

植物の RNA サイレンシング機構が自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

岩川 弘宙^{1,2}

東京大学分子細胞生物学研究所¹

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻²

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

Hiro-oki Iwakawa^{1,2}

How do plants avoid self-attack by unwanted RNA silencing?

Key words: Antiviral defense, PTGS, RNA silencing, siRNA

¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo

113-0032, Japan.

²Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier

Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan.

DOI: 10.24480/bsj-review.8b4.00114

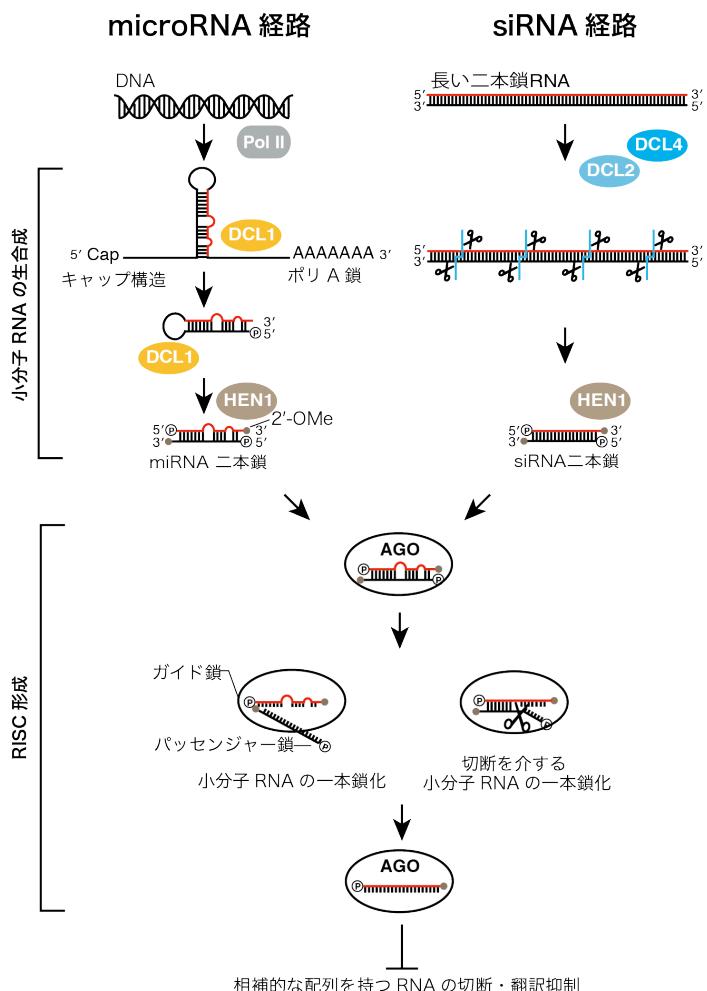
1. はじめに

RNA サイレンシング機構は 20–30 塩基程度の小さな RNA を介して相補的な配列をもつ遺伝子を転写レベル、また転写後レベルで抑制する遺伝子発現制御機構である。この機構は分化や発生など様々な生体反応を制御するのみならず、外来核酸を排除する生体防御機構としての役割も持ち合わせている(Ghildiyal and Zamore, 2009; Bologna and Voinnet, 2014; Castel and Martienssen, 2013; Kobayashi and Tomari, 2015)。特に植物や昆虫などでは主要な抗ウイルス防御機構としてはたらくことが知られている。植物には小分子 RNA の標的 RNA からさらに小分子 RNA を作り出す「小分子 RNA 増幅機構」が存在するため、RNA サイレンシングの標的となるウイルス RNA などは非

常に強い負の制御を受けることとなる (Ding, 2010)。この小分子 RNA 増幅機構の最重要反応は一本鎖の標的 RNA を小分子 RNA の前駆体である長い二本鎖 RNA に変換する過程であるが、自身の mRNA をむやみに二本鎖に変換してしまっては無秩序な RNA サイレンシングが引き起こされ、植物の遺伝子全体が抑制される事態に陥ってしまう。そのため、植物は正常な RNA と異常な RNA を見分け、異常な RNA のみを RNA サイレンシングに引き込む何らかのメカニズムを持っていると考えられる。RNA サイレンシング機構が発見されてから四半世紀が経ち、ようやく正常な RNA と異常な RNA を区別するしくみが分かりつつある。本稿では植物の RNA サイレンシング機構、および小分子 RNA 増幅機構を介して外来の異常な RNA を排除するメカニズムを概説するとともに、自己の mRNA を攻撃しないメカニズムを最新の知見を踏まえて考察したいと思う。

2. 小分子 RNA の生合成と RISC 形成

植物の RNA サイレンシング機構は 20 塩基から 24 塩基程度の小分子 RNA を介して引き起こされる配列特異的な遺伝子発現制御機構である。機能的な面からは小分子 RNA と相補的な mRNA の切断、翻訳抑制を行う転写後ジーンサイレンシング (PTGS: post-transcriptional gene silencing) と相補的な遺伝子を DNA のメチル化を介して抑制する転写制御 (TGS: transcriptional gene silencing) の 2 つの経路に分かれる。24 塩基の小分子 RNA は TGS で働くことが知られている。一方で 20–22 塩基の小分子 RNA は PTGS に関わ



H. Iwakawa et al. 図1.2 小分子 RNA の生合成と RISC 形成
BSJ-review 8:59 (2017)

るが、それらは生合成過程の違いにより microRNA (miRNA) と short-interfering RNA (siRNA) に大別される (Bologna and Voinnet, 2014)。

2-1. miRNA の生合成と RISC 形成

内在の遺伝子を制御する働きをもつ miRNA はゲノムにコードされた小分子 RNA で、RNA ポリメラーゼ II によりヘアピン構造を持った長い前駆体 RNA として転写される。ヘアピン構造は DICER-LIKE1 (DCL1) と呼ばれる RNase III 型酵素によって 20–22 塩基の miRNA 二本鎖にプロセシングされ、メチル基転移酵素である HEN1 により 3'末端がメチル化される (Reinhart et al., 2002; Park et al., 2002; Kurihara and Watanabe, 2004; Yu et al., 2006; Li et al., 2005)。miRNA 二本鎖は RNase H 様ドメインを持つ Argonaute (AGO) と呼ばれるタンパク質に取り込まれた後、一方の鎖 (ガイド鎖) は AGO に残り、もう一方の鎖 (パッセンジャー鎖) は RISC から排除される (Vaucheret et al., 2004; Iki et al., 2010; Bologna and Voinnet, 2014)。こうして出来た RNA タンパク質複合体は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれ、miRNA のガイド鎖と相補的な配列をもつ mRNA を切断・翻訳抑制する (図 1) (Bologna and Voinnet, 2014; Iwakawa and Tomari, 2015)。シロイヌナズナは 10 種類の AGO をコードしており、主に AGO1 が miRNA と RISC を形成し標的遺伝子の発現を制御する。

2-2. siRNA の生合成と RISC 形成

長い二本鎖 RNA より作られる小分子 RNA を siRNA と呼ぶ。長い二本鎖 RNA は様々な経路で生合成されるが、ウイルス RNA の高次構造や複製中間体、双方向の転写によって出来た二本鎖 RNA、そして後述する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RDR: RNA-dependent RNA polymerase) によって出来た二本鎖 RNA などが挙げられる (Ding, 2010)。これらの二本鎖 RNA は DCL2/3/4 によってそれぞれ 22, 24, 21 塩基の siRNA にプロセシングされる。24 塩基の siRNA は AGO3, 4, 6, 9 に結合し、主に TGS に関わる (Havecker et al., 2010; Zhang et al., 2016; Mi et al., 2008)。一方、21 塩

基、22 塩基の短い siRNA は AGO1,AGO2,AGO5 と RISC を形成し PTGS に関わることが知られている(Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008; Montgomery et al., 2008)。RISC 形成過程はパッセンジャー鎖の排除に AGO の切断活性を必要とする以外は miRNA と同様であると考えられている (Iki et al., 2010) (図 1)。

2-3. 小分子 RNA の振り分け機構

シロイヌナズナには 10 種類の AGO がコードされており、一部冗長性も認められるが、それぞれ固有の機能を持っている (Bologna and Voinnet, 2014)。組織による発現量の差や、発現誘導の有無などにより、細胞内で発現している AGO のバランスこそ異なるが、複数の AGO は一細胞内同時に発現している(Bologna and Voinnet, 2014)。そのような状況において小分子 RNA がどの AGO と結合するのかは極めて重要な問題である。ショウジョウバエでは小分子 RNA 二本鎖の形の違いにより（中央のミスマッチの有無）2つある AGO のどちらに入るかを決めているが (Tomari et al., 2007; Kawamata and Tomari, 2010; Montgomery et al., 2008), 植物においては主に小分子 RNA の 5'末端の塩基がどの AGO と結合するかを決めている。植物の miRNA の多くは 5'末端が U であり、5'末端が U の小分子 RNA と強く結合する性質を持つ AGO1 と結合し機能を果たす (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008)。また AGO2 は 5'末端が A, AGO5 は 5'末端が C の小分子 RNA とそれぞれ結合することが知られている (Montgomery et al., 2008; Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008)。AGO7 は小分子 RNA の 5'末端の塩基のみならず miRNA 二本鎖の配列や構造をチェックすることで miR390 という miRNA と特異的に結合することが知られている(Endo et al., 2013; Montgomery et al., 2008)。

3. 植物が持つ小分子 RNA 増幅機構

3-1. ウィルスの感染と小分子 RNA 増幅機構

上述したようにウィルスが感染すると、DCL2/4 の働きにより複製中間体などの長い二本鎖

RNA からウイルス由来の siRNA が作り出され、RISC を介してウイルス RNA は切斷される (Bouchéet al., 2006; Deleris et al., 2006; Diaz-Pendon et al., 2007; Fusaro et al., 2006)。植物は小分子 RNA を增幅する機構を持つことでより強力にウイルスの複製を阻害することができる。その中心的役割を担うのが一本鎖 RNA を二本鎖 RNA に変換する RDR である。シロイヌナズナには 6 種類存在するがウイルスの小分子 RNA 増幅において重要な RDR は RDR1 と RDR6 である (Wang et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2010; Diaz-Pendon et al., 2007; Donaire et al., 2008)。RDR1/6 は RNA 結合タンパク質である SGS3 やその他のタンパク質の助けを借りて RISC が切斷したウイルス RNA を二本鎖 RNA に変換し、その二本鎖 RNA を DCL2/4 が再度切斷することで小分子 RNA は増幅される (図 2) (Ding, 2010)。

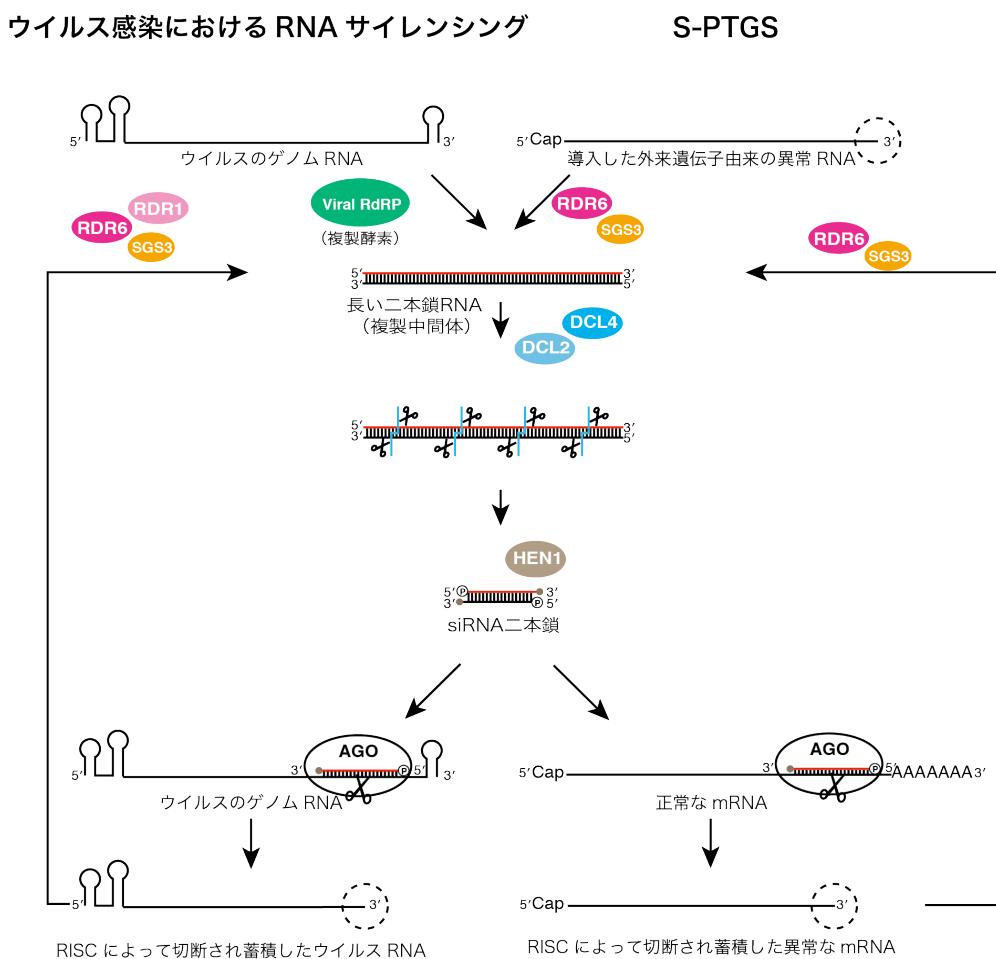


図2. ウィルス感染における RNA サイレンシングと S-PTGS

3-2. 外来遺伝子導入とコサプレッション・S-PTGS

1990 年 Napoli らが紫色のペチュニアに色素合成遺伝子であるカルコン合成遺伝子を導入し過剰発現した際、予想に反しアントシアニン合成は阻害され白色の花を咲かせる事を発見した (Napoli et al., 1990)。カルコン合成遺伝子 mRNA の蓄積量を調べてみると過剰発現されていないばかりか、野生型の 50 分の 1 程度まで減少していた(Napoli et al., 1990)。導入した外来遺伝子のみならず相同配列をもつ内在遺伝子の発現まで抑制する「コサプレッション」と名付けられたこの現象は、ウイルス RNA を排除する場合と同様に小分子 RNA の增幅を介した RNA サイレンシングによって引き起こされることが分かっている (Brodersen and Voinnet, 2006)。ウイルス RNA の場合と異なる部分は過剰発現した外来遺伝子は内在 mRNA と同様の一本鎖 RNA という点であるが、後述するように植物は外来遺伝子由来の「異常な」mRNA を見分け RDR6 によって二本鎖化することで RNA サイレンシングを引き起こす (図 2,3)。一本鎖 RNA により RNA サイレンシングを引き起こす機構のことを S-PTGS (Sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing) と呼ぶ。

3-3. tas iRNA 経路：小分子 RNA 増幅系を介した内在小分子 RNA の生合成

一部の内在 RNA は RDR6 によって二本鎖 RNA に変換され trans-acting siRNA (tasiRNA) と呼ばれる内在小分子 RNA を作り出すことで、相補性をもつ他の内在遺伝子の発現を制御することが知られている(Bologna and Voinnet, 2014)。最近になって、明確な標的は持たないが RDR6 依存的に生成される内在小分子 RNA も数多く発見されてきた(Fei et al., 2013)。これらの小分子 RNA は phasiRNA (phased, secondary, small interfering RNAs) と呼ばれる。tasiRNA の生成には RDR6, SGS3, その他のコファクターの他に、特殊な RISC (22 塩基の miRNA と結合した AGO1 や miR390 と結合した AGO7) が内在の TAS RNA (*TRANS-ACTING siRNA (TAS) precursor*) に結合することが必須であることが報告されている (Fei et al., 2013; Arribas-Hernández et al., 2016; de Felippes et al., 2017)。tasiRNA/PhasiRNA 経路は S-PTGS 機構と似ている点が多いが、S-PTGS 経路に特殊な RISC の結合

が必須か否かは未だ明らかでない (Branscheid et al., 2015)。

4. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

小分子 RNA の増幅を介した RNA サイレンシング機構は実に強力な生体防御システムではあるが、制御なく内在の mRNA に作用すると遺伝子発現が乱され、植物の生育は阻害されてしまう。なぜ内在の mRNA は小分子 RNA の増幅を介した RNA サイレンシング機構の標的にならないのであろうか？最近その謎を解決するかもしれない複数の論文が発表された。

4-1. 3'末端ポリ A 鎖の役割

前述したように、外来遺伝子を導入すると、植物は RNA サイレンシングを引き起こし、外来遺伝子の発現を抑制する。複製中間体などの長い二本鎖 RNA を作り出すウイルス RNA と異なり、過剰発現した外来遺伝子由来の mRNA は内在 mRNA と同様の一本鎖 RNA であるため、植物はどうにかして外来遺伝子由来の mRNA を内在 mRNA から区別して RNA サイレンシングを引き起こさなくてはならない。真核生物の mRNA は 5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ A 鎖を持ち、それらは翻訳の促進および mRNA の安定化に寄与している (Gallie, 1991)。これまでの報告で、キャップ構造やポリ A 鎖を欠いた異常な RNA が S-PTGS を引き起こす原因になることが示唆されていた (Luo and Chen, 2007; Gazzani et al., 2004; Parent et al., 2015)。長い間植物がどのような分子機構でポリ A 鎖を欠いた mRNA を特異的に RNA サイレンシング機構に導くかは謎であったが、最近、RDR6 にはポリ A 配列を欠いた RNA のみを二本鎖 RNA に変換し、3'末端にポリ A 鎖をもつ正常な mRNA は二本鎖 RNA に変換しないという興味深い基質特異性があることが明らかになった (Baeg et al., 2017)。すなわち正常な mRNA がもつ 3'末端のポリ A 鎖はこれまで知られていた RNA の安定化や翻訳促進だけでなく、RDR6 依存的な RNA サイレンシング機構の標的にならないようにする、いわば “自己 mRNA の ID” としての役割を兼ね備えていることが明らかになった。興味深いことに TAS RNA に関しては、ポリ A 鎖から二本鎖 RNA 合成を開始できるようである。

(Rajeswaran et al., 2012)。おそらく特殊な RISC は TAS RNA に積極的に RDR6 を呼び込むはたらきをしているのだと考えられる (Arribas-Hernández et al., 2016; de Felippe et al., 2017)。

4-2. RNA の品質管理システムおよび RNA 代謝システムの役割

生体内では常に RNA の品質管理システムが作動しており異常な RNA を迅速に分解することでそれらの蓄積を防いでいる (Inada, 2013)。また正常な mRNA も常に転写と分解のサイクルを繰り返すことで、動的な平衡状態を保っている。分解を促進する様々なタンパク質因子やシス因子は数多く見つかっているが、正常な RNA も異常な RNA も最終的にはエキソリボヌクレアーゼによる 5'-3' 方向または 3'-5' 方向への分解を受ける (Garneau et al., 2007)。mRNA は通常キャップ構造とポリ A 鎮によってエキソリボヌクレアーゼによる分解から身を守っているが、エンドリボヌクレアーゼの切断を受け生じたポリ A 鎮を欠いた 5' 側の RNA 断片は 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによって、キャップ構造を欠いた 3' 側の RNA 断片は 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによってそれぞれ分解される (Garneau et al., 2007)。エンドヌクレアーゼによる切断を介さない分解においては、まずポリ A 鎮分解酵素によって mRNA のポリ A 鎮が短縮され、キャップ構造がデキャッピング酵素によって取り除かれた後、最終的に 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによって分解される (Garneau et al., 2007)。

これまで複数の論文で RNA の品質管理に関わるタンパク質やエキソリボヌクレアーゼが働く植物体において、S-PTGS が増強されることが報告されている (Moreno et al., 2013; Gazzani et al., 2004; Branscheid et al., 2015)。これらの結果は RNA の品質管理システムや RNA の代謝経路が小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシングと拮抗していることを示唆している (Tsuzuki et al., 2017)。最近になって mRNA の分解経路が強く阻害されると、植物の様々な内在遺伝子から小分子 RNA が作り出され内在の遺伝子を濫りに抑制するため、植物の生育に異常をきたすことが報告された (Martinez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015)。この生育阻害は RDR6 や SGS3 などの RNA サイレンシング関連因子を欠損すると回復することから、エキソリボヌクレアーゼによる RNA

代謝は自身の mRNA が小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシングの対象になることを防いでいると示唆される (Martinez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015)。

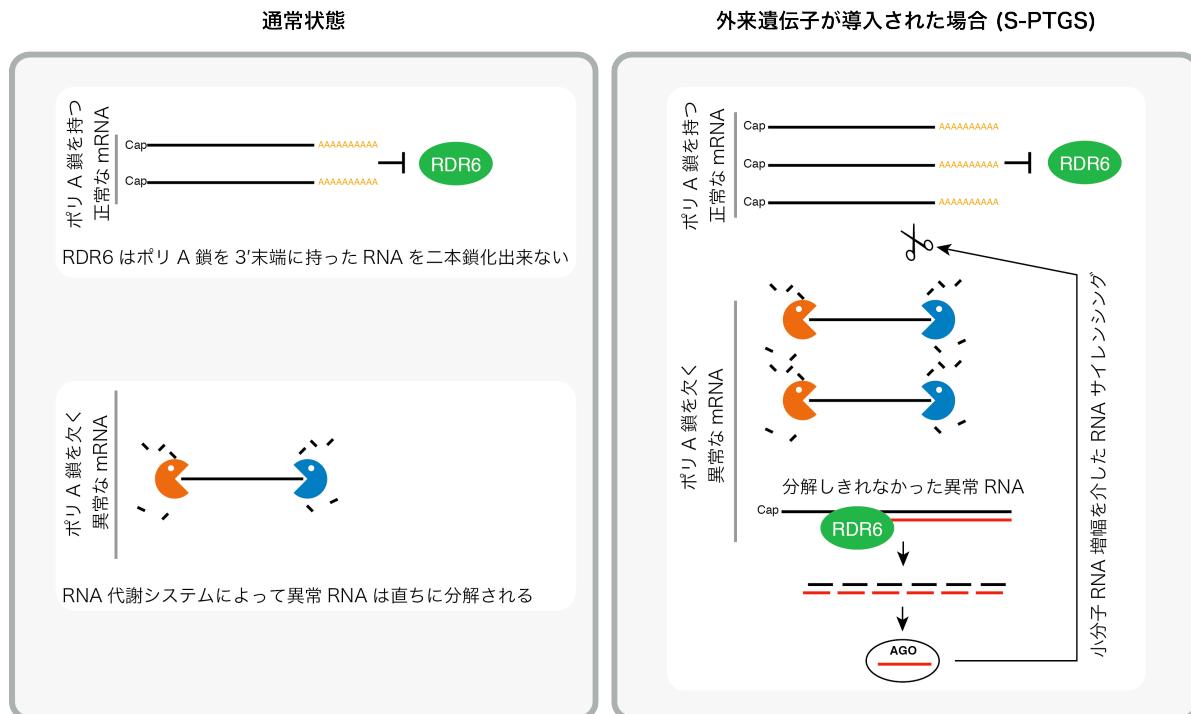


図 3. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

4-3. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズムのまとめ

これまで解説した結果をまとめると次のようなモデルが考えられる。安定に存在している内在 mRNA は poly A 鎖をもっているため RDR6 によって二本鎖化されない (図 3 左上)。また, RDR6 の鉄型となり得る poly A 鎖を欠いた異常な内在 mRNA は様々な原因により生じてはいるが, 通常は RNA 代謝系によって迅速に分解されており, RDR6 の認識を免れているのだと考えられる (図 3 左下)。外来遺伝子を過剰発現した場合等においては RNA 代謝系による分解が追いつかず RDR6 が好む poly A 鎖を欠いた異常 RNA が蓄積するため, RNA サイレンシングが引き起こされるのであろうと考えられる (図 3 右)。

おわりに

RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズムとして、今回 mRNA のポリ A 鎮と RNA 代謝経路の重要性を挙げたが、RDR6 や SGS3 の顆粒を形成することにより小分子 RNA 増幅を引き起こす「場」を限局することや (Kumakura et al., 2009)、RNA の 3' 末端に存在する強固な RNA 構造や RNA 結合タンパク質なども自己 RNA を RDR6 依存的な RNA サイレンシングをから守るはたらきをしている可能性もある (Baeg et al., 2017)。植物はそれらの多層的な制御機構をもつことによってはじめて諸刃の剣ともなり得る「小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシング」という極めて強力な核酸防御機構を常時配備し、内在遺伝子制御にまで応用できているのかもしれない。

引用文献

- Arribas-Hernández, L., Marchais, A., Poulsen, C., Haase, B., Hauptmann, J., Benes, V., Meister, G. & Brodersen, P. 2016 The Slicer Activity of ARGONAUTE1 Is Required Specifically for the Phasing, Not Production, of Trans-Acting Short Interfering RNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 28, 1563–1580.
- Baeg, K., Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2017 The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. *Nat Plants* 3, 17036.
- Bologna, N.G. & Voinnet, O. 2014 The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* 65, 473–503.
- Bouché, N., Lauressergues, D., Gascioli, V. & Vaucheret, H. 2006 An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J* 25, 3347–3356.
- Branscheid, A., Marchais, A., Schott, G., Lange, H., Gagliardi, D., Andersen, S.U., Voinnet, O. & Brodersen, P. 2015 SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 43, 10975–10988.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. 2006 The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22, 268–280.
- Castel, S.E. & Martienssen, R.A. 2013 RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet* 14, 100–112.

- de Felippes, F.F., Marchais, A., Sarazin, A., Oberlin, S. & Voinnet, O. 2017 A single miR390 targeting event is sufficient for triggering TAS3-tasiRNA biogenesis in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res*
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O. 2006 Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.X. & Ding, S.W. 2007 Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063.
- Ding, S.W. 2010 RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 632–644.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I. & Llave, C. 2008 Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* 82, 5167–5177.
- Endo, Y., Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2013 Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Rep* 14, 652–658.
- Fei, Q., Xia, R. & Meyers, B.C. 2013 Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 25, 2400–2415.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J. & Waterhouse, P.M. 2006 RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep* 7, 1168–1175.
- Gallie, D.R. 1991 The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5, 2108–2116.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. & Carrington, J.C. 2010 Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481–496.
- Garneau, N.L., Wilusz, J. & Wilusz, C.J. 2007 The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113–126.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R. 2004 A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306, 1046–1048.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. 2009 Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94–108.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. & Baulcombe, D.C. 2010 The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22, 321–334.

- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T. & Ishikawa, M. 2010 In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* 39, 282–291.
- Inada, T. 2013 Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim Biophys Acta* 1829, 634–642.
- Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2015 The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 25, 651–665.
- Kawamata, T. & Tomari, Y. 2010 Making RISC. *Trends Biochem Sci* 35, 368–376.
- Kobayashi, H. & Tomari, Y. 2015 RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y. 2009 SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* 583, 1261–1266.
- Kurihara, Y. & Watanabe, Y. 2004 Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12753–12758.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X. 2005 Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 1501–1507.
- Luo, Z. & Chen, Z. 2007 Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 943–958.
- Martinez de Alba, A.E., Moreno, A.B., Gabriel, M., Mallory, A.C., Christ, A., Bounon, R., Balzergue, S., Aubourg, S., Gautheret, D., Crespi, M.D., Vaucheret, H. & Maizel, A. 2015 In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Res* 43, 2902–2913.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. & Qi, Y. 2008 Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116–127.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J.C. 2008 Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128–141.
- Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A. & Mallory, A.C. 2013 Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Res* 41, 4699–4708.
- Napoli, C., Lemieux, C. & 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.

- Parent, J.S., Jauvion, V., Bouché, N., Béclin, C., Hachet, M., Zytnicki, M. & Vaucheret, H. 2015 Post-transcriptional gene silencing triggered by sense transgenes involves uncapped antisense RNA and differs from silencing intentionally triggered by antisense transgenes. *Nucleic Acids Res* 43, 8464–8475.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X. 2002 CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12, 1484–1495.
- Rajeswaran, R., Aregger, M., Zvereva, A.S., Borah, B.K., Gubaeva, E.G. & Pooggin, M.M. 2012 Sequencing of RDR6-dependent double-stranded RNAs reveals novel features of plant siRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* 40, 6241–6254.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. & Bartel, D.P. 2002 MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616–1626.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. 2008 The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 49, 493–500.
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P.D. 2007 Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130, 299–308.
- Tsuzuki, M., Motomura, K., Kumakura, N. & Takeda, A. 2017 Interconnections between mRNA degradation and RDR-dependent siRNA production in mRNA turnover in plants. *J Plant Res* 130, 211–226.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. & Bartel, D.P. 2004 The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187–1197.
- 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 U S A* 107, 484–489.
- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C. & Chen, X. 2006 Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 580, 3117–3120.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J. & Guo, H. 2015. Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* 348, 120–123.
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.J. & Zhang, X. 2016 *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nat Plants* 2, 16049.