

特集：酵母から動植物まで包括するユビキチン-プロテアソーム系の新展開

変異型ユビキチンによるユビキチン化タンパク質の網羅的解析

押川 清孝¹⁾, 松本 雅記²⁾, 中山 敬一¹⁾

ヒストン H2A がユビキチンとイソペプチド結合している最初のユビキチン化タンパク質として発見されて以降、生化学的・遺伝学的手法を駆使した統合的研究により、ユビキチンシステムが解明された。現在までに、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されるタンパク質をはじめとして、多くのタンパク質がユビキチン化修飾を受けていることが報告されている。では、いったいどれ位のタンパク質が細胞内でユビキチン化修飾を受けているのだろうか？本稿では、これまでに行われたユビキチン化部位の網羅的解析について概説するとともに、最近われわれが開発した、変異型ユビキチンを用いたユビキチン化部位同定法について紹介する。

はじめに

ユビキチンは、当初、ヒストンに共有結合している普遍的な修飾分子として報告されていたが、のちに ATP 依存性タンパク質分解系の必須因子として再発見された。その後の研究から、多くのタンパク質がユビキチン化修飾を受けることで、さまざまな生命現象において重要な役割を果たしていることも明らかになった。近年の質量分析計を用いたプロテオミクス技術の向上とともに、ユビキチン化タンパク質を網羅的に同定しようとする試みが精力的に行われている。

タンパク質の翻訳後修飾解析と質量分析計

遺伝子情報に基づき合成されたタンパク質は、その多くが特定の翻訳後修飾を受けることでさまざまな機能を発揮する。このタンパク質の修飾反応を調べることは、細胞機能全体を理解するうえで必要不可欠である。一般に、タン

パク質の翻訳後修飾には低分子量の官能基が付加するものと、比較的小さなタンパク質が付加されるものに大別することができる。官能基が付加される代表例として、リン酸化、アセチル化、メチル化、水酸化などがある。一方、タンパク質付加には、ユビキチン化、SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) 化、NEDD8 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 8) 化、Atg 化などが知られている。これらの翻訳後修飾は可逆的であり、それぞれの修飾酵素、脱修飾酵素などの存在も明らかになっている。

このタンパク質の翻訳後修飾の解析には、質量分析計 (mass spectrometry; MS) が大きな威力を発揮する。近年の質量分析計の高精度・高感度化および検索エンジンなど周辺技術向上により、多種多様なタンパク質の翻訳後修飾部位を正確かつ効率よく検出できるようになった。最も多くの修飾部位が同定されている翻訳後修飾はリン酸化である。リン酸化の場合、修飾部位ペプチドを特異的に回収する方法が開発される以前は、二次元電気泳動で分離されたタンパク質から、放射性同位体標識法や抗体検出法などでリン酸化タンパク質を検出し、そのタンパク質スポットより抽出したペプチドの中からリン酸化ペプチドを探しだすしかなかった。当然ながら存在量の多い限られたリン酸化ペプチドしか同定されず、微量かつ重要なリン酸化ペプチドは見逃されていた。ところが、金属キレートカラムでリン酸化ペプチドを特異的に回収する方法が開発されたこと

¹⁾九州大学生体防御医学研究所分子医科学分野, ²⁾プロテオミクス分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)
Comprehensive study of protein ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin
Kiyotaka Oshikawa¹⁾, Masaki Matsumoto²⁾, and Keiichi I. Nakayama¹⁾ (¹⁾Department of Molecular and Cellular Biology, ²⁾Department of Proteomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan)

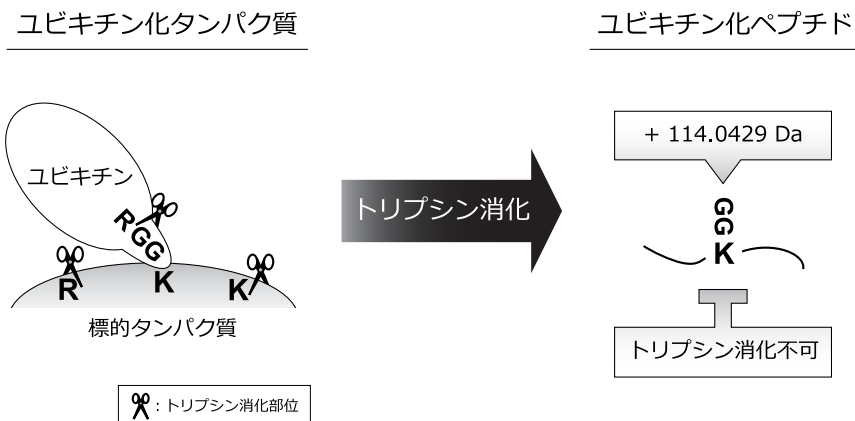


図1 質量分析計によるユビキチン化部位の検出
ユビキチン化タンパク質をトリプシン消化すると、ユビキチン化修飾部位のリジン残基は消化されず、さらにユビキチン由来の二つのグリシン残基が結合した状態になる。この質量変化を質量分析計により検出する。

により、リン酸化部位を網羅的に同定できるようになった。現在までに数万箇所のリン酸化部位が報告されている。これより、タンパク質の翻訳後修飾部位の大規模解析には、その修飾部位を含むペプチドをいかに効率よく回収できる方法が必須であるかがよくわかる。一方、ユビキチン化ではユビキチン化ペプチドの回収法の開発が遅れているため、これまでに開発されたいくつかの方法によって修飾部位の同定が試みられてきたものの、同定されたユビキチン化部位は数百箇所程度にとどまっている。

これまでのユビキチン化部位の網羅的解析

ユビキチンは真核生物において高度に保存された76アミノ酸からなる低分子量タンパク質である。標的タンパク質に対するユビキチン化とは、三つの酵素、すなわちユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、さらにユビキチンリガーゼ (E3) へとユビキチンが受け渡され、最終的に標的タンパク質のリジン残基にユビキチンがイソペプチド結合する反応である。ユビキチン化はタンパク質分解をはじめ、DNA修復、翻訳調節、細胞周期制御、シグナル伝達など、さまざまな生命現象に深く関わるタンパク質の翻訳後修飾の一つである¹⁾。

最初に同定されたユビキチン化タンパク質は、ヒストンH2Aである。エドマン分解によるアミノ酸配列決定法により、ユビキチンのC末端のグリシン残基が、ヒストンH2Aの119番目のリジン残基にイソペプチド結合していることが判明した²⁾。この発見以降、精力的な研究によりユビキチン修飾機構が解明された。標的タンパク質へのユビキチン修飾には、大きくポリユビキチン化とモノユビキチン化にわけることができる。ポリユビキチン化は、連続的にユビキチンが結合することで生じるポリユビキチン鎖が標的タンパク質に結合することであり、ユビキチンの

48番目のリジン残基(K48)を介したポリユビキチン鎖は、標的タンパク質のプロテアソームによる分解シグナルとなり、ユビキチンの63番目のリジン残基(K63)を介したポリユビキチン鎖は、タンパク質結合ドメインとして、シグナル伝達やDNA修復に関与することが知られている。一方、モノユビキチン化は、ユビキチン単独で標的タンパク質に結合することで内在化シグナルとして機能し、その細胞内局在を制御していることが知られている。これまでにさまざまな分子が、ポリまたはモノユビキチン化することが報告されているが、その検証には抗ユビキチン抗体を用いたものがほとんどであり、そのユビキチン化部位まで特定できたものはごく僅かである。

2003年に質量分析計を用いた手法により、ユビキチン化部位を検出できることが報告された³⁾。ユビキチン化タンパク質をトリプシン処理すると、標的タンパク質におけるユビキチン化部位はトリプシンで切断されず、またそのペプチドのリジン残基にユビキチンのC末端の二つのグリシン残基がイソペプチド結合したT字型ペプチドを形成し、質量が変化する(+114.0429 Da)。これを質量分析計で検出することで、ユビキチン化修飾部位の同定が可能となった(図1)。この質量変化を指標に、酵母抽出液から110箇所のユビキチン化部位を検出している。だが、この報告においては単にユビキチン化タンパク質を回収しているため、ユビキチン化ペプチドの割合は、同定された全ペプチドの僅か2.6%であった。

この報告以降、効率的なユビキチン化ペプチドの濃縮法の開発が行われてきた。これまでに開発された濃縮法は4通りあり、(i) ユビキチンに対する抗体による濃縮^{4,5)}、(ii) ユビキチン結合タンパク質や結合ドメインを使った濃縮⁶⁻⁸⁾、(iii) 細胞内にタグ付きユビキチンを発現させた後、タグによる濃縮⁹⁻¹¹⁾、そして最近報告された(iv) リ

ジン残基とトリプシン消化後に残る二つのグリシン残基に対する抗体（抗ジグリシン化リジン抗体）による濃縮¹²⁾である。これまでにこれらの方法で、多くのユビキチン化タンパク質が同定されている。例えば、抗ジグリシン化リジン抗体を用いたユビキチン化部位の網羅的解析では、HEK293細胞から374箇所のユビキチン化部位を決定している。ただ、この報告のユビキチン化タンパク質は、細胞内で発現量が多いものがほとんどで、低発現量かつ、重要なユビキチン化タンパク質として知られているp53やp27^{Kip1}などは同定できていない。

これまでのユビキチン化タンパク質の網羅的解析により明らかになった修飾部位数は、予想よりもはるかに少ない。これは、多くのユビキチン化タンパク質が不安定であるに加え、ユビキチンが標的タンパク質以外にもユビキチン同士で結合して複雑かつ多様なポリユビキチン鎖を形成するために、標的タンパク質の修飾部位を効率よく検出することが難しかったからである。また抗ジグリシン化リジン抗体を使用した場合には、得られたユビキチン化ペ

チドが本当にユビキチン化由来かどうかの検討が必要である。これは NEDD8 や ISG15 (Interferon Stimulated Gene, 15 kDa) などのユビキチン様タンパク質も、トリプシン消化でユビキチンと同じ質量変化を示すからである。さらにユビキチン化ペプチドの特徴的な質量変化が、プロテオミクス解析によく使用されるアルキル化試薬のヨードアセトアミドによるリジン残基への化学修飾による質量変化と一致することが報告されている¹³⁾。ユビキチン化部位の同定数向上のためには、リン酸化同様、ユビキチン化部位を含むペプチドを効率よく回収することが必要であると同時に、その修飾部位同定結果の解釈には注意を払わなければならない。

変異型ユビキチンを用いたユビキチン化部位同定法の開発

上述の問題点を踏まえ、われわれは変異型ユビキチンを用いて二段階精製と二段階酵素消化を組み合わせることにより、ユビキチン化修飾部位を効率よく検出する新方法を

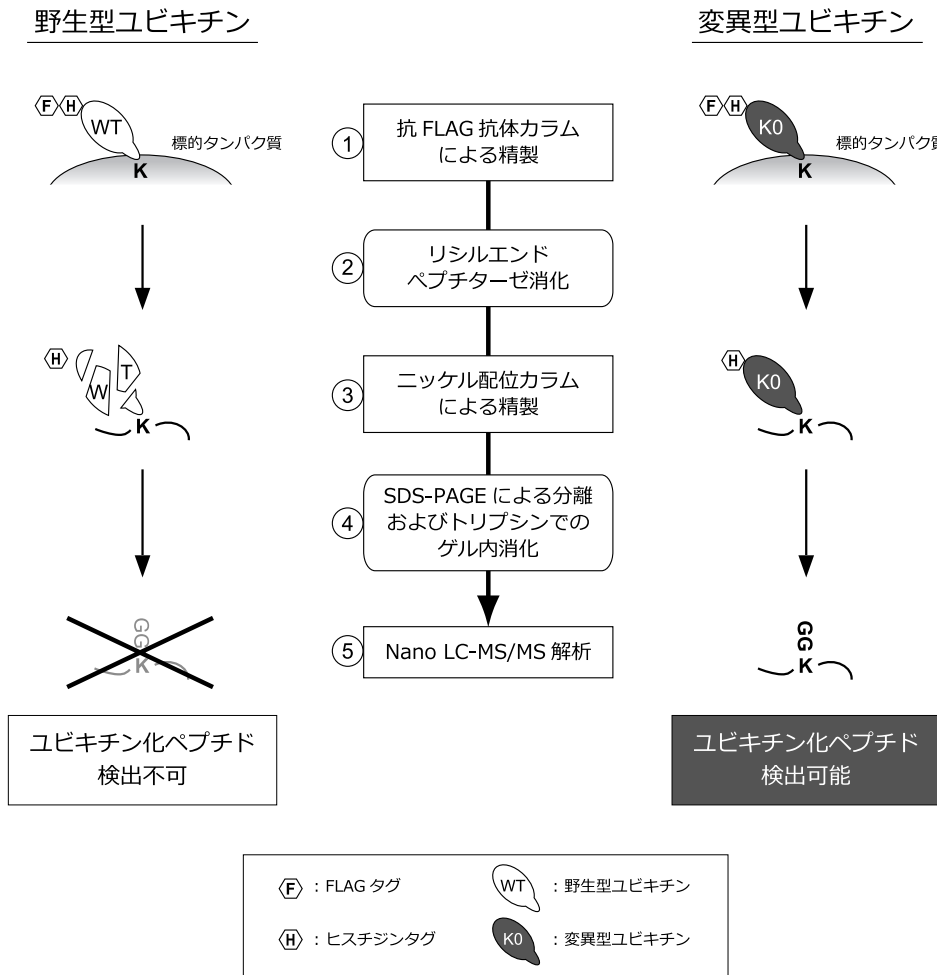


図2 K0-Ubを用いたユビキチン化部位同定法の概略図

開発した¹⁴⁾(図2). 変異型ユビキチンとは, ユビキチンの7箇所のリジン残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)をすべてアルギニン残基に置換したK0-ユビキチン(K0-Ub)である. そのためK0-Ubはポリユビキチン鎖形成能こそないが, 標的タンパク質へ直接結合することは可能である. このK0-Ubを用いたユビキチン化部位同定法の開発を行った. 本同定法では, 二回のタグによる回収を行うため, K0-UbのN末端にFLAGタグとヒスチジンタグを付加したベクターを作製した. ①それを培養細胞に遺伝子導入後, 抗FLAG抗体ビーズによる一回目の精製を行う. ②次に, 回収したK0-ユビキチン化タンパク質を還元アルキル化後, 4M尿素存在下にてLys-C消化する. この処理により, K0-Ub以外のタンパク質はすべて消化されるが, ユビキチン化部位を含む標的タンパク質由来ペプチドは, K0-Ubと結合したままである. ③このペプチドが結合したK0-Ubを, 二回目のニッケル配位カラムで精製する. ④精製後のサンプルをSDS-PAGEで分離したのち, トリプシンによるゲル内消化を行う. ⑤得られたペプチドからユビキチン化ペプチドを質量分析計にて検出する. 一方, 野生型ユビキチン(WT-Ub)では, Lys-Cにてすべて消化されてしまうため, その後の精製で回収することができず, ユビキチン化ペプチドは検出できないはずである.

本同定法を行うにあたっての注意点は, K0-Ubがユビキチン化反応に供することができるかどうかである. そこでまず, K0-UbのE1, E2への転移能について検討した(図3A). ビオチン標識したK0-UbとWT-Ubを作製し, *in vitro* ユビキチン化アッセイを行うと, K0-UbはWT-Ubと同程度にE1, 続いてE2へと転移していることが確認された. この反応産物に還元剤である2-メルカプトエタノール(2-ME)を加えることで, 共にE1, E2への転移がみられなくなることから, この反応は間違いなくE1, E2のシステイン残基を介していることが裏付けられた. 次に, HEK293T細胞にK0-Ubを発現させると, WT-Ubと同様のユビキチン化に特徴的なバンドパターンを示した. さらにK0-Ubは, 細胞内にてユビキチン化依存的に分解されるサイクリンD1やp27^{Kip1}の分解速度に影響を与えなかった(図3B, C). 以上より, K0-Ubは細胞内の, 特にタンパク質分解に関与するユビキチン化反応には影響しない¹⁵⁾ことが示唆された.

変異型ユビキチンによるユビキチン化部位の網羅的解析

本同定法を用いて, HEK293T細胞内のユビキチン化部位の網羅的解析を三回行い, あわせて1,392箇所のユビキチン化部位を同定することができた¹⁴⁾. ユビキチン化タンパク質としては, 794個であった. 以前にわれわれが行っ

たユビキチンに対する抗体を用いた網羅的解析¹⁾では, HEK293T細胞内から670個のユビキチン化タンパク質を同定したにもかかわらず, ユビキチン化部位は18箇所しか同定することができなかった. 本同定法は既存の方法と比べると, 網羅的にユビキチン化部位を同定できる方法である. 一方, WT-Ubでは予想通り, ユビキチン化ペプチドは検出されなかった. 今回, 同定されたユビキチン化タンパク質やその修飾部位を調べると, 既知の報告通りのユビキチン化部位が検出できた. その中には, DNA修復の際にモノユビキチン化することが知られるFANCD2の561番目のリジン残基も含まれていた. また, これまでのユビキチン化タンパク質の網羅的解析では同定することができなかった, ユビキチン化依存的に分解される不安定なタンパク質であるp53, HIF-1 α , Geminin, p27^{Kip1}などのユビキチン化部位も同定することができた. 今回の解析で同定できた, 細胞周期およびDNA修復関連タンパク質のユビキチン化部位を示す(表1). これらのほかに, 新規に同定された部位も多数見つかった. 加えて, ユビキチンの7箇所のリジン残基と, 直鎖状ポリユビキチン鎖形成時に使用されるN末端のユビキチン化¹⁶⁾も検出することができた.

バイオインフォマティクスによるユビキチン化部位の解析

本同定法によるユビキチン化部位の網羅的解析により得られたユビキチン化部位情報から, ユビキチン化修飾が, 標的タンパク質の1次および2次構造に対し, 選択性を持つかどうか調べるために, バイオインフォマティクスによる解析を行った. 得られた1,392箇所のユビキチン化リジン残基の前後10アミノ酸をデータベースから抽出し, データベースからランダムに抽出した10,000箇所のリジン残基の前後10アミノ酸をWebLogo上で比較した(図4A). その結果, 1次構造におけるユビキチン化修飾のコンセンサス配列を見出すことはできなかった. 2次構造については, Protein Data Bankに登録されていた151個のユビキチン化タンパク質の立体構造情報を抽出し, α -helix, β -sheet, Turn構造とそれ以外の四つに分類した. 抽出したユビキチン化タンパク質内の290箇所のユビキチン化リジン残基と, 2,463箇所すべてのリジン残基の2次構造領域を比較しても, 有意差は認められなかった(図4B). われわれの結果から, ユビキチン化修飾は特定の1次および2次構造を認識していないと推測された. 次に, ユビキチン化タンパク質内のユビキチン化部位数を算出した. ほとんどのタンパク質が, 1箇所あるいは2箇所のリジン残基がユビキチン化されているのに対し, HSP70-1やHSC71などでは, 複数箇所ユビキチン化されていた(図4C). 特にHSP70-1では, 22箇所ものユビキチン化部位が見つかった. この現象は, 分子シャペロンであるHSP70-1やHSC71

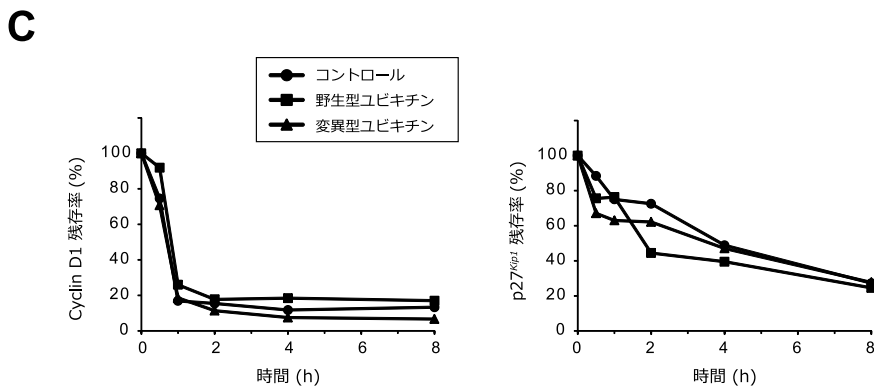
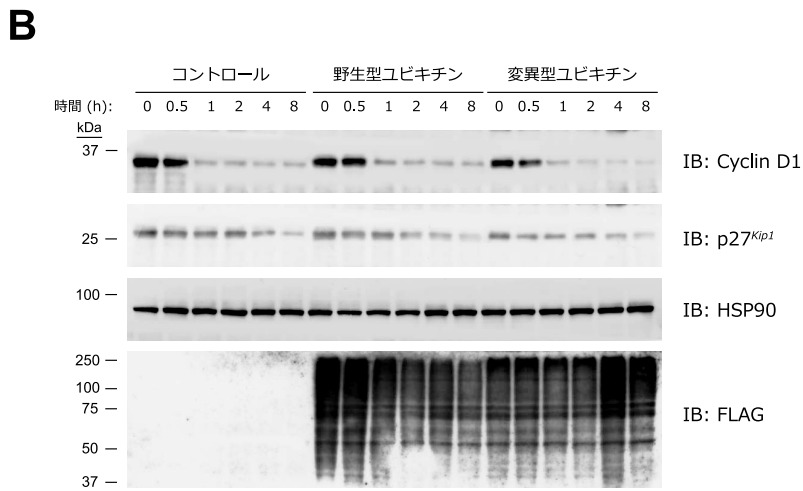
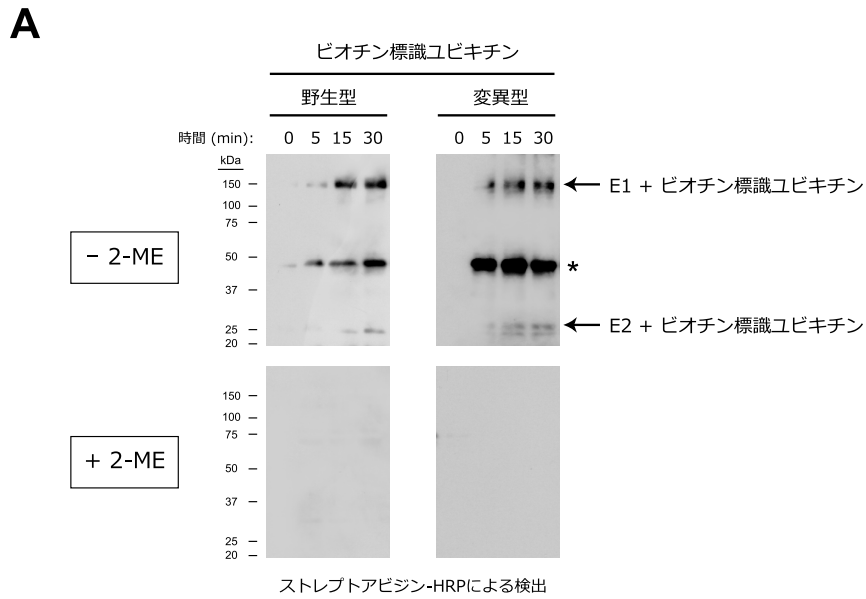


図3 K0-Ub と WT-Ub の *in vitro* ubiquitylation による E1, E2 転移能, および細胞内タンパク質の分解速度の比較
 (A) ビオチン標識ユビキチンを用いた *in vitro* ubiquitylation による E1, E2 転移能の評価. * : 非特異的バンド
 (B) シクロヘキシミド存在下での細胞内タンパク質 (Cyclin D1, p27^{Kip1}) の分解速度解析.
 (C) (B) の解析結果を定量化した.

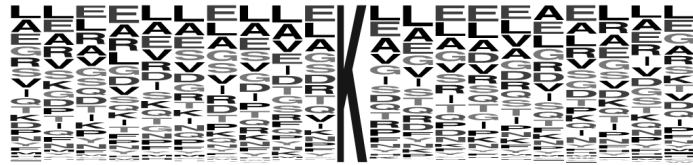
表1 本同定法により同定された細胞周期およびDNA修復に関するタンパク質のユビキチン化部位

	ユビキチン化 部位	同定したユビキチン化 ペプチド配列
細胞周期関連タンパク質		
CELL DIVISION CONTROL PROTEIN 2 HOMOLOG	K58:	EISLLK*ELR
	K136:	DLKPQNLLIDDK*GTIK
	K207:	K*PLFHGDSEIDQLFR
CELL DIVISION PROTEIN KINASE 4	K211:	RK*PLFCGNSEADQLGK
CELL DIVISION PROTEIN KINASE 6	K26:	ADQQYECVAIEGEGAYGK*VFK
CELLULAR TUMOR ANTIGEN P53	K120:	LGFLHSGTAK*SVTCTYSPALNK
	K321:	KK*PLDGEYFTLQIR
	K357:	DAQAGK*EPGGSR
	K370:	AHSSHLK*SK
CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1B (p27 ^{Kip1})	K165:	RPATDDSSTQNK*R
DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM2	K591:	GVCLIDEFDK*MNDQDR
DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM3	K351:	GDINILLIGDPSVAK*SQLLR
	K435:	VTIAK*AGIHAR
DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM4	K536:	GQYTS GK*GSSAVGLTAYVMK
	K600:	SVLHEVMEQQTLIAK*AGICQLNAR
	K628:	K*TTIENIQLPHTLLSR
DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM6	K313:	FGGK*ELRDEEQTAESIK
	K422:	AVYTS GK*ASSAAGLTAAVVR
	K517:	SLK*QNINLSAPIMSR
	K611:	DGSGVTK*SSWR
DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM7	K145:	FELYFQGPSSNK*PR
	K387:	GNINICLMGDPGVAK*SQLLSYIDR
	K471:	TAIHEVMEQQTISIAK*AGILTTLNAR
	K648:	DSLLGDK*GQTAR
GEMININ	K139:	ENK*ELAEVAEHVQYMAELIER
DNA修復関連タンパク質		
ATAXIA TELANGIECTASIA AND RAD3-RELATED PROTEIN	K1057:	ALHYLK*NETEIELGSLLR
ATP-DEPENDENT DNA HELICASE Q1	K38:	QQELIQK*K
FANCONI ANEMIA GROUP D2 PROTEIN	K561:	K*QLSSTVFK
POSTREPLICATION REPAIR PROTEIN RAD18	K186:	SVEEIAPDPSEAK*RPEPPSTSTLK
	K197:	RPEPPSTSTLK*QVTK
	K309:	SAAEIVQEIENIEK*TR
	K462:	DLLEEEEAWEASHK*NDLQDTEISPR
	K218:	VDCPVCGVNIPESHINK*HLDSCLSR
PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN	K80:	ILK*CAGNEDIITLR
	K164:	DLSHIGDAVVISCAK*DGVK
	K254:	YYLAPK*IEDEEGS
STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 1	K1196:	EEFYTK*AESLIGVYPEQGDCVISK
UV EXCISION REPAIR PROTEIN RAD23 HOMOLOG A	K47:	DAFPVAGQK*LIYAGK
	K53:	LIYAGK*ILSDDVPIR
	K78:	NFVVVMVTK*TK
	K122:	EDK*SPSEESAPTTSPESVSGSVSSGSSGR
WERNER HELICASE-INTERACTING PROTEIN 1	K457:	VLITENDVK*EGLQR

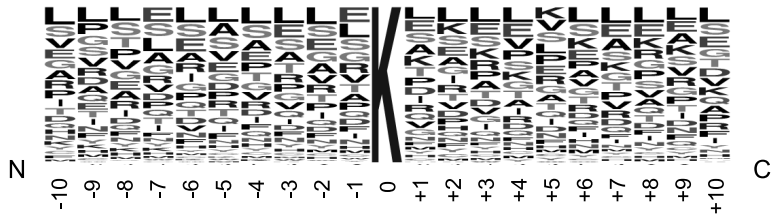
*: ユビキチン化部位

A

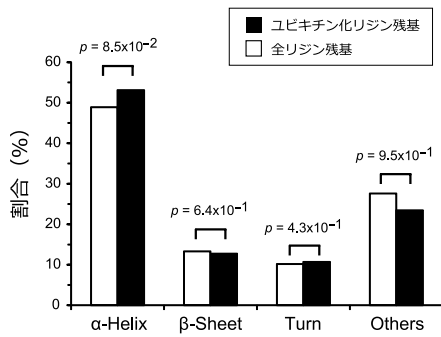
ユビキチン化リジン残基の前後 10 アミノ酸



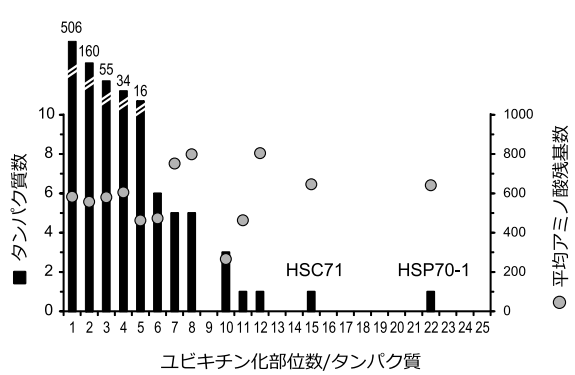
10,000 リジン残基の前後 10 アミノ酸



B



C



D

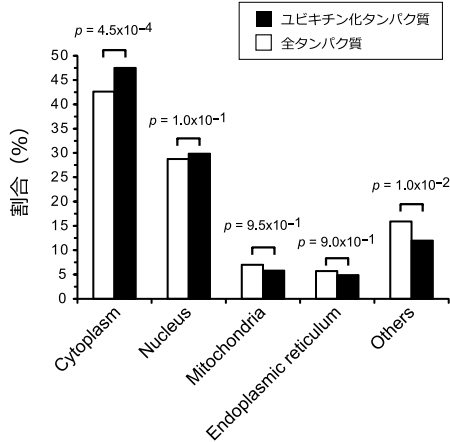
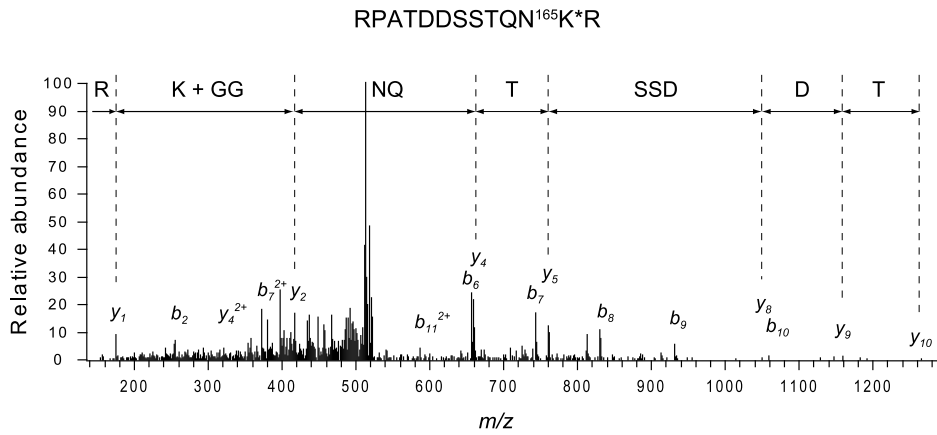


図4 本同定法により同定されたユビキチン化部位のバイオインフォマティクス解析 (A, B) ユビキチン化部位の一次構造(A)および二次構造解析(B). (C) ユビキチン化タンパク質内のユビキチン化部位数. (D) ユビキチン化タンパク質の細胞内局在.

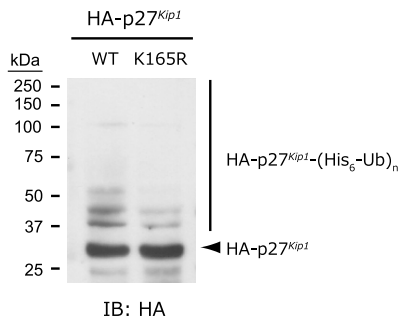
の機能調節に関与しているのかもしれない。さらに、Gene Ontology (GO) slim からユビキチン化タンパク質情報を抽出して、各機能分類を行った。アノテーションが付

いていたユビキチン化タンパク質と、GO slimに登録されている全タンパク質を比較したところ、ユビキチン化タンパク質の細胞内局在では、細胞質に局在する割合が、他の

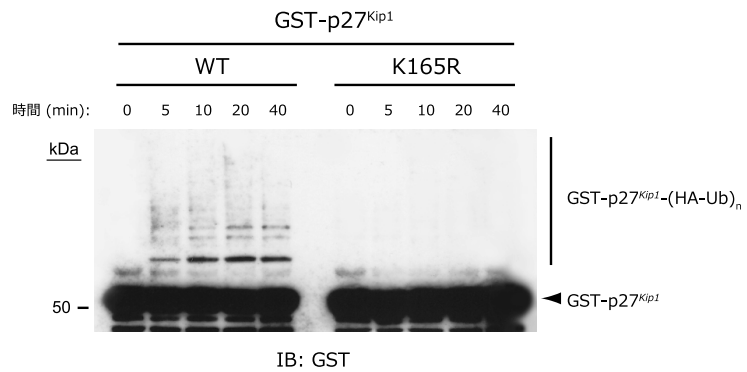
A



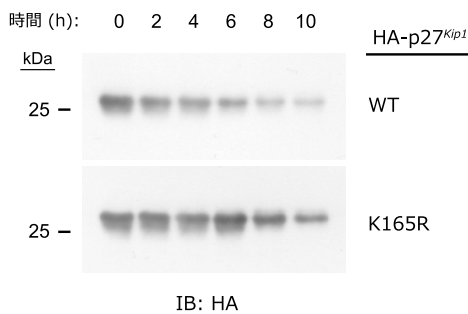
B



C



D



E

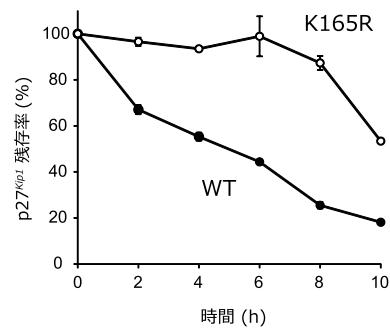


図5 p27^{Kip1} K165 のユビキチン化部位の検証

(A) p27^{Kip1} のユビキチン化ペプチドのマスマスペクトル。

(B, C) p27^{Kip1} K165R 変異による *in vivo* (B) および *in vitro* (C) でのユビキチン化能の低下。

(D) シクロヘキシミド存在下での p27^{Kip1} K165R 変異の分解速度解析。

(E) (D) の解析結果を定量化した。

場所に比べ若干高いことが判明した(図4D)。これは多くのユビキチン化タンパク質が、細胞質で分解されることを反映しているのかもしれない。

p27^{Kip1}の主要なユビキチン化部位の決定

p27^{Kip1}は細胞増殖に関してブレーキとして作用するサイクリン依存的キナーゼ(CDK)阻害分子の一つであり、細胞増殖およびがんの悪性度との関係において重要な細胞周期制御因子である。今回、われわれの網羅的解析から、この分子のユビキチン化部位(K165)を同定することができた(図5A)。そこで、本法により同定されたユビキチン化部位の生物学的意義を調べるために、このリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体(K165R)p27^{Kip1}を複製して、ユビキチン化能や分解速度変化を野生型p27^{Kip1}と比較した。K165R変異体では、野生型p27^{Kip1}に比べ、*in vivo*および*in vitro*でのユビキチン化能が低下していた(図5B, C)。さらに、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下での変異型と野生型p27^{Kip1}の半減期を調べると、p27^{Kip1}のK165R変異により細胞内での分解速度の遅延が認められた(図5D, E)。以上より、本同定法によって得られたp27^{Kip1}の165番目のリジン残基は、ユビキチン化依存的分解のために主要なリジン残基であることが証明された。

おわりに

本同定法は、これまでの方法に比べ、ユビキチン化修飾部位を効率よく検出できる方法であると思われる。そこで、他のユビキチン様タンパク質であるNEDD8へ応用できるかどうか検証を試みた。しかし、K0-NEDD8が、細胞内のNEDD8化反応に使われることはなかった。これは変異導入によりNEDD8の立体構造が大きく変化したためであると考えている。もし、NEDD8以外のユビキチン様タンパク質の中で変異導入による構造変化が少なく、かつ反応系に供することができるものがあれば、本同定法を適用することで、その修飾部位同定数の大幅な上昇が期待できる。

今回、紹介した方法と同時期に、他のグループから抗ジグリシン化リジン抗体を使ってユビキチン化部位の大規模かつ詳細な報告がなされた^{17,18)}。これらと合わせると、リン酸化程ではないが、飛躍的にユビキチン化部位の情報が蓄積されたことになる。今後は、さまざまな条件下での修飾部位の経時変化解析が行われることになると予想される。

今後のユビキチン研究の重要な課題の一つは、大規模解析により得られたユビキチン化部位の生物学的意義を明らかにすることである。そのためにはポリユビキチン化とモノユビキチン化を区別しなければならず、なおかつポリユ

ビキチン化の場合、ユビキチン鎖のパターンの識別も必要となる。今回、われわれが開発した同定法は、効率よくかつ網羅的にユビキチン化部位を同定することはできるが、その同定部位がポリまたはモノユビキチン化されているかどうか区別することはできない。将来、これらを簡便に区別できるような画期的な新方法が開発されることで、標的タンパク質へのユビキチン化修飾の理解がより一層深まることを期待したい。

文 献

- 1) Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479.
- 2) Goldknopf, I.L. & Busch, H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 864-868.
- 3) Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S.P. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 921-926.
- 4) Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., & Nakayama, K.I. (2005) *Proteomics*, **5**, 4145-4151.
- 5) Vasilescu, J., Smith, J.C., Ethier, M., & Figeys, D. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 2192-2200.
- 6) Tan, F., Lu, L., Cai, Y., Wang, J., Xie, Y., Wang, L., Gong, Y., Xu, B.E., Wu, J., Luo, Y., Qiang, B., Yuan, J., Sun, X., & Peng, X. (2008) *Proteomics*, **8**, 2885-2896.
- 7) Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P., & Rodriguez, M.S. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 1250-1258.
- 8) Shi, Y., Chan, D.W., Jung, S.Y., Malovannaya, A., Wang, Y., & Qin, J. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M110 002089.
- 9) Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., & Kaiser, P. (2006) *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 737-748.
- 10) Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., & Kaiser, P. (2008) *J. Proteome Res.*, **7**, 4566-4576.
- 11) Danielsen, J.M., Sylvestersen, K.B., Bekker-Jensen, S., Szklarczyk, D., Poulsen, J.W., Horn, H., Jensen, L.J., Mailand, N., & Nielsen, M.L. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M110 003590.
- 12) Xu, G., Paige, J.S., & Jaffrey, S.R. (2010) *Nat. Biotechnol.*, **28**, 868-873.
- 13) Nielsen, M.L., Vermeulen, M., Bonaldi, T., Cox, J., Moroder, L., & Mann, M. (2008) *Nat. Methods*, **5**, 459-460.
- 14) Oshikawa, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., & Nakayama, K. I. (2012) *J. Proteome Res.*, **11**, 796-807.
- 15) Ziv, I., Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Erpapazoglou, Z., Leon, S., Pantazopoulou, M., Kim, W., Gygi, S.P., Haguenuer-Tsapis, R., Reis, N., Glickman, M.H., & Kleifeld, O. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111 009753.
- 16) Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., & Iwai, K. (2006) *EMBO J.*, **25**, 4877-4887.
- 17) Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., & Choudhary, C. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111 013284.
- 18) Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., & Gygi, S.P. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 325-340.