

・ 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

尿サンプルのレクチンアレイ解析による新規バイオマーカーの同定

研究分担者 江口潤・岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教

研究分担者 中司敦子・岡山大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・助教

研究分担者 勅使川原早苗・岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教

研究要旨

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展にともないシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められた。 α 2-3シアル酸(MAL-1)および α 2-6シアル酸関連レクチン(SNA, SSA, TJA-1)では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって得られた糖蛋白質を同定したところ、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどが得られた。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有するもの同定されており、これらは糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーであることが想定される。

研究分担者

江口潤（岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教）、中司敦子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・助教）、勅使川原早苗（岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教）

A．研究目的

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ（GlycoStation™, LecChip™）を、健常者(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。さらに腎症の進行によって結合性の増加が認められたレクチンであるSSAレクチンを用いたカラムによって糖蛋白質を精製し、さらに質量解析によって新規バイオマーカーの候補を同定する。

B．研究方法

尿の前処置

尿は50 mLをセントリコンで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 μ Lをそれぞれヒト血清用アフィニティ除去スピナートリッジ（Agilent Technologies）にアプライして処理を行い、

albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要蛋白質を除去した。この6種類で総蛋白質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピナートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後サンプルに凝集（沈殿）が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREE0.5 BIOMAX-5k (Millipore) にサンプル500 μ Lをアプライして、10倍濃縮を2回行い、最終的には50 μ Lに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて蛋白定量を行った。

Cy3標識およびレクチンアレイ解析

蛋白定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 μ g/mLに調整し、うち20 μ gをCy3 (100 μ g蛋白標識用)と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過 (Zeba Desalt Spin Columns 0.5 mL, PIERCE)して未反応のCy3を除き、回収された蛋白量を1 μ gとして、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 μ g/mL

の溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 μ L (1ウエルあたり)をレクチンアレイ(LecChip)にアプライして、20、暗所にて15時間反応させた。レクチンアレイ上のレクチンのリストは表1に提示した。

LecChipの測定はGlycoStation™Reader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像(16 bit TIFF)をArray-Pto™Analyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

SSAレクチンカラムクロマトグラフィー

尿サンプルは100 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。SSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー (Lectin-Agarose Set-III, SSA-Agarose) を BioLogic LP システム II (#731-8300X2, BIO-RAD)を用いて施行した。まず6.0 mLのPBSを0.2 mL/minの速度で30分間平衡化を行った。次に尿サンプル1.0 mLをサンプルループにアプライして0.1 mL/minの速度で10分間かけてPBSによってサンプルをロードした。さらにPBSを0.1 mL/minの速度でPBS 7.0 mLを70分間かけて洗浄を行った。さらにサンプルループに溶出バッファー5.0 mL (0.2M lactose)をアプライしてPBSを0.1 mL/minの流量で60分間かけて溶出した。さらに0.5 mL/minの速度で10.0 mLのPBSを用いて洗浄を行った。溶出の過程で溶出サンプルを5分毎にフラクションコレクターで0.5 mL毎に分注し、洗浄過程では10分毎にフラクションコレクターで1.0 mL毎に分注した。さらに溶出サンプルをSDS-PAGEで展開して解析した。

酵素消化および質量分析

SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって得られた蛋白質をジチオスレイトール(DTT)およびヨードアセトアミド(IAA)によって還元処理した後に、0.1 μ gのシークエンシンググレードのトリプシンで酵素消化(30、一晩)を実施した。消化後に50%アセトニトリル5%蟻酸溶液でペプチドを抽出した。抽出されたペプチドを nanoUPLC (nanoACQUITY UPLC, ウォーターズ社)、Q-ToF micro (ウォーターズ社)を用いて解析した。UPLC条件としてはトラップカラム(5.0 μ m Symmetry C18, 180 μ mID \times 2 cm, S/N 0258110472D108)、カラム(1.7 μ m BEH 130 C18, 100 μ mID \times 10 cm, S/N 0193110811A119)を用いてカラム温度は30とした。移動相としてはA液:水0.1%蟻酸、B液:

アセトニトリル0.1%蟻酸を用いた。流速は400 nL/minで施行した。質量分析はMasslynx ソフトウェア(マイクロマス社)のサーベイモードで行った。

データベース検索

MS/MS 解析により得られたデータは、MassLynx (マイクロマス社)によりデコンボリューション処理を行った。得られたピークリストファイル(pk1ファイル)に対して、Mascot (マトリックスサイエンス社)を用いて、NCBIInrおよびSwiss-Protの最新のデータベース内で一致する蛋白質の検索を行った。修飾に関する検索条件は、システイン残基のカルバミドメチル化とメチオニンの酸化を標準とした。

C. 研究結果

糖尿病性腎症の各病期におけるレクチンアレイ解析の結果を図1に示した。蛋白濃度250 ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。青が健常者コントロールシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。病期の進行によってシグナルが増加しているレクチンと、シグナルがほぼ同じかまたは低下しているレクチンに分類できた。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展にともないシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められた。 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。

SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって得られた蛋白質をSDS-PAGEに展開したところ、 α 2-6シアル酸を認識するSSAカラムで精製された複数の糖蛋白質が、糖尿病性腎症の進行に伴って増加しており、病期による変化が認められた(図2)。質量解析の結果表2・表3に示すような糖蛋白質が同定された。トップにランクされるアルブミンは糖鎖を有さないことと、尿中に最も多く存在する蛋白質であることからコンタミネーションと考えられた。その他には免疫グロブリン(Ig gamma-1 chain C region, Ig gamma-2 chain C region, Ig alpha-1 chain C region, Ig lambda-2 chain C regions)・補体コンポーネント(Complement C4-A, Plasma protease C1 inhibitor, Complement C3)・凝固系因子(Antithrombin-III, Prothrombin)などのフラ

ゲメントが得られた。その他同定されたものとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどがある。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有する糖蛋白質が同定されており、これらは糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーであることが想定される。

D. 考察

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイを施行したところ、糖尿病性腎症の病期の進行に伴って特徴的な糖鎖プロファイルの変化が同定できた。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンのシグナルは病期の進行に伴い低下し、 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。またN型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し特徴的な経過を示した。

糖尿病性腎症の尿サンプルのレクチンアレイ解析では、 α 2-6シアル酸関連レクチンへの結合性が、腎症の進展に従って上昇した。そこでSSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、糖蛋白質を精製したところ、複数の糖蛋白質が病期の進展に従って増加していることが判明した。これらの糖蛋白質は糖尿病性腎症の新しい尿中バイオマーカーの候補であると考えられる。

E. 結論

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルにおいては、血清サンプルより尿サンプルの解析の方が、疾患特異的な変化が見出される可能性が高い。糖尿病性腎症の新規バイオマーカーとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenが、その候補として今後検討すべきであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear

receptors as an emerging therapeutic target. *Acta Medica Okayama* 67(3), 129-134, 2013

Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H. Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 2013

Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013

2. 学会発表

糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの同定(U-CARE 研究) 和田淳、井上謙太郎、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日

Vaspinによる小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 中司敦子、和田淳、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日

糖尿病性腎症におけるPEMT阻害の意義 中司敦子、和田淳、渡邊真由、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日

マウス腎および培養腎細胞における核内受容体の発現と高糖濃度刺激による発現変化の検討 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日

嚢胞形成の新規分子機構 - ACAM/CLMP 欠損マウスの解析 - 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、佐藤美和、寺見直人、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月12日

内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白Gpnmbの脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口

潤、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 16 日
Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. J Wada, A Nakatsuka, S Teshigawara, K Murakami, T Terami, K Inoue, A Katayama, C Higuchi, M Watanabe, J Eguchi, H Makino. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日

メタボリックシンドロームにおける Galectin-9-Tim-3 経路の意義 勅使川原早苗、和田淳、神崎資子、江口潤、中司敦子、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日

ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日

糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日

糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、小川大輔、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、片山晶博、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 18 日

メタボリックシンドロームにおける脂肪組織由来血清 miRNA の同定 樋口千草、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、江口潤、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 18 日

メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase(PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、江口潤、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 18

日
Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. D Ogawa, J Eguchi, H Tachibana, C Sato-Horiguchi, T. Hatanaka, A Nakatsuka, J Wada, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 22, 2013

Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. A Nakatsuka, J Wada, K Murakami, T Terami, J Eguchi, D Ogawa, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013

ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) / CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. K Murakami. J Wada, J Eguchi, D Ogawa, T Terami, N Terami, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013

肥満において Pemt 欠損がもたらす脂肪肝炎とエピゲノム 中司敦子、和田淳、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、片山晶博、寺見隆宏、勅使川原早苗、村上和敏、江口潤、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日

内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 Gpnmb の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、槇野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日

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

表1 LecChip™Ver.1 におけるレクチンのリストとその特異性

Lectin No.	Lectin	Origin	Reported specificity
1	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
2	PSA	<i>Pisum sativum</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
3	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
4	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
5	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>I-fucose-specific lectin</i>	Fuc α 1-6GlcNAc (core fucose)
6	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc
7	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
8	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
9	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
10	TJA-I	<i>Trichosanthes japonica</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
11	PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	tri/tetra-antennary complex-type N-glycan
12	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Gal β 1-4GlcNAc
13	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Gal β 1-4GlcNAc
14	PHAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	bi-antennary complex-type N-glycan with outer Gal and bisecting GlcNAc
15	DSA	<i>Datura stramonium</i>	(GlcNAc β 1-4) _n , Gal β 1-4GlcNAc
16	GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	agalactosylated tri/tetra antennary glycans, GlcNAc
17	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	High-Mannose, Man α 1-6Man
18	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man
19	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man
20	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
21	ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
22	TxLCI	<i>Tulipa gesneriana</i>	Man α 1-3(Man α 1-6)Man, bi- and tri-antennary complex-type N-glycan, GalNAc
23	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
24	TJA-II	<i>Trichosanthes japonica</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-> or GalNAc β 1-> groups at their nonreducing terminals
25	EEL	<i>Euonymus europaeus</i>	blood group B antigen, Gal α 1-3Gal
26	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Gal β 1-3GalNAc
27	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	GlcNAc trimers/tetramers
28	STL	<i>Solanum tuberosum</i>	GlcNAc oligomers, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc
29	UDA	<i>Urtica dioica</i>	GlcNAc β 1-4GlcNAc, Mixture of Man5 to Man9
30	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	(GlcNAc β 1-4) _n
31	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc

32	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal β 1-3GalNAc
33	WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3(-6)GalNAc
34	ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Gal β 1-3GalNAc
35	MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
36	HPA	<i>Helix pomatia agglutinin</i>	α -linked terminal GalNAc
37	VVA	<i>Vicia villosa</i>	α -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
38	DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	blood group A antigen, GalNAc α 1-3GalNAc
39	SBA	<i>Glycine max</i>	α - or β -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
40	Calsepa	<i>Calystegia sepium</i>	Mannose, Maltose
41	PTL-I	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	α -linked terminal GalNAc
42	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-3(Sia α 2-6)GalNAc
43	WGA	<i>Triticum vulgare</i>	chitin oligomers, Sia
44	GSL-I A4	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin I Isolectin A4	α -linked GalNAc
45	GSL-I B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin I Isolectin B4	α -linked Gal

These data were collected from lectin vendors and reports found by internet searches.

表2 糖尿病性腎症 A3G3 期の患者から得られた尿サンプルの liquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI*1	Score*2
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	36	11.04	3985
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	15	1.08	965
3	AMBP_HUMAN	Protein AMBP (alpha 1-microglobulin)	5	0.57	224
4	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	3	0.14	130
5	HEMO_HUMAN	Hemopexin	3	0.23	112
6	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	75
7	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	1	0.34	70
8	HPT_HUMAN	Haptoglobin	3	0.17	63
9	DTX3L_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	1	0.04	49
10	CLUS_HUMAN	Clusterin	1	0.07	39
11	SAP_HUMAN	Proactivator polypeptide	1	0.06	34
12	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	2	0.08	33
13	AFAM_HUMAN	Afamin	2	0.05	32
14	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	29
15	THRB_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	25
16	TRPC4_HUMAN	Short transient receptor potential channel 4	1	0.03	20
17	RABE1_HUMAN	Q15276	2	0.04	19
18	MARK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase MARK1	1	0.04	16

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amount

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}} - 1}$$

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

表 3 糖尿病性腎症A3G4期の患者から得られた尿サンプルのliquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI	Score*1
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	52	21.13	3829
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	23	1.61	800
3	HPT_HUMAN	Haptoglobin	17	3.1	683
4	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	10	2.56	601
5	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	8	0.99	227
6	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	6	4.73	516
7	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	10	1.54	422
8	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	18	0.46	417
9	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	10	1.16	392
10	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	8	1.53	251
11	AMBP_HUMAN	Protein AMBP (alpha 1-microglobulin)	7	0.88	226
12	HEMO_HUMAN	Hemopexin	7	0.62	214
13	LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	4	1.45	204
14	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	2	0.04	147
15	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	2	0.06	127
16	IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	4	0.22	94
17	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1	0.07	94
18	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	94
19	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1 (orosomuroid)	3	0.56	82
20	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	1	0.07	74
21	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	2	0.07	72
22	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	2	0.05	71
23	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	70
24	PGRP2_HUMAN	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1	0.06	62
25	CO3_HUMAN	Complement C3	5	0.02	55
26	THRB_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	31
27	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1	0.07	30
28	MTUS1_HUMAN	Microtubule-associated tumor suppressor 1	1	0.03	26

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amount

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}} - 1}$$

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

図 1 . 糖尿病性腎症の各病期におけるレクチンアレイ解析

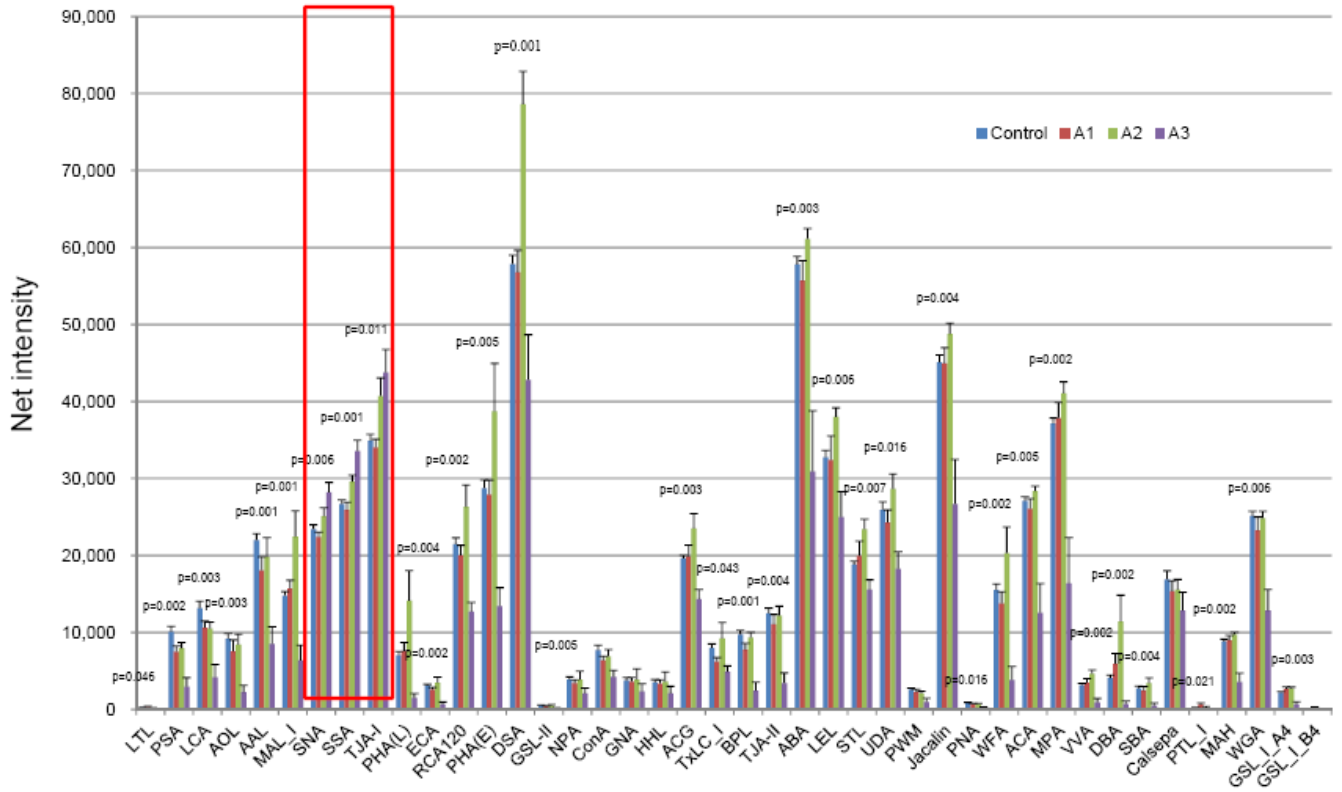


図 2 SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィー (A) と、精製された蛋白質の SDS-PAGE (B)

