3. RNA ファージ

—ウイルス RNA の翻訳と複製のモデル系—

井 口 義 夫

はじめに

RNA ファージは細菌を宿主とする RNA ウイルスの総称であり、大腸菌をはじめシュドモナスやカウロバクターの RNA ファージが見つかった¹⁾。ほとんどの RNA ファージは一本鎖 (+) 鎖 RNA をゲノム (レヴィウイルス科) とするが、シュドモナスファージ $\Phi 6$ は二本鎖 RNA がゲノム (シストウイルス科) である。(-) 鎖 RNA を持つファージは見つかっていない。大腸菌 RNA ファージは1961年に発見されて以来、RNA ウイルスや蛋白質合成機構のモデル系として精力的に研究されてきた。そして遺伝子工学の導入によってさらに詳細な解析がなされるとともに、新たな分野へも発展し始めている。本稿では大腸菌 RNA ファージについてトピック的に解説する。

1. RNA ファージの形状・分類と遺伝子構成

大腸菌 RNA ファージ (以後、単に RNA ファージと記す) は、ファージ粒子の血清学的性質に基づいて4つのグループ (I~IV) に分類される。殻は180分子のコート蛋白質と1分子の A2 蛋白質からなる直径約26nm の正二十面体状構造であり、内部に1分子のゲノム RNA がある。グループ III と IV のファージではさらに数分子の A1 蛋白質が殻内に存在する。コート蛋白質表面には FG ループと呼ばれる構造が突き出ており、殻を構成するコートサブユニット同士の結合にかかわる⁵³⁾。FG ループの78番目のプロリンを他のアミノ酸で置換するとファージ粒子は高温で不安定になったり⁵¹⁾、感染性粒子ができなくなる¹⁷⁾。また、ループ部のアミノ酸配列を改変すると正常粒子の4-30倍の長さの棍状粒子ができる⁹⁾。

現在までに MS2¹²⁾・fr¹⁾ (グループ I), GA²⁵⁾・KU1 (II), Q β ³⁶⁾・MX1・M11 (III), SP²¹⁾・NL95 (IV) の9種類のファージ RNA 全一次構造が決定されている (文献の記載がないものは GenBank に登録)。基本的な遺伝子構成は、ファージが大腸菌 F 線毛に吸着する際に必要な A2 蛋白質、ウイルス粒子殻を形成するコート蛋白質、RNA 複製酵素 (RNA レプリカーゼ) β -サブユニット蛋白質の各遺伝子からなる。その他にグループ I と II のファージには溶菌蛋白質、グループ III と IV のファージには A1 蛋白質遺伝子がある。A1 蛋白質は、コート遺伝子の終結コドン UGA がサプレッションされてできるリードスルー部分を持ち、キャプシド形成に必要である。また、グループ III と IV のファージでは A2 蛋白質が溶菌機能を併せ持っている。図1に緑膿菌のファージ PP7⁴¹⁾を含めた5種類のファージ RNA 遺伝子地図を示した。

2. 遺伝子発現の制御

RNA ファージは大腸菌 F プラスミド (F 因子) がつくる F 線毛に吸着した後、ファージ RNA と A2 蛋白質の複合体が細胞内に侵入する。ただし、F 因子が細胞に導入されれば、RNA ファージは赤痢菌やサルモネラ菌にも感染できる。また、スフェロプラストにした細胞には、F 因子の有無にかかわらずファージ RNA だけで感染できる。グループ I と II のファージは F 因子に traD 変異を持つ大腸菌には感染できない。

この後、細胞内ではファージ蛋白質合成と RNA 複製が進行するが、鍵となるのはコート遺伝子の翻訳開始部位 (リボソーム結合部位と開始コドンを含む領域) へのリボソームと RNA レプリカーゼの競合的結合である。この部位にリボソームが結合すると (-) 鎖 RNA 合成は阻害され、逆に RNA レプリカーゼが結合すると翻訳が全体的に抑制される。翻訳と RNA 複製のこのような相互排除機構は翻訳因子が RNA レプリカーゼのサブユニットであるため、同様の現象はポリオウイルスでも見い出されている¹³⁾。ファージゲノムは4個の遺伝子からなるポリシストロニックなメッセンジャー RNA (mRNA) とみなすこと

帝京大学理工学部バイオサイエンス学科 (〒320-8551 宇都宮市豊郷台1丁目1番地)

RNA Phage

—A model system for translation and replication of viral RNA—

Yoshio Inokuchi

Department of Biosciences Teikyo University

1-1 Toyosatodai Utsunomiya 320-8551 Japan

図1 RNA フェージの遺伝子地図。

A2：成熟遺伝子，C：コート遺伝子，R：RNA レプリカーゼ・β-サブユニット遺伝子，L：溶菌遺伝子，A1：リードスルー遺伝子。各遺伝子に書いてある数字は開始コドンと終結コドンの位置を示す。塩基配列データは文献12, 25, 36, 22, 41から引用した。

ができるが、コート遺伝子以外は独立して発現することはなく、遺伝子発現はフェージ RNA の二次構造などによって制御されている。

2-1. RNA 二次構造による制御

a. A2 遺伝子

A2 蛋白質は最も少量しか合成されないフェージ蛋白質である。A2 遺伝子の翻訳開始部位は MS2 RNA では上流の非翻訳領域と、Qβ RNA では A2 遺伝子内部と RNA 二本鎖を形成しているのでリボソームは A2 遺伝子に結合できない。そのため、A2 蛋白質合成は RNA 複製に依存し、新生 (+) 鎖 RNA の 5' 端部が二本鎖を形成するまでの短い期間だけ A2 蛋白質が合成されると考えられている^{4, 45)}。しかし、コート遺伝子の翻訳阻害が A2 遺伝子の翻訳を促進するという見方もある⁴⁶⁾。これは、RNA レプリカーゼがコート遺伝子翻訳開始部位に結合してリボソームの結合を邪魔すると、リボソームは結合力の弱い A2 遺伝子翻訳開始部位に結合するようになるという考えで

ある。

b. コート遺伝子

コート遺伝子は独立して発現する唯一のフェージ遺伝子である。コート遺伝子の翻訳開始部位は RNA 二次構造(ヘアピン)を形成し、開始コドンはループ部に位置する。このヘアピンを壊すとコート蛋白質合成が低下し、しかも復帰変異株はすべて類似のヘアピンを再構築している⁴²⁾ことから、リボソームはヘアピン構造を認識すると考えられる。

c. RNA レプリカーゼ β-サブユニット遺伝子

原核生物の mRNA では、ある遺伝子が翻訳されるにはそれに先だって上流遺伝子の翻訳が必要とされる場合がある。このような遺伝子発現制御は翻訳共役と呼ばれ、蛋白質の合成量と合成時期を調節する機構である。MS2 RNA では β-サブユニット遺伝子の翻訳開始部位は約300塩基上流のコート遺伝子内部と二本鎖を形成するので、リボソームは β-サブユニット遺伝子に結合できない。しかし、コート遺伝子を翻訳中のリボソームがこの二本鎖構造を壊すと、β-サブユニット遺伝子は発現できるようになる。Qβ

図2 コート遺伝子と溶菌遺伝子の境界領域のRNA二次構造（ヘアピン）。

大文字 AUG と UUG は溶菌遺伝子の開始コドン，大文字 UAA はコート遺伝子の終結コドンを示す。SD はリボソーム結合配列（Shine-Dalgarno 配列）を表わす。

RNA では A1 遺伝子リードスルー部分の RNA 二次構造を介して翻訳共役が成立している。コート遺伝子と β -サブユニット遺伝子との翻訳共役はファージ増殖に必要であり，翻訳共役を解消する変異を導入すると感染性が低下するが，復帰変異株はすべて翻訳共役を回復している^{27,35)}。

d. 溶菌遺伝子

溶菌遺伝子はグループ I または II に属するファージに特有の遺伝子で，遺伝子発現は上流のコート遺伝子の翻訳終結と共役している。MS2 溶菌遺伝子の開始コドンはコート遺伝子の終結コドンから 64 塩基上流に位置し，翻訳開始部位はヘアピンのステム部に位置する（図 2）。そのために，溶菌遺伝子は独立しては発現しない。リボソームがコート遺伝子の終結コドンに達すると，このステム部が崩れてリボソームが溶菌遺伝子に結合できるようになる⁵⁶⁾。一方，GA 溶菌遺伝子の開始コドン AUG はコート遺伝子の終結コドン UAA と重複（UAAUG）している。溶菌遺伝子に

はリボソーム結合部位がなく，コート蛋白質合成を終えたりリボソームが引き続いて溶菌蛋白質合成を行なう（蛋白質合成の再開）²¹⁾。MS2 ではコート蛋白質合成に携わったリボソームの約 5%，GA では約 20% が溶菌蛋白質合成を開始すると推定される。

リボソームが蛋白質合成を再開する場合，上流遺伝子の終結コドンと下流遺伝子の開始コドンとの距離が伸びるにしたがって下流遺伝子の発現は低下する。しかし，RNA 二次構造（ヘアピン）によって両者が接近できる場合は例外である。KU1 ファージの溶菌遺伝子にはリボソーム結合部位がなく，開始コドン UUG はコート遺伝子から 17 塩基下流にある¹⁴⁾ので溶菌遺伝子の発現は極めて低いはずである。しかし，ヘアピン構造によって溶菌遺伝子はコート遺伝子に近づくので，コート蛋白質合成を終えたりリボソームが溶菌蛋白質合成を開始することができる²⁰⁾。

翻訳を終えたりリボソームが mRNA から離れるには，リ

図3 コート蛋白質結合部位のRNA二次構造(ヘアピン).
大文字 AUG はβ-サブユニット遺伝子の開始コドンを示す. SD はリボソーム結合配列 (Shine-Dalgarno 配列) を表わす.

リボソームリサイクリング因子 (RRF) が必要である. RRF は大腸菌の増殖に必須であり, 古細菌以外のすべての細菌やマイコプラズマ, ミトコンドリア, 葉緑体に存在する. RRF は形や大きさが転移 RNA (tRNA) に似ており, 解離因子 (RF) が取れた後のリボソーム A-部位に tRNA のように入り込んでリボソームを mRNA から離す. しかしながら翻訳終結後のリボソームの挙動は終結位置周辺の RNA 構造に影響され, 終結コドンと開始コドンが重複している GA コート/溶菌遺伝子接続部では RRF の脱離機能は働かない. さらに, 蛋白質合成が正常な位置から再開するにも RRF が必要で, RRF が失活すると溶菌遺伝子開始コドンからの正常な翻訳が起きない²¹⁾.

2-2. リプレッサーとしてのコート蛋白質

ファージ RNA が細胞に侵入した時点では, β-サブユニット遺伝子の翻訳開始部位は前述のように RNA 二本鎖構造のために閉ざされた状態にある. コート蛋白質合成の進行にともなって二本鎖構造が壊れて一本鎖状態になるが, 同時にこの部分は局所的なヘアピンを形成する (図3). ファージ感染後期ではこのヘアピンにコート蛋白質が結合してリボソームの結合を妨げ, β-サブユニット蛋白質合成を阻害する.

コート蛋白質の X 線結晶解析によれば, MS2 と GA では RNA 結合領域の 3 ヶ所でアミノ酸が違う. これらの違いはループ部の -5 位置の塩基 (MS2: U₋₅, GA: A₋₅) の認識に関係がある⁴⁰⁾. これらのアミノ酸は RNA 結合の特异性を決めており, Qβ RNA に結合するようになった MS2

コート蛋白質では 2 ヶ所でアミノ酸が変化している⁵⁰⁾. 一方, MS2 RNA のループ部に存在する A₋₄ と A₋₁₀ はコート蛋白質との結合に不可欠^{44, 58)}で, A₋₄ は 45 番目のトレオニンと水素結合する⁵⁵⁾.

3. RNA 複製

1965 年に *in vitro* RNA 複製系が確立されて以来, Qβ RNA 複製はウイルス RNA 複製研究のモデルとして生化学的および遺伝学的解析が活発に行なわれてきた. Qβ RNA レプリカーゼの特徴は鋳型特異性と, プライマーを要求しないことである.

3-1. Qβ RNA レプリカーゼ・サブユニットの機能

Qβ RNA レプリカーゼは 5 種類のサブユニット蛋白質から構成されるが, ファージ蛋白質は β-サブユニットだけである. 他はリボソーム蛋白質 S1, 蛋白質合成伸長因子 EF-Tu および EF-Ts, 宿主因子 HF-I である. この中で, サブユニット S1 と HF-I は Qβ RNA ((+) 鎖) から (-) 鎖を転写する時に必要である. ポリオウイルスや水疱性口内炎ウイルスでは, 翻訳因子 EF-1 がウイルス RNA ポリメラーゼを構成している.

Qβ RNA レプリカーゼは Qβ RNA に 3 ヶ所で結合する. β-サブユニット遺伝子内部の M-部位とコート遺伝子の翻訳開始部位を含む S-部位, それと RNA 3' 末端部である. サブユニット S1 は M-および S-部位との結合に必要であり, 特に M-部位との結合は複製に不可欠である³⁷⁾. β-サブユニットは RNA 依存 RNA ポリメラーゼに特有な YGDD モチーフ配列を有し, RNA 鎖伸長反応を行なう^{20, 24)}. また, C 端部は鋳型 RNA の認識に関与している²³⁾. EF-Tu はマイナス鎖と結合する⁷⁾が, EF-Tu および EF-Ts の詳しい機能はわかっていない. HF-I は Qβ RNA 3' 末端部に結合して同末端を β-サブユニットの活性部位に近づけるとされているが, 3' 末端部の特異的な塩基配列を識別しているのではないらしい³⁷⁾. 一方, (-) 鎖からの転写には S1 も HF-I も必要でなく, RNA レプリカーゼは (-) 鎖 RNA の 3' および 5' 末端部に結合する.

HF-I は大腸菌の増殖に必須の蛋白質ではない. HF-I 欠損菌で生き延びた Qβ ファージの RNA 3' 末端構造を解析したところ, 野生株では 3' 末端の -CCCA_{OH} が上流域と RNA 二本鎖を形成して閉じているのにたいして, 3' 末端が開いているものがあつた⁴⁸⁾. これは, HF-I が Qβ RNA 3' 末端を開く働きをすることを示唆している. MS2 や GA ファージは HF-I 欠損菌に感染するが SP ファージは感染しないので, HF-I は SP RNA 複製にも必要である^{28, 52)}.

3-2. Qβ RNA の特徴と鋳型活性

Qβ RNA 複製の中間体は, 二本鎖 RNA 状態の RF (replicative form) ではなくて, 転写された多数の RNA が鋳型

図4 Qβ RNA の機能模式図。

□はA2, コート(C), β-サブユニット(R)各遺伝子の翻訳開始部位を表す。矢印は翻訳の方向で, 白はリボソーム結合部位が開いた状態, 黒は閉じた状態を示す。Qβ RNA レプリカーゼが結合するM-部位およびS-部位, 3'末端領域を棒線で示した。破線はシュードノット形成を表す。本文に出てくる機能部位を誇張して書いてある。

RNA から髭のように出ている状態の RI (replicative intermediate) であると考えられている。その原因は, RNA が二次構造を形成しやすく, 転写されるとすぐ鋳型 RNA から離れるためであろう。

M-部位には2個のヘアピンとそれに続くバルジ (bulge) ループを含む58塩基の領域がある。このヘアピン・ステム部の塩基配列を変えても鋳型活性は変わらないが, 片方のヘアピンあるいはバルジを除くと鋳型活性は低下する⁴⁷⁾。したがって, サブユニット S1 は M-部位の RNA 二次構造を認識すると考えられる。

Qβ RNA レプリカーゼが結合する M-部位は, RNA 合成が開始する 3' 末端から1500塩基離れている。RNA 3' 末端が RNA レプリカーゼの活性中心に近づくのは, HF-I の作用よりも Qβ RNA の構造的特徴によるらしい。Qβ RNA 3' 末端部には4個のヘアピンからなるクローバーリーフ構造が存在するが, 3' 末端に最も近いヘアピンのループ部が1200塩基上流の部位とシュードノット (pseudoknot) を形成することによって, RNA 3' 末端は M-部位に接近できるようになる (図4)²⁹⁾。

3-3. Qβ RNA レプリカーゼの鋳型特異性

Qβ RNA レプリカーゼには鋳型特異性がある。ところが, 反応系に Mn イオンを加えると, Qβ RNA レプリカーゼは *in vitro* で種々の RNA を転写できるようになる⁶⁾。しかし反応は転写段階で終了し, 複製には進まない。例外は反応中に新たに生じる短い一本鎖 RNA で, 鋳型活性が非常に高い^{6, 56)}。一方, Qβ 感染菌からも短鎖 (6S) RNA 種が見つかった。しかし, それら 6S RNA は感染菌中に微量しか存在せず, 大部分は23S rRNA や10Sa RNA 由来であって, しかも *in vitro* での鋳型活性は低い³⁾。したがって, 6S

RNA には, DI ゲノムのように, 細胞内での Qβ RNA 複製を干渉する作用はない。

Qβ 以外の MS2, GA および SP RNA レプリカーゼについても精製が試みられたが, RNA 複製系を確立するに至っていない。ただし, 共通の特徴として S1, EF-Tu および EF-Ts をサブユニットに持っている。 *in vivo* の相補性試験では, MS2 RNA レプリカーゼは GA RNA を, SP RNA レプリカーゼは Qβ RNA を複製するがその逆は観察されない^{11, 19)}。Qβ RNA レプリカーゼは *in vitro* で SP RNA を転写するので, SP (-) 鎖 RNA には Qβ RNA レプリカーゼに対する鋳型活性がないのであろう。

3-4. 細胞にとっての HF-I 機能

最近, HF-I の機能が少しずつわかってきたので紹介する。HF-I は hfq 遺伝子²⁹⁾の産物で分子量12,000, 大部分はリボソームに結合している³⁰⁾。HF-I の欠損によって細胞には多様な影響が現われる⁵⁴⁾が, 最初に明らかになった機能は RNA ポリメラーゼのシグマ (S) サブユニット遺伝子 (rpoS) の翻訳因子としてである³⁸⁾。HF-I は DsrA (85塩基の非翻訳 RNA で, rpoS や H-NS 遺伝子の翻訳を制御している) のコファクターとして作用し, rpoS mRNA のリボソーム結合部位付近の RNA 高次構造を変えるらしい^{8, 49)}。さらに, HF-I の欠損によって多数の遺伝子の蛋白質合成が影響を受けるが, それらの遺伝子の約40%は rpoS 変異による影響を受けないことから, HF-I は RNA シャペロンとして広範囲の遺伝子の発現に関与していると思われる³⁹⁾。また, HF-I はポリ (A) ポリメラーゼ I によるポリ (A) 鎖の伸長を促進するが, これは HF-I の性質 (A-rich な領域に結合する) と一致する¹⁵⁾。

4. RNA 構造の可塑性と適応

ウイルス RNA の二次構造や高次構造は翻訳や複製, キャプシド形成といったウイルスの増殖過程に重要な役割をはたす。それと同時に, RNA ウイルスは適応性に非常に富んでおり, ゲノムに生じた重大な傷害からも回復する力を持っている。

ファージ感染後期になると, コート蛋白質は β-サブユニット遺伝子の翻訳開始領域にあるヘアピンに結合し, β-サブユニット蛋白質合成を抑制したり, キャプシド形成を始める。ところが, このヘアピンを欠失したり, あるいはヘアピンがコート蛋白質を結合しないファージ変異株が見つかったことから, コート蛋白質による β-サブユニット蛋白質合成抑制はファージ増殖に必須ではないことがわかる^{34, 43)}。また, キャプシド形成が別の部位からも始まり得ることが示唆される。一方, ヘアピンが欠失すると溶菌蛋白質にも欠失が生じるが, この部分が欠けても溶菌機能に影響は与えない。

RNA ファージは RNA 分解酵素からどのようにして身

を護っているのだろうか。RNaseⅢはリボソームRNA (rRNA)のプロセッシングに必要な酵素であり、完全二本鎖RNAを切断する。そこで、17塩基対のヘアピン構造を非翻訳部位に持つMS2 RNAを作製してRNaseⅢ生産菌に感染させたところ、ほとんどのファージは増殖しなかった。生き延びたファージを調べたところ、上記ヘアピンのステム部を欠失したものの他に、ステム部にミスマッチあるいはバルジループを持つものが見つかった³²⁾。MS2 RNA全体を見渡しても10塩基対以上の完全二本鎖RNA部分は少ないので、MS2は実際にもこのようにしてRNaseⅢの攻撃から身を護ってきたのかも知れない。

5. ファージ遺伝子工学

RNA ファージは遺伝学的・生化学的解析が進んでいること、そして取り扱いが容易なことからウイルス遺伝子工学の研究にも利用されている。

5-1. 組換えワクチン

MS2コート蛋白質のN末端に見られるβ-ヘアピン・ループにペプチドを挿入すると、組換え型コート蛋白質は自己集合して免疫原性を持つキャプシド様殻を形成する。このループ部に熱帯熱マラリア原虫のT1エпитープを提示する殻をマウスに注射すると、インターフェロンγが増加する¹⁶⁾。また、リードスルー部分に外来性蛋白質を導入したQβ A1蛋白質は、通常のコート蛋白質と混じってモザイク殻を形成する³³⁾。そして、B型肝炎ウイルス表面抗原のpreS1エピトープをA1蛋白質に持つモザイク殻は免疫原性を示す⁵⁷⁾。これらの結果は、抗原性がペプチドの翻訳後修飾を必要としないならば、ファージ殻をエピトープ提示型ワクチンに利用できることを示唆している。

5-2. 環境汚染の指標

胃腸炎を起こすウイルスによる水質汚染は、保健衛生上ばかりでなくビジネスにとっても重大な問題である。Qβファージは、LB培地 (Luria-Bertani 培地) を1%に薄めた栄養分の乏しい環境では増殖しない⁵⁹⁾。また、MS2ファージ粒子は高温で徐々に失活するが、有機物存在下で低温に戻すと再活性化される²⁾。つまり、RNA ファージの増殖には汚れた環境が必要である。この点に着目して、腸内ウイルスによる下水やカキ (牡蠣) の汚染の指標にRNA ファージが利用されている。後者では、カキ肉中に検出されるRNA ファージ量が採取場所の糞尿汚染やカキ食に起因した胃腸炎の流行と関連しており、またノーウオーク様ウイルス (NLV) によるカキ肉の汚染とも一致することが報告されている¹⁰⁾。また、ブラックハイブリダイゼーションによってRNA ファージを迅速かつ正確に検出できることも、その利用価値を高めている一因である⁵⁾。

5-3. 抗ウイルス剤開発のモデル系

RNA ファージは一本鎖プラス鎖RNAをゲノムに持つ点で、mRNAあるいは一本鎖RNAを標的とした遺伝子発現制御法によるウイルス増殖抑制のモデルとなる。RNA ファージはこの分野で先駆的役割を果たしている。現在までに、アンチセンスRNAによるウイルス増殖抑制が最初に報告されたり¹⁸⁾、リボザイムによるウイルス増殖抑制効果が確かめられている²⁶⁾。また、YGDDモチーフ配列を改変したQβ RNA レプリカーゼのドミナントネガティブ効果によって、改変レプリカーゼ発現細胞がウイルス感染に抵抗性 (免疫) を示す現象が見つかっている²⁰⁾。

おわりに

筆者が以前に在職した慶応義塾大学医学部では、渡辺格教授 (当時) を中心に10年以上にわたって世界各地から大腸菌 RNA ファージを収集した。それらは分類・整理され、渡辺コレクションとして各国の研究者に利用されている。現在、性状が明らかにされている RNA ファージはそのコレクションのごく一部である。関心のある方は筆者までご連絡下さい。

謝 辞

執筆の機会を与えて下さいました京都大学ウイルス研究所の下遠野邦忠教授にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Adhin M, R., Avots, A., Berzin, V., Overbeek, G., P., and van Duin, J. (1990). Complete nucleotide sequence of the group I RNA bacteriophage fr. *Biochem. Biophys. Acta.* **1050**, 104-109.
- 2) Alvarez, M. E., Aguilar, M., Fountain, A., Gonzalez, N., Rascon, O., and Saenz, D. (2000). Inactivation of MS-2 phage and poliovirus in groundwater. *Can. J. Microbiol.* **46**, 159-65.
- 3) Avota, E., Berzins, V., Grens, E., Vishnevsky, Y., Luce, R., and Biebricher, C. K. (1998). The natural 6 S RNA found in Qβ-infected cells is derived from host and phage RNA. *J. Mol. Biol.* **276**, 7-17.
- 4) Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Poot, R., and van Duin, J. (1996). Secondary structure model for the first three domains of Qβ RNA. Control of A-protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **256**, 8-19.
- 5) Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A. H., and van Duin, J. (1996). An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 179-86.
- 6) Blumenthal, T., and Carmichael G. G. (1979). RNA replication: function and structure of Qβ replicase. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 525-548.
- 7) Brown, D., and Gold, L. (1996). RNA replication by Qβ replicase: a working model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA **93**, 11558–11562.
- 8) Brown, L., and Elliott, T. (1997). Mutations that increase expression of the *rpoS* gene and decrease its dependence on *hfq* function in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **179**, 656–662.
 - 9) Cielens, I., Ose, V., Petrovskis, I., Strelnikova, A., Renhofa, R., Kozlovskaya, T., and Pumpens, P. (2000). Mutation of RNA phage Q β virus-like particles: from icosahedrons to rods. *FEBS Lett.* **482**, 261–264.
 - 10) Dore, W. J., Henshilwood, K., and Lees, D. N. (2000). Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1280–1285.
 - 11) Fiers, W. (1979). Structure and function of RNA bacteriophages. *Comprehensive Virology* **13**, 69–204.
 - 12) Fiers, W., Contrera, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merreguett, J., Min-Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Vandenberghe, A., Volekaert, G., Ysebaert, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2-RNA; Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* **260**, 500–507.
 - 13) Gamarnik, A. V., and Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**, 2293–2304.
 - 14) Groeneveld, H., Oudot, F., and van Duin, J. (1996). RNA phage KU1 has an insertion of 18 nucleotides in the start codon of its lysis gene. *Virology* **218**, 141–147.
 - 15) Hajnsdorf, E., and Pagnier, P. (2000). Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly (A) tails by poly (A) polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1501–1505.
 - 16) Heal, K. G., Hill, H. R., Stockley, P. G., Hollingdale, M. R., and Taylor-Robinson, A. W. (1999). Expression and immunogenicity of a liver stage malaria epitope presented as a foreign peptide on the surface of RNA-free MS2 bacteriophage capsids. *Vaccine* **18**, 251–258.
 - 17) Hill, H. R., Stonehouse, N. J., Fonseca, S. A., and Stockley, P. G. (1997). Analysis of phage MS2 coat protein mutants expressed from a reconstituted phagemid reveals that proline 78 is essential for viral infectivity. *J. Mol. Biol.* **266**, 1–7.
 - 18) Hirashima, A., Sawaki, S., Inokuchi, Y., and Inouye, M. (1986). Engineering of the mRNA-interfering complementary RNA immune system against viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7726–7730.
 - 19) 井口義夫. (1999). フェージRNAレプリカーゼの構造特異性. 第47回日本ウイルス学会学術集会・総会
 - 20) Inokuchi, Y., and Hirashima, A. (1987). Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J. Virol.* **61**, 3946–3949.
 - 21) Inokuchi, Y., Hirashima, A., Sekine, Y., Janosi, L., and Kaji, A. (2000). Role of ribosome recycling factor (RRF) in translational coupling. *EMBO J.* **19**, 3788–3798.
 - 22) Inokuchi, Y., Jacobson, A. B., Hirose, T., Inayama, S., and Hirashima, A. (1988). Analysis of the complete nucleotide sequence of the group IV RNA coliphage SP. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6205–6221.
 - 23) Inokuchi, Y., and Kajitani, M. (1997). Deletion analysis of Q β replicase. *J. Biol. Chem.* **272**, 15339–15345.
 - 24) Inokuchi, Y., Kajitani, M., and Hirashima, A. (1994). A study on the function of the glycine residue in the YGDD motif of the RNA-dependent RNA polymerase β -subunit from RNA coliphage Q β . *J. Biochem.* **116**, 1275–1280.
 - 25) Inokuchi, Y., Takahashi, R., Hirose, T., Inayama, S., Jacobson, A. B., and Hirashima, A. (1986). The complete nucleotide sequence of the group II RNA coliphage GA. *J. Biochem.* **99**, 1169–1180.
 - 26) Inokuchi, Y., Yuyama, N., Hirashima, A., Nishikawa, S., Ohkawa, J., and Taira, K. (1994). A hammerhead ribosome inhibits the proliferation of an RNA coliphage SP in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 11361–11366.
 - 27) Jacobson, A. B., Arora, R., Zuker, M., Priano, C., Lin, C. H., and Mills, D. R. (1998). Structural plasticity in RNA and its role in the regulation of protein translation in coliphage Q β . *J. Mol. Biol.* **275**, 589–600.
 - 28) Kajitani, M. 未発表.
 - 29) Kajitani, M., and Ishihama, A. (1991). Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q β . *Nucl. Acids Res.* **19**, 1063–1066.
 - 30) Kajitani, M., and Ishihama, A. (1994). Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Q β . *J. Bacteriol.* **176**, 531–534.
 - 31) Klovins, J., and van Duin, J. (1999). A long range pseudonot in Q β RNA is essential for replication. *J. Mol. Biol.* **294**, 875–884.
 - 32) Klovins, J., van Duin, J., and Olsthoorn, R. C. (1997). Rescue of the RNA phage genome from RNase III cleavage. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4201–4208.
 - 33) Kozlovskaya, T. M., Cielens, I., Vasiljeva, I., Strelnikova, A., Kazaks, A., Dislers, A., Dreilina, D., Ose, V., Gusars, L., and Pumpens, P. (1996). RNA phage Q β coat protein as a carrier for foreign epitopes. *Intervirology* **39**, 9–15.
 - 34) Lics, N., Balklava, Z., and van Duin, J. (2000). Forced retroevolution of an RNA bacteriophage. *Virology* **271**, 298–306.
 - 35) Lics, N., van Duin, J., Balklava, Z., and Berzins, V. (1998). Long-range translational coupling in single-stranded RNA bacteriophages: an evolutionary analysis. *Nucl. Acids Res.* **26**, 3242–3246.
 - 36) Mekler, P. (1981). Determination of nucleotide sequences of the bacteriophage Q β genome: organization and evolution of an RNA virus. PhD thesis, University of Zurich.
 - 37) Miranda, G., Schuppli, D., Barrera, I., Hausherr, C., Sogo, J. M., and Weber, H. (1997). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β replicase; Role of RNA interactions mediated by ribosomal protein S1 and host factor. *J. Mol. Biol.* **267**, 1089–1103.
 - 38) Muffler, A., Fisher, D., and Hengge-Aronis, R. (1996). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**, 1143–1151.

- 39) Muffler, A., Traulsen, D. D., Fischer, D., Lange, R., and Hengg-Aronis, R. (1997). The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σ^s subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 297-300.
- 40) Ni, C. Z., White, C. A., Mitchell, R. S., Wickersham, J., Kodandapani, R., Peabody, D. S., and Ely K. R. (1996). Crystal structure of the coat protein from the GA bacteriophage : model of the unassembled dimer. *Protein Sci.* **5**, 2485-2493.
- 41) Olsthoorn, R. C. L., Grade, G., Dayhuff, T., Atkins, J. F., and van Duin, J. (1995). Nucleotide sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa*; knipship to coliphages and conservation of regulatory RNA structures. *Virology* **206**, 611-625.
- 42) Olsthoorn, R. C. L., and van Duin, J. (1996). Evolutionary reconstruction of a hairpin deleted from the genome of an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12256-12261.
- 43) Peabody, D. S. (1997). Role of the coat protein-RNA interaction in the life cycle of bacteriophage MS 2. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 358-364.
- 44) Peabody, D. S., and Chakerian, A. (1999). Asymmetric contributions to RNA binding by the Thr (45) residues of the MS 2 coat protein dimer. *J. Biol. Chem.* **274**, 25403-25410.
- 45) Poot, R. A., Tsareva, N. V., Boni, I. V., and van Duin, J. (1997). RNA folding kinetics regulates translation of phage MS 2 maturation gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10110-10115.
- 46) Priano, C., Arora, R., Jayant, L., and Mills, D. R. (1997). Translational activation in coliphage Q β : on a polycistronic messenger RNA, repression of one gene can activate translation of another. *J. Mol. Biol.* **271**, 299-310.
- 47) Schuppli, D., Miranda, G., Qiu, S., and Weber, H. (1998). A branched stem-loop structure in the M-site of bacteriophage Q β RNA is important for template recognition by Q β replicase holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **283**, 585-593.
- 48) Schuppli, D., Miranda, G., Tsui, H. C., Winkler, M. E., Sogo, J. M., and Weber, H. (1997). Altered 3'-terminal RNA structure in phage Q β adapted to host factor-less *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 10239-10242.
- 49) Sledjeski, D., Whitman, C., and Zhang, A. (2001). Hfq Is Necessary for Regulation by the Untranslated RNA DsrA. *J. Bacteriol.* **183**, 1997-2005.
- 50) Spingola, M., and Peabody, D. S. (1997). MS 2 coat protein mutants which bind Q β RNA. *Nucl. Acids Res.* **25**, 2808-2815.
- 51) Stonehouse, N. J., Valegard, K., Golmohammadi, R., van den Worm, S., Walton, C., Stockley, P. G., and Liljas, L. (1996). Crystal structures of MS 2 capsids with mutations in the subunit FG loop. *J. Mol. Biol.* **256**, 330-339.
- 52) Su, Q., Schuppli, D., Tsui, H-C-T., Winkler, M. E., and Weber, H. (1997). Strongly reduced phage Q β replication, but normal phage MS 2 replication in an *Escherichia coli* K12 mutant with inactivated Qbeta host factor (hfq) gene. *Virology* **227**, 211-214.
- 53) Tars, K., Bundule, M., Fridborg, K., and Liljas, L. (1997). The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviviruses. *J. Mol. Biol.* **271**, 759-773.
- 54) Tsui, H-CT., Leung, H-CE., and Winkler, M. E. (1994). Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **13**, 35-49.
- 55) van den Worm, S. H., Stonehouse, N. J., Valegard, K., Murray, J. B., Walton, C., Fridborg, K., Stockley, P. G., and Liljas, L. (1998). Crystal structures of MS 2 coat protein mutants in complex with wild-type RNA operator fragments. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1345-1351.
- 56) van Duin, J. (1988). Single-stranded RNA bacteriophages. In : *The Bacteriophages* (ed by Calender R). Plenum Press, New York.
- 57) Vasiljeva, I., Kozlovska, T., Cielens, I., Strelnikova, A., Kazaks, A., Ose, V., and Pumpens, P. (1998). Mosaic Q β coats as a new presentation model. *FEBS Lett.* **431**, 7-11.
- 58) Witherell, G. W., Gott, J. M., and Uhlenbeck, O. C. (1991). Specific interaction between RNA phage coat proteins and RNA. *Prog. Nucl. Acad. Res. Mol. Biol.* **40**, 185-220.
- 59) Woody, M. A., and Cliver, D. O. (1997). Replication of coliphage Q β as affected by host cell number, nutrition, competition from insusceptible cells and non-FRNA coliphages. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 431-440.