVif) plasmid, which bypassed the complicated viral-specific expression machinery and allowed efficient expression [31], and the cell surface expression of Flag-IFITMs was analyzed by flow cytometry using anti-Flag antibody. Nef was also added to the analysis, as it down-regulates the expression of multiple cell surface proteins including CD4 [36]. However, none of the HIV-1 proteins down-regulated the cell surface expression of IFITMs (data not shown). The expression levels of Vpu and Nef under our experimental conditions were sufficient to down-regulate tetherin and CD4, respectively (Fig. 2C). The expression level of Vif under our experimental conditions was sufficient to induce the degradation of APOBEC3G (Western blotting, data not shown). These results indicate that IFITMs are resistant to the down-regulation of cell surface expression or the degradation by HIV-1 proteins. These findings are important because they imply that any HIV-1 proteins, unlike those of tetherin and APOBEC3G, do not counteract the anti-HIV-1 activities of IFITMs.

3.3. IFITMs reduce the expression of several HIV-1 proteins when they were expressed by viral-specific machinery

We next attempted to understand how IFITMs suppress the production of HIV-1 viruses. There was no obvious difference in the inhibitory effect on viral production among IFITMs (Fig. 3A). All the IFITMs reduced the production of both the

expression of Gag, Nef, Vif, or Flag-tagged IFITMs by Western blotting (lower blots). The actin blot is a loading control. (A and B) Data shown are representative of two independent experiments with similar results. * $p < 0.05$.