

# Cloning and characterization of the 5'-flanking region of human cytokeratin 19 gene in human cholangiocarcinoma cell line

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 著者                           | Kagaya Makiko   |
| 著者別名                         | 加賀谷, 真希子  |
| journal or publication title | 博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院医学研究科                                     |
| volume                       | 平成14年7月   |
| page range                   | 15  |
| year                         | 2002-07-01  |
| URL                          | <a href="http://hdl.handle.net/2297/15681">http://hdl.handle.net/2297/15681</a> |

|         |  |    |         |
|---------|--|----|---------|
| 学位授与番号  | 医博甲第1497号  |    |         |
| 学位授与年月日 | 平成13年11月30日  |    |         |
| 氏名      | 加賀谷 真希子  |    |         |
| 学位論文題目  | Cloning and characterization of the 5'-flanking region of human cytokeratin 19 gene in human cholangiocarcinoma cell line<br>(ヒトサイトケラチン19遺伝子5'-上流領域のクローニングおよび同領域のヒト胆管癌培養細胞株における遺伝子発現調節機構の検討) |    |         |
| 論文審査委員  | 主査   | 教授 | 中 沼 安 二 |
|         | 副査   | 教授 | 山 本 博   |
|         |  | 教授 | 村 上 清 史 |

### 内容の要旨及び審査の結果の要旨

肝細胞で特異的に合成されるアルブミンなどの遺伝子を用いて、肝細胞における遺伝子発現調節機構や肝細胞に特異的な核蛋白が見出されてきた。一方、胆管細胞における細胞特異的遺伝子の発現調節機構については未だ十分な解析は行われていない。そこで今回、胆管細胞特異的遺伝子の一つと考えられているヒトサイトケラチン 19 遺伝子の 5'-上流領域をクローニングし、同領域をルシフェラーゼ遺伝子をもつ pGL3-Basic に組み込んでレポータープラスミドを作成した。そして、胆管細胞における同領域の遺伝子発現調節機構について、サイトケラチン 19 遺伝子を発現している胆管癌細胞株 KMBC, サイトケラチン 19 を発現していないヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 を用いて、分子生物学的に検討した。得られた結果は以下の如く要約される。

- 1) ヒトサイトケラチン 19 遺伝子 5'-上流領域 2952bp をクローニングし、その塩基配列を決定した。
- 2) 同領域は胆管癌細胞株 KMBC において強い転写活性を示し、骨肉腫細胞株 Saos-2 での発現の約 10 倍の活性を示した。この結果は培養細胞株のサイトケラチン 19 RNA や蛋白の発現レベルに符号していた。
- 3) レポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を検討した結果、-2249bp~-2050bp と-732bp~first ATG 領域に重要な発現調節領域があると考えられた。
- 4) 胆管癌細胞株 KMBC の核抽出蛋白を用いて、近位プロモーターが存在すると思われる-732bp~first ATG の領域について、DNA フットプリンティングを行った所、-0732bp~first ATG の領域の 6ヶ所、すなわち box I (-123~-101bp)、box II (-203~-178bp)、box III (-264~-236bp)、box IV (-480~-425bp)、box V (-627~-613bp)、box VI (-714~-682bp)、で蛋白結合領域を認めた。
- 5) -374bp~first ATG の領域には Sp1 site や CAAT box, TATA box が存在し、サイトケラチン 19 遺伝子発現のプロモーターを形成していると考えられた。
- 6) これら蛋白結合領域を 5'-側より box を一ヶ所づつ欠失させた internal deletion mutant を用いルシフェラーゼアッセイを行った検討により、複数の蛋白結合領域の相互作用により転写が活性化される可能性が示唆された。

以上、本研究は胆管細胞に特異的なサイトケラチン 19 遺伝子の発現調節機構を明らかにしたものであり、今後の胆管細胞の生物学的・病理学的研究、ヒト胆道系疾患の解析や遺伝子治療、さらに臨床肝臓病学に寄与する労作と評価された。