

5. ウイルスが生み出す様々なノンコーディング RNA

岩川 弘宙, 奥野 哲郎

京都大学大学院農学研究科 植物病理学分野

近年, microRNA (miRNA) や small interfering RNA (siRNA) を含むノンコーディング RNA が遺伝子発現制御,あるいはウイルスやトランスポゾンといった分子パラサイトに対する防御応答に関わっているところが次々と明らかとされてきた. 一方, ウイルスもまた効率の良い複製や潜在感染を成し遂げるために, さまざまな種類のノンコーディング RNA を用いることにより宿主やウイルス自身の遺伝子発現を時間的・空間的に制御していることが分かってきた. 本稿では, 最初に DNA ウイルスより生み出されるノンコーディング RNA の生成機構と機能を概説し, 次に植物と動物の RNA ウイルスから生み出される新しいタイプのノンコーディング RNA の生成機構とその機能を紹介する.

はじめに

リボザイム, リボスイッチ, リボセンサー, そして RNA サイレンシングに関わる small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) などの発見によりノンコーディング RNA がジャンクであると考えられていた時代は終わり, 現在ノンコーディング RNA は生物の複雑な遺伝子発現制御に必須な因子であると理解されている. ウイルス感染とノンコーディング RNA との関係は深く, 植物では RNA ウイルスに対する防御機構として siRNA を介した RNA サイレンシング機構が用いられている⁸⁾. 一方で C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝臓で多く発現する miR-122 と結合することにより効率の良い複製を可能にする¹⁷⁾. さらにはウイルス感染が宿主の発癌に関わる miRNA の発現を上昇させることによって癌化を引き起こしている可能性も報告されている^{54, 63)}. 近年, ウイルスも様々な種類のノンコーディング RNA を生成することが明らかとなってきたお

り, それらの機能解析が急ピッチで進められている. ウイルスノンコーディング RNA の種類と生成機構及びその機能 (潜在的な機能を含む) を表 1 と図 1 にまとめたのでこれらを参照しながら読み進めていただきたい.

DNA ウイルスがコードする miRNA

ウイルス由来のノンコーディング RNA の中で機能を持った, 恐らく最も小さい RNA は 20 数塩基長の viral miRNA であろう. viral miRNA は宿主の miRNA と同様, ~80 塩基長の不完全なステムループ構造を持つ転写産物 (pri-miRNA) が Drosha とそのコファクターである DGCR8 (哺乳類の場合) によって ~60 塩基長の pre-miRNA に切断される. その後, Exportin 5 によって細胞質へ運ばれ, Dicer 及びそのコファクターである TRBP によってさらにプロセッシングを受けて 20 数塩基の二本鎖 RNA である miRNA/miRNA* が生成される. miRNA/miRNA* はその後, Argonaute (AGO) をコアタンパク質として持つ RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれ, RISC に取り込まれた miRNA は標的 mRNA と部分的な二本鎖を形成し標的 mRNA の翻訳抑制または切断を行う⁵⁴⁾ (図 1).

これまでにヘルペスウイルス {Herpes simplex virus, Epstein-barr virus (EBV), Human cytomegalovirus (HCMV), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus など}, ポリオーマウイルス (Simian virus 40 など), アデノウイルス, アスコウイルスで数多くの viral miRNA が発見されているが, ヘルペスウイルスの viral miRNA がその大半を占めている⁵⁴⁾. RNA ウイルスではレトロウイルスの HIV-1 が

連絡先

〒606-8502

京都市左京区北白川追分町

京都大学農学研究科 植物病理学分野

TEL : 075-753-6131

FAX : 075-753-6131

E-mail : iwakawa@kais.kyoto-u.ac.jp,

okuno@kais.kyoto-u.ac.jp

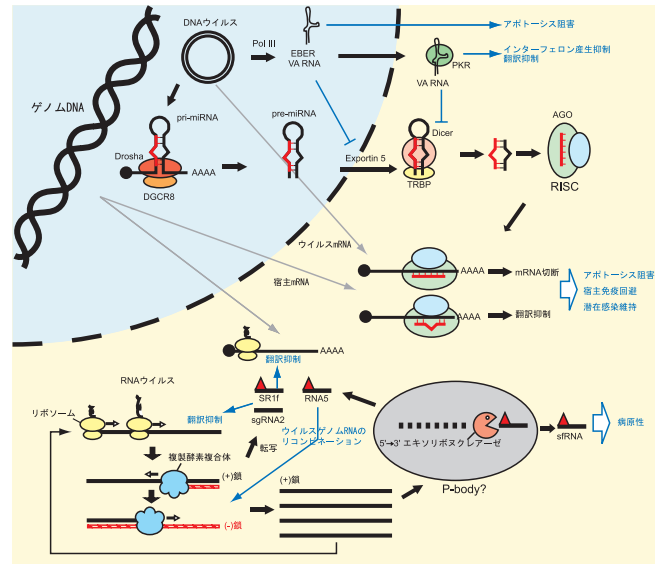


図1 ウイルス由来のノンコーディング RNA の生成機構と機能 (潜在的な機能も含む)

miRNA をコードしていることが知られているが^{19, 20, 32, 33}), 植物ウイルスを含むその他の RNA ウイルスからは今のところ miRNA は報告されていない. viral miRNA には大きく分けて, (1) ウイルスの転写産物を標的とするタイプと (2) 宿主の特定の遺伝子を標的とする 2つのタイプが存在する (表 1).

ウイルスの遺伝子を制御する viral miRNA の例としては EBV がコードする miR-BART2 が挙げられる³⁾. miR-BART2 は EBV DNA ポリメラーゼ遺伝子である BALF5 のアンチセンスに位置しており, BALF5 mRNA と完全な相補性を持つため BALF5 mRNA を切断する. 潜在感染時に低レベルの miR-BART2 が発現されることによって BALF5 の発現が制御され, 不適切な複製を抑えることによって潜在感染を維持していると考えられている.

宿主の遺伝子を制御する viral miRNA の例としては同じく EBV の miR-BART5 が挙げられる⁶⁾. miR-BART5 はアポトーシス促進因子である PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) の発現を負に制御することから, ウイルスが引き起こすアポトーシスから EBV 感染細胞を守る役割があると考えられる. また, HCMV の miR-UL112-1 が主要組織適合性複合体クラス I 関連鎖 B (MICB) mRNA の 3' UTR に結合することによって MICB 発現を抑えることが報告されている⁴⁷⁾. MICB は, ナチュラルキラー (NK) 細胞活性化受容体 NKG2D のストレス誘導性リガンドであり, NK 細胞によるウイルス感染細胞や腫瘍細胞の傷害に重要である. miR-UL112 の発現により MICB の発現が特異的に抑制され, MICB と NKG2D との結合が弱まり, NK 細胞による細胞傷害が減少することから, HCMV は miR-UL112-1 を発現することによって MICB の発現を

負に制御し, NK 細胞による免疫監視機構から逃れていることが示唆される.

以上述べてきた様にウイルスは viral miRNA を用いウイルス自身の遺伝子を制御することによって感染細胞が宿主免疫機構に認識, 除去されないようにするとともに, 宿主のアポトーシス又は免疫監視機構を負に制御することによって感染細胞を生きながらえさせることで, ウイルスの複製ポテンシャルを最大にしているのかもしれない.

VA RNA と EBER

アデノウイルスと EBV からそれぞれ転写されるノンコーディング RNA, virus-associated RNAs (VA RNA) と EBER は古くに発見され, 多くのグループによってその機能が研究されてきた. VA RNA は RNA ポリメラーゼ III (Pol III) によって転写され, 3' 末端に Poly (A) 鎖を欠く非常に安定な構造をとる約 160 塩基の一本鎖 RNA である. VA RNA は 2 本鎖 RNA で誘導される PKR に結合することによって PKR が行う eIF2 α のリン酸化を介した翻訳阻害を抑制し, インターフェロンを介した抗ウイルス作用を抑制することが知られている²⁷⁾. 今日では, 短い 3' 末端のオーバーハングを持つ VA RNA は pre-miRNA を細胞質に運ぶ Exportin 5 と相互作用し, 同時に Dicer の基質になることによって宿主の RNA サイレncing 経路を競合的に阻害することが分かっている^{1, 26)}. このように VA RNA は感染細胞に大量に蓄積することで, 分子デコイとして抗ウイルス反応に関わる様々な分子と結合・競合することにより宿主環境をウイルスに有利な状況に変え, 潜在感染を維持していると考えられる.

EBV から Pol III によって転写される約 170 塩基の

表1 ウイルス由来のノンコーディング RNA の生成機構と機能

	ウイルス	ncRNA*	生成機構	標的	機能 (想定される機能を含む)	参考文献
DNAウイルス	Herpes simplex virus type 1	miR-H2-3P miR-H6	転写 (miRNA生成経路)	ICP0 ICP4	潜在感染維持	Umbach et al., 2008 ⁵⁵⁾
		miR-H3 miR-H4-3P	転写 (miRNA生成経路)	ICP34, 5	ICP34, 5の 神経毒性抑制	Umbach et al., 2008 ⁵⁵⁾
	Herpes simplex virus type 2	miR-III	転写 (miRNA生成経路)	ICP0	潜在感染維持	Tang et al., 2009 ⁵¹⁾
		miR-I miR-II	転写 (miRNA生成経路)	ICP34, 5	ICP34, 5の 神経毒性抑制	Tang et al., 2008, 2009 ^{50, 51)}
	Human cytomegalovirus	miR-UL112-1	転写 (miRNA生成経路)	IE1/IE72	潜在感染維持	Grey et al., 2007 ¹³⁾
		miR-UL112-1	転写 (miRNA生成経路)	MICB	NK細胞による細胞傷害抑制	Stern-Ginossar et al., 2007 ⁴⁷⁾
	Epstein-Barr virus	miR-BART2	転写 (miRNA生成経路)	DNAポリメラーゼ (BALF5)	潜在感染維持	Barth et al., 2008 ³⁾
		miR-BHRF1-3	転写 (miRNA生成経路)	CXCL-11/I-TAC	宿主免疫機構回避	Xia et al., 2008 ⁶¹⁾
		miR-BART5	転写 (miRNA生成経路)	PUMA	アポトーシス阻害	Choy et al., 2008 ⁶⁾
	Kaposi's sarcoma -associated herpesvirus	EBER	PoI IIIによる転写	PKR	アポトーシス阻害 翻訳阻害抑制	Swaminathan et al., 2008 ⁴⁹⁾ 等
		miR-K5 miR-K9 miR-K10	転写 (miRNA生成経路)	BCLAF-1	潜在感染からの再活性	Ziegelbauer et al., 2009 ⁶⁴⁾
		miR-K12-1 miR-K12-3-3p miR-K12-6-3p miR-K12-11	転写 (miRNA生成経路)	THBS1	病原性・腫瘍形成 宿主免疫機構回避	Samols et al., 2007 ³⁹⁾
	Simian virus 40	miR-S1	転写 (miRNA生成経路)	T抗原 (Tag)	細胞傷害性T細胞 による細胞傷害回避	Sullivan et al., 2005 ⁴⁸⁾
	Adenovirus	VA RNA	PoI IIIによる転写	PKR, Exportin 5, Dicer	IFN産生抑制, 翻訳阻害抑制, RNAサイレンシング経路抑制	Ma and Mathews, 1996 ²⁷⁾ Lu and Cullen, 2004 ²⁶⁾ Andersson et al., 2005 ¹⁾ 等
	Heliothis virescens ascovirus	miR-I	転写 (miRNA生成経路)	DNAポリメラーゼI (ウイルス)	潜在感染維持	Hussain et al., 2008 ¹⁴⁾
RNAウイルス	Human immunodeficiency virus type1	TAR miRNA	転写 (miRNA生成経路)	プロウイルス	クロマチンリモデリング 潜在感染維持	Klase et al., 2007 ¹⁹⁾
		TAR miRNA	転写 (miRNA生成経路)	ERCC1 IER3	アポトーシス阻害	Klase et al., 2009 ²⁰⁾
		miR-N367	転写 (miRNA生成経路)	NEF	病原性抑制	Omoto et al., 2004 ³²⁾
	Barley yellow dwarf virus	sgRNA2	転写	eIF4F	翻訳抑制	Shen et al., 2006 ⁴⁴⁾ 等
	Red clover necrotic mosaic virus	SR1f	5'→3' 分解	eIF4F?	翻訳抑制	Iwakawa et al., 2008 ¹⁶⁾
	West Nile virus	sFRNA	5'→3' 分解	?	病原性促進	Pijlman et al., 2008 ³⁴⁾
	Cucumber mosaic virus Subgroup II	RNA5	RNA分解 (5'→3' 分解?)	-	ウイルスゲノム 組み換え	de Wispelaere and Rao, 2008 ⁷⁾

* ncRNA: ノンコーディングRNA

灰色の四角: ウイルス因子を標的としているmiRNA

EBER^{12, 24, 37)} はインターフェロン誘導性のアポトーシスを阻害する活性を持つことが知られている^{31, 59)}。EBERはVA RNAと同様、PKRに結合しeIF2 α のリン酸化を介した翻訳阻害を抑制するため⁴²⁾ PKR活性阻害を介してアポトーシスを回避していることが予想される。ただし、EBERは核に局在しシャトルしないこと¹¹⁾、in vivoではPKRを阻害しないという報告^{38, 59)}から、実際にin vivoでPKRとの結合を介してアポトーシスを抑制しているかどうかは意見が分かれている⁴⁹⁾。

RNAウイルスから生み出されるノンコーディング RNA

RNAウイルスにとってゲノムがコンパクトであるということは(1)複製1サイクルの時間が短い、(2)正確性の低い複製酵素を用いても致死的な変異を持たないゲノムが複

製できる率が高い、また(3)宿主の分解機構の対象になりにくいなど様々な利点がある。一方でウイルスは遺伝子発現を制御し、宿主の防御機構から逃れ、潜在感染を維持するなど複雑な仕事を同時に行わなければならないため、コンパクトなゲノムの中に様々な機能を詰め込んでいる。RNAウイルスの5'非翻訳領域(UTR)や3'UTR、さらには遺伝子コード領域内にも、翻訳や複製、粒子化などに必要なシス因子がオーバーラップしながら存在し、RNAの構造変化を介して複製及び遺伝子発現制御を行っている^{5, 9, 15, 21, 29, 35, 46, 52, 57, 60)}。さらにサブゲノムRNAやゲノムRNAそれ自身(それらのRNAの配列および構造が持つ機能)をトランス因子として用いることにより複雑な制御を行うこともある^{10, 45)}。

最近になってRNAウイルスは3'UTR領域に由来する

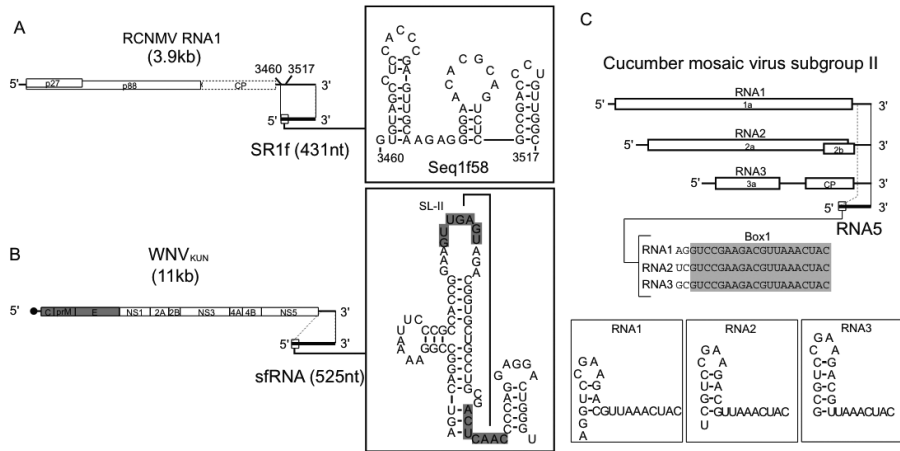


図2 3' 非翻訳領域 (UTR) に由来する低分子量 RNA の生成に必要な配列と二次構造

(A) RCNMV RNA1 のゲノム構造と SR1f の生成に必要な領域 (Seq1f58) の模式図. (B) WNV (KUN) のゲノム構造と sfRNA の生成に必要な領域の二次構造. 相互作用しうる領域が濃い灰色の四角で囲まれ線で結ばれている. (C) (上段) Cucumber mosaic virus サブグループ II のゲノム構造の模式図. (中断) RNA1, RNA2, 及び RNA3 より生成される RNA5 の 5' 末端領域. RNA5 の生成に必須な領域 (Box1) を灰色で示す. (下段) RNA1, RNA2, 及び RNA3 より生成される RNA5 の 5' 末端領域に予測される二次構造.

ノンコーディング RNA を生成し, それらをトランス因子として用いていることが徐々に明らかとなってきた.

RNA ウイルスの 3' UTR に由来する低分子量 RNA の発見

これまでに様々なグループから RNA ウイルスの 3' UTR (一部は極めて短い ORF を持つ) に由来する低分子量 RNA が感染細胞内に蓄積することが知られていた {Cucumber mosaic virus subgroup II (CMV subII)⁴⁾, Tomato aspermy cucumovirus subgroup I (TAV subI)⁴⁾, Beet necrotic yellow vein virus (BYNV)²⁾, Maiz chlorotic mottle machlomovirus⁴⁰⁾, Soybean dwarf virus⁶²⁾, Barley yellow dwarf virus (BYDV)²²⁾, West Nile virus (WNV)^{28, 41)}, Japanese encephalitis virus (JEV)²⁵⁾, Murray Valley encephalitis virus (MVEV)⁵⁶⁾}. それらの一部は明らかに転写を介して生成されていたものであったが, ゲノム RNA のプロモーター領域と全く異なる配列を 5' 末端に持ち転写産物なのか分解産物なのか分からない低分子量 RNA も存在していた.

最近になって, ウイルス RNA の不完全な分解が生み出す新たな RNA 種が植物と動物を宿主とする RNA ウイルスそれぞれで発見された. 初めに報告されたのは 2 分節の RNA ゲノムを持つ植物ウイルスである *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) においてである¹⁶⁾. ウイルス感染後期に大量に蓄積する小さな RNA (SR1f) を調べたところ, SR1f は RCNMV RNA1 の 3' UTR に由来することが分かった. さらに, SR1f は複製酵素を介して転写又は複製されたウイルス RNA ではなく, 宿主の 5' → 3' エキソリボ

ヌクレアーゼによって不完全に分解されるために蓄積する RNA 断片であることが分かった¹⁶⁾. また同年に, フラビウイルス属の WNV オーストラリア株 Kunjin (WNV_{KUN}) 由来の低分子量 RNA (sfRNA) も 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼである XRN1 の分解産物であることが明らかとなった³⁴⁾. それに引き続き, これまで転写を介して生成されると考えられてきた CMV subII より生成される RNA5 も複製酵素非依存的に生成されることから分解中間体であることが分かった⁷⁾. 以下で SR1f (RCNMV), sfRNA (WNV_{KUN}), RNA5 (CMV subII) の生成メカニズムと生化学的機能を紹介する.

5' → 3' エキソリボヌクレアーゼによる分解中間体

当初 RCNMV RNA1 から生成される SR1f はウイルス複製酵素による転写産物であると考えられていた. しかし, 機能的な複製酵素を翻訳できない RCNMV RNA1 変異体をタバコ BY-2 培養細胞由来の試験管内ウイルス翻訳複製系 (BYL)²³⁾ 内で培養しても野生型 RNA1 と同レベルの SR1f が蓄積したため, SR1f は複製酵素によって転写された産物ではなく RNA1 の分解産物であることが明らかとなった¹⁶⁾. SR1f は RCNMV RNA1 の 3' UTR のほぼ全長 431 塩基からなり, SR1f の 5' 末端からの 58 塩基 (Seq1f58) が SR1f の生成に必要かつ十分であった (図 2). Seq1f58 より上流の配列に由来する分解産物が検出できなかったこと, Seq1f58 を 5' 末端に挿入した RNA は安定性が顕著に上昇すること, また 2 つの Seq1f58 を配列中に持つ RNA から

生成される 3' 側の RNA 断片は上流の Seq1f58 によって減少することなどから, SR1f は, Seq1f58 が 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼによるゲノム RNA の分解から 3' 側を守ることにより生成される分解中間体であることが明らかとなった¹⁶⁾.

WNV_{KUN} においては, 5' UTR に欠損,あるいは複製酵素 ORF に欠損を持つ複製できない変異体を CMV プロモーターより BHK-21 細胞で発現させた場合においても sfRNA (525nt) と相同な低分子量 RNA が野生型の WNV からと同様に蓄積することから, sfRNA の生成には 5' UTR と複製酵素はいずれも必要ないことが示された. また Pijlman ら (2008) は sfRNA が 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼによる分解産物であると想定し, 細胞質での 5' → 3' 分解に携わる XRN1 の発現を XRN1 に対する siRNA を用いてノックダウンした細胞に WNV_{KUN} を感染させ, ウイルス RNA の蓄積を調べた. その結果, ゲノム RNA の蓄積量はあまり変化しない一方で, sfRNA の蓄積量が顕著に低下したため, sfRNA は予想通り XRN1 の不完全分解による分解中間体であると結論づけた. また WNV_{KUN} の 3' UTR を含む RNA (ゲノム RNA と sfRNA) が XRN1 と P-body (mRNA の分解と貯蔵を司る細胞質顆粒) で共局在することからも sfRNA が XRN1 の分解経路を介して生成されることが強く示唆された.

Cucumber mosaic virus は 3 分節のゲノムを持つ植物 RNA ウイルスで RNA1 と RNA2 には複製酵素成分タンパク質 (1a 及び 2a) がそれぞれコードされており, その両方のタンパク質がゲノム複製に必須である. de Wispelaere と Rao (2008) は CMV subII から生成される RNA5 が転写産物であるか分解産物であるかを調べるため, RNA1, RNA2, 及び RNA3 をアグロバクテリウム法を用いて植物体で一過的に発現させた. その結果, RNA1, 2, 3 それぞれを単独で発現した場合においても RNA5 が蓄積することから, これまで転写産物であると考えられてきた RNA5 は宿主のヌクレアーゼによって作り出される分解中間体であることが分かった. RNA5 が RCNMV の SR1f 及び WNV の sfRNA と同様 5' → 3' 分解によって生成されているかは証明されていないが, Ago1/5/10 及び Ago1/7/10 変異植物においても RNA5 が蓄積することから, 少なくとも RNA サイレンシング機構を介した部位特異的切断のみによって RNA5 が生成されていることはないと考えられる⁷⁾. また, 細胞内で RNA5 が安定に存在していることから RNA5 の 5' 末端付近の配列又は構造が 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼからの分解を防いでいる可能性は極めて高いと推測される.

それではいったいどのような機構で 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼから下流の分解を防ぐのだろうか. 酵母においては, Poly (G) 配列や, 安定なステムループ構造が 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼ活性を阻害することが分かっているが^{36, 58)}, 植物などの高等真核生物ではそれらの配

列や構造が存在しても 5' → 3' 分解活性を効率よく阻害できないことが知られている¹⁸⁾. 図 2 に示すように, SR1f, sfRNA, 及び RNA5 それぞれの 5' 末端近傍にはステムループやシュードノット構造が予想される. これらの構造が 5' → 3' 方向の分解を防ぐことに重要なのか, それとも配列が重要であるのかは分かっていない. しかし, 少なくとも植物や動物細胞内での 5' → 3' の分解を防ぐためにはただ RNA の二次構造が強ければよいというわけではない. 筆者らの研究より SR1f を生成するために必要な領域 Seq1f58 を 5' 末端に持つ RNA は, GC リッチで非常に強固なステムループ構造を 5' 末端に持つ RNA よりはるかに安定であることが分かった. また, Pijlman ら (2008) は複雑で強固なステムループを多数持っている EMCV IRES を WNV NY99 レプリコンの sfRNA が生成される 5' 末端上流に挿入しても下流の RNA 分解を防ぐことができないと報告している. SR1f, sfRNA, 及び RNA5 の生成に必要な領域に配列や二次構造の相同性はなく, それらの領域がいかにして 5' → 3' エキソリボヌクレアーゼによる分解を止めているかは謎であるが, ある種の宿主因子がそれらの領域に結合し, 強固な RNA-タンパク質複合体を形成することで 5' → 3' 分解を防いでいる可能性も考えられる.

様々な RNA ウイルスから生成される 5' → 3' 分解中間体

5' → 3' 分解中間体は RCNMV, WNV, 及び CMV sub II からだけでなく, かなり多くのウイルスから生成されそうである. 少なくとも筆者らの研究より, RCNMV を含むダイアンソウイルス属の Carnation ring spot virus (CRSV) と Sweet clover necrotic mosaic virus (SCNMV) から SR1f 様 3' UTR 断片が生成される¹⁶⁾. フラビウイルス属のウイルスはすべて sfRNA と同様の低分子量 RNA を蓄積する (WNV NY99 株, MVEV, Alfuy virus, Yellow Fever virus, dengue 2 replicon, JEV)^{25, 34)}. また, CMV subII より生成される RNA5 の生成に必須な領域 “Box1” を 5' 末端に持つことから, TAV subI から生成される RNA5⁴⁾, 及びクモウイルス属には属さない BYNV 感染植物内に蓄積する低分子量 RNA も分解中間体であると考えられる²⁾. つまり現在までに宿主も属している科も異なる 12 種の RNA ウイルスから 3' UTR ノンコーディング RNA 生成されていることになる. おそらくゲノム RNA の 5' 末端と相同性のない 5' 末端を持つ低分子量 RNA の多くがこの種の RNA 分子であると考えられ, 3' UTR ノンコーディング RNA の種類はこれからますます増えていくこととなるだろう.

3' UTR ノンコーディング RNA の生物学的機能

同様の機構で生成される SR1f, sfRNA, 及び RNA5 は興味深いことにそれぞれ異なる機能を持つことが報告されている^{7, 16, 34)}. RCNMV より生成される SR1f は Cap · Poly

(A) 依存的, 及び非依存的翻訳をいずれも負に制御する一方, sfRNA は WNV_{KUN} の病原性に必須の因子であることが分かっている. また CMV subII の RNA5 は相同性組み換えと非相同性組み換えいずれをも促進する役割を持つ. 以下で RCNMV から生成される SR1f と WNV_{KUN} から生成される sfRNA の生物学的機能を紹介する.

SR1f (RCNMV) : 翻訳抑制

RCNMV RNA1 の 5' 末端と 3' 末端には Cap 構造及び Poly (A) 配列が存在せず, 効率の良い翻訳には 3' UTR に存在する翻訳エンハンサー (3' TE-DR1) が必須である³⁰⁾. RNA1 の 3' UTR 断片である SR1f も配列中に 3' TE-DR1 を持っているため, 筆者らは SR1f が RCNMV の Cap 非依存的翻訳や Cap · Poly (A) を持つ宿主 mRNA の翻訳に何らかの影響を与えるのではないかと予測し, 植物セルフリー系及び植物プロトプラストを用いて SR1f が翻訳に与える影響を調べた. その結果 SR1f は RCNMV RNA1 及び Cap · Poly (A) mRNA の翻訳活性を濃度依存的に抑制したが, 3' TE-DR1 に変異を持つ SR1f 変異体の翻訳抑制能は顕著に低かった¹⁶⁾. 3' TE-DR 内の Cap 非依存的翻訳に必須な 17 塩基は, eIF4F が結合する BYDV の翻訳エンハンサー (BTE) と全く同じ配列であることより⁵³⁾, 感染後期の細胞に大量に蓄積する SR1f は 3' TE-DR1 を介して eIF4F を隔離することにより, ウイルス及び宿主 mRNA の翻訳を抑制している可能性が考えられる. 興味深いことに BYDV から転写される機能的なタンパク質をコードしないサブゲノム RNA (sgRNA2) も BTE 依存的にゲノム RNA にコードされた複製酵素成分タンパク質の翻訳を抑制する^{43, 44)}. つまりこれら SR1f と sgRNA2 は生成過程こそ違いますが極めて近い機構で翻訳抑制を行っているといえる.

sfRNA (WNV_{KUN}) : 細胞壊死性, 病原性

Pijlman ら (2008) は sfRNA の生物学的機能を調べるため sfRNA を生成できない WNV_{KUN} 変異体をベロ細胞及びモスクイト細胞系 C6/36 に接種して複製レベルを調べた結果, 複製レベルは野生型 WNV_{KUN} とあまり変わらないがはっきりと目に見えるプラークの形成能が極めて低いことに気付いた. ベロ細胞を用いたプラークアッセイの結果, 野生型や sfRNA を生成する WNV_{KUN} 変異体は細胞壊死性を持っていたのに対し, sfRNA を生成できない WNV_{KUN} 変異体は細胞壊死をほとんど起こさず, sfRNA を発現するプラスミドを接種した細胞に sfRNA を生成しない変異体を接種した場合, 再び細胞壊死が観察されたことから, sfRNA は WNV 感染による細胞壊死に必須な因子であることが明らかとなった³⁴⁾. 一方で sfRNA を発現するプラスミドのみを接種した細胞では壊死が観察されなかったことから, sfRNA のみでは細胞壊死性を発揮できず, 細胞壊死にはウイルス因子か, ウイルス感染によって発現する宿主因子が

関与することが示唆された³⁴⁾. また, 生後3週間のマウスに野生型の WNV_{KUN} を接種した場合, 接種6日後に重篤な症状が観察され9日後に安楽死処分したのに対し, sfRNA を生成できない変異体を接種したマウスは全く脳炎を起こさなかったことから, sfRNA はマウスにおける病原性にも必須であることが明らかとなった³⁴⁾.

RCNMV, WNV, 及び CMV subII で低分子量 RNA を生成できない変異ウイルスを宿主に感染させても, 一細胞での複製レベルは野生型とあまり変わらないことから, 少なくともそれらの低分子量 RNA は複製に必須な因子でないことは分かっている. しかし 3' UTR 由来の分解中間体がダイアンソウイルス属, フラビウイルス属, そして一部のククモウイルス属で保存されているということは, それらの低分子 RNA が偶然できた「ジャンク」というよりは, ウイルスの複製サイクルに何らかの利益をもたらしている因子である可能性が高い. 翻訳複製の微調整に必要なのか, あるいは潜在感染に必要なものであるのか, それとも一部の宿主においては感染に必須な因子なのか, 研究が始まったばかりの現段階では全く分からない. 今後, 上記3種の低分子量 RNA の機能解析を進めていくとともに, 他のウイルスでもこのような分解中間体があるかどうかを調べ, それらの機能を詳細に解析してゆくことがこの種のノンコーディング RNA の役割の解明に必要であろう.

おわりに

ウイルスはタンパク質をコードしない RNA を生み出すことによって, 緻密な遺伝子発現制御を行い, またウイルスの生存に有利な細胞環境を作っていることが徐々に明らかとなってきた. しかしながら, viral miRNA を含む数多くのノンコーディング RNA が発見されてきているにも関わらず, 機能が分かっているノンコーディング RNA は未だ少ない. その理由としては大半のウイルスノンコーディング RNA が複製や病原性に必須でないため, 真の生物学的機能を評価することが容易でないからである. ではどのようにしてそれらの機能を予測し解析できるだろうか. viral miRNA の場合, まずそのターゲットを明らかにすることが機能解明の鍵となろう. 一方, 3' UTR ノンコーディング RNA の機能を予測することはさらに難しいかもしれない. それらの機能は RNA の二次及び三次構造によって決まっている可能性が高いからである. しかし複製機構が詳細に解析されているウイルスであれば RNA の二次構造とその機能 (どの領域にどのような種類のウイルス及び宿主タンパク質が結合するかなど) は明らかとなっているはずなので, それらの情報をヒントに機能解析をスタートさせるのが適切かもしれない.

ウイルスノンコーディング RNA の研究はまだ始まったばかりである, 今後, 様々なウイルスから生成されるノンコーディング RNA の機能が解明され, 我々がこれまで認識

していなかったウイルスの複雑で緻密な生存戦略が明らかになることを期待したい。

訂正とお詫び

第58巻第1号65頁, 表1の最上段, カルモウイルスをポティウイルスに訂正し, お詫びします。

参考文献

- 1) Andersson, M. G., P. C. J. Haasnoot, N. Xu, S. Berenjian, B. Berkhout, and G. Akusjarvi. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79:9556-9565, 2005.
- 2) Balmori, E., D. Gilmer, K. Richards, H. Guilley, and G. Jonard. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* 75:517-521, 1993.
- 3) Barth, S., T. Pfuhl, A. Mamiani, C. Ehses, K. Roemer, E. Kremmer, C. Jaker, J. Hock, G. Meister, and F. A. Grasser. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* 36:666-675, 2008.
- 4) Blanchard, C. L., T. J. V. Higgins, and B. J. Anderson. RNAs 4A and 5 are present in tomato aspermy virus and both subgroups of cucumber mosaic virus. *Arch Virol* 142:1273-1283, 1997.
- 5) Bol, J. F. Replication of alfamo- and ilarviruses: Role of the coat protein. *Ann Rev Phytopathology* 43:39-62, 2005.
- 6) Choy, E. Y. W., K. L. Siu, K. H. Kok, R. W. M. Lung, C. M. Tsang, K. F. To, D. L. W. Kwong, S. W. Tsao, and D. Y. Jin. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205:2551-2560, 2008.
- 7) de Wispelaere, M., and A. L. N. Rao. Production of cucumber mosaic virus RNA5 and its role in recombination. *Virology* 384:179-191, 2009.
- 8) Ding, S. W., and O. Voinnet. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130:413-426, 2007.
- 9) Dreher, T. W. Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res* 139:217-229, 2009.
- 10) Eckerle, L. D., C. G. Albarino, and L. A. Ball. Flock House virus subgenomic RNA3 is replicated and its replication correlates with transactivation of RNA2. *Virology* 317:95-108, 2003.
- 11) Fok, V., K. Friend, and J. A. Steitz. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol* 173:319-325, 2006.
- 12) Glickman, J. N., J. G. Howe, and J. A. Steitz. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62:902-911, 1988.
- 13) Grey, F., H. Meyers, E. A. White, D. H. Spector, and J. Nelson. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog* 3:1593-1602, 2007.
- 14) Hussain, M., R. J. Taft, and S. Asgari. An insect virus-encoded microRNA regulates viral replication. *J Virol* 82:9164-9170, 2008.
- 15) Iwakawa, H. O., M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. cis-Acting core RNA elements required for negative-strand RNA synthesis and cap-independent translation are separated in the 3' untranslated region of Red clover necrotic mosaic virus RNA1. *Virology* 369:168-181, 2007.
- 16) Iwakawa, H. O., H. Mizumoto, H. Nagano, Y. Imoto, K. Takigawa, S. Sarawaneeyaruk, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. A Viral noncoding RNA generated by cis-element-mediated protection against 5' → 3' RNA decay represses both cap-independent and cap-dependent translation. *J Virol* 82:10162-10174, 2008.
- 17) Jopling, C. L., M. K. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, and P. Sarnow. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309:1577-1581, 2005.
- 18) Kastenmayer, J. P., and P. J. Green. Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13985-13990, 2000.
- 19) Klase, Z., P. Kale, R. Winograd, M. V. Gupta, M. Heydarian, R. Berro, T. McCaffrey, and F. Kashanchi. HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol Biol* 8: 63. doi: 10.1186/1471-2199-8-63, 2007.
- 20) Klase, Z., R. Winograd, J. Davis, L. Carpio, R. Hildreth, M. Heydarian, S. Fu, T. McCaffrey, E. Meiri, M. Ayash-Rashkovsky, S. Gilad, Z. Bentwich, and F. Kashanchi. HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology* 6:18. doi: 10.1186/1742-4690-6-18, 2009.
- 21) Kneller, E. L. P., A. M. Rakotondrafara, and W. A. Miller. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* 119:63-75, 2006.
- 22) Koev, G., and W. A. Miller. A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol* 74:5988-5996, 2000.
- 23) Komoda, K., S. Naito, and M. Ishikawa. Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1863-1867, 2004.
- 24) Lerner, M. R., N. C. Andrews, G. Miller, and J. A. Steitz. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:805-809, 1981.
- 25) Lin, K. C., H. L. Chang, and R. Y. Chang. Accumulation of a 3' terminal genome fragment in Japanese encephalitis virus-infected mammalian and mosquito cells. *J Virol* 78:5133-5138, 2004.
- 26) Lu, S. H., and B. R. Cullen. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA

- biogenesis. *J Virol* 78:12868-12876, 2004.
- 27) Ma, Y. L., and M. B. Mathews. Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: A phylogenetic approach. *J Virol* 70:5083-5099, 1996.
 - 28) Maeda, A., J. Maeda, H. Takagi, and I. Kurane. Detection of small RNAs containing the 5' - and the 3' -end sequences of viral genome during West Nile virus replication. *Virology* 371:130-8, 2008.
 - 29) Mizumoto, H., H. O. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. Cap-independent translation mechanism of Red clover necrotic mosaic virus RNA2 differs from that of RNA1 and is linked to RNA replication. *J Virol* 80:3781-3791, 2006.
 - 30) Mizumoto, H., M. Tatsuta, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. Cap-independent translational enhancement by the 3' untranslated region of Red clover necrotic mosaic virus RNA1. *J Virol* 77:12113-12121, 2003.
 - 31) Nanbo, A., K. Inoue, K. Adachi-Takasawa, and K. Takada. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* 21:954-965, 2002.
 - 32) Omoto, S., and Y. R. Fujii. Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA. *J Gen Virol* 86:751-755, 2005.
 - 33) Ouellet, D. L., I. Plante, P. Landry, C. Barat, M. E. Janelle, L. Flamand, M. J. Tremblay, and P. Provost. Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res* 36:2353-2365, 2008.
 - 34) Pijlman, G. P., A. Funk, N. Kondratieva, J. Leung, S. Torres, L. van der Aa, W. J. Liu, A. C. Palmenberg, P. Y. Shi, R. A. Hall, and A. A. Khromykh. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host & Microbe* 4:579-591, 2008.
 - 35) Pogany, J., M. R. Fabian, K. A. White, and P. D. Nagy. A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J* 22:5602-5611, 2003.
 - 36) Poole, T. L., and A. Stevens. Structural modifications of RNA influence the 5' exoribonucleolytic hydrolysis by XRN1 and HKE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 235:799-805, 1997.
 - 37) Rosa, M. D., E. Gottlieb, M. R. Lerner, and J. A. Steitz. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol* 1:785-796, 1981.
 - 38) Ruf, I. K., K. A. Lackey, S. Warudkar, and J. T. Sample. Protection from interferon-induced apoptosis by Epstein-Barr virus small RNAs is not mediated by inhibition of PKR. *J Virol* 79:14562-14569, 2005.
 - 39) Samols, M. A., R. L. Skalsky, A. M. Maldonado, A. Riva, M. C. Lopez, H. V. Baker, and R. Renne. Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog* 3:611-618, 2007.
 - 40) Scheets, K. Maize chlorotic mottle machlomovirus expresses its coat protein from a 1.47-kb subgenomic RNA and makes a 0.34-kb subgenomic RNA. *Virology* 267:90-101, 2000.
 - 41) Scherbik, S. V., J. M. Paranjape, B. M. Stockman, R. H. Silverman, and M. A. Brinton. RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J Virol* 80:2987-2999, 2006.
 - 42) Sharp, T. V., M. Schwemmle, I. Jeffrey, K. Laing, H. Mellor, C. G. Proud, K. Hilse, and M. J. Clemens. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* 21:4483-4490, 1993.
 - 43) Shen, R. Z., and W. A. Miller. Subgenomic RNA as a riboregulator: negative regulation of RNA replication by Barley yellow dwarf virus subgenomic RNA 2. *Virology* 327:196-205, 2004.
 - 44) Shen, R. Z., A. M. Rakotondrafara, and W. A. Miller. trans regulation of cap-independent translation by a viral subgenomic RNA. *J Virol* 80:10045-10054, 2006.
 - 45) Sit, T. L., A. A. Vaewhongs, and S. A. Lommel. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* 281:829-832, 1998.
 - 46) Steil, B. P., and D. J. Barton. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res* 139:240-252, 2009.
 - 47) Stern-Ginossar, N., N. Elefant, A. Zimmermann, D. G. Wolf, N. Saleh, M. Biton, E. Horwitz, Z. Prokocimer, M. Prichard, G. Hahn, D. Goldman-Wohl, C. Greenfield, S. Yagel, H. Hengel, Y. Altuvia, H. Margalit, and O. Mandelboim. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317:376-381, 2007.
 - 48) Sullivan, C. S., A. T. Grundhoff, S. Tevethia, J. M. Pipas, and D. Ganem. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435:682-686, 2005.
 - 49) Swaminathan, S. Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J Cell Physiol* 216:321-326, 2008.
 - 50) Tang, S., A. S. Bertke, A. Patel, K. Wang, J. I. Cohen, and P. R. Krause. An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10931-10936, 2008.
 - 51) Tang, S., A. Patel, and P. R. Krause. Novel less-abundant viral microRNAs encoded by Herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating ICP34.5 and ICP0 mRNAs. *J Virol* 83:1433-1442, 2009.
 - 52) Tatsuta, M., H. Mizumoto, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. The Red clover necrotic mosaic virus RNA2 trans-activator is also a cis-acting RNA2 replication element. *J Virol* 79:978-986, 2005.
 - 53) Treder, K., E. L. P. Kneller, E. M. Allen, Z. H. Wang, K. S. Browning, and W. A. Miller. The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA* 14:134-147, 2008.
 - 54) Umbach, J. L., and B. R. Cullen. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Dev* 23:1151-1164, 2009.
 - 55) Umbach, J. L., M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnows-

- ki, D. M. Coen, and B. R. Cullen. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454:780-U108, 2008.
- 56) Urosevic, N., M. vanMaanen, J. P. Mansfield, J. S. Mackenzie, and G. R. Shellam. Molecular characterization of virus-specific RNA produced in the brains of flavivirus-susceptible and -resistant mice after challenge with Murray Valley encephalitis virus. *J Gen Virol* 78:23-29, 1997.
- 57) Villordo, S. M., and A. V. Gamarnik. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res* 139:230-239, 2009.
- 58) Vreken, P., and H. A. Raue. The rate-limiting step in yeast PGK1 mRNA degradation is an endonucleolytic cleavage in the 3' -terminal part of the coding region. *Mol Cell Biol* 12:2986-2996, 1992.
- 59) Wong, H. L., X. H. Wang, R. C. C. Chang, D. Y. Jin, H. C. Feng, Q. Wang, K. W. Lo, D. P. Huang, P. W. Yuen, K. Takada, Y. C. Wong, and S. W. Tsao. Stable expression of EBERs in immortalized nasopharyngeal epithelial cells confers resistance to apoptotic stress. *Mol Carcinogenesis* 44:92-101, 2005.
- 60) Wu, B., and K. A. White. Uncoupling RNA virus replication from transcription via the polymerase: functional and evolutionary insights. *EMBO J* 26:5120-5130, 2007.
- 61) Xia, T., A. O' Hara, I. Araujo, J. Barreto, E. Carvalho, J. B. Sapucaia, J. C. Ramos, E. Luz, C. Pedroso, M. Manrique, N. L. Toomey, C. Brites, D. P. Dittmer, and W. J. Harrington. EBV MicroRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3. *Cancer Res* 68:1436-1442, 2008.
- 62) Yamagishi, N., H. Terauchi, S. Kanematsu, and S. Hidaka. Characterization of the small subgenomic RNA of Soybean dwarf virus. *Arch Virol* 148:1827-1834, 2003.
- 63) Yin, Q. Y., J. McBride, C. Fewell, M. Lacey, X. Wang, Z. Lin, J. Cameron, and E. K. Flemington. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol* 82:5295-5306, 2008.
- 64) Ziegelbauer, J. M., C. S. Sullivan, and D. Ganem. Tandem array-based expression screens identify host mRNA targets of virus-encoded microRNAs. *Nat Genet* 41:130-134, 2009.

Viral noncoding RNAs

Hiro-oki IWAKAWA and Testuro OKUNO

Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan.
E-mail: okuno@kais.kyoto-u.ac.jp.

Many lines of recent evidence indicate that non-coding RNAs including micro RNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) play an important role in the control of gene expression in diverse cellular processes and in defense responses against molecular parasites such as viruses and transposons. Viruses also use many different types of non-coding RNAs for regulating expression of their own genome or host genome temporally and spatially to ensure efficient virus proliferation and/or latency in the host cell. Here, we introduce the generation mechanisms and functions of novel non-coding RNAs generated from both animal and plant RNA viruses, after a brief review of non-coding RNAs of DNA viruses.

