

Focusing Review

プロテオミクスにおけるナノ LC-MS システム

石濱 泰*

NanoLC-MS systems in proteomics

Yasushi Ishihama*

*Institute for Advanced Biosciences, Keio University and PRESTO, Japan Science and Technology Agency,**403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan**Accepted February 1, 2008.***Abstract**

Current proteomics technologies based on mass spectrometry coupled with miniaturized on-line liquid chromatography allow us analyzing tryptic peptides for protein identification with high throughput. Compared to genome sequencing and microarray-based transcriptomics, however, proteomics is still under development to achieve the complete coverage of whole proteome including protein expression profiles, protein-protein interaction and post-translational modifications. In this review, the current status of proteomic nanoLC-MS/MS systems is addressed. In addition, the phosphorylation-focused proteome analysis systems consisting of phosphopeptide enrichment methods and nanoLC-MS is presented as an example of post-translational modification proteome. Furthermore, the future prospects for proteome analysis systems are discussed.

Keywords: nanoLC, LC-MS, proteomics, phosphoproteome, post-translational modification, omics

1. はじめに

ゲノムに続く第2, 第3の「オーム」として, トランスクリプトーム, プロテオーム, メタボローム, グライコーム, リピドーム等の生体関連物質群があり, これらを網羅的に解析し, その全体像を定量的に俯瞰する新しい研究分野「システム生物学」が提唱されている。しかし, これらの「オーム」群をすべて網羅的に, しかも定量的に測定することは現時点では困難であり, システム生物学といっても, 現状では測定が比較的容易な遺伝子発現解析とインフォマティクスを組み合わせた部分的な研究が多い。しかし, 技術の進展により, 例えばトランスクリプトーム, プロテオームおよびメタボローム解析技術を駆使した大腸菌のシステム生物学研究などが報告されるようになってきた[1]。

さて, 分離分析化学の側面からこれらの測定対象分子を考

えるとゲノムやトランスクリプトームは4種の核酸塩基の組み合わせからなるため, その物性のバリエーションも限られているし, またPCRによる増幅も可能であることから, 最も扱いやすく, したがって測定法としての完成度も高い。一方, その翻訳産物であるプロテオームは20種のアミノ酸の組み合わせであり, 物性のバリエーションもより広い。またPCRのような増幅も難しく, ダイナミックレンジの問題も考慮しなければいけない。さらに Alternative splicing や翻訳後修飾を受けるため, その複雑性(対象分子種数)は遺伝子数の10倍以上となると言われている。質量分析計(MS)を測定装置に用いる場合には, タンパク質のままでは感度の点で不利であり, トリプシンなどのプロテアーゼによりペプチドに切断して測定する。このため, ヒト細胞の場合, その測定対象分子種数は優に300万を越える。しかし, 分離の観点

から眺めると、これらのトリプシン切断ペプチドはある一定の物性値範囲（特に分子量・脂溶性）に入っており、しかも適度に疎水性がばらついているため、単一の逆相クロマトグラフィー条件でほとんどのものは測定することができる。一方、極性・イオン性分子が多いメタボローム解析における測定対象分子数はプロテオーム解析と比べるとはるかに少ないが、物性の幅が大きく、単一モードのクロマトグラフィーで全てを測定するのは困難である。したがって、メタボローム解析では、LCのようなカラム交換の必要がなく、分離溶液の交換や印加電圧の極性だけで複数の分離条件が設定できるキャピラリー電気泳動（CE）がMSとの組み合わせで使われることが多い。特にメタボロームではイオン性試料が大半を占めるので、電気泳動法は適していると考えられる。最近では、LCでも逆相系だけではなく HILIC モードを用いて極性分子を LC-MS で測定することも報告されている[2]。

さて、LC の高感度化、高性能化を実現させる一般的な手段として、充填剤およびカラム径のマイクロ化がある。前者は 2 μm 以下の充填剤と耐圧 HPLC システムの市販化により現在では UPLC 等の名前で一般的になりつつある[3, 4]。またモノリス型充填剤の開発により、新しい展開も見せている[5]。一方、後者については1970年代後半から80年代にかけて、内径20~250 μm のフェーズドシリカキャピラリーを用いた充填カラムを用いたキャピラリー LC が開発された[6-13]。このようにマイクロ化された LC システムでは吸光度検出器は十分な光路長を確保するのが難しいため高感度分析には向いていない。一方、MS では、試料溶媒を揮発させ、試料分子を気化、イオン化する必要があるため、一般的にはむしろ低流量での試料導入が好ましく、マイクロ化 LC との複合化に適している。1985年にキャピラリー LC と高速原子衝撃法を用いた質量分析計とのオンライン接続システムが初めて報告され[14]、直ちにペプチドマッピング等に応用された[15-17]。ちょうど同時期に質量分析における新しいイオン化法として、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）が開発され[18]、LC とのオンライン接続が比較的容易に行えるようになった。その後、ESI についてもマイクロ化による流速50~500 nL/min での高感度化が実現し[19, 20]、90年代後半には充填カラムと一体化した ESI ニードルも開発され[21, 22]、ポストカラムデッドボリュームがゼロになるナノ LC-MS 分析も可能となった。ポストゲノム研究が盛んになる中で、ナノ LC-MS システムはプロテオミクスを中心に日常的に使われる分析装置となってきた。ここではすでに確立しているプロテオミクス分野での適用例を中心にしてナノ LC-MS システムの現状を紹介するとともに、将来の展望についても述べたい。

2. ナノ LC カラムと質量分析計とのインターフェース

ナノ LC カラムとしては、内径75~100 μm のフェーズドシリカキャピラリーに3~5 μm の C18シリカゲルを充填した

ものももっとも広く用いられている。フリットにはシリカ粒子を焼結させたもの[12]やケイ酸塩をゾルゲル法で固定化したもの[23, 24]などが用いられている。カラム径も小さく流速も遅いので、カラムから下流ではデッドボリュームが生じないようにコネクターや接続チューブ断面に細心の注意を払う必要がある。ESI では、スプレーニードルの先端を細くし、できるだけオリフィスに近づけ、試料を低流量で注入することにより、感度を上昇させることができる[19, 25]。これはマイクロ ESI またはナノ ESI と呼ばれ（両者の定義の違いは厳密ではないが、ナノメートル領域の液滴が生じるもの、すなわち先端サイズが1マイクロメートル以下のものがナノ ESI とされている）、ナノ LC と MS のインターフェースに用いられている。この先端の先細り構造を利用してニードル自身にクロマトグラフィー用樹脂を充填したニードル一体型カラムでは、ポストカラムデッドボリュームを無視することができ、カラム前の接続部の影響も受けにくいというメリットがあるため、現在多くの研究室で使われている。このニードル一体型カラムではフリットなしで充填剤を保持させるため、当初先端径は充填剤径よりも小さめに設定されていたが、充填剤がニードルを完全に塞いでしまうケースがあり安定なカラム調製が問題となっていた[21, 26]。その後、先端径よりも小さい充填剤を使用しても石橋のアーチの原理で充填剤を保持可能であることがわかり、先端径と充填剤径をコントロールしてフリットレスカラムを調製することが可能となった[27]。筆者らの研究室ではこのカラムをフェーズドシリカ管の加工から自作しており、先端径と充填剤径をきちんとコントロールすることにより、連続運転しても数ヶ月は安定して使えるカラムを30分ほどで作製している。充填は、窒素ボンベによる圧力を利用して行っており、充填圧はせいぜい100bar 程度である。カラムを LC システムに取り付けてから、流速を上昇させて200bar の圧をかけてから、測定を開始するようにしている。このように非常に「ラフ」な充填であるにも関わらず、酢酸・水・アセトニトリル系移動相を用いた C18逆相グラジエント分析（アセトニトリル濃度変化 4~24%/10分）で、ピークの半値幅は約5秒と、非常に高い分離効率が得られている[28, 29]。筆者らの研究室では、質量分析計の入り口を洗浄するのに合わせて2週間から1ヶ月に1回はカラムを交換するようにしている。

ニードル一体型カラムではモノリスタイプの固定相をニードル中で調製することも可能であり[30, 31]、充填剤タイプでは難しい内径20 μm 以下のものにも適している。一方で、このタイプのものでは、カラムのみ、スプレーニードルのみを交換することは不可能であり、頻繁にどちらかを交換する必要がある場合にはカラムとスプレーニードルを別々にする必要があるのである。

ESI を行うためには試料溶液がニードル先端で荷電している必要があり、当初は先細りガラスキャピラリーの先端を金属（白金など）で被覆したものが使われていた[32]。しかし、

電気化学反応により金属コートの寿命が短くなるため、現在はスプレーニードルの背面に電圧をかける液絡法が主流となっている。気相と液相では電気抵抗に大きな差があるので、印加した電圧はニードル中では先端までほぼ維持されることになり、長さ50cm程度のニードル一体型カラムでも安定したスプレーを得ることができる[33]。

3. 頑健性および時間効率を重視したシステム構築

プロテオミクス用ナノ LC-MS システムに供される試料は、臨床検体（血液、尿、切除組織）や培養細胞などいわゆる「きたない」試料も多く、細い配管を用いるナノ LC-MS システムにとって難易度は高い。またマーカー探索などを行う場合には多数の試料を分析する必要があり、長期間にわたるシステムの安定性を確保することと同時に測定時間をできるだけ効率的に使うことが要求される。しかし移動相流量が少ないので、グラジエント分析におけるディレイ時間やカラムの洗浄時間、戻り時間なども通常の LC に比べると全体の測定時間に対する影響が大きい。また、複雑性の高い検体であれば、多次元分離も必要となり、ますます時間がかかることになる。インジェクターもシステムのデッドボリュームを最小にすべく、低流速に対応したものが必要となる。しかし、イソクラティック溶出系で理論的・実験的に要求されて

いるような数10nL レベルの試料溶液のマイクロ化は容易ではなく、またそのレベルの液を定量的に扱うことは、きわめて難しい。幸いなことに、C18カラムを用いたペプチドのグラジエント分析においては、数10 μ L の試料溶液でもカラムの先端で十分にトラップ、濃縮することが可能である。プロテオミクスでは通常、数 μ L から100 μ L 程度までの試料体積を注入する必要があるため、プレカラム（トラップカラム）が用いられることも多い。しかし、分析カラムのサイズが小さいので、十分なローディングキャパシティーと分離効率を得るためにはプレカラムのサイズ（内径と長さ）についても注意を払う必要がある。特に内径0.3~1 mm 程度で長さが2~3 mm のものはロットばらつきが懸念される。また、内径の小さなものをプレカラムに用いた場合、例えば内径100 μ m、長さ25mm のプレカラムと内径75 μ m の C18 分析カラムを用いた場合では、プレカラムに用いる C8 もしくは C18 の種類により溶出順が変化したという報告もある[34]。上記のプレカラムに付随する問題を回避するため、筆者らはピペットチップを用いた前処理マイクロカラムであらかじめ試料体積を数 μ L に減らすことにより、分析カラムへ直接注入するシステムを用いている（図1）[35]。当初は ZipTip に代表されるピペットチップ型の使い捨て脱塩濃縮チップを用いていたが、組織由来の試料を用いた場合には試料をクリーンアップ

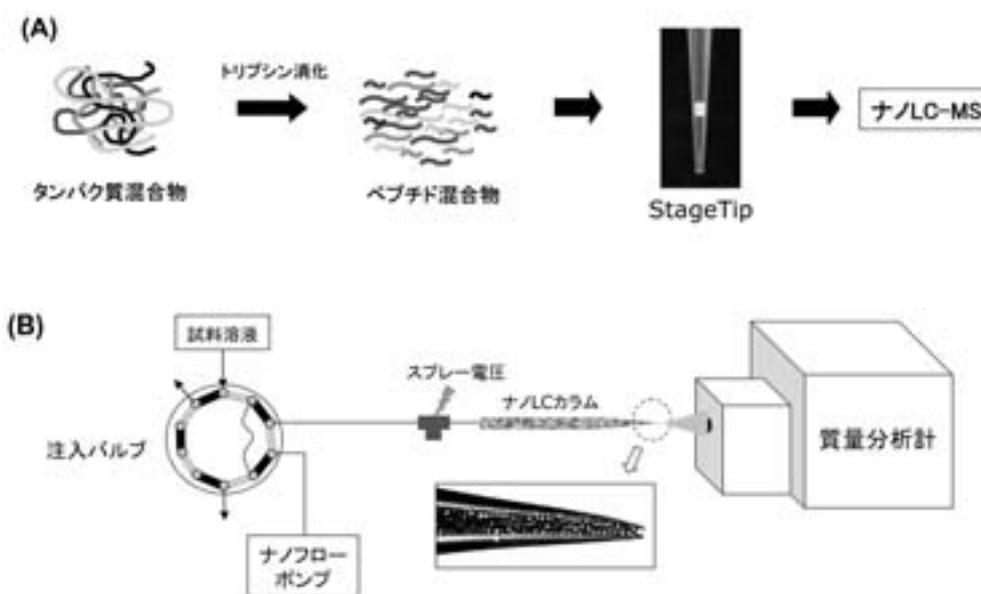


図1 ナノ LC-MS システムを用いるプロテオーム解析システム

(A) 分析フロー図

タンパク質混合物試料はトリプシンなどのプロテアーゼで消化された後、StageTip で脱塩濃縮され、ナノ LC-MS に供される。

(B) ナノ LC-MS システム

オートサンプラー中の注入バルブに注入された試料溶液は、そのままナノ LC カラムの先端で濃縮される。ナノフローポンプによるグラジエント溶出によりペプチドは分離され、カラム先端でエレクトロスプレーイオン化法によりイオン化し、質量分析計に導入される。写真はカラムの先端部を拡大したもの。先端径は約7 μ m で充填剤 (ReproSil C18) の粒径は3 μ m。

しきれない場合があったこと、およびローディングキャパシティーや微量試料に対する回収率が悪かったことから、もう少し樹脂の充填密度が高く、クリーンアップ効果の優れたものを、ということで、StageTip (stop and go extraction tip) と名付けた使い捨てのマイクロ固相抽出チップ (μ -SPE-Tip) を開発した[36]。これは 3M 社のエムポアディスクというテフロン繊維にクロマトグラフィー用充填剤が高密度に充填された膜を、ピペットチップに埋め込んだもので、従来のもののようにピペッターで試料を行き来させてペプチドをトラップするのではなく、一方向から注入と溶出を行うので、フィルターとしての役割も付加したものである。この StageTip による前処理と組み合わせることによって、複数の試料溶液を並行処理で数マイクロリットル程度までにあらかじめ濃縮し、分析カラムに直接注入することが可能となり、これにより、総分析時間の短縮、システムの安定性の著しい向上、試料間のキャリーオーバーの低減化を一気に実現することができた。筆者らの研究室で実際に用いているナノ LC-MS システムを図 1 (B) および図 2 に示す。オートサンプラはインジェクションバルブがむき出しのものを用い、さらに可動式の台に設置することにより、MS との接続距離を最小限にしている。また MS 側も元のイオン源を取り外し、オリフィス部分をむき出しにして、x-y-z 調節が可能なカラムホルダーをその直前に配置し、オートサンプラとの距離を最小限にしている。

分析カラムへの直接注入システムとしては、上記のようなオートサンプラを用いたシステムだけではなく、LC システムとは独立にカラムにあらかじめ試料を注入しておき、そのカラムを LC システムにセットするという方法もある。この場合は LC システム中にインジェクターが不必要となり、デッドボリュームやグラジエントディレイ時間を最小限にできるというメリットがある。さらに複数のカラムを用いれば

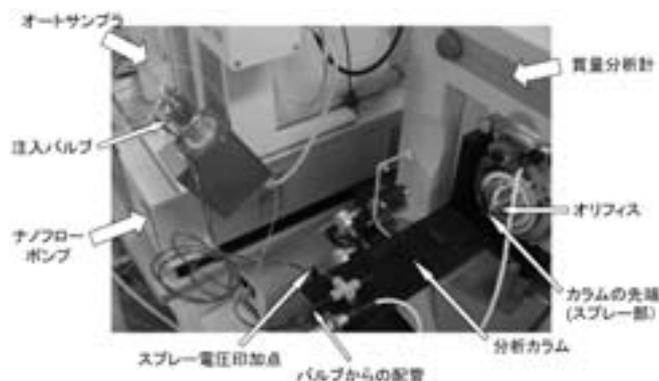


図 2 ナノ LC-MS システム

筆者らの研究室で実際に用いているシステム。装置構成は、(1)ポンプ：Dionex Ultimate 3000, (2)オートサンプラ：CTC Analytics 社 HTC-PAL, (3)カラム：自作, (4)インターフェース (x-y-z ステージを含む)：日京テクノス(株)によるカスタム品, (4)質量分析計：Thermo Fisher Scientific 社 LTQ-Orbitrap。

分析中に次の試料注入が可能になり、総分析時間を最小にすることができる。試料注入にはニードル一体型カラム充填でも用いた充填器を使ったものが便利である。注入量は先端からの液滴を採取することで概算することも可能である。分析毎にカラムの交換を行わなければならないが、カラムを使い捨てにすることで、試料間のキャリーオーバーをまったく考慮する必要がなくなる。このシステムは SCX-C18 オンライン二次元分離システムなど一度試料を注入すれば、分画一分析で 20 時間以上かかるようなシステムに適している[37, 38]。

4. 多次元分離

タンパク質のトリプシン消化物を試料として用いるショットガンプロテオミクスの場合には、試料の複雑性と広いダイナミックレンジの問題をある程度解決するために、LC-MS の分析の前に分画することは有効な手段であり、特にダイナミックレンジの問題を軽減するためのタンパク質レベルでの分画は効果的である[28]。タンパク質の分離法は色々あるが、溶解性の悪いものや塩基性・酸性タンパク質にも使えること、分離力や回収率に大きな欠点がないこと、パラレルで、しかも低コストで行えること、コンタミネーションの可能性が低いことなどを考慮して、筆者は SDS-PAGE を多用している[39, 40]。SDS-PAGE で分離後にレーン全体を 5~20 個に均等にスライス化し、ゲル内消化している。その後の LC-MS/MS による分析と組み合わせ、筆者らはこの手法を Gel-enhanced LC-MS, 略して GeLCMS と呼んでいる。余談だが、2003 年のアメリカ質量分析学会で初めて筆者らが “GeLCMS” という略号を用いた時、全く独立にコロラド大学のグループも同様の略号を用いていた。現在では論文のタイトル中にも使われる例も散見され、一般化しつつある。ちなみに方法自体は筆者らが創始したわけではなく、Simpson らが 2000 年にすでに膜タンパクデータベース用に用いている[41]。

ペプチドレベルでの分画の場合には、例えばオンライン二次元 LC-MS/MS システムで全自動で行うことができるが、分画操作は直列処理でしか行えないので、全体として効率が落ちてしまわないよう、分画数にも注意する必要がある。筆者らは前述の StageTip を用いて並列処理で分画することで効率を上げている[42]。使い捨てなのでコンタミネーションを考慮する必要がないのも実用的であり、96well フォーマットで並列処理するので、LC-MS 用注入プレートに直接適用できる。4 分画程度であれば、分画間の重なりは 15% 程度である。SCX 以外の StageTip を用いることも可能であり、Tip 作製法も含めて詳細なプロトコルを公開しているので、参考にされたい[36]。そのほかには、移動相に少量のイオンペア試薬 (トリフルオロ酢酸やヘプタフルオロ酢酸を 0.005~0.02% 程度) を加え、ペプチドの溶出パターンを変化させたり[39]、繰り返し分析の際に前に同定されたものを排除しな

がら分析を繰り返す方法[43]などがあり、これらは分画法というわけではないが、より多くのペプチドを同定するという目的には有用である[39]。

数回繰り返し分析ができるくらいの試料量がある場合に、同定の効率をあげる最も効率的な手段は、筆者の経験では違う質量分析計を使うことである。例えばアプライドバイオシステム社のQSTAR（ハイブリッド四重極—飛行時間型）とサーモフィッシャー社のLTQ（リニアイオントラップ型）では、得意とする m/z 領域が違うだけではなく[44]、衝突誘起解離パターンも違うことから、同じ試料で、同じLC条件を用いても、異なるペプチドをより多く同定することが可能である。

プロテオミクスだけではなく、メタボロミクスでもイオン交換クロマトグラフィーや親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）などが逆相クロマトグラフィーと組み合わせた二次元LCの一次元目として用いられている[45]。特にHILICは逆相系では保持できない極性成分の分析に対して有効である。プロテオミクスではSCXとWAXを混合させることにより生じるドナー効果を使って、より幅の広い化合物を分画することができることも報告されている[46]。

5. リン酸化プロテオミクス

特定の官能基のみにアフィニティーをもつ樹脂を用いることでその官能基を有する化合物群を選択的に濃縮することも可能であり、例えばプロテオミクスでは鉄イオンやガリウムイオンを固定化した金属固定化クロマトグラフィー（IMAC）を用いてリン酸化ペプチドの濃縮が行われている[47]。筆者らは、IMACの代わりにチタニアやジルコニアなどの金属酸化物を乳酸などの親水性ヒドロキシ酸で修飾した担体を用いて、リン酸化ペプチドの濃縮を行っている[36, 48, 49]。このような濃縮ステップなしで、細胞抽出物試料のナノLC-MS分析を行っても、リン酸化ペプチドを同定することはできない。これは、一般的にリン酸化を受けるタンパク質の存在量は、いわゆるハウスキーピングタンパク質の存在量よりもはるかに少なく、しかもその中でリン酸化を受けている割合はさらに少ないからである。また、リン酸化ペプチドのMS装置中の衝突誘起解離によるフラグメント化過程においても、リン酸基の存在により、アミノ酸配列に関する十分な情報が取れないことがしばしばあり、さらにリン酸基を有するペプチドはESIにおけるイオン化効率も一般的に低い。データベース検索による同定の過程でも、「セリン、スレオニン、チロシンの一部はリン酸基で修飾されているかもしれない」という条件で検索するので、検索対象が拡大し、同定精度が低下する。これらの理由から、リン酸化タンパク質、ペプチドに対する濃縮はリン酸化プロテオーム解析にとって必須のステップとなっている。

タンパク質リン酸化は細胞内情報伝達経路において重要な役割を担うなど、様々な細胞機能をコントロールしている。

ヒトタンパク質の20~30%はリン酸化を受けているといわれているが、その全体像は未だ不明である。21世紀に入って、プロテオームレベルでのリン酸化ペプチド濃縮法開発が積極的に展開され、特にこの2, 3年で飛躍的な進歩を見せている。その一例を図3に示す。UniProt (Release 54.1, 21-Aug-2007) には2006年12月までに発表されたすべてのリン酸化プロテオミクス論文の結果がインプットされている。筆者らが開発したヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー（HAMMOC）によるヒト由来培養細胞のリン酸化ペプチド同定結果（2007年6月以降、2008年1月31日まで、筆者らの研究室のみでの結果）をUniProtデータと照合してみた（図3）。その結果、たった1つの研究室の7ヶ月間のみの結果にも関わらず、時間の経過とともに、直線的に同定数が増しており、しかも数だけを見れば、UniProt登録数をすでに上回っている。データのオーバーラップが非常に少ない理由は、用いた試料の処理方法の違いだと考えている。すなわち、通常のリン酸化プロテオーム解析の試料は、より多くの

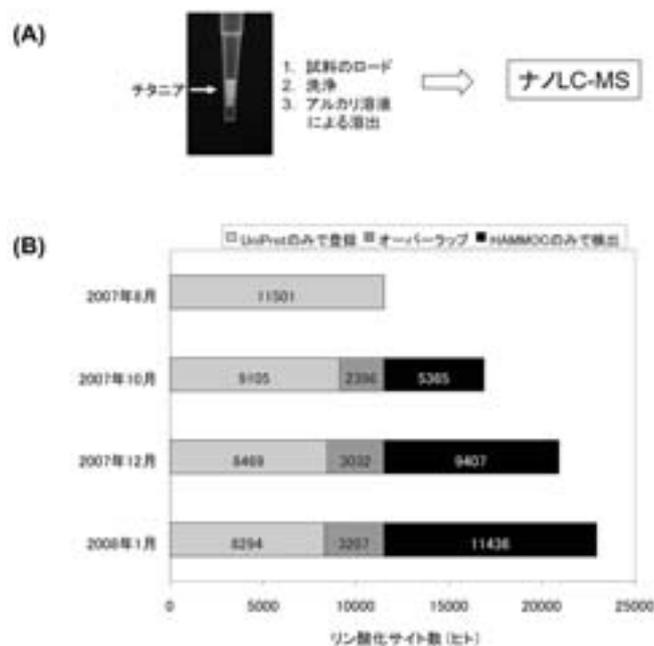


図3 リン酸化プロテオミクスによるタンパク質リン酸化の同定

(A) 分析フロー図

C8-StageTipにチタニアを充填したリン酸化ペプチド濃縮カラム（写真）でリン酸化ペプチドを選択的に濃縮した後、ナノLC-MSシステムで分析する。

(B) UniProtデータベースに登録されているヒトタンパク質のリン酸化サイトとHAMMOC法で筆者の研究室で検出されたリン酸化サイトの比較

UniProtデータが公開された2007年8月以降、HAMMOC法によるリン酸化サイトは1ヶ月当たり約2000サイトのペースで増加している（HAMMOC法は2007年6月以降のデータを採用）。オーバーラップは飽和傾向にあるが、HAMMOCユニークなリン酸化サイトは直線的に増加している。

リン酸化サイトを検出するために、リン酸化反応を活性化させるべく、前もって細胞を成長因子や脱リン酸化酵素阻害剤で処理しているため、定常状態では発現していないリン酸化サイトが多数存在すると考えられる。一方、筆者らは、試料の定常状態でのリン酸化（より少ない量のリン酸化）を測定しているために、UniProtに登録されていないユニークなリン酸化サイトが同定されているものと考えている。HAM-MOC法の現状の性能は、前分画なしに細胞抽出液のトリプシン消化物（50 μ g程度）からそのまま直接リン酸化ペプチド濃縮を行い、1回のナノLC-MS測定で1000個程度のリン酸化サイトを同定することが可能であり、図3にも示すように従来法よりも格段に進歩していると考えられる。しかし、一方で現状のHAMMOC法では同定できない一群のリン酸化ペプチドがあることもわかってきた[49]。これらのリン酸化ペプチドは、例えば結晶形の異なる高温処理チタニアを用いた場合に数百サイトがまとめて同定されており、まだまだ改良する必要がある。今のところ、リン酸化プロテオームの全体像が一体どのくらいであるのかまだ不明であるが、更なる技術開発とともに、この分野が発展していき、ライフサイエンスへのより大きな貢献へつなげることは間違いないと考える。

6. 今後の展望

ここ数年様々なタイプのハイブリッド型質量分析計が開発され、質量分析計の性能は大きく向上し、高速スキャンやより広いダイナミックレンジ、高い質量精度などが実現されている。一方、LC側ではUPLCやモノリス型のカラムなど新しい技術がでてきているものの、その性能はまだまだ質量分析計に追いついていない。充填剤タイプのHPLC用カラムのマイクロ化は限界にきており、サブミクロン充填剤相当の骨格をもったモノリスでの分離の向上に期待したい。いずれにせよ、翻訳後修飾なども含めた全プロテオームの解析という目的にはまだまだあらゆる部分での技術開発が必要とされているが、その一方ですでに現状の技術を用いた生命科学への応用研究もどんどんされている。今後もこの分野は技術革新と生命科学への応用という両輪でバランスをとりながら、益々発展していくと思われる。

参考文献

- [1] Ishii, N.; Nakahigashi, K.; Baba, T.; Robert, M.; Soga, T.; Kanai, A.; Hirasawa, T.; Naba, M.; Hirai, K.; Hoque, A.; Ho, P. Y.; Kakazu, Y.; Sugawara, K.; Igarashi, S.; Harada, S.; Masuda, T.; Sugiyama, N.; Togashi, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Yugi, K.; Arakawa, K.; Iwata, N.; Toya, Y.; Nakayama, Y.; Nishioka, T.; Shimizu, K.; Mori, H.; Tomita, M. *Science* **2007**, *316*, 593–597.
- [2] Tolstikov, V. V.; Fiehn, O.; Tanaka, N. *Methods Mol Biol.* **2007**, *358*, 141–155.
- [3] Mellors, J. S.; Jorgenson, J. W. *Anal Chem.* **2004**, *76*, 5441–5450.
- [4] Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Meeker, L. R.; Doerge, D. R. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2005**, *825*, 134–143.
- [5] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Nagayama, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N. *Anal Chem.* **2000**, *72*, 1275–1280.
- [6] Takeuchi, T.; Ishii, D. *J Chromatogr.* **1980**, *190*, 150–155.
- [7] Takeuchi, T.; Ishii, D. *J Chromatogr.* **1981**, *218*, 199–208.
- [8] Takeuchi, T.; Ishii, D. *J Chromatogr.* **1981**, *213*, 25–32.
- [9] Takeuchi, T.; Ishii, D. *J Chromatogr.* **1982**, *238*, 409–418.
- [10] Yang, F. J. *J Chromatogr.* **1982**, *236*, 265–277.
- [11] Shelly, D. C.; Gluckman, J. C.; Novotny, M. *Anal Chem.* **1984**, *56*, 2990–2992.
- [12] Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal Chem.* **1989**, *61*, 1128.
- [13] Karlsson, K. -E.; Novotny, M. *Anal Chem.* **1988**, *60*, 1662–1665.
- [14] Ito, Y.; Takeuchi, T.; Ishii, D.; Goto, M. *J Chromatogr.* **1985**, *346*, 161–166.
- [15] Caprioli, R. M.; DaGue, B.; Fan, T.; Moore, W. T. *Biochem Biophys Res Commun.* **1987**, *146*, 291–299.
- [16] Deterding, L. J.; Moseley, M. A.; Tomer, K. B.; Jorgenson, J. W. *Anal Chem.* **1989**, *61*.
- [17] Henzel, W. J.; Bourell, J. H.; Stults, J. T. *Anal Biochem.* **1990**, *187*.
- [18] Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451–4459.
- [19] Emmett, M. R.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 605–613.
- [20] Wilm, M.; Mann, M. *Int J Mass Spectrom Ion Processes.* **1994**, *136*, 167–180.
- [21] Davis, M. T.; Lee, T. D. *J Am Soc Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 194–201.
- [22] Gatlin, C. L.; Kleemann, G. R.; Hays, L. G.; Link, A. J.; Yates, J. R., 3rd *Anal Biochem.* **1998**, *263*, 93–101.
- [23] Piraino, S. M.; Dorsey, J. G. *Anal Chem.* **2000**, *75*, 4292–4296.
- [24] Behnke, B.; Bayer, E. *J. Chromatogr. A* **1995**, *716*, 207–213.
- [25] Wilm, M.; Mann, M. *Anal Chem.* **1996**, *68*, 1–8.
- [26] McGinley, M. D.; Davis, M. T.; Robinson, J. H.; Spahr, C. S.; Bures, E. J.; Beierle, J.; Mort, J.; Patterson, S. D. *Electrophoresis.* **2000**, *21*, 1678–1684.
- [27] Ishihama, Y.; Rappsilber, J.; Andersen, J. S.; Mann, M. *J Chromatogr A* **2002**, *979*, 233–239.
- [28] Ishihama, Y. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 73–83.

- [29] 石濱泰 *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2007**, *55*, 157–164.
- [30] Moore, R. E.; Licklider, L.; Schumann, D.; Lee, T. D. *Anal Chem.* **1998**, *70*, 4879–4884.
- [31] Luo, Q.; Tang, K.; Yang, F.; Elias, A.; Shen, Y.; Moore, R. J.; Zhao, R.; Hixson, K. K.; Rossie, S. S.; Smith, R. D. *J Proteome Res.* **2006**, *5*, 1091–1097.
- [32] Valaskovic, G. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *Science* **1996**, *273*, 1199–1202.
- [33] Mazereeuw, M.; Hofte, A. J. P.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 981–986.
- [34] Murphy III, J. P.; Valaskovic, G. A. In *Proceeding of 51st ASMS conference* Montreal, Canada, 2003, p TPP293.
- [35] Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. *Anal Chem.* **2003**, *75*, 663–670.
- [36] Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1896–1906.
- [37] Link, A. J.; Eng, J.; Schieltz, D. M.; Carmack, E.; Mize, G. J.; Morris, D. R.; Garvik, B. M.; Yates, J. R., 3rd *Nat Biotechnol.* **1999**, *17*, 676–682.
- [38] Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R., 3rd *Nat Biotechnol.* **2001**, *19*, 242–247.
- [39] Kerner, M. J.; Naylor, D. J.; Ishihama, Y.; Maier, T.; Chang, H. C.; Stines, A. P.; Georgopoulos, C.; Frishman, D.; Hayer-Hartl, M.; Mann, M.; Hartl, F. U. *Cell.* **2005**, *122*, 209–220.
- [40] Lasonder, E.; Ishihama, Y.; Andersen, J. S.; Vermunt, A. M.; Pain, A.; Sauerwein, R. W.; Eling, W. M.; Hall, N.; Waters, A. P.; Stunnenberg, H. G.; Mann, M. *Nature* **2002**, *419*, 537–542.
- [41] Simpson, R. J.; Connolly, L. M.; Eddes, J. S.; Pereira, J. J.; Moritz, R. L.; Reid, G. E. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1707–32.
- [42] Ishihama, Y.; Rappsilber, J.; Mann, M. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 988–994.
- [43] Kristensen, D. B.; Brond, J. C.; Nielsen, P. A.; Andersen, J. R.; Sorensen, O. T.; Jorgensen, V.; Budin, K.; Matthiesen, J.; Venø, P.; Jespersen, H. M.; Ahrens, C. H.; Schandorff, S.; Ruhoff, P. T.; Wisniewski, J. R.; Bennett, K. L.; Podtelejnikov, A. V. *Mol Cell Proteomics* **2004**, *3*, 1023–1038.
- [44] 石濱泰 In *できマス！プロテオミクス 質量分析によるタンパク質解析のコツ*; 小田吉哉, 夏目徹, Eds.; 中山書店: 東京, 2004, p93–103.
- [45] Tolstikov, V. V.; Fiehn, O. *Anal Biochem.* **2002**, *301*, 298–307.
- [46] Motoyama, A.; Xu, T.; Ruse, C. I.; Wohlschlegel, J. A.; Yates, J. R., 3rd *Anal Chem.* **2007**, *79*, 3623–3634.
- [47] Stensballe, A.; Andersen, S.; Jensen, O. N. *Proteomics.* **2001**, *1*, 207–222.
- [48] Sugiyama, N.; Masuda, T.; Shinoda, K.; Nakamura, A.; Tomita, M.; Ishihama, Y. *Mol Cell Proteomics* **2007**, *6*, 1103–1109.
- [49] Imami, K.; Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Tomita, M.; Ishihama, Y. *Anal Sci.* **2008**, *24*, 161–166.