

トピックス

2. 蚊の内在性ウイルス配列によるウイルス感染抑制

鈴木 康嗣

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 国際・社会連携室

はじめに

生物のゲノムは、遺伝子だけでなく、実に様々な種類の DNA 配列から構成されている。その中には、ウイルス由来の配列が存在することは、現在では広く知られている。これらの配列は、内在性ウイルス配列 (endogenous viral element, EVE) と呼ばれ、全ての生物が有しているといっても過言ではない。感染する際に、自身のウイルスゲノム RNA から逆転写した DNA を、宿主ゲノムに組み込むレトロウイルス由来の EVE は、1970 年代から、その発見がなされ、1990 年代からは、機能解明が盛んに行われてきた¹⁻⁵⁾。一方で、非レトロウイルス由来の内在性ウイルス配列 (non-retroviral EVE: nrEVE) の存在への認識は、近年の次世代シーケンス解析 (NGS) の急速な発展と普及によって、多様な生物種から様々なウイルス由来の配列が同定されるまで、“当たり前”ではなかったといえる。

本稿では、そのような nrEVE 探索が精力的に行われるようになった時期、筆者がフランス・パスツール研究所に在籍した際 (2015 年 -2020 年) に行った、蚊の内在性ウイルス配列の抗ウイルス機構の解明についての研究を紹介すると共に、残されている課題についても議論したい。また本研究では、「蚊の内在性ウイルス配列が、ウイルス複製を抑制する」という核となる仮説を実証することができたと考えているが、全てが当初の仮説通りに進んだわけではなく、予期せぬ結果により、幾度も軌道修正に迫られた。その過程は、研究を進める上で、非常に重要なものであるが、このような紆余曲折の経緯は、研究論文には載ること

はない。本寄稿には、研究成果を通して、若手ウイルス研究者の育成にもつなげたいという意味合いもあることであつたため、上記のような試行錯誤の部分もシェアすることで、若手研究者の皆様の今後に生かされるものが、僅かでもあれば幸いである。

シマカの EVE は昆虫特異的ウイルス由来である

EVE は、ウイルス感染の際に宿主ゲノムに組み込まれた全長もしくは断片的なウイルス DNA 配列であり、宿主におけるウイルス感染の歴史の痕跡であるともいえる。長い進化的時間の中で、変異の蓄積によるストップコドンの導入や転写抑制などにより、EVE の多くは、ウイルスの化石と化しているが、一部の EVE では、類似ウイルスの感染制御から宿主の胎盤形成など多岐に渡る機能を果たしていることが示されている¹⁻⁶⁾。一方で、これらの機能解明のほとんどは、哺乳類のレトロウイルス由来の EVE における知見であり、nrEVE の機能が示されたものは非常に限られている。その数少ない例の一つとして、リスのゲノムから同定されたボルナウイルスの nrEVE 由来タンパク質を人為的に細胞株に発現させることで、類似のウイルス複製を抑制するという報告がある⁷⁾。これにより、nrEVE も抗ウイルス機構として働き得ることが初めて示された。

私は、上記の先行研究に加え、博士課程の頃に從事していたレトロウイルスのゲノム組み込み過程についての研究、そして 1st ポスドクとして、米国・ペンシルベニア州立大学で行っていたマラリア原虫媒介蚊の研究経験から、蚊の EVE の存在と、その潜在的な機能の有無に興味を持つようになった。ヤブカ属シマカ亜属の蚊 (以下、シマカ) は、デングウイルス (DENV) やジカウイルス (ZIKV) など、多くのアルボウイルス (arthropod-borne virus: arbovirus) を媒介する。これらのウイルス感染に対して、シマカは、small interfering RNA (siRNA) 経路や Jak/STAT などの免疫経路といった抗ウイルス機構を備えていることが知られている⁸⁾。そこで、シマカのゲノムにもアルボウイルス由来の nrEVE が存在し、レトロウイルスやボルノウイ

連絡先

〒790-8577

愛媛県松山市文京町 3 番

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター

国際・社会連携室

TEL: 089-927-8554

E-mail: suzuki.yasutsugu.ao@ehime-u.ac.jp

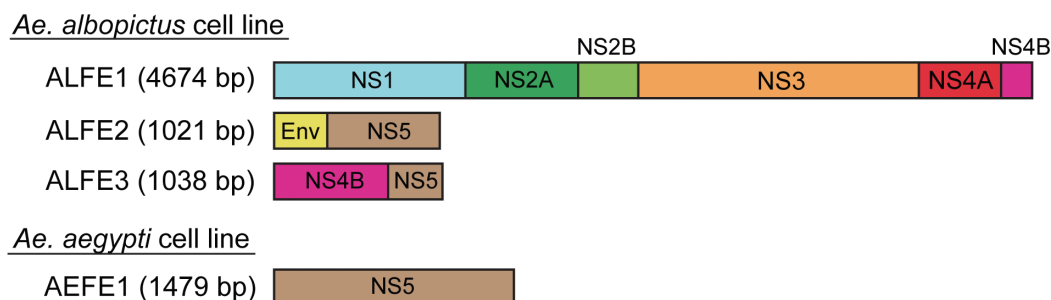


図1 ヒトスジシマカとネッタイシマカ細胞株から同定された昆虫特異的フラビウイルス様EVEの構造(文献14より改変)

ルス由来のnrEVEのようにタンパク質を発現することで、DENVなどの感染を蚊個体内で制御しているのではないかという可能性を考えた。今、振り返れば、もっと様々な可能性に思慮を巡らすべきであったと思うが、当時の私は、少なくとも上記のような仮説を立て、その実現に期待を膨らませていた。そして、この仮説の実証をするために、昆虫免疫研究の第一人者であるパスツール研究所のMaria-Carla Saleh教授の研究室に2ndポスドクとして赴いた。

研究開始当初は、シマカのEVEにおける知見が限られていたため、まず、我々は、NGS解析によって、シマカの中でも主要なアルボウイルス媒介蚊として知られるネッタイシマカとヒトスジシマカのゲノム中にDENVやZIKVなどに類似性を持つnrEVEが存在するかを検討した。しかしながら、ただの一つもこれらのアルボウイルス由来のEVEを見つけることはできなかった。この知見は、他の複数グループによっても確認されており、現在では、共通の認識となっている⁹⁻¹¹⁾。つまり、研究開始早々に仮説の一部が、否定される結果となったのである。しかし、一方で、昆虫特異的ウイルス(insect-specific virus: ISV)由来と思われるnrEVEが複数同定された。ISVは、その名の通り、昆虫にのみ感染性を示し、人をはじめとする脊椎動物には、感染しないとされているウイルスの総称である。シマカなどの媒介蚊でも、古くは1970年代、特に2000年代以降、多種多様なISVが、同定されている¹²⁾。シマカゲノムにおけるISV由来のnrEVEは、2004年に報告されており、これは昆虫で同定された初めてのnrEVEの例でもある¹³⁾。この報告では、DENVなどが属するフラビウイルスを標的としたdegenerate PCR法を用いて、ネッタイシマカから1種、ヒトスジシマカから3種のnrEVEを同定しており、細胞株における転写物の検出にも成功している。興味深いことに、同定されたnrEVEの中には、約4.5 kbpのORFを保持していたものもあった。一方で、nrEVEからのタンパク質産生や生存地域が異なるシマカ集団においても当該nrEVEが保存されているのかなどの検討は行われていなかった。我々がバイオインフォマティ

クスによって同定したISV由来のnrEVEの一部にも、上記4つと共通する配列があったため、まず、上記4種の昆虫特異的フラビウイルス由来のnrEVEに焦点を当て、その機能解明に向けた詳細な性状解析を行うこととした。

シマカEVEからのpiRNA産生

我々は、ヒトスジシマカとネッタイシマカで実験的に同定された4種の昆虫特異的フラビウイルス由来のnrEVEに便宜上、それぞれ*Aedes albopictus* flaviviral element (ALFE1, -2, -3: ヒトスジシマカ由来EVE), *Aedes aegypti* flaviviral element 1 (AEFE1: ネッタイシマカ由来EVE)と名前をつけた(図1)。これらのnrEVEは、異なるシマカ細胞株ならびにアジアとアフリカから採取したシマカのDNA試料を用いたPCRにより、検出がみられたため、蚊集団間で広く保存されていることが示された¹⁴⁾。また、4種全てのnrEVE由来の転写物もRT-PCRにより確認された。その一方で、ヒトスジシマカとネッタイシマカ細胞株を用いたプロテオーム解析では、ALFE1-3, AEFE1由来のタンパク質は確認されなかった¹⁴⁾。これは、研究開始当初に立てたnrEVEからのタンパク質産生という仮説が、また一つ否定されたことを意味しており、再び方向転換を迫られることになった。

Saleh教授の研究室では、2013年にRNAウイルスであるFlock house virusなどが感染したショウジョウバエにおいて、レトロトランスポゾンの逆転写酵素活性により、ウイルスRNAからcDNAが合成され、さらにそのcDNAを基質としたsiRNAの産生と標的ウイルスの複製阻害が起きることを報告していた¹⁵⁾。そこで、ALFE1-3とAEFE1からもsiRNAが産生されているのかを調べるために、ヒトスジシマカとネッタイシマカ個体におけるsmall RNA解析を行ったところ、siRNAではなく、PIWI-interacting RNA(piRNA)が産生されていることが明らかになった(図2)¹⁴⁾。さらに、このALFE1-3とAEFE1由来のpiRNAは、アンチセンス鎖のみ産生されていた。つまり蚊のnrEVE機能として、「piRNAを産生することで、同じ配列を有する外

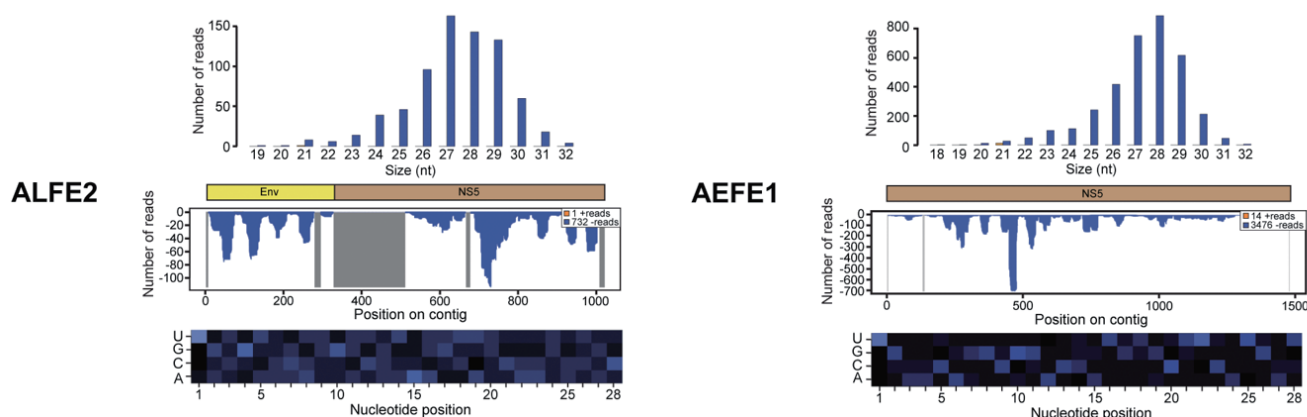


図2 ALFE2 および AEFE1 からの piRNA 産生

ALFE2 と AEFE1 配列にマッピングされた small RNA のサイズ分布 (上段), EVE 配列と産生された piRNA のリード数 (中段), piRNA 中の核酸の出現頻度 (下段). オレンジと青色はそれぞれ, ポジティブおよびネガティブ鎖由来のリードを示す (文献 14 より改変).

来のウイルス RNA を分解し, その複製を抑制する」という新たな仮説が浮上した.

新たな仮説検証のためのモデル探し

我々がシマカの新規から piRNA が産生されることを報告して間もなく, 他グループにより, ネットタイシマカとヒトスジシマカのリファレンスゲノム中から, 数百にも上る様々なウイルス由来の nrEVE が同定され, その多くが piRNA を産生していた^{9,10,16}). さらに nrEVE からの piRNA 産生は, シマカ以外にも, 哺乳類, 様々な節足動物, 貝類などにおいても報告され, 生物種を超えた普遍的な機

能を果たしている可能性が示唆された^{9,10,14,16-19}). その可能性の一つとして, 我々は nrEVE 由来 piRNA が核酸配列特異的に外来のウイルス RNA を分解し, その感染を阻害することを考えた. しかしながら, 先行研究^{9,10}) によりシマカのリファレンスゲノムから同定されていた nrEVE (ISV 由来) は, 現存するウイルスとは, 配列相同性が低く, 上記の仮説の検証ができないという問題に直面した. 一方で, 我々は, EVE 同定・検出において, リファレンスゲノムを用いた *in silico* 探索だけでなく, 様々なシマカ DNA 試料を用いた, PCR も数多く行ってきた中で, 同じ種類のシマカでも, 集団ごとに保有している nrEVE

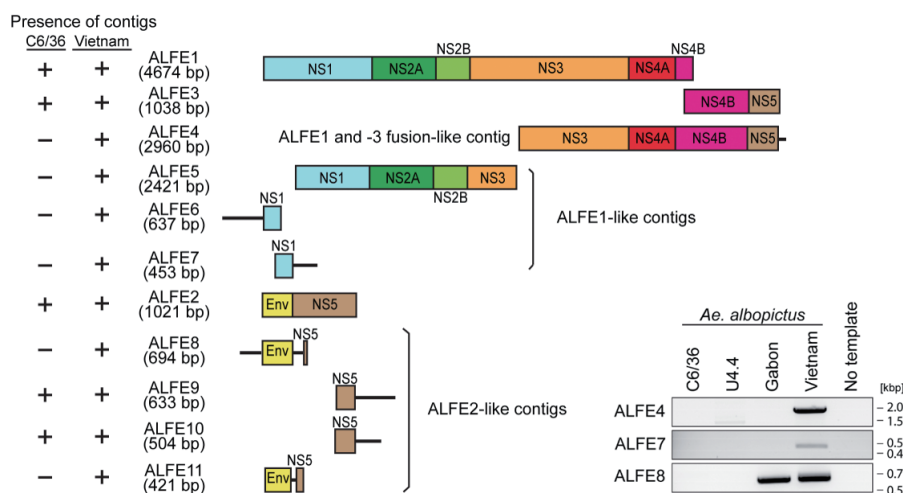


図3 新規に同定された ALFE 様 EVE 構造とヒトスジシマカ DNA 試料からの検出

ベトナム由来のヒトスジシマカから, 新たに同定された ALFE 様 EVE (ALFE4-11). 異なるヒトスジシマカ細胞株および個体 DNA 試料を用いた PCR による ALFE4, -7, -8 DNA の検出 (文献 14 より改変).

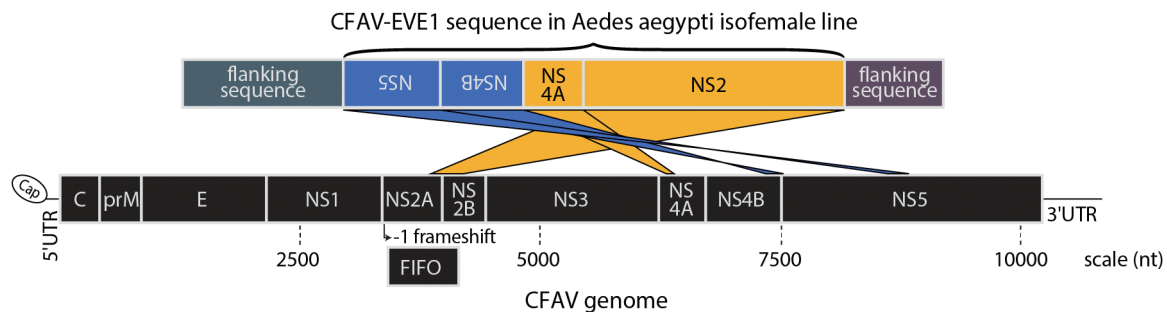


図4 ネットアイシマカから新規に同定された CFV 由来の EVE (CFV-EVE1) の構造

ネットアイシマカに広く自然感染が観察される ISV である cell-fusing agent virus (CFV) と約 96% の核酸相同性を示す新規 nrEVE (文献 21 より改変)。

の種類が異なるという知見を得ていた (図 3)¹⁴⁾。そこで、特定のシマカ集団のゲノムには、現存する ISV と同じ配列を有する EVE が存在する可能性を考え、ネットアイシマカに広く自然感染が確認されている ISV である cell-fusing agent virus (フラビウイルス属)²⁰⁾ に高い核酸相同性を持つ nrEVE の探索を行うこととした。当時の SRA (sequence read archive) に登録されていたほぼ全てのネットアイシマカの DNA および RNA シーケンスデータに対し、BLAST を用いた CFV 配列の網羅的探索を行ったところ、CFV の非構造遺伝子である NS2, NS4A, NS4B, NS5 の部分的配列が、異なる二方向で接合した構造を持つ nrEVE (以下、CFV-EVE1) を同定することができた (図 4)²¹⁾。さらに、我々が保有していたタイ由来のネットアイシマカ系統の一つにおいて、CFV-EVE1 の存在が PCR により確認された。この CFV-EVE1 の同定とそれを保有するネットアイシマカ系統により、nrEVE 由来の piRNA によるウイルス感染抑制という仮説の検証が可能となった。

CFV-EVE1 による CFV 複製の抑制

まず、CFV-EVE1 由来の piRNA が、プラス鎖一本鎖 RNA ゲノムを持つ CFV を標的とするためには、CFV ゲノムに対して、アンチセンス鎖の piRNA を発現している必要がある。これを検討するために、CFV-EVE1 保有ネットアイシマカから small RNA ライブラリを作製し、piRNA 産生を解析したところ、CFV-EVE1 の NS4A/NS2 配列部分から、CFV ゲノムに対して、アンチセンス鎖の piRNA が発現していることが確認された²¹⁾。次に CFV-EVE1 由来のアンチセンス鎖 piRNA が CFV RNA を認識・切断するのかを検討するため、CFV を胸腔内接種より感染させた成体蚊における small RNA 解析を行った。その結果、CFV-EVE1 の NS2 部分からのアンチセンス鎖 piRNA の産生に加えて、その相補鎖 (CFV の NS2) 由来のセンス鎖 piRNA の産生が観察された。さ

らに、CFV-EVE1 NS2 と CFV NS2 由来の piRNA 配列間における 10 塩基の重なりなど、piRNA 経路を介した標的 RNA の切断の際に見られる特徴²²⁾ も確認された。したがって、CFV 感染ネットアイシマカ個体において、CFV-EVE1 が piRNA を産生することで、外来の CFV RNA を切断していることが示された²¹⁾。

piRNA 経路は、元来、生殖系の細胞において、トランスポゾンの発現を抑制する機構として発見されたものである²²⁻²⁴⁾。シマカなどの媒介蚊においては、様々なアルボウイルスや ISV 感染時に、ウイルス由来の piRNA 産生は観察されていたが、その抗ウイルス機能は、明らかにはなっておらず、議論的となっていた^{10,25-29)}。よって、我々が観察した CFV-EVE1 由来の piRNA による CFV RNA の切断が、必ずしも CFV の複製に重大な影響を与えていることには、直結しない。そこで、CFV-EVE1 を CRISPR/Cas9 システムを用いて、ノックアウト (KO) したネットアイシマカ系統を作製し、CFV 複製への影響を検討した。この際には、piRNA 経路が活性化していると考えられる生殖系器官の卵巢と体細胞由来の器官として頭部を用いることとした。CFV-EVE1 KO 系統 (CFV-EVE1 (-/-)) と CFV-EVE1 を保有する姉妹系統 (CFV-EVE1 (+/+)) に、それぞれ CFV を感染させ、ウイルス RNA を定量した結果、CFV-EVE1 (-/-) 系統において、より高い CFV RNA 量が検出された (図 5)²¹⁾。また、この傾向は、特に卵巢において、顕著に見られた。さらに CFV-EVE1 (-/-) 系統では、CFV-EVE1 からの piRNA の産生と CFV RNA の切断が観察されなくなっていた。以上の結果より、CFV-EVE1 は piRNA 経路を介して、CFV RNA を分解し、その複製を抑制することが強く示唆された (図 6)。これは、nrEVE 機能をネットアイシマカ、ひいては多細胞生物個体を用いて初めて明らかにしたものである。また、蚊における piRNA 経路が抗ウイルス機構であるか否かという疑問に対しても、標的ウイルスと相補な配列を有する EVE が存在する場合には、

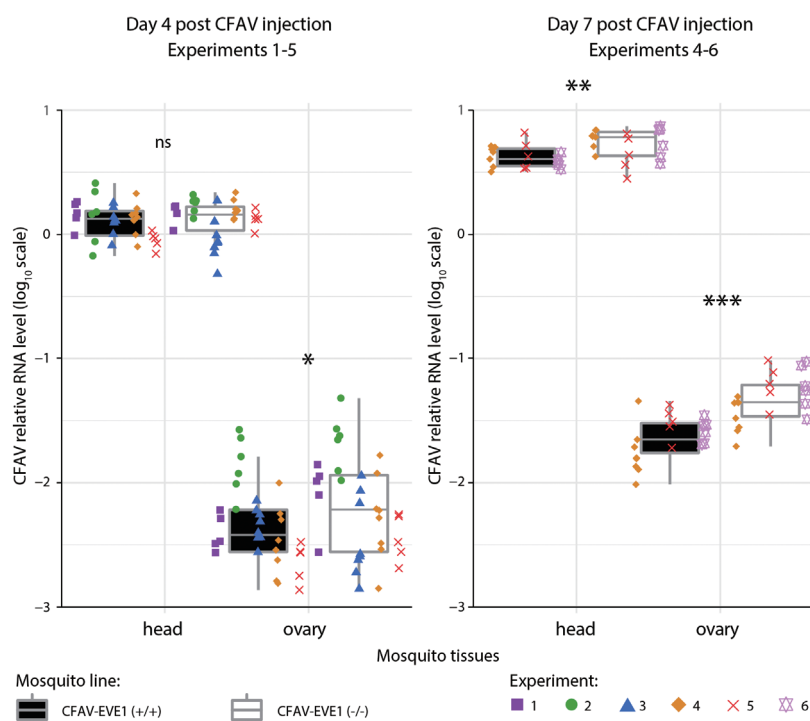


図5 CFAV-EVE1 ノックアウトにより, CFAV 感染蚊中の CFAV RNA 量が増大する

独立した6回のCFAV感染実験におけるCFAV-EVE(+/-) (黒箱ひげ図)とCFAV-EVE(-/-) ネットアイシマカ系統(白箱ひげ図)の頭部および卵巣中のCFAV RNA量(ネットアイシマカ rp49 遺伝子で補正). 各ドットは, 4-5 個体分の各器官におけるCFAV RNA量を示す(文献21より改変).

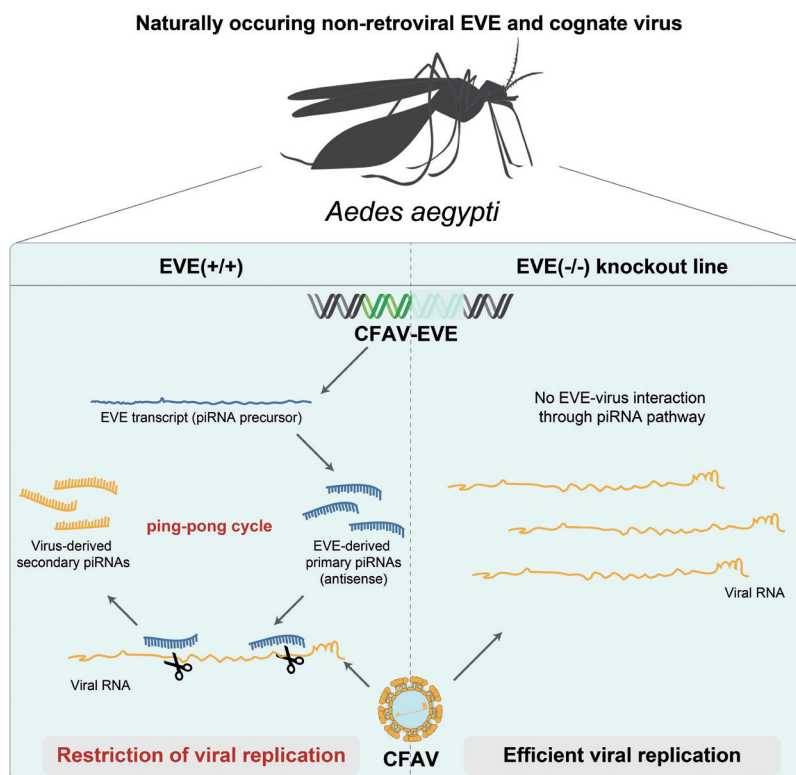


図6 ネットアイシマカの nrEVE による piRNA 経路を介したウイルス複製抑制の模式図(文献21より改変)

piRNA 経路は、抗ウイルス活性を示し得るという一つの答えを提示できたと考えている。

おわりに

近年のNGS解析とバイオインフォマティクスの台頭により、様々な生物種における多種多様なnrEVEの存在が明らかになり、それらnrEVE由来のpiRNA産生が確認されつつある。したがって、我々が今回、ネッタイシマカとISVをモデルに明らかにしたpiRNA経路を介したウイルス複製抑制というnrEVEの機能は、他の生物においても観察される可能性が十分あり、今後の研究成果が期待される。また、シマカのnrEVEを介した抗ウイルス機構について、残されている大きな疑問としては、nrEVEによるウイルス感染阻害が、病態の抑制などの観点から、宿主にどの程度の利益をもたらしているかという点である。人を含む哺乳類においては、ウイルス感染によって、病態が誘導されることが一般的に認知されているため、ウイルス複製の抑制は、ウイルス病態の抑制につながると考えられている。一方で、シマカなどの媒介蚊では、モデル昆虫のショウジョウバエなどと比較しても、ウイルス感染による急激な生存期間の減退などが観察されづらい。よって、媒介蚊をモデルにnrEVEの抗ウイルス機構の解明をさらに進める上では、ウイルス量の増減だけでなく、感染蚊の生存や行動への影響という観点からも評価することで、nrEVEが真に宿主にとって重要な役割を果たしているのかが、明らかとなってくると考えている。

蚊におけるEVE機能について、「アルボウイルス由来のEVEがタンパク質を発現し、アルボウイルス感染を抑制する」という仮説から始まった本研究は、「ISV由来のEVEがpiRNAを産生し、核酸配列特異的にISVを抑制する」という結論で一旦、幕を閉じた。この結論に至るまでの試行錯誤の中、アルボウイルスという医学的に重要性の高いトピックからは遠ざかってしまった一方で、扱うウイルス自体の社会的なインパクトの高さに関係なく、自身の研究にどのような意義を見出すことができるのかを常に考えるようになった。そして、研究が仮説通りに進まなくとも、得られた結果と深く向き合い、その都度、軌道修正を行いながら、最終的に論文としてまとめ切る力と重要性をSaleh教授の元で学ぶことができた。これは、今後、どのような研究に従事することになっても、有益な経験であると考えている。そして本稿を通して、若手ウイルス研究者の方々にその一端が伝わり、何か得られるものがあつたのであれば幸いである。

謝辞

本稿の執筆の機会を与えてくださった京都大学医生物学研究所の野田岳志先生をはじめとした編集委員会の皆様にお礼を申し上げます。また、本研究は、筆者が、パスツール研究

所のViruses and RNAi Unitに在籍した際に行ったものであり、ユニット長であるMaria-Carla Saleh教授、そのラボメンバー、そして、同研究所のInsect-Virus Interactions UnitのLouis Lambrechts博士、Artem Baidaliuk博士（現・Evolutionary Genomics of RNA Viruses Unit）、オランダ・ラドバウド大学のPascal Miesen博士をはじめとした共同研究者の皆様に深い感謝を申し上げます。

利益相反開示について

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Frank, J. A. & Feschotte, C. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. *Curr. Opin. Virol.* **25**, 81–89 (2017).
- 2) Feschotte, C. & Gilbert, C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 283–296 (2012).
- 3) Best, S., Le Tissier, P., Towers, G. & Stoye, J. P. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* vol. 382 826–829 at <https://doi.org/10.1038/382826a0> (1996).
- 4) Anderson, M. M., Lauring, A. S., Burns, C. C. & Overbaugh, J. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* **287**, 1828–1830 (2000).
- 5) Mi, S. *et al.* Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**, 785–789 (2000).
- 6) Dupressoir, A. *et al.* Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc. Natl Acad Sci U S A* **106**, 12127–12132 (2009).
- 7) Fujino, K., Horie, M., Honda, T., Merriman, D. K. & Tomonaga, K. Inhibition of Bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13175–80 (2014).
- 8) Sim, S., Jupatanakul, N. & Dimopoulos, G. Mosquito Immunity against Arboviruses. 4479–4504 (2014) doi:10.3390/v6114479.
- 9) Palatini, U. *et al.* Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics* **18**, 1–15 (2017).
- 10) Whitfield, Z. J. *et al.* The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr. Biol.* **27**, 3511–3519.e7 (2017).
- 11) Katzourakis, A. & Gifford, R. J. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* **6**, e1001191 (2010).
- 12) Bolling, B. G., Weaver, S. C., Tesh, R. B. & Vasilakis, N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses* vol. 7 at <https://doi.org/10.3390/v7010011>.

- org/10.3390/v7092851 (2015).
- 13) Crochu, S. *et al.* Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J. Gen. Virol.* **85**, 1971–80 (2004).
 - 14) Suzuki, Y. *et al.* Uncovering the Repertoire of Endogenous Flaviviral Elements in *Aedes* Mosquito Genomes. *J. Virol.* **91**, 571–588 (2017).
 - 15) Goic, B. *et al.* RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nat. Immunol.* **14**, 396–403 (2013).
 - 16) ter Horst, A. M., Nigg, J. C., Dekker, F. M. & Falk, B. W. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *J. Virol.* **93**, 2124–2142 (2019).
 - 17) Sun, Y. H. *et al.* Domestic chickens activate a piRNA defense against avian leukosis virus. *Elife* **6**, (2017).
 - 18) Parrish, N. F. *et al.* piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* **21**, 1691–703 (2015).
 - 19) Waldron, F. M., Stone, G. N. & Obbard, D. J. Metagenomic sequencing suggests a diversity of RNA interference-like responses to viruses across multicellular eukaryotes. *PLOS Genet.* **14**, e1007533 (2018).
 - 20) Baidaliuk, A. *et al.* Novel genome sequences of cell-fusing agent virus allow comparison of virus phylogeny with the genetic structure of *Aedes aegypti* populations. *Virus Evol.* **6**, (2020).
 - 21) Suzuki, Y. *et al.* Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr. Biol.* **30**, 3495–3506.e6 (2020).
 - 22) Czech, B. & Hannon, G. J. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 324–337 (2016).
 - 23) Aravin, A. A. *et al.* Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* **11**, 1017–1027 (2001).
 - 24) Aravin, A. A. *et al.* The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Dev. Cell* **5**, 337–350 (2003).
 - 25) Miesen, P., Joosten, J. & Rij, R. P. Van. PIWIs Go Viral : Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes. **2**, 1–17 (2016).
 - 26) Vodovar, N. *et al.* Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. *PLoS One* **7**, e30861 (2012).
 - 27) Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N. & Myles, K. M. Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog.* **8**, e1002470 (2012).
 - 28) Göertz, G. P. *et al.* Mosquito Small RNA Responses to West Nile and Insect-Specific Virus Infections in *Aedes* and *Culex* Mosquito Cells. *Viruses* **2019**, Vol. **11**, Page 271 **11**, 271 (2019).
 - 29) Rückert, C. *et al.* Small RNA responses of *Culex* mosquitoes and cell lines during acute and persistent virus infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **109**, 13–23 (2019).

