

RNAサイレンシングと植物ウイルス

熊倉直祐, 栗原志夫

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Naoyoshi Kumakura, Yukio Kurihara

Link between plant virus and RNA silencing

Key words: *plant RNA virus, resistance, RNA silencing, symptom*

RIKEN Center for Sustainable Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama,

Kanagawa, 230-0045 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b3.00113

1. RNAサイレンシングの概要

侵入してくるウイルスへの抵抗性は、動植物で大きく異なっている。動物は、抗体・抗原反応に代表される免疫機構を中心にウイルスの増殖を防ぎ、RNA干渉・サイレンシング機構（植物でのRNA干渉をRNAサイレンシングと呼ぶため、本稿ではRNA干渉を含めてRNAサイレンシングと呼称する）を使うことは稀である。一方で、植物はRNAサイレンシングがウイルス抵抗性において重要な役割を占めている。

RNAサイレンシングは内在性の遺伝子配列と相同な配列を外から導入すると、その遺伝子の発現が抑えられてしまうという現象である。1998年に線虫で、二本鎖RNAがRNA干渉の引き金となるという分子メカニズムの一端が初めて報告された (Fire et al. 1998)。植物での現象の発見は1990年に遡る。ペチュニアで内在性遺伝子と相同な遺伝子を形質転換で導入すると、その遺伝子の発現が抑制されることが明らかになり、これが現象としてのRNAサイレンシングの初めての報告であると考えられている (Napoli et al. 1990)。この例のように、しばしば形質転換植物で導入遺伝子のRNAサイレンシングによる抑制がみられてきた。現在では、RNAサイレンシングとは、細胞内に存在する長さ21-24塩基程度の小分子RNAが相補的な配列を持つRNAに結合し、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるエフェクター複合体をリクルートすることでRNAの分解・または翻訳抑制を行うメカニズムであることが明らかとなっている (Chapman and Carrington 2007, Iwakawa and Tomari 2015)。真核生物においてRNAサイレンシングの発生・環境応答における役割は非常に重要であり、RNAサイレンシ

グのいくつかの主要な遺伝子を欠損した生物個体は、動植物問わず致死に至る重篤な表現型を示す。特に植物においては、発生過程・ストレス応答時の遺伝子発現の制御・ウイルス抵抗性において重要であることが明らかになっている。本稿ではこれまで明らかになってきた植物の RNA サイレンシングを、植物ウイルス抵抗機構としての側面から概説する。

RNA サイレンシングは大きく二つのステップに分けられる。小分子 RNA の生合成と、小分子 RNA による標的 RNA への作用である。小分子 RNA は長さ 21-24 塩基程度の RNA であり、生合成過程から microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) に分類される。miRNA の前駆体はゲノムにコードされ、mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5' 末端にキャップ構造と 3' ポリ A 末端を持つ (図 1, 右)。miRNA 前駆体は自身の配列の持つ相補性からステムループ構造を形成し、二本鎖 RNA 切断酵素である Dicer-like 1 (DCL1) によってその構造が認識され、正確に miRNA となる配列が切り出される (Kurihara and Watanabe 2004, Kurihara et al. 2006)。成熟した miRNA は核内から核外へと移動し、相補的な標的 RNA を抑制すると考えられている。miRNA の持つ特徴としては、ゲノムにコードされていること、miRNA の標的となる mRNA の種類が決まっていることである。

一方、21 塩基長の siRNA は miRNA と異なり、ゲノム上の配列に限らず外来遺伝子など多様な配列をもとに合成される。21-22 nt 長の siRNA の前駆体となる RNA は細胞質で SGS3 とよばれるタンパク質に結合し、二本鎖 RNA 合成酵素である RDR6 によって二本鎖化される (Dalmay et al. 2000, Mourrain et al. 2000, Peragine et al. 2004, Yoshikawa et al. 2005)。SGS3 と RDR6 は細胞質で SGS3/RDR6-body (siRNA-body) とよばれる顆粒状構造を形成することから、この構造体内で siRNA の前駆体が二本鎖 RNA 化されると考えられる (Jouannet et al. 2012, Kumakura et al. 2009)。この二本鎖 RNA は二本鎖 RNA 切断酵素である Dicer-like タンパク質によって端から 21-22 nt 長ずつ順に切断され、成熟した siRNA となる。このような siRNA の原料は、ウイルス由来の RNA、細胞質内で分解されなかった mRNA、ta-siRNA (trans-acting siRNA) の前駆体など多岐にわたるのが特徴である (Allen et al. 2005, Hamilton and Baulcombe 1999, Gazzani et al. 2004)。

生合成経路とは異なり siRNA や miRNA の作用機構は共通している。モデル植物であるシロイヌナズナは RISC の活性中心である Argonaute (AGO) と呼ばれる endonuclease 活性を持つタンパク質を 11 種コードする。AGO は siRNA・miRNA と結合するポケットを備えており、取り込んだ siRNA・miRNA と相補的な配列を持つ標的 RNA を切断あるいは、その翻訳を抑制する。miRNA が結合するのは主に AGO1 である。siRNA は AGO1-11 のいずれからも検出される。AGO1-11 は発現・局在のパターンが異なっており、どの AGO と結合するかは miRNA・siRNA の作用を知るうえで非常に重要である。植物では小分子 RNA の 5' 末端の塩基がどの AGO に取り込まれるかを定める重要な因子であることが明らかになっている。たとえば、

AGO2 は主に 5'末端にアデニンを持つ小分子 RNA と、AGO5 は主に 5'末端にシトシンを持つ小分子 RNA は AGO5 と結合する。このように小分子 RNA はそれぞれ親和性を持つ AGO と結合し、標的 RNA に作用する (Mi et al. 2008, Takeda et al. 2008)。

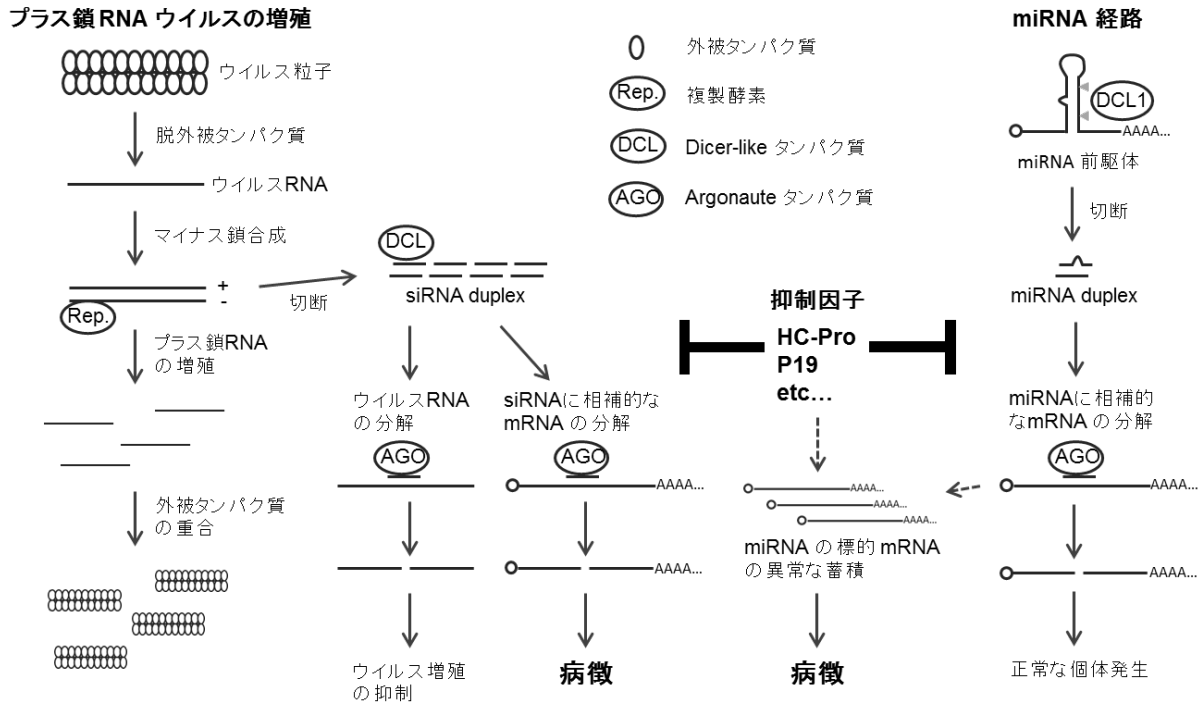


図1 植物ウイルスと RNA サイレンシングとの関係性

プラス鎖 RNA ウイルスを例とした。RNA サイレンシングは植物ウイルスの増殖を抑制する抵抗性機構として働く。一方で、植物ウイルスはカウンターディフェンスとして RNA サイレンシングを阻害する抑制因子を自ら備えている。ウイルス由来の siRNA はウイルス RNA を分解するだけでなく、宿主側の相補的な mRNA も分解してしまい、病徴が現れると考えられる。さらに、ウイルスの抑制因子は、miRNA 経路も阻害してしまい、miRNA とその標的 mRNA のバランスを崩してしまい、病徴を引き起こす。

2. 植物ウイルスと RNA サイレンシング抑制因子

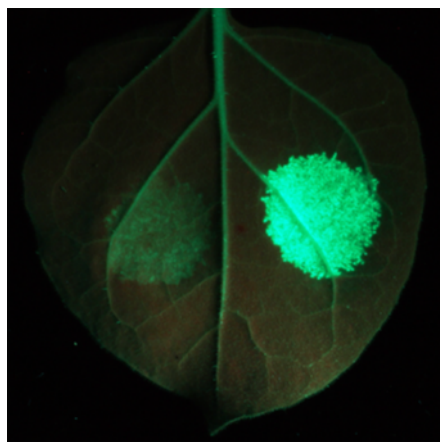
知られている植物ウイルスの約八割はゲノムが RNA からなる RNA ウイルスであり、そのゲノム RNA は外被タンパク質に覆われている。ウイルスの外被タンパク質を発現する組換え植物は、ウイルスの感染・増殖に対して抵抗性を示すことが知られていた (Abel et al. 1986)。また、植物ウイルスの感染を予防するために、予め植物に病原性の弱い弱毒ウイルスを感染させておき、後から侵入してくる強毒ウイルスの感染を防ぐ手法も広く使われてきた (Kurihara and Watanabe, 2003)。1990年代の後半に、上記のようなウイルス抵抗性と RNA サイレンシングの類似性が指摘され始めた (Ratcliff et al. 1997)。そして、1999年のウイルス由来の

siRNA の発見によって、RNA サイレンシングがウイルスに対する抵抗性機構であることが真に証明されたのである (Hamilton and Baulcombe 1999)。

植物ウイルスと RNA サイレンシングによる抵抗性の分子機構について、ここではタバコモザイクウイルス (TMV) に代表されるプラス鎖 RNA ウイルスを例に解説する (図 1, 左)。TMV ゲノムはプラス鎖の一本鎖 RNA であり、それが外被タンパク質に包まれることでウイルス粒子を形成している。このウイルスは細胞内に侵入すると外被タンパク質が外れ、ゲノム RNA から植物の持つ翻訳装置を用いて複製酵素の翻訳を開始する。複製酵素は、プラス鎖であるゲノム RNA からマイナス鎖 RNA (二本鎖化) を合成し、さらにマイナス鎖 RNA を鋳型にゲノム RNA を複製する。このように一本鎖プラス鎖 RNA 二本鎖化とマイナス鎖 RNA を鋳型にしたプラス鎖 RNA の合成の一連のサイクルを繰り返すことでウイルスは爆発的に増殖する。一方で植物は、ウイルスの増殖を抑えるために、ウイルス複製時の二本鎖 RNA の Dicer による切断を通して、RNA サイレンシングをひき起こすウイルス由来の siRNA の生成する (Hamilton and Baulcombe 1999)。siRNA 生成は RDR1/6 の作用によって、さらに促進される (Wang et al. 2010)。生成された siRNA は、さらにウイルス RNA を標的として分解することで、増殖を抑えると考えられている。

しかし、ウイルスも植物にやられてばかりではない。ウイルスは自身のゲノム上に RNA サイレンシング機構を抑制するタンパク質をコードする遺伝子を持つのである (図 1, 中央)。最初に同定されたウイルスの抑制因子はポティウイルスにコードされた HC-Pro (helper component protease) である (Anandalakshmi et al. 1998, Kasschau and Carrington, 1998)。もともと HC-Pro は、長期にわたるウイルスのゲノム複製や、維管束依存的なウイルスの長距離移行に必要な因子として知られていた。これらの現象は HC-Pro が RNA サイレンシングを阻害することで引き起こされる。また、広く知られている抑制因子としては P19 がある。P19 はトンバウイルスがコードする 19 kDa タンパク質で、ウイルスにとって病徴を引き起こすのに必要な因子として同定され、後に細胞内の siRNA と結合し、その siRNA の RISC への取り込みを阻害することで、RNA サイレンシングを抑制することが明らかになった (Silhavy et al. 2002, Qiu et al. 2002, Qu and Morris 2002)。比較的良く解析されている P19 による RNA サイレンシング抑制の一例を図 2 に示す。結晶構造解析によって、P19 は一組の siRNA duplex (図 1) に対して配列には依存せずにダイマーとして結合することが報告されている (Vargason et al. 2003)。このような性質から、P19 は siRNA duplex と同じ構造を持つ miRNA duplex にも結合する。HC-Pro や P19 のみならず、様々なウイルスが抑制因子を持つことが明らかになり、それらの多くが小分子 RNA と結合することが示された (Lakatos et al. 2006, Merai et al. 2006, Voinnet et al. 1999)。例に挙げた TMV の場合、複製酵素が、ウイルスの複製を担うだけではなく、

小分子 RNA に結合することで RNA サイレンシング抑制因子としても働く (Csorba et al. 2007, Kubota et al. 2003, Kurihara et al. 2007)。一つのタンパク質が全く異なる二つの機能をもつことは、ウイルスが極めて少ない遺伝子情報のみで最大限の機能を発揮し、生存するための効率の良い策かもしれない。このように植物ウイルスは抑制因子を発現することで小分子 RNA を RISC から隔離し、自身のゲノム RNA を RNA サイレンシング機構から守っている。RNA サイレンシングを抑制することが、植物ウイルスにとっては一般的な感染戦略であると考えられるようになった。



GFP

GFP + p19

図 2 トンバウイルス P19 による RNA サイレンシングの抑制の例

恒常的に GFP を発現する *Nicotiana benthamiana* の葉に外部からさらに GFP 遺伝子を導入すると GFP 蛍光が見られるものの、RNA サイレンシングが誘発されるため弱い蛍光となる (左側)。一方で、GFP 遺伝子とともに p19 遺伝子を導入すると RNA サイレンシングは抑制され、強い GFP 蛍光が見られる (右側)。アグロインフィルトレーション法を用いて遺伝子導入を行った。写真は UV 照射下で撮影。

3. RNA サイレンシング機構と病徴との関係性

ウイルスは植物に感染し、全身に広がって病徴を引き起こす。植物細胞に感染したウイルスは、細胞内で複製され、原形質連絡を通過して細胞から細胞へと移動し、師管を介して、感染した細胞から離れた組織へと広がっていく。ウイルス感染が引き起こす病徴はモザイク様斑紋に代表される組織の色の变化など比較的穏やかなものから、発生過程への大きな影響や細胞死などの激しいものまで多岐にわたる。これらの病徴がどのようなメカニズムによって引き起こされているかは未解明の部分が多い。しかしながら、少なくとも一部の病徴は、ウイルスの RNA サイレンシング抑制因子が、miRNA 経路を阻害することで引き起こされることが明らかになっている。

ポティウイルスであるカブモザイクウイルス (TuMV) がシロイヌナズナに感染すると生長障害や激しい発生異常という病徴が現れる。TuMV は抑制因子である HC-Pro をコードしており、HC-Pro を発現させたシロイヌナズナは、TuMV 感染植物と類似した成長の障害を受けた。HC-Pro 発現植物と TuMV 感染植物では共通して、複数個の miRNA の標的とされる mRNA の蓄積が上昇していた。つまり、HC-Pro が siRNA 経路を抑制するだけでなく、miRNA 経路も

阻害することがわかった。さらに、miRNA の標的 mRNA の多くは発生を制御する因子（転写因子など）をコードすることから、miRNA 経路が阻害され、標的 mRNA の量的な均衡が崩れることにより、TuMV の病徴の一部として発生異常が引き起こされると考えられた (Kasschau et al., 2003)。miRNA 経路の阻害によって引き起こされる発生異常（病徴）は、複数の抑制因子を個別に発現するシロイヌナズナでみられたことから、ウイルス病に共通した病徴発生メカニズムなのかもしれない (Chapman et al. 2004)。

図 1 に示すように、ウイルス由来 siRNA は、偶然にも siRNA の配列に相補的な宿主（植物）側の mRNA を分解の標的とすることが考えられる。植物ウイルスに付随して存在するサテライト RNA と呼ばれるタンパク質をコードしない病原性 RNA がある。キュウリモサイクウイルス (CMV) に付随して存在するサテライト RNA (Y-sat) は、タバコにおいて黄化の病徴を引き起こす。この病徴の原因が、Y-sat 由来の siRNA がクロロフィルの生成に必須の内在性遺伝子である CHL1 の mRNA を分解・抑制しているためであることが示された (Shimura et al. 2011, Smith et al. 2011)。

同様の現象が、ウイルスに類似したウイロイドとその宿主において報告されている。ウイロイドは、一本鎖環状 RNA のゲノムを持ち、タンパク質をコードしないが植物細胞内で自律的に増殖し、ウイルス同様に病徴を引き起こす。このウイロイドの病徴がどのように引き起こされているかは長年の謎であった。ウイロイドもウイルス同様に植物の RNA サイレンシングによって siRNA が生成され抑制される (Hammann and Steger 2012, Wang et al. 2004)。モモ潜在モザイクウイロイド (PLMVd) がモモに感染すると、葉に白化の症状が現れる。この病徴も、ウイロイド由来の二つの siRNA が葉緑体の生合成に関わる cHSP90 の mRNA を分解・抑制しているためであることが示された (Navarro et al. 2012)。以上の報告以外にも、ウイルスまたはウイロイド由来の siRNA が宿主側の mRNA を標的としていることが推測される報告がなされている (Hammann and Steger 2012, Miozzi et al. 2012)。しかしながら、まだ検証された例は少ないため、今後の報告を待ちたい。

4. まとめ

長期にわたる植物ウイルスと宿主側の抵抗性に関する研究の中で、RNA サイレンシングが外来性核酸に対する抑制機構であることが明らかとなった。植物ウイルスは宿主側の RNA サイレンシング機構によって増殖が抑制される一方で、ウイルス側はその抵抗を抑えるための抑制因子を自ら備えている。さらに、それらの RNA サイレンシング抑制因子は宿主側遺伝子の発現制御機構に干渉し、病徴を引き起こす。ウイルス病は時に、宿主が子孫を残すことを妨げることもある。ウイルスにとっては、宿主に過度な病徴が現れ、自らが存在する場が脅かさ

れてしまうことは本来好ましくない。RNAサイレンシングとウイルスがもつ抑制因子による抵抗の関係は、うまくバランスをとりながら共進化してきたのかもしれない。

5. 謝辞

植物の RNA 研究, 特に RNA サイレシングに関する研究に従事する機会を与えてくださった東京大学大学院総合文化研究科の渡邊雄一郎教授にこの場を借りて御礼申し上げます。

6. 引用文献

- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., and Carrington, J. C. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., and Vance, V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13079-13084.
- Chapman, E. J., and Carrington, J. C. 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* 8: 884-894.
- Chapman, E. J., Prokhnovsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V., and Carrington, J. C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18: 1179-1186.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. 2007. The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* 81: 11768-11780.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rubb, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A. Driver, S. E., and Mello, C. C. 1998. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. 2004. A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306: 1046-1048.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hammann, C., and Steger, G. 2012. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.* 9: 809-819.

- Iwakawa, H. O., and Tomari, Y. 2015. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol.* 25: 651-665.
- Jouannet, V., Moreno, A. B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M. D., and Maizel, A. 2012. Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane associated siRNA bodies and is required for ta siRNA biogenesis. *EMBO J.* 31: 1704–1713.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 1998. A Counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461–470.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a Viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4: 205–217.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., and Meshi, T. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77: 11016-11026.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., and Watanabe, Y. 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett.* 583: 1261–1266.
- Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y., and Watanabe, Y. 2007. The binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J. Gen. Virol.* 88: 2347-2352.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206–212.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. 2003. Cross-protection in Arabidopsis against crucifer tobamovirus Cg by an attenuated strain of the virus. *Mol. Plant Pathol.* 4: 259-269.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12753–12758.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J., and Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25: 2768-2780.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* 80: 5747-5756.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes Is directed by the 5 terminal nucleotide. *Cell* 133: 116–127.
- Miozzi, L., Gambino, G., Burgyan, J., Pantaleo, V. 2013. Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in *Vitis vinifera*. *Mol. Plant Pathol.* 14: 30-43.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., et al. 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for

- posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., and Poethig, R. S. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18: 2368-2379.
- Qiu, W., Park, J. W., and Scholthof, H. B. 2002. Tombusvirus P19-Mediated Suppression of Virus-Induced Gene Silencing Is Controlled by Genetic and Dosage Features That Influence Pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15: 269-280.
- Qu, F., and Morris, T. J. 2002. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15: 193-202.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-1560.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyan, J., and Masuta, C. 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* 7: e1002021.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyán, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing - generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070-3080.
- Smith, N. A., Eamens, A. L., and Wang, M. B. 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7: e1002022.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y. 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* 49: 493-500.
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyán, J., and Hall, T. M. T. 2003. Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell* 115: 799-811.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14147-14152.
- Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R.-M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., and Waterhouse, P. M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3275-3280.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L.&Ding, S.W. 2010.

RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 484–489.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., and Poethig, R. S. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 19: 2164–2175.