

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07154

研究課題名(和文) オミックス解析によるヒトパピローマウイルス細胞内侵入機構の解明

研究課題名(英文) Omics analysis in human papillomavirus cell entry

研究代表者

石井 克幸 (Ishii, Yoshiyuki)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：90342899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルス(HPV)は、環状DNAゲノムと2つのキャプシドタンパク質からなる非エンベロープウイルスであり、皮膚、口腔および肛門生殖器上皮基底細胞に入り、細胞分化と連動して増殖する。HPVのライフサイクルを達成するためには、複数の宿主因子が必要である。しかし、侵入プロセスに関連する細胞タンパク質はまだ完全に同定されていない。我々は、HPV18シュードビリオン(18PsV)を用いてCRISPRノックアウトゲノムライブラリースクリーニングを行い、細胞内GTPase活性化タンパク質であるフォリクリン(FLCN)が18PsV感染の優勢因子であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトパピローマウイルスは子宮頸がんの原因ウイルスである。本研究は細胞内のGTPase活性化タンパク質の一つであるフォリクリン(FLCN)が同ウイルスの細胞侵入に重要な役割を果たすことを見出した。研究の成果は、HPVの基礎研究ならびにHPV感染予防および子宮頸がん治療に貢献する。また、FLCNがバート・ホッグ・デューブ症候群(BHDS)の責任遺伝子であることから、BHDS発症メカニズムの解明にも寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Human papillomavirus (HPV), a non-enveloped virus composed of a circular DNA genome and two capsid proteins, enters skin, oral and anogenital epithelial basal cells and proliferates tightly associated with the cell differentiation. Multiple host factors are required to accomplish HPV life cycle. However, cellular proteins associated with the entry process have yet fully identified. Here, we conducted CRISPR knockout genome library screening using HPV18 pseudovirion (18PsV), and found Folliculin (FLCN), an intracellular GTPase activating protein, as a predominant factor for 18PsV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HPV 細胞侵入 CRISPR-Cas9 sgRNAライブラリー FLCN

## 1 研究の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、粘膜の上皮基底細胞に感染し、細胞分化とともに増殖するか、基底細胞で持続感染する。これまで 200 以上の遺伝子型が確認され、そのうち 16 型や 18 型を含む高リスク型と呼ばれる 15 種の遺伝子型 HPV 感染が子宮頸がんの原因である。HPV 感染を達成するためには、複数の宿主因子が必要である。しかし、細胞侵入に關与する分子メカニズムはまだ完全には理解されていない。

## 2 研究の目的

本研究では、HPV18 型の細胞侵入 (正確には、細胞表面の接着からウイルスゲノムの核移行までの過程) に必要な細胞内タンパク質を大規模に同定することを目的とし、ヒト子宮頸部腺がん組織由来の HeLa 細胞をターゲットにした CRISPR-Cas9 ノックアウトライブラリスクリーニングを実施した。

## 3 研究の方法

### 3-1 細胞

子宮頸部上皮内腺がん細胞 HeLa-mCAT#8、ヒト表皮角化細胞 HaCaT、ヒト胎児腎細胞 293FT、Lenti-X™ 293T、および子宮頸外部上皮細胞 Ect1/E6E7 が使用された。それぞれ専用培地で培養された。

### 3-2 プラスミド

ウシパピローマウイルス E2 遺伝子発現プラスミド(pCMS-BE2-EGFP)は、合成したウシパピローマウイルス E2 遺伝子を pCMS-EGFP に挿入することにより構築した。ルシフェラーゼ発現レポータープラスミド(pCMV-luc2)の構築のため、ホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子を pGL4.10 から PCR により増幅し、pCMV-LacZ から -ガラクトシダーゼ DNA を切除した後、これを挿入した。続いて、SV40 原点配列を挿入した。lentiGuide-Puro プラスミド中のヒトゲノムスケール CRISPR ノックアウト (GeCKO) v2.0 ライブラリー (ライブラリー A のシングルガイド RNA (sgRNA) 65386 個とライブラリー B の 58031 個の sgRNA) および lentiCas9-Blast プラスミド (2 つのベクターレンチウイルス GeCKO システム) を Addgene から取得した。

### 3-3 HPV シュードウイルス (PsV)

pCMS-BE2-EGFP をパッケージした HPV18 型シュードウイルス (18PsV-BE2) は、293FT 細胞を pCMV-18L1, pCMV-18L2, pCMS-BE2-EGFP の混合物をトランスフェクションすることで得られた。また、pCMV-luc2 を内包した HPV18 型偽ウイルス (18PsV-luc) および HPV16 型偽ウイルス (16PsV-luc) は、293FT 細胞を pCMV-18L1, pCMV-18L2, pCMV-luc2 の混合物、または pCMV-16L1, pCMV-16L2, pCMV-luc2 の混合物をトランスフェクションすることで得られた。pCMV-luc2 を EdU で標識した EdU 標識 18PsV (18PsV-EdU) または 16PsV (16PsV-EdU) は、EdU を含む培地で増殖させた 293FT によって生成された。

### 3-4 組換えレンチウイルスと組換えアデノ随伴ウイルス血清型 2

#### FLCN-sgRNA 発現

#### レンチウイルス

#### (LV FLCN

sgRNA)、FLCN-HA 発現レンチウイルス (LV FLCN-HA)、およびホタルルシフェラーゼ遺伝子発現レンチ

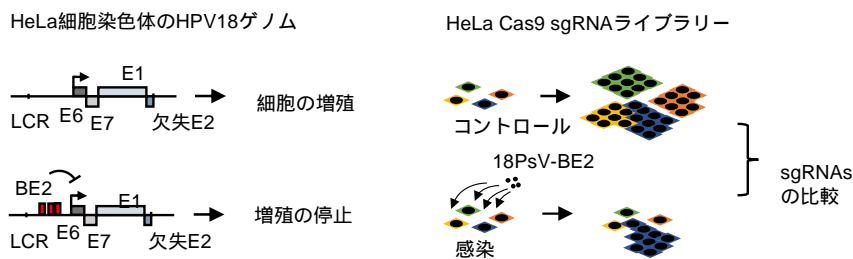


図1 E2の効果とスクリーニングの概略

ウイルス(rLV)を Lentivirus High Titer Packaging Mix (タカラバイオ)を用いて調製した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子発現組換えアデノ随伴ウイルス血清型 2(rAAV2)は、AAVpro®ヘルパーフリーシステム(タカラバイオ)により調製した。

### 3-5 sgRNA 発現細胞ライブラリーの作製

4つの独立したsgRNA発現細胞ライブラリー(A1、A2、B1およびB2)を調製した。S. pyogenes Cas9発現HeLa細胞クローンであるHeLa CAS9#W7細胞に、GeCKO v2.0ライブラリーの4つの独立したレンチウイルスプール(A1、A2、B1およびB2)を感染させた。24時間後、細胞をピューロマイシンを含む培地で培養した。これらの細胞ライブラリーを凍結し、使用時まで保存した。

### 3-6 18PsV-BE2 感染に対する CRISPR スクリーニング

各細胞ライブラリーからのsgRNA発現細胞(A1、A2、B1およびB2)  $3 \times 10^7$  細胞を、150 mm dish の12枚 ( $2.5 \times 10^6$  細胞/dish x 12枚)に播種した(Yamaji et al. iScience 2019)。16時間後、18PsV-BE2を  $17.3 \times 10^3$  vg/細胞 ( $60 \mu\text{g}$  of L1 /dish x 12枚)で感染させた。翌日、同じウイルス量で2回目の感染を行った。培養から14日後(継代1回)に、細胞を回収し、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結した。コントロール(18PsV-BE2非感染細胞)として、各細胞ライブラリーからの  $1.5 \times 10^7$  sgRNA発現細胞を、150 mm dish の6dish ( $2.5 \times 10^6$  細胞/dish x 6枚)に播種した。培養から14日後(継代2回)、細胞を回収し、凍結した。

### 3-7 ゲノム DNA シーケンシングとデータ解析

凍結細胞由来のゲノムDNAを、従来のフェノールクロロホルム法を用いて精製した。染色体に挿入されたsgRNA配列の増幅と解析およびデータの処理は、山地らの方法で実施された(Yamaji et al. iScience 2019)。また、MAGeCKによって解析されたデータは、Plotly Java Script Open Source Graphing Library を用いたマンハッタンプロット(plotly.js version 1.50.0)によって視覚化された。

### 3-8 ウイルス感染

細胞を10%FBS培地を含むDMEMで一晩培養し、ウイルスを感染させた。2日後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。活性は、CellTiter 96 非放射性細胞増殖アッセイによる細胞生存率で標準化された。実験は独立して3回実施された。

### 3-9 ウェスタンブロット

細胞タンパク質をSDS/PAGEで分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。1次抗体にウサギモノクローナル抗FLCN抗体(EPNCIR147; abcam)、2次抗体に西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウスIgGを使用した。検出試薬にアマシャムECL primeを用い、ChemiDoc XRS Plusで画像化された。

### 3-10 共焦点蛍光顕微鏡解析

HPV粒子と細胞表面の結合を解析するため、細胞を18PsV-Lucを含む培地で1時間 $4^\circ\text{C}$ でインキュベートした。4%パラホルムアルデヒドPBSで固定し、1次抗体にマウスモノクローナル抗HPV18 L1抗体(J4)またはマウスIgMk鎖抗ヘパラン硫酸抗体(F58-10E4; amsbio)を、2次抗体にAlexa fluor 555または488ヤギ抗マウスIgG(H+L)を使用した。HPV粒子の細胞内局在を解析するため、細胞を18EdUまたは16EdUを含む培地で8時間インキュベートした。細胞の固定、TX-100による透過処理、Alexa fluor 488 azideによるClick-iT反応を行った。1次抗体にウサギモノクローナル抗EEA1抗体(C45B10; Cell Signaling Technology)、2次抗体にAlexa fluor 555ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を使用した。ProLong Gold Antifade 試薬を用いてマウントした。蛍光画像は、FluoView FV1000共焦点顕微鏡で撮影された。

### 3-11 HPV粒子の細胞侵入解析

細胞を16PsV-Lucを含む培地と共に $4^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした後、EDATまたはEDTA-トリプシンでデッシュから剥離した。他は、 $37^\circ\text{C}$ で18時間培養され、EDTA-トリ

プシンで剥離された。細胞内 16PsV-Luc はウエスタンブロットで解析された。マウスモノクローナル抗 16L1 抗体(554171;BD Biosciences Pharmingen)が使用された。

## 4 研究結果

### 4-1 CRISPR ノックアウトライブラリスクリーニング

ウシパピローマウイルス E2(BE2)は HeLa 細胞などの腺がん細胞の E6 や E7 の発現を抑制し細胞増殖を停止させることが知られている。この性質を利用し BE2 発現プラスミドを内包した HPV18 型偽ウイルス(18PsV-BE2)を作成し、これに耐性となる HeLa 細胞を CRISPR ノックアウト(KO)ライブラリーからスクリーニングした(図1)。18PsV-BE2 感染後、増殖を続ける細胞を集め、染色体ゲノムに組み込まれた sgRNA の配列とリード数を次世代シーケンサーで解析した。ヘパラン硫酸合成に関わる遺伝子 (*NDST1*, *HS6ST1*, *EXT1*, *EXT2*, *XYLT2*, *EXTL3*, *B4GALT7*),  $\gamma$ -secretase 複合体遺伝子(*APH1A*, *PSEN1*, *PSEN2*, *NCSTN*, *PSENUM*), ER-Golgi 関連遺伝子 (*COG4*, *TRAPPC12*, *TMEM165*, *USO1*, *RER1*, *GOSR2*, *UNC50*)の sgRNA が複数種で濃縮された。Model-base Analysis of Genome-wide CRISPR-CAS9 Knockout (MAGeCK)もこれら遺伝子に高いスコアを与え、GO 解析は Regulator 複合体を含む TOR-signaling、Cornified envelope、プロテアソームとの関連も示唆した。HSPGs と  $\gamma$ -secretase は HPV 感染に必須な宿主タンパク質であることが知られている。今回の解析により、HSPGs と  $\gamma$ -secretase の重要性が再確認されると共に、本スクリーニングが正しく機能していることが明らかとなった。

### 4-2 CRISPR スクリーニングの評価

本 CRISPR スクリーニング結果を評価するため、sgRNA/Cas9 を導入した HeLa 細胞にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドをもつ HPV18 型偽ウイルス(18PsV-Luc)を感染させた。先に示したヘパラン硫酸に関わる遺伝子、 $\gamma$ -secretase 複合体、ER-Golgi 関連遺伝子 (*COG4*, *TRAPPC12*, *USO1*, *RER1*, *GOSR2*, *UNC50*)の sgRNA に加え、MAGeCK で高スコアを示した ER-Golgi と小胞輸送関連遺伝子 (*TRAPPC13*, *SEC31A*, *SEC23IP*, *SEC23B*, *GPR89A*, *GPR89B*, *RAB1A*, *RAB1B*, *TMEM147*, *TBC1D5*)、および TOR-signaling 関連遺伝子 (*FLCN*, *RRAGA*, *RRAGC*, *RICTOR*)、さらに 26S subunit non-ATPase 12 (*PSMD12*), ubiquitin protein ligase E3D (*UBE3D*), *FURIN*, PDS5 cohesin associated factor A (*PDS5A*), olfactomedin-like protein 2B (*OLFML2B*), signal peptide peptidase like 3 (*SPPL3*), CXADR like membrane protein (*CLMP*), unc-45 myosin chaperon B (*UNC45B*)遺伝子の sgRNA は 18PsV-Luc の感染を有意に低下させた。

### 4-3 HPV 感染におけるフォリクリン(FLCN)の影響

4-2 の実験結果から、FLCN に焦点を当て解析を進めた。FLCN 遺伝子に対して配列の異なる 2 種類の sgRNA を Cas9 とともにそれぞれ HeLa 細胞に導入し、18PsV-Luc および 16 型偽ウイルス(16PsV-Luc)を感染させた。細胞内 FLCN 量はウエスタンブロットで解析された。FLCN の減少と相関するように 18PsV-Luc, 16PsV-luc の感染は低下した。同様の低下はヒト表皮角化細胞 HaCaT、子宮頸外部上皮細胞 Ect1/E6E7 を用いた場合でも観測された。クローナルな FLCN の KOHeLa 細胞( $\Delta$ FLCN)を作成し、18, 16PsV-Luc による感染実験を行った。 $\Delta$ FLCN は 18, 16PsV-Luc に対し強い抵抗性を示したが、FLCN を入れ戻した細胞( $\Delta$ FLCN/FLCN-HA)はその感受性を回復した。一方、 $\Delta$ FLCN は水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質をもつ組換えレンチウイルス (rLV) やアデノ随伴ウイルス 2 型 (rAAV2) に対し高い感受性を示した。以上の結果から、FLCN は複数の遺伝子型 HPV 感染に重要であり、ウイルス特異的な宿主内タンパク質であることが示唆された。

### 4-4 HPV 感染における FLCN の役割

FLCN の HPV 粒子と細胞表面との結合に及ぼす影響を検討した。HeLa 細胞(親株)、 $\Delta$ FLCN 細胞に 18PsV-Luc 粒子を与え、4°C で 1 時間培養後、HPV18 型 L1 特異抗体および 2 次抗体で標

識し、これを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。親株、 $\Delta$ FLCN 細胞共にその結合性に違いはなかった(図 2 A)。HPV 粒子は細胞に侵入後初期エンドソームを經由しトランスゴルジネットワーク(TGN)へ輸送されることが知られている。EdU でレポータープラスミドをラベルした 18PsV-Luc(18PsV-EdU)と 16PsV-Luc(16PsV-EdU)をそれぞれ親株、 $\Delta$ FLCN 細胞、 $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞に与え、8 時間インキュベートした後、その局在を共焦点顕微鏡で観察した。親株に比べ  $\Delta$ FLCN 細胞の 18PsV-EdU,16PsV-EdU と EEA1(初期エンドソームのマーカ)との共局在の割合は有意に減少した(図 2 A)。一方、 $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞におけるその共局在レベルは、親株のそれと同等であった(図 2 A)。最後に、HPV 粒子細胞侵入実験を行った。16PsV-Luc を親株、 $\Delta$ FLCN 細胞、 $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞に結合させた後、1 ~ 8 時間培養した。細胞をトリプシン-EDTA で回収後、SDS-PAGE を行い、抗 L1 抗体によるウエスタンブロットで解析した。親株と  $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞において L1 は検出できたが、 $\Delta$ FLCN 細胞では僅かであった(図 2 B)。以上の結果から、FLCN は HPV 粒子の取り込みに重要な役割を果たすことが明らかとなった。

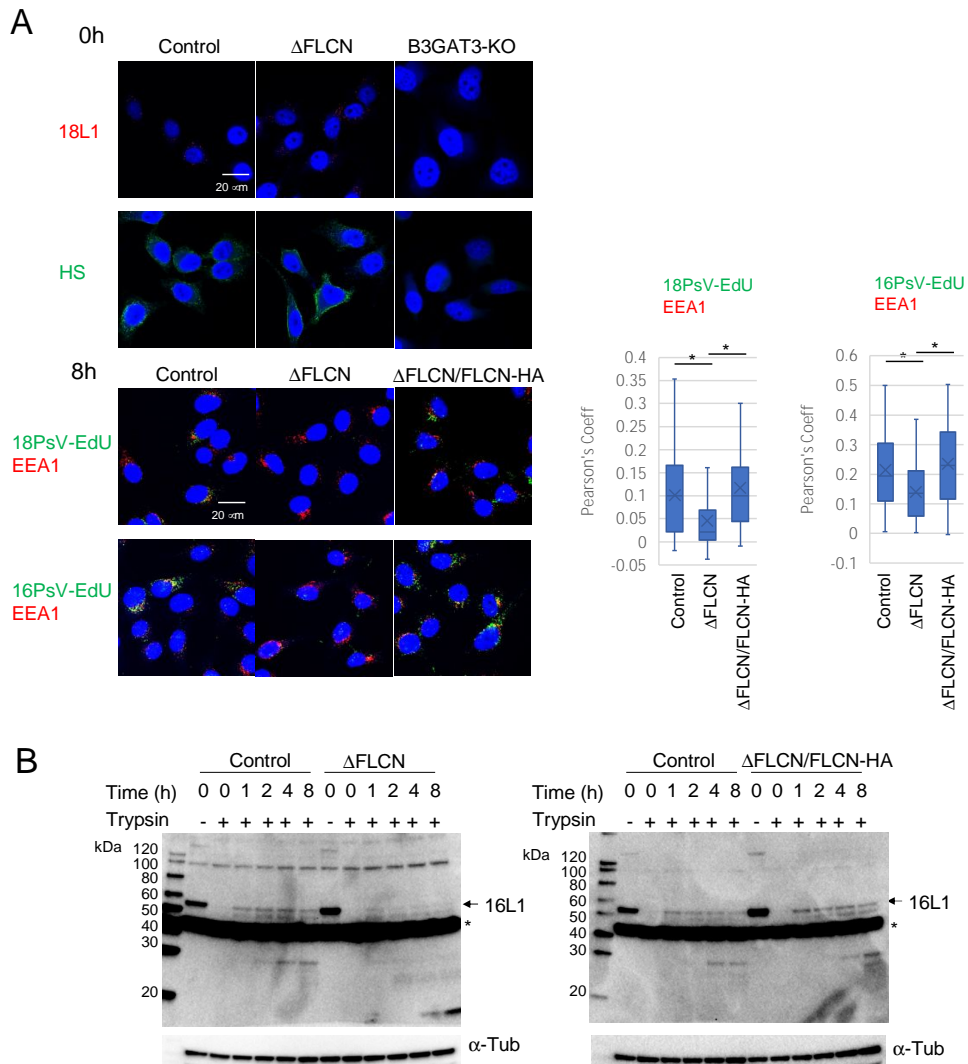


図 2 HPV粒子のHeLa細胞内局在と侵入  
(A) 細胞表面への結合(0h)と細胞内局在(8h). (B) HPV粒子の細胞内侵入

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井克幸、山地俊之、本間悠太、関塚剛史
2. 発表標題 ゲノムワイドCRISPRスクリーニングによるHPV細胞侵入に必要な宿主因子の同定
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関塚 剛史  (Sekizuka Tsuyoshi)  (40462775)	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長   (82603)	
研究分担者	山地 俊之  (Yamaji Toshiyuki)  (50332309)	国立感染症研究所・細胞化学部・室長   (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------