

定量プロテオミクスとバイオインフォマティクスの
アプローチによる薬剤のタンパク質複合体への
影響解析手法の開発

Novel Approach for Detecting the Effects of a Drug on
Protein Complexes by Quantitative Proteomics and
Bioinformatic Approaches

東京農工大学連合農学研究科
応用生命科学専攻 応用生物化学大講座
黒川 奈月

目次

目次	1
表一覧	2
図一覧	2
略語表	3
要旨	5
1. 序論	7
2. 研究内容	12
2.1. 概要及び目的	12
2.1.1. HepG2 細胞の培養とタンパク質の SILAC 標識化	12
2.1.2. HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析 (Figure 3, Experiment #1)	13
2.1.3. タンパク質複合体の抽出及び解析 (Figure 3, Experiment #2)	13
2.2. 材料及び方法	16
2.2.1. HepG2 細胞の培養とタンパク質の SILAC 標識化	16
2.2.2. HepG2 細胞溶解液の調製	17
2.2.3. SILAC-LC-MS/MS による HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析	17
2.2.4. IEC によるタンパク質複合体の分離	18
2.2.5. LC-MS/MS 用サンプルの調製と測定	20
2.2.6. LC-MS/MS データの解析 (タンパク質の同定及び SILAC 定量)	22
2.2.7. 階層的クラスタリング解析	23
2.2.8. タンパク質複合体のパスウェイ・ネットワーク/GO 解析	24
2.3. 結果と考察	26
2.3.1. HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析	26
2.3.2. IEC と SILAC-LC-MS/MS によるタンパク質複合体の検出	28
2.3.3. 階層的クラスタリング解析によるタンパク質複合体の抽出	31
2.3.4. パスウェイ・ネットワーク/GO 解析によるサリドマイド作用機序関連細胞機能の探索	33
3. 結論	40
4. 謝辞	45
5. 出典	45
6. 引用文献	46
7. 付録	53

表一覧

Table 1: IEC に使用したカラム仕様	19
Table 2: LC-MS/MS の詳細条件	21
Table 3: LC-MS/MS データ解析の詳細条件	23
Table 4: 階層的クラスタリング解析の条件	24
Table 5: サリドマイド処理 HepG2 細胞中のタンパク質変動解析結果	27
Table 6: IEC で分離した 96 フラクション中で検出された分子数	30
Table 7: サリドマイド間接的相互作用分子を含むグループ一覧	35
Supplemental Table 1: SILAC-LC-MS/MS による HepG2 細胞全体にお けるタンパク質発現変動解析結果リスト	54
Supplemental Table 2: IEC 分離フラクションにおける SILAC-LC- MS/MS、及び階層的クラスタリング解析結果リスト	63

図一覧

Figure 1: 本研究で提唱する方法論におけるタンパク質複合体変動検 出方法の模式図	9
Figure 2: 本研究において提唱する方法論の概念図	10
Figure 3: 実験の概要図	15
Figure 4: HepG2 細胞溶解溶液のイオン交換クロマトグラム	29
Figure 5: タンパク質定量データのヒートマップ描画と階層的クラ スタリング解析によるタンパク質複合体の抽出	32
Figure 6: サリドマイド相互作用タンパク質	34
Figure 7: サリドマイドとの関連が示唆される細胞機能の探索	36
Figure 8: グループ No. 28 のネットワーク解析結果	37
Figure 9: グループ No. 46, No. 104 に含まれる分子から形成されるネ ットワーク (A: No. 46, B: No. 104)	39
Figure 10: グループ No. 36 に含まれる分子から形成されるネットワ ーク	41
Figure 11: サリドマイドが関与する細胞機能ネットワーク	42

略語表

AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
BP	Biological Process
CID	Collision-Induced Dissociation
CHAPS	3-(3-Cholamidepropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate
CV	Column Volume
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
eIF	Eukaryotic Initiation Factor
FBS	Fetal Bovine Serum
FDR	False Discovery Rate
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GO	Gene Ontology
GST	Glutathione S-Transferase
hESC	Human Embryonic Stem Cell
hnRNPs	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Iodoacetamide
IEC	Ion-Exchange Chromatography
IMiDs	Immunomodulatory Drugs
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEM	Minimum Essential Medium
MF	Molecular Function
MM	Multiple Myeloma
mRNA	messenger RNA
Ms	Millisecond
NQO1	NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1
NRF2	NFE2-related factor 2
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEI	Polyethyleneimine
PPIs	Protein-Protein Interactions
Ppm	parts per million
ROS	React Oxygen Species

SDB	Styrene Divinyl Benzene
SILAC	Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell culture
SPE	Solid-Phase Extraction
TCEP	Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine
TEAB	Triethylammonium Bicarbonate
TFA	Trifluoroacetic Acid
TNF α	Tumor Necrosis Factor-alpha
UniProt	Universal Protein Resource
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

要旨

タンパク質は遺伝子発現、細胞増殖、代謝プロセス、翻訳、転写、mRNA スプライシング、シグナル伝達等のほぼ全ての細胞機能において重要な役割を果たす。この際、細胞内においてタンパク質は単独ではなく、互いに相互作用し、複合体を形成することで機能する。さらに、タンパク質複合体間では細胞内でお互いにネットワークを構成し、細胞機能を制御している。疾患治療に用いられる薬剤は、特定のタンパク質複合体あるいは複合体間のネットワークに影響を与えることによって薬理作用を発揮すると考えられるが、薬剤のこれらへの影響を解析する方法論は確立されていない。

本研究は、薬剤がタンパク質複合体あるいはそれらのネットワークへ与える影響を解析するための新しい方法論の確立を目的とした。そのために、タンパク質複合体の構成タンパク質間の相互作用状態を保持したまま分離する高速液体イオン交換クロマトグラフィー (Ion-Exchange Chromatography; IEC) 法と、質量分析法によるタンパク質定量法の一種である stable isotope labeling using amino acids in cell culture (SILAC)-Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry (LC-MS/MS) を組み合わせた新しいタンパク質解析法を考案し、この方法の有効性を薬剤としてのサリドマイドが与えるタンパク質複合体への影響を解析することで検証した。

サリドマイドは鎮静・催眠薬としての西ドイツでの上市直後に、催奇形性が原因で市場撤退したが、その後の研究結果から優れた抗癌活性が認められ、現在は多発性骨髄腫の治療薬として使われている。また肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等の癌に対しても、細胞増殖、血管新生を阻害し、癌の浸潤と転移を抑制する効果が認められ治療薬としての利用拡大が期待されている。しかし、その有用性にもかかわらず、薬剤の薬効と副作用の関係を明らかにする作用機序の詳細のほとんどは未解明である。

本研究では、このサリドマイドの影響を調べる実験対象としてヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を用いた。HepG2 細胞は、従来から数多くの *in vitro* 実験において汎用されており、加えて、先行研究において肝癌へのサリドマイドの有効性が報告されている。本研究でタンパク質の比較定量に用いる SILAC 法は、細胞の代謝を利用して細胞内タンパク質に安定同位体標識したアミノ酸を取り込ませ、そのアミノ酸に由来するペプチド質量の差を利用して、タンパク質を定量的かつ網羅的に解析するプロテオミクスの研究において広く使われている。この方法は細胞種や培養条件によらず、多数のタンパク質の定量データを取得出来る利点があるため選択した。タンパク質複合体の分離に用いた IEC は、本来は電荷

状態の違いによってタンパク質を分離する方法である。本研究では、解析対象であるタンパク質複合体の形成を維持したまま分離することを目的とし、移動相中の有機溶媒含有を最低限にし、酢酸アンモニウム濃度勾配を用いた、タンパク質間の物理的相互作用が失われない穏やかな溶出条件を用いた。この条件下では、一つのタンパク質複合体に含まれる構成タンパク質は同じ挙動で溶出されるとの原理に基づき、IECで分離したフラクション全てについて、SILAC-LC-MS/MSによりフラクション中に含まれるタンパク質の定量データを取得した。

次に、サリドマイドの影響により変動したタンパク質複合体の探索を目的に、SILAC-LC-MS/MSデータを階層的クラスタリング解析に供した。IECで分離された各フラクションにおいて、コントロール (Dimethyl Sulfoxide; DMSO 処理) に対するタンパク質の量変動が同一方向 (増加、又は減少) であるもの、及び溶出パターンに高い類似性があるものを同じクラスターとして分類し、タンパク質複合体を抽出した。その結果、HepG2細胞内でサリドマイドの影響により変動したと考えられる135種類のタンパク質複合体を特定した。

さらに、これら135種類のタンパク質複合体とサリドマイドの既知作用機序との関連性及びサリドマイドの未知の作用機序を解析するために、タンパク質複合体の構成分子について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアによる分子パスウェイ・ネットワーク解析、及び Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) データベースを用いた Gene ontology (GO) 解析を行った。その結果、135種類の中から、複数のサリドマイド既知相互作用タンパク質を含むタンパク質複合体を12種類特定した。それらの構成分子から形成される分子パスウェイ、及びそれらの分子が分類されるGOを調べ、サリドマイド作用機序との関連が見られる細胞機能を推定した。これらの解析によって、NRF2酸化ストレス応答系やDNA損傷応答等、これまでに報告されている知見と一致するものに加え、mRNAスプライシング機構や Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) シグナル伝達系等の既報にはない新規のものを見いだした。さらに、これらの細胞機能について、ネットワーク解析、及び先行研究と比較した結果、これらの細胞機能はサリドマイドの影響を受けている新たな細胞機能であると結論付けた。以上より、本研究で検証した方法論は、他の薬剤の作用機序解析にも適用可能であると考えられる。本研究が薬剤のタンパク質複合体への作用機序の解明を通して、主作用及び副作用の分子メカニズムを解明し、また標的疾患の病態メカニズムを解明する一助となることが期待される。

1. 序論

タンパク質は遺伝子発現、細胞増殖、代謝プロセス、翻訳、転写、mRNA スプライシング、シグナル伝達等のほぼ全ての細胞機能において重要な役割を果たす。だが、タンパク質は細胞内において単独では機能せず、互いに相互作用し、複合体を形成することで機能している。また、タンパク質複合体同士が細胞内でネットワークを構成し、様々な細胞機能の制御に関与することが報告されている。タンパク質複合体の構成分子は、それらが関与する細胞機能の変化に応じて柔軟に変化する [1,2,3]。従って、タンパク質複合体ネットワーク解析の推進が、未知の細胞機能分子メカニズムの解明や、細胞機能の破綻に起因する病態の発症メカニズムの解明に貢献すると考えられる。

病態発症の裏に隠れた、細胞機能の変化を明らかにすることは、すなわち、病態の分子メカニズム、及び治療標的の解明に繋がると考えられる。ひいては、より効果的な治療法や薬剤の開発に応用されることが期待される。また、逆の視点から見ると、現在有効性が確認されている薬剤の作用機序を解明することは、その薬効の標的となる病態のメカニズムを知ることには繋がると同時に副作用の発症メカニズムを知ることにも繋がると考えられる。今日の医療において、実際に広く利用されている薬剤の中には、その作用機序が未だに不明なものも多い (例. 抗うつ薬や全身麻酔薬などの中枢神経薬、鎮痛薬の一種であるアセトアミノフェン等)。未知の薬剤作用機序を解明することで、病態治癒との関連性や副作用との因果関係をより詳細に把握することが可能となり、より効果的かつ安全性の高い薬剤の開発への貢献につながると考えられる。

薬剤は、生体内のいずれかの生体分子へ影響を及ぼすことで薬理作用をもたらしている。薬剤が直接あるいは間接的に影響を及ぼす生体分子として、タンパク質がよく知られている。今までに良く解析されている薬剤がタンパク質に及ぼす効果としては、タンパク質の細胞内での動態変化 (合成から分解までの時間軸に沿った変化、及び細胞内の機能する場所への輸送もしくは移動の空間的变化)、タンパク質の酵素としての活性化もしくは不活性化、受容体としてのタンパク質の阻害・活性化等が挙げられる。一方で、冒頭で触れた細胞機能の制御に重要な役割を担っているタンパク質間相互作用、及びタンパク質複合体ネットワークへの薬剤の作用については殆んど解析されていない [4]。特に、薬剤は主作用とともに、副作用をもたらすが、副作用の発現機序にも、このようなタンパク質間相互作用あるいはタンパク質複合体ネットワークの動態変化に関与すると考えられている [5,6]。従って、薬剤がタンパク質間相互作用、及びタンパク質複合体ネットワークへ与える影響を解析することは、薬理作用機序の解明に寄与すると考えられる。

これまで薬理作用機序の解明を目的とし、多くの方法論が検証されてきた。ヒトのゲノム情報の解析が終了して以降、例えば、RNA-sequence 解析 [7,8], DNA micro array [9], Protein micro array [10] 等を用いた方法論が薬理作用機序の解明に導入されてきた。これらのポストゲノム科学の方法論のほとんどは、RNA やタンパク質の大規模な「発現量変動」を解析するものである。しかし、これらの方法論は、RNA もしくはタンパク質の発現量の変動として現れない薬理作用に関しては検出が不可能であるという欠点を有している。

本研究では、タンパク質の「発現量変動」として現れない場合でも、タンパク質間相互作用、及びタンパク質複合体ネットワークへの影響として薬理作用を検出できるのではないかと考え、細胞内のタンパク質複合体の変動を解析する従来とは異なるアプローチによる新たな方法論の確立を試みた。私が提唱する方法論は、下記の概念から成る。これまでの先行研究の結果を踏まえ、薬剤が細胞機能に影響を及ぼすと、その細胞機能に参与するタンパク質間の相互作用が変化する、仮にその変化が細胞全体での当該分子の発現量の変化を伴わないとしても、変化したタンパク質間相互作用で形成されるタンパク質複合体も変化するはずであり、タンパク質複合体の変化は各構成タンパク質の顔ぶれ、及び量的な変化として現れると仮定した。従って、タンパク質間相互作用を保持したまま、タンパク質複合体を分離し、その複合体中の構成タンパク質を定性、及び定量解析すれば、薬剤の作用機序解明に繋がると考えた。

この考えを実践するために、初めに、どのような手段でタンパク質複合体を分離するかを思案した結果、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) の分離モードの一種であるイオン交換クロマトグラフィー (Ion-Exchange Chromatography; IEC) を用いることとした。IEC の分離条件にタンパク質間の物理的相互作用が失われない温和な条件を設定し、薬剤処理した細胞溶解液中のタンパク質を分離した。細胞溶解液中のタンパク質は、タンパク質間相互作用を維持したまま、すなわちタンパク質複合体形成を維持したまま分離され、一つのタンパク質複合体を構成するタンパク質分子らは同一のフラクション中に分離されると考えた。また、薬剤処理に影響を受けたタンパク質複合体は、その構造変化に伴い IEC による溶出位置が移動するはずである。よって、同一のタンパク質複合体を構成するタンパク質らは、同様に溶出位置が変化するため、薬剤未処理のコントロールサンプルと比べ、フラクション中のタンパク質量が同一方向 (増加、または減少) に変化すると仮定した。この仮説を模式的に表した図を以下に示した (Figure 1)。

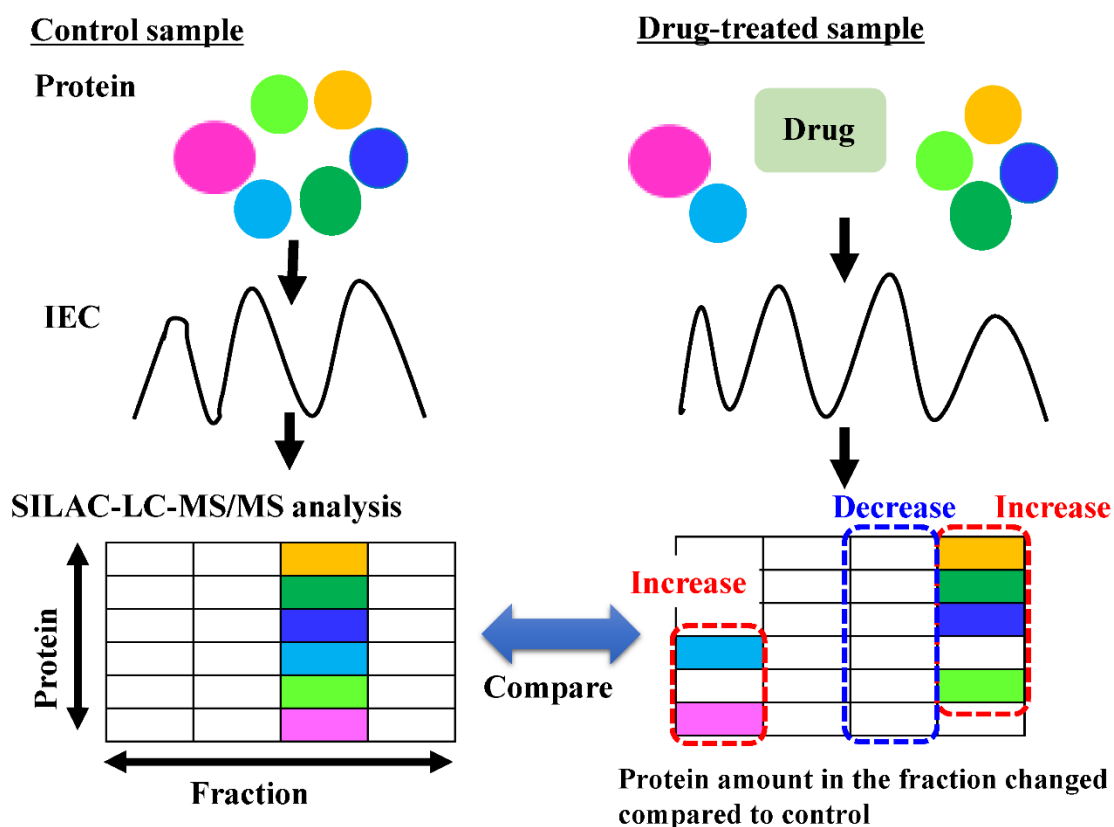


Figure 1: 本研究で提唱する方法論におけるタンパク質複合体変動検出方法の模式図

次に、IECで分離した全てのフラクションについて、各フラクション中に含まれるタンパク質を定性、定量することで、同一フラクション中に溶離されたタンパク質を特定すると同時に、フラクション間での同定したタンパク質の量が増加又は減少する程度を比較できると考えた。即ち、隣接するフラクションにおいて類似性の高い溶離パターン、及び同様なコントロールに対する量比の変動（増加、または減少）を示した異なるタンパク質は互いに相互作用し複合体を形成している可能性が高いと判断した。この目的のために、細胞を培養する際に安定同位体標識法 (Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture; SILAC) によって薬剤処理した細胞と処理しない細胞中のタンパク質を安定同位体アミノ酸でラベルし、それぞれの細胞抽出液を混合後、液体クロマトグラフィー - 質量分析法 (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry; LC-MS/MS) で分析した。この方法を SILAC-LC-MS/MS 法と呼ぶこととする。即ち、本研究では、温和な条件での IEC によるタンパク質複合体の分離と、SILAC-LC-MS/MS 法によるタンパク質の定性・比較定量を組合せた方法を薬剤処理により影響を受けるタンパク質複合

体を解析する方法として提案する。この方法論の概念図を以下に示した (Figure 2)。

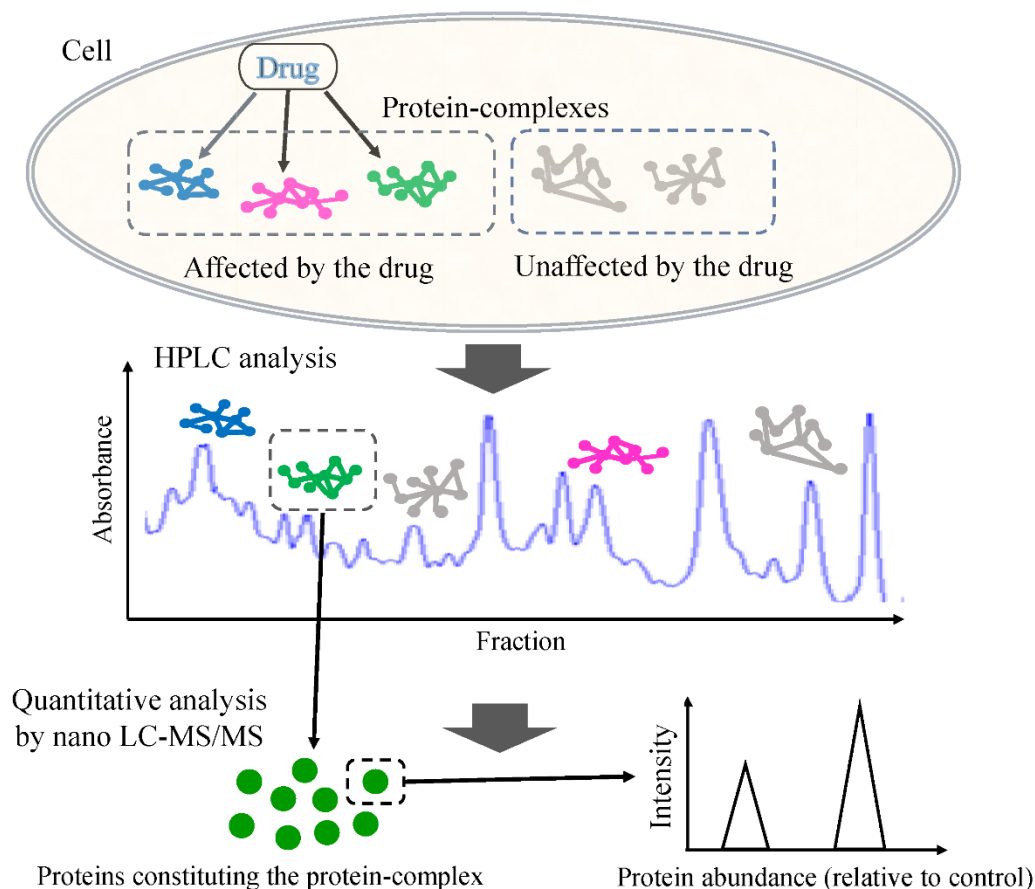


Figure 2: 本研究において提唱する方法論の概念図

さらに、この方法では、定性・定量したタンパク質データを基に、タンパク質複合体を同定するためのバイオインフォマティクスの活用法も同時に提案し、それらの有効性を、鎮静・催眠薬として使われ、副作用が問題となったことで有名なサリドマイドのタンパク質複合体への効果を調べることで検証した。

サリドマイドは西ドイツでの上市直後に、催奇形性が原因で市場撤退したが [11]、その後の研究結果から優れた抗癌活性が認められ、現在は多発性骨髄腫の治良薬として承認され、さらに肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等の癌に対しても、細胞増殖、血管新生を阻害し、癌の浸潤と転移を抑制する治療効果を有することが報告されている。しかしながら、その有用性にもかかわらず、薬剤の作用機序の詳細はほとんど未解明である [12,13,14]。また、サリドマイドの効果を調べる対象としてヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞は、多くの *in vitro* 実験において汎用されている、かつ、サリドマイドの肝癌への有効性が報告されている [14,15]、という理由から本研究に用いた。

次に、分析手法に関して、タンパク質複合体分離に適用した IEC については前述した通りである。タンパク質複合体分離後の構成成分の定量法として採用した SILAC 法は、プロテオミクスに関連した研究において広く使われている手法で[16]、細胞種や培養条件に影響を受けることなく細胞内の全てのタンパク質を標識し、その後の LC-MS/MS 法による測定で、細胞試料に含まれるタンパク質の種類と量の網羅的データを取得出来る利点があるため選択した。

最後に、バイオインフォマティクスアプローチとして、まず、SILAC-LC-MS/MS 測定データを階層的クラスタリング解析に供した。IEC 溶離パターンが類似し、かつ、フラクション中のタンパク質の変動方向が同方向（増加又は減少）の分子群を同一のクラスターに分類した。本方法論の概念に基づき、同じクラスターに分類された分子群は、サリドマイド処理により類似の挙動を示した分子群であり、これらはタンパク質複合体を形成していると仮定した。第二に、階層的クラスタリング解析により抽出した分子群に対し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアによるパスウェイ・ネットワーク解析、及び Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) データベースを用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。階層的クラスタリング解析で抽出した分子群が、それらの分子間相互作用によりネットワークを形成しているか、既知の分子パスウェイと関連はあるか、どんな細胞機能に関わるアノテーションが付加されるか、について解析した。解析結果を統合的に考察し、サリドマイドの既知の作用機序との関連性を検証すると同時に、未知の作用機序の探索を行った。すなわち、タンパク質間相互作用、及びタンパク質複合体に薬剤が及ぼす影響の解明に着目した我々の新規方法論が、薬剤の作用機序解析に有用であるかを検証した。

2. 研究内容

2.1. 概要及び目的

2.1.1. HepG2 細胞の培養とタンパク質の SILAC 標識化

初めに、HepG2 細胞の培養、及び SILAC 法による細胞内タンパク質の標識化を行った。SILAC 法は、細胞の代謝を利用し、細胞内のタンパク質に安定同位体標識したアミノ酸を導入することでタンパク質を標識する手法である。あらかじめ、リジン、及びアルギニン不含有の培地を用い、一方の培地に ^{12}C と ^{14}N で標識したリジンとアルギニンを、もう一方の培地に ^{13}C と ^{15}N で標識したリジン及びアルギニンを添加することで、それぞれの培地で培養したアミノ酸標識が異なる 2 種の細胞を作製する。その後の LC-MS/MS で、アミノ酸の分子量の差が MS スペクトルの差として検出できることから、両サンプルを定量比較することが可能である。本研究では、コントロールとして用いる DMSO 処理用の HepG2 細胞培養培地に ^{12}C , ^{14}N 標識アミノ酸を、サリドマイド処理用の HepG2 細胞培養培地に ^{13}C , ^{15}N 標識アミノ酸を添加した。また、各培地にはアミノ酸代謝によるプロリンからアルギニンへの変換反応を阻害する目的で、Minimum Essential Medium (MEM) non-essential amino acid solution を添加した。MEM non-essential amino acid solution は、不要なアミノ酸代謝によるアルギニンの産生が SILAC 標識化、及び LC-MS/MS 定量結果に影響を及ぼすことを防止するに十分量のプロリン (10 mg/mL) を含量している [17,18]。SILAC 標識化の詳細条件は、Thermo Fisher Scientific 発行のマニュアルを参考に決定した [19,20]。

予備実験として、以下の確認試験を行った。第一に、SILAC 標識が完了していることの確認のため、安定同位体非標識アミノ酸 (light) と標識アミノ酸 (heavy) それぞれで標識した HepG2 細胞抽出液をタンパク質量あたり等量ずつ混合したサンプルを LC-MS/MS し、検出されたタンパク質のほぼ全てが SILAC 標識されており、かつ、理論通り 1:1 の比で検出されたことを確認した (data not shown)。第二に、HepG2 細胞のサリドマイド処理濃度を決定するため、HepG2 細胞を 0.4 μM から 200 μM までの濃度域で 24 時間処理し、画像解析による細胞核数のカウント結果から、10 μM の濃度にて細胞生存率に影響が無いことを確認し、処理濃度を決定した (data not shown)。また、本実験におけるサリドマイドの細胞曝露濃度 (10 μM) は、サリドマイドの多発性骨髄腫に対する臨床薬効用量 (100 mg, 単回経口投与) における、最高血中濃度 ($1.68 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ [$6.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$]) と近い濃度である [21]。

2.1.2. HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析 (Figure 3, Experiment #1)

2.1.1.項で作製した細胞から調製したサンプルの一部を、HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析に供した (Figure 3, Experiment #1)。この実験は、SILAC 標識による定量法が信頼のおけるタンパク質定量法であり、サリドマイドの影響により変化した細胞機能の検出に有用であることを確認するために行った。発現の変動は、増減±1.2 倍を基準に判定した。この値は、先行研究の結果をもとに設定した (Park SS. et al. [2012], [18])。

変動が検出された分子をパスウェイ・ネットワーク解析し、サリドマイド処理により変動した細胞機能を探索した。

2.1.3. タンパク質複合体の抽出及び解析 (Figure 3, Experiment #2)

2.1.1.項で作製した細胞から調製したサンプルの一部をタンパク質複合体検出用の実験に供した。この実験の目的は、タンパク質複合体の検出を介して、サリドマイドの作用機序に関わる細胞機能を解析することである。初めに、IEC によるタンパク質複合体の分離を試みた。1.章で先述したように、IEC は、タンパク質間相互作用を維持したまま、すなわちタンパク質複合体形成を維持したまま、細胞溶解液を分離することを目的とし、タンパク質間の物理的相互作用が失われない穏やかな条件を設定した。次に、IEC で分離した全てのフラクション中に含まれるタンパク質を SILAC-LC-MS/MS で測定した。測定データより、コントロール (DMSO 処理) に対するサリドマイド処理サンプルにおけるタンパク質量の変動比を算出し、ヒートマップ描画によりデータを可視化した。次に、描画したヒートマップから、フラクション中のタンパク質量の変動、及び隣接するフラクションにおける IEC 溶離パターン、及びフラクション中に含まれるタンパク質のコントロールに対する量比が類似するものを階層的クラスタリング解析によりクラスター化し、同じクラスターに属する分子群をグループ化した。この作業の目的は、タンパク質複合体を形成していることが推測されるタンパク質群を抽出することである。我々は、本方法論の概念に基づき、分子間相互作用を維持したまま IEC で分離されたタンパク質らは、複合体を形成したまま同じフラクションに溶離され、また、サリドマイドの作用機序により影響を受ける細胞機能に関与する複合体は、サリドマイド処理によりその構成が変化したことで、溶出位置が移動すると考えた。その際、同一の複合体を構成する分子は、一様に溶出位置が移動し、同一フラクション中の、コントロールに対する量比が同一方向に変動 (増減、または減少) するという仮説を立てた。最後に、この仮説に基づき、抽出したタンパク質複合体

各々について、パスウェイ・ネットワーク解析、GO解析を行った。この解析の目的は、抽出したタンパク質複合体と細胞機能との関連性を解析し、サリドマイドの作用機序が関与する細胞機能を明らかにすることである。様々な視点からの解析により、タンパク質複合体の構成分子が互いにネットワークを形成しているか、また、それはどのような細胞機能に関与しているかを調べた。解析用ソフトウェアのライブラリデータから抽出されたサリドマイド既知相互作用タンパク質情報と比較解析し、既知のサリドマイド作用機序との関連性を解析するとともに、未知のサリドマイド作用機序との関連性についても解析した。

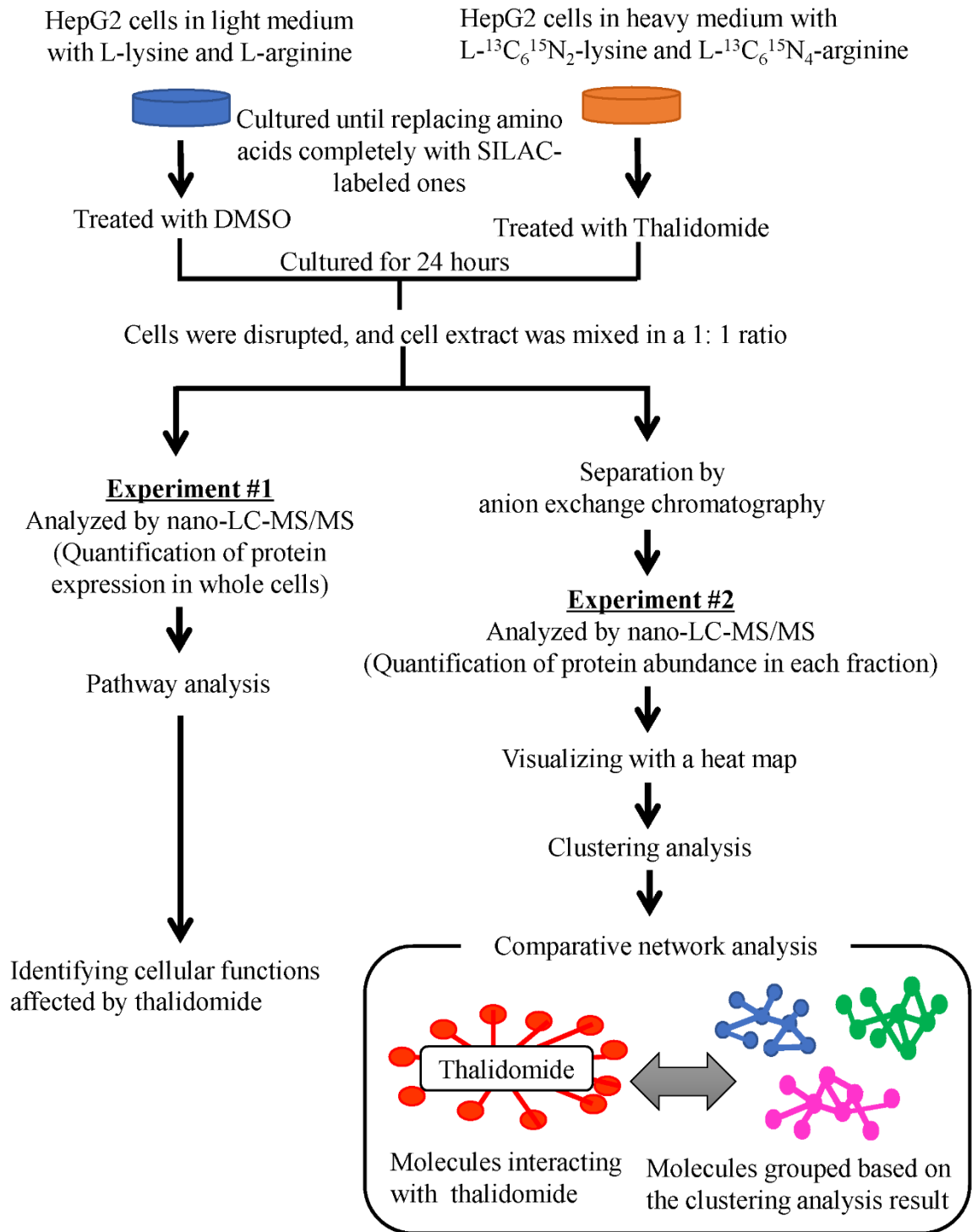


Figure 3: 実験の概要図

2.2. 材料及び方法

2.2.1. HepG2 細胞の培養とタンパク質の SILAC 標識化

HepG2 細胞 (ヒト肝癌由来細胞株、ATCC No. HB-8065) の培養には、Minimum Essential Medium, liquid, with Earle's salt, 2 mM L-glutamine 培地 (以下 MEM 培地; Thermo Fisher Scientific) を用いた。事前に、MEM 培地に 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific)、10 mM MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific)、1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific)、50 units/mL penicillin (FUJIFILM)、50 µg/mL streptomycin (FUJIFILM) を添加し調製した後、細胞培養用フラスコ (培養面積 75 cm²: Corning) を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

数週間、継続して培養し、HepG2 細胞が安定的に増殖していることを確認した後、HepG2 細胞中タンパク質の SILAC 標識作業を行った。最初に、SILAC ラベル用培地を調製した。L-lysine と L-arginine 不含有の SILAC 用 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地に、10% dialyzed FBS (Thermo Fisher Scientific)、1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific)、50 units/mL penicillin (FUJIFILM)、50 µg/mL streptomycin (FUJIFILM)、10 mM (1,150 mg/L) MEM non-essential amino acid solution (Thermo Fisher Scientific) を添加し調製した。調製した DMEM 培地に安定同位体非標識アミノ酸 (light、L-Lysine-2HCl [¹²C₆/¹⁴N₂], L-Arginine-HCl [¹²C₆/¹⁴N₄]; Thermo Fisher Scientific) 及び標識アミノ酸 (heavy、L-Lysine-2HCl [¹³C₆/¹⁵N₂], L-Arginine-HCl [¹³C₆/¹⁵N₄]; Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ 0.1 mg/mL の濃度で添加し、2 種類の培地を作製した。SILAC 標識化用培地 10 mL を添加した細胞培養用フラスコ (培養面積 75 cm²: Corning) を用い、標識反応が完了するまで、HepG2 細胞を 6 代以上 (約 10 日間) 継代した。その際、3 日間毎に新鮮な培地に交換した。

SILAC 標識後、細胞回収時に 80-90%コンフルエント (1.0 X 10⁷ cell/Flask) の状態になるように、10 mM thalidomide (Sigma-Aldrich) DMSO 溶液 ((R)-thalidomide と (S)-thalidomide を 1:1 の比で混合) を終濃度 10 µM になるように添加した SILAC 用培地 10 mL に交換した。コントロールとして、サリドマイド溶液と等量の DMSO を添加した SILAC 用に交換した培養細胞を用意した。

2.2.2. HepG2 細胞溶解液の調製

10 μ M thalidomide 含有培地への変換 24 時間後に、Phosphate-Buffered Saline (PBS) 溶液 (Thermo Fisher Scientific) で細胞を回収し、細胞溶解液を作製した。HepG2 細胞をセルスクレーパーによりフラスコから剥離し、PBS 溶液で 2 回洗浄しながら 1.5 mL チューブ (Eppendorf) に回収した。回収した細胞塊を 0.5% 3-(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate (CHAPS; 富士フィルム和光純薬) 含有 PBS 溶液 500 μ L (細胞溶解用溶液) に懸濁し、超音波処理機 (Nanoruptor; コスモバイオ) によって 30 秒 X 10 回 (インターバル 10 秒, 4 $^{\circ}$ C 冷却下) の超音波処理により破碎した。細胞溶解用溶液に添加する界面活性剤 (CHAPS) の濃度は、試薬メーカー発行の手順書を参考に決定した (Fivephoton BiochemicalsTM 発行 引用文献: [22])。CHAPS (分子量:615) の臨界ミセル濃度は 3~10 mM (0.2~2.0%) であり、本実験で選択した CHAPS 濃度 (0.5%) は、細胞の膜タンパク質を可溶化し、一部の核タンパク質も溶出される条件であると考えた。超音波処理後、30 分間氷上で静置した後、30 分間遠心した (15000 rpm, 4 $^{\circ}$ C、遠心機; KUBOTA)。遠心処理後、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し、さらに不純物を取り除くためフィルターろ過した (フィルター; Millipore, 0.22 μ m pore size, hydrophilic PVDF, 0.5 mL)。Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) を用い、フィルターろ過後の溶液中のタンパク質濃度を測定した。このサンプルの一部を、HepG2 細胞中のサリドマイドの影響により変動したタンパク質の発現解析に用いた。また、その他の一部を IEC によりタンパク質複合体分離する解析用に用いた。

2.2.3. SILAC-LC-MS/MS による HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析

2.2.2.項で調製した HepG2 細胞溶解液を LC-MS/MS により、分離同定し、その後データ解析した。タンパク質量 10 μ g 分の細胞溶解液 10 μ L (あらかじめ、8 M Urea バッファーを用いてコントロールサンプル、薬剤処理サンプル、同量になるように調製した) に Urea バッファー (8 M urea [GE healthcare], 5 mM tris [2-carboxyethyl] phosphine [TCEP; Sigma-Aldrich], 50 mM triethylammonium bicarbonate [TEAB; Sigma-Aldrich]) を 30 μ L 添加し、タンパク質システイン基の還元アルキル化反応を行った。反応条件の詳細は後項で詳述した (2.2.5.参照)。次に、専用の懸濁用バッファーに溶解した 400 ng の Trypsin/Lys-C Mix (Promega) を添加し、37 $^{\circ}$ C で一晩静置させタンパク質の溶液内酵素消化反応を行った。その後、酵素消化反応後の溶液中の不純物除去のため、固相抽出処理した。

実験条件の詳細は後項 2.2.5. に記した。固相抽出処理後のペプチド溶液を窒素ガス吹付により乾固させ、20 μ L の 0.1% TFA バッファーに溶解した。半量 10 μ L の溶液を LC-MS/MS 解析に供し、分析データを XCalibur, Proteome discoverer (共に Thermo Fisher Scientific) らのソフトウェアを用いて出力及びタンパク質同定・定量解析した (検出タンパク質一覧は、Supplemental Table 1 を参照)。LC-MS/MS 条件及びデータの解析条件は後項で詳述した (2.2.5 及び 2.2.6 参照)。タンパク質の定量データより、コントロール (DMSO 処理) に対するサリドマイド処理細胞中のタンパク質の発現量が増減比 1.2 倍以上変動した分子を抽出し、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェア (IPA[®], <http://www.ingenuity.com>, Ingenuity Systems[®], QIAGEN) を用いて解析した。IPA ソフトウェアデータベースに登録されている既知の細胞機能の分類データに基づき、サリドマイド処理により発現が変動した分子との統計学的関連度が高いことが示された細胞機能を検出した。

2.2.4. IEC によるタンパク質複合体の分離

タンパク質濃度測定後、サリドマイド処理 (+)、未処理 (-) のサンプルそれぞれをタンパク量 500 μ g (合計 1 mg) になるように混合し、カラム平衡化に用いるものと同じのバッファー (0.02 M CH₃COONH₄ (以下、AcONH₄), pH6.0, 4.8% isopropanol/acetonitrile [V/V (%) = 1:1]) で合計 1 mL になるよう希釈し、IEC 用サンプルを調製した。HPLC (HPLC 装置; HITACHI, インジェクター; GLサイエンス) には、陰イオン交換用と陽イオン交換用の 2 種類の分析カラムをタンデムに結合させたものを用い、分析カラム保護のため、それぞれの分析カラムに対するガードカラムを接続した。分析カラムとガードカラムの詳細は以下に記した (Table 1)。

Table 1: IEC に使用したカラム仕様

Anion-exchange column (PolyWAX LP™)	Item No.	104WX05-10 (PolyLC Inc.)
	Column dimensions	100 x 4.6 mm
	Particle size	5 μm
	Pore diameters	1000 Å
	Column volume (CV)	2.5 mL
	Affinity support	Silica-based material with an adsorbed, cross-linked coating of linear polyethyleneimine (PEI)
Cation-exchange column (PolyCAT A™)	Item No.	104CT05-10 (PolyLC Inc.)
	Column dimensions	100 x 4.6 mm
	Particle size	5 μm
	Pore diameters	1000 Å
	Column volume (CV)	2.5 mL
	Affinity support	Silica-based material with a bonded coating of polyaspartic acid
Anion-exchange guard column (PolyWAX LP guard column)	Item No.	JGCWX0510 (PolyLC Inc.)
	Column dimensions	10 x 4.0 mm
	Particle size	5 μm
	Pore diameters	1000 Å
Cation-exchange guard column (PolyCAT A guard column)	Item No.	JGCCT0510 (PolyLC Inc.)
	Column dimensions	10 x 4.0 mm
	Particle size	5 μm
	Pore diameters	1000 Å

サンプルの分析カラムへの充填前に、平衡化バッファー (0.02 M AcONH₄, pH6.0, 2.4% isopropanol/acetonitrile [V/V (%) = 1:1]) を分析カラムボリュームの 10~20 倍量送液し、分析カラムを平衡化した。サンプルは 5 mL シリンジ (シリンジ本体; TERUMO, 20 G シリンジ針; TERUMO) を用いて 200 μL サンプルループ (GLサイエンス) に注入した。移動相は以下の A、B、C、3 種類のバッファーを用いた (A バッファ

ー: 2 M AcONH₄ [pH 6.0], B バッファー: 80% isopropanol/acetonitrile [V/V (%) = 1:1], C バッファー: H₂O)。

溶出は、以下の手順でリニアグラジエントにより 1 mL/min の流速で行い、280 nm の吸光度によって溶出ピークを検出した [22]。また、フラクションコレクターを用い、溶液 1mL を 1 フラクションとし、4° C 冷却下で 1 分ごとにそれぞれ 1.5 mL チューブ (Eppendorf) に集めた。分析開始直後からフラクションの捕集を開始し、連続して計 96 フラクションを収集した。

溶出ステップ

- 1) 1% A バッファー (0.02 M AcONH₄) を 4 CV 分送液
- 2) 1% to 20% A バッファー (0.02 M – 0.4 M AcONH₄) を 20 CV 分送液
- 3) 20% to 50% A バッファー (0.4 M – 1 M AcONH₄) を 12 CV 分送液
- 4) 1% A バッファー (0.02 M AcONH₄) を 6 CV 分送液

※全てのステップにおいて 3% B バッファー (2.4% isopropanol/acetonitrile [V/V (%) = 1:1]) は一定とした。溶出バッファーに含まれる有機溶媒濃度は、タンパク質間の相互作用に影響を与えず、かつ、カラムの分離能向上に至適な濃度を選択した。先行研究の結果より、選択した有機溶媒濃度の条件下では、アミノ酸の疎水性結合への影響、及びタンパク質の立体構造への影響が軽微であることが確認されていたため当該濃度に決定した [24,25]。

2.2.5. LC-MS/MS 用サンプルの調製と測定

LC-MS/MS 用のサンプルを以下の手順で調製した。IEC のフラクション溶液の一部 (200 µL) を分取し、窒素ガス吹付により乾固させた (窒素ガス発生装置; テクノサイエンス)。その後、8 M urea (GE healthcare), 5 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP; Sigma-Aldrich), 50 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB; Sigma-Aldrich) のバッファー 40 µL に再溶解した。氷上に 15 分静置し、十分にサンプルを溶解した後、37° C で 1 時間静置し (インキュベータ; アステック)、還元反応によるタンパク質のジスルフィド結合切断処理をした。還元反応後の溶液に、125 mM iodoacetamide (IAA; Sigma-Aldrich) を 4 µL 添加し (IAA 終濃度 14 µM)、さらに 37° C で 30 分間静置することでシステイン残基のアルキル化処理を行った [26]。

次に、1 サンプルあたり、専用の懸濁用バッファーに溶解した 400 ng の Trypsin/Lys-C Mix (Promega) を添加し、37° C で一晩静置させタンパク質の溶液内酵素消化反応を行った。(Trypsin/Lys-C Mix を用いたタン

パク質消化マニュアル Promega 社発行：引用文献[27]) 酵素消化反応後の溶液中の不純物除去のため、固相抽出処理した。固相担体として styrene divinyl benzene (SDB) polymer が充填されたチップカラムを用い (GL-Chip SDB; GL Sciences, Inc.)、カラムの洗浄及び平衡化には 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) を、ペプチドの溶出には 80% acetonitrile (0.1% TFA 含む) のバッファーを使用した。溶出されたペプチド溶液を窒素ガス吹付により乾固させ、20 μ L の 0.1% TFA バッファーに溶解した (GL-Chip SDB を用いた固相抽出マニュアル, GL Sciences, Inc.発行, 引用文献: [28])。ペプチド溶液 (0.1% TFA バッファー溶解) の半量 (10 μ L) を LC-MS/MS に供した。下記の装置から構成された LC-MS システム及び分析条件によりデータを取得した (Table 2)。

Table 2: LC-MS/MS の詳細条件
液体クロマトグラフィー (LC)

Liquid chromatographic system	Michrom nano Advance UHPLC (Michrom Bioresources, Inc.)
Autosampler	PAL-HTS-xt (CTC analysis)
Trap column	Monolith Trap column C18-50-150 (50 μ m id x 150 mm, Hitachi High-Technologies)
Separation column	MonoCap C18 Fast Flow column (50 μ m x 25 cm, GL Sciences)
Analysis method	Equilibration (0.1% TFA), Elution (95%-65% solvent A [0.1% formic acid] / 5-35% solvent B [98% acetonitrile with 0.1% formic acid])
Flow rate	200 nL/min

質量分析 (MS)

Mass spectrometer	LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)
Ion source	ES ion source (Thermo Fisher Scientific)
Splay voltage	1.6 kV
Temperature of Heated capillary	200° C
Full scan MS survey spectra	m/z 300-2000 acquired in the Orbitrap
Resolution	30,000
Mass spectra scan	Data-dependent manner with an automatic switch between MS and MS/MS using the top six methods that the six most intense peptide ions from the preview scan in the Orbitrap are fragmented
MS/MS fragmentation method	collision-induced dissociation (CID) method (normalized collision energy 35, activation 0.25 and activation time 30 ms) in the LTQ after the accumulation of 100,000 ions

2.2.6. LC-MS/MS データの解析 (タンパク質の同定及び SILAC 定量)

LC-MS/MS により取得した MS/MS スペクトルデータを XCalibur ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) によって、ファイル出力した (raw data file)。出力したファイルを Proteome Discoverer ソフトウェア (version 2.2, Thermo Fisher Scientific) で解析し、タンパク質の同定及び SILAC 法による定量値算出を行った。HepG2 細胞全体における分析結果は、Supplemental Table 1 に、また、IEC により分離した 96 フラクションにおける解析結果は、Supplemental Table 2 (検出タンパク質一覧) に示した。Proteome Discoverer ソフトウェアの解析条件を以下に記した (Table 3) [29]。

Table 3: LC-MS/MS データ解析の詳細条件

Database searching algorithms	SEQUEST HT (Thermo Fisher Scientific)
Minimum/maximum precursor mass	350/5,000 Da
Protein level quantification	Measured ion counts
Signal to noise (S/N) threshold	1.5
Search database	Universal Protein Resource (UniProt)
Taxonomy	Homo sapiens
Peptides used for search	Fully tryptic peptides only
Maximum missed cleavage	Two
Precursor mass tolerance	10 parts per million (ppm)
Fragment mass tolerance	0.6 Da
Search parameter for variable modification	Oxidation of methionine (+15.995 Da), N-terminal acetylation (+42.011 Da), SILAC modifications of lysine ($^{13}\text{C}_6/^{15}\text{N}_2$) and arginine ($^{13}\text{C}_6/^{15}\text{N}_4$)
Search parameter for fixed modification	Carbamidomethylation of cysteine residues (+ 57.021 Da)
False Discovery Rate (FDR) calculated with Proteome Discoverer decoy database	5%
Confidence of identification of peptide and protein	High or medium confidence

2.2.7. 階層的クラスタリング解析

Proteome discoverer ソフトウェアの解析により取得したタンパク質定量結果に対し、階層的クラスタリング解析を行った。解析を行う前の準備として、初めに、コントロールサンプル (DMSO 処理) 及びサリドマイド処理サンプル、それぞれのサンプル中で検出された各タンパク質の定量値から、サリドマイド処理サンプルのコントロールに対する各タンパク質の量比を算出し、対数値に変換した。次に、縦軸 (列) に同定されたタンパク質、横軸 (行) にフラクション番号を配置し、検出されたタンパク質の定量比を入力したマトリクス表を作成した。さらに、算出されたコントロールに対するタンパク質の量比の対数変換値をもとに、このマトリクス表からヒートマップを描画しデータの可視化を行った。描画の際の色付けの条件として、増加傾向 ($0 < \text{対数変換値} < 1$) に赤色、減少傾向 ($-1 < \text{対数変換値} < 0$) に青色のグラデーションを設定した。

続いて、ヒートマップを横軸のフラクション番号ごとに6分割した。全96フラクションを順番に16フラクションずつに6つに分割し(No. 1~16, 2~32, 33~48, 49~64, 65~80, 81~96)、6枚のヒートマップを作成した(Supplemental Table 2A,2B,2C,2D,2E,2F)。この6枚のヒートマップそれぞれについて階層的クラスタリング解析を行い、クラスターを樹形図で表した。縦軸に配置された各タンパク質について、横軸に配置されたフラクション上のIECによる溶出パターン(溶出位置情報のみならず、コントロールサンプルに対する各フラクション中のタンパク質量比の情報も含む)の類似性が高い程、近いクラスターに分類される。すなわち、同一もしくは近接するクラスターに分類されたタンパク質同士は、薬剤処理の影響により変動したことにより、溶出位置及び、フラクション中のタンパク質量が変化したことが示唆され、同一のタンパク質複合体複合体を形成している可能性が高いと考えられる。また、タンパク質溶出パターンの類似性(ヒートマップ上の各タンパク質の間の距離)は、ピアソンの積率相関係数を用いて算出した。係数が0.3以上のクラスターを全て抽出し、各クラスターに含まれるタンパク質を別々のグループに分類した。全部で135グループが抽出された。階層的クラスタリング解析及びヒートマップ描画には、Spotfire®ソフトウェア(TIBSO® Software Inc., <http://www.spotfire.com>)を用いた。解析に用いたアルゴリズム及び各パラメータを以下に記した。

Table 4: 階層的クラスタリング解析の条件

Clustering method	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
Distance measure	Correlation (the correlation between two points, a and b, with k dimensions was calculated with Pearson Product Momentum Correlation),
Normalization	None
Empty value replacement	Constant value (0)

2.2.8. タンパク質複合体のパスウェイ・ネットワーク/GO解析

2.2.8.1. Ingenuity Pathway Analysis ネットワーク解析

階層的クラスタリング解析により分類した135グループについて、パスウェイ・ネットワーク解析を行った。初めに、Ingenuity Pathway Analysisソフトウェア(IPA®, <http://www.ingenuity.com>, Ingenuity Systems®, QIAGEN)を用い、ソフトウェアデータベース上に登録されているタンパク質間相互作用に関する登録情報に照らし合わせた検索を行っ

た。各グループに含まれるタンパク質と IPA データベース上の既知のタンパク質間相互作用を比較し、分類された各グループ内に既知のタンパク質間相互作用が存在するかを調べた。タンパク質間相互作用の検索条件を以下に記した。この検索により、実験結果により検証済みの直接的なタンパク質間相互作用により形成されるネットワークが、抽出された各タンパク質群内に含まれているかを確認した。

- Relationship to consider: Direct relationship
- Molecules per network: Up to 35 molecules
- Confidence filter: Experimentally observed

また、同じくデータベースに登録されている既知の細胞機能や代謝、シグナル伝達経路と照合し、サリドマイドに影響を受けて変動したと考えられる細胞機能を探索した。

2.2.8.2. Gene ontology 解析

次に、同じく分類した 135 グループについて、GO 解析を行った。GO 解析は、データベース上に登録されたアノテーション情報 (GO term: 分子機能、細胞構成要素、生物学的プロセスの 3 分類について階層的に付与されている) をもとに、解析対象の分子群が、統計学的に関連度が高いとされる GO term を検索する手法である。GO 解析のデータベースには、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, version 6.8; National Institute of Allergy and Infectious Diseases) を使用した。階層的クラスタリング解析により分類したグループに属するタンパク質群の Uniprot accession ID リスト、及びバックグラウンドとしてヒトの全遺伝子を適用し、分子機能 (Molecular Function; MF) の生物学的プロセス (Biological Process; BP) の二つの GO カテゴリについて解析した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析

薬剤が細胞中のタンパク質に与える影響の検出を従来のタンパク質定量アプローチにより検討した (Figure 3, Experiment #1)。サリドマイド処理した HepG2 細胞の全溶出液中のタンパク質を SILAC 法により定量し発現変動解析を行った。コントロール (DMSO 処理) に対するサリドマイド処理 HepG2 細胞中のタンパク質の発現量が増減比 1.2 倍以上変動した分子を抽出したところ、検出された全ての 532 分子中、1.2 倍以上の増減を示した分子は 344 分子であった (Supplementary Table 1)。また、その内、109 分子は発現量の増加が、235 分子は発現の減少が認められた (Table 5A and Supplementary Table 1)。サリドマイド処理細胞において発現量が 1.2 倍以上変動した 344 分子を IPA[®]ソフトウェアの解析に供し、これらの分子が関連する細胞機能を調べた。解析結果より、最も統計学的に関連が高いと認められた細胞機能は Eukaryotic Initiation Factor (eIF2) シグナル経路であり、344 分子中の 25 分子 (PTBP1, RPL32, RPLP1, RPS5, RPS19, RPS15A, RPS11, EIF4A1, RPS3A, RPL30, RPS6, RPLP2, RPL22, PABPC1, RPS7, EIF1, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPLP0, MAPK1, RPS4X, RPL10, RPS15) が含まれていた。次に関連度が高かったのは、eIF4 及び p70S6K シグナル経路の調節に関与する 19 分子 (RPS6, PTPA, PABPC1, RPS7, RPS5, EIF1, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPS19, RPS15A, PPP2R1A, RPS11, MAPK1, EIF4A1, RPS4X, RPS3A, RPS15) であり、その次は、mTOR シグナル経路に関連する 18 分子 (RPS6, PTPA, RPS6KA3, RPS7, RPS5, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPS19, RPS15A, PPP2R1A, RPS11, MAPK1, EIF4A1, RPS4X, RPS3A, RPS15) であった (Table 5B)。

Table 5: サリドマイド処理 HepG2 細胞中のタンパク質変動解析結果

A) サリドマイド処理した HepG2 細胞において発現変動したタンパク質数 (コントロールに対し 1.2 倍以上の増減を変動判断基準とした), B) サリドマイド処理した HepG2 細胞において発現変動したタンパク質の IPA ソフトウェア解析結果 (統計学的に関連が高いと判断された順に列挙)

A

Protein expression fold change	Number of molecules for pathway analysis
UP	109
Down	235

B

Ingenuity Canonical Pathways	Molecules (Symbol)
EIF2 Signaling	PTBP1, RPL32, RPLP1, RPS5, RPS19, RPS15A, RPS11, EIF4A1, RPS3A, RPL30, RPS6, RPLP2, RPL22, PABPC1, RPS7, EIF1, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPLP0, MAPK1, RPS4X, RPL10, RPS15
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	RPS6, PTPA, PABPC1, RPS7, RPS5, EIF1, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPS19, RPS15A, PPP2R1A, RPS11, MAPK1, EIF4A1, RPS4X, RPS3A, RPS15
mTOR Signaling	RPS6, PTPA, RPS6KA3, RPS7, RPS5, RPS2, RPS12, RPSA, RPS3, RPS19, RPS15A, PPP2R1A, RPS11, MAPK1, EIF4A1, RPS4X, RPS3A, RPS15

eIF2 シグナル経路に関わる分子の一つである eIF2- α kinase は多発性骨髄腫におけるサリドマイドの治療標的として報告されている [30]。また、eIF4 及び p70S6K シグナル経路と mTOR シグナル経路は、互いに深く関連することが報告されており、複数の分子が両経路に共通して分類されていた。これらの経路は、細胞増殖、アポトーシス、タンパク合成、血管新生等の機能に関与することが報告されており、これらの細胞機能は、同じく多発性骨髄腫において、サリドマイド作用機序に関連することが強く示唆されており、サリドマイドの処理により血管新生や細胞増殖の抑制が起こることが報告されている [31, 32]。加えて、サリドマイドをヒト胚性幹細胞 (Human Embryonic Stem Cell; hESC) に処理し 2 次元電気泳動解析を行った先行研究で検出された分子の内のいくつかについて、本研究においても変動が認められた。例えば、核輸送に関わる分子である PAFAH1B3 は、先行研究においてサリドマイド処理による発

現低下が認められており、この結果は本研究の結果と一致していた [33]。以上のように、細胞全体のタンパク質発現変動を解析する従来のアプローチは、薬剤に影響を受けた細胞機能の検出に有用であり、かつ、本研究で我々が採用した SILAC 標識による定量法は、信頼のおけるタンパク質定量法であることが示された。

しかしながら、従来のアプローチは、薬剤処理による細胞中の各タンパク質の変動が、総量の変化として現れない場合に検出できないという短所を持つ。それゆえ、我々は次のステップとして、細胞全体における発現量の変化とは異なった評価指標を用いて、薬剤の影響を検出することを試みた。

2.3.2. IEC と SILAC-LC-MS/MS によるタンパク質複合体の検出

細胞全体のタンパク質量変動として検出されない薬剤の影響を捉えるため、従来とは異なるアプローチによる分析を試みた。タンパク質間相互作用により形成されているタンパク質複合体の構成成分（構成タンパク質）の量を評価することで薬剤の細胞へ及ぼす影響を評価しようとした (Figure 1)。前項で述べた従来のアプローチと同一のサンプル（タンパク質を SILAC 標識し、サリドマイド 24 時間処理した HepG2 細胞抽出液）を用いた。しかし、LC-MS/MS に供する前に、イオン交換クロマトグラフィーによる HPLC のステップを組み入れた。陰イオン交換用と陽イオン交換用の 2 種のカラムを直列に接続した分析カラムを用い、酢酸アンモニウムの濃度勾配によりタンパク質を溶出した。波長 280 nm における吸光度の測定によって得られたクロマトグラムを以下に示した (Figure 4)。

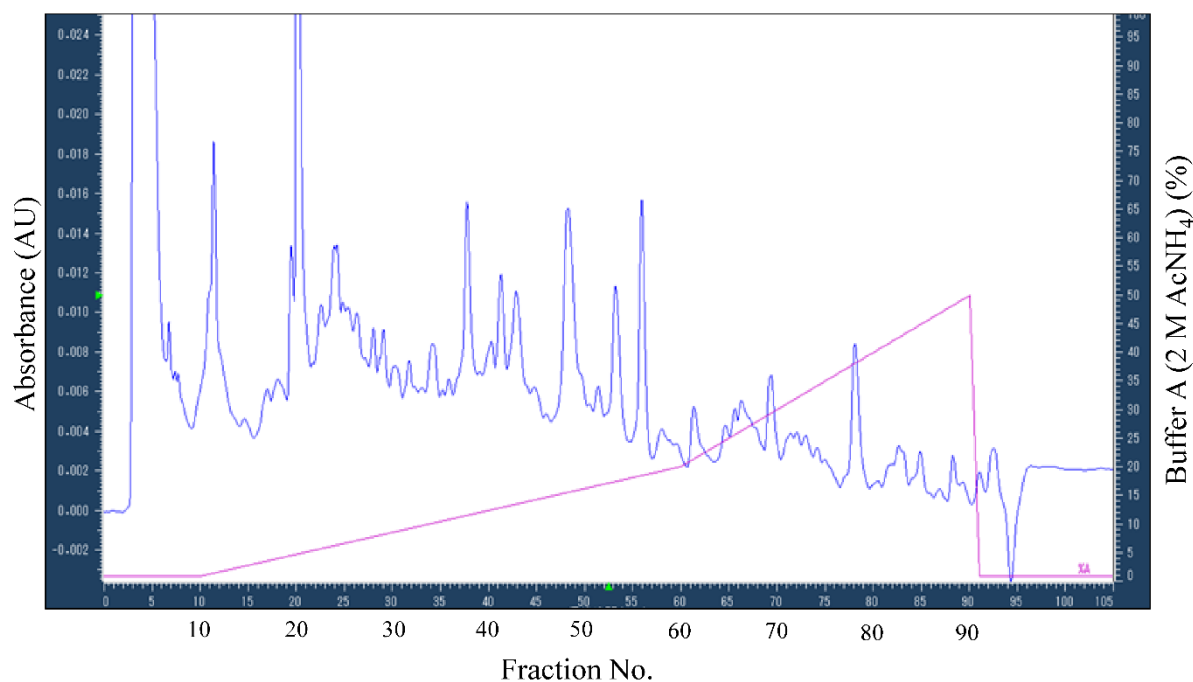


Figure 4: HepG2 細胞溶解溶液のイオン交換クロマトグラム

IECにより分離した96フラクションについて、SILAC-LC-MS/MSを行い、各フラクション中に含まれるタンパク質を定量した。SILAC-MS/MS分析の結果、1,256タンパク質が検出され、その内の720分子について定量値が算出された。また、測定した96フラクション中のいずれかのフラクションにおいて、コントロールに対する定量比が増減1.2倍以上であったものは709分子であった (Table 6, Supplementary Table 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F)。2.3.1.項で述べた、HepG2細胞全体のタンパク質変動解析結果と比較すると、より多くのタンパク質の変動が検出された。この結果より、従来のアプローチに比べ、サリドマイドに影響を受ける細胞内の変動をより詳細に捉えられる可能性が示唆された。

Table 6: IEC で分離した 96 フラクション中で検出された分子数

Definition	Number of molecule
Molecules identified (including ones not quantified)	1,256
Molecules which the amount in any of 96 fractions was quantified	720
Molecules which their expression levels were changed by more than 1.2 times (up and down) relative to those of the control	709

また、個々のタンパク質定量値について、HepG2 細胞全体における定量値と比較すると、下記のような現象が認められた。第一に、HepG2 細胞では発現の変動が認められなかった分子について、IEC 後の 96 フラクション中のタンパク質量の総和を比較すると、必ずしも収支がゼロになっていない分子が散見された。この現象の一つの解釈として、タンパク質翻訳後修飾の LC-MS/MS への影響が考えられた。時として、翻訳後修飾されたタンパク質は、非修飾タンパク質と比べ LC-MS/MS による検出が難しくなるため、定量に影響を与えた可能性があり、また、翻訳後修飾の反応は、サリドマイドの作用に付随して起きた可能性があると考えられた。例として、タンパク質のリン酸化は、非リン酸化と比べ LC-MS/MS による検出が難しく、また、多くの細胞内シグナル伝達経路の制御に重要な機能を果たすことが報告されている。第二に、

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、アクチン、チューブリンらのハウスキーピング分子は HepG2 細胞全体では発現の変動が認められなかった。しかし、IEC 後の 96 フラクション中では、複数のフラクション中でそれらの変動が検出された。サリドマイドは、細胞骨格動態や酸化ストレスなどの細胞機能に影響することが報告されており、加えて、先に挙げたハウスキーピング分子のこれら細胞機能への関与も報告されている [34]。ハウスキーピング分子は細胞内の多数の細胞機能に関与しているため、細胞全体における変動としての検出は困難であるが、IEC によるサンプルの分離工程の導入により、これらの分子に対するサリドマイドの影響の検出が可能となったことが示唆された [35]。

以上の結果より、IEC を SILAC-LC-MS/MS 法と組み合わせることにより、サリドマイドにより影響を受けた細胞機能に関与するタンパク質の変動がより詳細に検出できる可能性が示唆された。

2.3.3. 階層的クラスタリング解析によるタンパク質複合体の抽出

2.3.2 項の SILAC-LC-MS/MS によるタンパク質定量結果をヒートマップに描画した (Figure 5A)。次に、2.2.7.項で述べた通り、順番に 16 フラクションずつ全 96 フラクションを 6 分割し (No. 1~16, 2~32, 33~48, 49~64, 65~80, 81~96)、それぞれについてヒートマップを作成した (Supplemental Table 2A,B,C,D,E,F)。それぞれのヒートマップについて、階層的クラスタリング解析を行い、IEC による溶出パターンの類似性が高い分子同士を同じクラスターに分類した。本研究で提唱する方法論の概念より、同じクラスターに分類されたタンパク質群は、タンパク質複合体を形成していると考えられる。階層的クラスタリング解析結果の例として、フラクション No. 1~16 の解析から作成されたヒートマップを Figure 5B に示した。このように、6 つ全てのヒートマップに対し、階層的クラスタリング解析を行い、その結果より、サリドマイドの影響で変動したタンパク質複合体を形成すると考えられるタンパク質群を抽出した。2.2.7.項に記載した条件に基づき解析を行った結果、135 個の分子群 (グループ) が抽出された。酵母を用いた先行研究において、タグ標識したタンパク質によるアフィニティ精製を行った結果、547 個のタンパク質複合体が同定されたことが報告されている [36]。この結果を参照すると、本実験において見出されたタンパク質群は、細胞全体における約 4 分の 1 程度のタンパク質複合体の検出を示唆していると考えられる。

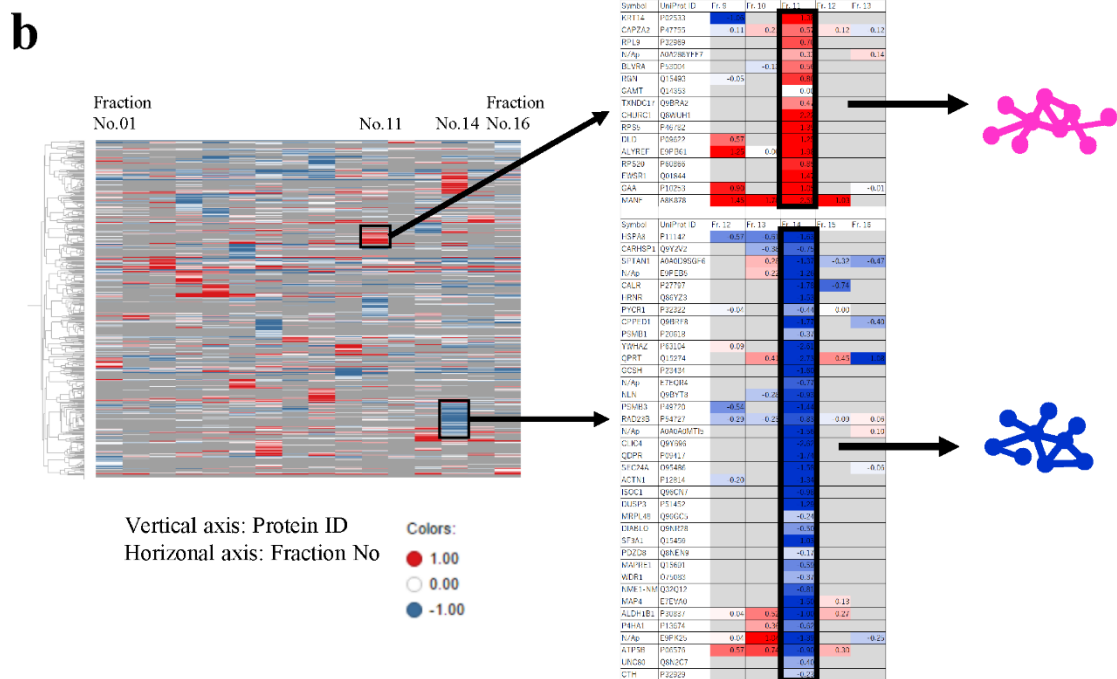
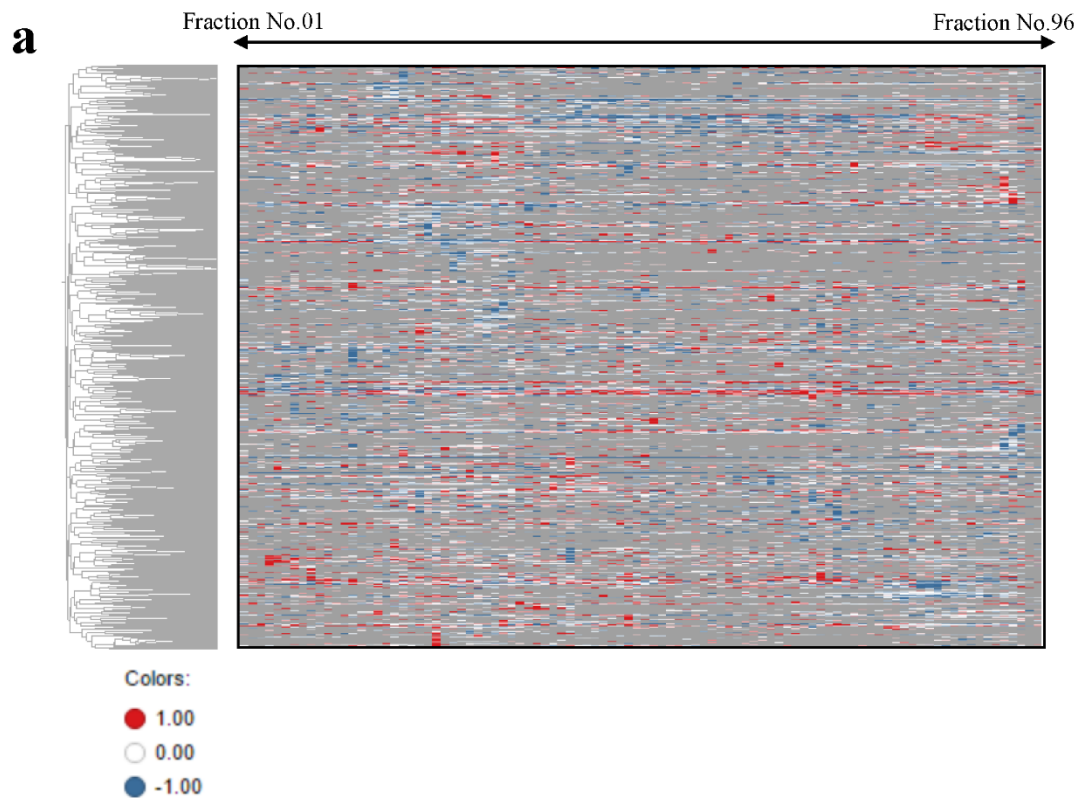


Figure 5: タンパク質定量データのヒートマップ描画と階層的クラスタリング解析によるタンパク質複合体の抽出

- A. IECにより分離した96フラクション中で定量されたタンパク質全てのデータをヒートマップに可視化。コントロールに対するタンパク質の量比の対数変換値を、増加傾向 ($0 < \text{対数変換値} < 1$) は赤色、減少傾向 ($-1 < \text{対数変換値} < 0$) は青色のグラデーションに色付けした。
- B. フラクション No. 1~No. 16のヒートマップの階層的クラスタリング結果

2.3.4. パスウェイ・ネットワーク/GO解析によるサリドマイド作用機序 関連細胞機能の探索

IPAソフトウェアのデータベースの検索結果より、5つのタンパク質 (CRBN, TNF, NFKB1, FGFR2, CDH2) についてサリドマイドに直接的に相互作用することが報告されているが (Figure 6A)、サリドマイドが関与するタンパク質複合体についての報告はこれまでにない。そこで、我々は、サリドマイドが関与するとされる既知のタンパク質間相互作用が、それぞれのタンパク質群に含まれているかを調べた。初めに、サリドマイドと直接相互作用する上記5分子について調べたが、これらを含むタンパク質群は見出されなかった。その理由として、これらの分子は抽出されたタンパク質複合体の主要構成成分ではなく、間接的に他の分子を介してタンパク質複合体の調節に関与しているためであると考察した。次に、5分子 (CRBN, TNF, NFKB1, FGFR2, CDH2) と直接的に相互作用する755分子をリストアップし、それらがタンパク質群に含まれるかを調べた (Figure 6B)。すなわち、5分子を介してサリドマイドと間接的に相互作用する分子の探索を試みた。結果、755分子中90分子が、SILAC-LC-MS/MS分析により検出された1,256分子中に含まれていた。我々は、サリドマイドと間接的に相互作用する分子をより多く含むグループが、サリドマイドの影響により変動したタンパク質複合体を形成している可能性が高いと考え、4つ以上のサリドマイド間接的相互作用分子を含むグループを抽出することにした、その結果、階層的クラスタリング解析により見出された135グループ中12グループが抽出された。抽出された12グループに含まれるサリドマイド間接的相互作用分子の分子名、数等をTable 7に示した。

次に、サリドマイドの影響を受けた細胞機能、及びそれらが関与する分子ネットワークを調べる目的で、この12グループに対し、DAVIDを用いたGO解析、及びIPAソフトウェアを用いたパスウェイ・ネットワーク解析を行った。12グループに含まれるタンパク質の最も多くが分類されたGO termは、mRNA splicing, via the spliceosome (カテゴリ; BP) と poly (A) RNA binding (カテゴリ; MF)であった (Table 7 参照)。

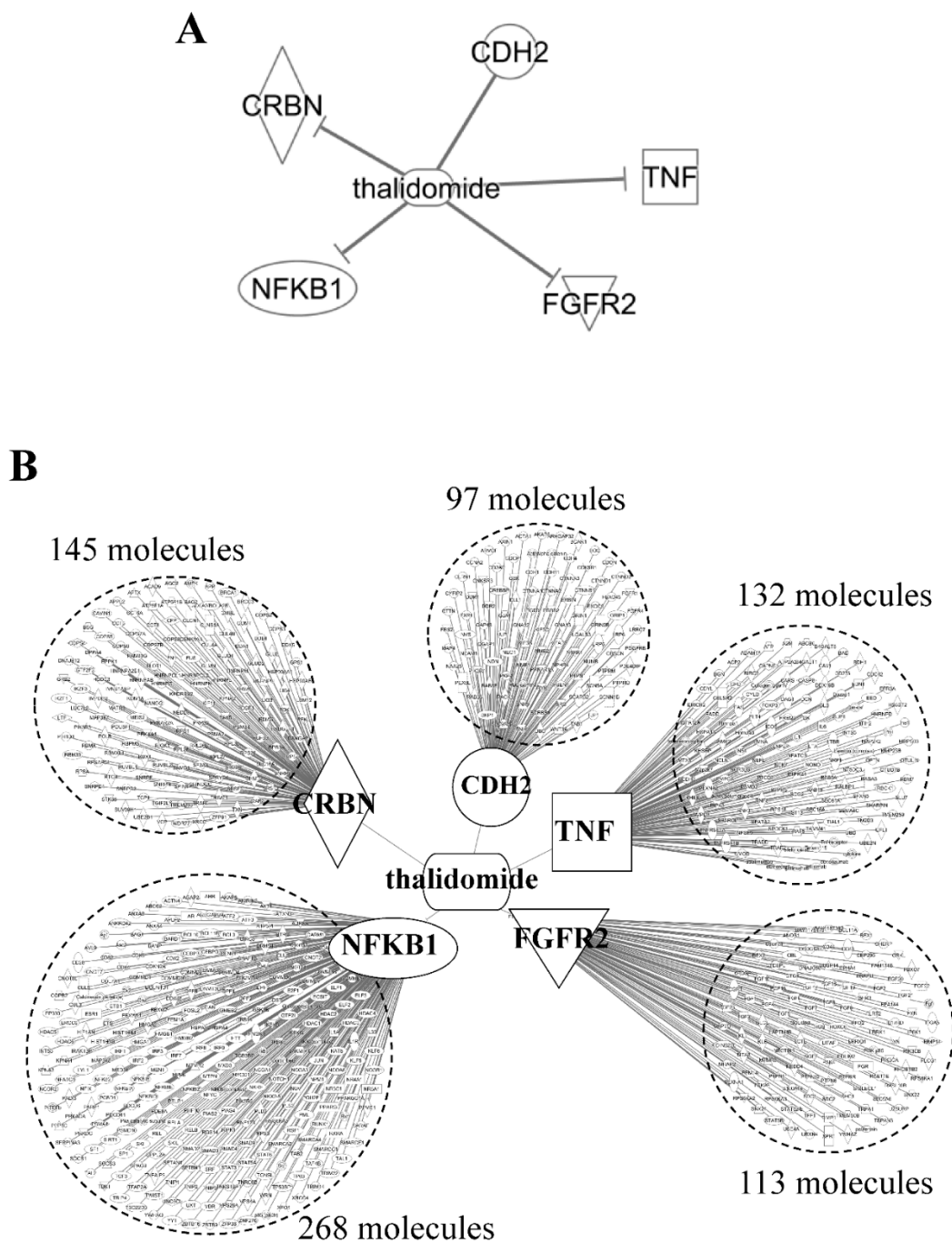


Figure 6: サリドマイド相互作用タンパク質

A. サリドマイド直接相互作用分子

B. サリドマイド直接相互作用分子 (CRBN, TNF, NFKB1, FGFR2, CDH2) のいずれかの直接相互作用分子

Table 7: サリドマイド間接的相互作用分子を含むグループ一覧

既知のサリドマイド相互作用分子を4分子以上含んでいたグループを列挙し、各グループについて以下の情報を記した。構成分子数、含まれていたサリドマイド相互作用分子名 (Gene symbol)、GO解析において統計学的有意性が最も高く検出されたGO term (カテゴリ; BP, MF)。また、各サリドマイド相互作用分子が、サリドマイド直接相互作用分子 (CRBN, TNF, NFKB1, FGFR2, CDH2) のどの分子と相互作用しているかの情報を、上付き数字によって以下の通り示した。(1; CRBN 相互作用分子, 2; TNF 相互作用分子, 3; NFKB1 相互作用分子, 4; FGFR2 相互作用分子, 5; CDH2 相互作用分子)

Group No.	Number of molecules	Names of known thalidomide-interacted molecules (Gene symbol)	Top scored GO term (Biological process)	Top scored GO term (Molecular function)
2	28	NONO ² , RPSA ¹ , PSMA4 ³ , HNRNPC ¹	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	identical protein binding
25	36	HNRNPK ¹ , Hnrnpa3 ² , PUF60 ¹ , HNRNPC ¹	mRNA splicing, via spliceosome	poly(A) RNA binding
26	17	YWHAZ ⁴ , HNRNPD ² , NPM1 ³ , ANXA4 ³	epithelial cell differentiation	cadherin binding involved in cell-cell adhesion
28	32	HSP90AA1 ¹ , TXN ¹ , YWHAQ ³ , PDIA6 ¹	cell-cell adhesion	poly(A) RNA binding
64	17	CD2AP ⁵ , SNRPD3 ¹ , RBMXL1 ¹ , RPS3 ³ , Dazap1 ²	nucleotide metabolic process	RNA binding
70	16	Hnrnpa3 ² , Hnrnpa1 ² , VCP ¹ , HNRNPC ¹	gene expression	poly(A) RNA binding
92	18	HSP90AA1 ¹ , NONO ² , HMGB2 ³ , SNRPD3 ¹	response to drug	poly(A) RNA binding
100	14	DDB1 ¹ , NPM1 ³ , HSPA4 ³ , ACTN4 ³	nucleotide-excision repair, DNA duplex unwinding	poly(A) RNA binding
108	17	YWHAZ ⁴ , SPTAN1 ³ , SNRPD3 ¹ , PDIA6 ¹	mRNA splicing, via spliceosome	poly(A) RNA binding
112	25	TXN ¹ , RBMX ¹ , RPS3A ¹ , U2AF2 ¹	negative regulation of protein export from nucleus	poly(A) RNA binding
120	32	MAP4 ⁵ , HMGB2 ³ , U2AF2 ¹ , PUF60 ¹	metabolic process	poly(A) RNA binding
130	45	Hnrnpa3 ² , SF1 ¹ , HMGB1 ³ , PSMA2 ¹	mRNA splicing, via spliceosome	poly(A) RNA binding

Poly (A) RNA 結合タンパク質は、messenger RNA (mRNA) の poly (A) 鎖に結合し、mRNA の転写や代謝に深く関与する。また、mRNA プロセッシングの重要な機構の一つである mRNA スプライシングに関与し、イントロン配列とエクソン配列の境界に位置するスプライス部位の認識に寄与することが報告されてる [37]。加えて、複数の heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) とスプライシング因子を含むグループが認められ、hnRNPs は mRNA の転写時に pre-mRNA と複合体を形成することが、スプライシング因子は pre-mRNA からイントロン配列が除かれる際に機能することが知られている。

No.130 のグループは、mRNA splicing の GO term に分類される5分子 (HNRNPA3, SF1, HNRNPH1, PABPN1, HNRNPR) を含んでいた。また、その内の2分子 (HNRNPH1, SF1) は、CRBN との間接的相互作用が報告されている。この2分子は、スプライシング因子と hnRNPs で構成される巨大複合体スプライソソームの成分であり、同じく成分の一つとして知られる U2AF65 と相互作用することが報告されている [38,39]。また、先

行研究により、U2AF65はCRBNと相互作用することが示唆されている。ここまでの結果から、No. 130のグループはスプライソソームを構成するタンパク質間相互作用を含んでおり、サリドマイドはmRNAスプライシングの制御に関与することが推測した (Figure 7)。

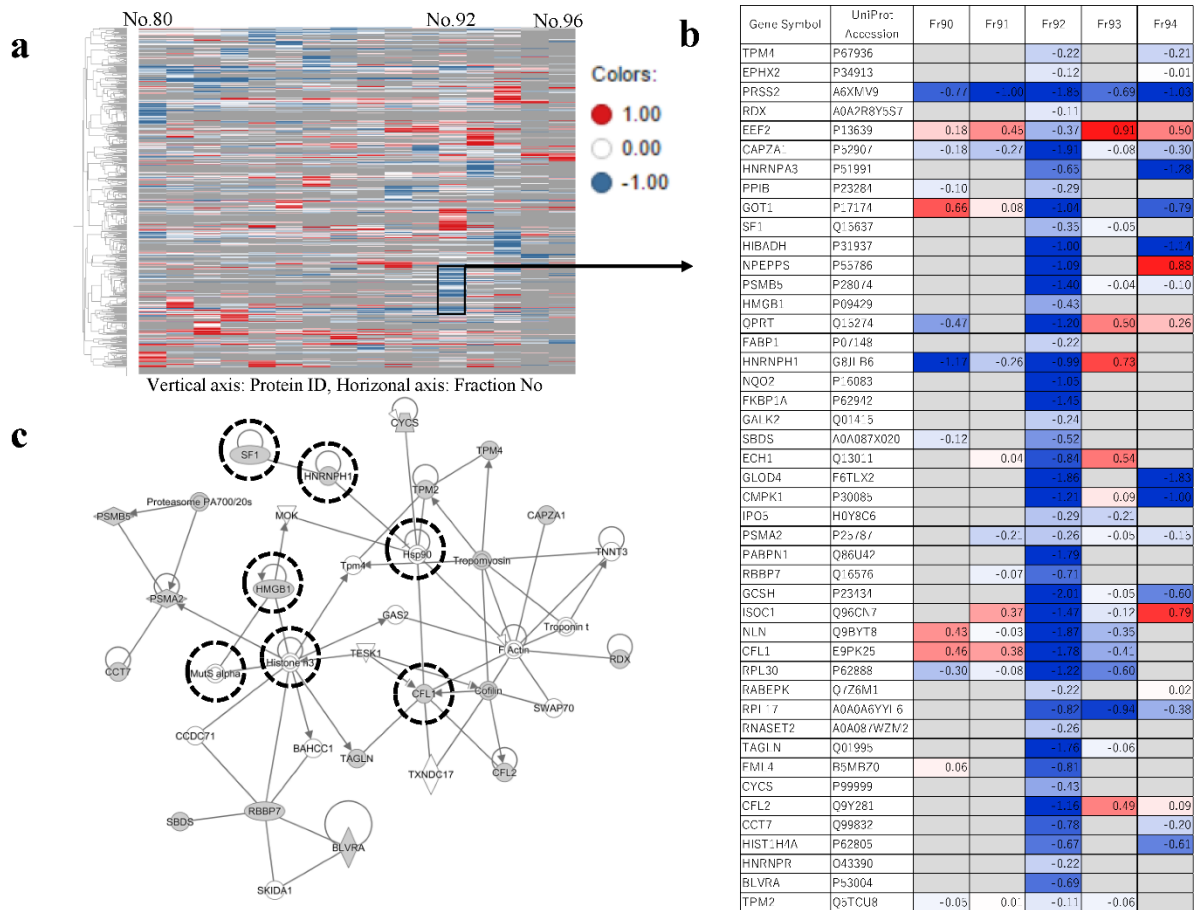


Figure 7: サリドマイドとの関連が示唆される細胞機能の探索

A. フラクシオン No. 80~96 の階層的クラスタリング結果ヒートマップ

B. ヒートマップより抽出されたグループ No. 130 の分子リスト

C. グループ No. 130 のネットワーク解析結果

※破線で囲んだ分子: mRNA スプライシング機構関連分子

灰色に色付けされた分子: グループ内に含まれる分子

別の解析結果として、グループ No. 28 に含まれるタンパク質が分類された GO term は、「cell-cell adhesion (カテゴリ; BP)」と「cadherin binding involved in cell-cell adhesion (カテゴリ; MF) ※統計学的スコアは 2 番目 (data not shown)」があり、グループ No. 28 に含まれる分子の内、6 分子 (PDLIM5, UBFD1, COBLL1, PCBP1, RTN4, RAN) が両アノテーションに共通していた。上記 6 分子にサリドマイド相互作用分子は含まれてはいなかったが、サリドマイドは TNF- α シグナル伝達の阻害により、

多発性骨髄腫の細胞接着を抑制することが報告されている [40,41]。グループ No. 28 に含まれるタンパク質の量は減少しており、これはサリドマイドが細胞接着を抑制するという知見に一致する。さらに、ネットワーク解析の結果、上記 6 分子中のいくつかの分子が直接的に相互作用することが認められ、これらは複合体を形成し、細胞内で同時に機能することが示唆された (Figure 8)。

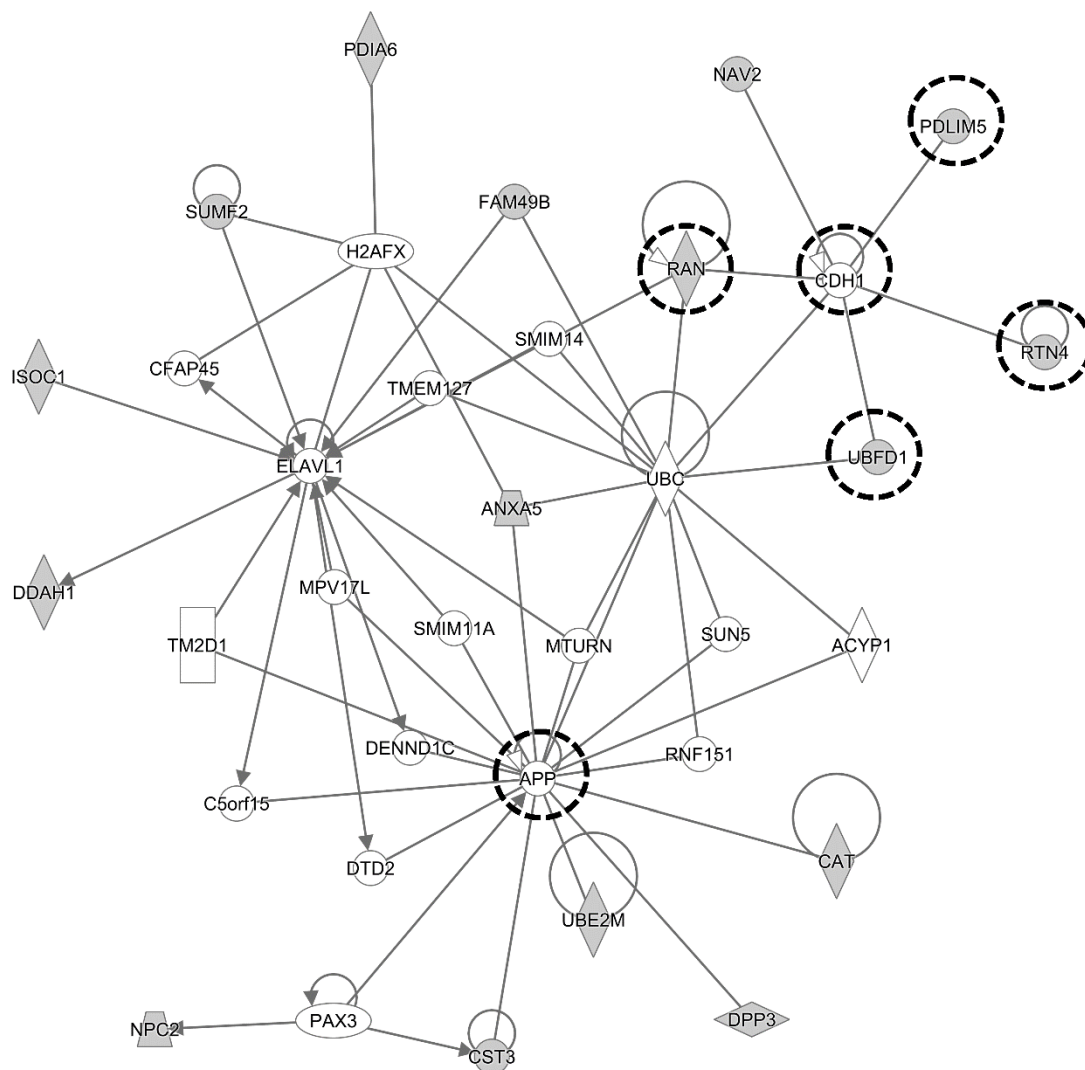


Figure 8: グループ No. 28 のネットワーク解析結果

※破線で囲んだ分子：細胞接着機能関連分子

灰色に色付けされた分子：グループ内に含まれる分子

ここまでに行った解析では、我々は、サリドマイドの既知作用と階層的クラスタリングにより抽出されたグループとの関連性を探索するため、サリドマイドとの相互作用が既知である分子に着目してきた。しか

しながら、サリドマイドが細胞にもたらす作用 (例. 催奇形性、抗血管新生、抗腫瘍活性、免疫抑制、炎症抑制)は、多くの先行研究の結果、部分的には明らかにされているが、未だ全貌の解明には至っていない。そこで、続く解析で、我々は、サリドマイドの未知の作用機序を探ることを目的に、既知のサリドマイド相互作用分子を含まない、または含まれる分子数が3分子以下のグループにも目を向けて解析した。GO解析の結果、BPカテゴリに属する酸化ストレス関連のGO termが数多くのグループで検出された (例. **response to oxidative stress, response to the reactive oxygen species, response to the oxidation-reduction process**)。サリドマイドによる催奇形性と活性酸素 (React Oxygen Species; ROS) の関連性について、ウサギの胚性幹細胞において活性酸素産生工程の中間体であるフリーラジカルの産生を阻害すると、サリドマイドによるDNA酸化と催奇形性が減弱されることが報告されている [42]。このことから、酸化ストレス関連分子を含んでいたグループは、サリドマイドの作用によりタンパク質間相互作用が変化した可能性が示唆された。次に、GO解析で酸化ストレス関連アノテーションが付与されたグループを、IPAソフトウェアのデータベースに登録されているパスウェイ情報と照らし合わせた。その結果、データベース登録パスウェイ名「**NFE2-related factor 2 (NRF2)-mediated oxidative stress response**」が、最も多くの共通分子を含むパスウェイとしてヒットした。NRF2は酸化ストレスにより活性化される転写因子で抗酸化遺伝子の発現を誘導することが知られている。グループ No. 46と No. 104は、パスウェイ「**NRF2-mediated oxidative stress response**」が最も高い統計学的有意性を持ってヒットしたグループであり、NRF2下流遺伝子にコードされるレドックスシグナル関連因子の一部の分子 (NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 [NQO1], catalase, glutathione S-transferase [GST]等)を含んでいた (Figure 9)。最近の研究成果として、活性化されたNRF2がNF- κ Bシグナル伝達のアнтаゴニストとしてはたらいた結果、マウスの多発性骨髄腫細胞において細胞接着関連分子の発現が抑制されることが報告されている [43]。このようなシグナル伝達経路のクロストークは、サリドマイドの作用機序と関連していると推定される。

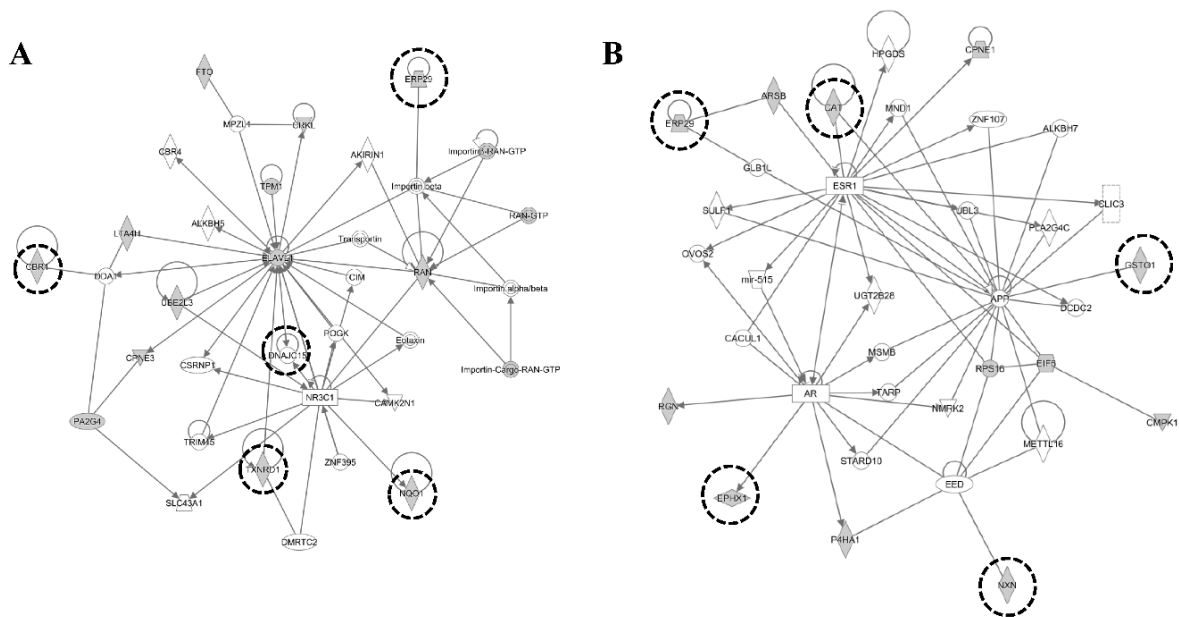


Figure 9: グループ No. 46, No. 104 に含まれる分子から形成されるネットワーク (A: No. 46, B: No. 104)

※破線で囲んだ分子: NRF2 酸化ストレス応答系関連分子
 灰色に色付けされた分子: グループ内に含まれる分子

3. 結論

本研究で提唱した IEC と SILAC-LC-MS/MS を組み合わせた方法論により、サリドマイドの作用機序との関連が示唆される複数の細胞機能を検出した。その内、細胞接着と NRF2 酸化ストレス応答系は、サリドマイド作用機序との関連性が報告されていたが、mRNA スプライシング機構については、サリドマイドとの明確な関連性に関する報告は無かった。

グループ No. 130 の GO 解析結果より、mRNA スプライシング機構の GO term が統計学的有意性高く検出された。続けて行ったパスウェイ解析結果より、グループ No.130 に含まれる分子中には、mRNA スプライシング機構だけでなく、DNA 修復プロセスに関与するタンパク質間相互作用も含まれることが明らかになった。グループ No. 130 に含まれる IPO5, HMGB1, CFL1, RNASET2 の 4 分子は DNA 修復プロセスに関与することが報告されていた (Figure 7)。mRNA スプライシング機構と DNA 修復プロセスは、互いに相互作用することが知られている。DNA 損傷応答は、スプライソソームの活性化を介してスプライシングパターンに影響を与え、DNA 修復プロセス関連遺伝子の発現を惹起することが報告されている [44]。また、サリドマイドは DNA にインターカレーションすることで DNA 損傷を引き起こし、その結果、ROS の産生を誘導することが示唆されている [45]。サリドマイドと mRNA スプライシング機構の直接的関連性は未解明であるが、以上の結果を踏まえると、サリドマイド自身が DNA 損傷を引き起こした結果、DNA 修復プロセス応答の過程で mRNA スプライシング機構に影響を与える可能性が考察された。

次に我々は、NRF2 酸化ストレス応答系に関連する分子パスウェイについて、さらに IPA ソフトウェアを用いた解析を行った。IPA ソフトウェアのデータベース上に登録されている NRF2 酸化ストレス応答系の分子パスウェイを、同じくデータベースに登録されている他の分子パスウェイと比較解析した。その結果、Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) シグナル伝達経路が、NRF2 酸化ストレス応答系と共通した分子を最も多く含んでいることを見出した。一方、IPA ソフトウェアのデータベース上では、AHR シグナル伝達経路に関与する分子として登録されている 27 分子の内、25 分子が SILAC-LC-MS/MS で検出された 1,256 分子中に含まれていた。また、これら 25 分子中、9 分子 (GSTM3, GSTO1, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, MAPK1, MAPK3, NQO1, NQO2) が、データベース上に登録された NRF2 酸化ストレス応答系関連分子と共通していた (Supplementary Table. 2)。マウスの胚線維芽細胞を用いた先行研究により、両分子パスウェイは相互作用することが報告されており、NRF2 が AHR 遺伝子のプロモータ領域に直接的に結合し、AHR シグナル伝達を制御すること、また、AHR シグナル伝達は NRF2 を介した酸化ストレス応

答制御に関与することが明らかにされている[46]。また、我々は、NRF2酸化ストレス応答系とAHRシグナル伝達に焦点を当て、ネットワーク解析を行った。その結果、グループ No. 36は、NRF2酸化ストレス応答系とAHRシグナル伝達に共通して含まれる3分子(MAPK1, NQO1, GSTO1)を含んでいた。また、その内の2分子(NQO1, GSTO1)は、同一のタンパク質相互作用ネットワーク上に検出され、サリドマイドの影響で変動したことが示唆された(Figure 10)。加えて、2.3.4項で先述したように、別の先行研究結果より、酸化ストレスとサリドマイドによる催奇形性には関連性があることが示唆されている[42]。サリドマイドの作用機序とAHRシグナル伝達との直接的関連性を示唆した報告はこれまでに無いが、以上の知見を統合すると、サリドマイドの作用機序にAHRシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。

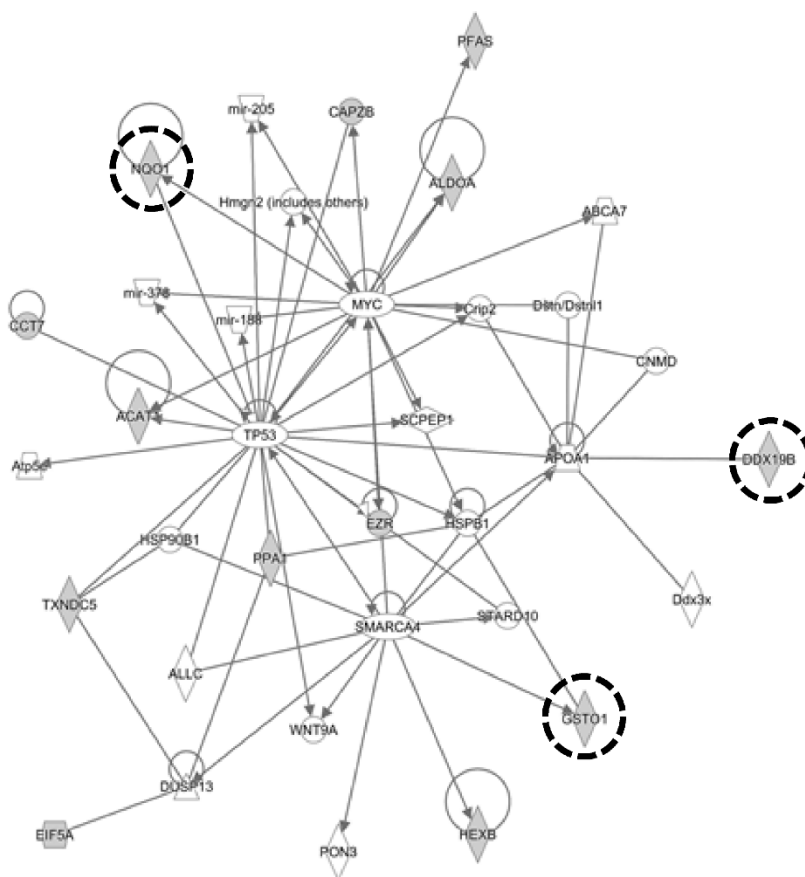


Figure 10: グループ No. 36 に含まれる分子から形成されるネットワーク

続いて、より詳細にAHRシグナル伝達について考察した。AHRは、生体異物代謝プロセスに重要な役割を果たすことが明らかにされているが、その他の細胞機能への関与については大部分が未解明のままであった。最近の研究で、生体異物非存在下における内因性AHRの役割に焦点が当てられ、AHRは癌遺伝子または腫瘍抑制因子として作用し、細胞増

殖の制御に關与する可能性が示唆されている [47]。同じく、サリドマイドは、TGFシグナル抑制による抗腫瘍効果を有することが広く知られている。加えて、ヒト表皮角化細胞株を用いた先行研究で、AHR活性化と細胞遊走プロセスの破綻が同時に起こることが観察され、AHRと細胞遊走の間の相関関係が推測されている。このように、AHRが細胞遊走に關わる細胞接着分子と相互作用する可能性があることが示された。ここまでに列挙した先行研究結果より、AHRシグナル伝達が關与する細胞機能は広範囲に及ぶことが予想され、それらに關する詳細は現時点では未解明な点が多いが、既報のAHRシグナル伝達關連細胞機能は、サリドマイドの作用機序と關連が深いことが示唆される細胞機能と重複していた(例. 酸化ストレス応答、細胞接着、腫瘍抑制)。これらの報告は、サリドマイドの作用機序がAHRシグナル伝達経路に影響を与えるという仮説を支持していた。

これまでに得られたサリドマイドの作用機序に關する知見を以下に列挙した。広く知られているサリドマイドの作用としては、TGFβの阻害による抗腫瘍効果、NFκBの阻害による抗炎症効果及び細胞接着阻害作用、等が挙げられる。また、本研究の解析結果及び、それに関連した先行研究の結果より、DNA損傷、DNA損傷へのNRF2酸化ストレス応答、DNA修復プロセスにおけるmRNAスプライシング機構の制御、NRF2酸化ストレス応答系もしくはその他の作用を介したAHRシグナル伝達の制御等が挙げられる。これらの細胞機能は単独では働かず、おそらく直接的もしくは間接的に相互作用し複雑なネットワークを形成していると考察される (Figure 11)。

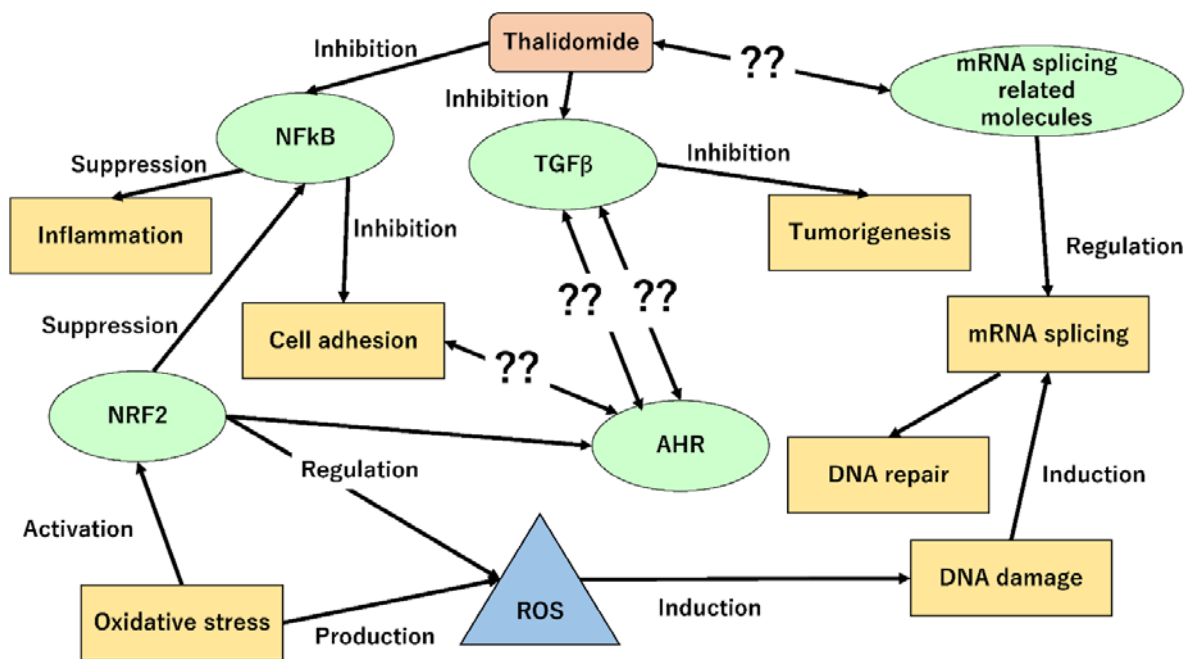


Figure 11: サリドマイドが關与する細胞機能ネットワーク

細胞機能に関わるシグナル伝達経路間の相互作用は非常に複雑である、なぜなら、それらの機能に関与する分子パスウェイは単独で機能せず、外因性・内因性物質、環境の変化などの刺激に依存して、時には活性化、そして時には阻害を受けるといった、多くの側面を有する。また、タンパク質複合体は、細胞内シグナル伝達プロセスに必須であり、タンパク質複合体を形成するタンパク質間相互作用は、時には結合、そして時には乖離するというように動態を常に遷移させながら、シグナル伝達プロセスの変化に応答している [48,49]。サリドマイドが関与する細胞機能ネットワークについても同じ事が言える、一部は解明されているが、全容は未解明である。例えば、AHRシグナル伝達は本研究においてサリドマイド作用機序との関連が示唆されたが、そのクロストークの詳細は不明である。おそらく、サリドマイドの他の作用と相互に働き合い、複雑なネットワークの形成に寄与していることが推測される。また、このような考察に導かれた仮説を検証するためには、サリドマイドを除去した際に、これらのタンパク質相互作用の変動が打ち消されるかどうかの追加解析が重要と考える。

本研究の結果より、我々は、一次元的なタンパク質発現変動解析である従来のアプローチと比べ、より多数の分子の検出に成功した。かつ、サリドマイド作用機序との関連が示唆される多くの細胞機能を見出した。また、近年、用いられている代表的なタンパク質複合体手法として、分析物とリガンドの特定の親和性を活用した親和性クロマトグラフィーが挙げられるが、この手法に比べ、本方法論は直接的なタンパク質間相互作用だけでなく、間接的な相互作用も捉えることができる長所を有している。

本研究では、IECとSILAC-LC-MS/MSを組み合わせた方法論を用い、サリドマイド処理によってHepG2細胞中で変動したタンパク質間相互作用、及びタンパク質複合体を検出することで、それらが関与する細胞機能とサリドマイドの作用機序との関連性を解析した。その結果、サリドマイド作用機序に関連することが示唆される細胞機能を見出した。従って、この方法論が、薬剤の未知の作用機序解析への適用可能性が示唆された。今後の研究の発展性として、様々な条件下（同じ適応症の複数の薬剤、複数の処理濃度、及び処理時間、特定の翻訳後修飾等）で詳細な実験データを取得し、解析することによって、薬剤の主作用、及び副作用に関わる分子メカニズムの解明に繋がることが考えられる。一方で、今回の解析における問題点としては、検出されたタンパク質複合体の変動が、薬剤のどのような効果によって生じたかについては明らかにできていないことが挙げられる。例えば、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるリン酸化は、細胞内のシグナル伝達機構において重要な役割を担っており、薬理作用の解析には欠かせない機構であると考えられる。本研究方

法では、薬剤のこのリン酸化への効果に伴うタンパク質複合体の変動も検出できている筈である。しかし、今回の解析では、どのタンパク質複合体の変動がリン酸化に起因していたのかは判らない。理由として、リン酸化ペプチドは負の電荷を帯びているため正イオン検出条件下では検出が難しいこと、可逆的修飾のためサンプル処理工程中で失われた可能性があること、または予期せぬ反応として付加された可能性があること、全ペプチドに対するリン酸化ペプチドの量が少なく検出できていない可能性があることなどの問題点が挙げられる。従って、リン酸化に起因するタンパク質複合体の変動を検出するためには、本方法の IEC でのタンパク質複合体分離後の SILAC-LC-MS/MS 分析の段階で、リン酸化に絞った解析を行う必要があると考えられる。但し、その場合、薬剤処理の有無の細胞から抽出液を得る段階で生じる可能性のある脱リン酸化・リン酸化を抑えるために、細胞抽出液を得る際の前処理として、キナーゼ阻害剤/ホスファターゼ阻害剤処理を行うなどの実験操作を追加する必要があると考える。また、LC-MS/MS 分析においては、前処理として必要に応じてリン酸化ペプチドの濃縮を行い、負イオン検出モードで分析する必要があると考える。このような問題点を解決し、様々な角度からの解析へと発展させることによって、今回提案したタンパク質複合体の変動を解析する方法が、さまざま薬剤の作用機序解明に繋がると考える。また、このような薬剤の作用機序の解明を通して、標的疾患の病態メカニズムを解明し、より薬効が強く、かつ安全性の高い薬剤の開発に貢献することを期待したい。

4. 謝辞

この学位論文の執筆に際し、多くの方々にご指導、ご厚意を頂きましたことを心より感謝申し上げます

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、長きに渡り、多くのご支援とご指導を賜りました、東京農工大学 高橋信弘先生に深く感謝いたします。

学位論文申請にあたり、有益なるご助言とご指導を賜りました主指導教官の東京農工大学 三浦豊先生に厚く御礼申し上げます。締切間際にもかかわらず、審査を快くお引き受け下さりました、蕪山由己人先生、西河淳先生、松下保彦先生、長南茂先生にお礼申し上げます。

実験を行うにあたり、イオン交換クロマトグラフィーについて丁寧にご指導いただいた近藤淳氏、LC-MS/MS の測定、及びデータの解析をサポート頂いた岸本太郎氏、田中恒平氏に感謝申し上げます。

5. 出典

本論文の内容は、以下の雑誌に掲載済である。

<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1637244>

(Natsuki KUROKAWA, Taro KISHIMOTO, Kohei TANAKA, Jun KONDO, Nobuhiro TAKAHASHI, Yutaka MIURA, New Approach to Evaluating Effects of a Drug on Protein Complexes with Quantitative Proteomics, Using the SILAC Method and Bioinformatic Approach, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019 Jul 7:1-15.)

6. 参考文献

- 1] Phizicky EM, Fields S. Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiol Rev.* 1995 Mar;59(1):94-123.
- 2] Pawson T, Nash P. *Genes Dev.* Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. 2000 May;14(9):1027-1047.
- 3] Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, Will CL, Pena V, Luhrmann R, Stelzl U. Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. *Mol Cell.* 2012 Feb;45(4):567-580.
- 4] Duan XJ, Xenarios I, Eisenberg D. Describing Biological Protein Interactions in Terms of Protein States and State Transitions. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Feb;1(2):104-116.
- 5] Zarzycka B, Kuenemann MA, Miteva MA, Nicolaes, GAF, Vriend G, Sperandio O. Stabilization of protein-protein interaction complexes through small molecules. *Drug Discov Today.* 2016 Jan;21(1):48-57.
- 6] Archakov AI, Govorun VM, Dubanov AV, Ivanov YD, Veselovsky AV, Lewi P, Janssen P. Protein-protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics.* 2003 Apr;3(4):380-391.
- 7] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.
- 8] Wacker SA, Houghtaling BR, Elemento O, Kapoor TM. Using transcriptome sequencing to identify mechanisms of drug action and resistance. *Nat Chem Biol.* 2012 Feb;8(3):235-237.
- 9] Wang S, Cheng Q. Microarray analysis in drug discovery and clinical applications. *Methods Mol Biol.* 2006; 316:49-65.

- 10] MacBeath G, Schreiber SL. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science*. 2000 Sep;289(5485):1760-1763.
- 11] Vargesson N. Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms. *Birth Defects Res C*. 2015 Jun;105(2):140-156.
- 12] Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, Blade J, Offidani M, Gay F, Moreau F, Waage A, Spencer A, Ludwig H, Boccadoro M, Harousseau LJ. Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2008 Apr;111(8): 3968-3977.
- 13] Sherbet GV. Therapeutic Potential of Thalidomide and Its Analogues in the Treatment of Cancer. *Anticancer Res*. 2015 Nov;35(11):5767-5772.
- 14] Chen YY, Yen HH, Chou KC, Wu SS. Thalidomide-based multidisciplinary treatment for patients with advanced hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis. *World J Gastroenterol*. 2012 Feb;18(5):466-471.
- 15] Chang JY, Ka WS, Chao TY, Liu TW, Chuang TR, Chen LT. Hepatocellular carcinoma with intra-atrial tumor thrombi. A report of three cases responsive to thalidomide treatment and literature review. *Oncology*. 2004; 67(3-4):320-326.
- 16] Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics*. 2015 Sep;15(18): 3175-3192.
- 17] Bendall SC, Hughes C, Stewart MH, Doble B, Bhatia M, Lajoie GA. Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Sep;7(9):1587-1597.

- 18] Park SS, Wu WW, Zhou Y, Shen RF, Martin B, Maudsley S. Effective correction of experimental errors in quantitative proteomics using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteomics*. 2012 Jun;75(12):3720-3732.
- 19] User Guide: SILAC Protein Quantitation Kits issued by Thermo Fisher Scientific (Version: MAN0016245, Rev C.0, Pub. Part No. 2161996.8). Available from: <https://www.thermofisher.com/>
- 20] Zhang G, Fenyö D, Neubert TA. Evaluation of the variation in sample preparation for comparative proteomics using stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *J Proteome R*. 2009 Mar;8(3):1285-1292.
- 21] サレド®カプセル 100 (サリドマイド製剤) 添付文書
- 22] Cell Lysis and Immunoprecipitation Protocol with CHAPS buffer issued by Fivephoton Biochemicals™. Available from: <https://fivephoton.com/>
- 23] Motoyama A, Xu T, Ruse CI, Wohlschlegel JA, Yates JR. Anion and Cation Mixed-Bed Ion Exchange for Enhanced Multidimensional Separations of Peptides and Phosphopeptides. *Anal Chem*. 2007 May;79(10):3623-3634.
- 24] Gekko K, Ohmae E, Kameyama K, Takagi T. Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Sep;1387(1-2):195-205.
- 25] Bobaly B, Beck A, Veuthey J-L, Guillarme D, Fekete S. Impact of organic modifier and temperature on protein denaturation in hydrophobic interaction chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2016 Nov; 131:124-132.
- 26] Rebecchi KR, Go EP, Xu L, Woodin CL, Mure M, Desaire H. A general protease digestion procedure for optimal protein sequence coverage and

- PTM analysis of recombinant glycoproteins: Application to the characterization of hLOXL2 glycosylation. *Anal Chem.* 2011 Nov;83(22):8484-8491.
- 27] Technical manual: Trypsin/Lys-C Mix, Mass spec grade issued by Promega (Version: TM390 Revised 2/14). Available from: <https://www.promega.com/>
- 28] GL-Tip™ SDB Instruction Manual issued by GL Science. Available from: <http://www.glsciencesinc.com/>
- 29] Proteome Discoverer User Guide Software Version 2.2 issued by Thermo Fisher Scientific. Available from: <https://www.thermofisher.com/>
- 30] Eckalbar WL, Schlebusch SA, Mason MK, Gill Z, Parker AV, Booker BM, Nishizaki S, Muswamba-Nday C, Terhune E, Nevonen KA, Makki N, Friedrich T, VanderMeer JE, Pollard KS, Carbone L, Wall JD, Illing N, Ahituv N. Transcriptomic and epigenomic characterization of the developing bat wing. *Nature Genet.* 2016;48(5):528-539.
- 31] Guglielmelli T, Giugliano E, Brunetto V, Rapa I, Cappia S, Giorcelli J, Rrodhe S, Papotti M, Saglio G. Therapeutic Potential of Thalidomide and Its Analogues in the Treatment of Cancer. *Oncoscience.* 2015 Nov;35(11):5767-5772.
- 32] Sherbet GV. mTOR pathway activation in multiple myeloma cell lines and primary tumour cells: pomalidomide enhances cytoplasmic-nuclear shuttling of mTOR protein. *Anticancer Res.* 2015 Apr;2(4):382-394.
- 33] Meganathan K, Jagtap S, Wagh V, Winkler J, Gaspar JA, Hildebrand D, Trusch M, Lehmann K, Hescheler J, Schlüter H, Sachinidis A. Identification of thalidomide-specific transcriptomics and proteomics

- signatures during differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e44228
- 34] Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015 Jun;105(2):140-156.
- 35] Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*. 2011 Feb;23(2):317-323.
- 36] Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrín-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2006 Mar 30;440(7084):637-43.
- 37] Proudfoot NJ. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev*. 2011 Sep;25(17):1770-1782.
- 38] Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, Will CL, Pena V, Lührmann R, Stelzl U. Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell*. 2012 Feb;45(4):567-580.

- 39] Singh I, Lee SH, Sperling AS, Samur MK, Tai YT, Fulciniti M, Munshi NC, Mayr C, Leslie CS. Widespread intronic polyadenylation diversifies immune cell transcriptomes. *Nat Commun.* 2018 Apr;9(1):1716.
- 40] Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia.* 2001 Dec;15(12):1950-1961.
- 41] Wang LH, Yang XY, Zhang X, Farrar WL. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPAR α cross talk with NF- κ B and C/EBP β . *Blood.* 2007 Dec;110(13):4373-4384.
- 42] Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med.* 1999 May;5(5):582-585.
- 43] Yen CH, Hsiao HH. NRF2 Is One of the Players Involved in Bone Marrow Mediated Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov;19(11):3503.
- 44] Shkreta L, Chabot B. The RNA Splicing Response to DNA Damage. *Biomolecules.* 2015 Oct;5(4):2935-2977.
- 45] Stephens TD, Bunde CJ, Fillmore BJ. Mechanism of Action in Thalidomide Teratogenesis. *Biochem Pharmacol.* 2000 Jun;59(12):1489-1499.
- 46] Shin S, Wakabayashi N, Misra V, Biswal S, Lee GH, Agoston ES, Yamamoto M, Kensler TW. NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor

Signaling: Influence on Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2007

Oct;27(20):7188-7197.

47] Baroukia R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 2007 Jul;581(19):3608-3615.

48] Jaeger S, Aloy P. From Protein Interaction Networks to Novel Therapeutic Strategies. *IUBMB Life.* Jun;64(6):529-537.

49] Perkins JR, Diboun I, Dessailly BH, Lees JG, Orengo C. Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure.* 2010 Oct;18(10):1233-1243.

7. 付録

Supplemental Table 1: SILAC-LC-MS/MS による HepG2 細胞全体におけるタンパク質発現変動解析結果リスト

SILAC-LC-MS/MS による HepG2 細胞全体における検出タンパク質をリストに示した。同定された 532 分子の内、344 分子においてコントロール (DMSO 処理) に比べ ± 1.2 倍 (対数変換値: ± 0.079) 以上の増減が認められた。

Supplemental Table 2: IEC 分離フラクションにおける SILAC-LC-MS/MS、及び階層的クラスタリング解析結果リスト

SILAC-LC-MS/MS による IEC で分離した 96 フラクションの検出タンパク質をリストに示した。96 フラクションを 16 フラクションずつ 6 分割し (fraction No.: 1-16, 17-32, 33-48, 49-64, 65-80, 81-96)、それぞれについて階層的クラスタリングを行った結果を、順に Table 2 A, B, C, D, E, F に示した。

Supplementary Table 1

Serial No.	Accession (UniProt ID)	Description	Accession (Gene Symbol)	Coverage [%]	# Peptides	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	WCE
1	A0A0A0MSS8	Aldo-keto reductase family 1 member C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1C3 PE=1 SV=1	AKR1C3	59	11	7	323	36.8	7.94	292.9	0.00
2	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BIP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2	HSPA5	55	31	29	654	72.3	5.16	1619.27	0.04
3	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD1 PE=1 SV=2	SOD1	60	6	6	154	15.9	6.13	164.15	0.19
4	A0A0A0MRR7	U1 small nuclear ribonucleoprotein C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPC PE=1 SV=1	SNRPC	10	1	1	180	19.7	9.58	3.9	0.01
5	E7EUC7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGP2 PE=1 SV=1	UGP2	11	4	4	517	57.8	8.13	28.19	0.20
6	P62258	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAE PE=1 SV=1	YWHAE	49	11	10	255	29.2	4.74	173.53	0.04
7	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6	HNRNPU	16	7	7	825	90.5	6	59.84	-0.13
8	Q00796	Sorbitol dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SORD PE=1 SV=4	SORD	39	8	8	357	38.3	7.97	71.86	-0.19
9	P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF3 PE=1 SV=1	SRSF3	26	4	3	164	19.3	11.65	35.96	0.01
10	Q8NCW5	NAD(P)H-hydrate epimerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAXE PE=1 SV=2	AP0A1BP; NAXE	11	2	2	288	31.7	7.66	6.24	0.09
11	P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP1 PE=1 SV=1	RPLP1	67	3	2	114	11.5	4.32	9.7	-0.10
12	Q9BX68	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HINT2 PE=1 SV=1	HINT2	22	2	2	163	17.2	9.16	17.2	8.55
13	Q96HE7	ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERO1A PE=1 SV=2	ERO1; ERO1A	23	6	6	468	54.4	5.68	47.23	-0.09
14	Q15417	Calponin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN3 PE=1 SV=1	CNN3	18	4	4	329	36.4	6.05	33.26	-0.27
15	Q13268	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHRS2 PE=1 SV=4	DHRS2	70	13	13	280	29.9	9.01	392.5	-0.12
16	P53597	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUCLG1 PE=1 SV=4	SUCLG1	24	5	5	346	36.2	8.79	23.82	0.56
17	H0Y449	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YBX1 PE=1 SV=1	YBX1	22	5	5	374	42	10.43	48.43	-1.20
18	P14174	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIF PE=1 SV=4	MIF	26	2	2	115	12.5	7.88	37.66	0.02
19	Q15366	Poly(ADP-ribose) polymerase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1	PCBP2	19	4	2	365	38.6	6.79	63.93	0.06
20	P61457	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBD1 PE=1 SV=2	PCBD1	36	3	3	104	12	6.8	20.56	-0.03
21	P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX5 PE=1 SV=4	PRDX5	52	9	9	214	22.1	8.7	58.46	-0.16
22	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2	HSPD1	57	25	25	513	61	5.87	1534.42	0.00
23	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	HNRNPK	41	14	3	463	50.9	5.54	328.27	-0.10
24	Q75884	Putative hydrolase RBBP9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBBP9 PE=1 SV=2	RBBP9	56	6	6	186	21	18.6	25.78	0.28
25	Q9NR45	Sialic acid synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NANS PE=1 SV=2	NANS	28	5	5	359	40.3	6.74	52.4	0.09
26	P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB	54	14	6	375	41.7	5.48	515.09	-0.08
27	E7EVA0	Microtubule-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1	MAP4	6	10	10	2297	245.3	6.23	40.33	-0.84
28	Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAP1 PE=1 SV=5	CAP1	19	5	5	475	51.9	8.06	68.54	-0.14
29	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	HSP90AA1	30	17	10	732	84.6	5.02	107.85	-0.04
30	A0A0B042C3	Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPST1 PE=1 SV=1	TPST1	39	4	4	197	22.6	5.24	41.77	0.22
31	K7ELL7	Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCSH PE=1 SV=1	PRKCSH	26	7	7	535	60.2	4.41	144.42	-0.05
32	P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2	TUBB	43	12	1	444	49.6	4.89	92.88	-0.06
33	F5H2F4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTHFD1 PE=1 SV=1	MTHFD1	3	2	2	1020	110.5	8.43	0	-0.10
34	P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	ALB	58	30	30	609	69.3	6.28	460.36	-0.02
35	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSME1 PE=1 SV=1	PSME1	60	12	12	249	28.7	6.02	141.4	-0.62
36	Q12904	Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AIMP1 PE=1 SV=2	AIMP1	28	6	6	312	34.3	8.43	28.88	0.39
37	P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF2 PE=1 SV=4	EEF2	38	19	19	858	95.3	6.83	133.63	-0.06
38	Q04828	Aldo-keto reductase family 1 member C1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1C1 PE=1 SV=1	AKR1C1	65	15	1	323	36.8	7.88	396.79	0.04
39	P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1B1 PE=1 SV=3	ALDH1B1	21	8	8	517	57.2	6.8	118.24	-0.28
40	A0AZU3TUZ2	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPI PE=4 SV=1	GPI	39	14	14	597	67.2	8.97	124.51	-0.03
41	Q75369	Flavin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=2	FLNB	15	23	23	2602	278	5.73	179.62	-0.11
42	Q95394	Phosphoacetylglucosaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGM3 PE=1 SV=1	PGM3	10	2	2	542	59.8	6.25	29.46	-0.15
43	Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLN1 PE=1 SV=3	TLN1	2	2	2	2541	269.6	6.07	9.3	-0.23
44	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2	HSPA9	34	18	18	679	73.6	6.16	128.17	-0.13
45	P42765	3-ketacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAA2 PE=1 SV=2	ACAA2	48	12	12	397	41.9	8.09	68.94	-0.07
46	A0A087WUZ3	Spectrin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN1 PE=1 SV=1	SPTBN1	6	8	8	2366	274.7	5.57	49.22	0.02
47	A0A0G2JIW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1	HSPA1B	55	22	20	642	70.1	5.66	366.75	-0.02
48	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERP29 PE=1 SV=4	ERP29	47	8	8	261	29	7.31	66.27	-0.10
49	Q06830	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1	60	13	12	199	22.1	8.13	57.616	-0.04
50	Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5	RRBP1	12	10	10	1410	152.4	8.6	48.46	-1.34
51	P48147	Prolyl endopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PREP PE=1 SV=2	PREP	43	22	22	710	80.6	5.86	102.62	2.12
52	Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAPRE1 PE=1 SV=3	MAPRE1	21	4	4	268	30	5.14	20.35	-0.12
53	I3LOA0	HC2044781 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM189-UBE2V1 PE=4 SV=1	TMEM189-UBE2V1	18	5	2	370	42.2	6.71	35.6	-0.47
54	Q04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD2 PE=1 SV=3	SOD2	78	10	10	222	24.7	8.25	390.03	-0.34
55	A0A0U1RRM4	Poly(pyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=1	PTBP1	23	7	7	588	62.4	9.1	89.67	-0.17
56	P00352	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	ALDH1A1	74	24	24	501	54.8	6.73	627.57	-0.21
57	Q9C005	Protein dpy-30 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPY30 PE=1 SV=1	DPY30	36	2	2	99	11.2	4.88	3.41	-0.71
58	Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCK2 PE=1 SV=4	PCK2	17	5	5	640	70.7	7.62	5.75	-0.07
59	P62280	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3	RPS11	30	5	5	158	18.4	10.3	37.55	-0.28
60	Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAP1 PE=1 SV=3	TRAP1	5	2	1	704	80.1	8.21	12.1	-0.13
61	K7EM18	Eukaryotic translation initiation factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF1 PE=1 SV=1	EIF1	36	4	4	121	13.6	7.9	16.67	-0.29
62	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAPZA1	35	6	6	286	32.9	5.69	60.08	-0.28
63	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2	HNRNPA3	28	8	8	378	39.6	9.01	105.98	-0.11

64	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT8 PE=1 SV=7	34	20	15	483	53.7	5.59	296.9	0.00
65	P61981	14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAG PE=1 SV=2	56	10	9	247	28.3	4.89	264.04	0.21
66	P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPST PE=1 SV=3	47	9	9	297	33.2	6.6	107.76	0.13
67	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIIB PE=1 SV=2	40	8	8	216	23.7	9.41	41.23	-0.15
68	F8V71	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2N PE=1 SV=1	23	2	2	152	17.7	8.46	27.67	-0.41
69	O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLS PE=1 SV=1	9	3	3	669	73.4	7.77	4.35	-0.54
70	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4	4	3	3	1270	140.9	6.84	9.63	-0.01
71	H7BZ13	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDI3 PE=1 SV=1	60	5	1	123	13.5	7.3	90.18	-0.01
72	G3V0E4	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PMP2B PE=1 SV=1	6	2	2	490	54.2	6.83	21.07	-0.63
73	P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA2 PE=1 SV=3	34	6	4	286	32.9	5.85	54.42	-0.10
74	O75083	WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDRL1 PE=1 SV=4	22	5	5	606	66.2	6.65	30.96	-0.04
75	Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3	27	17	17	894	95.3	8.76	228.91	-0.09
76	Q86C23	Aldose 1-epimerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GALM PE=1 SV=1	52	11	11	342	37.7	6.65	76.16	0.02
77	Q9UBQ7	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRHPR PE=1 SV=1	17	3	3	328	35.6	7.39	14.44	-0.05
78	P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOT1 PE=1 SV=3	60	15	15	413	46.2	7.01	192.29	0.20
79	P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1	53	16	13	245	27.7	4.79	365.45	-0.10
80	P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2	38	9	9	263	29.6	10.15	48.61	-0.25
81	P30038	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH4A1 PE=1 SV=3	21	9	9	563	61.7	8.07	62.23	-0.01
82	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STIP1 PE=1 SV=1	10	4	4	543	62.6	6.8	14.15	-0.01
83	Q15493	Regucalcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RGN PE=1 SV=1	36	7	7	299	33.2	6.25	27.45	1.36
84	Q16881	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNRD1 PE=1 SV=3	7	3	3	649	70.9	7.39	10.35	0.05
85	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PA2G4 PE=1 SV=3	19	4	4	394	43.8	6.55	27.1	0.15
86	P35270	Sepsin-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPR PE=1 SV=1	32	5	5	261	28	8.05	31.44	0.09
87	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 PE=1 SV=3	57	14	14	338	35.5	8.68	134.48	0.10
88	P01019	Angiotensinogen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGT PE=1 SV=1	29	8	8	485	53.1	6.32	84.33	0.37
89	Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF7 PE=1 SV=1	9	2	2	238	27.4	11.82	17.33	-0.04
90	Q3LXA3	Triokinase/FMN cyclase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKFC PE=1 SV=2	11	3	3	575	58.9	7.49	4.44	-0.05
91	P39748	Flap endonuclease 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FEN1 PE=1 SV=1	8	2	2	380	42.6	8.62	8.81	-0.10
92	P09622	Dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLSD PE=1 SV=2	21	6	6	509	54.1	7.85	25.37	-0.17
93	A0A286YFF7	Palmitoyl-protein thioesterase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPT1 PE=1 SV=1	31	7	7	335	37.1	6.52	36.15	0.38
94	D6R6Z0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPAB PE=1 SV=1	4	1	1	327	35.7	6.95	4.73	0.00
95	O00764	Pyridoxal kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDXK PE=1 SV=1	48	11	11	312	35.1	6.13	71.41	0.12
96	J3KQE5	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=1	23	5	5	234	26.8	9.58	31.98	0.06
97	Q15181	Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPAI PE=1 SV=2	51	9	9	289	32.6	5.86	92.9	0.03
98	Q14847	LIM and SH3 domain protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LASP1 PE=1 SV=2	35	6	6	261	29.7	7.05	27.79	-0.02
99	F5GXR3	Parathyroid hormone-related protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTHrP PE=1 SV=1	11	1	1	104	12.1	11	5.73	-0.35
100	A0A087X1Z3	Proteasome activator complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSME2 PE=1 SV=1	39	6	6	254	29.1	6.71	100.11	0.10
101	P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1	44	6	6	194	22.1	10.1	46.52	-0.11
102	U3KQK0	Histone H2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H2BN PE=1 SV=1	9	1	1	166	18.8	10.54	11.88	-0.14
103	P29218	Inositol monophosphatase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPA1 PE=1 SV=1	20	5	5	277	30.2	5.26	17.47	-0.09
104	A0A0S2Z4G6	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_o (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM1 PE=1 SV=1	29	9	4	284	32.7	4.74	77.59	0.77
105	P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHCY PE=1 SV=4	48	17	17	432	47.7	6.34	92.95	0.49
106	P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2L3 PE=1 SV=1	64	6	6	154	17.9	8.51	58.52	-0.07
107	P08133	Annexin A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA6 PE=1 SV=3	31	17	17	673	75.8	5.6	103.08	0.04
108	P68371	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB4B PE=1 SV=1	43	1	1	445	49.8	4.89	75.86	0.04
109	P05455	Lupus La protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSB PE=1 SV=2	31	12	12	408	46.8	7.12	85	-0.23
110	Q8Y2V2	Calcium-regulated heat-stable protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARHSP1 PE=1 SV=2	35	2	2	147	15.9	8.21	135.21	-0.01
111	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTB PE=1 SV=2	70	4	4	98	11.1	7.56	146.31	-0.68
112	P62913	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	28	3	3	178	20.2	9.6	24.46	0.04
113	H7BY58	Protein-L-isopartate O-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCMT1 PE=1 SV=1	17	2	2	286	30.3	6.73	10.47	-0.39
114	P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS27A PE=1 SV=2	39	7	7	156	18	9.64	40.78	0.03
115	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APRT PE=1 SV=2	48	5	5	180	19.6	6.02	30.41	-0.37
116	P52758	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RIDA PE=1 SV=1	41	4	4	137	14.5	8.68	18	0.78
117	Q06520	Bile salt sulfotransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SULT2A1 PE=1 SV=3	13	3	3	285	33.8	5.95	28.54	0.34
118	Q04760	Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLO1 PE=1 SV=4	39	6	6	184	20.8	5.31	79.51	0.05
119	Q8N392	Rho GTPase-activating protein 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARGAP18 PE=1 SV=3	6	3	3	663	74.9	6.44	10.7	-0.88
120	K2ELC2	40S ribosomal protein S15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS15 PE=1 SV=1	41	3	3	152	17.7	10.39	36.37	-0.72
121	P62495	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETF1 PE=1 SV=3	51	18	18	437	49	5.71	129.7	-0.72
122	Q9NRV9	Heme-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEBP1 PE=1 SV=1	13	2	2	189	21.1	5.8	14.49	0.43
123	P10768	S-formylglutathione hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESD PE=1 SV=2	63	11	11	282	31.4	7.02	81.03	-0.06
124	Q16658	Fascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FSCN1 PE=1 SV=3	30	10	10	493	54.5	7.24	55.32	0.93
125	O75533	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3	22	17	17	1304	145.7	7.09	145.7	-0.24
126	BQ0Z18	Cupine-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPNE1 PE=1 SV=1	32	9	9	542	59.7	6.04	137.11	0.06
127	P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FH PE=1 SV=3	12	3	3	510	54.6	8.76	31.08	-0.16
128	E9PF18	Hydroxacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADH PE=1 SV=2	22	4	4	390	42.1	9.26	69.91	-0.72
129	P49327	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FASN PE=1 SV=3	13	15	15	2511	273.3	6.44	21.56	-0.05
130	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4	24	6	6	471	54.2	8.95	123.68	-0.27
131	P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAT1 PE=1 SV=1	36	10	10	427	45.2	8.85	37.95	-0.27
132	H8BP67	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1	6	2	2	527	53.5	9.36	4.7	-0.05

133	P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	59	25	25	531	57.9	7.84	240.54	0.02
134	AOA087WY85	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2D3 PE=1 SV=1	36	3	3	148	16.8	8.44	22.56	-0.13
135	P08758	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2	64	16	16	320	35.9	5.05	124.24	-0.07
136	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEBP1 PE=1 SV=3	78	13	13	187	21	7.53	693.53	-0.05
137	P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1A1 PE=1 SV=3	53	13	12	325	36.6	6.79	92.53	-0.36
138	Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPS31 PE=1 SV=3	10	2	2	395	45.3	39.9	9.55	-0.14
139	D3YTI2	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACPI PE=1 SV=1	45	3	3	85	9.4	8.35	21.19	-0.64
140	O43399	Tumor protein D54 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPD52L2 PE=1 SV=2	38	4	4	206	22.2	5.36	19.91	0.09
141	O00151	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDLIM1 PE=1 SV=4	49	8	8	329	7.02	7.02	69.84	-0.41
142	P42126	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECI1 PE=1 SV=1	40	9	2	302	32.8	8.54	109.01	-0.24
143	Q15637	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFI1 PE=1 SV=4	6	2	2	639	68.3	8.98	4.8	-0.19
144	P21695	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPD1 PE=1 SV=4	9	1	1	349	37.5	6.18	5.43	-0.11
145	Q16630	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPSF6 PE=1 SV=2	5	1	1	551	59.2	7.15	25.06	-0.18
146	D6REE5	Receptor of activated protein C kinase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=1	22	4	4	321	34.9	6.83	6.55	-0.03
147	G3V3Z7	Proteasome subunit alpha type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA6 PE=1 SV=1	22	5	5	252	25.2	6.76	21.8	0.96
148	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	19	2	2	261	26.9	7.78	1.63	-0.05
149	Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERBP1 PE=1 SV=2	20	7	7	408	44.9	8.65	83.26	0.16
150	P45954	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACADSB PE=1 SV=1	17	5	5	432	47.5	6.99	52.32	-0.08
151	P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAP1L1 PE=1 SV=1	17	3	3	391	45.3	4.46	6.32	-0.04
152	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYGB PE=1 SV=5	2	1	1	843	96.6	6.86	15.29	-0.04
153	Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARK7 PE=1 SV=2	57	9	9	189	19.9	6.79	244.08	0.15
154	AOA0C4DG17	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPSA PE=1 SV=1	37	6	6	300	33.3	4.87	48.81	-0.09
155	Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHMP4B PE=1 SV=1	23	4	4	224	24.9	4.82	12.37	0.28
156	Q9BY32	Inosine triphosphate pyrophosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITPA PE=1 SV=2	40	6	6	194	21.4	5.66	47.7	-0.04
157	P25789	Proteasome subunit alpha type-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA4 PE=1 SV=1	21	3	3	261	29.5	7.72	22.1	-0.08
158	Q15393	Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B3 PE=1 SV=4	23	19	19	1217	135.5	5.26	193.93	-0.06
159	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=2	49	14	14	390	43	5.26	178.36	0.14
160	P00390	Glutathione reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GR PE=1 SV=2	25	8	8	522	56.2	8.5	88.86	-0.15
161	P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPEPPS PE=1 SV=2	25	15	15	919	103.2	5.72	110.07	-0.60
162	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGDH PE=1 SV=1	64	21	21	494	55	7.12	275.58	0.08
163	P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS19 PE=1 SV=2	38	7	7	145	16.1	10.32	31.56	0.28
164	AOA1C7YX9	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL2 PE=1 SV=1	12	4	3	677	73.5	6.35	38.3	-0.03
165	P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APEX1 PE=1 SV=2	53	13	13	318	35.5	8.12	112.38	-0.14
166	P09104	Gamma-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO2 PE=1 SV=3	26	6	6	434	47.2	5.03	347.5	0.57
167	P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LYZ PE=1 SV=1	27	2	2	148	16.5	9.16	14.69	-0.35
168	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GD12 PE=1 SV=2	61	24	24	445	50.6	6.47	190.56	0.11
169	P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXN PE=1 SV=3	78	6	6	105	11.7	4.92	126.66	-0.24
170	P61081	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2M PE=1 SV=1	15	2	2	183	20.9	7.69	14.75	-0.67
171	P63146	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2B PE=1 SV=1	11	1	1	152	17.3	5.01	4.06	-0.46
172	Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2	40	8	8	356	37.5	7.09	135.5	-0.22
173	P27348	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1	44	9	9	245	47.8	4.78	263.66	0.26
174	Q75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH1 PE=1 SV=2	34	11	11	414	46.6	7.01	75.95	-0.04
175	P32322	Pyroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYCR1 PE=1 SV=2	39	8	8	319	33.3	7.61	37.11	-0.03
176	O60547	GDP-mannose 4,6 dehydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GMD5 PE=1 SV=1	14	3	3	372	41.9	37.1	5.19	-0.46
177	P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=Hprt1 PE=1 SV=2	20	2	2	218	24.6	6.68	16.85	-0.33
178	P09429	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3	21	4	4	215	24.9	5.74	44.24	-0.17
179	O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJA2 PE=1 SV=1	12	5	5	412	45.7	6.48	17.5	1.64
180	O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP3 PE=1 SV=2	21	8	8	579	63.7	8.87	52.18	-0.08
181	Q15274	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QPRT PE=1 SV=3	47	9	9	297	30.8	6.21	230.66	-0.81
182	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3	36	1	1	415	45.6	5.58	135.75	-0.21
183	Q63HM1	Kynurenine formamidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFMID PE=2 SV=2	5	1	1	303	34	5.91	7.28	-0.29
184	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAPK1 PE=1 SV=3	34	8	8	360	41.4	6.98	32.13	-0.18
185	P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEXB PE=1 SV=3	13	5	5	556	63.1	6.76	32.33	-0.18
186	Q8NBS9	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NQO1 PE=1 SV=1	19	4	4	274	30.8	8.88	24.86	-0.17
188	P62249	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS16 PE=1 SV=2	36	5	5	146	16.4	10.21	19.28	0.06
189	P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAD23B PE=1 SV=1	26	5	5	409	43.1	4.84	33.41	0.21
190	P36871	Phosphoglucosyltransferase-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGM1 PE=1 SV=3	53	17	17	582	61.4	6.76	121.88	-0.42
191	E7EQR4	Ezrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EZR PE=1 SV=3	12	6	6	586	69.3	6.16	43.28	0.07
192	P07099	Epoxide hydrolase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPHX1 PE=1 SV=1	15	3	3	455	52.9	7.25	6.43	-0.23
193	Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SND1 PE=1 SV=1	19	9	9	910	101.9	7.17	36.8	-0.28
194	P12814	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2	31	20	20	892	103	5.41	224.73	-0.09
195	P32119	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5	49	7	7	198	21.9	5.97	468.21	0.04
196	P04406	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3	71	17	17	335	36	8.46	2274.29	-0.02
197	AOA0D9SGF6	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=1	11	16	16	2498	287.4	5.36	180.45	-0.26
198	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2	12	6	6	707	76.1	9.44	98.95	-0.51
199	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP61 PE=1 SV=2	53	5	5	102	10.9	8.92	91.09	-0.02
200	P07148	Fatty acid-binding protein, liver OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FABP1 PE=1 SV=1	61	5	5	127	14.2	7.18	188.48	-0.07
201	AOA0M1T15	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DBI PE=1 SV=1	25	2	2	143	15.9	5.05	44.95	-0.05

202	Q9BRF8	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPPED1 PE=1 SV=3	43	9	9	314	35.5	6.2	89.33	0.63
203	P09417	Dihydropteridine reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QDPR PE=1 SV=2	32	5	5	244	17.71	7.37	25.8	-0.01
204	Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC4 PE=1 SV=4	36	5	5	263	28.8	5.59	24.64	-0.38
205	P27797	Calreticulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALR PE=1 SV=1	39	9	9	417	48.1	4.44	6.8	-0.18
206	P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACO1 PE=1 SV=3	27	14	14	889	98.3	6.68	56.84	-0.42
207	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3	31	10	10	529	56.5	5.4	47.47	-0.25
208	G8LLB6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	36	11	11	472	51.2	6.8	187.03	0.07
209	P21333	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4	5	5	5	2647	280.6	6.06	6.33	-0.30
210	Q16531	DNA damage-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDDB1 PE=1 SV=1	22	17	17	1140	126.9	5.26	90.4	-0.20
211	Q96EK6	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPNPAT1 PE=1 SV=1	27	2	2	184	20.7	7.99	6.52	0.35
212	P04040	Catalase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAT PE=1 SV=3	12	3	3	527	59.7	7.39	14.22	-0.83
213	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPD PE=1 SV=1	17	4	4	355	38.4	7.81	59.11	0.39
214	AAQ2R8Y6G6	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=1	66	21	21	434	47.3	6.99	57.365	-0.01
215	P16083	Ribosyl-dihydropyrimidinase dehydrogenase [quinone] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NQO2 PE=1 SV=5	26	4	4	231	25.9	6.29	26.73	0.34
216	O14737	Programmed cell death protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD5 PE=1 SV=3	39	4	4	125	14.3	6.04	12.38	-0.71
217	AAOAU1RRH7	Histone H2A OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	11	1	1	170	18.5	11.52	41.96	-0.13
218	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGDI4 PE=1 SV=3	45	6	6	204	23.2	5.11	60.74	-0.38
219	O14818	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA7 PE=1 SV=1	21	4	4	248	27.9	8.46	39.38	-0.03
220	Q13228	Methanethiol oxidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SELENBP1 PE=1 SV=2	34	10	10	472	52.4	6.37	51.65	-0.41
221	Q95336	6-phosphogluconolactonase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGLS PE=1 SV=2	73	11	11	258	27.5	6.05	84.45	-0.09
222	Q08257	Quinone oxidoreductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CRYZ PE=1 SV=1	42	10	10	329	35.2	8.44	56.98	-0.58
223	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP1A PE=1 SV=2	59	6	6	108	11.9	8.16	47.88	-0.07
224	P78417	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTO1 PE=1 SV=2	54	9	9	241	27.5	6.6	112.42	0.08
225	P68363	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1B PE=1 SV=1	37	10	10	451	50.1	5.06	258.62	-0.01
226	Q09028	Histone-binding protein RBBP4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBBP4 PE=1 SV=3	54	10	10	425	47.6	4.89	106.04	-0.87
227	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	34	17	17	646	70.9	5.52	509.51	-0.02
228	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLUD1 PE=1 SV=2	64	31	31	558	61.4	7.8	739.76	0.02
229	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX3 PE=1 SV=3	22	3	3	256	21.7	7.78	215.08	-0.18
230	Q96IU4	Protein ABHD14B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABHD14B PE=1 SV=1	52	7	7	210	22.3	6.4	48.1	-0.27
231	P07858	Cathepsin B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSB PE=1 SV=3	33	8	8	339	37.8	6.3	254.34	-0.11
232	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUFM PE=1 SV=2	40	12	12	482	49.5	7.61	76.08	-0.17
233	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	41	21	21	724	83.2	5.03	225.53	0.00
		Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUCLG2 PE=1 SV=2								
234	Q96199		39	10	10	432	46.5	6.39	53.84	0.60
235	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5	27	11	11	372	38.7	9.13	86.03	-0.06
236	O75223	Gamma-glutamylcyclotransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GGCT PE=1 SV=1	28	5	5	188	21	5.14	29.92	0.24
237	P49753	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACOT2 PE=1 SV=6	14	4	4	483	53.2	8.47	11.09	-0.97
238	AAAIW2PQ51	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=1	8	3	3	731	80.4	8.37	21.71	-0.21
239	O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4	18	4	4	358	38.8	5.77	19.74	-0.06
240	Q96E39	RNA binding motif protein, X-linked-like-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMXL1 PE=1 SV=1	10	3	3	390	42.1	9.89	39.09	-0.24
241	AAO1LBQGW23	ABHD14A-ACY1 readthrough (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABHD14A-ACY1 PE=1 SV=1	31	10	10	586	65.4	6.67	81.36	0.14
242	P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3 PE=1 SV=2	43	8	8	243	26.7	9.66	65.74	-0.18
243	O15514	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLR2D PE=1 SV=1	22	2	2	142	16.3	4.79	6.83	0.16
244	Q9IBS0	Twirlin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TWIF2 PE=1 SV=2	36	7	7	349	39.5	6.84	34.71	-0.35
245	Q5I537	NHL repeat-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NHLRC3 PE=2 SV=1	15	2	2	347	38.3	6.43	5.23	-0.09
246	P24534	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1B2 PE=1 SV=3	19	4	4	225	24.7	4.67	24.91	0.21
247	P09960	Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LT4A4 PE=1 SV=2	51	23	23	611	69.2	6.18	111.36	-0.05
248	E9PL57	NEDD8-MDP1 readthrough (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEDD8-MDP1 PE=4 SV=1	22	4	4	170	19.5	7.43	25.1	0.94
249	Q9H8Y8	Golgi reassembly-stacking protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GORASP2 PE=1 SV=3	15	4	4	452	47.1	4.82	8.79	-0.01
250	P14625	Endoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	37	29	29	803	92.4	4.84	333.06	-0.20
251	Q96G03	Phosphoglucosyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGM2 PE=1 SV=4	29	14	14	612	68.2	6.73	78.68	-0.02
252	Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECHI PE=1 SV=2	30	6	6	328	35.8	8	76.5	-0.01
253	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT14 PE=1 SV=4	46	19	19	472	51.5	5.16	139.5	-0.65
254	P09327	Villin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIL1 PE=1 SV=4	19	10	10	827	92.6	6.39	73.14	-0.12
255	Q14019	Coactosin-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COTL1 PE=1 SV=3	18	2	2	142	15.9	5.67	6.54	0.28
256	P60174	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPI1 PE=1 SV=3	66	14	14	286	30.8	5.92	366.84	-0.03
257	P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOC PE=1 SV=2	15	4	4	364	39.4	6.87	110.27	-0.01
258	P23141	Liver carboxylesterase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CES1 PE=1 SV=2	61	29	29	567	62.5	6.6	884.51	-0.10
259	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=4	58	23	23	505	56.7	6.35	348.41	-0.10
260	B5MC82	D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDT PE=4 SV=2	17	3	3	166	17.7	8.69	12.72	0.25
261	P18669	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2	31	5	5	254	28.8	7.18	2.44	-0.03
262	F6TLX2	Glyoxalase domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLOD4 PE=1 SV=1	11	5	5	502	54.7	8.7	35	0.21
263	P30085	UMP-CMP kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMPK1 PE=1 SV=3	22	4	4	196	22.2	5.57	31.66	0.01
264	O60888	Protein Cuta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUTA PE=1 SV=2	33	3	3	179	19.1	5.5	10.89	0.05
265	P25787	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA2 PE=1 SV=2	42	5	5	234	25.9	7.43	40.26	-0.26
266	Q9BYT8	Neurolysin, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NLN PE=1 SV=1	12	6	6	704	80.6	6.64	41.11	0.44
267	E9PK25	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COF1 PE=1 SV=1	50	11	11	204	22.7	8.34	327.5	0.27
268	Q15435	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1R7 PE=1 SV=1	21	5	5	360	41.5	4.91	49.02	-0.19
269	P62888	60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL30 PE=1 SV=2	50	4	4	115	12.8	9.63	43.05	-0.12
270	P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF6 PE=1 SV=1	57	8	8	245	26.6	4.68	198.25	-0.24

271	Q04917	14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAH PE=1 SV=4	YWHAH	25	6	5	246	28.2	4.84	93.36	-0.86
272	P30740	Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINB1 PE=1 SV=1	SERPINB1	18	5	5	379	42.7	6.28	30.37	0.23
273	ERH66	Tubulin-specific chaperone A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBCA PE=1 SV=2	TBCA	31	5	5	131	15.1	5.16	54.41	-0.12
274	Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G1 PE=1 SV=4	EIF4G1	3	3	3	1599	175.4	5.33	21.19	-0.01
275	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6	KRT1	65	52	47	644	66	8.12	2627.11	-0.40
276	P48637	Glutathione synthetase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSS PE=1 SV=1	GSS	13	4	4	474	52.4	5.92	22.9	-0.14
277	A8MXP9	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=1	MATR3	6	3	3	895	99.9	6.04	8.16	-0.08
278	P35268	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=2	RPL22	51	4	4	128	14.8	9.19	67.73	0.28
279	P54819	Adenylylate kinase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK2 PE=1 SV=2	AK2	34	4	4	239	26.5	7.81	53.2	0.23
280	Q6DKJ4	Nucleoredoxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NXN PE=1 SV=2	NXN	14	4	4	435	48.4	4.97	17.05	0.44
281	P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	EEF1A1	55	14	14	462	50.1	4.62	530.88	0.00
282	ESRJR5	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SKP1 PE=1 SV=1	SKP1	32	5	5	163	18.7	4.7	48	-0.11
283	H3BNC9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=2	N/Ap	9	5	5	584	64.5	8.78	49.57	-0.07
284	Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	HNRNPA0	19	3	3	305	30.8	9.29	61.51	-0.04
285	P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGD PE=1 SV=3	PGD	48	15	15	483	53.1	7.23	123.48	0.17
286	P18206	Vinculin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCL PE=1 SV=4	VCL	15	9	9	1134	123.7	5.66	53.21	0.35
287	P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H1D PE=1 SV=2	HIST1H1D	11	4	4	221	22.3	11.02	59.27	0.34
288	O43491	Band 4.1-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41L2 PE=1 SV=1	EPB41L2	4	2	2	1005	112.5	5.44	4.25	-0.64
289	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT10 PE=1 SV=6	KRT10	62	39	35	584	58.8	5.21	1739.08	-0.65
290	P30041	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6	60	13	13	224	25	6.38	106.89	0.00
291	P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=2	PFN1	66	9	9	140	15	8.27	97.15	0.02
292	Q9Y2B0	Protein canopy homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNPY2 PE=1 SV=1	CNPY2	51	8	8	182	20.6	4.92	89.74	1.14
293	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RANBP1 PE=1 SV=1	RANBP1	45	5	5	201	23.3	5.29	29.32	-0.04
294	P62244	40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS15A PE=1 SV=2	RPS15A	41	5	5	130	14.8	10.13	66.89	-0.18
295	P61158	Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTR3 PE=1 SV=3	ACTR3	21	4	4	418	47.3	5.88	23.28	-0.05
296	A0A1B0G3W77	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH7A1 PE=1 SV=1	ALDH7A1	51	20	20	554	60	8.18	303.77	-0.59
297	P62337	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2	PPIA	67	11	11	165	18	7.81	257.26	0.16
298	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	SNRPD1	37	3	3	119	13.3	11.56	15.56	-0.28
299	P35754	Glutaredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLRX PE=1 SV=2	GLRX	71	5	5	106	11.8	8.09	59.26	0.60
300	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH2 PE=1 SV=2	ALDH2	53	17	17	517	56.3	7.05	201.76	-0.04
301	Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHNAK PE=1 SV=2	AHNAK	12	27	27	5890	628.7	6.15	145.61	-0.26
302	P61970	Nuclear transport factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUTF2 PE=1 SV=1	NUTF2	63	4	4	127	14.5	5.38	63.84	0.01
303	Q32Q12	Nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME1-NME2 PE=1 SV=1	NME1-NME2	53	10	5	292	32.6	8.48	177.72	-0.19
304	P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM1	26	5	5	294	4.78	4.78	44.75	0.01
305	Q01995	Transgelin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN PE=1 SV=4	TAGLN	27	4	4	201	22.6	8.84	58.02	0.48
306	J3KQ32	Oag-like ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OLA1 PE=1 SV=1	OLA1	10	2	2	416	46.9	8.06	10.02	-0.03
307	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HA1 PE=1 SV=2	P4HA1	31	11	11	534	61	6.01	77.98	0.91
308	O43852	Calumenin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALU PE=1 SV=2	CALU	40	8	8	315	37.1	4.64	127.42	-0.20
309	O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNCRIP PE=1 SV=2	SYNCRIP	14	7	5	623	69.6	8.59	29.94	-0.48
310	Q9BSE5	Agmatinase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGMAT PE=1 SV=2	AGMAT	19	4	4	362	37.6	7.59	89.52	-0.35
311	O75937	DnaJ homolog subfamily C member 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJC8 PE=1 SV=2	DNAJC8	30	7	7	253	29.8	9.06	37.95	0.14
312	Q16543	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC37 PE=1 SV=1	CDC37	8	2	2	378	44.4	3.78	14.8	-0.15
313	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	HNRNPA2B1	26	9	6	353	37.4	8.95	74.7	-0.16
314	Q9BSH4	Translational activator of cytochrome c oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TACO1 PE=1 SV=1	TACO1	28	4	4	297	32.5	8.13	14.71	0.31
315	P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETFB PE=1 SV=3	ETFB	31	7	7	255	27.8	8.1	62.23	0.34
316	O75390	Citrate synthase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CS PE=1 SV=2	CS	35	9	9	466	51.7	8.32	60.93	0.26
317	B5MBZ0	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EML4 PE=1 SV=3	EML4	9	6	6	992	110.1	6.49	26.64	-2.49
318	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH1 PE=1 SV=4	MDH1	47	13	13	334	36.4	7.36	137.62	-0.76
319	P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2	RPS2	26	6	6	293	31.3	10.24	47.56	0.33
320	A0A1B0G3VH5	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FTO PE=1 SV=1	FTO	13	5	5	559	64.1	5.38	42.94	-0.39
321	P98179	RNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM3 PE=1 SV=1	RBM3	20	1	1	157	17.2	8.91	18.43	-0.05
322	P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT5 PE=1 SV=1	CCT5	15	4	4	541	59.6	5.66	9.48	-0.30
323	P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACPI PE=1 SV=3	ACPI	67	8	7	158	18	6.74	105.38	-0.22
324	P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1	LMNA	18	8	3	664	74.1	7.02	73.81	-0.07
325	Q9BWJ5	Splicing factor 3B subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B5 PE=1 SV=1	SF3B5	56	4	4	86	10.1	6.35	40.06	0.11
326	P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3	NCL	20	12	12	710	76.6	4.7	134.14	-0.05
327	P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C3 PE=1 SV=2	C3	2	2	2	1663	187	6.4	29.48	-0.14
328	P09525	Annexin A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA4 PE=1 SV=4	ANXA4	56	17	17	319	35.9	6.13	112.34	-0.18
329	P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDHA1 PE=1 SV=3	PDHA1	25	5	5	390	43.3	8.06	20.83	-0.34
330	Q14696	LRP chaperone MESD OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MESD PE=1 SV=2	MESDC2; MESD	9	1	1	234	26.1	7.78	28.3	-0.34
331	P12955	Xaa-Pro dipeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEPD PE=1 SV=3	PEPD	37	12	12	493	54.5	6	112.13	0.85
332	H3BRN4	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABAT PE=1 SV=1	ABAT	52	18	18	515	58.1	8.09	108.37	-0.09
333	FBW0W8	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CC PE=1 SV=1	PPP1CC	11	2	2	332	38.2	6.83	17.34	0.00
334	A0A087WVQ6	Claithrin heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=1	CLTC	7	7	7	1679	191.9	5.69	9.81	0.35
335	P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFKL PE=1 SV=6	PFKL	5	2	2	780	85	7.5	1.68	-0.04
336	O76021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSL1D1 PE=1 SV=3	RSL1D1	30	12	12	490	54.9	10.13	51.62	0.58
337	P12004	Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNA PE=1 SV=1	PCNA	47	7	7	261	28.8	4.69	130.79	0.04
338	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBA1 PE=1 SV=3	UBA1	11	6	6	1058	117.8	5.76	63.91	-0.23
339	P50502	Hsc70-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STT3 PE=1 SV=2	STT3	5	1	1	369	41.3	5.27	2.11	0.05

340	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUB1 PE=1 SV=3	SUB1	46	6	6	127	9.6	70.22	-0.15
341	P48735	isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH2 PE=1 SV=2	IDH2	4	1	452	8.69	8.69	0	0.02
342	P20618	Proteasome subunit beta type-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB1 PE=1 SV=2	PSMB1	37	5	241	8.13	29.83	29.83	-0.44
343	P30050	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL12 PE=1 SV=1	RPL12	40	4	165	9.42	17.8	35.92	-0.07
344	P47897	Glutamine--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QARS PE=1 SV=1	QARS	12	5	775	7.15	87.7	22.2	0.06
345	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTC1 PE=1 SV=1	ACTC1	10	3	556	6.11	60.3	14.68	0.00
346	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTC1 PE=1 SV=1	ACTC1	19	1	377	5.39	202.53	202.53	-0.05
347	P62487	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLR2G PE=1 SV=1	POLR2G	23	3	172	17.2	19.3	8.54	-0.75
348	P99999	Cytochrome c OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYCS PE=1 SV=2	CYCS	41	3	105	9.57	29.98	29.98	-0.05
349	Q02790	Peptidyl--prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP4 PE=1 SV=3	FKBP4	12	3	459	5.43	51.8	17.9	0.38
350	P13667	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDI4 PE=1 SV=2	PDI4	8	3	645	5.07	72.9	1.98	-0.09
351	Q9Y281	Cofilin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CF2 PE=1 SV=1	CF2	57	9	166	7.88	139.53	139.53	-0.21
352	P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS12 PE=1 SV=3	RPS12	26	3	132	7.21	14.5	11.74	0.55
353	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSAT1 PE=1 SV=2	PSAT1	42	11	370	7.66	40.4	62.67	-0.07
354	Q577Y6	Protein S100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A1 PE=1 SV=1	S100A1	15	2	147	4.48	91.08	91.08	0.06
355	Q9UHD8	Septin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPT9 PE=1 SV=2	SEPT9	7	3	586	65.4	8.97	12.01	0.68
356	P31946	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAB PE=1 SV=3	YWHAB	56	14	246	4.83	28.1	587.4	0.00
357	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCP PE=1 SV=4	VCP	56	36	806	5.26	89.3	628.59	0.11
358	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4H PE=1 SV=5	EIF4H	35	5	248	7.23	27.4	49.66	-0.68
359	P61247	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3A PE=1 SV=2	RPS3A	36	9	264	9.73	29.9	69.36	-0.59
360	P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECHS1 PE=1 SV=4	ECHS1	31	6	290	8.07	31.4	71.77	0.27
361	Q7L1Q6	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BZWI1 PE=1 SV=1	BZWI1	23	7	419	48	83.38	83.38	0.26
362	P02787	Serotransferrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TF PE=1 SV=3	TF	45	25	698	7.12	214.97	214.97	0.06
363	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT7 PE=1 SV=2	CCT7	14	5	543	7.65	15.93	15.93	-0.04
364	F9W727	60S ribosomal protein L32 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL32 PE=1 SV=1	RPL32	24	3	163	10.59	27.37	27.37	1.66
365	P29401	Transketolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKT PE=1 SV=3	TKT	45	16	623	7.66	67.8	337.16	-0.06
366	Q75191	Xylose kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XYLB PE=1 SV=3	XYLB	31	10	536	5.86	56.47	56.47	0.63
367	Q9NV59	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNPO PE=1 SV=1	PNPO	28	5	261	7.06	30	57.57	0.07
368	Q94760	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDAH1 PE=1 SV=3	DDAH1	39	6	285	5.81	31.1	28.64	-0.52
369	Q12765	Secernin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCRN1 PE=1 SV=2	SCRN1	32	10	414	4.75	80.5	80.5	0.36
370	Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAT2 PE=1 SV=2	ACAT2	53	12	397	6.92	234.19	234.19	0.02
371	E9P861	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALYREF PE=1 SV=1	ALYREF	31	5	264	11.05	68.11	68.11	-0.41
372	AKK878	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MANF PE=1 SV=1	MANF	32	6	185	8.92	33.99	33.99	-0.11
373	P00558	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3	PGK1	55	14	417	44.6	166.84	166.84	0.00
374	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDI6 PE=1 SV=1	PDI6	52	20	440	5.08	525.48	525.48	-0.07
375	P37837	Transaldolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TALDO1 PE=1 SV=2	TALDO1	35	9	337	6.81	207.54	207.54	-0.62
376	P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOT2 PE=1 SV=3	GOT2	53	17	430	9.01	175.37	175.37	0.06
377	P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMBN1 PE=1 SV=2	LMBN1	16	4	586	5.16	66.4	26.21	0.10
378	P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=2	KRT18	36	11	430	5.45	58.56	58.56	0.16
379	O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC1 PE=1 SV=4	CLIC1	65	13	241	5.17	182.76	182.76	0.20
380	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	EIF4A1	36	11	406	5.48	55.95	55.95	-0.38
381	Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LSM2 PE=1 SV=1	LSM2	40	2	95	6.52	85.08	85.08	0.23
382	BLAK88	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_d OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=1	CAPZB	32	7	301	6.43	98.14	98.14	-0.07
383	P62310	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LSM3 PE=1 SV=2	LSM3	12	1	102	11.8	10.63	10.63	-0.09
384	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC5 PE=1 SV=3	XRCC5	31	12	732	5.81	82.7	76.43	-0.24
385	P24932	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA4 PE=1 SV=4	HSPA4	31	18	840	5.19	191.61	191.61	0.18
386	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2	ALDOA	75	21	364	8.09	39.4	430.89	-0.03
387	Q6F181	Anamorfin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CJAPIN1 PE=1 SV=2	CJAPIN1	29	6	312	5.62	33.6	16.63	-0.37
388	P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RP56KA3 PE=1 SV=1	RP56KA3	8	3	740	6.89	4	4	-0.23
389	Q15257	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPA PE=1 SV=3	PTPA	37	8	358	5.94	40.6	60.67	-0.27
390	P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETFA PE=1 SV=1	ETFA	64	15	333	8.38	265.45	265.45	-0.19
391	O43707	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN4 PE=1 SV=2	ACTN4	57	37	911	5.44	104.8	469.5	-0.42
392	P30405	Peptidyl--prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PP1F PE=1 SV=1	PP1F	29	4	207	9.38	22	14.5	-0.15
393	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	HIST1H4A;	31	3	103	11.36	11.4	51.61	-0.18
394	Q9BZ75	Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=API5 PE=1 SV=3	API5	17	7	524	7.34	59	52.74	-0.52
395	Q9WU11	Protein Churchill OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHURC1 PE=1 SV=2	CHURC1	45	5	139	5.54	16.1	19.59	0.33
396	Q08380	Galactin-3-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=L3BP PE=1 SV=1	L3BP	17	7	585	5.27	65.3	28.84	-0.45
397	O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNP R PE=1 SV=1	HNRNP R	10	3	633	8.13	70.9	27.36	0.11
398	P07237	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3	P4HB	53	23	508	4.87	57.1	390.95	-0.06

399	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRC6 PE=1 SV=2	XRCC6	9	9	609	6.64	98.84	-0.13
400	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRPEL1 PE=1 SV=2	GRPEL1	8	1	217	8.12	9.83	0.94
401	P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP2 PE=1 SV=1	RPLP2	87	7	115	4.54	120.95	0.10
402	Q16762	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TST PE=1 SV=4	TST	21	4	297	7.25	41.15	0.89
403	P53004	Bliwerdin reductase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLVRA PE=1 SV=2	BLVRA	19	4	296	6.44	16.13	-0.28
404	P07339	Cathepsin D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSD PE=1 SV=1	CTSD	44	11	412	6.54	131.06	-0.02
405	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF5A PE=1 SV=2	EIF5A	62	9	164	5.24	129.52	0.11
406	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2	LDHA	56	13	332	8.27	96.22	-0.01
407	P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1G PE=1 SV=3	EEFIG	19	6	437	6.67	50.1	0.05
408	B4DUC8	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTAP PE=1 SV=1	MTAP	34	6	300	33.2	61.32	0.33
409	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1	ATP5A1	6	2	553	9.13	17.63	-0.29
410	P11940	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2	PABPC1	23	11	636	70.6	76.92	-0.36
411	Q8Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THRAP3 PE=1 SV=2	THRAP3	3	3	955	10.15	17.46	0.18
412	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBR1 PE=1 SV=3	CBR1; SETD4	21	3	277	8.32	8.83	0.40
413	Q62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1	RPS6	10	2	249	10.84	8.42	-0.41
414	Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLRX5 PE=1 SV=2	GLRX5	21	2	157	6.79	8.81	-0.10
415	Q5TCU8	Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM2 PE=1 SV=1	TPM2	17	1	322	4.78	61.21	0.40
416	Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNDC17 PE=1 SV=1	TXNDC17	47	4	123	13.9	44.23	-0.27
417	X6R8A1	Carboxypeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSA PE=1 SV=1	CTSA	7	3	498	56.2	46.07	-0.11
418	P15121	Aldose reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1B1 PE=1 SV=3	AKR1B1	23	4	316	6.98	12.31	0.02
419	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4	HNRNPC	13	3	306	33.7	38.88	-0.03
420	Q9HA64	Ketotransaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN3KRP PE=1 SV=2	FN3KRP	7	3	309	34.4	15	-0.30
421	P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS5 PE=1 SV=4	RPS5	26	4	204	22.9	19.88	-0.32
422	Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1	DDX39B	58	18	428	49	131.39	-0.05
423	AAO087WYT3	Prostaglandin H synthase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTGES3 PE=1 SV=1	PTGES3	18	2	164	4.55	4.07	0.33
424	AAO0A0MRM9	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOLC1 PE=1 SV=1	NOLC1	3	1	708	74.6	0	0.05
425	AAO0A0MS56	Alcohol dehydrogenase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADH6 PE=1 SV=1	ADH6	6	1	375	7.88	0	-0.02
426	AAO0D9SFF53	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=1	DDX3X	3	1	733	81.4	1.99	0.00
427	AAO0G2JK23	Large proline-rich protein BAG6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAG6 PE=1 SV=1	BAG6	7	4	1132	119.3	5.6	8.87
428	AAO2R8Y5A3	Catenin beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNB1 PE=1 SV=1	CTNNB1	3	1	783	85.6	1.9	0.02
429	AGNIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=2 SV=1	RAP1BL	7	1	184	20.9	2.51	-0.06
430	B4DR61	cDNA FLJ59739, highly similar to Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC61A1 PE=1 SV=1	SEC61A1	4	1	482	8.24	0	-0.24
431	B4DJT8	Calponin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN2 PE=1 SV=1	CNN2	5	1	330	35.9	0	0.11
432	BZ76Z4	cDNA FLJ56329, highly similar to Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1	MYL6	12	2	238	26.7	4.49	-0.12
433	C9JC84	Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGG PE=1 SV=1	FGG	9	2	461	52.3	2.25	-0.39
434	E7EMB3	Calmodulin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM2 PE=1 SV=1	CALM2	47	4	196	21.7	9.91	-0.01
435	EP9AV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACA PE=1 SV=1	NACA	2	3	2078	9.58	12.83	0.03
436	F5H4Z3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	N/An	10	1	210	23.3	2.34	-0.03
437	F8VM2	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A3 PE=1 SV=1	SLC25A3	8	1	324	9.26	0	-0.22
438	J3KNF8	Cytochrome b5 type B (Outer mitochondrial membrane), isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5B PE=1 SV=1	CYB5B	23	1	150	16.7	3.18	-0.19
439	J3KTA4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1	DDX5	7	2	614	69	16.94	-0.07
440	J3KTL2	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=1	SRSF1	9	1	253	28.3	0	-0.09
441	000231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD11 PE=1 SV=3	PSMD11	8	2	422	47.4	0	0.05
442	000203	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3F PE=1 SV=1	EIF3F	5	1	357	37.5	1.71	0.02
443	000429	Dynamin-1-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNM1L PE=1 SV=2	DNM1L	3	1	736	81.8	0	0.00
444	014980	Exportin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO1 PE=1 SV=1	XPO1	4	2	1071	123.3	3.58	-0.01
445	015144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARPC2 PE=1 SV=1	ARPC2	10	2	300	34.3	4.46	-0.52
446	060488	Enoyl-CoA delta isomerase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL4 PE=1 SV=2	ACSL4	5	2	711	79.1	8.38	-0.19
447	075521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECI2 PE=1 SV=4	ECI2	7	2	394	43.6	9	-0.20
448	076094	Signal recognition particle subunit SRP72 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP72 PE=1 SV=3	SRP72	4	1	671	74.6	9.26	0.03
449	095373	Importin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO7 PE=1 SV=1	IPO7	2	1	1038	119.4	4.82	0.11
450	095433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHS1 PE=1 SV=1	AHS1	7	1	338	38.3	5.19	0.02
451	P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R3 PE=1 SV=3	CYB5R3	9	1	301	34.2	0	-0.17
452	P00439	Phenylalanine-4-hydroxylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PAH PE=1 SV=1	PAH	4	1	452	51.8	6.6	1.32
453	P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN2 PE=1 SV=3	RPN2	9	3	631	69.2	0	-0.41
454	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1A1 PE=1 SV=1	ATP1A1	2	1	1023	112.8	0	-0.22
455	P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP0 PE=1 SV=1	RPLP0	10	1	317	34.3	2.4	-0.23
456	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT19 PE=1 SV=4	KRT19	30	4	400	44.1	28.8	0.01
457	P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNP PE=1 SV=2	CNP	14	3	421	47.5	9.07	-0.13
458	P11766	Alcohol dehydrogenase class-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADH5 PE=1 SV=4	ADH5	15	3	374	39.7	2.16	0.12
459	P13489	Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNH1 PE=1 SV=2	RNH1	12	2	461	49.9	1.82	-0.04
460	P15170	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSPT1 PE=1 SV=1	GSPT1	5	1	499	56.2	2.3	-0.20
461	P16104	Histone H2AX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AFX PE=1 SV=2	H2AFX	16	1	143	15.1	1.68	-0.13
462	P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7 PE=1 SV=1	RPL7	7	1	248	29.2	0	-0.03
463	P21964	Catechol O-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COMT PE=1 SV=2	COMT	19	3	271	5.47	5.91	0.31

464 P22234	Multifunctional protein ADE2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PAICS PE=1 SV=3	PAICS	3	425	47	7.23	15.39	0.01
465 P27144	Adenylate kinase 4, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK4 PE=1 SV=1	AK4; LOC100507855	1	223	25.3	8.4	3.12	-0.14
466 P27635	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10 PE=1 SV=4	RPL10	1	214	24.6	10.08	2.97	-0.10
467 P27824	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=2	CANX	2	592	67.5	4.6	6.32	-0.19
468 P28838	Cytosol aminopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAP3 PE=1 SV=3	LAP3	1	519	56.1	7.93	1.68	-0.03
469 P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP2R1A PE=1 SV=4	PPP2R1A	4	589	65.3	5.11	9.74	-0.26
470 P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATIC PE=1 SV=3	ATIC	3	592	64.6	6.71	5.4	0.26
471 P33176	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1	KIF5B	2	963	109.6	6.51	7.33	-0.21
472 P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHMT2 PE=1 SV=3	SHMT2	3	504	56	8.53	3.78	-0.33
473 P35606	Coatomer subunit beta' OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB2 PE=1 SV=2	COPB2	1	906	102.4	5.27	0	0.04
474 P36776	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LONP1 PE=1 SV=2	LONP1	3	959	106.4	6.39	4.79	-0.45
475 P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDOST PE=1 SV=4	DDOST	2	456	50.8	6.55	2.67	-0.13
476 P40227	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT6A PE=1 SV=3	CCT6A	2	531	58	6.68	8.01	0.00
477 P41250	Glycine-tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GARS PE=1 SV=3	GARS	1	739	83.1	7.03	1.98	-0.02
478 P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3	LRPPRC	11	1394	157.8	6.13	9.32	-0.23
479 P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT3 PE=1 SV=4	CCT3	2	545	60.5	6.49	0	0.02
480 P50225	Sulfotransferase 1A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SULT1A1 PE=1 SV=3	SULT1A1	4	295	34.1	6.62	1.67	-0.03
481 P50454	Serpin H1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	SERPINH1	1	418	46.4	8.69	2.44	-0.09
482 P50990	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT8 PE=1 SV=4	CCT8	1	548	59.6	5.6	0	-0.10
483 P50991	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT4 PE=1 SV=4	CCT4	2	539	57.9	7.83	2.89	0.32
484 P53396	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACLY PE=1 SV=3	ACLY	1	1101	120.8	7.33	3.24	0.00
485 P53618	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB1 PE=1 SV=3	COPB1	1	953	107.1	6.05	3.68	-0.02
486 P53621	Coatomer subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPA PE=1 SV=2	COPA	1	1224	136.3	7.66	2.01	-0.06
487 P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH18A1 PE=1 SV=2	ALDH18A1	2	795	87.2	7.12	7.37	-0.10
488 P55060	Exportin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSEIL PE=1 SV=3	CSEIL	5	971	110.3	5.77	7.28	0.05
489 P61313	60S ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=2	RPL15	2	204	24.1	11.62	1.65	-0.05
490 P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1	RPL23	1	140	14.9	10.51	0	-0.07
491 P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL8 PE=1 SV=2	RPL8	2	257	28	11.03	3.22	0.02
492 P63172	Dynein light chain Tctex-type 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNLT1 PE=1 SV=1	DYNLT1	1	113	12.4	5.08	1.67	0.06
493 P68431	Histone H3.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST1H3A PE=1 SV=2	HIST1H3A; HIST1H3F; HIST1H3C; HIST1H3D; HIST1H3G; HIST1H3H; HIST1H3B; HIST1H3A; HIST1H3E; HIST1H3I; HIST1H3J	2	136	15.4	11.12	1.95	-0.98
494 P78371	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT2 PE=1 SV=4	CCT2	4	535	57.5	6.46	1.73	-0.08
495 P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKDC PE=1 SV=3	PRKDC	2	4128	468.8	7.12	4.78	-0.76
496 P82650	28S ribosomal protein S22, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPS22 PE=1 SV=1	MRPS22	1	360	41.3	7.9	0	-0.05
497 P84243	Histone H3.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3F3A PE=1 SV=2	H3F3A; H3F3AP4; H3F3B	2	136	15.3	11.27	4.38	-0.19
498 Q01105	Protein SET OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SET PE=1 SV=3	SET	2	290	33.5	4.32	4.99	-0.02
499 Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3	RPL6	1	288	32.7	10.58	0	-0.04
500 Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1QB	C1QB	4	282	31.3	4.84	9.37	-0.14
501 Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1	KHDRBS1	1	443	48.2	8.66	0	-0.10
502 Q12849	G-rich sequence factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRSF1 PE=1 SV=3	GRSF1	1	480	53.1	6.19	0	-0.07
503 Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD2 PE=1 SV=3	PSMD2	5	908	100.1	5.2	7.96	-0.25
504 Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	DYNC1H1	2	4646	532.1	6.4	3.51	-0.05
505 Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM25 PE=1 SV=2	TRIM25	1	630	70.9	8.09	0	0.04
506 Q14444	Caprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPRINI PE=1 SV=2	CAPRINI	2	709	78.3	5.25	3.38	-0.15
507 Q14554	Protein disulfide-isomerase A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDI5 PE=1 SV=1	PDI5	1	519	59.6	7.91	0	0.03
508 Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GANAB PE=1 SV=3	GANAB	3	944	106.8	6.14	2.02	0.09
509 Q14974	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPXB1 PE=1 SV=2	KPXB1	2	876	97.1	4.78	0	-0.01
510 Q15019	Septin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPT2 PE=1 SV=1	SEPT2	4	361	41.5	6.6	0	0.01
511 Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACOX1 PE=1 SV=3	ACOX1	1	660	74.4	8.16	0	-0.17
512 Q15437	Protein transport protein Sec23B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC23B PE=1 SV=2	SEC23B	2	767	86.4	6.89	0	-0.05
513 Q66MV3	Putative peptidyl-L-lysine hydrolase PTRHD1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTRHD1 PE=1 SV=1	PTRHD1	1	140	15.8	9.1	0	0.00
514 Q6P2Q9	Pur-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF8 PE=1 SV=2	PRPF8	2	2395	273.4	8.84	0	-0.13
515 Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3M PE=1 SV=1	EIF3M	6	374	42.5	5.63	2.43	0.06
516 Q7Z4W1	L-xylose reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCXR PE=1 SV=2	DCXR	2	244	25.9	8.1	0	-0.09
517 Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAND1 PE=1 SV=2	CAND1	1	1230	136.3	5.78	1.64	0.00
518 Q92544	Transmembrane 9 superfamily member 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TM9SF4 PE=1 SV=2	TM9SF4	1	642	74.5	6.54	0	-0.14
519 Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANP32B	ANP32B	2	251	28.8	4.06	2.82	-0.01
520 Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRCS9 PE=1 SV=1	LRRCS9	1	307	34.9	9.57	0	-0.10

521 Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNDP2 PE=1 SV=2	CNDP2	7	2	2	475	52.8	5.97	5.85	-0.25
522 Q96LD4	Tripartite motif-containing protein 47 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM47 PE=1 SV=2	TRIM47	3	1	1	638	69.5	6.44	0	-0.17
523 Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAP1L4 PE=1 SV=1	NAP1L4	7	1	1	375	42.8	4.69	6.08	-0.07
524 Q9BQ60	Myb-binding protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYBBP1A PE=1 SV=2	MYBBP1A	1	1	1	1328	148.8	9.28	3.99	-0.27
525 Q9H6S3	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPS8L2 PE=1 SV=2	EPS8L2	8	2	2	715	80.6	6.84	2.36	0.01
526 Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5	DDX21	3	1	1	783	87.3	9.28	0	-0.09
527 Q9P035	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HACD3 PE=1 SV=2	PTPLAD1; HACD3	6	1	1	362	43.1	8.94	0	0.18
528 Q9UBEO	SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAE1 PE=1 SV=1	SAE1	6	1	1	346	38.4	5.3	2.7	-0.04
529 Q9ULV4	Coronin-1C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COR01C PE=1 SV=1	COR01C	6	1	1	474	53.2	7.08	2.43	-0.11
530 Q9YZ95	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DRG1 PE=1 SV=1	DRG1	4	1	1	367	40.5	8.9	0	-0.05
531 Q9Y310	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCB PE=1 SV=1	C22orf28; RTCB	4	1	1	505	55.2	7.23	0	0.05
532 Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HYOUI PE=1 SV=1	HYOUI	14	6	6	999	111.3	5.22	15.24	-0.02

Gene	Protein	Accession	Length	Start	End	Score	CBX3	CtBP1	CBX3-CtBP1	Score	CBX3	CtBP1	CBX3-CtBP1
382	Q13185	Chromobox protein homolog 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBX3 PE=1 SV=4	14	2	2	183	20.8	5.33	19.87	0.38	-0.51	0.55	1.44
383	Q04828	Aldo-keto reductase family 1 member C1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1C1 PE=1 SV=1	65	15	1	323	36.8	7.88	396.79	0.72	-0.88	-0.11	-0.28
667	384	Q9BEP5	DAZAP1	4	1	407	43.4	8.56	18.73	0.07	0.00		0.08
695	385	Q9Y617	PSAT1	11	11	370	40.4	7.66	62.67	0.27	-0.17		
80	386	OUUK65	LSM7	9	1	103	11.6	5.27	2.29	0.41	-0.22		
387	Q9UL60	NFU1	20	4	4	254	28.4	5.07	8.94	0.04			
613	388	P03691	DSTN	15	2	165	18.5	7.85	10.37	0.03			
389	Q9BY32	ITPA	40	6	6	194	21.4	5.66	47.7	0.13			
41	390	Q9Y9K6	CD2AP	10	4	69	71.4	6.4	10.66	0.04			
194	391	Q9NRV9	HEBP1	2	2	189	21.1	5.8	14.49	0.33			
392	Q43776	NARS	13	4	548	62.9	6.25	17.2	0.21				
594	393	P10253	GAA	14	7	92	105.3	6	64.17	0.38	-0.04		
477	394	Q08623	HDHD1; PUDP	31	4	228	5.31	23.64	0.39		0.04		
375	395	P62318	SNRPD3	25	2	126	13.9	10.32	32.12	0.26	0.09		
417	396	Q9BE39	BMX1	40	3	390	9.89	39.09	0.63				
419	397	P23396	RPS3	8	1	243	26.7	9.65	65.74	0.67	0.12	0.50	
617	398	P07377	TF	45	25	698	77	7.12	214.97	-0.08	0.83	-0.02	-0.10
399	P24666	ACP1	67	8	17	158	18	6.74	105.38	0.15	0.84	0.12	
558	400	P04006	GAPDH	71	17	350	36	8.46	274.29	-0.04	-0.07	-0.08	
86	401	H0Y8K4	DNPH1	25	3	243	25.9	5.5	13.9	0.01			
622	402	P37802	TAGLN2	26	3	199	22.4	8.25	18.65		0.25		
595	403	P36354	CTSC	11	3	63	51.8	6.99	66.12	0.00	0.12		
276	404	P53786	NPEPPS	25	15	919	103.2	5.72	110.07	-0.49	-0.84	0.18	
632	405	Q9BWD1	ACAT2	53	12	397	41.3	6.92	234.19	0.16	-0.16	-0.27	
610	406	P55072	VCP	56	36	806	89.3	5.26	626.59	0.51	-0.08	0.01	
531	407	Q43852	CALU	40	8	315	37.1	4.64	127.42	0.62	0.67	0.81	
418	Q04382	CPNE1	32	9	542	50.7	6.04	137.11	-0.12	-0.29	-0.52		
71	409	AD497WU3	SPTBN1	6	8	2366	274.7	5.87	49.22	-0.46	-0.13	0.28	
611	410	Q15556	EIF4H	35	5	248	27.4	7.23	49.66		-0.25	-0.06	
443	411	P08866	RPS20	23	3	119	13.4	9.94	14.54	-0.57			
88	412	P12277	CKB	14	3	381	42.6	5.59	21.55		-0.36		
147	413	P39748	FEN1	2	2	380	42.6	8.62	8.81		-0.12		
89	414	Q15591	MAPRE1	21	4	268	30	5.14	20.35		-0.24	-0.09	
334	415	P54727	RAO23B	26	5	409	43.1	4.84	33.41		-0.13		
529	416	JKQ32	OLA1	10	2	416	46.9	8.06	10.02		-0.13		
286	417	P26583	HMG2	14	2	209	24	7.81	10.31		-0.2		
72	418	P13910	ILIRN	8	1	177	20	6.19	3.45		-0.25		
619	420	Q98822	CGM3	10	2	542	59.8	6.25	29.46		-0.21		
246	421	P33689	CC71	14	5	543	93.3	7.65	15.93		-0.07		
93	422	I3LD00	DNMA1	18	5	397	44.8	7.08	19.35		0.06		
629	423	P29569	RPL9	43	6	192	21.9	35.6	47.21		-0.25	-0.06	
167	424	P26639	THM188; UBZV1	3	2	380	8.2	6.67	10.07		-0.36		
499	425	Q9R314	TTG38	14	4	406	52.8	5.99	18.5		-0.12		
90	426	AD498WZM2	RNASET2	5	1	369	34.9	7.11	3.26		0.16	0.24	
91	428	Q9H488	MAPK3	12	3	379	43.1	6.74	10.29		-0.20	-0.30	
94	429	P04179	POPDC1	13	2	388	43.9	8.53	3.08		-0.53	-0.57	
123	430	P17174	SOO2	78	10	223	24.7	8.25	390.03	-0.52	0.42	0.74	
217	431	P30086	GOT1	15	15	413	46.2	7.01	192.29	0.22	0.85	0.46	
76	432	P42765	ACAA1	48	13	187	21	7.53	693.53	-0.38	0.71	0.72	
134	433	H8BN04	POXDC1	9	3	806	88.7	5.48	29.42		0.13	0.75	
586	434	P20518	PSMB1	5	5	241	26.5	8.13	29.83	-0.14		-0.75	
11	435	Q07936	SORD	39	8	357	38.3	7.97	71.86		0.95	0.85	
696	436	P67936	TPM4	28	6	248	28.5	4.69	89.66		-0.28	-0.38	
437	Q14161	ARF	1	1	759	84.5	7.23	2.62		-0.43	-0.24		
438	P31949	Prtein S100-A11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A11 PE=1 SV=2	30	1	105	11.7	7.12	28.94		-0.59			
336	439	AD424R0X1	CEP2	4	2	623	68.9	6.49	5.74		0.13	0.14	
440	Q98W12	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNP PE=1 SV=2	17	2	178	18.9	7.49	16.65		-0.17	-0.14		
713	441	Y8R641	CTSA	7	3	498	56.2	6.61	46.07		0.41	-0.05	
324	442	P28462	MAPK1	6	6	360	41.4	6.98	32.13		0.64	0.47	
474	443	P56537	EIF6	8	8	245	26.6	4.68	196.25	0.58	0.49	0.34	
694	444	Q9H993	Prtein-glutamate O-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARMT1 PE=1 SV=1	3	3	441	51.1	5.76	11.83		0.31	-0.23	
620	445	Q85777	Ubr1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBR1 PE=1 SV=1	61	3	96	10.4	4.48	94.03		-0.12	0.06	
337	446	AD404DFZ2	Arylsulfatase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARSA PE=1 SV=1	3	3	509	53.8	6.07	10.14		0.69	0.37	
492	447	ESR1R5	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SKP1 PE=1 SV=1	5	1	163	18.7	4.7	48		0.55	-0.17	
179	448	P13674	Prlyl-4-hydroxylase subunit alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHAI1 PE=1 SV=2	31	11	534	61	6.01	77.98	-0.21	0.48	0.11	
439	Q9P279	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS27A PE=1 SV=2	39	7	156	18	9.64	40.78		0.82	0.55		
405	450	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	41	21	724	83.2	5.03	225.53	-0.25	0.40	0.33	
275	451	Q1937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIBADH PE=1 SV=2	31	7	336	35.3	8.13	45.26	0.07	-0.18	0.43	
96	452	P0352	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	74	24	501	54.8	6.73	627.57	0.64	-0.47	0.04	
559	453	P02645	Prtein-N-C O-succinyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA PE=1 SV=1	18	8	664	74.1	7.02	73.81		0.45	-0.38	
221	454	Q15417	Galactin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GN3 PE=1 SV=1	18	4	329	35.4	6.05	33.26	0.72	-0.18	-0.31	
673	455	Q08390	Galactin-3-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	17	7	585	65.3	5.27	28.84		0.50	0.37	
87	457	P48147	Prlyl endopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PREP PE=1 SV=2	56	10	28.3	4.89	26.04		-1.52	-1.33		
384	458	AD404MT15	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAB1 PE=1 SV=1	43	22	710	80.6	5.86	102.62	0.09	0.45	-0.27	
127	459	P30038	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH4A1 PE=1 SV=3	25	2	143	15.9	5.05	44.95		-0.52	0.18	
109	460	P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFST PE=1 SV=3	21	9	563	61.7	8.07	62.23	0.27	-0.18	0.07	
126	461	P27021	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2	47	9	297	33.2	6.6	107.76		0.84	0.33	
131	462	PE1160	Actin-related protein 54, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2	38	9	263	29.6	10.15	48.61		-0.78	-0.05	
125	463	AD403ZMM1	Leucocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LLRB3 PE=1 SV=1	15	3	384	44.7	6.74	16.47	0.55		-0.68	
599	464	P12955	Xba-Pro dipeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEPD PE=1 SV=3	7	1	648	71.1	6.86	0		-0.29	0.04	
128	465	Q9BY43	Charged multivesicular body protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHMP4A PE=1 SV=3	37	12	469	54.5	6	112.13	-0.05	0.17	0.16	
130	466	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STIP1 PE=1 SV=1	4	2	222	25.1	4.7	10.45			-0.18	
386	467	Q9A6B3	Isochorismate domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ISOC2 PE=1 SV=1	10	4	543	62.6	6.8	14.15			-0.20	
160	468	PE2081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1	57	5	205	22.3	7.77	31.39		0.77	0.54	
129	469	Q9UKM9	RNA-binding protein Raly OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RALY PE=1 SV=1	44	6	194	22.1	10.1	46.52		-0.78	-0.36	
376	470	Q9BE45	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPNAT1 PE=1 SV=1	28	5	306	32.4	9.17	15.84		0.91	0.63	
417	PD7996	Protasome subunit beta type-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB3 PE=1 SV=2	27	2	184	20.7	7.99	6.52		0.25	0.00		
367	472	P49720	Protasome subunit beta type-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB3 PE=1 SV=2	2	1	1170	129.3	4.94	0		0.25	0.69	
132	473	Q1E493	Regucalcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RCN PE=1 SV=1	26	3	205	22.9	6.55	22.1		0.30	0.45	
513	474	P62244	40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS15A PE=1 SV=2	36	7	299	32.2	6.25	27.45	0.46		0.64	

