

6. microRNA-122 による C 型肝炎ウイルスの複製制御

政木 隆博¹⁾, Stanley M. Lemon²⁾

1) 国立感染症研究所 ウイルス第二部

2) ノースカロライナ大学チャペルヒル校医学部ラインバーガー総合がんセンター

microRNA-122 (miR-122) は肝臓に高発現している小分子非翻訳 RNA で、通常は、他の miRNA と同様に Argonaute-2 (AGO2) タンパク質などとともに複合体を形成後、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (untranslated region: UTR) に結合し、翻訳を抑制あるいは mRNA 分解を促進することにより遺伝子発現を負に制御する。一方、HCV はゲノム RNA の 5' UTR に 2 カ所の miR-122 結合部位を有し、この部位への miR-122/AGO2 複合体の結合は、典型的な miRNA 機能とは異なりウイルス RNA を安定化し、その分解を阻害することが示されている。最近我々は、HCV RNA 分解に関与する主たる宿主細胞性因子として 5'-エキソヌクレアーゼである XRN1 を同定し、miR-122/AGO2 複合体は XRN1 のエキソヌクレアーゼ活性に拮抗することでウイルス RNA を安定化することを明らかにした。さらに、miR-122 には HCV RNA の安定化作用以外にも、ウイルスゲノム RNA の可用性を翻訳から RNA 合成過程に移行することでウイルス RNA 合成を直接増強する作用があることを見出した。本稿では、我々の最近の知見を交え miR-122 による HCV ゲノム複製の制御機構について解説する。

1. はじめに

現在、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者は全世界で1億7000万人、本邦で150万~200万人存在すると推定されている。感染後は持続感染により肝炎が慢性化し、肝硬変を経て高率に肝細胞癌を合併することが知られており、公衆衛生上極めて重要な病原ウイルスである¹⁾。HCVはフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、mRNAとして機能できる約9.6 kb長のプラスセンスの一本鎖RNAをゲノムとして有する。ウイルスゲノムの5'非翻訳領域 (UTR) には複雑な二次構造をとる internal ribosomal entry site (IRES) が存在し、キャップ非依存的に約3000アミノ酸からなる巨大な前駆タンパク質が翻訳される²⁾。この5'UTRにはpoly(rC)-binding protein 2

(PCBP2) や microRNA-122 (miR-122) をはじめとする多くの宿主細胞性因子が結合し、ウイルス RNA の翻訳、複製を制御している³⁻⁷⁾。特に、miR-122 は効率的な HCV 複製に必須の因子であり、HCV 感染の組織指向性への関与も指摘されている⁸⁾。また、miR-122 機能を特異的に阻害するアンチセンス核酸が強力な抗 HCV 効果を有することが示され^{9,10)}、現在、miR-122 は新たな創薬標的としても注目されている。

2. miR-122/AGO2 複合体は HCV RNA を安定化することでウイルス複製を増強する

miRNA は 22 塩基長程度の小さな非翻訳 RNA であり、標的 mRNA の 3' UTR に結合し、翻訳を抑制あるいは mRNA 分解を促進することにより遺伝子発現の転写後調節に関与する^{11,12)}。miR-122 は肝臓に高発現している miRNA で、肝臓内成熟 miRNA の約半数を占めている¹³⁾。HCV RNA とは 5' UTR の IRES 上流側の 2 カ所 (S1, S2) で結合し (図 1)、miR-122 の S1, S2 両部位への結合は HCV 複製だけでなく感染性ウイルス産生にも重要である^{14,15)}。また、HCV RNA との効率的な結合にはシード配列である 5' 側の 2-8 番目の塩基の他に補助的な 3' 側の数塩基が必要である (図 1)¹⁶⁻¹⁸⁾。他の miRNA と同様に miR-122 は Argonaute-2 (AGO2) タンパク質に取り込まれた後 HCV

連絡先

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 ウイルス第二部

TEL: 03-5285-1111

FAX: 03-5285-1161

E-mail: tmasaki@nih.go.jp

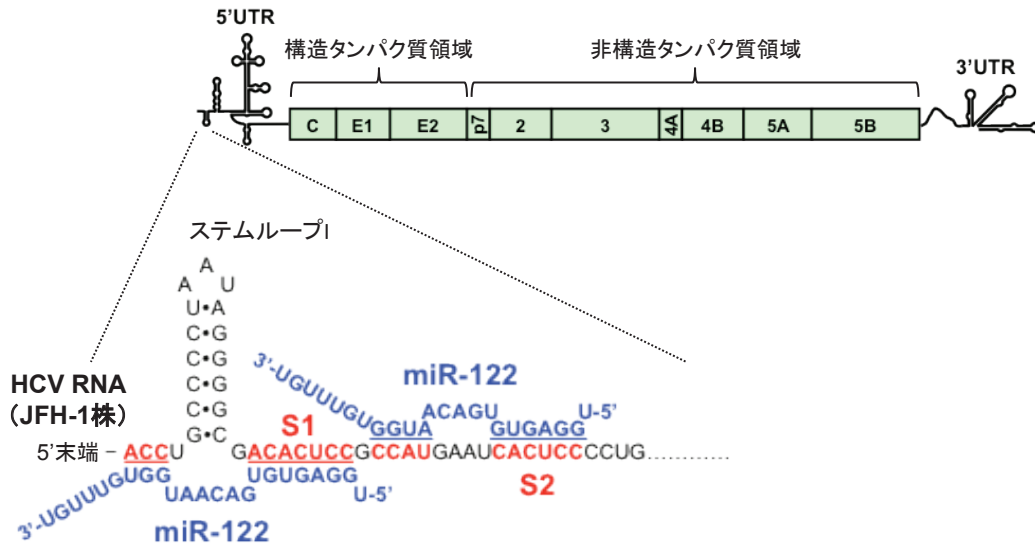


図1 HCV ゲノムと miR-122 の結合
HCV はゲノム RNA の 5' UTR に 2 カ所の miR-122 結合部位 (S1, S2) を有する。

RNA に結合するが、典型的な miRNA 機能とは異なり感染細胞内でウイルス RNA を安定化し、その分解を阻害することが示されている¹⁹⁾。この安定化作用はゲノム RNA 5' 末端のキャップ構造付加により機能的に置換されることから、miR-122/AGO2 複合体は 5' - エキソヌクレアーゼから HCV RNA を保護し、安定化することによりウイルス複製の増強作用に貢献するものと推測される¹⁹⁾。

3. miR-122 は XRN1 の 5' - エキソヌクレアーゼ活性に拮抗することで HCV RNA を安定化する

宿主 mRNA の分解経路に比べてウイルス RNA の分解に関する詳細はあまり明らかになっていない。HCV RNA はタンパク質合成の鋳型として mRNA としても機能するため、宿主 mRNA と共通の経路を利用して分解される可能性がある。一般的に、mRNA の分解は脱キャップ化酵素、脱アデニル化酵素による 5' 末端キャップ構造もしくは 3' 末端ポリ A 鎖の除去から始まり、エキソヌクレアーゼによる RNA 本体の分解へと続く²⁰⁾。5' - エキソヌクレアーゼである XRN1 と 3' - エキソヌクレアーゼであるエキソソーム複合体はこの過程に関わる代表的な分解酵素である^{21,22)}。HCV RNA は 5' 末端キャップ構造および 3' 末端ポリ A 鎖を持たないため、分解に脱キャップ化、脱アデニル化反応は必要としない。一方で、前述のエキソヌクレアーゼはウイルス RNA の分解に関与する可能性がある。

感染細胞内での HCV RNA 分解を調べるために、HCV を感染させたヒト肝癌由来細胞に NS5B ポリメラーゼに対する選択的阻害剤²³⁾を加え、ウイルス RNA の新規合成を停止させた状態での HCV RNA 量を定量的 RT-PCR 法で解析した。その結果、感染細胞内での HCV RNA の分

解速度は *in vitro* で合成後細胞内に導入された HCV RNA の分解速度よりも極めて緩やかであることが分かった (前者の半減期: 約 11 時間, 後者の半減期: 約 1.4 時間)²⁴⁾。これは、複製しているウイルス RNA を含む複製複合体は細胞内膜に由来する特殊な膜構造体によって保護されているためと考えられる^{25,26)}。合成 miR-122 の細胞への導入により HCV RNA の半減期は有意に延長した (約 18 時間)¹⁹⁾。興味深いことに、siRNA による 5' - エキソヌクレアーゼ XRN1 のノックダウンもこれと同程度に半減期を延長した。一方、エキソソーム複合体の構成因子である PM/Scf-100 のノックダウンはウイルス RNA の分解に影響を及ぼさなかった²⁴⁾。さらに、XRN1 ノックダウン細胞では合成 miR-122 導入による相加的な HCV RNA の安定化作用がみられなかったことから²⁴⁾、miR-122 には XRN1 のエキソヌクレアーゼ活性に拮抗することで HCV RNA を安定化させる作用があることが示唆された。

5' 末端からの分解が HCV RNA 分解の主たる経路であるか否かを検証するために、抽出 RNA を環状化後、HCV 特異的 RT-PCR を施行し、5' 一リン酸化末端を有する HCV RNA の検出を試みた²⁴⁾。この実験系では、完全長の HCV RNA は 5' 三リン酸化末端を有するため、T4 RNA リガーゼによる環状化にポリフォスファターゼ処理が必要となるが²⁷⁾、5' 一リン酸化末端を有する分解中間産物はポリフォスファターゼ処理を必要とせずに環状化し、RT-PCR で増幅される。増幅産物のシーケンスの結果、全ての分解中間産物は 5' 末端が短縮したものであったが 3' 末端は完全長であり、5' 末端が HCV RNA 分解の主たる標的であることが再度示された²⁴⁾。

最近、XRN1 の他にも 5' - エキソヌクレアーゼである XRN2

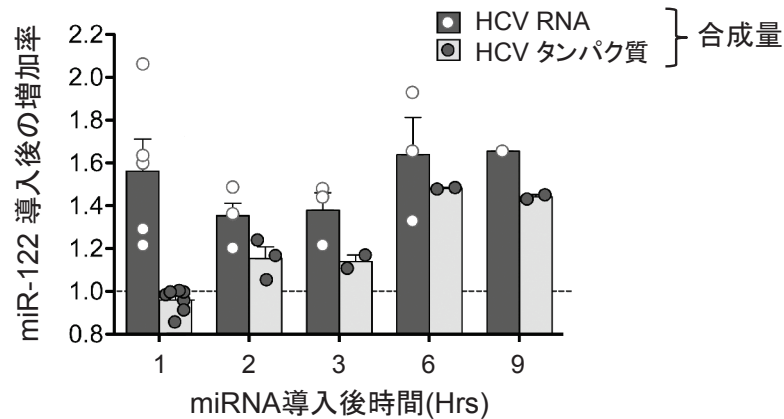


図2 miR-122 導入後の HCV RNA 合成と HCV タンパク質合成

HCV RNA 新規合成量の増加は miR-122 導入後1時間の時点で観察されたが、ウイルスタンパク質合成量の増加は2時間以降に認められた。miR-122 導入後の HCV RNA およびタンパク質の新規合成量は、それぞれコントロール miRNA (miR-124) 導入後の合成量に対する相対値で表している。(文献 34 より引用)

が HCV RNA 分解に関与するという報告がなされた²⁸⁾。XRN1 は細胞質に発現しており、主に RNA 分解の場である P-body に局在する。一方、XRN2 は主に核に局在し、RNA ポリメラーゼ II による転写の終結やリボソーム RNA、核小体低分子 RNA の成熟化に関与する^{29,30)}。siRNA による XRN2 のノックダウンは HCV RNA の半減期を延長したが、この作用は細胞培養系で複製効率の高い JFH-1 などの一部のウイルス株に限定されていた^{28,31)}。一方、XRN1 ノックダウンによる HCV RNA の安定化は複数のウイルス株で共通に観察され、かつ、その効果は XRN2 ノックダウン時よりも顕著であった^{24,31,32)}。以上の検証より、HCV RNA 分解に関与する主たる宿主因子は XRN2 ではなく XRN1 であることが示された。

4. miR-122 は HCV 複製に対してウイルス RNA の安定化作用以外にも機能を有する

XRN1 は HCV RNA 分解に関与する主要な宿主因子であり、XRN1 のノックダウンは感染細胞内のウイルス RNA を増加させ、感染性 HCV 粒子産生を増加させることが示されている^{24,32,33)}。HCV RNA の分解に対しては、XRN1 サイレンシングと miR-122 導入間に相加作用を認めなかったが、XRN1 をノックダウンした感染細胞への miR-122 導入はウイルス複製、粒子産生をともに相加的に増強した^{24,34)}。また、miR-122 の結合部位である S1, S2 に変異を導入した HCV RNA は複製できないことが示されているが^{4,15)}、もし miR-122 の機能が XRN1 のエキソヌクレアーゼ活性に拮抗することだけに限定しているのであれば、XRN1 ノックダウンによりこの変異体の複製は可能になることが想定される。しかし、XRN1 発現をほぼ完全に抑制した細胞(こ

の細胞では miR-122 による HCV RNA の安定化作用を無視できる)に変異 HCV RNA を導入しても複製はみられなかった²⁴⁾。興味深いことに、この細胞に変異ウイルス RNA と結合できる変異 miR-122 を導入すると、著明な RNA 複製が観察された²⁴⁾。以上の結果は、HCV ゲノムとの miR-122 の結合がウイルス RNA の安定化作用以外にも HCV 複製に対して促進的な作用を有することを示唆するものであり³⁵⁾、無細胞システムを用いた他の報告でも同様の結論が提示されている³⁶⁾。

5. HCV 複製過程における miR-122 の作用起点

HCV の複製は、IRES 依存的なウイルスタンパク質の合成とそれに引き続く複製複合体の形成、ウイルス RNA の合成および分解により厳密に制御されている。前述の miR-122 が HCV 複製に対してウイルス RNA の安定化作用以外にも機能を有する可能性は、miR-122 の作用起点がウイルスタンパク質の合成(翻訳)もしくはウイルス RNA の合成過程にも存在することを示唆している。miR-122 の HCV RNA 分解系以外の主たる作用起点を同定するために、siRNA で XRN1 をノックダウンした HCV 感染細胞に合成 miR-122 を導入し、ウイルス RNA とウイルスタンパク質の新規合成量を比較した(この XRN1 ノックダウン細胞では miR-122 による HCV RNA の安定化作用を無視することができる)³⁴⁾。ウイルス RNA の新規合成量は、細胞培養下で 5-ethynyl uridine を新規合成 RNA に取り込ませ、総 RNA 抽出後のクリック反応によりビオチン標識された新生 RNA 量を HCV 特異的定量 RT-PCR 法により定量することで解析した。ウイルスタンパク質の新規合成量は、³⁵S-メチオニン・システインで代謝標識した培養細

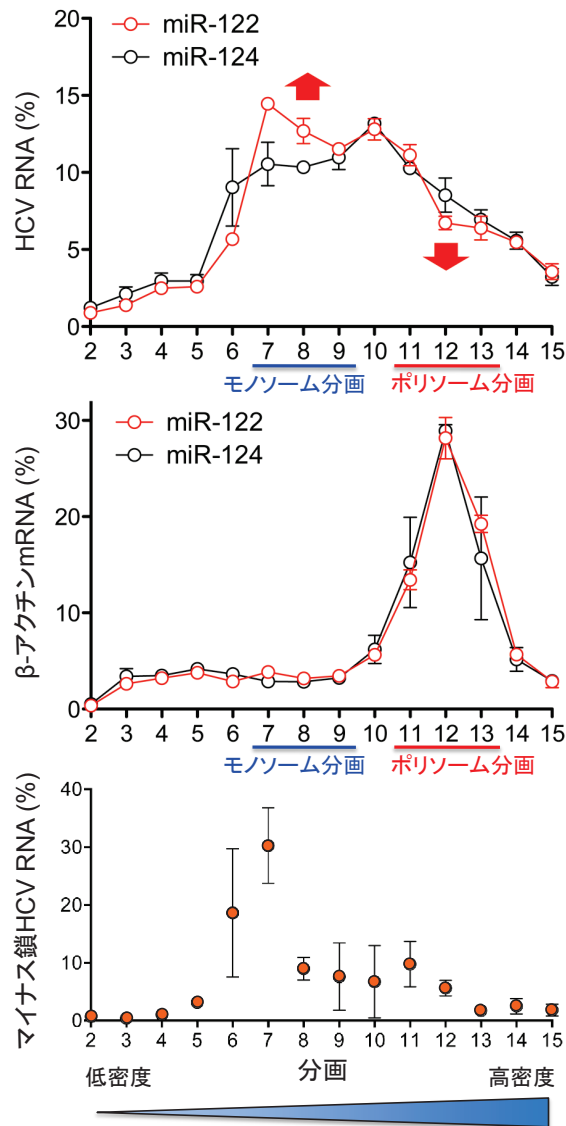


図3 HCV RNA, β -アクトリン mRNA, ポリソームの分布

miR-122 は翻訳効率の高いポリソーム分画中の HCV RNA を減少させ、翻訳効率の低いモノソーム分画中の HCV RNA を増加させた。一方、 β -アクトリン mRNA の分布は miR-122 導入後も変化しなかった。マイナス鎖 HCV RNA 量のピークはモノソーム分画に存在した。(文献 34 より引用)

胞の HCV タンパク質を免疫沈降法により回収し、SDS-PAGE で分離後、ホスフォイメジャーを用いて定量解析した³⁴⁾。解析の結果、ウイルス RNA の新規合成量は miR-122 導入後 1 時間の時点ですでに増加していたのに対して、この時点におけるウイルスタンパク質の合成量は増加していなかった(図 2)³⁴⁾。タンパク質合成量の増加は miR-122 導入後 2 時間以降で認められたが(図 2)³⁴⁾、これはウイルス RNA 合成量の増加に伴ってウイルスタンパク質合成に利用される鋳型 RNA が増加したためと考えられた。もし XRN1 ノックダウン後に miR-122 による安定化作用が残存していたとしても、複製している HCV RNA の半減期を加味すると、miR-122 導入後 1 時間における新

生 HCV RNA 量の増加は miR-122 による安定化作用では説明不可能であり、直接的なウイルス RNA 合成の刺激作用に起因するものと考えられた。以上の結果をまとめると、miR-122 導入による新生 HCV RNA 量の増加は新生タンパク質量の増加よりも早期にかつ強力に認められたことから、miR-122 による HCV 複製制御の作用起点はウイルス RNA の合成過程にあることが示唆された。

HCV IRES 依存的な翻訳過程が miR-122 機能の標的になるか否かに関しては意見が分かれている^{15,16,24,37,38)}。最近の報告によると、miR-122 導入後の HCV タンパク質発現量の増加は翻訳活性の増強に起因するものではなく、miR-122 によるウイルスメンブール安定化作用や RNA 合成増

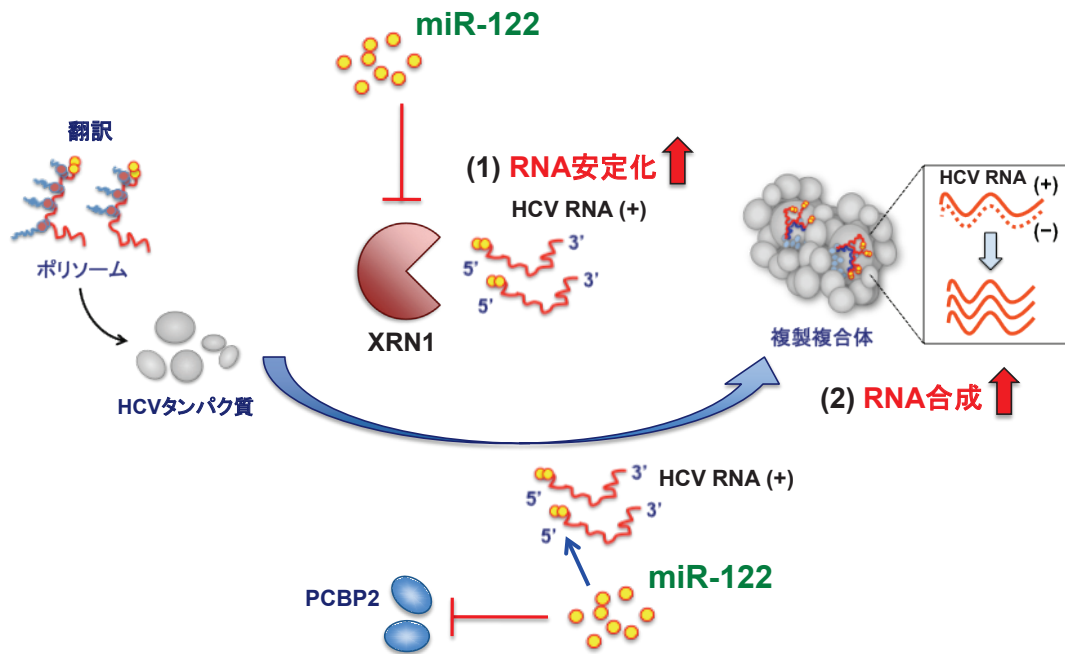


図4 miR-122 による HCV RNA 複製の制御機構

miR-122 は AGO2 に取り込まれ、HCV RNA の 5' UTR に結合後、主に以下の 2 つの作用機構で HCV 複製を増強する。

- (1) miR-122 は XRN1 の 5' - エキソヌクレアーゼ活性から HCV RNA を保護し、安定化することで HCV 複製を増強する。
- (2) miR-122 は PCBP2 を HCV ゲノムから解離し、ウイルスゲノム RNA の可用性を翻訳から RNA 合成過程に移行することで直接 HCV RNA 合成を増強する。

強作用に伴う二次的な現象と考えられている^{24,34)}。XRN1 をノックダウンした HCV 感染細胞に NS5B ポリメラーゼ選択的阻害剤を加え、ウイルス RNA 合成を停止させた状態での新生 HCV タンパク質量を解析した³⁴⁾。XRN1 ノックダウン後のため細胞内のウイルス RNA 量は miR-122 導入細胞とコントロールである miR-124 導入細胞間で有意な差を認めなかった。新生 HCV タンパク質量も両細胞間で有意な差を認めなかったことから³⁴⁾、HCV 複製サイクルにおける miR-122 の作用点はウイルスタンパク質の合成過程(翻訳)ではなく、ウイルス RNA の合成過程にあることが改めて支持された。

6. miR-122 による HCV RNA 合成の増強には新規タンパク質合成が必要である

プラス鎖 RNA ウイルスの新規感染細胞では、ウイルスゲノムの翻訳はウイルス複製複体の形成と RNA 合成の開始のために必要である。しかし、ウイルスが持続感染した細胞ではタンパク質合成を停止してもウイルス RNA の合成には影響しないことが HCV などのフラビウイルス科の一部ウイルスで報告されている^{39,40)}。これはウイルス複製複体を構成するタンパク質が細胞内に過剰量存在する、もしくは新たなウイルス RNA 合成に再利用される可能性を強く示唆するものと考えられる。タンパク質合成を

停止させた後も miR-122 による HCV RNA 合成の増強作用が認められるか否かを調べるために、XRN1 をノックダウンした HCV 感染細胞にタンパク質合成阻害剤であるピューロマイシン (PUR) とシクロヘキシミド (CHX) を処理し、miR-122 導入によるウイルス RNA 合成への影響を解析した³⁴⁾。興味深いことに、短時間 (3-5 時間) の PUR 処理は単独でウイルス RNA 合成を miR-122 導入時と同程度にまで増強した。一方、CHX 処理ではウイルス RNA 合成は保たれるものの、PUR 処理のような RNA 合成の増強作用はみられなかった³⁴⁾。この結果の相違は両阻害剤の作用機序の違いで説明できる。PUR はウイルス RNA から翻訳過程にあるリボソームの解離を促進することでタンパク質合成を阻害する。これによりフリーの鋳型ウイルス RNA が増加し RNA 合成に利用される。一方、CHX はウイルス RNA にリボソームを固着させることで翻訳を阻害する。そのためフリーの鋳型 RNA が増加せず RNA 合成の増強は起らない。この PUR による RNA 合成増強作用は既にポリオウイルスで報告されている⁴¹⁾。さらに興味深いことに、PUR および CHX 処理下では miR-122 導入によるウイルス RNA 合成の増強がみられなかった³⁴⁾。以上の結果から、ウイルス複製に必要な因子 (HCV 非構造タンパク質および宿主細胞性因子) が十分に存在していれば、タンパク質の新規合成は必ずしも HCV

RNA合成に必要なこと、一方で、miR-122によるHCV RNA合成の増強には新規タンパク質合成が必要であることが示唆された。

7. miR-122はHCV RNAの可用性を翻訳からRNA合成過程に移行させる

前述のように、HCV RNA合成に対してPUR処理とmiR-122導入間に相加作用がみられなかったことから、両者はHCVの複製制御に共通の作用機序を有する可能性が示唆された。PURはポリオウイルスRNAに結合するリボソームの解離を促進し、フリーの鋳型ウイルスRNAを増加させることによりRNA合成を増強する⁴¹⁾。すなわち、ウイルスRNAの可用性を翻訳からRNA合成に移行させる作用を有するものと考えられる。そこで、miR-122にもPURと同様の作用が認められるか否かを調べるために、miR-122を導入したHCV感染細胞の溶解液をショ糖密度勾配遠心法により分画し、HCV RNA(コントロールとして β -アクチン mRNA)とポリソームの分布を解析した(図3)³⁴⁾。miR-122はPURほどではないものの、翻訳効率の高いポリソーム分画中のHCV RNAを減少させ、翻訳効率の低いモノソーム分画中のHCV RNAを増加させた。一方、 β -アクチン mRNAの分布はmiR-122導入後も変化しなかった(図3)³⁴⁾。鎖特異的定量RT-PCR法によりHCV RNAの複製中間体で複製複合体中に存在すると考えられるマイナス鎖HCV RNAを解析したところ、マイナス鎖RNA量のピークはモノソーム分画に存在した(図3)³⁴⁾。以上より、miR-122はウイルスゲノムRNAの可用性を翻訳からRNA合成過程に移行することによりHCV複製を刺激することが示唆された。

8. miR-122によるHCV RNA合成の増強にはPCBP2が必要である

miR-122, AGOタンパク質の他に種々の宿主細胞性因子がHCVゲノムRNAの5' UTRに結合し、HCV複製を制御することが報告されている^{3,7,42)}。その中でも、PCBP2はポリオウイルスや他のプラス鎖RNAウイルスのIRES依存的翻訳を制御し、また、HCVゲノムの環状化や翻訳を促進することでも知られている^{7,43)}。最近の研究により、HCVゲノムの5' UTRにおけるPCBP2結合部位がmiR-122の結合部位と一部重複することが示された³⁴⁾。これは、miR-122がウイルスゲノムRNAの可用性を翻訳からRNA合成に移行させる過程にmiR-122とPCBP2が競合し、PCBP2をHCVゲノムから解離させる機構が関与している可能性を示唆するものである。これを証明するために、PCBP2のノックダウンがウイルスRNAとウイルスタンパク質の新規合成量に与える影響を解析した³⁴⁾。HCV感染細胞のPCBP2をノックダウンすることによりウイルスタンパク質の新規合成量は有意に低下したが、新生ウイルス

RNA量は低下しなかった。予想通り、PCBP2ノックダウン細胞ではmiR-122導入によるHCV RNA合成の増強はみられなかったことから³⁴⁾、miR-122はPCBP2をHCVゲノムから解離し、ウイルスゲノムRNAの可用性を翻訳からRNA合成過程に移行することでHCV RNA複製を増強することが示唆された(図4)。

9. おわりに

microRNA-122によるHCVゲノム複製の制御機構について総説した。HCV生活環におけるmiR-122の役割は大きい。しかし、最近では、miR-122発現量が検出感度以下の細胞でのHCV複製例やmiR-122阻害剤に耐性を示す変異ウイルスも細胞培養系で報告されており⁴⁴⁻⁴⁷⁾、miR-122非依存的なHCV複製機構の解明は今後の課題である。また、HCVに対する直接的な作用のほかに、感染細胞では大量のHCV RNAがいわゆる“スポンジ”として機能し、宿主標的遺伝子に対するmiR-122機能を障害しているという報告がある⁴⁸⁾。miR-122の機能障害は肝発癌頻度を上昇させる^{49,50)}。しかし、培養細胞で観察されたHCVによるこのスポンジ効果が、HCV RNA量が極めて少なく、miR-122がより高発現している生体肝の環境においても認められるか否かについてはさらなる検証が必要と思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご協力、ご指導を頂きました国立感染症研究所副所長兼ウイルス第二部部長脇田隆字先生、同部第三室室長加藤孝宣先生、同部教室員の皆様、ならびに、ノースカロライナ大学チャペルヒル校医学部レモン研究室の皆様がこの場をお借りして厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med* 2013;19(7):850-858.
- 2) Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 2013;19(7):837-849.
- 3) Fukushi S, Okada M, Kageyama T, Hoshino FB, Nagai K, Katayama K. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res* 2001;73(1):67-79.
- 4) Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309(5740):1577-1581.
- 5) Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 2001;7(2):194-206.
- 6) Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic

- eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998;12(1):67-83.
- 7) Wang L, Jeng KS, Lai MM. Poly(C)-binding protein 2 interacts with sequences required for viral replication in the hepatitis C virus (HCV) 5' untranslated region and directs HCV RNA replication through circularizing the viral genome. *J Virol* 2011;85(16):7954-7964.
 - 8) Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, Matsuura Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2012;86(15):7918-7933.
 - 9) Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327(5962):198-201.
 - 10) Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013;368(18):1685-1694.
 - 11) Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19(6):586-593.
 - 12) Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, Godfrey JD, Willis AE, Bushell M. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* 2013;340(6128):82-85.
 - 13) Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004;1(2):106-113.
 - 14) Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 2008;4(1):77-85.
 - 15) Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 2010;84(13):6615-6625.
 - 16) Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* 2011;39(17):7716-7729.
 - 17) Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol* 2012;86(13):7372-7383.
 - 18) Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(8):3193-3198.
 - 19) Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(3):941-946.
 - 20) Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(2):113-126.
 - 21) Jones CI, Zabolotskaya MV, Newbury SF. The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012;3(4):455-468.
 - 22) Liu Q, Greimann JC, Lima CD. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 2006;127(6):1223-1237.
 - 23) Stuyver LJ, McBrayer TR, Tharnish PM, Clark J, Hollecker L, Lostia S, Nachman T, Grier J, Bennett MA, Xie MY, Schinazi RF, Morrey JD, Julander JL, Furman PA, Otto MJ. Inhibition of hepatitis C replicon RNA synthesis by beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine: a specific inhibitor of hepatitis C virus replication. *Antivir Chem Chemother* 2006;17(2):79-87.
 - 24) Li Y, Masaki T, Yamane D, McGovern DR, Lemon SM. Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(5):1881-1886.
 - 25) Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 2003;278(50):50301-50308.
 - 26) Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77(9):5487-5492.
 - 27) Stevens A. Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5' leads to 3' mode of hydrolysis. *J Biol Chem* 1980;255(7):3080-3085.
 - 28) Sedano CD, Sarnow P. Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. *Cell Host Microbe* 2014;16(2):257-264.
 - 29) Miki TS, Grosshans H. The multifunctional RNase XRN2. *Biochem Soc Trans* 2013;41(4):825-830.
 - 30) Nagarajan VK, Jones CI, Newbury SF, Green PJ. XRN 5' → 3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta* 2013;1829(6-7):590-603.
 - 31) Li Y, Yamane D, Lemon SM. Dissecting the roles of the 5' exoribonucleases Xrn1 and Xrn2 in restricting hepatitis C virus replication. *J Virol* 2015;89(9):4857-4865.
 - 32) Jones DM, Domingues P, Targett-Adams P, McLauchlan J. Comparison of U2OS and Huh-7 cells for identifying host factors that affect hepatitis C virus RNA replication. *J Gen Virol* 2010;91(Pt 9):2238-2248.
 - 33) Ruggieri A, Dazert E, Metz P, Hofmann S, Bergeest JP,

- Mazur J, Bankhead P, Hiet MS, Kallis S, Alvisi G, Samuel CE, Lohmann V, Kaderali L, Rohr K, Frese M, Stoecklin G, Bartenschlager R. Dynamic oscillation of translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection. *Cell Host Microbe* 2012;12(1):71-85.
- 34) Masaki T, Arend KC, Li Y, Yamane D, McGivern DR, Kato T, Wakita T, Moorman NJ, Lemon SM. miR-122 Stimulates Hepatitis C Virus RNA Synthesis by Altering the Balance of Viral RNAs Engaged in Replication versus Translation. *Cell Host Microbe* 2015;17(2):217-228.
- 35) Li Y, Masaki T, Lemon SM. miR-122 and the Hepatitis C RNA genome: more than just stability. *RNA Biol* 2013;10(6):919-923.
- 36) Mortimer SA, Doudna JA. Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. *Nucleic Acids Res* 2013;41(7):4230-4240.
- 37) Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008;27(24):3300-3310.
- 38) Zhang C, Huys A, Thibault PA, Wilson JA. Requirements for human Dicer and TRBP in microRNA-122 regulation of HCV translation and RNA abundance. *Virology* 2012;433(2):479-488.
- 39) Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* 2003;77(7):4160-4168.
- 40) Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM. Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology* 1999;258(1):108-117.
- 41) Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB. Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 1999;73(12):10104-10112.
- 42) Li Y, Masaki T, Shimakami T, Lemon SM. hnRNP L and NF90 interact with hepatitis C virus 5'-terminal untranslated RNA and promote efficient replication. *J Virol* 2014;88(13):7199-7209.
- 43) Perera R, Daijogo S, Walter BL, Nguyen JH, Semler BL. Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly(rC)-binding protein. *J Virol* 2007;81(17):8919-8932.
- 44) Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, van Doorn LJ, van der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK. In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(1):599-608.
- 45) Israelow B, Mullokandov G, Agudo J, Sourisseau M, Bashir A, Maldonado AY, Dar AC, Brown BD, Evans MJ. Hepatitis C virus genetics affects miR-122 requirements and response to miR-122 inhibitors. *Nat Commun* 2014;5:5408.
- 46) Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Bukh J. MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(12):4991-4996.
- 47) Thibault PA, Huys A, Dhillon P, Wilson JA. MicroRNA-122-dependent and -independent replication of Hepatitis C Virus in Hep3B human hepatoma cells. *Virology* 2013;436(1):179-190.
- 48) Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, Fak JJ, Nishiuchi E, Takacs CN, Catanese MT, de Jong YP, Jacobson IM, Rice CM, Darnell RB. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 2015;160(6):1099-1110.
- 49) Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 2012;122(8):2871-2883.
- 50) Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, Hsu MT, Wu JC, Huang HD, Shiao MS, Hsiao M, Tsou AP. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012;122(8):2884-2897.

Regulation of hepatitis C virus genome replication by microRNA-122

Takahiro MASAKI¹⁾, Stanley M. LEMON²⁾

1) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

2) Lineberger Comprehensive Cancer Center, Departments of Medicine and Microbiology & Immunology, The University of North Carolina at Chapel Hill, NC 27517, USA

microRNA-122 (miR-122) is an abundant, liver-specific miRNA that regulates gene expression post-transcriptionally, typically by binding to the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs, repressing their translation and mediating their degradation. Hepatitis C virus (HCV) is uniquely dependent on miR-122. Similar to conventional miRNA action, miR-122 recruits Argonaute-2 (AGO2) protein to the 5' UTR of the viral genome. However, in contrast to typical miRNA function, this stabilizes HCV RNA and slows its decay in infected cells. We found that HCV RNA is degraded primarily by the cytoplasmic 5' exonuclease XRN1 and that miR-122 acts to protect the viral RNA from XRN1-mediated 5' exonucleolytic decay. However, HCV replication still requires miR-122 in XRN1-depleted cells, suggesting additional functions. We also showed that miR-122 enhances HCV RNA synthesis by reducing viral genomes engaged in translation while increasing the fraction available for RNA synthesis. In this review, we summarize the recent progress on the regulatory mechanisms of HCV genome replication by miR-122.

