

グライコブロットイング法が明らかにする翻訳後修飾の意義と大規模糖鎖解析への展開

天野 麻穂¹, 三浦 嘉晃², 西村 紳一郎^{1,2}

糖鎖修飾は、老化や疾患など種々の生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしその重要性にも関わらず、糖鎖の網羅的な解析はこれまでほとんど行われてこなかった。これはひとえに、生体試料から糖鎖だけを精製する簡単迅速な方法が存在しなかったためである。著者らは最近、網羅的かつ定量的で、しかもハイスループットな糖鎖エンリッチ技術である「グライコブロットイング法」を開発した。さらに、グライコブロットイング法で見出された興味ある糖鎖をキャリアする親タンパク質の同定法である「リバースグライコブロットイング法」を考案したことにより、これまでとは全く異なる新しいバイオマーカー探索アプローチを展開している。ここでは、それに必須となる方法論や、構造解析技術とその応用例について紹介する。

1. はじめに

グライコミクス (glycomics) という言葉を耳にされたことがおありだろうか？ ゲノミクス (genomics), プロテオミクス (proteomics), あるいはメタボロミクス (metabolomics) などと同じ-omics の一種であり、グライコム (glycome) = 「糖鎖構造 (その全体像)」を解析することをグライコミクスと定義している。

糖タンパク質・プロテオグリカンや糖脂質などの複合糖質は、発生や分化、老化、疾患などの生命現象において、きわめて重要な役割を担っているにも関わらず、近年盛んに行われているゲノミクスやプロテオミクスからのアプ

ローチに比べて、グライコミクスは大きく立ち遅れている感がある。それは、なぜか？

タンパク質の糖鎖による修飾は、リン酸化などと並び、その構造や機能を制御するためのメカニズムとして、非常に重要かつ基本的な生合成のプロセスであるが、着目すべきは、それが遺伝子による直接制御を受けない「翻訳後修飾」である点である。そのため、PCR 法によりそれ自体を増幅したり、そのもののリコンビナントを作成したりすることができない。これが、第一の理由である。

さらに、体組織は、核酸、タンパク質や多糖類に代表される高分子から、脂質や多様な代謝中間体などの低分子までの様々な化合物が存在する超複雑系であり、複合糖質の糖鎖は、その中のタンパク質や脂質に結合した状態で存在している。そのため、この多種多様な夾雑物が含まれる混合物の中から糖鎖のみを抽出し解析を行うためには、多段階の精製ステップが要求される。場合によっては、精製法の最適化が必要とされる上、わずかしかな存在しないものや安定性を欠くものは、この精製を繰り返す過程で取りこぼされてしまう可能性も高い。あるいは、最初から、これらの特殊な糖鎖を特別な方法で回収して別途解析を行う必要がある。そうすると、微量試料からの解析は難しいものとなる。これが第二の理由である。

また、ヒトの全てのタンパク質のうち約 50% は、糖鎖

¹ 北海道大学大学院先端生命科学研究院 (〒001-0021 札幌市北区北 21 条西 11 丁目)

² エゾースサイエンス (米国ニュージャージー州パインブルック市リバーサイドドライブ 25)

Significance of posttranslational modifications uncovered by glycoblotting method and development of large-scale glycomics

Maho Amano¹, Yoshiaki Miura², and Shin-Ichiro Nishimura^{1,2} (¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, N21, W11, Kita-ku, Sapporo 001-0021 Japan;

²Ezose Sciences, Inc., 25 Riverside Drive, Pine Brook, NJ07058 USA)

を結合した糖タンパク質として存在していると言われるが、糖鎖の構造は極めて複雑であり、多様性に富んでいる。ヒトに存在する主な単糖の種類は9種類にすぎないが、修飾された誘導体や膨大な数の異性体が存在している上、単糖は水酸基を多くもつことから、どの水酸基が他のどの単糖のどの水酸基と結合するか、組み合わせもバラエティ豊かである。例えば、三つの単糖がつながるだけでも、単純に計算して119,376通りの組み合わせが考えられる。ちなみに、これが三つの核酸(ヌクレオチド)では64通り、またアミノ酸では800通りに過ぎない。そのような糖鎖の多様性こそが、生物学的に重要かつ複雑な情報を発信・伝達する上で有利に働いているものと考えられるが、一方で、グライコミックスの技術的ハードルを高くしている理由にもなっている。

著者らの研究チームでは、最近、網羅的かつ定量的で、しかもハイスループットな糖鎖構造解析法を開発してきたが、これを実現した基本概念が「グライコブロットティング法 (glycoblotting)」である¹⁾。さらに、グライコブロットティング法で見出された、興味ある糖鎖をもつ親タンパク質は「リバースグライコブロットティング法 (reverse glycoblotting)」により同定することが可能であり^{2,3)}、これら一連の流れを基本戦略とする、新しいバイオマーカーの探索研究を進めている。本小文では、このアプローチに必須のいくつかの新しい方法論や、構造解析技術とその応用例について紹介したい。

2. グライコブロットティング法の概要

BlotGlyco™H ビーズ⁴⁾を用いた、グライコブロットティング法による *N*-結合型糖鎖解析のおおまかな流れを図1に示した。*O*-結合型糖鎖解析の場合は、必要とする試料の量および前処理法が若干異なるが、これは「4. *O*-グライコミックス」の項で述べる。また、BlotGlyco™ABC ビーズを用いるグライコブロットティング法³⁾も、定量的な蛍光標識化反応が簡単に達成できる点で、非常に有用であるが、ここでは紙面の都合上、割愛することとする。

図1を順に見ていくと、本工程は (i) 血清、組織、培養細胞からの *N*-結合型糖鎖の切り出し、(ii) BlotGlyco ビーズへの全糖鎖の化学選択的捕捉、(iii) ビーズ上でのシアル酸の誘導体化、(iv) ラベル化糖鎖の遊離、(v) MALDI-TOF/MS 等による糖鎖構造の解析と定量分析、の五つのステップから成る。(i) では、基本的に1本のチューブ内で全ての反応を完結できるため、サンプルロスの懸念が無く、試料の量も従来法に比べて少量でよいのが特長である。また、植物由来の糖タンパク質試料を解析する際には、*N*-結合型糖鎖を遊離する酵素として、ペプチド *N*-グリカナーゼ F (PNGase F) の代わりに、ペプチド *N*-グリカナーゼ A (PNGase A) を使用すればよい⁶⁾。(ii) 本法の最大の特徴は、糖鎖の精製を化学選択的に行う点にある。生体分子中、糖鎖のみがその還元末端にアルデヒド基 (と等価のヘミアセタール基) を有しており、ビーズ上

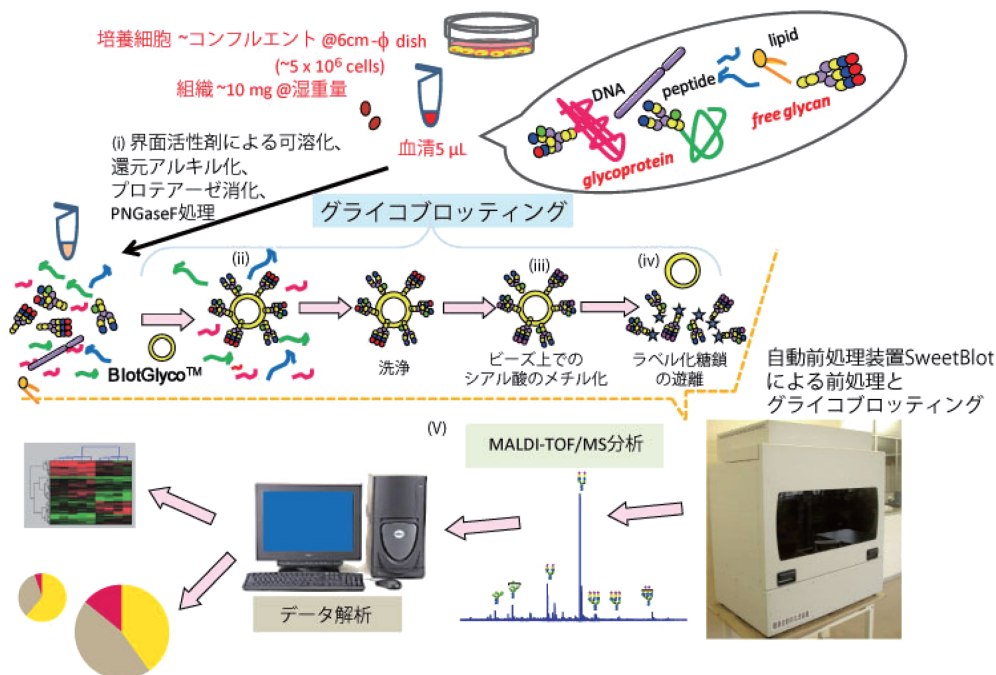


図1 サンプル前処理とグライコブロットティング法

基本的なサンプル前処理法と、グライコブロットティング法のフローチャートを示した。図中、φは直径をさす。

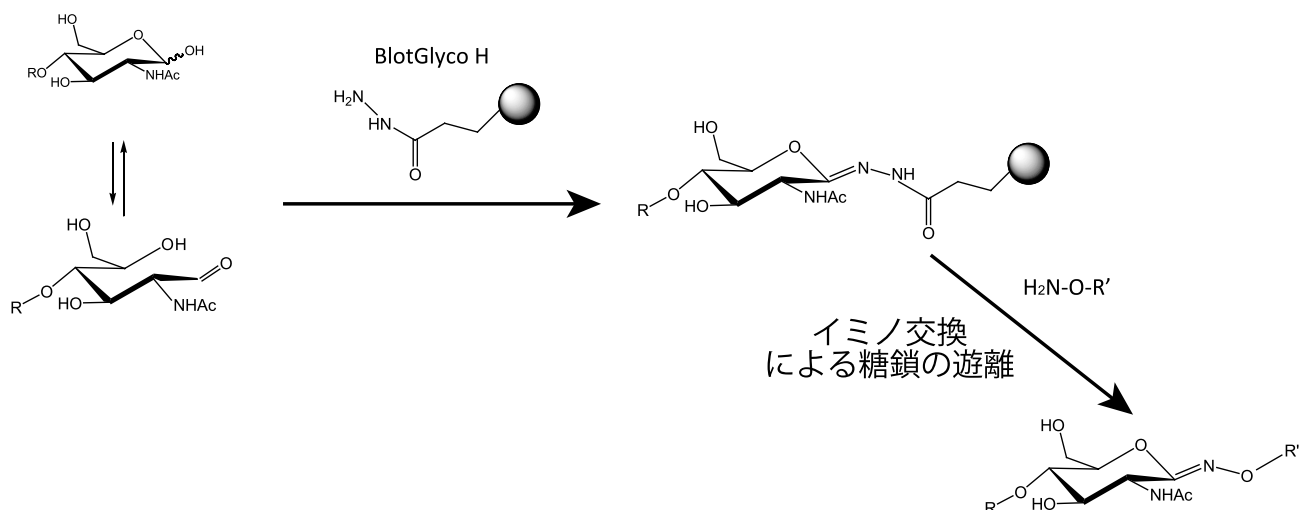


図2 BlotGlycoH ビーズを用いた糖鎖のエンリッチ

糖鎖の還元末端に存在するヘミアセタール基は、アルデヒド基と等価であり、BlotGlycoH ビーズ表面のヒドラジド基と化学選択的に反応する。ビーズに捕捉された糖鎖は、イミノ交換反応により、アミノオキシ基を有する MS 高感度試薬などで標識すると同時に、ビーズから遊離することが可能である。

のヒドラジド基と安定なオサゾン結合を形成することができ(図2)。そのため、大量の夾雑物が存在する生体試料であっても、高効率で糖鎖のみをエンリッチすることが可能となり、多段階の精製ステップを踏む必要がなくなるのである。ただし、反応溶液の pH や反応温度を厳守する必要はある。また、この捕捉ステップから、(iv) の糖鎖の遊離に至るまで、マルチウエルフィルタープレートの1 ウェル上で、全ての反応操作を行えるようになっているが、これもサンプルロスを最小にする工夫の一つである。(iii) 生体試料中、特にヒトを含む動物の血清などには、シアル酸に代表される酸性オリゴ糖が多く含まれている。これらを質量分析(MALDIあるいはESIを問わず)に供する場合、シアル酸の脱落や、多価アルカリ金属イオンの付加などが生じるため、スペクトルが複雑化し、定量性が失われてしまう。この問題を解決するためには、シアル酸のカルボン酸を安定な形に変換(保護)する必要があった⁷⁾。同様の目的で糖鎖の官能基を完全メチル化により修飾したり⁸⁾、シアル酸のカルボン酸をアミド化する方法⁹⁾なども報告されているが、これらはいずれも操作が煩雑であり、サンプルロスも起こりやすいことが予想された。著者らが考案した方法では糖鎖を固相ビーズに捕捉したまま、そのシアル酸残基のみを直接メチルエステル化する。その場合には、MALDI-TOF/MS においては一定の条件下で定量性が保たれるため、中性糖鎖と酸性糖鎖の一斉定量解析が可能となる^{4,5,7)}。(iv) 補足した糖鎖の遊離は、イミノ交換反応を利用して、アミノオキシ基を有する質量分析高感度化試薬や、蛍光試薬による標識化反応と同時に達成できる(図2)。もちろん、酸加水分解により遊離オリゴ糖として、さらにはそれら遊離糖に対して、従来法による還元アミノ化

を施し、標識体を作製することも可能である。(v) MALDI-TOF/MS による糖鎖構造の推定は、Glycomod Tool (<http://br.expasy.org/tools/glycomod/>) と GlycoSuite DB (<http://glycosuitedb.expasy.org/glycosuite/glycodb>) を用いて行うことができる。定量計算は、濃度既知の内部標準オリゴ糖を予め試料に加えておき、該当糖鎖ピークに対して、面積比を算出すればよい。各糖鎖の発現量を算出した後は、各種統計計算のほか、著者らが提唱している生合成経路解析(BSP 解析; biosynthetic pathway 解析)や、糖鎖タイプ分析に用いることができる¹⁰⁾。

血清を試料として、本法を実施した場合、検体数が10前後であれば、およそ2日程度で、全てのステップを終え、N-グライコーム情報を得ることができる。著者らの研究室では、グライコプロット法を自動で行う、前処理ロボット“SweetBlot”を開発しており、96 検体を14時間以内に処理している。つまり、1 検体のグライコミクスに要する時間は、たった7~8分程度である。このスループットの高さは、大規模解析に欠かせない要素の一つであり、この強みを活かして、著者らは実用化を念頭に置いた疾患糖鎖マーカー探索を実施している。

3. 血清糖鎖の N-グライコミクス

著者らは既に、グライコプロット法を用いて、健康者20例と肝細胞がん(HCC)患者83例の血清 N-グライコミクスを実施し、糖鎖発現プロファイルに有意な変化があることを報告している。任意の2種類のオリゴ糖の発現量比を計算したところ、3種類の組み合わせで、HCCと健常を100%の精度で判別することが可能であった⁵⁾。

ところで、二つの糖鎖の発現量の比は、一体何を意味す

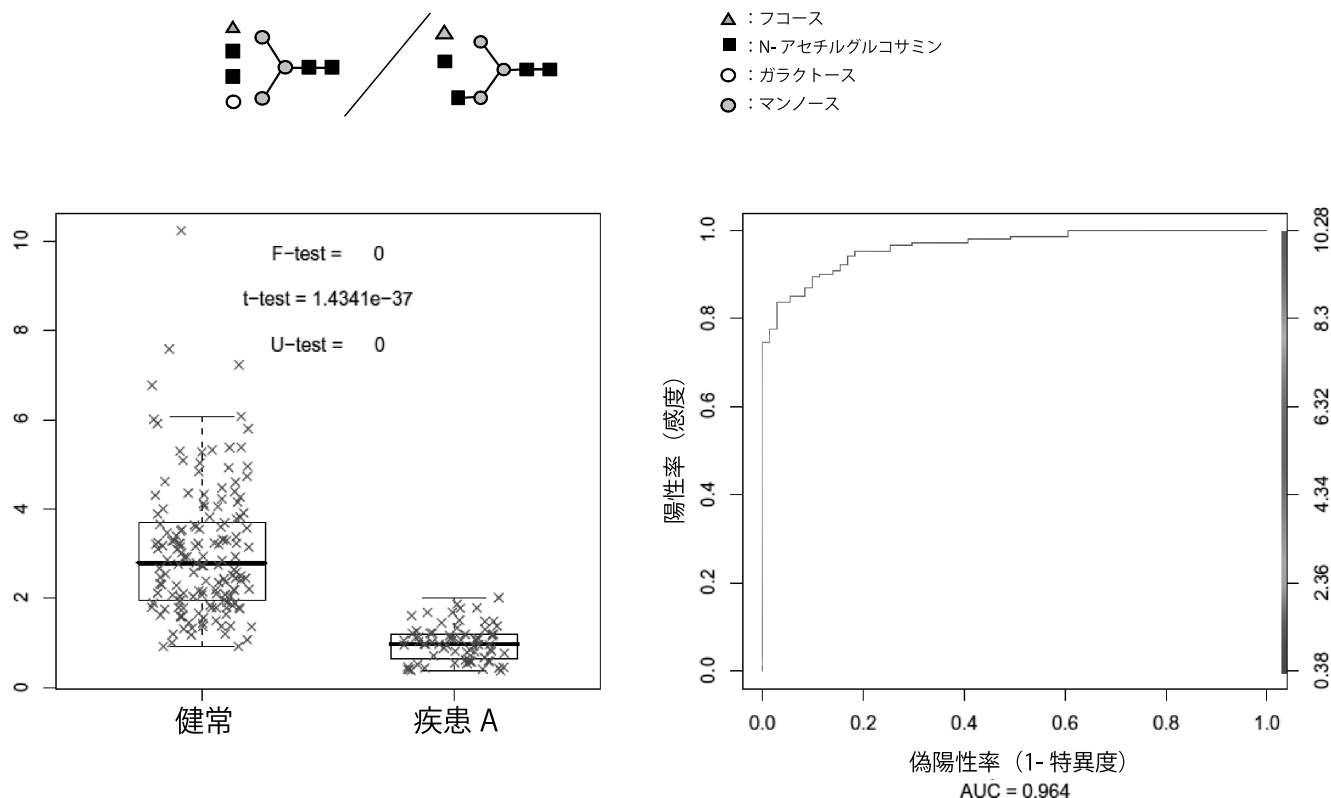


図3 健康と疾患 A における二つの糖鎖の発現量比

箱ひげ図 (検体ごとの分布を知るために、ここでは一症例を一つのプロットで反映させている。「ひげ」は最小値と最大値を、「箱」は第1四分位点から第3四分位点の範囲をそれぞれ表している。「箱」の中のひときわ太い線は、中央値。縦軸は、比を表している) と ROC (receiver operating characteristic) カーブ (診断用テストなどで特異度・感度を求める際、使用される統計グラフの一種。このカーブの下面積 AUC (area under curve) は診断能の指標として用いられる) を作成し、図に示した2種類の糖鎖の発現量の比較を行った。

るのだろうか？ 分子と分母にくるものが、生合成経路上、原料 (糖転移酵素の受容体基質) と産物の関係に相当するか複数の競合する酵素反応の産物の関係である場合には、疾患による生合成系の偏りがみえてくる場合もあるだろう。一例を図3に示したが、分子に置いた糖鎖構造は、分母の構造より、白色丸印 (ガラクトース) が一つ多く付加している。生体内では、分母に示す構造が原料 (受容体基質) となり、ガラクトース転移酵素の触媒作用によりガラクトースがさらに1分子付加することで、分子に表記した新たなオリゴ糖鎖 (産物) が合成されることが分かっている。つまり、図3のようなケースでは、ある疾患 A において、血清糖タンパク質全体としてみた場合、この反応が特に著しく進行しにくくなっていることが示唆される。このような、生合成経路における個々の糖鎖の関係を考慮したグライコミクスは、疾患メカニズムや分子標的医薬を開発する上で、今後、欠かせないツールとなることが大いに期待されている¹¹⁾。

4. 培養細胞の N-グライコミクス

1. において述べたとおり糖鎖の発現は遺伝子による直

接制御を受けず、さらにその構造は多様性に富んでいる。この事実は言い換えれば、遺伝子やタンパク質に比べて、生物の糖鎖生合成系では環境因子 (広義のストレス) の影響や自身の状態 (生活習慣や体調) を鋭敏に反映して、その構造を微妙に変化させたり発現量を変化させ得る、ということになる。著者らは、マウス胚性幹細胞株 P19 系列の細胞分化系を用いた実験系により、グライコームを追跡することで、細胞分化を経時的に評価できる可能性があることを報告している¹⁰⁾。P19CL6 細胞の DMSO 添加による心筋細胞への分化誘導系は、汎用性の高い細胞分化のモデル実験系であり、細胞分化に伴うプロテオーム変化もよく研究されている¹²⁾。しかし、分化誘導の前後で、発現量に変化したタンパク質は、定量 PCR の結果と矛盾の見られたタンパク質も含めて 17 種類のみで、これは全タンパク質の約 0.1~0.6% を占めるにとどまる。その変化量も、銀染色の濃度比にして、1.5 倍程度と微妙なものであった。著者らは、分化誘導した細胞と、コントロールの細胞に対して N-グライコミクスを実施した。分化誘導された細胞と、分化誘導を行わず、同じ日数培養したコントロールの細胞とでは、1 ディッシュあたりの細胞数や形態が異

なることから、総タンパク質量 200 μg あたりの各糖鎖発現量を算出し、評価を行った。その結果、検出された 67 種類のオリゴ糖のうち、分化誘導を行った細胞では、コントロールと比較して、9 種類の糖鎖構造が増加し、8 種類が減少していることが判明した（それぞれ、全糖鎖構造のうちの 13%、あるいは 12% が変化したことになる）。また、糖鎖タイプ (glycotype) 解析を行ったところ、増減の見られた糖鎖構造には、それぞれ何らかのユニークな傾向（偏り）が見出された。つまり、全糖鎖をそれぞれの構造の特徴に基づいて、「ハイマンノース型糖鎖群」、「フコースを一つもつ糖鎖群」、「フコースを二つ以上もつ糖鎖群」、「フコースをもたない糖鎖群」の四つのタイプに分け、各糖鎖タイプの合計発現量を求めた。そして、細胞に発現している全糖鎖の中で、各糖鎖タイプが、それぞれどのくらいの割合を占めているかを検討した。その結果、分化を誘導された細胞では、フコースを一つ有する糖鎖タイプが、およそ 2 倍に増加していることが明らかとなり、新規に 11 種類の同糖鎖タイプのオリゴ糖が検出されることが分かった（図 4）。同様の手法で、P19C6 細胞株や、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）から神経細胞への分化誘導系においても、顕著な糖鎖タイプの変化を観察しているが、この場合にはバイセクト型の糖鎖が有効な分化マーカーとなり

得ることが明らかとなった¹⁰⁾。バイセクト型糖鎖とは、*N*-結合型糖鎖のコア五糖の末端に、 $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合した GlcNAc をもつ糖鎖構造のことをいう。

これらのことから、*N*-グリコーム全体像を調べることで、細胞の状態を分別評価することができると考え、現在、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）や、ES 細胞の品質管理への *N*-グリコミクスの利用を目指して、研究を進めている。

5. リバースグリコブロットング法

グリコブロットング法により、興味ある糖鎖を検出した場合、どのようなタンパク質がその糖鎖構造をもっているのか、知りたくなるであろう。それら糖鎖をタグとみなし、親糖ペプチド（群）ごと選り分け同定する手法を、非還元末端側の糖鎖に着目して捕捉していることから、著者らはリバースグリコブロットング法（reverse glyco-blotting）と名付けた²⁾。特に、シアル酸をもつ糖ペプチドの同定法については、MRM（multiple reaction monitoring）法を用いるターゲット糖ペプチドの定量解析が可能な段階にまで方法論を確立している³⁾。その概念図を図 5 に示した。シアル酸は、通常、オリゴ糖鎖の非還元末端に存在しているが、これを特異的に過ヨウ素酸酸化（限定酸化反応）

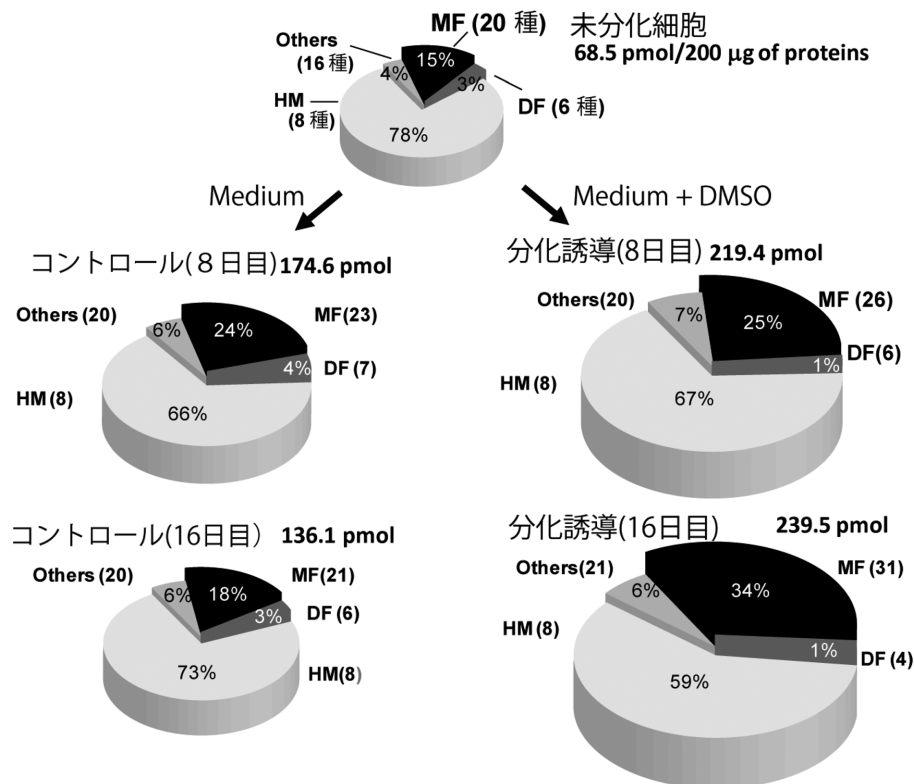


図 4 P19CL6 細胞の心筋細胞分化に伴う発現糖鎖タイプの変化

図中、HM はハイマンノース型糖鎖を、MF はフコースを一つ有する糖鎖を、DF はフコースを二つ有する糖鎖を、Others はそれら以外の糖鎖タイプを示している。（ ）内には、それぞれの糖鎖タイプにおいて検出された糖鎖の種類を記載した。

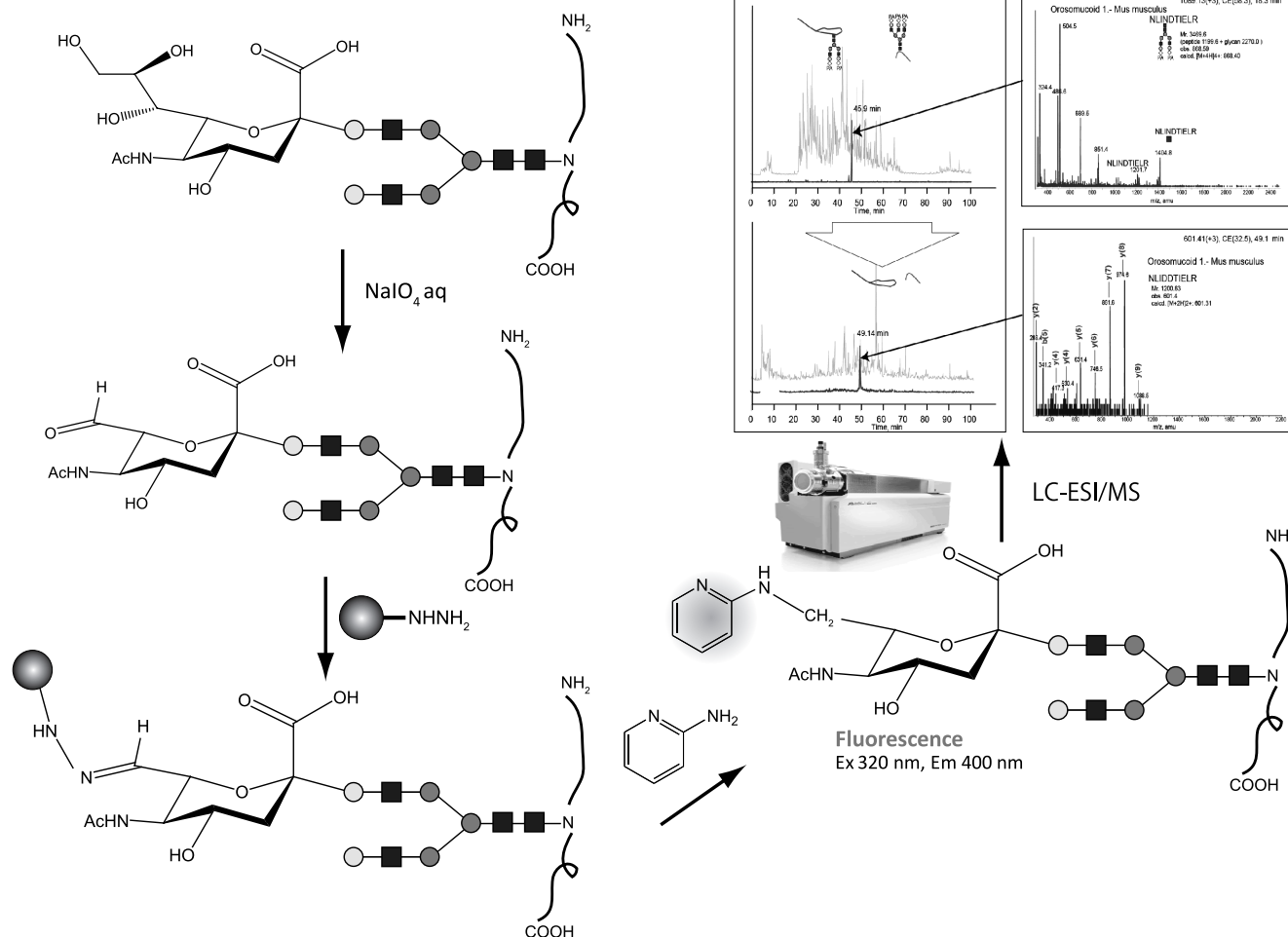


図5 リバースグライコプロファイリング法

リバースグライコプロファイリング法の基本的なフローチャートを示した。詳細は、文献3)を参照のこと。

することで、アルデヒド基をシアル酸選択的に付与する。このアルデヒド基をヒドラジドビーズに捕捉することで、シアル酸を有する糖ペプチドを選択的にエンリッチし夾雑物、特にペプチド片やシアル酸を含まない糖ペプチドを徹底的に洗浄して除去する。さらに、ヒドラゾン結合を酸性条件で選択的に切断後、再遊離したアルデヒド体を2-アミノピリジンとの還元アミノ化により蛍光標識する。これにより、その糖ペプチドのグライコミクス（グライコームの決定）に加えてLC-ESI/MSによるペプチドの配列決定さらには親タンパク質の同定を行うことが達成された³⁾。

リバースグライコプロファイリング法により同定した糖タンパク質については、それ自身や、その発現制御に関わる遺伝子情報に遡る、いわばセントラルドグマを逆方向に辿ることにより、転写メカニズムや翻訳制御の解析を行う多様なアプローチも考えられるだろう。これが、著者らの提唱するグライコフォームフォーカストリバースジェノミクス（GFRG）の概念である¹³⁾。GFRGの展開により、さまざまな-omicsから提供される情報を横断的に意味づけ、関

連づけることが可能となる。GFRG法の今後の展開が期待される。

6. O-グライコミクス

生体中にはタンパク質中のアスパラギン残基に窒素原子を介してオリゴ糖鎖が結合するN-結合型糖鎖のほかに、セリンあるいはスレオニン残基に酸素原子を介して糖鎖が結合しているO-結合型糖鎖もまた広く存在し、グライコミクスの対象となる場合がある。

そのほとんどが、酵素処理により遊離させることができるN-結合型糖鎖に比べ、O-結合型糖鎖には網羅的に作用する酵素が存在しないことから、糖タンパク質上の糖鎖構造解析は、N-結合型糖鎖を対象とするものが多かった。しかし、例えば健常者と多くのがん患者のムチン糖タンパク質においてO-結合型糖鎖にダイナミックな構造変化が生じるという報告などが多くあり¹⁴⁾、O-グライコミクスの研究も盛んになりつつある。

従来、O-結合型糖鎖の遊離には専ら還元β脱離法が用

いられてきた。ピーリングと呼ばれる副反応を抑えつつ効率よく回収する化学的糖鎖遊離法として広く適用されている¹⁵⁾。しかし、この方法では遊離糖鎖の還元末端がアルジトールという非還元性糖鎖として回収されるため、還元アミノ化法による蛍光色素による標識などができない。古くから用いられているヒドラジン分解法によれば、還元性の遊離糖鎖を得ることができるが、危険な試薬や煩雑な操作に注意が必要な点およびアセチル基の脱離といった副反応があるため多検体の前処理と汎用的な分析に相応しいとは言えない。近年、*O*-結合型糖鎖を還元性の遊離糖鎖として回収する方法として、飽和炭酸アンモニア-濃アンモニア水溶液を用いた系が報告されている¹⁶⁾。上述の通り、グライコプロッティング法では、還元末端あるいはアルデヒド基を糖鎖特異的なエンリッチ反応に用いるため、著者らは、比較的容易に還元性糖鎖が得られるこの飽和炭酸アンモニア-濃アンモニア水溶液法に改良を加え、*O*-結合型糖鎖を効果的にグライコプロッティングしている¹⁷⁾。この方法は定性的 *O*-グライコムプロファイルを得るための簡

便かつ有効な方法の一つであると考えている。本改良法（以下、アンモニウム塩法）によりヒト血清中 *O*-結合型糖鎖の解析を、従来の抽出あるいは濃縮分画操作などを一切省略して達成できた。すなわち、ヒト全血清（20 マイクロリットル）からエンリッチされた主要な *O*-結合型糖鎖はシアリル T（Hex1HexNAc1NeuAc1）およびジシアリル T 型糖鎖（Hex1HexNAc1NeuAc2）の 2 種であり、これはヒト血清中の主要な *N*-結合型糖鎖が 50 種以上検出される事実と対照的な結果であった。また、わずか培養皿 1 枚分からの培養細胞抽出物やホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルからの *O*-結合型糖鎖の網羅的解析も本法により実現した¹⁷⁾。特に FFPE サンプルへの応用では臨床機関等に存在する膨大な臨床保存サンプルの再活用之道を拓くことが期待されている。

アンモニウム塩法を用いての標準糖タンパク質の解析例を図 6 に示す。二つの試薬会社（試薬会社 A および試薬会社 B）より購入したウシ顎下腺ムチン（BSM）をそれぞれ本法により処理し、還元性遊離 *O*-結合型糖鎖をグラ

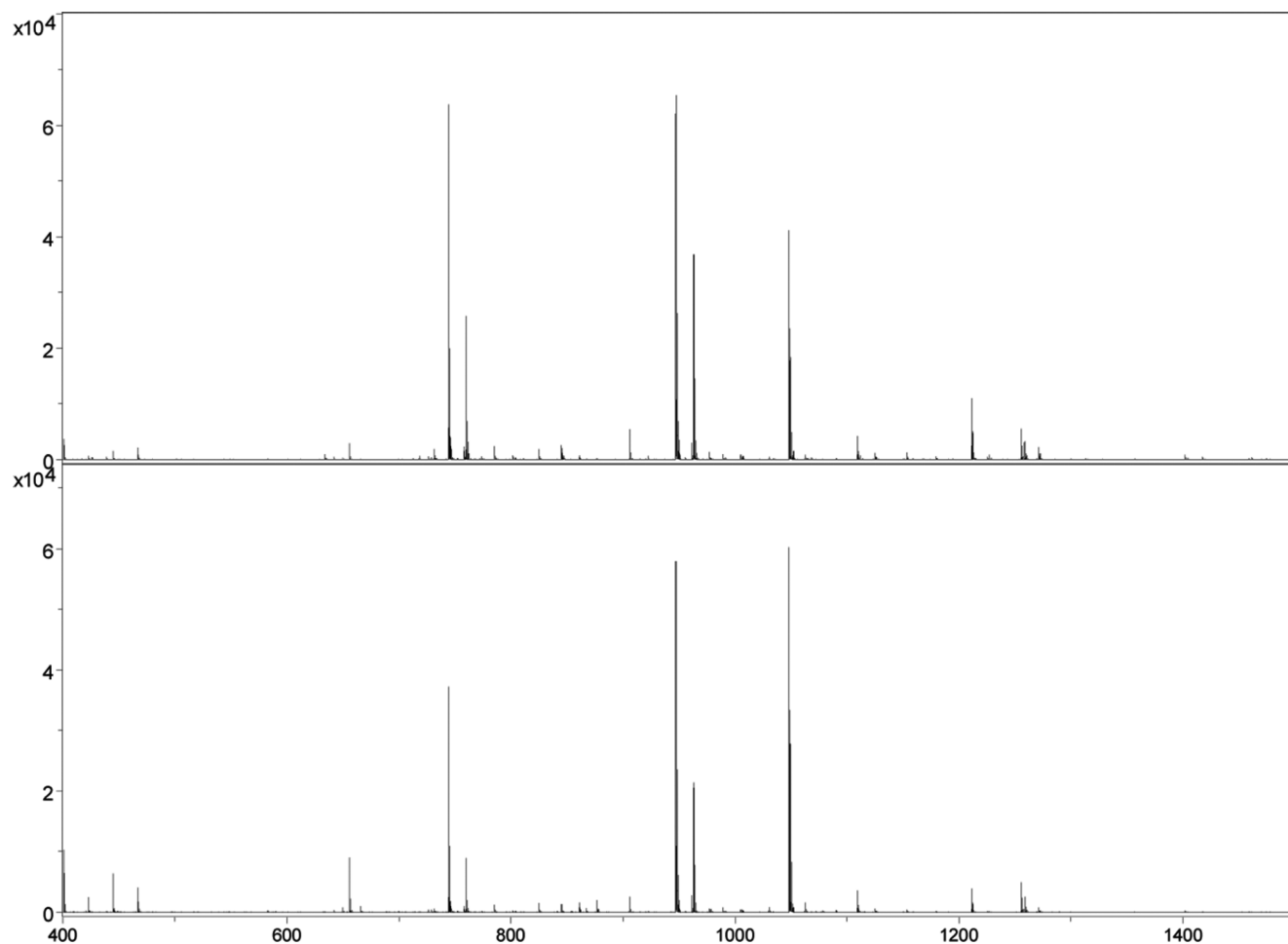


図 6 ウシ顎下腺ムチンの *O*-グライコムクス

試薬会社 A、試薬会社 B の各サンプルの *O*-結合型糖鎖プロファイル MS スペクトルを示した。図中、I.S.は内部標準物質を表す。

イコブロットティング法により精製・回収後、MALDI-TOFMSによって糖鎖プロファイルスペクトルを得た。通常、BSMには4種類の主要O-結合型糖鎖の存在が知られている。図から明らかなように、構成する糖鎖の分子種においては大きな違いは無いものの、試薬会社の違いにより糖鎖分子種の構成比率ならびに総糖鎖量が、内部標準糖鎖(図中I.S.)と比べて大きく異なっていることが分かる。また、ピーリング反応(非還元末端側の糖鎖部分が脱落する反応)産物に相当する糖鎖は検出されていないことから本法の高い有用性と信頼性が理解できる。今後、生体試料中の網羅的O-結合型糖鎖の解析による疾患マーカー探索研究はもとより、糖タンパク質医薬などの品質管理においても活用されることが予想されている。

7. 終わりに

本文中でも少し触れたが、近年進歩の著しい質量分析装置やその周辺技術、例えばLC-MS-MRM (multiple reaction monitoring)^{3,18)}や電子捕捉(移動)解離法(ECD/ETD, Electron capture/transfer dissociation)^{19~22)}など糖タンパク質(糖ペプチド)の糖鎖構造と修飾部位を同時に同定できる優れた新手法も報告されている。しかしいずれの解析法においてもそれに先立って、対象とする糖鎖や糖ペプチド群を生体試料から精製する工程を避けては通れない。糖鎖はPCR法によって増幅できないのである。グライコブロットティング法とリバースグライコブロットティング法はこれらの分子を化学選択的に簡単に、しかも再現性よくエンリッチできる唯一の方法論である。既に、多検体試料による大規模解析を実現した自動糖鎖前処理装置 SweetBlot (<http://www.jst.go.jp/seika/01/sentan.html>, 先端機器開発プログラム「疾患早期診断のための糖鎖自動分析装置開発」)を用いた疾患糖鎖マーカー探索研究が加速されている。また、現在質量分析までの一連の工程を全自動で行うことが可能な第2世代の装置開発が進行中である(<http://www.jst.go.jp/sentan/saitaku/H21p.html>, プロトタイプ実証・実用化プログラム「全自動糖鎖プロファイル解析診断システムの開発」)²³⁾。

文 献

- 1) Nishimura, S.-I., Niikura, K., Kuroguchi, M., Matsushita, T., Fumoto, M., Hinou, H., Kamitani, R., Nakagawa, H., Deguchi, K., Miura, N., Monde, K., & Kondo, H. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 91–96.
- 2) Kuroguchi, M., Amano, M., Fumoto, M., Takimoto, A.,

- Kondo, H., & Nishimura, S.-I. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 8808–8813.
- 3) Kuroguchi, M., Matsushita, T., Amano, M., Furukawa J.-i., Shinohara, Y., Aoshima, M., & Nishimura, S.-I. (2010) *Mol. Cell. Proteomics*, 9, in press.
- 4) Furukawa, J.-i., Shinohara, Y., Kuramoto, H., Miura, Y., Shimaoka, H., Kuroguchi, M., Nakano, M., & Nishimura, S.-I. (2008) *Anal. Chem.*, 80, 1094–1101.
- 5) Miura, Y., Hato, M., Shinohara, Y., Kuramoto, H., Furukawa, J.-i., Kuroguchi, M., Shimaoka, H., Tada, M., Nakanishi, K., Ozaki, M., Todo, S., & Nishimura, S.-I. (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, 7, 370–377.
- 6) Kimura, A., Tandang-Silvas, M.R.G., Fukuda, T., Cabanos, C., Takegawa, Y., Amano, M., Nishimura, S.-I., Matsumura, Y., Utsumi, S., & Maruyama, N. (2010) *J. Agric. Food Chem.*, 58, 2923–2930.
- 7) Miura, Y., Shinohara, Y., Furukawa, J.-i., Nagahori, N., & Nishimura, S.-I. (2007) *Chem. Eur. J.*, 13, 4797–4804.
- 8) Dell, A., Reason, A.J., Khoo, K.H., Panico, M., McDowell, R. A., & Morris, H.R. (1994) *Methods Enzymol.*, 230, 108–132.
- 9) Sekiya, S., Wada, Y., & Tanaka, K. (2005) *Anal. Chem.*, 77, 4962–4968.
- 10) Amano, M., Yamaguchi, M., Takegawa, Y., Yamashita, T., Terashima, M., Furukawa, J.-i., Miura, Y., Shinohara, Y., Iwasaki, N., Minami, A., & Nishimura, S.-I. (2010) *Mol. Cell. Proteomics*, 9, 523–537.
- 11) Amano, M. & Nishimura, S.-I. (2010) *Methods Enzymol.*, 479, 109–125.
- 12) Wen, J., Xia, Q., Lu, C., Yin, L., Hu, J., Gong, Y., Yin, B., Monzen, K., Yuan, J., Qiang, B., Zhang, X., & Peng, X. (2007) *J. Cell Biochem.*, 102, 149–160.
- 13) <http://www.gfrg.org/>
- 14) Wandal, H.H., Blixt, O., Tarpe, M.A., Pedersen, J.W., Bennett, E.P., Mandel, U., Ragupathi, G., Livingston, P.O., Hollingsworth, M.A., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., & Clausen, H. (2010) *Cancer Res.*, 70, 1306–1313.
- 15) Carlson, D.M. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 616–626.
- 16) Huang, Y., Mechref, Y., & Novotny, M.V. (2001) *Anal. Chem.*, 73, 6063–6069.
- 17) Miura, Y., Kato, K., Takegawa, Y., Kuroguchi, M., Furukawa, J., Shinohara, Y., Nagahori, N., Amano, M., Hinou, H., & Nishimura, S.-I. (2010) *Anal. Chem.*, 82, 10021–10029.
- 18) Martin, D.B., Holzman, T., May, D., Perterson, A., Eastam, A., Eng, J., & McIntosh, M. (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, 7, 2270–2278.
- 19) Zubarev, R.A. (2003) *Mass Spectrometry Rev.*, 22, 57–77.
- 20) Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., & Hunt, D.F. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9528–9533.
- 21) Satake, H., Hasegawa, H., Hirabayashi, A., Hashimoto, Y., Baba, T., & Masuda, K. (2007) *Anal. Chem.*, 79, 8755–8761.
- 22) Yoshimura, Y., Matsushita, T., Fujitani, N., Takegawa, Y., Fujihira, H., Naruchi, K., Gao, X.-D., Manri, N., Sakamoto, T., Kato, K., Hinou, H., & Nishimura, S.-I. (2010) *Biochemistry*, 49, 5929–5941.
- 23) 古川潤一, 西村紳一郎 (2010) 未来材料, 11, 印刷中.