

中屋 照雄氏の学位論文審査の要旨

論文題目

哺乳動物mRNA核外輸送機能分子Pcid2の同定とB細胞における細胞周期制御の研究

(Identification of the mammalian mRNA-export molecule Pcid2 and the study of its involvement in cell-cycle regulation of B-cells)

胚中心B細胞に高発現する germinal center-associated nuclear protein (GANP) の出芽酵母相同分子 Suppressor of actin 3 (Sac3) と Tho phenotype 1 (Thp1) は核内で複合体を形成し、mRNA の核外輸送に働いている。最近、哺乳類細胞で GANP が *Shugoshin-1* mRNA の選択的核外輸送に関与していることが報告された。本論文では、Thp1 の哺乳類相同分子 Pcid2 が B 細胞の増殖分化や生存維持、mRNA の核外輸送において果たす役割を検討した。方法として、マウスの骨髄及び脾臓細胞を分離し、正常 B 細胞の各分化段階における *Pcid2* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。HeLa 細胞を用いた RNA 干渉法によって、Pcid2 の発現抑制が細胞周期及び *MAD2* mRNA の細胞内動態に及ぼす影響について解析した。細胞周期はフローサイトメーター解析、蛍光免疫染色法等で調べた。mRNA の細胞内局在については、*in situ* RNA ハイブリダイゼーション法等を用いた。*Pcid2*-floxed マウスを作製し、*Cd19-cre* ノックインマウスと交配して B 細胞特異的 *Pcid2* KO マウスを樹立し、B 細胞の増殖分化等における Pcid2 の機能を解析した。

結果として、*Pcid2* mRNA は、プレ B 細胞、未熟 B 細胞、移行期 1 B 細胞、濾胞 B 細胞等で高発現していた。*Pcid2* siRNA 処理した HeLa 細胞で、コルセミド存在下で多倍体細胞が著増し、M 期チェックポイントに関わる MAD2 タンパク質が減少していた。細胞全体及び細胞質内の *MAD2* mRNA 量は *Pcid2* 欠乏細胞で低下しており、細胞質に局在する *MAD2* mRNA の選択的低下を認めた。B 細胞特異的 *Pcid2* KO マウスでは骨髄の未熟 B 細胞の数が減少し、その後の成熟 B 細胞の分化が障害されて、脾臓の濾胞 B 細胞数が著減していた。*Pcid2*-floxed 成熟 B 細胞にレトロウィルスを用いて cre リコンビナーゼを発現させると、*Pcid2* 及び *mMAD2* の mRNA 量が減少し、アポトーシス細胞が増加した。以上の結果から、哺乳類細胞において、Pcid2 が *MAD2* mRNA の核外輸送に関わり、細胞周期制御および B 細胞等で重要な役割を果たす可能性が示唆された。

審査において、(1) mRNA の核外輸送の生物学的意義、(2) 酵母 Sac3/Thp1 の哺乳類相同分子の全体像、(3) GANP と Pcid2 の機能的関連性、(4) GANP/Pcid2 依存性及び非依存性の mRNA 核外輸送、(5) Pcid2 発現と B 細胞の遺伝子再構成との合致性、(6) B 細胞の増殖・分化・生存における Pcid2 の役割、(7) 残存した Pcid2 欠乏 B 細胞における分化や染色体の状況、(8) Pcid2 欠乏 HeLa 細胞での *MAD2* mRNA の動態と安定性、(9) REST による *MAD2* 遺伝子制御、(10) *MAD2* 発現によるレスキュー実験、(11) M 期チェックポイントの機序、(12) mRNA の核外輸送の選択性、などについて質問が出され、発表者からは適切な答えと討論がなされた。

本論文は、Pcid2 が *MAD2* mRNA の核外輸送に関わり、細胞周期制御において重要な役割を果たすことを明らかにしたものであり、B 細胞等における Pcid2 の新規機能を示唆した点で高く評価する。

審査委員長

細胞医学担当教授

中屋 光善

審査結果

学位申請者名：中屋 照雄

専攻分野： 免疫学

学位論文名：哺乳動物mRNA核外輸送機能分子Pcid2の同定とB細胞における細胞周期制御の研究
(Identification of the mammalian mRNA-export molecule Pcid2 and the study of its involvement in cell-cycle regulation of B-cells)

指導教官名： 阪口 薫雄教授

判定結果：

㊦

不可

不可の場合： 本学位論文名での再審査

可

不可

平成23年2月7日

審査委員長 細胞医学担当教授

中尾 忠善

審査委員 エイズ学Ⅲ担当教授

岡田 誠治

審査委員 組織幹細胞学担当教授

小川 峰太郎

審査委員 分子細胞制御学担当教授

小原 光