

## トピックス

## 2. ヒトパピローマウイルスのライフサイクルを支える 新たな宿主因子の同定

石井 克幸, 森 清一郎, 柊 元 巖

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

### はじめに

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) には 400 種以上の遺伝子型が存在し、そのうちの HPV16 や HPV18 など約 13 種が子宮頸癌の原因ウイルスとして知られている<sup>1)</sup>。癌化のメカニズムとして、HPV がコードする癌タンパク質 E6/E7 が p53/pRb をそれぞれ不活化することで、無制限な細胞増殖を引き起こすことが 1990 年代に明らかにされた。さらに E6/E7 が標的とする宿主タンパク質は p53/pRb 以外にも多岐にわたっており、HPV 研究は E6/E7 の機能解明を通してヒトの癌生物学に大きなインパクトを与えてきた。その一方で HPV が増殖する実用的な培養細胞系が存在しないことから、臨床検体から分離した「生の」ウイルスを用いた研究が困難であり、HPV 感染・増殖から持続感染に至るライフサイクルの解明は遅れていた。このハードルを乗り越えるため、ヒト胎児腎細胞 (HEK293TT) に導入した発現プラスミドから HPV キャプシドタンパク質を産生させ、細胞内でレポータープラスミドを HPV 粒子内にパッケージするシステムが 2004 年に報告され<sup>2)</sup>、簡便に感染性のあるシュードウイルス (pseudovirus: PsV) を作成することが可能になり、HPV 感染の初期過程の解析が現実的になった。

HPV は約 8 kb の環状二本鎖 DNA ゲノムに 7 つの初期タンパク質 (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8) と 2 つのキャ

プシドタンパク質 (L1, L2) をコードするのみなので、そのライフサイクルは宿主タンパク質の機能に大きく依存している。これまでに HPV 初期タンパク質に結合する宿主タンパク質の網羅的なプロテオミクス解析が行われ、宿主/HPV 間のタンパク質相互作用ネットワークが明らかにされている<sup>3, 4)</sup>。しかしこれらはあくまでもタンパク質間の物理的な相互作用に基づいており、細胞内でのウイルス機能を実際に反映しているかは不明な点が多い。そのため HPV 感染・増殖の素過程を支える宿主因子を、機能面から同定することが求められている。最近我々は、HPV の細胞侵入および HPV 癌遺伝子の転写に関わる宿主因子を探索するために、HPV の生物活性に裏付けられたスクリーニングを行い、新たな宿主タンパク質を見出したので紹介したい。

### HPV の細胞侵入機構

PsV を用いた解析により、HPV 細胞侵入の基本的な分子機構が明らかにされている。まず PsV は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) に結合し<sup>5-7)</sup>、この結合が L1 キャプシドの構造を変化させ<sup>8-11)</sup>、その変化領域が分泌型プロテアーゼ KLK8 や細胞表面タンパク質メタロプロテアーゼ ADAM17 により部分的に切断される<sup>12, 13)</sup>。KLK8 や ADAM17 による切断と連動して、PsV はマクロピノサイトーシス様のエンドサイトーシスにより、ゆっくりした速度 (半減期 9 ~ 12 時間) で細胞内に取り込まれ、初期エンドソームに送られる<sup>14, 15)</sup>。HSPGs との結合は L1 キャプシドに覆われていた L2 分子を PsV 表面に露出させる<sup>16)</sup>。すると L2 の N 末端領域はプロテアーゼ Furin により切断され<sup>17)</sup>、C 末側領域は  $\gamma$ -secretase のシャペロン作用によりエンドソームの脂質二重膜を貫通するようになる<sup>18)</sup>。膜貫通した L2 に細胞質のレトロマー複合体が結合することで、PsV はエンドソームを離れてトランスゴルジネットワーク (TGN)・ゴルジ体へと逆行輸送される<sup>19, 20)</sup>。その後、細胞分裂期のゴルジ体の分散と核膜の崩壊を経て、

### 連絡先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所

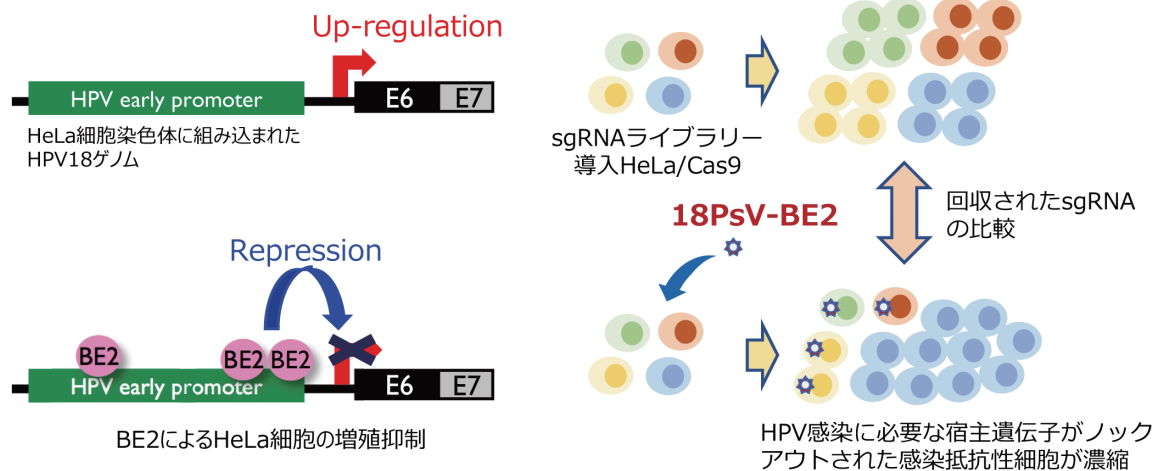
病原体ゲノム解析研究センター

TEL: 042-561-0771

FAX: 042-565-3315

E-mail: ikuki@niid.go.jp

## A



## B

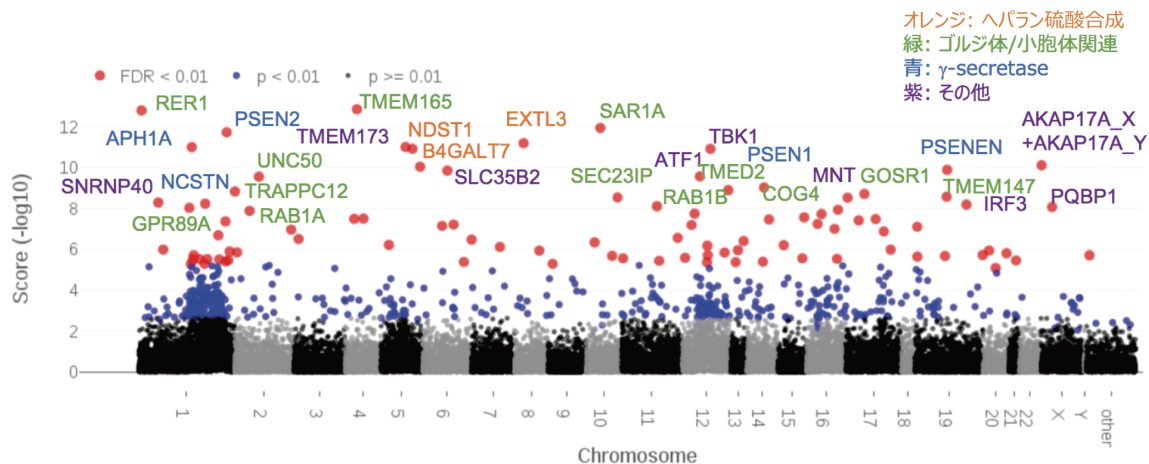


図1 HPV感染に関わる宿主因子のCRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニング

(A) ウシパピローマウイルス1型のE2(BE2)によるHeLa細胞の増殖抑制と、BE2を発現するHPV18シュドウイルス(18PsV-BE2)による感染抵抗性細胞のスクリーニングの原理。HeLa細胞ではintegrationによりHPV18 E2遺伝子が破壊され、恒常的にE6/E7が発現している。BE2によりE6/E7発現が抑えられると細胞増殖が停止する。(B) Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockoutによる結果。マンハッタンプロットで表示し、上位30位までの遺伝子名をラベルした。(文献23より改変)

PsVは核内に到達する<sup>21)</sup>。PsVの細胞染色体への結合にはL2のリン酸化が必要であり、分裂期特異的なキナーゼ(CDK1, PLK1)が重要な役割を果たしている<sup>22)</sup>。このように多くの宿主タンパク質がHPV細胞侵入の際に働くことが示されてきたが、まだ多くの未知のタンパク質がHPV感染に関与していると考えられる。

#### HPV感染に関わる宿主因子の網羅的スクリーニング

我々はHPV細胞侵入に関わる宿主タンパク質を網羅的に同定するため、CRISPR-Cas9ノックアウト細胞ライブラ

リーを用いたゲノムワイドなスクリーニングを実施した<sup>23)</sup>。PsVにパッケージするレポーター遺伝子として、HPV初期プロモーターに結合してE6/E7遺伝子の発現を強く抑制するウシパピローマウイルス1型のE2遺伝子(BE2)を選び、BE2をパッケージしたHPV18 PsV(18PsV-BE2)を作成した。スクリーニングの標的細胞として、HPV18ゲノムが細胞染色体に組み込まれ、HPV初期プロモーターからE6/E7が恒常的に発現しているヒト子宮頸癌細胞(HeLa)を用いた。18PsV-BE2の感染が成立したHeLa細胞では、BE2によりE6/E7の発現が抑えられると、増殖

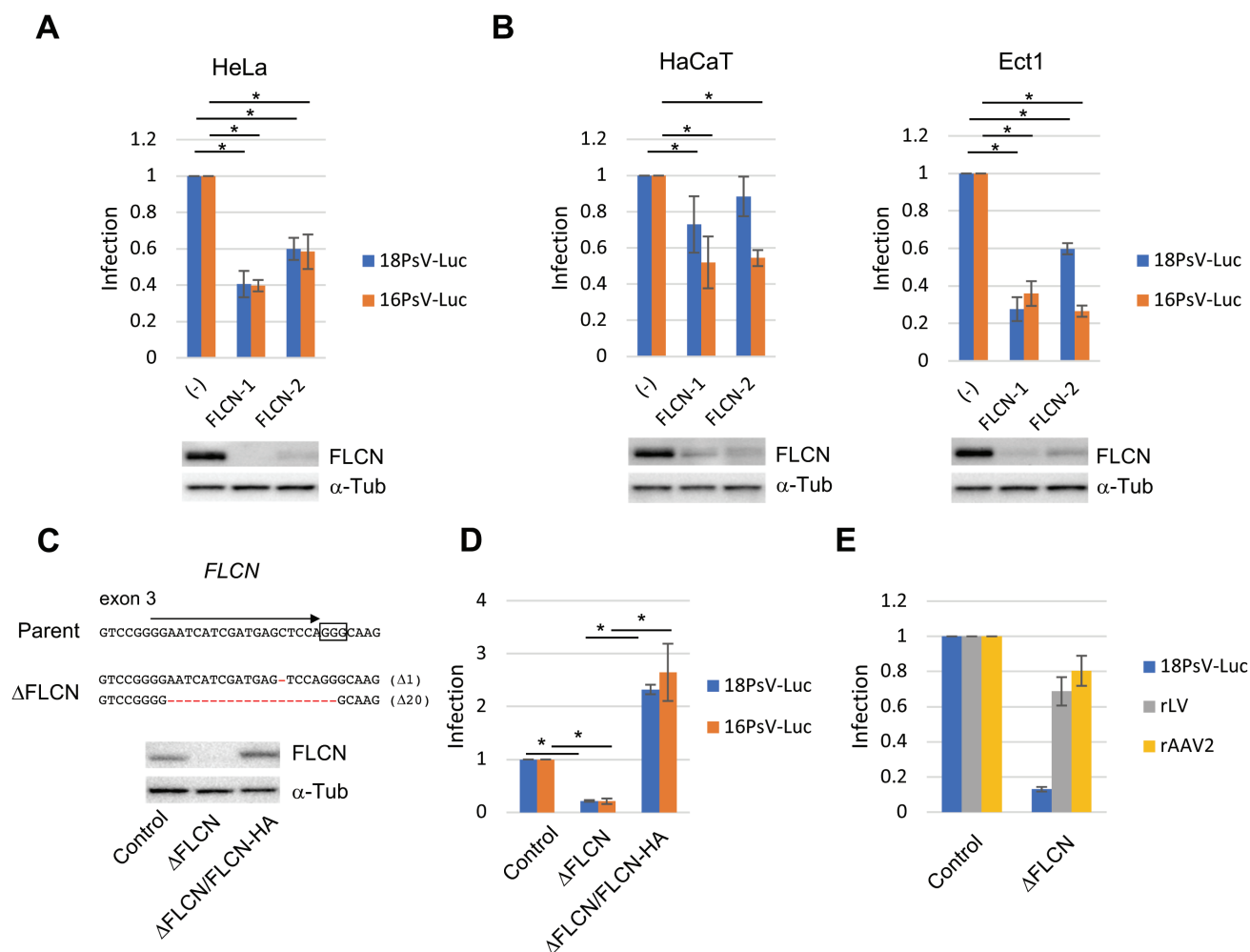


図2 PsV 感染に対する FLCN ノックアウトの効果

(A) FLCN sgRNA 導入 HeLa 細胞における HPV18 および HPV16 PsV(18PsV-Luc, 16PsV-Luc) の感染. (B) ヒト角化細胞 (HaCaT) と, ヒト子宮外頸部上皮細胞 (Ect1) における PsV 感染. (C, D) FLCN ノックアウトシングルセルクローン HeLa 細胞 ( $\Delta$ FLCN) および FLCN 入れ戻し細胞 ( $\Delta$ FLCN/FLCN-HA) における PsV の感染. (E)  $\Delta$ FLCN における組換えレンチウイルス (rLV) および組換えアデノ随伴ウイルス 2 型 (rAAV2) の感染. \*,  $P < 0.05$ . (文献 23 より改変)

が停止しアポトーシスが誘導されるが, 感染抵抗性の細胞は増殖能を維持するため, HPV 感染に必要な宿主遺伝子がノックアウトされた細胞が濃縮されることになる (図 1A).

レンチウイルスベクターを用いて CRISPR ノックアウトライブラリー (Genome-scale CRISPR Knock-Out v2.0 pooled libraries, Human) を, Cas9 を発現する HeLa 細胞に導入した. 作成したノックアウト細胞ライブラリーに 18PsV-BE2 を感染させ, 2 週間後に増殖を続ける細胞を回収した. 細胞 DNA に組み込まれた sgRNA の配列を次世代シーケンサーで解読し, その濃縮度を評価した. その結果, ヘパラン硫酸合成遺伝子,  $\gamma$ -secretase 複合体および

ゴルジ体/小胞体関連遺伝子が上位を独占していた (図 1B). これらは前述したように, HPV 感染の初期過程において重要な遺伝子群であることから, スクリーニングの妥当性が示された. さらにスクリーニングで得られた個々の遺伝子をノックアウトしたところ, Folliculin (FLCN) のノックアウトが顕著な HPV 感染阻害を示した. FLCN は線維毛包腫, 腎腫瘍, 肺嚢胞や自然気胸などの特徴を示す Birt-Hogg-Dubé 症候群の患者で変異が認められるタンパク質で<sup>24, 25)</sup>, small GTPase である RagC/D に対する GTPase 活性化タンパク質 (GAP) として知られているが<sup>26)</sup>, これまでに HPV 感染過程への関与は報告されていなかった.

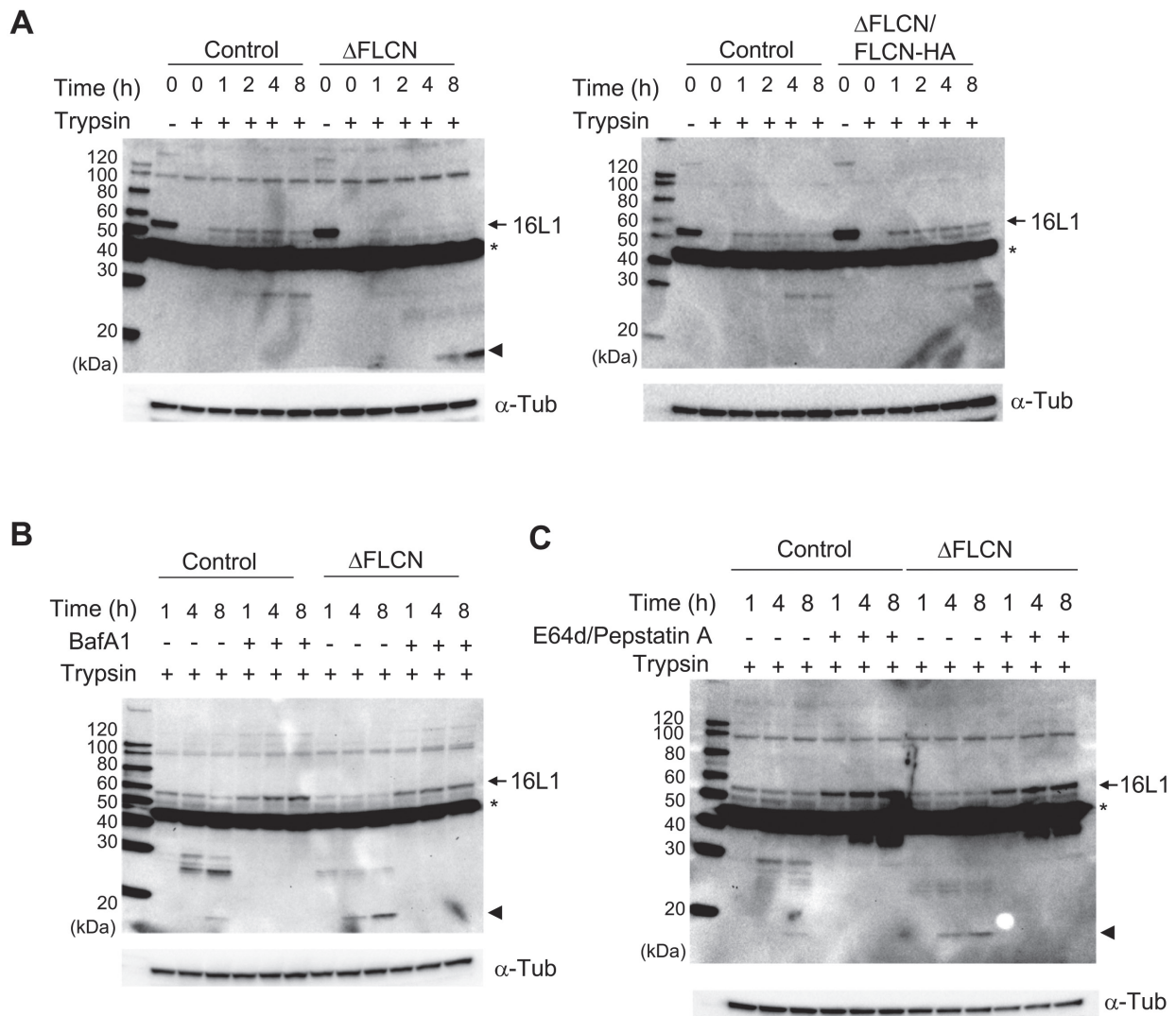


図3 ウェスタンブロッティングによる PsV の細胞侵入過程の解析

(A) 野生型 (control) と FLCN ノックアウト ( $\Delta$ FLCN) および FLCN 入れ戻し ( $\Delta$ FLCN/FLCN-HA) HeLa 細胞に 4°C で 16PsV-Luc を結合させたのち、37°C で 1~8 時間培養した。細胞表面に結合したままの PsV をトリプシンで分解した後 (trypsin+), 細胞内に侵入した PsV の L1 タンパク質を抗 L1 抗体で検出した。矢印はフルサイズの L1, 矢尻は 20kDa 以下の L1 バンド, \* は細胞内の交差タンパク質。(B) Bafilomycin A1 (BafA1) を培地に添加。(C) E64d/Pepstatin A を添加。(文献 23 より改変)

#### Folliculin のノックアウトによる HPV 分解の亢進

FLCN ノックアウトが HPV 感染に及ぼす効果を解析するために、ルシフェラーゼ発現プラスミドをパッケージした HPV PsV を用いて感染実験を行った<sup>23)</sup>。その結果、FLCN の減少レベルに相関して、HPV16 および HPV18 PsV 感染に対する抵抗性が認められた (図 2A)。この感染抵抗性は、HPV 陰性のヒト角化細胞 (HaCaT) および E6/E7 導入により不死化させた子宮頸部細胞 (Ect1) でも同様に観察された (図 2B)。次に FLCN ノックアウトのシングルセルクローン ( $\Delta$ FLCN) を樹立し (図

2C), さらに FLCN の入れ戻し細胞 ( $\Delta$ FLCN/FLCN-HA) も作成して同様の感染実験を行ったところ、 $\Delta$ FLCN 細胞は HPV16/18 PsV に対する強い感染抵抗性を示し、 $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞では感染感受性が回復した (図 2D)。一方で、組換えレンチウイルスと組換えアデノ随伴ウイルス 2 型の感染には、FLCN ノックアウトは影響を与えなかった (図 2E)。PsV の細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、PsV 添加から 2 時間後に  $\Delta$ FLCN 細胞では初期エンドソームへの PsV の局在が低下し、この低下は  $\Delta$ FLCN/FLCN-HA 細胞で回復した。FLCN ノックアウトによる PsV 侵入効率の低下、あるいは



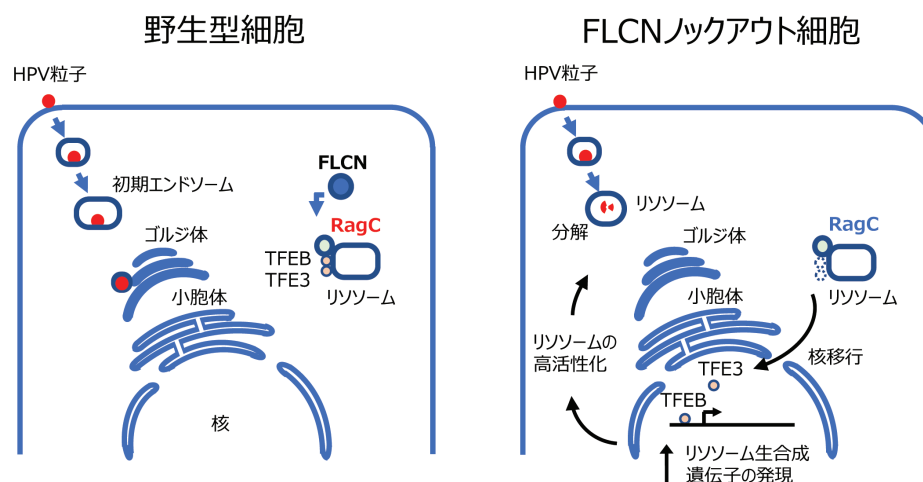


図4 FLCN ノックアウト細胞での HPV 分解のメカニズム (文献 23 より改変)

野生型の細胞では、FLCN により RagC が活性化されることで、mTORC1 により転写因子 TFEB と TFE3 がリン酸化され、リソソーム膜上に留まる。FLCN ノックアウト細胞では、RagC の不活性化に伴い、TFEB と TFE3 のリン酸化レベルが下がり核内に移行する。するとリソソーム生合成遺伝子の発現が上昇し、侵入した HPV 粒子が効率よく分解される。

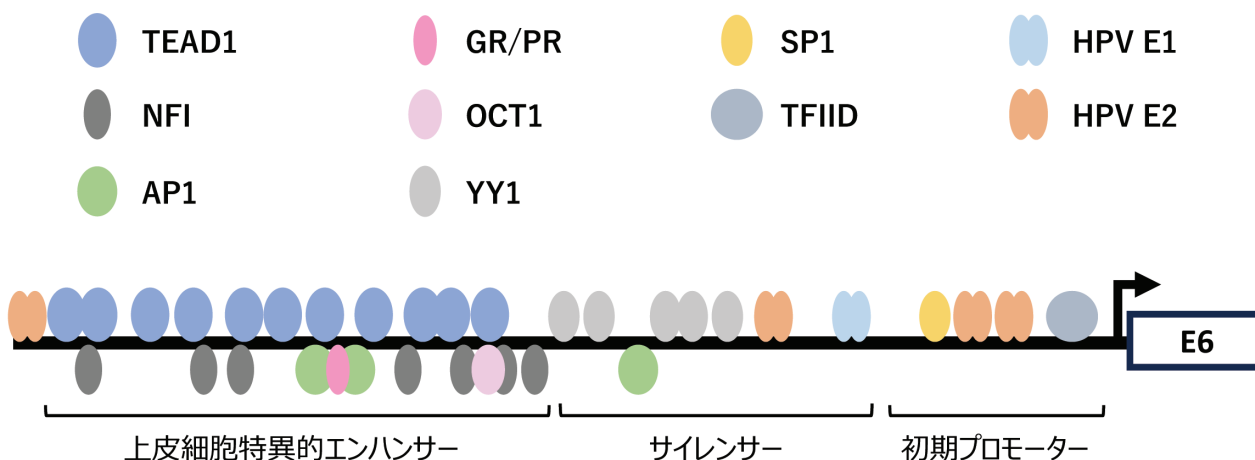


図5 HPV16 の転写調節領域 (long control region: LCR) の構造と宿主転写因子およびウイルス因子の結合部位 (文献 31 と 36 をもとに作成)

は PsV 分解の促進が考えられたため、細胞表面をトリプシン消化後、ウェスタンブロッティングにて細胞内に取り込まれた L1 の検出を行った。親株細胞と比べて  $\Delta$  FLCN 細胞では取り込まれた完全長の L1 タンパク質が減少し、代わって 20kDa 以下の L1 バンドが出現した (図 3A)。この現象は V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 およびリソソームのプロテアーゼ阻害剤 E64d/Pepstatin A の添加により消失したことから (図 3B,C), FLCN ノックアウトにより PsV のリソソームでの分解が速やかに起こること、すなわち通常の細胞環境では FLCN が機能することにより、HPV はリソソームでの分解を免れていることが示唆され

た。さらに FLCN ノックアウトによる PsV 感染抵抗性と PsV 分解の亢進は、FLCN の作用標的である RagC のノックアウト細胞でも再現された<sup>23)</sup>。

FLCN ノックアウトがリソソームでの HPV 分解を誘導する分子機構として、タンパク質合成・分解などの細胞内代謝を制御する mTORC1 シグナル系の関与が考えられる。FLCN の GAP 活性標的である RagC/D は、RagA/B とヘテロダイマーを形成し、リソソーム膜上の Ragulator と結合して mTORC1 の活性を制御する<sup>26-28)</sup>。栄養富裕状態では FLCN が RagC を GDP 結合型 (活性型) に変換し、この活性型 Rag ヘテロダイマーに mTORC1 が結合して、

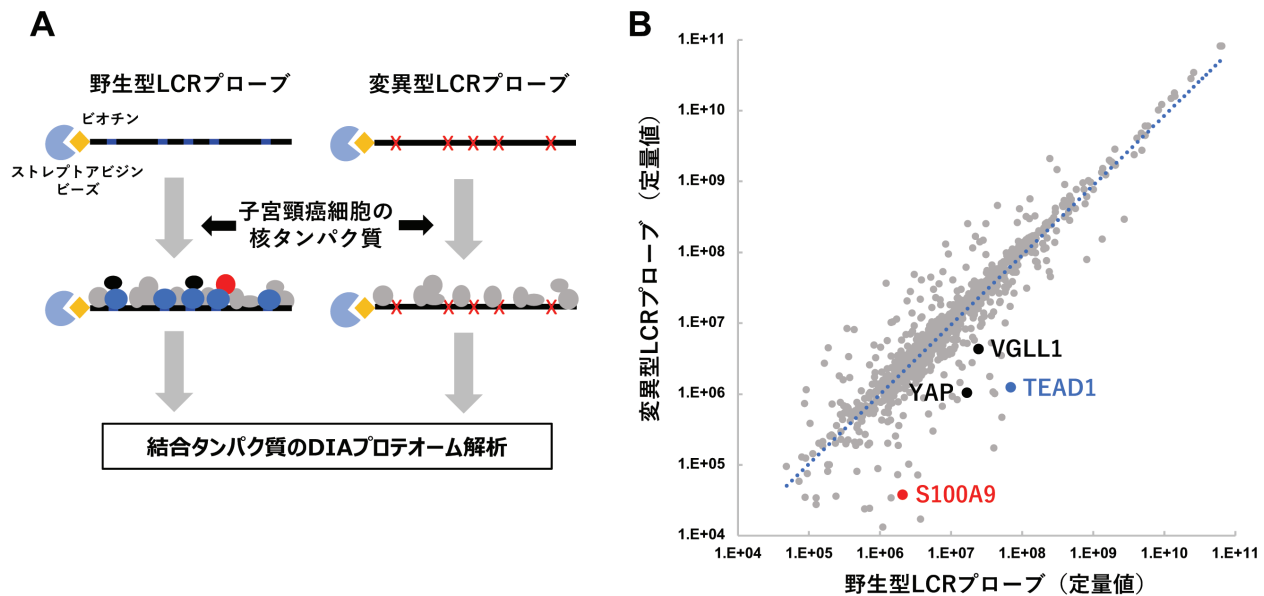


図6 転写因子 TEAD1 を介して LCR に結合する宿主因子の探索

(A) ビーズに結合した HPV16 の野生型 LCR プローブまたは TEAD1 結合配列に変異を導入した変異型 LCR プローブと CaSki 細胞の核タンパク質をインキュベートした (青丸が TEAD1)。精製後、結合したタンパク質を質量分析により解析した。(B) 野生型および変異型 LCR プローブに結合したタンパク質の定量値をそれぞれ横軸と縦軸にプロットした。1000 種類以上のタンパク質が検出され、そのうち TEAD1, VGLL1, YAP, S100A9 など、約 40 種類のタンパク質の変異型 LCR プローブへの結合が野生型プロローブに比べ 1/5 以下に減少した。(文献 38 より改変)

リソソーム・オートファジー関連遺伝子の発現を司る MiT-TFE 転写因子 (TFEB, TFE3 など) をリン酸化することで、これらの転写因子を細胞質内にとどめている<sup>29)</sup>。一方、栄養飢餓状態では RagC が GTP 結合型 (不活性型) に変わること、TFEB/TFE3 のリン酸化が失われて核内に移行し、リソソーム生合成遺伝子の発現を上昇させて、細胞内の異化反応を引き起こす。すなわち FLCN は RagC を活性型に保ち、リソソームの過剰な生合成を抑えることで、HPV 分解を抑えて感染過程を支えていると考えられる (図 4)。Birt-Hogg-Dubé 症候群の皮膚病変 (線維毛包腫) では HPV 感染が検出されないとの報告もあり<sup>30)</sup>、FLCN/RagC 経路の特異的な障害が HPV 分解を誘導するような新たな感染阻害剤の開発につながる可能性がある。

#### HPV 癌遺伝子の発現制御機構

HPV の癌タンパク質 E6/E7 の持続的な高発現は、細胞を不死化して子宮頸癌の発生につながる重要なイベントである。E6/E7 遺伝子の発現は、long control region (LCR) と呼ばれる転写調節領域によって制御される<sup>31)</sup>。LCR は約 750 bp の非コード領域で、上皮細胞特異的な活性を示すエンハンサー、サイレンサー、初期プロモーターで構成される (図 5)。これまでに LCR に結合し、HPV 癌遺伝子の発現を活性化または抑制する多くの宿主転写因子が報告されている<sup>32)</sup>。一方、真核生物の転写複合体は、DNA

に直接結合する転写因子と、転写因子に結合して転写を調節する転写共役因子 (co-activator) からなっている。転写因子に比べ、HPV の遺伝子発現に関わる宿主の転写共役因子はほとんど明らかにされていない。

細胞の TEAD ファミリー転写因子 (TEAD1/2/3/4) は、ショウジョウバエからヒトまで広く保存されており、発生における細胞増殖や発癌に関わる遺伝子の発現を制御する<sup>33)</sup>。TEAD は特異的 DNA 配列に結合するが、自身に転写活性化能はなく、YAP や TAZ などの共役因子と複合体を形成することで転写を活性化する。これまでに HPV 遺伝子制御に関して、TEAD1 が LCR のエンハンサー領域に結合し、E6/E7 遺伝子の転写を活性化することが報告されている<sup>34)</sup>。また我々は E6 が、表皮角化細胞で TEAD1/4 の発現を増加させることを見出した<sup>35)</sup>。さらに LCR のエンハンサー領域に 11 カ所の TEAD1 結合部位を同定し (図 5)、そのうちの 8 カ所に同時に変異を導入すると、エンハンサー活性が完全に消失した<sup>36)</sup>。これらの結果から、TEAD1 は HPV の遺伝子発現に重要な転写因子と考えられる。

#### HPV 癌遺伝子の発現を促進する転写共役因子

我々は TEAD1 による転写調節に共役因子が必要なことに着目し、TEAD1 を LCR 上の足場として HPV 癌遺伝子の発現を引き起こす転写共役因子を探索した。既知の

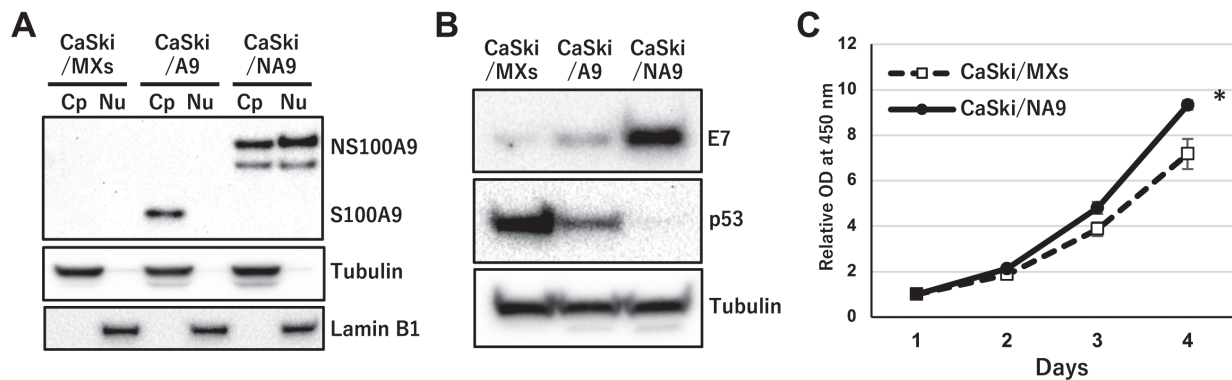


図7 核内 S100A9 による HPV 癌遺伝子の発現亢進と細胞の増殖促進

(A) 子宮頸癌細胞で S100A9 を安定に発現させると細胞質 (Cp) に局在したが (CaSki/A9), 核局在シグナルを付加すると (NS100A9), 核 (Nu) にも検出された (CaSki/NA9). (B) CaSki/NA9 では E7 の発現が顕著に増加した. p53 の減少により, E6 の増加も確認された. (C) CaSki/NA9 は高い増殖能を示した. \*,  $P < 0.05$ . (文献 38 より改変)

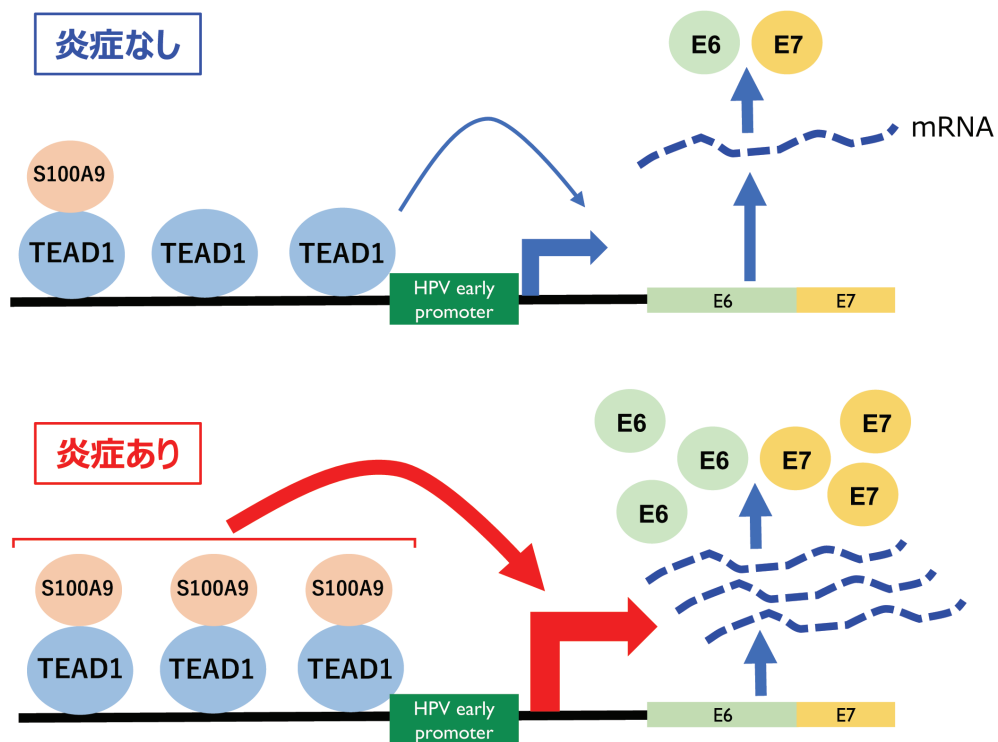


図8 S100A9 による TEAD1 を介した HPV 癌遺伝子の転写促進

TEAD 共役因子に対する siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行ったところ, VGLL1/TEAD1 複合体が表皮角化細胞および子宮頸癌細胞での E6/E7 遺伝子の発現に必要なことを見出した<sup>36)</sup>. 転写における VGLL1 の機能は十分解明されていないが, VGLL1 は上皮組織で特異的に発現し, 細胞増殖や発癌に関わることが報告されている<sup>37)</sup>. VGLL1 がユビキタな転写因子 TEAD1 を介して LCR のエンハンサーに結合することで, HPV 癌遺伝子の

上皮細胞特異的な発現を起こすことが推察される. 一方, VGLL1 自身も転写活性化能をもたないことから, TEAD1 を介して HPV 癌遺伝子の発現を活性化する他の共役因子の存在が示唆された.

そこで TEAD1 を介して LCR に結合する宿主因子を網羅的に探索するため, LCR 内の 5 つの TEAD1 結合配列を含む野生型 LCR プロンプ (138 bp) と TEAD1 結合配列に変異導入した変異型 LCR プロンプを作成し, それぞ

れに結合する HPV16 陽性子宮頸癌細胞 (CaSki) 由来の核タンパク質をプロテオーム解析により比較した (図 6A)<sup>38)</sup>。その結果, 野生型プローブに選択的に結合するタンパク質として, TEAD1 および既知の TEAD 結合タンパク質である VGLL1 や YAP に加えて, 炎症性サイトカインとして知られる S100A9 が見出された (図 6B)。S100A9 は主に骨髄球系細胞で発現が認められるが, 慢性炎症性疾患や子宮頸癌を含む様々な上皮性腫瘍でも発現が亢進しており<sup>39)</sup>, 核にも局在して癌関連遺伝子の転写に関わることが報告されている<sup>40)</sup>。そこで HPV 遺伝子発現への S100A9 の関与を調べたところ, S100A9 の siRNA ノックダウンにより, 子宮頸癌細胞 (HeLa, CaSki) での E6/E7 遺伝子の発現が低下した。また, ホルボールエステル処理により CaSki 細胞に炎症反応を誘導すると, 核での S100A9 の発現と S100A9 の LCR への結合が増加した。さらに, 核移行シグナルを付加した S100A9 を CaSki 細胞で発現させると, E6/E7 遺伝子の発現が顕著に増加し, 細胞増殖が促進された (図 7)。共免疫沈降実験などの結果を合わせると, S100A9 が TEAD1 との直接的な相互作用を介して LCR に結合し, 転写共役因子として E6/E7 遺伝子の初期プロモーターからの転写を活性化することが示された (図 8)<sup>38)</sup>。病原微生物の腔内感染による慢性的な炎症が, 子宮頸癌の発症に寄与することが疫学的に明らかにされているが<sup>41)</sup>, その背後の分子機構は十分に解明されていない。S100A9 は炎症とウイルス発癌をつなぐ重要な宿主因子と考えられる。

以上の結果から, 宿主の転写共役因子が HPV の組織指向性や発癌性に重要な役割を果たしていることが想定される。VGLL1 と S100A9 はどちらも分子内に天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) と呼ばれる柔軟で特定の立体構造をとりにくい領域をもち, 核の不溶性画分に検出されることから<sup>36, 38)</sup>, IDR を介して自身や他の様々な宿主因子と相互作用することで核内に液-液相分離を誘導して, 液滴内で濃縮され効率的に HPV 癌遺伝子の転写を促進している可能性がある。

### おわりに

1983 年に子宮頸癌検体から HPV16 DNA が初めて報告され<sup>42)</sup>, その発見によりノーベル生理学医学賞を受賞した Harald zur Hausen 博士が 2023 年に亡くなったことで, HPV 研究は一つの時代の終わりを迎えた感がある。しかし現在でも, L2 と coat protein complex I の相互作用が TGN・ゴルジ体での HPV 逆行輸送を引き起こすこと<sup>43)</sup>, E6 が分裂期キネシンである CENP-E を分解することで染色体の不安定性を誘導すること<sup>44)</sup> など, 興味深い報告が相次いでいる。HPV のライフサイクルを支える宿主因子は未同定のものが残されていると考えられ, これからも HPV 基礎研究は細胞生物学上の重要な知見を生み出していくものと期待される。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり, 多大なるご協力を頂きました, 国立感染症研究所の山地俊之先生, 本間悠太先生, 関塚剛史先生に心より感謝申し上げます。また本稿の執筆の機会を与えてくださった学会誌編集委員長の野田岳志先生および編集委員の皆様に御礼申し上げます。

### 利益相反開示について

本稿に関連し, 開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

### 参考文献

- 1) McBride AA: Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2022, 20:95-108.
- 2) Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT: Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 2004, 78(2):751-757.
- 3) Rozenblatt-Rosen O, Deo RC, Padi M, Adelman G, Calderwood MA, Rolland T, Grace M, Dricot A, Askenazi M, Tavares M *et al*: Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature* 2012, 487(7408):491-495.
- 4) Eckhardt M, Zhang W, Gross AM, Von Dollen J, Johnson JR, Franks-Skiba KE, Swaney DL, Johnson TL, Jang GM, Shah PS *et al*: Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network. *Cancer Discov* 2018, 8(11):1474-1489.
- 5) Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM: The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999, 274(9):5810-5822.
- 6) Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M: Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001, 75(3):1565-1570.
- 7) Surviladze Z, Sterkand RT, Ozbun MA: Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. *J Gen Virol* 2015, 96(8):2232-2241.
- 8) Guan J, Bywaters SM, Brendle SA, Ashley RE, Makarov AM, Conway JF, Christensen ND, Hafenstein S: Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site. *Structure* 2017, 25(2):253-263.
- 9) Selinka HC, Giroglou T, Nowak T, Christensen ND, Sapp M: Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* 2003, 77(24):12961-12967.
- 10) Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M: Inhibition of transfer to



- secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol* 2007, 81(20):10970-10980.
- 11) Cerqueira C, Liu Y, Kuhling L, Chai W, Hafezi W, van Kuppevelt TH, Kuhn JE, Feizi T, Schelhaas M: Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cell Microbiol* 2013, 15(11):1818-1836.
  - 12) Cerqueira C, Samperio Ventayol P, Vogeley C, Schelhaas M: Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *J Virol* 2015, 89(14):7038-7052.
  - 13) Mikulicic S, Finke J, Boukhallouk F, Wustenhagen E, Sons D, Homsy Y, Reiss K, Lang T, Florin L: ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic human papillomavirus entry platform assembly. *Elife* 2019, 8.
  - 14) Becker M, Greune L, Schmidt MA, Schelhaas M: Extracellular Conformational Changes in the Capsid of Human Papillomaviruses Contribute to Asynchronous Uptake into Host Cells. *J Virol* 2018, 92(11).
  - 15) Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kuhling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A: Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog* 2012, 8(4):e1002657.
  - 16) Day PM, Lowy DR, Schiller JT: Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* 2008, 82(24):12565-12568.
  - 17) Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM: Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(5):1522-1527.
  - 18) Inoue T, Zhang P, Zhang W, Goodner-Bingham K, Dupzyk A, DiMaio D, Tsai B: gamma-Secretase promotes membrane insertion of the human papillomavirus L2 capsid protein during virus infection. *J Cell Biol* 2018, 217(10):3545-3559.
  - 19) Lipovsky A, Popa A, Pimienta G, Wyler M, Bhan A, Kuruvilla L, Guie MA, Poffenberger AC, Nelson CD, Atwood WJ *et al*: Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(18):7452-7457.
  - 20) Popa A, Zhang W, Harrison MS, Goodner K, Kazakov T, Goodwin EC, Lipovsky A, Burd CG, DiMaio D: Direct binding of retromer to human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 mediates endosome exit during viral infection. *PLoS Pathog* 2015, 11(2):e1004699.
  - 21) Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF: Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009, 5(2):e1000318.
  - 22) Rizzato M, Mao F, Chardon F, Lai KY, Villalonga-Planells R, Drexler HCA, Pesenti ME, Fiskin M, Roos N, King KM *et al*: Master mitotic kinases regulate viral genome delivery during papillomavirus cell entry. *Nat Commun* 2023, 14(1):355.
  - 23) Ishii Y, Yamaji T, Sekizuka T, Homma Y, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I: Folliculin Prevents Lysosomal Degradation of Human Papillomavirus To Support Infectious Cell Entry. *J Virol* 2023, 97(5):e0005623.
  - 24) de Martin Garrido N, Aylett CHS: Nutrient Signaling and Lysosome Positioning Crosstalk Through a Multifunctional Protein, Folliculin. *Front Cell Dev Biol* 2020, 8:108.
  - 25) Ramirez Reyes JMJ, Cuesta R, Pause A: Folliculin: A Regulator of Transcription Through AMPK and mTOR Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:667311.
  - 26) Tsun ZY, Bar-Peled L, Chantranupong L, Zoncu R, Wang T, Kim C, Spooner E, Sabatini DM: The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol Cell* 2013, 52(4):495-505.
  - 27) Lawrence RE, Fromm SA, Fu Y, Yokom AL, Kim DJ, Thelen AM, Young LN, Lim CY, Samelson AJ, Hurley JH *et al*: Structural mechanism of a Rag GTPase activation checkpoint by the lysosomal folliculin complex. *Science* 2019, 366(6468):971-977.
  - 28) Petit CS, Roczniak-Ferguson A, Ferguson SM: Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J Cell Biol* 2013, 202(7):1107-1122.
  - 29) Napolitano G, Di Malta C, Ballabio A: Non-canonical mTORC1 signaling at the lysosome. *Trends Cell Biol* 2022, 32(11):920-931.
  - 30) Bradley M, Nordfors C, Vlastos A, Ferrara G, Ramqvist T, Dalianis T: No association between Birt-Hogg-Dube syndrome skin fibrofolliculomas and the first 10 described human polyomaviruses or human papillomaviruses. *Virology* 2014, 468-470:244-247.
  - 31) Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H: Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 2012, 3:152.
  - 32) Bernard HU: Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 2013, 445(1-2):197-204.
  - 33) Zhou Y, Huang T, Cheng AS, Yu J, Kang W, To KF: The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2016, 17(1).
  - 34) Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P, Turek LP: Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J* 1992, 11(6):2271-2281.
  - 35) Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Yugawa T, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I: Human Papillomavirus 16 E6 Upregulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J Virol* 2017, 91(6).
  - 36) Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I: The Transcriptional Cofactor VGLL1 Drives Transcription of

- Human Papillomavirus Early Genes via TEAD1. *J Virol* 2020, 94(10).
- 37) Sonnemann HM, Pazdrak B, Antunes DA, Roszik J, Lizee G: Vestigial-like 1 (VGLL1): An ancient co-transcriptional activator linking wing, placenta, and tumor development. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2023, 1878(3):188892.
- 38) Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Kukimoto I: Nuclear proinflammatory cytokine S100A9 enhances expression of human papillomavirus oncogenes via transcription factor TEAD1. *J Virol* 2023, 97(8):e0081523.
- 39) Markowitz J, Carson WE, 3rd: Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1835(1):100-109.
- 40) Song R, Struhl K: S100A8/S100A9 cytokine acts as a transcriptional coactivator during breast cellular transformation. *Sci Adv* 2021, 7(1).
- 41) Boccardo E, Lepique AP, Villa LL: The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010, 31(11):1905-1912.
- 42) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80(12):3812-3815.
- 43) Harwood MC, Woo TT, Takeo Y, DiMaio D, Tsai B: HPV is a cargo for the COPI sorting complex during virus entry. *Sci Adv* 2023, 9(3):eadc9830.
- 44) Cosper PF, Hrycyniak LCF, Paracha M, Lee DL, Wan J, Jones K, Bice SA, Nickel K, Mallick S, Taylor AM *et al*: HPV16 E6 induces chromosomal instability due to polar chromosomes caused by E6AP-dependent degradation of the mitotic kinesin CENP-E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023, 120(14):e2216700120.