

1. 抗ウイルス宿主膜貫通タンパク質 MARCH8 の同定

徳永 研三

国立感染症研究所 感染病理部

MARCH8 は、最近発見された RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼの MARCH ファミリーに属する 11 メンバーのうちの 1 つである。MARCH8 は種々の宿主膜貫通タンパク質の発現を低下させるが、その生理的役割は不明である。今回筆者らは MARCH8 を新規抗ウイルス因子として同定した。ウイルス産生細胞における MARCH8 の過剰発現は、レンチウイルスの産生レベルには影響しなかったが、ウイルスの感染性を著しく低下させた。MARCH8 は HIV-1 エンベロープ糖タンパク質のウイルス粒子への取り込みを、相互作用を介して細胞膜から発現低下させることによって阻害し、結果としてウイルスエントリー効率の大幅な低下を生じさせた。水胞性口炎ウイルス G タンパク質への MARCH8 の阻害効果はさらに顕著であったことから、MARCH8 によるエンベロープウイルスの感染阻害が広範囲に渡る可能性が示唆された。MARCH8 の内因性発現は単球由来マクロファージおよび樹状細胞で高く、MARCH8 を枯渇させたマクロファージから産生されたウイルス粒子の感染性を有意に増加させた。今回の筆者らの知見は、MARCH8 が最終分化型のミエロイド系細胞に高発現しており、それがウイルスエンベロープ糖タンパク質のウイルス粒子への取り込みを低下させる強力な抗ウイルス宿主膜貫通タンパク質であることを示すものである。

1. はじめに

Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 は RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼである 11 種類の MARCH ファミリータンパク質の 1 つである^{1,2)}。MARCH ファミリータンパク質は、E2 ユビキチン結合酵素との相互作用に重要な C4HC3 RING フィンガー (RING-CH フィンガー) ドメインを N 末端領域に有する (図 1)。また膜貫通領域を持たない MARCH7 と MARCH10 以外の MARCH ファミリータンパク質は、2 つまたはそれ以上の膜貫通領域を持つ (MARCH8 は図 1 のように 2 つ有する)。MARCH ファミリーのひとつ MARCH8 は元々、ウイルス性 RING-CH リガーゼであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイ

ルスの K3/K5、マウス γ -2 ヘルペスウイルス 68 の K3、ミクソマウイルスの M153R 等の細胞ホモログとして同定されている^{1,2)}。ウイルス性 RING-CH リガーゼが MHC-I の細胞表面発現を抑制するのに対し³⁻⁵⁾、MARCH8 は MHC-II⁶⁻⁸⁾、CD81⁹⁾、CD86¹⁰⁾、CD98¹¹⁾、IL-1 受容体アクセサリタンパク質¹²⁾、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド受容体¹³⁾ およびトランスフェリン受容体¹⁴⁾ 等の膜貫通タンパク質の細胞表面発現を低下させることが報告されている。筆者が抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin の研究^{15,16)} を行っていた頃からの共同研究仲間であり、高校時代からの盟友である藤田英明君 (当時、九州大学薬学研究院に所属、現在は長崎国際大学薬学部教授) と共に、MARCH8 がトランスフェリン受容体をダウンレギュレートすること、そしてその結果トランスフェリン受容体がリソゾーム分解を受けることを、細胞生物学の論文として 2013 年に報告した¹⁴⁾。その後、MARCH8 のさらなる機能解析を行う過程において、MARCH8 安定発現細胞を樹立すべく、まず藤田君が MARCH8 発現レンチウイルスベクターを作製してトランスダクションを試みた。しかしながら、何か月経っても安定発現細胞がとれないとの連絡が彼からあったため、やはりウイルスを扱い慣れてない研究者に任せていても駄目だと思い、早速、筆者らがレンチウ

連絡先

〒162-8640
東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所
TEL: 03-5281-1111
FAX: 03-5285-1189
E-mail: tokunaga@nih.go.jp

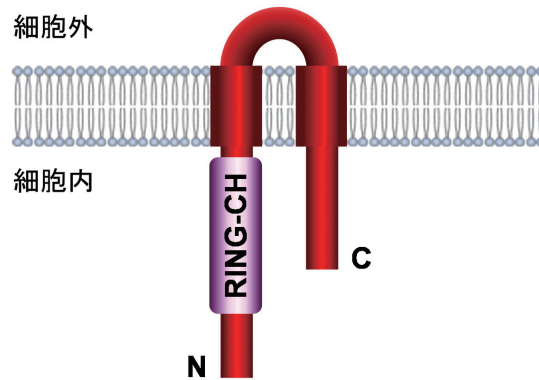


図1 MARCH8の構造

RINGフィンガー型E3ユビキチンリガーゼであるMARCHファミリータンパク質の1つMARCH8は二回膜貫通タンパク質であり、N末端側の細胞質領域にE2ユビキチン結合酵素との相互作用に重要なRING-CHドメインを有する。

イルスベクターの系を引き継いで実施した。ところが何度トライしても、安定発現細胞を樹立できないという藤田君の結果が再現出来ただけであった。そして筆者はふと、MARCH8の発現自体がレンチウイルスベクター(=HIV-1)のトランスダクション(=感染)を阻害しているのではないかと、つまりMARCH8が、これまで報告されてきたAPOBEC3G^{17,18)}、TRIM5 α ¹⁹⁾、BST-2/tetherin^{20,21)}、SAMHD1^{22,23)}およびMX2²⁴⁻²⁶⁾のように、HIV-1に対する感染抑制効果を持った抗ウイルス宿主因子として機能しているのではないか、という可能性を考えた。

2. ウイルス産生細胞におけるMARCH8の発現がHIV-1粒子の感染性を低下させる

この可能性を検証するため、筆者はまずポストドクの小山貴芳君と共に、MARCH8を発現させた293T細胞からトランスフェクションにより得られたVSV-G(水疱性口炎ウイルスGタンパク質)シュードタイプHIV-1の感染性をMARCH8非発現293T細胞から得られたコントロールウイルスのそれと比較検討した。MARCH8の発現はウイルスの産生レベルには影響しなかったが、ウイルスの感染性を大きく低下させた。標的細胞においてMARCH8を発現させた場合はウイルスの感染効率に変化が無いことから、ウイルス産生細胞でのMARCH8の発現がウイルス感染性の低下に繋がること明らかになった。次にVSV-G以外のウイルスエンベロープの場合を検討したところ、HIV-1のエンベロープではトロピズムの違いに依らずMARCH8による感染性低下が認められ、またHIV-2/SIV(サル免疫不全ウイルス)エンベロープやマウスレトロウイルス(マウス白血病ウイルスおよび異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス)のエンベロープにおいても同様の結果が認められたことから、MARCH8によるHIV-1感染抑制はエンベロープのタイプに依存しないことが分

かった。MARCH8のN末端細胞質領域に存在するRING-CHドメインはE2リガーゼのリクルートに関与し、いくつかの宿主膜貫通タンパク質のダウンレギュレーションに重要であることが知られているが、MARCH8の抗ウイルス活性においても重要か否かを検討した。この実験のあたりから、私のもとで学位を取ったばかりのポストドクの多田卓哉君と東京医科歯科大からの研究生である張延昭君が、大きな役割を果たすようになってきた。彼らが行った解析の結果、RING-CH変異型MARCH8ではウイルス感染抑制能が失われた事から、MARCH8のE3リガーゼ活性が抗ウイルス機能に必要な可能性が示唆された。

3. MARCH8はウイルス粒子のエントリー効率を低下させる

MARCH8の抗ウイルス活性が、ウイルス複製のどの過程で認められるのかについて、VSV-GシュードタイプHIV-1およびHIV-1全粒子を使用して、初期および後期逆転写物、さらに核移行の指標である2-LTRのコピー数をリアルタイムPCRによって比較検討した。その結果、両ウイルスとも初期逆転写においてすでにMARCH8の抑制効果が認められることが分かった。このことから、MARCH8は複製前期の最も初期段階、すなわちエントリーの部分を抑えている可能性が示唆された。この可能性を検証するため、共同研究者のひとりで、私と同じ研究部に所属する飛梅実氏が米国留学時代に樹立したアッセイ、すなわち β ラクターマーゼ-Vpr融合型タンパク(以下、BlaM-Vpr)の系を利用したエントリーアッセイ²⁷⁾を行った。ウイルスと標的細胞をインキュベートしてエントリーが成立するとウイルス粒子内のBlaM-Vprが細胞内に取り込まれ、あらかじめ標的細胞に取り込ませておいた蛍光基質であるCCF2がBlaM-Vprによって切断されることにより、本来、緑色の蛍光を発するCCF2が青色のシグナルを呈する切断

型へと変化する。その両シグナルの測定によりエントリー効率を定量した。その結果、MARCH8 発現細胞から産生された VSV-G シュードウイルスまたは HIV-1 のエントリー効率が著しく低下した。このことから、ウイルス産生細胞における MARCH8 の発現がウイルスのエントリーを負に制御することが明らかとなった。

4. MARCH8 はエンベロープのウイルス粒子への取り込みを抑制する

上記の結果を踏まえて、筆者らは MARCH8 によるウイルスエントリー効率の低下がウイルス粒子へのエンベロープの取り込み阻害に起因する可能性を考えた。それを検証するため、まず、産生されたウイルス上清のエンベロープ量を gp120 ELISA によって評価した結果、コトランスフェクションに用いた MARCH8 発現プラスミドの量に依存的に、上清中のエンベロープ量が減少していた。この ELISA の実験系ではウイルス粒子上のエンベロープそのものを測定していないため、ウイルス粒子の超遠心精製を行い、そのペレットを用いたウエスタンブロットを行った。その結果、MARCH8 発現細胞から産生された HIV-1 ウイルス粒子では HIV-1 エンベロープおよび VSV-G が共に著しく減少していた。このことから、MARCH8 はウイルス粒子へのエンベロープの取り込みを低下させることが明らかになった。ちなみに MARCH8 自身は野生型と RING-CH 変異型ともに、超遠心精製したウイルス粒子サンプルにおいて検出されたことから、MARCH8 はウイルス粒子中に取り込まれることが分かった。

5. MARCH8 は異なるメカニズムにより HIV-1 エンベロープと VSV-G の細胞表面発現を抑制する

ウエスタンブロット実験において、VSV-G が MARCH8 の共発現によりウイルス産生細胞内で完全に消失するのに対し、HIV-1 エンベロープでは量的な変化が認められなかった。この原因を究明するために、フローサイトメトリーにより、HIV-1 エンベロープの細胞表面および細胞内の発現レベルを定量した。その結果、HIV-1 エンベロープの細胞表面の量は MARCH8 によって減少したが、細胞内の発現量は変わらなかった。その一方で、VSV-G の細胞内発現量は MARCH8 により著しく減少した。これらの結果は蛍光抗体法でも確認され、さらに同手法により VSV-G の細胞内発現がリソゾームプロテアーゼ阻害剤の存在下で回復することが分かった。以上のことから、HIV-1 エンベロープおよび VSV-G のウイルス粒子中への取り込みが MARCH8 によって減少するのは、前者の場合 MARCH8 がその細胞表面発現を減少させて細胞内コンパートメントに隔離するためであり、後者の場合はさらに MARCH8 によって細胞内でリソゾーム分解されるためである、と考え

られた。また免疫沈降法によって、HIV-1 エンベロープおよび VSV-G が MARCH8 とそれぞれ結合することが分かり、MARCH8 によるこれらウイルスエンベロープ糖タンパク質の細胞膜表面における発現減少は、MARCH8 との相互作用を介して起こる可能性が示唆された。

6. マクロファージにおける MARCH8 の枯渇はウイルスの感染性を高める

ここまでの結果は全て MARCH8 の過剰発現系の実験にもとづくものであったため、次に MARCH8 の内在性発現レベルについて、各種細胞株および初代培養細胞から抽出したトータル RNA を用いてリアルタイム RT-PCR により検討した。全ての培養細胞株、PHA/IL-2 刺激後 CD4 陽性リンパ球、および単球において MARCH8 の発現は低レベルであったのに対し、単球由来マクロファージと単球由来樹状細胞のような最終分化型のみエロイド系細胞においては、5-8 倍高いレベルの MARCH8 遺伝子を発現していた。特にマクロファージでの MARCH8 発現レベルは、筆者らが 293T 細胞で過剰発現させた時のそれに近似したものであった。またウエスタンブロット実験においても、タンパク質レベルにおける培養細胞株とマクロファージでの MARCH8 発現の差は大変顕著なものであった。次に筆者らは、マクロファージにおける内在性発現レベルの MARCH8 が、ウイルスの感染性を減弱させているか否かを検討した。shRNA または CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクター²⁸⁾を用いて、MARCH8 遺伝子を標的としたノックダウンまたはノックアウト効果を検証した後、これらを用いてマクロファージへのトランスダクションを行った。MARCH8 を枯渇させたマクロファージに HIV-1 を感染させ、そこから産生されたウイルスの感染性を調べた。その結果、3 人のドナー由来のマクロファージ全てにおいて、MARCH8 を枯渇させた場合に得られたウイルスの感染性は有意に上昇していた。この結果は、MARCH8 を枯渇させたマクロファージを用いたウイルス複製実験においても再現された。以上の結果より、マクロファージの内在性 MARCH8 は HIV-1 の感染性を大幅に低下させていることが示唆された。

7. 終わりに

今回筆者らは、宿主膜貫通タンパク質 MARCH8 が、エンベロープのウイルス粒子への取り込みを抑えることによりウイルスの感染性を低下させる新規抗ウイルス宿主因子であることを見出した²⁹⁾ (図 2)。以前の報告において MARCH8 は、IL-1 β に結合する IL1 受容体アクセサリタンパク質を細胞表面から減少させることにより、NF- κ B の IL-1 β 依存的活性化を抑制すると言われている。筆者らの実験においては、NF- κ B による LTR 転写活性化が影響する HIV-1 ウイルス粒子産生を MARCH8 が抑制す

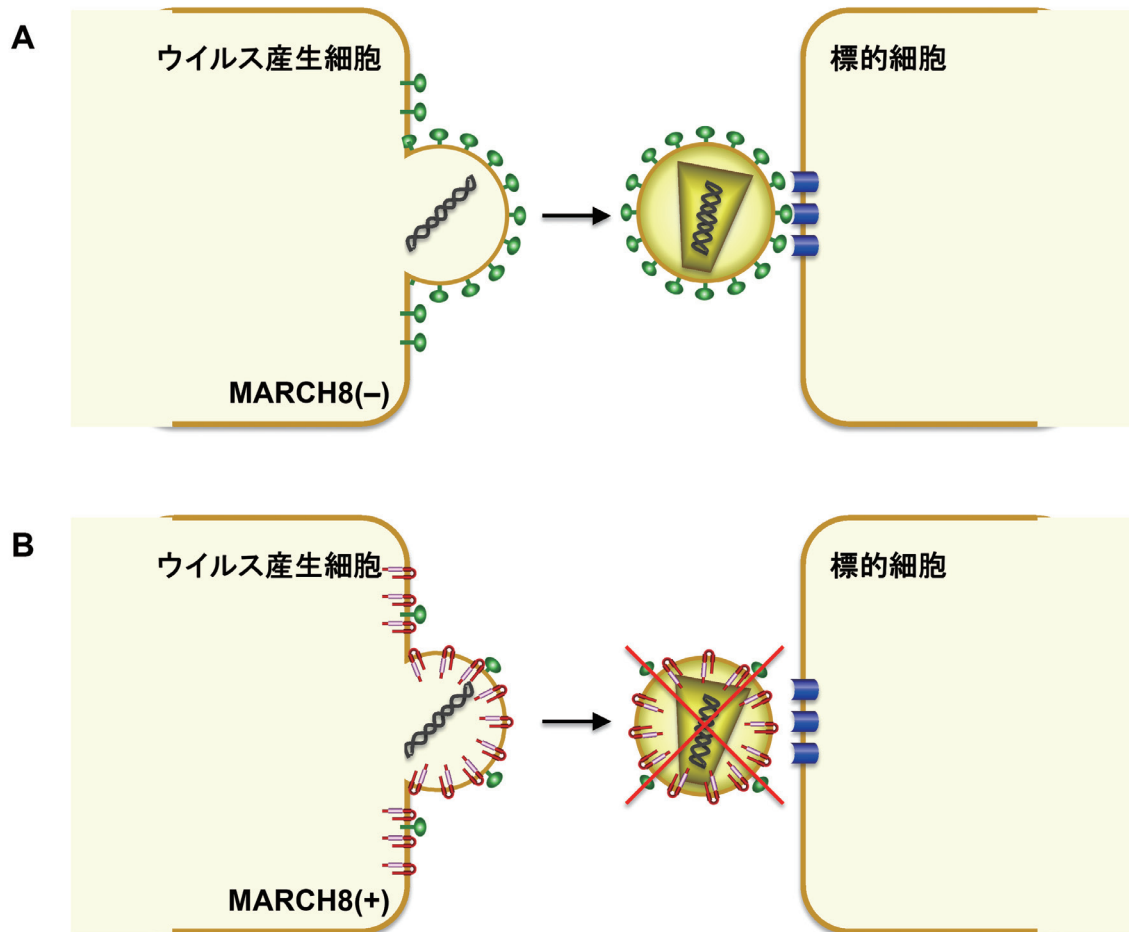


図2 MARCH8によるHIV-1感染抑制の機序

(A) MARCH8の発現がほとんど認められない細胞から産生されたHIV-1は、正常にウイルスエンベロープ糖タンパク質を取り込むため、標的細胞へ吸着・侵入することができる。

(B) MARCH8を高発現する細胞では、MARCH8が細胞表面のエンベロープ糖タンパク質の量を減少させるため、それがウイルス粒子中に効率よく取り込まれなくなる結果、ウイルス粒子の感染性が著しく低下する。

ることは無かった。これはおそらく、転写因子 Ets-1 (の選択的スプライシング型) が関与するような NF- κ B 非依存的な LTR 活性化³⁰⁾ には、MARCH8 が影響しないであろう。今回注目すべきことの一つは、VSV-G に対する MARCH8 の抑制効果が、HIV-1 や他のレトロウイルスエンベロープに対するそれと比較してはるかに強力であったことである。実際、MARCH8 は VSV-G に対しては細胞表面から消失させるだけでなく、それをリソゾーム分解へと導くことが明らかになった。このことから、MARCH8 が HIV-1 をはじめとするレトロウイルスのみならず、エンベロープウイルスの感染を広範囲に渡り阻害する可能性が示唆された。MARCH8 は複数の宿主膜貫通タンパク質 (MHC-II, CD44, CD86, IL-1 受容体アクセサリタンパク質, TNF 関連アポトーシス誘導リガンド受容体 1 およびトランスフェリン受容体) を、それらに共通する結合モチーフが存在しないにも関わらず、互いの膜貫通領域を介

して、細胞表面から減少させることが知られている。恐らく MARCH8 は、今回のウイルスエンベロープの場合も含めて、特異的なモチーフというよりはむしろ膜貫通領域全体の立体構造を認識しているのではないかと考えられる。なお抗ウイルス宿主因子の多くは HIV-1 アクセサリタンパク質によって不活化されることから、筆者らはアクセサリタンパク質のうち、複数の宿主膜貫通タンパク質を標的とすることが報告されている Vpu と Nef^{31, 32)} の有無による MARCH8 の HIV-1 感染抑制への影響を検討した。しかしながらいずれの場合も HIV-1 の感染性に変化はなかった。本論文の執筆中に、Mashiba ら³³⁾ が、マクロファージ特異的な未知の抗ウイルス宿主因子がアクセサリタンパク質 Vpr によって不活化されることを報告したことから、筆者らは Vpr の有無も同時に検討したが、やはり MARCH8 の抗ウイルス活性に影響しなかった。これらのことは HIV-1 が MARCH8 の機能を阻害するような進化を

遂げていないことを意味する。今後、MARCH8が認識する膜貫通領域の構造学的共通性、MARCH8が標的とするエンベロープウイルスの検索、さらに他のMARCHファミリーメンバーの抗ウイルス活性の有無等を解析していくことは、このミエロイド系細胞特異的な新規抗ウイルス宿主因子がHIV/AIDS治療をはじめとする新たな抗ウイルス戦略のひとつとなり得るかを検証する一助となるであろう。

参考文献

- 1) Bartee E, Mansouri M, Hovey Nerenberg BT, Gouveia K, Fruh K: Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *J Virol* 78: 1109-1120, 2004.
- 2) Goto E, Ishido S, Sato Y, Ohgimoto S, Ohgimoto K, Nagano-Fujii M, Hotta H: c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity. *J Biol Chem* 278: 14657-14668, 2003.
- 3) Stevenson PG, Efsthathiou S, Doherty PC, Lehner PJ: Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8455-8460, 2000.
- 4) Ishido S, Wang C, Lee BS, Cohen GB, Jung JU: Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol* 74: 5300-5309, 2000.
- 5) Coscoy L, Ganem D: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8051-8056, 2000.
- 6) Lapaque N, Jahnke M, Trowsdale J, Kelly AP: The HLA-DRalpha chain is modified by polyubiquitination. *J Biol Chem* 284: 7007-7016, 2009.
- 7) Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Aoki M, Goto E, Mito M, Uematsu M, Kakiuchi T, Hotta H, Ishido S: Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *J Immunol* 177: 341-354, 2006.
- 8) Jahnke M, Trowsdale J, Kelly AP: Structural requirements for recognition of major histocompatibility complex class II by membrane-associated RING-CH (MARCH) protein E3 ligases. *J Biol Chem* 287: 28779-28789, 2012.
- 9) Bartee E, Eyster CA, Viswanathan K, Mansouri M, Donaldson JG, Fruh K: Membrane-Associated RING-CH proteins associate with Bap31 and target CD81 and CD44 to lysosomes. *PLoS One* 5: e15132, 2010.
- 10) Tze LE, Horikawa K, Domasch H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC: CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208: 149-165, 2011.
- 11) Eyster CA, Cole NB, Petersen S, Viswanathan K, Fruh K, Donaldson JG: MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. *Mol Biol Cell* 22: 3218-3230, 2011.
- 12) Chen R, Li M, Zhang Y, Zhou Q, Shu HB: The E3 ubiquitin ligase MARCH8 negatively regulates IL-1beta-induced NF-kappaB activation by targeting the IL1RAP coreceptor for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14128-14133, 2012.
- 13) van de Kooij B, Verbrugge I, de Vries E, Gijzen M, Montserrat V, Maas C, Neefjes J, Borst J: Ubiquitination by the membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) ligase controls steady-state cell surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1. *J Biol Chem* 288: 6617-6628, 2013.
- 14) Fujita H, Iwabu Y, Tokunaga K, Tanaka Y: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J Cell Sci* 126: 2798-2809, 2013.
- 15) Iwabu Y, Fujita H, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K: Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun Integr Biol* 3: 366-369, 2010.
- 16) Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K: HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem* 284: 35060-35072, 2009.
- 17) Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH: DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113: 803-809, 2003.
- 18) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH: Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 646-650, 2002.
- 19) Stremlau M, Owens C, Perron M, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J: The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853, 2004.
- 20) Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD: Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-430, 2008.
- 21) Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J: The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3: 245-252, 2008.
- 22) Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M: SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474: 654-657, 2011.
- 23) Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J: Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474: 658-661, 2011.
- 24) Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, Kutluay SB, Zang T,

- Wilson SJ, Schoggins JW, Rice CM, Yamashita M, Hatzioannou T, Bieniasz PD: MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502: 563-566, 2013.
- 25) Goujon C, Moncorge O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, Hue S, Barclay WS, Schulz R, Malim MH: Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502: 559-562, 2013.
- 26) Liu Z, Pan Q, Ding S, Qian J, Xu F, Zhou J, Cen S, Guo F, Liang C: The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* 14: 398-410, 2013.
- 27) Tobiume M, Lineberger JE, Lundquist CA, Miller MD, Aiken C: Nef does not affect the efficiency of human immunodeficiency virus type 1 fusion with target cells. *J Virol* 77: 10645-10650, 2003.
- 28) Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F: Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 343: 84-87, 2014.
- 29) Tada T, Zhang Y, Koyama T, Tobiume M, Tsunetsugu-Yokota Y, Yamaoka S, Fujita H, Tokunaga K: MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat Med.* 2015 Nov 2. doi: 10.1038/nm.3956. [Epub ahead of print]
- 30) Yang HC, Shen L, Siliciano RF, Pomerantz JL: Isolation of a cellular factor that can reactivate latent HIV-1 without T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6321-6326, 2009.
- 31) Haller C, Muller B, Fritz JV, Lamas-Murua M, Stolp B, Pujol FM, Keppler OT, Fackler OT: HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins. *J Virol* 88: 14241-14257, 2014.
- 32) Tokarev A, Guatelli J: Misdirection of membrane trafficking by HIV-1 Vpu and Nef. *Cellular Logistics* 1: 90-102, 2011.
- 33) Mashiba M, Collins DR, Terry VH, Collins KL: Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. *Cell Host Microbe* 16: 722-735, 2014.

Identification of an antiviral host transmembrane protein MARCH8

Kenzo TOKUNAGA

Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases

Membrane-associated RING-CH 8 (MARCH8) is one of 11 members of the recently discovered MARCH family of RING-finger E3 ubiquitin ligases. MARCH8 downregulates several host transmembrane proteins; however, its physiological roles remain unknown. Here we identify MARCH8 as a novel antiviral factor. The overexpression of MARCH8 in virus producing cells did not affect levels of lentivirus production, but markedly reduced viral infectivity. MARCH8 blocked the incorporation of HIV-1 envelope glycoprotein into virions by downregulating it from the cell surface, probably through their interaction, resulting in reduced viral entry efficiency. The inhibitory effect of MARCH8 on vesicular stomatitis virus G-glycoprotein was even more remarkable, suggesting a broad-spectrum inhibition of enveloped viruses by MARCH8. Importantly, the endogenous expression of MARCH8 was high in monocyte-derived macrophages and dendritic cells, and MARCH8 depletion in macrophages significantly increased the infectivity of virions produced from these cells. Our findings thus indicate that MARCH8, which is highly expressed in terminally differentiated myeloid cells, is a potent antiviral host transmembrane protein that reduces virion incorporation of viral envelope glycoproteins.