

201210013B

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 日吉 真照

平成25（2013）年3月

目 次

I. 総合研究報告

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 ----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 11

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 は宿主細胞の様々な因子を利用し、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、様々な宿主因子と相互作用することでエイズ発症に関与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と新規の Nef 機能阻害低分子化合物の同定を試みた。さらに、これらの Nef 結合分子を用いて、Nef の機能発現に重要な宿主タンパク質（群）を同定し、エイズ発症に寄与する分子メカニズムについての新たな知見と視点を得ることを目的として研究を行った。

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

(1) Nef 機能阻害 Hck ペプチドの同定とその機能解析

ドミナントネガティブ Hck 変異体のアミノ酸配列のうちで、キナーゼ領域を欠失した HckN ペプチドを作製した。

まず、HckN について Nef 機能の阻害効果を調べた。HckN を発現した細胞を用いて組み替え HIV-1 ウイルスを作製し、p24 Gag タンパク質量を ELISA 法で測定した後、p24 を同量に含んだウイルス溶液を用いてインディケーター細胞 TZM-bl に感染させ、ウイルス粒子の感染性を LTR プロモーター下に発現する b-gal の活性を指標に評価した。同時に、293 細胞あるいはヒト MHC I (HLA-A2 や HLA-B35) を発現するマウス L 細胞を用いて、Nef と HckN を発現させ、FACS にて細胞表面の MHC-I 発現量を測定した。

さらに、HckN のアミノ酸配列の中で、どの領域が Nef 機能阻害に重要なのか調べるために、HckN 変異体を作製して、同様の解析を行なった。その結果明らかになった重要な配列を含むペプチドをコードした発現ベクターを作製し、Nef 機能阻害効果を比較して、機能阻害ペプチドの最小化を試みた。これらの実験に用いた Hck の変異体について、Nef との結合を確認するために、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を用いた GST pull down 法を行った。GST と Nef の融合タンパク質をコードした DNA を作製し、大腸菌に導入した。IPTG を用いてタンパク質発現を誘導した後、大腸菌を破砕してグルタチオンビーズを加え、GST-Nef タンパク質とグルタチオンビーズを結合させた。Hck もしくは Hck 変異体を発現させた細胞抽出液に GST-Nef/グルタチオンビーズを加えてインキュベートした後、GST-Nef/グルタチオンビーズと Hck の結合を western blot によって解析した。

(2) Nef 機能阻害低分子化合物 2C と Nef の結合様式の同定

Nef をターゲットとした新たな抗 HIV-1 薬剤候補を同定するために、Nef 機能阻害

低分子化合物を選別した。近年申請者らは独自に Nef に結合すると考えられる低分子化合物 2C を同定した。そこで、化合物 2C について解析を行った。まず、化合物 2C が Nef のどの領域に結合するのかを解析するために、HckN の実験と同様に GST pull down 法を行った。さらに、化合物 2C と Nef の結合様式を予測するために、Molecular operating environment ver. 2007.09. を用いて化合物 2C-Nef ドッキングモデルを作製した。

(3) 化合物 2C のウイルス感染力に対する効果の解析

Nef のウイルス感染力増強機能に対する化合物 2C の効果を解析した。化合物 2C 存在下と非存在下において、293 細胞に HIV molecular clone もしくは HIV Nef 欠損変異体をトランスフェクションによって導入し、組み替え HIV ウイルスを作製した。それぞれの培養上清中の p24 Gag タンパク質量を ELISA 法で測定した後、p24 量が一定となるようにインディケーター細胞 TZM-bl に感染させ、ウイルス粒子の感染性を LTR プロモーター制御下で発現する b-gal を指標に評価した。

さらに、化合物 2C がどのように HIV ウイルスの感染力を抑制するのか、分子メカニズムを解析した。まず、HIV の標的細胞への感染過程における化合物 2C の効果を調べるために、293 細胞を用いて作製した組み替え HIV ウイルスと化合物 2C を同時にインディケーター細胞 TZM-bl に加え、ウイルス粒子の感染を評価した。また、感染細胞内におけるウイルス産生過程に対する化合物 2C の効果を調べるために、293 細胞に HIV molecular clone をトランスフェクションで導入して 24 時間後に化合物 2C を加えた。その後、産生されたウイルス粒子の感染性をインディケーター細胞 TZM-bl を用いて解析した。一方、エンベロープを欠損した HIV 変異体と vesicular stomatitis virus (VSV-G) のエンベロープをコードした DNA を 293 細胞を導入し、

同時に化合物 2C を加えて VSV-G シュードタイプ HIV ウイルスを含んだ培養上清を得た。このウイルスについても TZM-bl を用いてウイルスの感染力を解析した。

(4) 化合物 2C のウイルス複製に対する効果の解析

ウイルス複製に対する化合物 2C の効果を調べた。293 細胞で作製した組み替え HIV ウイルスを Jurkat 細胞、マクロファージもしくは U87-CD4-CCR5 細胞に加え、化合物 2C 存在下と非存在下で培養した。その後、それぞれの培養上清中の p24 Gag タンパク質量を LISA 法で測定して比較した。また、U87-CD4-CCR5 については、MTT assay をを行い、ウイルス感染によってアポトーシスが誘導されているか解析した。

(5) 化合物 2C の Nef が誘導するゴルジ体機能異常に対する効果の解析

さらにウイルスの感染力と複製の増強以外の Nef 機能に対する化合物 2C の抑制効果を調べた。我々は近年、Nef が Hck の酵素活性を異常に活性化することで HIV 感染マクロファージのゴルジ体機能を阻害することを見出している。そこで、化合物 2C は Nef によるゴルジ体機能異常を抑制できるか検討した。具体的には、Nef と Hck をトランスフェクション法で導入した 293 細胞を化合物 2C の存在下と非存在下で培養した後、それらの細胞から調整した細胞質抽出液を用いて western blot 行い、リン酸化 GRASP65 タンパク質を検出した。このリン酸化 GRASP65 の量を指標にして、化合物 2C の Nef によるゴルジ体機能異常の抑制効果を検討した。

(6) Nef 機能発現に関与する新規宿主因子 (群) の同定

Nef の機能を担う新規の宿主因子の同定も試みた。そのために、Nef と結合す

る宿主タンパク質の中で化合物 2C もしくは Hck 由来ペプチドの存在下で結合が阻害される宿主タンパク質の抽出を行なった。具体的には、Nef と Flag tag そして Strep tag の融合タンパク質 (Nef-Flag-Strep 融合タンパク質) をコードした発現ベクターを作製し、トランスフェクション法によって 293 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を Strep-Tactin アフィニティゲルに加え、Nef-Flag-Strep 融合タンパク質をゲルに結合させた。ビオチン溶液を用いてゲルから抽出した Nef-Flag-Strep 融合タンパク質溶液は次に 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 融合タンパク質をゲルに結合させた。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

(1) Nef 機能阻害 Hck ペプチドの同定とその機能解析

ドミナントネガティブ Hck 変異体のアミノ酸配列のうち、酵素ドメインを欠失させたペプチド HckN を作製し、HIV-1 ウイルスに対する影響を調べたところ、HckN はウイルスの感染力を低下させることがわかった。HckN の最小化を行うために、HckN のどの領域が HIV ウイルスの感染力抑制に重要か調べた。HckN に様々な変異を導入して検討したところ、HckN の 93 番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換した NckN W93F 変異体では、ウイルス感染力抑制が全く見られなくなることがわかった。

次に、HckN によるウイルス粒子感染力抑制は Nef の機能阻害による効果かを確認するために、まず GST pull down 法を行い、Hck wild type と同様に HckN が Nef タンパク質と結合するか検討した。その結果、HckN は Nef と特異的に結合することがわかった。また、HckN W93F 変異体は、ウイルス粒子感染力抑制効果が見られない結果と一致して、Nef と結合しないことが明らかになった。これまでの報告では、Hck は Nef の機能に重要な PxxP 領域に結合することが報告されている。そこで、HckN と HckN 変異体は Nef のどの領域と結合するのか解析した。GST と PxxP 領域だけを含まないペプチドとの融合タンパク質 (SF2-PxxP) を作製して GST pull down 法を行なったところ、HckN は、

Hck wild type と同様に、Nef PxxP領域と結合することが確認された。一方、HckN W93F変異体はNef PxxP領域と結合しないことがわかった。これらの結果から、HckNは93番目のトリプトファン付近の領域でNefの機能に重要なPxxP領域と結合しNef機能を抑制することが明らかになった。

Nef機能抑制活性を持つペプチドのさらなる最小化を行なうために、HckNの93番目のトリプトファン周辺に着目して様々な大きさのHckN欠失変異体を作製し、それぞれの変異体についてNefによるウイルス粒子感染力増強に対する効果を検討した。その結果、以下に示す54アミノ酸からなるHckペプチドにおいてもウイルス粒子感染力増強の抑制活性があることを明らかになった。

配列：IVVALYDYEAIHHEDLSFQKGDQMVLEES
GEWWKARSLATRKEGYIPSNYVAR

(2) Nef 機能阻害低分子化合物 2C と Nef の結合様式の同定

Nefをターゲットにした低分子化合物の同定も試みた。近年、申請者らは独自にNefと結合する可能性がある低分子化合物2Cを同定していた。そこで、低分子2Cに着目した。まず、化合物2CはNefと特異的に結合するか調べるために、NefとHckが特異的に結合することを利用して、GST-NefとHckの結合を化合物2Cが阻害するか検討した。GST-NefをHckを混ぜてインキュベートした後、化合物2Cを加えたところ、化合物2CはGST-NefとHckの結合を阻害しなかった。次に、GST-Nef、Hckそして化合物2Cを同時に混ぜてインキュベートしたところ、化合物2CはGST-Nefと

Hckの結合を阻害することがわかった。さらに、GST-Nefと化合物2Cを混ぜてインキュベートした後にHckを加えたところ、化合物2Cはさらに強くGST-NefとHckの結合を阻害することが明らかになった。これらの結果から、化合物2CはNef

と特異的に結合することが明らかになった。さらに、化合物2CはNefのどの領域と結合するのかを調べるために、Nefの様々な領域とGSTとの融合タンパク質をそれぞれ用いたGST pull down法を行なった。その結果、化合物2CもHckNと同様に、NefのPxxP領域と特異的に結合することが明らかになった。さらに、Nefと化合物2Cの結合様式のモデルを作製したところ、これまでに我々が示した結果と一致して、化合物2CはNefに直接結合することが強く示唆された。特に、Nefのアルギニン (R) 77、リシン (K) 82、アラニン (A) 83、アスパラギン酸 (D) 86、イソロイシン (I) 87、フェニルアラニン (F) 90、グルタミン (Q) 118そしてチロシン (Y) 120 (アミノ酸の番号はHIV NL43株のNefにおける位置を示す) は、化合物2Cとの結合に関与することが示唆された。

(3) 化合物 2C のウイルス感染力に対する効果の解析

化合物2CがNefによるウイルス粒子感染力増強に対する効果を検討した。化合物2C存在下で培養した細胞で作製したHIVウイルスの感染力を調べたところ、化合物2Cの濃度依存的にHIVウイルスの感染力が低下することが明らかになった。化合物2Cが結合するNefのPxxP領域に変異を入れたウイルス (SF2-AxxA) とNefを欠失させたウイルス (Δ Nef) においても同様に化合物2Cの効果を解析したところ、化合物2Cはこれら2つのウイルスの感染力には影響がないことがわかった。このとき、化合物2CはHIVウイルスタンパク質の翻訳と翻訳後プロセッシングへの影響を調べるために、HIV Gagタンパク質についてwestern blotを行なって解析をしたところ、化合物2CはGagタンパク質の発現量と翻訳後の切断には全く影響しないことがわかった。また、化合物2Cは細胞のHIVウイルス産生量には影響しなかった。これら

のことは、Nefによるウイルス感染力増強はHIVのエンベロープタンパク質の違いによって起こる可能性を示唆している。以上の結果から、化合物2CはNefに結合することによって、Nefの機能であるウイルス粒子の感染力増強を抑制することが明らかになった。さらに、Nef PxxP領域の付近に変異を導入したHIVウイルスの感染力について、化合物2Cの効果を解析したところ、化合物2Cは検討したすべてのHIVウイルスの感染力を低下させることがわかった。このことは、化合物2CはNefのPxxP領域が構成する立体構造を特異的に認識して結合し、その機能を阻害することを示唆している。

(4) 化合物 2C のウイルス複製に対する効果の解析

化合物2CのMHC-I発現低下に対する効果を検討するために、化合物2Cの存在下でHIVを感染させた細胞のMHC I発現量をFACSによって解析したところ、化合物2CはNefによるMHC Iの発現抑制を部分的に回復させることが明らかになった。

次に、化合物2CのHIVウイルス複製に対する効果を解析した。まず、Jurkat細胞を標的細胞として用いた。HIV-1 NL4-3を感染させたJurkat細胞を化合物2C存在下と非存在下で培養した後、それぞれの培養上清に含まれるウイルス量を測定したところ、それらのウイルス量に違いは無かった。次に、マクロファージを用いて同様の実験を行なったところ、化合物2C存在下ではウイルス量が減少していた。一方、Nefを欠損したHIV-1 NL4-3を感染させたマクロファージを用いて同様の実験を行なったところ、化合物2C存在下においてもウイルス量は減少しなかった。さらに、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。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。これらの結果から、化合物2CはNefの機能を阻害することでウイルス産生を抑制することが明らかになった。

(5) 化合物 2C の Nef が誘導するゴルジ体機能異常に対する効果の解析

我々は、HIV感染マクロファージにおいてNefはGRASPタンパク質のリン酸化を誘導することでゴルジ体の機能異常を引き起こすことを明らかにしている。そこで、化合物2Cは感染細胞内のゴルジ体機能異常を抑制するか調べた。NefとHckを導入した293細胞を化合物2C存在下と非存在下で培養した後、それぞれの細胞質抽出液を用いたwestern blotでリン酸化GRASPタンパク質を検出したところ、化合物2C存在下ではGRASPタンパク質のリン酸化が抑制されていることがわかった(図6)。このことから、化合物2CはHIV感染マクロファージにおけるゴルジ体機能異常を抑制することが示唆された。

(6) Nef 機能発現に関与する新規宿主因子 (群) の同定

Nefが結合する新規の宿主因子 (群) を同定するために、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た。Nefを発現させた293細胞から調整した細胞質抽出液中のNefをビーズに結合させ、化合物2Cを加えた時にゲルから流出する宿主タンパク質を調べたところ、3種類のタンパク質が検出された。さらにイオン交換クロマトグラフィーを加えてタンパク質同定法の改良を行

ったところ、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。このサンプルから新たに2種類のタンパク質が検出された。

一方、すでに報告されているNef結合宿主タンパク質を検索し、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。

D. 考察

ドミナントネガティブ Hck 変異体のアミノ酸配列から、Nef と結合する 54 アミノ酸からなるペプチドを同定することができた。この Hck ペプチドは、ドミナントネガティブ Hck 変異体と同様に Nef の機能ドメイン PxxP 領域と特異的に結合し、Nef 機能であるウイルス粒子感染力増強を抑制することがわかった。この Hck ペプチドはドミナントネガティブ Hck 変異体よりも分子量が小さいため、より実用的な分子である。さらに、Hck ペプチドのアミノ酸配列中のトリプトファンが Nef との結合と Nef 機能阻害に重要であることを明らかにすることができた。このことは、Hck ペプチドの最小化などの改良を加える上で有用な情報である。今後、さらなる分子の最小化や細胞膜への透過性を向上させる修飾を行うベース分子として Hck ペプチドは利用できる。

本研究において、我々は独自に同定した低分子化合物 2C について、Nef との結合様式と Nef 機能の抑制効果を詳細に検討してきた。その結果、化合物 2C は様々な種類の細胞に対して毒性を示さず、Hck ペプチドと同様に、Nef と特異的に結合し、Nef の機能であるウイルス粒子複製と感染力の増強及び MHC I 分子の発現低

下を阻害することを見出した。化合物 2C による HIV ウイルス感染力低下のメカニズムを調べたところ、化合物 2C は感染細胞内でウイルスが産生されるときに作用することがわかった。さらに化合物 2C はシュードタイプ HIV ウイルスの感染力には全く影響がないことがわかった。シュードタイプの HIV ウイルスは感染初期のステップが野生型ウイルスと異なる。また、他のグループはシュードタイプウイルスの感染力には Nef は関与しないという結果を報告している。これらの報告と合わせて考えると、化合物 2C は産生細胞内で Nef 機能を特異的に阻害することで、感染初期に関与するウイルス構成分子などに作用して感染力を低下させると考えられる。

さらに、化合物 2C によるウイルス複製への影響を調べた。HIV を感染させた Jurkat 細胞では化合物 2C はのウイルス複製を抑制しなかった。これまでの研究によって Jurkat 細胞では Nef 非依存的にウイルスが産生されることが示されている。そのため、Jurkat 細胞では化合物 2C による抑制効果が見られなかったと考えられる。一方、化合物 2C は HIV 感染マクロファージにおけるウイルス複製を抑制することがわかった。これらの結果から、化合物 2C は Nef の機能を特異的に抑制することで、ウイルス複製を抑制すると考えられる。

また、Nef 機能に対する化合物 2C の効果についてさらに調べた。最近、我々は Nef が感染マクロファージにおいてゴルジ体の機能を阻害することを見出している。本研究において、化合物 2C は Nef によるゴルジ体機能阻害を回復させることがわかった。このことは、化合物 2C の使用は、多くの Nef 機能を抑制する可能性を示唆している。

本研究によって、化合物 2C は Nef の機能に重要な PxxP モチーフと直接結合することがわかった。この PxxP モチーフは、

Nef が機能を発揮する際に宿主因子との結合に重要な領域であることが知られている。そのため、化合物 2C を作用させたときに Nef との結合が阻害される宿主タンパク質は、Nef 機能を発揮する上で必要とされる因子であると考えられる。本研究において、既知の Nef 結合宿主タンパク質を用いた選別と、Nef と結合する宿主タンパク質の中で化合物 2C 存在下では Nef と結合できない宿主タンパク質の同定を行ったところ、化合物 2C は非受容体型チロシンキナーゼである Tec タンパク質と Itk タンパク質、そして 3 種類の候補タンパク質を見出すことができた。これらのタンパク質について調べることによって、Nef 機能の発現機構の分子メカニズムについて、新たな知見を得ることができると考えられる。

これまでに世界中で報告された Nef 機能阻害分子は、化合物 2C を含めて 2 例だけである。今回の詳細な検討の結果、化合物 2C は HIV-1 ウイルスの感染力と複製を抑制することがわかった。さらに、Nef の他の機能を阻害する可能性も示唆された。既存の抗 HIV-1 薬剤とは異なり、化合物 2C は Nef 機能を阻害するという新たな作用機序を持つ分子であるため、この化合物をさらに改良することは全く新しい抗 HIV-1 薬剤の開発に貢献すると考えられる。

E. 結論

本研究を通じて、Nef によるウイルス粒子感染力増強を抑制する Hck ペプチドを作製することができた。このペプチドをもとにして、さらなる分子の最小化や細胞透過性ペプチドの付加などの最適化を行なうベースペプチドとなり得る。また、我々が独自に同定していた化合物 2C は、Hck ペプチドと同様に、Nef と直接結合して Nef 機能（ウイルス産生増加、ウイルス粒子感染力の増強、MHC-I 発現低下及びゴルジ体 Hck の過剰活性化による

ゴルジ体機能異常）を抑制することを見出した。このように、Nef をターゲットとした新たな作用機序を持つ抗 HIV-1 分子を同定することができた。さらに、化合物 2C は Nef PxxP モチーフに直接結合することがわかった。このような結合特性から、化合物 2C は Nef と結合する宿主因子の検索に有用なツールとなり得る。また本研究において、化合物 2C を用いて Nef に結合する可能性がある 3 種類の宿主タンパク質を見出すことができた。これらのタンパク質を同定することで、Nef の機能発現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.

Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S, Suzu S.

HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages.

J Immunol., 188, 3620-3627, 2012.

Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S and Suzu S.

HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the golgi through the Src kinase Hck.
J Cell Physiol., 227, 1090-1097, 2012.

Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S and Suzu S. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement.
PLoS One. 6, e27696, 2011.

Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, Emert-Sedlak L, Byeon IJ, Jung J, Ahn J, Wortman MD, Kukull B, Saito M, Koizumi H, Williamson DM, Hiyoshi M, Barklis E, Takiguchi M, Suzu S, Gronenborn AM, Smithgall TE, Thomas G. Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Downregulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action.
Mol Biol Cell 21, 3279-3292, 2010.

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, 2012年, 熊本

日吉真照

HIV-1 Nef Perturbs the Function, Structure, and Signaling of the Golgi through the Src Kinase Hck. 第12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, 2012年10月19-21日, 熊本

Chutiwitoonchai Nopporn, 日吉真照, 鈴木伸也. HIV-1 粒子感染性を維持する機構の解析. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 2010年11月24-26日, 東京

日吉真照

HIV-1 Nef Perturbs Function, Structure and Signaling of the Golgi through a Src Kinase Hck. 第11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, 2010年10月6-8日, 熊本

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし。

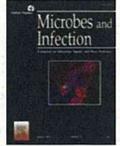
研究成果の刊行に関する一覧表

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 |
| Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S, Suzu S. | HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the golgi through the Src kinase Hck. | J Cell Physiol | 227 | 1090-1097 | 2012 |
| Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M , Okada S, Suzu S. | HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages. | J Immunol | 188 | 3620-3627 | 2012 |
| Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S. | The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. | PLoS One | 6 | e27696 | 2011 |
| Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, Emert-Sedlak L, Byeon IJ, Jung J, Ahn J, Wortman MD, Kukull B, Saito M, Koizumi H, Williamson DM, Hiyoshi M , Barklis E, Takiguchi M, Suzu S, Gronenborn AM, Smithgall TE, Thomas G. | Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Downregulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action. | Mol Biol Cell | 21 | 3279-3292 | 2010 |



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.

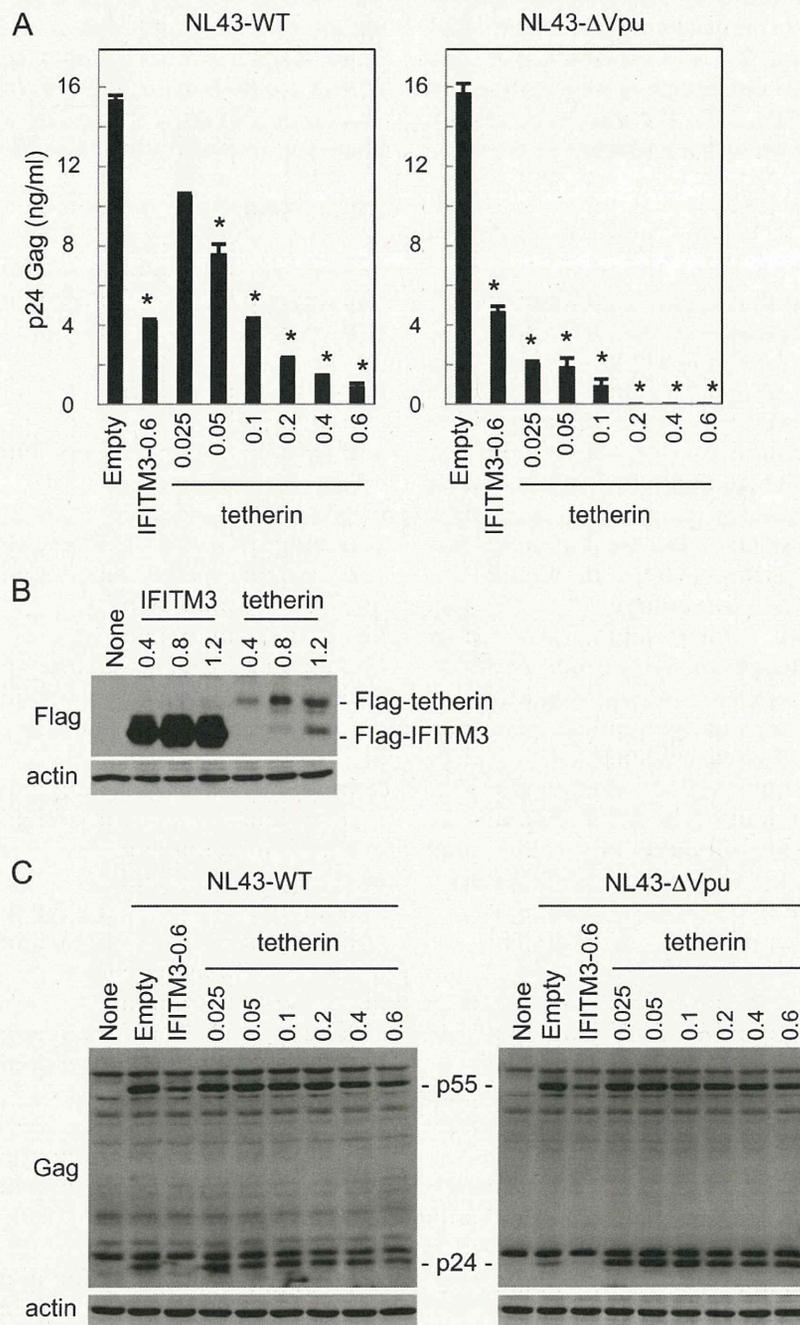


Fig. 1. The effects of IFITM3 and tetherin on viral production and Gag expression. (A) The 293 cells were transfected with the wild-type (NL43-WT, 0.6 μ g) or *vpu*-deleted NL43 proviral plasmid (NL43- Δ Vpu, 0.6 μ g), or co-transfected with the empty vector (Empty, 0.6 μ g), the IFITM3 expression plasmid (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.

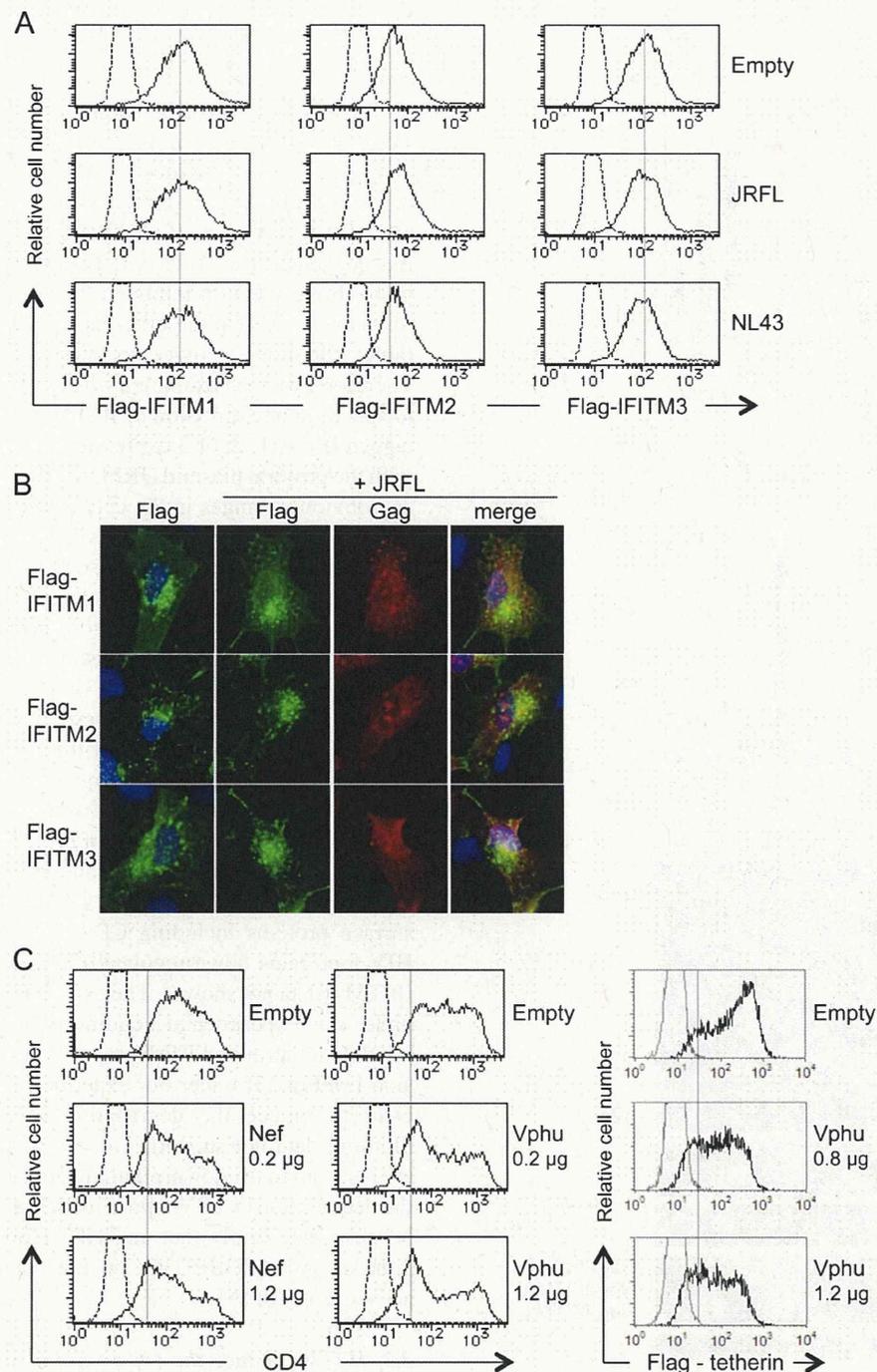


Fig. 2. The effects of HIV-1 proteins on the cell surface expression and intracellular distribution of IFITMs. (A) The 293 cells were co-transfected with the Flag-tagged IFITM1, -2, or -3 expression plasmid (0.4 µg) and the following plasmids (1.2 µg): the empty vector (Empty), the proviral NL43 plasmid, 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.)

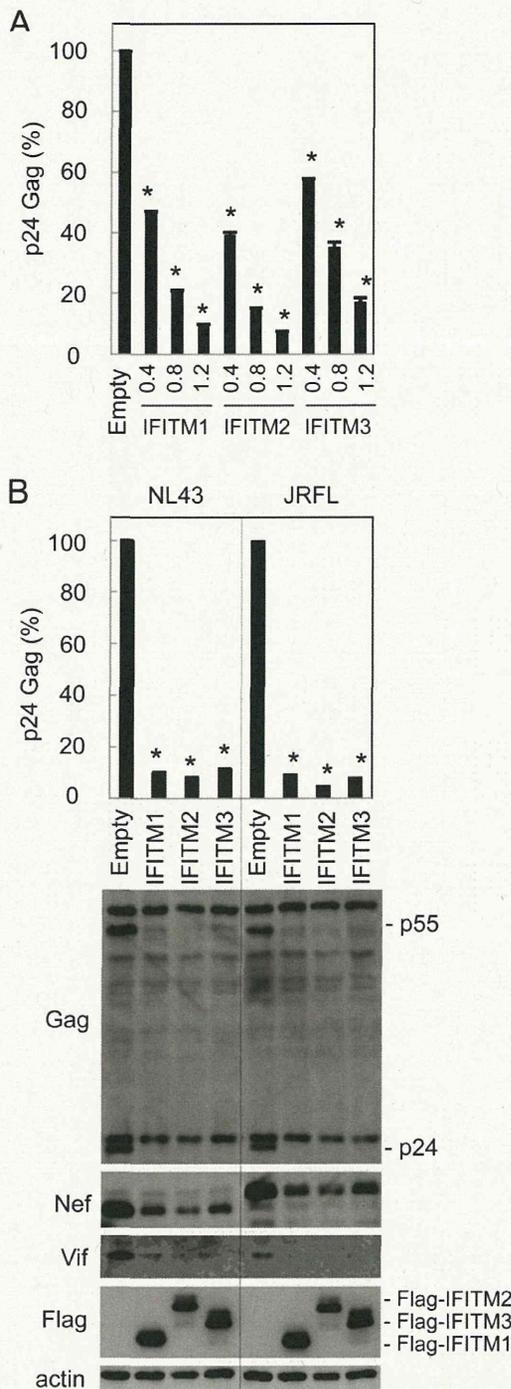


Fig. 3. The effects of IFITMs on viral production and the expression of Gag, Nef, and Vif. (A) The 293 cells were co-transfected with the proviral NL43 plasmid (0.4 µg) and the indicated amount (0.4, 0.8, or 1.2 µg) of the IFITM expression plasmids. The cells were cultured for 2 days, and the concentration 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 µg), or co-transfected with the empty vector (Empty, 1.2 µg) or IFITM expression plasmid (1.2 µg), 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. * $p < 0.05$.

NL43 and JRFL strain viruses (Fig. 3B, bar graph), and this effect was strongly associated with reduced Gag expression (Fig. 3B, Gag blot). Importantly, we found that IFITMs also reduced the expression of Nef and Vif (Nef and Vif blots). However, more important finding was that IFITM proteins did not induce any reduction in the expression of these viral proteins when they were co-transfected with the codon-optimized Gag expression plasmid (Fig. 4A, synGag–GFP blot), the Nef expression plasmid (Fig. 4A, Nef–GFP blot), or the codon-optimized Vif expression plasmid (Fig. 4B, HVif blot). It is well characterized that Gag and Vif RNAs contain a double-stranded region (Rev response element; RRE), and the incompletely spliced RNAs encoding these viral proteins

require the binding of HIV-1 Rev protein to the RRE sequences for their nuclear export and subsequent expression [37,38]. Codon-optimization bypasses this complicated mechanism and allows these proteins to be expressed in a Rev-independent manner [31,37,38]. Thus, our results raised the possibility that IFITMs selectively interfere with the Rev/RRE-mediated expression of Gag and Vif. Indeed, IFITMs displayed an inhibitory effect on Gag expression in an artificial Rev-dependent expression system (Fig. 4C). In this system, the codon-unoptimized and RRE sequence-containing Gag–Pol and Gag expression plasmids (Gag–Pol–RRE and Gag–RRE) were expressed at normal levels only in the presence of the Rev plasmid (Fig. 5B, first 2 lanes). As a result, we

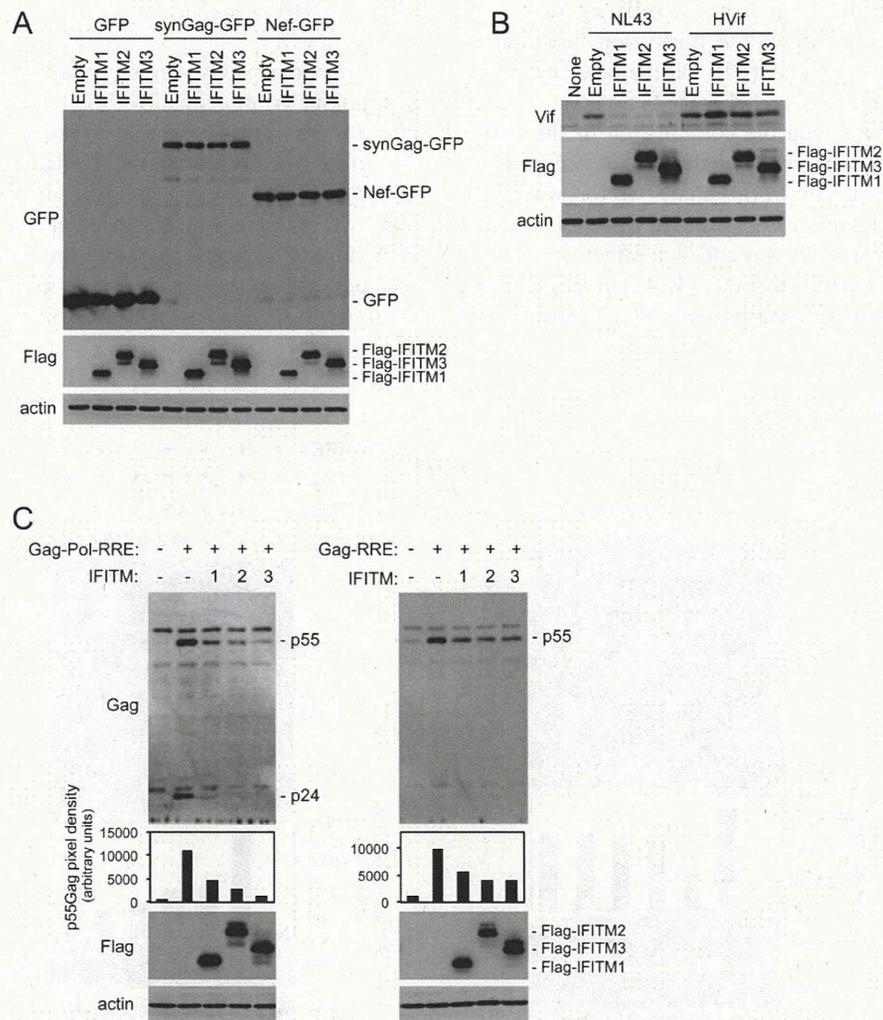


Fig. 4. The effects of IFITMs on the expression of the codon-optimized Gag, Nef and Vif, and the Rev/RRE-mediated expression of Gag. (A) The 293 cells were transfected with the GFP expression plasmid (0.1 μ g), the codon-optimized Gag–GFP fusion expression plasmid (synGag–GFP, 0.2 μ g), or the Nef–GFP expression plasmid, or co-transfected with the indicated IFITM expression plasmid (1.2 μ g). (B) The 293 cells were transfected with the empty vector (None), the proviral NL43 plasmid (0.4 μ g), or the codon-optimized Vif expression plasmid (HVif, 0.4 μ g), or co-transfected with the indicated IFITM expression plasmid (1.2 μ g). (A and B) The transfected cells were cultured for 2 days, lysed, and analyzed for the expression of GFP or GFP fusion proteins, Vif, and the Flag-tagged IFITM proteins by Western blotting. (C) The 293 cells were transfected with the Gag–Pol–RRE (0.3 μ g) or Gag–RRE (0.3 μ g) expression plasmid in combination with the Rev (0.1 μ g) and/or IFITM (1.2 μ g) expression plasmids, as indicated. The cells were cultured for 2 days, lysed, and analyzed for the expression of Gag and the Flag-tagged IFITM proteins by Western blotting. The profile created by quantifying the band pixel densities of p55Gag is also shown. (A–C) The actin blot is a loading control. Data shown are representative of two independent experiments with similar results.

found that IFITM1, 2, and 3 significantly reduced Rev/RRE-mediated Gag expression (lanes 3–5), as they did in the proviral plasmid-mediated expression system (see Fig. 3B).

However, the finding that IFITMs interfere with Rev/RRE-mediated expression does not explain the fact that they also reduced the proviral plasmid-mediated expression of Nef (see Fig. 3B) because Nef RNA does not contain RRE, and therefore its expression is independent of the function of Rev [37,38]. Thus, we next examined whether another viral double-stranded RNA, i.e., the *trans*-activation response (TAR) element, was involved in the inhibitory activity of IFITMs. All of the HIV-1 RNAs including that encoding Nef contain the TAR element at their 5' end, which binds and activates the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) [39]. Once activated, PKR phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α), which reduces the efficiency and rate of the translation initiation of proteins including viral proteins [39]. On the other hand, the HIV-1 Tat protein counteracts PKR activation via various complicated mechanisms, and the combination of the inhibitory pathways that prevent PKR activation determines the level of viral expression [39]. In this study, we found that the small molecule PKR inhibitor C16 restored the expression of p55Gag, Vif, and Nef, when it was added at effective but non-cytotoxic concentrations (0.2–0.8 μ M) [40,41] to the cells that had been co-transfected with the proviral NL43 plasmid and

IFITM3 (Fig. 5A). Meanwhile, C16 did not restore Gag expression in the Tat/TAR-independent but Rev/RRE-dependent expression system (Fig. 5B), which was consistent with the fact that TAR, but not RRE, induces strong PKR activation [39]. Therefore, our results (Figs. 3–5) suggested that IFITMs reduced the expression of Gag, and possibly Vif, by interfering with both Rev/RRE- and Tat/TAR-mediated expression, and reduced the expression of Nef by interfering with Tat/TAR-mediated expression. Again, the inhibitory effect was not non-specific because IFITMs did not affect the levels of these viral proteins when they were expressed via the system that bypassed the viral-specific machinery (see Fig. 4A and B).

3.4. The S-palmitoylation of IFITMs is not required for their anti-HIV-1 activity

A previous study demonstrated that IFITM3 was post-translationally modified by S-palmitoylation, which is crucial for its activity against influenza virus infection [7]. Therefore, we finally examined whether the S-palmitoylation of IFITMs is important for their anti-HIV-1 activity. To this end, we prepared three different mutants of Flag-tagged IFITM3 and IFITM2, in which the S-palmitoylated cysteine residues were mutated singly or in combination to alanine (Fig. 6A). Consistent with the finding that the first two

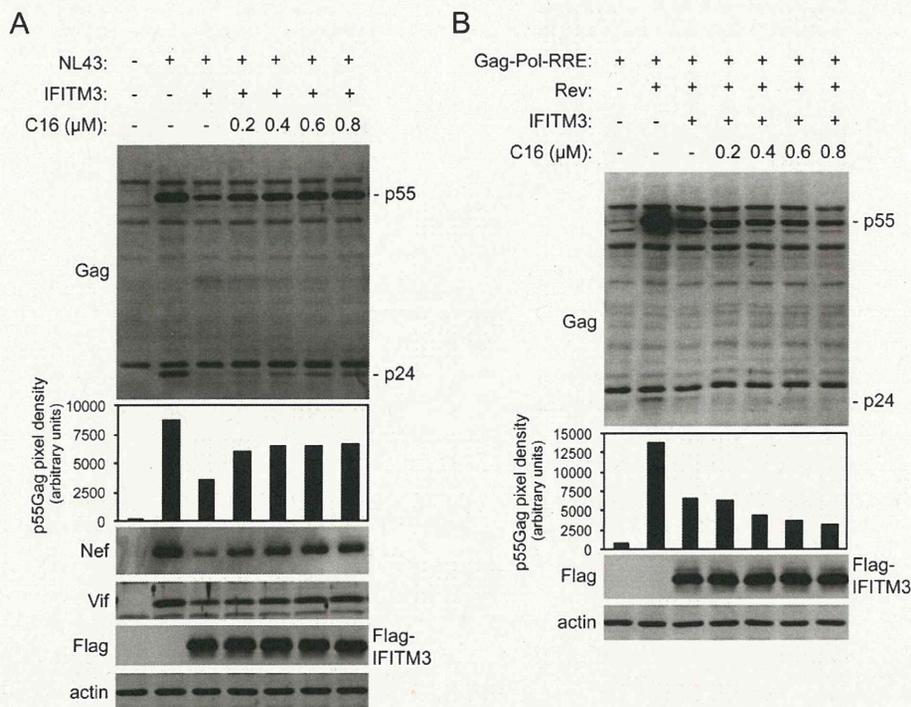


Fig. 5. The effect of the PKR inhibitor C16 on the suppression of Gag, Nef, and Vif expression by IFITM. (A) The 293 cells were transfected with the proviral NL43 plasmid (0.6 μ g) and IFITM3 expression plasmid (1.0 μ g), as indicated. (B) The 293 cells were transfected with the expression plasmids for Gag–Pol–RRE (0.3 μ g), Rev (0.1 μ g) and IFITM3 (1.0 μ g), in the indicated combinations. (A and B) After 6 h transfection, the PKR inhibitor C16 was added to the culture at the indicated concentration (0.2–0.8 μ M), and the cells were cultured for an additional 42 h. The cells were lysed and analyzed for the expression of Gag, Nef, Vif, and the Flag-tagged IFITM3 proteins. The actin blot is a loading control. The profile created by quantifying the band pixel densities of p55Gag is also shown. Data shown are representative of two independent experiments with similar results.