

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年3月30日 (30.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/033409 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/25 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

健司 (ABE, Kenji) [JP/JP]; 〒5660022 大阪府摂津市三島2丁目5番1号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/017518

(22) 国際出願日: 2005年9月22日 (22.09.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-275715 2004年9月22日 (22.09.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP). 塩野義製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 下達野 邦忠 (SHIMOTOHNO, Kunitada) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区聖護院川原町5番3 国立大学法人京都大学ウイルス研究所内 Kyoto (JP). 土方 誠 (HIJIKATA, Makoto) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区聖護院川原町5番3 国立大学法人京都大学ウイルス研究所内 Kyoto (JP). 渡士 幸一 (WATASHI, Koichi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区聖護院川原町5番3 国立大学法人京都大学ウイルス研究所内 Kyoto (JP). 阿部

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ASSAYING ANTI-HCV AGENT WITH USE OF CYCLOPHILIN

(54) 発明の名称: サイクロフィリンを用いた抗HCV剤のアッセイ方法

(57) Abstract: A method of assaying an anti-HCV agent capable of inhibiting the multiplication of hepatitis C virus (HCV); HCV replicon cells capable of repeating the multiplication of HCV; and cultured cells capable of producing HCV. The invention is characterized in that it is carried out in the presence of CyPB.

(57) 要約: C型肝炎ウイルス (HCV) の増殖を阻害する抗HCV剤のアッセイ方法、HCV増殖を再現するHCVレプリコン細胞およびHCVを産生する培養細胞を提供する。本発明は、CyPBの存在下で行うことを特徴とする。

明 細 書

サイクロフィリンを用いた抗HCV剤のアッセイ方法

技術分野

- [0001] 本発明は、C型肝炎ウイルス(以下、「HCV」ともいう)の増殖を阻害する抗HCV剤のアッセイ方法に関し、詳細にはサイクロフィリンB(以下、「CyPB」ともいう)の活性を利用する抗HCV剤の非細胞系または細胞系アッセイ方法に関する。

背景技術

- [0002] HCVは感染後高率に慢性化し、急性肝炎から経過が遷延して慢性肝炎や肝硬変に進展する例が多く、ひいては肝癌へと進展する場合もある。

これらの発症を防ぐには感染早期の段階でHCVを体内から完全に排除する必要がある。抗HCV治療として従来インターフェロン単独療法が施行され、最近ではリバビリンとの併用療法などが行われ、全体の著効率は上昇している。しかし、依然として大半の症例は既存の抗HCV剤に抵抗性である。

HCVの増殖を阻害する抗HCV剤のアッセイを行うため、大量かつ半永久的に培養細胞内でHCV RNAを複製できる画期的なシステム、HCVレプリコンシステム(非特許文献1)が利用されている。しかし、これは、HCV増殖を完全に再現したものではない。HCVレプリコンは、HCVの構造遺伝子を除去したHCVの非構造部分(NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)を含むミニゲノムを含有する。

- [0003] サイクロフィリン(以下、「CyP」ともいう)は臓器移植の際の拒絶反応を抑える免疫抑制剤シクロスポリンA(以下、「CsA」ともいう)の細胞内標的蛋白質として知られている。このCyPは蛋白質のプロリン残基のペプチド結合のシス・トランス異性化反応を触媒するペプチジルプロリル-シス・トランス-イソメラーゼ(以下、「PPIase」という)としても働くことが見いだされている。また、CyPは蛋白質のフォールディング促進やシャペロン様機能を有することが見いだされている。CyPには10種類以上のサブタイプが存在し、このうち細胞内における発現量が高いものがサイクロフィリンA(以下、「CyPA」ともいう)とCyPBである。CyPAは主に細胞質に局在するが、CyPBは主に小胞体に局在することが知られている。

[0004] HCV陽性患者の治療において、CsAとインターフェロン α （以下、「IFN α 」ともいう）との併用療法がIFN α 単独療法よりも有意に抗HCV効果を有することが示されたが（非特許文献2）、その作用機序は不明である。

HCVレプリコン細胞において、CsAはレプリコンRNA複製とHCV蛋白質発現に対して抑制効果を有することが示されたが（非特許文献3）、作用機序は不明である。

CyPBをsiRNAにより発現抑制した場合、HCVレプリコンRNAの複製が低下し、他方CyPAの場合にはRNA複製の低下が殆ど認められないことが示されたが（非特許文献4）、その差異の作用機序は不明である。

HCVレプリコン細胞において、CsAはレプリコンRNA複製を抑制し、他方FK506は抑制しないことが示されたが（非特許文献5）、その差異の作用機序は不明である。

HCV NS5Bは、非細胞系でテンプレートRNA、プライマーRNAおよびMg²⁺存在下でプレインキュベーションすることによりRNA依存性RNA合成酵素（以下、「RdRp」ともいう）活性の上昇、RdRp反応の37℃における安定性向上および抗HCV剤スクリーニングにおける擬陽性の減少などの効果を得ることが示されているが（特許文献1）、細胞内での安定な構造変化に至る機序は不明である。

また、HCVではない他のウイルスヒト免疫不全ウイルス（以下、「HIV-1」ともいう）についてCyP関連として、CyPAとCyPBは共にin vitroにおいてHIV-1 Gag蛋白質に結合することが示されているが（非特許文献6）、HIV-1感染に対する意義は不明である。HIV-1Gag蛋白質と結合してHIV-1粒子内に取り込まれるのはCyPBではなくCyPAが主であった（非特許文献7）。HIV-1の増殖を促進するのは、CyPファミリーの中でCyPAのみであった（非特許文献8）。CyPAの機能は細胞内でHIV-1が増殖するために必須であった（非特許文献9）。これらはいずれも、HIV-1の増殖に関わりがあるのはCyPBではなくCyPAであることを示唆するものである。

[0005] 特許文献1:PCT/JP01/02619(WO 01/77371)

非特許文献1:Lohmann V, et al., Science 285(5424): 110-113, 1999

非特許文献2:J.Gastroenterology 2003 38, 567-572

非特許文献3:Hepatology 2003, 38, 1282-1288

非特許文献4:第26回日本分子生物学会年会、2c/1PA-151、Dec. 10-13, 2003

非特許文献5: Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 313, 42-47

非特許文献6: Cell 1993, 73, 1067-1078

非特許文献7: Nature 1994, 372, 359-362

非特許文献8: EMBO J., 2001, 20, 1300-1309

非特許文献9: Nature Med., 2003, 9, 1138-1143

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、抗HCV剤を探索するための新しいアッセイ方法およびHCV増殖を再現できる培養細胞を提供する。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明は、CyPBが、HCVの非構造部分であるNS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのうち、RNA依存性RNA合成酵素(RdRp)であるNS5Bとのみ結合し、さらに、CyPBがHCV NS5BのRNA伸長活性を亢進させるという驚くべき発見を基礎としている。同じCyPファミリーであるCyPAはNS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのいずれとも結合しない。

- [0008] 即ち、本発明は、

(A) CyPBの存在下で行うことを特徴とする、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法；

具体的には、

(A-1) HCV RdRpとCyPBとを接触させ、次いで被験物質を接触させ、HCV RdRpの酵素活性の阻害を検出する、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法、

(A-2) HCV RdRpと被験物質とを接触させた後に、CyPBを接触させ、HCV RdRpの酵素活性の阻害を検出する、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法、

(A-3) CyPBと配列表の配列番号:1に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの結合の阻害を検出する、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法；

(B) CyPBを強制発現させたHCVレプリコン細胞、およびそれを利用するHCVレプリ

コン阻害物質のアッセイ方法;

(C) CyPBを強制発現させた培養細胞、およびそれを利用するHCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法;および

(D) CyPBを含有する、HCV RdRpの酵素活性亢進剤およびHCV RdRpのRNAに対する結合促進剤;に関する。

発明の効果

- [0009] 本発明は、CyPBがHCVのRdRpであるNS5Bと特異的に結合し、さらにCyPBがHCV NS5BのRdRp活性を亢進させるという驚くべき発見を基礎とするアッセイ方法であり、よってこれまで知られていないユニークなHCV RNA複製阻害物質を提供できる。また、従来と比較してRNA複製を格段に亢進させHCV蛋白質産生量をも増加させるHCVレプリコン細胞およびHCV増殖を完全に再現し感染機能を有するHCVを産生する培養細胞を提供できるため、さらに新たな阻害メカニズムを有する抗HCV剤をアッセイするために有用である。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]CyPAおよびCyPBとHCV由来のNS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bとの結合実験の結果を示す図面に代わる写真である。
- [図2]CyPBとHCV由来のNS5B(1-591)およびNS5B(1-570)との結合実験の結果を示す図面に代わる写真である。
- [図3]CyPBとHCV NS5Bとの結合に対するCsAの効果を示す図面に代わる写真である。
- [図4]HCV NS5BとpolyUとの結合に対するCyPBの効果を示す図面に代わる写真である。
- [図5]HCV NS5B(1-591)の伸長活性に対する種々の蛋白質の効果を示すグラフである。図中、5BはNS5B蛋白質を示す。
- [0011] [図6]HCV RdRp活性に対するCyPAおよびCyPBの効果を示すグラフである。
- [図7]Huh-7細胞と初代肝実質細胞でのCyPB発現量の比較を示す図面に代わる写真である。
- [図8]HCV RdRpによるRNA合成開始反応におけるCyPBの効果を示すグラフである。

[図9]HCV RdRpと1本鎖及び2本鎖のオリゴヌクレオチドとの結合に対するCyPBの効果を示す図面に代る写真である。

[図10]Huh-7レプリコン細胞とCyPBを一過性に発現させたHuh-7レプリコン細胞とのCyPB発現量の比較を示す図面に代る写真である。

[0012] [図11]Huh-7レプリコン細胞とCyPBを一過性に発現させたHuh-7レプリコン細胞とのレプリコンRNA量の比較を示すグラフである。

[図12]Huh-7細胞とCyPBを安定に発現させたHuh-7細胞とのCyPB発現量の比較を示す図面に代る写真である。

[図13]293T細胞とCyPBを安定に発現させた293T細胞とのCyPB発現量の比較を示す図面に代る写真である。

発明を実施するための最良の形態

[0013] (A) CyPBの存在下で行うことを特徴とする、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法

本発明は、CyPBの存在下で行うことを特徴とする、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法に関する。ここに、非細胞系アッセイ方法とは、細胞を使用しないアッセイ方法を意味する。

すなわち、本発明は、HCVのRNA複製との関連が認められるRdRpとCyPBとの一連の相互作用に対する被験物質による影響を調べることにより、HCV RNA複製阻害物質として有効な物質のアッセイを効率的に行うものである。被験物質による影響は、被験物質の非存在下の場合を対照として調べるのが好適である。本発明のアッセイ方法は抗HCV剤の候補物質の薬理評価やスクリーニングに用いることができる。

[0014] 被験物質は、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物(低分子化合物等)、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などのいずれであってもよい。またこれらを含む試料であってもよい。

アッセイに際しての条件は、特に制限されないが、反応温度としては約15℃～約50℃であり、好ましくは20℃～40℃である。またpH条件としては約pH6～約pH9であり、好ましくはpH7～pH8である。

[0015] 本発明においてCyPBとは、蛋白質のプロリン残基のペプチド結合のシス・トランス

異性化反応を触媒するPPIaseとしての、天然のCyPBの性質を有するあらゆるポリペプチドを意味し、これには例えば、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および当該ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:2)において1つまたは数個の置換、欠失および/または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつCyPBとしての性質、すなわちPPIase酵素としての性質を備えた改変ポリペプチドが挙げられる。好ましい改変ポリペプチドは、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと機能的に同等の性質を有する当該改変ポリペプチドである。

本発明に使用するCyPBは当業者に周知の手法により組換え的に調製される。CyPBの全アミノ酸配列(配列番号:2)およびそれをコードするDNA配列はGENBANK番号NM000942のもとで利用可能である。

実施例6より、細胞内では、CyPBが有しているPPIase活性がNS5Bの高次構造変化を触媒するものと考えられる。このことから、細胞内でNS5Bが安定にRNA合成機能を発揮するためには、CyPBがNS5Bと結合し、CyPBのPPIase活性が働く必要があると言える。

[0016] 「HCV RNA 複製阻害物質」とはC型肝炎ウイルス(HCV)RNAの複製の阻害物質である。

HCVの細胞への感染および増殖は、1)吸着、2)侵入、3)アンコーティング(脱殻)、4)蛋白質の翻訳、5)プロセッシング、6)RNA複製、7)ビリオン形成、8)放出の過程を経ることが知られている。

また、HCVレプリコン細胞におけるRNA複製は、上記過程の内、4)蛋白質の翻訳、5)プロセッシング、6)RNA複製の過程を繰り返す。

本発明における「抗HCV物質」とは、上記1)～8)の何れかの過程または複数の過程に渡って作用することにより、HCVの感染と増殖を阻害する物質を意味する。

本発明における「HCVレプリコン阻害物質」とは、上記4)～6)の何れかの過程または複数の過程に渡って作用することにより、HCVレプリコンRNAの複製を阻害する物質を意味する。

[0017] 上記過程6)の「RNA複製」は、1本のプラス鎖RNA(遺伝子)を鋳型として相補するマイナス鎖RNAを合成して2本鎖になったRNAを引き剥がし、さらにマイナス鎖RNA

からプラス鎖RNAを合成するという過程を経て行われる。この時、HCV RNA複製を完遂する為には、RNA合成が十分に進み、鋳型RNAと同じ完全長の相補RNAを合成することが必要である。ここで、HCV RNA合成は、HCV RdRpのRNA合成開始活性とRNA伸長活性により進められる。HCV RdRpが完全なRdRp活性を発揮する為には、適正な高次構造を形成し鋳型RNAと複合体形成することが必要である。そして、HCV RdRpの適正な高次構造の形成の為には、CyPBがHCV RdRpに接触しPPIaseとして働くことが必要である。

本発明における「HCV RNA 複製阻害物質」とは、HCV RdRp阻害物質、すなわちRNA合成開始活性の阻害物質およびRNA伸長活性の阻害物質だけでなく、HCV RdRpの適正な高次構造形成の阻害物質や鋳型RNAとの複合体形成の阻害物質をも含む。

[0018] HCVは1本のプラス鎖RNAゲノムを有する。HCVが増殖するためのゲノム複製は上記の通り、プラス鎖RNAを鋳型としてこれに対応するマイナス鎖RNAが合成され、さらにマイナス鎖RNAからプラス鎖RNAが再合成されることによって行われる。

このプラス鎖RNAゲノムからは10種類の蛋白質が産生されるが、もっとも3'側にコードされている蛋白質がNS5Bである。NS5Bは上記RNA合成反応を触媒するRdRp活性を有する。本明細書において、用語NS5BとRdRpあるいはRNA依存性RNA合成酵素とは同義である。

NS5Bの全アミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列はGENBANK番号(AB080299)のもとで利用可能である。本発明に使用されるNS5Bは当業者に周知の手法により組換え的に調製される。本発明のHCV RdRp(=NS5B)には、配列番号:15に示されるアミノ酸を有するNS5B、およびそれと同等のRNA伸長反応およびRNA合成開始反応における触媒活性を有するあらゆるポリペプチドが含まれる。

[0019] 本発明は、CyPBがNS5Bの特定の部位に結合して(実施例1、2、3参照)NS5Bの構造変化をさせ、RdRpのRNAに対する結合促進およびRdRp活性を上昇させる(実施例4、5、6参照)という、従来では知られていなかった本発明者らの新しい知見に基づく。

[0020] 本発明は一態様として、HCV RdRpとCyPBを接触させ、次いで被験物質を接触さ

せることによりHCV RdRpの酵素活性を基準として、被験物質のHCV RNA複製阻害能を決定するアッセイ方法を提供する((A-1)アッセイ方法)。

このアッセイ方法を用いれば、CyPBがRdRpと接触することにより構造変化した後の機能的に完全なRdRpを用いてHCV RNA複製阻害物質を評価することができる。これは従来の機能的に不完全なRdRpを使用した場合よりも、より生体を反映していると考えられることから新たな抗HCV剤の探索を可能とする。

本発明のアッセイ方法では、HCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性を基準として、被験物質のHCV RNA複製阻害能を評価する。即ち、被験物質非存在下でのHCV RdRpの酵素活性よりも該酵素の酵素活性を低下させる物質を、目的とするHCV RNA複製阻害物質として同定する。

[0021] HCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性にはプライマーを要するRNA伸長活性とプライマーを要しないRNA合成開始活性があるので、これらのHCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性を測定する二種類の(A-1)アッセイ方法が存在する。

具体的には、RNA伸長反応を利用する(A-1)アッセイ方法として、例えば

- (1)HCV RdRp、テンプレート、プライマー、金属イオンおよびCyPBを接触させる工程、
- (2)上記(1)で得られた混合物に被験物質およびNTPを接触させる工程、および
- (3)被験物質非存在下でのHCV RdRpのRNA伸長活性よりも該酵素のRNA伸長活性を低下させる物質を同定する工程、を含むアッセイ方法が挙げられる。

テンプレートとしては、例えばpoly(rA)、poly(rG)、poly(rU)もしくはpoly(rC)などのRNAホモポリマー、またはHCVゲノムRNAなどのRNAヘテロポリマーを利用できる。好ましくはpoly(rA)(Amersham Biosciences)である。プライマーとしては一般には、テンプレートと相補的な配列を有し、長さとしては2~20塩基、好ましくは8~16塩基のものを用いる。金属イオンとしては、例えば、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ などが使用できる。好ましくは $MgCl_2$ である。NTPは通常標識して使用する。このとき標識としては、当業者に周知のものであればよく、好ましくは ^{32}P 、 3H である。

[0022] RNA合成開始反応を利用する(A-1)アッセイ方法として、具体的には、(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、テンプレート、金属イオンおよびサイクロフィリンBを接触

させる工程、

(2) 上記(1)で得られた混合物に被験物質およびNTPを接触させる工程、および

(3) 被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA合成開始活性よりも該酵素のRNA合成開始活性を低下させる物質を同定する工程、を含むアッセイ方法がある。

テンプレートとしては、例えばpoly(rU)もしくはpoly(rC)などのRNAホモポリマー、またはHCVゲノムRNAなどのRNAヘテロポリマーを利用できる。好ましくはpoly(rC)(Amersham Biosciences)である。金属イオンとしては、例えば、 MgCl_2 、 MnCl_2 などが使用できる。好ましくは MgCl_2 である。NTPは通常標識して使用する。このとき標識としては、当業者に周知のものであればよく、好ましくは ^{32}P 、 ^3H である。

[0023] 本発明は別の態様として、HCV RdRpと被験物質とを接触させた後に、CyPBを接触させることにより、HCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性を基準として、被験物質のHCV RNA複製阻害能を決定するアッセイ方法を提供する((A-2)アッセイ方法)。

このアッセイ方法を用いれば、構造変化前のNS5Bに特異的に結合することで、CyPBがNS5Bと結合しても、完全な構造変化を妨害する阻害物質の探索が可能である。その結果として、HCV RNA複製阻害を評価することができる。

本発明のアッセイ方法では、HCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性を基準として、被験物質のHCV RNA複製阻害能を評価する。即ち、被験物質非存在下でのHCV RdRpの酵素活性よりも該酵素の酵素活性を低下させる物質を、目的とするHCV RNA複製阻害物質として同定する。

[0024] HCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性にはプライマーを要するRNA伸長活性とプライマーを要しないRNA合成開始活性があるので、これらのHCV RdRpのRNA依存性RNA合成活性を測定する二種類の(A-2)アッセイ方法が存在する。

具体的には、RNA伸長反応を利用する(A-2)アッセイ方法として、例えば

(1) HCV RdRp、被験物質、テンプレート、プライマーおよび金属イオンを接触させる工程、

(2) 上記(1)で得られた混合物にCyPBおよびNTPを接触させる工程、および

(3)被験物質非存在下でのHCV RdRpのRNA伸長活性よりも該酵素のRNA伸長活性を低下させる物質を同定する工程を含むアッセイ方法が挙げられる。

テンプレートとしては、例えばpoly(rA)、poly(rG)、poly(rU)もしくはpoly(rC)などのRNAホモポリマー、またはHCVゲノムRNAなどのRNAヘテロポリマーを利用できる。好ましくはpoly(rA) (Amersham Biosciences)である。プライマーとしては一般には、テンプレートと相補的な配列を有し、長さとしては2～20塩基、好ましくは8～16塩基のものをを用いる。金属イオンとしては、例えば、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ などが使用できる。好ましくは $MgCl_2$ である。NTPは通常標識して使用する。このとき標識としては、当業者に周知のものであればよく、好ましくは ^{32}P 、 3H である。

[0025] RNA合成開始反応を利用する(A-2)アッセイ方法として、具体的には、

(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、被験物質、テンプレートおよび金属イオンを接触させる工程、
(2)上記(1)で得られた混合物にCyPBおよびNTPを接触させる工程、および
(3)被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA合成開始活性よりも該酵素のRNA合成開始活性を低下させる物質を同定する工程を含むアッセイ方法である。

テンプレートとしては、例えばpoly(rU)もしくはpoly(rC)などのRNAホモポリマー若しくはHCVゲノムRNAなどのRNAヘテロポリマーを利用できる。好ましくはpoly(rC) (Amersham Biosciences)である。金属イオンとしては、例えば、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ などが使用できる。好ましくは $MnCl_2$ である。NTPは通常標識して使用する。このとき標識としては、当業者に周知のものであればよく、好ましくは ^{32}P 、 3H である。

[0026] 本発明はさらなる別の態様として、CyPBと結合することが判明したHCV NS5Bの571-591領域のアミノ酸配列(配列表の配列番号:1)またはその変異配列を含むポリペプチドを利用し、それに対する結合を阻害する阻害物質のアッセイ方法を提供する(A-3)アッセイ方法)。

このアッセイ方法を用いれば、NS5BとCyPBとの結合を阻害することにより、細胞内でNS5Bの機能を安定に発揮させず、HCV RNA複製を抑制する阻害物質の評価が

可能となる。

[0027] 本発明に使用する配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列またはその変異配列を含むポリペプチドにおける「配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列」はHCV NS5Bの571-591領域のアミノ酸配列である。この部分は、CyPBがNS5B(1-591)とは結合するが、NS5B(1-570)とは結合しないこと(実施例2)から、NS5BにおけるCyPBの結合部位と考えられる。

配列番号:1に示すアミノ酸配列の「変異配列」とは、当該アミノ酸配列(配列番号:1)において1つまたは数個の置換、欠失および／または付加を含むアミノ酸配列であって、CyPBとの結合能を保持しているものを意味する。

本アッセイにおいて使用するポリペプチドは通常、NS5Bのアミノ酸配列の571-591領域、好ましくは521-591領域、より好ましくは401-591領域、最も好ましくは1-591領域(配列番号:15)のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは、それらの領域のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。このようなポリペプチドは当業者に周知の手法により組換え的にまたは合成により調製される。

[0028] より具体的には、本アッセイ方法は、例えば

- (1)配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列またはその変異配列を含む、固相化されたポリペプチドと被験物質を接触させる工程、
- (2)上記(1)の後に、CyPBを接触させる工程、
- (3)上記(2)の後に、抗CyPB抗体を接触させる工程、
- (4)上記(3)の後に、標識抗IgG抗体を接触させる工程、
- (5)上記(4)の後に、標識レベルを測定し、該ポリペプチドとCyPBとの結合量を算出する工程、および
- (6)被験物質非存在下で測定されたCyPB量よりも上記CyPB量を低下させる物質を同定する工程、を含む方法が挙げられる。

[0029] 抗体の標識には当業者に周知の種々のもの、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどを利用できる。好ましくはHRPまたはALPである。この場合、本アッセイ方法は、ポリペプチド、被験物質、CyPB、および抗CyPB抗体の混合物とHRP標識抗Ig

G抗体を接触させる工程、得られた混合物とHRPの基質を接触させる工程、次いで吸光度測定し、NS5BとCyPBとの結合量を算出する工程、および被験物質非存在下で測定されたCyPB量よりも上記CyPB量を低下させる物質を同定する工程を含む。

- [0030] あるいは、工程(2)において、CyPBの代わりに、CyPBを含む融合蛋白質を使用しても良い。CyPBに融合させるものとしては、当業者に周知の種々のもの、例えばグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合蛋白質(MBP)、ヒスチジン-タグ、プロテインA、ビオチンなどを利用できる。好ましい融合蛋白質はGST融合CyPB(以下、「GST-CyPB」という)である。GST-CyPBを使用する場合、一次抗体である抗CyPB抗体と二次抗体である標識抗IgG抗体の代わりにHRP標識抗GST抗体を使用することによって、上記工程(2)と工程(3)を1つの工程にまとめることが可能となる。

配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列またはその変異配列を含むポリペプチドの固相への固相化は当業者に周知の手法により行う。

- [0031] (A-1)アッセイ方法は機能的に完全なRdRpに対する阻害物質をアッセイでき、(A-2)アッセイ方法は機能的に不完全なRdRpの構造変化に対する阻害物質をアッセイでき、そして(A-3)アッセイ方法はCyPBとNS5Bとの結合に対する阻害物質をアッセイできる。このように、(A-1)、(A-2)および(A-3)の各アッセイ方法は、それぞれに異なるメカニズムの阻害物質のアッセイ方法である。また、これらのアッセイ方法により得られる阻害物質は夫々にその働くステージが異なるため、これらの阻害物質を併用することによりHCV RNA複製阻害の相乗効果が見込まれる。

- [0032] 上記の各アッセイ方法(スクリーニング方法も含む)により同定(選択)されたHCV RNA複製阻害物質は、HCVの感染・増殖の過程におけるRNA複製阻害のメカニズムにより、HCVの増殖を抑えるための抗HCV剤の有力な候補となりうる。そのため、本発明のアッセイ方法は抗HCV剤のアッセイ方法としても利用することができる。

ここに「抗HCV剤」とは、HCVの感染・増殖を阻害するための医薬組成物における有効成分として利用できる物質を意味する。その医薬組成物の実施態様としては、本発明により得られたHCV RNA複製阻害物質を単独の有効成分として投与する場合のみならず、該HCV RNA複製阻害物質と他の抗ウィルス剤(インターフェロン、リバビリン等)と組み合わせて投与する場合も含まれる。また、本発明の医薬組成物の

対象となる疾患としては例えば、C型肝炎、それに伴う種々の肝疾患(肝硬変、肝ガン等)等が挙げられるが、HCVにより引き起こされる疾患であれば特に限定されない。

[0033] (B) CyPBを強制発現させたHCVレプリコン細胞、およびそれを利用するアッセイ方法

最近になるまでin vitroあるいは細胞内でHCVの複製増殖を効率良く再現できる系はなかったが、近年になり培養細胞内でHCVゲノム様RNAが持続的に自己複製する系が確立された(非特許文献1)。この系をHCVレプリコンシステムと言い、この細胞はHCVレプリコン細胞と呼ばれている。HCVレプリコン細胞は、HCVの構造遺伝子を除去したHCVの非構造部分(NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)を含むミニゲノムを、Huh-7細胞をはじめとする培養細胞に導入することにより樹立される。この系を用いることによりHCVゲノム複製のレベルを簡便に調べる事が可能となる。培養細胞としては、不死化あるいはがん化することにより培養系内で安定的に無限増殖性を獲得した株化細胞を用いる。具体的には、当業者に周知なものとして、例えば、HepG2細胞、Huh-7細胞、Huh-6細胞、Hep3B細胞、HLE細胞、HLF細胞、FLC4細胞、U2OS細胞、PH5CH細胞、IMY細胞、293細胞、HeLa細胞、HeLa S3細胞、MT-2細胞、MT-4細胞、Raji細胞、Daudi細胞、Ramos細胞、JT細胞などを使用する。これらはアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に登録されている。

CyPBはHCV RdRpの酵素活性を上昇させることが判明し(以下の実施例6参照)、このことからCyPBはHCV RNA複製を亢進させHCVの増殖に重要な機能を持つことが予想される。一方、HCVが増殖できるヒトの初代肝実質細胞は高いCyPB発現量を示したのに対し、機能的HCVウイルス粒子の放出がほとんど認められない培養細胞、Huh-7細胞は低いCyPB発現量しか示さなかった(以下の実施例17参照)。これらの結果は、HCVが細胞内で増殖するためには大量のCyPB発現が必要であることを示唆している。

よって、CyPB発現量の少ないHCVレプリコン細胞にCyPBを強制的に大量発現させれば、HCV RdRpの酵素活性が上昇し、HCV レプリコンRNA複製が亢進されるはずである。その結果、細胞中で複製されるレプリコンRNAの定量が容易になった、ア

ッセイの感度、精度および正確度に優れたレプリコン細胞が樹立できる。以上の点で、従来のレプリコン細胞よりも本発明のHCVレプリコン細胞は有益である。ここに、「CyPBを強制発現させた」とは、元のHCVレプリコン細胞の発現レベルよりも高いレベルでCyPBを発現するよう人為的に、例えば遺伝子組換え手法によりCyPBを強制的に発現させることを意味する。

- [0034] HCVレプリコン細胞にCyPBを強制発現させる方法としては、まず、クローニング用大腸菌、当業者に周知なものとして例えば、HB101、JM109、DH5、DH5 α などを使用し、CyPBの蛋白質コード領域(ORF)を挿入した発現用プラスミドDNAを調製する。次に、得られたCyPB発現用プラスミドDNAを当業者に周知のリポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等(例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition」、2001年、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照)によりHCVレプリコン細胞にトランスフェクトする。そして、細胞培養液に抗生物質を添加することによりCyPBを発現しているHCVレプリコン細胞を選択する。抗生物質としては、当業者に周知なものとして、例えばAmpicillin、Hygromycin B、Zeocin、Blasticidin、Neomycin、Kanamycin、Geneticin、Puromycinなどを使用する。好ましくは、異なった作用機作の抗生物質の併用により二重選択が可能で、例えば、ZeocinとGeneticinの併用、ZeocinとHygromycin Bの併用、GeneticinとHygromycin Bの併用などがある。トランスフェクト用のリポフェクション試薬としては、当業者に周知なものとして、例えばFuGENE6(ROCHE)、Lipofectin(Invitrogen)、DMRIE-C(Invitrogen)、Lipofectamine(Invitrogen)、Lipofectamine Plus(Invitrogen)、Lipofectamine2000(Invitrogen)、Effectene(QIAGEN)、SuperFect(QIAGEN)、PolyFect(QIAGEN)、TransFectin(BIORAD)、siLentFect(BIORAD)、LIPOTAXI(TOYOBO)、DOTAP(Biontex)などを使用する。

レプリコン細胞でのCyPB蛋白質の発現の有無は当業者に周知な蛋白質同定方法であるウェスタンブロットリング法などにより確認できる。

- [0035] これらのHCVレプリコン細胞の培養は一般的な条件で行うことが可能であり、一般的な条件は各種の成書(例えば「組織培養の技術」、日本培養学会編、1982年、朝倉書店)に記載されている。細胞培養について簡単に説明すると、ダルベッコ変法イ

ーグル培地やRPMI1640、F-12等の合成培地から適宜選択し、必要であれば、ウシ血清やウシ胎児血清、グルコースやアミノ酸等を適宜加えてもよい。また各種抗生物質を添加しても良い。ただし、これらの抗生物質を添加した培地は、細胞の維持や継代時の培地としては適しているが、アッセイにおいて悪影響を及ぼす可能性がある。従って、本発明のこれらの細胞を用いた抗HCV剤のアッセイを実施する場合にはこれらの添加物を含まない培地に交換して細胞を培養して行うことが望ましい。また、培養温度は25℃～37℃付近、炭酸ガス濃度は5%、細胞の植え込み濃度は $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 細胞/mL、培地交換の頻度は2～5日に一度くらいを目安に行う。

[0036] これらのHCVレプリコン細胞は、従来のHCVレプリコン細胞と比較してRNA複製が格段に亢進し、またHCV蛋白質産生量をも増加しており、遺伝子または蛋白質を高感度に測定するために利用できる。例えば、この細胞の培養液に被験物質を添加した状態で培養し、被験物質非存在状態もしくは対照被験物質を添加した状態、と比較した場合に増減するHCVレプリコン細胞内生物質を指標にすれば、HCVレプリコン阻害物質、ひいては抗HCV剤の高感度のスクリーニングに利用できる。ここで「HCVレプリコン細胞内生物質」は内生の蛋白質または遺伝子である。

[0037] 増減するHCVレプリコン細胞内生物質を蛋白質として測定する方法は公知の方法であるが、抗体などを用いる免疫化学的方法(ELISA法、免疫組織染色法など)やウェスタンブロット法その他の適当な測定法があげられる(例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition」、2001年、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照)。蛋白質を測定する際、蛋白質は、細胞内に含まれるものまたは細胞外に分泌されるもののいずれであってもよく、さらに両者の合計であってもよい。また、細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波または凍結融解などによって細胞を破壊した後、破碎液中の蛋白質を測定することもできる。必要により、破碎液中の蛋白質を分離精製した後に、蛋白質の測定を行ってもよい。

[0038] 増減するHCVレプリコン細胞内生物質を遺伝子として測定する方法は公知の方法であるが、例えば細胞から、総RNAを抽出して逆転写を行い、測定したい蛋白質をコードするcDNA配列から作製したプライマーを使用してPCRにより該遺伝子の転写産物量を測定することができる。この場合ABI PRISM 7700 Sequence Detection System

等の定量的PCRを用いることが好ましい。このときに用いるプライマーは、細胞工学別冊DNAマイクロアレイと最新PCR法、秀潤社2003年等の記載に従って測定対象によって設計・作製する。また、常法(分子細胞生物学基礎実験法、南江堂1994年に記載)またはそれに準じる方法に従って、該遺伝子をコードするDNAの塩基配列を含むポリヌクレオチドを標識して作製したプローブを用いたノザンブロットティング法やDNAチップを用いる方法等によっても測定できる。

[0039] 本発明の細胞を用いてスクリーニング方法を行う場合、目的物質の選別は、被験物質を添加した細胞における上記各蛋白質(遺伝子)の発現レベルが被験物質を添加しない細胞における同蛋白質(遺伝子)の発現レベルに比して変動することをもって、当該被験物質を目的物質として選別することができる。例えば、指標とする蛋白質(遺伝子)発現レベルの変動(抑制・減少または誘導・増加)の程度としては、被験物質を添加した細胞における蛋白質(遺伝子)の発現が被験物質を添加しない対照の細胞での発現量と比較して例えば10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上の減少または増加を示す場合、当該被験物質を目的物質として選別することができる。

[0040] 本発明のHCVレプリコン細胞を用いたHCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法としては、例えば、

- (1) CyPBを強制発現させたHCVレプリコン細胞に被験物質を接触させる工程、
 - (2) 上記(1)の後に、複製されたレプリコンRNAを定量する工程、および
 - (3) 被験物質非存在下で測定されたレプリコンRNA量よりも上記レプリコンRNA量を低下させる物質を同定する工程、
- を含む、HCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法が挙げられる。

[0041] 上記のアッセイ方法(スクリーニング方法も含む)により同定(選択)されたHCVレプリコン阻害物質は、HCVの感染・増殖の過程における、蛋白質翻訳阻害、プロセッシング阻害、RNA複製阻害などのメカニズムにより、HCVの増殖を抑えるため抗HCV剤の有力な候補となりうる。そのため、上記アッセイ方法は抗HCV剤のアッセイ方法としても利用することができる。

ここに「抗HCV剤」とは、HCVの感染・増殖を阻害するための医薬組成物における有効成分として利用できる物質を意味する。その医薬組成物の実施態様としては、

本発明により得られたHCV RNA複製阻害物質を単独の有効成分として投与する場合のみならず、該HCV RNA複製阻害物質と他の抗ウィルス剤（インターフェロン、リバビリン等）と組み合わせて投与する場合も含まれる。また、本発明の医薬組成物の対象となる疾患としては例えば、C型肝炎、それに伴う種々の肝疾患（肝硬変、肝ガン等）等が挙げられるが、HCVにより引き起こされる疾患であれば特に限定されない。

[0042] (C) CyPBを強制発現させた培養細胞、およびそれを利用するアッセイ方法

現在までにHCVが感染し長期に渡って安定に増殖できる培養細胞は存在していない。このことはHCV感染症の治療方法の確立、抗HCV剤、ワクチンの開発研究の障壁となってきた。しかし、上記の通り、CyPBがHCV RdRpの酵素活性を上昇させること（以下の実施例6参照）、およびHCVが増殖できるヒトの初代肝実質細胞が高いCyPB発現量を示したのに対し、HCVが感染増殖できないHuh-7細胞は低いCyPB発現量しか示さなかったこと（以下の実施例17参照）を勘案すれば、CyPB発現量の少ない培養細胞にCyPBを人為的に大量発現させ、HCVを感染させた後のHCV RdRpの酵素活性を上昇させ、そしてHCV遺伝子RNAの複製を亢進させることによって、HCVが増殖する培養細胞が樹立できると考えられる。

[0043] HCVが感染して増殖する培養細胞が樹立できれば、これらの細胞は、HCVに感染しHCV増殖を完全に再現し感染機能を有するHCVを産生するため、レプリコン細胞では不可能であった1)吸着、2)侵入、3)アンコーティング(脱殻)、4)タンパク質の翻訳、5)プロセッシング、6)RNAの複製、7)ビリオン形成、8)放出、のHCV感染のライフサイクルをin vitro実験によって評価することができる。

本発明は、HCVが感染して増殖する培養細胞の樹立を可能とする「CyPBを強制発現させた培養細胞」に関する。

[0044] 「培養細胞」とは上記の通り、不死化あるいはがん化することにより培養系内で安定的に無限増殖性を獲得した株化細胞であり、具体的には当業者に周知であるHepG2細胞、Huh-7細胞、Huh-6細胞、Hep3B細胞、HLE細胞、HLF細胞、FLC4細胞、U2OS細胞、PH5CH細胞、IMY細胞、293細胞、HeLa細胞、HeLa S3細胞、MT-2細胞、MT-4細胞、Raji細胞、Daudi細胞、Ramos細胞、JT細胞などである。これらはアメリカ

ンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に登録されている。

- [0045] 「CyPBを強制発現させた」とは、元の培養細胞の発現レベルよりも高いレベルでCyPBが発現するよう人為的な手法、例えば遺伝子組換え手法によりCyPBを強制的に発現させることを意味する。

培養細胞にCyPBを強制発現させる方法としては、上記のとおり、当業者に周知のリポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

- [0046] 本発明はさらに、CyPBを強制発現させた培養細胞にHCVを感染させることにより得られる、HCVを産生する培養細胞、および該培養細胞にHCVを感染させることを特徴とする、HCVを産生する培養細胞の調製方法に関する。

HCVを産生する培養細胞を得るためには、HCVを培養細胞に感染させる必要がある。そのためには、本発明のCyPBを強制発現させた培養細胞をダルベッコ変法イーグル培地等の通常の発育培地に播種した後、HCV感染患者から得られる血清または血漿を培養液中に添加し、培養温度は25～37℃、好ましくは37℃付近にて、少なくとも0.5時間以上、好ましくは24時間程度培養すれば感染させることが可能となり、HCVを産生する培養細胞を得ることができる。この際、血清を用いる場合、培養液に対して容積比で0.01%～50%、好ましくは1%～5%にて使用し、血漿の場合、培養液に対して容積比で0.01%～2%、好ましくは0.1%～0.5%にて使用する。

- [0047] 本発明の培養細胞は、抗HCV物質のアッセイ方法に利用できる。

このときの細胞の培養条件、細胞を用いたアッセイ方法の条件、および増減する細胞内生物質の測定方法はサイクロフィリンBを強制発現させたレプリコン細胞を用いたHCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法に準ずる。また、本発明の培養細胞は、HCVを産生できることから、増減する細胞内生物質の測定のみならず、増減するHCVを定量することにより、新たな阻害メカニズムの抗HCV剤のスクリーニングや評価が可能になる。このとき、アッセイにおいて増減するHCVの定量方法としては、当業者に周知のウイルス同定方法による(医学ウイルス学 第4版 近代出版)。好ましくは、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)または放射免疫測定法(RIA)を使用してHCV抗原を定量する方法や、リアルタイムRT-PCR等を使用してHCV 遺伝子のコ

ピー数を計測する方法、若しくはウイルスによる細胞変性効果(CPE)を観察する方法などが挙げられる。

- [0048] 抗HCV物質のアッセイ方法の具体的な一例として、
- (1) CyPBを強制発現させた培養細胞と被験物質を接触させる工程、
 - (2) 上記(1)の後に、培養細胞とHCVを接触させる工程、
 - (3) 上記(2)の後に、培養細胞から産生されるHCVを定量する工程、および
 - (4) 被験物質非存在下で測定されたHCV量よりも上記HCV量を低下させる物質を同定する工程、
- を含む、抗HCV物質のアッセイ方法が挙げられる。

- [0049] 上記のアッセイ方法(スクリーニング方法も含む)により同定(選択)された抗HCV物質は、HCVの感染・増殖の過程における、吸着阻害、侵入阻害、アンコーティング(脱殻)阻害、蛋白質翻訳阻害、プロセッシング阻害、RNA複製阻害、ビリオン形成阻害、放出阻害などのメカニズムにより、HCVの増殖を抑えるため抗HCV剤の有力な候補となりうる。そのため、上記アッセイ方法は抗HCV剤のアッセイ方法としても利用することができる。

ここに「抗HCV剤」とは、HCVの感染・増殖を阻害するための医薬組成物における有効成分として利用できる物質を意味する。その医薬組成物の実施態様としては、本発明により得られたHCV RNA複製阻害物質を単独の有効成分として投与する場合のみならず、該HCV RNA複製阻害物質と他の抗ウイルス剤(インターフェロン、リバビリン等)と組み合わせて投与する場合も含まれる。また、本発明の医薬組成物の対象となる疾患としては例えば、C型肝炎、それに伴う種々の肝疾患(肝硬変、肝ガン等)等が挙げられるが、HCVにより引き起こされる疾患であれば特に限定されない。

- [0050] (D) CyPBを含有する、HCV RdRpの酵素活性亢進剤およびHCV RdRpのRNAに対する結合促進剤

この態様においてHCV RdRpの「酵素活性」とは当該酵素におけるRNA伸長活性およびRNA合成開始活性を意味する。この態様の発明は、CyPBがHCV RdRpの酵素活性を亢進させ(実施例5)、さらにCyPBがNS5BとRNAとの結合を促進させる(実

施例4)という本発明者らによる初めての知見に基づく。

この態様において有効成分CyPBとは、蛋白質のプロリン残基のペプチド結合のシス・トランス異性化反応を触媒するPPIaseとしての、天然のCyPBの性質を有するあらゆるポリペプチドを意味し、これには例えば、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および当該ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:2)において1つまたは数個の置換、欠失および／または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつCyPBとして性質、すなわちPPIase酵素としての性質を備えた改変ポリペプチドが挙げられる。好ましい改変ポリペプチドは、配列番号:2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと機能的に同等の性質を有する当該改変ポリペプチドである。

本発明に使用するCyPBは当業者に周知の手法により組換え的に調製される。CyPBの全アミノ酸配列(配列番号:2)およびそれをコードするDNA配列はGENBANK(番号NM000942)のもとで利用可能である。

[0051] HCVは生体内では37℃でHCV遺伝子RNAの複製をしているにもかかわらず、非細胞系アッセイにおいてHCV RdRp単独ではRNA依存性RNA合成反応を37℃で再現することは困難であることが確認されている。この原因として37℃でRdRp活性を安定に維持することが困難であることが挙げられる。つまり生体内での反応を非細胞系で再現することは難しい(特許文献1)。しかし、実施例1～6に示すように、CypBはRdRpが鋳型としてのRNAと結合するのを促進させ、またそのRdRp活性を数倍に増強させ、RNA合成反応を安定化させることができる。よって、HCV RdRpのRNAに対する結合促進剤として、もしくはHCV RdRpの酵素活性亢進剤としてCypBを、トリスバッファ一等の適当な担体に溶解させた状態で、もしくはウシ血清などの適当な安定化剤と共に反応液中に添加することで、アッセイの感度を上昇させることができる。例えば、RdRpに関する非細胞系のスクリーニングに試薬として添加することにより、そのスクリーニング系をより高感度にするのが可能となる。

また適当なベクターに組み込んで細胞中に発現させることにより同様の効果が期待できる。この態様において、本発明はCyPBをコードするDNA配列を含有する、HCV RdRpの酵素活性亢進剤、およびHCV RdRpのRNAに対する結合促進剤を提供する。当該DNA配列は通常、プラスミドに組み込まれている。

実施例

[0052] 以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0053] 参考例1

GST-CyPBの調製

Huh-7細胞(厚生労働省細胞バンク登録番号:JCRB403)の総RNAを使用して、CyPB領域を含むcDNAをRT-PCRにより作製した。そのcDNAを鋳型として、5'-GTTGGATCCGCCATGCTGCGCCTCTCC-3'(配列番号:3)および5'-GTTGAATTCCTCCTTGGCGATGGCAA-3'(配列番号:4)をプライマーとしてPCR増幅を行った。得られたPCR産物を制限酵素BamHIとEcoRIで消化し、結果として得られたCyPB領域を発現ベクターpGEX-6P1(Clontech)のBamHIとEcoRIの位置にサブクローニングした。

構築した発現ベクターを使用し、GST融合したCyPBを大腸菌内で発現させた。細胞抽出液中のGST-CyPBは、グルタチオンセファロース(amersham)に吸着させ、塩化ナトリウム(150mM)、ジチオスレイトール(1mM)、TritonX-100(0.5%)を含むトリス塩酸緩衝液(50mM、pH8.0)で洗浄し、その後、還元型グルタチオン(100mM)、塩化ナトリウム(150mM)、ジチオスレイトール(1mM)、TritonX-100(0.5%)を含むトリス塩酸緩衝液(50mM、pH8.0)により溶出させた。これをグリセロール(50%)、塩化ナトリウム(150mM)、ジチオスレイトール(1mM)、TritonX-100(0.5%)を含むトリス塩酸緩衝液(20mM、pH8.0)で透析した。精製したGST-CyPB液は、アッセイに使用するまで4℃または-20℃にて保存した。

なお、CyPBの発現方法は、この他にバキュロウイルス発現系を使用して昆虫細胞に発現させる方法でも可能である。

[0054] 参考例2

GST-CyPAの調製

5'-GTTGGATCCGCCATGGTCAACCCCACCG-3'(配列番号:5)と5'-GTTGAATTCTTCGAGTTGTCCACAGTC-3'(配列番号:6)をプライマーとしてPCR増幅を行う以外は参考例1記載の手法と同様にして、CyPA領域を発現する発現ベクターを作製し、GST融合したCyPAを大腸菌内で発現させた。

[0055] 参考例3

HCV RdRpの調製

HCV感染者血漿から分離したHCV RNAを使用し、NS5B領域を含むcDNAをRT-PCRにより作製した。そのcDNAを鋳型として、5'-TCTCACGTTGAGTCGTACTCC-3' (配列番号:7) および5'-AAAAAAAAAAGGGATGGCC-3' (配列番号:8)をプライマーとしてPCR増幅を行った。得られたPCR産物を制限酵素NdeIとHindIIIで消化し、結果として得られたNS5B領域を発現ベクターpRSET-C (Promega)のBamHIとEcoRIの位置にサブクローニングした。

構築した発現ベクターを使用し、HCV RdRpを大腸菌内で発現させた。細胞抽出液中のHCV RdRpは、アニオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、poly Uアフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して精製した。精製は約4℃の低温条件で実施し、精製過程や保存の時に酵素濃度を調整するために使用する酵素溶解液として、エチレンジアミン四酢酸(1mM)、ジチオスレイトール(10mM)、グリセロール(20%)を含むトリス緩衝液(pH7.5)を使用した。精製したHCV RdRpは、アッセイに使用するまで4℃または-20℃にて保存した。なお、NS5Bの発現と精製について、当業者に周知の方法として、例えば、ヒスチジン-タグを標識したNS5Bを発現させ、ニッケルキレートカラムを使用して精製する方法も可能である。

[0056] 参考例

GST-CyPB ΔPPIの調製

CyPBのPPIase活性を失活させた変異体であるCyPB ΔPPIは、オーバーラッピングミュータジェネシス法によりCyPBの95番目アルギニンと100番目フェニルアラニンを両方共にアラニンに置換し、参考例1記載の手法と同様にして、GST融合したCyPB ΔPPIを大腸菌内で発現させた(Mol Cell., 2005, 19, 111-22.)。

[0057] 実施例1

NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bに対するCyPAおよびCyPBの結合特性

TNT T7 quick coupled transcription-translation system (Promega)を用いてウサギ網状赤血球溶解物(rabbit reticulocyte lysate)にRedivue [³⁵S]メチオニン(amersham)

、およびpcDNA-NS3 (panel a)、pcDNA- NS4A (panel b)、pcDNA- NS4B (panel c)、pcDNA- NS5A (panel d)あるいはpcDNA-NS5B (panel e)プラスミドを添加し、30 °Cで1.5時間反応させることにより、放射標識in vitro合成蛋白質を調製した(すべてのプラスミドベクターはInvitrogenから購入)。パネル番号および以下のレーン番号は図1中のものである。

参考例2にて調製したGST-CyPA(lane 3)および参考例1にて調製したGST-CyPB(lane 4)あるいは同様に調製したGST (lane 2)に各in vitro合成蛋白質を添加し、4 °Cで1時間攪拌した。遠心後、上清を除去し、結合緩衝液(binding buffer)で4回洗浄した。沈殿画分を試料緩衝液(sample buffer:125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % グリセロール, 0.01 % ブロモフェノールブルー, 10 % 2-メルカプトエタノール)に溶解させた。100 °C, 5分で煮沸させたものを泳動試料(loading sample)とした。

泳動試料あるいは結合反応に用いたin vitro合成蛋白質の1/10量を試料緩衝液に溶かしたインプット試料(input sample:lane 1)をSDS-PAGEでサイズ分画したあと、ゲルをクーマシーブリリアントブルー (CBB)液(0.25 % CBB R-250, 45 % メタノール, 10 % 酢酸)で染色した。脱色液(30 % メタノール, 10 % 酢酸)で脱色後、ゲルドライ溶液(BIO-RAD)で処理し、ゲル乾燥機中でゲルをろ紙にトランスファーした。ろ紙をイメージングプレートに12時間露光し、得られたイメージングプレートをイメージアナライザーBAS5000 (FUJIFILM)で解析した。

結果、CyPAはNS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのいずれとも結合せず、他方、CyPBはNS5Bとは結合するが、NS3、NS4A、NS4BおよびNS5Aとはいずれとも結合しないことが判明した(図1)。

[0058] 実施例2

NS5B(1-591)およびNS5B(1-570)に対するCyPBの結合特性

in vitro合成蛋白質としてNS5Bの全読み取り枠を含むもの(NS5B(1-591)) (panel a)とNS5Bの1から570アミノ酸領域のみを含むもの(NS5B(1-570)) (panel b)を用い、実施例1に記載の手法に実質的に従い、結合実験を行った。

結果、CyPBは、NS5B(1-591)とは結合するが、NS5B(1-570)とは結合しないことが判明した(図2)。

[0059] 実施例3

CyPBとNS5Bとの結合に対するCsAの効果

GST-CyPB液とin vitro合成蛋白質を結合緩衝液内で混ぜる時、これとともにCsAを終濃度各0.8 (lane 4), 4 (lane 5), 8 (lane 6), 16 μ M (lane 7)となるように加える以外は、実施例1に記載の手法に実質的に従い、結合実験を行った。結果を図3に示す。Lane 3はCsAを加えていない。Lane 2はGST-CyPBのかわりにGSTを用いたものである。

これにより、CyPBとNS5Bとの結合は、CyPBのPPIase活性阻害物質であるCsAにより阻害されること、およびNS5BとGST-CyPBの結合(レーン3)はCsAをさまざまな用量で加えた場合にCsAの用量を増やしていくに従って減弱していくことから(レーン4から7)、その阻害は濃度依存的であること、が判明した(図3)。

これまでにCsAはHCV複製を抑制することが分かっている。図3のデータは、CsAによるHCVの複製抑制がCsAがCyPBとNS5Bとの結合を解除することに由来することを示唆している。つまりこのデータは、CyPBとNS5Bとの結合がHCV複製に重要であり、この結合が抗HCV剤開発の標的となることを裏付ける1つの証拠である。

[0060] 実施例4

NS5BとpolyUとの結合に対するCyPBの効果

実施例1と同様にして放射標識NS5Bをin vitro合成した。これと実施例1と同様に調製した組換えGST(lane 3)あるいは／およびGST-CyPB(lane 4から8)を混ぜ、これにpoly-Uセファロース(amersham) (lane 3から8)あるいはプロテインAセファロース(amersham) (lane 2)を加えた。レーン番号は図4中のものである。加えたGST-CyPBの量を図4に示す。また加えた組換え蛋白質はGSTで補正することによりすべてのレーンで4 μ Mとした。これらを結合緩衝液内で4 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した後、遠心し、上清を除去した。結合緩衝液で4回洗浄した。沈殿画分を試料緩衝液に溶解させ、以下実施例1と同様にして結合実験を行った。

結果を図4に示す。NS5Bとpoly-U RNAとの結合(レーン3)は、CyPBをさまざまな量で加えた場合に、CyPBの量を増やしていくにしたがって増強すること(レーン4から7)が観察された。これによりCyPBは、NS5BとRNAとの結合を促進させることが示唆され

た。これはCyPBがNS5BのRdRp活性を亢進する機序のひとつと考えられ、CyPBによるRdRp活性亢進を裏付ける1つのデータである。

[0061] 実施例5

HCV RdRp(1-591)のRNA伸長活性に対するCyPBの効果

参考例1と同様に調製したGST-CyPB液を遠心し、上清を除去した。沈殿画分に10 mMグルタチオン溶液(pH 8.0)を加え、4 °Cで16時間攪拌した。これを遠心し、上清をCyP 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 50 % グリセロール, 0.5 % トリトン X-100, 1 mM DTT)を用いて2回透析した。結果的に調製されたものをCyPB蛋白質液とした。

参考例3で調製したHCV RdRp 50 ng、CyPB 500 ngをポリメラーゼ反応緩衝液 (10 μ g/mL poly-A, 0.1 μ g/mL oligo-U, 0.85 μ M UTP, 4 μ Ci [α -³²P] UTP (Amersham), 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 1 mM EDTA)に加え、全量 40 μ lの系で25 °Cで30分反応させた(lane 3)。またCyPBを加えないもの(lane 2)、CyPBのかわりにGST (lane 4)、あるいはBSA (lane 5)を添加したものを対照として用いた。NS5Bを加えないもの(lane 1)は基礎対照 (basal control)とした。反応後、このうち20 μ lをDEAE膜にスポットし、風乾させた。これを0.5 M Na₂HPO₄ (pH 7.0)で3回洗浄した後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

得られた結果を図5に示す。これより、CyPBはNS5B(1-591)の伸長活性を亢進させることが判明した。

[0062] 実施例6

HCV RdRp活性に対するCyPAおよびCyPBの効果

完全長のHCV RdRp (NN50-1、SH591)並びにC末端51アミノ酸を欠損したHCV RdRp(SH540) (特許文献1またはProtein Expr Purif. 2004 35, 304-312を参照)を使用し、12.5 μ g/mL CyPAまたは12.5 μ g/mL CyPBを添加した場合のRdRp活性を、CyP無添加(ー)の場合のRdRp活性を基準として比較した。RdRp活性は、テンプレートとしてpoly(rA)、プライマーとしてoligo(rU)、基質として³²P-UTPを使用し、生成物に取り込まれた³²P-UMPの放射活性を測定して求めた。

得られた結果を図6に示す。完全長のHCV RdRpは何れのクローンも、CyPAまたは

CyPB存在下では2倍以上のRdRp活性上昇を示した。また、C末端51アミノ酸を欠損したSH540のRdRp活性も、CyPAまたはCyPB存在下では3倍以上のRdRp活性上昇を示した。

CyPAおよびCyPBはPPIase活性を有することが知られている。従って、これらの結果より、組換えRdRpは、CyPAおよびCyPBによりRdRp活性の高い成熟したRdRpにフォーメーディングされる可能性が示唆される。

上記の結果から、RdRpに特異的に結合しそのRdRp活性を阻害するRdRp阻害物質を使用すれば、遺伝子RNAの複製が抑制され、結果としてHCVの増殖が阻害される、と考えられる。

さらには、NS5B(=RdRp)はその他の非構造蛋白質と複合体を形成してRNA合成を進めているので、NS5B(=RdRp)蛋白質自身のRNA合成反応における触媒機能を直接阻害しなくても、その複合体の形成阻害によってもRNA複製は阻害され、また複合体の構成蛋白質のどれかの機能を阻害してもRNA複製は阻害される。このように、結果としてHCVの複製を阻害する物質を、「HCV RNA複製阻害物質」と称している。

[0063] 実施例7

RdRpとCyPBとの複合体形成後における目的物質のアッセイ(1)

まず、工程1～5に使用する水を準備する。使用する水は全てジエチルピロカーボネートでRNA分解酵素の失活処理を行う。ジエチルピロカーボネートによる処理は、ジエチルピロカーボネート(0.1g)を脱イオン水(100mL)に溶解後37℃で24時間放置し、その後120℃で30分間オートクレーブにかけて行う。

工程1: トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)を含有する緩衝液I(10.5 μ l)をポリプロピレン製容器に入れ、ここへpoly(rA)水溶液(100 μ g/mL、10.5 μ l)とoligo(U)12水溶液(1 μ g/mL、10.5 μ l)と水(2.74 μ l)を添加し、緩やかに混和する。ここに、poly(rA)は、アデニル酸のみで構成された単鎖のポリヌクレオチドであり、テンプレートとして使用する。oligo(U)12は、ウリジル酸12分子のみで構成された単鎖のオリゴヌクレオチドであり、プライマーとして使用する。

工程2: 次に、RdRp液(10.5 μ l)とCyPB(5.26 μ l)を工程1の溶液(34.24 μ l)に添

加し、緩やかに混和する。

工程3: ジメチルスルホキシドまたは水で溶解した被験物質(1穴当り $5.26\mu\text{l}$)を分注しておいた96穴マイクロタイタープレートに、工程2の溶液($50\mu\text{l}$)を加える。

工程4: さらに、トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)、UTP(ウリジン三リン酸:基質として使用、 $2.1\mu\text{M}$ 、含 $1\mu\text{Ci } ^3\text{H-UTP}$)を含有する緩衝液II($10.6\mu\text{l}$)と水($39.4\mu\text{l}$)の混合液($50\mu\text{l}$)を添加混和し、 25°C で30分間 酵素反応を行う。

工程5: 酵素反応が30分経過した時、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム水溶液(50mM、 $50\mu\text{l}$)を添加混合し、酵素反応を停止させる。

工程6: 次にセルハーベスターを使用し、ジエチルアミノエチル基を導入したフィルター(以下、DEAE-フィルターマットと略す)上に工程5のサンプル全量に移した後、りん酸ナトリウム緩衝液(0.25 M、pH 7.0)で10秒間のすすぎ洗いを2回と脱イオン水で10秒間のすすぎ洗いを1回行う。

工程7: すすぎ終えたDEAE-フィルターマットを 95°C で15分間乾燥し、液体シンチレータ(10mL)と共にサンプルバッグに入れ密封する。

工程8: シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

工程9: 放射活性計測値(単位;cpm)を以下の計算式に代入して阻害率を求める。

阻害率 = $100 - (\text{被験物質存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})$

$\div (\text{被験物質非存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値}) \times 100$

工程10: 工程9で求めた阻害率と使用した被験物質濃度から50%阻害時の被験物質濃度(IC_{50})を求める。

[0064] 実施例8

RdRpとCyPBとの複合体形成後における目的物質のアッセイ(2)

実施例7と同様、使用する水は全てジエチルピロカーボネートでRNA分解酵素の失活処理を行う。

工程1: トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオス

レイトール (5mM)、塩化カリウム (125mM)、エチレンジアミン四酢酸 (5mM) を含有する緩衝液I (10.5 μ l) をポリプロピレン製容器に入れ、ここへpoly(rC)水溶液 (100 μ g/mL、10.5 μ l) と水 (13.24 μ l) を添加し、緩やかに混和する。poly(rC) はシチジル酸のみで構成された単鎖のポリヌクレオチドであり、テンプレートとして使用する。

工程2: 次に、RdRp液 (10.5 μ l) とCyPB (5.26 μ l) を工程1の溶液 (34.24 μ l) に添加し、緩やかに混和する。

工程3: ジメチルスルホキシドまたは水で溶解した被験物質 (1穴当り5.26 μ l) を分注しておいた96穴マイクロタイタープレートに、工程2の溶液 (50 μ l) を加える。

工程4: さらに、トリス塩酸 (100mM、pH 7.5) および塩化マグネシウム (25mM)、ジチオスレイトール (5mM)、塩化カリウム (125mM)、エチレンジアミン四酢酸 (5mM)、GTP (グアノシン三リン酸; 基質として使用、2.1 μ M、含1 μ Ci 3 H-GTP) を含有する緩衝液II (10.6 μ l) と水 (39.4 μ l) の混合液 (50 μ l) を添加混和し、25°Cで30分間 酵素反応を行う。

工程5: 酵素反応が30分経過した時、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム水溶液 (50mM、50 μ l) を添加混合し、酵素反応を停止させる。

工程6: 次にセルハーベスターを使用し、ジエチルアミノエチル基を導入したフィルター (以下、DEAE-フィルターマットと略す) 上に工程5のサンプル全量に移した後、りん酸ナトリウム緩衝液 (0.25 M、pH 7.0) で10秒間のすすぎ洗いを2回と脱イオン水で10秒間のすすぎ洗いを1回行う。

工程7: すすぎ終えたDEAE-フィルターマットを95°Cで15分間乾燥し、液体シンチレータ (10mL) と共にサンプルバッグに入れ密封する。

工程8: シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

工程9: 放射活性計測値 (単位; cpm) を以下の計算式に代入して阻害率を求める。

$$\text{阻害率} = 100 - \frac{(\text{被験物質存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})}{(\text{被験物質非存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})} \times 100$$

工程10: 工程9で求めた阻害率と使用した被験物質濃度から50%阻害時の被験物質濃度 (IC_{50}) を求める。

[0065] 実施例9

RdRpとCyPBとの複合体形成前においてRdRpに結合する目的物質のアッセイ(1)

実施例7と同様、使用する水は全てジエチルピロカーボネートでRNA分解酵素の失活処理を行う。

工程1: トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)を含有する緩衝液I(10.5 μ l)をポリプロピレン製容器に入れ、ここへpoly(rA)水溶液(100 μ g/mL、10.5 μ l)とoligo(U)12水溶液(1 μ g/mL、10.5 μ l)と水(2.74 μ l)を添加し、緩やかに混和する。ここに、poly(rA)は、アデニル酸のみで構成された単鎖のポリヌクレオチドであり、テンプレートとして使用する。oligo(U)12は、ウリジル酸12分子のみで構成された単鎖のオリゴヌクレオチドであり、プライマーとして使用する。

工程2: ジメチルスルホキシドまたは水で溶解した被験物質(1穴当り5.26 μ l)を分注しておいた96穴マイクロタイタープレートに、工程1の溶液(34.24 μ l)およびRdRp液(10.5 μ l)を加える。

工程3: 次に、CyPB(5.26 μ l)を工程2の溶液(50 μ l)に添加し、緩やかに混和する。

工程4: さらに、トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)、UTP(ウリジン三リン酸:基質として使用、2.1 μ M、含1 μ Ci 3 H-UTP)を含有する緩衝液II(10.6 μ l)と水(39.4 μ l)の混合液(50 μ l)を添加混和し、25°Cで30分間 酵素反応を行う。

工程5: 酵素反応が30分経過した時、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム水溶液(50mM、50 μ l)を添加混合し、酵素反応を停止させる。

工程6: 次にセルハーベスターを使用し、ジエチルアミノエチル基を導入したフィルター(以下、DEAE-フィルターマットと略す)上に工程5のサンプル全量を移した後、りん酸ナトリウム緩衝液(0.25 M、pH 7.0)で10秒間のすすぎ洗いを2回と脱イオン水で10秒間のすすぎ洗いを1回行う。

工程7: すすぎ終えたDEAE-フィルターマットを95°Cで15分間乾燥し、液体シン

チレータ(10mL)と共にサンプルバッグに入れ密封する。

工程8: シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

工程9: 放射活性計測値(単位;cpm)を以下の計算式に代入して阻害率を求める。

$$\text{阻害率} = 100 - \frac{(\text{被験物質存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})}{(\text{被験物質非存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})} \times 100$$

工程10: 工程9で求めた阻害率と使用した被験物質濃度から50%阻害時の被験物質濃度(IC₅₀)を求める。

[0066] 実施例10

RdRpとCyPBとの複合体形成前においてRdRpに結合する目的物質のアッセイ(2)

実施例7と同様、使用する水は全てジエチルピロカーボネートでRNA分解酵素の失活処理を行う。

工程1: トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)を含有する緩衝液I(10.5 μl)をポリプロピレン製容器に入れ、ここへpoly(rC)水溶液(100 μg/mL、10.5 μl)と水(13.24 μl)を添加し、緩やかに混和する。poly(rC)はシチジル酸のみで構成された単鎖のポリヌクレオチドであり、テンプレートとして使用する。

工程2: ジメチルスルホキシドまたは水で溶解した被験物質(1穴当り5.26 μl)を分注しておいた96穴マイクロタイタープレートに、工程1の溶液(34.24 μl)およびRdRp液(10.5 μl)を加える。

工程3: 次に、CyPB(5.26 μl)を工程2の溶液(50 μl)に添加し、緩やかに混和する。

工程4: さらに、トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)、GTP(グアノシン三リン酸;基質として使用、2.1 μM、含1 μCi ³H-GTP)を含有する緩衝液II(10.6 μl)と水(39.4 μl)の混合液(50 μl)を添加混和し、25℃で30分間 酵素反応を行う。

工程5: 酵素反応が30分経過した時、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム水溶液

(50mM、50 μ l)を添加混合し、酵素反応を停止させる。

工程6: 次にセルハーベスターを使用し、ジエチルアミノエチル基を導入したフィルター(以下、DEAE-フィルターマットと略す)上に工程5のサンプル全量に移した後、りん酸ナトリウム緩衝液(0.25 M、pH 7.0)で10秒間のすすぎ洗いを2回と脱イオン水で10秒間のすすぎ洗いを1回行う。

工程7: すすぎ終えたDEAE-フィルターマットを95°Cで15分間乾燥し、液体シンチレータ(10mL)と共にサンプルバッグに入れ密封する。

工程8: シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

工程9: 放射活性計測値(単位;cpm)を以下の計算式に代入して阻害率を求める。

$$\text{阻害率} = 100 - \frac{(\text{被験物質存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})}{(\text{被験物質非存在下の計測値} - \text{酵素非存在下の計測値})} \times 100$$

工程10: 工程9で求めた阻害率と使用した被験物質濃度から50%阻害時の被験物質濃度(IC₅₀)を求める。

[0067] 実施例11

RdRpとCyPBとの複合体形成前においてRdRpに結合する目的物質のアッセイ(3)

実施例7と同様、使用する水は全てジエチルピロカーボネートでRNA分解酵素の失活処理を行う。

Streptavidin SPAビーズ(Amersham Biosciences)にBiotin標識oligoU12(Proligo)を結合させたoligoU12固相化SPAビーズを使用したシンチレーションプロキシミティーアッセイ(SPA)方法により実施する。

工程1: トリス塩酸(100mM、pH 7.5)および塩化マグネシウム(25mM)、ジチオスレイトール(5mM)、塩化カリウム(125mM)、エチレンジアミン四酢酸(5mM)、poly(rA)(20 μ g/mL)を含有する緩衝液Iに、oligoU12固相化SPAビーズ(0.2 μ g/mL相当oligoU12)を添加する。

工程2: ジメチルスルホキシドまたは水で溶解した被験物質(5 μ L)を分注しておいた96穴プレートに、工程1の混合液(50 μ L)を添加し、混和する。

工程3: 次いで、参考例3に記載の方法で調製したRdRp(200 μ g/mL、5 μ L)を37

℃に保温した工程2の96穴プレートに添加し、混和する。

工程4: 更に、参考例1に記載の方法で調製したGST-CyPB (1.4 μ g/mL、20 μ L) を37℃に保温した工程3の96穴プレートに添加し、混和する。

工程5: 工程4の混合溶液にUTP (2 μ M、含1 μ Ci 3 H-UTP) (20 μ L) を添加し、混和後、恒温 (37℃、1時間) する。

工程6: シンチレーションカウンターで放射活性を計測する。

[0068] 実施例12

CyPBを強制発現させた高いRNA複製能を有するHCVレプリコン細胞系の樹立方法

工程1: 参考例1に記載する通り、cDNAから作製したCyPB領域を発現ベクターpGEX-6P1 (Clontech) にサブクローニングして得られたpGEX-CyPBプラスミドDNAから制限酵素BamHIとEcoRIを使用してCyPB ORFを切り出す。

工程2: アガロースゲル電気泳動後、切り出したCyPB ORFのDNAを精製する。

工程3: pcDNA3.1/Zeo(+) 発現ベクター (Invitrogen) のBamHIとEcoRIのクローニングサイトにCyPB ORFを挿入する。

工程4: CyPB ORFを挿入した発現用プラスミドDNAを、アンピシリン存在下で大腸菌DH5 α (TOYOBO) にトランスフェクションし、クローニングする。

工程5: クローニングした組換え大腸菌DH5 α から、pcDNA3.1/Zeo(+)/CyPB プラスミドを精製する。

工程6: FuGENE6 (Roche) を使用して、Huh-7レプリコン細胞 (非特許文献3のp51 31またはJ. Biol. Chem. 2003 278, 50301-50308を参照) にpcDNA3.1/Zeo(+)/CyPB プラスミドをトランスフェクションする。

工程7: 抗生物質ゼオシンとジェネティシン (ともにInvitrogen) 存在下で、トランスフェクションしたレプリコン細胞を選択培養する。

工程8: レプリコン細胞でのCyPB蛋白質の発現の有無をWB法 (ウェスタンブロッティング法) で確認する。

工程9: TaqMan-PCR測定することにより、CyPB蛋白質を恒常発現しているレプリコン細胞とネガティブコントロールトランスフェクションレプリコン細胞とのレプリコンRNA複製量を比較する。

[0069] 実施例13

CyPBを強制発現させたHuh-7細胞を使用するHCV感染細胞系の樹立方法

工程1: pGEX-CyPBプラスミドDNAから制限酵素BamHIとEcoRIを使用してCyPB ORFを切り出す。

工程2: アガロースゲル電気泳動後、切り出したCyPB ORFのDNAを精製する。

工程3: pcDNA3.1/Neo(+) 発現ベクターのBamHIとEcoRIのクローニングサイトにCyPB ORFを挿入する。

工程4: CyPB ORFを挿入した発現用プラスミドDNAを、アンピシリン存在下で大腸菌DH5 α にトランスフェクションし、クローニングする。

工程5: クローニング下組換え大腸菌DH5 α から、pcDNA3.1/Neo(+)/CyPB プラスミドを精製する。

工程6: リポフェクトアミン2000を使用して、Huh-7細胞、HepG2細胞またはMT2細胞にpcDNA3.1/Neo(+)/CyPB プラスミドをトランスフェクションする。

工程7: 抗生物質ジェネティシン存在下で、トランスフェクションした培養細胞を選択培養する。

工程8: 培養細胞内でのCyPB蛋白質の発現の有無をウェスタンブロッティング法で確認する。

工程9: HCV感染患者から得た血清または血漿により感染実験をおこない、CyPB蛋白質を恒常発現している培養細胞とネガティブコントロールトランスフェクション培養細胞とのHCVゲノム複製量を比較する。具体的には、培養細胞を播種した後にHCV感染患者から得た血清または血漿を培養液中に添加する。約24時間後に培養液を除き、さらにPBS緩衝液で洗浄する。血清または血漿を培養液中に添加後、1, 3, 5, 7, 9, 14日などのように経時的に細胞抽出液を回収し、これよりRNAを得る。これらのRNAを鋳型として5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3' (配列番号:9)と5'-AGTACCACAAGGCCTTTTCG-3' (配列番号:10)をプライマーとし、5'-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (配列番号:11)を蛍光プローブとしてリアルタイムRT-PCR法によりHCV RNAゲノムを定量する。詳細は「非特許文献3」(p5 l31)を参照。

[0070] 実施例14

CyPBとNS5Bとの結合に対する阻害物質のアッセイ方法(1)

工程1: EIA用96ウェルプレートに炭酸ナトリウム緩衝液(含0.02% NaN_3 、pH9.6)に溶解したNS5B(50 $\mu\text{g/mL}$)を50 μL 分注し、25°Cで2時間恒温した後、4°C冷蔵保存する。工程2: 使用前に、反応液を吸引除去し、PBS-Tween(100 μL)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程3: PBS-Tween で適当な濃度に希釈した被験物質の試料(含5%DMSO)を50 μL 分注する。

工程4: PBS-Tween で希釈したGST融合CyPB(1 $\mu\text{g/mL}$)を50 μL 分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程5: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween(100 μL)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程6: PBS-Tween で希釈した抗GST抗体(1 $\mu\text{g/mL}$)を50 μL 分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程7: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween(100 μL)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程8: PBS-Tween で希釈したHRP標識抗IgG抗体(1 $\mu\text{g/mL}$)を50 μL 分注し、室温で30分間、穏やかに振盪する。

工程9: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween(100 μL)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程10: PBS-Tween で希釈した基質溶液(8mM ABTS、6mM H_2O_2)を50 μL 分注し、室温で30分間、穏やかに振盪する。

工程11: 0.05% NaN_3 (150 μL)を加え、反応停止する。

工程12: 415nmにて吸光度測定する。

工程13: 対照試料の吸光度と被験サンプルの吸光度とを比較し、CyPBとNS5Bとの結合に対する被験物質の試料の阻害活性を評価する。

[0071] 実施例15

CyPBとNS5Bとの結合に対する阻害物質のアッセイ方法(2)

工程1: スレプトアビジンコーティング96ウェルプレートにビオチン標識NS5B(50

$\mu\text{g}/\text{mL}$)を $50\mu\text{L}$ 分注し、 25°C で2時間恒温し結合させた後、ブロッキング液を $100\mu\text{L}$ 分注し、 4°C 冷蔵保存する。

工程2: 使用前に、ブロッキング液を吸引除去し、PBS-Tween($100\mu\text{L}$)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程3: PBS-Tween で適当な濃度に希釈した被験物質の試料(含5%DMSO)を $50\mu\text{L}$ 分注する。

工程4: PBS-Tween で希釈したGST融合CyPB($1\mu\text{g}/\text{mL}$)を $50\mu\text{L}$ 分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程5: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween($100\mu\text{L}$)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程6: PBS-Tween で希釈したHRP標識抗GST抗体($1\mu\text{g}/\text{mL}$)を $50\mu\text{L}$ 分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程7: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween($100\mu\text{L}$)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程8: PBS-Tween で希釈した基質溶液(8mM ABTS、 6mM H_2O_2)を $50\mu\text{L}$ 分注し、室温で30分間、穏やかに振盪する。

工程9: $0.05\%\text{NaN}_3$ ($150\mu\text{L}$)を加え、反応停止する。

工程10: 415nm にて吸光度測定する。

工程11: 対照試料の吸光度と被験サンプルの吸光度とを比較し、CyPBとNS5Bとの結合に対する被験サンプルの阻害活性を評価する。

[0072] 実施例16

CyPBとペプチド(NS5B;571-591)との結合に対する阻害物質のアッセイ方法

工程1: EIA用96ウェルプレートに炭酸ナトリウム緩衝液(含 $0.02\%\text{NaN}_3$ 、 $\text{pH}9.6$)に溶解したCyPB($50\mu\text{g}/\text{mL}$)を $50\mu\text{L}$ 分注し、 25°C で2時間恒温した後、 4°C 冷蔵保存する。

工程2: 使用前に、CyPB液を吸引除去し、PBS-Tween($100\mu\text{L}$)の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程3: PBS-Tween で適当な濃度に希釈した被験物質の試料(含5%DMSO)を5

0 μ L分注する。

工程4: PBS-Tween で希釈したビオチン標識ペプチド(NS5B;571-591) (0.01 μ g/mL)を50 μ L分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程5: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween (100 μ L) の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程6: PBS-Tween で希釈したストレプトアビジン標識HRP (0.1 μ g/mL)を50 μ L分注し、室温で1時間、穏やかに振盪する。

工程7: 反応液を吸引除去し、PBS-Tween (100 μ L) の添加と吸引除去操作を3回繰り返す。

工程8: PBS-Tween で希釈した基質溶液(8mM ABTS、6mM H₂O₂)を50 μ L分注し、室温で30分間、穏やかに振盪する。

工程9: 0.05%NaN₃ (150 μ L)を加え、反応停止する。

工程10: 415nmにて吸光度測定する。

工程11: 対照試料の吸光度と被験サンプルの吸光度とを比較し、CyPBとNS5Bとの結合に対する被験サンプルの阻害活性を評価する。

[0073] 実施例17

Huh-7細胞と初代肝実質細胞でのCyPB発現量の比較試験

まず、ヒト初代肝実質細胞を分離した。肝臓切片をメスで適当な大きさに切断し、血管をUW 溶液 (4℃)で約15分還流し、除血した。溶液 I (10 mM HEPES, 1 mg/mL グルコース, 0.2 mg/mL EGTA, 0.01 mg/mL ゲンタマイシン(Hanks溶液中)) (37℃)で約15分還流した。次いで、溶液 II (10 mM HEPES, 0.5 mg/mL コラゲナーゼ, 0.6 mg/mL CaCl₂, 0.01 mg/mL ゲンタマイシン(Hanks溶液中)) (37℃)で約15分還流した。

被膜を切開し、溶液 III (10 mM HEPES, 10 mg/mL BSA, 0.01 mg/mL ゲンタマイシン(Hanks溶液中)) (37℃)中で振盪し、肝臓内の細胞を遊離させた。得られた懸濁液を0.25 μ mメッシュでろ過し(粗懸濁液)、これを50 G, 2minの遠心で分画し、上清を除いて沈殿を得た(肝実質細胞画分)。これを溶液 IIIで50 G, 2minの遠心で3回洗浄し、細胞数、生存率をカウントした。次いで、被検溶解緩衝液(sample buffer; 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % グリセロール, 0.01 % ブロモフェノールブルー,

10 % 2-メルカプトエタノール)で溶解させた。

次いで、当業者に周知な蛋白質同定方法であるウエスタンブロッティング法によりCyPB発現量を示す図7を得た。

この結果は、Huh-7細胞におけるCyPB発現量が初代肝細胞におけるそれよりも明らかに低いことを示している。

[0074] 実施例18

HCVレプリコン細胞を用いた抗HCV剤のアッセイ

96ウェル細胞培養プレートにおいて、ウシ胎児血清(2%)、MEM非必須アミノ酸溶液(1x)およびジメチルスルホキシド(0.5%)を含むダルベッコ改変イーグル培地(200 μ L)で培養したレプリコン細胞(2.5×10^4 細胞)に被験物質を添加する。このとき、被験物質は、適当な濃度でジメチルスルホキシドに溶解し、ジメチルスルホキシドの最終濃度が1%になるようにウシ胎児血清(2%)およびMEM非必須アミノ酸溶液(1x)を含むダルベッコ変法イーグル培地で希釈して使用する。

37°CでCO₂(5%)存在下で3日間培養後、培地を吸引装置により除去する。細胞は、グアニジンチオシアネート(4 M)、トリス塩酸(10 mM、pH 7.5)および β -メルカプトエタノール(0.97%)を含有する細胞溶解液(200 μ L)で溶解し、その溶解物(150 μ L)を、WizardTM SV96 DNA 結合プレート(Promega)に移す。その後、プレートを1200rpmで5分間遠心分離し、プレートを通じた溶解物は廃棄する。ウェルを、酢酸カリウム(60 mM)、トリス塩酸(10 mM、pH7.5)およびエタノール(60%)を含む洗浄液(1mL)を使用して3000rpmで5分間の遠心分離により洗浄する。洗浄後、プレート上の残渣を、別の96ウェルプレートの上に移す。全てのRNAを、RNaseフリーの水(100 μ L)に溶出し、1200rpmで5分間の遠心分離により回収する。こうして溶出したRNAは、直ちに分析するか、もしくは使用するまで-80°Cで保存することができる。

次に、ネオマイシン耐性遺伝子を標的としたHCVサブジェノミックレプリコン遺伝子のコピー数を計測するためにGeneAmpTM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を使用し、リアルタイムRT-PCRを行う。

具体的には、回収したRNA(1 μ L)を、MicroAmp Optical 96well Reaction Plate (Applied Biosystems)のウェルの中で、ThermoScript TM Reaction Mix (1x, Invitrogen)、

順方向プライマー[5'-CCG CTT TTC TGG ATT CAT CG-3' (配列番号:12)](0.3 μ M)、逆方向プライマー[5'-CCC ATT CGC CGC CAA-3' (配列番号:13)](0.3 μ M)、レポーターのFAMTMと消光剤のTAMRATMを標識したプローブ[5'-FAMTM-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRATM-3' (配列番号:14)](0.2 μ M、Applied Biosystems)およびThermoScript TM PLUS /Platinum TM Taq Mix (2%、Invitrogen)を含有するRT-PCR混合液(25 μ L)と混和する。また、対照試料から抽出されたRNAは、連続的に希釈し、検量線として使用する。プログラムは50°Cで2分、60°Cで30分、95°Cで5分反応後、95°Cで15秒および60°Cで60秒のサイクルを40回繰り返す。また、Ct(スレッシュホールドにおけるサイクル)値は、GeneAmpTM 5700 Sequence Detection System software v1.0.0.1によって得られる。対照試料に対する相対的なレプリコンRNAコピー数は検量線から推定することができ、この値から、レプリコンRNA複製阻害を測定することが可能である。

[0075] 実施例19

HCV RdRpによるRNA合成開始反応におけるCyPの影響

完全長のHCV RdRp(NN50-1)を使用し、CyPB、CyPB Δ PPIまたはCyPAがHCV RdRpのRNA合成開始反応(25°C、90 min)に及ぼす影響について調べた。RNA合成開始反応におけるRdRp活性は、テンプレートとしてオリゴヌクレオチドである5'-AAA AAAAAGC-3' (配列番号:16) (以下、「A8GC」ともいう)、基質としてGMPと α -³²P-CTPを使用し、反応生成物pGpCの放射活性を測定して求めた。

Hepes-NaOH緩衝液 pH7.3 (500 mM、2 μ L)、ジチオスレイトール(100 mM、2 μ L)、GMP(5 mM、2 μ L)、塩化マグネシウム(250 mM、0.4 μ L)、A8GC(20 μ M、1 μ L)、 α -³²P-CTP(3.4 μ M、11 kBq/ μ L、0.6 μ L)および水(10 μ L)をエッペンドルフチューブ(0.5 mL 容)に入れ穏やかに混和した。そこへ、GST-CyPB、GST-CyPB Δ PPIまたはGST-CyPB(1 μ M、1 μ L)を完全長HCV RdRp NN50-1(154 nM、1 μ L)と各々混和した溶液(2 μ L)を添加し、直ちに25°Cの水浴で90分間 RNA合成開始反応を行った。RNA合成開始反応は、反応停止液(90% ホルムアミド、10mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、0.1% キシレンシアノール、0.1% ブロモフェノールブルー)50 μ Lを添加することにより停止した。

反応液の入ったチューブをサーマルサイ클ラーMP TP3000型(タカラバイオ)にて65℃、10分間インキュベートした後、直ちに氷冷し、反応液の一部(2 μ L)を電気泳動アクリルゲル300×400 mm(25%アクリルアミド/ N,N'-メチレンビスアクリルアミド(19:1)、7M 尿素、50 mM Tris、1 mM EDTA二ナトリウム、5mMホウ酸(pH8.2))に載せ、定電力70Wにて約1時間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをイメージングプレートに3時間露出させ、得られたイメージングプレートをバイオイメージングアナライザーBAS2500(富士写真フイルム)にて反応生成物(pGpC)を定量した。

得られた結果を図8に示す。RNA合成開始反応において、HCV RdRpにCyPBまたはCyPB Δ PPIを添加した場合にRdRp活性が上昇した。しかし、RdRpにCyPAを添加してもRdRp活性に変化は認められなかった。

RdRpと結合性を有するCyPBの添加によりRdRp活性が上昇したが、RdRpと結合性を有しないCyPAの添加によってはRdRp活性の上昇は認められないことから、RNA合成開始反応におけるHCV RdRp活性上昇にはCyPのRdRpへの結合が必要であることが示唆された。

一方、CyPBの添加だけでなくPPIase活性を失っているCyPB Δ PPIの添加によってもRdRp活性が上昇したことから、CyPBによるRNA合成開始反応の亢進はPPIase活性に非依存的事であることが示唆された。

[0076] 実施例20

RNA合成開始反応におけるCyPBのRdRp活性亢進作用に対する阻害物質のアッセイ方法

全ての工程で、GengardTM フィルターカートリッジ(日本ミリポア)にて作製したRNAseフリー水を使用する。また、工程1と工程2は氷上で操作する。

工程1: HEPES-NaOH緩衝液 pH7.3 (500 mM、2 μ L)、ジチオスレイトール(100 mM、2 μ L)、GMP(5 mM、2 μ L)、塩化マグネシウム(250 mM、0.4 μ L)、A8GC(20 μ M、1 μ L)、および α ³²P-CTP(3.4 μ M、11 kBq/ μ L、0.6 μ L)をエッペンドルフチューブ(0.5 mL 容)に入れ穏やかに混和する。

工程2: GST-CyPB、GST-CyPB Δ PPIまたはGST-CyPB(1 μ M、1 μ L)を完全長HCV RdRp NN50-1(154 nM、1 μ L)と各々混和した溶液(2 μ L)、水(9.5 μ L)および被

験物質 (DMSO溶液、0.5 μ L)を工程1のエッペンドルフチューブ内へ添加し、直ちに25℃の水浴で90分間酵素反応を行う。

工程3: 反応後、直ちに反応停止液 (90% ホルムアミド、10mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、0.1% キシレンシアノール、0.1% ブロモフェノールブルー) 50 μ Lを添加混合し、酵素反応を停止させる。

工程4: 反応液の入ったチューブをサーマルサイクラーMP TP3000型 (タカラバイオ) にて65℃、10分間インキュベートした後、直ちに氷冷し、反応液の一部 (2 μ L) を電気泳動アクリルゲル300×400 mm (25%アクリルアミド/ N,N'-メチレンビスアクリルアミド(19:1)、7M 尿素、50 mM Tris、1 mM EDTA二ナトリウム、5mMホウ酸 (pH8.2)) に載せ、定電力70Wにて約1時間電気泳動を行う。

工程5: 電気泳動後、ゲルをイメージングプレートに3時間露出させ、得られたイメージングプレートをバイオイメージングアナライザーBAS2500 (富士写真フイルム) にて反応生成物 (pGpC) 量をPSL値として測定する。

工程6: CyPBのRdRp活性亢進作用に及ぼす被験物質の阻害を求める。

[0077] 実施例21

HCV RdRpとオリゴヌクレオチドとの結合性におけるCyPBの影響

HCV RdRpはPoly(rA)、Poly(rA)/(rU)12、Poly(rU)並びにPoly(rU)/(rA)12のオリゴヌクレオチドと結合するが、これらの結合においてCyPBが及ぼす影響について調べた。

Poly(A)Sepharose 4B (アマシャムバイオサイエンス) 100mgまたは Poly(U)Sepharose 4B (アマシャムバイオサイエンス) 100mgを20mM トリス-塩酸 (pH7.5)、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、25mM KCl、10mM ジチオスレイトール、20% グリセロール、0.5% トライトーン-X10を含有するRdRp反応緩衝液により平衡化した。相補するオリゴヌクレオチドを添加する場合は、Poly(A)Sepharose 4Bには(rU)12を、Poly(U)Sepharose 4Bには(rA)12を夫々最終濃度0.2 μ g/mlになるよう添加した。ここで(rU)12はウリジル酸12分子のみで構成された単鎖のオリゴヌクレオチドであり、一方の(rA)12はアデニル酸12分子のみで構成されている。

Poly(rA)、Poly(rA)/(rU)12、Poly(rU)またはPoly(rU)/(rA)12の各ゲル懸濁液 (50 μ L

)にGST-CyPB(136 μ g/mL, 20 μ L)とBiotin-RdRp(SH591)(19 μ g/mL, 5 μ L)を添加し、37°C、60分間インキュベーション後、RdRp反応緩衝液(1mL)を添加し遠心分離して上清を取り除く洗浄操作を4回繰返した。洗浄後のゲルに、250mM トリス-塩酸(pH6.8)、8.6% SDS、60% グリセロール、20% メルカプトエタノール、0.02% ブロモフェノールブルーを組成するゲルローディング液(20 μ L)を添加した後、96°C、5分間加熱処理した。この上清15 μ LをSDS-PAGE(40mA定電流、1時間)で泳動した。

ゲルを転写したクリアブロット-P膜(アトー)を室温で1時間ブロッキングした後、0.05% Tween-20を含むPBSで3回洗浄した。続いて、転写膜をHRP標識抗ストレプトアビジン抗体(ZYMED)と室温で1時間インキュベーションし、次いで洗浄液で3回洗浄後、直ちに転写膜をECL ウェスタンブロットングシステム試薬(アマシャムバイオサイエンス)と接触させ、化学発光検出システムLumi Vision PRO(アイシン精機)にて光強度を測定した。

なお、Biotin-RdRp は、7.38 μ M HCV RdRp(SH591)をアルカリ条件(500mM NaHCO₃)下で、Biotinylation Kit(Sulfo-OSu)(同仁化学研究所)を使用して、ビオチン化し、ゲルろ過カラムにて精製して得た。

実験結果を図9に示す。何れのオリゴヌクレオチドを使用した場合においても、CyPBの添加によりBiotin-RdRpの結合量の増加が示された。Poly(rA)、Poly(rA)/(rU)12、Poly(rU)並びにPoly(rU)/(rA)12に対するBiotin-RdRpの結合量は、CyPB添加により各々1.5倍、1.9倍、1.6倍並びに1.8倍の増加となった。

以上の結果から、CyPBは、プライマーRNAの有無に関わらず、Poly(rA)、Poly(rU)の何れのテンプレートRNAに対してもHCV RdRpの結合を上昇させることが判明した。

[0078] HCVレプリコンRNA複製におけるCyPB発現の影響

Huh-7レプリコン細胞にCyPBを一過性に強制発現させた場合のレプリコンRNA複製量を測定した。Huh-7レプリコン細胞(1×10^5 /well)にCyPB発現プラスミド(0 μ g, 0.11 μ g, 0.33 μ gまたは1.0 μ g)をトランスフェクションして3日後の細胞について、CyPB発現量をウェスタンブロットング法で確認すると共にレプリコンRNA量をTaqMan-PCRで測定した。

その結果、プラスミドのトランスフェクション量に順じてCyPBの発現が抗CyPB抗体を使用したウエスタンブロッティング法により認められた(図10)。また、 $1\mu\text{g}$ のCyPB発現プラスミドをトランスフェクションした場合、レプリコンRNA量が約2.5倍に上昇していることが確認された(図11)。

[0079] 実施例23

CyPBを恒常的に発現する細胞株の作製

Huh-7細胞並びに293T細胞を使用して、CyPBを恒常的に発現する細胞株を樹立した。

CyPB発現プラスミドをHuh-7細胞並びに293T細胞へトランスフェクション後、得られたコロニーをプレートに移し増殖させた。この細胞において、実際にCyPBが安定に発現しているか否かをウエスタンブロッティング法により確認した(図12、図13)。

その結果、CyPBが強制発現していることを確認できた。

産業上の利用可能性

[0080] 本発明はHCVの増殖を阻害する抗HCV剤のアッセイ方法を提供するものであり、その実施により新たな抗HCV剤が開発されることが期待される。

請求の範囲

- [1] サイクロフィリンBの存在下で行うことを特徴とする、HCV RNA複製阻害物質の非細胞系アッセイ方法。
- [2] HCV RNA依存性RNA合成酵素とサイクロフィリンBとを接触させた後に、得られた酵素およびサイクロフィリンBを含む混合物に被験物質を接触させ、該酵素における酵素活性の阻害を検出することを特徴とする、請求項1記載のアッセイ方法。
- [3] 以下の工程：
(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、テンプレート、プライマー、金属イオンおよびサイクロフィリンBを接触させる工程、
(2) 上記(1)で得られた混合物に被験物質およびNTPを接触させる工程、および
(3)被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA伸長活性よりも該酵素のRNA伸長活性を低下させる物質を同定する工程
を含むことを特徴とする、請求項2記載のアッセイ方法。
- [4] 以下の工程：
(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、テンプレート、金属イオンおよびサイクロフィリンBを接触させる工程、
(2) 上記(1)で得られた混合物に被験物質およびNTPを接触させる工程、および
(3)被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA合成開始活性よりも該酵素のRNA合成開始活性を低下させる物質を同定する工程
を含むことを特徴とする、請求項2記載のアッセイ方法。
- [5] HCV RNA依存性RNA合成酵素と被験物質とを接触させた後に、得られた酵素および被験物質を含む混合物にサイクロフィリンBを接触させ、該酵素における酵素活性の阻害を検出することを特徴とする、請求項1記載のアッセイ方法。
- [6] 以下の工程：
(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、被験物質、テンプレート、プライマーおよび金属イオンを接触させる工程、
(2) 上記(1)で得られた混合物にサイクロフィリンBおよびNTPを接触させる工程、および

(3)被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA伸長活性よりも該酵素のRNA伸長活性を低下させる物質を同定する工程を含むことを特徴とする、請求項5記載のアッセイ方法。

[7] 以下の工程:

(1)HCV RNA依存性RNA合成酵素、被験物質、テンプレートおよび金属イオンを接触させる工程、

(2)上記(1)で得られた混合物にサイクロフィリンBおよびNTPを接触させる工程、および

(3)被験物質非存在下でのHCV RNA依存性RNA合成酵素のRNA合成開始活性よりも該酵素のRNA合成開始活性を低下させる物質を同定する工程を含むことを特徴とする、請求項5記載のアッセイ方法。

[8] サイクロフィリンBと配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列またはその変異配列を含むポリペプチドの結合の阻害を検出することを特徴とする、請求項1記載のアッセイ方法。

[9] 以下の工程:

(1)配列表の配列番号:1に示すアミノ酸配列またはその変異配列を含む、固相化されたポリペプチドと被験物質を接触させる工程、

(2)上記(1)の後に、サイクロフィリンBを接触させる工程、

(3)上記(2)の後に、抗サイクロフィリンB抗体を接触させる工程、

(4)上記(3)の後に、標識抗IgG抗体を接触させる工程、

(5)上記(4)の後に、標識レベルを測定し、該ポリペプチドとサイクロフィリンBとの結合量を算出する工程、および

(6)被験物質非存在下で測定されたサイクロフィリンB量よりも上記サイクロフィリンB量を低下させる物質を同定する工程、を含む、請求項8記載のアッセイ方法。

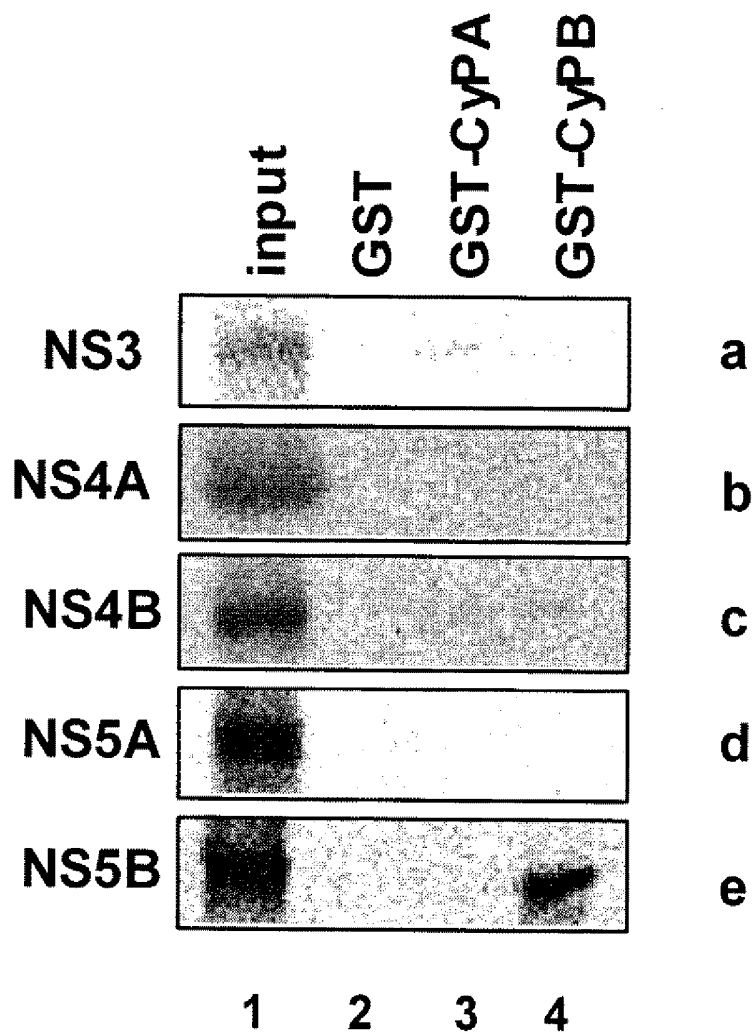
[10] 該ポリペプチドが配列番号:15に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドである請求項8または9記載のアッセイ方法。

[11] 抗HCV剤のアッセイ法である、請求項1から10記載のアッセイ方法。

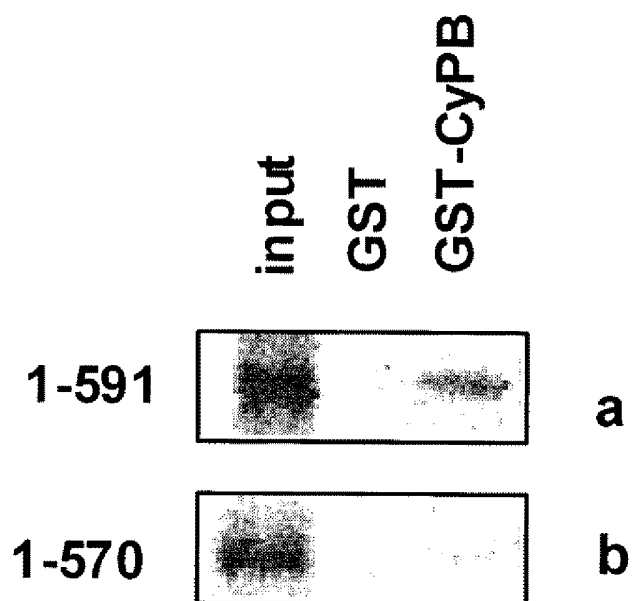
- [12] サイクロフィリンBを強制発現させたHCVレプリコン細胞。
- [13] 請求項12記載の細胞を用いることを特徴とする、HCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法。
- [14] 以下の工程：
(1)サイクロフィリンBを強制発現させたHCVレプリコン細胞に被験物質を接触させる工程、
(2)上記(1)の後に、複製されたレプリコンRNAを定量する工程、および
(3)被験物質非存在下で測定されたレプリコンRNA量よりも上記レプリコンRNA量を低下させる物質を同定する工程、
を含む、請求項13記載のHCVレプリコン阻害物質のアッセイ方法。
- [15] 抗HCV剤のアッセイ法である、請求項13または14記載のアッセイ方法。
- [16] サイクロフィリンBを強制発現させた培養細胞。
- [17] 請求項16記載の培養細胞にHCVを感染させることにより得られる、HCVを産生する培養細胞。
- [18] 請求項16記載の培養細胞にHCVを感染させることを特徴とする、HCVを産生する培養細胞の調製方法。
- [19] 請求項16または17記載の培養細胞を用いることを特徴とする抗HCV物質のアッセイ方法。
- [20] 以下の工程：
(1)サイクロフィリンBを強制発現させた培養細胞と被験物質を接触させる工程、
(2)上記(1)の後に、培養細胞とHCVを接触させる工程、
(3)上記(2)の後に、培養細胞から産生されるHCVを定量する工程、および
(4)被験物質非存在下で測定されたHCV量よりも上記HCV量を低下させる物質を同定する工程、
を含む、請求項19記載の抗HCV物質のアッセイ方法。
- [21] 抗HCV剤のアッセイ法である、請求項19または20記載のアッセイ方法。
- [22] サイクロフィリンBを含有する、HCV RNA依存性RNA合成酵素の酵素活性亢進剤。
- [23] サイクロフィリンBを含有する、HCV RNA依存性RNA合成酵素のRNAに対する結合

促進劑。

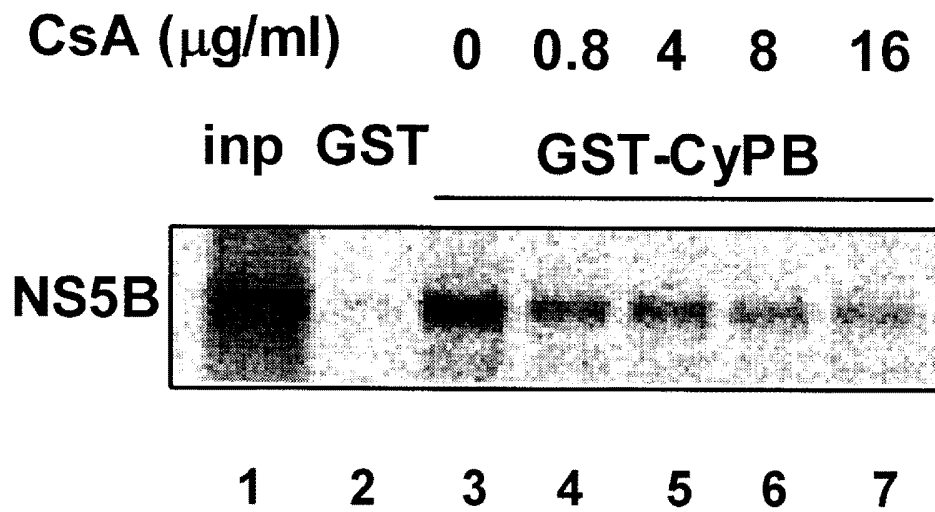
[図1]



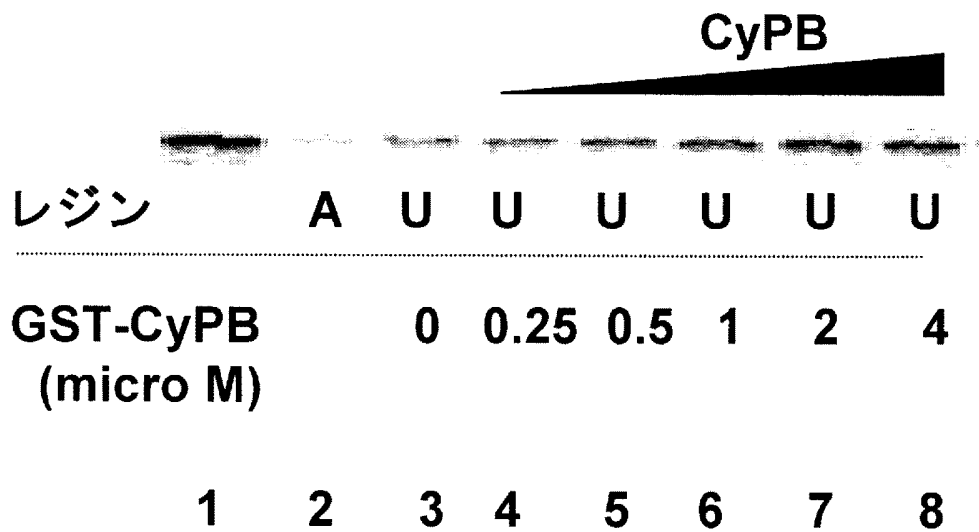
[図2]



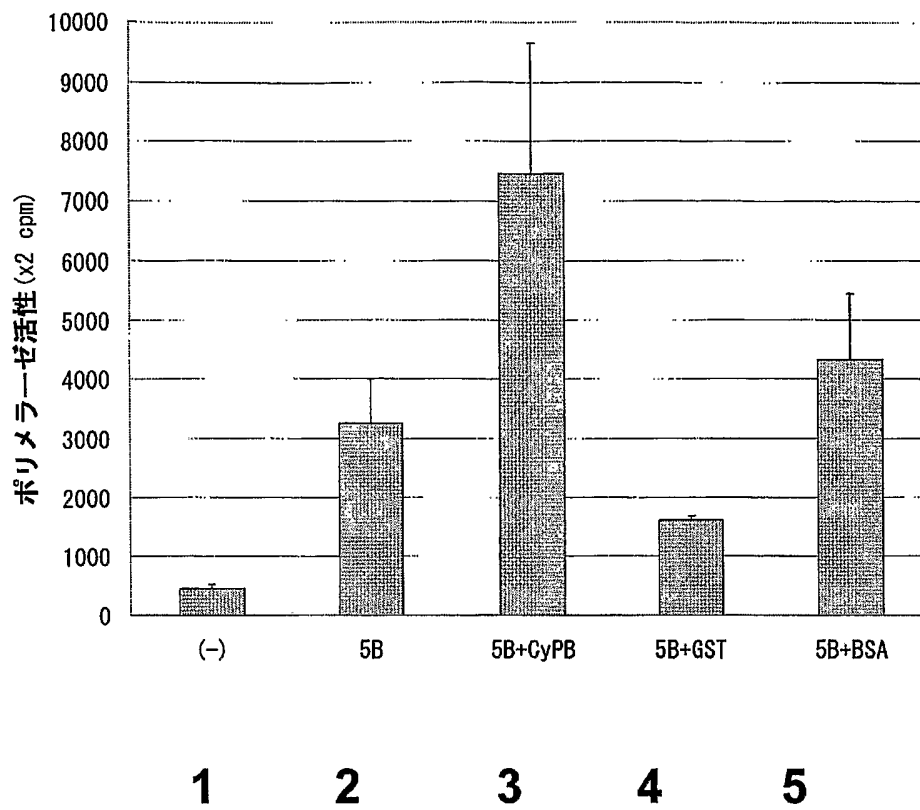
[図3]



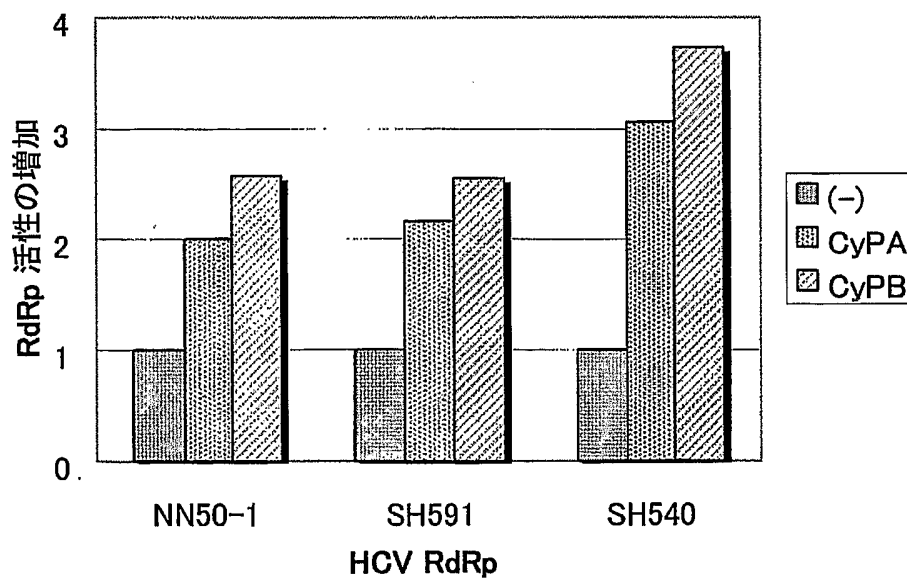
[図4]



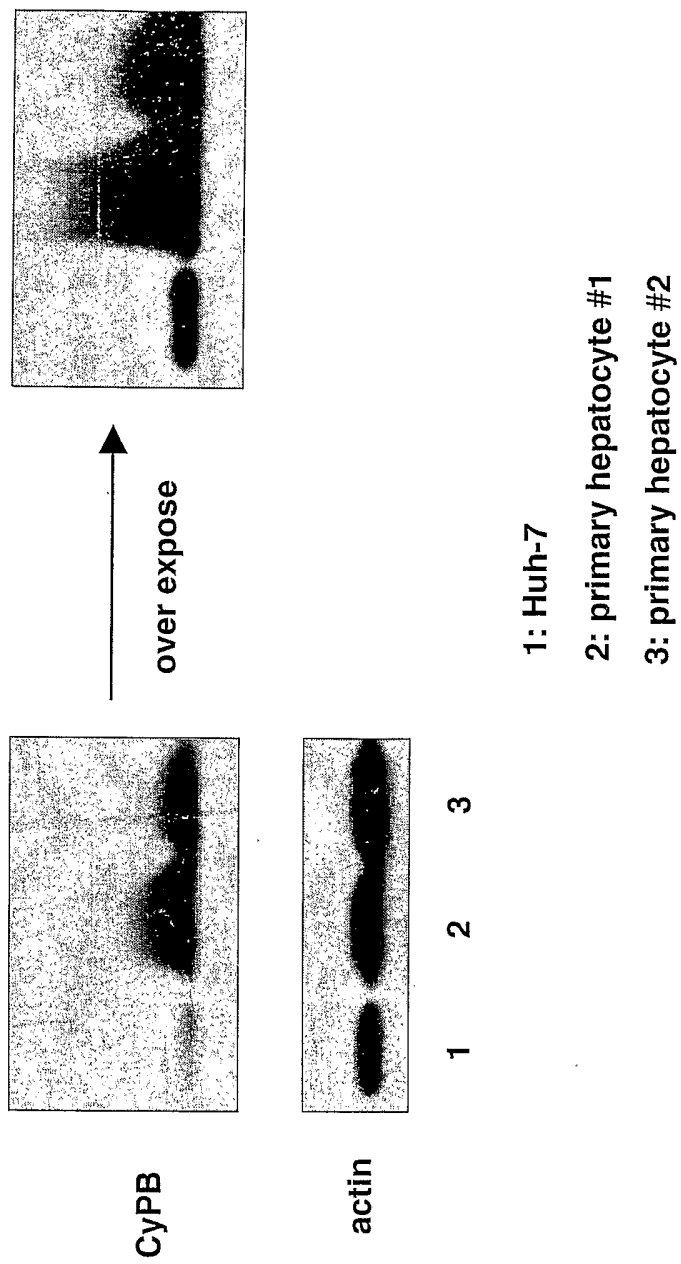
[図5]



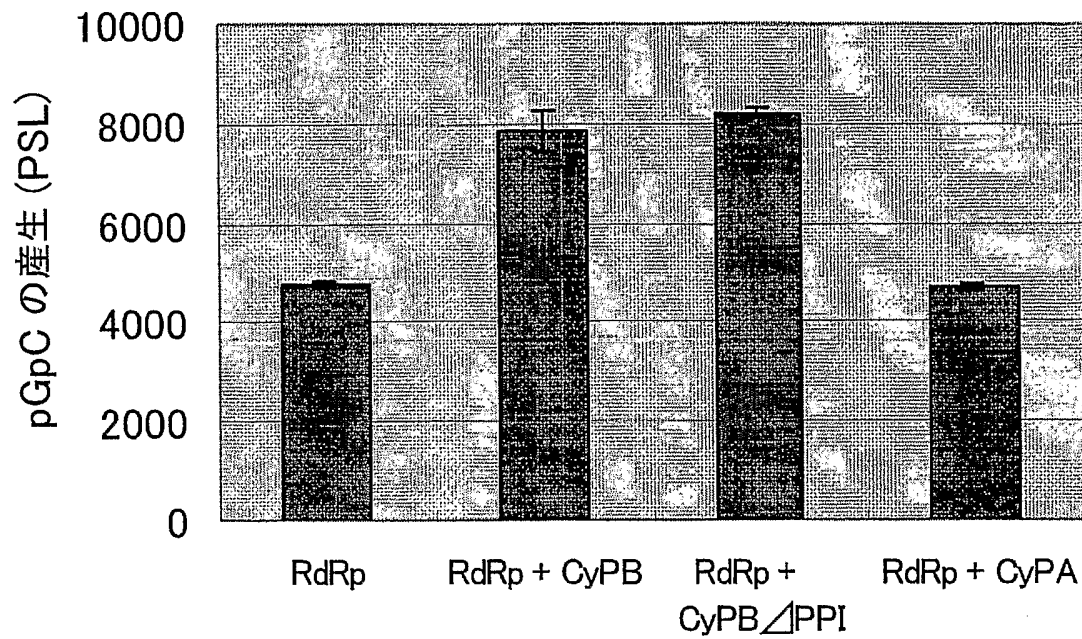
[図6]



[図 7]



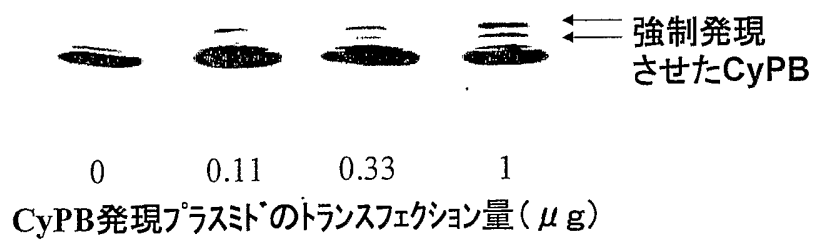
[図 8]



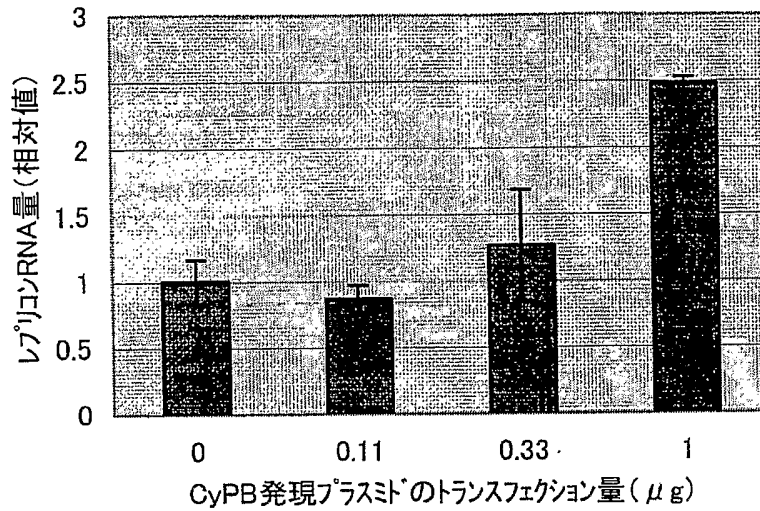
[図 9]

オリゴヌクレオチド:	Poly(rA)		Poly(rA)/ (rU)12		Poly(rU)		Poly(rU)/ (rA)12	
CyPB:	—	+	—	+	—	+	—	+
RdRp:								

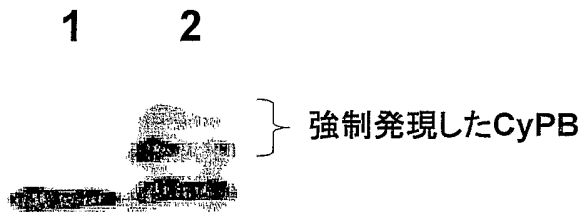
[図 10]



[図 1 1]

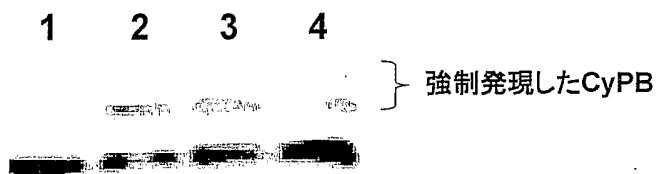


[図 1 2]



1. Huh-7 cell
2. CyPB expression clone

[図 1 3]



1. 293T cell
2. CyPB expression clone 1
3. CyPB expression clone 2
4. CyPB/PP1 expression clone

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q1/25</i> (2006.01), <i>C12N15/09</i> (2006.01), <i>C12N5/10</i> (2006.01), <i>C12Q1/02</i> (2006.01), <i>C12Q1/68</i> (2006.01), <i>G01N33/15</i> (2006.01), <i>G01N33/50</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12Q1/25</i> (2006.01), <i>C12N15/00</i> (2006.01) - <i>C12N15/90</i> (2006.01), <i>C12N5/10</i> (2006.01), <i>C12Q1/02</i> (2006.01), <i>C12Q1/68</i> (2006.01), <i>G01N33/15</i> (2006.01), <i>G01N33/50</i> (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRICE E.R. et al., Human cyclophilin B: a	16, 22, 23
Y	second cyclophilin gene encodes a peptidyl-	1-7, 11-15,
A	prolyl isomerase with a signal sequence, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 01 March, 1991 (01.03.91), 88(5), p.1903-7	17-22 8-10
Y	NAKAGAWA, M. et al., Specific inhibition of	1-7, 11-15,
A	hepatitis C virus replication by cyclosporin A, Biochem.Biophys.Res.Comm., 02 January, 2004 (02.01.04), 313(1), p.42-7	17-22 8-10
P, X	WATASHI, K. et al., Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase, Mol.Cell, 01 July, 2005 (01.07.05), 19(1), p.111-22	1-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 October, 2005 (06.10.05)		Date of mailing of the international search report 25 October, 2005 (25.10.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017518

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HEITMAN J. et al., Cyclophilin B escorts the hepatitis C virus RNA polymerase: a viral achilles heel? Mol.Cell, 22 July, 2005 (22.07.05), 19(2), p.145-6	1-23
A	Kazuaki INOUE et al., "Cyclosporin A ni yoru C-gata Kan'en Virus Idenshi Fukusei Sogai Kijo no Kaiseki", 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Koen Yoshishu, 2003, page 564	1-23
A	ISHII, N. et al., Molecular mechanisms of cyclosporin A induced suppression of HCV genome replication, Seikagaku, 25 August, 2004 (25.08.04), 76(8), page 872	1-23
P,A	INOUE, K. et al., Cyclophilins are essential for HCV RNA replication: An in vitro study, Journal of Hepatology, April 2005, 42(Suppl.2), p.20-1	1-23
T	Medline accession No.2005474484, NAKAGAWA, M. et al., Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins, Gastroenterology, 2005 September, 129(3), p.1031-41, abstract	1-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl. ⁷ C12Q1/25 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl. ⁷ C12Q1/25 (2006.01), C12N15/00(2006.01)-C12N15/90(2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01)		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	PRICE E R et al., Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence, Proc Natl Acad Sci U S A, 1991 Mar 1, 88(5), p. 1903-7	16, 22, 23
Y		1-7, 11-15, 17-22
A		8-10
Y	NAKAGAWA M et al., Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A, Biochem Biophys Res Commun, 2004 Jan 2, 313(1), p. 42-7	1-7, 11-15, 17-22
A		8-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06.10.2005		国際調査報告の発送日 25.10.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伏見 邦彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WATASHI K et al, Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase, Mol Cell, 2005 Jul 1, 19(1), p. 111-22	1-23
PX	HEITMAN J et al., Cyclophilin B escorts the hepatitis C virus RNA polymerase: a viral achilles heel? Mol Cell, 2005 Jul 22, 19(2), p. 145-6	1-23
A	井上和明等, シクロスポリンAによるC型肝炎ウイルス遺伝子複製阻害機序の解析, 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2003, p. 564	1-23
A	ISHII N et al., Molecular mechanisms of cyclosporin A induced suppression of HCV genome replication, 生化学, 2004. 08. 25, 76(8), p. 872	1-23
PA	INOUE K et al., Cyclophilins are essential for HCV RNA replication: An in vitro study, Journal of Hepatology, Apr. 2005, 42(Suppl. 2), p. 20-1	1-23
T	Medline accession No. 2005474484, Nakagawa M et al., Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins, Gastroenterology, 2005 Sep, 129(3), p. 1031-41, abstract	1-23