

201226007B

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(H22-エイズ-若手-007)

霊長類ゲノム情報を利用した抗エイズウイルス自然免疫因子の
探索およびその新規エイズ治療法への応用

平成22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 武内 寛明

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

平成25（2013）年5月

目次

I.	総合研究報告 霊長類ゲノム情報を利用した抗エイズウイルス自然免疫因子の探索 およびその新規エイズ治療法への応用 1 武内 寛明	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	13
III.	研究成果の刊行物・別刷	15

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
（総合）研究報告書

霊長類ゲノム情報を利用した抗エイズウイルス自然免疫因子の探索およびその新規
エイズ治療法への応用

研究代表者 武内 寛明
東京医科歯科大学 助教

研究要旨 世界的に流行しているエイズの原因であるヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、サル免疫不全ウイルス（SIV）が「種の壁」を乗り越え病原性を示す HIV へと変貌を遂げた歴史的背景が明らかとなってきた。しかし、SIV がヒトに感染し、病原性を示すようになった原因は、未だ解明がなされていない部分が多い。当該研究では、SIV が「種の壁」を乗り越えてヒトへ感染伝播する際に関わる自然免疫因子（群）および HIV 感染制御ヒト宿主因子（群）を同定することにより、新規エイズ治療法に向けての基盤確立に寄与すること、および今後の新興感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めることを目的として研究を遂行した。3年間の当該研究で得られた研究成果として、（1）独自の機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立、（2）HIV 感染増殖伝播環境下において HIV 感染制御候補因子群を多数見出すことが出来たこと、（3）HIV 感染制御候補因子群の中で、複数の HIV 感染制御因子（AMPK-RPK および ABP）を同定したことが挙げられる。特に、3年目で同定に至った AMPK-RPK のような、1つのヒト細胞内因子が、複数の HIV 感染過程に作用することで HIV 感染制御効果を示す事例は、現段階で未だ報告されていないことから、HIV 感染過程の理解をより深めることが可能になるだけでなく、AMPK-RPK 特異的機能阻害剤が、新たな抗 HIV 薬になりうる可能性がある。また、ABP については、HIV 感染過程において、吸着・侵入過程に影響をおよぼす HIV 感染制御因子であることが明らかとなった。これらの研究成果は、本研究の目的である新規エイズ治療法の開発にもつながるものと考えられる。

A. 研究目的

本研究では、HIV 感染伝播に関わる自然免疫（群）および SIV がヒトへ感染伝播する際に関わる自然免疫因子（群）を同定し、新規エイズ治療法に向けての基盤確立に寄与すること、および今後の新興感染症に対するヒト宿主防御機構の理解を深めることを目的とした。

現在までにヒトゲノム情報に立脚した HIV 感染制御宿主因子探索法として、RNA 干渉法による genome-wide screening 法による研究成果が幾つか報告されているが、本来の HIV 感染標的細胞を用いたものではなく、そのため自然感染における HIV 感染伝播での役割

については不明な点が多い。本研究では、HIV 感染標的細胞である T リンパ球を用いて機能遺伝子発現抑制 T リンパ球ライブラリーを構築し、これらライブラリーと正常 T リンパ球との間での HIV 感染効率を比較検討し、HIV 感染制御抑制因子群を同定することを試みた。また、平成 22 年度は、RNA 干渉法（shRNA）を用いたヒト機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立に成功し、HIV 感染制御宿主因子候補群を多数得ることが出来た。平成 23 年度は、前年度に得られた HIV 感染制御宿主因子候補群の機能解析を進めた結果、2 種の機能遺伝

子発現抑制 T 細胞における HIV 感染増殖効率の著しい低下が認められ、その中の 1 つは、逆転写反応過程に影響をおよぼし、もう 1 つは HIV 感染吸着・侵入過程に影響をおよぼす宿主因子であることを明らかにした。

平成 24 年度は、前年度に同定した 2 種の宿主因子の中でも、逆転写反応効率に影響をおよぼす因子について重点的に詳細な解析を行い、同一細胞内因子が異なる HIV 感染過程に影響をおよぼすことを明らかにした。また本研究で得られた他の HIV 感染制御候補因子群についても、順次機能評価を行った。

B. 研究方法

(1) 宿主機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの作製

宿主遺伝子 (約 1 万 8 千遺伝子) を標的とした short hairpin RNA (shRNA) ライブラリーを発現するカセットを組み込んだレンチウイルスベクターを用いて T 細胞ゲノムへ shRNA 発現カセットを組み込むことにより、機能遺伝子発現抑制 shRNA T 細胞ライブラリーを作製した。具体的には、CD4 陽性ヒト T 細胞株である MT-4/CCR5 細胞をライブラリー作製材料とし、shRNA-レンチウイルスライブラリーを MOI=10 で感染させた。shRNA 発現カセットには、ピューロマイシン耐性遺伝子が含まれていることから、shRNA 発現カセットが組み込まれた細胞を選択する目的で、感染 4 8 時間後にピューロマイシン (1 µg/ml) を含む培地と交換し、2 週間選択培養を行った後に T 細胞株ライブラリーを樹立した。

(2) HIV および SIV 感染制御宿主因子群の探索

(1) にて作製したヒト T 細胞株ライブラリーを用いて、HIV および SIV 感染耐性 T 細胞株を選択した。具体的には、HIV-1 NL4-3 株および SIVmac239 株感染感受性 T 細胞株である MT-4/CCR5 細

胞ライブラリーに、HIV (MOI=0.001) および SIV (MOI=0.1) を感染させた。感染 12 日後に HIV/SIV 感染耐性細胞を限界希釈し、更に 2 週間培養することで、HIV/SIV 感染耐性 T 細胞ライブラリーを得た。その後、これら細胞株が保持している shRNA 配列を解析し、shRNA 配列が標的としている宿主機能遺伝子を同定した。

(3) 単独 shRNA 発現 T 細胞株の樹立

HIV 感染増殖効率が著しく低下している細胞群 (semi-clonal population) の中で、6 種の shRNA が混在している細胞群について、各々の shRNA 単独発現 T 細胞株を樹立した。

(4) HIV-1 感染効率の解析

(2) で樹立した各 T 細胞株に、HIV-1_{IIIIB} env-pseudotyped HIV-1 (III Benv/luciferase-reporter HIV-1) または VSVG-pseudotyped HIV-1 (VSVG/ luciferase-reporter HIV-1) を感染させ、24 時間後の luciferase 活性を測定した。

(5) HIV-1 増殖能の解析

各 T 細胞株に、HIV-1 を感染させた。その後継時的に培養上清を回収し、それらに含まれるウイルス由来の逆転写酵素 (RT) 活性を測定した。

(6) HIV-1 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析

(3) で樹立した各 T 細胞株に HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量について、*pol* および *env* の各領域におけるリアルタイム PCR 法にて測定した。

(7) Fate-of-capsid アッセイによる感染細胞内のウイルスコア安定性の解析

ヒト T 細胞株に HIV-1 を感染させ、8 時間後の感染細胞を Dounce Homogenizer にて細胞破碎後に細胞質

分画を得た。この細胞質分画を、20%-60%シュクロースに重層した後、細胞質成分の比重分離を超速心法にて行った。比重分離後、上部から3分画に分けて回収し、各分画に含まれているウイルス CA タンパク量を Western blotting 法および ELISA 法を用いて検出した。

(8) HIV 感染細胞内におけるウイルス mRNA 合成量の解析

HEK293細胞に pNL4-3を導入することで、HIV 感染成立環境を擬似的に構築し、宿主転写因子を利用したウイルス mRNA 合成量を、i) unspliced form、ii) single-spliced form、iii) double-spliced form の3種各々に検出するリアルタイム PCR 法にて経時的に測定した。

(9) HIV 感染細胞内におけるウイルスタンパク量の解析

HEK293細胞に pNL4-3 もしくは pNL4-3luc (ルシフェラーゼレポーター HIV) を導入し、ウイルスタンパク量の経時変化を WB 法および化学発光検出法にて測定した。

(10) AMPK-RPK 再構築細胞における HIV 感染効率の解析

AMPK-RPK-KD 293細胞に AMPK-RPK タンパク発現プラスミドを導入することで AMPK-RPK 再構築を行い、VSV-G/NL4-3luc シュードタイプ HIV-1 を感染させる。感染 24 時間後に感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することで感染効率を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた東京医科歯科大学の機関承認および文部科学大臣承認を既に取得済みである。

る。

C. 研究結果

1. HIV および SIV 感染制御因子探索システムの確立

ヒト機能遺伝子 (約 1 万 8 千遺伝子) を標的とした shRNA ライブラリーによる機能遺伝子発現抑制 T 細胞株を作製するため、SIV および HIV の双方に対して感染感受性細胞である MT-4/CCR5 細胞をライブラリー作製細胞として選択した。様々な感染条件を検討した結果、 1×10^5 個の MT-4/CCR5 細胞に MOI=10 に相当する shRNA-レンチウイルスライブラリーを 48 時間感染させた。shRNA 発現カセットには、ピューロマイシン耐性遺伝子が含まれていることを利用して、shRNA 発現カセットが組み込まれた細胞を選択する目的で、感染 48 時間後にピューロマイシン (1 μ g/ml) を含む培地と交換し、更に 2 週間選択培養を行った後に、T 細胞株ライブラリーを樹立した (図 1)。

2. 機能遺伝子発現抑制 T 細胞株ライブラリーを用いた HIV/SIV 感染制御因子の探索

樹立した T 細胞株ライブラリーを用いて、HIV NL4-3 (MOI=0.001) および SIVmac239 (MOI=0.1) を感染させた。感染 12 日後に HIV/SIV 感染耐性細胞を限界希釈し、更に 2 週間培養することで、HIV/SIV 感染耐性 T 細胞株を得た (図 1)。

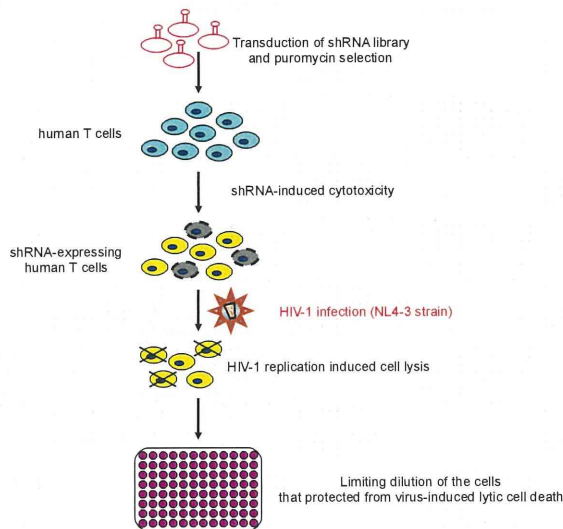


図1. ヒト T 細胞株ライブラリーの樹立および HIV 感染耐性細胞株の選択法

次に、これら細胞株が保持している shRNA 配列を解析し、shRNA 配列が標的としている宿主機能遺伝子群を同定した。これら遺伝子群の機能解析を行うために、細胞内局在分布を INGENUITY 社データベースによる YFG search (SIGMA-ALDRICH)を行った。その結果、HIV 感染制御因子群の中で、細胞膜および細胞質に局在するものが 50%前後を占める結果となった (図2)。

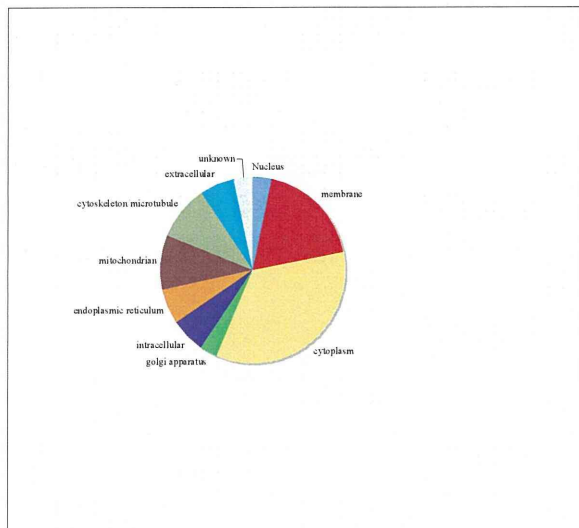


図2. HIV 感染制御因子群の細胞内局在分布

3. HIV 感染増殖効率におよぼす機能遺伝子群の解析

HIV 感染耐性 T 細胞ライブラリーを希釈して再培養を行った後に得られた細胞集団 (sub-clonal cell population) のウイルス既感染の有無、および shRNA の off-target 効果によるウイルス感染必須レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 の細胞膜表面発現レベルへの影響について、正常 MT-4/CCR5 細胞とともに比較検討を行った。具体的には、ウイルス感染の有無については、細胞内ウイルス DNA の定量および培養上清中の逆転写酵素活性を測定した。その結果、細胞内ウイルス DNA および培養上清中の逆転写酵素活性共に認められなかった。また、細胞膜表面上の各上記レセプターの発現レベルを細胞表面解析装置 (FACS) にて検討したところ、発現レベルの差異は認められなかった。これらの結果より、HIV 感染耐性細胞は HIV 非感染細胞であり、かつ HIV 感染標的細胞としての性状を維持していることが判明した (data not shown)。

次に、これら T 細胞ライブラリーと正常 T 細胞とを用いてウイルス感染効率を比較検討するために、T 細胞ライブラリー集団および正常 T 細胞とに、HIV (MOI=0.001) を感染させた。感染効率については、定期的に培養上清中の RT activity を測定することにより検討した。その結果、HIV 感染効率が顕著に低下した T 細胞ライブラリー集団を多数確認した。その代表的なライブラリー集団の結果を示す (図3)。

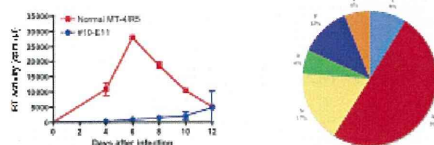


図3. HIV 感染増殖効率に対する感染制御機能遺伝子群の影響. 6 種の機能遺伝子を

標的とした T 細胞ライブラリー集団(#10-E11) および正常 T 細胞 (Normal MT-4/R5) に NL4-3 を感染させ、経時的に培養上清中の RT activity を測定した。

4. HIV 感染増殖効率に対する AMPK-RPK の影響

HIV 感染増殖効率が著しく低下している細胞群の中で、6 種の shRNA が混在している細胞群 (図 3) について、各々の shRNA 単独発現 T 細胞株を樹立した。次に、shRNA 単独発現 T 細胞株を用いて HIV-1 感染実験 (single-round infection) を行った結果、6 種類のうち 2 種類の shRNA 単独発現 T 細胞株において感染効率の顕著な低下が認められた。また、それ以外の 4 種についても、感染効率が 50%以上低下することが明らかとなった。そこで、感染効率が顕著に低下した 2 種のうち、AMP-activated protein kinase (AMPK)ファミリーに属する AMPK-related protein kinase (AMPK-RPK)について詳細な解析を進めた。AMPK-RPK が HIV-1 感染制御因子となり得るかどうかを解析するために、内在性 AMPK-RPK の発現抑制 T 細胞株 (AMPK-RPK-KD) を樹立し、HIV-1 感染実験 (single-round infection) を行った。まず、X4-tropic HIV-1 の感染経路である CD4/CXCR4 分子を利用した細胞侵入経路および VSVG 分子を利用した別の感染経路を利用して細胞侵入後の HIV-1 生活環に影響を及ぼすか否かを検討したところ、いずれの HIV-1 細胞内侵入経路においても HIV-1 生活環に影響をおよぼすことが分かった (図 4)。

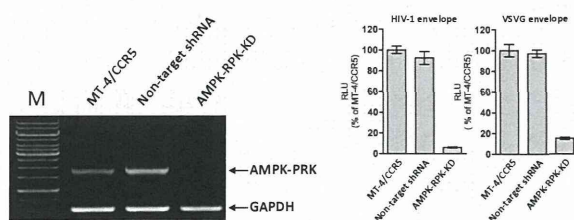


図 4. HIV 感染効率に対する AMPK-RPK の

影響. 左パネル: AMPK-RPK を標的とした shRNA を用いて AMPK-RPK-KD 細胞を作製し、MT-4/CCR5 細胞および shRNA コントロール細胞 (Non-target shRNA) の内在性 AMPK-RPK の mRNA 量と比較した結果。右パネル: MT-4/CCR5、Non-target shRNA、AMPK-RPK-KD 細胞に HIV-1 env/NL-luc および VSVG/NL-luc HIV-1 を感染させ、24 時間後の細胞内における luciferase activity を測定した。

5. HIV 逆転写反応過程に対する AMPK-RPK の影響

そこで、AMPK-RPK の HIV-1 感染制御メカニズムを解析するため、まずは HIV-1 生活環の各過程における AMPK-RPK の影響について解析を進めた。具体的には、リアルタイム PCR 法を用いて逆転写反応によって合成されるウイルス DNA 量を定量することで、HIV-1 が標的細胞内に侵入後に起こる逆転写反応過程への影響について解析を行った。その結果、AMPK-RPK-KD 細胞において、ウイルス DNA 合成効率が著しく低下していることが明らかとなった (図 5)。

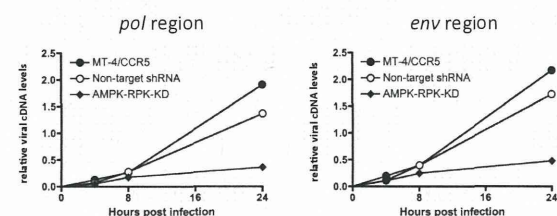


図 5. AMPK-RPK の逆転写反応過程に対する影響. MT-4/CCR5、Non-target shRNA、AMPK-RPK-KD 細胞に HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、4、8、24 時間の各時間において Total DNA を抽出し、HIV-1 の pol および env 領域を特異的に増幅するリアルタイム PCR 法を用いてウイルス DNA 合成量を定量した。

6. HIV 感染細胞内での CA コアの安定性に対する AMPK-RPK の影響

感染細胞内における逆転写反応が行われる場合は、ウイルスコア内であることが分かっており、コアの安定性が逆転写反応効率と強く関連していることが明らかとなっている。そこで、AMPK-RPK が、逆転写反応が行われている際のコア

安定性に影響を及ぼしているかどうかを検討するため、Fate-of-capsid 法を用いて CA コアの安定性について解析を行った。その結果、ヒト T 細胞内において、AMPK-RPK 発現レベルが低下した結果、CA コアの安定性が変化していることが明らかとなった (図 6)。

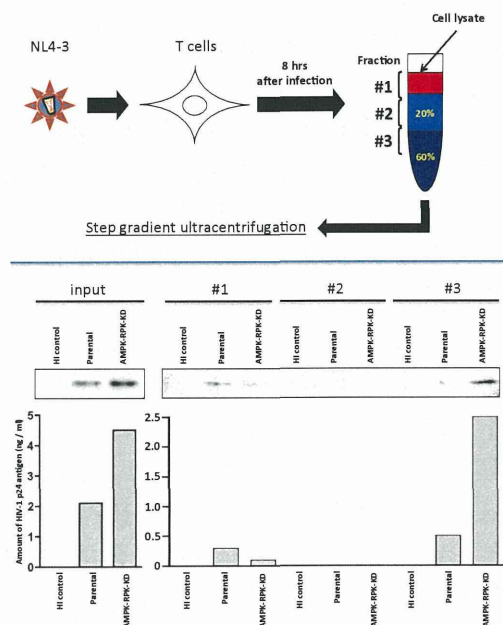


図 6. HIV 感染細胞内における CA コアの安定性に対する AMPK-RPK の影響。上段：MT-4/CCR5、Non-target shRNA、AMPK-RPK-KD 細胞に HIV-1(NL4-3 株)を感染させ、8 時間後に感染細胞の細胞質分画を抽出し、20-60%シュクロースの上に細胞質分画を重層し、超遠心法にて CA コアを分離した。CA コアは#3 分画に集積している。下段：#1, #2, #3 の各分画について CA タンパクを検出する Western blotting を行った。下部のグラフは、各分画を ELISA 法にて定量を行った結果を示している。

7. HIV 感染後期過程に対する AMPK-RPK の影響

AMPK-RPK の HIV 感染後期過程における影響を解析するために、HEK293、293 non-target shRNA control および 293 AMPK-RPK-KD 細胞に、pNL4-3 DNA を導入し、その後合成されるウイルスタンパク量に AMPK-RPK が影響をおよぼすか否かを検討した。その結果、

培養上清中に産生される HIV CA p24 タンパク量だけでなく、AMPK-RPK の細胞内発現量が低下するに従い細胞内 HIV CA p24 タンパク量も低下することが明らかとなった (図 7)。

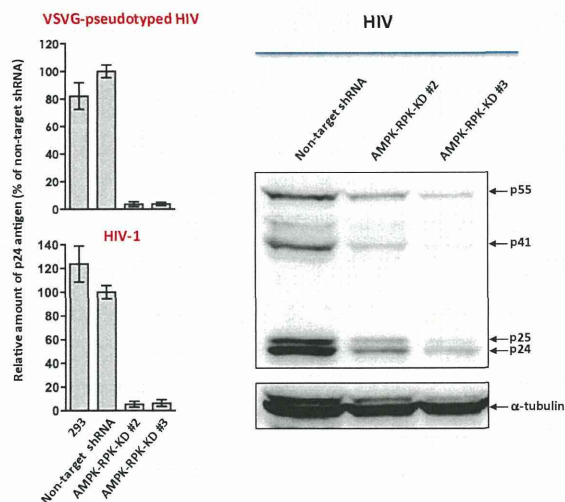


図 7. 細胞内 HIV gag タンパク発現量に対する AMPK-RPK の影響。左側：293、non-target shRNA、AMPK-RPK-KD 細胞に、pNL4-3 をトランスフェクションし、24 時間後の培養上清に含まれる HIV p24 タンパク量を ELISA 法にて定量した。右側：24 時間後の細胞内 HIV p24 タンパク量を WB 法にて検出した。

8. AMPK-RPK 再構築細胞における HIV 感染効率への影響

本研究では、shRNA を用いた遺伝子発現制御法にて、標的遺伝子の機能解析を行っているため、shRNA が標的的特異的に作用しているかどうかを確認する必要がある。そこで、AMPK-RPK が HIV 感染制御因子であることを更に検証するため、AMPK-RPK-KD 細胞内に AMPK-RPK タンパク発現プラスミドを導入することで AMPK-RPK タンパク再構築を行い、HIV 感染効率が復帰するかどうかを検討した。その結果、再構築することで、HIV 感染効率が有意に上昇することが明らかとなった (図 8)。

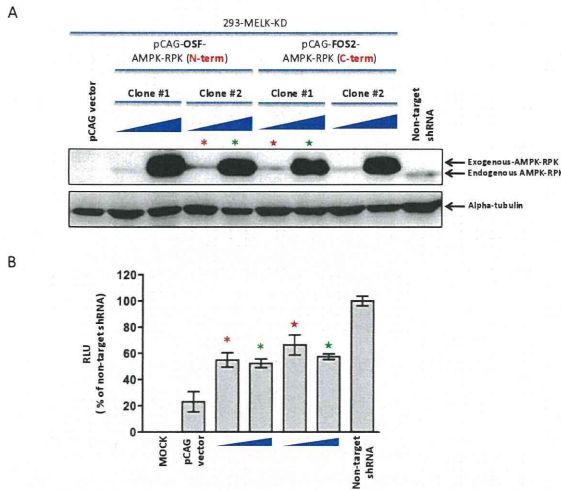


図 8. AMPK-RPK-KD 細胞における HIV 感染効率に対する AMPK-RPK タンパク再構築の影響. 293 AMPK-RPK-KD 細胞に AMPK-RPK タンパク発現プラスミド (pCAG-OSF/FOS2-AMPK-RPK) を遺伝子導入し (A)、導入 24 時間後に VSV-G/NL43-luc を感染させ、感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した (B)。

9. HIV 感染増殖伝播効率に対する AMPK-RPK の影響

MT-4/CCR5、Non-target shRNA および AMPK-RPK-KD T 細胞株を用いた HIV-1 感染実験 (multi-round infection) を行った結果、AMPK-RPK-KD T 細胞株における HIV-1 感染増殖伝播効率が顕著に低下することが明らかとなった (図 9)。

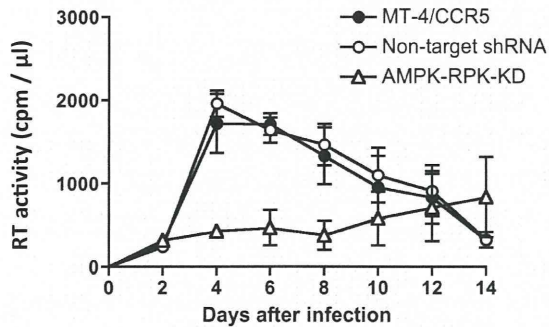


図 9. HIV 感染増殖効率に対する AMPK-RPK の影響. MT-4/CCR5、Non-target shRNA、AMPK-RPK-KD 細胞に HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、経時的に培養上清中の RT activity を測定した。

10. HIV 感染効率に対する ABP の影響

当該研究で AMPK-RPK と共に HIV 感染制御候補因子として見出されたアクチン結合タンパク (ABP) について、ABP が HIV 感染効率におよぼす影響についても検討した。具体的には、T リンパ球を用いて ABP 発現抑制細胞 (ABP-KD) を樹立し、HIV 特異的および HIV 非特異的吸着・侵入過程におよぼす影響を検討した。その結果、HIV 特異的吸着・侵入過程に影響をおよぼす可能性が示唆された (図 6、下段: HIV-1 envelope と VSV-G envelope との比較)。

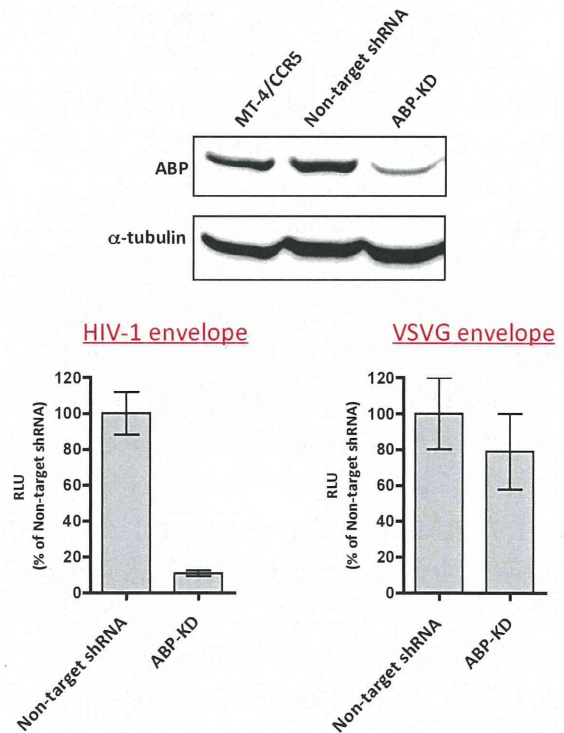


図 10. HIV 感染効率に対する ABP の影響. ABP-KD T リンパ球 (上段) に HIV-1 または VSV-G エンベロープを用いたシュードタイプ HIV を感染させた。感染 24 時間後の感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する事で感染効率を検討した (下段)。

以上の結果より、細胞内 AMPK-RPK 発現量が低下することで、HIV-1 感染細胞内における CA コアの安定性に影響を与えることで逆転写反応効率を低下さ

せるだけでなく、HIV mRNA 合成効率にも影響をおよぼすことが明らかとなった。また、ABP は HIV-1 envelope 特異的なウイルス感染効率に影響することが明らかとなった。よって、AMPK-RPK は複数の HIV 感染過程に影響をおよぼす HIV-1 感染必須因子であり、ABP は HIV 感染における吸着・侵入過程に影響をおよぼす HIV 感染必須因子であることが示唆された。

D. 考察

現在までに、ヒトゲノム情報に立脚したエイズウイルス制御宿主因子探索は既に幾つかの成果が報告されているが、それらはエイズウイルス標的細胞を用いたものではなく、そのため自然感染におけるエイズウイルス感染伝播での役割については不明な点が多い。3年間の本研究により得られた研究成果として、

(1) 独自の機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立、(2) HIV 感染増殖伝播環境下において HIV 感染制御候補因子群を多数得る事が出来たこと、(3) HIV 感染制御候補因子群の中で複数種の HIV 感染制御因子を同定したことなどが挙げられる。特に、3年目で同定した AMPK-RPK のような1つのヒト細胞内因子が、複数の HIV 感染過程に作用することで HIV 感染制御効果を示す事は、現段階で未だ報告されていないことから、HIV 感染過程の理解をより深めることが可能になるだけでなく、AMPK-RPK 特異的機能阻害剤が、新たな抗 HIV 薬になりうる可能性があり、本研究の目的である、新規エイズ治療法の開発にもつながると考えられる。また、(2) の T リンパ球における HIV 感染制御候補因子群については、エイズ対策研究事業において、基礎および臨床研究者に情報提供することは可能である事から、新たな事業成果を見出すための有効な情報になり得ると考えられる。

近年、インフルエンザの異種間感染や SARS による人的被害の状況を踏まえ、新興・再興および人獣共通感染症に対する適切な予防策を一刻も早く講じる必要性が急務となっており、このことは厚生労働行政の最重要課題の一つであると考えられる。当該研究から同定された宿主制御因子群を公表することで、これらを「バイオロジカルプローブ」として用いた新たなエイズ治療法の確立に寄与する事が出来、この治療法を薬剤併用化学療法と併用することで、薬剤耐性株への効果的な治療法の確立に向けた具体的な議論が可能となる。これらの成果は、様々な病原体に対する種間感染の発展的な解析が可能になるだけでなく、それらの新規予防・治療法の開発に大きく寄与することが予想される。

以上の事から、当該研究を3年間遂行出来たことで、エイズウイルス感染制御宿主因子群を利用した新たなエイズ治療法の基盤確立に向けた情報を集積することが出来た。今後、当該研究で得られた情報を厚生労働省エイズ対策研究事業において新規 HIV 感染制御法の足掛かりとして共有することにより、日本独自の抗 HIV 薬や治療プロトコルの開発にも十分有用であると考えられる。

E. 結論

ゲノムワイドスクリーニング法による HIV 感染制御因子群の探索を目的とした本研究において、世界に先駆けて機能遺伝子発現制御 T リンパ球ライブラリーを樹立し、新たな HIV 感染制御候補因子群を多数見出し、それらに基づく HIV 感染制御因子データベースを構築する事が出来た。その中から機能阻害剤の標的として有効と考えられる AMPK-RPK および ABP を HIV 感染制御因子として同定した。AMPK-RPK は、複数の HIV 感染過程に影響をおよぼすことで、HIV 感染増殖伝播効率に影響をおよぼし、ABP は HIV 特異的吸着・侵

入過程に影響をおよぼす HIV 感染必須因子であるという結果を得た。これらの特異的機能阻害剤は、現在開発中であり、新規エイズ治療法の開発に結びつく重要な成果であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto N., Tsukamoto T., Kawada M., Takeda A., Yamamoto H., **Takeuchi H.**, and Matano T. Broadening of CD8+ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS*. 24(18):2777-87. 2010.
- 2) Inagaki N., **Takeuchi H.**, Yokoyama M., Sato H., Ryo A., Yamamoto H., Kawada M., and Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology*. 7:90. 2010.
- 3) **Takeuchi H***. Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update. *Vaccine*. 28 Suppl 2:B51-4. 2010.
- 4) Sakuma R and **Takeuchi H***. Retroviral Host Cell Factors: APOBEC3G, TRIM5, and Cyclophilins. *HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies* ISBN 978-953-307-665-2:183-196. 2011.
- 5) Sugiyama R., Nishitsuji H., Furukawa A., Katahira M., Habu Y., **Takeuchi H.**, Ryo A., and Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10051-7. 2011.
- 6) Ohmine S., Sakuma R., Sakuma T.,

Thatava T., **Takeuchi H.**, and Ikeda Y. The antiviral spectra of TRIM5 α orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS ONE* 6(1) e16121. 2011.

- 7) **Takeuchi H***, Ishii H., Kuwano T., Inagaki N., Akari H., and Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology*, 9(1):3. 2012.
- 8) Sakuma R and **Takeuchi H***. SIV replication in human cells. *Frontiers in Microbiology*. 3:162. 2012.

* Corresponding author

2. 学会発表

- 1) **武内 寛明**、俣野 哲朗. ヒト細胞におけるサルエイズウイルス感染増殖能を規定するウイルス側領域の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月 7-9 日、徳島)
- 2) **Takeuchi H**, Sakuma R and Yamaoka S. HIV-1 replication is modulated by host AMPK-related protein kinase expression levels in human cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Reroviruses, New York, USA, 2012.
- 3) 武内 寛明、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-1 感染制御因子群の解析. 日本ウイルス学会、2012 年、大阪.
- 4) 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感

染必須因子群の解析. 日本エイズ学会、2012年、横浜.

- 5) 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. 日本エイズ学会、2012年、横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Sakuma R., Takeuchi H	Retroviral Host Cell Factors: APOBEC3s, TRIM5, and Cyclophilins.	Nancy Dumais	<i>HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies</i>	Intech	Croatia	2011	ISBN 978-953-307-665-2: 183-196.

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
Iwamoto N., Tsukamoto T., Kawada M., Takeda A., Yamamoto H., Takeuchi H. , Matano T	Broadening of CD8+ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers	AIDS	24(18)	2777-87	2010
Inagaki N., Takeuchi H. , Yokoyama M., Sato H., Ryo A., Yamamoto H., Kawada M., Matano T	A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins	Retrovirology	7	90	2010
Takeuchi H*	Contribution of Cyclophilin A to the termination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update	Vaccine	28 Suppl 2	B51-4	2010

Sugiyama R., Nishitsuji H., Furukawa A., Katahira M., Habu Y., <u>Takeuchi H.</u> , Ryo A., Takaku H	Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G.	Journal of Biological Chemistry	286(12)	10051-7	2011
Ohmine S., Sakuma R., Sakuma T., Thatava T., <u>Takeuchi H.</u> , Ikeda Y	The antiviral spectra of TRIM5 α orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production.	PLoS ONE	6(1)	e16121	2011
<u>Takeuchi H*</u> , Ishii H., Kuwano T., Inagaki N., Akari H., Matano T	Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication.	Retrovirology	9(1)	3	2012
Sakuma R., <u>Takeuchi H*</u>	SIV replication in human cells.	Frontiers in Microbiology	3	162	2012

Retroviral Host Cell Factors: TRIM5, APOBEC3G and Cyclophilins

Ryuta Sakuma and Hiroaki Takeuchi

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

1.3 TRIM5 α : Fv1-type host factor restricting HIV-1 in primate cells

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

TRIM5 α recognizes incoming viral core, but not a monomeric capsid protein, thorough its B30.2(PRYSPRY) domain. B-box2 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 core into cytoplasm. To restrict HIV-1 infection and to recognize viral core, TRIM5 α must be oligomerized through its B-box 2 and coiled-coil domains. Its RING domain has E3 ubiquitin ligase activity, and self-ubiquitination is occurred, then TRIM5 α is quickly degraded. This quick degradation of TRIM5 α is not necessary for post-entry restriction, since replacement of TRIM5 α RING domain with the corresponding domain of TRIM21 which has lower self-ubiquitination activity and longer half life than TRIM5 α didn't alter the antiviral activity. When TRIM5 α was over expressed, cytoplasmic body is formed, and the cytoplasmic body is supposed to be required for its antiviral activity. During TRIM5 α -mediated post-entry restriction, disassembly of viral core is induced too quickly and the accumulation of viral RT-products is reduced. MG132 treatment inhibits to induce quick-disassembly, but still HIV-1 infectivity was restricted. Two reports showed that TRIM5 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 quick-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. Recently, Pacheco *et al.* reported that new world monkey TRIM5 α restricts foamy virus

infection (Pacheco et al., 2010). Another consideration is the clinical significance of TRIM5 α against acquired immunodeficiency syndrome (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 (Cagliani et al., 2010; van Manen et al., 2008). Thus, TRIM5 α -mediated restriction may occur multi step in retrovirus replication with the relationship between other host factor(s).

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

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

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

1.4 APOBEC: Enzymatic restriction factor that target retroviruses

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Conclusion

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

3. References

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