

# 学位論文抄録

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)

中 屋 照 雄

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻免疫学

指導教員

阪 口 薫 雄 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻免疫学

## 学位論文抄録

[目的] 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 actin3 (Sac3) と Tho phenotype 1 (Thp1) は核内で複合体を形成し、mRNA の核外輸送に関与している。最近、哺乳動物で GANP が *Shugoshin-1* mRNA の選択的核外輸送に関与していることが証明された。本研究において、Thp1 の哺乳動物相同分子 *Pcid2* が B 細胞の増殖や生存維持に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

[方法] (1) マウス正常 B 細胞の分化段階における *Pcid2* の発現解析。骨髓、脾臓細胞を B220、CD21、CD23、CD24、CD43、IgM、IgD、AA4.1 (CD93) 蛍光色素標識抗体にて染色後、各分化段階で分離、採取し、それぞれの *Pcid2* mRNA 量を定量的 RT-PCR で測定した。

(2) *Pcid2* の細胞周期に及ぼす影響の解析。*Pcid2* siRNA 処理後 HeLa 細胞の細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリー解析、免疫染色観察、細胞質および核内 mRNA の定量的 RT-PCR 測定、細胞周期関連分子をウェスタンブロット解析で調べ、また *in situ* RNA ハイブリダイゼーションで *MAD2* の細胞質と核内における mRNA の動態を検出した。

(3) *Pcid2* の B 細胞分化発達に及ぼす影響の解析。*Pcid2* floxed マウスを相同組み換えによって作製し *CD19-cre* ノックインマウスとかけ合わせて B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスを樹立した。そのマウスを用いて B 細胞の分化、発達に及ぼす影響、*Pcid2* mRNA 量の変化、脾臓の濾胞構築を解析した。レトロウイルスにより *cre* 遺伝子を *Pcid2* floxed B 細胞に発現させ、成熟 B 細胞における *Pcid2* 欠損の影響を定量的 RT-PCR による *Pcid2* と *MAD2* の mRNA 量測定、およびその細胞周期解析を行った。

[結果] *Pcid2* mRNA は、プロ B 細胞を (1.0) として、プレ B 細胞 (13.5)、未熟 B 細胞 (18.0)、更に移行期 (T) 1 B 細胞 (29.0)、濾胞 B 細胞 (30.0) で高値を示したが、T2 B 細胞 (6.5)、辺縁帯 B 細胞 (4.5) と前駆 B 細胞から成熟 B 細胞へ分化する際にステージ依存的に著しく増減していることが明らかになった。高値を示すのは免疫グロブリン (*Ig*) 遺伝子再構成、体細胞突然変異、クラススイッチ組換えのステージに相当し、*Pcid2* の必要性と関連することが示唆された。細胞周期に及ぼす影響の解析では *Pcid2* siRNA 処理 HeLa 細胞で、コルセミド存在下、非存在下で多倍体細胞が増加した。この表現型は他のグループが報告した *MAD2* 発現抑制細胞と類似し、これを支持する結果として M 期チェックポイントに関わる分子のうち、*MAD2* タンパクのみが著しく減少していた。細胞全体及び細胞質内の *MAD2* mRNA 量は *Pcid2* siRNA 処理細胞で有意に低下していた。従って *MAD2* の低下する理由として、*MAD2* mRNA の核外への輸送障害が考えられた。*in situ* RNA ハイブリダイゼーションにより、*Pcid2* siRNA 処理細胞における細胞質 *MAD2* mRNA の選択的発現低下を確認した。B 細胞特異的 *Pcid2* 欠損マウスでは骨髓のプレ B 細胞の数が減少し、その後の成熟 B 細胞の分化、発達が障害され、脾臓の濾胞 B 細胞数が著減していた。さらに成熟 B 細胞における *Pcid2* の機能を解析するために、レトロウイルスにより *cre* 遺伝子を *Pcid2* floxed B 細胞に発現させた。その結果 *Pcid2* 及び *MAD2* の mRNA 量が減少し、細胞周期解析においてアポトーシス細胞が増加していた。

[考察・結論] *Pcid2* は哺乳動物細胞で mRNA の核外輸送に関与し、*MAD2* 選択的な制御により細胞周期の正当性を保つ分子である。B 細胞では *Ig* 遺伝子再構成、体細胞突然変異、クラススイッチ組換えなど何らかの DNA 損傷が起こる B 細胞分化ステージで発現が上昇し、*Pcid2* の必要性と関連することが示唆された。