

# C型肝炎ウイルス(HCV)NS5BのRNA合成活性と炎症応答の修飾

著者	村上 清史
著者別表示	Murakami Seishi
雑誌名	平成12(2000)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1999-2000
ページ	10p.
発行年	2001-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00050056">http://doi.org/10.24517/00050056</a>



KAKEN
2000
88

金 沢 大 学

# C型肝炎ウイルス (HCV) NS5BのRNA 依存RNA合成活性と炎症応答の修飾

(課題番号：11694257)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金(基盤B一般(2))  
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 **村上 清史**

(金沢大学がん研究所教授)

金沢大学附属図書館



8000-96515-1

## 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)  
研究分担者 T. B. S. Yen (Dept. Clinical Pathology, Univ. California, San Francisco, USA)  
研究分担者 須田貴司 (金沢大学がん研究所分子標的薬剤開発センター)  
研究分担者 善岡克次 (金沢大学がん研究所細胞制御)  
研究分担者 野村孝弘 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学)  
研究分担者 林 直之 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学)  
(研究協力者 QinWeiping 金沢大学大学院医学研究科大学院生)

### 研究経費

平成 11 年度	3,300 千円
平成 12 年度	2,800 千円

### 研究のまとめ

HCV 慢性炎症の程度と肝発がんのリスクが連関することから、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。HCV は宿主とは異なる RNA 複製過程があり、RNA 複製酵素である NS5B が HCV 複製遮断の有力な標的である。HCV 複製の阻止を目標に、HCV 複製酵素 NS5B の構造と機能の検討と、NS5B の宿主の炎症応答経路への影響の検討を行った。我々は、集約的な及び 1 残基のアラニン置換変異を系統的に導入し、NS5B の諸機能を解析した。その結果 1) NS5B の RNA 依存 RNA 合成(RdRP)活性に必須である 5 アミノ酸残基を新たに特定した(Hepatology, in press)。2) NS5B の RdRP 活性には、鋳型結合能は要求せず、鋳型/primer 結合能を要求した。Y276 が鋳型/primer に必須なアミノ酸残基として特定された。3) 活性中心より離れた RdRP 活性に必須 2 残基が、NS5B の homomeric な相互作用に関わることを見い出し、各種の置換変異を用いて homomeric な作用が RdRP 活性に必須で、この 2 残基は相互作用に直接関わる残基の可能性が強く示唆された。4) NS5B の過剰発現系で炎症関連シス配列 AP-1, NFkB の活性化を認めた。しかしアラニンスキャンで NS5B の特定配列との相関が認められず、発現量によって NS5B の転写活性化効果は変動した。NS5B による炎症関連遺伝子の修飾の可能性はあるが、感染時に HCV の他の蛋白が同時発現する条件で、NS5B の微量発現が今回観察された効果が得られるか否かは今後の検討に残された。

## 研究発表

### 1) 学会誌等で発表

1. T. Nomura, Y. Ling, D. Dorjsuren, S. Ohno, T. Yamashita, S. Murakami. Human Hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells, and active for transactivation. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1453:330-340.
2. Yul, DY., Moon, HB., Son, JK., Jeong, SK., Yu, SL., Yoon, H., Han, YM., Lee, CS., Park, JS., Lee, CH., Hyun, BH., Murakami, S., Lee, KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in the transgenic mice expressing hepatitis B virus X-protein. (1999) *J.Hepatol.* 31:123-132..
3. Ohno, H, Kaneko, S, Lin, Y, Kobayashi, K, Murakami, S. Human hepatitis B virus X protein augments the DNA binding of nuclear factor for IL-6 through its basic-leucine zipper domain. (1999) *J. Med. Virol.*, 58, 11-18.
4. Koyano, S., Ito, M., Takamatsu, N., Shiba, T., Yamamoto, K. and Yoshioka, K. (1999) A novel Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein that enhances the activation of JNK by MEK kinase1 and TGF- $\beta$ -activated kinase1. *FEBS Lett.* 457:385-388.
5. Ito, M.<sup>†</sup>, Yoshioka, K.<sup>\*†</sup>, Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T. and Yamamoto, K. (1999) JSAP1, a novel Jun N-terminal kinase (JNK) that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19:7539-7548.
6. Takao, N., Kato, H., Mori, R., Morrison, C., Sonoda, E., Sun, X., Shimizu, H., Yoshioka, K., Takeda, S. and Yamamoto, K. (1999) Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 18:7002-7009.

7. Zhang, Y., Sun, X., Muraoka, K., Ikeda, A., Miyamoto, S., Shimizu, H., Yoshioka, K. and Yamamoto, K. (1999) Immunosuppressant FK506 activates NF- $\kappa$ B through the proteasome-mediated degradation of I $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 274:34657-34662.
8. Miwa, K., Hashimoto, H., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., and Suda, T., Therapeutic effect of an anti-Fas ligand mAb on lethal graft-versus-host disease. *Int Immunol* 11:925-931, (1999).
9. Saito, I., Haruta, K., Shimuta, M., Inoue, H., Sakurai, H., Yamada, K., Ishimaru, N., Higashiyama, H., Sumida, T., Ishida, H., Suda, T., Noda, T., Hayashi, Y., and Tsubota, K., Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol* 162:2488-2494, (1999)
10. Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyazaki, H., and Hara, N., Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 104:13-19, (1999)
11. S-W. Kee, Y. M. Lee, S-K. Bae, S. Murakami, Y. Yun, K-W. Kim. Human Hepatitis B Virus X protein is a possible mediator of hypoxia induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268:456-461.
12. Kenkichi Masutomi, Shuichi Kaneko, Naoyuki Hayashi, Tatsuya Yamashita, Yukihiro Shirota, Kenichi Kobayashi, and Seishi Murakami. Telomerase Activity Reconstituted *in Vitro* with Purified Human Telomerase Reverse Transcriptase and Human Telomerase RNA Component. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275: 22568-22573.
13. Ikeda, A., Sun, X., Li, Y., Zhang, Y., Eckner, R., Doi, T.S., Takahashi, T., Obata, Y., Yoshioka, K. and Yamamoto, K. (2000) p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF- $\kappa$ B RelA and p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:375-379.

14. Ito, M., Akechi, M., Hirose, R., Ichimura, M., Takamatsu, N., Xu, P., Nakabeppu, Y., Shiba, T., Yamamoto, K. and Yoshioka, K. (2000) Isoforms of JSAP1 scaffold protein generated through alternative splicing. *Gene* 255:229-234.
15. Kuboki, Y., Ito, M., Takamatsu, N., Yamamoto, K., Shiba, T. and Yoshioka, K. (2001) A scaffold protein in the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling pathways suppresses the extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* in press.
16. Qin, W., Yamashita, T., Shiota, Y., Y. Lin, W. Wei, S. Murakami. (2001) Mutational Analysis of the Structure and Functions of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology*, in press.
17. Wei, W., Dorjsuren, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N., Murakami, S. (2001). Direct interaction between the subunit RAP30 of TFIIF and RNA polymerase subunit 5 (RPB5) which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, in press.
18. S. Murakami. Hepatitis B Virus X Protein: Structure, Function and Biology. (1999) *Intervirology*, 42:82-99 .
19. 村上清史 B型肝炎ウイルスX蛋白の発現と機能 *生化学* 71:1309-1326. (1999)
20. 村上清史. B型肝炎ウイルス(HBV)の遺伝子制御 (1999) p227-233, ウイルス肝炎—最新情報、メデイコピア 39、亀田治夫、山中学、河合忠、飯野四郎編.
21. Dorjsuren D., 村上清史. (2000) B型肝炎ウイルス(HBV) Xタンパクに拮抗する新規タンパク RMP. *実験医学* 18:1137-1141
22. 増富健吉、村上清史. (2000) 昆虫細胞発現系を用いたヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現・精製。 *バイオインダストリー*、17:35-42.
23. 村上清史. (2001).ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現・精製とヒトテロメラーゼ活性の試験管内の再構成 (前)。(2001) 印刷中.

24. 村上清史。(2001).ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現・精製とヒトテロメラーゼ活性の試験管内の再構成(後)。(2001)印刷中.

2) 国内外の学会等発表

- (1) D. Dorjsuren, Y. Lin, WX. Wei, T. Yamashita, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami. RMP, a novel RNA polymerase subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. 2nd Kanazawa International Symposium on Cancer. 1999. Feb.24 at Kanazawa.
- (2) N. Hayashi, S. Murakami. STM1, which encodes a binding protein of G:G quadruplex DNA, is involved in telomere structure and DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. A meeting on Telomere and Telomerase at Cold Spring Harbor Laboratory.
- (3) Y. Shiota, T. Yamashita, Q. Weiping, S. Kaneko, K. Kobayashi, and S. Murakami. Hepatitis C Virus NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and augments the RdRP activity. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (4) S. Murakami, T. Yamashita, Y. Shiota, W. Qin, Y. Lin, TBS. Yen, S. Kaneko. Transacting activity of hepatitis C virus NS5B. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (5) W. Qin, T. Yamashita, Y. Shiota, S. Murakami. Effect of alanine scanning mutants on the properties of Hepatitis C Virus NS5B. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (6) T. Yamashita, Kaneko. S., Y. Shiota, M. Hirano, W. Qin, Y., S. Murakami, The new region which affects subcellular localization of Hepatitis C Virus NS5B. 6th International Symp. on Hepatitis C and related viruses at Washington.
- (7) S. Murakami, W. Wei, Y. Yang, Y. Lin, T. Nomura, D. Dorjbal. Transactivation and coactivation functions of Hepatitis Virus X protein. The molecular biology of Hepatitis B Viruses 1999 at Santa Cruz.

- (8) W. Wei, D. Dorjbal, Y. Lin, Y. Yang, S. Murakami. RNA polymerase subunit 5, one of the targets of HBV X protein, interact with TFIIF. The molecular biology of Hepatitis B Viruses 1999 at Santa Cruz.
- (9) D. DORJSUREN, .WEI, Y. Lin, B. Dashnyam, N. Hayashi, and S. Murakami. RNA polymerase subunit 5 (RPB5) functions in activated transcription through interaction with TFIIB. Transcriptional regulation of eukaryotic cells at Cold Spring Harbor Laboratory.
- (10) K. Masutomi, K. Kaneko, N. Hayashi, T. Yamashita, Y. Shirota, K. Kobayashi, S. Murakami. Reconstituted telomerase activity of purified recombinant hTERT and hTR. Miami Symposium at 1999.
- (11) S. Murakami. A modulation mechanism of transcription by Hepatitis B Virus X protein. Lecture at 1999 at Foods and Drugs Administration at Bethesda, USA.
- (12) S. Murakami. Molecular functions of Hepatitis C Virus proteins. Lecture at 1999 at Medical University of Mongolia.
- (13) S. Murakami. Structure and function of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) Lecture at 2000 at Univ. South California
- (14) 山下竜也、代田幸博、村上清史、金子周一。HCV NS5B の細胞内局在に影響を与える領域の同定. 第35回日本肝臓学会総会パラレルシンポ。
- (15) 村上清史。B型肝炎ウイルス(HBV)X蛋白による転写の修飾。日本癌学会シンポジウム『感染症と発がん』
- (16) 村上清史、ウエイウエンシャン、野村孝弘、ドルジスレンドルジバル B型肝炎ウイルス X蛋白のトランス活性化能と転写補助機能第58回日本癌学総会。
- (17) 野村孝弘、ドルジスレン ドルジバル、山下竜也、代田幸博、村上清史 遺伝子導入したヒト B型肝炎ウイルス X蛋白は核でも観察される。第58回日本癌学会総会



- (18) W. Wei, D. Dorjbal, N. Hayashi, T. Nomura, S. Murakami Interaction of general transcription factor TFIIF and RNA polymerase subunit 5.第58回日本癌学会総会
- (19) D. Dorjbal, B. Dashnyam, W. Wei, T. Nomura, S. Murakami Corepression domain of RMP inhibits Hbx transactivation.第58回日本癌学会総会
- (20) W. Qin, T. Yamashita, Y. Shirota, S. Murakami. Mutational analysis of the properties of Hepatitis C Virus NS5B 第23回日本分子生物学会総会、
- (21) 林 直之、村上清史. 出芽酵母 STM1 遺伝子の S 期完了から M 期進行過程における機能第23回日本分子生物学会総会
- (22) 村上清史、Lin Yong, Wei WenXiang, Dorjsuren Dorjbal. B 型肝炎ウイルス X 蛋白の coactivator 能とトランス活性化能第23回日本分子生物学会総会
- (23) K. Masutomi, S. Kaneko, N. Hayashi, T. Yamashita, Y. Shirota, K. Kobayashi, S. Murakami.. Telomerase activity reconstituted in vitro. 2000 Miami Symposium on Biotechnology. Feb. 3, 2000. Miami, U.S.A.
- (24) S. Murakami. Structure and function of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). Invited Lecture at Feb. 5, 2000 at Univ. South California
- (25) W. Qin, T. Yamashita, S. Murakami. Molecular Characterization of HCV RNA Dependent RNA polymerase. Invited lecture at First National Conference “Mongolia towards molecular biology” At Sept.9, 2000 at Ulanbaataar Mongolia.
- (26) L. Delgermaa, B. Dashnyam, L. Delgermaa, T. Nomura, D. Dorjsuren, Wx. Wei, S. Murakami. Function and subcellular localization of RPB5-mediating protein. Invited lecture at First National Conference “Mongolia towards molecular biology” At Sept.9, 2000 at Ulanbaataar Mongolia.
- (27) K. Masutomi, K. Arai, and S. Murakami. Telomerase activity using purified recombinant human telomerase reverse transcriptase (hTERT).Pusan-Kanazawa International Symposium Sept. 26, 2000 at Pusan.

- (28) S. Murakami. Biological Function and Structure of human telomerase reverse transcriptase. Invited lecture at Gwanju University at Sept. 27 in Korea.
- (29) B. Dashnyam, L. Delgermaa, T. Nomura, D. Dorjsuren, Wx. Wei, S. Murakami. Subcellular localization of RMP, which counteracts HBx transactivation. At the 6<sup>th</sup> Asian conference on transcription. Oct. 23-27, 2000, at Beijing China.
- (30) W. Qin, T. Yamashita, H. Shirota, H. Luo, S. Murakami. Molecular Characteristics of HCV NS5B RNA Dependent RNA Polymerase. 7<sup>th</sup> International Conference on Molecular Biology of Hepatitis C Virus and related viruses.
- (31) S. Murakami. Structure and Functions of HCV Replicating Enzyme, NS5B. 3<sup>rd</sup> Kanazawa International Symposium on Cancer. Jan. 10, 2001 at Kanazawa.
- (32) 増富健吉、金子周一、荒井邦明、林 直之、代田幸博、山下竜也、小林健一、村上清史。組み換え型ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現・精製と触媒酵素の再構成。第 59 回日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 - 6 日.横浜.
- (33) 平野正明、山下竜也、代田幸博、野村孝弘、林 直之、村上清史。C 型肝炎ウイルス(HCV)NS5B 蛋白と核小体蛋白 nucleolin の会合。第 59 回日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 - 6 日横浜
- (34) 秦 偉平、村上清史。HCV NS5B RNA 依存 RNA ポリメラーゼの 2 量体化。第 59 回日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 - 6 日横浜
- (35) W. Wei, D. Dorjsuren, T. Nomura, S. Murakami. Mutations of RAP30, a subunit of TFIIF, defects in interaction with human RNA polymerase II subunit 5. 第 59 回日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 - 6 日横浜
- (36) B. Dashnyam, L. Delgermaa, D. Dorjsuren, T. Nomura, W. Wen, S. Murakami. Two regions of RNA polymerase II subunit 5-mediating protein (RMP) are important for the subcellular localization.第 59 回日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 - 6 日横浜

- (37) 林 直之、村上清史。出芽酵母のテロメア領域複製に関与する遺伝子の機能。第23回日本分子生物学会年会。2000年12月13日-16日、神戸。
- (38) W. Wei, D. Dorjsuren, Y. Lin, W. Qin, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami. Human general transcription factor IIF and RNA polymerase II through binding of RAP30 and RPB5.第23回日本分子生物学会年会。2000年12月13日-16日、神戸。
- (39) 荒井邦明、増富健吉、金子周一、小林健一、村上清史。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の多量体形成に関する検討。第23回日本分子生物学会年会。2000年12月13日-16日、神戸。
- (40) W. Qin, T. Yamashita, Y. Shirota, T. Nomura, N Hayashi, H. Luo, S. murakami. Characterization of HCV NS5B RNA dependent RNA polymerase (RdRP).第23回日本分子生物学会年会。2000年12月13日-16日、神戸。
- (41) B. Dashnyam, L. Delgermaa, D. Dorjsuren, T. Nomura, W. Wen, S. Murakami. Subcellular localization of RMP, a RNA polymerase II subunit 5-Mediating Protein. B.第23回日本分子生物学会年会。2000年12月13日-16日、神戸。