

## 論文の内容の要旨

論文題目      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

氏名            山本 一樹

### 背景

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)、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、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、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。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。

## 方法

### 【質量分析法によるヒストン H4 翻訳後修飾の定量解析】

細胞周期におけるヒストン H4 の修飾変動を測定対象とした。サンプルは、ダブルチミジンプロック法で細胞周期を同調した HeLa S3 細胞から 2 時間おきに回収し、ヒストン抽出したものを消化酵素 AspN で消化することによって用意した。LC/MS/MS 測定系は、リン酸化ペプチドの吸着を防ぐため、金属素材をなるべく排除した部品で構成した。修飾は MS/MS スペクトルから同定し、定量は LC/MS のピーク面積から行った。

### 【ヒストン H4S1 リン酸化結合タンパク質の同定】

通常のペプチドプルダウン法を改良し、ペプチドプローブに光反応基を導入したベイトを用いてプルダウン実験を行った。光反応基 2 種類と反応基挿入部位 3 種類を試し、リン酸化修飾の有無による結合タンパク質の差異を探索した。

## 結果

ラベルフリー定量 LC/MS/MS により、ヒストン H4 の細胞周期における変動を再現性を以って観測した。既報にある修飾変動に加え、H4S1 リン酸化の変動がより詳細に明らかとなり、M 期における増加だけでなく新生ヒストンにおいて M 期に先立って S 期終盤でリン酸化が増加することが分かった。

この H4S1 リン酸化に関し、修飾を認識するクロマチン制御因子を同定するため、光クロスリンク法を利用した結合分子探索を行った。H4S1 リン酸化結合分子として 14-3-3 タンパク質が同定され、拮抗実験によって結合の特異性が確認された。

## 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。

本ワークフローは、例えば特定の疾患を対象としてヒストン修飾の異常を探索し、さらには修飾関連分子を同定することによって修飾の生理的意義の解明、ひいては創薬標的を見出すといった使い方が可能である。エピゲノム解析は高速シーケンサーに頼った手法で行われることが多いが、我々が開発したような質量分析法を駆使した手法も用いることによって、シーケンサーでは捉えられない修飾組合せや未知の結合分子の探索といった情報を提供できる。