

博士論文

定量 LC/MS/MS とケミカルプロテオミクスによる

包括的ヒストン修飾解析ワークフローの開発

山本 一樹

目次	1
要旨	3
序文	4
第 1 章 質量分析法によるヒストン H4 翻訳後修飾の定量解析	6
1.1 技術的背景	6
1.2 材料と方法	8
1.2.1 細胞周期同調サンプルの調製	8
1.2.2 ヒストン抽出	9
1.2.3 プロテアーゼ AspN によるヒストンの消化	9
1.2.4 LC/MS/MS 測定	10
1.2.5 ラベルフリー半定量	11
1.2.6 データベースサーチによるペプチド同定	12
1.3 結果	13
1.3.1 LC/MS/MS 測定	13
1.3.2 細胞周期におけるヒストン H4 翻訳後修飾の動態	17
1.4 考察	23
第 2 章 ヒストン H4S1 リン酸化結合タンパク質の同定	24
2.1 技術的背景	24
2.2 材料と方法	26

2.2.1	ベイトペプチドの合成	26
2.2.2	光クロスリンクによる標的タンパク質濃縮	28
2.2.3	クロスリンク産物の検出と同定	29
2.3	結果	30
2.4	考察	34
第3章	結語	37
付録	38
本文中で用いた略語一覧	47
謝辞	48
参考文献	49

要旨

ヒストン修飾の同定・定量において質量分析は主要な測定法の一つであり、特にメチル化やアセチル化の解析法としては確立されている。一方、リン酸化については、その物性に起因して定量性に劣る傾向がある。また、修飾認識分子の親和性の強弱は幅広く、その同定は時に困難を極める。本研究では、リン酸化に対しても高感度な LC/MS/MS 測定系を実現し、さらに、光反応基を用いたケミカルプロテオミクス手法の導入によって低親和性の修飾結合分子の同定をも可能とした。

以上のワークフローにより、細胞周期におけるヒストン H4S1ph の量的変動を明らかとし、かつ、修飾認識分子の候補として 14-3-3 タンパク質を同定した。

序文

多種多様なヒストン翻訳後修飾の組み合わせはそれぞれ固有の生理的意義を有すると考えられており(ヒストンコード仮説 [1])、すなわち、遺伝子の発現制御や細胞分化・リプログラミング、そして修飾異常による病的現象など、あらゆるエピゲノム過程の理解のため、ひいては新規エピゲノム創薬標的の創出のために、ヒストンコードの解読は必須の課題である。

これまで、個別のヒストン修飾に対する抗体や次世代シーケンサ技術に基づいた解析(ChIP-Seq 等)が世界中で行われ [2, 3]、膨大なエピゲノム情報が蓄積されてきた。その一方で、近年の質量分析技術の進歩に伴い、今まで知られていなかった修飾の発見が相次いでおり、未解明のヒストン暗号は今も増大の一途を辿っている [4] のが現状である。実質、ありうる修飾パターンは既に組み合わせ爆発 (combinatorial explosion) を起こしてしまっており [5]、その中から重要なパターンを如何に拾い上げ、効率的な機能解析を行うかがネックになっている。

本研究では、膨大なヒストンコードの解読のための、「修飾の動態の計測」から「クロマチン制御因子としての修飾認識分子の同定」に至るワークフローを開発した (Fig. 1)。今回は細胞周期における修飾動態を測定対象とし、特に、リン酸化の検出感度の向上と、親和性の強弱によらないロバストな修飾結合分子捕捉法を実現した。本ワークフローは、ヒストン修飾変化に関わる様々な実験系に適用可能であり、今後のヒストンコード解読研究およびエピゲノム創薬標的探索に資する強力な基盤技術である。

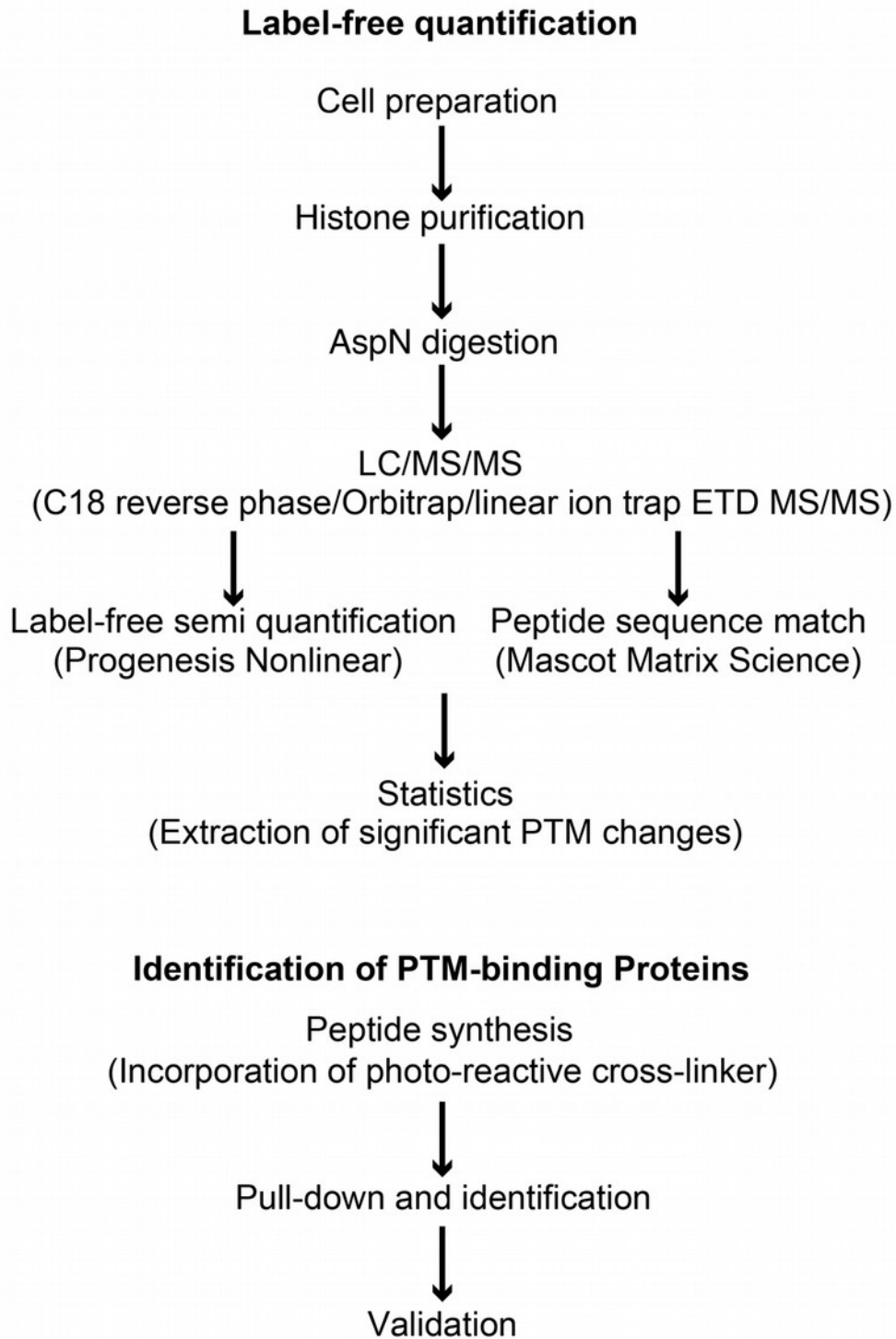


Fig. 1 全体のワークフロー

本研究で構築したヒストン修飾解析ワークフローの全体像。前半の LC/MS/MS によるヒストン修飾定量と、後半のプルダウン法による修飾結合分子同定から成る。

第 1 章 質量分析法によるヒストン H4 翻訳後修飾の定量解析

1.1 技術的背景

タンパク質の翻訳後修飾 (Post-Translational Modification; PTM) の解析において、質量分析法は今日 最も強力な手法の一つである。しかし、一つのタンパク質上に複数生じるような複合 PTM の同定と定量は依然、技術的に難度が高く、その中でもヒストンはあまりにも多くの修飾部位を有することで、最も複雑な測定対象として知られる [4, 6] (Fig. 2)。

既存の報告の中で、最も徹底的に修飾組合せパターンを検出し最大のパターン数を記録しているものは、二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) とトップダウンプロテオミクスを組み合わせた手法によるものである [7]。一方、検出感度と個別の修飾の網羅性を改善するには、分子を断片化しないまま質量分析器に導入するトップダウン法とは逆に、測定対象のペプチド配列を短くすること(ボトムアップ法)が有効であるが、組み合わせ情報は犠牲となるというトレードオフとなる。ただしヒストン H4 に関しては、アスパラギン酸残基 N 末側ペプチド結合に特異的なプロテアーゼ AspN で消化することによって、H4 の修飾部位の大半を含む N 末テール領域をひとつづきの状態のペプチドとして得ることができ、修飾組合せ情報を失わずにミドルダウン法(トップダウン法とボトムアップ法の間である数十残基のペプチドを測定対象とする方法)による解析に落とし込むことが可能である [8] (Fig. 3)。ただし、同時に複数の修飾がペプチド上に存在するため、定量難度は比較的高い [9]。より正確な定量を実現するためには、リン酸化ペプチドの吸着を防ぐために金属素材を避けるといった測定システムの材質の最適化 [10] や、注意深い液体クロマトグラフィー管理・操作、

精密な LC-MS マップのサンプル間アラインメント(定量比較のための保持時間軸合わせ)
[11]、そして厳密な測定品質管理が必要となる。私はまず、振舞いのよく知られた細胞周期
におけるヒストン H4 の修飾動態を測定対象として、測定系を評価した。

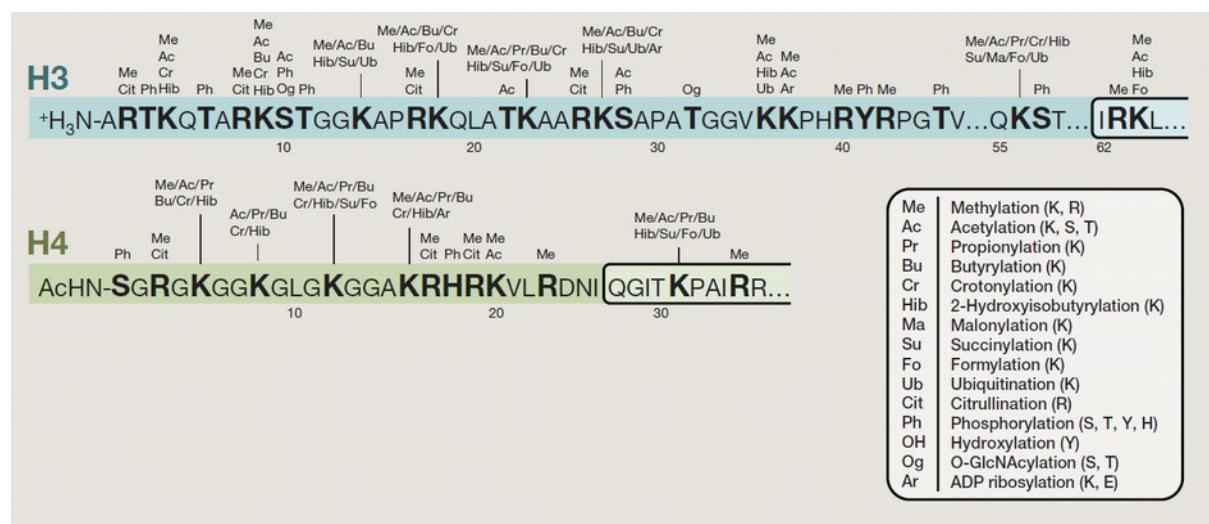


Fig. 2 ヒストン H3 と H4 の N 末テール領域の既知の翻訳後修飾（文献 [5] より引用）
既知の修飾部位として、リシン、アルギニン、セリン、トレオニン、チロシン、ヒスチジン、及び
N 末端が示されている。特にリシンは、様々な種類の修飾を受けることが可能である。

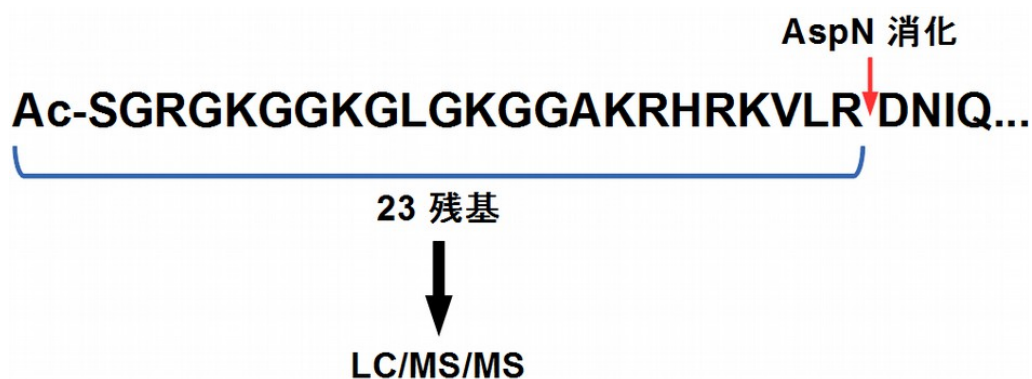


Fig. 3 ヒストン H4 N 末テール領域のミドルダウン測定
アスパラギン酸残基 (D) の N 末側を切断する消化酵素である AspN によってヒストン H4
を消化することで、LC/MS/MS 測定可能な 23 残基のペプチドが得られる。

1.2 材料と方法

1.2.1 細胞周期同調サンプルの調製

接着阻害 (contact inhibition) による増殖速度の変化が少ないことと、浮遊培養による分取の容易さから、細胞周期同調実験において最もよく用いられる細胞株である HeLa S3 細胞 (RIKEN BRC Cell Bank より入手) を用いた。RPMI-1640 培地 (HEPES 改変、Sigma-Aldrich 製) を用い、10% ウシ胎児血清、2 mM GlutaMAX I (Gibco Life Technologies 製) および 100 U/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシン添加下で、細胞密度 6×10^5 から 8×10^5 cells/mL にて浮遊培養系を維持した。細胞同調には、double thymidine block 法 [12] を用いた。即ち、まず 1st block として 20 時間 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich 製) を加えて DNA 複製阻害によって S 期アレストしたのち、thymidine を除いて 12 時間培養し S 期を離脱させ、そして 2nd block として再度 2 mM thymidine を加えて 15 時間培養し、細胞全体を G1/S 期境界にアレストさせた。G1/S 期境界から thymidine を除いて細胞周期進行をリリースし、2 時間おきに細胞を回収し、0 hr ~ 14 hr の計 8 点のサンプルを得た。各サンプルの細胞周期同調プロファイルはヨウ化プロピジウム染色フローサイトメトリーによる DNA 量測定によって確認した。ヒストン修飾解析のための細胞サンプルについては、回収後すぐ PBS により洗浄し、ペレットを液体窒素で凍結し、ヒストン抽出処理までの間 -80 °C 保存した。

1.2.2 ヒストン抽出

細胞周期同調サンプルからのヒストン抽出は、スピнкаラムを利用して酸抽出法を行うキット製品 Histone Purification Mini Kit (Active Motif 製) を用いて、メーカープロトコル通りに行った。カラムからの溶出サンプルのタンパク質濃度は、660 nm Protein Assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific 製) によって測定した。

1.2.3 プロテアーゼ AspN によるヒストンの消化

抽出精製したヒストンを各 2.5 µg ずつ消化した。まず、16% アセトニトリル水溶液中にて 2 mM 3,3',3''-phosphinetriyltripropanoic acid (TCEP; Pierce 製) 存在下で 50 °C 15 分間、変性還元した。次に、5 mM ヨードアセトアミド (Sigma-Aldrich 製) を添加し遮光下、室温 1 時間でアルキル化した。そして、プロテアーゼ AspN (Sequencing Grade; Roche 製) 50 ng を加え、85 mM pH 8.0 リン酸バッファー中で 30 °C 一晩で消化した。消化産物は C-tip (AMR Inc. 製) を用いて脱塩し、0.2% トリフルオロ酢酸添加 2% アセトニトリルに溶解し、LC/MS/MS 測定に供する最終的なサンプルとした。測定コントロール用のウシヒストン (Roche 製) も同様に処理している。

1.2.4 LC/MS/MS 測定

LTQ Orbitrap Elite ETD 質量分析器 (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて LC/MS/MS 測定を行った。マイクロ高速液体クロマトグラフィー (micro-HPLC) は Paradigm (Michrom BioResources, Inc. 製)、オートサンプラーは HTS PAL (CTC Analytics 製)、イオン源は nanospray ionization (NSI) source (AMR Inc. 製) でそれぞれ構成している。また、全てのデバイスはナノスケール・フューズドシリカ・キャピラリー (Viper; Thermo Fisher Scientific 製) で接続されている。

消化したヒストンサンプルは、高耐久性シリンジ (AMR Inc. 製) によって自動的に Cheminert PAEK injector valve (CTC 製) 上の micro-precolumn C18 PepMap 100 Peptide Trap cartridge (5 × 0.3 mm 内径; Thermo Fisher Scientific 製) に注入され、濃縮・脱塩される。0.2% トリフルオロ酢酸 2% アセトニトリルによる脱塩ののち、サンプルは逆相 L-column2 micro C18 column (3 μm, 200 Å, 150 × 0.2 mm 内径; CERI 製) を通して分離される。移動相 A は 2% アセトニトリル、移動相 B は 90% アセトニトリルで、いずれも 0.1% ギ酸を含む。クロマトグラフィーのグラジエント条件設定は、B 3% (0 min) → 10% (40 min) → 28% (100 min) → 95% (102 min) → 95% (110 min) → 4% (112–120 min) としている。HPLC からの溶出液は流速 1.0–1.2 μL/min で質量分析器に導入される。NSI ニードル PicoTip FS360-50-30 (New Objective Inc. 製) は逆相カラムに直接接続し、電圧は 2.0 kV で、キャピラリーは 200 °C に加熱している。加えて、T3 Spray (AMR Inc. 製) を介して補助窒素ガスを流している。

質量分析は、Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific 製) の自動制御下で mass range m/z 430–1000 での MS 取得から data-dependent acquisition mode に よって MS/MS に切り替える設定で実施した。MS スキャンは半値幅分解能 240,000 で Orbitrap によって測定し、続く MS/MS スキャンはイオントラップでの測定とした。それぞれ automated gain control (AGC) mode で測定し、AGC value は MS に対しては 1×10^6 、MS/MS に対しては 1×10^4 である。ペプチドのフラグメント化には、電子転移解離 (Electron Transfer Dissociation; ETD) と衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation; CID) を用いた。ETD に関しては、MS スキャンのうち最も強度の大きい 4 つのイオンを前駆イオンとして選択し、分離 m/z 幅 (isolation width) 3.0 で MS/MS スキャンに供し、ETD 反応時間は 100 ms を基準にイオンの価数に応じて自動変更される設定とした。同じイオンを何度も不必要に MS/MS につけないため、10 秒間のうち 2 回を超えて観測されたイオンは除外時間幅 25 秒、除外質量幅 5 ppm の設定で dynamic exclusion 機能で除外した。CID については、normalized collision energy 値を 35 に設定し、その他の設定は ETD と同様である。

1.2.5 ラベルフリー半定量

測定データは Progenesis LC-MS software (version 4.1; Nonlinear Dynamics Ltd.) によって解析した。サンプル間の retention time 合わせは、自動アラインメント機能で処理した上に手作業で微調整を加えて最適化した。ピーク検出は +2 価から +6 価までのイオンに対して施し、出力した MS/MS ピークリストから Mascot database search

(version 2.4.1; Matrix Science Ltd.) によって peptide sequence match (PSM) でアミノ酸配列および修飾を同定し、ペプチド同定リストを再度 Progenesis 側に取り込んだ。ペプチドごとの存在量 (abundance) はそれぞれのピーク面積として計測され、最終的な定量データ解析は JMP Pro 10 software (version 10. 0. 2; SAS Institute Inc.) を用いて行った。

1.2.6 データベースサーチによるペプチド同定

MS/MS スペクトルは Progenesis によって抽出し、全 MS/MS データセットは Mascot によって解析した。検索設定は、Swissprot_2014_08.fasta (Homo sapiens 選択; 20,194 entries、ウシヒストン用には other mammalia; 13,077 entries) をデータベースとし、fragment-ion mass tolerance は 0.80 Da、parent ion tolerance は 10.0 ppm とした。最大 missed cleavage site 数は 1 に設定した。修飾に関しては、fixed modification としてシステインの Carbamidomethylation (57.021464)、variable modification としてアルギニンの Citrullination (0.984016)、メチオニンの oxidation (15.994915)、リシンとアルギニンの methylation (14.01565)、リシンとアルギニンの dimethylation (28.0313)、リシンの trimethylation (42.04695)、リシンとペプチド N 末の acetylation (42.010565)、セリンとトレオニンとチロシンの phosphorylation (79.966331) を設定した。同定基準は、Mascot significance threshold $p < 0.05$ で統一した。

1.3 結果

1.3.1 LC/MS/MS 測定

抽出ヒストン(泳動像; Fig. 4)をプロテアーゼ AspN で消化し、23 残基から成るヒストン H4 N 末テール部分のペプチドを得、それを nanoLC-MS/MS によって測定した。液体クロマトグラフィーの保持時間 (retention time) と質量 (m/z) の二軸から成る 2D map 上で (Fig. 5)、アセチル化・メチル化・リン酸化がもたらす様々な質量のイオン (+3, +4, +5 価) が分離・同定された。

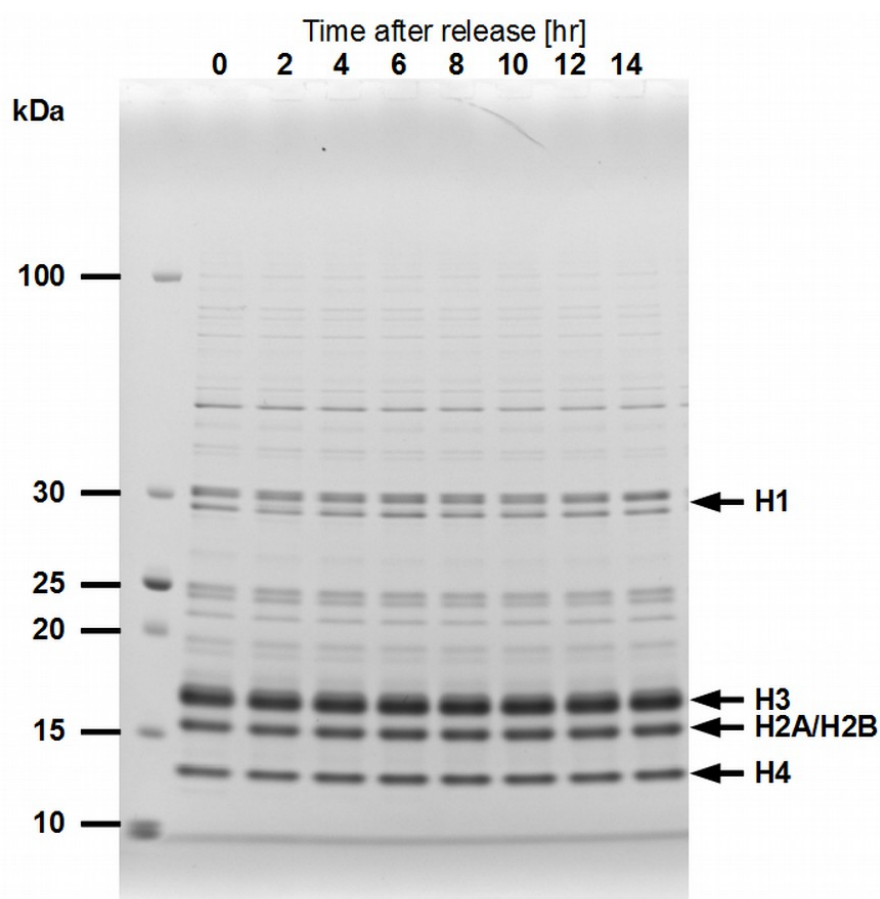


Fig. 4 抽出ヒストンのタンパク質染色像

クマシーブリリアントブルー (CBB) によって染色した。

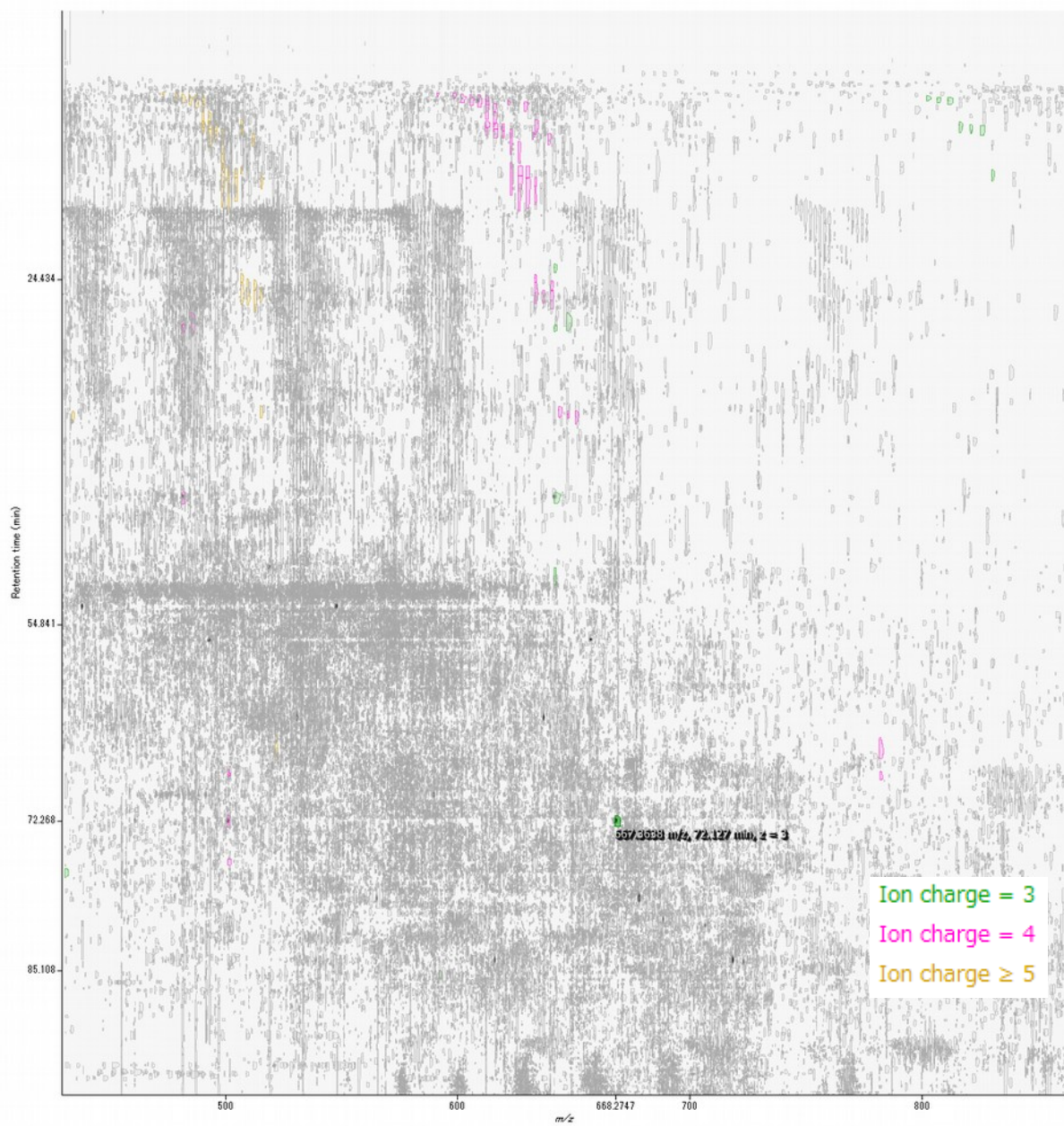


Fig. 5 Progenesis software によって表示した nanoLC-MS/MS 2D map 全体像
H4 ペプチドとして同定されたピークを着色表示した。

最もシグナル強度の強かった +4 価の H4 テールペプチドを、修飾状態と共に表示した 2D map を示す (Fig. 6)。同定された H4 ペプチドのリストは 付録 Table S1 に付す。

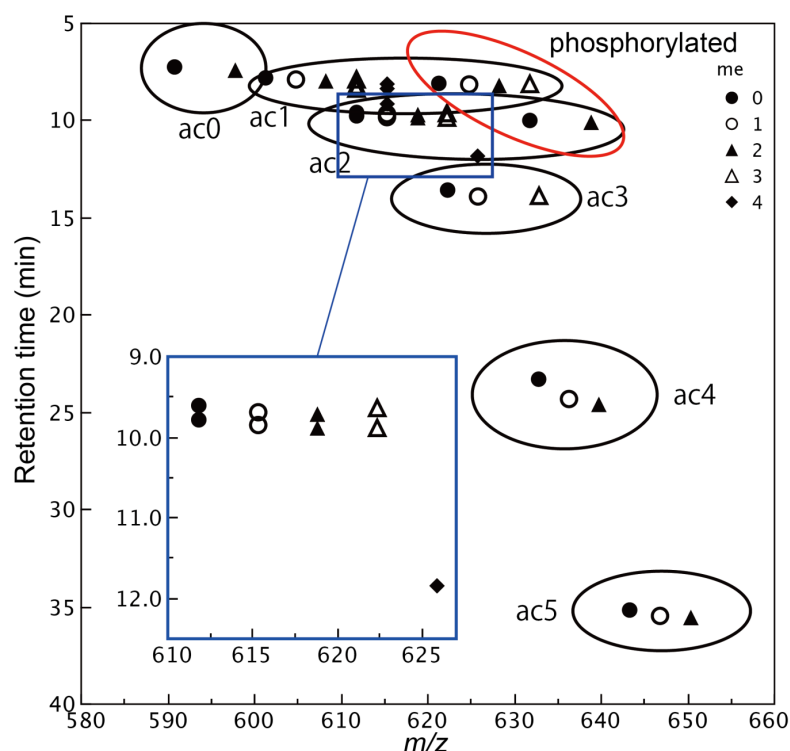


Fig. 6 LC-MS 2D map 上でのヒストン H4 テールペプチド (+4 価) の分布
各修飾状態のペプチドが保持時間と m/z によって分離されている。

実験 $n = 3$ それぞれについて、再現性を以ってピークは分離されていた (付録 Fig. S1, S2)。等質量の修飾組合わせのペプチドイオン同士は、MS/MS スペクトル及び保持時間の差異によって区別した (付録 Fig. S3)。既報 [8, 9, 13, 14] と比較して、今回のデータセットでは より多くの H4S1 リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトル数を獲得できていた (全データセットのうち H4 テールペプチドと同定された MS/MS 述べ 6,391 スペクトル中、99 本が H4S1 リン酸化ペプチド; リスト省略)。

また、ウシヒストン消化物を測定したデータ中の H4S1 非リン酸化 / リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトルを Fig. 7 に示す。CID では多価の正電荷によってスペクトルが低 m/z 領域に集中してしまっているが、ETD では電子転移によって電荷が相殺されるぶんスペクトルが高 m/z 側に広がり、かつ、リン酸基のニュートラルロス(価数の変化を伴わない修飾基脱離)が起きず高品質な開裂が得られている。CID スペクトルからはリン酸化ペプチドの同定はできていないが、ETD フラグメントは理論質量との一致が良好であった (Mascot score ≥ 35 , $p < 0.05$; 付録 Fig. S4)。

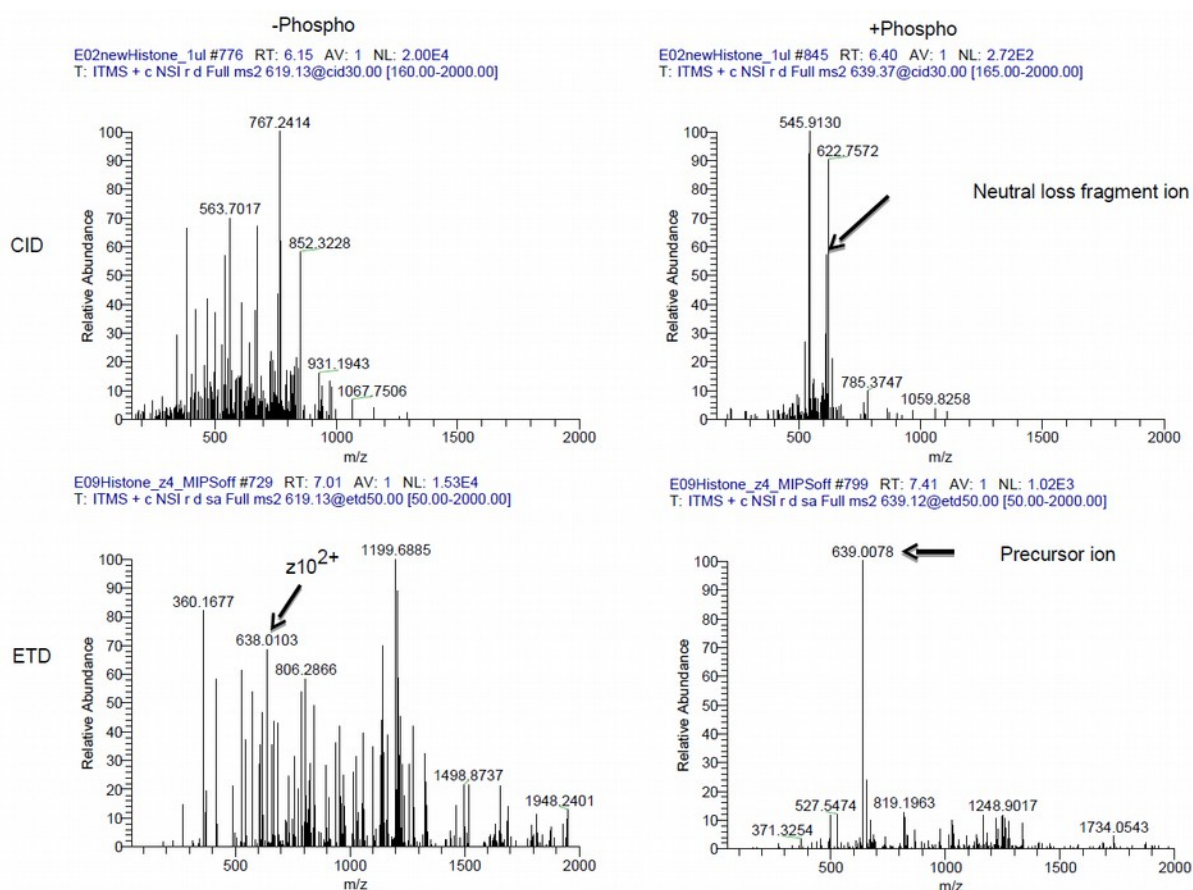


Fig. 7 H4S1 非リン酸化 / リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトル

イオンの価数に対応して、CID に比べて ETD の方が広い m/z 範囲のフラグメントを生成していることが分かる。

1.3.2 細胞周期におけるヒストン H4 翻訳後修飾の動態

細胞周期における H4K20 のメチル化動態を特異的抗体や質量分析で観測した報告 [15-18] や、アセチル化の組み合わせパターンを詳細に観測した報告 [19, 20] などが既にある。一方、H4S1 のリン酸化が S 期と M 期で増加することは知られている [21] もの、質量分析によって観測されているのは今のところ M 期での増加だけであった [22]。

ここで、本研究では HeLa S3 細胞を用いて細胞周期を同調し、ヒストン修飾の動態を調べた。フローサイトメトリーによる細胞周期同調確認の結果を Fig. 8 に示す。

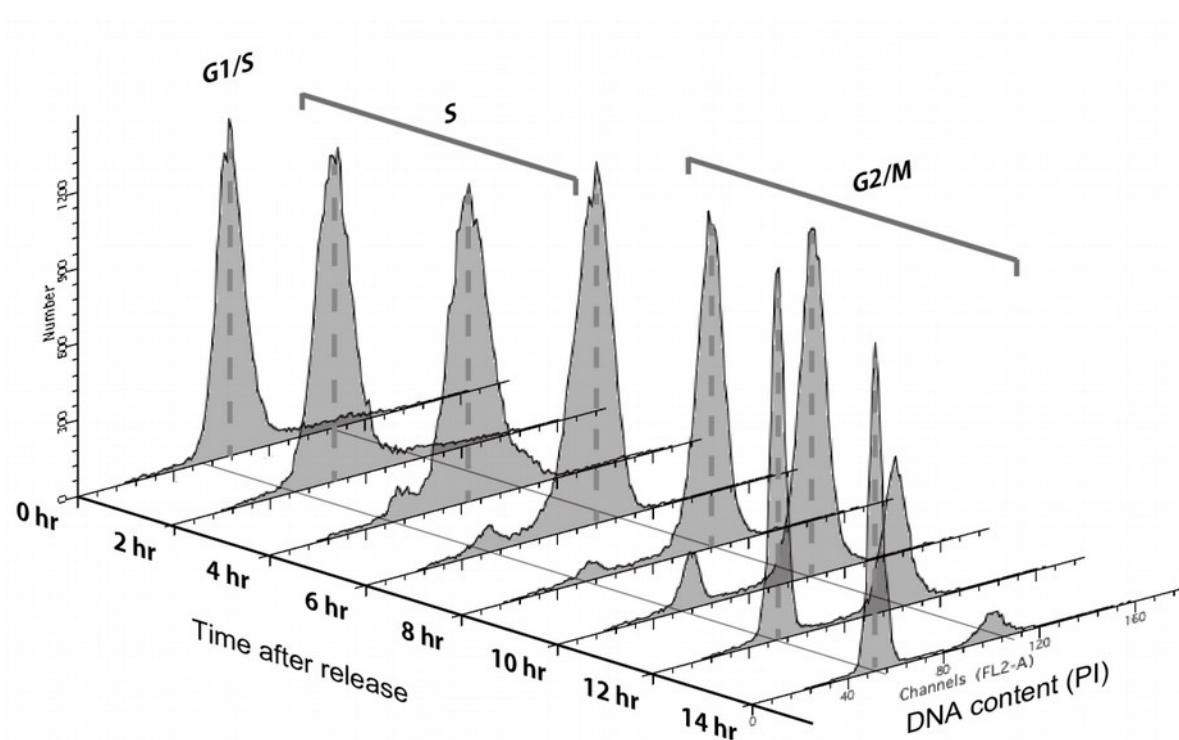


Fig. 8 フローサイトメトリーによる HeLa S3 細胞周期同調の確認

ヨウ化プロピジウム染色により細胞ごとの DNA 量を測定した。G1/S 期境界 (0 hr) からスタートし、概ね 0 ~ 8 hr が S 期、8 ~ 12 hr が G2/M 期に相当する。

G1/S 期境界からスタートして 2 時間おきに採取した各サンプル(タンパク質重量にして、1 測定につき約 500 ng ずつ)を LC/MS/MS で測定し、実験セット数 $n = 3$ で再現性を確保した。各実験セットは独立に Progenesis ソフトウェアで解析し、ペプチド存在量は H4 の消化断片のうち、修飾を受けない C 末ペプチドの存在量でノーマライズした (付録 Fig. S5)。また、測定のダイナミックレンジ(検出可能信号の最小値と最大値の比)をできる限り揃えるため、サンプルのインジェクション量も本測定前のプレ測定での H4 C 末ペプチドの存在量から計算して決定している。ペプチドイオンの最大のピーク面積は 1.1×10^7 [H4, DVVYALKRQGRTLYGFGG, 3+, 4 hr; CV = 2.5% (normalized), 3.4% (raw)], 最小のピーク面積は 19.2 (Histone H4, SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLR, 5+, 14 hr; CV = 120%) で、すなわちダイナミックレンジは 6×10^5 であった。CV 値の中央値は、同定されたペプチド全体では 29%、H4 テールでは 25% であった ($n = 3$)。

次に、様々な存在量を呈する修飾組み合わせパターンごとの時系列変化を捉えるため、各修飾組み合わせのペプチドの存在量の時系列中での最大値で再ノーマライズを施し、実験 3 セットを通して同定が再現されていた修飾組み合わせについて階層的クラスタリングを行った (Fig. 9)。H4K20 残基のメチル化数によって大きく 3 つのクラスターに分かれ (K20me0/me1/me2-3)、さらに、各クラスター内では S1 リン酸化の有無やアセチル化の組み合わせによってサブクラスターが分かれた。H4K20 のメチル化状態は、S 期から G2 期にかけて無修飾からモノメチルへと移り変わり、M 期でジメチル優位となり、既報の結果 [13-16] を再現した。アセチル化の組み合わせパターンについても概ね既報 [13] が再現

され (付録 Table S2)、H4 モノアセチルペプチドは K16ac と K12ac が多く、ジアセチルは K16ac/K12ac と K12ac/K8ac が多く、トリアセチルは K16ac/K12ac/K8ac と K12ac/K8ac/K5ac が多かった。一方、K20 無修飾が示す新生ヒストン (S 期に新規合成されるヒストン) においてはアセチル化組み合わせパターンは異なり、K5ac/K12 ジアセチルが多かった [20]。

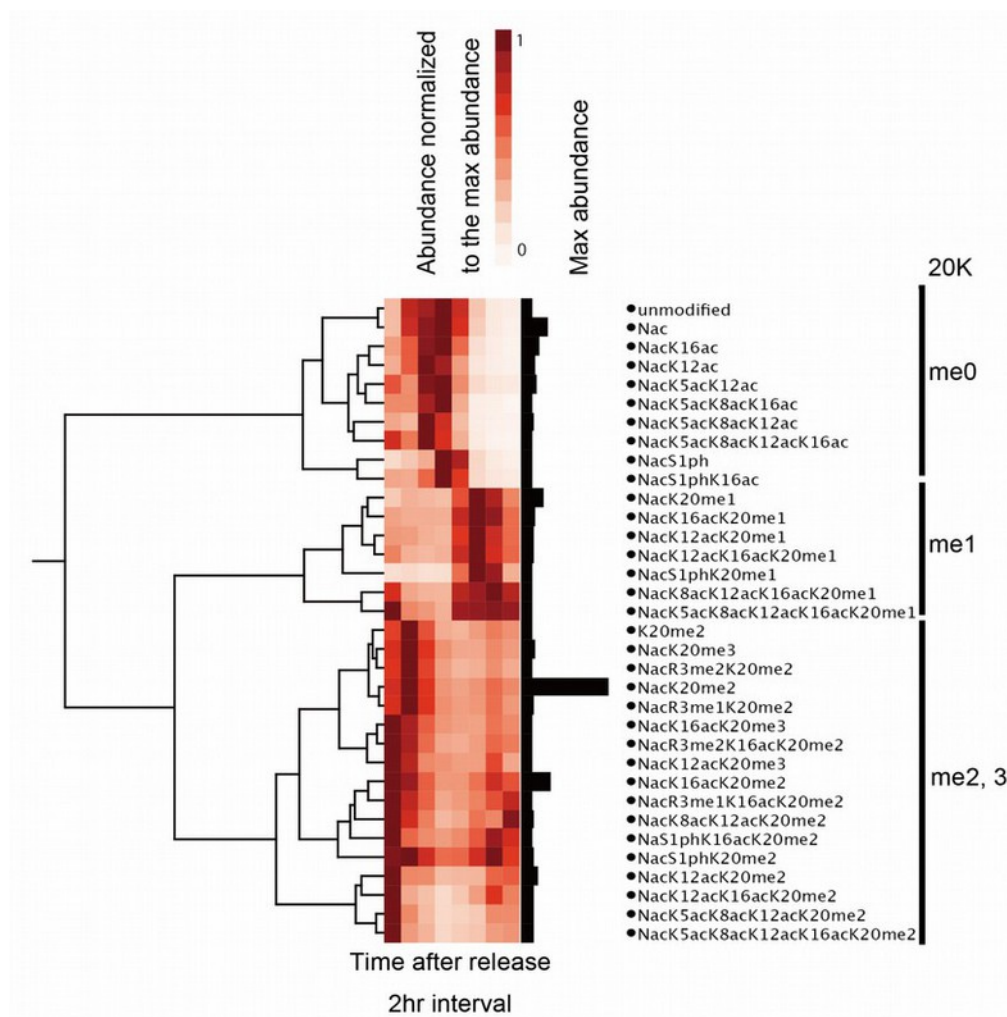


Fig. 9 細胞周期に伴う修飾変動に基づく階層的クラスタリング

各修飾組合せのペプチド (+4 価) についてそれぞれ時系列中の最大値でイオン存在量をノーマライズした。2 つ以上の実験セットで再現よく観測されたものを Table S1 から選び、階層的クラスタリングに供した。

H4K20 のメチル化状態を追った時系列データを Fig. 10 に示す。K20me0 の S 期新生ヒストンは、S 期初期から中頃にかけてはリン酸化に乏しかった。S 期終盤では、新生ヒストン (K20me0) は S1 がリン酸化を受け、そこから先 G2 期から M 期にかけて K20me1、K20me2 へと移行していた。S1 非リン酸化 H4 に関しても、K20 のメチル化状態の遷移は同様であった。ただし、K20me0 から K20me1 への移行に着目すると、S1 非リン酸化 H4 では Area Under Curve (AUC) が $K20me1 < K20me0$ であるが、S1 リン酸化 H4 では AUC は逆の関係 ($K20me0 < K20me1$) であった。

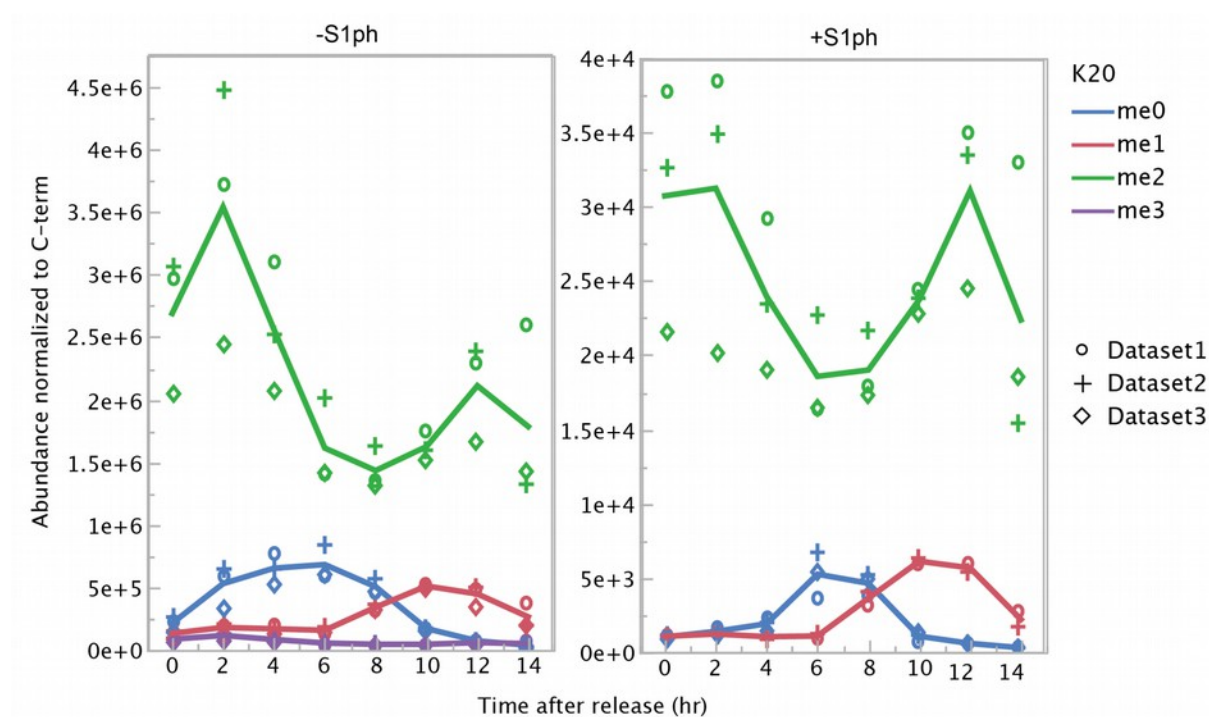


Fig. 10 H4K20 のメチル化状態の時系列変化

各実験セット毎に H4 C 末の存在量でノーマライズした。実線は実験 3 セットの平均を示す。左図は H4S1 リン酸化なし、右図は H4S1 リン酸化ありの H4 テールペプチド。

H4S1 のリン酸化の総量の変動を追ったグラフを Fig. 11 に示す。厳密には、修飾状態によってペプチドのイオン化効率は異なるので単純に足し上げることはできない [54] が、H4 C 末の存在量でノーマライズしたペプチド存在量 (normalized abundance) を H4S1ph 修飾を有するペプチドに関して合計した値を擬似的なリン酸化総量として扱った。総量としては、S 期 (0 ~ 8 hr) で減少し、M 期 (10 ~ 12 hr) において増加している。

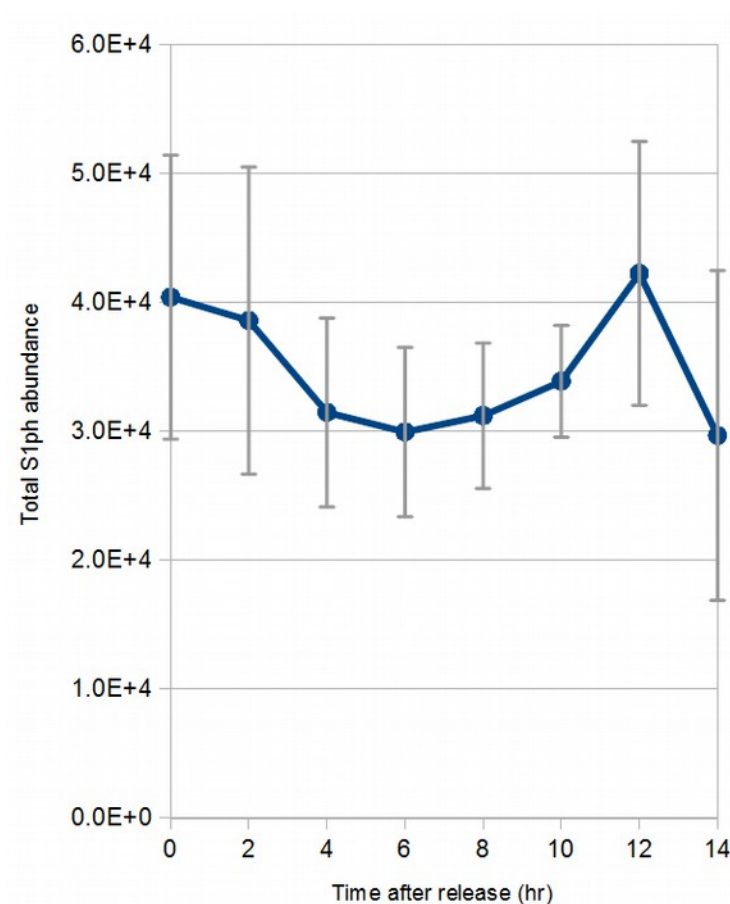


Fig. 11 H4S1ph の総量の時系列変化

各実験セット毎に H4 C 末の存在量でノーマライズした値を、リン酸化を含む H4 テールペプチド (S1ph, S1phK20me1, S1phK20me2, S1phK16ac, S1phK16acK20me2) に関して足し上げた擬似的なリン酸化総量を示す。実線は実験 3 セットの平均、エラーバーは実験 3 セットの標準偏差を示す。

また、修飾組合せ別にリン酸化/非リン酸化修飾動態を追ったグラフを Fig. 12 に示す。

K20me2 で見ると、M 期で S1 リン酸化/非リン酸化の差が開いている。K20me2 にさらに K16ac が共存した場合には、S 期初期における S1 リン酸化/非リン酸化の差の開き(S1ph の相対的低下)が、K16 非アセチルに比べてより早かった。

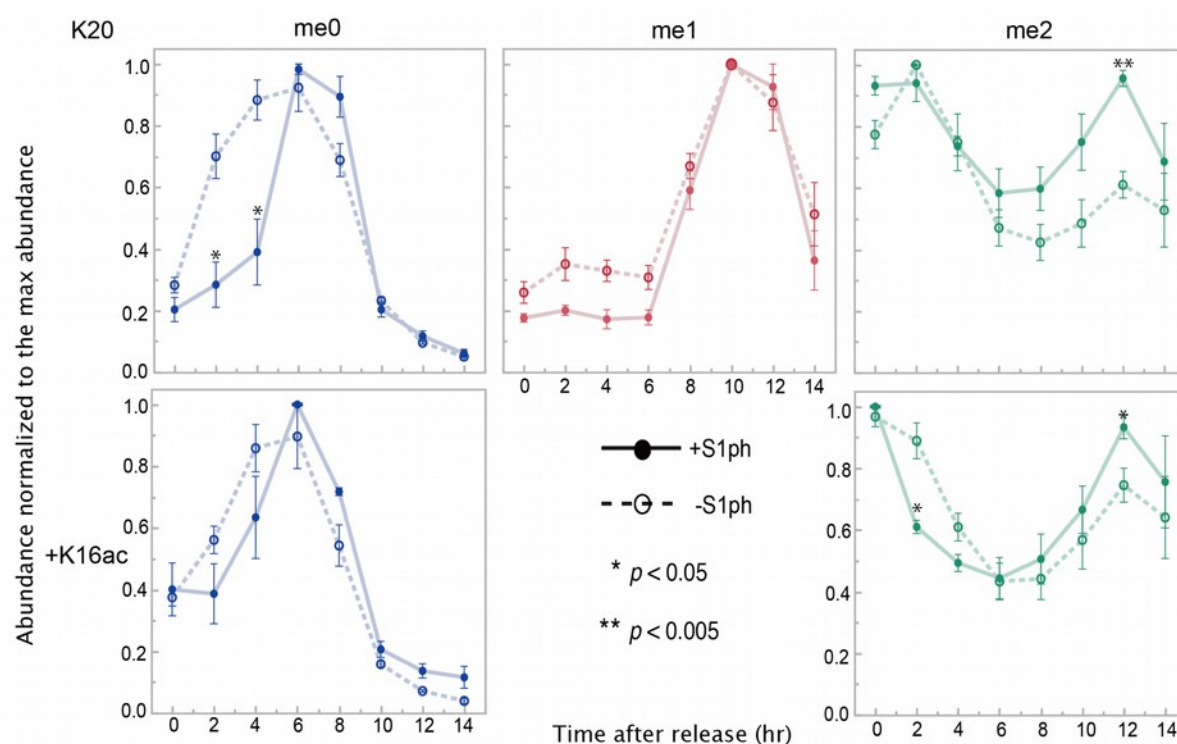


Fig. 12 修飾組合せ別の H4S1/H4S1ph 時系列プロファイル

時系列中での最大値でノーマライズした、修飾組合せごとの量的変動を示す。エラーバーは実験 3 セットぶんの標準誤差。H4S1/H4S1ph 間の差は pooled t-test で検定している。

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$

1.4 考察

ラベルフリー定量法によって、細胞周期におけるヒストン H4 の修飾動態を観測することに成功した。H4K20 メチル化動態や H4 アセチル化動態について既報を再現できており、本研究における測定系の妥当性を確認できた。細胞周期における修飾動態を質量分析法によって測った既報では H4S1 リン酸化については M 期における上昇のみが報告されている [22]。また、生化学的 [55]、細胞学的 [21] には S 期と M 期での上昇が示されているが、それに加え今回、LC/MS/MS による時系列測定によって新生ヒストン (H4K20me0) において H4S1ph が S 期の中で特に終盤に上昇することを新たに見出した。

測定系の流路内に金属素材を用いると一般的にリン酸化ペプチドの感度は吸着により著しく落ちるが、今回、H4S1ph 量を再現性良く定量できた理由としては金属素材を避けたことが寄与していると考えられ [10]、測定系構成の最適化が奏功したと言えよう。一方、K5/K8/K12/K16 のアセチル化状態の組み合わせについては、液体クロマトグラフィー上での分離が完全ではないこともあり、ピーク同士の混ざり込みによって定量性には改善の余地がある。これについては今後、MS/MS フラグメントベースの定量法を組み込むといった課題が挙げられる。

以上、細胞周期におけるヒストン H4 の修飾動態を包括的に観測し、特に H4S1ph の詳細な変動を明らかにしたわけだが、変動の観測自体はただの現象論であり、H4S1ph が生理的にどのような意義を以って生滅しているかについての情報はこの測定からだけでは得られない。そこで、H4S1ph がクロマチンに与える影響を調べるため、H4S1ph に特異的に結合する分子を同定することにした (第 2 章)。

第2章 ヒストン H4S1 リン酸化結合タンパク質の同定

2.1 技術的背景

タンパク質の翻訳後修飾が生体分子間相互作用に寄与する例は多岐にわたる [23, 24]。特にヒストン修飾に関しては、“リーダー (reader)” と呼ばれる修飾認識分子がクロマチン制御因子として機能する例が数多く存在し [25]、修飾の生理的意義を解明する上でリーダー分子の同定が鍵となる。例えばトリメチルリシン (Kme3) に関しては、その親和性の強さ (解離定数 K_D にして時に sub- μM) に起因して、リーダー分子の同定はプルダウンプロテオミクスの手法が奏功する場合が多い [26–28]。それに対し、アセチルリシン (Kac) やリン酸化セリン/トレオニン (S/Tph) といった修飾のリーダー分子に関しては、親和性の強弱に幅があり [29]、時に K_D は $10^2 \mu\text{M}$ を超える。従来のプルダウン法における低親和性結合分子の同定能には限界があり、そこで近年、クロスリンク法を利用した改良プルダウン法が試されている [30–35]。ホルムアルデヒドやアミンクロスリンカーといった、細胞抽出液に外から加えるクロスリンカーとは異なり、ペプチドに直接クロスリンカーを仕込んだベイトを用いることで、真の結合パートナー分子だけを共有結合で捕捉することができる (Fig. 13)。

ここで私は、光クロスリンカーを仕込んだ合成ペプチドベイトを特別に設計し、高感度かつ特異性の高いクロスリンクプルダウン法によって、親和性の強弱に依存しないロバストなリーダー分子同定法の確立を試みた。

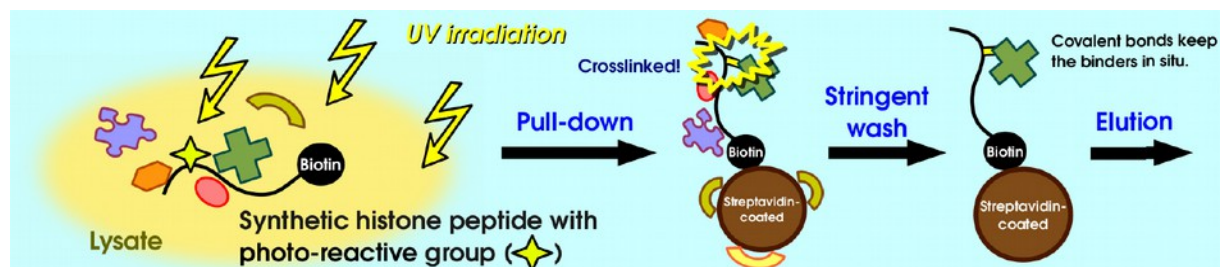


Fig. 13 光クロスリンクを利用したプルダウン法の概略

光反応基を導入したペプチドと細胞抽出液を混ぜ、UV 照射で相互作用分子とクロスリンクさせる。ペプチド末端のビオチンを介してstreptavidinビーズによってプルダウンし、非特異的結合分子を強く洗浄してから、目的のクロスリンク産物を溶出する。

2.2 材料と方法

2.2.1 ペプチドの合成

ペプチド合成用の天然アミノ酸の Fmoc 体 (Novabiochem 製) の側鎖保護基は Arg(Pbf), Asp(OtBu), Lys(Boc), Ser(tBu), Tyr(tBu) である。一方、非天然アミノ酸の Fmoc 体としては Fmoc-4-azide-1-phenylalanine {Fmoc-Phe(4-N₃)-OH}, Fmoc-O-benzyl-1-phosphoserine [Fmoc-Ser{PO(OBzl)OH}-OH], and Fmoc-4-benzoyl-1-phenylalanine (Fmoc-Bpa-OH) (いずれも渡辺化学工業製) を用いた。H₄N 末修飾として付加するための 3-(3-Methyl-3H-diaziren-3-yl)propanoic acid (4,4-azopentanoic acid) は共同研究者の 林剛介氏に既報 [36] の如くに合成して頂いた。

合成ペプチドは、TentaGel rink-amide resin (0.23 mmol/g; intavis 製) 上で 10 mmol スケールで自動ペプチド合成機 (ResPep SL; intavis AG 製) を用いて標準的な Fmoc 固相ペプチド合成法によって合成した。即ち、(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) と N-methylmorpholine (NMM) でカップリング反応を終結させ、Fmoc の除去は 20% piperidine/N,N-dimethylformamide 処理によって行った。N 末のリン酸化セリンおよび 4,4-azopentanoic acid については、共同研究者 坂元亮介氏がレジン上で手作業で (1H-benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)-N,N-dimethylmethaniminium hexafluorophosphate (HBTU), 1H-benzotriazol-1-ol (HOBt), ethyl(diisopropyl)amine (DIEA) で 30 分間 処理しダブルカップリングを行った。カップ

リング反応の進行はカイザーテストで確認した。レジンからのペプチドの切り出しは、95% TFA, 2.5% water, and 2.5% triisopropylsilane (TIPS) で氷上 6 時間処理して行い、このクルードのペプチドは氷冷ジエチルエーテルで沈殿、遠心して回収した。上清は廃棄し、ペレットは氷冷ジエチルエーテルで 2 回洗浄した。これを 0.1% TFA 含有アセトニトリル水溶液に溶解し、C18 カラム AR-300 (Nacalai Tesque) を用い アセトニトリル/水の 30 分リニアグラジエントで逆相 HPLC によって筆者 山本が分取精製した。ペプチド生成物の確認は nanoLC-MS によって行い、次の質量を確認した。

m/z 655.82 $[M + 4H]^{4+}$, calculated m/z 655.82 $[M + 4H]^{4+}$ for dzH4S1;

m/z 675.81 $[M + 4H]^{4+}$, calculated m/z 675.81 $[M + 4H]^{4+}$ for dzH4S1ph;

m/z 460.25 $[M + 4H]^{4+}$, calculated m/z 460.25 $[M + 4H]^{4+}$ for H4S1-Bpa;

m/z 480.25 $[M + 4H]^{4+}$, calculated m/z 480.25 $[M + 4H]^{4+}$ for H4S1ph-Bpa.

※ 全て monoisotopic mass で示している。

これら合成ペプチドの C 末アジド部分に対し、等モルの Dibenzylcyclooctyne-PEG12-Biotin Conjugate (Jena Bioscience 製) を click chemistry (37 °C 一晚) により反応させ、C 末にビオチンの付いたプルダウン用ペプチドとした。反応生成物は HPLC および MALDI-TOF MS により確認し、次の質量を観測した。

m/z 3695.76 $[M - N_2 + H]^+$, calculated m/z 3696.08 $[M - N_2 + H]^+$ for dzH4S1-PEG12-biotin; m/z 3775.52 $[M - N_2 + H]^+$, calculated m/z 3776.06 $[M - N_2 + H]^+$ for dzH4S1ph-PEG12-biotin; m/z 2941.45 $[M + H]^+$, calculated m/z 2941.42 $[M + H]^+$ for H4S1-Bpa-PEG12-biotin; m/z 3021.48 $[M + H]^+$, calculated

m/z 3021.40 $[M + H]^+$ for H4S1ph-Bpa-PEG12-biotin.

※ 各 calculated mass は average mass で示している。

上記 MALDI-TOF MS 測定には MALDI-7090 質量分析器 (Shimadzu) を用いた。合成ペプチドを HCCA Pre-spotted μ Focus MALDI plate 384 circles 900 μ m (HST Inc. 製) 上にスポットし風乾した。測定は positive リフレクターモードで行った。質量キャリブレーションには ProteoMass™ Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich 製) を用いた。

2.2.2 光クロスリンクによる標的タンパク質濃縮

HeLa S3 whole cell lysate (タンパク質濃度 5 mg/mL) を ProNET LIVE! cell lysis buffer PBS (ESI Source Solutions 製) で調製した。Lysate には Roche Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail と Roche PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail を加え、タンパク質分解と脱リン酸化を防いだ。ペプチドプローブ 1-6 (Fig. 14) を lysate に添加し氷上 15 分間 静置した。14-3-3 結合阻害実験は、R18 peptide (Sigma-Aldrich 製) を 10 μ M 添加下に行った。そして、各サンプルに対し Bio-Link BLX-E UV lamp (Vilber Lourmat 製) を用いて 365 nm の UV 照射を氷上 10 分間 実施した。照射後 lysate は Dynabeads streptavidin C1 (Invitrogen 製) と混合し、緩やかに回転混合しながら 4 °C 1.5 時間プルダウンを行った。その後の洗浄として、0.8% sodium dodecylsulfate (SDS) 含有 PBS、0.1% Tween 20 含有 PBS (PBST)、0.1% Tween 20 含有 5M NaCl 水溶液、そして再度 PBST の順で懸濁・沈降・上清除去を繰り返す。

返した。1× LDS sample buffer (Novex 製) 50 mM dithiothreitol (DTT) で 96 °C 3 min ボイルし、ビーズに濃縮されたタンパク質を溶出した。

2.2.3 クロスリンク産物の検出と同定

ビーズから溶出した各サンプルは、それぞれウエスタンブロット検出用と質量分析に供するゲル内消化用の 2 つに分割した。NuPAGE 10% Bis-Tris gel (Invitrogen 製) にて泳動し、iBlot (Invitrogen 製) を用いて poly(vinylidene fluoride) (PVDF) メンブレンに転写した。メンブレンはトリス緩衝生理食塩水 0.1% Tween 20 (TBST) 1% ウシ血清アルブミンにて一晩ブロッキング処理したのち、streptavidin–poly(horseradish peroxidase) conjugate (SA-HRP; Pierce Protein Biology Products 製) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (Toyobo Corp. 製) で 1:5000 で希釈した溶液で biotin-streptavidin を 2 時間ハイブリダイズした。化学発光基質 Luminata Forte Western HRP substrate (EMD Millipore 製) を用い、LAS-3000 imager (Fujifilm 製) で検出した。

最初に分割したサンプルの残り一方は、上記と同時に同じゲル上で泳動し、50% メタノール 7% 酢酸で固定処理し、SYPRO Ruby protein gel stain (Molecular Probes 製) で染色した。そして、ゲル内消化用サンプルとして、ウエスタンブロットで検出されたバンドに一致する泳動度領域のゲルを切り出し、1 mm³ 角ゲル片にスライスした。ゲル片は既報 [37] に則ってトリプシンによるゲル内消化に供した。消化サンプルは LC-MS 測定し、MS/MS データを Mascot ソフトウェアで解析 [38, 39] した。

2.3 結果

H4S1ph に関わる細胞内現象を示した免疫染色研究や、修飾のゲノム上での分布を示した研究は過去いくつかあるが [21, 40, 41]、修飾を直接認識してクロマチン制御因子として働くタンパク質に関する情報はほとんど無かった [42, 43]。H4S1 リン酸化によって H4 テールに対するヒストンメチル化酵素の結合が減弱するといった知見 [44] はあるものの、現時点において知る限り、H4S1ph を直接認識するリーダータンパク質は未だ同定されていない。そこで今回、H4S1 および H4S1ph と相互作用するタンパク質群を直接 捕捉するため、数種類の光親和性プローブを合成 (Fig. 14) し、プルダウンを試した。UV 照射によって活性化できる光反応基を仕込む位置を、ペプチド配列中の 3 ヶ所試した。H4G7 の位置にベンゾフェノンを導入したもの (プローブ 3-4)、H4G11 の位置にベンゾフェノンを導入したもの (プローブ 5-6)、そして H4S1/S1ph の真横である N 末アセチル化に代えてジアジリンを導入したもの (プローブ 1-2)、の 3 種類である。嵩高いベンゾフェノンによって結合部位に立体障害を生じることを避けるため、H4S1 に近過ぎる残基を benzoylphenylalanine (Bpa) 置換することはしなかった。

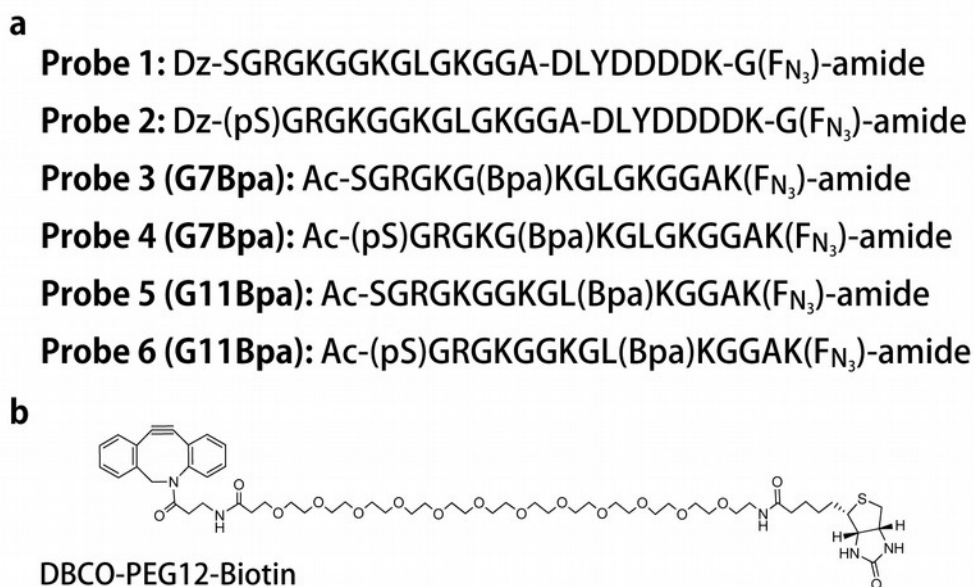


Fig. 14 ペプチドプローブのデザイン

(a) 6 種類のプローブ配列

(b) C 末ビオチン付加のための Click 反応可能な DBCO-PEG12-Biotin

これらのペプチドを用いて、HeLa S3 の細胞抽出液を対象にクロスリンクプルダウン法を実施した。これらのプローブペプチドと共有結合でクロスリンクしたタンパク質は、プローブを介してビオチンが付加された状態となるので、Streptavidin–HRP (SA–HRP) を用いてウェスタンブロットによって高感度に検出することができる (Fig. 15a, b)。結果、プローブ 3–6 (G7Bpa および G11Bpa 置換) では H4S1/S1ph でクロスリンク産物に差は無かった (Fig. 16) が、プローブ 1 と 2 では、H4S1 のリン酸化の有無によってクロスリンク産物の泳動バンドに差が生じた (Fig. 15c)。非リン酸化 H4S1 特異的な泳動バンドは 60 kDa 領域と 40 kDa 領域に見られ、一方 リン酸化 H4S1 特異的なバンドは 30 kDa 領域に認めた。

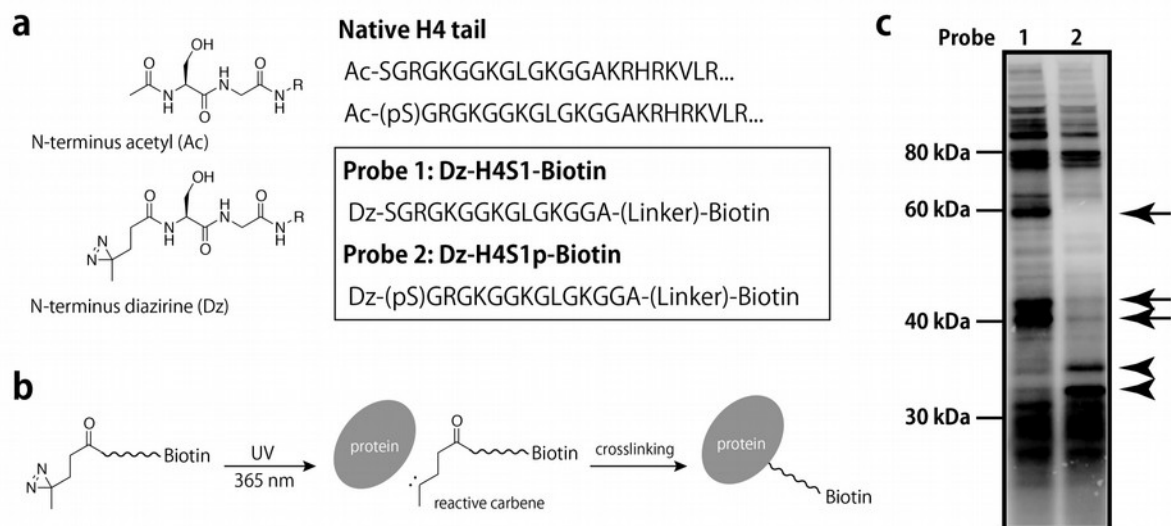


Fig. 15 光クロスリンクによるプルダウン実験

(a) N 末ジアジリン導入ペプチドデザイン。N 末アセチル化をジアジリン含有基で置換した。

(b) ジアジリンによるクロスリンク反応機構 (carbene insertion)

(c) Streptavidin–HRP によるクロスリンク産物の検出。

H4S1 特異的バンド; arrows、H4S1ph 特異的バンド; arrowheads。

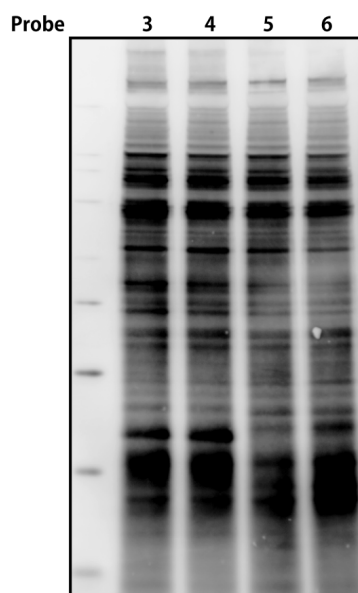


Fig. 16 Bpa 導入ペプチドプローブでの結果

リン酸化の有無による明らかなバンドの差は認められなかった。

30 kDa 領域の泳動バンド切り出し質量分析(付録 Fig. S6)により、H4S1ph 特異的なタンパク質は 14-3-3 タンパク質と同定され (Fig. 17a)、これは anti-pan-14-3-3 抗体によるウエスタンブロットによっても確認された (Fig. 17b)。さらに、この H4S1ph – 14-3-3 間相互作用は、14-3-3 タンパク質のリン酸化セリン認識部位に特異的に結合するペプチド [45] である R18 (PHCVPRDLSWLDLEANMCLP; K_D 70 nM) によって特異的に拮抗され、Dz-H4S1ph 特異的な 14-3-3 の泳動バンドは消失した (Fig. 17c) ので、すなわち H4S1ph は 14-3-3 のリン酸化セリン認識部位に特異的に結合することが判明した。

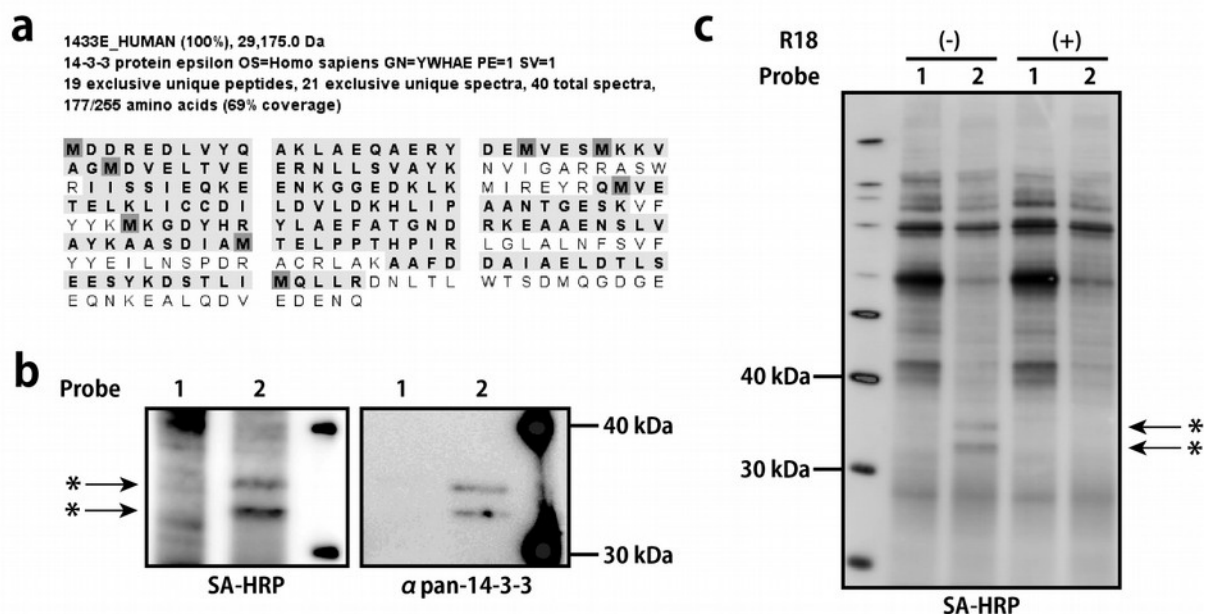


Fig. 17 H4S1ph と 14-3-3 間の相互作用の検証

(a) 質量分析によるバンド同定

(b) Streptavidin–HRP と抗 pan-14-3-3 抗体によるクロスリンク産物の確認

(c) R18 ペプチドによる特異的拮抗実験

* (asterisks) は ペプチドベイトと 14-3-3 タンパク質とのクロスリンク産物を示す。

2.4 考察

新規開発した光クロスリンク法を利用したプルダウンにより、H4S1ph の直接の相互作用分子として 14-3-3 タンパク質を同定した。14-3-3 タンパク質が多くのリン酸化タンパク質を認識するアダプター分子である [46, 47] ことを考慮すると、知見としての新規性には乏しいが、妥当な結果である。ただし、細胞内でこの相互作用が生理的意義を有しているかどうかについては、更なる実験的検討が必要である。前章の細胞周期ヒストン修飾解析において、H4S1ph が S 期終盤の新生ヒストンおよび M 期において増加することを見出したわけだが、例えば M 期の染色体において 14-3-3 がリン酸化 CENP-A スクレオソームと CENP-C との間のアダプターとなり、キネトコア内で橋渡し機能を果たしていること [48] を踏まえると、H4S1 のリン酸化もキネトコアを構成するタンパク質複合体の安定性増強因子であるといった蓋然性の高い仮説を導くことが可能である。この仮説を示すためには、キネトコア複合体の結合安定性を直接測定する(無細胞再構成系で物理的に張力を測る、など)といった実験が必要であろう。そのほか、14-3-3 タンパク質の遍在性を考慮すると、セントロメアに限らずゲノム上に広く分布する可能性も考えられ、例えば、14-3-3 と H4S1ph を免疫染色して共在を確認したり、もしくは ChIP-Seq によってゲノム配列レベルでの共在を示すといった方針もとりうる。

また、H4 N 末配列 (Ac-pSGRGKGG...) は既知の 14-3-3 のリン酸化認識配列 [49] には当てはまらない配列であり、実際、クロスリンク無しのプルダウンでは H4S1ph 特異的な結合分子を捕捉することはできなかった。即ち、修飾-タンパク質相互作用をスクリーニングする上で、既存手法では捉えることのできないような弱親和性の相互作用も捕捉できたと

いう点で、従来法に勝る手法を開発できたと言える。

一方、複数の光反応性ペプチドを試したことで、ベイト設計において考慮すべき条件に関する示唆も得られた。今回、修飾部位から 5 残基以上離れた部位に嵩高い光反応基(ベンゾフェノン)を仕込んだベイトではリン酸化有無に対応した結合タンパク質の差は見出せなかったが、修飾部位の真横にコンパクトな光反応基(ジアジリン)を仕込んだベイトでは、修飾有無に特異的なタンパク質を捕捉することができた。以上を踏まえ、標的分子同定を成功させる望ましいベイト設計の条件として次のような項目が考えられる。

- i) 修飾-タンパク質相互作用に対してクロスリンク反応基自体が立体障害を生じないこと
- ii) できるだけ元々の化学構造に似せた形を保つこと (bioisosteric design)
- iii) クロスリンク反応基を修飾部位のなるべく近くに配置すること

ベンゾフェノンと比べてコンパクトで分子間相互作用の邪魔になりにくいジアジリンは、上記の条件を満たす理想的なベイト設計をする上で使いやすい反応基である [50, 51]。ヒストン H4 テールの場合には、もともと生理的にほぼすべての N 末端がアセチル化されているため、N 末端のその化学的性状を保ちつつ、H4S1 残基の真横にジアジリンを仕込むことができた。クロスリンクの反応機構的にも、タンパク質と架橋するまで励起されることを繰り返すベンゾフェノンよりも、UV 照射による不可逆的な脱窒素によって生じるカルベン中間体が一度限りの架橋反応 (※タンパク質に限らず、水とも反応する) で近傍分子を強力に捕捉するジアジリンのほうが、非特異的クロスリンクは起こしづらいとされており [52, 53]、実際今回のクロスリンク実験でも、ジアジリンプローブのほうがバックグラウンド少なくシャープなバンドが見られた。

しかしながら、目的の修飾部位のアミノ酸配列次第では、ジアジリンの導入は時に合成上困難である。様々なヒストン修飾を相手に修飾関連分子を捕捉してゆくには、個々の修飾と周辺配列に応じてケースバイケースで設計を工夫する必要がある。

また、今回は **H4S1** のリン酸化という単一の修飾に着目して修飾結合タンパク質探索を実施したが、実際には複数の修飾が協調して修飾リーダー分子ないしは修飾リーダー分子複合体と相互作用することで結合が安定化する場合もある [29]。光クロスリンク法を用いれば、本来は単一修飾だけでは相互作用が弱く複数修飾の協調を以って初めて安定化するような相互作用であっても、単一修飾を糸口にリーダー分子候補を捕捉できる可能性がある。一方、複数修飾の協調(クロストーク)効果を調べるためには、修飾組合わせを観測(本論文第1章)した情報を参考に、複数修飾を施したペプチドプローブでプルダウン実験を行う、といったアプローチも考えられ、今後、光クロスリンク法と合わせて検討することも有用であろう。

第3章 結語

ヒストン修飾解析用にカスタマイズした LC/MS/MS による修飾動態のより精密な定量と、光クロスリンカーを利用したケミカルプロテオミクスによる高感度かつ特異的な修飾関連タンパク質同定法を開発し、修飾変動の観測からエピゲノム現象仲介分子の同定に至るまでの、包括的なヒストンコード解析ワークフローを構築した。本ワークフローの用途としては、例えばまずは特定の疾患にヒストン修飾異常が存在するかどうか探索し、そこで正常と比べて逸脱（増加もしくは低下）して疾患のドライバーとなっている可能性のある修飾が認められれば、さらにその修飾の関連分子 (Writer/Reader/Eraser) を同定し、生理的意義の解明、ひいては創薬標的を見出すという使い方がある。従来のエピゲノム創薬標的は、遺伝子変異や増幅・欠失、遺伝子融合といったゲノム解析によるターゲット探索に基づいて発見されたものが多かったが、本ワークフローのように遺伝子発現の直接の制御因子であるヒストン修飾を切り口として、疾患ドライバー修飾を探索することによって、ゲノム解析では見つかることのなかった新規エピゲノム創薬標的を発見できる可能性がある。

一方、修飾検出の網羅性にはまだ改善の余地があり、H4 のみならず H3、H2A、H2B そして H1 も含めたヒストン修飾を測定するには、配列に応じた消化や測定上の工夫が必要である。また、光クロスリンカーを用いた修飾関連分子同定法に関しても、今回は個別のバンド切り出しによってタンパク質同定を行ったが、ケミカル“プロテオミクス”たるためには、本来プルダウンしたタンパク質全体を対象としたショットガン法によって網羅的な比較を実施したいところである。そのためには、非特異的なタンパク質やストレプトアビジンのコンタミネーションが多い加熱変性溶出を避け、温和な溶出法を実装する必要がある。今後の展開としては、これらの課題を解決し、より深いヒストン修飾解析を実現することを考えている。

付録 Supplementary Figures and Tables

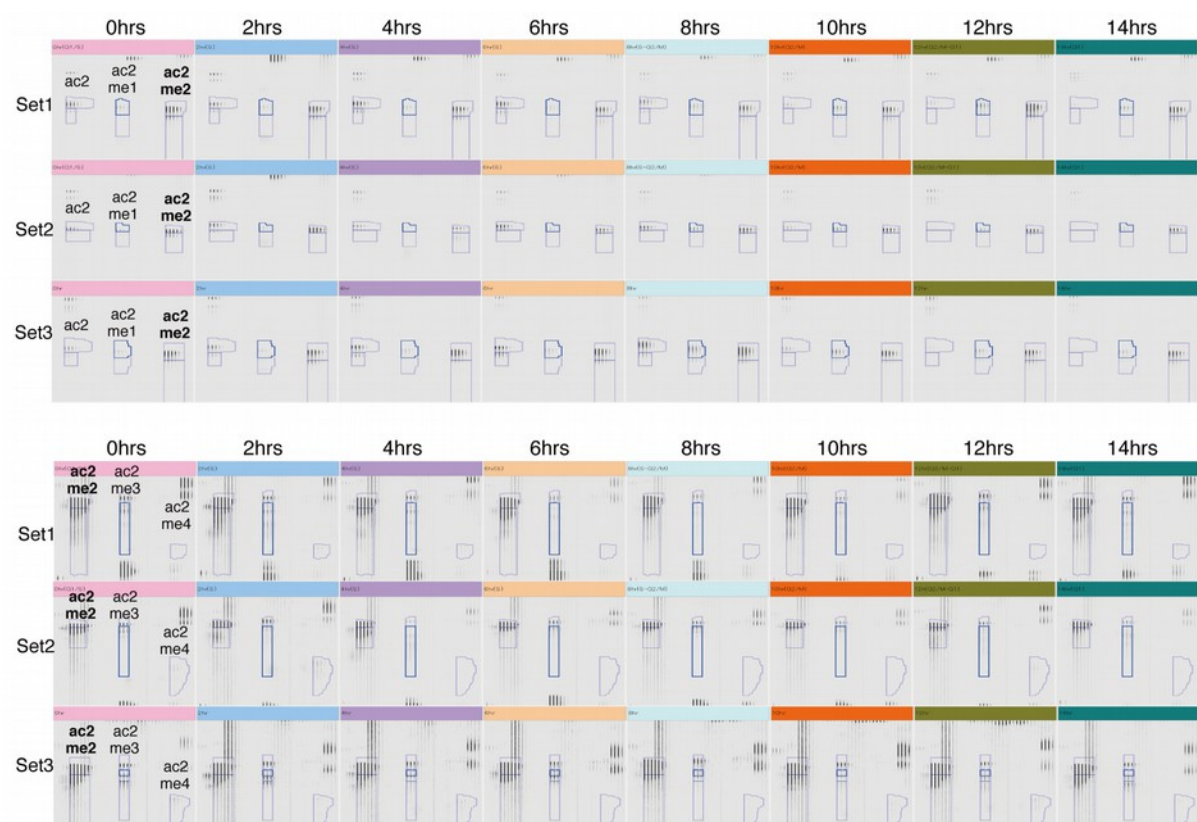


Fig. S1 ジアセチル H4 テールペプチドを例とした LC-MS 測定再現性確認
Progenesis software を用いて 2D map を表示している。

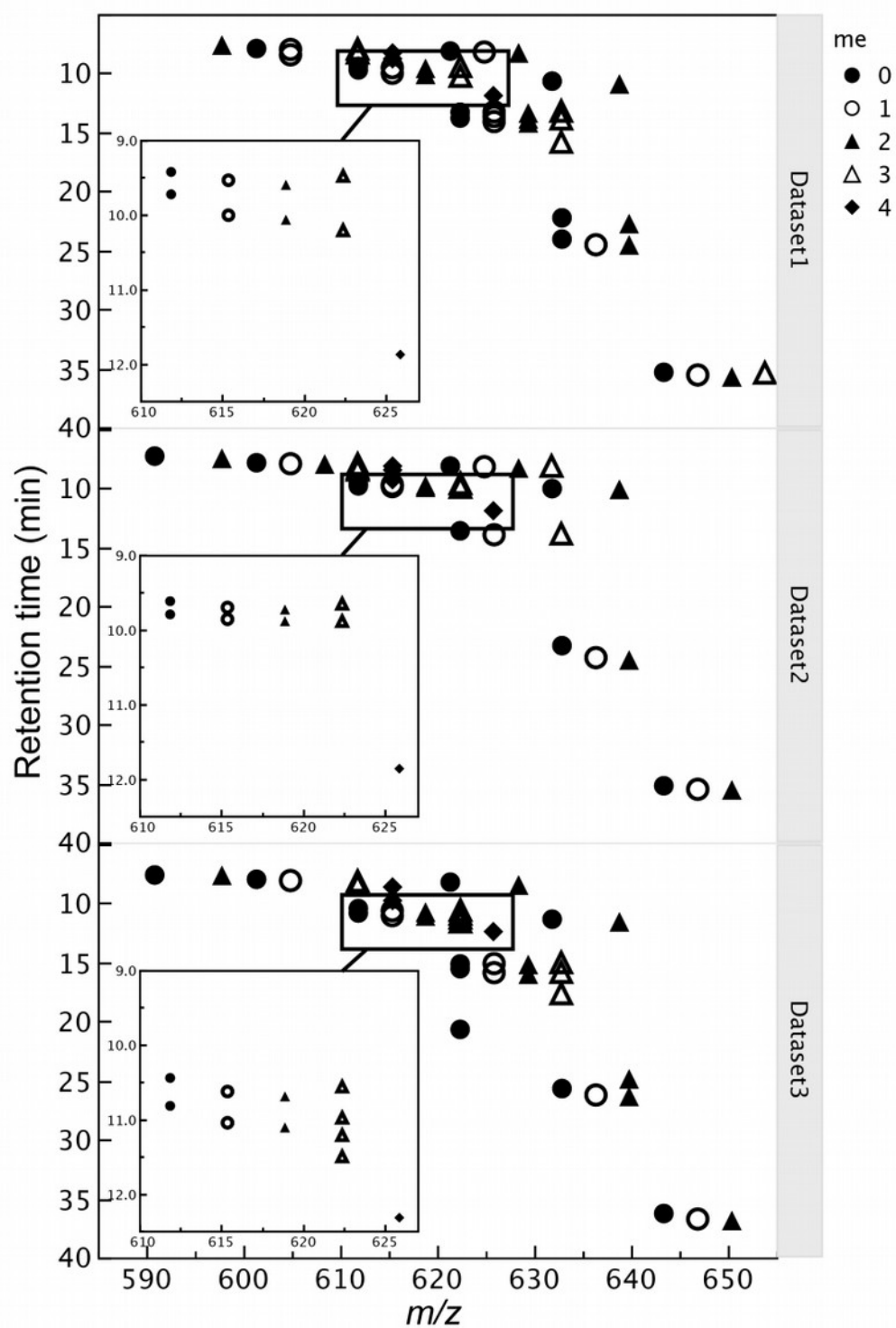


Fig. S2 +4 価の H4 テールペプチドの LC/MS マップ

実験 3 セットいずれも同様に分離が再現されている。囲み枠内はジアセチルペプチド。

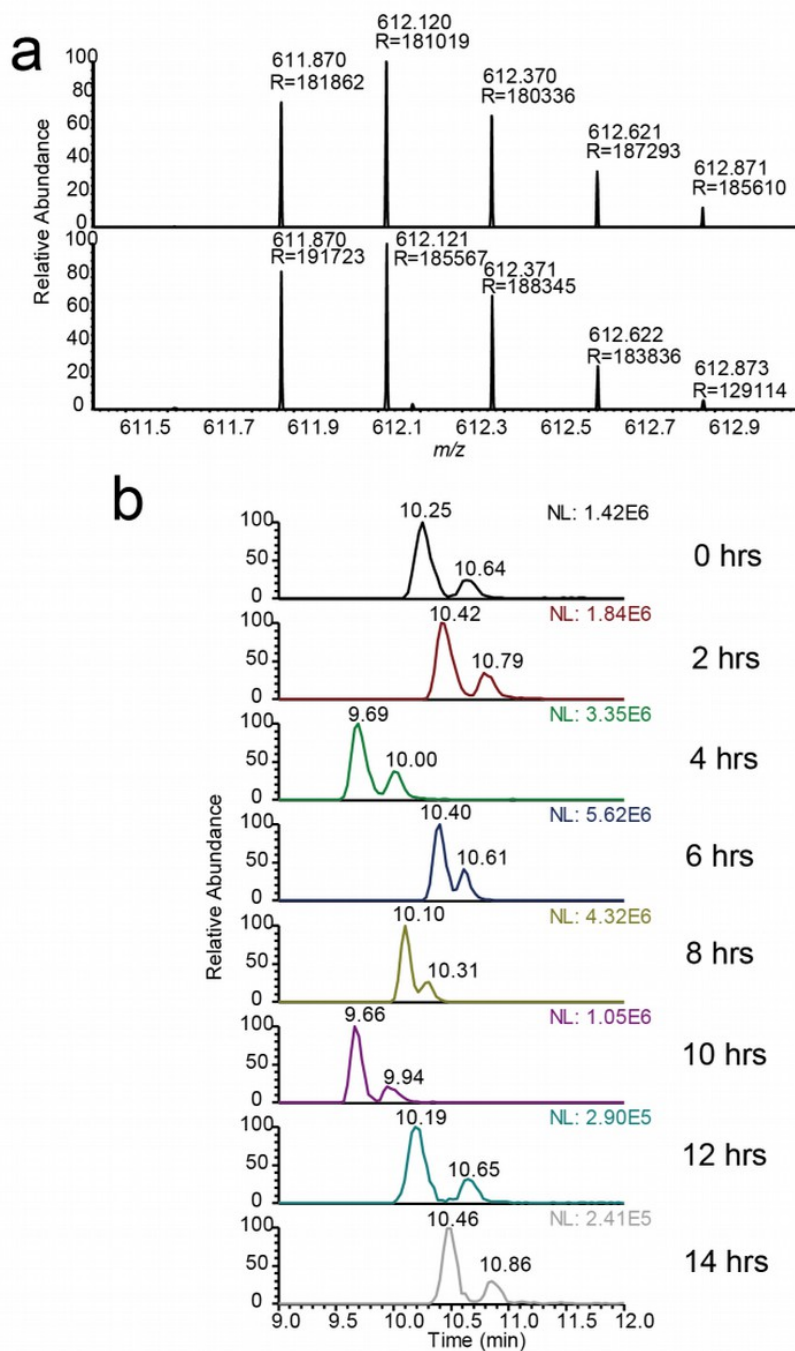


Fig. S3 ジアセチル・ジメチル (Nac, K12 or K16 ac と K20me2) ペプチドの LC 分離

(a) +4 価の m/z 611.870 ペプチド、保持時間 10.25 min (上) と 10.64 min (下)

(b) 各時間のサンプルにおける m/z 611.870 の抽出イオンクロマトグラム

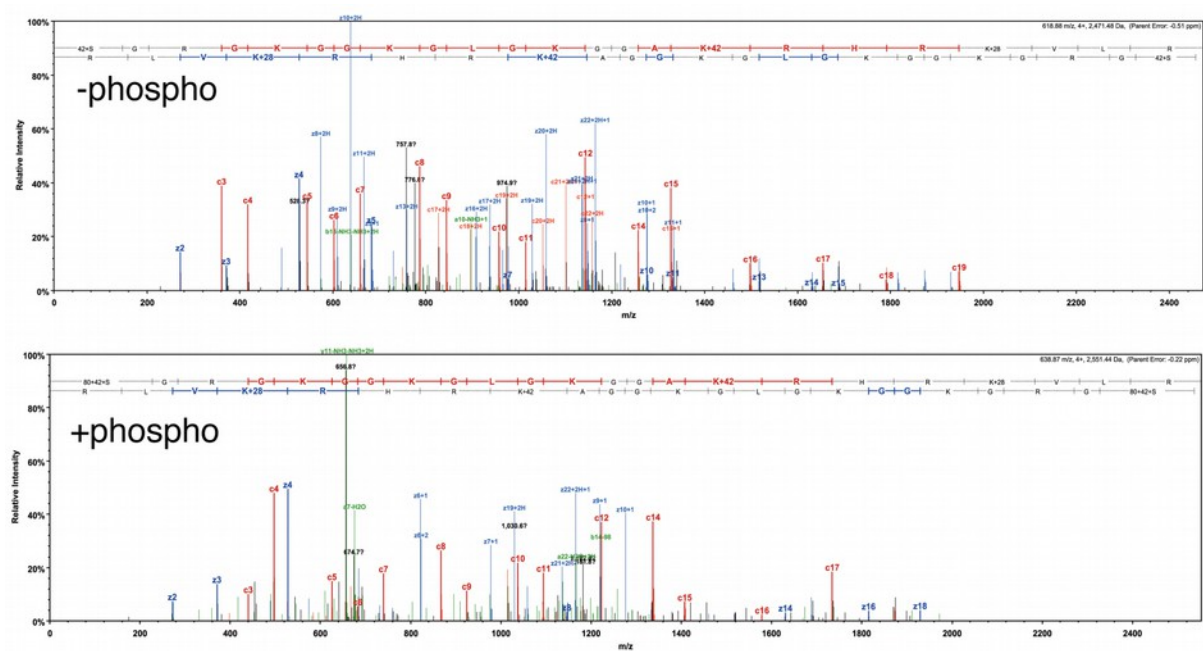


Fig. S4 リン酸化 H4 テールペプチドの MS/MS スペクトルのペプチド断片アサインメント
リン酸化なし(上)とリン酸化あり(下)の Nac-K16ac-K20me2 ペプチドの ETD スペクトル。

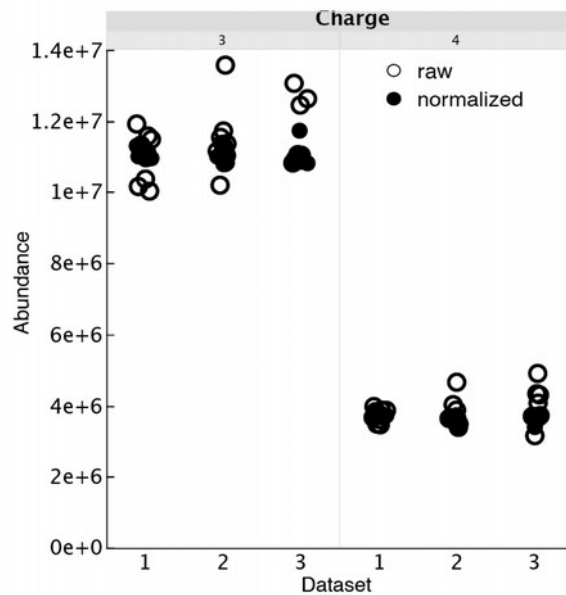
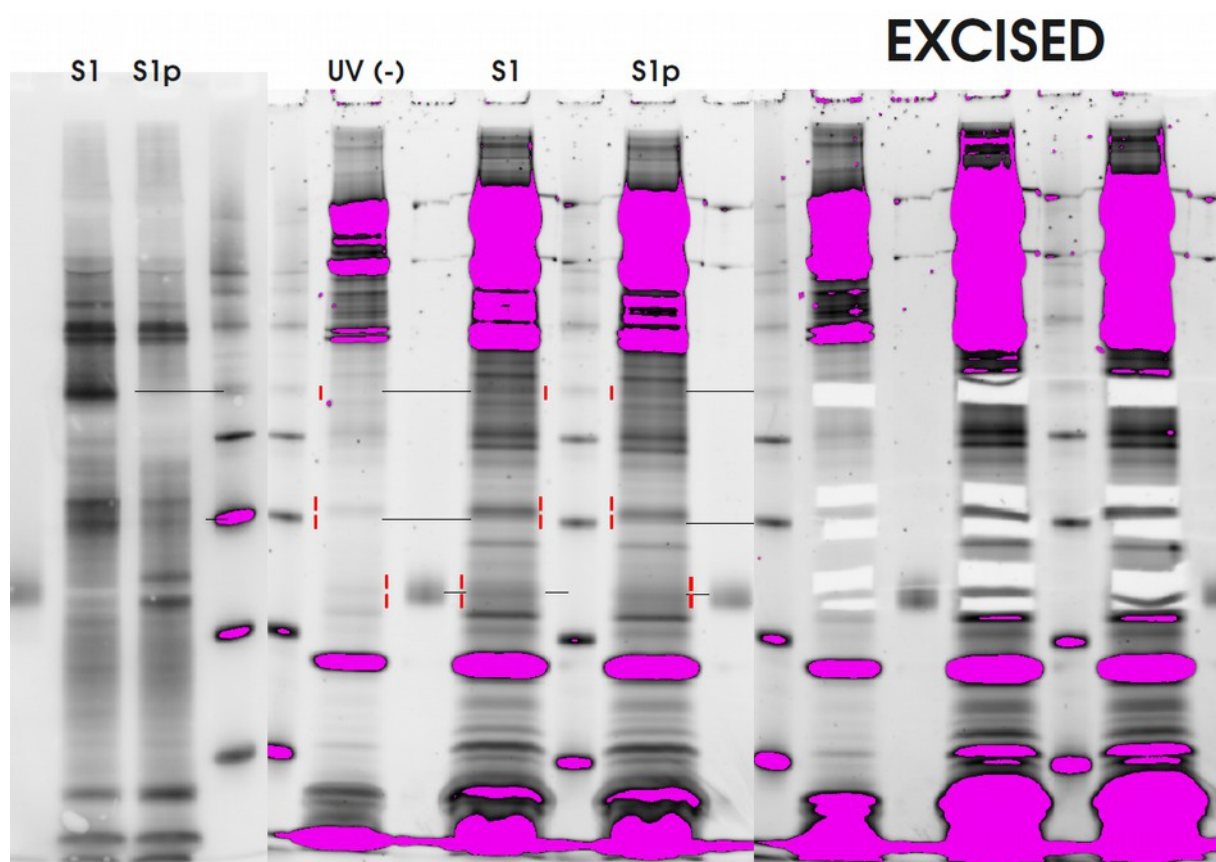


Fig. S5 ペプチドイオン存在量 (abundance) のノーマライゼーション
実験 3 セットそれぞれ H4 C 末ペプチド DVVYALKRQGRTLYGFGG (+3 価, +4 価)
の存在量でノーマライズした。



SA-HRP 検出 SYPRO-Ruby 染色

Fig. S6 クロスリンク産物バンド切り

Streptavidin-HRP でのウェスタンブロットで見えているバンドは、タンパク質染色では背景に埋もれて見えないので、マーカー位置から見当をつけて切り出した。

Table S1. 同定されたヒストン H4 ペプチドのリスト

Protein	m/z	Charge	Mass	Maximum Mascot Score (pep. score)	Retention time (min)	Sequence	Variable modifications ([position] description)
H4 HUMAN	602.989	3	1805.946	47	42.38	AVTYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	602.989	3	1805.945	44	24.94	AVTYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	456.492	4	1821.941	70	13.71	AVTYTEHAQRKTVTAM	[16] Oxidation (M)
H4 HUMAN	448.490	4	1789.931	55	27.29	DAVYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	641.332	3	1920.974	84	42.35	DAVYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	646.663	3	1936.968	80	26.48	DAVYTEHAQRKTVTAM	[17] Oxidation (M)
H4 HUMAN	641.332	3	1920.973	48	21.38	DAVYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	641.332	3	1920.973	42	26.88	DAVYTEHAQRKTVTAM	
H4 HUMAN	646.663	3	1936.968	39	34.42	DAVYTEHAQRKTVTAM	[17] Oxidation (M)
H4 HUMAN	485.250	4	1936.970	92	26.48	DAVYTEHAQRKTVTAM	[17] Oxidation (M)
H4 HUMAN	485.250	4	1936.971	44	42.32	DAVYTEHAQRKTVTAM	[17] Oxidation (M)
H4 HUMAN	781.219	4	3120.845	48	65.95	DNQGIKPAIRRLARRGGYKRISGLIY	
H4 HUMAN	781.465	4	3121.829	37	68.14	DNQGIKPAIRRLARRGGYKRISGLIY	
H4 HUMAN	506.963	3	1517.867	44	59.06	DVYALKRQRTIL	[13] Deamidated (R)
H4 HUMAN	561.317	3	1680.929	46	63.58	DVYALKRQRTILY	
H4 HUMAN	580.324	3	1737.951	67	63.28	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	629.348	3	1885.021	63	73.51	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	472.262	4	1885.021	49	73.51	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	648.355	3	1942.043	67	72.42	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	486.518	4	1942.043	41	72.42	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	667.364	3	1999.070	61	71.72	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	667.692	3	2000.054	79	75.28	DVYALKRQRTILYGF	[11] Deamidated (R)
H4 HUMAN	500.774	4	1999.069	68	71.72	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	501.020	4	2000.051	59	75.25	DVYALKRQRTILYGF	[8] Deamidated (R)
H4 HUMAN	500.773	4	1999.064	60	75.67	DVYALKRQRTILYGF	
H4 HUMAN	430.919	3	1289.734	51	76.19	EETRGVLKVF	
H4 HUMAN	591.685	3	1772.032	71	85.31	EITRGVLKVFLENVIR	
H4 HUMAN	435.950	3	1304.827	52	8.00	GGAKRHRKVL	[8] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	435.949	3	1304.827	67	13.94	GGAKRHRKVL	[8] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	488.310	3	1461.907	71	7.84	GGAKRHRKVL	
H4 HUMAN	511.658	3	1531.952	65	9.73	GGAKRHRKVL	[6] Acetyl (K)[10] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	525.662	3	1573.963	39	14.07	GGAKRHRKVL	[2] Acetyl (K)[6] Acetyl (K)[10] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	525.662	3	1573.964	36	15.22	GGAKRHRKVL	[2] Acetyl (K)[6] Acetyl (K)[10] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	462.299	4	1845.166	69	7.78	GGKLGKGGAKRHRKVL	[14] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	472.801	4	1887.176	38	9.62	GGKLGKGGAKRHRKVL	[10] Acetyl (K)[14] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	554.357	3	1660.049	73	8.00	GLGGAKRHRKVL	[12] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	472.290	5	2356.416	36	13.61	GRGKGGKLGKGGAKRHRKVL	[4] Acetyl (K)[11] Acetyl (K)
H4 HUMAN	461.093	5	2300.427	60	8.03	GRGKGGKLGKGGAKRHRKVL	[18] Methyl (KR)[19] Methyl (KR)
H4 HUMAN	462.954	3	1385.839	50	88.18	GVLVLENVIR	
H4 HUMAN	478.648	3	1432.922	59	7.01	KGGAKRHRKVL	[8] Methyl (KR)[9] Methyl (KR)
H4 HUMAN	508.577	4	2030.280	60	7.55	KGGKLGKGGAKRHRKVL	[16] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	484.941	3	1451.800	70	53.92	LKROGRTILYGF	
H4 HUMAN	561.859	4	2243.405	75	7.41	RGKGGKLGKGGAKRHRKVL	[18] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	554.851	4	2215.373	40	7.31	RGKGGKLGKGGAKRHRKVL	
H4 HUMAN	449.688	5	2243.401	78	7.38	RGKGGKLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)
H4 HUMAN	552.320	3	1653.939	68	8.59	SGRKGGKLGKGGAKR	[N-term] Acetyl (Protein N-term)
H4 HUMAN	636.037	3	1905.088	96	6.41	SGRKGGKLGKGGAKRHR	[N-term] Acetyl (Protein N-term)
H4 HUMAN	477.279	4	1905.088	75	6.41	SGRKGGKLGKGGAKRHR	[N-term] Acetyl (Protein N-term)
H4 HUMAN	487.782	4	1947.100	50	7.41	SGRKGGKLGKGGAKRHR	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)

H4_HUMAN	688.079	3	2061.214	75	6.34	SRGKGKGLKGGAKRHRK	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[19] Methyl (KR)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	516.311	4	2061.215	70	6.34	SRGKGKGLKGGAKRHRK	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[19] Methyl (KR)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	569.349	4	2273.368	44	9.21	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	455.681	5	2273.366	47	9.18	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	810.830	3	2429.468	110	8.00	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	801.486	3	2401.436	91	7.84	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)
H4_HUMAN	806.158	3	2415.451	88	7.92	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	815.489	3	2443.446	93	9.62	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)
H4_HUMAN	837.485	3	2509.432	86	8.23	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[1] PhosphoNoNL (STY)[5] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	829.493	3	2485.456	96	13.67	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)
H4_HUMAN	839.171	3	2514.491	76	14.07	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)[23] Deamidated (R)
H4_HUMAN	820.160	3	2457.460	94	9.70	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[23] Methyl (KR)
H4_HUMAN	820.161	3	2457.460	42	9.89	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[8] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	820.161	3	2457.460	58	9.96	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	824.833	3	2471.477	106	9.73	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	824.833	3	2471.476	87	9.89	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[8] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	815.501	3	2443.481	67	8.20	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[23] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	815.501	3	2443.482	67	8.40	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[23] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	608.376	4	2429.474	98	8.00	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	601.368	4	2401.441	90	7.84	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	604.871	4	2415.456	82	7.92	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	611.877	4	2443.479	109	7.89	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	628.366	4	2509.435	77	8.23	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	652.372	4	2485.460	90	13.61	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)
H4_HUMAN	650.385	4	2597.510	83	35.60	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	624.862	4	2495.419	54	8.18	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	615.382	4	2457.500	75	9.21	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	597.872	4	2387.458	68	7.45	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	625.876	4	2499.475	74	13.94	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	659.883	4	2555.501	80	24.64	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	633.132	4	2528.498	68	9.65	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[17] Methyl (KR)[19] Dimethyl (KR)[20] Acetyl (K)[23] Deamidated (R)
H4_HUMAN	652.875	4	2527.470	75	23.33	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)
H4_HUMAN	638.869	4	2551.445	72	10.15	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	643.377	4	2569.479	70	35.20	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)
H4_HUMAN	621.357	4	2481.397	42	8.12	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)
H4_HUMAN	631.869	4	2523.447	46	8.18	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	625.885	4	2499.511	64	11.86	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	636.379	4	2541.486	67	24.35	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	646.881	4	2583.494	55	35.50	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	590.864	4	2359.427	70	7.28	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	
H4_HUMAN	631.860	4	2523.412	53	10.03	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[16] Acetyl (K)
H4_HUMAN	652.884	4	2527.505	51	13.90	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Trimethyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Acetyl (K)
H4_HUMAN	611.878	4	2443.484	77	8.20	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	611.878	4	2443.484	66	8.40	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	611.870	4	2443.450	89	9.62	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)
H4_HUMAN	611.870	4	2443.451	78	9.79	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)
H4_HUMAN	615.382	4	2457.497	62	8.18	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	615.382	4	2457.500	57	8.40	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	615.374	4	2457.466	97	9.70	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	615.374	4	2457.465	76	9.86	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4_HUMAN	618.878	4	2471.481	89	9.73	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4_HUMAN	618.877	4	2471.480	75	9.89	SRGKGKGLKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)

H4 HUMAN	622.380	4	2485.491	68	9.65	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	622.381	4	2485.494	67	9.89	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	486.902	5	2429.472	80	8.00	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[5] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	484.098	5	2415.456	88	7.92	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	489.703	5	2443.481	68	7.89	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	498.099	5	2485.461	75	13.61	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)
H4 HUMAN	503.705	5	2513.491	70	14.26	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	512.107	5	2555.500	73	24.67	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	520.509	5	2597.509	53	35.60	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	500.902	5	2499.474	65	13.94	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[19] Methyl (KR)
H4 HUMAN	506.501	5	2527.468	75	23.33	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)
H4 HUMAN	514.903	5	2569.479	74	35.20	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)
H4 HUMAN	492.507	5	2457.500	73	9.21	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	507.106	5	2530.495	51	10.15	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Deamidated (R)[12] Acetyl (K)[16] Trimethyl (K)[17] Deamidated (R)[19] Deamidated (R)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	506.707	5	2528.496	58	9.65	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[17] Dimethyl (KR)[19] Methyl (KR)[20] Acetyl (K)[23] Deamidated (R)
H4 HUMAN	500.091	5	2495.418	41	8.18	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	478.499	5	2387.458	79	7.48	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	511.296	5	2551.444	63	10.15	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[16] Acetyl (K)[19] Methyl (KR)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	498.106	5	2485.494	67	9.92	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	509.304	5	2541.484	63	24.32	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	505.884	5	2524.385	38	9.73	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[1] PhosphoNoNL (STY)[12] Acetyl (K)[19] Deamidated (R)
H4 HUMAN	481.290	5	2401.414	74	7.81	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)
H4 HUMAN	492.698	5	2458.455	36	7.72	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[19] Methyl (KR)[20] Acetyl (K)[23] Deamidated (R)
H4 HUMAN	506.508	5	2527.501	59	13.87	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	486.901	5	2429.468	47	87.76	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[20] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	472.892	5	2359.425	37	7.24	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	515.109	5	2570.510	42	13.84	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[17] Deamidated (R)[19] Methyl (KR)[20] Acetyl (K)[23] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	490.098	5	2445.452	37	17.99	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Methyl (KR)[17] Deamidated (R)[19] Deamidated (R)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	506.098	5	2525.455	38	8.53	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[1] PhosphoNoNL (STY)[3] Deamidated (R)[5] Dimethyl (KR)[8] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)[23] Deamidated (R)
H4 HUMAN	489.898	5	2444.451	39	8.94	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[17] Deamidated (R)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	515.101	5	2570.467	57	35.47	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[5] Acetyl (K)[8] Acetyl (K)[12] Acetyl (K)[16] Acetyl (K)[17] Deamidated (R)
H4 HUMAN	481.302	5	2401.474	49	7.58	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[5] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	495.304	5	2471.481	81	9.73	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	492.500	5	2457.466	86	9.70	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	492.500	5	2457.465	87	9.89	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)[20] Methyl (KR)
H4 HUMAN	489.704	5	2443.484	63	8.20	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Methyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	489.704	5	2443.484	74	8.40	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Trimethyl (K)
H4 HUMAN	489.697	5	2443.451	82	9.62	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[16] Acetyl (K)
H4 HUMAN	489.697	5	2443.451	80	9.79	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[12] Acetyl (K)
H4 HUMAN	492.507	5	2457.498	46	8.40	SGRGGGKGLGKGGAKRHRKVL	[N-term] Acetyl (Protein N-term)[3] Dimethyl (KR)[20] Dimethyl (KR)
H4 HUMAN	458.251	3	1371.730	46	42.38	TEHAARKVTAM	
H4 HUMAN	546.287	3	1635.840	47	42.35	TYTEHAARKVTAM	
H4 HUMAN	551.619	3	1651.835	39	26.48	TYTEHAARKVTAM	[14] Oxidation (M)
H4 HUMAN	579.310	3	1734.909	54	42.35	VTYTEHAARKVTAM	
H4 HUMAN	584.642	3	1750.904	56	26.48	VTYTEHAARKVTAM	[15] Oxidation (M)
H4 HUMAN	629.020	3	1884.038	73	65.00	VYVALKRGQRTLYGFGG	
H4 HUMAN	472.017	4	1884.037	64	65.00	VYVALKRGQRTLYGFGG	
H4 HUMAN	595.997	3	1784.971	61	71.72	VYVALKRGQRTLYGFGG	

Table S2. アセチル化組み合わせ

		S1ph	-				+			-	
		R3	me0				me0			me1	me2
		K20	me0	me1	me2	me3	me0	me1	me2	me2	me2
acetylation	0	none	11		36						
	1	N	615	203	1133	90	6	2	8	69	96
	2	N+K16	160	105	176	47	10		63	62	23
		N+K12	95	75	113	34				4	
		N+K8	4	12	22						
		N+K12+K16	93	83	201	10					
	3	N+K8+K12	13	31	74	7					
		N+K5+K8	6	10	32						
		N+K5+K12	138								
		N+K5+K16	73								
	4	N+K8+K16	20								
		N+K8+K12+K16	58	62	137						
		N+K5+K8+K12	114	23	98						
	5	N+K5+K8+K16	63								
		N+K5+K12+K16	54								
		N+K5+K8+K12+K16	85	29	77						

(数値はスペクトルカウント)

本文中 で用いた略語一覧

LC/MS/MS	Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry
ChIP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation - Sequencing
PTM	Post-Translational Modification
CID	Collision-Induced Dissociation
ETD	Electron-Transfer Dissociation
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
TCEP	3,3',3''-phosphinetriyltripropanoic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
CV	Coefficient of Variation
K_D	Dissociation Constant
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
SA-HRP	Streptavidin–horseradish peroxidase
Dz	Diazirine
Bpa	Benzoylphenylalanine

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学 先端科学技術研究センター システム生物医学ラボラトリー プロテオミクス部門 川村 猛 助教には、大変多くのご指導を賜りました。同 近岡 洋子 博士研究員には、定量データ解析をはじめ、日頃から研究全般にわたり助言・討議をして頂きました。MS 測定におきましては、中山 綾 研究補助員、齋藤 はる奈 研究補助員、中村 有子 研究補助員、(株) 島津製作所 山崎 雄三 様に多大なる御助力を賜りました。

ペプチド合成につきましては、東京大学 工学部 化学生命工学科 岡本研究室の皆様 (岡本 晃充 教授、林 剛介 助教、坂元 亮介 殿) に多大なる御助力を頂きました。

東京大学 アイソトープ総合センター 和田 洋一郎 教授、先端研 穴井 元暢 准教授、田中 十志也 准教授には、ミーティングにて建設的な御指摘を多々頂きました。先端研 計量生物医学分野 堀内 恵子 助教、三井 健一 研究員にはフローサイトメトリー実験をはじめとした実験手技をご指導頂きました。

遺伝子実験(※ 本論文とは別件)におきましては、杉山 暁 助教、石井 正純 研究員、山本 竜児 殿よりご指導・御助力を賜りました。

クロスリンク実験の解釈につきましては、マルティン・ルター大学ハレ・ヴィッテンベルク Andrea Sinz 教授より詳細な御意見を頂戴致しました。

14-3-3 タンパク質とリン酸化ペプチドとの間の相互作用に関し、京都大学 化学研究所 大神田 淳子 准教授より的確な御意見を頂戴致しました。

児玉龍彦 教授 には日頃よりきめ細やかなご指導を賜りました。

以上、本研究におきましてお世話になった方々に、深く御礼申し上げます。

参考文献

1. “EPIGENETICS” *CSHL Press* (2007).
2. IHEC: <http://www.ihec-epigenomes.org/>
3. The ENCODE Project: <http://www.genome.gov/encode/>
4. Arnaudo, A. M., & Garcia, B. A. (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin*, 6, 24.
5. Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., Allis, C. D., & Zhao, Y. (2014). SnapShot: Histone Modifications. *Cell*, 159(2), 458-458.
6. Yuan, Z. F., Arnaudo, A. M., & Garcia, B. A. (2013). Mass Spectrometric Analysis of Histone Proteoforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1) 113-128.
7. Tian, Z., Tolic, N., Zhao, R., Moore, R. J., Hengel, S. M., Robinson, E. W., ... & Pasa-Tolic, L. (2012). Enhanced top-down characterization of histone post-translational modifications. *Genome Biol*, 13(10), R86.
8. Phanstiel, D., Brumbaugh, J., Berggren, W. T., Conard, K., Feng, X., Levenstein, M. E., ... & Coon, J. J. (2008). Mass spectrometry identifies and quantifies 74 unique histone H4 isoforms in differentiating human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4093-4098.
9. Young, N. L., DiMaggio, P. A., Plazas-Mayorca, M. D., Baliban, R. C., Floudas, C. A., & Garcia, B. A. (2009). High throughput characterization of

- combinatorial histone codes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(10), 2266-2284.
10. Zhao, R., Ding, S. J., Shen, Y., Camp II, D. G., Livesay, E. A., Udseth, H., & Smith, R. D. (2009). Automated metal-free multiple-column nanoLC for improved phosphopeptide analysis sensitivity and throughput. *Journal of Chromatography B*, 877(8), 663-670.
 11. Sandin, M., Ali, A., Hansson, K., Månsson, O., Andreasson, E., Resjö, S., & Levander, F. (2013). An adaptive alignment algorithm for quality-controlled label-free LC-MS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(5), 1407-1420.
 12. Knehr, M., Poppe, M., Enulescu, M., Eickelbaum, W., Stoehr, M., Schroeter, D., & Paweletz, N. (1995). A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Experimental cell research*, 217(2), 546-553.
 13. Pesavento, J. J., Bullock, C. R., LeDuc, R. D., Mizzen, C. A., & Kelleher, N. L. (2008). Combinatorial modification of human histone H4 quantitated by two-dimensional liquid chromatography coupled with top down mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14927-14937.
 14. Tweedie-Cullen, R. Y., Brunner, A. M., Grossmann, J., Mohanna, S., Sichau, D., Nanni, P., ... & Mansuy, I. M. (2012). Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain. *PLOS ONE*, 7(5), e36980.

15. Rice, J. C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., & Allis, C. D. (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & development*, 16(17), 2225-2230.
16. Pesavento, J. J., Yang, H., Kelleher, N. L., & Mizzen, C. A. (2008). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Molecular and cellular biology*, 28(1), 468-486.
17. Zee, B. M., Levin, R. S., DiMaggio, P. A., & Garcia, B. A. (2010). Global Turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells. *Epigenetics & chromatin*, 3(1), 1-11.
18. Zee, B. M., Levin, R. S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N. S., & Garcia, B. A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3341-3350.
19. Zhang, K., Williams, K. E., Huang, L., Yau, P., Siino, J. S., Bradbury, E. M., ... & Burlingame, A. L. (2002). Histone Acetylation and Deacetylation Identification of Acetylation and Methylation Sites of HeLa Histone H4 by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(7), 500-508.
20. Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T., & Allis, C. D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(4), 1237-1241.

21. Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S. D., Mollah, S., ... & Allis, C. D. (2004). The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma*, 112(7), 360-371.
22. Bonenfant, D., Towbin, H., Coulot, M., Schindler, P., Mueller, D. R., & Van Oostrum, J. (2007). Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(11), 1917-1932.
23. Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M., & Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(7), 473-483.
24. Mann, M., & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3), 255-261.
25. Musselman, C. A., Lalonde, M. E., Côté, J., & Kutateladze, T. G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), 1218-1227.
26. Eberl, H. C., Spruijt, C. G., Kelstrup, C. D., Vermeulen, M., & Mann, M. (2013). A map of general and specialized chromatin readers in mouse tissues generated by label-free interaction proteomics. *Molecular Cell*, 49(2), 368-378.
27. Vermeulen, M., Eberl, H. C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter,

- F., ... & Mann, M. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*, 142(6), 967-980.
28. Wysocka, J. (2006). Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods*, 40(4), 339-343.
29. Patel, D. J., & Wang, Z. (2013). Readout of epigenetic modifications. *Annual review of biochemistry*, 82, 81-118.
30. Lewis, P. W., Müller, M. M., Koletsky, M. S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L. A., ... & Allis, C. D. (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*, 340(6134), 857-861.
31. Li, X., Foley, E. A., Kawashima, S. A., Molloy, K. R., Li, Y., Chait, B. T., & Kapoor, T. M. (2013). Examining post-translational modification-mediated protein–protein interactions using a chemical proteomics approach. *Protein Science*, 22(3), 287-295.
32. Li, X., Foley, E. A., Molloy, K. R., Li, Y., Chait, B. T., & Kapoor, T. M. (2012). Quantitative chemical proteomics approach to identify post-translational modification-mediated protein–protein interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 1982-1985.
33. Li, X., & Kapoor, T. M. (2010). Approach to profile proteins that recognize post-translationally modified histone “tails”. *Journal of the American*

- Chemical Society*, 132(8), 2504-2505.
34. Liu, Z., & Myers, L. C. (2012). Med5 (Nut1) and Med17 (Srb4) are direct targets of mediator histone H4 tail interactions. *PLOS ONE*, 7(6), e38416.
 35. Yu, S. H., Boyce, M., Wands, A. M., Bond, M. R., Bertozzi, C. R., & Kohler, J. J. (2012). Metabolic labeling enables selective photocrosslinking of O-GlcNAc-modified proteins to their binding partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4834-4839.
 36. Bond, M. R., Zhang, H., Vu, P. D., & Kohler, J. J. (2009). Photocrosslinking of glycoconjugates using metabolically incorporated diazirine-containing sugars. *Nature protocols*, 4(7), 1044-1063.
 37. Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Ishimoda-Takagi, T., Shimizu, N., ... & Okuno, M. (2003). Identification of 36-kDa flagellar phosphoproteins associated with hamster sperm motility. *Journal of biochemistry*, 133(3), 361-369.
 38. Daigo, K., Kawamura, T., Ohta, Y., Ohashi, R., Katayose, S., Tanaka, T., ... & Hamakubo, T. (2011). Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 674-686.
 39. Daigo, K., Yamaguchi, N., Kawamura, T., Matsubara, K., Jiang, S., Ohashi, R., ... & Hamakubo, T. (2012). The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1

- and other components of neutrophil extracellular traps. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M111.
40. Cheung, W. L., Turner, F. B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S. H., Foley, M., ... & Allis, C. D. (2005). Phosphorylation of Histone H4 Serine 1 during DNA Damage Requires Casein Kinase II in *S. cerevisiae*. *Current biology*, 15(7), 656-660.
 41. Govin, J., Schug, J., Krishnamoorthy, T., Dorsey, J., Khochbin, S., & Berger, S. L. (2010). Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 38, 4599-4606.
 42. Banerjee, T., & Chakravarti, D. (2011). A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 31(24), 4858-4873.
 43. Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098-1108.
 44. Ho, M. C., Wilczek, C., Bonanno, J. B., Xing, L., Seznec, J., Matsui, T., ... & Shechter, D. (2013). Structure of the arginine methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. *PLOS ONE*, 8(2), e57008.
 45. Wang, B., Yang, H., Liu, Y. C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E., & Fu, H. (1999). Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by

- phage display. *Biochemistry*, 38(38), 12499-12504.
46. Collins, B. C., Gillet, L. C., Rosenberger, G., Röst, H. L., Vichalkovski, A., Gstaiger, M., & Aebersold, R. (2013). Quantifying protein interaction dynamics by SWATH mass spectrometry: application to the 14-3-3 system. *Nature methods*, 10(12), 1246-1253.
47. Kakiuchi, K., Yamauchi, Y., Taoka, M., Iwago, M., Fujita, T., Ito, T., ... & Ichimura, T. (2007). Proteomic analysis of in vivo 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 46(26), 7781-7792.
48. Goutte-Gattat, D., Shuaib, M., Ouararhni, K., Gautier, T., Skoufias, D. A., Hamiche, A., & Dimitrov, S. (2013). Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8579-8584.
49. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., ... & Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91(7), 961-971.
50. Sinz, A. (2010). Investigation of protein–protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3433-3440.
51. Preston, G. W., & Wilson, A. J. (2013). Photo-induced covalent cross-linking for the analysis of biomolecular interactions. *Chemical Society Reviews*, 42(8),

3289-3301.

52. Gomes, A. F., & Gozzo, F. C. (2010). Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI-and ESI-MS/MS. *Journal of mass spectrometry*, 45(8), 892-899.
53. Albertoni, B., Hannam, J. S., Ackermann, D., Schmitz, A., & Famulok, M. (2012). A trifluoromethylphenyl diazirine-based SecinH3 photoaffinity probe. *Chem. Commun.*, 48(9), 1272-1274.
54. Lin, S., Wein, S., Gonzales-Cope, M., Otte, G. L., Yuan, Z. F., Afjehi-Sadat, L., ... & Garcia, B. A. (2014). Stable-isotope-labeled Histone Peptide Library for Histone Post-translational Modification and Variant Quantification by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(9), 2450-2466.
55. Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J., & Allfrey, V. G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science*, 190(4210), 117-128.