

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 30年 4月 12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29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 29年 4月 1日 ~ 平成 30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・分子生物学実験	
(分担研究者) 都出千里	神戸薬科大学中央分析室	講師	機器分析全般	
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

- ①RNA-蛋白質複合体の形成：蛍光標識した RNA プローブ (IR エクソン 11 を含む配列または他のエクソン配列) 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トティングにより、同定蛋白質の確認を行う。

7. 共同利用研究の成果

In vitro 結合実験と電気泳動分離の結果、複合体形成を示す 4 本の蛍光バンドが観察された。バンドの切り出しとゲル内酵素消化の後、これらペプチド断片を LC/MS/MS 解析した。ペプチドの質量や部分配列情報から多くの蛋白質が候補として同定された。RNA 結合能を有する蛋白質を RNA 結合ドメインのクラスに基づき、構造比較を行った。最も広く存在する「RNA recognition motif (RRM)」に着目し、5 種の蛋白質が RRM を有しており、このドメインを介して RNA に結合することが予想された。LC/MS/MS 解析において、スプライシング抑制作用を有する「hnRNPA1 (ヘテロ核リボヌクレオ蛋白質 A1; A1)」が最も高いスコアで同定された。架橋形成後の RNA-蛋白質複合体を SDS-PAGE で分離した結果、約 50kDa 付近に一本の蛍光バンドが観察された。このバンドを切り出し、ゲル内酵素消化と LC/MS/MS 解析の結果、A1 が高いカバー率と同定スコアを示した。これらの結果から、A1 は IR エクソン 11 領域に直接的に結合していることが明らかとなった

以上の結果、本法は RNA 結合蛋白質を同定できる汎用性の高い手法であることを示した。本研究手法は他の遺伝子におけるエクソン解析にも有効であり、今後のスプライシング異常に起因する遺伝性疾患治療薬開発への応用が期待できる。

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)

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)

3) 竹内敦子, 寶田徹, 吉野健一, 松尾雅文
スプライシングを制御する RNA 結合タンパク質の解析法の構築 第 65 回日本質量分析総合討論会 つくば(2017/5/19)

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。