

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-524575

(P2018-524575A)

(43) 公表日 平成30年8月30日 (2018. 8. 30)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006. 01)		GO 1 N 33/68	Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)		GO 1 N 33/53	D	4 H O 4 5
CO 7 K 7/06 (2006. 01)		CO 7 K 7/06		
CO 7 K 7/08 (2006. 01)		CO 7 K 7/08		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁)

(21) 出願番号	特願2017-565057 (P2017-565057)	(71) 出願人	514135801
(86) (22) 出願日	平成28年6月20日 (2016. 6. 20)		シーダーズ-サイナイ メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月2日 (2018. 2. 2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー ブールバード 8700
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/038439	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02016/205828		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成28年12月22日 (2016. 12. 22)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	62/181, 665		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成27年6月18日 (2015. 6. 18)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	62/233, 231	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成27年9月25日 (2015. 9. 25)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/387, 149		
(32) 優先日	平成27年12月23日 (2015. 12. 23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

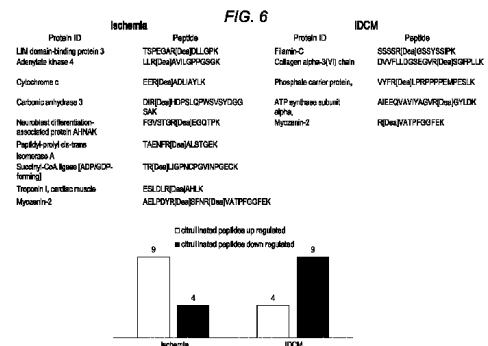
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患の診断におけるシトルリン化の役割

(57) 【要約】

本明細書では、対象の心血管疾患及び/または神経変性疾患を診断するための方法及びマーカーが提供される。本方法は、診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びかかる対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの量を検出することを含む。

【選択図】 図 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象において疾患状態を診断するための方法であって、
前記対象から生物学的試料を採取すること、及び
前記対象から採取した前記生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの量を検出すること

を含み、

基準値に対する前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドのレベルの変化が、前記対象における前記疾患状態のリスクの増加を示す、前記方法。

【請求項 2】

前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドが前記基準値に対して増加している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記疾患状態が、慢性神経変性疾患、後天的脳損傷、心血管疾患、またはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記心血管疾患が虚血性心疾患または特発性心筋症である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記慢性神経変性疾患が、アルツハイマー病 (A D) 及び他の認知症、パーキンソン病 (P D) 及び P D 関連疾患、プリオン病、運動ニューロン疾患 (M N D)、ハンチントン病 (H D)、脊髄小脳失調症 (S C A)、脊髄性筋萎縮症 (S M A)、またはこれらの組み合わせである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記後天的脳損傷が、外傷性脳損傷 (T B I)、脳卒中、脳疾患、腫瘍、出血、またはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドが分泌される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドが分泌されない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記疾患状態が心血管疾患であり、前記シトルリン化ペプチドが、
NIDALSGMEGRK (SEQ ID NO: 18), PRSFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 20),

ESLDLRAHLK (SEQ ID NO: 19), AEETQRSVNDLTSQRAK (SEQ ID NO: 24),

FADLSEAANRNNDALRQAK (SEQ ID NO: 22)

もしくはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上であるか、またはそれと少なくとも 80 % が同一である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記疾患状態が A L S であり、前記シトルリン化ペプチドが、
PSGVQMDPCCRALYDFEPENEGELGFK (SEQ ID NO: 306), QYMRRSTCTINYSK

(SEQ ID NO: 307), LILIARNK (SEQ ID NO: 308),

VIVVWVGTTNNHENTAEVAGGIEAIVQLINTRQPQAK (SEQ ID NO: 309),

EVDVGLAADVGTLQRLPK (SEQ ID NO: 310), HEEAPGHRPTTNPASK (SEQ ID

NO: 311), GETPVNSTMSIGQARK (SEQ ID NO: 312), VRIQTQPGYANTLRDAAPK

(SEQ ID NO: 313), NVGCLQEALQLATSFAQLRLGDVK (SEQ ID NO: 314)

もしくはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上であるか、またはそれと少なくとも 80

10

20

30

40

50

%が同一である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記疾患状態が慢性神経変性疾患であり、前記シトルリン化ペプチドが、SEQ ID NO: 355、SEQ ID NO: 402、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 348、SEQ ID NO: 363、SEQ ID NO: 428、SEQ ID NO: 373、SEQ ID NO: 315、SEQ ID NO: 316、SEQ ID NO: 340、SEQ ID NO: 377、SEQ ID NO: 331、SEQ ID NO: 332、SEQ ID NO: 325、SEQ ID NO: 375、SEQ ID NO: 429、SEQ ID NO: 414、SEQ ID NO: 313、SEQ ID NO: 366、SEQ ID NO: 360、SEQ ID NO: 423、SEQ ID NO: 405、SEQ ID NO: 439、SEQ ID NO: 321、SEQ ID NO: 475、SEQ ID NO: 476、SEQ ID NO: 477、SEQ ID NO: 478、SEQ ID NO: 479、SEQ ID NO: 480、SEQ ID NO: 481、SEQ ID NO: 482、SEQ ID NO: 483、SEQ ID NO: 484、SEQ ID NO: 485、SEQ ID NO: 486、SEQ ID NO: 487、SEQ ID NO: 488、SEQ ID NO: 489、SEQ ID NO: 490、SEQ ID NO: 491、SEQ ID NO: 492、SEQ ID NO: 493、SEQ ID NO: 494、SEQ ID NO: 495、SEQ ID NO: 496、SEQ ID NO: 497、SEQ ID NO: 498、SEQ ID NO: 499、SEQ ID NO: 500、SEQ ID NO: 501、SEQ ID NO: 502、SEQ ID NO: 503、SEQ ID NO: 504もしくはこれらの組み合わせに示される配列を有するペプチドのいずれか1つ以上と同一であるか、またはそれと80%が同一である、請求項5に記載の方法。

【請求項12】

前記疾患状態が後天的脳損傷であり、前記シトルリン化ペプチドが、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 265、SEQ ID NO: 285、SEQ ID NO: 505、SEQ ID NO: 506、SEQ ID NO: 507、SEQ ID NO: 508、SEQ ID NO: 509、SEQ ID NO: 510、SEQ ID NO: 511、SEQ ID NO: 512、SEQ ID NO: 513、SEQ ID NO: 514、SEQ ID NO: 515、SEQ ID NO: 516、SEQ ID NO: 517、SEQ ID NO: 518、SEQ ID NO: 519、SEQ ID NO: 520、SEQ ID NO: 521、SEQ ID NO: 522、SEQ ID NO: 523、SEQ ID NO: 524、SEQ ID NO: 525、SEQ ID NO: 526、SEQ ID NO: 527、SEQ ID NO: 528、SEQ ID NO: 529、SEQ ID NO: 530、SEQ ID NO: 531、SEQ ID NO: 532、SEQ ID NO: 533、SEQ ID NO: 534、SEQ ID NO: 535、SEQ ID NO: 536、SEQ ID NO: 537、SEQ ID NO: 538、SEQ ID NO: 539、SEQ ID NO: 540、SEQ ID NO: 541、SEQ ID NO: 542、SEQ ID NO: 543、SEQ ID NO: 544、SEQ ID NO: 545、SEQ ID NO: 546、SEQ ID NO: 547もしくはこれらの組み合わせに示される配列を有するペプチドのいずれか1つ以上であるか、またはそれと80%が同一である、請求項5に記載の方法。

【請求項13】

前記生物学的試料が、血液、血漿、血清、組織生検材料またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドのレベルが、質量分析、高分解能質量分析、タンデム型質量分析、結合試験、免疫学的検査、抗体結合もしくは免

疫組織化学を用いて検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

心血管疾患、慢性神経疾患、後天的脳損傷、またはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上と診断された前記対象に対し、治療を指示することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記治療が、治療的ライフスタイル変更、治療薬、外科的治療、またはこれらの組み合わせのいずれか 1 つ以上である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記シトルリン化タンパク質または前記シトルリン化ペプチドの存在が、前記慢性神経変性疾患、後天的脳損傷、またはこれらの組み合わせの発症中の自己抗体の生成を示す、請求項 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究の陳述

本発明は、国立衛生研究所から助成金第 H L 1 1 2 5 8 6 - 0 1 号及び第 H H S N 2 6 8 2 0 1 0 0 0 0 3 2 C 号を受け、政府の支援により行われたものである。政府は本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

背景

本明細書の全ての出版物は、個々の出版物または特許出願が具体的かつ個別に参照により組み込まれるよう指示された場合と同程度に参照により組み込まれる。以下の説明は、本発明の理解に有用である可能性がある情報を含む。これは、本明細書で提供されるいかなる情報も先行技術であるもしくは本願で請求される発明に関連していると認めるものではなく、または具体的もしくは黙示的に参照されるいかなる出版物も先行技術であることを認めるものではない。

【0003】

シトルリン化、すなわち酵素ファミリーペプチジルアルギニンデイミナーゼ (P A D) によるアルギニンのシトルリンへの転換を含む不可逆的な翻訳後修飾 (P T M) は、いくつかの疾患に関連している。シトルリン化は全身性のプロセスであるように思われ、シトルリン化タンパク質を標的とする自己抗体は関節リウマチ (R A) に対してかなり特異的であり、他の自己免疫状態において時折認められるが、健常なヒトで認められることはまれである。本発明者らの以前の研究において、シトルリン化タンパク質抗原に対する自己抗体の高値が R A 患者の心筋層で認められた。 P A D は、心筋細胞、常在炎症細胞、内皮細胞、及び血管平滑筋細胞で検出された。

【0004】

シトルリン化によって、分子量がわずかに増加 (+ 0 . 9 8 4 D a) するが、アルギニン残基の正に荷電したグアニジン基がシトルリンアミノ酸の電荷中性のウレイド基に転換される。アルギニンからシトルリンへの電荷の喪失は、タンパク質の構造、タンパク質分解感受性、タンパク質 - タンパク質相互作用及び細胞内情報伝達に劇的な結果を生じ得る。シトルリン化は、タンパク質の構造及び機能に重大な変化をもたらすことがあるため、シトルリン化及び P A D 酵素が多く慢性疾患で認められることは驚くことではない。さらに、アルギニンからシトルリンへの転換は、比較的高い細胞内カルシウム濃度で Ca^{2+} に依存する形で触媒される。細胞内可溶質及び核細胞質のカルシウム濃度は比較的低いため、 P A D は標準状態で不活性であるはずである。しかしながら、 P A D は、細胞外環境からのカルシウムイオンの流入及び細胞内のカルシウム貯蔵部位からの放出によりカルシウム濃度が上昇すると、損傷して瀕死状態にある細胞において活性化する。

【0005】

心筋層でシトルリン化される実際のタンパク質は、i) 心筋のシトルリン化タンパク質が循環自己抗体に対する免疫ターゲットであるかどうか、ii) 心筋のシトルリン化タンパク質がそれ自体自己免疫反応を誘発し得るかどうか、iii) 心筋のシトルリン化タンパク質が心臓の構造または機能への表現型修飾に直接介在するかどうか同様、解明されていない。心不全(HF)において心臓の収縮性及び構造の変化をもたらす心筋タンパク質のPTMについては先例がある。筋節タンパク質のリン酸化、酸化、アセチル化は、HFを伴う収縮能力の低下及び有害な心臓の再構成をもたらすタンパク質への構造的変化を生じる。しかしながら、心筋タンパク質のシトルリン化が同様の役割を果たすかどうかは解明されていない。

【0006】

神経変性疾患に関する健康情報の枠組みには、脳(中枢神経系の頭蓋内要素から成る)に影響する病的状態としても定義される脳疾患が含まれることがある。これには、大脳皮質、頭蓋内白質、大脳基底核、視床、視床下部、脳幹、小脳(MeSHの定義)などがある(ただし、これらに限定されない)。神経変性疾患の家族歴がある全ての個人が識別可能な遺伝子変異を有するわけではないことに留意することが重要である。これは、原因である遺伝子がまだ特定されていないこと、またはこの疾患が実際は遺伝子の変異によるものではないことが理由である可能性がある。

【0007】

シトルリン化されたタンパク質及び修飾されたアミノ酸残基の特定は課題であった。本願において、発明者らは、心血管疾患及び神経変性疾患のマーカーとして作用し得る修飾アミノ酸残基を示すシトルリン化タンパク質及びペプチドの例を提供する。

【発明の概要】

【0008】

要旨

以下の実施形態及びその態様は、代表的かつ実例であることを意図するシステム、組成物、及び方法と併せて説明及び解説するが、範囲を限定するものではない。

【0009】

本明細書では、心血管疾患を診断及び予測する方法を提供する。本方法は、心血管疾患の診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びかかる対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの量を検出することを含む。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示す。一実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示すシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの基準値に対する上昇である。別の実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示すシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベル基準値に対する低下である。代表的な実施形態において、表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示す1つ以上のシトルリン化タンパク質またはペプチドの存在は、心血管疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示すシトルリン化タンパク質またはペプチドのレベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、レベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示す表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示すタンパク質またはペプチドのシトルリン化レベルの上昇である。代表的な実施形態において、レベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示す表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示すタンパク質またはペプチドのシトルリン化レベルの低下である。いくつかの実施形態において、表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示すいくつかのペプチドのシトルリン化レベルの上昇、及び表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eに示すいくつかのペプチドのシトルリン化レベルの低下は、心血管疾患リスクの増加を示す。様々な実施形態において、シトルリン化は、表1A、表1B、表1C、表1D及び/または表1Eにおいて「Dea」と表示されるアルギニン残基で生じる。代表的な実施形態において、心血管

10

20

30

40

50

疾患は、虚血性心疾患（I S H D）、特発性筋疾患（I D C M）またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上である。

【0010】

本明細書では、それを必要とする対象において心血管疾患を治療する方法も提供する。この方法は、本明細書において説明される方法によって心血管疾患を診断すること、及び心血管疾患と診断された対象に対し、その対象の心血管疾患を治療するため有効量の治療薬を投与することを含む。代表的な実施形態において、心血管疾患は、虚血性心疾患（I S H D）、特発性筋疾患（I D C M）またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上である。

【0011】

本明細書では、筋萎縮性側索硬化症（A L S）を診断及び/または予測する方法を提供する。本方法は、A L Sの診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びその対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドを検出することを含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在はA L Sリスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、A L Sリスクの増加を示す。一実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの増加は、A L Sリスクの増加を示す。別の実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの低下は、A L Sリスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表2に示すシトルリン化ペプチドの存在はA L Sを示す。代表的な実施形態において、表2、3または4に示す1つ以上のシトルリン化ペプチドの存在はA L Sリスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表2、3または4に示すシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、A L Sリスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表2、表3、または表4に示すペプチドのシトルリン化の量の変化は、神経変性疾患リスクの増加を示す。様々な実施形態において、シトルリン化は、表2、表3または表4で「D e a」と表示されるアルギニン残基で生じる。

【0012】

本明細書では、それを必要とする対象においてA L Sを治療する方法も提供する。この方法は、本明細書で説明する方法によってA L Sを診断すること、及びA L Sと診断された対象に対し、その対象のA L Sを治療するため有効量の治療薬を投与することを含む。

【0013】

本明細書では、慢性神経変性疾患を診断及び/または予測する方法を提供する。本方法は、慢性神経変性疾患の診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びかかる対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドを検出することを含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は慢性神経変性疾患リスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す。一実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの増加は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す。別の実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの低下は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表5 A ~ 5 Bに示す1つ以上のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、神経変性疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す表5 A ~ 5 Bに示す1つ以上のペプチドまたはタンパク質のシトルリン化レベルの上昇である。代表的な実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す表5 A ~ 5 Bに示す1つ以上のペプチドまたはタンパク質のシトルリン化レベルの低下である。いくつかの実施形態において、表5 A ~ 5 Bに示すいくつかのペプチドのシトルリン化レベルの上昇、及び表5 A ~ 5 Bに示すいくつかのペプチドのシ

10

20

30

40

50

トルリン化の低下は、慢性神経変性疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、神経変性疾患の例としては、後天的脳損傷、慢性神経変性疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィ小体認知症、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、フリードライヒ運動失調症、脊髄性筋萎縮症、プリオン病、多発性硬化症、脳卒中、退化性神経疾患、脳炎、脊髄性筋萎縮症、及び／またはクロイツフェルト・ヤコブ病などがあるが、これらに限定されない。

【0014】

本明細書では、それを必要とする対象において慢性神経変性疾患を治療する方法も提供する。この方法は、本明細書で説明する方法によって慢性神経変性疾患を診断すること、及び慢性神経変性疾患と診断された対象に対し、その対象の慢性神経変性疾患を治療するため有効量の治療薬を投与することを含む。代表的な実施形態において、神経変性疾患の例としては、後天的脳損傷、慢性神経変性疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィ小体認知症、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、フリードライヒ運動失調症、脊髄性筋萎縮症、プリオン病、多発性硬化症、脳卒中、退化性神経疾患、脳炎、脊髄性筋萎縮症、及び／またはクロイツフェルト・ヤコブ病などがあるが、これらに限定されない。

10

【0015】

本明細書では、後天的脳損傷を診断及び／または予測する方法を提供する。本方法は、後天的脳損傷の診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びかかる対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドを検出することを含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は後天的脳損傷リスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。一実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの増加は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。別の実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの低下は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表6A～6Bに示す1つ以上のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表6A～6Bに示す1つ以上のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、後天的脳損傷リスクの増加を示す表6A～6Bに示す1つ以上のペプチドまたはタンパク質のレベルの上昇である。代表的な実施形態において、シトルリン化レベルの変化は、後天的脳損傷リスクの増加を示す表6A～6Bに示す1つ以上のペプチドまたはタンパク質のシトルリン化レベルの低下である。いくつかの実施形態において、表6A～6Bに示すいくつかのペプチドのシトルリン化レベルの上昇、及び表6A～6Bに示すいくつかのペプチドのシトルリン化の低下は、後天的脳損傷リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、後天的脳損傷には、外傷性脳損傷(TBI)、脳卒中、脳疾患、腫瘍、出血、及び他の種類の後天的に得た脳損傷が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0016】

本明細書では、それを必要とする対象において後天的脳損傷を治療する方法も提供する。この方法は、本明細書で説明する方法によって後天的脳損傷を診断すること、及び後天的脳損傷と診断された対象に対し、その対象の後天的脳損傷を治療するため有効量の治療薬を投与することを含む。代表的な実施形態において、後天的脳損傷には、外傷性脳損傷(TBI)、脳卒中、脳疾患、腫瘍、出血、及び他の種類の後天的に得た脳損傷が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0017】

参照する図面において、代表的な実施形態を説明する。本明細書で開示される実施形態及び図面は、限定するものではなく例証のためであるとみなすことが意図される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 8 】

【図 1】本発明の様々な実施形態に従って、心臓のシトルリン化されたプロテオームを示す。有意の p 値の群を有するシトルリン化タンパク質を (A) 細胞成分により及び (B) 分子機能により示す。詳細は表 1 A ~ F に見られる。(C) 4 ~ 12 % SDS PAGE を用いて対照及び HF 患者 (ISHD、IDCM) から採取した心臓のシトルリン化タンパク質の検出。デンストメトリー分析により、群間で有意な変化が無かったことが明らかとなった。

【図 2】本発明の様々な実施形態に従って、PAD2 で処理した試料を用いた 2DE DIGE 分析を示す。(A) 方法のセクションで述べるように、Cy2 (内部対照)、Cy3 (未処理)、及び Cy5 (処理) で標識された試料。(B) ネットワークによって記述したタンパク質：収縮性及びエネルギー産生。虚血において上方及び下方制御されたシトルリン化タンパク質を既知のヒトタンパク質相互作用のヒトの STRING データベース上にマッピングした。赤、下方制御されたと示されたタンパク質、緑、上方制御されたタンパク質、及び青 = タンパク質 - タンパク質相互作用の相手。以下の略語を用いた：FLNC：フィラミン C、LDB3：LIMドメイン結合タンパク質 3、MYBPC：ミオシン結合タンパク質 C、心臓型、MYOZ2：ミオゼニン - 2、TNNT3：トロポニン I、MYH：ミオシン、CRYAB：アルファクリスタリン B 鎖、VIM：ATP 合成酵素サブユニットアルファ、AHNAK：神経芽細胞分化関連タンパク質、HSP90A A1：熱ショックタンパク質 HSP90 - アルファ、HSPD1：60 kDa 熱ショックタンパク質、PP1A：ペプチジル - プロリルシス - トランス異性化酵素 A、FABP3：脂肪酸結合タンパク質。

【図 3】本発明の様々な実施形態に従って、アクチン結合試験を示す。A) TM (0.5 μ M ~ 2 μ M) の濃度を増加させながら、F - アクチンまたは B) アクチン - HMM 及び C) TnI (0.5 μ M ~ 2 μ M) と共に、40 mM の Tris - HCl (pH 7.6)、100 mM の NaCl、5 mM の MgCl₂、及び 1 mM DTT を含有する緩衝液中で培養した。TM の F - アクチンへの結合を 25 で 30 分間行い、Beckman モデル TL - 100.2 にて 20、60、000 rpm で 25 分間超遠心分離した。ペレット及び上澄み液 (未結合のタンパク質) の両方を分析した。代表的な銀染色ゲルが上澄み液とペレットのタンパク質組成を示す。3 組のゲルをデンストメトリーで分析した。それぞれのデータポイントは、その 3 組のゲルから得られた値の平均値 (及び範囲) である。

【図 4】様々な実施形態に従って、筋節タンパク質のシトルリン化、生化学的及び生理学的効果を示す。A) シトルリン化 F - アクチン及び / またはシトルリン化 HMM によるアクトミオシン HMM - ATP アーゼ活性の制御を示す。B) TM によるアクトミオシン HMM - ATP アーゼ活性の阻害を示す。ATP アーゼ活性は TM 濃度の関数として測定した。結果は、それぞれの TM 濃度でそれぞれのタンパク質についての 4 つの独立した実験の平均値である。試験条件：0.2 mg / ml F - アクチン、0.02 mg / ml HMM、10 mM Hepes (pH 7.5) 中 0 ~ 2.0 μ M TM、30 mM NaCl、5 mM MgCl₂、4 mM ATP。PAD2 処理により筋フィラメントカルシウム感受性が低下した。C) 未処理の対照群 (3 匹のマウスからの n = 8 の筋細胞、グレーの丸) 及び PAD2 処理群 (3 匹のマウスからの n = 8 の筋細胞、白丸) から膜透過処理した未処理の筋細胞についての力 - カルシウムの関係を示す。D) 2 つの群間に最大カルシウム活性化力 (Fmax) の差は無かった。E) PAD2 処理により、EC50 (50 % Fmax を生じるのに必要なカルシウム) が有意に増加し (p = 0.009)、カルシウム感受性の低下が示唆された。F) ヒル計数 (nH) は PAD2 処理によって低下する傾向にあったが (パネル C の曲線の急勾配を参照)、一方でその差は有意でなかった (p = 0.34)。

【図 5】本発明の様々な実施形態に従って、A、B) 対照マウスから採取した心臓、C) マウスケラチノサイト及び D) リポ多糖で活性化されたマウスマクロファージ細胞株の PAD アイソフォームの発現レベルの RT - PCR 分析を示す。PCR 産物の PAD2 は全ての種類の試料で見られ、PAD4 及び PAD1 は心臓線維芽細胞、ケラチノサイト、マ

10

20

30

40

50

クロファージ細胞株で見られる。PAD3は検出されていない。(分子量：PAD1 285bp、PAD2 390bp、PAD3 200bp、PAD4 550bp)。

【図6】本発明の様々な実施形態に従って、心不全群、虚血群及びIDCM群間で上方/下方制御されたシトルリン化タンパク質を示す。

【図7】本発明の様々な実施形態に従って、収縮性タンパク質のシトルリン化が制御機能の種々の態様に影響することがあることを示す。それによって、構造変化が引き起こされるか、あるいはアクチン活性化されたPi放出及びATPアーゼサイクルの完成に必要なコンフォメーションが安定化されることがある。

【図8】本発明の様々な実施形態に従って、神経変性疾患に係わるタンパク質のシトルリン化を確認するSWATH-MS技術の利用を示す。

【図9】本発明の様々な実施形態に従って、シトルリン化スペクトルライブラリファイルを加工するための概略的なバイオインフォマティクスワークフローを示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

本明細書で引用される全ての参照は、その参照により全体が記載されているかのように組み込まれる。別途定義されていない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における普通の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012)、Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008)、Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006)、Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013)、Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012)、及びGreen and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)は、本出願で使用される用語の多くに対する一般的な指針を当業者に提供する。抗体の調製方法を参照するには、以下を参照されたい。Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013)、Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7): 511-9、Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, U.S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec)、及びRiechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Mar 24, 332(6162): 323-7。

【0020】

当業者は、本明細書に記載のものと同様もしくは等価で、本発明の実施に使用し得る多くの方法及び物質を認識するであろう。本発明の他の特徴及び利点は、例として本発明の

10

20

30

40

50

実施形態の様々な特徴を説明する添付の図面と併せて、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。実際は、本発明は記載された方法及び物質に何ら限定されるものではない。便宜上、本明細書で、すなわち明細書、実施例及び添付された特許請求の範囲で使用される特定の用語をここにまとめる。

【0021】

別途述べられていない限り、もしくは文脈から默示的に示されない限り、以下の用語及び語句は以下で提供される意味を有する。別途明記されていない限り、もしくは文脈から明白でない限り、以下の用語及び語句は、その用語または語句が関連する技術分野で獲得した意味を除外しない。発明の範囲は請求項のみにより限定されるため、定義は特定の実施形態を説明するために提供するものであり、請求される発明を限定するものではない。別途定義されていない限り、本明細書で使用する技術語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の普通の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。

10

【0022】

用語「マーカー」または「バイオマーカー」は本明細書において互換的に使用され、本発明における文脈において、対照群の対象（例えば、診断が陰性の対象、正常または健常の対象）から採取した比較試料の対照値、例えば代表値または平均値から成る対照値と比較して、特定の疾患または障害を有する患者から採取した試料に差次的に存在する、特定のシトルリン化されたアミノ酸残基または酵素自体、すなわちPAD1、PAD2、PAD3、またはPAD4（特定の特異的同一性または見かけの分子量の）を有するタンパク質またはペプチドのことをいう。バイオマーカーは、抗体または質量分析法により検出することができる特定のペプチドまたはタンパク質（表1～10）として測定することができる。いくつかの実施形態において、質量分析法もしくは他の分析結果、または多数の抗体を用いて多数のバイオマーカーを測定することができ、個々のバイオマーカー間の差、及び/または部分的もしくは完全な分析結果を用いて診断することができる。これは、酵素またはそれがシトルリン化したタンパク質を、単独または一緒に検出することを含むことができる。

20

【0023】

用語「差次的に存在」または「レベルの変化」は、対照群の対象と比較して特定の疾患また障害を有する患者から採取された試料に存在するマーカーの量及び/または頻度の相違のことをいう。例えば、マーカーは、疾患または障害を有する患者の試料に対照値（例えば、対照群の対象の試料から測定された値）と比較して高値もしくは低値で存在することがあり得る。あるいは、マーカーは、対照群の対象と比較して患者の試料に、より高頻度もしくは低頻度で検出されることがあり得る。マーカーは、2つ以上の特定の修飾されたアミノ酸残基及び/または酵素自体の間の差異の比だけでなく、量、頻度、またはこれらの両方の観点で差次的に存在することができる。一実施形態において、本明細書に記載の修飾されたタンパク質及びペプチドの、未修飾のタンパク質及びペプチドに対する比の増加は、本明細書に記載の疾患のいずれか1つ以上の診断に役立つ。実施形態において、本明細書に記載のタンパク質及びペプチドのシトルリン化の増加は、本明細書に記載の修飾された（シトルリン化された）タンパク質及び/またはペプチドの、未修飾の（シトルリン化されていない）タンパク質及び/またはペプチドに対する比の増加のことをいう。一実施形態において、本明細書に記載の修飾されたタンパク質及びペプチドの、未修飾のタンパク質及びペプチドに対する比の低下は、本明細書に記載の疾患のいずれか1つ以上の診断に役立つ。実施形態において、本明細書に記載のタンパク質及びペプチドのシトルリン化の減少は、本明細書に記載の修飾された（シトルリン化された）タンパク質及び/またはペプチドの、未修飾の（シトルリン化されていない）タンパク質及び/またはペプチドに対する比の低下のことをいう。

30

40

【0024】

マーカー、化合物、組成物、もしくは物質は、試料中のマーカー、化合物、組成物、または物質の量が別の試料中のマーカー、化合物、組成物、もしくは物質の量、もしくは対照値と統計的に有意に異なる場合、試料中に差次的に存在する。例えば、化合物は、それ

50

が他の試料（例えば、対照）に存在するより、少なくとも約 120%、少なくとも約 130%、少なくとも約 150%、少なくとも約 180%、少なくとも約 200%、少なくとも約 300%、少なくとも約 500%、少なくとも約 700%、少なくとも約 900%、または少なくとも約 1000% 多く、あるいは少なくとも存在する場合、またはそれがあつた試料で検出できて他の試料では検出できない場合、差次的に存在する。

【0025】

また、あるいはさらに、マーカー、化合物、組成物、もしくは物質は、特定の疾患または障害を有する患者の試料のマーカーなどの検出頻度が、健常な個人から得た対照試料の検出頻度または対照値より統計的に有意に高いもしくは低い場合、試料間で差次的に存在する。例えば、ある組の試料で、他の組の試料より、バイオマーカーが少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 100% 高頻度もしくは低頻度で検出される場合、バイオマーカーはその 2 組の試料間で差次的に存在する。上記の代表的な値にもかかわらず、マーカーが差次的に存在するかどうか判定する統計的な有意差を表すカットオフポイントなどを当業者が決定できることが期待される。

10

【0026】

「診断」は、ある生理学的状態の存在または性質を特定することを意味し、特定の疾患もしくは障害を発症するリスクがある患者を特定することを含む。診断方法は感度と選択性が異なる。診断分析の「感度」とは、検査結果が陽性の罹患個人の割合（「真陽性の割合」）である。検査で検出されない罹患個人は「偽陰性」である。病気ではなく検査結果が陰性の対象は「真陰性」である。診断分析の「選択性」は、1 マイナス偽陽性率であり、ここで「偽陽性」率は検査結果が陽性で疾患が無い対象の比率と定義される。ある特定の診断方法がある状態の明確な診断ができないとしても、その方法が診断に役立つ陽性の兆候を提供できれば十分である。

20

【0027】

用語「検出」、「検出する」などは、バイオマーカーを検出するまたは疾患または障害を検出する（例えば、陽性の検査結果が得られた場合）という文脈において使用される。後者の文脈においては、「検出する」と「診断する」は同義語と考えられる。

30

【0028】

「を示す」または「のリスクがある」は、正常な対象と比較して、すなわち対照群、例えば患者集団と比較してリスクが高いことを意味するものとする。従って、特定のマーカーを有する対象は、特定の疾患または障害のリスクが高く、追加試験が必要であると確認される可能性がある。「リスクの増大」または「リスクの上昇」は、例えば対象が障害を有する確率の統計的に有意なあらゆる増加を意味する。そのリスクは、比較を行う対照群に対して、好ましくは少なくとも 10%、より好ましくは少なくとも 20%、さらにより好ましくは少なくとも 50% 高い。

【0029】

マーカーの「試験量」は、試験される試料中のマーカーの量のことをいう。試験量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、信号の相対強度）のいずれかであることができる。

40

【0030】

マーカーの「診断量」は、特定の疾患または障害の診断と一致する対象の試料中のマーカーの量のことをいう。診断量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、信号の相対強度）のいずれかであることができる。

【0031】

マーカーの「対照量」は、試験のマーカー量と比較すべき任意の量または量の範囲であることができる。例えば、マーカーの対照量は、診断しようとする疾患または障害に罹患していない人のマーカーの量であることができる。対照量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、信号の相対強度）のいずれかであることができる。

50

【 0 0 3 2 】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」ならびに「タンパク質」は、本明細書において α -アミノ酸残基、特に天然に存在する α -アミノ酸のポリマーに言及するのに互換的に用いられる。この用語は、天然由来のアミノ酸ポリマーに関してだけでなく、1つ以上のアミノ酸残基が相当する天然由来のアミノ酸の類似物もしくは模倣物であるアミノ酸ポリマーにも適用される。ポリペプチドは、例えば、糖質残基の付加による糖タンパク質の形成、リン酸化によるリンタンパク質の形成、及び多くの化学修飾（例えば、酸化、脱アミド化、アミド化、メチル化、ホルミル化、ヒドロキシメチル化、グアニジン化）に加え、分解、還元、または架橋により、修飾することができる。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、タンパク質の未修飾の形態と修飾された形態の全てを含む。ペプチドは、シトルリン化された残基を有することがある、もしくは P A D 酵素の一部である。

10

【 0 0 3 3 】

「検出可能な部分」または「標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、もしくは化学的方法により検出可能な組成物のことをいう。例えば、有用な標識としては、 ^{32}P 、 ^{35}S 、蛍光染料、高電子密度試薬、酵素（例えば、E L I S A に通常使用されるような酵素）、ビオチン-ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なハプテン及びタンパク質、または標的に相補的な配列を有する核酸分子などがある。検出可能な部分はしばしば、例えば、放射性、色素生産性、または蛍光性の信号のような、試料中の結合した検出可能な部分の量を定量化するのに用いることができる測定可能な信号を発生する。この信号の定量は、例えば、シンチレーションの計数、デンストメトリー、フローサイトメトリー、またはシトルリン化された可能性がある残基または P A D 酵素の一部を有する無傷のタンパク質またはペプチドの質量分析による直接分析（1つ以上のペプチドを評価することができる）によって実現できる。タンパク質またはペプチドの一部としてシトルリン化された A r g は、M S もしくは化学的誘導体化により直接検知することができる。抗体やアプタマーを含むがこれらに限定されないあらゆる捕獲試薬を、本明細書に記載のシトルリン化ペプチドの検出に用いることができる。

20

【 0 0 3 4 】

「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子（単数または複数）またはこれらのフラグメントによって実質的にコード化されたポリペプチドリガンドをいい、エピトープ（例えば抗原）と特異的に結合してこれを識別する。識別される免疫グロブリン遺伝子としては、カッパならびにラムダ軽鎖定常領域遺伝子、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンならびにミュー重鎖定常領域遺伝子、及び種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子がある。抗体は、例えば、無傷の免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼによる消化によって産生される十分に特性評価されたフラグメントとして存在する。これには、例えば、F a b ' 及び F (a b) ' . s u b . 2 のフラグメントが含まれる。本明細書で使用される用語「抗体」にはさらに、抗体全体の修飾により産生される抗体フラグメント、または新たに組み換え D N A 法を用いて合成された抗体フラグメントのいずれかも含まれる。これにはさらに、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ型抗体、ヒト化抗体、または単鎖抗体も含まれる。抗体の「F c」部分は、1つ以上の重鎖定常領域、C H 1、C H 2、及び C H 3 を含むが、重鎖可変領域は含まない、免疫グロブリン重鎖の抗体の部分という。

30

40

【 0 0 3 5 】

「結合試験」は、バイオマーカーが抗体などの物質と結合することにより検出され、それにより検出工程が実施される生化学的検査を意味する。この検出工程には、放射性または蛍光性の標識などを含むことができる。この検査はバイオマーカーの固定化を含むことができ、溶液中で行ってもよい。さらに、シトルリン化された残基への化学結合は直接生じることあり得る。

【 0 0 3 6 】

50

「免疫学的検査」は、抗原（例えば、マーカー）と特異的に結合する抗体を用いる検査である。免疫学的検査は、抗原を単離し、標的とし、かつ／または定量するため特定の抗体の特異的な結合特性を使用することが特徴である。

【0037】

抗体に、「特異的に（もしくは選択的に）結合する」または「と特異的に（もしくは選択的に）免疫反応性の」という語句は、タンパク質もしくはペプチドに言及する場合、タンパク質及び他の生物製剤の不均一な集団におけるタンパク質の存在を決定する結合反応をいう。従って、所定の免疫学的検査の条件の下で、特定の抗体は、特定のタンパク質にバックグラウンドの少なくとも2倍結合し、試料中に存在するその他のタンパク質には実質的に有意な量で結合しない。前述の条件での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性に関して選択される抗体を必要とする可能性がある。特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するため、多様な様式の免疫学的検査を用いることができる。例えば、固相ELISA免疫学的検査は、あるタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するためごく普通に用いられる（特異的免疫反応性の測定に用いることができる免疫学的検査の様式及び条件の説明については、例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照されたい）。

10

【0038】

シトルリン化を検出するための方法は、シトルリン化されたペプチド、ポリペプチド及びタンパク質の検出に用いられる質量分析法（MS）に基づいた方法をいう。この方法には、脱イミノ化がArgで生じた時の1Daのニュートラルロス、未修飾のシトルリンからのイソシアン酸及びタンパク質のシトルリン化の検出の診断マーカーとして用いられるイソシアン酸イオンのニュートラルロス、238Daまたは239Daの化学修飾がCit残基で生じる時の誘導体化（ペプチド及びタンパク質のレベルでモニターできる）、ピーズ/カラム/基質に固定化され、低pHでシトルリン残基のウレイド基と排他的に反応するグリオキサル誘導体の特異的反応に基づくシトルリン化ペプチド（またはタンパク質）の濃縮が含まれるが、これらに限定されない。同様に、多重反応または選択的反応のモニタリングのようなターゲットメソッドを用いるMSは、直接修飾ペプチドの定量に用いることができる。いくつかの実施形態において、濃度が既知の標識化された（例えば、¹⁵Nで標識化または付加的な安定同位体で化学的に標識された）ペプチドを試料に添加し、内在性の（非標識の）対応するペプチドと直接比較することで定量化が可能となる（内在ペプチドの同位体標識化ペプチドに対する比、または同位体標識化ペプチドの正確な量が既知の場合は絶対量に基づく）。

20

30

【0039】

用語「対象」、「患者」または「個人」は一般にヒトをいうが、本発明の方法はヒトに限定されず、他の動物（例えば、鳥類、爬虫類、両生類、哺乳類）、特にアルブミンが種間で相同であるため哺乳類において有用であろう。

【0040】

「試料」は本明細書においてその最も広い意味で用いる。試料は、血液、血清、血漿、涙、眼房水ならびに硝子体液、脊髄液を含む体液、細胞もしくは組織調製物の可溶性画分、または細胞を増殖させた培地、または細胞もしくは組織から単離もしくは抽出された膜、ポリペプチド、または溶液中のペプチド、もしくは基質に結合したペプチド、細胞、組織、組織プリント、指紋、皮膚もしくは毛髪、これらのフラグメントならびに誘導体を含むことができる。被検試料は通常、血液、血漿、及び血清を含む血液製剤の誘導体を含む。

40

【0041】

用語「特定のPADアイソフォームの調節」は、遺伝子療法、siRNA、既知のPAD阻害剤、または部位特異的突然変異誘発法を用いる内在性PADアイソフォームの活性の増加または減少を含むが、これらに限定されない。

【0042】

50

本明細書で用いられる用語「ペプチド」は、通常長さが2から約30残基の、もしくは約40残基の、もしくは約50残基の、もしくは約60残基の、もしくは約70残基の範囲のアミノ酸残基のポリマーをいう。特定の実施形態において、ペプチドの長さは、約2、3、4、5、7、9、10、または11残基から約60、50、45、40、45、30、25、20、または15残基の範囲にある。特定の実施形態において、ペプチドの長さは、約8、9、10、11、または12残基から約15、20、または25残基の範囲にある。特定の実施形態において、ペプチドを含むアミノ酸残基は「L-型」アミノ酸残基であるが、様々な実施形態において「D」アミノ酸がペプチドに組み込まれることがあることが認められる。ペプチドには、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然由来のアミノ酸、及び天然由来のアミノ酸ポリマーの人工の化学的類似物であるアミノ酸ポリマーも含まれる。さらに、この用語は、ペプチド結合または他の「修飾された結合」で結合したアミノ酸に適用される（例えば、ペプチド結合が α -エステル、 β -エステル、チオアミド、ホスホンアミド、カルバメート、ヒドロキシル化などで置換される場合（例えば、Spatola, (1983) Chern. Biochem. Amino Acids and Proteins 7:267-357を参照されたい）、アミドが飽和アミンで置換される場合（例えば、参照により本明細書に組み込まれている Skiles et al., U.S. Pat. No. 4,496,542、及び Kaltenbronn et al., (1990) Pp. 969-970 in Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, The Netherlandsなどを参照されたい）。

10

20

【0043】

シトルリン化（脱イミノ化とも呼ばれる）は、タンパク質内でのアミノ酸であるアルギニンのシトルリンへの変換を含むPADで触媒される翻訳後タンパク質修飾である。多くの自己免疫疾患の発生病理におけるシトルリン化タンパク質の関与は確立されている。例えば、タンパク質のシトルリン化は関節リウマチ（RA）の一因となる自己抗体の生成に直接関連している。しかしながら、PAD活性化の正確な状況及び根本的な目的及び結果として生じる細胞内のタンパク質のシトルリン化は、完全には分かっていない。さらに、シトルリン化タンパク質を標的とする自己抗体の産生は、例えば、多発性硬化症、乾癬、散発性クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病及びアルツハイマー病（AD）などの他の多くの自己免疫疾患に係わっている。シトルリン化タンパク質及びタンパク質配列におけるシトルリン化部位についての知見から、これらのシトルリン化タンパク質の病原学的重要性及び機能についての非常に有益な情報を得ることができる。本明細書では、シトルリン化タンパク質及びペプチドを含む、心血管疾患及び神経変性疾患を予測する指標となる新規なバイオマーカーを提供する。

30

【0044】

シトルリン化は、心疾患を検出するための（未修飾/非シトルリン化の）自己抗原の（修飾/シトルリン化された）自己抗原に対する比の検出または測定に用いることができる自己抗原と自己抗体の反応に関連している（バイオマーカーとしてのシトルリン化自己抗体/自己抗原）。さらに、シトルリン化自己抗体の検出は、リスクの層別因子として用いることができる。心不全（HF）の発症リスク及び心筋梗塞で死亡するリスクは年齢とともに増加する。シトルリン化は年齢と共に増加することが知られており、シトルリン化は心不全を予測する指標となる可能性がある。シトルリン化の原因であるPAD酵素を阻害すること（例えば、薬剤による阻害）は、治療標的となる可能性がある。

40

【0045】

タンパク質のシトルリン化は、アルツハイマー病（AD）などの特定の神経変性疾患の発生病理における自己抗体の生成においてある役割を果たす。シトルリン化は、タンパク質内の全体的な電荷分布を変えて、三次構造を変える可能性があるため、これらのPAD発現細胞中の多くのシトルリン化タンパク質は、特にそれらが細胞から放出されそれにより免疫モニタリングに利用しやすくなる場合は、免疫原性を有する可能性のある非ネイティブ型のコンフォメーションをとる可能性がある。

50

【 0 0 4 6 】

シトルリン化は、神経変性疾患を検出するための（未修飾／非シトルリン化の）自己抗原の（修飾／シトルリン化された）自己抗原に対する比の検出または測定に用いることができる自己抗原と自己抗体の反応に関連している（バイオマーカーとしてのシトルリン化自己抗体／自己抗原）。シトルリン化は年齢と共に増加することが知られており、シトルリン化の増加は神経変性疾患を予測する指標となる可能性がある。シトルリン化の原因であるPAD酵素を阻害すること（例えば、薬剤による阻害）は、治療標的となる可能性がある。

【 0 0 4 7 】

ペプチジル - シトルリンの検出 - 他の方法との比較

現在のシトルリン化についての研究は、例えば、多発性硬化症及び関節リウマチ（RA）などの自己免疫疾患におけるその役割に集中している [Baka Z, et al. Citrullination under physiological and pathological conditions. Joint Bone Spine 2012, 79: 431 - 436、De Ceuleneer M, et al. In vivo relevance of citrullinated proteins and the challenges in their detection. Proteomics 2012, 12: 752 - 760]。これに関連して、タンパク質中のシトルリン化部位の正確な知見から、これらのシトルリン化タンパク質の病原学的重要性について非常に有益な情報が得られる。しかしながら、高処理量形式においてペプチドレベルでシトルリン化を正確に検出することができる技術はほとんど存在しない。

【 0 0 4 8 】

一般にMSによるPTMの分析は困難な課題であり、以下のような局所的なペプチドの特性に対するPTMの大きな影響に依存する：（i）PTMによって誘発されたペプチドの分子量の質量シフト、（ii）修飾ペプチドの総数、（iii）MS及びMS/MS分析の間の修飾の安定性、及び（iv）ペプチドのイオン化効率に対する修飾の影響。シトルリン化は正規のアルギニン残基と比較して名目上0.9802ダルトンの質量増加をもたらすだけであることから、シトルリン化タンパク質／ペプチドを非PTMの形態と区別することが困難であるため、シトルリン化は複雑であり偽陽性を生じる傾向がある。通常適用されるショットガンタイプ液体クロマトグラフィタンデム型MS（LC-MS/MS）法は、このような場合に同様な質量増加（特に通常生じるグルタミンやアスパラギン残基の脱アミド化）をもたらす¹³C同位体の誤認または他の修飾の誤認を引き起こす可能性がある自動データベーススクリーニングに依存する。¹³C同位体はアルギニンのシトルリンへの変換（0.9802 Da）よりわずかに大きい質量増（1.0036 Da）を引き起こすため、¹³C同位体の誤認は十分小さい親イオンの質量許容差（< 5 ppm）を有するデータベースを検索することで防ぐことができる [De Ceuleneer M, et al. In vivo relevance of citrullinated proteins and the challenges in their detection. Proteomics 2012, 12: 752 - 760、Rajmakers R, et al. Elevated levels of fibrinogen-derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res Ther 2012, 14: R114]。しかし、脱アミド化は質量だけに基づいてシトルリン化と区別することができない。脱アミド化ではペプチドの荷電した残基の数は変化しないが（LC-MSに用いられる酸性条件下）、一方でアルギニンのシトルリンへの変換では正電荷が中和される。シトルリン化は正電荷の消失をもたらし、それによってアルギニンの場合の11.41からシトルリンの場合の5.91への等電点の移動が生じる。従って、シトルリン化によって非修飾及び／または脱アミノ化ペプチドと比較してペプチドの全体的な疎水性が増加するため保持時間の変化が生じるが、これはペプチドが脱アミノ化ではなくシ

10

20

30

40

50

トルリン化されたことの証拠である[Raijmakers R, et al. Elevated levels of fibrinogen-derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res Ther 2012, 14:R114.]. しかし、現在の方法では、複数の試料にわたって、シトルリン化ペプチドを、迅速に、一貫して、再現性良く、正確に、かつ高感度で検出し定量することは依然課題である。

【0049】

シトルリン化標的タンパク質の検出の他の方策を超えるSWATH MSの利点

タンパク質のシトルリン化の高処理分析に最も一般的に使用される質量分析法ベースの方法は、データ依存的分析(DDA)である[tahl DC, Set al. Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. J Am Soc Mass Spectrom 1996, 7:532-540, Yates JR, 3rd, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. Anal Chem 1995, 67:1426-1436]. しかし、定量化の場合の確率的前駆体の選択及びMS1イオン依存性により、包括性が妨げられる。数年前この限界を越えるため、Aebersoldのグループは、多重反応モニタリング(MRM)と類似の標的法としてSWATH MSを考案した。SWATH MSは、データ非依存的分析(DIA)を標的化データ抽出と組み合わせる手法であり、これにより定量精度、再現性、ダイナミックレンジが同時に得られ、定量可能なペプチドの数が拡大する[Gillet LC1 NP TS, Rost H, Selevs ek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra new concept for consistent and accurate proteome generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. Mol Cell Proteomics 2012, Liu Y, et al. Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research. Expert Rev Mol Diagn 2013, 13:811-825]. 高度にシトルリン化されたライブラリを作成することによって感度と定量精度が改善される。

【0050】

心血管疾患

本明細書では心血管疾患を診断及び/または予測する方法を提供する。本方法は心血管疾患の診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、及びその対象から採取した生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの量を検出することを含む。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は心血管疾患のリスクの増加を示す。一実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの増加は、心血管疾患リスクの増加を示す。別の実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの低下は、心血管疾患リスクの増加を示す。代表的な実施形態において、表1A、1B、1C、1D及び/または1Eに示す1つ以上のタンパク質またはペプチドのシトルリン化レベルの変化は、心血管疾患リスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、表1C、1D、1E、及び1Fにおいて「アップ」で示す表1C、1D、1E、及び1Fに示すタンパク質のシトルリン化の増

加は心血管リスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、表 1 C、1 D、1 E、及び 1 F において「ダウン」で示す表 1 C、1 D、1 E、及び 1 F に示すタンパク質のシトルリン化の減少は心血管リスクの増加を示す。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0051】

いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、虚血性心疾患の列（「I」）に「アップ」で示されているように、表 1 C のタンパク質のいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は虚血性心疾患（I S H D）を有するか、I S H D リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、表 1 A のペプチドのいずれか 1 つ以上にシトルリン化の存在またはシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は I S H D を有するか、I S H D リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、表 1 A のペプチドのいずれか 1 つ以上にシトルリン化の非存在またはシトルリン化の減少が認められる場合は、その対象は I S H D を有するか、I S H D リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、E S 1 タンパク質相同体、アコニテート水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェート脱水素酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、デルタ - 1 - ピロリン - 5 - カルボキシレート脱水素酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ビメンチンもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、神経芽細胞分化関連タンパク質 A H N A K もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、血清除去応答性タンパク質もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、エノイル - C o A 水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アコニテート水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、またはこれらの組み合わせのうちいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められた場合は、その対象は I S H D を有するか、I S H D リスクが高い。

【0052】

いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、特発性心筋症（I D C M）の列（「I D」）に「アップ」で示されているように、表 1 D のタンパク質のいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は I D C M を有するか、I D C M リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、表 1 A のペプチドのいずれか 1 つ以上にシトルリン化の存在またはシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は I D C M を有するか、I D C M リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、表 1 A のペプチドのいずれか 1 つ以上にシトルリン化の非存在またはシトルリン化の減少が認められる場合は、その対象は I D C M を有するか、I D C M リスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、A T P 合成酵素サブユニットアルファもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ミオゼニン - 2 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェート脱水素酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、E S 1 タンパク質相同体もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、及び / またはこれらの組み合わせのうちいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は I D C M を有するか、I D C M リスクが高い。

【0053】

いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、表 1 A ~ 1 F に示すタンパク質またはペプチドのうちいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は心血管疾患（I S H D、I D C M または I S H D と I D C M の両方）を有するかそのリスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、A T P 合成酵素サブユニットアルファ、もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェート脱水素酵素、もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、E S 1 タンパク質相同体もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、デルタ - 1 - ピロリン - 5 - カルボキシレート脱水素酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、エノイル - C o A 水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラ

10

20

30

40

50

グメント、電位依存性アニオン選択チャンネルプロテイン 1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アコニテート水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ピルビン酸脱水素酵素 E 1 コンポーネントサブユニットアルファ、体細胞型もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ピメンチンもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、三官能性酵素サブユニットベータもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ミオシン結合タンパク質 C、心臓型もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、塩化物細胞内チャンネルタンパク質 4 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、熱ショックタンパク質 H S P 9 0 - アルファもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、血清除去応答性タンパク質もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アルコール脱水素酵素 1 B もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、コハク酸脱水素酵素 [ユビキノン] 鉄 - 硫黄サブユニットもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、二重特異性タンパク質ホスファターゼ 3 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント (表 1 E) のうちいずれか 1 つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は心血管疾患 (I S H D、I D C M または I S H D と I D C M の両方) を有するか、そのリスクが高い。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、トロポニン I、アルファ - クリスタリン B 鎖、A T P 合成酵素カップリングファクター 6、ベータ - エノラーゼ、アデニル酸キナーゼイソ酵素 I またはこれらの組み合わせ (表 1 F) のうちいずれか 1 つ以上にシトルリン化の減少が認められる場合は、その対象は心血管疾患 (I S H D、I D C M または I S H D と I D C M の両方) を有するかそのリスクが高い。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

10

20

【 0 0 5 4 】

さらに本明細書では、心疾患の診断を必要とする対象から生物学的試料を採取すること、ペプチドに特異的に結合することができる抗体の有無を検出するために、その生物学的試料の検査にペプチドを用いること、そのペプチドに特異的に結合することができる抗体の存在が検出された場合に心血管疾患の存在を判定すること、及びそのペプチドに特異的に結合することができる抗体の存在が検出された場合に対象に心血管疾患の治療を指示することを含む方法も提供する。様々な実施形態において、ペプチドに特異的に結合することができる抗体の存在は、I S H D、I D C M、心不全、またはこれらの組み合わせのうちいずれか 1 つ以上を示す。いくつかの実施形態において、ペプチドは、トロポニン I、

30

NIDALSGMEGRK (SEQ ID

NO: 18), PRSFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 20), ESLDLRAHLK (SEQ ID NO: 19),

AEETQRSVNDLTSQRAK (SEQ ID NO: 24) もしくは FADLSEAANRNNDALRQAK (SEQ ID NO: 22)

を含むか、またはこれらのアミノ酸配列から成るか、あるいは本質的にこれらのアミノ酸配列から成る。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のシトルリン化ペプチドのペプチド配列は、少なくとも 9 5 %、9 0 %、8 0 %、7 0 %、または 6 0 % が表 1 A ~ 1 F のいずれかに示すペプチドと同一である。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のシトルリン化ペプチドのペプチド配列は、少なくとも 9 5 %、9 0 %、8 0 %、7 0 %、または 6 0 % が、

40

NIDALSGMEGRK (SEQ ID NO: 18), PRSFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 20),

ESLDLRAHLK (SEQ ID NO: 19), AEETQRSVNDLTSQRAK (SEQ ID NO: 24) または FADLSEAANRNNDALRQAK (SEQ ID NO: 22)

と同一である。様々な実施形態において、ペプチドの長さは試料中の抗体と結合するため

50

最適化されている。様々な実施形態において、シトルリン化ペプチドは、質量分析、高分解能質量分析、タンデム型質量分析、結合試験、免疫学的検査、SDS PAGE電気泳動、ウエスタンブロット解析、SWATHを含む質量分析におけるコンフォメーションを用いて検出される。

【0055】

様々な実施形態において、この方法はさらに、心血管疾患と診断された対象に治療を指示することを含む。様々な実施形態において、治療には、治療的ライフスタイル変更、治療薬、外科的治療またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがあるが、これらに限定されない。代表的な実施形態において、ライフスタイル変更には、健康食、身体活動、体重管理、ストレス管理、禁煙またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがある。代表的な実施形態において、治療薬としては、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンギオテンシンII受容体遮断薬（ARB）、ベータ遮断薬、アルドステロン拮抗薬、強心配糖体、利尿薬、血管拡張薬、抗不整脈薬、ヒトB型ナトリウム利尿ペプチド、強心薬、抗凝固剤、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ（PAD）酵素またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがある。代表的な実施形態において、外科的治療には、左室補助装置、心臓再同調療法（両心室ペーシング）、自動植込型除細動器、心室修復術、心臓移植、血管形成術、ステント、アテローム切除術、放射線療法、冠動脈バイパス移植術またはこれらの組み合わせの使用のいずれか1つ以上などがある。適切な治療は当業者にとっては明らかであろう。

【0056】

本明細書で述べるプロセス、検査及び方法の様々な実施形態において、基準値は、例えば表1A、1B、1C、1D、1E及び/または1Fに示すシトルリン化タンパク質もしくはシトルリン化ペプチドのレベルの変化に基づいている。一実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、心筋細胞における変化である。別の実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、非心臓細胞における変化である。付加的な実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、任意の細胞における変化である。付加的な実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、任意の体液における変化である。いくつかの実施形態において、基準値は、心血管疾患を有していない対象の集団におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化の平均値または中央値である。他の実施形態において、基準値は、心血管疾患を有するが治療を受けており、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現を示さないか減少を示す対象の集団のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化の平均値または中央値である。付加的な実施形態において、基準値は、例えば、診断時、治療前、治療後またはこれらの組み合わせなど、異なる（例えば、より早期の）時点で対象から採取された試料におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルの変化である。いくつかの実施形態において、心血管疾患は、ISHD、IDCM、心不全またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上である。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0057】

様々な実施形態において、心血管疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質もしくはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、基準値と比較して少なくとも、または約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%高い。様々な実施形態において、心血管疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質もしくはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、基準値と比較して、少なくとも、または約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍もしくはこれらの組み合わせの倍数高い。

【 0 0 5 8 】

様々な実施形態において、心血管疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質もしくはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、基準値と比較して、少なくとも、または約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % もしくは 1 0 0 % 低い。様々な実施形態において、心血管疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質もしくはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、基準値と比較して、少なくとも、または約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、2 5 倍、3 0 倍、3 5 倍、4 0 倍、4 5 倍、5 0 倍、5 5 倍、6 0 倍、6 5 倍、7 0 倍、7 5 倍、8 0 倍、8 5 倍、9 0 倍、9 5 倍、1 0 0 倍 もしくはこれらの組み合わせの倍数低い。

10

【 0 0 5 9 】

神経変性疾患

本明細書では、慢性神経変性疾患及び／または後天的脳損傷及び／または急性脳疾患を診断及び／または予測する方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、神経変性疾患を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、神経変性疾患及び／または後天的脳損傷及び／または急性脳疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの増加は、神経変性疾患及び／または後天的脳損傷及び／または急性脳疾患を示す。別の実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの減少は、神経変性疾患及び／または後天的脳損傷及び／または急性脳疾患を示す。代表的な実施形態において、表 2 ～ 1 0 に示す 1 つ以上のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、神経変性疾患を示す。代表的な実施形態において、表 2 ～ 1 0 に示す 1 つ以上のペプチドまたはタンパク質のシトルリン化の量の変化は、神経変性疾患を示す。いくつかの実施形態において、レベルの変化は、表 2 ～ 1 0 に示す 1 つ以上のシトルリン化ペプチドまたはシトルリン化タンパク質のレベルの上昇であり、慢性神経変性疾患を示す。いくつかの実施形態において、レベルの変化は、表 2 ～ 1 0 に示す 1 つ以上のシトルリン化ペプチドまたはシトルリン化タンパク質のレベルの減少であり、慢性神経変性疾患を示す。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

20

30

【 0 0 6 0 】

代表的な実施形態において、神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィ小体認知症、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、フリードライヒ運動失調症、脊髄性筋萎縮症、プリオン病、多発性硬化症、脳卒中、退行性神経疾患、脳炎、運動ニューロン疾患（MND）、脊髄小脳失調症（SCA）、脊髄性筋萎縮症（SMA）、またはクロイツフェルト・ヤコブ病などがあるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態において、生物学的試料は、血液、血漿、血清、尿または組織（組織生検材料）のいずれか 1 つ以上である。

【 0 0 6 2 】

様々な実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルは、質量分析、高分解能質量分析、タンデム型質量分析、結合試験、免疫学的検査、抗体結合もしくは免疫組織化学を用いて検出される。

【 0 0 6 3 】

本明細書では、それを必要とする対象においてALSを診断する方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態

50

において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、ALSを示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、ALSを示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの増加は、ALSを示す。一実施形態において、対象から採取された試料において、表2、表3、または表4のタンパク質のいずれか1つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象はALSを有するか、ALSを有するリスクが高い。別の実施形態において、対象から採取された試料において、

PSGVQMDPCCRALYDFEPENEGELGFK (SEQ ID NO: 306), QYMRRSTCTINYSK

(SEQ ID NO: 307), LILIARNK (SEQ ID NO: 308),

VIVVWVGTTNNHENTAEVAGGIEAIVQLINTRQPQAK (SEQ ID NO: 309),

EVDVGLAADVGTLQRLPK (SEQ ID NO: 310), HEEAPGHRPTTNPASK (SEQ ID NO:

311), GETPVNSTMSIGQARK (SEQ ID NO: 312), VRIQTQPGYANTLRDAAPK (SEQ ID

NO: 313), NVGCLQEALQLATSFAQLRLGDVK (SEQ ID NO: 314)

のペプチドまたはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象はALSを有するか、ALSを有するリスクが高い。代表的な実施形態において、SEQ ID NO: 306 ~ 314に示す配列を有するペプチド中のシトルリン化部位を表2に示す。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、SEQ ID NO: 315、SEQ ID NO: 316、SEQ ID NO: 317、SEQ ID NO: 318、SEQ ID NO: 319、SEQ ID NO: 320、SEQ ID NO: 321、SEQ ID NO: 322、SEQ ID NO: 323、SEQ ID NO: 324、SEQ ID NO: 325、SEQ ID NO: 326、SEQ ID NO: 327、SEQ ID NO: 328、SEQ ID NO: 329、SEQ ID NO: 330、SEQ ID NO: 331、SEQ ID NO: 332、SEQ ID NO: 333、SEQ ID NO: 334、SEQ ID NO: 335、SEQ ID NO: 336、SEQ ID NO: 337、SEQ ID NO: 338、またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上に示す配列を有するペプチドのいずれか1つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象はALSを有するか、ALSを有するリスクが高い。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のシトルリン化ペプチドの配列のそれぞれは、少なくとも100%、95%、90%、80%、70%、または60%がSEQ ID NO: 306 ~ 338のいずれかに示す配列と同一である。いくつかの実施形態において、対象から採取された試料において、SEQ ID NO: 339 ~ 474にいずれか1つ以上に示す配列を有するペプチドのいずれか1つ以上にシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象はALSを有するか、ALSを有するリスクが高い。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のペプチド配列のそれぞれは、少なくとも100%、95%、90%、80%、70%、または60%がSEQ ID NO: 339 ~ 474のいずれかに示す配列と同一である。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0064】

本明細書では、それを必要とする対象において神経変性疾患を診断する方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、慢性神経変性疾患を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、慢性神経変性疾患を示す。一実施形態

において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの増加は、慢性神経変性疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの減少は、慢性神経変性疾患を示す。一実施形態において、対象から採取された試料において、表5Aのタンパク質のいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性神経変性疾患を有するか、慢性神経変性疾患を有するリスクが高い。いくつかの実施形態において、シトルリン化ペプチドは脳に特有のものである。いくつかの実施形態において、シトルリン化ペプチドは脳に特有のものではない。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、SEQ ID NO: 355、SEQ ID NO: 402、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 348、SEQ ID NO: 363、SEQ ID NO: 428、SEQ ID NO: 373、SEQ ID NO: 315、SEQ ID NO: 316、SEQ ID NO: 340、SEQ ID NO: 377、SEQ ID NO: 331、SEQ ID NO: 332、SEQ ID NO: 325、SEQ ID NO: 375、SEQ ID NO: 429、SEQ ID NO: 414、SEQ ID NO: 313、SEQ ID NO: 366、SEQ ID NO: 360、SEQ ID NO: 423、SEQ ID NO: 405、SEQ ID NO: 439、SEQ ID NO: 321、SEQ ID NO: 475、SEQ ID NO: 476、SEQ ID NO: 477、SEQ ID NO: 478、SEQ ID NO: 479、SEQ ID NO: 480、SEQ ID NO: 481、SEQ ID NO: 482、SEQ ID NO: 483、SEQ ID NO: 484、SEQ ID NO: 485、SEQ ID NO: 486、SEQ ID NO: 487、SEQ ID NO: 488、SEQ ID NO: 489、SEQ ID NO: 490、SEQ ID NO: 491、SEQ ID NO: 492、SEQ ID NO: 493、SEQ ID NO: 494、SEQ ID NO: 495、SEQ ID NO: 496、SEQ ID NO: 497、SEQ ID NO: 498、SEQ ID NO: 499、SEQ ID NO: 500、またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上に示す配列(表5A)を有するペプチドのいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性神経変性疾患を有するか、慢性神経変性疾患を有するリスクが高い。代表的な実施形態において、上記の配列番号に示す配列を有するペプチド中のシトルリン化部位を表5Aに示す。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のシトルリン化ペプチドの配列のそれぞれは、少なくとも95%、90%、80%、70%、または60%が表5Aに示す配列と同一である。代表的な実施形態において、慢性神経変性疾患の診断に用いることができるペプチドは脳に特有のものであり、表5Aに示す配列のいずれか1つ以上を含むか、これらの配列から成るか、もしくは本質的にこれらの配列から成る。代表的な実施形態において、慢性神経変性疾患の診断に用いることができるペプチドは脳に特有のものではなく、SEQ ID NO: 501、502、503、506、またはこれらの組み合わせ(表5B)に示す配列から成るか、もしくは本質的にこれらの配列から成る。代表的な実施形態において、慢性神経変性疾患には、アルツハイマー病(AD)ならびに他の認知症、パーキンソン病(PD)ならびにPD関連疾患、プリオン病、運動ニューロン疾患(MND)、ハンチントン病(HD)、脊髄小脳失調症(SCA)、脊髄性筋萎縮症(SMA)またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがあるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0065】

本明細書では、それを必要とする対象における後天的脳損傷の診断方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は後天的脳損傷を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、後天的脳損傷を示す。一実施形態において、基準

値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの増加は、後天的脳損傷を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの減少は、後天的脳損傷を示す。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 265、SEQ ID NO: 285、SEQ ID NO: 505、SEQ ID NO: 506、SEQ ID NO: 507、SEQ ID NO: 508、SEQ ID NO: 509、SEQ ID NO: 510、SEQ ID NO: 511、SEQ ID NO: 512、SEQ ID NO: 513、SEQ ID NO: 514、SEQ ID NO: 515、SEQ ID NO: 516、SEQ ID NO: 517、SEQ ID NO: 518、SEQ ID NO: 519、SEQ ID NO: 520、SEQ ID NO: 521、SEQ ID NO: 522、SEQ ID NO: 523、SEQ ID NO: 524、SEQ ID NO: 525、SEQ ID NO: 526、SEQ ID NO: 527、SEQ ID NO: 528、SEQ ID NO: 529、SEQ ID NO: 530、SEQ ID NO: 531、SEQ ID NO: 532、SEQ ID NO: 533、SEQ ID NO: 534、SEQ ID NO: 535、SEQ ID NO: 536、SEQ ID NO: 537、SEQ ID NO: 538、SEQ ID NO: 539、SEQ ID NO: 540、SEQ ID NO: 541、SEQ ID NO: 542、SEQ ID NO: 543、SEQ ID NO: 544、SEQ ID NO: 545、SEQ ID NO: 546、SEQ ID NO: 547、またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上で示す配列を有するペプチドの1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は後天的脳損傷を有するか、後天的脳損傷を有するリスクが高い。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、表6A及び/または6Bに示す配列を有するペプチドのいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は後天的脳損傷を有するか、後天的脳損傷を有するリスクが高い。代表的な実施形態において、対象から採取された試料のシトルリン化ペプチドの配列のそれぞれは、少なくとも95%、90%、80%、70%、または60%が表6A及び/または6Bのいずれかに示す配列と同一である。代表的な実施形態において、後天的脳損傷には、外傷性脳損傷(TBI)、脳卒中、脳疾患、腫瘍、出血、及び他のあらゆる種類の後天的脳損傷が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0066】

本明細書では、それを必要とする対象において慢性脳疾患を診断する方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、慢性脳疾患を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、慢性脳疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの増加は、慢性脳疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの減少は、慢性脳疾患を示す。一実施形態において、対象から採取された試料において、表7の分泌タンパク質のいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性脳疾患を有するか、慢性脳疾患を有するリスクが高い。一実施形態において、対象から採取された試料において、表8の非分泌タンパク質のいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性脳疾患を有するか、慢性脳疾患を有するリスクが高い。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、シタキシン結合タンパク質1もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ヒストンH4もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、細胞質ダイニン1重鎖1もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ダイナミン-1もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ガンマ-エノラーゼもしくはそのシトルリン

化されたフラグメント、エンドプラスミン前駆体もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、熱ショック 70 kDa タンパク質 12A もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、セリン/スレオニン-タンパク質ホスファターゼ PP1-アルファ触媒サブユニットもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、カレルティキュリン前駆体もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、コロニン-1A もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、電子伝達フラビンタンパク質サブユニットベータもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ヘモグロビンサブユニットベータもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 3 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、26S プロテアソーム非 ATP アーゼ調節サブユニット 12 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、60S リボソームタンパク質 L4 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、60S 酸性リボソームタンパク質 P2 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、セブチン-7 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アラニン-tRNA リガーゼ、細胞質もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、もしくはこれらの組み合わせから選択された分泌タンパク質の 1 つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性脳疾患を有するか、慢性脳疾患を有するリスクが高い。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、シナプシン-1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アコニテート水添加酵素もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、コンプレキシン-1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、コンプレキシン-2 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、バンド 4.1 様タンパク質 3 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、シナプシン-2 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、AP2 関連タンパク質キナーゼ 1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、アルファ-アデュシンもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、AP-2 コンプレックスサブユニットベータもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ DCLK1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、グルタミナーゼ腎臓アイソフォームもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、イソシトレート脱水素酵素 [NAD] サブユニットアルファもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、セリン/スレオニン-タンパク質ホスファターゼ 2B 触媒サブユニットアルファアイソフォームもしくはそのシトルリン化されたフラグメント、もしくはこれらの組み合わせから選択された非分泌タンパク質の 1 つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は慢性脳疾患を有するか、慢性脳疾患を有するリスクが高い。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0067】

本明細書では、それを必要とする対象において急性脳疾患を診断する方法を提供する。この方法は、診断を必要とする対象からの試料採取及び対象から採取された生物学的試料中のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの検出を含む。いくつかの実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの存在は、急性脳疾患を示す。いくつかの実施形態において、基準値に対するシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、急性慢性脳疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの増加は、急性脳疾患を示す。一実施形態において、基準値に対するタンパク質のシトルリン化またはペプチドのシトルリン化のレベルの減少は、急性脳疾患を示す。一実施形態において、対象から採取された試料において、表 9 の分泌タンパク質のいずれか 1 つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は急性脳疾患を有するか、急性脳疾患を有するリスクが高い。一実施形態において、対象から採取された試料において、表 10 の非分泌タンパク質のいずれか 1 つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は急性脳疾患を有するか、急性脳疾患を有するリスクが高い。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、カリン関連 NEDD8 解離タンパク質 1 もしくはそのシトルリン化されたフラグメント、ペルオキシレドキシシン-5 もしくはそのシトルリン

化されたフラグメントまたはそれらの組み合わせから選択された分泌タンパク質のいずれか1つ以上にシトルリン化の変化が認められる場合は、その対象は急性脳疾患を有するか、急性脳疾患を有するリスクが高い。さらなる実施形態において、対象から採取された試料において、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G(I)/G(S)/G(O)サブユニットガンマ-3前駆体もしくはそのシトルリン化されたフラグメントにシトルリン化の増加が認められる場合は、その対象は急性脳疾患を有するか、急性脳疾患を有するリスクが高い。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

【0068】

本明細書では、それを必要とする対象において神経変性疾患を治療する方法も提供する。この方法は、本明細書で説明する方法によって神経変性疾患を診断すること、神経変性疾患と診断された対象に対し、その対象の神経変性疾患を治療するため有効量の治療薬を投与することを含む。代表的な実施形態において、神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィ小体認知症、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、フリードライヒ運動失調症、脊髄性筋萎縮症、プリオン病、多発性硬化症、脳卒中、退化性神経疾患、脳炎、またはクロイツフェルト・ヤコブ病などがあるが、これらに限定されない。様々な実施形態において、治療には、治療的ライフスタイル変更、治療薬、外科的治療またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがあるが、これらに限定されない。代表的な実施形態において、ライフスタイル変更には、健康食、身体活動、体重管理、ストレス管理、禁煙またはこれらの組み合わせのいずれか1つ以上などがある。

【0069】

代表的な実施形態において、アルツハイマー病の治療薬としては、コリネステラーゼ阻害剤（例えば、ドネペジル、リバスチグミン、ガランタミンなど）、メマンチン（ナメンダ）、ビタミンE、代替療法（例えば、カプリン酸及びココナッツ油、コンサーンズ、コエンザイムQ10、コーラルカルシウム、イチョウ、フベルジンA、オメガ-3脂肪酸、ホスファチジルセリン、トラミプロサート）、またはその組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。適切な治療及び投薬量は当業者にとっては明らかであろう。

【0070】

代表的な実施形態において、パーキンソン病の治療薬には、カルビドパノレボドパ、ドーパミン拮抗剤、モノアミン酸化酵素阻害剤、抗コリン薬、手術、ライフスタイル変更、代替療法（例えば、抗酸化剤のビタミンC及びE、地中海食、カルシウム及びビタミンD、コエンザイムQ10、葉酸塩（葉酸）、ショウガ（ショウキョウ）、イチョウ、緑茶ポリフェノール（GTP）、オオアザミ（マリアアザミ）、セントジョーンズワート（セイヨウオトギリソウ）、ビタミンB12）またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。適切な治療及び投薬量は当業者にとっては明らかであろう。

【0071】

代表的な実施形態において、ハンチントン病の治療法には、治療薬及び精神療法、言語療法、理学療法、作業療法またはこれらの組み合わせなどの療法などがある。ハンチントン病の代表的な治療剤には、テトラベナジン（ゼナジン）、抗精神病薬、（例えばハロペリドール（ハルドール）など）、アマンタジン、レベチラセタム（ケブラ）、クロナゼパム（クロノピン）またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。適切な治療及び投薬量は当業者にとっては明らかであろう。

【0072】

代表的な実施形態において、運動失調の治療薬には、リルゾール、抗グルタミン酸作動薬、ニコチン受容体拮抗薬、セトロニン作動療法、GABA作動療法、コリン作動療法、チャネル安定化療法（例えば、炭酸脱水酵素阻害剤など）、インスリン様成長因子、サプリメント（例えば、ビタミンEなど）またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。適切な治療及び投薬量は当業者にとっては明らかであろう。

【0073】

10

20

30

40

50

代表的な実施形態において、脊髄性筋萎縮症の治療法には、正しい食生活、治療薬及び精神療法、言語療法、理学療法、作業療法またはこれらの組み合わせなどの療法などがある。脊髄性筋萎縮症の治療薬には、例えば、バクロフェン、チザニジン、ならびにベンゾジアゼピンなどの痙攣を緩和する筋弛緩薬、顎の痙攣や流涎症を治療するボツリヌス毒素、アミトリプチリン、唾液過剰を治療するグリコピロレート及びアトロピンもしくは唾液腺へのボツリヌス毒素注射、抑鬱症を治療する抗鬱薬などがあるが、これらに限られない。適切な治療及び投薬量は当業者にとっては明らかであろう。

【0074】

代表的な実施形態において、プリオン病の治療薬には、キナクリン、ペントサン、ポリ硫酸塩（PPS）、四環性化合物またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。

10

【0075】

本明細書に記載のプロセス、検査及び方法の様々な実施形態において、基準値は、例えば、表2～10に示すシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化に基づく。一実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、神経細胞における変化である。別の実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、非神経細胞における変化である。付加的な実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、任意の細胞における変化である。付加的な実施形態において、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドのレベルの変化は、任意の体液における変化である。いくつかの実施形態において、基準値は、神経変性疾患を有していない対象の集団におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルの平均値または中央値である。他の実施形態において、基準値は、神経変性疾患を有するが治療を受けており、シトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現を示さないか減少を示す対象の集団のシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルの平均値または中央値である。付加的な実施形態において、基準値は、例えば、神経変性疾患の診断時、神経変性疾患の治療前、神経変性疾患の治療後またはこれらの組み合わせなど、異なる（例えば、より早期の）時点で対象から採取された試料におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルである。代表的な実施形態において、神経変性疾患には、ALS、アルツハイマー病、脳卒中、慢性脳疾患、急性脳疾患またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、シトルリン化の変化は、本明細書で定義される「差次的に存在する」シトルリン化のことをいう。

20

30

【0076】

様々な実施形態において、神経変性疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルは、基準値と比較して、少なくとも、もしくは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%高い。様々な実施形態において、神経変性疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルは、基準値と比較して、少なくとも、もしくは約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍またはこれらの組み合わせの倍数高い。代表的な実施形態において、神経変性疾患には、ALS、アルツハイマー病、脳卒中、慢性脳疾患、急性脳疾患またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。

40

【0077】

様々な実施形態において、神経変性疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルは、基準値と比較して、少なくとも、もしくは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%低い。様々な実施形態において、神経変性

50

疾患を有しているか、もしくは有していると疑われる対象におけるシトルリン化タンパク質またはシトルリン化ペプチドの発現レベルは、基準値と比較して、少なくとも、もしくは約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍またはこれらの組み合わせの倍数低い。代表的な実施形態において、神経変性疾患には、ALS、アルツハイマー病、脳卒中、慢性脳疾患、急性脳疾患またはこれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0078】

実施例1：実験方法

10

試薬及び材料

以下の試薬を入手した：ウサギ骨格筋PADカクテル(PAD)(SignalChem)、PAD2(Sigma)、ヘビーメロミオシン(HMM)、トロポミオシン(TM)(Sigma)、F-アクチン(Cytoskeleton, Inc)、心臓トロポニン(TnI)(Abcam)、抗修飾シトルリン抗体(Millipore)、配列決定グレードLys-Cタンパク質分解酵素(WAKO)、及びタンパク質分解酵素阻害薬カクテル(Roche)。

【0079】

ヒト心臓組織

左心室組織試料はインフォームドコンセント後に現地の倫理委員会の承認を得て、オーストラリア、シドニー大学のCris Dos Remediosから入手した。試料は、以前記載されたように、心臓移植術の際にHF患者(虚血性心疾患(ISHD)及び特発性心筋症(IDCМ)、それぞれn=10)及び非不全ドナー心臓(n=10)から採取した[Zhang P et al., Multiple reaction monitoring to identify site-specific troponin I phosphorylated residues in the failing human heart. Circulation 2012, 126:1828-1837]。

20

【0080】

マウス心臓組織及び新生仔筋細胞

30

雄C57BL/6マウス(n=3)(5日齢の新生仔マウス、Jackson Laboratories)を入手した。動物試験は、ジョンズ・ホプキンス大学動物実験委員会の承認を受け、規定されたNIH指針に従った。簡潔には、初代培養心室筋細胞を新生仔マウスから単離した。コラゲナーゼ消化単離筋細胞を、 Ca^{2+} 濃度を増大させながらバッファー中でインキュベートし、最終濃度をMEM培地と同様の1.2mM Ca^{2+} とした。細胞を、ラミニンをコートした6ウェルのプレートまたは60mmのシャーレに25,000桿状筋細胞/mlで播種した。5%CO₂で37℃で1時間インキュベートした後、培地を交換して付着していない細胞を除去した。

【0081】

タンパク質抽出及びSWATH MS

40

インシークエンスプロトコルを用いて、心臓を筋フィラメントリッチの画分と細胞質基質リッチの画分とに分画した[Kane LA et al. Subfractionation of heart tissue: the "in sequence" myofibrillar protein extraction of myocardial tissue. Methods Mol Biol 2007, 357:87-90]。亜画分からのタンパク質抽出及びLysCペプチドの生成は、濾過補助試料調製(FASP)プロトコル[24]を用いて行った。必要な場合、組み換えタンパク質またはインシークエンス画分をPADのカクテルと1:20の比で、100mM Tris、pH 7.6、5mM DTT、10mM CaCl₂中、37℃で2時間インキュベートした。消化前に5mM EDTAを添加して反応を停止した。TripleTOF6600質

50

量分析計 (Sciex) を、ペプチドのスペクトルライブラリを構築するためのデータ依存性取得とそれぞれの個別試料の分析のための SWATH-MS (データ依存性取得) の両方に用いた。生データを Protein Pilot (商標) ソフトウェア 5.0 で検索してスペクトルライブラリを作成した。個々の SWATH-MS のランを、筋フィラメントリッチの画分と細胞質基質リッチの画分の両方について、PAD (プラス及びマイナス PAD) の存在下もしくは非存在下で作成されたスペクトルライブラリとマッチングした。(データ補遺を参照されたい)。

【0082】

シトルリン化試料の作製

組み換えタンパク質及びインシュークエンスから得た画分を、PAD2 と 1:20 の比で、作業バッファー (100 mM Tris、pH 7.6、5 mM DTT、10 mM CaCl₂) 中 37 °C で 2 時間インキュベートした。5 mM EDTA を添加して反応を停止した。

10

【0083】

ペプチド、タンパク質、及びシトルリン化残基の統計的確認：合格基準

データ補遺に記載のワークフローを用いてバイオインフォマティクス分析を行った。本試験で用いるペプチドの正規化は iRT ペプチド保持時間に基づいたものであり、[Escher C, et al. Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides. Proteomics 2012, 12:1111-1121]、正規化された値を下流の分析に用いた。アンサンブルタンパク質 ID 登録番号を、それらの関連するコード化アンサンブル遺伝子のエントリーに戻ってマッピングした。データの解析及びマイニングは iProXpress (<http://proteininformationresource.org/iproxpress2>) [Natalie DA et al. Protein Ontology: a controlled structured network of protein entities. Nucleic Acids Res 2014, 42:D415-421] 及び Cytoscape [Saito R et al. A travel guide to Cytoscape plugins. Nat Methods 2012, 9:1069-1076] を用いて行った。それぞれのペプチドについてのクラスカル・ワリス検定 (ノンパラメトリック一元配置 ANOVA) を用いて p 値を算出した。生化学的変化の有意性は、全ての対データに関し差異についての t 検定 (p < 0.05) を行って判定した。特に明記していない限り、全ての生化学的検査は 3 回繰り返した。

20

30

【0084】

シトルリン化についての SDS-PAGE イムノブロット

1:2000 希釈の抗シトルリン (修飾) 抗体を 1 DE ウエスタンブロット (データ補遺を参照) に用いた。

【0085】

2 次元ゲル電気泳動 (2DE)

プロテオミクスデータの独立検証は、以前の報告通り、蛍光 2DE ゲル電気泳動 (2D-DIGE、pI レンジ及び SDS-PAGE レンジ) を用いて行った [Matt P et al. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. Physiol Genomics 2008, 33:12-17]。PAD2 による試料の処理を用いて、修飾タンパク質内の特定のアルギニン残基からグアニジノ基を除去し、処理後のタンパク質の電荷の変化に基づいてシトルリン化タンパク質を同定することができる (データ補遺を参照)。

40

【0086】

膜透過筋細胞

C57BL/6 マウスから採取した左心室組織を液体窒素で急速冷凍し、-80 °C で保

50

存した。分析のため、記載されたように組織を、0.3% Triton X-100、及びタンパク質分解酵素阻害薬ならびにホスファターゼ阻害薬の存在下で均質化した [Kirk JA et al. Cardiac resynchronization sensitizes the sarcomere to calcium by reactivating GSK-3beta. J Clin Invest. 2014, 1:129-38]。筋細胞を Triton X-100 を用いずに洗浄して界面活性剤を除去し、分離バッファーに再分散した。PAD2 を 10 mM Ca^{2+} 及び 50 mM DTT 中、37 で 60 分間活性化した。次いで、PAD2 で処理した筋細胞を 1:10 希釈の活性化 PAD2 に、分離バッファー中、室温で 30 分間曝露した。その後、筋細胞を、力変換器及びモーターアームに装着された直径 150 μm のミニューシアピン (Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canada) の先端にシリコンで接着した。筋節長をビデオカメラ (Imperx, Boca Raton, FL) でモニターし、High-speed Video Sarcomere Length Program (Aurora Scientific Inc.) によって算出した。筋細胞の筋節長は 2.1 μm に設定した。筋細胞の完全な活性化は実験の開始時及び終了時に発生し、記載されるように、>10% のランダウンがあった場合は筋細胞を廃棄した [Kirk JA et al. Cardiac resynchronization sensitizes the sarcomere to calcium by reactivating GSK-3beta. J Clin Invest. 2014, 1:129-38]。

【0087】

ATPアーゼの活性

HMM-ATPアーゼの活性は、以前記載された3回の独立した実験において分析した [White HD. Special instrumentation and techniques for kinetic studies of contractile systems. Methods Enzymol 1982, 85:698-708, Tauhata SB, et al. High affinity binding of brain myosin-Va to F-actin induced by calcium in the presence of ATP. J Biol Chem 2001, 276:39812-39818]。1回目の実験は、シトルリン化もしくは非シトルリン化HMM及び/またはF-アクチンを用い、一定のHMM及びF-アクチン濃度で行った。2回目は、TM濃度(シトルリン化または非シトルリン化)を上げてHMM-ATPアーゼの活性を測定した。3回目の実験のHMM-ATPアーゼの活性は、シトルリン化または非シトルリン化TnIを用い、一定のHMM、F-アクチン、及びTM濃度で測定した。それぞれの実験は、3重反復かつ3回の別個の時点で行った。

【0088】

アクチン結合実験

種々の濃度のシトルリン化タンパク質及び非シトルリン化HMM、TM、及び/またはTnIをF-アクチンに添加し、遠心分離して結合の程度を測定した。ペレット及び上澄み液を10% SDS PAGEを用いて分析し、以前記載されたように、それぞれのタンパク質の量をデンシトメトリーによって定量した [Skorzewski R et al. Effect of actin C-terminal modification on tropomyosin isoforms binding and thin filament regulation. Biochim Biophys Acta 2009, 2:237-243, Nascimento AA et al. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. J Biol Chem 1996, 271:17561-17569]。それぞれの試験は3重反復で行った。

【0089】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

製造元のプロトコルに従い、TRI試薬 (Sigma) を用いてマウス新生仔心筋細胞から全mRNAを抽出した。相補DNA (cDNA) は、SuperScript II First-Standard Synthesis System (Invitrogen) を用いて製造元の指示に従って生成した。RT-PCRは、PAD1、PAD2、PAD3、PAD4、及び β -アクチンに特異的なプライマーを用いて行った。PCR生成物を、1.8%アガロースゲル上で電気泳動によって分離しUV光で可視化した。それぞれの試験は2重反復で行った。

【0090】

1D-PAGE及びウエスタンブロット

製造元の指示に従い、ウェルあたり10 μ gのタンパク質を、12ウェルの4~12% NuPAGE Bis-Trisゲルを用いて1D-PAGEによって分離し、PVDF膜の上にブロットした。ブロットされた膜をダイレクトブルーで染色して画像を走査した後、修飾試薬 [1体積の1%ジアセチルモノキシム / 0.5%アンチピリン / 1N 酢酸、及び2体積の0.025% FeCl_3 を含有する85% H_3PO_4 / 98% H_2SO_4 / H_2O (20/25/55) の混合物] と、遮光下で37℃で一晩インキュベートした。膜をブロッキングし、1:2000の抗修飾シトルリン抗体 (Millipore, Billerica, MA) を用いて4℃で一晩ブローディングし、その後洗浄して、二次抗体 (ヤギポリクローナル抗ウサギIgG、1:10000希釈) と共に1時間インキュベートした。結合した抗体は、製造元 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) の説明の通り化学発光基質によって可視化した。現像時に、フィルムをEpson Expression 10000 XLスキャナー (Epson, US) でスキャンし、GraphPad Prismツールにインポートした。チューデントのt検定を用いて群間の統計的な差異を判定した。p値<0.05の場合に統計的に有意と考えた。

【0091】

試料の脱イミノ化、Cy標識、2-DE分離

重量が約150mgの心臓の試料を先に述べたように垂分画した。各画分の脱イミノ化のため、全体積100 μ Lの200mM Tris-HCl pH7.5 / 10mM ジチオスレイトール (DTT) / 20mM CaCl_2 中で、1.5mgの細菌性PAD2で処理した。同一量の各試料を酵素が無いこと以外は同一の条件で処理した。試料を50℃で2時間インキュベートした後、DIGE標識バッファー (7M 尿素 / 2M チオ尿素 / 4% CHAPS / 30mM Tris pH8.5) と混合し最終濃度70 μ g / 110 μ Lとした。Cy染料を添加し (3200pmol / 400mgアリコート)、アリコートを室温、暗所で30分間インキュベートした。染料400pmolあたり1mLの10mM リジンを添加して反応を停止した。プールした標準物質をCy2で標識し、PAD2で処理していない試料をCy3で標識し、さらにPAD2で処理した試料をCy5で標識した。上記のように標識されたプールした標準物質、試料+PAD2及び試料-PAD2のアリコート150 μ gを混ぜ合わせ、IEFバッファー (7M 尿素 / 2M チオ尿素 / 4% CHAPS / 1% DTT / 1% 3-10両性電解質) で希釈し最終体積350 μ Lとした。調製した試料を18cmの固定化リニアpH勾配 (4~7) ストリップ (IPG, BioRad) に塗布し、20℃で12時間能動的再水和を行った。等電点分画電気泳動 (IEF) のために、バイオラッドプロテインIEF細胞を20℃において以下の条件で用いた: ステップ1: 目標電圧200Vで1時間、ステップ2: 目標電圧500Vで1時間ランピング、ステップ3: 目標電圧500Vで1時間、ステップ4: 目標電圧1000Vで1時間ランピング、ステップ5: 目標電圧1000Vで2時間、ステップ6: 目標電圧1000Vで2時間ランピング、ステップ7: 50000V / 時間 (約6時間)。IEF後、製造元の指示に従ってストリップを平衡化した。次いで、10%ゲルを用いて2-DEの2次元目を実施し、一定電圧 (80V) で30~60分間、その後一

10

20

30

40

50

定電圧 (2 0 0 V、2 0 0 m A) で 6 時間電気泳動した。D I G E ゲルを T y p h o o n 9 4 1 0 (G E H e a l t h c a r e) を用いて、差次的に発現したタンパク質が変色して見える種々の発光波長でスキャンした。分取用ゲルを銀染色で染色し、T y p h o o n 9 4 1 0 でスキャンした。

【 0 0 9 2 】

画像分析

スモールゲルは E p s o n E x p r e s s i o n 1 0 0 0 0 X L (E p s o n A m e r i c a) を用いてスキャンし、ラージゲルは A m e r s h a m T y p h o o n 9 4 1 0 (G E H e a l t h c a r e) を用いてスキャンした。差次的に発現したタンパク質を (P A D 2 で処理した場合と処理していない場合との比較で)、スポットの検出、マッチング、及び分析のために L u d e s i R E D F I N 解析を用いて同定した (L u d e s i、<http://www.ludesi.com>)。L u d e s i R E D F I N 解析は、差次的インゲル解析 (D I A) と、その後の生物学的差異分析 (B V A) の 2 ステップで行った。D I A は C y 2、C y 3 及び C y 5 についての蛍光強度からタンパク質の体積を定量し、比 C y 3 / C y 2 (内部標準に対する非 P A D 2 処理の比) 及び C y 5 / C y 2 (内部標準に対する P A D 2 処理の比) を算出する。その後、値を画像ごとのタンパク質の量は同一であるという過程に基づいて正規化する。2 - D E ゲルの画像を R E D F I N A (<http://www.ludesi.com>) でスチューデントの t 検定を用いて解析し群間の統計的な差を判定した。p 値 < 0 . 0 5 の場合に統計的に有意と考えた。次いで、対象のスポットをゲルから切除し、脱色してトリプシンでインゲル消化した。消化された試料を、以下に述べるように L C - M S / M S 分析に用いた。

10

20

【 0 0 9 3 】

インゲルタンパク質消化及びペプチドの同定

短くしたピペットを用いて対象のスポットをゲルから摘出し、小さなエッペンドルフチューブに入れ、3 0 m M フェリシアン化カリウム及び 1 0 0 m M チオ硫酸ナトリウムを用いて脱色した。再蒸留水でさらに洗浄後ゲルプラグを乾燥して還元及びアルキル化試薬中で直接再水和した後、5 0 m M N H ₄ H C O ₃ p H 8 . 8 溶液中で 0 . 1 μ g / μ l トリプシン (トリプシンウルトラグレード配列決定グレード、P r o m e g a、W I、U S A) で消化した。消化は氷上で 1 時間行い、次いで余分な溶液を除去してゲルプラグを 1 0 0 μ l の 5 0 m M N H ₄ H C O ₃ に浸し、3 7 ° で一晩インキュベートした。ペプチドを Z i p T i p で脱塩し、A g i l e n t 1 2 0 0 ナノ L C システムと連動する L T Q イオントラップ M S (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を用いナノフロー L C - M S / M S により分析した。

30

【 0 0 9 4 】

質量分析

それぞれのヒト心臓を、インシークエンスプロトコルを用いて筋フィラメントリッチの画分と細胞質基質リッチの画分に分画した [K a n e L A , e t a l . S u b f r a c t i o n a t i o n o f h e a r t t i s s u e : t h e “ i n s e q u e n c e ” m y o f i l a m e n t p r o t e i n e x t r a c t i o n o f m y o c a r d i a l t i s s u e . M e t h o d s M o l B i o l 2 0 0 , 3 5 7 : 8 7 - 9 0]。タンパク質抽出物を、L y s C (1 : 2 0) で消化する前に、濾過補助試料調製 (F A S P) プロトコル (<https://www.biochem.mpg.de/226356/FASP>) を用いて変性、還元、アルキル化した。外来性の内部保持時間標準をそれぞれのペプチド画分に添加した (I R T、会社及び参照 [E s c h e r C , e t a l . U s i n g i R T , a n o r m a l i z e d r e t e n t i o n t i m e f o r m o r e t a r g e t e d m e a s u r e m e n t o f p e p t i d e s . P r o t e o m i c s 2 0 1 2 , 1 2 : 1 1 1 1 - 1 1 2 1])。シトルリン化プロテオームの深さの最大化を行うため、P A D カクテルを用いて心組織溶解質のインビトロでのシトルリン化を行った後、L y s C でタンパク質消化を行った。スペクトルイオンライブラリを A B S c i e x 6 6 0 0 T r i p l e T O F でのデータ

40

50

依存性取得によって構築し、生データをProteinPilot(商標)Software 5.0で検索しスペクトルイオンライブラリを作成した。それぞれの個人から採取した2つの画分を、順次6600 Triple TOFでのデータ依存解析(SWATH-MS)を用いて分析した。ペプチドのデータに高信頼度のシトルリン化ペプチド/スペクトル割り当て(>95%信頼度)が少なくとも1つ含まれ、マッピングされるタンパク質の信頼度が>95%の場合、ペプチドのデータをさらなる分析のために保持した。リバーシブルヒューマンデータベースの検索から得られたペプチド及びタンパク質プロフェットの閾値、すなわち反転したヒトのデータベースから得られた本試験についての全体的な誤発見率は、ペプチドとタンパク質のレベルでそれぞれ約<0.1%であると見積もられた。重要なことには、標的としたプロテオームの実験についての正確な感度と選択性を規定するため、それぞれのシトルリン化ペプチドの転移を選択して検証した。各ウィンドウについて20msのドウェル時間を有する200個の可変SWATHウィンドウを用いて、400~1250m/zの範囲のSWATH-MSフラグメントイオンマップを(内因性試料から)作成した。DDA及びSWATHの実験の場合、ソースの条件は以下の通りである。スプレー電圧を2.4kVに設定し、ソースガスを5に設定し、カーテンガスを30に設定し、インターフェースヒーター温度を80に設定し、及びデクラスタリング電位を100に設定した。DDAの測定におけるMS2の実験については転がり衝突エネルギーを用いた。DDAとSWATHの測定のいずれの場合も、ペプチドを、ekspert(商標)chPLC及びekspert(商標)nanolC 400オートサンプラーを装備したEksigent ekspert(商標)415 nanolCを用いて分離した。試料を、100%溶媒A(0.1%ギ酸水溶液)中、流速2µL/分で10分間トラップカラム(nano chPLC Trap 200µm×0.5mm ChromXP C18-CL 3µm 120)に投入し、次いで、nano chPLC 75µm×15cm ChromXP C18-CL 3µm 120 カラムを用い、流速300nL/分、直線勾配5~35%の溶媒B(0.1%のギ酸のアセトニトリル溶液)で120分間、35~85%の溶媒Bで2分間、85%に保持して5分間、その後5%Bで再平衡化17分間の条件でそれらを分離した。

10

20

30

40

50

【0095】

検証されたシトルリン化スペクトルイオンライブラリの構築

イオンライブラリに存在する非修飾(非シトルリン化)の形態を有するペプチドとシトルリン化された形態を有するペプチドとのペア間の保持時間(RT)の差、及びN/Q脱イミノ化された形態を有するペプチドとシトルリン化された形態を有するペプチドの間のRTの差に基づいて、検証されたシトルリン化ペプチドイオンライブラリを構築した。本発明者らのデータによると、同一のペプチド配列の非修飾の形態とシトルリン化された形態との間のRTの差(他にいかなる修飾も無い場合)は平均10分で、シトルリン化ペプチドの方がより長い保持時間を有していたが、これに対してN/Q脱イミノ化では平均で約2.5分のRTのシフトが生じたことが観察された。従って、ペアの非修飾形態またはペアのN/Q脱イミノ化形態を有するシトルリン化ペプチド配列で、RT差が5分より大きいものはイオンライブラリにおいて選択されたトランジションイオンを変更しなかった。RT差がペア間で5分未満のシトルリン化ペプチドの場合、または標準物質として使用される非修飾形態が無い場合は、シトルリン化ペプチドを非修飾またはN/Q脱イミノ化形態と明確に区別できるとされるトランジションイオンをマニュアルで選択し、シトルリン化部位を明確に区別できないあらゆるトランジションをイオンライブラリから除外した。このペプチドのサブセットの場合、シトルリン化ペプチドをライブラリに組み込むには固有のトランジションが5つ必要であった。各タンパク質について検証されたシトルリン化ペプチドに加え、最大10個の非修飾ペプチドが、全タンパク質の定量化のライブラリに組み込まれた。

【0096】

SWATHデータの分析

検証されたイオンライブラリをPeakView 2.1版にインポートし、SWATH

HファイルをSWATH microapp 2.0版にロードした。抽出の設定は以下の通りである：タンパク質あたりペプチド30個、ペプチドあたりトランジション5個、95%ペプチド信頼度カットオフ、FDR 閾値1%、XIC 抽出ウィンドウ5分及び許容差0.05 Da。

【0097】

共沈降試験

実質的に先に記載された通りに5 μ M F-アクチンとのTMの共沈降(0~2 μ M)によって結合試験を行い、次の修正を加えて行った。[Skorzewski R, et al. Effect of actin C-terminal modification on tropomyosin isoforms binding and thin filament regulation. Biochim Biophys Acta, 2009, 2:237-243]。TM単独の結合は、40 mM Tris HCl、pH 7.6、1 mM DTT、5 mM MgCl₂、及び100 mM NaClで分析した。全ての試験化合物を混合した後、確実に定常状態とするため試料を室温で約0.5時間インキュベートした。タンパク質混合物をBeckman rotor TLA 100.2にて60,000 rpmで25分間超遠心した。ペレット中のタンパク質の組成及び上澄み液に残存する遊離TMの量を4~12%のSDS-PAGEで分析した。クマシーブルーで染色したゲルをスキャンし定量した。ペレット化したF-アクチンのSDSゲルのバンドの強度は同様であった。アクチンに結合したTMは、飽和に達した最大の比に対して正規化されたTM/アクチンのバンド強度の比として算出した。未結合TMの濃度は、上澄み液に残存するTMのバンド強度から算出した。

10

20

【0098】

ミオシンHMMに誘発されるF-アクチンへのTMの結合

F-アクチン(5 μ M)及びTM(1 μ M、シトルリン化または対照)を、30 mM NaCl、0.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、5 mM イミダゾール、pH 7.0中で、HMM(0~3.5 μ M)と混合した。この混合物を室温で30分間インキュベートし、次いでTLA-100.2ローターにて15、60,000 rpmで25分遠心分離した。ペレットに沈殿したタンパク質の組成をSDS-PAGE及びデンストメトリーで分析した[Sliwinska M, et al. Role of actin C-terminus in regulation of striated muscle thin filament. Biophys J. 2008, 4:1341-]。

30

【0099】

HMM-ATPアーゼ試験。この試験は、Whiteによる記述にいくつか修正を加えて行った[White HD. Special instrumentation and techniques for kinetic studies of contractile systems. Methods Enzymol 1982, 85:698-708]。全ての試験は、最終濃度をF-アクチン 0.2 mg/ml及びHMM 0.02 mg/mlとした30 mM NaCl、5 mM MgCl₂、及び10 mM Hepes、pH 7.5を含有するバッファー中22で行った。存在する場合、非シトルリン化またはシトルリン化TMをF-アクチンに加え、最終モル濃度を0~2 μ M TMとした。HMM-アクチン-TM-TnI試験は上述したように、F-アクチン:TM:TnIのモル比それぞれ7:1:1で、シトルリン化されたTnIまたはシトルリン化されていないTnIを用いて行った。調整したアクト-S1システムの感度を評価するため、全ての検査を、カルシウムの存在下(0.5 mM CaCl₂)及び非存在下(2 mM EGTA)の両方を並行して行った。4 mM ATPを添加して全ての反応を開始した。遊離リン酸塩の量は、650 nmで熱量測定により測定した。全ての試験を線形範囲内で行い、それぞれの試験は3重反復で行った。

40

【0100】

実施例 2

50

心筋のシトルリン化タンパク質の同定

心臓のシトルリン化された標的を同定するため、S W A T H - M S [3 4] を用いて、I S H D 群、I D C M 群、非不全ドナー心臓群の3つの群（群あたり、 $n = 10$ ）におけるシトルリノームを評価した。S W A T H - M S によりこの定量が可能となった。非不全対照群と比較して、53か所のシトルリン化部位がH F により変化した（ $p < 0.05$ ）。これらを表1 A に記載する。

【 0 1 0 1 】

（表1 A ）シトルリン化ペプチド配列を有するシトルリン化タンパク質（ $p = 0.05$ ）の一覧。「D e a」はシトルリン化または脱アミノ化である。「C A M」はカルバミドメチル化である。シトルリン化タンパク質は細胞の成分でグループ化した。U P 識別子 = ユニバーサルプロテイン（U P）リソースのタンパク質I D、 p_kw = クルスカル・ワリス検定のp値（統計値）。

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
アデニル酸キナーゼ イソ酵素1	RGETSGR[Dea]VDDNEETIK (SEQ ID NO: 1)	Q5T9B7	0.03
アルコール脱水素酵素 1B	AAGAAR[Dea]IIAVDINK (SEQ ID NO: 2)	ADH1B	0.04
ベーターエノラーゼ	SPDDPAR[Dea]HITGEK (SEQ ID NO: 3)	ENOB	0.00
炭酸脱水酵素3	DIR[Dea]HDPSLQPWSVSYDGGS AK (SEQ ID NO: 4)	CAH3	0.01
脂肪酸結合タンパク質、 心臓	LILTLTHGTAVC[CAM]TR[Dea]TYEK (SEQ ID NO: 5)	FABPH	0.04
ペプチジルプロリルシス トランス異性化酵素A	TAENFR[Dea]ALSTGEK (SEQ ID NO: 6)	PPIA	0.01
血清除去反応 タンパク質	FQHPGSDMR[Dea]QEK (SEQ ID NO: 7)	SDPR	0.01
血清除去反応 タンパク質	VSPLTFGR[Dea]K (SEQ ID NO: 8)	SDPR	0.01
熱ショックタンパク質ベーター7	RHPHTEHVQQTFR[Dea]TEIK (SEQ ID NO: 9)	HSPB7	0.05
アルファークリスタリンB鎖	GLSEMR[Dea]LEK (SEQ ID NO: 10)	CRYAB	0.01
アクチン*	C[CAM]DIDIR[Dea]K (SEQ ID NO: 11)	ACTA1	>0.05
アクチン*	QEYDEAGPSIVHR[Dea]K (SEQ ID NO: 12)	ACTA2	>0.05
フィラミン-C	SSSSR[Dea]GSSYSSIPK (SEQ ID NO: 13)	FLNC	0.03
LIMドメイン結合 タンパク質3	TSPEGAR[Dea]DLLGPK (SEQ ID NO: 14)	LDB3	0.00
ミオシン結合 タンパク質C、心臓型	EPVFIPR[Dea]PGITYEPPNYK (SEQ ID NO: 15)	A8MXZ9	0.03
ミオゼニン-2	R[Dea]VATPFGGF EK (SEQ ID NO: 16)	MYOZ2	0.01
ミオゼニン-2	AELPDYR[Dea]SFNR[Dea]VATPFGGF EK (SEQ ID NO: 17)	MYOZ2	0.02

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
トロポニンI、 心筋	NIDALSGMEGR[Dea]K (SEQ ID NO: 18)	TNNI3	0.02
トロポニンI、 心筋	ESLDLR[Dea]AHLK (SEQ ID NO: 19)	TNNI3	0.02
トロポニンT、 心筋	PR[Dea]SFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 20)	E7EPW4	0.01
トロポミオシン**	ETR[Dea]AEFAERSVTKLEK (SEQ ID NO: 21)	TPM1	0.002
ビメンチン	FADLSEAA[Dea]RNNDALR[Dea]QAK (SEQ ID NO: 22)	VIME	0.03
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	LWR[Dea]D[Dhy]GRGALQN[Oxi]IIPASTGAAK (SEQ ID NO: 23)	G3P	0.01
ミオシン-7	AEETQR[Dea]SVNDLTSQR[Dea]AK (SEQ ID NO: 24)	MYH7	0.05
アコニテート 水添加酵素	SYLR[Dea]LRPDRVAMQDATAQ[Dea]M[Oxi]A MLQFISSGLSK (SEQ ID NO: 25)	ACON	0.01
アコニテート 水添加酵素	ANSVR[Dea]NAVTFEFGPVPDTAR[Dea]YYK (SEQ ID NO: 26)	ACON	0.03
アコニテート 水添加酵素	IVYGHLLDDPASQEIER[Dea]GK (SEQ ID NO: 27)	ACON	0.03
アデニル酸キナーゼ4	LLR[Dea]AVILGPPGSGK (SEQ ID NO: 28)	KAD4	0.00
アルコール脱水素酵素 クラス-3	VAGASR[Dea]IIGVDINK (SEQ ID NO: 29)	ADHX	0.05
ATP合成酵素 サブユニットアルファ	R[Dea]TGAIVDVPVGEELLGR[Dea]VVDALGN AIDGK (SEQ ID NO: 30)	ATPA	0.00
ATP合成酵素 サブユニットアルファ	AIEEQVAVIYAGVR[Dea]GYLDK (SEQ ID NO: 31)	ATPA	0.01
ATP合成酵素 サブユニットアルファ	GIRPAINVGLSVSR[Dea]VGSAAQ[Dea]TRAMK (SEQ ID NO: 32)	ATPA	0.01
ATP合成酵素 サブユニットアルファ	QGQYSPMAIEEQVAVIYAGVR[Dea]GYLDK (SEQ ID NO: 33)	ATPA	0.03
ATP合成酵素カップリング ファクター6	SGGPVDASSEYQQELER[Dea]ELFK (SEQ ID NO: 34)	ATP5J	0.00
塩化物細胞内チャネル タンパク質4	YR[Dea]NFDIPK (SEQ ID NO: 35)	CLIC4	0.04
シトクロムc (フラグメント)	EER[Dea]ADLIAYLK (SEQ ID NO: 36)	C9JFR7	0.01
デルタ-1-ピロリン- 5-カルボキシレート 脱水素酵素	VLR[Dea]NAAGNFYINDK (SEQ ID NO: 37)	AL4A1	0.00
デルタ-1-ピロリン- 5-カルボキシレート 脱水素酵素	AADMLSGPR[Dea]R[Dea]AEILAK (SEQ ID NO: 38)	AL4A1	0.01
デルタ-1-ピロリン- 5-カルボキシレート 脱水素酵素	VANEPVLAFTQGSPER[Dea]DALQK (SEQ ID NO: 39)	AL4A1	0.03
エノイル-CoA水添加酵素	EMVLTGDR[Dea]ISAQDAK (SEQ ID NO: 40)	ECHM	0.01
ES1タンパク質相同体	VLR[Dea]GVEVTVGHEQEEGGK (SEQ ID NO: 41)	ES1	0.00
熱ショックタンパク質 HSP90-アルファ	HLEINPDHSIIETLR[Dea]QK (SEQ ID NO: 42)	HS90A	0.04
NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	AATITPFR[Dea]K (SEQ ID NO: 43)	NNTM	0.05

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ホスフェートキャリアタンパク質	VYFR[Dea]LPRPPPEMPESLK (SEQ ID NO: 44)	MPCP	0.00
ピルビン酸脱水素酵素E1成分 サブユニットアルファ、 体細胞型	C[CAM]DLHR[Dea]LEEGPPVTTVLTR[Dea]ED GLK (SEQ ID NO: 45)	ODPA	0.01
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノン] 鉄- 硫黄サブユニット	FAIYR[Dea]WDPDK (SEQ ID NO: 46)	SDHB	0.05
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP/GDP形成] サブユニットアルファ	TR[Dea]LIGPNC[CAM]PGVINPGEC[CAM]K (SEQ ID NO: 47)	SUCA	0.02
サクシニル-CoA: 3-ケト酸 コエンザイムA転移酵素1	ADR[Dea]AGNVIFR[Dea]K (SEQ ID NO: 48)	SCOT1	0.04
電圧依存アニオン 選択性チャネル タンパク質1	SR[Dea]VTQSNFAVGKY (SEQ ID NO: 49)	VDAC1	0.02
60kDa熱ショック タンパク質	FDR[Dea]GYISPYFINTSK (SEQ ID NO: 50)	CH60	0.04
三官能酵素 サブユニットベータ	PNIR[Dea]NVVVVDGVR[Dea]TPFLLSGTSYK (SEQ ID NO: 51)	ECHB	0.02
アコニテート水添加酵素	TGR[Dea]EDIANLADEFK (SEQ ID NO: 52)	ACON	0.00
アコニテート水添加酵素	R[Dea]LQLLEPFDK (SEQ ID NO: 53)	ACON	0.01
二重特異性タンパク質 ホスファターゼ3	LGITHVLNAAEGR[Dea]SFMHVNTNANFYK (SEQ ID NO: 54)	DUS3	0.01
神経芽細胞分化関連 タンパク質AHNAK	FGVSTGR[Dea]EGQTPK (SEQ ID NO: 55)	AHNK	0.01
コラーゲンアルファ-3 (VI) 鎖	DVVFLLDGSEGVR[Dea]SGFPLLK (SEQ ID NO: 56)	E7ENL6	0.03

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

表 1 B は本試験で見出された全てのシトルリン化ペプチドを示す。これらは、転写ならびにクロマチン構造、細胞骨格ならびに収縮、細胞信号伝達プロセスならびに代謝の制御因子を含む多様な細胞機能を有するタンパク質である（図 1）。

【 0 1 0 3 】

（表 1 B）本試験で見出された全てのシトルリン化ペプチド。「D e a」はシトルリン化または脱アミノ化である。「C A M」はカルバミドメチル化である。

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
シス테인リッチ タンパク質2	GVNTGAVGSYTYDR[Dea]DPEGK (SEQ ID NO: 57)	P52943	0.58
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	RGETSGR[Dea]VDDNEETIK (SEQ ID NO: 1)	Q5T9B7	0.03
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	R[Dea]GETSGR[Dea]VDDNEETIK (SEQ ID NO: 58)	Q5T9B7	0.15
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	YGYTHLSTGDLLR[Dea]SEVSSGSAR[Dea]GK (SEQ ID NO: 59)	Q5T9B7	0.57

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	LLR[Dea]SEVSSGSAR[Dea]GK (SEQ ID NO: 60)	Q5T9B7	0.68
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	YGYTHLSTGDLLR[Dea]SEVSSGSARGK (SEQ ID NO: 61)	Q5T9B7	0.74
アルコール脱水素酵素1B	AAGAAR[Dea]IIAVDINK (SEQ ID NO: 2)	P00325	0.04
アルドース還元酵素	PEDPSLLEDPR[Dea]IK (SEQ ID NO: 62)	P15121	0.18
アルファークリスタリンB鎖	GLSEMR[Dea]LEK (SEQ ID NO: 10)	P02511	0.01
アルファークリスタリンB鎖	QVSGPER[Dea]TIPITREEK (SEQ ID NO: 63)	P02511	0.23
アルファークリスタリンB鎖	YR[Dea]IPADVDPLTITSSLSSDGLTVNGPR[Dea] JK (SEQ ID NO: 64)	P02511	0.41
アルファークリスタリンB鎖	SPFYLR[Dea]PPSFLR[Dea]APSWFDTGLSEMRLE K (SEQ ID NO: 65)	P02511	0.51
アルファークリスタリンB鎖	SPFYLRPPSFLR[Dea]APSWFDTGLSEMRLEK (SEQ ID NO: 66)	P02511	0.55
アルファークリスタリンB鎖	QVSGPER[Dea]TIPITR[Dea]EEK (SEQ ID NO: 67)	P02511	0.97
アスパラギン酸アミノ基転移酵素	HIYLLPSGR[Dea]INVSGLTTK (SEQ ID NO: 68)	P17174	0.84
ATP依存性6- ホスホフルクトキナーゼ	LLAHVR[Dea]PPVSK (SEQ ID NO: 69)	P08237	0.53
ATP依存性6- ホスホフルクトキナーゼ	NVLGHMQQGGSPFPDR[Dea]NFATK (SEQ ID NO: 70)	P08237	0.80
ATP依存性6- ホスホフルクトキナーゼ	[IAc]-MDADDSR[Dea]APK (SEQ ID NO: 71)	Q01813	0.55
ベーターエノラーゼ	SPDDPAR[Dea]HITGEK (SEQ ID NO: 3)	P13929	0.00
炭酸脱水酵素3	DIR[Dea]HDPQLPWSVSYDGGSAAK (SEQ ID NO: 4)	P07451	0.01
クレアチンキナーゼM型	ELFDPIISDR[Dea]HGGYK (SEQ ID NO: 72)	P06732	0.20
クレアチンキナーゼM型	GGDDLDPNYVLSSR[Dea]VR[Dea]TGR[Dea]SIK (SEQ ID NO: 73)	P06732	0.36
クレアチンキナーゼM型	PIISDR[Dea]HGGYKPTDK (SEQ ID NO: 74)	P06732	0.47
クレアチンキナーゼM型	ELFDPIISDR[Dea]HGGYKPTDK (SEQ ID NO: 75)	P06732	0.51
クレアチンキナーゼM型	GGDDLDPNYVLSSRVR[Dea]TGRSIK (SEQ ID NO: 76)	P06732	0.66
クレアチンキナーゼM型	FEEILTR[Dea]LRLQK (SEQ ID NO: 77)	P06732	0.82
脂肪酸結合タンパク質	LILTLTHGTAVC[CAM]TR[Dea]TYEK (SEQ ID NO: 5)	P05413	0.04
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	LWR[Dea]D[Dhy]GRGALQN[Oxi]IIPASTGAAK (SEQ ID NO: 23)	P04406	0.01
グリコーゲン ホスホリラーゼ	VAIQLNDTHPALSIPELMR[Dea]ILVDVEK (SEQ ID NO: 78)	P11216	0.39
グリコーゲンホスホリラーゼ	QISVR[Dea]GLAGLGDVAEVRK (SEQ ID NO: 79)	P11216	0.63
ヘモグロビンサブユニットアルファ	LR[Dea]VDPVN[Dea]FK (SEQ ID NO: 80)	P69905	0.91
ヘモグロビン サブユニットアルファ	VGAHAGEYGAEALER[Dea]MFLSFPT (SEQ ID NO: 81)	P69905	0.93
ヘモグロビンサブユニットアルファ	LER[Dea]MFLSFPTTK (SEQ ID NO: 82)	P69905	0.93
ヘモグロビンサブユニットアルファ	R[Dea]VDPVNFK (SEQ ID NO: 83)	P69905	0.93
ヘモグロビン サブユニットベータ	VNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQ[Dea]R[Dea]FF ESFGDLSTPDVAVM[Oxi]GNPK (SEQ ID NO: 84)	P68871	0.40

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ヘモグロビンサブユニットベータ	VNVDEVGGEALGR[Dea]LLV (SEQ ID NO: 85)	P68871	0.46
ヘモグロビン サブユニットベータ	VNVDEVGGEALGR[Dea]LLVVYPWTQ[Dea]RFF ESFGDLSTPDAVMGPNK (SEQ ID NO: 86)	P68871	0.67
ヘモグロビン サブユニットベータ	R[Dea]FFESFGDLSTPDAVMGPNK (SEQ ID NO: 87)	P68871	0.82
ヘモグロビンサブユニットベータ	VNVDEVGGEALGR[Dea]L (SEQ ID NO: 88)	P68871	0.90
ペプチジル-プロリルシス トランス異性化酵素A	TAENFR[Dea]ALSTGEK (SEQ ID NO: 6)	P62937	0.01
ホスファチジルエタノール アミン結合タンパク質1	VLTPDAPSR[Dea]KDPK (SEQ ID NO: 89)	P30086	0.12
ホスファチジルエタノール アミン結合タンパク質1	C[CAM]DEPILSN[Dea]RSGDHR[Dea]GK (SEQ ID NO: 90)	P30086	0.55
ホスホグリセレート キナーゼ1	SVVLMShLGR[Dea]PDGVMPDK (SEQ ID NO: 91)	P00558	0.26
ホスホグリセレートキナーゼ1	R[Dea]VVMR[Dea]VDFNVPMK (SEQ ID NO: 92)	P00558	0.27
血清アルブミン	YLYEIARR[Dea]H[AAS]P[Oxi]YFYAPELLFFAK (SEQ ID NO: 93)	P02768	0.06
血清アルブミン	VPQVSTPTLVEVSR[Dea]N (SEQ ID NO: 94)	P02768	0.31
血清アルブミン	WAVAR[Dea]LSQR[Dea]FPK (SEQ ID NO: 95)	P02768	0.40
血清アルブミン	FGER[Dea]AFK (SEQ ID NO: 96)	P02768	0.46
血清アルブミン	TESLVNR[Dea]RPC[CAM] (SEQ ID NO: 97)	P02768	0.49
血清アルブミン	AWAVAR[Dea]LSQR[Dea]FPK (SEQ ID NO: 98)	P02768	0.64
血清アルブミン	DDNPNLRLVR[Dea]PEVDVMC[CAM]TAFHDN EETFLK (SEQ ID NO: 99)	P02768	0.66
血清アルブミン	TPVSDR[Dea]VTK (SEQ ID NO: 100)	P02768	0.69
血清アルブミン	ALLVR[Dea]YTK (SEQ ID NO: 101)	P02768	0.70
血清アルブミン	SEVAHR[Dea]FK (SEQ ID NO: 102)	P02768	0.72
血清アルブミン	LVEVSR[Dea]NLGK (SEQ ID NO: 103)	P02768	0.74
血清アルブミン	R[Dea]MPC[CAM]AEDYLSVVLNQLC[CAM]VLH EK (SEQ ID NO: 104)	P02768	0.82
血清アルブミン	DDNPNLPR[Dea]LVR[Dea]PEVDVMC[CAM]TAF HDNEETFLK (SEQ ID NO: 105)	P02768	0.84
血清アルブミン	[CRM]-YLYEIAR[Dea]RHPYFYAPELLFFAK (SEQ ID NO: 106)	P02768	0.86
血清アルブミン	C[CAM]C[CAM]TESLVNR[Dea]RPC[CAM] (SEQ ID NO: 107)	P02768	0.93
血清除去反応タンパク質	FQHPGSDMR[Dea]QEK (SEQ ID NO: 7)	O95810	0.01
血清除去反応タンパク質	VSPLTFGR[Dea]K (SEQ ID NO: 8)	O95810	0.01
トランスゲリン	R[Dea]EFTESQLQEGK (SEQ ID NO: 108)	Q01995	0.22
翻訳制御腫瘍 タンパク質	MIIYR[Dea]DLISHDEMFSDIYK (SEQ ID NO: 109)	Q5W0H4	0.14
腫瘍タンパク質D54	TSAALSTVGSAISR[Dea]K (SEQ ID NO: 110)	O43399	0.08
リンゴ酸脱水素酵素	FVEGLPINDFSR[Dea]EK (SEQ ID NO: 111)	P40925	0.17

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
アクチン、アルファ骨格筋	C[CAM]DIDIR[Dea]K (SEQ ID NO: 11)	Q5T8M8	0.11
アクチン、アルファ骨格筋	QEYDEAGPSIVHR[Dea]K (SEQ ID NO: 12)	Q5T8M8	0.16
デスミン	EEAENNLAAFR[Dea]ADVDAATLAR (SEQ ID NO: 112)	P17661	0.06
デスミン	SR[Dea]LGTTR[Dea]TPSSYGAGELLDFSLADAV NQEFLTTRTNEK (SEQ ID NO: 113)	P17661	0.08
デスミン	NFRETSPEQR[Dea]GSEVHTK (SEQ ID NO: 114)	P17661	0.23
デスミン	MALDVEIATYR[Dea]K (SEQ ID NO: 115)	P17661	0.23
デスミン	SR[Dea]LGTTRTPSSYGAGELLDFSLADAVNQEF LTTRTNEK (SEQ ID NO: 116)	P17661	0.31
デスミン	VDVER[Dea]DNLLDDLQRLK (SEQ ID NO: 117)	P17661	0.39
デスミン	NFR[Dea]ETSPEQR[Dea]GSEVHTK (SEQ ID NO: 118)	P17661	0.43
デスミン	TIETR[Dea]DGEVVSEATQQQHEVL (SEQ ID NO: 119)	P17661	0.55
デスミン	SSPVFPR[Dea]AGFGSK (SEQ ID NO: 120)	P17661	0.88
デストリン	[IAC]-ASGVQVADEV[CAM]R[Dea]IFYDMK (SEQ ID NO: 121)	P60981	0.78
フィラミン-C	SSSSR[Dea]GSSYSSIPK (SEQ ID NO: 13)	Q14315	0.03
フォーアンドハーフLIM ドメインタンパク質2	KPITTTGGVTYR[Dea]EQPWHK (SEQ ID NO: 122)	Q14192	0.08
フルクトースービス ホスフェートアルドラーゼA	ELSDIAHR[Dea]IVAPGK (SEQ ID NO: 123)	P04075	0.55
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	LVIN[Dea]GNPITIFQER[Dea]DPSK (SEQ ID NO: 124)	P04406	0.66
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	R[Dea]VIISAPSADAPMFVMGVNHEK (SEQ ID NO: 125)	P04406	0.68
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	AFRVPTAN[Dea]VSVDLTC[CAM]R[Dea]LEK (SEQ ID NO: 126)	P04406	0.88
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	VSVVDLTC[CAM]R[Dea]LEKPAK (SEQ ID NO: 127)	P04406	0.93
グリセルアルデヒド-3- ホスフェート脱水素酵素	LWR[Dea]DGR[Dea]GALQNIIPASTGAAK (SEQ ID NO: 128)	P04406	0.99
LIMドメイン結合 タンパク質3	TSPEGAR[Dea]DLLGPK (SEQ ID NO: 14)	O75112	0.00
モエシン	DR[Dea]SEEER[Dea]TTEAEK (SEQ ID NO: 129)	P26038	0.28
ミオメシン-1	HVSGITDTEER[Dea]IK (SEQ ID NO: 130)	P52179	0.07
ミオメシン-1	SPR[Dea]FALFDLAEGK (SEQ ID NO: 131)	P52179	0.57
ミオシン軽鎖3	LGQNPTQAEVLR[Dea]VLGKPRQEELNTK (SEQ ID NO: 132)	P08590	0.09
ミオシン軽鎖3	LGKPR[Dea]QEELNTK (SEQ ID NO: 133)	P08590	0.16
ミオシン軽鎖3	[CRM]-EAFMLFDR[Dea]TPK (SEQ ID NO: 134)	P08590	0.39
ミオシン軽鎖3	EAFMLFDR[Dea]TPK (SEQ ID NO: 135)	P08590	0.41
ミオシン軽鎖3	VLGKPR[Dea]QEELNTK (SEQ ID NO: 136)	P08590	0.42
ミオシン軽鎖3	ALGQNPTQAEVLR[Dea]VLGK (SEQ ID NO: 137)	P08590	0.59
ミオシン軽鎖3	LGQNPTQAEVLR[Dea]VLGKPRQ[Dea]EELNTK (SEQ ID NO: 138)	P08590	0.70

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ミオシン軽鎖3	LGQNPTQAEVLR[Dea]VLGK (SEQ ID NO: 139)	P08590	0.71
ミオシン軽鎖3	EAFM[Oxi]LFDR[Dea]TPK (SEQ ID NO: 140)	P08590	0.86
ミオシン軽鎖4	MLDFETFLPILQHISR[Dea]NK (SEQ ID NO: 141)	P12829	0.28
ミオシン軽鎖4	EQGTYEDFVEGLR[Dea]VFDD (SEQ ID NO: 142)	P12829	0.74
ミオシン制御軽鎖2	NDLRDTFAALGR[Dea]VNVK (SEQ ID NO: 143)	P10916	0.71
ミオシン制御軽鎖2	EAFTIMDQNR[Dea]DGFIDK (SEQ ID NO: 144)	P10916	0.77
ミオシン-7	AEETQR[Dea]SVNDLTSQR[Dea]AK (SEQ ID NO: 24)	P12883	0.05
ミオシン-7	[1Ac]-GDSEMAVFGAAAPYLR[Dea]K (SEQ ID NO: 145)	P12883	0.18
ミオシン-7	VR[Dea]ELENELEAEQK (SEQ ID NO: 146)	P12883	0.27
ミオシン-7	R[Dea]YR[Dea]ILNPAAIPEGQFIDSRK (SEQ ID NO: 147)	P12883	0.28
ミオシン-7	RNHLR[Dea]VVDSLQT (SEQ ID NO: 148)	P12883	0.31
ミオシン-7	R[Dea]VR[Dea]ELENELEAEQK (SEQ ID NO: 149)	P12883	0.40
ミオシン-7	AVFGAAAPYLR[Dea]K (SEQ ID NO: 150)	P12883	0.42
ミオシン-7	LEAR[Dea]VR[Dea]ELENELEAEQK (SEQ ID NO: 151)	P12883	0.43
ミオシン-7	YR[Dea]ILNPAAIPEGQFIDSRK (SEQ ID NO: 152)	P12883	0.51
ミオシン-7	RYR[Dea]ILNPAAIPEGQFIDSRK (SEQ ID NO: 153)	P12883	0.52
ミオシン-7	DFELNALNAR[Dea]IEDEQALGSQK (SEQ ID NO: 154)	P12883	0.58
ミオシン-7	AEETQRSVNDLTSQR[Dea]AK (SEQ ID NO: 155)	P12883	0.60
ミオシン-7	RSVNDLTSQR[Dea]AK (SEQ ID NO: 156)	P12883	0.74
ミオシン-7	R[Dea]VRELENELEAEQK (SEQ ID NO: 157)	P12883	0.76
ミオシン-7	YRILNPAAIPEGQFIDSR[Dea]K (SEQ ID NO: 158)	P12883	0.81
ミオシン-7	RVIQYFAVIAAIGDR[Dea]SK (SEQ ID NO: 159)	P12883	0.86
ミオシン-7	RYR[Dea]ILNPAAIPEGQFIDSR[Dea]K (SEQ ID NO: 160)	P12883	0.96
ミオシン結合タンパク質C	EPVFIPR[Dea]PGITYEPPNYK (SEQ ID NO: 15)	A8MXZ9	0.03
ミオシン結合タンパク質C	VRWQR[Dea]GGSDISASNK (SEQ ID NO: 161)	A8MXZ9	0.09
ミオシン結合タンパク質C	PR[Dea]PQVTWTK (SEQ ID NO: 162)	A8MXZ9	0.21
ミオゼニン-2	R[Dea]VATPFGGFKEK (SEQ ID NO: 16)	Q9NPC6	0.01
ミオゼニン-2	AELPDYR[Dea]SFNR[Dea]VATPFGGFKEK (SEQ ID NO: 17)	Q9NPC6	0.02
ホスホグルコムターゼ-1	SGEHDFGAAGDGDGR[Dea]NMILGK (SEQ ID NO: 163)	P36871	0.86
ホスホグルコムターゼ-1	DLEALMFDR[Dea]SFVGK (SEQ ID NO: 164)	P36871	0.87
プラスチン-2	VNDDIIVNWVNETLR[Dea]EAKK (SEQ ID NO: 165)	P13796	0.45

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
プロフィリン-1	C[CAM]SVIR[Dea]DS[Dhy]LLQDGEFSMDLRTK (SEQ ID NO: 166)	P07737	0.18
チチン	C[CAM]DVS[Dhy]R[Dea]GDWVTALASVTK (SEQ ID NO: 167)	Q8WZ42	0.17
トロポミオシン*	ETR[Dea]AEFAERSVTKLEK (SEQ ID NO: 21)	B7Z596	0.002*
トロポニンI	NIDALSGMEGR[Dea]K (SEQ ID NO: 18)	P19429	0.02
トロポニンI	ESLDR[Dea]AHLK (SEQ ID NO: 19)	P19429	0.02
トロポニンI	YR[Dea]AYATEPHAK (SEQ ID NO: 168)	P19429	0.09
トロポニンI	[PGQ]-QELEREAEER[Dea]R[Dea]GEK (SEQ ID NO: 169)	P19429	0.49
トロポニンT	PR[Dea]SFMPNLVPPK (SEQ ID NO: 20)	E7EPW4	0.01
トロポニンT	GERVDFDDIHR[Dea]K (SEQ ID NO: 170)	E7EPW4	0.06
トロポニンT	EAEDGPMEESKPKPR[Dea] (SEQ ID NO: 171)	E7EPW4	0.23
トロポニンT	AEAETEETR[Dea]AEDEEEEEAK (SEQ ID NO: 172)	E7EPW4	0.66
チューブリンアルファ-1B鎖	HVPR[Dea]AVFVDLEPTVIDEVR[Dea]TGTYR[Dea]QLFHPEQLITGK (SEQ ID NO: 173)	P68363	0.43
チューブリンアルファ-4A鎖	HVPR[Dea]AVFVDLEPTVIDEIRN[Dea]GPYRQ[Dea]LFHPEQLITGK (SEQ ID NO: 174)	P68366	0.26
チューブリンアルファ-4A鎖	EIIDPVLDR[Dea]IR[Dea]K (SEQ ID NO: 175)	P68366	0.72
チューブリンアルファ-8鎖	EDAANNYAR[Dea]GHYTVGK (SEQ ID NO: 176)	C9J2C0	0.37
ビメンチン	FADLSEAAN[Dea]RNNDALR[Dea]QAK (SEQ ID NO: 22)	P08670	0.03
ビメンチン	TVETR[Dea]DGQVINETSQHDDLE (SEQ ID NO: 177)	P08670	0.09
熱ショックタンパク質ベータ-1	LATQSNEITIPVTFESR[Dea]AQLGGPEAAK (SEQ ID NO: 178)	P04792	0.34
熱ショックタンパク質ベータ-7	RHPHTEHVQQTFR[Dea]TEIK (SEQ ID NO: 9)	Q9UBY9	0.05
ロイシンリッチPPRモチーフ含有タンパク質	IPENIYRGIR[Dea]N[Dea]LLESYHVPELIK (SEQ ID NO: 179)	P42704	0.55
トロポニンC	SEEELSDLFR[Dea]MFDK (SEQ ID NO: 180)	P63316	0.69
アルファ-1-抗トリプシン	ELDR[Dea]DTVFALVN[Dea]YIFFK (SEQ ID NO: 181)	P01009	0.61
アポリポタンパク質A-I	[PGE]-EN[Dea]GGAR[Dea]LAEYHAK (SEQ ID NO: 182)	P02647	0.58
アポリポタンパク質A-I	DSGR[Dea]DYVSQFEGSALGK (SEQ ID NO: 183)	P02647	0.90
アポリポタンパク質A-I	AKPALEDLR[Dea]QGLLPVLESFK (SEQ ID NO: 184)	P02647	0.96
カルレティキュリン	PR[Dea]QIDNPDYK (SEQ ID NO: 185)	P27797	0.17
カルメニン	TEREQFVEFR[Dea]DK (SEQ ID NO: 186)	Q43852	0.06
サルカルメニン	IER[Dea]AITQELPGLLGSGLGK (SEQ ID NO: 187)	Q86TD4	0.24
サルカルメニン	TIEGIVMAADSAR[Dea]SFSPLEK (SEQ ID NO: 188)	Q86TD4	0.60
デコリン	ISR[Dea]VDAASLK (SEQ ID NO: 189)	P07585	0.25

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ベーター2-糖タンパク質1	ATVVYQGER[Dea]VK (SEQ ID NO: 190)	P02749	0.55
カテプシンD	VER[Dea]QVFGEATK (SEQ ID NO: 191)	P07339	0.14
ルミカン	YLYLR[Dea]NNQIDHIDEK (SEQ ID NO: 192)	P51884	0.66
ミオグロビン	ALELFR[Dea]K (SEQ ID NO: 193)	P02144	0.11
ユビキチンカルボキシル 末端水添加酵素5	EEDPATGTGDPFR[Dea]K (SEQ ID NO: 194)	P45974	0.50
2, 4-ジエノイル-CoA還元酵素	GAFSR[Dea]LDPTGTFEK (SEQ ID NO: 195)	B7Z6B8	0.26
28Sリボソームタンパク質 S36	PNVSEALR[Dea]SAGLPSSHSVISQHSK (SEQ ID NO: 196)	P82909	0.29
3-ケトアシル-CoAチオラーゼ	YALQSQQR[Dea]WK (SEQ ID NO: 197)	P42765	0.55
3-ケトアシル-CoA チオラーゼ	VSPETVDSVIMGNVLQSSSDAIYLAR[Dea]HVGL R[Dea]VGIPK (SEQ ID NO: 198)	P42765	0.82
アセチル-CoAアセチル 転移酵素	EVVIVSATR[Dea]TPIGSFLGSLSLPATK (SEQ ID NO: 199)	P24752	0.07
アコニテート水添加酵素	SYLR[Dea]LRPDRVAMQDAT[Dhy]AQ[Dea]M[Ox i]AMLQFISSGLSK (SEQ ID NO: 25)	Q99798	0.01
アコニテート水添加酵素	ANSVR[Dea]NAVVTQEFQVPDPTAR[Dea]YYK (SEQ ID NO: 26)	Q99798	0.03
アコニテート水添加酵素	IVYGHLDDPASQEIER[Dea]GK (SEQ ID NO: 27)	Q99798	0.03
アコニテート水添加酵素	SYLR[Dea]LRPDRVAMQDATAQMAMLQFISSGL SK (SEQ ID NO: 200)	Q99798	0.14
アコニテート水添加酵素	FR[Dea]GHLDNISNNLLIGAINIEN[Dea]GK (SEQ ID NO: 201)	Q99798	0.19
アシルコエンザイムA 脱水素酵素、 C-4~C-12直鎖、 アイソフォームCRA_a	AFTGFIVEADTPGIQ[GR]Dea]K (SEQ ID NO: 202)	Q5T4U5	0.15
アシルコエンザイムA 脱水素酵素、 C-4~C-12直鎖、 アイソフォームCRA_a	FAR[Dea]EEIIPVAAEYDK (SEQ ID NO: 203)	Q5T4U5	0.26
アシルコエンザイムA 脱水素酵素、 C-4~C-12直鎖、 アイソフォームCRA_a	TR[Dea]PVVAAGAVGLAQRALDEATK (SEQ ID NO: 204)	Q5T4U5	0.93
アデニル酸キナーゼ4	LLR[Dea]AVILGPPGSGK (SEQ ID NO: 28)	P27144	0.00
アデニル酸キナーゼイソ 酵素1	KR[Dea]GETSGR[Dea]VDDNEETIK (SEQ ID NO: 205)	Q5T9B7	0.95
アルコール脱水素酵素 クラス-3	VAGASR[Dea]IIGVDINK (SEQ ID NO: 29)	P11766	0.05
アルデヒド脱水素酵素	VAFTGSTEIGR[Dea]VIQVAAGSSNLK (SEQ ID NO: 206)	P05091	0.08
アルデヒド脱水素酵素	SR[Dea]VVGPNPFDK (SEQ ID NO: 207)	P05091	0.55
アスパラギン酸アミノ基転移酵素	PYVLPSVR[Dea]K (SEQ ID NO: 208)	P00505	0.22
ATP合成酵素サブユニット アルファ	R[Dea]TGAIVDVPVGEELLGR[Dea]VVDALGNAI DGK (SEQ ID NO: 30)	P25705	0.00
ATP合成酵素サブユニット アルファ	AIEEQVAVIYAGVR[Dea]GYLDK (SEQ ID NO: 31)	P25705	0.01
ATP合成酵素サブユニット アルファ	GIRPAINVGLSVSR[Dea]VGSAAQ[Dea]TRAMK (SEQ ID NO: 32)	P25705	0.01

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ATP合成酵素サブユニット アルファ	QGQYSPMAIEEQVAVIYAGVR[Dea]GYLDK (SEQ ID NO: 33)	P25705	0.03
ATP合成酵素サブユニット ベータ	IPVGPETLGRIMNVIGEPIDER[Dea]GPIK (SEQ ID NO: 209)	P06576	0.26
ATP合成酵素サブユニット ベータ	IPVGPETLGR[Dea]IMNVIGEPIDER[Dea]GPIK (SEQ ID NO: 210)	P06576	0.51
ATP合成酵素サブユニット ベータ	IQR[Dea]FLSQPFQVAEVFTGHMGK (SEQ ID NO: 211)	P06576	0.70
ATP合成酵素サブユニット ベータ	AHGGYSVFAGVGERTR[Dea]EGN[Dea]DLYHEM IESGVINLK (SEQ ID NO: 212)	P06576	0.87
ATP合成酵素サブユニットe	PRAEEER[Dea]R[Dea]IAAEEK (SEQ ID NO: 213)	P56385	0.32
ATP合成酵素カップリング ファクター6	SGGPVDASSEYQQELER[Dea]ELFK (SEQ ID NO: 34)	P18859	0.00
塩化物細胞内チャンネル タンパク質4	YR[Dea]NFDIPK (SEQ ID NO: 35)	Q9Y696	0.04
クエン酸合成酵素	SQLSAAVTALNSESND[Dea]FARAYAQGISR[Dea] TK (SEQ ID NO: 214)	B4DJV2	0.34
クエン酸合成酵素	TVVGQITVDMMYGGMR[Dea]GMK (SEQ ID NO: 215)	B4DJV2	0.75
クレアチンキナーゼB型	LR[Dea]FPAEDEFPLSAHNNHMAK (SEQ ID NO: 216)	P12277	0.33
クレアチンキナーゼB型	EVFTR[Dea]FC[CAM]TGLTQIETLFK (SEQ ID NO: 217)	P12277	0.82
クレアチンキナーゼS型	C[CAM]TR[Dea]AER[Dea]R[Dea]EVENVAITALE GLK (SEQ ID NO: 218)	P17540	0.31
クレアチンキナーゼS型	TR[Dea]AER[Dea]R[Dea]EVENVAITALEGLK (SEQ ID NO: 219)	P17540	0.59
クレアチンキナーゼS型	EVREQ[Dea]PR[Dea]LFPPSADYPDLRK (SEQ ID NO: 220)	P17540	0.72
シトクロムc	EER[Dea]ADLIAYLK (SEQ ID NO: 36)	C9JFR7	0.01
シトクロムc	KEER[Dea]ADLIAYLK (SEQ ID NO: 221)	C9JFR7	0.01
シトクロムc酸化酵素 サブユニット5A	EIYPYVIQELR[Dea]PTLNELGISTPEELGLDKV (SEQ ID NO: 222)	P20674	0.07
シトクロムc酸化酵素 サブユニット5A	SHGSQETDEEFDARWVTYFN[Dea]KPDIDAWEL R[Dea]K (SEQ ID NO: 223)	P20674	0.18
シトクロムc酸化酵素 サブユニット5A	ASGGGVPTDEEQATGLER[Dea]EIMLA AK (SEQ ID NO: 224)	P10606	0.49
デルター1-ピロリン-5- カルボキシレート脱水素酵素	VLR[Dea]NAAGNFYINDK (SEQ ID NO: 37)	P30038	0.00
デルター1-ピロリン-5- カルボキシレート脱水素酵素	AADMLSGPR[Dea]R[Dea]AEILAK (SEQ ID NO: 38)	P30038	0.01
デルター1-ピロリン-5- カルボキシレート脱水素酵素	VANEPVLAFTQGSPER[Dea]DALQK (SEQ ID NO: 39)	P30038	0.03
デルター1-ピロリン-5- カルボキシレート脱水素酵素	TVIQAEIDAAAELIDFFR[Dea]FNAK (SEQ ID NO: 225)	P30038	0.12
ジヒドロリポイル脱水素酵素	NFQR[Dea]ILQK (SEQ ID NO: 226)	P09622	0.87
電子伝達フラビンタンパク質 サブユニットアルファ	VVVSGGR[Dea]GLK (SEQ ID NO: 227)	P13804	0.18

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
電子伝達フラビンタンパク質 サブユニットアルファ	VFSVR[Dea]GTSFDAAATSGGSASSEK (SEQ ID NO: 228)	P13804	0.18
電子伝達フラビンタンパク質 サブユニットアルファ	LLYDLADQLHAAVGASR[Dea]AAVDAGFVPND MQVGQTGK (SEQ ID NO: 229)	P13804	0.48
電子伝達フラビンタンパク質 サブユニットベータ	VEREIDGGLETLR[Dea]LK (SEQ ID NO: 230)	P38117	0.17
電子伝達フラビンタンパク質 サブユニットベータ	LSVISVEDPPQR[Dea]TAGVK (SEQ ID NO: 231)	P38117	0.70
伸長因子Tu	PFLLPVEAVYSVPGR[Dea]GTVVTGTLER[Dea]GI LK (SEQ ID NO: 232)	P49411	0.34
伸長因子Tu	SLERAEAGDN[Dea]LGALVR[Dea]GLK (SEQ ID NO: 233)	P49411	0.53
伸長因子Tu	NIR[Dea]TVVTGIEMFHK (SEQ ID NO: 234)	P49411	0.58
伸長因子Tu	PFLLPVEAVYSVPGR[Dea]GTVVTGTLERGLK (SEQ ID NO: 235)	P49411	0.80
伸長因子Tu	SLERAEAGDNLGALVR[Dea]GLK (SEQ ID NO: 236)	P49411	0.80
エノイル-CoA水添加酵素	EMVLTGDR[Dea]ISAQDAK (SEQ ID NO: 40)	P30084	0.01
エノイル-CoA水添加酵素	AQFAQPEILIGTIPGAGGTQ[Dea]RLTR[Dea]AVG K (SEQ ID NO: 237)	P30084	0.11
ES1タンパク質相同体	VLR[Dea]GVEVTVGHEQEEGGK (SEQ ID NO: 41)	P30042	0.00
フマル酸水添加酵素	IANDIRFLGSGPR[Dea]SGLGELILPEN[Dea]EPGS SIMP GK (SEQ ID NO: 238)	P07954	0.19
フマル酸水添加酵素	YYGAQTVR[Dea]STMNFK (SEQ ID NO: 239)	P07954	0.55
グルタチオンS-転移酵素 カップ1	DSGNKPPGLLPR[Dea]K (SEQ ID NO: 240)	Q9Y2Q3	0.95
グルタチオンS-転移酵素P	DQQEAAALVDMVNDGVEDLR[Dea]C[CAM]K (SEQ ID NO: 241)	P09211	0.63
熱ショック70kDa タンパク質1A/1B	AQIHDLVLVGGSTR[Dea]IPK (SEQ ID NO: 242)	P08107	0.68
熱ショック70kDa タンパク質1A/1B	DAGVIAGLNVLRIN[Dea]EPTAAAIAYGLDR[De a]TGK (SEQ ID NO: 243)	P08107	0.74
熱ショックタンパク質 HSP90-アルファ	HLEINPDHSIIETLR[Dea]QK (SEQ ID NO: 42)	P07900	0.04
熱ショックタンパク質 HSP90-ベータ	EQVANSASFVERVR[Dea]K (SEQ ID NO: 244)	P08238	0.60
イソクエン酸脱水素酵素 [NAD] サブユニットアルファ	ANIMR[Dea]MSDGLFLQK (SEQ ID NO: 245)	P50213	0.84
イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]	IWYEHR[Dea]LIDDMVAQVLK (SEQ ID NO: 246)	P48735	0.13
イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]	SNLDR[Dea]ALGRQ (SEQ ID NO: 247)	P48735	0.19
イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]	ATDFVADR[Dea]AGTFK (SEQ ID NO: 248)	P48735	0.35
イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]	PITIGR[Dea]HAHGDQYK (SEQ ID NO: 249)	P48735	0.58
イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]	TIEAEAAHGTVTR[Dea]HYREHQK (SEQ ID NO: 250)	P48735	0.73
ケチミン還元酵素ミュー クリスタリン	HR[Dea]GYLGVM PAYSAAEDALTTK (SEQ ID NO: 251)	Q14894	0.21

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
ケチミン還元酵素ミュー クリスタリン	PGAHINAVGASR[Dea]PDWR[Dea]ELDDELMK (SEQ ID NO: 252)	Q14894	0.49
L-ラクテート脱水素酵素 A鎖	GEMMDLQHGSFLRL[Dea]TPK (SEQ ID NO: 253)	P00338	0.23
L-ラクテート脱水素酵素 B鎖	HR[Dea]VIGSGC[CAM]NLDSAR[Dea]FR[Dea]YL MAEK (SEQ ID NO: 254)	P07195	0.87
L-ラクテート脱水素酵素 B鎖	IVVVTAGVRRQEGESR[Dea]LNLVQRN[Dea]VN VFK (SEQ ID NO: 255)	P07195	0.87
ロンプロテアーゼ相同体	LQQ[Dea]RLGR[Dea]EVEEK (SEQ ID NO: 256)	K7EKE6	0.97
リンゴ酸脱水素酵素	GC[CAM]DVVVIPAGVPR[Dea]K (SEQ ID NO: 257)	P40926	0.49
リンゴ酸脱水素酵素	NSPLVSR[Dea]LTLYDIAHTPGVAADLSHIETK (SEQ ID NO: 258)	P40926	0.97
メチルクロトノイル-CoA カルボキシラーゼサブユニットアルファ	QEGHIFIGPPPSAIR[Dea]DMGIK (SEQ ID NO: 259)	Q96RQ3	0.31
メチルマロネート- セミアルデヒド脱水素酵素 [アシル化]	NLR[Dea]VNAGDQPGADLGPLITPQAK (SEQ ID NO: 260)	Q02252	0.70
NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	AATITPFR[Dea]K (SEQ ID NO: 43)	Q13423	0.05
NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	SMGAIVR[Dea]GFDTR[Dea]AAALEQFK (SEQ ID NO: 261)	Q13423	0.11
NADH脱水素酵素 [ユビキノ] 1アルファ サブコンプレックスサブユニット6	PIFSR[Dea]DMNEAK (SEQ ID NO: 262)	P56556	0.16
ペルオキシレドキシン-1	R[Dea]TIAQDYGVLLK (SEQ ID NO: 263)	Q06830	0.21
ペルオキシレドキシン-2	EGGLGPLNIPLADVTR[Dea]R[Dea]LSEYGVLL K (SEQ ID NO: 264)	P32119	0.16
ペルオキシレドキシン-5	VR[Dea]LLADPTGAFGK (SEQ ID NO: 265)	P30044	0.16
ペルオキシレドキシン-6	LPFPIIDDR[Dea]NR[Dea]ELAILLGMLDPAEK (SEQ ID NO: 266)	P30041	0.68
ホスフェートキャリアタンパク質	VYFR[Dea]LPRPPPEMPESLK (SEQ ID NO: 44)	Q00325	0.00
ピルビン酸脱水素酵素E1 成分サブユニットアルファ、 体細胞型	C[CAM]DLHR[Dea]LEEGPPVTTVLTR[Dea]EDGL K (SEQ ID NO: 45)	P08559	0.01
ピルビン酸脱水素酵素E1 成分サブユニットアルファ、 体細胞型	DR[Dea]MVNSNLASVEELK (SEQ ID NO: 267)	P08559	0.60
ピルビン酸脱水素酵素 タンパク質X成分	HSLDASQGTATGPR[Dea]GIFTK (SEQ ID NO: 268)	O00330	0.37
短鎖特異性アシル- CoA脱水素酵素	SAAVVFASTDR[Dea]ALQNK (SEQ ID NO: 269)	P16219	0.54
ストレス-70タンパク質	SDIGEVILVGGMTR[Dea]MPK (SEQ ID NO: 270)	P38646	0.11
ストレス-70タンパク質	IVR[Dea]ASN[Dea]GDAWVEAHGK (SEQ ID NO: 271)	P38646	0.16
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノ] フラビン タンパク質サブユニット	VTLEYR[Dea]PVIDK (SEQ ID NO: 272)	P31040	0.07
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノ] フラビン タンパク質サブユニット	IYQR[Dea]AFGGQSLK (SEQ ID NO: 273)	P31040	0.40
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノ] 鉄- 硫黄サブユニット	FAIYR[Dea]WDPDK (SEQ ID NO: 46)	P21912	0.05

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP/GDP形成] サブユニットアルファ	TR[Dea]LIGPNC[CAM]PGVINPGEC[CAM]K (SEQ ID NO: 47)	P53597	0.02
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP/GDP形成] サブユニットアルファ	PVVSFIAGLTAPPGR[Dea]R[Dea]MGHAGAIAG GK (SEQ ID NO: 274)	P53597	0.09
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP形成] サブユニットベータ	INFDSNSAYR[Dea]QK (SEQ ID NO: 275)	Q9P2R7	0.27
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP形成] サブユニットベータ	GRIC[CAM]N[Dea]QVLVC[CAM]ER[Dea]K (SEQ ID NO: 276)	Q9P2R7	0.39
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP形成] サブユニットベータ	IFDLQDWTQEDER[Dea]DK (SEQ ID NO: 277)	Q9P2R7	0.73
サクシニル-CoA : 3-ケト酸 コエンザイムA転移酵素1	ADR[Dea]AGNVIFR[Dea]K (SEQ ID NO: 48)	P55809	0.04
サクシニル-CoA : 3-ケト酸 コエンザイムA転移酵素1	GLTAVSNNAGVDNFGGLLLR[Dea]SK (SEQ ID NO: 278)	P55809	0.93
チオレドキシン依存性 ペルオキシド還元酵素	HLSVNDLPVGR[Dea]SVEETLRLVK (SEQ ID NO: 279)	P30048	0.18
チオレドキシン依存性 ペルオキシド還元酵素	HLSVNDLPVGR[Dea]SVEETLR[Dea]LVK (SEQ ID NO: 280)	P30048	0.68
三官能酵素サブユニット アルファ	ALTSFER[Dea]DSIFSNTGQLDYQGFEK (SEQ ID NO: 281)	P40939	0.99
超長鎖特異性アシル-CoA 脱水素酵素	SDSHPSDALTR[Dea]K (SEQ ID NO: 282)	P49748	0.32
超長鎖特異性アシル-CoA 脱水素酵素	ITAFVVER[Dea]GFGGITHGPPEK (SEQ ID NO: 283)	P49748	0.55
超長鎖特異性アシル-CoA 脱水素酵素	ALVER[Dea]GGVVTSNPLGF (SEQ ID NO: 284)	P49748	0.87
電圧依存アニオン選択性 チャンネルタンパク質1	SR[Dea]VTQSNFAVGYK (SEQ ID NO: 49)	P21796	0.02
60kDa熱ショックタンパク質	FDR[Dea]GYISPYFINTSK (SEQ ID NO: 50)	P10809	0.04
61kDa熱ショックタンパク質	VVR[Dea]TALLDAAGVASLLTTAEVVVTEIPK (SEQ ID NO: 285)	P10809	0.07
62kDa熱ショックタンパク質	LVQDVANNTNEEAGDGTATVTLAR[Dea]SIK (SEQ ID NO: 286)	P10809	0.14
63kDa熱ショックタンパク質	GANPVEIR[Dea]R[Dea]GVMLAVDAVIAELK (SEQ ID NO: 287)	P10809	0.22
64kDa熱ショックタンパク質	GR[Dea]TVIIQSWGSPK (SEQ ID NO: 288)	P10809	0.55
65kDa熱ショックタンパク質	GANPVEIRR[Dea]GVMLAVDAVIAELK (SEQ ID NO: 289)	P10809	0.58
66kDa熱ショックタンパク質	FGADAR[Dea]ALMLQGVDLLADAVAVTMGPK (SEQ ID NO: 290)	P10809	0.93
細胞質アコニテート 水添加酵素	PAR[Dea]VILQDFTGVPVVDFAAMR[Dea]DAV K (SEQ ID NO: 291)	P21399	0.77
ポリメラーゼI及び 転写産物遊離因子	TVRGSRLER[Dea]QAGQIK (SEQ ID NO: 292)	Q6NZI2	0.09
ポリメラーゼI及び 転写産物遊離因子	TVR[Dea]GSRLER[Dea]QAGQIK (SEQ ID NO: 293)	Q6NZI2	0.34
三官能酵素サブユニット ベータ	PNIR[Dea]NVVVVDGVR[Dea]TPFLLSGTSYK (SEQ ID NO: 51)	P55084	0.02

10

20

30

40

タンパク質	ペプチド	UniProtKB 登録	p_kw
アコニテート水添加酵素	TGR[Dea]EDIANLADEFK (SEQ ID NO: 52)	Q99798	0.00
アコニテート水添加酵素	R[Dea]LQLEPFDFK (SEQ ID NO: 53)	Q99798	0.01
二重特異性タンパク質 ホスファターゼ3	LGITHVLNAAEGR[Dea]SFMHVNTNANFYK (SEQ ID NO: 54)	P51452	0.01
伸長因子1-アルファ2	ASGVSLLEALDTILPPTR[Dea]PTDK (SEQ ID NO: 294)	Q05639	0.45
伸長因子1-アルファ2	IGGIGTVPVGR[Dea]VETGILR[Dea]PGMVVTFAP VNITTEVK (SEQ ID NO: 295)	Q05639	0.80
伸長因子2	VNFTVDQIR[Dea]AIMDK (SEQ ID NO: 296)	P13639	0.09
真核生物翻訳開始因子4B	VAPAQPSEEGPGR[Dea]K (SEQ ID NO: 297)	E7EX17	0.95
ヒストンH2Bタイプ1-M	AVR[Dea]LLLPGELAK (SEQ ID NO: 298)	Q99879	0.99
ヒストンH3 (フラグメント)	LPFQR[Dea]LVR[Dea]EIAQDFK (SEQ ID NO: 299)	K7EK07	0.36
ヒストンH4	RISGLIYEETR[Dea]GVLK (SEQ ID NO: 300)	P62805	0.65
ヒストンH4	VFLENVIR[Dea]DAVTYTEHAK (SEQ ID NO: 301)	P62805	0.74
神経芽細胞分化関連 タンパク質AHNAK	FGVSTGR[Dea]EGQTPK (SEQ ID NO: 55)	Q09666	0.01
フィブリノーゲンアルファ鎖	ESSSHHPGIAEFPSR[Dea]GK (SEQ ID NO: 302)	P02671	0.39
フィブリノーゲンガンマ鎖	R[Dea]LDGSVDFK (SEQ ID NO: 303)	C9JEU5	0.62
ハプトグロビン	LR[Dea]TEGDGVYTLNNEK (SEQ ID NO: 304)	P00738	0.40
セロトランスフェリン	DYELLC[CAM]LDGTR[Dea]K (SEQ ID NO: 305)	P02787	0.10
コラーゲンアルファ-3 (VI) 鎖	DVVFLLDGSEGVR[Dea]SGFPLLK (SEQ ID NO: 56)	E7ENL6	0.03

【 0 1 0 4 】

(表1C) 健常対象群と虚血対象群、及び健常対象群とIDCM対象群の比較における、
 上方制御または下方制御されるシトルリン化ペプチド。I：虚血性心疾患 (ISHD)、
 I/N = 虚血群と正常 (健常) 群の比較、ID = 特発性心筋症 (IDCM)、ID/N =
 IDCM群と対照 (健常) 群の比較。

タンパク質	I/N	I
ES1タンパク質相同体	10.32617915	アップ
アコニテート水添加酵素	8.871956482	アップ
グリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素	7.914843955	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	7.552745345	アップ
ピメンチン	6.886890573	アップ
神経芽細胞分化関連タンパク質AHNAK	6.631800512	アップ
血清除去反応タンパク質	5.310526396	アップ
エノイル-CoA水添加酵素	5.304039413	アップ
アコニテート水添加酵素	5.18248378	アップ

タンパク質	I/N	I
ペプチジルプロリル シスートランス異性化酵素A	4.691862761	アップ
デルター1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	4.531765219	アップ
塩化物細胞内チャネルタンパク質4	4.143020683	アップ
アルコール脱水素酵素1B	3.979284116	アップ
アデニル酸キナーゼ4	3.954001114	アップ
脂肪酸結合タンパク質	3.891772332	アップ
ミオシン結合タンパク質C	3.770886194	アップ
アコニテート水添加酵素	3.740779581	アップ
アコニテート水添加酵素	3.54332942	アップ
デルター1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	3.484011583	アップ
二重特異性タンパク質ホスファターゼ3	3.348178139	アップ
ピルビン酸脱水素酵素E1成分サブユニットアルファ、体細胞型	3.336292196	アップ
電圧依存アニオン選択性チャネルタンパク質1	3.075867039	アップ
熱ショックタンパク質HSP90-アルファ	3.018162117	アップ
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノン] 鉄-硫黄サブユニット	2.797967329	アップ
アコニテート水添加酵素	2.646902712	アップ
炭酸脱水素酵素3	2.393105549	アップ
血清除去反応タンパク質	2.181113303	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	2.125964715	アップ
サクシニル-CoA : 3-ケト酸コエンザイムA転移酵素1	2.02609809	アップ
アルコール脱水素酵素クラス-3	1.955112799	アップ
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP/GDP形成] サブユニットアルファ	1.813434217	アップ
トロポニンI、心筋	1.770629108	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	1.757665967	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	1.716317069	アップ
フィラミン-C	1.707322518	アップ
60kDa熱ショックタンパク質	1.691322503	アップ
熱ショックタンパク質ベータ-7	1.659329245	アップ
ミオゼニン-2	1.640224333	アップ
シトクロムc (フラグメント)	1.516000483	アップ
LIMドメイン結合タンパク質3	1.456615429	アップ
三官能酵素サブユニットベータ	1.262914035	アップ
ホスフェートキャリアタンパク質	0.90684035	ダウン
ATP合成酵素サブユニットアルファ	0.821046528	ダウン
コラーゲンアルファ-3 (VI) 鎖	0.787448747	ダウン
ミオゼニン-2	0.750016161	ダウン
トロポニンI	0.707050891	ダウン
NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	0.689499324	ダウン
アルファ-クリスタリンB鎖	0.574071929	ダウン
ATP合成酵素カップリングファクター6	0.558912444	ダウン

10

20

30

40

タンパク質	I/N	I
トロポニンT、心筋（フラグメント）	0.474388613	ダウン
ベーターエノラーゼ	0.324050919	ダウン
アデニル酸キナーゼイソ酵素1	0.134886108	ダウン

【 0 1 0 5 】

（表 1 D）健常対象群と虚血対象群、及び健常対象群と I D C M 対象群の比較における、上方制御または下方制御されるシトルリン化ペプチド。I：虚血性心疾患（I S H D）、I / N = 虚血群と正常（健常）群の比較、I D = 特発性心筋症（I D C M）、I D / N = I D C M 群と対照（健常）群の比較。

タンパク質	ID/N	ID
ATP合成酵素サブユニットアルファ	18.47537571	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	15.31631115	アップ
ミオゼニン-2	14.27029851	アップ
グリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素	12.08226474	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	9.229219757	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	7.956015709	アップ
ES1タンパク質相同体	6.450987219	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	4.442955018	アップ
エノイル-CoA水添加酵素	3.92858654	アップ
電圧依存アニオン選択性チャネルタンパク質1	3.872789427	アップ
アコニテート水添加酵素	3.868674325	アップ
ホスフェートキャリアタンパク質	3.29840839	アップ
ピルビン酸脱水素酵素E1成分サブユニットアルファ、体細胞型	3.241986763	アップ
アコニテート水添加酵素	3.202560876	アップ
ビメンチン	3.18977634	アップ
NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	3.087350045	アップ
三官能酵素サブユニットベータ	3.078371104	アップ
アコニテート水添加酵素	3.033531051	アップ
ミオシン結合タンパク質C	2.938608028	アップ
塩化物細胞内チャネルタンパク質4	2.768865949	アップ
アコニテート水添加酵素	2.733376766	アップ
熱ショックタンパク質HSP90-アルファ	2.673523729	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	2.570795078	アップ
コラーゲンアルファ-3 (VI) 鎖	2.444430998	アップ
血清除去反応タンパク質	2.396582653	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	2.194292783	アップ
アルコール脱水素酵素1B	1.513050932	アップ
アコニテート水添加酵素	1.359569141	アップ

10

20

30

40

タンパク質	ID/N	ID
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノン] 鉄-硫黄サブユニット	1.182430989	アップ
二重特異性タンパク質ホスファターゼ3	1.089131195	アップ
血清除去反応タンパク質	1.05734493	アップ
60kDa熱ショックタンパク質	0.676500721	ダウン
熱ショックタンパク質ベーター7	0.569844647	ダウン
フィラミン-C	0.543903731	ダウン
アルコール脱水素酵素クラス-3	0.539343446	ダウン
アデニル酸キナーゼ4、	0.516646378	ダウン
脂肪酸結合タンパク質	0.500998082	ダウン
ミオゼニン-2	0.483486835	ダウン
神経芽細胞分化関連タンパク質AHNAK	0.440092248	ダウン
シトクロムc (フラグメント)	0.256014197	ダウン
サクシニル-CoAリガーゼ [ADP/GDP形成] サブユニットアルファ	0.234602593	ダウン
ペプチジル-プロリル シス-トランス異性化酵素A	0.231427358	ダウン
炭酸脱水素酵素3	0.230059909	ダウン
LIMドメイン結合タンパク質3	0.21853459	ダウン
トロポニンI	0.188118204	ダウン
トロポニンI	0.184373163	ダウン
トロポニンT	0.153543871	ダウン
アルファ-クリスタリンB鎖	0.145172906	ダウン
サクシニル-CoA : 3-ケト酸コエンザイムA 転移酵素1	0.121733077	ダウン
ATP合成酵素カップリングファクター6	0.076789945	ダウン
アデニル酸キナーゼイソ酵素1	0.023786955	ダウン
ベーター-エノラーゼ	0.013231973	ダウン

10

20

30

【 0 1 0 6 】

(表1E) I群及びID群の両方でアップであったタンパク質。I：虚血性心疾患 (ISHD)、I/N = 虚血群と正常 (健常) 群の比較、ID = 特発性心筋症 (IDCM)、ID/N = IDCM群と対照 (健常) 群の比較。

タンパク質	I/N	I	ID/N	ID
ATP合成酵素サブユニットアルファ	2.125964715	アップ	18.47537571	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	1.757665967	アップ	15.31631115	アップ
グリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素	7.914843955	アップ	12.08226474	アップ
ATP合成酵素サブユニットアルファ	1.716317069	アップ	7.956015709	アップ
ES1タンパク質相同体	10.32617915	アップ	6.450987219	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	4.531765219	アップ	4.442955018	アップ
エノイル-CoA水添加酵素	5.304039413	アップ	3.92858654	アップ
電圧依存アニオン選択性チャネルタンパク質1	3.075867039	アップ	3.872789427	アップ
アコニテート水添加酵素	3.54332942	アップ	3.868674325	アップ
ピルビン酸脱水素酵素E1成分サブユニット アルファ、体細胞型	3.336292196	アップ	3.241986763	アップ
アコニテート水添加酵素	8.871956482	アップ	3.202560876	アップ
ビメンチン	6.886890573	アップ	3.18977634	アップ
三官能酵素サブユニットベータ	1.262914035	アップ	3.078371104	アップ
アコニテート水添加酵素	5.18248378	アップ	3.033531051	アップ
ミオシン結合タンパク質C	3.770886194	アップ	2.938608028	アップ
塩化物細胞内チャネルタンパク質4	4.143020683	アップ	2.768865949	アップ
アコニテート水添加酵素	3.740779581	アップ	2.733376766	アップ
熱ショックタンパク質HSP90-アルファ	3.018162117	アップ	2.673523729	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	7.552745345	アップ	2.570795078	アップ
血清除去反応タンパク質	2.181113303	アップ	2.396582653	アップ
デルタ-1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	3.484011583	アップ	2.194292783	アップ
アルコール脱水素酵素1B	3.979284116	アップ	1.513050932	アップ
アコニテート水添加酵素	2.646902712	アップ	1.359569141	アップ
コハク酸脱水素酵素 [ユビキノ] 鉄- 硫黄サブユニット	2.797967329	アップ	1.182430989	アップ
二重特異性タンパク質ホスファターゼ3	3.348178139	アップ	1.089131195	アップ
血清除去反応タンパク質	5.310526396	アップ	1.05734493	アップ

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

(表 1 F) I 群及び I D 群の両方でダウンであったタンパク質。I : 虚血性心疾患 (I S H D)、I / N = 虚血群と正常 (健常) 群の比較、I D = 特発性心筋症 (I D C M)、I D / N = I D C M 群と対照 (健常) 群の比較。

タンパク質	I/N	I	ID/N	ID
トロポニンI	0.707051	ダウン	0.188118	ダウン
アルファ-クリスタリンB鎖	0.574072	ダウン	0.145173	ダウン
ATP合成酵素カップリングファクター6	0.558912	ダウン	0.07679	ダウン
トロポニンT、心筋 (フラグメント)	0.474389	ダウン	0.153544	ダウン
ベータ-エノラーゼ	0.324051	ダウン	0.013232	ダウン
アデニル酸キナーゼイソ酵素1	0.134886	ダウン	0.023787	ダウン

【 0 1 0 8 】

抗修飾シトルリン抗体を用いる I S H D、I D C M 及び非不全ドナーの心臓 (n = 1 0 / 群) から採取した筋フィラメントリッチの画分及び高細胞質基質リッチの画分のウエスタンブロッティングにより、シトルリン化が細胞内タンパク質で生じることが確認された

。プロットあたりのバンド数またはバンド密度に関して、群間の全体的な免疫反応性に差はなかったが（図 1 B）、インゲル消化及びその後の免疫反応性のバンドの質量分析により、予想される分子量に主要な筋節タンパク質（例えば、ミオシン重鎖及び軽鎖、ならびにアクチン）が同定された。イムノ - 1 D E による定量的評価は、ゲルバンドの他のタンパク質の存在、及び質量分析を用いる直接的な部位特定評価の課題によって複雑になったことに留意しなければならない。

【 0 1 0 9 】

多量に存在する筋節タンパク質のシトルリン化をさらに検証するため、D I G E 2 D ゲル電気泳動（pH 4 ~ 7、10 % S D S P A G E）を行った。I S H D、I D C M 及び非不全ドナーの心臓（n = 4 / 群）の筋フィラメントリッチの画分及び高細胞質基質リッチの画分を、最大のシトルリン化を誘発するため P A D 2 で前処理し、マッチングする未処理試料と 1 : 1 の比で混合すると同時に 2 D ゲル電気泳動で分離した。アクチン、T M 及びミオシン軽鎖などの筋節タンパク質が、P A D 2 の異所的処理でシトルリン化されることが示された（図 2）。

【 0 1 1 0 】

修飾筋節タンパク質の生化学的評価

シトルリン化が筋節タンパク質の機能に影響を与えるかどうか試験するため、アクチン、H M M、T M 及びトロポニンを異所性 P A D 2 でシトルリン化し、次いでそれぞれの非修飾組み換えタンパク質と比較してシトルリン化がこれらの生化学的特性、構造特性、または酵素特性に影響するかどうか判定した。F - アクチンに対するシトルリン化 H M M、T M もしくは T M - T n I、または未処理の H M M、T M もしくは T M - T n I の結合は、古典的な共沈降試験を用いて測定した（図 3 A ~ C）。アクチンのシトルリン化によって F - アクチン形成は変化せず、アクチンの 95 % 超が遠心分離でペレット化した。F - アクチンへのシトルリン化 T M の結合は非修飾の T M と比較して向上した（図 3 A）。T M 及び H M M は、F - アクチンとの互いの結合に協同的に影響することがあり得るため [Galinska A et al. The C terminus of cardiac troponin I stabilizes the Ca²⁺-activated state of tropomyosin on actin filaments. Circ Res 2010, 106: 705 - 711]、F - アクチンへの T M 単独の結合が乏しいが、F - アクチンへのミオシン頭部の結合においては増大する条件の下で協同性について試験した [Eaton BL. Tropomyosin binding to F-actin induced by myosin heads. Science 1976, 192: 1337 - 1339]。図 3 B に示すように、低塩濃度においてシトルリン化 T M は、H M M 存在下で F - アクチンに結合することができた。

【 0 1 1 1 】

T M 存在下での F - アクチンへの心臓 T n I の結合は、F - アクチンと T M の存在下でシトルリン化 T n I を共沈降することによって行うことができた。心臓 T n I のシトルリン化形態と非シトルリン化形態のいずれも F - アクチンに等しくよく結合することが明らかになった（図 3 C）。

【 0 1 1 2 】

H M M - A T P アーゼ活性の阻害

筋節タンパク質のシトルリン化によるアクトミオシン H M M - A T P アーゼ活性の潜在的な修飾作用を検証するため、シトルリン化 H M M、F - アクチン及び T M の存在下で実験を行った。図 4 A に要約したデータから、シトルリン化 H M M の存在下で（0.5 μ mol / L の H M M 及び 7 μ mol / L の F - アクチン）アクトミオシン H M M - A T P アーゼの活性が 0.32 ± 0.01 nmol P i から 0.22 ± 0.002 nmol P i に低下し、30 % の酵素活性の低下に相当することが明らかとなった。対照的に F - アクチンのシトルリン化の場合は、アクトミオシン H M M - A T P アーゼの活性が酵素活性で最大 55 % 向上した（図 4 A）。F - アクチンと H M M の両方をシトルリン化した場合は、A T P 加水分解の速度は対照群より大きい状態を維持した（ 0.32 ± 0.01 nm

o l P i に対し $0.368 \pm 0.005 \text{ nmol P i}$)。図 4 B から、アクトミオシン HMM - A T P アーゼの活性が T M のシトルリン化による影響を受けたことが明らかとなった。非シトルリン化 T n I 及びシトルリン化 T n I によってもたらされるアクトミオシン HMM - A T P アーゼの阻害を比較した。HMM - F - アクチン - T M に非シトルリン化 T n I を添加すると、37 における A T P アーゼの比率が低下した。シトルリン化 T n I は非シトルリン化 T n I と同様に作用し、A T P アーゼの減少を引き起こしたが非シトルリン化の形態に対する有意差は無かった。

【0113】

P A D 2 によって、除膜した筋細胞のカルシウム感受性が低下する

野生型 C 5 7 B 1 6 雄マウスの左心室から単離し化学的に除膜した心筋細胞を様々な濃度のカルシウムに曝露した (群あたり 3 匹のマウスから $n = 8$ の筋細胞を採取、図 4 C ~ F)。P A D 2 処理は、最大カルシウム活性化力 (F_{max}) とヒル係数 (nH) のいずれにも影響しなかった。しかしながら、P A D 2 は、力とカルシウムの関係において EC_{50} の増加またはカルシウム感受性の減少を示す右方向への移動を引き起こす ($p = 0.009$ 、図 4 C)。このことから、筋フィラメントタンパク質のシトルリン化によって機能喪失表現型が生じ、その細胞内カルシウムに応答する力を生じる能力が低下することが示唆される。

【0114】

P A D m R N A 発現の分析

心筋層における P A D アイソフォーム発現の細胞特異性を測定するため、単離した心筋細胞及び線維芽細胞においてネステッド P C R によるアイソフォーム特異的プライマーを用いて m R N A 発現レベルを測定した (図 5)。P A D 2 は、心筋細胞及び心臓線維芽細胞の両方で発現する主要なアイソフォームであったが、線維芽細胞では P A D 1 と P A D 4 の m R N A の顕著な発現も認められた。対照的に、P A D 3 の m R N A は、試験したいずれの細胞型及び条件においても検出されなかった (図 5、200 b p にバンドが無いことに留意されたい、より詳細についてはオンラインの補遺を参照されたい)。

【0115】

実施例 3

本発明者らの実験結果は、正常群及び H F 群の心筋層のシトルリン化タンパク質の特性を示す。分析によってシトルリン化がミトコンドリア及び筋節サブプロテオームにおいて増加することが明らかとなった。タンパク質のシトルリン化は広範な細胞に分布しているが (図 1)、ミトコンドリア及び筋節サブプロテオームにおいて極めて多い。これら 2 つのサブプロテオームの間の密接な関係は、筋節のエネルギー要求性が高いことから予想されないことではない。シトルリン化は、ホスホリル化及びアセチル化と同様、協調して筋収縮タンパク質を制御する可能性があると推測した。興味深いことに、代謝経路 / 代謝に関与する複数の酵素は、虚血性群では上方制御され I D C M 群では下方制御された (図 6)。心臓系におけるシトルリン化タンパク質 - タンパク質相互作用のトポロジー及び機能アノテーションを理解するため、S T R I N G データベースを用いてタンパク質のネットワークを構築した (図 2 B)。全タンパク質ネットワークは、高スコアの相互作用の相手から構成される (S T R I N G 関連信頼性スコア 0.5、虚血性群 / I D C M 群と対照群の比較)。このサブネットワークの目視による解析から、シトルリン化タンパク質は互いに相互作用し、代謝ならびに呼吸鎖の標的、収縮及び情報伝達系に関与することが示された。シトルリン化の潜在的な機能的結果を理解するための最初の評価として、組み換え筋節タンパク質 HMM、F - アクチン、T M 及び T n I をモデルタンパク質として用いて、厚フィラメントと細フィラメントの機能を支配する相互作用について検討し、P A D 2 で処理した単一の除膜筋細胞の収縮特性を測定した。

【0116】

T n への Ca^{2+} 依存性の転換によりアクチン表面での T M の方位角の動きが変化し、この結果、ミオシン結合及び架橋異性化によって強力な結合、力生成状態、筋肉収縮を可能にする。低濃度の細胞内 Ca^{2+} では T n - T M はアクチンのミオシン結合部位を立体

的に遮断するが（遮断状態）、一方で高濃度の Ca^{2+} の存在下では $\text{Tn} - \text{TM}$ は移動して $\text{F} - \text{アクチン}$ のミオシン結合部位を部分的に露出させる（閉鎖状態）。 Ca^{2+} 存在下でのミオシン結合は十分な活性化に必要とされる。アクチンフィラメントの TM の正確な位置調整に影響するのは、 TnT を経て TM に一部伝達される Ca^{2+} 誘発性の TnI のコンフォメーション変化（特に TM に沿って結合する T1 領域）ならびにミオシン結合の組み合わせでもある。本発明者らの MS データに基づく、ミオシン、アクチン、 TM 、 TnI 及び TnT のシトルリン化部位は、これらの相互作用、従ってアクトミオシン $\text{HMM} - \text{ATP}$ アーゼの活性及び収縮に影響する可能性がある領域にある。以下に、本明細書で提示される生化学的生理学的実験に基づいて潜在的な影響について概説する。

【0117】

第一に、固有のアクトミオシン $\text{HMM} - \text{ATP}$ アーゼはシトルリン化によって阻害されるが、これは $\text{F} - \text{アクチン}$ の存在下において、 $\text{F} - \text{アクチン}$ がシトルリン化されているかいないかにかかわらず克服された。シトルリン化 $\text{F} - \text{アクチン}$ は、 HMM 酵素活性のより強力な調節物質であり、非修飾 $\text{F} - \text{アクチン}$ と比較してアクトミオシン $\text{HMM} - \text{ATP}$ アーゼを 55% 増加させた。このことから、 $\text{F} - \text{アクチン}$ のシトルリン化はアクチンフィラメントのコンフォメーションを変化させ、結合した時点でミオシンによる ATP の加水分解の容易さを変化させることが示唆される。アクチン - HMM 相互作用は TM のシトルリン化によっても影響を受けた。シトルリン化 TM は、非シトルリン化 TM と比較して $\text{F} - \text{アクチン}$ により強固に結合した。これは HMM の存在下においても認められた（遠心分離分析に基づく）。これは、非シトルリン化 TM と比較して、シトルリン化 $\text{TM} - \text{アクチン} - \text{HMM}$ ATP アーゼ活性の阻害と相関しており、シトルリン化 TM によって HMM のアクチンフィラメントへの結合能力が変化することが示唆された（図 7）。興味深いことに、遠心分離分析に基づく、シトルリン化 TnI は、非修飾タンパク質複合体と同様に、 $\text{アクチン} - \text{TM}$ に強固に結合した。図 3 C から、非修飾 TnI 及び修飾 TnI の > 95% がペレットに存在していたことが明らかである。

【0118】

生化学的結果は、本発明者らの生理学的結果と関連しており、筋節タンパク質のシトルリン化によって除膜心筋細胞中の Ca^{2+} 感受性が低下したことを示した（図 4 C）。 TnI において、シトルリン化残基 203 を含む C 末端残基 191 ~ 210 は、主に、架橋環化を防止する TM のコンフォメーションの維持を担う。従って、 TnI は遮断状態を促進するだけでなく、さらに閉鎖状態における TM の安定化に寄与する。マウスにおいては、心筋症の変異、R192H または R204H（これらは、ヒトの配列 191 または 203 と同等で、後者は上記のシトルリン化された残基と同一である）を有する心臓 TnI は $\text{アクチン} - \text{TM}$ に対する Tn の結合親和性を向上させる。おそらくこれは、 TM に沿って存在し、 $\text{アクチン} - \text{TM} - \text{Tn}$ フィラメントの協同性に関与することが示されている N 末端の尾部（ TnT1 ）にある残基 77 における TnT のシトルリン化によって増大する。さらに、 $\text{アクチン} - \text{TM} - \text{Tn}$ への Ca^{2+} またはミオシンの結合は、2 番目のシトルリン化残基 169 の隣接する TnI 残基 151 及び 188 を $\text{F} - \text{アクチン}$ の外部領域から離れた位置に移動させることができる。このことは、ミオシンに対する $\text{F} - \text{アクチン}$ の高親和性結合部位を露出させることができる Ca^{2+} による $\text{TnI} - \text{TM}$ への方位角移動と一致する。厚フィラメントタンパク質（ TM 、 MHC 、 MyBP-C 、 ELC 、及び RLC ）に生じる家族性の肥大性心筋症変異についての研究から、1 つのアミノ酸側鎖の変化が心臓のモルフォロジー及び機能に多大な影響を与えることが明らかである。さらに、心不全における異常な収縮や緩和をもたらす因子には、結果としてエネルギーの生成、エネルギーの伝達及びエネルギーの利用の減少を生じる代謝経路の異常などがある。

【0119】

最後に、心臓におけるシトルリン化タンパク質の関与をより理解するためには、細胞特異性についての洞察力を得ることが重要である。過去に免疫組織学的分析によって得られたデータから、PAD1 ~ 3 及び、ある程度であるが PAD6 が、心筋細胞で検出され、PAD2 及び 4 は内皮細胞及び血管平滑筋細胞に見られたことが示された。本研究におい

10

20

30

40

50

て、本発明者らは抗体や組織片に依存せず、むしろ単離したマウス心筋細胞及び心臓線維芽細胞のPADファミリーメンバーのmRNA発現について調べた。データによると、PAD2が主として心筋細胞及び心臓線維芽細胞の両方で発現したのに対して、PAD1とPAD4のmRNAは心臓線維芽細胞における主要な形態であった。

【0120】

心臓におけるシトルリン化に関して過去に研究されていない役割について提示してきた。最終的に、大部分の筋節タンパク質のシトルリン化の同定及びそれらの生化学的特性の変化から、心臓の収縮性の新規なPTM制御が存在する可能性があることが示唆される。これらの残基のいくつかにおけるシトルリン化は、対照群と比較してHFを有する個人の心筋層で増大するため、シトルリン化がHFにおける収縮不全の減少においてある役割を果たす可能性があることが示唆される。

10

【0121】

実施例4：神経変性疾患におけるシトルリン化ペプチド

シトルリン化は、側鎖の酸化が特徴のアルギニン残基のPTMである。この修飾は、アルギニンからシトルリンへの変換を生じるペプチジルアルギニンデイミナーゼ酵素(PAD)によって触媒される。シトルリン化は、脱イミノ化としても知られ、正電荷が消失し水素結合能が低下した場合に生じて、最終的にタンパク質の化学構造の変化を引き起こす。この修飾は、例えばアポトーシスやエピジェネティクスにおける生理学的役割と、癌や中枢神経系の疾患における病理学的役割の両方を果たす[3]。さらに、抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)は、関節リウマチ(RA)患者の約60%に存在しており、侵襲性疾患と予後不良に関連している[4、5]。RAの遺伝学的研究により、100を超える非HLA遺伝子座における疾患を生じやすいSNPが多数同定されてきた[6]。従って、シトルリン化、SNP及び疾患に関連付ける研究によって、多くの病理学的障害に対する洞察を得ることができる。

20

【0122】

プロトコルの概説

このプロトコルの目的は、インビボのシトルリン化タンパク質/ペプチドの正確な検出を裏付けるシトルリン化試験ライブラリを構築することである。プロトコルは、試料調製、DIAモードにおける高品質のフラグメントイオンスペクトルの取得、スペクトルシトルリン化ライブラリの生成及び品質に基づくシトルリン化ペプチドをピーキングするためのバイオインフォマティクスパイプラインを網羅する。さらに、ペプチドデータを既知データと新規データを比較してさらにアノテートし、疾患に関連するゲノム異常情報にリンクすることによって、巨大なデータセットを知識に翻訳するため追加のツールを開発した。

30

【0123】

材料

試薬：ウサギ骨格筋PADカクテル(PAD)(SignalChem)、配列決定グレードLys-Cプロテアーゼ(WAKO)、iRT保持時間ペプチド[13]、FASP(商標)タンパク質消化キット(Expedeon)。

【0124】

ヒト脳組織。NIH NeuroBioBank(NBB)から入手した上前頭回(SFG)(n=10)に相当する健常対照の死後ヒト脳組織。この事例には、神経疾患の病歴と神経病理学的診断のいずれも無かった。ヒトALS運動皮質(n=1)及びALS胸髄(n=4)、及び後頭葉から採取した相当する健常な試料(n=3)。マウスの脳：アルツハイマーのモデル(1.9月齢、ベータ-アミロイドのロット、記憶障害及び神経変性の発症、n=5。2.9月齢、正常/健常なマウス、記憶正常、n=5。3.2月齢、ベータ-アミロイド検出ほとんど無し乃至全く無し、及び記憶正常、n=2。4.2月齢、健常なマウス、n=2。)。脳卒中のマウス(中大脳動脈閉塞脳卒中、n=5、脳卒中発生箇所の左脳、右脳、相当する健常対照)。健常なマウス(n=5、脳、大動脈、骨格筋)。

40

【0125】

50

脳バッファーA：氷冷した低塩バッファー：10 mM Tris、pH 7.5、5 mM EDTA、1 mM DTT、10 %スクロース、10 mM b-グリセロホスフェート、10 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、10 mM ピロリン酸4ナトリウム、50 mM フッ化ナトリウム、1 × Rocheコンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル)。

【0126】

脳バッファーB：1 % Triton、10 mM Tris、pH 7.5、5 mM EDTA、1 mM DTT、10 %スクロース、10 mM b-グリセロホスフェート、10 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、10 mM ピロリン酸4ナトリウム、50 mM フッ化ナトリウム、1 × Rocheコンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテル。

10

【0127】

PADバッファー：0.1 M tris-HCl、pH 7.4、10 mM CaCl₂、5 mM DTT、10 µg / ul アプロトニン、10 µg / ul ロイペプチン、10 µg / ul ペプスタチン。

【0128】

機器：High Speed Mixer Mill (MM400) (Retsch)、Mixer Mill ジャー (#22.008.0005 Retsch) 及び7 mm ステンレス鋼ボール (#22.455.0008 Retsch)、Refrigerated Bench-top遠心分離機 (Eppendorf 5415R) (温度 4 及び20)、TLA 100.2ローター付きBeckman Coulter Optima Ultracentrifuge、TripleToF 5600 + 質量分析計 (AB Sciex)、TripleToF 6600 + 質量分析計 (AB Sciex)、iProXpress (<http://proteininformaticsresource.org/iproxpress2>) [14]、コンピュータ：マイクロソフト・ウィンドウズ7 付属PC (Microsoft)、RAM 4 GB、十分なハードディスクの空き容量 (このプロトコルの場合の試験は 40 GB)。

20

【0129】

ソフトウェア：マイクロソフト・ウィンドウズ7 (Microsoft)、MSエクセル (Microsoft)、Cytoscape Plugin BiNGO バイオロジカル遺伝子オンコロジーツール (<http://baderlab.org/Software/EnrichmentMap/BingoTutorial>)。

30

【0130】

装置セットアップ：スクリーンショットを含む各ソフトウェアのインストールの詳細説明は補助資料で提供する。

【0131】

方法：1. 脳試料の調製。タイミング 90 分から数日 (試料数に依存)。2. 組織を秤量し湿潤組織重量を記録する。3. 組織を外科用メスまたは組織スライス刃を用いて小片に切断する。4. 組織片を3 体積 (w/v) の氷冷バッファーAに移す。5. 組織を氷冷しながらホモジナイザーを用いて均一化する (単一の7 mm ステンレス鋼ボールを用い 20 Hz で30 秒)。6. 試料をBeckman Coulter Optima UltracentrifugeでTLA 100.2ローターを用い30800 rpm、4 で15 分間遠心分離する。7. 上澄み液を清浄なチューブに移す。8. 残りのペレットにバッファーBを加え (組織とバッファーの比、1:3)、冷却したMixer Mill MM400にて30 Hz で30 秒間均一化する。9. TLA-100.2ローター (Beckman) にて100,000 rpmで20 分間遠心分離する。10. 上澄み液を清浄なチューブに移しブラッドフォード法によってタンパク質濃度を測定する。

40

【0132】

タンパク質のシトルリン化：試験ライブラリに含まれている場合、ペプチドは標的とされたMSのみによって同定できる。特定の生物学的条件で発現するタンパク質を網羅するため、理論的に全生物学的空間を表すシトルリン化ペプチドのプールを作成する必要があ

50

った。ほとんどのPADアイソフォームは、核局在化シグナルを含み実際に少なくとも一部分が核に存在することが認められるPAD4を除いて、細胞質で排他的に発現する。従って、基質の特異性がPADのアイソフォーム間で異なると仮定するのが妥当であろう[15、16]。このプロセスにおける重要なステップは、接近可能なアルギニン残基の低シトルリン化を誘発するPADカクテルによる、プールした組織/試料(複数可)のインビトロでの処理である。(1)200ugの試料プールを得るため各画分の試料をプールする。(2)最大30μlのタンパク質プールを150μlのPADバッファーと混合する。(3)PADカクテル(カタログ番号P312-37C)を重量(w/w)比1:25の酵素/基質に加え、反応物を軽く揺らしながら37で2時間インキュベートする。最終濃度50mMになるまでEDTAを加えてシトルリン化を停止する。(4)PADカクテルの代わりに水を添加する以外は同様の方法で陰性対照を調製する。(5)使用するまで氷上に保存する。

10

【0133】

タンパク質消化。全試料を重量比1:30の酵素/基質においてLysCで消化するためProtein DiscoveryのFASPプロテインタンパク質消化キットを用い、反応物を軽く揺らしながら37で20時間インキュベートした。

【0134】

SWATH-MSデータの取得。SWATH-MSマップの生成:DDAにおけるTriple-TOF MSの分析及びSWATHモード。TripleTOF6600質量分析計(Sciex)をデータ依存性取得に用いてペプチドのスペクトルライブラリを構築し、さらに個々の試料の分析用にSWATH-MS(データ依存性取得)にも用いた。生データをProteinPilot(商標)ソフトウェア5.0で検索してスペクトルライブラリを作成した。個々のSWATH-MSのランを、PAD存在下もしくは非存在下(プラス及びマイナスPAD)で作成されたスペクトルライブラリに対してマッチングした。

20

【0135】

保存されたシトルリン化ペプチドの詳細な同定及び分析。脳卒中マウスモデル、アルツハイマーのマウス及び健常なマウスの脳に加え、マウス大動脈及びマウス骨格筋から得られたマウスのデータと等価なヒト相溶性(配列が類似)を見出すため、ペプチドレベルについてブラストを行った。マッチングリストには、blastp-shortでのトップヒットのみが含まれ、これはマウスとヒトの間のペプチド相溶性の>80%が認められたことを意味する。ほとんどの場合において、トップヒットがアイソフォームであれば、他のアイソフォーム及び基準のタンパク質も保存された。図9に、シトルリン化されたスペクトルライブラリファイル进行处理の概略的なバイオインフォマティクスのワークフローを示す。2つの異なるタイプの組織試料である心臓と脳を用いて提示する方法を開発した。ヒトの脳から生成した最終的なSWATH試験ライブラリは360,202個のペプチド(特異ペプチド16,275個)から構成される。バイオインフォマティクスパイプラインにより、信頼度が高く妥当なシトルリン化ペプチドと考えられる1,530個の特異ペプチドを抽出した(表11)。1,571個の追加の特異ペプチドを潜在的に信頼度が高く妥当なシトルリン化ペプチドと特定し、残りの他のペプチドは信頼度の低いペプチドと考えた(表11)。1個のペプチドは1個より多いシトルリン化されたRを有する可能性があり、いくつかのペプチドが全長タンパク質上で正確にシトルリン化されたR部位を共有することに留意することが重要である。従って、特異ペプチドの数は特異的シトルリン化部位の数と同じではない。アウトプット1、2、及び3における特異的シトルリン化部位の総数(全長タンパク質上で)は2413である。

30

40

【0136】

(表11)脳試料の場合の、脳試料のプラス及びマイナスPAD処理に関する出力ファイルの要約(使用した信頼度の閾値は0.995であった)(JF__150402__5600-プラス/マイナスPAD)

出力ファイル	説明	NG規則	全タンパク質		全特異ペプチド	
			マイナスPAD	プラス/マイナスPAD	マイナスPAD	プラス/マイナスPAD
1	$\Delta \geq 5$ 分 信頼度>0.95	未確認	1,637	36,202	58	1,530
2	$\Delta < 5$ 分または 信頼度<0.95または マッチングする対照無し	適合	3,238	30,382	152	1,571
3	$\Delta < 5$ 分または 信頼度<0.95または マッチングする対照無し	不適合	1,370	19,450	55	1,006
4	全ての系統に R[Dea]無し	未確認	375,717	431,816	17,147	20,702

10

【0137】

シトルリン化ペプチドをベースにした4つの異なる出力ファイルにビンニングした。出力1には、修飾ペプチドペプチドと非修飾ペプチドの間の保持時間の Δ が>5分である高信頼度のペプチド、及び信頼度スコア(ユーザーが入力)が含まれる。出力2及び3には、シトルリン化されたR残基を有するペプチドが含まれるが、データセットに非修飾ペプチドが認められず保持時間の差を計算する能力に限度があった。しかしながら、出力2の場合、N/Q残基はシトルリン化されたR残基のいずれの側においても5個以内のアミノ酸に無いが、それに対し出力3においては、N/Q残基はシトルリン化されたR残基のいずれの側においても5個以内のアミノ酸に存在する。出力4には、出力1~3の基準に適合しなかったオリジナルファイルの全ペプチドが含まれる。

20

【0138】

本明細書では、段階的なプロトコルと、複合体の生物学的試料中のシトルリン化ペプチドの分析のための高品質試験ライブラリを生成する、統合されオープンに利用できるコンピュータによるパイプラインについて説明する。ペプチドの溶出プロファイルの信頼できる同定、及び近接するアイソバリック親質量許容差と結果を決めるバイオインフォマティクスパイプラインの間の識別を可能とする高分解能の飛行時間型質量分析計(>30,000)を用いて、約6桁のダイナミックレンジにわたってシトルリン化ペプチドを同定することができ、相対量でそれらを定量した。

30

【0139】

現在、複合体試料のシトルリン化の分析に利用できる化学的、プロテオーム及び抗体に基づく手順がいくつかある[15~17]。しかし、現在の方法では、複数の試料にわたって、シトルリン化ペプチドを、迅速に、一貫して、再現性良く、高精度で、かつ高感度で検出し定量することは依然課題である。ここで、修飾された部位が正確なシトルリン化タンパク質の存在と量について、系統的に試料セットに照会する新しい方策を提示する。これは、相対強度、クロマトグラフの一致のようなフラグメントイオンスペクトルライブラリ内の利用できる情報を用いて、DIAを用いて生成された完全なシトルリン化フラグメントイオンのマップを調べることから成る。

40

【0140】

本質的に、本発明者らのツールは、包括的なSWATH MSシグナルマップ内の標的としたシトルリン化ペプチドと一意的に関連するピーク群を特定し、次いで標的としたシトルリン化ペプチドがバイオインフォマティクスパイプラインにおいて設定された規則に従って正確に同定された確率をコンピュータで計算する。シトルリン化試験の高品質なライブラリは、感度を上げるためSWATH MS及び同様な標的指向性のMS法に必要な条件である。理想的には、この試験ライブラリのシトルリン化ペプチドは特定の研究の場合に対象となる全てのシトルリン化タンパク質、もしくはさらに全プロテオームをも網羅する。それが真であることを確実にするため、構築されたライブラリに基づくベースとされた試料をインピットでPADカクテルによってシトルリン化する。このステップは、少量存在するシトルリン化タンパク質の検出を改善すると共に潜在的に新規な部位を網羅す

50

る助けとなる。

【0141】

SWATH (商標) - MS が PTM 分析に問題なく適用できることを示す。シトルリン化ペプチドの分析のため追加されたバイオインフォマティクスパイプラインは、分析を信頼性が高くロバストかつ迅速なものにする。本発明者らは、この方法が当分野におけるシトルリン化分析の評判を高め、近いうちにこのインピボでの翻訳後修飾の重要性を明確にするため非常に有益なものになると確信する。

【0142】

本明細書で述べるように、シトルリン化、すなわちペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) のファミリーによるアルギニンのシトルリンへの翻訳後 (PTM) 変換は通常、プリオン病、多発性硬化症、及びアルツハイマー病などの神経変性疾患における異常な病理学的特徴に関係があるとされてきた。この PTM が新規な診断薬または治療薬の標的となる可能性がある。従って、シトルリン化タンパク質及びそれらの修飾された残基を同定する明確で効率的な方法は極めて重要である。

【0143】

ALS、すなわち筋萎縮性側索硬化症は、脳の神経細胞や脊髄に影響を与える進行性の神経変性疾患である。発明者らは、ALS 疾患におけるシトルリン化の役割について、臨床的に関連する可能性がある PTM バイオマーカー (複数可) を特定することに集中して研究した。

【0144】

図 8 B にシトルリン化されたイオンのライブラリの構築を図示する。図 8 C に非修飾配列と比較した R [Dea] 及び N/Q [Dea] についての ΔRT を図示する。それぞれシトルリン化 Arg を含むペプチドは非修飾ペプチドと比較して遅く溶出した (> 5 分の差)。同じ傾向が、シトルリン化された R を有するペプチドと N ならびに Q 脱アミン化を有するペプチドの間で認められた。

【0145】

図 8 F に示すように、グリア線維酸性タンパク質、グルコース - 6 - ホスフェート異性化酵素、ピメンチン、エンドフィリン - A1、ミエリン塩基性タンパク質、デルタ - 1 - ピロリン - 5 - カルボキシレート脱水素酵素、ペルオキシレドキシン - 5、ニューログラニン、二重特異性マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ 1、チューブリン重合促進タンパク質ファミリーメンバー 3、デルタ (3, 5) - デルタ (2, 4) - ジエノイル - CoA 異性化酵素、システイン及びグリシンリッチタンパク質 1、細胞レチノイン酸結合タンパク質 1 GMP 還元酵素 2 及び / またはグアニンヌクレオチド結合タンパク質 G (I) / G (S) / G (O) サブユニットガンマ - 3 のうちのいずれか 1 つ以上のシトルリン化の変化が ALS を示す可能性がある。

【0146】

(表 2) ALS のバイオマーカーとしてのシトルリン化ペプチド。これらのペプチドは ALS を有する対象で検出されるが健常なヒトでは検出されない。「Dea」はシトルリン化または脱アミノ化である。「CAM」はカルバミドメチル化である。

10

20

30

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
Q99962	SH3エンドフィリン-A1 G2	PSGVQMDPC[CAM]C[CAM]R[Dea]ALYDFEPENEGEL GFK (SEQ ID NO: 306)	296
P49419	アルファ- アミノアジピン酸 セミアルデヒド 脱水素酵素	QYMR[Dea]R[Dea]STC[CAM]TINYSK (SEQ ID NO: 307)	518, 519
H3BRN4	4-アミノブチレート アミノ転移酵素	LILIAR[Dea]NK (SEQ ID NO: 308)	465
P68402	血小板活性化因子 アセチルヒドラーゼ IBサブユニットベータ	VIVVWVGTTNNHENTAEVAGGIEAIVQLINTR[Dea]QP QAK (SEQ ID NO: 309)	128
Q13011	ECHデルタ (3, 5) - デルタ (2, 4) - ジエノイル-CoA 異性化酵素	EVDVGLAADVGTQLQR[Dea]LPK (SEQ ID NO: 310)	211
P21291	CSPR1システイン及び グリシンリッチタンパク質1	HEEAPGHR[Dea]PTTNPASK (SEQ ID NO: 311)	109
P63215	GBGグアニン ヌクレオチド結合 タンパク質 G (I) /G (S) /G (O) サブユニットガンマー33	GETPVNSTMSIGQAR[Dea]K (SEQ ID NO: 312)	17
F8VVM2	Fホスフェート キャリアタンパク質	VRIQTQPGYANTLR[Dea]DAAPK (SEQ ID NO: 313)	200
P49588	SYAアラニン- tRNAリガーゼ	NVGC[CAM]LQEALQLATSFAQLR[Dea]LGDVK (SEQ ID NO: 314)	962

10

20

【 0 1 4 7 】

(表3) A L S のバイオマーカーとしてのシトルリン化ペプチド (ヒト由来)。 「 D e a 」 はシトルリン化または脱アミノ化である。 「 C A M 」 はカルバミドメチル化である。

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
P14136	グリア線維酸性タンパク質	FADLTDAAR[Dea]NAELLR[Dea]QAK (SEQ ID NO: 315)	270, 276
P14136	グリア線維酸性タンパク質	EIR[Dea]TQYEAMASSNMHEAEWYRSK (SEQ ID NO: 316)	239
P14136	グリア線維酸性タンパク質	MASSNMHEAEWYR[Dea]SK (SEQ ID NO: 317)	258
P14136	グリア線維酸性タンパク質	ASSNMHEAEWYR[Dea]SK (SEQ ID NO: 318)	258
P14136	グリア線維酸性タンパク質	LAR[Dea]LEEEGQSLK (SEQ ID NO: 319)	330
P06744	グルコース-6-ホスフェート異性化酵素	ILLANFLAQTEALMR[Dea]GK (SEQ ID NO: 320)	438
P08670	ビメンチン	TVETR[Dea]DGQVINETSQHDDLE (SEQ ID NO: 321)	450
P08670	ビメンチン	VELQELNDR[Dea]FANYIDK (SEQ ID NO: 322)	113
P08670	ビメンチン	SSVPGVR[Dea]LLQDSVDFSLADAINTEFK (SEQ ID NO: 323)	78
P08670	ビメンチン	ALR[Dea]DVR[Dea]QQYESVAAK (SEQ ID NO: 324)	270, 273
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	GAEGQRPGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 325)	264
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	SHGR[Dea]TQDENPVVHFF (SEQ ID NO: 326)	213
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	SRFSWGAEGQRPGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 327)	264
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	SR[Dea]FSWGAEGQR[Dea]PGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 328)	247, 256, 264
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	SWGAEGQR[Dea]PGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 329)	256, 264
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	SHGR[Dea]TQDENPVVHF (SEQ ID NO: 330)	213
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	LGGR[Dea]DSRSGSPMARR[Dea] (SEQ ID NO: 331)	293
P02686	ミエリン塩基性タンパク質	EGQRPGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 332)	264
P30038	デルター1-ピロリン-5-カルボキシレート脱水素酵素	AIEAALAAR[Dea]K (SEQ ID NO: 333)	113
P30044	ペルオキシレドキシン-5	VR[Dea]LLADPTGAFGK (SEQ ID NO: 334)	148
Q9BW30	チューブリン重合促進タンパク質ファミリーメンバー3	TGGAVIDR[Dea]LTDTSR[Dea]YTGSHK (SEQ ID NO: 335)	124, 130
Q13011	デルタ (3, 5) -デルタ (2, 4) -ジェノイル-CoA異性化酵素	VIGNQSLVNELAFTAR[Dea]K (SEQ ID NO: 336)	230
P29762	細胞レチノイン酸結合タンパク質1	MR[Dea]SSENFDELLK (SEQ ID NO: 337)	11
Q9P2T1	GMP還元酵素2	YAGGVAEYR[Dea]ASEGK (SEQ ID NO: 338)	286

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

(表4) マウスの配列のヒトの配列へのマッチングに基づく、相関性のあるシトルリン化 LysC ペプチド。「Dea」はシトルリン化または脱アミノ化である。「CAM」はカルバミドメチル化である。

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
P69905	ヘモグロビンサブユニットアルファ OS=ホモサピエンス GN=HBA1 PE=1 SV=2	R[Dea]MFLSFPTTK (SEQ ID NO: 339)	32,
P69905	ヘモグロビンサブユニットアルファ OS=ホモサピエンス GN=HBA1 PE=1 SV=3	VGAHAGEYGAEALER[Dea]MFL (SEQ ID NO: 340)	32,
P46821	微小細管関連タンパク質1B OS= ホモサピエンス GN=MAP1B PE=1 SV=2	TTR[Dea]TSDVGGYYEYK (SEQ ID NO: 341)	1897,
Q15149	プレクチン OS=ホモサピエンス GN=PLEC PE=1 SV=3	VPQR[Dea]AGEVER[Dea]DLDK (SEQ ID NO: 342)	571, 577,
Q15149	プレクチン OS=ホモサピエンス GN=PLEC PE=1 SV=4	LHVAILER[Dea]EK (SEQ ID NO: 343)	517,
Q14204	細胞質ダイニン1重鎖1 OS=ホモサピエンス GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	R[Dea]VEPLR[Dea]NELQK (SEQ ID NO: 344)	3408, 3413,
Q01484	アンキリン-2 OS=ホモサピエンス GN=ANK2 PE=1 SV=4	EGHVGLVQELLGR[Dea]GSSVDSAT K (SEQ ID NO: 345)	86,
J3KPX8	MAP1軽鎖LC2 OS=ホモサピエンス GN=MAP1A PE=1 SV=1	AIVFEIMEAGEPTGPILGAEALPGGL R[Dea]TLPQEPGKPKQK (SEQ ID NO: 346)	1123,
Q13885	チュープリンベーター-2A鎖 OS=ホモサピエンス GN=TUBB2A PE=1 SV=1	IREEYPDR[Dea]IMNTFSVMPSPK (SEQ ID NO: 347)	162,
Q00610	クラスリン重鎖1 OS=ホモサピエンス GN=CLTC PE=1 SV=5	GILR[Dea]TPDTIR[Dea]R[Dea]FQSV AQPQTSPLLQYFGILLDQGQLNK (SEQ ID NO: 348)	393, 399, 400,
Q00610	クラスリン重鎖1 OS=ホモサピエンス GN=CLTC PE=1 SV=6	YESLELC[CAM]R[Dea]PVLQQGR[D ea]K (SEQ ID NO: 349)	436, 437, 444,
Q99798	アコニテート水添加酵素、 OS=ホモサピエンス GN=ACO2 PE=1 SV=2	SYLR[Dea]LR[Dea]PDR[Dea]VAMQD ATAQMAMLQFISSGLSK (SEQ ID NO: 350)	90, 92, 95,
E7ESP9	神経フィラメント媒介ポリペプチド OS=ホモサピエンス GN=NEFM PE=1 SV=1	SIELESVR[Dea]GTK (SEQ ID NO: 351)	335,
Q9NQC3	レティキュロン-4 OS=ホモサピエンス GN=RTN4 PE=1 SV=2	AESAVIVANPR[Dea]EEIIVK (SEQ ID NO: 352)	320,
Q9NQC3	レティキュロン-4 OS=ホモサピエンス GN=RTN4 PE=1 SV=2	EAQIR[Dea]ETETFSDDSSPIIIDEFPT LISSK (SEQ ID NO: 353)	854,
Q9NQ66	1-ホスファチジルイノシトール4,5- ビスホスフェートホスホジエステラーゼベーター1 OS=ホモサピエンス GN=PLCB1 PE=1 SV=1	EWTNEVFSLATNLLAQNMSR[Dea] DAFLEK (SEQ ID NO: 354)	148,

10

20

30

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
P04075	フルクトースービスホスフェート アルドラーゼA OS=ホモサピエンス GN=ALDOA PE=1 SV=2	ADDGR[Dea]PFPQVIK (SEQ ID NO: 355)	92,
P10809	60kDa熱ショックタンパク質 OS= ホモサピエンス GN=HSPD1 PE=1 SV=2	LVQDVANNTNEEAGDGTATVLA R[Dea]SIAK (SEQ ID NO: 356)	121,
P00558	ホスホグリセレートキナーゼ1 OS= ホモサピエンス GN=PGK1 PE=1 SV=3	ALESPER[Dea]PFLAILGGAK (SEQ ID NO: 357)	206,
P00558	ホスホグリセレートキナーゼ1 OS= ホモサピエンス GN=PGK1 PE=1 SV=3	R[Dea]VVMR[Dea]VDFNVPMK (SEQ ID NO: 358)	18, 22,
P13639	伸長因子2 OS=ホモサピエンス GN=EEF2 PE=1 SV=4	YEWDVAEAR[Dea]K (SEQ ID NO: 359)	647,
P38646	ストレス-70タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=HSPA9 PE=1 SV=2	VLENAEGAR[Dea]TTPSVVAFTADG ER[Dea]LVGMPAK (SEQ ID NO: 360)	85, 99,
P06744	グルコース-6-ホスフェート 異性化酵素 OS=ホモサピエンス GN=GPI PE=1 SV=4	NLVTEDEVMR[Dea]MLVDLAK (SEQ ID NO: 361)	66,
P12277	クレアチンキナーゼB型 OS= ホモサピエンス GN=CKB PE=1 SV=1	DLFDPIIEDR[Dea]HGGYKPSDEHK (SEQ ID NO: 362)	96,
P12277	クレアチンキナーゼB型 OS= ホモサピエンス GN=CKB PE=1 SV=2	DLFDPIIEDR[Dea]HGGYK (SEQ ID NO: 363)	96,
P11216	グリコーゲンホスホリラーゼ、脳型 OS=ホモサピエンス GN=PYGB PE=1 SV=5	QISVR[Dea]GLAGLGDVAEVR[Dea] K (SEQ ID NO: 364)	17, 29,
P49588	アラニン-tRNAリガーゼ、細胞質 OS=ホモサピエンス GN=AARS PE=1 SV=2	DVQR[Dea]EIADLGEALATAVIPQW QK (SEQ ID NO: 365)	793,
Q01814	細胞膜カルシウム輸送ATPアーゼ2 OS=ホモサピエンス GN=ATP2B2 PE=1 SV=2	GIIDSTHTEQR[Dea]QVVAVTGDGT NDGPALK (SEQ ID NO: 366)	812,
P09543	2', 3' -環状ヌクレオチド3' - ホスホジエステラーゼ OS= ホモサピエンス GN=CNP PE=1 SV=2	ITPGAR[Dea]GAFSEEYK (SEQ ID NO: 367)	93,
P09543	2', 3' -環状ヌクレオチド3' - ホスホジエステラーゼ OS= ホモサピエンス GN=CNP PE=1 SV=2	TLFILR[Dea]GLPGSGK (SEQ ID NO: 368)	56,
P09543	2', 3' -環状ヌクレオチド3' - ホスホジエステラーゼ OS= ホモサピエンス GN=CNP PE=1 SV=2	ELR[Dea]QFVPGDEPREK (SEQ ID NO: 369)	224,
P19367	ヘキソキナーゼ-1 OS=ホモサピエンス GN=HK1 PE=1 SV=3	MVSGMYLGELVR[Dea]LILVK (SEQ ID NO: 370)	307,
Q9ULC6	タンパク質アルギニンデイミナーゼ1型 OS=ホモサピエンス GN=PADI1 PE=1 SV=2	R[Dea]ELGLAESDIVDIPQLFFLK (SEQ ID NO: 371)	556,
Q8N573	酸化抵抗性タンパク質1 OS=ホモサピエンス GN=OXR1 PE=1 SV=2	TLYR[Dea]TMTGLDTPVLMVIK (SEQ ID NO: 372)	754,
P15311	エズリン OS=ホモサピエンス GN=EZR PE=1 SV=4	EELER[Dea]QAVDQIK (SEQ ID NO: 373)	405,
P08238	熱ショックタンパク質HSP90-ベータ OS=ホモサピエンス GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	IDIIPNPQER[Dea]TLTLVDTGIGMTK (SEQ ID NO: 374)	82,
P29966	ミリスチル化アラニンリッチC- キナーゼ基質 OS=ホモサピエンス GN=MARCKS PE=1 SV=4	GEAAAER[Dea]PGEAAVASSPSK (SEQ ID NO: 375)	18,

10

20

30

40

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
P49418	アンフィファイシン OS=ホモサピエンス GN=AMPH PE=1 SV=1	AAEPLAAVTPAVGLDLGMDTR[Dea] AEEPVEEAVIIPGADADAAGTLVS AAEGAPGEEAEAEK (SEQ ID NO: 376)	457,
P10636	微小細管関連タンパク質タウ OS=ホモサピエンス GN=MAPT PE=1 SV=5	SR[Dea]LQTAPVPMPLDK (SEQ ID NO: 377)	559,
P52306	Rap1 GTPアーゼーGDP解離 シミュレータ1 OS=ホモサピエンス GN=RAP1GDS1 PE=1 SV=3	LLGTLR[Dea]MLIDAQAEAAEQLGK (SEQ ID NO: 378)	427,
Q05639	伸長因子1-アルファ2 OS=ホモサピエンス GN=EEF1A2 PE=1 SV=1	YYITIIDAPGHR[Dea]DFIK (SEQ ID NO: 379)	96,
Q02252	メチルマロネート-セミアルデヒド脱水素酵素 [アシル化]、OS=ホモサピエンス GN=ALDH6A1 PE=1 SV=2	YAHLVDPVGVGVNVPIPVPLPMFSF TGSR[Dea]SSFR[Dea]GDTNFGYK (SEQ ID NO: 380)	488, 492,
P09972	フルクトース-ビスホスフェート アルドラーゼC OS=ホモサピエンス GN=ALDOC PE=1 SV=2	R[Dea]AEVNGLAAGQK (SEQ ID NO: 381)	331,
P40926	リンゴ酸脱水素酵素、OS=ホモサピエンス GN=MDH2 PE=1 SV=3	GLDPA[Dea]VNVPIVGGHAGK (SEQ ID NO: 382)	191,
P48735	イソクエン酸脱水素酵素 [NADP]、 OS=ホモサピエンス GN=IDH2 PE=1 SV=2	ATDFVADR[Dea]AGTFK (SEQ ID NO: 383)	188,
F5GXC8	サクシニル-CoAリガーゼ [ADP形成] サブユニットベータ、OS=ホモサピエンス GN=SUCLA2 PE=1 SV=1	IFDLQDWTQEDER[Dea]DK (SEQ ID NO: 384)	242,
P09104	ガンマー-エノラーゼ OS=ホモサピエンス GN=ENO2 PE=1 SV=3	LAMQEFMILPVGAESFR[Dea]DAMR LGAEVYHTLK (SEQ ID NO: 385)	179,
Q9BPU6	ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質5 OS=ホモサピエンス GN=DPYSL5 PE=1 SV=1	VR[Dea]GVDR[Dea]TPYLGDVAVVV HPGK (SEQ ID NO: 386)	485, 489,
Q9BPU6	ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質5 OS=ホモサピエンス GN=DPYSL5 PE=1 SV=2	MDENR[Dea]FVAVTSSNAK (SEQ ID NO: 387)	372,
Q14195	ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質3 OS=ホモサピエンス GN=DPYSL3 PE=1 SV=1	SAADLISQAR[Dea]K (SEQ ID NO: 388)	268,
P09471	グアニジンスクレオチド結合タンパク質G (o) サブユニットアルファ OS=ホモサピエンス GN=GNA01 PE=1 SV=4	PVVYSNTIQSLAAIVR[Dea]AMDTL GIEYGDK (SEQ ID NO: 389)	86,
Q9ULU8	カルシウム依存性分泌アクチベーター1 OS=ホモサピエンス GN=CADPS PE=1 SV=3	ELGR[Dea]VILHPTPNPK (SEQ ID NO: 390)	479,
P49419	アルファ-アミノアジピン酸 セミアルデヒド脱水素酵素 OS= ホモサピエンス GN=ALDH7A1 PE=1 SV=5	DLGR[Dea]IFR[Dea]WLGPK (SEQ ID NO: 391)	466, 469,
P38606	V型プロトンATPアーゼ触媒サブユニットA OS=ホモサピエンス GN=ATP6V1A PE=1 SV=2	TVGMLSNMIAFYDMAR[Dea]R[Dea] AVETTAQSDNK (SEQ ID NO: 392)	552, 553,
H3BRN4	4-アミノブチレートアミノ転移酵素、 OS=ホモサピエンス GN=ABAT PE=1 SV=1	EEFR[Dea]PNAPYR[Dea]IFNTWLGD PSK (SEQ ID NO: 393)	386, 392,
P07237	タンパク質ジスルフィド-異性化酵素 OS=ホモサピエンス GN=P4HB PE=1 SV=3	R[Dea]TGPAATTLPGAAAESLVES SEVAVIGFFK (SEQ ID NO: 394)	132,
O94760	N (G), N (G) -ジメチルアルギニン ジメチルアミノ水添加酵素1	IMQQMSDHR[Dea]YDK (SEQ ID NO: 395)	208,

10

20

30

40

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
Q16181	セプチン-7	DR[Dea]LPLAVVGSNTIIEVNGK (SEQ ID NO: 396)	243,
O75781	パラレミニン-1 OS=ホモサピエンス GN=PALM PE=1 SV=2	R[Dea]RQLEDER[Dea]RQLQHLK (SEQ ID NO: 397)	32, 39,
P30153	セリン/スレオニン-タンパク質 ホスファターゼ2A 65kDa制御サブユニットA アルファアイソフォーム OS=ホモサピエンス GN=PPP2R1A PE=1 SV=4	HMLPTVLR[Dea]MAGDPVANVR[Dea] a]FNVAK (SEQ ID NO: 398)	527, 537,
P15121	アルドース還元酵素 OS=ホモサピエンス GN=AKR1B1 PE=1 SV=3	PEDPSLLEDPR[Dea]IK (SEQ ID NO: 400)	233,
P07954	フマル酸水添加酵素、 OS=ホモサピエンス GN=FH PE=1 SV=3	IGR[Dea]THTQDAVPLTLGQEFSGY VQQVK (SEQ ID NO: 401)	233,
P24752	アセチル-CoAアセチル転移酵素 OS=ホモサピエンス GN=ACAT1 PE=1 SV=1	EVVIVSATR[Dea]TPIGSFLGSLSLLP ATK (SEQ ID NO: 402)	49,
E9PFW3	AP-2複合体サブユニットミュー OS=ホモサピエンス GN=AP2M1 PE=1 SV=1	DIILPFR[Dea]VIPLVR[Dea]EVGR TK (SEQ ID NO: 403)	313, 319,
P30086	ホスファチジルエタノールアミン 結合タンパク質1 OS=ホモサピエンス GN=PEBP1 PE=1 SV=3	LYTLVLTDPDAPSR[Dea]K (SEQ ID NO: 404)	76,
P04350	チュープリンベーター-4A鎖 OS=ホモサピエンス GN=TUBB4A PE=1 SV=2	GHYTEGAELVDAVLDDVVR[Dea]K (SEQ ID NO: 405)	121,
Q9UI15	トランスグリン-3 OS=ホモサピエンス GN=TAGLN3 PE=1 SV=2	AAETYGVVR[Dea]TTDIFQTVDLWEG K (SEQ ID NO: 406)	106,
O43175	D-3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素、 OS=ホモサピエンス GN=PHGDH PE=1 SV=4	VLISDSLDP[CAM]C[CAM]R[Dea]K (SEQ ID NO: 407)	18, 19, 20,
P00915	炭酸脱水酵素1 OS=ホモサピエンス GN=CA1 PE=1 SV=2	ESISVSSEQLAQFRSLLSN[Dea]VEG DNAVPMQHNNR[Dea]PTQPLK (SEQ ID NO: 408)	233, 247,
P61981	14-3-3タンパク質ガンマ OS=ホモサピエンス GN=YWHAG PE=1 SV=2	MKGDYYR[Dea]YLAEVATGEK (SEQ ID NO: 409)	132,
P61604	10kDa熱ショックタンパク質 OS=ホモサピエンス GN=HSP61 PE=1 SV=2	DYFLFR[Dea]DGDILGK (SEQ ID NO: 410)	92,
P21281	V型プロトンATPアーゼサブユニットB、 脳アイソフォーム OS=ホモサピエンス GN=ATP6V1B2 PE=1 SV=3	DIGWQLLR[Dea]IFPK (SEQ ID NO: 411)	485,
B4DKF8	PH及びSEC7ドメイン含有タンパク質3 OS=ホモサピエンス GN=PSD3 PE=1 SV=1	FSR[Dea]PLLATTTK (SEQ ID NO: 412)	245,
P32119	ペルオキシレドキシン-2 OS=ホモサピエンス GN=PRDX2 PE=1 SV=5	EGGLGPLNIPLADVTR[Dea]R[Dea] LSEYGVVK (SEQ ID NO: 413)	109, 110,
P32119	ペルオキシレドキシン-2 OS=ホモサピエンス GN=PRDX2 PE=1 SV=5	TDEGIAYR[Dea]GLFIIDGK (SEQ ID NO: 414)	127,
P02647	アポリポタンパク質A-I OS=ホモサピエンス GN=APOA1 PE=1 SV=1	VEPLR[Dea]AELQEGARQK (SEQ ID NO: 415)	147,
Q12765	セセルニン-1 OS=ホモサピエンス GN=SCRN1 PE=1 SV=2	NSAR[Dea]PR[Dea]DEVQEVVYFSA ADHEPESK (SEQ ID NO: 416)	30, 32,
Q12765	セセルニン-1 OS=ホモサピエンス GN=SCRN1 PE=1 SV=2	AHEWAR[Dea]AIIESDQEQGR[Dea]K (SEQ ID NO: 417)	355, 366,
P00918	炭酸脱水酵素2 OS=ホモサピエンス GN=CA2 PE=1 SV=2	LNFNGEGEPEELMVDNWR[Dea]PA QPLK (SEQ ID NO: 418)	245,
E9PDE8	熱ショック70kDa タンパク質4L OS=ホモサピエンス GN=HSPA4L PE=1 SV=1	VR[Dea]YLEEER[Dea]PFAIEQVTGM LLAK (SEQ ID NO: 419)	78, 84,
Q9H115	ベータ溶解性NSF接着タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=NAPB PE=1 SV=2	ER[Dea]EAVQLMAEAEK (SEQ ID NO: 420)	8,

10

20

30

40

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
Q9UPY8	微小細管関連タンパク質RP/EB ファミリーメンバー3 OS=ホモサピエンス GN=MAPRE3 PE=1 SV=1	LIGTAVPQR[Dea]TSPTGPK (SEQ ID NO: 421)	160,
P00505	アスパラギン酸アミノ基転移酵素 OS=ホモサピエンス GN=GOT2 PE=1 SV=3	FSR[Dea]DVFLPK (SEQ ID NO: 422)	153,
Q13509	チューブリンベータ3-鎖 OS=ホモサピエンス GN=TUBB3 PE=1 SV=2	FWEVISDEHGIDPSGNYVGDSLQL ER[Dea]ISVYYNEASSHK (SEQ ID NO: 423)	46,
O15144	アクチン関連タンパク質2/3複合体 サブユニット2 OS=ホモサピエンス GN=ARPC2 PE=1 SV=1	DR[Dea]VTVVFTVFK (SEQ ID NO: 424)	160,
P09211	グルタチオンS-転移酵素P OS=ホモサピエンス GN=GSTP1 PE=1 SV=2	FQDGDLTLYQSNTILR[Dea]HLGR[D ea]TLGLYGK (SEQ ID NO: 425)	71, 75,
O95292	小胞会合膜タンパク質関連タンパク質 B/C OS=ホモサピエンス GN=VAPB PE=1 SV=3	FR[Dea]GPFTDVVTNLK (SEQ ID NO: 426)	19,
P42765	3-ケトアシル-CoAチオラーゼ、OS= ホモサピエンス GN=ACAA2 PE=1 SV=2	QTMQVDEHAR[Dea]PQTTLQLQK (SEQ ID NO: 427)	224,
Q8TAM6	エルミン OS=ホモサピエンス GN=ERMN PE=2 SV=1	GHQAAEIEWLGFR[Dea]K (SEQ ID NO: 428)	163,
Q92686	ニューログラニン OS=ホモサピエンス GN=NRGN PE=1 SV=1	GPGPGPGGAGVAR[Dea]GGAGGG PSGD (SEQ ID NO: 429)	68,
K7ELL7	グルコシダーゼ2サブユニットベータ OS=ホモサピエンス GN=PRKCSH PE=1 SV=1	MPPYDEQTQAFIDAAQEAR[Dea]NK (SEQ ID NO: 430)	381,
Q9BY11	タンパク質キナーゼC及びニューロン タンパク質1中のカゼインキナーゼ基質 OS=ホモサピエンス GN=PACIN1 PE=1 SV=1	GPQYGSRLER[Dea]AWGAIMTEADK (SEQ ID NO: 431)	82,
O15075	セリン/スレオニン-タンパク質 キナーゼDCLK1 OS=ホモサピエンス GN=DCLK1 PE=1 SV=2	TTSASR[Dea]AVSSLATAK (SEQ ID NO: 432)	161,
P09622	ジヒドロリポイル脱水素酵素、 OS=ホモサピエンス GN=DLD PE=1 SV=2	NLGLEELGIELDPR[Dea]GR[Dea]IPV NTRFQ[Dea]TK (SEQ ID NO: 433)	334, 336, 344,
P25705	ATP合成酵素サブユニットアルファ、OS= ホモサピエンス GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	R[Dea]TGAIVDVPVGEELLGR[Dea]V VDALGNAIDGK (SEQ ID NO: 434)	133, 149,
Q02750	二重特異性ミトジェン活性化タンパク質 キナーゼキナーゼ1 OS=ホモサピエンス GN=MAP2K1 PE=1 SV=2	AGR[Dea]IPEQILGK (SEQ ID NO: 435)	160,
Q01995	トランスグリン OS=ホモサピエンス GN=TAGLN PE=1 SV=4	GPSYGMSR[Dea]EVQSK (SEQ ID NO: 436)	12,
Q16352	アルファ-インターネキシン OS= ホモサピエンス GN=INA PE=1 SV=2	SEMAR[Dea]HLR[Dea]EYQDLLNVK (SEQ ID NO: 437)	374, 377,
Q92752	テネイシン-R OS=ホモサピエンス GN=TNR PE=1 SV=3	R[Dea]HAVLMGLQPATEYIVNLVAV HGTVTSEPIVGSITTGIDPPK (SEQ ID NO: 438)	827,
O94811	チューブリン重合促進タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=TPPP PE=1 SV=1	AISSPTVSR[Dea]LTDTTK (SEQ ID NO: 439)	165,
P30048	チオレドキシン依存性ペルオキシド 還元酵素、OS=ホモサピエンス GN=PRDX3 PE=1 SV=3	HLSVNDLPVGRSVEETLR[Dea]LVK (SEQ ID NO: 440)	214,
Q9Y570	タンパク質ホスファターゼ メチルエステラーゼ1 OS=ホモサピエンス GN=PPME1 PE=1 SV=3	R[Dea]DFSPVPWSQYFESMEDVEVE NETGK (SEQ ID NO: 441)	39,

10

20

30

40

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
P69891	ヘモグロビンサブユニットガンマー1 OS=ホモサピエンス GN=HBG1 PE=1 SV=2	MVTAVASALSSR[Dea]YH (SEQ ID NO: 442)	145,
Q5T9B7	アデニル酸キナーゼイソ酵素1 OS=ホモサピエンス GN=AK1 PE=1 SV=1	GQLVPLETVLDMLR[Dea]DAMVAK (SEQ ID NO: 443)	93,
F5GXJ9	CD166抗原 OS=ホモサピエンス GN=ALCAM PE=1 SV=1	PDGSPVFIAFR[Dea]SSTK (SEQ ID NO: 444)	20,
Q6PUV4	コンプレキシン-2 OS=ホモサピエンス GN=CPLX2 PE=1 SV=2	AALEQPC[CAM]EGSLTR[Dea]PK (SEQ ID NO: 445)	90, 96,
Q5T6W5	不均一核リボ核タンパク質K、 OS=ホモサピエンス GN=HNRNPK PE=1 SV=1	R[Dea]PAEDMEEEEQAFK (SEQ ID NO: 446)	22,
Q9NQR4	オメガ-アミダーゼNIT2 OS=ホモサピエンス GN=NIT2 PE=1 SV=1	R[Dea]SDLYAVEMK (SEQ ID NO: 447)	265,
P48426	ホスファチジルイノシトール5-ホスフェート4 -キナーゼ2型アルファ OS=ホモサピエンス GN=PIP4K2A PE=1 SV=2	R[Dea]FLDFIGHILT (SEQ ID NO: 448)	396,
Q4J6C6	プロリルエンドペプチターゼ様 OS= ホモサピエンス GN=PREPL PE=1 SV=1	LMR[Dea]TAADTPAIMNWDLFFTM K (SEQ ID NO: 449)	326,
P61106	Ras関連タンパク質Rab-14 OS= ホモサピエンス GN=RAB14 PE=1 SV=4	ADLEAQR[Dea]DVTYEEAK (SEQ ID NO: 450)	132,
Q99447	エタノールアミン-ホスフェート シチジル転移酵素 OS=ホモサピエンス GN=PCYT2 PE=1 SV=1	GPPVFTQEER[Dea]YK (SEQ ID NO: 451)	76,
P48506	グルタミン酸-γ-システインリガーゼ 触媒サブユニット OS=ホモサピエンス GN=GCLC PE=1 SV=2	SR[Dea]YDSIDSYLSK (SEQ ID NO: 452)	328,
P27361	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ3 OS=ホモサピエンス GN=MAPK3 PE=1 SV=4	R[Dea]ITVEEALAHPLYEQYYDPTD EPVAEEPFTFAMELDDLPK (SEQ ID NO: 453)	318,
B1AKZ3	星状細胞ホスホタンパク質PEA-15 OS=ホモサピエンス GN=PEA15 PE=1 SV=1	LTR[Dea]IPSAK (SEQ ID NO: 454)	122,
P12036	神経フィラメント重ポリペプチド OS=ホモサピエンス GN=NEFH PE=1 SV=4	EQLQALNDR[Dea]FAGYIDK (SEQ ID NO: 455)	107,
P62333	26Sプロテアーゼ制御サブユニット 10B OS=ホモサピエンス GN=PSMC6 PE=1 SV=1	IHIDLNPNEQAR[Dea]LDILK (SEQ ID NO: 456)	309,
P36578	60Sリボソームタンパク質L4 OS= ホモサピエンス GN=RPL4 PE=1 SV=5	GHR[Dea]IEEVPELPLVVEDK (SEQ ID NO: 457)	143,
P13861	cAMP依存性タンパク質キナーゼII型 -アルファ制御サブユニット OS= ホモサピエンス GN=PRKAR2A PE=1 SV=2	NLDQEQLSQVLDAMFER[Dea]IVK (SEQ ID NO: 4589)	158,
Q8WW12	PESTタンパク質分解信号含有核 タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=PCNP PE=1 SV=2	R[Dea]SAEEEEAADLPTKPTK (SEQ ID NO: 459)	52,
P50897	パルミトイル-タンパク質 チオエステラーゼ1 OS=ホモサピエンス GN=PPT1 PE=1 SV=1	ETIPLQETSLYTQDR[Dea]LGLK (SEQ ID NO: 460)	268,
Q9UJU6	ドレブリン様タンパク質 OS= ホモサピエンス GN=DBNL PE=1 SV=1	ESGR[Dea]FQDVGPQAPVGSVYQK (SEQ ID NO: 461)	148,
Q14019	コアクトシン様タンパク質 OS= ホモサピエンス GN=COTL1 PE=1 SV=3	FALITWIGENVSGLQR[Dea]AK (SEQ ID NO: 462)	91,
Q8TEA8	D-チロシル-tRNA (Tyr) 脱アシル酵素1 OS=ホモサピエンス GN=DTD1 PE=1 SV=2	ILNLR[Dea]VFEDESGK (SEQ ID NO: 463)	53,

10

20

30

40

UniProtKB 登録	タンパク質名	修飾された配列	修飾位置
H0Y7Q1	二重PHドメイン含有タンパク質1 (フラグメント) を伴うArf-GAP OS=ホモサピエンス GN=ADAP1 PE=1 SV=1	AVDR[Dea]PMLPQEYAVEAHFK (SEQ ID NO: 464)	340,
O00401	神経ウィスコット-アルドリッチ 症候群タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=WASL PE=1 SV=2	AALLDQIR[Dea]EGAQLK (SEQ ID NO: 465)	414,
O94772	リンパ球抗原6H OS=ホモサピエンス GN=LY6H PE=2 SV=1	R[Dea]HFFSDYLMGFINSGLK (SEQ ID NO: 466)	82,
A8MX49	タンパク質ホスファターゼ1F OS= ホモサピエンス GN=PPM1F PE=1 SV=2	APGTVLSQEEVEGELAELAMGFLGS R[Dea]K (SEQ ID NO: 467)	69,
O95336	6-ホスホグルコノラクトナーゼ OS=ホモサピエンス GN=PGLS PE=1 SV=2	IVAPISDSPKPPPPQR[Dea]VTLTLPVL NAAR[Dea]TVIFVATGEGK (SEQ ID NO: 468)	185, 197,
O43708	マレイルアセトアセート異性化酵素 OS=ホモサピエンス GN=GSTZ1 PE=1 SV=3	R[Dea]ASVR[Dea]MISDLIAGGIQPLQ NLSVLK (SEQ ID NO: 469)	96, 100,
Q9UII2	ATPアーゼ阻害剤 OS=ホモサピエンス GN=ATPIF1 PE=1 SV=1	GSDQSENVDR[Dea]GAGSIR[Dea]EA GGAFGK (SEQ ID NO: 470)	35, 41,
Q9P1F3	コスターズファミリータンパク質 ABRACL OS=ホモサピエンス GN=ABRACL PE=1 SV=1	FGVLFR[Dea]DDK (SEQ ID NO: 471)	35,
P62851	40Sリボソームタンパク質S25 OS= ホモサピエンス GN=RPS25 PE=1 SV=1	IR[Dea]GSLAR[Dea]AALQELLSK (SEQ ID NO: 472)	80, 85,
C9J0K6	ソルシン OS=ホモサピエンス GN=SRI PE=1 SV=1	ALTTMGFR[Dea]LSPQAVNSIAK (SEQ ID NO: 473)	92,
Q9NVJ2	ADP-リボシル化因子様タンパク質8B OS=ホモサピエンス GN=ARL8B PE=1 SV=1	R[Dea]DLPNALDEK (SEQ ID NO: 474)	132,

10

20

【 0 1 4 9 】

(表5A) 慢性神経変性疾患で認められるシトルリン化ペプチド。これらのシトルリン化ペプチドは脳に特有のものである。

ペプチド	UniProtKB 登録	名称
ADDGR[Dea]PFPQVIK (SEQ ID NO: 355)	sp P04075- 2 ALDOA_HUMAN	フルクトース-ビスホスフェートアルドラーゼAの アイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=ALDOA
EVVIVSATR[Dea]TPIGSFLGSLSL PATK (SEQ ID NO: 402)	sp P24752 THIL_HU MAN	アセチル-CoAアセチル転移酵素
RGETSGR[Dea]VDDNEETIK (SEQ ID NO: 1)	sp P00568 KAD1_H UMAN	アデニル酸キナーゼイソ酵素1 OS=ホモサピエンス GN=AK1 PE=1 SV=3
PGVVHVIDIDR[Dea]GEEK (SEQ ID NO: 475)	sp P55087 AQP4_H UMAN	アクアポリン-4 OS=ホモサピエンス GN=AQP4 PE=1 SV=2
IPVGPETLGR[Dea]IMNVIGEPIDER GPIK (SEQ ID NO: 476)	sp P06576 ATPB_H UMAN	ATP合成酵素サブユニットベータ、 OS=ホモサピエンス GN=ATP5B PE=1 SV=3
SVHR[Dea]GEVPCTVTTASPLDDA VLSELK (SEQ ID NO: 477)	sp P48047 ATPO_H UMAN	ATP合成酵素サブユニット0、OS=ホモサピエンス GN=ATP50 PE=1 SV=1
GILR[Dea]TPDTR[Dea]R[Dea]FQS VPAQPGQTSPLLQYFGILLDQGQL NK (SEQ ID NO: 348)	sp Q00610 CLH1_H UMAN	クラスリン重鎖1
ELEEDFIR[Dea]SELK (SEQ ID NO: 478)	sp Q14019 COTL1_ HUMAN	コアクトシン様タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=COTL1 PE=1 SV=3

30

40

DLFDPIIEDR[Dea]HGGYK (SEQ ID NO: 363)	sp P12277 KCRB_HUMAN	クレアチンキナーゼB型 OS=ホモサピエンス GN=CKB PE=1 SV=1
EGNASGVSLLEALDTILPPTR[Dea]PTDK (SEQ ID NO: 479)	sp Q05639 EF1A2_HUMAN	伸長因子1-アルファ2 OS=ホモサピエンス GN=EEF1A2 PE=1 SV=1
GHQAAEIEWLGFR[Dea]K (SEQ ID NO: 428)	sp Q8TAM6 ERMIN_HUMAN	エルミン
EELER[Dea]QAVDQIK (SEQ ID NO: 373)	sp P15311 EZRI_HUMAN	エズリン
EIR[Dea]TQYEAMASSNMHEAEEWYRSK (SEQ ID NO: 316)	sp P14136 GFAP_HUMAN	グリア線維酸性タンパク質
FADLTDAAR[Dea]NAELLR[Dea]QAK (SEQ ID NO: 315)	sp P14136 GFAP_HUMAN	グリア線維酸性タンパク質
GYFEDRR[Dea]PSANCDPYAVTEAIVRTCLLNETGDEPFQYK (SEQ ID NO: 480)	sp P15104 GLNA_HUMAN	グルタミン合成酵素 OS=ホモサピエンス GN=GLUL PE=1 SV=4
RLIGRR[de]FDDAVVQSDMK (SEQ ID NO: 481)	sp P11142 HSP7C_HUMAN	熱ショック同族71kDaタンパク質 OS=ホモサピエンス GN=HSPA8 PE=1 SV=1
VGAHAGEYGAEALER[Dea]MFL (SEQ ID NO: 340)	sp P69905 HBA_HUMAN	ヘモグロビンサブユニットアルファ
LGRLLVVYPWTQR[de]YFDSFGDLSSASAIMGNAK (SEQ ID NO: 482)	sp P69892 HBG2_HUMAN	ヘモグロビンサブユニットガンマー2 OS=ホモサピエンス GN=HBG2 PE=1 SV=2
ESLLFEGR[de]ITPELLTRGK (SEQ ID NO: 483)	sp P19367 HXK1_HUMAN	ヘキソキナーゼ-1 OS=ホモサピエンス GN=HK1 PE=1 SV=3
RSTITSR[Dea]EVQTAVR[de]LLLP GELAK (SEQ ID NO: 484)	sp Q8N257 H2B3B_HUMAN	ヒストンH2B 3-B型 OS=ホモサピエンス GN=HIST3H2BB PE=1 SV=3
CR[Dea]EVAENCK (SEQ ID NO: 485)	sp P50213 IDH3A_HUMAN	イソクエン酸脱水素酵素 [NAD] サブユニットアルファ、 OS=ホモサピエンス GN=IDH3A PE=1 SV=1
CR[Dea]APEVSQYIYQVYDSILK (SEQ ID NO: 486)	sp P63010-2 AP2B1_HUMAN	AP-2複合体サブユニットベータのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=AP2B1
GILR[Dea]TPDTIR[de]RFQSVPAQPGQTSPLLQYFGILLDQGQLNK (SEQ ID NO: 487)	sp Q00610-2 CLH1_HUMAN	クラスリン重鎖1のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=CLTC
PITIFQE[Dea]RDPTNIK (SEQ ID NO: 488)	sp P04406-2 G3P_HUMAN	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=GAPDH
GCDVVVIPAGVPR[Dea]K (SEQ ID NO: 489)	sp P40926-2 MDHM_HUMAN	リンゴ酸脱水素酵素のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=MDH2
HR[Dea]DTGILDSIGRFFSGDR[Dea]GAPK (SEQ ID NO: 490)	sp P02686-2 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=MBP
ER[Dea]LDQPMTEIVSR[Dea]VSK (SEQ ID NO: 491)	sp P22314-2 UBA1_HUMAN	ユビキチン様調整剤活性化酵素1のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=UBA1
LLVSEEDYGR[de]DLTGVQNLRK (SEQ ID NO: 492)	sp Q13813-3 SPTN1_HUMAN	スペクトリンアルファ鎖のアイソフォーム3、非赤血球1 OS=ホモサピエンス GN=SPTAN1
VAVTPPGLAR[Dea]EDWK (SEQ ID NO: 493)	sp P28331-4 NDUS1_HUMAN	NADH-ユビキノン酸化還元酵素75kDaサブユニットのアイソフォーム4 OS=ホモサピエンス GN=NDUFS1
VR[Dea]IQTPQGYAN (SEQ ID NO: 494)	sp Q00325-2 MPCP_HUMAN	ホスフェートキャリアタンパク質のアイソフォームB OS=ホモサピエンス GN=SLC25A3
RIER[Dea]ELAEAQDDSILK (SEQ ID NO: 495)	sp P30530-2 UFO_HUMAN	チロシン-タンパク質キナーゼ受容体UF0のアイソフォームショート型 OS=ホモサピエンス GN=AXL
SR[Dea]LQTAPVPMPDLK (SEQ ID NO: 377)	sp P10636 TAU_HUMAN	微小管結合タンパク質タウ
HRDTGILDSIGRFFGGDR[Dea]GAPK (SEQ ID NO: 496)	sp P02686 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質
LGGR[Dea]DSRSGSPMARR[Dea] (SEQ ID NO: 331)	sp P02686 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質
SHGR[Dea]TQDENPVVHF (SEQ ID NO: 330)	sp P02686 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質
EGQRPGFGYGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 332)	sp P02686 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質

10

20

30

40

GAEGQRPFGYGGGR[Dea]ASDYK (SEQ ID NO: 325)	sp P02686 MBP_HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質
GEAAAER[Dea]PGEAAVASSPSK (SEQ ID NO: 375)	sp P29966 MARCS_HUMAN	ミリストイル化アラニンリッチC-キナーゼ基質
GPGPGGPGGAGVAR[Dea]GGAGG GPSGD (SEQ ID NO: 429)	sp Q92686 NEUG_HUMAN	ニューログラニン
TDEGIAYR[Dea]GLFIIDGK (SEQ ID NO: 414)	sp P32119 PRDX2_HUMAN	ペルオキシレドキシン-2
VRIQTQPGYANTLR[Dea]DAAPK (SEQ ID NO: 313)	sp F8VVM2 F8VVM2_HUMAN	ホスフェートキャリアタンパク質
GIIDSTHTEQR[Dea]QVVAVTGDG TNDGPALK (SEQ ID NO: 366)	sp Q01814 AT2B2_HUMAN	細胞膜カルシウム輸送ATPアーゼ2
EAFQNAYLELGLGER[Dea]VLGF CHYYLPPEEQFPK (SEQ ID NO: 497)	sp P13637 AT1A3_HUMAN	ナトリウム/カリウム輸送ATPアーゼ サブユニットアルファ-3 OS=ホモサピエンス GN=ATP1A3 PE=1 SV=3
VLENAEGAR[Dea]TTPSVVAFTAD GER[Dea]LVGMPAK (SEQ ID NO: 360)	sp P38646 GRP75_HUMAN	ストレス-70タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=HSPA9 PE=1 SV=2
RIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLK (SEQ ID NO: 498)	sp P55072 TERA_HUMAN	移行型小胞体ATPアーゼ OS=ホモサピエンス GN=VCP PE=1 SV=4
HVPR[Dea]AVFVDLEPTVIDEIRNG PYRQLFHPEQLITGK (SEQ ID NO: 499)	sp P68366 TBA4A_HUMAN	チューブリンアルファ-4A鎖 OS=ホモサピエンス GN=TUBA4A PE=1 SV=1
FWEVISDEHGIDPSGNYVGSDSLQ LER[Dea]ISVYYNEASSHK (SEQ ID NO: 423)	sp Q13509 TBB3_HUMAN	チューブリンベータ-3鎖
AILVDLEPGTMDSVRS[Dea]GAFG HLFRR[Dea]PDNFIFGQSGAGNNWA K (SEQ ID NO: 500)	sp Q13509 TBB3_HUMAN	チューブリンベータ-3鎖 OS=ホモサピエンス GN=TUBB3 PE=1 SV=2
GHYTEGAELVDAVLVDVVR[Dea]K (SEQ ID NO: 405)	sp P04350 TBB4A_HUMAN	チューブリンベータ
AISSPTVSR[Dea]LTDTTK (SEQ ID NO: 439)	sp O94811 TPPP_HUMAN	チューブリン重合促進タンパク質
TVETR[Dea]DGQVINETSQHDDL E (SEQ ID NO: 321)	sp P08670 VIME_HUMAN	ビメンチン

10

20

30

40

【 0 1 5 0 】

(表 5 B) 慢性神経変性疾患で認められるシトルリン化ペプチド。これらのシトルリン化ペプチドは脳に特有のものではない。

ペプチド	UniProtKB 登録	タンパク質名
AVLDVAETGTEAAAATGVIGGI RK (SEQ ID NO: 501)	sp Q96P15-3 SPB11_HUMAN	セルピンB11のアイソフォーム3 OS=ホモサピエンス GN=SERPINB11
GFPVVLDSRPDGNLK (SEQ ID NO: 502)	sp Q9Y2J8 PADI2_HUMAN	タンパク質アルギニンデイミナーゼ2型 OS=ホモサピエンス GN=PADI2 PE=1 SV=2
GPDLRLPAGYEIVLYISMSDSK (SEQ ID NO: 503)	sp Q9Y2J8 PADI2_HUMAN	タンパク質アルギニンデイミナーゼ2型 OS=ホモサピエンス GN=PADI2 PE=1 SV=2
RFSMVIDNGIVK (SEQ ID NO: 504)	sp P30044 PRDX5_HUMAN	ペルオキシレドキシン-5 OS=ホモサピエンス GN=PRDX5 PE=1 SV=4

【 0 1 5 1 】

(表 6 A) ヒトの脳の後天的脳損傷で検出されるシトルリン化ペプチド。これらのシトルリン化ペプチドは脳に特有のものである。

ペプチド	UniProtKB 登録	タンパク質名
AQQRDVDGATLARLDLEK (SEQ ID NO: 505)	sp Q16352 AINX_HUMAN	アルファ-インターネキシン OS=ホモサピエンス GN=INA PE=1 SV=2
AVTELNEPLSNEDR[Dea]NLLSVAYK (SEQ ID NO: 506)	sp Q04917 1433F_HUMAN	14-3-3タンパク質エータ OS=ホモサピエンス GN=YWHAH PE=1 SV=4
AVTEQGAELSNEER[dea]NLLSVAYK (SEQ ID NO: 507)	sp P27348 1433T_HUMAN	14-3-3タンパク質シータ OS=ホモサピエンス GN=YWHAQ PE=1 SV=1
VVR[Dea]TALLDAAGVASLLTTAEVVVTEIPK (SEQ ID NO: 285)	sp P10809 CH60_HUMAN	60kDa熱ショックタンパク質
LEAPDADELPR[Dea]SDFDPGQDTYQHPPK (SEQ ID NO: 508)	sp Q99798 ACON_HUMAN	アコニテート水添加酵素、 OS=ホモサピエンス GN=AC02 PE=1 SV=2
LSEELSGGR[Dea]LK (SEQ ID NO: 509)	sp P61158 ARP3_HUMAN	アクチン関連タンパク質3 OS=ホモサピエンス GN=ACTR3 PE=1 SV=3
ILIPWLLSPER[Dea]LDIK (SEQ ID NO: 510)	sp Q8WXF7 ATLA1_HUMAN	アトラスチン-1 OS=ホモサピエンス GN=ATL1 PE=1 SV=1
LR[Dea]FPAEDEFDPDLSHNNHMAK (SEQ ID NO: 511)	sp P12277 KCRB_HUMAN	クレアチンキナーゼB型 OS=ホモサピエンス GN=CKB PE=1 SV=1
ITR[Dea]TSFLDDAFRK (SEQ ID NO: 512)	sp Q14204 DYHC1_HUMAN	細胞質ダイニン1重鎖 OS=ホモサピエンス GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5
DNFTLIPEGTNGTEER[Dea]MSVIWDK (SEQ ID NO: 513)	sp Q16555 DPYL2_HUMAN	ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質2 OS=ホモサピエンス GN=DPYSL2 PE=1 SV=1
MVEGFFDR[Dea]GASIVEDK (SEQ ID NO: 514)	sp P49448 DHE4_HUMAN	グルタミン酸脱水素酵素2、 OS=ホモサピエンス GN=GLUD2 PE=1 SV=2
GDYYR[Dea]YLAEVAAGDDK (SEQ ID NO: 515)	sp P63104-2 1433Z_HUMAN	14-3-3タンパク質ゼータ/デルタのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=YWHAZ
R[Dea]ALVFQPVTELK (SEQ ID NO: 516)	sp P08237-2 PFKAM_HUMAN	ATP依存性6-ホスホフルクトキナーゼ、筋肉型のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=PFKM
GVPLYR[Dea]HIADLAGNPEVILPVPFNVINGGSHAGNK (SEQ ID NO: 517)	sp P09104-2 ENOG_HUMAN	ガンマー-エノラーゼのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=EN02
R[Dea]VIISAPSADAPMFVMGVNH EK (SEQ ID NO: 125)	sp P04406-2 G3P_HUMAN	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート脱水素酵素のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=GAPDH
NSPLVSR[Dea]LTLYDIAHTPGVAADLSHIETR[Dea]ANVK (SEQ ID NO: 518)	sp P40926-2 MDHM_HUMAN	リンゴ酸脱水素酵素のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=MDH2
HEGFE[Dea]DLAALGDK (SEQ ID NO: 519)	sp Q13813-2 SPTN1_HUMAN	スペクトリンアルファ鎖、非赤血球1のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=SPTAN1
LFVTNDAATILR[Dea]ELEVQHPAAK (SEQ ID NO: 520)	sp P50990-2 TCPQ_HUMAN	T-複合タンパク質1サブユニットシータのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=CCT8
GR[dea]GITGIEDK (SEQ ID NO: 521)	sp P29401-2 TKT_HUMAN	トランスケトラーゼのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=TKT
PHSVSLNDTETR[Dea]K (SEQ ID NO: 522)	sp Q9P0L0-2 VAPA_HUMAN	小胞会合膜タンパク質関連タンパク質Aのアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=VAPA

10

20

30

40

ペプチド	UniProtKB 登録	タンパク質名
MDIRG[Dea]AVDAAVPTNIIAAK (SEQ ID NO: 523)	sp Q9U112- 2 VATH_HU MAN	V型プロトンATPアーゼサブユニットHの アイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=ATP6V1H
TDDYGR[Dea]DLSSVQTLLTK (SEQ ID NO: 524)	sp Q13813- 3 SPTN1_HU MAN	スペクトリンアルファ鎖、非赤血球1の アイソフォーム3 OS=ホモサピエンス GN=SPTAN1
R[Dea]LVPGGGATEIELAK (SEQ ID NO: 525)	sp P50990- 3 TCPQ_HU MAN	T-複合タンパク質1サブユニットシータの アイソフォーム3 OS=ホモサピエンス GN=CCT8
VR[Dea]LLADPTGAFGK (SEQ ID NO: 265)	sp P30044- 4 PRDX5_HU MAN	ペルオキシレドキシニン-5のアイソフォーム4 OS=ホモサピエンス GN=PRDX5
R[Dea]GFGFVTDDHDPVDK (SEQ ID NO: 526)	sp P22626- 2 ROA2_HU MAN	不均一核リボ核タンパク質A2/B1の アイソフォームA2 OS=ホモサピエンス GN=HNRNPA2B1
IATPR[Dea]GAASPAQK (SEQ ID NO: 527)	sp P10636- 7 TAU_HUM AN	微細管関連タンパク質タウの アイソフォームタウ-E OS=ホモサピエンス GN=MAPT
RVVAEPVELAQEFR[Dea]K (SEQ ID NO: 528)	sp O75489 ND US3_HUMA N	NADH脱水素酵素 [ユビキノ] 鉄- 硫黄タンパク質3 OS=ホモサピエンス GN=NDUFS3 PE=1 SV=1
GADEAALAR[Dea]AELEK (SEQ ID NO: 529)	sp P07196 NF L_HUMAN	神経フィラメント軽ポリペプチド OS= ホモサピエンス GN=NEFL PE=1 SV=3
QIVWNGPVGVEWEAFAR[Dea]G TK (SEQ ID NO: 530)	sp P00558 PG K1_HUMAN	ホスホグリセレートキナーゼ1 OS= ホモサピエンス GN=PGK1 PE=1 SV=3
PMQFLGDEETVR[Dea]K (SEQ ID NO: 531)	sp P18669 PG AM1_HUMA N	ホスホグリセレートムターゼ1 OS=ホモサピエンス GN=PGAM1 PE=1 SV=2
R[Dea]GFGFVYFQSHDAADK (SEQ ID NO: 532)	sp Q4VXU2 P APIL_HUMA N	ポリアデニレート結合タンパク質1様 OS= ホモサピエンス GN=PABPC1L PE=2 SV=1
VPDFSDYR[Dea]RAEVLSTK (SEQ ID NO: 533)	sp P0C7P4 UC RIL_HUMAN	推定のシトクロムb-c1複合体サブユニット リスキ様タンパク質1 OS=ホモサピエンス GN=UQCRCF1P1 PE=5 SV=1
R[Dea]DVAGDASESALLK (SEQ ID NO: 534)	sp P13637 AT 1A3_HUMA N	ナトリウム/カリウム輸送ATPアーゼサブユニット アルファ-3 OS=ホモサピエンス GN=ATP1A3 PE=1 SV=3
DLTSMVR[Dea]LLSK (SEQ ID NO: 535)	sp Q01082 SP TB2_HUMA N	スペクトリンベータ鎖、非赤血球1 OS=ホモサピエンス GN=SPTBN1 PE=1 SV=2
FMELLEPLSER[Dea]K (SEQ ID NO: 536)	sp Q01082 SP TB2_HUMA N	スペクトリンベータ鎖、非赤血球1 OS=ホモサピエンス GN=SPTBN1 PE=1 SV=2
ER[Dea]VEAVNMAEGIIHDTETK (SEQ ID NO: 537)	sp P38646 GR P75_HUMAN	ストレス-70タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=HSPA9 PE=1 SV=2
HVLSGTLGIPEHTYR[Dea]SR[Dea] VTLSNQPYIK (SEQ ID NO: 538)	sp P04216 TH Y1_HUMAN	Thy-1膜糖タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=THY1 PE=1 SV=2
MIYR[Dea]DLISHDELFSDIYK (SEQ ID NO: 539)	sp P13693 TC TP_HUMAN	翻訳制御腫瘍タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=TPT1 PE=1 SV=1
TGGAVDR[Dea]LTDTSK (SEQ ID NO: 540)	sp Q9BW30 T PPP3_HUMA N	チューブリン重合促進タンパク質 ファミリーメンバー3 OS=ホモサピエンス GN=TPPP3 PE=1 SV=1
SSEEAVR[Dea]EVHR[Dea]LIEGRA PVISGVTK (SEQ ID NO: 541)	sp O94811 TP PP_HUMAN	チューブリン重合促進タンパク質 OS=ホモサピエンス GN=TPPP PE=1 SV=1
LLIIGTTSR[Dea]K (SEQ ID NO: 542)	sp P46459 NS F_HUMAN	小胞融合ATPアーゼ OS=ホモサピエンス GN=NSF PE=1 SV=3
WGDPVTR[Dea]VLDDGELLVQQT K (SEQ ID NO: 543)	sp P46459 NS F_HUMAN	小胞融合ATPアーゼ OS=ホモサピエンス GN=NSF PE=1 SV=3

10

20

30

40

ペプチド	UniProtKB 登録	タンパク質名
ITR[Dea]VEMLEIIEAIYK (SEQ ID NO: 544)	sp P62760 VISL1_HUMAN	ビシニン様タンパク質1 OS=ホモサピエンス GN=VSNL1 PE=1 SV=2
FPR[deca]YAEIVHLTLPDGTK (SEQ ID NO: 545)	sp P21281 VATB2_HUMAN	V型プロトンATPアーゼサブユニットB、脳アイソフォーム OS=ホモサピエンス GN=ATP6V1B2 PE=1 SV=3

【 0 1 5 2 】

(表 6 B) ヒトの脳の後天的脳損傷で検出されるシトルリン化ペプチド。これらのシトルリン化ペプチドは脳に特有のものではない。

ペプチド	UniProtKB 登録	名称
GDARPAEIDSLWEISK (SEQ ID NO: 546)	sp P49821 NDUV1_HUMAN	NADH脱水素酵素 [ユビキノン] フラビンタンパクタンパク質1、OS=ホモサピエンス GN=NDUFV1 PE=1 SV=4
SVVLMShLGRPDGVPMPDK (SEQ ID NO: 547)	sp P00558-2 PGK1_HUMAN	ホスホグリセレートキナーゼ1のアイソフォーム2 OS=ホモサピエンス GN=PGK1

10

【 0 1 5 3 】

(表 7) 慢性脳損傷の分泌シトルリン化ヒトタンパク質

UniProtKB 登録	タンパク質名
P61764	シンタキシン結合タンパク質1
P62805	ヒストンH4
Q14204	細胞質ダイニン1重鎖1
Q05193	ダイナミン-1
P09104	ガンマーエノラーゼ
P14625	エンドプラスミン前駆体
O43301	熱ショック70kDaタンパク質12A
P62136	セリン/スレオニン-タンパク質ホスファターゼPP1-アルファ触媒サブユニット
P27797	カルレティキュリン前駆体
P31146	コロニン-1A
P38117	電子伝達フラビンタンパクタンパク質サブユニットベータ
P68871	ヘモグロビンサブユニットベータ
P28482	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1
P27361	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ3
O00232	26Sプロテアソーム非ATPアーゼ制御サブユニット12
P36578	60Sリボソームタンパク質L4
P05387	60S酸性リボソームタンパク質P2
Q16181	セプチン-7
P49588	アラニン-tRNAリガーゼ、細胞質

20

30

【 0 1 5 4 】

(表 8) 慢性脳損傷の非分泌シトルリン化ヒトタンパク質

UniProtKB 登録	タンパク質名
P17600	シナプシン-1
Q99798	アコニテート水添加酵素
O14810	コンプレキシン-1
Q6PUV4	コンプレキシン-2
Q9Y2J2	バンド4. 1様タンパク質3
Q92777	シナプシン-2
Q2M2I8	AP2関連タンパク質キナーゼ1
P35611	アルファ-アデュシン
P63010	AP-2複合体サブユニットベータ
O15075	セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼDCLK1
O94925	グルタミナーゼ腎臓アイソフォーム
P50213	イソクエン酸脱水素酵素 [NAD] サブユニットアルファ
Q08209	セリン/スレオニン-タンパク質ホスファターゼ2B触媒サブユニットアルファアイソフォーム

10

【 0 1 5 5 】

(表 9) 急性脳損傷の分泌シトルリン化ヒトタンパク質

UniProtKB 登録	タンパク質名
Q86VP6	カリン会合NEDD8-解離タンパク質1
P30044	ペルオキシレドキシン-5

【 0 1 5 6 】

(表 10) 急性脳損傷の非分泌シトルリン化ヒトタンパク質

UniProtKB 登録	タンパク質名
P63215	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 G (I) / G (S) / G (O) サブユニットガンマー3前駆体

20

【 0 1 5 7 】

実施例 4 の参考文献

- Ren J, Jiang C, Gao X, Liu Z, Yuan Z, Jin C, et al. PhosSNP for systematic analysis of genetic polymorphisms that influence protein phosphorylation. Mol Cell Proteomics 2010, 9:623-634.
- Ryu GM, Song P, Kim KW, Oh KS, Park KJ, Kim JH. Genome-wide analysis to predict protein sequence variations that change phosphorylation sites or their corresponding kinases. Nucleic Acids Res 2009, 37:1297-1307.
- Baka Z, Gyorgy B, Geher P, Buzas EI, Falus A, Nagy G. Citrullination under physiological and pathological conditions. Joint Bone Spine 2012, 79:431-436.
- Demoruelle MK, Deane K. Antibodies to citrullinated protein antigens (ACPAs): clinical and pathophysiologic significance. Curr Rheumatol Rep 2011, 13:421-430.
- Uysal H, Nandakumar KS, Kessel C, Haag S, Carlsen S, Burkhardt H, et al. Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity. Immunol Rev 2010, 233:9-33.

30

40

6. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014, 506:376-381.
7. De Ceuleneer M, Van Steendam K, Dhaenens M, Deforce D. In vivo relevance of citrullinated proteins and the challenges in their detection. *Proteomics* 2012, 12:752-760.
8. Raijmakers R, van Beers JJ, El-Azzouny M, Visser NF, Bozic B, Pruijn GJ, et al. Elevated levels of fibrinogen-derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2012, 14:R114. 10
9. Stahl DC, Swiderek KM, Davis MT, Lee TD. Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. *J Am Soc Mass Spectrom* 1996, 7:532-540.
10. Yates JR, 3rd, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* 1995, 67:1426-1436.
11. Gillet LC1 NP TS, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012. 20
12. Liu Y, Huttenhain R, Collins B, Aebersold R. Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research. *Expert Rev Mol Diagn* 2013, 13:811-825.
13. Escher C, Reiter L, MacLean B, Ossola R, Herzog F, Chilton J, et al. Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides. *Proteomics* 2012, 12:1111-1121. 30
14. Crowgey EL, Stabley DL, Chen C, Huang H, Robbins KM, Polson SW, et al. An integrated approach for analyzing clinical genomic variant data from next-generation sequencing. *J Biomol Tech* 2015, 26:19-28.
15. Hensen SM, Boelens WC, Bongers KM, van Cruchten RT, van Delft FL, Pruijn GJ. Phenylglyoxal-based visualization of citrullinated proteins on Western blots. *Molecules* 2015, 20:6592-6600.
16. Hensen SM, Pruijn GJ. Methods for the detection of peptidylarginine deiminase (PAD) activity and protein citrullination. *Mol Cell Proteomics* 2014, 13:388-396. 40
17. Stensland M, Holm A, Kiehne A, Fleckenstein B. Targeted analysis of protein citrullination using chemical modification and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009, 23:2754-2762.

【 0 1 5 8 】

上述した様々な方法及び技術は、本出願を実行する多数の方法を提供する。もちろん、必ずしも説明した全ての目的もしくは利点が、本明細書に記載の特定のいずれかの実施形態に従って達成できるわけではないことを理解すべきである。従って、例えば当業者は、この方法が、本明細書で教示される１つの利点もしくは一群の利点を、本明細書で教示も

しくは示唆される他の目的もしくは利点を必ずしも達成することなく達成あるいは最適化する手法で実施できることを認めるであろう。本明細書では多様な選択肢を述べる。好ましい実施形態に特異的に1つの、またはもう1つの、もしくはいくつかの特徴を包含するものがある一方で、他の実施形態に特異的に1つの、またはもう1つの、もしくはいくつかの特徴を排除するものがあり、また一方でさらに他の実施形態に1つの、またはもう1つの、もしくはいくつかの長所を包含することによって特定の特徴を軽減するものがあるということを理解すべきである。

【0159】

さらに、熟練した技術者は、様々な実施形態から種々の特徴の適用性を認めるであろう。同様に、上述した様々な要素、特徴及びステップに加え、前記の要素、特徴またはステップのそれぞれに対する他の既知の同等物は、当分野の通常の熟練者によって様々な組み合わせで使用して、本明細書に記載の原則に従って方法を実行できる。多様な実施形態において、様々な要素、特徴、及びステップの中で、特異的に包含されるものもあれば、特異的に除外されるものもある。

【0160】

本出願を特定の実施形態及び実施例との関係において開示してきたが、本出願の実施形態は具体的に開示される実施形態を越え、当業者は、他の代わりになり得る実施形態及び/または利用及び修正ならびにそれらの同等物まで広がることを理解するであろう。

【0161】

本明細書では、発明者らにとって既知の本出願を実施するための最良の方法を含め、本出願のより好ましい実施形態を説明する。これらのより好ましい実施形態の変形は、前述の説明を読めば当分野の通常の熟練者には明白になるであろう。熟練者は前述の変形を適宜使用でき、本出願は本明細書で具体的に述べられた方法とは異なる方法で実施することができるものとする。従って、本出願の多くの実施形態は、適用法によって許可される、本明細書に添付の請求項に列挙される対象物の全ての修正物及び同等物を含む。さらに、本明細書において特に断りがない限り、もしくは文脈上明らかに矛盾していない限り、それらの全ての変形における上記の要素のいかなる組み合わせも本出願に包含される。

【0162】

本明細書で参照される全ての特許、特許出願、公開特許公報、及び、論文、書籍、仕様書、出版物、文書、物体及び/またはその類似物などの他の資料は、全ての目的のためそれらの全体がこの参照により組み込まれるが、本明細書と矛盾するもしくは対立する同一物、同一物のいずれか、または現在以降本明細書に関連する請求項の最も広い範囲に関して制限する影響を及ぼす可能性がある同一物のいずれかに関連するあらゆる出願経過を除く。例として、組み込まれた資料のいずれかと関連する説明、定義、及び/または用語の使用と本文書と関連するそれらとの間に不一致や対立がある場合は、本明細書における説明、定義及び/または用語の使用が優先されなければならない。

【0163】

本明細書で開示される出願の実施形態は、本出願の実施形態の原理の実例であることを理解すべきである。使用できる他の修正物が本出願の範囲内であることがあり得る。従って、例として、これに限定されないが、本出願の実施形態の代わりとなる構成を本明細書の教示に従って使用することができる。従って、本出願の実施形態は、正確に示され説明される実施形態に限定されない。

【0164】

本発明の様々な実施形態は先に「発明の詳細な説明」で説明されている。これらの説明では上述の実施形態が直接的に述べられているが、当業者は本明細書において示され説明される具体的な実施形態に対する修正及び/または変形を思いつく可能性があることを理解すべきである。この説明の範囲内にあるような修正もしくは変形は、いかなるものも同様にその中に含まれるものとする。特に述べていない場合、本明細書及び請求項の単語及び語句は、適用される分野（複数可）の通常の熟練者にとって普通かつ熟知した意味であるということが発明者の意図である。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 5 】

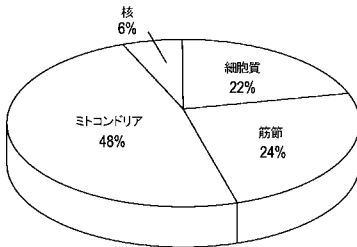
出願時に出願人にとって既知の前述の本発明の様々な実施形態に関する記述は、例示及び説明の目的で提示され意図されたものである。本説明は包括的でも本発明を開示される正確な形態に限定するものでもなく、上述の教示の下で多くの修正及び変形が可能である。説明される実施形態は、本発明の原理及び実用的応用を説明し、他の当業者が様々な実施形態において、予期される特定の用途に適するように様々に修正して本発明を利用できるようにすることに役立つ。従って、本発明は発明を実施するため開示された特定の実施形態に限定されないものとする。

【 0 1 6 6 】

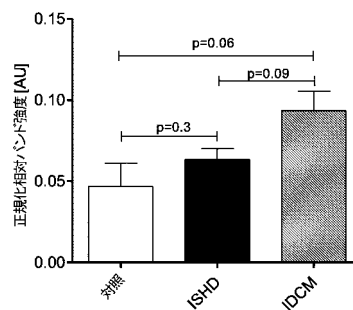
本発明の特定の実施形態を示し説明してきたが、ここで教示されることに基づいて本発明やそのさらに広い態様から逸脱することなく変更や修正を行うことができ、そのため添付される請求項がその範囲内に全ての変更や修正を本発明の真の精神と範囲内にあるものとして包含することができるということは、当業者にとって明らかであろう。

10

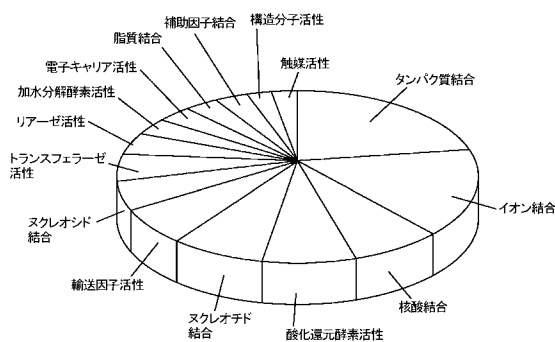
【 図 1 A 】



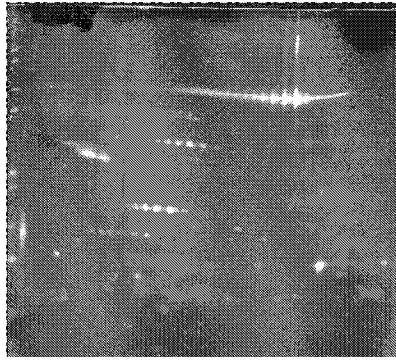
【 図 1 C 】



【 図 1 B 】



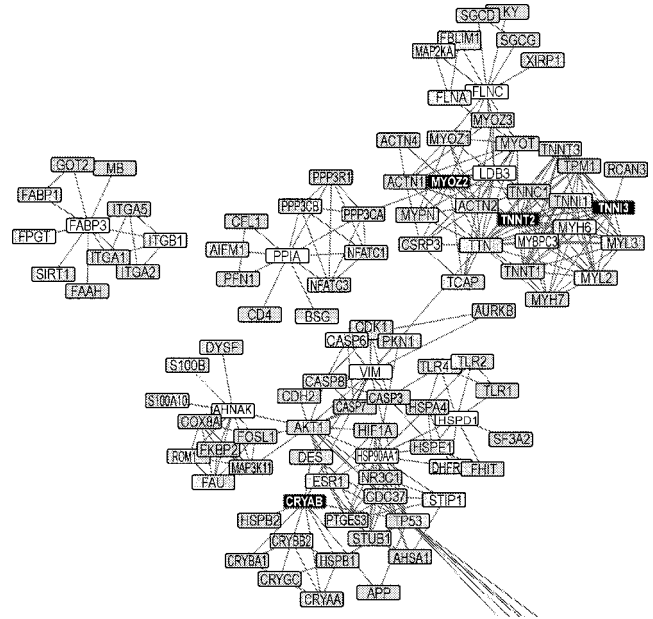
【図 2 A】



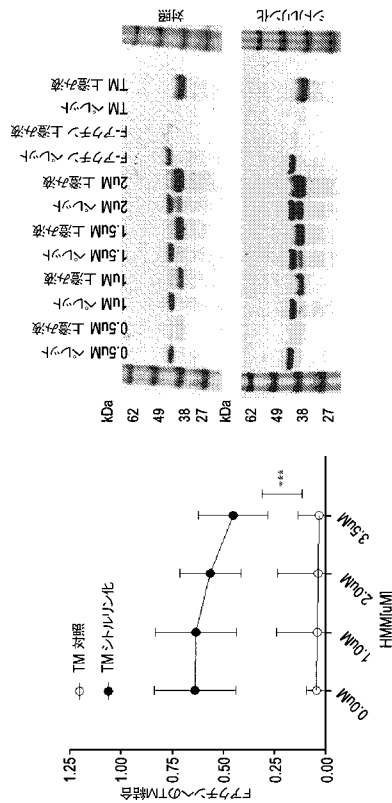
ゲルの写真	MS/MS ID*	登録番号	被覆率 %	実験値 pI/MW	理論値 pI/MW	P<0.05
1	脂肪酸結合タンパク質 心臓	P05413	63.2	6.0/ 14.500	6.29/ 14.858	0.20*
2	レーフラクターゼ 脱水素酵素阻鎖	P07195	35.9	5.8/ 36.00	5.71/ 36.638	0.13*
3	ピンキュリン	P18206	4.5	6.2/ 170.00	5.83/ 123.799	0.19*
4	アクチン アルファ型 心臓	P62736	30.1	5.5/ 44.00	5.24/ 42.009	0.020
5	トロポミオシン	P09493	6.2	4.6/ 38.000	4.69/ 32.709	0.0020
6	ミオシン軽鎖	P08590	32	5.0/ 24.000	5.03/ 21.932	0.021
7	ミオシン調節軽鎖2	P10916	39.8	4.9/ 18.000	4.92/ 18.789	0.0018

*統計的に有意ではない

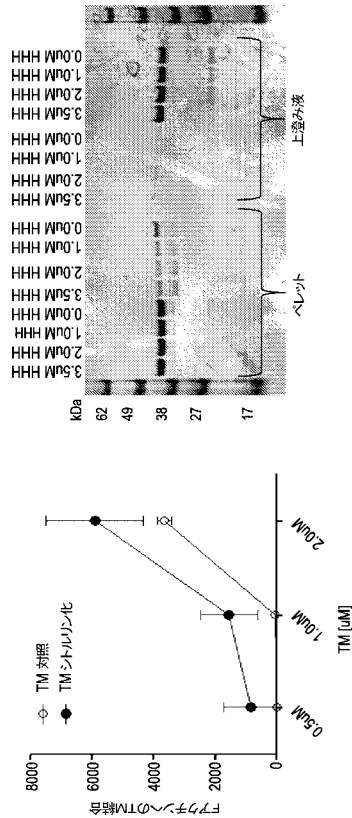
【図 2 B】



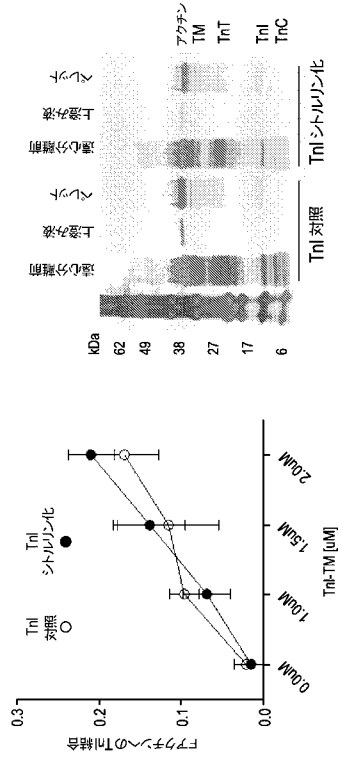
【図 3 A】



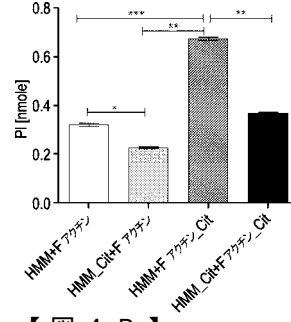
【図 3 B】



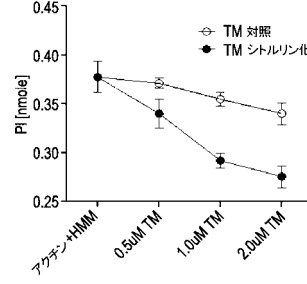
【図 3 C】



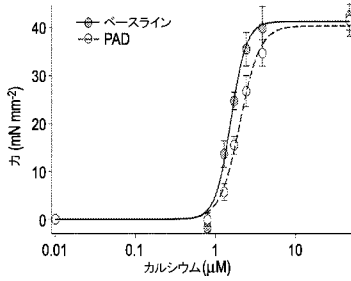
【図 4 A】



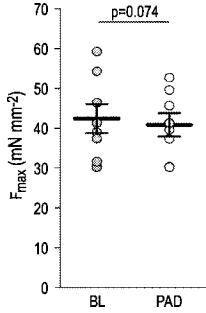
【図 4 B】



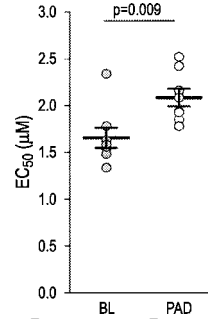
【図 4 C】



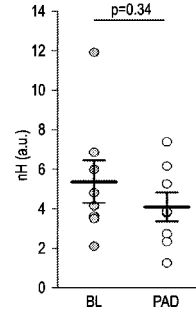
【図 4 D】



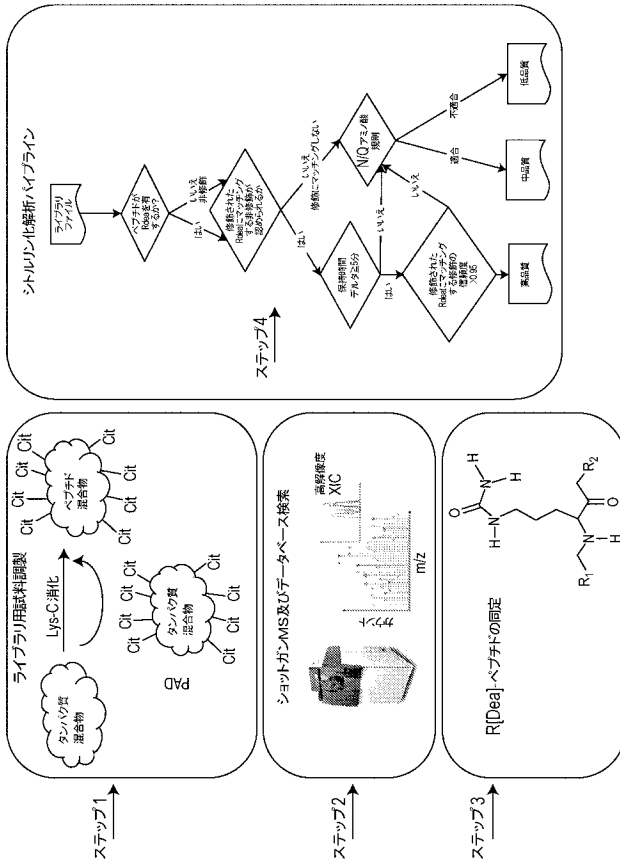
【図 4 E】



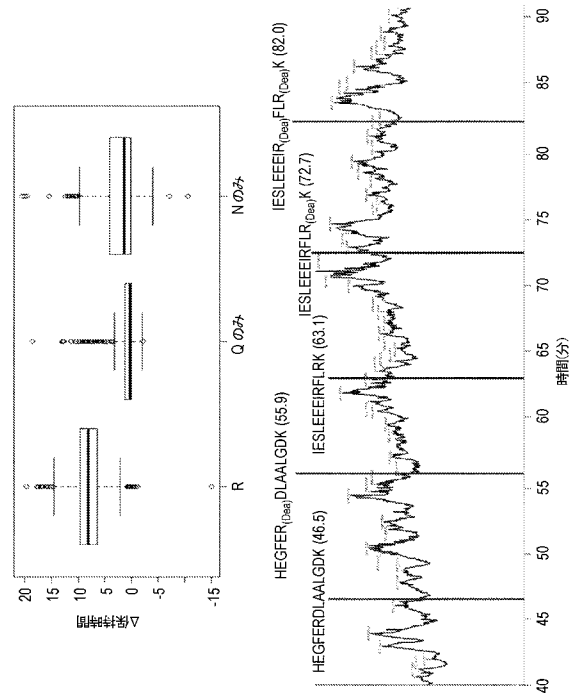
【図 4 F】



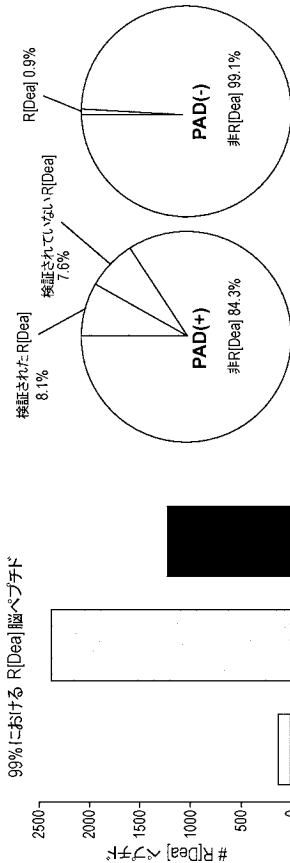
【図 8 B】



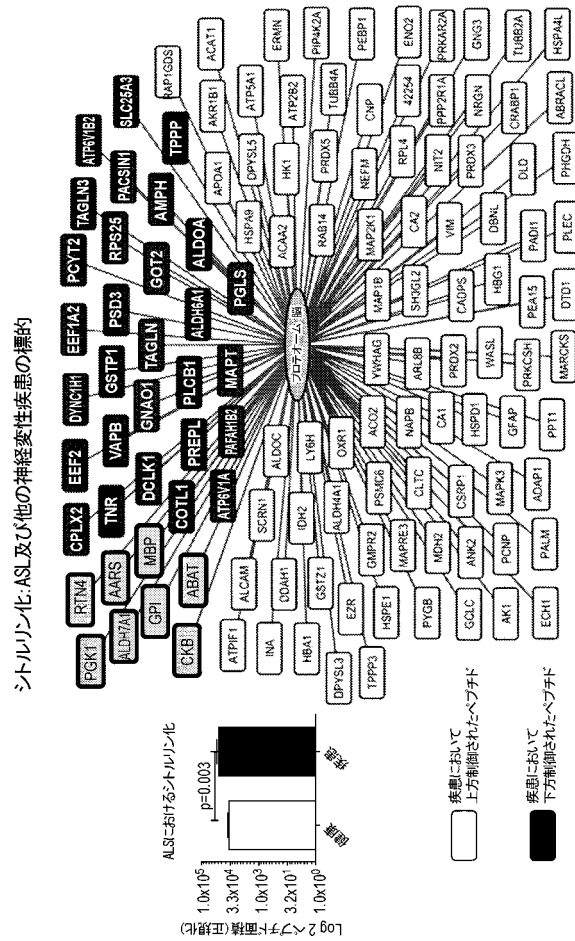
【図 8 C】



【図 8 D】

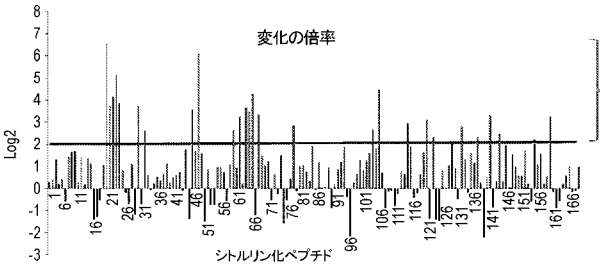


【図 8 E】

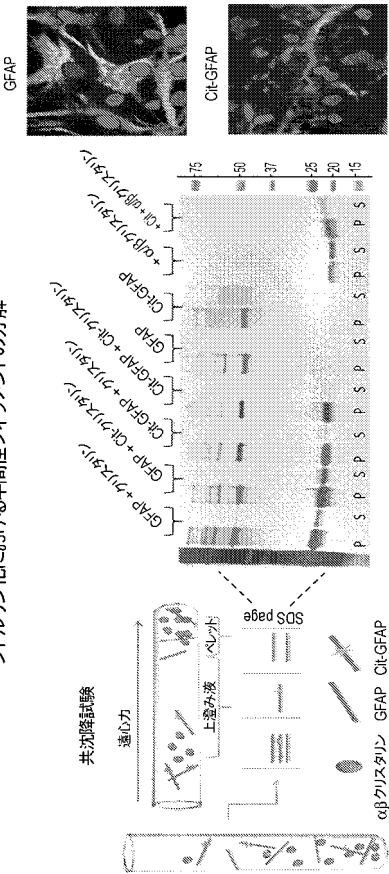


【 図 8 F 】

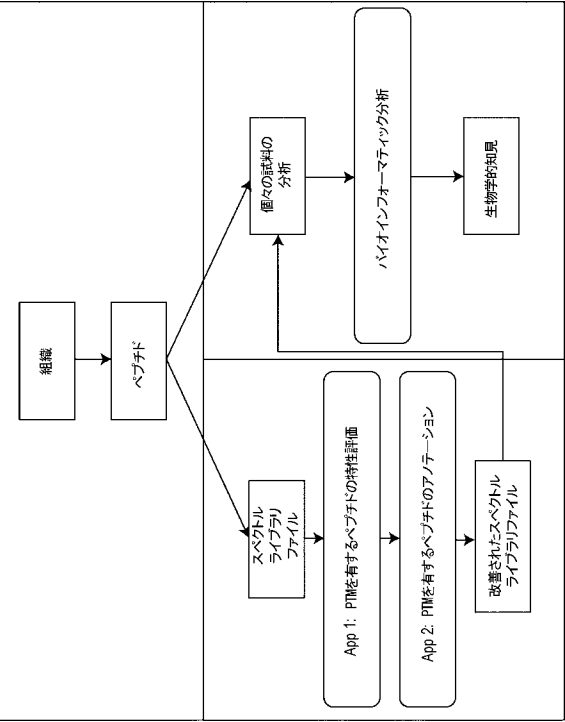
対象のタンパク質	
タンパク質名	タンパク質の機能
グリア線維酸性タンパク質	クラスIII中間径フィラメント、中枢神経系の発達中に星状膠細胞を他のグリア細胞と区別する細胞特異的マーカー。
グルコース-6-ホスフェート異性化酵素	GPIIは、脊髄ニューロン及び感覚ニューロンに対する神経栄養因子（ニューロイキン）である。
ビメンチン	ビメンチンは、核、小胞体、及びミトコンドリアに、側面もしくは末端のいずれかで結合する。
エンドフィリン-A1	シナプス小胞エンドサイトーシスに関与する。他のタンパク質を曲率の高い膜に集める可能性がある。
ミエリン塩基性タンパク質	CNSにおいてミエリン膜の形成と安定化の役割。
デルターピロリン-5-カルボン酸脱水酵素、ミトコンドリア	フロリンもしくはオルニチンのいずれから誘導されるデルターピロリン-5-カルボキシレート(P5C)の不可逆的変換。これは、尿素とトリカルボン酸サイクルを相互に連結する経路に必要なステップである。
ペルオキシドキシニン-6、ミトコンドリア	過酸化水素及びアルキルヒドロペルオキシドを、チオレドキシン系を通して供給される還元性の同等物で還元する。細胞内酸化還元信号発生に関与する。
ニューログラニン	シナプスの発達及び再構築時のタンパク質キナーゼC介在性分子カスケードの「第3のメッセンジャー」の基質として作用する。カルシウムの不存在下でカルモジュリンに結合する。
二重特異性マイトゲン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ1	MAPキナーゼシグナル伝達経路の不可欠の成分として作用する二重特異性タンパク質キナーゼ。
チュープリン重合促進タンパク質ファミリーメンバー3	チュープリンと結合し微小管を束ねる活性を有する。細胞の増殖と有糸分裂において役割を果たす可能性がある。
デルタ(3,5)-デルタ(2,4)-エノイル-CoA異性化酵素、ミトコンドリア	このタンパク質は、脂質の代謝の一部である脂肪酸ベータ参加の経路に関与する。
システイン及びグリシンリッチタンパク質1	神経細胞の発達において役割を果たすことがあり得る。
細胞内レチノイン酸結合タンパク質1	細胞質基質(CRABP)は、レチノイン酸の核レチノイン酸受容体への接近を制御する可能性がある。
GMP還元酵素2	GMPのIMPへの不可逆NAD(P)H依存性脱アミノ化に触媒作用を及ぼす。
タンパク質G(i1)/G(s)/G(o)サブユニットガンマ-3	グアニヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)は、様々な膜貫通シグナル伝達系におけるモジュレーターまたはトランスデューサーとして関与する。



【 図 8 G 】



【 図 9 】



【配列表】

2018524575000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2016/038439 08.12.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/38439

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~. 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~. 1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~. 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PCT/US2016/038439 08.12.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/38439

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. --continued on first extra sheet attached hereto-- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 5, 7-8, 10, and 13-17 limited to chronic neurodegenerative disease and SEQ ID: 306 Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

PCT/US2016/038439 08.12.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/38439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/68 (2016.01) CPC - C12Q 1/34, G01N 33/564 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01N 33/68 (2016.01) CPC - C12Q 1/34, G01N 33/564 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.1; 436/501 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) pubWEST; PatBase; Google Scholar search terms - Citrullinated, diagnos\$, protein, polypeptide, peptide, troponin, cTnI, cTn, TnI, citrui\$, cardio\$, heart, stroke, infarct\$, NIDALSGMEGRK		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2014/0308676 A1 (FERT-BOBER et al.) 16 October 2014 (16.10.2014) claims 1, 2; para [0015]-[0021]; [0025]; [0053]; Tables 1A, 1B.	1, 2, 7, 8, 13, 14, 17 ----- 3, 5, 10, 15, 16
Y	ALMER et al. "Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Journal of neurochemistry 72.6 (1999): 2415-2425. entire document, especially abstract and Fig. 3B.	3, 5, 10, 15, 16
Y	US 2004/0265849 A1 (CARGILL et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) claims 26, 30, 31; para [0034]-[0035], Table 1, SEQ ID NO 740	10
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 November 2016		Date of mailing of the international search report 08 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2016/038439 08.12.2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/38439

--continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking--

Group I+: Claims 1-17, directed to a method for diagnosing a disease-state in a subject in need thereof comprising detecting the amount of a citrullinated protein or a citrullinated peptide in the biological sample. The method will be searched to the extent that the disease-state encompasses the first named disease state, chronic neurodegenerative disease (claim 3) and the first named citrullinated peptide of chronic neurodegenerative disease, SEQ ID NO: 306 (claim 10). It is believed that claims 1-3, 5, 7-8, 10, and 13-17 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass chronic neurodegenerative disease and peptide sequence SEQ ID NO: 306. Additional disease states and citrullinated peptide sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected disease states and citrullinated peptide sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be cardiovascular disease and peptide sequence SEQ ID NO: 20 (claims 1-4, 7-9 and 13-17).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique disease-state and related citrullinated peptide sequence. Each disease state-associated citrullinated peptide sequence is considered a distinct technical feature.

Common technical features

The inventions of Group I+ share the common technical feature of a method for diagnosing a disease-state in a subject in need thereof, comprising: obtaining a biological sample from the subject and detecting the amount of a citrullinated protein or a citrullinated peptide in the biological sample obtained from said subject; wherein a change in the level of the citrullinated protein or the citrullinated peptide relative to a reference value is indicative of increased risk of the disease-state in the subject.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are anticipated by reference US 2014/0308676 A1 to Fert-Bober et al., (hereinafter Fert).

Fert teaches a method for diagnosing a cardiovascular disease-state in a subject in need thereof (abstract), comprising: obtaining a biological sample from the subject; and detecting the amount of a citrullinated protein or a citrullinated peptide in the biological sample obtained from said subject; wherein a change in the level of the citrullinated protein or the citrullinated peptide relative to a reference value is indicative of increased risk of the disease-state in the subject (claims 1 and 2 'method of diagnosing cardiovascular disease in a subject, comprising (a) obtaining a biological sample from said subject, and (b) detecting the presence of a citrullinated protein in the biological sample obtained from said subject, wherein the level of citrullinated protein is indicative of cardiovascular disease...wherein the citrullinated protein is elevated compared to the control amount of the citrullinated protein').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Note, claim 12 depends from claim 5, as drafted, is objected to, because claim 5 does not have the antecedent "acquired brain injury" disclosed in claim 12. Thus, claim 12 is interpreted to depend from claim 6.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヴァン アイク ジェニファー
アメリカ合衆国 9 0 0 3 5 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウスオーランド アベニュー
1 0 3 3

(72)発明者 フェルト - ボベル ジャスティナ
アメリカ合衆国 9 1 4 2 3 カリフォルニア州 シャーマン オークス マグノリア ブールバ
ード 1 4 1 5 5 アpartment 2 1 6

(72)発明者 クロウギー エリン
アメリカ合衆国 1 9 7 0 2 デラウェア州 ニューアーク ウェスト カイラ マリー ドライ
ブ 3 9

(72)発明者 ホールウィンスキ ロナルド
アメリカ合衆国 9 1 4 2 3 カリフォルニア州 シャーマン オークス マグノリア ブールバ
ード 1 4 1 5 5 アpartment 1 2 1

(72)発明者 バーマン ベンジャミン フィリップ
アメリカ合衆国 9 0 2 3 0 カリフォルニア州 カルバー シティ フランクリン アベニュー
1 0 8 0 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 FB03 FB06 JA06
4H045 AA50 BA10 BA15 BA16 BA17 CA40 EA50

专利名称(译)	瓜氨酸化在疾病诊断中的作用		
公开(公告)号	JP2018524575A	公开(公告)日	2018-08-30
申请号	JP2017565057	申请日	2016-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	雪松-西奈医学中心		
申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心		
[标]发明人	ヴァンアイクジェニファー フェルトボベルジャステイナ クロウギーエリン ホールウィンスキロナルド バーマンベンジャミンフィリップ		
发明人	ヴァン アイク ジェニファー フェルト-ボベル ジャステイナ クロウギー エリン ホールウィンスキ ロナルド バーマン ベンジャミン フィリップ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2440/18 G01N2800/28 G01N2800/2814 G01N2800/2835 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D C07K7/06 C07K7/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/JA06 4H045/AA50 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/181665 2015-06-18 US 62/233231 2015-09-25 US 62/387149 2015-12-23 US		
其他公开文献	JP2018524575A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了用于诊断受试者的心血管和/或神经变性疾病的方法和标志物。该方法包括从需要诊断的受试者中取出生物样品，并检测取自该受试者的生物样品中的瓜氨酸化蛋白质或瓜氨酸化肽的量。[选图]图6

FIG. 6

Protein ID	Peptide	Protein ID	Peptide
UIM domain-binding protein 3	TSPEQAR(D)QILQPK	Filamin C	SSSSRR(D)SSSVSSPK
Adenylyl kinase 4	LRQ(D)AVILGPPQSGK	Collagen alpha-2(V) chain	DVHFLDQSEGVSR(D)GAPALIK
Cytochrome c	EEQ(D)GKILAIYIK	Phospholipase protein	VYTR(D)GLPRPPPELMPESLK
Calcium-ATPase 3	QNR(D)GKPSIDPNSVSYDGS	ATP synthase subunit alpha	AIEEQHAYVAGNRP(D)EYLDK
Neuroblast differentiation-associated protein 1	SNK	Nyx2	RQ(D)VAIPFDQPK
Protein-tyrosine phosphatase	FQVSTQ(D)KQITPK		
Isomerase A	TADNFR(D)ALSTGEK		
Succinyl-CoA ligase (ADP/CoA-forming)	TR(D)GLGPNPQGVNPPGEK		
Tropomyosin, cardiac muscle	ESLQ(D)GKILAIYIK		
Myosin-2	AEIPQ(D)GKPSIR(D)VAITPPQGEK		

