総　説

安定同位体利用技術

プロテオーム解析のための安定同位体標識試薬

九山浩樹，西村　紀

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.56, No.6
June 2007

Japan Radioisotope Association
http : //www.jrias.or.jp/

RADIOISOTOPES, **56**, 303-314 (2007)

総　説

安定同位体利用技術

プロテオーム解析のための安定同位体標識試薬†

九山浩樹*，西村　紀*,**

*大阪大学蛋白質研究所
565-0871　大阪府吹田市山田丘 3-2
**株式会社 島津製作所　分析計測事業部
ライフサイエンスビジネスユニット　ライフサイエンス研究所
604-8511　京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1

Key Words：proteomics, quantification, differential analysis, 2-nitrobenzenesulfenyl chloride, stable isotope

1. はじめに

生命現象は遺伝子による精緻な制御のもとにある。そしてその直接的な担い手は主として蛋白質・ペプチドであると考えられてはいたが，生命現象の解明は遺伝子からのアプローチによって可能であるとされていた。このような潮流のもとで人的資源等が投入され生命の解明に大きく寄与してきた。しかしながら，mRNA レベルでみた遺伝子発現の変化が必ずしも細胞内蛋白質の量的変化とは一致しないこと，また多くの蛋白質が翻訳後に修飾を受けて機能するが，この翻訳後修飾も遺伝子情報からだけでは解明できないことなどから蛋白質レベルでの解析が極めて重要視されるようになった。著者（O. N）は製薬企業の基礎研究部門に長く籍を置き，創薬研究に携わった経験からこのことを強く感じている。

このようなコンテクストにおける蛋白質の解析とはプロテオーム解析と呼ばれる。プロテオームという言葉は，gene-genome からの類推から生まれた言葉であり，プロテオーム解析とはある特定の細胞中で発現している蛋白質の時系列での網羅的定量解析と一般的に定義される。プロテオーム解析の方法論として従来から一般的なものは二次元電気泳動で分離・定量し，質量分析装置により蛋白質の同定を行うものである（2D-PAGE）。しかしながらゲルを用いる分離法には，ゲル板そのものの品質均一性，染色の再現性，極端な等電点・分子量を持つもの及び疎水性蛋白質などゲルでの分離に適用できない蛋白質の存在などの問題点があることが認識されており[1]，また，見かけ上は単一スポットであるが，co-elution によって複数の蛋白質が含まれる場合の蛍光検出での定量における問題点が安定同位体試薬による方法との比較で論じられている[2]。このような問題点を解決する方法として開発されたのが安定同位体で標識された試薬と質量分析を組み合わせた方法論である。

本稿では，まずそのプロトコールについて述べ，次いで現在報告されている試薬について概

† “Applications of Stable Isotopes in Life Sciences”. Stable Isotope Labeling Reagents for Proteome Analysis.
Hiroki KUYAMA* and Osamu NISHIMURA*,** :*Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan, **Life Science Laboratory, Life Science Business Unit, Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation, 1, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan.

観する。最後に筆者らが開発した 2-nitrobenzenesulfenyl chloride（NBSCl）を用いる方法[3]について解説する。

2. 安定同位体試薬を用いるプロテオームーディファレンシャル解析のプロトコール[4)−8)]

安定同位体を用いた試薬の蛋白質（あるいはペプチド）への導入は生体組織あるいは体液から抽出された蛋白質・ペプチドサンプルに対して行う方法（in vitro ラベル化）と，培養細胞の培地に添加する方法（in vivoラベル化）とに大別される。

2･1 in vitro ラベル化

生体サンプルから抽出・精製された蛋白質を安定同位体試薬でラベル化する方法である。2･2 で述べる in vivo ラベル化と比較すると，抽出された蛋白質を出発物質とするため，培地中で生育できない組織・細胞などにも適用でき，一般性がある方法論である。（相対）定量解析（ディファレンシャル解析）であるから比較の対象とするものが必要である。例えば，ある病気の場合に変動している蛋白質のプロテオーム解析を行う場合は，病態の組織あるいは体液から抽出された蛋白質と病態でない組織あるいは体液から抽出された蛋白質を用意する。ラベル化試薬にはその構成原子すなわち水素（^{1}H），炭素（^{12}C），窒素（^{14}N）等のうち単一，あるいは複数組み合わせてそれぞれの安定同位体（D，^{13}C，^{15}N）と置換したものと，そうでないものの 2 種（重い試薬と軽い試薬）を用いる。これら 2 種類のラベル化試薬の質量は質量分析でのシグナルの同位体分布を考慮しペアで観測されるピークの重なりが相対定量に影響しないように 3 から 4 以上の差を持つように設計される。病態サンプルに対して，例えば重い試薬でラベル化し，もう一方の健常サンプルには軽い試薬と反応させる。このステップまでは二つのサンプルを独立して処理するが，この反応以降は混合して進める。すなわち，二つを混ぜた反応溶液を脱塩精製，バッファー交換などを行った後，酵素消化を行い，次いでラベル化されたペプチド断片をアフィニティカラムで濃縮後，更に液体クロマトグラフィなどで分離精製し，質量分析を行う。図 1 にこの手順をまとめた。

2･2 in vivo ラベル化

この方法は生物体中での代謝によって安定同位体を含む化学種を取り込ませ，蛋白質をラベル化する方法である。従来からの放射性同位元素の取り込みによる方法論と類似している。細胞の培地中に安定同位体元素を含む化合物を加え，細胞の成長とターンオーバー（代謝回転）により細胞中の全ての蛋白質に取り込ませる。図 1 に示したように，培地中に加える安定同位体元素含有化合物が重いものと軽いものの 2 種あるため，細胞培養は別々に行う。2･1 で述べた in vitro ラベル化と実験プロセスを比較した場合，この方法は培地中で生育できないものには適用できないという点では一般性がないが，ラベル化は生体中でなされ，細胞の段階で混合されて以後の種々のプロセスを受けるところに有利な点がある。すなわち，混合後のプロセス，例えば蛋白質抽出，精製などは混合状態で進められ抽出効率・回収率などは 2 種のラベル化された蛋白質・ペプチドで差がないため，これら各ステップは後の質量分析装置での定量解析に影響を与えない（図 1）。

3. 発現蛋白質の相対定量比較（ディファレンシャル解析）に用いられる安定同位体標識試薬

ここでは，ラベル化のターゲットとなるアミノ酸残基及び官能基からみた試薬についていくつか紹介する（図 2，図 3）。なお，トリプトファン残基に対する NBS 試薬によるラベル化の方法論については 4 で解説する。

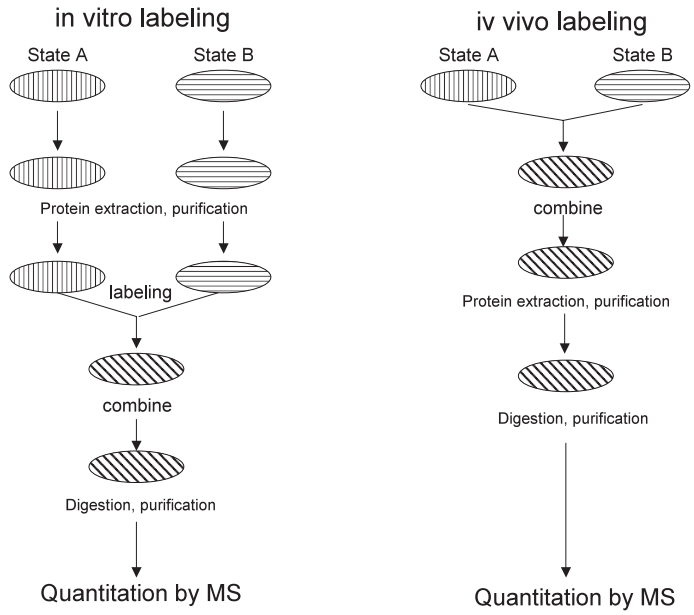


図1　解析プロトコール概略

3･1　システイン（スルフヒドリル基）

1999年にAebersoldらによって報告されたisotope-coded affinity tag（ICAT）法[9]がこの種の方法論の最初である。この試薬はヨウ素化された反応部位，重水素化されたポリエーテルリンカー部，そしてビオチン部分からなる。リンカー部の水素が8個重水素に置換された構造であるので重い試薬と軽い試薬の質量数の差は8である。ビオチン部分はラベル化後の酵素消化断片の混合物からアビジンを用いるアフィニティカラムによってラベル化されたペプチド断片のみを濃縮・精製するために用いられる。重水素によって質量数の差を与える方法は液体クロマトグラフィで同位体効果がみられ溶出時間に差があるため，後に^{13}Cによって質量差をあたえる構造の化合物が開発された（Cleavable ICAT試薬[10,11]）。この他，システイン（スルフヒドリル基）へのラベル化試薬としてacrylamide[12,13]（D×3），2-vinylpyridine[14]（D×4），iodoacetanilide[15]（D×5）などが報告されている（図2）。

3･2　リジン（アミノ基）

アミノ基一般をターゲットとする試薬については3･4で述べるが，リジン残基のアミノ基はO-methylisoureaによって選択的にグアニジノ化されることを利用したものである[16,17]。重い試薬の化学構造はグアニジノ基の炭素原子，二つの窒素原子がそれぞれ^{13}C，^{15}Nで置換されたものであり，軽い試薬との質量数の差は3である。リジン残基のアミノ基のグアニジノ基への変換は，すなわち残基としてはリジンのホモアルギニンへの変換である。MALDI-TOFMS（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry）を用いた質量分析という観点から見てみれば，この試薬でラベル化された蛋白質はトリプシンによる（一般的な）酵素消化を行った場合，得られるペプチド断片の全てのC末端にアルギニンあるいはホモアルギニンが位置することになる。一般的にC末端にアルギニンを有するペプチドは，MALDI-MS（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry）で

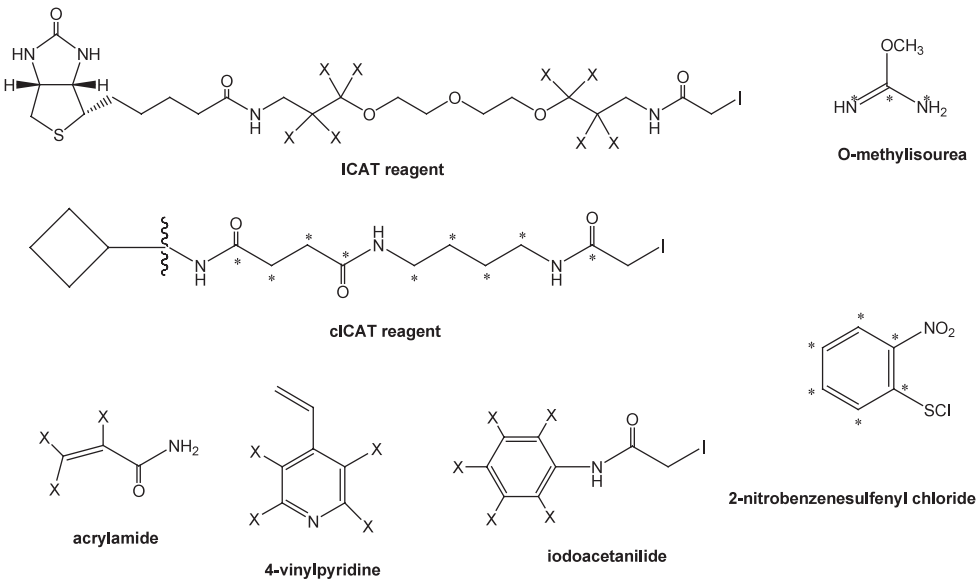


図 2　安定同位体元素を含む試薬（その 1）
X : H or D, * : (^{12}C or ^{13}C) or (^{14}N or ^{15}N)

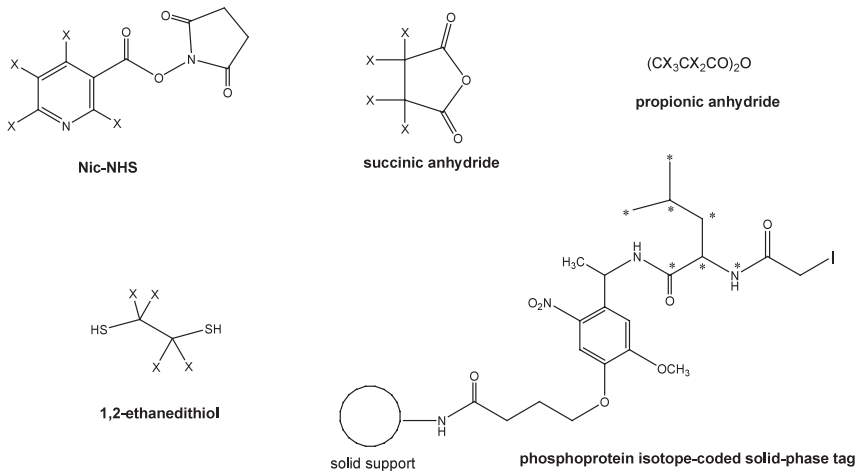


図 3　安定同位体元素を含む試薬（その 2）
X : H or D, * : (^{12}C or ^{13}C) or (^{14}N or ^{15}N)

の感度が良いことが知られているので，トリプシン消化で生ずるペプチド断片の全てを感度よく観測することができる。また，タンデムマス測定時のフラグメントイオンが単純化されるので de novo 配列解析にも有効であることが報文[18]中で述べられている（図 2）。

3･3　リン酸化セリン・スレオニン

これは翻訳後修飾のひとつである蛋白質のリン酸化をターゲットとした解析法である。この方法はセリンあるいはスレオニンの水酸基とエステル結合したリン酸基が塩基性条件下でベータ脱離反応を起こすことを基礎としている。ベータ脱離が起こったセリン及びスレオニン残基

はデヒドロアラニン骨格となり，α,β–不飽和カルボニル系を有する残基へと変化する。生じたα，β–不飽和カルボニル系はマイケルアクセプタであるので，適当な求核試薬を働かせてマイケル付加反応することにより安定同位体で標識された試薬でラベル化することができる。求核試薬・ラベル化試薬としては，1,2エタンジチオール[19]（D×4）等のチオール誘導体が用いられ，また，光開裂性リンカーを有する化合物[20]（^{13}C×6，^{15}N×1）等をマイケル付加反応後に生じるSH基に反応させる2段階での導入が報告されている。これらを用いると，質量数の差がそれぞれ4及び7となる（図3）。

3･4　アミノ基

従来から知られているアミノ基の修飾試薬に安定同位体元素を組み込んだ試薬がいくつか開発されている。ラベルするアミノ基は蛋白質のN末端のみ，リジンのε–アミノ基のみ（3･2），酵素消化後のペプチドに対するラベル化など，いくつかの方法が報告されている。これらの方法と関連するが，蛋白質中のアミノ基は数が多く，ラベル化後の酵素消化ペプチド混合物は極めて複雑であるので，予め蛋白質の段階で2D–PAGE，HPLCなどで分離しておくか，リジンのグアニジノ化の場合もそうであるがラベル化―酵素消化後のペプチド混合物をHPLCで分離精製して質量分析を行う等，複雑さを小さくするように実験系が工夫されるのが普通である。ラベル化試薬としては，コハク酸無水物[21]（D×4），ニコチン酸のN–ヒドロキシコハク酸イミドエステル[22),23)]（Nic-NHS：D×4），プロピオン酸無水物[24]（D×10），ホルムアルデヒド[25]（D×2，^{13}C×1）などがあげられる（図3）。

2D–HPLC等の分離手法の発展と，多検体の高速かつ高効率な解析を可能にする質量分析装置（及び解析ソフトウェア）の進歩を背景にした，蛋白質消化断片中のアミノ基を全てラベル化してプロテオーム解析を行うという方法も開発されている（iTRAQ法[4),26)]）。

3･5　その他

C末端及び側鎖のカルボキシル基をエステル化によりラベル化する方法[27),28)]，セリン及びスレオニン残基のO–グリコシル化部位のラベル化による方法[29)–31)]，^{18}O水中でのトリプシン消化により各消化断片にC末端に^{18}Oを導入する方法[32),33)]などが報告されている。

4.　トリプトファンをターゲットとするプロテオーム解析法及びそのラベル化試薬

ここからは，筆者らが開発したプロテオーム解析法[3)]について述べる。この方法は蛋白質構成アミノ酸残基中のトリプトファン残基をラベル化のターゲットとするもので，ラベル化にはハロゲン化スルフェニル試薬のひとつ，塩化2–ニトロベンゼンスルフェニル[34),35)]（2-nitrobenzenesulfenyl chloride：NBSCl）（別名：2-nitrophenylsulfenyl chloride：NPSCl）を用いる。

トリプトファン残基は生体中で，例えば触媒作用等，様々な働きを担っており，蛋白質の生物活性に重要な寄与をもつ残基として知られている。プロテオーム解析を目的とする場合，カバー率が重要なファクターであるが，トリプトファン残基の蛋白質中での分布は，マウスあるいはヒトの場合90% 以上[36)]であり，システイン残基の場合の95% と比べても遜色が無いと考えられる。また，個々の蛋白質での含有率は最も低いアミノ酸残基であるので最終的に得られるマススペクトルの複雑さがかなりの程度減少することが予測された。塩化ベンゼンスルフェニル（NBS）試薬の反応性については，報告[34),35)]がなされており，選択性よくトリプトファン残基に反応することが知られている。ラベル化―酵素消化後の目的ペプチド断片の分離・濃縮に関して，トリプトファン含有ペプチドがセファデックス系の充填剤に親和性を示すことが報告[37),38)]されており，この方法では，トリプトファン残基の側鎖インドール環を疎水性の2–ニトロベンゼンスルフェニル基で修飾するため，疎水性が更に大きくなりセファデックス系の充

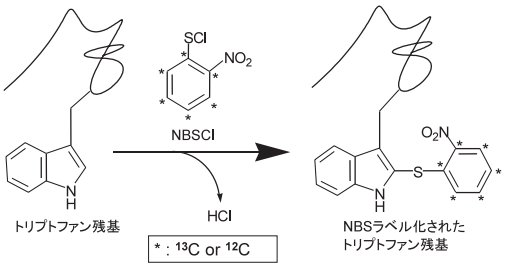


図4　トリプトファン残基とNBS試薬との反応

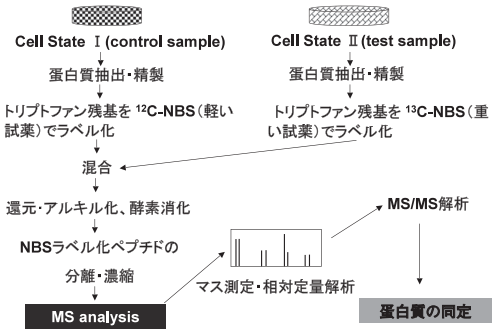


図5　NBS法のプロトコール概略

填剤に対してより強い親和性を示すと予想された。質量タグとしての2–ニトロベンゼンスルフェニル基は質量数が小さく（m/z：153）構造が比較的単純であるので，質量分析を行う際にタグ由来のフラグメンテーションによってデータベース検索に悪い影響を与えないと予測した。以上のようなストラテジーで本法の開発を進めた。

4･1　原理と実験プロセス

NBS試薬はトリプトファン残基のインドール環を酸性条件下で選択的に修飾し，重い試薬と軽い試薬が導入されたそれぞれのラベル化ペプチドの質量数の差は6Daである。図4にトリプトファン残基とNBS試薬の反応を示す。本法はNBSClのトリプトファン側鎖のインドール環に対する選択的な反応（求電子置換反応）に着目したところに新規性がある。一般的にハロゲン化アリールスルフェニル試薬（2-nitrobenzenesulfenyl chloride[34),35)]，4-nitrobenzenesulfenyl chloride[39)]，2,4-dinitrobenzenesulfenyl chloride[40)]，2-nitro-4-carboxybenzenesulfenyl chloride[37),41)]，等）でこのような反応性が以前から知られている。これらのうちで2-nitrobenzenesulfenyl chlorideはトリプトファン，システイン残基以外のアミノ酸残基とは事実上反応しないことが報告[35)]されていることから，本法でのラベル化試薬として採用した。反応の選択性に関しては，トリプトファン，システイン残基の双方に反応し，これら両者間での選択性はないと言ってよい。しかしながら，生成する結合様式はトリプトファン残基とはスルフィド結合，システイン残基とはジスルフィド結合であるので，NBSタグが結合したシステイン残基は，以下にのべるように実験プロセス中の（蛋白質中のジスルフィド結合の）還元操作の際に還元的開裂を受けてスルフヒドリル基に戻り，次のヨードアセトアミドによるアルキル化でシスチン由来のスルフヒドリル基とともにアルキル化される[3)]。

さて，実験プロセスの概略は次の通りである。生体試料から抽出した蛋白質を，1）変性させ，一方のサンプルを軽い試薬で，もう一方を重い試薬でラベル化する。2）これら二つのサンプルを混合し，過剰の試薬等をゲルろ過（セファデックスLH–20等）により除去する。3）サンプル蛋白質中のジスルフィド結合を還元し次いでアルキル化する。4）酵素消化を行い，ペプチド混合物とする。5）NBSラベル化ペプチドをフェニルセファロースカラムで分離・濃縮する。6）必要ならば，更に逆相のHPLCで分離して質量分析を行う。上述のように，このプロセス全体で見ればNBSタグはトリプトファン残基のみに結合し選択的な反応が達成される（図5）。このプロセスは蛋白質変性剤及びラベル化ペプチド濃縮カラムの選択などで改良を加え[42)]，またMALDI–TOFMSでの検出の際のマトリクスの探索を行って，NBSラベル化ペプチドを選択的に感度よく検出するマトリクス添加剤（3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid）を見出している[43)]（図6）。

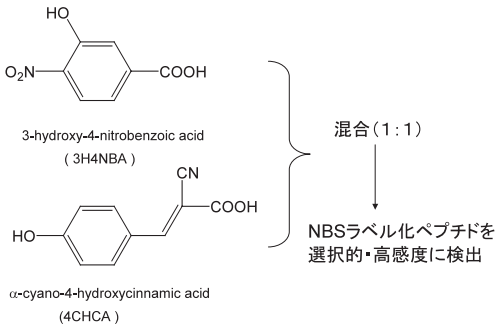


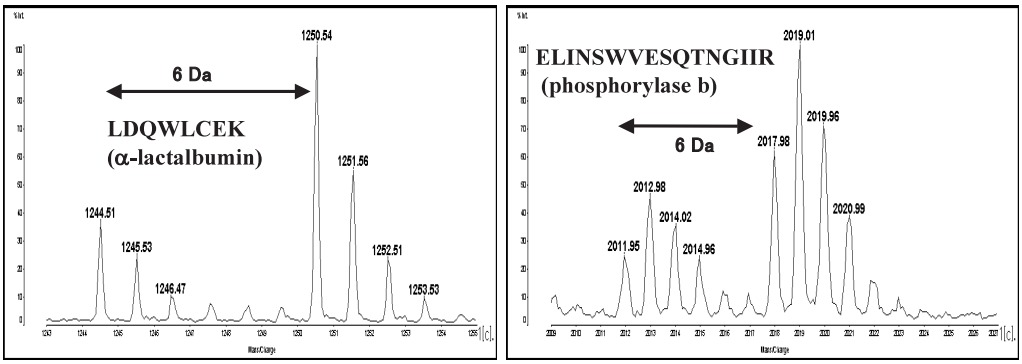
図 6　NBS ラベル化ペプチドを高感度・高選択的に検出するための混合マトリクス法

4･2　モデル蛋白質を用いた相対定量の実例[3)]

実際のマススペクトル上でどのようなシグナルが観測されるかをモデル蛋白質を用いた実験から例を示す。用いた蛋白質は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（rabbit），phosphorylase b（rabbit），ovalbumin（chicken），α-lactalbumin（bovine）の 4 種であり，これらを用いて二つの状態を次のようにモデル化した：状態 A（4 種を各々 12.5 μg），状態 B（4 種を各々 25 μg）。これら二つの状態間での 4 種の蛋白質の比はいずれも 1：2 である。このように調製した二つのサンプルを 4･1 で概略を述べたプロセスに従って処理し，目的とする NBS ラベル化ペプチドの混合物を得た。この混合物を MALDI-TOFMS（AXIMA-CFR：島津製作所）で測定したスペクトルを図 7 に示す。ここでは例として 4 種の蛋白質のうち，α-lactalbumin 由来の LDQWLCEK と phosphorylase b からの ELINSWVESQTNGIIR のシグナルを抽出した。いずれもペプチド断片中に一つのトリプトファン残基を有するため質量数 6Da 差のペアとして観測される。それぞれのペアピークの強度比は 1：2 であり，調製したモデル系での設定比とよい一致を示している。プロテオーム解析では質量分析装置での測定と同時に解析ソフトによる蛋白質同定も重要な位置を占める。図 8 にはデータベース検索による蛋白質同定の例を示す。これは lysozyme（chicken）を材料とした実験からのデータであるが，*m/z*：1 198，1 204 に観測される 6Da 差のペアピークの一方，*m/z*：1 204 のピークに対して PSD を行ってマスコット検索した結果である。ニワトリ由来のリゾチームであることがペプチドの配列情報とともに一位にランクされている。

4･3　生体試料を用いた実例[3)]

実際の生体試料であるラット血清に対して筆者らの方法を適用して発現蛋白質の解析を試みた。用いた血清の由来は，Crj：Wister（正常



α-lactalbumin及び phosphorylase b由来のラベル化ペプチドを示す。それぞれのペアピークの強度比は1：2であり、モデルとして設定した比率と良い一致を示した。

図 7　モデル蛋白質（4 種混合）での一例

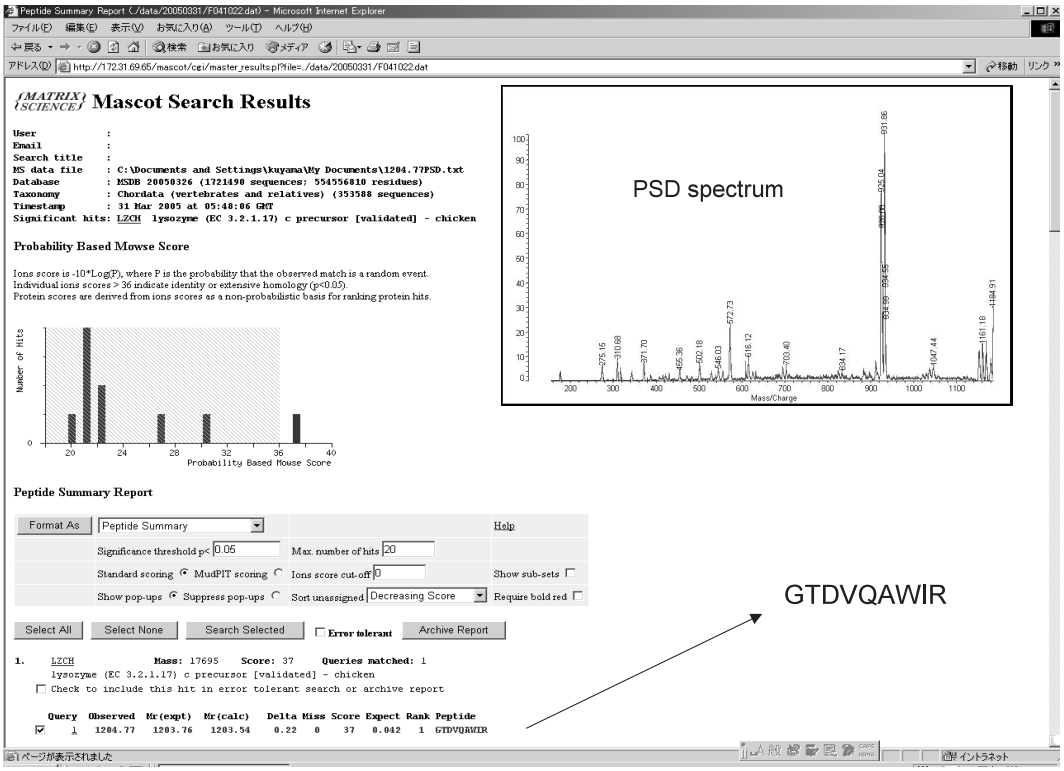


図 8　蛋白質のデータベース検索例

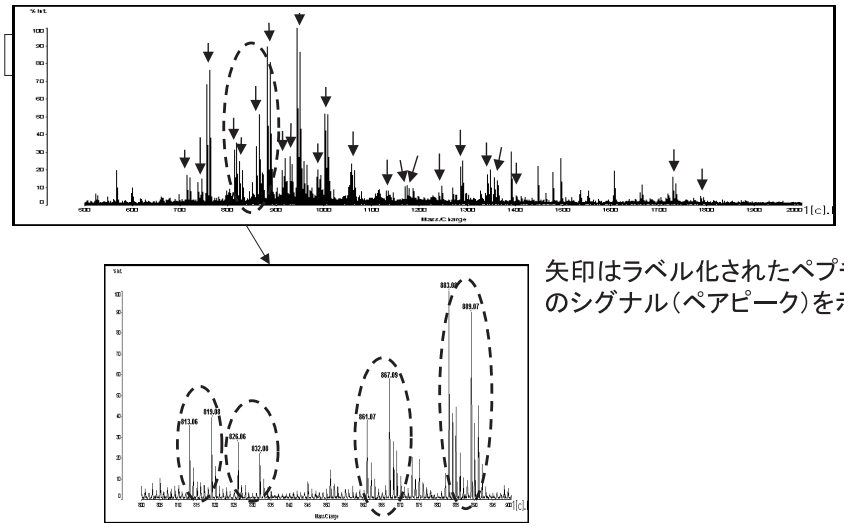


図 9　ラット血清（正常及び高血糖）を用いた解析例

ラット）及び Gk/Crj（高血糖ラット）である。各々 2 μL の血清（総蛋白量 100 μg 相当）を 4･1 で述べたプロセスに従って処理した（正常血清を軽い試薬で，高血糖血清を重い試薬でラベル化した）。次いで得られたラベル化ペプチド混合物を MALDI-TOFMS で分析した。図 9 にはそのマススペクトルを示した。図中，矢印で示すようにラベル化されたペプチドのペアピー

クが多数観測された。蛋白質の同定等は現在進行中であるのでここでの記述は控えるが，HPLCと微少フラクションコレクタ（AccuSpot：島津製作所製）とを組み合わせたシステムによるラット及びマウス血清の分析例は報告済みである[44]。生体からのサンプルを用いたNBS法による研究（バイオマーカー探索）に関しては，乳癌細胞を題材とした研究結果が既に報告[2]されている。その他大腸癌[45),46)]，肝臓癌[47)－49)]，腎臓癌[50),51)]などを題材にして探索研究を進めており，マーカーの候補蛋白質が複数見つかっている。

5. おわりに

この稿，前半部分では現在までに報告されている安定同位体標識試薬の中から，いくつかのものについてターゲットとなる残基あるいは官能基の観点から分類し解説した。後半では筆者らの開発したNBS法について実際のマススペクトル上のデータを示しながら解説し，現在進めている癌マーカー探索についても言及した。安定同位体試薬と質量分析装置を用いるプロテオーム解析は試薬の開発，装置側の進歩等により一大研究分野となっており，方法論も数多く報告されているが，マーカーとなる蛋白質を発見したという報告は現在のところみられない。このような現状では，種々提案されている方法論の中から自身の目的に合った，適切と考えられるものを選択して解析を行うのもひとつの方向であり，他とは違った新規な試薬・方法論を開発してターゲット蛋白質を探すのもまたひとつの方向である。いずれにせよ質量分析装置側の発展・進歩と試薬，解析ソフトウェアの進歩とが両輪となって進んでいくことがマーカー探索を前進させる原動力であるのは間違いないであろう。

文　献

1) Gygi, S. P., Rist, B. and Aebersold, R., Measuring gene expression by quantitative proteome analysis, *Curr. Opin. Biotechnol*., **11**, 396-401 (2000)

2) Ou, K., Kesuma, D., Ganesan, K., Soon, S. Y., Lee, S. Y., Goh, X. P., Hooi, M., Chen, W., Jikuya, H., Ichikawa, T., Kuyama, H., Matsuo, E., Nishimura, O. and Tan, P., Quantitative profiling of drug-associated proteomic alterations by combined 2-nitrobenzenesulfenyl chloride (NBS) isotope labeling and 2DE/MS identification, *J. Proteome Res*., **5**, 2194-2206 (2006)

3) Kuyama, H., Watanabe, M., Toda, C., Ando, E., Tanaka, K. and Nishimura, O., An approach to quantitative proteome analysis by labeling tryptophan residues, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **17**, 1642-1650 (2003)

安定同位体試薬を用いたプロテオーム解析に関する総説を4から8に挙げる。

4) Leitner, A. and Lindner, W., Chemistry meets proteomics : The use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics, *Proteomics*, **6**, 5418-5434 (2006)

5) Brancia, F. L., Mass spectrometry based strategies in quantitative proteomics, *Curr. Anal. Chem*., **2**, 1-7 (2006)

6) Ong, S-E. and Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, *Nat. Chem. Biol*., **5**, 252-262 (2005)

7) Yan, W. and Chen, S. S., Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, **4**, 1-12 (2005)

8) Zhang, H., Yan, W. and Aebersold, R., Chemical probes and tandem mass spectrometry : a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes, *Curr. Opin. Chem. Biol*., **8**, 66-75 (2004)

9) Gygi, S. P., Rist, B., Geber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. and Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat. Biotechnol*., **17**, 994-998 (1999)

10) Hansen, K. C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R. J., Hirsh, J. and Baldwin, M. A., Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ^{13}C-isotope-coded affinity tag and multidimentional chromatography, *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 299-314 (2003)

11) Li, J., Steen, H., Gygi, S. P., Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents, *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 1198-1204 (2003)
12) Sechi, S. and Chait, B. T., Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification, *Anal. Chem*., **70**, 5150-5158 (1998)
13) Faca, V., Coram, M., Phanstiel, D., Glukhova, V., Ahzng, Q., Fitzgibbon, M., McIntosh, M. and Hanash, S., Quantitative analysis of acrylamide labeled serum proteins by LC-MS/MS, *J. Proteome Res*., **5**, 2009-2018 (2006)
14) Sebastiano, R., Citterio, A., Lapadula, M. and Rhigetti, P. G., A new deuterated alkylating agent for quantitative proteomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **17**, 2380-2386 (2003)
15) Pasquarello, C., Sanchez, J-C., Hochstrasser, D. F. and Corthals, G. L., *N-t*-Butyliodoacetamide and iodoacetanilide : two new cycteine alkylating reagents for relative quantification of proteins, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **18**, 117-127 (2004)
16) Brancia, F. L., Montgomery, H., Tanaka, K. and Kumashiro, S., Guanidino labeling derivatization strategy for global characterization of peptide mixtures by liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem*., **76**, 2748-2755 (2004)
17) Warwood, S., Mohammed, S., Cristea, I. M., Evans, C., Whetton, A. D. and Gaskell, S. J., Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **20**, 3245-3256 (2006)
18) Brancia, F. L., Openshaw, M. E. and Kumashiro, S., Investigation of the electrospray response of lysine-, arginine-, and homoarginine-terminal peptide mixtures by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **16**, 2255-2259 (2002)
19) Goshe, M. B., Conrads, T. P., Panisko, E. A., Angell, N. H., Veenstra, T. D. and Smith, R. D., Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analysis, *Anal. Chem*., **73**, 2578-2586 (2001)
20) Qian, W-L., Goshe, M. B., Camp II, D. G., Yu, L-R., Tang, K. and Smith, R. D., Phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag approach for enrichment and quantitative analysis of phosphopeptides from complex mixtures, *Anal. Chem*., **75**, 5441-5450 (2003)
21) Wang, S. and Regnier, F. E., Proteomics based on selecting and quantifying cysteine containing peptides by covalent chromatography, *J. Chromatogr. A*, **924**, 345-357 (2001)
22) Munchbach, M., Quadroni, M., Miotto, G. and James, P., Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety, *Anal.Chem*., **72**, 4047-4057 (2000)
23) Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F., A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels, *Proteomics*, **5**, 4-15 (2005)
24) Zhang, X., Jin, Q. K., Carr, S. A. and Annan, R. S., N-terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags : a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **16**, 2325-2332 (2002)
25) Hsu, J-L., Huang, S-Y., Shiea, J-T., Huang, W-Y. and Chen, S-H., Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Anal.Chem*., **75**, 6843-6852 (2003)
26) Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D. J., Multiplexed protein quantitation in saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents, *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 1154-1169 (2004)
27) Goodlett, D. R., Keller, A., Watts, J. D., Newitt, R., Yi, E. C., Purvine, S., Eng, J. K., von Haller, P., Aebersold, R. and Kolker, E., Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and *de novo* sequence derivatization, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **15**, 1214-1221 (2001)
28) Syka, J. E., Marto, J. A., Bai, D. L., Horning, S., Senko, M. W., Schwartz, J. C., Ueberheide, B., Garcia, B., Busby, S., Muratore, T., Shabanowitz,

J. and Hunt, D. F., Novel linesr quadrupole ion trap/FT mass spectrometer : performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modification, *J. Proteome Res*., **3**, 621-626 (2004)

29) Wells, L., Vosseller, K., Cole, R. N., Cronshaw, J. M., Matunis, M. J. and Hart, G. W., Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications, *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 791-804 (2002)

30) Amoresano, A., Marino, G., Cirulli, C. and Quemeneur, E., Mapping phosphorylation sites : a new strategy based on the use of isotopically labeled DTT and mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom*., **10**, 401-412 (2004)

31) Vosseller, K., Hansen, K. C., Chalkley, R. J., Trinidad, J. C., Wells, L., Hart, G. W. and Burlingame, A. L., Quantitative analysis of both protein expression and serine/threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol, *Proteomics*, **5**, 388-398 (2005)

32) Mirgorodskaya, O. A., Kozmin, Y. P., Titov, M. I., Koerner, R., Soenksen, C. P. and Poepstorff, P., Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ^{18}O-labeled internal standards, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **14**, 1226-1232 (2000)

33) Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A. and Fenselaou, C., Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics : model studies with two serotypes of adenovirus, *Anal.Chem*., **73**, 2836-2842 (2001)

34) Scoffone, E., Fontana, A. and Rocchi, R., Selective modification of the tryptophan residue in peptides and proteins using sulfenyl halides, *Biochem. Biophis. Res. Commun*., **25**, 170-174 (1966)

35) Scoffone, E., Fontana, A. and Rocchi, R., Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. I. Modification of tryptophan residues, *Biochemistry*, **7**, 971-979 (1968)

36) 渡辺　真，西村　紀，新規プロテオーム解析法の開発，バイオサイエンスとインダストリー，**62**, 49-52 (2004)

37) Tanaka, S., Mohri, N., Kihara, M. and Ohno, M., Selective separation of tryptophan-containing peptides via hydrophobic modification with 2-nitro-4-carboxy-phenylsulfenyl chloride, *J. Biochem.* (*Tokyo*), **97**, 1377-1384 (1985)

38) Sasagawa, T., Titani, K. and Walsh, K. A., Selective isolation of tryptophan-containing peptides by hydrophobicity modulation, *Anal. Biochem*., **134**, 224-229 (1983)

39) Zincke, Th. and Leinhardt, S., Uber p-Nitrophenylschwefelchlorid und umwandlungsproducte, *Ann. Chem*., **400**, 2-47 (1913)

40) Kharash, N., Gleason, G. I. and Buess, C. M., Derivatives of sulfenic acids. III. The catalytic chlorinolysis of 2, 4-dinitrophenyl disulfide, *J. Am. Chem. Soc*., **72**, 1796-1798 (1950)

41) Havlic, A. J. and Kharash, N., Derivatives of sulfenic acids. XIX. Synthesis and characterization of 2-nitro-4-carboxybenzenesulfenyl chloride, *J. Am. Chem. Soc*., **77**, 1150-1152 (1955)

42) Matsuo, E., Toda, C., Watanabe, M., Iida, T., Masuda, T., Minohata, T., Ando, E., Tsunsawa, S. and Nishimura, O., Improved 2-nitrobenzenesulfenyl method : optimization of the protocol and improved enrichment for labeled peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., **20**, 31-38 (2006)

43) Matsuo, E., Toda, C., Watanabe, M., Ojima, N., Izumi, S., Tanaka, K., Tsunsawa, S. and Nishimura, O., Selective detection of 2-nitrobenzenesulfenyl-labeled peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using a novel matrix, *Proteomics*, **6**, 2042-2049 (2006)

44) Iida, T., Kuyama, H., Watanabe, M., Toda, C., Matsuo, E., Kido, A., Ando, E., Tsunasawa, S. and Nishimura, O., Rapid and efficient MALDI-TOF MS peak detection of 2-nitrobenzenesulfenyl-labeled peptides using the combination of HPLC and an automatic spotting apparatus, *J.Biomol. Tech*., **17**, 333-341 (2006)

45) Watanabe, M., Takemasa, I., Matsubara, T., Nishimura, N., Matsuo, E., Masuda, T., Yoshioka, S., Miyake, M., Nagai, K., Monden, M., Tsunasawa, S. and Nishimura, O., The proteomic profiling of human colorectal cancer tissue using NBS method, 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, MP27-624 (2006)

46) Watanabe, M., Takemasa, I., Matsubara, T., Nishimura, N., Yoshioka, S., Miyake, M., Nagai, K., Monden, M., Tsunasawa, S. and Nishimura, O., The proteomic profiling of human colorectal cancer tissue using NBS method, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 4PA-382 (2006)

47) 竹政伊知朗，渡辺　真，吉岡慎一，池田正孝，山本浩文，関本貢嗣，西村　紀，永井克也，松原謙一，門田守人，ポストゲノム時代における大腸癌の網羅的な遺伝子およびタンパク質の発現プロファイル解析，第 60 回日本消化器外科学会学術総会 SY-2-6（平成 17 年 7 月）

48) 竹政伊知朗，永野浩昭，吉岡慎一，丸橋　繁，宮本敦史，武田　裕，堂野恵三，渡辺　真，西村　紀，永井克也，松原謙一，門田守人，肝癌の個別化治療の実践にむけて：ポストゲノム時代における網羅的な遺伝子及びタンパク質の発現プロファイル解析，第 64 回日本癌学会学術総会 S16-2（平成 17 年 9 月）

49) 竹政伊知朗，渡辺　真，吉岡慎一，池田正孝，山本浩文，関本貢嗣，西村　紀，永井克也，松原謙一，門田守人，大腸癌の発育・進展過程に関与する分子異常：網羅的な遺伝子およびタンパク質の発現プロファイル解析，第 64 回日本癌学会学術総会 W-011（平成 17 年 9 月）

50) Masuda, Y., Okamura, N., Suganuma, K., Tanaka, H., Matsuo, E., Watanabe, M., Tsunasawa, S., Gotoh, A., Shirakawa, T., Terao, S., Okumura, K. and Nishimura, O., Construction of the proteomic profiles on human kidney cancer tissue using the NBS method, 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, MP28-557 (2006)

51) Masuda, Y., Okamura, N., Suganuma, K., Tanaka, H., Gotoh, A., Shirakawa, T., Terao, S., Okumura, K. and Nishimura, O., Quantitative proteome analysis of renal cell carcinoma based on NBS method, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 4PA-365 (2006)