

4. 非分節マイナス鎖 RNA ウイルスの多機能 RNA ポリメラーゼ L タンパク質はユニークな mRNA キャッピング反応を触媒する

荻野 朝朗

Department of Molecular Biology and Microbiology
Case Western Reserve University School of Medicine

モノネガウイルス目に属する非分節マイナス鎖 RNA ウイルスはウイルス粒子内に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ L タンパク質をもつ。L タンパク質は、ウイルス RNA の合成と修飾 (mRNA キャッピング, キャップメチル化, および ポリアデニル化) を触媒する多機能酵素である。近年, 筆者らは非分節マイナス鎖 RNA ウイルスのプロトタイプであるウシ水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) をモデルウイルスとして用いることにより, L タンパク質が宿主真核細胞とは全く異なる機構で mRNA キャッピング反応を触媒すること, キャッピング反応が完全長 mRNA を合成するための正確なストップ-スタート転写反応とウイルスの細胞内増殖に必須であることを明らかにした。本稿では, VSV mRNA キャッピング機構の解明につながった歴史的な研究と現在の最新の研究について解説したい。

はじめに

モノネガウイルス目 (*Mononegavirales*) は, これまで, ラブドウイルス科 (*Rhabdoviridae*), パラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*), フィロウイルス科 (*Filoviridae*), およびボルナウイルス科 (*Bornaviridae*) から構成されていたが^{1,2}, 新たにニヤミウイルス科 (*Nyamiviridae*)³ が加わり現在では5つのファミリーを含む (国際ウイルス分類委員会ウェブサイト参照, <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). この目に属するウイルスは, 一分節 (*monopartite*) のマイナス極性 (*negative polarity*) RNA をゲノムとしてもつため, “モノネガ” ウイルスあるいは非分節マイナス鎖 RNA ウイルスと呼ばれている¹. この

ため, 近年発見された二分節型の植物ウイルスはラブドウイルスと極めて良く類似しているが, 分類学上モノネガウイルスに加えることは難しいようである⁴. モノネガウイルス目には, 狂犬病ウイルス (ラブドウイルス), 麻疹ウイルス (パラミクソウイルス), RS (respiratory syncytial) ウイルス (パラミクソウイルス), ニバウイルス (パラミクソウイルス), エボラウイルス (フィロウイルス), マールブルグウイルス (フィロウイルス) などのヒトに重篤な病原性を示すウイルスが多く含まれている。

モノネガウイルスの特徴は, ウイルス粒子内にマイナス極性一本鎖 RNA ゲノムと共通の起源から進化したと考えられる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) L タンパク質 (図 1) をもつことである。異なる科に属するモノネガウイルスは粒子やスクレオカプシドの形態が異なり, それぞれの科に属する個々のウイルスは異なる宿主 (植物, 昆虫, 魚類, 鳥類, は虫類, ほ乳類) に異なる病原性を示すなど非常に高い生物学的多様性を示す。一方で, 異なる科に属するモノネガウイルスであっても, ウイルスゲノムや L タンパク質の構造には多くの共通点が存在する^{1,2,5-10}。このことから, モノネガウイルスゲノムは共通の機構で転写・複製されると推測されている。L タンパク質は, RNA 合成だけでなく, mRNA キャッピング, キャップメチル化, およびポリア

連絡先

Department of Molecular Biology and Microbiology
Case Western Reserve University School of Medicine
10900 Euclid Avenue, LC 4960
Cleveland, OH 44106, USA
TEL: 1-216-368-2070
FAX: 1-216-368-3055
E-mail: tomoaki.ogino@case.edu

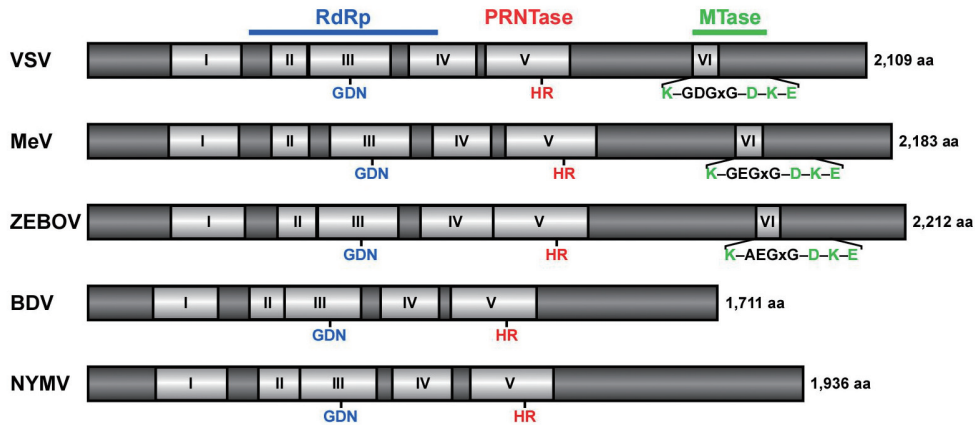


図1 非分節マイナス鎖RNAウイルスのLタンパク質の構造

モノネガウイルス目の異なる5つの科に属するウシ水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV), 麻疹ウイルス (measles virus, MeV), ザイルエボラウイルス (Zaire ebolavirus, ZEBOV), ボルナ病ウイルス (Borna disease virus, BDV), およびニヤマニーニウイルス (Nyamanini virus, NYMV) のLタンパク質の構造を模式的に示した。Lタンパク質は6つの保存された領域(IからVI)をもつ⁵⁾。推定されるRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp), ポリリボヌクレオチルトランスフェラーゼ(PRNTase, キャッピング酵素), およびキャップメチルトランスフェラーゼ(MTase)ドメインの位置, およびそれらの活性中心のアミノ酸モチーフを示した。

デニル化に必要な全ての酵素反応を触媒すると考えられている¹¹⁻²³⁾。

1970年にDavid Baltimoreら²⁴⁾が界面活性剤で処理したウシ水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) の粒子にRNA合成活性を初めて検出して以来, 過去40年以上に渡って, VSVはプロトタイプウイルスとしてモノネガウイルスの転写・複製機構の生化学的解析に用いられてきた。その理由としては, (1)VSVは昆虫を媒介して牛, 豚, 馬などの動物に水疱性口内炎を引き起こすことが知られているが, ヒトに対してはほとんど病原性を示さないこと, (2)ほ乳類培養細胞で極めて効率よく増殖するため, 大量の精製ウイルス粒子を容易に調製できること, (3)そしてなによりも精製ウイルス粒子のRNA合成活性が知られているモノネガウイルスの中で最も高いことなどが挙げられる。VSVを用いた初期の研究から, ウイルス粒子には, RdRp²⁴⁾だけでなく, mRNAキャッピング酵素^{25,26)}, キャップメチルトランスフェラーゼ(MTase)^{25,27)}, およびポリ(A)ポリメラーゼ^{28,29)}などのウイルスmRNAの修飾に関わる酵素が存在することが次々と発見された。本総説では, VSV転写・複製研究の歴史的な背景と筆者らが明らかにしたLタンパク質のmRNAキャッピングにおける機能について紹介したい。

VSVの転写・複製機構

VSVは, モノネガウイルスの中で最も単純なゲノム(11 kb)をもつ(図2)。ゲノムの3'と5'側には, それぞれリーダー配列およびトレーラー配列と呼ばれる約50ヌクレオ

チドの領域が存在する。ゲノム内部には, N, P, M, G, およびLの5つの遺伝子が順番に並んでいる。ゲノムは, ヌクレオ(N)タンパク質に覆われており, N-RNA複合体と呼ばれるヌクレオカプシドとして存在する³⁰⁾。VSV Lタンパク質(2,109アミノ酸, 241 kDa)は, その補助因子であるPタンパク質(古くはNSタンパク質と呼ばれていた)と結合してRdRp複合体を形成する^{11,31)}。RdRp複合体は, Pタンパク質とNタンパク質との結合を介して, N-RNA複合体に結合し, 転写活性のあるリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体を形成する^{11,13,31,32)}。

試験管内転写系による解析から, RdRp複合体は, ゲノムの3'末端からエントリーして, 47ヌクレオチドのプラス鎖リーダーRNAを合成した後に³³⁻³⁵⁾, ストップ-スタートと呼ばれる機構によって5つのmRNAを順番に合成すると考えられている³⁶⁻³⁸⁾(図2)。5つの遺伝子は3'と5'側に共通の遺伝子開始配列(3'-UUGUCDNUAG; D: A, U, あるいはG; N: いずれかのヌクレオチド)および遺伝子終結配列(3'-MUACUUUUUUU; M: A あるいはC)をもち, それぞれが転写開始シグナルおよび転写終結・ポリアデニル化シグナルとして機能する³⁹⁾。また, 遺伝子終結配列と開始配列の間にはmRNAには転写されない2ヌクレオチドの介在配列(SA; S: G あるいはC)が存在する。ちなみに, 異なる属に属するモノネガウイルスでは, それぞれ特徴のある遺伝子開始, 遺伝子終結, および介在配列をもち, VSVのそれらとは異なる³⁹⁻⁴²⁾。上流(3'側)の遺伝子の転写終結後, 同じRdRpが下流(5'側)の遺伝子の転写を再開すると推測されているが, 再開効率は完全に

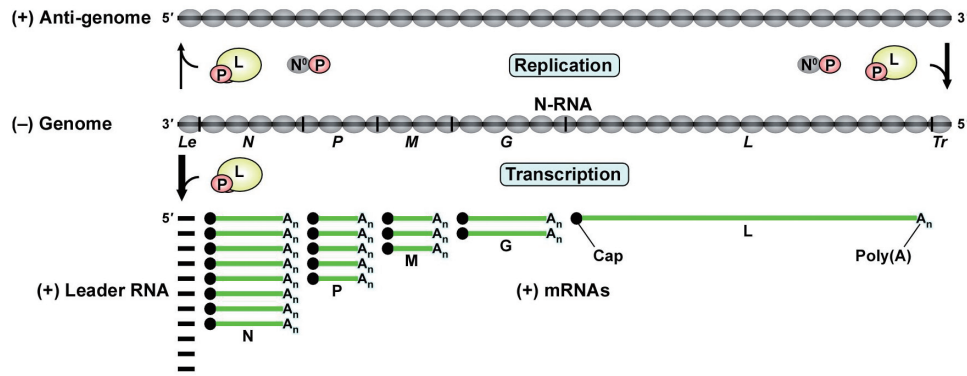


図2 VSVの転写・複製機構

VSV マイナス鎖ゲノム (中央) は、3' および 5' 末端にそれぞれリーダー配列 (Le) およびトレーラー配列 (Tr) を、内部に5つの遺伝子 (*N*, *P*, *M*, *G*, および *L*) をもつ。マイナス鎖ゲノムおよびプラス鎖アンチゲノムは *N* タンパク質に覆われた *N*-RNA 複合体として存在する。 *L* タンパク質と *P* タンパク質からなる RdRp 複合体は、マイナス鎖ゲノムの 3' 末端から転写を開始し、プラス鎖リーダー RNA (47 ヌクレオチド) とキャップ構造とポリ (A) 鎖をもつ 5つの mRNA を合成する (下側)。複製反応には (上側)、RdRp 複合体に加えて、RNA を含まない *N* タンパク質と *P* タンパク質からなる N^0 -P 複合体が必要である。

はないため、下流に向かうほど mRNA 合成量が低下する。その結果、mRNA 合成量のグラディエント ($N > P > M > G > L$) が生み出される^{36-38,43}。このユニークな転写レベルでの遺伝子発現量の調節機構によって、ゲノムを覆い尽くす *N* タンパク質の量を最大にし、酵素である *L* タンパク質の量を最小にすることができる。

ゲノム 3' 末端から転写されるリーダー RNA (47 ヌクレオチド) は、5'-ACGAA 配列で始まり、5'-三リン酸 (あるいは二リン酸) 基をもち、3'-ポリアデニル化されない^{33,34}。一方で、mRNA は、5'-AACAG 配列で始まり、遺伝子開始配列から転写された直後は 5'-三リン酸基をもつが、mRNA 鎖伸長反応の初期段階 (23 から 37 ヌクレオチド) で 5' 末端の修飾 (キャップ構造の付加とそのメチル化) を受ける^{38,44-46}。また、遺伝子終結配列の中のポリ (U) ストレッチで RdRp がスリッページを起こすことによって、mRNA の 3' 末端にはポリ (A) 鎖が付加されると推測されている^{43,47,48}。ウイルスの mRNA は細胞質で合成されるが、核内で DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ II によって合成される宿主 mRNA と同様に、翻訳に必要なキャップ構造とポリ (A) 鎖をもつため、宿主翻訳装置によって効率良くウイルスタンパク質へと翻訳される。

一方で、RdRp が *N*-RNA 複合体の中のゲノムを複製するためには、 N^0 -P 複合体 (N^0 : RNA と結合していない *N* タンパク質の意)が必要である⁴⁹⁻⁵⁶ (図2)。 N^0 -P 複合体は、*N* タンパク質と *P* タンパク質の比が 1:1 で RNA を含まない複合体であり、合成途上のゲノムあるいはアンチゲノム RNA に *N* タンパク質を運ぶ役割を担っていると考えられ

ている。ゲノムのエンカプシデーションを伴う複製過程では、RdRp はゲノム中の遺伝子開始・終結配列を認識せず完全長のアンチゲノム RNA (11 kb) を合成するが、その機構の詳細についてはほとんど明らかになっていない。

従来型のキャップ形成反応とキャップ構造の機能

VSV のキャッピング機構について述べる前に、宿主および他のウイルスのキャッピング機構について説明したい。mRNA キャップ構造は、1975 年にカイコ細胞質多角体病ウイルス⁵⁷ やレオウイルス⁵⁸ などの二本鎖 RNA ウイルスおよびワクシニアウイルス⁵⁹ などの巨大核質 DNA ウイルスの mRNA の 5' 末端に初めて発見された。同年には、真核細胞の mRNA にも同一のキャップ構造が存在することが明らかになった⁶⁰⁻⁶⁴。キャップ構造 (m^7 GpppN-) は、7-メチルグアノシン (m^7 G) の 5' 位が三リン酸基 (ppp) を介して mRNA の第一ヌクレオシド (*N*) の 5' 位に連結した真核細胞の mRNA に普遍的に存在する構造である (図3)⁶⁵⁻⁶⁷。キャップ構造は、真核細胞では RNA 5'-トリホスファターゼ (RTPase) および GTP:RNA グアニリルトランスフェラーゼ (GTase) からなるキャッピング酵素により核内で合成途上の mRNA 前駆体の 5' 末端に付加される (図4A)。この従来型のキャップ形成反応は、レオウイルス⁶⁸ およびワクシニアウイルス⁶⁹⁻⁷² を用いて初めて明らかにされ、その後真核細胞のキャッピング酵素も同様の反応を触媒することが示された^{66,67,73}。RTPase は mRNA 前駆体の 5'-三リン酸末端から γ 位リン酸基を除去し、5'-二リン酸末端をもつ RNA (ppN-RNA)

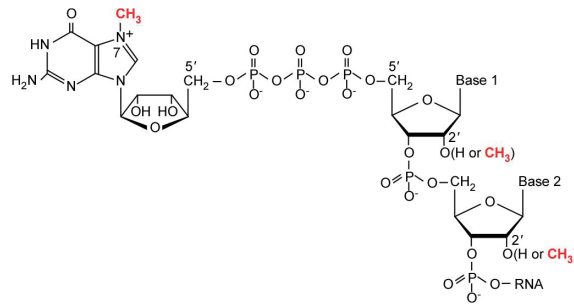


図3 真核細胞 mRNA の5'末端に存在するキャップ構造

真核細胞の mRNA は、7-メチルグアノシンの5'位が第一ヌクレオシドの5'位に三リン酸基を介して結合した修飾構造(キャップ0構造, m^7GpppN -)をもつ。高等真核細胞では、第一および第二ヌクレオシドの2'-O位がさらにメチル化され、キャップ1 ($m^7GpppNm$ -) およびキャップ2 ($m^7GpppNmpNm$ -) となる。

を生成する。真核細胞および巨大核質 DNA ウイルスの GTase は、ATP 依存性 DNA/RNA リガーゼと共に、共有結合型ヌクレオチジルトランスフェラーゼスーパーファミリーに属し、高度に保存された KxDG モチーフを活性中心にもつ⁷⁴⁾。KxDG モチーフ内のリジン残基は、 ϵ -アミノ基の窒素原子上に存在する孤立電子対を用いて、GTP の α 位リン原子へ求核攻撃し、その結果として酵素は GMP と共有結合反応中間体 (E-pG) を形成する。その後、GMP は中間体から mRNA 前駆体の 5'-二リン酸末端に転移し、キャップ化 RNA (GpppN-RNA) が生じる。この従来型のキャッピング反応を“GMP 転移反応”ともいう。さらに、S-アデノシル-L-メチオニン (AdoMet) をメチル基供与体として用いて、mRNA グアニン-N7-MTase がキャップ構造のグアニン N7 位をメチル化し、いわゆるキャップ0 (m^7GpppN -) と呼ばれる真核細胞の mRNA に共通に見出される構造が形成される。このキャップ0構造は、核内 mRNA 前駆体のスプライシング、mRNA の効率の良い翻訳、mRNA の安定化など様々な過程が必要である^{65-67,75)}。

高等真核細胞では、キャップ0構造は mRNA リボース-2'-O-MTase によってメチル化され、キャップ1 ($m^7GpppNm$ -) となることが知られる。さらに、第二ヌクレオシドのリボース-2'-O位がメチル化されるとキャップ2構造 ($m^7GpppNmpNm$ -) となる^{65,66)}。キャップ1構造は前述した高等真核細胞の細胞質で複製するウイルスの mRNA に初めて発見されたが⁵⁷⁻⁵⁹⁾、リボース-2'-O位のメチル化の意義は長い間わかっていなかった。近年、リボース-2'-O-MTase 活性を欠失させたウエストナイルウイルスやコロナウイルスなどの複製がインターフェロンによって野生型ウイルスよりも強く抑制されること^{76,77)}、インターフェロンで誘導される抗ウイルスタンパク質の一つ IFIT1 (IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats 1) が mRNA のキャップ0構造に結合してその翻訳を抑制す

ること^{78,79)}、リボース-2'-O位のメチル化が IFIT1 のキャップ構造への結合を防ぐこと^{78,79)}などが示された。さらに、高等真核細胞の mRNA リボース-2'-O-MTase の発現はインターフェロンで誘導されることが報告されている^{80,81)}。これらのことから、古代の真核細胞ウイルスは、キャップ構造に依存した宿主翻訳機構を利用するために、mRNA の5'末端にキャップ0構造をもっていたが、宿主は自己の mRNA のリボース-2'-O位を核内でメチル化しキャップ1とすることによって、細胞質で合成されたキャップ0構造をもつウイルス mRNA の翻訳を選択的に抑制する機構を構築したことが推測される。残念ながら、現在では、多くの細胞質で複製するウイルスは、リボース-2'-O-MTase の遺伝子をすでに獲得しており、自らの酵素でキャップ1構造を作ることができるため、IFIT1 による自然免疫反応に耐性を示す。一方で、リボース-2'-O-MTase をもたないアルファウイルスは、mRNA の5'非翻訳領域に二次構造をもうけることによって、IFIT1 のキャップ0構造への結合を防いでいることが明らかになった⁸²⁾。

VSV の mRNA キャッピング反応

キャップ構造が発見された1975年には、試験管内で合成された VSV mRNA にも同一のキャップ構造 ($m^7GpppAm$ -) が存在することが明らかになった²⁵⁾。キャップ構造のメチル化の順序は宿主細胞と異なり、VSV 粒子内の MTase は、リボース-2'-O位を初めにメチル化し、次にグアニン N7 位をメチル化する²⁷⁾。ウイルス感染細胞で合成された VSV mRNA のキャップ構造は、さらに宿主 MTase によって第二ヌクレオシドのリボース-2'-O位および第一と第二ヌクレオシドのアデニン-N6位がメチル化を受け、 $m^7Gppp^6Am^6Am$ - (m^6Am : N6,2'-O-ジメチルアデノシン) となる^{83,84)}。Abraham ら^{25,26)} は、異なる部位を ³²P 標識した GTP あるいは ATP を基質として用いて VSV の試験管内転写反応を行うことによって、GTP

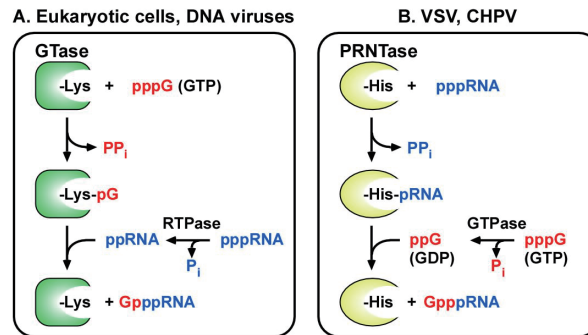


図4 従来型および非従来型キャッピング反応

(A) 真核細胞および巨大核質 DNA ウィルスは、RNA 5'-トリホスファターゼ (RTPase) および グアニリルトランスフェラーゼ (GTase) からなるキャッピング酵素によって mRNA 前駆体の 5' 末端にキャップ構造を付加する。GTase の活性中心に存在する リジン残基は GMP と共有結合反応中間体を形成する。

(B) VSV およびチャンディピュラウィルス (CHPV) などの非分節マイナス鎖 RNA ウィルスは、L タンパク質のもつグアノシン 5'-トリホスファターゼ (GTPase) とポリリボスクレオチルトランスフェラーゼ (PRNTase) 活性によってキャップ構造を作る。PRNTase の活性中心に存在するヒスチジン残基は pRNA と共有結合反応中間体を形成する。

からは α 位および β 位のリン酸基、ATP からは α 位のリン酸基がキャップ構造 (GpppA-あるいは AdoMet 存在化では $m^7GpppAm^-$) に組み込まれることを明らかにした。この結果は、VSV のキャッピング反応が真核細胞や他のウィルスの GTase が触媒する ppRNA への GMP 転移反応と異なることを示した初めての例である。しかしながら、他のウィルスのキャッピング反応と異なり、外から加えた RNA と [α - ^{32}P]GTP を基質として用いた試験管内キャッピング系を構築することができなかったため、その反応機構の詳細は長い間不明であった。さらには、キャッピング反応は mRNA 合成反応と共役して起こるために、試験管内キャッピング系を構築することは不可能であると言われた。加えて、他のウィルスの GTase と異なり、[α - ^{32}P]GTP と VSV RNP をインキュベートしても、共有結合反応中間体 (例えば E-ppG) を形成するウィルスタンパク質を検出することもできなかった。VSV では、5'-一リン酸化 RNA (pRNA) への“GDP 転移反応”が起こると多くの研究者が長い間信じていたが、実際には、GDP が転移するのではなく、GDP へ pRNA が転移する“pRNA 転移反応”が起こることが筆者らの研究で 2007 年に初めて明らかになった¹⁹⁾。

VSV のキャッピング反応を解明するために、筆者はまず、5'-ACGAA 配列で始まるリーダー RNA (47 nt) は 5'-三リン酸基 (ppp-) をもつものに対して、5'-AACAG 配列で始まる完全長 mRNA は 5' 末端にキャップ構造 (GpppA-) をもつこと^{33,85)} に着眼した。興味深いことに、VSV の試験管内転写産物の中に、mRNA 前駆体あるいはアポータイブ転写産物と思われる短鎖 RNA が見出されており、これ

らは 5'-AACAG 配列で始まるにもかかわらず、キャップ構造ではなく 5'-三リン酸基をもつ^{38,45,86,87)}。これらのことから、筆者は、VSV キャッピング酵素は、mRNA 開始配列特異的に 5'-三リン酸基をもつ RNA にキャップ構造を付加するのではないかと仮説を立てた。そこで、T7 ポリメラーゼで 5'-三リン酸基をもつオリゴ RNA, pppAACAG (mRNA 開始配列) および pppACGAA (リーダー RNA 開始配列) を合成し、それらを [α - ^{32}P]GTP 存在下に VSV 粒子から精製した RNP とインキュベートした。その結果、pppAACAG のみが基質として働き、キャップ化 RNA すなわち GpppAACAG が生成した¹⁹⁾。

この試験管内キャッピング系を用いることにより、RNP 中に存在する VSV キャッピング酵素は、(1) GTP の α 位および β 位のリン酸基をキャップ構造 (GpppA) に組み込むが、GTP の γ 位のリン酸基は組み込まないこと、(2) GTP だけでなく GDP を基質にし、キャップ構造を作ること、(3) 5'-三リン酸化 RNA を基質にするが、5'-二リン酸化 RNA や 5'-一リン酸化 RNA を基質にしないことが明らかになった¹⁹⁾。これらの結果は、VSV キャッピング酵素の基質特異性が宿主あるいは他のウィルスのキャッピング酵素のそれと大きく異なることを示す。宿主あるいは他のウィルスの GTase は、5'-二リン酸化 RNA を GMP 受容体として用いるが、GDP を GTP の代わりに GMP 供与体として用いることはできない^{68,71,88,89)}。さらに、(4) VSV キャッピング酵素がウィルス mRNA の 5' 末端配列 (AACAG) をもつ RNA に特異的にキャップを付加することが^{19,90)}、RNA 配列に依存しないでキャップ構造を付加する宿主や DNA ウィルスの酵素と大きく異なる点である^{88,89)}。RNA 配列特

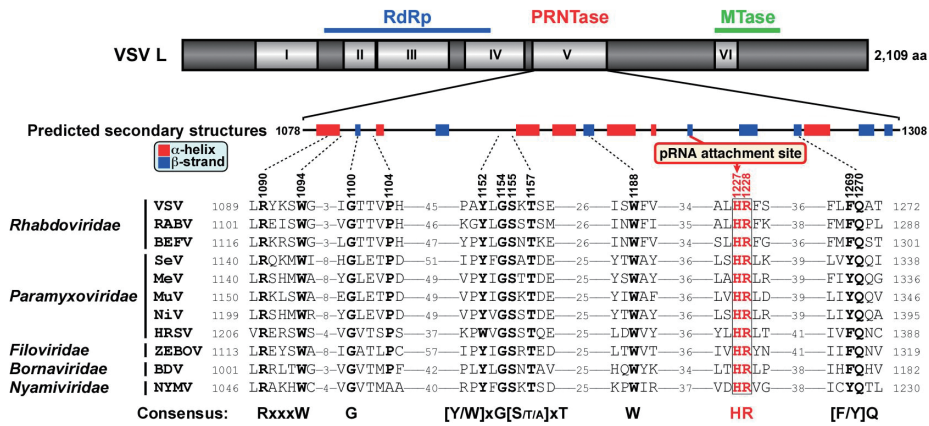


図5 Lタンパク質の第五保存領域に存在するアミノ酸モチーフ

VSV Lタンパク質の第五保存領域の推定二次構造 (PHD法¹¹⁰) と他のモノネガウイルスのLタンパク質に保存されているアミノ酸モチーフを示した。VSV Lタンパク質の1227番目のヒスチジンは、キャッピング反応の中でpRNAの共有結合部位として機能する。図中に示したウイルスのLタンパク質アミノ酸配列のGenBank登録番号は以下の通りである：VSV, K02378; 狂犬病ウイルス (rabies virus, RABV), M13215; 牛流行熱ウイルス (bovine ephemeral fever virus, BEFV), AF234533; センダイウイルス (Sendai virus, SeV), X03614; 麻疹ウイルス (MeV), M20865; ムンプスウイルス (mumps virus, MuV), D10575; ニパウイルス (Nipah virus, NiV), AF212302; ヒトRSウイルス (human respiratory syncytial virus, HRSV), M75730; ザイルエボラウイルス (ZEBOV), AF086833; ボルナ病ウイルス (BDV), AJ311522; ニヤマニーニウイルス (NYMV), FJ554526。

異性の解析の結果、pppARCNG (R: AあるいはG) 配列をもつRNAがVSVのキャッピング酵素によって効率良くキャップ化されること、中でも第一ヌクレオシドのAと第三ヌクレオシドのC残基は基質活性に必須であることがわかった^{19,90}。

VSVのキャッピング酵素の基質特異性は、さらなる反応機構の解明に糸口を与えた。まず、GDPをRNA合成の前駆体GTPから生み出すためのグアノシン5'-トリホスファターゼ (GTPase) 活性がRNPにあることを見出した¹⁹。さらに、筆者は、GTaseの触媒機構から類推して、pppRNAからpRNAをGDPに転移するためには、酵素がpRNAと共有結合反応中間体 (E-pRNA) を形成する可能性があるのではないかと考えた。予測的中し、RNP中のLタンパク質がRNAの5'末端リン酸基と共有結合する活性 (共有結合L-pRNA複合体形成活性) があることを発見した¹⁹。これらのキャップ形成活性、GTPase活性、およびL-pRNA複合体形成活性は、昆虫細胞で発見し、高度に精製した組換えVSV Lタンパク質単独にも検出されたことから、他のウイルス因子 (Pタンパク質, Nタンパク質, ゲノムRNAなど) は活性発現に必要ではないことが明らかになった¹⁹。GTPase活性はGpppAキャップ形成活性に必要であり、GTPのGDPへの加水分解の程度が低いと四リン酸を含んだ異常なGppppAキャップ構造が形成される⁹⁰。共有結合L-pRNA複合体はpRNA転移反応 (VSVキャッピング反応) のE-pRNA共有結合反応中

間体であることが強く示唆されたため、我々はこの新規酵素をRNA:GDPポリリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (polyribonucleotidyltransferase, PRNTase) と命名した^{19,90}。すなわち、VSVのmRNAキャッピング酵素は“RNA転移酵素”であることを提唱した。

さらに、共有結合L-pRNA複合体が反応中間体であることを証明するために、L-pRNA複合体をホスホセルロース樹脂で単離し、それにGDPへのpRNA転移活性があることを示した²³。以上の結果より、PRNTase反応は、下記の二段階反応を経て進行すると結論づけた (図4B)。(i) Lタンパク質中に存在すると考えられるPRNTaseドメインが、5'-三リン酸末端をもつVSV mRNA開始配列 (pppRNA) に特異的に反応し、共有結合反応中間体 (L-pRNA) を形成する。(ii) pRNAはL-pRNA中間体からGDPに転移し、キャップ化RNA (GpppRNA) がLタンパク質から遊離する。

Lタンパク質のmRNAキャッピング酵素ドメイン

VSV Lタンパク質とpRNAとの共有結合はホスホアミド結合であり、その形成にはヒスチジン残基が関与していることが、結合の化学特性の解析から示唆された¹⁹。我々は、PRNTaseドメインの活性中心を明らかにすることを目的とし、L-pRNA中間体内のpRNA共有結合部位を同定した。実際には、L-pRNAを酵素反応および化学反応で段階的に分解することによって得られたペプチド-AMP

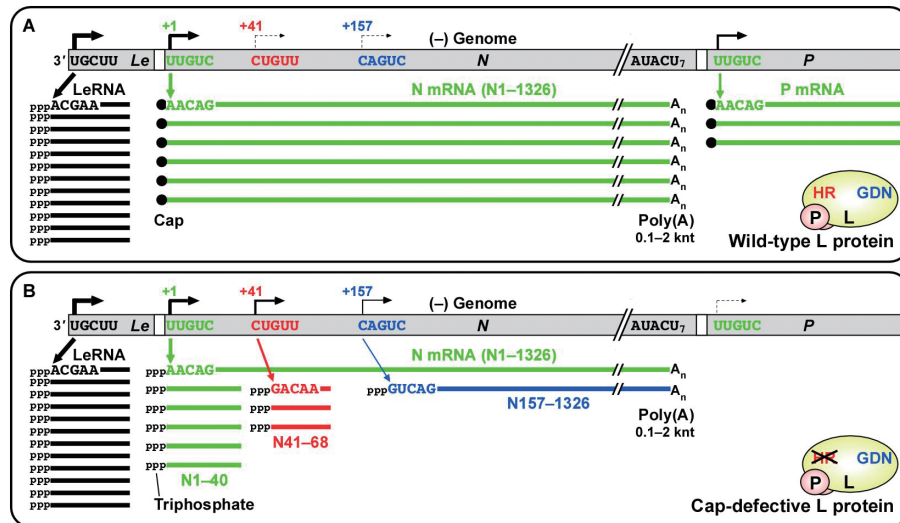


図6 キャップ形成不全のVSV mRNA 生合成に与える影響

(A) 野生型Lタンパク質を含むRdRp複合体は、ウイルスゲノムの3'末端からエントリーし、まず5'-三リン酸末端をもつリーダーRNA (47ヌクレオチド)を合成する。次に、5'-キャップ構造および3'-ポリ(A)鎖をもつ5つの完全長mRNA(N, P, M, G, およびL)をストップ-スタートと呼ばれる機構で順次合成する。図中ではゲノム3'側の一部(リーダー配列からP遺伝子の途中まで)から起こる転写反応を模式的に示した。ゲノム上の転写開始部位の配列と転写産物の5'末端配列を示した。

(B) HRモチーフに変異をもつLタンパク質を含むRdRp複合体は、リーダーRNAを合成した後、異常なストップ-スタート転写反応を起こし、5'-三リン酸末端をもつN mRNAの断片(N1-40, N41-68, およびポリアデニル化されたN157-1326)を合成する。なお、量は少ないがポリアデニル化された完全長N mRNA(N1-1326)も合成されるが、P mRNAはほとんど合成されない。隠れた転写開始部位の配列と転写産物の5'末端配列を示した。

複合体やリン酸化アミノ酸をそれぞれタンデム質量分析法と逆相薄層クロマトグラフィーで解析した²³⁾。その結果、RNAの5'-一リン酸末端は、ホスホアミド結合を介して、Lタンパク質中の1227番目ヒスチジン残基(H1227)のε2位の窒素原子に共有結合していることが明らかになった。この結果から、我々は、H1227のε2位の孤立電子対がRNAの5'-三リン酸末端の中のα位リン原子に求核攻撃することにより、L-pRNA中間体が形成するというモデルを提唱した^{10,23,91)}。H1227は、モノネガウイルスLタンパク質に高度に保存されているヒスチジン-アルギニン(HR)モチーフ内に位置した^{10,23,91,92)}(図5)。HRモチーフは、PRNTase反応中のL-pRNA中間体形成活性に必須であるが、GTPase活性には必要ではない²³⁾。HRモチーフおよびその周辺のアミノ酸配列は知られている100以上の異なるモノネガウイルスのLタンパク質で高度に保存されている。

VSV以外では、ヒトに脳炎を引き起こすことが知られるチャンディピュラウイルス(CHPV, ラブドウイルス)のLタンパク質がVSVと同様のPRNTase活性を触媒すること、その活性にHRモチーフが必要であることを明らかにした²²⁾。コイ春季ウイルス血症ウイルス(SVCV, ラブドウイルス)でも、非従来型のキャッピング反応が転写反応

中に起こることが知られる⁹³⁾。しかしながら、SVCVはGTPの非水解アナログであるGMP-PNPからGMP部分をキャップ構造(GpppA)に組み込むことができると報告されているが⁹³⁾、この反応はVSVやCHPVでは決して起こらない。牛疫ウイルス(パラミクソウイルス)では、Lタンパク質のC末端領域が従来型のGTaseのようにGTPとインキュベートするとE-pG反応中間体の様な複合体を形成することが報告されているが、この複合体が従来型キャッピング反応の共有結合反応中間体であるかは証明されていない⁹⁴⁾。ほとんどのモノネガウイルスのLタンパク質はHRモチーフをもつが、これまでのところ生化学的実験でキャッピング機構を明らかにした例はVSVとCHPV以外にはない。一方で、ノビラブドウイルス属に属するウイルスのLタンパク質は、例外的にHRモチーフの代わりにヒスチジン-リジン(HK)配列をもつが^{10,23,92)}、HK配列がキャッピング反応に関与しているか否かは不明である。

Liら⁹⁵⁾は2008年に、アラニンスキャニング変異導入法によって、VSV Lタンパク質の第五保存領域内の四つの保存されたアミノ酸残基(G1155, T1157, H1227, H1228)が[α-³²P]GTPを基質としたキャッピング反応に必要であることを示した。前述したように、その後HRモチーフ

は PRNTase 活性の L-pRNA 中間体形成段階で必要であることがわかったが、HR モチーフの N 末端側に位置する G1155 と T1157 残基はキャッピング反応のどの段階で必要であるかはわかっていなかった。これらの残基は、知られているすべてのモノネガウイルス（ノビラブドウイルスを含む）の L タンパク質に高度に保存されている [Y/W]xG[S/T/A]xT モチーフ内に含まれる^{10,91,92} (図 5)。筆者らの解析から、このモチーフと HR モチーフの C 末端側に位置する FQ モチーフ（多くのパラミクソウイルスは YQ 配列）が VSV L タンパク質の触媒する PRNTase 活性の L-pRNA 中間体形成段階に必須であることがわかってきた（未発表）。しかしながら、正確な PRNTase ドメインの位置は同定されていない。

低温電子顕微鏡を用いた、組換え L タンパク質の超微形態観察の結果、L タンパク質単独では N 末端側のリング状 RdRp ドメインにフレキシブルな三つの球状のドメインが連結しており、その内の二つが PRNTase ドメインと MTase ドメインであることが推測されている⁹⁶。しかしながら、酵素活性を保った VSV L タンパク質の断片を得た例は、現在のところ報告されていない。筆者らは、パラミクソウイルス科のプロトタイプであるセンダイウイルスの L タンパク質を用いて、グアニン-N7-MTase 活性のある C 末端側断片を得ることに成功しているが、その酵素活性は完全長 L タンパク質に比べると極めて低いものであった¹⁸。興味深いことに、パラミクソウイルス科の麻疹ウイルス⁹⁷、牛痘ウイルス⁹⁸、犬ジステンパーウイルス⁹⁹、および RS ウイルス¹⁰⁰ の L タンパク質そして VSV の L タンパク質¹⁰¹ の MTase ドメインの N 末端近傍に位置する推定ヒンジ領域に GFP を組み込んでも、それらの融合タンパク質はある程度転写・複製活性を保っていることが報告されている。さらに、麻疹ウイルス、ニパウイルス、および RS ウイルスの L タンパク質では、推定ヒンジ領域で、RdRp ドメインとキャッピング酵素ドメインを含む N 末端側と MTase ドメインを含む C 末端側に分け、それぞれの断片に人工的な二量体ドメインを付加すると、細胞内で転写活性のある複合体を再構成できることが示された¹⁰²。一方で、宿主細胞の核内で増殖するモノネガウイルス（ボルナウイルス、ニヤミウイルス、およびヌクレオラブドウイルス）の L タンパク質は、MTase ドメインをもたないため (図 1)、核内の宿主 MTase を利用してキャップ構造をメチル化しているものと推測される。細胞質で増殖するモノネガウイルスは、MTase ドメインを L タンパク質の C 末端に融合させることによって、細胞質でもキャップ構造のメチル化を触媒できるようになったものと考えられる。なお、真核細胞ではグアニン-N7-MTase とリボース-2'-O-MTase は独立のタンパク質として存在するが、モノネガウイルス L タンパク質の C 末端 MTase ドメインはグアニン N7 位とリボース-2'-O 位

の二カ所をメチル化できる特殊な酵素ドメインであると推測されている^{8,9,16-18,103}。

mRNA キャッピング酵素ドメインの 転写反応における役割

筆者らは^{19,104}、高度に精製した組換え VSV L タンパク質、P タンパク質、および N-RNA 複合体からなる再構成転写系を開発し、この系で合成された mRNA がキャッピング、キャップメチル化、およびポリアデニル化を受けていることを示した。この系を用いて、キャッピング反応に必須な HR モチーフへの変異が転写反応に与える影響を調べた¹⁰⁵。HR モチーフ変異体は、野生型 L タンパク質と同様に、ゲノム 3' 末端から効率よくリーダー RNA を合成したが、著しく低い N mRNA 合成活性を示した¹⁰⁵ (図 6)。詳細に転写産物を解析してみると、HR モチーフ変異体は、N 遺伝子開始配列の正確な転写開始部位 (+1) から mRNA 合成を開始したものの、40 ヌクレオチドで転写を停止していた。驚くべきことに、変異体は、+41 に位置する隠された転写開始部位から再び RNA 合成を開始し、28 ヌクレオチドの RNA を合成した。さらに、+157 に位置する隠された転写開始部位からも再び RNA 合成を開始し、約 1200 ヌクレオチドで 3' 側にポリ (A) 鎖の付加を受けた異常な RNA (N mRNA の 5' 側が欠損した RNA) を合成した。+1 からの RNA は 5'-ATP で始まっていたが、+41 と +157 からの RNA は開始ヌクレオチドとして通常は利用されない 5'-GTP で始まっていた。HR モチーフ変異体は、N 遺伝子の中の隠れた転写終結および開始配列を頻繁に利用するため、ストップ-スタート転写反応に伴う劇的な転写の減弱を起し、下流の P 遺伝子の転写がほとんどできない。これらの結果は、mRNA 鎖伸長反応の初期段階 (23 から 37 ヌクレオチド) でキャッピング反応^{38,44-46} が起こらないと、RdRp ドメインは mRNA 鎖伸長反応の再開、遺伝終結配列での正確な転写終結、そしてそれに引き続いて起こる遺伝開始配列からの正確な転写再開ができなくなることを示唆する。

一方で、Li ら⁹⁵ は筆者とは異なる結果を報告している。彼らのウサギ網状赤血球可溶化液を含んだ再構成転写系では、HR モチーフ変異体は N 遺伝子内の不特定の部位で転写を早期停止し、100 から 500 ヌクレオチドの不均一な長さの転写産物を合成したことから、彼らはキャッピングが mRNA 鎖伸長反応のプロセッシビティの上昇に必要であるというモデルを提唱した。さらに、彼らの系では完全長 mRNA にポリ (A) 鎖が付加されなかったことから、5' 末端の mRNA キャッピングが 3' 末端のポリアデニル化に必要であるとも推測している¹⁰⁶。しかしながら、筆者の系では、同じ変異体を用いても、不均一な長さの転写産物やポリ (A) 鎖をもたない完全長 mRNA は合成されない。少ないながらも HR モチーフ変異体によって合成された N

mRNA は、キャップ構造こそもないが、野生型 L タンパク質と同様に 100 から 2000 ヌクレオチドの長さのポリ (A) 鎖をもつ¹⁰⁵⁾。よって、筆者は¹⁰⁵⁾、HR モチーフへの変異は、mRNA 鎖伸長反応のプロセシビリティやポリアデニル化に影響を与えずに、隠れた転写終結および開始配列を用いた異常なストップ-スタート転写を引き起こし、結果として N mRNA の断片化を誘発すると結論づけた。

VSV のレプリコン系を用いた解析により、Stillman と Whitt¹⁰⁷⁾ は、遺伝子開始配列 (3'-UUGUCDNUAG) が 3'-UYG 配列 (Y: U あるいは C) で始めると完全長の mRNA が合成されるが、3'-CUG や UGG などの配列で始めるとキャップ構造をもたない短い RNA (40 から 200 ヌクレオチド) が合成されることを発見した。前述したように、筆者らの解析では、3'-UYG に相補的な 5'-ARG 配列は VSV L タンパク質の PRNTase ドメインによる 5'-三リン酸化 RNA 基質認識に必要である^{19,90)}。よって、3'-CUG や UGG 配列から合成される RNA は 5' 末端に GAG や ACC 配列をもつため、これらにはキャップ構造が付加されないと考えられる。L タンパク質の HR モチーフへの変異と同様に、遺伝子開始配列への変異も mRNA 合成を約 40 ヌクレオチドで停止させる作用があることは、大変興味深い。

一方で、抗 RS ウイルス活性を有する低分子化合物存在下に試験管内 RS ウイルス RNA 合成反応を行うと、完全長 mRNA の合成が阻害され、5'-三リン酸基をもつ 50 ヌクレオチド以下のアポータティブ転写産物が蓄積することが見出されている¹⁰⁸⁾。さらに、その低分子化合物存在下に RS ウイルスを培養細胞で継代すると、化合物に耐性のウイルスが出現し、耐性ウイルスは L タンパク質の HR モチーフ近傍にアミノ酸変異をもっていた¹⁰⁸⁾。このことから、その低分子化合物は、PRNTase ドメインに結合することにより mRNA キャッピングを阻害し、その結果 mRNA の合成を早期終了させたことが推測された。

これらの発見は、モノネガウイルス mRNA 鎖の伸長反応の初期に起こる mRNA 前駆体のキャッピングが完全長 mRNA の合成において必須なステップであることを強く示唆する。現在のところ、キャップ形成不全によって引き起こされる転写終結の機構は良くわかっていないため、今後の詳細な解析が期待される。

おわりに

VSV および CHPV L タンパク質を用いた我々の研究から、PRNTase ドメインは、真核細胞キャッピング酵素とは独立に進化した、新しいクラスのキャッピング酵素であることが明らかになった。現在のところ、真核細胞には PRNTase のホモログは見出されていない⁹²⁾。さらに、筆者は VSV L タンパク質の PRNTase ドメイン活性中心に存在する HR モチーフは VSV の細胞内増殖に必須であるこ

とを証明した¹⁰⁵⁾。PRNTase ドメイン活性中心の HR モチーフとその周辺のアミノ酸配列は、他のモノネガウイルス L タンパク質においても良く保存されているため^{10,23,91,92)}、他のモノネガウイルスの L タンパク質も VSV と同様に非従来型の mRNA キャッピング酵素活性をもつことが強く示唆される。以上の結果は、モノネガウイルス mRNA キャッピング酵素が抗ウイルス剤の標的となりうることを強く示唆するものである。

2014 年 10 月の時点で西アフリカでの致死的なエボラ出血熱の流行は収束のめどが立っておらず¹⁰⁹⁾、エボラウイルスに対するワクチンおよび薬剤の開発は急務である。過去 40 年間 VSV を用いて明らかになった転写・複製機構が、エボラウイルスなどのヒトに病原性を示すモノネガウイルスに対する薬剤を開発する上で重要な知見になることを期待したい。

謝 辞

本総説に述べられた筆者らの研究は、米国オハイオ州 Cleveland Clinic の Amiya K. Banerjee 博士の研究室と Cleveland Clinic および現在では Case Western Reserve University の筆者の研究室で、米国国立衛生研究所からの支援を受けて行われた。研究を支えて頂きました Banerjee 博士、Satya P. Yadav 博士 (Cleveland Clinic)、および研究室のメンバーに感謝致します。本総説の執筆の機会を与えて下さいました松浦義治先生ならびにウイルス編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Pringle, C.R.: The order Mononegavirales. *Arch. Virol.*, 117, 137-140, 1991.
- 2) Pringle, C.R.: The order Mononegavirales-current status. *Arch. Virol.*, 142, 2321-2326, 1997.
- 3) Kuhn, J.H., Bekal, S., Cai, Y., Clawson, A.N., Domier, L.L., Herrel, M., Jahrling, P.B., Kondo, H., Lambert, K.N., Mihindukulasuriya, K.A., Nowotny, N., Radoshitzky, S.R., Schneider, U., Staeheli, P., Suzuki, N., Tesh, R.B., Wang, D., Wang, L.F., and Dietzgen, R.G.: Nyamiviridae: proposal for a new family in the order Mononegavirales. *Arch. Virol.*, 158, 2209-2226, 2013.
- 4) Dietzgen, R.G., Kuhn, J.H., Clawson, A.N., Freitas-As-tua, J., Goodin, M.M., Kitajima, E.W., Kondo, H., Wetzel, T., and Whitfield, A.E.: Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. *Arch. Virol.*, 159, 607-619, 2014.
- 5) Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N.: Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.*, 71, 1153-1162, 1990.
- 6) Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A.J., Park, Y.S.,

- Kim, S., Ludwig, H., and Lipkin, W.I.: Genomic organization of Bornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4362-4366, 1994.
- 7) Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Chepurinov, A.A., Blinov, V.M., Dolnik, O., Netesov, S.V., and Feldmann, H.: Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.*, 80, 355-362, 1999.
 - 8) Bujnicki, J.M. and Rychlewski, L.: In silico identification, structure prediction and phylogenetic analysis of the 2'-O-ribose (cap 1) methyltransferase domain in the large structural protein of ssRNA negative-strand viruses. *Protein Eng.*, 15, 101-108, 2002.
 - 9) Ferron, F., Longhi, S., Henrissat, B., and Canard, B.: Viral RNA-polymerases - a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 222-224, 2002.
 - 10) Ogino, T. and Banerjee, A.K.: An unconventional pathway of mRNA cap formation by vesiculoviruses. *Virus Res.*, 162, 100-109, 2011.
 - 11) Emerson, S.U. and Yu, Y.: Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 15, 1348-1356, 1975.
 - 12) Horikami, S.M. and Moyer, S.A.: Host range mutants of vesicular stomatitis virus defective in in vitro RNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 7694-7698, 1982.
 - 13) De, B.P. and Banerjee, A.K.: Requirements and functions of vesicular stomatitis virus L and NS proteins in the transcription process in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 40-49, 1985.
 - 14) Hunt, D.M. and Hutchinson, K.L.: Amino acid changes in the L polymerase protein of vesicular stomatitis virus which confer aberrant polyadenylation and temperature-sensitive phenotypes. *Virology*, 193, 786-793, 1993.
 - 15) Sleat, D.E. and Banerjee, A.K.: Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *J. Virol.*, 67, 1334-1339, 1993.
 - 16) Grdzlishvili, V.Z., Smallwood, S., Tower, D., Hall, R.L., Hunt, D.M., and Moyer, S.A.: A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *J. Virol.*, 79, 7327-7337, 2005.
 - 17) Li, J., Fontaine-Rodriguez, E.C., and Whelan, S.P.: Amino acid residues within conserved domain VI of the vesicular stomatitis virus large polymerase protein essential for mRNA cap methyltransferase activity. *J. Virol.*, 79, 13373-13384, 2005.
 - 18) Ogino, T., Kobayashi, M., Iwama, M., and Mizumoto, K.: Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. *J. Biol. Chem.*, 280, 4429-4435, 2005.
 - 19) Ogino, T. and Banerjee, A.K.: Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Mol. Cell*, 25, 85-97, 2007.
 - 20) Galloway, S.E. and Wertz, G.W.: S-adenosyl homocysteine-induced hyperpolyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA requires the methyltransferase activity of L protein. *J. Virol.*, 82, 12280-12290, 2008.
 - 21) Rahmeh, A.A., Li, J., Kranzusch, P.J., and Whelan, S.P.: Ribose 2'-O methylation of the vesicular stomatitis virus mRNA cap precedes and facilitates subsequent guanine-N-7 methylation by the large polymerase protein. *J. Virol.*, 83, 11043-11050, 2009.
 - 22) Ogino, T. and Banerjee, A.K.: The HR motif in the RNA-dependent RNA polymerase L protein of Chandipura virus is required for unconventional mRNA-capping activity. *J. Gen. Virol.*, 91, 1311-1314, 2010.
 - 23) Ogino, T., Yadav, S.P., and Banerjee, A.K.: Histidine-mediated RNA transfer to GDP for unique mRNA capping by vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 3463-3468, 2010.
 - 24) Baltimore, D., Huang, A.S., and Stampfer, M.: Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 66, 572-576, 1970.
 - 25) Abraham, G., Rhodes, D.P., and Banerjee, A.K.: The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell*, 5, 51-58, 1975.
 - 26) Abraham, G., Rhodes, D.P., and Banerjee, A.K.: Novel initiation of RNA synthesis in vitro by vesicular stomatitis virus. *Nature*, 255, 37-40, 1975.
 - 27) Testa, D. and Banerjee, A.K.: Two methyltransferase activities in the purified virions of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 24, 786-793, 1977.
 - 28) Banerjee, A.K. and Rhodes, D.P.: In vitro synthesis of RNA that contains polyadenylate by virion-associated RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 3566-3570, 1973.
 - 29) Villarreal, L.P. and Holland, J.J.: Synthesis of poly(A) in vitro by purified virions of vesicular stomatitis virus. *Nat. New Biol.*, 246, 17-19, 1973.
 - 30) Green, T.J., Zhang, X., Wertz, G.W., and Luo, M.: Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*, 313, 357-360, 2006.
 - 31) Mellon, M.G. and Emerson, S.U.: Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 27, 560-567, 1978.
 - 32) De, B.P. and Banerjee, A.K.: Specific interactions of vesicular stomatitis virus L and NS proteins with heterologous genome ribonucleoprotein template lead to mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.*, 51, 628-634, 1984.
 - 33) Colonno, R.J. and Banerjee, A.K.: A unique RNA species involved in initiation of vesicular stomatitis virus RNA transcription in vitro. *Cell*, 8, 197-204, 1976.
 - 34) Colonno, R.J. and Banerjee, A.K.: Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell*, 15, 93-101, 1978.
 - 35) Emerson, S.U.: Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. *Cell*, 31, 635-642, 1982.
 - 36) Abraham, G., and Banerjee, A.K.: Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1504-1508, 1976.
- 37) Ball, L.A. and White, C.N.: Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 442-446, 1976.
 - 38) Testa, D., Chanda, P.K., and Banerjee, A.K.: Unique mode of transcription in vitro by Vesicular stomatitis virus. *Cell*, 21, 267-275, 1980.
 - 39) Lyles, D.S. Kuzmin, I.V., and Rupprecht, C.E.: Rhabdoviridae. In: *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. and Howley P.M.), pp. 885-922, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
 - 40) Lamb, R.A. and Parks, G.D.: Paramyxoviridae. In: *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. and Howley P.M.), pp. 957-995, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
 - 41) Feldmann, H., Sanchez, A., and Geisbert, T.W.: Filoviridae. In: *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. and Howley P.M.), pp. 923-956, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
 - 42) Herden, C., Briese, T., Lipkin, W.I., and Richt, J.A.: Bornaviridae. In: *Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. and Howley P.M.), pp. 1124-1150, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
 - 43) Iverson, L.E. and Rose, J.K.: Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell*, 23, 477-484, 1981.
 - 44) Schubert, M., Harmison, G.G., Sprague, J., Condra, C.S., and Lazzarini, R.A.: In vitro transcription of vesicular stomatitis virus: initiation with GTP at a specific site within the N cistron. *J. Virol.*, 43, 166-173, 1982.
 - 45) Piwnica-Worms, H., and Keene, J.D.: Sequential synthesis of small capped RNA transcripts in vitro by vesicular stomatitis virus. *Virology*, 125, 206-218, 1983.
 - 46) Tekes, G., Rahmeh, A.A., and Whelan, S.P.: A freeze frame view of vesicular stomatitis virus transcription defines a minimal length of RNA for 5' processing. *PLoS Pathog.*, 7, e1002073, 2011.
 - 47) Barr, J.N., Whelan, S.P., and Wertz, G.W.: cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *J. Virol.*, 71, 8718-8725, 1997.
 - 48) Hwang, L.N., Englund, N., and Pattnaik, A.K.: Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions. *J. Virol.*, 72, 1805-1813, 1998.
 - 49) Peluso, R.W. and Moyer, S.A.: Initiation and replication of vesicular stomatitis virus genome RNA in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 3198-3202, 1983.
 - 50) Masters, P.S. and Banerjee, A.K.: Phosphoprotein NS of vesicular stomatitis virus: phosphorylated states and transcriptional activities of intracellular and virion forms. *Virology*, 154, 259-270, 1986.
 - 51) Masters, P.S. and Banerjee, A.K.: Complex formation with vesicular stomatitis virus phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to nonspecific RNA. *J. Virol.*, 62, 2658-2664, 1988.
 - 52) Masters, P.S. and Banerjee, A.K.: Resolution of multiple complexes of phosphoprotein NS with nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 62, 2651-2657, 1988.
 - 53) Peluso, R.W. and Moyer, S.A.: Viral proteins required for the in vitro replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. *Virology*, 162, 369-376, 1988.
 - 54) La Ferla, F.M. and Peluso, R.W.: The 1:1 N-NS protein complex of vesicular stomatitis virus is essential for efficient genome replication. *J. Virol.*, 63, 3852-3857, 1989.
 - 55) Chen, M., Ogino, T., and Banerjee, A.K.: Interaction of vesicular stomatitis virus P and N proteins: identification of two overlapping domains at the N terminus of P that are involved in N0-P complex formation and encapsidation of viral genome RNA. *J. Virol.*, 81, 13478-13485, 2007.
 - 56) Leyrat, C., Yabukarski, F., Tarbouriech, N., Ribeiro, E.A., Jr., Jensen, M.R., Blackledge, M., Ruigrok, R.W., and Jamin, M.: Structure of the vesicular stomatitis virus N(0)-P complex. *PLoS Pathog.*, 7, e1002248, 2011.
 - 57) Furuichi, Y. and Miura, K.: A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 253, 374-375, 1975.
 - 58) Furuichi, Y., Morgan, M., Muthukrishnan, S., and Shatkin, A.J.: Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal structure: m⁷G(5')ppp(5')GmpCp-. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 362-366, 1975.
 - 59) Wei, C.M. and Moss, B.: Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 318-322, 1975.
 - 60) Adams, J.M., and Cory, S.: Modified nucleosides and bizarre 5'-termini in mouse myeloma mRNA. *Nature*, 255, 28-33, 1975.
 - 61) Desrosiers, R.C., Friderici, K.H., and Rottman, F.M.: Characterization of Novikoff hepatoma mRNA methylation and heterogeneity in the methylated 5' terminus. *Biochemistry*, 14, 4367-4374, 1975.
 - 62) Furuichi, Y., Morgan, M., Shatkin, A.J., Jelinek, W., Salditt-Georgieff, M., and Darnell, J.E.: Methylated, blocked 5' termini in HeLa cell mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 1904-1908, 1975.
 - 63) Perry, R.P. and Kelley, D.E.: Methylated constituents of heterogeneous nuclear RNA: presence in blocked 5' terminal structures. *Cell*, 6, 13-19, 1975.
 - 64) Wei, C.M., Gershowitz, A., and Moss, B.: Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, 4, 379-386, 1975.
 - 65) Banerjee, A.K.: 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, 44, 175-205, 1980.
 - 66) Furuichi, Y. and Shatkin, A.J.: Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virus Res.*, 55, 135-184, 2000.
 - 67) Shuman, S.: Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 66, 1-40, 2001.

- 68) Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., and Shatkin, A.J.: Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m⁷GpppGmpC. *J. Biol. Chem.*, 251, 5043-5053, 1976.
- 69) Martin, S.A. and Moss, B.: Modification of RNA by mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. *J. Biol. Chem.*, 250, 9330-9335, 1975.
- 70) Ensinger, M.J., Martin, S.A., Paoletti, E., and Moss, B.: Modification of the 5'-terminus of mRNA by soluble guanylyl and methyl transferases from vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2525-2529, 1975.
- 71) Venkatesan, S., Gershowitz, A., and Moss, B.: Modification of the 5' end of mRNA. Association of RNA triphosphatase with the RNA guanylyltransferase-RNA (guanine-7-)methyltransferase complex from vaccinia virus. *J. Biol. Chem.*, 255, 903-908, 1980.
- 72) Shuman, S. and Hurwitz, J.: Mechanism of mRNA capping by vaccinia virus guanylyltransferase: characterization of an enzyme-guanylate intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78, 187-191, 1981.
- 73) Mizumoto, K. and Kaziro, Y.: Messenger RNA capping enzymes from eukaryotic cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 34, 1-28, 1987.
- 74) Shuman, S. and Lima, C.D.: The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14, 757-764, 2004.
- 75) Cougot, N., van Dijk, E., Babajko, S., and Seraphin, B.: 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem. Sci.*, 29, 436-444, 2004.
- 76) Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G.C., Fensterl, V., Klimstra, W.B., Pierson, T.C., Buller, R.M., Gale, M., Jr., Shi, P.Y., and Diamond, M.S.: 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 468, 452-456, 2010.
- 77) Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., Siddell, S.G., Ludwig, B., and Thiel, V.: Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.*, 12, 137-143, 2011.
- 78) Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., and Pichlmair, A.: Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'-O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog.*, 9, e1003663, 2013.
- 79) Kumar, P., Sweeney, T.R., Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Hellen, C.U., and Pestova, T.V.: Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 42, 3228-3245, 2014.
- 80) Haline-Vaz, T., Silva, T.C., and Zanchin, N.I.: The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372, 719-724, 2008.
- 81) Belanger, F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Pelletier, J.: Characterization of hMTr1, a human Cap1 2'-O-ribose methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 285, 33037-33044, 2010.
- 82) Hyde, J.L., Gardner, C.L., Kimura, T., White, J.P., Liu, G., Trobaugh, D.W., Huang, C., Tonelli, M., Paessler, S., Takeda, K., Klimstra, W.B., Amarasinghe, G.K., and Diamond, M.S.: A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA. *Science*, 343, 783-787, 2014.
- 83) Moyer, S.A., Abraham, G., Adler, R., and Banerjee, A.K.: Methylated and blocked 5' termini in vesicular stomatitis virus in vivo mRNAs. *Cell*, 5, 59-67, 1975.
- 84) Moyer, S.A. and Banerjee, A.K.: In vivo methylation of vesicular stomatitis virus and its host-cell messenger RNA species. *Virology*, 70, 339-351, 1976.
- 85) Rhodes, D.P. and Banerjee, A.K.: 5'-terminal sequence of vesicular stomatitis virus mRNA's synthesized in vitro. *J. Virol.*, 17, 33-42, 1976.
- 86) Lazzarini, R.A., Chien, I., Yang, F., and Keene, J.D.: The metabolic fate of independently initiated VSV mRNA transcripts. *J. Gen. Virol.*, 58, 429-441, 1982.
- 87) Pinney, D.F. and Emerson, S.U.: Identification and characterization of a group of discrete initiated oligonucleotides transcribed in vitro from the 3' terminus of the N-gene of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 42, 889-896, 1982.
- 88) Martin, S.A. and Moss, B.: mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)methyltransferase from vaccinia virions. Donor and acceptor substrate specificities. *J. Biol. Chem.*, 251, 7313-7321, 1976.
- 89) Venkatesan, S. and Moss, B.: Donor and acceptor specificities of HeLa cell mRNA guanylyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 255, 2835-2842, 1980.
- 90) Ogino, T. and Banerjee, A.K.: Formation of guanosine(5')tetraphospho(5')adenosine cap structure by an unconventional mRNA capping enzyme of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 82, 7729-7734, 2008.
- 91) Ogino, T. and Banerjee, A.K.: mRNA capping by vesicular stomatitis virus and other related viruses. In: *Negative strand RNA virus* (ed. Luo, M), pp. 79-94, World Scientific, Singapore, 2011.
- 92) Koonin, E.V. and Moss, B.: Viruses know more than one way to don a cap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 3283-3284, 2010.
- 93) Gupta, K.C. and Roy, P.: Alternate Capping Mechanisms for Transcription of Spring Viremia of Carp Virus: Evidence for Independent mRNA Initiation. *J. Virol.*, 33, 292-303, 1980.
- 94) Gopinath, M. and Shaila, M.S.: RNA triphosphatase and guanylyl transferase activities are associated with the RNA polymerase protein L of rinderpest virus. *J. Gen. Virol.*, 90, 1748-1756, 2009.
- 95) Li, J., Rahmeh, A., Morelli, M., and Whelan, S.P.: A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *J. Virol.*, 82,

- 775-784, 2008.
- 96) Rahmeh, A.A., Schenk, A.D., Danek, E.I., Kranzusch, P.J., Liang, B., Walz, T., and Whelan, S.P.: Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 20075-20080, 2010.
- 97) Duprex, W.P., Collins, F.M., and Rima, B.K.: Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame. *J. Virol.*, 76, 7322-7328, 2002.
- 98) Brown, D.D., Rima, B.K., Allen, I.V., Baron, M.D., Banyard, A.C., Barrett, T., and Duprex, W.P.: Rational attenuation of a morbillivirus by modulating the activity of the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.*, 79, 14330-14338, 2005.
- 99) Silin, D., Lyubomska, O., Ludlow, M., Duprex, W.P., and Rima, B.K.: Development of a challenge-protective vaccine concept by modification of the viral RNA-dependent RNA polymerase of canine distemper virus. *J. Virol.*, 81, 13649-13658, 2007.
- 100) Fix, J., Galloux, M., Blondot, M.L., and Eleouet, J.F.: The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *Open Virol. J.*, 5, 103-108, 2011.
- 101) Ruedas, J.B. and Perrault, J.: Insertion of enhanced green fluorescent protein in a hinge region of vesicular stomatitis virus L polymerase protein creates a temperature-sensitive virus that displays no virion-associated polymerase activity in vitro. *J. Virol.*, 83, 12241-12252, 2009.
- 102) Dochow, M., Krumm, S.A., Crowe, J.E., Jr., Moore, M.L., and Plemper, R.K.: Independent structural domains in paramyxovirus polymerase protein. *J. Biol. Chem.*, 287, 6878-6891, 2012.
- 103) Li, J., Wang, J.T., and Whelan, S.P.: A unique strategy for mRNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 8493-8498, 2006.
- 104) Ogino, T.: In vitro capping and transcription of rhabdoviruses. *Methods*, 59, 188-198, 2013.
- 105) Ogino, T.: Capping of vesicular stomatitis virus pre-mRNA is required for accurate selection of transcription stop-start sites and virus propagation. *Nucleic Acids Res.*, 42, 12112-12125, 2014.
- 106) Li, J., Rahmeh, A., Brusica, V., and Whelan, S.P.: Opposing effects of inhibiting cap addition and cap methylation on polyadenylation during vesicular stomatitis virus mRNA synthesis. *J. Virol.*, 83, 1930-1940, 2009.
- 107) Stillman, E.A. and Whitt, M.A.: Transcript initiation and 5'-end modifications are separable events during vesicular stomatitis virus transcription. *J. Virol.*, 73, 7199-7209, 1999.
- 108) Liuzzi, M., Mason, S.W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R.S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagace, L., Massariol, M.J., Do, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., and Simoneau, B.: Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.*, 79, 13105-13115, 2005.
- 109) W.H.O. Ebola Response Team: Ebola virus disease in West Africa—the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N. Engl. J. Med.*, 371, 1481-1495, 2014.
- 110) Rost, B. and Sander, C.: Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.*, 232, 584-599, 1993.

The multifunctional RNA polymerase L protein of non-segmented negative strand RNA viruses catalyzes unique mRNA capping

Tomoaki OGINO

Department of Molecular Biology and Microbiology
Case Western Reserve University School of Medicine

Non-segmented negative strand RNA viruses belonging to the *Mononegavirales* order possess RNA-dependent RNA polymerase L proteins within viral particles. The L protein is a multifunctional enzyme catalyzing viral RNA synthesis and processing (*i.e.*, mRNA capping, cap methylation, and polyadenylation). Using vesicular stomatitis virus (VSV) as a prototypic model virus, we have shown that the L protein catalyzes the unconventional mRNA capping reaction, which is strikingly different from the eukaryotic reaction. Furthermore, co-transcriptional pre-mRNA capping with the VSV L protein was found to be required for accurate stop-start transcription to synthesize full-length mRNAs *in vitro* and virus propagation in host cells. This article provides a review of historical and present studies leading to the elucidation of the molecular mechanism of VSV mRNA capping.