

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

令和元年 5 月 6 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 30 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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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。

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

修飾 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方法を用いることにより、エクソン内にスプライシング因子が直接結合することを確認し、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、構造解析することができた。我々が確立した本研究手法は他の遺伝子のエクソンにも利用できる汎用性が高い複合体解析法であるので、スプライシング因子の制御による RNA 結合性評価も可能であり、昨年達成した成果をさらに発展させ、これまで複雑で解析が困難であったスプライシング機構の新たな知見が得られた。

また、これまでに培った手法を応用して、化学修飾トリプシン由来想定外断片スペクトルライブラリーを利用した誤同定防止法を提案し、その成果を Mass Spectrometry and Proteomics 2018 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会で発表して、評価を得た。

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) 吉野健一, 宇佐美 至, 竹内敦子

化学修飾トリプシン由来想定外断片スペクトルライブラリーを利用した誤同定防止法

Mass Spectrometry and Proteomics 2018 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 大阪 (2018/5/15)

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。