

Table 3 糖尿病で合併症のない患者の尿 (DN-)

Quantitation overview (124 proteins)							
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1	UROM_HUMAN	1798	69714	142 (89)	54 (29)	3.98	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1
2	PCSK1_HUMAN	1035	27356	37 (33)	17 (14)	5.14	ProSAAS OS=Homo sapiens GN=PCSK1N PE=1 SV=1
3	OSTP_HUMAN	752	35401	58 (40)	29 (18)	7.27	Osteopontin OS=Homo sapiens GN=SPP1 PE=1 SV=1
4	SAP_HUMAN	599	58074	43 (21)	14 (7)	1.38	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2
5	HBB_HUMAN	592	15988	38 (28)	25 (18)	75.89	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
6	ALBU_HUMAN	473	69321	92 (30)	71 (26)	3.51	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
7	MASP2_HUMAN	455	75685	46 (27)	36 (20)	1.59	Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=3
8	FETUA_HUMAN	415	39300	36 (23)	30 (18)	5.74	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1
9	A1AT_HUMAN	415	46707	48 (28)	31 (17)	3.83	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
10	PIGR_HUMAN	389	83232	76 (29)	53 (19)	1.28	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4
11	SLUR1_HUMAN	345	11178	22 (18)	8 (6)	19.73	Secreted Ly-8/uPAR-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=SLURP1 PE=1 SV=2
12	HBA_HUMAN	288	15248	22 (14)	17 (10)	18.25	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
13	LTBP2_HUMAN	257	194938	19 (9)	17 (7)	0.14	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=LTBP2 PE=1 SV=2
14	CLUS_HUMAN	224	52461	16 (11)	11 (6)	0.51	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1
15	GRN_HUMAN	219	83500	12 (8)	8 (5)	0.33	Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN PE=1 SV=2
16	AMBP_HUMAN	204	38974	17 (10)	14 (8)	1.08	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1
17	VGF_HUMAN	183	67218	14 (9)	12 (7)	0.45	Neurosecretory protein VGF OS=Homo sapiens GN=VGF PE=1 SV=2
18	UBIQ_HUMAN	170	8560	7 (5)	7 (5)	6.01	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1
19	LMAN2_HUMAN	152	40203	23 (13)	17 (10)	1.91	Vesicular integral-membrane protein VIP38 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1
20	SLUR2_HUMAN	151	10153	9 (5)	9 (5)	4.31	Secreted Ly-8/uPAR-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLURP2 PE=2 SV=1
21	VEGFA_HUMAN	149	27024	5 (5)	4 (4)	0.69	Vascular endothelial growth factor A OS=Homo sapiens GN=VEGFA PE=1 SV=2
22	ISK1_HUMAN	145	8501	9 (5)	8 (5)	6.01	Pancreatic secretory trypsin inhibitor OS=Homo sapiens GN=SPINK1 PE=1 SV=2
23	FN1_HUMAN	143	262442	21 (3)	19 (2)	0.04	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=3
24	THR_B_HUMAN	137	69992	5 (3)	3 (1)	0.11	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2
25	DEFB1_HUMAN	119	7415	8 (5)	7 (4)	4.88	Beta-defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFB1 PE=1 SV=1
26	ITIH2_HUMAN	118	106397	3 (2)	2 (1)	0.03	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2
27	ACTB_HUMAN	102	41710	8 (5)	7 (4)	0.41	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
28	MSMB_HUMAN	100	12856	8 (3)	5 (2)	0.7	Beta-microseminoprotein OS=Homo sapiens GN=MSMB PE=1 SV=1
29	HEPC_HUMAN	98	9402	10 (6)	8 (4)	4.92	Hepcidin OS=Homo sapiens GN=HAMP PE=1 SV=2
30	TFF2_HUMAN	95	14274	4 (2)	3 (2)	0.62	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
31	TFF1_HUMAN	94	9143	5 (3)	4 (2)	2.01	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1
32	K1C10_HUMAN	88	58792	5 (2)	5 (2)	0.13	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
33	FCN2_HUMAN	86	33980	11 (4)	9 (3)	0.37	Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2
34	PLVAP_HUMAN	85	50562	4 (2)	4 (2)	0.15	Plasmalemma vesicle-associated protein OS=Homo sapiens GN=PLVAP PE=2 SV=1
35	DMKN_HUMAN	83	47054	7 (3)	5 (2)	0.16	Dermokine OS=Homo sapiens GN=DMKN PE=1 SV=3
36	TNR12_HUMAN	81	13902	6 (3)	6 (3)	1.11	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A OS=Homo sapiens GN=TNFRSF12A PE=1 SV=1
37	LAMC1_HUMAN	80	177489	13 (2)	11 (2)	0.04	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3
38	VTNC_HUMAN	74	54271	8 (2)	8 (2)	0.14	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1
39	NID1_HUMAN	74	136291	9 (4)	6 (2)	0.05	Nidogen-1 OS=Homo sapiens GN=NID1 PE=1 SV=3
40	MA1A1_HUMAN	72	72922	4 (1)	3 (1)	0.05	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3
41	FIBB_HUMAN	71	55892	6 (3)	4 (2)	0.14	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2
42	MGP_HUMAN	71	12345	6 (5)	4 (4)	2.03	Matrix Gla protein OS=Homo sapiens GN=MGP PE=1 SV=2
43	CO1A1_HUMAN	69	178077	19 (3)	17 (3)	0.06	Collagen alpha-1(XVII) chain OS=Homo sapiens GN=COL18A1 PE=1 SV=5
44	APOA2_HUMAN	66	11168	9 (5)	9 (5)	3.55	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1
45	AZAP_HUMAN	65	54531	9 (1)	9 (1)	0.07	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3
46	CAD15_HUMAN	64	88861	5 (3)	5 (3)	0.13	Cadherin-15 OS=Homo sapiens GN=CDH15 PE=1 SV=1
47	IBP4_HUMAN	62	27915	6 (1)	6 (1)	0.14	Insulin-like growth factor-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=IGFBP4 PE=1 SV=2
48	FBN1_HUMAN	62	312083	28 (2)	28 (2)	0.02	Fibrillin-1 OS=Homo sapiens GN=FBN1 PE=1 SV=2
49	CAD11_HUMAN	62	87911	2 (1)	2 (1)	0.04	Cadherin-11 OS=Homo sapiens GN=CDH11 PE=1 SV=2
50	IGHG1_HUMAN	62	36083	8 (2)	7 (2)	0.22	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
51	VCC1_HUMAN	61	13810	2 (1)	2 (1)	0.28	VEGF co-regulated chemokine 1 OS=Homo sapiens GN=CXCL17 PE=1 SV=1
52	FBLN3_HUMAN	61	54604	5 (3)	4 (2)	0.14	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1 PE=1 SV=2
53	GELS_HUMAN	61	85644	9 (2)	9 (2)	0.09	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1
54	P3IP1_HUMAN	61	28230	3 (3)	2 (2)	0.29	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PIK3IP1 PE=1 SV=2
55	PGRC1_HUMAN	61	21658	5 (2)	5 (2)	0.38	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRMC1 PE=1 SV=3
56	CDSN_HUMAN	58	51463	8 (1)	5 (1)	0.07	Cornodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=2
57	PODGC_HUMAN	56	101016	3 (1)	3 (1)	0.04	Protocadherin gamma-C3 OS=Homo sapiens GN=PODGC3 PE=1 SV=1
58	MEX3C_HUMAN	56	69323	5 (1)	5 (1)	0.05	RNA-binding protein MEX3C OS=Homo sapiens GN=MEX3C PE=1 SV=3
59	FIBA_HUMAN	56	94914	6 (1)	6 (1)	0.04	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
60	EGF_HUMAN	55	133908	14 (2)	12 (1)	0.03	Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2
61	LAMA4_HUMAN	55	202401	10 (1)	9 (1)	0.02	Laminin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=LAMA4 PE=1 SV=3
62	APOA1_HUMAN	54	30759	8 (5)	6 (3)	0.41	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1
63	THY1_HUMAN	54	17923	2 (2)	2 (2)	0.48	Thy-1 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens GN=THY1 PE=1 SV=2
64	COL6A1_HUMAN	54	108462	6 (1)	6 (1)	0.03	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3
65	IGF2_HUMAN	53	20127	2 (1)	2 (1)	0.19	Insulin-like growth factor II OS=Homo sapiens GN=IGF2 PE=1 SV=1
66	CD59_HUMAN	53	14168	4 (2)	4 (2)	0.82	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1
67	REN_R_HUMAN	52	38983	2 (1)	2 (1)	0.1	Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP8AP2 PE=1 SV=2
68	BIRC1_HUMAN	51	159479	8 (1)	7 (1)	0.02	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=NAIP PE=1 SV=3
69	DOT1L_HUMAN	51	184740	9 (1)	9 (1)	0.02	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific OS=Homo sapiens GN=DOT1L PE=1 SV=2
70	A1BG_HUMAN	50	54239	3 (1)	3 (1)	0.07	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=3
71	TPP1_HUMAN	50	61210	3 (1)	3 (1)	0.06	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=TPP1 PE=1 SV=2
72	SRGN_HUMAN	49	17641	1 (1)	1 (1)	0.22	Serylglycin OS=Homo sapiens GN=SRGN PE=1 SV=3
73	AT2B3_HUMAN	48	134112	4 (1)	4 (1)	0.03	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 OS=Homo sapiens GN=ATP2B3 PE=1 SV=3
74	VTDB_HUMAN	48	52929	6 (1)	6 (1)	0.07	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1
75	KCNK_C_HUMAN	48	46858	5 (1)	5 (1)	0.08	Potassium channel subfamily K member 12 OS=Homo sapiens GN=KCNK12 PE=1 SV=1
76	PENK_HUMAN	48	30767	1 (1)	1 (1)	0.12	Pronkaphalin-A OS=Homo sapiens GN=PENK PE=1 SV=1
77	NTF2_HUMAN	47	14489	4 (1)	4 (1)	0.27	Nuclear transport factor 2 OS=Homo sapiens GN=NUTF2 PE=1 SV=1
78	ACVR1B_HUMAN	46	56770	6 (3)	6 (3)	0.21	Activin receptor type-1B OS=Homo sapiens GN=ACVR1B PE=1 SV=1
79	K1C9_HUMAN	44	82027	4 (1)	4 (1)	0.08	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
80	KV204_HUMAN	44	12308	3 (1)	3 (1)	0.32	Ig kappa chain V-II region TEW OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
81	SULF2_HUMAN	43	100390	5 (1)	5 (1)	0.04	Extracellular sulfatase Sulf-2 OS=Homo sapiens GN=SULF2 PE=1 SV=1
82	BLVRB_HUMAN	43	22105	2 (1)	2 (1)	0.17	Flavin reductase OS=Homo sapiens GN=BLVRB PE=1 SV=3

83	FURIN_HUMAN	43	86624	4 (1)	4 (1)	0.04	Furin OS=Homo sapiens GN=FURIN PE=1 SV=2
84	GGH_HUMAN	42	35941	1 (1)	1 (1)	0.1	Gamma-glutamyl hydrolase OS=Homo sapiens GN=GGH PE=1 SV=2
85	FBLN4_HUMAN	42	49372	4 (1)	4 (1)	0.08	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=EFEMP2 PE=1 SV=3
86	CADH1_HUMAN	40	97396	6 (1)	6 (1)	0.04	Cadherin-1 OS=Homo sapiens GN=CDH1 PE=1 SV=3
87	DRB4_HUMAN	39	29922	5 (1)	4 (1)	0.13	HLA class II histocompatibility antigen, DR beta 4 chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB4 PE=2 SV=2
88	CSF1_HUMAN	39	60082	7 (1)	7 (1)	0.06	Macrophage colony-stimulating factor 1 OS=Homo sapiens GN=CSF1 PE=1 SV=1
89	HPT_HUMAN	37	45177	1 (1)	1 (1)	0.08	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
90	CO4A_HUMAN	37	192850	10 (1)	10 (1)	0.02	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=1
91	DMBT1_HUMAN	36	260569	6 (1)	6 (1)	0.01	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 PE=1 SV=2
92	CI082_HUMAN	36	38344	1 (1)	1 (1)	0.1	Uncharacterized protein C9orf82 OS=Homo sapiens GN=C9orf82 PE=1 SV=2
93	TENX_HUMAN	35	464034	17 (1)	17 (1)	0.01	Tenascin-X OS=Homo sapiens GN=TNXB PE=1 SV=3
94	WISP2_HUMAN	35	26807	2 (1)	2 (1)	0.14	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2 OS=Homo sapiens GN=WISP2 PE=1 SV=1
95	APOA4_HUMAN	35	45371	2 (1)	2 (1)	0.08	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3
96	KAIN_HUMAN	33	48511	1 (1)	1 (1)	0.08	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3
97	LTP4_HUMAN	33	173320	10 (1)	10 (1)	0.02	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=LTP4 PE=1 SV=2
98	ATS1_HUMAN	33	105290	5 (1)	5 (1)	0.03	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 OS=Homo sapiens GN=ADAMTS1 PE=1 SV=4
99	SHSA5_HUMAN	33	25564	7 (2)	5 (2)	0.32	Protein shisa-5 OS=Homo sapiens GN=SHISA5 PE=2 SV=1
100	CO3_HUMAN	31	187030	5 (1)	5 (1)	0.02	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
101	AUGN_HUMAN	31	17173	3 (1)	3 (1)	0.22	Augurin OS=Homo sapiens GN=C2orf40 PE=1 SV=1
102	YE026_HUMAN	31	39225	2 (1)	2 (1)	0.1	Putative uncharacterized protein LOC285679 OS=Homo sapiens PE=2 SV=2
103	FBLN5_HUMAN	30	50147	13 (1)	12 (1)	0.07	Fibulin-5 OS=Homo sapiens GN=FBLN5 PE=1 SV=1
104	HEPS_HUMAN	30	44982	1 (1)	1 (1)	0.08	Serine protease hepsin OS=Homo sapiens GN=HPN PE=1 SV=1
105	FBLN1_HUMAN	29	77162	2 (1)	2 (1)	0.05	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4
106	KNG1_HUMAN	29	71912	3 (1)	2 (1)	0.05	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2
107	APOL1_HUMAN	29	43947	1 (1)	1 (1)	0.08	Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1 PE=1 SV=5
108	B2MG_HUMAN	28	13706	6 (2)	4 (2)	0.66	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 SV=1
109	H2B1A_HUMAN	27	14159	2 (1)	2 (1)	0.27	Histone H2B type 1-A OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BA PE=1 SV=3
110	CATF_HUMAN	27	53332	2 (1)	2 (1)	0.07	Cathepsin F OS=Homo sapiens GN=CTSF PE=1 SV=1
111	TMSL1_HUMAN	27	5067	1 (1)	1 (1)	0.85	Thymosin beta-4-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMSL1 PE=2 SV=1
112	ROBO4_HUMAN	25	107390	11 (1)	9 (1)	0.03	Roundabout homolog 4 OS=Homo sapiens GN=ROBO4 PE=1 SV=1
113	CLM9_HUMAN	24	36120	1 (1)	1 (1)	0.1	CMRF35-like molecule 9 OS=Homo sapiens GN=CD300LG PE=1 SV=1
114	BTD_HUMAN	24	61093	6 (1)	6 (1)	0.06	Biotinidase OS=Homo sapiens GN=BTD PE=1 SV=2
115	TFF3_HUMAN	23	8635	12 (2)	9 (2)	1.16	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1
116	CFAD_HUMAN	23	27016	5 (1)	4 (1)	0.14	Complement factor D OS=Homo sapiens GN=CFD PE=1 SV=5
117	MSTP9_HUMAN	23	79642	7 (1)	6 (1)	0.05	Putative macrophage-stimulating protein MSTP9 OS=Homo sapiens GN=MSTP9 PE=5 SV=2
118	PGCB_HUMAN	23	99056	8 (1)	8 (1)	0.04	Brevican core protein OS=Homo sapiens GN=BCAN PE=1 SV=2
119	GPR56_HUMAN	22	77688	4 (1)	4 (1)	0.05	G-protein coupled receptor 56 OS=Homo sapiens GN=GPR56 PE=1 SV=2
120	CELR1_HUMAN	20	329278	22 (1)	22 (1)	0.01	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 OS=Homo sapiens GN=CELSR1 PE=1 SV=1
121	ADML_HUMAN	18	20408	3 (1)	3 (1)	0.19	ADM OS=Homo sapiens GN=ADM PE=1 SV=1
122	CD99_HUMAN	17	18836	22 (1)	19 (1)	0.2	CD99 antigen OS=Homo sapiens GN=CD99 PE=1 SV=1
123	AEGP_HUMAN	17	131416	16 (1)	15 (1)	0.03	Apical endosomal glycoprotein OS=Homo sapiens GN=MAMDC4 PE=1 SV=2
124	GUC2A_HUMAN	17	12380	1 (1)	1 (1)	0.32	Guanylin OS=Homo sapiens GN=GUCA2A PE=1 SV=2

Table 4 糖尿病で微量アルブミン尿の患者の尿 (DN+)

Quantitation overview (112 proteins)							
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1	UROM_HUMAN	2442	69714	191 (132)	58 (35)	7.32	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1
2	ALBU_HUMAN	1137	69321	199 (79)	122 (51)	14.67	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
3	OSTP_HUMAN	851	35401	46 (28)	24 (14)	4.53	Osteopontin OS=Homo sapiens GN=SPP1 PE=1 SV=1
4	PCSK1_HUMAN	538	27358	22 (20)	11 (9)	2.21	ProSAAS OS=Homo sapiens GN=PCSK1N PE=1 SV=1
5	A1AT_HUMAN	520	46707	50 (27)	22 (10)	1.92	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
6	FETUA_HUMAN	433	39300	36 (24)	27 (18)	3.69	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1
7	PIGR_HUMAN	419	83232	70 (30)	42 (18)	1.18	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4
8	HBB_HUMAN	343	15988	28 (14)	17 (9)	7.76	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
9	GRN_HUMAN	329	83500	21 (9)	15 (4)	0.33	Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN PE=1 SV=2
10	SAP_HUMAN	309	58074	24 (13)	13 (5)	0.86	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2
11	LTBP2_HUMAN	245	194936	18 (8)	17 (7)	0.14	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=LTBP2 PE=1 SV=2
12	FIBB_HUMAN	238	55892	14 (9)	8 (5)	0.38	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2
13	SLUR1_HUMAN	229	11178	20 (9)	7 (4)	3.55	Secreted Ly-8/uPAR-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=SLURP1 PE=1 SV=2
14	AMBP_HUMAN	194	38974	18 (9)	9 (5)	0.58	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1
15	CLUS_HUMAN	183	52461	14 (11)	8 (6)	0.51	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1
16	K2C1_HUMAN	178	65999	18 (6)	17 (5)	0.39	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
17	VEGFA_HUMAN	178	27024	9 (8)	6 (4)	0.83	Vascular endothelial growth factor A OS=Homo sapiens GN=VEGFA PE=1 SV=2
18	PLMN_HUMAN	172	90510	13 (7)	11 (7)	0.32	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2
19	UBIQ_HUMAN	160	8580	7 (8)	7 (6)	9.35	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1
20	K1C9_HUMAN	156	62027	14 (7)	14 (7)	0.42	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
21	MASP2_HUMAN	153	75885	20 (10)	18 (9)	0.54	Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=3
22	TFF1_HUMAN	143	9143	8 (5)	6 (4)	5.29	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1
23	TRFE_HUMAN	138	77000	18 (11)	15 (9)	0.52	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=2
24	APOA1_HUMAN	135	30759	13 (9)	11 (7)	1.52	Apolipoprotein A-1 OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1
25.1	K2C8A_HUMAN	133	80008	11 (5)	10 (4)	0.35	Keratin, type II cytoskeletal 8A OS=Homo sapiens GN=KRT8A PE=1 SV=3
25.2	K2C8B_HUMAN	128	80030	11 (5)	10 (4)	0.35	Keratin, type II cytoskeletal 8B OS=Homo sapiens GN=KRT8B PE=1 SV=5
26	MSMB_HUMAN	130	12858	10 (5)	6 (2)	0.7	Beta-microseminoprotein OS=Homo sapiens GN=MSMB PE=1 SV=1
27	ISK1_HUMAN	126	8501	10 (7)	8 (7)	14.27	Pancreatic secretory trypsin inhibitor OS=Homo sapiens GN=SPINK1 PE=1 SV=2
28	PGRC1_HUMAN	124	21658	8 (4)	6 (3)	0.83	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRC1 PE=1 SV=3
29	ACTB_HUMAN	112	41710	15 (6)	11 (5)	0.53	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
30	DEFB1_HUMAN	103	7415	5 (4)	4 (3)	2.76	Beta-defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFB1 PE=1 SV=1
31	K2C5_HUMAN	101	82340	5 (3)	4 (3)	0.19	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3
32	SLUR2_HUMAN	100	10153	7 (4)	7 (4)	2.8	Secreted Ly-8/uPAR-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLURP2 PE=2 SV=1
33	FN1_HUMAN	95	282442	13 (2)	13 (2)	0.03	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=3
34	VEGF_HUMAN	94	67218	10 (5)	10 (5)	0.31	Neurosecretory protein VEGF OS=Homo sapiens GN=VEGF PE=1 SV=2
35	THRB_HUMAN	93	69992	6 (2)	5 (1)	0.11	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2
36	FBN1_HUMAN	90	312083	29 (4)	28 (3)	0.05	Fibrillin-1 OS=Homo sapiens GN=FBN1 PE=1 SV=2
37	K1C10_HUMAN	88	58792	2 (1)	2 (1)	0.06	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
38	IGF2_HUMAN	86	20127	9 (5)	6 (3)	0.89	Insulin-like growth factor II OS=Homo sapiens GN=IGF2 PE=1 SV=1
39	THY1_HUMAN	85	17923	5 (3)	3 (1)	0.22	Thy-1 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens GN=THY1 PE=1 SV=2
40	LAMC1_HUMAN	83	177489	15 (2)	15 (2)	0.04	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3
41	TIH2_HUMAN	79	106397	7 (2)	6 (1)	0.03	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=TIH2 PE=1 SV=2
42	TFF2_HUMAN	78	14274	5 (2)	4 (1)	0.27	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
43	VTNC_HUMAN	77	54271	9 (3)	8 (2)	0.14	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1
44	FIBA_HUMAN	76	94914	9 (2)	5 (2)	0.08	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
45	HBA_HUMAN	74	15248	6 (3)	6 (3)	0.98	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
46	MGP_HUMAN	71	12345	15 (8)	8 (5)	3.01	Matrix Gla protein OS=Homo sapiens GN=MGP PE=1 SV=2
47	K1C16_HUMAN	70	51236	7 (2)	7 (2)	0.15	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4
48	AZAP_HUMAN	70	54531	6 (1)	6 (1)	0.07	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3
49	MT1G_HUMAN	58	6136	12 (3)	8 (3)	3.86	Metallothionein-1G OS=Homo sapiens GN=MT1G PE=1 SV=2
50	TTHY_HUMAN	69	15877	3 (1)	3 (1)	0.24	Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1
51	MA1A1_HUMAN	67	72922	4 (1)	4 (1)	0.05	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1 PE=1 SV=3
52	COL1A_HUMAN	67	178077	20 (5)	15 (4)	0.11	Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens GN=COL18A1 PE=1 SV=5
53	TNR12_HUMAN	64	13902	3 (2)	3 (2)	0.64	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A OS=Homo sapiens GN=TNFRSF12A PE=1 SV=1
54	FBLN3_HUMAN	64	54604	3 (2)	2 (1)	0.07	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1 PE=1 SV=2
55	IBP4_HUMAN	62	27915	4 (1)	4 (1)	0.14	Insulin-like growth factor-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=IGFBP4 PE=1 SV=2
56	HEPC_HUMAN	60	9402	7 (4)	6 (3)	3.15	Hepcidin OS=Homo sapiens GN=HAMP PE=1 SV=2
57	CALL5_HUMAN	57	15883	2 (1)	2 (1)	0.24	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=CALML5 PE=1 SV=2
58	2B14_HUMAN	54	30093	4 (3)	2 (2)	0.27	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-4 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=1 SV=1
59	BGAL_HUMAN	54	76027	4 (1)	4 (1)	0.05	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=GLB1 PE=1 SV=2
60	DNS2A_HUMAN	51	39558	1 (1)	1 (1)	0.09	Deoxyribonuclease-2-alpha OS=Homo sapiens GN=DNASE2 PE=1 SV=2
61	AT2B3_HUMAN	50	134112	9 (1)	9 (1)	0.03	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 OS=Homo sapiens GN=ATP2B3 PE=1 SV=3
62	CDSN_HUMAN	50	51463	8 (2)	6 (1)	0.07	Cornodesmosin OS=Homo sapiens GN=CDSN PE=1 SV=2
63	EGF_HUMAN	50	133906	11 (2)	9 (2)	0.06	Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2
64	SAP3_HUMAN	50	20825	3 (1)	2 (1)	0.18	Ganglioside GM2 activator OS=Homo sapiens GN=GM2A PE=1 SV=4
65	NRAP_HUMAN	50	198950	4 (1)	4 (1)	0.02	Nebulin-related-anchoring protein OS=Homo sapiens GN=NRAP PE=2 SV=2
66	CD24_HUMAN	49	8092	1 (1)	1 (1)	0.51	Signal transducer CD24 OS=Homo sapiens GN=CD24 PE=1 SV=2
67	TNFB_L2_HUMAN	49	31464	3 (1)	3 (1)	0.12	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 OS=Homo sapiens GN=TNFRSF6 PE=1 SV=1
68	ZAN_HUMAN	49	305374	24 (1)	20 (1)	0.01	Zonadhesin OS=Homo sapiens GN=ZAN PE=2 SV=3
69	TKNK_HUMAN	48	13430	1 (1)	1 (1)	0.29	Tachykinin-3 OS=Homo sapiens GN=TAC3 PE=1 SV=1
70	FBLN1_HUMAN	48	77162	9 (3)	9 (3)	0.15	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4
71	PK1L2_HUMAN	48	272371	15 (2)	9 (1)	0.01	Polycystic kidney disease protein 1-like 2 OS=Homo sapiens GN=PKD1L2 PE=1 SV=3
72	SHRM3_HUMAN	47	216528	8 (1)	8 (1)	0.02	Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=1
73	PENK_HUMAN	47	30767	4 (1)	4 (1)	0.12	Proenkephalin-A OS=Homo sapiens GN=PENK PE=1 SV=1
74	KLOT_HUMAN	47	118107	5 (3)	5 (3)	0.06	Klotho OS=Homo sapiens GN=KL PE=1 SV=2
75	WASL_HUMAN	47	54793	10 (1)	10 (1)	0.07	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein OS=Homo sapiens GN=WASL PE=1 SV=2
76	CO1A1_HUMAN	47	138827	11 (1)	10 (1)	0.03	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=4
77	ATNG_HUMAN	44	7279	9 (2)	9 (2)	1.45	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit gamma OS=Homo sapiens GN=FXDY2 PE=1 SV=3
78	FBLN5_HUMAN	43	50147	7 (1)	7 (1)	0.07	Fibulin-5 OS=Homo sapiens GN=FBLN5 PE=1 SV=1
79	VTCN1_HUMAN	41	30859	1 (1)	1 (1)	0.12	V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=VTCN1 PE=1 SV=1

80	TSN9_HUMAN	41	28780	4 (1)	4 (1)	0.14	Tetraspanin-9 OS=Homo sapiens GN=TSPAN9 PE=1 SV=1
81	P3IP1_HUMAN	41	28230	2 (1)	2 (1)	0.13	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=PIK3IP1 PE=1 SV=2
82	2B1A_HUMAN	39	30055	3 (2)	2 (1)	0.13	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-10 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=2 SV=1
83	2B1F_HUMAN	39	29947	5 (2)	3 (2)	0.27	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-15 beta chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=1 SV=2
84	APOA4_HUMAN	37	45371	7 (1)	5 (1)	0.08	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3
85	SRGN_HUMAN	37	17841	1 (1)	1 (1)	0.22	Serglycin OS=Homo sapiens GN=SRGN PE=1 SV=3
86	TENX_HUMAN	37	464034	25 (1)	25 (1)	0.01	Tenascin-X OS=Homo sapiens GN=TNXB PE=1 SV=3
87	MEP1A_HUMAN	37	84365	7 (1)	7 (1)	0.04	Meprin A subunit alpha OS=Homo sapiens GN=MEP1A PE=2 SV=2
88	DMBT1_HUMAN	37	260569	8 (1)	8 (1)	0.01	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 PE=1 SV=2
89	TPP1_HUMAN	36	61210	5 (2)	4 (1)	0.12	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=TPP1 PE=1 SV=2
90	SULF2_HUMAN	35	100390	6 (1)	5 (1)	0.04	Extracellular sulfatase Sulf-2 OS=Homo sapiens GN=SULF2 PE=1 SV=1
91	LMAN2_HUMAN	35	40203	6 (1)	4 (1)	0.09	Vesicular integral-membrane protein VIP38 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1
92	CO4A6_HUMAN	35	163704	25 (1)	24 (1)	0.02	Collagen alpha-8(IV) chain OS=Homo sapiens GN=COL4A6 PE=1 SV=3
93	IGHA2_HUMAN	35	36503	5 (1)	5 (1)	0.1	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3
94	VTDB_HUMAN	34	52929	4 (1)	4 (1)	0.07	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1
95	IGHG1_HUMAN	27	36083	16 (2)	10 (2)	0.22	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
96	CO3_HUMAN	33	187030	13 (1)	13 (1)	0.02	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
97	NIPBL_HUMAN	33	315854	14 (1)	14 (1)	0.01	Nipped-B-like protein OS=Homo sapiens GN=NIPBL PE=1 SV=2
98	CD99_HUMAN	32	18836	32 (2)	25 (2)	0.45	CD99 antigen OS=Homo sapiens GN=CD99 PE=1 SV=1
99	HPT_HUMAN	30	45177	4 (2)	4 (2)	0.17	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
100	TYB10_HUMAN	29	5023	1 (1)	1 (1)	0.87	Thymosin beta-10 OS=Homo sapiens GN=TMSB10 PE=1 SV=2
101	TETN_HUMAN	29	22552	4 (1)	4 (1)	0.17	Tetranectin OS=Homo sapiens GN=CLEC3B PE=1 SV=2
102	SHSA5_HUMAN	29	25564	7 (2)	6 (2)	0.32	Protein shisa-5 OS=Homo sapiens GN=SHSA5 PE=2 SV=1
103	CD59_HUMAN	28	14168	3 (1)	3 (1)	0.27	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1
104	TMSL1_HUMAN	27	5067	3 (2)	3 (2)	2.43	Thymosin beta-4-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMSL1 PE=2 SV=1
105	ROBO4_HUMAN	26	107390	13 (1)	10 (1)	0.03	Roundabout homolog 4 OS=Homo sapiens GN=ROBO4 PE=1 SV=1
106	FURIN_HUMAN	26	86624	6 (1)	6 (1)	0.04	Furin OS=Homo sapiens GN=FURIN PE=1 SV=2
107	CATD_HUMAN	25	44524	7 (1)	6 (1)	0.08	Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1
108	UBP53_HUMAN	24	120730	4 (1)	4 (1)	0.03	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53 OS=Homo sapiens GN=USP53 PE=2 SV=2
109	ADML_HUMAN	24	20408	2 (1)	2 (1)	0.19	ADM OS=Homo sapiens GN=ADM PE=1 SV=1
110	FAM78A_HUMAN	21	31947	2 (1)	2 (1)	0.12	Protein FAM78A OS=Homo sapiens GN=FAM78A PE=2 SV=1
111	HS3SA_HUMAN	20	44871	3 (1)	3 (1)	0.08	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 3A1 OS=Homo sapiens GN=HS3ST3A1 PE=1 SV=1

D. 考察

今回、糖尿病性腎症のバイオマーカー候補ペプチドを検出するために、臨床検体を用いて nanoLC/QSTAR システムを用いてペプチドのリスト化を行った。

今回のデータだけでも、各サンプル間において検出されたペプチドの種類に違いがあるため、バイオマーカー候補ペプチドになる可能性がある。

得られたペプチドは多数あり、MS/MS 解析の結果から、今後定量解析のための MRM 測定をする場合に必要な質量データも得ることができたため、測定したいターゲットを絞り込んだら、MRM 測定にて一斉に定量解析することができると考えられる。

今後は、得られたバイオマーカー候補ペプチドと MS/MS データをもとに、MRM 測定し、多検体でのデータを収集して解析することで、糖尿病性腎症のバイオマーカーとなり得るペプチドを見いだ

したいと考えている。

E. 結論

糖尿病性腎症のバイオマーカー候補ペプチド探索の一步を踏み出したばかりであるが、今後さらにデータを集めることで、プロテオーム解析だけでは見つからなかったバイオマーカーが見つかることを期待している。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

論文：

学会発表：

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

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

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

高橋 枝里、鏑木 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

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 243 個のタンパク質スポットが有意な変動を示し、13 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) 質量分析計によるタンパク質の相対定量

Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて 2D-DIGE 解析により糖尿病-非糖尿病ラット間で変動の見られたタンパク質を質量分析計による相対定量を行った。

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。ProteomeLab™IgY-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 2 次元電気泳動で分離後イメージアナライザー Typhoon (GE Healthcare) により得られた各ゲルデータを 2D-DIGE 解析用ソフトウェア DeCyder 2D 6.5 を用いて糖

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。

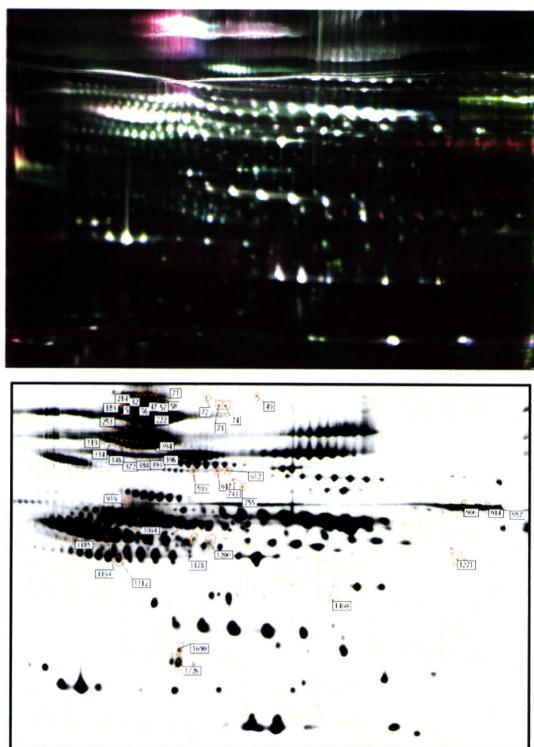


図1. 2D-DIGE法による LEA/Sendai ラットの血清タンパク質発現プロファイル

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148個、16週齢で変化が見られたタンパク質スポットは204個あり、うち95個が共通して変動を見せた。

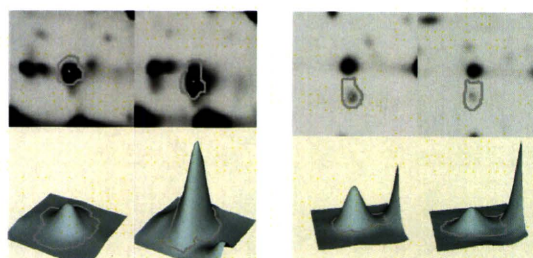


図2. 糖尿病-非糖尿病間で有意に発現変動するタンパク質スポット

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-LC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。

48個のスポットを解析に使い、うち42個を同定した。42個のタンパク質スポットから13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スポット31個から9種のタンパク質を同定した。16週齢においては変化が見られたタンパク質スポットは32個あり10種のタ

ンパク質を同定した。8 週齢、16 週齢で共通して6種のタンパク質が変動を見せた。

c) 質量分析計によるタンパク質の相対定量

質量分析計内でペプチドを開裂前後の2段階でフィルタリングすることで標的タンパク質のペプチドを特異的に検出する Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて、2D-DIGE 解析により糖尿病-非糖尿病ラット間で変動の見られたタンパク質を質量分析計による相対定量を行った。モニタリングのため標的タンパク質のペプチドおよびその開裂断片による二重フィルター (transition) の設定を、標的タンパク質の質量分析計による同定時の情報およびデータベースを元に行い、各 transition のイオン強度を測定した。

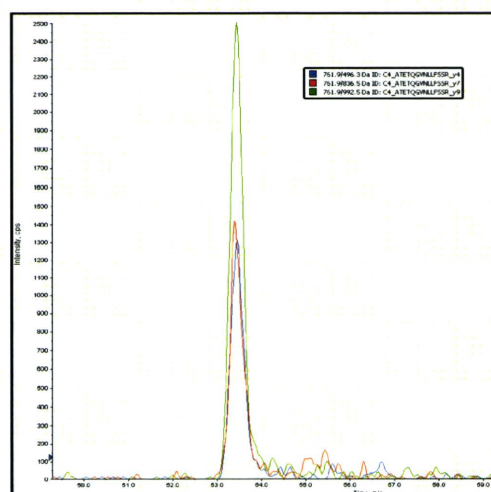
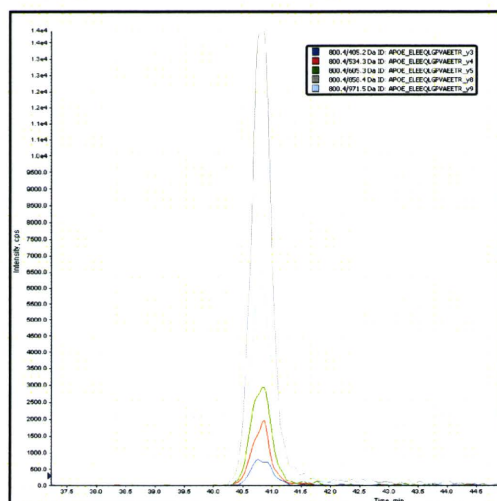
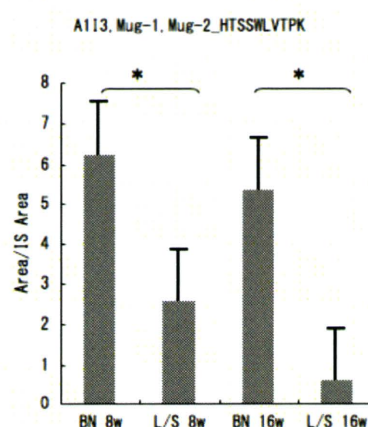


図 4. MRM による各ペプチドの transition 検出

その結果、Alpha 1 inhibitor 3 や Apolipoprotein E 等のタンパク質は 2D-DIGE 解析と同様の結果を示した。一方で 2D-DIGE 解析による 2 次元に分離された際とは異なる結果を示すタンパク質も見られた。



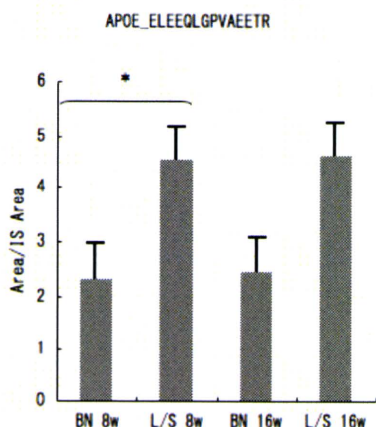


図 4. MRM 法により測定されたタンパク質量の変動

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。MRM 法を用いた相対定量によるタンパク質量の変動を解析した結果では、やはり 2 次元に分離を行った 2D-DIGE 解析とは異なる結果を示すものがあり、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。また今回同定されたタンパク質の一部に

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,
Hisashi Hirano, Kazuki Yasuda,
Yasushi Kaburagi. Proteomic
analysis of serum proteins in
diabetic LEA/Sendai rats.
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学
会年会・第 83 回日本生化学会大会
合同大会) 神戸, 12 月, 2010

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

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
Takarabe D, Rokukawa Y, Takashi Y, Goto A, Takaichi M, Okamoto M, Tsujimoto T, Notoh H, Kishimoto M, <u>Kaburagi Y</u> , Yasuda K, Yamamoto-Honda R, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kajio H, Kikuchi Y, Oka S, <u>Noda M.</u>	Autoimmune diabetes in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. J Clin Endocrinol Metab.	J Clin Endocrinol Metab.	95	4056-4060	2010
Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, <u>Kaburagi Y</u> , Kobayashi N, Le Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N.	Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant.	BMC Infect Dis.			In press
<u>Unoki-Kubota H</u> , Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y.	Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 diabetic mice.	Protein Expr Purif Lett.	17	1177-1181	2010

