

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	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	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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 C型肝炎ウイルス(HCV)増殖に重要なRNA領域に対する特異的結合ペプチドの創薬化を目指す。人工ペプチドライブラリースクリーニングから、HCV 3'UTR stem-loop領域に選択的に結合する3種類のペプチドを得た(特許出願中)。HCV RNA合成開始領域に対して高親和性を有するアミノ酸モチーフが初めて同定された。現在、これらのペプチドのHCV複製阻害効果の解析を進めている。

分担研究者

(株)進化創薬・東京学芸大学
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 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った。

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・プラスミドは、標的RNAを含むオリゴDNAカセットをpACKおよびpAC(LacZ)プラスミドの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・プラスミドは、スクリーニング用大腸菌(N567)に導入後、pACKプラス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・プラスミドを含む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・プラスミドを単離する。(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・プラスミドを単離する。(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・プラス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 Transcripton 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。

HCV コア蛋白による HCV 翻訳阻害機構の解析

コア蛋白の塩基性アミノ酸クラスター変異体を発現するプラスミドは野生型発現 pCAGC191 を基にして、PCR mutagenesis で作製した (pCAGC191m1, -m2, -m3, -m4, -m5, -m6, -m7)。各コア発現プラスミドを HCV IRES レポーター (pHCVLuc) 及び capped-Rluc から合成した RNA とともに HepG2 細胞へトランスフェクションした。2 日後に細胞を回収し 2 種類のルシフェラーゼ活性を測定した。コア蛋白の発現はウエスタンブロット法で解析した。

C. 研究結果

HCV 3'UTR RNA 結合ペプチドのスクリーニング

HCV 3'UTR stem-loop II のターミナルループ領域(以下 SL2) を標的とした ARPL2 からのスクリーニングにおいて、陽性を示すペプチド 9 配列を検出した。これらの候補配列について HIV RRE RNA をネガティブ・コントロールとした特異性試験を行ったところ、5 配列は HIV RRE RNA に対しても活性を示し、1 配列はいずれにおいても活性を示さなかったが、残りの 3 配列は SL2 選択的に活性を示した。また、これら 3 クローンは配列中の特定の位置に共通したアミノ酸残基を有していることから、標的 RNA に特異的に結合する構造的特徴を有することが期待された。そこで、このうち 1 配列をもとにペプチドを化学合成し、ゲルシフトアッセイによって in vitro における標的 RNA との結合を評価している。また、HCV 複製増殖細胞系を用いた薬理効果の評価を行っている。評価にあたって、まず感染細

胞へのペプチドの導入方法の検討を行った。ポリアルギニンを用いた試験において、アルギニンリッチペプチドはそれ自身が細胞内移行性を有するというデータが出ている (Wender et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**: 13003-13008)。そこで、まず蛍光修飾したペプチドを用いて細胞内移行性を評価した。感染モデル細胞の培地中に蛍光修飾したペプチドを添加すると、最終濃度 500nM 以上において、細胞内に蛍光が観察された。このことから、今回検出されたペプチドは十分な細胞内移行性を有しており、薬理活性を試験する上でトランスフェクション等の特別な操作を必要としないことが示唆された。現在薬理効果の試験を行なっている。

また、これまで HCV IRES を標的としてドメイン IIIa, c (野生型)、IIIa, c mutant、IIIb、III d upper に結合するペプチドのスクリーニングを行ってきたが、大腸菌試験細胞内で特異的かつ高い RNA 結合能を有するクローンは得られなかった。そこで、検出用レポータープラスミドの改良を試みた。ドメイン IIIa、IIIc について、標的 RNA をレポーター・プラスミドに導入する際に、リンカー配列を付加した改良型プラスミドを用いてスクリーニングを行なった。これまでのところ、特異性の高い陽性クローンを得るには至っていない。

HCV IRES 結合ペプチドの HCV 翻訳抑制効果

昨年度行った HCV IRES 結合ペプチドのスクリーニングでは、特異性は必ずしも高くないものの stem-loop III 領域に結合するペプチドが同定された。これら 5 種類のペプチドについて、試験管内 IRES 活性測定系により HCV 翻訳抑制の評価を行ったところ、1 種類のペプチドが HCV IRES 活性を有意に阻害し、cap-dependent の翻訳には影響を及ぼさないことが見出された。

HCV コア蛋白による HCV 翻訳阻害機構の解析

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 III d 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。IRES 阻害に必要なコア蛋白配列が明らかになれば、その情報を基にスクリーニングに用いるペプチドライブラリーをデザインすることが可能になる。

コア蛋白には三ヶ所の塩基性アミノ酸クラスター (aa 5-13, 38-43, 58-71) が存在し、RNA との相互作用に関与するものと考えられる。そこで、各クラスターのリジン、アルギニンをアラニンに

置換した変異体を作製し、IRES活性阻害へ及ぼす影響を調べた。その結果、塩基性アミノ酸クラスター三ヶ所のうち一ヶ所または二ヶ所を変異させた6種類のコア蛋白ではIRES阻害作用が認められたのに対し、三ヶ所とも変異させた場合には阻害作用は消失することがわかった。すなわち、クラスターのいずれか一つが存在すれば野生型と同程度の阻害効果を示すことが明らかとなった。

D. 考察

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のRNA複製に重要な3'UTR SL2領域を標的RNAとしてスクリーニングを行い、特異的なRNA結合能を有するペプチド3種類を特定した(特許出願中)。得られたペプチド配列には共通したアミノ酸モチーフがみられることから、標的RNAに選択的に結合し、複製阻害活性を示すことが期待される。

昨年度、5'UTR 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の標的に対して5種類の陽性クローンが得られ、そのうち1種類のペプチドがIRES依存的な翻訳を阻害することがわかった。しかしながら、そのRNA結合性は必ずしもHCV IRES特異的ではなかった。

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、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。既知のIRES結合蛋白の中のIRES結合領域のアミノ酸配列を基にしてライブラリーをデザインすることで、効率よくRNA結合ペプチドが同定できる可能性が考えられる。HCVコア蛋白はIRES stem-loop IIIId領域と結合し翻訳を阻害することを報告しているが、その結合、翻訳阻害に必要な領域が明らかになればペプチド・ライブラリーの改良に繋がるものと期待される。種々のコア変異体を用いた解析からaa 5-13, 38-43, 58-71の各塩基性アミノ酸クラスターがIRES阻害として機能しうることが示された。

E. 結論

HCV 3'UTR SL2領域に対して、特異的に活性を示すペプチド配列を同定した。現在RNAとの結合親和性を

ゲルシフトアッセイを用いて検討している。また、合成ペプチドを用いた薬理活性の評価を進めている。

E. 結論

1. KANシステムによるライブラリースクリーニングから、HCV RNA複製に重要な3'UTR SL2領域と選択的に結合する3種類のペプチドを同定した。
2. HCV IRES結合ペプチド1種類が、試験管内でIRES活性を阻害することを見出した。
3. コア蛋白の塩基性アミノ酸クラスター三ヶ所のうち少なくとも一ヶ所が保存されていれば、HCV IRES活性を阻害しうることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Ishikawa, T., Fukushima, Y., Shiobara, Y., Kishimoto, T., Tanno, S., Shoji, I., Suzuki, T., Matsui, T., Shimada, Y., Ohya, T., Nagai, R., and Miyamura, T. Outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 1087-1093, 2005.
3. Suzuki, T., Omata, K., Satoh, T., Miyasaka, T., Arai, C., Maeda, M., Matsuno, T., and Miyamura, T. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4413-4417, 2005.
4. Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, Y., Suzuki, T., Lai, M. M. C., Miyamura, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through

- interaction with NS5A and NS5B. **J. Virol.** 79, 13473-13482, 2005.
5. Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, and Koike K. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. **J. Hepatol.** 43, 757-763, 2005.
 6. Masumi, A., Aizaki, H., Suzuki, T., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Komuro, K., Fukazawa, H. Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 336, 572-8, 2005.
 7. Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. **Virology** 345: 434-445, 2006.
 8. Murakami, K., Ishii, K., Ishihara, Y., Yoshizaki, S., Tanaka, K., Gotoh, Y., Aizaki, H., Kohara, M., Yoshioka, H., Mori, Y., Manabe, N., Shoji, I., Sata, T., Bartenschlager, R., Matsuura, Y., Miyamura T., and Suzuki, T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. **Virology** (in press).
 9. Iwazaki, T., Li, X, and Harada, K. (2005) "Evolvability of the mode of peptide-binding by an RNA" **RNA**, 11:1364-1373.
 10. Ohmori, R., Hakozaiki, S., and Harada, K. (2005) "Regulation of the structure of RNA assemblies through RNA tertiary interactions" **Nucleic Acids Symp. Ser.**, 49: 193-194.
 11. Li, X., Horiya, S., and Harada, K. (2006) "An efficient thermally induced RNA conformational switch as a framework for the functionalization of RNA nanostructures" **J. Am. Chem. Soc.**, 128: 4035 - 4040.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
出願番号: 2005-300350・石橋 正也、原田 和雄、飛田 高孝、鈴木 哲朗、石井 孝司・RNA結合ペプチド
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社