

2017 年奨励賞受賞論文

総説

分裂期クロマチンの制御機構を理解するプロテオミクス解析

太田 信哉*

*E-mail: shinya.ohata@kochi-u.ac.jp

高知大学医学部生化学講座 : 783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮

(受付 2017 年 10 月 2 日, 改訂 2017 年 10 月 30 日, 受理 2017 年 11 月 8 日)

これまで分裂期染色体上に, 約 4,000 種類のタンパク質を同定した. そこに含まれる非特異的結合タンパク質を除いた“真の”染色体タンパク質の抽出や, 隠されたタンパク質間の相互作用を見いだすために, 機械学習を基盤としたコンピュータシミュレーションが応用できる. 一方で, 分裂期の制御を理解する上で, タンパク質リン酸化の包括的な理解は欠かせない. これまでに, 染色体上の分裂期特異的リン酸化と脱リン酸化を決定しており, これらは, 今後の染色体動態の制御機構の解明に向けて大きな足がかりとなる.

1 序論

分裂期の染色体は, 1882 年に Walther Flemming によって観察されて以来, その特徴的な構造から多くの生物学研究者の興味の対象となってきた. 1977 年に Uli Laemmli らは, Chromosome Scaffold とそれによる染色体の分裂期特異的な規則的な折りたたみのモデルを提唱し¹⁾, その後, DNA トポイソメラーゼ II α (TopoII α) と Structure maintenance of chromosome 2 (SMC2) という 2 つの Chromosome Scaffold 因子が決定されている. 特に SMC2 は SMC4, Chromosome-associated protein D2 (CAP-D2), CAP-H, CAP-G とともにコンデンシン複合体を形成し, 分裂期特異的染色体凝縮に重要であることが示されている^{2),3)}. 後に, この複合体はコンデンシン I となり, SMC2, SMC4, CAP-D3, CAP-H2, CAP-G2 からなる複合体, コンデンシン II も近年見いだされている⁴⁾. 最近では, これらのコンデンシンと Kinesin family member 4A (Kif4A) の働きが, 反対の作用を持つ TopoII α とバランスよく組み合わせられることで, 分裂期染色体の構造が形成されていることが示されている⁵⁾. しかし, この分裂期の染色体凝縮は未だに未知部分が多く, PMM 標識と呼ばれるヒストン H3 の修飾 (H3pT3K4me2R8me2) が染色体構造を形成している原動力であるという報告もなされている⁶⁾.

一方で, 染色体が正確に娘細胞に分配される際には, 染色体狭窄部のセントロメアが重要な領域となる. 近年, この領域のヒストンは一部の H3 が Centromere protein A (CENP-A) に置き換わっているだけでなく⁷⁾, CENP-A

を含むヌクレオソームのヒストン H4 の 20 番目のリジンがメチル化されていることが報告されている⁸⁾. さらには, 両端のペリセントロメアの領域に CENP-B が特異的に結合し⁹⁾, ヒストンが高度に修飾され, ヘテロクロマチン形成していることもわかっている¹⁰⁾. このセントロメア上には分裂期には数十種類のタンパク質からなる巨大複合体, キネトコアが形成される¹¹⁾. キネトコアは微小管との接合や, 分裂期チェックポイントのモニタリングなどの機能を担っている.

このように, 正確な分裂期の染色体構造の構築機構を解明することは非常に重要であるが, 未だに解明されていない点が多い. 我々は, これまでに, こうした重要な機構を作り上げている分裂期染色体のタンパク質組成を決定することを目的として研究を進めてきた. もちろん同様に分裂期の染色体タンパク質組成の決定を目的とした研究はこれまでもなされてきたが^{12),13)}, 染色体という巨大なタンパク質複合体の組成決定には, 非特異的結合タンパク質を考慮しなくてはならず, タンパク質組成の完全決定には至っていなかった. 我々は, この問題を解決するために, 機械学習を応用した Multi-classifier combinational proteomics (MCCP) という解析方法を作り上げ, 意味のある分裂期染色体のタンパク質組成決定に至った. そして, 近年ではそれをさらに発展させ, 分裂期染色体上の相互作用をシミュレーションする手法, nano Random Forest (nanoRF) を開発した. また, これらとは別に我々は分裂期染色体上のタンパク質リン酸化サイトを網羅的に決定している.

2 分裂期染色体をターゲットとしたプロテオミクス解析

様々な機能のタンパク質が結合している巨大複合体である染色体の組成の決定を試みる研究は、染色体の制御メカニズムを明らかにする上で必須となる。近年いくつかのグループにより分裂期染色体プロテオームの決定が試みられたが、明確な知見が得られてこなかった^{12),13)}。それは、染色体は非常に大きく複雑な複合体であるため単離が困難であり、加えて核膜消失後に大量の細胞質タンパク質が非特異的に結合してしまうことが原因であった。我々はニワ

トリ DT40 細胞より分裂期染色体の単離を試み、質量分析でその組成を確認したところ、4,027種類の染色体タンパク質を同定した。この中には、122のこれまでに見いだされているほぼ全ての分裂期セントロメア局在タンパク質が含まれており (Fig. 1A), 4,027種類の染色体タンパク質に、新規の機能的な染色体タンパク質が含まれている可能性が高く存在する。

一方で、他グループの先行研究と同様に、非特異的染色体結合タンパク質と考えられるものも含まれていた

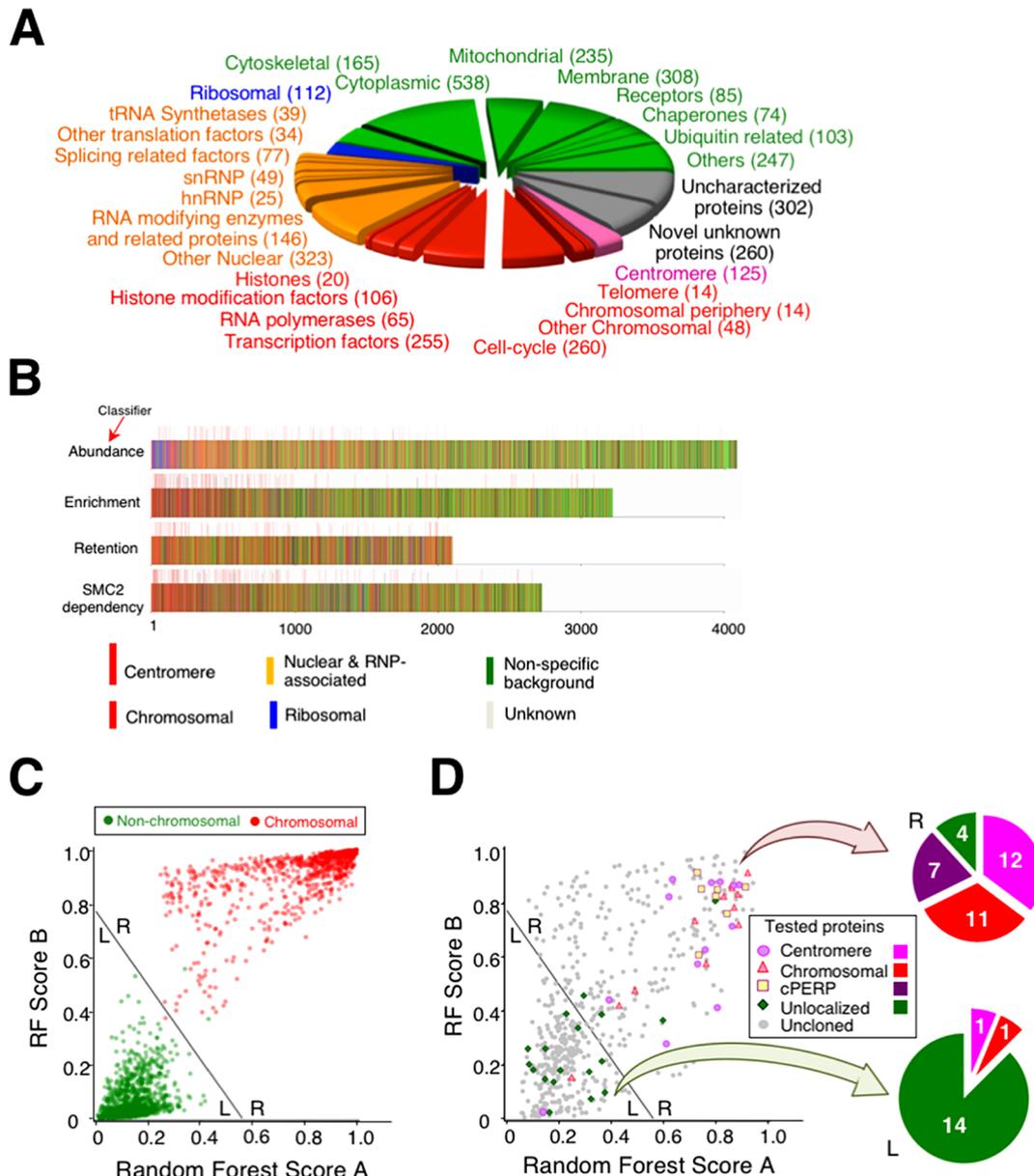


Fig. 1 Proteomic analysis of mitotic chromosome proteins with Random forest analysis predicting novel proteins of interest

(A) The 27 classes of proteins found in chromosomes. (B) The rank of all proteins observed for proteomic abundance, enrichment, retention, SMC2 dependency is plotted as vertical color coded lines (rug plots). Proteins are ranked from the highest (left) to lowest values. Centromere proteins are indicated by longer bars. (C) Separation of the two training sets by RF analysis. The line provides optimal separation of the two training sets. RF analysis of B includes the bioinformatic analysis. (D) Position of novel cloned proteins and remaining uncloned proteins in the same 2d analysis with classification of newly cloned proteins from regions to the left and right of the dividing line, respectively. This figure was modified from Ohta *et al.*, 2010 (15).

(Fig. 1A). 質量分析スペクトラムから定量すると、それらが全体に占める質量の割合は16%に過ぎず、ごく少量ではあった。しかし、その種類は1,700種類ほどもあり、有益なタンパク質の発見を試みるためにはこの数字は少ないとは言えない。そこで、得られたプロテオームから意味のあるタンパク質とそれ以外を分類する手法を兼ね備えた新しい解析法を取り入れたプロテオミクスが必要となった。

3 分裂期染色体上のタンパク質コピー数の決定

最初に、質量分析により決定した4,027種類のタンパク質全てにおいて、染色体に結合しているタンパク質のコピー数を決定することを試みた。その結果、質量分析によるペプチドのスペクトラルカウント数とタンパク質コピー数の相関を基にした下記の式と定数 a を決定することで、全ての染色体タンパク質のコピー数を推測することが可能となった。定数 a の決定のため、数種類の染色体タンパク質を大腸菌の大量発現系より精製、濃度を決定した。それを標準タンパク質として、単離した炭素13でラベルした染色体に混合し、質量分析でその比を測定し、 a の決定に至った。

estimated copy number

$$= a * (10^{[\text{lb} * (\text{spectral count}) / (\text{protein-specific normalization})]} - 1)$$

本定量法の正確性を示すために、Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture (SILAC) を用いてラベルした、二種類の染色体を単離し、全タンパク質の相対差を比較した。同時に上記の式を用いて、この二種類の染色体に含まれる全タンパク質の定量を行ない、その結果より個々のタンパク質の相対差を比較した。その結果、2つの定量法による相対差は、80%のタンパク質で2倍以内に、97%で4倍以内となった。この事実は、本項で開発した方法が、SILAC を用いた方法と同程度に信頼できる定量性を持つこと、なおかつこれまで困難であった網羅的絶対量の推定を可能にするものであることを示している。解析結果の一例として、ニワトリ DT40 細胞においては、1つのセントロメアには CENP-A を含むヌクレオソームが約12分子存在することを示した。これは、報告されているヒトにおける CENP-A の数の1/15程度である。このことから、ヒトとニワトリでは、セントロメアの形成過程が異なることが推測される。また、CCAN, Ndc80, Mis12 複合体は1つのセントロメアにそれぞれ 51 ± 27 , 47 ± 5 , 40 ± 22 と、ほぼ50分子の複合体が存在することを明らかにした。この事実とこれまでの電子顕微鏡による先行研究などから、ニワトリ細胞のセントロメアには、6つの微小管が結合しそれぞれに各8分子の複合体が存在することが示唆された。この数は酵母における微小管あたりの Ndc80 の数と完全に一致した。

しかし、コピー数を基盤とした切り口のみでは、実際の染色体タンパク質を決定するための強力なパラメータとはならず (Fig. 1B), 異なるパラメータの導入が必要であることが示唆された。

4 多次元プロテオミクスによる組成の決定

分裂期においては、「目的とする染色体タンパク質は染色体上に多く存在し、細胞質内には少ない」と仮定し、そのようなタンパク質を抽出する定量プロテオミクスを展開することを試みた。実際には、SILAC を基盤に、安定同位体でラベルした細胞質と非ラベルの染色体を単離し、1対1に混合し質量分析を行い、全てのタンパク質の染色体特異性 “Enrichment” を決定した。得られた結果は、染色体タンパク質を抽出する傾向にはあるが、完全に分裂期染色体タンパク質とそれ以外を分けるには至らなかった (Fig. 1B)。

そこで、単離した染色体と細胞質を用いて、全てのタンパク質の *in vitro* における置換速度 “Retention” を、SILAC を応用することで決定した (Fig. 1B)。また、分裂期の染色体凝縮に必須と考えられる複合体、コンデンシンの存在下と非存在下の染色体における各タンパク質の量の比較 “SMC2 dependency” (Fig. 1B), そして新規に見いだしたアウトターキネトコア (動原体外層部) 局在タンパク質 Ska3 の存在下と非存在下の染色体における各タンパク質の量の比較 “Ska3 dependency” を決定した¹⁴⁾。しかし、どのパラメータ “Classifier” も完全に分裂期染色体タンパク質とそれ以外を分けるには至らない事実から、全ての classifier を組み合わせる事でそれが改善できないかを検討した。実際に全てをクラスター解析で組み合わせると、複合体ごとに一つのブランチに収まる傾向があり、プロテオミクスの結果を多次元で解析することが、実際の染色体タンパク質を決定するために有効であることが示唆された。しかし、このような解析法でもやはり非特異的染色体結合タンパク質が、染色体タンパク質を多く含むブランチに、無視できない程度含まれており、異なる解析法を開発する必要があった。

5 機械学習を応用した分裂期染色体プロテオームの理解

前述の全ての定量プロテオミクスを、機械学習によって染色体タンパク質と非特異的染色体結合タンパク質に分類することを試みた。実際にはランダムフォレストを用い、同定したタンパク質のうち、分裂期染色体に結合することがよく知られている、ヒストン、セントロメアタンパク質、テロメアタンパク質そしてコヒーシンなどの染色体タンパク質を “True”, 膜タンパク質やミトコンドリアタンパク質などを “False” として “Learning set” を構築し、これまでのプロテオミクスの結果をもとにランダムな決定

木, “Decision tree”, を数百通り作成した. 一つ一つの決定木に従い, 個々のタンパク質が染色体タンパク質と認識されるかどうかシミュレーションしたところ, その確率を計算することが可能であると分かり, 高い確率で“真の”分裂期染色体タンパク質の抽出に成功した. 既知の染色体タンパク質と非染色体タンパク質で, この手法の正確性を検証したところ, 89%のタンパク質を正確に分類できた (Fig. 1C).

実際にその有効性を示すためには, すべてのタンパク質の細胞内局在を細胞生物学的手法で確認しなくてはならない. したがって, 未知タンパク質を分類し, そのうち染色体タンパク質と分類された 34 種類のタンパク質について, そのヒト類似タンパク質を GFP と融合した形でヒト細胞内において発現させ, 蛍光顕微鏡を用いてその局在を確認した. 結果, その中から 30 種類の新規染色体局在タンパク質を見いだすことができた (Fig. 1C). 同様に, 非染色体タンパク質と分類された 16 種類には 2 種類の染色体タンパク質しか見いだせなかった (Fig. 1C). 以上の結果は, 93%の新規染色体タンパク質と 83%の非染色体タンパク質を正確に分類したことを示している. この MCCP は分裂期染色体のみならず, 精製が困難で明確な答えでないあらゆる細胞内巨大複合体プロテオーム決定に応用できる手法 “Fuzzy proteomics” である^{15),16)}.

6 機械学習による分裂期染色体上のタンパク質相互作用解析

我々は, プロテオミクス解析のモデル細胞としてニワトリ DT40 細胞を用いている. この細胞の最大の利点は, 遺伝学的ノックアウト細胞を作製でき, これまでに構築したノックアウト細胞のライブラリーとプロテオミクス解析とを融合することが可能な点にある. 従って, 染色体構造の構築とその維持に重要な役割を担っている (あるいはその可能性がある) 遺伝子の欠失変異体から分裂期の染色体を単離し, その欠失が染色体のタンパク質組成に及ぼす影響を, 前述の SILAC を用いることで定量的かつ網羅的に調べることが可能である. 実際に, 染色体構造に関わる SMC タンパク質を含む複合体 (コンデンシン I やコンデンシン II, あるいはその両方, そして, コヒーシンや SMC5/6 複合体) をそれぞれ欠失させた変異体について, 分裂期染色体上の全タンパク質の組成変化を測定し, それぞれの複合体がどのように分裂期染色体構造に寄与しているかを明らかにした¹⁷⁾. さらに, ここで得られた 5 種類の変異体における分裂期染色体タンパク質の組成変化を基にして, 分裂期染色体上のタンパク質間の相互作用や制御構造を, 網羅的に予測することを試みた (Fig. 2A, B). そのために MCCP を発展させ, 定量プロテオミクスデータからコンピュータシミュレーションで標的タンパク質の

相互作用タンパク質を予測する解析アルゴリズム nanoRF を開発した¹⁸⁾. これにより, 標的としたタンパク質複合体の新規構成因子の予測を可能としただけでなく, タンパク質複合体間の制御構造を理解することも可能であることを示した (Fig. 2A). 実際に, GFP 融合タンパク質の形で局在観察や siRNA を用いたノックダウン表現型の観察により, これらの機能未知タンパク質がセントロメアや染色体腕部などに局在し, 分裂期の制御に関与することを確認している¹⁷⁾ (Fig. 2C).

7 分裂期染色体のリン酸化プロテオーム解析

現在知られている制御機構だけでは染色体動態の全体像を説明することは困難であり, 未知の制御機構がまだ数多く残されていると考えられる. そこで, その機構に近づくことを目的として染色体上の未知の分裂期特異的リン酸化を同定することを試みた.

チタニアを利用した Hydroxy acid-modified metal oxide chromatography (HAMMOC) 法を用いて¹⁹⁾, 精製された分裂期染色体からリン酸化ペプチドのみを濃縮した. 続けて, 分裂期染色体のリン酸化部位の決定を行い, その結果 4,274 のリン酸化部位を決定した (Fig. 3A, B).

さらに, 同定したリン酸化が, どの程度分裂期に特異的であるかを調べるために, 分裂期の細胞から単離した複合体と, 間期から単離したそれとを SILAC を用いて比較した. その結果 2,761 種類のリン酸化ペプチドについて分裂期と間期の間で起こる増減を調べることができた. さらに, 分裂期と間期の個々のタンパク質の量比も決定し, この結果も合わせて考察することで, 351 の分裂期特異的リン酸化サイトと 167 の分裂期特異的脱リン酸化サイトを決定するに至った. その詳細を見てみると, CENP-T や INCENP といったセントロメアタンパク質や Ki-67 やコンデンシン, TopoIIa などが分裂期特異的に高度にリン酸化されていることがわかった (Fig. 3C). 逆に, DNA 複製や組換え機構に関わるタンパク質群は分裂期において特異的に脱リン酸化されていることを示した²⁰⁾ (Fig. 3C). これらの分裂期特異的なリン酸や脱リン酸化は, 染色体動態の制御機構を知る上で大きな足がかりとなる.

8 終わりに

質量分析装置に関する技術向上, あるいは新しい解析手法の開発は, 非常に展開が早く, SILAC を含めた定量質量分析は今日では頻繁に目にする手法となっている. しかし, 未だそこから得られる膨大なデータをシームレスに生物の基本的システムの理解へと結びつけられる手法は限られている. 本稿でふれた機械学習を取り入れた解析に加え, 主成分分析や k-Neighbor 法など, 数学, 統計分野を取り入れた新手法を確立し駆使することで, 質量分析を基盤と

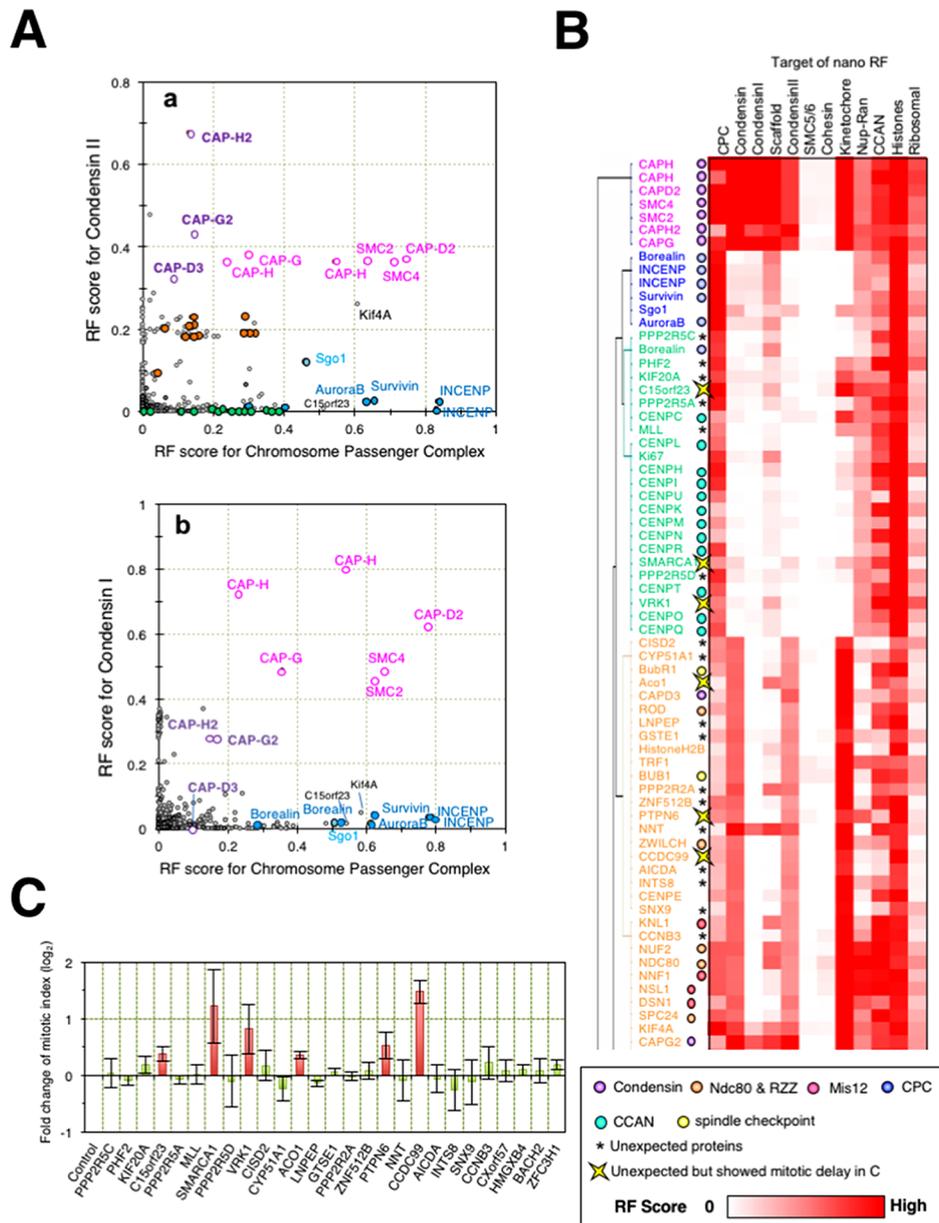


Fig. 2 Nano Random Forest to figure out the novel chromosomal regulation

(A) Two-dimensional scatter graph plots of RF scores for (a) CPC versus condensin II and (b) CPC versus condensin I. Key proteins are color coded by category: condensin I, pink; condensin II, purple; CPC, blue; kinetochores, orange; and CCAN, green. (B) Magnification of the part of the heat map depicting the combined results of 5,058 proteins from nanoRF targeting condensin, condensin I, condensin II, cohesin, SMC5/6, CPC, histones, CCAN, Nup-Ran complexes, kinetochores, chromosomal scaffolds, and ribosomal proteins. (C) Relative mitotic index of HeLa cells after 28 individual siRNA treatments against human orthologues. * in (B) shows the siRNA target in. This figure was modified from Ohta *et al.*, 2016 (17).

したプロテオミクス解析は、染色体構造だけでなく、多くの未解明のメカニズムの一端を解き明かす歩みに貢献できると考えている。

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

文献

- 1) Adolph KW, Cheng SM, Laemmli UK. Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell.* 1977;12:805–816.
- 2) Hirano T, Kobayashi R, Hirano M. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell.* 1997;89:511–521.
- 3) Hudson DF, Vagnarelli P, Gassmann R, Earnshaw WC. Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev Cell.* 2003;5:323–336.
- 4) Ono T, Losada A, Hirano M, Myers MP, Neuwald AF, Hirano T. Differential contributions of condensin I and condensin II

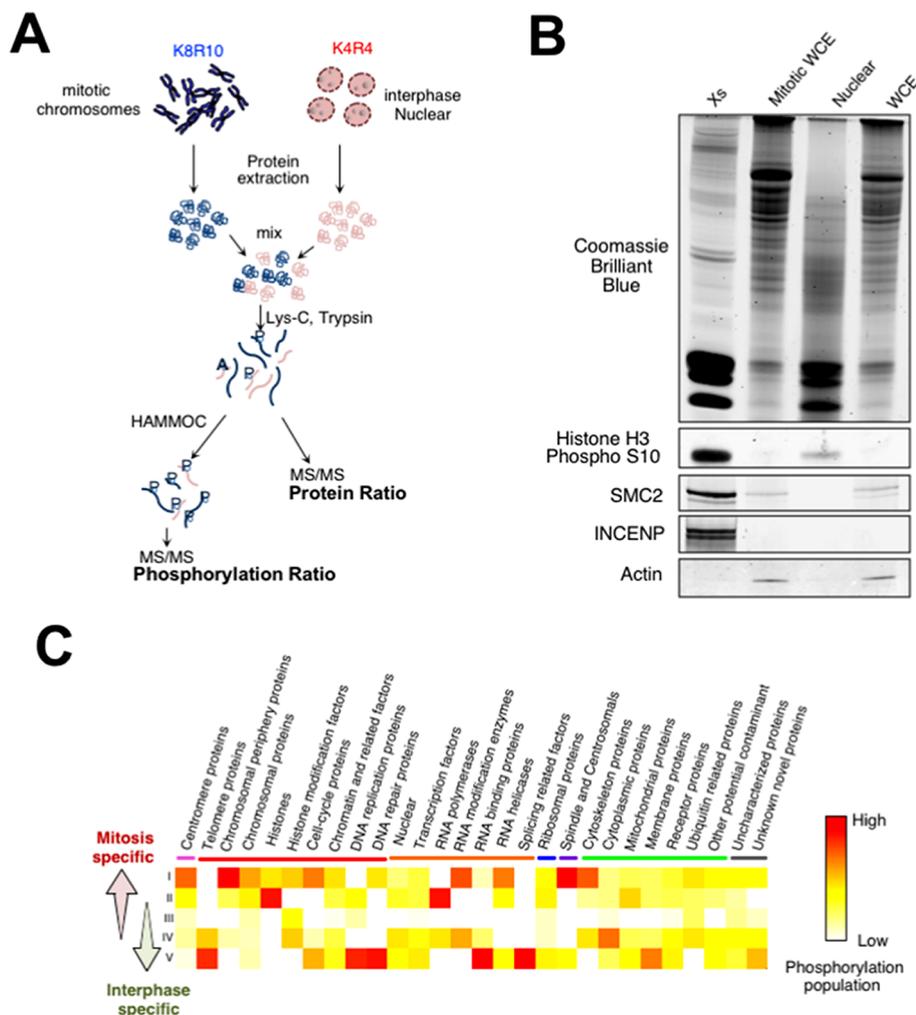


Fig. 3 Quantitative analysis of mitosis-specific phosphorylation

(A) Experimental design for quantification of mitosis-specific phosphorylation. (B) Immunoblot analysis of the abundance of chromosomal markers and actin in each fraction. Proteins were resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Xs: isolated mitotic chromosomes; mitotic WCE: whole-cell extract of mitotic cells; nuclear: nuclear fraction of unsynchronized cells; WCE: whole-cell extract of unsynchronized cells. (C) Heat map showing the population category of the 28 protein categories; clustering tendency is shown at the bottom. This figure was modified from Ohta *et al.*, 2016 (20).

to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*. 2003;115:109–121.

- 5) Samejima K, Samejima I, Vagnarelli P, *et al.* Mitotic chromosomes are compacted laterally by KIF4 and condensin and axially by topoisomerase II α . *J Cell Biol*. 2012;199:755–770.
- 6) Markaki Y, Christogianni A, Politou AS, Georgatos SD. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci*. 2009;122:2809–2819.
- 7) Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, *et al.* Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*. 2011;476:232–235.
- 8) Hori T, Shang W-H, Toyoda A, *et al.* Histone H4 Lys 20 monomethylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly. *Dev Cell*. 2014;29:740–749.
- 9) Tanaka Y, Nureki O, Kurumizaka H, *et al.* Crystal structure of the CENP-B protein-DNA complex: the DNA-binding domains of CENP-B induce kinks in the CENP-B box DNA.

EMBO J. 2001;20:6612–6618.

- 10) Nakagawa H, Lee J-K, Hurwitz J, *et al.* Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev*. 2002;16:1766–1778.
- 11) Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:379–393.
- 12) Morrison C, Henzing AJ, Jensen ON, *et al.* Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:5318–5327.
- 13) Uchiyama S, Kobayashi S, Takata H, *et al.* Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol Chem*. 2005;280:16994–17004.
- 14) Ohta S, Bukowski-Wills J-C, Wood L, *et al.* Proteomics of isolated mitotic chromosomes identifies the kinetochore protein Ska3/Rama1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2010;75:433–438.

- 15) Ohta S, Bukowski-Wills J-C, Sanchez-Pulido L, *et al.* The Protein Composition of Mitotic Chromosomes Determined Using Multiclassifier Combinatorial Proteomics. *Cell*. 2010;142:810–821.
- 16) Kustatscher G, Hégarat N, Wills KLH, *et al.* Proteomics of a fuzzy organelle: interphase chromatin. *EMBO J*. 2014;33:648–664.
- 17) Ohta S, Montano-Gutierrez LF, Alves F de L, *et al.* Proteomics analysis with a nano Random Forest approach reveals novel functional interactions regulated by SMC complexes on mitotic chromosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15:2802–2818.
- 18) Montano-Gutierrez LF, Ohta S, Kustatscher G, Earnshaw WC, Rappsilber J. Nano Random Forests to mine protein complexes and their relationships in quantitative proteomics data. *Mol Biol Cell*. 2017;28:673–680.
- 19) Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M, Ishihama Y. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6:1103–1109.
- 20) Ohta S, Kimura M, Takagi S, Toramoto I, Ishihama Y. Identification of Mitosis-Specific Phosphorylation in Mitotic Chromosome-Associated Proteins. *J Proteome Res*. 2016;15:3331–3341.

Proteomics Analysis Understanding the Regulation System of the Mitotic Chromosome

Shinya Ohta*

*E-mail: shinya.ohta@kochi-u.ac.jp

Department of Biochemistry, Medical School, Kochi University, Kohasu, Oko-cho, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan

(Received: October 2, 2017; Revised: October 30, 2017; Accepted: November 8, 2017)

Packaging of the DNA into condensed chromosomes during mitosis is essential for the faithful segregation of the genome into daughter nuclei. Although intensely studied for over 100 years, mitotic chromosome structure and composition are still yet to be fully elucidated. We developed the multi-classifier combinatorial proteomics (MCCP) and nano Random Forest to reveal the protein composition in mitotic chromosomes purified from chicken DT40 cells. One of the greatest advances from the MCCP approach to analysis of the mitotic chromosome proteome is the ability to combine with genetic knock-out and the stable labeling with amino acids in cell culture. These approaches open the door to the identification of all functional components of mitotic chromosomes despite the adventitious binding of cellular background proteins during mitosis. Furthermore, they can be extended by adding additional classifiers to delineate protein complexes and define functional dependencies between them in the context of intact mitotic chromosomes. This will serve both as a starting point for systematic determination of the full range of functions involved in mitotic chromosome segregation, and as a basis for the development of detailed structural and functional interaction maps of key chromosomal sub-domains. Indeed, we have discovered and characterized several number of novel centromere or chromosomal proteins. Currently we succeeded the identification of 4,274 total phosphorylation sites and 350 mitosis-specific phosphorylation sites in mitotic chromosome-associated proteins with using TiO₂-based hydroxy acid-modified metal oxide chromatography. In future, phosphoproteome analysis combined with MCCP and nanoRF approaches based on machine learning would be useful for the analysis of much more complex hierarchical regulation network on mitotic chromosomes.

Keywords: chromatin; mitosis; fuzzy proteomics; machine learning; phosphoproteome; SILAC.