

ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 鈴木 哲朗

研究要旨 HCV IRES 結合ペプチドのスクリーニングを行い、domain IIIa, c, IIId に対する結合ペプチドをそれぞれ同定した。これらのペプチドについて試験管内 IRES 活性測定系で HCV 翻訳阻害作用の評価を開始した。これまでに1種類のペプチドで選択的な HCV IRES 活性の抑制作用が観察された。

分担研究者

(株) 進化創薬 原田 和雄

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。C型肝炎は我が国の国民病とも言われ、現在、HCVキャリアは約200万人とされる。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝臓での年間死亡者は3万人を超える。インターフェロン、リバビリンを基軸とした現行の化学療法では、その有効率は40-50%程度であり、半数以上のC型肝炎患者は、肝臓発症のリスクを避けられない。既存の治療薬とは異なる作用機序を有し、より有効かつ副作用の少ない抗HCV薬が開発されることにより、慢性C型肝炎を制圧し、肝硬変、肝細胞癌の発生を防ぐことが可能となる。高齢化社会をむかえ、より質の高い生活が求められる現在、その社会的要請は極めて高い。

HCVは一本鎖RNAウイルスであり、約3000アミノ酸をコードする読み取り枠の両末端側に非翻訳領域(5'UTRと3'UTR)を有する。感染細胞では、5'UTR内に存在するInternal Ribosome Entry Site(IRES)から翻訳が開始される。また、生成されたウイルス蛋白の持つRNA依存的RNAポリメラーゼ活性によって3'UTRから相補鎖RNAが合成される。すなわち、HCVの生活環において、ウイルスゲノムRNAの5'UTRと3'UTRは非常に重要な役割を果たしている。

本研究では、HCVの複製に必須なウイルスRNA領域に対する、選択性の高い結合ペプチドを創製し、C型肝炎治療薬としての開発を目指す。

B. 研究方法

HCV IRES 遺伝子配列解析

解析に用いた遺伝子配列は HCV Database (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>)より入手した。主成分分析法と多次元尺度構成法を組み合わせた手法(Nuc. Acids Res. 26: 1974-1979 (1998))を用いて配列解析を行った。

HCV RNA 結合ペプチドのスクリーニング

本研究グループが独自に開発したRNA結合ペプチド検出系KAN(Kanamycin antitermination)システム(RNA 9: 252-261 (2003))を用いてHCV RNA結合スクリーニングを行う。

ペプチド・ライブラリーは、ポリアルギニン15残基の各残基を「VVKコドン」(V=C, A, G; K=G, T)を用いて50%の割合でドーピングしたarginine-rich peptide library 2 (ARPL2)をDNA合成機PerSeptive Biosystems, Expedite Nucleic Acid Synthesis System)により作製した。レポーター・プラズミドは、標的RNAを含むオリゴDNAカセットをpACKおよびpAC(LacZ)プラズミドのPstIおよびBamHIを用いて導入した。標的RNAは表1に示した。作製したレポーター・プラズミドは、スクリーニング用大腸菌(N567)に導入後、pACKプラズミドはエレクトロコンピテント細胞とし、pAC(LacZ)はヒート・ショック・コンピテント細胞とし、ペプチドのスクリーニングに用いた。スクリーニングは、典型的には次の4段階で行った。(1)一次セレクション:pACKレポーター・プラズミドを含むN567細胞にペプチド・ライブラリーをエレクトロポレーション法により導入し、得られた $\sim 10^7$ の形質転換体の中から、カナマイシンを含むプレート上で生存した大腸菌を集菌し、ライブラリー・プラズミドを単離する。(2)二次セレクション:単離したライブラリー

を再びレポーター細胞に導入し、カナマイシンを含むプレート上で生存するコロニーからライブラリー・プラズミドを単離する。(3) 三次スクリーニング：単離したライブラリーを pAC(LacZ)レポーター細胞に導入し、X-gal を含むプレート上で青いコロニーからライブラリー・プラズミドを個別に単離する。(4) 特異性チェック：三次スクリーニングにおいて陽性だったクローンの RNA 特異性を個別にテストする。

HCV RNA 結合ペプチドの HCV 翻訳抑制効果

1st cistron (Renilla ルシフェラーゼ) と 2nd cistron (Firefly ルシフェラーゼ) 遺伝子の間に HCV IRES 遺伝子を持つ dicistronic レポータープラスミド pRL/04-Luc を NotI 切断により直鎖化し RNA 合成の鋳型とした。RNA の合成には AmpliScribe T7 High Yield Transcription kit (EPICENTRE) を用いた。合成 IRES RNA とペプチドを種々の濃度で混合し、Rabbit reticulocyte lysate (Promega) を加え 30°C、1 時間で翻訳反応を行った。Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて 2 種類のルシフェラーゼ活性を連続的に定量した。

IRES RNA、コア蛋白と宿主因子との相互作用解析

ヒト肝癌細胞 Huh7 を isotonic buffer で洗浄した後、hypotonic buffer を加えホモジナイズを行った。さらに 10 分の 1 量の incubation buffer: 0.2 M HEPES (pH7.5), 1.2M KCl, 50mM Mg(OAc)₂, 60mM beta-ME を加えた後、10000g, 15 分間の遠心操作を 4 回行った。その上清 (crude S10 分画) と 5'末端をビオチン化した IRES-IIIId RNA (nt 250-281) を混合し、蛋白-RNA 複合体を形成させた後、アビジン化磁気ビーズを加え複合体を回収した。陰性コントロールとして相補鎖 RNA に対する結合蛋白を同様に調製した。これらについて SDS-PAGE を行い IIIId 配列特異的に結合が認められた蛋白を切り出し、ゲル内トリプシン消化後、MALDI-TOF MS により質量分析を行いデータベース検索により蛋白を同定した。HCV コア蛋白との相互作用は、精製コア蛋白を混合した crude S10 分画を免疫沈降 (抗コア抗体) -ウエスタンブロット法 (抗 p54-nrb 抗体) により解析した。

C. 研究結果

HCV 遺伝子型を特徴づける IRES 配列の解析

データベースより入手した遺伝子型の明らかな HCV IRES 遺伝子配列 330 種類について推定される RNA 二次構造毎 (domain I, IIa, IIb, py-I, IIIa-c, IIIId, IIIe-f, IV) に主成分分析法で相関関係を計算した。多次元尺度構成法を利用して得られた相関行列を二次

元平面上に射影した。その結果、domain I の loop、IIa, IIb の stem、IIIa の stem、IIIb の stem 及び loop、IIIId の stem、IV の loop 部分などに遺伝子型選択的な塩基、配列が見出された。この中で domain IIIb 領域は最も遺伝子型に特徴的な配列が多く存在することが明らかとなった。同時に、遺伝子型間でよく保存されている領域が示された。

HCV RNA 結合ペプチドのスクリーニング

HCV IRES の domain IIIa, c (野生型)、IIIa, c mutant、IIIb、IIIId、IIIId- upper に結合するペプチドのスクリーニングを試みた。その結果、ドメイン IIIa, c (野生型)、IIIId、IIIId- upper の場合、細胞 RNA-ペプチド相互作用アッセイにおいて活性を示す陽性クローンが多数同定された。しかしながら、ネガティブ・コントロールとした HIV RRE RNA に対しても活性を示し、標的配列に対する特異性は見られなかった。次に、domain IIIa, c に対して結合活性を示したクローンがコードするペプチドの RNA との親和性を検討する目的で、合成ペプチドとドメイン IIIa, c RNA との結合について Biacore 装置を使って解析した。現在のところ、同定したペプチドが正に荷電したアルギニン残基を多数有するためか、ビオチンを介した基盤との結合が困難となっており、結合能の定量測定について引き続き検討中である。

一方、本研究において用いているファージ λ N タンパク質の作用に関する研究から、標的 RNA をレポーター・プラズミドに導入する際に、長いリンカーを導入することにより活性の向上が期待されたことから、domain IIIa、IIIc、IIIId について、長いリンカーを持つレポーターを作製した。現在、これらの改良型レポーターを用いた RNA 結合ペプチドの ARPL2 からの同定を行っている。

HCV RNA 結合ペプチドの HCV 翻訳抑制効果

HCV IRES 結合ペプチドのスクリーニング (前項) から、stem-loop III 領域に結合するペプチドが同定された。そこで、これらのペプチドについて HCV 翻訳抑制の評価を開始した。現在、試験管内 IRES 活性測定系により合成ペプチド 5 種類の翻訳阻害作用を調べているが、これまでに 1 種類のペプチドで選択的な HCV IRES 活性の抑制、すなわち IRES 活性は抑制するものの Cap-dependent の翻訳には影響を与えないことが観察された。今後、動物細胞内での HCV 翻訳、複製阻害活性を検討していく予定である。

IRES RNA、コア蛋白と宿主因子との相互作用解析

我々はHCV蛋白の中でヌクレオキャプシドを構成するコア蛋白がHCV IRES stem-loop IIIId領域と結合すること、この結合に伴ってIRES活性が抑制されることを見出してきた。そこで、コア蛋白がIIIId領域を介した翻訳調節に対して競合阻害的に働いているのではないかという仮説をたて、この領域に結合しHCVの翻訳調節に関与する因子の同定を試みた。

得られたHCV RNA結合蛋白のうちで、IIIId配列によってcompeteされないもの、および相補鎖配列にも結合の認められたものを排除した後、質量分析を行ったところ、p54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hを同定することができた。これらの蛋白はいずれもmRNAスプライシングなどRNAプロセッシングに関与することが知られているもののこれまで翻訳調節への関与については報告されていない。

次に、同定した蛋白とIRES IIIIdとの結合に対してHCVコア蛋白が及ぼす影響を検討したところ、コア蛋白の量依存的にp54-nrbとIIIId RNAとの複合体量が亢進することが示された。また、IIIId RNA非存在下でp54-nrbとコア蛋白が相互作用しうることが観察された。IRES IIIId上に形成されるコア蛋白・宿主因子複合体によってHCVの翻訳がどのように調節されるのかを明らかにしていきたい。

D. 考察

HCVは遺伝子配列の多様性に富んだウイルスである。RNA結合ペプチドをスクリーニングする際に標的となるHCV RNA配列はHCVの各遺伝子型間でよく保存されていることが望ましい。そこで、多くの情報、変数を持ったデータ間の相互関係をとらえ、複雑なデータが持つ傾向や特徴を要約する目的で使われる多変量解析を利用して、HCV IRES領域の中で各遺伝子型に特徴的な配列はどこか、すべての遺伝子型で保存されている領域はどこか、を検討した。得られた解析結果は、より保存性の高いHCV IRES配列を導入したレポータープラスミドを設計する上で有用な知見となった。

KANシステムによるライブラリースクリーニングでは、ペプチドライブラリー及び標的遺伝子配列をそれぞれ発現する2種類のプラスミドを用いて大腸菌を形質転換させる。標的RNAにペプチドが結合するとアンチターミネーション複合体が形成され、下流域のカナマイシン耐性遺伝子が発現するため、薬剤耐性クローンを選択することができる。更にレポーターのbeta-galactosidase活性を指標とすることでRNA-ペプチド結合を定量的に評価できる。本年度はHCV IRESのstem-loop構造のうち5箇所を標的としてスクリーニングを行い、domain IIIa, c(野生型)、IIIId、IIIId-upper

の標的に対して陽性のクローンが得られた。それぞれのスクリーニングにおいて得られた配列は類似性が見られなかったことから、これらのペプチドが標的RNAと実際に結合する可能性が示唆され、IRES依存的な翻訳阻害剤の開発に繋がることが期待される。

本研究で用いたRNA-ポリペプチド相互作用検出系によるRNA結合ペプチドの同定の成否は、まず、検索可能な人工ペプチド・ライブラリーの中に目的とするペプチドが含まれるか否かに依存している。ここで用いた人工ペプチド・ライブラリーは、アルギニン・リッチ・モチーフ(ARM)に基づいた、ポリアルギニンにアルギニン以外のアミノ酸を「散りばめた」配列の混合物である。ARMはRNAのインターナル・ループ、バルジ、ターミナル・ループ、およびその周辺に結合することがわかっているため、今回の標的RNAを選定する上でこの点について配慮したが、実際の標的と成るか否かについて予想することは現在難しい。また、レポーター・プラスミドにおける標的RNAの空間的な配置がこのアッセイ系における活性に影響することもわかっている。今後は、このような点も踏まえて、標的となるIRES中の特定の二次構造の検索とスクリーニングを行って行く。

E. 結論

1. HCV遺伝子配列の多変量解析により、HCV IRES領域の中で各遺伝子型に特徴的な配列、すべての遺伝子型で保存されている領域を明らかにした。
2. HCV IRESのstem-loop構造のうち5箇所を標的としてRNA結合ペプチドのスクリーニングを行った結果、domain IIIa, c(野生型)、IIIId、IIIId-upperに対して陽性のクローンが認められた。各スクリーニングから得られたペプチド配列には類似性がないことから疑陽性でなく各ペプチドが実際に標的RNAと結合する可能性が示唆された。
3. スクリーニングで同定されたペプチドについて試験管内IRES活性測定系でHCV翻訳阻害作用の評価を開始した。これまでに1種類のペプチドで選択的なHCV IRES活性の抑制作用が観察された。
4. 新たに改良型レポーターを作製し、ペプチドライブラリースクリーニングを開始した。
5. IRES IIIId結合蛋白p54-nrb、PSFおよびhnRNP-Hのうち、p54-nrbはHCVコア蛋白とも相互作用する。IRES IIIId上でコア蛋白・p54-

nrb が複合体を形成する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa T., Fukushima Y., Shiobara Y., Kishimoto T., Tanno S., Shoji I., Suzuki T., Matsui T., Shimada Y., Ohyama T., Nagai R., and Miyamura T. An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, (2005) (in press).

2) Suzuki, T., and Suzuki, R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. *In: FLAVIVIRIDAE: Pathogenesis, Molecular Biology and genetics.* (2005) (in press).

3) Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 79: 1271-1281 (2005).

4) Suzuki T., Suzuki R., Li J., Hijikata M., Matsuda M., Li T-C., Matsuura Y., Mishiro S., and Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.*, 78: 10820-10824 (2004).

5) 鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスと肝発癌 臨床とウイルス 32: 156-162 (2004).

6) 村上恭子, 鈴木哲朗. HCVの新たな感染系及びHCV-RNA複製系の開発動向. ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 増刊号, 62: 111-115 (2004).

7) 相崎英樹, 鈴木哲朗. HCV-RNA複製およびHCV増殖の分子メカニズム. ウイルス性肝炎(上) 日本臨床 増刊号, 62: 81-84 (2004).

8) 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV感染レセプター. 肝疾患 Review 2004. 117-120 (2004).

2. 学会発表

1) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures. 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 2004年12月.

2) 勝二郁夫, 白倉雅之, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 相山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男. MEFタグ精製-プロテオーム解析によるC型肝炎ウイルスCore蛋白新規結合因子の同定. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.

3) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 松田麻未, 森石恆司, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎

ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.

4) 亀岡洋祐, 伊東玲子, 笠間 毅, 鈴木哲朗, 猪原登志子, 武曾恵理, 橋本雄之, 鈴木和男. ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連. 第27回日本分子生物学会年会, 2004年12月.

5) 飯島沙幸, 石井孝司, 李 永仲, 岩田奈織子, 八木慎太郎, 山口健次郎, 榎 昇, 吉崎佐矢香, 町田早苗, 木村展之, 鈴木哲朗, 佐多徹太郎, 宮村達男, 明里宏文. C型肝炎ウイルスのサル病態モデル開発. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

6) 白倉雅之, 勝二郁夫, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 相山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男. MEF tag 精製-プロテオーム解析によるC型肝炎ウイルスCore蛋白新規結合因子の同定. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

7) 森石恆司, 中村理加, 宮本大伸, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 小池和彦, 宮村達男, 松浦善治. HCVコア蛋白質の局在および病原性発現におけるPA28 γ の役割. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

8) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 下池貴志, 森石恆司, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の小胞体, ミトコンドリア, 核への局在を規定するシグナルの解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

9) 村上恭子, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 相崎英樹, 田中恵子, 勝二郁夫, 佐多徹太郎, 鈴木哲朗, 宮村達男. 三次元肝細胞培養システムによるC型肝炎ウイルス(HCV)粒子形成. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

10) 町田早苗, 松井政則, 石井孝司, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 赤塚俊隆. HCV envelope E1 (signal peptide)-E2 をコードするDNAを用いたHCV E2 特異的CTLの誘導. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

11) 石井孝司, 横田恭子, 竹森利忠, 長谷川秀樹, 水谷哲也, 森川 茂, 田口文広, 田代真人, 吉崎佐矢香, 鈴木哲朗, 宮村達男. 高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsのSARS生ワクチンとしての応用. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月.

12) Shirakura, M., Shoji, I., Ichimura, T.,

- Suzuki, R., Suzuki, T., Sugiyama, Y., Shimoji, T., Murakami, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., and Miyamura, T. Proteomic analysis of hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 13) Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Moriishi, K., Watanabe, R., Ishii, K., Numberg, J.H., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 14) Fukasawa, M., Sato, S., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing hepatoma cell lines. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 15) Sakamoto, S., Shiroki, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., and Miyamura, T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 16) Moriishi, K., Mochizuki, R., Abe, T., Mori, Y., Moriya, K., Koike, K., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. PA28gamma-dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 17) Murakami, K., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Tanaka, K., Shoji, I., Sata, T., Suzuki, T., Bartenshlarger, R., and Miyamura, T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004年10月.
- 18) 松浦善治、森屋恭爾、小池和彦、田中啓二、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司. HCV コア蛋白質の成熟および分解の分子機構. 第63回日本癌学会学術総会, 2004年9月.
- 19) Suzuki, T. Assembly of HCV-like particles in the three-dimensional cultures of human hepatoma cells. Fuji Forum 2004. 2004年8月.
- 20) 森屋恭爾、田島 藍、堤 武也、伊藤晃成、三好秀征、藤江 肇、新谷良澄、下池貴志、鈴木哲朗、宮村達男、堀江利治、小池和彦. HCV core 蛋白質はミトコンドリア電子伝達系 complex I 機能を障害する. 第40回日本肝臓学会総会, 2004年6月.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし