

# 霊長類レンチウイルス粒子内ゲノム二量体化機構の解析

櫻木 淳一

大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染制御分野

霊長類レンチウイルスを含むレトロウイルスのゲノム RNA は成熟ウイルス粒子内で常に二量体化していることは古くから知られていた。このことはウイルスゲノム複製時の補償や、相同組換えによる遺伝的多様性の獲得を通じてウイルスの生残に有利に働くと解釈されてきた。しかしこれらのことは、ウイルス粒子が自己の小ささを犠牲にしてまで同一情報を複数持っていなければならないことの十分な回答とはなり得ていない。筆者は自ら構築した実験系を用いて簡潔かつ明瞭にヒト免疫不全ウイルスゲノム上の二量体化シグナルのマッピングを行い、ゲノムパッケージングシグナルとの機能相関を解析した。その結果はゲノム二量体化がゲノムパッケージングという複数段階からなる反応の必須の一ステップであることを強く示唆するものであった。

## 1. レトロウイルスについて

レトロウイルスは 100nm 強の直径を持つ球形 RNA ウィルスである。最新の分類ではレトロウイルス科は、アルファ（トリの肉腫ウイルス等）・ベータ（マウスの乳ガンウイルスやサル D 型レトロウイルス等）・ガンマ（マウスやネコの白血病ウイルス・C 型レトロウイルス）・デルタ（牛と霊長類の T 細胞性白血病ウイルス）・イプシロン（ヘビや魚のレトロウイルス）の五属のレトロウイルスと、レンチウイルス属・スプーマウイルス属からなる複雑な系統図が描かれている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/retroviruses/>)。すべてのレトロウイルス（内在性を除く）に共通する構造蛋白である Gag・Pol・Env の各遺伝子産物がウイルス粒子を構成している。粒子を物理的に形作る主要蛋白は Gag 蛋白であり、粒子の成熟に伴って 4-6 種類の蛋白に開裂する (MA, CA, NC など)。外殻にウイルスの MA 蛋白によって裏打ちされた細胞の形質膜由来の脂質二重膜をまとい、そこにウイルス由来の糖タンパク Env が多数刺さっている。粒子内部には CA 蛋白により構築され

たコアがあり、コア内部に NC 蛋白とゲノムの核酸蛋白複合体が存在している。粒子内部に Pol 前駆体蛋白からの解裂産物であるプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN) が存在している<sup>6)</sup> (図 1)。周知の通り、このウイルスは複製過程で自身の RNA ゲノムをプロウイルス DNA へと逆転写することが知られており、レトロのネーミングも遺伝情報が RNA から DNA へと復古 (Retro) することから付けられている。

## 2. レトロウイルスのパッケージングシグナル

パッケージングシグナル (E/psi) とはウイルスゲノムが粒子に特異的に取り込まれるために持つゲノム上の構造である。レトロウイルスのゲノムは約 9000 塩基の一本鎖ポジティブ RNA であり、E/psi はその 5' 末端の 500 塩基前後の領域から成っている。一般的に RNA は通常一本鎖であるため、鎖の内で相補的な部分が水素結合をして二本鎖状になり、糸がよじれるような形の高次構造をとる場合が多い。RNA の二次構造において、水素結合した塩基が連なって相補した二本鎖状になった領域をステム、ステムの端に出来る折り返し領域をループ、ステムの途中が途切れて 2-4 塩基程度相補鎖形成をしていない部分（ステム途中にはみ出して見える部分）をバルジと呼ぶ。レトロウイルスの E/psi 部位は複数のステムループ（バルジを含む）が連続して並ぶ二次構造をとりうる配列となっている (図 2)。これらのステムループ・バルジ群は一本鎖が露出したステム・バルジ部分を介してさらに相互に結合することでより複雑

### 連絡先

〒565-0871 吹田市山田丘 3-1

TEL : 06-6879-8348

FAX : 06-6879-8347

E-mail : sakuragi@biken.osaka-u.ac.jp

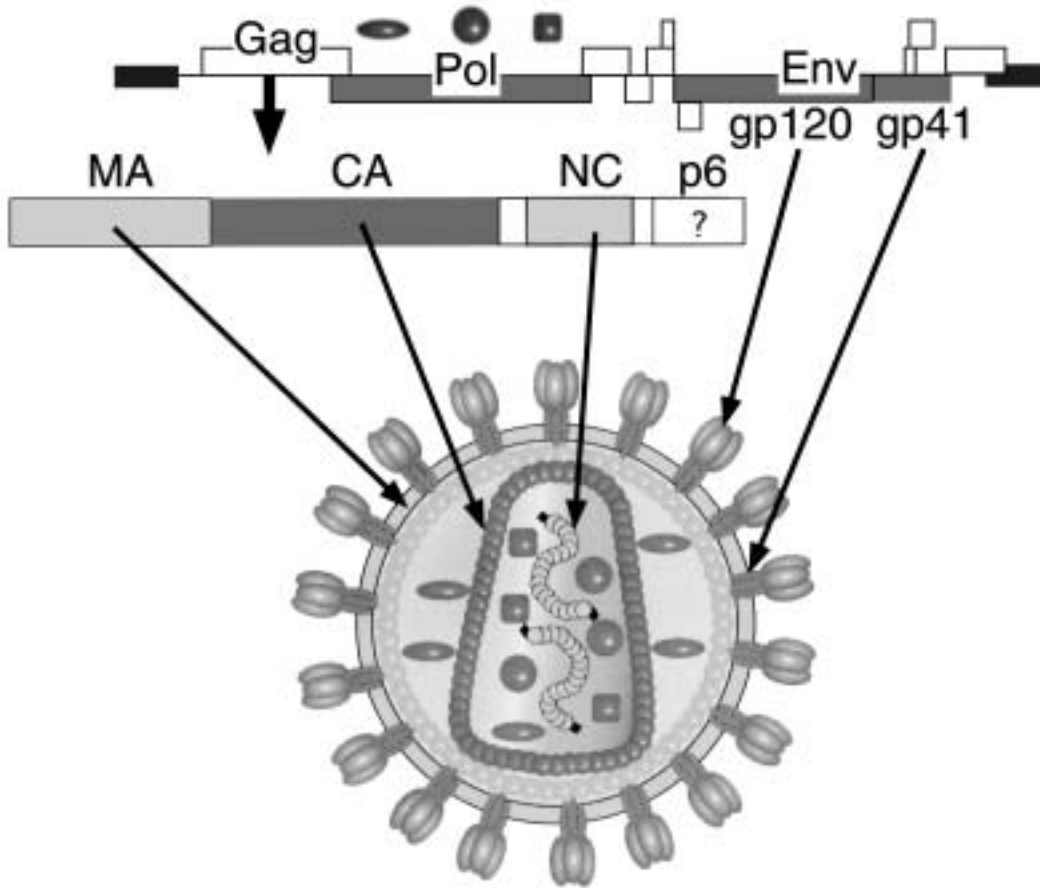


図1. HIVのゲノム・遺伝子と粒子構造の模式図。

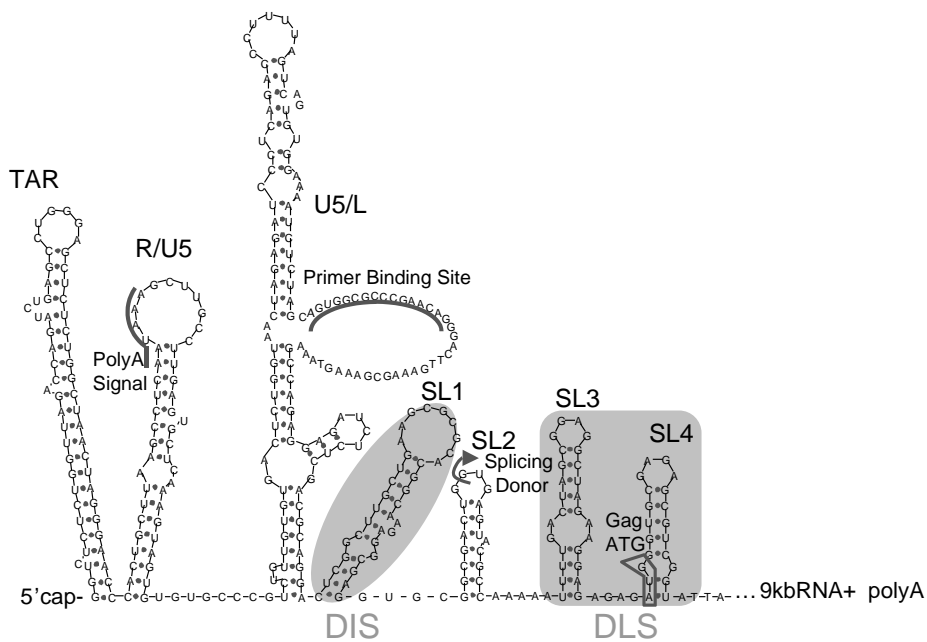


図2. HIVゲノム上のパッケージングシグナル領域の二次構造予測図。示した7つのステムループ構造すべてが効率良いゲノムパッケージングに必要である。in vitro の解析から指摘されている DIS/DLS についても示してある。

な高次構造をとり、この特徴的な分子の形状がシグナルとして認識され、ウイルス粒子蛋白と特異的に結合してゲノム RNA が粒子に取り込まれると考えられている。

### 3. ウイルスゲノム二量体化の理由

非常にユニークな事象として、レトロウイルスのゲノムはウイルス粒子内で二量体化していることが古くから知られている。1970年代には既にこの結合が共有結合ではないことや、電子顕微鏡像の解析等から RNA 鎖の 5'末端近傍で結合していることなどが報告されている<sup>2,4,9,10</sup>。HIV-1においてもこれは同様であり、少し前の論文ではゲノム RNA の詳細な電子顕微鏡像の解析により、RNA 結合部が単純な一点ではないという興味深い可能性が示唆されている(図3)<sup>8</sup>。粒子内に同一のゲノムを複数保持することは、ゲノム損傷時の補償や、ゲノム組換えによる遺伝的多様性の獲得を通じてウイルスの生残に有利に働くとして説明されてきた<sup>7</sup>。しかしほとんどのウイルスではゲノムは一セットしかないし、二量体化しているレトロウイルスゲノムは通常一つのプロウイルスからの転写産物であり、遺伝的には同一で多様性を持ち得ない。従ってこれらの仮説が、レトロウイルスだけがゲノムを一粒子内に積極的に複数持たなければならない必然性を十分説明しているとは言い難いのではないかと筆者は常に感じていた。ウイルスは物理的な小ささこそが生き残りのための大きな価値であり、一つあれば十分な遺伝情報(しかもそれはウイルスの身からすればかなり大きい質量を持つ)を重複して持つことは無駄が多いように思える。では他にも二量体化する理由があるのか? 筆者はここ数年一貫してこの古くて新しい命題の解明に取り組んできた。その結果、ゲノム二量体化という現象がウイルスゲノムパッケージングと分かちがたく結びついていることを示唆する様々なデータを得た。

### 4. ウイルス粒子を用いたゲノム二量体化シグナルの探索

レトロウイルスのゲノム RNA の 5'断片(1000塩基程度)を *in vitro* で合成し、適当なバッファ環境中で加熱後冷却すると、RNA 断片が二量体化することが知られている。さらにこの溶液中にウイルスの Gag 前駆体蛋白や NC を加えることによって二量体が安定化することも示されている。この現象を実際のウイルスゲノム二量体化を再現したものと考えて、断片への変異導入によるゲノム二量体化領域のマッピングがおこなわれて来た<sup>1,3,11</sup>。特に HIV-1 では多くの研究がおこなわれ、二量体化結合配列(Dimer Linkage Sequences : DLS)や二量体化開始部位(Dimer Initiation Site : DIS)といった領域がかなり詳細に解析されている<sup>5,16</sup>(図2)。しかし実際にウイルス内で起こっている現象ははるかに複雑で、様々な因子が介在する可能性がある。たとえば、*in vitro* の系ではフルゲノムと RNA 断片の構造の違いは考慮されていないし、そもそも細胞内での粒子形成・二量体化のタイミングはほとんど判っていない。細胞内で二量体化が起きる点で介在する因子はまったく不明であるし、細胞内で起きる現象なので温度は定常であり *in vitro* の系での Heat & Chill などあり得ない環境である。また、粒子が成熟する前の二量体の結合は非常に不安定であったり、逆に成熟粒子内の RNA はほぼ 100% 二量体化しているといった性質が *in vitro* の系ではまったく再現されていない。このように様々な疑問点が存在するにもかかわらず、筆者の留学当時ウイルス粒子を用いたゲノム二量体化の研究はまだ少なく、筆者が取り組む余地はあると考えられた。このためまず HIV-1 のパッケージングシグナル領域(E/psi)等に比較的小さい変異を導入して、ウイルス粒子内 RNA の二量体形成及び維持に作用するシス因子の探索をネイティブノザン法を用いて試みることから実験を開始した。す

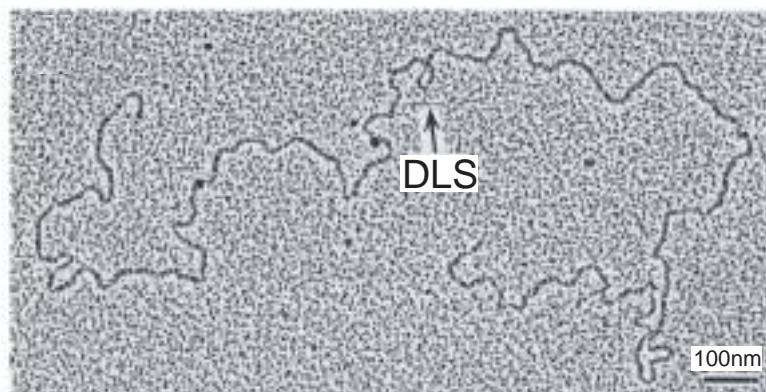


図3. HIV ゲノム RNA 二量体の電子顕微鏡像。ループ状になった結合部が見える。バーは 100nm であるが、これはウイルスの直径とほぼ等しい。Höglund, S. et al.; *Virology* 233, 271-279 (1996) より許可を得て転載。

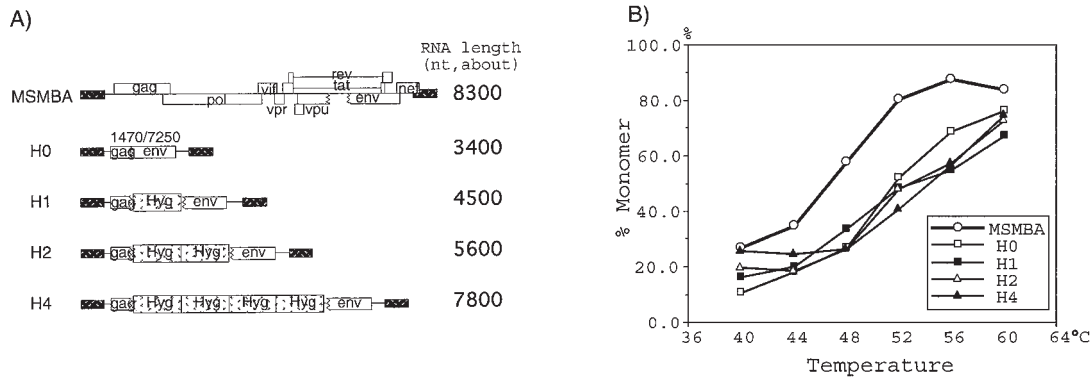


図 4. ゲノム長およびゲノム中央領域が二量体化に及ぼす影響. A) ハイグロマイシン耐性遺伝子(Hyg)を重複させることによって HIV ベクターのゲノム長を段階的に変化させた. B) 二量体安定性の比較. 本来のウイルスゲノム中央部を欠いたベクターはすべてゲノム長にかかわらず野生型ウイルスより高い安定性のゲノム二量体を形成した.

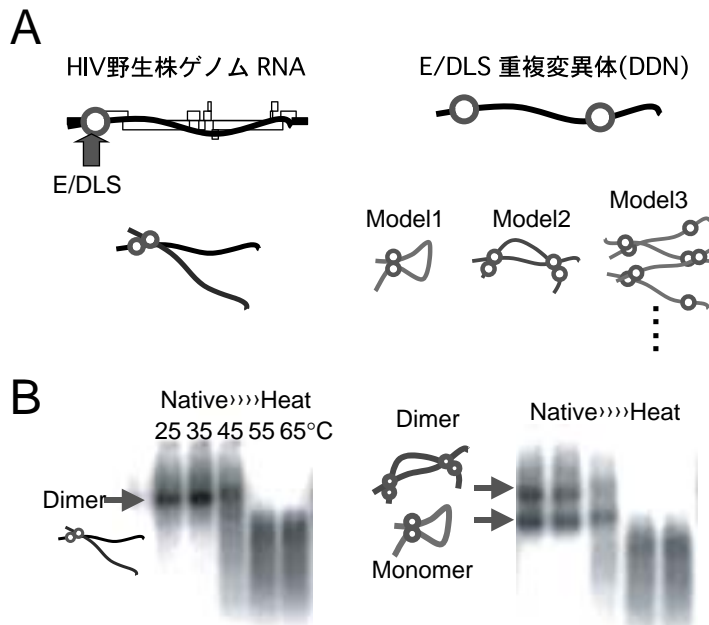


図 5. E/DLS 重複変異体の説明図. A) 二量体化シグナルを重複させることによって、分子内結合が起き、単量化する (モデル 1) ・分子間結合がニカ所で起き、二量体化する (モデル 2) ・分子間結合が鎖状に起き、多量体化する (モデル 3) という三つの可能性が考えられた. B) ネイティブノザンプロットのデータ. 野生株 RNA は 25-35 °C のネイティブ環境下で移動度が小さい. 55-65 °C で解離し、移動度の大きい単量体になることから、ネイティブでは二量体であることが判る. DDN ゲノムではネイティブで既に多くの RNA が単量体として存在している.

ると in vitro の実験系で示されてきた RNA 二量体化に必要とされている領域 (DIS/DLS) が、ウイルス粒子内での二量体形成には必ずしも必要十分ではないことを見いだした.むしろウイルスゲノムはウイルス粒子内にパッケージされる限りは常に二量体化する傾向が見られた. また、ゲノムの長さが二量体形成に与える影響を調べるためにウイルスベクターを用いて様々な長さのゲノム二量体化の解析

を行った. 二量体の安定性はゲノム長に依存せず、調べたベクターですべて同程度であったが、コントロールである野生型ゲノムより明らかにベクターの二量体安定性が高いという予想外の結果が得られた (図 4). このことは二量体の安定性に影響を与える領域が、従来指摘されていた二量体化領域とは大きく離れたゲノム上の領域に存在することを示唆する新しい知見であり、これらのデータをまとめて

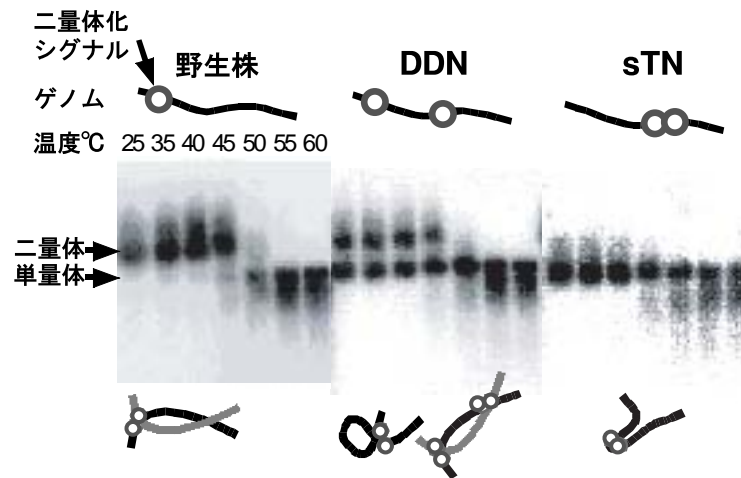


図 6. 単量体ゲノムのみを持つ HIV 粒子の作成. sTN ウイルスではほぼ全ゲノムがネイティブでも単量体化している.

論文とすることが出来た<sup>15)</sup>. これらの結果は *in vitro* の実験だけでは二量体化を説明するには不足であることを示しており、今後の研究の継続と発展に向けて筆者にモチベーションを与えるものであった.

### 5. 単量体化ゲノムを持つ成熟ウイルス粒子

引き続き二量体化についてどんなことを調べようかと考えたとき、筆者は一つのアイデアを思いついた. DIS/DLS がゲノム上に一つだから、二本が束になる. では DIS/DLS が一本のゲノム上に二つあったら? 筆者が考えた可能性は 3 つである (図 5A). そこで実際に同一ゲノム上に、DIS/DLS と E/psi を含むと考えられる領域 (今後 E/DLS とする) をもう一つ挿入することで重複させた変異体 DDN を作成して調べてみると、約半分程度のゲノムが単量体化していることが観察された (図 5B). つまり少なくとも一部はモデル 1 のようになり、分子内の E/DLS 同士が結合する結果分子間反応が不可能となり、二量体化が競争的に阻害されたと考えられたのである. この粒子内単量体の生成は非常に明瞭であり、E/DLS の挿入箇所に依存していなかった. また、このようにゲノムが不完全にしか二量体化していなくても、DDN のパッケージング及びウイルス粒子の形成・成熟には影響は見られなかった<sup>13)</sup>.

### 6. 完全なウイルスゲノム単量体化の試み

この実験で単量体ゲノムを持つウイルス粒子を作ることにはできたが、半分程度の効率では中途半端で、何かを言おうにも根拠が弱いように感じた. また、この現象の可能性を試したい思いもあり、完全にゲノムが単量体化したウイルスを作成することを次の目標においた. DDN ウイルス産生細胞内において、同一 RNA 上の DIS/DLS 同士の物理的距離はゲノム RNA 間の DIS/DLS 同士のそれよりはるかに

近いはずである. にもかかわらず分子内反応の結果の単量体生成と分子間反応の結果の二量体生成が同等ということは、分子間の DIS/DLS 反応の方が同一条件では効率良く起きることを意味している. その原因は、そもそも本来の位置にある E/DLS は分子間反応をするために働いているので、DDN においてはあとから挿入した E/DLS より分子間の反応性が高くなっているためではないかと考えた. そこで本来の DIS/DLS 領域を可能な限り削除して、3' 寄りの Env 領域に二つの E/DLS をタンデムに挿入した変異体 sTN を作成した. 同一箇所にタンデムに配置することで二つの E/DLS の反応性を等価にして、距離の近い分子内での反応性を高める意図である. この結果、単量体ゲノム RNA のみを含む成熟ウイルス粒子の作成に世界で初めて成功した (図 6). sTN 粒子に Env を補って感染実験も行った結果、やや低下したものの変異体ゲノムの逆転写能も観察され、吸着・融合・脱殻等が進行していることを意味していた. これらの結果は HIV-1 のゲノム二量体化とパッケージングが分離可能であること、ウイルス粒子の成熟及び出芽・感染にゲノム二量体化が必須ではないことを示唆していた.<sup>12)</sup>

### 7. 簡便・明瞭な粒子内ゲノム二量体化領域解析系の構築

さて、今まで示してきたように、*in vitro* の解析から示唆される HIV-1 の DIS/DLS の必要領域は E/psi と重なっている. このためウイルス粒子を用いてゲノム二量体化の解析を行おうとした場合、DIS/DLS に大きな変異を導入することはゲノムパッケージングにも影響を与えることになり、観察される変化が二量体化・パッケージングどちらのあるいは双方への影響の結果なのかを判断できないというジレンマがあった. ここで筆者の今までのアイデアを応用することを考えた (図 7A). 変異体 DDN のゲノムを考えると、E/DLS がゲノムの二カ所に存在していて、それ

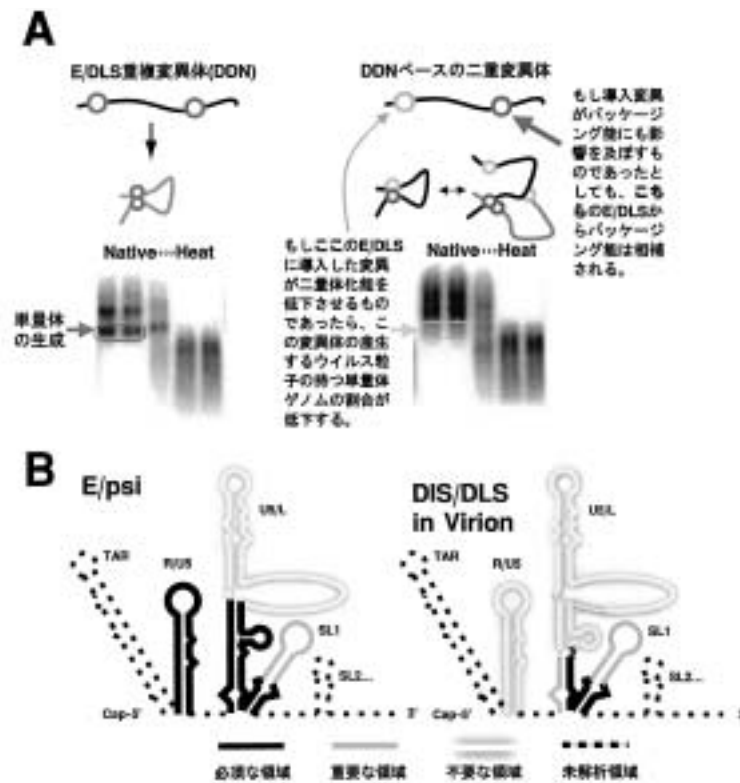


図 7. HIV 粒子内ゲノム二量体化責任領域の探索. A) 探索系の模式図. B) ゲノム二量体化とパッケージングの機能マッピング.

らがウイルス粒子内では一部分子内結合することで単量体化する。そこで DDN の E/DLS のどちらか一方に変異を入れて、その変異が粒子内で働く二量体化シグナルを破壊するものであれば、DDN のゲノム分子内結合が阻害されることになる。結果としてゲノム分子間結合の方が増加し、導入変異の影響を粒子内単量体の減少としてモニターでき、機能領域の探索系となりうる。もしその変異が同時に E/psi を破壊したとしても、ゲノム上のもう一つの E/DLS は完全なのでゲノムのパッケージング能は保たれる理屈である。実際にいくつかの派生変異体を作成して、この系が理屈通りに動くことが判ったので、E/DLS 領域に様々な変異を導入した変異体群を用いてウイルス粒子内での DIS/DLS の機能領域の詳細な探索を行った。同時に、E/DLS を一つしか持たない野生株型のゲノム上に同様の変異群を導入した変異体群も作成し、それらの変異がゲノムパッケージングに及ぼす影響についても調べ、マッピングを行った。その結果の比較図を図 7B に示した。ここから HIV-1 の E/psi が DIS/DLS よりかなり広い領域にわたっていること、DIS/DLS が E/psi に完全に含まれていることなどが見て取れる。また調べた範囲の一部領域において、大きな変異を入れるとパッケージングも二量体化もほとんど阻害され、小さな変異では双方ともおよそ半分程度の機能の残存が見られるなど、二つの機能の順相関が見られる部分があるという重要な知見も明らかとなった<sup>14)</sup>。

### 8. まとめ・今後の展開

今までの筆者の一連の解析結果をあわせ考察した結果、到達した一つの仮説は、ゲノム二量体化が複数の段階からなるパッケージングというイベントの必須の一段階である、というものである。DIS/DLS 領域が二分子集合して特定の構造をとることで、初めてウイルス蛋白に特異的に認識されうる信号となるという仮説は、長年の命題に対する簡潔で明瞭な説明となりうる。つまり、パッケージングされるためには全長のゲノムが二本結合している必要は無いが、二つの DIS/DLS 領域が作り出す形あるいは反応が重要ということである。二量体化には不要だがパッケージングには必要な領域も解析の結果見られたが、これは二量体化が完成したあとのステップで機能するシグナルと考えれば説明がつく。なお筆者は相変わらず同じテーマで仕事を続けているので、学会等で見かけられたら仕事の進展具合を御覧いただければ幸いです。

このようにウイルスのゲノムパッケージング・二量体化という現象は学術的興味からも非常に面白い。加えてウイルスを制圧すべき病原体としてみた場合、パッケージングを妨げることは効果的な抗ウイルス療法であると言えるし、逆にウイルスベクターとしての応用を考えたときも、外来遺伝子の効率的な導入のためにパッケージング能は重要な役割を担う。こうした様々な面で実用に直結する機能でも

あるが、未だ明らかになっていないことは多く、実験系によって結論にズレがある知見も少なくない。今後もいっその研究が求められており、様々な分野の方に興味を持っていただきたい題材である。

### 9. おわりに

筆者のテーマは、教科書では「レトロウイルスのゲノムはウイルス粒子中で二量体化している」あるいは「レトロウイルスのゲノムは二本ある」（厳密にはこれは正しくない。二量体ゲノムが一つだけかどうかは誰も証明していない）と、一行で済まされるたぐいの事象である。大概はそのまま素通りしてしまうか、それがどうしたと思って終わりである。しかし筆者はこの記述を読んだとき、どうして二本なのか、なぜ二本でなければならないのかと言う疑問を抱いてしまい、それはいつまでも消えることがなかった。そして留学先でゲノム二量体化はテーマになる、と言ってくれるボスと出会った。競争者もいるにはいるが、流行っているとか、派手とは言い難いテーマである。しかし、そういう研究があっても良いのでは、と筆者は思っている。研究者全員が、広いフィールドの中にある小さなトラックに集合して100m競争に血道を上げる必要があるだろうか。まして新しいトラックが出来るたびにそこへ皆が殺到していくような必要が。雑草の茂る隅っこで一人で石を遠投しているものが居ても良いのではないか……。そのことに本人以外にも意味を見いだせるような一般性が備わっていればであるが。

そういう意味で、筆者がラボを転々としながらもこのテーマで研究を続けていられるのは、ひとえにそれを認め、許してくれるボスたちが居たからである（もっとも、認めてもらえていたかはかなり疑問である。むしろ面倒な奴だから好きにやらせておくのが無難と思われた可能性が高い）。筆者の研究が思いもかけず杉浦奨励賞という重みのある賞の対象となり、このような場に拙文を掲載させていただく機会までも得たが、そこに筆者自身の功績があるとすればそれは多くの寛容な方々に出会えたことだけだと本心から思っている。それは派手な論文誌には縁のない筆者をあえて選出してくださった杉浦賞選考委員の先生方も含んでいることは言うまでもない。拙文を読んでくださった若い方には、己の世界を広げて多くの人と知り合う機会を持つことを強く勧めたい。それが自分の研究と、なにより自分自身を高めることにもなることを少なくとも筆者は実感している（高まってその程度かと言われても返す言葉はない）。

### 謝 辞

本稿は平成16年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞の受賞対象となった研究の内容をまとめたものである。本研究は米国ウイコンシン大学マカドール癌研究所・東京大学医科学研究所感染症分野・大阪大学微生物病研究所神経ウイル

ス分野およびウイルス感染制御分野で行われた。上田重晴教授・Prof. Nito Panganiban・岩本愛吉教授・塩田達雄教授の愛情溢れるサポートに深く感謝いたします。

また、杉浦奨励賞に御推挙いただきました上田教授・塩田教授・京大ウイルス研 小柳義男教授と、本研究を評価して下さった日本ウイルス学会に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Alford, R. L., S. Honda, C. B. Lawrence, and J. W. Belmont. RNA secondary structure analysis of the packaging signal for Moloney murine leukemia virus. *Virology* 183: 611-9, 1991.
- 2) Bender, W., and N. Davidson. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* 7: 595-607, 1976.
- 3) Bieth, E., C. Gabus, and J. L. Darlix. A study of the dimer formation of Rous sarcoma virus RNA and of its effect on viral protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 18: 119-127, 1990.
- 4) Canaani, E., K. V. Helm, and P. Duesberg. Evidence for 30-40S RNA as precursor of the 60-70S RNA of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 401-405, 1973.
- 5) Darlix, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel, and F. Barre-Sinoussi. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* 216: 689-99, 1990.
- 6) Frankel, A. D., and J. A. Young. HIV-1 : fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67: 1-25, 1998.
- 7) Hu, W. S., and H. M. Temin. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle : pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1556-1560, 1990.
- 8) Hoglund, S., A. Ohagen, J. Goncalves, A. T. Panganiban, and D. Gabuzda. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* 233: 271-279, 1997.
- 9) Kung, H. J., J. M. Bailey, N. Davidson, P. K. Vogt, M. O. Nicolson, and R. M. McAllister. Electron microscope studies of tumor virus RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39: 827-834, 1975.
- 10) Riggin, C. H., M. Bondurant, and W. M. Mitchell. Physical properties of moloney murine leukemia virus high-molecular-weight RNA : a two subunit structure. *J Virol* 16: 1528-1535, 1975.
- 11) Roy, C., N. Tounekti, M. Mougél, J. L. Darlix, C. Paoletti, C. Ehresmann, B. Ehresmann, and J. Paoletti. An analytical study of the dimerization of in vitro generated RNA of Moloney murine leukemia virus MoMuLV. *Nucleic Acids Res* 18: 7287-7292, 1990.
- 12) Sakuragi, J., A. Iwamoto, and T. Shioda. Dissociation of Genome Dimerization from Packaging Functions and Virion Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol* 76, 2002.

- 13) Sakuragi, J., T. Shioda, and A. T. Panganiban. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of HIV-1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in virions. *J Virol* 75: 2557-2565, 2001.
- 14) Sakuragi, J., S. Ueda, A. Iwamoto, and T. Shioda. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* 77: 4060-9, 2003.
- 15) Sakuragi, J. I., and A. T. Panganiban. Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability in vivo. *J Virol* 71: 3250-3254, 1997.
- 16) Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4945-9, 1994.

## **Analysis on primate lentivirus genome dimerization in virion.**

### **Jun-ichi Sakuragi**

Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases (RIMD), Osaka University.

Yamadaoka 3-1, Suita City, Osaka 565-0871, Japan

sakuragi@biken.osaka-u.ac.jp

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/kenkyu/meneki/DVI/index.html>

The genomic RNA of retrovirus, including the primate lentivirus such as HIV, always form dimers in matured virions. It is likely that the presence of two genomes in one virion is advantageous for survival, providing an extra template that can be used when one RNA molecule is damaged, and/or giving genetic variety to their progeny. However, these ideas might not fully explain why the virion have to carry multiple identical RNAs in spite of the severe limitation of the space. We developed and utilized a novel system to investigate viral RNA dimerization in virion clearly and simply without affecting RNA packaging. The results of precise mapping of dimerization functional region strongly suggested that the RNA dimerization is one of the essential steps of RNA packaging.