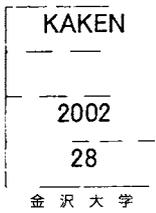


Drug desigins of inhibitors targeted to replicase and replication of Hepatitis C Virus (HCV)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-02-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Murakami, Seishi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050055

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 International License.





C型肝炎ウイルス (HCV) 複製酵素 (NS5B) と複製を標的とした阻害剤 のデザイン開発

研究課題番号 12558084

平成12-14年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))
研究成果報告書

金沢大学附属図書館



0300-02133-X

平成15年3月

研究代表者 村上 清史
(金沢大学がん研究所教授)

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	野村孝弘	(金沢大学がん研究所腫瘍分子科学) (H12-13)
	林 直之	(金沢大学がん研究所腫瘍分子科学) (H14)
	大藤 努	(北斗科学産業株式会社) (H12-13)
	草川貴史	(北斗科学産業株式会社) (H14)
(研究協力者)	Weipin Qin	金沢大学大学院医学研究科大学院生)

研究経費

平成 12 年度	5,500 千円
平成 13 年度	4,100 千円
平成 14 年度	4,100 千円

研究のまとめ

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 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。HCV 複製の阻止を目標に、HCV NS5B の構造と機能の検討を行った。我々は、1) 集約型と点置換アラニン変異を系統的に導入し、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。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(Qin et al., *Hepatology*, 2001)。2) NS5B が homomeric にオリゴマー化することを見い出し、アラニンスキャン法によりオリゴマーに必須な 2 残基を特定した。この 2 残基は活性中心より離れ RdRP 活性に必須な 2 残基と一致した。この 2 残基、E18 と H502、の各種置換変異による解析から、オリゴマー化も RdRP 活性もアミノ酸残基特異性が高いが、この 2 残基の交換が可能である結果を得た(Qin & Luo, et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)。3) In vivo 及び in vitro で NS5B と NS5A の特異的結合を見い出し、集約型アラニン置換変異 NS5B のライブラリーを用いてスキャンし、4 配列が NS5A 結合に必要な領域と限定し、NS5A の 2 つの独立した領域が NS5B 結合に必要なことを同定した(*J. Biol. Chem.*, 2002)。法により各々の結合必要領域を限定した。NS5A が NS5B の RdRP 活性を修飾することを見い出した(Shirota et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 11149-11155)。NS5B の C 端 21 アミノ酸が欠損した NS5Bt は、培養細胞系で GFP 融合型として発現させると、核内に局在し、全長型 NS5B は核周辺の膜成分に局在する。我々は、ヌクレオリンと全長型 NS5B の膜構造での共局在を見い出し、培養細胞系で内在性ヌクレオリンと NS5B 或いは NS5Bt との特異的な結合を見い出した。相互作用の領域は、ヌクレオリンの C 端側の領域に限定され、NS5B では、集約型アラニン置換変異ライブラリーを用いた解析から、2 つの領域に限定され

た。ヌクレオリン結合欠損の NS5B の変異で、全長 NS5B とヌクレオリンの共局在は観察されなかった。部分精製した GST 融合型ヌクレオリンを部分精製して、NS5Bt の RdRP 活性への効果を検討した結果、NS5B 結合性を示すヌクレオリン断片は、量依存的に RdRP 活性を阻害した (Hirano et al., J. Biol. Chem., in press, 2003)。これらの結果は、HCV 複製の阻害剤開発の新たなデザインとして、NS5B のオリゴマー化、NS5A との相互作用、及びヌクレオリン結合領域が標的となる可能性を示唆した。NS5B のオリゴマー化と NS5A 結合領域に関しては、従来の基質アナログとは異なり、HCV 複製酵素に特異的な阻害剤の開発が可能であると考えられる。今後、*in vitro* の RdRP 活性への効果と HCV レプリコン系を用いた HCV 複製複製の効果の比較が必要である。

研究発表

1) 学会誌等で発表

1. 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.
2. Kenkichi Masutomi, Shuichi Kaneko, Naoyuki Hayashi, Tatsuya Yamashita,, Yukihiko 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.
3. Wei, W., Dorjbal, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N., Murakami, S. 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.*, 276:12266-12273, 2001.
4. Qin, W., Yamashita, T., Shirota, Y., Lin, Y., Wei, W., Murakami, S. Mutational analysis of the structure and functions of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology*, 33:728-737, 2001.
5. . Arai, K. Masutomi, S. Khurts, S., Kaneko, K. Kobayashi, S. Murakami. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for their oligomerization and telomerase activity. *J. Biol. Chem.* 277:8536-8544, 2002.
6. Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita Y., Murakami, S. Oligomeric interaction of Hepatitis C Virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 277:2132-2137, 2002.
7. Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, K., Kobayashi, K., Murakami, S. Hepatitis C Virus NS5A Binds RNA-Dependent RNA Polymerase NS5B and modulates RdRP activity. *J. Biol. Chem.*, 277:11149-11155, 2002.
8. Maida Y, Kyo S, Kanaya T, Wang Z, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Ohmichi M, Gotoh N, Murakami S, Inoue M. Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 21(26):4071-4079, 2002
9. 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):5946-5950, 2002.
10. N. Hayashi, S. Murakami. *STMI*, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein interacts with *CDC13* in *Saccharomyces cerevisiae*. (2002) *Mol. Genet. Genomics*. 267: 806-813, 2002.
11. M. Hirano, S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shirota, T. Nomura, K. Kobayashi, S. Murakami. Direct Interaction between nucleolin and Hepatitis C

- Virus NS5B, *J. Biol. Chem.*, 278: 5109-5115.2003.
12. Murakami, S. Hepatitis B Virus X protein: A multifunctional regulatory protein. *J Gastroenterol.* 36:651-660, 2001.
 13. 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
 14. 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.
 15. 村上清史. 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. *教育通信*, (前). 23:24-25, 2001.
 16. 村上清史. 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. *教育通信*, (後). 24:22-23, 2001.
 17. 村上清史. データ解説: C型肝炎ウイルス非構造蛋白(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*, 8:66-67, 2003.

2) 国内外の学会等発表

- (1) 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.
- (2) S. Murakami. Structure and function of Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). Invited Lecture at Feb. 5, 2000 at Univ. South California
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) S. Murakami. Biological Function and Structure of human telomerase reverse transcriptase. Invited lecture at Gwanju University at Sept. 27, 2000 in Korea.
- (7) B. Dashnyam, L. Delgermaa, T. Nomura, D. Dorjsuren, Wx. Wei, S. Murakami. Subcellular localization of RMP, which counteracts HBx transactivation. At the 6th Asian conference on transcription. Oct. 23-27, 2000, at Beijing China.
- (8) W. Qin, T. Yamashita, H. Shirota, H. Luo, S. Murakami. Molecular Characteristics of HCV NS5B RNA Dependent RNA Polymerase. 7th Internatinal Conference on Molecular Biology of Hepatitis C Virus and related

viruses.

- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) W. Wei, D. Dorjsuren, T. Nomura, S. Murakami. Mutations of RAP30, a subunit of TFIIIF, defects in interaction with human RNA polymerase II subunit 5. 第 59 回日本癌学会総会.
- (13) 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
- (14) 林 直之、村上清史。出芽酵母のテロメア領域複製に関する遺伝子の機能。第 23 回日本分子生物学会年会。
- (15) 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。
- (16) 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。
- (17) 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。
- (18) 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。
- (19) S. Murakami. Structure and Functions of HCV Replicating Enzyme, NS5B. 3rd Kanazawa International Symposium on Cancer. Jan. 10, 2001 at Kanazawa.
- (20) K. Arai, K. Masutomi, S. Kaneko, K. Kobayashi, S. Murakami. Analysis of homomeric interaction of human telomerase reverse transcriptase. Telomere and Telomerase. March 29 - April 1, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- (21) W. Wei, D. Dorjsuren, Y. Lin, S. Murakami. Direct interaction between RPB5 and RAP30 is critical for the association of RNA polymerase II and TFIIIF.Mechanism of eukaryotic transcription Aug. 29-Sept2 2001. Cold

Spring Harbor Laboratory, USA.

- (2 2) S. Zhang, W. Wei, L. Dergemaa, T. Le, S. Murakami. DNA-binding ability of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5). Mechanism of eukaryotic transcription Aug. 29-Sept 2 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- (2 3) W. Qin, H. Luo, T. Yamashita, T. Nomura, N. Hayashi, S. Murakami Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural protein 5B (NS5B) is critical to RNA Dependent RNA polymerase. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and related viruses. Sept. 2-5 2001, at Paris France.
- (2 4) M. Hirano, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, Y. Shiota, T. Nomura, K. Kobayashi, S. Murakami. Interaction between nucleolin and Hepatitis C Virus NS5B affects subcellular localization of the truncated NS5B. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and related viruses. Sept. 2-5 2001, at Paris France.
- (2 5) S. Murakami Hepatitis C Virus RNA replication enzyme. Kanazawa International Symposium on Cancer (KISC) III. Jan. 11, 2001 at Kanazawa.
- (2 6) ウエイ ウエンシャン、デルゲルマ ジュフサンジャフ、レイツイ、林 尚之、野村孝弘、村上清史。RNA ポリメラーゼサブユニット 5 (RPB5) と RAP30 の結合は、TFIIF と RNA ポリメラーゼ (Pol II) の会合に関与する。第 60 回日本癌学会総会。
- (2 7) チン ウエイピン、ルオ ホン、島上哲朗、村上清史。C 型肝炎ウイルス (HCV) 非構造蛋白 5B (NS5B) のオリゴマー化は RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRP) 活性に必須である。第 60 回日本癌学会総会。
- (2 8) 荒井邦明、増富健吉、フルツ シラガルデイ、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 60 回日本癌学会総会。
- (2 9) S. Zhang, W. Wei, L. Dergemaa, T. Le, N. Hayashi, S. Murakami. Human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5) exhibits DNA-binding ability. 第 2 4 回日本分子生物学会年会
- (3 0) H. Luo, W. Qin, Y. Ma, T. Shimakami, N. Hayashi, S. Murakami. Dimerization of Hepatitis C Virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase. 第 2 4 回日本分子生物学会年会
- (3 1) 林 尚之、野村孝弘、作本直子、向 由起夫、金子嘉信、原島 俊、村上清史。出芽酵母の protein phosphatase knock-out series を用いた細胞老化形質の解析。第 2 4 回日本分子生物学会年会
- (3 2) 荒井邦明、増富健吉、フルツ シラガルデイ、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 2 4 回日本分子生物学会年会

- (33) Murakami, S. New aspects of Hepatitis C Virus (HCV) replicase, Nonstructural Protein 5B (NS5B), in structure and function. May 18-19, 2002, at the workshop of Spring Meeting of Biochemistry Society of the Republic of Korea, Seoul, Korea.
- (34) Luo, H., Shimakami, T., Ma, Y., Murakami, S. HCV NS5A modulates RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B through direct binding. July 7- 11, 2002 at 9th International Meeting on HCV and related viruses at San Diego, U.S.A.
- (35) Murakami, S. 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、平成14年12月11-14日、横浜。
- (36) Murakami, S. Novel modulation steps of Hepatitis C Virus replicase. at May 19, 2002, Invited lecture at Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology.
- (37) Murakami S. Human Telomerase as a target of drug design. May 31, 2002. Invited lecture at Medical Unit of Sichuan University.
- (38) L. Delgermaa, N. Hayashi, T. T. Thu Le, T. Nomura, S. Murakami Interacting factors with RPB5-mediating protein (RMP) which functionally antagonizes transcriptional activation of HBV X protein (HBx). 第61回日本癌学会総会、平成14年10月1-3日、東京。
- (39) L. Hong, T. Shimakami, Y. Ma, Y. Shirota, S. Murakami. 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、平成14年10月1-3日、東京。
- (40) 林直之、野村孝之、作本直子、向田起夫、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
- (41) L. Delgermaa, N. Hayashi, T.T. Lei, S. Murakami The regulation of subcellular localization of RPB5-mediating protein, RMP. 第25回日本分子生物学会年会、平成14年12月11-14日、横浜。
- (42) L. Hong T. Shimakami, Y. Ma, S. Murakami. 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、平成14年12月11-14日、横浜。
- (43) 林直之、野村孝之、作本直子、向田起夫、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 平成14年
- (44) 村上清史 組み換え型ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の発現精製とその利用。平成14年度金沢大学がん研究所薬剤開発セン

ター公開シンポジウム 平成14年11月1日、金沢。

- (45) 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。平成14年11月1
1-12日、北陸先端科学技術大学院大学