

特集：HIV 複製研究の最前線

HIV 粒子形成機構
HIV Particle Assembly

森川 裕子

Yuko MORIKAWA

北里大学北里生命科学研究所・大学院感染制御科学府

Kitasato Institute for Life Sciences and Graduate School for Infection Control,
Kitasato University

HIV ゲノムは両末端 LTR に挟まれて *gag*, *pol*, *env* と呼ばれる 3 つの主要な構造遺伝子を持ち, *gag* 遺伝子領域からは粒子の主構造蛋白である Gag 蛋白が, *pol* 遺伝子領域からは酵素群 (プロテアーゼ, 逆転写酵素, インテグラーゼ) が, *env* 遺伝子領域からはエンベロップ蛋白が合成される。Gag 蛋白は蛋白合成に伴ってアミノ末端にミリスチン酸と呼ばれる長鎖脂肪酸の 1 つが付加される。このアミノ末端ミリスチル化に依存して Gag 蛋白は膜に結合し, アセンブリーすなわち多量体形成によりウイルス粒子を形成して出芽する。膜に結合できない変異 Gag 蛋白は粒子を産生できない。一方, GagPol 蛋白は Gag 蛋白合成時にリボゾーム上での読み枠のフレームシフトにより 1 : 10-20 の分子比で合成され, Gag 蛋白とともに粒子に入ってくる。HIV 粒子は出芽に伴ってあるいはその直後に HIV 自身のプロテアーゼによりプロセッシング (特異的な部位での切断のこと) を受け, 感染性をもつ HIV となる。

HIV 粒子形成の概要をほぼ決めてしまうのは Gag 蛋白である。それは Gag 蛋白が単独発現で未成熟型と呼ばれる HIV 粒子と酷似した Gag 粒子を産生できるからである。こうした理由から, HIV 粒子形成の研究は Gag 蛋白を主軸に展開されている。本稿では Gag 蛋白の細胞内輸送と宿主因子について, 筆者らの内容も交えながら近年の研究を紹介する。

1. HIV Gag 蛋白の構造と機能

HIV Gag 蛋白はアミノ末端より, MA-CA-(p2)-NC-(p1)-p6 の順で 4 つドメインが並ぶポリプロテインである (p2 と p1 は短いスペーサーペプチドである)。MA/p17 は膜との親和性を, CA/p24 は Gag 蛋白の多量体形成を, NC はウイルスゲノム RNA のパッケージングを, p6 は粒子出芽を決定する領域である。これらのドメイン個々の構造は

NMR や X 線結晶構造解析で明らかになっているが¹⁻⁴, ポリプロテインの構造は決定されていない (図 1 左)。これらドメインについて簡単に概説すると, ① MA/p17 はヘリックスに富む球状構造物で, 細胞膜と面する領域にはミリスチル基と塩基性アミノ酸が集中する。ミリスチル基は膜の脂質と疎水結合し, 塩基性アミノ酸群は膜の陰性荷電と電気的に結合していると考えられている。3 量体を形成することが構造解析でも明らかとなっている¹。② CA/p24 は構造的にアミノ末端側²とカルボキシル末端側の 2 つの独立したドメインに分けられる³。アミノ末端側ドメインは 6 量体を形成し⁴, カルボキシル末端側ドメインは 2 量体³を形成することが示されている。6 量体ユニットどうしの間で 2 量体が形成されるため, キャプシドはフラレン様構造⁵をとることになる。アミノ末端側ドメインに存在するループ部分にはサイクロフィリン A が結合する⁶。もう 1 つの小さなループ部分へ TRIM5 α が結合する可能性が示唆されている。③ NC/p7 は比較的ほどこけた構造をとり, 2 つのジンクフィンガーモチーフをもつ。ゲノム RNA との結合領域であり, パッケージングを行なう。④ p6 はエンドソーム輸送経路の宿主因子 TSG101^{7,8} や AIP1/ALIX と結合し⁹, 粒子出芽を制御する。Vpr との結合も知られている。

2. HIV 粒子形成と宿主因子

1. 粒子出芽と Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)

近年の大発見は粒子出芽に関する宿主因子が同定されたことである。その昔, 粒子形成に必要な Gag 蛋白領域を決定する目的で, Gag 蛋白のカルボキシル末端からアミノ酸を削除していく実験が行なわれた。すると不思議なことに, p6 のアミノ末端近傍にある PTAP 配列を削除すると, 粒子出芽が途中で停止する現象が観察された¹⁰。この理由は長らく不明であったが, このペプチドモチーフを bait として酵母 Two Hybrid 法で結合する宿主因子が探索された

著者連絡先: 〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1 北里大学北里生命科学研究所・大学院感染制御科学府

2008 年 2 月 19 日受付

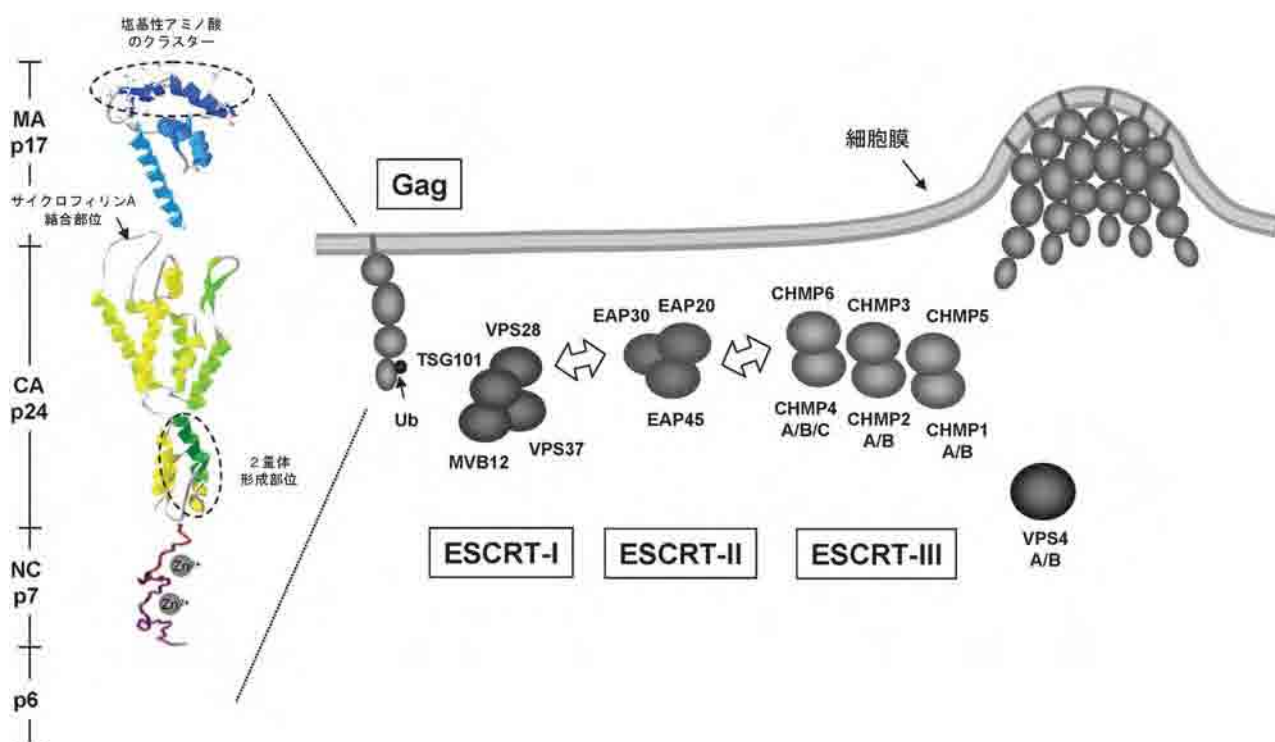


図 1 Gag 蛋白の構造と粒子出芽機構

Gag 蛋白は MA, CA, NC, p6 の 4 つのドメインからなる。p6 に ESCRT-I 複合体 (TSG101, VPS28, VPS37, MVB12) の TSG101 が結合すると, ESCRT-II 複合体 (EAP20, EAP30, EAP45), 続いて ESCRT-III 複合体 (CHMP1-6) が呼び込まれ, 出芽がおこる。この時のエネルギーは ATPase 活性をもつ VPS4 から供給される。

ころ, 後期エンドソームへの輸送に関連する分子群 ESCRT の 1 つである TSG101 が同定されたのである^{7,8)}。類似の配列モチーフ (PSAP, PPXY) が他のレトロウイルス, またエボラウイルスや水泡性口炎ウイルスの M 蛋白でも見つかかり, 驚いたことに, ① これら配列モチーフをアミノ酸置換すると HIV の場合と同じように粒子出芽ができなくなる。② それらの配列モチーフは異種ウイルス間で交換でき, しかもその挿入部位ですら交換可能である¹¹⁾。③ この配列モチーフがなくても TSG101 が膜にリクルートできれば粒子が出芽できることが判明した¹²⁾。さらにこの酵母 Two Hybrid 法を駆使して Gag 蛋白が結合する ESCRT 分子群と ESCRT 分子群どうしの結合が網羅的に調べられた結果, 細胞生物学の研究で判明していた相互作用マップをはるかに超えた詳細なマップが解明されたのである¹³⁾ (図 1 右)。それによると, ESCRT 分子群は ESCRT-I, II, III に分けられるが, ① Gag 蛋白は ESCRT-I 複合体 (TSG101, VPS28, VPS37, MVB12) の 1 分子である TSG101 と結合する。② ESCRT-I 複合体が ESCRT-II 複合体 (EAP20, EAP30, EAP45) をリクルートする。③ この ESCRT-II 複合体はさらに ESCRT-III 複合体 (CHMP1-6) をリクルートす

る。④ ESCRT-I と ESCRT-III を橋渡す AIP1/ALIX 分子とも Gag 蛋白は結合すること⁹⁾ が明らかとなった (図 2)。宿主細胞の cargo 蛋白は後期エンドソームで ESCRT-I と結合することが引き金となり, 最終的にエンドソーム内に取り込まれる。脂質二重膜に包まれたウイルス粒子の出芽はこうした宿主細胞機構を利用しているらしいと考えられる。

しかし, 出芽に関する宿主因子は ESCRT だけではないらしい。「p6 の PTAP 配列を削除すると粒子出芽が停止するという観察から TSG101 が発見された」と上述したが, この PTAP 配列削除による出芽停止という現象を見いだした同じ著者が「Vpu を欠損させても, またインターフェロン α 処理によっても, 奇妙なことに出芽停止現象 (ただしこちらの粒子のほうが成熟型である) が観察される」と報告していた¹⁴⁾。これも長年解明されないうでいたが, 本年始め別のグループより, インターフェロン α によって発現誘導される膜蛋白 CD317 (著者らは Tetherin と命名) が, Vpu 削除によって観察される出芽停止の責任宿主因子であると突き止められた¹⁵⁾ (図 2)。Vpu はこの宿主因子に拮抗するらしく, その点では Vif と APOBEC の関係に似て

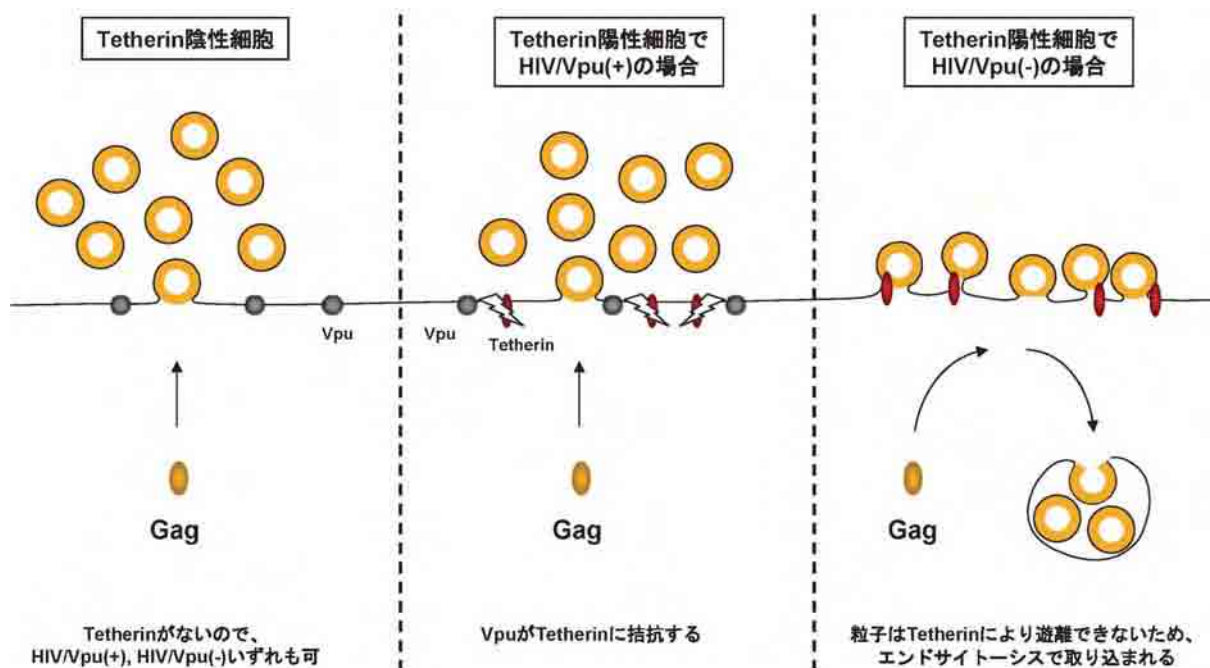


図 2 CD317/Tetherin による粒子遊離阻害と Vpu による解除

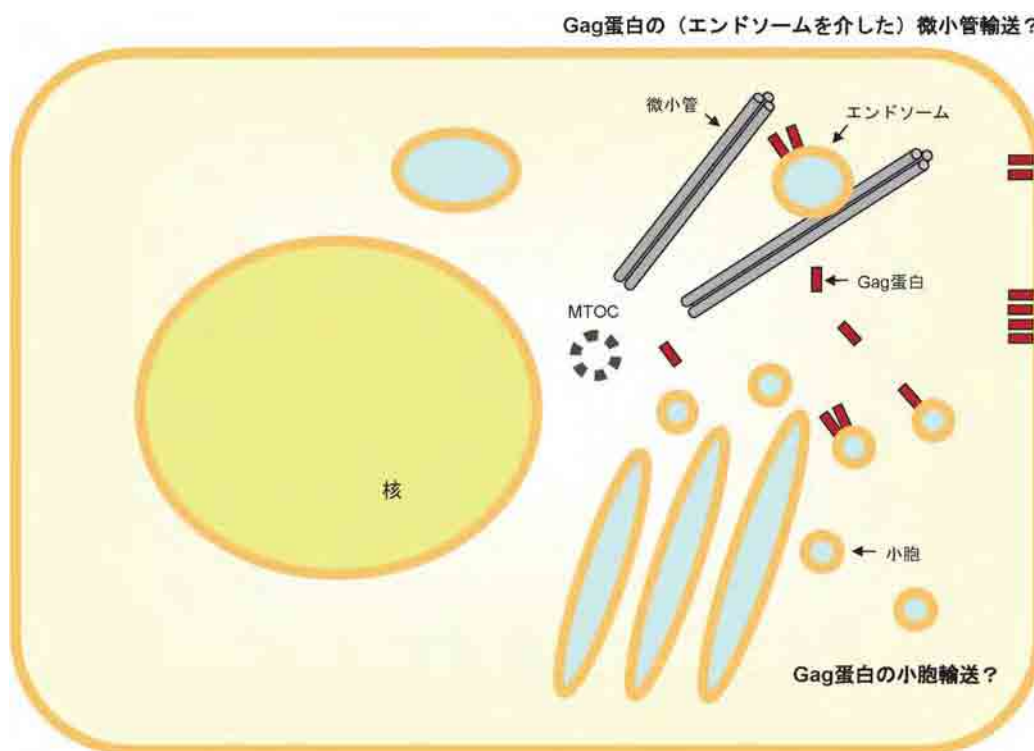


図 3 Gag 蛋白の細胞内輸送機構 (仮説)

いる。

2. Gag 蛋白の形質膜ターゲティングとエンドソーム
「レンチウイルスや C 型レトロウイルスの Gag 蛋白は、

cytosol で合成された後、形質膜にターゲティングし、その形質膜直下で多量体を形成しながら粒子を出芽する」というのが定説である。しかし上述したように、HIV の粒子出

芽にエンドソーム経路の蛋白が関与していたという事実と、Gag 蛋白の細胞内輸送をタイムラプスなどで経時的に調べると「cytosol で合成された後、核近傍の CD63 陽性領域（エンドソームと考えられる）に局在してから形質膜にターゲティングしている」という観察^{16,17)}から、Gag 蛋白はまずエンドソームにターゲティングし、次に形質膜に達するとの考えが提唱された。しかし最近ではこの説がまた否定されそうである。というのは、このような解析に用いていたのは Gag/Gag-GFP 発現プラスミドであり、Vpu を欠損している。こうした Gag 発現プラスミドを用いると、細胞によっては、形質膜にターゲティングした Gag 蛋白はエンドサイトーシスされ、Vpu が共存するとこのエンドサイトーシスが抑制されることが示されたからである¹⁸⁾ (図2)。どうも Gag 蛋白は基本的に形質膜ターゲティングの性状をもつらしいが¹⁹⁾、しかし、核外輸送されたゲノム RNA が微小管形成中心 MTOC (中心体で微小管の一端が付着している) で Gag 蛋白と結合し形質膜へ輸送される²⁰⁾と報告したものもあり、このエンドソームと思われた核近傍での Gag 蛋白集積は微小管形成中心 MTOC を見ていたのかもしれない。

HIV の標的細胞はマクロファージと T リンパ球である。電子顕微鏡で観察すると、マクロファージではエンドソームのように見える細胞内空胞に粒子が出芽しているのに対し、T リンパ球や HeLa 細胞ではもっぱら形質膜から出芽している像が認められる。こうした観察から、細胞の種類により粒子出芽の場が異なり、マクロファージでは細胞内空胞に出芽した HIV 粒子が刺激によりエクソサイトーシスされるのではないかと考えられた^{21,22)}。ところが近年、このマクロファージを膜非透過性の色素で染めると、形質膜とともに粒子が蓄積した細胞内空胞も染色されたことから、エンドソームのように見えた空胞は実は形質膜とつながっていることが明らかとなった^{23,24)}。現在では、この粒子を蓄積していた空胞は仮足によってできた窩の部分であると考えられており、マクロファージでも粒子は形質膜から出芽し、出芽粒子はこうした窩に隠れているとの考察がなされている。しかし HIV 慢性感染細胞では時に、大きな細胞内空胞に膨大な数の粒子を蓄積している像が観察される。筆者らは HIV 慢性感染細胞やひょっとしたら潜伏感染細胞が活性化する過程ではこうした細胞内空胞への粒子蓄積が観察されるのではないかと考え、T リンパ球系と単球系の HIV 潜伏感染細胞を TNF- α で刺激し解析した。しかし、いずれの細胞でも形質膜からの粒子出芽が認められたが、細胞内における出芽像は観察されなかった (未発表)。

ではこうした Gag 蛋白の形質膜ターゲティングを規定するものは何なのか？ Gag 蛋白が膜に結合するか否か

はアミノ末端のミリストイル基と MA/p17 の塩基性アミノ酸によって規定されている。古くはこのミリストイル基に対するレセプターが形質膜内側に存在するのではないかととも言われたが、その存在はなさそうである。むしろミリストイル基は脂質ラフトなどに親和すると考える方がもっともらしい。脂質ラフトの主な構成成分はスフィンゴ糖脂質やコレステロールであるが、イノシトールリン脂質や複合糖質等をも含み、近年 Gag 蛋白の MA ドメインがこの1つであるホスファチジルイノシトールリン酸の PI (4, 5) P2 に選択的に結合することが示された²⁵⁾。ホスファチジルイノシトールリン酸は、PI (4, 5) P2 と PI (3, 4, 5) P3 が形質膜、PI (3) P が初期エンドソーム、PI (3, 5) P2 が後期エンドソーム、PI (4) P がゴルジ装置と分布しているが、この PI (4, 5) P2 の形質膜局在が Gag 蛋白の形質膜輸送を規定しているとの報告があり²⁶⁾、なるほどと納得できる。

Gag 蛋白のミリストイル化は膜結合に必須であり、人工的なアミノ酸置換によりミリストイル化されなくした Gag 蛋白は形質膜にターゲティングできず、粒子を産生できないことがよく知られている。筆者らはこうした Gag 蛋白のミリストイル化/非ミリストイル化と粒子形成機能を解析する目的で、ミリストイル化と非ミリストイル化の Gag 蛋白を共発現させる実験を行なったところ、この非ミリストイル化 Gag 蛋白は、①ミリストイル化 Gag 蛋白とのアセンブリーにより膜画分に入り、多量体形成により粒子にも取り込まれる。②しかし形質膜からの粒子出芽の時点でドミナントに阻害する。③その結果、粒子産生量は著しく低下する。④この出芽しそこなった粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが判明した。この非ミリストイル化 Gag 蛋白による HIV 粒子産生阻害は、かなりドミナントでありかつ濃度依存的である。例えば、ミリストイル化と非ミリストイル化の分子比が 1 : 1 であると産生粒子量は約 1/10 くらいに減少する²⁷⁾。Gag 蛋白ミリストイル化は HIV 増殖に必須のステップであるが、宿主酵素 NMT によって触媒される反応であるため抗 HIV 薬開発の標的にできないと考えられてきた。本当にそうなのだろうか？ この実験は、ミリストイル化を完全に阻害しなくても抗 HIV 効果が期待できる可能性を示唆している。

3. Gag 蛋白の細胞内輸送と宿主機構

Gag 蛋白の構造機能解析と関与する宿主因子の同定により粒子形成機構は解明されつつある。確かに、膜からの粒子出芽過程が ESCRT 分子群によって制御されていると解明された。が、しかし、Gag 蛋白がどのようにしてその粒子出芽の場に輸送されるのか、今なお不明のままである。非効率的な自由拡散であるはずはなく、何かの宿主機構を利用できるようにウイルスは進化したと考えるほうが

素直である(図3)。この Gag 蛋白の形質膜への輸送機構は何なのかという疑問に対し、他のウイルスの場合でもそうだが、微小管やアクチンといった細胞骨格系が繰り返し取り上げられてきた²⁸⁾。こうした宿主因子の1つとしてキネシンモーター蛋白 KIF4 と Gag 蛋白の相互作用が報告されている²⁹⁾。KIF4 は微小管を利用した(+)端への順行性輸送つまり細胞周辺部への輸送に関与するモーター蛋白である。Gag 蛋白の細胞内輸送をタイムラプスで観察すると、そのかなりは微小管をレールとした輸送と思われる(モーター蛋白による輸送のため、速度が数 $\mu\text{m}/\text{秒}$ と速い)動態を示している。しかし残念なことにその Gag 蛋白輸送にあまり方向性がない。また、微小管重合阻害剤であるノコダゾールやコルヒチンで処理しても HIV 粒子産生量が減少しない、あるいは少ししか減少しないという実験結果も多く、微小管輸送が主役かは疑問である。多くの細胞は直径 10-30 μm くらいであり、もし微小管で順行性に一方方向輸送されるなら数秒で形質膜に到達できるはずである。ところが、Gag 蛋白の細胞内輸送をタイムラプスで経時的に調べてもやはり形質膜に達するのにもっと時間が(30分-数時間)かかっているのである^{17,30)}。確かに RI を用いた pulse-chase 実験でも、Gag 蛋白の蛋白合成から粒子放出までに数時間を要することが知られている。しかし、同じく pulse-chase 実験で Gag 蛋白はその蛋白合成後 5 分くらいで膜に結合していると示されている³¹⁾。これらの結果を整理すると「Gag 蛋白は合成後 5 分以内に形質膜に達する前に何かの膜に結合している」ということになる。そこで、筆者らは形質膜ターゲティング前の Gag 蛋白の細胞質内局在を前述の非ミリスチル化 Gag 蛋白(膜に結合しない)ものと比較した。多くの論文で記載されているように、いずれも「細胞質内に diffuse に」分布したが、よくよく観察すると、それは同質のものではなさそうである。核近傍は多くの細胞内小器官が集積している領域であり、膜結合能がない非ミリスチル化 Gag 蛋白はその核近傍領域には分布しないが、それ以外では均質な感じで分布しているのに対し、膜結合能をもつ野生型 Gag 蛋白の発現細胞はざらざらした感じで、その分布に網状あるいは斑状の濃淡が認められるのである(しかしこれらはエンドソームでないようである)。筆者は「Gag 蛋白は、合成後すみやかに細胞質内に散在する小胞などに結合し、小胞輸送などを経て形質膜にターゲティングする」からこのように見えるのではないかと考えるのだが、どうであろうか? これを検証する目的で、小胞輸送に必要とされる SNARE 複合体の knockdown 実験を行っているが、HIV 粒子産生量の減少と Gag 蛋白の細胞内局在変化を認めている。

3. Gag 蛋白のアセンブリー

Gag 蛋白は多量体形成により粒子構造を形成する(粒子には 1,500-2,000 分子の Gag 蛋白が含まれるとされる。5,000 分子という報告もある)。この粒子形成反応は精製 Gag 蛋白のみを用いた試験管内反応で再現でき、興味あることに、全長 Gag 蛋白を用いると未成熟型粒子のような球状粒子が³¹⁾、CA-NC 断片を用いると成熟型粒子の円錐状コアが形成される⁵⁾。この精製 Gag 蛋白のみで(膜画分がなくても)粒子が人工的に形成できるという事実は、膜結合と多量体化が基本的には分離可能な独立事象であることを意味する。しかし、Gag 蛋白のカルボキシル末端から多量体化ドメイン(CA/p24 のカルボキシル末端側ドメインと NC/p7 ドメイン)を削除すると、膜結合能を決定する MA/p17 ドメインは無傷であるにも拘らず、膜結合能が失われる現象が観察されたことから³³⁾、「ミリスチルスイッチ仮説」が提唱された³⁴⁾。この仮説は「アミノ末端に付加されたミリスチル基は Gag 蛋白では露出しており、成熟断片の MA/p17 では内部に埋まっている」というもので、粒子形成時の Gag 蛋白には膜結合能があるが、切断され MA/p17 になるとそれがなくなる、つまり、次の細胞に感染した際に MA/p17 が形質膜から離れやすく細胞質内に侵入できることをうまく説明していた。この仮説は魅力的であったが、しかしミリスチル基付き MA/p17 の NMR 解析で明らかとなったのは、そのスイッチは Gag 蛋白プロセッシングによるものではなく、「3量体 MA ではミリスチル基が露出し、単量体 MA ではそれがかくされている」という多量体化によるスイッチであった³⁵⁾。前述したように「Gag 蛋白は形質膜にターゲティングした後、その膜上で多量体化し粒子をアセンブリーする」とされている。これは「Gag 蛋白は膜に結合すると、その膜上で Gag 蛋白濃度が増加することとなり、多量体化がおこる」と理解しうる。しかし、膜結合が多量体化を促進する一方で、多量体化が膜結合を促進することも明らかとなったのである(図4)。

Gag 蛋白アセンブリーすなわち多量体化に関与する宿主因子を同定する目的で、Gag 蛋白の試験管内翻訳系や上記の試験管内粒子形成反応が用いられている。例えば、試験管内翻訳系に宿主細胞のライセート分画を添加して見いだされた ABCE1 (著者らは HP68 と命名) と呼ばれる ATPase があり、この宿主因子は Gag 蛋白アセンブリー中間体に結合し多量体化を促進するが、粒子出芽時には解離することが報告されている³⁶⁾。一方、精製 Gag 蛋白を用いた試験管内粒子形成反応系に宿主細胞のライセート分画を添加する実験からは、イノシトールリン酸やホスファチジルイノシトールリン酸が粒子形状に関与することが示唆されてい

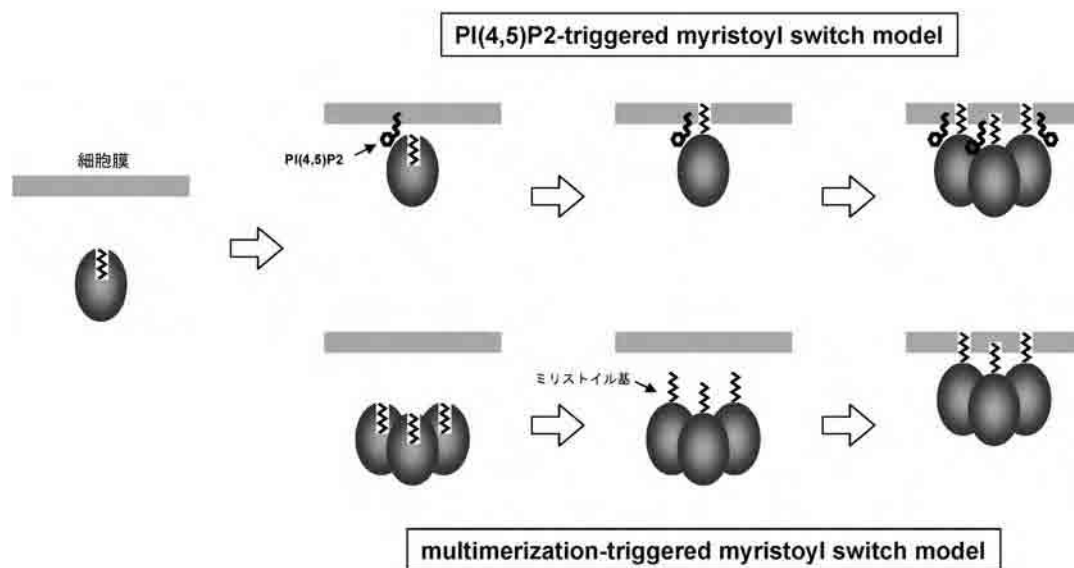


図 4 ミリストイルスイッチ機構

Gag 蛋白に PI (4, 5) P が結合すると, ミリストイル基が露出し膜結合が安定する (上段)。

Gag 蛋白が多量体化すると, ミリストイル基が露出し膜に結合できるようになる (下段)。

る³⁷⁾。筆者もこの実験を行なってみたことがあるが, 同じように脂質画分に Gag 蛋白の多量体化促進活性を見いだしている。近年このホスファチジルイノシトールリン酸の 1 つである PI (4, 5) P2 が MA ドメインに結合すると, それがスイッチとなってミリストイル基が露出し, その露出したミリストイル基と結合した PI (4, 5) P2 が相加的に膜結合に寄与するという構造モデルが示唆されている²⁵⁾ (図 4)。

おわりに

本稿では HIV の粒子形成機構として, Gag 蛋白の細胞内輸送とアセンブリー, それに関与する宿主因子などを概説した。エイズ学会誌ということから「詳細に, でも論点ははっきりと」と心がけたつもりであるが, あれこれと書いているうちに雑多な総説風になってしまった。また HIV のゲノムパッケージングや成熟機構については紙面の関係から書けなかった。筆者らは現在 GagPol 蛋白やゲノム RNA の細胞内輸送と粒子形成を解析しようと試みているのだが, それらについての紹介はもう少し時間がかかりそうである。

文 献

- 1) Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI : 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.
- 2) Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI : Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. Science 273 : 231-235, 1996.
- 3) Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP : Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. Science 278 : 849-853, 1997.
- 4) Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT : Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. Nature 407 : 409-413, 2000.
- 5) Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI : Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. Science 283 : 80-83, 1999.
- 6) Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP : Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. Cell 87 : 1285-1294, 1996.
- 7) Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI : Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. Cell 107 : 55-65, 2001.
- 8) VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikon-yogo A, Leis J, Carter CA : Tsg101, a homologue of

- ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55 (Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 7724–7729, 2001.
- 9) Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG : AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689–699, 2003.
 - 10) Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA : Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 3195–3199, 1991.
 - 11) Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW : Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol* 69 : 5455–5460, 1995.
 - 12) Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD : HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7 : 1313–1319, 2001.
 - 13) von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimborra DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI : The protein network of HIV budding. *Cell* 114 : 701–713, 2003.
 - 14) Gottlinger HG, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA : Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 7381–7385, 1993.
 - 15) Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD : Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451 : 425–430, 2008.
 - 16) Nydegger S, Foti M, Derdowski A, Spearman P, Thali M : HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4 : 902–910, 2003.
 - 17) Perlman M, Resh MD : Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* 7 : 731–745, 2006.
 - 18) Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD : HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2 : e39, 2006.
 - 19) Jouvenet N, Neil SJ, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD : Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 4 : e435, 2006.
 - 20) Poole E, Strappe P, Mok HP, Hicks R, Lever AM : HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site ; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* 6 : 741–755, 2005.
 - 21) Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M : Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162 : 443–455, 2003.
 - 22) Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H : Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3 : 718–729, 2002.
 - 23) 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. *J Cell Biol* 177 : 329–341, 2007.
 - 24) Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krinje-Locker J, Krausslich HG : HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 3 : e36, 2007.
 - 25) Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF : 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.
 - 26) Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO : Phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 14889–14894, 2004.
 - 27) Kawada S, Goto T, Haraguchi H, Ono A, Morikawa Y : Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the non-myristoylated form of Gag. *J Virol* (in press)
 - 28) Greber UF, Way M : A superhighway to virus infection. *Cell* 124 : 741–754, 2006.
 - 29) Tang Y, Winkler U, Freed EO, Torrey TA, Kim W, Li H, Goff SP, Morse HC 3rd : Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J Virol* 73 : 10508–10513, 1999.
 - 30) Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE : Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* 79 : 4055–4065, 2005.
 - 31) Tritel M, Resh MD : Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* 74 : 5845–5855, 2000.

- 32) Campbell S, Rein A : In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* 73 : 2270–2279, 1999.
- 33) Sandefur S, Varthakavi V, Spearman P : The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol* 72 : 2723–2732, 1998.
- 34) Zhou W, Resh MD : Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Virol* 70 : 8540–8548, 1996.
- 35) Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF : Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 517–522, 2004.
- 36) Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR : Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415 : 88–92, 2002.
- 37) Campbell S, Fisher RJ, Towler EM, Fox S, Issaq HJ, Wolfe T, Phillips LR, Rein A : Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 10875–10879, 2001.