

Management System、LIMS):

PF に送付された試料は厳重に管理された試料保管室の -140°C のフリーザーに保管した。実験に使用する場合は必ず「試料請求申請書」に日時、試料の種類、二次匿名化番号、使用量を記入して、総務部門長、生体試料分析部門長、施設長の許可(押印)を得た上で使用するシステムを構築した。これにより、試料の残量が正確に把握でき、試料の厳重な管理が可能になる。なお、使用済みの試料は滅菌処理後廃棄する。また、フリーザー等の保守管理のために非常用電源確保および委託業者による点検を行うこととした。二次匿名化された試料の情報はLIMSで確認できる。なお、LIMSは、指紋認証によってログインする特定パソコンでのみ閲覧可能である。

4) 機器研修:

平成16年度4月より、実際に研究員がPFに入所したので、機器納入業者による各種分析機器類の標準仕様および標準サンプルを用いる以下の研修を行った。(1) Cell Sorter FACS Aria (BD)、(2) LCQ-Deca-XP (Thermo ELECTRON)、(3) Laser Microdissection system (Leica)、(4) Ettan DIGE/Spot Handling Workstation (Amasham)、(5) MALDI-TOF/TOF-ABI-4700 (ABI)、(6) AXIMA-QIT (島津)、(7) ABI-Q-Star XL (ABI)、(8) Vision-PF system (SCX、Avidin affinity)、(9) nano-LC/Probot system (LC-Packings)、(10) SELDI-TOF (Ciphergen)、(11) Ultraflex TOF/TOF (Bruker)、(12) ABI PKSM 7900 HTR-PF (ABI)、(13) GeneChip Fluidics Station (Affymetrix)、(14) Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent)、(15) Mascot/HiSpec (Hitachi)等。一応の基準はクリアしたが、高性能を発揮するためには特別な調整が必要であることが分かった。

5) 質量分析機器類のPF特別仕様用対策の検討:

通常の測定室レベルでのクリーン度および質量分析機器メーカーより提供された標準仕様であ

ると、PFで要求される高感度、精密かつ高いハイスループット性を満足させることはできない。そのため、以下の対策を行った。

(1) 質量分析測定室の改造:

測定室の空気中に漂うダストをできるだけ除くため、特別仕様のフィルターをエアコンに装着し、室内空気を循環させた。その結果、ダスト($0.3\mu\text{m}$)は従来の約1/10に減少させることができ、質量測定時に妨害するシリコン粒子も低下させることが可能になった。

(2) nano-LC/Q-Star システム:

当初、10台のQ-Starを常時連続フル稼働で測定すると、想定外の種々のトラブルが続出した。そこで、各種パーツを改良品(fused silica tube等)に交換し、nano-LCのトラブルを解消した。またMS本体とnano-LCとのコミュニケーションエラーを解決するために、信号のやり取りを1回(スタート時)にした。これにより、コミュニケーションエラーは解消し、さらに、nano-LCのモニターが可能になったため、何らかの異常があった場合いち早く認知可能になった。

試料を測定するための、SOPを策定し、試料測定前と測定後に50 fmolのBSAトリプシン断片を測定し、その配列カバー率が40%以上の値を示した時のみ試料の測定値として採用した。これにより、Q-Star機種同士の誤差および測定者による誤差は殆ど解消することができた。なお、一部のnano-LCはsplit flow typeから、より信頼性の高いdirect flow typeに交換した。また、Q-Starの恒常的な性能確保のため、常時7-8台を稼働させ、2-3台を保守・点検・整備に回すことにした。

(3) nano-LC/Probot/ABI-4700-Proteomics Analyzer system (ABI-4700):

nano-LCから溶出画分をMALDI-金属プレートに分注する装置 Probot system(8台、LC-Packings製)は6枚の金属プレートに連続して正確に分注することはできなかった。その原因を探ったところ、プレートを支えるステージに基本的な欠陥が見出された(修理・修正不可能)。そこで、日本のメーカー(バイ

オロジカ)に特注したメラニン樹脂製(削り成型)のステージを使用した結果、ほぼ正確に6枚の金属プレートに連続注入可能になった。nano-LC に関しては、peek tube から低吸着の peek-coated fused silica tube に変更することにより、脂溶性の高いペプチドの回収率を6-10倍上げることが可能になった。また、試料をLCで分画する場合は、試料分画前と分画後に、アンジオテンシン断片(5種)を分画し(UVでモニター)、一定の基準を満たした時のみのものを採用した。これにより、機種間および測定者による誤差は殆ど見られなくなった(SOP策定済み)。

ABI-4700-Proteomics Analyzer (ABI-4700)は、内部のハードパラメーター(Time ion selector)を変更し、cICAT ペプチド解析用仕様に設定した。また、質量誤差補正用に6種類のペプチド(Angiotensin I、ACTH(1-7)、ACTH(8-39)、ACTH(7-38)、Des-[Arg¹]-bradykinin)を外部標準として使用し、質量誤差(Δ)を0.1以下にした。ABI-4700を常時4台稼働させ、1台は保守・点検・整備に回すことにした。

(4)LCQ Deca XP system(以下、LCQとする):

空気中のダスト(シリコンポリマー)の影響を受けやすい本機種に特製のガラスフードを装着し、さらに窒素ガスパージシステムにより、測定感度を大幅に向上させた。また、1台は低分子化合物解析用にも使用できるように設定した。

6)統合データベースシステムの構築:

(1)統合データベースシステムの稼働

平成17年3月現在、PFで稼働している統合データベースシステム:HiSpec(質量分析計の測定データをサーバに転送し、各種自動解析処理を行って、最終的に得られたたんぱく質同定結果・比較定量結果を統合データベースに登録する一体化システム)の概要を図42に示す。

本システムは、①ピークリスト生成等の前処理部分(Search Manager)、②たんぱく質同定エンジン(Mascot サーバ)、③同定・比較定量結果の後処理

部分(Results Viewer)、④たんぱく質同定・比較定量結果が格納される、たんぱく質発現データベース(統合データベース)から構成される。以下、個々の機能について得られた成果を述べる。

(2)Search Manager 機能

Search Manager によって、データベース構築用の質量分析計:ABI-4700、Q-Star、LCQで測定された生データのサーバへの自動転送が安定稼働できた。また、Search Managerのユーザインターフェイスを新たに構築し、研究者(ユーザ)が個別に測定データをサーバに登録し、個々の解析を実行することも可能にした(半自動処理)。ABI-4700は機器付属PC上の専用データベースで測定データを管理する。ユーザは機器番号、プロジェクト名、スポットセット名、MS及びMS/MSのRun番号を順次指定し、測定データを登録できるシステムにした。一方Q-StarおよびLCQについては、測定データが単一ファイルで管理される。ユーザは測定データの所在を個々のPC上あるいはサーバ共有領域上のデータファイルから選択し、ディレクトリを追うことによって測定データを登録可能にした。サーバへ転送された各測定データの解析処理法は、サンプルの属性やICAT処理の有無等の実験情報をLIMSサーバとの連携により、自動的に決定できるように設定した。

たんぱく質同定処理のためのMS/MSスペクトルのピークリスト生成と、比較定量処理のためのMSスペクトルのピークリスト生成(ICATサンプルの場合)の自動実行が安定稼働可能となった。また、ピークリスト生成のためのパラメータをユーザ側で設定するユーザインターフェイスを新たに構築し、ABI-4700におけるMS Peak Filter、MS/MS Peak Filterの各パラメータ、Q-StarにおけるDefault precursor charge statesやIDA survey scan centroid parameter等のパラメータのマニュアル設定を可能とした。

ICATサンプルのABI-4700及びQ-Starによる測定データに対し、Mascotによる同定処理に加えて、

ペプチドレベル・たんぱく質レベルの比較定量処理を可能にする自動解析処理を安定稼働させた。具体的には、まず MS スペクトルピークリストから ICAT ペア(それぞれ ICAT -L 鎖試薬と ICAT- H 鎖試薬でラベルされた同一ペプチド由来の親イオンのペア)を自動探索する。さらに、全ての親イオンについて同位体イオンまで含めたピーク面積(クラスタ面積)を求め、親イオンの Mass、価数、Retention time (ABI-4700 の場合は Spot 番号)などの ICAT 関連情報と共に、MS/MSピークリストファイルに情報付加した。その結果、Mascot 処理後のペプチド・たんぱく質同定結果と、ICAT ペアの比較定量結果がリンクし、後述の Results Viewer による表示が可能となった。

Mascot 同定エンジンは、PC クラスタ上に 10 CPU 分インストールしており、高速検索が可能な状態で安定稼働している。Search Manager からの自動投入に加え、各質量分析計の制御 PC からの Mascot Daemon 投入や、研究者 PC からのピークリストの個別投入も可能であり、各 PC において Web 上で結果を確認することが可能になった。

Mascot 検索を実行するための参照たんぱく質配列データベースとしては、NCBI nr、Swiss Prot、MSDB、RefSeq などが標準で使用可能になった。これらのデータベースは、自動アップデート機能により随時最新バージョンにアップデートされている。なお、参照データベースとしては、上記のもの以外にも、定められた形式に変換することにより自由に登録することができ、ユーザの要望に応じて対応できる。

(3) Results Viewer 機能

Search Manager によって生成された Mascot によるたんぱく質同定結果をメインサーバ上のたんぱく質発現データベース(統合データベース)に自動的に転送・登録する自動アップロード機能を、常時安定稼働させた。Results Viewer は、Mascot 同定結果のみならず、同定されたペプチドの ICAT 定量比やたんぱく質レベルでの平均 ICAT 定量比を自動計算して表示する機能を有す。なお、ICAT 比較定量計算は、

現在 ABI-4700 及び Q-Star の ICAT サンプル測定データに対応した。

Mascot 出力結果の中から統合データベースに登録する内容を自動フィルタリングする条件(ペプチドスコアの下限值、たんぱく質スコアの下限值、ペプチド鎖長の下限值、Viewer に表示されるたんぱく質スコアの下限值等)を個別に設定する場合は、Results Viewer 中の Configuration 画面によって対応できるように設定した。

PF で扱う血清等のヒトのサンプルは、2 サンプルを ICAT 処理して混合した後トリプシン処理を行い、複数種類のクロマトグラフィーによって数十フラクションに分画し、それぞれのフラクションを独立に質量分析計で測定する。その結果得られる数十の Mascot 同定結果・ICAT 比較定量結果は、フラクションごとに検討するだけでは、サンプルレベルでの全体像を把握することが困難である。今回構築された PF の統合データベースシステムにおいては、Results Viewer の Combine Mascot Results 機能を利用することにより、同一のサンプル由来の Mascot 結果を統合・集約して Mascot スコア等も自動再計算可能になった。その結果、元々のサンプルに含まれていたペプチド・たんぱく質の情報を統合的に一覧表示することができ、その後の比較データ解析が飛躍的に容易になった。なお、このコンバイン機能を SCX50 画分用等の大量のデータに対してローカルな PC 上で実行すると、速度低下やメモリ不足による動作不良が現れるおそれがあるため、新たにサーバ側でコンバイン処理を行うための Web インターフェイスを開発した。

Results Viewer のメイン画面である Manually Filter & Annotate 画面については、ユーザが様々な編集処理を大きな負荷なく実行できるための改良・利便性向上を図った。

本メイン画面を構成する①Protein Identified 画面、②Peptide Details 画面、③Spectrum Details 画面に関して、以下の項目について表示が可能となった。

①Protein Identified 画面

- ・ **たんぱく質の属性情報**: GI 番号、RefSeq ID、LocusLink ID、SwissProt ID、たんぱく質名 (Description)、分子量、関連たんぱく質 (Associated Proteins) 一覧
- ・ **Mascot 関連情報**: たんぱく質スコア、ヒットペプチド数、平均ペプチドスコア、最大ペプチドスコア、ペプチドカバー率
- ・ **ICAT 関連情報**: ICAT ラベル情報、平均 ICAT 定量比と偏差、システイン残基数(たんぱく質中の全体数およびヒットしたペプチドに含まれる数)

②Peptide Details 画面

- ・ **ペプチドの属性情報**: 親イオンピーク強度、リテンションタイム(又は MALDI スポット番号)、ペプチド分子量
- ・ **Mascot 関連情報**: ペプチドスコア、1st ランクペプチドのアミノ酸配列、2nd ランク以下のペプチドのアミノ酸配列、Miss cleavage 数、修飾の有無
- ・ **ICAT 関連情報**: ICAT ラベル情報、ペプチド単位の ICAT 定量比

③Spectrum Details 画面

- ・ **MS/MS スペクトル情報**: 離散化されたスペクトル、マッチしたフラグメント配列のリスト
- ・ **フラグメントイオン情報**: ペプチドの理論フラグメント数、マッチしたフラグメント数、ペプチド配列同定に利用されたピーク強度比率、各種イオン(a、b、y)シリーズのピーク強度比率

Results Viewer の Proteins Identified 画面に表示されるたんぱく質リストに対して、以下の操作が可能となった。

①Filter

指定された条件に該当するたんぱく質レコードを表示画面から除去する機能。数値による条件設定、文字列による条件設定が可能(例: Score が 30 未満のたんぱく質の除去、Description に "unknown" が含まれるたんぱく質の除去、等々)。

②Roll up

同定ペプチドを共有する関連たんぱく質

(Associated Proteins) を一つに集約する機能

③Auto Roll up

Associated Proteins の関係にあるたんぱく質の中から、代表する一つのたんぱく質のみを画面に残し、残りを全てフィルタアウトする機能。上記「Roll up」が個別のたんぱく質を対象とするのに対し、本機能は Protein Identified 画面にある全てのたんぱく質が、ワンクリックで一度に Roll up される。

④Remove

選択したたんぱく質を表示画面から除去する機能。除去理由をコメント化してデータベースに残すことが可能。

⑤Undo

Filter、Roll up、Auto Roll up、Remove して画面から除去したたんぱく質を再表示させる機能。エクスポローラ様表示により、再表示させるべきたんぱく質リストの判断が容易になった。

⑥Annotate

各たんぱく質にマニュアルでアノテーションを付与してデータベースに残す機能。

⑦Save

表示されているたんぱく質・ペプチドのデータをデータベースに保存する機能。編集中のデータを仮保存しておくことも可能。

⑧Recall

保存されたデータを呼び出す機能。

⑨Report

Protein Identified 画面、Peptide Details 画面の編集結果を、エクセルファイル形式で保存する機能。

これらの操作がたんぱく質・ペプチド表示画面において自在に実施できるようになったことにより、たんぱく質同定・比較定量結果のユーザによる整理、解釈に要する作業の利便性が飛躍的に向上した。

7) 情報セキュリティシステムの構築

PF では、研究協力機関からの試料についての解析を行う。その試料は、試料管理システムに登録される他に、それら試料についての臨床情報や個人

情報がシステム上に(匿名化され)登録される。そのような個人情報を保護するための、システム構成から見た取組みについて以下に述べる。

(1)情報セキュリティネットワーク

図 43 は、PF におけるシステムを、セキュリティの観点から領域分けした時の概念図である (なお、詳細情報はセキュリティ保護のため割愛した)。

最大の特徴はシステム全体が四相構造、すなわち、A.外部エリア、B.内部エリア 1、C.内部エリア 2、D.内部エリア 3 の 4 つに分かれているということである。

通常、外部との境界には Firewall を設置し、セキュリティに配慮する。PF でも、①に示すように、そのような Firewall を導入し、その Firewall の管理下に②メールサーバーが設置されている。

①に保護された領域のすぐ後ろに配置されているのが、③研究室である。ここが主として B.内部エリア 1 となる。このエリアで、コンピュータ的に可能な作業としては、メールの閲覧や事務処理、標準資料等を用いた条件検討等に限定される。よって、研究協力機関より持ち込まれたサンプルに関する一切の情報は、このエリアでは原則として扱うことは出来ない。

B.内部エリア 1 と C.内部エリア 2 の境界に位置するのが、④Firewall-2 である。この Firewall 導入が最大の特徴であり、PF におけるセキュリティの要となる。基本的には④Firewall-2 により、その背後に位置する C.内部エリア 2 へのアクセスは一切不可能となっている。

C.内部エリア 2 には、⑤実験室、⑥分析室、⑦情報処理端末がネットワーク的に配置されている。このエリアでは、研究活動の全てが行われる。ここで生み出される研究結果は、専用の端末(⑦情報処理端末)で処理が行われる。

上記 3 つのエリアとは別のエリアとして、D.内部エリア 3 がある。このエリアには、個人情報管理室が位置する。このエリアは基本的に他のいかなるネットワ

ークとも接続されておらず、また、個人情報管理者が厳重に管理する。

(2)情報セキュリティの確保

上記情報セキュリティネットワークの元、下記の運用でセキュリティを厳重に確保している。

C.内部エリア 2 では、LIMS 端末等に指紋認証装置を設置し、権限を有する研究者のみが入力・操作可能としている。またここで生み出される研究結果は、専用の端末(⑦情報処理端末)からのみ操作可能としている。これら端末には指紋認証装置が設置されており、確実な本人確認により権限を持った管理者・研究者のみが結果の参照、確定等の処理を行えるようにしている。

D.内部エリア 3 の個人情報管理室は他のいかなるネットワークとも接続されておらず、個人情報管理者が厳重に管理する。研究協力機関から持ち込まれた試料および臨床情報はこのエリアに隔離管理する。研究協力機関から提供された試料に関する情報や臨床情報のうち、必要最小限で匿名化された情報のみが C.内部エリア 2 に対して登録され、厳重な管理下において利用されることとなる。

さらに、研究協力機関から提供された情報、プロテオームファクトリー施設内で得られたすべての情報は C.内部エリア 2、D.内部エリア 3 内のサーバに保持されるとともに、その複製を別媒体に2部作成し、プロテオームファクトリー施設内の個人情報管理室およびヒューマンサイエンス振興財団内の耐火金庫に厳重に保管する。これによって装置の故障や火事・地震等の災害が発生しても貴重なデータの損失を防ぐことができる。

8) 血清主要たんぱく質の除去法の検討:

ヒト血清中のたんぱく質濃度は約 80 mg/ml である。しかし、そのうち Albumin (54%)、IgG (17%)、 α 1-Antitrypsin(3.8%)、IgA(3.4%)、Transferrin (3.3%)、Haptoglobin (2.9%) などが主要たんぱく質として存在し、それに続き、補体系たんぱく質、線溶・凝固系たんぱく質、リポたん

ばく質、プロテアーゼインヒビターなどが存在し、残りの 1%に多数の低濃度たんぱく質があるとされている(図 44)。また、血清中のたんぱく質の濃度範囲は非常に広く $1-10^{12}$ range に達する。従って、血清中のたんぱく質を全て、質量分析装置で解析するためには、多量に存在する血清たんぱく質と微量たんぱく質を選択的に分離した上で、各々を解析する必要がある。

そこで、Albumin、IgG、IgA、 α 1-Antitrypsin、Transferrin、Haptoglobin の 6 種を結合できるアジレント社抗体カラムを用いて、ヒト標準血清(市販)から前述の血清主要たんぱく質の除去を試みた。すなわち、抗体カラム未処理血清と抗体カラム処理血清を 2 次元電気泳動(1次元:等電点電気泳動、2次元:SDS-PAGE、SyprpRuby 染色)を行い、両者を比較すると、アジレント抗体カラムにより、6 種の主要たんぱく質が除去され、それ以外のたんぱく質のスポット数が増加したことが確認された(Data not shown)。さらに、抗体カラム除去血清の 2 次元電気泳動の各スポット(図 45)を Ettan Spot Handling Workstation(Amersham)で切りぬき、トリプシン消化を行い、そのペプチド断片を Q-Star で解析し、各スポット(#1~#94)のたんぱく質を、Swiss Prot データベースを用い Mascot 同定エンジンにより検索した。結果を表 14 に示す。94 個のスポットから、 α 2-Macroglobulin、C1r、C1s、C3、C4、Factor B、Factor H、Apolipoprotein A1、 α 1-Antichymotrypsin、Serum amyloid P-component、 β -1B-glycoprotein、Kininogen、Anti-thrombin III など 約 50 種の血清たんぱく質が同定された。この中には比較的濃度である補体制御たんぱく質の一種、Factor I (20 – 50 μ g/ml) が同定されているので、アジレント抗体カラム処理により、より微量な血清たんぱく質が濃縮されたものとする。なお、ラダーで存在するスポットは糖鎖が異なる同種のたんぱく質と考えられる。以上のことから、アジレント抗体カラム処理は血清微量たんぱく質の分取に有効であり、同抗体カラム処理血清を

後述する cICAT(同位体標識)法や SELDI-TOF 法で解析することにした。

9) BSA を用いた Cleavable ICAT(cICAT)法の検討:

同位体標識試薬の一つである Cleavable ICAT (cICAT) 試薬(ABI) は、Cystein 残基に特異的に反応する ^{13}C -chain (heavy chain (H 鎖)) または ^{12}C -chain (light chain)(L 鎖))を含むアルキル化試薬である。また、cICAT 試薬はビオチンタグを含むので反応したペプチド断片は簡単にアビジンカラムでアフィニティ精製することができる(図 46)。従って、 ^{13}C -cICAT(heavy-cICAT) (H 鎖)あるいは ^{12}C -cICAT (light-cICAT) (L 鎖)試薬を各々別々にたんぱく質に反応させた後に、cICAT 試薬反応 Cystein 含有ペプチドの質量(H 鎖標識と L 鎖標識で 9 Dalton 差がある)を分析すると、両者の存在比を定量することができる(3)。

そこで、我々は、等量の牛血清アルブミン(BSA)に、cICAT(light、 ^{12}C)と cICAT(heavy、 ^{13}C)試薬を各々別々に標識した後、両者を 1:1 に混合し、トリプシンで消化後、ICAT 反応ペプチドを SCX カラムおよびアビジンカラムで分画し、TFA でビオチンタグをはずした各断片を C18-nano-LC/ Probot で分画し、ABI-4700 (MALDI-/TOF/TOF)を用いて、同定、比較定量を行った。

その結果、BSA トリプシン消化 Cystein 含有ペプチド断片(25 種)のうち、21 種(84%)を同定・比較定量することができた(図 47)。また、各断片の H 鎖標識と L 鎖標識の比率 (H/L)はほぼ 1:1 であり、BSA たんぱく質全体としての比率 (H/L)は 1:0.92 であった。なお、同定・定量できなかった 3 種のペプチド (DVCK、CASIQK、GACLLPK) は、いずれも短い断片であったため、ABI-4700 では検出することが難しかったと思われる。図 48 に BSA のアミノ配列、ICAT 反応断片および cICAT 法による BSA 解析 (ABI-4700 を用いた)の配列カバー率(46%)を示す。以上のことから、cICAT 法はたんぱく質の発現量の

比較定量に優れた方法であると考えた。

10) cICAT 法によるヒト正常血清たんぱく質の解析

濃度範囲が非常に大きくかつ多種類のたんぱく質を含むヒト血清を、cICAT 法により解析した報告は今までに殆どない。そこで、cICAT 試薬をヒト血清に反応させ、どのような種類・濃度の血清たんぱく質が本方法により同定および比較定量可能なのかを検討した。

そこで、アジレント抗体カラム(10 x 100mm)で主要 6 種の血清たんぱく質を除いた等量のヒト標準血清(1mg)に、cICAT(light, ^{12}C)と cICAT(heavy, ^{13}C)試薬を各々別々に標識した後、同様に両者を1:1に混合し、トリプシンで消化後、ICAT 反応ペプチド含有反応液を、BSA の場合と同様に、ABI 社の標準方法により分画した。しかし、BSA と異なり、血清を用いた場合には、TFA 切断後に多量のビオチンが残り、その後の質量分析機器による解析を大きく妨害した。そこで、ICAT 反応ペプチド含有反応液を、まず、SCX カラム(4.6 x 100mm)で脱塩後、ペプチドを溶出(1 分画)し、次に大型アビジンカラム(6.2 x 66.5mm)でビオチン含有 ICAT ペプチドを分取し、その後、TFA 処理でビオチンタグをはずした各断片を、SCX カラム(4.6 x 100mm)で KCl の濃度勾配(0 - 0.5M)で 50 画分に分画した(図 49)。

各画分(合計で 50 画分)を脱塩後、一方は C18-nanoLC system で分画・Probot で金属プレートに分注し、ABI-4700 を用いて解析した(同定、比較定量)。また、一方は C18-nanoLC/Q-Star system で解析した。ペプチド/たんぱく質の同定および H 鎖と L 鎖の比較定量は、検索対象 DB として RefSeq (RefSeq: 主要な生物種に関する、重複がなく正確性や完全性が評価された遺伝子、たんぱく質のリファレンス配列のデータベース)を用い、PF で開発した統合データ同定システム(HiSpec)で解析した。

なお、H鎖標識とL鎖標識は、等量反応させたので(前述)、H鎖標識/L鎖標識比(Ratio)は理論的には1になると考えられる。結果を表 15 に示す。

すなわち、総合 Score の高い同定たんぱく質順に順位(Rank、Q-Star or ABI-4700)をつけ、その一般名(Description)、GI 番号、分子量(Mass)、H鎖およびL鎖別 Score 値、H鎖/L鎖比(Ratio、比較定量値)、Cys 残基数(Total Cys)、実際に同定したH鎖標識およびL鎖標識反応トリプシン消化断片数(NRPepCnt(H、L))、および配列カバー率(Protein Coverage (H、L))を纏めたものである。

その結果、本画分(SCX50 画分)を ABI-4700 で解析し、Rank 1 で Peptide での Mascot score が 30 以上のものを選択すると、158 種類のたんぱく質の同定と比較定量が可能であり、Peptide Score を 20 以上とすると、約 286 種類が同定・定量された。一方、同様に SCX50 画分を C18-nanoLC/Q-Star system で解析した場合は、Rank 1、Peptide Score が 20 以上のものを選択すると、119 種類のたんぱく質が同定および定量が可能であった。なお、ここでいう「同定」とは、Mascot によって基準以上のスコアでヒットしたことを意味しており、偽陽性の結果の排除等の精査を経た最終的な同定数については、別途検討する必要がある。

また、殆どのたんぱく質のH鎖標識/L鎖標識比(比較定量値)は約1であったので、cICAT 法による比較定量法は基本的には満足するものと考えられた(後述)。しかし、一部のものは Score が低いときは、定量値が1より大きくずれるものがあった。このような場合は、データを詳細に再検討すると、他のペプチドがスペクトル上で重複している場合が多かった。

ABI-4700 でのトップ 119 種類と Q-Star でのトップ 119 種類を比較検討したところ、両者の共通なたんぱく質は 80 種類であり、Q-Star でのみ同定・定量されたものが 39 種類、ABI-4700 でのみ同定・定量されたものが 39 種類であり、どちらか一つでも同定・定量されたものは合計 158 種類であった(図 50A)。一方、ABI-4700 および Q-Star で Score が 20 以上のものを選択すると、両者で共通なものは 94 種類、Q-Star でのみ同定されたものが 25 種類、ABI-4700 でのみ同定されたものが 192 種類であり、

どちらか一つでも同定されたものは合計 311 種類であった(図 50B)。

図 51、52 は、それぞれ Q-Star および ABI-4700 のランク(#1-119) 種類までのたんぱく質種類のカテゴリー分類を示す。いずれの場合も、上位は、すでに血清中に存在が報告されている、補体たんぱく質系、線溶・凝固たんぱく質系、血清糖たんぱく質系、結合たんぱく質系、リポたんぱく質系、接着たんぱく質系、プロテアーゼ系、プロテアーゼインヒビター系、キニン系等などであった。また、Q-Star と ABI-4700 ではカテゴリー分類(上位 119 種類に関して)に、特に大きな差はなかった。

一方、ABI-4700 のランク(#1~119)と、ランク(#120 ~200)、ランク(#201~286)までのカテゴリー分類を比較すると(Data not shown)、ランクがさがるとつれて、補体、線溶・凝固系のたんぱく質は減っていく、その代わり、おそらくは細胞内からリークしたと思われるより微量な各種細胞質構造たんぱく質、プロテインカイネース系、プロテインホスファターゼ系、核内受容体関連たんぱく質系、機能不明たんぱく質等が増加する傾向が観察された。

さて、cICAT 試薬はたんぱく質中の Cys 残基に特異的に反応するとされる。従って、たんぱく質のモル濃度が高く、かつ Cys 含有ペプチドが多いほど良く反応し、同定の Score 値は高くなると考えられる。すなわち、濃度が高くて Cys 含有ペプチドが少なければ Score 値は低く、逆に濃度が低くても Cys 含有ペプチドが多ければ、Score 値は高くなる。そこで、表 15 の中から、血中濃度がすでに測定されている補体系たんぱく質と線溶・凝固系たんぱく質を選択(表 16)、各たんぱく質(H鎖標識+L鎖標識)の同定 Score (S)と、その血清モル濃度(C (μM))およびその Cys 残基数(N)との関係を調べた(図 53、54)。その結果、Score (S)を Y 軸に、モル濃度(C) × Cys 残基数(N):(Cys モル濃度)を X 軸のプロットしたところ、ABI-4700 でも Q-Star を用いた場合でも、Y と X 値は正の相関が見られた(ABI-4700: $Y = 11.6 X + 263$, $R^2 = 0.74$ 、図 53)、Q-Star: $Y = 6.86 X +$

172、 $R^2 = 0.69$ 、図 54)。このことは上述の推論を支持するものである。

11) Spike sample(Lactoglobulin)を用いた ICAT 比較定量解析

前述のように、殆どの血清中のたんぱく質のH鎖/L鎖比(比較定量値)は約1であったので、cICAT法による比較定量法は基本的には満足するものと考えられる。このことをさらに確実にするために、血清中に既知量のSpike sample (Lactoglobulin)の量比を2~40倍に変えて添加したサンプルを、それぞれH鎖試薬、L鎖試薬で標識し、比較定量解析を行った(HiSpec ICAT比較定量ソフトを使用)。その結果、血清たんぱく質は前述と同様に殆どH鎖とL鎖の量比(H/L鎖比)は約1であったが、SpikeしたLactoglobulinの同定ICATペプチド(WENDECAQK)の量比は、2~20倍までのスパイク比と直線関係であり、ほぼ正確なICAT比較定量結果を示した(表17、図55)。このことは、cICAT法はスペクトルの重なりやIntensityの弱いものを除けば、2~20倍の発現差であれば正確に比較定量が可能であることを示すと考える。

本年度は、施設内の倫理審査委員会、個人情報保護のための匿名化システム、試料機器管理システム(LIMS)、情報セキュリティシステムを構築することで、研究協力機関からの臨床試料の受け入れ体制を整えたと考える。また、ヒト標準血清を用いて、同位体標識法(cICAT法)、前処理法、質量分析法、大量たんぱく質同定法を含む一連の解析システムを検討した結果、本システムが血清疾患関連たんぱく質(トップ#1~100種類)解析に有効な方法であると考えた。今後はさらに、ハイスループット性の高く、感度が高い解析システムを完成させ、研究協力機関より提供される患者臨床試料(血清)の解析に望みたい。なお、cICAT試薬は、血清中のたんぱく質中のCys残基数(モル濃度)に比例して反応することが確認された。従って、微量成分でありCys残基数が少ないたんぱく質は、そのままでは同定・定量が困難であ

ると予想されるので、限外ろ過法などの手段で微量成分を濃縮した上で、cICAT 法を用いた微量成分の解析研究を行いたい。また、今後、他の同位体標識試薬や iTRAQ 試薬等の新しい解析技術も必要であれば検討する。

E. 結論

本年度の疾患関連たんぱく質解析研究事業では、以下にまとめたように、我が国の主要疾患に対する疾患プロテオミクス研究を推進するために必要不可欠な基礎的知見・情報の集積を図る得ると共に、ソフト面とハード面からその研究基盤を整備し、十二分に基盤技術を確立した。

- ① 安定同位体標識法、及び linearITMS/FT-ICRMS を用いた定量的定性的糖鎖プロファイリング法を開発し、SLE モデルマウス腎臓と正常マウス腎臓に発現する糖たんぱく質糖鎖の差異解析を行った。その結果、両マウスにおける糖鎖結合量は異なっていることが明らかとなった。また、2D DIGE によるたんぱく質発現解析を行い、糖鎖生合成に関わる α -glucosidase II の発現が低下していることを見出した。以上の結果から、疾患モデルマウスの腎臓では、糖たんぱく質糖鎖の生合成過程に何からの変化が生じていることが示唆された。
- ② 効果的かつ効率的な疾患プロテオーム解析基盤を確立する準備を始め、さらにたんぱく質の機能解析とその有効活用法の開発に関して、ファージディスプレイ法や半導体量子ドット法を駆使し、重要な知見を得た。
- ③ 16 年度の研究により、国立循環器病センターでは広範な循環器疾患における疾患関連たんぱく質探索研究を実施するため、必要となる倫理的、研究的基盤を確立できた。
- ④ オーフアン GPCR である FM-3/GPR66、
- ⑤ FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして NMU の他に 36 アミノ酸残基からなる新規生理活性ペプチド、NMS を単離・同定した。NMS は概日リズムの発振機構や摂食調節において重要な機能を担っている可能性が示唆された。
- ⑥ ショットガン法によるプロテオーム解析におけるプロファイリングに、ペプチドーム解析で開発してきた自動化リニア2次元 HPLC が有効であることが確認できた。分離充填剤や溶媒などの選択と至適化により、貴重なヒト試料の解析に適した分離システムの構築が可能である。一方、組織たんぱく質の抽出から消化物調製までの段階でたんぱく質特有の均一処理を困難とする問題点が多数見出され、少量循環器系組織から出発したたんぱく質を包含、解析できる処理方法の設定を17年度に行う。
- ⑦ 倫理委員会での承認を受け2005年2月までに、10名のパーキンソン病患者血漿をプロテオームファクトリーに供給した。
- ⑧ ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者:740万人、潜在的には推計1620万人と患者数が多い上にさらに増加傾向にあること、患者の90%以上を占める2型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、たんぱく質の網羅的同定を行い、たんぱく質プロファイルと様々な臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて多変量解析することによって、遺伝子素因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療に貢献することが期待される。
- ⑨ 小児の腎疾患の病態説明・薬物標的因子の探

素において患者由来の血清のプロテオーム解析は非常に有望と考えられる。しかしながら、解析結果のデータベースを作製し、疾患関連因子の探索を行うには、それぞれの症例において少なくとも10例の解析を必要とする。現在、ネフローゼ症候群においては、データベース作製・関連因子の探索が可能となる症例数が集まってきているが、今後他の疾患についても症例数を増やす必要がある。

- ⑨ 加齢関連疾患(痴呆・骨粗鬆症・褥創)の臨床検体のプロテオームファクトリーへの提供体制の整備を完了した。研究所におけるたんぱく質・ペプチド分析態勢を整備し、尿中たんぱく質の分析を試みた。続発性骨粗鬆症の主因の一つである甲状腺機能亢進状態に着目して行った基礎的検討では、骨芽細胞におけるアデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路の活性化が p38 MAP キナーゼ活性化の抑制を介して、T3によるオステオカルシン産生促進を抑制的に制御している可能性が強く示唆された。
- ⑩ 倫理的問題の解決はいくつかの疾患で終わり、保存体制が整った。今後疾患範囲を広げていく。臨床データの保存については、その範囲を検討した。
- ⑪ 尿の前処理、及び、分離法の確立により、個人尿の尿(~50mL)を用いてペプチド・たんぱく質のプロファイルを取得することが可能となった。また、糖たんぱく質糖鎖やリン酸化等の翻訳後修飾解析について興味ある結果を得ることができ、疾患マーカー探索に応用できるものと考えられる。ナノ ESI による精密質量測定法を開発し、LC/ESI-MS に適用した。それにより、従来困難であった LC/ESI-MS における精密質量測定が可能となり、たんぱく質の同定確度の向上や未知翻訳後修飾の構造解析に威力を発揮するものと期待される。MS や MS/MS スペクトルで観測される同位体分布を理論同位体分布と自動で照合できる新しいソフトウェア“Isotopica”を開発した。

スペクトルのバリデーションのみならず、量変動解析に用いられている種々の安定同位体標識の含有率を生データから直接算出することが可能になった。

- ⑫ 今回の研究で確立された方法を用いることにより、癌のプロテオーム解析のデータは精度を増すものと考えられる。今後は各種癌サンプルを解析し、データを蓄積することにより、予後、転移能などの悪性度に関わるたんぱく質、あるいは癌のマーカーとなるたんぱく質の発見をめざす。
- ⑬ 研究協力機関からの臨床試料の受け入れために必要な施設内の倫理審査委員会、個人情報保護のための匿名化システム、試料機器管理システム(LIMS)を確立した。ヒト標準血清を用いる同位体標識法(cICAT 法)を検討し、血清前処理法(主要たんぱく質の除去)、cICAT peptide の分離法、nano-LC system/高性能質量分析(Q-Star XL、ABI-4700等)解析法、および大量たんぱく質同定・定量解析法(HiSpec System)までの一連の血清疾患関連たんぱく質解析フローをほぼ完成させた。本システムは、血清疾患関連たんぱく質(トップ#1~100種類)の同定と比較定量(発現差解析)に有効な方法であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 早川堯夫,永田龍二:バイオリジクスの品質と安全性評価、薬の安全性(長尾 拓編), pp.33-51 (2004)、南山堂、東京
2. 早川堯夫、石井明子:バイオ医薬品の現状と

- 将来、*J.Integrated Med.*, **14**(2), 142-143 (2004)
3. 早川堯夫 : バイオ創薬の新たな展開と効果的な推進に向けて、*Drug Delivery System*, **19**(2), 18 (2004)
 4. 早川堯夫、石井明子: 組換え医薬品、薬学教科書シリーズ(日本薬学会編)、東京化学同人、東京(印刷中)
 5. Masashi HYUGA, Satsuki ITO, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Analysis of Site-Specific Glycosylation in Recombinant Human Follistatin Expressed In Chinese Hamster Ovary Cells, *Biologicals*, **32**, 70-77 (2004)
 6. Yuka OKADA, Naoki OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI, and Nobuyasu MIZUNO: Optimization of antitumor efficacy and safety of *in vivo* cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1670**, 172-180 (2004).
 7. Jun OKABE, Akiko EGUCHI, Renu WADHWA, Randeep RAKWAL, Rumi TSUKINOKI, Takao HAYAKAWA and Mahito NAKANISHI: Limited Capacity of the Nuclear Matrix to Bind Telomere Repeat Binding Factor TRF1 May Restrict the Proliferation of Mortal Human Fibroblasts, *Human Molecular Genetics*, **13**, 1-9 (2004)
 8. Takafumi NAKAMURA, Kah-Whye PENG, Sompong VONGPUNSAWAD, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Roberto CATTANEO and Stephen J. RUSSELL: Antibody-targeted cell fusion, *Nature Biotech.*, **22**, 331-336 (2004)
 9. J.Q.Gao, L.S.Alexandre, Y. Tsuda, K. Katayama, Y. Eto, F. Sekiguchi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Nakayama, O. Yoshie, Y. Tsutsumi, T. Mayumi and S. Nakagawa: Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors, *Pharmazie*, **59**, 238-239 (2004)
 10. 川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、日向昌司、川西 徹、早川堯夫 : LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析、*生物物理化学*, **48**, 5-10 (2004)
 11. Yohko Gotoh, Shingo Niimi, Takao Hayakawa and Tokuji Miyashita: Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, **25**(6):1131-1140 (2004)
 12. Xu Z.L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T: Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, in press
 13. Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Hiroyuki Miyoshi, Kozo Ohashi¹, Masashi Tachibana, Rie Furuki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Atsushi Nakajima, Takashi Kadowaki Yasuo Tsutsumi¹, Shinsaku Nakagawa, Yoshinori Kamisaki, Tadanori Mayumi¹: RNA interfering approach for clarifying PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA, *FEBS Lett.*, **560**, 178-182 (2004)
 14. 水口裕之、早川堯夫; アデノウイルスベクター: *Mebio*, **21**(4), 8-16 (2004)

15. 早川堯夫:米国における新薬開発の動向、大阪医薬品協会会報、662, 1-18 (2004)
16. Eto Y., Gao J-Q, Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of MPEG-SPA. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 936-938 (2004)
17. Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Communication In Mass Spectrometry* **18**, 1156-1160 (2004)
18. Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Ito, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Youichi Kohno, Atsuo Urisu and Jun-ichi Sawada: Kinetic Analysis of Pepsin digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **136**, 23-32 (2005)
19. Tetsuji Hosono, Hiroyuki Mizuguchi, Kazufumi Katayama, Zhi-Li Xu, Fuminori Sakurai, Akiko Ishii-Watabe, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi and Takao Hayakawa: Adenovirus Vector-Mediated Doxycycline-Inducible RNA Interference, *Human Gene Ther.*, **15**, 813-819 (2004)
20. Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 68-76 (2004)
21. Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 781-785 (2004)
22. Jian-Qing Gao, Yusuke Eto, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Toshiki Sugita, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi¹, Shinsaku Nakagawa: Enhanced Gene Expression of Adenovirus Vector in Tumor Induced by PEGylation, *Gene Ther.*(submitted)
23. Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology* (in press)
24. Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichirou Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi†, and Takao Hayakawa: Expression of Annexin III in Primary Cultured Rat Hepatocytes and Inhibition of DNA Synthesis by Suppression of Annexin A3 Expression

- Using RNA Interference, *Biol Pharm Bull.*, 28, 424-428 (2005)
25. Naoki Okada, Naoki Mori, Ryosuke Koretomo, Yuka Okada, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto: Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction, *Gene Ther.*, 12, 129-139 (2005)
 26. Naoki Okada, Sayaka Iiyama, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto: Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12, *Cancer Gene Ther.*, 12, 72-83 (2005)
 27. Tetsuji Hosono, Hiroyuki Mizuguchi, Kazufumi Katayama, Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Shinsaku Nakagawa, Yoshiteru Watanabe, Tadanori Mayumi, and Takao Hayakawa : RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Gene.*, (in press)
 28. Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1693, 101-110 (2004)
 29. Eriko Uchida, Koei Sato, Akiko Iwata, Akiko Ishii-Watabe, Hiroyuki Mizuguchi, Mikio Hikata, Mitsuhiro Murata, Teruhide Yamaguchi, and Takao Hayakawa: An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals* 32, 139-146 (2004)
 30. Shingo NIIMI, Masashi HYUGA, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isolated small rat hepatocytes express both Annexin III and terminal differentiated hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase, at the mRNA level, *Biol. Pharm. Bull.*, 27(11) 1864-1866 (2004)
 31. Hiroshi Kawai¹, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka, Koki Shigenobu, Ryu Nakamura, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi : Simultaneous real-time detection of inhibitor- and effector-caspase activation by double FRET analysis, *J. Pharmaceutical Sci.*, (in press)
 32. Hiroko Shibata, Yasuo Yoshioka, Shinji Ikemizu, Kyoko Kobayashi, Yoko Yamamoto, Yohei Mukai, Takayuki Okamoto, Madoka Taniai, Maki Kawamura, Yasuhiro Abe, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Satoshi Nagata, Yuriko Yamagata, Tadanori Mayumi, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi: Functionalization of TNF- α using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window,

- Clinical Cancer Research* (in press)
33. Gao J-Q., Inoue S., Tsukada Y., Katayama K., Eto Y., Kurachi S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. High gene expression of the mutant adenovirus vector, both in vitro and in vivo, with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, 59, 571-572 (2004)
 34. Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., Kawakami Y. Gene therapy for human small cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene Ther.*, 12, 95-100 (2005)
 35. Hiroyuki Mizuguchi and Takao Hayakawa :Targeted adenovirus vector , *Hum. Gene Ther.*, 15, 1034-1044 (2004)
 36. Eto, Y., Gao, J.-Q., Sekiguchi, F., Kurachi, S., Katayama, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Maeda, M., Kawasaki, K., Tsutsumi, Y., Mayumi, T., And Nakagawa, S. (2004). PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J. Gene Med.* (in press)
 37. Koizumi, N., Mizuguchi H., Kondoh, M., Fujii, M., Hayakawa, T., Watanabe, Y. Efficient gene transfer into human trophoblast cells with adenovirus vector containing chimeric type 5 and 35 fiber protein. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 2046-2048 (2004)
 38. Naoya Koizumi, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Tsuyoshi Nakanishi, Akane Masuyama; Fumie Ida; Makiko Fujii, Takao Hayakawa; Emi Nakashima, Keiichi Tanaka, Yoshiteru Watanabe: Comparison of transgene expression mediated by several fiber-modified adenovirus vectors in trophoblast cells: *Placenta*, (in press)
 39. Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa: Efficient Gene Transfer into Mouse Embryonic Stem Cells with Adenovirus Vectors, *Mol. Ther.*, submitted
 40. Satoru Kamoda, Chie Nomura, Mitsuhiro Kinoshita, Saori Nishiura, Rika Ishikawa, Kazuaki Kakehi, Nana Kawasaki and Takao Hayakawa, Profiling Analysis of Oligosaccharides in Antibody Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1050, 211-216(2004)
 41. 早川 堯夫、永田龍二:安全性評価の国内規制と技術商品化のための規制、医薬品、「遺伝子組換え体安全性評価システムガイドブック」、(株)エヌ・ティー・エス、東京、(印刷中)
 42. 早川 堯夫 :バイオロジクスの将来展望と課題、バイオロジクス:生体由来物質を用いた製品開発、(社)高分子学会編、pp.5-42 (2004), (株)エヌ・ティー・エス、東京
 43. 新見 伸吾, 川西 徹, 早川 堯夫:抗体医薬の現状と展望、医薬品研究(印刷中)
 44. Takuo Suzuki, Tomoko Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives, *Phytomedicine* (in

- press)
45. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: Analysis of glycan structural alteration in the cells, *Proteomics*, (submitted)
 46. J. Yuan, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. (submitted)
 47. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Structural characterization of oligosaccharide sequence and linkage using linear ion trap tandem mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (submitted)
 48. Satsuki Itoh, Akira Harazono, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, (in press)
 49. 水口裕之, 早川堯夫: 「ウイルスベクター」、*Drug Delivery System*, (in Press)
 50. Asami Ino, Yasuhiro Naito, Hiroyuki Mizuguchi, Naofumi Handa, Takao Hayakawa, Ichizo Kobayashi: Attempt for somatic gene targeting in vivo with a mutation-reporter mouse system: use of a replication-defective adenovirus vector for gene transfer, *J. Gene Med.*, (Submitted)
 51. 早川堯夫、永田龍二: 再生医療分野における指針・ガイドライン: 再生医療の適正かつ効果的な推進を目指して: Approaches for Appropriate and Effective Promotion of Regenerative Medicine、再生医療、3(3), 11-19 (2004)
 52. 水口裕之、川端健二、櫻井文教、早川堯夫: 改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES細胞への高効率遺伝子導入: Efficient gene transfer into hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell, and ES cell by modified adenovirus vectors、炎症・再生、(印刷中)
 53. Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma, *Cancer Gene Ther.*, (in press)
 54. Nasimuzzaman M, Kuroda M, Dohno S, Yamamoto T, Iwatsuki K, Matsuzaki S, Rashel M, Kumita W, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakamura H, Taguchi T, Wakiguchi H, Imai S. : Eradication of Epstein-Barr Virus Episome and Associated Inhibition of Infected Tumor Cell Growth by Adenovirus Vector-Mediated Transduction of Dominant-Negative EBNA1, *Mol Ther.*, (in press)
 55. Jian-Qing Gao, Toshiki Sugita, Naoko Kanagawa, Keisuke Iida, Yusuke Eto, Yoshiaki Motomura, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa: A single intratumoral injection of a

- fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (in press)
56. Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, and Takao Hayakawa : Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities, *Gene Ther.*, (submitted)
57. Hiroyuki Mizuguchi, Tomomi Sasaki, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Takao Hayakawa: Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into human mesenchymal stem cells and adipocytes, *Gene Ther.*, (submitted)
58. 伊藤さつき、原園 景、川崎ナナ、橋井則貴、松石 紫、川西 徹、早川堯夫 : LC/MS/MSを用いた糖たんぱく質の糖鎖解析 —糖鎖結合位置及び結合糖鎖の解析—、Satsuki ITOH, Akira Harazono, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Yukari Matsuishi, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, 48, 5-10 (2004)
59. Okamoto T., Mukai Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kawamura M., Yamamoto Y., Nakagawa S., Kamada H., Hayakawa T., Mayumi T., Tsutsumi Y. : The Optimal Construction of Non-immune scFv phage display library from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs binding to antigens efficiently., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323(2):583-91, 2004.
60. Taki M., Kagawa S., Nishizaki M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Kyo S., Nagai K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene*, (in press)
61. Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2005) Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem* (Tokyo) (in press)
62. Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Ikemizu S., Yamamoto Y., Shibata H., Nishibata T., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T. : Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-alpha improves its antitumor potency., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(4): 808-814, 2004.
63. Kaneda Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs., *Biomaterials*, 25(16): 3259-3266, 2004.
64. Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Kamada-Sato K., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T. : Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier., *J. Control. Release.*, 95(2): 229-237, 2004.
65. Kodaira H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y.,

- Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : The targetting of anionized polyvinylpyrrolidone to the renal system., *Biomaterials.*, 25: 4309-4315, 2004.
66. Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.**, Kamada H., Kihira T., Tsunoda S., Yamamoto Y., Okamoto T., Shibata H., Mukai Y., Taniai M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Mayumi T. : Selective enhancer of tumor vascular permeability for optimization of cancer chemotherapy., *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 437-439, 2004.
67. Kamada H., **Tsutsumi Y.**, Yoshioka Y., Yamamoto Y., Kodaiara H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy., *Clin. Cancer Res.*, 10(7): 2545-2550, 2004.
68. Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.**, Mukai Y., Shibata H., Okamoto T., Kaneda Y., Tsunoda S., Kamada H., Koizumi K., Yamamoto Y., Mu Y., Kodaira H., Kamada-Sato K., Nakagawa S., Mayumi T. : Effective accumulation of poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl laurate) into the spleen., *J. Biomed. Materials Res.*, 70A(2): 219-223, 2004. .
69. Yoshikawa T., Imazu S., Gao J.Q., Hayashi K., Tsuda Y., Shimokawa M., Sugita T., Niwa T., Oda A., Akashi M., **Tsutsumi Y.**, Mayumi T., Nakagawa S. : Augmentation of antigen specific immune responses using DNA-fusogenic liposome vaccine., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325(2):500-505, 2004.
70. Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., **Tsutsumi Y.** : Functionalization of TNF-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window., *Clin. Cancer Res.*, 10(24): 8293-8300, 2004.
71. Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.**, Nakagawa S., Mayumi T. : Recent progress on tumor missile therapy and tumor vascular targeting therapy as a new approach., *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2: 259-270, 2004.
72. Okamoto T., Nakagawa S., **Tsutsumi Y.**: The optimal molecular design of polymeric drug carriers and its application for renal drug targeting., *Gene Ther. Mol. Biol.*, 8: 221-229, 2004.
73. Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., **Tsutsumi Y.**: Development of novel drug delivery system technologies for proteomic-based drug development., *Biol. Pharm. Bull.*, 27(10): 1483-1488, 2004.
74. 堤 康央 : たんぱく療法の最適化に叶う DDS の開発を目指して., *薬剤学(生命とくすり)*, 64(3): 159-163, 2004.
75. 柴田寛子, 真弓忠範, 堤 康央: たんぱく療法の最適化に叶う新たな薬物送達戦略., *医学のあゆみ*, Vol.210 (9): 730-736, 2004.
76. 堤 康央 : プロテオーム創薬に叶う DDS 基盤技術の開発., *薬学雑誌*, 124(11): 769-780, 2004.
77. 向 洋平, 真弓忠範, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した機能性人工たんぱく質の創製と DDS への応用., *Bio ベンチャー*, 4(6): 65-68, 2004.

78. Sugita T., Yoshikawa T., Gao J.Q., Shimokawa M., Oda A., Niwa T., Akashi M., **Tsutsumi Y.**, Mayumi T., Nakagawa S. : Fusogenic liposome can be used as an effective vaccine carrier for peptide vaccination to induce CTL response., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(1): 192-193, 2005.
79. Shibata H., Shinsaku Nakagawa, **Tsutsumi Y.**: Optimization of protein therapies by polymer-conjugation as an effective DDS., *Molecules*, 10: 162-180, 2005.
80. Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J*, 24: 325- 335, 2005.
81. Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, 50: 1077-1080. 2004
82. Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y, Kangawa K, Nakazato M. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism*, 53: 84-88. 2004
83. Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nomura S, Kangawa K, Ishii H. *Helicobacter pylori* infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut*, 53: 187-194. 2004
84. Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*, 25: 279-287. 2004
85. Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 150: 913-914, 2004.
86. Itoh T, Nagaya N, Yoshikawa M, Fukuoka A, Takenaka H, Shimizu Y, Haruta Y, Oya H, Yamagishi M, Hosoda H, Kangawa K, Kimura H. Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 879-882, 2004.
87. S. Takeda, T. Okada, M. Okamura, T. Haga, J. Isoyama-Tanaka, H. Kuwahara and N. Minamino: The receptor-G α i2 fusion protein as a tool for ligand screening: a model study using a nociceptin receptor-G α i2 fusion protein. *J. Biochem. (Tokyo)*, 135, 597-604 (2004)
88. S.M. Guan, H. Nagata, K. Maeda, M. Kuboniwa, N. Minamino and S. Shizukuishi: Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett.*, 235, 333-339 (2004).
89. Y. Takei, S. Hyodo, T. Katafuchi and N. Minamino: Fish-derived novel adrenomedullin in mammals: its structure and function. *Peptides*, 25, 1643-1656

- (2004)
90. T. Katafuchi and N. Minamino: Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family. *Peptides*, 25, 2039-2045 (2004)
 91. 佐々木一樹、磯山正治、南野直人:ペプチド一△解析の現状と展望, *実験医学*, 23, 585-592(2005)
 92. Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and Kohsaka, S.: Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178, 2004
 93. Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., Sasaki Y., Ohsaki, K., Nakamura, S. Arakawa, Y. and Kohsaka, S.: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J. Neurosci.* 24, 7923-7930, 2004
 94. Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T. and Kohsaka, S.: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. *Neurochem Int.* 46, 107-116, 2005
 95. Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *BBRC.*, 2005, in Press
 96. Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba-1EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.*, 2005 in press
 97. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.: Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. *J. Neurochem.*, 88, 1540-1546, 2004
 98. Bonin, M., Poths, S., Osaka, H., Wang, Y.L., Wada, K. and Riess, O.: Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res*, 126, 88-97, 2004.
 99. Wang, Y.L., Takeda, A., Osaka, H., Hara, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Sun, Y.J., Kwon, J., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Accumulation of β - and γ -synucleins in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficient gad mouse. *Brain Res*, 1019, 1-9, 2004
 100. Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. *Am. J. Pathol.*, 165, 1367-1374, 2004.
 101. Kubota, T., Furuumi, H., Kamoda, T., Iwasaki, N., Tobita, N., Fujiwara, N., Goto, Y., Matsui, A., Sasaki, H. and Kajii, T.: ICF syndrome in a girl with DNA hypomethylation but without detectable

- DNMT3B mutation. *American J. of Medical Genetics* 129A, 290-293, 2004
102. Yamashita R, Fujiwara Y, Yuan X, Yazuda K, Kaburagi Y. 2D-LC-MS/MS Analysis of secreted proteins from HepG2 cells. *J Electrophoresis* in press
 103. Yamashita R, Yazuda K, Kaburagi Y. Proteomic analysis of proteins secreted from hepatocytes. *J Mass Spectrom Soc Jpn* in press
 104. Yasuda E, Tokuda H, Ishisaki A, Hirade K, Kanno Y, Hanai Y, Nakamura N, Noda T, Katagiri Y, Kozawa O. PPAR- γ ligands up-regulate basic fibroblast growth factor-induced VEGF release through amplifying SAPK/JNK activation in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 328:137-143.
 105. Kanno Y, Ishisaki A, Yoshida M, Nakajima K, Tokuda H, Numata O, Kozawa O. Adenylyl cyclase-cAMP system inhibits thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 2005, 229:75-82.
 106. Kanno Y, Tokuda H, Nakajima K, Ishisaki A, Shibata T, Numata O, Kozawa O. Involvement of SAPK/JNK in prostaglandin E₁-induced VEGF synthesis in osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2004, 220:89-95.
 107. Tokuda H, Niwa M, Ishisaki A, Nakajima K, Ito H, Kato K, Kozawa O. Involvement of stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) in prostaglandin F_{2 α} -induced heat shock protein 27 in osteoblasts. *Prost Leukot Essent Fatty Acids.* 2004, 70:441-7.
 108. Ishisaki A, Tokuda H, Yoshida M, Hirade K, Kunieda K, Hatakeyama D, Shibata T, Kozawa O. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 2004, 214:189-95.
 109. Tokuda H, Kanno Y, Ishisaki A, Takenaka M, Harada A, Kozawa O. Interleukin (IL)-17 enhances tumor necrosis factor- α -stimulated IL-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2004, 91:1053-61.
 110. Uchiyama S, Kobayashi S, Takata H, Ishihara T, Hori N, Higashi T, Hayashihara K, Sone T, Higo D, Nirasawa T, Takao T, Matsunaga S, Fukui K.: Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol. Chem.* in press.
 111. Wada A, Wang AP, Isomoto H, Satomi Y, Takao T, Takahashi A, Awata S, Nomura T, Fujii Y, Kohno S, Okamoto K, Moss J, Millan JL, Hirayama T.: Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin. *Int J Med Microbiol.* 294, 427-35 (2005)
 112. Satomi Y., Kudo Y., Sasaki K., Takao T. Accurate Mass Measurement in Nanoflow Electrospray Ionization Mass Spectrometry by Alternately Potentiating Sample and Reference Sprayers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 540-546 (2005).
 113. Kassai H., Satomi Y., Fukada Y., Takao T. Top-Down Analysis of Protein Isoprenylation by Electrospray Ionization Hybrid Quadrupole-TOF Tandem Mass