

C型肝炎ウイルス(HCV)複製酵素(NS5B)と制御因子NS5Aの機能解析

著者	村上 清史
著者別表示	Murakami Seishi
雑誌名	平成16(2004)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2002-2004
ページ	7p.
発行年	2005-03
URL	http://doi.org/10.24517/00050054



C型肝炎ウイルス (HCV) 複製酵素 (NS5B) と 制御因子NS5Aの機能解析

(研究課題番号：14370054)

平成14年度～16年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))
成果報告書

平成17年3月

研究代表者 **村上 清史**

(金沢大学がん研究所)

金沢大学附属図書館



0500-04109-1

はしがき

研究組織

研究代表者：村上 清史（金沢大学がん研究所腫瘍分子科学・教授）
研究分担者：林 直之（金沢大学がん研究所腫瘍分子科学・助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	5,000	0	5,000
平成 15 年度	3,800	0	3,800
平成 16 年度	3,100	0	3,100
総 計	11,900	0	11,900

研究発表

(1)学会誌等

- 1) Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 277:2132-37.2002
- 2) Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T, Kobayashi K, Murakami S. Hepatitis C virus NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase NS5B and modulates RdRP activity. *J Biol Chem.*277:11149-55. 2002
- 3)Hayashi N, Murakami S. STM, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein interacts with CDC13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics.* 267:806-13. 2002
- 4)Arai K, Masutomi K, Khruts S, Kaneko S, Kobayashi K, Murakami S. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. *J Biol Chem.* 277:8538-44
- 5)Masutomi K, Kaneko S, Yasukawa M, Arai K, Murakami S, Kobayashi K. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene.*21(38):5946-50.2002
- 6)Hirano M,Kaneko S, Yamashita T, Luo H, Qin W, Shirota Y, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem.*278:5109-15. 2003

- 7)Wei W, Gu JX, Zhu CQ, Sun FY, Dorjsuren D, Lin Y, Murakami S. Interaction with general transcription factor IIF(TFIIF) is required for the suppression of activated transcription by RPB5-mediating protein (RMP). *Cell Research*.13:111-20. 2003
- 8)村上清史、C型肝炎ウイルス非構造(NS5B)のオリゴマー化が複製酵素の活性に必須である。 *Frontier in Gastroenterology*.8:66-7.2003
- 9)Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*.114(2):241-53.2003
- 10)Shikamami T, Hijikata M, Luo H, Ma Y, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on the hepatitis C virus replicon. *J Virol*.78:2738-48. 2004
- 11)Ma Y, Shimakami T, Luo H, Hayashi N, Murakami S. Mutational analysis of hepatitis C virus NS5B in the subgenomic replicon cell culture. *J Biol Chem*.279(24):25474-82.2004
- 12)Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, Kim KR, Yu DY, Murakami S, Kim CW, Kim KW. Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *FASEB J*.18(2):382-84.2004
- 13)Delgermaa L, Hayashi N, Dorjsuren D, Nomura T, Thuy LT, Murakami S. Subcellular localization of RPB5-mediating protein, RMP, and its putative functional partner. *Mol Cell Biol*.24(19):8556-66.2004
- 14)Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem*.279:51508-15.2004
- 15)HBV 蛋白と複製制御。 *日本臨床*、62:26-32,2004
- 16)Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He L, Zhao L, Murakami S. Transcriptional transactivation function of HBx protein is important for the augmentation role in hepatitis B virus replicon. *J Virol*. 79(9) in press. 2005
- 17)Hayashi N, Nomura T, Sakumoto N, Mukai Y, Kaneko Y, Harashima S, Murakami S. The *SIT4* gene, which encodes protein phosphatase 2, is required for telomere function in *saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. in press. 2005

(2)口答発表

- 1)Murakami S. New aspects of hepatitis C virus(HCV) replicase, nonstructural protein 5B(NS5B), in structure and function. Spring meeting of biochemistry society of Republic of Korea. May 18-19,2002
- 2)Luo H, Shimakami T, Ma Y, Murakami S. HCV NS5A modulates RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B through direct binding.9th international meeting on HCV and related viruses at San Diego, USA. July 7-11,2002
- 3)村上清史. Hepatitis B virus (HBV) X protein and transcriptional regulation in which

RPB5 is involved.第 25 回日本分子生物学会年会シンポジウム、12 月 11-14 日、2002 年

4)Murakami S, Novel modulation steps of hepatitis C virus replicase. Invited lecture at Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. May 19,2002

5)Murakami S, Telomerase as a target of drug design. Invited lecture at Medical Unit of Sichuan University. May 31,2002

6)Delgermaa L, Hayashi N, Thuy LT, Nomura T, Murakami S. Interaction factor with RPB5-mediating protein (RPM) which functionally antagonizes transcriptional activation of HBV X protein(HBx).第 61 回日本癌学会総会、10 月 1-3 日、2002 年

7)Luo H, Shimakami T, Ma Y, Shirota Y, Murakami S. Modulation of RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) activity of hepatitis C virus (HCV) NS5B by nonstructural protein NS5A. 第 61 回日本癌学会総会、10 月 1-3 日、2002 年

8)林直之、野村孝弘、作本直子、向由起夫、金子嘉信、原島峻、村上清史。酵母の protein phosphatase knock-out series を使った細胞寿命に関わる信号伝達系の検索。第 25 回日本基礎老化学会、5 月 17-18 日、2002 年

9) Delgermaa L, Hayashi N, Thuy LT, Murakami S. The regulation of subcellular localization of RPB5-mediating protein, RMP.第 25 回日本分子生物学会年会、12 月 11-14 日、2002 年

10)Luo H, Shimakami T, Ma Y, Murakami S. HCV NS5A modulates RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B in the *in vitro* assay using homopolymeric RNA templates.第 25 回日本分子生物学会年会、12 月 11-14 日、2002 年

11)林直之、野村孝弘、作本直子、向由起夫、金子嘉信、原島峻、村上清史。出芽酵母のテロメア機能と細胞寿命に関与する protein phosphatase。第 25 回日本分子生物学会年会、12 月 11-14 日、2002 年

12)村上清史、組換え型ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現精製とその利用。金沢大学がん研究所分子標的薬剤開発センター公開シンポジウム。11 月 1 日、2002 年

13)村上清史、がん領域の分子標的と研究開発。北陸先端科学技術大学院大学・材料科学研究科セミナー&フォーラム。11 月 11-12 日、2002 年

14)Masutomi K, Yu EY, Khruts S, Sheila A, Stewart SA, Ben-Porath I L, Currier JL, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg R, Hahn WC. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. Meeting on telomere and telomerase at Cold Spring Harbor Laboratory, March 31-April 3.2003

15)DeCaprio JA, Masutomi K, Khruts S, Delgermaa L, Murakami S, Hahn WC, Weinberg R. Human nucleorin interacts with hTERT through its C-terminal domain. Meeting on telomere and telomerase at Cold Spring Harbor Laboratory, March 31-April 3.2003

- 16) Tang H, Oishi N, Huang F, Delgermaa L, Zhao L, Murakami S. The important role and functional domain of HBx protein in hepatitis B virus replicon. International meeting on molecular biology of Hepatitis B Virus 2003 at Bergamo, Italy. September 12-15. 2003
- 17) Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, Kim KR, Yu DY, Murakami S, Kim CW, Kim KW. Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1 alpha. International meeting on molecular biology of Hepatitis B Virus 2003 at Bergamo, Italy. September 12-15. 2003
- 18) Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma Y, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. 10th international meeting on Hepatitis C Viruses at Kyoto. December 2-6. 2003
- 19) Ma Y, Shimakami T, Luo H, Hayashi N, Murakami S. Mutational analysis of HCV NS5B in the subgenomic replicon cell culture. 10th international meeting on Hepatitis C Viruses at Kyoto. December 2-6. 2003
- 20) Murakami S. Telomere and telomerase as targets for cancer research. Invited lecturer at Medical school of Beijing University. December 26. 2003
- 21) Murakami S. Hepatitis C virus replication and NS5B. Invited lecturer at School of pharmacy of Seoul University. December 30. 2003
- 22) 島上哲朗、土方誠、ルオホン、マエンエン、下遠野邦忠、金子周一、村上清史。C型肝炎ウイルス(HCV)非構造蛋白(NS)5A と 5B の相互作用はレプリコン系においてその複製に必要である。第 62 回日本癌学会総会、9 月 25-27 日、2003 年
- 23) フルツシラガルディ、増富健吉、デルゲルマルブサンジャバ、村上清史。ヒトテロメラーゼとヒトヌクレオリンの相互作用に関する検討。第 62 回日本癌学会総会、9 月 25-27 日、2003 年
- 24) Delgermaa L, Hayashi N, Murakami S. Functional interaction on RPB5-mediating protein, RMP, and DMAP1 corepressors. 第 26 回日本分子生物学会年会、12 月 10-13 日、2003 年
- 25) 島上哲朗、土方誠、ルオホン、マエンエン、下遠野邦忠、金子周一、村上清史。C型肝炎ウイルス(HCV)レプリコン系を用いた非構造蛋白(NS)5A と NS5B の相互作用の HCV RNA 複製に与える影響に関する検討。第 26 回日本分子生物学会年会、12 月 10-13 日、2003 年
- 26) 林直之、野村孝弘、作本直子、向由起夫、金子嘉信、原島峻、村上清史。細胞老化表現型を指標とした出芽細胞プロテインフォスファターゼ変異の網羅的スクリーニング。第 26 回日本分子生物学会年会、12 月 10-13 日、2003 年
- 27) Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Hahn WC, Murakami S. Direct interaction of telomerase and human nucleorin. 第 26 回日本分子生物学会年会、12 月 10-13 日、2003 年

年

28)Shimakami T, Kaneko S, Murakami S. Effect of nucleorin on HCV RNA replication in HCV subgenomic replicon cells. 11th international symposium on HCV and related viruses at Heidelberg, Germany, October 3-7, 2004

29)唐紅、村上清史。B型肝炎ウイルス X 蛋白の機能。第 40 回日本肝臓学会総会シンポジウム。6月3日 2004 年

30)Delgermaa L, Hayashi N, Nomura T, Thuy LT, Murakami S. Subcellular localization of RPB5-mediating protein RMP, and its putative partner. 第 63 回日本癌学会総会、9月30日 2004 年

31)Thuy LT, Zhang S, Delgermaa L, Hayashi N, Murakami S. ヒト RNA polymerase II サブユニット 5 の変異解析：RAP30 と B 型肝炎ウイルス X 蛋白との相互作用に必要なアミノ酸残基。第 63 回日本癌学会総会、9月30日 2004 年

32)林直之、長浦善一郎、都留崎茜、沖昌也、塚本恭正、小川英行、西谷秀夫、村上清史、西本毅。Ran-RCC1 系のチェックポイントシグナル伝達での機能。第 27 回日本分子生物学会年会、12月8日 2004 年

33)Khruts S, Masutomi K, Delgermaa L, Oishi N, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. Effect of human nucleolin on subcellular localization of telomerase. 第 27 回日本分子生物学会年会、12月9日 2004 年

34)Murakami S, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Tang H. Important role and functional domain of HBx protein in hepatitis B virus replication. 第 27 回日本分子生物学会年会、12月9日 2004 年

研究成果

HCV の持続感染の遮断が肝がん発症のリスクを低下させると期待される。RNA 依存 RNA 合成酵素(RdRP)である NS5B は HCV 複製遮断の有力な標的である。NS5B に集約型(Cm)及び置換型(Pm)変異を導入し RdRP 活性の検討を行い、RdRP 活性に必須な 5 残基を新たに報告した。本研究では、RdRP 活性と構造の研究を進め、NS5B と相互作用する HCV NS5A と宿主蛋白ヌクレオリンの RdRP 活性への影響と、in vitro で得られた知見が HCV 複製に与える影響を解析し、以下の成果を得た。

1) NS5B がオリゴマー化することを見出し、Cm 変異解析によりオリゴマーに必須な 2 残基は、活性中心より離れた RdRP 活性に必須な 2 残基と一致した。これは RdRP 活性にオリゴマー化が必須であることを示した。

2) NS5B と NS5A の特異的結合を見出し、NS5B の 4 配列と NS5A の 2 つの領域が相互作用に必要である。精製 NS5A は少量で RdRP 活性を促進し、多量で RdRP 活性を阻害した。

3) 我々は、ヌクレオリンと NS5B 相互作用を見出し、2 蛋白の相互作用領域を限定した。この結合が NS5B の細胞内局在に影響を与えた。

4) MILE HCV RNA レプリコン系を用いて解析した結果、RdRP 活性に必須な 5 アミノ酸残基が HCV 複製に必須であった。

5) HCV RNA レプリコン系に NS5A の NS5B 結合領域に Cm 或は Pm を導入した解析で、NS5B 結合変異 NS5A では HCV 複製が起きず、NS5A と NS5B との相互作用が HCV 複製に必須であることを強く示唆した。

6) ヌクレオリンと NS5B の相互作用の影響を HCV RNA レプリコン系で検討した。ヌクレオリン結合領域に Cm 或は Pm を持つレプリコンは、HCV 複製が起きないか極端に低下していた。SiRNA 法でヌクレオリン発現が一時的に低下した細胞では、HCV 複製が 1/3-1/4 程度に低下した。