3. HCV 由来ゲノム複製酵素の立体構造と その複製機構

宮野 雅 司, 吾 郷 日出夫

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、慢性肝炎の主な病原ウイルスで、血液によって感染する。現在ではPCRによる精度の高いウイルス検出のアッセイ法ができるようになり、輸血による新たな感染のリスクは激減した。しかしすでにWHOの推計では、世界中におよそ1億7千万人のキャリアーがいるので、HCV自体の脅威が去ったわけではない (WHO 1999)。HCVの感染者の8割が慢性化し、このうちの2割が感染から20~30年を経て肝硬変に移行し、さらにその一部は肝細胞癌に至るといわれている。現在日本では、癌による死亡者の中で肝癌は増えており、胃、肺に次いで第三位となっている。このうち約8割の病因はHCVである。国内の200万人といわれるHCV感染者の治療はこれからが正念場といえよう。現在まで、HCVに対する有効なワクチンが無く、また有効な治療法であるとされているインターフェロン療法もウイルスの型によって効果は限定的である。HCVウイルス増殖を直接抑える治療薬の開発が危急の課題である。

1. HCV ウィルスゲノムのコードするタンパク質

HCVはフラビウイルスの一種に分類され、9600塩基からなるプラス一本鎖RNA((+)ssRNA)ウイルスであり (Bartenschlager, 1997)、レトロウイルスであるHIVと

は違いが多いが、同様の血液感染をするためHIVとHCVの同時感染も少なくなく、そのゲノム構成、成熟過程で類似点も多く、その増殖様式も比較に値する。こうした点を考えあわせると、抗HCV剤開発のためには抗HIV薬開発など広汎な研究がなされてきたHIVウイルスは参照以上の意味がある。

HCVゲノムはおよそ3010アミノ酸残基のただ一つのポリペプチドをコードしている (図1)。このポリペプチドは宿主由来のプロテアーゼとウイルス由来のプロテアーゼによって限定分解を受け成熟する。HCVウイルス粒子を構成する構造蛋白質 (C, E1, E2) とウイルス増殖に関わる非構造蛋白質 (NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B) となる。構造タンパク質は感染した宿主細胞の蛋白分解酵素で成熟すると考えられている。NS2からNS3のN端側とNS3のN末側3分の1とNS4Aはそれぞれメタロプロテアーゼとセリンプロテアーゼである。メタロプロテアーゼは自己消化的にNS2を遊離し、NS3セリンプロテアーゼは残りのすべてをポリペプチドから切り出す。NS3のC末側3分の2はRNAヘリカーゼ活性を有する。NS5BはHCVゲノム複製酵素である。

これらの非構造タンパク質はHCV増殖で中心的な役割を担っているため、抗HCV薬開発の主要なターゲットである機能のはっきりしている。これらのタンパク質は抗HCV剤開発のターゲットとして立体構造がすでに解明されている。HIVプロテアーゼ阻害剤のエイズ薬として成功に触発されて、NS3プロテアーゼ・ドメインの構造が最初に決められた (Love 1996 and Kim 1996)。そして、NS3のヘリカーゼ・ドメインと順次決定され (Yao *et al.* 1997 and Kim *et al.* 1998)、ついにNS3全体の構造が最近決定された (Yao *et al.* 1999)。NS5BはRNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp) であり (Behrens *et al.* 1996 and De Francesco *et al.* 1996)、複製開始、終了はもちろん、複製開始断片 (プライマー) なしでウイルスゲノムのアンチセンスRNAの合成、またそのアンチセンスRNAを鋳型としてゲノムRNAの全過程を一つのタンパク質でこなすスーパー複製酵素である (Lohmann *et al.* 1997, 1998, 1999 and Oh *et al.*

理研・播磨研究所/Spring-8, 日本たばこ産業 (株)
医薬総合研究所 (〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光
都1-1-1)

Atomic Structure and Mechanism of Replicase from
hepatitis C virus

Masashi Miyano*, Hideo Ago

*RIKEN Harima Institute at Spring-8, 1-1-1 Kouto,
Mikazuki-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

Japan Tobacco Inc., Central Pharmaceutical Research
Institute, 1-1 Murasaki-cho, Takatsuki, Osaka 519-
0045, Japan

e-mail: miyano@spring8.or.jp

phone: 0791-58-2815

Fax: 0791-58-2816

図1 HCV ゲノム RNA に唯一にコードされている ORF のポリプロテインを構成するタンパク質群。
C: ウィルス・コートタンパク質, E1, E2: ウィルス・エンベロップタンパク質, NS: 非構造タンパク質。

図2 HCV RdRp 結晶構造のリボンモデル (PDB: 1QUV) (Ago *et al.* 1999).
中心に基質供給のための穴が親指ドメインとつながったβ指サブドメインの長くのびたループ領域にみられる。

1999). この複製酵素である NS5B の結晶構造は我々も含めて3つのグループが相次いできめた (図2) (Ago *et al.* 1999, Bressanelli *et al.* 1999, and Lesburg *et al.* 1999).

2. HCV RdRp の立体構造

全体構造

HCV RdRp は約 $67 \times 63 \times 68 \text{ \AA}$ の大きさの球状蛋白質で、大きく分けて3つのドメインから構成され (図2), すでによく知られた HIV の逆転写酵素・RNA 依存 DNA ポリメラーゼなど多くのポリメラーゼと同様に鋳型と複製

開始断片になる核酸2重鎖をつかむ右手にみえて、指 (Fingers), 掌 (Palm), 親指 (Thumb) の3つのドメインに割り当てられる。しかし、それまで知られていたポリメラーゼとの比較において、指と親指ドメインの構造はずっと複雑でちょうど野球グローブをはめた右手に近く、さらに、この野球グローブにはちゃんと指と親指の間に捕球ネット構造がある (図2)。この全体構造は大きさと複雑さを無視すると、ちょうどバクテリア由来の転写酵素 DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II に近い (Cramer *et al.* 2000)。さらには、掌の上は親指ドメインからのびた2本のβシートとC末部分によってすっかり埋まっている (図3)。

野球グローブの捕球ネットの下は穴があいていて、活性ドメインである掌の核酸伸張反応部位につながっている (図4A, B)。この穴を通して基質であるヌクレオチド三リン酸を供給すると予想される。実際その穴はプラスとマイナスの静電表面の帯が外側から伸長反応部位までつながって、基質リボヌクレオシド三リン酸はそのリン酸のマイナス、塩基のプラスに対応してうまく反応部位まで都合よい分子配向で導入されるだろう。

掌ドメイン

掌ドメインは RNA 複製伸張反応の中心であり、そのペプチド主鎖の折れ畳はすべてのポリメラーゼで保存された一枚のβシートを2本のαヘリックスが裏打ちした構造になっている (図2)。マグネシウムまたはマンガンの2価陽イオンがポリメラーゼの活性発現には必須である (Behrens *et al.* 1996 and De Francesco *et al.* 1966)。これらの2価金属イオンを結合するアミノ酸残基は HCV RdRp では Asp318, Asp319 (以上β7), Asp220そして Thr221 の主鎖カルボキシル基 (以上β3) である (図4C) (Lohmann *et al.* 1997)。これら3つの酸性残基の位置関係は他のポリメラーゼとほぼ同じであった。

指ドメイン

指ドメインは、さらにαヘリックスに富む指のα, そしてβストランドに富む指のβサブドメインの2つに分割できる (図2)。これまで構造の知られていたポリメラー

図3 RNA 2重鎖の結合クレフト部位を埋めている親指ドメインからのびるβシート(β10, β11)とC末ペプチド。A. HCV RdRpの空間充填モデル。白色が親指ドメインからのびるβシートで、C末部位は濃い灰色で示した。B. クレフトを埋めるC末部分の拡大図。C末部分を除いて静電ポテンシャルで色づけした分子表面と棒モデルで表したC末ペプチド。カゼインキナーゼIIでリン酸化されうるセリン残基を球状モデルであらわした。

図4 HCV複製酵素とRNA 2重鎖複合体モデル。

A. HCV RdRpの活性クレフトの静電ポテンシャルとRNA 2重鎖モデル。図2の分子を上方からみたものを、見やすくするために分子を一部切り取ってある。RNAモデルはHIV RTの複合体結晶構造(Huang *et al.* 1998)に基づいて作成した。静電ポテンシャルは、濃淡で表されている。B. α指サブドメイン方向からみたHCV RdRpのRNA鎖結合モデル。α指サブドメインは針金モデルで示し、また親指ドメインからのβシートはモデルから除外して、クレフトが見えるようになっている。奥にあいた穴が基質が供給されると考えられるスルーホール。C. リボンモデルで表したHCV RdRpと棒モデルで示した鋳型RNA、新生RNA(1塩基のみ)と基質UTPの複合体の拡大モデル。パネルAの図を時計回りにだいたい45度回転したもの。触媒部位にある2原子の Mn^{2+} (二つのボール)と基質UTPの三リン酸部分の位置はHCV RdRpの Mn^{2+} /UTP浸漬結晶で実験的に決定した。RNA鎖の位置は、実験で決まった三リン酸の位置とHIV RTの複合体結晶構造(Huang *et al.* 1998)に基づいて決めた。鋳型RNAには複製開始点(+1)を基準に順番に合成の進行順位なるように番号付けしている((0), (+1), (+2))。親指ドメインから垂れ下がったβシート(β10, β11)がちょうどこれらの塩基を支えるようになっていることから、このβシート構造が翻訳開始時に働いているという仮説を支持する。さらに、このHCV複合体モデルはごく最近報告されたφ6ファージのRNA依存RNAポリメラーゼの複合体モデルとよく一致している(Butcher *et al.* 2001)。

ゼでの掌と指ドメイン間の位置関係にくるのは HCV RdRp では β 部で、 α 部は小指側に拡がっている。これらの α 、 β 指サブドメインの間に小さなクレバスがあり、鋳型となる 1 本鎖 RNA のパスがある (図 4 A, C) HIV 逆転写酵素 (reverse transcriptase : RT) (Huang *et al.* 1998) と HCV RdRp の指ドメイン同士を比べると、HCV RdRp の β 部には HIV RT の指ドメイン全体が対応し、 α 部に対応する構造は HIV RT には無い。指ドメインの β 部のコア部分は、有為なアミノ酸配列の相同性が無いにもかかわらず HIV RT の指ドメイン全体とトポロジーが同じである。ただ、HCV RdRp では β 部のコア構造から親指ドメインに向かって 2 対の長いループ (ループ 1 : Ala 9 ~ Thr 41, ループ 2 : Asn142 ~ Ala157) が上下に重なりながら伸び、捕球ネットとなる (図 2, 図 4 C)。ループ 1 は親指ドメインの中心に届いて、ループ先端の短い α -ヘリックスが親指ドメインの窪みにしっかりとハマっている。ループ 2 はこのループ 1 を下から支えるようにしてのびて、その下に基質取り込みの穴があいている。この捕球ネット構造のため、他のポリメラーゼで知られている核酸を握り込む指ドメインの大きな構造変化は HCV RdRp ではとてもできそうもない (Cramer *et al.* 2000, Huang *et al.* 1998 and Li *et al.* 1998)。その代わり、指ドメインの α 部は新生した RNA 二重鎖が出ていく位置に構造既知のポリメラーゼでは見られなかったオーバーハング構造があり、ここに塩基性残基が集まってこの部位だけで核酸を結合できる (図 2, 図 4 C) (Cheng *et al.* 1999)。

親指ドメイン

HCV RdRp の親指ドメインは、今までに構造決定されたポリメラーゼの親指ドメインと比べると圧倒的に複雑な構造をしているにもかかわらず、その中心の 3 本ヘリックス構造は HIV RT の親指ドメインとほぼ同じである (図 2)。このコア構造を取り巻くように配置されたその他の二次構造は、アミノ酸配列上コア構造の C 末の後に付加されている。

親指ドメインの最上部から RNA 二重鎖を結合するクレフト内に向かって長く伸びた β シート ($\beta 10$, $\beta 11$) は、それまでの構造既知のポリメラーゼではまったくなかったが (図 2, 図 4 C)、近着の Nature 誌に報告された大腸菌 $\phi 6$ ファージの RNA 依存 RNA ポリメラーゼの複合体構造にはほぼ相当する構造が報告された (Butcher *et al.* 2001)。我々は HCV RdRp で可能性の一つとして、この β シート構造が複製開始核酸合成に寄与していることを推定している (Butcher *et al.* 2001 and Cheetham *et al.* 1999)。HCV RdRp は他のタイプのポリメラーゼにみられる校正ドメインを持たない (Cramer *et al.* 2000, Huang *et al.* 1998 and Li *et al.* 1998)。複製開始後は校正反応のために途中で止まる必要がなく、実際、HCV RdRp では例外的に複製

は最後まで止まらない (Lohmann *et al.* 1998, 1999)。つまり、HCV RdRp では複製開始後はかなり安定した核酸 2 重鎖複製酵素複合体を形成していることになる。先に述べたオーバーハングした指ドメインの α 部構造が、この複合体を安定化するのはもちろんであるが、複製延長反応中は、この β シートが結合した核酸鎖を外側から覆って核酸鎖と酵素の結合の安定化に寄与している可能性も考えられる (Butcher *et al.* 2001)。

HCV RdRp のタンパク質の発現によって邪魔者で、結晶化用タンパク質では除かれている C 末端にあるきわめて疎水性の高い膜結合領域 (Hwang *et al.* 1997, Yamashita *et al.* 1998 and Ferrari *et al.* 1999) の直前にある C 末部分 (Thr532 から Arg570) は、RNA 二重鎖の代わりに活性クレフトを埋めている (図 2, 図 3)。特に Leu547 から Ser556 のペプチド (図 3 A : 濃い灰色部分, 図 3 B) は親指ドメインの β シート (図 3 A, 白色部分) と掌ドメインの間に挟まれ、RNA 二重鎖の結合を明らかに邪魔しそうである。実際この埋もれた C 末を除去するほどに更に短く改変した HCV RdRp では活性がより高くなった (Ferrari *et al.* 1999)。つまり、この C 末領域は自己阻害領域である。そして、C 末領域の Ser543 と Ser556 はカゼインカイネース II のリン酸化モチーフを構成している。HCV RdRp 自身が宿主細胞中でリン酸化されるという報告 (Hwang *et al.* 1997) があり、この二つのサイトがこのリン酸化部位かもしれない (図 3 B)。このリン酸化によって C 末の親水性が高まり、C 末が溶媒中へ出て複製酵素活性が高くなることが予想される。つまり、HCV RdRp 自身のこのリン酸化が感染細胞中での複製活性調節機構であるかもしれない。

3. 核酸選択性

他のクラスのポリメラーゼが DNA 鎖も RNA 鎖もしばしば鋳型として受容しうるのに対し、HCV RdRp は、RNA 合成の基質であるリボヌクレオチド三リン酸 (rNTP) を DNA となる基質であるデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) から厳密に認識する。その上、鋳型となる核酸は RNA だけである (Behrens *et al.* 1996, De Francesco *et al.* 1996 and Yamashita *et al.* 1998)。複製開始断片鎖の種類の認識は鋳型に比べ寛容であるが、DNA 複製開始断片のほうが RNA 複製開始断片より明らかに活性が低い (De Francesco *et al.* 1996 and Yamashita *et al.* 1998)。

基質選択性機構

基質選択の分子機構は同じ RNA を鋳型として RNA を合成する HCV RdRp の反応部位の構造を同じ構造を持ちながら DNA 合成をする逆転写酵素 HIVRT の基質複合体と重ね合わせることでよく理解できる。RNA と DNA の基質での違いは糖の 2' 位炭素の水酸基があるかないかだ

図5 HCV RdRp (Ago *et al.* 1999) と HIV RT/dUDP 複合体 (Huang *et al.* 1998) の基質結合部位のスティックモデル。

HCV RdRp モデルと HIV RT/dUDP モデルの炭素原子は、それぞれ灰色、白色で表している。ボールモデルは HIV RT の結晶構造中の Mg^{2+} である。文字は HCV RdRp のアミノ酸の種類と配列番号である。HIV RT/dUDP 複合体では 2 Å 炭素にはチロシンのベンゼン環が位置している。一方の HCV RdRp では対応するアミノ酸残基はアスパラギン酸となっており、リボースの 2' 位置にある水酸基と水素結合できる位置にある。

けである。この結合したデオキシリボウリジン三リン酸 (dUTP) の 2' 位炭素位置には HIV RT では Tyr115 がある。複製酵素に結合した基質 dUDP の代わりに UDP としたときに 2'-炭素に結合した水酸基は HCV RdRp では Asp225 と水素結合位置にあり、この残基が基質選択性決定の中心のアミノ酸残基である (図 5) (Hansen *et al.* 1997 and Gao *et al.* 1997)。

さらに、この 2'-炭素の周辺環境が両者で明らかに違う。HCV RdRp の Asp225 近傍は (+)ssRNA RdRp で良く保存された親水性残基 (Asp225, Ser282, Thr287, Asn291) を含む浅く窪んだ表面になっており (図 4 C, 図 5)、結合水がある。これに対して HIV RT では疎水性残基が多く HCV RdRp に比べてより浅く平らな表面となっている。このことは、HCV RdRp での基質結合において、2'-水酸基を持つリボ核酸では Asp225 と水素結合の形成によるエンタルピーの利得に併せて、その親水表面により疎水的なデオキシリボ核酸にはよけいな結合のためのコストが必要である。

鋳型／複製開始断片の選択性

α 指サブドメインは他のクラスのポリメラーゼと比較した場合もっとも大きな構造上の特徴で、おそらく α 指サブドメインが RNA 二重鎖を認識する一つの重要な構造で

あろう。

親指ドメインから垂れ下がった β シートとクレフトを埋めている C 末 (図 3 A: それぞれ白色、濃灰色) を除いた HCV RdRp モデルを HIV RT 複合体 (Huang *et al.* 1998) と重ねあわせると、若干の分子衝突は残るものの HIV RT 複合体の結合した A 型 DNA 二重鎖は HCV RdRp の活性クレフトにうまく収まる。この重ね合わせたモデルをもとに HCV RdRp の RNA 二重鎖複合体モデルを構築した (図 4)。このモデルは鋳型 RNA の負に荷電したリン酸ジエステル骨格が α 指サブドメイン上の窪んだ正の静電ポテンシャル表面にはまる。このオーバーハンゲした α 指サブドメインと掌ドメインの間に浅い溝があり、鋳型のリン酸ジエステル骨格と RNA のリボース糖をつかむ。鋳型 RNA の特異性を決める 2'-水酸基は Gly283 と Leu285 の主鎖のカルボニル基、Ser288 の側鎖の水酸基と水素結合可能距離にある。またこれとは別に Tyr191 の側鎖の水酸基も 2' 位の水酸基と水素結合可能距離にあった。実際、すでに述べたようにこれらの領域を含むペプチドが RNA と特異的結合能を有する (Cheng *et al.* 1999)。

4. HCV 複製酵素阻害による抗 HCV 薬開発

これまで述べてきたように、HCV 複製酵素である NS5B は、これまでのポリメラーゼ同様の構造と機能を持つ

ているばかりでなく、多くの特徴を示している。この構造をもとに、阻害剤開発競争が繰り広げられている。HIV 逆転写酵素の例からもわかる通り、基質アナログによる阻害がまず考えられる。活性部位の構造からこれまでの核酸アナログの HIV RT 阻害剤は HCV RdRp のよい阻害剤になりそうもないことが、結晶構造から容易に推定される(図4)。実際、HIV の核酸アナログベースの阻害剤はほとんど HCV RdRp を阻害しない。基質アナログの抗 HCV 薬として、リバビリンはインターフェロンとの併用療法で有効性が臨床的に認められているが、この抗 HCV 活性の増強は免疫調整作用であって HCV 複製酵素阻害ではないといわれている (McHutchinson *et al.* 1998)。また、このタイプでは生体中で広汎に利用されるアデノシン、グアノシンなどに似た化合物が考えられるが、核酸関連 HIV RT 阻害剤でみられたように重篤な副作用がやすい。

比較的副作用がでにくいと考えられる基質に対して非拮抗型の阻害剤が考えられる。こうした阻害剤を考える上で可能性のあるのは、HCV RdRp でみられた鋳型の特異性の高さから、鋳型結合部位が考えられる。実際、1 本鎖 RNA が比較的強く特異的に結合できることから期待がもてる(図4) (Cheng *et al.* 1999)。さらに、立体構造を解明して初めて明らかになった活性クレフトを埋めている C 末部位のペプチドの存在である。この部分を除いた HCV RdRp が高い活性を持つので (Ferrari *et al.* 1999)、この部位が活性調節に関わっていることが考えられるとともに、阻害剤開発のターゲット部位になりうる。この部位をベースにした阻害剤開発にはまず、この部位のペプチド配列を基本とした阻害剤開発が可能かもしれない(図3)。

現在、HCV RdRp 阻害剤など抗 HCV 薬となりうる多くの研究が進められている。そして、実際に薬とするための長い道のりがはじまっている(日経新聞2001)。

謝 辞

本研究は、JT 医薬総合研究所でなされたものであり、JT の安達剛、稲垣栄二、奥田佳代、公納秀幸、永尾英太、羽深典之、八浪公夫、吉田厚仁 諸氏、播磨理研の熊坂崇、山本雅貴 両氏との共同研究である。

参考文献

- 1) Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., Miyano, M., (1999). Crystal Structure of the RNA-Directed RNA Polymerase of Hepatitis C Virus., *Structure* **7**, 1417-1425
- 2) Bartenschlager, R., (1997). Candidate targets for hepatitis C virus-specific antiviral therapy., *Intervirology* **40**, 378-393
- 3) Behrens, S. E., Tomei, L. and De Francesco, R., (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus., *EMBO J.* **15**, 12-22
- 4) Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, L., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Ray, F. A., (1999). Crystal Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of Hepatitis C Virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13034-13039
- 5) Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., and Stuart, D., (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerase., *Nature*, **410**, 235-240
- 6) Cheetham, G. M. T., Jeruzalmi, D. and Steitz, T. A., (1999). Structure basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex., *Nature* **399**, 80-83
- 7) Cheng, J.-C., Chang, M.-F. and Chang, S. C., (1999). Specific interaction between the hepatitis C virus NS 5 B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA., *J. Virol.* **73**, 7044-7049
- 8) Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnat, A. L., Marier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edward, A. M., Davis, P. R., and Kornberg, R. D., (2000). Architecture of RNA Polymerase II and Implications for the Transcription Mechanism., *Science* **288**, 640-649
- 9) De Francesco, R., Behrens, S. E., Tomei, L., Altamura, S., Jiricny J., (1996). RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus., *Methods Enzymol.* **275**, 58-67
- 10) Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J. W., Baroudy, B. M., Lau, J. Y., and Hong, Z., (1999). Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*., *J. Virol.* **73**, 1649-1654
- 11) Gao, G., (1997). Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 407-411
- 12) Hansen, J. L. H., Long, A. M. and Schultz, S. C., (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus., *Structure* **5**, 1109-1122
- 13) Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. and Harrison, S. C., (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for drug resistance., *Science* **282**, 1669-1675
- 14) Hwang, S. B., Park, K.-J., Kim, Y.-S., Sung, Y. C. and Lai, M. M. C., (1997). Hepatitis C virus NS 5 B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization., *Virology* **227**, 439-446
- 15) Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C., and Caron, P. R., (1998). Hepatitis C virus NS 3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding., *Structure* **6**, 89-100
- 16) Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A., O' Malley, E. T., Harbeson, S. L., Rice, C. M., Murcko, M. A., Caron, P. R., and Thomson, J. A., (1996) Crystal structure of the hepatitis C virus NS 3 protease domain complexed with a synthetic NS 4 A cofactor peptide., *Cell* **18**, 343-355

- 17) Lesburg, C. A., Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C., (1999). Crystal Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from Hepatitis C Virus Reveals a Fully Encircled Active Site., *Nat. Struct. Biol.* **6**, 937-943
- 18) Li, Y., Korolev, S., and Waksman, G., (1998). Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I., *EMBO J.* **17**, 7514-7525
- 19) Lohmann, V., Korner F., Herian U. and Bartenschlager, R., (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS 5 B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity., *J. Virol.* **71**, 8416-8428
- 20) Lohmann, V., Overton, H. and Bartenschlager R., (1999). Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS 5 B RNA polymerase activity by GTP., *J. Biol. Chem.* **274**, 10807-10815
- 21) Lohmann, V., Roos, A., Korner, F., Koch, J. O. and Bartenschlager R., (1998). Biochemical and kinetic analyses of NS 5 B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus., *Virology* **249**, 108-118
- 22) Love, R. A., Parge, H. E., Wickersham, J. A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E. W., Adachi, T., and Hostomska, Z., (1996). The crystal structure of hepatitis C virus NS 3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site., *Cell* **18**, 331-342
- 23) McHutchinson, J. G., *et al.*, (1998). Interferan alfa-2 b alone or on combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepaitis C., *New Eng. J. Med.* **329**, 1485-1492.
- 24) Oh, J-W., Ito, T., and Lai, M. M., (1999). A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA., *J. Virol.* **73**, 7694-7702
- 25) WHO., (1999). Global surveillance and control of hepatitis C., *J. Viral Hepatitis* **6**, 35-47
- 26) Yamashita, T., *et al.*, (1998). RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS 5 B protein truncated at the C-terminal region., *J. Biol. Chem.* **273**, 15479-15486
- 27) Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V., and Weber, P. C., (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain., *Nat. Struct. Biol.* **6**, 463-467
- 28) Yao, N., Reichert, P., Taremi, S. S., Prosise, W. W., and Weber, P. C., (1999). Molecular Views of Viral Polyprotein Processing Revealed by the Crystal Structure of the Hepatitis C Virus Bifunctional Protease-Helicase., *Structure* **7**, 1353-1363
- 29) 日本経済新聞 C型肝炎研究開発が加速 2001年2月21日