

Spot No.	Protein Name ^{a)}	Accession No.	MW	pI	Fold	Peptide No.	Coverage (%)	Mascot Score	Reference
331	Hornenn	HORN_HUMAN	283140	10.05	-2.41	4	2%	124	
342,	Polymeric immunoglobulin receptor [precursor]	PIGR_HUMAN	84429	5.58	-2.3	10	15%	325	
379,					-2.32	10	13%	269	
388,					-2.23	12	16%	301	
397,					-2.17	11	14%	286	
& 406					-1.89	14	18%	335	
707	Hemopexin [precursor]	HMO_HUMAN	52385	6.55	-1.72	4	11%	123	15
918	Pancreatic alpha-amylase [precursor] ^{b)}	AMYP_HUMAN	58415	6.47	-1.83	7	14%	141	
	Alpha-amylase 1 [precursor] ^{b)}	AMY1_HUMAN	58415	6.47			14%		
	Alpha-amylase 2B [precursor] ^{b)}	AMY2B_HUMAN	58300	6.64			14%		
960,	Kininogen-1 [precursor]	KNG1_HUMAN	72996	6.34	-1.6	12	17%	209	35, 36
& 1022					-1.74	10	13%	177	
1053	Prostatic acid phosphatase [precursor]	PPAP_HUMAN	44880	5.83	-1.67	8	21%	135	20
2472	calbindin	CABL1_HUMAN	30291	4.7	-4.06	8	28%	135	37, 38
2688	venetian membrane outer layer protein 1 homolog [precursor]	VMO1_HUMAN	22034	4.9	-1.86	2	14%	121	

a) Protein identity was given as precursor form.

b) Protein group

表 3. 早期腎症にて健常者群と比較して有意に減少した尿蛋白スポットから同定された蛋白

3. 自然発症糖尿病モデル LEA/Sendai ラットの血清プロテオーム解析

分担研究者 鏑木 康志 [国立国際医療センター・研究所]

研究要旨：多因子疾患である糖尿病について、非肥満型糖尿病モデルラットである LEA/Sendai ラットの血清を用いたプロテオーム解析により新規の糖尿病早期診断及び病態予測のマーカーとなりうるタンパク質の探索を行った。LEA/Sendai ラットおよび非糖尿病ラットである BN ラットから得た血清より血清中の高濃度タンパク質 7 種を除去して試料とし、2D-DIGE 法及び質量分析計によりタンパク質プロファイルを解析した。BN ラットに対し、LEA/Sendai ラットにおいて 22 個のタンパク質スポットが有意な変動を示し、10 個のタンパク質が同定された。糖尿病マーカータンパク質候補の確定には発現変動を示しながら未同定の一部のタンパク質スポットについて分析を進めるとともに、同定されたタンパク質について詳細な解析を進めることが必要である。

A. 研究目的

糖尿病は遺伝因子と環境因子が複雑に絡み合う多因子疾患である。多彩な病像とともに長い期間を経て発症・進展する。そのため、交配や飼育条件の操作を行うことで遺伝因子、環境因子の影響を経時的に調べることができるモデル動物は糖尿病研究において非常に有用な存在である。

我々は非肥満、インスリン分泌能低下を主徴とした自然発症糖尿病モデルラット LEA/Sendai ラットの血清プロテオームの解析により新規の糖尿病早期診断および病態予測マーカーの候補となる血清タンパク質の検索を行った。

B. 研究方法

a) 2D-DIGE 法による糖尿病モデル LEA/SENDAI ラット血清での解析
雄の LEA/Sendai ラットおよび非糖

尿病ラットである BN ラットについて 8 週齢、16 週齢より各 4 匹ずつ、計 16 検体の血清を試料とし蛍光ダイファレンスゲル 2 次元電気泳動 (2D-DIGE) 法により糖尿病ラット、非糖尿病ラット間の血清プロテオームの差異を画像解析した。

b) 質量分析計によるタンパク質の同定

2D-DIGE 法による画像解析の結果、変動の見られたタンパク質スポットについて、タンパク質のゲル内消化・ペプチド抽出後、LC-MS/MS 解析によりタンパク質の同定を行った。

C. 研究結果

a) 糖尿病モデル LEA/Sendai ラット血清の 2D-DIGE 法による解析

雄の LEA/Sendai ラットおよび非糖尿病ラットである BN ラットについて 8 週齢、16 週齢より各 4 匹ずつ、計 16 検体から一晩絶食後に採血し、血清を得た。ProteomeLabTMIgY-R7 Proteome Partitioning Kits (Beckman Coulter) を用いてアルブミン、IgG をはじめとした血清中の高濃度に存在し、解析を阻害するタンパク質 7 種を除去した。各検体を蛍光標識試薬 CyDye DIGE Fluor, Cy3 minimal dye (GE Healthcare) もしくは Cy5 により標識を行い、すべての試料を混ぜたものを Cy2 で標識し、内部標準とした。以上を、試料とし蛍光ディファレンスゲル 2 次元電気泳動 (2D-DIGE) 法により糖尿病ラット、非糖尿病ラット間の血清プロテオームの差異を画像解析した。

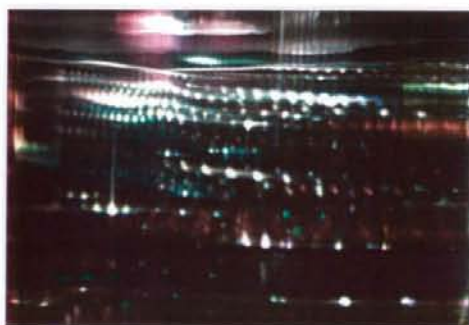


図 1. 2D-DIGE 法による LEA/Sendai ラットの血清タンパク質発現プロファイル

糖尿病モデル-非糖尿病モデル間の比較では、8 週齢で存在量に変化が見られたタンパク質スポット

は 144 個、16 週齢で変化が見られたタンパク質スポットは 200 個あり、うち 95 個が共通して変動を見せた。週齢間の比較では BN ラットの 8 週齢-16 週齢間において差異を認めたタンパク質スポットが 37 個。同様に LEA/Sendai ラットでは 32 個であった。うち 3 個が共通して変動を見せた。



図 2. 糖尿病-非糖尿病間で有意に発現変動するタンパク質スポット

b) 質量分析計によるタンパク質の同定

2D-DIGE 法による画像解析の結果、変動の見られたタンパク質スポットについて質量分析計を用いて同定を行った。

対象となるタンパク質スポットをゲルから切り出し、ゲル切片中で標的タンパク質の還元アルキル化、トリプシン消化後ペプチドを抽出した。得られた各タンパク質スポットのペプチド溶液を nano-HPLC と LCQ Deca XP Plus (Thermo Electron) を用いた LC-MS/MS 解析にて標識ペプチドの

アミノ酸配列を決定、蛋白を同定した。

263個のスポットを解析に用い、うち87個を同定した。87個のタンパク質スポットから24個のタンパク質が同定された。糖尿病モデル-非糖尿病モデル間の比較では、8週齢で存在量に変化が見られたタンパク質は16個、16週齢で変化が見られたタンパク質は18個あり、うち12個が共通して変動を見せた。週齢間の比較ではBNラットの8週齢-16週齢間において差異を認められたタンパク質が4個。同様にLEA/Sendaiラットでは8個であった。うち2個が共通して変動を見せた。

D. 考察

本研究で解析に用いたLEA/Sendaiラットはインスリン分泌不全を主徴とした非肥満型の糖尿病モデルラットである。若齢から耐糖能異常を示し、軽症糖尿病を呈するが高血糖に至る前からインスリン分泌不全が観察されること、加齢とともに緩やかに進展を見せることから糖尿病のごく初期の状態の再現が期待できる。今回、糖尿病マーカー候補の探索において同定されたタンパク質は、2D-DIGE法による解析において複数のスポットに分離・検出されたものが多い。これは翻訳後修飾によるタンパク質の質的な変化が示唆される。また一部については過

去の報告で糖尿病との関連が示唆されているものが含まれており、本研究の結果から糖尿病のかなり早い段階から量的あるいは質的な変化をすることが示唆された。

E. 結論

糖尿病は遺伝的および環境要因が複雑に絡み合い、その病態は非常に複雑な疾患である。そのため、一定の環境条件、遺伝的コントロールを可能とするモデル動物を用いた解析は本研究が目的とした糖尿病の早期診断や病態予測のマーカー探索に非常に有用である。モデルラット血清を用いた今回の解析では、糖尿病-非糖尿病間で有意に変動を示すタンパク質を22個同定したがその多くは翻訳後修飾による質的変動をしていることが示唆された。今後の課題としては、バイオマーカー開発の上で必要な情報となるマーカー候補タンパク質の質的変化の解析および変動が検出されながら同定に至らなかったタンパク質、特に低分子領域の微量タンパク質の解析が挙げられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：

Eri Takahashi, Tadashi Okamura,
Kohei Ikari, Hisashi Hirano,
Kazuki Yasuda, Yasushi Kaburagi.
Proteomic analysis of serum from
diabetic LEA/Sendai rats. 17th
Meeting of Methods in Protein
Structure Analysis. August, 2008,
Sapporo

高橋 枝里、岡村 匡史、井狩 高
平、平野 久、安田 和基、鏑木
康志. LEA/Sendai ラット血清のプ
ロテオーム解析. 第 51 回日本糖尿
病学会年次学術集会, 口演 & ポス
ター発表, 東京, 5 月, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予
定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Oshawa H, <u>Kasuga M</u> , et al.	Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.	Nat Gene	40	1092-1097	2009
Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirata Y, <u>Kasuga M</u> , et al.	Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan.	J Clin Endocrinol Metab.	93	3136-3141	2008
<u>Kaburagi Y</u> , Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, <u>Noda M</u> .	Proteomic Studies on Investigations of Diabetes.	J Mass Spectrom Soc Jpn.			In press