

博士論文

高精度定量プロテオミクスによる膠芽腫幹細胞分化の  
リン酸化ネットワーク解析

(Analysis of protein phosphorylation networks in glioblastoma stem cell  
differentiation based on high-accuracy quantitative proteomics)

成島 悠太

## 略語一覽

ACVR2	activin receptor type-2
ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
Akt	protein kinase B
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor 7
BAIAP2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
bFGF	basal fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
CaMK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type-1
CD	cluster of differentiation
CFL1	cofilin-1
CID	collision-induced dissociation
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular regulated kinase
ESI	electrospray ionization
ETD	electron-transfer dissociation
FASP	filter-aided sample preparation
FoxO3a	Forkhead box O3a
GELFREE	Gel-Eluted Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GO	Gene Ontology
H/L ratio	Heavy/Light ratio
HCD	higher-energy collisional dissociation
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ITGA4	integrin- $\alpha$ 4
iTRAQ	isotopic tags for relative and absolute quantification
LC	liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography - tandem mass spectrometry
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
m/z	mass-to-charge ratio
MAPK	mitogen activated protein kinase
MOAC	metal oxide affinity chromatography
MS	mass spectrometry
MYL12A	myosin regulatory light chain 12A
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B

NGFR	nerve growth factor receptor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
PKA	protein kinase A
Q-TOF-MS	quadrupole time-of-flight mass spectrometer
Rho	Ras homolog gene family
RNAi	RNA interference
ROCK	Rho associated protein kinase
SCX	strong cation exchange
SILAC	stable isotope labelling by amino acids in cell culture
Sox	Sry-related HMG box
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TGF- $\beta$	transforming growth factor-beta
TGFBR2	transforming growth factor-beta receptor type-2
TiO <sub>2</sub>	titanium dioxide
TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 目次

第 1 章	序論	1
1.1	研究背景：膠芽腫	1
1.1.1	膠芽腫とがん幹細胞	1
1.1.2	膠芽腫幹細胞とその分化	4
1.1.3	膠芽腫幹細胞分化に関わるリン酸化シグナル伝達	4
1.1.4	GB2 細胞	6
1.2	研究背景：定量リン酸化プロテオミクス	6
1.2.1	質量分析計によるプロテオミクス	6
1.2.2	定量プロテオミクス	8
1.2.3	リン酸化プロテオミクス	11
1.2.4	定量リン酸化プロテオーム情報のデータ解析	12
1.3	研究目的	14
第 2 章	方法	16
2.1	試薬及び抗体	16
2.2	細胞培養	16
2.3	安定同位体アミノ酸による細胞の代謝ラベル化	17
2.4	定量用サンプルの調製	17
2.5	リン酸化ペプチドの濃縮	18
2.6	nanoLC-MS/MS システムによる質量分析	19
2.7	質量分析測定データに基づくタンパク質同定及び定量解析	20
2.8	Gene Ontology 解析	21
2.9	パスウェイ解析	22
2.10	上流キナーゼ予測解析	23
2.11	Western blotting	23
2.12	スフィアアッセイ	24
第 3 章	結果	25
3.1	血清培養による GB2 細胞の分化誘導	25
3.2	無血清及び血清培養 GB2 細胞の比較定量リン酸化プロテオーム解析	27
3.3	リン酸化プロテオーム情報に基づく GO 解析及びパスウェイ解析	35
3.4	リン酸化プロテオーム情報に基づく上流キナーゼ予測解析及び上流制御因子解析	44
3.5	膠芽腫幹細胞分化の TGFBR2 の寄与に関する実験的検討	48
第 4 章	考察	53
	参考文献	59
	補足資料	71

## 第 1 章 序論

### 1.1 研究背景：膠芽腫

膠芽腫(Glioblastoma)は、WHO2007 中枢神経系腫瘍分類において最も悪性度の高い grade 4 に属し、2001-2004 年の日本における原発性脳腫瘍の統計において 10.8%を占め最も頻度の高い脳腫瘍である(1, 2)。脳内周辺組織への高い浸潤性により外科的な完全切除が困難であることから再発率が高く、膠芽腫診断後の平均生存期間は約 1 年と非常に短い(3, 4)。治療法としては腫瘍の外科的切除の後に放射線療法、テモゾロミドによる化学療法を行う Stupp レジメンが標準的に用いられている(5)。過去 30 年の間に、外科的手術の技術支援として術中 MRI 検査及び科学的蛍光法、術後化学療法としてテモゾロミド、放射線療法としてサイバーナイフ治療法が開発され、Stupp レジメンとともに膠芽腫の治療法に進展が見られたが、2006-2010 年の調査における生存期間中央値は 15.8 ヶ月であり治療成績はほとんど改善されていない(6)。最近では血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体で血管新生阻害薬であるベバシズマブを標準的治療法に加えた方法が新たな治療法として報告され、臨床試験の結果で無増悪生存期間の延長(ベバシズマブ使用群 10.6 ヶ月 vs プラセボ群 6.2 ヶ月)は認められたが、全生存期間の延長は見られなかった(2 年生存率: ベバシズマブ使用群 33.9% vs プラセボ群 30.1%) (7)。そのため、膠芽腫の克服に向けて新たなアプローチによる治療法が開発が求められている。本節では、膠芽腫の新たな治療標的として考えられているがん幹細胞とその分化、分化に関わるリン酸化シグナル伝達、本研究で用いた膠芽腫幹細胞である GB2 細胞について概説する。

#### 1.1.1 膠芽腫とがん幹細胞

近年、がんの悪性化及び再発の原因としてがん組織中において自己複製能・多分化能を有する少数のがん細胞集団であるがん幹細胞の存在が注目されている(8)。がん幹細胞は、がん細胞集団の階層の頂点に位置する細胞として提唱され、これまでに白血病(9)を

初めとして脳腫瘍(10)・乳がん(11)・大腸がん(12)・すい臓がん(13)といった多くの腫瘍においてその存在が実験的に証明されている。また、がん幹細胞は高い腫瘍形成能を有し、従来の化学療法及び放射線療法に対する耐性を示すことが明らかとなっており、がん幹細胞の制御ががんの根治に繋がると考えられている(図 1 上)。膠芽腫のがん幹細胞(膠芽腫幹細胞)については、神経幹細胞の表面マーカーとして知られていた CD133 陽性の膠芽腫細胞が自己複製能及び多分化能を有することを 2003 年に Singh らが初めて報告して以来、CD15 や Integrin  $\alpha 6$  といった CD133 以外の表面マーカーによる膠芽腫患者組織からの単離が試みられ、単離された膠芽腫幹細胞の性状解析が精力的に行われている(14, 15)。膠芽腫幹細胞は神経幹細胞と同様の性質を示すことが知られており、持続的な自己複製能、神経細胞やグリア細胞等への多分化能、脳内における高い浸潤能を有することに加え、Nestin、Sox-2 及び Musashi-1 等の神経幹細胞マーカーを高く発現している。さらに、神経幹細胞様性質の他に膠芽腫幹細胞を免疫不全マウスに移植すると高い腫瘍形成能を示すことや高い DNA 修復能により放射線療法に耐性を有することが明らかとなっており、膠芽腫の克服に向けて膠芽腫幹細胞を標的とした治療戦略の開発が求められている(16)。

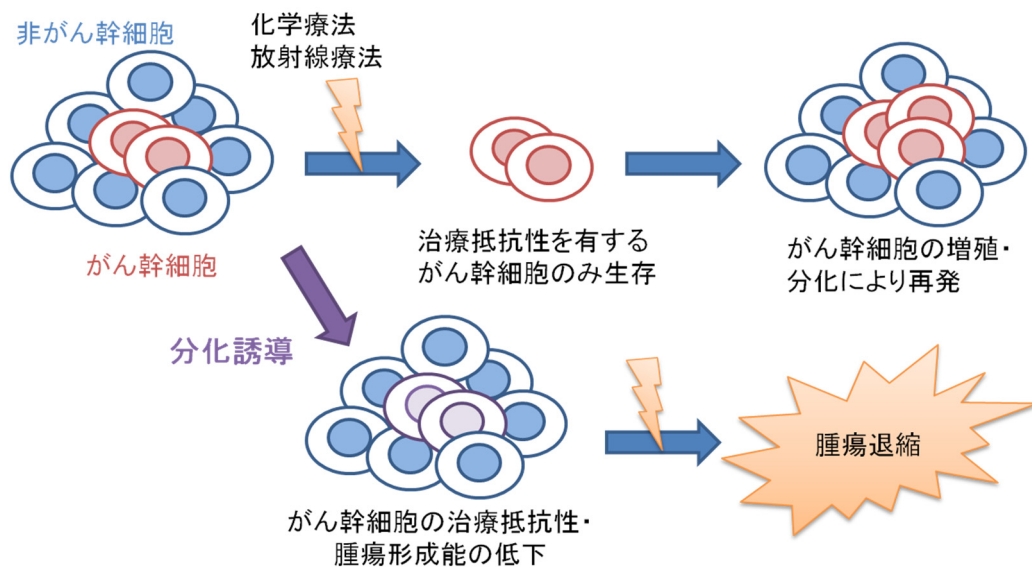


図 1. がん幹細胞の治療抵抗性及び分化誘導療法の概略図

がんの再発・悪性化に寄与しているがん幹細胞の治療抵抗性や腫瘍形成能は分化誘導により減弱又は喪失することが明らかとなっている。

### 1.1.2 膠芽腫幹細胞とその分化

膠芽腫患者の腫瘍組織から単離された膠芽腫幹細胞は、神経幹細胞の培養条件と同様の無血清培地を用いることで *In vitro* において幹細胞性を維持した状態で培養される。無血清培地で培養された膠芽腫幹細胞は患者の膠芽腫組織や正常な神経幹細胞と近い遺伝子型及び遺伝子発現プロファイルを示す一方、がん細胞株の培養に広く用いられる血清含有培地において膠芽腫幹細胞は分化が誘導され、従来の膠芽腫細胞株に近い遺伝子型及び遺伝子発現プロファイルを示し、腫瘍形成能が低下することが明らかとなっている(17)。膠芽腫幹細胞の分化誘導因子としては、miR-124 や miR-137 等の microRNA 及び Smac mimetic 分子 BV6 や all-trans retinoic acid 等の低分子が報告されており、これらによる分化誘導は腫瘍形成能の低下や放射線療法に対する感受性の上昇を引き起こす(18–20)。さらに、膠芽腫幹細胞は免疫抑制サイトカインを分泌して宿主免疫への抑制作用を示すが、血清及び all-trans retinoic acid により分化誘導された膠芽腫幹細胞ではその免疫抑制作用が失われるため、膠芽腫幹細胞の幹細胞性を制御することで免疫療法の効果を向上できると考えられている(21)。これらから、分化誘導により膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能及び放射線療法や免疫療法等の各種療法に対する耐性を低下させることは膠芽腫の新たな治療戦略として期待できる(図 1 下)。一方、*In vivo* において膠芽腫幹細胞は血管周皮細胞へと分化して腫瘍への血管を維持することで膠芽腫の増殖に寄与することも報告されており(22)、膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持及び分化に関する制御機構の解明が求められている。

### 1.1.3 膠芽腫幹細胞分化に関わるリン酸化シグナル伝達

増殖、細胞死や分化等の細胞の運命決定は細胞内シグナル伝達経路により制御され、タンパク質リン酸化はシグナル伝達経路の活性調節に重要な役割を担っている。膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持及び分化においては PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt、BMP (Bone morphogenetic protein)、Wnt、Hedgehog、Notch シグナルが知られており、これら



のシグナル伝達経路の活性は様々なタンパク質のリン酸化活性により制御されている(23, 24)。例えば PI3K/Akt シグナルでは、セリン・スレオニンキナーゼである Akt は下流の転写因子 FoxO3a (Forkhead box O3a)をリン酸化して膠芽腫幹細胞性の維持に関与しており、Akt 自身も膜受容体型キナーゼによるリン酸化を受けることで活性が調節されている(25)。

膠芽腫幹細胞における BMP シグナルではシグナルの起点となる受容体型セリン・スレオニンキナーゼ BMPR1B (BMP receptor type-1B)の遺伝子発現がエピジェネティックな機構により抑制されており、神経幹細胞で見られる BMP 依存的な下流のリン酸化が生じず正常な分化が誘導されない状態となっている(26)。

Wnt、Hedgehog、Notch シグナルは造血幹細胞等の他組織幹細胞においても幹細胞性の維持や分化への関与が知られており、Wnt シグナルにおいて転写因子として働く  $\beta$ -catenin や Hedgehog シグナルの転写因子である Gli1/2 はリン酸化を受けることでユビキチン化が促進され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されることにより Wnt 及び Hedgehog シグナルの活性が調節されている(27)。

また、CD133 陽性の膠芽腫幹細胞は Notch シグナルを阻害されると転写因子 STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)のリン酸化が低下し、腫瘍形成能が低下することが報告されている(28)。

これらの膠芽腫幹細胞分化に関わるリン酸化シグナル伝達の解析は目的タンパク質のリン酸化に特異的な抗体を用いた western blotting によって個別に解析されたものが主となっており、幹細胞性維持及び分化におけるタンパク質リン酸化の全体像は明らかとなっていない。

また、Wurduk らは約 500 種類のキナーゼに対する RNAi スクリーニングを行い、膠芽腫幹細胞の幹細胞性と分化の制御に関わるキナーゼを選別後、特に PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase)ファミリーのセリン・スレオニンキナーゼである TRRAP (Transformation/transcription domain-associated protein)が膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持や腫瘍形成能に重要であることを見出した(29)。

このことから膠芽腫幹細胞の幹細胞性や分化に関わる因子としてタンパク質リン酸化が重要な解析ターゲットであることが示唆される。

#### 1.1.4 GB2 細胞

本研究では研究対象試料として膠芽腫患者組織から単離された膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞を用いた(30–32)。膠芽腫幹細胞は 24 遺伝子の発現パターンに基づいて胎生神経幹細胞と似た性質を示す proneural 型及び成体神経幹細胞と似た性質を示す mesenchymal 型に分類できることが知られている。GB2 細胞はその遺伝子発現パターンから proneural 型に属し、無血清培養下では神経幹細胞と同様のスフィアを形成して増殖することが明らかとなっている(32, 33)。また、低悪性度膠芽腫において高頻度で変異型となっている isocitrate dehydrogenase 1 及び 2 (IDH1/2) 遺伝子に関して GB2 細胞は野生型を示している一方、5-hydroxymethylcytosine によるエピジェネティックな制御が膠芽腫形成に関わる EGFR、AKT3、CDK6、CCND2 や BRAF の発現に寄与することが報告されている(32)。これまでの研究で GB2 細胞は血清培養によってがん幹細胞マーカーである CD133 や神経幹細胞マーカーである Nestin の発現量が低下することが示されている(30)。さらに、GB2 細胞は免疫不全マウスの前頭葉に移植されると高い腫瘍形成能を示すが、血清培養によってその腫瘍形成能が失われることが明らかとなっている(30)。そのため、本研究では GB2 細胞の幹細胞性に関わるリン酸化シグナルを調べるために無血清または血清培養した GB2 細胞を用いた。

## 1.2 研究背景：定量リン酸化プロテオミクス

近年、質量分析技術及びリン酸化タンパク質・ペプチド濃縮技術の飛躍的な進展により、細胞内タンパク質リン酸化の網羅的な定量解析(定量リン酸化プロテオミクス)が可能となっている。本節では本研究で用いた定量リン酸化プロテオーム解析技術の背景について概説する。

### 1.2.1 質量分析計によるプロテオミクス

プロテオームとは生物の細胞や組織等に存在するタンパク質全体を表し、プロテ

オームを対象として大規模に系統的・網羅的なタンパク質の発現やその性質、機能を研究することをプロテオミクスと呼ぶ。細胞内のプロテオームは数万種類に及ぶタンパク質が翻訳後修飾を受けながら複雑に構成されており、その解析には存在量の少ないタンパク質まで測定できる高感度な分析法が必要とされ、液体クロマトグラフィと質量分析計を組み合わせた LC-MS/MS システムによる測定は一度で数千種類以上のタンパク質の同定が可能でありプロテオーム解析における主流の方法となっている(34)。LC-MS/MS システムによるプロテオーム解析法は主に 4 つのステップに分けられる(35)。

1. 細胞や組織から抽出したタンパク質溶液サンプルについて、酵素消化によるペプチド断片化を行う。酵素消化にはタンパク質中のリジン・アルギニンの C 末端側を切断するエンドペプチダーゼであるトリプシンが主に用いられている。また、タンパク質サンプルの複雑さに応じて酵素消化前の分画も行われており、分画には一次元電気泳動を用いた方法がよく用いられ、トリプシンを用いたゲル内消化によりペプチドを抽出する。最近では分画したタンパク質を液中で回収できる Gel-Eluted Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis (GELFREE) システム(36)や液中で消化可能な Filter-Aided Sample Preparation (FASP)法(37)が開発されている。

2. 断片化ペプチド溶液を液体クロマトグラフ装置により分画し、イオン化装置によりペプチドをイオン化及び気化し質量分析装置へと流入させる。ペプチドの分画には主に逆相カラムが用いられ、その疎水性に従ってペプチドが溶出される。ペプチドのイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)が頻用されており、ペプチド溶液を霧状に放出させ、高電場下において溶液を蒸発させることで正電荷にイオン化されたペプチドが得られる。

3. 質量分析装置によりイオン化されたペプチドの質量電荷比( $m/z$ )を測定(MS 測定)し、一定の条件で選択したペプチドをさらに開裂(フラグメンテーション)させ生じたイオンの測定(MS/MS 測定)を行う。フラグメンテーションの方法には衝突誘起解離法(CID)、高エネルギー衝突解離法(HCD)、電子移動解離法(ETD)があり、解析対象のペプチドの種類により

適したものをを用いる。プロテオミクスにおける MS 測定及び MS/MS 測定には、四重極型質量分析計と飛行時間型質量分析計を組み合わせた四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-TOF-MS) や、リニアイオントラップと Orbitrap アナライザを組み合わせたハイブリッド質量分析計 (LTQ-Orbitrap) が頻用されている。Q-TOF-MS は前段に 4 本の円筒形の電極により電場を調節してイオンの選別が可能な四重極型質量分析装置があり、後段に高真空下の質量分析装置内で電圧をかけられ加速したペプチドイオンが検出器に届くまでの時間差から質量を高感度に測定できる飛行時間型質量分析計が組み合わされている。一方、LTQ-Orbitrap は大量のイオンをトラップできるリニアイオントラップ型質量分析計と非常に高い分解能と分析精度を持つフーリエ変換型質量分析計を組み合わせた質量分析計である(35, 38)。

4. 質量分析測定から得られたスペクトルデータに基づきタンパク質の同定を行う。タンパク質の同定は質量分析で得られたペプチドの質量及び断片化ペプチドの質量と一致するペプチドをタンパク質の配列データベースから検索し、同定スコアを算出することで信頼性の高い同定が行われている。ペプチド同定を行う検索エンジンには商用ソフトウェアである Mascot(39)及び SEQUEST(40)が主に用いられ、X!Tandem(41)や Andromeda(42)といったフリーのソフトウェアも開発されている。

### 1.2.2 定量プロテオミクス

定量プロテオミクスは非処理群、刺激処理群といった 2 つ以上の異なった状態の細胞もしくは組織についてタンパク質量を網羅的に比較解析する方法であり、Q-TOF-MS や LTQ-Orbitrap により高感度・高精度な定量解析が可能になって以来、タンパク質の解析に非常に有効な方法となっている。定量プロテオミクスの比較定量法にはタンパク質又はペプチドを安定同位体標識するラベル化法が主に用いられており、細胞内のタンパク質を安定同位体アミノ酸で標識する Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture

(SILAC)法と質量分析測定前のペプチドに安定同位体標識タグを結合させる isotopic Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ)法が頻用される(43) (図 2)。SILAC 法は非放射性安定同位体の  $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  で標識したアルギニン及びリジンを中心に用い、これらのアミノ酸を加えた培養液中で細胞を培養し、細胞内の全てのタンパク質を代謝ラベル化する方法である。各々のアミノ酸でラベル化した細胞に処理を加え(あるいは未処理で)、タンパク質を抽出したすぐ後に等質量比で混ぜた上で質量分析までの解析を行うことで、MS 測定時に別々の安定同位体で標識された同じ配列ペプチドが  $m/z$  の違いから別々のピークとして測定され、それらのピーク強度がペプチド量の変動を反映しているため比較定量ができる(44)。一方、iTRAQ 法は各々処理を行った細胞から抽出したタンパク質を酵素消化まで行い、得られたペプチドに安定同位体標識タグを付けた上で混合して質量分析を行うことで、MS/MS 解析時に安定同位体標識タグから発生するフラグメントイオンのピーク強度から比較定量ができる(45)。SILAC 法は代謝標識法であるため培養細胞の標識を容易に行えるが、iTRAQ 法は酵素消化後のペプチドに対して標識するため SILAC 法に適さないサンプルの標識もできる利点がある。しかし、SILAC 法は質量分析用サンプル調製初期の段階で比較するサンプルの混合を行うため、分画や濃縮等のサンプル調製時に生じる誤差を最小限に抑えられる利点があり、iTRAQ 法はサンプル調製過程の最後で標識して混合するため SILAC 法に比べ誤差が生じやすい(46)。特にリン酸化等の翻訳後修飾を受けたタンパク質は細胞内での存在量が少ないため、調製時の誤差をなるべく少なくする必要がある。

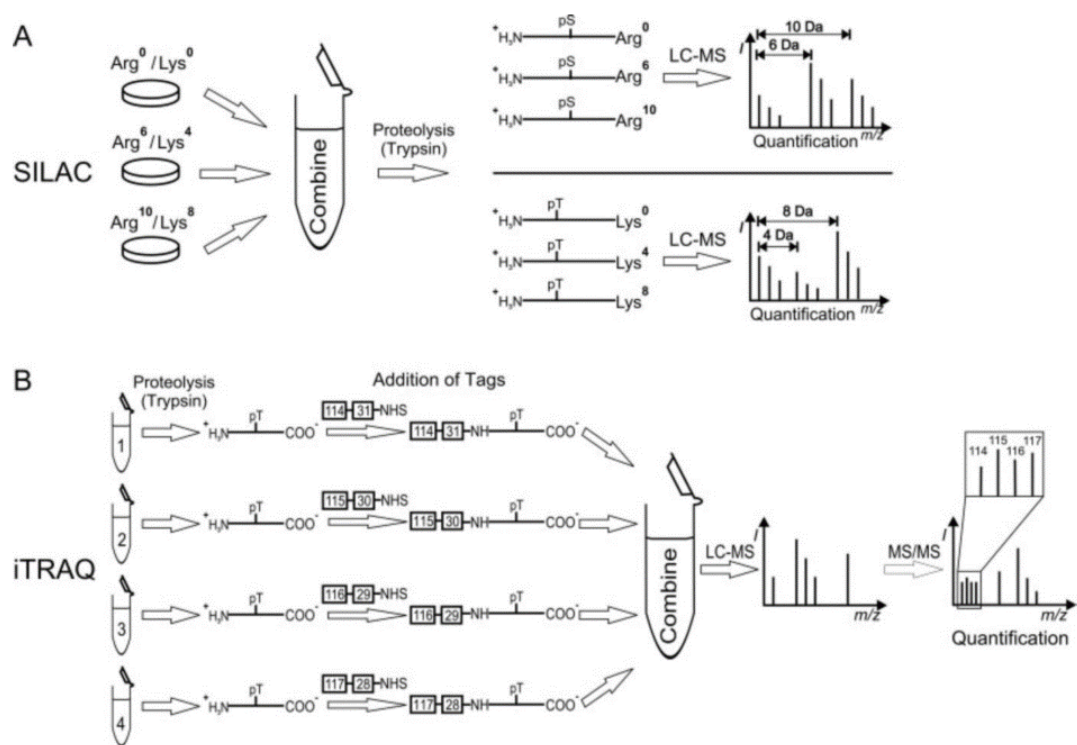


図 2. SILAC 法及び iTRAQ 法の概略図

(A) SILAC 法の概略図。安定同位体アミノ酸で標識した細胞からタンパク質を回収後すぐに混和して酵素消化等のサンプル調製及び質量分析測定を行う。MS 測定時に安定同位体アミノ酸の分だけ  $m/z$  がシフトしたピークを比較することで定量できる。

(B) iTRAQ 法の概略図。タンパク質の酵素消化後のペプチドに対し分子量が異なるタグを化学結合させて質量分析測定を行う。これらのタグの分子量が異なるレポーターイオンはペプチドのフラグメンテーション時に放出され MS/MS 測定時にピークを比較することで定量できる。

(John Wiley & Sons, Inc.の許諾を得て[39]より転載)

### 1.2.3 リン酸化プロテオミクス

タンパク質リン酸化の解析は従来、放射性同位体元素の  $^{32}\text{P}$  による代謝ラベル化、抗リン酸化抗体による **western blotting**、解析対象のリン酸化部位のアミノ酸置換といった方法が用いられてきた。これらの方法はタンパク質リン酸化に関する数々のデータが生み出し現在も有効な方法であるが、高感度及び高精度な質量分析計はタンパク質リン酸化の状態を一度に大量に解析することが可能であり、現在のリン酸化プロテオミクスには欠かせない方法となっている。しかし、前述の通りリン酸化タンパク質は非リン酸化タンパク質に比べその存在量は少なく、通常のプロテオーム解析に用いられるペプチドサンプル中の **0.2%**以下とも言われており、リン酸化プロテオミクスにはリン酸化タンパク質又はリン酸化ペプチドの濃縮が必要である(47)。

リン酸化タンパク質の濃縮には抗リン酸化抗体を用いた免疫沈降法、リン酸化ペプチドの濃縮には強陽イオン交換体(**SCX**)カラムによるクロマトグラフィ、固定化金属親和性クロマトグラフィ(**IMAC**)や酸化金属親和性クロマトグラフィ(**MOAC**)が主に用いられているが、本項では本研究で用いた二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )による **MOAC** について概説する。**MOAC** は酸化金属とリン酸化が配位結合する性質を利用した方法であり、リン酸化ペプチドを含むリン酸化エステルの抽出法として最初に開発された  $\text{TiO}_2$  を用いた方法が頻用されている(48, 49)。 $\text{TiO}_2$ にはリン酸化ペプチド以外にも非リン酸化酸性ペプチドが結合してしまう問題があり、**2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)**を競合させることでリン酸化ペプチドを高収率で回収する方法が開発されたが、**LC-MS/MS** システムを用いた解析には適さなかった。そのため **Sugiyama** らは  $\text{TiO}_2$ に対してリン酸化ペプチドより弱く、酸性ペプチドより強く結合する乳酸等の脂肪族ヒドロキシカルボン酸を用いた方法を開発した(50)。リン酸化ペプチド濃縮後の脱塩のステップで乳酸は容易に除くことができ、**LC-MS/MS** 解析において非常に高収率(約 **90%**)でリン酸化ペプチドを測定可能な方法となっており広く用いられている。

#### 1.2.4 定量リン酸化プロテオーム情報のデータ解析

リン酸化プロテオーム解析技術の進歩によりタンパク質のリン酸化部位の同定情報は急速に蓄積されているが(51)、定量リン酸化プロテオーム情報の有効なデータ解析方法は未だ模索されている。私は本研究で得られたタンパク質及びそのリン酸化部位について、タンパク質相互作用情報及びキナーゼ-リン酸化部位情報を視覚化するためにネットワーク視覚化・解析ツールである **Cytoscape** のプラグインを作成し(52)、リン酸化ネットワークの視覚化を行ったが、図 3 のように非常に複雑なネットワークが描出され、活性化している分子やネットワークを抽出するためには多角的なバイオインフォマティクス解析が必要であることが示された。定量リン酸化プロテオーム情報のバイオインフォマティクス解析にはプロテオーム情報に対して使われる手法が頻用されており、タンパク質についてその機能及び局在情報等を関連付けする **Gene Ontology** 解析(53)や、文献で報告されているパスウェイ情報から関連するタンパク質を有意に含むパスウェイを抽出するパスウェイ解析(54)が行われているが、これらの手法はリン酸化部位に関する情報を考慮できない欠点がある。そのため、リン酸化部位に関する解析法として、リン酸化部位前後のアミノ酸配列の傾向を調べるモチーフ解析を利用して、キナーゼ特異的なモチーフの情報からリン酸化部位のリン酸化状態を制御している上流キナーゼの予測解析が行われている(55)。しかし、モチーフ情報のみに基づくキナーゼ-リン酸化部位関係の予測には偽陽性結果が多く見られるため、文献の相互作用情報を考慮した解析法が開発されるとともに予測の基準となるキナーゼのモチーフ情報も更新されており、リン酸化部位の解析法は現在も成長過程にある(56, 57)。これらの解析法を組み合わせながら、網羅的なリン酸化部位の定量情報から生物学的に意義のある情報を抽出する解析プラットフォームが確立されることで、生命システム解析におけるリン酸化プロテオミクスの重要性は更に大きくなると考えられる。



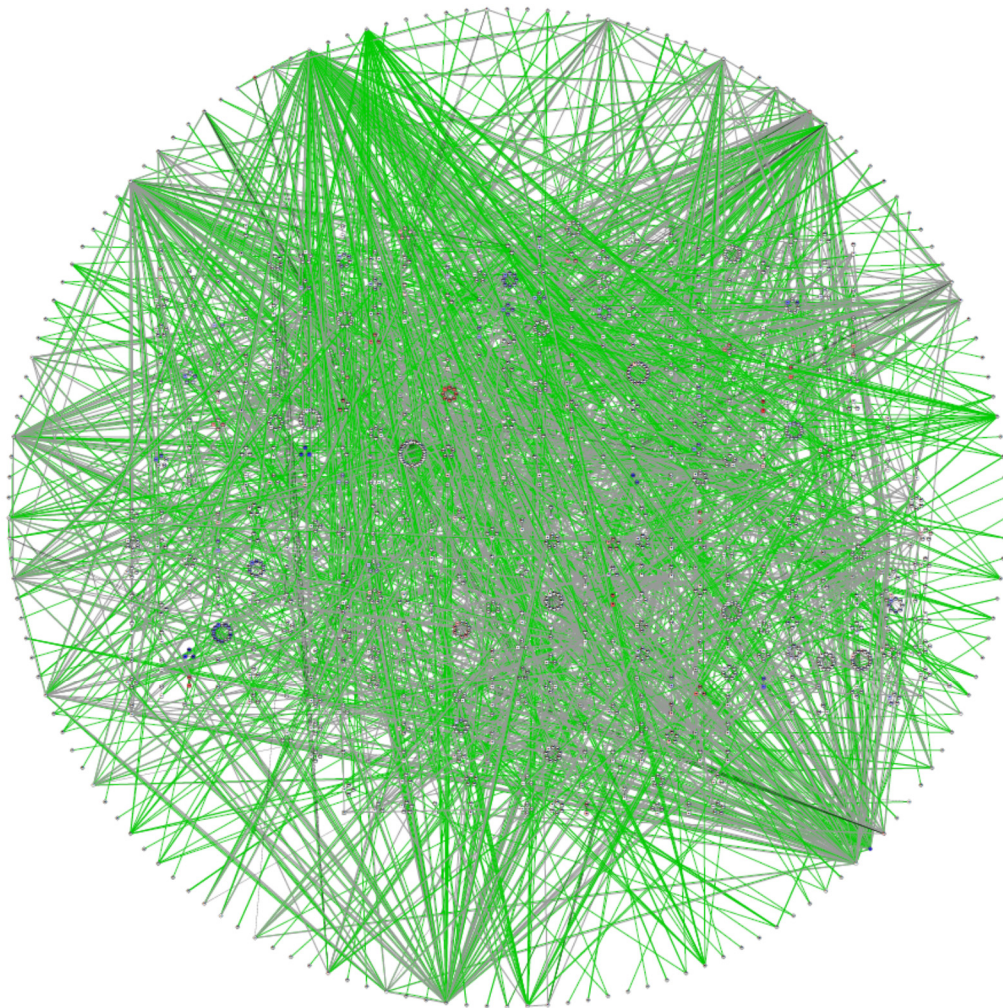


図 3. GB2 細胞分化のリン酸化ネットワークの可視化

160 キナーゼを含む 1,313 タンパク質と 2,426 リン酸化部位のネットワーク図。

キナーゼを円状に配置し、円の内側にキナーゼ以外のタンパク質及びリン酸化部位を配置した。線は緑色がキナーゼ-リン酸化部位関係、灰色がその他の相互作用を表す。

### 1.3 研究目的

本研究は膠芽腫幹細胞の分化誘導におけるリン酸化変動の全体像を明らかにし、幹細胞性維持及び分化に関して新たな知見を見出すことを目的として、幹細胞性が維持された細胞と分化誘導された細胞との比較定量リン酸化プロテオーム解析を試みた。本研究では膠芽腫患者の組織から単離した膠芽腫幹細胞株である **GB2** 細胞を用いて血清培地による分化誘導を行い、比較定量法に **SILAC** 法、リン酸濃縮法に **TiO<sub>2</sub>** カラム、質量分析測定には **LTQ-Orbitrap Velos** にナノ流速クロマトグラフィ装置を **on-line** で接続した **nanoLC-MS/MS** 装置を利用して解析を行った(図 3)。定量リン酸化プロテオームデータに基づく **Gene Ontology** 解析、パスウェイ解析、上流制御因子解析といったバイオインフォマティクス解析により膠芽腫幹細胞の幹細胞性に関わるシグナルパスウェイ及び分子の抽出を行い、得られた分子の膠芽腫幹細胞への寄与に関して実験的検討を行った。

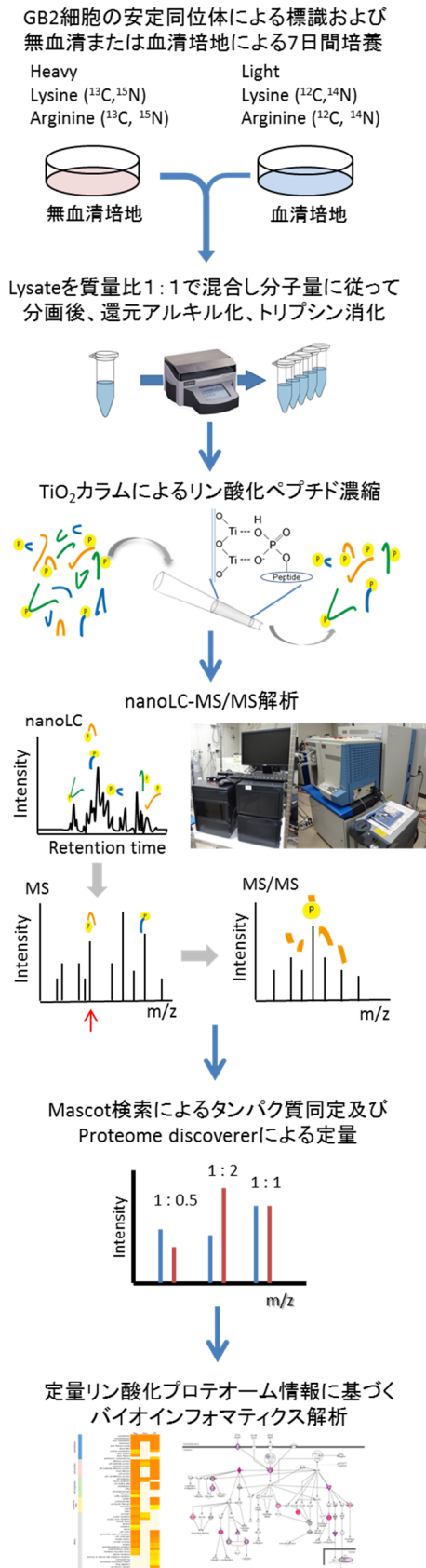


図 4. GB2 細胞分化の定量リン酸化プロテオーム解析の概略図

## 第2章 方法

### 2.1 試薬及び抗体

TGFBR1 阻害剤 SB431542、上皮成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)は Wako から購入した。TGFBR1/2 二重阻害剤 LY2109761 は Selleckchem から購入した。LY2109761 及び SB431542 は dimethylsulfoxide (DMSO)を用いて 10 mg/ml に調製した。抗 Sox2 ヤギ由来ポリクローナル抗体(#sc-17320)、抗 TGFBR2 ウサギ由来ポリクローナル抗体(#sc-400)、抗 ACVR2 ウサギ由来ポリクローナル抗体(#sc-25451)及び HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 GFAP ウサギ由来ポリクローナル抗体は Dako から購入した。抗リン酸化 Src (416 番目のチロシン; Tyr416, Fyn-Tyr420 反応性)ウサギ由来ポリクローナル抗体(#2101)、抗リン酸化 ERK1 (Thr202/Tyr204), ERK2(Thr185/Tyr187)ウサギ由来ポリクローナル抗体(#9101)、抗 ERK1/2 ウサギ由来モノクローナル抗体(#4370)及び抗 c-Myc マウス由来モノクローナル抗体(#5605)は Cell Signaling Technology から購入した。抗 $\alpha$ -Tubulin マウス由来モノクローナル抗体(#CP06)は Calbiochem から購入した。HRP 標識抗マウス IgG 抗体及び HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体は GE healthcare から購入した。

### 2.2 細胞培養

東京大学医学部附属病院にてインフォームド・コンセントを得た膠芽腫患者の組織から単離・樹立された膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞を東京大学分子細胞生物学研究所分子情報研究分野秋山研究室より譲受した。本研究は東京大学医科学研究所倫理委員会の承認を取得している。GB2 細胞の培養は、幹細胞性を維持するために Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)培地に B27 supplement (ビタミン A 不含)、EGF (20 ng/ml)、bFGF (20 ng/ml)を添加した無血清培地にて行い、2~3 日ごとに EGF、bFGF を追加した。幹細胞性を維持させながら浮遊系でスフィア (凝集した細胞塊)を形成させて培養する場合、表面未処理のプラスチック製シャーレ上で培養し、6~7 日ごとに 1/4 量

を継代した。スフィアの継代は、回収したスフィアを細胞分散溶液 **Accumax (Innovative Cell Technologies)**により 37°Cで 30 分間処理し、細胞を均一に分散させて行った。幹細胞性を維持したまま接着状態で培養する場合は **Pollard** らの方法に従い(58)、PBS により 10 µg/ml に調製した **laminin (Sigma)**にて 2 時間以上表面処理したシャーレを用い、コンフルエントの 80%程度になった際に 1/4 量を継代した。接着細胞の継代は、培地を除いたシャーレ上に 0.05% **Trypsin-EDTA** を加え、5 分間の処理により細胞を剥離させて行った。GB2 細胞の分化誘導系としては **DMEM/F12** に 10%**FBS (Fetal bovine serum)**を添加した血清培地を用いた。GB2 細胞に対するキナーゼ阻害剤の効果は、継代時の培地中に **DMSO** 又は **TGFBR1** 阻害剤(**SB431542**) 20 µM 又は **TGFBR1/2** 二重阻害剤(**LY2109761**) 20 µM を添加して検討した。全ての細胞は 37°C、5% (v/v) **CO<sub>2</sub>** で維持されたインキュベーター内で培養された。

### 2.3 安定同位体アミノ酸による細胞の代謝ラベル化

**SILAC** 法を利用した質量分析により細胞内タンパク質の比較定量解析を行うために、安定同位体標識されたアミノ酸を含む培地を用いて **GB2** 細胞を代謝ラベル化した。代謝ラベル化用培地として **DMEM/F12 for SILAC (Thermo Scientific)**に安定同位体標識のリジン(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub> L-lysine)、アルギニン(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub> L-Arginine)を加えた **Heavy** 培地及び通常のリジン(<sup>12</sup>C<sub>6</sub>,<sup>14</sup>N<sub>2</sub> L-lysine)、アルギニン(<sup>12</sup>C<sub>6</sub>,<sup>14</sup>N<sub>4</sub> L-Arginine)を加えた **Light** 培地を用いた。リジン及びアルギニンの終濃度は各々 146~36.5 mg/l 及び 84~21 mg/l で細胞の発育状態及び幹細胞マーカーの発現量を検討した上で、36.5 mg/l 及び 21 mg/l とした。幹細胞性が維持された状態で細胞内タンパク質を均一に代謝ラベル化するため、**laminin** 処理シャーレで接着状態の **GB2** 細胞を無血清の **Heavy** 培地及び **Light** 培地において 6 回以上倍加させた。

### 2.4 定量用サンプルの調製

通常のアミノ酸が含まれた **Light** 培地でラベル化した **GB2** 細胞に対し、無血清培地を血清培地へと交換し、7 日間培養することで分化を誘導した。安定同位体標識アミノ酸

が含まれた Heavy 培地でラベル化した GB2 細胞については未分化状態を維持させた。各々の細胞を PBS にて 3 回洗浄後、セルスクレーパーを用いて回収し、ホスファターゼ阻害剤カクテルである PhosSTOP (Roche Diagnostics) 及び核酸分解酵素である Benzonase (Novagen) を添加したタンパク質抽出液 UPX Universal Protein Extraction Buffer (Protein Discovery) に溶解させ、細胞溶解液とした。4°C、15,000 rpm、30 分間遠心した後、上清をタンパク質溶液として回収し、BCA Assay Kit, Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific) を用いてタンパク質量を定量した。無血清培養した Heavy 標識細胞及び血清培養した Light 標識細胞から得られたタンパク質溶液を等量で混合し(250 µg : 250 µg)、液中でタンパク質が回収可能な GELFREE8100 分画システムにより 10% カートリッジを用いて、タンパク質を分子量に従って分画した。各分画中のタンパク質をペプチド断片とするため、Filter-Aided Sample Preparation (FASP) 法による酵素消化を行った(37)。FASP 法の概略は以下の通りである。まず、タンパク質溶液をフィルター上に乗せ、8M 尿素を含むバッファーにより 2 回洗浄して界面活性剤を完全に除いた。次に、フィルター上のタンパク質に対し、90 分間の 1 mM ジチオスレイトール処理による還元化、30 分間の 5.5 mM ヨードアセトアミド処理によるアセチル化を行った。最後に、フィルター上の還元アルキル化されたタンパク質にトリプシンを加え一晩酵素消化した後、断片化ペプチドを含むタンパク質消化液を遠心により回収した。

## 2.5 リン酸化ペプチドの濃縮

球状に合成された TiO<sub>2</sub> 結晶を固定化したチップカラムを含む Titansphere Phos-TiO Kit (GL Sciences) を用い、断片化ペプチドを含むタンパク質消化液からリン酸化ペプチドを濃縮した。平衡化したチップカラムの上にタンパク質消化液を乗せ、乳酸バッファーと混和した。遠心してカラム上の液を除き、さらにカラムの洗浄を行った後、カラムに吸着したリン酸化ペプチドを 5% アンモニウム溶液及び 5% ピロリジン溶液にて溶出

した。リン酸化ペプチド溶液を 10%トリフルオロ酢酸により酸性化し、ZipTip C18 (Millipore)を用いて脱塩を行った後、減圧濃縮機により 10  $\mu$ l 以下まで濃縮し質量分析用サンプルとした。

## 2.6 nanoLC-MS/MS システムによる質量分析

ナノ流速クロマトグラフ装置 Dina-2A (KYA Technologies) と高精度質量分析計 LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)をオンラインで接続した nanoLC-MS/MS システムにより、計 16 サンプルのリン酸化ペプチド濃縮液の質量分析測定を行った。nanoLC の条件として、ペプチドサンプルを流速 10  $\mu$ l/min にて C18 逆相カラムに注入・吸着させ、溶媒 A (2%アセトニトリル/0.1%ギ酸水溶液)と溶媒 B (40%アセトニトリル/0.1%ギ酸水溶液)を用いリニアグラジエントとして流速 300 nl/min で分離を行った。続けて、ナノエレクトロスプレーイオン源 (KYA Technologies)からペプチドを噴霧し、生成したプリカーサーイオンを質量分析計へと導入し MS 解析を行った。さらにプリカーサーイオンを衝突誘起解離法(CID)により開裂させプロダクトイオンを生成し MS/MS 解析を行った。MS スペクトル取得及び MS/MS スペクトル取得が自動的に切り替わるデータ依存モードにより質量スペクトルデータを得た。MS スペクトルは全て m/z 範囲 380-2,000 において、target value 1,000,000 及び m/z 400 における分解能 100,000 のフーリエ変換質量分析により取得した。MS スキャンにおいてイオン強度 2,000 以上の高いピークを 20 種まで順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した(CID, Normalized collision energy 35%, Activation time 10 ms)。質量測定精度の高い測定を行うため、質量校正用標準物質として polydimethylcyclosiloxane イオン(m/z = 445.120025)を用いた lock mass 法による補正を利用した。

## 2.7 質量分析測定データに基づくタンパク質同定及び定量解析

タンパク質同定ソフトウェアである Mascot Ver. 2.4.1 (Matrix Science)を用い、質量分析測定から得られた MS 及び MS/MS データについて、RefSeq (National Center for Biotechnology Information)のヒトタンパク質データベース(35,853 シーケンス、2013 年 2 月 4 日時点)をターゲットデータベースとして検索を行い、ペプチド及びタンパク質を同定した。検索条件は以下の通りに設定した。

消化酵素 (Enzyme): Trypsin

許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages): 2

化学的修飾 (Fixed Modifications): システインのカルバミドメチル化

可変修飾 (Variable Modifications): メチオニンの酸化、タンパク質 N 末端のアセチル化、グルタミン N 末端のピログルタミル化、セリン・スレオニン・チロシンのリン酸化、リジン・アルギニンの安定性同位体標識(<sup>13</sup>C 及び <sup>15</sup>N)

MS 測定における質量許容差 (Peptide Mass Tolerance):  $\pm 3$  ppm

MS/MS 測定における質量許容差 (Fragment Mass Tolerance):  $\pm 0.8$  Da

Mascot ソフトウェアにより、ターゲットデータベースの逆配列である Decoy データベースに対し同時検索を行い、False Discovery Rate (FDR) 1%未満となる基準スコアを用いたフィルタリングによりペプチドを同定した。安定同位体標識ペプチドのピーク強度比による比較定量及び PhosphoRS アルゴリズムによるペプチド上のリン酸化修飾位置の確率計算には Proteome Discoverer Ver. 1.3 (Thermo Fisher Scientific)を用いた。PhosphoRS による確率計算に基づき、site probability 75%以上のリン酸化ペプチドについてそのリン酸化のアミノ酸残基と位置を同定した。同定・定量されたペプチドごとの相対定量値(Heavy/Light: H/L ratio)について相対標準偏差(RSD)を計算して定量結果の精度の評価を行った。相対定量値に基づく更なる解析を行うため、相対定量値について 2 を底とする対数変換及び中央値を 0 とする補正を行った。誤同定を避けるために 1 ペプチドのみで同定されたタンパク質



を除去した後、得られたデータから同じリン酸化部位を含むリン酸化ペプチドをまとめたリン酸化アイソフォームについて平均相対定量値を計算した。リン酸化プロテオーム解析では酵素消化による切れ残りや 2 ヶ所以上のリン酸化が生じているペプチドが同定されることがあり、これらを整理するために表 1 のように同じリン酸化部位を持つ分子種をリン酸化アイソフォームとしてデータの整理を行った(59)。本研究では、平均相対定量値が 2 倍以上変動したリン酸化アイソフォーム( $\log_2[\text{H/L ratio}] > 1$  又は  $\log_2[\text{H/L ratio}] < -1$ )を含むタンパク質を血清培養による分化誘導で変動が見られたリン酸化タンパク質とした。

表 1. リン酸化アイソフォームを用いたデータ整理

リン酸化アイソフォーム (タンパク質名-リン酸化部位)	アミノ酸配列 (小文字:リン酸化部位)	酵素消化 切れ残り数	
MAPK1-Y187	VADPDHDHTGFLTEyVATR	0	} 同一 } } 同一 } } 同一 } } 同一 }
MAPK1-Y187	VADPDHDHTGFLTEyVATRwYR	1	
MAPK1-T185;Y187	VADPDHDHTGFLtEyVATR	0	
MAPK1-T185;Y187	VADPDHDHTGFLtEyVATRwYR	1	

## 2.8 Gene Ontology 解析

リン酸化タンパク質に関する Gene Ontology (GO)解析は、ネットワーク解析ツール Cytoscape のプラグインで、遺伝子及びタンパク質について過剰出現する GO タームを抽出可能である Biological Networks Gene Ontology tool (BiNGO) Ver. 3.0.2 を用いた(60)。3つの GO カテゴリー(Molecular function、Cellular component、Biological process)について、フィッシャーの正確確率検定により p-value を求め、p-value から Benjamini & Hochberg の多重検定補正法に基づいて q-value を計算し、q-value が 0.01 未満の GO タームを入力タンパク質と有意に関連する GO タームとした。リン酸化活性が無血清培養で 2 倍以上亢進、血清培養で 2 倍以上亢進した 2 群のリン酸化タンパク質及び変動しなかったリン酸化タンパク質を解析し、血清による分化誘導で変動した 2 群のリン酸化タンパク質に特徴的な GO タームを抽出した。

## 2.9 パスウェイ解析

パスウェイ解析及び上流制御因子解析はネットワーク解析ソフトである **Ingenuity Pathway Analysis (IPA®)**, QIAGEN, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity))を用いた。血清培養による 2 倍以上のリン酸化変動が見られたタンパク質の **RefSeq ID** と定量値を入力した。入力したタンパク質群と関連のあるパスウェイ及び上流制御因子について **Ingenuity Knowledge Base** から **core analysis** モードを用いて解析した。**Ingenuity Knowledge Base** は数百万に及ぶタンパク質、遺伝子、複合体、細胞、組織、薬剤、疾患等の相互作用情報からなるデータベースであり、これらの情報は博士号取得者により精査された文献情報に基づいている。解析の条件はデフォルトの設定を利用した。関連性の高さはフィッシャーの正確確率検定(片側検定)により **p-value** として算出した。

別のネットワーク解析ソフトとして **KeyMolnet (KM Data Inc.)**を用いたネットワーク作成及びパスウェイ解析を行った。**KeyMolnet** は分子間の関係性(リレーション)の集合体であるネットワークを中心に、分子に関連しているパスウェイ、疾患や医薬品情報を収録した解析ソフトウェアであり、リレーションに基づいた統計解析が可能な点が **IPA** と異なっている。**KeyMolnet** のタンパク質データベースが **Uniprot ID** に基づいているため、血清培養による 2 倍以上のリン酸化の変動が見られたタンパク質の **Uniprot ID** と定量値を入力した。相互関係検索法により、入力したタンパク質の中で互いにリレーション情報が存在する分子を抽出しネットワークを形成した。検索条件は下記の通りに設定した。

相互作用関係検索のデータベース : **Core** コンテンツの直接+/-及び発現+/-

パス数上限 : 1

得られたネットワークと関連のあるパスウェイを **KeyMolnet** カノニカルパスウェイから **p-value** と共に抽出した。**p-value** は得られたネットワークのリレーションとカノニカルパスウェイのリレーションの重複から超幾何分布に基づいた計算により算出した。

## 2.10 上流キナーゼ予測解析

タンパク質リン酸化部位情報に基づく **NetworkKIN** によるキナーゼ予測及びその予測結果に基づく統計プログラム **R** による統計解析が可能である **PhosphoSiteAnalyzer** を用いて上流キナーゼ予測解析を行った(61, 62)。**NetworkKIN** 及び **PhosphoSiteAnalyzer** に入力するため、リン酸化部位についてタンパク質 ID (RefSeq ID)、アミノ酸残基、残基番号、相対定量値及び相対定量値に基づくサブセット情報(Serum[-]: H/L ratio > 2.0, Serum[+]: H/L ratio < 0.5)をまとめた **txt** ファイル、タンパク質 ID 及び配列情報をまとめた **fasta** ファイルを定量リン酸化プロテオームデータから **perl** プログラムを用いて作成した。タンパク質リン酸化部位のモチーフ情報及び相互作用情報からキナーゼが予測可能な **NetworkKIN** により、リン酸化部位に対するキナーゼ及び 3 つのスコア(Motif score、Context score 及び **NetworkKIN score**)を得た。**PhosphoSiteAnalyzer** により、キナーゼ-基質予測結果についてスコアに基づいたフィルタリング(Motif score > 0.1, Context score > 0.8, **NetworkKIN score** > 3, Minimum percent of best **NetworkKIN score** > 80%)を行い偽陽性の予測結果を 5%未満にした後、得られたキナーゼ-基質関係の有意な偏りが見られるサブセットについてフィッシャーの正確確率検定から **p-value** を計算した。**p-value** から **Benjamini & Hochberg** の多重検定補正法に基づいて計算された **q-value** が 0.05 未満の場合を有意な偏りとした。

## 2.11 Western blotting

浮遊系細胞では培地ごと細胞を回収し、4°C、3,000 rpm、10 分間遠心後、上清を除去し、氷冷 PBS にて細胞を洗浄した。接着系細胞ではシャーレ中の培地を除去し、氷冷 PBS にて細胞を洗浄後、細胞を回収した。洗浄及び回収した細胞を可溶化バッファー (8M 尿素/0.5M Tris-HCl)に可溶化し、60 分間の氷冷後、4°C、15,000 rpm、30 分間遠心し、上清をタンパク質溶液として回収した。タンパク質溶液のタンパク質濃度は **BCA Protein Assay Kit (Pierce)**を用いて測定した。10~40 µg 分のタンパク質溶液を **SDS-PAGE** サンプ

ルバッファー (0.06M Tris-HCl, 1% SDS, 10% glycerol, 5% 2-ME)と混和し、95°Cで3分間処理した。処理した試料を泳動バッファー(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)中で濃縮ゲル(3 % polyacrylamide, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1%SDS)及び分離ゲル(10% polyacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS)に20 mA の定電流で泳動した。分離後のゲルを転写バッファー (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 20% methanol)に浸し、トランスブロット SD (Bio-Rad)を用い25 V の定電圧でPVDF 膜(Bio-Rad)に転写した。転写後の膜を2.1に記載した1次抗体と反応させ、1次抗体に応じたHRP 標識2次抗体を反応させた後、発色基質としてLuminata Forte Western HRP Substrate (Millipore)を加え、ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad)により検出した。

## 2.12 スフィアアッセイ

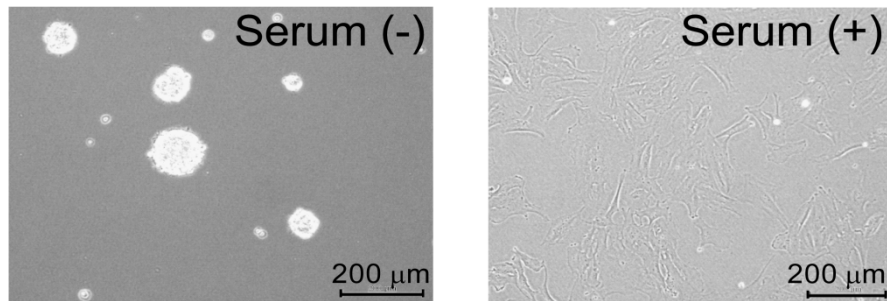
スフィア形成状態のGB2細胞を回収後、37°C、30分間のAccumax処理により細胞を均一に分散させた。血球測定板を用いて細胞数を数えた後、DMSO又はTGFBR1阻害剤(SB431542)10~20 µM又はTGFBR1/2二重阻害剤(LY2109761)10~20 µMを添加した無血清培地により調製した1,000及び500 cells/100 µlの細胞懸濁液を表面非処理の96 wellプレートに100 µl/well加えた。7日間の培養後、位相差顕微鏡を用いて各wellにおける直径50 µm以上のスフィアを数え、自己複製能の評価を行った。スフィア形成数の違いはStudentのt検定(両側検定)によりp-valueを計算し、0.05未満を有意とした。

## 第3章 結果

### 3.1 血清培養による GB2 細胞の分化誘導

膠芽腫幹細胞の幹細胞性・分化に関わるリン酸化プロテオームを解析するために、本研究では膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞を用いた。GB2 細胞は無血清培地において神経幹細胞と同様のスフィア形成能を示すと共に神経幹細胞マーカーを高く発現し、幹細胞性が維持されることが報告されている (30, 31, 63)。GB2 細胞の幹細胞性を低下させる方法として、膠芽腫幹細胞を分化誘導させて多分化能の有無を調べるために頻用されている血清培地による方法を用いた(17, 64)。まず、血清培養における GB2 細胞の形態の変化を観察したところ、無血清培養では浮遊系細胞でスフィアを形成しながら増殖したが、7 日間の血清培養では接着系細胞へと変化し単一層での増殖が見られた(図 5A)。Western blotting により無血清培養または血清培養した GB2 細胞における幹細胞マーカー(Sox2)、分化マーカー (Glial fibrillary acidic protein: GFAP)の発現量を調べたところ、無血清培養 GB2 細胞は Sox2 高発現及び GFAP 低発現であったのに対し、血清培養では Sox2 低発現及び GFAP 高発現となっていた(図 5B)。これらの結果から、これまでの膠芽腫幹細胞の報告と同様に血清培地による幹細胞性の低下が見られたため(10, 65)、無血清培地及び血清培地を用いて 7 日間培養した GB2 細胞の比較定量リン酸化プロテオーム解析を試みた。

(A)



(B)

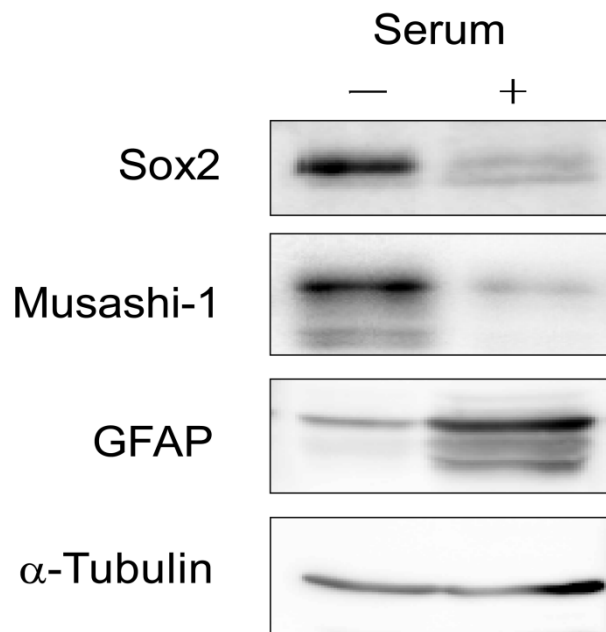


図 5. 血清培地による GB2 細胞の分化誘導

(A) 無血清培養(Serum[-])及び血清培養(Serum[+])した GB2 細胞の顕微鏡写真

無血清培地で培養した GB2 細胞はスフィアを形成して増殖したが、血清培地で培養した GB2 細胞は接着系細胞へと変化して単一層となって増殖した。

(B) 血清培養における GB2 細胞の幹細胞マーカー及び分化マーカー発現量の定量

Western blotting の結果、血清培養による幹細胞マーカー(Sox2 及び Musashi-1)発現量の低下及び分化マーカー(GFAP)発現量の上昇が見られた。([66]より転載)

### 3.2 無血清及び血清培養 GB2 細胞の比較定量リン酸化プロテオーム解析

無血清または血清培地で培養した GB2 細胞の細胞内リン酸化タンパク質について質量分析による比較定量解析を行うため、本研究では SILAC 法を用いて GB2 細胞を安定同位体標識アミノ酸で標識した。GB2 細胞内のタンパク質を安定同位体標識されたアミノ酸で完全に置き換えるため、laminin をコートしたディッシュ上にて単一層で幹細胞性を維持させながら GB2 細胞を培養し、安定同位体標識のリジン( $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_2$  L-lysine)、アルギニン( $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$  L-Arginine)を含む Heavy 培地及び通常のリジン( $^{12}\text{C}_6, ^{14}\text{N}_2$  L-lysine)、アルギニン( $^{12}\text{C}_6, ^{14}\text{N}_4$  L-Arginine)を含む Light 培地において 6 回以上倍加させた。安定同位体標識アミノ酸のラベル化による GB2 細胞の幹細胞性への影響について幹細胞マーカー及び分化マーカー発現量を western blotting により検討したところ、Heavy 培地と Light 培地で培養された GB2 細胞においてマーカー発現量の違いは見られなかった。次に、Light 標識の GB2 細胞は血清含有培地 7 日間の培養で幹細胞性を低下させ、Heavy 標識の GB2 細胞は幹細胞性を維持させた状態で、各々の細胞を回収及び可溶化し、タンパク質量比 1:1 となるように混和した。混和したタンパク質溶液を GELFREE 8100 システムにより分子量に従って 14 フラクシオンに分画し、各フラクションのタンパク質量を SDS-PAGE と銀染色により推定した後、図 6 に示した 8 サンプルを nanoLC-MS/MS 解析用のサンプルとして調製を行うこととした。

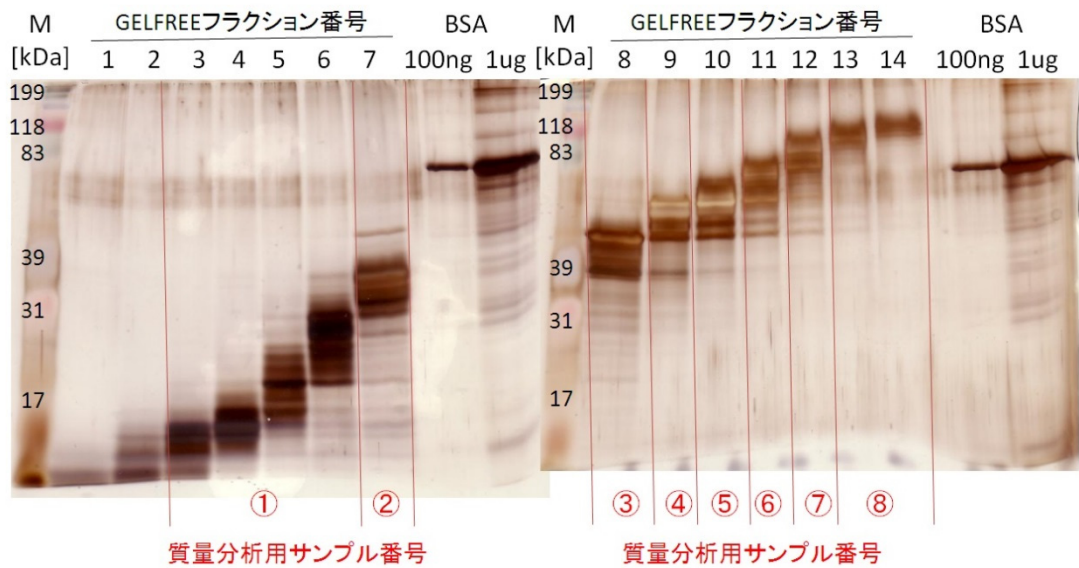


図 6. GELFREE8100 システムによるタンパク質溶液の分画結果

GELFREE8100 システムにより分子量に従って分画したタンパク質溶液のフラクションを SDS-PAGE にて泳動して銀染色を行った。14 フラクションの中で 12 フラクションを 8 サンプルにまとめて質量分析用サンプルとした。



8 サンプルのタンパク質溶液について FASP 法により還元アルキル化及びトリプシン消化を行い、得られた断片化ペプチドから TiO<sub>2</sub> カラムによりリン酸化ペプチドを濃縮し、TiO<sub>2</sub> カラムからの溶出にアンモニア溶液及びピロリジン溶液を用いたため計 16 サンプルの質量分析用試料を得た。nanoLC-MS/MS システムによる質量分析測定及び Mascot ソフトウェアによるデータベース検索の結果、1,726 種類のタンパク質に由来する 21,456 ペプチドが FDR 1%未満の条件で同定された。その中でリン酸化ペプチドは 19,090 ペプチド(1,584 種類のリン酸化タンパク質)であり、TiO<sub>2</sub> カラムによる濃縮効率は 89.0%と高い選択性でリン酸化ペプチドが得られた(図 7A)。また、phosphoRS アルゴリズムによりリン酸化ペプチドの MS/MS ピーク情報に基づきリン酸化部位のアミノ酸残基及びその位置を計算したところ、2,876 ヶ所のリン酸化部位が同定された(phosphorylation site probability > 75%)。その中でリン酸化セリンは 2,523 ヶ所(87.7%)、リン酸化スレオニン 317 ヶ所(11.0%)、リン酸化チロシンは 36 ヶ所(1.3%)であり、TiO<sub>2</sub> カラムを用いた定量リン酸化プロテオーム解析を行った過去の報告と同様の割合であった(図 7B) (67)。

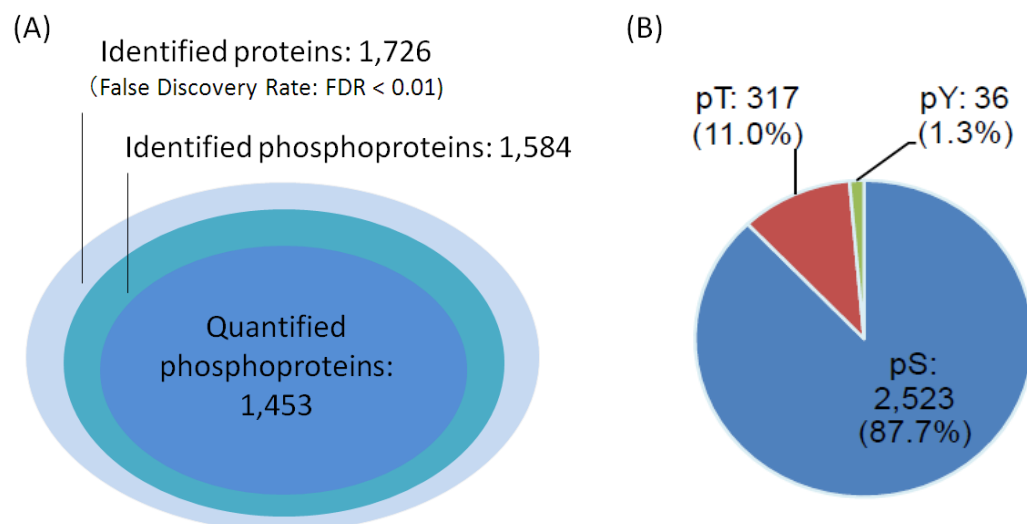


図 7. nanoLC-MS/MS によるリン酸化タンパク質の質量分析測定結果

(A) 同定されたタンパク質及び同定・定量されたリン酸化タンパク質の数。(B) 同定されたリン酸化部位の割合。pS はリン酸化セリン、pT はリン酸化スレオニン、pY はリン酸化チロシンを表す。

2 つ以上のスペクトルデータから同定されたタンパク質のリン酸化活性の変動に関して、Proteome Discoverer を用い MS ピーク面積に基づいた定量を行い、PhosphoRS で同定されたリン酸化部位に基づいてリン酸化ペプチドをリン酸化アイソフォームとしてまとめて平均値を計算した結果、1,139 種類のタンパク質における 2,452 リン酸化アイソフォームの定量データが得られた(図 8)。定量値の相対標準偏差(RSD)の平均は 18.0% であり、リン酸化変動の cut-off 値を 2 倍としたところ、無血清培養では 238 種類のタンパク質における 372 リン酸化アイソフォームが 2 倍以上亢進しており( $\log_2[\text{H/L ratio}] > 1$ )、血清培養では 184 種類のタンパク質における 362 リン酸化アイソフォームが 2 倍以上亢進していた( $\log_2[\text{H/L ratio}] < -1$ )。これらの中で、無血清培養で亢進しているリン酸化部位と血清培養で亢進しているリン酸化部位のどちらも保持していたのは 3 タンパク質であった。血清培養によるリン酸化の変動が見られたリン酸化アイソフォームとそのタンパク質は補足資料にまとめた。

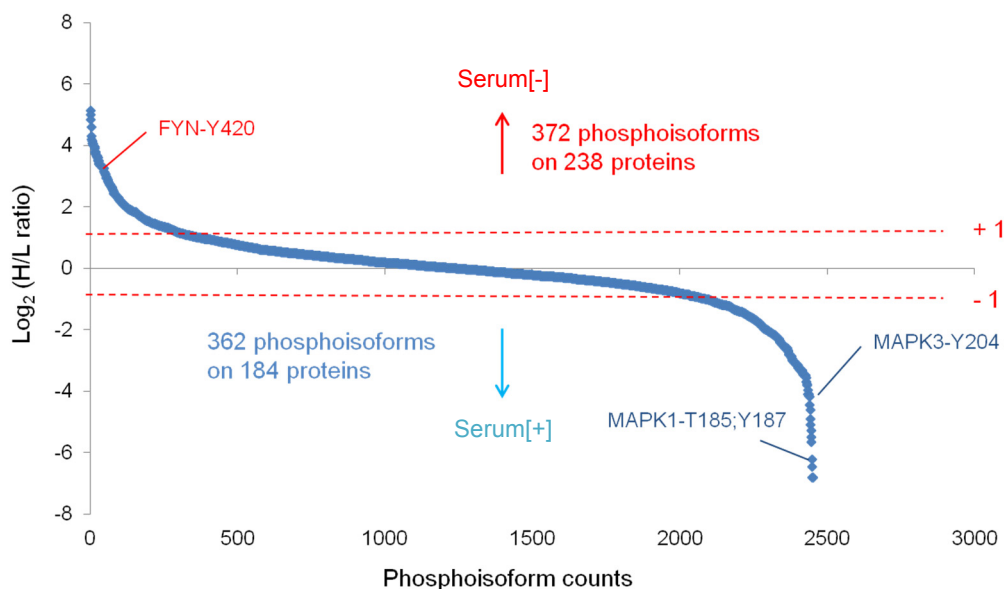


図 8. 血清培養における GB2 細胞のリン酸化プロテオームの定量解析結果  
 定量されたリン酸化アイソフォームをその定量値( $\log_2[\text{H/L ratio}]$ )でプロットした。定量値が高いほど無血清培養(Serum[-])でリン酸化が亢進、低いほど血清培養(Serum[+])でリン酸化が亢進している。キナーゼの活性部位で大きく変動しているリン酸化アイソフォームをグラフ中に示した。

キナーゼは細胞内シグナル伝達においてタンパク質の可逆的なリン酸化を制御しており、自身のキナーゼ活性も多くは特定のアミノ酸残基におけるリン酸化により制御されているため、血清培養で活性が変化しているキナーゼを調べることを目的としてリン酸化が大きく変動したキナーゼとそのリン酸化部位について表 2 にまとめた。その中で、Src ファミリーに属するチロシンキナーゼであり、がん幹細胞マーカーとして知られる CD133 の細胞質側ドメインをリン酸化することで膠芽腫幹細胞の自己複製能と腫瘍形成能の維持への関与が報告されている Fyn は、420 番目チロシン(Tyr420)が無血清培養でリン酸化の亢進が見られたため活性化型となっていることが示された(表 2) (68)。また、MAPK (Mitogen activated protein kinase)ファミリーのチロシンキナーゼであり、膠芽腫幹細胞の血清分化においてリン酸化亢進の報告がある MAPK3(Extracellular regulated kinase-1; ERK1)の 204 番目チロシン(Tyr204)及び MAPK1 (ERK2)の 185 番目スレオニン(Thr185)・187 番目チロシン(Tyr187)は、本研究においても血清培養でリン酸化が亢進しており MAPK3 および MAPK1 が活性化型となっていることが示された(69)。これらのリン酸化について抗リン酸化抗体を用いて western blotting による定量を行ったところ、質量分析による定量結果と同様の結果が得られた(図 9)。

表 2. 血清培養でリン酸化が変動したキナーゼとそのリン酸化部位のリスト

Gene symbol	Description	Phosphorylation site	Log <sub>2</sub> (H/L ratio) (Mean ± S.D.)*
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta isoform 3	S330	1.791 ± 0.186
		S333	1.466 ± 0.000
		T287	-0.051 ± 0.081
		T331	1.996 ± NA
		T337	0.230 ± 0.017
DCLK1	Serine/threonine-protein kinase DCLK1 isoform 1	S352	-1.388 ± 0.000
FYN	Tyrosine-protein kinase Fyn isoform a	S21	1.155 ± NA
		S25	1.155 ± NA
		Y420	2.575 ± 0.000
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	S484	1.120 ± 0.000
LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn isoform A	S13	1.405 ± 0.000
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	T185; Y187	-6.212 ± 0.000
		Y187	-2.447 ± 0.000
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3 isoform 2	Y204	-3.761 ± 0.000
MARK1	Serine/threonine-protein kinase MARK1	T648	1.343 ± NA
MARK2	Serine/threonine-protein kinase MARK2 isoform a	S422	0.463 ± 0.000
		S452	-0.625 ± 0.310
		S585	-1.655 ± NA
		S7	0.318 ± 0.000
PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 isoform 1	S241	-0.790 ± 0.518
		T245	-1.022 ± NA
PRKCB	Protein kinase C beta type isoform 2	S660	3.417 ± NA
		S664	3.417 ± NA
		T500	-0.166 ± 0.030
		T504	-0.122 ± NA

\* 赤地: 無血清培養におけるリン酸化亢進(Log<sub>2</sub>[H/L ratio] > 1)、青地: 血清培養におけるリン酸化亢進(Log<sub>2</sub>[H/L ratio] < -1)

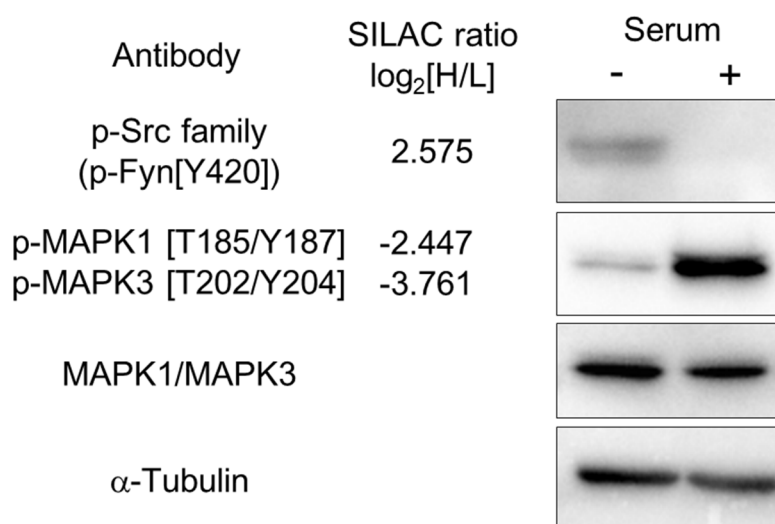


図 9. 血清培養 GB2 細胞におけるリン酸化 MAPK1/3 及びリン酸化 Fyn 発現量の定量  
リン酸化 MAPK1(T187/Y189)・MAPK3(T202/Y204) に対する抗体及びリン酸化 Fyn(Y420)反応性のリン酸化 Src family (Y416)抗体による Western blot の結果、質量分析による定量結果と同様、血清培養(Serum[+])における MAPK1/3 のリン酸化亢進、無血清培養(Serum[-])における Fyn のリン酸化亢進が見られた。

さらに、得られたリン酸化定量データから、がん幹細胞の幹細胞性に関連するシグナルパスウェイ(Wnt, Notch, Hedgehog, Akt, BMP, NF- $\kappa$ B, Myc)において血清培養による 2 倍以上の変動が見られたリン酸化タンパク質をネットワーク解析ソフトウェアの KeyMolnet 及び Ingenuity Pathway Analysis から抽出して表 3 にまとめた。これらのパスウェイはがん幹細胞の 3 つの総説で挙げられているものを選択した(70–72)。がん幹細胞の幹細胞性維持及び分化に関与している Wnt シグナルにおいて、Fizzled 受容体に対して抑制的に働く LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1)では、LRP1 の会合に関わる Ser4517 及び Ser4520 のリン酸化が無血清培養した GB2 細胞で亢進していた(73)。また、 $\beta$ -Catenin に結合及び競合してその転写活性を抑制する Sox family においてリン酸化タンパク質の亢進が無血清培養した GB2 細胞で見られた(74)。膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持に関わる Notch シグナルでは、Notch の開裂に働く ADAM10 (A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) のリン酸化が無血清培養で亢進していた(75)。また、膠芽腫幹細胞の増殖に関与している Hedgehog シグナルにおいて、シグナル伝達初期に生じる Smoothed の第一繊毛への移動に必要な $\beta$ -Arrestin1 の Ser404 のリン酸化が無血清培養で亢進していた(76)。Akt、BMP、Myc シグナルでは先述した MAPK1 及び MAPK3 の血清培養 GB2 細胞におけるリン酸化の亢進が見られた。NF- $\kappa$ B シグナルにおいては神経幹細胞マーカーとして知られる NGFR (Nerve growth factor receptor)が無血清培養でリン酸化が亢進していた(77)。キナーゼ及びがん幹細胞の代表的なシグナルのリン酸化変動の傾向から、nanoLC-MS/MS 解析により得られた定量リン酸化プロテオームデータは GB2 細胞の血清培養による分化誘導で生じたリン酸化の変動を反映しているものと考え、定量データに基づくバイオインフォマティクス解析を行った。

表 3. がん幹細胞関連パスウェイにおいて血清培養でリン酸化が変動したタンパク質リスト

Pathway name	Protein name	Gene symbol	
Wnt signaling	G1/S-specific cyclin-E2	CCNE2	
	protocadherin-16 precursor	DCHS1	
	serine/threonine-protein kinase DCLK1 isoform 1	DCLK1	
	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	DPYSL2	
	dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 1	DPYSL3	
	gap junction alpha-1 protein	GJA1	
	cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor	IGF2R	
	transcription factor AP-1	JUN	
	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor	LRP1	
	microtubule-associated protein 1A	MAP1A	
	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	
	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	
	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	
	microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	
	microtubule-associated protein tau isoform 2	MAPT	
	serine/threonine-protein kinase MARK2 isoform a	MARK2	
	serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform isoform 1	PPP2R5D	
	transcription factor SOX-13	SOX13	
	transcription factor SOX-2	SOX2	
	transcription factor SOX-5 isoform a	SOX5	
	transcription factor SOX-6 isoform 1	SOX6	
	transcription factor SOX-9	SOX9	
	stathmin isoform a	STMN1	
	transducin-like enhancer protein 4	TLE4	
	tubulin beta-2B chain	TUBB2B	
	Notch signaling	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 precursor	ADAM10
		myocyte-specific enhancer factor 2C isoform 1	MEF2C
numb-like protein		NUMBL	
probable global transcription activator SNF2L2 isoform b		SMARCA2	
SNW domain-containing protein 1	SNW1		
Hedgehog signaling	beta-arrestin-1 isoform B	ARRB1	
	transcriptional activator GLI3	GLI3	
Akt signaling	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 isoform 1	PDPK1	
	bcl2 antagonist of cell death	BAD	
	heat shock protein beta-1	HSPB1	
	integrin alpha-4 precursor	ITGA4	
	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	
	mitogen-activated protein kinase 3 isoform 2	MAPK3	
	protein kinase C beta type isoform 2	PRKCB	
	ras-related protein R-Ras2 isoform a	RRAS2	
serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform isoform 1	PPP2R5D		
NF-κB signaling	cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor	IGF2R	
	histone deacetylase 2	HDAC2	
	protein kinase C beta type isoform 2	PRKCB	
	ras-related protein R-Ras2 isoform a	RRAS2	
tumor necrosis factor receptor superfamily member 16 precursor	NGFR		
BMP signaling	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	
	mitogen-activated protein kinase 3 isoform 2	MAPK3	
	ras-related protein R-Ras2 isoform a	RRAS2	
	transcription factor AP-1	JUN	
Myc-related signaling	bcl2 antagonist of cell death	BAD	
	caspase-3 preproprotein	CASP3	
	histone deacetylase 2	HDAC2	
	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	
	mitogen-activated protein kinase 3 isoform 2	MAPK3	
	nucleophosmin isoform 1	NPM1	
	prothymosin alpha isoform 2	PTMA	
	ras-related protein R-Ras2 isoform a	RRAS2	
	serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform isoform 1	PPP2R5D	
	S-phase kinase-associated protein 2 isoform 2	SKP2	
tropomyosin alpha-1 chain isoform 3	TPM1		

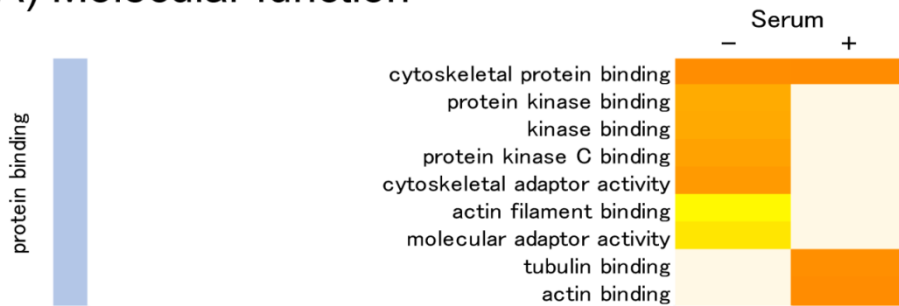
\* 赤字: 無血清培養でリン酸化が亢進(H/L ratio > 2), 青字: 血清培養でリン酸化が亢進(H/L ratio < 0.5)

### 3.3 リン酸化プロテオーム情報に基づく GO 解析及びパスウェイ解析

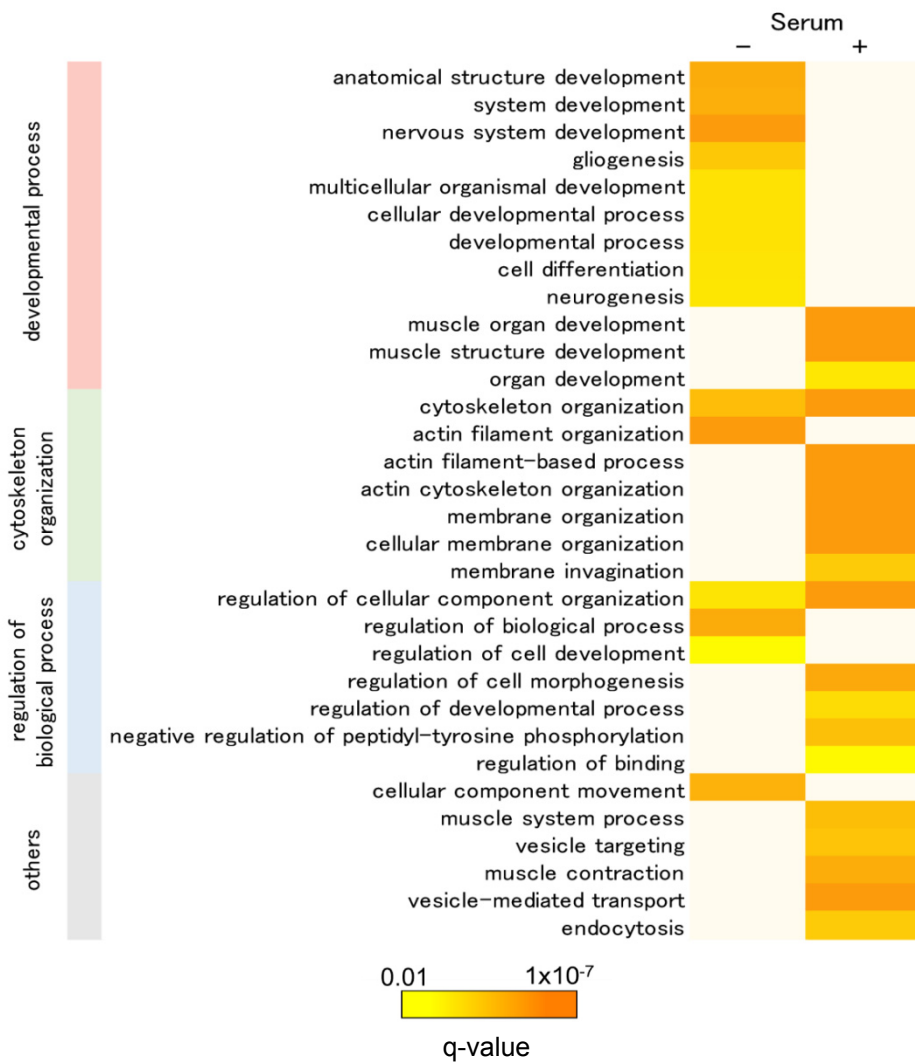
リン酸化が変動したタンパク質群の傾向を明らかにするため、**Biological Network Gene Ontology tool (BiNGO)**を用いて血清培養でリン酸化が変動したタンパク質群と関連が見られる GO タームを 3 つの GO カテゴリー(**Molecular function, Cellular component, Biological process**)から抽出した。血清培養でリン酸化が変動していなかったタンパク質群についての解析結果と比較し、変動したタンパク質群(**Serum[-]:  $\log_2[H/L \text{ ratio}] > 1$ , Serum[+]:  $\log_2[H/L \text{ ratio}] < -1$ )で有意に抽出された GO タームをヒートマップとして図 10 に示した(**q-value < 0.01**)。Molecular function カテゴリーについて解析した結果、タンパク質との結合に関わる GO タームである **protein binding** と血清培養で変動したタンパク質群との関連性が示され、特に細胞骨格系タンパク質を結合対象とする **cytoskeletal protein binding** (**q-value =  $9.84 \times 10^{-19}$** )及びキナーゼを結合対象とする **protein kinase binding** (**q-value =  $9.58 \times 10^{-5}$** )との有意な関連が示された(図 10A)。リン酸化タンパク質を解析対象としたため、タンパク質リン酸化を制御しているキナーゼと関連する GO タームが抽出されることは予測されていたが、意外なことに細胞骨格系への結合に関するタンパク質に対してより高い関連性が見られた。Cellular component カテゴリーにおいては、細胞の形態や運動に関わる細胞骨格(**cytoskeleton, q-value =  $3.13 \times 10^{-23}$** )、接着結合(**adherens junction, q-value =  $1.59 \times 10^{-9}$** )及び細胞突起(**cell projection, p-value =  $2.22 \times 10^{-8}$** )に局在するタンパク質と血清培養により変動したリン酸化タンパク質との有意な関連性が見られた(図 10B)。Biological process カテゴリーにおける解析の結果、細胞の発生や分化に関わる **system development** (**q-value =  $3.1 \times 10^{-6}$** )及び細胞骨格系の再構築に関わる **cytoskeleton organization** (**q-value =  $3.03 \times 10^{-8}$** )が血清培養によりリン酸化が変動したタンパク質と有意な関連のある GO タームとして抽出された(図 10C)。興味深いことに、**system development** の下層に位置する GO タームで、神経系の発生・分化に関わる **nervous system development** に属するタンパク質は無血清培養 GB2 細胞でリン酸化が亢進しており、筋肉系に関わる**

muscle organ development は血清培養 GB2 細胞でリン酸化が亢進していた。

### (A) Molecular function



### (B) Biological process





### (C) Cellular component

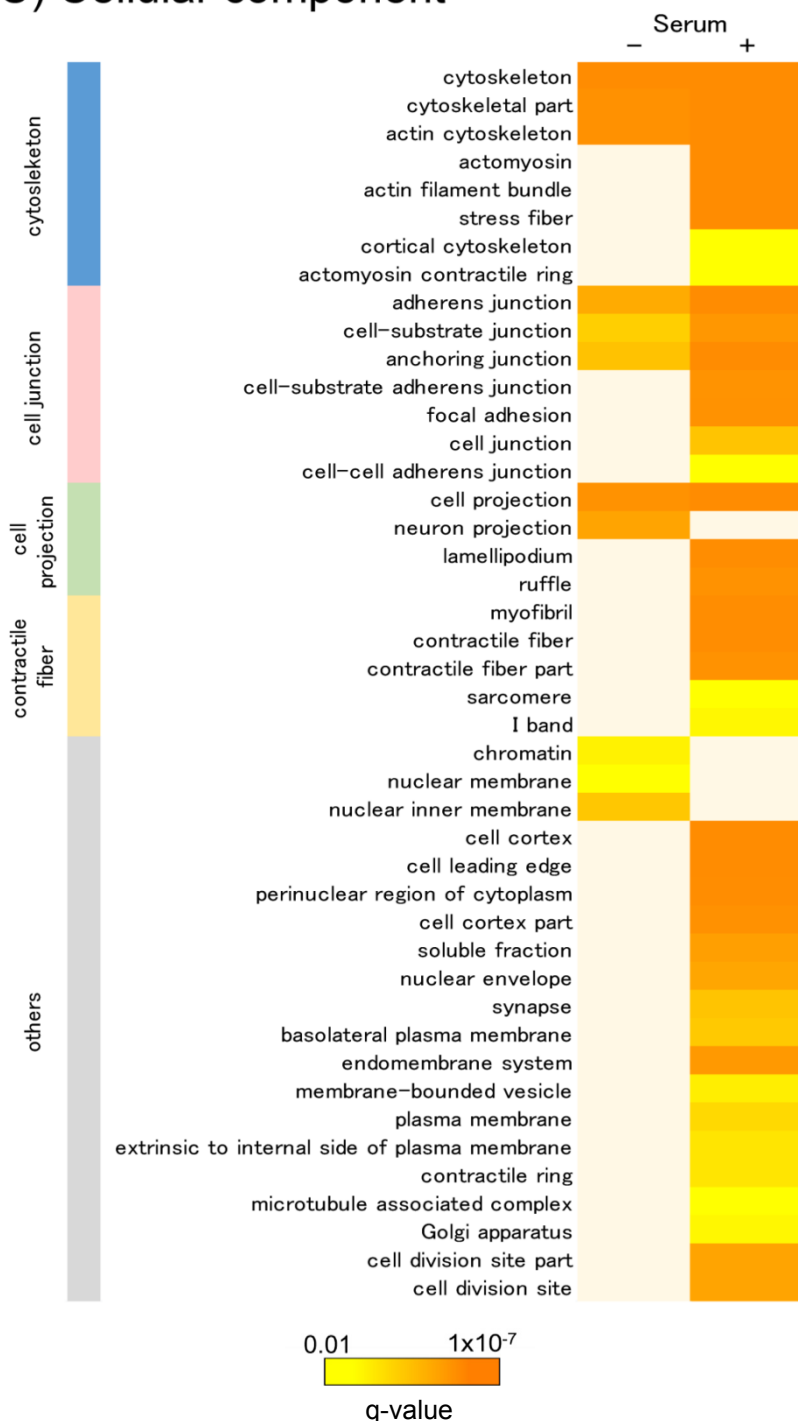


図 10. Gene Ontology 解析結果のヒートマップ

3つのGOカテゴリー(A: Molecular function, B: Cellular component, C: Biological process)に関して血清培養で変動したリン酸化タンパク質群(Serum[-]:  $\log_2[H/L \text{ ratio}] > 1$ , Serum[+]:  $\log_2[H/L \text{ ratio}] < -1$ )についてBiNGOにより有意に抽出されたGOタームとq-valueをヒートマップとして示した( $q\text{-value} < 0.01$ )。得られたGOタームについて共通する上層のGOタームにより分類した(左端)。(〔66〕より転載)

リン酸化が変動したタンパク質群の関連するパスウェイを明らかにするため、ネットワーク解析ソフトウェアである Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いてパスウェイ解析を行った(図 11)。GB2 細胞の血清培養によって 2 倍以上変動した 408 リン酸化タンパク質を IPA core analysis により解析した結果、血清培養によるリン酸化の変動と関連性がある canonical pathway として、アクチン骨格及び微小管を制御し細胞骨格系の再構築に関わる Signaling by Rho family GTPases が最も有意に抽出された( $-\log[p\text{-value}] = 8.55$ ) (図 12)。また、細胞接着に関与している Integrin signaling も上位に抽出されていた( $-\log[p\text{-value}] = 6.75$ )。

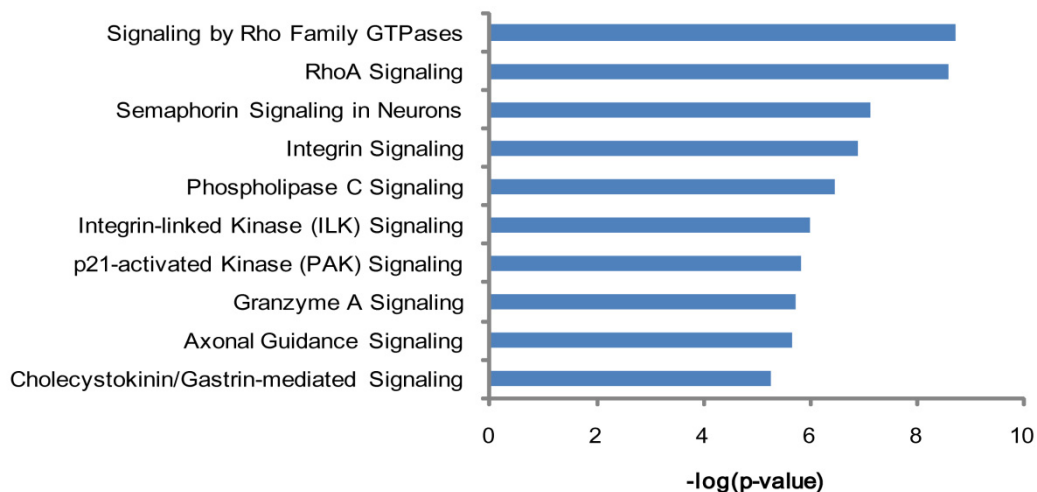


図 11. IPA パスウェイ解析で抽出されたパスウェイ  
血清培養で変動していたリン酸化タンパク質と関連が見られた上位 10 個のパスウェイをスコア( $-\log[p\text{-value}]$ )とともに示した。([66]より転載)

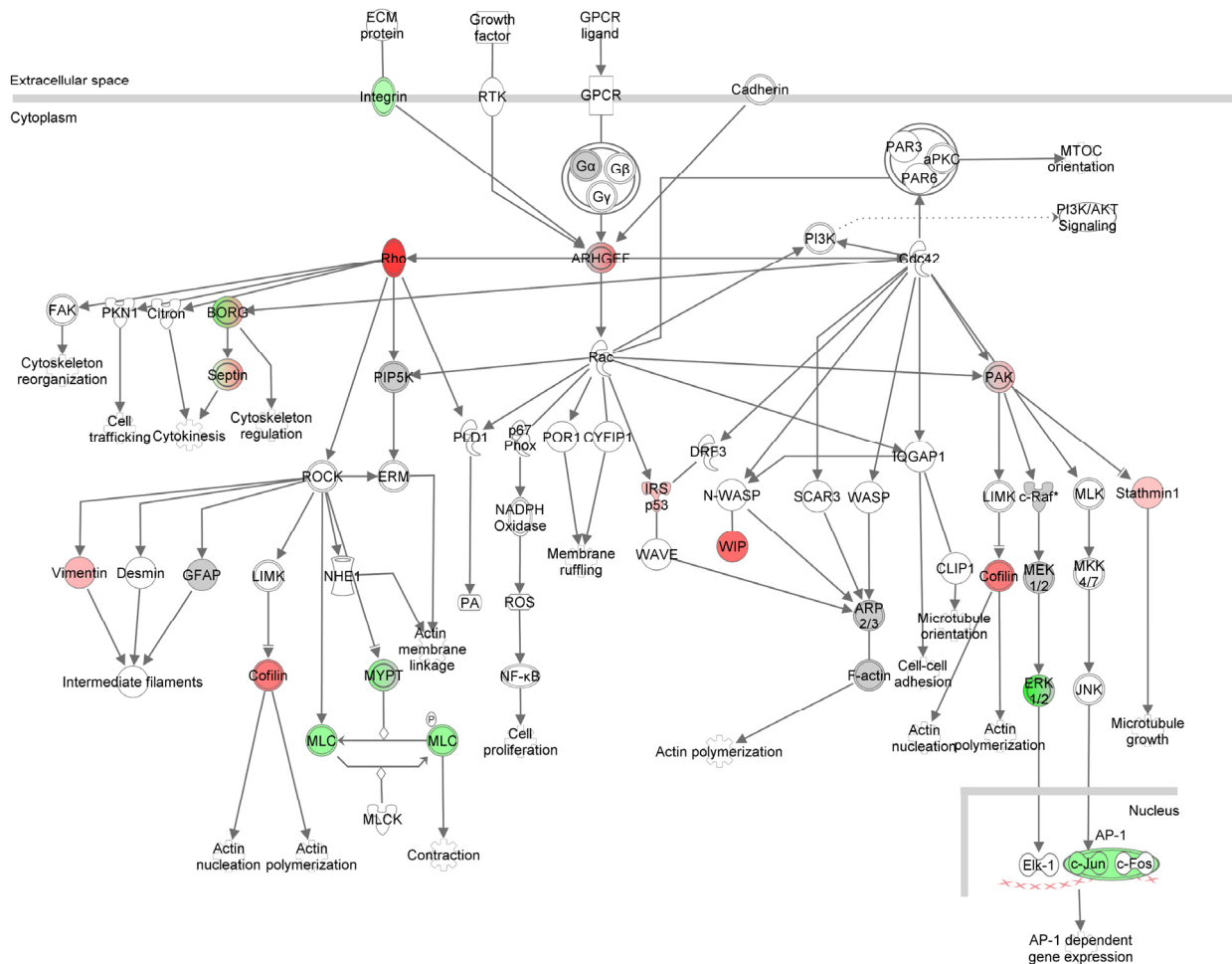


図 12. Signaling by Rho family GTPases に属するタンパク質の GB2 細胞血清培養によるリン酸化の変動

IPA によるパスウェイ解析で血清培養によるリン酸化変動と最も有意な関連が見られたパスウェイである Signaling by Rho family GTPases の分子にリン酸化変動の定量値のマッピングを行った。分子の色は、赤: H/L ratio > 2、緑: H/L ratio < 0.5、灰色:  $0.5 \leq H/L \leq 2$ 、白: 定量値なし又は未同定。 ([66]より転載)

さらに、別の解析ソフトウェアである **KeyMolnet** を用いてパスウェイ解析を行った。**KeyMolnet** は入力したタンパク質からネットワークを作成し、作成したネットワークと **canonical pathway** との相互作用関係の重複率を計算することができ、**IPA** とは異なったパスウェイ解析が可能となっている。血清培養でリン酸化が変動した **408** タンパク質を入力し、お互いに相互作用関係(リレーション)が存在するタンパク質からなるネットワークを相互関係検索により作成した。得られた **151** 分子及び **175** リレーションからなるネットワークに基づいてパスウェイ解析を行ったところ、**IPA** のパスウェイ解析で抽出された **Rho family signaling pathway** ( $-\log[p\text{-value}] = 7.86$ )や **Integrin signaling pathway**( $-\log[p\text{-value}] = 12.81$ )が上位に見られた(図 13)。また、神経幹細胞マーカーである **Nestin** や **Vimentin** を含み、細胞骨格・核骨格の構成に関わる **Intermediate filament signaling pathway** が最も有意な関連が見られるパスウェイとして抽出された( $-\log[p\text{-value}] = 29.35$ ) (図 14)。

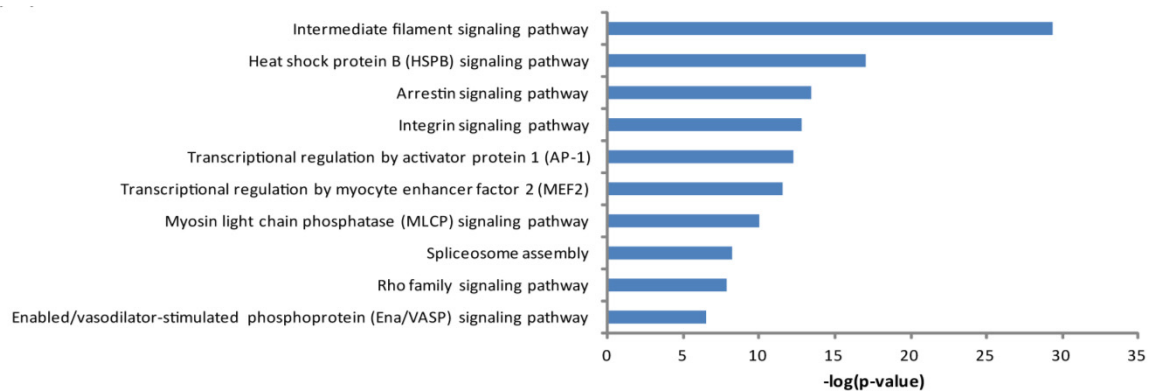


図 13. **KeyMolnet** パスウェイ解析で抽出されたパスウェイ  
血清培養で変動していたリン酸化タンパク質と関連が見られた上位 10 個のパスウェイ  
をスコア( $-\log[p\text{-value}]$ )とともに示した。([66]より転載)

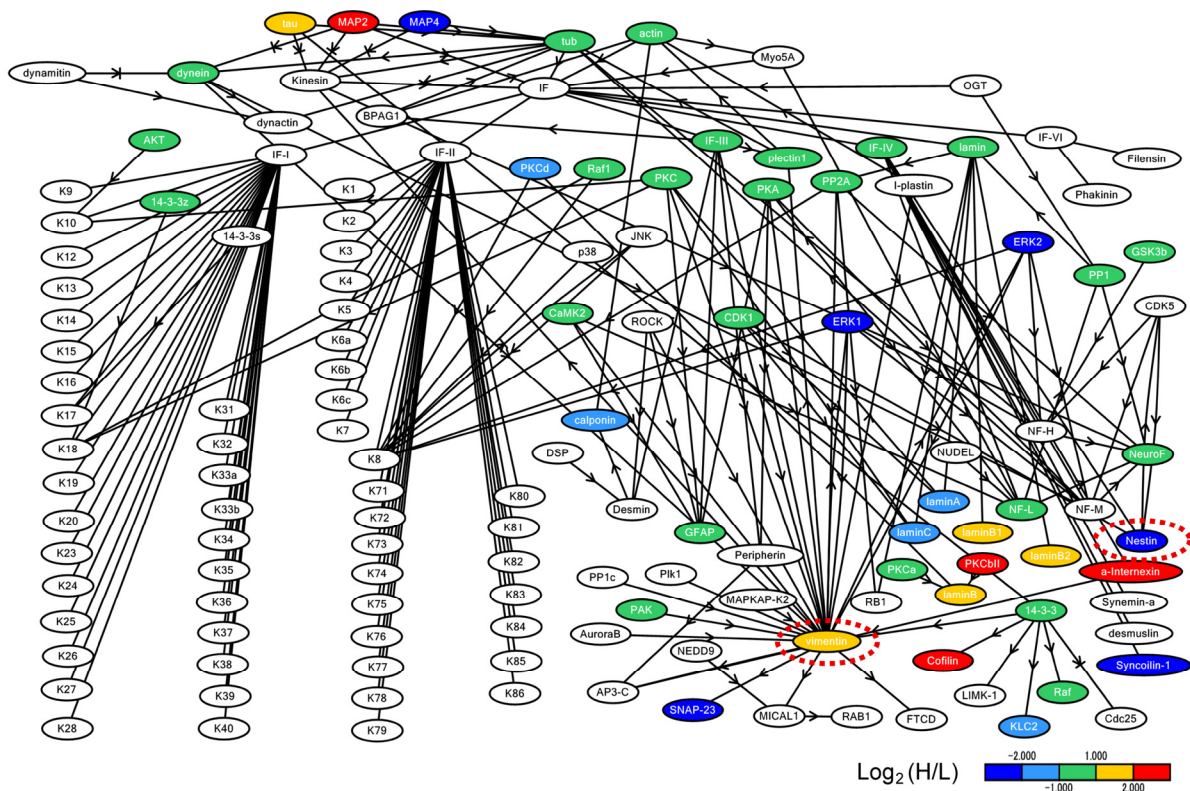


図 14. Intermediate filament signaling pathway に属するタンパク質の GB2 細胞血清培養によるリン酸化の変動

KeyMolnet によるパスウェイ解析で血清培養によるリン酸化変動と最も有意な関連が見られたパスウェイである Intermediate filament signaling pathway の分子にリン酸化変動の定量値のマッピングを行った。分子の色が表す定量値については右下を参照。赤破線の円は Vimentin 及び Nestin を示している。([66]より転載)

IPA 及び KeyMolnet のパスウェイ解析結果から、細胞骨格系及び細胞接着に関する GO タームが多く抽出された GO 解析の結果は、Rho family GTPase signaling、Integrin signaling 及び Intermediate filament signaling pathway におけるリン酸化の変動を反映していることが示唆された。また、Intermediate filament signaling pathway 及び Rho family GTPase signaling に属する Vimentin は本解析において最も多くリン酸化部位が同定・定量されており(29 ヶ所)、その中の 2 ヶ所(Ser39, Thr361)のリン酸化は無血清培養において亢進していた(表 4)。さらに、Intermediate filament signaling pathway に属する Nestin は過去の膠芽腫幹細胞のリン酸化プロテオーム解析において多数のリン酸化部位が同定されており(63)、本解析では 9 ヶ所が同定・定量され、Thr315 は無血清培養で、Ser1016 は血清培養でリン酸化が亢進していた。GO 解析及びパスウェイ解析では、血清培養による分化誘導で変動したリン酸化タンパク質の傾向とパスウェイが明らかとなったが、これらの変動を制御している因子を抽出するために更なる解析を試みた。

表 4. GB2 細胞の Vimentin 及び Nestin 上で同定・定量されたリン酸化部位

Vimentin				Nestin			
Site	Log <sub>2</sub> (H/L ratio)	S.D.	Count	Site	Log <sub>2</sub> (H/L ratio)	S.D.	Count
S7	-0.829	± NA	1	T315	1.938	± NA	1
S10	-0.031	± 0.061	3	S325	0.955	± 0.084	6
T20	-0.047	± NA	1	S471	-0.485	± 0.163	21
S22	0.079	± 0.214	14	S680	-0.551	± 0.419	17
S22; S26	-0.795	± 0.000	3	S768	-0.879	± 0.620	38
S25	-0.122	± 0.080	9	S1016	-2.016	± NA	1
S26	-0.197	± 0.000	6	S1347	-0.305	± 0.000	5
S27	0.049	± 0.182	3	S1409; S1418	-0.811	± 0.000	3
S29	0.048	± 0.301	2	S1418	-0.550	± 0.325	13
S34	0.147	± 0.000	2	S1577	-0.833	± 0.297	19
S39	1.493	± 0.494	2				
S42	0.392	± 0.501	4				
S5	-0.829	± NA	1				
S51	0.076	± 0.398	22				
S51; S56	0.783	± 0.000	4				
S55	0.887	± 0.229	14				
S56	0.910	± 0.208	31				
Y61	0.820	± 0.221	10				
S72	-0.690	± 0.352	2				
S73	0.354	± 0.072	5				
S83	0.963	± 0.798	21				
Y117	0.105	± NA	1				
S205	-0.197	± 0.110	5				
S214	0.094	± 0.118	12				
S299	0.318	± 0.000	2				
S325	0.650	± 0.314	23				
S339	0.193	± 0.007	6				
T361	1.208	± 0.000	3				
S430	-0.484	± 0.047	14				

\* 赤地: 無血清培養においてリン酸化亢進(Log<sub>2</sub>[H/L ratio] > 1)、青地: 血清培養においてリン酸化亢進(Log<sub>2</sub>[H/L ratio] < -1)。

### 3.4 リン酸化プロテオーム情報に基づく上流キナーゼ予測解析及び上流制御因子解析

GB2 細胞の血清培養において変動したリン酸化タンパク質を制御している上流因子を明らかにするため、PhosphoSiteAnalyzer を用いリン酸化部位のモチーフに基づくキナーゼ予測解析及び IPA を用い分子相互作用情報に基づく上流制御因子解析を行った。

PhosphoSiteAnalyzer に対し、本解析で同定・定量された 2,427 リン酸化部位の部位情報(タンパク質配列・アミノ酸残基・位置)とその定量値及び定量値に基づくサブセット情報(Serum[-]: H/L ratio > 2.0, Serum[+]: H/L ratio < 0.5)を入力してキナーゼ予測解析を行った。リン酸化部位のモチーフ情報とタンパク質相互作用情報からキナーゼを予測する NetworKIN プログラムによりリン酸化部位について 10,111 のキナーゼ-基質予測情報を得た。得られたキナーゼ-基質予測情報について PhosphoSiteAnalyzer を用いたフィルタリングにより 1,468 リン酸化部位と 72 キナーゼからなる 4,643 キナーゼ-基質情報まで絞り込み、キナーゼが予測されたリン酸化部位がどのサブセットに偏っているか統計的に解析したところ、TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- beta)スーパーファミリーのセリン・スレオニンキナーゼ型受容体である TGF- $\beta$  receptor type-2 (TGFB2)及び Activin receptor type-2A/B (ACVR2A/B)が予測されたリン酸化部位は無血清培養 GB2 細胞においてリン酸化の有意な亢進が見られ (q-value < 0.05)、TGFB2 が最も有意な偏りを示していた (p-value = 0.0004) (図 15)。



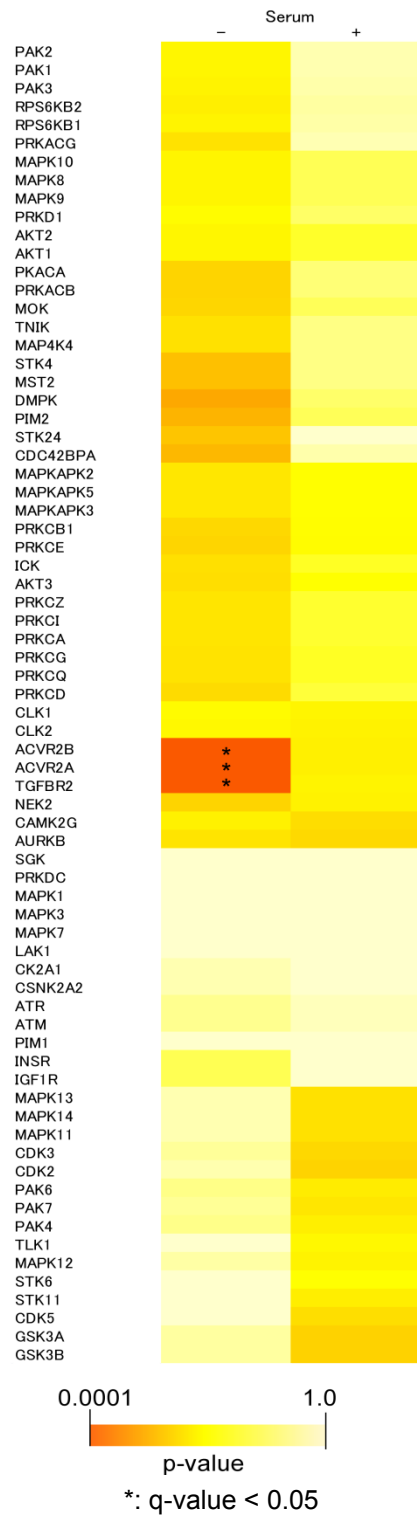


図 15. NetworKIN により予測されたキナーゼ-リン酸化部位の出現頻度解析結果

定量値で分類したサブセットにおいてキナーゼが予測されたリン酸化部位数の偏りについて Fisher の正確確率検定により p-value を求めヒートマップで示した。Benjamini & Hochberg の多重検定補正法により p-value から q-value を計算し、q-value が 0.05 未満を有意とした。([66]より転載)

パスウェイ解析と同様に、血清培養で 2 倍以上変動した 408 リン酸化タンパク質を IPA に入力し、core analysis モードによる上流制御因子解析を行った結果、TGFBR2 のリガンドである TGF- $\beta$ 1 が最も有意な制御因子として抽出された(-log[p-value] = 16.96) (図 16)。さらに、IPA の Ingenuity Knowledge Base において TGF- $\beta$ 1 の下流で制御されているリン酸化タンパク質の中で、ERK1/2 (MAPK3/1)及び paxillin は TGF- $\beta$ 1 の刺激によりリン酸化が亢進することが報告されていた(図 17) (78, 79)。キナーゼ予測解析の結果と合わせて、TGF- $\beta$ 1 と TGFBR2 が開始点となっている TGF- $\beta$ シグナルに着目した。

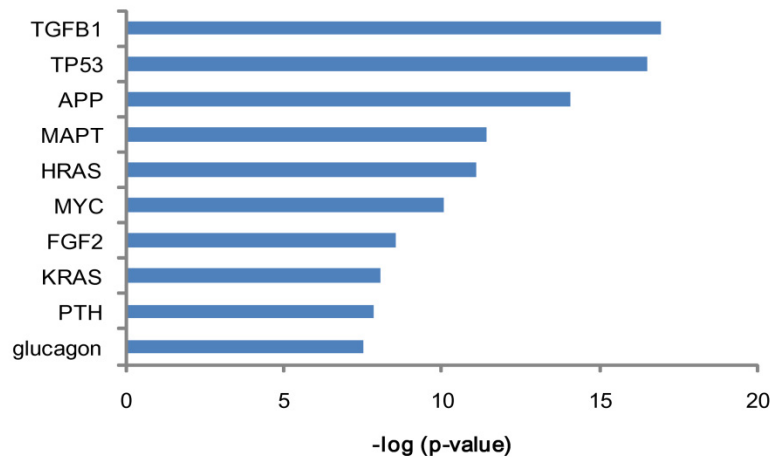


図 16. IPA 上流制御因子解析で抽出された因子  
血清培養で変動していたリン酸化タンパク質と関連が見られた上位 10 個の上流制御因子をスコア(-log[p-value])とともに示した。([66]より転載)

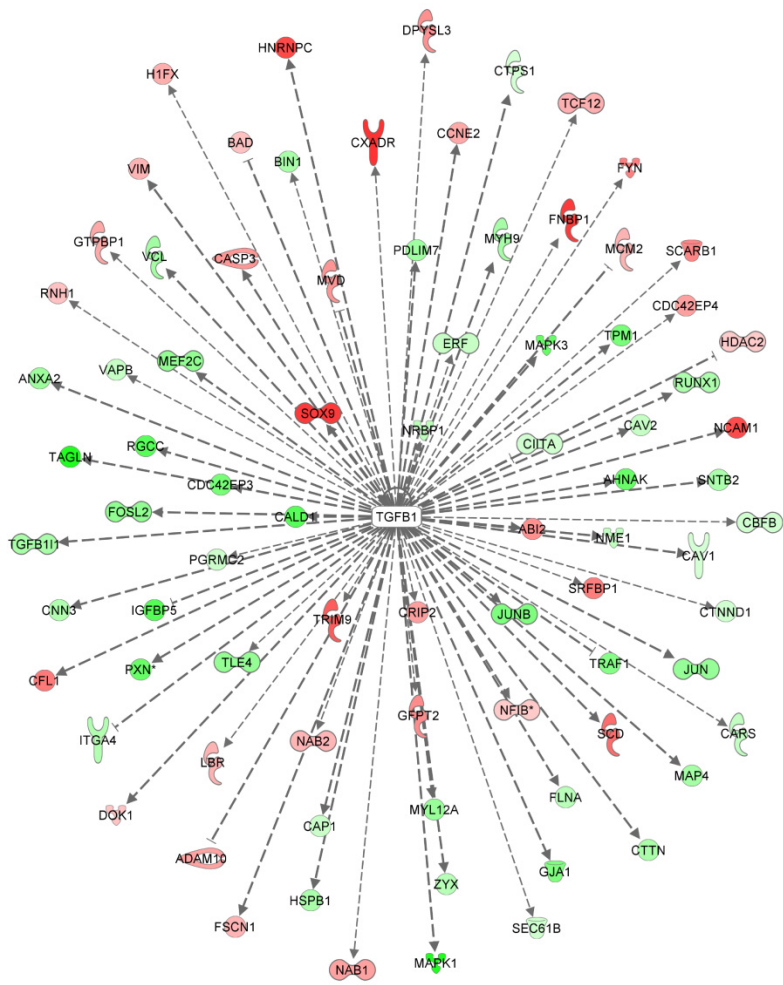


図 17. IPA 上流制御因子解析で抽出された TGF-β1 と GB2 細胞において血清培養で変動しているリン酸化タンパク質群

TGF-β1 下流分子の赤は無血清培養におけるリン酸化の亢進( $\log_2[H/L \text{ ratio}] > 1$ )、緑は血清培養におけるリン酸化の亢進( $\log_2[H/L \text{ ratio}] < -1$ )を表す。([66]より転載)

### 3.5 膠芽腫幹細胞分化の TGFBR2 の寄与に関する実験的検討

TGF- $\beta$ シグナルには古典的な SMAD 経路と MAPK1/3 や RhoGTPase が関与する non-SMAD 経路が存在する。細胞膜に存在し自己リン酸化により恒常的に活性化している TGFBR2 の 2 量体に TGF- $\beta$ 1 が結合すると、TGFBR2 の 2 量体及び同じく細胞膜に存在する TGFBR1 の 2 量体からなるヘテロ 4 量体が形成され、TGFBR1 は TGFBR2 によりリン酸化されることで活性化する。SMAD 経路においては活性化した TGFBR1 が SMAD2/3 をリン酸化し、リン酸化 SMAD2/3 は SMAD4 と会合して核内に移動し転写因子として働く。一方、non-SMAD 経路では TGFBR1 及び TGFBR2 が各々のパスウェイのタンパク質をリン酸化してシグナルを伝達している(80)。パスウェイ解析で抽出された RhoGTPase family signaling は特に TGFBR2 の活性が鍵となっている non-SMAD 経路の一つであり、TGFBR2 が細胞極性因子の Par6 をリン酸化することで RhoA (Ras homolog gene family, member A) の分解を促進し細胞骨格の再構成を引き起こすことが報告されている(81)。今回上流キナーゼ解析で抽出された TGFBR2 について GB2 細胞における発現量を western blotting を用いて定量したところ、無血清培養及び血清培養のいずれでも発現は見られたが、血清培養 GB2 細胞において著しく高く発現していた(図 18)。この結果は膠芽腫幹細胞、その分化細胞及び膠芽腫細胞株のトランスクリプトーム解析を行った Schulte らの報告とも一致していた(82)。このことから、TGFBR2 の膠芽腫幹細胞分化への関与が推測され、キナーゼ阻害剤を用いた実験的検討を試みた。

本研究では TGFBR1 阻害剤(SB431652)及び TGFBR1/2 二重阻害剤(LY2109761)を用いて GB2 細胞の幹細胞性への影響を検討した。まず、阻害剤を 20  $\mu$ M ずつ無血清培地及び血清培地に加え GB2 細胞の形態変化を観察したところ、無血清培地において TGFBR1/2 二重阻害剤の添加によるスフィア形成数の増加傾向が見られ、血清培地では接着状態からの変化は見られなかった(図 16)。次に、無血清培地を用いたスフィアアッセイにより GB2 細胞の自己複製能を評価したところ、TGFBR1/2 二重阻害剤を終濃度 10  $\mu$ M 及び 20  $\mu$ M で加えた GB2 細胞群ではコントロール群(DMSO)に比べスフィア形成数の有意な増加が見られ、TGFBR1 阻害剤を終濃度 10  $\mu$ M 及び 20  $\mu$ M で加えた群ではスフィア形成数に変化がなかった(n = 8, \*: p-value < 0.05) (図 17)。このことから、TGFBR1/2 二重阻害剤により GB2 細胞の自己複製能が亢進することが明らかとなった。

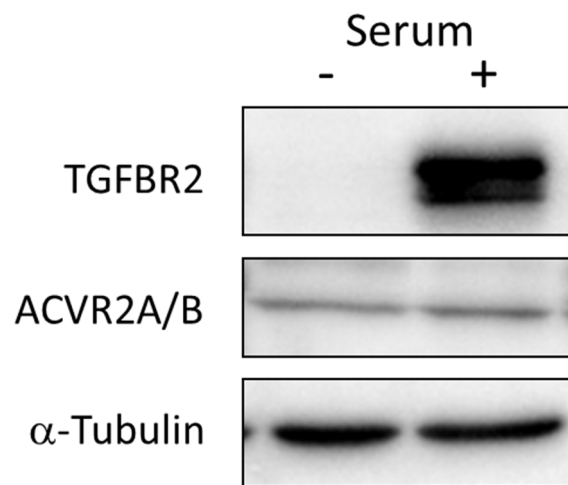


図 18. TGFBR2 及び ACVR2A/B 発現量の定量

上流キナーゼ予測解析で抽出された TGFBR2 及び ACVR2A/B について、無血清培養(Serum[-])または血清培養(Serum[+])した GB2 細胞における発現量を western blotting により調べた。TGFBR2 は分化誘導で著増していたが、ACVR2A/B には変化は見られなかった。

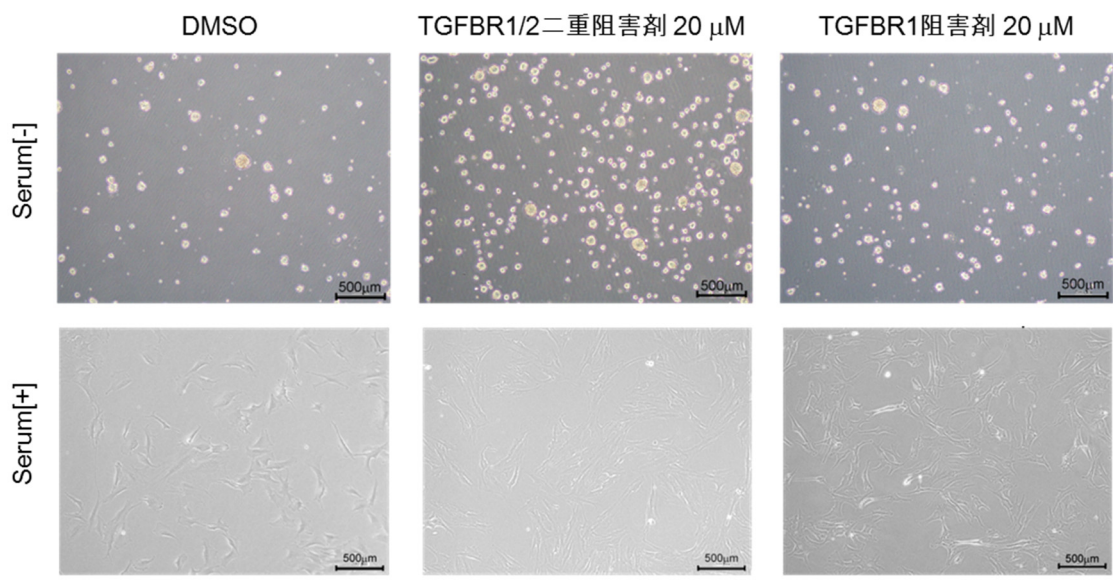


図 19. キナーゼ阻害剤添加時の GB2 細胞観察像

無血清培養(Serum[-])の GB2 細胞では TGFBR1/2 二重阻害剤添加時にスフィア形成数の増加が見られた。血清培養(Serum[+])の GB2 細胞では観察像に大きな違いはなかった。

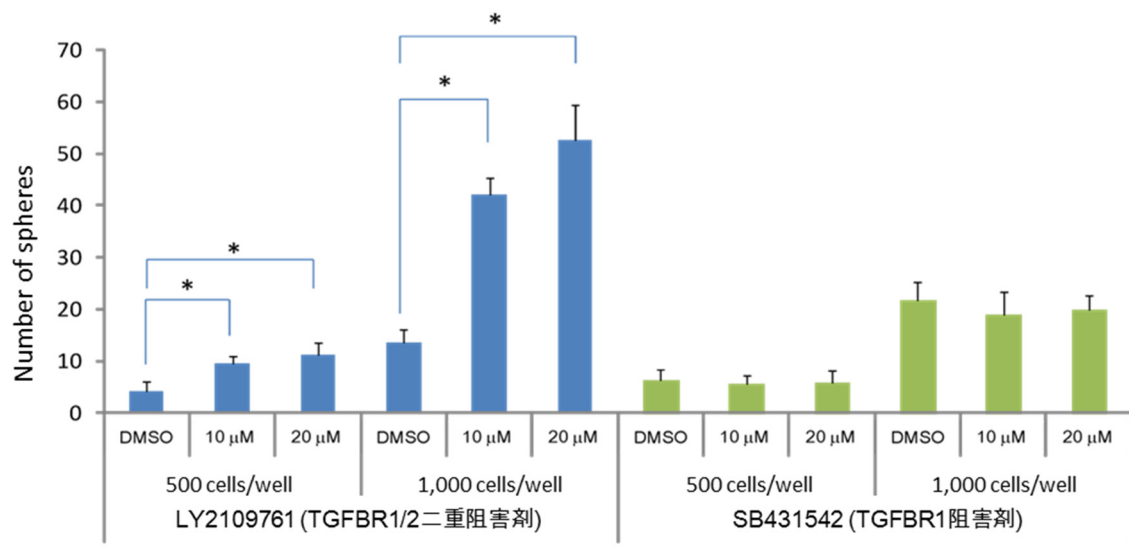


図 20. スフィアアッセイの結果

96 well plate 上で無血清培地により 7 日間培養した GB2 細胞のスフィア形成数を数えた (直径 > 50 μm)。TGFBR1/2 二重阻害剤添加時に形成数の有意な増加が見られた。エラーバーは標準偏差を表す(n = 8, \*: p-value < 0.05)。

さらに、無血清培養または血清培養においてキナーゼ阻害剤を添加した時の GB2 細胞における幹細胞マーカー(Sox2, c-Myc)、分化マーカー(GFAP)の発現量について、western blotting により定量した。無血清培地においてキナーゼ阻害剤(20  $\mu$ M)を添加して 7 日間培養した結果、TGFBR1 阻害剤及び TGFBR1/2 二重阻害剤添加した GB2 細胞群において、コントロール群(DMSO)に比べて幹細胞マーカーの増加及び分化マーカーの減少が見られた(図 18)。血清培養時にキナーゼ阻害剤を添加して 7 日間培養した結果では、TGFBR1/2 二重阻害剤添加した GB2 細胞群において、コントロール群(DMSO)に比べて幹細胞マーカーの著しい増加、分化マーカーの著しい減少が見られた。しかし、TGFBR1 阻害剤を添加した GB2 細胞群ではこれらの変化が見られなかった。スフィアアッセイとの結果と合わせて、TGFBR2 の阻害は GB2 細胞の血清培養による分化誘導における幹細胞性の喪失を抑制しており、TGFBR2 の活性が GB2 細胞の分化に関与していることが示された。

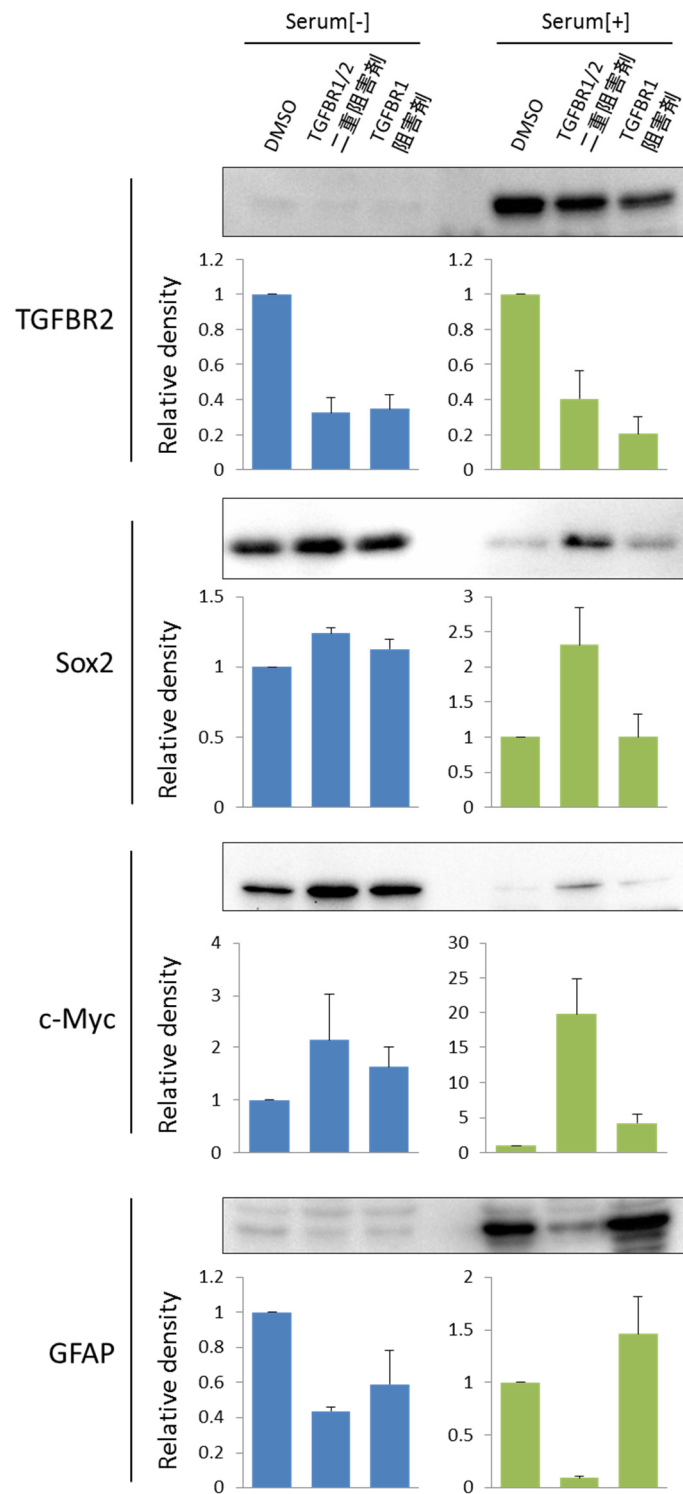


図 21. TGFBR キナーゼ阻害剤添加時の幹細胞/分化発現量の定量  
 無血清培養(Serum[-])または血清培養(Serum[+])における GB2 細胞に対する TGFBR1/2 二重阻害剤及び TGFBR1 阻害剤の幹細胞マーカー及び分化マーカー発現量への影響を western blotting により定量した。血清培養 GB2 細胞で TGFBR1/2 阻害剤による特異的なマーカー変動が見られた。エラーバーは標準偏差を表す(n=3)。



## 第4章 考察

本研究では膠芽腫幹細胞の幹細胞性に関わる細胞内リン酸化ネットワークを解析するために、膠芽腫患者から樹立・単離した膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞を用いた。タンパク質や遺伝子発現の網羅的な解析は生命の複雑な分子システムを理解するための強力なツールとなっており、膠芽腫幹細胞の分化に関する解析にも応用されている。Schulte らは膠芽腫幹細胞とその分化細胞及び従来の膠芽腫細胞株の遺伝子発現パターンを比較し、細胞膜を7回貫通するGタンパク共役受容体である CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4) が膠芽腫幹細胞の浸潤性の増殖に重要であることを見出した(82)。Niibori-Nambu らは膠芽腫幹細胞の血清分化における遺伝子発現とタンパク質発現の変化を網羅的に解析し、Collagen type-4、Laminin- $\alpha$ 2 や Fibronectin といった Integrin ファミリーや細胞外マトリックスが分化誘導により mRNA レベル及びタンパク質レベルで上昇していることや、Integrin  $\alpha$ 5 及び Fibronectin が膠芽腫幹細胞の分化における微小環境の形成に重要であることを明らかにした(69)。しかし、リン酸化シグナルが膠芽腫幹細胞の分化に重要である報告はあるものの、そのリン酸化プロテオーム解析は未だ行われていなかった。そこで本研究では膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞について血清培地を用いた分化誘導系における定量リン酸化プロテオーム解析を行い、1,139 種類のタンパク質における 2,452 リン酸化アイソフォームの定量データを取得し、血清培養により 419 種類のタンパク質における 734 リン酸化アイソフォームのリン酸化が 2 倍以上変動していることを明らかにした。当研究室で過去に報告した GB2 細胞の EGF 刺激の定量リン酸化プロテオーム解析では約 27.8%のリン酸化タンパク質が変動していたが、今回は約 36.4%のリン酸化タンパク質が変動しており GB2 細胞の血清培養による分化は EGF 刺激に比べ多くの因子により制御されていることが示された。また、今回変動したリン酸化タンパク質について GO 解析を行ったところ、Biological process カテゴリーにおいて細胞の分化・発生に関わる developmental process の GO タームが有意に抽出され、この結果は本解析が膠芽腫幹細胞の幹細胞性及び分化に関わるタン

パク質リン酸化の変動を検出していることを示唆すると考えられた。

本解析で同定・定量されたリン酸化部位の中でキナーゼの酵素活性部位に注目したところ、GB2 細胞の無血清培養における Fyn の活性化及び血清培養における MAPK1/3 の活性化が明らかとなった。本解析において Fyn は Ser21、Tyr420 のリン酸化が無血清培養で亢進しており、Yeo らの報告では cAMP 依存性キナーゼ PKA (Protein kinase A) の認識部位である Ser21 のリン酸化は Tyr420 の自己リン酸化を促進させ、細胞外マトリックスによる刺激から生じるシグナルに重要な役割を担っている(83)。また、Tyr420 の高リン酸化は膠芽腫の臨床検体の組織染色においても検出されている(84)。GB2 細胞の血清培養で活性化していた MAPK1/3 に関しては、結果で述べた膠芽腫幹細胞分化におけるリン酸化亢進の報告の他に、神経幹細胞・神経前駆細胞及び細胞において分化の促進に関与していることが報告されている(85, 86)。さらに、Wnt、Notch、Hedgehog シグナルといったがん幹細胞に関連するシグナルパスウェイについて、血清培養で変動したリン酸化タンパク質を用いたパスウェイ解析では有意な関連性は見られなかったものの、個々の分子に注目した際に幹細胞性や分化に関わるタンパク質のリン酸化変動が見られた。これらから GB2 細胞の幹細胞性維持及び分化に関わるリン酸化ネットワークは各々異なるキナーゼの活性化が生じており、多岐にわたるシグナル伝達パスウェイにより制御されていることが示された。

血清培養による分化誘導系において 2 倍以上変動したリン酸化タンパク質について関連するパスウェイを抽出するため、KeyMolnet 及び Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析した結果、Intermediate filament signaling、Signaling by Rho family GTPases 及び Integrin signaling と有意な関連性が示された。これらは細胞骨格の再構築、接着結合や形態形成に関わるパスウェイであり、GO 解析で細胞骨格や細胞接着に関わる GO タームが有意に抽出されたことに大きく寄与していると考えられた。これらのパスウェイの中で特に Signaling by Rho family GTPases に属するタンパク質においてタンパク質の機能に関わる部位のリン酸化活性の変動が多く見られた(図 11)。例えば Rho guanine nucleotide

exchange factor 7 (ARHGEF7)、Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 (BAIAP2)、Cofilin-1(CFL1)及び Vimentin (VIM)の機能に関わるリン酸化部位は無血清培養においてリン酸化が亢進していた。Rho グアニンヌクレオチド交換因子の一つである ARHGEF7 の Ser516 は  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性キナーゼ CaMK1 によりリン酸化が促進され、神経の発生や構造的変化におけるシナプス形成促進に関与している(87)。BAIAP2 は Rho ファミリーを含む膜結合性の低分子型 G タンパク質と細胞質内のエフェクター分子を繋げるアダプタータンパク質であり、Thr340 及び Thr360 がリン酸化されることで 14-3-3 タンパク質との結合が促進され、神経幹細胞の分化時に生じる平板状細胞突起の制御因子として働いている(88)。さらに、CFL1 は脳の発生における神経突起の形成時のアクチン重合化に関与しており、LIM キナーゼファミリーによる Ser3 のリン酸化によってその活性は阻害されている(89)。VIM は結果(表 5)で示した通り、本解析で最も多くリン酸化部位(29 ヶ所)が同定されたタンパク質であり、2 ヶ所のリン酸化部位が無血清培養でリン酸化が亢進していた。その中で Ser39 はセリン・スレオニンキナーゼの Akt1 によりリン酸化が促進され、軟部肉腫細胞の運動性や浸潤性の促進への関与が報告されている(90)。一方、血清培養においては Integrin- $\alpha$ 4 (ITGA4)及び Myosin regulatory light chain 12A (MYL12A)の機能に関わるリン酸化部位のリン酸化活性の亢進が見られた。ITGA4 は Integrin- $\beta$ 1 又は  $\beta$ 7 とヘテロ二量体を形成し接着分子 fibronectin 及び vascular cell adhesion molecule 1 と結合する受容体であり、その Ser1021 の PKA によるリン酸化は細胞質内アダプター分子である paxillin の結合を阻害し、細胞の伸展を亢進させている(91)。Myosin の制御に関わる Myosin サブユニットである MYL12A の Ser19 におけるリン酸化は接着刺激により活性化され、Myosin IIA 及び IIB を動員させることで細胞伸展における平板状細胞突起の促進に関わっている(92)。これらの結果に加え、神経幹細胞のスフィアの安定化や分化における神経突起の伸展にも Rho family GTPase が関与していることから(93)、膠芽腫幹細胞の血清培養における細胞骨格の再構成や接着状態の変化に Signaling by Rho family GTPases のリン酸化の変動が重要

な役割を担っていることが示された。これらのリン酸化の変動が血清培養による分化誘導によって生じたものか、リン酸化の変動自体が分化を引き起こすのかは明らかではないが、**Signaling by Rho family GTPases** における Rho 結合型キナーゼである **ROCK (Rho associated protein kinase)**の活性は ES 細胞の未分化性維持に関わり、**ROCK** の阻害は神経細胞への分化を促進することが報告されており(94)、本シグナルのリン酸化の制御により膠芽腫幹細胞の分化を誘導できる可能性が考えられた。

膠芽腫幹細胞の分化におけるリン酸化の変動を制御している因子の同定を目指して **PhosphoSiteAnalyzer** による上流キナーゼ予測解析を行った結果、**TGFBR2** 及び **ACVR2A/B** が抽出され、**IPA** による上流制御因子解析を行った結果では、**TGF- $\beta$ 1** が最も有意に抽出された。**TGF- $\beta$ 1** の **TGFBR2** 結合により活性化される **TGF- $\beta$**  シグナルと **Activin** の **ACVR2A/B** 結合により活性化される **Activin** シグナルは共にがん幹細胞への関連が報告されているが(95, 96)、**TGFBR2** 及び **ACVR2A/B** の膠芽腫幹細胞の分化への寄与は明らかとなっていなかった。これらの受容体の発現量を **western blotting** により定量したところ、**TGFBR2** は血清培養において発現が著増していたのに対し、**ACVR2A/B** の発現量は変化がなく、**TGFBR2** の活性が **GB2** 細胞の分化に関与している可能性が考えられた。また、**TGFBR2** の増加は過去の膠芽腫幹細胞のトランスクリプトーム解析結果と一致していただだけでなく、**TGFBR2** 発現量依存的に **MAPK1/3** のリン酸化が亢進する報告とも一致していた(97)。そこで、**TGFBR2** の **GB2** 細胞への寄与を調べるために **TGFBR1** 阻害剤及び **TGFBR1/2** 二重阻害剤を用いた実験的検討を試みた結果、**TGFBR2** 阻害が無血清培養における **GB2** 細胞の自己複製能を亢進させ、血清培養による分化誘導時の幹細胞マーカーの低下及び分化マーカーの上昇を抑制することが明らかとなり、**TGFBR2** の活性が **GB2** 細胞の分化を促進させる方向に働くことが示された。この結果は、不活性型 **TGFBR2** を発現する神経幹細胞は自己複製能が亢進する報告や(98)、**TGF- $\beta$** シグナルの活性が膠芽腫幹細胞の血管周皮細胞への分化に重要である報告と一致していた(22)。また、**TGFBR1** の阻害が膠芽腫幹細胞の放

射線感受性や増殖を抑制する報告はあるが(99)、本研究は **TGFBR2** の阻害が膠芽腫幹細胞の分化を抑制することを初めて明らかにした。しかし、**TGFBR1/2** 二重阻害剤の阻害のみでは **GB2** 細胞のスフィア状態から接着細胞への変化を阻害することはできず、他のシグナルパスウェイも膠芽腫幹細胞の分化に寄与していることが示唆された。

終わりに、本研究は膠芽腫の患者組織から単離されたがん幹細胞である **GB2** 細胞について、分化におけるリン酸化ネットワークの変動を高精度定量プロテオミクスにより明らかにし、多角的なバイオインフォマティクス解析により分化に重要なパスウェイや分子の同定を行った。本解析は血清分化誘導における膠芽腫幹細胞のリン酸化プロテオームの変動を解析した初めての報告であり、細胞骨格の再構築に関わる **Signaling by Rho family GTPases** や **Intermediate filament signaling pathway** と膠芽腫幹細胞分化との関連が示唆された。さらに、分化におけるリン酸化変動の制御因子として抽出された **TGFBR2** について、キナーゼ阻害剤を用いて膠芽腫幹細胞の分化に関わることを初めて示すことができた。以上から、本研究で同定されたパスウェイや分子は膠芽腫幹細胞の幹細胞性制御による膠芽腫治療法の開発の一助となることが期待できる。さらに、今回の定量リン酸化プロテオーム解析と多角的なバイオインフォマティクス解析を組み合わせた手法はがん幹細胞に対する新規薬剤標的の同定に貢献しうると考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー 尾山大明 准教授に深甚なる敬意と感謝の意を表します。非常に有益な御指導、御助言を賜りました、東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー 秦裕子 博士に深謝致します。貴重な細胞を分与下さり、培養法をはじめ実験遂行にあたり御指導、御助言を賜りました東京大学 分子細胞生物学研究所 分子情報研究分野 秋山徹 教授、那須亮 助教に深く感謝致します。研究遂行及び論文作成に当たり終始応援して頂いた東京大学 医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリーの皆様に感謝の意を表します。

また、博士過程の学生生活において御助言・激励を頂きました東京大学 医科学研究所所属の友人各位に厚く御礼申し上げます。最後に、これまでの学生生活を精神的・経済的に支えて下さった家族に深く感謝致します。

## 参考文献

1. The committee of the brain tumor registry of Japan. (2014) REPORT OF BRAIN TUMOR REGISTRY OF JAPAN (2001-2004) 13th Edition *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 54, Supple, 1–120
2. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97–109
3. Jones, T. S., and Holland, E. C. (2012) Standard of care therapy for malignant glioma and its effect on tumor and stromal cells. *Oncogene* 31, 1995–2006
4. Wen, P. Y., and Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 359, 492–507
5. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. a, Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R. O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996
6. Kawano, H., Hirano, H., Yonezawa, H., Yunoue, S., Yatsushiro, K., Ogita, M., Hiraki, Y., Uchida, H., Habu, M., Fujio, S., Oyoshi, T., Bakhtiar, Y., Sugata, S., Yamahata, H., Hanaya, R., Tokimura, H., and Arita, K. (2014) Improvement in treatment results of glioblastoma over the last three decades and beneficial factors. *Br. J. Neurosurg.*, 1–7
7. Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A. a., Hilton, M., Abrey, L., and Cloughesy, T. (2014) Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722
8. Magee, J. A., Piskounova, E., and Morrison, S. J. (2012) Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283–296
9. Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737

10. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828
11. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988
12. O'Brien, C. a, Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110
13. Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., and Simeone, D. M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037
14. Son, M. J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J., and Fine, H. a (2009) SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440–452
15. Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421–432
16. Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760
17. Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J. K., and Fine, H. A. (2006) Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391–403
18. Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., Bergers, G., Weiss, W. A., Alvarez-Buylla, A., and Hodgson, J. G. (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation



- of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 6, 14
19. Tchoghandjian, A., Jennewein, C., Eckhardt, I., Momma, S., Figarella-Branger, D., and Fulda, S. (2014) Smac mimetic promotes glioblastoma cancer stem-like cell differentiation by activating NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ.* 21, 735–747
  20. Ying, M., Wang, S., Sang, Y., Sun, P., Lal, B., Goodwin, C. R., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Lathia, J., and Xia, S. (2011) Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene* 30, 3454–3467
  21. Wei, J., Barr, J., Kong, L.Y., Wang, Y., Wu, A., Sharma, A. K., Gumin, J., Henry, V., Colman, H., Sawaya, R., Lang, F. F., and Heimberger, A. B. (2010) Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin. Cancer Res.* 16, 461–473
  22. Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N., and Bao, S. (2013) Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152
  23. Li, Z., Wang, H., Eyler, C. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009) Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 284, 16705–16709
  24. Nager, M., Bhardwaj, D., Cantí, C., Medina, L., Nogués, P., and Herreros, J. (2012)  $\beta$ -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 192362
  25. Sunayama, J., Sato, A., Matsuda, K.I., Tachibana, K., Watanabe, E., Seino, S., Suzuki, K., Narita, Y., Shibui, S., Sakurada, K., Kayama, T., Tomiyama, A., and Kitanaka, C. (2011) FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* 29, 1327–1337
  26. Lee, J., Son, M. M. J. M., Woolard, K., Donin, N. N. M. N. M., Li, A., Cheng, C. H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J. C., Zhang, W., Maric, D., and Fine, H. a (2008)

- Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 13, 69–80
27. Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., and Ivy, S. P. (2011) Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 97–106
  28. Arbor, A., Neurosurgery, F., Besta, N. N. C., Bicocca, M., Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.M., Maciaczyk, J., Nikkhah, G., Dimeco, F., Piccirillo, S., Vescovi, A. L., and Eberhart, C. G. (2010) NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 28, 5–16
  29. Wurdak, H., Zhu, S., Romero, A., Lorger, M., Watson, J., Chiang, C.Y., Zhang, J., Natu, V. S., Lairson, L. L., Walker, J. R., Trussell, C. M., Harsh, G. R., Vogel, H., Felding-Habermann, B., Orth, A. P., Miraglia, L. J., Rines, D. R., Skirboll, S. L., and Schultz, P. G. (2010) An RNAi screen identifies TRRAP as a regulator of brain tumor-initiating cell differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 37–47
  30. Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Todo, T., Ino, Y., Saito, N., Aburatani, H., Funato, K., Echizen, K., Sugano, H., Haruta, R., Matsui, M., Takahashi, R., Manabe, E., Oda, T., and Akiyama, T. (2013) The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 3840–3845
  31. Koyama-Nasu, R., Haruta, R., Nasu-Nishimura, Y., Taniue, K., Katou, Y., Shirahige, K., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Matsui, M., Takahashi, R., Hoshino-Okubo, A., Sugano, H., Manabe, E., Funato, K., and Akiyama, T. (2014) The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 33, 2236–2244
  32. Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Katou, Y., Ogawa, H., Morishita, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Toyoshima, C., Shirahige, K., and Akiyama, T. (2014) 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell Rep.* 9, 48–60
  33. Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M.,

- Oefner, P. J., Bogdahn, U., Wischhusen, J., Spang, R., Storch, A., and Beier, C. P. (2010) Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res.* 70, 2030–2040
34. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207
35. Walther, T. C., and Mann, M. (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.* 190, 491–500
36. Botelho, D., Wall, M. J. M. M. J., Vieira, D. B., Fitzsimmons, S., Liu, F., and Doucette, A. (2010) Top-down and bottom-up proteomics of SDS-containing solutions following mass-based separation. *J. Proteome Res.*, 2863–2870
37. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. Supplementary Information. *Nat. Methods* 6, 359–362
38. Domon, B., and Aebersold, R. (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212–217
39. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567
40. Eng, J. K., McCormack, A. L., and Yates, J. R. (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976–989
41. Craig, R., Cortens, J. P., and Beavis, R. C. (2004) Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J. Proteome Res.* 3, 1234–1242
42. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. a, Olsen, J. V, and Mann, M. (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10, 1794–1805
43. Schreiber, T. B., Mäusbacher, N., Breitkopf, S. B., Grundner-Culemann, K., and Daub, H.

- (2008) Quantitative phosphoproteomics—an emerging key technology in signal-transduction research. *Proteomics* 8, 4416–4432
44. Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386
  45. Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., and Pappin, D. J. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1154–1169
  46. Ong, S.E., and Mann, M. (2006) A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* 1, 2650–2660
  47. Kanshin, E., Michnick, S., and Thibault, P. (2012) Sample preparation and analytical strategies for large-scale phosphoproteomics experiments. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 843–53
  48. Ikeguchi, Y., and Nakamura, H. (1997) Determination of Organic Phosphates by Column-Switching High Performance Anion-Exchange Chromatography Using On-Line Preconcentration on Titania. *Anal. Sci.* 13, 479–483
  49. Pinkse, M. W. H., Uitto, P. M., Hilhorst, M. J., Ooms, B., and Heck, A. J. R. (2004) Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal. Chem.* 76, 3935–3943
  50. Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2007) Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1103–1109
  51. Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B.,

- Latham, V., and Sullivan, M. (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res.* 40, D261–D270
52. Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.L., Lotia, S., Pico, A. R., Bader, G. D., and Ideker, T. (2012) A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat. Methods* 9, 1069–1076
53. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29
54. Khatri, P., Sirota, M., and Butte, A. J. (2012) Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002375
55. Imamura, H., Wakabayashi, M., and Ishihama, Y. (2012) Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: status and prospects. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 836–842
56. Linding, R., Jensen, L. J., Pasculescu, A., Olhovsky, M., Colwill, K., Bork, P., Yaffe, M. B., and Pawson, T. (2008) NetworKIN: a resource for exploring cellular phosphorylation networks. *Nucleic Acids Res.* 36, D695–D699
57. Horn, H., Schoof, E. M., Kim, J., Robin, X., Miller, M. L., Diella, F., Palma, A., Cesareni, G., Jensen, L. J., and Linding, R. (2014) KinomeXplorer: an integrated platform for kinome biology studies. *Nat. Methods* 11, 603–604
58. Pollard, S. M., Yoshikawa, K., Clarke, I. D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., Squire, J. A., Smith, A., and Dirks, P. (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580
59. Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., Swaney, D. L., Tervo, M. A., Bolin, J. M., Ruotti, V., Stewart, R., Thomson, J. A., and Coon, J. J. (2011) Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS

- cells. *Nat. Methods* 8, 821–827
60. Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21, 3448–3449
  61. Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. a T. M., Jørgensen, C., Miron, I. M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., Metalnikov, P., Nguyen, V., Pasculescu, A., Jin, J., Park, J. G., Samson, L. D., Woodgett, J. R., Russell, R. B., Bork, P., Yaffe, M. B., and Pawson, T. (2007) Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415–1426
  62. Bennetzen, M. V, Cox, J., Mann, M., and Andersen, J. S. (2012) PhosphoSiteAnalyzer: a bioinformatic platform for deciphering phospho proteomes using kinase predictions retrieved from NetworkKIN. *J. Proteome Res.* 11, 3480–3486
  63. Kozuka-Hata, H., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Ao-Kondo, H., Tsumoto, K., Akiyama, T., and Oyama, M. (2012) Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome. *PLoS One* 7, e43398
  64. El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J. L., Eichmann, A., Delattre, J. Y., Maniotis, A. J., and Sanson, M. (2010) A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: Tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133, 973–982
  65. deCarvalho, A. C., Nelson, K., Lemke, N., Lehman, N. L., Arbab, A. S., Kalkanis, S., and Mikkelsen, T. (2010) Gliosarcoma stem cells undergo glial and mesenchymal differentiation in vivo. *Stem Cells* 28, 181–190
  66. Narushima, Y., Kozuka-Hata, H., Koyama-Nasu, R., Tsumoto, K., Inoue, J., Akiyama, T., and Oyama, M. Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals TGFBR2 as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties. *Mol. Cell. Proteomics* 2015 Dec 15. pii: mcp.M115.049999. [Epub ahead of print]

67. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnädig, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648
68. Wei, Y., Jiang, Y., Zou, F., Liu, Y., Wang, S., Xu, N., Xu, W., Cui, C., Xing, Y., Liu, Y., Cao, B., Liu, C., Wu, G., Ao, H., Zhang, X., and Jiang, J. (2013) Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 6829–6834
69. Niibori-Nambu, A., Midorikawa, U., Mizuguchi, S., Hide, T., Nagai, M., Komohara, Y., Nagayama, M., Hirayama, M., Kobayashi, D., Tsubota, N., Takezaki, T., Makino, K., Nakamura, H., Takeya, M., Kuratsu, J., and Araki, N. (2013) Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin  $\alpha V$ . *PLoS One* 8, e59558
70. Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C. J. (2012) Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* 12, 133–143
71. Visvader, J. E. E., and Lindeman, G. J. J. (2012) Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728
72. Rosen, J. M., and Jordan, C. T. (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670–1673
73. Zilberberg, A., Yaniv, A., and Gazit, A. (2004) The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 17535–17542
74. Kormish, J. D., Sinner, D., and Zorn, A. M. (2010) Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev. Dyn.* 239, 56–68
75. Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., and Miele, L. (2010) Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 3141–3152
76. Parathath, S. R., Mainwaring, L. A., Fernandez-L, A., Guldal, C. G., Nahlé, Z., and

- Kenney, A. M. (2014)  $\beta$ -Arrestin-1 links mitogenic sonic hedgehog signaling to the cell cycle exit machinery in neural precursors. *Cell Cycle* 9, 4013–4024
77. Tomellini, E., Lagadec, C., Polakowska, R., and Le Bourhis, X. (2014) Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2467–2481
78. Han, X., Stewart, J. E., Bellis, S. L., Benveniste, E. N., Ding, Q., Tachibana, K., Grammer, J. R., and Gladson, C. L. (2001) TGF-beta1 up-regulates paxillin protein expression in malignant astrocytoma cells: requirement for a fibronectin substrate. *Oncogene* 20, 7976–7986
79. Luo, X., Ding, L., and Chegini, N. (2004) Gonadotropin-releasing hormone and TGF-beta activate MAP kinase and differentially regulate fibronectin expression in endometrial epithelial and stromal cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E991–E1001
80. Zhang, Y. E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128–139
81. Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., and Wrana, J. L. (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603–1609
82. Schulte, A., Günther, H. S., Phillips, H. S., Kemming, D., Martens, T., Kharbanda, S., Soriano, R. H., Modrusan, Z., Zapf, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2011) A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia* 59, 590–602
83. Yeo, M. G., Oh, H. J., Cho, H.S., Chun, J. S., Marcantonio, E. E., and Song, W. K. (2011) Phosphorylation of Ser 21 in Fyn regulates its kinase activity, focal adhesion targeting, and is required for cell migration. *J. Cell. Physiol.* 226, 236–247
84. Lu, K. V., Zhu, S., Cvrljevic, A., Huang, T. T., Sarkaria, S., Ahkavan, D., Dang, J., Dinca, E. B., Plaisier, S. B., Oderberg, I., Lee, Y., Chen, Z., Caldwell, J. S., Xie, Y., Loo, J. A., Seligson, D., Chakravari, A., Lee, F. Y., Weinmann, R., Cloughesy, T. F., Nelson, S. F.,



- Bergers, G., Graeber, T., Furnari, F. B., James, C. D., Cavenee, W. K., Johns, T. G., and Mischel, P. S. (2009) Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 69, 6889–6898
85. Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., and Sugimoto, H. (2007) Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* 25, 649–658
86. Singh, A. M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A. L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., and Dalton, S. (2012) Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 10, 312–326
87. Saneyoshi, T., Wayman, G., Fortin, D., Davare, M., Hoshi, N., Nozaki, N., Natsume, T., and Soderling, T. R. (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/ $\beta$ PIX signaling complex. *Neuron* 57, 94–107
88. Robens, J. M., Yeow-Fong, L., Ng, E., Hall, C., and Manser, E. (2010) Regulation of IRSp53-dependent filopodial dynamics by antagonism between 14-3-3 binding and SH3-mediated localization. *Mol. Cell. Biol.* 30, 829–844
89. Flynn, K. C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B. K., Gurniak, C., Shaw, A. E., Meyn, L., Wedlich-Söldner, R., Bamburg, J. R., Small, J. V., Witke, W., and Bradke, F. (2012) ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron* 76, 1091–1107
90. Zhu, Q.S., Rosenblatt, K., Huang, K.L., Lahat, G., Brobey, R., Bolshakov, S., Nguyen, T., Ding, Z., Belousov, R., Bill, K., Luo, X., Lazar, A., Dicker, A., Mills, G. B., Hung, M.C., and Lev, D. (2011) Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene* 30, 457–470
91. Han, J., Liu, S., Rose, D. M., Schlaepfer, D. D., McDonald, H., and Ginsberg, M. H. (2001) Phosphorylation of the integrin  $\alpha$ 4 cytoplasmic domain regulates paxillin binding. *J. Biol. Chem.* 276, 40903–40909
92. Schaar, B. T., and McConnell, S. K. (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal

- migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13652–13657
93. da Silva, J. S., and Dotti, C. G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 694–704
94. Chang, T.C., Chen, Y.C., Yang, M.H., Chen, C.H., Hsing, E.W., Ko, B.S., Liou, J.Y., and Wu, K. K. (2010) Rho kinases regulate the renewal and neural differentiation of embryonic stem cells in a cell plating density-dependent manner. *PLoS One* 5, e9187
95. Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2009) Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5, 504–514
96. Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M.T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcalá, S., Rodríguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruiz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrián, D. Á., Heuchel, R., Löhr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., and Heeschen, C. (2011) Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell* 9, 433–46
97. Rojas, A., Padidam, M., Cress, D., and Grady, W. M. (2009) TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1165–1173
98. Falk, S., Wurdak, H., Ittner, L. M., Ille, F., Sumara, G., Schmid, M.T., Draganova, K., Lang, K. S., Paratore, C., Leveen, P., Suter, U., Karlsson, S., Born, W., Ricci, R., Götz, M., and Sommer, L. (2008) Brain area-specific effect of TGF-β signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion. *Cell Stem Cell* 2, 472–483
99. Zhang, M., Kleber, S., Röhrich, M., Timke, C., Han, N., Tuettenberg, J., Martin-Villalba, A., Debus, J., Peschke, P., Wirkner, U., Lahn, M., and Huber, P. E. (2011) Blockade of TGF-β signaling by the TGFβR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res.* 71, 7155–7167

## 補足資料

- GB2 細胞の分化誘導において 2 倍以上変動した  
リン酸化アイソフォームのリスト

補足資料：分化誘導で2倍以上変動したリン酸化アイソフォームのリスト

<sup>1</sup> 同定されたリン酸化部位のアミノ酸残基とタンパク質内における位置(S: Serine, T: Threonine, Y: Tyrosine)

<sup>2</sup> 同定されたリン酸化ペプチド(小文字: リン酸化部位)

<sup>3</sup> リン酸化アイソフォームの定量回数

<sup>4</sup> 定量値の標準偏差 (NA: Not Available, 定量回数が1回だけのリン酸化アイソフォーム)

RefSeq protein ID	Protein name	Gene symbol	Phospho-site <sup>1</sup>	Identified sequence <sup>2</sup>	Quantification count <sup>3</sup>	Normalized log <sub>2</sub> (H/L ratio)	S.D. <sup>4</sup>
NP_005750.4	abl interactor 2	ABI2	S177	TTPTQKPPsPPMSGK	7	2.219	0.661
NP_005750.4	abl interactor 2	ABI2	S221	NMAPSQQsPVR	11	1.296	0.390
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	S431	TLsPTPSAEGYQDVR	12	1.015	0.255
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	S452	STsQGSINSVPYYSR	7	1.992	0.337
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	S587	RSsGREEDDEELLR	3	1.565	0.664
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	S655	TAsLPGYGR	5	1.938	0.627
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	S706	GVsMPNMLEPK	8	2.429	0.825
NP_002304.3	actin-binding LIM protein 1 isoform a	ABLIM1	T433	TLSPtPSAEGYQDVR	1	1.051	NA
NP_061147.1	acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic isoform 1	ACSS2	S267	AELGMGDSTsQsPPIKR	2	3.088	0.599
NP_061147.1	acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic isoform 1	ACSS2	S30	SWsPPPEVSR	23	1.900	0.168
NP_001101.1	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 precursor	ADAM10	T719	LPPPKPLPGtLKR	2	1.855	0.000
NP_068368.2	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22 isoform 2 preproprotein	ADAM22	S798	SNsWQGNLGGNK	4	3.121	0.000
NP_001608.1	beta-adducin isoform a	ADD2	S713	TPsFLKK	3	1.030	0.655
NP_940997.1	actin filament-associated protein 1 isoform B	AFAP1	S668	SGTSSPQsPVFR	7	-1.387	0.638
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S135	LKsEDGVEGDLGETQSR	10	-2.906	0.643
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5731	GGVTGsPEASISGSK	10	-1.022	0.147
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5735	GGVTGSPEAsISGSK	3	-2.049	2.455
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5752	ASLGSLEGEAEAEASSPK	5	-1.350	0.726
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5763	ASLGSLEGEAEAEASsPK	1	-2.004	NA
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5782	SNsFSDER	1	-3.680	NA
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S5841	GHYEVtGsDDETgKLGSGV SLASK	1	-2.146	NA
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	S93	KGDRsPEPGQTWTR	4	-1.251	0.622
NP_001611.1	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	AHNAK	T5839	GHYEVtGSDDETgKLGSGV SLASK	1	-2.146	NA
NP_116265.1	LIM domain-containing protein ajuba isoform 1	AJUBA	S263	GAQPGRHsVTGYGDCAVGAR	2	1.934	0.078
NP_001092102.1	proline-rich AKT1 substrate 1 isoform b	AKT1S1	S203	SsDEENGPPSSPDLDR	1	-1.557	NA
NP_000025.1	fructose-bisphosphate aldolase A isoform 1	ALDOA	S46	LQsIGTENTEENR	2	-1.201	0.000
NP_001034977.1	ankyrin repeat domain-containing protein 34A	ANKRD34A	S473	RHsMQTEQIR	1	-3.025	NA
NP_061155.2	actin-binding protein anillin	ANLN	S323	TPIsPLK	1	-1.792	NA
NP_000691.1	annexin A1	ANXA1	S34	GGPGsAVSPYPTFNPSsDVA ALHK	3	1.836	0.194
NP_001129487.1	annexin A2 isoform 2	ANXA2	S12	LsLEGDHSTPPSAYGSVK	6	-2.415	0.000
NP_001129487.1	annexin A2 isoform 2	ANXA2	S18	LSLEGDHsTTPSAYGSVK	1	-1.963	NA
NP_001129487.1	annexin A2 isoform 2	ANXA2	T19	LSLEGDHsTTPSAYGSVK	5	-2.415	0.000
NP_057041.2	probable methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	APIP	S87	DISGPsPSKK	1	1.479	NA
NP_057041.2	probable methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	APIP	S89	DISGSPsKK	1	1.203	NA
NP_115765.2	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2 isoform 1	ARFGAP2	S368	DNPFLGEsFGSR	3	1.374	0.000
NP_115765.2	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2 isoform 1	ARFGAP2	S432	AIssDMFFGR	3	1.148	0.230
NP_055385.3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3 isoform 1	ARFGAP3	S428	AIssDMYFGR	17	1.250	0.205
NP_055385.3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3 isoform 1	ARFGAP3	S451	LsASSISSADLFEEPR	1	2.958	NA
NP_055385.3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3 isoform 1	ARFGAP3	S455	LSASSsISSADLFEEPR	6	2.274	0.749
NP_004299.1	rho GTPase-activating protein 1	ARHGAP1	S51	SSsPELVTHLK	8	-1.910	0.261
NP_060757.4	rho GTPase-activating protein 12 isoform 1	ARHGAP12	S165	FNNDShsPK	1	1.875	NA
NP_060757.4	rho GTPase-activating protein 12 isoform 1	ARHGAP12	S240	ATTPPNQGRPDsPVYANLQELK	1	2.714	NA
NP_003890.1	rho guanine nucleotide exchange factor 7 isoform a	ARHGEF7	S516	KPsDEEFASR	2	1.427	0.000

NP_003890.1	rho guanine nucleotide exchange factor 7 isoform a	ARHGEF7	S71	ASEKPVsPK	3	1.397	0.000
NP_663788.1	rho guanine nucleotide exchange factor 7 isoform b	ARHGEF7	S155	sLDMTDNSNNQLVVR	4	2.809	0.000
NP_663788.1	rho guanine nucleotide exchange factor 7 isoform b	ARHGEF7	S228	ASEKPVsPK	3	1.397	0.000
NP_663788.1	rho guanine nucleotide exchange factor 7 isoform b	ARHGEF7	S673	KPsDEEFASR	2	1.427	0.000
NP_006619.1	cAMP-regulated phosphoprotein 19	ARPP19	S104	KPsLVASK	10	1.071	0.020
NP_064647.1	beta-arrestin-1 isoform B	ARRB1	S404	GMKDDKEEEEDGTGsPQLNRR	5	1.203	0.153
NP_004313.1	bcl2 antagonist of cell death	BAD	S118	RMsDEFVDSFK; RMsDEFVDSFKK	4	1.225	0.083
NP_006331.1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 isoform 3	BAIAP2	T340	LSDSYSNtLPVR	11	1.106	0.114
NP_006331.1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 isoform 3	BAIAP2	T360	NSYATTENKtLPR	2	1.287	0.000
NP_000700.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial isoform 1 precursor	BCKDHA	S337	IGHHsTSDDSSAYR	1	-2.290	NA
NP_056182.2	bcl-2-like protein 13 isoform a	BCL2L13	S426	EESLVEELsPASEK	1	-1.160	NA
NP_056182.2	bcl-2-like protein 13 isoform a	BCL2L13	S444	SRLsPAGEMKPMPLSEGG	1	-2.169	NA
NP_056182.2	bcl-2-like protein 13 isoform a	BCL2L13	T374	SSPAtSLFVELDEEEVK	1	-1.779	NA
NP_005859.1	BET1 homolog	BET1	S50	SLsIEIGHEVK	5	1.888	0.000
NP_001092257.1	BET1-like protein isoform 1	BET1L	S9	AQsPGAVEEILDR	3	-2.134	0.000
NP_647593.1	myc box-dependent-interacting protein 1 isoform 1	BIN1	T348	KGPPVPPPKHtPSK	2	-2.112	0.581
NP_031397.1	bromodomain-containing protein 3	BRD3	S263	SEsPPPLSDPK	1	1.188	NA
NP_001138505.1	uncharacterized protein C11orf96	C11orf96	S112	LRNsLDSSSDSAL	1	-1.963	NA
NP_001138505.1	uncharacterized protein C11orf96	C11orf96	S86	SFLQsLECLR	4	-2.388	0.299
NP_001138505.1	uncharacterized protein C11orf96	C11orf96	T55	FKtQPVTFDEIQEVEEEGVSP MEEK	3	-2.227	0.076
NP_001138505.1	uncharacterized protein C11orf96	C11orf96	T55;S72	FKtQPVTFDEIQEVEEEGVsP MEEK	2	-3.277	0.000
NP_001138505.1	uncharacterized protein C11orf96	C11orf96	T94	StQSLSLQR	2	-1.948	0.000
NP_997263.2	uncharacterized protein C15orf52	C15orf52	S201	sPPTQVAISSDSAR; VTRsPPTQVAISSDSAR	14	-1.415	0.558
NP_997263.2	uncharacterized protein C15orf52	C15orf52	S392	LGSAPAASPALAsPEGPK	3	-1.615	0.000
NP_659492.1	uncharacterized protein C18orf25 isoform a	C18orf25	S66	RDsSEQLASTESDKPTTGR	2	-1.170	0.086
NP_659492.1	uncharacterized protein C18orf25 isoform a	C18orf25	S69	RDSSEsQLASTESDKPTTGR	1	-1.140	NA
NP_116189.1	uncharacterized protein C1orf198 isoform 1	C1orf198	S175	SSsLDALGPTR	8	-3.035	0.000
NP_116189.1	uncharacterized protein C1orf198 isoform 1	C1orf198	S289	LPsPDVR	6	-4.904	0.747
NP_110433.1	uncharacterized protein C1orf21	C1orf21	S115	GRDYCsEEEDIT	2	2.383	0.000
NP_110433.1	uncharacterized protein C1orf21	C1orf21	S95	ANMHISEsQEFFR	3	2.689	0.200
NP_001078844.1	uncharacterized protein C1orf226 isoform 2	C1orf226	S222	RA sPSLIER	5	3.338	0.513
NP_001078844.1	uncharacterized protein C1orf226 isoform 2	C1orf226	S223	RA sPSLIER	8	2.339	0.446
NP_149988.1	UNC119-binding protein C5orf30	C5orf30	S167	sLDYLNLDK	2	1.745	0.000
NP_036245.1	carbonic anhydrase 14 precursor	CA14	S325	KsVVFtSAQATTEA	15	3.336	0.686
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S202	RGsIGENQIKDEK	52	-3.055	0.547
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S373	MPEDGLsDDKKPFK	1	-3.315	NA
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S388	GSsLKIEER	6	-2.230	0.602
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S401	AEFLNKsVQK	2	-3.234	0.326
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S469	GNVFSsPTAAGTPNK	7	-3.302	0.063
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S504	TPDGNKsPAPKPSDLRPGDV SSK	6	-3.063	0.285
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S504;S510	TPDGNKsPAPKsDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S528	NLWEKQsVDK	6	-1.076	0.000
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S534	VTsPTKV; QSVDKVTsPTKV	13	-3.805	0.700
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	S73	QKQEEESLGQVTDQVEVNAQ NsVPDEEAK	5	-4.078	0.000
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	T471	GNVFSSPTAAGTPNK	4	-3.395	0.000
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	T480	GNVFSSPTAAGTPNKtAGLK	2	-1.398	0.000
NP_004333.1	caldesmon isoform 2	CALD1	T498;S504	tPDGNKsPAPKPSDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S628	MPEDGLsDDKKPFK	1	-3.315	NA
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S643	GSsLKIEER	2	-1.516	0.016
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S656	AEFLNKsVQK	1	-3.004	NA
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S724	GNVFSsPTAAGTPNK	7	-3.302	0.063
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S73	QKQEEESLGQVTDQVEVNAQ NsVPDEEAK	5	-4.078	0.000
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S759	TPDGNKsPAPKPSDLRPGDV SSK	4	-3.233	0.139
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S759;S765	TPDGNKsPAPKsDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S783	NLWEKQsVDK	6	-1.076	0.000
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	S789	VTsPTKV; QSVDKVTsPTKV	9	-3.475	0.284
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	T726	GNVFSSPTAAGTPNK	4	-3.395	0.000

NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	T735	GNVFSSPTAAGTPNKEtAGLK	2	-1.398	0.000
NP_149129.2	caldesmon isoform 1	CALD1	T753;S759	tPDGNKsPAPKPSDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S196	RGsIGENQGEEK	7	-1.464	0.578
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S393	MPEDGLsDDKKPFK	1	-3.315	NA
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S408	GSSLKIEER	3	-1.749	0.405
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S421	AEFLNKsVQVK	1	-3.004	NA
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S489	GNVFSsPTAAGTPNK	7	-3.302	0.063
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S524	TPDGNKsPAPKPSDLRPGDV SSK	4	-3.233	0.139
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S524;S530	TPDGNKsPAPKPsDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S548	NLWEKQsVDK	6	-1.076	0.000
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S554	VTsPTKV; QSVDKVTsPTKV	11	-3.561	0.382
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	S67	QKQEEESLGQVTDQVEVNAQ NsVPDEEAK	5	-4.078	0.000
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	T491	GNVFSSPTAAGTPNK	4	-3.395	0.000
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	T500	GNVFSSPTAAGTPNKEtAGLK	2	-1.398	0.000
NP_149130.1	caldesmon isoform 4	CALD1	T518;S524	tPDGNKsPAPKPSDLRPGDVS SK	1	-3.479	NA
NP_149131.1	caldesmon isoform 5	CALD1	S196	RGsIGENQIKDEK	4	-2.786	0.111
NP_149131.1	caldesmon isoform 5	CALD1	S404	SSGVKsTHQAAIVSK	1	-2.792	NA
NP_149131.1	caldesmon isoform 5	CALD1	S498	TPDGNKsPAPKPSDLRPGDV SSK	4	-3.157	0.000
NP_001212.2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta isoform 3	CAMK2D	S330	KPDGVKEsTESSNTTIEDEDV K	9	1.787	0.186
NP_001212.2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta isoform 3	CAMK2D	S333	ESTEsSNTTIEDEDVK	2	1.462	0.000
NP_001212.2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta isoform 3	CAMK2D	T331	KPDGVKEStESSNTTIEDEDV K	1	1.993	NA
NP_006358.1	adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	S301	SGPKPFsAPKPQTSPSPK	1	-1.198	NA
NP_006358.1	adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	S308	SGPKPFsAPKPQTsPSPK	3	-1.300	0.089
NP_006358.1	adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	S310	SGPKPFsAPKPQTSPsPK	3	-1.188	0.003
NP_006358.1	adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	T307	SGPKPFsAPKPQtSPSPK	6	-1.121	0.203
NP_001742.1	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform b	CARS	S307	ALQEGEGDLsIsADR	2	-1.454	0.000
NP_004337.2	caspase-3 preproprotein	CASP3	S24	IIHGSEMSDGSIGLDSNYK	1	2.097	NA
NP_001166366.1	caveolin-1 isoform beta	CAV1	S6	ADELsEKQVYDAHTK	4	-1.030	0.254
NP_001224.1	caveolin-2 isoform a	CAV2	S18	ADVQLFMDDDsYSHSGLEY ADPEK	2	-1.382	0.879
NP_074036.1	core-binding factor subunit beta isoform 1	CBFB	S173	RQQDPsPGSNLGGGDDLK	5	-1.109	0.076
NP_000062.1	cystathionine beta-synthase	CBS	S32	GSLEKGS PEDK	2	1.041	0.000
NP_065700.1	chromobox protein homolog 8	CBX8	S256	RQDsDLVQCGVTSPSSAEAT GK	4	-1.225	0.000
NP_005427.2	coiled-coil domain-containing protein 6	CCDC6	S323	QLsESESLEMDDER	8	-1.057	0.178
NP_477097.1	G1/S-specific cyclin-E2	CCNE2	S21	QQPQPSQTEsPQEAQIIQAK	7	1.743	0.346
NP_604394.1	CD99 antigen-like protein 2 isoform 3 precursor	CD99L2	Y171	ySTLHTQSAEPPPPPEPAR	1	-1.189	NA
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	S121	NAIsLPQLNQAAyDSLVLGK	20	-3.032	0.631
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	S192	RSDsLLSFR	11	-2.803	0.418
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	S350	AsWESLDEEWR	1	-2.123	NA
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	S353	ASWESLDEEWR	2	-2.345	0.306
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	S73	GGDVFGDTSFSLNHGGSSGs THR	1	-2.545	NA
NP_689449.1	cdc42 effector protein 1	CDC42EP1	T367	tPVPSTVQANTFEFADAEEDD EVKV	4	-3.453	0.301
NP_001257365.1	cdc42 effector protein 3	CDC42EP3	S144	LsCEPVMEEK	1	-3.328	NA
NP_001257365.1	cdc42 effector protein 3	CDC42EP3	S89	ANsTSDSVFTETPSPVLK	5	-3.054	0.336
NP_001257365.1	cdc42 effector protein 3	CDC42EP3	S89;S100	ANsTSDSVFTETPSPVLK	2	-2.584	0.000
NP_001257365.1	cdc42 effector protein 3	CDC42EP3	T90;S100	ANsTSDSVFTETPSPVLK	1	-2.584	NA
NP_036253.2	cdc42 effector protein 4	CDC42EP4	S11	QLVSSsVHSK	5	1.379	0.090
NP_036253.2	cdc42 effector protein 4	CDC42EP4	S118	NAMsLPQLNEK	4	1.901	0.000
NP_036253.2	cdc42 effector protein 4	CDC42EP4	S142	SLSSsPVKK	2	1.340	0.063
NP_036253.2	cdc42 effector protein 4	CDC42EP4	S292	AGPDLPSLPSHALEDEGWAA AAPsPGSAR	4	1.430	0.206
NP_112589.1	cell division cycle-associated protein 3	CDCA3	S68	HAQSDPRsPTLGIAR	2	-1.208	0.864
NP_004815.3	chromodomain Y-like protein isoform a	CDYL	S147	ILVPKsPVK	1	1.171	NA
NP_001035863.1	centrosomal protein of 170 kDa isoform beta	CEP170	S1431	SSPVNNHsPGQTPTLGQPE AR	3	-1.671	0.693
NP_005498.1	cofilin-1	CFL1	S3	AsGVAVSDGVK	28	2.688	0.487
NP_000237.2	MHC class II transactivator	CIITA	S944	SSsEDTAGELPAVR	3	-1.085	0.016
NP_006816.2	cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4	S26	GAHPsGGADDAVAK	2	-1.137	0.000
NP_001830.1	calponin-3	CNN3	S259	GMsVYGLGR	1	-1.889	NA

NP_004757.1	coatomer subunit beta'	COPB2	S859	STAQQELDGKPA sPTPVIVAS HTANK	6	-2.216	0.000
NP_001303.1	cysteine-rich protein 2 isoform 1	CRIP2	S104	KA sGPPKGPSR	1	1.117	NA
NP_001303.1	cysteine-rich protein 2 isoform 1	CRIP2	S115	AS sVTTF TGEPNT CPR	4	1.921	0.022
NP_001876.1	alpha-crystallin B chain	CRYAB	S59	AP sWFD TGLSEMR	2	-6.801	0.000
NP_001876.1	alpha-crystallin B chain	CRYAB	S76	DRF sVNL DVK	1	-6.801	NA
NP_057480.2	CTD small phosphatase-like protein 2	CTDSPL2	S104	RK sQVNGEAGSYEMTNQHVK	2	1.606	0.000
NP_055587.1	CBP80/20-dependent translation initiation factor isoform 1	CTIF	S18	sQEIEELER	2	-2.968	0.050
NP_055587.1	CBP80/20-dependent translation initiation factor isoform 1	CTIF	S299	sPDTLAPVASER	3	-2.465	0.000
NP_001078929.1	catenin delta-1 isoform 1A	CTNND1	S252	AP sRQDVYGPQPQVR	2	-1.120	0.000
NP_001078929.1	catenin delta-1 isoform 1A	CTNND1	S268	VG sSVDLHR	2	-1.114	0.000
NP_001896.2	CTP synthase 1	CTPS1	S575	SG sSPDSEITELK	18	-1.013	0.068
NP_005222.2	src substrate cortactin isoform a	CTTN	S405	TQT PPV sPAPQPTEER	1	-1.770	NA
NP_005222.2	src substrate cortactin isoform a	CTTN	S418	LP sPVYEDAASFK	7	-2.043	0.429
NP_005222.2	src substrate cortactin isoform a	CTTN	T401	TQT PPV sPAPQPTEER	8	-1.668	0.543
NP_005222.2	src substrate cortactin isoform a	CTTN	T401;S405	TQT PPV sPAPQPTEER; AKTQT PPV sPAPQPTEER	12	-2.019	0.579
NP_612632.1	src substrate cortactin isoform b	CTTN	S11	ASAGHAV sIAQDDAGADDWE TDPDFVNDVSEK	1	-1.395	NA
NP_612632.1	src substrate cortactin isoform b	CTTN	S381	LP sPVYEDAASFK	24	-1.446	1.046
NP_612632.1	src substrate cortactin isoform b	CTTN	S5	AsAGHAV sIAQDDAGADDWE TDPDFVNDVSEK	1	-1.395	NA
NP_612632.1	src substrate cortactin isoform b	CTTN	T362;S368	AKtQT PPV sPAPQPTEER	3	-1.904	1.066
NP_612632.1	src substrate cortactin isoform b	CTTN	T364;S368	TQT PPV sPAPQPTEER; AKTQT PPV sPAPQPTEER	29	-1.185	0.988
NP_001329.1	coxsackievirus and adenovirus receptor isoform 1 precursor	CXADR	S332	TPQ sPTLPPAK	2	5.161	0.000
NP_004385.1	death-associated protein 1	DAP	S51	DKDDQEWESP sPPKPTVFISG VIAR	6	-1.137	0.784
NP_543157.1	drebrin isoform b	DBN1	S144	LS sPVLHR	27	-1.049	0.155
NP_001014436.1	drebrin-like protein isoform b	DBNL	S274	AMSTT sIS sPQPGK	1	-1.123	NA
NP_001014436.1	drebrin-like protein isoform b	DBNL	S275	AMSTT sIS sPQPGK	2	-1.123	0.000
NP_003728.1	protocadherin-16 precursor	DCHS1	S2985	KAEAAPGPM SQAAPL ASD sL QK	2	-2.186	0.000
NP_001182359.1	serine/threonine-protein kinase DCLK1 isoform 4	DCLK1	S46	DLYRPL sDDLDSV GDSV	2	-1.249	0.485
NP_004725.1	serine/threonine-protein kinase DCLK1 isoform 1	DCLK1	S352	SSQHGG sSTSLASTK	2	-1.392	0.000
NP_060873.4	mRNA-decapping enzyme 1A	DCP1A	S525	ASSP sPLTIGTPESQR	6	1.117	0.000
NP_006377.2	probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 1	DDX17	S599	RD sASYR	1	1.004	NA
NP_001347.3	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 1	DDX3X	S90	SSFFSDRG sGSR	2	1.112	0.000
NP_003463.1	protein DEK isoform 1	DEK	S71	LTMQV sSLQR	1	1.141	NA
NP_001351.2	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	S14	AK sLDGVTNDR	9	3.503	0.517
NP_000100.2	dystrophin Dp427c isoform	DMD	S3613	sDSSQPMLLR	4	1.380	0.288
NP_000100.2	dystrophin Dp427c isoform	DMD	S3615	SD sSQPMLLR	4	1.380	0.288
NP_055192.1	dnaJ homolog subfamily C member 2 isoform 1	DNAJC2	S49	NASAsFQELEDK	1	1.048	NA
NP_079495.1	dnaJ homolog subfamily C member 5	DNAJC5	S161	APEGEETEFYVSPEDLEAQLQ sDER	1	1.093	NA
NP_056005.1	dnaJ homolog subfamily C member 9	DNAJC9	S109	KIsLEDIQAFEK	4	2.173	0.043
NP_001372.1	docking protein 1 isoform 1	DOK1	S269	AD sHEGEVAEGK	2	1.176	0.198
NP_001184222.1	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	DPYSL2	S25	NLGS sGSPKPR	1	2.844	NA
NP_001184222.1	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	DPYSL2	S27	NLGS sGSPKPR	15	2.728	0.146
NP_001184222.1	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	DPYSL2	S645	NLHQSGF sLSGAQIDDNIPR	3	2.424	0.025
NP_001184222.1	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 1	DPYSL2	S647	NLHQSGF sLSGAQIDDNIPR	1	3.147	NA
NP_001377.1	dihydropyrimidinase-related protein 2 isoform 2	DPYSL2	S542	NLHQSGF sLSGAQIDDNIPR	1	2.419	NA
NP_001184223.1	dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 1	DPYSL3	S653	NLHQSGF sLSGTQVDEGVR	3	2.227	0.463
NP_001378.1	dihydropyrimidinase-related protein 3 isoform 2	DPYSL3	S539	NLHQSGF sLSGTQVDEGVR	1	1.955	NA
NP_064519.2	dihydropyrimidinase-related protein 5	DPYSL5	S531	DLHE sSFSLSGSQIDDHVPK	2	3.349	0.000
NP_064519.2	dihydropyrimidinase-related protein 5	DPYSL5	S532	DLHE sSFSLSGSQIDDHVPK	7	3.279	0.132
NP_001138787.1	kinetochore-associated protein DSN1 homolog isoform 1	DSN1	S77	sLHLSPQEQSASYQDR	1	1.051	NA
NP_006861.1	destrin isoform a	DSTN	S3	AsGVQVADEVCR	8	1.445	0.708
NP_057532.2	denticleless protein homolog	DTL	S485	RG sVSSVSPKPPSSFK	3	1.858	0.000
NP_116757.2	dystrobrevin alpha isoform 2	DTNA	S605	TQFEDLVP sPTSEK	3	1.265	0.000
NP_001939.1	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial isoform 2	DUT	S11	PCSEETPAIsPSKR	6	1.135	0.405
NP_004084.1	ephrin-B2 precursor	EFNB2	S260	KH sPQH TTTLSLSTLATPK	2	1.252	0.000

NP_004084.1	ephrin-B2 precursor	EFNB2	S260;S268	KHsPQHtTTLsLSTLATPK	1	1.619	NA
NP_004084.1	ephrin-B2 precursor	EFNB2	S260;T264	KHsPQHtTTLsLSTLATPK	1	1.252	NA
NP_004084.1	ephrin-B2 precursor	EFNB2	S260;T266	KHsPQHtTTLsLSTLATPK	2	1.252	0.000
NP_004870.3	etoposide-induced protein 2.4 homolog isoform 1	EI24	S46	RA <sub>s</sub> SVLAQR	2	2.005	0.000
NP_003746.2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	EIF3G	T41	GIPLATGDtSPEPELLPGAPLP PPK	1	-1.030	NA
NP_001408.2	eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	S497	SQ <sub>s</sub> SDTEQQSPTSGGGK	1	1.220	NA
NP_001408.2	eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	S498	SQ <sub>s</sub> SDEQQSPTSGGGK	3	1.220	0.000
NP_001408.2	eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	S93	sPPYTAFLGNLPYDVTEESIK	2	1.462	0.570
NP_001410.2	ELAV-like protein 1	ELAVL1	S202	NVALLS <sub>Q</sub> LYH <sub>s</sub> PAR	5	1.001	0.000
NP_000108.1	emerin	EMD	S54	RLSPPSS <sub>s</sub> AASSYSFSDLNSTR	1	-1.615	NA
NP_004425.2	echinoderm microtubule-associated protein-like 1 isoform b	EML1	S113	KPTGSLP <sub>s</sub> PSGVR	1	-3.134	NA
NP_060682.2	protein enabled homolog isoform b	ENAH	S508	TNTMNGSK <sub>s</sub> PVISRPK	4	-1.689	0.099
NP_004427.1	alpha-endosulfine isoform 3	ENSA	S109	KS <sub>s</sub> LVTSK	2	1.049	0.011
NP_065960.2	band 4.1-like protein 5 isoform 1	EPB41L5	S366	ST <sub>s</sub> FER	1	2.229	NA
NP_065960.2	band 4.1-like protein 5 isoform 1	EPB41L5	S517	QLEMEN <sub>s</sub> PLLS <sub>SPR</sub>	6	2.039	0.000
NP_683723.2	epsin-2 isoform a	EPN2	S192	AGG <sub>s</sub> PAS <sub>Y</sub> HGSTSPR	5	1.408	0.066
NP_683723.2	epsin-2 isoform a	EPN2	S192;S195	AGG <sub>s</sub> PA <sub>s</sub> YHGSTSPR	4	1.823	0.271
NP_004438.3	epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	EPS8	S659	QN <sub>s</sub> SSSDSGGSIVR	2	1.175	4.488
NP_004438.3	epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	EPS8	S685	RK <sub>s</sub> QMEEVQDELIHR	1	1.098	NA
NP_006485.2	ETS domain-containing transcription factor ERF	ERF	S21	TPADTGFAPDWAYKPES <sub>s</sub> P GSR	2	-1.362	3.374
NP_057050.1	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 isoform b	ERGIC3	S116	LDKDGIPV <sub>s</sub> SEAER	1	-1.659	NA
NP_061821.1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	S251	SH <sub>s</sub> G <sub>P</sub> AGSFNKPAIR	20	-2.445	0.622
NP_061821.1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	S273	AsPNSDEDKPEVPPR	1	-2.078	NA
NP_061821.1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	S302	RW <sub>s</sub> AEVTSSTYSDEDRPPK	1	-2.271	NA
NP_061821.1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	T306	RWSAEVtSSTYSDEDRPPK	1	-2.271	NA
NP_001017420.1	N-acetyltransferase ESCO2	ESCO2	S75	LPSANQGS <sub>PFK</sub>	2	1.557	0.000
NP_001128504.1	protein FAM176A	EVA1A	S114	NVFT <sub>s</sub> AEELER	3	-6.801	0.000
NP_000494.2	eyes absent homolog 1 isoform b	EYA1	S314	NNN <sub>s</sub> PPDSDLER	3	1.298	1.672
NP_742103.1	eyes absent homolog 4 isoform d	EYA4	S361	NNP <sub>s</sub> PPDSDLER	6	2.375	0.366
NP_073744.2	niban-like protein 1 isoform 1	FAM129B	S665	GLLAQGLRPE <sub>s</sub> PPPAGPLLNG APAGESPQPK	1	1.281	NA
NP_055505.3	protein FAM131B isoform b	FAM131B	S59	S <sub>s</sub> FSGISR	2	2.237	0.000
NP_671735.1	protein FAM219A isoform 4	FAM219A	S98	GYSSLDQSPDEKPLVALD <sub>T</sub> D <sub>s</sub> DDDFDMSR	6	-1.837	0.073
NP_056948.2	protein FAM65B isoform 2	FAM65B	S21	SQ <sub>s</sub> FAGFSQLQER	5	-1.631	0.728
NP_005757.1	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 isoform 1	FARP1	S23	LGAPENSG <sub>s</sub> TLER	5	-1.247	0.446
NP_005757.1	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 isoform 1	FARP1	S427	VSAGEPGSHP <sub>s</sub> PAPR	6	-1.288	0.161
NP_005094.1	fasciculation and elongation protein zeta-1 isoform 1	FEZ1	S298	GL <sub>s</sub> LQSSR	2	1.066	0.000
NP_005094.1	fasciculation and elongation protein zeta-1 isoform 1	FEZ1	S58	sMEDLVNEFDEK	1	1.337	NA
NP_005094.1	fasciculation and elongation protein zeta-1 isoform 1	FEZ1	T136	DPNIEALNGNCSDtEIHEK	2	1.860	0.000
NP_001447.2	filamin-A isoform 1	FLNA	S2144	RAP <sub>s</sub> VANV <sub>G</sub> SHCDLSLK	3	-1.675	0.026
NP_055848.1	formin-binding protein 1	FNBP1	S497	RQ <sub>s</sub> GLYDSQNPPTVNNCAQDR	4	3.965	0.000
NP_005244.1	fos-related antigen 2	FOSL2	S308	RS <sub>s</sub> SSGDQSSDSLNSPTLLAL	1	-2.672	NA
NP_116281.2	FERM domain-containing protein 5 isoform 2	FRMD5	S351	sCPSITHGPR	2	1.131	0.452
NP_003079.1	fascin	FSCN1	S38	VNASAs <sub>s</sub> SLKK	1	1.479	NA
NP_003079.1	fascin	FSCN1	S39	VNASAs <sub>s</sub> LKK	4	1.487	0.111
NP_003925.1	far upstream element-binding protein 3	FUBP3	T76	tVITEEFKVPDK	6	1.481	0.090
NP_076423.2	FUN14 domain-containing protein 2	FUNDC2	S151	sNQIPTEVR; K <sub>s</sub> NQIPTEVR	2	-1.377	0.114
NP_002028.1	tyrosine-protein kinase Fyn isoform a	FYN	S21	DG <sub>s</sub> LNQSSGYR	1	1.152	NA
NP_002028.1	tyrosine-protein kinase Fyn isoform a	FYN	S25	DGSLNQ <sub>s</sub> SGYR	1	1.152	NA
NP_002028.1	tyrosine-protein kinase Fyn isoform a	FYN	Y420	LIEDNE <sub>y</sub> TAR	3	2.571	0.000
NP_002036.1	neuromodulin isoform 2	GAP43	S96	KGEGTTTAEAAPATG <sub>s</sub> KPDE PGK	1	1.099	NA



NP_006469.2	GAS2-like protein 1 isoform a	GAS2L1	S358	RYSGDSDSsASSAQSGPLGT R	1	-1.325	NA
NP_006469.2	GAS2-like protein 1 isoform a	GAS2L1	S479	ARsPAAPR	2	-1.416	0.253
NP_006469.2	GAS2-like protein 1 isoform a	GAS2L1	Y351	RySGDSDSSASSAQSGPLGT R	1	-1.968	NA
NP_004184.1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 isoform 1	GBF1	S1298	ADAPDAGAQsDSELPSYHQN DVSLDR	1	-1.534	NA
NP_004184.1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 isoform 1	GBF1	S1300	ADAPDAGAQSDsELPSYHQN DVSLDR	1	-1.534	NA
NP_005101.1	glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	GFPT2	S244	LDsSACLHAVGDK	3	2.305	0.626
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S251	SDPYHATsGALSPAK	1	-2.545	NA
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S255	SDPYHATSGALsPAK	8	-2.588	1.261
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S306	QAsEQNWANYSAEQNR	11	-2.817	0.223
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S330	MGQAGSTISNsHAQPFDFPD DNQNSK	2	-2.477	0.173
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S364	LAAGHELQPLAIVDQRPsSR	2	-3.088	1.340
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	S365	LAAGHELQPLAIVDQRPsR; KLAAGHELQPLAIVDQRPsSR	16	-2.575	0.695
NP_000156.1	gap junction alpha-1 protein	GJA1	T326	MGQAGStISNSHAQPFDFPDD NQNSK	2	-2.107	0.663
NP_612435.1	glucocorticoid-induced transcript 1 protein	GLCC1	S223	SAsWGSADQLK	2	2.542	0.000
NP_612435.1	glucocorticoid-induced transcript 1 protein	GLCC1	S258	DRQsPLHGNHITISHTQATGS R	2	2.115	0.000
NP_612435.1	glucocorticoid-induced transcript 1 protein	GLCC1	S398	DKDSGSSsPLPK	1	2.432	NA
NP_000159.3	transcriptional activator GLI3	GLI3	T669	SPGRPtQGALGEEQDLSNTT SK	1	1.650	NA
NP_115958.2	putative oxidoreductase GLYR1	GLYR1	S130	KLsLSEK	5	1.346	0.251
NP_057632.2	Golgi membrane protein 1	GOLM1	S309	GFGGAGELGQTPQVQAALSV sQENPEMEGPER	3	1.352	0.000
NP_005268.1	neuronal membrane glycoprotein M6-a isoform 1	GPM6A	S267	SKEEQELHDIHsTR	8	2.995	0.340
NP_001001995.1	neuronal membrane glycoprotein M6-b isoform 1	GPM6B	S320	sKEQLNSYT	2	3.613	0.000
NP_997657.1	COP9 signalosome complex subunit 1 isoform 1	GPS1	S510	EGsQGELTPANSQSR	6	1.103	0.154
NP_037428.3	G-protein-signaling modulator 2	GPSM2	S408	RHsMENMELMK	2	1.076	0.147
NP_005299.1	G protein-coupled receptor kinase 5	GRK5	S484	DVLDIEQFsTVK	2	1.120	0.000
NP_004277.2	GTP-binding protein 1	GTBPB1	S580	LLQTTNNSPMNSKPPQK	2	1.736	0.000
NP_006017.1	histone H1x	H1FX	S31	AGGSAALsPSK; AGGSAALsPSKK	5	1.616	0.223
NP_006017.1	histone H1x	H1FX	S33	AGGSAALSPsKK	1	1.521	NA
NP_219485.1	HAUS augmin-like complex subunit 8 isoform a	HAUS8	S21	GAGKPATGPTNSSsAK	1	1.267	NA
NP_001518.3	histone deacetylase 2	HDAC2	S394	MLPHAPGVQMGAIPEDAVHE DsGEDGEDPDKR	2	1.036	1.123
NP_003600.2	HIRA-interacting protein 3 isoform 1	HIRIP3	S125	NGVAAEVsPAKEENPR	3	1.366	0.000
NP_003600.2	HIRA-interacting protein 3 isoform 1	HIRIP3	S370	EVsDSEAGGGPQGER	2	1.363	0.000
NP_005313.1	histone H1.5	HIST1H1B	T11;S18	SETAPAETAtPAPVEKsPAK; SETAPAETAtPAPVEKsPAKK	15	1.385	0.202
NP_005311.1	histone H1.3	HIST1H1D	T18	SETAPLAPTIPAPAEKtPVK	2	1.567	0.000
NP_005312.1	histone H1.4	HIST1H1E	S2;T18	sETAPAAPAAPAPAEKtPVK	1	1.718	NA
NP_005312.1	histone H1.4	HIST1H1E	S36	KAsGPPVSELTK	3	2.183	0.000
NP_005312.1	histone H1.4	HIST1H1E	T18	SETAPAAPAAPAPAEKtPVK; SETAPAAPAAPAPAEKtPVKK	30	1.104	0.398
NP_005312.1	histone H1.4	HIST1H1E	T4;T18	SETAPAAPAAPAPAEKtPVK	1	1.718	NA
NP_003529.1	histone H4	HIST1H4A	S48	RIsGLIYEETR	5	-1.070	0.000
NP_002119.1	high mobility group protein B1	HMGB1	S35	KHPDAsVNFSEFSK	6	1.364	0.050
NP_001091742.1	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	S4	PGsLPLNAEACWPK	2	4.148	0.000
NP_653171.1	hematological and neurological expressed 1-like protein	HN1L	S144	SIPAGAEPGEKGSAR	1	1.719	NA
NP_002128.1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform	HNRNPA2 B1	S200	GGNFSGFDsR	2	1.104	0.000
NP_002128.1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform	HNRNPA2 B1	S247	GFGDGYNGYGGGGGGNFG GsPGYGGGR	2	1.562	0.728
NP_002128.1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform	HNRNPA2 B1	S332	NMGPPYGGGNYGPGGGGs GGYGGR	1	1.491	NA
NP_919223.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	S14	MEVKPPGPRQPDSGR	1	1.015	NA
NP_004491.2	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform b	HNRNPC	S108	SAAEMYSsFDLDYDFQR	2	3.669	0.000
NP_005959.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform a	HNRNPM	S481	IGsGVER	1	2.504	NA
NP_005959.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform a	HNRNPM	S528	MGLsMER	2	1.923	0.000
NP_005959.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform a	HNRNPM	S618	MGLAMGGGGAsFDR	35	1.754	0.552
NP_004829.3	homer protein homolog 3 isoform 1	HOMER3	S159	SQsADAPGPTER	1	1.705	NA
NP_076920.1	homeobox protein Hox-B4	HOXB4	S46	REsSFQPEAGFGR	2	1.070	0.000

NP_001531.1	heat shock protein beta-1	HSPB1	S15	GP <sub>s</sub> WDPFR	3	-2.041	0.000
NP_001007226.1	insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 isoform b	IGF2BP2	S162	ISYPDEEV <sub>s</sub> SPSPQR	15	1.403	0.087
NP_000867.2	cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor	IGF2R	S2409	ALSSLHGDDQD <sub>s</sub> EDEVLTPIE VK	2	-1.782	0.571
NP_000590.1	insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor	IGFBP5	S116;S125	I <sub>ERD</sub> <sub>s</sub> REHEEPT <sub>s</sub> EMAEETYS PK	1	-2.530	NA
NP_000590.1	insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor	IGFBP5	S116;T131	I <sub>ERD</sub> <sub>s</sub> REHEEPT <sub>s</sub> EMAEETYS PK	1	-3.277	NA
NP_000590.1	insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor	IGFBP5	S125	EHEEPT <sub>s</sub> EMAEETYS PK	10	-4.144	0.329
NP_002173.1	interleukin-1 receptor accessory protein isoform 1 precursor	IL1RAP	S557	RSS <sub>s</sub> DEQGLSYSSLK	11	1.323	0.701
NP_116116.1	alpha-internexin	INA	S30	L <sub>s</sub> GAGGAGGFR	1	2.022	NA
NP_892017.2	interferon regulatory factor 2-binding protein 2 isoform A	IRF2BP2	S244	RPASVSS <sub>s</sub> AAVEHEQR	1	-2.591	NA
NP_892017.2	interferon regulatory factor 2-binding protein 2 isoform A	IRF2BP2	S71	sPPGAAASAAKPPPLSAK	7	-1.017	0.000
NP_078772.1	interferon regulatory factor 2-binding protein-like	IRF2BPL	S657;S659	RN <sub>s</sub> S <sub>s</sub> PVSPASVPGQR	1	1.505	NA
NP_003740.2	insulin receptor substrate 2	IRS2	S1176	HNSA <sub>s</sub> VENVSLR	1	1.864	NA
NP_003740.2	insulin receptor substrate 2	IRS2	S304	sKSSQSSGSSATHPI <sub>s</sub> VPGAR	1	1.003	NA
NP_003740.2	insulin receptor substrate 2	IRS2	S560	RV <sub>s</sub> GDAAGQLDR	1	1.325	NA
NP_000876.3	integrin alpha-4 precursor	ITGA4	S1021	RD <sub>s</sub> WSYINSK	4	-1.870	0.000
NP_065698.1	junctionalophilin-1	JPH1	S216	RG <sub>s</sub> LLGSMK	1	2.380	NA
NP_002219.1	transcription factor AP-1	JUN	S63	NSDLLT <sub>s</sub> PDVGLLK	10	-2.533	0.503
NP_002219.1	transcription factor AP-1	JUN	S73	LA <sub>s</sub> PELER	8	-1.666	0.390
NP_002220.1	transcription factor jun-B	JUNB	S251;S259	sRDATPPV <sub>s</sub> PINMEDQER	2	-3.134	0.000
NP_002220.1	transcription factor jun-B	JUNB	T255;S259	SRDATPPV <sub>s</sub> PINMEDQER	1	-3.134	NA
NP_008998.1	histone acetyltransferase KAT7 isoform 1	KAT7	S102	SSG <sub>s</sub> ETE <sub>s</sub> VVDFSDR	1	1.591	NA
NP_612453.1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	S185	sPSGGAAGPLLTPSQSLDGS R	4	1.582	0.338
NP_612453.1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	S187	SP <sub>s</sub> GGAAGPLLTPSQSLDGS R	5	1.661	0.367
NP_612453.1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	T196	SPSGGAAGPLLTPSQSLDGS R	1	1.958	NA
NP_073733.1	kinesin light chain 2 isoform 1	KLC2	S151	KLDEDA <sub>s</sub> PNEEKGDV <sub>s</sub> PK	2	-1.384	0.349
NP_849156.1	layilin isoform 2 precursor	LAYN	S291	KQ <sub>s</sub> EADLAETRPDLK	1	-3.450	NA
NP_112177.2	protein LBH	LBH	S63	LP <sub>s</sub> IVVEPTEGEVESGELR; DRLP <sub>s</sub> IVVEPTEGEVESGELR	6	2.164	0.016
NP_919424.1	lamin-B receptor	LBR	S86	SR <sub>s</sub> PGRPPK	1	1.515	NA
NP_919424.1	lamin-B receptor	LBR	S97	sASASHQADIK	1	1.159	NA
NP_919424.1	lamin-B receptor	LBR	S99	SA <sub>s</sub> ASHQADIK; RSA <sub>s</sub> ASHQADIK	13	1.028	0.146
NP_057441.1	LIM domain and actin-binding protein 1 isoform 2	LIMA1	S374	ASSLSE <sub>s</sub> PPK	1	-1.527	NA
NP_057441.1	LIM domain and actin-binding protein 1 isoform 2	LIMA1	S490	ETPH <sub>s</sub> PGVEDAPIAK	41	-1.009	0.361
NP_057441.1	LIM domain and actin-binding protein 1 isoform 2	LIMA1	S708	SLNW <sub>s</sub> SFVDNTFAEEFTTQN QK	1	1.927	NA
NP_057441.1	LIM domain and actin-binding protein 1 isoform 2	LIMA1	S726	sQDV <sub>s</sub> ELWEGEVVK	4	1.299	0.000
NP_057441.1	LIM domain and actin-binding protein 1 isoform 2	LIMA1	T487	EtPHSPGVEDAPIAK	1	-1.580	NA
NP_055803.2	LIM and calponin homology domains-containing protein 1 isoform a	LIMCH1	S718	sPEPEATLTFPFLDK	5	-2.856	0.852
NP_733821.1	lamin isoform A	LMNA	S22	SGAQASSTPL <sub>s</sub> PTR	8	-1.210	0.913
NP_733821.1	lamin isoform A	LMNA	T424	KLEStESR	1	-1.195	NA
NP_005564.1	lamin-B1 isoform 1	LMNB1	S375	LALDMEI <sub>s</sub> AYR	2	1.588	0.258
NP_116126.3	lamin-B2	LMNB2	S5	SPP <sub>s</sub> PGRR	1	1.019	NA
NP_005349.3	LIM domain only protein 7 isoform 1	LMO7	S1176	RGE <sub>s</sub> LDNLDS <sub>s</sub> PR	4	-5.647	0.032
NP_005349.3	LIM domain only protein 7 isoform 1	LMO7	S1259	SH <sub>s</sub> PSASQSGS <sub>s</sub> QLR	1	-5.078	NA
NP_005349.3	LIM domain only protein 7 isoform 1	LMO7	S246	RED <sub>s</sub> FESLDSLGS <sub>s</sub> R	1	-2.078	NA
NP_002323.2	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor	LRP1	S4520	H <sub>s</sub> LASTDEKR	4	1.441	0.394
NP_002323.2	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor	LRP1	S4523	HSLA <sub>s</sub> TDEKR	1	1.054	NA
NP_002325.2	low-density lipoprotein receptor-related protein 4 precursor	LRP4	S1887	RG <sub>s</sub> LPDTG <sub>s</sub> WK	2	1.606	0.000
NP_002328.1	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor	LRPAP1	S247	VSHQGY <sub>s</sub> TEAEFE <sub>s</sub> EPR	1	1.001	NA
NP_002328.1	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor	LRPAP1	S50	RE <sub>s</sub> GEEFR	2	1.085	0.000
NP_004726.2	leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 isoform 4	LRRFIP1	S115	NMPGLSAATLASLGGT <sub>s</sub> SR	1	-1.599	NA
NP_057103.2	putative RNA-binding protein Luc7-like 2 isoform 1	LUC7L2	S18	AML <sub>s</sub> DQLMG <sub>s</sub> TsR	11	1.377	0.508
NP_002341.1	tyrosine-protein kinase Lyn isoform A	LYN	S13	GKDSL <sub>s</sub> DDGV <sub>s</sub> DLK	5	1.401	0.000

NP_699205.1	lysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 2 isoform 1	LYSMD2	S31	sGSESEAEALSLSLAR	1	1.091	NA
NP_066300.1	leucine zipper putative tumor suppressor 1	LZTS1	S50	FGFSQDsGHGK	3	-1.006	0.065
NP_066300.1	leucine zipper putative tumor suppressor 1	LZTS1	S71	SEDFFYIKVsQK	7	-1.035	0.360
NP_002364.5	microtubule-associated protein 1A	MAP1A	S2629	sPTPGKGPADR	1	-1.933	NA
NP_002364.5	microtubule-associated protein 1A	MAP1A	S2664	STTSQVTPAEEKDGHsPMSK	4	-1.202	0.157
NP_002364.5	microtubule-associated protein 1A	MAP1A	T2631	SPtPGKGPADR	1	-1.933	NA
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S1501	LGDVSPtQIDVVSQFGSFK	1	-2.068	NA
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S1779	VQSLEGEKLSPK	3	-1.475	0.383
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S1915	TTKsPSDSGYSYETIGK	4	-1.393	0.092
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S1917	TTKSPsDSGYSYETIGK	3	-1.607	0.000
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S2209	HMDPPPAPVQDRsPSPR	1	-1.419	NA
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	S2209;S2211	HMDPPPAPVQDRsPsPR	6	-1.865	0.302
NP_005900.2	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	T1949	tPEEGGYSYDISEK	2	-1.851	0.000
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S185	IPALQGStK	1	3.312	NA
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S235	DGVTKsPEKR	1	3.077	NA
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S256	GVsGDRDENSFSLNSSISSSA R	2	4.861	0.000
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S354	TPPKsPATPK	4	3.813	0.966
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S514	VDHGAEIITQsPGR; ARVDHGAEIITQsPGR	21	3.420	0.291
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	S522	SSVAsPR	1	4.081	NA
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	T332	TPHTPGtPK	1	4.005	NA
NP_001034627.1	microtubule-associated protein 2 isoform 5	MAP2	T350;S354	VAIIrtPPKsPATPK	1	3.662	NA
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	S178	VSDGVTkSPEKR; DKVSDGVTkSPEK	5	4.147	0.454
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	S297	TPPKsPATPK	4	3.813	0.966
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	S457	VDHGAEIITQsPGR; ARVDHGAEIITQsPGR	49	3.364	0.659
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	S465	SSVAsPR	1	4.081	NA
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	T249	SGTSTPTTPGStAITPGtPPS YSSR	4	3.919	0.745
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	T275	TPHTPGtPK	1	4.005	NA
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	T293	VAIIrtPPKSPATPK; KVAIIrtPPK	3	3.727	2.805
NP_114035.2	microtubule-associated protein 2 isoform 4	MAP2	T293;S297	VAIIrtPPKsPATPK	2	4.195	0.754
NP_002366.2	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	S280	DMEsPTKLDVTLAK	58	-2.006	0.236
NP_002366.2	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	S787	RAAsPSKASAPASR	2	-1.973	0.378
NP_002366.2	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	S941	SKVGsTENIK	1	-1.341	NA
NP_002366.2	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	T282	DMESPtKLDVTLAK	3	-1.847	0.088
NP_002366.2	microtubule-associated protein 4 isoform 1	MAP4	T521	DVtPPPETEVLK	23	-2.182	0.477
NP_060537.3	MAP7 domain-containing protein 1	MAP7D1	S112;S113	RssQPSPTAVPASDSPPTK	1	-3.953	NA
NP_002736.3	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	T185;Y187	VADPDHDHTGFLtEyVATR	2	-6.216	0.000
NP_002736.3	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Y187	VADPDHDHTGFLTEyVATR	3	-2.450	0.000
NP_001035145.1	mitogen-activated protein kinase 3 isoform 2	MAPK3	Y204	IADPEHDHTGFLTEyVATR	4	-3.765	0.000
NP_036457.1	microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	T154	KPLtSSSAAPQRPISTQR	1	-1.355	NA
NP_005901.2	microtubule-associated protein tau isoform 2	MAPT	S396	TDHGAEIVYKsPVVSGDTSPr	1	1.838	NA
NP_005901.2	microtubule-associated protein tau isoform 2	MAPT	S396;S404	TDHGAEIVYKsPVVSGDTSPr	2	1.353	0.000
NP_005901.2	microtubule-associated protein tau isoform 2	MAPT	S404	SPVVSgDtsPr	4	1.969	0.524
NP_005901.2	microtubule-associated protein tau isoform 2	MAPT	T231;S235	VAVVRtPPKsPSSAK	2	1.082	0.346
NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S101	GEPAAAAPEAGAsPVEK	25	1.439	0.701
NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S134	EAPAEGEAAEPGSPTAAEGE AASAASSTsSPK	2	1.977	1.253
NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S135	EAPAEGEAAEPGSPTAAEGE AASAASSTsSPK	4	1.129	0.000

NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S145;T150	AEDGATP <sub>s</sub> PSNEtPK	1	1.468	NA
NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S147;T150	AEDGATPSP <sub>s</sub> NEtPK	1	1.468	NA
NP_002347.5	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	S167	SFKLsGFsFK	2	1.533	0.585
NP_075385.1	MARCKS-related protein	MARCKSL1	S22	GDVTAAEEAAGAsPAK	23	1.289	0.318
NP_061120.3	serine/threonine-protein kinase MARK1	MARK1	T648	RGtSTGIISK	1	1.339	NA
NP_059672.2	serine/threonine-protein kinase MARK2 isoform a	MARK2	S585	DQQNLPYGVTPAsPSGHSQGR	1	-1.659	NA
NP_848591.2	protein MB21D2	MB21D2	S436	RGSTTsIPSPQSDGGDPNQPDDR	1	3.273	NA
NP_848591.2	protein MB21D2	MB21D2	S439	RGSTTSIPsPQSDGGDPNQPDDR	1	3.273	NA
NP_003917.1	methyl-CpG-binding domain protein 3	MBD3	S56	YLGGSMDLSTFDFR	13	1.134	0.249
NP_004517.2	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	S13	AESSESFTMASsPAQR	3	1.485	0.000
NP_004517.2	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	S139	GLLYDsDEEDEERPAR	3	1.517	0.152
NP_005578.2	myocyte-specific enhancer factor 2A isoform 1	MEF2A	S255	VMPTKsPPPPGGGNLGMNSR	3	-1.009	0.682
NP_005578.2	myocyte-specific enhancer factor 2A isoform 1	MEF2A	S98	GCDsPDPDTSYVLTPHTEEK	1	-3.157	NA
NP_005578.2	myocyte-specific enhancer factor 2A isoform 1	MEF2A	T253	VMPtKSPPPPGGNLGMNSR	1	-1.796	NA
NP_002388.2	myocyte-specific enhancer factor 2C isoform 1	MEF2C	S240	sPPPMNLGMNRR	2	-2.631	0.000
NP_005911.1	myocyte-specific enhancer factor 2D isoform 1	MEF2D	S251	VIPAKsPPPTHSTQLGAPSR	14	-2.087	1.186
NP_006829.1	methionine aminopeptidase 2	METAP2	S45	sKGPSAAGEQEPDKESGASVDEVAR	1	1.175	NA
NP_006829.1	methionine aminopeptidase 2	METAP2	S49	SKGP <sub>s</sub> AAGEQEPDKESGASVDEVAR	1	1.175	NA
NP_958431.2	myosin phosphatase Rho-interacting protein isoform 2	MPRIP	S993	SKsNPDFLK; SKsNPDFLKK	15	-3.008	0.459
NP_003944.1	myelin protein zero-like protein 1 isoform a precursor	MPZL1	Y241	SLPSGSHQGPVlyAQLDHSGGHHSDK	1	1.088	NA
NP_002433.1	RNA-binding protein Musashi homolog 1	MSI1	S191	EVMSPTGSAR	1	3.693	NA
NP_848927.2	protein LYRIC	MTDH	S298	LSSQIsAGEEK	4	-2.273	0.264
NP_612410.1	multivesicular body subunit 12A	MVB12A	S232	SCsPLAFSAFGDLTIK	2	1.046	0.000
NP_002452.1	diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	S96	RNsRDGDPLPSSLsCK	4	2.150	0.000
NP_002464.1	myosin-9	MYH9	S1943	KGAGDGsDEEVDGK; KGAGDGsDEEVDGKADGAEAKPAE	18	-2.168	0.292
NP_006462.1	myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	T134	ELLTTMGRDRfDEEVDLYR	3	-1.784	0.354
NP_006462.1	myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	T18	AtSNVFAMFDQSQIQEFK	6	-1.436	0.126
NP_006462.1	myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	T18;S19	AtsNVFAMFDQSQIQEFK	2	-2.493	0.000
NP_005957.2	NGF1-A-binding protein 1	NAB1	S395	RLsAGLYR	1	1.882	NA
NP_005958.1	NGF1-A-binding protein 2	NAB2	S6	APsPTAEQPPGGGDSAR	7	1.465	0.526
NP_060037.3	N-acetyl-D-glucosamine kinase	NAGK	S122	SLGLSLsGGQEDAGR	13	-1.155	0.110
NP_004528.1	nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	T62	LDGLVeTPGYIESLPR	4	-1.328	0.000
NP_000606.3	neural cell adhesion molecule 1 isoform 1 precursor	NCAM1	S774	DEsKEPIVEVR	3	3.604	0.000
NP_001004720.1	cytoplasmic protein NCK2 isoform A	NCK2	S90	DAsPTPSTDAEYPANGSGAD R	2	1.854	0.000
NP_006087.2	protein NDRG1 isoform 1	NDRG1	S330	TAsGSSVtSLDGTR	10	2.068	0.406
NP_006087.2	protein NDRG1 isoform 1	NDRG1	S333	SRTASGSsVTSLDGTR	8	1.553	1.193
NP_006087.2	protein NDRG1 isoform 1	NDRG1	T328	SRTASGSsVTSLDGTR	13	2.420	0.253
NP_006087.2	protein NDRG1 isoform 1	NDRG1	T328;T335	SRTASGSsVtSLDGTR	1	2.656	NA
NP_963294.1	protein NDRG2 isoform b	NDRG2	S318;T320	SRTAsLtsAASVDGNR	1	2.629	NA
NP_963294.1	protein NDRG2 isoform b	NDRG2	S324	TASLTSAAsVDGNR	3	1.003	0.000
NP_963294.1	protein NDRG2 isoform b	NDRG2	T316;S318	SRTAsLtsAASVDGNR	1	2.314	NA
NP_114402.1	protein NDRG3 isoform a	NDRG3	S335	THSTSSsLGSGSPFSR	1	-1.225	NA
NP_690869.1	protein NEDD1 isoform b	NEDD1	S516	LVTSGAESGNLNTsPSSNQTR	6	1.261	0.461
NP_002895.3	negative elongation factor E	NELFE	S251	RSDsFPER	2	1.135	0.000
NP_006608.1	nestin	NES	S1016	EEVVEQGELNATEEVWIPGEGHPEsPEPK	1	-2.020	NA
NP_006608.1	nestin	NES	T315	LQtPGGGSK	1	1.934	NA
NP_653174.3	nexilin isoform 1	NEXN	S365	TIsQEFLTPGK	11	-5.277	0.155
NP_653174.3	nexilin isoform 1	NEXN	S80	EMLAsDDEEDVSSK	8	-4.163	2.508
NP_000259.1	merlin isoform 1	NF2	S13	MSFsLKR	4	-1.241	0.046
NP_000259.1	merlin isoform 1	NF2	S315	KADsLEVQMK	1	-3.100	NA
NP_000259.1	merlin isoform 1	NF2	S518	RLsMEIEK	2	-1.117	0.000
NP_005587.2	nuclear factor 1 B-type isoform 3	NFIB	S192	ELDLFLAYYYQEQDSGGsGSPSHNDPAK	1	1.061	NA

NP_005588.2	nuclear factor 1 C-type isoform 5	NFIC	S333;S339	TEMdKsPFNSP <sub>s</sub> PQDSPr	1	-1.186	NA
NP_005588.2	nuclear factor 1 C-type isoform 5	NFIC	T328;S339	tEMdKsPFNSP <sub>s</sub> PQDSPr	1	-1.186	NA
NP_002498.1	tumor necrosis factor receptor superfamily member 16 precursor	NGFR	S311	LHSDSGISVD <sub>s</sub> QSLHDQQPHTQTASGQALK	1	3.356	NA
NP_002498.1	tumor necrosis factor receptor superfamily member 16 precursor	NGFR	S313	LHSDSGISVD <sub>s</sub> QsLHDQQPHTQTASGQALK	1	3.356	NA
NP_000260.1	nucleoside diphosphate kinase A isoform b	NME1	S120	NIHGsDSVESAEK	2	-1.512	0.000
NP_055512.1	carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein isoform 1	NOS1AP	S266	VSHPQEPMLTAsPR	5	2.739	0.452
NP_006482.1	RNA-binding protein Nova-1 isoform 3	NOVA1	S154	QTLPS <sub>s</sub> PTTTK	2	2.078	0.020
NP_006482.1	RNA-binding protein Nova-1 isoform 3	NOVA1	T156	QTLPSSPtTTK	1	2.064	NA
NP_006482.1	RNA-binding protein Nova-1 isoform 3	NOVA1	T157	QTLPSSPTtTK	1	3.411	NA
NP_002511.1	nucleophosmin isoform 1	NPM1	S254	MQAsIEK	1	1.146	NA
NP_002511.1	nucleophosmin isoform 1	NPM1	Y67	TVSLGAGAKDELHIVEAEAMN <sub>y</sub> EGSPIK	1	1.136	NA
NP_037524.1	nuclear receptor-binding protein	NRBP1	T431	tPTPEPAEVETR	1	-1.486	NA
NP_037524.1	nuclear receptor-binding protein	NRBP1	T433	TPtPEPAEVETR	8	-1.649	0.302
NP_848659.2	nuclear receptor-binding protein 2	NRBP2	T409;T411	AKtPtPEPFdSETR	3	-2.375	0.000
NP_848659.2	nuclear receptor-binding protein 2	NRBP2	T411	TPtPEPFdSETR	1	-1.328	NA
NP_006169.2	vesicle-fusing ATPase	NSF	S207	QsINPDWNFEK	3	1.684	0.000
NP_073568.2	nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	NUCKS1	S204	EKTP <sub>s</sub> PKEEDEEPESPEK	1	1.929	NA
NP_065823.1	nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	NUFIP2	S629	DYEIESQNPLAsPTNTLLGSAK	1	1.264	NA
NP_004747.1	numb-like protein	NUMBL	S263	KAEAAAAPTVPAGPAQPGHV <sub>s</sub> PTPATTSPGEK	5	-1.140	0.051
NP_005076.3	nuclear pore complex protein	NUP214	S430	sPGSTPTTPTSSQAPQK	5	-1.447	0.016
NP_057404.2	nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 isoform 1	NUP98	S871	YGLQDsDEEEEEHPSK	2	-1.225	0.000
NP_060924.4	nucleolar and spindle-associated protein 1 isoform 2	NUSAP1	T313	SAHVTVSGGtPK	1	1.009	NA
NP_001008212.1	optineurin	OPTN	S198	EIKH <sub>s</sub> PGPTR	1	-1.422	NA
NP_001008212.1	optineurin	OPTN	S526	TsDSDQQAYLVQR	1	-1.198	NA
NP_001008212.1	optineurin	OPTN	S528	TSDsDQQAYLVQR	1	-1.198	NA
NP_001008212.1	optineurin	OPTN	T525	tSDSDQQAYLVQR	1	-1.198	NA
NP_002547.1	oxysterol-binding protein 1	OSBP	S238	sLSELESKLPAESNEK	1	-1.647	NA
NP_002547.1	oxysterol-binding protein 1	OSBP	S379	RTGsNISGASSDISLDEQYK	2	2.726	0.000
NP_002547.1	oxysterol-binding protein 1	OSBP	T377	tGSNISGASSDISLDEQYK; RtGSNISGASSDISLDEQYK	3	2.096	0.038
NP_054747.2	osteopetrosis-associated transmembrane protein 1	OSTM1	T324;S325	RLKStsFANIQENS	2	1.350	0.216
NP_060910.3	phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	PAG1	S229	AEFAEYAsVDR	8	2.409	0.249
NP_006443.1	multifunctional protein ADE2 isoform 2	PAICS	S27	TKEYVELLdsPGK	5	1.655	0.350
NP_005875.1	serine/threonine-protein kinase PAK 4 isoform 1	PAK4	S148	FAGHSEAGGGS <sub>s</sub> GDR	5	1.491	0.144
NP_005875.1	serine/threonine-protein kinase PAK 4 isoform 1	PAK4	S181	DKRPLsGPDVGTQPAGLASGAK	13	1.141	0.086
NP_005875.1	serine/threonine-protein kinase PAK 4 isoform 1	PAK4	T187	DKRPLSGPDVGTQPAGLASGAK	1	1.019	NA
NP_057165.3	palladin isoform 2	PALLD	S669	IAsDEEIQGTK	4	-2.215	0.399
NP_057165.3	palladin isoform 2	PALLD	S880	sPSGHPHVR	4	-2.498	0.064
NP_057165.3	palladin isoform 2	PALLD	S882	SPsGHPHVR	2	-2.502	0.083
NP_057165.3	palladin isoform 2	PALLD	S897	SRDsGDENEPIQER	4	-2.548	0.106
NP_001035224.1	paralemmin-1 isoform 2	PALM	S116	ENAAAPsPVR	2	1.410	0.000
NP_001035224.1	paralemmin-1 isoform 2	PALM	T141;T145	KTEVVMNSQQtPVGtPK	3	1.154	0.219
NP_065090.1	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	S147	DTPTSAGPNsFNK	5	1.052	0.302
NP_005008.2	choline-phosphate cytidyltransferase A	PCYT1A	S331	SPsPSFR; ERSPsPSFR	4	-1.314	0.445
NP_005008.2	choline-phosphate cytidyltransferase A	PCYT1A	T342	tSPPCSPANLSR	1	-1.128	NA
NP_055706.1	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	PDAP1	S176	MQsLSLNK	3	1.559	0.056
NP_055706.1	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	PDAP1	S178	MQSLsLNK	3	1.327	0.157
NP_005011.1	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C isoform 1	PDE1C	S3	MEsPTKEIEEFESNSLK	18	-3.072	0.415
NP_005011.1	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C isoform 1	PDE1C	S469	RSsLNSISSDAK	19	-2.857	0.340

NP_005011.1	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C isoform 1	PDE1C	T5	MESPtKEIEEFESNSLK	15	-3.297	0.355
NP_002591.2	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B isoform 1	PDE4B	S319	LMHSSsLNNTSISR	2	1.852	0.000
NP_000275.1	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial isoform 1 precursor	PDHA1	S293	YHGHsMSDPGVSYR	24	-1.769	0.179
NP_000275.1	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial isoform 1 precursor	PDHA1	S293;S300	YHGHsMSDPGVsYR	1	-2.151	NA
NP_000275.1	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial isoform 1 precursor	PDHA1	Y289	yHGHSMSDPGVSYR	2	-1.595	0.000
NP_005442.2	PDZ and LIM domain protein 7 isoform 1	PDLIM7	S111	YTFAPSVsLNLK	16	-2.329	0.341
NP_002604.1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 isoform 1	PDPK1	T245	ANSFVGtAQYVSPPELLTEK	1	-1.022	NA
NP_002618.1	6-phosphofructokinase type C isoform 1	PFKP	S386	GRsFAGNLNTYK	7	-1.230	0.125
NP_060760.2	phosphoglucomutase-2	PGM2	S165	LCAGIMITAsHNPk	7	-1.059	0.000
NP_775853.2	glucose 1,6-bisphosphate synthase	PGM2L1	S175	AVAGVMITAsHNR	39	-2.861	0.456
NP_775853.2	glucose 1,6-bisphosphate synthase	PGM2L1	T173	AVAGVMItASHNR	2	-2.672	0.000
NP_006311.2	membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRMC2	S128	DFsLEQLR	1	-1.240	NA
NP_006311.2	membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRMC2	S232	LLKPGEEPsEYTDEEDTK	1	-1.087	NA
NP_055972.1	pleckstrin homology-like domain family B member 1 isoform a	PHLDB1	S563	KLsSGDLR	4	-1.253	0.042
NP_055972.1	pleckstrin homology-like domain family B member 1 isoform a	PHLDB1	S578	KNsITEISDNEDDLLEYHR	1	-1.268	NA
NP_009097.2	phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein isoform 1	PICALM	S16	ITAAQHsVTGSAVSK	9	-1.735	0.264
NP_060685.2	PNMA-like protein 1 isoform a	PNMAL1	S333	AEAESPgGAsESDQDGGHES PPK	2	1.845	0.000
NP_006582.1	DNA polymerase delta subunit 3	POLD3	S458	QVsITGFFQR	2	2.159	0.000
NP_005595.2	POU domain, class 3, transcription factor 2	POU3F2	S341	WLEADSSSGsPTSIDK	2	1.736	0.161
NP_003613.3	liprin-beta-1 isoform 1	PPFIBP1	S593	sQSTTFNPDDMSEPEFK	2	-2.801	0.000
NP_003613.3	liprin-beta-1 isoform 1	PPFIBP1	S595	SQsTTFNPDDMSEPEFK	10	-2.791	0.085
NP_057231.1	protein phosphatase methylesterase 1 isoform a	PPME1	S25	LSPRPPLPGSGGsQSGAK	5	-2.697	0.000
NP_057231.1	protein phosphatase methylesterase 1 isoform a	PPME1	S42	DFsPVPWSQYFESMEDVEVE NETGK; DFsPVPWSQYFESMEDVEVE NETGKDTFR	3	-2.072	0.219
NP_002471.1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A isoform a	PPP1R12A	S299	DKKsPLIESTANMDNNSQSK	16	-3.104	0.421
NP_002471.1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A isoform a	PPP1R12A	S445	KTGsYGALAEITASK	15	-1.631	0.268
NP_002471.1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A isoform a	PPP1R12A	T443	tGSYGALAEITASK	2	-2.123	0.000
NP_002471.1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A isoform a	PPP1R12A	T696	RSStQGVTLTDLQEAKEK	15	-2.141	0.398
NP_060077.1	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C isoform a	PPP1R12C	T560	RSStQGVTLTDLK	5	-1.166	0.000
NP_001128342.1	phostensin	PPP1R18	S125	RPSPGEMR	1	-1.120	NA
NP_001128342.1	phostensin	PPP1R18	S224	LsPGESAYQK	1	-2.697	NA
NP_006232.1	protein phosphatase inhibitor 2	PPP1R2	T89	IDEPSTPYHSMMDDEDACS DtEATEAMAPDILAR	1	3.114	NA
NP_006236.1	serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform isoform 1	PPP2R5D	S573	RKsELPQDVYTIK	21	1.082	0.277
NP_942559.1	prickle-like protein 2	PRICKLE2	S695	SRsDNALHLASER	5	-4.439	0.497
NP_006244.2	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1	PRKAB1	S96	EVYLSGsFNNWSK	1	1.345	NA
NP_005390.1	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	PRKAB2	S108	sHNDFVAILDLPEGEHQYK	11	-1.351	0.516
NP_005390.1	5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	PRKAB2	S184	DLSSsPPGPYQGEMYAFR	10	-2.248	0.612
NP_002729.2	protein kinase C beta type isoform 2	PRKCB	S660	NIDQSEFEFGFsFVNSEFLKPEV/K	1	3.413	NA
NP_002729.2	protein kinase C beta type isoform 2	PRKCB	S664	NIDQSEFEFGFsFVNsEFLKPEV/K	1	3.413	NA
NP_006245.2	protein kinase C delta type	PRKCD	S664	NLIDSMDQSAFAGFsFVNPk	1	-1.166	NA
NP_002754.2	prospero homeobox protein 1	PROX1	S179	GMSHsPSVALR	1	2.755	NA
NP_002754.2	prospero homeobox protein 1	PROX1	S511	DRAsPEsLDLTR	1	3.753	NA
NP_056444.3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	PRPF31	S439	QSVVYGGKsTIR	2	1.611	0.000
NP_079117.3	proline-rich protein 5-like isoform a	PRR5L	S28	FMsSPVLSDLPR	2	2.338	0.000

NP_066967.3	PC4 and SFRS1-interacting protein isoform 1	PSIP1	T122	ETSVSKEDtDHEEK	1	1.005	NA
NP_002781.2	proteasome subunit alpha type-5 isoform 1	PSMA5	S56	ITsPLMEPSSIEK	3	-1.713	0.129
NP_055569.1	phosphatidylserine synthase 1	PTDSS1	S442	GSEDsPPKHAGNNESHSSR	4	1.116	0.431
NP_002814.3	prothymosin alpha isoform 2	PTMA	S2	sDAAVDTsSEITTK	4	1.361	0.072
NP_002814.3	prothymosin alpha isoform 2	PTMA	S9	SDAAVDtSSEITTK	1	1.354	NA
NP_002814.3	prothymosin alpha isoform 2	PTMA	T8	SDAAVDtSSEITTK	1	1.354	NA
NP_001074324.1	paxillin isoform 2	PXN	S258	IsASSATR	1	-3.680	NA
NP_005600.1	glycogen phosphorylase, muscle form isoform 1	PYGM	S15	KQIsVR	5	1.541	0.182
NP_057361.3	ras-related protein Rab-23	RAB23	S186	QQIAEDPELTHsSSNK	2	-2.175	0.451
NP_057361.3	ras-related protein Rab-23	RAB23	T184	QQIAEDPELTHSSSNK	2	-1.358	0.704
NP_114140.4	ras-related protein Rab-34 isoform	RAB34	S244	INSDDsNLYLTASK	3	1.798	0.000
NP_057238.3	ras-related protein Rab-4B	RAB4B	S193	MGSIGQYGDAsLR	3	1.553	0.294
NP_005044.1	UV excision repair protein RAD23 homolog A isoform 1	RAD23A	S123	EDKsPSEESAPTTSPESVSGS VPSSGSSGR	8	-1.594	0.202
NP_002873.1	ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	S60	FAsENDLPEWK	2	1.162	0.000
NP_001139130.1	rap1 GTPase-activating protein 1 isoform a	RAP1GAP	S7	sFTFGAYGGVDK	1	3.057	NA
NP_597709.2	ribonucleoprotein PTB-binding 1	RAVER1	S634	HKMsPPPSGFGGER	5	1.098	1.595
NP_116294.1	splicing factor 45	RBM17	S266	HEQGLSTALsVEK	1	2.101	NA
NP_057174.1	RNA-binding protein 7	RBM7	S136	SFsSPENFQR	4	-3.158	0.163
NP_055965.1	raftlin	RFTN1	S220	NQsPEPSSGPR	1	-5.479	NA
NP_054778.2	regulator of cell cycle RGCC	RGCC	S65	RSsASVDSGGFSDSESADSL YR	2	-4.078	0.000
NP_002917.1	regulator of G-protein signaling 12 isoform 2	RGS12	S850	ALPDSQQVPSsPASK	6	-2.592	0.720
NP_006471.2	regulator of G-protein signaling 14	RGS14	T292	SLGStEGESESRPGK	1	2.717	NA
NP_060813.2	serine/threonine-protein kinase RIO2 isoform 1	RIOK2	S390	sFEMTEFNQALEEIK	8	1.469	0.054
NP_001013860.1	leucine-rich repeat-containing protein 16C	RLTPR	S1423	SPPsPATDQR	3	-4.599	0.000
NP_002930.2	ribonuclease inhibitor	RNH1	S2	sLDIQSLDIQCEELSDAR	9	1.218	0.275
NP_000981.1	60S ribosomal protein L27a	RPL27A	S68	NQsFCPTVNLDK	3	-1.983	0.000
NP_005608.1	40S ribosomal protein S14	RPS14	S139	IEDVTPIPSDsTRR	9	-1.061	0.133
NP_036382.2	ras-related protein R-Ras2 isoform	RRAS2	S186	KFQEGCEPPsPEPTRK	9	-2.292	0.394
NP_001025.1	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 isoform 2	RRM2	S20	VLAPITDPQQLQLsPLK	18	-1.497	0.094
NP_149035.1	rhotekin isoform b	RTKN	S207	LSSsLGR	1	1.414	NA
NP_149035.1	rhotekin isoform b	RTKN	S93	RPsDSGPPAER	4	1.238	0.317
NP_065393.1	reticulon-4 isoform A	RTN4	S107	QPswDPPSPVSTVPAPSPLS AAAVSPSK	8	-1.706	0.160
NP_722550.1	reticulon-4 isoform B	RTN4	S107	QPswDPPSPVSTVPAPSPLS AAAVSPSK	8	-1.706	0.160
NP_001745.2	runt-related transcription factor 1 isoform AML1c	RUNX1	T41;S48	RfTppSTALsPGK	3	-2.004	0.399
NP_060498.2	protein Smaug homolog 2	SAMD4B	S607	HALTsPSLGGQGR	1	-1.553	NA
NP_060498.2	protein Smaug homolog 2	SAMD4B	T606	HALtSPSLGGQGR	2	-1.553	0.000
NP_005689.2	secretory carrier-associated membrane protein 3 isoform 1	SCAMP3	S76	KLsPTEPK	13	-1.560	0.289
NP_005496.4	scavenger receptor class B member 1 isoform 1	SCARB1	S493	DKEAIQAYSEsLMTSAPK	2	2.445	0.000
NP_699165.2	scavenger receptor class F member 2 isoform 1 precursor	SCARF2	S718	SAHTVEHGSPR	2	-1.434	0.084
NP_005054.3	acyl-CoA desaturase	SCD	S198	GsTLDLSDLEAEK	1	2.956	NA
NP_005054.3	acyl-CoA desaturase	SCD	T199	GStLDLSDLEAEK	1	2.956	NA
NP_006799.1	protein transport protein Sec61 subunit beta	SEC61B	S13	PGPTPSGTNVGsSGR	1	-1.078	NA
NP_006799.1	protein transport protein Sec61 subunit beta	SEC61B	S13;S14	PGPTPSGTNVGsGRSPSK	1	-1.001	NA
NP_006799.1	protein transport protein Sec61 subunit beta	SEC61B	S17	PGPTPSGTNVGSSGRsPSK	4	-1.140	0.619
NP_006799.1	protein transport protein Sec61 subunit beta	SEC61B	T5;S17	PGPtPSGTNVGSSGRsPSK	1	-1.001	NA
NP_056485.2	septrin-specific protease 3	SENP3	S212	GsPPVPSGPPMEEDGLR	3	-1.448	0.764
NP_060713.1	septin-11	SEPT11	T417	AAAQLLQSQAAQQSGAQQtKK ; KAAAQLLQSQAAQQSGAQQtK K	2	1.471	0.036
NP_002679.2	septin-5 isoform 1	SEPT5	S225	FGIHVYGFPECDsDEDEDfKQ QDR	9	-1.182	0.837
NP_001011553.2	septin-7 isoform 2	SEPT7	S422	ILEQQNsSR	1	1.687	NA
NP_006631.2	septin-9 isoform c	SEPT9	S12	sFEVEEVETPNSTPPR	11	2.337	0.669
NP_006631.2	septin-9 isoform c	SEPT9	S93	RTELsDISSK	5	1.711	0.743
NP_001018077.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 1	SERBP1	S330	SKsEEAHAEDsVMDHHFR	4	1.389	0.139
NP_001018077.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 1	SERBP1	S338	SKSEEHAEDsVMDHHFR	1	1.323	NA
NP_001018077.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 1	SERBP1	S391	TDKsSASAPDvDDPEAFPALA	1	1.849	NA
NP_001018077.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 1	SERBP1	S392	TDKsSASAPDvDDPEAFPALA	1	1.849	NA

NP_001018079.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 3	SERPBP1	S315	SKsEEAHAEDSVMDHFR	3	1.333	0.102
NP_001018079.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 3	SERPBP1	S323	SKSEEAHAEDsVMDHFR	1	1.323	NA
NP_001018079.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 3	SERPBP1	S376	TDKsSASAPDVDDPEAFPALA	1	1.849	NA
NP_001018079.1	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 3	SERPBP1	S377	TDKsSASAPDVDDPEAFPALA	1	1.849	NA
NP_003002.2	protein SET isoform 2	SET	S50	LNEQA <sub>s</sub> EEILK	6	-1.603	0.000
NP_055336.1	SH3 domain-binding protein 4	SH3BP4	S131	NSTLSDSGMIDNLPDsPDEVA K	3	-1.310	0.799
NP_055336.1	SH3 domain-binding protein 4	SH3BP4	S246	SYsLSELSVLQAK	12	-1.020	0.131
NP_085148.1	SH3 domain-binding protein 5-like	SH3BP5L	S350	CDsVEHLR	1	-1.169	NA
NP_085148.1	SH3 domain-binding protein 5-like	SH3BP5L	S358	GLsDHVSLDGGQELGTR	1	-1.157	NA
NP_085148.1	SH3 domain-binding protein 5-like	SH3BP5L	S362	GLSDHV <sub>s</sub> LDGGQELGTR	8	-1.170	0.015
NP_085148.1	SH3 domain-binding protein 5-like	SH3BP5L	S49	SPVAEEPGGGSSSSEAKLsP R	1	-1.296	NA
NP_114098.1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 isoform a	SH3KBP1	S589	ANSP <sub>s</sub> LFGTEGKPK	1	1.307	NA
NP_058544.3	SHC-transforming protein 3	SHC3	S474	AA <sub>s</sub> VECISPVSPPR	3	4.302	0.000
NP_001640.1	protein Shroom2	SHROOM2	S974	EGsPGSQQHPPSQK	1	4.613	NA
NP_116026.1	S-phase kinase-associated protein 2 isoform 2	SKP2	S64	EEDPSENIPQELLSNLGHPEsP PR	2	2.773	1.790
NP_003042.3	monocarboxylate transporter 1	SLC16A1	S461	KEsKEEETSIDVAGKPNVTK	5	1.400	0.237
NP_003042.3	monocarboxylate transporter 1	SLC16A1	S461;S467	KEsKEEETSIDVAGKPNVTK	3	1.700	0.000
NP_004163.3	excitatory amino acid transporter 1 isoform 1	SLC1A3	S512	DVEMGN <sub>s</sub> VIIEENEMK	4	5.022	0.849
NP_620614.2	probable global transcription activator SNF2L2 isoform b	SMARCA2	S1377	GRPPAEKLsPNPPK	5	1.762	0.459
NP_620614.2	probable global transcription activator SNF2L2 isoform b	SMARCA2	S1554	AKPVVSDFDsDEEQDER	1	2.848	NA
NP_003816.2	synaptosomal-associated protein 23 isoform SNAP23A	SNAP23	S20	AHQITDE <sub>s</sub> LESTR; AHQITDE <sub>s</sub> LESTRR	2	-3.783	0.025
NP_003816.2	synaptosomal-associated protein 23 isoform SNAP23A	SNAP23	S5	MDNLsSEIIQQR	1	-1.580	NA
NP_003816.2	synaptosomal-associated protein 23 isoform SNAP23A	SNAP23	S6	MDNLs <sub>s</sub> EEIIQQR	1	-1.580	NA
NP_006741.1	beta-2-syntrophin	SNTB2	S233	KPSLVSDLPWEGAAPQSPSF SGSEDSG <sub>s</sub> PK	1	-2.030	NA
NP_006741.1	beta-2-syntrophin	SNTB2	S393	sPSLGSDLTFATR	4	-1.414	0.203
NP_006741.1	beta-2-syntrophin	SNTB2	S95	GLGPPsPPAPPR	5	-1.220	0.324
NP_036377.1	SNW domain-containing protein 1	SNW1	S224	GPPsPPAPVMHSPSR	6	-1.378	1.384
NP_057308.1	sorting nexin-9	SNX9	S197	AsSSSMKIPLNK	2	1.379	0.095
NP_057308.1	sorting nexin-9	SNX9	S200	ASSS <sub>s</sub> MKIPLNK	1	1.446	NA
NP_066547.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2	SORBS2	S154	SHsDNSPNAFK	1	2.063	NA
NP_066547.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2	SORBS2	S239	sLERPMSSASMASDFR	1	2.013	NA
NP_066547.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2	SORBS2	S259	RKsEPAVGPPR	16	1.661	0.208
NP_066547.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2	SORBS2	S299	SFTSSsPSSPSR	2	1.199	0.180
NP_066547.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2	SORBS2	S304	SFTSSSPSSP <sub>s</sub> R	1	1.072	NA
NP_001018003.1	vinexin isoform 2	SORBS3	S188	LCDDGPQLPT <sub>s</sub> PR	16	1.074	0.438
NP_005677.2	transcription factor SOX-13	SOX13	S335	DLQ <sub>s</sub> sPPSLPLGLGEGDAVT K	1	2.083	NA
NP_005677.2	transcription factor SOX-13	SOX13	T307	APELPNtSSSPSLK	1	2.219	NA
NP_003097.1	transcription factor SOX-2	SOX2	S251	SEASSsPPVVTSSSHSR	2	3.503	0.000
NP_008871.3	transcription factor SOX-5 isoform a	SOX5	S109	VMSSSFAPHNSSTsPQK	1	3.540	NA
NP_059978.1	transcription factor SOX-6 isoform 1	SOX6	S416	TsPVNLPNK	2	1.194	0.191
NP_000337.1	transcription factor SOX-9	SOX9	S199	NGQAEAEATEQTHIsPNAIFK	2	3.990	0.000
NP_055761.2	spastin isoform 1	SPAST	S245	RKDPLTHTSNsLPR	4	1.041	0.228
NP_055761.2	spastin isoform 1	SPAST	S268	APsYSGLSMVSGVK	2	1.817	0.000
NP_112226.2	protein sprouty homolog 4 isoform 1	SPRY4	S148	LLDHMAPPPVADQAsPR	12	3.305	0.349
NP_003891.1	sequestosome-1 isoform 1	SQSTM1	T269;S272	SRLtPVsPESSSTEK	6	1.084	0.550
NP_689759.2	serum response factor-binding protein 1	SFRBP1	S367	sLDFQNEPQIK	4	2.596	0.000
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2398	TsPPLDR	2	-2.837	0.000
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2407	sRTPPSAPSQSR	1	-2.009	NA
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2449	sPVPSAFSDQSR	13	-2.408	0.295
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2581	RVPsPTPAPK	5	-1.766	0.728
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2702	RRPsPQPSPR	4	-1.811	0.555
NP_057417.3	serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	S2702;S2706	RRPsPQP <sub>s</sub> PR	3	-1.374	0.696
NP_036578.2	single-stranded DNA-binding protein 2 isoform 2	SSBP2	S321	NsPNNMSLSNQP <sub>s</sub> GTPR	3	2.939	1.128



NP_036578.2	single-stranded DNA-binding protein 2 isoform 2	SSBP2	S326	NSPNNMsLSNQPGTTPR	1	1.637	NA
NP_003147.2	stromal interaction molecule 1 precursor	STIM1	S618	SHsPSSPPDPTSPVGDSTR	2	-1.381	0.000
NP_005554.1	stathmin isoform a	STMN1	S16;S25	AsGQAFELILsPR; RAsGQAFELILsPR	17	1.178	0.276
NP_005554.1	stathmin isoform a	STMN1	S46	DLsLEEIQK; DLsLEEIQKK	3	1.063	0.124
NP_006704.3	activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	SUB1	S55	QsSSSRDDNMFIQIK	1	3.297	NA
NP_003165.2	supervillin isoform 1	SVIL	S574	RGsLER	1	-2.073	NA
NP_110413.2	syncollin isoform 1	SYNC	S325	RLsAQFENLMAESR	9	-2.273	0.278
NP_001108072.1	SUZ domain-containing protein 1 isoform 1	SZRD1	S107	ILGSAsPEEEQEKPILDRPTR	1	-1.123	NA
NP_003177.2	transgelin	TAGLN	S181	HVIGLQMGsNR	6	-6.469	0.174
NP_003177.2	transgelin	TAGLN	S186	GAsQAGMTGYRPR	1	-6.801	NA
NP_003555.1	transgelin-2	TAGLN2	S185	GAsQAGMTGYGMPR	11	-1.994	0.163
NP_006747.1	transcription elongation factor A protein 1 isoform 1	TCEA1	S97	KKEPAITsQNSPEAR	9	1.288	0.764
NP_001006934.1	transcription elongation factor A protein-like 3	TCEAL3	S121	GTDDsPKDSQEDLQER	1	-1.126	NA
NP_001006934.1	transcription elongation factor A protein-like 3	TCEAL3	S125	GTDDSPKDsQEDLQER	1	-1.216	NA
NP_001006934.1	transcription elongation factor A protein-like 3	TCEAL3	S30	NEGNLENEGKPEDEVEPDDE GksDDEEKPDVEGK	2	-1.568	0.000
NP_001006934.1	transcription elongation factor A protein-like 3	TCEAL3	S65	REDEGEPEGDEGQLEDEGsQE K	4	-1.421	0.172
NP_003196.1	transcription factor 12 isoform b	TCF12	S559	TSsTNEDEDLNPEQK	2	1.597	0.795
NP_003196.1	transcription factor 12 isoform b	TCF12	T557	tSSTNEDEDLNPEQK	1	1.035	NA
NP_006512.2	transcription factor E3	TFE3	S556	AASDPLLSSVsPAVSK	4	-1.948	0.638
NP_036275.1	tuftelin-interacting protein 11	TFIP11	S98	GAAEEAELEDsDDEEKPVKQD DFPK	2	-1.486	0.000
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S120	KRPsLPSSPSPGLPK	43	-1.524	0.453
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S120;S124	KRPsLPsPSPGLPK	7	-1.011	0.027
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S123;S124	KRPSPsPSPGLPK	2	-1.089	0.008
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S124	KRPSPsPSPGLPK	4	-1.152	0.354
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S126	KRPSPSPSPGLPK	9	-2.111	0.441
NP_057011.2	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein isoform 2	TGFB11	S51	sPKPAAPAAPPFSSSSGVLGT GLCELDLDR	20	-1.190	0.198
NP_005110.2	thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	S682	IDIsPSTFR	2	-1.447	0.000
NP_008936.2	transducin-like enhancer protein 4	TLE4	S208	SSSVsPSASFR	4	-2.004	0.000
NP_008936.2	transducin-like enhancer protein 4	TLE4	S292	DAPIsPASIASSSSTPSSK	4	-2.584	0.000
NP_055673.2	transmembrane and coiled-coil domains protein 2 isoform 1	TMCC2	S438	FGsADNIAHLK	2	2.641	0.572
NP_443139.2	transmembrane protein 132B	TMEM132B	S793	VKFEPsDEHQGGSNDIEGIN R	1	3.316	NA
NP_001027454.1	thymopoietin isoform beta	TMPO	T208	AKtPVTLK	2	1.165	0.000
NP_001027455.1	thymopoietin isoform gamma	TMPO	S184	QNGSNDSDRYsDNEEDSKIEL K	10	1.081	0.495
NP_001027455.1	thymopoietin isoform gamma	TMPO	T208	AKtPVTLK	4	1.585	0.097
NP_110382.3	thioredoxin-related transmembrane protein 1 precursor	TMX1	S270	sLGPPLATDKS	1	1.537	NA
NP_005479.1	target of Myb protein 1 isoform 1	TOM1	S376	GSsLADQR	2	-1.222	0.000
NP_005070.1	tumor protein D52 isoform 3	TPD52	S136	NSPTFKsFEEK; sFEEKVENLK	7	4.021	0.039
NP_001018004.1	tropomyosin alpha-1 chain isoform 3	TPM1	S87	ATDAEADVAsLNR	1	-3.252	NA
NP_000358.1	thiopurine S-methyltransferase	TPMT	S14	TSLDIEEYsDTEVQK	2	-1.774	0.000
NP_005649.1	TNF receptor-associated factor 1 isoform a	TRAF1	S66	GEDLQSI sPGRS	3	-2.943	0.000
NP_004286.2	TNF receptor-associated factor 4	TRAF4	S426	GsLDESSLGFGYPK	1	2.882	NA
NP_443210.1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM9 isoform 2	TRIM9	S46	NILVQTPESEsPQSHR	2	3.279	0.000
NP_004231.1	cdc42-interacting protein 4	TRIP10	S299	APSDSsLGTPSDGRPELR	2	-1.296	0.000
NP_006283.1	tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	T220	DGtISEDITIR	2	2.198	0.000
NP_001010854.1	tetratricopeptide repeat protein 7B	TTC7B	S202	sPKPGAPHDQELGFFLETGL QR	3	1.695	0.000
NP_079526.1	protein tweety homolog 3	TTYH3	S496	CENTPLIGREsPPPSYTSSMR	11	3.685	0.361
NP_079526.1	protein tweety homolog 3	TTYH3	S519	YLATSQRPDPsSGSH	2	1.430	0.000
NP_079526.1	protein tweety homolog 3	TTYH3	S522	YLATSQRPDPSSGsH	4	1.546	0.134
NP_821080.1	tubulin beta-2B chain	TUBB2B	T55	INLVYNEATGNK	4	1.010	0.000
NP_001120792.1	ubiquitin-associated protein 2-like isoform b	UBAP2L	S609	RYPSSISSsPQK	10	-1.055	0.459
NP_056377.1	UBX domain-containing protein 7	UBXN7	S285	SESLIDAsEDSQLEAAIR	1	1.058	NA
NP_056377.1	UBX domain-containing protein 7	UBXN7	S288	SESLIDASEDsQLEAAIR	13	1.025	0.216

NP_004772.1	vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3	S63	ADALQAGASQFETsAAK	3	1.307	0.000
NP_003753.2	vesicle-associated membrane protein 4 isoform 1	VAMP4	S17	HLNDDDVtGsVK	1	-1.409	NA
NP_006625.1	vesicle-associated membrane protein 5	VAMP5	S48	SDQLLDMsSTFNK	1	-2.422	NA
NP_006625.1	vesicle-associated membrane protein 5	VAMP5	T50	SDQLLDMSStFNK	1	-1.676	NA
NP_065068.1	vang-like protein 2	VANGL2	S58	SVTIQAPGEPLLDNEsTRGDE R	1	2.137	NA
NP_004729.1	vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C isoform 1	VAPB	S156;S160	sLSSsLDDTEVKK	1	-1.355	NA
NP_004729.1	vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C isoform 1	VAPB	S160	SLSSsLDDTEVKK	2	-1.204	0.000
NP_079025.2	vasohibin-2 isoform 1	VASH2	T260	ILKPASAHSPtQVR	2	2.461	0.000
NP_003364.1	vinculin isoform VCL	VCL	S721	sLLDASEEAIKK	4	-2.277	0.000
NP_003371.2	vimentin	VIM	S39	TYsLGSALRPSTSR	2	1.489	0.494
NP_003371.2	vimentin	VIM	T361	EMEENFAVEAANYQDtIGR	3	1.204	0.000
NP_003378.3	WAS/WASL-interacting protein family member 1	WIPF1	S234	GTALGGGsIR	1	1.286	NA
NP_003378.3	WAS/WASL-interacting protein family member 1	WIPF1	S276	ALDDKPPPPPPVGNRP sIHR	9	2.005	0.732
NP_003378.3	WAS/WASL-interacting protein family member 1	WIPF1	S340	NLsLSSSTPPLPSPGR	4	2.951	0.224
NP_056982.1	zinc finger and BTB domain-containing protein 7A	ZBTB7A	S549	HFKDEDEDEDVAsPDGLGR	2	-1.001	0.000
NP_149105.3	zinc finger CCHC-type and RNA-binding motif-containing protein 1	ZCRB1	S155	KAPEEEEEIEVEEsEDEGEDP ALDLSQAI AFQQA K	2	1.316	0.918
NP_003430.1	zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1	ZKSCAN1	S357	sFSLSSNFTTPEEVPTGTK	1	1.896	NA
NP_003430.1	zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1	ZKSCAN1	S359	SFsLSSNFTTPEEVPTGTK	1	1.896	NA
NP_006289.2	zinc finger protein 192	ZKSCAN8	S12	KPSAPsPPDQTPEEDLVIVK	2	2.314	0.000
NP_078947.3	zinc finger protein 768	ZNF768	S125	YEPQsPGYEPR	3	1.432	0.000
NP_003452.1	zyxin	ZYX	S259	GPPASsPAPAPK	6	-1.318	0.110
NP_003452.1	zyxin	ZYX	S308	LGHPEALSAGTGsPQPPSFTY AQQR	2	-1.277	0.000
NP_003452.1	zyxin	ZYX	S344	sPGAGPLTLK	17	-1.739	0.438