

特集：ゲノムからプロテオームへ—ヒトプロテオミクスの目指すもの—

バイオインフォマティクス

戸田年総

ヒトゲノムの全塩基配列が解読された現在、生命科学は遺伝子情報をもとに生命現象および疾患のメカニズムを解明する段階に入った。しかし、実際に細胞内で機能するタンパク質は組織特異的に発現し、様々な翻訳後修飾を受け、他のタンパク質と複合体を形成し、巧妙な分解調節を受けている。そのため遺伝子情報だけでなく、タンパク質の構造や発現動態に関する情報も揃わなければ、真の機能や病態との関わりを解明することはできない。バイオインフォマティクスは、遺伝子情報に加えこのようなタンパク質に関する情報を電子化し、サーバーコンピュータで収集管理し、必要な時に利用できるネットワーク環境を作るための情報科学であり、生命現象をコンピュータシミュレーションするための計算科学である。本章では、主に我々が行っているプロテオームインフォマティクスを中心に解説する。

1. はじめに

生命科学において、今ほどインフォマティクス（情報科学）が重要視された時代はかつてなかったと言える。これには様々な要因が考えられるが、一つはゲノム DNA 塩基配列情報や、タンパク質のアミノ酸配列情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質相互作用情報など、それぞれの研究分野において膨大な情報がデータベースの形で蓄積され、それらを有効利用するための仕組みが必要になったこと、もう一つは、インターネット通信網が発達し、大量の情報をリアルタイムで共有することが容易になったことがあげられる。

ヒトゲノム計画がスタートした当初は、ヒトの全ゲノム DNA の塩基配列を解読することが暗黙の到達目標であった。しかし実際に目標が達成されたことにより、塩基配列情報だけで生命の仕組みのすべてを解き明かすことはでき

ないという当然のことが再認識される結果となった。ヒトゲノム計画終了後のいわゆるポストゲノム研究では、遺伝子情報に基づいて作られるすべてのタンパク質の機能の解明と、それらの相互連携によって繰り広げられる複雑な生命活動の仕組みの解明、さらにはそれが破綻することによって起きる疾患の機序を明らかにし、発症の予防や進行の遅延、症状の緩和に結びつく知見を得ることが、次なる到達目標となった。この目標を達成するために最適な網羅的タンパク質探索研究手法として登場したのがプロテオーム研究^{1,2)}（プロテオミクス）であった。プロテオミクスではタンパク質を同定する段階でインフォマティクスが不可欠であり、またプロテオミクスによって得られる膨大な情報を収集管理する際にもインフォマティクスが要求される。しかしながらバイオインフォマティクス³⁻⁵⁾は、それを利用する研究者の立場によって様々な解釈がなされており、現時点では必ずしも明確な枠組みがあるわけではない。これは、基本的にはバイオインフォマティクスがまだ未成熟であるためであるが、遺伝子情報から疾患のメカニズムの解明に至る研究の過程で必要とされるバイオインフォマティクスの内容が極めて多岐にわたっていることも大きな要因となっている。したがってここでは、まずバイオインフォマティクスがどのようなものかという概要について述べ、次に主にプロテオーム研究において必要とされて

東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループ
(〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

Bioinformatics

Tosifusa Toda (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Proteomics Collaboration Research Group, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan)

いるバイオインフォマティクス（プロテオームインフォマティクス）に関し、東京都老人総合研究所で行っている取り組みを中心に述べる。

2. バイオインフォマティクスの階層性

生体はゲノム情報を頂点とする階層的なシステムによって作られている。したがってそのような生体を包括的に理解するためには、階層ごとに得られた要素的生物情報を有機的に統合し、生体内で起きている分子レベルの事象をシステムとして論理的に組み上げるシステム生物学 (system biology^{6,7)}) の進展が重要である。そしてそれには、それぞれ下記のような階層ごとのバイオインフォマティクスが不可欠であると考えられる。

①構造・機能バイオインフォマティクス⁸⁻¹⁰⁾

ゲノムの塩基配列から ORF を推定しタンパク質の一次構造を予測したり、タンパク質の一次構造情報から立体構造を推定したりすること。さらには立体構造情報からタンパク質の機能を推定することを目的とする研究アプローチ。そのための計算科学技術の開発も含まれる。

②発現調節機構および発現プロファイリングのバイオインフォマティクス¹¹⁻¹³⁾

トランスクリプトームレベルおよびプロテオームレベルで発現タンパク質を網羅的にプロファイリングすることや、発現調節因子を上流で共有するタンパク質群のクラスター分析を行うこと、細胞特異的な発現動態を定量的にプロファイリングすることなども含まれる。

③相互作用のバイオインフォマティクス¹⁴⁻¹⁶⁾

タンパク質複合体形成に関する知識のほか、代謝のパスウェイ、シグナル伝達のパスウェイ、遺伝子発現制御のネットワークなど、様々な機能的タンパク質の相互作用を解明するための情報科学。

④翻訳後修飾のバイオインフォマティクス¹⁷⁻¹⁹⁾

●タンパク質リン酸化・脱リン酸化のバイオインフォマティクス

細胞内シグナル伝達、代謝調節、タンパク質凝集調節とタンパク質リン酸化の関係を解明するための情報科学。

●タンパク質糖鎖構造のバイオインフォマティクス

糖鎖の結合によって調節されるタンパク質の機能を解明するための情報科学。

●タンパク質のフォールディングと品質管理・分解除去機構のバイオインフォマティクス

タンパク質の機能を発現するために必須であるタンパク質のフォールディングのメカニズムや、その破綻をコントロールする分子シャペロン、ユビキチン化およびプロテアーゼ分解システムを解明するための情報科学。

⑤細胞内局在・細胞内輸送のバイオインフォマティクス

細胞内で作られたタンパク質が、実際に働く場を求めて移動する様子を解明するための情報科学。

⑥細胞形態、組織形態、個体形態のバイオインフォマティクス

細胞が形態を形成し、組織を形作り、器官としての機能を生み出すメカニズムを解明するための情報科学。

⑦発生・分化・不死化・老化・細胞死のインフォマティクス

細胞が様々な特異的機能を獲得するに至るメカニズムを解明するための情報科学。

⑧疾患・病態のバイオインフォマティクス

システムの破綻によって生じる様々な疾患病態を分子レベルでプロファイリングし、発症のメカニズムを解明するための情報科学。

バイオインフォマティクスの根幹がゲノム DNA 塩基配列であることは言うまでもない。データベース化された塩基配列情報が NCBI, EMBL, および DDBJ のウェブサイトで公開され、それを利用するための各種ツールやサーチエンジンも、それらの組織をはじめとして数多くのサイトから無償で提供されたことにより、ポストゲノムの生命科学が飛躍的な発展をとげることとなった。その一つがプロテオーム研究である。プロテオーム研究は基本的にはタンパク質研究そのものであるが、従来のタンパク質研究と異なる点は、分析の『網羅性』と『ハイスループット』にあり、特に、質量分析によってタンパク質を同定する際のデータベースサーチにその特長がよく現れている^{20,21)}。

プロテオーム研究がスタートした 1995 年当時、分解能が最も高いタンパク質分離法は二次元電気泳動法であった。そのため、『網羅性』と『ハイスループット』が要求されるプロテオミクスにおいて二次元電気泳動がタンパク質の分離法として取り上げられた。その後、技術的困難さゆえに二次元電気泳動が敬遠され、サンプルをいきなりトリプシン消化して得られたペプチド断片を二次元マイクロ LC (liquid chromatography) で分離する方法²²⁾ (「ショットガン法」) が生まれたが、ショットガン方式は定量分析や翻訳後修飾の解析が困難であるなど様々な問題点が残されているために、再び二次元電気泳動に戻る研究者が増えている。二次元電気泳動に基づくプロテオーム解析では、上記の②, ④, ⑤, ⑦, ⑧に関する情報を得ることができる。

3. プロテオミクスの問題点

プロテオミクスはゲノミクスの延長上に登場し、ゲノミクスではカバーできない部分を補うものとして期待されて

いるが、ゲノミクスでは標的DNAの長さが有限であり、研究の到達点が自ずと設定されていたのに対し、プロテオミクスでは対象となるタンパク質の最大数を特定することが困難で、到達点を設定することができないという本質的な問題を抱えている。標的タンパク質の数が無限であることの最大の理由は、タンパク質には『翻訳後修飾』があり、『タンパク質の数 ≧ 遺伝子の数』となることである。第二の理由は、遺伝子は基本的にコピー数が1で、すべての配列が同じ感度で検出できるのに対し、タンパク質は細胞内での発現量(コピー数)に1,000倍以上の差があり、発現レベルの低いタンパク質を分析する際にメジャーなタンパク質が妨害となること、第三は、ゲノムDNAはすべての細胞で同じ配列情報を共有しているのに対し、タンパク質の場合には、実際に発現されるもの(発現プロファイル)が細胞の分化やおかれた環境によって全く異なり、細胞種ごと、細胞の状態ごとに解析を行う必要があるということである。このような理由で、プロテオミクスに『真の網羅性』を要求することは現実的に意味がない。むしろ最近の多くのプロテオーム研究者は、現実即した形で『可及的網羅的なプロテオーム解析』を行うべきであるという考え方に移ってきており、特に疾患プロテオミクスや創薬プロテオミクスなどの応用プロテオミクスにおいては、研究の目的に絞り込んだプロテオミクス(targeted/focused proteomics)²³⁻²⁵⁾を目指す方向に転換されつつある。

4. プロテオーム研究に必要な バイオインフォマティクス

エドマン分解法に基づくペプチドシーケンサーを用いて同定を行っていた時代には、CBBで染色される程度はかなり多量なタンパク質が必要であったが、質量分析によるタンパク質の同定法が開発されたことにより、銀染色やSYPRO Ruby 蛍光染色でかろうじて検出される程度の微量なタンパク質の同定も可能となった。また、所用時間もエドマンシーケンサーでは1サンプルの同定に数時間を要したのにくらべ、質量分析法では1時間当たり数十~数百サンプルの同定が可能となっている。当然のことながら、プロテオミクスでタンパク質を同定するときには、Swiss-Protなどのタンパク質を直接分析して得られたアミノ酸配列データや、TrEMBLやNCBI nrなどのゲノムの情報に基づいて作り出された理論的翻訳アミノ酸配列データが必要である。また実際に質量分析を行って得られた質量スペクトルに最も高いスコアで一致するものを見つけ出すためのデータベース検索ソフト(検索エンジン)も必要である。ちなみに質量分析によるタンパク質の同定法には大きく分けて①peptide mass fingerprinting (PMF)法と②sequence tag (MS-Tag)法の二通りの方法があるが、これらの方法でタンパク質を同定するためのツール(デー

タベース検索エンジン)としては、(A) MATRIX SCIENCE社の Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), (B) UCSF Mass Spectrometry Facilityの Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>), (C) ExPASy Proteomics tools (<http://au.expasy.org/tools/>)などがインターネット上で公開されており、Internet Explorerなどのブラウザを用いて検索を行うことができる(図1)。但しこれらの無料サイトは、時間帯によってはアクセスが錯綜し検索に時間を要したり、リアルタイムによる検索を拒否されることもある。このような事態を避け、ハイスループットな同定を実現するためには、ライセンスを取得し施設内に Mascot 検索サーバーを立ち上げることが必要である。現在 Mascot 検索サーバーのライセンスについては、MATRIX SCIENCE社の日本法人が取り扱っている。

5. プロテオーム研究で得られた情報を収集・管理・ 公開するためのインフォマティクス

プロテオーム研究には、様々な手法が用いられており、それぞれの手法ごとに得られる情報の形態や内容が異なる。このため、手法ごとに最適なバイオインフォマティクスシステムを開発する必要があるが、我々は老化研究を目的として二次元電気泳動法に基づいたプロテオミクスを行っており、老化によって変動するタンパク質の同定には主にMALDI(matrix-assisted laser desorption ionization)-TOF(time of flight)/MS(mass spectrometry)によるPMF(peptide mass fingerprinting)法を利用している²⁶⁻²⁸⁾。そこで本章では、プロテオーム研究によって得られた情報をグループ内で共同管理するために、我々が実際に行っているバイオインフォマティクスについて述べる。

二次元電気泳動に基づいたプロテオーム研究では、まず図2に示す様々な情報が得られる。このうち左側のカラムの情報は、使用したサンプルや試薬、方法などに関するもので、創薬研究等の情報管理が重要な企業系研究機関ではすでに利用されているLIMS(Laboratory Information Management System^{29,30)})と呼ばれる『電子化ラボ情報管理ネットワークシステム』で管理されるべき情報である。さらに臨床プロテオミクスにおいては、ヒトサンプルの情報管理の機密性も要求される。これに対し右側のカラムの情報は、分析の結果に関するもので、分離法としてマイクロLCやSELDI(surface enhanced laser desorption ionization)チップ^{31,32)}を利用した場合には、それらの方法に即したデータ項目がつけ加わる。

我々の共同研究グループが実施している二次元電気泳動に基づいたプロテオーム研究では、等電点や分子量などの定性的データ、発現レベルの変動などの定量的データ、

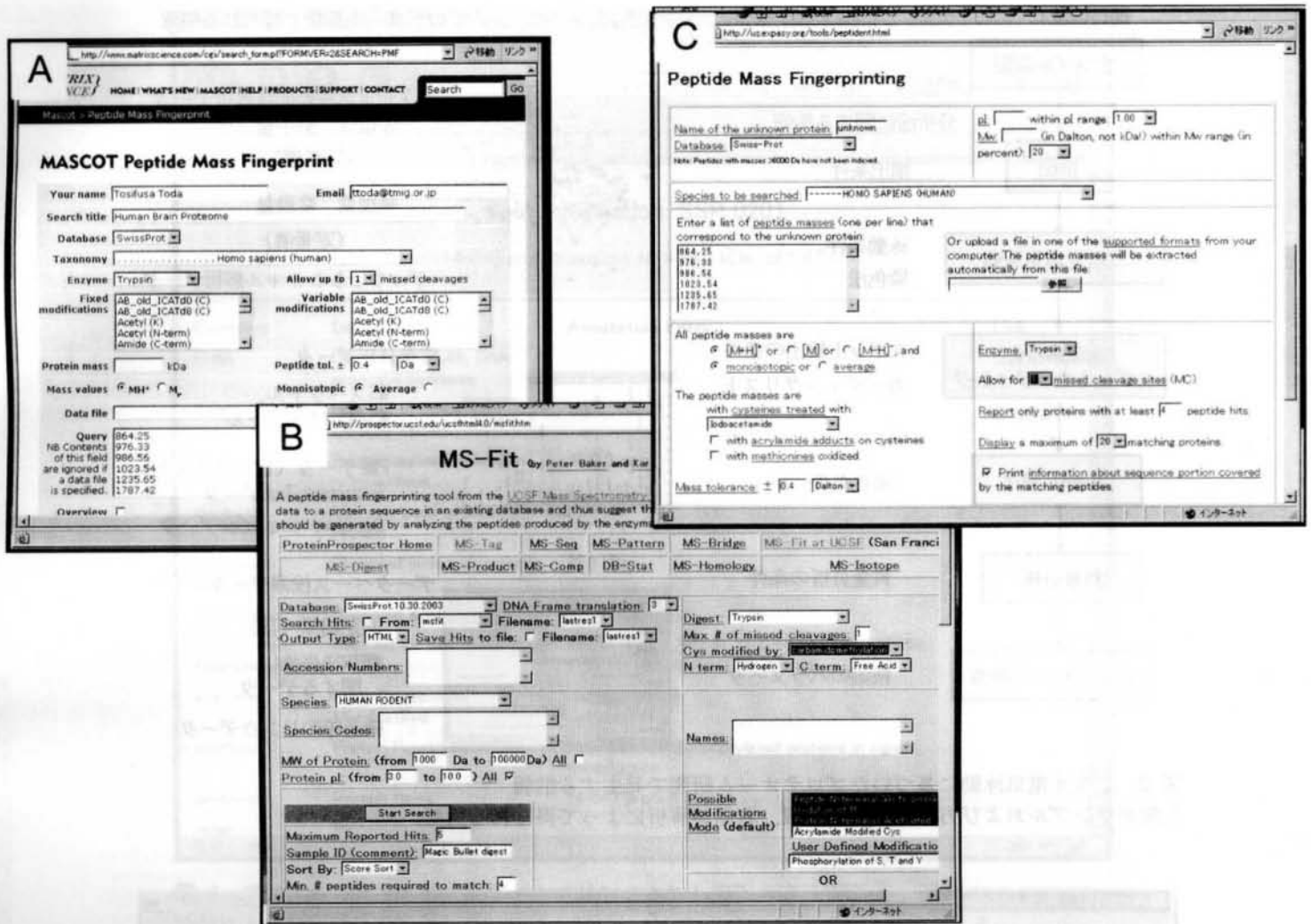


図 1 質量分析データに基づいてタンパク質の同定を行う際に利用されているデータベース検索エンジン (A) MATRIX SCIENCE 社の Mascot, (B) UCSF Mass Spectrometry Facility の Protein Prospector, (C) ExPASy Proteomics tools.

MS スペクトルや MS/MS スペクトル, データベース検索結果などの生データなどを, 二次元電気泳動パターン (2-DE gel map) 上のスポットにリンクした形で保存しているが, それには現在次の 3 通りの方法がとられている。

- ① PDQuest などの画像解析ソフトに付加されたアノテーション機能を用いてデータを保存する。
- ② ファイアウォールの内側に設置された LIMS 機能を有するデータベースサーバーに保存する
- ③ ファイアウォールの外側に設置されたウェブサーバーに XML 形式のファイルとして保存する

このうち①と②は, 東京都老人総合研究所内で共同研究を行っているグループ内で情報を共同することを前提としている。③は基本的には, 所外に向けて情報を発信するためのシステムであるが, 所外の共同研究者と情報を共有するための目的として利用している。以後, 個々の方式について詳しく述べる。

①画像解析ソフトのアノテーション機能を用いたプロテオーム解析データの保存

最近の二次元電気泳動画像解析ソフトには, 検出されたタンパク質スポットにリンクした形で, 様々な情報を保存することができるようになってきている。たとえば, 私たちのラボで利用している Bio-Rad の PDQuest Version 7.3 の場合には, プルダウンメニューの「Analyze」から「Annotate...」を開くと, 図 3 の入力画面が現れる。ここでは二次元電気泳動パターン上で検出されたタンパク質スポットの ID 番号 (ssp number) が「Select Spot(S)」ウィンドウに, デフォルトのデータ項目が「Select Category」ウィンドウに表示されるので, データ入力を開始する前に, 不必要と思われる項目を削除し, 必要な項目を新たに追加する。実際にデータを入力する際には, データ項目とスポット番号を特定し, 「Annotation Entry」のウィンドウ内に, 文字列情報などをペーストする。保存できる情報の種類は, i) テキスト形式の文字列情報, ii) ファイルリンク (画像情報などはこの形式で保存する。これにアクセ

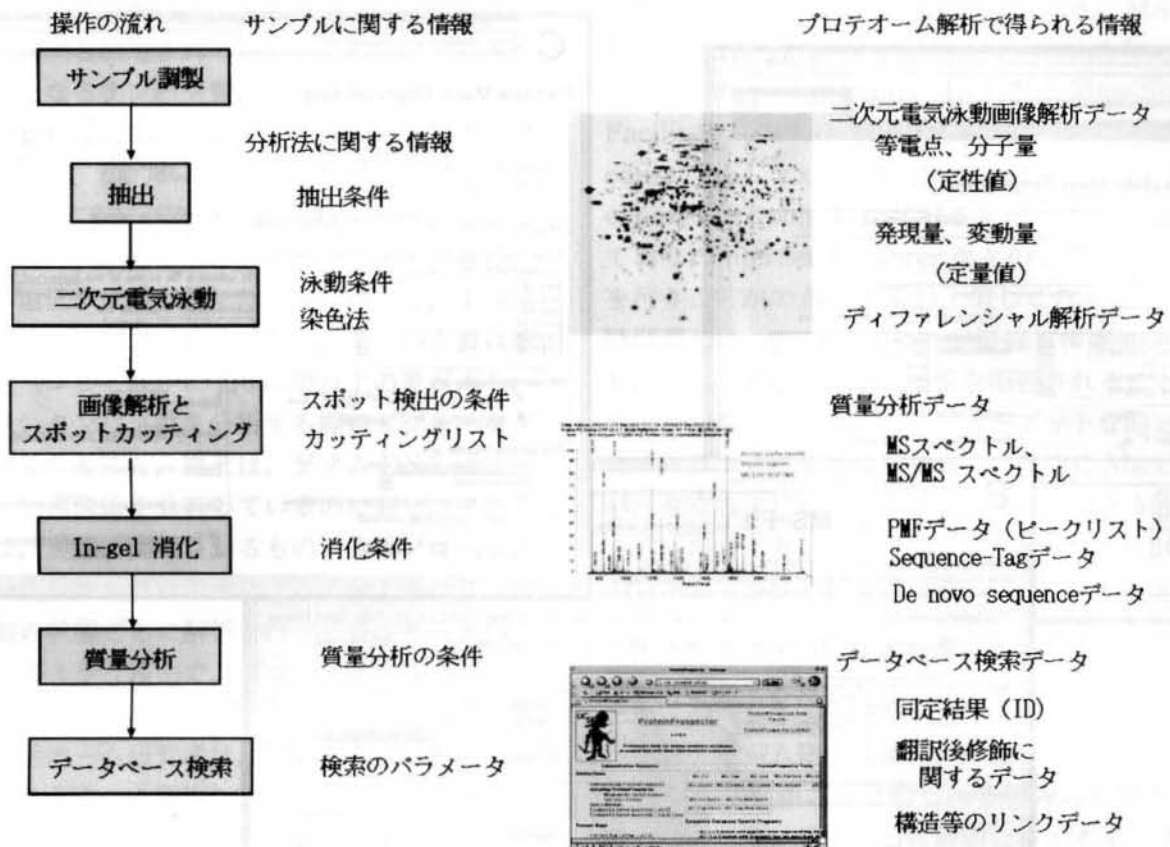


図 2 二次元電気泳動に基づいたプロテオーム研究で発生する情報
左側がサンプルおよび方法に関する情報、右側が解析によって得られる情報。

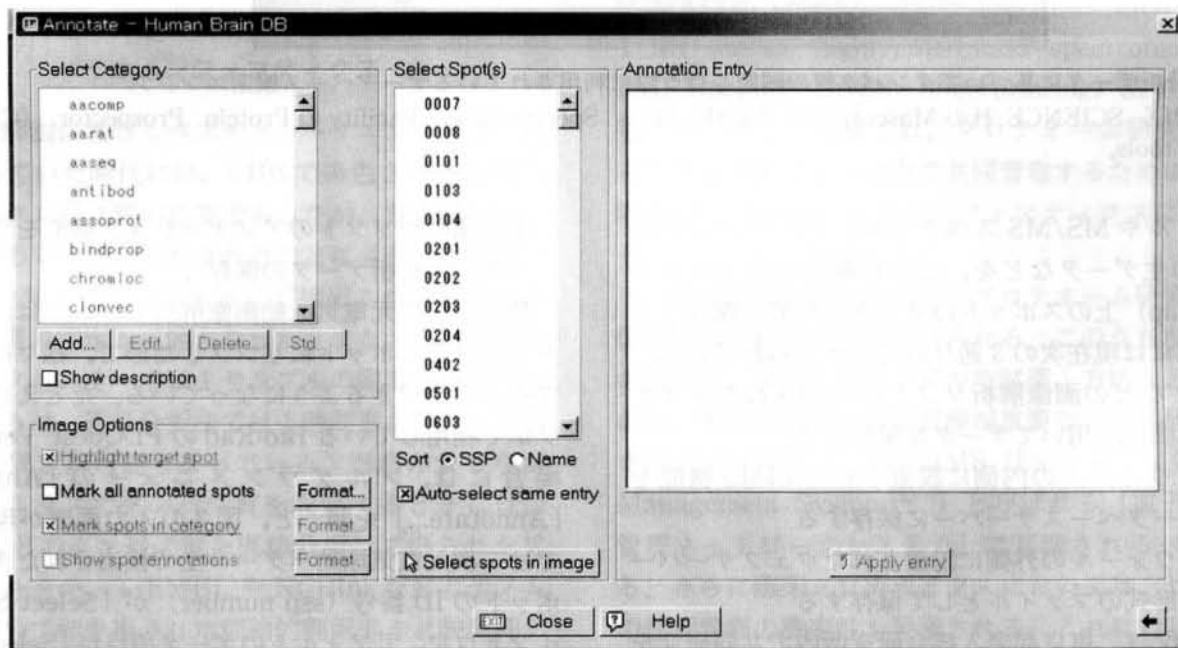


図 3 二次元電気泳動画像解析ソフトを利用したスポット情報（アノテーション）の入力画面
CategoryとSpotを選び、その情報をAnnotation Entryの枠内にペーストすることによって、スポットに情報がリンクされる。

スすると、対応するアプリケーションが起動される), iii) URL リンク (ウェブサーバー上に保存された情報を引用するとき利用する。これをダブルクリックするとブラウ

ザが起動し、URLの内容が表示される)。保存されたアノテーション情報は、二次元電気泳動の画像マップ上にタグとして表示されるほか、スポットをクリックすることによ

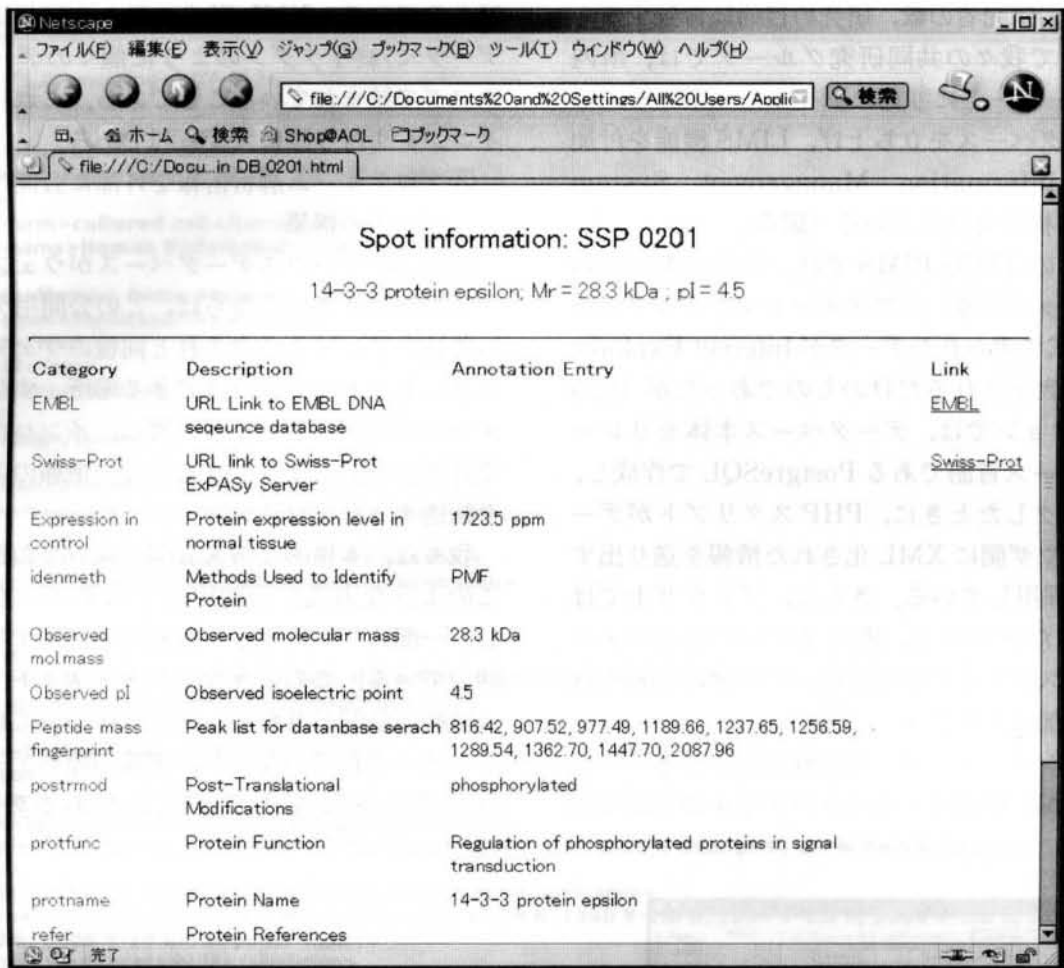


図 4 アノテーションとしてスポットにリンクされた情報の表示画面
情報は HTML 形式で保存されており、Netscape などのブラウザ上に表示される。

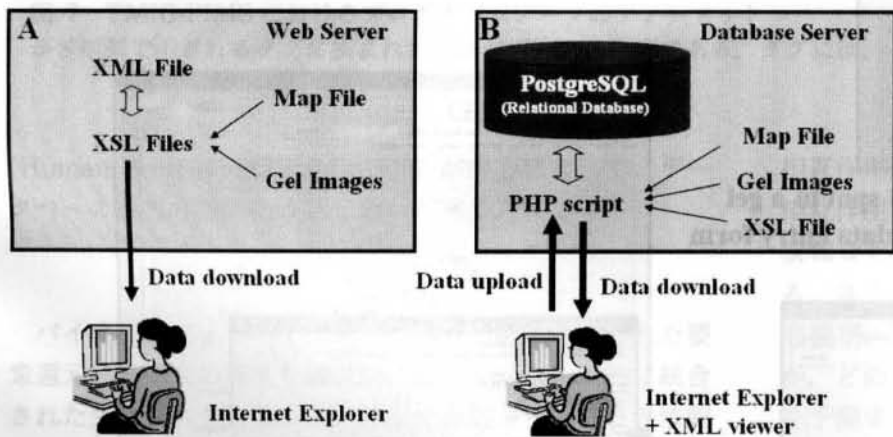


図 5 我々の研究グループで開発中の Proteome Information Management System (TMIG-PIMS) の基本構造

初期バージョン (A) ではすべてを XML ファイル形式で処理する形を採用したが、データマイニングに有利なリレーショナルデータベース形式とするために、最新のバージョン (B) ではデータベースの本体部分を PostgreSQL で構築し、データの入力や表示を行う際には PHP スクリプトを介する方式にあらためられている。

って登録された全情報を図 4 のような形で閲覧することができる。アノテーション情報は HTML 形式でも保存されるので、後述のウェブサーバー上に構築するプロテオームデータベースにリンクすることも可能である。しかしこのような画像解析ソフトのアノテーション機能を用いるデータの保存は、個々の研究者が個人的に管理することを想定して作られており、LIMS のように多くの共同研究者が職

場内のネットを介して情報を共有できるような機能は備わっていない。

②研究組織内で共同研究者が情報を共有するためのインハウスのプロテオームデータベースの構築

このような場合、LIMS (Laboratory Information Management System) 機能を持った市販のデータベースソフトを利用できると大変便利であるが、現時点で我々のよう

な施設の規模や共同研究者の数, 研究の目的に合致するものは少ない. そこで我々の共同研究グループでは, 所内 LAN のウェブサーバー上に独自に開発した XML 形式のプロテオームデータベースを立ち上げ, LIMS 機能を付加した Proteome Information Management System (TMIG-PIMS) の構築を試みている (図 5).

初期バージョンの TMIG-PIMS では, 二次元電気泳動ゲルイメージ (マップ画像) 上でスポットをクリックしたときに, XML 形式で書かれたデータが Internet Explorer などのブラウザに表示されるだけのものではあったが (図 5 A), 最新のバージョンでは, データベース本体をリレーショナルデータベース言語である PostgreSQL で作成し, スポットをクリックしたときに, PHP スクリプトがデータを中継してブラウザ側に XML 化された情報を送り出す方式 (図 5 B) を採用している. さらに, ブラウザ上ではデータを閲覧するだけでなく, 書式 (データ入力フォーム) に情報をペーストするだけで簡単にデータの登録も行えるような改良が加えられている (図 6).

このような情報システムによって登録管理されるデータは図 7 のように XML 形式のテキストファイルの形式で記

録されている. XML 形式の最大の特長は, <開始タグ>データ</終了タグ>のように個々のデータが, 内容を示すタグで挟まれていることである. これは, 後にデータマイニングを行う際に大変有利である.

③プロテオーム解析情報を外部に公開するためのデータベースの構築

前述のインハウスデータベースがウェブサーバーを利用して構築されているならば, この公開用データベースについては, インハウスのそれと同種のウェブサーバーを, インターネットでアクセスできる場所, すなわちファイアウォールの外側にもう 1 台設置し, インハウスのデータの中で外部に公開して差し支えない情報のみを選択的にデータ転送するだけでよい.

我々は, 本格的な情報公開に向けての準備作業として, このような方式で公開用のデータベースを試験的に構築し, 一部のプロテオーム解析結果に関する情報の発信を開始している. このようなインターネット上でのプロテオーム情報の公開と共有のシステムについては, タグの定義などが統一されていないと, 閲覧の際やデータマイニングを行う際に混乱をきたす恐れがあるので, 現在 HUPO

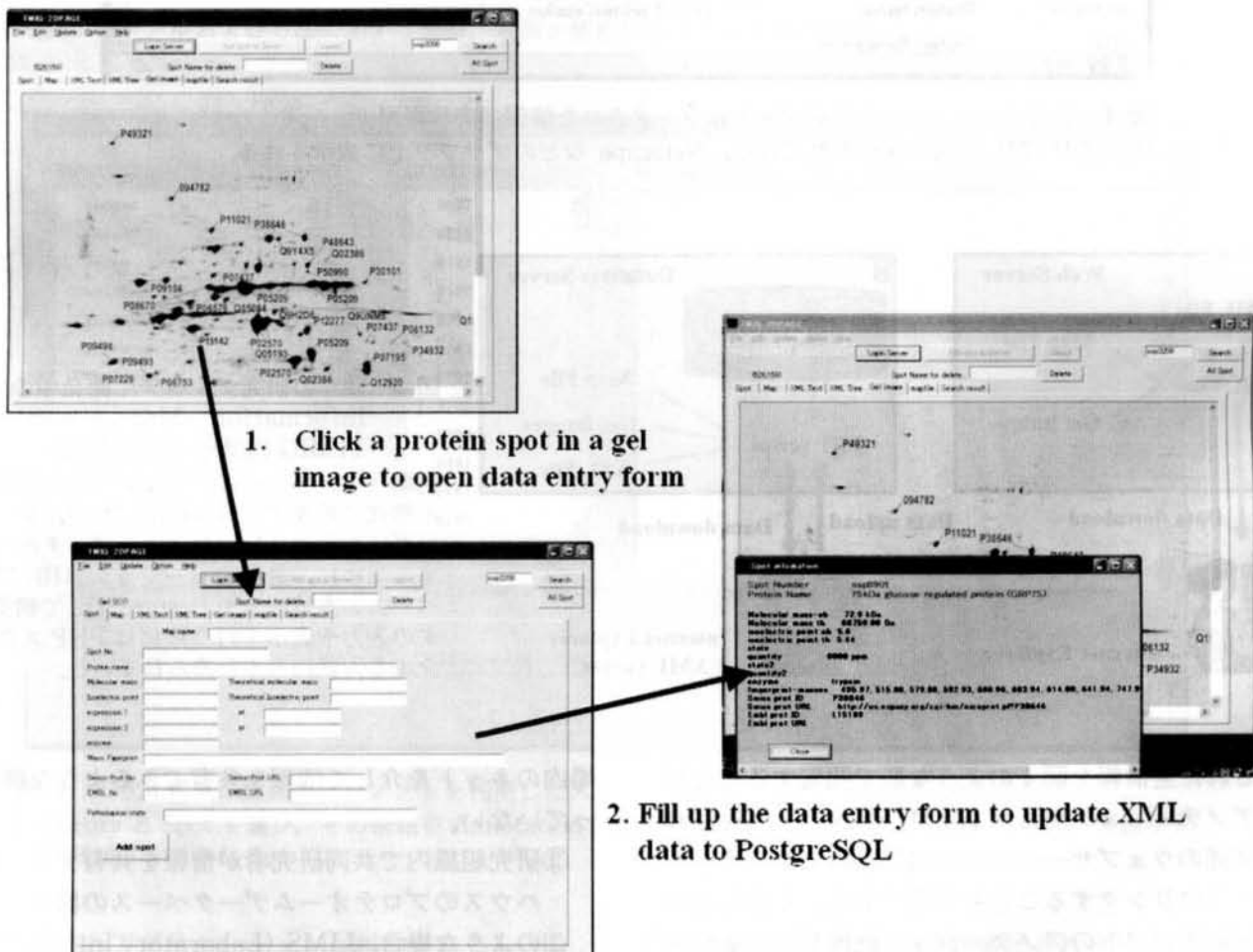


図 6 TMIG-PIMS におけるプロテオームデータの入力画面

スポットをクリックするとデータ入力フォームが表示されるので, そこに情報を書き込むと, 自動的にセーブされる.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" ?>
<dataroot>
  <map>
    <mapname>HUVEC</mapname>
    <date-of-modif>Feburuary 3, 2003</date-of-modif>
    <material>
      <sample-form>cultured cell</sample-form>
      <sample-name>Human Endothelial Cells</sample-name>
      <animal>
        <species>Human, homo sapiens</species>
        <race-strain>Japanese</race-strain>
        <sex>?</sex>
        <age>??</age>
        <disease-treatment>??</disease-treatment>
      </animal>
      <tissue>lung</tissue>
      <cell>
        <line-strain>Endothel. ???</line-strain>
        <in-vitro-treatment>hyperoxia ??</in-vitro-treatment>
      </cell>
      <subcellular-fractionation>no</subcellular-fractionation>
      <protein-concentration>10 mg/ml</protein-concentration>
    </material>
    <methods>
      <extraction>
        <buffer>8.5 M urea, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, 0.4% Ampholine</buffer>
        <homogenization>sonication</homogenization>
        <centrifugation>100,000 x g, 15 min</centrifugation>
        <protein-treatment>no</protein-treatment>
      </extraction>
      <separation>
        <ief-gel>Immobilen drystrip, 18 cm, pH 4-7</ief-gel>
        <ief-buffer>8.5 M urea, 2% Triton X-100, 10 mM acetic acid, 0.01% Orange G, 0.4% Ampholine</ief-buffer>
        <sample-application>20 micro-l on filter paper</sample-application>
        <ief-power-supply>500V-2.0 h, 700 V-1.0 h, 1000 V-1.0 h, 1500 V-1.0 h, 2000 V-1.0 h, 2500 V-1.0 h, 3000 V-1.0 h, 3500 V-1.0 h</ief-power-supply>
        <alkylation>iodoacetamide</alkylation>
        <page-gel>7.5% homogeneous gel plate, 19 x 18 cm</page-gel>
        <page-buffer>Cathode: Tris-Tricine, Anode: 0.2 M Tris-HCl</page-buffer>
        <page-power-suply>20 mA constant</page-power-suply>
      </separation>
    </methods>
  </map>
</dataroot>

```

図7 TMIG-PIMSにおけるプロテオームデータのフォーマット

かぎ括弧で示されるタグに挟まれた部分がデータの内容である。タグには、データの内容がわかる名前が付けられている。

(Human Proteome Organisation) が中心になって、データベース構造の標準化の話合いが進められている。

6. おわりに

バイオインフォマティクスは、個々の階層で得られた要素還元論的研究の成果を論理的に纏め上げ、俯瞰的に統合された生体システムとしての知識に発展させるための情報科学である。ここでは、実際に我々が行っている二次元電気泳動に基づいたプロテオーム研究について、情報の収集管理共有を行うシステムについて述べたが、この他にも二次元マイクロ LC に基づいたショットガンプロテオミクスや、SELDI 法に基づくプロテインチッププロテオミクスなど、様々な形のプロテオミクスにはそれぞれに最適なバイオインフォマティクスの形がある。また、タンパク質の機能を解明するためには、タンパク質の立体構造を知ること重要であるが、多くのタンパク質は他のタンパク質と

相互作用し、協調的に働いている。そのためタンパク質間相互作用に関する情報やタンパク質複合体の形成に関する情報なども、タンパク質の機能を理解する上で重要である。さらに個々のタンパク質がシグナル伝達回路や代謝調節機構、遺伝子発現調節機構などのどこの位置にあるのか、どのタンパク質の支配下にあるかといったパスウェイを予測するコンピュータシミュレーション技術などもバイオインフォマティクスの重要な要素となる。

最後に、本稿執筆の機会を与えて下さった山口大学の中村和行先生に深謝いたします。また、LIMS 機能を持つ TMIG-PIMS の開発は、当プロテオーム共同研究グループの森澤拓研究助手との共同研究の中で行われており、システムの開発に当たっては、日本バイオラッドの東方友久氏や島津製作所の西根勤氏など多くの方々にご助力をいただいたことを申し添えます。

文 献

- 1) Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., & Humphery-Smith, I. (1995) *Electrophoresis* **16**, 1090-1094
- 2) Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., & Williams, K.L. (1996) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19-50
- 3) Wiemer, J.C. & Prokudin, A. (2004) *Pathol. Res. Pract.* **200**, 173-178
- 4) White, C.N., Chan, D.W., & Zhang, Z. (2004) *Clin. Biochem.* **37**, 636-641
- 5) Maojo, V. & Martin-Sanchez, F. (2004) *Methods Inf. Med.* **43**, 208-214
- 6) Aggarwal, K. & Lee, K.H. (2003) *Brief Funct. Genomic. Proteomic.* **2**, 175-184
- 7) Thomas, J.D., Lee, T., & Suh, N.P. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 75-93
- 8) De Rienzo, F., Gabdoulline, R.R., Wade, R.C., Sola, M., & Menziani, M.C. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1123-1142
- 9) Yakunin, A.F., Yee, A.A., Savchenko, A., Edwards, A. M., & Arrowsmith, C.H. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 42-48
- 10) Innis, C.A., Anand, A.P., & Sowdhamini, R. (2004) *J. Mol. Biol.* **337**, 1053-1068
- 11) Traxler, E., Bayer, E., Stockl, J., Mohr, T., Lenz, C., & Gerner, C. (2004) *Proteomics*, **4**, 1314-1323
- 12) Kim, S.I., Voshol, H., van Oostrum, J., Hastings, T.G., Cascio, M., & Glucksman, M.J. (2004) *Neurochem. Res.* **29**, 1317-1331
- 13) Freeman, W.M. & Hemby, S.E. (2004) *Neurochem. Res.* **29**, 1065-1081
- 14) Figeys, D. (2004) *Brief Funct. Genomic. Proteomic.* **2**, 57-65
- 15) Osman, A. (2004) *Methods Mol. Biol.* **270**, 403-422
- 16) Cho, S., Park, S.G., Lee do, H., & Park, B.C. (2004) *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 45-52
- 17) Kumar, G.K. & Klein, J.B. (2004) *J. Appl. Physiol.* **96**, 1178-1186
- 18) Emmett, M.R. (2003) *J. Chromatogr.* **1013**, 203-213
- 19) Butterfield, D.A. (2004) *Brain Res.* **1000**, 1-7
- 20) James, P. (1997) *Q. Rev. Biophys.* **30**, 279-331
- 21) Henzel, W.J., Watanabe, C., & Stults, J.T. (2003) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 931-942
- 22) Wolters, D.A., Washburn, M.P., & Yates, J.R. 3rd. (2001) *Anal. Chem.* **73**, 5683-5690
- 23) Archambault, V., Chang, E.J., Drapkin, B.J., Cross, F.R., Chait, B.T., & Rout, M.P. (2004) *Mol Cell.* **14**, 699-711
- 24) Brooks, H.L., Sorensen, A.M., Terris, J., Schultheis, P.J., Lorenz, J.N., Shull, G.E., & Knepper, M.A. (2001) *J. Physiol.* **530**, 359-366
- 25) Dos Remedios, C.G., Liew, C.C., Allen, P.D., Winslow, R. L., Van Eyk, J.E., & Dunn, M.J. (2003) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 251-260
- 26) Toda, T. (2001) *Ann. NY Acad. Sci.* **928**, 71-78
- 27) Toda, T. (2000) *Exp. Gerontol.*, **35**, 803-310
- 28) Tsugita, A., Kawakami, T., Uchida, T., Sakai, T., Kamo, M., Matsui, T., Watanabe, Y., Morimasa, T., Hosokawa, K., & Toda, T. (2000) *Electrophoresis* **21**, 1853-1871
- 29) Hunkapiller, T. & Hood, L. (1991) *Biotechnology (NY)*, **9**, 1344-1345
- 30) Bund, C., Heinemann, G.W., Jager, B., & Trinkler, M. (1998) *Pharm. Acta Helv.* **72**, 349-356
- 31) Tang, N., Tornatore, P., & Weinberger, S.R. (2004) *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 34-44
- 32) Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y., & Yamori, T. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 18-25