

第23回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

感染者由来の *nef* 遺伝子多型が病態形成へ及ぼす影響の解析Study on the Impact of Naturally Arising HIV-1
nef Polymorphisms on Pathogenesis

豊田 真子

Mako TOYODA

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター

Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto University

日本エイズ学会誌 25: 61-67, 2023

はじめに

HIV-1 感染における病原性発現は、ウイルス増殖とこれを抑制する免疫系や宿主因子との攻防の結果である。HIV-1 は、アクセサリ蛋白質と呼ばれる固有の蛋白質を獲得・適応進化させることで、宿主での増殖を可能にしてきた。なかでも、アクセサリ蛋白質の「Nef」は、(1) ウイルスレセプター (CD4, CCR5, CXCR4 など) の発現低下を通じて、ウイルスの重複感染を防ぐほか¹⁻³⁾、(2) HLA クラス I 分子の発現低下を通じて T 細胞免疫から逃避させることで、ウイルス複製促進に寄与し^{4,5)}、(3) SERINC3/5 などの内在性の宿主因子と呼ばれる防御システムに拮抗することで感染性を増強させる^{6,7)}、などの多様な機能を持ち、病原性の発現に重要な因子である^{8,9)}。これまで実験室株 (NL43 など) をもとに変異を導入することで、Nef の機能性ドメインが同定されてきた¹⁰⁾。しかしながら、感染者由来の配列では、そうした領域はきわめてよく保存されており、生体内において Nef の機能の相違を規定する配列や領域はよくわかっていない。一方で、HIV-1 遺伝子の中で *nef* は変異性の著しい領域であり、特に HLA 拘束性の免疫応答である細胞傷害性 T 細胞 (CTL) からの逃避に関連していることが知られている^{11,12)}。このように、免疫系からの淘汰圧を受け、生体内で選択される Nef の変異が、ウイルスレセプターや HLA クラス I 分子への発現、ウイルス感染性、複製能、宿主因子への拮抗能等に、どのように影響するかを明らかにすることは、HIV-1 病態形成を理解するうえで重要と考えられる。本稿では、筆者がこれまでに行ってきた研究を中心に、さまざまな感染者由来パネルを用いた、*nef* の遺伝子多型 (変異) とその機能、病態形成との関連性を紹介する。

1. 感染者由来の *nef* 遺伝子多型とウイルスレセプター発現低下機能に関する研究

Nef は HIV-1 の中でも多型性が著しい蛋白質であるが、生体内では ORF として非常に良く保存されており、*nef* 欠損はきわめて稀である。Nef には機能的に重要で高度に保存されたドメインが存在し、これまでに Nef の機能性ドメインは、実験室で適応させた HIV-1 株に変異を導入する、部位特異的な研究から特定されてきた。たとえば、Nef の特徴的な機能の 1 つであるウイルスレセプターの発現低下作用においては、CD4 は EE₁₅₄₋₁₅₅, LL₁₆₄₋₁₆₅, DD₁₇₄₋₁₇₅ などを、CCR5 および CXCR4 は G₂, E₆₂EEE₆₅, P₇₂XXP₇₈ などをアラニン置換すると、その発現低下作用が減弱化する^{1,3,13-15)}。しかしながら、これらドメインは保存性が非常に高く、生体内での Nef の変異獲得と機能の関連については、多くの不明な点が残されている。そこで筆者らは、きわめてまれに (感染者の 1% 未満) 自身の免疫系で HIV を制御し、病態が長期にわたって安定している、エリートコントローラー ($n=45$) および未治療慢性感染者 ($n=46$) 由来の Nef クローンを用いて、ウイルスレセプター発現低下機能を担うドメインの同定を進めた¹⁶⁾。慢性感染者由来 Nef と比較してエリートコントローラー由来 Nef ではすべてのウイルスレセプターの発現低下作用が有意に減弱化していた (図 1)。このことから、エリートコントローラー由来の Nef で見られる配列には、ウイルスレセプター発現低下機能を担う領域に変異があると示唆されたが、既知の機能性ドメインに変異は認められなかった。さらに、各ウイルスレセプターにおける相関を解析したところ、CD4 と CCR5 の発現低下活性に正の相関が認められた (図 2)。これまで実験室株の Nef に変異を導入した研究では、CD4 および CCR5 の発現低下に寄与する責任領域は異なっていることが報告されているが¹⁾、感染者由来の Nef では CD4 と CCR5 の両発現低下活性に相関が認められた。CD4 発現低下機能を

著者連絡先: 豊田真子 (〒860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1 熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター)

2023 年 3 月 22 日受付

エリートコントローラー (EC) vs. 慢性感染者 (CP)

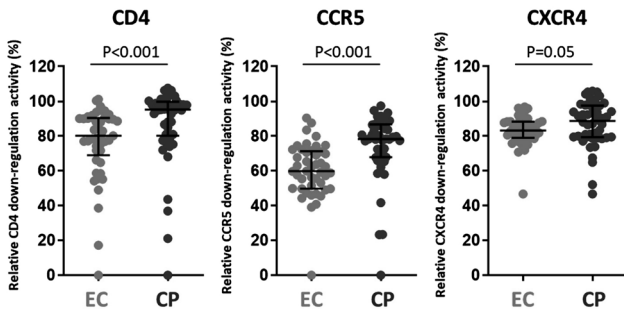


図 1 エリートコントローラーおよび慢性感染者由来 Nef がウイルスレセプター発現低下活性に及ぼす影響の解析
SF2 Nef (コントロール株) のウイルスレセプター発現低下活性を 100% として、感染者由来の Nef クローンの活性を正規化した。各ウイルスレセプターの発現低下活性の中央値は、CD4 の場合、EC Nef クローンで 80.2% (IQR: 68.9~90.3%), CP Nef クローンで 95.3% (IQR: 80.2~99.8%), CCR5 の場合、EC Nef クローンで 60.0% (IQR: 49.8~71.3%), CP Nef クローンで 78.3% (IQR: 67.8~86.6%), CXCR4 の場合、EC Nef クローンで 83.2% (IQR: 79.0~88.3%), CP Nef クローンで 88.7% (IQR: 79.4~97.5%) であった。各レセプターの発現低下活性は、EC および CP 間において統計学的有意差が認められた (Mann-Whitney test)。文献 16 を改変。

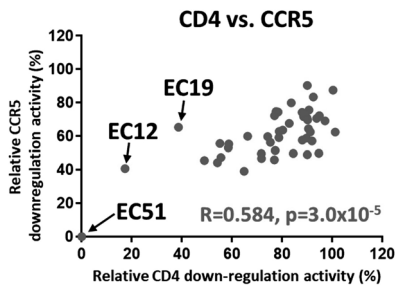


図 2 エリートコントローラー由来 Nef における CD4 および CCR5 発現低下活性の相関
CD4 および CCR5 発現低下活性に正の相関が認められた (Spearman's correlation test)。EC12, EC19, EC51 は CD4 および CCR5 の両発現低下活性が減弱化している 3 クローンを示す。文献 16 を改変。

失う代わりに CCR5 発現低下機能を得るなどという代償的な傾向は見られず、ウイルスレセプター発現低下という機能として選択圧を受けていると示唆された。

次に、生体内ではどのように両機能が制御されているかを明らかにするため、特に CD4 と CCR5 の発現低下活性が減弱化している 3 つのエリートコントローラー由来 Nef クローン (EC12, EC19, EC51) (図 2) に着目して、機能と

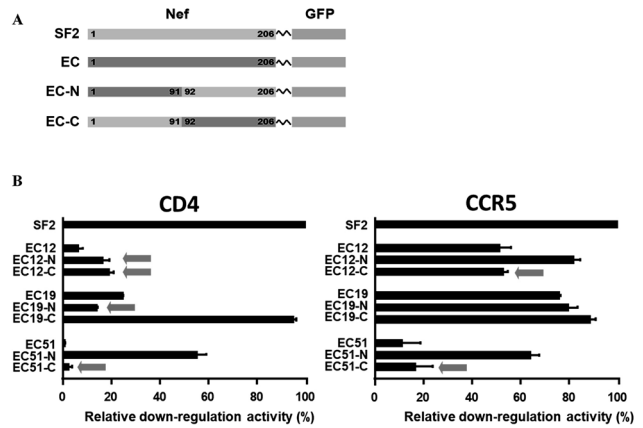


図 3 エリートコントローラー Nef を用いた、CD4 および CCR5 発現低下活性の減弱化に寄与する責任領域の探索
(A) SF2 Nef-GFP fusion コンストラクトをもとに、SF Nef と EC クローン (EC12, EC19, EC51) 間でキメラを構築。
(B) 各キメラにおいて CD4 および CCR5 発現低下活性の減弱化に寄与する領域を矢印で示す。文献 16 を改変。

変異を解析した。SF2 Nef の配列を組み合わせて、感染者由来の Nef とキメラをすることにより、各機能を回復させる責任領域をマッピングした (図 3)。SF2 Nef と比較して、CD4 に関しては EC12 では両方に、EC19 においては N ターミナル側に、EC51 においては C ターミナル側に発現低下活性を減弱化する領域が認められた (図 3)。一方、CCR5 に関しては、EC12, EC51 とともに C ターミナル側に発現低下活性を減弱化する領域が認められ (図 3)、各クローンで異なる領域が機能制御に関わることが明らかになった。さらに、これらキメラを用いて、重複感染阻止機能の解析を行った (図 4)。その結果、EC12 とその両キメラでは、重複感染の阻止機能の減弱化が認められ、また、EC19 と EC19-N においても、阻止機能の減弱化が認められたが、CD4 の発現低下活性の回復が認められ、CCR5 の発現低下機能も維持されている EC19-C では SF2 Nef 同様に重複感染阻止活性が認められた (図 4)。また、EC51 および EC51-C でも阻止機能は減弱化しており、重複感染を阻止する活性は CD4 の発現低下活性と強く相関することが示された (図 4)。詳細な解析により、最終的に、57 番目や 183 番目のトリプトファンからアルギニンへの変異が CD4 や CCR5 の発現低下活性の減弱化に寄与し、重複感染阻止機能の低下につながることを明らかにした¹⁶⁾。こうしたことから、生体内ではさまざまな変異を組み合わせることにより、Nef の CD4 および CCR5 発現低下機能を状況に応じて維持または変化させることで、生体内での環境に適応し、このウイルスレセプター発現低下機能は、重複感染阻止を通じて、

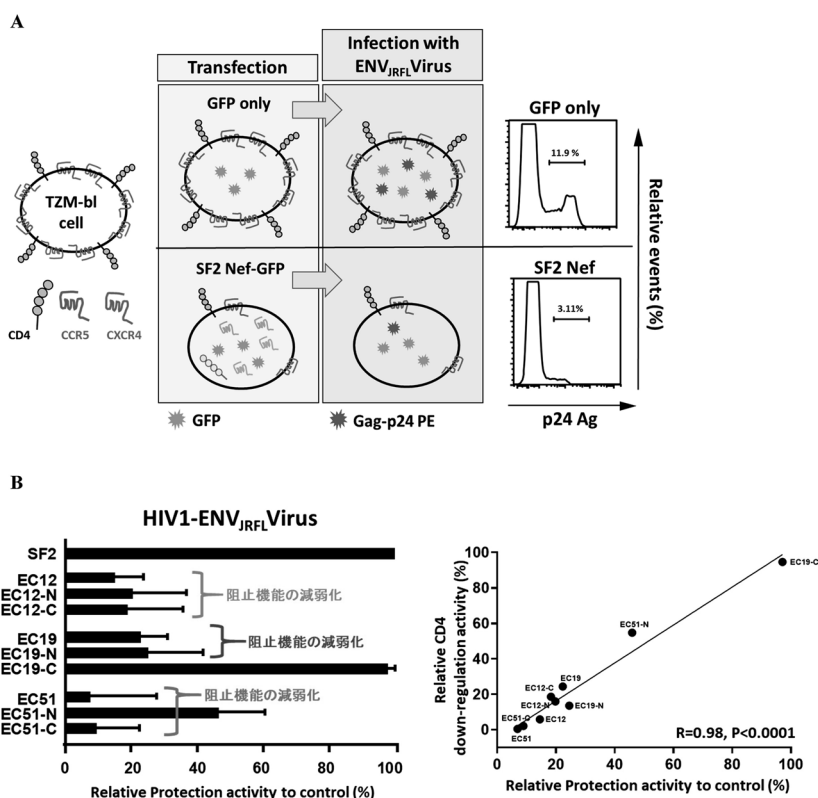


図 4 重複感染阻止機能の解析

(A) 重複感染阻止機能アッセイの模式図を示す。TZM-bl 細胞に GFP のみおよび SF2 Nef-GFP fusion コンストラクトを導入後、ENV_{JRFL} シュードウイルスを感染させ、GFP 陽性細胞中の Gag-p24 PE 陽性細胞を検出した。GFP のみでは、p24 PE 陽性細胞の割合が 11.9%であったが、SF2 Nef 存在下では p24 PE 陽性細胞の割合が 3.11%に低下した。このように、SF2 Nef による重複感染阻止機能の検出を可能にした。(B) SF2 Nef の重複感染阻止活性を 100%として、各 EC クローンおよびキメラの活性を正規化した。各 EC クローンおよびキメラの重複感染阻止活性と CD4 発現低下活性 (図 3) に正の相関が認められた (Spearman's correlation test)。文献 16 を改変。

生体内のウイルス複製に寄与するものと示唆された。

2. 感染者由来の nef 遺伝子多型と HLA クラス I 分子発現低下に関する研究

HLA はヒトゲノムで最も多様性に富む遺伝子群から構成されており、アレル間の相違は提示する抗原ペプチドの多様性を通じて、HIV-1 を含めたウイルス感染免疫の中樞を担っている¹⁷⁾。なかでも、HLA クラス I 拘束性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は HLA クラス I 分子に提示された HIV-1 由来ペプチドを認識して、HIV-1 感染細胞を攻撃する^{18,19)}。一方で、HIV-1 ウイルスは、細胞内抗原プロセッシング経路の阻害や感染細胞表面からの HLA-I 分子の発現低下など、CTL による抗ウイルス免疫を回避するためのさまざまなメカニズムを進化させてきた^{20,21)}。なかでも、Nef は宿主アダプター分子とともに HLA 細胞内ドメインに結合して HLA

クラス I 分子の発現低下を起こすが、この現象は HLA-A や HLA-B に対して強く作用し、HLA-C に対しては作用しないことが知られている^{4,22,23)}。しかしながら、こうした報告の多くは実験室株を用いており、感染者から分離した Nef の HLA-A, HLA-B, HLA-C に対する作用はよくわかっていない。そこで、筆者らはサブタイプ B 慢性感染者から分離した Nef クローン ($n=46$) を用いて、HLA クラス I 分子の発現低下作用を解析した²⁴⁾。HLA-A と比較して、HLA-B 発現を低下させる能力が減弱化しており、一方で HLA-C 発現を低下させるクローンは認められなかった (図 5)。各クローンにおける HLA-A および HLA-B 発現低下活性を定量化するために、HLA-A/HLA-B 発現低下活性比を算出したところ、中央値は 1.25 を示した (図 5)。そこでさらに、Nef 機能と各コドンのアミノ酸残基について相関を解析したところ、Nef の 202 番目のアミノ酸がコンセ

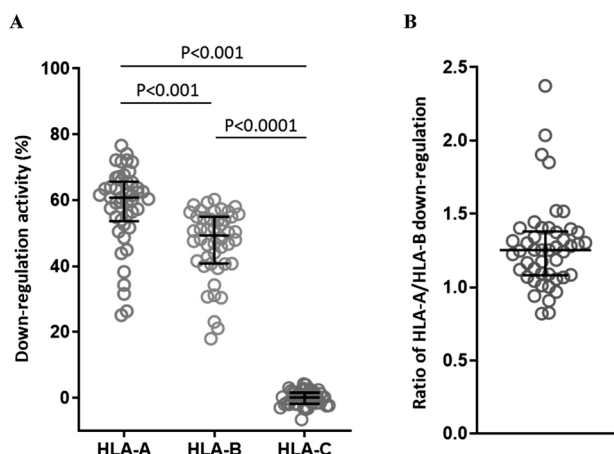


図 5 感染者由来 Nef が HLA クラス I 分子の発現低下活性に及ぼす影響の解析
 (A) 感染者由来 Nef クローンの HLA-A および HLA-B 発現低下活性の中央値はそれぞれ 60.8% (IQR: 54.2~65.5%), 49.3% (IQR: 41.0~55.5%) を示し, HLA-A と比較して, HLA-B の発現を低下させる能力が減弱化していた (Mann-Whitney test)。また, HLA-C の発現低下活性は認められなかった。(B) HLA-A/HLA-B 発現低下活性比の中央値は 1.25 (IQR: 1.09~1.37) を示した。文献 24 を改変。

ンサスのチロシンか, 変異体 (チロシン以外) によって, HLA-A/HLA-B 発現低下活性比が有意に異なることを見出した (図 6)。さらに, 202 番目のチロシンを生体内で選択されたいくつかの変異に置き換えると, ヒスチジンへの変異は HLA-B 発現低下作用を減弱化させ, さらには CTL による抗原認識を増強することを明らかにした (図 6)。加えて, このサブタイプ B で認められた HLA-B 発現低下能力を減弱化させるという Nef の性質は, HIV-1 グループ M サブタイプ ($n=228$), さらに霊長類レンチウイルス ($n=35$) の Nef に共通することを見出しており²⁵, Nef のこの特性が抗ウイルス細胞性免疫応答に影響を与える複数の結果を得た。

3. 感染者由来の *nef* 遺伝子多型と宿主因子の相互作用に関する研究

HIV-1 Nef がウイルス粒子の感染性を増強させる分子機序は長らく解明されていなかったが, 2015 年に 2 グループが HIV-1 感染性を抑制する新しい宿主制限因子 (SERINC3, SERINC5) を同定するとともに, HIV-1 Nef がその働きに拮抗することを明らかにした^{6,7}。SERINC3/5 は 10 個以上の膜貫通領域を有する蛋白質で, 子孫ウイルス粒子へ取り込まれる。SERINC3/5 が取り込まれたウイルス粒子は, 新たなターゲット細胞に感染する際の膜融合過程を阻害あるいはウイルスコアの輸送を妨げることで, 感染性を減弱化させ

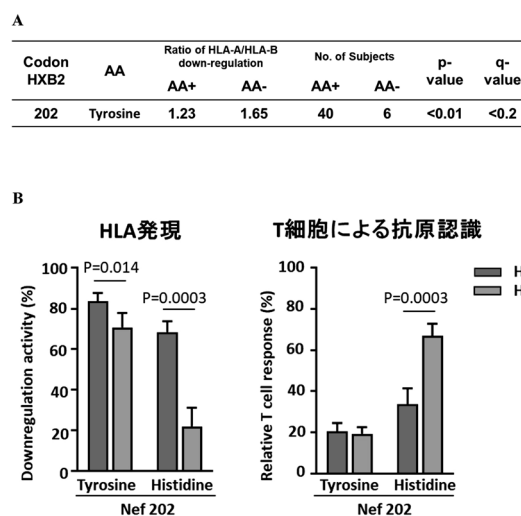


図 6 感染者で選択される Nef 変異が HLA クラス I 分子の発現低下活性および T 細胞抗原認識に及ぼす影響の解析
 (A) HLA-A/HLA-B 発現低下活性比は, Nef の 202 番目のアミノ酸がコンセンサスのチロシンおよびチロシン以外の変異体でそれぞれ, 1.23, 1.65 を示し, 有意差が認められた (Mann-Whitney test)。(B) 202 番目のチロシンからヒスチジンへの変異は, HLA-B の発現低下活性を有意に減弱化させ, T 細胞による抗原認識の増強に寄与していた (paired *t* test)。文献 24 を改変。

るが, これに対して, Nef は感染細胞表面から SERINC3/5 の発現を減少させることで, ウイルス粒子中への SERINC3/5 の取り込みを防ぎ, 感染性の維持に働くことが報告された^{7,26}。FPD モチーフ (F₁₂₁-P₁₂₂-D₁₂₃) など, よく保存された領域への変異導入によって SERINC3/5 への拮抗能力が低下することが知られているが⁷, 生体内で選択される Nef の多型変異がその機能に及ぼす影響や, 病態形成との関連性はよくわかっていない。そこで, 筆者らは病態情報とリンクした HIV-1 感染者コホートをを用いて, SERINC3/5 と Nef の攻防が HIV-1 感染者の病態形成に与える影響の解明を目指した²⁷。国内で集めた未治療の HIV-1 慢性感染者コホート ($n=375$) を用いた解析においては, 感染者の血漿からウイルス RNA を抽出後, 逆転写, nested PCR を行い, *nef* 領域のダイレクトシーケンスを行った。得られた *nef* 遺伝子配列および血漿ウイルス量, HLA 遺伝子型を用いて, インフォマティクス解析を行ったところ, 各感染者の Nef における変異の総和は, 血漿ウイルス量 (pVL) に逆相関していた (図 7)。これにより, 変異の蓄積が生体内のウイルス複製に負の影響をもたらすと示唆された。さらに詳細な解析を行ったところ, HLA-B*51:01 を持つ感染者に優位に頻度高く観察された Nef の 120 番目のチロシンから

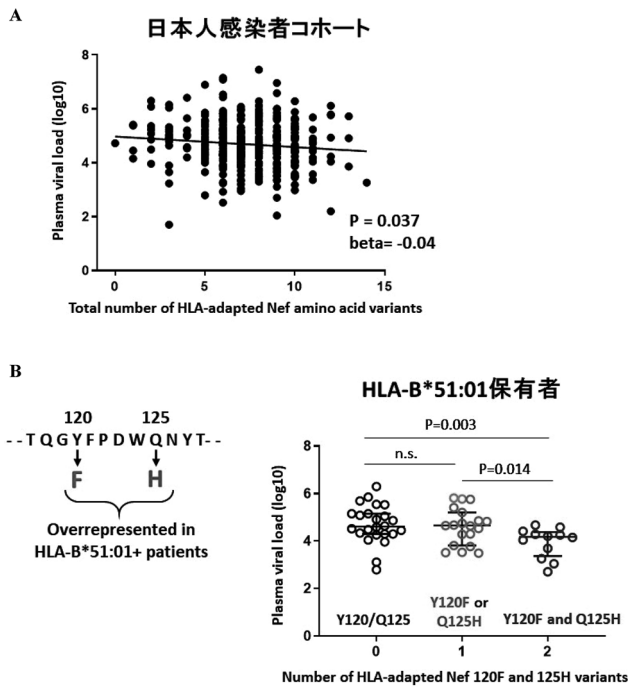


図 7 HLA 関連 Nef アミノ酸変異と血漿ウイルス量の相関解析

(A) 日本人感染者コホート ($n=375$) において、HLA 関連 Nef アミノ酸変異の総数と血漿ウイルス量の回帰分析を行ったところ、有意な負の相関が認められた ($\beta = -0.04$, $p = 0.037$)。 (B) HLA-B*51:01 保有者 ($n=55$) において頻度高く認められた、Nef の 120 番目の Y (チロシン) から F (フェニルアラニン) および 125 番目の Q (グルタミン) から H (ヒスチジン) への変異は血漿ウイルス量の低下と関連していた (Mann-Whitney test)。文献 27 を改変。

フェニルアラニンへの変異と 125 番目のグルタミンからヒスチジンへの変異の蓄積が、血漿ウイルス量の低下に関与していることを明らかにした (図 7)。この領域は Nef の FPD モチーフの近傍にあるため、SF2 Nef にこれら変異を導入して、Nef 機能に与える影響を解析した。その結果、1 つずつの変異では大きな影響が認められなかったが、両方の変異を導入したところ、Nef によるウイルス粒子の感染性増強作用が減弱し、さらには SERINC3/5 に対する拮抗作用が有意に低下することを明らかにした (図 8)。また、エリートコントローラー ($n=45$) および未治療慢性感染者 ($n=46$) 由来の Nef クローンを用いたカナダグループとの共同研究においては、ウイルスレセプターの発現低下作用と同様に、慢性感染者と比較して、エリートコントローラーでは SERINC5 発現低下作用が減弱化し、さらに HLA-B*08 に関連した Nef の 94 番目のリシンからグルタミン酸への変異および、HLA-B*57 に関連した Nef の 116

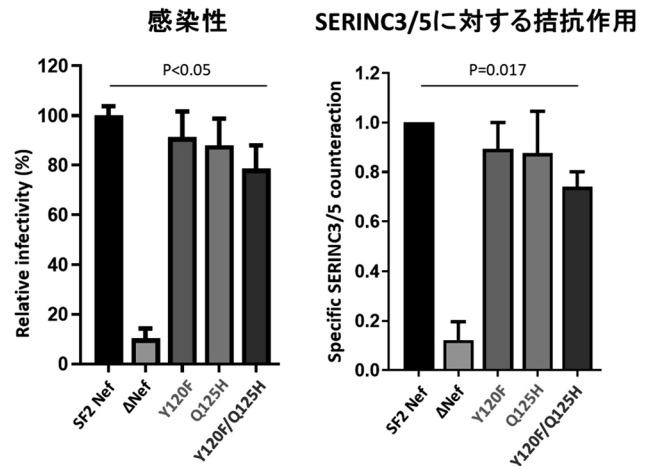


図 8 Y120F/Q125H Nef 変異が感染性および SERINC3/5 に対する拮抗作用に及ぼす影響の解析
Y120F/Q125H Nef 変異はウイルス粒子の感染性を低下させ、さらには SERINC3/5 に対する拮抗作用を有意に低下させた (ANOVA with multiple comparisons vs SF2 Nef)。文献 27 を改変。

番目のヒスチジンからアスパラギンへの変異が、SERINC5 発現低下作用の減弱化を引き起こし、ウイルス複製と感染性の低下に寄与していることも明らかにした²⁸⁾。このように、HLA 拘束性免疫系による選択圧が Nef 機能の減弱化および生体内のウイルス複製能の低下に寄与することを示唆する、複数の結果を得た。

おわりに

本研究では病態情報とリンクしたさまざまな未治療 HIV 感染者に由来するサンプルから樹立した Nef ライブラリーを用いて、ウイルスレセプターおよび HLA クラス I 分子の発現低下作用、ウイルス感染性、複製能、宿主因子に対する拮抗作用など、Nef に特徴的な機能の解析を行った。このライブラリーはナチュラルに存在する変異 (遺伝子多型) を多く網羅しており、これまで見過ごされていた感染者由来に特徴的な変異を同定することができた。これまでに同定した *nef* 変異の多くは HLA アリルに関連する遺伝子変異であり、宿主免疫系からの選択圧のもとに生じる *nef* 遺伝子の多型は、Nef に特徴的なウイルスレセプター発現低下作用、HLA クラス I 分子の発現低下作用の減弱化を引き起こし、さらには宿主制限因子の 1 つである SERINC3/5 に拮抗する能力を損なうことで、ウイルスの感染性や複製能を弱め、血漿ウイルス量の低下に繋がることを見出した。このように、感染者で選択される *nef* 遺伝子多型が Nef の機能に影響を及ぼし、病態形成の違いが生じることを明らかにした。HIV のみならず、さまざまなウイルス

感染症におけるウイルス変異を丁寧に解析し、病態との関連性を解析していくことは、ウイルス感染症の制御に向けて重要と考えられる。これからも HIV 感染者由来サンプルを用いて、*nef*などのウイルス遺伝子多型が、HIV の潜伏化へ及ぼす影響などを解析していき、HIV 感染症の治療に向けて基盤となる研究を継続していきたい。

謝辞

第23回日本エイズ学会ECC山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり、多大なるご指導、ご助言を賜りました上野貴将教授(熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター)に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、エリートコントローラーコホートの樹立にご協力いただきました、Dr. Bruce D. Walker (Massachusetts General Hospital), Dr. Zabrina L. Brumme, Dr. Mark A. Brockman (Simon Fraser University, Canada), 三浦聡之先生 (AstraZeneca), 日本人感染者コホートの樹立にご協力いただきました、岡慎一先生、湯永博之先生 (国立国際医療研究センター), 立川愛先生、菊地正先生 (国立感染症研究所), 古賀道子先生 (東京大学医科学研究所)そして、ご協力くださった多くの患者様に深く御礼申し上げます。また、シークエンスデータ解析およびHLA 関連変異の同定にご協力いただきました、Dr. Jonathan M. Carlson (Microsoft Research, USA), 大橋順先生 (東京大学), SERINC3/5の解析にご協力いただきました、Dr. Massimo Pizzato (Trento University)に謹んで感謝申し上げます。また、本賞にご推薦いただいた立川愛先生に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター感染免疫学分野のメンバーならびに、いつも支えてくれる家族に深く感謝申し上げます。

利益相反：本研究の遂行にあたり利益相反に該当する事項はない。

文 献

- 1) Michel N, Allespach I, Venzke S, Fackler OT, Keppler OT : The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* 15 : 714-723, 2005.
- 2) Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D : Nef induces CD4 endocytosis : requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76 : 853-864, 1994.
- 3) Venzke S, Michel N, Allespach I, Fackler OT, Keppler OT : Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol* 80 : 11141-11152, 2006.
- 4) Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM : Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2 : 338-342, 1996.
- 5) Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D : HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391 : 397-401, 1998.
- 6) Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG : SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526 : 218-223, 2015.
- 7) Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M : HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526 : 212-217, 2015.
- 8) Foster JL, Denial SJ, Temple BR, Garcia JV : Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. *J Neuro-immune Pharmacol* 6 : 230-246, 2011.
- 9) Das SR, Jameel S : Biology of the HIV Nef protein. *Ind J Med Res* 121 : 315-332, 2005.
- 10) Fackler OT, Moris A, Tibroni N, Giese SI, Glass B, Schwartz O, Kräusslich HG : Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection. *Virology* 351 : 322-339, 2006.
- 11) Brumme ZL, Brumme CJ, Heckerman D, Korber BT, Daniels M, Carlson J, Kadie C, Bhattacharya T, Chui C, Szinger J, Mo T, Hogg RS, Montaner JS, Frahm N, Brander C, Walker BD, Harrigan PR : Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS Pathog* 3 : e94, 2007.
- 12) Ueno T, Motozono C, Dohki S, Mwimanzu P, Rauch S, Fackler OT, Oka S, Takiguchi M : CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J Immunol* 180 : 1107-1116, 2008.
- 13) Janvier K, Craig H, Le Gall S, Benarous R, Guatelli J, Schwartz O, Benichou S : Nef-induced CD4 downregulation : a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol* 75 : 3971-3976, 2001.
- 14) Bentham M, Mazaleyrat S, Harris M : The di-leucine motif in the cytoplasmic tail of CD4 is not required for binding to

- human immunodeficiency virus type 1 Nef, but is critical for CD4 down-modulation. *J Gen Virol* 84 : 2705–2713, 2003.
- 15) Lindwasser OW, Smith WJ, Chaudhuri R, Yang P, Hurley JH, Bonifacino JS : A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J Virol* 82 : 1166–1174, 2008.
 - 16) Toyoda M, Ogata Y, Mahiti M, Maeda Y, Kuang XT, Miura T, Jessen H, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T : Differential ability of primary HIV-1 Nef isolates to downregulate HIV-1 entry receptors. *J Virol* 89 : 9639–9652, 2015.
 - 17) Parham P : Function and polymorphism of human leukocyte antigen-A,B,C molecules. *Am J Med* 85 : 2–5, 1988.
 - 18) Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, Walker BD, Ripke S, Brumme CJ, Pulit SL, Carrington M, Kadie CM, Carlson JM, Heckerman D, Graham RR, Plenge RM, Deeks SG, Gianniny L, Crawford G, Sullivan J, Gonzalez E, Davies L, Camargo A, Moore JM, Beattie N, Gupta S, Crenshaw A, Burt NP, Guiducci C, Gupta N, Gao X, Qi Y, Yuki Y, Piechocka-Trocha A, Cutrell E, Rosenberg R, Moss KL, Lemay P, O’Leary J, Schaefer T, Verma P, Toth I, Block B, Baker B, Rothchild A, Lian J, Proudfoot J, Alvino DM, Vine S, Addo MM, Allen TM, *et al* : The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330 : 1551–1557, 2010.
 - 19) Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB : Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68 : 6103–6110, 1994.
 - 20) Ambagala AP, Solheim JC, Srikumaran S : Viral interference with MHC class I antigen presentation pathway: the battle continues. *Vet Immunol Immunopathol* 107 : 1–15, 2005.
 - 21) Petersen JL, Morris CR, Solheim JC : Virus evasion of MHC class I molecule presentation. *J Immunol* 171 : 4473–4478, 2003.
 - 22) Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, Berlioz-Torrent C, Liu L, Benarous R, Heard JM, Schwartz O : Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8 : 483–495, 1998.
 - 23) Williams M, Roeth JF, Kasper MR, Fleis RI, Przybycin CG, Collins KL : Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J Virol* 76 : 12173–12184, 2002.
 - 24) Mahiti M, Toyoda M, Jia X, Kuang XT, Mwimanzzi F, Mwimanzzi P, Walker BD, Xiong Y, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T : Relative resistance of HLA-B to downregulation by naturally occurring HIV-1 Nef sequences. *mBio* 7 : e01516–01515, 2016.
 - 25) Mwimanzzi F, Toyoda M, Mahiti M, Mann JK, Martin JN, Bangsberg D, Brockman MA, Goulder P, Kirchhoff F, Brumme ZL, Ndung’u T, Ueno T : Resistance of major histocompatibility complex Class B (MHC-B) to Nef-mediated downregulation relative to that of MHC-A is conserved among primate lentiviruses and influences antiviral T cell responses in HIV-1-infected individuals. *J Virol* 92 : e01409–014017, 2018.
 - 26) Firrito C, Bertelli C, Vanzo T, Chande A, Pizzato M : SERINC5 as a new restriction factor for human immunodeficiency virus and murine leukemia virus. *Annu Rev Virol* 5 : 323–340, 2018.
 - 27) Toyoda M, Kamori D, Tan TS, Goebuchi K, Ohashi J, Carlson J, Kawana-Tachikawa A, Gatanaga H, Oka S, Pizzato M, Ueno T : Impaired ability of Nef to counteract SERINC5 is associated with reduced plasma viremia in HIV-infected individuals. *Sci Rep* 10 : 19416, 2020.
 - 28) Jin SW, Alshafi N, Kuang XT, Swann SA, Toyoda M, Göttinger H, Walker BD, Ueno T, Finzi A, Brumme ZL, Brockman MA : Natural HIV-1 Nef polymorphisms impair SERINC5 downregulation activity. *Cell Rep* 29 : 1449–1457.e5, 2019.