

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790173

研究課題名（和文） 低侵襲かつ客観的、定量的に測定可能なバイオマーカー探索技術の開発

研究課題名（英文） Development of discovering technology to quantify the biomarker for minimally invasive diagnostics.

研究代表者 鎌田 春彦

（独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・サブプロジェクトリーダー）

研究者番号：00324509

研究成果の概要（和文）：

疾患発症の分子メカニズムに基づいた画期的治療薬の開発に期待が寄せられている一方、疾患の治療方針を決定するためのバイオマーカーは数少なく、『低侵襲かつ客観的、定量的に計測出来る臨床評価』のための有効なバイオマーカー開発が待ち望まれている。疾患の診断には疾患組織に効率よく集積する抗体等の分子プローブが必要不可欠であるが、分子プローブの標的となる有効なバイオマーカー探索技術基盤が未熟なため、効率よく病巣部位を可視化できる分子プローブは殆どないのが現状である。そこで本課題では、『低侵襲かつ客観的、定量的に計測出来る臨床評価』の確立を目的に、疾患の診断に有効なバイオマーカーを探索するための技術開発を行った。我々独自の方法である *in vivo* biotinylation 法を用いて、GalN/TNF 投与により肝炎を誘導したモデルマウスのプロテオーム解析を行った。その結果、500 種類以上もの有用なマーカー候補分子を見出した。今後、これらの結果をもとに、上記バイオマーカーと肝炎との関連ならびに、診断法の確立等に有効活用する予定である。

研究成果の概要（英文）：

The proteins they express at the time of disease and which are related to organ dysfunction are poorly characterized. Our group has developed a general chemical proteomics approach for the identification of biomarker proteins. The aim of this study was to identify protein biomarkers present in sinusoidal endothelial cells following hepatic injury using chemical proteomics employing *in vivo* biotinylation. We performed a proteomic study in a mouse model of massive hepatocyte apoptosis in tumor necrosis factor (TNF)/D-(+)-galactosamine (GalN) animals induced by the combined administration of GalN and TNF. *In vivo* biotinylation was carried out by perfusing mice with a reactive ester derivative of biotin that enables the covalent modification of proteins. Protein expression was analyzed using purified proteins from hepatic and normal livers. The biotinylated proteins were purified from liver extracts using streptavidin beads, digested on the resin by trypsin and subjected to mass spectrometry for identification. These results indicate that the sinusoidal endothelial biomarkers expressed on liver injury reflect the molecular pathobiology and the mechanisms of hepatitis induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学・医療薬剤学

キーワード：バイオマーカー、プロテオーム解析、膜蛋白質、ビオチンラベル化、肝炎

1. 研究開始当初の背景

ゲノム科学の発展により、疾患の治療に有益な標的遺伝子が多数発見されているものの、疾患の早期診断や経過観察のための『低侵襲かつ客観的、定量的に計測出来る臨床評価』が進展しなければ、疾患の進行状態やその特性を勘案しながら治療するような、新しいタイプの治療法の確立は困難である。そのため、疾患の診断に有効なバイオマーカーを探索するためのプロテオミクス技術に注目が集まっている。プロテオミクスは、疾患状態と健常状態の蛋白質の発現を比較検討することで、疾患に特異的に発現しているバイオマーカーを効率よく同定出来る。しかし、1.ハウスキーピング蛋白質等の細胞内で大量に発現している蛋白質の中から、目的とするバイオマーカー蛋白質を効率よく探索することが困難であること、2. 見出したマーカー蛋白質が細胞質内蛋白質であった場合、抗体等の蛋白質の細胞内浸透性の問題等から、プローブが結合出来ないこと、等の幾つかの問題点が指摘されている。このような問題点を解決するには、①発現量が少ないと考えられるバイオマーカーを効率よく精製し、②抗体等の分子プローブが、効率よく結合出来るような細胞表面上に発現するバイオマーカーの同定が必要不可欠であると考えられる。

上記のような背景の下、細胞表面上に発現する細胞膜蛋白質を効率よく解析することが可能な「メンブランプロテオミクス」が最近注目を集めている。細胞膜蛋白質は、細胞質内蛋白質とは異なり、受容体や接着分子等、細胞と外界とを繋げるインターフェイスの役割を担う、様々な分子が存在している為、マーカーとしてだけではなく、創薬標的の探索にも繋がるものと期待される。

このような背景のもと、我々は細胞膜蛋白質を効率よく回収可能なサンプル調整法 (in vivo biotinylation 法) を実施することで、疾患の発症や悪化により発現変動する細胞膜蛋白質を効率よく解析することにした。さらに、このような抗原に対して、迅速に抗体を作製することで、バイオマーカーの絞り込みが可能になるが、本方法により同定された抗原に対する抗体の作製は、長年にわたって我々が作製してきたファージ抗体ライブラリを将来的に応用することにした。上記、我々独自の方法論を組み合わせることで、炎症性疾患の診断・治療マーカー分子を、より高感度かつ高効率で検出できるものと考えられた。本結果から見出されたマーカー分子は、臨床的にも有用な診断・治療標的になる

ことが示唆される。

2. 研究の目的

近年のオミクス解析の進展に伴い、疾患発症の分子メカニズムが明らかになり、疾患メカニズムに基づいた画期的治療薬の開発に期待が寄せられている。特に近未来の治療法として期待されている、患者個人々に特化したオーダーメイド医療では、これまで汎用されてきた生化学検査や血圧等の古典的なマーカーのみで、的確な診断と治療を行うことは困難であると言わざるを得ない。

本研究では、疾患の診断に有効なバイオマーカーを探索するための技術開発を行い、『低侵襲かつ客観的、定量的に計測出来る臨床評価』の確立を目的とする。具体的には、蛋白質の発現動態に加えて翻訳後修飾や分解産物をも検出可能なプロテオミクス技術を応用し、未だ有効なバイオマーカーが存在しない肝炎の診断バイオマーカーの同定を目指す。

3. 研究の方法

ヒトゲノムの解析がほぼ完了した現在、ヒトの構成蛋白質の約30%が細胞膜蛋白質であると推定されている。細胞膜蛋白質は先述したとおり、疾患の診断に有効なバイオマーカーになりうる可能性があるにも関わらず、そのプロテオーム解析は、あまり進んでいない。その理由として、細胞膜蛋白質は個々の性質がそれぞれ異なっている上、水溶性に乏しく、さらに、発現量が低いこと等が挙げられており、標準化された方法論を構築しづらい背景がある。現在、細胞膜蛋白質を解析するための様々な方法論が考えられており、1)濃縮法、2)可溶化法、3)分離法、4)酵素消化法の改善が行われている。本研究では、特に1)に着目し、細胞膜蛋白質を効率よく濃縮するために、ラベル化試薬を疾患臓器に対して直接環流し、細胞膜蛋白質を、疾患における発現状態そのままに膜蛋白質を濃縮する in vivo biotinylation 法を実施した。

【疾患モデルの作製】

疾患モデル動物の作製は、Balb/c マウスに、炎症性サイトカインのTNFならびにD-ガラクトサミンを共投与し、実験的肝炎を誘導することで作製した。

【In vivo biotinylation 法】

肝炎モデル動物に対して、in vivo biotinylation 法を施行した。マウスの左心室より、水溶性ビオチン化試薬を環流し、肝

臓の類洞血管内に発現する細胞膜蛋白質をビオチンラベルした。環流の後、肝臓を回収し、実際に肝臓がビオチン化されたかどうかを、蛍光ラベル化ストレプトアビジン等の検出試薬を用いて確認した。ビオチン化が確認された肝臓を、SDS ならびに Nonidet-P40 等の溶解性の高い界面活性剤とともにホモジネートすることで細胞膜蛋白質を回収した。回収されたビオチンラベル化細胞膜蛋白質を、アビジンが固相化されたビーズにて回収し、回収された蛋白質を固相ビーズ上でトリプシン等の蛋白質消化酵素により分解することでペプチド鎖を得た。得られたペプチド鎖を HPLC により分離し、質量分析装置 (ESI-TOF/TOF) を用いたバイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

我々独自の方法である *in vivo* biotinylation 法を用いて、GalN/TNF 投与により肝炎を誘導したモデルマウスのプロテオーム解析を行い、健常マウスと比較検討した (結果の一部を Table 1 として示した)。その結果、生理的なビオチン化蛋白質である各種カルボキシラーゼに加えて、Fibronectin 等の細胞外マトリクスや EGF 受容体等の細胞膜蛋白質等の複数のマーカー分子が同定された。さらに感度・分解能に優れた質量分析機にてプロテオーム解析を行った結果、肝炎モデルにおける肝臓のみで発現が上昇している可能性のある 525 種類の蛋白質を最終的に同定することが出来た。そのうち 47 種類の蛋白質に関しては、正常の肝臓においては全く発現が認められなかったにも関わらず、肝炎を誘発させたモデルマウスにおいては、検討した個体全てにおいて発現が認められ、肝炎のマーカーとして有用なものが数多く同定された。現在、これらの膜蛋白質に関して、肝炎を発症した組織における局在を免疫組織染色により評価しており、さらに血中へのこれらの膜蛋白質の放出が見られるのかに関する検討を順次行っているところである。これらの結果をもとに、上記バイオマーカーと肝炎との連関ならびに、診断法の確立等に有効活用する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

(2009 年度)

1. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Tani M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., **Kamada H.**, Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor

necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009.

2. Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., **Kamada H.**, Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie.*, 64(3):214-6, 2009.
3. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., **Kamada H.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie.*, 64(4):238-41, 2009.
4. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., **Kamada H.**, Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta Crystallogr. Sect. F.*, 65(Pt 3):295-8, 2009.
5. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., **Kamada H.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials.*, 30(19):3318-23, 2009.
6. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Tani M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., **Kamada H.**, Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists., *J. Biochem.*, 146(2):167-72, 2009.
7. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Mayumi T., **Kamada H.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y. : TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3):296-300, 2009.
8. Nabeshi H., Yoshikawa T., **Kamada H.**, Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Minowa K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide has the inhibitory effect on transmission of human T-cell leukemia virus type 1., *Biol. Pharm. Bull.*, 32(7):1286-8, 2009.
9. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., **Kamada H.**, Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant

- for the induction of mucosal immune responses., *Biomaterials.*, 30(29):5869-5876, 2009.
10. Nomura T., Abe Y., **Kamada H.**, Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tani ai M., Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30:388(4):667-71, 2009.
 11. Shibata H., Yoshioka Y., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Tani ai M., Ohta T., Tsunoda S., **Kamada H.**, Tsutsumi Y. : The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., *Biomaterials.*, 30(34):6638-6647, 2009.
 12. **Kamada H.**, Fugmann T., Neri D., Roesli C. : Improved protein sequence coverage by on resin deglycosylation and cysteine modification for biomarker discovery., *Proteomics.*, 9(3):783-787, 2009.

(2010 年度)

1. Nomura T., Abe Y., **Kamada H.**, Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology., *Pharmazie.*, 65(2):93-96, 2010.
2. Shibata H., Abe Y., Yoshioka Y., Nomura T., Sato M., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., **Kamada H.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine.*, 50(1):75-83, 2010.
3. **Kamada H.**, Okamoto T., Hayashi T., Suzuki K., An in vitro method for screening anti-platelet agents using a microchannel array flow analyzer. *Biorheology.* 47(2):153-161, 2010
4. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., **Kamada H.**, Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells., *Pharmazie.*, 65(3):199-201, 2010.
5. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Kawai Y., Mayumi T., Hiroi T., Itoh N., Nagano K., **Kamada H.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Mutant TNF-alpha, mTNF-K90R, is a novel mucosal vaccine adjuvant candidate against HIV., *Pharmazie.*, 65(4):254-6, 2010.
6. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Nagano K., Abe Y., **Kamada H.**, Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape., *Inflammation.*, 33(4):276-80, 2010.
7. Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Morishita Y., Nabeshi H., Yamashita T., Muroi M., Tanamoto K., Nagano K., Abe Y., **Kamada H.**, Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Yoshikawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo., *Biol. Pharm. Bull.*, 33(5):780-3, 2010.
8. Nabeshi H., Yoshikawa T., **Kamada H.**, Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Minowa K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells., *Pharmazie.*, 65:702-707, 2010.
9. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Nomura T., Yoshikawa T., Kubota-Koketsu R., Ikuta K., Okamoto S., Mori Y., Kunisawa J., Kiyono H., Itoh N., Nagano K., **Kamada H.**, Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The IL-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvant for the induction of protective immunity against influenza virus., *J. Virol.*, 84(24):12703-12712, 2010.
10. Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Morishita Y., Kayamuro H., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., **Kamada H.**, Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y. : Potential adjuvant effect of intranasal urban aerosols in mice through induction of dendritic cell maturation., *Toxicol. Lett.*, 199(3):383-388, 2010.
11. Schliemann C., Roesli C., **Kamada H.**, Borgia B., Fugmann T., Klapper W., Neri D.: In vivo biotinylation of the vasculature

in B cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy., Blood., 115(3): 736-744, 2010.

[学会発表] (計4件)

1. 鎌田春彦, 廣瀬賢治, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央, イオンモビリティ質量分析法による蛋白質医薬品の構造と活性の連関解析. 第57回日本質量分析総合討論会, 大阪, 2009年5月
2. 鎌田春彦, 廣瀬賢治, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央, イオンモビリティ質量分析法を用いた蛋白質医薬品の品質管理に向けた基礎検討. 第9回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009年5月
3. 鎌田春彦, 廣瀬賢治, 押方基二, 佐藤太, 長野一也, 阿部康弘, 堤康央, 角田慎一, イオンモビリティ質量分析法を用いた抗体医薬品の構造とその生物活性の変化に関する基礎検討, 第10回 日本蛋白質科学会, 北海道, 2010年6月
4. 鎌田春彦, 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術, 日本薬学会 第131年会, 静岡, 2011年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/bio-r/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 鎌田 春彦 (独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・サブプロジェクトリーダー)

研究者番号: 00324509

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

Table 1 In vivo biotinylation法にて回収した肝炎誘導マウス由来タンパク質上位30

Accession	Coverage	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Description
Q05920	67.06	456	1178	129.6	6.71	16112.69	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pc PE=1 SV=1 - [PYC_MOUSE]
Q8C196	51.80	156	1500	164.5	6.92	5581.78	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cps1 PE=1 SV=2 - [CPSM_MOUSE]
Q912A3	61.33	100	724	79.9	7.25	3921.81	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pcca PE=2 SV=2 - [PCCA_MOUSE]
P11276	31.09	131	2477	272.3	5.59	3902.45	Fibronectin OS=Mus musculus GN=Fn1 PE=1 SV=3 - [FINC_MOUSE]
Q8VCM7	51.38	87	436	49.4	5.86	2808.55	Fibrinogen gamma chain OS=Mus musculus GN=Fgg PE=2 SV=1 - [FIBG_MOUSE]
Q8K0E8	60.91	100	481	54.7	7.08	2739.23	Fibrinogen beta chain OS=Mus musculus GN=Fgb PE=2 SV=1 - [FIBB_MOUSE]
Q99MR8	60.39	79	717	79.3	7.83	2711.90	Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mccc1 PE=2 SV=2 - [MCCA_MOUSE]
Q05793	19.72	94	3707	398.0	6.32	2709.72	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Mus musculus GN=Hspg2 PE=1 SV=1 - [PGBM_MOUSE]
P07724	35.86	83	608	68.6	6.07	2514.15	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3 - [ALBU_MOUSE]
P28665	31.23	73	1476	165.2	6.42	2306.44	Murinoglobulin-1 OS=Mus musculus GN=Mug1 PE=1 SV=3 - [MUG1_MOUSE]
Q55WU9	19.91	65	2345	265.1	6.39	1871.69	Acetyl-CoA carboxylase 1 OS=Mus musculus GN=Acaca PE=1 SV=1 - [ACACA_MOUSE]
Q61838	29.30	67	1495	165.8	6.68	1705.78	Alpha-2-macroglobulin OS=Mus musculus GN=A2m PE=1 SV=2 - [A2M_MOUSE]
Q8BWT1	51.13	35	397	41.8	8.09	1472.76	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acaa2 PE=1 SV=2 - [THIM_MOUSE]
O08601	34.23	41	894	99.0	7.62	1464.26	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit OS=Mus musculus GN=Mtgp PE=2 SV=2 - [MTP_MOUSE]
P51660	29.93	34	735	79.4	8.57	1423.32	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Mus musculus GN=Hsd17b4 PE=1 SV=3 - [DHB4_MOUSE]
Q80X19	19.92	40	1797	192.9	5.10	1387.23	Collagen alpha-1(XIV) chain OS=Mus musculus GN=Col14a1 PE=2 SV=2 - [COE1_MOUSE]
P56480	57.66	43	529	56.3	5.34	1345.11	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2 - [ATPB_MOUSE]
P97449	29.50	39	966	109.6	5.90	1337.06	Aminopeptidase N OS=Mus musculus GN=Anpep PE=1 SV=4 - [AMPN_MOUSE]
P54869	34.45	37	508	56.8	8.41	1316.93	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hmgcs2 PE=1 SV=2 - [HMGCS2_MOUSE]
P01027	21.83	44	1663	186.4	6.81	1285.20	Complement C3 OS=Mus musculus GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_MOUSE]
Q03265	38.52	36	553	59.7	9.19	1282.99	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1 - [ATPA_MOUSE]
Q8BMS1	33.55	34	763	82.6	9.14	1261.06	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1 - [ECHA_MOUSE]
P16460	44.17	39	412	46.6	8.22	1236.35	Argininosuccinate synthase OS=Mus musculus GN=Ass1 PE=1 SV=1 - [ASSY_MOUSE]
Q63836	51.91	36	472	52.6	6.18	1210.02	Selenium-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Selenbp2 PE=1 SV=2 - [SBP2_MOUSE]
Q63880	31.70	37	571	63.3	6.14	1179.97	Liver carboxylesterase 31 OS=Mus musculus GN=Es31 PE=1 SV=2 - [EST31_MOUSE]
Q90X04	42.75	39	676	74.4	8.60	1175.88	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Mus musculus GN=Slc25a13 PE=1 SV=1 - [CMC2_MOUSE]
Q01279	16.69	35	1210	134.8	6.86	1156.62	Epidermal growth factor receptor OS=Mus musculus GN=Egfr PE=1 SV=1 - [EGFR_MOUSE]
Q68FD5	24.30	43	1675	191.4	5.69	1120.96	Clastrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc PE=1 SV=3 - [CLH_MOUSE]
P32020	37.84	33	547	59.1	7.44	1110.83	Non-specific lipid-transfer protein OS=Mus musculus GN=Scp2 PE=1 SV=3 - [NLTP_MOUSE]
Q908M2	25.49	30	718	78.2	9.17	1107.73	Peroxisomal bifunctional enzyme OS=Mus musculus GN=Ehadh PE=1 SV=3 - [ECHP_MOUSE]