

## 審査の結果の要旨

氏名 山本 一樹

本研究は、複雑なヒストン翻訳後修飾の組み合わせ状態によって制御されるクロマチン現象の理解に資するため、質量分析法を駆使した修飾動態定量計測法および修飾関連分子同定法を開発し、そのワークフローを細胞周期同調系に適用したものであり、下記の結果を得ている。

1. HeLa S3 細胞株を用いダブルチミジンブロック法によって細胞周期を同調し、ヒストン H4 の翻訳後修飾の時系列変化を定量 LC/MS/MS によって観測した。特に MS/MS のペプチド開裂法として電子転移解離 (Electron Transfer Dissociation; ETD) を用いたことで、アセチル化やメチル化に加えてリン酸化修飾に関しても良好な修飾同定を可能とし、また、金属素材を避けた測定機器構成の最適化により、リン酸化ペプチドの定量性も向上した。
2. ヒストン H4 の N 末セリンのリン酸化 (H4S1ph) は S 期や M 期に上昇することが知られているが、上記の測定から、新生ヒストン (S 期に新規合成された H4K20me0 修飾状態のヒストン) において H4S1ph が S 期のうち特に終盤に上昇することを新たに見出した。
3. S 期と M 期に特徴的な増加を呈する H4S1ph に着目し、その修飾がクロマチン制御に与える影響を調べるために修飾認識分子の同定を試みた。光反応基 (ジアジリンおよびベンゾフェノン) を導入したペプチドプローブを合成し、光クロスリンクを利用したプルダウン法を新たに開発した。特に、ジアジリン導入プローブにおいて、H4S1 リン酸化 / 非リン酸化状態それぞれに特異的な泳動バンドを検出することに成功した。
4. 切り出した泳動バンドに含まれる分子を LC/MS/MS に供し、H4S1ph 修飾特異的な新規結合分子 (ヒストン修飾 reader 分子の候補) として 14-3-3 タンパク質を同定した。また、当該の泳動バンドは抗 14-3-3 抗体によっても認識されることを確認した。
5. 14-3-3 タンパク質のリン酸基結合部位に高い親和性を持つペプチド R18 による拮抗実験を行った。プルダウン実験において 14-3-3 タンパク質に相当する泳動バンドだけが拮抗により消失することが確認され、H4S1ph は R18 と同様に 14-3-3 タンパク質のリン酸基結合部位に特異的に結合していると考えられた。

以上、本論文は LC/MS/MS によるヒストン修飾定量法 および 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。本成果は、ヒストン修飾変化に関わる様々な実験系に適用可能な強力な基盤技術であり、今後のエピゲノム研究・創薬標的探索への大きな貢献が期待され、学位の授与に値するものと考えられる。