

3. レトロウイルス Gag タンパク質の膜結合

小野 陽

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School

ウイルス粒子形成が細胞内のどの部位でおこるか、またそれがどのように決定されているかという点は、粒子形成・放出のみならず、細胞間伝播など粒子形成後の過程にも大きく影響するため、ウイルス増殖の理解を深める上でも、また抗ウイルス薬の戦略を考える上でも重要な問題である。レトロウイルスの粒子形成はウイルス構造タンパク質である Gag タンパク質の発現により起こる。HIV-1 の場合、Gag はその N 末端の MA ドメインを介して plasma membrane (PM) に結合・局在し、そこでウイルス粒子を形成する。近年の研究により、この過程には PM 特異的なリン脂質 PI(4,5)P₂ が重要な役割を果たしていることが明らかになって来た。本稿では、HIV-1 や他のレトロウイルスの MA が生体膜のリン脂質とどのように関わっているかについて、最近の知見を含めて紹介する。

はじめに

細胞内情報伝達、膜輸送、細胞骨格制御など多様な細胞機能の過程で、細胞質中の多くのタンパク質が生体膜に結合する。この際に生体膜の一部である酸性リン脂質の多くがタンパク質と膜との結合を直接仲介する因子として重要な役割を果たしていることが知られている¹⁻³⁾。こうした酸性リン脂質に結合するタンパク質には大きく分けて二通りある。一つのタイプはリン脂質の親水性部位を成す headgroup を特異的に認識し結合する構造（モチーフあるいはドメイン）を持つもので、phospholipase C delta 1 の pleckstrin homology (PH) ドメイン (PHPLC δ 1) などが代表例である。PHPLC δ 1 は plasma membrane (PM) に局在する酸性リン脂質 phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate [PI(4,

5)P₂] およびその headgroup に相当する D-myo-inositol 1,4,5 trisphosphate に特異的に結合する^{2,6)}。この脂質特異性のため PHPLC δ 1 は細胞内では PM に局在する。他に特定の脂質の headgroup を認識することでその脂質が含まれるオルガネラに局在するタンパク質ドメインは数多く同定されている。第2のタイプは塩基性アミノ酸クラスターによりリン脂質の酸性 headgroup と非特異的な静電的結合をするもので K-Ras, Src, MARCKS などが含まれる^{2,3)}。これらの多くは myristoylation, palmitoylation, prenylation などの脂肪酸による修飾も受けており、静電的結合と疎水性結合の2つを介して脂質二重層に結合する。近年の研究によりレトロウイルス、特に HIV-1 の Gag タンパク質は、上記2タイプのリン脂質結合タンパク質の特徴を併せ持ちつつ、さらに別のメカニズムで脂質特異性を決定するタンパク質であることが明らかになりつつある。

レトロウイルスの粒子形成はいくつかの構造的ドメインを含む Gag タンパク質の発現により起こる⁷⁻⁹⁾。主要な Gag タンパク質のドメインは matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC) の3つであり (図1)、これらの3ドメインの持つ機能によりウイルス粒子形成過程のほぼ全ての段階（粒子放出を除く）が進行する。N末端の MA ドメインは Gag の膜結合を仲介するほか、ウイルス糖タンパク質 Env の粒子への取り込みを促進する。Gag の膜結合と前後して Gag は多量体化するが、これには C 末端側の2つのドメイン CA と NC が関わっている。CA は Gag

連絡先

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School
Rm. 5736, Medical Science Building II
1150 W. Medical Center Dr.
Ann Arbor, MI 48109, USA
TEL: 734-615-4407
FAX: 734-764-3562
E-mail: akiraono@umich.edu
Homepage: <http://sitemaker.umich.edu/ono.lab/home>

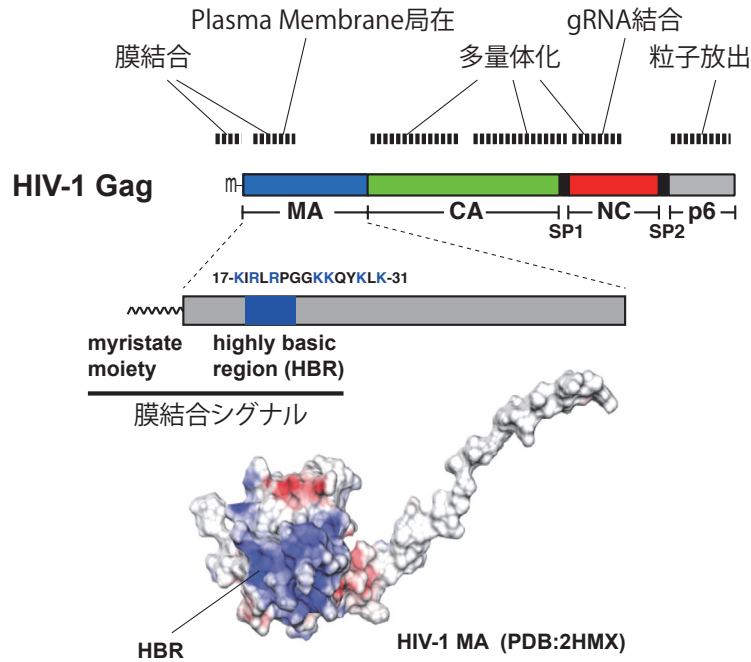


図1 HIV-1 Gagの膜結合シグナル

分子どうしの直接の結合を促進し、NCは共通のRNAに結合することを通して、Gag分子の高度多量体化を可能にすると考えられている。NC中のZinc fingerモチーフによりNCはウイルスゲノムRNAに高い親和性を持って結合するがGagのNC依存的な多量体形成は非ゲノムRNAでも促進される。

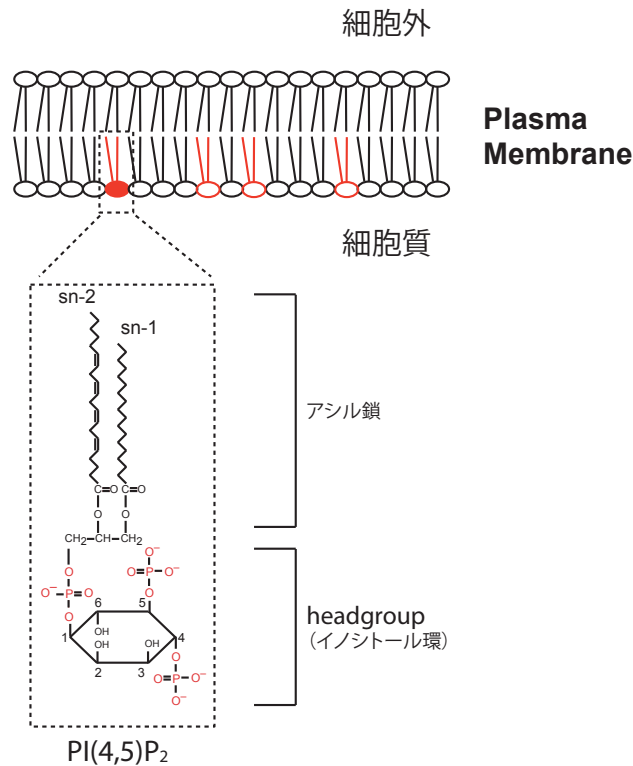
ウイルス粒子形成が細胞内のどの部位で起こるかはウイルス感染サイクル及びその素過程を阻害する抗ウイルス薬の開発を考える上で重要な問題である。なぜなら、ウイルスが正常な細胞内部位で形成されることは粒子形成・放出の効率のみならず、細胞間伝播など粒子形成後の過程に大きく影響するからである。HIV-1の場合、自然宿主の一つであるT細胞を含む多くの細胞では、粒子形成はPM脂質二重層の細胞質側に結合したGagが膜上で多量体化し、続いて出芽することで起こる。マクロファージでは、ウイルス粒子の形成・集積が細胞内部の膜で囲まれた空間で見られるが^{10,11)}、この膜も少なくとも部分的にはPMの一部が深く陥入したもので、PMと同質のものであることが知られている¹²⁻¹⁴⁾。PMでのウイルス粒子形成はGagがPM特異的に局在することによるが、この局在にはMAとPMリン脂質との相互作用が重要な役割を果たしている。本稿ではこの相互作用について近年明らかになりつつあるメカニズムの詳細を紹介する。

MAドメインの膜結合シグナル

Gagの膜結合にはMAドメインのN末端myristoyl化

及び同じくMA内のHighly Basic Region (HBR)の二つのシグナルが必要である(図1)。前者は疎水性結合を通して、後者は酸性リン脂質との結合を通してGagの膜結合を促進する。

いくつかのmyristoyl化されたタンパク質でみられるように、HIV-1 Gagのmyristate moietyはタンパク質分子外に露出(exposed)した状態とタンパク質内に収納(sequestered)された状態の二つの状態をとりうる。一般にこの二つの状態間の移行はmyristoyl switchと呼ばれる¹⁵⁻¹⁹⁾。myristate moietyは露出した時に脂質二重層に挿入されることを通してmyristoyl化されたタンパク質の膜結合を促進すると考えられるので、myristoyl switchはタンパク質の膜結合を制御するメカニズムの一つとして知られている。HIV-1 Gagの場合、myristate moietyの露出はGagの多量体化(trimerなど)あるいはMAとPI(4,5)P₂の結合(後に詳述)の際に起こることがMAのNMR解析により明らかになっている^{20,21)}。一方HIV-2やMason Pfizer Monkey Virus (MPMV)のMAの場合、PI(4,5)P₂の結合はmyristate moietyの露出を誘起しないことが同様の解析で示されている^{22,23)}。myristoyl switchで制御される他のタンパク質(ARF-1¹⁷⁾、c-Abl¹⁶⁾、recoverin^{15,18)}など)と異なり、HIV-1のMAの場合、myristate moietyの露出に大規模な構造変化を必要としない²⁰⁾。したがって実際のウイルス粒子形成過程でGag多量体化やMA-PI(4,5)P₂結合によるmyristoyl switchの誘起がどの程度重要な役割を果たしているかは不明である。実際にNMR²⁴⁾やin silico²⁵⁾の解析で、脂

図2 PI(4,5)P₂

質二重層の存在下では myristate moiety の露出が自発的に起こることが示されている。

HIV-1 MA のもう一つの膜結合シグナルである HBR については、生化学的解析や構造解析の結果に基づき、MA の表面に basic patch を形成して酸性リン脂質とのインターフェイスを作り、酸性リン脂質との結合を通して Gag の膜結合を促進するだろうと当初より考えられて来た²⁶⁻²⁸⁾ (図1)。この考えは変異体の解析結果にも支持されており、例えば、HBR 内に塩基性アミノ酸の変異を導入すると、HIV-1 Gag が PM に結合する代わりに他のオルガネラに局在したり、膜結合せずに細胞質中に拡散したりすることが知られている²⁹⁻³¹⁾。したがって、HBR が Gag を PM に導くのに中心的な役割を果たしているのは明らかである。更なる構造解析により、HIV-1 MA と同様の basic patch は大小の差こそあれ他のレトロウイルスの MA にもあることが明らかになっており³²⁾、また、いくつかのレトロウイルスでは MA 内の塩基性アミノ酸残基の変異により Gag の膜結合が低下したり細胞内局在が変化したりすることが見られている³³⁻³⁹⁾。したがって、塩基性アミノ酸残基を介した酸性リン脂質との結合は myristate moiety を持たないレトロウイルス (たとえば Rous sarcoma virus [RSV] や equine infectious anemia virus [EIAV]) の MA にも共有される Gag 膜結合のメカニズム

であるといえる。PM 脂質二重層の細胞質側 leaflet には phosphatidylserine (PS) や phosphoinositides のような酸性リン脂質が含まれ、負電荷をもつので、正電荷を持つ塩基性アミノ酸残基が MA の膜結合を促進するのは容易に予測される。しかしながら、こうした酸性リン脂質は PM だけでなく、エンドソームやゴルジなど他の生体膜の細胞質側 leaflet にも多く存在するため、PM 特異的な局在を示すレトロウイルスの場合、その MA が PM の脂質に特異性を示す可能性が考えられる。次節に述べるように、HIV-1 Gag の場合、実際にこの可能性が当てはまることが示されている。

Gag の膜結合と細胞内局在における PI(4,5)P₂ の役割

繰り返しになるが HIV-1 Gag は PM に局在し、その結果、HIV-1 の粒子形成は PM で起こる。過去 10 年ほどの研究により、HIV-1 Gag がこのような局在を示すのは HIV-1 の MA HBR が PM 特異的な酸性リン脂質で phosphoinositide の一つである PI(4,5)P₂ と結合することによるということが明らかになって来ている (図2)。HeLa 細胞や T 細胞を用いた解析で polyphosphoinositide 5-phosphatase IV (5ptaseIV) の高発現により細胞の PI(4,5)P₂ を減少させると Gag の PM 結合が阻害され、Gag が細胞質にとどまるか、あるいは核近傍のオルガネラに局在することが観察されて

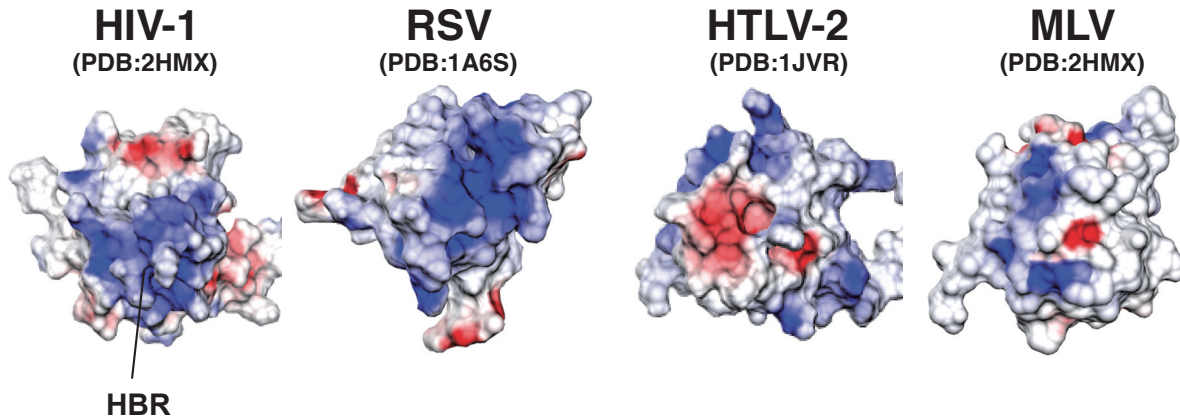


図3 レトロウイルス MA の globular domain 上にある basic patch

いる^{40,41)}。このような細胞では、ウイルス粒子形成・放出も大きく減少する^{34,40-43)}。HIV-2, murine leukemia virus (MLV), MPMV など他のレトロウイルスでも PI(4,5)P₂ の減少によりウイルス粒子形成が阻害されることが見られている^{23,35,38,43)}。しかしながら、すべてのレトロウイルスの粒子形成が PI(4,5)P₂ 依存性であるわけではなく、EIAV³⁴⁾ や human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)⁴⁴⁾ は 5ptaseIV の影響をあまり受けないことが報告されている。RSV の場合、5ptaseIV 感受性・非感受性の解析結果は報告によって異なり^{42,45)}、実験系の違いなどにより結果やその解釈に違いが出る可能性が考えられる。他のレトロウイルスも含めて同一の実験系で比較することはどのウイルスがどの程度 PI(4,5)P₂ 依存性であるかを評価する上で重要であろう。

HIV-1 の MA HBR が phosphoinositide と結合する可能性は inositol polyphosphates が Gag の in vitro assembly に影響を与えるという報告で最初に示唆された⁴⁶⁾。その後、protein footprinting や NMR による解析で、MA HBR が短いアシル鎖を持つ水溶性の PI(4,5)P₂ と直接結合することが示された^{21,47)}。SPR を用いた解析もこれを支持する⁴⁸⁾。さらに、通常長さのアシル鎖を持つ PI(4,5)P₂ を含むリポソームを用いた生化学的解析により、PI(4,5)P₂ がリポソーム中にあると Gag のリポソーム膜への結合を強く促進することが明らかになった^{29,49,50)}。加えて、放出されたウイルス粒子のエンベロープ膜とウイルス産生細胞の PM を比較した lipidome 解析で、前者は後者より多く PI(4,5)P₂ を含み、この現象は MA 依存性であることが示された⁴³⁾。これらの知見を総合すると、HIV-1 の MA HBR が PI(4,5)P₂ と結合することは確かであると考えられる。

Gag-PI(4,5)P₂ 間の結合が静電的結合によってのみ起こるものか、あるいは HBR と PI(4,5)P₂ の間に構造特異的な

関係があるのかについては、多少の議論が存在する。我々を含む複数のグループの報告では、PI(4,5)P₂ を含むリポソームと palmitoyl-oleoyl-PS (POPS) のみを酸性リン脂質として含むリポソームを比較すると、全体の電荷を同等にしても（一分子当たり PI(4,5)P₂ は +3 か +4, PS は +1）、HIV-1 の MA を介した膜結合は前者とのみ効率的に起こることが観察されており、Gag と PI(4,5)P₂ の結合が静電的なものだけによるのではないことが示唆されている^{29,51,52)}。しかし別のグループによる報告では、PI(4,5)P₂ の有無で大きな差は見られず、PS のみを酸性リン脂質として含むリポソームでも相当の Gag 結合が検出された⁴²⁾。ただし、この違いは少なくとも部分的には PS のアシル鎖の違いに起因すると考えられる。実際、同じグループが別の報告で POPS を使ったところ、Gag のリポソーム結合はほとんど検出されなかった⁴⁹⁾（後述）。上記の知見に加えて、我々は、1) PI(4,5)P₂ と PI(3,5)P₂ (headgroup を成すイノシトール環でリン酸残基の位置だけが異なる) を比較すると同じ荷電にもかかわらず前者が後者より効率的に Gag をリポソームに結合させること²⁹⁾、そして、2) HBR 内の Lys と Arg を入れ替えると HBR 全体の電荷は変わらないにもかかわらず Gag の PI(4,5)P₂ 依存性リポソーム膜結合が見られなくなること⁵³⁾ も報告しており、総合すると、静電的結合だけでなく HBR と PI(4,5)P₂ の headgroup の構造に依存的な相互作用が両者の結合に重要な役割を果たしている可能性は高いと考えられる。

リン脂質のアシル鎖による影響

短いアシル鎖を持つ水溶性の PI(4,5)P₂ を用いた前述の NMR 解析では、PI(4,5)P₂ の headgroup が HBR と相互作用するだけでなく、sn-2 のアシル鎖が MA 内の cleft に位置するアミノ酸残基と相互作用することが観察された²¹⁾。この結果に基づき、Saad らは、PI(4,5)P₂ との結合の結果

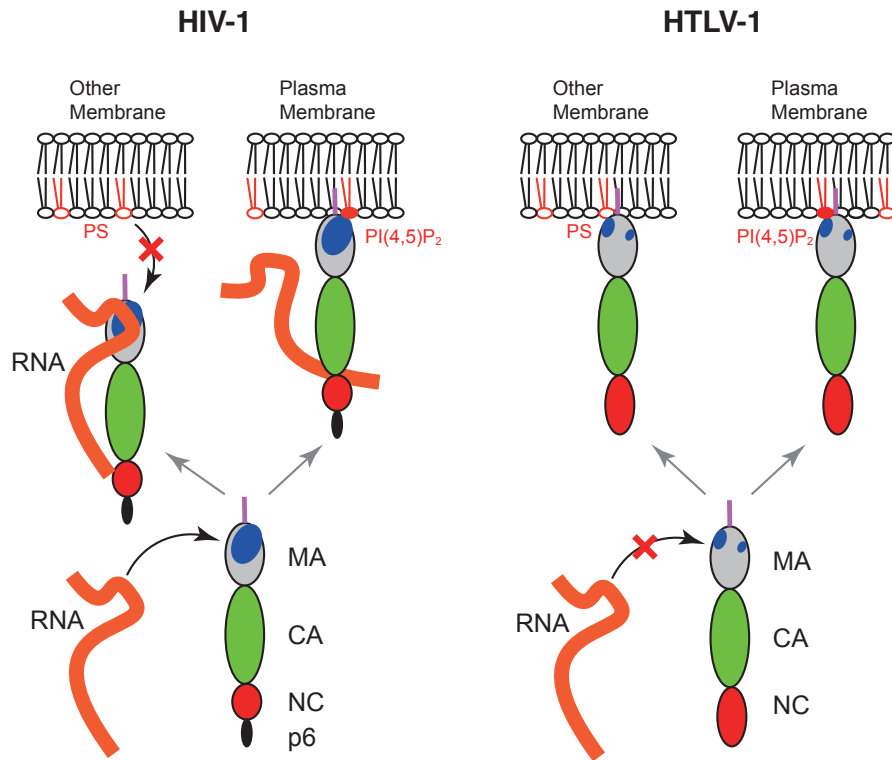


図4 HIV-1 Gag と HTLV-1 Gag の膜結合に対する RNA の影響 (作業仮説)

sn-2 アシル鎖が cleft に収まることは Gag の PM 上での動態に影響を及ぼすという仮説を提示している。一般に細胞に存在する PI(4,5)P₂ の sn-2 アシル鎖は不飽和なものが多く (図 2), lipid raft (ウイルス粒子形成を促進すると考えられている PM の microdomain) とは親和性が低いと考えられている。このことから, 上記の仮説では, Gag が PI(4,5)P₂ と結合する際にその sn-2 アシル鎖を PM 中から引き抜き MA 内に収納することにより, Gag-PI(4,5)P₂ の複合体の lipid raft への移行が促進されると推論されている。しかしながら, giant unilamellar vesicle (GUV) を用いた in vitro の系では, Gag の liquid-ordered phase (lipid raft のモデルとして扱われている) への結合は PI(4,5)P₂ 存在下で見られなかった⁵²⁾。また細胞中に存在する PI(4,5)P₂ のアシル鎖は NMR で使われた PI(4,5)P₂ のものより 2 倍以上長く, 実際に MA 内の cleft に収まるかどうか, また脂質二重層からそのようなアシル鎖を引き抜くのはエネルギー的に可能か (前例はあるが), などの疑問もある。現在のところ, リポソームを使った実験系では, Gag のリポソーム膜結合に対する PI(4,5)P₂ のアシル鎖の影響は検出されておらず⁵⁴⁾, 上記の可能性を支持する生化学的な知見は得られていない。

PI(4,5)P₂ 以外のリン脂質のアシル鎖も脂質二重層の成分によっては Gag の膜結合に大きな影響を及ぼす。酸性リン脂質として PS のみを含むリポソームの系では,

dioleoyl-PS は POPS より高い効率で Gag の膜結合を促進することが示されている⁴⁹⁾。しかし現時点ではこの現象を説明するメカニズムは明らかになっていない。これと関連して, 最近報告された NMR による解析では, PS や中性リン脂質 (phosphatidylcholine [PC], phosphatidylethanolamine などの zwitterionic headgroup を持つもの) のアシル鎖も MA のアミノ酸残基と相互作用することが観察されている²⁴⁾。しかし, この相互作用が Gag の膜結合に関してどのような意義をもつかは明らかになっていない。

Gag の膜結合における MA-RNA 結合の役割

MA 内の塩基性アミノ酸残基はリン脂質に加えて RNA とも結合しうることが, HIV-1 を含むいくつかのレトロウイルスで知られている^{47,55-61)}。HIV-1 MA の RNA との結合はウイルスゲノム RNA の encapsidation に必要ではないが⁶²⁻⁶⁴⁾, RSV や bovine leukemia virus の場合, MA-RNA 間の相互作用はウイルスゲノム RNA の encapsidation や二量体化, mRNA の翻訳制御などに関与していると報告されている⁶⁵⁻⁶⁸⁾。HIV-1 の場合, MA と RNA の間のインターフェースは HBR であり, in vitro の実験系だけでなく^{47,58,60,69,70)}, 細胞質内でも^{50,71)} RNA と結合していることが示されている。我々は同じ HBR がリン脂質とも結合することから, RNA が Gag の膜結合を制御するというモデルを提示して来た。実際, rabbit reticulocyte lysate (RRL)

を使って *in vitro* 合成した HIV-1 Gag は、通常 PC と POPS からなるリポソーム (PC+PS) に結合しないが、Gag を含む lysate を RNase 処理すると Gag が効率よくリポソーム膜に結合するようになる⁵⁰⁾。この現象は NC ドメインを欠損した Gag 変異体でも見られる⁵⁰⁾。これらの結果から、RNA は MA に結合することで PS などの酸性リン脂質に MA が結合するのを阻害していると考えられる。一方 PI(4,5)P₂ を含むリポソームの場合、RNase 処理していない Gag でも膜結合は見られるので、膜に PI(4,5)P₂ が含まれている場合には Gag は RNA による膜結合阻害を乗り越えることができると考えられる。同様の結論は他のグループによる精製した MA や核酸を使った系でも得られている⁵⁴⁾。PI(4,5)P₂ と RNA が MA HBR への結合で競合した場合、前者が勝ることが間接的に示めされており^{69,72)}、RNA の膜結合阻害効果が PI(4,5)P₂ の有無で異なるのはこのためであろう。特筆すべきことに PS は細胞内に最も豊富にある酸性リン脂質であり、PM だけでなくエンドソーム・ゴルジなどの細胞内オルガネラにも存在する⁷³⁻⁷⁵⁾。したがって、RNA は、結果的に Gag が非特異的に細胞内オルガネラに結合するのを防ぎ、PI(4,5)P₂ を含む生体膜 (つまり PM) に選択的に結合するのを助ける cofactor のような役割を果たしていることになる (図 4)。HIV-1 を発現している細胞質に由来する Gag も RRL で *in vitro* 合成した Gag と同じ性質を示すことから⁷¹⁾、上記のような役割を果たす RNA は細胞内に実際存在していると考えられる。RNase 処理した Gag の膜結合は細胞質中の濃度より低濃度の tRNA を加えることで再び阻害されることが我々の PC+PS リポソームの系で明らかになった⁷¹⁾。したがって、cofactor の役割を果たす RNA は tRNA である可能性がある。

興味深いことに、RRL で合成した HTLV-1 Gag の膜結合を調べると HIV-1 の MA と異なり、HTLV-1 の Gag は PI(4,5)P₂ 非存在下でも高い効率で PC+PS リポソームに結合し、この結合に RNase 処理を必要としないことが明らかになった⁴⁴⁾。同様の実験系ではさらに、RSV は HIV-1 と同様の PI(4,5)P₂ 依存性及び RNA 阻害に対する感受性を示す一方、MLV は HTLV-1 と同様に PI(4,5)P₂ 非依存的かつ RNA 阻害を受けないことが示された (*in revision*)。これと呼応して、HeLa 細胞内では、HIV-1 及び RSV の Gag は PM にのみ局在するのに対し、MLV と HTLV-1 の Gag は PM だけでなく細胞内オルガネラにも分布することが明らかになった (*in revision*)。これらの結果を総合すると、レトロウイルスの MA には PI(4,5)P₂ 依存・RNA 阻害感受性のタイプと PI(4,5)P₂ 非依存・RNA 阻害非感受性のタイプがあり、この違いが細胞内局在のパターンに大きな違いをもたらすと考えられる。

MA の PI(4,5)P₂ や RNA との関わり方は HeLa 細胞内での局在に影響を及ぼすが、最終的な粒子形成・放出効率に

については少なくともこの細胞では HIV-1 と HTLV-1 の間に大きな違いは見られない⁴⁴⁾。それでは HIV-1 の PI(4,5)P₂ 依存性にはどのような意味があるのでしょうか。MA の構造を比較すると、HIV-1 と RSV には比較的大きな basic patch が見られるのに対し、HTLV-2 (HTLV-1 の構造は決定されていない) や MLV では小さな basic patch が MA 表面上の数カ所に散らばって存在しているように見える³²⁾ (図 3)。酸性アミノ酸残基を塩基性のものに置換することにより HTLV-1 の MA において basic patch の一つを拡大することを試みると、この変異体は RNA 阻害に感受性を示すようになった (*in revision*)。しかしこの変異体は PI(4,5)P₂ 存在下でも RNase 処理しない限りリポソームに結合することはできなかった。これらの結果に基づいて推察すると、大きな basic patch をもつ HIV-1 や RSV は RNA による阻害に対応するために PI(4,5)P₂ を利用する機能を獲得し、その結果として PM 特異的に局在する能力を得た可能性が考えられる。一方、HTLV-1 や MLV は basic patch が小さいために RNA による阻害を受けず、PI(4,5)P₂ を利用する必要がないのかもしれない (図 4)。この場合、RNA は前述のような MA の cofactor ではなく、ある程度以上の大きさを持つ basic patch に対する general な阻害因子であると考えることができよう。

おわりに

上述の通り、レトロウイルスの Gag の膜結合には Gag の myristate moiety 付加・露出、HBR と酸性リン脂質の相互作用、RNA による HBR の阻害など様々な要因が影響することが明らかになりつつある。一方で、リン脂質のアシル鎖の役割、阻害作用を持つ RNA の特徴、異なる細胞種でのこれらの因子の働きなど、不明の点も依然として多く存在する。これらの点を明らかにすることは、RNA aptamer⁶¹⁾ や低分子化合物^{76,77)} による Gag の膜結合阻害剤の開発を進めていくうえで大きな貢献となるのではないかと期待している。

謝辞

最後になりましたが、本稿を執筆する機会を与えてくださった松浦善治先生に心より感謝いたします。

校正時加筆

本文中で (*in revision*) とした知見は現在すでに論文として発表されています⁷⁸⁾。また、最近 Bieniasz らによって、細胞内で MA と結合している RNA は実際に tRNA であることが示されました⁷⁹⁾。最後に本稿は我々の最近の英文総説⁸⁰⁾ と内容的に重複する部分があることをおことわり致します。

文献

- 1) Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. Nature reviews. Molecular cell biology 9, 99-111, 2008.
- 2) McLaughlin, S. & Murray, D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. Nature 438, 605-611, 2005.
- 3) McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. & Murray, D. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. Annual review of biophysics and biomolecular structure 31, 151-175, 2002.
- 4) Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B. & Schlessinger, J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 10472-10476, 1995.
- 5) Garcia, P. *et al.* The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. Biochemistry 34, 16228-16234, 1995.
- 6) Kavran, J. M. *et al.* Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. The Journal of biological chemistry 273, 30497-30508, 1998.
- 7) Balasubramaniam, M. & Freed, E. O. New insights into HIV assembly and trafficking. Physiology (Bethesda) 26, 236-251, 2011.
- 8) Bieniasz, P. D. The cell biology of HIV-1 virion genesis. Cell Host Microbe 5, 550-558, 2009.
- 9) Sundquist, W. I. & Krausslich, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2, a006924, 2012.
- 10) Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. & Marsh, M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. The Journal of cell biology 162, 443-455, 2003.
- 11) Raposo, G. *et al.* Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. Traffic 3, 718-729, 2002.
- 12) Bennett, A. E. *et al.* Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. PLoS pathogens 5, e1000591, 2009.
- 13) Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. & Marsh, M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. The Journal of cell biology 177, 329-341, 2007.
- 14) Welsch, S. *et al.* HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. PLoS pathogens 3, e36, 2007.
- 15) Tanaka, T., Ames, J. B., Harvey, T. S., Stryer, L. & Ikura, M. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. Nature 376, 444-447, 1995.
- 16) Nagar, B. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. Cell 112, 859-871, 2003.
- 17) Goldberg, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. Cell 95, 237-248, 1998.
- 18) Ames, J. B. *et al.* Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. Nature 389, 198-202, 1997.
- 19) McLaughlin, S. & Aderem, A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. Trends Biochem Sci 20, 272-276, 1995.
- 20) Tang, C. *et al.* Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 517-522, 2004.
- 21) Saad, J. S. *et al.* Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11364-11369, 2006.
- 22) Prchal, J., Srb, P., Hunter, E., Ruml, T. & Hrabal, R. The structure of myristoylated Mason-Pfizer monkey virus matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in its membrane binding. Journal of molecular biology 423, 427-438, 2012.
- 23) Saad, J. S. *et al.* Structure of the myristoylated human immunodeficiency virus type 2 matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in membrane targeting. Journal of molecular biology 382, 434-447, 2008.
- 24) Vlach, J. & Saad, J. S. Trio engagement via plasma membrane phospholipids and the myristoyl moiety governs HIV-1 matrix binding to bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 3525-3530, 2013.
- 25) Charlier, L. *et al.* Coarse-grained simulations of the HIV-1 matrix protein anchoring: revisiting its assembly on membrane domains. Biophysical journal 106, 577-585, 2014.
- 26) Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W. & Resh, M. D. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. J Virol 68, 2556-2569, 1994.
- 27) Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M. & Sundquist, W. I. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 3099-3104, 1996.
- 28) Massiah, M. A. *et al.* Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. Journal of molecular biology 244, 198-223, 1994.
- 29) Chukkapalli, V., Hogue, I. B., Boyko, V., Hu, W. S. & Ono, A. Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding. J Virol 82, 2405-2417, 2008.
- 30) Ono, A., Orenstein, J. M. & Freed, E. O. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. J Virol 74, 2855-2866, 2000.
- 31) Yuan, X., Yu, X., Lee, T. H. & Essex, M. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular trans-

- port of the Gag precursor. *J Virol* 67, 6387-6394, 1993.
- 32) Murray, P. S. *et al.* Retroviral matrix domains share electrostatic homology: models for membrane binding function throughout the viral life cycle. *Structure (Camb)* 13, 1521-1531, 2005.
 - 33) Callahan, E. M. & Wills, J. W. Repositioning basic residues in the M domain of the Rous sarcoma virus gag protein. *J Virol* 74, 11222-11229, 2000.
 - 34) Fernandes, F. *et al.* Phosphoinositides Direct Equine Infectious Anemia Virus Gag Trafficking and Release. *Traffic* 12, 438-451, 2011.
 - 35) Hamard-Peron, E. *et al.* Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4,5)P2/PS and a polybasic region in the matrix. *J Virol* 84, 503-515, 2010.
 - 36) Manrique, M. L., Celma, C. C., Gonzalez, S. A. & Affranchino, J. L. Mutational analysis of the feline immunodeficiency virus matrix protein. *Virus Res* 76, 103-113, 2001.
 - 37) Soneoka, Y., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. Mutagenesis analysis of the murine leukemia virus matrix protein: identification of regions important for membrane localization and intracellular transport. *J Virol* 71, 5549-5559, 1997.
 - 38) Stansell, E. *et al.* Basic residues in the Mason-Pfizer monkey virus gag matrix domain regulate intracellular trafficking and capsid-membrane interactions. *J Virol* 81, 8977-8988, 2007.
 - 39) Le Blanc, I., Rosenberg, A. R. & Dokhelar, M. C. Multiple functions for the basic amino acids of the human T-cell leukemia virus type 1 matrix protein in viral transmission. *J Virol* 73, 1860-1867, 1999.
 - 40) Monde, K., Chukkapalli, V. & Ono, A. Assembly and replication of HIV-1 in T cells with low levels of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *J Virol* 85, 3584-3595, 2011.
 - 41) Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. & Freed, E. O. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14889-14894, 2004.
 - 42) Chan, J., Dick, R. A. & Vogt, V. M. Rous sarcoma virus gag has no specific requirement for phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate for plasma membrane association in vivo or for liposome interaction in vitro. *J Virol* 85, 10851-10860, 2011.
 - 43) Chan, R. *et al.* Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol* 82, 11228-11238, 2008.
 - 44) Inlora, J., Chukkapalli, V., Derse, D. & Ono, A. Gag Localization and Virus-like Particle Release Mediated by the Matrix Domain of Human T-Lymphotropic Virus Type-1 Gag are Less Dependent on Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate than Those Mediated by the Matrix Domain of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Gag. *J Virol*, 2011.
 - 45) Nadaraia-Hoke, S., Bann, D. V., Lochmann, T. L., Gudleski-O'Regan, N. & Parent, L. J. Alterations in the MA and NC domains modulate phosphoinositide-dependent plasma membrane localization of the Rous sarcoma virus Gag protein. *J Virol* 87, 3609-3615, 2013.
 - 46) Campbell, S. *et al.* Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10875-10879, 2001.
 - 47) Shkriabai, N. *et al.* Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. *Biochemistry* 45, 4077-4083, 2006.
 - 48) Anraku, K. *et al.* Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry* 49, 5109-5116, 2010.
 - 49) Dick, R. A., Goh, S. L., Feigenson, G. W. & Vogt, V. M. HIV-1 Gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18761-18766, 2012.
 - 50) Chukkapalli, V., Oh, S. J. & Ono, A. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1600-1605, 2010.
 - 51) Carlson, L. A. & Hurley, J. H. In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16928-16933, 2012.
 - 52) Keller, H., Krausslich, H. G. & Schulle, P. Multimerizable HIV Gag derivative binds to the liquid-disordered phase in model membranes. *Cellular microbiology* 15, 237-247, 2013.
 - 53) Llewellyn, G. N., Grover, J. R., Olety, B. & Ono, A. HIV-1 Gag associates with specific uropod-directed microdomains in a manner dependent on its MA highly basic region. *J Virol* 87, 6441-6454, 2013.
 - 54) Alfadhli, A., Still, A. & Barklis, E. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *J Virol* 83, 12196-12203, 2009.
 - 55) Chang, C. Y. *et al.* HIV-1 matrix protein repositioning in nucleocapsid region fails to confer virus-like particle assembly. *Virology* 378, 97-104, 2008.
 - 56) Cimarelli, A. & Luban, J. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* 73, 5388-5401, 1999.
 - 57) Hears, A. C., Wagstaff, K. M., Piller, S. C. & Jans, D. A. The N-terminal basic domain of the HIV-1 matrix protein does not contain a conventional nuclear localization sequence but is required for DNA binding and protein self-association. *Biochemistry* 47, 2199-2210, 2008.
 - 58) Lochrie, M. A. *et al.* In vitro selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic acids research* 25, 2902-2910, 1997.
 - 59) Ott, D. E., Coren, L. V. & Gagliardi, T. D. Redundant roles for nucleocapsid and matrix RNA-binding sequences in human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* 79, 13839-13847, 2005.
 - 60) Purohit, P., Dupont, S., Stevenson, M. & Green, M. R.

- Sequence-specific interaction between HIV-1 matrix protein and viral genomic RNA revealed by in vitro genetic selection. *Rna* 7, 576-584, 2001.
- 61) Ramalingam, D. *et al.* RNA aptamers directed to human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein bind to the matrix and nucleocapsid domains and inhibit virus production. *J Virol* 85, 305-314, 2011.
 - 62) Poon, D. T., Li, G. & Aldovini, A. Nucleocapsid and matrix protein contributions to selective human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA packaging. *J Virol* 72, 1983-1993, 1998.
 - 63) Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. & Gottlinger, H. G. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *The EMBO journal* 17, 2699-2708, 1998.
 - 64) Wang, C. T., Zhang, Y., McDermott, J. & Barklis, E. Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. *J Virol* 67, 7067-7076, 1993.
 - 65) Garbitt, R. A., Albert, J. A., Kessler, M. D. & Parent, L. J. trans-acting inhibition of genomic RNA dimerization by Rous sarcoma virus matrix mutants. *J Virol* 75, 260-268, 2001.
 - 66) Gudleski, N., Flanagan, J. M., Ryan, E. P., Bewley, M. C. & Parent, L. J. Directionality of nucleocytoplasmic transport of the retroviral gag protein depends on sequential binding of karyopherins and viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9358-9363, 2010.
 - 67) Parent, L. J. *et al.* RNA dimerization defect in a Rous sarcoma virus matrix mutant. *J Virol* 74, 164-172, 2000.
 - 68) Wang, H., Norris, K. M. & Mansky, L. M. Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging. *J Virol* 77, 9431-9438, 2003.
 - 69) Alfadhli, A. *et al.* HIV-1 matrix protein binding to RNA. *Journal of molecular biology* 410, 653-666, 2011.
 - 70) Cai, M., Huang, Y., Craigie, R. & Clore, G. M. Structural basis of the association of HIV-1 matrix protein with DNA. *PLoS One* 5, e15675, 2010.
 - 71) Chukkappalli, V., Inlora, J., Todd, G. C. & Ono, A. Evidence in support of RNA-mediated inhibition of phosphatidylserine-dependent HIV-1 Gag membrane binding in cells. *J Virol* 87, 7155-7159, 2013.
 - 72) Jones, C. P., Datta, S. A., Rein, A., Rouzina, I. & Musier-Forsyth, K. Matrix domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity via inositol phosphate binding. *J Virol* 85, 1594-1603, 2011.
 - 73) Yeung, T. *et al.* Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319, 210-213, 2008.
 - 74) Stace, C. L. & Ktistakis, N. T. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 913-926, 2006.
 - 75) Leventis, P. A. & Grinstein, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39, 407-427, 2010.
 - 76) Alfadhli, A. *et al.* Analysis of small molecule ligands targeting the HIV-1 matrix protein-RNA binding site. *The Journal of biological chemistry* 288, 666-676, 2013.
 - 77) Tateishi, H. *et al.* Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for the HIV-1 MA domain. *Organic & biomolecular chemistry* 12, 5006-5022, 2014.
 - 78) Inlora, J., Collins, D. R., Trubin, M. E., Chung, J. Y. & Ono, A. Membrane Binding and Subcellular Localization of Retroviral Gag Proteins Are Differentially Regulated by MA Interactions with Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate and RNA. *mBio* 5, 2014.
 - 79) Kutluay, S. B. *et al.* Global Changes in the RNA Binding Specificity of HIV-1 Gag Regulate Virion Genesis. *Cell* 159, 1096-1109, 2014.
 - 80) Olety, B. & Ono, A. Roles played by acidic lipids in HIV-1 Gag membrane binding. *Virus Res* 193, 108-115, 2014.

Membrane Binding of Retroviral Gag Proteins

Akira ONO

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School

Location of virus assembly in infected cells has major influences on efficiencies of virus assembly and release and on post-assembly processes including cell-to-cell transmission. Therefore, for better understanding of virus spread and for developing new antiviral strategies, it is important to elucidate mechanisms by which the subcellular site of virus particle assembly is determined. Retrovirus particle assembly is driven by viral structural protein Gag. In the case of HIV-1, Gag binds to the plasma membrane (PM) via the N-terminal MA domain and forms nascent particles at this location. Recent studies revealed that PM-specific phospholipid PI(4,5)P₂ plays an important role in directing Gag to the PM through its interaction with MA. In this review, I will summarize our current understanding of relationships between retroviral MA domains and phospholipids in cellular membranes and discuss possible mechanisms by which lipids and other factors regulate membrane binding and subcellular localization of retroviral Gag proteins.