

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29年 4月 17日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 神戸薬科大学・中央分析室
職 名 准教授
研究代表者名 竹内敦子

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281019)

1. 共同利用研究 課題名	プロテオーム解析技術を利用した RNA スプライシングを制御するバイオシグナル伝達機構の 解明			
2. 共同利用研究 目的	バイオシグナル総合研究センターで確立されているプロテオーム解析技術を利用したシグナル 伝達分子の探索および翻訳後修飾解析技術を利用し、エクソン認識制御に関わるスプライ シング因子として働く RNA 結合蛋白質を探索、構造解析することによって、スプライシングを 制御するバイオシグナル伝達機構を明らかにする。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28年 7月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 竹内敦子	神戸薬科大学中央分析室	准教授	研究の計画及び総括 質量分析	
(分担研究者) 都出千里 寶田 徹	神戸薬科大学中央分析室 神戸薬科大学	講師 大学院生	機器分析全般 分子生物学実験	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	共同利用・共同研究 支援推進部門	氏 名	吉野健一

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 281019)

6. 共同利用研究計画

① RNA-蛋白質複合体の形成：蛍光標識した RNA プローブ（インスリンレセプター(IR)のエクソン 11 を含む配列）と HeLa 細胞の核抽出液を 30℃で 20 分間インキュベートし、*in vitro binding* 反応を行う。さらに、RNA-蛋白質複合体を UV 照射によりクロスリンクさせた後、SDS-PAGE で分離する。その後、蛋白質の結合により移動度が低下した蛍光バンドを追跡する。

② スプライシング因子の同定：RNA-蛋白質複合体と予想される蛍光を有するバンドを切り出し、ゲル内酵素消化後、ペプチド断片を抽出、LC-MS/MS によりペプチド断片を分析し、得られたプロダクトイオンマススペクトルに基づき結合するスプライシング制御因子を同定する。さらにウエスタンブロッティングにより、同定蛋白質の裏付けを行う。

7. 共同利用研究の成果

スプライシング反応は多様な蛋白質が関わるため、新規治療薬の開発には汎用性の高い標的蛋白質同定法及びその解析法が必要となる。さらに、スプライシング制御因子の同定は複雑なスプライシング機構の解明にもつながる。そこで、RNA-EMSA 法を利用した分子生物学的なアプローチと網羅的解析が可能な質量分析アプローチを組み合わせた制御因子同定法を構築した。蛍光標識した RNA プローブ（IR エクソン 11 を含む配列）と HeLa 細胞の核抽出液をインキュベートし、*in vitro binding* 反応を行い、RNA-蛋白質複合体を形成させた。さらに、この RNA-蛋白質複合体を UV 照射によりクロスリンクさせた後、SDS-PAGE で分離した。その後、蛋白質の結合により移動度が低下した蛍光バンドを追跡した。この蛍光バンドを切り出し、ゲル内酵素消化後、ペプチド断片を抽出、LC-MS/MS によりペプチド断片を分析した。蛋白質の同定手法は高感度化や高い信頼性を得るためには、最適条件を求める必要がある。この分析法を確実なものとするために、種々の検討を行ってスプライシング因子の同定法を確立した。本法を用いることにより、IR のスプライシングを制御することが知られている heterogenous nuclear ribonucleoproteins A1 (hnRNPA1) を同定した。さらに、hnRNPA1 の抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、同定蛋白質の裏付けを行った。また、蛍光標識した RNA プローブを用いる結合反応と UV クロスリンク法及び質量分析法を用いた解析から IR エクソン 11 内にスプライシング因子が直接結合することを明らかにした。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

1) Takarada T, Takeuchi A, Matsuo M, Yoshino K “New strategy for analysis of the splicing regulatory factors using high-resolution mass spectrometry.”, 21st International Mass Spectrometry Conference Toronto (2016/8/24-25) 受賞講演

2) 寶田徹, 吉野健一, 松尾雅文, 竹内敦子
エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法の構築と遺伝性疾患治療薬開発への応用 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 高槻 (2016/10/15)

9. 共同利用研究に関連した受賞, 博士学位論文の取得, 大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

受賞：寶田 徹 2016 Journal for Mass Spectrometry Award (2016/8/24)

“New strategy for analysis of the splicing regulatory factors using high-resolution mass spectrometry.”

博士学位の取得：寶田 徹 博士（薬学） (2017/3/9)

“エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法構築と遺伝性疾患治療薬開発への応用研究”