

2. ウイルス共進化： 偽遺伝子としての内在性 RNA ウイルスエレメント

朝長 啓造

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
ウイルス研究部門 RNA ウイルス分野

RNA ウイルスは複製過程で DNA の形態をとる必要はなく、RNA のみで複製サイクルを完結する。一方で、1970 年代以降から、RNA ウイルス感染細胞内に RNA ウイルスに由来する DNA 断片が検出されることが知られていた。さらに、21 世紀に入り、真核生物のゲノムにはレトロウイルス以外の RNA ウイルスに由来する遺伝配列が存在することも明らかとなってきた。これら RNA ウイルスに由来する DNA 配列は、転移因子であるレトロトランスポゾンを持つ逆転写機構を介して作られると考えられている。内在性 RNA ウイルス配列の多くは、真核細胞におけるプロセス型偽遺伝子と同じ機構で形成されるが、感染細胞において RNA ウイルスの“偽遺伝子”が作られる意義については明らかではない。著者らは、一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナウイルスに由来する内在性ボルナウイルス様エレメント (Endogenous bornavirus-like elements: EBLs) を発見し、哺乳動物ゲノムにおける EBLs の多様性と生理的機能について研究を行ってきた。EBLs の解析は、宿主とボルナウイルスとの攻防と共存の歴史をひも解く手段を私たちに与えてくれる。本項では、哺乳動物ゲノムに存在する内在性 RNA ウイルス配列、特に EBLs の機能についての知見を概説するとともに、生命進化における RNA ウイルス内在化の意義について考察を行いたい。

1. はじめに

2010 年、著者らはヒトゲノム内にボルナ病ウイルス (Borna disease virus; BoDV) のヌクレオプロテイン (N) 遺伝子と高い相同性を示す配列が存在することを発見した¹⁾。この配列は BoDV の N とほぼ同じ長さのオープンリーディングフレーム (ORF) をコードしており、アミノ酸レベルで 40% 以上の相同性を示した。内在性ボルナウイルス様エレメント (Endogenous bornavirus-like elements: EBLs)

と名づけられたこの配列は、その後の解析で、多くの脊椎動物ゲノムに相同配列が存在することが明らかとなった^{2,3)}。現在、ヒトゲノムには N 遺伝子に由来する EBLs (EBLNs) が 7ヶ所、エンベロープ糖タンパク質 (G) 遺伝子に由来する EBL (EBLG) が 1ヶ所で見つかっている。ヒトゲノムに見つかる EBLs は、私たちと祖先を同じにする真猿下目 (真猿類) のゲノムでオルソログが見つかる。このことは、ヒトで見つかる EBLs は真猿類の共通祖先で形成されたことを示しており、それは少なくとも 4,300 万年前までさかのぼれると推定される。同様に、ハイラックス、ゾウ、マナティー等の幅広い動物が含まれる哺乳類のクレードであるアフリカ獣上目も EBLNs のオルソログを共有しており、それらは 8,300 万年前までには形成されたと考えられる^{4,5)}。

現在、哺乳動物ゲノムで見つかる RNA ウイルス由来内在性配列 (non-retroviral endogenous viral elements; nrEVEs) は、ボルナウイルス科に加え、エボラウイルスが属するフィロウイルス科のウイルス系統の配列である。これまでに確認された nrEVEs のいくつかは、数千万年間のというきわ

連絡先

〒 606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 53

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

RNA ウイルス分野

TEL: 075-751-4034

FAX: 075-751-4000

E-mail: tomonaga.keizo.5r@kyoto-u.ac.jp

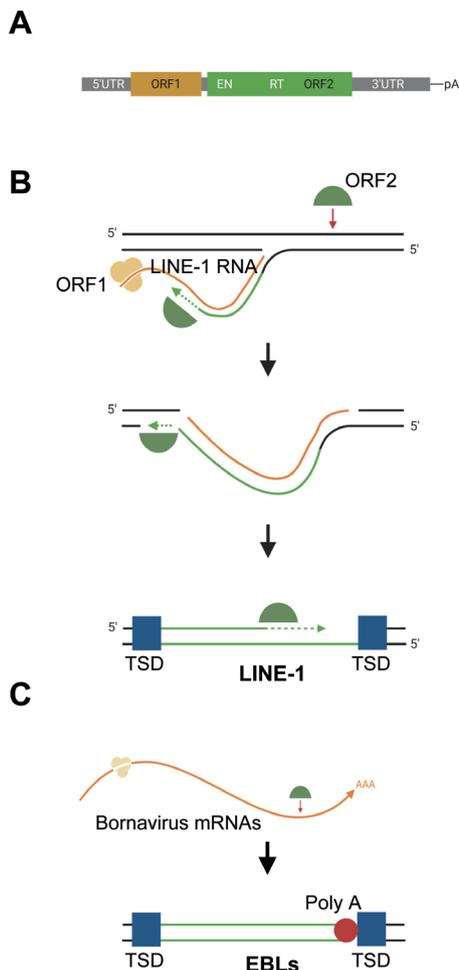


図1 LINE-1の構造と転移機序

(A) LINE-1の構造. EN: エンドヌクレアーゼ, RT: 逆転写酵素

(B) LINE-1の転移機序. TSD: Target site duplication

(C) EBLsの構造.

めて長い時間を経ても比較的長いORFを保持している^{4,6)}。また、多くの配列がユビキタスあるいは特定の臓器で転写されていることも明らかとなっている⁷⁾。自然選択を受けているnrEVEsも報告されている^{5,8)}。感染過程において偶発的に内在化したと考えられるこれらRNAウイルス遺伝子は、なぜゲノムから削除されずにその遺伝子的様相を保ってきたのか。最近の研究から、いくつかのnrEVEs由来産物には機能が付与されている可能性が示されつつあるが、それは何を意味するのか。本稿では、ボルナウイルスに由来するEBLsを中心に、nrEVEsの成り立ちとこれまでに明らかになっている生理機能を概説するとともに、ウイルス共進化におけるnrEVEs形成の意義について考察したい。

2. 内在性RNAウイルスエレメントの形成メカニズム

RNAウイルスはその複製過程でDNA中間体を介さず、RNAのみで複製サイクルを完結する。逆転写酵素を持たないRNAウイルスがどのように宿主細胞のゲノムに組み込まれるかについてはいくつかの機序が考察されている。EBLsをはじめ多くのnrEVEsの解析からもっともよく理解されているのが、転移因子であるLINE-1を介する挿入機構である。LINE-1は自律的な転移機構を持つnon-LTRレトロトランスポゾンであり、哺乳類ではゲノムに占める割合が高く、ヒトでは約17%である。しかし、それらの多くは既に転移活性を失っており、ヒトで活性を示すLINE-1はおおよそ80-100コピーと推定されている^{9,10)}。全長約6kbのLINE-1の配列内には2つのORFがある。ORF1は、転移に必要なRNA結合タンパク質であるが、

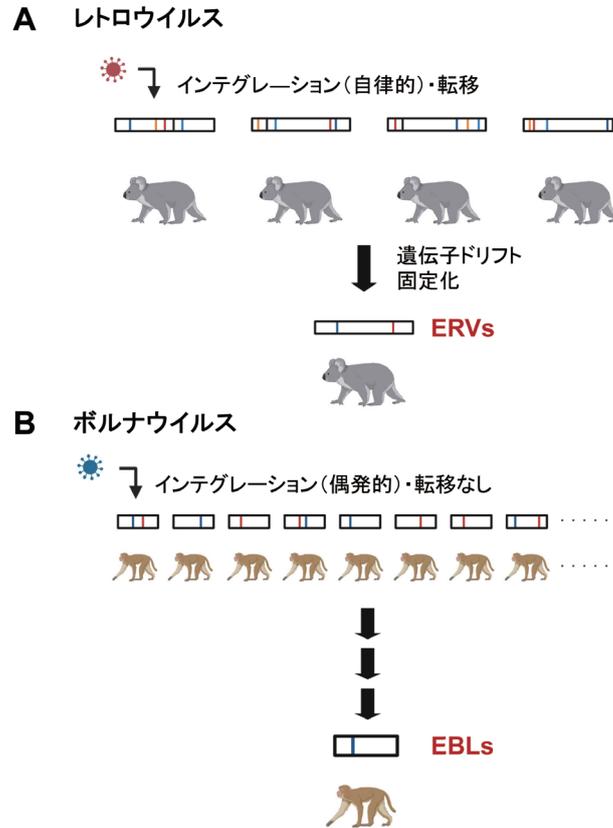


図2 ウイルスの内在化機序

(A) KoRVs ならびに (B) ボルナウイルスの内在化. インテグレーション頻度が低いボルナウイルスの内在化配列をランダムに持つ近縁種集団を作るためには, 頻回する流行が必要であり, 固定化にも時間がかかると考えられる.

その詳細は不明である. ORF2 には転移活性に必要なヌクレアーゼと逆転写酵素がコードされている (図 1A). LINE-1 RNA と ORF2 タンパク質は, 細胞質で複合体を形成した後, 核内に移行する. ヌクレアーゼによりゲノム DNA の片鎖にニックを入れ切断し, その部位の配列をプライマーに逆転写酵素により, 自らの RNA を DNA へと変換していく. 相補鎖の DNA にもニックを入れるが, 切断部位は通常, 最初の切断箇所よりも下流に位置するため, 最終的に挿入された LINE-1 の両側には標的部重複 (Target site duplication: TSD) と呼ばれる短いリピート配列ができる (図 1B)¹¹⁾. 重要なことは, LINE-1 タンパク質は自身の RNA だけではなく, 細胞由来 mRNA を標的することでプロセス型偽遺伝子の形成に関与していることである. 哺乳類ゲノムではプロセス型偽遺伝子が多く存在し, poly A 配列や TSD などその構造は転移 LINE-1 と類似した特徴を有している.

哺乳類ゲノムでの EBLs の挿入部位の配列構造を解析すると, ほぼすべての EBLs は単一のウイルス由来遺伝子をコードし, その遺伝子の下流にはアデニン塩基が続く poly

A 配列を持っている (図 1C). この特徴は, EBLs がウイルス mRNA に由来していることを示している. また, EBLs 配列の両末端には, TSD が EBLs を挟むように配置されている (図 1C). 私たちは, BoDV を実験的に感染させた哺乳類細胞ならびにマウス脳において, BoDV 由来 DNA がゲノムに挿入されていることを明らかにしている^{1,12)}. 面白いことに, 新たに組み込まれた BoDV 由来配列の構造は多くが EBLs と同様に poly A 配列と TSD を持っていた. すなわち, EBLs は, 感染細胞においてボルナウイルスの mRNA が LINE-1 タンパク質の標的となり, プロセス型偽遺伝子と同じメカニズムでゲノムに組み込まれたものであると考えられる. 真猿類で EBLs が挿入された時期 (6,000 ~ 4,300 万年前) は, LINE-1 が高度に活性化していた時期と一致しており^{3,13)}, LINE-1 による組み込み仮説を支持している.

一方, EBLs や実験的に再現された BoDV の組み込み配列においても, poly A 配列がなく TSD が不明瞭な挿入も一部に観察される. これは, LINE-1 の転移でも観察されるように, エンドヌクレアーゼ非依存的な組み込み事象を反

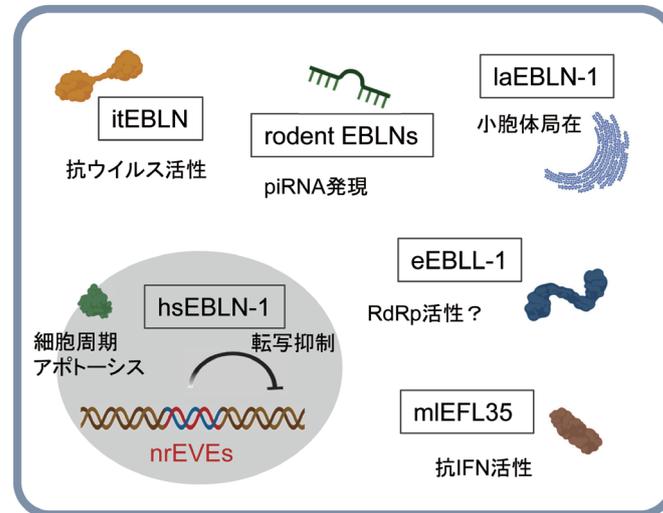


図3 予測される nrEVEs 機能

多くの nrEVEs が宿主細胞内で発現し機能を持つ可能性が示されている。

映している可能性がある。また、ジュウサンセンジリスのゲノムに内在化している EBLN (*Ictidomys tridecemlineatus* EBLN: itEBLN) は、ゲノム解析により 30 万年以前に組み込まれたと推定されている¹⁴⁾。この時期は、ジュウサンセンジリスでの LINE-1 の活性化が消失した後であることが示唆されており、itEBLN は LINE-1 以外の逆転写酵素により内在化した可能性がある。itEBLN の周辺配列には複数の LTR レトロトランスポゾンがあることも分かっている。これは、itEBLN の内在化に LTR レトロトランスポゾンが関与したことを示しているのかもしれない¹⁴⁾。

RNA ウイルスの非典型的な組み込みとして、ボルナウイルス以外の例を挙げる。アレナウイルス科に属するリンパ球性絨毛膜炎ウイルス (LCMV) のゲノム RNA は、LTR レトロトランスポゾンである IAP、あるいはレトロウイルスである HIV との共感染によって、宿主細胞染色体に組み込まれることが報告されている¹⁵⁾。また、節足動物ではあるが、ネッタイシマカでは、節足動物に感染する RNA ウイルスが LTR レトロトランスポゾンとの組換えを起こして宿主ゲノムに組み込まれることが報告されている¹⁶⁾。これらの例が示すように、nrEVEs の一部は LTR レトロトランスポゾンあるいは外来性レトロウイルスの逆転写の仕組みを介してゲノムに組み込まれた可能性がある。

3. ウイルス感染と内在化

内在性レトロウイルスを含むレトロトランスポゾンは「動く遺伝子」であり、逆転写酵素を利用した転移機構によりゲノム上でのコピー数を増やしてきた。レトロトランスポゾンの多くは、この転移機構あるいは遺伝子重複によっ

てゲノム内で半数を占めるまでになったと考えられる¹⁷⁾。しかしながら、この機構は内在性レトロウイルスの起源予測を難しくしている。外来性レトロウイルスの感染により最初に形成された祖先配列を探るためには、転移や重複によって作られた複数の相同配列を比較する必要がある。一方、RNA ウイルスに由来する nrEVEs は、プロセス型偽遺伝子と同じ非転移配列である。そのため、ゲノムに見つかる nrEVEs は基本的にそれぞれ個別の感染イベントによって挿入された配列であると推察できる。ヒトゲノムに存在するオルソボルナウイルス由来の 7 つの EBLN も、それぞれ個別の感染により形成されたと考えられる。

ここで、ウイルスゲノムが集団ゲノム内で固定化するための条件について、オーストラリアのコアラを例に考えてみたいと思う。オーストラリアのコアラでは、コアラレトロウイルス (Koala retroviruses; KoRVs) の内在化が近年になり進んでいると報告されている^{18, 19)}。血縁関係のないコアラ同士では、ゲノム内で共通してみられる KoRVs の内在化配列は数か所だけであり、個体によりその組み込み部位に多様性があることがわかっている¹⁹⁾。これは KoRVs の感染により、今まさに内在化が起こっていることを示している。また、コアラ間での組み込み部位の共通性は年代の経過とともに増加傾向にあり、最近解析されたゲノムでは、以前に採取、保存されていたゲノムよりも多くの共通組み込み部位を有している^{19, 20)}。これは、進化においてはランダムな遺伝的ドリフトにより、いくつかの内在性ウイルスは除去されるが、他の組み込み部位では固定化が起こるという予想と一致している (図 2A)。今後、オーストラリアのコアラの全個体群は、すべて内在性 KoRVs 陽性になると予想されている。しかし、最終的に

固定される KoRVs の遺伝子座の数は、内在化配列数が少ない地域と多い地域の間レベルにまで徐々に均等化されていくと考えられる。コアラの例からもわかるように、近縁種間において内在化配列が固定化されるためには、ランダムに挿入された内在化配列をもつ集団が必要である。

ゲノムへの組み込みとゲノム内での転移が特徴であるレトロウイルスでは、少ない流行で内在性ウイルスがランダムに挿入された集団を生み出すことが可能と考えられる。一方で、“偶然に”ゲノムに組み込まれ、かつゲノム内を転移できない RNA ウイルスにとってはそのような集団を生み出すのは困難である。複製のためにゲノムへの組み込みが必要なレトロウイルスに比べて、LINE-1 を介して組み込まれる RNA ウイルスが宿主ゲノムに取り込まれる効率はきわめて低い。私たちは、ヒト培養細胞において BoDV mRNA の挿入効率を確認した。その結果、ある特定の細胞においてのみ BoDV に由来する挿入配列が確認されるとともに、その細胞においてもおおよそ 0.1% 未満（検出限界以下）の感染細胞のみが挿入配列を有することが示された^{1,12)}。RNA ウイルスのゲノムへの組み込み効率は感染細胞内のレトロトランスポゾン活性と関連していると考えられる。ボルナウイルスの内在化が多く起こった時期の祖先動物における LINE-1 活性は不明であるが、レトロウイルスに比べるとボルナウイルスの組み込み効率ははるかに小さかったに違いない。すなわち、きわめて低い挿入頻度で、しかも転移活性を持っていないボルナウイルスに由来する多数の内在化配列をランダムに持つ近縁種集団を作るためには、数多くの個体である程度近い時期に複数回の内在化が起こる必要がある（図 2B）。真猿類では 4,300 万年前までに 7 つの EBLN が固定化している。このことは、私たち真猿類の共通祖先は頻回するボルナウイルスの流行を経験した可能性を強く示している。

4. nrVEEs の機能

私たちの祖先はボルナウイルスの流行を経験し、ゲノムに EBLs を固定化してきた。ゲノムに固定化された EBLs の中には、現在に至るまで子孫ウイルスとの間に高い相同性を保存した ORF を持ち、RNA へと転写されているものがある。また、進化解析により自然選択を受けていると予測される EBLs も存在する。これらの観察は、EBLs が進化の過程で何らかの機能を付与された可能性を示している。この仮説は、LTR レトロトランスポゾンや内在性レトロウイルスが機能遺伝子として宿主に外適応してきたことから支持される。一方で、ウイルス由来偽遺伝子であり、転移による増殖も起こらない RNA ウイルス由来配列が宿主に外適応する可能性はどのぐらいあるのだろうか？

これまでの研究により、いくつかの EBLs は少なくとも培養細胞において機能を有することが明らかにされている。ジュウサンセンジリスのゲノムには、比較的近年に

内在化したと考えられる itEBLN が存在する^{14,21)}。itEBLN の ORF は、BoDV の N タンパク質とアミノ酸で約 77% の相同性がある。BoDV 感染細胞に組換え itEBLN タンパク質を発現させると、BoDV の複製場である核内構造体に局在し、ウイルス RNA 量を減少させる²¹⁾。また、itEBLN タンパク質が発現する細胞は、BoDV 感染を阻害することも示されている。itEBLN タンパク質は細胞内で BoDV の複製複合体であるリポ核タンパク質複合体と相互作用することから、itEBLN タンパク質が複製のドミナントネガティブ体として機能することで感染を抑制していると考えられている²¹⁾（図 3）。

一方、ヒトの 10 番染色体に存在する EBLN (*Homo sapiens* EBLN-1; hsEBLN-1) は、ボルナウイルスの N 遺伝子とほぼ同じ長さの ORF を持ち、BoDV の N タンパク質とアミノ酸で約 41% の相同性がある。hsEBLN-1 は生体サンプルでは精巢のみで発現が認められている⁷⁾。一方、培養細胞での転写を確認することは困難である。私たちは、培養細胞にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を作用させることで hsEBLN-1 の転写が誘導され、それに伴い hsEBLN-1 の上流遺伝子である COMMD3 の発現が低下することを見出した（図 3）。さらに、COMMD3 の転写抑制状態は hsEBLN-1 に対する siRNA で消失することも明らかとなった。このことは、hsEBLN-1 の転写産物である RNA が周辺遺伝子の転写制御を行っている可能性を示している⁷⁾。hsEBLN-1 の機能に関しては、他の研究グループからも報告されている。He らは、siRNA により hsEBLN-1 RNA を抑制することで、細胞増殖が抑制と G2/M 期の停止が誘導され、アポトーシスが促進されることを示した²²⁾。また、Myers らは、hsEBLN-1 欠損細胞が DNA 損傷を蓄積し、細胞周期や微小管の異常、そして細胞分裂の際に未熟な中心体を誘導することを報告している²³⁾（図 3）。

霊長類とマウスやラットなどのげっ歯類では、EBLNs から低分子 RNA である piRNA (PIWI-interacting RNA) が発現していることが確認されている²⁴⁾。piRNA は、主に生殖系細胞でレトロトランスポゾンの分解を促進することで、転移によるゲノム損傷を防いでいる。piRNA 前駆体は、ゲノム上に形成された piRNA クラスターとよばれる領域から長い一本鎖 RNA として転写される。Parrish らは、霊長類とげっ歯類ゲノムの EBLNs が有意に高い確率で、piRNA クラスターに組み込まれていることを見出した²⁴⁾（図 3）。また、piRNA クラスターに存在する EBLNs からは、ボルナウイルス mRNA に相補的な piRNA が産生されていた。このことは、ボルナウイルスの mRNA を標的とする piRNA を発現している個体が選択され、現存種の共通祖先となった可能性を示している。ウイルス由来の piRNA を用いた感染防御は、細菌の CRISPR-Cas による抗ウイルス応答と類似している。EBLN 由来 piRNA の存在は、哺乳類にも CRISPR-Cas に類似したゲノムに刻まれた抗

ウイルスシステムが存在する可能性を示している。

アフリカ獣上目ゲノムに見つかる EBLNs は、8,300 万年以上の起源を持ち、負の自然選択が検出される ORF を保持している^{4,5)}。laEBLNs (*Loxodonta africana* EBLNs) と名付けられたアフリカゾウ由来の EBLNs は、スプライシングによって2種類のアイソタイプを発現しており、それぞれ粗面小胞体と核に局在することが示されている(図3)⁵⁾。宿主細胞での転写も確認されており、laEBLN 由来のタンパク質が細胞内で何らかの機能を付与されていることが示唆されている。

N タンパク質由来の内在化配列以外にも多くのウイルスの宿主となると考えられるコウモリ目 (*Chiroptera*) のゲノムには複数の EBLs が同定されている。なかでも特に興味深いのは、*Eptesicus* 属のゲノムに存在するボルナウイルスの L 遺伝子由来の EBLs である。1,200 万年以前に内在化したと考えられるこの eEBLL-1 (*Eptesicus*EBLL) は、1,718 個のコドンからなる大きな ORF を有しており、コウモリ組織や培養細胞において mRNA に転写されている⁸⁾。また、eEBLL-1 には負の選択圧が検出されるとともに、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 活性に必須な機能モチーフがすべて高度に保存されている。これらの観察は、eEBLL-1 が *Eptesicus* コウモリの生存に有利な RdRp をコードしている可能性を示唆している。

ボルナウイルス由来内在性配列に加え、トビイロホオヒゲコウモリで見つかったフィロウイルス様配列 (*Myotis lucifugus* endogenous filovirus VP35; mlEFL35) にも機能性が報告されている。mlEFL35p を培養細胞で一過性に発現させたところ、ウイルス由来 VP35 タンパク質と同様に IFN- β プロモーター活性を有意に阻害することが示された(図3)²⁵⁾。

上記以外にも培養細胞で機能性を示す nrEVEs は見つかっており(第66回および67回日本ウイルス学会学術集会)、nrEVEs 形成の進化的意義に関して大きな謎を投げかけている。

5. nrEVEs 形成の意義: 偽遺伝子としての進化

nrEVEs の謎を解く鍵は、哺乳類細胞にも多く存在する偽遺伝子にあると考える。ゲノム中の偽遺伝子の7割近く占めるプロセス型偽遺伝子は、nrEVEs と同様にレトロトランスポゾンにより形成される²⁶⁾。ヒトゲノムに1万配列以上あると考えられるプロセス型偽遺伝子は、これまで親遺伝子の mRNA がレトロトランスポゾンに捕捉され、偶発的にゲノムに入り込んだもので、名前の通り機能は持たない偽の遺伝子であると考えられてきた。しかしながら、最近の研究により、プロセス型を含む偽遺伝子もさまざまな機能が付与されていることが示されている。実際に、ヒトゲノムでタンパク質をコードする遺伝子のうち8.9%はイントロンを持たずプロセス型偽遺伝子と同じ構造を有し

ていることも知られている²⁷⁾。偽遺伝子はタンパク質をコードする以外にも、RNA に転写されて親遺伝子のアンチセンス RNA として機能するものや、microRNA の生成に関与するもの、そして長鎖を含む非コード RNA を発現するものが存在する²⁸⁾。また、シス配列としての機能や非対立遺伝子同士の組換えにより親遺伝子との間に組換えを起こすことも知られている²⁸⁾。これら機能を持つ偽遺伝子は免疫応答から疾患までの広い現象に関与している。例えば、ヒトの5S リボソーム RNA の偽遺伝子 141 (RNA5SP141) は、単純ヘルペスウイルス 1 型の感染時に RIG-I と結合し、I 型インターフェロンの誘導に関与していることが知られており、RNA5SP141 のサイレンシングは、エプスタインバーウイルスやインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス応答を強く減弱させる²⁹⁾。前立腺癌では、偽遺伝子 KLKPI のエクソンが隣接する KLK4 遺伝子にスプライシングされ、新規な融合タンパク質が生成されている³⁰⁾。すなわち、レトロトランスポゾンによる偽遺伝子の形成は、生物がゲノムの多様性を生み出すメカニズムの一部として存在しており、生物の適応性と新たな生物学的機能の獲得などの進化を支える重要なプロセスと考えられている^{28,31)}。すなわち、親遺伝子がウイルス由来のプロセス型偽遺伝子である nrEVEs も宿主がゲノムの多様性と適用性を生み出すために作り出した遺伝配列であると考えられることができる。内在性レトロウイルスを含むレトロトランスポゾンと同様、nrEVEs も機能性遺伝子のレパートリーとしての意義を持ち、その配列は適応性を生み出すための候補として保持されているのかもしれない。偽遺伝子としての nrEVEs 形成と進化的意義に関しては、今後、生体での機能を含めきわめて興味深い研究課題であると考えられる。

6. おわりに

私たち生物は、進化過程でウイルス遺伝子をゲノムに取り込むことで多様性を獲得してきた。nrEVEs の存在とその予測される機能性からは、宿主がレトロトランスポゾンを利用して RNA ウイルス配列も積極的に取り込んできたことを示唆している。これは、生物が適応性を増すために遺伝的レパートリーを獲得するひとつの手段であることが、偽遺伝子の解析からも予想される。RNA ウイルス遺伝子の取り込みが宿主にどのような適応変化を生み出してきたのか。内在性 RNA ウイルスの研究はウイルスと宿主の共進化を探るきわめて有効な手段であるとともに、生物のゲノム進化を考える一助にもなると考える。これからの内在性 RNA ウイルス研究の多方面へのさらなる展開に期待したい。

謝辞

本稿は、2019 年第 67 回日本ウイルス学会学術集会におけるシンポジウム「Neo-virology; the raison d'etre of

viruses」での発表をもとにその内容の一部をまとめたものである。本稿を執筆するにあたり、特集を企画して下さった雑誌「ウイルス」編集委員の先生方ならびに、シンポジウムでの発表の機会を与えてくださった新学術領域「ネオウイルス学」の領域代表・河岡義裕先生に感謝を申し上げます。

利益相反事項について

本稿に関し、開示すべき利益相反状態にある企業はありません。

参考文献

- 1) Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K. 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463:84-7.
- 2) Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM. 2010. Unexpected Inheritance: Multiple Integrations of Ancient Bornavirus and Ebolavirus / Marburgvirus Sequences in Vertebrate Genomes 6.
- 3) Horie M, Tomonaga K. 2011. Non-retroviral fossils in vertebrate genomes. *Viruses* 3:1836-1848.
- 4) Horie M, Tomonaga K. 2019. Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. *Virus Res* 262:2-9.
- 5) Kobayashi Y, Horie M, Nakano A, Murata K, Itou T, Suzuki Y. 2016. Exaptation of Bornavirus-Like Nucleoprotein Elements in Afrotherians. *PLoS Pathog* 12:1-21.
- 6) Katzourakis A, Gifford RJ. 2010. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes 6.
- 7) Sofuku K, Parrish NF, Honda T, Tomonaga K. 2015. Transcription Profiling Demonstrates Epigenetic Control of Non-retroviral RNA Virus-Derived Elements in the Human Genome. *Cell Rep* 12:1548-54.
- 8) Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Mühldorfer K, Kurth A, Müller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmler M, Tomonaga K. 2016. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep* 6:25873.
- 9) Beck CR, Collier P, Macfarlane C, Malig M, Kidd JM, Eichler EE, Badge RM, Moran J V. 2010. LINE-1 Retrotransposition Activity in Human Genomes. *Cell* 141:1159-1170.
- 10) Hacks DC, Kazazian HH. 2016. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA* 7.
- 11) Levy A, Schwartz S, Ast G. 2009. Large-scale discovery of insertion hotspots and preferential integration sites of human transposed elements. *Nucleic Acids Res* 38:1515-1530.
- 12) Horie M, Kobayashi Y, Suzuki Y, Tomonaga K, Horie M, Kobayashi Y, Suzuki Y, Tomonaga K. 2013. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes.
- 13) Ohshima K, Hattori M, Yada T, Gojobori T, Sakaki Y, Okada N. 2003. Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates. *Genome Biol* 4:1-14.
- 14) Suzuki Y, Kobayashi Y, Horie M, Tomonaga K. 2014. Origin of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein element in thirteen-lined ground squirrels. *Genes Genet Syst* 89:143-148.
- 15) Geuking MB, Weber J, Dewannieux M, Gorelik E, Heidmann T, Hengartner H, Zinkernagel RM, Hangartner L. 2009. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science* (80-) 323:393-396.
- 16) Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, Tassetto M, Seetin MG, Oh S, Heiner C, Paxinos E, Andino R. 2017. The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr Biol* 27:3511-3519.e7.
- 17) Platt RN, Vandeweghe MW, Ray DA. 2018. Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution. *Chromosom Res* 26:25-43.
- 18) Tarlinton RE, Meers J, Young PR. 2006. Retroviral invasion of the koala genome. *Nature* 442:79-81.
- 19) Greenwood AD, Ishida Y, O' Brien SP, Roca AL, Eiden M V. 2017. Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions. *Microbiol Mol Biol Rev* 82:1-41.
- 20) Legione AR, Patterson JLS, Whiteley P, Firestone SM, Curnick M, Bodley K, Lynch M, Gilkerson JR, Sansom FM, Devlin JM. 2017. Koala retrovirus genotyping analyses reveal a low prevalence of KoRV-A in Victorian koalas and an association with clinical disease. *J Med Microbiol* 66:236-244.
- 21) Fujino K, Horie M, Honda T, Merriman DK, Tomonaga K. 2014. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13175-80.
- 22) He P, Sun L, Zhu D, Zhang H, Zhang L, Guo Y, Liu S, Zhou J, Xu X, Xie P. 2016. Knock-down of endogenous bornavirus-like nucleoprotein 1 inhibits cell growth and induces apoptosis in human oligodendroglia cells. *Int J Mol Sci*.
- 23) Myers KN, Barone G, Ganesh A, Staples CJ, Howard AE, Beveridge RD, Maslen S, Skehel JM, Collis SJ. 2016. The bornavirus-derived human protein EBLN1 promotes efficient cell cycle transit, microtubule organisation and genome stability. *Sci Rep*.
- 24) Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T, Tomonaga K. 2015. piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* 21:1691-703.
- 25) Kondoh T, Manzoor R, Nao N, Maruyama J, Furuyama W, Miyamoto H, Shigeno A, Kuroda M, Matsuno K,

- Fujikura D, Kajihara M, Yoshida R, Igarashi M, Takeda A. 2017. Putative endogenous filovirus VP35-like protein potentially functions as an IFN antagonist but not a polymerase cofactor. *PLoS One* 12:1–17.
- 26) Pei B, Sisu C, Frankish A, Howald C, Habegger L, Mu XJ, Harte R, Balasubramanian S, Tanzer A, Diekhans M, Raymond A, Hubbard TJ, Harrow J, Gerstein MB. 2012. The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biol* 13.
- 27) Jorquera R, Ortiz R, Ossandon F, Cárdenas JP, Sepúlveda R, González C, Holmes DS. 2016. SinEx DB: A database for single exon coding sequences in mammalian genomes. *Database* 2016:1–8.
- 28) Cheetham SW, Faulkner GJ, Dinger ME. 2020. Overcoming challenges and dogmas to understand the functions of pseudogenes. *Nat Rev Genet* 21:191–201.
- 29) Chiang JJ, Sparrer KMJ, Van Gent M, Lässig C, Huang T, Osterrieder N, Hopfner KP, Gack MU. 2018. Viral unmasking of cellular 5S rRNA pseudogene transcripts induces RIG-I-mediated immunity article. *Nat Immunol* 19:53–62.
- 30) Lai J, Lehman ML, Dinger ME, Hendy SC, Mercer TR, Seim I, Lawrence MG, Mattick JS, Clements JA, Nelson CC. 2010. A variant of the *KLK4* gene is expressed as a cis sense-antisense chimeric transcript in prostate cancer cells. *Rna* 16:1156–1166.
- 31) Singh RK, Singh D, Yadava A, Srivastava AK. 2020. Molecular fossils “pseudogenes” as functional signature in biological system. *Genes Genomics*.

Virus-host coevolution: Endogenous RNA viral elements as pseudogenes

Keizo TOMONAGA

Laboratory of RNA viruses, Department of Virus Research, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

RNA viruses do not need to take the form of DNAs, and RNAs alone complete their replication cycles. On the other hand, since the 1970s, it has been known that DNA fragments derived from RNA viruses can be detected in RNA virus-infected cells. Furthermore, in this decade, it has become clear that the eukaryotic genomes contain genetic sequences derived from non-retroviral RNA viruses. The DNA sequences derived from these RNA viruses are thought to be generated by using a transposable mechanism of retrotransposon, such as LINE-1. Many endogenous RNA viral sequences are formed by the same mechanism as processed pseudogenes in eukaryotic cells, but the significance of the production of RNA viral "pseudogenes" in infected cells has not been elucidated. We have discovered endogenous bornavirus-like elements (EBLs), which derived from a negative-sense, single-stranded RNA virus, Bornaviruses, and have studied the evolution and function of EBLs in host animals. The analysis of EBLs provides us a clue to unravel the history of host-RNA virus coexistence. In this review, I overview about the function of endogenous RNA virus sequences, especially EBLs in mammalian genomes, and discuss the significance of endogenization of RNA viruses as viral pseudogenes in evolution.