

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号			
KH11001	バイオフィotonics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	16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司	21
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	30
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	40
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	100
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	126
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	144
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	154
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	168
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	181
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	196
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	208
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	221
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	235
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	247
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	262
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	286
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	300
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	310
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	318

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 …… 344
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 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 独自に開発したKANシステムによりHCV RNA結合ペプチドを同定した。IRES結合ペプチド1種類がHCV IRES活性を阻害し、3'UTR SL2結合ペプチド1種類がHCV RNA複製を抑制することを示した。さらにRNA結合能を高めた進化型SL2結合ペプチドを得ており、抗HCV薬候補として期待される。

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、現在のウイルス保有者数は、我が国に約200万人、世界中には1.7億人(エイズ患者の4倍)にのぼると言われている。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の複製に必要なウイルス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・プラスミドを単離した。(2) 二次セクション: 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・プラスミドを単離した。(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した。(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 SL2 RNA 結合ペプチドの最適化を目指したスクリーニングは以下のように行った。SL2 結合ペプチド配列の中の 17 残基をそれぞれ 20 種類のアミノ酸により 25% の割合でドーピングしたライブラリー DNA を作製し、ペプチド-N 融合タンパク質発現プラスミド (pBR プラスミド) に導入した。この pBR プラスミドを標的 RNA を含む pAC(LacZ)レポーター・プラスミド細胞に導入し、前項と同様に β -ガラクトシダーゼ活性の高いクローンを選択した。

RNA 結合ペプチド発現ベクターの作製

HCV RNA 結合ペプチドの N 末端に HA エピトープタグ配列を付加した融合ペプチドをコードする DNA を合成し、pCAGmcs ベクターの KpnI、BglIII 部位へ挿入した (pCAGHA#5)。陰性コントロールとして、上記 RNA 結合ペプチドとアミノ酸組成を変えずに配列を入れ替えたペプチドを発現するベクターを作製した (pCAGHA#5mut)。

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。

HCV RNA 結合ペプチドの抗 HCV 活性の評価

RNA 結合ペプチドの HCV RNA 複製阻害活性は、HCV サブジェノミックレプリコンを保持するヒト肝がん細胞 Huh-7 由来細胞株 (遺伝子型 1b: Con1 株) にペプチドを種々の濃度で添加し 2 または 4 日間培養した

後、細胞内 HCV RNA をリアルタイム RT-PCR 法で測定することによって評価した。

HCV 粒子産生に対する効果は、感染性 HCV を恒常的に産生する細胞株 (Huh751JFH1Zeo) を用いて行い、ペプチド添加培養後、細胞内の HCV RNA をリアルタイム RT-PCR 法で、また培養上清中のコア蛋白量を ELISA 法でそれぞれ定量した。

HCV 翻訳活性調節に関与するシスエレメントの解析

Renilla ルシフェラーゼと Firefly ルシフェラーゼ遺伝子の間に HCV cDNA nt 1-914 領域遺伝子を持つ dicistronic レポータープラスミドを構築し、さらにその HCV コア領域 (nt 342-914) を塩基置換した種々の変異体を作製した。各プラスミドを直鎖化した後、試験管内で RNA を合成し、Rabbit reticulocyte lysate を加えて翻訳反応を行った。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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントを必要とする材料は含まれない。

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, IIId, 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、IIIc 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 IRES 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、IIIc、IIIc-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、domain IIIa,c (野生型)、IIIc、IIIc-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。この中の多くはネガティブ・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が、IIIa,c に対する結合ペプチド 3 配列 (III-1, -2, -3) 及び IIIc 結合ペプチド 2 配列 (III-4,

-5) でHCV 選択的な結合が認められた。

より特異性の高いペプチドの探索を目指し、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。しかしながら、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 結合ペプチドの抗HCV 活性の評価

HCV IRES結合ペプチド (III-1, -2, -3, -4, -5) 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 (III-5) 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。さらに、このペプチドをHCVレプリコン細胞へ添加し抗HCV作用を検討したがHCVゲノム複製を抑制する効果は認められなかった。

HCV 3'UTR SL2 結合ペプチドのスクリーニング

3'UTR内のSL2に2領域に対する結合ペプチドをアルギニンリッチペプチドコンビナトリアルライブラリーから探索し、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選択的に結合活性を示した。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。

HCV 3'UTR SL2 結合ペプチドの抗HCV 活性の評価

SL2結合ペプチド3配列をそれぞれ発現するプラスミドを作製し、サブジェノミックレプリコン細胞へ導入したところ、1種類のペプチド (#5) でHCVゲノム複製阻害効果が認められた。この#5ペプチドと同様のアミノ酸組成を持ち配列を入れ替えた変異ペプチドではこのような阻害効果は認められなかったため、#5ペプチドによる阻害は、SL2 RNAへの結合によるRNA合成の抑制によることが示唆された。

RNA 結合活性の最適化を目指した HCV SL2 結合ペプチドの再スクリーニング

細胞内 RNA-ポリペプチド相互作用検出系を用いて、SL2 結合ペプチド・ドープ・ライブラリーの中から、SL2 結合ペプチドよりも高い RNA 結合活性を示すペプチドの同定を試みた。その結果、RNA 結合能の指標となる

beta-ガラクトシダーゼ活性が、SL2 結合ペプチド#5 の場合 (2+) と比較して有意に高いクローン (3+ ~ 4+) が複数同定できた。

HCV 翻訳活性調節に關するシスエレメントの解析

HCV IRES活性には5'UTR配列に加えてコア遺伝子の5'末端側12~40塩基が重要であるとされているものの、コア遺伝子が翻訳活性に及ぼす影響については報告内容が一貫しておらず、また詳細な解析も進んでいない。HCV 翻訳活性調節に必要な新たなRNAエレメントが同定されれば、HCV RNA結合ペプチドスクリーニングの新たな標的配列となりうる。種々のコア遺伝子置換変異体を作製し翻訳活性を比較した結果、コア遺伝子のA rich領域 (nt 16-39) をG/Cに置換することによりHCV翻訳活性は有為に低下することがわかった。この領域より下流側は翻訳活性に影響しないことも示された。

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 IIIc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との相互作用に關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-ガラクトシダーゼ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。

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,d 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。

一方、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種類を同定した(特許出願中)。このうち1種類(#5)で、HCV RNA 複製を抑制する可能性が示された。しかしながらその抑制効果は20%程度であり必ずしも十分ではない。細胞免疫染色の結果、細胞内で発現するペプチドは主に核内に存在することから、HCV RNA が複製している細胞質でペプチド-HCV RNA 複合体が形成される効率は高くないことが推定される。スクリーニング系で得られた候補ペプチドを細胞内でHCV RNA 複製、翻訳反応が行われている場に局在化させるためシグナル配列等を導入することで抗HCV 活性を高めることができるかもしれない。また、このペプチド配列を基にした新たなペプチドライブラリーを構築し、HCV SL2 RNA とより強く結合するペプチドの探索を進めている。すでに、プロトタイプ(#5 ペプチド)に比べHCV RNA との結合能が有意に高い「進化型」SL2 結合ペプチドを取得している。これらは、より高い抗HCV 効果が期待できるため、細胞質内に安定に局在化できるようキャリア蛋白との融合蛋白で発現するコンストラクトを作製しHCV RNA 複製、及びウイルス粒子産生に対する阻害効果を検討する予定である。

5'UTRの3'末端から翻訳開始コドンをはさみコア遺伝子の5'末端領域はstem-loop構造をとることが推測される。HCV翻訳活性調節に関与するシスエレメントの解析から、この領域の配列をデザインしたレポーターはRNA 結合ペプチドの探索に有用と考えられた。

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、8種類のHCV RNA 結合ペプチドを同定した(特許出願)。
2. HCV IRES 結合ペプチドのうち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. HCV 3'UTR SL2 結合ペプチドのうち1種類が細胞内でHCV RNA 複製を抑制することを示した。
4. SL2 結合ペプチド・ドープ・ライブラリーの中から、上記SL2 結合ペプチドよりも高いRNA 結合活性を示す「進化型」ペプチドを同定した。
5. HCV 翻訳調節に重要な新規RNA エレメントとして、コア遺伝子の A rich 領域を同定した。RNA 結合ペプチド探索の新たな標的となりうる。

F. 研究発表

論文発表

1. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* (in press).
2. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, and Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1174-1185 (2007).
3. Moriishi K, Suzuki T, Koike K., Matsuura Y., et al. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1661-1666 (2007).
4. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
5. Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim C-K, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.* 80: 11265-11273 (2006).
6. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* 25: 5015-25 (2006).
7. 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* 351: 381-392 (2006).
8. Suzuki T, and Suzuki R. Maturation and assembly

- of hepatitis C virus core protein. In: *Molecular Biology of the Flavivirus*. Horizon bioscience U.K. pp. 295-312 (2006).
9. 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 III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434-445 (2006).
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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).
 16. 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).
 17. 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004. 117-120 (2004).
 18. X. Li, S. Horiya, and K. Harada (2006) An efficient thermally induced RNA conformational switch as a framework for the functionalization of RNA nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 4035 - 4040.
 19. Yano, M. Kunimoto, T. Minami, and K. Harada (2006) Identification of antisense stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50: 77-78 (2006).
 20. Iwazaki, T., Li, X, and Harada, K. (2005) "Evolvability of the mode of peptide-binding by an RNA" *RNA*, 11;1364-1373.
 21. Ohmori, R., Hakoizaki, S., and Harada, K. (2005) "Regulation of the structure of RNA assemblies through RNA tertiary interactions" *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 49: 193-194.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
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18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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