

PRSS35	protease, serine, 35	204.1	9.2	22.292	0.0209
	Gamma-aminobutyric acid (GABA)				
GABBR1	B receptor, 1	55.8	25.4	2.200	0.0079
CALU	Calumenin	155.3	74.0	2.098	0.0013
ARSK	arylsulfatase family, member K	357.5	148.0	2.415	0.0318
CCNL1	cyclin L1	33.5	15.8	2.120	0.0340
IL31RA	interleukin 31 receptor A	54.2	23.7	2.282	0.0157

---

表4 ヒト網膜血管内皮細胞において高ブドウ糖負荷により発現が上昇した分泌蛋白コード遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	高ブドウ糖 負荷(HG)	通常ブドウ 糖負荷(LG)	発現比 (HG/LG)
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	57.6	15.0	3.849
CXorf36	chromosome X open reading frame 36	40.8	20.2	2.023
NRP2	neuropilin 2	48.8	17.2	2.837
CNPY2	Canopy 2 homolog (zebrafish)	10.6	5.3	2.012
C1orf85	chromosome 1 open reading frame 85	461.2	205.7	2.242
LRCH3	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3	35.1	11.5	3.038
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	156.1	62.6	2.495
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	1367.5	570.3	2.398
DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	456.7	170.8	2.675
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	1762.9	898.7	1.962
IL8	interleukin 8	703.5	305.1	2.306
ADM	adrenomedullin	3875.1	1159.6	3.342
TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	815.6	275.9	2.956
CRELD1	cysteine-rich with EGF-like domains 1	455.5	165.1	2.759
FSTL3	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)	291.6	113.0	2.580
SCG5	secretogranin V (7B2 protein)	97.5	41.5	2.351
LOX	lysyl oxidase	1345.5	576.9	2.332
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	112.9	41.3	2.733
STC1	stanniocalcin 1	259.1	106.8	2.427
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	56.9	23.9	2.382
ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	177.9	60.0	2.966
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	101.4	45.9	2.207
BMP2	bone morphogenetic protein 2	270.3	137.3	1.969
ITGBL1	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	14.1	5.4	2.588
PLAU	plasminogen activator, urokinase	863.9	418.0	2.067
TUFT1	tuftelin 1	292.0	47.6	6.133
IL15	interleukin 15	864.2	146.8	5.888
UCN	urocortin	23.8	7.7	3.088
NRG1	neuregulin 1	789.9	203.4	3.883
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	606.2	131.7	4.605
SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	215.2	101.1	2.128
IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	62.3	25.4	2.448
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	271.9	126.9	2.143
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	255.9	45.2	5.657
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	44.3	22.0	2.010
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	27.0	7.8	3.469
FGF5	fibroblast growth factor 5	85.3	18.4	4.641
TMED3	transmembrane emp24 protein transport domain containing 3	2808.9	1250.4	2.246

ADFP	adipose differentiation-related protein	2490.3	694.3	3.586
RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	617.6	231.6	2.667
SPP1	secreted phosphoprotein 1	2001.2	897.6	2.229
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	298.4	144.0	2.072
	colony stimulating factor 2			
CSF2	(granulocyte-macrophage)	100.2	15.6	6.424
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	73.1	13.7	5.356
NRP1	neuropilin 1	391.5	125.7	3.114
INHBA	inhibin, beta A	2067.6	824.3	2.508
	tissue factor pathway inhibitor			
TFPI	(lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	5069.6	1806.0	2.807
CLDN14	claudin 14	722.1	41.7	17.306
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	7487.6	3278.6	2.284
LAMA4	laminin, alpha 4	1623.7	339.5	4.783
LEPR	leptin receptor	98.2	35.2	2.795
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	48.1	18.7	2.569
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	3330.0	1579.3	2.109
PRSS3	protease, serine, 3	772.2	292.8	2.637
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	109.2	46.5	2.349
COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	48.5	20.4	2.382
NOTCH2NL	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like	1038.9	401.6	2.587
FBN2	fibrillin 2	593.0	83.8	7.077
NPIPL1	nuclear pore complex interacting protein-like 1	42.4	13.6	3.122
LAMA4	laminin, alpha 4	124.2	51.7	2.404
LAMB2	laminin, beta 2 (laminin S)	637.0	309.0	2.061
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	3440.5	1258.6	2.734
	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-			
B4GALT1	galactosyltransferase, polypeptide 1	14.6	6.9	2.100
RETSAT	retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase)	422.3	200.9	2.102
GOLT1B	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)	1604.6	386.6	4.151
THSD4	thrombospondin, type I, domain containing 4	47.1	15.5	3.030
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	234.1	118.4	1.978
DERL1	Der1-like domain family, member 1	1008.1	379.1	2.659
C4orf29	chromosome 4 open reading frame 29	41.9	17.5	2.400
SLC35F5	solute carrier family 35, member F5	28.1	9.4	2.995
UTS2	urotensin 2	18.2	6.6	2.778
GDF15	growth differentiation factor 15	9658.6	4744.3	2.036
	ADAM metallopeptidase with thrombospondin			
ADAMTS1	type 1 motif, 1	234.7	53.3	4.401
C12orf49	chromosome 12 open reading frame 49	138.3	63.1	2.193
	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member			
TNFSF13B	13b	27.4	11.0	2.488
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26	16.1	4.7	3.447
FAM172A	family with sequence similarity 172, member A	34.7	16.3	2.131
	transmembrane protein with EGF-like and two			
TMEFF2	follistatin-like domains 2	144.6	43.5	3.324
EMILIN2	elastin microfibril interfacier 2	155.4	68.5	2.269
C2orf30	chromosome 2 open reading frame 30	1363.8	667.9	2.042
TMEM77	transmembrane protein 77	1438.4	663.3	2.169
MFSD2	major facilitator superfamily domain containing 2	51.6	24.9	2.073
AADACL1	arylacetamide deacetylase-like 1	309.2	141.0	2.193
IL6R	interleukin 6 receptor	85.1	25.5	3.336
TMEM25	transmembrane protein 25	103.5	50.5	2.050
CRTAP	cartilage associated protein	291.8	132.9	2.195

FCHSD1	FCH and double SH3 domains 1	31.2	14.1	2.217
C12orf73	chromosome 12 open reading frame 73	429.5	211.0	2.036
TMEM50B	transmembrane protein 50B UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	338.3	106.8	3.167
GALNTL2	N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	295.1	46.9	6.297
RTN4R	reticulon 4 receptor	25.9	12.1	2.136
MAMDC2	MAM domain containing 2	60.7	15.6	3.898
TMEM178	transmembrane protein 178	81.0	25.0	3.238
A1BG	alpha-1-B glycoprotein	190.9	68.4	2.789
DKK3	dickkopf homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	2036.2	402.3	5.062
FAM24B	family with sequence similarity 24, member B	67.9	29.7	2.281
YME1L1	YME1-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	44.3	12.1	3.671
DNHD1	dynein heavy chain domain 1 solute carrier family 30 (zinc transporter), member	56.5	9.5	5.971
SLC30A5	5	775.0	379.0	2.045
ADAMTSL1	ADAMTS-like 1	63.3	22.7	2.790
ULBP2	UL16 binding protein 2	390.2	134.4	2.903
GPC2	glypican 2	64.3	26.3	2.447
LIN7B	lin-7 homolog B ( <i>C. elegans</i> )	89.7	27.5	3.261
FAM55C	family with sequence similarity 55, member C	55.5	28.4	1.956
FAM132A	family with sequence similarity 132, member A	230.3	19.1	12.062
PVR	poliovirus receptor	216.5	87.1	2.485
RCN3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	1130.1	552.4	2.046

表5 腎糸球体上皮細胞でのみ発現上昇する遺伝子群

プローブセット	遺伝子タイトル	遺伝子シンボル	発現比(HG/LG)
1561714_a_at	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2	B3GALNT2	3.8672638
1553298_at	chromosome 17 open reading frame 77	C17orf77	3.7314836
1561761_x_at	Hypothetical LOC645513	LOC645513	2.1713612
237837_at	---	---	2.0738386
233850_s_at	early B-cell factor 4	EBF4	1.9723308
222950_at	NIPA-like domain containing 2	NIPAL2	1.9332093
1566642_at	LOC100290201	hypothetical protein LOC100290201	1.9302991
204622_x_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	1.8847469
208555_x_at	cystatin SA	CST2	1.8622296
208515_at	histone cluster 1, H2bm	HIST1H2BM	1.8029432
241310_at	---	---	1.746602
237058_x_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	SLC6A13	1.7394177
205404_at	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	1.7193225
223939_at	succinate receptor 1	SUCNR1	1.693028
214481_at	Histone cluster 1, H2am	HIST1H2AM	1.6926683
236512_at	---	---	1.602123
1552986_at	hypothetical protein BC008131	LOC142937	1.5972049
240990_at	RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A	1.5879296
202340_x_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NR4A1	1.5848558
230872_s_at	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3	TTLL3	1.5637341
204782_at	myeloid leukemia factor 1	MLF1	1.5553918
219501_at	ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1	ENOX1	1.5403378
227048_at	laminin, alpha 1	LAMA1	1.5264104
210619_s_at	hyaluronoglucosaminidase 1	HYAL1	1.4883695
228811_at	---	---	1.424815
1568696_at	arginine-rich, mutated in early stage tumors-like 1	ARMETL1	1.4223291
244677_at	---	---	1.360264
241193_at	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	ETS2	1.341011
1560075_at	Zinc finger protein 622	ZNF622	1.2679174
238576_at	---	---	1.25832
233592_at	ankyrin repeat domain 18A /// ankyrin repeat domain 18B /// ankyrin repeat	ANKRD18A /// ANKRD18B ///	1.2531773

	domain 19 /// hypothetical protein	ANKRD19 ///	
	LOC728897 /// hypothetical LOC644249	LOC728897 ///	
	/// coiled-coil domain containing 29-like	RP11-195B21.3 ///	
		RP11-38M15.10	
243404_at	---	---	1.2487691
203061_s_at	mediator of DNA damage checkpoint 1	MDC1	1.2465137
234932_s_at	CUB domain containing protein 1	CDCP1	1.2284076
1569701_at	Period homolog 3 (Drosophila)	PER3	1.2238809
229127_at	junctional adhesion molecule 2	JAM2	1.209273
239109_at	Hypothetical LOC728190	LOC728190	1.1905247
232442_at	similar to hCG1980470	LOC100131601	1.1657914
237316_at	ankyrin repeat and death domain containing 1A	ANKDD1A	1.1621664
1569110_x_at	programmed cell death 6 pseudogene	LOC728613	1.156922
242779_at	---	---	1.1101795
233289_at	---	---	1.0903329
215350_at	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	SYNE1	1.0536246
210230_at	---	---	1.0246957
1564807_at	---	---	1.0163167
203713_s_at	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)	LLGL2	1.0031563

---

表6 腎系球体上皮細胞でのみ発現低下する遺伝子群

プローブセット	遺伝子タイトル	遺伝子シンボル	High/Low 発現比
231898_x_at	SOX2 overlapping transcript (non-protein coding)	SOX2OT	-4.750073
206433_s_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	SPOCK3	-2.536879
234137_s_at	---	---	-2.27802
1554328_at	syntaxin binding protein 4	STXBP4	-2.206474
1564301_a_at	RPA interacting protein	RPAIN	-2.018406
1569439_at	---	---	-1.917873
1562111_at	---	---	-1.824418
234206_at	---	---	-1.807087
243185_at	---	---	-1.759835
1553698_a_at	chromosome 1 open reading frame 96	C1orf96	-1.738062
235102_x_at	---	---	-1.571988
237240_at	---	---	-1.521594
1559069_at	---	---	-1.480948
228237_at	pappalysin 2	PAPPA2	-1.413762
233445_at	---	---	-1.364568
212921_at	SET and MYND domain containing 2	SMYD2	-1.342469
1560657_at	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	TIE1	-1.252929
235178_x_at	establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)	ESCO2	-1.196047
239542_at	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	ITPR3	-1.162602
1561939_at	dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1	DYNC2H1	-1.146672
244225_x_at	Lamin A/C	LMNA	-1.145667
1569521_s_at	---	---	-1.142191
227317_at	LIM and cysteine-rich domains 1	LMCD1	-1.118643
238977_at	minichromosome maintenance complex component 6	MCM6	-1.104874
241700_at	zinc finger homeobox 4	ZFHX4	-1.102967
206079_at	choroideremia-like (Rab escort protein 2)	CHML	-1.077451
226374_at	---	---	-1.06584
223270_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2	CTDSPL2	-1.039652
224947_at	ring finger protein 26	RNF26	-1.01953
244289_at	zinc finger protein 300 pseudogene	LOC134466	-1.018805
242685_at	GTP-binding protein 8 (putative)	GTPBP8	-1.012799
1565635_at	---	---	-1.009009

表 7 Functional Annotation Tool を用いた遺伝子の機能分類 - 腎系球体内皮細胞で発現上昇する遺伝子群

(1) Functional Annotation Cluster

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 2.4			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">biological rhythms</a>	RT		3	5.3E-4	5.3E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">rhythmic process</a>	RT		4	1.4E-3	5.6E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	compositionally biased region:Pro-rich	RT		5	8.2E-2	1.0E0
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 1.25			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell morphogenesis</a>	RT		4	2.4E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular component morphogenesis</a>	RT		4	3.2E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell protection morphogenesis</a>	RT		3	6.9E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell part morphogenesis</a>	RT		3	7.5E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell projection organization</a>	RT		3	1.4E-1	1.0E0

(2) Functional Annotation Chart

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">biological rhythms</a>	RT		3	7.5	5.3E-4	5.3E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">rhythmic process</a>	RT		4	10.0	1.4E-3	5.6E-1
<input type="checkbox"/>	PIR_SUPERFAMILY	PIRSF002524:nerve growth factor 1B-like nuclear receptor	RT		2	5.0	4.9E-3	6.6E-2
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	region of interest:CSNK1E binding domain	RT		2	5.0	5.2E-3	6.7E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	region of interest:CRY binding domain	RT		2	5.0	5.2E-3	6.7E-1
<input type="checkbox"/>	INTERPRO	<a href="#">Orphan nuclear receptor</a>	RT		2	5.0	5.6E-3	4.4E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	mutagenesis site	RT		10	25.0	6.4E-3	5.0E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">hemopoietic progenitor cell differentiation</a>	RT		2	5.0	1.9E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">nucleus</a>	RT		14	35.0	2.0E-2	6.4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell morphogenesis</a>	RT		4	10.0	2.4E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">behavioral fear response</a>	RT		2	5.0	2.6E-2	9.8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">behavioral defense response</a>	RT		2	5.0	2.6E-2	9.8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular component morphogenesis</a>	RT		4	10.0	3.2E-2	9.8E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	domain:PAS 2	RT		2	5.0	3.2E-2	9.0E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	domain:PAS 1	RT		2	5.0	3.2E-2	9.0E-1
<input type="checkbox"/>	INTERPRO	<a href="#">PAS fold-3</a>	RT		2	5.0	3.3E-2	8.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">fear response</a>	RT		2	5.0	3.3E-2	9.6E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">phosphoprotein</a>	RT		19	47.5	3.7E-2	7.2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Circadian rhythm</a>	RT		2	5.0	4.0E-2	6.8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_FAT	<a href="#">protein heterodimerization activity</a>	RT		3	7.5	4.4E-2	9.7E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	domain:PAC	RT		2	5.0	4.4E-2	9.1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cell cycle</a>	RT		5	12.5	4.6E-2	9.8E-1
<input type="checkbox"/>	INTERPRO	<a href="#">PAC motif</a>	RT		2	5.0	4.7E-2	8.1E-1



表8 Functional Annotation Tool を用いた遺伝子の機能分類 - 腎糸球体内皮細胞で発現低下する遺伝子群

(1) Functional Annotation Cluster

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 1.93			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">intracellular protein transport</a>	RT		5	2.4E-3	5.8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular protein localization</a>	RT		5	3.3E-3	4.6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular macromolecule localization</a>	RT		5	3.4E-3	3.4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein targeting</a>	RT		4	4.3E-3	3.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein localization</a>	RT		6	9.9E-3	5.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">intracellular transport</a>	RT		5	1.7E-2	6.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein transport</a>	RT		5	2.8E-2	7.7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">establishment of protein localization</a>	RT		5	2.9E-2	7.4E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">cytoplasm</a>	RT		7	2.9E-1	9.6E-1
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 1.18			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">DNA metabolic process</a>	RT		4	4.2E-2	7.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular response to stress</a>	RT		4	5.5E-2	8.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">DNA repair</a>	RT		3	7.1E-2	8.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">response to DNA damage stimulus</a>	RT		3	1.1E-1	9.6E-1
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 1.04			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">response to radiation</a>	RT		3	3.8E-2	7.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular response to stress</a>	RT		4	5.5E-2	8.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">response to abiotic stimulus</a>	RT		3	1.1E-1	9.6E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">cytoplasm</a>	RT		7	2.9E-1	9.6E-1
Annotation Cluster 4		Enrichment Score: 0.96			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">phosphoprotein</a>	RT		16	3.1E-2	8.2E-1
<input type="checkbox"/>	UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">sequence variant</a>	RT		20	1.9E-1	1.0E0
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">polymorphism</a>	RT		19	2.3E-1	9.6E-1

(2) Functional Annotation Chart

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">intracellular protein transport</a>	RT		5	17.2	2.4E-3	5.8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular protein localization</a>	RT		5	17.2	3.3E-3	4.6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">cellular macromolecule localization</a>	RT		5	17.2	3.4E-3	3.4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein targeting</a>	RT		4	13.8	4.3E-3	3.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein localization</a>	RT		6	20.7	9.9E-3	5.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">intracellular transport</a>	RT		5	17.2	1.7E-2	6.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	<a href="#">insoluble fraction</a>	RT		5	17.2	1.8E-2	8.4E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">zinc</a>	RT		8	27.6	2.3E-2	9.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	<a href="#">nuclear envelope</a>	RT		3	10.3	2.6E-2	7.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">protein transport</a>	RT		5	17.2	2.8E-2	7.7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">establishment of protein localization</a>	RT		5	17.2	2.9E-2	7.4E-1
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	<a href="#">phosphoprotein</a>	RT		16	55.2	3.1E-2	8.2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">response to radiation</a>	RT		3	10.3	3.8E-2	7.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	<a href="#">cell fraction</a>	RT		5	17.2	4.1E-2	7.6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	<a href="#">DNA metabolic process</a>	RT		4	13.8	4.2E-2	7.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_FAT	<a href="#">ubiquitin binding</a>	RT		2	6.9	4.5E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_FAT	<a href="#">small contiguous protein binding</a>	RT		2	6.9	4.6E-2	9.5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	<a href="#">perinuclear region of cytoplasm</a>	RT		3	10.3	4.9E-2	7.2E-1

## 2. MRM 法による糖尿病性細小血管症診断マーカー候補蛋白の定量解析

分担研究者 鍋木 康志

独立行政法人国立国際医療研究センター

研究所 糖尿病研究センター

臓器障害研究部

### 研究要旨

糖尿病にて慢性的に進行し重篤な合併症を引き起こすに至る糖尿病性細小血管症を簡便に診断可能とするバイオマーカーの開発は重要であるが、従来の血清あるいは尿蛋白を網羅的に定量するアプローチでは、同定された蛋白のバイオマーカーとしての意義を検証するのは困難であった。このため本研究では、先に培養細胞や実験動物にて糖尿病性細小血管症関連蛋白を絞り込んだ後に、個々のバイオマーカー候補を定量解析することとし、定量解析の新しい手法として Multiple reaction monitoring (MRM)法を取り入れて効率性をあげることを目的に条件検討を行った。まず内皮細胞にて High glucose 処理で発現上昇した 3 種の蛋白 (GDF-15, TFPI-2, TIMP-2) について、健常者血清にて検出可能か 4000 QTRAP を用いた MRM 解析にて検証したところ、いずれの蛋白でも少なくとも 1 組以上のペプチド及びプロダクトイオンの組み合わせを検出することに成功した。4000 QTRAP を用いた MRM 解析の測定条件などをさらに改良する必要があるが、糖尿病性細小血管症関連蛋白を臨床検体にて効率的に定量して検証する手法は、効率よく糖尿病性細小血管症のバイオマーカーを探索するために有用と考えられる。

## A. 研究目的

糖尿病患者は 2007 年国民健康・栄養調査では約 890 万人といわれ、戦後一貫して増加している。糖尿病の特徴は慢性的な経過で糖尿病性細小血管症を引き起こすことであり、網膜症では失明、腎症では腎不全による人工透析、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断に帰結し、国民健康上大きな問題になっている。これらの合併症は自覚症状を伴わないで進行するため、病期や予後・進行性などを的確かつ簡便に診断するバイオマーカーの開発が急務である。国立国際医療センター（当時）は平成 19 年度までの「疾患関連たんぱく質解析研究事業」に参加しており、その解析センター（プロテオームファクトリー）を利用した網羅的タンパク質解析を駆使して、糖尿病患者血清 124 例、健常者血清 42 例から cICAT 法での定量解析を行い、各糖尿病性合併症で異なる血清蛋白プロファイルを認めた。

糖尿病患者の臨床検体を用いてプロテオーム解析を行う際は、多くの場合に糖尿病診療の現場で日常的に採取される血清あるいは血漿が研究対象となる。ところが、糖尿病は全身疾患であるため、同定されたバイオマーカー候補蛋白がどの臓器あるいは組織に由来しているのか、その蛋白の量的変動が本当に糖尿病合併症の出現あるいは進行を反映しているのかを検証するのは非常に困難である。このように、まず臨床検

体を試料として網羅的に蛋白の定量を行うアプローチは糖尿病でのバイオマーカー探索においては限界がある。ところが近年、あらかじめ判明しているバイオマーカー候補蛋白について、高感度で特異的に蛋白を定量できる Multiple reaction monitoring (MRM) 法による解析が使われるようになってきた (Anderson et al. Mol Cell Proteomics 5:573, 2006)。本法を用いたアプローチでは、先に糖尿病性細小血管症の場となる組織由来の培養細胞あるいは疾患モデル動物を用いた実験にてバイオマーカー候補蛋白を絞り込んだ後に、これらの蛋白を糖尿病患者由来検体にて定量評価することが可能であり、先に臨床検体を網羅的に解析する場合と比較して、バイオマーカー候補蛋白の意義付けが容易となる。さらに MRM 法の測定感度は、網羅的な定量解析法の代表である iTRAQ 法より優れている。また、iTRAQ 法は試薬に同位体元素が含まれていて高価であるのに対して、MRM 法はこうした高価な試薬を使用する必要がないというメリットもある。

このため、今回は MRM 法による定量解析の予備的検討を行うために、別項で述べた High glucose 処理した内皮細胞にて有意に RNA レベルで発現が上昇していた 3 種の蛋白について、検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. リコンビナント蛋白を用いた定量ペプチドの選択

予備検討に用いた GDF-15 (Abnova 社)、TFPI-2 (R&D 社)、TIMP-2 (abcam 社)の3種のリコンビナント蛋白を 3 kDa Amicon Ultrafree で脱塩、真空乾燥させ、0.1% RapiGest SF (Waters)に溶解した。還元アルキル化後、トリプシン消化した。得られた消化物を、nanoLC の C18 カラムで分離し、順次オンラインで 4000 QTRAP に投入した。分析は、EMS、ER、EPI、EPI の測定モードを使用した IDA (Information Dependent Acquisition) で行い、ProteinPilot Software 2.0 で蛋白同定した。

同定結果を MRMPilot software で読み込み、MRM 測定 Method を作製した。ペプチドは、基本的に Confidence と Ion Intensity が高く、修飾のなるべくないものから 1 タンパクあたり 8-9 個選択した。Ion Intensity が高く基本的に Precursor より m/z の大きい b または y イオンを選択し、1 ペプチドあたり 3 つの MRM チャンネルを作製した。MRM 測定 Method は MRM モード単体で行った。

### 2. 血清サンプルを用いた定量対象ペプチドの絞り込み

今回の予備検討に用いた健常者血清は、「創薬基盤推進研究事業」の前に行われた「疾患関連たんぱく質解析研究事業」において国立国際医療センター（当時）にて収

集した健常者血清である。この健常者血清を Albumin/IgG 除去カラム (GE Healthcare)にて処理後に 3 kDa Amicon Ultrafree で限外ろ過後、乾燥させ、0.1% RapiGest SF (Waters)に溶解、還元アルキル化後、トリプシン消化した。得られた消化物を HPLC の C18 カラムで緩やかなグラジエントで分離させ、スプレーさせる際のサンプルの濃度がある程度低くなり、感度の低下を抑えるように工夫した。複雑な混合物である血清ではイオンサプレッションがおこりやすく、チャンネルにより最適な血清量が異なるので 150 ng, 500 ng, 1 µg, 1.5 µg の血清で分析を行った。

## C. 研究結果

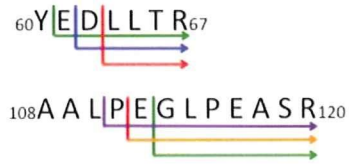
まず、今回検討した3種のリコンビナント蛋白を用いて MRM チャンネルを作製し、nanoLC/4000QTRAP システムで測定することができた。次に、血清サンプルで3種の蛋白について測定したところ、そのままでは、擬陽性と考えられるピークが多数検出されたため、リコンビナント蛋白をスパイクした MRM の結果と実サンプルの MRM のデータを比較することで、真のピークを抽出することに成功し、それぞれの蛋白について測定することができた。

GDF-15 では、10 pmol を LC/MS/MS し、修飾の違いも含めて Contribute > 0 以上のペプチドを 4 個同定できた。2 pmol の GDF-15 を MRM 測定し、2 ペプチドにつ

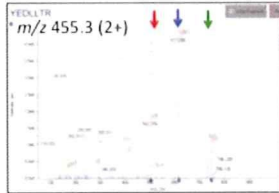
いて3チャンネルとも Ion Intensity が 1)。  
 $1 \times 10^3$  を超える高いピークが得られた (図

### GDF15

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSALAEASRASFPGPSELHT  
 EDSRFRELKRKYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSG  
 GHLLRISR~~AALPEGLPEASRL~~HRALFRLSPATASRWVTRPLRRQLSLA  
 RQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPOAARGRRRAR  
 ARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIG  
 ACP SQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDI  
 GVS LQTYDDLAKDCHCI



Q1: Product ions selection



Q3: Product ions monitoring

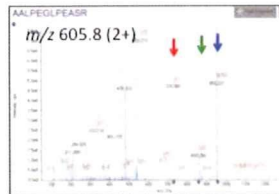
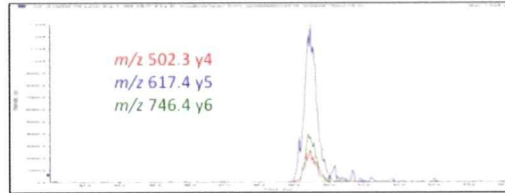
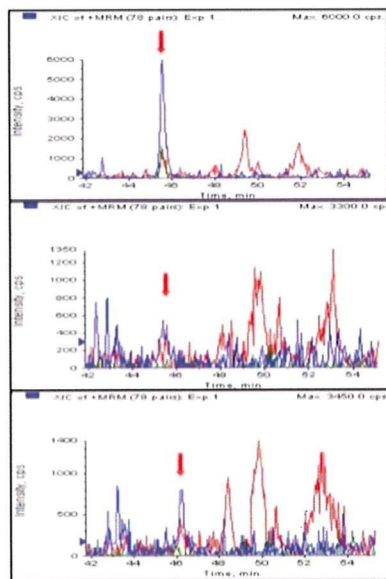


図 1. GDF-15 にて作製した MRM チャンネル

設定した GDF-15 の MRM チャンネルで、 $1.5 \mu\text{g}$  の血清で 1 ペプチドを検出することがで  
 実際に血清を用いて測定したところ、 $1.5 \mu\text{g}$  きた (図 2)。

### GDF15 MRM測定 m/z 455.3



GDF15 1pmol + Serum 1.5 $\mu\text{g}$

GDF15 1fmol + Serum 1.5 $\mu\text{g}$

Serum 1.5 $\mu\text{g}$

図 2. 血清での GDF-15 の MRM 測定

TFPI-2 では、15 pmol を LC/MS/MS し修飾の違いも含めて Contribute > 0 以上のペプチドが 39 個同定できた。そのうち、Confidence と Ion Intensity が高く、修飾のなるべくないペプチドを 9 個選択した。

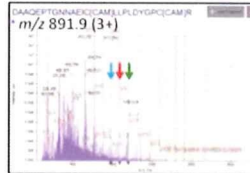
2 pmol の TFPI-2 を MRM 測定し、4 ペプチドについて 3 チャンネルとも Ion Intensity が  $1 \times 10^3$  を超える高いピークが得られた。1.5  $\mu\text{g}$  の血清を使用し、1 ペプチドを検出することができた (図 3)。

### TFPI2

MDPARPLGLSILLFLTEAALGDAAQEP  
 TGNNAEICLLPLDYGPCRALRLRYDYDRY  
 TQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACD  
 DACWRIEKVPKVCRLQVSDDDQCEGST  
 EKYYFNLSMTCEKFFSGGCHRNRIENR  
 FPDEATCMGFAPKIPSFYSPKDEGL  
 CSANVTRYFNPYRRTCDAFYTGCGG  
 NDNNFVSRREDCKRACAKALKKKKMMP  
 KLRFASIRKIRKKQF



Q1: Product ions selection



Q3: Product ions monitoring

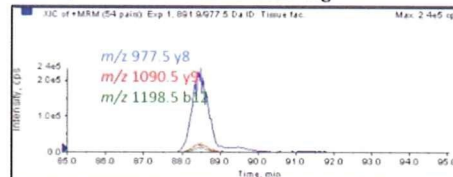
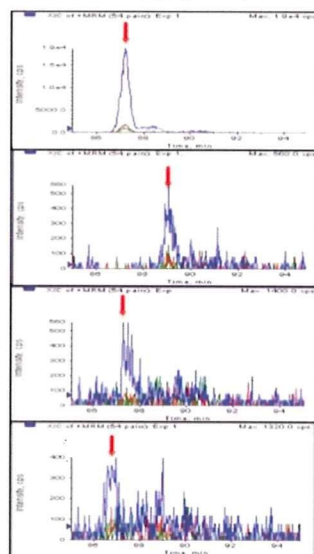


図 3. TFPI-2 にて作製した MRM チャンネル

スパイクした量に比例してピークが消失し  
 ないので、1 回の MS で測定する血清あた

り、1 fmol 以上の TFPI-2 が存在すると考  
 えられた (図 4)。

TFPI-2 MRM測定 m/z 891.9



TFPI-2 125fmol + Serum 1.5 $\mu\text{g}$

TFPI-2 1fmol + Serum 1.5 $\mu\text{g}$

TFPI-2 1amol + Serum 1.5 $\mu\text{g}$

Serum 1.5 $\mu\text{g}$

図 4. 血清での TFPI-2 の MRM 測定

TIMP-2 は 100 fmol で修飾の違いも含めて Contribute > 0 以上のペプチドが 13 個同定できた。TFPI-2 同様に 9 個のペプチドに絞りチャンネルを作製した。200 pmol で測定したところ 8 ペプチドについて 3 チ

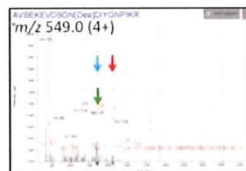
ャンネルとも Ion Intensity が  $1 \times 10^3$  を超える高いピークが得られた。150 ng の血清を使用し、1 ペプチドについて検出することができた (図 5、図 6)。

## TIMP2

MGAAARTLRALGLLLATLLRPADACSCSPVHP  
 QQAFCNADVIRAKAVSEKEVDSGNDIYGNPIKR  
 IQYEIKQIMFKGPEKDIEFIYTPSSAVCGVSLDV  
 GGKKEYLIAGKAEKMGKMHILCDFIVPWTLLST  
 TQKSLNHRVQMGCECKITRCPMIPCYISSPDEC  
 LWMDWVTEKNINGHQAKFFACIKRSDGSCAWY  
 RGAAPPKQEFLDIEDP



Q1: Product ions selection



Q3: Product ions monitoring

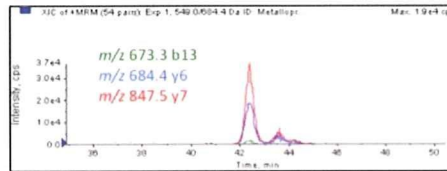
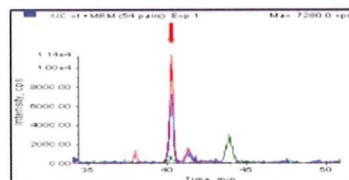
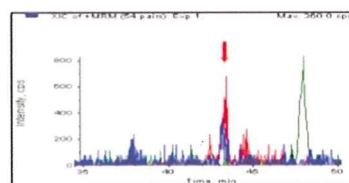


図 5. TIMP-2 にて作製した MRM チャンネル

## TIMP2 m/z 549.0



TIMP2 50fmol + Serum 1.5 $\mu$ g



Serum 150ng

図 6. 血清での TIMP-2 の MRM 測定

#### D. 考察

今回、糖尿病性細小血管症のバイオマーカー候補蛋白を定量するために、High glucose 処理した内皮細胞にて発現上昇していた3種の蛋白について、臨床サンプルの測定を想定し、健常者血清を用いて nanoLC/4000QTRAP システムにおける検出が可能か予備検討を行った。検討に用いた蛋白のうち GDF-15, TFPI-2 は血中濃度としては、0.4~0.5 ng/ml と極めて低いものであるが、血清中から定量に用いるペプチド及びプロダクトイオンのピークを検出することに成功した。血清の前処理にて多数の high abundant protein (HAP) を除去可能なカラムが入手できなかったため、今回は Albumin/IgG 除去カラム (GE Healthcare) を使用し、HAP 処理が不十分である等の問題点はあったにもかかわらず、10 fmol 程度の検出限界を得ることができた。

今後は、前処理に多数の HAP を除去可能なカラムを使用することや、他の分画法などを検討することによって、血清中の微量蛋白をより濃縮し、より感度の高い定量を可能にする。加えて、内部標準を用いた Multiplex MRM 法の使用により、対象ペプチドのシグナル検出を容易にし、信頼性の高い定量値を得た上で、糖尿病患者血清も用いてバイオマーカー候補蛋白の定量解析系を確立していく。

また、MRM 法を用いた定量解析で得られたデータは、世界中でも開発段階であり、抗体を用いた ELISA 法などでも定量し裏付けすることも必要と考えられるため、そちらの準備も整えることを想定している。

これらの検討により、内皮細胞でのトランスクリプトーム解析にて発現レベルに変動があったバイオマーカー候補蛋白について、糖尿病患者や健常者由来検体から効率よく定量評価することが可能となる。

#### E. 結論

糖尿病性細小血管症のバイオマーカー候補蛋白を糖尿病患者血清あるいは尿から効率的に同定するためには、これまでのように臨床検体を用いて網羅的な定量解析を行うより、既に他の実験系で糖尿病性細小血管症に関連していることが判明した蛋白に焦点を当てて、効率の良い解析手法で定量していく方が有利である。質量分析器を用いた MS/MS 解析による MRM 法はこのようなストラテジーに適しており、本法を用いて糖尿病性細小血管症の病態、病期、予後等を判定しうるバイオマーカー蛋白を探索することの意義は大きい。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし



G. 研究発表

該当事項なし

論文：

Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E,  
Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on  
Investigations of Diabetes. J Mass  
Spectrom Soc Jpn. (2009) 57, 201-206

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を  
含む）

該当事項なし

学会発表：

## II. 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

### 分担研究報告書

#### 3. ABE法によるパルミチル化蛋白網羅的解析の試み

分担研究者 楠木 康志

国立国際医療センター (研究所)

臓器障害研究部長

#### 研究要旨

蛋白のパルミチル化は細胞内の蛋白の輸送、蛋白間の相互作用、蛋白の安定性の制御等の様々な生命現象を調節している。このパルミチル化により制御される蛋白を網羅的に同定するために、我々はチオエステル結合したアシル基をビオチンにて置換することによってパルミチル化蛋白を精製する acyl-biotinyl exchange technology (ABE法) を用いて検討した。Human embryonic kidney (HEK) 293細胞の細胞抽出液から ABE法にてビオチン化した蛋白を streptavidin 固定化ナノ磁性粒子ビーズにてアフィニティ精製し、SDS-PAGE後のゲルをトリプシン消化してペプチドを抽出し、LC-MS/MS解析にて蛋白を同定した。その結果、26個の蛋白がパルミチル化蛋白の候補として同定され、そのうち18個が未報告の蛋白であった。このように、ABE法はパルミチル化蛋白を効率的に精製することが可能であり、新規のパルミチル化蛋白を探索するのに有用である。

#### A. 研究目的

パルミチン酸は炭素16個を含む長鎖飽和脂肪酸のひとつである

が、システイン残基にチオエステ

ル結合する反応はパルミチル化

と呼ばれる。このパルミチル化は

protein acyltransferase (PAT)及び acylprotein thioesterase (APT)にて制御される可逆性の反応であり、細胞内の蛋白輸送、蛋白間の相互作用、蛋白の安定性の制御等の様々な生命現象を調節している。特にパルミチル化は蛋白の膜への局在の調節に重要であり、例えば Ras の場合はパルミチル化により Golgi から Plasma membrane に輸送され、脱パルミチル化により Cytosol に移動するといわれている。

信州大学・駒津らの研究によると、膵  $\beta$  細胞での High glucose によって促進されるインスリン分泌は、パルミチル化阻害剤の Cerulenin により抑制される (Yajima H et al. Diabetes 49:712, 2000)。また、長鎖飽和脂肪酸の添加によって、High glucose により促進されるインスリン分泌がさらに増強し、その効果は 16 個の炭素を有するパルミチン酸が最大で

ある (Komatsu M and Sharp GW. Diabetes 47:352, 1998; Komatsu M et al. Diabetes 48:1543, 1999)。さらに、トリチウムラベルしたパルミチン酸で in vivo labeling を行った細胞での二次元電気泳動の結果では、ブドウ糖刺激で特異的にパルミチル化される 24kD の蛋白質の存在が示唆されたが、パルミチル化された蛋白を精製することができなかつたため、同定には至らなかった (Yamada S et al. Endocrinology 143:4203-4209, 2002)。

今回我々は、膜輸送、特にインスリン分泌を制御する新規蛋白を探索することを最終的な目的として、最近 Roth らにより報告されたパルミチル化蛋白の精製法である acyl-biotinyl exchange technology (ABE 法)にて Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞の細胞抽出液を精製後に LC-MS/MS 解析し、パルミチル化蛋白の網羅

的同定の予備検討を行った。

## B. 研究方法

パルミチル化された蛋白質の特異的な精製が可能な ABE 法 (Wan et al. Nature Protocols 2:1573, 2007) とは、次に示すような三段階の反応から構成される。Step 1 ; 蛋白質のシステイン残基に存在する free の SH 基を N-ethylmaleimid

(NEM) でブロックする。Step 2 ; タンパク質に結合しているパルミチル基を  $\text{NH}_2\text{OH}$  (HA) で外す。Step 3 ; Step 2 により新たに作られた free の SH 基を biotin でラベルし、streptavidin-agarose で特異的に biotin-labeled protein を回収する (図 1)。

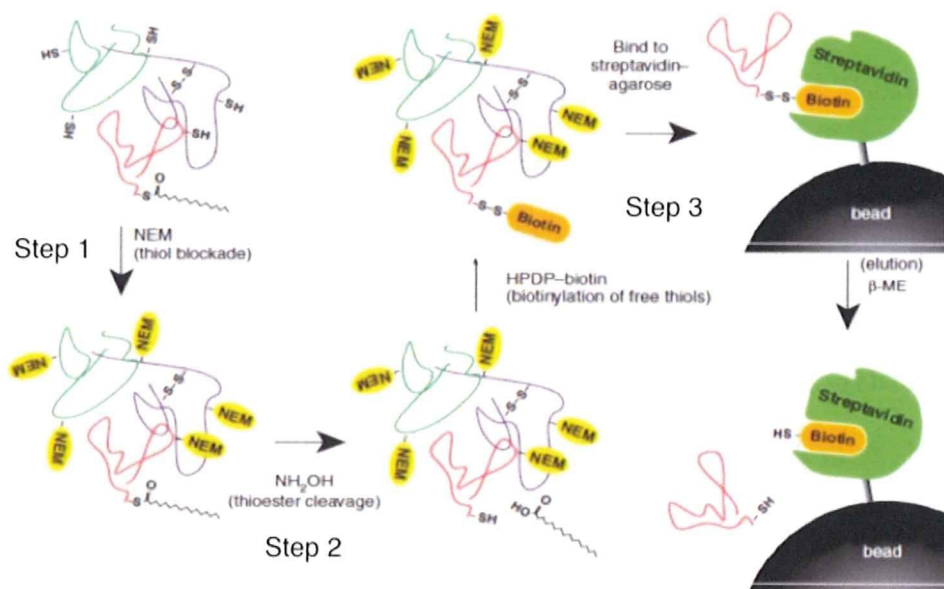


図 1. ABE 法によるパルミチル化蛋白精製の実験の流れ (Wan et al.

Nature Protocols 2:1573, 2007 より図を改変)

パルミチル化蛋白の精製が行われていることを確認するために、