

「遺伝子発現及び機能情報解析のための 次世代プロテオーム解析システムの開発」

(H12年～H16年)

研究代表者：磯辺俊明（東京都立大学）他6機関

研究の概要・目標

1 何を目指しているのか

ゲノムの設計図をもとに生命が織りなすさまざまな現象を演出している蛋白質の全体像（プロテオーム）を解析するためのシステムを開発し、それぞれの蛋白質の相互関係や働きをあらわす地図を作成する。

3年後の目標：

- できるだけ多くの蛋白質を系統的に分離する技術の開発
- 超微量の蛋白質を同定する技術の開発
- 蛋白質の相互関係や繋がりを解析する技術の開発
- 一回の解析操作で2500種以上の蛋白質を分離し、その半数についてどんな蛋白質であるかを知ることができるプロテオーム解析システム

5年後の目標：

- 一回の解析操作で3000種以上の蛋白質を分離し、その80%以上についてどんな蛋白質であるかを知ることができます
- 蛋白質の相互関係（リンクエージ）を迅速に知ることができます
- 体系的自動化解析システムの構築
- 疾患に関連する蛋白質を知るための総合的プロテオーム解析技術の確立

2 何を研究している

- ・ゲノムがいつどのような蛋白質を作り出しているかを調べるために技術の確立。
- ・生体内で働いている蛋白質を微量成分も含めてできるだけ多く分離してその構造を詳しく調べるために技術の開発。
- ・蛋白質相互の関係や働きを調査する技術の確立とその結果をまとめた地図の作成。

3 何が新しいのか

- ・生命の設計図であるゲノムの活動状況や働きを、生命活動を実際に演出している蛋白質の種類や働き、相互関係の変動として把握するためのシステムを確立すること。

諸外国の現状等

1 現状

欧米を中心として、ゲノム情報から予測される蛋白質の完全なデータベース化がヒトにおいても完成に近づき、また、ゲノム情報の発現の指標と考えられているmRNAの発現状況を示すトランスクリプトームを解析するためのマイクロチップアレイ（DNAチップ）などの技術開発も進んでいる。しかし、ヒトなどの高等生物ではこうした技術で得られたmRNAの発現状態と蛋白質の発現状態の間には相関性が乏しいことが知られている。また、実際に遺伝情報として発現されて生体内で働いている蛋白質はリン酸化や糖結合などの変化（翻訳後修飾）を受けていることから、いつどんな時にどのゲノム情報がどんな状態で実際に働くプロテオームとして発現しているかは全く予測がつかない。さらに、DNAやRNAに比べ遙かに多様性に富む蛋白質を系統的に分離・同定する技術開発は、極めて重要であるにも関わらず、世界的にも未だ着手され始めたばかりの発展途上段階である。

2 我が国の水準

現時点ではプロテオームを解析する方法として国際的に広く使われているのは、寒天のように軟弱なゲルを使って蛋白質を分離する「2次元電気泳動法」と質量分析法を組み合わせて1つ1つ蛋白質を同定する方法である。我が国は、この技術では世界的な水準から僅かに劣るが、全自动で蛋白質の分離や同定ができるオンライン多次元高速液体クロマトグラフィー－質量分析法の開発、超微量試料で蛋白質の相互関係を明らかにするシステムの原理開発、新規蛋白質を分離してその働きを解明する技術など、次世代のプロテオーム解析法として期待される要素技術においては世界をリードしている。

プロテオーム：ゲノムによって指定される蛋白質の全体像のこと。

トランスクリプトーム：ゲノムとプロテオームをつなぐ中間物質（mRNA）の全体像のこと。

研究進展・成果がもたらす利点

1. 世界との水準の関係

現行の蛋白質の分離能を一桁上げた分離技術と二桁少ない量の蛋白質を同定する技術を組み合わせた迅速かつ系統的なプロテオーム解析システムを確立するとともに、蛋白質の相互関係や繋がりを極微量で解析同定する技術を確立することによって、ゲノム科学の要素的な中核技術の一つである次世代の総合的プロテオーム解析システムを世界に先駆けて開発することができる。この技術を駆使することによって、我が国はゲノム情報に基づく全遺伝子の動態と機能のネットワークの体系的解析の分野で世界の拠点となることが可能となる。

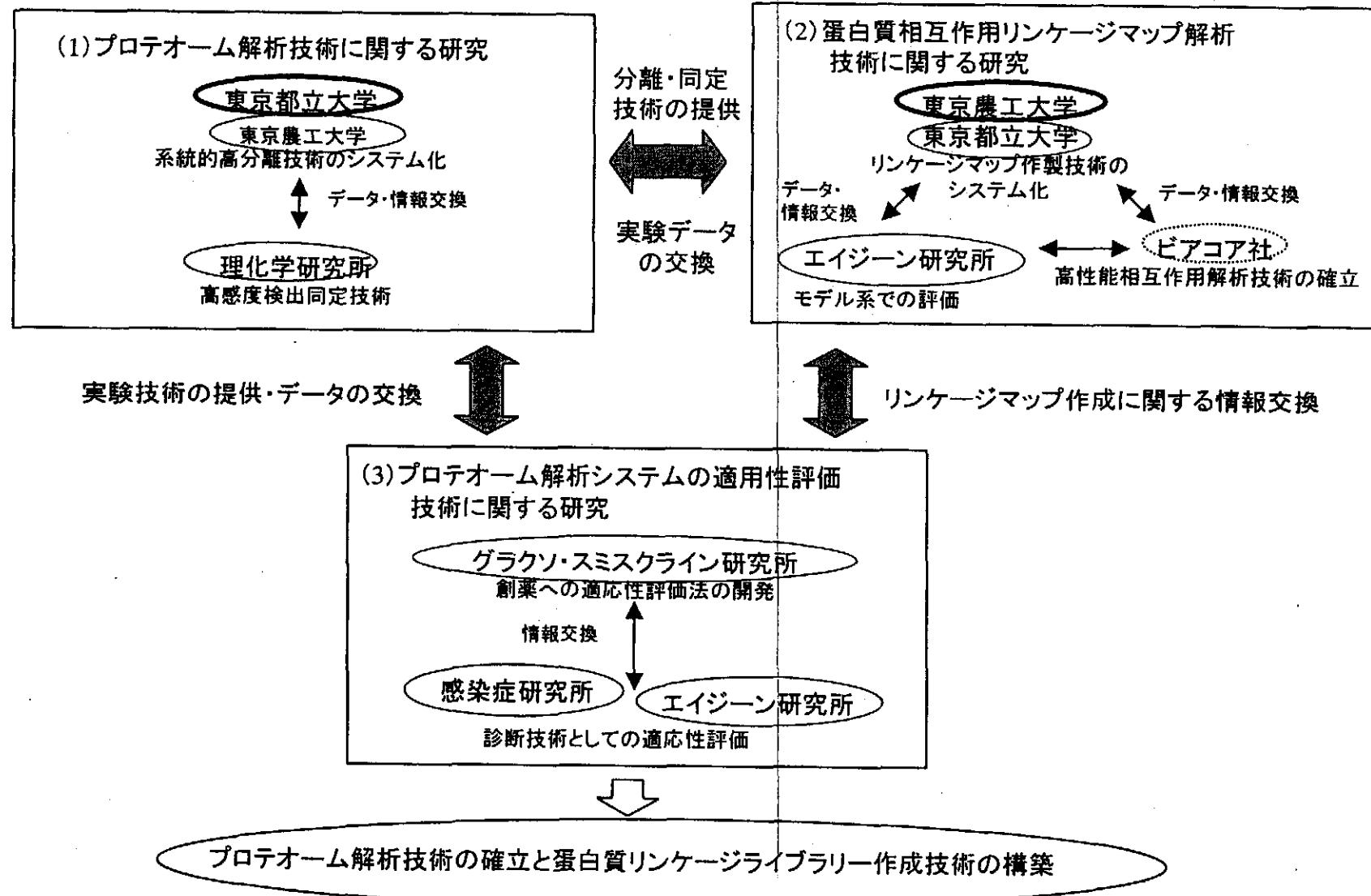
なお、本研究の成果は知的所有権等によるプロテクトを囲り、基盤固めを行う予定である。

2 波及効果

・本研究で開発される総合的プロテオーム解析システムにより、ある瞬間のゲノム情報の発現状態と相互作用を、生命を演じる実働部隊である蛋白質のレベルで捕らえることが可能になる。このことにより、例えば、環境変化による個別の組織や器官あるいは細胞の状態変化、環境ホルモンなどの組織や器官への影響、薬剤の標的や作用機構、組み換え作物・動物の解析等々、ゲノムの発現状態に影響を与えるあらゆる生命現象の解析が可能になり、基礎から応用に至る生命科学ならびに関連産業に多大な影響を及ぼすことが期待できる。

・特に、総合的臨床診断法や医薬品開発における活用はもとより、農畜産物の品質管理、環境ホルモンモニタリングなど、ライフサイエンスの基礎からバイオ産業への応用に至る広範囲な技術開発が可能である。

遺伝子発現及び機能情報解析のための 次世代プロテオーム解析システムの開発



第Ⅰ期研究における所用経費

「遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発」

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
1. プロテオーム解析技術に関する研究			258,292
(1) 系統的高分離技術とシステム化に関する研究			224,443
①高度分離技術に関する研究	東京都立大学	磯辺俊明	204,682
②修飾蛋白質の分離に関する研究	東京農工大学	高橋信宏	19,761
(2) 超高感度検出同定技術に関する研究	理化学研究所	瀬尾擴士	33,849
2. タンパク質相互作用リンクージマップ解析技術に関する研究			252,712
(1) システム化に関する研究			153,991
①システム化に関する研究	東京農工大学	高橋信宏	145,150
②インターフェース技術に関する研究	東京都立大学	磯辺俊明	8,841
(2) マイクロチップによる解析技術に関する研究	(株)ヒアコア	橋本せつ子	89,911
(3) モデル細胞系への適用に関する研究	(株)ジーンケア	杉本正信	8,810
3. プロテオーム解析システムの適用性評価法に関する研究			120,885
(1) 薬剤への適用評価技術に関する研究	(株)グラクソ・スミスクライン	西村俊秀	73,534
(2) 老人病への適用評価に関する研究	(株)ジーンケア	杉本正信	21,910
(3) 診断技術としての感染症への応用評価に関する研究	国立感染症研究所	山河芳夫	25,441
4. 研究管理			4,585
	(株)グラクソ・スミスクライン	西村俊秀	1,056
	東京都立大学	磯辺俊明	3,529
合計			636,474

研究目標の概要・成果の概要<課題全体>

課題名（研究代表者）：遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発（磯辺俊明）

【研究目標の概要】

1) プロテオーム解析技術に関する研究

分離様式の異なる複数のカラムを制御することで分離能の向上を計った多次元液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせたオンライン型のプロテオーム解析システムを組み立て、その評価と改良によって一回の操作で 1,000 成分のタンパク質を同定できるシステムとすることを目指とした。また、糖鎖の付加・リン酸化等の翻訳後修飾を受けたタンパク質の修飾基特異的な回収法を開発し、多次元分離システムに組み込み可能な一次分離系を構築することで、翻訳後修飾を系統的に解析できるシステムの構築を目指した。

2) タンパク質相互作用リンクエージマップ解析技術に関する研究

タンパク質の相互作用の検出から同定までをオンライン化するためのプロトタイプ装置を組み立て、その評価・改良を行うことで、一度の操作で 50 成分のタンパク質を同定できるシステムとすることを目指とした。この目標に向けて、表面プラズモン共鳴センサーチップ上に結合したタンパク質のオンチップ上で酵素分解で得られたペプチド混合物を効率よく回収する方法を考案するとともに、マイクロフルイディックス技術を応用したナノフロー液体クロマトグラフ・インターフェイスを組み立て、タンパク質相互作用を検出と同時にセンサーチップから溶出したフェムトモルレベルの試料を質量分析計で効率よく同定できるシステムとすることを目指した。

3) プロテオーム解析システムの適用性評価法に関する研究

上記 1) 2) で開発されたプロテオーム解析システムを高度医療技術として適用するための評価法の開発を目標として、以下の研究を行った。
①モデル疾患動物の組織や細胞を用いた創薬ターゲットの同定や疾患マーカーの検索など、創薬分野へのプロテオーム解析システムの適用性評価研究
②モデル細胞系を用いたガンを含めた老人病の診断技術としてのプロテオーム解析システムの適用性評価研究
③C-型肝炎ウイルスやプリオンによって引き起こされる感染症の診断技術としてのプロテオーム解析システムの適用性評価研究。

【研究成果の概要】

1) プロテオーム解析技術に関する研究

・2種類の分析カラムと試料脱塩用のトラップカラムをスイッチングバルブで連結し、その流路系を制御することで複雑な試料分離を可能にした多次元液体クロマトグラフとハイブリッド型の質量分析計をオンラインで結合し、データ処理とゲノムデータベース検索エンジンを搭載したコンピュータを連結した全自动プロテオーム解析システムを構築した。

・このシステムによって、試料の分析からデータ処理までの一貫した作業を約 30 時間で行い、大腸菌や線虫、動物細胞のオルガネラなどの複雑な生体試料に含まれる 700-1,000 種

類のタンパク質を自動的に同定することができるようになった。

・翻訳後修飾タンパク質の系統的分離解析技術に関して、各種液体クロマトグラフィーカラム担体による糖タンパク質の分離特性を明らかにするとともに、LC-MS 法による糖鎖構造の解析系を構築した。また、網羅的リン酸化タンパク質検出同定評価系として、リン酸化アミノ酸抗体を用いた二次元電気泳動-イムノプロット法によるリン酸化タンパク質の検出同定系を確立した。

・水溶系で電気化学的に切断可能な新規化合物の合成に成功した。この化合物は、アフィニティー精製法として、従来法とは異なる全く新しい原理・手法を提供するものであり、翻訳後修飾特異的あるいはアミノ酸特異的な化学修飾試薬と組み合わせることで、タンパク質同定の効率化と高感度化が期待できる革新的な方法となることが期待される。

2) タンパク質相互作用リンクエージマップ解析技術に関する研究

・微小内径のフューズドシリカ管を加工した死容積ゼロのフリットレスカラムとこのカラムを操作するためのナノフロー送液ポンプ、濃度勾配作成装置（レンコンシステム）を組み合わせたダイレクトナノフロー液体クロマトグラフを設計した。この装置をハイブリッド型質量分析計とオンラインで結合し、データ処理とゲノムデータベース検索エンジンを搭載したコンピュータと連結することでナノ LC-MS/MS システムを構築した。

・このシステムによって、培養細胞などから調製したフェムトモルレベルの超微量機能性タンパク質複合体に含まれる約 200 種類のタンパク質成分を従来のゲル電気泳動を用いることなく自動的に同定できる液体クロマトグラフィーインターフェース技術を確立した。

・タンパク質相互作用リンクエージ解析の評価系として、各種リボソーム生合成に関わる因子のエピトープタグ融合発現系とそれらに結合するリボソーム前駆体の単離系、及びゲル電気泳動-質量分析法による同定系を確立した。ここで分離したタンパク質複合体の構成成分を上記のナノ LC-MS/MS システムで解析することで、ほ乳類では初めてリボソーム前駆体の単離と構成成分の大規模同定に成功した。さらに、同様の手法によって転写調節にかかる新規の活性化補助因子複合体の同定に成功した。

・表面プラズモン共鳴センサーのセンサーチップ上に結合した微量タンパク質の酵素消化、溶離・分離回収方法の検討を行い、100 フェムトモル程度のタンパク質をオンラインで消化・回収することに成功した。また、センサーチップに固定化するリガンド分子の選定、センサーチップ上へのリガンド分子の固定化条件、リガンドを安定に保持する条件検討と合わせて、より効率のよい微量相互作用タンパク質の結合・回収システムの試作とこれを制御するソフトウェアを開発した。

・表面プラズモン共鳴検出用のマイクロフルイディクス系を利用し、多段階アフィニティー精製に必要なタグタンパク質の設計・送液ソフトの作成など各種要素を総合化することで相互作用タンパク質の検出と精製の自動化のための基本システムを構築した。さらに、上記の要素をすべて組み合わせることで、タンパク質の相互作用の検出から同定までをオ

ンライン化するためのプロトタイプ装置を組立てることができた。

3) プロテオーム解析システムの適用性評価法に関する研究

①創薬への適用性評価技術に関する研究

・プロテオーム解析システム評価系として、ヒトアトピー性皮膚炎様マウスの疾患動物モデルを確立した。また、多遺伝子が原因となる疾患関連タンパク質の発現プロファイルを得るための2次元電気泳動法および画像解析システムを構築し、蛍光染色法及び安定同位体アフィニティータグ(ICAT)法による疾患関連タンパク質発現の定量法について検討した。

・上記の技術をもとにして、アトピー性皮膚炎様マウス疾患モデルを対象とするプロテオーム解析評価技術 I：蛍光染色法と2次元電気泳動ゲル法に基づく解析モデルシステムおよびプロテオーム解析評価技術 II：安定同位体アフィニティータグ法及び1次元ゲル法に基づく解析モデルシステムを確立した。

②診断技術としてのガンを含めた老人病への適用評価に関する研究

・ヒト早老症とDNA修復に関わるWRNヘリカーゼとRTSヘリカーゼ、リボソーム生成に関するnucleolinのタンパク質相互作用複合体の単離と同定に成功した。その結果、早老症に関わるDNAヘリカーゼであるWRNヘリカーゼとRTSヘリカーゼが実際には異なる修復経路で機能することを明らかにした。

・nucleolinの変異体を用いた複合体解析から、nucleolinのRNA結合領域がリボソーム生成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。老化・不死化細胞を用いたマーカータンパク質の検索から、老化細胞ではWRNヘリカーゼを含むRecQ型ヘリカーゼの発現を認め、不死化細胞ではWRNヘリカーゼの発現上昇と癌抑制遺伝子p16の消失を見出した。

③診断技術としての感染症への応用評価に関する研究

・C型肝炎ウイルス(HCV)のコアタンパク質発現培養肝細胞のプロテオーム解析によって、HCVのコアタンパク質発現培養肝細胞の脂肪滴にはRNAヘリカーゼなどのRNA代謝に関わるタンパク質が特異的に認められ、C型肝炎の発症のメカニズムを明らかにするためには、コアタンパク質の油滴上の機能解析が重要であることが示唆された。

・プリオントン病発症マウス脳のプロテオーム解析によって、異常型プリオントンタンパク質の蓄積に伴う量的変動が顕著なスポットとして、GFAPおよびvacuolar ATPaseAを同定した。ATPaseAは、異常型プリオントンが蓄積するエンドソームやリソソーム等の内腔を酸性に保つために必須のプロトンポンプであることから、ATPaseの減少により小胞の酸性度が保持されず、内腔プロテアーゼ類の活性低下によって異常型プリオントンが細胞から排除されずにエンドソームやリソソームに蓄積する原なっている可能性が示された。

研究成果公表等の状況<課題全体>

課題名（研究代表者）：遺伝子発現及び機能情報解析のための次世代プロテオーム解析システムの開発（磯辺俊明）

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	2 (1) 件	72 件	145 件	219 (1) 件
国外	36 (4) 件	5 件	29 件	70 件
合計	38 (5) 件	77 件	174 件	289 (5) 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと)

【特許出願等】 4 (出願準備中1) 件 (国内 4 (1) 件、国外 0 件)

【受賞等】 0 件 (国内 0 件、国外 0 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	合計
Mol. Cell	16.611		1		16.611
J. Cell Biol.	12.915		1		12.915
Mass Spectrometry Reviews	8.391		1		8.391
J. Biol. Chem.	7.258	2	1	1	29.032
Oncogene	6.737			2	13.474
Nucleic Acids Res.	6.373			1	6.373
J. Am. Chem. Soc.	6.079		1		6.079
J. Mol. Biol.	5.388	1			5.388
Trends in Biotechnol.	5.006	1			5.006
Anal. Chem.	4.532	2			9.064
Electrophoresis	4.282	2	1	1	17.128
Biochemistry	4.114	1			4.114
Gene to Cells	3.826			1	3.826

Org. Lett.	3. 670		1		3. 670	
Biochem. Biophys. Res. Commun.	3. 055	1			3. 055	
Yeast	2. 540		1		2. 540	
Am. J. Med. Genet.	2. 378			1	2. 378	
Tetrahedron	2. 276		1		2. 276	
主要雑誌小計		10	9	7	151. 32	
発表論文合計		15	11	12	165. 26	

Impact Factor 2.0 以上のものを主要雑誌とした。

【主な原著論文による発表の内訳】

- 1) 国内 [発表題名、発表者名、発表誌名等（雑誌名、巻、号、頁、年等）]
(計 3 件)

1. Kawakami, T., Usui, F. & Nishimura, T. (2000): A system for on-line highly sensitive analysis of expression proteome using microLC-nanoESI/MS/MS and two-dimensional electrophoresis; towards large scale and identification of disease-related proteins. *Seibutu Butsuri Kagaku* 44, 185-190.
2. Kawakami, T., Anyuji, H. & Nishimura, T. (2000): Development of proteome analysis systems for efficient expression profiling: Towards high throughput identification and quantitation of disease target proteins. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 135-141.
3. Hirabayashi, J., Hayama, K., Kaji, H., Isobe, T. & Kasai, K. (2002): Affinity capturing and gene assignment of soluble glycoproteins produced by the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 103-114.

- 2) 国外 [発表題名、発表者名、発表誌名等（雑誌名、巻、号、頁、年等）]
(計 39 件)

1. Kaji, H., Tsuji, T., Mawuenyega, K. G., Wakamiya, A., Taoka, M. and Isobe, T. (2000) Profiling of *Caenorhabditis elegans* proteins using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 1755-1765.
2. Taoka, M., Wakamiya, A. and Isobe, T. (2000) Protein profiling of rat cerebellar proteins during the morphogenesis. *Electrophoresis* 21, 1872-1879.
3. Yanagida, M., Miura, Y., Taoka, M., Isobe, T. and Takahashi, N. (2000) Grouping proteins on proteome-maps by signal transduction. 1. Detection and identification of proteins that vary in phosphorylated state in fibroblast cells after TNF-alfa stimulation. *Electrophoresis* 21, 1890-1898.
4. Natsume, T., Nakayama, T., Jansson, O., Takio, K., Isobe, T. & Mikoshiba, K. (2000) Combination of Biomolecular Interaction Analysis and Mass Spectrometric Amino-acid Sequencing. *Anal. Chem.* 72, 4193-4198.
5. Ikura, T., Hayano, T., Takahashi, N. and Kuwajima, K. (2000) Kinetic folding of *Escherichia coli* cyclophilin A. A unique hydrophobic core with a phenylalanine cluster leads to the first folding. *J. Mol. Biol.* 297 (3), 791-802.
6. Lee, S., Takeda, Y., Kawano, H., Hosoya, H., Nomoto, M., Fujimoto, D., Takahashi, N., Watanabe, K. (2000) Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain. *Gene*, 245(2):253-266
7. Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., and Furuichi, Y. (2000) Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3 alpha and 3 beta. *Nucleic Acids Res.* 28 (7), 1647-1655.
8. Toda T, Sugimoto M, Omori A, Matsuzaki T, Furuichi Y, Kimura N. (2000) Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis*. 21, 1814--22.
9. Kawabe T, Tsuyama N, Kitao S, Nishikawa K, Shimamoto A, Shiratori M, Matsumoto T, Anno K, Sato T, Mitsui Y, Seki M, Enomoto T, Goto M, Ellis NA, Ide T, Furuichi Y, Sugimoto M. (2000) Differential regulation of human RecQ family helicases in cell transformation and cell cycle. *Oncogene*. 28, 4764--72.
10. Kawakami, T., Nagata, T., Muraguchi, A. and Nishimura, T. (2000) Alteration of protein composition in mouse thymocytes by signals through T-cell receptor, *Electrophoresis* 21(9), 1846-1852.
11. Ohki, S., Kariya, E., Kazumi, H., Wakamiya, A., Isobe, T., Oda, K. & Kainosho, M. (2001) NMR structure of Streptomyces killer toxin-like protein, SKLP: Further evidence for the wide distribution of single-domain bg-crystalline superfamily proteins. *J. Mol. Biol.* 305, 109-120.
12. Yanagida, M., Shimamoto, A., Nishikawa, K., Furuichi, Y., Isobe, T. & Takahashi, N. (2001) Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. *Proteomics* 1, 1390-1404.
13. Natsume, T., Nakayama, H. and Isobe T., (2001) BIA-MS/MS: Biomolecular Interaction Analysis for Functional Proteomics. *Trends in Biotechnology* 19, S28-33
14. Okubo, M., Tsurukubo, Y., Higaki, T., Kawabe, T., Goto, M., Murase, T., Ide, T., Furuichi, Y. & Sugimoto, M. (2001) Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase

- activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet.* **129**, 30-34.
15. Sakamoto, S., Nishikawa, K., Heo, S.J., Goto, M., Furuichi, Y. & Shimamoto A. (2001) Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *A. Genes Cells.* **6**, 421-430.
 16. Imamura, O., Fujita, K., Shimamoto, A., Tanabe, H., Takeda, S., Furuichi, Y. & Matsumoto, T. (2001) Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells. *Oncogene.* **20**, 1143-1151.
 17. Kawabe, Y., Branzei, D., Hayashi, T., Suzuki, H., Masuko, T., Onoda, F., Heo, S.J., Ikeda, H., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Seki, M. & Enomoto, T. (2001) A novel protein interacts with the Werner's syndrome gene product physically and functionally. *J Biol Chem.* **276**, 20364-20369.
 18. Tachikawa, H., Bloecheer, A., Tatchell, K., Aaron, M. N. (2001) A Gip 1p-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation, *J. Cell Biol.* **155**, 797-808
 19. Chiba, K., Miura, T., Kim, S., Kitano, Y., and Tada, M. (2001) Electrocatalytic Intermolecular Olefin Cross-Coupling by Anodically Induced Formal [2+2] Cycloaddition between Enol Ethers and Alkenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11314-11315
 20. Reddy, S. H. K., Chiba, K., Sun, Y and Moeller, K. D. (2001) Anodic oxidations of electron-rich olefins: radical cation based approaches to the synthesis of bridged bicyclic ring skeletons, *Tetrahedron*, **57**(24), 5183-5197.
 21. Chiba, K.; Uchiyama, R.; Kim, S.; Kitano, Y.; Tada, M.; (2001) Benzylic Intermolecular Carbon-Carbon Bond Formation by Selective Anodic Oxidation of Dithioacetals, *Org. Lett.*, **3**(8); 1245-1248.
 22. Kim, S., Kitano, Y., Tada, M., and Chiba, K. (2001) Benzylic Nitroalkylation by Paired Electrolysis of Benzyl Sulfides in Nitroalkanes, *J. Electroanal. Chem.* **507**(1-2), 152-156.
 23. Chiba, K.; Kono, Y.; Kitayama, M.; Uchiyama, R.; Kim, S.; Kitano, Y.; Tada, M.;(2001) "A Perfluorinated Micellar Reaction System In Lithium Perchlorate / Acetonitrile; Enhanced Efficiency In Anodic Electron-Transfer and Intermolecular Cycloaddition, *Electrochemistry Communications*, **3**(2), 63-66.,
 24. Nakanishi, H., Nakayama, K., Yokota, A., Tachikawa, H., Takahashi, N., Jigami, Y. (2001) Hutl proteins identified in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* are functional homologues involved in the protein-folding process at the endoplasmic reticulum, *Yeast* **18**, 543-554.
 25. Yoshimura, Y., Shinkawa, T., Taoka, T., Kobayashi, K., Isobe, T. & Yamauchi, T. (2002): Identification of protein substrates of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 948-954.
 26. Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Itagaki, C., Taoka, M., Hayano, T., Nasumé, T. & and Isobe, T. (2002): Phosphorylation dependent interaction of kinesin light chain 2 and the 14-3-3 Protein. *Biochemistry* **41**, 5566-5572.
 27. Fujuyama, S., Yanagida, M., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T. & Takahashi, N. (2002): Isolation and proteomic characterization of human parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* **277**, 23773-23780.
 28. Horiuchi T, Taoka M, Isobe T, Komano T, Inouye S. (2002): Role of fruA and csgA Genes in Gene Expression during Development of *Myxococcus xanthus*: Analysis by two-dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26753-26760.
 29. Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N. & Isobe, T. (2002): A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal. Chem.* **74**, 4725-4733.
 30. Sasaki T, Taoka M, Ishiguro K, Uchida A, Saito T, Isobe T, Hisanaga SI. (2002): In vivo and in vitro phosphorylation at Ser493 in the E-segment of neurofilament-H subunit by GSK3beta. *J. Biol. Chem.*, **277**, 36032-36039.
 31. Yanagisawa J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Cole, M.D., Tora, L., Takahashi, N., Nagasawa, H., Kato, S. (2002) Nuclear Receptor Function Requires a TFTC-Type Histone Acetyl Transferase Complex, *Mol. Cell* **9**, 553-562.
 32. Natsume, T., Taoka, M., Manki, H., Kume, S., Isobe, T. & Mikoshiba, K. (2002) Rapid analysis of protein interaction: on-chip micro purification of recombinant protein expressed in *E. coli*. *Proteomics* (in press).
 33. Ichimura, T., Itagaki, C., Wakamiya, A. & Isobe, T. (2002) Interaction of tyrosine hydroxylase and 14-3-3 proteins in PC12 cells. *Catechol. Res.* (in press).

34. Rohra, D. K., Yamakuni, T., Furukawa, K., Ishii, N., Shinkawa, T., Isobe, T. & Ohizumi, Y. (2002) Stimulated tyrosine phosphorylation of phosphatidylinositol 3 kinase causes acidic pH-induced contraction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J. Pharm. Exp. Therap.* (in press).
35. Mawuenyega, K., Kaji, H., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Saito, H., Taoka, M., Takahashi, N. & Isobe, T. (2002) Large-scale Identification of *Caenorhabditis elegans* Proteins by Multidimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* (in press)
36. Taoka, M., Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Kubota, Y., Araki, T., Obinata, T., and Isobe, T. (2002) V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein, *J. Biol. Chem.* (in Press).
37. Takahashi, N. (2002) Proteomic Analyses of Ribonucleoprotein complexes formed at Various Stages of Ribosome Biogenesis in Mammalian Cells", Mass Spectrometry Reviews (in Press)
38. Toda, T. and Sugimoto M. (2002) Proteome analysis of Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblasts and its data base (review).*J.Chromatography* (in press).
39. Kawakami, T., Nagata, T., Muraguchi, A., Nishimura, T. (2002) Proteomic approach to apoptotic thymus maturation, *J. Chromatogr. B*, (in press).