

10. 質量分析計によるヒストン修飾解析

Histone Modification Analysis

川村 猛

Takeshi Kawamura

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

2000年のヒトゲノムシーケンスプロジェクトのドラフトが発表されてからポストゲノムの時代と言われて久しく、今日では医薬品開発においてゲノム情報をもとにすることは当たり前となっている。

その結果シーケンスデータベースが充実し、さらに Electro spray ionization (ESI), Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) をはじめとするタンパク質・ペプチドのソフトイオン化法および、質量分析計の高感度・高分解能・高速化と相まってポストゲノム時代の新規技術としてプロテオミクスが注目された。初期のプロテオミクスでは血漿などの体液を用い非侵襲的に患者試料を得て、その中から疾患関連タンパク質であるバイオマーカーを探索するのが主流であった。近年ではその技術も広がりを見せ、以前はタンパク質同定中心だった手法が翻訳後修飾、スプライシングバリエーション、アミノ酸置換などより深い解析が可能になり、ターゲットも術後試料やホルマリン固定切片などより、疾患の現場に近い試料からの探索も行われるようになった。さらにかつては探索的研究が主だった測定系に関しても既知のターゲットを質量分析計で絶対定量する手法も行われるようになった。生命現象をシステムとして捉えるシステムバイオロジーという言葉も、かつてのコンピューターシミュレーションによる解析からゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなどの統合オミックス解析として現実味を帯びてきている。

ゲノムシーケンスが完了した時点でゲノム解析は終わりと思われる風潮もあったが、遺伝子以外のゲノムの重要性、例えばヒトゲノムの約 1/3 を占める部分がタンパク質には翻訳されず、RNA まで転写されているノンコーディング RNA である事などがあきらかになり遺伝子発現制御機構としてのノンコーディング RNA など非遺伝子部分の役割が注目されている。このような研究の結果、遺伝子の発現は特定の遺伝子領域に結合する転写因子などのタンパク質、ノンコーディング RNA などによって複雑に制御されている事が明らかになってきた。これらの DNA 配列によらない後天的なゲノム制御をエピゲノムと言う。例えば昨年ノーベル医学・生理学賞をとった iPS 細胞はエピゲノム制御によって特定の細胞群を初期化する事により様々な細胞に分化する万能性を持たせた物である。ここ数年エピゲノム研究は急速な進展を見せている。次世代シーケンサ、次々世代シーケンサと呼ばれる、

最新の DNA シーケンサを使えば 2 週間で 600GBp のリード数が得られるようになっている。これは 30 億塩基対をもつヒトゲノムの 20 倍である。これらを使い DNA のメチル化や特定のヒストン修飾をもつクロマチンを構成する遺伝子が同定されていえる。

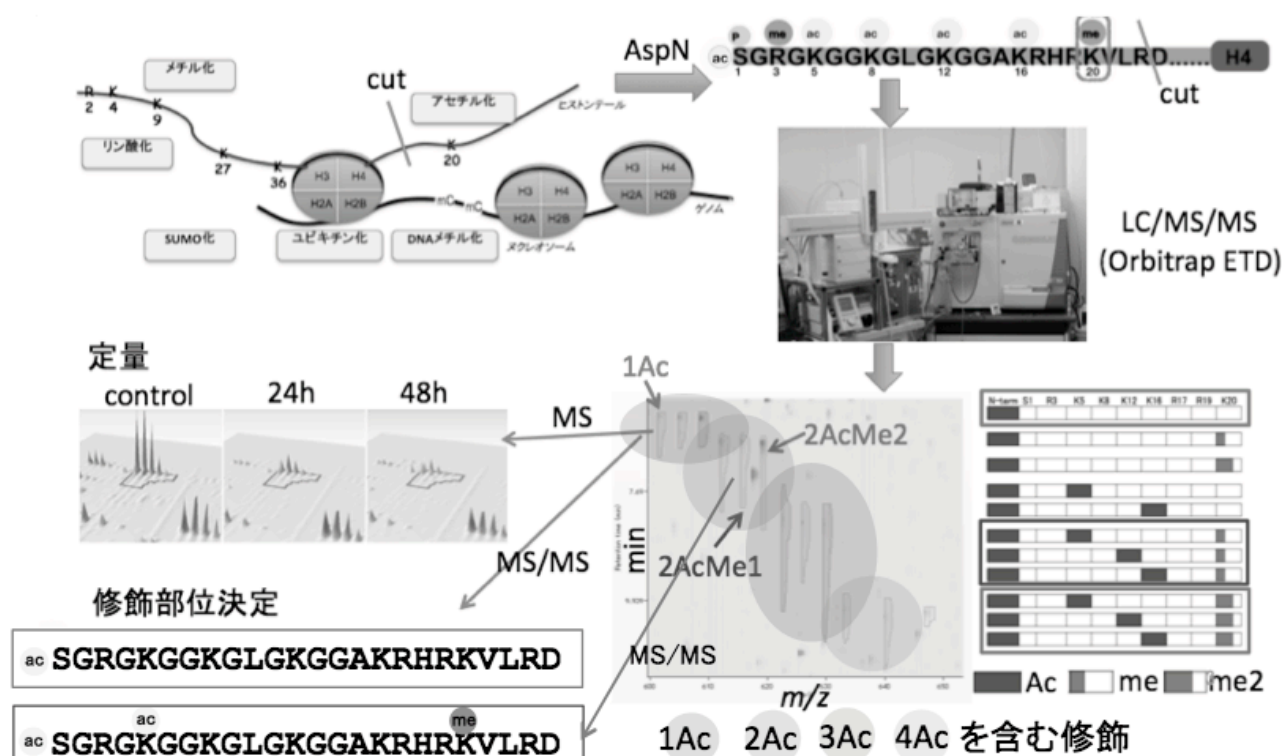
エピゲノム制御の中心的役割を持つ物は遺伝子である DNA のメチル化と、DNA と複合体を作りクロマチンを構成するヒストンタンパク質の修飾である。DNA のメチル化により遺伝子はサイレンシングされる。また以前からヒストンのアセチル化酵素 (HDAC) が抗がん剤になることは知られており、いくつかの HDAC 阻害剤が上市されている。近年、複数のヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素が発見され新たな創薬標的として注目されている。エピゲノムを制御するヒストンメチル化酵素は 60 以上、ヒストン脱メチル化酵素は 30 以上が同定され、ヒストンメチル化修飾酵素の異常は多くの癌で報告されている。また修飾されたヒストンを特異的に認識し結合するリーダータンパク質も創薬標的として注目されている。

我々のグループでは質量分析計を用いたプロテオミクスの立場からエピゲノム解析を行っている。一般的なエピゲノム解析でヒストン修飾はクロマチン免疫沈降 (Chromatin immuno precipitation: ChIP) という特定の修飾をもつクロマチンを特異的抗体で免疫沈降し、そのなかの DNA をシーケンスすることを繰り返し特定の遺伝子領域に着くヒストンの修飾を同定している (ChIP-seq)。それに対し我々はヒストンの修飾を質量分析計で解析する手法も組み合わせることにより直接ヒストンの修飾組み合わせを解明しようとしている。

ヒストンは H2A, H2B, H3, H4 と呼ばれるサブユニットが二分子ずつオクタマーを作り、それに DNA が約 2 回半巻き付いてヌクレオソームと呼ばれる構造を作っている。それぞれのヒストンの N 末端側がテールと呼ばれその翻訳後修飾がエピゲノム修飾の主要な制御の一つである。

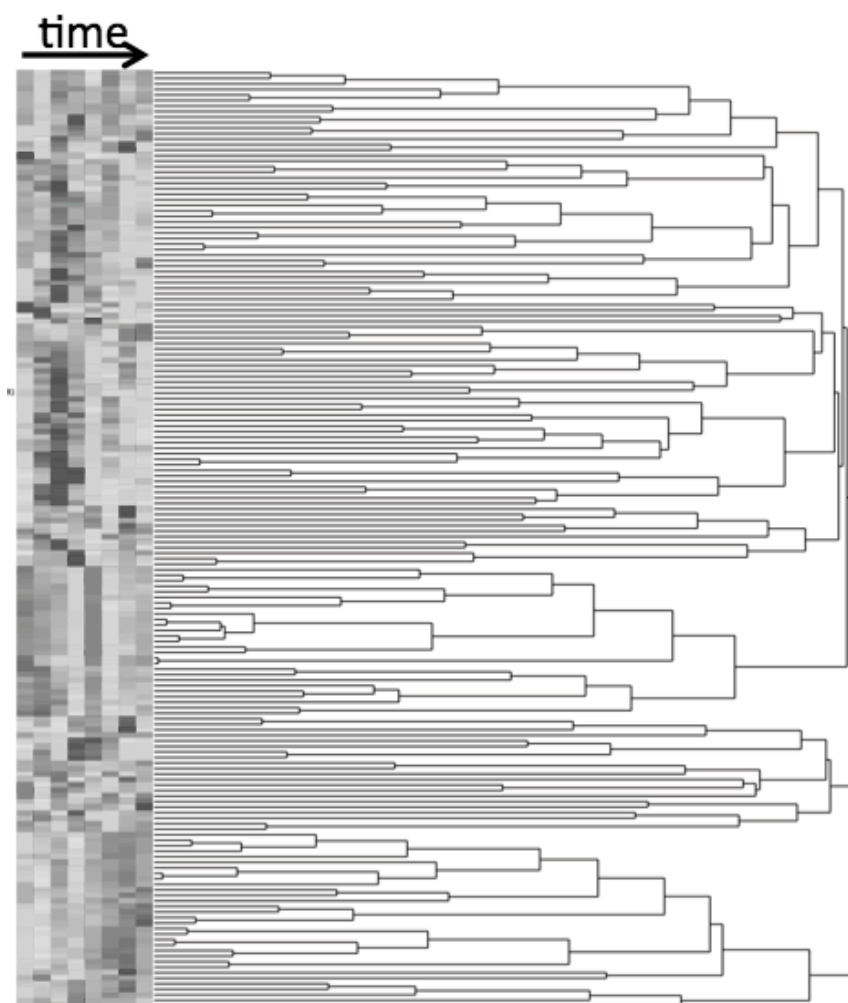
我々はこのヒストンテールの解析を LC-MS で行っているがヒストンテールは通常のプロテオミクスの手法ではほとんど同定されない。ヒストンテールはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など修飾に富み、メチル化も 1 アミノ酸に mono-, Di-, Tri- と最大 3 個まで入り、理論組み合わせでは 1 万を超える修飾組み合わせを持つ。通常のプロテオームでの同定では多数の修飾を設定すると擬陽性が上がるうえ、データベース検索時間が膨大になるため修飾設定は最小限に絞っている。そのため多数の修飾を持つヒストンテールはほとんど同定されない。またヒストンはリジン・アルギニンを多く含むためプロテオームで一般的なトリプシンでは数アミノ酸単位まで消化されるので通常ペプチドを測定する LC-MS の測定範囲では検出されない。また他の消化酵素で断片化しても塩基性タンパク質であるため 3 価以上の多価イオンがベースピークとなり CID では Mascot 等の一般的なデータベース検索エンジンでは有意なスコアで同定されない。この様な問題点を持つためヒストンテール解析には工夫が必要である。

ヒストン H4 テールを対象とした我々の解析のアウトラインを次図に示す。



まず、細胞等よりヒストンを抽出し AspN で消化することによりヒストン H4 の N 端側 23 アミノ酸のペプチドを含む混合物が得られる。このペプチドは逆相系の LC-MS で 4-6 価イオンがメインで観測される。このペプチドの LC/MS/MS を電子転移解離 (electron transfer dissociation: ETD) で行うことで価数が下がり修飾も維持されるため、Mascot データベース検索で同定可能になる。これらについてピーク面積比較によるラベルフリー半定量を行い、時系列・疾患特異的修飾探索・ヒストン修飾酵素阻害剤の評価等を行う。この手法により次図の様に細胞周期によるヒストン H4 テール修飾組み合わせの変動解析を行った。その結果いくつかの課題が見つかった。H4 テールでは 1, 5, 8, 12, 16 番目のアミノ酸がアセチル化、3, 20 番目のアミノ酸がメチル化されることが知られている。先の図に示したようにアセチル化数が増えると逆相カラムで保持が強くなる。メチル化でもわずかに保持が強くなりアセチル基を 1 個持つペプチドとメチル基を 3 個もつペプチドがほとんど同じ時間に溶出される場合がある。これらを分離するためには 20 万程度の分解能を持つ MS が必要である。またアミノ酸配列が同一の 1 ペプチドが非常に多くの修飾組み合わせを持ったため狭い範囲に多数のピークが集中するため高速なスキャンスピードが必要になる。高速データ取得には三連四重極型質量分析計による SRM/MRM が適しているがそのためにはフラグメントリストの作成が必要になる。しかしヒストンテール解析には ETD が適しており CID では修飾部位が決定しにくいという問題点がある。

本演題ではこれらの課題についての現状を紹介する。



細胞周期によるヒストン H4 テール修飾組み合わせの変動
1 行が 1 種の修飾組み合わせを示す。