

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 Khalid Bin Ahsan


### 論 文 題 目

SRSF1 suppresses selection of intron-distal 5' splice site of *DOK7* intron 4 to generate functional full-length Dok-7 protein

(SRSF1 は *DOK7* intron 4 の 5' 遠位端スプライスサイト選択を抑制し機能性 Dok-7 タンパク産生を促す)

### 論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員 門松 健治 


名古屋大学教授

委員 山中 宏二 

名古屋大学教授

委員 荻 朋男 

名古屋大学教授

指導教授 大野 欽司 

## 論文審査の結果の要旨

Dok-7 は、神経筋接合部においてアグリン依存性に生じるアセチルコリン受容体 (AChR) 凝集に必須なアダプター蛋白である。DOK7 イントロン 4 には選択的 5' スプライスサイト (5' SS) があり、正常型 Dok-7 もしくはフレームシフト転写産物による短縮型 Dok-7 を生成する。今回、この選択的スプライシングの制御機構を解析し、スプライシング因子 SRSF1 が遠位 5' SS への U1 snRNP の結合を阻害し、近位 5' SS への結合を増強することで、正常型 Dok-7 産生を促すことを明らかにした。短縮型 Dok-7 は、AChR 凝集能が欠如しており、脳、骨格筋、心筋で DOK7 mRNA の 1/4 ほどに認められた。以上から、AChR 凝集制御に、この選択的スプライシングが関与する可能性が示唆された。また、CLIP-seq と RNA-seq の統合解析では、千か所を超える選択的 5' SS で、Dok-7 と同様の SRSF1 による選択的スプライシング制御が、認められた。SRSF1 は、競合する 5' SS の選択的スプライシングに重要な役割を持つと考えられた。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. CLIP-seq と RNA-seq の統合解析で、選択的 5' SS を同定した方法について。

SRSF1 をノックダウンした HeLa 細胞の RNA-seq data を公共データベースからダウンロードし、RNA-seq のスプライシング解析に定評ある MISO アルゴリズムを用いて、コントロール細胞 data との比較により選択的 5' SS を同定した。さらに、公共データベースに登録されている SRSF1 の CLIP-seq data を用いて、同定された 5' SS 周囲の SRSF1 結合分布を解析することで、SRSF1 結合部位特異的な 5' SS スプライシング制御を明らかにした。

2. cis-element の塩基置換によるスプライシング変化を予測する方法について。

SpliceAid や ESE finder などのバイオインフォマティクスサービスが発表されており、頻用されている。これらは、与えられた塩基配列に対し、各 RNA 結合蛋白の結合モチーフ配列を検索することで、様々な RNA 結合タンパクの結合部位を予測する。

3. 実験で 5' SS へ挿入した変異配列の選択方法について。

5' SS の配列から、そのスプライシング強度を予測するバイオインフォマティクスサービス、MaxEntScan::score5ss を利用した。このサービスにより、いくつかのランダムな変異配列のスプライシング強度を予測し、弱まる変異配列について、実際にミニジーンに挿入して、スプライシング変化を観察した。

4. 短縮型 Dok-7 が、脳、骨格筋、心筋に発現する意義について。

SRSF1 は、これらの組織で低発現であり、明らかに、これらの組織で短縮型 Dok-7 の発現が促されている。これらの組織では、正常型 Dok-7 も高発現しており、短縮型 Dok-7 との同時発現により、微細な AChR 凝集制御を行っている、と考えられた。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

## 試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	Khalid Bin Ahsan
試験担当者	主査	門松 通江	山中 宏二	串 秋 明男
	指導教授	大野 鉄司		
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. CLIP-seqとRNA-seqの統合解析で、選択的5'スプライスサイトを同定する方法について</li> <li>2. 塩基配列の変異により生じるスプライシング変化を予測する方法について</li> <li>3. 短縮型Dok-7が、脳、骨格筋、心筋に発現する意義について</li> </ol> <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、神経遺伝情報学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				