

# DNA 損傷センサー ATM キナーゼと Chk2はC型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である

有海 康雄<sup>a\*</sup>, 黒木美沙緒<sup>a</sup>, 團 迫 浩 方<sup>a</sup>, 阿 部 健 一<sup>a</sup>, 池 田 正 徳<sup>a</sup>, 脇 田 隆 字<sup>b</sup>, 加 藤 宣 之<sup>a</sup>

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学, <sup>b</sup>国立感染症研究所・ウイルス第二部

キーワード: HCV, ATM, Chk 2, 宿主因子, DNA 損傷センサー

## The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication

Yasuo Ariumi<sup>a\*</sup>, Misao Kuroki<sup>a</sup>, Hiromichi Dansako<sup>a</sup>, Kenichi Abe<sup>a</sup>, Masanori Ikeda<sup>a</sup>, Takaji Wakita<sup>b</sup>, Nobuyuki Kato<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Tumor Virology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>b</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

### 緒 言

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎，肝硬変そして肝癌の原因ウイルスである。現在，我が国のHCV感染者は約200万人いると推定されており，実に日本人における肝癌の原因の8割をHCV感染が占めるに至っている<sup>1,2)</sup>。しかしながら，日本人の多くはインターフェロンが効きにくい1b遺伝子型HCVに感染しているために，現行のインターフェロンとリバビリンを用いた併用療法の著効率は約50%程度に留まっている。

HCVはエンベロープを保持するフラビウイルス科に属するRNAウイルスである。約9.6kbの全長HCV

RNAゲノムから翻訳された3,000アミノ酸からなる大きな前駆体が，宿主およびウイルスのプロテアーゼの作用により切断され，少なくとも10種類のHCVウイルスタンパク質が生成される。N末側から順に構造タンパク質のCore，エンベロープE1，E2，p7，非構造（NS）タンパク質NS2，NS3，NS4A，NS4B，NS5A，NS5Bである<sup>3,4)</sup>。これらHCVタンパク質が種々の宿主因子と相互作用することにより，HCVの複製が行われる。

これまでDNAゲノムを保持するウイルスが，感染細胞内のDNA損傷応答経路を活性化し，ウイルスの自己複製に利用していることが知られている<sup>5-8)</sup>。RNAゲノムしか保持しないHCVの場合も，HCV感染により，宿主細胞に二重鎖DNA切断（dsDNA breaks）を誘導し，宿主ゲノムを変異させていることが報告されている<sup>9,10)</sup>。実際，HCV Core，E1そしてNS3が活性化酸素種（ROS）を誘導させ，DNA損傷の原因とな

平成22年1月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7390 FAX：086-235-7392

E-mail：ariumi@md.okayama-u.ac.jp

### プロフィール



有海 康雄

昭和44年12月24日生

平成4年3月 熊本大学理学部卒業

平成10年3月 京都大学大学院医学研究科博士課程修了

平成10年4月 京都大学ウイルス研究所助手

平成15年6月 ジュネーブ大学医学部博士研究員（京大休職）

平成17年4月 熊本大学エイズ学研究センター助手

平成18年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍制御学講座

分子生物学分野 助手

平成20年4月 腫瘍ウイルス学分野 助教となる

現在に至る

っていることが明らかになっている<sup>9,10</sup>。我々も HCV の RNA 依存的 RNA ポリメラーゼである NS5B を発現させたヒト不死化肝細胞株 PH5CH8 細胞において、dsDNA breaks が誘導される DNA 損傷に感受性が高いことを見出している<sup>11</sup>。そこで、本研究において RNA ゲノムしか保持しない HCV の複製に DNA 損傷応答経路が関与しているのかどうかについて検討した。

## 材料と方法

### 細胞培養

293FT 細胞は、10%牛胎児血清 (FBS) を添加した Dulbecco 改変 Eagle 培地 (DMEM) を用いて 37°C で培養した。全長 HCV RNA (O 株) が自己複製しているヒト肝癌細胞 HuH-7 細胞株由来である O 細胞、そのサブゲノムレプリコン sO 細胞<sup>12,13</sup> やウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ遺伝子を保持する全長 HCV RNA (O 株) 複製細胞株 OR6 細胞<sup>12</sup> も同様な培養条件で培養した。

### RNA 干渉法

ATM, ATR, Chk2, そして PARP-1 に対する short hairpin (sh) RNA をコードする以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖のオリゴヌクレオチドを合成した<sup>14</sup>。

ATMi,  
5'-GATCCCCGGATTTGCGTATTACTCAGTTCAA  
GAGACTGAGTAATACGCAAATCCTTTTTGGAA  
AA-3' (センス鎖),

5'-AGCTTTTCCAAAAAGGATTTGCGTATTACT  
CAGTCTCTTGAAGTACTGAGTAATACGCAAATCCG  
GG-3' (アンチセンス鎖)

ATRi,  
5'-GATCCCCGGCGTCTGCTCTCAGCTCGTCTTCAA  
GAGAGACGAGCTGAGACGACGCCTTTTTGGAA  
A-3' (センス鎖),

5'-AGCTTTTCCAAAAAGGCGTCTGCTCTCAGCTCG  
TCTCTCTTGAAGACGAGCTGAGACGACGCCGGG  
-3' (アンチセンス鎖)

Chk2i,  
5'-GATCCCCGGGGGAGAGCTGTTTGACATTCAA  
GAGATGTCAAACAGCTCTCCCCCTTTTTGGAA  
A-3' (センス鎖),

5'-AGCTTTTCCAAAAAGGGGAGAGCTGTTTGA  
CATCTCTTGAATGTCAAACAGCTCTCCCCCG

GG-3' (アンチセンス鎖)

PARP-1i,

5'-GATCCCCGCGCTTCTGCACCAACTCATTTCAA  
GAGATGAGTTGGTGCAGAAGCGCTTTTTGGAA  
A-3' (センス鎖),

5'-AGCTTTTCCAAAAAGCGCTTCTGCACCAACT  
CATCTCTTGAATGAGTTGGTGCAGAAGCGCGG  
G-3' (アンチセンス鎖)

合成したオリゴヌクレオチドはアニーリングした後、pSuper ベクター<sup>15</sup> の RNA ポリメラーゼ III プロモーターの下流 *Bgl* II-*Hind* III サイトにサブクローニングし、pSuper-ATMi, pSuper-ATRi, pSuper-Chk2i, あるいは pSuper-PARP-1i を作製した。次に pLV-ATMi, pLV-ATRi, pLV-Chk2i, pLV-PARP-1i を作製するために、各々の *Bam* HI-*Sal* I 断片をピューロマイシン耐性マーカーを保持する HIV-1 由来レンチウイルスベクター pRDI292<sup>16</sup> の *Bam* HI-*Sal* I サイトにサブクローニングした。

### レンチウイルスベクターの調製

水疱性口内炎ウイルス vesicular stomatitis virus (VSV)-G-シールドタイプ レンチウイルスベクターは、第 2 世代パッケージングコンストラクト pCMV- $\Delta$ R8.91 と VSV-G-エンベロープ発現プラスミド pMDG2 及び pRDI292 を 293FT 細胞に FuGene6 を用いて、一過性にトランスフェクションして作製した<sup>14,17-19</sup>。

### 定量的 RT-PCR 法

定量的 RT-PCR 法は、以下の forward 及び reverse プライマーを用いて real-time LightCycler PCR (Roche) により解析した<sup>12</sup>。

HCV-O, 5'-AGAGCCATAGTGGTCTGCGG-3' (forward), 5'-CTTTCGCGACCCAACACTAC-3' (reverse)

### ウエスタンブロット法

細胞は 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 4 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM dithiothreitol (DTT) 及び 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む溶解バッファーに溶解させた。細胞溶解物の上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離させた後、ウエスタンブロット法で解析した。ウエスタンブロット法に用いた抗体は、抗 ATM 抗体、抗 ATR 抗体、抗 Chk2 抗体、抗 PARP-1 抗体、抗 HCV Core

抗体 (CP-9 と CP-11 との混合物)、抗  $\beta$ -actin 抗体、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 HCV NS3 (R212) 抗体あるいは抗 HCV NS5B 抗体 (東京都臨床総合研・小原道法先生より供与された) である。

#### 免疫蛍光抗体染色法

細胞を 3.6%ホルムアルデヒドを含む phosphate-buffered saline (PBS) で固定した後、0.1% NP-40 を含む PBS を用いて室温下において permeabilize させた。次に 3%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS でブロッキングした後、300倍希釈した抗 ATM 抗体、抗 HCV NS3 抗体、抗 NS5B 抗体あるいは抗 HA 抗体を加え、37°C、30分間インキュベートした。リンスした後、細胞に300倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC)-が結合した抗ウサギ抗体あるいは Cy3 が結合した抗マウス抗体を加え、37°C、30分間インキュベートした。核は DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) で染色した。PBS でリンスした後、消光防止のために細胞を 0.01% *p*-フェニレンジアミンを含む 90%グリセリンと 10% PBS でマウントした。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Zeiss) を用いて観察した。

#### 免疫沈降法

細胞を 10mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、4 mM EDTA、0.5% NP-40、1 mM DTT、1 mM PMSF を含む RIPA バッファーで可溶化させた。細胞ライゼートに 30 $\mu$ l の protein-G-Sepharose を加え、クリーニングした。そして、5 $\mu$ l の抗 HA 抗体、抗 Chk2 抗体、抗 HCV NS5B 抗体あるいは抗 FLAG 抗体と抗 ATM 抗体との混合物を加え、4°C、1時間インキュベートした。さらに 30 $\mu$ l の protein-G-Sepharose 樹脂を加え、1時間回転させながらインキュベートさせた後、樹脂は RIPA バッファー 700 $\mu$ l を用いて 5 回洗った。樹脂に結合したタンパク質は 1x Laemmli サンプルバッファーで 5 分間ボイルして溶出させた。サンプルは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、抗 HA 抗体、抗 ATM 抗体、抗 HCV NS3 抗体、抗 HCV NS5B 抗体、あるいは抗 HCV Core 抗体 (CP-9 と CP-11 との混合物) を用いたウエスタンブロット法により解析した。

## 結 果

### 1. ATM と Chk2 は HCV RNA 複製に必要である

DNA 損傷応答経路の HCV 複製における役割を明

らかにするために、DNA 損傷センサーである ATM、ATR、Chk2、そして PARP-1 を標的とした short hairpin (sh) RNA を発現するレンチウイルスをヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来細胞株 Oc 細胞 (HCV 陰性) に導入し、ノックダウン細胞を作製した。ウエスタンブロット法により、各々のノックダウン細胞において、ATM、ATR、Chk2、あるいは PARP-1 が非常に効率良くノックダウンされていることが確認された (図 1 A)。このノックダウン Oc 細胞に全長 HCV RNA (O 株、遺伝子型 1b) をエレクトロポレーション法により導入し、G418 で 3 週間選択培養した後、生じてくるコロニーを比較した。その結果、ATR と PARP-1 ノックダウン細胞は、コントロール細胞と同程度のコロニー形成能が観察されたが、驚くべきことに ATM と Chk2 ノックダウン細胞ではほとんどコロニー形成が見られなかった (図 1 B)。ちなみに各々のノックダウン細胞の増殖能には顕著な差はなかった (図 1 C)。この結果は dsDNA 損傷センサーである ATM と Chk2 (ATM の直接のターゲットでもある) が HCV 複製に関与していることを示唆している。そこで、この仮説を検証するために全長 HCV (O 株) RNA が自己複製している O 細胞を用いて、同様に ATM、ATR、Chk2、あるいは PARP-1 ノックダウン細胞を作製して、real-time RT-PCR 法により細胞内 HCV RNA レベルを比較した。その結果、予想通り、ATM と Chk2 をノックダウンした時のみ、コントロール細胞に比べ、細胞内の HCV RNA レベルが顕著に減少することが見出された (図 1 D)。さらに HCV RNA 複製に最低限必要な複製領域である NS3-NS5B まで保持するサブゲノムレプリコン sO ノックダウン細胞を用いても同様な結果が得られた (図 1 E)。また、ウエスタンブロット法により、ATM と Chk2 ノックダウン O 細胞において、細胞内の HCV Core 及び NS5B タンパク質の発現レベルがコントロール細胞に比べ、顕著に減少していることが確認された (図 1 F)。以上の結果より、ATM と Chk2 が HCV RNA 複製に必要な宿主因子であることが示唆された。

### 2. ATM キナーゼ阻害剤の抗 HCV 効果

次に ATM キナーゼ特異的阻害剤である 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933)<sup>8)</sup>を用いて、その抗 HCV 効果について検討した。ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ遺伝子を保持する全長 HCV (O 株) 複製細胞株 OR 6 細胞<sup>12)</sup>を

ATM キナーゼ阻害剤で処理し、72時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ATM 阻害剤は濃度依存的にルシフェラーゼ活性、すなわち HCV RNA 複製を抑制することが見出された (図 2)。HCV RNA 複製を 50%抑制するのに必要な濃度 EC<sub>50</sub> 値は 1.9 μM

で、少なくとも HCV RNA 複製を約 90% 阻害する 5 μM までの濃度では、ATM 阻害剤に顕著な細胞毒性はないことも判明した。

### 3. HCV NS3-4A と ATM の相互作用

HCV NS3-4A は dsDNA breaks を誘導することが

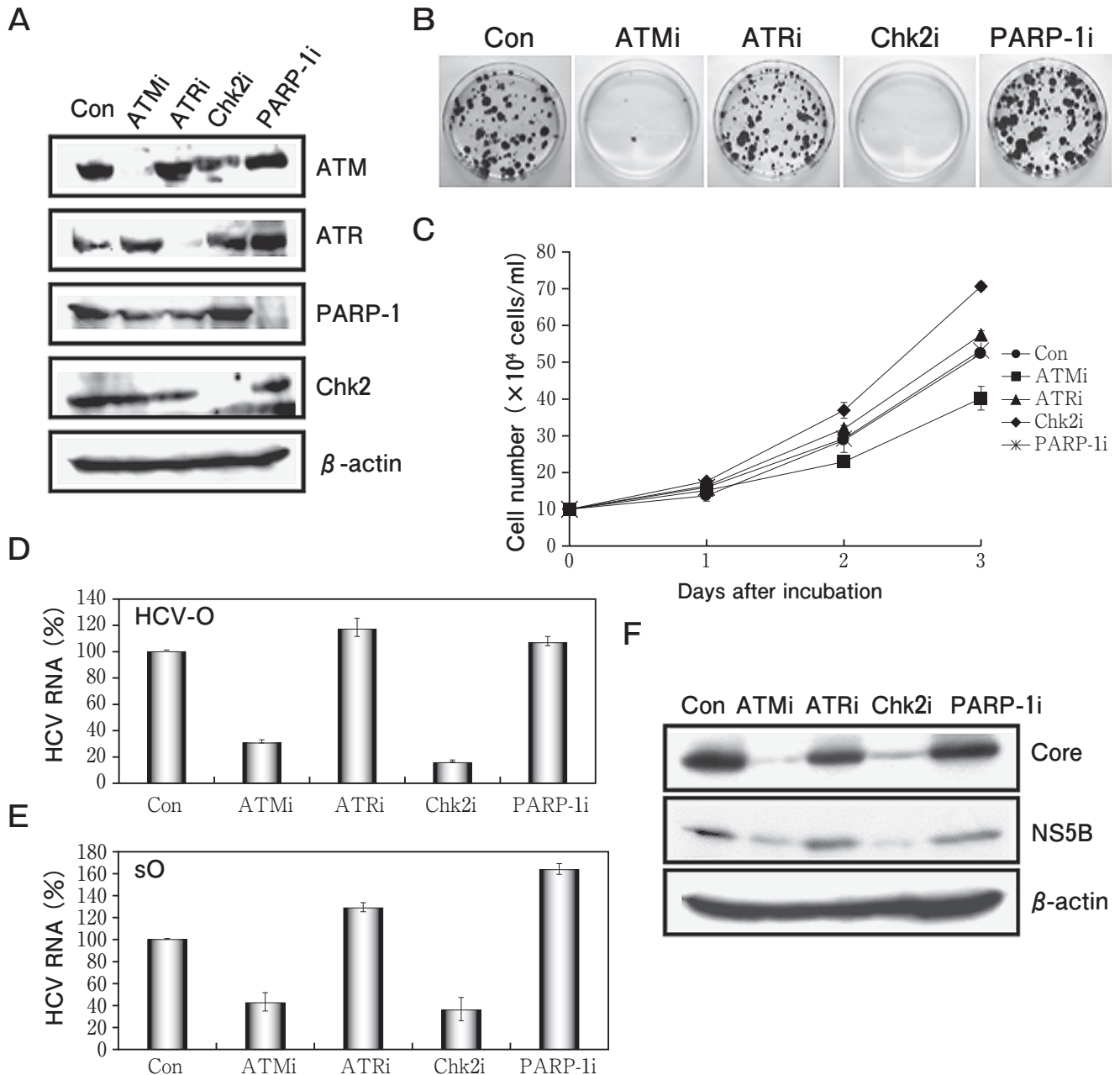


図 1 ATM シグナル伝達経路の HCV RNA 複製への関与。(A) shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて作製したノックダウン細胞の ATM, ATR, PARP-1, Chk2 発現レベルをウエスタンブロット法で解析。(B) ATM, ATR, PARP-1, Chk2 ノックダウン細胞のコロニー形成能。(C) ATM, ATR, PARP-1, Chk2 ノックダウン細胞の細胞増殖曲線。(D) ATM, ATR, PARP-1, Chk2 ノックダウン O 細胞内の HCV RNA レベル。(E) ATM, ATR, PARP-1, Chk2 ノックダウン sO 細胞内の HCV RNA レベル。(F) ATM, ATR, PARP-1, Chk2 ノックダウン O 細胞内の HCV Core, NS5B および  $\beta$ -アクトチンの発現レベルをウエスタンブロット法で解析。

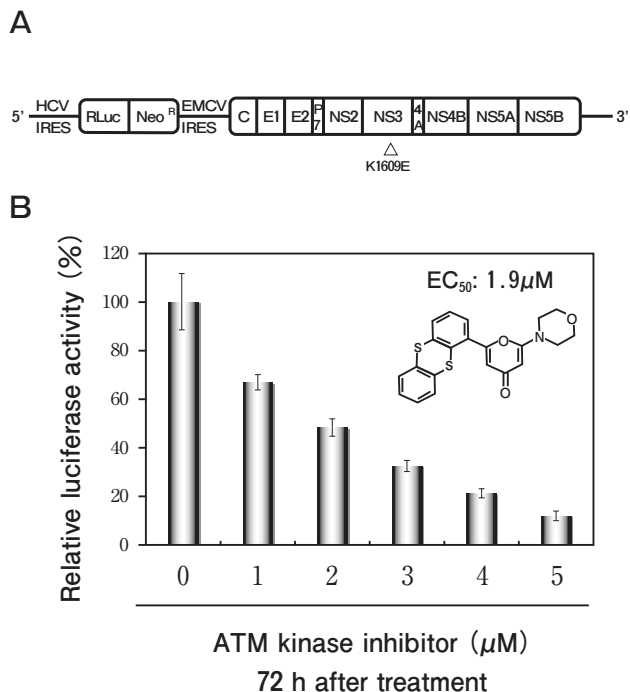


図2 ATM 特異的阻害剤の抗 HCV 効果。(A) OR6 細胞内に導入したウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ遺伝子を保持する全長 HCV (O 株) の遺伝子構造。(B) ATM 特異的阻害剤で OR6 細胞を処理して 72 時間後のウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定。結果は 3 回の平均値を示し、阻害剤 0 μM 濃度におけるルシフェラーゼ値を 100 とした場合の相対値で表示している。

知られている<sup>9,10</sup>。そこで、ATM が NS3-4A と相互作用するのかどうかについて検討するため、まず共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ATM と NS3-4A の細胞内局在を観察した。293FT 細胞に HCV NS3-4A (1B-1 株と O 株、共に遺伝子型 1b) と ATM を共発現させると、ATM は主に核に局在し、NS3 は細胞質に局在したが、2 つの異なる NS3 共に ATM と核周囲の境界領域と細胞質が斑点状に部分的に共局在していることが観察された (図 3 A)。さらに NS3-4A と ATM との結合を調べるために免疫沈降実験を行った。293FT 細胞に FLAG タグした ATM (FLAG-ATM) NS3-4A あるいは NS3 を共発現させると、NS3 より NS3-4A の方が強く ATM と結合することが見出された (図 4 A)。また、FLAG-ATM のみを発現させた 293FT 細胞と全長 HCV RNA が複製している O 細胞のライゼートの混合物を抗 FLAG 抗体と抗 ATM 抗体で免疫沈降しても、FLAG-ATM と O 細胞中の内在性 NS3 とが結合していることが確認できた (図 4 B)。一方、NS3-4A はプロテアーゼ活性があるので、ATM を分解

しないか共発現させ、ウエスタンブロットで確認したが、ATM は NS3-4A により分解されないことが判明した (図 4 D)。以上の結果より、ATM は HCV NS3-4A と相互作用することが示唆された。

#### 4. HCV NS5B と ATM 及び Chk2 との相互作用

我々は、HCV NS5B を発現させたヒト不死化肝細胞株 PH5CH8 細胞において、dsDNA breaks が誘導される DNA 損傷に感受性が高いことを見出してきたので<sup>11</sup>、次に HCV NS5B が dsDNA breaks センサーである ATM や Chk2 と相互作用するのかどうかについて検討した。293FT 細胞に NS5B と FLAG-ATM あるいは HA-Chk2 を共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡によりその細胞内局在を観察した結果、NS5B は FLAG-ATM と細胞質において部分的に局在の一致が観察された (図 3 B)。また、NS5B は HA-Chk2 と核と細胞質の境界領域において共局在が観察された (図 3 C)。そこで、NS5B と ATM あるいは Chk2 との結合を免疫沈降実験で確かめた。O 細胞のライゼートを抗 ATM 抗体で免疫沈降すると内在性の NS5B と ATM とが共沈することを見出した (図 4 E)。この結合を確かめるために、293FT 細胞に FLAG-ATM と NS5B を共発現させても両者の共沈が確認できた (図 4 F)。また、FLAG-ATM のみを発現させた 293FT 細胞と O 細胞のライゼートの混合物を抗 FLAG 抗体と抗 ATM 抗体で免疫沈降しても、FLAG-ATM と O 細胞中の内在性 NS5B とが結合していることが確認できた (図 4 G)。一方、NS5B と Chk2 との結合を検討するために O 細胞のライゼートを抗 Chk2 抗体で免疫沈降すると内在性 NS5B の共沈が見出された (図 4 H)。293FT 細胞に HA-Chk2 と NS3-4A を共発現させても両者の共沈は観察されなかったが (図 4 C)、HA-Chk2 のみを発現させた 293FT 細胞と O 細胞のライゼートの混合物を抗 HA 抗体で免疫沈降すると NS5A や Core は共沈しないものの、NS5B のみ共沈した (図 4 I)。さらにこの NS5B と Chk2 との結合を確かめるために 293FT 細胞に HA-Chk2 と NS5B を共発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降すると両者の共沈が確認できた (図 4 J)。以上の実験結果より、HCV NS5B は ATM と Chk2 と相互作用することが示唆された。

#### 考 察

DNA 損傷センサー ATM は多くの DNA ゲノムを保持するウイルス感染により活性化され、ウイルスの

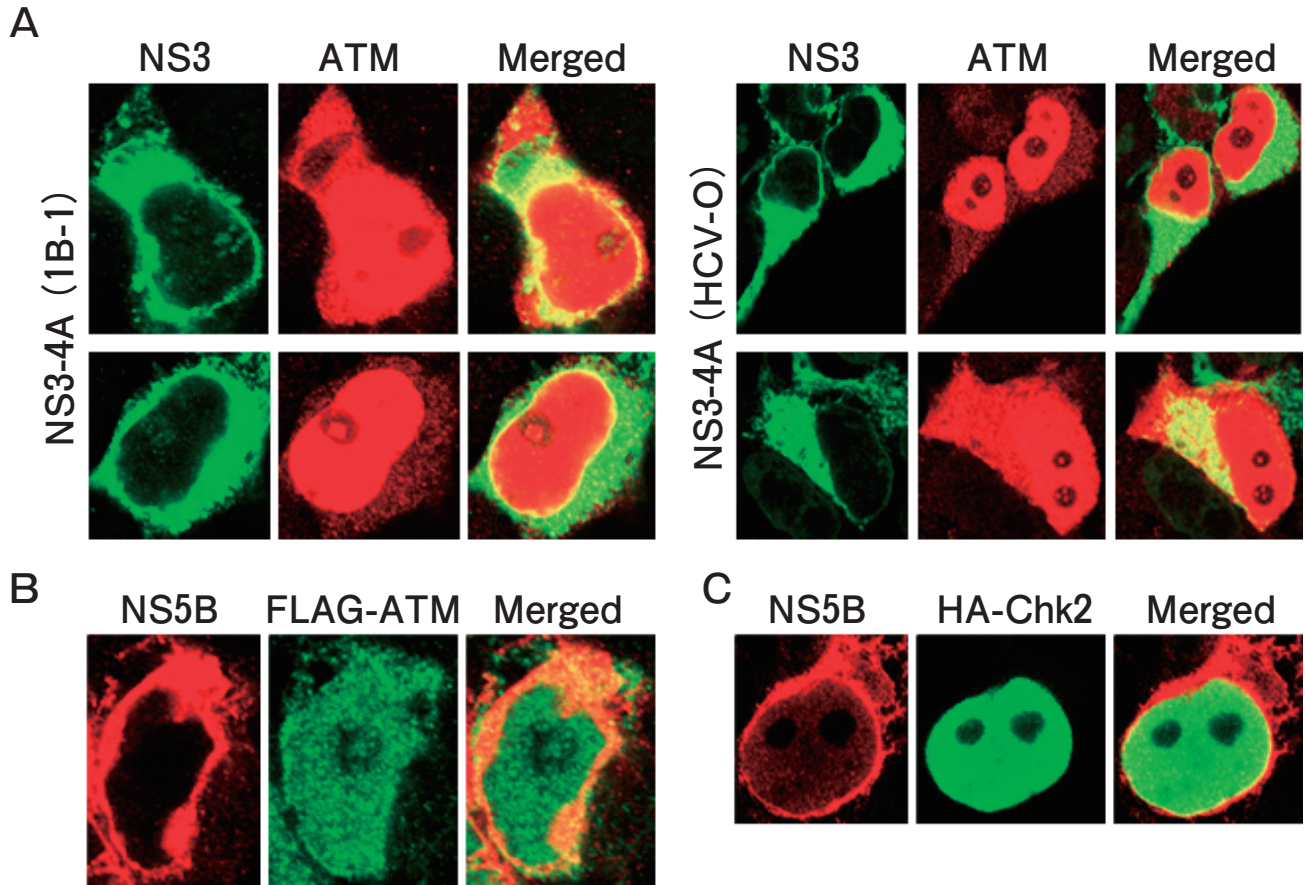


図3 HCV NS3-4AあるいはNS5B発現293FT細胞におけるATMとChk2の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察。2つの色を重ねて得られた(Merged)黄色は両者の因子の共局在を示している。

複製に関与する宿主因子であることが知られているが<sup>5-8)</sup>、本研究により、RNAゲノムしか保持しないHCVも自身のRNAの複製に必要であることが明らかとなった<sup>20)</sup>。HCV NS3やCoreが宿主ゲノムにdsDNA breaksを誘導することにより、RNAゲノムしか保持しないHCVもATMシグナル伝達経路を活性化できるのかもしれない。実際、我々もHCV RNA複製細胞において、ATMの直接リン酸化することが同定されているChk2のThr68がリン酸化されていることを見出している<sup>20)</sup>。

最近、興味深いことにLaiらのグループはHCV NS3-4AがATMに結合することにより、宿主のDNA修復機構を抑制していることを報告している<sup>21)</sup>。一方、本研究により、我々はNS5BがATMやChk2と相互作用していることを発見した<sup>20)</sup>。この知見は以前、我々が報告したHCV NS5Bを発現させたヒト不死化肝細胞株PH5CH8細胞において、dsDNA breaksが誘導

されるDNA損傷に感受性が高いこと<sup>11)</sup>との関連が示唆される。HCVが自己複製のため、ATMと相互作用する結果、宿主のDNA修復機構が阻害され、宿主のゲノム不安定性が増強される。その結果、宿主ゲノムの変異率が高まり、細胞が癌化する可能性も示唆される。

ATMがHCV RNA複製に必要である知見の裏付けとして、ATM特異的阻害剤2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933)が、顕著にHCV RNA複製を阻害していることを見出した(図2)。このATM阻害剤のHCV RNA複製を半減させるEC<sub>50</sub>値は1.9μMであるが、興味深いことにエイズの原因ウイルスであるHIV-1の複製を半減させるEC<sub>50</sub>値も2.3μMである<sup>8)</sup>。今後、ATM特異的阻害剤が慢性C型肝炎とエイズの両方の慢性持続ウイルス感染症に有効な抗ウイルス剤として臨床の場で期待される。

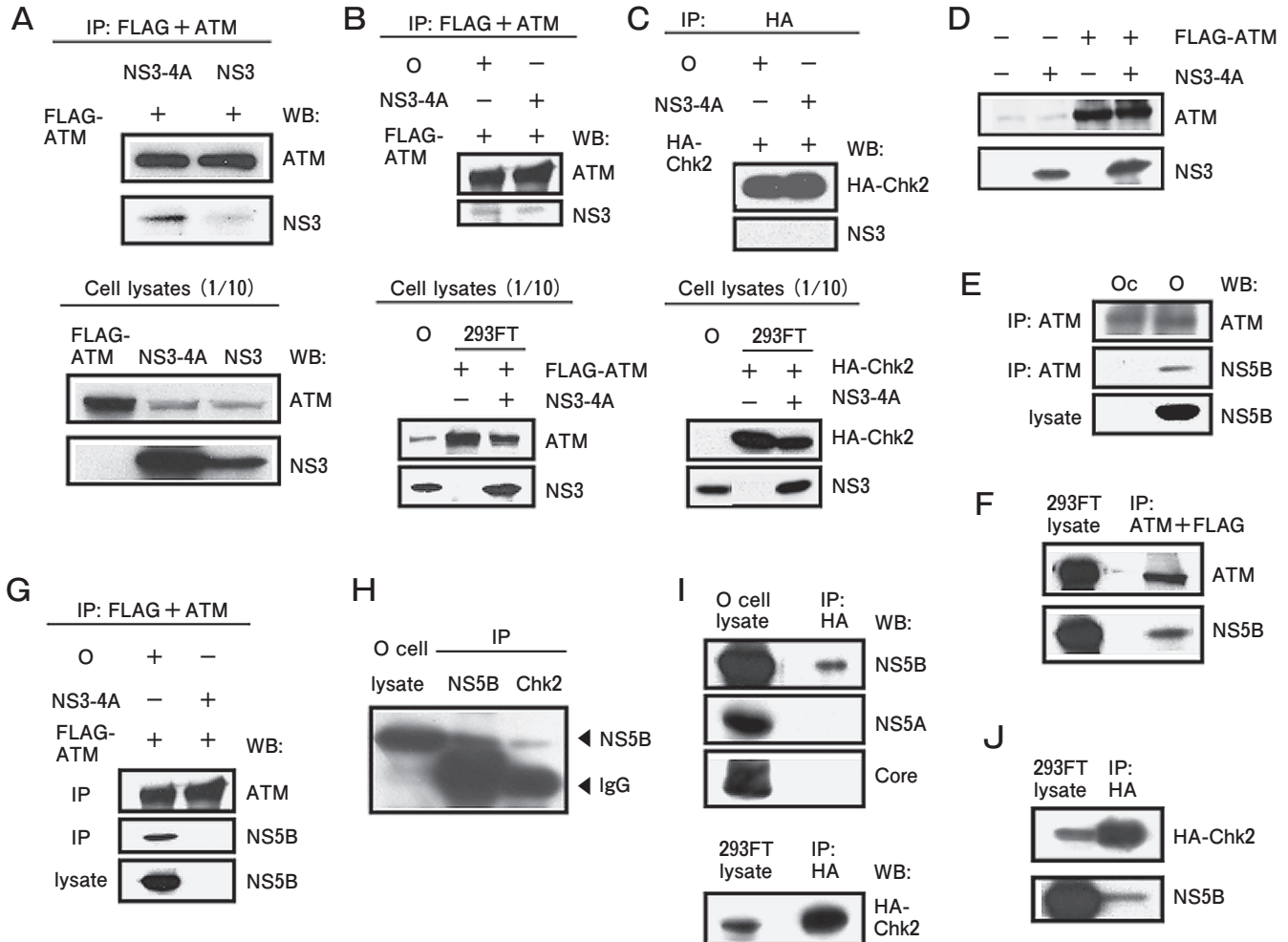


図4 HCV と ATM/Chk2 との相互作用。(A)-(C) HCV NS3-4A と ATM あるいは Chk2 との結合を免疫沈降法により解析。(D) ATM は HCV NS3-4A により分解されないことをウエスタンブロット法で解析。(E)-(G) HCV NS5B と ATM との結合を免疫沈降法により解析。(H)-(J) HCV NS5B と Chk2 との結合を免疫沈降法により解析。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり，文部科学省，日本学術振興会，厚生労働省のご支援を受け賜りましたことに深謝致します。また，実験材料を提供して頂きましたスイス連邦工科大学ローザンヌ校 Didier Trono 先生，京都大学ウイルス研究所 土方 誠先生，東京都臨床医学総合研究所 小原 道法先生，そして，共焦点レーザー顕微鏡の使用にあたりご協力頂きました岡山大学医学部共同実験室の皆様へ深謝致します。最後になりましたが，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 中村孝志氏をはじめ腫瘍ウイルス学分野の教室員のご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 有海康雄，加藤宣之：日本臨床，67：増刊号 3，(2009) 138-142.

- 2) Thomas DL：Hepatitis C epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol* (2000) 242, 25-41.
- 3) Kato N：Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* (2001) 55, 133-159.
- 4) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K：Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87, 9524-9528.
- 5) Lilley CE, Schwartz RA, Weitzman MD：Using or abusing：viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* (2007) 15, 119-126.
- 6) Gaspar M, Shenk T：Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103, 2821-2826.
- 7) Ariumi Y, Trono D：Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) protein can enhance human immunodeficiency

- virus type 1 replication by stimulating Rev function. *J Virol* (2006) 80, 2445-2452.
- 8) Lau A, Swinbank KM, Ahmed PS, Taylor DL, Jackson SP, Smith GC, O'Connor MJ : Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase. *Nat Cell Biol* (2005) 7, 493-500.
  - 9) Machida K, Cheng KT, Sung VM, Shimodaira S, Lindsay KL, Levine AM, Lai MY, Lai MM : Hepatitis C virus induces a mutator phenotype : enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101, 4262-4267.
  - 10) Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM : Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* (2004) 78, 8835-8843.
  - 11) Naka K, Dansako H, Kobayashi N, Ikeda M, Kato N : Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- $\beta$  via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* (2006) 346, 348-362.
  - 12) Ikeda M, Abe K, Dansako H, Nakamura T, Naka K, Kato N : Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 329, 1350-1359.
  - 13) Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K : Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 306, 756-766.
  - 14) Ariumi Y, Turelli P, Masutani M, Trono D : DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* (2005) 79, 2973-2978.
  - 15) Brummelkamp TR, Bernard R, Agami R : A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* (2002) 296, 550-553.
  - 16) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R : Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* (2003) 34, 263-264.
  - 17) Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D : In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (1996) 272, 263-267.
  - 18) Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D : Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* (1997) 15, 871-875.
  - 19) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N : DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* (2007) 81, 13922-13926.
  - 20) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N : The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* (2008) 82, 9639-9646.
  - 21) Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM : Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* (2008) 370, 295-309.