

令和 4 年 6 月 22 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：18K09244

研究課題名(和文) 宿主の転写共役因子によるHPV遺伝子発現制御機構の解明と抗HPVペプチド薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism of HPV gene expression by host transcriptional cofactors and development of anti-HPV peptide drugs.

研究代表者

森 清一郎 (Mori, Seiichiro)

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：80342898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の転写因子TEADによる転写調節には転写共役因子が必要である。TEAD1はヒトパピローマウイルス(HPV)の遺伝子発現を活性化するが、それに関わる転写共役因子等の詳細は不明である。本研究により、TEAD共役因子の一つであるVGLL1がHPVの遺伝子発現に必要なことが明らかとなった。子宮頸がん細胞でVGLL1をノックダウンするとHPVの遺伝子発現が低下した。HPVゲノムの転写調節領域(LCR)に複数のTEAD結合配列を特定した。VGLL1は、TEAD1を介してLCRに結合した。これらの結果から、VGLL1/TEAD1の複合体がLCRに結合し、HPV遺伝子の転写を活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPVの遺伝子発現に関わる多くの宿主転写因子が報告されているが、転写共役因子についてはほとんど知られていない。本研究で、転写共役因子VGLL1が、転写因子TEAD1を介してHPVゲノムの転写調節領域に結合し、転写を活性化することが明らかとなった。TEAD1が広範な細胞種で発現しているのに対し、VGLL1は主に上皮細胞で発現していることから、VGLL1はHPVの上皮細胞への指向性に関わる重要な宿主因子と推測される。また、shRNAを用いてVGLL1をノックダウンすると子宮頸がん細胞の増殖が抑制されたことから、VGLL1は子宮頸がん治療の標的分子となり得る。

研究成果の概要(英文)：The TEAD family of transcription factors requires associating cofactors to induce gene expression. TEAD1 is known to activate the early promoter of human papillomavirus (HPV), but the precise mechanisms of TEAD1-mediated transactivation of the HPV promoter, including its relevant cofactors, remain unexplored. In this study, we revealed that VGLL1, a TEAD-interacting cofactor, contributes to HPV early gene expression. Knockdown of VGLL1 and/or TEAD1 led to a decrease in viral early gene expression in human cervical keratinocytes and cervical cancer cell lines. We identified 11 TEAD1 target sites in the HPV16 long control region (LCR). VGLL1 bound to the HPV16 LCR via its interaction with TEAD1 both in vitro and in vivo. These results suggest that multiple VGLL1/TEAD1 complexes are recruited to the LCR to support the efficient transcription of HPV early genes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パピローマウイルス 遺伝子発現 転写因子 転写共役因子 子宮頸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の初期遺伝子は、HPVの複製及び子宮頸がん細胞の増殖に必須ながんタンパク質であるE6、E7をコードすることから、その発現調節機構を明らかにすることは、HPVの増殖と発がんの仕組みを理解し、治療法を開発するうえで重要である。

HPVの初期遺伝子の転写は上皮細胞でのみ起こり、HPVゲノムの転写調節領域(LCR)によって制御される。一般に、真核生物の遺伝子の転写は、DNAに直接結合する転写因子と、転写因子に結合する転写共役因子等からなる転写複合体によって調節される。HPVのLCRに結合し、初期遺伝子の転写を調節する多くの宿主転写因子が報告されているが、共役因子はほとんど知られていない。

細胞の転写因子TEADは、特定のDNA配列に結合するが転写活性はなく、共役因子に依存して転写を活性化または抑制する。TEADがHPV初期遺伝子の転写に必要なことが報告されているが、それに関わる共役因子等、転写調節機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子TEADを介してHPV初期遺伝子の転写を調節する宿主の転写共役因子を特定し、転写複合体によるHPVの遺伝子発現調節機構を明らかにすることである。さらに、得られた結果をもとに、転写複合体を標的としてHPVの遺伝子発現を阻害する薬剤を開発し、感染するHPVの排除と子宮頸がん細胞の増殖阻止を目指す。

3. 研究の方法

HPV16陽性子宮頸がん細胞(CaSki)、HPV18陽性子宮頸がん細胞(HeLa)、HPV16陽性子宮頸部角化細胞(W12)におけるHPV初期遺伝子のmRNAとE7タンパク質の発現を、それぞれ定量的逆転写PCR(qRT-PCR)とウェスタンブロッティングにより調べた。LCRからの転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量した。HPVの遺伝子発現における転写因子等の関与を、siRNAを用いたノックダウンまたは過剰発現系により調べた。細胞内での転写因子等とLCRの結合を、クロマチン免疫沈降(ChIP)法によって確認した。In vitroでの転写因子等とLCRの結合をDNAプルダウン法によって調べた。DNAプルダウン法は、CaSki細胞の核抽出液とビオチン標識したLCR DNA断片を反応させ、LCRに結合したタンパク質をウェスタンブロット、または、DIA(Data independent acquisition) プロテオーム解析によって検出した。タンパク質の複合体形成を共免疫沈降(Co-IP)法で調べた。

4. 研究成果

(1) 宿主の転写共役因子VGLL1による転写因子TEAD1を介したHPV初期遺伝子の転写活性化

HPV初期遺伝子の転写に関わるTEAD転写因子の特定

TEADファミリータンパク質にはTEAD1/2/3/4がある。まず、どのTEADがHPV初期遺伝子の転写に関与するか調べた。W12及びCaSki細胞でsiRNAによりTEAD1をノックダウンすると、HPV16のmRNAとE7タンパク質の発現及びLCRからの転写活性が低下した。TEAD4のノックダウンはHPVの遺伝子発現に影響がなかった。HeLa細胞では、TEAD1だけでなくTEAD4をノックダウンしてもHPV18の初期遺伝子の発現が低下した。いずれの細胞においてもTEAD2またはTEAD3のノックダウンはHPVの遺伝子発現に影響しなかった。従って、HPV16とHPV18に共通してTEAD1が初期遺伝子の転写に必要なことがわかった。

HPV16 LCRのTEAD1結合部位の特定

ChIP解析により、細胞内でTEAD1がHPV16およびHPV18のLCRに結合することを確認した。また、DNAプルダウン法により、TEAD1がHPV16 LCRにある上皮細胞特異的な活性を示すエンハンサー領域に結合することを明らかにした。さらに、DNAプルダウン法の反応液中に競合する短いLCR DNA断片を混ぜることにより、エンハンサー領域に11ヶ所のTEAD1結合配列(5'側からT1~T11)を特定した。

転写活性に必要なHPV16 LCRのTEAD1結合配列の特定

T1~T11のそれぞれにTEAD1が結合できない塩基置換を導入した変異LCRの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドをCaSki細胞にトランスフェクションし、転写活性に必要なTEAD1結合部位を調べた。T1、T2、T5以外の8カ所のいずれか1つに変異を導入すると転写活性が有意に低下し、8カ所すべてに変異を導入すると、転写活性がほとんど認められなかったことから、これら8つのTEAD1結合配列が、HPV初期遺伝子の転写に必要なことがわかった。

HPV初期遺伝子の転写に必要なTEAD共役因子の特定

これまでに知られている主な TEAD 共役因子 (YAP、TAZ、VGLL1、VGLL3、VGLL4) を、W12 細胞で siRNA を用いて個別にノックダウンし、HPV の遺伝子発現に関わる共役因子を探索した。主に上皮系細胞で発現している VGLL1 をノックダウンすると HPV16 の mRNA の発現が有意に低下した。

HPV 初期遺伝子の転写における VGLL1 の必要性

W12、CaSki、HeLa 細胞で VGLL1 をノックダウンすると、いずれの細胞でも HPV の mRNA 及び E7 タンパク質の発現が低下したことから、VGLL1 は、HPV16 と HPV18 の初期遺伝子の発現に必要であることが分かった。また、VGLL1 と TEAD1 を同時にノックダウンした場合、それぞれどちらか一方をノックダウンした場合と同程度の遺伝子発現の低下がみられたことから、VGLL1 と TEAD1 は、協調して HPV の遺伝子発現を活性化することが示唆された。レポーターアッセイで、VGLL1 をノックダウンすると HPV16 及び HPV18 の LCR からの転写活性が低下したことから、VGLL1 は初期遺伝子の転写に必要なことがわかった。

TEAD1 を介した VGLL1 の HPV16 LCR への結合

VGLL1 と TEAD1 の発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞の抽出液を用いて DNA プルダウンアッセイを行った。VGLL1 と TEAD1 を同時に発現させた場合、LCR に VGLL1 が結合したが、VGLL1 のみを発現させた場合、結合しなかった。また、VGLL1 の TEAD1 結合ドメイン、または、TEAD1 の VGLL1 結合ドメインに変異を導入した場合、VGLL1 は LCR に結合しなかった。ChIP 解析により、CaSki 細胞内で VGLL1 が TEAD1 結合ドメインに依存して LCR に結合することを確認した。これらの結果から、VGLL1 は TEAD1 を介して LCR に結合することが示された。

VGLL1 のノックダウンによる子宮頸がん細胞の増殖抑制

CaSki 細胞及び HeLa 細胞で siRNA または shRNA を用いて VGLL1 をノックダウンすると、HPV の遺伝子発現が低下し、細胞の増殖が抑制された。

HPV による TEAD を介した VGLL1 の発現増強

初代角化細胞に HPV16 または HPV18 ゲノムを導入すると、TEAD1/4 と VGLL1 の発現が増加したことから、HPV が自身の遺伝子発現に必要な宿主因子の発現を誘導し、感染に都合の良い環境を作っていると考えられる。HPV 感染細胞で TEAD1/4 を siRNA でノックダウンすると、VGLL1 の mRNA 及びタンパク質の発現レベルが低下した。また、TEAD1 と結合することにより、VGLL1 タンパク質の細胞内での半減期が約 5 倍になった。これらのことから、HPV が、TEAD1/4 を介して VGLL1 の発現を増強することが示唆された。

以上の結果から、HPV の感染により増加した VGLL1/TEAD1 複合体が、TEAD1 を介して LCR のエンハンサー領域に結合し、HPV 初期遺伝子の転写を活性化すると考えられる (図 1)。TEAD1 が広範な細胞種で発現しているのに対し、VGLL1 は主に上皮細胞で発現している。なぜ HPV の遺伝子発現が上皮細胞に限られるのか十分にわかっていないが、本研究により、上皮細胞特異的な転写共役因子が必要なが示唆された。また、VGLL1 は、子宮頸がん細胞の増殖に必須であったことから、子宮頸がんの治療標的となり得る。

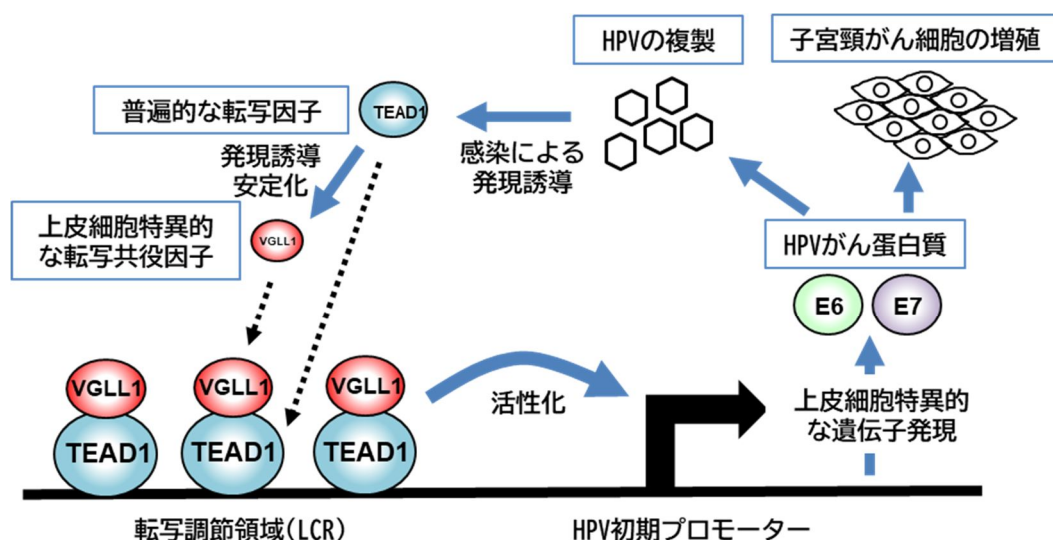


図1 VGLL1/TEAD1複合体によるHPV初期遺伝子の転写活性化

(2) プロテオミクスによる HPV 転写複合体の解析

VGLL1/TEAD1 複合体と協調して HPV 初期遺伝子の転写を調節する宿主因子を探索した。野生型 LCR DNA 及び(1)で同定した TEAD 結合配列に変異を導入した変異型 LCR DNA を用いて DNA プルダウンアッセイを行った。それぞれの LCR に結合した子宮頸がん細胞の核タンパク質を DIA プロテオーム解析によって比較した。TEAD 結合配列への変異導入により、TEAD1 と VGLL1 を含む約 40 種類の宿主タンパク質の LCR への結合が 1/4 以下に減少した(図 2)。これらのタンパク質は、TEAD1 と複合体を形成して LCR に結合すると推測される。この中から、細胞の遺伝子に対する転写活性化能が報告されている炎症性サイトカイン S100A9 に注目し、解析を行った。ChIP 解析により、CaSki 及び HeLa 細胞内で S100A9 が LCR に結合することを確認した。抗 S100A9 抗体を用いた Co-IP 実験で、核抽出液中の S100A9 と TEAD1 及び VGLL1 が共沈した。CaSki 細胞で siRNA により S100A9 をノックダウンすると初期遺伝子の発現が減少し、過剰発現させると増加した。これらの結果から、S100A9 は VGLL1/TEAD1 と複合体を形成して LCR に結合し、転写共役因子として HPV 遺伝子の転写を活性化すると考えられる。HPV の宿主細胞である表皮角化細胞において、S100A9 は、炎症反応により発現が誘導されることから、炎症とウイルス発がんを直接結び付ける重要な宿主因子である可能性があり、今後さらに解析が必要である。また、変異型 LCR への結合が減少した他の宿主因子についても HPV の遺伝子発現との関りを調べることで、HPV 初期遺伝子の転写を制御する転写複合体の全体像が明らかになるとと思われる。

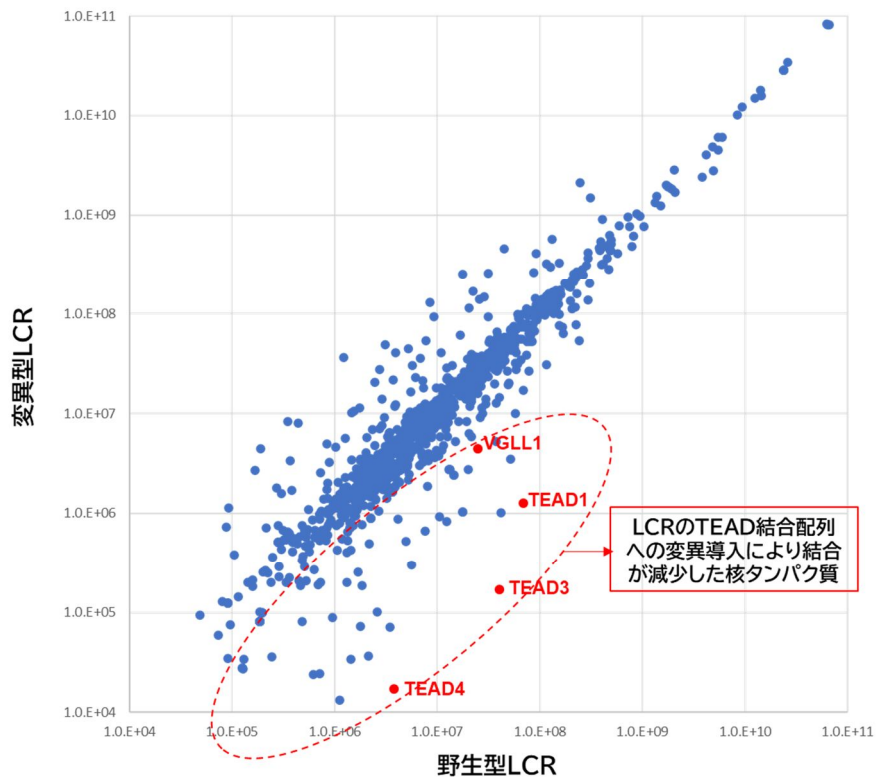


図2 プロテオミクスによるHPV転写複合体の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I.	4. 巻 94
2. 論文標題 The Transcriptional Cofactor VGLL1 Drives Transcription of Human Papillomavirus Early Genes via TEAD1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01945-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01945-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mori S, Kukimoto I.
2. 発表標題 TRANSCRIPTIONAL FACTOR TEAD1 AND ITS COFACTOR VGLL1 ARE REQUIRED FOR TRANSCRIPTION OF HPV16 EARLY GENES
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柊元 巖
2. 発表標題 転写共役因子VGLL1による転写因子TEADを介したヒトパピローマウイルス初期遺伝子の転写
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術総会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I.
2. 発表標題 TRANSCRIPTIONAL COFACTOR VGLL1 IS REQUIRED FOR TEAD-MEDIATED TRANSCRIPTION OF HPV EARLY GENES
3. 学会等名 30th International Papillomavirus Conference (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------