総説

1. 発がんにおけるヒトパピローマウイルス遺伝子の役割

清野 透

(愛知県がんセンター, 研究所, ウイルス部)

要 旨

子宮頸がんより高頻度に分離される16, 18型など一群のヒトパピローマウイルス (HPV) の初期遺伝子 E6 は, 腎臓培養細胞 3Y1 および Ψ2 を形質転換する。これらの E6 は p53 の分解を促進し不活化することがよく知られているが, p53 の不活化はこの形質転換には関与しないことを示す実験結果が得られた。これら E6 による細胞形質転換機構を明らかにするため, E6 の新たな標的探しをイースト two hybrid 法を用いて検索した結果, PDZ ドメインを持つ蛋白が E6 と結合することが明らかになった。さらに, 一群の E6 は C 末端に保存された XS/TXV/L (X: 任意のアミノ酸; S/T: セリンまたはスレオニン; V/L: バリンまたはロイシン) モチーフを介してショウジョウバエがん抑制蛋白 Dlg のほ乳類ホモログ (DLG) の第2 PDZ ドメインと結合することを明らかにした。この第2 PDZ ドメインは APC (Adenomatous Polyposis Coli) がん抑制蛋白とも結合することが明らかにされているが, E6 の C 末モチーフを含む合成オリゴペプチドは両者の結合を阻害した。また, C 末モチーフを潰した変異 E6 は p53 の不活化活性は維持しているものの, 3Y1 および Ψ2 細胞に対する形質転換能を失っていた。これにより, これらの細胞対

する形質転換能など少なくとも一部の生物活性が, p53 の不活化によるのではなく C 末モチーフを介した宿主因子に対する結合に依存していることが明らかとなった。これらの結果は, E6 が APC とほ乳類 DLG との結合を阻害し, APC あるいは DLG のがん抑制蛋白としての機能を阻害することにより細胞を形質転換あるいはがん化するという可能性を示唆している。一方これらの E6 は E7 と共同してヒト初代表皮細胞や乳腺上皮細胞を不死化するが, この系においては E6 による p53 の不活化も DLG に対する結合能も必要ではなく, テロメラーゼの活性化能が必要であることが最近明らかとなった。

はじめに

ヒトパピローマウイルス (HPV) は, ヒト上皮細胞を宿主とする, 約8,000塩基対よりなる2重鎖環状 DNA ウイルスであり, これまでに70以上の型が報告されている^{65,110}。これらの型は, 主に皮膚に感染する型 (皮膚向性) と粘膜に感染する型 (粘膜向性) とに分類できる (表1)。さらに, 粘膜向性 HPV のうち 16, 18型など一群の HPV は子宮頸がんの前がん病変と考えられている頸部異形性および, 子宮頸がんより高率に分離されることから, 粘膜向性高リスク型あるいは単に高リスク型 HPV と呼ばれている⁷⁵。それに対し, 6, 11型などは良性腫瘍である尖形コンジローマより分離されることから低リスク型 HPV と呼ばれている。一方, 皮膚向性 HPV の中にもある種の遺伝的背景のもとに皮膚がんの前がん病変と考えられる難治性のゆう贅を特徴とする疾患 (EV 症: epidermodysplasia verruciformis) を引き起こす一群の型 (5型など) があり^{1,30}, 皮膚向性高リスク型 HPV と分類することができる。一方, 1型などいわゆる皮膚の“いぼ”をつくる型は皮膚向性無リスク型 HPV と呼ぶことができる。子宮頸がん細胞においてはウイルス初期

Roles of HPV genes in carcinogenesis

Tohru Kiyono

Laboratory of Viral Oncology,

Aichi Cancer Center, Research Institute,

1-1 Kanokoden, Chikusaku, Nagoya 464-0021 JAPAN

〒464-0021 愛知県名古屋市中種区鹿子殿 1-1

電話: 052-764-2981

ファックス: 052-763-5233

email: tkiyono@aichi-cc.pref.aichi.jp

本研究は平成10年度, 杉浦奨励賞を受賞した。

16E6

control

図1 高リスク型 HPV の E6 をラット線維芽細胞 3Y1 に導入すると、細胞は重層し渦巻き様配列をとるようになる。HPV16E6 を導入された 3Y1 細胞 (左)；対照細胞 (右) の位相差顕微鏡写真。

表1 粘膜向性高リスク型 HPV の E6 蛋白などに保存される PDZ ドメイン結合モチーフ (文献39より引用)

コンセンサス				- 3	- 2	- 1	0
APC				X	S/T	X	V/I/L
				V	T	S	V
HPV	E 6						
粘膜高 リスク 型	18	31	16型	E	T	Q	L
	45	51	39	E	T	Q	V
			70型				
			30型	E	T	A	V
			33型	E	T	A	L
			35型	E	T	E	V
			52型	V	T	Q	V
			56型	E	S	T	V
			58型	Q	T	Q	V
	低リスク型			6 型	D	M	L
			11型	D	L	L	P
皮膚高 リスク 型	5	8型	Y	H	D	W	
		47型	Y	N	D	W	
	無リスク型		1 型	L	Y	A	I
RhPV1							
E 6			F	L	Q	A	
E 7			A	S	R	V	
アデノウイルス							
E 4 ORF 1							
			3 型	A	T	M	I
			5 型	A	S	N	V
			9 型	A	T	L	V
			12型	A	S	L	I
アデノウイルス							
E 1 B							
			40型	S	T	E	L
			41型	Q	T	E	L
HTLV1 Tax				E	T	E	V

C末端のアミノ酸の位置を0とする。6, 11型などの粘膜向性低リスク型 HPV や5, 8, 47型など皮膚向性高リスク型 HPV の E6 には PDZ ドメイン結合配列が保存されていない。

遺伝子である E6 と E7 のみが共通に発現されていることから^{4, 45, 61, 66}、これら両遺伝子が子宮頸がん発生における責任遺伝子と考えられている。

粘膜向性高リスク型 HPV の E6, E7 は共同して初代ヒト上皮細胞を不死化することができる^{21, 22, 54}。齧歯類培養細胞株を用いた初期の形質転換実験では、E7 にのみ活性が認められたが³⁰、その後使用する細胞株によって、あるいは形質転換の指標によっては E6 も E7 とは異なる活性を示すことが明らかになった。これらのうち、ラット 3Y1 細胞の形態学的形質転換^{33, 35, 22}、マウス Ψ2 細胞の腫瘍原性形質転換^{73, 26, 38}、E6 単独の活性を検出できる系として著者らは活用している。またある種の選択を受けた初代ヒト乳腺上皮細胞の不死化も同様に E6 単独で高率に誘導できる^{62, 16, 17, 40}。

E7 は、がん抑制蛋白 Rb と結合し¹³非リン酸化型 Rb と結合している E2F を遊離させることにより、S 期進入に必要な遺伝子群の発現を誘導し G1/S 移行を促進すると考えられている³⁹。最近、E7 は cdk インヒビター p21^{18, 28}、p27²⁴や、DnaJ のヒトホモログ hTid160 などとも結合することが報告されているが、E7 の生物学的活性との関係は必ずしも明らかではない (表3)。一方、E6 はユビキチンリガーゼの一つである E6 AP と p53 との 3 者複合体を形成し、p53 の分解を促進する^{71, 58, 24, 59, 25}。この E6 による p53 の不活化は、子宮頸がん発生におけるゲノム不安定性や、変異の蓄積に中心的役割を果たしているだろうと考えられている。しかし、E6 の生物学的活性の中には p53 の不活化によらない活性があるとする証拠が蓄積し^{62, 36, 55}、p53 以外の標的の存在が示唆されてきた³¹。

図2 E6CPは粘膜向性高リスク型である16, 18型のE6と特異的に結合する。大腸菌で発現させたマルトース結合蛋白(MBP)と種々のE6との融合蛋白をアミロースビーズに結合させ、 $[^{35}\text{S}]$ Met 標識されたE6CPの試験管内転写翻訳産物が結合するかどうかを調べた。対照としてMBPと β -galactosidaseとの融合蛋白(MBP- β gal)を用いている。

我々は、ショウジョウバエがん抑制遺伝子産物 Discs large (Dlg)⁷²⁾のは乳類ホモログ DLG⁴⁰⁾がE6と結合する事を見だし、E6の生物学的活性の一部がこの結合活性に依存することを明らかにした³⁸⁾。本稿では、これまでの著者らの研究を中心にE6の機能について概説する。

E6による細胞形質転換

E6は約150アミノ酸残基からなり、4つのCys-X-X-CysモチーフをもつZn結合蛋白である³¹⁾。高リスク型HPVのE6をレトロウイルスベクターを用いてラット3Y1細胞に発現させると、本来、接触阻止により増殖を停止し単層敷石状配列をとる細胞が、渦巻き模様状配列をとり一部は重層化ようになる(図1)^{33, 35, 23)}。おもしろいことに、このような変化は皮膚向性、粘膜向性を問わず、高リスク型HPVのE6のみで起こり、ウイルスの発がん性とよい相関を示す。また、粘膜向性高リスク型E6を同様にNIH3T3細胞由来の Ψ 2細胞に発現させると、細胞はヌードマウスにおける造腫瘍性を獲得する^{73, 26, 38)}。

E6によるp53機能の不活化と形質転換能との関係³⁶⁾

p53の転写活性化能を指標にE6によるp53機能の不活化能を比較した。p53の効果を評価しやすいように、p53を発現していない肺がん細胞株H358を用いた。2コピーのp53結合配列をタンデムにもつルシフェラーゼレポータープラスミドとp53発現プラスミドを同細胞に共導入するとルシフェラーゼ活性は少な

くとも30倍に増加した。これにさらに、種々の型のE6や、SV40大型T抗原、変異p53などを共導入して、ルシフェラーゼ活性の変化を調べると、予測通り16, 18型E6はSV40大型T抗原、変異p53などと共にp53による転写活性化能を抑制した。意外なことに、3Y1細胞に対して形質転換能のない皮膚向性無リスク型HPVである1型のE6が同転写活性化能を強く抑制した。また、同様の実験を3Y1細胞を用いて行なっても1型のE6が同転写活性化能を強く抑制したのに対し16, 18型E6はほとんど抑制しなかった³⁶⁾。以上の結果より明らかなように、3Y1細胞に対する形質転換能と、E6によるp53転写活性化能の抑制活性とは全く相関しなかった。すなわち、p53の不活化は3Y1細胞の形質転換に、十分でも必要でもないことが示唆された。このことは、高リスク型HPVのE6がp53の不活化以外の機能を介して3Y1細胞を形質転換することを示唆している。

新たなE6の標的の検索³⁸⁾

E6がp53以外の蛋白との結合を介して、3Y1細胞を形質転換するとの仮説のもとに、18型E6を bait としたイースト two hybrid 法を用いてE6結合蛋白cDNAの検索を行った。その結果、MCM7^{38, 43)}やPDZドメインをもつ未知の蛋白(仮称E6CP)などのcDNAが候補として得られた。そのうち、E6CPは粘膜向性高リスク型である16, 18型E6には結合するが、低リスク型の11型E6とは結合しないことが示された(図2)。さらに、この結合には、E6のC末領域とPDZドメインが必須であることがtwo hybrid 法ならびにin vitro 結合解析により示された。このことはE6がPDZドメインを持つ他の蛋白とも結合する可能性を示唆した。そこで、未知の蛋白の解析を進める一方で、3つのPDZドメインをもつほ乳類DLGとE6が結合する可能性を検討した。ハエにおいてはDlgの突然変異によりimaginal discの上皮細胞は極性、細胞増殖制御を失い腫瘍を形成する⁷²⁾。さらにDLGはPDZドメインを介してAPC(Adenomatous Polyposis Coli)遺伝子産物のC末端領域と結合することが示されている⁴⁹⁾。APCは家族性大腸ポリポーシスの原因遺伝子として発見されたが、非家族性大腸がんにおいても遺伝子変異が見つかることから、広く大腸がんにおけるがん抑制遺伝子と考えられている⁷⁰⁾。APCは分子量約30万の膜蛋白であり、DLGとAPCとは細胞間接着部位に於いて局在がオーバーラップする事が示されている⁴⁹⁾。ほ乳類DLGも、がん

図3 ヒト DLG (hDLG) は粘膜向性高リスク型である16, 18型のE6やAPCと特異的に結合し、これらの結合は高リスク型HPV E6のC末合成オリゴペプチドにより特異的に阻害される。A, 図2と同じ。ただし、E6 CPの代わりにhDLGを用いている。B, Aと逆に大腸菌で発現させたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とhDLGとの融合蛋白をグルタチオンビーズに結合させ、35S標識された種々のE6の試験管内転写翻訳産物が結合するかどうかを調べた。対照として非融合GSTを用いている。C, AのMBP-16E6とhDLGとの結合条件に種々のE6のC末に対応する合成オリゴペプチドを表示量 (mg) 加えた。(粘膜向性) 高リスク型 (16, 18, 31, 33, 51, 52, 58型) 由来のペプチドは結合を阻害するのにに対し、低リスク型 (11型) 由来のペプチドあるいは16型のC末端1アミノ酸 (Leu) を欠損したペプチド (16CT-L151del) は阻害できない。D, Cと同様。ただし、GSTとAPCのC末369アミノ酸残基とを融合したもの (GST-APC-C369)⁴⁰⁾ および、hDLGとの結合に各合成ペプチドを加えた。各合成ペプチドはCと同様の特異的阻害活性を示している。(文献38より引用)

抑制蛋白であるかどうか、APCとDLGとの結合が、細胞増殖シグナルを制御しているかどうかはまだ明らかにされていない。しかし、APCにおける既知の突然変異によって、DLGとの結合に必要なC末領域が失われる。このC末端にあるPDZドメインとの結合コンセンサス配列^{42, 43, 20, 67)}がそれに類似の配列が粘膜向性高リスク型HPVのE6にはほぼ排他的に保存されていたのである (表1)。そこで、粘膜向性高リスク型HPVのE6蛋白はそのC末モチーフを介してDLGなどPDZドメインをもつ蛋白と結合しその結果APCとDLGとの結合も阻害する、との魅力的な仮説を導き検証を進めた。

E6とDLGとの結合³⁸⁾

E6蛋白とDLGとの結合を“pull-down”アッセイ

を用いて解析すると、高リスク型である16, 18型のE6はDLGと結合するのにに対し、低リスク型である11型のE6は結合しなかった (図3 A, B)。また種々の粘膜向性高リスク型HPV E6のC末モチーフをふくむ合成ペプチドは、この両者の結合のみならず、APCとDLGとの結合をも阻害したが、低リスク型由来の合成ペプチドは全く阻害しなかった (図3 C, D)。さらに、両者の結合がE6のC末モチーフに依存していることを変異E6を用いて決定づけた (図4)。一方、E6はAPCの場合と同じく⁴⁰⁾、DLGの第2PDZドメイン (DLGは3つのPDZドメインをもっている) と強く結合した (図5)。さらに、in vivoにおける両者の結合を確かめるためCOS細胞で高発現させたE6を免疫沈降し、DLGが共沈されるか否かを調べた。E6を効率よく沈降できる抗体がないためMyc

図4 16型E6 (16E6) と hDLG との結合はE6のC末PDZドメイン結合モチーフに依存している。C末PDZドメイン結合モチーフに種々の変異を入れた16型E6を用い、図3Bと同様にGST-hDLGとの結合性を調べた。(文献38より引用)

エビトープタグをN末に付け、抗Myc抗体を用いてE6を沈降した。その結果、*in vitro*での結果と同じくC末モチーフを保存しているE6のみがDLGを共沈した。

E6のC末モチーフと形質転換能³⁸⁾

種々の変異16型E6をレトロウイルスベクターを用い3Y1細胞ならびに、 Ψ 2細胞に導入し、それらの形質転換能を比較した(表2)。その結果、C末モチーフを保存しDLGとの結合活性を持つもののみが両細胞に対する形質転換能を維持していた。このことは、C末のPDZドメイン結合モチーフが両細胞の形質転換に必要なことを示している。しかし、C末モチーフに変異のない一部の欠失変異16型E6 (Δ 123-127など)は、両細胞に対する形質転換能を失っている³⁷⁾(筆者ら、未発表データ)。このことは、C末のPDZドメイン結合モチーフ以外にも形質転換に必要な機能ドメインの存在を示唆している。これがE6APとの結合ドメインであり、p53の場合と同様、E6/E6AP/DLG(あるいは他のPDZドメイン含有蛋白)の3者複合体形成によりDLG(あるいは他のPDZドメイン含有蛋白)の分解が促進されるとの可能性を考え現在検証を進めている。

3Y1細胞の形態学的形質転換の特徴は、先に述べたように接触阻止の抑制と考えられる。APC、DLGおよびPDZドメインをもつ蛋白の多くは細胞間接着部位に局在することが知られている。従って、これら

の蛋白が細胞間接着による細胞増殖抑制シグナルを伝えており、それをE6が遮断あるいは修飾すると考えるとつじつまが合う。また、E6による Ψ 2細胞の造腫瘍性獲得についても、同様の機構を想定して矛盾しない。

興味深いことに、アカゲザルの陰茎がんから分離されたパピローマウイルス(RhPV1)のE6にはPDZドメイン結合配列が保存されておらず、かわりにE7にこの配列が見られる³⁹⁾。また、このモチーフはパピローマウイルス以外のDNA腫瘍ウイルス初期蛋白のみならず、RNA腫瘍ウイルスであるHTLV1 Tax蛋白にも保存されている(表1)⁴⁰⁾。アデノウイルス9型E4ORF1では、形質転換細胞内でE4ORF1とDLGの結合が検出されており、E6の場合と同様にC末モチーフに変異をもったE4ORF1は細胞を形質転換できない⁴⁰⁾。C末PDZドメイン結合モチーフ是一群の腫瘍ウイルスで共通の機能を果たしているようである。

E6と細胞不死化能

E6は初代ヒト表皮細胞、乳腺上皮細胞などでテロメラーゼ活性を誘導することが報告されており⁴¹⁾、実際、E7と共同あるいは特定の条件においてはE6単独でこれらの細胞を不死化することができる^{22,52,21,5,63)}。特に乳腺上皮細胞ではE6とE7の必要な時期がはっきりと分かれており、両者の不死化における機能を区別するのに都合がよい。ここでのE7の働きはRbの不活化であり、推定分裂回数約20回で訪れるp16^{ink4a}の増加による細胞増殖停止(M0)をE7は乗り越えさせることができる^{16,17,40)}。それに対しE6の働きはテロメラーゼの逆転写酵素触媒サブユニット(hTERT)の転写活性化によるテロメラーゼの活性化であり、同細胞の場合推定分裂回数約50回で訪れるおそらくテロメア短小化による細胞増殖停止(M1)を防ぐことができる⁴⁰⁾。また従来の報告と異なり^{5,9,19)}p53の不活化¹⁵⁾は不死化に不要であること、またC末PDZドメイン結合モチーフも不要であることなどを明らかにした(図6)⁴⁰⁾。現在、E6によるテロメラーゼ活性化にかかわる新たなE6の標的の同定を目指している。

おわりに

本稿では、DLGが細胞形質転換におけるE6の標的であるとの仮説を立て検証してきたが、DLG以外の他のPDZドメイン含有蛋白が、E6の標的である

図5 16型E6 (16E6) とhDLGとの結合はhDLGの第2PDZドメインに最も依存している。A, 結合解析に用いた種々の変異hDLGの模式図。B, 図4と同様。ただし16型E6と、種々の変異hDLGのGST融合蛋白を用いた。C, 図3Aと同様。ただし、種々の変異hDLGの試験管内翻訳産物を用いた。(文献38より引用)

表2 E6のC末配列, DLGとの結合性と細胞形質転換能との関係 (文献38より引用)

名前	C末配列	DLGとの結合	3Y1細胞の形質転換	Y2細胞の造腫瘍性 ^{*1}
16E6	ETQL	+	+	9/10
16E6 L151del	ETQ	-	-	0/10
16E6 L151V	ETQV	+	+	7/10
16E6 L151I	ETQI	+	+	n.t. ^{**2}
16E6 L151P	ETQP	-	-	0/10
16E6 L151LP	ETQLP	-	-	n.t.
16E6 L151ETQV	ETQETQV	+	+	n.t.
18E6	ETQV	+	+	n.t.
11E6	DLLP	-	-	0/10

^{*1}腫瘍数/接種箇所 (接種後36日後に判定)

^{**2}Not tested.

表3 E6, E7 の標的蛋白と生物学的活性との関連

	標的蛋白	推測 (観察) される生物学的活性	文献
E 6	E 6 AP/p53	アポトーシスの抑制, ゲノムの不安定化 突然変異の蓄積など	71, 58, 24, 25, 59
	DLG	細胞間接着による細胞増殖抑制の解除?	44, 38
	paxillin	細胞骨格の破壊?	69
	ERC55 (E 6 BP)	細胞最終分化の抑制?	8
	IRF 3	免疫応答の抑制?	57
	?	テロメラーゼの活性化, 不死化	41, 40
E 7	?	種々のプロモーターに対する転写活性化能	64
	Rb, p107, p130	E 2 F 放出による G 1 / S 移行の促進	13, 10, 29
	cyclin A	細胞周期の調節 (Rb を介した結合?)	14, 3, 68
	cyclin E	細胞周期の調節 (p107 を介した結合?)	51
	p27	cdk 活性抑制の解除	74
	p21	cdk 活性抑制の解除	18, 28
	AP 1 (c-jun, junB, junD, c-fos)	特定遺伝子の転写活性化	2, 53
	TBP	特定遺伝子の転写活性化?	47, 48, 56
	TAF110	特定遺伝子の転写活性化?	50
	26S proteasome S 4 subunit Rb の分解促進?		7
	hTid 1	ゲノムの複製?	60
		(SV40LT にも DnaJ ドメインがある)

図6 ヒト乳腺上皮細胞の不死化

可能性も忘れてはならない。E6は小型の蛋白であるが、上記以外にも多くの機能をもっているようである。これまで述べた、p53/E6AP、DLG以外に、小胞体のCa結合蛋白ERC55⁶⁰⁾、接着斑分子パキシリン⁶⁰⁾、インターフェロンβプロモーターなどに結合する転写因子IRF-3⁵⁷⁾などがE6結合蛋白として報告されている(表3)。しかし、これら蛋白との結合とE6の生物学的活性との関係は必ずしも明らかではない。

これまで述べたE6、E7の機能から子宮頸がん発

生のモデルを考えてみる(図7)。E6とE7は実に巧妙に相補しながら細胞死を妨げ、増殖、変異の蓄積をもたらしているように見える。最近の知見によれば、E7とRbの結合などにより遊離されるE2Fや、*ras*などががん遺伝子の突然変異はp14^{ARF}の発現を上げp53のMDM2による分解を抑制し、結果的にp53依存性のアポトーシスや細胞周期停止を誘導する⁶¹⁾。また活性化Rasはp16^{INK4a}の発現を上げRbのリン酸化を抑え細胞周期を停止させる⁵⁴⁾。E6発現細胞ではp53-

図7 HPVによる子宮頸がんの発生機序

nullの状態を作り出すことでこれらのいわゆる“fail-safe”機構を解除し変異の蓄積を許していると考えられる。

ここでは、子宮頸がんより分離される粘膜向性高リスク型 HPV の E 6 を中心に取り上げたが皮膚向性高リスク型 HPV の E 6 は p53, DLG などと結合しないが、3 Y 1 細胞に対しては極めて類似の形質転換能を示す。もしかすると、両群の E 6 による形質転換機構は共通の経路を介しているのかも知れない。さらに、がんを離れて全ての E 6 蛋白が普遍的に結合するような（すなわち本来のウイルス増殖に必須と考えられる）共通の標的も見つかっていない。今後とも、E 6 の研究からウイルス学のみならず、不死化、発がんなどの細胞生物学に貢献できる研究をめざしたい。

謝 辞

本研究の大部分は文部省科学研究費の補助を受けて、愛知県がんセンター研究所ウイルス部に於いて行われた。本研究の開始より同部長として全面的な援助をいただいた石橋正英博士をはじめウイルス部に在籍した共同研究者の皆さま、DLG との結合解析において多大な援助をいただいた阪大微研、秋山徹教授、杉浦奨励賞に御推挙くださった鶴見達也現ウイルス部長、石橋正英前部長、西山幸廣名古屋大学教授に深く感謝いたします。

文 献

1) Adachi, A., Kiyono, T., Hayashi, Y., Ohashi, M. and

Ishibashi, M. (1996). Detection of human papillomavirus type47 DNA in malignant lesions of epidermodysplasia verruciformis with protocols for precise typing of related HPV DNAs. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 369-375.

- 2) Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. and McCance, D. J. (1996). The human papillomavirus type16 E 7 gene product interacts with and trans-activates the AP 1 family of transcription factors. *EMBO J.* **15**, 1950-1960.
- 3) Arroyo, M., Bagchi, S. and Raychaudhuri, P. (1993). Association of the human papillomavirus type16E 7 protein with the S-phase-specific E 2 F-cyclin complex. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6537-6546.
- 4) Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A. and Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* **61**, 962-971.
- 5) Band V., De Caprio J. A., Delmolino L., Kulesa V. and Sager R. (1991). Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E 6-immortalized human mammary epithelial cells. *J. Virol.* **65**, 6671-6676.
- 6) Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., and Vousden, K. H. p14 ARF links the tumor suppressors RB and p53. (1998). *Nature* **395**, 124-125.
- 7) Berezutskaya, E. and Bagchi, S. (1997). The human papillomavirus E 7 oncoprotein functionally interacts with the S 4 subunit of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* **272**, 30135-30140.
- 8) Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V. and Androphy, E. J. (1995). Interaction of papillomavirus E 6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* **269**, 529-531.
- 9) Dalal, S., Gao, Q., Androphy, E. J., and Band, V. (1996). Mutational analysis of human papillomavirus type16 E 6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* **70**, 683-688.
- 10) Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J. and Vousden, K. (1993). Human papillomavirus type 16E 7 associates with a histone H 1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* **67**, 2521-2528.
- 11) de Villiers, E. M. (1994). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 1-12.
- 12) Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-

- binding domain : molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-1076.
- 13) Dyson N., Howley P. M., Munger K. and Harlow E. (1989). The human papilloma virus-16E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937.
- 14) Dyson, N., Guida, P., Munger, K. and Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* **66**, 6893-6902
- 15) Foster, S. A., Demers, G. W., Etscheid, B. G. and Galloway, D. A. (1994). The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* **68**, 5698-5705.
- 16) Foster, S. A. and Galloway, D. A. (1996). Human papillomavirus type 16E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene* **12**, 1773-1779.
- 17) Foster, S. A., Wong, D. J., Barrett, M. T. and Galloway, D. A. (1998). Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1793-1801.
- 18) Funk J. O., Waga S., Harry J. B., Espling E., Stillman B., and Galloway D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**, 2090-2100.
- 19) Gao, Q., Hauser, S. H., Liu, X. L., Wazer, D. E., Madoc-Jones, H., and Band, V. (1996). Mutant p53-induced immortalization of primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **56**, 3129-3133.
- 20) Gomperts, S. N. (1996). Clustering membrane proteins : It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* **84**, 659-662.
- 21) Halbert, C. L., Demers, G. W. and Galloway, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type16is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* **65**, 473-478.
- 22) Hawley-Nelson P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**, 3905-3910.
- 23) Hiraiwa, A., Kiyono, T., Segawa, K., Utsumi, K. R., Ohashi, M. and Ishibashi, M. (1993). Comparative study on E6 and E7 genes of some cutaneous and genital papillomaviruses of human origin for their ability to transform 3Y1 cells. *Virology* **192**, 102-111.
- 24) Huibregtse, J. M., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**, 4129-4135.
- 25) Huibregtse, J. M., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell Biol.* **13**, 775-784.
- 26) Inoue, T., Kyo, S., Kiyono, T., Ishibashi, M., Ishiwatari, H., Hwang, Y. I., Yutsudo, M. and Hakura, A. (1994). Correlation between tumorigenicity and expression levels or splicing patterns of transcripts of the human papillomavirus type 16E6 gene. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 357-363.
- 27) Inoue, T., Oka, K., Yong-Il, H., Vousden, K. H., Kyo, S., Jing, P., Hakura, A. and Yutsudo, M. (1998). Dispensability of p53 degradation for tumorigenicity and decreased serum requirement of human papillomavirus type 16 E6. *Mol. Carcinog.* **21**, 215-222.
- 28) Jones, D. L., Alani, R. M., and Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21 Cip1 mediated inhibition of cdk 2. *Genes Dev.* **11**, 2101-2111.
- 29) Jones, D. L., and Munger, K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. (1996). *Semin. Cancer. Biol.* **7**, 327-337.
- 30) Kanda, T., Furuno, A. and Yoshiike, K. (1988). Human papillomavirus type 16E6 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol.* **62**, 610-613.
- 31) Kanda, T., Watanabe, S., Zanma, S., Sato, H., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1991). Human papillomavirus type 16E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology* **185**, 536-543.
- 32) Keen, N., Elston, R. and Crawford, L. (1994). Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene* **9**, 1493-1499.
- 33) Kiyono, T., Nagashima, K. and Ishibashi, M. (1989). The primary structure of major viral RNA in a rat cell line transfected with type 47 human papillomavirus DNA and the transforming activity of its cDNA and E6 gene. *Virology* **173**, 551-565.
- 34) Kiyono, T., Adachi, A. and Ishibashi, M. (1990).

- Genome organization and taxonomic position of human papillomavirus type 47 inferred from its DNA sequence. *Virology* **177**, 401-405.
- 35) Kiyono, T., Hiraiwa, A. and Ishibashi, M. (1992). Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E 6 genes of several papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology* **186**, 628-639.
 - 36) Kiyono, T., Hiraiwa, A., Ishii, S., Takahashi, T. and Ishibashi, M. (1994). Inhibition of p53-mediated transactivation by E 6 of type 1, but not type 5, 8, or 47, human papillomavirus of cutaneous origin. *J. Virol.* **68**, 4656-4661.
 - 37) Kiyono, T., Fujita, M., Hayashi, Y. and Ishibashi, M. (1996). Cloning of a cDNA encoding a human homologue of CDC47, a member of the MCM family. *Biochem. Biophys. Acta.* **1307**, 31-34.
 - 38) Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T. and Ishibashi, M. (1997). Binding of high risk HPV E 6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11612-11616.
 - 39) 清野 透 (1998). 子宮頸がんと大腸がんの前がん病変形成に共通分子機構の可能性. *細胞工學* **17**, 758-760, 1998.
 - 40) Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. and Klingelutz, A. J. (1998). Both Rb/p16^{ink4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, **396**; 84-88.
 - 41) Klingelutz, A. J., Foster, S. A., and McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E 6 gene product of human papillomavirus type16. *Nature*, **380**, 79-82.
 - 42) Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. (1995). *Science* **269**, 1737-1740.
 - 43) Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K. and Kanda, T. (1998). Human papillomavirus oncoprotein E 6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 258-262.
 - 44) Lee, S. S., Weiss, R. S. and Javier, R. T. (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6670-6675.
 - 45) Lehn, H., Krieg, P. and Sauer, G. (1985). Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5540-5544.
 - 46) Lue, R. A., Marfatia, S. M., Branton, D. and Chishti, A. H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9818-9822.
 - 47) Massimi, P., Pim, D., Storey, A. and Banks, L. (1996). HPV-16 E 7 and adenovirus E 1 a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. *Oncogene* **12**, 2325-2330.
 - 48) Massimi, P. and Pim, D. and Banks, L. (1997). Human papillomavirus type 16 E 7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E 7 transforming activity. *J. Gen. Virol.* **78**, 2607-2613.
 - 49) Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G.H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1996). Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science* **272**, 1020-1023.
 - 50) Mazzei, J. M., Atkins, G. B., Geisberg, J. V., and Ricciardi, R. P. (1995). The viral oncoproteins Ad 5 E 1 A, HPV16 E 7 and SV40 TAg bind a common region of the TBP-associated factor-110. *Oncogene* **11**, 1859-1864.
 - 51) McIntyre, M. C., Ruesch, M. N. and Laimins, L. A. (1996). Human papillomavirus E 7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk 2 and p107. *Virology* **215**, 73-82.
 - 52) Munger, K., Phelps, W. C., Bubbs, V., Howley, P. M. and Schlegel, R. (1989). The E 6 and E 7 genes of the human papillomavirus type16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4417-4421.
 - 53) Nead, M. A., Baglia, L. A., Antinore, M. J., Ludlow, J. W. and McCance, D. J. (1998). Rb binds c-Jun and activates transcription. *EMBO J.* **17**, 2342-2352.
 - 54) Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumor suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**, 125-126.
 - 55) Pan, H. and Griep, A. E. (1994). Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E 6 or E 7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development. *Genes Dev.* **8**, 1285-1299.
 - 56) Phillips, A. C. and Vousden, K. H. (1997). Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E 7 and the TATA-

- binding protein, TBP. *J. Gen. Virol.* **78**, 905-909.
- 57) Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. and Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E 6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**, 2061-2072.
- 58) Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. and Howley P. M. (1990). The E 6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.
- 59) Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E 6 and E 6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- 60) Schilling, B., De-Medina, T., Syken, J., Vidal, M. and Munger, K. (1998). A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the *Drosophila* tumor suppressor protein Tid56, can interact with the human papillomavirus type 16 E 7 oncoprotein. *Virology* **247**, 74-85.
- 61) Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114.
- 62) Sedman, S. A., Hubbert, N. L., Vass, W. C., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1992). Mutant p53 can substitute for human papillomavirus type 16 E 6 in immortalization of human keratinocytes but does not have E 6-associated trans-activation or transforming activity. *J. Virol.* **66**, 4201-4208.
- 63) Shay, J. W., Wright, W. E., Brasiskyte, D. and van der Haegen, B. A. (1993). E 6 of human papillomavirus type 16 overcome the M 1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* **8**, 1407-1413.
- 64) Shino, Y., Shirasawa, H., Kinoshita, T. and Shimizu, B. (1997). Human papillomavirus type 16 E6 protein transcriptionally modulates fibronectin gene expression by induction of protein complexes binding to the cyclic AMP response element. *J. Virol.* **71**, 4310-4318.
- 65) 白澤 浩 (1998). パピローマウイルス. ウイルス **48**, 27-37.
- 66) Smotkin, D. and Wettstein, F. O. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E 7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4680-4684.
- 67) Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. and Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-77.
- 68) Tommasino, M., Adamczewski, J. P., Carlotti, F., Barth C. F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T., and Crawford, L. (1993). HPV16 E 7 protein associates with the protein kinase p33 CDK 2 and cyclin A. *Oncogene*, **8**, 195-202.
- 69) Tong, X., and Howley, P. M. (1997). The bovine papillomavirus E 6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4412-4417.
- 70) Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138-141.
- 71) Werness, B. A., Levine, A. J. and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E 6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-79.
- 72) Woods, D. F. and Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-464.
- 73) Yutsudo, M., Okamoto, Y. and Hakura, A. (1988). Functional dissociation of transforming genes of human papillomavirus type 16. *Virology*, **166**, 594-597.
- 74) Xerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. and Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27 KIP 1 by the human papillomavirus type 16 E 7 oncoprotein. *Oncogene* **13**, 2323-2330.
- 75) zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **1228**, F55-F78.