原	著
---	---

HIV-1 インテグラーゼと相互作用する新規宿主因子の同定と その細胞内発現プロファイルの解析

濱 本 誠 二

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面顎部機能再建学系専攻

顎顔面機能修復学講座 顎顔面外科学分野

(主任・指導：天笠光雄教授)

(2006 年 1 月 13 日 受付)

Identification of the Novel Host Factor that Interacts with HIV-1 Integrase and Analysis of the Expression Profile of the Interactor *in vivo*

HAMAMOTO Seiji

Maxillofacial Surgery, Department of Maxillofacial Reconstruction
and Function, Division of Maxillofacial/Neck Reconstruction,
Graduate School, Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. AMAGASA Teruo)

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is one of the lentiviruses, and unlike other retroviruses, HIV-1 is capable of infecting not only dividing cells but also non-dividing cells. It has been strongly suggested that this property is due to the viral mechanism which facilitates the integration of the viral genome cDNA into the host chromosome more efficiently than other retroviruses. HIV-1 integrase (IN) is a viral protein which catalyzes insertion of the viral genome cDNA into the host cell chromosome. However, it has been suggested that HIV-1 IN also plays putative roles at the steps prior to integration such as uncoating, reverse transcription and nuclear transport of the viral cDNA. In this study, we tried to identify the novel host factor which interacted with HIV-1 IN using two different kinds of yeast two hybrid methods : the conventional yeast two hybrid method and the mating method. First, the full-length cDNA fragment of HIV-1 IN was amplified using polymerase chain reaction (PCR), and the amplified products were ligated into pGBT 9 vector as bait. Plasmid vectors expressing human lymphocytes cDNA library and HeLa cDNA library were used as prey plasmid in the conventional yeast two hybrid method and the mating method, respectively. These plasmids were transformed into the corresponding yeast strain cells, and several positive clones were isolated. As a result, a known gene product was identified as a candidate. Further analysis revealed that this protein was expressed in HeLa, 293 T cells, primary macrophages and activated T lymphocytes, and that suppression of this protein expression affected HIV-1 replication.

I. 緒 言

レトロウイルスの感染は、ウイルスゲノム RNA の脱殻や cDNA コピーへの逆転写から核移行、宿主染色体への組み込みといったことを含むいくつかの過程が生じる。インテグラーゼ (integrase : IN) は、逆転写酵素によって合成されたウイルス cDNA コピーを宿主細胞染色体へ組み込む過程を触媒するウイルス酵素タンパク質

であるが¹⁾、こうしたウイルスの感染初期の事象は、いくつかのウイルスタンパク質や宿主因子とウイルスゲノムとの相互作用を介して生じ、この相互作用の際に生じる複合体は、逆転写酵素複合体 (reverse transcription complex : RTC) やプレインテグレーションコンプレックス (preintegration complex : PIC) と呼ばれる²⁻⁴⁾。

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1) はレトロウイルス科に属する

レンチウイルス属の一種であり、HIV-1 インテグラーゼ変異体解析により、これまで脱殻⁵⁻⁷⁾、逆転写^{5,8,9)}、ウイルス cDNA の核移行⁹⁻¹¹⁾といった組み込み以前の段階にもインテグラーゼの機能的関与が示唆されるが、インテグラーゼによる多面的、機能的な関与に対する機序は、大部分が不明である。これまで、HIV-1 インテグラーゼと直接相互作用する細胞性タンパク質がいくつか報告されており、そのなかには、integrator interactor 1 (INI 1)^{12,13)}や human lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator p 75 (LEDGF/p 75)^{14,15)}がある。一方、HIV-1^{16,17)}、マウス白血病ウイルス (murine leukemia virus : MLV)¹⁸⁾、酵母レトロウイルス様エレメント Ty 3¹⁹⁾に対しては、逆転写過程におけるインテグラーゼと逆転写酵素 (reverse transcriptase : RT) との物理的な相互作用があるという報告がますます増えてきており、精製した HIV-1 ウイルス粒子を用いた内在性 RT アッセイによると、細胞性コファクターが逆転写を *in vivo* で完了するには必須であるとも示唆されている⁵⁾。

今回、yeast two hybrid 法を用いて、HIV-1 インテグラーゼと結合する宿主因子の同定を試みた。その結果、survival motor neuron (SMN)-interacting protein 1 (SIP 1)/Gemin 2 を同定した。次に HIV-1 の生活環における SIP 1/Gemin 2 の機能的な関与を、SIP 1/Gemin 2 を標的とする small interfering RNA (siRNA) を用いて検討した。また、Gemin 2 の細胞内発現プロファイリングも併せて解析したので報告する。

II. 方 法

1. プラスミド

HIV-1 インテグラーゼの全長の DNA フラグメントを、HIV-1 pNL 4-3 lucΔenv ベクター (*env* 遺伝子を欠失させ、*nef* 遺伝子をホタルルシフェラーゼ遺伝子で置換させたもの)⁵⁾より、PCR を用いて増幅した。プライマー対は GBT 9 IN-1 R センスプライマー (5'-CCGGAATTCTTTTATAGATGGAATA-3') と GBT 9 INenBH アンチセンスプライマー (5'-ACGGATCCTTAATCCTCATCCTG-3') を用いた。増幅した PCR 産物を *Eco*RI と *Bam*HI を用いて制限酵素処理して、pGBT 9 ベクター (BD Bioscience, San Jose, CA) にライゲーションした (pGBT-IN)。ヒトリンパ球 cDNA ライブラリーをライゲーションして作製した pACT プラスミド (BD Bioscience) およびイースト細胞株 Y 187 に、あらかじめトランスフォーメーションした HeLa cDNA ライブラリーをライゲーションして作製した pGAD-GH プラスミド (BD Bioscience) も用いた。

2. yeast two hybrid 法および cDNA 単離

pGBT-IN プラスミドを bait 側とし、ヒトリンパ球 cDNA ライブラリーを含む pACT プラスミドを prey 側として、イースト細胞株 HF 7 c に共トランスフォーメーションを行った。得られた陽性クローンを、さらに X-gal 活性を用いて確認した。また、pGBT-IN プラスミドをイースト細胞株 AH 109 にトランスフォーメーションし、さらに HeLa cDNA ライブラリーを含む pGAD-GH プラスミドとともにイーストメイティングを行った。得られた陽性クローンを、X-gal 活性を用いて確認した。

3. 細胞

HeLa 細胞と 293 T 細胞を、10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium : DMEM, MP Biomedicals Inc., Irvine, CA), 2 μg/ml 炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業(株)), 0.88 μg/ml イーグル MEM アミノ酸ビタミン培地 (日水製薬(株)), 100 単位/ml ペニシリン G, 100 μg/ml 硫酸ストレプトマイシン含有) で培養した。ヒト末梢血単核球 (human peripheral blood mononuclear cell : PBMC) を、血清中の HIV-1 が陰性の健常人より Ficoll-Paque Plus (アマシャム バイオサイエンス(株)) を用いて遠心密度勾配法で単離した。そのヒト末梢血単核球より末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte : PBL) を単離して、10% FBS (Invitrogen) および 10 単位/ml 組み換えヒト IL-2 を添加した RPMI 1640 培地 (GIBCO, Invitrogen) で培養した。同時に、PBMC より単核球由来マクロファージ (monocyte-derived macrophage : MDM) を単離して、5% ヒト AB 型血清添加 RPMI 1640 培地 (GIBCO) にて培養した。

4. siRNA の作製

ヒト Gemin 2 mRNA のオープンリーディングフレームの 5'-AAGGUGCUCUGAAGUGAGGCU-3' 配列を標的とする siRNA (siGemin 2) と、コントロール用 Green Fluorescent Protein (GFP) の mRNA の 5'-CGGCAAGCUGACCCUGAAGUUC AU-3' 配列を標的とする siRNA (siGFP) を作製した (QIAGEN Inc., MD, USA)。

5. siRNA トランスフェクション

HeLa 細胞に 60 nM の siRNA (siGemin 2 または siGFP) を、オリゴフェクトアミン (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、4 時間後に 30% FBS (Invitrogen) 添加 DMEM 培地 (MP Biomedicals Inc.) を加えた。さらに 12~18 時間後に、10% FBS (Invitrogen) 添加 DMEM 培地 (MP Biomedicals Inc., 100 単位/ml ペニシリン G, 100 μg/ml 硫酸ストレプト

表1 yeast two hybrid 法でのスクリーニングの結果

yeast two hybrid 法の結果					
	bait	cDNA ライブラリー	スクリーニング したクローン数	陽性 クローン	yeast 細胞株
#1	pGBT-IN (full)	ヒトリンパ球	2.8×10^6	28	HF 7 c
#2	pGBT-IN (full)	HeLa 細胞	2.0×10^7	5	AH 109
陽性クローンの DNA 配列検索の結果					
#1	Succinate-CoA ligase ADP-forming				
#2	SMN-interacting protein 1 (SIP 1/Gemin 2) (137~238 a.a.) [101/102 a.a. (99%)]				

マイシン含有)に置換した。標的タンパク質の効果的な減少を狙って、24 時間後に再度同じ siRNA を、同様にトランスフェクションした。

6. ウイルス調整と感染

293 T 細胞に $1 \mu\text{g}$ の pNL 4-3 uc Δenv ベクターと $1 \mu\text{g}$ の MLV 発現ベクター (pJD 1) を、リポフェクトアミン (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし²⁰⁾、6 時間後に 10%FBS (Invitrogen) 添加 DMEM 培地 (MP Biomedicals Inc., 100 単位/ml ペニシリン G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸ストレプトマイシン含有)に置換した。48 時間後にトランスフェクションした細胞の培養上清を 0.45 mm の孔径のフィルターで濾過滅菌し、さらにそのウイルス含有培養上清を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I (Worthington, Lakewood, NJ) および 10 mM MgCl_2 を添加して 37°C, 40 分インキュベート処理してウイルス調整をして、プラスミド DNA の混入を防止しようとした。各プラスミドベクターの発現をモニタリングするために、トランスフェクションして 48 時間後に Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison, WI) を加えて細胞を溶解し、10 μl の全細胞溶解物をルシフェラーゼ活性の測定に使用した。

7. モノクローナル抗体

マウス抗 Gemin 2/SIP 1 抗体 (BD Biosciences) を用いた。

8. ウェスタンブロッティング

細胞溶解物を 10-20%濃度勾配のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (Sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gels, システム インストルメント株) にアプライして電気泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (アト株) に転写し、ECL ウェスタンブロッティング検出試薬 (アマシャム バイオサイエンス株) および CCD カメラ (LAS-1000, 富士写真フイルム株) で検出し、撮影した。

III. 結 果

1. HIV-1 インテグラーゼと結合する宿主因子の同定

bait 側として全長の HIV-1 インテグラーゼをコードする遺伝子を挿入したプラスミド (pGBT-IN) を用い、prey 側としてヒトリンパ球 cDNA ライブラリーをコードする遺伝子を挿入したプラスミド (pACT) を用いて yeast 株 HF 7 c に共トランスフォーメーションさせたところ、28 個の陽性クローンを得た。また、bait 側として pGBT-IN プラスミドを用いて、prey 側に HeLa 細胞 cDNA ライブラリーをコードする遺伝子を挿入したプラスミド (pGAD-GH) を yeast 株 AH 109 に接合 (yeast mating 法) させたところ、5 個の陽性クローンを得た (表 1)。この陽性クローンより DNA を抽出し、BLAST サーチで検索したところ、Succinate-CoA ligase ADP-forming および survival motor neuron (SMN)-interacting protein 1 (SIP 1 または Gemin 2) の 137~238 番アミノ酸残基をコードする cDNA クローンであった。SIP 1/Gemin 2 は SMN と強く結合して SMN 複合体を形成し、細胞質内でスプライソームである snRNP の組み立て (assembly) に関与している 288 アミノ酸残基からなる 32 kD のタンパク質である^{21~24)}。HIV-1 ウイルスゲノムがタンパク質と複合体を形成 (RTC または PIC) していることより、Gemin 2 がインテグラーゼの新規宿主細胞因子であると考えて、解析を進めていくこととした。

2. Gemin 2 の細胞株および初代培養細胞における発現プロファイル

図 1 は、細胞株 (HeLa 細胞, 293 T 細胞) と初代培養細胞 (PBL および MDM) における Gemin 2 の内在性発現プロファイルを調べたものである。細胞株では、有意に発現が認められた。初代培養細胞では、PBL では IL-2 (60 μg) で刺激したもので有意に発現増強が認められたが、PHA および IL-2 (20 μg) で刺激したものでは発

図1 細胞株および初代培養細胞における内在性 Gemin 2 の発現プロファイル

全細胞溶解物を SDS-PAGE で電気泳動し、ウエスタンブロットティングで解析した。

1 : HeLa (20 µg), 2 : HeLa (60 µg), 3 : MDM #1 (20 µg), 4 : MDM #2 (20 µg), 5 : 未刺激 PBL (20 µg), 6 : PHA 刺激 PBL (20 µg), 7 : IL-2 刺激 PBL (60 µg), 8 : IL-2 刺激 PBL (20 µg), MW : 分子量マーカー

現が認められなかった。MDM でも発現は認められなかった。

3. HIV-1 の感染後期における Gemin 2 の影響

まず、Gemin 2 を特異的な標的とする siRNA を用いて、Gemin 2 の機能的な役割を検討した。設計した siGemin 2 は、コントロールの HeLa 細胞と比較して、約 20~40% の SIP 1/Gemin 2 の減少が得られた。次に、この siGemin 2 を用いてシングルラウンド感染実験を行った。まず siGemin 2 をトランスフェクションした 293 T 細胞 (Gemin 2 (-)) に HIV-1 分子クローンをトランスフェクションした細胞でウイルスを調整し、感染実験を行ったところ、ルシフェラーゼ活性を指標にした場合、コントロール細胞と比較して、ほぼ同様の結果が得られた (図 2)。

4. HIV-1 の感染初期における Gemin 2 の影響

siGemin 2 をトランスフェクションした 293 T 細胞 (Gemin 2 (-)) にウイルスを感染させてウイルスを調整し、感染実験を行ったところ、コントロールと比較して、ルシフェラーゼ活性を指標にすると 30~40% の減少が認められた (図 3)。

IV. 考 察

本研究より、yeast two hybrid 法の結果から、HIV-1

図2 HIV-1 感染後期における Gemin 2 の影響

コントロール用 siGFP (左), siGemin 2 (中央) を 293 T 細胞にトランスフェクションして Gemin 2 (-) とした後、HIV-1 の分子クローンをトランスフェクションして 48 時間後に HeLa 細胞に感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。Mock-transfected : トランスフェクションのコントロール。

図3 HIV-1 感染前期における Gemin 2 の影響

siGFP におけるルシフェラーゼ活性を 100 としたときの siGemin 2 のルシフェラーゼ活性を、%減少率として測定した。293 T 細胞に siGemin 2 をトランスフェクションして Gemin 2 (-) とした後、HIV-1 を感染させ、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

インテグラーゼの新規宿主細胞因子 SIP 1/Gemin 2 を同定した。また、その結果から、HIV-1 インテグラーゼは Gemin 2 の 137~238 番アミノ酸残基と結合しており、それを Gemin 2 のインテグラーゼ結合部位 (integrase binding region of Gemin 2 : IBDG 2) と名付けた。インテグラーゼは機能的に 3 つのドメイン、N 末端ドメイン (Zn²⁺結合ドメイン : 1~50 番アミノ酸残基)、中央酵素活性ドメイン (50~212 アミノ酸残基)、さらに C 末端ドメイン (213~288 アミノ酸残基) からなっている²⁰⁾。本研究では、インテグラーゼの機能ドメインごとの IBDG 2 との結合性やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase (GST)) 融合タンパク質を用いた pull-down アッセイでの *in vitro* の結合性は調べていないので、それが今後の検討課題である。Gemin 2 は細胞内で SMN と複合体を形成 (SMN 複合体) しており、細胞質内での低分子リボ核タンパク質 (small nuclear RNP : snRNP) の組み立てにきわめて

重要であるとの報告がある²¹⁻²⁴)。SMN 複合体には SMN と Gemin 2 以外にも、Gemin 3²⁵), Gemin 4²⁶), Gemin 5²⁷), Gemin 6²⁸), Gemin 7²⁹)などがあり、インテグラーゼとこれらの SMN 複合体の構成タンパク質との相互作用もまた検討課題である。Gemin 2 の内在性発現プロファイルを調べると、細胞株(HeLa 細胞と 293 T 細胞)では恒常的に強く発現している結果が得られた。初代培養細胞では、末梢血リンパ球において IL-2 で刺激をした場合だけに Gemin 2 の発現が認められ、それは細胞溶解物の濃度依存的に発現が増強していた。Gemin 2 が、PBL を PHA で刺激をしたときには認められず、IL-2 で刺激をしたときのみ検出されたのかは不明である。T リンパ球は PHA 刺激により HIV-1 の感染はより増強される^{30,31})が、Gemin 2 の内在性発現と T リンパ球の刺激の有無や刺激の種類との関連は今後の検討課題である。また、MDM で 32 kD よりも低分子量のバンドが検出できたが、これについても不明であり検討すべき課題である。RNA 干渉の実験から、Gemin 2 は HIV-1 の感染後期過程には働きを有せず、感染前期過程にきわめて重要な働きを有していることが示唆された。HIV-1 の感染前期過程は、吸着、脱殻、逆転写、核移行、組み込みからなるが、どの段階で Gemin 2 が作用しているかは、今後の解明が待たれる。そして、Gemin 2 と HIV-1 インテグラーゼとの結合後、どのような機構により HIV-1 の感染、特に感染前期過程に影響を及ぼすのかを解明することも今後の検討課題である。その際、Gemin 2 は上述したように、SMN 複合体を形成して snRNP の組み立て、さらにいえば pre-mRNA のスプライシングに関与しているとの報告があるので²¹⁻²⁴)、HIV-1 の脱殻から逆転写の過程において HIV-1 インテグラーゼと結合し、HIV-1 の感染に重要な影響を与えていることが示唆された。また最近、Golembe らにより、ヘルペスウイルスでの実験からウイルスの感染と SMN 複合体の関連に関する報告がされており³²)、Gemin 2 が HIV-1 の感染に及ぼす機構の解明に対する一助となりうるものと思われる。そして、Gemin 2 の HIV-1 の感染に対する機能的な関与の解明により、HIV-1 が原因となっている AIDS の治療、特に HIV-1 (さらにいえば HIV-1 インテグラーゼ)を特異的な標的とする薬剤開発に貢献することができるものと考えられる。

V. 結 論

今回、yeast two hybrid 法を用いて、HIV-1 インテグラーゼの新規宿主細胞因子 SIP 1/Gemin 2 を同定した。Gemin 2 は HIV-1 の感染前期過程にきわめて重要な働きを有していることが示唆された。

謝 辞

本稿作成および本研究に関して多大なるご助言を下さいました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野 増田貴夫助教授、実験方法のご助言を下さいました同分野 西辻裕紀氏と貝賀聡史氏、さらには同分野 神奈木真理教授ならびに顎顔面外科学分野 山口 聡助手と天笠光雄教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Katz, R. A. and Skalka, A. M. : The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63 : 133-173, 1994.
- 2) Bukrinsky, M. I. and Haffar, O. K. : HIV-1 nuclear import : in search of a leader. *Front. Biosci.* 2 : d 578-587, 1997.
- 3) Cullen, B. R. : Journey to the center of the cell. *Cell* 105 : 697-700, 2001.
- 4) Goff, S. P. : Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection : viral exploitation of cellular pathways. *J. Gene Med.* 3 : 517-528, 2001.
- 5) Masuda, T., Planelles, V., *et al.* : Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U 3 att site : unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J. Virol.* 69 : 6687-6696, 1995.
- 6) Leavitt, A. D., Robles, G., *et al.* : Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain *in vitro* integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J. Virol.* 70 : 721-728, 1996.
- 7) Nakamura, T., Masuda, T., *et al.* : Lack of infectivity of HIV-1 integrase zinc finger-like domain mutant with morphologically normal maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 : 715-722, 1997.
- 8) Wu, X., Liu, H., *et al.* : Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J. Virol.* 73 : 2126-2135, 1999.
- 9) Tsurutani, N., Kubo, M., *et al.* : Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74 : 4795-4806, 2000.
- 10) Bukrinsky, M. I., Sharova, N., *et al.* : Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 : 6125-6129, 1993.
- 11) Ikeda, T., Nishitsuji, H., *et al.* : Evaluation of the functional involvement of human immunodeficiency virus type 1 integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. *J. Virol.* 78 : 11563-11573, 2004.
- 12) Yung, E., Sorin, M., *et al.* : Specificity of interaction of INI 1/hSNF 5 with retroviral integrases and its functional significance. *Nat. Med.* 7 : 920-926, 2001.
- 13) Kalpana, G. V., Marmon, S., *et al.* : Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF 5. *Science* 266 : 2002-2006, 1994.

- 14) Maertens, G., Cherepanov, P., *et al.* : LEDGF/p 75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J. Biol. Chem.* 278 : 33528-33539, 2003.
- 15) Maertens, G., Cherepanov, P., *et al.* : Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p 75. *J. Biol. Chem.* 279 : 33421-33429, 2004.
- 16) Fassati, A. and Goff, S. P. : Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75 : 3626-3635, 2001.
- 17) Zhu, K., Dobard, C., *et al.* : Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J. Virol.* 78 : 5045-5055, 2004.
- 18) Fassati, A. and Goff, S. P. : Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 73 : 8919-8925, 1999.
- 19) Nymark-McMahon, M. H., Beliakova-Bethell, N. S., *et al.* : Ty 3 integrase is required for initiation of reverse transcription. *J. Virol.* 76 : 2804-2816, 2002.
- 20) 増田貴夫 : HIV-1 インテグレーションと複製. *ウイルス* 48 : 19-25, 1998.
- 21) Liu, Q., Fischer, U., *et al.* : The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP 1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90 : 1013-1021, 1997.
- 22) Buhler, D., Raker, V., *et al.* : Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly : implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 8 : 2351-2357, 1999.
- 23) Jablonka, S., Bandilla, M., *et al.* : Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP 1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 497-505, 2001.
- 24) Meister, G., Buhler, D., *et al.* : A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.* 3 : 945-949, 2001.
- 25) Charroux, B., Pellizzoni, L., *et al.* : Gemin 3 : A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.* 147 : 1181-1194, 1999.
- 26) Charroux, B., Pellizzoni, L., *et al.* : Gemin 4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.* 148 : 1177-1186, 2000.
- 27) Gubitz, A. K., Mourelatos, Z., *et al.* : Gemin 5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.* 277 : 5631-5636, 2002.
- 28) Pellizzoni, L., Baccon, J., *et al.* : Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin 6 as a novel component. *J. Biol. Chem.* 277 : 7540-7545, 2002.
- 29) Baccon, J., Pellizzoni, L., *et al.* : Identification and characterization of Gemin 7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J. Biol. Chem.* 277 : 31957-31962, 2002.
- 30) Siekevitz, M., Josephs, S. F., *et al.* : Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science* 238 : 1575-1578, 1987.
- 31) Gowda, S. D., Stein, B. S., *et al.* : Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD 4+ lymphocytes. *J. Immunol.* 142 : 773-780, 1989.
- 32) Golembe, T. J., Yong, J., *et al.* : Lymphotropic Herpesvirus saimiri uses the SMN complex to assemble Sm cores on its small RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 25 : 602-611, 2005.